

Rhodospiridium sp. J-5 B株により生産された 酵素による各種生澱粉の分解*

赤木盛郎・野田武宏**・山田哲也***
久松 誠***・吉田弘一****・岡野節子

Hydrolysis of Various Raw Starch by the Enzyme that excreted with *Rhodospiridium* sp. J-5 B Strain

Morio AKAKI, Takehiro NODA**, Tetsuya YAMADA***
Makoto HISAMATSU***, Hirokazu YOSHIDA**** and Setsuko OKANO

緒 言

微生物の生産するアミラーゼの性質や、その生産手法については、古くから多くの研究業績が積み重ねられてきている。微生物起源のアミラーゼについては、細菌、放線菌、糸状菌に関係するものが大部分であり、酵母起源のアミラーゼ生産菌としては、*Emdomyces fibuligera*,^{1~9)} *Saccharomyces diastaticus*^{10~12)} についての報告が見られる程度でその学術的、応用的研究は比較的少ない。

近年、無蒸煮アルコール醱酵法が省エネルギー、バイオマスの両面から注目され、この目的にかなったアミラーゼの開発が要請されている。*Phizopus* 属や *Aspergillus* 属などの生産するアミラーゼがよく研究されているが、酵母についてはそれらについての研究が少ない。

赤木ら^{13~21)} は、自然界から新たに分離・同定した赤色酵母 *Rhodospiridium* sp. J-5 B株について一連の研究を進めているが、本報では、本菌の大量培養による菌体外酵素生産と酵素の精製、各種生澱粉（米、とうもろこし、馬鈴薯、さつまいも、タピオカ）の分解性などについて検討した結果を報告する。

* 澱粉資化性酵母に関する研究
** 現在上野農業高等学校
*** 三重大学
**** 松阪大学

実験の部

1. 実験方法

1・1 還元糖の定量および酵素活性の測定

DNS 法²²⁾ 径1.8×18cmの試験管に、試料溶液 (Glucose 100~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 1.0ml をとり、3,5-Dinitrosalicylic Acid 試薬3.0ml を加えて混和し、沸騰水浴中に5分間保った後水冷し、20ml の純水を加え十分攪はんした後、日立 UVIDEC を用い500nmで比色した。

Somogyi-Nelson 法²³⁾

A液：無水炭酸ナトリウム25g、酒石酸カリウム・ナトリウム25g、炭酸水素ナトリウム20g、無水硫酸ナトリウム200gを脱イオン水800mlにとかし、1000mlにメスアップした。

B液： $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 30gを脱イオン水800mlに溶解し、濃 H_2SO_4 を4~5滴添加した。

C液：モリブデン酸アンモニウム50gを脱イオン水900mlにとかし、濃 H_2SO_4 42mlを加えた。 $\text{Na}_2\text{HAs} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6gを脱イオン水50mlにとかし、前述の液に加え1000mlにメスアップした。

D液：A液25ml+B液1mlを測定の直前に調整した。

操作：径1.8×18cmの試験管に、試料溶液 (Glucose 20~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 1.0ml をとり、D液1.0mlを加えて混和し、ガラス玉をのせ沸騰水浴中に10分間保った後、水で急冷し、C液1.0mlを加え酸化銅の沈澱がとけるまで十分攪はんした。これに10mlの純水を加え攪はんした後、日立製 UVIDEC を用いて520nmで比色した。

酵素活性の測定：適度に希釈した酵素液0.1mlに、pH5.0の酢酸緩衝液を0.4ml加え、恒温槽で40°Cに保ち平衡化した後、可溶性澱粉 (DNS法では2%、Somogyi-Nelson法では1%) 0.5mlを加え、正確に10分間反応させたのち、DNS試薬3.0mlまたはSomogyi試薬1.0mlを加え反応を止め生成還元糖量を求めた。対照は澱粉を加える前に試薬を加えて酵素を失活させたものに澱粉を加え、還元糖量を求めた。酵素力価は、酵素溶液1mlが40°C、1分間に1 μmol のグルコース相当の還元力を生成したときを1単位とする International Unit で示した。以後のアミラーゼ活性測定、力価表示はすべてこれに従った。

