

Pichia guilliermondii i-1899の生産する アミラーゼの生デンプン分解性

伊藤美香・田中竹美・楡木ゆき・飯野久和・小崎道雄

Raw starch digesting of amylase from *Pichia guilliermondii* i-1899

Mika ITO, Takemi TANAKA, Yuki NIREKI, Hisakazu IINO and Michio KOZAKI

Raw starch digesting and adsorbing abilities on crude and purified extracellular amylase of *Pichia guilliermondii* i-1899 were investigated by using with raw starch of rice, wheat, corn, potato and sweet potato as a substrate.

The crude enzyme effectively digested raw corn starch, and produced glucose as the end product that digesting ratio showed 100% recovery. The adsorbable ratio of crude enzyme on raw starch was between 31-35% on corn, rice, sweet potato, and potato starches.

Purified α -amylase A1 and A2 had not the digestive abilities for five kinds of raw starch. But purified glucoamylase GA had the digestive ability for raw starch. Final digestive ratios of GA were in 20% on wheat and 5% on rice.

The digestive reactions against to raw starch granules with crude or purified glucoamylase GA on the digesting stage were observed by scanning electron microscope. The both reactions on early stage were observed many pinholelike holes on surface of starch granules, and then gradually digested.

アミラーゼは生デンプンに作用しにくいと言う理由からその作用性については160年来、糊化デンプンを用いて検討が行われてきた。

しかし、自然界には糊化デンプンはほとんど存在しないため、全てのアミラーゼはデンプン粒を分解しているはずであるとの観点に立って、1970年代になってアミラーゼのデンプン粒に対する作用が見直され始めた。その結果、前田ら¹⁾がオオムギ種子にデンプン粒を分解するアミラーゼが含まれることを確かめ、上田ら²⁾は各種起源のデンプン粒に対する麦芽 α -アミラーゼの作用を比較した。

高等植物や *Bacillus subtilis*、*Aspergillus oryzae* の生産する α -アミラーゼは生デンプン分解力の弱いものとされ、これに対しブタ膵臓の

α -アミラーゼ(PPA)³⁾は生デンプン分解力の強いアミラーゼとされてきた。また、溝上ら⁴⁾はウシのルーメンから単離した *Streptococcus bovis* の α -アミラーゼが強い生デンプン分解力を有することを示し、その酵素科学的諸性質についての検討を行った。一般に地下茎デンプンには酵素が作用しにくいと言われているものの、谷口⁵⁾らは腐ったじゃがいもから、バレイショ生デンプンによく作用する *B. circulans* F-2 を単離した。グルコアミラーゼでは、上田ら²⁾⁶⁾が *Asp. awamori* の生デンプン分解酵素について検討し、貝沼ら⁷⁾は *Charala paradoxa* のグルコアミラーゼを、また安倍ら⁸⁾は *Asp. sp* K-27 を、黒澤ら⁹⁾は *Corticium rolfii* を単離し、詳細な検討を行っている。

本報では液化力、糖化力ともに高いアミラーゼ活性を有する糸状菌酵母 *Pichia guilliermondii* i-1899の粗酵素液および精製酵素の生デンプンへの作用性を分解活性、吸着率、最終分解率について検討すると共に、分解過程の経時的変化を走査型電子顕微鏡により観察した。

実験方法

粗酵素および精製酵素の調製 *Pichia guilliermondii* i-1899をSYP培地(可溶性デンプン1%, 酵母エキス1%, ペプトン1%)にて24時間の前培養後、本培養培地(コメデンプン1%, 酵母エキス0.5%, ペプトン0.5%, Tween 80 0.05%, リン酸二ナトリウム0.4%)に接種し、25℃にて振盪培養(175rpm, 96時間)した。培養液を遠沈(3500×g, 4℃, 10分間)して菌体を除去し、限外濾過(分子量10,000)にて分別・濃縮後、2日間透析して粗酵素液を得た。

この粗酵素液の精製にはイオン交換クロマトグラフィー(DEAE-TOYOPEARL 650M)およびゲル濾過クロマトグラフィー(Sephacryl S-100)を行い、さらに強陰イオン交換体(Protein Pak G-QA)を用いた高速液体クロマトグラフィーにより、2種類の α -アミラーゼ(以下A1、A2とする)とグルコアミラーゼ(以下GAとする)の計3種類の精製酵素を得た。

