

報 文

ペーパークロマトグラフィによる
タンニン分解酵素生産条件の解析 (その1)

黴類のタンニン分解酵素に関する研究 (第5報)

西 羅 寛 (兵庫農科大学農芸化学醸造学教室)

緒 言

本邦における所謂タンナーゼの研究については、喜多氏¹⁾の麹菌とタンニン分解、小田・池田・谷本氏等²⁾の強力なタンナーゼを生成する麹かび属糸状菌の検索並びに検索菌種の代用醤油製造への応用、福本氏³⁾の高梁糠の利用研究における青かびによる脱タンニン、中林氏⁴⁾のおおみどろタンニンの研究における糸状菌タンナーゼによるタンニン酸よりアルキルガレート生成等の報告が見られるのみで、タンニンそのものの研究手段としてのタンナーゼ酵素力の利用は別として、特にタンナーゼの酵素学的見地からの研究報告は数少ない。

著者は林産物利用加工の基礎的研究として黴類の生産するタンニン分解酵素の研究をとりあげ、酵素力測定法^{5)~7)}、菌株の分離選抜および該酵素の生産条件^{3), 8)~10)}、ペーパークロマトグラフィによるタンニンの酵素的分解産物の研究を進め⁸⁾、黴類の該酵素はタンニンおよびタンニンに関連性のある没食子酸等の添加あるいは含有培地に生育した場合にのみ所謂適応的に生産される酵素であり、菌の生育の際、培地へのタンニン添加量あるいは含有程度は菌株の発育を甚しく害しない範囲にて添加量あるいは含有量の高い方がその生産力は強いことおよび培養日数の老若によりその生産に大きな影響があること等を指摘した。更に該酵素が適応的に生産される事実から、タンニン、没食子酸、ピロガロール等の黴類による代謝分解について研究を続け、KCN-添加タンニン培地におけるピロガロール集積^{10), 11)}等の新しい事実を認め、タンニンの代謝分解経路の一部を推定した¹²⁾。

今回は該酵素が所謂適応的に惹起される酵素という観点に立脚して、ペーパークロマトグラフィによるタンニンの経時的酵素分解過程の追跡から、タンニン分解酵素の適応的必須生産条件を更に確実にしたのでここに報告する。

実 験 の 部

A. 実験方法

- (1) 使用菌は *Penicillium sp. No.80 B'*, 使用基質は五倍子より調整されたガロタンニンである。
- (2) 酵素液の調整: 麴麴よりの酵素液調整は既報³⁾の如く麴 5g に 0.2g のタンニンあるいは没食子酸、ピロガロールを加え(対照はこの場合タンニン等の基質を添加しない麴のみ)水道水 4.5ml を注加してよく混合し、15lb30分加圧殺菌後、新しい麴汁寒天培養菌を 1~2 白金鈎移植、30℃で 3 日培養する。このようにして得た麴麴を乳鉢でよく磨砕し 1% 食塩水を加え、25℃で 4~5 時間トルオール添加のもとで抽出濾過し、濾液をそのまま酵素液とした。菌体抽出酵素液の調整⁹⁾。500ml 容三角フラスコにサベック・ドックス蔗糖 5% 培地を 200ml 入れ常法殺菌後、麴麴の場合と同様菌を移植、5~6 日、30℃で静置培養し十分に菌蓋を作らせる。この第一次培養菌蓋をこわさないように出来るだけ注意しながら蒸留水の入換えによつて数回洗滌した後、4% タンニン・サベック・ドックス培地(没食子酸、ピロガロールの場合は各 3%) 200ml を注加し 7~8 日間第二次培養を行う。かくして得た菌蓋を蒸留水でよく洗滌し、次に圧搾して水分を除き、N/10 磷酸緩衝液 (pH5.8) 20ml とトルオール 0.5ml を加え、25℃、24 時間抽出、濾過した液をそのまま酵素液として使用した。
- (3) 酵素反応: 反応液の組成は、0.6% タンニン液 25ml, N/10 磷酸緩衝液 (pH5.8) 10ml, 蒸留水 10ml, 酵素液 5ml, トルオール 0.5ml, 反応温度 40℃。時間的に反応混液 5ml をとり手早く 0.5ml に濃縮、この濃縮液をペーパークロマトグラフィにかける。タンニンの分解が進むと、濃縮液を放置冷却することにより没食子酸の針状結晶が析出して来る。この濃縮液の状態を観察することによりタンニンの分解程度の推移を大体知ることが出

