九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

黒麹菌Aspergillus awamori var. kawachiiのUVおよび^60Co-γ線照射による変異 : トランスグルコシダーゼ欠損株の分離

太田, 欽幸
九州大学農学部醗酵学教室

上田, 誠之助
九州大学農学部醗酵学教室

https://doi.org/10.15017/23016

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 23 (4), pp.185-190, 1968-09. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

第23巻 第4号　九州大学農学部学芸雑誌　昭和43年9月

黒麹菌 *Aspergillus awamori* var. *kawachii* の UV および ^{60}Co-γ 線照射による変異

トランスグルコシダーゼ欠損株の分離

太田欽幸・上田誠之助

Mutation of *Aspergillus awamori* var. *kawachii* by irradiation of UV and ^{60}Co-γ rays

Isolation of transglucosidase-less mutants

Yoshiyuki Ohta and Seinosuke Ueda

緒　言

糸状菌糖化酵素を用いるブドウ糖製造工業において強力な糖化酵素を産生する菌株を選択することは重要な問題の一つである．糖化酵素としては，デンプンを直接グルコースに加水分解できる強力な糖化型アミラーゼと，適当量の液化型アミラーゼとを含み，しかも *Aspergillus* 属の菌株が産生する酵素にみられるような非発酵性糖（たとえば，イソマルトース，パノースなど）を生成するトランスグルコシダーゼを全く含まないものが最も優れているとされている．現在これらの目的に適つた酵素を産生する菌株として *Rhizopus* 属が用いられている．しかし *Rhizopus* 属は経済的に有利な液体培養を行なうことが困難であり，現状では主として固体培養を行ないそれから糖化酵素を得ている．液体培養が可能である麹菌 *Aspergillus* 属に種々の変異剤を作用させて優良な変異株を得る試みは色々となされている（井口，1953；富金原，1960；飯塚，1961；務台，1961）．しかしトランスグルコシダーゼ欠損変異株が得られたという報告は全くない．

液体培養が可能であり，強力な糖化型アミラーゼを産生する黒麹菌の一種である *Aspergillus awamori* var. *kawachii* に紫外線，^{60}Co-γ 線を照射してトランスグルコースダーゼ欠損株を得る目的で研究を行なつた．

材　料

紫外線（UV）の線源としてマツダ殺菌灯（10 W）を用いた．^{60}Co-γ 線の線源として九州大学工学部の Cage 型（^{60}Co ペレット，1 mmϕ×1 mm，比放射線能 6.9 curie/g）の ^{60}Co-γ 線照射装置を用いた．ペーパークロマトグラフィー用の濾紙には東洋濾紙 No. 50 を用いた．トランスグルコシダーゼの基質には和光純薬工業株式会社製のマルトース(一級)を用いた．使用菌株は米麹として保存している *Aspergillus awamori* var. *kawachii* を用いた．

方　法

1）酵素力価の測定

i）総合アミラーゼ：デンプンに対する糖化型アミラーゼと液化型アミラーゼの総合力はつぎのようにして測定した．可溶性デンプン 2 % 溶液 3 ml と 0.1 M のクエン酸緩衝液（pH 4.0）2 ml を 40°C に予熱し，酵素液 1 ml を加えよく混合し 40°C, 10 分間反応させた．反応後 1 ml を採取しミクロベルトラン法で生じた還元糖を定量した．上記の反応条件で反応液 1 ml 中に 0.1 mg の還元糖を増加させる酵素の力価を 1 単位と定義した．

ii）糖化型アミラーゼ（SA）：液化型アミラーゼが混在している酵素液から糖化型アミラーゼ活性のみを選択的に測定できる Residual dextrin value 法（富金原，1955）をつぎのように改変して用いた．富金原の方法に従いデンプンにタカジアスターゼを作用させて平均重合度が 10～11 個のグルコースからなつているデキストリンを調製し，これを基質として用いた．この基質 2 % 溶液 1 ml（この中の 1/3 容は pH 4.0 の 0.1 M のクエン酸緩衝液である）を 40°C に予熱し，酵素液 0.5 ml を加えて，40°C，2 時間反応させた．