生デンプン分解活性

粗酵素および精製酵素の生デンプン分解活性は、反応液を各基質終濃度2.5%、酢酸緩衝液(pH5.5)終濃度200mMになるように調製して酵素液を加え、40℃にて60分間振盪中で反応を行った。なお、3種類の精製酵素については可溶性デンプンを基質とした場合の糖化力活性が同一になる酵素量をそれぞれ添加した。反応停止後、遠沈(3000×g)により上澄液を得、上澄液中の還元糖量をソモギーネルソン法¹⁰⁾にて測定した。また、酵素を加えないものを同様に用意し、同

条件下において反応を行いブランクとした。生デンプン分解活性1U(以下RSUとする)は1mlの酵素液が1分間に1 μ molのグルコースを生成する酵素力とした。

なお、基質としてはコメデンプン(Sigma製)、コムギデンプン(Wako製)、トウモロコシデンプン(Wako製)、カンショデンプン(Wako製)、パレイショデンプン(Wako製)の5種を用いた。これらのデンプンは酵素反応に供する前に、それぞれをクリーンベンチ内のUVランプ下で30分間殺菌処理後、滅菌水に懸濁・洗浄を数回繰り返して無菌処理したものを用いた。なお、本報で供した無菌処理済み生デンプンはいずれも微生物汚染の無いこと、アミラーゼ活性のないことを確認後用いるとともに、酵素反応中も微生物の汚染を防ぐため無菌条件下で行った。

生デンプンへ吸着率

各基質2g、30%飽和(NH₄)₂SO₄-100mMリン酸緩衝液3ml、粗酵素液2mlを30分間氷水中で振盪しながら反応を行った。反応終了後、遠沈(3500×g)し、上澄液中に残存するアミラーゼ活性を求めることにより、生デンプンへの吸着率を検討した。また、ブランクとして生デンプンを加えないものと酵素を加えないものを用意した。

なお、吸着活性1単位は上澄液1ml中に含まれる未吸着のアミラーゼが示す酵素活性をブランクの上澄液の活性から差し引いた値とした。このときの未吸着アミラーゼ活性は上澄液中の生デンプン分解によって生成した糖量をブランクとして差し引いて測定を行った。

最終分解率の測定 基質は分解活性測定時に使用した各種生デンプンを同様に前処理して用いた。

測定は基質を粗酵素液および精製酵素(200mM-酢酸緩衝液pH5.5)により終濃度1%になるように調製したものを37℃の振盪条件下(100rpm)で150時間まで反応を行うことより、各基質に対する最終分

解率を求めた。

反応液は経時的によく懸濁し、一定量を無菌的に採取して未分解生デンプンを含む全糖量をフェノール硫酸法⁷⁾にて測定し、また、未分解生デンプンを遠沈除去した上澄液の還元糖量をDNS法¹⁰⁾にて測定した。

分解率は反応液中の全糖量に対する還元糖量の割合で示した。

分解生成物 分解生成物はペーパークロマトグラフィーにより調べた。濾紙はADVANTEC TOYO A-51(20cm×20cm)を用い、70% n-プロパノールにて常温で三重展開を行った。展開後はグルコアミラーゼ処理を行い、硝酸銀アルカリ法¹⁰⁾により発色を行った。

走査型電子顕微鏡による分解過程の観察 酵素の基質への作用性を走査型電子顕微鏡で観察するため、反応液を遠心分離して得られた沈澱物は冷水を加えよく攪拌し遠心分離するという操作を数回繰り返し、凍結乾燥して観察試料を調製した。

試料は金蒸着し、JSM-5400LV (日本電子社製)で観察した。

結 果 および 考 察

粗酵素および精製酵素の生デンプンに対する分解活性を検討した結果をTable 1に示した。

Table 1. Raw starch digesting activities of crude and purified enzymes from *P. guilliermondii* i-1899 on various starches. (RSU U/ml/min)

Enzyme	Rice	Corn	Wheat	Sweet potato	Potato
Crude	0.60	0.05	1.50	0.20	0.01
A1	—	—	—	—	—
A2	—	—	—	—	—
GA	0.14	0.06	0.20	0.01	—

粗酵素はいずれの生デンプンにも活性が認められ、その活性はコムギデンプンが最も高く、

次にコメ、カンショ、トウモロコシ、バレイシヨの順であった。一方、 α -アミラーゼA1、A2の精製酵素では生デンプン分解活性は認められず、GAのグルコアミラーゼにのみ活性が認められた。このことから、本菌の生産する α -アミラーゼは生デンプンに対して無効吸着の酵素であると考えられた。

一般にリン含量が多いとされるカンショ、バレイシヨなどの根茎デンプンに対してはアミラーゼは作用しにくいことがわかっており¹¹⁾、本酵素においても同様の結果であった。また地上デンプンに関して生じた分解活性の違いは、デンプンの種類あるいは立体構造に由来する酵素の吸着のしやすさ、または作用性の違いによるものと考えた。