280nmの吸収：カラムなどによりタンパク質の分離精製を行ったばあい、まず溶液中の280nm吸収を測定した。これは、タンパク質、ペプチッド、アミノ酸などの溶液に含まれるトリプトファン、チロシンのベンゼン環の280nmの吸収であり、適度な濃度の溶液を石英セルを用い日立製 UVIDEC で測定した。

1・2 *Rhodosporidium* sp. J-5 B株の培養による粗酵素の取得とその精製

赤木らの分離・同定した *Rhodosporidium* sp. J-5 B株をYM斜面培地に植え継ぎ、これをYM液体培地を用いて、30°C、48時間振とう培養した。これを種菌として用い、ジャーファ

メンターで、ふすま5%、米糠0.5%添加培地に3日間通気攪はん培養を行った。培養物を60メッシュの金網で滷過後、連続遠心分離で上澄み29 lを採った。これに滷過助剤としてケイソウ土を加えて滷過し、滷液27 lをえ、濃縮して3 lとした。さらにエバポレーターで1.05 lまで濃縮し、これを3 lのエチルアルコール中へ攪拌しながら徐々に加え、沈澱物を遠心分離で集めエチルアルコールで洗浄後、真空乾燥し粗酵素36.9gを得た。

粗酵素はD E A E-Cellulofineにより次の如く精製を行った。D E A E-Cellulofine A H (生化学工業)ゲル200mlを1 l容のビーカーにとり脱イオン水で十分洗浄し、静置沈澱した後、上澄み中の微粒子を傾斜法で除いた。これに0.01 NのNaOH溶液500mlを加え、マグネチックスターラーで攪はんし、ゲルを洗浄、活性化させた後、脱イオン水で十分洗浄した。ガラスウールで栓をしたガラス管カラムに水を1/3程度入れゲルを充填した。次いで、pH7.5トリス塩酸緩衝液(25mM)を一夜流しカラムを平衡化させた。次に、粗酵素5gを少量のpH6.5リン酸緩衝液(10mM)に溶解し、カラムに流し同じリン酸緩衝液で溶出させた。溶出液はフラクションコレクターで12.5mlずつ分取した。溶出液中の280nmでの吸収ピークが見られなくなった時点で、リン酸緩衝液中にNaClの直線的な濃度勾配をかけ、残存している酵素を溶出させ、そして280nmの吸収とアミラーゼ活性を測定し、また伝導度計によりイオン量をはかり、NaClの直線的な濃度勾配を確認した。このようにして活性区分を集め、少量のメルカプトエタノールを加え、硫安を80%飽和になるように徐々にとかしながら加えてゆき、硫安塩析を行った。一夜放置後上澄を捨て、沈澱部を遠沈管にとり、遠心分離(10000rpm, 20分間)を行った。沈澱を少量の水に溶解し、透析チューブに入れ、低温室中でpH5.0酢酸緩衝液(10mM)中で2日程度透析を行った。これを遠沈管にとり、5°Cで遠心分離(10000rpm, 10分間)を行った。上澄を凍結乾燥し以後の実験に使用した。

1・3 酵素の性質の検討

A区分の至適pH、pH安定性、温度安定性とA区分と粗酵素の振とう下における安定性について検討した。

至適pH

pH1.0~10.0について検討した。

pH1.0~2.0についてはHCl-KCl緩衝液を、pH2.4~8.0についてはMcIlvaine緩衝液を、pH2.4~8.0についてはホウ酸緩衝液を用いた。

酵素溶液0.1mlに各pH緩衝液を0.4ml加え、各pH溶液の酵素溶液としDNS法で測定した。

pH安定性

酵素溶液に前記緩衝液を最終濃度0.02Mとなるように加え、30°Cの恒温器中に24時間おいた。そしてこの0.1mlにpH5.0の酢酸緩衝液0.1Mを0.4ml加え、酵素溶液のpHを5にもどし、DNS法で測定した。

