

aride はフコース, 葡萄糖約450より構成される鎖状重合體なる事が分つた.

(昭和26年4月日本農藝化學大會にて発表)

文 献

- 1) EVENS. T. H and HIBBERT: Advance in Carbohydrate Chem 4 (1946). 2) GREENWOOD, C.T.: Advance in Carbohydrate chem. 7 (1952). 3) 三崎, 足立, 堀: 本誌, (未刊). 4) STAUDINGER, H: Die Hochmolekularen Organischen Verbindungen (1932). 5) GEOGHAN. M. J. and BRIAN: Biochem J., 45, 5 (1948). 6) BULL. H.B.: J. Biol Chem., 137, 143 (1941). 7) BULL, H.B. and CURRIE, B.R: J. Am. Chem. Soc. 68, 742 (1946). (昭和29, 5, 19受理)

リンゴ加工に関する研究 (第12報)

液内培養法による糸状菌ペクチン分解酵素の生産 (Ⅲ)

藤井義紹・芦澤 長・手嶋睦子・植村定治郎 (東北大學農學部)

緒 論

さきに主として葡萄糖-ペプトンを使用して液内培養法による糸状菌ペクチン分解酵素の生産条件を検索したが¹⁾。その際麩糠法で該酵素生産の強力菌株としてえらんだ *Asp. niger* No. 55が液内培養用菌株として不適當であるとした。併し實際製造に使用し得る麩及び玉蜀黍のような自然培養基を用いた場合にはこの菌株でも比較的に高位の酵素蓄積を液内培養法で示したので、その培養条件を検討した成績をここに報告する。

實 験 方 法

a. 供試菌株: *Asp. niger* No. 55

b. ペクチン分解酵素能の測定: 前報に準じ粘度低下法により酵素能を測定したが、但しその酵素力は下記のように粘度變化の百分率で示した。即ち2%ペクチン(犬印製)溶液5ml, pH3.5のクエン酸緩衝液(M/5)2mlを粘度計にとつて温度平衡に達せしめた後に酵素液1ml, 蒸溜水2ml(何れも測定温度と同温度のもの)を加えて40°Cで一定時間作用させ、そのまま粘度降下を測定したが、酵素力 At (作用時間 t 分) は次式で求めた²⁾。

$$At = \frac{V_0 - V_t}{V_0 - V_s} \times 100$$

V₀: Pectin soln. + inactivated enzyme

V_t: Pectin soln. + active enzyme

V_s: Distilled water

c. 培養液の分析: pHの測定はキンヒドロン電極法に、又糖分、N分の定量は夫々 BERTRAND 法, KJE LDAHL 法によつた。

d. 培養基: 玉蜀黍に麩を加えたものを主に用いた。麩以外に米糠, 蛹粕, 大豆粕等をも使用して試験したが、麩が最もよい成績を示したので主としてこれをN源的に取扱つて使用した。これに前報所載の無機鹽類を加えて基本培養基とし、ペクチン物質添加試験にはリンゴ粕を以つてこれに當てた。供試の玉蜀黍, 麩, リンゴ粕の主成分は次の如し。

Table 1. Sugar and nitrogen contents of the raw materials for the pectic enzyme production.

	Total sugars (%)	Total nitrogen (%)	Water
Corn	53.3	1.27	14.0
Wheat bran	32.1	2.51	12.7
Pomace	25.5	0.59	18.7

これらの原料の濃度は最高2.0%まで培養基に使用した。

e. 培養方法: 液内培養法としては振盪培養法によつた。500ml容培養瓶に培養液75mlをとり、振幅7cm, 廻轉數150rpmで振盪した。又通氣攪拌培養法を行つた場合は通氣管及び攪拌機を具備した1l容丸底三頸培養瓶か或はス

ティンレス製の三頸の蓋附の圓筒形ガラス瓶(約2l)容を使用した。前者の装置の通氣管は先端部に數箇の噴出

(346)

(藤井, 芦澤, 手嶋, 楯村) リンゴ加工に関する研究 (第12報)

孔のある弧状管であるために空気の噴出状況は一様でなく、又攪拌器の翼も双状でないので攪拌効果も餘り良好でなかつた。後者の装置ではこれらの部分を改良してガラス濾板を先端部に附した噴出管或は二段の双状の翼をそなえた攪拌器を用いたがその成績は良好であつた。培養は何れも30°Cで行い、振盪培養の場合は7~9日間、通氣攪拌培養の場合は3~4日間培養した。

