

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、大日本製菓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

〔 90 〕 (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2)

1 分間に約110) して得た第一次菌体をよく洗滌, 次に圧搾して水分を除き(菌体は湿潤状態で約2g前後), 0.6%タンニン・サベック・ドックス培地で所用日数第二次培養を行う。かくして得た第二次菌体(余り菌体の重量増加は見られない)を静置培養の場合と同様に抽出して, その抽出濾液をそのまま酵素液とした。尚培養液の場合は, 静置, 振盪培養共に第二次培養液をそのまま酵素液として使用した。

(3) 酵素反応および酵素反応液のペーパークロマトグラフィ

東洋濾紙No. 2 使用。展開剤: $n\text{-BuOH-AcOH-HOH}$ (4 : 1 : 1), 発色剤: Ferric chloride-potassium ferricyanide mixture⁹⁾ (各試薬共に0.15%溶液)。前報と全く同様にして行つた。

B. 実験結果

(1) タンニンの酵素的分解経過のペーパークロマトグラムによる菌の分類

Pen. sp. No.80 B', *Pen. chrysogenum* Q176, *Pen. sp.* A, *Pen. sp.* No.80, *Pen. sp.* P, *Asp. niger*, *Asp. niger sp.* 分離10号, *Asp. oryzae*, *Asp. kawachii*, *Mucor javanicum* の10菌株を各々タンニン添加麴培地に1日, 2日, 3日, 4日, 5日培養して得た, 都合1菌株につき培養日数の異なる5種類の, 合計50種の麴からの抽出酵素液を用いて, タンニン分解経過のクロマトグラムを作り, これ等を比較して各菌株の該酵素生産状況を検討した。Fig. 1に*Asp.*

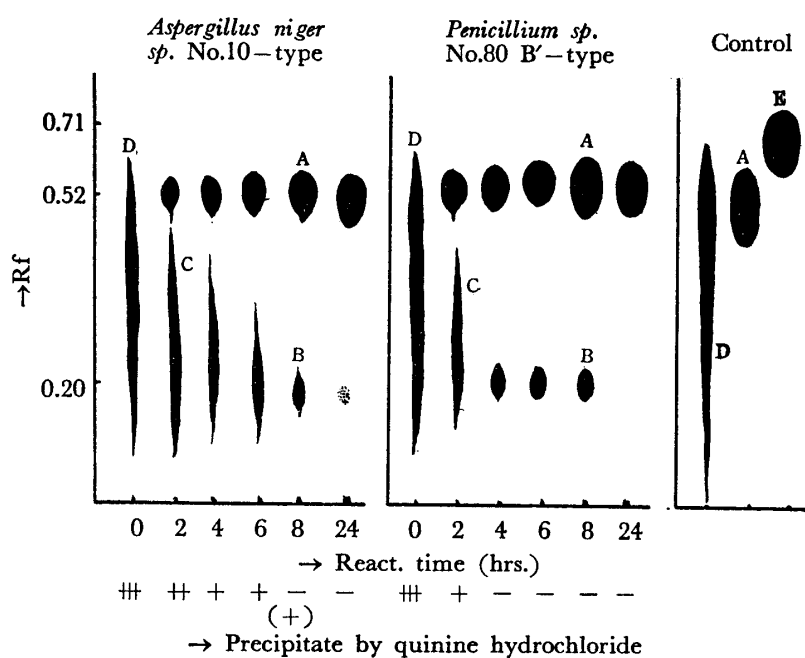


Fig. 1. Two paper-chromatograms of enzymatic tannin-decomposition.

A : Gallic acid. B : Intermediate hydrolysate.