温度安定性

酵素溶液に前記緩衝液を最終濃度0.02Mとなるように加え、30°Cの恒温器中に24時間おいた。そしてこの0.1mlにpH5.0の酢酸緩衝液0.1Mを0.4ml加え、酵素溶液のpHを5にもどし、DNS法で測定した。

酵素溶液(pH5.0、0.02M)を所定温度に設定した恒温槽に30分間おき、この0.1mlをDNS法で測定した。

振とう下での安定性

酵素を50mlのpH4.5の酢酸緩衝液と、pH3.0のMcIlvaine緩衝液(各0.04M)中に20IU相当量とかし、これを100ml容の三角フラスコにとり、37°Cで100rpmの振とうを行った。残存活性を一日ごとにSomogyi-Nelson法で測定した。また、市販グルコアミラーゼである*Rhizopus*由来の粗酵素グルコザイム6000を使用して、これらと同様な実験を行った。

1・4 各種生澱粉分解性の検討

酵素溶液の調整

各種生澱粉の分解性について至適pHであるpH4.5とpH安定限界であるpH3.0で検討を行った。pH4.5は0.04Mの酢酸緩衝液を用い、pH3.0は0.04MのMcIlvaine緩衝液を用いた。これらの溶液には防腐剤としてNaN₃を0.03%添加した。別に、精製酵素A区分を20IU/mlとなるように調整した。

各種澱粉の調整

生澱粉は穀粒澱粉として米、とうもろこし、小麦を用い、地下茎澱粉として馬鈴薯、さつまいも、タピオカを用いた。生澱粉の水分含量は、試料500mgを恒量ビンを用い、110°Cで2時間乾燥する常法により測定した。

分解性についての検討

100ml容三角フラスコに生澱粉200mgを入れ、pH4.5の緩衝液49mlを添加した。またpH3.0についても同様に行った。これらに20IU/mlとなるように調整した酵素液1.0mlを加え、20IU/50mlとしビニールをかぶせゴム輪をかけて栓とした。これを振とう機にかけ37°C、100rpmで振とうした。これらを経時的にサンプリングし生成還元糖をSomogyi-Nelson法で測定した。

またpH3.0において24時間後に酵素液をさらに追加し、その後の分解性の変化を検討した。さらに、*Rhizopus*由来の市販酵素グルコザイム6000との比較も行った。

2. 実験結果および考察

DEAE-Cellulofineによる精製については、*Rhodospiridium* sp. J-5Bの生産した菌体外アミラーゼをDEAEカラムにかけたところ、Fig. 1に示した溶出パターンが得られた。

カラムに非吸着区分(以後A区分とする)のアミラーゼ活性の活性回収率は81%であり、凍結乾燥品重量で約0.8gであったので、酵素活性は約6倍に濃縮された。蛋白質当たりの活性比

でも同様であった。

酵素の至適 pH、pH 安定性、温度安定性、振とう下における安定性については、Fig. 2 に示したように至適 pH は pH4.5~5.5 付近であった。pH 安定性は Fig. 3 に示したように pH3.0~7.0 であった。