実験成績

1. NaNO₃ 或は CaCO₃ の添加の影響

培養基として玉蜀黍2%, 麩1%, リンゴ粕1.5%を混じたものを使用して供試菌株を振盪培養すると、その始発pHを6.0に調節しても2~3日後にはpH2.0近くまで下降する。この急激なpH低下を防げばアミラーゼ生産の場合³⁾のように酵素蓄積を増大し得るとも考えられるので、NaNO₃を0.05%, 0.15%或はCaCO₃を0.5%に添加してその影響を試験した。この際の酵素力の測定値はA₂₀(作用時間20分間)である。その成績は第1圖に掲げたが、これよりみられるようにNaNO₃は培養の初期の急激なpH低下を殆ど防ぎ得ず、且べ

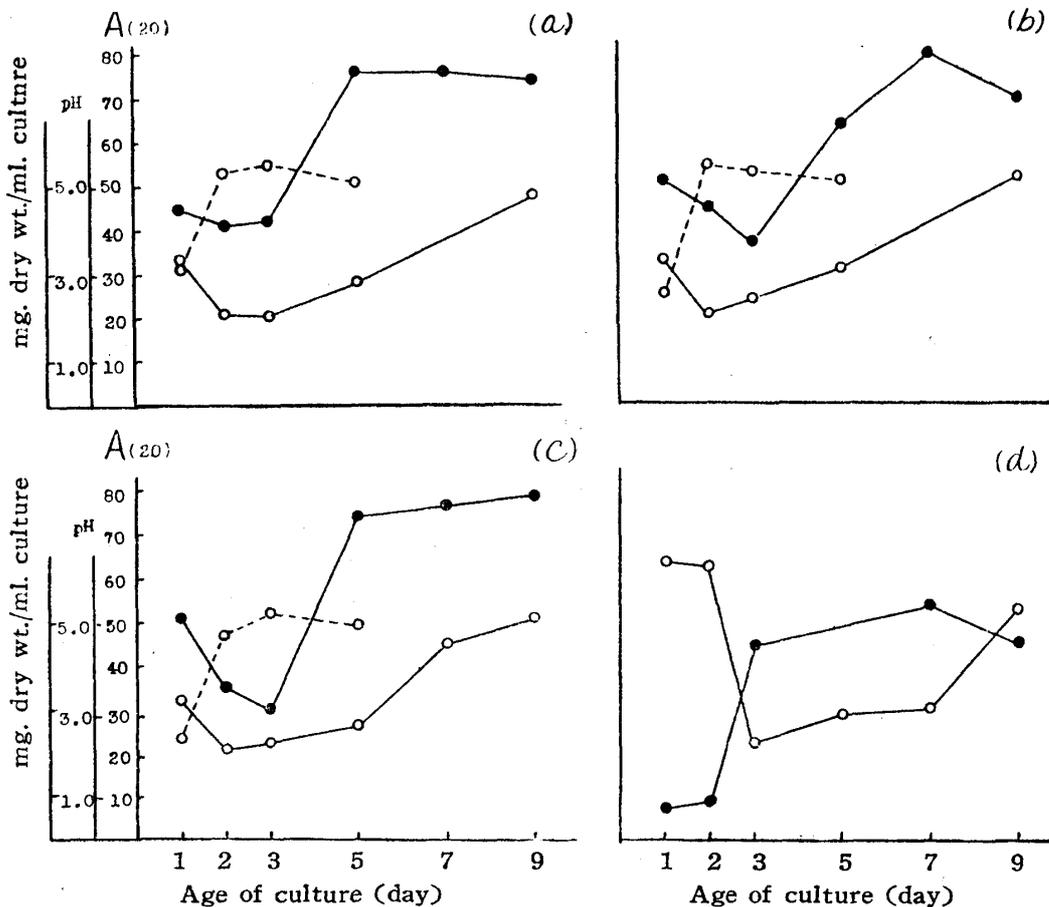


Fig.1. Effect of "NaNO₃ and CaCO₃" on the pectic enzyme production by *Asp. niger* No.55. Mould was grown in (a) basal medium, (b) basal medium, + 0.15% NaNO₃, (c) 0.05% NaNO₃, and (d) 0.5% CaCO₃. ●—●; pectic enzyme activity (A₂₀), O—O; pH, O.....O; growth of cells in mg. dry wt./ml. culture.