(86) (西羅) ペーパークロマトグラフィによるタンニン分解酵素生産条件の解析(其の1)

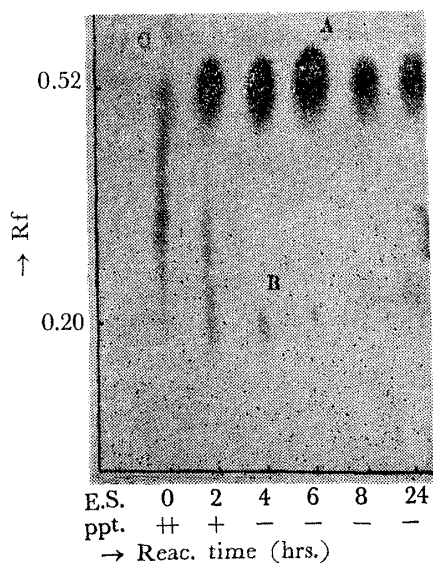


Fig. 1. Paper chromatogram of enzymatic tannin decomposition. E.S. : enzyme solution. ppt. : precipitate by quinine hydrochloride. + : precipitate, - : no precipitate. Solvent system : n-BuOH-AcOH-HOH (4 : 1 : 1). Spray reagent : 0.1% FeCl₃, 30% methanol solution. A : gallic acid. B : intermediate hydrolysate. C : tannin.

来る。なお塩酸キニンによる沈澱反応⁹⁾も併せて行い、その分解程度をしらべた。

(4) 反応液のペーパークロマトグラフィ：東洋濾紙 No. 2 を使用。室温にて一次元の上昇展開。フェノール類のペーパークロマトグラフィにおける展開溶媒および呈色試薬については中林・西田氏等¹⁰⁾の報告があるが、種々検討の結果、n-ブタノール・醋酸・水 (4 : 1 : 1) および n-ブタノール・ベンゼン・醋酸・水 (1 : 5 : 1 : 0.5) を使用した。呈色試薬は 0.1% 塩化第二鉄 30% メタノール溶液および Diazobenzene sulfonic acid 50% アルコール溶液。一夜展開後 (約 23cm 展開) 室温にて放置乾燥、呈色試薬を噴霧して発色させる。タンニン、没食子酸、分解中間産物と考えられる物質は塩化第二鉄試薬で青色に (各々は色調が幾分異なる) Diazobenzene sulfonic acid では黄褐色に呈色する。比較的長期間保存にたえるペーパークロマトグラムを得ようとする時は、塩化第二鉄による発色を用いるのがよい。

