

杉浦 衛, 伊藤万蔵, 奥村一忠: 酵素剤の研究 (第12報)

耐酸性プロテアーゼの培養条件

Mamoru Sugiura, Manzo Ito and Kazutada Okumura:

Studies on Enzyme preparations (12) Culture Conditions of Acid stable Protease

Several strains of microorganisms selected by the previous screening tests were further investigated on their ability to produce acid-stable protease. As a result, one strain of *Rhizopus* was finally concluded to be the most preferable. By using this strain, the change of the acid-stable protease activity in the course of growth was investigated. The maximum formation of the acid-stable protease was observed after 40 hours of incubation and, there-after, the activity decreased gradually. The culture in high moist Koji and low temperature was fit for the enzyme formation.

緒 言

従来より耐酸性プロテアーゼとして、利用されているものには、*Aspergillus Saitoi*¹⁾をはじめ、*Aspergillus niger*²⁾、*Aspergillus oryzae*³⁾ etc. *Aspergillus* 属がよく開発されているが、*Rhizopus* 属に関しては、*Rhizopus chveinsis* 一種類のみがあるだけである。そこで最近著者らは、*Rhizopus* 属の耐酸性プロテアーゼを求めて、多数の *Rhizopus* 属菌株中から、耐酸性プロテアーゼ生産菌を検索した結果、*Rhizopus niveus* に属する一株菌が多量生産することを見出した。そこで、その培養法の検討を行ない、培養時間と各種酵素の産生状態について検討したのでその結果を報告する。

培養条件の検討

実験方法

1) 酵素活性測定法

酸性プロテアーゼ: Anson 変法⁴⁾に準じ酸変性ヘモグロビンを基質にし Folin 試薬による比色を利用した。リパーゼ: Nord⁵⁾の山田, 太田, 町田変法の改良法⁶⁾を用いた。力価は1分間に1 μ egの酸を遊離せしめる酵素量を、1単位とする。CMC アーゼ: pH 4.5, 40°C, 30分間, 0.5%, CMC-Na と酵素を反応せしめ、生成した糖を Somogyi 法⁷⁾で測定した。力価は1分間に1mgのグルコースを生成するとき100単位とする。

グルクアミラーゼ: pH 4.5, 30分間, 0.5% 可溶性デンプンと酵素を反応せしめ、生成したグルコースを、Fehling-Lehmann-Schoolr 法⁸⁾で測定し、10mgのグルコースを生成する酵素力を1単位とした。

