

好熱性糸状菌 *Thermoascus aurantiacus* による デンプン培地における酵素の生産

(Production of Enzymes by a *Thermophilic Fungus*, *Thermoascus aurantiacus*, in a Medium Containing Starch)

大野 信子、福田 晴美、王 紅 猷

NOBUKO OHNO, HARUMI FUKUDA and

WANG HONGXIAN

1. 緒 言

Thermoascus aurantiacus は、40°C以下では生育が不良で、30°C以下ではほとんど生育しない好熱性糸状菌であり¹⁻⁴⁾、本菌のセルロースやキシランの利用と関連して、耐熱性のセルラーゼ⁵⁻⁹⁾やキシラナーゼ¹⁰⁻¹⁴⁾の細胞外への生産条件や生産された酵素の性質等について多くの検討が加えられている。これらとは別に、デンプンの利用と関連して、アミラーゼについても報告されているが¹⁵⁻¹⁷⁾、その酵素化学的性質等についての詳細は明らかにされていない。

本報告は、*T. aurantiacus*のデンプンを中心に各種炭素源における生育やカタラーゼとアミラーゼの生産について若干の検討を加えたものである。

2. 実験材料と方法

1) 使用菌株ならびに培養法

菌株は勸発酵研究所より分譲の *Thermoascus aurantiacus* IFO 31693を用いた。供試菌株は、ポテトデキストロース寒天 (Difco) 斜面培地を用い、40°Cにて7~10日間培養後、常温で保存した。菌株の培養は、下記基本塩類培地に各種の炭素源を2%の濃度で添加したものを、各培地の30ml、200mlをそれぞれ100ml、1ℓ容の三角フラスコにいれ、これに供試菌株を接種し、40°Cにて5~10日間回転振盪 (180rpm) して行った。酵素の生産のためには1ℓ容三角フラスコを用いて培養した。基本塩類培地には、NaNO₃ 5g、K₂PHO₄ 5g、MgSO₄·7H₂O 1g、酵母エキス 0.2g、FeC₆H₅O₇·xH₂O 20mg、CaCl₂ 10mg、ZnSO₄·7H₂O 10mg、MnCl₂·4H₂O 2.0mg、CuSO₄·5H₂O 0.2mg、KI 0.2mg、(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.2mg、H₃BO₃ 0.2mgを1ℓ蒸留水中に添加したものをpH7.0に調整して用いた。

2) 酵素活性の測定

アミラーゼの活性は、酵素液1.0mlと100mM酢酸緩衝液(pH5.0) 2.0mlに2.0%可溶性デンプン

ブ 1.0mlを加えて反応を開始し、30°Cに10分間インキュベートしたのち、生じた還元糖を3,6-ジニトロフタル酸法¹⁸⁾にて定量して求めた。酵素活性の1単位(U)は、上記反応条件下において1分間に生成する還元糖量をグルコース相当量(μmol)として求めて表示した。

カタラーゼの活性は、30°Cにおいて、過酸化水素を含む50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.0) 2.5mlに酵素液 0.5mlを加えて反応を開始し、過酸化水素の分解を240nmにおける吸光度の減少より求めて測定した¹⁹⁾。反応基質の過酸化水素はリン酸緩衝液の250mlに市販の30%過酸化水素 0.32mlを添加して用いた。酵素活性の1単位(U)は、上記反応条件下において1分間に分解した過酸化水素量(μmol)として表示した。過酸化水素の分子吸光係数は、 $0.0436 (\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$ を用いた。

3. 結 果

1) カタラーゼの生産に及ぼす炭素源の影響

各種の炭素源が*T. aurantiacus* IFO 31693の培養ろ液へのカタラーゼの生産に及ぼす影響について調べた。本菌は、各種の炭素源(2%)でカタラーゼを生産した。酵素生産量はデンプンを用いた場合が最大となり、生育も良好であった(Table 1)。なお、エタノール(2%)を炭素源とした場合には、本菌の生育は、極めて悪かったので、その濃度を1%にして培養したが、生育菌体重量当たり(U/g dry cell weight)のカタラーゼの生産量に換算すると2%の濃度を用いた他の炭素源と比較して良好で、デンプンの65,000U/g dry cell wt.に対して175,000U/g dry cell wt.とかなり高い結果を与えた。

