

醤油麹菌のアミラーゼ及びプロティナーゼに就て 耐塩性及び無機イオンの影響

今 原 広 次

HIROTSUGU IMAHARA: On the Amylase and the Proteinase from
a strain of *Aspergillus sp.* in Syoyu Koji. Halophilic
Behavior and Influence of Inorganic Ions

摘 要 醤油麹より分離せるアミラーゼ力及びプロティナーゼ力共に強力なる *Aspergillus* 属一株 (As-16号) に就てその酵素力に対する塩類の影響を検討した。

1) 20%食塩溶液中で麹を浸漬すると、両酵素共に10~20日で著しく失活するが、この場合 0°C、20°C では比較的失活は少く、40°C では大であつた。

2) Cation による影響は Hg^{++} , Ag^+ , Cd^{++} , Sn^{++} , Pb^{++} によりアミラーゼが又 Hg^{++} , Ag^+ , Cu^{++} によりプロティナーゼが強く失活された。又 Mg^{++} , Zn^{++} はアミラーゼの活性に対し促進的に作用するが、プロティナーゼに就いてはかかる作用を示す Cation は認められなかつた。

麹菌の澱粉分解酵素系及び蛋白分解酵素系に就いては既に数々の研究がなされているが、特にアミラーゼ系を主とする麹菌に関するものが多く、それ等のアミラーゼに就いて諸性質^{1,2)}の検討や分離精製法^{3,4)}等が詳細に報告されている。

併し醤油醸造上重要と考えられる麹菌の菌株に就いてその濃厚食塩の存在がその酵素力価に如何なる影響を与えるかと云う問題に就いての報告は殆んど見当らない。著者は数年来醤油麹及び諸味中より分離せる麹菌よりアミラーゼ力及びプロティナーゼ力共に強力であり、高食塩濃度下に於いても比較的その力価減少率の小さい代表菌株を選択し、その酵素の食塩及び他の無機塩類による影響を検討したのでここに報告する。

実 験 之 部

供 試 菌 株

過去に於いて醤油麹より分離せる約40菌株の実用麹菌よりそのアミラーゼ力、プロティナーゼ力共に食塩による影響の比較的少い菌株として選択された As-16

3) Anion による影響は両酵素共に JO_3^- , ClO_3^- , $Cr_2O_7^{--}$, $Fe(CN)_6^{--}$ 及び $Fe(CN)_6^{----}$ の如き酸化還元に関連する Ion によつてのみかなりの失活を認め、他の Anion による顕著な影響は見られず CN^- , CrO_4^{--} がアミラーゼに対してのみ若干の阻害的影響を示した程度であつた。

4) NaCl による両酵素の失活は Cl^- よりも Na^+ による影響が大なる如く推察される。即ち $CaCl_2$ 及び $AlCl_3$ の10%溶液中に麹を浸漬する場合、NaCl と同様 $AlCl_3$ により両酵素共に強く失活されるが $CaCl_2$ によつてはその失活は、比較的 low rate に止まる事を認めた。

号菌を用いた。

麹 麴 の 調 製

Fernbach フラスコ (内容 500 cc) に麹 50 g を入れ、蒸溜水 40 cc を撒布して蒸気殺菌後、接種し 30°C、3日間培養を行い、充分孢子着生せるものを調製した。

Proteinase 力価の測定

所定の方法で調製せる酵素液 5cc に Walpole-緩衝液 (M/10, pH \approx 5.0) 5cc を加え基質 gelatine 5% 液 10cc を加え 40°C で反応させ、60分後その反応液 5cc 中のアミノ態窒素の増加を Formol-滴定法で測定した。

Amylase 力価の測定

上述と同じ酵素液 5cc に Walpole-緩衝液 (M/10, pH \approx 5.0) 5cc を加え基質 Soluble starch 2%液 10cc を加え 50°C で反応させ、30分後生成還元糖をヨード法にて測定した。

