Aspergillus amstelodami に関する研究 (第 7 報)振とう培養による β -fructofuranosidase の生成条件について矢 吹 稔, 高野 一郎
(千葉大学園芸学部農芸化学科)

昭和 42 年 7 月 10 日 受 理

Studies on *Aspergillus amstelodami*
Part VII. On the Cultural Media for Extracellular₂ Formation
of β -Fructofuranosidase by Shaking Culture
of *Aspergillus amstelodami* IAM 2035By Minoru YABUKI and Ichiro TAKANO
Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Horticulture,
Chiba University, Matsudo, Chiba, Japan

The culture conditions for the extracellular formation of β -fructofuranosidase (invertase) by *Aspergillus amstelodami* IAM 2035 which was selected here as the highest former of this enzyme were examined. Among the nitrogen sources tested, sodium nitrate, sodium glutamate and sodium aspartate showed good results for enzyme formation, and sucrose was found to be the best carbon source.

By the addition of sugar ester (sucrose mono-palmitate, nonionic surface-active agent) to the medium, pellet formation of the mold was much inhibited, whereas invertase formation was promoted about six times. When sugar ester was used as sole carbon source, this organism formed a greater amount of invertase in the medium. Then it was considered that, the effect of sugar ester on the formation of invertase is due to its activities as surface-active agent and inducer for invertase formation.

Under the conditions used in this study, the following composition of the medium showed the best result; 0.5% of sucrose, 0.3% of sodium nitrate, 0.05% of sugar ester, 0.05% of monopotassium phosphate and magnesium sulfate, and 0.05% of yeast extract (Difco) per liter of deionized water, and pH was adjusted to 5.5.

By applying the culture medium obtained above it could be presented that some of the mutants obtained by UV-irradiation on ascospores showed two to three times in their invertase-forming ability than their parent strain *Asp. amstelodami* IAM 2035.

(Received July 10, 1967)

酵母の β -D-fructofuranoside fructohydrolase (EC. 3.2.1.26, 以下インペルターゼと称する) は, 古くから数多くの研究がおこなわれ, この酵素は糸状菌にも広く分布していることはよく知られている事実である⁽¹⁾.

糸状菌インペルターゼに関する最近の研究は *Myrothecium verrucaria*⁽²⁾, *Neurospora*^(3,4), *Fusarium*⁽⁵⁾ における細胞内所在, *Neurospora*^(6,7), *Fusarium*⁽⁸⁾ における isozyme の存在, *Neurospora*^(9,10) における分泌機構に関するもの, および *Penicillium*⁽¹¹⁾, *Neurospora*⁽¹²⁾

における培養中の酵素生成に関するものが見られる.

著者ら^(13,14) は, すでに *Aspergillus amstelodami* の ascospore のインペルターゼ (β -fructofuranosidase) 含有量と胞子熟度との関連およびその胞子内所在について報告してきたが, 菌糸のインペルターゼの細胞内所在と分泌機構を知るための基礎的知見を得るために今回は振とう培養による培地中におけるインペルターゼ生成の培養条件の検討と, 紫外線照射によって得られた変異株の中からインペルターゼ生成能の高い菌株の選択につい

ておこなった実験結果について述べることにする。

実験材料および方法

(1) 使用菌株保存および種菌 : *Aspergillus* 10 種, *Penicillium* 11 種, *Rhizopus* 3 種, *Mucor* 1 種を自製したトマト汁寒天斜面⁽¹⁵⁾に接種し 30°C で培養し, 2 週間から 4 週間培養したものを種菌として用いた。使用菌株中 IAM 番号のついたものは東京大学応用微生物研究所から分与されたものである。

(2) インペルターゼ生成試験 : 使用した基本培地は 1 l 中にショ糖 25 g, 硝酸ナトリウム 3 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 酵母エキス (Difco) 0.5 g を含み, pH 5.5 に調節した。窒素源, 炭素源の検索に用いた物質はそれぞれこの基本培地が含む窒素, 炭素量に相当する量が含まれるように計算して調節した。この培地 50 ml を 300 ml 容のエルレンマイヤーフラスコに入れて常法により間断殺菌後, 前記寒天斜面培養から 2 白金耳の培養物をかきとり接種し, 28~29°C の恒温室中で毎分 210 回転の回転振とう機を用いて 5 日間培養したのち, その培養濾液中のインペルターゼ力価を検討比較した。