クチン分解酵素の蓄積にも殆ど著しい影響を與えなかつた。これらの経過からNaNO₃は供試菌株によつて極めて僅かにしか攝取されなかつたと推定される。CaCO₃添加の場合もこの初期のpH低下を單に遅らせるような効果しかみられず、しかも初期の高いpHが維持されている間は他の場合に認められる酵素蓄積が殆どなく、又後期の蓄積期にもその酵素力は低い値であつた。この故に供試の *niger* 株にあつては初期に比較的低いpH環境にあることがむしろ後期の酵素蓄積にとって重要な意義を有すると認められる。

2. 培養基組成のCN比の影響

培養基として使用する玉蜀黍及び麩の混合割合をかえてそのCN比〔糖量(%) / N量(%)の値〕と酵素生産との関係を検索した。第2圖及び第3圖はその成績を示すものであるが、CN比が減少するほど酵素蓄積は高位となり、培養時の最低pH値もやや高く、ペクチン分解酵素蓄積の最適pHと認められるpH3.0⁴⁾附近を經過し

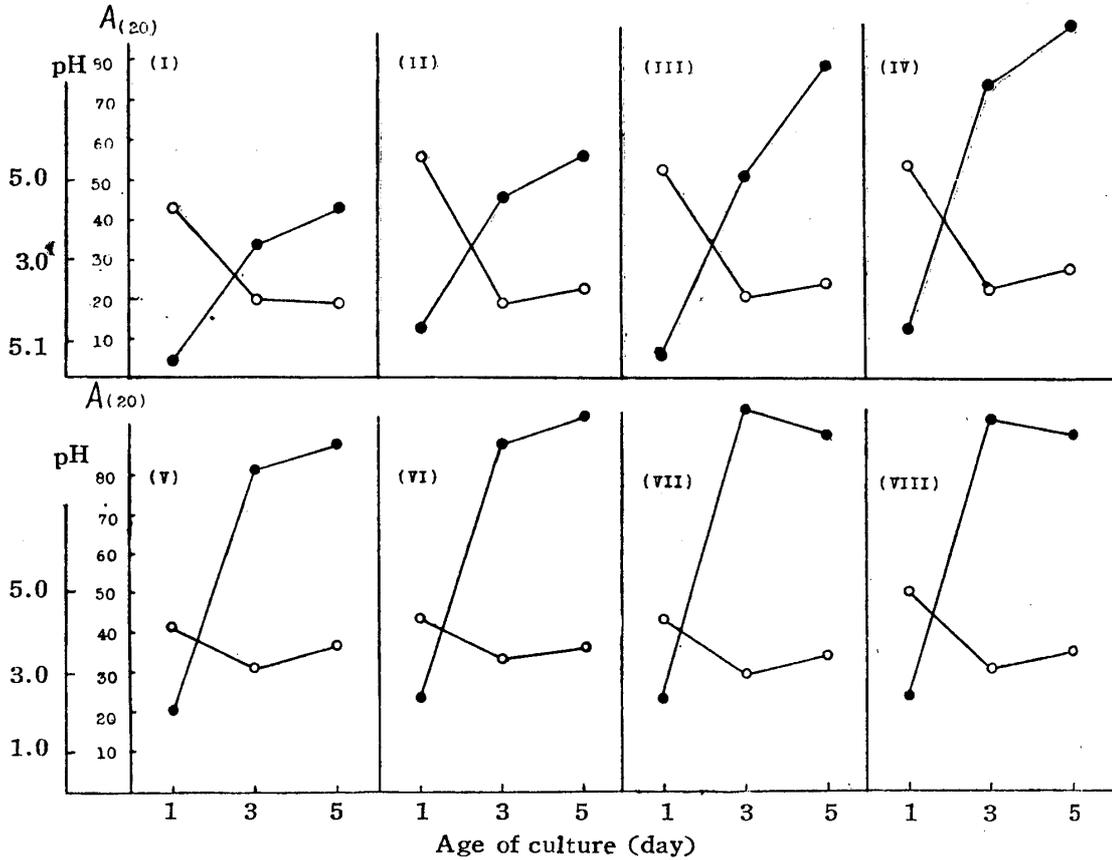


Fig.2. Effect of "CN ratio of the components of the mediums" on the pectic enzyme production by *Asp. niger* No.55. Corn-flour was presumed as a carbon source and wheat-bran as a nitrogen source. ●—● ; pectic enzyme activity (A_{20}), ○—○ ; pH. CN ratio: (I)=42.1, (II)=32.1, (III)=27.6, (IV)=22.7. (V)=18.6, (VI)=16.0, (VII)=14.2, (VIII)=12.8.