B. 実験結果

(1) タンニンの酵素的分解経過を示す標準ペーパークロマトグラム。

タンニンの分解を時間的に追跡したペーパークロマトグラムは Fig. 1 に示す如くである。

タンニン添加麹抽出液を硫酸塩析、水に溶解、透析処理して

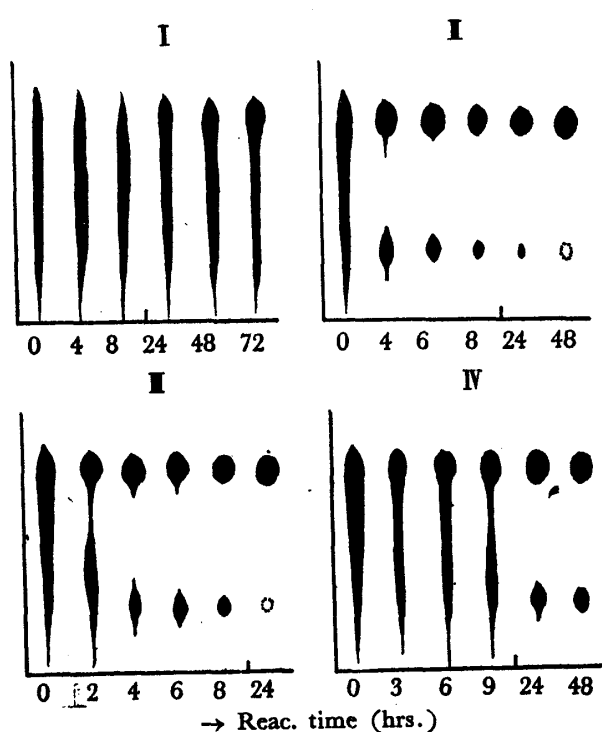


Fig. 2. Tannase production by *Pen. sp. No. 80B'* in the wheat-bran-solid-medium with a variety of phenolic substances.

I, Fusuma-koji (control). II, Tannin fusuma-koji. III, Gallic acid fusuma-koji. IV, Pyrogallol fusuma-koji.

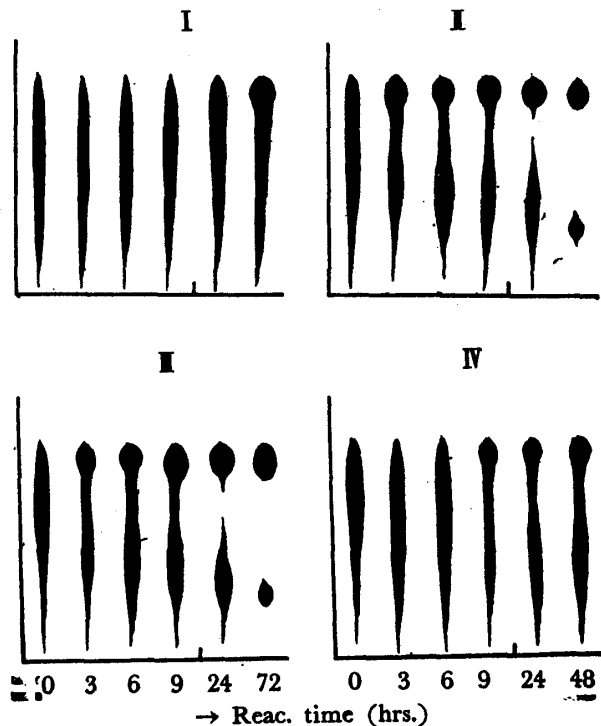


Fig. 3. Tannase production by *Pen. sp. No. 80B'* in replacement-stationary-cultures with a variety of phenolic substances.

Carbon source of secondary culture medium :
I, Glucose (control). II, Tannin. III, Gallic acid. IV, Pyrogallol.