(3) インペルターゼ力価の測定 : 振とう培養によって生じた菌体は濾紙上に集め, 純水でよく洗ったのち 60°C で 16 時間乾燥後秤量し濾紙乾燥重量を差し引き菌体乾燥重量とした。濾液中に生成されたインペルターゼの力価は著者ら⁽¹⁴⁾の方法により, pH 5.8, 2.5% のショ糖溶液から 25°C, 15 分間のインキュベーションにより生成された還元糖の μg 数を 3,6-ジニトロフタル酸法により測定し, 1 μg の還元糖を生ぜしめる酵素量を 1 単位として表示した。

(4) タンパク質の定量 : Lowry ら⁽¹⁶⁾の銅-Folin 試薬を用い牛血清を標準として比色定量した。

(5) 培養液中の残糖の定量 : 培養後に培養液中に残存する還元糖の定量は前記インペルターゼ力価の測定に用いた 3,6-ジニトロフタル酸法によりブドウ糖を標準として定量し, 1 ml の培養液中の μg 数で表示した。

(6) 培地に添加した sugar ester : 大日本製糖株式会社製の食品添加物ニットーエステル-3015 を用いた。製造者の表示した分析結果によれば, 水分 60%, 固形分 40% を含み, 固形分の 90% は sucrose-mono-palmitate と 5% の sucrose-dipalmitate を含んでいる。

(7) 紫外線照射による変異株の選択 : *Asp. am-*

Fig. 1. Survival Curve of Ascospores of *Asp. amstelodami* IAM 2035 after Irradiation of Ultra-violet Light.

stelodami IAM 2035 の ascospore を既報⁽¹⁷⁾のようにして選択的に形成させたのち風乾胞子として収穫し, デシケーターに入れて冷蔵庫中に保存した。この風乾胞子と同じく既報⁽¹⁷⁾のようにホモブレNDERと殺菌水を用いて無菌的に胞子懸濁液をつくり, トーマ血球計を用い顕微鏡で計測し, 胞子濃度を $2 \times 10^4/\text{ml}$ 程度になるように調製した。胞子の紫外線照射は飯塚ら⁽¹⁸⁾, 井口⁽¹⁹⁾の方法を参考にして 9 cm のペトリ皿に 8 ml の水寒天を流し固めた平板上に, 前記胞子懸濁液 5 ml を注入し, 冷暗室の無菌箱内で照射距離 30 cm, 東芝製 10 W 殺菌灯でそれぞれ 0.5, 1, 2, 3, 5, 7 分間おこなった。照射中ペトリ皿をゆっくり回転させ, 照射ムラがおこらぬよう注意した。すべての操作はできるだけ無菌的条件下でおこなった。次に予め求めておいた生存率曲線 Fig. 1 から計算して, 9 cm ペトリ皿 1 個当り 20 程度の集落が出現するように照射後の胞子懸濁液を殺菌水で希釈する。この懸濁液 0.5 ml をショ糖 50% を含む Czapek 寒天培地を流し固めた 9 cm のペトリ皿の平板に接種する。これを 30°C の恒温器中で 5~7 日間培養し, 親株と比較して培養所見の異なるものを釣菌し, 20% ショ糖を含む Czapek 寒天斜面に接種し, 30°C, 7 日間の培養を 8~10 代継代培養した。この結果, 30 株の安定した変異株が得られたので, インペルターゼ生成の実験に使用した。

結 果

1. *Asp. amstelodami* IAM 2035 の振とう培養によるインペルターゼの生成能と他菌種との比較

Table I に示すように, この実験条件下では *Asp. amstelodami*, *Asp. chevalieri*, *Asp. mangini*, *Asp. oryzae*, *Pen. chrysogenum* が高いインペルターゼ生成能を示し, とくに *Asp. amstelodami* の 3 菌株が最も高い値を示した。

2. インペルターゼ生成に及ぼす培地の窒素源の影響

窒素濃度は NaNO_3 3 g/l に相当するよう調節して, 種類の窒素源について検討した。Table II に示されるように NaNO_3 , グルタミン酸ナトリウム, アスパラギン酸ナトリウムがインペルターゼの生成に好結果を与えた。

