

Aspergillus niger によるアミラーゼの 生成にたいする有機酸の影響

鎌田秀郎*

Effect of Organic Acids on the Production of Amylase by *Aspergillus niger*

Shuro KAMATA*

Synopsis

Aspergillus niger van Tieghem IFO 4414 was used for studying the effect of various organic acids on the production of liquefying amylase.

Various organic acids used in this investigation were acetate, lactate, pyruvate, citrate, *cis*-aconitate, isocitrate, α -ketoglutarate, succinate, fumarate, malate and oxaloacetate, and these compounds were added in the incubating medium at various concentrations from 5×10^{-2} to $5 \times 10^{-4} M$. The strain was incubated by shaking culture at 35°C for 6 days, and the broth was used for the determination of liquefying amylase activity.

As the results, α -ketoglutarate, pyruvate, citrate, fumarate and oxaloacetate were effective to produce amylase by this strain. On the other hand, acetate, succinate and malate were less effective than α -ketoglutarate. Isocitrate, *cis*-aconitate and lactate were scarcely effective.

I 結 言

微生物によるアミラーゼの生成は、有機あるいは無機化合物の種類や濃度の相違によって変化のあることが認められているが、LEEら¹⁾は、*Aspergillus oryzae*、*Rhizopus javanicus*などを用いてアミラーゼの生成を調べた結果、でんぷん、 $(\text{MH}_4)_2\text{SO}_4$ 、カゼインを種々の濃度で添加した場合、47%でんぷんと6%カゼイン添加においてアミラーゼの生成が最も良好であると報告している。FOGARTYら²⁾は *Bacillus polymyxa* の培養において Mn^{2+} および Cu^{2+} を添加した場合にアミラーゼの生成が増加し、また最適 pH は 6.5~6.8 であると報告している。さらに YAROVENKOら³⁾ は、種々の炭水化物の添加とアミラーゼの生成について *Aspergillus awamori* を使用して検討した結果、フラクトース、マルトース、グルコースなどが良好であることを認めた。福本ら⁴⁾ は、アミラーゼの生成にたいして糖類を炭素源とす

る時はリン酸が必要であると報告しており、また MUKHERJEEら⁵⁾ は、*Aspergillus flavus* によるアミラーゼの生成について、マルトースを5%添加した場合が良く、また窒素源として NH_4NO_3 と NH_4Cl が良好な結果をえられると報告している。しかしアミラーゼの生成にたいする有機酸の影響について、まだ不明な点があり、本報は *Aspergillus niger* van Tieghem IFO 4414 によるアミラーゼの生成にたいする有機酸の影響について検討し、二、三の知見をえたので報告する。

II 実験方法

供試菌株 アミラーゼ生成の実験において、供試菌として *Aspergillus niger* van Tieghem IFO 4414 を使用した。

培地組成・添加化合物 基本培地の組成は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0g、 Na_2HPO_4 1.0g、 K_2SO_4 0.5g。

MgSO₄ 0.2g, FeSO₄ 0.01g, CaCl₂ 0.01g, 酵母エキス 0.01 g を蒸留水 1 l にとかし, pH 5.0 に調整した。アミラーゼの生成にたいする各種の有機的添加の効果については, 基本培地に酢酸, 乳酸, ピルビン酸, クエン酸, シスーアコニット酸, イソクエン酸, α -ケトグルタル酸, コハク酸, フマル酸, リンゴ酸, オキサロ酢酸をそれぞれ $5 \times 10^{-2} M$, $10^{-2} M$, $5 \times 10^{-3} M$, $10^{-3} M$, $5 \times 10^{-4} M$ 添加し, 供試菌を接種して 35°C で振とう培養した。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 時間透析してアミラーゼの測定に用いた。すなわち液化型アミラーゼの測定には上澄液を酵素液として使用した。

液化型アミラーゼ活性の測定 酵素活性の測定は前報⁶⁾と同じ方法であり, ヨード反応によって行

なった⁷⁾。すなわち酵素液 1 ml を用い, 0.5 M 酢酸緩衝液で pH 5.0 にし, 0.2% アミロース液を加えて反応させ, 反応液にヨウ素液を加えたのち 700 m μ で吸光度を測定した。酵素単位は盲験の吸光度の 10% を消失させる酵素量を 1 単位とした。

生育量 増殖した菌体の収量は, 6 日間振とう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あつめ 105°C~110°C にて恒量になるまで乾燥させたのち, 培養液 200 ml あたりの乾物重量として算出した。