反応後，反応液全量中の還元糖をミクロベルトラン法で定量した．上記の反応液中に 0.1 mg の還元糖を増加させる酵素の力価を1単位と定義した．

iii) 液化型アミラーゼ (DA)；可溶性デンプン1％溶液5 ml に 0.05 M の酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1 ml と蒸留水1 ml を加え 40°C に予熱した後，酵素液 0.5 ml を加え 40°C で反応させた．適時に反応液 0.5 ml を採り，0.01 M のヨード溶液1 ml に加え Sandstedt の赤色 (Sandstedt, 1939) に達する時間 (分) を測定した．その時間 (分) の逆数に 100 を乗じた値を液化型アミラーゼの力価の単位とした．

iv) トランスグルコシダーゼ (TD)：pH 4.5 のクエン酸緩衝液 (0.1 M) に溶解した 20％マルトース溶液 0.5 ml に酵素液 0.5 ml を加え 40°C で2時間反応させた後，沸騰水に5分間浸漬して酵素反応を停止させ，流水で急冷させた．この反応液1 ml に 0.03 M のリン酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁させた 10％ のパン酵母溶液を3 ml 加えた．30°C に一夜放置して発酵性糖を除去した後，遠心分離 (1,000 g，5分間) によりパン酵母を分離した．非発酵性糖を含む上清液1 ml に 2 N の硫酸溶液 1 ml を加え沸騰水中で 2.5 時間加水分解を行なつた．全量に固形の炭酸水素ナトリウムを加えて中和した後，ミクロベルトラン法を用い当溶液中の還元性糖を定量した．この加水分解溶液中に 0.1 mg の非発酵性糖を生じさせる酵素の力価を1単位と定義した．

2) ペーパークロマトグラフィー

pH 4.5 のクエン酸緩衝液 (0.1 M) に溶解した 20％マルトース溶液 0.5 ml に酵素液 0.5 ml を加え 40°C 反応させ，適時に沸騰水中で5分間加熱して酵素反応を停止させた．この溶液をペーパークロトグラフィー用の試料とした．濾紙にガラスの毛細管で4回スポットし，ピリジン：n-ブタノール：水＝6：4：2.5 の溶媒系を用い上昇法により室温で3重展開を行ないアニリンフタール酸で発色させた．

結　　果

1. 紫外線 (UV) 照射による変異

i. 胞子懸濁液の調製：　米麹として保存している *Aspergillus awamori* var. *kawachii* を純粋分離して，麹寒天斜面培地に接種した．30°C で7日間培養して，胞子を形成，熟成させた．これに殺菌水を適当量加え胞子をガラス棒でかきとり，得られた胞子に混在する夾雑物を脱脂綿を用いて濾別し，胞子を遠心分離 (1,000 g，5分間) により3回洗滌した．この洗滌胞子を適当量の殺菌水に懸濁させて，セルホモジナイザーで激しく攪拌 (3,000 rpm，1分間) して互いにくつついている胞子を1個1個切りはなした．トーマの血球計を用い胞子濃度が1 ml 当り 10^7 個になるように調整した懸濁液を UV 照射に供した．

ii. UV 照射および優良株の分離：　胞子懸濁液 10 ml (10^7 個/ml) を直径 9 cm のペトリ皿に入れ (液層2～3 mm) UV を 25 cm の高さから室温で30分間照射した．ペトリ皿を時々廻転させて胞子懸濁液を攪拌した．この UV 照射線量で 10^7 個/ml の胞子は 20～30 個/ml に減少した．この照射胞子懸濁液 1 ml を 30°C で 90 時間麹寒天培地で平面培養した，生じたコロニーを白金線で丸く切り取り，100 ml 容の三角フラスコ中で 10 g のフスマ培地 (フスマ：モミ殻：バレイショデンプン＝160：14.5：14.5，水分60％) に接種し，30°C で6～7日間培養した．このフスマ麹を 50 ml の井水でトルエン存在下，室温で2時間抽出した．夾雑物を濾紙を用いて濾別し，濾液を酵素液として用いた．この酵素液を10％マルトースに 40°C で 2時間 (pH 4.5) 作用させ，反応生成物をペーパークロマトグラフィーに供し，得られた非発酵性糖のスポットが，原株の酵素液を用い得られた同スポットより小さくかつ薄いものをトランスグルコシダーゼ (TD) 力が減少した変異株として分離した．培養した 303 株の中から TD 力が減少したと思われる 16 株を選び，TD 力を定量した．最終的に TD 力の小さい変異株として2菌株を分離した．その結果は第1表に示されている．表から分るように No. 181 は原株に比較して総合アミラーゼ力は同じであつたが TD 力は 1/3 に減少していた．また No. 220 は原株に比較して総合アミラーゼ力はほぼ同じであつたが TD 力は 1/2 に減少していた．No. 181 は No. 220 に比較して胞子の着生，生育が不良であつたので，No. 220 を UV 照射によつて得られた優良株とした．

Table 1. Comparison of enzyme activities.