C : Tailing substance. D : Gallotannin. E : Pyrogallol.

niger sp. 分離10号と *Pen. sp.* No.80 B' の4日培養麴の抽出酵素液による代表的タンニン分解経過のペーパークロマトグラムを示す。

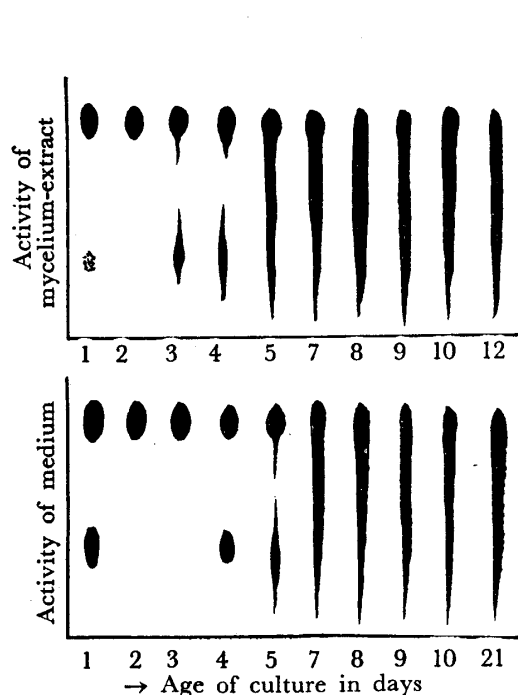
Asp. niger, *Asp. niger sp.* 分離10号, *Pen. sp.* No.80等の菌株は *Pen. sp.* No.80 B', *Pen. sp.* A, *Pen. chryso.* Q176等に比し, 芽胞着成も早く且芽胞着成能も極めて強く発育は極めて旺盛であるが酵素力生産は劣る。*Asp. niger sp.* 分離10号の1日, 2日の若い培養および5日の古い培養よりの酵素液では, Fig. 1に示す4日培養の場合に比較してはるかに弱いタンニン分解のクロマトグラムを示すに過ぎない。*Asp. niger sp.* 分離10号は発育が旺盛なために培地中のタンニンの分解, 利用が早く3日, 4日, 5日の老培養では既に培地中の添加タンニンあるいは分解されて生

じた没食子酸の消失が考えられ, 該酵素の適応的生産の観点から既に酵素力が消失して了つていることが予想される。しかし1日, 2日の若い培養の場合でも Fig. 1の *Pen. sp.* No.80 B' のような強い酵素力生産を示すペーパークロマトグラムを与えない。5種の酵素液の中で最も強い酵素力を示したのがFig. 1に示す如き4日培養麴からの抽出液であつた。即ちタンニン添加麴培地においては, 菌糸の発育状態とか分生芽胞の着成状況と該酵素生産能とは必ずしも平併関係になく, 各菌株にて個有の性質を有している。本解析においても既報の RHIND-SMITH 変法⁴⁾, 塩酸キニン沈澱反応を利用する著者等の案出による簡易測定法⁵⁾, コロイド滴定法⁶⁾による結果といずれも一致した傾向を示し, 本実験条件における該酵素生産力の強弱は略々次の如くなる。*Pen. sp.* No.80 B', *Pen. chryso.* Q176, *Pen. sp.* A > *Asp. niger sp.* 分離10号, *Asp. niger* > *Asp. oryzae*, *Pen. sp.* No.80, *Pen. sp.* P, *Asp. kawachii*, *Mucor javanicus* 菌はタンニン添加麴培地にて極めて良好な発育をするに不拘, 酵素力は殆んど認められなかつた。

各使用菌株における1日, 2日, 3日, 4日, 5日培養の中で最も強い酵素力の生産を示すような場合のペーパー

クロマトグラムを各菌株について、とりあげ比較すると Fig. 1 に示される如く、タンニンの酵素的分解経過において一つは *Pen. sp. No.80 B'*, 他は *Asp. niger sp. 分離 10号* によつて代表される2つの型のペーパークロマトグラムに整理分類される。既報⁹⁾ の塩酸キニン沈澱反応を利用するタンニンの酵素的分解曲線図において、そのタンニンの分解は *Pen. sp. No.80 B'* の場合は急速に又直線的且短時間に進行するに反して、*Asp. niger sp. 分離10号* は彎曲線を描いて漸進的に分解が徐々に進行することを示し、各菌株の相違によりタンニンの酵素的分解に2様の型式が存在することを推察した。Fig. 1 から明らかなように、タンニンの分解中に生ずるクロマトグラム上のテーリング物質が徐々に消失する *Asp. niger sp. 分離10号* の場合と、このテーリングが急速に消失する *Pen. sp. No.80 B'* の場合の2通りがあり、図中の塩酸キニンによる沈澱反応からもわかるようにテーリングの長い物質は塩酸キニンによる沈澱性を示し、その沈澱性はテーリングの長さが減少するにつれて減少し、Spot B に集約するに至つて消失する。この結果と塩酸キニン沈澱反応による既報⁹⁾ の結果とを考えあわせると、各菌株の相違によりタンニンの酵素的分解に2様の型式の存在が推察される。この原因が酵素組成の相違によるものか、あるいはもつと本質的な酵素自体の相違に由来するものかは今後の問題として、この2つのクロマトグラムを基準として使用菌を分類すると、*Pen. chryso. Q 176*, *Pen. sp. A* は *Pen. sp. No.80 B'* 型に属し、他の使用菌株6種 (*Mucor javanicus* は除く) は酵素力に強弱の差はあるが *Asp. niger sp. 分離10号* 型に属する。