I 高食塩濃度の下で浸漬せる場合の影響

前述の方法で調製せる麹麴 (原料麹 50g より製麴)

Table 1 Influence of Steeping in High Concentrate Salt Solution

Amylase					
Steeping Temp. °C	Steeping Liquid Days	Distilled Water		20%NaCl Solution	
		10	20	10	20
		0	85.9	62.3	72.3
20	73.4	51.7	64.5	40.2	
40	65.7	43.5	42.4	21.8	

Proteinase					
Steeping Temp. °C	Steeping Liquid Days	Distilled Water		20%NaCl Solution	
		10	20	10	20
		0	92.3	75.6	82.4
20	90.5	67.3	74.7	54.2	
40	75.2	52.7	51.6	38.7	

に20%食塩水 250cc を加え 0°C, 20°C 及び 40°C で所定日数浸漬の後, 蒸溜水 250cc を更に加え沝過し, その沝液を酵素液としてアミラーゼ力, プロティナーゼ力を測定した. 一方蒸溜水 250cc で浸漬し同一の条件で処理して得た酵素液を対照とした. 尚, 製麴直後, 同一の条件で蒸溜水にて抽出せる酵素液の各力価を100として夫々の比力価を以て表示した.

即ちこの結果, アミラーゼ, プロティナーゼ共に食塩水中で浸漬する事に依りその力価が減少するが, 温度の高い程その減少率が大で, 特に 20°C 迄は比較的その減少率が小であるが, 40°C では両酵素共その力価は大きく減少している. 一方蒸溜水で浸漬を行つた場合に於いてもかなり減少を示し, 食塩の影響は 40°C に於て顕著に見られるが, 0°C, 20°C 付近では著しい影響は認められなかつた. 又一般にアミラーゼよりプロティナーゼの方が食塩に対して比較的安定であつて, 醬油麴菌の酵素の中ではアミラーゼよりプロティナーゼの方が此の様な条件に対してその安定性の点で優れていると考えられた. 更に長期の濃厚食塩水浸漬によるこれら酵素の状態を検討し, 麴菌酵素の諸味中に於ける活性を明かにせんと試みたが, かかる条件で20日以上浸漬は他の因子の影響が大となり, その実態を掴み得なかつたので, 改めて他の面より検討することとした.

II 諸種の Cation の影響

前記の実験に於て該菌のアミラーゼ, プロティナーゼは温度上昇によつて一部不活性化されるのみならず

食塩の存在によつて, 更に強く影響されることを認めた. この結果の示す食塩の影響は Na⁺ によるものか或は Cl⁻ によるものか, 又その中何れが大なる影響力を有するかが問題となる. よつて各種の Cation 及び Anion による影響を検討することにより, この問題の推論の一助とせんとした. トリプシン, パパイン等の動植物界に存在する主要プロティナーゼに就いて

Table 2 Influence of Cations on the Amylase Activity

Cations	Concentration M	Glucose Produced mg/5cc	Relative Activity
Na ⁺ (NaCl)	10 ⁻²	26.2	94
K ⁺ (KCl)	"	24.8	89
Ca ⁺⁺ (CaCl ₂)	"	29.8	108
Mg ⁺⁺ (MgCl ₂)	"	22.7	82
Ba ⁺⁺ (BaCl ₂)	"	18.5	66
Al ⁺⁺⁺ (AlCl ₃)	"	20.7	74
Ni ⁺⁺ (NiCl ₂)	"	13.5	49
Pb ⁺⁺ (PbAc ₂)	"	9.8	35
Co ⁺⁺ (CoCl ₂)	"	18.4	66
Cu ⁺⁺ (CuCl ₂)	"	12.1	43
Mn ⁺⁺ (MnCl ₂)	"	19.2	69
Zn ⁺⁺ (ZnCl ₂)	"	29.5	106
Ag ⁺ (AgNO ₃)	"	3.8	13
Hg ⁺⁺ (HgCl ₂)	"	4.2	15
Cd ⁺⁺ (CdCl ₂)	"	7.1	25
Sn ⁺⁺ (SnCl ₂)	"	6.4	23
Control		27.7	100