Strain	Total amylase Act. units/ml	Transglucosidase Act. units/ml
Wild	13.5	92.2
No. 181	13.5	29.0
No. 220	14.0	41.4

2. ^{60}Co-γ 線照射および優良株の分離

UV 照射で得られた No. 220 の TD 力をさらに減少させるために，この菌株の胞子に ^{60}Co-γ 線を照射した．胞子懸濁液の調製は UV 照射の場合と同様に行

なつた．胞子懸濁液 5 ml (10^7 個/ml) を 15 ml 容の試験管に入れ綿栓を施し，^{60}Co-γ 線を 160,000 rep. 照射した．死滅率は UV 照射の場合と同様であつた．優良変異株の分離は UV 照射による変異の場合と全く同じ方法によつた．培養した 831 株の中からペーパークロマトグラフィーで非発酵性糖のスポットの小さい 81 株を選択した．これらの菌株について TD 力を定量した結果，No. 785 が最も TD 力が小さいことが分つた．またこの No. 785 の酵素液を 10 %マルトースに 2 時間させて得られた反応液についてペーパークロマトグラフィーを行なつた結果，非発酵性糖のスポットは見い出せなかつた．しかもアミラーゼの総合力は原株のそれとほとんど変わらなかつた．この No. 785 を単胞子分離を数回くりかえして純粋にした．また継代培養をくりかえしたが TD 力は復元しなかつたので，この変異は固定されたものと思われる．第 2 表に TD 力とアミラーゼ力を示した．この No. 785 を M-1 と命名した．M-1 の胞子着生，生育は良好であり，胞子の色は原株のそれが黒褐色であるのに対しねずみ色に変わつていた．

Table 2. Comparison of enzyme activities.

Strain	Total amylase Act. units/ml	Transglucosidase Act. units/ml
Wild	14.0	98.6
No. 220*	15.5	50.1
No. 785	15.0	2.0

* Mutant strain induced by irradiation of UV rays.

Table 3. Comparison of enzyme activities.

Enzyme preparation from	SA Act. units/ml	DA Act. units/ml
M-1*	14.0	5.5
Rhizopus †	38.0	2.0

* Mutant strain induced by irradiation of ^{60}Co-γ rays.
† Enzyme preparation obtained commercially was dissolved in water (4 mg/ml).
SA : Saccharogenic amylase.
DA : Dextrinogenic amylase.

M-1 は TD 力が非常に小さいことが分つたので，その糖化型アミラーゼ (SA) 力と液化型アミラーゼ (DA) 力を市販されている *Rhizopus* 属の菌株から得られている糖化酵素剤のそれらと比較した．第 3 表に示すように，DA 力を一定にした場合，M-1 の産生する酵素は市販酵素剤に比較して SA 力は約 1/6 であつた．つまり M-1 は DA 力が SA 力に比較して非常に強力であることが分つた．つぎに，富金原の方法を用いて，粉飴を調製し (富金原，1955)，粉飴濃度 40 %で総合アミラーゼ力を一定にして糖化試験を行なつたところ，第 4 表のような結果がえられた．表から分るように M-1 から得られた酵素では約 60 %で反応が停止している．これは DA 力が SA 力より強いための結果であると思われる．つぎに，SA が強力で DA 力が小さい変異株を得る目的で M-1 に，さらに ^{60}Co-γ 線を照射した．

Table 4. Time course of saccharification.

Hour	DS/TS		
	Enzyme preparation from		
	Wild (%)	M-1 (%)	*Rhizopus* (%)
0	11.3	11.3	11.3
24	74.5	60.0	93.5
45	78.7	64.2	95.6

Reaction mixture : Dextrin powder, 20 g ; 0.01 M acetate buffer, 40 ml (at pH 4.0 and 5.0 for the enzymes from the wild strain, the mutant strain and *Rhizopus*, respectively) and enzyme solution, 10 ml (16 units/ml).
DS : Direct reducing sugar (mg).
TS : Total reducing sugar (mg).

