糸状菌の変異とアミラーゼ組成について*

久留島通俊, 藤井孝子, 北原覚雄*

(松谷化学工業株式会社, *東京農業大学)

昭和 47 年 2 月 21 日 受理

Enzymatical and Morphological Variations by Ultraviolet Irradiation (Studies on the Fungal Amylases Part II)

By Michitoshi KURUSHIMA, Takako FUJII and Kakuo KITAHARA*

Matsutani Chemical Industry Co., Ltd.; *Tokyo University of Agriculture

Survivors of ultraviolet-irradiated *Asp. cinnamomeus* IAM 2040 were picked up. Most of them were similar to the parent strain in the activity of acid-stable α -amylase, which was mainly investigated in this study. Only a few strains were found to be charged in enzyme activity. Mutant No. 7117 obtained by four repeated selections by irradiation was observed to be fortified to 6 folds in the acid-stable α -amylase. Not only the amylase activity, some other properties were also observed to be changed as shown in the following table.

Strain No.	Mycelial color	Optimum pH	Preferable sugars for utilization
Parent	light brown brown	5.0~5.5	maltose saccharose dextrin starch
Mutant No. 7117	milk white light yellow	3.0~4.0	inulin fructose

(Received February 21, 1972)

緒 言

糸状菌, 細菌, 麦芽等に広く存在する α -アミラーゼと異なり, 著しく低い pH でも安定である耐酸性 α -アミラーゼの存在することを, 私ら⁽¹⁾は 1949 年に認めたが, その利用面について 1962 年頃から, *Asp. niger*⁽²⁾, *Pullularia pullulans*^(3,4) 等により, この種の酵素製造の企業化研究が活発に行なわれた。しかし, その生成した α -アミラーゼの組成は普通の α -アミラーゼが大部分で, 耐酸性 α -アミラーゼは一部にすぎず, したがって耐酸性 α -アミラーゼの量的生成については, 検討の必要があるように思われる。そこで先に, 私らが耐酸性 α -アミラーゼの存在を認めた *Asp. cinnamomeus* の 4 株を, 東大応用微生物研究所より分譲を受けて再検討を

行ない, そのうち α -アミラーゼと少量の耐酸性 α -アミラーゼを併有する *Asp. cinnamomeus* IAM 2040 株の紫外線照射による人工突然変異株の誘起を試み, 耐酸性 α -アミラーゼ生成能に優れた菌株の取得を目的として検討した。

実 験 方 法

1. 各アミラーゼ活性の測定方法

(a) SA-U (糖化型アミラーゼ力単位): SA-U は, 下記反応液を 40°C で 1 時間作用させて生成したグルコースを改変 Tauber 法⁽⁵⁾ で測定して, 次式より単位を求めた。

$$SA-U = \frac{\text{反応液 1 ml 中の生成グルコース mg}}{\text{反応液 1 ml 中の全糖 mg}} \cdot 100$$

反応液組成は, 次のとおりである。

* 糸状菌のアミラーゼに関する研究 (第 2 報)。

2% 可溶性澱粉 5 ml + 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) 2 ml + 蒸留水 3 ml + 酵素液 0.25 ml.

(b) α A-U (α -アミラーゼ単位): α A-U は, 下記反応液 0.5 ml を 0.002 M ヨード液 0.5 ml に添加して, そのヨード呈色消失時間 (分) を測定して, 次式より単位を求めた.

$$\alpha A-U = \frac{100}{\text{ヨード呈色消失時間 (分)}} \cdot 100$$

反応液組成は, 次のとおりである.

2% 可溶性澱粉 5 ml + 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) 2 ml + 蒸留水 3 ml + 酵素液 1 ml.

Acid-stable α A-U (耐酸性 α -アミラーゼ力単位) は, 原酵素液を pH 3.0, 40°C, 30 分の処理を行ない, 残存 α -アミラーゼ力単位を, 上式より算出して求めた.

