

## バレイショでん粉の高度利用技術の開発 (第2報)

—カビ (*Aspergillus* 属) の生産するでん粉分解酵素について—

中川 良二, 宇野 豊子

Useful Utilization of Potato Starch (Part II)  
— Starch Degrading Enzyme from *Aspergillus* sp. —

Ryoji NAKAGAWA, Toyoko UNO

## 抄 録

薄く切った木板に発生した数種のカビから分離した *Aspergillus* 属菌を振盪培養, 菌体内からでん粉分解酵素を得た。本酵素は硫酸塩析, Sephacryl S-300 ゲル濾過クロマトグラフィー及び DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィーの手順で部分精製された。部分精製酵素は至適 pH4.5, 至適温度 60°C であり, pH3~6 で安定性を維持した。また Hg イオンで活性の阻害がみられ, 0.1M 以上の緩衝液濃度での反応は酵素活性を急激に低下させた。本酵素は生の米でん粉粒をよく分解したが, バレイショでん粉粒に対してはほとんど作用しなかった。でん粉分解物はグルコース以外に 2 つ認められ, これら生成物はペーパークロマトグラフィーからマルトテトラオースとマルトペンタオースであろうことが示唆された。

## 1. 緒 言

でん粉は高等植物種子や根茎などの貯蔵器官に多く含まれる炭水化物であり, 食糧資源, 工業原料, エネルギー資源として重要なバイオ産物である。現在, 我国のでん粉生産量の約 63% がでん粉糖の製造に使用され, ここ 15 年間で異性化糖の需要増加に伴いでん粉糖の生産は飛躍的に増大した。でん粉の糖化には酵素糖化法が用いられ, 酵素反応を行なうためには予めでん粉を高温で糊化しなければならない。そのため多大なエネルギーを必要としている。そこでオイルショックを境にでん粉を糊化することなく生の状態で分解しようという無蒸煮糖化法の開発が検討され始め, 生でん粉分解酵素の探索が活発に行われた。ところが, 以前から生でん粉は糊化でん粉に比べて極めて酵素分解され難いと言われ, 実際に生でん粉を完全に分解する酵素の発見は非常に困難なものである。その中であって今までに幾つかの有望な酵素が発見

されている。

強力な生でん粉分解酵素としては *Chalara paradoxa*<sup>(1)</sup>, *Aspergillus* sp.K-27<sup>(2)</sup>, *Corticium rolfsii*<sup>(3)</sup> 起源のグルコアミラーゼ, *Bacillus circulans*<sup>(4)</sup> 起源の  $\alpha$ -アミラーゼなどが知られている。*C.paradoxa* のグルコアミラーゼは 1% 米, モチトウモロコシでん粉を 24 時間でほぼ完全に糖化したが, バレイショでん粉は 10% 程度しか分解しなかった。*Aspergillus* sp.K-27 及び *C.rolfsii* のグルコアミラーゼは各種起源の生でん粉を非常によく分解した。特に, 分解され難いバレイショでん粉に対して比較的よく作用した。*B.circulans* の  $\alpha$ -アミラーゼは他起源の  $\alpha$ -アミラーゼに比べてかなり強いでん粉分解力を持ち, バレイショ生でん粉を 1 日で約 50% 分解した。しかしながら, これらのアミラーゼは優れた生でん粉分解能を有しているが, 工業的に応用されるまでには至っていないのが現状である。

我々は農林水産省の委託研究であるバレイショでん粉

の高度利用技術開発に関する研究の一環として、新規の生でん粉分解酵素の検索を行なった。その結果、薄く切った木板に発生した数種のカビから単離した *Aspergillus* 属の菌に生でん粉分解酵素のあることを発見したので報告する。

## 2. 実験材料及び方法

### 2.1 試薬

バレイショでん粉粒は中央農業試験場で調製したものを使用した。米でん粉粒は島田化学製、可溶性でん粉は MERCK 製のものを用いた。Sephacryl-300 グルはファルマシア製、DEAE-セルロースは BUROUN 製であった。マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオースは生化学用（キシダ化学製）を使用した。その他の試薬類は全て市販のものを用いた。