2) その他の測定法

酸度: 麴の20倍抽出液を使用し、麴1gが含む酸を N/10-NaOH 溶液で中和するに必要なアルカリのml 数。

pH: 麴の20倍抽出液を測定。

着色度: 波長 420m μ と 720m μ で吸光度を測定し、その差をもって表わした。

3) 培 養 法

実験結果

a) 培養温度と酸性プロテアーゼ

培養温度と酸性プロテアーゼ生産との関係は Fig. 1 のようになり、培養温度は 25°C~30°C が適当と考えられる。

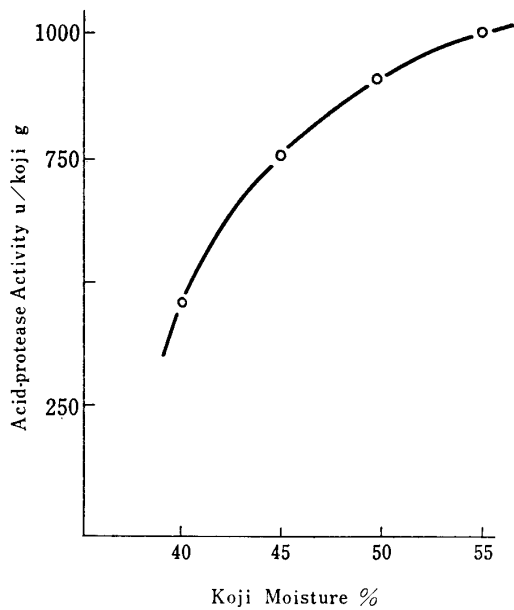


Fig 1. Culture Temperature and Acid-stable Protease Activity
Koji Moisture 55%

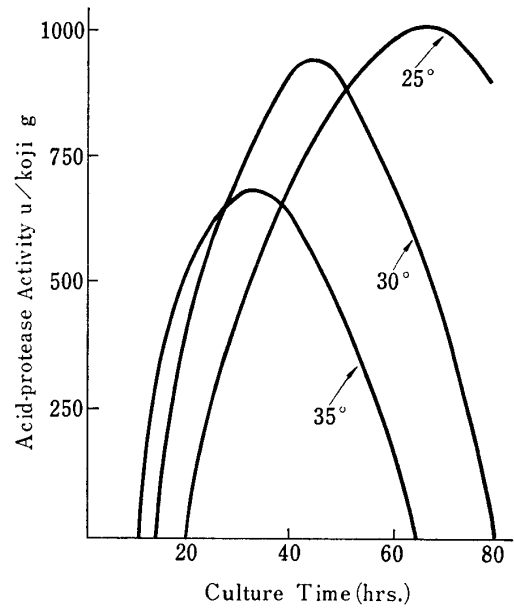


Fig 2. Koji Moisture and Acid-protease Activity
30°C, 40Hr Culture

b) 麴水分と酸性プロテアーゼ

Rhizopus 属は一般に高い水分を好むため、麴水分を調べるために温度 30°C 培養時間 40 時間とした場合の麴水分と酸性プロテアーゼの関係は Fig. 2 のようになり、この結果から水分は多いほど酸性プロテアーゼ生産に有利であることが判明し、水分 55% が適当であった。

c) 培養中の諸酵素の時間的消長

培養中の諸酵素の時間的消長を表わすと、Fig 3, 4 のようになる。この結果から酸性プロテアーゼは、培養初期に生産され、pH の上昇とともに失活するものと思われる。またリパーゼも酸性プロテアーゼと同じようなカーブをえがき培養後期で失活する。一方、CMCアーゼ、グルクアミラーゼのごとき、pH 安定性の高い酵素は、一旦生成するとなかなか失活しなかった。

結 論

Rhizopus 属について優秀な耐酸性プロテアーゼ生産菌の検索を行った結果、強力な 1 菌種を見出した。

培養温度は 25°~30°C が適当であり、培養時間は 40 時間、培養水分は 55% としたが、多い程酸性プロテアーゼ生産に有利であることが判明した。培養中の諸酵素の時間的消長は、酸性プロテアーゼは培養初期に生産され、pH の上昇とともに失活し、リパーゼも同じようなカーブをえがき、培養後期で失活した。これに反し、CMCase, glucamylase のような pH 安定性の高い酵素は一旦生成すると失活しなかった。