2. 変異株の誘起, 選択方法

(a) 紫外線照射方法: 周囲を黒布で覆った無菌箱内で, 紫外線光源 (マツダ 15 W 殺菌灯) から 40 cm の距離に, 各菌株孢子濃度 $10^5 \sim 10^6$ /ml の試料液 10 ml を注入した直径 9 cm のペトリ皿をおき, 静かにゆすりながら 1~10 分間照射を行ない, 孢子の残存率に応じて希釈して, その 0.1 ml を YM 寒天培地で固めた直径 9 cm のペトリ皿にまき広げ, 30°C で 48~96 時間培養を行なって, 残存各コロニーを YM 寒天培地斜面にとり, 30°C で培養した.

(b) 照射残存菌株の選択方法: 紫外線照射処理の残存菌株の繁殖は, 一般に遅れる傾向で, その各菌株の繁殖の度合は, まちまちである. しかし, その各 α -アミラーゼ活性を比較するには, 同じ繁殖の時期に測定する必要があるので, 麴 4, 澱粉 1, 水 4.5 の割合で良く混合した培地 2 g を内径 2 cm × 19 cm の試験管にとり, 殺菌したもの各 3 本に同一菌株の孢子を接種して 30°C, 65~80 時間培養を行なって, この麴麩に水 10 ml を加えて抽出を行ない, その抽出液 pH が 5.0~6.0 にあるものを供試酵素液とし, 全 α -アミラーゼ力, 耐酸性 α -アミラーゼ力を測定して, 各菌株の優劣を決定した.

実験結果および考察

1. *Asp. cinnamomeus* 株の α -アミラーゼ組成

東大応用微生物研究所より分譲を受けた *Asp. cinnamomeus* IAM: 2040, 2134, 2552, 2927 の 4 株それぞれの麴麩を調製して, 耐酸性 α -アミラーゼ生成能を検討した結果は, Table I のとおりである.

Table I. Amylase Activity of *Asp. cinnamomeus*

	Total α A-U	Acid stable α A-U	SA-U
<i>Asp. cinnamomeus</i> IAM 2040	900	71	2.88
<i>Asp. cinnamomeus</i> IAM 2927	153	153	7.50

Table I のごとく, 耐酸性 α -アミラーゼ生成能を持つものが 2 株得られ, *Asp. cinnamomeus* IAM 2927 の生成 α -アミラーゼは全部耐酸性であるのに対し IAM 2040 では, 全 α -アミラーゼ力 900 unit のうち耐酸性 α -アミラーゼ力は, 70 unit にすぎなかった.

2. 変異株の誘起試験結果

Asp. cinnamomeus IAM 2040 株を供試菌株として, 紫外線による変異株の誘起試験を行なったが, 第 1 回照射では照射残存菌株 100 株について, 各麴麩抽出液の α -アミラーゼ力を測定して, 耐酸性 α -アミラーゼ生成能の優れた菌株を選び, ついでこの耐酸性 α -アミラーゼ生成能の優れた菌株を, 次の照射試験の対照株に用いて紫外線照射を行なう方法を繰り返して, 第 2 回照射では照射残存株 28 株, 第 3 回照射では照射残存菌株 14 株, 第 4 回照射では照射残存菌株 20 株が得られた. その全菌株について, 各麴麩の α -アミラーゼ力を測定して, 耐酸性 α -アミラーゼ生成能の優れた菌株を選んだ. Table II では, 各照射試験における紫外線照射時間 (分) ごとの残存菌株 %, およびそれぞれ残存菌株のうち, 著しく α -アミラーゼ組成に差異のあるものを表示したが, 照射残存菌株の大部分は, 対照株に比べて全 α -アミラーゼ力, 耐酸性 α -アミラーゼ力に差異が認められなかった.

Table II において, 紫外線照射時間 (分) と菌株孢子の生存率をみると, 第 1 回照射では照射 10 分で生存率 0.06%, 第 2 回照射では照射 10 分で生存率 0, 照射 8 分で 0.01%, 第 3 回照射では照射 3 分で 0.05%, 照射 5 分で 0.01% となり, 第 4 回照射では, 照射 2 分で 0.18%, 照射 5 分で 0.01% となった. すなわち, 紫外線照射ごとに各々残存菌株は, それぞれの対照株に比べて紫外線処理により, 孢子の生存率が減少する傾向がみられた.

