

いわゆる“あまぐら”に関する研究

第五報 あまぐら菌の酵素力について

西村 久子・吉川 せつ

(教育学部・被服科学研究室)

A Study of What is Called "Amagura"

Paper V. On the Enzymic Activity of Amagura Fungi

Hisako NISHIMURA and Setsu YOSHIKAWA

I. 緒 言

織物に発生する黒色汚点俗称“あまぐら”が微生物の発生に起因するものであること、及びその微生物 *Moniliales Dematium Hormodendrum* sp. の生物学的及び生理学的特徴の一部については既に報告したが、更にこの微生物が織物に対して如何なる影響を及ぼすかを究明しようとした。

微生物が織物に発生した場合色素による汚点を生ずる一方繊維の強度劣化が見られる。一般に高分子材料が微生物により劣化を起す原因としては微生物の生産する有機酸その他の生産物が繊維に影響すると共に微生物自身が高分子物質及びその付着物を分解して自らの栄養源として利用する事等が考えられる。この場合生産物として種々の酵素の生成が行われるであろうことは当然考えられるところで特に糸状菌は付着した有機物に対して *Amylase*, *Protease*, *Lipase* 等の酵素を分泌し、その複雑な作用により有機物を分解する事は既に知られている。以下の実験はあまぐら菌が繊維に与える影響を知るために蛋白、澱粉及び脂肪分解酵素について酵素力を測定し他の糸状菌との比較によりその一端を知ろうとしたものである。

なお対照として用いたのは織物に発生する最も普通の糸状菌である *Aspergillus oryzae* R. C. 及び *Aspergillus niger* であるが、いずれも京都大学農学部より分譲されたものである。

II. 実 験 方 法

A. 菌の培養及び酵素の抽出

a. 菌の培養

ペトリ皿に小麦麩をとり同量の水を加えてよく混和してから1時間蒸煮し、斜面培養した菌を3白金耳量接種し胞子をなるべく均一に撒布させてから30°Cで培養した。

実験に供したのはいずれも接種後1週間前後を経たもの、即ち肉眼的には菌の発育が概ね停止したと思われるもので、それより日数を越える時は電気冷蔵庫中に保存した。対照として用いた *Aspergillus oryzae* その他もあまぐら菌と同一日数を経過したものである。

なおあまぐら菌は黴培地に接種後一昼夜では黴の表面に僅かに暗緑色の菌体の発生が認められる程度であり4~5日後には黴の全面に亘って黒緑色の菌苔が生じ、以後は次第に黒色を増すのに対し、*Aspergillus oryzae* 及び *niger* では一昼夜で既に白色の菌糸がペトリ皿全面に広がり2日後には多数の胞子が発生していた。

b. 酵素の抽出

菌の発育した各々のペトリ皿の内容を混合し乳鉢中で摩碎後一定量秤取し、1% NaCl sol. または蒸留水を加え湯浴中で一定時間抽出を行いガラスフィルターで濾過した濾液を酵素液とした。酵素液は実験の都度調製し実験期間中保存するには電気冷蔵庫を用いた。

B. *Protease* の測定

蛋白分解酵素の測定には *Sørensen* の formol 滴定法及び *Folin* 試薬による光電比色法を採用した。

a. Formol 法

5% Gelatin sol. 5 cc を基質とし pH 6.0 の MacIlvain 緩衝液 2.5 cc と共に酵素液 2.5 cc を 40°C で 3 時間作用させた後、反応液 5 cc に 20% フォルマリン 2.5 cc を加えてフォルマリンとアミノ基を結合させ、遊離するカルボキシル基の増加をフェノールフタレンを指示薬として N/10 NaOH sol. で滴定する方法で、沸騰浴中で 5 分間加熱した酵素液を用いて同様に滴定した Blank test の値を差し引いたものが sample 中のアミノ酸のカルボキシル基の量に相当する。滴定に用いる N/10 NaOH sol. 1 cc はアミノ態窒素 1.4 mg に当る。