### 2.2 菌体の分離、培養及び同定

供試菌体は薄く削った木板に生えたカビの 1 種であり、菌体の分離にはポテトデキストロース寒天培地を用い 25℃、4 日間の培養を繰り返し、分離した。菌体の培養は糖源として 3% ショ糖を添加した 51 Czapek 液体培地<sup>(5)</sup>を用いて 25℃、7 日間振盪培養し行った。菌体の同定はポテトデキストロース寒天培地をスライド培養し顕微鏡観察にて行った。

### 2.3 還元糖量及び蛋白質量の測定

培養液及び菌体内の還元糖量は Somogyi-Nelson 法<sup>(6)(7)</sup>によりグルコース検量線から定量した。カラムクロマトグラフィーによる分画溶液の蛋白質分析は、日立製 200-20 型ダブルビーム分光光度計で 280 nm の吸光度を測定した。酵素の精製段階での蛋白質量は Bradford の方法<sup>(8)</sup>により定量した。標準物質は牛血清アルブミンを用いた。

### 2.4 でん粉分解活性の測定

25ml 容試験管に酵素溶液 0.1ml を取り、2% 可溶性でん粉（予め、沸騰水中で糊化させたもの）0.35ml、マツキルベン緩衝液（pH4.5）0.2ml を加え、さらに蒸留水で 1ml に合わせ、40℃、30 分間インキュベーションした。反応後直ちに沸騰水槽中で 5 分間加熱し、Somogyi-Nelson 法で還元糖を測定した。酵素活性は上記条件で

1 分間に 1  $\mu$  モルのグルコースに相当する還元糖を生成する量を 1 ユニット (U) とした。

### 2.5 透析

試料をセルロースチューブの透析膜（Viskase sales corp 製）に入れ、低温室中で蒸留水に対して透析した。透析溶液は必要に応じてコロジオンバック（Sartorius 製）を用いて濃縮した。

### 2.6 菌体のホモジネイト

吸引濾過後の菌体を 50mM リン酸緩衝液（pH6.0）に懸濁、そして Excel-Auto ホモジナイザー（日本精機製）で  $1.4 \times 10^4$  rpm、2 分間ホモジネイトした。

### 2.7 生でん粉分解反応

30ml 容バイアルに酵素溶液 2U を取り、生でん粉 1.14g、マツキルベン緩衝液（pH4.5）1ml を加え、蒸留水で 10ml に合わせ、45℃で一定時間インキュベーションした。0.5M 炭酸ナトリウム 2.5ml を添加し反応を止め、Somogyi-Nelson 法により還元糖量を測定した。分解率はグルコース検量線を基準に算出した。

### 2.8 ペーパークロマトグラフィー

試料をアドバンテックトローヨー製フィルターペーパー No.50 上にスポットした。展開溶媒はブタノール：ピリジン：水 = 6 : 4 : 3 を用い、室温で多重展開（上層法）した。ペーパーを乾燥後、アルカリ性硝酸銀法<sup>(9)</sup>で発色した。

## 3. 実験結果

### 3.1 供試菌体の同定

本菌体のコロニーはポテトデキストロース寒天培地上 25℃、4 日で 4cm ほどに達した。コロニーは黒色であった。顕微鏡観察により、直立した分生子柄の密集した菌糸層がみられ、分岐した分生子柄は認められなかった。また頂のうは亜球形であり、分生子頭は放射状であることが確認された（図 1a）。分生子は球形、褐色、粗面であった（図 1b）。以上の特徴から本菌体は *Aspergillus* 属と同定した。