これらのデンプンを含む多くの炭素源において、培養8日から9日にかけて菌体重量は若干増加し、ほとんど減少することがなかったにもかかわらず、培養ろ液のカタラーゼの活性は急激に増加した。

2) カタラーゼの生産に及ぼすデンプンの影響

最大のカタラーゼ生産を与えたデンプンについては、さらにその濃度が生産に及ぼす影響について調べた。その結果、カタラーゼの生産量はデンプンの濃度が4%以下では少なく、8%の時に最大に達し、16%の濃度においてもかなりのカタラーゼが生産されることがわかった(Table 2)。いずれの培養においてもカタラーゼの生産量は培養8日から9日の間で急激に増加した。なお、別にグルコースに関しては、その濃度を2%から4%あるいは8%に高めて添加してみたが、デンプンの場合のような培養液中のカタラーゼの蓄積量の増加は見られなかった。

Table 1 Effects of carbon source on production of catalase by *Thermoascus aurantiacus* IFO 31693

Carbon source (2%)	8 days		9 days	
	Catalase production (U/ml)	Dry cell weight (g/30ml)	Catalase production (U/ml)	Dry cell weight (g/30ml)
Glucose	72.3	0.088	150	0.110
Fructose	175	0.144	230	0.140
Maltose	270	0.207	396	0.213
Xylose	82.3	0.111	166	0.123
Isomaltose	65.3	0.137	102	0.120
Galactose	96.7	0.045	137	0.052
Sucrose	155	0.132	263	0.153
Lactose	42.5	0.047	80.2	0.053
Cellobiose	60.6	0.088	115	0.083
Trehalose	107	0.133	123	0.151
Starch	325	0.183	426	0.195
Xylan	N.D.	growth	N.D.	growth
Cellulose	10.0	growth	17.2	growth
Ethanol (1%)	177	0.037	250	0.043
Glycerol	173	0.163	267	0.160
Inositol	5.32	0.042	10.1	0.045
Olive oil	130	growth	161	growth
Succinate	N.D.	0.028	N.D.	0.030
Wheat bran	96.9	growth	142	growth
Rice bran	51.4	growth	92.3	growth

The organism was incubated in a 100ml Erlenmeyer flask containing 30ml of each medium for 8 or 9 days. Sodium nitrate (0.5%) was used as a nitrogen source. N.D.: Not detectable. Growth: Cell weight was not determined because it was difficult to separate mycelia from leavings of the insoluble carbon substrate.

3) アミラーゼの生産に及ぼすデンプンの影響

本菌のデンプンの利用性に関連して、さらにアミラーゼの生産性に関して調べた。アミラーゼの生産に及ぼすデンプン濃度の影響については、その濃度が2~4%で最大に達し、6%以上で急激に低下した (Table 3)。アミラーゼの生産量は調べた各濃度において培養経過に伴い徐々に増加し、培養5~7日で最大に達した。上記のカタラーゼの生産においては、このデンプン濃度が2~4%では培養ろ液中への蓄積は少なく、8%で最大になるといったように、両酵素の生産性に関して培地に添加するデンプン濃度に著しい差が見られた。

Table 2 Effects of concentrations of starch on production of catalase by *Thermoascus aurantiacus* IFO 31693

Starch Concentration (%)	8 days		9 days	
	Catalase production (U/ml)	Dry cell weight (g/30ml)	Catalase production (U/ml)	Dry cell weight (g/30ml)
2	272	0.153	416	0.147
4	422	0.189	688	0.256
8	815	0.243	1412	0.350
12	793	0.342	1376	0.497
16	764	0.461	1164	0.585

The organism was incubated in a 100ml Erlenmeyer flask containing 30ml of each medium for 8 or 9 days. Sodium nitrate was used as a nitrogen source.

Table 3 Effects of concentrations of starch on production of amylase by *Thermoascus aurantiacus* IFO 31693

Starch concentration (%)	Amylase production (U/ml)
1	0.783
2	1.50
4	1.76
6	0.369
8	0.134
10	0.111

The organism was incubated in a 100ml Erlenmeyer flask containing 30ml of each medium for 6 days.