Table 2に粗酵素の生デンプンへの吸着性を検討した結果を示したが、コムギを除くいずれのデンプンにおいても認められ、全活性の約30%が生デンプンに吸着された。また、本実験の結果からは生デンプン分解活性と吸着活性は必ずしも相関関係にはなく、特によく分解されたコムギデンプンにその傾向がみられた。しかし、生デンプン分解活性を有する酵素は生デンプン吸着部位を有することが報告¹²⁾されており、本実験のこの現象は分解により生じた生成糖が生デンプンへの吸着を阻害している可能性が考えられた。

Table 2. Adsorption ratio of crude enzyme from *P. guilliermondii* i-1899 on various raw starches.

Raw starch	adsorption rate %
Rice	35
Corn	33
Wheat	3
Potato	31
Sweet potato	35

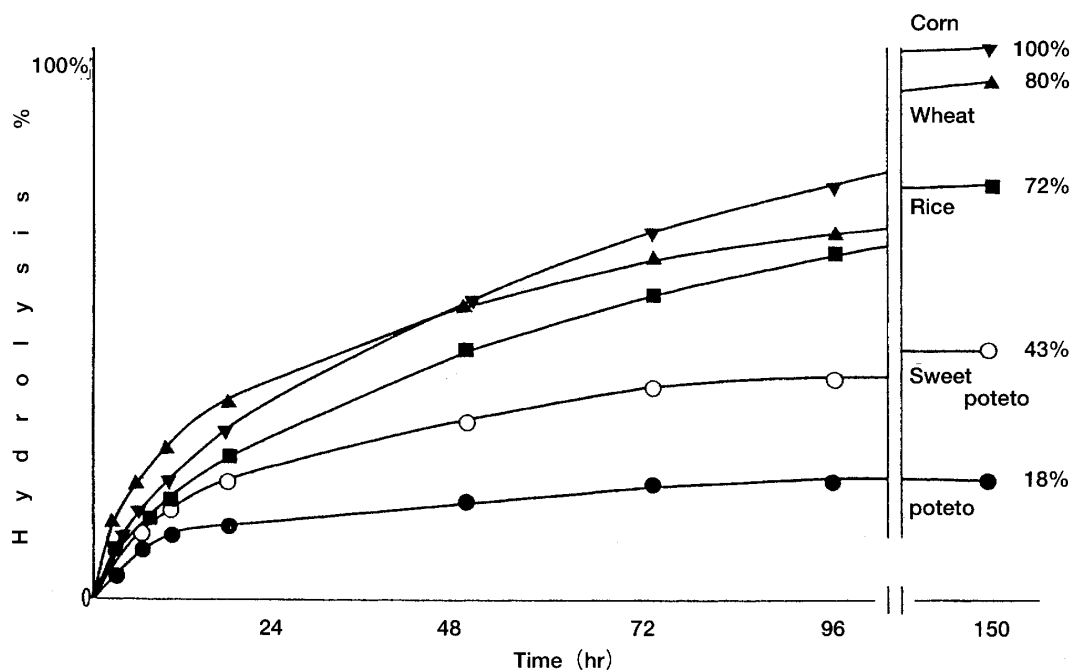


Fig. 1. Time courses of various raw starch degradations by crude enzyme from *P. guilliermondii* i-1899.

Incubation was carried out at 37°C in the reaction mixture containing 1% raw starch in 200mM-acetate buffer (pH5.5). Total glucose amount was determined by the phenol-sulfuric acid method. Reducing sugar was determined by 3,5-DNS method.

▼ : corn, ▲ : wheat, ■ : rice, ○ : sweet potato, ● : potato

粗酵素による最終消化率の検討結果をFig.1に示した。

最終消化率はトウモロコシ100%、コムギ90%、コメ72%、カンショ43%、バレイショ18%であった。特に分解能の高かったトウモロコシ、コムギ、コメデンプン分解生成物は全てグルコースであった。(Fig. 2, 3, 4)

精製酵素では分解活性が認められたGAについてのみ、そのうちの活性の高かったコメ、コムギデンプンについて最終分解率を求めた結果をFig. 5 に示した。

コムギを基質とした際に最終分解率は20%、コメでは5%であった。

粗酵素液を作用させた試料の走査型電子顕微鏡観察の結果、トウモロコシでは10時間以降から小さなピンホールがデンプン粒表面に空き次第に大きくなり、48時間目には中の層状構造が

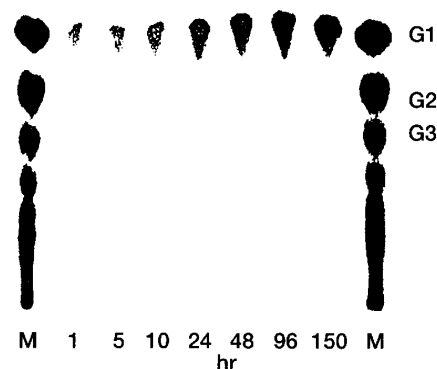


Fig. 2. Paper chromatogram in time course of raw wheat starch hydrolyzate with crude enzyme from *Pichia guilliermondii* i-1899 .