Table 3 Influence of Cations on the Proteinase Activity

Cations	Concentration M	Formol Titer* cc/5cc	Relative Activity 10 ⁻²
Na ⁺ (NaCl)	10 ⁻²	0.92	94
K ⁺ (KCl)	"	0.93	95
Ca ⁺⁺ (CaCl ₂)	"	0.84	85
Mg ⁺⁺ (MgCl ₂)	"	1.03	106
Ba ⁺⁺ (BaCl ₂)	"	0.74	76
Al ⁺⁺⁺ (AlCl ₃)	"	0.71	73
Ni ⁺⁺ (NiCl ₂)	"	0.63	65
Pb ⁺⁺ (PbAC ₂)	"	0.62	53
Co ⁺⁺ (CoCl ₂)	"	0.82	84
Cu ⁺⁺ (CuCl ₂)	"	0.34	35
Mn ⁺⁺ (MnCl ₂)	"	0.74	76
Zn ⁺⁺ (ZnCl ₂)	"	0.87	89
Ag ⁺ (AgNO ₃)	"	0.16	16
Hg ⁺⁺ (HgCl)	"	0.24	24
Cd ⁺⁺ (CdCl ₂)	"	0.58	59
Sn ⁺⁺ (SnCl ₂)	"	0.74	76
Control		0.97	100

* Formol Titer of 0.1 N-NaOH per 5 cc of Reaction mixture.

は各種の阻害剤の影響^{5,6,7)}が報告され、麴菌プロテイナーゼに就いては既に松島氏⁸⁾の報告がある。又アマミラーゼに関しても種々の原料のアミラーゼに就いて同様な報告^{9,10,11,12)}があり、又麴菌アマミラーゼに就いて

は岡崎氏等^{13,14)}の報告があるが、特に無機イオンに關してその影響を詳細に検討した報告は見当らず未だ充分解明の域に達していない。著者は前記酵素液(製麴直後の抽出酵素液) 2.5 cc に各イオン溶液 2.5 cc を加え 20°C で 30分 incubate した後、そのアマミラーゼ力、プロテイナーゼ力を測定し、無処理の場合の力価と比較した。

即ちこの結果、アマミラーゼは Hg⁺⁺, Ag⁺, Cd⁺⁺, Sn⁺⁺, Pb⁺⁺ により強く阻害され、又 Cu⁺⁺, Ni⁺⁺ によつてもかなり阻害されているが、Mg⁺⁺, Zn⁺⁺ は促進的影響を示している。又一方、プロテイナーゼは Hg⁺⁺, Ag⁺, Cu⁺⁺ により強く阻害され、Pb⁺⁺, Cd⁺⁺, Ni⁺⁺ によつてもかなり阻害されたが、特に促進的影響を示す Cation は見当らなかつた。

併し何れの場合も Na⁺, K⁺ は上の実験に示す条件下ではその影響は顕著でない様であつた。

III 諸種の Anion の影響

実験 I と同様な見地より各種 Anion の影響を検討した。実験方法は全く前記と同じで行つた。

この結果、アマミラーゼに就いては、ClO₃⁻, JO₃⁻, Cr₂O₇²⁻, Fe(CN)₆³⁻ 及び Fe(CN)₆⁴⁻ は強い阻害的影響を示したが、他には CN⁻, CrO₄²⁻ が僅かに若干の阻害的影響を示したに過ぎなかつた。一方プロテイナーゼに於ても、特に顕著な阻害的影響を示す Anion は認められず、ClO₃⁻, JO₃⁻, Fe(CN)₆³⁻ 及び Fe(CN)₆⁴⁻, Cr₂O₇²⁻ に於て阻害的影響を認め