4) カタラーゼとアミラーゼの生産に及ぼす窒素源の影響

カタラーゼの生産に及ぼす窒素源の影響については、無機窒素源として硝酸ナトリウム、有機窒素源として酵母エキス、ポリペプトン、大豆カゼイン、ミルクカゼインを添加した2%デンプン培地ではほぼ同程度(300~400U/ml)の酵素の生産量が得られた(Table 4)。これに対して、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウムを用いた培地においては、菌体の生育量が硝酸ナトリウムの場合とほとんど変わらなかったにもかかわらず、培養ろ液中にカタラーゼの活性はいずれもほとんど検出されなかった。別に尿酸を窒素源とした2%デンプン培地においては、カタラーゼの生産量は硝酸ナトリウムを用いた場合の2~3

Table 4 Effects of nitrogen source on production of catalase by *Thermoascus aurantiacus* IFO 31693

Nitrogen source (0.5%)	8 days		9 days	
	Catalase production (U/ml)	Dry cell weight (g/30ml)	Catalase production (U/ml)	Dry cell weight (g/30ml)
NaNO ₃	297	0.177	353	0.195
(NH ₄) ₂ SO ₄	N.D.	0.140	N.D.	0.142
NH ₄ Cl	N.D.	0.127	N.D.	0.110
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.45	0.055	23.9	0.066
Yeast extract	290	0.150	371	0.147
Corn steep liquor	97.8	0.095	202	0.106
Polypepton	367	0.171	532	0.116
Uric acid	465	0.166	956	0.147

The organism was incubated in a 100ml Erlenmeyer flask containing 30ml of each medium for 8 or 9 days. Soluble starch (2%) was used as a carbon source. N.D.: Not detectable.

倍 (約1,000U/ml) に達した。いずれの場合においても、培養ろ液中のカタラーゼの活性が急激に増加した培養8日から9日の間で菌体の重量は若干増加する傾向を示した。

アミラーゼは、アンモニウム塩を窒素源に用いた場合にも、硝酸ナトリウムや有機窒素源を用いた場合 (1.5~2.5U/ml) の1/2程度 (0.5~1.0U/ml) の活性が培養ろ液に認められ、カタラーゼの生産性のよう、窒素源によって大きく変動することはなかった。

4. 考 察

Thermoascus aurantiacus が培養液中にアミラーゼを生産することはすでに報告されているが¹⁵⁻¹⁷⁾、酵素の生産条件や生産された酵素の諸性質等についての詳細は必ずしも明らかになっていない。本報において、*T. aurantiacus* IFO 31693は、デンプン培地において、カタラーゼとアミラーゼを生産することを明らかにしたが、アミラーゼとカタラーゼの最適生産条件におけるデンプンの濃度は著しく異なることが見いだされた。また、それぞれの培地におけるアミラーゼとカタラーゼの最大蓄積に達する時間にはずれがあることも明らかになり、両酵素の間に直接的な相関は見られなかった。

微生物によるカタラーゼの細胞外への生産蓄積に関しては、*Aspergillus niger* において、古くよりグルコン酸発酵との関連から、グルコース培地におけるグルコースオキシダーゼとカタラーゼとの関連が詳細に検討されている²⁰⁻²⁴⁾。また、*A. niger* のカタラーゼの生産につ

いては、窒素源の種類やそれらの濃度が酵素量のレベルに影響すると報告されている。*T. aurantiacus*のデンプン培地においては、カタラーゼはアンモニウム塩では培地中への生産が見られず硝酸塩や有機態の窒素が用いられた場合に生産されるといった結果が得られている。*T. aurantiacus*のカタラーゼの生産機構に関して、当初*A. niger*と同様な関連も考えられたが、本菌におけるカタラーゼの蓄積にはグルコースの直接的な添加が、必ずしも最大の効果をもたらす訳ではなく、また、エタノールのように細胞当たりのカタラーゼの生産性の高い炭素源も存在し、*A. niger*の様なグルコースオキシダーゼとカタラーゼの図式からでは説明できない結果となっている。*T. aurantiacus*によるデンプン培地におけるカタラーゼの生産は、培養ろ液中の酵素量が急激に増加した培養8日目から9日目の間で細胞量も増加していることから、単に菌体の急速な自己消化によって細胞内の酵素が、培養ろ液中に蓄積してきたものではないと思われるが、さらに過酸化水素の生成系と考えられるオキシダーゼ等との関連も含めて、本菌がなぜデンプン培地やエタノール培地においてカタラーゼを培養液中に生産するのかについての検討を現在加えている。

