

Aspergillus niger による α -amylase の生成に たいするグルタチオンの影響に関する研究 各種の糖類および有機酸の効果

鎌田 秀郎*

Studies on the Production of α -amylase by *Aspergillus niger*

Effect of Glutathione, Sugar and Organic Acid

Shuro KAMATA*

Synopsis

In this paper, *Aspergillus niger* van Tieghem IFO 4414 was used for studying the effect of glutathione, sugar and organic acid on the production of α -amylase by the fungus. Glutathione was added in the incubating medium at various concentrations from 30mg/l to 1mg/l. *Aspergillus niger* was incubated in the medium by shaking culture at 35°C for 6 days, and the medium was used for determining α -amylase produced by the fungus.

It was shown that glutathione from 10mg/l to 5mg/l added in the medium was effective to produce α -amylase by the fungus. On the other hand, 1mg/l glutathione was considerably effective. Glutathione seemed to be associated with the production of α -amylase by the fungus.

Glucose, fructose, galactose, mannose, sucrose and maltose were added at the concentration of 5×10^{-2} M in the incubating medium which contained 5mg/l glutathione, and gluconate, galacturonate, succinate, citrate, pyruvate, malate, formate, glyoxylate, oxalate, lactate, propionate, α -ketoglutarate, glycollate, fumarate, acetate, acetoacetate and oxaloacetate were added at the concentration of 10^{-2} M in the same incubating medium. As the results, it was shown that sucrose, glucose, fructose, maltose, succinate, citrate, malate, α -ketoglutarate, lactate, fumarate and oxaloacetate were effective to produce α -amylase by the fungus. On the other hand, gluconate, pyruvate and propionate were considerably effective. From these results, it was concluded that these compounds were associated with the production of α -amylase by the fungus in the incubating medium which contained glutathione.

I 緒 言

グルタチオンは、生体内の種々の酵素の活性化や賦活化に作用しているとともに、生体内のアミノ酸や含硫化合物の代謝、および酸化還元反応などにあづかっている。HIBBERD¹⁾らは *Escherichia coli* を用いて、ジアミドの代謝にグルタチオンが重要な働きを持っており、また細胞中のタンパク質とグルタ

チオンの関係についても報告している。NIEBROJ - DOBOSZ²⁾はクレアチンホスホキナーゼの活性に対するグルタチオンの効果について研究をしており、MEISTER³⁾は、アミノ酸の移送における γ -グルタミール回路でのグルタチオンの重要性について報告している。また、YOUNG⁴⁾らは、アラニン、フェニールアラニン、リジンなどのアミノ酸代謝にグルタチオン

*農芸化学科、植物栄養学研究室 (Lab. of Plant Nutrition, Dep. of Agricultural Chemistry, Kinki Univ. Higashiosaka, Osaka, 577, Japan)

が必要であることを示し, SANDY⁵⁾らは, *Rhodospseudomonas spheroides*を用いて5-アミノロイプリーネート合成酵素の活性剤としてグルタチオンが作用していると報告している。さらに FUCHS⁶⁾らは, *Escherichia coli*の突然変異株を用いてグルタチオンが細胞中のアミノ酸代謝に関係し, またリボヌクレオシドジホスフェートレダクターゼの作用に重要であると報告しており, MANNERVIK⁷⁾らは, チオトランスフェラーゼの作用にグルタチオンが必要であり, またシステインの代謝にグルタチオンが関与していることを示している。しかし, α -amylaseの生成にたいするグルタチオンの効果については, まだ明らかではない。本報文は *Aspergillus niger* van TIEGHEM IFO 4414による α -amylaseの生成にたいするグルタチオンの影響について検索し, 二・三の知見を得たので報告する。