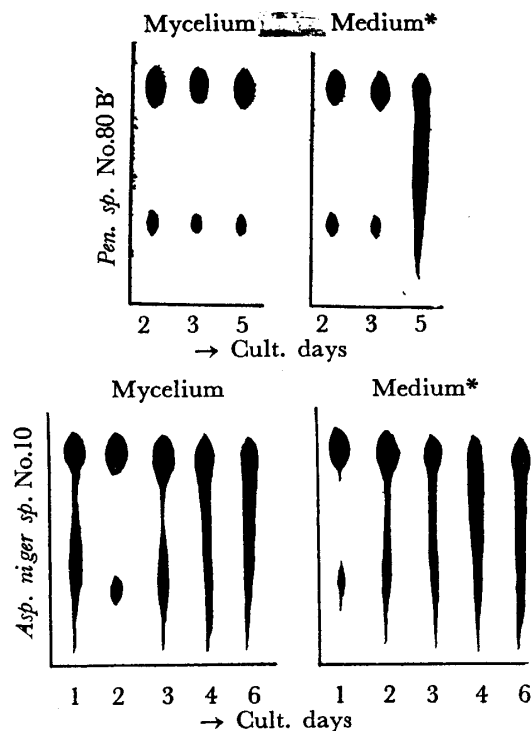
(2) 液体培養液の酵素力



Changes of pH and FeCl_3 -reaction in medium during cultures

Age of culture in days	1	2	3	4	5	7	8	9	10	12
pH	3.2	3.6	6.0	6.2	6.2	6.6	6.6	6.2	6.2	6.4
FeCl_3 -react.	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-

Fig. 2. Change of activity in mycelium-extract and culture-fluid during replacement-stationary-culture of *Aspergillus niger sp. No.10*.



* Changes of pH and FeCl_3 -reaction in medium during cultures

Age of culture in days	<i>Pen. sp. No.80 B'</i>			<i>Asp. niger sp. No.10</i>					
	2	3	5	0	1	2	3	4	6
pH	6.6	6.8	7.4	4.4	3.6	4.8	5.2	7.8	7.8
FeCl_3 -react.	+	+	-	+	-	-	-	-	-

Fig. 3. Changes of activity in mycelium-extract and culture-fluid during replacement-shaking cultures of *Penicillium sp. No.80 B'* and *Aspergillus niger sp. No.10*

(92) (西澤) 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2)

Asp. niger sp. 分離10号を用いて液体静置第二次培養により得た菌体抽出液および培養液の酵素生産状況を示したのがFig. 2である。上記菌および *Pen. sp.* No. 80 B' を使用して行つた液体振盪第二次培養菌体と培養液の酵素力を示したクロマトグラムはFig. 3に示す如くである。