Incubation was carried out at 37°C with shaking, in the reaction mixture containing raw wheat starch. Samples at definite time were obtained. Each 10 μ l of reaction mixture was spotted on the filter paper (A.51). Paper was developed three times by ascending in the solvent system of 70% n-propanol at room temperature. Color development was carried out by the silver nitrate method after glucoamylase treatment. M : Maltooligosaccharides, G1 : glucose, G2 : maltose, G3 : maltotriose

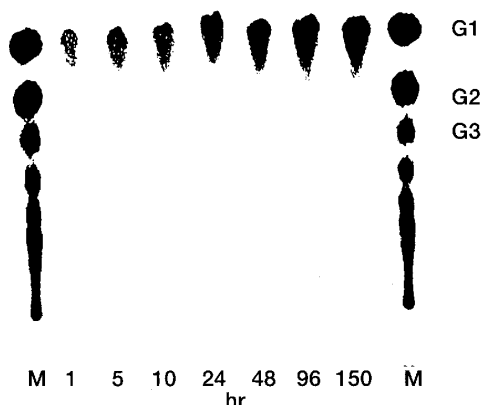


Fig. 3. Paper chromatogram in time course of raw rice starch hydrolyzate with crude enzyme from *Pichia guilliermondii* i-1899.

Incubation was carried out at 37°C with shaking, in the reaction mixture containing raw rice starch. Samples at definite time were obtained. Each 10 μ l of reaction mixture was spotted on the filter paper (A.51). Paper was developed three times by ascending in the solvent system of 70% n-propanol at room temperature. Color development was carried out by the silver nitrate method after glucoamylase treatment. M : Maltooligosaccharide, G1 : glucose, G2 : maltose, G3 : maltotriose

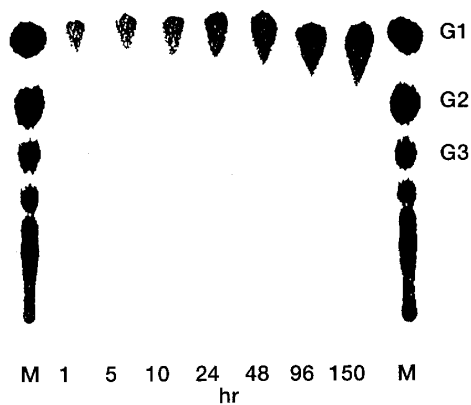


Fig. 4. Paper chromatogram in time course of raw corn starch hydrolyzate with crude enzyme from *Pichia guilliermondii* i-1899.

Incubation was carried out at 37°C with shaking, in the reaction mixture containing raw corn starch. Samples at definite time were obtained. Each 10 μ l of reaction mixture was spotted on the filter paper (A.51). Paper was developed three times by ascending in the solvent system of 70% n-propanol at room temperature. Color development was carried out by the silver nitrate method after glucoamylase treatment. M : Maltooligosaccharide, G1 : glucose, G2 : maltose, G3 : maltotriose