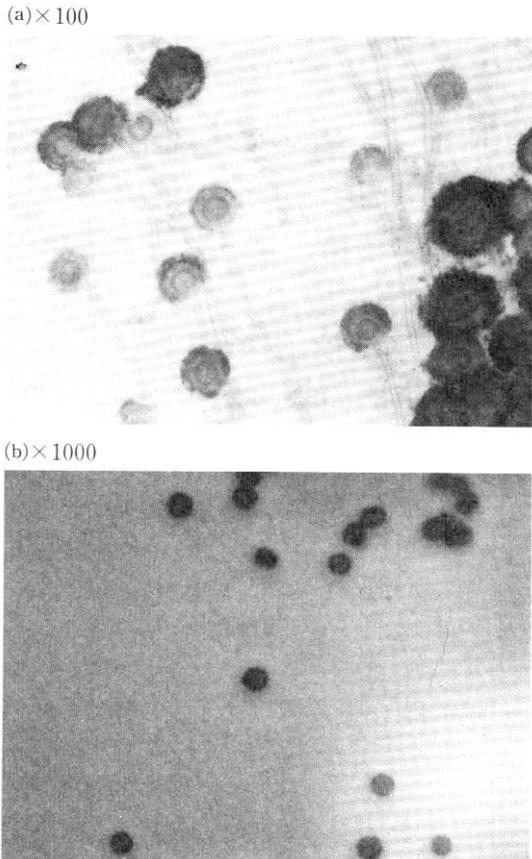


図1 *Aspergillus* sp. の顕微鏡写真

3.2 培養中の酵素活性及び還元糖量の培養期間による変動

培養菌体の可溶性でん粉分解活性は、吸引濾過後に培養液と菌体にわけて測定した。培養液中の活性は4℃、5000rpm、10分間の遠心分離後、蒸留水中で透析した溶

液を用いて得られた値である。菌体中の活性は50mMリン酸緩衝液(pH6.0)中でホモジネイト後濾過、濾過液を4℃、5000rpm、10分間の遠心分離、得られた上澄液を透析した溶液の測定値である。図2aに記したように、菌体内の活性は培養後4日目まで最大に達し、その後ほぼ一定の値で推移した。また、培養液中には殆ど活性がなかった。この結果は本菌体が菌体外(すなわち、培養液中)に可溶性でん粉を分解する酵素を分泌しないことを示唆する。

培地に添加したショ糖は非還元糖である。しかしながら、図2bに示したように培養液中の還元糖量は3日目で54mg/mlまで増加した。このことは菌体の増殖によってショ糖を分解する酵素が菌体外に分泌されているか、ショ糖を菌体内に取り込み分解後体外に放出しているか、または体内で合成した還元糖を新たに分泌しているとも考えられる。ショ糖の代わりに可溶性でん粉を添加した培地中で本菌体の増殖は認められなかった。

以下の実験は菌体内に含まれるでん粉分解酵素を用いて行った。

3.3 粗酵素液における可溶性でん粉の分解

実験方法に記した条件で培養した菌体を50mMリン酸緩衝液(pH6.0)中でホモジネイトした後濾過した。濾過液を4℃、5000rpm、10分間遠心分離し得られた上澄液を蒸留水で透析した。透析した溶液を粗酵素液とした。

実験方法の手順に従い粗抽出液でのでん粉分解活性を測定した。全活性は54.8U、比活性は1.65U/mgタンパク質であった。

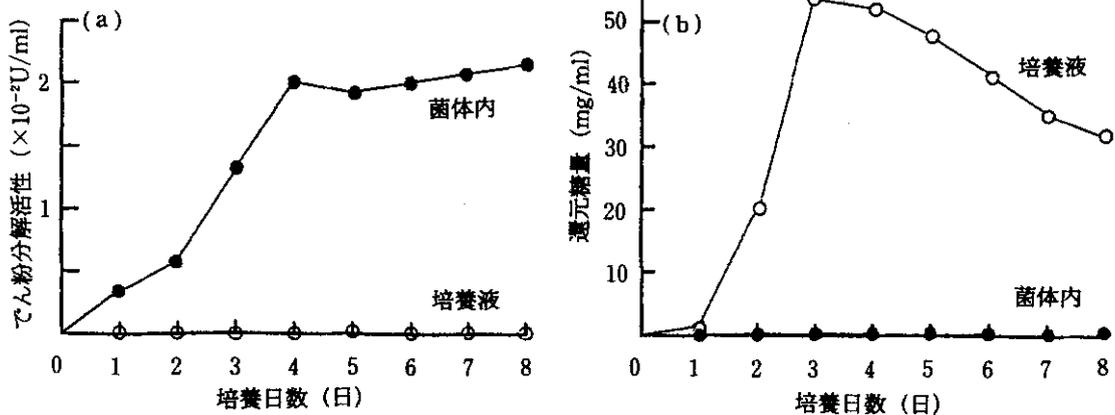


図2 *Aspergillus* sp. 菌体の培養中におけるでん粉分解活性(a)及び還元糖量の変動(b)

