

## 和紙原料の醱酵精練

## XIII 細菌の醱酵条件がペクチン分解酵素の生産に及ぼす影響に就て

梶 明, 穴 吹 吉 夫

On the retting of plant fibre materials for Japanese paper manufacture. XIII On the influence of cultural conditions on the formation of pectic enzymes by the retting bacteria.

Akira KAJI and Yoshio ANABUKI (Laboratory of Technical Microbiology)

(Received May 16, 1955. Accepted as received.)

微生物のペクチン分解酵素はペクチンを含有する培地に生育するとき一段と生産が大になることは相当古くから知られていたようであるが KERTESZ<sup>(1)</sup> もこの事実を記載している。PHAFF<sup>(2)</sup> は *Pen. chrysogenum* を使用して polygalacturonase (PG) 及び pectinesterase (PE) 生産の適応性について実験を試み, D-galacturonic acid, L-galactonic acid, mucic acid, pectin, pectic acid, gum tragacanth が酵素生産に卓効のあることを確認し, このかびが PG 及 PE を生産するには上記物質中の前三者に共通の configuration を有する化合物が必要であることを証明した。小沢及び武田<sup>(3)</sup> は *Asp. oryzae*, *Pen. expansum*, *Giberella saubinette* を使用して炭素源及び窒素源の影響等を検討して protopectinase (PP) の生成にはペクチン, 可溶性澱粉, デキストリンが好ましく, 窒素源としては硝酸カリが好適であると報告した。朝井, 齊藤<sup>(4)</sup> は *Asp. niger* の一株を用いて degumming enzyme, PP, depolymeric enzyme, PG, PE と酵素作用を分類し, これ等酵素の菌体外生成に対する炭素源の影響を検討し適応性の程度は各酵素により異り, PE 最も顕著であり, PP 最も少なかったと報告した。

これ等の報告は何れもかびを使用しているが細菌のペクチン分解酵素の生産に関する報告は少ない。著者はさきに和紙原料の醱酵精練に有効な細菌, *Cl. felsineum* var. *sikokianum*<sup>(5)</sup> を分離し, その PP<sup>(6)</sup> 及び PG<sup>(7)</sup> 作用についても報告した。本報に於てはこの細菌を使用して培養条件が酵素生産に及ぼす影響及び醱酵中の酵素の生産状況及び培地成分の変化を追求した。第10報<sup>(7)</sup> に述べた如くこの細菌は PP 及び液化型 PG を多量に生産するが PE 及び糖化型 PG は僅かに生成するのみである, 従つて本報に於ても前二者の酵素の生産を問題とした, 本報中の protopectinase (PP) とは従来と同じく retting enzyme のことである。中葉の pectin が protopectin でなく pectin であることからこの呼称は必ずしも 適当でないがこのことについては又後報に於てふれることにしてとりあえず従前通りの表現法に従う。

## 実 験

I. 培養方法 基本培養基を設定しようと試み, 片桐が *Cl. acetobutylicum* について成功した 純合成培養基<sup>(8)</sup>, その栄養源組成を変更したもの, 大豆粕を窒素源としたもの, ペプトンを窒素源としこれに growth factors を添加したもの, 大豆粕又はペプトンの加水分解液を窒素源としこれに *p*-aminobenzoic acid, ビオチンを添加又は酵母の抽出液を添加した培養基, 以上の種々の培養基に細菌を繁殖せしめたが常に確実に繁殖し最も適當するものとしてペプトン加水分解液に酵母抽出液を加えたものを使用した。即ち5倍量の10%硫酸でペプトンを100°で30分, 更に120°で1時間加熱した後バリタ水で中和, 活性炭処理, 濾過した液を次記の如く適量使用した。無機塩類としては SPEAKMAN の塩, growth factors として乾燥酵母の抽出液即ち酵母1gに蒸溜水100ccを添加, 1時間煮沸した後濾過した液を培養液100ccにつき5cc使用した。炭素源は原則として2%とした。種醱は玉蜀黍醱とし主醱酵液の1/10容量を使用したかヘットの部分のみを添加して液部は使用しなかつた。種の接種直前に培養液を37°に加温した。ペプトン加水分解液が良い成績を示したのは既報<sup>(6)</sup> の如くこの細菌が proteolytic enzymes に乏しいためと考えられる。