b. Folin 法

緩衝液を用いて調製した Casein の 2% sol. 1 cc に酵素液 1 cc を加えて 35°C で 10 分間作用させた 2 cc の 0.4M [TCA] を添加して反応を停止せしめ、未反応の Casein の沈澱を濾過しその濾液に 0.4 M CaCO₃ 5 cc と 5 倍稀釈の Folin 試薬 1 cc を加え振盪混和してから 35°C で 20 分間加温発色させて光電比色計にかけて吸光度を測定し、煮沸不活性化した酵素液を用いた Blank test の吸光度を各々の測定値から差し引いたものを実際の呈色値とする。

なお各々の pH の緩衝液の調製には pH 2.8 は M/10 乳酸, pH 5.9~8.1 は M/10 磷酸, pH 9, 3~10.0 では M/10 硼酸・塩化カリ・炭酸ソーダ緩衝液を用いたが Casein の等電点 4.6 付近では溶解が行われず使用不能であった。pH 測定には島津製 Model GU-1 型ガラス電極 pH メーターを使用した。

光電比色計は島津製 DF-II 型で厚さ 10 mm の cubett, 波長 660 m μ の filter を用い蒸留水を標準として吸光度を測定した。

C. Amylase の測定

糖化 Amylase については生成された還元糖量を sumner の Dinitrosalicyl 酸による比色定量、及び Somogyi 変法による滴定によって求めた。

糊精化 Amylase の澱粉糊精化力の測定には Wohlgemuth 法を用いた。

a. Dinitrosalicyl 酸法

pH 6.9 の磷酸緩衝液を用いた澱粉の 1% sol. 1 cc に酵素液 1 cc を加え 40°C で 1 時間反応させた後、10 倍に稀釈してその 2 cc をとり 3.5-Dinitrosalicyl 酸の 1% アルカリ溶液 2 cc を加えて

反応を止め沸騰浴中に 5 分間浸漬して発色を最大ならしめ、流水で冷却し水 20 cc を加えてから吸光度を測定する。なお Blank test を加熱不活性化させた酵素液を用いて同様に各行い各々の測定値から差し引く。

予め Glucose を用いて吸光度と濃度との関係を求めた検量線を作製しておき遊離する糖量をグラフから Glucose の mg 数で読みとる。

この場合一般には Maltose を用いて検量線をとる Maltose の mg 数で読む方法が行われるが澱粉分子の Glucoside 連鎖の末端から順に Glucose 単位に切っていくのが糸状菌の糖化酵素に共通な特徴であるところから Glucose を用いた。

なお種々の pH をもつ澱粉溶液の調製には pH 3.4~5.0 では M/50 醋酸, pH 5.6~7.8 では M/50 磷酸緩衝液を用い測定には島津製 Model GU-I 型ガラス電極 pH メーターを使用した。

光電比色計は島津製 DF-II 型で厚さ 20 mm の波長 660 m μ の filter を用いた蒸留水を標準として吸光度を測定した。

b. Somogyi 変法

pH 6.9 の M/50 磷酸緩衝液を用いた 1% 澱粉溶液に同容量の酵素液を加えて 40°C で 1 時間反応させた後、ロッシェル塩、磷酸ソーダ、硫酸銅、沃度酸カリの混液 10 cc に酵素反応液 (5~10 mg の還元糖を含む) を加えて 30 cc とし加熱して正確に 3 分間沸騰を継続し速かに冷却する。次にクロム酸カリ、沃度カリ混液 10 cc, 更に 2NH₂SO₄ sol. 10 cc を加えて振盪混和し、直ちに 1% 澱粉溶液を指示薬として 0.05 N チオ硫酸ソーダで滴定する。