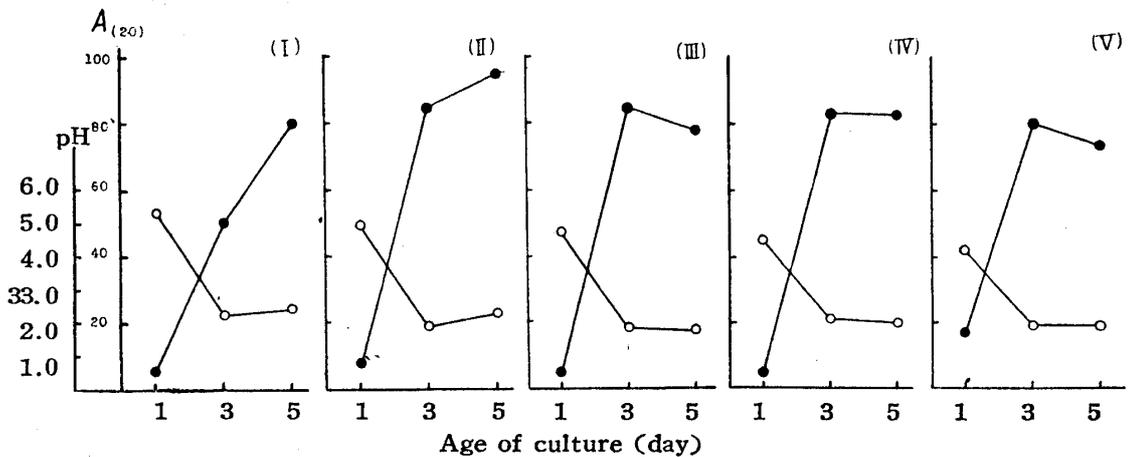


Fig.3. Effect of an apple-pomace on the pectic enzyme production by *Asp. niger* No.55. Corn-wheat-bran mixture (CN ratio=27.6) was used as a basal medium. ●—● ; pectic enzyme activity (A_{20}), ○—○ ; pH. Pomace added; (I)=0, (II)=0.2%, (III)=6.5%, (IV)=1.0%, (V)=2.0%, CN ratio; (I)=27.6 (II)=27.9, (III)=28.7, (IV)=29.6, (V)=30.5,

た。反之初期の pH 経過は逆に低い傾向にあることが注目される。即ち培養基中の攝取され易い N 源の量を増大させるときは N 代謝が旺盛となるとともに糖代謝も旺盛になり、しかも酵素蓄積期にはその最適 pH 以下の低い値となることを防ぐ効果があると認められる。換言すれば前報でも指摘したように本酵素の蓄積を増大させるためには菌の生長時に糖代謝とともに N 代謝も旺盛であるべきことが必要である。

3. リンゴ粕添加の影響

ペクチン分解酵素の蓄積が適應的性格のあることは屢々観察されているし¹⁰⁾、前報でもこれを認めたので、供試の培養基についてもペクチン添加の影響を検討した。ペクチン物質としてリンゴ粕を使用し、これを玉蜀黍 2%、麩 1% の培養基に夫々 0.2%、0.5%、1%、2% の割合に加えて試験した。その成績は第 4 圖に掲げるよ