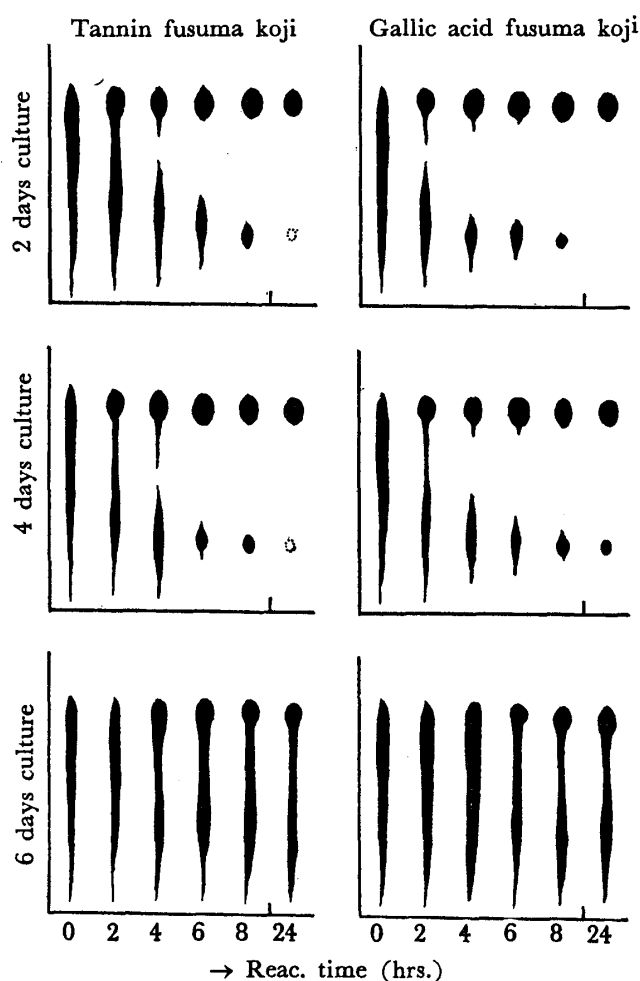


Fig.4. Effect of culture period on the tannase production.

Table 1. The change of enzyme-solution-component by the age of culture.

* Paper chromatographic detection, using *n*-BuOH : Benzene : AcOH : HOH (1 : 5 : 1 : 0.5) as solvent and diazobenzene sulfonic acid for spray reagent was used.

Source of enzyme solution	Component of enzyme solution	Age of culture in days						
		2	3	4	5	6	7	9
Tannin-fusuma-koji (<i>Pen. sp.</i> No.80 B ²)	Detection* of phenolic substance (gallic acid)	+++	++	+	±	—	—	—
	pH	5.0	6.0	6.6	6.8	7.2	7.4	7.2
	FeCl ₃ -colouring substance (tannin and gallic acid)	++	+	—	—	—	—	—
Gallic acid-fusuma-koji (<i>Pen. sp.</i> No.80 B ²)	Detection* of phenolic substance (gallic acid)	+++	++	+	—	—	—	—
	pH	4.8	6.2	7.0	7.0	7.2	7.4	7.4
	FeCl ₃ -colouring substance (tannin and gallic acid)	++	+	—	—	—	—	—

得た濃縮酵素液を用いたタンニン分解過程のペーパークロマトグラムも同じ経過を示す¹¹⁾。n-ブタノール・醋酸・水の展開剤の場合は、未分解タンニンはテーリングするが、分解が進むにつれて没食子酸が Spot A に現われ、それにつれてタンニンのテーリングは短く小さくなって遂には Spot B に集約し、この Spot B はタンニンのテーリング消失時間に比較して長時間を要するが、24時間反応では完全に分解され、呈色試薬によつて発色するフェノール性物質は Spot A の没食子酸のみになる。なお透析酵素においても同じペーパークロマトグラムを与えるので、該酵素は透析操作によつては失活されないことがわかる。n-ブタノール・ベンゼン・醋酸・水の展開剤ではタンニンは原点にとどまり上昇しない。故にこの場合は、分解が進むにつれて Rf が 0.03~0.04 の所に没食子酸のみの Spot が現われて来る。従つてこの展開剤では、上記の如き分解中間産物と考えられる Spot B の検出は出来ない。

(2) タンニン分解酵素生産におけるタンニンおよび没食子酸の必須性。

Fig.2, Fig.3 は各々麴抽出液および菌体抽出液を酵素液とした場合のペーパークロマトグラフィによる解析図である。

いづれも(ピロガロールの場合は少々疑問)タンニン分解酵素の生産にはタンニンあるいはその

(88) (西羅) ペーパークロマトグラフィによるタンニン分解酵素生産条件の解析(其の1)

分解産物である没食子酸の存在が絶対に必要である。即ち該酵素の生産は菌の生育培地中の対応基質に依存している所謂適応酵素であることがわかる。

(3) 培養日数の長短が該酵素生産におよぼす影響。

Fig.4 に示される如く老培養になるにつれて該酵素生産分泌は減少乃至消失する。

Table 1. は培養日数の長短にともなう、麩麴から調整した酵素液の pH の変化とフェノール性物質の消長を示したものである。

即ちタンニン、没食子酸が菌の生育によつて代謝分解されて消失することがとりもなおさず酵素の減少あるいは消滅を意味する。かく該酵素は基質が完全に代謝分解されるや否や減弱し始める所謂培地の対応基質の存在に強く依存する適応酵素である。