II. 酵素作用力の決定方法 PGの作用力は第10報<sup>(7)</sup>と同様に行つた。第12報<sup>(9)</sup>に記載したと同じ理由で測定には醱酵液を直接使用せず酵素液の調製は次の如く行つた。醱酵液を遠沈した後その一定量にアルコールを70%にな

るよう添加し氷室に一夜放置後遠沈して沈澱をとりこれを元の遠沈液と同量の水に溶解して酵素液とした。尚酵素作用時間は1.5時間又は3時間でそれぞれ A<sub>1.5</sub>, A<sub>3.0</sub>と記載した。PPの作用力は次の配合となし37°で24時間作用した後水洗し、充分叩解して開繊状況及びペクチン含量を求めた。雁皮2g. 酵素液 24cc. MC ILVAINE 緩衝液 (PH6.0) 15cc, 蒸留水49cc, トルオール1ccを配合した。酵素液としては醗酵液を遠沈した液を使用した。

Ⅲ. 窒素源の使用量 ペプトン20gに10%硫酸100ccを添加して上記の条件で加水分解後中和した溶液は540ccとなつた。この液を Table 1 の如く添加して窒素源の最適量を決定した。表中の含有百分率は元のペプトンに換算した量で加水分解中の損失量を度外視した含量である。

Table 1. Effect of nitrogen source on enzyme production.

Amount of nitrogen source			pH			* <sub>2</sub> Titratable acid			* <sub>3</sub> Wt. of cells			Polygalacturonase						Protopectinase			Ratio of sugar consumed %
% as peptone	Total N mg%	Amino N mg%	* <sub>1</sub>			cc			mg			(Observed by viscosity) A <sub>1.5</sub> %			* <sub>4</sub> (Observed by reducing value) cc			(Separation of ganpi fibre)			
			13	33	57	13	33	57	13	33	57	13	33	57	13	33	57	13	33	57	
0.2	18.5	6.1	4.0	4.2	4.2	3.4	1.8	1.7	6.2	3.1	1.9	30.1	34.4	33.7	0.02	0.05	0.01	±	±	±	97.0
0.5	46.3	15.3	4.2	4.0	4.0	2.2	3.8	3.0	9.6	6.7	2.1	78.2	78.1	36.8	0.10	0.11	0.11	+	±	±	96.0
0.7	64.8	21.4	4.0	4.0	4.2	3.6	2.8	2.8	5.9	5.3	3.4	83.1	80.4	79.0	0.14	0.13	0.10	+	+	+	96.6

\*<sub>1</sub> Time of fermentation in hours.

\*<sub>2</sub> Titratable acid is represented as 0.1 N NaOH soln. per 10cc cultural media.

\*<sub>3</sub> Cells in 10cc of cultured media were centrifuged, dried and weighed.

\*<sub>4</sub> Increase of reducing value is represented as 0.02N I<sub>2</sub> soln. consumed per 1cc of reaction media.