III 結果および考察

Aspergillus niger van Tieghem IFO 4414 のアミラーゼ生成にたいする各種の有機酸の影響について検討した結果, つぎのようであった。

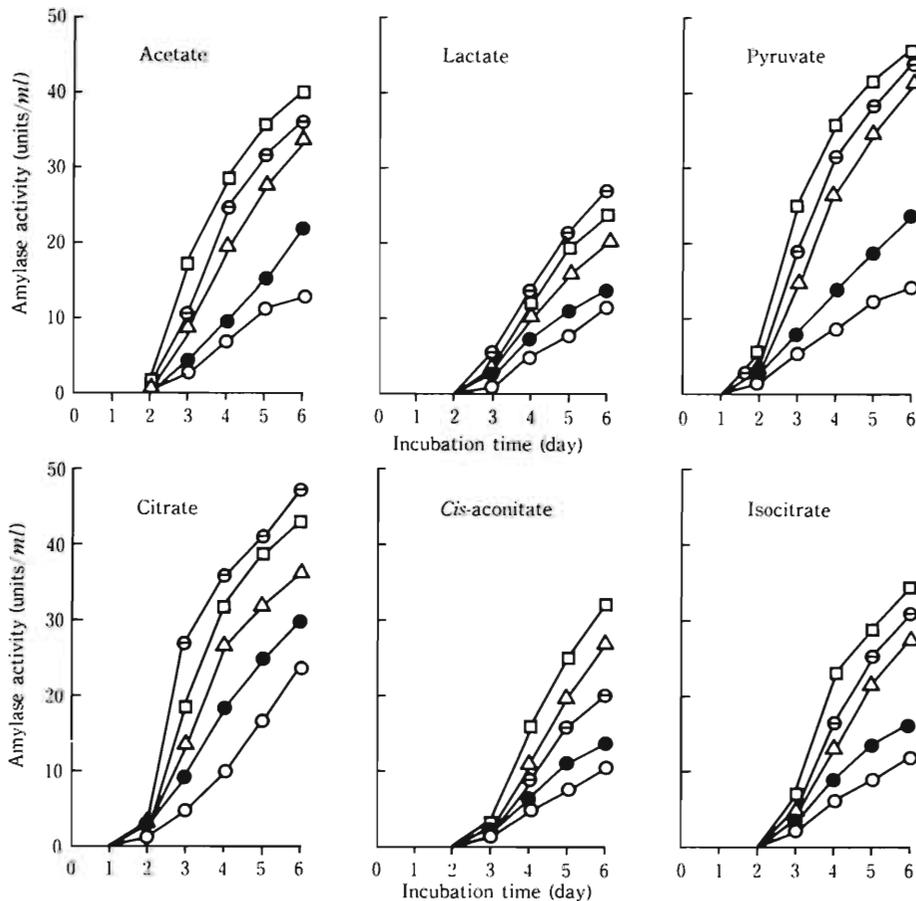


Fig. 1. Effect of various organic acids on the production of α -amylase by *Aspergillus niger* van Tieghem IFO 4414. Organic acid concentrations: \circ , $5 \times 10^{-4} M$; \bullet , $1 \times 10^{-3} M$; \triangle , $5 \times 10^{-3} M$; \square , $1 \times 10^{-2} M$; \diamond , $5 \times 10^{-2} M$.

酢酸を添加した場合には、アミラーゼの生成にたいして $5 \times 10^{-2} M$, $10^{-2} M$, $5 \times 10^{-3} M$ においてそれぞれ 36.4 units/ml, 40.3 units/ml, 34.0 units/ml と生成量が多いが、低濃度では少ないことが認められた。また培養初期の2日目から少しアミラーゼの生成が認められ、その後、日数の経過と共に生成が顕著である。菌の生育も $10^{-2} M$, $5 \times 10^{-2} M$, $5 \times 10^{-3} M$ において、それぞれ 196 mg/200 ml, 180 mg/200 ml, 175 mg/200 ml と良好であった。

乳酸を添加した場合には、アミラーゼの生成にたいする効果が酢酸より劣っており、 $5 \times 10^{-2} M$, $10^{-2} M$ において、27.0 units/ml, 24.0 units/ml と少なく、アミラーゼの生成にあまり効果がないと考えられる。菌の生育も各濃度において良くなかった。またアミラーゼ生成の時期も3日目、4日目から徐々に認められた。