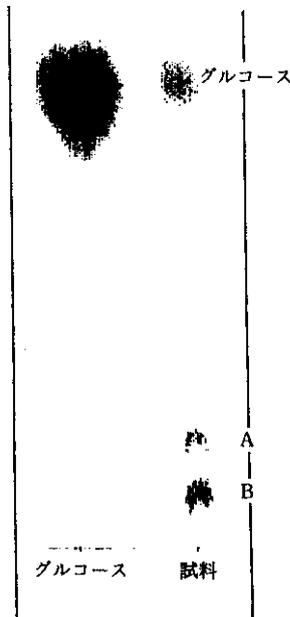


図3 *Aspergillus* sp. 粗酵素液の可溶性でん粉への作用における反応生成物のペーパークロマトグラム

また、実験方法に記した生でん粉分解反応に従い、48時間後の反応溶液を用いてペーパークロマトグラフィーを行った。でん粉分解物はグルコースのスポット以外に2つのスポットが認められた。以下、これら2つのスポットはA及びBと呼ぶことにした(図3)。

### 3.4 酵素の部分精製

粗酵素液に含まれるでん粉分解酵素の特性を明らかにするために、以下の手順で酵素の精製を試みた。

硫酸塩析；粗酵素液を10%飽和硫酸で塩析、遠心分離(7000rpm, 20分間)後上澄液を得た。上澄液に対して80%飽和硫酸で塩析、遠心分離(7000rpm, 20分間)後沈殿を回収した。沈殿は少量の10mMリン酸緩衝液(pH6.0)に溶解し、蒸留水に対して一晚透析した。透析溶液を用いて蛋白質量及び活性を測定した。

Sephacryl S-300 ゲル濾過クロマトグラフィー；80mM塩化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したSephacryl S-300カラム(2.65×80cm)に試料を添加し、同緩衝液を溶媒としてゲル濾過を行った。流速は5.5ml/min, 1画分当たり100滴/チューブで分画を行った。溶出パターンは図4に示した。活性画分(No.45~48)を集め、蒸留水に対して一晚透析した。透

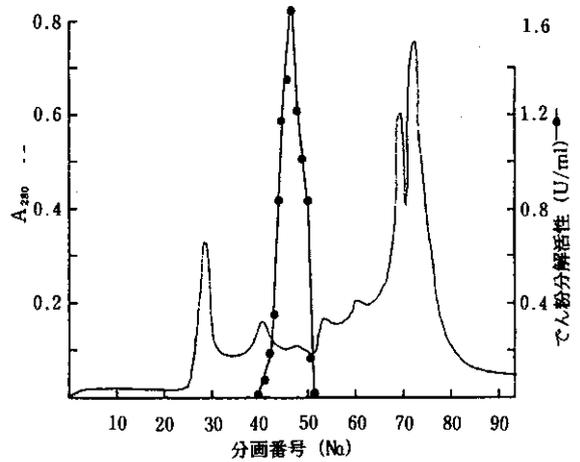


図4 *Sephacryl* S-300による*Aspergillus* sp. でん粉分解酵素のゲル濾過クロマトグラフィー溶出パターン

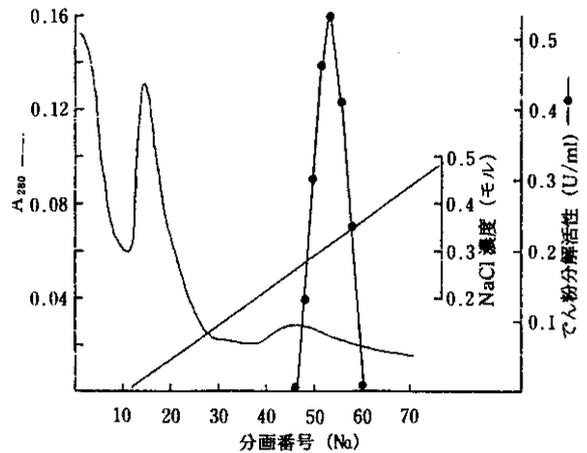


図5 *Aspergillus* sp. でん粉分解酵素のDEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー溶出パターン

析した溶液を蛋白質量測定、活性測定に供した。またこのものをDEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィーの試料とした。

DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー；10mMリン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したDEAE-セルロースカラム(2.0×16cm)に上記試料を添加し、カラム容量以上の同緩衝液を流した。溶出は0~0.5M塩化ナトリウムを用いて、直線濃度勾配で行った。溶出パターンは図5に載せた。活性画分(No.52~56)を集め、蒸留水に対して一晚透析したのち蛋白質量及び活性測定

表1 *Aspergillus* sp. のでん粉分解酵素の精製ステップ

精製ステップ	全活性 (U)	蛋白質 (mg)	比活性 (U/mg)	精製度	回収率 (%)
粗抽出液	54.8	33.2	1.65	1	100
硫酸塩析	49.4	8.8	5.61	3.4	90.2
Sephacryl S-300	30.2	1.0	30.20	18.3	55.1
DEAE-セルロース	8.1	0.03	270.00	163.6	14.6

に供した。

以上の精製結果は表1に要約した。本酵素は粗酵素液の約164倍に精製され、比活性が270U/mg、回収率が15.6%であった。

3.5 部分精製酵素の性質

Sephacryl S-300によるゲル濾過画分(No.45~48)を用いて本酵素の幾つかの性質を調べた。

至適pH及び安定pH；部分精製した酵素の至適pH及び安定pHを測定した。至適pHはpH4.5付近にあ

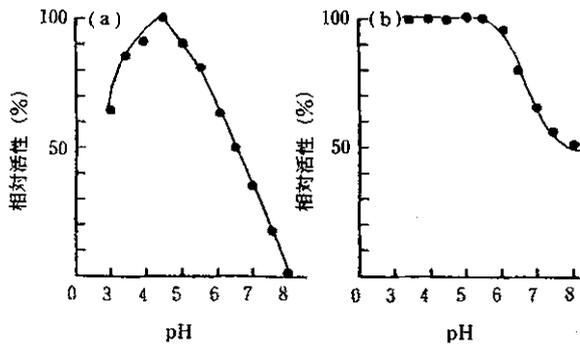


図6 *Aspergillus* sp. のでん粉分解活性に及ぼすpHの影響(a)及びpH安定性(b)

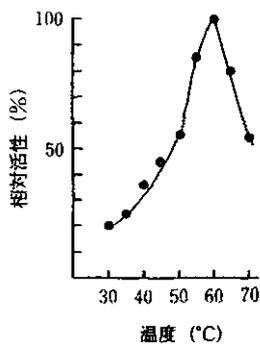


図7 *Aspergillus* sp. のでん粉分解活性に及ぼす温度の影響

表2 *Aspergillus* sp. のでん粉分解活性に対する金属イオン及び数種化合物の影響

	相対活性 (%)
None	100
CaCl <sub>2</sub>	100
MgSO <sub>4</sub>	99
ZnSO <sub>4</sub>	102
CuSO <sub>4</sub>	98
MnCl <sub>2</sub>	90
FeSO <sub>4</sub>	102
AgNO <sub>3</sub>	101
SnCl <sub>2</sub>	118
BaCl <sub>2</sub>	104
CoCl <sub>2</sub>	98
HgCl <sub>2</sub>	20
EDTA	99
SDS	100
DTT	100

り(図6a), pH3.0~6.0で酵素活性が安定(図6b)であった。

至適温度；本酵素の至適温度は図7に記したように、実験方法に示した条件下では60°C前後であった。

金属イオン及び数種化合物の影響；2mM濃度での各種金属イオン及び数種化合物の影響について検討した(表2)。Snイオンにより活性の僅かな増加がみられ、Hgイオンにより強い阻害を受けた。

塩濃度の影響；酵素活性は反応混合液中の緩衝液濃度に影響を受け(図8)、60mM濃度以上のマッキルベン緩衝液及びリン酸緩衝液中で急激に減少した。0.4M以上のリン酸緩衝液中では活性を消失した。