Table I. Formation of Extracellular Invertase by Some Fungi

Strain	Invertase unit/ml
<i>Aspergillus chevalieri</i> IAM 2001	2960
<i>Asp. glaucus</i> IAM 2124	240
<i>Asp. mangini</i> IAM 2030	2800
<i>Asp. amstelodami</i>	3060
<i>Asp. amstelodami</i> IAM 2025	3300
<i>Asp. amstelodami</i> IAM 2035	3500
<i>Asp. usamii</i>	340
<i>Asp. niger</i>	630
<i>Asp. oryzae</i>	1160
<i>Penicillium chrysogenum</i>	2700
<i>Pen. islandicum</i>	340
<i>Pen. ochrosalmonicum</i>	200
<i>Pen. citrinum</i>	30
<i>Pen. variable</i>	0
<i>Pen. urticae</i>	420
<i>Pen. brunneum</i>	200
<i>Pen. tardum</i>	280
<i>Pen. uridicatum</i>	400
<i>Pen. citreoviride</i>	0
<i>Pen. claviforme</i>	0
<i>Rhizopus javanicus</i>	40
<i>Rh. nigricans</i>	20
<i>Rh. tritici</i>	20
<i>Mucor mucedo</i>	50

Composition of the basal medium was as follows: sucrose 25 g, NaNO_3 3 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, FeSO_4 0.05 g, yeast extract (Difco) 0.5 g were dissolved in one liter of deionized water and pH was adjusted to 5.5. Fifty ml of this medium was sterilized in 500 ml Erlenmyer flask and incubated under the condition of 30°C for 5 days using rotary shaker at 210 rpm. After cultivation the filtrate of culture broth was employed as enzyme solution.

Table II. Effect of the Nitrogen Sources of the Medium on the Formation of Invertase by *Asp. amstelodami* IAM 2035

Nitrogen source	Dry weight of mycelia mg/100ml medium	Invertase activity unit/ml
Sodium nitrate	648	2600
Ammonium sulfate	110	400
Urea	289	0
Peptone	281	0
Casamino acids (Difco)	683	200
Sodium glutamate	679	3800
Sodium aspartate	667	3600
Asparagine	612	900

Nitrogen content of the medium was adjusted to the amount equivalent to that of 3 g/l of sodium nitrate.

カザミノ酸, アスパラギンは菌体の生育は前記 3 種の窒素源におとらぬ結果を示したが, インペルターゼの生成量はすくなくかった。

3. インペルターゼの生成に及ぼす培地の炭素源の影響

窒素源には菌体の生育も, インペルターゼの生成にもよく, かつ炭素源とならない NaNO_3 をえらび, 種々の糖を炭素源として検討した。炭素濃度はショ糖 25 g/l の濃度に相当するよう調節した。Table III に示されるように, 廃糖蜜がややよい結果を示したほかは, ショ糖よりすぐれた炭素源は用いた糖類の中からは見出せなかった。このショ糖の効果は inducer としてのものではなからうか。

Table III. Effect of Carbon Sources of the Medium on the Formation of Invertase by *Asp. amstelodami* IAM 2035

Carbon source*	Dry weight of mycelia per 100 ml of culture broth mg	Invertase activity of culture broth unit/ml
Sucrose	648	1500
Maltose	466	120
Lactose	45	60
Cellobiose	388	60
Glucose	531	240
Fructose	84	240
Galactose	324	0
Molasses	155	675

* Carbon content of the medium was adjusted to the amount equivalent to that of 25 g/l of sucrose.

4. 脂肪酸シヨ糖エステル (sugar ester) の添加がインペルターゼの生成に及ぼす効果

非イオン界面活性剤である脂肪酸シヨ糖エステル (sugar ester) を振とう培養の培地に加えると菌糸の分散がよくなり, 菌による生産物の収量が上昇するとの報告⁽²⁰⁾もあり, また sugar ester のシヨ糖部分はインペルターゼ生成の inducer にもなるのではないかと考え, 前の実験に用いたものと同じ糖類を炭素源とし sugar ester 0.05% を加えた培地をつくり, 酵素の生成量について検討した。

Table IV に示すように, sugar ester の添加によっていずれの糖を炭素源として用いた場合も Table III の結果に比べて著しくインペルターゼの生成が促進され, 菌糸の分散の度合も sugar ester 無添加の場合に比べて良好であり, 形成されたペレットも小さかった。乳糖, セロビオース, 果糖, ガラクトースを炭素源として用いた場合に最もよくインペルターゼが生成された。菌体重量当りの生成酵素力価は乳糖, セロビオースにおいて最も高かった。Table III の結果では sugar ester 無添加