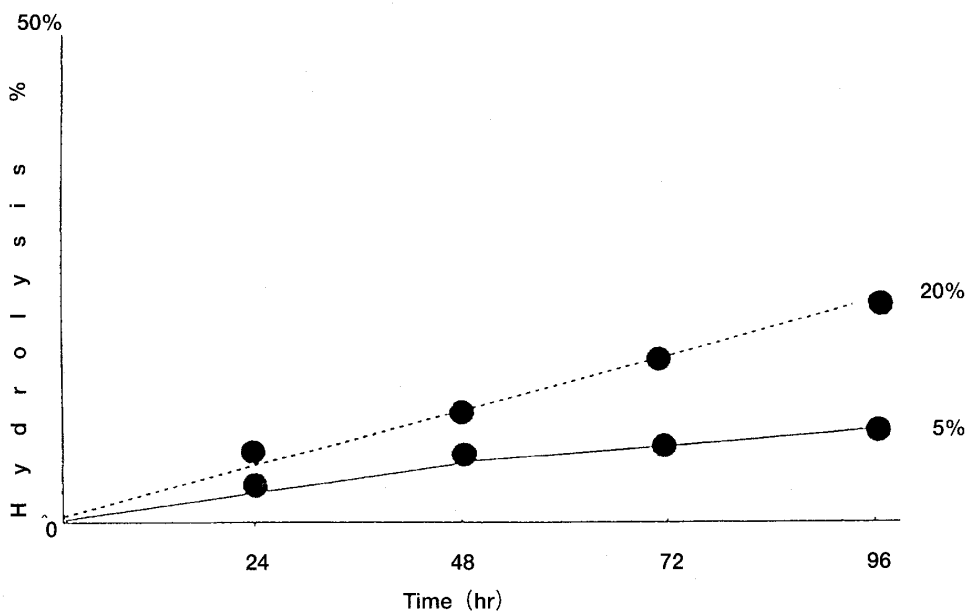


Fig. 5. Time courses of raw starch hydrolysis by purified GA from *P. guilliermondii* i-1899.

Incubation was carried out at 37°C in the reaction mixture containing 1% raw starch in 200mM-acetate buffer (pH5.5). Total glucose was determined by the phenol-sulfuric acid method. Reducing sugar was determined by Somogyi-Nelson method.

-----: Wheat starch, ———: Rice starch

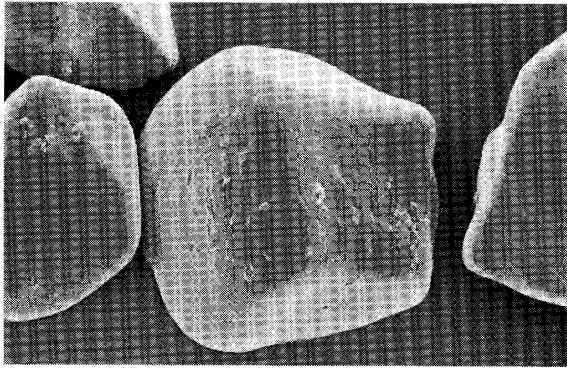


Photo. 1 Degradation of raw corn starch granules in i-1899 culture filtrate at 0h (hydrolysis degree, 0%) with scanning electron microscopy.

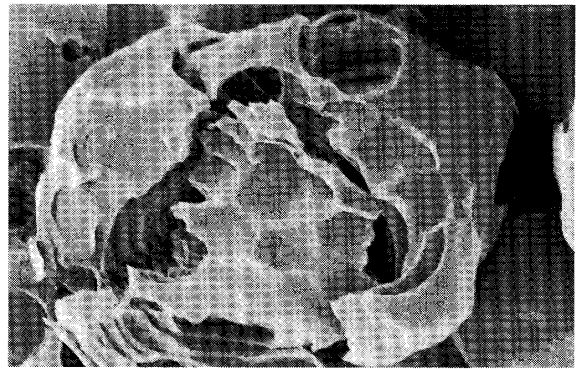


Photo. 4 Degradation of raw corn starch granules in i-1899 culture filtrate at 96hr (hydrolysis degree, 70%) with scanning electron microscopy.

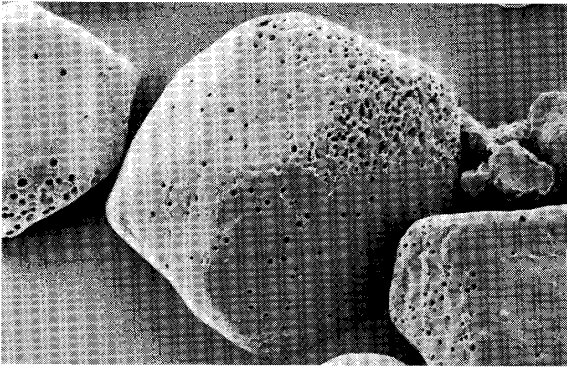


Photo. 2 Degradation of raw corn starch granules in i-1899 culture filtrate at 10hr (hydrolysis degree, 22%) with scanning electron microscopy.

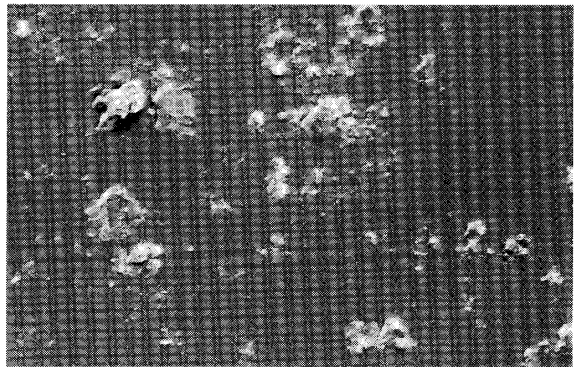


Photo. 5 Degradation of raw corn starch granules in i-1899 culture filtrate at 150hr (hydrolysis degree, 100%) with scanning electron microscopy.