3. M-1 の ^{60}Co-γ 線照射による変異

M-1 の SA 力を増加させる目的で富金原の方法 (富金原，1955) を用い胞子死滅率が 99.9 %になるように ^{60}Co-γ 線を照射した．胞子懸濁液の調製，優良変異株の分離は UV 照射の場合と全く同じ方法によつた．ただし，γ 線の線量は 80,000 rep にした．培養した 1350 株について SA 力，DA 力を測定し SA 力が大きく，DA 力の小さい変異株を 40 株選択した．その中から最も SA 力が大きく，DA 力の小さい菌株として No. 771 を選びこれを M-2 と命名した．M-2 は M-1 と同様に胞子の着生，生育は良好であつた．

原株，M-1，M-2 のそれぞれについて合成培地で培養を行ない，SA 力，DA 力，TD 力などについて検討した．

4. 合成培地による振盪培養

次のような合成培地を用いた(g/100 ml)：バレイショデンプン，3；$NH_4H_2PO_4$, 1.5；グルコース，0.1；$MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1；NaCl, 0.05；$MnSO_4$ 4～6 H_2O, 0.05；$ZnSO_4$, 0.01；$Fe_2(SO_4)_3$, 0.01；KCl, 0.2．培地 100 ml を 500 ml 容の振盪フラスコに入れ 30°C で往復振盪培養を行なつた．第 1，2，3 図から分るように，菌の生育は原株，M-1，M-2 の三

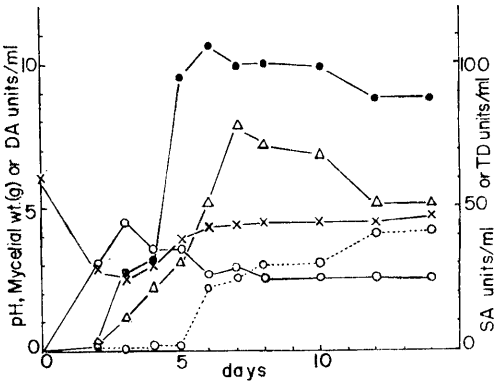

Fig. 1. Time course of growth and enzyme production by the wild strain.

x——x : pH of the cultured broth,
o——o : mycelial weight (wet weight per 100 ml),
△——△ : saccharogenie amylase activity,
o……o : dextrinogenic amylase activity,
●——● : transglucsoidase activity.
SA : saccharogenic amylase,
DA : dextrinogenic amylase,
TD : transglucosidase.

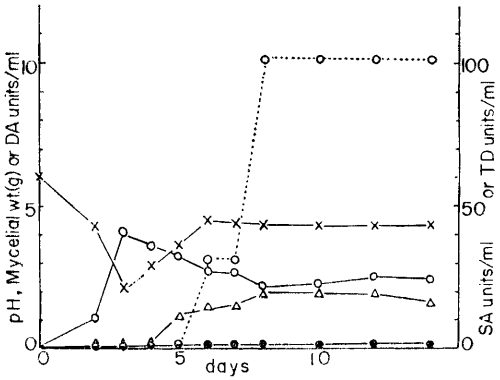

Fig. 2. Time course of growth and enzyme production by M-1.

x——x : pH of the cultured broth,
o——o : mycelial weight (wet weight per 100 ml),
△——△ : saccharogenic amylase activity,
o……o : dextrinogenic amylase activity,
●——● : transglucosidase activity.
Abbreviations are shown in the legend for Fig. 1.

者とも大体同じ時間にほぼ同じ程度に達した．SA 力は原株が最も大きく，M-1の約4倍，M-2の約2倍であつた．一方，DA 力は原株が最も小さく，M-1，M-2の約半分であつた．これから分るようにM-2のSA 力は M-1のそれより2倍強くなつただけである．

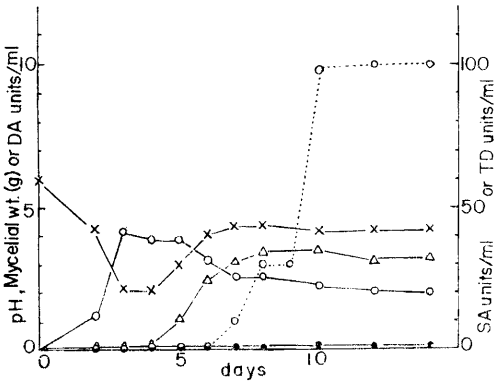

Fig. 3. Time course of growth and enzyme production by M-2.

x——x : pH of the cultured broth,
o——o : mycelial weight (wet weight per 100 ml),
△——△ : saccharogenic amylase activity,
o……o : dextrinogenic amylase activity,
●——● : transglucosidase activity.
Abbreviations are shown in the legend for Fig. 1.