に認められた。

ピルビン酸を添加した場合には、アミラーゼの生成にたいして $10^{-2} M$ で 45.8 units/ml と効果が認められ、酢酸より良い結果となっている。生成の時期も2日目から認められ、3日、4日と顕著に増加している。また菌の生育量も $5 \times 10^{-2} \sim 5 \times 10^{-3} M$ において多いことが認められた。

クエン酸を添加した場合には、ピルビン酸と同様、アミラーゼの生成に顕著な効果を示し、 $5 \times 10^{-2} M$, $10^{-2} M$, $5 \times 10^{-3} M$ でそれぞれ 47.5 units/ml, 43.5 units/ml, 36.6 units/ml と良く、またアミラーゼ生成の時期も乳酸より早く、2日目から認められた。菌の生育も良好であり低濃度の $10^{-3} M$ で 105 mg/200 ml の生育量がえられた。

シスアコニット酸を添加した場合には、 $10^{-2} M$

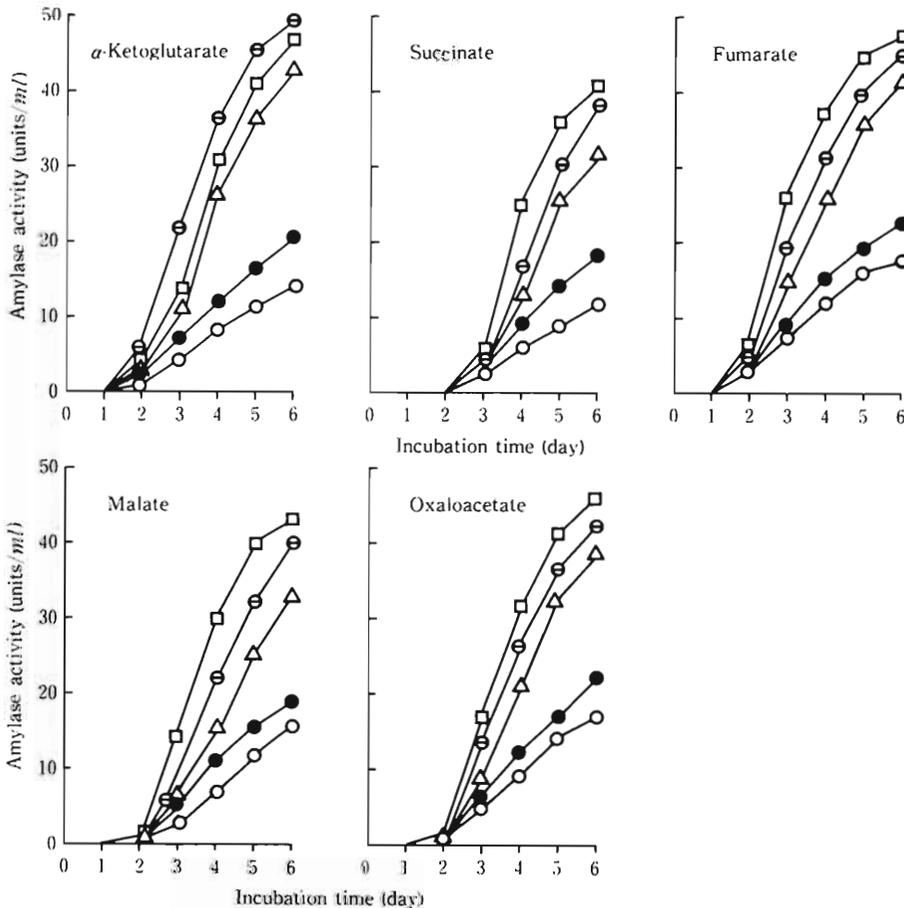


Fig. 2. Effect of various organic acids on the production of α -amylase by *Aspergillus niger* van Tieghem IFO 4414. Organic acid concentrations: see Fig. 1.