いずれも40°C, 24時間反応後の反応溶液のクロマトグラムである。J. PHAFF⁹⁾ が詳細に報告しているペクチン分解酵素と同様に、該酵素は菌体内と共に培養液中にも生産される酵素である。従来タンナーゼの調整は菌体抽出液から出発する方法のみであるが、適当な条件のもとに行われた液体培養における培養液も十分に酵素源として使用され得る(尚振盪培養における酵素生産の諸条件についての研究は次報に譲る)。前報¹⁾ にのべた如く該酵素はその生産が対応基質に依存する適応酵素であるが、Fig. 3に示される *Pen. sp.* No. 80 B' の場合、培地中の酵素生産は特に対応基質に対する依存性が厳密で、5日培養の培養液は FeCl_3 反応がなくpHも7.4で始めより高くなつておりフェノール性物質の存在が既に認められないが、それと同時に酵素力も全く消失している。但し菌体の酵素力は培養液中の酵素力が消滅して後も尚含まれており、培養液に比し菌体においては酵素の持続性が認められる。しかし振盪培養日数が更になると菌体内の酵素も消失するし自己消化を起してしまう。以上の関係は本報告の培養条件にて *Asp. niger* sp. 分離10号は *Pen. sp.* No. 80 B' に比し判然とは現われない。

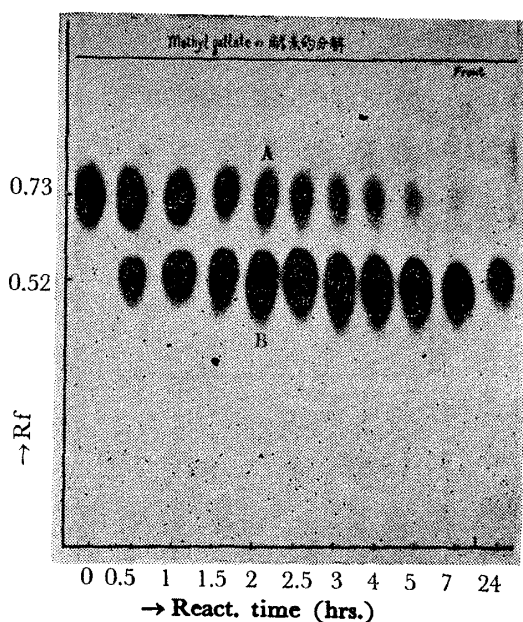


Fig. 4. Photograph of paper-chromatogram shows the enzymatic methyl-gallate-decomposition.

A : methyl-gallate. B : Gallic acid.

(3) 該酵素による Methyl-gallate の分解

Pen. sp. No. 80 B' の液体振盪第二次培養液の硫酸 0.6~0.8 飽和の間で沈澱する部分を蒸留水に溶解、次に1日蒸留水にて透析して得た濃縮酵素溶液⁷⁾を用いて、methyl-gallate (合成品⁸⁾, mp. 202°C) の酵素分解を行い、その酵素的分解過程のクロマトグラムを示したのがFig. 4である。

Table 1はクロマトグラムと平併して行つた、酸滴定法による Methyl-gallate の分解状況を示した実験結果である。この場合0.23gの Methyl-gallate を15mlの蒸留水に溶解、5 mlの N/10磷酸緩衝液(pH5.8)と5 mlの濃縮酵素液を加えた反応混液(総量25ml, G. TÓTH と G. BÁRSONY⁹⁾ が行つたのと同じ基質濃度)を用いた。上記と同様の濃縮酵素液を用いた行つたタンニンの分解経過(そのペーパークロマトグラム¹⁰⁾ および酸滴定法による分解曲線¹¹⁾と Methyl-gallate のそれとの比較から、タンナーゼの基質となり得る物質でも基質の相違によりその分解力に差異が認められる。このことは前報で考察したタンニンの構造中でタンナーゼによつて分解され易い結合部と比較的切れ難い結合との存在を推定せしめる一つの支持であると考えられる。

Table 1. Enzymatic hydrolysis of methyl-gallate.

