

- 6) Stransky, Biochem. Z., **266**, 454 (1933)
- 7) R. Truszkowski and C. Goldmanowna, Biochem. J., **27**, 612 (1933)
- 8) St. J. V. Przyleki, Bull. Soc. Chim. Bil., **8**, 804 (1926)
- 9) R. Fosse, C. R., **195**, 1198 (1932)
- 10) M. M. Smith, Nature, **197**, 361 (1963)
- 11) R. C. Greene and H. K. Mitchelli, Arch. Biochem. Biophys., **20**, 603 (1957)
- 12) A. H. Roush and A. J. Dammas, Science, **124**, 125 (1956)
- 13) J. Keilin, Biol. Revs. Cambridge Phil. Soc., **39**, 265 (1959)
- 14) G. Hubscher, H. Baum and H. R. Mahler, B. B. A., **23**, 43 (1957)
- 15) H. Beaufay, D. S. Bendall, P. Bandhuin and C. de Duve, B. J., **73**, 632 (1959)
- 16) 日本特許公告, 昭42-5192
- 17) F. W. Klemperer, H. C. Trimble and A. B. Hastings, J. Biol. Chem., **125**, 44 (1938)

杉浦 衛, 伊藤万蔵: *Aspergillus melleus* によるプロティナーゼの産生条件  
(酵素剤の研究第43報)<sup>1)</sup>

Mamoru Sugiura, Manzo Ito: Productive Conditions of Proteinase  
from *Aspergillus melleus* (Studies on Enzymes XXXXIII)<sup>1)</sup>

(Received September 24, 1969)

Summary

Effects of cultural conditions on the proteinase production were investigated by using *Aspergillus melleus*. Optimum moisture of bran-medium and temperature of culture for the proteinase production were 50-55% and 20-25°, respectively. At 25° and 50% of medium moisture, the proteinase production began at 2 days after inoculation.

Accumulation of the proteinase attained to the highest level after 5 days, the amount of which was  $9 \times 10^{-2}$  PU per gram of dry koji.

*Aspergillus* 属は大きく黒麹菌と黄麹菌に分類される。*Asp. niger* および *Asp. Saitoi* に代表される黒麹菌は主として酸性プロティナーゼを産生し、吉田らにより、*Asp. Saitoi* より酸性プロティナーゼが結晶化され、その諸性質が検討されている。<sup>2-4)</sup>

一方、*Asp. oryzae* および *Asp. sojae* に代表される黄麹菌は主として中性およびアルカリ性のプロティナーゼを産生し、*Asp. oryzae* より結晶または均一標品として得られており、*Asp. sojae* の麹抽出物よりイオン交換樹脂 Amberlite IRC 50 を用いて結晶が、<sup>9)</sup> DEAE セルロースを用いて均一標品が得られている。<sup>10)</sup>

また、*Asp. fumigatus* のプロティナーゼは Jönsson らにより研究が始められ、<sup>11)</sup> 経節によく繁殖し、肉質を不良にする *Asp. melleus* のプロティナーゼは住江らにより研究されているが、<sup>12)</sup> まだ結晶または均一標品は得られていない。

著者らは消炎酵素剤としてのプロティナーゼを糸状菌より開発する目的で多数の *Aspergillus* 属の菌株をスクリ

ーニングした結果、住江らの報告と同じく、*Asp. melleus* の1株が強力なプロティナーゼを産生することを確認した。

そして、*Asp. melleus* によるプロティナーゼの産生条件を種々検討したところ、興味ある知見が得られたので報告する。

## 実験の部

### 実験材料および実験方法

**供試菌株** *Asp. melleus* No.2611 菌を使用した。

**酵素液の調製** 水分を調製した麩 10 g を予め綿栓殺菌した 100 ml 容の三角フラスコに入れ、120°, 30 分煮沸殺菌し、供試菌株を接種し、実験結果に示す各種条件で培養した。

1) 中性、アルカリ性プロティナーゼ測定用酵素液の調製

*Asp. melleus* を培養して得られた麩麩に pH 7.0 の Sørensen リン酸緩衝液を 10 倍量加え、10 分間磨砕し、トルエン添加下で 30°, 1 時間振盪抽出をおこない、濾過して透明な酵素液を得た。