～ $5 \times 10^{-3} M$ の濃度においてアミラーゼの生成が少し認められ、また菌の生育も $10^{-2} M$ においてのみ良かった。生成の時期も3日目から認められシスーアコニット酸はあまり効果がないと考えられる。

イソクエン酸を添加した場合には、シスーアコニット酸よりはアミラーゼの生成も菌の生育も良いが、クエン酸よりは少ない。しかし、 $10^{-2} M$ 、 $5 \times 10^{-2} M$ においてそれぞれ34.3 units/ml, 31.2 units/mlとなっており、かなり効果が認められた。

α -ケトグルタル酸を添加した場合には、 $5 \times 10^{-2} M$ 、 $10^{-2} M$ 、 $5 \times 10^{-3} M$ において、それぞれ49.5 units/ml, 47.0 units/ml, 43.2 units/mlとアミラーゼの生成が良く、また $5 \times 10^{-2} M \sim 5 \times 10^{-3} M$ が適した濃度である。菌の生育も良好で、低濃度の 10^{-3}

M においても82 mg/200 mlの菌体量がえられた。アミラーゼ生成は2日目から認められ、 α -ケトグルタル酸は良く同化、利用されると考えられる。またアミラーゼの生成は、実験に用いた有機酸の中で最も良好であった。

コハク酸を添加した場合には、 $10^{-2} M$ 、 $5 \times 10^{-2} M$ 、 $5 \times 10^{-3} M$ においてアミラーゼの生成が多く、最適濃度も $10^{-2} M \sim 5 \times 10^{-3} M$ の範囲にある。菌の生育も $10^{-2} M \sim 5 \times 10^{-3} M$ において良いが、アミラーゼの生成はフマル酸と比較すると少ないことが認められた。

フマル酸を添加した場合には、コハク酸とアミラーゼの生成が類似しているが $5 \times 10^{-2} M \sim 5 \times 10^{-3} M$ でコハク酸より生成量が多く、すなわち 10^{-3}

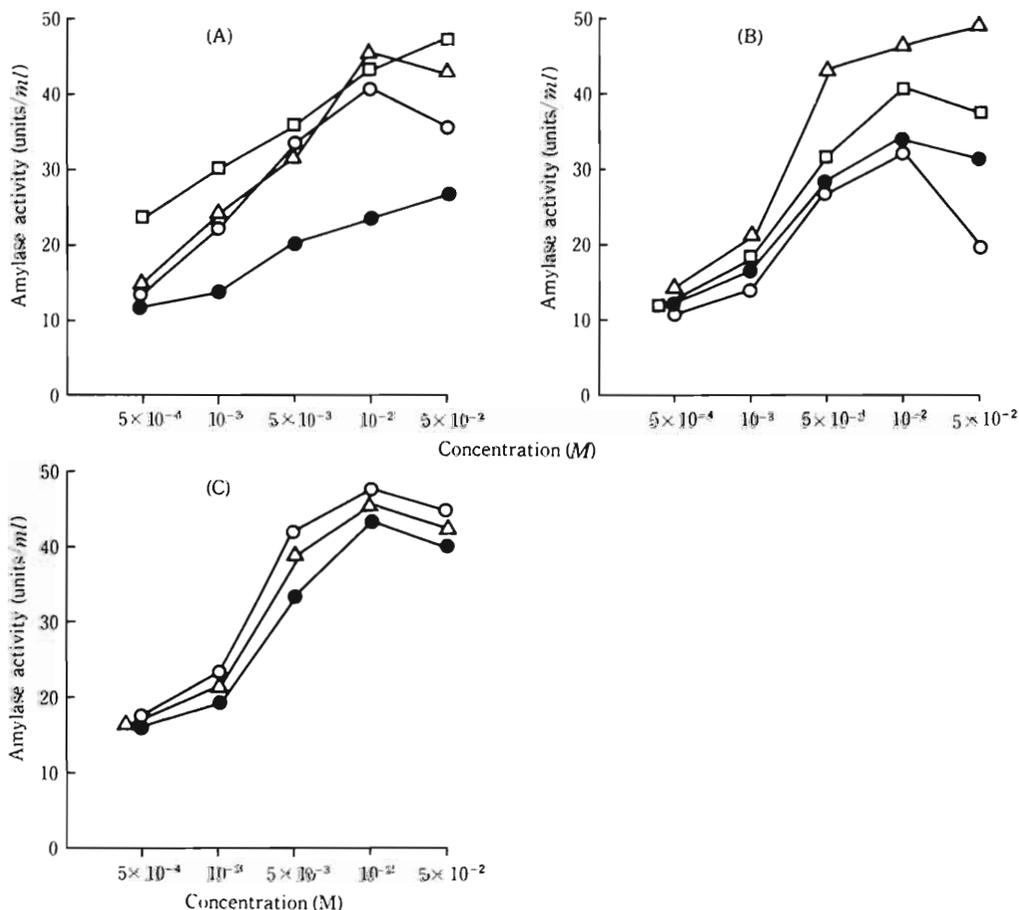


Fig. 3. Relation between organic acid concentrations and α -amylase activity. Organic acid: (A) ○, acetate; ●, lactate; △, pyruvate; □, citrate. (B) ○, cis-aconitate; ●, isocitrate; △, α -ketoglutarate; □, succinate. (C) ○, fumarate; ●, malate; △, oxaloacetate.