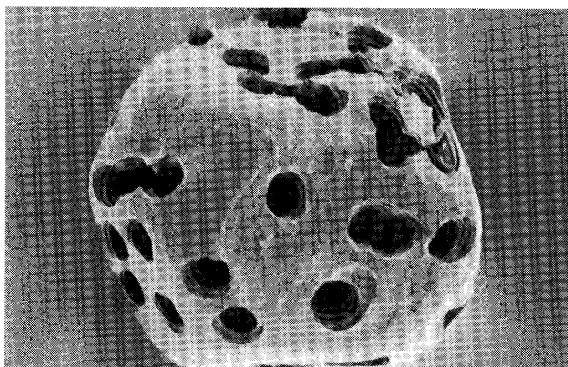


Photo. 3 Degradation of raw corn starch granules in i-1899 culture filtrate at 48hr (hydrolysis degree, 52%) with scanning electron microscopy.

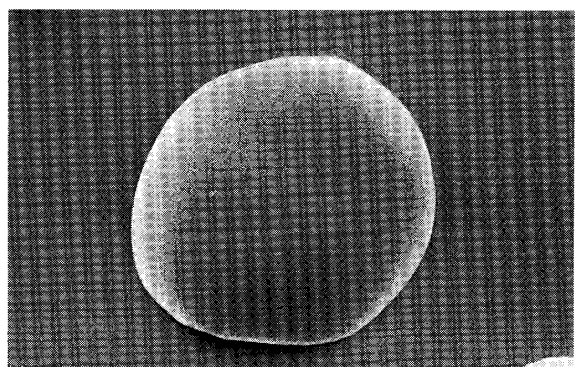


Photo. 6 Degradation of raw wheat starch granules in i-1899 culture filtrate at 0hr (hydrolysis degree, 0%) with scanning electron microscopy.

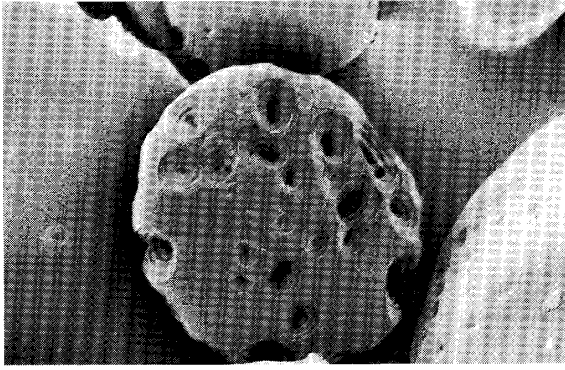


Photo. 7 Degraddation of raw wheat starch granules in i-1899 culture filtrate at 150hr (hydrolysis degree, 90%) with scanning electron microscopy.

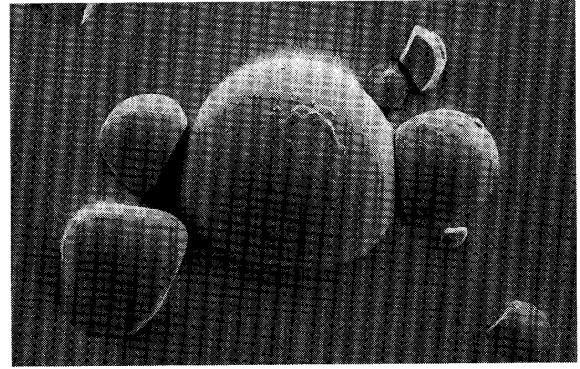


Photo.10 Degraddation of raw sweet potato starch granules in i-1899 culture filtrate at 0hr (hydrolysis degree, 0%) with scanning electron microscopy.

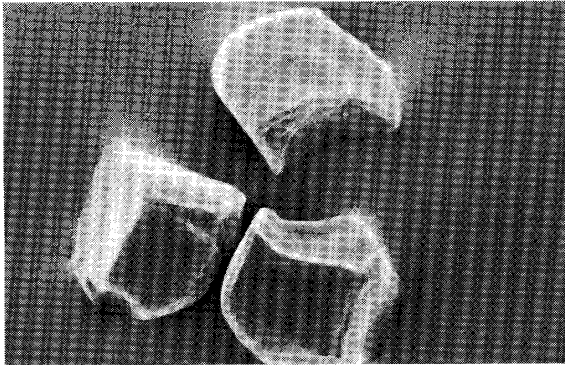


Photo. 8 Degraddation of raw rice starch granules in i-1899 culture filtrate at 0hr (hydrolysis degree, 0%) with scanning electron microscopy.