0.05 N チオ硫酸ソーダ 1 cc は Glucose 1.44 mg に相当する処から同一条件で蒸留水で行った滴定数との差に乗じて還元糖量を知る。なお Blank test として加熱不活性化した酵素液を用いて同様に行った値を各々の測定値から差し引く。

c. Wohlgemuth 法

1 cc 中に 0.5 cc, 0.25 cc, 0.12 cc... と等比級数的に濃度を低くした酵素液を 9 個作って氷水中に冷却し、各々に 1% 澱粉液 5 cc を加え、全部を同時に 40°C の湯浴中に入れて 1 時間反応させ、再び氷水中にとって酵素作用を停止させ、0.1 N 沃度液と一滴づつ加えて沃度反応を観察し、その青色が認められなく紫色を呈する時の酵素液の量か

ら 1cc の酵素液により分解される 1% 澱粉液の cc 数を算出する。

D. Lipase の測定

脂肪酵素のエステル分解作用によって生ずる遊離脂肪酸を Willstätter アルカリ滴定法で測定したが水不溶性基質の場合安定で均一な乳化状態が得難いので乳化安定剤として Poly Vinyl Alcohol (PVA) を使用した。

即ち重合度 2000 の [PVA] 10 g を水 1 l に加えて攪拌溶解し 0.1N HCl 5cc と共に 75~80°C に加熱して完全な溶液とし冷却濾過後 N/10 NaOH sol. で pH 8.0 に調整し、鹼化価 186.5 のオリーブ油を 0.1M 濃度になる様に加え blender にかけて完全に乳化させたものを基質として用いた。

基質 10cc に pH 8.0 の MacIlvain 緩衝液 5cc 及び酵素液 5 cc を加え 37°C の孵卵器中で時々振盪しながら反応を行わせ 4 時間後アルコールとアセトンの同量混液 30cc を加えて乳化状態を破壊し

た後、フェノールフタレンを指示薬として N/10 KOH アルコール溶液で滴定を行い Blank test として短時間煮沸不活性化した酵素液を用いて同様に測定した値との差をとった。

III. 結果及び考察

A. 酵素の抽出

あまぐら菌の酵素抽出方法については種々の条件が考えられるので二、三の条件に関して蛋白及び澱粉分解能力につき検討してみた。Protease については Folin 法, Amylase については Saly-cyl 酸法による比色定量の結果である。

a. 抽出液及び温度

菌の発育した穀培地に 10 倍量の蒸留水及び 1% NaCl sol. を加えて抽出する場合 40°C の湯浴中で 1 時間、15 分毎に攪拌しながら抽出したものと冷蔵庫中 (7°±2°C) に 20 時間静置したものととの比較を行った。

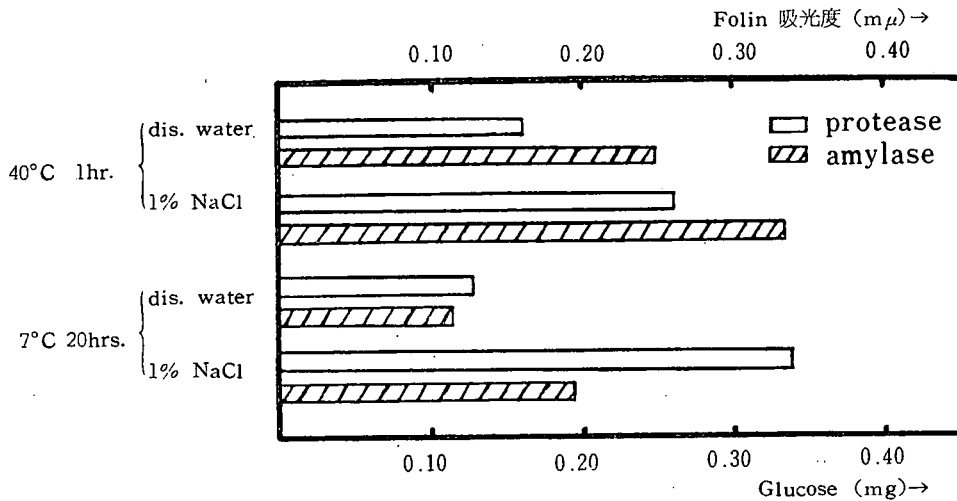


Fig. 1 抽出液及び温度の影響

これによると 1% NaCl sol. を用いた方が蒸留水の場合より抽出能力が大と認められ、また冷蔵庫中に 20 時間放置するよりも 40°C で 1 時間行う方が効果的と言える。