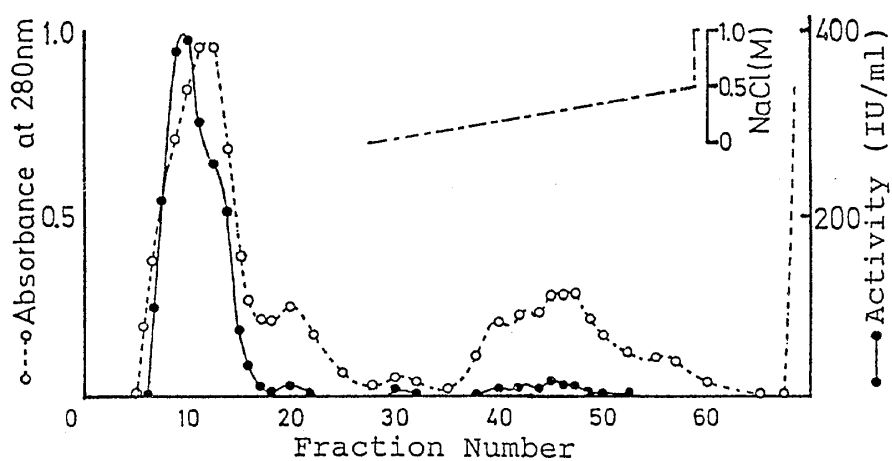


Fig. 1. DEAE-Cellulofine Chromatography

Condition : Column DEAE-Cellulofine Gel (activated pH 7.5) 3.0×25cm
Eluent 0.01M phosphate buffer (pH 6.5)
Flow rate 0.5ml/min
Fraction volume 12.5ml

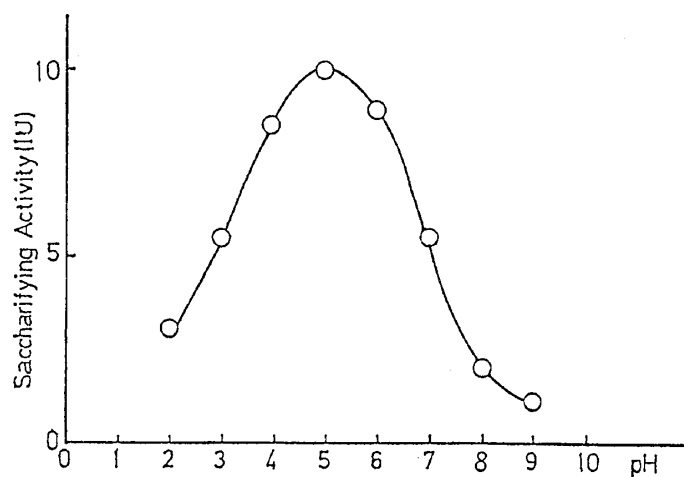


Fig. 2. Effect of pH on the Glucoamylase Activity

Glucosylase activity was estimated under the standard assay conditions at various pH.
McIlvaine buffer for pH 2.4-8.0
borate buffer for pH 8.0-10.0

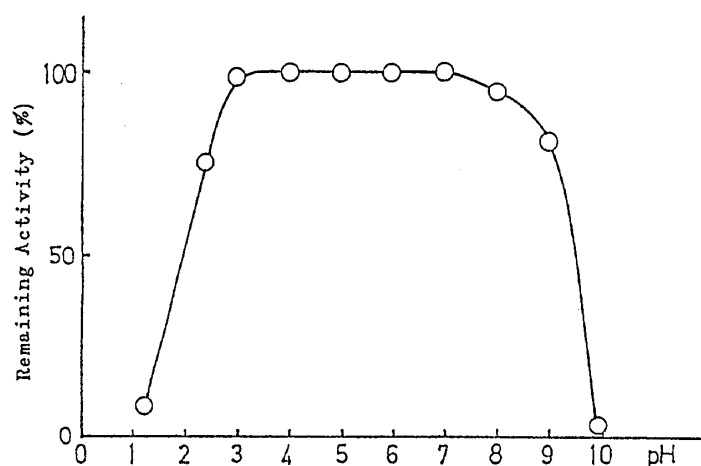


Fig. 3. pH Stability of Glucoamylase
 Remaining activity after storage for 24 hr at 30°C.
 HCl-KCl buffer for pH 1.0 -2.0
 McIlvaine buffer for pH 2.4-8.0
 borate buffer for pH 8.0-10.0

