

〔醸酵工学 第55号 第2号 80-83, 1977〕

培地のシュクロース濃度のプルラン分子量への影響*

三浦 芳助・有馬 裕史・上田誠之助

九州大学農学部食糧化学工学科

Effect of sucrose concentration on molecular weight of pullulan formed.* MIURA, Y., H. ARIMA, and S. UEDA (Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka) Hakkokogaku 55: 80-83, 1977.

Pullulan fermentation by *Aureobasidium pullulans* was investigated to clarify the effect of sucrose concentration on the molecular weight of the pullulan formed.

In the culture media containing 2.5, 5 and 10% sucrose, the molecular weight of the pullulan formed had a maximum value of 5×10^5 after 48 hr-cultivation. On further incubation, the molecular weight decreased gradually and reached 2×10^5 after 144 hr. In the case of 15% sucrose, the molecular weight of the pullulan had a constant value of 5.5×10^5 during the fermentation. The enzyme which caused the decrease in the molecular weight of the pullulan formed seemed to be inhibited at pH values between 2.3 and 2.5.

プルラン培養液の流動特性値は培養経過時間によって大きく変動する。その変動は主として菌体量およびその形態の変化に依存し、プルラン生成量との関連は少ないと考えられたが、その際、培養過程における生成プルランの分子量の変化についてさらに検討する必要があることが示唆された。¹⁾ 分子量に関する知見は、プルラン培養液のレオロジー的性質を理解する上に重要であると同時に、合理的なプルラン生産に対しても有用であると考えられる。²⁾

本報では、炭素源として sucrose を2.5~15%含む培地を使用してプルラン生産培養を行い、生成プルランの分子量を決定するとともに、培養液の流動特性を調べ、それらを比較検討した。また、培地中の sucrose 濃度のプルラン分子量への影響について考察した。

実験方法

使用菌株および培養方法 使用菌株は、プルラン生産菌、*Aureobasidium pullulans* S-1³⁾ である。培地は既報³⁾ のものを用い、炭素源として前培養には glucose を5%, 本培養には sucrose を2.5, 5, 10, 15%含むものを使用した。培養は500ml 容坂口フラスコを使

用し、既報の方法¹⁾ にしたがった。

粗プルラン量、菌体量の定量 上田の方法³⁾ に準じた。

粘度の測定 培養液の粘度の測定は、前報¹⁾ と同様に、円錐板型回転粘度計を使用した。

培地中の sucrose の定量 培養液から菌体、ならびに粗プルランを除去した分析試料を、0.01N HCl を用いて沸とう水浴中で15分間加水分解を行い残存している sucrose を還元糖にかえた後、これをマイクロベルトラン法にて glucose として定量し sucrose 量とした。

分子量の測定 分子量はオストワルド粘度計を用い、既報の方法^{4,5)} にしたがって決定した。測定に供したプルランは、粗プルランを田口らの方法⁵⁾ にしたがって精製したものである。

実験結果および考察

培養経過

1. プルラン生成量 Fig. 1 は初発炭素源濃度の粗プルラン生成量および残糖量に対する影響を示したものである。最大粗プルラン量は、培地中の初発 sucrose 濃度を2.5~10%と増すにつれて増加しているが、15%の場合には10%の場合より少なくなった。この結果、

* プルラン培養液の流動特性に関する研究 (第3報) Rheological Properties of Pullulan Broths (III)

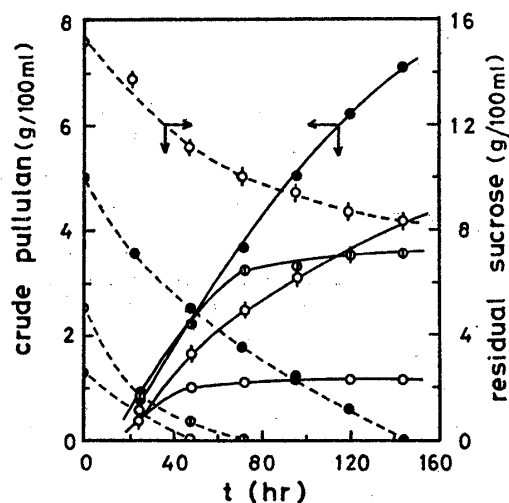


Fig. 1. Effect of initial concentrations of sucrose on pullulan formation and residual sugar. Cultivation was carried out at 26°C with shaking on a reciprocal shaker. The initial pH of the media was adjusted to 6.0.¹⁾ sucrose concentration: ○ 2.5%, ⊙ 5%, ● 10%, ○ 15%. —: crude pullulan,: residual sugar.

