

た。ヌアセトン、エチルアルコール80%沈澱物については明らかな効力がみられなかつた。

3) 培養液を 8,000r.p.m で遠沈し、その上澄液を Berkefeld 濾過器で濾過した液については効力がなかつた。又 4,000r.p.m で遠沈後更に 8,000r.p.m で遠沈して生じた沈澱物には明らかな作用がみられなかつた。

甘露崩壊作用に関係するこの菌の酵素は単一でなく2種以上の系が関与していると思われるのでこれらの系が菌体外酵素か或は菌体内酵素かを決定するのは以上の実験結果だけからでは断定出来ず、更に実験をすすめる必要がある。

なお、詳細は別紙に報告の予定である。

文 献

- 1) 鹿工誌業務報告 昭和28年度 P27
- 2) 本江, 栗栖: 日農化 33 286 (1959)

4.2.6 黒カビによる糖化酵素の生産

糖化率D/Tを高めるための酸処理と培養条件

川原一 松久保好太朗

黒カビの生産する糖化酵素の欠点の一つは、デンプンの最終分解限度(糖化率)が、リゾプス属の酵素に比べ、かなり低い事である。

著者等は前報において、この点の改良について予備的に検討した結果、培養濾液を酸処理することによつて、JAS規格に定めるDE97の精製ぶどう糖の製造用酵素剤として充分使用出来ることを知つた。又この性質を利用してD/T比の高い培養で強生酸性菌株を使用して、最終PHの低い培養液を得ることが、工業的酵素生産には有効な手段となることを予報した。

本報では粗酵素液を種々のPHで処理した場合のD/Tの向上について基礎的に検討し、これがトランスグルコシダーゼの除去に因ることを明らかにすると共に、酵素力価を高めると同時に糖化率の高い培養液を得るには培養組成を適当に選択し、最終PHを低下させることが一応の目安となることについて実験の結果を報告する。

結果の要旨

1, Asp. Usamii に属するクエン酸生産菌株 945-k 株の培養によつて得られた粗酵素液は

デンプンの最終糖化率(D/T) 94~96%に止まるが、之をPH2.3, 40°C時間処理すればD/T 97以上に向上することは前報の通り。

(前報PHI.8とあるは、PH試験紙TBによる値で正確にはガラス電極でPH2.3 内外となる)

その理由として次の事が実験の結果から考察された。

A) トランスグルコシダーゼの存在する複合酵素において糊精化力(D.P.)を消去して、糖化力との比(S/D)を高める事は、一見有効な手段と考えられるが、実験の結果からは、この事は必ずしも肯定出来ない。即ちD/Tの伸びはD.P.の除去による結果とは認め難い。

この事は、酸処理酵素液に細菌の α -アミラーゼを添加してS/D比を原組成にもどしてもD/Tに何等の変化も見られないことから立証された。何れにしても黒カビの糊精化力がD/T 94内外から97内外への変化に及ぼす影響は殆んど無視して良いだろう。

B) そこで酸処理酵素液のトランスグルコシダーゼ(TrG)の変化を調べると、PH2.3附近から急激に減少しそれ以下のPHでは殆んど大部分失活することが分つた。それとD/Tの伸びとの関係には明らかに高い相関が認められる。次に、従来報告されている塩基性醋酸鉛によるTrGの除去法をこの場合に應用して見ると明らかにD/Tが向上したことから、酸処理によつて、TrGが除去されたことが証明される。

C) 之等の酵素液で得られた糖化液の糖組成を、酵母法及びペーパークロマトグラムの切り抜き法で定量して検討した結果、予期した如く酸処理区分ではオリゴ糖が減少し、それと共にグルコース含量が高くなつて、所謂糖転移作用が阻止されていることが認められた。

以上の実験結果から、PH2.3 40°C 3時間処理すれば、原酵素液に混在するTrGが殆んど完全に消去出来ることを明らかにした。しかもこの条件において見掛けの糖化力及び真のグルコアミラーゼの失活は僅かに5~7%の損失に止まり、極めて効率的なTrGの除去法といえよう。