Table IV. Effect of Addition of Sugar Ester on the Formation of Extracellular Invertase by *Asp. amstelodami* IAM 2035

Carbon source	Dry weight of mycelia mg/100 ml medium	Invertase activity unit/ml
Sucrose (control without sugar ester)	648	1500
Sucrose	728	9100
Maltose	664	8800
Lactose	132	20000
Cellobiose	383	23600
Glucose	614	6700
Fructose	618	20000
Galactose	422	14600

Sugar ester (sucrose mono-palmitate) was added at the concentration of 0.05%. Other components of the medium were the same as described under Table I.

Table V. Assimilation of Sugar Ester and Secretion of Invertase by *Asp. amstelodami* IAM 2035

Concentration of sucrose in medium %	Concentration of sugar ester in medium %	Invertase activity unit/ml
2.5	0.05	9100
0	2.5	36000
0.1	2.5	49600

のとき乳糖, セロビオースの場合酵素生成量は著しく低い, 菌体生育量は Table IV の sugar ester 添加の場合と大差はないので sugar ester は inducer として作用したのではないかと考えられる。

つぎに sugar ester 自身が炭素源として利用されるか否かを検討するために Table V に示すような実験をおこなった。すなわち, 炭素源として sugar ester のみを用いた場合にはシヨ糖を炭素源として sugar ester を 0.05% 添加した場合に比べ約 4 倍のインペルターゼが生成された。また主たる炭素源として sugar ester を用い, 0.1% のシヨ糖を補った場合には約 5.5 倍のインペルターゼの生成が認められた。この結果は sugar ester が炭素源としても利用され, さらにインペルターゼの生成にも好適であることを示している。

Table VI はシヨ糖 0.5% を含む培地にパルミチン酸, パルミチン酸ナトリウム, sugar ester をそれぞれ 0.05% 添加した場合のインペルターゼ生成量を検討した結果であるが, sugar ester 以外のものはインペルターゼ生成量は低く, sugar ester の効果は一応そのシヨ糖部分が重要であると考えられる結果が得られた。

Table VI. Effect of Derivatives of Palmitic Acid on the Extracellular Formation of Invertase by *Asp. amstelodami* IAM 2035

Addition*	Invertase unit/ml of culture filtrate	Dry mycelial weight per 100 ml of culture medium mg
No addition	1650	140
Sucrose mono- palmitate	10400	211
Na-palmitate	1600	150
Palmitic acid	1800	183

* Concentration of the additions were 0.05%. Sucrose was used as carbon source at the concentration of 0.5%.

5. Sugar ester によるインペルターゼの net synthesis の増加

以上の実験によって培地に sugar ester を加えると培養濾液中に多量のインペルターゼが生成されることが明らかとなったが, この効果はインペルターゼの net synthesis の増加によるものか, あるいは菌体からのインペルターゼの抽出量の増加であるのかを確かめるために以下の実験をおこなった。今回は 5 l のこぶ付三角フラスコに 1 l の培地を入れ, 27°C, 6 日間の回転振とう培養により sugar ester 0.05% 添加または無添加の培養を

おこなった。生じた菌体を濾紙上に集め、純水でよく洗ったのち氷水中で冷却しながらワーリングブレンダーで 10 分間処理して菌体の懸濁液をつくる。これをもとの培養液と同容量になるように水で定容にする。この菌体懸濁液についてインペルターゼの力価を測定し、培養濾液中のそれと比較し、菌体外、菌体内に生成された酵素量を検討した。同時に得られた菌体を上記懸濁液の 12,000 rpm, 10 分間の遠沈によって集め、この菌体を 0.05% の KH_2PO_4 と $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 5.5 の溶液およびこの溶液に 0.05% の sugar ester をとкаした液で氷水中、1 時間抽出し、sugar ester によるインペルター

Table VII. Formation of Invertase by *Asp. amstelodami* IAM 2035 with and without Sugar Ester*

	With sugar ester	Without sugar ester
Invertase formed in culture filtrate (unit/ml)	11200	2420
Invertase formed in mycelia (unit/ml of mycelial suspension)	5200	760
Protein in culture filtrate ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	395	445
pH of culture medium	7.3	6.3

* The concentration of sucrose and sugar ester of the medium were 0.5% and 0.05% each. Mycelia formed by cultivation was collected by filtration and washed thoroughly with water. Washed mycelia was treated with Waring blender for 10 min in ice cold water and brought to original volume of culture medium. Invertase activity of this mycelial suspension was measured as described before.