また Fig. 4 に示したように温度安定性は50°C付近であった。
 振とう下における安定性は、Fig. 5、Fig. 6 に示したように、本酵素のアミラーゼは粗酵素、
 A区分とも *Rhizopus* 由来のグルコザイム6000にくらべて安定であった。

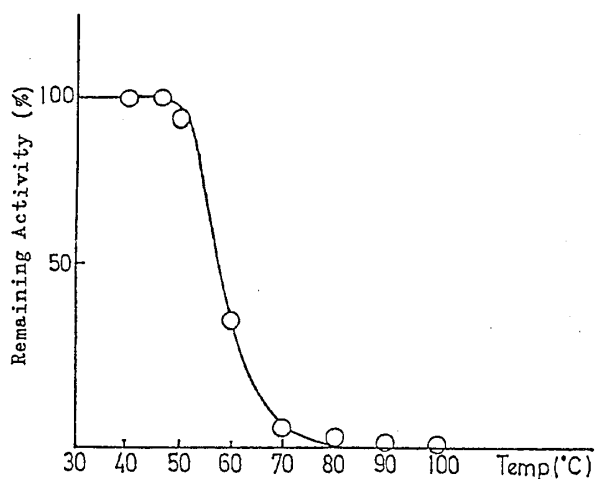


Fig. 4. Thermal Stability of Glucoamylase
 The reaction mixture was incubated for 10 min at various temperatures. After incubation,
 remaining activity was estimated under the standard assay conditions.

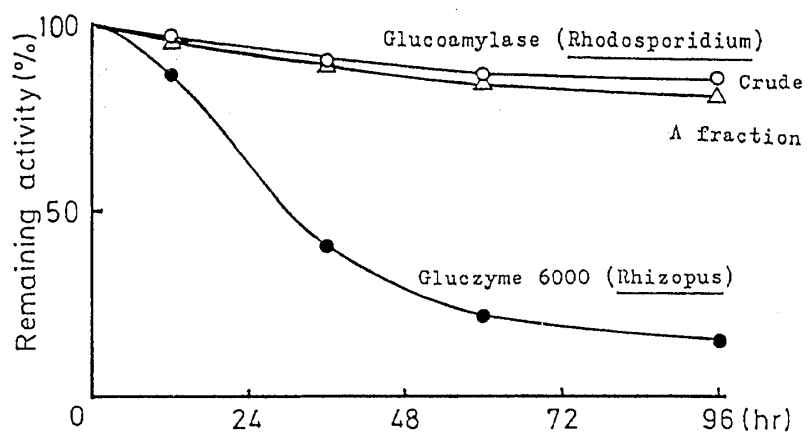


Fig. 5. Stability of Glucoamylase in Buffer Solution (pH 4.5)
condition : incubated at 37°C shaking at 100 rpm

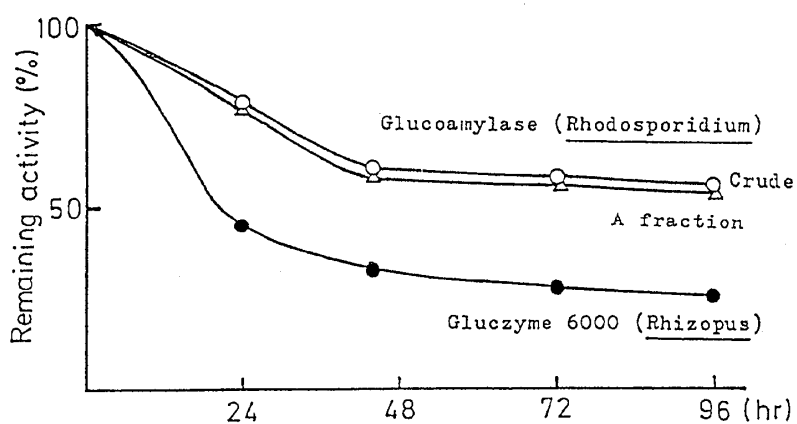


Fig. 6. Stability of Glucoamylase in Buffer Solution (pH 3.0)
condition : incubated at 37°C shaking at 100 rpm