Reaction time (hrs.)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	5	24	48
Gallic acid mg. in React. mix. solution 5ml	7.6	11.9	17.8	19.5	21.2	22.1	23.8	25.5	25.5
Hydrolysis %	18	28	42	46	50	52	56	60	60

(4) 附 記

タンナーゼはタカ菌およびタカシアスターゼ¹²⁾ (*Asp. flavus-oryzae*) 中にもその存在が知られている。市販の酵素製剤タカシアスターゼにつき本解析法を用いて実験を行つたが、タンニンの顕著な分解経過を示すようなクロマトグラムを得ることが出来ず、ほとんどその甚しい活性を認め得なかつた。かく該酵素製剤中のタンナーゼ活性のみについては、たとえ存在したとしても非常に微弱であるから、比較的タンナーゼに富んだ菌を得ようとする

(西羅) ペーパークロマトグラフィーによるタンニン分解酵素生産条件の解析(其の2) (93)

る場合には、記述の如く菌の培養にあたり培地へのタンニンの積極的な添加が必要であると考えられる。

要 約

ペーパークロマトグラフィーによる解析法を用いて、黴類のタンニン分解酵素の生産条件をしらべ、次のことを明らかにした。

1) 各菌株(10種)の酵素生産能力を比較して、さきに RHIND-SMITH 氏変法⁷⁾、塩酸キニン沈澱反応を利用した測定法⁸⁾、コロイド滴定法⁹⁾の3法によつて得られた結果と同様に、*Pen. sp.* No. 80 B', *Pen. chrysogenum* Q 176, *Pen. sp.* A の各菌株は他菌株に比して酵素生産能が強いことを知つた。タンニン添加麩培地における各使用菌株の生育状態の観察から、培地における成育の強弱良否、孢子着成の遅速および強弱と酵素生産能との間には余りはつきりした相関関係は認められず、各菌株によつて外観的な成育状態の如何に不拘その生産能力は本質的に異つている。タンニン含有培地上における菌の成育状態のみによる菌株の分離選択は該酵素を対照とする場合一考を要する。

2) 各菌株の酵素的タンニン分解経過のクロマトグラムを比較検討して、2型のクロマトグラムに整理分類されることを確認し、それにもとずいてタンニン分解型式の観点から使用各菌株を *Pen. sp.* No. 80 B' 型と *Asp. niger* 分離10号型の2群に分類した。この結果は既報の塩酸キニン沈澱反応によつて得たタンニン分解の2型式の推定とよく一致する。

3) 麩固体培養と同様に液体培養においても、酵素生産には対応基質タンニンの存在が必要であり、且該酵素は菌体内に生産される Intracellular enzyme であると共に、培地中にもよく生産分泌される Extracellular enzyme であることを見出した。

4) Methyl-gallate の酵素的分解経過のクロマトグラムと、それと併行して行つた酸滴定法による methyl-gallate の時間的分解率を示した。該酵素によるタンニンと methyl-gallate の分解の間には、その酵素力に差異が認められた。

5) 市販酵素製剤タカジアスターゼの該酵素活性については本実験条件ではほとんど認められなかつたことを附記した。

終りに臨み平素御指導を賜わつている当教室主任麦林教授、日頃御高見、御高配をいただいている大阪市大福本教授並びに大日本製薬の小路氏、貴重な Methyl-gallate 等の標準品を恵与いただいた九大の大島教授に厚く御礼申し上げます。本報告の大部分は昭和30年5月21日、日本農芸化学会関西中部両支部合同大会にて発表した。

文 献

- 1) 西羅：本誌，**37**，85 (1959).
- 2) 麦林，西羅，久保：兵庫農大研報，**2**，(農化編)，5 (1955).
- 3) WHITE, T., KIRBY, K.S., and KNOWLES, E.: J. Soc. Leather Trades' Chemists, **36**, 148 (1952).
- 4) 西羅，麦林：兵庫農大研報，(農化編)，**1**，6 (1953)，**2**，1 (1955).
- 5) 西羅，新家，麦林：ibid., **3**, 43 (1957).
- 6) PHAFF, J.: Arch. Biochem., **13**, 67 (1947). LINEWEAVER, H., and JANSEN, E.F.: Advances in Enzymology, **11**, 292 (1951).
- 7) 西羅：未発表.
- 8) WILL: Ber., **21**, 2020 (1888).
- 9) BEITSTEIN: **10**, 483.
- 10) TÓTH, G. and BÁRSONY, G.: Enzymol., **11**, 19 (1943).
- 11) 西羅：未発表.
- 12) 喜多：工化，**20**，134 (1917).
- 井上：応用微生物の理論と実際，65頁 (1957)(技報堂).

(昭和33. 12. 22 受理)