2) 酸性プロティナーゼ測定用酵素液の調製

前記の抽出剤、Sørensen リン酸緩衝液の代わりに 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) を使用し、同様操作し酵素液を調製した。

3) アミラーゼ測定酵素液の調製

酸性プロティナーゼ測定用酵素液を使用した。

4) リパーゼ測定用酵素液の調製

中性、アルカリ性プロティナーゼ測定用酵素液を使用した。

### 酵素活性測定法

1) プロティナーゼ

基質にカゼイン (メルク製 Hammarsten casein) を使用、Folin-Ciocalteu のフェノール試薬による比色法を用い、37° で 1 分間に 1 ミリ当量のチロシンに相当する分解物を生成する酵素量を 1 単位とした。

すなわち、2% カゼイン溶液 1 ml に酵素液 1 ml を加え、37° の恒温槽中で 20 分間反応したのち、トリクロル酢酸 2 ml を加え反応を停止せしめ、20 分間恒温槽中に放置後濾過し、その濾液 1 ml を 0.55M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 ml 中に入れ、5 倍希釈した Folin-Ciocalteu 試薬 1 ml を加え、37° で 20 分間放置後日立分光光度計 EPU-2A 型を用い、660 mμ における吸光度を測定した。

カゼイン溶液は酸性プロティナーゼには 2% カゼイン—0.1M 乳酸緩衝液 (pH 3.0) を、中性プロティナーゼには 2% カゼイン—M/15 Sørensen リン酸緩衝液 (pH 6.0) を、アルカリプロティナーゼには 2% カゼイン—M/15 Sørensen リン酸緩衝液 (pH 8.0) を使用した。

トリクロル酢酸は酸性プロティナーゼ測定時には 0.44M CCl<sub>3</sub>COOH を、中性、アルカリ性プロティナーゼの測定には 0.11M CCl<sub>3</sub>COOH, 0.22M CH<sub>3</sub>COONa, 0.33M CH<sub>3</sub>COOH の混液を使用した。なお、酵素活性は次式により算出した。

$$PU_{\text{meq tyr/min}}^{\text{cas, 37°, FR, B or A}} = \frac{OD(\text{measured})}{OD \text{ of 1 meq tyrosine}} \times \frac{\text{Volume}}{\text{Reaction time}} \times \text{Dilution factor} = \frac{OD(\text{measured})}{1600} \times \frac{4}{20} \times \text{Dilution factor} = OD(\text{measured}) \times 1.250 \times 10^{-4} \times \text{Dilution factor}$$

## 2) アミラーゼ

1%可溶性デンプン (和光アミラーゼ測定用デンプン) 液 5 ml, M/8 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 4 ml, 酵素液 1 ml の混液を 40° で 30 分反応せしめ, 生成した還元糖を Fehling-Lehmann-Schoorl 法で測定した。

アミラーゼ活性の表示は, 上記条件で 10 mg の還元糖 (グルコースとして) を生成する酵素量を 1 単位とした。

## 3) リパーゼ

Nord の山田, 太田, 町田<sup>13)</sup>変法に従った。すなわち, 基質にオリーブ油エマルジョンを使用した中和滴定により遊離脂肪酸を定量し, 1 分間に 1  $\mu$ eq の遊離脂肪酸を生成する酵素量を 1 単位とした。

## 蛋白定量法

蛋白濃度の測定は波長 280 m $\mu$  の吸光度を測定する方法に従った。試料は中性, アルカリ性プロティナーゼ測定用酵素液を用い, 適宜希釈 (通常 40 倍) して測定した。

## 色素定量法

色素の定量は波長 420 m $\mu$  と 720 m $\mu$  の吸光度を測定し次式により定量した。

$$\text{色素量 (Color value)} = [(-\log T_{420}) - (-\log T_{720})]$$

試料は中性, アルカリ性プロティナーゼ測定用酵素液を用い, 適宜希釈 (通常 5 倍) して測定した。

## 麴 pH の測定

麴を 10 倍量の精製水にて 30°, 1 時間浸出し, 濾過した液の pH をガラス電極 pH メーターにより測定した。

## 水分の定量

赤外水分計により定量した。

なお, 本実験に記載する酵素活性, 蛋白, 色素量などはすべて麴乾燥物 1 g に対する値で示した。

## 実験結果

### 酵素活性におよぼす pH の影響

水分 50% の麴培地に供試菌株を接種し, 25° で 4 日間培養した麴麴を 100 倍量の水で 1 時間抽出し, さらに抽出液を精製水にて 10 倍して酵素液とした。