しかし原株に多量に産生されている TD は M-1，M-2にはほとんど産生されていなかつた．原株，M-1，M-2から得た酵素液を10％マルトースに2時間(40℃)-作用させた反応液をペーパークロマトグラフィーに供した．その結果，第4a図から分るように，原株は培養の初期から TD を産生し，イソマルトース，パノース，デキストラントリオースなどの非発酵性糖を生成していたが，M-1，M-2 のそれぞれの酵素液は非発酵性糖に相当するスポットを全く生成していなかつた．しかし M-1，M-2 の酵素液を10％マルトースに作用させた反応物には基質が第4a図にみられるように多量に残つていた．そこで M-1，M-2 の酵素液を10％マルトースに24時間作用させた．その反応物をペーパークロマトグラフィーに供し，その結果を第4b図に示してある．第4b図から分るように長時間作用させても，やはりM-1，M-2の酵素は非発酵性糖を生成していなかつた．しかし，原株の酵素の反応物についてみられなかつたマルトトリオースのスポットが M-1，M-2 の酵素の反応物に検出された．

考　　察

強力なアミラーゼを産生する黒麹菌 *Aspergillus awamori* var. *kawachii* に UV を照射することにより，第1表に示すようにTD力が約半分に減少した変異株を得ることができた．ついで，これに ^{60}Co-γ 線

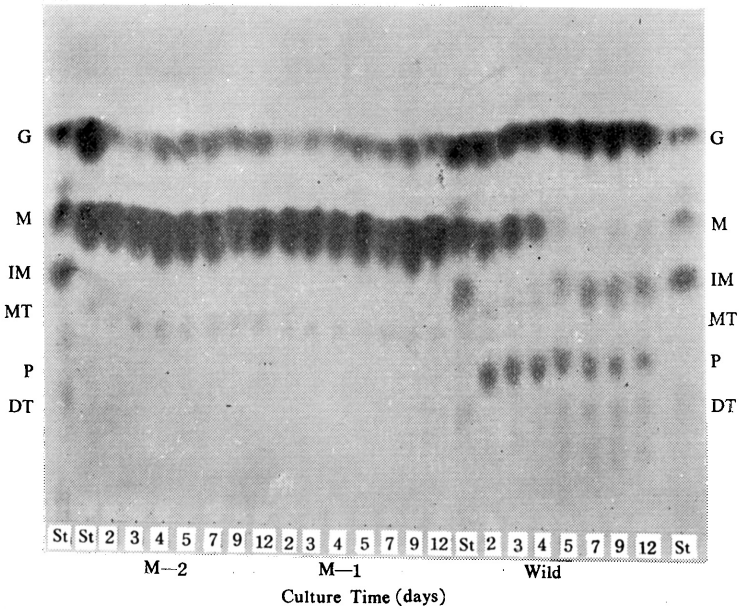

Fig. 4a. Paper chromatogram.

The procedures are shownin the text. The 2 hours reaction products were applied. G : glucose, M : maltose, IM : isomaltose, MT maltotriose, DT : dextrantriose, St : standard materials.

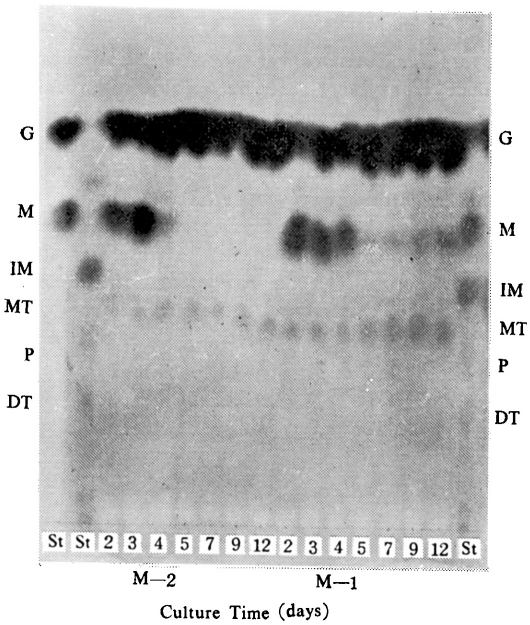

Fig. 4b. Paper chromatogram.

The procedures are shown in the text. The 24 hours reaction products were applied. Abbreviations are shown in the legend to Fig. 4a.