プルラン生産に対しては sucrose 濃度 (5~10%) が適当と考えられ, この範囲における対糖収率は約70%であった. 培養液中の sucrose は, 2.5, 5, 10%の場合培養期間中にすべて資化されたが, 15%の場合その約55%が未資化のまま培地中に残った.

粗プルラン中の精製プルランの割合⁵⁾は, 培養初期においては70~80%と変わらなかったが, 培養中期から後期にかけては炭素源濃度の影響がみられ, sucrose 濃度2.5, 15%の場合約90%, sucrose 濃度5, 10%の場合約95%であった.

2. 菌体量 菌体量は sucrose 濃度2.5%の場合, 最大 0.76 g/100 ml-broth であったが, 5, 10, 15%の場合には 1.1 g/100 ml-broth 前後で, この範囲内での初発 sucrose 濃度の影響はみられなかった.

3. 流動特性 培養液は, すでに報告したように,¹⁾ 指数法則 (power law) にしたがう非ニュートン流体特性を示した. Fig. 2 に流動特性の一つとして, せん断速度 $D=500 \text{ sec}^{-1}$ における見かけ粘度 μ_a の変化を示した. 培養液の見かけ粘度は, 初発 sucrose 濃度2.5, 5, 10%の場合, プルラン量は減少していないにもかかわらず (Fig. 1), 培養中期ないしは後期において低下をはじめた.¹⁾ 一方, sucrose 濃度15%の場合 μ_a は上昇を続けた. これは後述するように生成プルランの分子量との関連で説明できる.

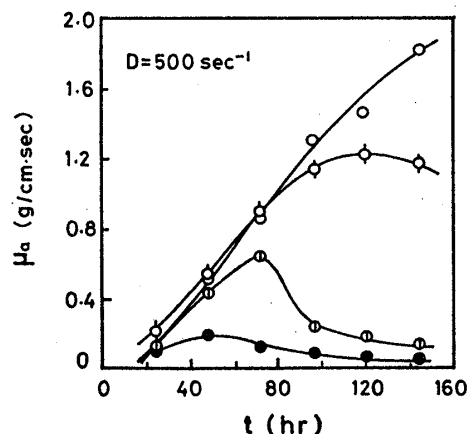


Fig. 2. Changes in apparent viscosity of the broth during the pullulan fermentation. sucrose concentration: ● 2.5%, ⊙ 5%, ○ 10%, ○ 15%.

4. pH 培養経過時間ともなう培養液の pH の変化を Table 1 に示した. この表より明らかなように, 培養液の pH は培養開始後24時間以内に急激に低下した. 特に初発 sucrose 濃度15%の場合には2.5まで低下し, 以後 pH 2.4~2.5 であった.

分子量の検討 オストワルド粘度計を用いて, 得られたプルランの分子量の測定を行った. その一例として初発 sucrose 濃度10%で培養を行い, 培養時間144時間の培養液から得られたプルランについて Table 2, ならびに Fig. 3 に示した. 各濃度のプルラン水溶液の密度は, 25.0°C において 1.0 g/cm^3 であった. また, 還元粘度 η_{sp}/c の濃度 0 に外挿した値, すなわち固有粘度 $[\eta]$ は 98 ml/g であった. ここで Wallenfels ら⁴⁾ によるプルラン分子量と固有粘度との関係を適用すると, この場合の分子量は 2.01×10^5 と計算された.

このようにして推定したプルラン分子量の変化を

Table 1. Effect of sucrose concentration on pH of the broth.