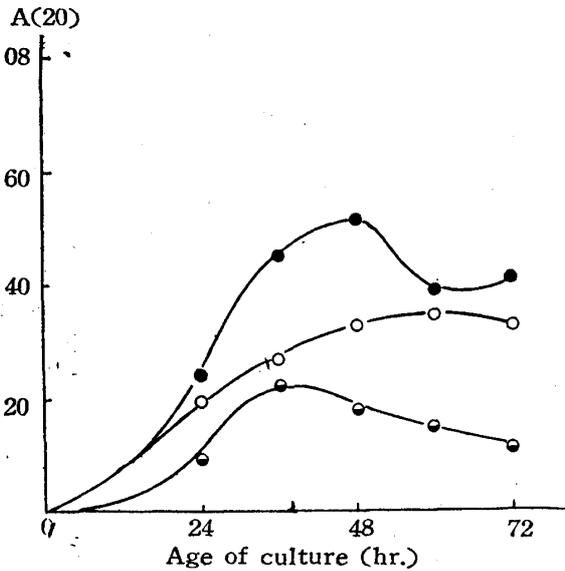


Fig. 4. Pectic enzyme production by *Asp. niger* No. 55 when cultured in a three-necked culture flask (1 litre) equipped with a agitator. Grown in basal medium (2% corn-flour and 1% wheat bran medium), ○—○ grown in basal medium + 0.2% pomace, ●—● grown in basal medium + 0.2% pomace and 0.02% FeSO₄.

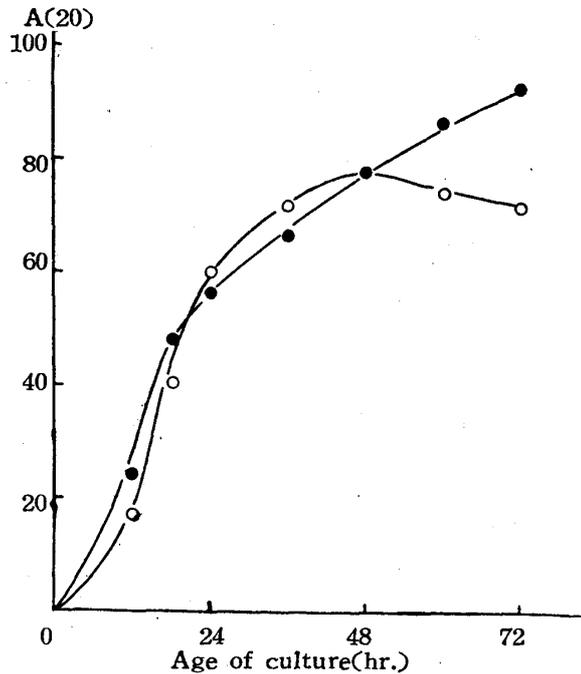


Fig. 5. Pectic enzyme production by *Asp. niger* No. 55 when cultured in a glass jar (2 litre) equipped with a stainless steel lid and a agitator. Mould was grown in a medium composed of 2% corn, 1% wheat-bran, and 0.5% pomace.

ろにペクチン物質が 0.2% の低濃度の場合には比較的の高い CN 比であるに拘らず高位の酵素蓄積を示すが、これよりペクチン物質の添加量が増すに従つて酵素蓄積は漸次低下して無添加の対照に接近し、最大の添加量である 2% の場合には対照よりも緩慢でやや低位の酵素蓄積を示した。本試験ではペクチン物質としてリンゴ粕を使用したのでペクチンそのものよりも添加による CN 比への影響は比較的の少ないと思われるが、併しリンゴ粕中に含まれる酸類その他の影響も考えられるから、ここに得た成績から直ちにペクチン添加の影響を明確に云々し得な

Table 2. Effect of the preservation period upon the pectic enzyme activity

Enzyme activity Medium	Culti- vation period (Day)	Pectic enzyme activity (A ₂₀)		
		Before pre- servation	Preserved for 5 days at room temperature	Preserved for 14 days in ice box
A { Corn 2% Wheat bran 1% Apple-pomace 0.2%	3	86.5	85.5	-
B { Corn 0.5% Wheat bran 2%	5	93.7	-	93.7

い、併しリンゴ粕をペクチン物質として0.2%に添加した場合の促進的效果は無添加の対照とCN比に大差のないことからペクチンそのものに歸し得るようである。

4. 酵素液の保存試験

玉蜀黍, 麩, リンゴ粕よりなる培養基を使用して振盪培養後, 菌體を濾別して得られる培養液を酵素液とし, これを室温或は氷室に放置して酵素能の變化を試験したが, その成績は第2表に掲げる。

上表より明らかなように培養液の組成の量比を問わず, 得られる酵素液は極めて安定であることが認められた。尙酵素液(A)をリンゴ搾汁100mlに對して5%に加え, 40°Cで90分間作用させた結果, その濾液は完全な清澄果汁であつた。