各種生澱粉の分解性については、pH4.5における実験結果は Fig. 7 に示した。米は約24時間、とうもろこしは約48時間でそれらの多くが分解された。地下茎澱粉は一般に分解率が悪く特に馬鈴薯澱粉が悪く、100時間後でさつまいも、タピオカが約60%分解率を与えた。pH3.0における実験結果は Fig. 8 に示した。分解性の順序は pH4.5の場合とほぼ同様になったが、分解率はpH4.5の場合の約半分程度であり24時間以降の分解は見られなかった。

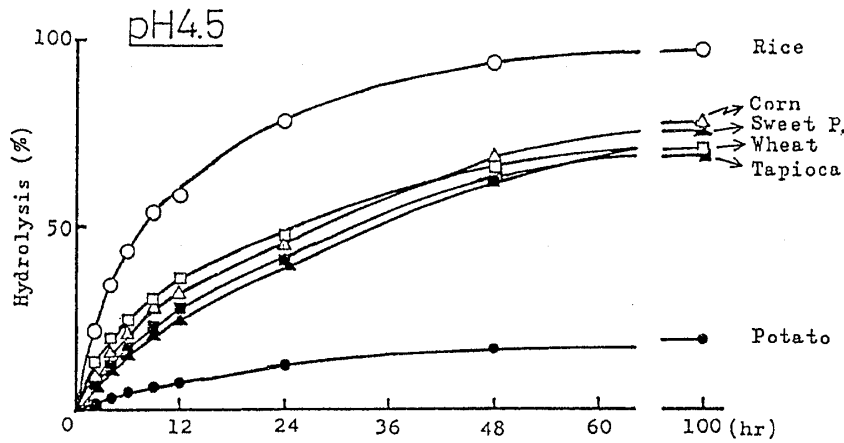


Fig. 7. Hydrolysis of Raw Starch by Glucoamylase (A fraction)

Hydrolysis condition : 4 mg/ml of starch was treated with 0.4 IU/ml glucoamylase at 37°C, pH 4.5.

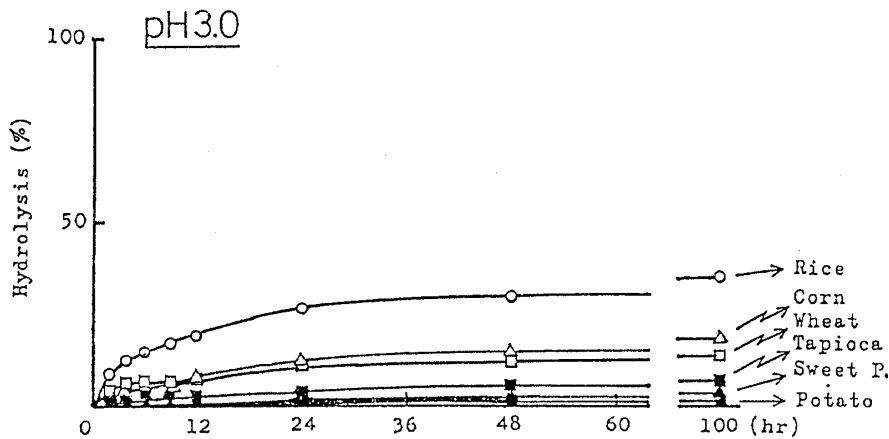


Fig. 8. Hydrolysis of Raw Starch by Glucoamylase (A fraction)

Hydrolysis condition : 4 mg/ml of starch was treated with 0.4 IU/ml glucoamylase at 37°C, pH 3.0.