b. 抽出時間

穀培地に 10 倍量の 1% NaCl sol. を加え 40°C で抽出を行い Protease と Amylase について抽出時間による酵素液の基質分解能を測定した。

その結果 Protease と Amylase は大体類似し

た傾向を示し抽出時間が長いだけ多く抽出されるが 4 時間程度ではまだ平衡に達しないことがわかった。

c. 攪拌

抽出時の攪拌は酵素の抽出に効果があるか否かを知るため毎に 10 倍量の 1% NaCl sol. を加え 40°C で 1 時間、毎秒 2~2.5 回の速度で抽出フラスコを連続攪拌したものと同様の条件で、5 時間及び 6 時間静置したものにつき Amylase の基質

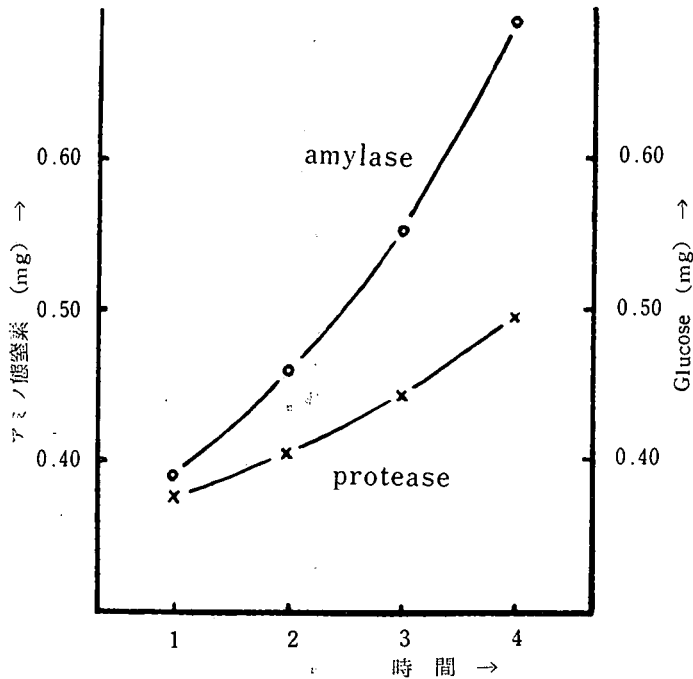


Table 1 攪拌による影響

条件	No.	吸光度 ($m\mu$)	Glucose (mg)
1 時間 攪拌	①	0.476	0.095
	2	0.88	0.518
5 時間 静置	③	0.512	0.125
	4	0.92	0.560
6 時間 静置	⑤	0.483	0.095
	6	0.93	0.574

sample No. 中の奇数は加熱不活性化した酵素液を用いた Blank test の値を示す。

分解能力によって比較したものが Table 1 である。

これによれば攪拌しながら1時間抽出したものは静置して5~6時間経過した値に近く、連続攪拌により短時間でもかなり効果のあるものと判断された。

以上の結果から以後の実験における抽出条件は特別の場合を除いて栽培地に10倍量の1% NaCl sol. を加え、40°C の湯浴中で時々攪拌しながら3時間抽出後ガラスフィルターで濾過しその濾液を酵素原液とした。

B. Protease

Aspergillus oryzae, *Aspergillus niger* 及びあまぐら菌の Protease 力を Formol 法によって測定し、酵素液 2.5cc が作用条件下において分解し得たアミノ態窒素の量で比較すれば Table 2 の通りである。