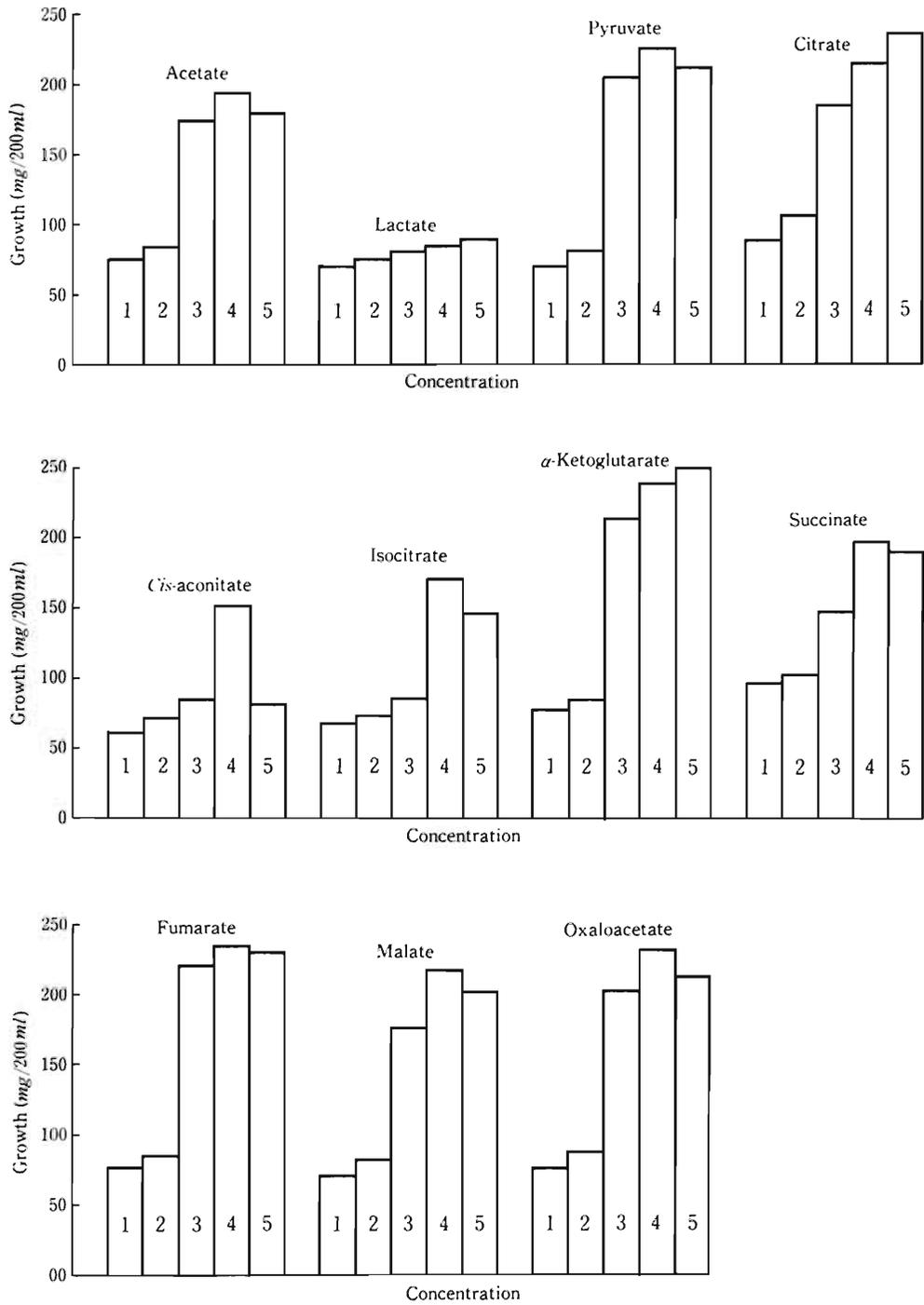


Fig. 4. Effect of various organic acids on the growth of the *Aspergillus niger* van Tieghem IFO 4414 incubated for 6 days. Organic acid concentrations: 1, $5 \times 10^{-4}M$; 2, $1 \times 10^{-3}M$; 3, $5 \times 10^{-3}M$; 4, $1 \times 10^{-2}M$; 5, $5 \times 10^{-2}M$.