II 実験方法

供試菌には *Aspergillus niger* van TIEGHEM IFO 4414を使用した。基本培地の組成は, 可溶性でんぷん1.0g, (NH₄)₂SO₄ 2.0g, Na₂HPO₄ 1.0g, K₂SO₄ 0.5g, MgSO₄ 0.2g, FeSO₄ 0.01g, CaCl₂ 0.01g 酵母エキス0.01g, 蒸留水 1 l であり, pH5.0に調製した。この基本培地に, グルタチオンをそれぞれ, 30mg/l, 20mg/l, 10mg/l, 5mg/l, 1mg/l, および無添加のものを調製して実験に供した。また, 各種の糖類および有機酸の効果については, 基本培地として, (NH₄)₂SO₄2.0g, Na₂HPO₄0.1g, K₂SO₄0.5g, MgSO₄0.2g, FeSO₄0.01g, CaCl₂0.01g, 酵母エキス0.01g, 蒸留水1l であり, pH5.0に調製したものに, それぞれグルコース, フラクトース, ガラクトース, マンノース, サッカロース, マルトースでは 5×10^{-2} M を添加し, グルコン酸, グルキユロン酸, ガラクチュロン酸, コハク酸, クエン酸, ピルビン酸, リンゴ酸, 蟻酸, グリオキシル酸, シュー酸, 乳酸, プロピオン酸, α -ケトグルタル酸, グリコール酸, フマル酸, 酢酸, アセト酢酸, オキサロ酢酸では 10^{-2} M を添加したものにグルタチオンを 5mg/l 添加したものと無添加のものを調製した。供試菌を接種して35°Cで振とう培養し, 経時的に培養液の一定量を採取し, ろ過したのち遠心分離して菌体を除去した。その上澄液を蒸留水で24時間透析して α -amylaseの測定に用いた。すなわち α -amylaseの測定には上澄液を酵素液として使用した。

α -amylaseの活性の測定はヨード反応によりおこなった。すなわち酵素液 1 ml を用い, 0.5M 酢酸緩

衝液でpH5.0にし, 0.2%アミロース液を加えて反応させ, 反応液にヨード液を加えたのち700m μ で吸光度を測定した。酵素液1mlのかかわりに水1mlを用いて同様に処理したものを盲験とし, その吸光度(D₀)を測定した。酵素単位は吸光度D₀の10%を消失させる酵素量を1単位とした。さらに, 増殖した菌体の収量は, 6日間培養したのち培養液をろ過し, さらに遠心分離して菌体を集め105°C~110°Cにて恒量となるまで乾燥させたのち, 培養液200mlあたりの乾物重量として算出した。

Table 1. Effects of glutathione on the production of α -amylase by *Aspergillus niger* van Tieghem IFO 4414 and on the fungus growth.

		Glutathione					
		30mg/l	20mg/l	10mg/l	5mg/l	1mg/l	no addition (units/ml)
Incubation time (days)	1	0	0	0	0	0	0
	2	2.8	2.8	3.3	3.5	2.8	2.6
	3	9.4	14.8	15.0	16.5	12.3	11.8
	4	21.3	29.4	38.2	44.0	26.3	26.0
	5	41.2	47.5	58.1	65.0	46.2	45.5
	6	49.2	55.0	67.0	70.4	54.0	52.8
Growth		230	255	285	296	250	(mg/200ml) 242

III 結果および考察

Aspergillus niger van TIEGHEM IFO 4414の α -amylaseの生成において, グルタチオンを各種の濃度で添加した場合, およびグルタチオンに各種の糖類, あるいは有機酸を添加した場合の効果については下記の様であった。

すなわち, 基本培地 1 l あたりにグルタチオンを 30mg, 20mg, 5mg, 1mg 添加したものと無添加のものにおける α -amylaseの生成については(表1), グルタチオンを 10mg~5mg/l 範囲で添加した場合, 無添加のものと比較して顕著な効果が認められた。すなわちグルタチオンを 30mg 添加した場合には, 無添加のものと比較して α -amylaseの生成に効果が認められず, α -amylaseの生成が少なくなっている。グルタチオ

Table 2. Effects of glucose, fructose, galactose, mannose, sucrose and maltose in the presence or absence of glutathione on the production of α -amylase by *Aspergillus niger* van Tieghem IFO 4414 and on the fungus growth.

