



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	糸状菌による maltose の生成 : (第1報) acetone powder による maltose 生成の諸条件
Author(s)	中村, 幸彦; NAKAMURA, Yukihiko; 菅原, 四郎 他
Citation	北海道大學農學部邦文紀要, 3(1), 66-69
Issue Date	1958-03-14
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/11646">https://hdl.handle.net/2115/11646</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	3(1)_p66-69.pdf



# 絲状菌による maltose の生成

(第1報) acetone powder による maltose 生成の諸条件

中 村 幸 彦\*  
菅 原 四 郎\*

Biosynthesis of maltose by *Aspergillus oryzae*

Part I. Some experiments with acetone powder

By

Yukihiko NAKAMURA

Shirô SUGAWARA

(Dept. agricultural Chemistry, Hokkaido University)

## 緒 言

著者等は *Asp. oryzae* の amylase の生成機構に関する研究<sup>(1)</sup>に於て、炭素源を glucose とせる場合の amylase の生成は glucose の消費が進んだ時期に maltose が生産され、これが inducer となつて酵素が生成されるものである事を報告した。

Maltose の絲状菌による代謝産物として isomaltose その他の少糖類が生産されることは麻生等 (1954)<sup>(2)</sup> により報告され著者も又経験している所であるが、glucose を炭素源とした場合、以下述べるが如き実験条件に於て maltose 以外の糖類は検出されなかつた。更に菌蓋のアセトン処理粉末に glucose を与えると、この糖の減少と共に maltose が生成し、且つ M. Doudoroff et al. (1949)<sup>(3)</sup> が報告している *E. coli* に於て glucose と glucose-1-phosphate から maltose が合成される反応とは異り、glucose の磷酸エステルは含まれない合成であることが分つた。

この報告は growing cell に於ける maltose 生成の確認と acetone powder による glucose より maltose の生成の諸条件及び基質特異性等に関するものである。

## 実験結果

### 実験方法

絲状菌株は北海道工試より恵与された *Aspergillus oryzae* を用いた。

還元力の測定は小林、田淵法<sup>(4)</sup>による Somogyi 変法、maltose の定量は baker's yeast による醱酵法<sup>(5)</sup> を用いた。acetone powder による生成 maltose は反応終了後、遠心分離で acetone powder を除いた上澄の 5 cc につき定量した。

糖の chromatography は buthanol-pyridine-water (3:2:1.5)<sup>(6)</sup> を展開液とし aniline-phthalic acid で発色せしめた。

uridine-diphosphate-glucose は酵母より調製<sup>(7)</sup>し、ATP は市販 Ba 塩より K-塩として使用した。

glucose-1-phosphate は potatophosphorylase<sup>(8)</sup> により、又 glucose-6-phosphate は小野寺法 (1952)<sup>(9)</sup> により調製した。

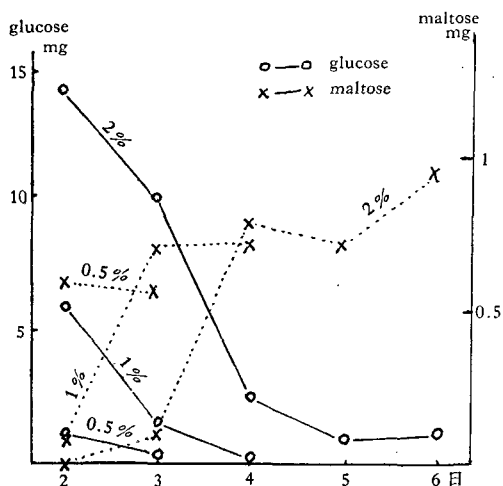
### 実験結果

#### 1. 培養液中に於ける glucose の濃度と maltose の生成量

1 l. 中  $\text{NHNO}_3$  5 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g; KCl 0.5 g;  $\text{MgSO}_4$  0.5 g;  $\text{FeSO}_4$  0.01 g を含む培養基に glucose を各々 2%, 1%, 0.5% 与え、胞子懸濁液添加直前に  $\text{CaCO}_3$  を 0.5% 加え 30°C, pH 6.6 で培養し、glucose 消費と maltose の生成量を追跡した。この

\* 北海道大学農芸化学教室

結果は第1図に示した如く、maltose は glucose が殆んど消費された頃に生成することが認められた。従つて初糖濃度の低いほど maltose の生成が早い。即ち glucose 0.5% 添加に於て既に二日目に 0.7 mg/10cc であり、この量の生成は 1% 添加で三日目、2% 添加で四日目である。



第1図 Asp. oryzae の培養に於ける glucose の消費と maltose の生成  
培養は 500 cc 三角フラスコに各 100 cc 宛 glucose は 1 cc 中 mg; maltose は 10 cc 中 mg.