この酵素液を使用して pH 3—10 のカゼイン溶液を用いてプロティナーゼ活性を測定した。カゼイン溶液は pH 3 が乳酸緩衝液, pH 4—5 が酢酸緩衝液, pH 6—8 がリン酸緩衝液, pH 9—10 がホウ酸—炭酸ナトリウム緩衝液を用い調製した。

その結果, Fig. 1 に示すように中性からアルカリ性の pH 領域において強いプロティナーゼ活性を示し, その至適 pH は 8 付近であった。

このように *Asp. melleus* の産生するプロティナーゼは反応最適 pH がアルカリ性にあるので, 以下アルカリプロティナーゼと仮称することにする。

### 色素の吸収スペクトル

この供試菌株は非常に色素生産能が強力であるので, 本菌の産生する色素の吸収スペクトルを検討した。すなわち, 前記と同様調製した麴麴を 50 倍量の M/15 Sørensen リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用い, 常温にて 1 時間抽出し, 濾過して透明な抽出液を得た。

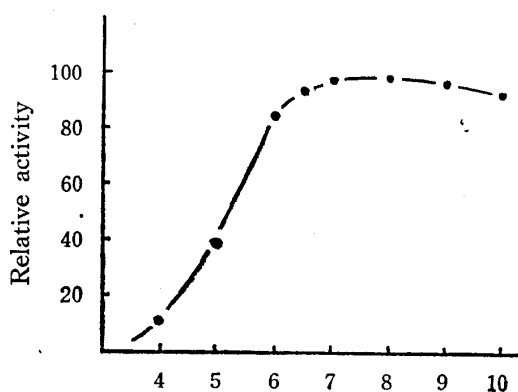


Fig. 1 pH-Activity Curve of *Aspergillus* Proteinase

この抽出液を光電分光光度計により吸収スペクトルを求めたところ、Fig. 2に示すように顕著な吸収極大はなく紫外部に近いほど吸収が強く、赤外部に近づくにしたがって吸収は減少した。

**培地水分のプロティナーゼ産生におよぼす影響**

水分 40—60% (w/w) の麩培地に供試菌株を接種し、25° で4日間培養した麩麩を100倍量の水で常温にて1時間浸出し、この浸出液を精製水でさらに10倍してアルカリプロティナーゼ活性を測定した。

その結果、Fig. 3に示すように培地水分が50—55%においてプロティナーゼ生産量は最大となった。

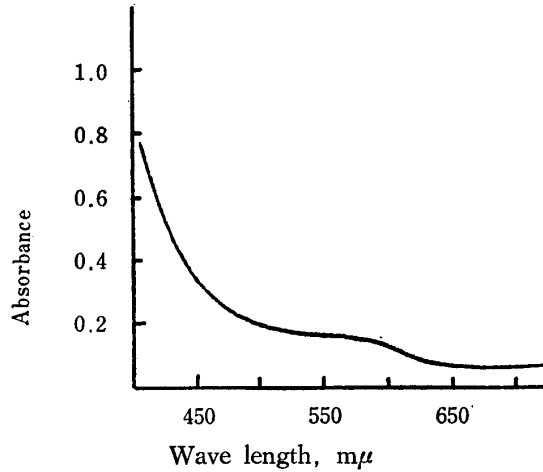


Fig. 2 Absorption Spectrum of Pigment from *Aspergillus melleus*

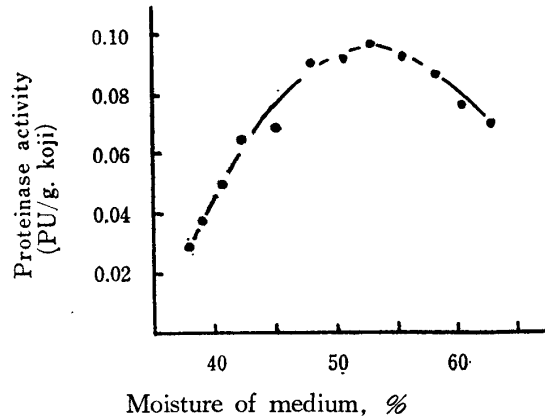


Fig. 3 Relation between Proteinase Activity and Moisture of Bran Medium Culture temperature: 25°