これによれば *Aspergillus oryzae* は他に比べて非常に酵素力が強く他の二種の約7倍の力を示しているが、この培養及び測定条件下ではあまぐら菌は *niger* よりやや優る程度である。

更に酵素作用は水素イオン濃度によって相異し、最適 pH 以外ではその作用が漸次不活潑になるものである。そこであまぐら菌の最適 pH を知

Table 2 Protease の 比較

菌 種	No.	滴 定 値 (cc)	アミノ態窒素 (mg)
Aspergillus oryzae	①	1.030	2.460
	2	2.787	
niger	③	0.770	0.347
	4	0.998	
Hormodendrum sp.	⑤	0.796	0.349
	6	1.044	

sample No. 中の奇数は Blank test の値を示す。

るため各 pH における酵素作用を Folin 呈色法で 度を光電比色計の吸光度で示したものが Table 3 比較してみた。あまぐら菌の各 pH における活性 であり, Fig. 3 はそれを図示したものである。

Table 3 Protease 反応液の各 pH に於ける吸光度

pH	No.	吸 光 度 (m μ)	pH	No.	吸 光 度 (m μ)
2.8	①	0.130	8.1	⑨	0.151
	2	0.135		10	0.197
5.9	③	0.135	9.3	⑩	0.128
	4	0.182		12	0.235
6.6	⑤	0.142	10.0	⑬	0.138
	6	0.178		14	0.229
7.4	⑦	0.136			
	8	0.200			

sample No. 中の奇数は Blank test の値を示す。

これによると pH の値によって酵素力にかなりの影響のあることがわかる。あまぐら菌の最適 pH はアルカリ側に傾く傾向があり 酵素作用の最大は pH 9.0 付近であるがその作用曲線には弱酸性、中性及びアルカリ性の三つのピークが認められ、あまぐら菌は三つのタイプの蛋白分解酵素の

複合したものと考えられる。

先に Formol 法で pH 6.0 の緩衝液を用いて実験を行ったが必ずしも最適の条件であったとはいえない訳であり、あまぐら菌としての最高の活性を示す pH 値における値を以て比較を行う必要がある。

Table 4 Amylase の 比較

菌 種	No.	吸 光 度 (m μ)	Glucose (mg)
Aspergillus niger	①	0.566	0.709
	2	1.23	
Hormodendrum sp.	③	0.673	0.145
	4	0.796	