		Incubation time (days)						Growth (units/ml)(mg/ 200 ml)
		1	2	3	4	5	6	
Glucose	5×10^{-2} M	0	3.8	11.3	24.2	41.5	52.0	242
Glucose + Glutathione	5×10^{-2} M 5mg/l	0	4.0	16.0	37.6	56.4	67.5	289
Fructose	5×10^{-2} M	0	3.0	8.0	21.2	39.0	49.8	229
Fructose + Glutathione	5×10^{-2} M 5mg/l	0	3.2	12.5	37.1	58.2	67.4	285
Galactose	5×10^{-2} M	0	2.8	8.3	16.6	30.6	45.0	224
Galactose + Glutathione	5×10^{-2} M 5mg/l	0	3.4	12.2	26.3	40.7	52.0	240
Mannose	5×10^{-2} M	0	2.0	11.3	24.6	36.2	42.2	205
Mannose + Glutathione	5×10^{-2} M 5mg/l	0	2.5	11.6	23.8	42.3	49.0	230
Sucrose	5×10^{-2} M	0	3.8	14.5	30.1	45.2	54.0	252
Sucrose + Glutathione	5×10^{-2} M 5mg/l	0	6.8	22.4	46.2	64.5	73.0	312
Maltose	5×10^{-2} M	0	3.0	10.6	23.5	40.3	51.3	238
Maltose + Glutathione	5×10^{-2} M 5mg/l	0	4.9	17.8	38.0	56.8	68.1	290

ンを20mgまたは1mg添加した場合には、無添加のものと同様の α -amylaseの生成を認めた。菌の生育もグルタチオンを10mg～5mg添加したものが最も良好であり、 α -amylaseの生成には10mg～5mg/lのグルタチオンの添加が効果のあることが認められた。グルタチオンは酵素作用の活性化物質であるばかりでなく、酵素のSH基や酸化還元反応に関与しており、また生体内のアミノ酸代謝の経路にも重要な役割を持っており、すなわちマレイリアセト酢酸イソメラーゼや α -アミノアジピン酸レダクターゼなどの活性化剤である他、ELCE⁹⁾によりアミノ酸代謝に関係を持っている α -グルタミールトランスフェラーゼとグルタチオンについての報告などもあり、この様なことから、グルタチオンの添加が α -amylaseの生成に

効果があったものと推察した。

グルコース、フラクトース、ガラクトース、マンノース、サッカロース、マルトースを各 5×10^{-2} Mにグルタチオンを5mg/l添加したものと、無添加のものにおける α -amylaseの生成は(表2)、各種の糖類においてグルタチオン添加の効果に相違のあることが認められた。すなわち、サッカロースにグルタチオンを添加した場合に α -amylaseの生成が最も多く認められ、またグルタチオン添加の効果も顕著である。グルコースとフラクトースの場合も、グルタチオンの添加において顕著な効果が認められ、サッカロースよりは α -amylaseの生成は少なかったが、グルコースとフラクトースは類似の傾向を示している。このことはグルコースとフラクトースが炭素源

として同化利用される時同じ程度の効果があることを示していると考えられる。マルトースも顕著な効果が認められグルコースやフラクトースと程んど等しい α -amylaseの生成があり、グルコース、フラクトース、マルトースはグルタチオン添加の効果が認められた。これに反してガラクトースとマンノースの場合は、 α -amylaseの生成はサッカロースやグルコースなどと比較して少ない。グルタチオン添加の効果も、やはりサッカロースやグルコースより少ないが、かなりの効果が認められた。糖類ではサッカロースの場合が α -amylaseの生成に対してグルタチオン添加の効果が最も良好であり、グルコース、フラクトース、マルトースでも顕著な効果が認められた。菌の生育は、サッカロース、グルコース、フラクトース、マルトースにおいて良く、ガラクトースとマンノースにおいては少し劣っている。グルコースやフラクトースなど種々の糖類はフラクトース1, 6-ジホスフェートを経てクリセルアルデヒドとなり、さらに1, 3-ジホスホグリセレートになって代謝され