次に、培地水分を45, 50, 55, 60%の4点にとり、同じく25°培養で培養日数とプロティナーゼ活性の関係を検討した。

その結果、Fig. 4に示すように、培地水分が45—55%の間では水分が少ないほどプロティナーゼ活性のピークは遅くなり、そのピークは水分50—55%では培養5日後前後にあらわれ45%では7日後前後にあらわれた。

**培地水分の蛋白産生におよぼす影響**

*Asp. melleus* の蛋白産生におよぼす培地水分の影響を検討した。その結果、Fig. 5に示すように、25°培養で

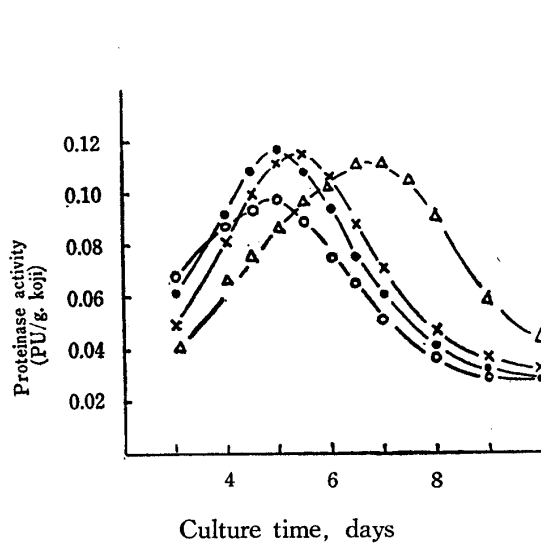


Fig. 4 Relation between Proteinase Activity and Moisture of Bran Medium Moisture, —△—45%, —×—50%, —●—55%, —○—60%. Culture temperature, 25°.

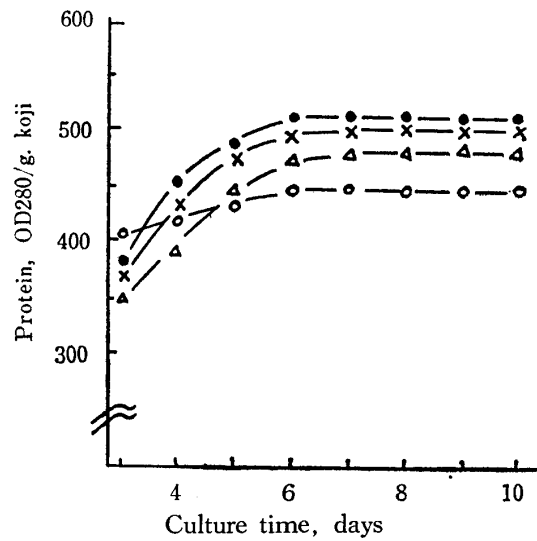


Fig. 5 Relation between Protein Productivity and Moisture of Bran Medium Moisture, —△—45%, —×—50%, —●—55%, —○—60%. Culture temperature, 25°.

は培地水分が高いほど, 培養初期において蛋白の生産量は多く, 培養5日以降においては 55>50>45>60% の順であった。

そして培地水分が45—55%においては, 培養6日ぐらいまでは蛋白の生産量が增大し, 以後その伸びは低下した。しかし, 高水分培地(60%)においては培養初期の蛋白生産は大きい, その伸びは少なく, 培養日数を伸ばしても蛋白生産量は最も少なかった。

**培地水分の麴 pH におよぼす影響**

麴 pH は出麴の時期を左右する重要な因子で, 一般に麴がひねると麴 pH は上昇する。

そこで麴 pH と培地水分および培養日数の関係を検討した。

その結果, Fig. 6 に示すように培養温度が25°では, 培養日数が4日から7日までは著しい pH の上昇が認められた。そして培地水分が高い程麴 pH は高く, アンモニアの産生が著しかった。

**培地水分の経時変化について**

培地水分は培養初期と培養後期では著しく変化する。この水分の変化は菌の代謝が大きく原因しているものと考えられる。

そこで培地水分の経時変化を25°培養で観察した。その結果, Fig. 7 に示すように培養日数が3日から5日にかけて, 培地水分の多少に関係なく著しい麴水分の上昇を観察した。