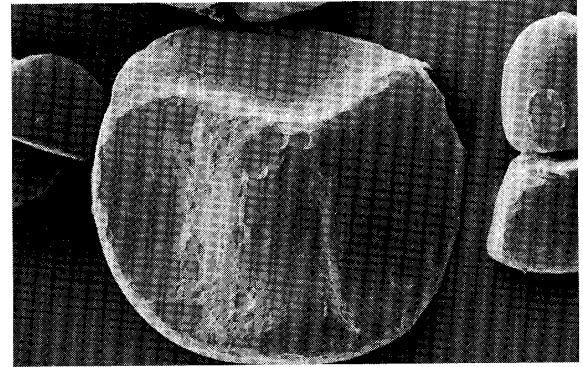


Photo.11 Degraddation of raw sweet potato starch granules in i-1899 culture filtrate at 150hr (hydrolysis degree, 43%) with scanning electron microscopy.

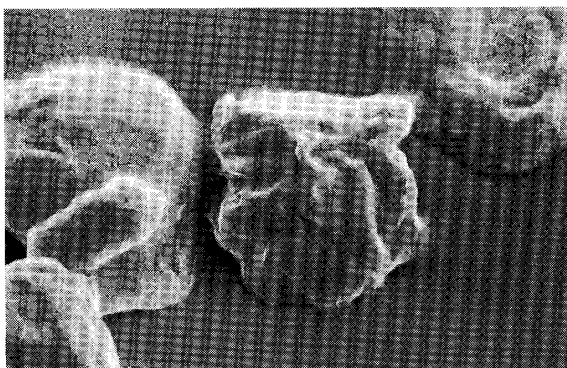


Photo. 9 Degraddation of raw rice starch granules in i-1899 culture filtrate at 96hr (hydrolysis degree, 65%) with scanning electron microscopy.

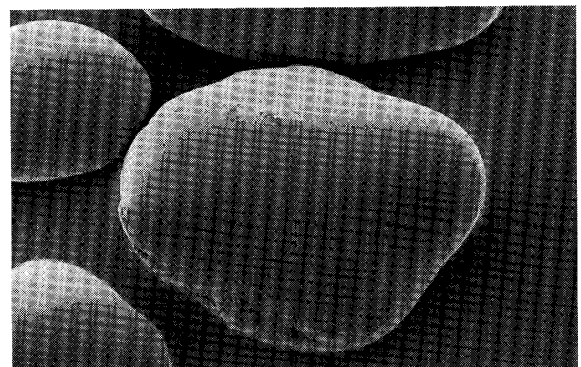


Photo.12 Degraddation of raw potato starch granules in i-1899 culture filtrate at 0hr (hydrolysis degree, 0%) with scanning electron microscopy.

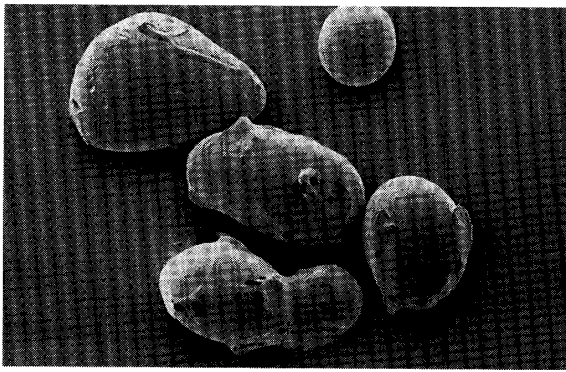


Photo.13 Degratation of raw potato starch granules in i-1899 culture filtrate at 150hr (hydrolysis degree, 18%) with scanning electron microscopy.

見えるほどピンホールが大きくなり、96時間目にはデンプン粒が崩壊し始めそれに伴い空洞化され、97%消化した時点でのグルコースの収量は90%以上であった。それ以降の観察では完全にデンプン粒は崩壊し原型を止めていなかった。

(Photo.1~5)

コムギでは同様に最初にピンホールを空けそしてデンプン粒を空洞化させ、崩壊が起こった。

(Photo.6,7)

コメでも同様にピンホールを空けたがデンプン粒の空洞化などは観察できなかった。

(Photo.8,9)

カンショでは表面にピンホールなどは観察されず全体的に形がいびつになっていった。

(Photo.10,11)

