膜の一部を溶して更に研究中である。以上の事を総合すると、カビの菌糸のトルオールに依る自己消化の初期の段階は第 6 図の様に推測出来る。

トルオールに依って自己消化を起させても細胞膜が消滅する事がない。これは黴の体中に細胞膜を溶かす酵素が無いのか、又は弱い為であろう。この事についても現在研究中である。

要 約

Aspergillus oryzae の自己消化を促進させる物質について研究をし、トルオールの如き溶媒が良い事を見出した。これに依る自己消化をアミノ酸、糖の両面から考察し、free のそれ等が体外に溶出して来る過程を、酵素的にそれ等の polymer が分解されて、放出される過程との二つに分離した。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導を賜りました坂口謹一郎教授に感謝申し上げますと共に、種々御助言を戴きました有馬助教授、科研の飯田茂次先生及び東大の天羽幹氏、野村真康氏、安井恒男氏に御礼申し上げます。

(1) G. Beher : <i>Arch. für. Mikrobiol.</i> , 1, 411 (1930).	(5) S. Moor, W. Stein : <i>J. B. C.</i> , 211, 909 (1954).
(2) D. W. Wooly, W. H. Peterson : <i>Arch. Biochem.</i> , 1, 319 (1942).	(6) C. W. Chung, W. J. Nickerson : <i>J. B. C.</i> , 208, 395 (1954).
(3) D. C. Vosti, N. A. Joslyn : <i>Appli. Microbiol.</i> , 2, 70 (1954).	(7) 松島欽一 : 本誌, 29, 781 (1955).
(4) N. Bohones et al. : <i>J. B. C.</i> , 149, 295 (1943).	(8) T. Amano et al. : <i>Med. J. Osaka Univ.</i> , 4, 291 (1953).

麹菌液内培養によるプロテアーゼ生産について (第 2 報)*

中性乃至アルカリ性で作用するプロテアーゼの 生産用培地組成の検討 (その 2)

元 永 和 生, 三 浦 勇 吉 (三共株式会社高峰研究所)

昭和 32 年 12 月 10 日 受理

前報⁽¹⁾においてプロテアーゼ生産用菌株として 433 号菌を選び、之を用いグルコース 1%, ペプトン 0.42%, 第 1 磷酸カリ 3%, 硫酸マグネシウム 0.01%, 始発 pH 7.5 なる培地を決定した。その組成の通常の培地と異なる点は、1) 3% に及ぶ大量の磷酸カリの使用、2) 培養 pH が始から 7.5 と言うアルカリ性にあり培養中は中性ないしアルカリ性に保たれている、の二点が考えられた。

一方蛋白質の生体内合成には磷酸の代謝が重要な関係をもっていると言うことを既に種々述べられている。微生物によるアミラーゼ、プロテアーゼの生産については福本、山本⁽²⁾、福本、根来⁽³⁾は細菌の洗滌菌体を用いアミラーゼ生成には充分なる磷酸塩の必要なることを述べ、プロテアーゼ生産については更に磷酸塩の存在は窒素代謝と深い関連にあると報じている。又外村、田辺⁽⁴⁾も麹菌洗滌菌体のアミラーゼ生成について磷酸塩代謝の必要性について述べている。本報においては前報の磷酸カリについて二、三検討した点について報告する。

実 験 方 法

プロテアーゼ力価の測定および培養方法はこれも第 1 報の方法を用いた。使用菌株は 433 号。培養時間は特記しない限り 72 時間とした。滲透圧の測定は氷点降下法による。

実 験 お よ び 考 察

実験 1 磷酸カリの他塩類による代替について

(1) 3% という多量の磷酸カリの意味について：多量の磷酸塩の持つ特有の性質によるのか、硫酸ソーダ、食塩のような塩類で代替出来るのかと考え、次の実験を行った。基本培地としてグルコース 1%, ペプトン 0.42%, 硫酸マグネシウム 0.01%, 磷酸第 1 カリ 0.3% を加用し、苛性ソーダで pH を 7.5 とした。これに培地全

* *Protease Production by the Submerged Culture of Aspergillus oryzae. Part II. Selection of Suitable Media for the Production of Protease active in Neutral and Alkaline Reaction.*
By Kazuo MOTONAGA and Yukichi MIURA (Takamine Laboratory, Snankyo Co., Ltd.)

第 1 図 磷酸カリの他塩類による代替について

第 2 図 硫酸ソーダの濃度について

A: 硫酸ソーダ使用 B: 磷酸カリ使用

体の浸透圧が上記培地の磷酸第 1 カリを 3% にしたものと同様の約 13 atm となる様に硫酸ソーダ, 食塩を加用した。即ち, 1) 基本培地に磷酸第 1 カリ 2.7% を加え苛性ソーダで pH を 7.5 としたもの, 2) 硫酸ソーダ 2.5% を加えたもの, 3) 食塩 1.1% を加えたもの, 4) 基本培地のみのもの, を置いた。これに接種培養した結果, 磷酸カリのプロテアーゼ生産におよぼす効果は或程度まで硫酸ソーダ, 食塩で代替出来, この場合培地の pH はあまり動いていない (第 1 図)。