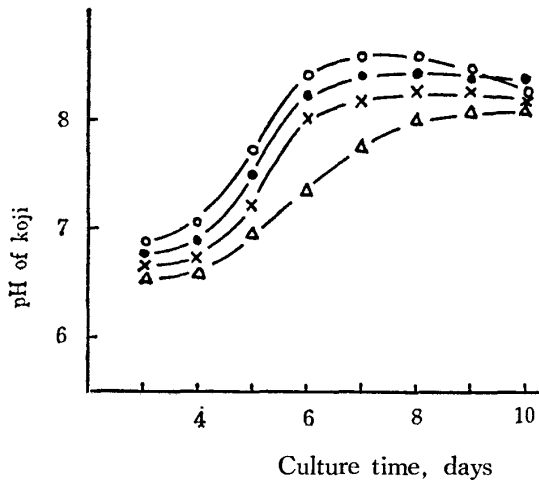


Fig. 6 Relation between pH of Koji and Moisture of Bran Medium  
Moisture, —△—45%, —×—50%,  
—●—55%, —○—60%.  
Culture temperature, 25°.

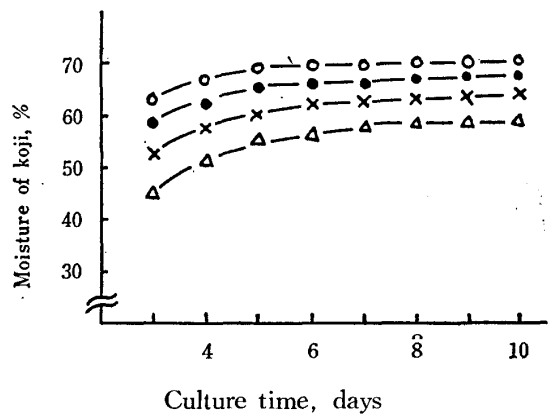


Fig. 7 Relation between Culture Time and Moisture of Koji  
Moisture, —△—45%, —×—50%,  
—●—55%, —○—60%.  
Culture temperature, 25°.

これはおそらく3日から5日にかけてプロティナーゼの産生, 色素の産生など菌の代謝が著しく活発になっているためと考えられる。

**プロティナーゼ産生におよぼす培養温度の影響**

培地水分は50—55%においてプロティナーゼの生産が最高に達することが判明したので, 培地水分は50%とし培養温度の影響を検討することにした。

培養温度は糸状菌の培養に, 一般に用いられている30°, プロティナーゼはアミラーゼに比較して耐熱性が悪いので30°より低い温度, すなわち25°および20°の3温度を選定し実験をおこなった。

その結果, Fig. 8 に示すように, 培養温度が高い程, プロティナーゼ生産のピークは初期に移行した. しかし, プロティナーゼ生産のピークの高さは培養温度が低い程高く, 培養温度が高くなるにつれて低下した. これらの結果よりみると, プロティナーゼ生産の目的では培養温度が低い程よい結果になると考えられるが, 培養期間が長くなるという悪条件をとまなう.

蛋白産生におよぼす培養温度の影響

*Asp. melleus* の蛋白産生におよぼす培養温度の影響を検討した. その結果, Fig. 9 に示すように培養温度は蛋白産生に大きな影響をおよぼすとは考えられないが, 培養期間が著しく長い場合にはプロティナーゼ産生と同じく, 培養温度が低い程蛋白の生産量は多いものと考えられる.

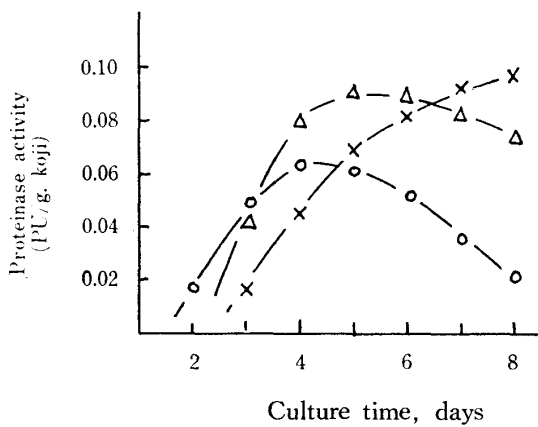


Fig. 8 Relation between Proteinase Activity and Culture temperature  
Culture temperature, —x—20°, —Δ—25°, —○—30°. Moisture of bran medium, 50%.