sample No. 中の奇数は Blank test の値を示す。

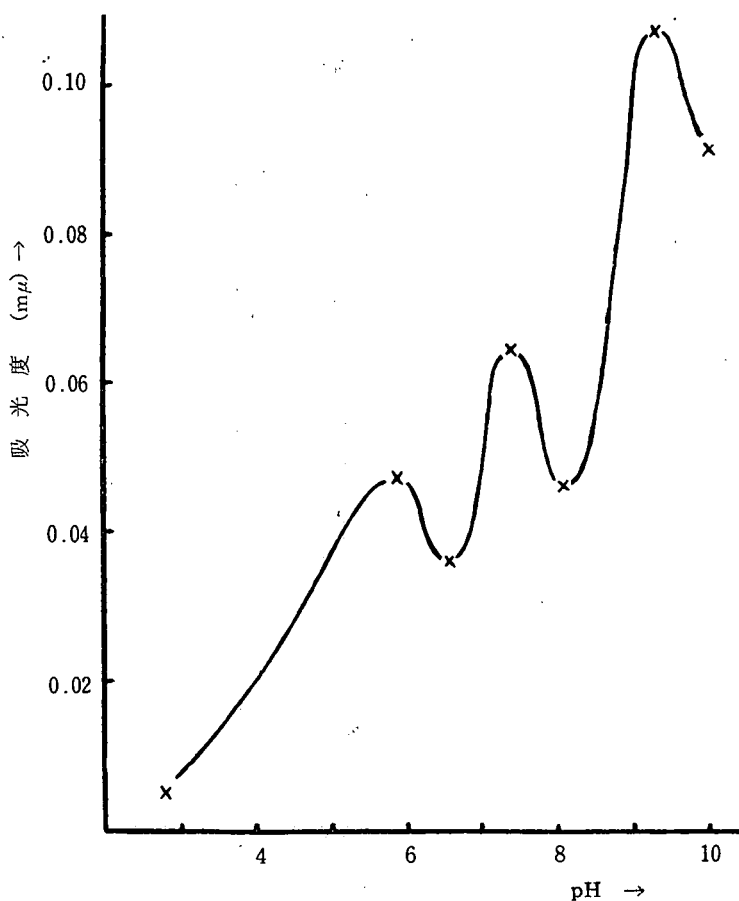


Fig. 3 Protease の pH 作用 曲線

C. Amylase

Salycyl 酸法を用い、測定条件下において酵素液 0.1 cc が遊離する Glucose 量を *Aspergillus niger* とあまぐら菌を比較すれば Table 4 の通りである。

なお *Aspergillus niger* とあまぐら菌の前述と同一の酵素反応液について Salycyl 酸法と Somogyi 変法による測定結果を比較したが、今酵素液 1 cc が遊離する Glucose の mg 数で示せば Table 5 の通りである。

Table 5 糖化 Amylase 測定法の比較

菌 種	比色法 (mg)	滴定法 (mg)
<i>Aspergillus niger</i>	7.09	6.98
<i>Hormodendrum sp.</i>	1.45	1.36

前記の表によれば滴定法では多少すくなく出る傾向があるがまづ同一の結果と見てよいと思う。

これによると *niger* の Amylase 力はあまぐら菌のその約 4.5 倍の強さを示しているがこの時の培養条件が各々にとって最適の状態であったかどうかについては問題があり、次に述べる pH の影響もあろうが敏に培養した時 *niger* の方が発育経過が早くペトリ皿全面に繁殖した事などからみてやはりあまぐら菌の Amylase 力は *niger* に劣る事は動かせないと思われる。

次にあまぐら菌の Amylase について各種 pH における酵素作用を同じく比色法で測定した、即ち Amylase 反応液の吸光度及びそれを図示したものが Table 6 及び Fig. 4 である。

これによるとあまぐら菌の Amylase 作用曲線は pH 4.5 付近、5.5 付近に小さな山をもつた

Table 6 糖化 Amylase 反応液の各 pH における吸光度

pH	No.	吸光度 (m μ)	pH	No.	吸光度 (m μ)
3.4	①	0.816	5.9	⑬	0.770
	2	1.23		14	1.37
3.7	③	0.800	6.45	⑮	0.860
	4	1.24		16	1.47
4.2	⑤	0.724	6.95	⑰	0.876
	6	1.26		18	1.29
4.4	⑦	0.774	7.32	⑱	0.878
	8	1.34		20	1.22
5.06	⑨	0.790	7.8	㉑	0.870
	10	1.40		22	1.06
5.6	⑪	0.814			
	12	1.43			

sample No. 中の奇数は Blank test の値と示す.