を照射して TD をほとんど産生しない変異株 M-1 を得ることができた．従来，TD の産生が減少した変異株を得たという報告はないのでこの M-1 は新しい変異株であると思われる．従来，変異株を得る場合，変異剤処理後の生存率が 1.0，0.1 あるいは 0.01 %になるように処理されていた．この実験では生存率が 0.0002～0.0003 % になるように行なつた．このような線量が TD の生成をつかさどる代謝機構をブロックするのに必要な量であつたと考えられる．しかし M-1 は DA 力が大きいので SA 力を増加させる目的でさらに M-1 に ^{60}Co-γ 線を照射して M-2 を得た．第2，3図にみられるように M-2 の SA 力は M-1 のそれの2倍にしかならななかつた．第3表に示すように，市販の糖化酵素剤は SA 力が DA 力よりも約20倍強いので M-2 の SA 力が現存よりもさらに数倍以上大きくならなければ実際に工業的にこの M-2 を用いることはできないであろう．しかし，TD がほとんど産生されなく，継代培養をくりかえしても TD の産生が復元されないのでこの変異は固定されたものと考えられる．またこられの変異株 M-1，M-2 は共に液体培養が可能であり，生育，胞子の着生も良好であるから，なんらかの方法たとえばこの実験に用いた以外の変異剤による変異，あるいは培地の選択などによつて

SA 力を増加させれば工業的に用いられる可能性はあると考えられる．原株と変異株を合成培地で培養して得た酵素液を10％マルトースに反応させ，その生成物をペーパークロマトグラフィーに供した．その結果，原株の酵素についてみられるようなイソマルトース，パノース，デキストラントリオースなどの非発酵性糖に相当するスポットは M-1，M-2 の酵素の反応生成物には全く見い出すことができなかつた．しかし，M-1，M-2 の酵素では原株の酵素についてみられないマルトトリオースのスポットが検出された．このことはTDの酵素的あるいは蛋白的性質が原株と変異株とで異なつたことによるのか，あるいは原株にはなかつた新しいTDが変異株にできたことによるのかはさらに今後の研究にまたなければならない．

総　　括

黒麹菌 *Aspergillus awamori* var. *kawachii* に UV，^{60}Co-γ 線を照射してトランスグルコシダーゼをほとんど産生しない変異株を得ることができた．しかしこの変異株は糖化型アミラーゼ力が原株のそれより減少し，逆に液化型アミラーゼ力が原株のそれより増加した．この変異株を合成培地を用い振盪培養を行ない，それより得られた酵素を10％マルトースに作用させた結果，非発酵性糖に相当するスポットはペーパークロマトグラム上では見い出せなかつた．しかし原株の酵素についてはみられないマルトトリオースのスポットが変異株の酵素について検出された．

謝　　辞

この研究を行なうにあたり，終始ご鞭撻を頂きました本江元吉教授に謝意を表します．また ^{60}Co-γ 線の照射装置を使用させて頂きました九州大学工学部に厚くお礼を申し上げます．

文　　献

1) 富金原孝 (1955) 日本農芸化学会誌 **29**, 62.
2) 富金原孝 (1960) 澱粉糖技術研究会報 **22**, 20.
3) 飯塚 広・新井英夫 (1961) 日本農芸化学会誌 **35**, 1218.
4) 井口信義 (1935) 日本農芸化学会誌 **27**, 229.
5) 務台蔵人・御園光信・相川忠治・蜂谷好照 (1961) 工業技術院発酵研究所報告 20 号, 37.
6) Sandstedt, R. M., Kneen, E. and Blish, M. J. (1939) Cereal Chemistry **16**, 712.

Summary

By irradiation of UV rays and ^{60}Co-γ rays on *Aspergillus awamori* var. *kawachii*, the mutant strain which is almost lacking in the ability to produce transglucosidase but is able to produce amylases was isolated. The amount of saccharogenic amylase produced by the mutant strain reduced to half of that produced by the wild strain. On the contrary, the amount of dextrinogenic amylase from the mutant strain increased 3-fold as compared with that from the wild strain. The shaken cultures of the wild strain and the mutant strain were made at 30°C, with the synthetic medium. It was found from paper chromatography that the enzyme from the mutant strain did not change 10％ maltose (used as the substrate for transglucosidase) to unfermentable sugars such as isomaltose, panose, and dextrantriose and so on. But the spot of maltotriose was detected on the paper chromatogram of the reaction products obtained with the enzyme from the mutant strain, but not with that from the wild strain.

Laboratory of Applied Microbiology
Department of Agricultural Chemistry
Kyushu University, Fukuoka, Japan