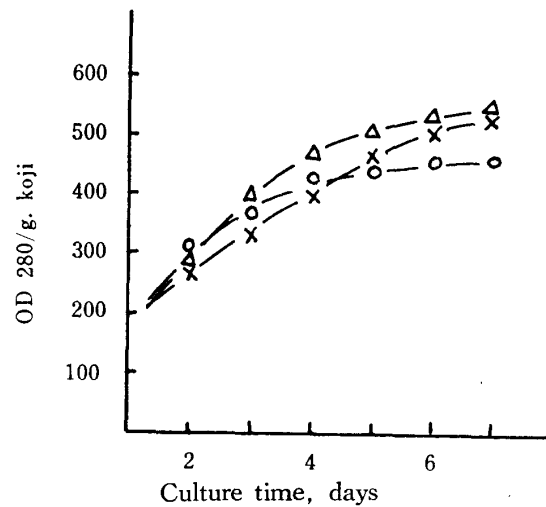


Fig. 9 Relation between Culture Temperature and Protein Productivity  
Culture temperature, —x—20°, —Δ—25°, —○—30°. Moisture of bran medium, 50%.

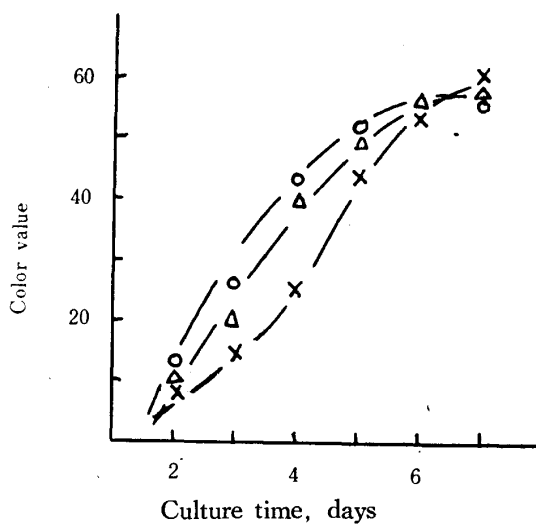


Fig. 10 Relation between Culture Temperature and Pigment Productivity  
Culture temperature, —x—20°, —Δ—25°, —○—30°. Moisture of bran medium, 50%.

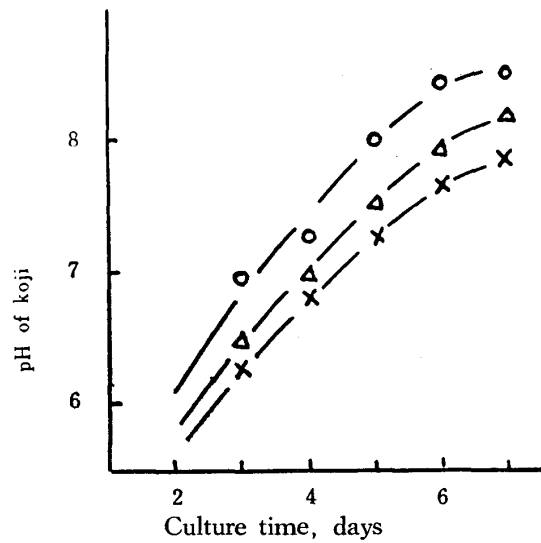


Fig. 11 Relation between Culture Temperature and pH of Koji  
Culture temperature, —x—20°, —Δ—25°, —○—30°. Moisture of bran medium, 50%.

**色素産生におよぼす培養温度の影響**

*Asp. melleus* の色素産生におよぼす培養温度の影響を検討した。

その結果 Fig. 10 に示すように、培養温度が高い程色素の産生は多く、比較的短い培養期間で不純物としての色素量の少ない、強力なプロティナーゼを生産するには、培養温度は 20—25° が適当と思われる。

**培養温度と麴 pH の関係について**

培養温度の麴 pH におよぼす影響について検討した。その結果、Fig. 11 に示すように培養温度が高い程麴 pH は高い傾向を示した。

麴 pH は培養後期ほど高くなるが、麴 pH が 7.5 以上になるとプロティナーゼの安定性が著しくそこなわれるので、麴 pH よりみても培養温度は 20—25° が最適と考えられる。