この結果をみれば糖消費率は0.2%の濃度でも良好であり、菌体数も相当量に達するが、PG, PPの作用特に後者の作用力は著しく劣る。0.5%及び0.7%の区分では各実験項目とも大差ないが酵素作用は0.7%区分の結果が優れている。即ち窒素源の濃度はペプトン加水分解液を使用して培養液中全窒素64.8mg/100cc, アミノ態窒素として21.4mg/100ccの濃度を必要とする。但し炭素源は葡萄糖で平均濃度は1.72%である。

Ⅳ. 炭素源の影響 Table 2 に示す如き各種の糖を使用して酵素生産に及ぼす影響を検討した。D-galacturonic acid はEastman Kodak 社, 他は和光製品を使用した。

Table 2. Influence of carbon source on enzyme production.

carbon source	pH			Titratable acid			Wt. of cells			Polygalacturonase						Protopectinase			Ratio of sugar consumed %	
	* <sub>24</sub>			cc			mg			(Observed by viscosity) A <sub>1.5</sub> %			(Observed by reducing value) cc			(Separation of ganpi fibre)				
	48	72	hr	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72		48
Arabinose	3.6	3.6	3.6	5.7	5.6	6.2	8.8	6.4	5.3	7.2	2.5	6.7	5.5	5.5	0.07	+	+	+	39.5	57.7
Glucose	3.8	4.0	4.0	4.2	3.1	3.0	8.9	5.4	4.4	7.2	4.7	7.3	7.4	0.11	+	+	±	30.5	97.5	
Galactose	3.6	3.8	3.8	5.6	4.2	4.5	15.5	5.4	3.0	7.2	0.7	7.5	8.2	0.10	+	+	+	37.3	84.7	
Fructose	3.6	3.8	3.8	3.6	3.6	3.6	6.3	4.5	2.3	7.4	8.7	9.3	6.4	0.09	+	+	+	49.1	97.1	
Lactose	3.6	3.8	3.8	3.6	3.7	4.0	7.7	4.7	2.6	7.8	3.8	2.1	8.2	0.11	+	+	+	58.7	89.7	
Maltose	3.6	3.6	3.6	4.7	4.6	4.5	5.7	3.7	3.8	7.5	7.3	6.3	2.9	0	+	—	—	5.2	75.1	
Cane sugar	3.6	4.0	4.0	3.3	3.5	2.7	8.2	5.2	2.3	1.7	6.2	7.9	6.7	0.11	+	+	+	44.1	96.1	
Soluble starch	4.2	3.6	3.8	2.9	4.2	4.2	12.0	12.0	7.1	7.4	8.8	2.1	8.1	0.13	+	+	+	54.8	91.0	
Pectin	3.8	3.8	4.0	2.9	2.9	4.3	4.9	4.3	4.1	1.7	2.7	6.3	7.9	0.18	+	+	+	65.4	—	
Glucose + Pectin	3.6	3.8	4.2	6.2	2.6	2.7	11.5	2.5	1.8	7.4	0.7	6.8	7.6	0.14	+	+	+	58.1	96.2	
Galacturonic acid	5.6	5.2	2.3	0.3	0	2.2	6.9	5.5	5.1	1.7	0.4	—	—	0.17	+	+	+	47.3	99.0	

\* Time of incubation in hours.

Table2中のPPの生産を検討するとき、ペクチンに対して特に生産量大きく一応適応的と判断される。上記の PHAFF の観察の如き PG 及び PE の著しい適応性は PP については認められなかつたが galactose, lactose, galacturonic acid は生産が大きい傾向にあることは指摘出来た。次に可溶性澱粉にみる如く多糖類が良い影響を与えるようである。しかしこの実験区分に於ては細菌の繁殖が他の炭素源より優れているのでこの事実を併せて考えると早急に断定は出来ないが菌体数を考慮に入れても尚葡萄糖等よりは優れた生産を与えるものと考えられる。一方麦芽糖を炭素源にしたときの PP の生産は顕著に小さい値を示した。

次に液化型 PG については寧ろ構成酵素の傾向にあつた。糖化型 PG については galacturonic acid 及び pectin に対して適応的であつた。

