

Title	好アルカリ性バチルスF5株の生産するオリゴ-1, 6-グルコシダーゼに関する研究
Author(s)	山本, 幹男
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36813">https://hdl.handle.net/11094/36813</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	山本幹男
学位の種類	工学博士
学位記番号	第 8969 号
学位授与の日付	平成 2 年 2 月 2 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	好アルカリ性バチルス F 5 株の生産するオリゴ-1, 6-グルコシダーゼに関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 弘輔 (副査) 教授 大嶋 泰治 教授 山田 靖宙 教授 高野 光男

### 論文内容の要旨

澱粉糖化工業においては高濃度の澱粉液を高い収率で糖化し、副産物を最低限に低下させる必要がある。本論文では望ましくない副産物、イソマルトース等を分解する新しい酵素を探索し、その工業的応用を図ったものである。

第 I 部では菌体内にイソマルトース加水分解型  $\alpha$ -グルコシダーゼを生産する好アルカリ性の細菌を分離している。同酵素はマルトースや可溶性澱粉により強く誘導される。精製した酵素は分子量 60,000、最適 pH 6.0~6.5、最適反応温度 45°C である。イソマルトオリゴ糖に対する基質特異性から、オリゴ-1, 6-グルコシダーゼに属すると同定されたが、 $\alpha$ -1, 4-マルトオリゴ糖に対する作用から新しいタイプの酵素であると判定している。

第 II 部では本オリゴ-1, 6-グルコシダーゼ遺伝子を大腸菌へクローン化している。3.1kb の *EcoRV*-*PvuII* 断片中にこの酵素遺伝子はコードされており、この断片を挿入した合成プラスミド pMC21 を保持する大腸菌は原株、F 5 株に対し培養液当り 8 倍、菌体量当り 14 倍の酵素を生産した。挿入断片を分泌ベクター pEAP 2 に組み換え発現させると酵素生産はさらに 3 倍に上昇したが分泌していない。大腸菌で生産させた酵素は F 5 株の生産する酵素と一致している。

オリゴ- $\alpha$ -1, 6-グルコシダーゼ遺伝子を含む 3.1kb DNA 断片の塩基配列を決定し、その中に 1,500bp の読み取り開放枠の存在を認め、その N-末端の 10 アミノ酸配列が F 5 株の生産する酵素のそれと一致すること、および全アミノ酸組成が一致することからこの 1,500bp がオリゴ- $\alpha$ -1, 6-グルコシダーゼの構造遺伝子であると決定している。また SD 配列とターミネーター配列の存在を認めている。

第Ⅲ部ではグルコースの工業生産において、現行の仕込澱粉濃度が30%から36%まで上昇させるため、*Rhizopus*由来のグルコアミラーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼにオリゴ $\alpha$ -1,6-グルコシダーゼを添加すると無添加対照に比べて0.5%以上グルコース含有量が高く保たれる。さらに生コンスターチの糖化においても本酵素の添加効果を認めている。

### 論文の審査結果の要旨

澱粉糖化工業においては可能な限り高濃度の澱粉液をできるだけ副産物を少量に抑えて糖化するかが問題になっている。本研究はこの問題を解決するためにイソマルトース等の副産物を分解する酵素を検索し、その応用を図ったもので次のような重要な結論を得ている。

- 1) 好アルカリ性細菌 *Bacillus* sp. を天然から分離し、その生産するイソマルトース加水分解型の $\alpha$ -グルコシダーゼを精製し、その性質を調べている。その結果本酵素は $\alpha$ -1,4-マルトオリゴ糖に作用せず、 $\alpha$ -1,6-グルコシド結合にのみ作用し、オリゴ-1,6- $\alpha$ -グルコシダーゼと呼ぶべき新しいタイプの酵素であることを明らかにしている。
- 2) オリゴ-1,6-グルコシダーゼ遺伝子を大腸菌中にクローニングし、pBR322をベクターとして使用すると菌体量当り生産性は原株の14倍に増加し、さらに分泌ベクター pEAP 2 に組み換えると原株の40倍以上の生産性を得ている。
- 3) オリゴ-1,6-グルコシダーゼ遺伝子のDNA塩基配列を決定し、1,527bpの読み取り可能枠の存在を認めている。このコードする蛋白質は509アミノ酸残基からなるものである。
- 4) 液化澱粉液の仕込み濃度を現在使用されている濃度30%から36%に上昇させるために、従来使用されている酵素混合物に本酵素を添加すると0.5%以上グルコース含有率が高くなり、収率が増加する。
- 5) 生コンスターチ糖化においても従来使用されている酵素混合物に本酵素を添加すると良好な結果が得られる。

以上の成果は、食品工学ならびに酵素工学の発展に寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。