**培養日数とプロティナーゼの安定性について**

プロティナーゼの安定性が培養日数により変化するのではないかと考えられたので、培養温度 30° にて培養日数とプロティナーゼの安定性について検討した。

水分 50% の麴培地に供試菌を接種し、30° にて 3 日および 5 日間培養した麴麴に 100 倍量の水を加えて常温にて 1 時間抽出した。

この抽出液を 4° に冷却し、1N—0.01N の HCl および NaOH を加えて pH を調整し、4°、24 時間および 50°、20 分間放置後、その残存プロティナーゼ活性を測定した。

その結果、Fig. 12 に示すように 3 日培養麴は 5 日培養麴よりも、そのプロティナーゼの pH 安定性は良好であった。

***As. melleus* によるアミラーゼおよびリパーゼの産生について**

水分 50% の麴培地に供試菌を接種し、20°、25°、30° の各温度で 4 日間培養し、アミラーゼ、リパーゼ、プロティナーゼ、その他を測定した。その結果、Table I および Table II に示すように、アミラーゼおよびリパーゼ活性はアルカリプロティナーゼ活性に比較し極めて少量しか生産されなかった。

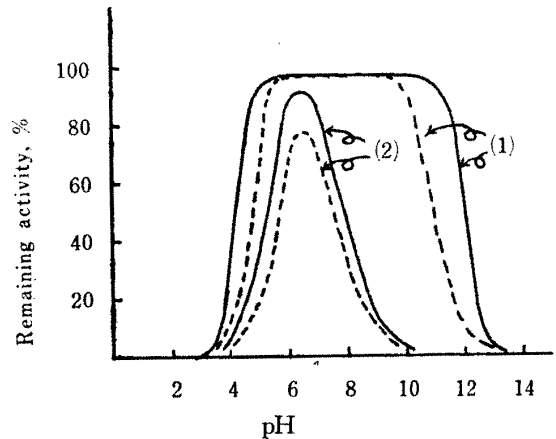


Fig. 12 Relation between Culture Time and pH-Stability of Proteinase  
 Culture temperature: 30°  
 Culture time: —72 hrs., ----120 hrs.  
 Condition of pH-stability: 1) 24 hrs. at 4°, 2) 20 mins. at 50°.

Table I. Relation between Culture Temperature and Proteinase Activity

Culture condition		Proteinase activity (10 <sup>-2</sup> PU/g. koji)			pH of extract
Temp. (°C)	Time (hrs.)	Acid	Neutral	Alkaline	
20	96	0.23	5.55	6.46	6.85
25	96	0.42	10.00	11.30	6.90
30	96	0.33	7.71	8.64	7.25

Table II. Relation between Culture Temperature and Productivity of Amylase, Lipase, Protein, Pigment, and Spore

Culture condition		Amylase (U)	Lipase (U)	Protein (OD <sub>280</sub> )	Pigment (CV)	Spore
Temp. (°C)	Time (hrs.)					
20	96	21	0.3	390	26.0	few
25	96	31	0.4	475	40.0	middle
30	96	25	0.4	430	43.0	many

### 考 察

住江らによれば、*Asp. melleus* の製麴上の好適水分は比較的少ない水分、30—40% においてプロティナーゼ生産が最大になると報告しているが、著者らの実験結果ではこれより多い水分、すなわち 50—55% においてプロティナーゼ生産が最大になった。

また、住江らは培養温度の検討をおこなっていないので、その検討をおこなった結果、30° で培養した場合は 4 日頃から漸次プロティナーゼ活性の低下がみられるが、培養温度が低い 20° 培養ではこの低下の傾向は認められなかった。これは蛋白量が各培養温度において培養日数とともに増加しているところからみても、麴 pH が高温培養ほど高くなっている点からみても、あきらかに自己消化または pH の上昇ともなう失活と考えられる。

また、培養期間とプロティナーゼの pH 安定性の関係について検討したところ、培養期間が長くなるとプロティナーゼの pH 安定性が低下する傾向が認められた。これは培養期間が長い場合、麴 pH の上昇ともない生産されたプロティナーゼが変性寸前になっているためではないかと考えられる。

以上の結果からプロティナーゼ生産のための培養条件は、培養初期においては菌の発育に最適な温度、すなわち 30° で培養し、漸次培養温度を低下させプロティナーゼの生産時期（2 日から 5 日）には pH の上昇を抑制して、生産されたプロティナーゼの失活をできるだけ少なくし、温度による失活もおさえ、プロティナーゼの生産期間を長くするような培養温度、すなわち 20° で培養するのが最も適当であるものと推察される。