考 察

Fig. 1 に示される Spot B に相当する物質はタンニンの酵素分解中間産物と考えられるもので(この物質はタンニンを基質とした液体培養の培地中にも見出される)この部分を切りとり水で抽出、5%硫酸で加水分解した後、再びペーパークロマトグラフィを行うと、この Spot B は消失し Spot A に相当する没食子酸のみが現われる¹⁰⁾。なおこの分解液は最早 Spot B に相当する部分に塩化第二鉄、Diazobenzene sulfonic acid による呈色性を示さないが、ベンチデン試薬、ベンチデン・塩化第二鉄試薬¹⁴⁾によつて発色する。従つて Spot B は糖と没食子酸の結合物で且酸滴定法によるタンニンの分解定量曲線¹⁵⁾とペーパークロマトグラフィ¹¹⁾との平併実験から推定される如く、タンニンに比し糖に結合している没食子酸分子の少ない物質と考えられる。Spot B 物質は、タンニンのテーリングが短時間で短くなるに反して、其の消失分解に長時間を要する。この事実は、ガロタンニンの糖と没食子酸あるいは没食子酸同志の結合中、タンナーゼによつて分解され易い結合と比較的分解され難い結合の存在(メチルガラートの分解が比較的長時間を要することもこの考えを推定せしめる)、ないしは従来タンナーゼと考えられているタンニン分解酵素に2つの型の存在を推定せしめる。塩酸キニン沈澱反応によるタンニン分解酵素力の測定中⁹⁾、未分解タンニンと塩酸キニンは無定形の沈澱を生ずるに反し、分解が進むと結晶性の結合沈澱の析出して来るのを見るが、これはこの Spot B に相当するフェノール性物質と塩酸キニンの結合物であろうと推定している。没食子酸と塩酸キニンとは沈澱物を生成しないので分解の進んだ反応混液は最早この沈澱反応は認められない。なおこの Spot B に相当するフェノール性物質は結晶状として分離に成功していないが、70%アルコールにおける吸収の極大は、タンニンが274m μ 、没食子酸が268m μ を示すに対し、277m μ に存在する¹²⁾。

J. PHAFF¹⁶⁾は *Penicillium chrysogenum* による Pectinase の適応的生産の研究において、52の異つた炭素化合物を用い Pectinesterase, Polygalacturonase の生産刺激の有無を試験し、Pectin, Pectin の加水分解産物である D-galacturonic acid および5つの炭素原子上における各基が D-galacturonic acid と同じ配置を所有する化合物が pectinase の生産を刺激することを報告している。既述の如く該酵素は対応基質の存在に依存する適応酵素であり、タンニンおよびその加水分解産物である没食子酸は該酵素の生産を惹起せしめる。生産刺激を予想される8種のフェノール性物質についてその効果を試験したが¹²⁾、ピロガロールの酵素生産刺激性は認められない。没食子酸とピロガロールの構造の比較から、ベンゼン核上における-COOH の必須性が考えられる。しかし酵素を生産せしめる基質としては安息香酸は無効である。従つて生産刺激性物質としての構造は少くともベンゼン核上の-OH, -COOH の両基の存在が必要である。しかし安息香酸とピロガロールの混合基質は酵素生産を引き起こさない。なお又 Protocatechuic acid も無効である。従つて同一ベンゼン核上に-OHと-COOHを有し、且-OHの数およびそれ等各基のベンゼン核上における配置が重要な関係を持つていることが認められ、該酵素生産刺激の最小構造単位は没食子酸であると考えられる。

要 約

Penicillium sp. No. 80 B' 菌の麩麴抽出液および第二次静置培養菌体抽出液を酵素液として用い、タンニンの酵素的分解経過のペーパークロマトグラムを示し、これを基準としてペーパークロマトグラフィ解析を行つて次のことを明らかにした。