Table VIII. Extraction of Mycelia of *Asp. amstelodami* IAM 2035 by the Solution of Sugar Ester*

Extraction media	Invertase activity in extract unit/ml	Protein content of extract $\mu\text{g}/\text{ml}$
Soln. of 0.05% of KH_2PO_4 and MgSO_4 (Salt solution)	26	10
0.05% of sugar ester dissolved in salt solution	16	14

* Washed and homogenized mycelia obtained from the culture without sugar ester was extracted with above mentioned solutions for one hour in ice cold water bath. Invertase activity listed in the table was extracted from 475 unit/ml invertase retaining mycelia, and pH was controlled to 5.5.

Table IX. Effect of Sugar Concentration of the Medium on the Formation of Extracellular Invertase by *Asp. amstelodami* IAM 2035

Concentration of sucrose % (w/v)	Dry weight of mycelia mg/100 ml	pH	Protein* $\mu\text{g}/\text{ml}$	Residual sugar* $\mu\text{g}/\text{ml}$	Invertase activity* unit/ml
0.5	177	6.7	270	475	8200
1.0	298	7.0	450	500	7900
1.5	355	5.7	620	1500	5700
2.0	380	5.4	800	2250	5700
2.5	489	5.2	890	2500	4000

Sugar ester was added at the concentration of 0.05% to the basal medium. Other cultural conditions were the same as described under Table I.

* In the filtrate of culture medium.

ゼの抽出について実験した。Table VII および VIII に示す結果から明らかなように sugar ester 添加によってインペルターゼの net synthesis は著しく増加し、sugar ester の界面活性性による菌体からの酵素タンパクの抽出効果ではないことがわかった。

6. 培地のシヨ糖濃度がインペルターゼの生成に及ぼす影響

Sugar ester を 0.05% 添加した場合、培地のシヨ糖濃度と生成されるインペルターゼ量との関係について検討した結果を Table IX に示す。28~29°C, 5 日間の振とう培養においては実験に用いた最低濃度 0.5% の場合に菌体生育量は最もすくないが、インペルターゼ生成量は最も多かった。Table IX に見られるように、培地の糖濃度がますますつれて培養後に残存する糖が多くなるので、この場合、培養日数がさらに経過すれば酵素生成量も多くなるかも知れぬと考え、培養日数を 15 日までとり、その経過を追った結果を Fig. 2, および Fig. 3 に示す。シヨ糖濃度は 0.5% と 1.5% の二つの場合について検討したが、1.5% の場合は、0.5% の場合に比べて酵素生成量が最高に達する日順が 2 日おくれたが、酵素生成量は 0.5% の場合と同等あるいはややおとる結果が得られた。生成された酵素の培地中における濃度レベルは安定であり、培養 15 日の後にもさ程の低下は示さなかった。

7. 培地の窒素源の濃度がインペルターゼの生成に及ぼす影響

Table II の実験でインペルターゼ生成に好結果を与えた NaNO_3 とグルタミン酸ナトリウムの培地中における濃度の影響をシヨ糖 0.5%, sugar ester 0.05% を含む

Fig. 2. Changes in Analytical Values During Cultivation of *Asp. amstelodami* IAM 2035 in the Medium Containing 0.5% Sucrose.

Fig. 3. Changes in Analytical Values During Cultivation of *Asp. amstelodami* IAM 2035 in the Medium Containing 1.5% Sucrose.

Table X. Influence of the Concentration of Nitrogen Sources of the Medium on the Formation of Invertase by *Asp. amstelodami* IAM 2035

Nitrogen source	Dry weight of mycelia mg/100 ml	pH	Residual sugar* µg/ml	Protein* µg/ml	Invertase activity* unit/ml
NaNO ₃ 1 g/l	160	6.65	77	270	6400
NaNO ₃ 2 g/l	146	7.55	55	270	7200
NaNO ₃ 3 g/l	148	7.80	54	360	9800
Na-glutamate 2 g/l	226	6.80	63	400	7100
Na-glutamate 4 g/l	235	8.00	58	465	9600
Na-glutamate 6 g/l	246	8.40	59	465	10700
Na-glutamate 6 g/l (without sucrose)	43	8.30	23	220	9000

Nitrogen content of 2 g of Na-glutamate is almost equal to 1 g of NaNO₃. Sucrose concentration was 0.5%, and sugar ester was added at the concentration of 0.05%. Other cultural conditions were the same as described under Table I.