従来、トランスグルコシダーゼの除去を目的として粗酵素液の酸処理を行なつた報告は未だ見られない。黒カビの如く耐酸性アミラーゼを生成する菌類においては、処理条件を適当に選べば、それ等が生成する複雑な酵素系から酸に対する抵抗力の差を巧みに利用して、目的とする酵素特性への改変が可能であることを示すものである。同時に著者等の菌株が生成する糖化酵素はこれに僅かに混在する TrG を除去すれば、DE97 のブドウ糖製品の酵素剤として充分利用出来ることを明らかにした。

2. 前実験の結果から、TrG は他のアミラーゼに比べて耐酸性が若干劣ることが考えられるので、この性質を利用すれば、黒カビの培養過程において PH を必要な程度に調節するか、或は培養の最終 PH を下げる様な、菌株の選定、又は培養条件の改変等は、TrG を含まない糖化酵素生産の上に有効と考えられる、以下これ等の見地から行なつた実験結果の概要を述べる。

A) TrG の生成力の強い菌株 945-KN の培養において、培養途次における PH の調節を行なつた結果では、D/T の上に明らかな影響が見られる。即ち無処理区に対して 40~70 時間目に夫々 PH を下げるため、 $2N-H_2SO_4$ の適量を加えて培養した区では何れも D/T 97% 以上の酵素液が得られている。そしてこれ等の最終 PH は対照の 3.0 に対して 2.3~2.5 内外に下ること、且 S/D の上から見て特別な関係は認められないことから、低 PH による TrG の失活と考えられる。次に培養終了直前 3 時間前に PH を下げた区分においても前実験の結果と同様な効果が得られ D/T 97% 以上に達していることと同時に、力価の顕著な低下が起らないことから工業的に応用され得る方法である。

B) 次に考えられることはこのように培養過程において人為的に PH を調節することなく、菌自身の生成する酸によつて最終 PH を下げる方法が挙げられるので、前記の 945-KN 株の人工変異株（紫外線照射による）を造つて、生酸性と力価の点からスクリーニングした。その結果得られた Colour mutant の中には適株は無かつたが、形態的に Conidial Head の小さい

もの、又 Steril type のものの中に高力価、低 PH で明らかに D/T の伸びる株が得られて、その 1 株 945-u-8 を選定した。この株は培養液の力価 $SP_{20U/l/ml}$ 内外、最終 PH は最低 2.3 低下し、デンプンの糖化率 96~97% に達する菌株である。

C) 選定した 945-u-8 株について、その培養条件を主として D/T の点から検討した。第 1 報で選定した黴、デンプンを主体として、 PO_4 源、N 源について再検討した。

その結果黴 5%，デンプン 4% を基本組成とすれば KH_2PO_4 と K_2HPO_4 とでは後者が SP は高いが何れも PH が 3.0 内外に止まり、従つて D/T 96 内外にしか伸びない。又 Ca-phosphate は更にこの点が劣る。

又同様な基本培地に代表的な無機 N 源として $NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3 を使用した例では、SP の値は $NaNO_3$ が最も高いが、PH は NH_4NO_3 0.3% で 2.0、0.1% で 2.4 となり、D/T は夫々 97 以上を示す。 $(NH_4)_2SO_4$ はその中間にあつて PH—2.5 内外で D/T 96% 台に終る。

次に K_2HPO_4 と NH_4NO_3 の組同せについては K_2HPO_4 0.2%, NH_4NO_3 0.2% で SP 24 内外が得られるが PH は 2.5 と高く D/T が伸びない。即ちこの両者においては NH_4NO_3 の影響が大きく、 PO_4 源の添加は無用と考えられる。

D) 界面活性剤添加の影響について、黴 5% デンプン 4%， $NaNO_3$ 1.2% の培地に一定量の界面活性剤を添加して培養した結果、両性活性剤のリポミン SH, OH, COH は SP, DP, D/T に何等の影響も及ぼさない、非イオン活性剤のリポノックス I, C, R は SP には変化はないが DP は殆んど生成しない。然しこの事は D/T を上げる上には何等の影響も認められなかつた。

（本報の詳細は別に投稿中）