ついで, 変異の著しい残存菌株の各 α -アミラーゼ活性をみると, 第 1 回照射では耐酸性 α -アミラーゼ生成能が親株の 1/13 以下の No. 1115 株と, 親株の 2 倍優れた

Table II. Effect of UV Irradiation on *Asp. cinnamomeus* IAM 2040 and its Survivors
(1) UV Irradiation on *Asp. cinnamomeus* IAM 2040

Result of irradiation			α -Amylase activity of survivors		
Irradiation minute	Colony count / Suspension 0.1 ml	Survival %	Strain No.	Acid stable α -A-U	Total α -A-U
4	21(1/5)*	2.9	parent	65	900
5	26(1/2)*	1.4	1115	5	700
6.5	29	0.17	2652	120	740
8	14	0.08	1110	105	900
10	10	0.06			

Initial spore count 1.76×10^5 /ml.

(2) UV Irradiation on No. 2652

Irradiation minute	Result of irradiation		Survival %	α -Amylase activity of survivors		
	Colony count	Suspension 0.1ml		Strain No.	Acid stable α -A-U	Total α -A-U
3	19	(1/10)*	1.9	parent	70	1000
5	5		0.1	2652	130	800
6.5	3		0.03	5340	240	700
8	1		0.01	5655	195	700
10	0		0			

Initial spore count 10^5 /ml.

(3) UV Irradiation on No. 5340

Irradiation minute	Result of irradiation		α -Amylase activity of survivors			
	Colony count	Suspension 0.1 ml	Survival %	Strain No.	Acid stable α -A-U	Total α -A-U
1	8	(1/20)*	1.6	5340	238	880
2	3	(1/10)*	0.3	1115	5	990
3	1	(1/5)*	0.05	6211	320	880
5	1		0.01	6118	320	770
8	0		0			

Initial spore count 10^5 /ml.

(4) UV Irradiation on No. 6211

Irradiation minute	Result of irradiation		α -Amylase activity of survivors			
	Colony count	Suspension 0.1 ml	Survival %	Strain No.	Acid stable α -A-U	Total α -A-U
1	10	(1/10)*	1	5340	238	880
2	9	(1/2)*	0.18	6211	320	880
5	1		0.01	7117	400	900

Initial spore count 10^5 /ml.

* Indicated the degree of dilution.

No. 2652 株が得られた。そこで、その耐酸性 α -アミラーゼ生成能の優れた菌株を対照株にして、照射試験を重ねて行なうと、耐酸性 α -アミラーゼ生成能が、それぞれの対照株に比べて第2回照射では、その2倍の No. 5340 株、第3回照射では、またその1.5倍の No. 6211 株、第4回照射では、さらにその1.3倍の No. 7117 株

が段階的に取得された。なお以上の各菌株は、それぞれの対照株に比べて耐酸性 α -アミラーゼ生成能は増大したが、全 α -アミラーゼ生成能に差異が認められず、あたかも普通の α -アミラーゼが、耐酸性 α -アミラーゼに転換されたような変化がみられた。この変異は、遺伝子自体の変異に基づくものであるかどうか、興味ある問題

Table III. Amylase Activity of Representative UV Strains

Strain No.	Total α -A-U	Acid stable α -A-U	SA-U
Parent	900	71	2.88
1115	870	5	0.57
7117	900	400	6.66

と思われる。

Table III では, 各照射試験で変異のはなはだしい No. 1115 株と, No. 7117 株の各 α -ミラーゼ力を示した。

Table III のごとく, 4 回の紫外線照射による変異株の誘起と選択を繰り返して, 原株に比べ耐酸性 α -ミラーゼ力が 6 倍, 糖化型 α -ミラーゼ力が 2.5 倍の生成能を持つ変異株 No. 7117 株が得られた。また一部前記したごとく, 1 回だけの紫外線照射によって, 原株に比べ耐酸性 α -ミラーゼ力が 1/13 以下で, しかもほとんど普通の α -ミラーゼだけの組成を持つ No. 1115 株も得られた。

3. 原株と変異株 No. 7117 株の菌学的性質

原株と変異株 No. 7117 株の菌学的諸性質を比較するため, 各培地における生育状態, 各 pH および各温度における生育状態, 炭水化物の利用性について検討を行った。