* In the filtrate of culture medium.

基本培地に種々の濃度で加え、その影響について検討した。NaNO₃ 1 g は約 2 g のグルタミン酸ナトリウムに相当する窒素を含むわけであるが、Table Xに見られるように、窒素の多い培地においてインベルターゼの生成量が多かった。また、シヨ糖 0.5% の添加をやめてグルタミン酸ナトリウム 6 g/l の割合で含む培地を用い、炭素源、窒素源の二つの役割をグルタミン酸ナトリウムに兼用させた場合にも相当量のインベルターゼが生成された。

8. *Asp. amstelodami* IAM 2035 の紫外線 (UV) 照射変異株によるインベルターゼの生成について

実験方法の項で述べた方法によって得られた変異株30株をシヨ糖 0.5%, sugar ester 0.05%, NaNO₃ 3 g/l の割合で含む合成培地を用い、インベルターゼ生成能について検討した。その結果、親株よりも酵素生成能の強い菌株5株を得た。その結果を Table XI に示す。これら

Table XI. Formation of Invertase by UV-Mutants of *Asp. amstelodami*

Strain	Invertase activity* unit/ml	Mycelial dry weight* ml/100 ml
<i>Asp. amstelodami</i> IAM 2035 (parent strain)	10400	208
mutant 0541	8800	220
mutant 111	8580	193
mutant 211	31500	198
mutant 222	10200	211
mutant 724	6600	227
mutant 744	23500	209

Sugar ester was added to the basal medium at the concentration of 0.05%. Sucrose concentration was 0.5%.

* In the filtrate of culture broth.

5 株の菌学的特性については目下実験継続中である。

考 察

糸状菌類にインペルターゼが広く分布していることはよく知られている⁽¹⁾が、その振とう培養によるこの酵素の培地中における生成についての研究は比較的すくなく、*Penicillium*⁽¹¹⁾、*Neurospora*⁽¹²⁾ についての報告がみられる程度である。われわれは *Asp. amstelodami* の ascospore のインペルターゼについて研究をおこなってきたが^(13,14)、今回の実験結果から、この菌の振とう培養によって比較的用いた他の *Aspergillus*、*Penicillium* のどの菌よりもインペルターゼ生成能が高いことを知った。実験に供した菌株数がすくないので断定はできないが、高濃度培地によく生育する *Aspergillus glaucus* 群の菌⁽²¹⁾ がインペルターゼ生成能が高いように思われる。このことは、培地中のショ糖をブドウ糖と果糖に加水分解して培地の浸透圧を高めるのに好都合であるためとも推察できる。佐藤ら⁽²²⁾ は、パン酵母の耐糖性の高いものはインペルターゼ活性が低く、ショ糖の加水分解による培地の浸透圧の上昇を防ぐためであろうと述べていることと対照的で、興味あるところである。

インペルターゼ生成のためには、培地の窒素源には NaNO_3 、グルタミン酸ナトリウム、アスパラギン酸ナトリウムがよく、炭素源にはショ糖が好適であった。培地に非イオン界面活性剤である sugar ester (主成分 sucrose mono-palmitate) を加えると、ショ糖以外の乳糖、セロビオース、果糖、ガラクトースを炭素源とした場合にも多量のインペルターゼが生成された。sugar ester のみを炭素源とした場合にもこの菌は生育し、かつ多量のインペルターゼが生成された。*Asp. niger* によるクエン酸の生産⁽²⁰⁾ において振とう培養の培地に sugar ester を添加すると菌糸の分散がよく、ペレット形成が抑制され、クエン酸の収量がよくなると報告され、その原因は sugar ester の界面活性にあるとされている。しかしこの実験の結果は、sugar ester はその界面活性により菌糸を分散させる作用のほかにインペルターゼ生成に対しては inducer としても作用したものと考えられるが、その作用機構については目下研究を続行中である。