24時間以後にさらに酵素液を加えた実験結果は Fig. 9 に示したが、その後の分解はあまり進まなかった。

また、比較として *Rhizopus* 由来の市販グルコアミラーゼである粗酵素グルコザイム6000を用い、同様に実験を行った結果を Fig.10に示した。

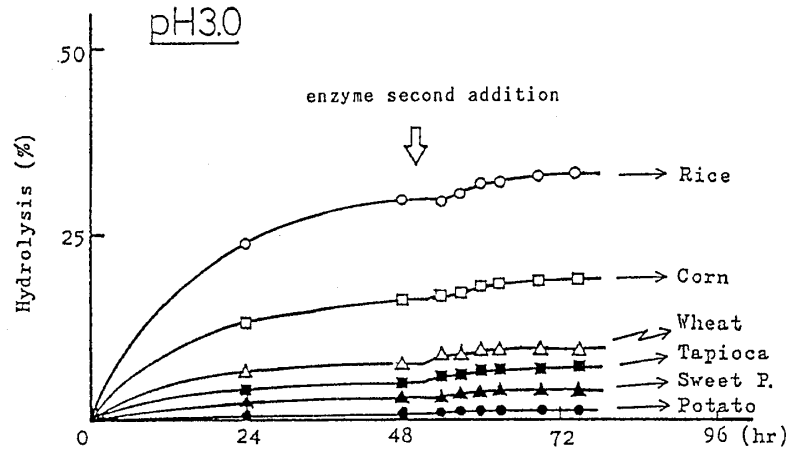


Fig. 9. Hydrolysis of Raw Starch by Glucoamylase (A fraction)

Hydrolysis condition : 4 mg/ml of starch was treated with 0.4 IU/ml glucoamylase at 37°C, pH 3.0.

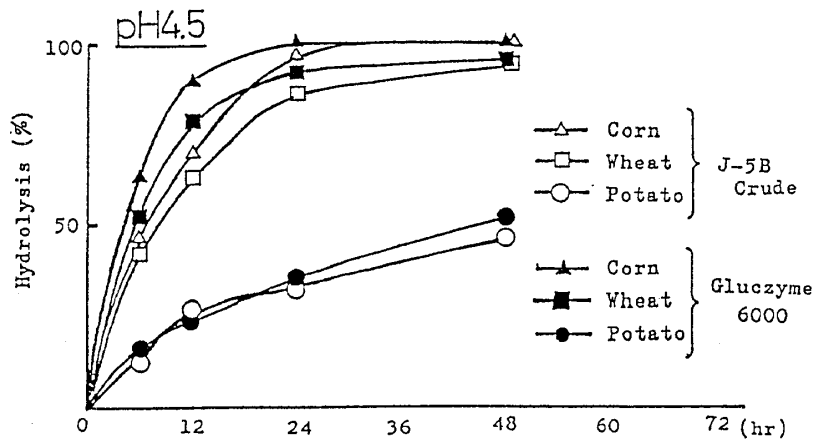


Fig. 10. Comparison of Hydrolytic Ratio with Yeast Glucoamylase (J-5B) and Gluczyme 6000 (*Rhizopus*)

Hydrolysis condition : 4 mg/ml of starch was treated with 1 IU/ml glucoamylase.

以上、考察すれば、*Rhodospiridium* sp. J-5Bの生産するアミラーゼは、その至適 pH4.5において、*Rhizopus*, *Aspergillus* など他の微生物由来のグルコアミラーゼについての報告と同様に穀粒澱粉に対する分解性はよく、地下茎澱粉に対する分解性はあまりよくなかった。各種

生澱粉の分解性は、米澱粉がよく、とうもろこしや小麦澱粉がこれにつき、馬鈴薯は悪かった。これは澱粉粒の粒径の差か、澱粉分子構造に差があるのではないかと考えられる。生澱粉の分解性は、pH3.0ではpH4.5に比べ悪かったが、多少とも分解性を示し、かつ100時間後の残存活性がかなり残っていたことから、低pHでもJ-5 B菌が生育することとあいまって、醗酵による生澱粉の分解に有利であろうと考えられた。また本酵素の低pHでの分解性の低下は、24時間後にさらに酵素液を添加したにもかかわらず分解があまり進まなかったことから、澱粉分子において低pHのため分子末端で水素結合が強化されて、澱粉分子が収縮したため酵素分子が作用しにくくなったのではないかと考えられた。または低pHにより酵素分子自体に変化が起こり、広海、^{24,25)} 林田^{26,27)}らの報告にある生澱粉吸着部位あるいは活性部位またはそれら両方が働かなくなったためではないかと考えられた。