Time (hr)	Sucrose concentration (%)			
	2.5	5	10	15
0	6.0	6.0	6.0	6.0
24	3.0	3.0	3.0	2.5
48	2.9	3.2	3.1	2.4
72	3.1	2.8	3.1	2.5
96	3.6	2.9	2.9	2.4
120	4.0	3.0	3.0	2.4
144	4.5	3.0	3.0	2.5

Table 2. Relation between reduced viscosity and concentration of pullulan.^{a)}

Pullulan concentration (g/ml)	Time (sec)	η_r	η_{sp}	η_{sp}/c^b
0.80×10^{-2}	291.0	2.458	1.458	182.3
0.56	225.9	1.908	0.908	162.1
0.40	188.1	1.589	0.589	147.3
0.24	153.3	1.295	0.295	122.9
0.16	140.6	1.188	0.188	117.5
0.08	128.7	1.087	0.087	108.8
0	118.4			

Measurement was carried out at 25.0°C.

^{a)} sample: pullulan solution (sucrose 10%, 144 hr).^{b)} c (g/ml).

Fig. 4 に示した。初発 sucrose 濃度 2.5, 5, 10% の場合、分子量は培養時間 48 時間付近で最大約 5×10^5 に達し、その後徐々に減少して、144 時間付近においては約 2×10^5 であった。一方 sucrose 濃度 15% の場合、培養時間 72 時間で分子量は約 5.5×10^5 に達し、それ以後大きな変動はみられなかった。

初発 sucrose 濃度 2.5~10% の場合には、培養液の流動特性値の変化はプルラン生成量よりも、菌体の量およびその形態に依存しており、また生成プルランの分子量も影響を与える因子の一つであろうと考えていた²⁾ が、上述したように、培養期間中に分子量が低下していることが明らかとなった。

培養期間中にプルラン分子量が低下することに関しては、田口ら⁵⁾ および Catley ら^{6,7)} の報告がある。Catley らはプルラン培養中に菌体外ないしは表面に endoamylase が生産され、これがプルラン分子内の

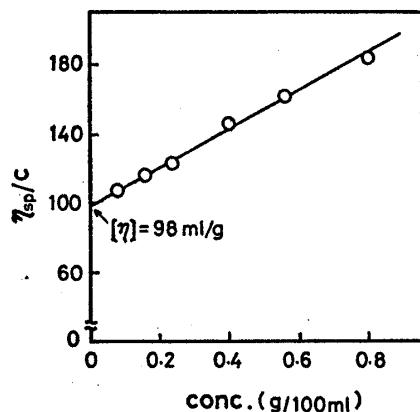
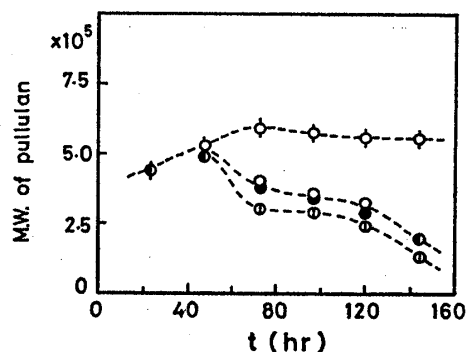
Fig. 3. Variation of η_{sp}/c with pullulan concentration.

Fig. 4. Effect of sucrose concentration on molecular weight of pullulan.

sucrose concentration: ○ 2.5%, ● 5%, ○ 10%, ⊙ 15%.

maltotetraose⁸⁾ の部分に作用して分子量を減少させるのであろうと報告した。^{9,7)} 一方、山田は *Aureobasidium pullulans* (*Pullularia pullulans*) が耐酸性 amylase を生産することを見出し、その性質について検討を行った。^{9,10)}

本研究においては、初発 sucrose 濃度 15% で培養を行った場合には分子量の低下がみられなかったが、この場合、培養液の pH が sucrose 濃度 2.5~10% のものと比較して 2.4~2.5 とより低下していることが特徴であった。初発 pH を 2.5~3 と酸性側にするとプルランはほとんど生産されない¹¹⁾ が、培養液の pH と分子量との関連について検討を行うために、培地の初発 pH を 5~8 に調整し、sucrose 濃度はすべて 10% としてプルラン培養を行った。

Fig. 5 に初発 pH の粗プルラン量への影響を示した。プルラン生産量に対しては初発 pH 6 が最適であり、pH 5 の場合の約 2 倍であった。培養液の pH は初発 pH 5 の場合最も低下し培養期間中 2.3~2.4 となり、