て行くが、この場合グルタチオンなどが必要であり、糖類はこの様にしてピルビン酸を経て種々の化合物に代謝されていく。また、サッカロース、フラクトース、グルコースなどがグルコース-1-ホスフェートを経てUDP-グルコースとなり、それから多糖類の生合成や糖の代謝経路に入っていくが、この反応においてグルタチオンが重要な働きを持っている。またグルタチオンの構成成分としてシステインが含まれているが、CoAの生合成にはシステインが必要であり、4'-ホスホ-L-パントテニール-L-システインを経て生成される。CoAは各種の有機酸や糖の代謝に重要な働きを持っており、このようなことからグルタチオン添加の効果があつたものと考えられる。

グルコン酸、グルキュロン酸、ガラクチュロン酸、コハク酸、クエン酸を各 10^{-2} Mにグルタチオンを5mg/g添加したものと無添加のものにおける α -amylaseの生成については(表3)、これらの有機酸においてグルタチオン添加の効果に相違のあることが認められた。すなわち、コハク酸においてはグルタチ

Table 3. Effects of gluconate, glucuronate, galacturonate, succinate and citrate in the presence or absence of glutathione on the production α -amylase by *Aspergillus niger* van Tieghem IFO 4414 and on the fungus growth.

		Incubation time (days)						Growth (units/ml) (mg/200 ml)
		1	2	3	4	5	6	
Gluconate	10^{-2} M	0	2.8	11.2	23.3	35.8	44.5	215
Gluconate + Glutathione	10^{-2} M 5mg/l	0	3.0	13.5	30.2	49.8	58.0	263
Glucuronate	10^{-2} M	0	2.6	8.5	17.0	26.5	38.0	186
Glucuronate + Glutathione	10^{-2} M 5mg/l	0	2.8	11.0	22.0	36.0	47.2	225
Galacturonate	10^{-2} M	0	3.0	10.6	20.5	34.8	45.5	210
Galacturonate + Glutathione	10^{-2} M 5mg/l	0	3.2	14.2	28.0	44.1	53.6	246
Succinate	10^{-2} M	0	3.8	11.9	24.6	40.5	50.2	240
Succinate + Glutathione	10^{-2} M 5mg/l	0	4.8	18.2	36.0	55.8	68.3	290
Citrate	10^{-2} M	0	3.0	8.0	19.8	37.8	48.2	225
Citrate + Glutathione	10^{-2} M 5mg/l	0	4.0	16.2	33.5	51.0	64.0	274

オンの効果が最も良く認められ、 α -amylaseの生成が多く、グルコースやフラクトースと類似の傾向が認められた。クエン酸においてもグルタチオン添加の効果が、菌の生育もコハク酸やクエン酸において良好であった。グルコン酸においてもグルタチオン添加の効果が、かなり認められたが、コハク酸やクエン酸よりは α -amylaseの生成が少なく、ガラクトキロン酸やグルキロン酸ではグルタチオン添加の効果があまり認められない。菌の生育も良くなかった。

ピルビン酸、リンゴ酸、蟻酸、グリオキシル酸、シュウ酸を各 10^{-2} Mにグルタチオンを $5\text{mg}/\ell$ 添加したものと無添加の場合については(表4)、リンゴ酸において α -amylaseの生成が最も多く、グルタチオン添加の効果が著しいことが認められた。コハク酸やグルコースと同じ程度の α -amylaseの生成があり、菌の生育も良好であった。ピルビン酸においても、グルタチオンの効果が認められたが、グリオキシル酸においてはピルビン酸よりも効果が少なかった。

菌の生育もリンゴ酸より劣る結果となっている。シュウ酸と蟻酸においてはグルタチオンを添加すると無添加のものに比較して α -amylaseの生成は増しているが、リンゴ酸やピルビン酸よりは少なく、また菌の生育も良くなかった。

乳酸、プロピオン酸、 α -ケトグルタル酸、グリコール酸の各 10^{-2} Mにグルタチオンを $5\text{mg}/\ell$ 添加したものと無添加のものの場合には(表5)、 α -ケトグルタル酸にグルタチオンを添加した場合が、 α -amylaseの生成が最も多く、グルタチオンの効果が認められる。乳酸の場合も効果が認められ、どちらの有機酸の場合も菌の生育も良好であった。プロピオン酸においては、乳酸よりも α -amylaseの生成が少ないが、グリコール酸よりも多くなっており、グルタチオンを添加することによって、プロピオン酸は α -amylaseの生成が増加することが認められた。グリコール酸の場合もグルタチオンを添加すると、無添加の場合より α -amylaseの生成が増加するが、 α -ケトグルタル酸と比較すると少なく、菌の生育

Table 4. Effects of pyruvate, malate, formate, glyoxylate and oxalate in the presence or absence of glutathione on the production of α -amylase by *Aspergillus niger* van Tieghem IFO 4414 and on the fungus growth.