### 要 約

*Aspergillus melleus* を用い、プロティナーゼ生産におよぼす培養条件の影響を検討した。

プロティナーゼ生産に対する麴培地の好適水分は 50—55%、好適培養温度は 20—25° であった。

培地水分 50%、25° において、プロティナーゼ生産は菌接種 2 日後に始まり、プロティナーゼの蓄積は 5 日後に最適に達した。その酵素量は乾燥麴 1 g 当り  $9 \times 10^{-2}$  PU であった。

### 文 献

- 1) 42報: 杉浦衛, 伊藤万蔵, 薬誌, **89**, 1325 (1969)
- 2) F. Yoshida, M. Nagasawa, *Bull. Agr. Chem. Soc., Japan*, **20**, 257 (1956); *ibid*, **20**, 262 (1956); *ibid*, **22**, 32 (1958)
- 3) F. Yoshida, M. Nagasawa, E. Ichishima, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 363 (1959); F. Yoshida, E. Ichishima, *ibid*, **25**, 102 (1961)
- 4) E. Ichishima, F. Yoshida, *Biochim. Biophys. Acta*, **99**, 360 (1965)
- 5) W. C. Crewther, F. G. Lennox, *Australian J. Biol. Sci.*, **6**, 428 (1953)



- 6) 赤堀四郎, 萩原文二, 池中徳治, 迫田真一, 酵素化学シンポジウム, **8**, 49 (1953)
- 7) R. Bergkuist, *Acta. Chem. Scand.*, **17**, 1541 (1963)
- 8) A. R. Subramanian, G. Kalnitsky, *Biochem.*, **3**, 1861 (1964)
- 9) T. Mizunuma, N. Iguchi, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **22**, 35 (1957)
- 10) K. Hayashi, D. Fukushima, K. Mogi, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **31**, 1171, 1237 (1967)
- 11) A. G. Jönsson, S. M. Martin, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **28**, 734 (1964)
- 12) K. Suminoe, J. Miura, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **31**, 73 (1957)
- 13) K. Yamada, Y. Ota, H. Machida, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **36**, 860 (1962)

杉浦 衛, 伊藤万蔵: *Aspergillus melleus* の産生するプロティナーゼの  
エタノール分画 (酵素剤の研究第44報)<sup>1)</sup>

Mamoru Sugiura, Manzo Ito: Ethanol Fractionation of Proteinase  
from *Aspergillus melleus* (Studies on Enzymes XLIV)<sup>1)</sup>

(Received October 2, 1969)

#### Summary

Partial purification of the proteinase from *Aspergillus melleus* was investigated by ethanol fractionation method.

From the data obtained in the proteinase activity, amount of the pigment, absorption ratio at 280 m $\mu$  to 260 m $\mu$ , difficulty of the fractionated operation etc., it was suggested that the best condition of ethanol fractionation was ethanol concentration 50—70%, at pH 8.0.

<sup>1)</sup> 前報において, 著者らは *Aspergillus melleus* によるプロティナーゼの産生条件について検討した。今回は前報<sup>1)</sup>の検討によって調製されたプロティナーゼ含量の高い麩麴よりプロティナーゼを抽出し, この抽出液を用いプロティナーゼのエタノール分画について検討したので報告する。

#### 実験の部

##### 実験材料および実験方法

##### 酵素液の調製

<sup>1)</sup> 前報の検討にもとずき培養条件は 30° で 1 日, 25° で 1 日, 20° で 3 日の 5 日培養とし, 麩培地の水分は 50% とした。酵素の抽出は水道水でおこない, 抽出液の温度が 20° 以上にならないように冷却し, 累浸抽出をおこなった。

##### 酵素活性測定法

<sup>1)</sup> 前報に準じておこなった。

##### 蛋白, 色素, 水分の定量

<sup>1)</sup> 前報に準じておこなった。

##### 抽出液中の可溶性固形分の定量

抽出液中の固形分の定量は島津製 Abbe 型屈折計を用い, 20° の屈折率を測定し Brix に換算した。

1) 第43報; 杉浦衛, 伊藤万蔵, 岐阜薬大紀要 **19** 29 (1969)