この菌は *Asp. glaucus* 群に属し、高濃度培地によく生育するのであるが、インペルターゼ生成のための条件としては 0.5% ショ糖のように低濃度の場合に好結果が得られ、培養日数を延長して検討してもやはり低濃度の糖を含む場合の方が酵素の生成量は多かった。

窒素源の濃度について NaNO_3 とグルタミン酸ナトリウムについて実験したが、いずれの場合も NaNO_3 3 g/l に相当する窒素量が適当であった。この実験ではさらに窒素源と炭素源の両方をグルタミン酸ナトリウムにのみ負わしめたときも多量のインペルターゼが生成された。

Asp. amstelodami の紫外線照射変異株のうちから親株の 2 倍、3 倍のインペルターゼを生成する菌株が見出された。これら変異株の菌学的性質については目下研究中である。

以上述べた諸結果および変異株を用いてインペルターゼの生成と分泌の機構について、さらに研究を続けている。

要 約

(1) *Asp. amstelodami* IAM 2035 の振とう培養によって培地中にインペルターゼが生成され、比較的用いた他の *Aspergillus*、*Penicillium* よりもその生成量が多かった。

(2) インペルターゼ生成のための培地の窒素源には硝酸ナトリウム、グルタミン酸ナトリウム、アスパラギン酸ナトリウムがよく、炭素源にはショ糖が適当であった。

(3) 培地に非イオン界面活性剤である脂肪酸ショ糖エステル (sugar ester) を添加すると、インペルターゼの生成が著しく促進された。

(4) この実験条件下では 0.5% のショ糖、0.3% の硝酸ナトリウム、0.05% の sugar ester を含む培地を用い、28~29°C、5 日間の回転振とう培養によって著量のインペルターゼの生成が認められた。

(5) *Asp. amstelodami* IAM 2035 は炭素源として Sugar ester、また炭素源・窒素源としてグルタミン酸ナトリウムを利用して生育し、インペルターゼを培地中に生成した。

(6) この菌の紫外線照射処理により得られた菌株の中から親株の 2~3 倍のインペルターゼ生成能をもつものが見出された。

終りに、実験に助力された山本清和、山本武男両君に感謝し、sugar ester につき種々御援助いただいた大日本製糖株式会社に御礼申し上げます。

なお、本報告の大部分は昭和 42 年度日本農芸化学会大会で講演した。

-
- (1) V. W. Cochrane: "Physiology of Fungi", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1958, p. 106.
(2) G. R. Mandels: *J. Bacteriol.*, **71**, 684 (1956).
(3) R. L. Metzenberg: *Biochim. Biophys. Acta*, **77**, 455 (1963).
(4) R. L. Metzenberg: *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 468 (1962).
(5) 丸山芳治, 小野寺一清, 瀬戸治男, 舟橋三郎: 第 15 回酵素化学シンポジウム講演抜刷, p. 156 (1963).
(6) J. R. Trevithick and R. L. Metzenberg: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 319 (1964).
(7) R. L. Metzenberg: *Biochim. Biophys. Acta*, **80**, 291 (1964).
(8) 丸山芳治, 小野寺一清, 舟橋三郎: 第 16 回酵素化学シンポジウム講演抜刷, p. 191 (1964).
(9) J. R. Trevithick and R. L. Metzenberg: *J. Bacteriol.*, **92**, 1010 (1966).
(10) J. R. Trevithick and R. L. Metzenberg: *ibid.*, **92**, 1016 (1966).
(11) F. M. Poonawalla, K. L. Patel and M. R. S. Iyenger: *Appl. Microbiol.*, **13**, 749 (1965).
(12) E. P. Hill and A. S. Sussman: *J. Bacteriol.*, **88**, 1556 (1964).
(13) 矢吹 稔: 農化, **39**, 138 (1965).
(14) 矢吹 稔: 農化, **40**, 201 (1966).
(15) 矢吹 稔: 農化, **37**, 272 (1963).
(16) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
(17) 矢吹 稔: 農化, **37**, 481 (1963).
(18) 飯塚 廣, 山口辰良: 農化, **26**, 71 (1952).
(19) 井口信義: 農化, **23**, 357 (1949).
(20) J. Takahashi, A. Hidaka and K. Yamada: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 331 (1965).
(21) 高野一郎, 矢吹 稔: 醸酵協会, **24**, 409 (1966).
(22) 佐藤友太郎, 小柳妙子: 食研報告, **15**, 32 (1961).
-