### 2. Acetone powder の調製

acetone powder の調製には窒素源として  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  の代りに casein の塩酸加水分解物を同量使用した。glucose は 1.5% とし、無機塩類は前述と同じで、培養は 250 cc 三角フラスコに 40 cc 宛注入し、 $30^\circ\text{C}$ 、pH 6.6 で培養した。この maltose 合成作用の研究に於て、妨害となるのは maltase による加水分解作用の影響であるが、菌蓋分離の時期を検討の結果、培養後約 50~55 時間で glucose 消費量及び maltose 生成量を定量し、maltose の微量認められた時期即ち、培養濾液 2 cc 中 glucose 5 mg 前後、5 cc 中 maltose 0.5 mg 前後を選び、この時期に於て maltase 作用は極めて微弱である。

又、胞子の着生直後が大体この時期に相当した。

かくて菌蓋を集め、ガーゼ袋に入れて水を含ませては絞ることを繰り返して洗液に還元力の認められなくなるまで洗滌し且つ胞子を可及的除去する。最後に固くしぼり 7~10 倍量の acetone 中に入れ、スッチェで濾過し、一度再び acetone で洗滌して真空乾燥す

る。

### 3. 生成物の確認

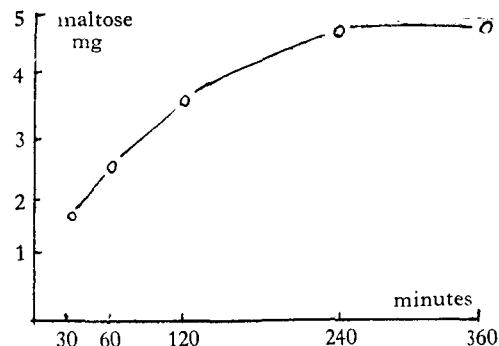
反応生成物の確認は培養濾液について及び acetone powder を pH 6.8 (phosphate puffer M/20) に於て glucose 2% を添加し  $35^\circ\text{C}$ 、5 時間 incubate した反応液を使用して検索した。

即ち、培養濾液又は反応液に ethanol を加えて 70% (v/v) とし遠心分離上澄液より ethanol を溜去濃縮して吸着炭の層を通し糖を吸着せしめる。次で吸着炭カラムより水、15% ethanol 及び 30% ethanol の順で溶出し、各フラクションにつき paper chromatography により糖を検出した。この結果は水溶出部より glucose ( $R_f=0.38$ )、15% ethanol 溶出部より maltose ( $R_f=0.29$ ) を検出し、30% ethanol 溶出部よりは糖を検出し得なかつた。

更に、15% ethanol 溶出部より phenylhydrazine 処理により osazone を導き maltose なることを確認した。

### 4. acetone powder による maltose 生合成の諸条件

反応の時間は第2図の如く、glucose 1% に於て大



第2図 acetone powder による maltose の生成

acetone powder 1200 mg, glucose 500mg; phosphate (pH 6.8) 1/25 M,  $35^\circ\text{C}$ 、全量 50 cc とし、5 cc を以て定量。

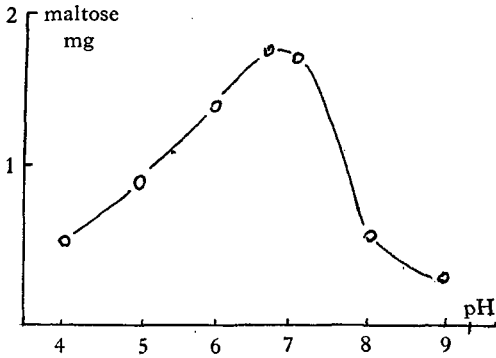
体 4 時間で maltose 生成が最大値となつた。生成量は用いた glucose に対し約 10% である。

ここに使用した acetone powder は時により maltase 活性が認められ、且つ後述の如く maltose 生成の基質は glucose のみと考えられるので、この maltose 合成が maltase の合成反応という疑問も生ずる。然し、絲状菌の maltase を精製したものにつき、第2図

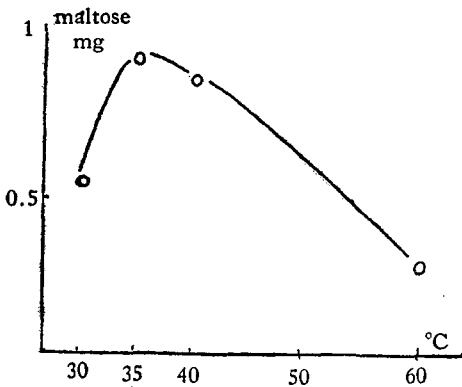
と同様の実験条件で観察した結果は glucose より maltose の合成は認められなかつた。

この acetone powder は調製してから約 50 時間で真空中に保存しても、その活性は約 35% 失われる。

最適 pH は (第 3 図) 6.8~7.0 であり、最適温度は (第 4 図) は 35° 附近にある。60°C で殆んど失活し、100°C、5 分間の処理では完全に失活する。



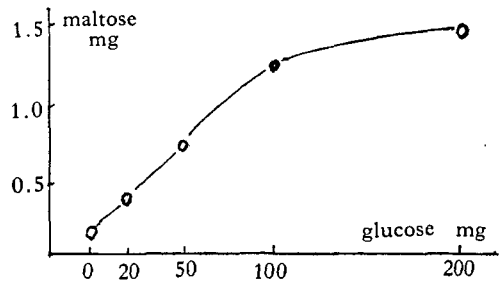
第 3 図 acetone powder による maltose 生成と pH との関係  
acetone powder 300mg, glucosyl 0.5%, 全量 20 cc より 5 cc を以て定量。  
phosphatc 0.05 M, 温度 35°C.