すなわち全体の pH のあまり動かない培地では, 磷酸カリの効果はある程度まで硫酸ソーダ, 食塩で代替出来る。しかしその全効果を再現することは出来ない。

(2) 硫酸ソーダを用いて磷酸カリと同様なその最適濃度について: 先ず基本培地としてグルコース 1%, ペプトン 0.42%, 硫酸マグネシウム 0.01%, 第 1 磷酸カリ 0.5%, pH 7.5 を用い, これに硫酸ソーダ 2.3%, 4.2%, 8.8% を加用したもの (これらはそれぞれ第 1 磷酸カリ 2.5%, 4.5%, 9.5% を加用し苛性ソーダで pH 7.5 に調整したものと同様な浸透圧を示す) および第 1 磷酸カリ 2.5% を加用し pH を 7.5 としたものについて接種培養した結果, プロテアーゼ生産に関して磷酸カリのみの量について検討した場合⁽¹⁾と同様の型の曲線が得られ, その最高生産を示す値は第 1 磷酸カリ 3% を用いたのと同様な浸透圧約 13 atm を示す濃度のところであった。この場合そのプロテアーゼ生産量は磷酸カリを用いた場合より落ちている (第 2 図)。

すなわち以上 2 つの実験から, 磷酸カリの効果は或程度まで硫酸ソーダ, 食塩で代替出来るが完全には代替は出来ない。換言すれば pH の変化の少い培地において磷酸カリの効果は浸透圧が考えられるが, それ以外に何か他の塩類でおきかえることの出来ない効果があるのではないかと考えられる。この点については更に検討を要する。

実験 2 他のプロテアーゼ生産用培地に対する磷酸カリ添加の効果について

先に決定したプロテアーゼ生産用培地と他の従来の培地とを比較すると 433 号菌を用いたのでは他培地は著しくプロテアーゼ生

産性が少かった⁽¹⁾。この場合培地の pH は上昇している。今その中の Dworschack 等の培地⁽⁵⁾, 入江の培地⁽⁶⁾及び麩 5% の培地に第 1 磷酸カリ 3% を添加した後苛性ソーダで pH 6.0 に調整し接種培養してプロテアーゼ生産について検討した。結果は何れも著しい力価上昇を示し, 又 pH も抑えられた。

又次に之等の培地に第 1 磷酸カリ 3% と同様の浸透圧を示す硫酸ソーダ 2.7% を加用した。結果は力価僅かに上昇したが磷酸カリを用いたもの迄にはおよばなかった。この場合 pH はあまり抑えられていなかった (第 3 図)。

この二点だけから考えると pH の動きの大きい培地に対する磷酸カリの効果は, 塩類の濃度による浸透圧よりも pH 調整作用が重要な意味をもって来るのではないかと考えられる。

実験 3 イオン交換樹脂の使用による pH の調整について

実験 2 で第 1 磷酸カリの効果として pH の調整が意味がある様に思われたので, 種々問題はあるかと思うが簡単に浸透圧を上げずに pH を調整するものとしてイオン交換樹脂を使用しては如何と考え, 入江の培地に Amberlite IRC-50 を入れたものについて検討した。これはナトリウム型にしておき, 後 3% 第 1 磷酸カリ, 苛性ソーダ混液で pH を 7.5 とし, 後培地 100 cc に対し約 5 g の割で添加し pH を調整した。結果は pH も調整

第 3 図 他のプロテアーゼ生産用培地に対する磷酸カリ添加の効果について
A: 磷酸カリ添加, B: 硫酸ソーダ添加, C: 無添加

要 約

先に第 1 報に決定した培地の一つの特長は磷酸カリを 3% も含む点であった。この作用について若干検討を加えた結果その重要な作用としては、(1) 高濃度の磷酸塩の添加によるその pH 緩衝作用、(2) 適当な塩類濃度による滲透圧の調整、の二者があり、そのうち最も重要なものは pH 緩衝作用と考えられる。又この二者以外の効果も考えられるがこの点は更に検討を要する問題である。

終に御指導御助言を頂いた中村研究部次長、中西、岡崎の諸氏に感謝する。

本報告の要旨は昭和 31 年 4 月、日本農芸化学大会で発表した。

- (1) 元永和生、三浦勇吉：本誌, 32, 422 (1958).
- (2) 福本寿一郎、山本武彦：酵素化学シンポジウム, 7, 1 (1952).
- (3) 福本寿一郎、根来秀夫：酵素化学シンポジウム, 7, 9 (1952).

- (4) 外村健三、田辺 脩：本誌, 30, 511 (1956).
- (5) R. G. Dworschack, H. J. Koepsel, A. A. Lagoda: Arch. Biochem. Biophys., 41, 48 (1954).
- (6) 入江利夫：本誌, 28, 550 (1954).

第 4 図 イオン交換樹脂の使用による pH の調整について

出来力価も相当の上昇を見た (第 4 図)。別に第 1 報の培地に Amberlite IRC-50 を入れたものについて検討したが之は加用しても力価の上昇は見られなかった。

すなわち仮にイオン交換樹脂の作用を簡単に pH の調整だけとし他の影響を無視するとすれば、この結果は pH の調整がプロテアーゼ生産に重要な要素であることを示していると考えられる。