生でん粉分解；ジャガイモでん粉粒、米でん粉粒及び

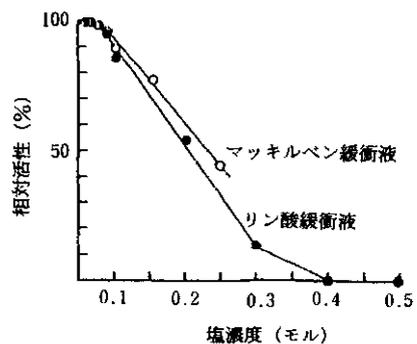


図8 *Aspergillus* sp. のでん粉分解活性に及ぼす塩濃度の影響

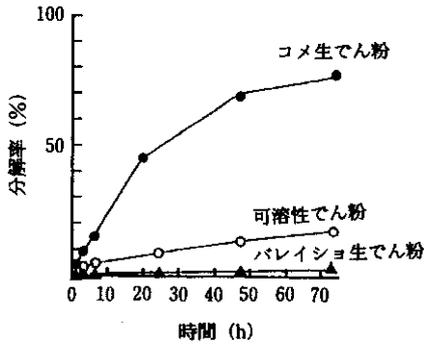


図9 *Aspergillus* sp. のでん粉分解酵素による各種澱粉の加水分解曲線

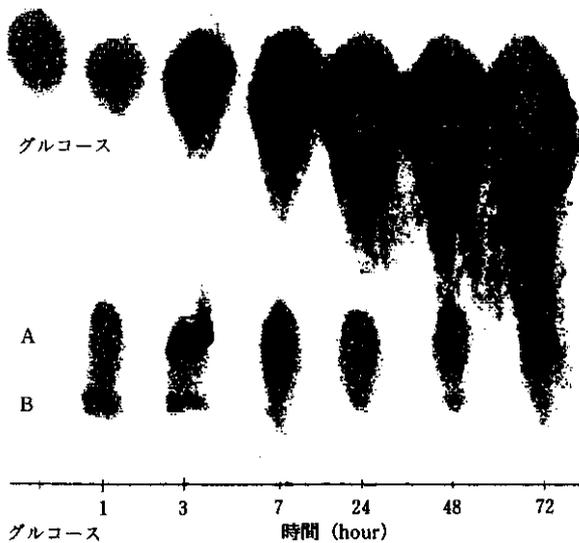


図10 *Aspergillus* sp. の部分精製したでん粉分解酵素の米生でん粉への作用における反応生成物のペーパークロマトグラム

可溶性でん粉を基質として、実験方法に記した手順で分解反応を行った。図9にでん粉分解の経時変化を示した。米でん粉粒は72時間で約80%分解されたが、ジャガイモでん粉粒はほとんど分解されなかった。ペーパークロマトグラフィーの結果から、ジャガイモでん粉粒、米でん粉粒及び可溶性でん粉のいずれもからグルコース、A及びBのスポットが確認された(図10に、米でん粉粒のペーパークロマトグラフィーによる結果のみを載せた)。A及びBは多重展開を繰り返したペーパークロマトグラフィーから、純粋なマルトオリゴ糖とのRf比よりマルトテトラオースとマルトペンタオースであることが示唆された(図11)。

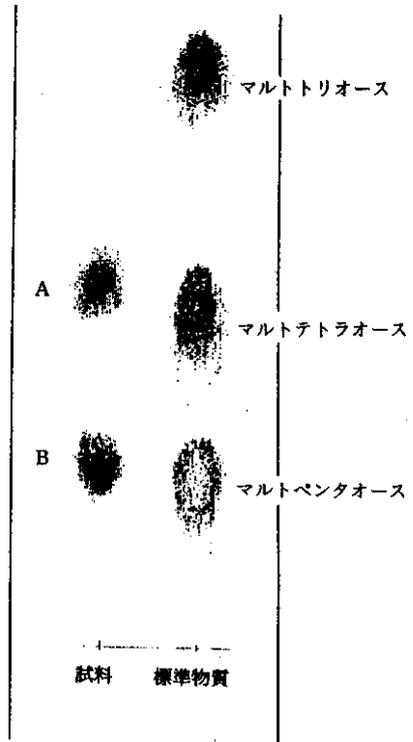


図11 A, Bのペーパークロマトグラフィーによる標準物質との比較

*Aspergillus* 属からのでん粉分解酵素はグルコアミラーゼを中心に多くの報告がなされてきた<sup>(10-15)</sup>。これらの酵素はいずれも至適pHは4.0~5.0にあり、他の性質も非常に類似していた。本研究に用いた *Aspergillus* 属酵素も pH4.5 まで至適値を示し、本実験で調べられた幾つかの性質から他起源の酵素に近い酵素であろうと考えられる。