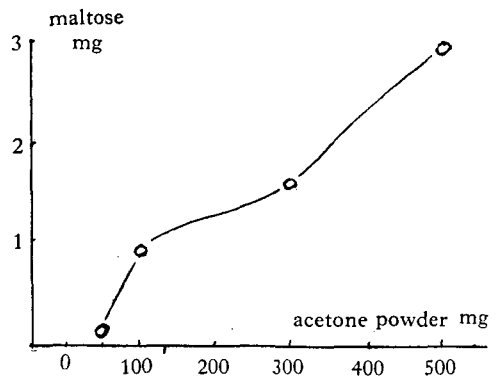
第 4 図 acetone powder による maltose 生成と温度との関係  
条件は第 3 図と同じ pH 6.8.

基質 glucose の濃度による影響は第 5 図の如く、濃度上昇と共に maltose 生成量も増加するが、反応液量に対し 0.5% を越えても顕著な増加は認められない。

酵素量の影響は第 6 図に示した。



第 5 図 acetone powder による maltose 生成と glucose の濃度  
反応条件は第 2 図と同じ。



第 6 図 acetone powder による maltose 生成と powder の量  
反応条件は第 2 図と同じ。

##### 5. 基質に対する特異性

glucose-1-phosphate 及び glucose-6-phosphate は基質とはならない。又これらのエステルを夫々 glucose と当量与えた場合も glucose 単独の場合に於ける生成量以上ではなかつた。

更に, sucrose<sup>(10)</sup> (及びその phosphate) や trehalose phosphate<sup>(11)</sup> の生合成に関与する uridine-diphosphate-glucose も生成に関与せず,  $Mg^{++}$  (0.01 M), cysteine (0.01 M) も活性に影響を与えず, ATP の添加の必要も認められなかつた。

以上 *Asp. oryzae* の acetone powder による glucose より maltose 生成に関する実験結果を述べた。著者等の用いた菌種に於ては glucose phosphate は基質に含まれないから *Escherichia coli* に於ける amyломaltase<sup>(9)</sup>, *Neisseria meningitidis* に於ける maltose phosphorylase<sup>(12)</sup> 等とは異なるものと考えられる。又 maltase による glucose→maltose の反応も考えられるが、前述の如く *Asp. oryzae* の maltase

を精製したものについての実験では本報告に於けるような glucose 濃度に於ては合成反応は認められなかつた。

ここに用いたのは acetone powder であるから合成に必要なエネルギー源は当然存在している筈であるが、其後著者等は菌体抽出液にこの反応の強い促進作用を認めたので追求中である。

即ち, acetone powder を pH 7.0 の M/5 phosphate で 80° に於て抽出し、活性炭処理による吸着物からアルコールで溶出される画分に促進作用を認め、これが maltose 合成のエネルギー源と関連あるものと予想している。

### 要 約

1. glucose を炭素源として培養した *Aspergillus oryzae* はこの糖が殆んど消費された時期に maltose を生成せしめる。

2. acetone powder によつても glucose より maltose の合成を認め、この反応条件は最適 pH 6.8 ~7.0, 最適温度 35°C である。基質として glucose の磷酸エステルは含まれぬ。

### Summary

Culturing *Asp. oryzae* on the medium containing glucose as carbon-source, maltose is detected when glucose was almost consumed.

The formation of maltose from glucose was also observed with acetone powder. Phosphate of glucose was not involved as substrate. Opt. pH is 6.8~7.0 and opt. temp. 35°C.

### 文 献

- (1) 中村, 菅原: 農化誌に投稿中
- (2) 麻生, 柴崎: 醸工 31 (1953) 311
- (3) M. Dondoroff, W.Z. Hassid, E.W. Putman and A.L. Pottes: J. Biol. Chem 179 (1949) 921
- (4) 小林, 田淵: 農化 28 (1954) 171
- (5) M. Somogyi: J. Biol. Chem. 119 (1937) 471
- (6) A. Jeaus et al: Analyt. Chem. 23 (1951) 3
- (7) R. Caputts, L. E. Leloir, C. E. Cardini and A.C. Paladini J. Biol. Chem. 184 (1950) 333
- (8) 中村道徳: 標準生化実験 p. 260
- (9) 小野寺幸之進: // p. 273
- (10) C.E. Cardini, L.E. Leloir and J. Chiriboga. J. Biol. Chem. 214 (1955) 149  
L. E. Leloir and C. E. Cardini: J. Biol. Chem. 214 (1955) 157
- (11) L. E. Leloir and E. Cabib: J. Am. Chem. Soc. 75 (1953) 5445
- (12) C. Fitting and M. Doudoroff: J. Biol. Chem. 199 (1952) 153