5. 要 約

好熱性糸状菌 *Thermoascus aurantiacus* IFO 31693は、デンプン培地を用いた40°Cの培養において、培養ろ液中にカタラーゼとアミラーゼを生産した。カタラーゼの生産は窒素源に硝酸ナトリウムを用いた8%デンプンの場合に最大であった。このときアミラーゼ等の生産は低いレベルに抑えられた。窒素源にアンモニウム塩が用いられた場合にはカタラーゼはほとんど生産されなかった。アミラーゼの生産には2~4%デンプン濃度が効果的で、窒素源がカタラーゼの生産のように影響することはなかった。

本研究を遂行するにあたり、実験協力やご助言を頂いた千葉大学藤井貴明教授に感謝いたします。

引用文献

- 1) Evans, H.C.: *Trans. Br. mycol. Soc.*, **57**, 241-254 (1971).
- 2) Evans, H.C.: *Trans. Br. mycol. Soc.*, **57**, 255-266 (1971).
- 3) Minoura, K., Yokoe, M., Kizima, T., and Nehira, T.: *Trans. mycol. Soc. Japan*, **14**, 352-361 (1973).
- 4) Awao, T., and Otsuka, S.: *Trans. mycol. Soc. Japan*, **14**, 221-236 (1973).

- 5) Fergus, C.L.: *Mycologia*, **61**, 120-129 (1969).
- 6) Romanelli, R.A., Houston, C.W., and Barnett, S.M.: *Appl. Microbiol.*, **30**, 276-281 (1975).
- 7) Tong, C.C., Cole, A.L., and Shepherd, M.G.: *Biochem. J.*, **191**, 83-94 (1980).
- 8) Shepherd, M.G., Tong, C.C., and Cole, A.L.: *Biochem. J.*, **193**, 67-74 (1981).
- 9) Feldman, K.A., Lovett, J.S., and Tsao, G.T.: *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 262-272 (1988).
- 10) Grajek, W.: *Biotechnol. Lett.*, **9**, 353-356 (1987).
- 11) Yu, E.K.C., Tan, L.U.L., Chan, M.K.-H., Deschatelets, L., and Saddler, J. N.: *Enzyme, Microb. Technol.* **9**, 16-24 (1987).
- 12) Khandke, M.K., Vithayathil, P.J., and Murthy, S.K.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **274**, 491-500 (1989).
- 13) Khandke, M.K., Vithayathil, P.J., and Murthy, S.K.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **274**, 501-510 (1989).
- 14) Gomes, D.J., Gomes, J., and Steiner, W.: *J. Biotech.*, **33**, 87-94 (1994).
- 15) Jayachandran, S., and Ramabadran, R.: *Indian J. Exp. Biol.*, **8**, 344 (1970).
- 16) Adams, P.R.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **13**, 430-432 (1991).
- 17) Adams, P.R.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **15**, 311-313 (1991).
- 18) 百瀬 勉、向井良子、河辺節子、鈴木順子、山本恭子：分化、**11**、956-959 (1962)。
- 19) Beers, R.F. Jr., and Sizer, I.W.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 133-140 (1952).
- 20) Kikuchi-Torii, K., Hayashi, S., Nakamoto, H., and Nakamura, S.: *J. Biochem.*, **92**, 1449-1456 (1982).
- 21) Witteveen, C.F.B., Veenhuis, M., and Visser, J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1190-1194 (1992).
- 22) Witteveen, C.F.B., van de Vondervoort, P.J.I., van den Broeck, H.C., van Engelenburg, F.A.C., de Graaff, L.H., Hillebrand, M.H.B.C., Schaap, P.J., and Visser, J.: *Curr. Genet.*, **24**, 408-416 (1993).
- 23) Gromada, A., and Fiedurek, J.: *J. Basic. Microbiol.*, **37**, 85-91 (1997).
- 24) Fiedurek, J., and Gromada, A.: *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 344-347 (1997).

大野 信子(本学教授)

福田 晴美(本学助手補)

王 紅 猷 (千葉大学大学院自然科学研究科)