		Incubation time (days)						Growth (units/ml)(mg/ 200 ml)
		1	2	3	4	5	6	
Paruvate	10^{-2} M	0	2.8	11.0	23.5	34.8	42.2	203
Pyruvate	10^{-2} M	0	4.2	15.8	34.2	53.0	61.8	270
Glutathione	+ 5mg/l							
Malate	10^{-2} M	0	2.7	10.1	23.2	40.6	51.5	228
Malate	10^{-2} M	0	4.3	13.8	34.0	54.5	64.0	272
Glutathione	+ 5mg/l							
Formate	10^{-2} M	0	2.0	6.7	16.0	28.2	34.5	162
Formate	10^{-2} M	0	2.5	11.4	24.6	37.0	42.0	198
Glutathione	+ 5mg/l							
Glyoxylate	10^{-2} M	0	2.2	7.8	19.2	33.0	36.2	168
Glyoxylate	10^{-2} M	0	3.1	10.5	27.4	42.0	46.3	215
Glutathione	+ 5mg/l							
Oxalate	10^{-2} M	0	2.4	7.3	16.2	27.8	33.0	155
Oxalate	10^{-2} M	0	3.0	10.3	23.7	36.5	42.1	196
Glutathione	+ 5mg/l							

もあまり良くなかった。

フマル酸, 酢酸, アセト酸, オキサロ酢酸の各 10^{-2} Mに, グルタチオンを 5 mg/l 添加したものと無添加のものの場合には(表6), フマル酸, 酢酸, およびオキサロ酢酸にグルタチオンを添加すると, α -amylaseの生成にたいして顕著な効果を示し, グルコースやフラクトースと同じ程度の α -amylaseの生成が認められた。菌の生育も良好であった。アセト酢酸においては, グルタチオンの効果があまり認められず α -amylaseの生成は少なく, また菌の生育も良くなかった。

グルタチオンは, コハク酸からイソクエン酸への反応において活性剤として作用するほか, グリオキシレートからリンゴ酸への反応においても重要な働きを持っている。また, 4-マレイルアセト酢酸から4-フマリルアセト酢酸の反応にもグルタチンが必要であり, 4-フマリルアセト酢酸はフマル酸とアセト酢酸に分解されてピルビン酸などに変化して代謝されていく。さらに, またシステインから β -メル

カプトピルビン酸への反応でグルタチンが作用しており, β -メルカプトピルビン酸はピルビン酸に変化して他の化合物へと代謝されていく。糖類や有機酸は, 生体内において相互に関連し合ってエネルギー源などになるほか, アミノ酸などの化合物に代謝されていくが, 生体内におけるグルタチオンの役割について, CHEN¹⁰⁾らは, グルタチオンとタンパク質との関係を¹⁴Cを用いて研究しており, グルタチオンは生体内で重要な働きをしていることが推察される。このようなことから, α -amylaseの生成に対して, 糖類および有機酸におけるグルタチオン添加の効果が認められたものと推論した。

IV 要 約

Aspergillus niger van TIEGHEM IFO 4414における α -amylaseの生成にたいするグルタチオンの効果, および糖, 有機酸にグルタチオンを添加した場合の効果について検索した。

その結果, グルタチオンの添加量においては, 10 mg

Table 5. Effects of lactate, propionate, α -ketoglutarate and glycollate in the presence or absence of glutathione on the production of α -amylase by *Aspergillus niger* van Tieghem IFO 4414 and on the fungus growth.