Table 4 Influence of Anions on the Amylase Activity

Anions	Concentration M	Glucose Produced mg/5 cc	Relative Activity
Cl ⁻ (NaCl)	10 ⁻²	27.1	96
Br ⁻ (NaBr)	"	26.8	95
J ⁻ (NaJ)	"	24.3	87
CN ⁻ (KCN)	"	20.3	72
SO ₄ ²⁻ (Na ₂ SO ₄)	"	27.3	97
SO ₃ ²⁻ (Na ₂ SO ₃)	"	26.9	95
CO ₃ ²⁻ (Na ₂ CO ₃)	"	28.0	99
HCO ₃ ⁻ (NaHCO ₃)	"	27.8	98
HPO ₄ ²⁻ (Na ₂ HPO ₄)	"	27.3	97
NO ₃ ⁻ (NaNO ₃)	"	27.7	98
ClO ₃ ⁻ (KClO ₃)	"	18.4	65
JO ₃ ⁻ (KJO ₃)	"	11.7	41
SCN ⁻ (KSCN)	"	23.8	84
CrO ₄ ²⁻ (K ₂ CrO ₄)	"	25.3	90
Cr ₂ O ₇ ²⁻ (K ₂ Cr ₂ O ₇)	"	4.5	16
Fe(CN) ₆ ³⁻ (K ₃ Fe(CN) ₆)	"	10.4	37
Fe(CN) ₆ ⁴⁻ (K ₄ Fe(CN) ₆)	"	11.8	41
Control		28.1	100

Table 5 Influence of Anions on the Proteinase Activity

Anions	Concentration M	Formol Titer* cc/5 cc	Relative Activity
Cl ⁻ (NaCl)	10 ⁻²	0.92	94
Br ⁻ (NaBr)	"	0.93	95
J ⁻ (NaJ)	"	0.92	94
CN ⁻ (KCN)	"	0.91	92
SO ₄ ⁻⁻ (Na ₂ SO ₄)	"	0.93	95
SO ₃ ⁻⁻ (Na ₂ SO ₃)	"	0.86	87
CO ₃ ⁻⁻ (Na ₂ CO ₃)	"	0.95	96
HCO ₃ ⁻ (NaHCO ₃)	"	0.95	96
HPO ₄ ⁻⁻ (Na ₂ HPO ₄)	"	0.94	95
NO ₃ ⁻ (NaNO ₃)	"	0.91	92
ClO ₃ ⁻ (KClO ₃)	"	0.63	64
JO ₃ ⁻ (KJO ₃)	"	0.73	74
SCN ⁻ (KSCN)	"	0.85	87
CrO ₄ ⁻⁻ (K ₂ CrO ₄)	"	0.90	91
Cr ₂ O ₇ ⁻⁻ (K ₂ Cr ₂ O ₇)	"	0.51	52
Fe(CN) ₆ ⁻⁻⁻⁻ (K ₃ Fe(CN) ₆)	"	0.63	64
Fe(CN) ₆ ⁻⁻⁻⁻⁻ (K ₄ Fe(CN) ₆)	"	0.57	58
Control		0.98	100

* Formol Titer of 0.1 N-NaOH per 5 cc of Reaction mixture.

たに過ぎなかつた。而して Anion の影響は上の如き酸化還元に関連のある Ion のみが影響を示す結果が得られ、これは酵素の活性中心の酸化還元機構に起因するものか、又は担体としての蛋白質の酸化還元による変性に起因するものと推察され、従つて何れの場合も Anion の影響は直接的にその Ion の種類によるのではないと考えられた。

IV 塩化物溶液に浸漬の影響

実験Ⅱ及び実験Ⅲよりアミラーゼ及びプロティナーゼの活性に対する食塩の阻害作用に就いては Anion の影響として Cl⁻ を考えるよりも Cation 即ち Na⁺ の影響が大であろうと推察されるので、Na⁺ に代るべき Ca⁺⁺ 及び Al⁺⁺⁺ を用い実験Ⅰと同様な麩麩の塩類溶液中浸漬によるそれら塩類の影響を検討した。