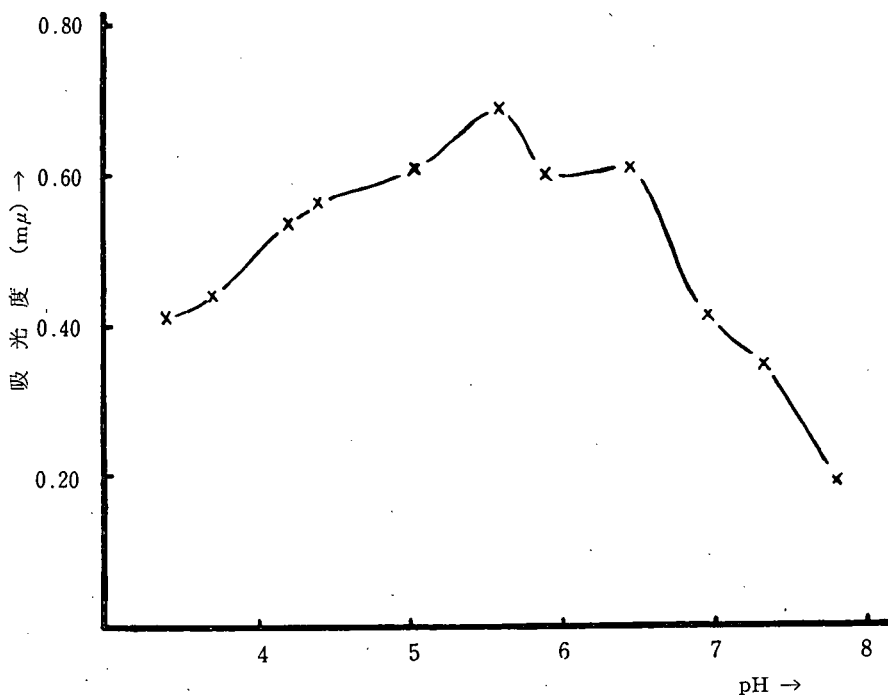


Fig. 4 Amylase の pH 作用曲線

らかなカーブを画き最適 pH を異にする数種の Amylase の複合作用と見られるが弱酸性において酵素作用が盛であるといえる。

最前の niger との比較実験で pH 6.9 を用いたのはやゝアルカリ側に傾きすぎたきらいがある。

更に澱粉を糊精化して沃度反応を消失させるいわゆる糊精化 Amylase についても実験を行った。酵素液としては穀培地に 3 倍量の 1% NaCl sol. を加え 40°C で 1 時間攪拌抽出後濾過したものを酵素原液とし Wohlgenuth 法により 1cc の

酵素液により分解される1%澱粉溶液のcc数を算出した結果は次の通りである。

Table 7 糊精化 Amylase の比較

菌 種	D _{40°} _{60'}
<i>Aspergillus niger</i>	200
<i>Hormodendrum sp.</i>	50

Table 7 によればあまぐら菌の糊精化力は *niger* の4であり Salycyl 酸法による還元糖の測定値と略々似かよった割合を示している。

D. Lipase

黴培地に3.5倍量の蒸留水を加え常法により抽出した酵素液5ccを用いた反応液の滴定値と同時に行った Blank test の値を差し引いた全滴定数を示せば次の通りである。

Table 8 Lipase の比較

菌 種	No.	滴定値 (cc)
<i>Aspergillus niger</i>	①	3.740
	2	3.942
<i>Hormodendrum sp.</i>	③	2.380
	4	2.600

sample No. 中の奇数は Blank test の値を示す。

その測定結果はどれも脂肪分解能力は大差なく強くないが一般に Lipase は菌苔生育後ある日数を経てから生成される傾向があり *Aspergillus* などの糸状菌の場合菌体脂肪の蓄積は培養の末期に急激に高くなることが知られている。接種後1週間前後の黴培地ではその点で最大活性を示していないという事も考えられる。

以上の実験の結果あまぐら菌の蛋白、澱粉、脂肪分解酵素力は *Aspergillus oryzae* 及び *niger* に比べて特に強大なということはないことがわかった。この菌の酵素が繊維に与える影響を考える場合一応この三つの酵素の上から見ればその影響は少いものと思われるが、更にその代謝生産物についても研究を進めて行きたい。

IV. 要 約

織物に発生する黒色汚点“あまぐら”の原因で

ある *Moniliales Dematium Hormodendrum sp.* を黴上に培養し約一週間後のサンプルにつき1%NaCl sol. 及び蒸留水で抽出を行い Protease, Amylase, Lipase の活性につき実験し *Aspergillus oryzae* 及び *niger* の活性と比較を行った。

1. Protease

Sørensen の formol 法及び Folin 法で測定したが *Hormodendrum sp.* は *Aspergillus oryzae* の約1/2の酵素力を示し *niger* よりやや優る程度である。最適 pH はアルカリ側に傾き最大活性は pH 9.3 付近である。