M で48.0 units/mlであり、また菌の生育も $10^{-2}M$ ~ $5 \times 10^{-2}M$ において良好であった。

リンゴ酸を添加した場合には、アミラーゼの生成にたいして $5 \times 10^{-2}M$ ~ $10^{-2}M$ が最適濃度であり、 $10^{-2}M$ で43.6 units/mlと生成量が多くなっている。菌の生育も $5 \times 10^{-2}M$ ~ $10^{-2}M$ において良好であり、それより低濃度ではアミラーゼの生成も菌の増殖も少ない。

オキサロ酢酸を添加した場合には、 $5 \times 10^{-2}M$ ~ $10^{-2}M$ においてアミラーゼの生成量はリンゴ酸よりも多く、 $10^{-2}M$ で46.0 units/mlでありアミラーゼの生成に有効な有機酸であると考えられる。菌の生育も $5 \times 10^{-2}M$ ~ $10^{-2}M$ で良い結果となっており、 $10^{-2}M$ では230 mg/200 mlの生育量が認められた。またアミラーゼの生成の時期も2日目から認められ、生成量の多い α -ケトグルタル酸やフマル酸と類似の傾向がえられた。

アミラーゼの生成にたいして、有機酸の種類や濃度において、かなりの相違が認められたのは、*Aspergillus niger* van Tieghem IFO 4414による有機酸の同化、利用と密接な関係のあることを示していると思われる。すなわち、酢酸においては酸化的に分解されて代謝されエネルギー源となるが、またクエン酸や α -ケトグルタル酸その他フマル酸やオキサロ酢酸などに代謝されていく。ピルビン酸においては、解糖作用や酢酸、乳酸の代謝に重要な役割をもっており、またアミノ基転移反応によって容易にアラニンが生成される。クエン酸は有機酸代謝において重要な位置をしめており、いくつかの有機酸を経て α -ケトグルタル酸に変化するが、さらにグルタミン酸の生成に関係している有機酸である。またフマル酸はアスパラギン酸アンモニアリアーゼの作用でアスパラギン酸を生成するが、その他TCA回路などにより α -ケト酸となってアミノ酸生成の素材となる。このように有機酸の代謝とアミノ酸の生成は極めて密接な関係にあり、有機酸がアミラーゼの生成に効果があったものと推論した。

IV 要 約

Aspergillus niger van Tieghem IFO 4414による液化型アミラーゼの生成にたいする各種の有機酸の効果について検索した。

その結果、 α -ケトグルタル酸、ピルビン酸、クエン酸、オキサロ酢酸では $5 \times 10^{-2}M$ ~ $5 \times 10^{-3}M$ の濃度範囲において、アミラーゼの生成にたいして有効であることが認められた。

酢酸、コハク酸、リンゴ酸においては $10^{-2}M$ ~ $5 \times 10^{-2}M$ において、かなり効果が認められたが、イソクエン酸、シス-アコニット酸、乳酸においては効果が少ないことが認められた。

アミラーゼの生成にたいする効果は、有機酸の種類によって、ことなった挙動をすることが認められ、それは生体内における有機酸の同化、利用と密接な関係をもっているためと推論した。

文 献

- (1) S.D. LEE and Y.H. RYU: *Han'guk Sikp'um Kwahakhoe Chi*, 5, 224~230 (1973)
- (2) W.M. FOGARTY and P.J. GRIFFIN: *Biochem. Soc. Trans.*, 1, 263~266 (1973)
- (3) V.L. YAROVENKO, T.N. PISARENKO and G.M. DOBRORINSKAYA: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 8, 562~568 (1972)
- (4) 福本寿一郎, 山本武彦: 農化, 31, 425~429 (1957)
- (5) S.K. MUKHERJEE and S.K. MAJUMDAR: *Indian J. Exp. Biol.*, 11, 436~438 (1973)
- (6) 鎌田秀郎: 本誌, 13, 77~86 (1980)
- (7) 植物栄養学実験編集委員会: 植物栄養学実験書, P 186, 朝倉書店 (1959)