5. 通氣攪拌培養法によるペクチン分解酵素の生産

玉蜀黍, 麩及びリンゴ粕を使用して振盪培養を行えば供試くろかび菌株も比較的強力な酵素蓄積を行うことを認めたので, 實際製造のことをも考えて通氣攪拌培養法による酵素生産試験を行つた。既述の兩培養装置に於ける成績は第5, 6圖に掲げたが, 通氣並びに攪拌に就て改良した装置では豫期以上の良好な成績が得られた。即ち玉蜀黍2%, 麩1%, リンゴ粕0.5%の組成に於ける酵素蓄積量は振盪培養以上に優れたものであり, 振盪培養に於けると同様にリンゴ搾汁に對して5%添加により40°C, 90分間でこれを完全に清澄させ得た。又リンゴ粕を培養基の組成に加えたものは何れも良好且安定な酵素蓄積を示したから, この種の培養法でもリンゴ粕を添加することは明らかに望ましい。尙FeSO₄を少量加えた場合には一時的な促進的效果がみられたが, これらの培養基の微量組成や更にまた通氣量等については今後の検討を豫定している。

考 察

供試の黒かび菌株はさきに葡萄糖-ペプトン培養基ではペクチン分解酵素の液内生産用として十分に適當でないことを認めたが, 本報に於けるように玉蜀黍と麩からなる培養基を使用した場合には液内培養法でもかなり強力に酵素生産を示し, 實際に液體醗式に使用し得ることを認めた。即ち供試のように菌株を液内培養してその培養液を酵素液として清澄劑の代りに使用すれば透明な果汁が得られるわけであつて少量ながらも同時に増量的効果をも期待し得ることとなる。使用する培養基によるこのような酵素蓄積量の顯著な差異は明らかに培養基の組成の差異に基くものであるが, 極めて興味深い。

又供試の自然培養基を使用しても既に述べたように培養基のpHの急激な低下がみられたが, この成績を, 培養基組成のCN試験の結果或は一般に認められているように本酵素蓄積の最適pHが3.0附近にあることをあわせ考えるときは, むしろ菌の生育の初期から比較的低いpH環境を經過してこの間に旺盛な糖並びにN代謝を行わしめる方が好適ではないかと推定される。供試の黒かび菌株の如く酸生産能が強く且酸性條件でも比較的旺盛にN代謝を行い得るものは上述の目的に相應するものであろう。尙本報で行つた通氣攪拌培養試験の成績からみると, この場合の通氣量と攪拌数との関係はアミラーゼ生産の場合に近く, 即ち本酵素の蓄積期にもかなり嫌氣的條件を與えてもよいようである。併しアミラーゼの場合⁶⁾のように通氣攪拌を菌の生育の平衡期に停止しては, 本酵素蓄積をたかめることはできなかった。

何れにしても實際に使用すべき培養基としては麩1~2%, 玉蜀黍1%, リンゴ粕0.2~0.5%に混合したものが, 酵素蓄積或は果汁の香味等の面から最も良好と認められた。單に酵素蓄積の點では麩の使用量の多いほど良好であるが, それに相應して果汁の香味を害するようになる。麩以外の若干の含窒素物について試験した成績では大豆粕及び蠶蛹粕が麩に劣らぬ酵素蓄積を示したが, 果汁の香味を害し, 米糠は酵素蓄積の面で良好でなかつた。

總 括

さきにペクチン分解酵素生産の強力菌株としてえらんだ *Asp. niger* No.55 を用い, 自然培養基(玉蜀黍, 麩, リンゴ粕)に於ける該酵素生産の液内培養條件について検索した。これらの培養基へのNaNO₃添加は酵素生産にも培養のpH經過にも特別の影響を與えず, CaCO₃の添加はむしろ阻害的であつた。次で供試培養基に使用する玉蜀黍及び麩の量比をCN比の見地から検討し, CN=16以下の割合では比較的に高位の酵素の蓄積を與え, 又少量のペクチン物質(リンゴ粕)の添加は適應的により高位の蓄積をみたが, 多量のリンゴ粕を與えると逆に酵素の蓄積を阻害した。ここに得られた酵素液は何れも室温又は氷室温度によく耐え, 極めて安定である。

(350) (寺本, 石川, 嶋谷) イオン交換樹脂による酒精不純物除去に関する研究

尙通氣攪拌培養による酵素の生産条件を検索したが, これらの液内培養法によつて得られる酵素液を5%に加えて清澄果汁をつくることができた。

終りに本研究は青森縣の委託のもとに行われ, その研究費の一部を考慮して戴いた同縣當局に謝意を表す。尙本報は昭和28年7月日本農藝化學會東北支部第4回大會で講演した。

文 献

- 1) 藤井その他: 醸酵工學, 30, 468 (1952). 2) ROBOZ, E, BARRATT, R.W. & TATUM, E.J.: J. Biol. Chem. 195, 459, (1952). 3) 土井その他: 醸酵工學, 29, 63 (1951). 4) 朝井, 齋藤: 日農化, 25, 307 (1952). 5) 朝井, 齋藤: 同上, 26, 382 (1952). 6) 池見: 發酵協會, 11, 41 (1953).