本酵素はでん粉分解物としてグルコース以外に2つのオリゴ糖と思われる物質を生成した。これらの物質はマルトテトラオースとマルトペンタオースであると示唆され、他のオリゴ糖のスポットは検出されなかった。生成物にグルコースも見られることから複数の酵素が作用している可能性もある。しかしながら、生でん粉を基質としては特異的なオリゴ糖を生成する酵素に関する報告はほとんどなく、本菌体から生でん粉を基質として限られたオリゴ糖が生成されたことは価値がある。

我々の研究目的はバレイショでん粉を酵素処理し新規でん粉分解物を得ることにある。バレイショでん粉は粒

形が大きく、リン酸含量が非常に高く、高粘度であることなどの特徴をもつ。粒子が大きいことは酵素分解速度を低下させる。またでん粉に結合したリン酸は酵素による分解を停止させるらしい。これらがバレイショでん粉が酵素分解されにくい理由として挙げられている。本実験で用いた菌体の酵素もバレイショでん粉を僅かに分解するだけであった。バレイショでん粉を高度利用するためにはバレイショでん粉のこのような特徴は何に起因するのか、なぜバレイショでん粉は酵素分解されにくいのかを解明することが必要であろう。そしてバレイショでん粉固有の性質から特有のでん粉分解生成物が効率よく得られることを期待する。

## 5. 要 約

農林水産省の委託研究であるバレイショでん粉の高度利用技術開発に関する研究の一環として、新規の生でん粉分解酵素の検索を行なった。その結果を以下に要約する。(1) 供試菌体は薄く切った木板に発生したカビである。(2) 本菌は検鏡により *Aspergillus* 属と同定した。(3) Czapek 液体培地による振盪培養において、でん粉分解酵素は菌体内に存在した。(4) 本酵素は硫安塩析, Sephacryl S-300 ゲル濾過クロマトグラフィー及び DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィーの手順で部分精製された。(5) 部分精製酵素を用いて調べられた幾つかの性質は他起源のアミラーゼに近い性質を示した。(6) 本酵素は生でん粉である米でん粉粒をよく分解したが、バレイショでん粉粒は殆ど分解しなかった。(7) でん粉分解物はグルコース以外に 2 つ認められ、これらはペーパークロマトグラフィーからマルトテトラオースとマルトペンタオースであろうことが示唆された。

## 6. 参考文献

- 1) Kainuma, K., Ishigami, H. and Kobayashi, S. : J. Jpn. Soc. Starch Sci., 32, 136, (1985).
- 2) 安部淳一, フレデリコ W. ベルグマン, 小幡和哲, 檜作進 : 澱粉科学, 32, 128, (1985).
- 3) Sasaki, H., Kurosawa, K. and Takao, S. : Agric. Biol. Chem., 50, 1661, (1986).
- 4) Taniguchi, H., Odashima, F., Igarashi, M., Maruyama, Y. and Nakamura, M. : Agric. Biol. Chem.,

- 46, 2107, (1982).
- 5) 宇田川俊一, 室井哲夫訳 : 「カビの分離・培養と同定」, p23, (1983).
- 6) M. Somogyi. : J. Biol. Chem., 195, 19, (1952).
- 7) N. Nelson. : J. Biol. Chem., 153, 375, (1944).
- 8) M. M. Bradford. : Anal. Biochem., 72, 248 (1976).
- 9) 中村道徳, 貝沼圭二編 : 「澱粉・関連糖質実験法」, P237, (1986).
- 10) Hayashida, S. and Yoshino, E. : Agric. Biol. Chem., 42, 2149, (1978).
- 11) Pazur, J. H. et al. : Carbohydr. Res, 21, 83, (1971).
- 12) Yamasaki, Y. et al. : Agric. Biol. Chem., 41, 2149, (1977).
- 13) Miah, M. N. N and Ueda, S. : Starke, 29, 235, (1977).
- 14) Lineback, D. R. and Bauman, W. E. : Carbohydr. Res., 14, 341, (1970)
- 15) Takahashi, T. et al. : J. Biochem., 89, 125, (1981).