バレイショではピンホールが認められたがその数は非常に少なくデンプン粒自体もかたちをそのまま保持していた。(Photo.12,13)

生デンプンの分解ではデンプンの起源と酵素の違いによっていろいろな分解様式が知られている⁸⁾。その分解様式にはデンプン粒に垂直に穴をあける、表面に沿ってまたは段丘状に侵食するなどが知られている。本酵素においては穴を開けていく分解様式が多く見られた。

以上の結果より本菌の生産するアミラーゼは

根茎デンプンよりも地上茎デンプンをよく分解するものであった。

現在までに報告された生デンプン分解アミラーゼの中で*St. bovis*, *Asp. sp K-27*, *B. circulans* F-2, *Charala paradoxa*などは48時間ほどで完全分解が起こることが報告されているが、これらと比較すると本酵素の作用性は非常にゆっくりであった。

しかし、その分解率は既知のものと比較しても高く、現在までに報告された酵母のアミラーゼの中では生デンプンの分解活性は非常に高かった。

精製酵素GAを作用させた試料の走査型電子顕微鏡による観察では小さなピンホールが確認されたがその消化率によっても反映されるようにピンホールは非常に小さいものであった。

現在までに*Asp. awamori*のグルコアミラーゼIは α -アミラーゼが共存するとその分解率が上昇することが知られている。また、生デンプンへの酵素作用性と生デンプンの構造は密接な関係があるとされている。しかしながら、その構造に関してはタンパクの膜に包まれていること、グルコースの炭素の3位と6位にリン酸エステルを形成しているなどのことが明らかにされてきたが、まだまだ不明瞭な点が残されている。そして、これら構造上の性質から、生デンプン糖化にはアミラーゼが単独ではなく α -グルコシダーゼ、枝切り酵素、D-酵素、フォスファターゼ、酸性プロテアーゼ、細胞膜分解酵素などの協力酵素が存在することが知られている¹³⁾。

今回の検討における、精製酵素と粗酵素での最終消化率の差はグルコアミラーゼと α -アミラーゼの相互作用によるものであるか、またアミラーゼ以外の協力酵素によるものであるかは今後の検討を要するものである。

要 約

Pichia guilliermondii i-1899の生産する菌体外アミラーゼの粗酵素および精製酵素によるコメ、コムギ、トウモロコシ、カンショ、バレイショの5種の生デンプンへの作用性を検討した。その結果、粗酵素液は地上デンプンをよく分解し、トウモロコシデンプンでは100%グルコースに分解した。また、その生デンプンへの吸着性はコムギデンプン以外の供試デンプンに約30%の割合で吸着された。

一方、精製酵素の生デンプン分解活性ではA1、A2の2種の α -アミラーゼには作用性は認められず、グルコアミラーゼ (GA) のみで認められた。しかし、最終分解率はコムギで20%、コメで5%にすぎなかった。

また、粗酵素および精製酵素 (GA) の走査型電子顕微鏡による生デンプン粒分解過程の観察では分解初期段階でデンプン粒に垂直に穴を空け、そこから徐々に作用していく分解様式が認められた。

走査型電子顕微鏡観察にあたりご尽力くださいました日本電子(株)営業部武満氏ならびに同社応用研究センター第2応用研究室柳原利成氏、川島徹也氏に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 前田巖、自見信子、谷口肇、中村道徳：澱粉科学, 26, 117 (1979)
- 2) 上田誠之助：澱粉科学, 21, 117 (1974)
- 3) 大西正健、坂野好幸、谷口 肇：アミラーゼ, 学会出版センター, 187 (1986)
- 4) 溝上恭平、小崎道雄、北原覚雄：澱粉科学, 25, 132 (1978)
- 5) 谷口肇、萬在、丸山芳治、中村道徳：澱粉科学, 29, 107 (1982)
- 6) 上田誠之助：澱粉科学, 21, 210 (1974)
- 7) 貝沼圭二、石神博、小林昭一：澱粉科学, 32, 128 (1985)
- 8) 安部淳一、フレデリコW. ベルグマン、小幡和哲、檜作進：澱粉科学, 32, 128 (1985)
- 9) 黒澤和彦、佐々木博、高尾彰一：日本農芸化学会昭和60年度大学講演要旨集, 365 (1985)
- 10) 福井作蔵：生物化学実験法1還元糖の定量法 第2版, 学会出版センター
- 11) 谷口肇：現代化学, 増刊28, 166 (1995)
- 12) 檜作進、竹田靖史、松林卓哉：澱粉科学, 26, 2 (1979)
- 13) D.Gallant, A. Derrien, A. Aumaitre and A. Guibot : Stärke, 25, 56 (1973)