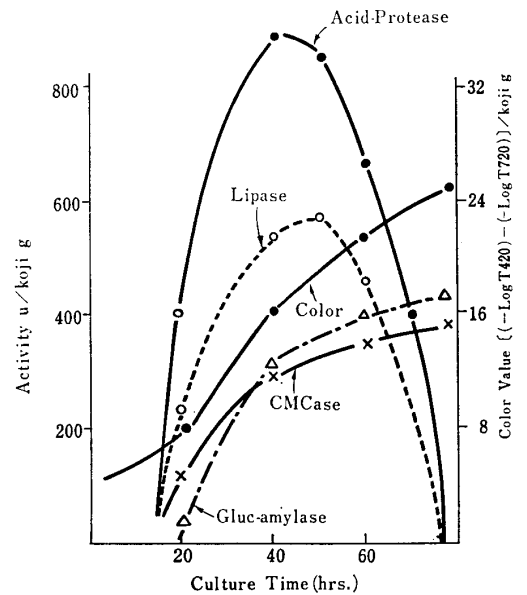


Fig 3. Various Enzyme in Culture
Koji Moisture 55%, Culture Temp. 30°C

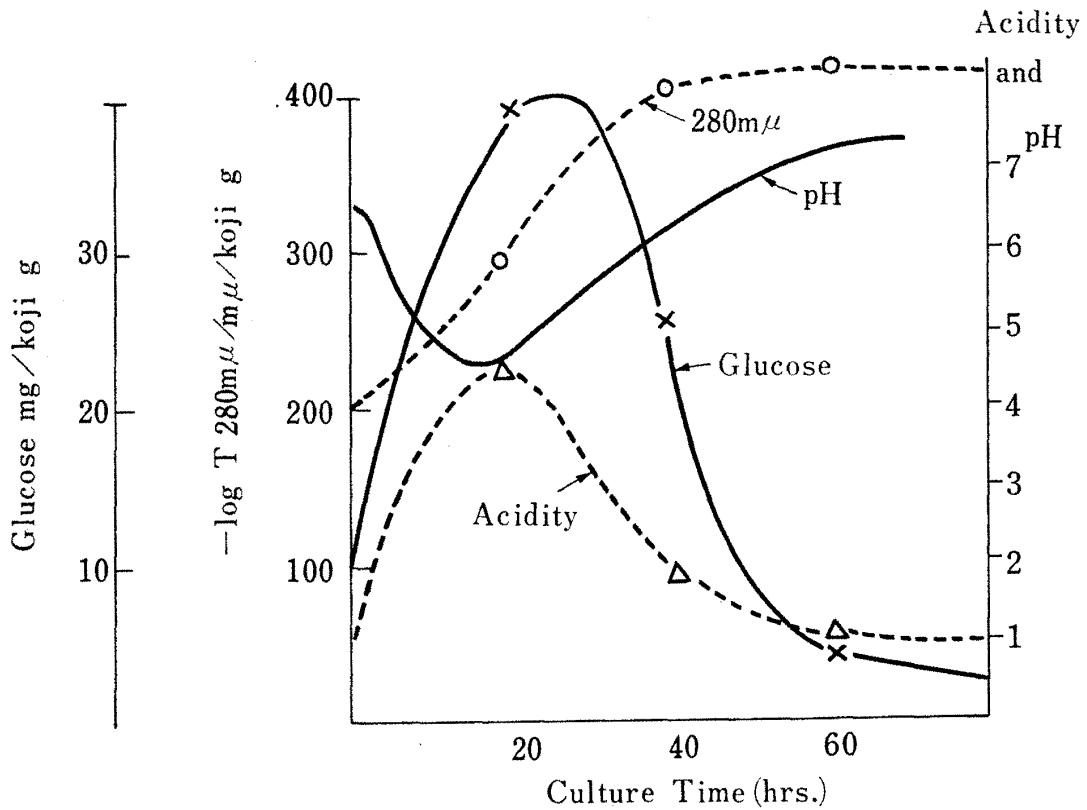


Fig 4. Various Enzyme in Culture
Koji moisture 55%, culture temp, 30°C

文 献

- 1) 岡崎, 石川: 薬剂学 **20**(4), 24 (1960)
- 2) 岡崎, 江田: 薬剂学 **24**(2), 41 (1964)
- 3) 野上 : 薬誌 **80**, 371, 1788 (1960)
- 4) M, L, Anson J. Gen. Physiol **22**, 79 (1938)
- 5) 山田, 太田, 町田: 日本農芸化学会誌 **36**, 860 (1962)
- 6) 杉浦, 伊藤, 浅野: 未発表.
- 7) Somogyi, M. : J. Biol. Chem. **195**, 19 (1952)
- 8) 駒居 : 澱粉糖技術研究会報 **23**, 88 (1961)

杉浦 衛, 小木曾太郎, 棚橋淳行: 酵素剤の研究 (第19報)
消化酵素製剤中における酵素活性の経時変化について

Mamoru Sugiura, Taro Ogiso, Junkō Tanahashi: Studies on Enzyme preparations. (19) On the Change of Enzyme Activity in Digestive Enzyme Preparations in Course of Time.

Recently, the enzyme Preparations formed in two layers, the outside of which acts in gastric