(a) 各培地における生育状態: 各培地を通じて, 菌叢の色が原株では淡茶色または灰色を呈するが, 変異株

Table V. Relation to pH of Medium

Strain No.	Optimum pH	Minimum pH	Maximum pH
Parent	5.0~5.5	2.5	7.0
7117	3.0~4.0	2.5	7.0

Table VI. Temperature Relation

Strain No.	Optimum (°C)	Minimum (°C)	Maximum (°C)
Parent	28~30	20	37
7117	28~30	20	37

では乳白色または淡黄色であって, その相違が明らかに識別される。

(b) 各 pH における生育状態: 各 pH による生育限界は, 原株および No. 7117 株とも 2.5~7.0 であるが, 最適 pH は原株の 5.0~5.5 に対し, No. 7117 株は 3.0~4.0 と低下している。

(c) 各温度における生育状態: 各温度による生育限界は, 原株および No. 7117 株とも 20~37°C で, 最適温度は 28~30°C であった。

(d) 炭水化物の利用性: 原株はマルトース, サッカロース, デキストリン, 澱粉が良好で, 菌蓋を作り, No. 7117 株はフラクトース, イヌリンの利用性が良好であった。

上記菌学的諸特性の比較から, 変異株 No. 7117 株は原株と比較して, 全く異なる別種と思われるほどの変異

Table IV. Cultural Characters of Media

A) Malt agar

Strain No.	Colony					Spore
	Growth	Size diameter (mm)	Form	Elevation	Color	
Parent	abundant	45~60	round	convex	light brown	light brown
7117	abundant	33~35	round	convex	milk white	yellow

B) Czapek agar

Strain No.	Colony					Spore
	Growth	Size diameter (mm)	Form	Elevation	Color	
Parent	abundant	20~30	irregular	convex	milk white	yellow
7117	abundant	20~22	irregular	convex	light yellow	yellow

C) Potato dextrose agar

Strain No.	Colony					Spore
	Growth	Size diameter (mm)	Form	Elevation	Color	
Parent	abundant	35~40	round	convex	light brown	gray
7117	abundant	20~25	round	convex	light brown	yellow

Table VII. Utilization of Sugar

Sugars/Strain No.	Parent	7117
Arabinose	±	±
Xylose	±	±
Glucose	+	+
Mannose	+	+
Galactose	—	—
Fructose	+	++
Lactose	—	—
Maltose	+++	±
Saccharose	+++	±
Melibiose	+	±
Trehalose	++	±
Inulin	±	+
Dextrin	+++	±
Starch	+++	±
Control	—	—

を受けていることが認められた。

なお、この No. 7117 株を YM 寒天培地に接種して 30°C に培養し、2 週間の間隔をおいて 10 代にわたり植継を続けたが、肉眼的にも各アミラーゼ活性においても、異状は認められなかった。この結果から、この菌株は形態的、生理的には固定していると考えられる。

要 約

- (1) *Asp. cinnamomeus* IAM 2040 株の紫外線照射

による人工突然変異株の誘起を試み、大部分の菌株は全 α -アミラーゼ力、耐酸性 α -アミラーゼ力とも、原株に比べ差異はなかったが、ごく一部の菌株では、耐酸性 α -アミラーゼの特に優れたものと劣ったものが認められた。

(2) 紫外線照射処理を 4 回繰り返して、耐酸性 α -アミラーゼ力が、原株の 6 倍の生成能を持つ Mutant No. 7117 株が得られた。

(3) Mutant No. 7117 株は、原株に比べ増殖の温度では一致しているが、pH が酸性に傾いている外、分生子の着色において顕著な差が認められた。各炭水化物の利用性も変わっていた。

終りに、菌株の生理的諸性質の検討に御協力をいただいた東京農業大学農芸化学科、鈴木伸枝、伊藤たつ子両氏に深謝致します。

本研究は昭和 45 年度、日本農芸化学会大会に発表した。

- (1) 北原覚雄、久留島通俊：醸工，28，388 (1950)。
- (2) 養田泰治、朝井勇宜：特許出願公告，昭35-5046。
- (3) 山田覃洋：農化，37，637，706 (1963)。
- (4) 山田覃洋：特許出願公告，昭 39-11046。
- (5) 高山瑞男：京大食研報，1，22 (1949)。