2. Amylase

糖化 Amylase の測定には Dinitrosalicyl 酸法及び Somogyi 変法によったが *niger* のその約2/3の活性を示し最適 pH は弱酸性であった。

糊精化 Amylase も Wohlgemuth 法によれば *niger* のその約4/5の活性度を示した。

3. Lipase

Willstätter のアルカリ滴定法によったが、*Aspergillus niger*, *Hormodendrum sp.* 両者に殆ど差がなく数値は小であった。

以上あまぐら菌の蛋白、澱粉、脂肪分解酵素力は *Aspergillus oryzae*, 及び *niger* に比べて特に強大なということはないので繊維に対する影響も少いであろうという事が推察される。

終りに望み特に実験に関し御助言いただいた本学部岡崎教官に対し深謝する。

参 考 文 献

- 1). 西村・吉川：いわゆる“あまぐら”に関する研究 第一報・第二報：高知大学学術研究報告 Vol. 5, No. 11
- 2). 西村・吉川：いわゆる“あまぐら”に関する研究 第三報・第四報：高知大学学術研究報告 Vol. 6, No. 23
- 3). 赤堀編：酵素研究法 1, 2, 3.: 昭32
- 4). 江上他：標準生化学実験：昭28
- 5). 京大農編：農芸化学実験書 2, 3.: 昭32
- 6). 東大農編実験農芸化学 上：昭27
- 7). 坂口他：微生物及び酵素実験法：昭18
- 8). S. P. Colowick et al.: *Methods in Enzymology* I: p. 631 (1955)
- 9). 齊藤他：新潟県立農村工業指導所研究報告 第3号：p. 51 (1957)
- 10). 村松・富金原：農化誌, 28, 456 (1954)

- 11). 松島：農化誌，28, 711 (1954). 29, 87, 883 (1955). 31, 38, 331, 358 (1957). 32, 211, 211, 230 (1958)
- 12) 里村・大井：農化誌，31, 202 (1957)
(昭和34年度日本家政学会中，四国支部総会にて発表)

(昭和34年9月30日受理)

Summary

A Study of what is called “Amagura”

Paper V. On the Enzymic activity of Amagura fungi

Hisako NISHIMURA and Setsu YOSHIKAWA

(Laboratory of Clothing Science, Education Faculty, Kōchi University)

Moniliales *Dematium Hormodendrum* sp., which causes “Amagura”, or black stains on textiles, was cultured in wheat bran for a week. From this were extracted, by 1% NaCl solution and distilled water, Protease, Amylase and Lipase. Experiments were made on these to study their enzymic activity, which was then compared with that of *Aspergillus oryzae* R. C. and *niger*.

1). Protease

Measurement by the Formol method of Sørensen and the Folin method showed that the enzymic power of *Hormodendrum* sp., was somewhat superior to that of *Aspergillus niger*, or about $\frac{1}{4}$ that of *Aspergillus oryzae*. Optimum pH was on the alkaline side, with the maximum activity appearing around pH 9.3.

2). Amylase

For Saccharogenic amylase, the Dinitrosalicylic acid method and the modified Somogyi method were employed. The enzymic power of Amagura fungi was about $\frac{2}{9}$ that of *Aspergillus niger*, and the optimum pH was on the acid side. Dextrinogenic amylase, by the method of Wohlgemuth, showed $\frac{1}{4}$ the power of *Aspergillus niger*.

3). Lipase

The alkaline titration method of Willstätter showed that there was little difference between *Aspergillus niger* and *Hormodendrum* sp., both showing small numerical values.

In sum, the enzymic power of Amagura fungi toward protein, starch and fat is not markedly superior to that of *Aspergillus oryzae* or *niger*, and therefore it is inferred that Amagura fungi will not greatly affect fiber.

(Received September 30, 1959)