(昭和29, 6, 14 受理)

イオン交換樹脂による酒精不純物除去に関する研究

寺本四郎・石川正人・嶋谷幸雄 (大阪大學工學部醸酵工學教室)

緒 論

酒精製造特に飲料用酒精製造に於ては微量の不純物の存在がその品質を著しく低下せしめる。之等不純物中低沸點物質たるアセトアルデヒド, アセトン, メチルアルコール, 醋酸エチルエステル等¹⁾の除去に關しては現在主として蒸溜操作による分溜分縮等の處理が行われて居り, C₆H₆-ベンゼンとの共沸混合物として除去せんとする BAKOWSKI 等の研究²⁾もある。

之等機械的並びに物理的方法に對する化學的方法としては, 一般にカメレオン・活性炭處理法が行われて居り PLÜCKER³⁾は6~7%の苛性カリとの8~10時間煮沸を, DUNLAP⁴⁾, LENZ⁵⁾, ROBERTS⁶⁾は酸化銀の使用を, CHACE⁷⁾, GEORGESCU⁸⁾は *m*-Phenylendiamine・HCl, Semicarbazide・HCl 等の使用を提案し, ENGLIS¹¹⁾等は酸性亜硫酸ソーダとの附加物として, LLANELLY¹¹⁾は亜鹽素酸鹽で處理して不落性のクロ、化合物としてアルデヒドを除去して居る。寺本¹²⁾は之等の比較を行い, 酸化銀處理法及び活性炭, 骨炭處理後減壓で蒸溜する事を推奨して居る。此の他に還元法としては苛性カリと金屬アルミニウムを加える STOUT¹³⁾, 硫酸, 亜鉛, ニッケル粉末を加える ATWOOD¹⁴⁾, RANEY-ニッケルで水添後アルカリを加えて蒸溜する MELLE法¹⁵⁾等があり, 更に酸素又はオゾンと活性炭の使用^{16, 17)}, アニリンの使用¹⁸⁾等も考えられて居る。しかし之等化學的方法に於てはアルデヒドとの反應生産物除去の操作を必要とし, それが不充分である時には却つて品質低下の恐れがある。

SAMUELSON は有機酸, アルデヒド, ケトンの分離に關する一連の研究^{19)~24)}を行い, 陰イオン交換樹脂 Amberlite IRA-400のHCO₃⁻型により有機酸を, HSO₃⁻型でアルデヒド及びケトン除去し, 且夫々を炭酸ソーダ, 食鹽水, 熱水で elute して居る。伊藤等²⁵⁾は酒精中のアルデヒド, フーゼル油, チアセチル除去の爲カメレオン等の酸化劑で處理した後ダイヤイオン交換樹脂により酸化生成物の除去を研究して居るが樹脂がアルコールに溶解する事及び不純物除去に就ても特に優れた結果を示さぬ事より活性炭の代替としての使用に難點があると述べて居る。此の他にイオン交換樹脂の醸酵工業への應用としては酒質の矯正に利用せんとする伊藤²⁶⁾, 麻生²⁷⁾, GUNTZ²⁸⁾, GAUSE²⁹⁾の研究もある。

本研究は HSO₃⁻型の陰イオン交換樹脂を用いて酒精中のアルデヒドを除去する場合の条件について検討せんとするもので, アルデヒド濃度, 酒精濃度, 通過速度等による影響並びに樹脂筒通過前後の品質の變化等について實驗を行つた。

實 験 の 部

實 験 試 料

強鹽基性陰イオン交換樹脂; ROHM & HASS Co. 製 Amberlite IRA-400及び Amberlite IRA-410を使用した。

エチルアルコール; 酒精含量97 Vol %, メチルアルコール, フーゼル油共に不検出, アセトアルデヒド 0.065