実施条件は全く同前であるが、浸漬温度は 20°C のみで行つた。

この結果、明かに AlCl₃ 溶液に浸漬すればアミラーゼ、プロティナーゼ共に強く失活されるが CaCl₂ 溶液中ではその失活程度は少い。よつて少く共両酵素は Anion よりも Cation の種類により選択的に阻害を受ける事が認められた。

即ち麩菌アミラーゼ及びプロティナーゼの活性は程度の差はあるが、夫々温度及び NaCl により影響される。而してその主因は NaCl の Cl⁻ よりも Na⁺ の影響する所大であろうと考えられた。

本研究は中浜敏雄教授の終始御懇篤なる御指導によるものであり、又発表に当り同教授の御校閲を得た。ここに謹んで深謝の意を表す。

Table 6 Influence of Steeping in AlCl₃ and CaCl₂ Solution

Enzymes and Salts	Steeping Liquid Days	Distilled Water		10% Salt-Solution	
		10	20	10	20
		Amylase { AlCl ₃ CaCl ₂	86.1	71.5	41.2 67.5
Proteinase { AlCl ₃ CaCl ₂	91.3	68.5	50.1 60.7	24.8 47.8	

Steeping at 20°C

引用文献

- 1) 赤堀・池中・萩原 (1954) : J. Biochem, **41**, 577.
- 2) V. M. Hanrahan, and M. L. Caldwell (1953) : J. Am. Chem. Soc., **75**, 4030.
- 3) 赤堀・萩原・池中 (1951) : Proc. Japan. Acad., **27**, 350.
- 4) 岡崎 (1951, 1951. 1952) : 日農化., **24**, 88 ; **24**, 201 ; **25**, 317.
- 5) M. Bergman (1941) : J. Biol. Chem., **39**, 569.
- 6) 奥村 (1939) : Bull. Chem. Soc. Jap., **14**, 161.
- 7) M. M. Green, J. A. Gladner, L. W. Cunningham and J. H. Neurath (1952) : J. Am. Chem. Soc., **74**, 2122.
- 8) 松島 (1955) : 日農化, **29**, 781.
- 9) 福本・辻阪 (1955) : 科学と工業, **29**, 124.
- 10) C. E. Weill, and M. L. Caldwell (1945) : J. Am. Chem. Soc., **67**, 212.
- 11) A. K. Balls (1948) : J. Biol. Chem., **173**, 9.
- 12) S. Schwimmer (1949) : J. Biol. Chem., **179**, 1063.
- 13) 岡崎 (1952) : 日農化, **26**, 447.
- 14) 西村 (1930) : 日農化, **6**, 485.

Summary

Previously Prof. Nakahama and Imahara isolated a strain of *Aspergillus* sp. which produced much amylase and proteinase from soja koji. I have studied on the halophilic properties of the amylase and the proteinase in the koji made by this strain. I could see that the both enzymes in it were inactivated by the steeping the koji in high concentrate sodium chloride solution and were far more weakened at higher temperature as 40°C than the lower. The influence of various cations and anions to the two enzymes were studied upon they were incubated at 20°C. In presence of the cations ; Hg⁺⁺, Ag⁺, Cd⁺⁺, Sn⁺⁺ and Pb⁺⁺, the amylase activity was decreased, while

the cations, Mg⁺⁺ and Zn⁺⁺, increased it. The proteinase activity was decreased in presence of cations, Hg⁺⁺, Ag⁺ and Cu⁺⁺. The anions, ClO₃⁻, JO₃⁻, Cr₂O₇⁻⁻⁻, Fe(CN)₆⁻⁻⁻ and Fe(CN)₆⁻⁻⁻⁻, decreased the activities of the both enzymes. I suppose that the actions of the anions are belong to the oxydoreductive system and no specific action according to the kinds of anions are shown and the influence of NaCl to these enzymes is more owing to the cations in it, Na⁺, than the anion, Cl⁻. I showed the influence of Al⁺⁺⁺ to the activities of the two enzymes was obvious, but that of Ca⁺⁺ was not.