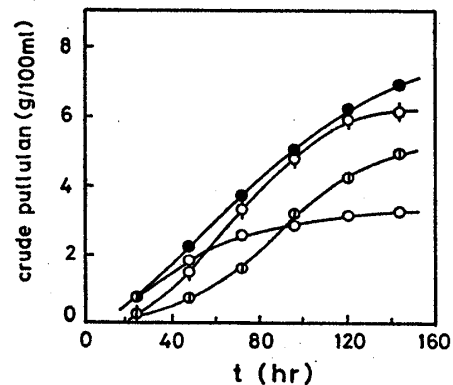


Fig. 5. Effect of initial pH on pullulan formation.

initial pH: ○ 5.0, ● 6.0, ⊙ 7.0, ⊕ 8.0.

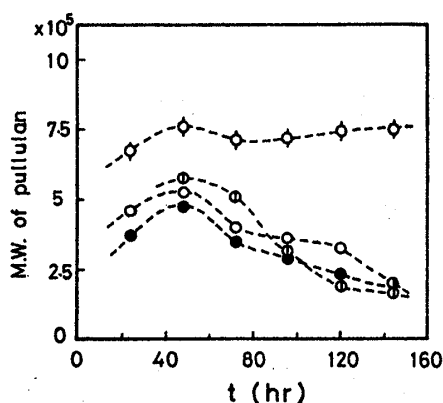


Fig. 6. Effect of initial pH on molecular weight of pullulan.
initial pH: ○ 5.0, ○ 6.0, ● 7.0, ○ 8.0.

sucrose の約 35% は資化されずに培地中に残った。初発 pH 7, 8 では、pH は徐々に低下し培養時間 48 時間以降 4 付近であった。この場合の生成プルランの分子量の変化を Fig. 6 に示した。初発 pH 6, 7, 8 の場合、分子量は培養時間 48 時間付近が最大となりその後徐々に減少した。一方、初発 pH 5 の場合、分子量は 7.5×10^5 前後で培養期間中はほぼ一定であった。

以上の結果より、プルラン生成と並行した分解酵素の生成が示唆されるとともに、この分解酵素は、2.3~2.5 と低 pH 範囲においてはその活性が抑制され、^{9,10)} このため初発 sucrose 濃度 15%, ならびに初発 pH 5 の場合、分子量の低下がみられないものであろうと推察された。

なお、分子量低下に関する酵素については、さらに検討が必要であると考えられる。

要 約

1. プルラン分子量は、初発 sucrose 濃度 2.5, 5,

10% の場合、培養時間 48 時間付近で最大約 5×10^5 に達し、その後徐々に減少して 144 時間付近においては約 2×10^5 であった。sucrose 濃度 15% の場合 72 時間付近で分子量は約 5.5×10^5 に達し、それ以後ほぼ一定であった。

2. プルラン分子量の低下に関与する分解酵素は、培養液の pH が 2.3~2.5 と低い場合、その活性が抑制されるものであろうと推察された。

3. 生成プルランの分子量は、培養液の流動特性の変化に影響を与える因子の一つであらうと考えられた。

本研究の一部は、第 13 回化学関連支部合同九州大会（昭和 51 年、福岡）において発表した。

文 献

- 1) 三浦, 福島, 三分一, 上田: 醸工, **54**, 166 (1976).
- 2) 三浦, 石井, 川路, 三分一, 上田: 醸工, **54**, 667 (1976).
- 3) 上田: 工化, **67**, 757 (1964).
- 4) Wallenfels, K., Keilich, G., Bechtler, G., Freudenberger, D.: *Biochem. Z.*, **341**, 433 (1965).
- 5) Taguchi, R., Kikuchi, Y., Sakano, Y., Kobayashi, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 1583 (1973).
- 6) Catley, B. J.: *FEBS Letter.*, **10**, 190 (1970).
- 7) Catley, B. J., Whelan, W. J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**, 138 (1971).
- 8) Catley, B. J., Robyt, J. F., Whelan, W. J.: *Biochem. J.*, **100**, 5 (1966).
- 9) 山田: 農化, **37**, 706 (1963).
- 10) 山田: 農化, **37**, 712 (1963).
- 11) 小埜, 安田, 上田: 日農化西日本支部大会講演要旨集, p. 12 (1974).

(昭 51. 9. 30 受付)