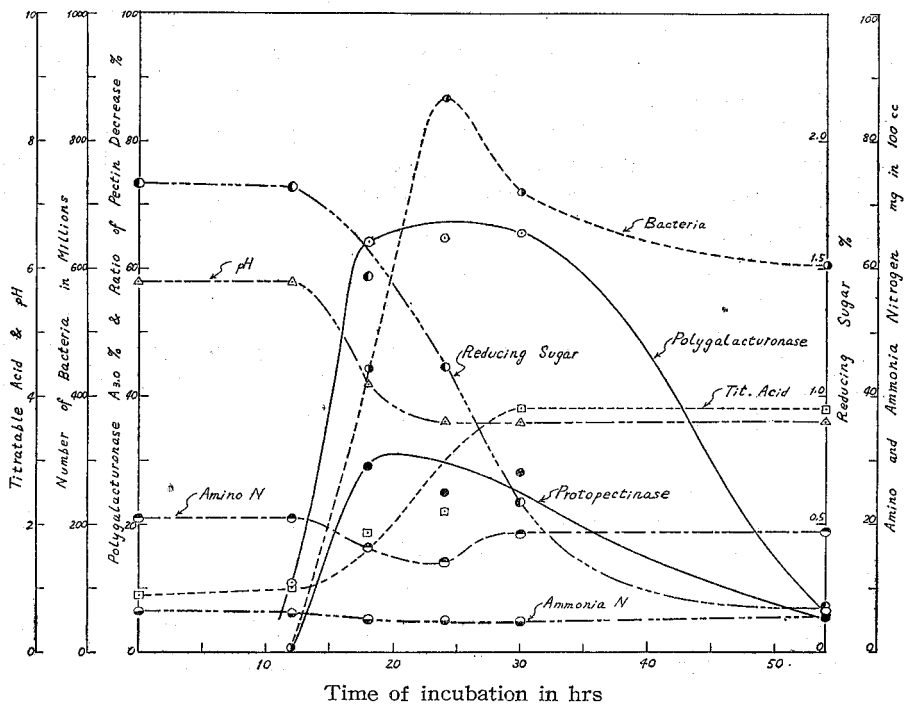


Fig. 1. Change of enzymic activity and composition of media during fermentation. (Carbon source is glucose)

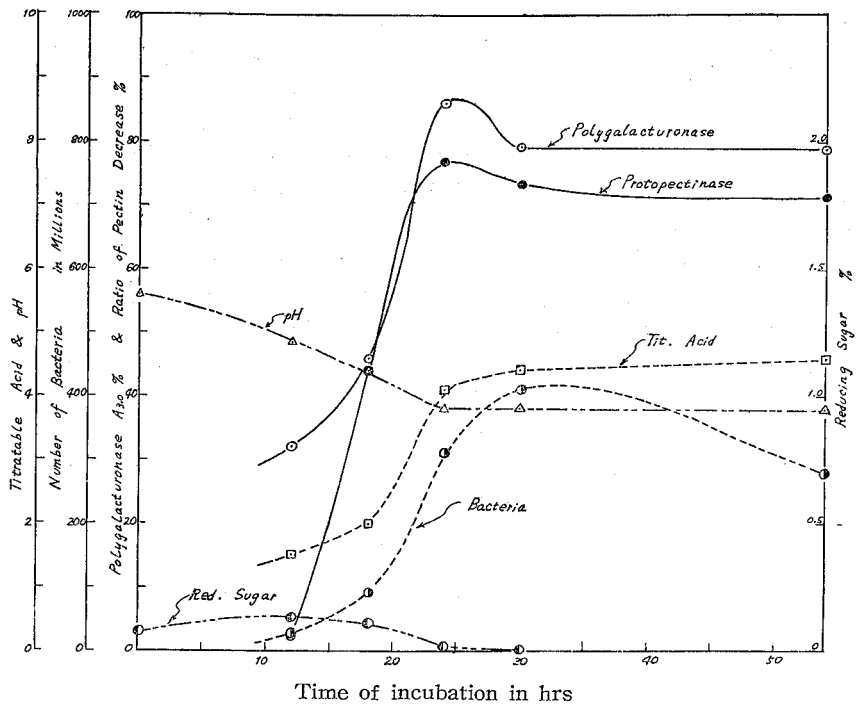


Fig. 2. Change of enzymic activity and composition of media during fermentation. (Carbon source is pectin)