		Incubation time (days)						Growth (units/ml) (mg/200 ml)
		1	2	3	4	5	6	
Lactate	10^{-2} M	0	2.8	13.0	30.2	42.5	48.0	227
Lactate + Glutathione	10^{-2} M + 5 mg/l	0	4.8	27.5	51.0	62.5	67.2	286
Propionate	10^{-2} M	0	2.0	10.1	25.2	40.0	47.0	220
Propionate + Glutathione	10^{-2} M + 5 mg/l	0	3.0	14.6	33.4	51.2	59.2	275
α -ketoglutarate	10^{-2} M	0	4.2	14.8	27.0	40.8	52.0	240
α -ketoglutarate + Glutathione	10^{-2} M + 5 mg/l	0	5.0	28.0	40.2	58.6	67.5	291
Glycollate	10^{-2} M	0	2.3	9.6	17.5	26.0	33.2	160
Glycollate + Glutathione	10^{-2} M + 5 mg/l	0	2.3	10.2	20.0	31.4	44.0	208

Table 6. Effects of fumarate, acetate, acetoacetate and oxaloacetate in the presence or absence of glutathione on the production of α -amylase by *Aspergillus niger* van Tieghem IFO 4414 and on the fungus growth.

		Incubation time (days)						Growth (units/ml) (mg/200 ml)
		1	2	3	4	5	6	
Fumarate	10^{-2} M	0	3.2	13.8	25.5	42.1	50.2	236
Fumarate + Glutathione	10^{-2} M 5mg/l	0	4.0	18.6	40.2	56.2	68.0	302
Acetate	10^{-2} M	0	3.4	14.2	30.0	44.2	53.0	243
Acetate + Glutathione	10^{-2} M 5mg/l	0	4.7	18.5	48.7	58.0	67.5	286
Acetoacetate	10^{-2} M	0	2.0	6.8	10.5	22.5	34.0	167
Acetoacetate + Glutathione	10^{-2} M 5mg/l	0	2.0	7.3	16.2	29.8	40.2	185
Oxaloacetate	10^{-2} M	0	2.2	6.8	16.1	34.0	50.6	235
Oxaloacetate + Glutathione	10^{-2} M 5mg/l	0	4.3	17.5	30.7	53.8	68.3	305

～5 mg/gの範囲の濃度が効果のあることが認められた。

糖類においては、サッカロース、グルコース、フラクトース、マルトースにおいては、グルタチオン添加の効果が認められたが、ガラクトースおよびマンノースにおいては効果があまり認められなかった。

有機酸においては、コハク酸、クエン酸、リンゴ酸、 α -ケトグルタル酸、乳酸、フマル酸、オキザロ酢酸では α -amylaseの生成に効果が認められ、グルコン酸、ピルビン酸、プロピオン酸では、かなり効果が認められたが、グルキユロン酸、蟻酸、グリオキシル酸、シュウ酸、グリコール酸、アセト酢酸においては、 α -amylaseの生成に対するグルタチオンの効果は、あまり認められなかった。

引用文献

- 1) K. A. HIBBERD, P. B. BERGET, H. R. WARNER and J. A. FUCHS : *J. Bacteriol.*, **133**, 1150～1155 (1978)
- 2) I. NIEBROJ-DOBOSZ : *Clin. Chim. Acta*, **71**, 327～329 (1976)
- 3) A. MEISTER : *Struct. Basis Membr. Funct. Proc. Int. Symp.*, 95～106 (1975)
- 4) J. D. YOUNG, J. C. ELLOORY and P. C. WRIGHT : *Biochem. J.*, **152**, 713～715 (1975)
- 5) J. D. SANDY, R. C. DAVIES and A. NEUBERGER : *Biochem. J.*, **150**, 245～257 (1975)
- 6) J. A. FUCHS and H. R. WARNER : *J. Bacteriol.*, **124**, 140～148 (1975)
- 7) B. MANNERVIK and K. AXELSSON : *Biochem. J.*, **149**, 785～788 (1975)
- 8) 植物栄養学実験編集委員会：植物栄養学実験書, 186, 朝倉書店, 東京 (1959)
- 9) J. S. ELCE and B. BROXMEYER : *Biochem. J.*, **153**, 223～232 (1976)
- 10) C. CHEN and S. G. LEE : *Mol. Pharmacol.*, **11**, 409～420 (1975)

(昭和53年10月16日受理)