Rhodosporidium sp. J-5 Bの酵素はグルコザイム6000に比べ分解能は多少劣ったが、これについては α -アミラーゼの混在の差であると考えられ、この点は α -アミラーゼを添加することにより、分解能の向上は可能と思われた。本酵素は振とう条件においてグルコザイム6000に比べて安定なので、振とう、通気という培養の場でより有効であると考えられた。

要 約

赤木らの分離・同定した *Rhodosporidium* sp. J-5 Bの生産する菌体外酵素をDEAEカラムを用いて精製して得られたA区分は、市販酵素に比べ、低pHにおいて生澱粉をよく分解し、残存活性率がよかった。

文 献

- 1) Y. HATTORI : *Agric. Biol. Chem.*, 25, 737 (1961)
- 2) Y. HATTORI and I. TAKEUCHI : *Agric. Biol. Chem.*, 25, 895 (1961)
- 3) Y. HATTORI and I. TAKEUCHI : *Agric. Biol. Chem.*, 26, 316 (1962)
- 4) T. FUKUI and S. NIKUNI : *Agric. Biol. Chem.*, 33, 884 (1969)
- 5) L. J. WICKERHAM : *J. Bact.*, 48, 413 (1944)
- 6) H. EBERTOVA : *Folia. Microbiol.*, 11, 14 (1966a)
- 7) H. EBERTOVA : *Folia. Microbiol.*, 11, 422 (1966b)
- 8) J. SUKHUMAVASI, K. KATO and T. HARADA : *J. Ferment. Technol.*, 53, 559 (1975)
- 9) K. KATO, K. KUSWANO, I. BANNO and T. HARADA : *J. Ferment. Technol.*, 54, 831 (1976)
- 10) HOPKINS, R. H. and KULKA, D. : *Arch. Biochem.*, 69, 45 (1957)
- 11) 齊藤清, 坂井拓夫 : 昭和57年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1982, P.566
- 12) 齊藤清, 坂井拓夫 : 昭和57年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1982, P.351
- 13) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也 : 昭和58年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1983, P.404
- 14) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 神本郁子, 山田哲也 : 昭和58年度第87回日本農芸化学会中部支部大会講演要旨集, 1983, P.8

- 15) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 神本郁子, 山田哲也: 昭和59年度日本農芸化学会中部支部大会講演要旨集, 1984, P.180
- 16) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也: 農化, 58, 153 (1984)
- 17) 赤木盛郎, 野田武宏, 山田哲也: 昭和60年度第314・93回日本農芸化学会関西・中部支部合同大会講演要旨集, 1985, P.37
- 18) 赤木盛郎, 野田武宏, 久松眞, 山田哲也: 昭和61年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 1986, P.462, P.659
- 19) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也: 本誌, 10, 1 (1990)
- 20) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也, 中尾孝子: 本誌, 11, 91 (1991)
- 21) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也, 岡野節子: 本誌, 12, 1 (1992)
- 22) 福井作蔵: 還元糖の定量法, 東京大学出版会, 1973, P.19
- 23) 福井作蔵: 還元糖の定量法, 東京大学出版会, 1973, P.8
- 24) 大西正健: 酵素科学入門, ワイリージャパン, 1984, P.135
- 25) 中村道德: アミラーゼ, 1987
- 26) S. HAYASHIDA: *Agric. Biol. Chem.*, 141 (1975)
- 27) 林田晋楽: 澱粉科学, 32, 177 (1985)