V. 醱酵中の酵素生産量及び液内成分量の変化 葡萄糖又はペクチンを炭素源としたときの培養液中の各変化を追求した。その結果をFig. 1及びFig. 2に示す。葡萄糖の濃度は1.84%, ペクチンの濃度は0.68%であつた。

(a) 細菌の繁殖と平行してPG, PPは液内へ急激に溶出した。(b) PP, PG特にPPは葡萄糖の区分では最高作用力が小さく、時間の経過と共に両酵素共葡萄糖区分では急激な減退を示したが、ペクチンの区分では最高作用力が大であるのみならず長時間作用力を維持した。Fig. 2に示されていないが72時間後も両酵素共にその作用力は殆ど減少しなかつた。(c) PG, PPの作用力の曲線はほぼ平行している。(d) 葡萄糖の区分では参考のために液内の窒素の量を併せて追求した。アミノ態窒素が最小量を示すとき菌体数及び酵素の生産は最大量を示した。

## 要 旨

1. *Cl. felsineum* var. *sikokianum* の protopectinase (retting enzyme) 及び polygalacturonase の生産に適當なる窒素栄養源の量を決定した。即ちペプトン加水分解液を使用して炭素源2%のときの最適窒素量は全窒素として10Ccc中64.8mg (アミノ態窒素として21.4mg) であつた。

2. 10種類の炭素源について酵素の生産状況を検討した結果、protopectinase はペクチンに対して適応性を示したが液化型 polygalacturonase は寧ろ構成酵素の傾向を示した。

3. 葡萄糖又はペクチンを炭素源として醱酵中に变化する酵素の作用力及び液内諸成分量を追求した。

御懇篤なる御指導を賜つた京大片桐英郎教授に深謝し、御激励頂いた東大北原覚雄教授に感謝の意を表する。又 galacturonic acid の入手に御便宜頂いた川村信一郎教授及び Van Slyke の装置を快よく使用させて頂いた中潤三郎先生に感謝する。又実験費用の一部は文部省の昭和28年度科学研究助成補助金によつた。

(本報告の要旨は昭和29年11月13日開催の日本農芸化学会関西支部大会に於て講演発表済)

- |  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| (1) KERTESZ, Z. I. : <i>Ergeb. Enzymforsch.</i> , 5, 247 (1936). | (5) 梶, 斉藤 : 醱酵工学, 30, 242 (1952). |
| (2) PHAFF, H. J. : <i>Arch. Biochem.</i> , 13, 67 (1947).        | (6) 梶 : 農化, 27, 855 (1953).       |
| (3) 小沢, 武田 : 農学研究, 37, 159 (1947).                               | (7) 梶 : 同誌, 27, 699 (1953).       |
| (4) 朝井, 斉藤 : 農化, 26, 381, 389 (1952).                            | (8) 片桐 : 酵素化学シンポジウム, 6, 1 (1951). |
|  | (9) 梶 : 農化, 28, 695 (1954).       |

## Résumé

A study has been done on the production of depolymeric polygalacturonase and protopectinase by *Clostr. felsineum* var. *sikokianum*. The optimum nitrogen source was found to be hydrolysed peptone solution, and optimum concentration of nitrogen was 64.8 mg total N or 21.4 mg amino N per 10Ccc of cultural media. When ten kinds of sugars shown in Table 2 were employed as carbon source, it was found that protopectinase was an adaptive enzyme while depolymeric polygalacturonase was a constitutive enzyme. Changes of these enzymic activities and of the chemical composition of media were observed during fermentation and the results will be seen in Fig. 1 and 2.