1) タンニン分解酵素はタンニンあるいは没食子酸が培地中に存在する時にのみ生産される所謂適応酵素であ

る。ピロガロールについては酵素生産刺激性はなく、又あつてもその力は極めて微弱である。

2) 該酵素生産とタンニンあるいは没食子酸の代謝分解との間には密接な関係が認められ、培養の経過と共に培地中の添加タンニンあるいは没食子酸は分解され消失するが、それに伴つて該酵素生産も減少し、タンニン、没食子酸の完全消失の時には最早酵素の活性は認められない。

3) タンニンの酵素分解過程に現われる未知中間産物 (Spot B, 糖と没食子酸との結合物と推定) について考察した。

4) 該酵素の生産を惹起せしめる化合物について考察し、この酵素生産を刺激する最小構造単位は没食子酸であることを推定した。

終りに臨み平素絶えず御指導頂いている麦林教授並びに御高見、御高配を頂いている大阪市大福本教授、大日本製薬の小路氏に対して厚く感謝致します。尚この報告の一部は昭和29年9月18日、日本農芸化学会関西支部例会にて発表した。

文 献

- 1) 喜多：工化，**20**，134 (1917).
 - 2) 小田，池田，谷本：本誌，**27**，16 (1949).
 - 3) 福本：未発表.
 - 4) 中林：農化，**29**，161 (1955).
 - 5) 西羅，麦林：兵農大研報，**1**，6 (農化編) (1953).
 - 6) 麦林，西羅，久保：ibid.，**2**，5 (農化編) (1955).
 - 7) 西羅，新家，麦林：ibid.，**3**，43 (農化編) (1957).
 - 8) 西羅，麦林：ibid.，**2**，1 (農化編) (1955).
 - 9) 西羅，麦林：ibid.，**2**，87 (農化編) (1956).
 - 10) 西羅，麦林：昭32・4・10，日本農芸化学大会講演.
 - 11) 西羅：科学，Vol 29, No. 1, 42 (1959) (岩波書店).
 - 12) 西羅，麦林：昭33・5・3，日本農芸化学大会講演.
 - 13) 中林，西田：農化，**26**，333 (1952).
 - 14) 西羅：科学，**28**，578 (1958).
 - 15) 西羅：未発表.
 - 16) J. PHAFF：Arch. Biochem.，**13**，67 (1947).
- (昭和33. 12. 12受理)

ペーパークロマトグラフィによる

タンニン分解酵素生産条件の解析 (その2)

黴類のタンニン分解酵素に関する研究 (第6報)

西 羅 寛 (兵庫農科大学農芸化学醸造学教室)

緒 言

前報¹⁾に引き続き、タンニンの酵素的分解経過のペーパークロマトグラムを比較の基準として、該酵素の生産条件のペーパークロマトグラフィ的解析を行い、各菌株によつて得られたタンニンの酵素的分解経過を示すペーパークロマトグラムも、塩酸キニン沈澱反応を用いて行つた既報²⁾の2型式推定の場合と同様に2つの型に分類されることを指摘した。文献記載の従来の研究におけるこの酵素の調整源はいずれも菌体抽出液であるが、今回は液体静置第二次培養の外に液体振盪第二次培養を行い、該酵素は菌体内と同様に培養液中にもよく分泌生産されることを確認した。更に又メチールガレート³⁾の該酵素による分解も試験したのでこれ等について報告する。

実 験 の 部

A. 実験方法

(1) 使用タンニンおよび使用菌株

五倍子より調整されたガロタンニン。使用菌株は主として *Penicillium* sp. No. 80_B' と *Aspergillus niger* sp. 分離10号の両菌で、外に8種の菌株を用いた。

(2) 酵素液の調整

黴菌および液体静置第二次培養菌体 (但しこの場合は0.6%タンニン培地) からの酵素液は前報¹⁾と同様に調整した。振盪培養による場合：500ml容の肩付振盪培養フラスコにサベック・ドックス蔗糖5%培地 (あるいは麦芽汁) 50mlを入れ常法の如く殺菌して菌株移植後、27°Cで2~3日振盪培養 (振巾8cm，振盪往復回数