

(西羅) 液体培養におけるタンニン分解酵素の生産条件について (その2) (137)

BEVENUE, A. & WILLIAMS, K.T.: Arch. Biochem. Biophys. 71, (2) 477 (1957). 6) DOETSH & RAKOSKY: Proc. 50 th Gen. Meeting Soc. Amer. Bact., Baltimore 38 (1950). (昭和 35, 9, 12 受付)

液体培養におけるタンニン分解酵素の 生産条件について (その2)

黴類のタンニン分解酵素に関する研究 (第10報)

西 羅 寛 (兵庫農科大学農芸化学醸造学教室)

Studies on the Tannin-decomposing Enzyme of Molds (X)

Tannase Formation by Molds in Liquid Culture with Phenolic Substances

Hiroshi NISHIRA (Inst. Agric. Chem., Hyogo Univ. Agric.)

Some conditions of the tannase formation by *Penicillium sp.* No. 80B' were examined in shaken cultures with CZAPECK-DOX solution containing 0.5% tannin as the secondary medium.

The results obtained were as follows.

1) Age of pre-culture had an effect on the adaptability of the mold to tannin; tannase formation by old cells was faster than that by young cells.

2) For abundant formation of tannase, it was necessary to use nitrogen sources such as NaNO_3 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ which were found to be more effective than organic ones such as aspartic and glutamic acids.

3) Addition of 2,4-dinitrophenol to the secondary culture did not cause considerable inhibition of enzymatic hydrolysis of tannin to gallic acid, but inhibited the subsequent decomposition of gallic acid. In this case, tannase formation was poor, but its activity lasted comparatively long.

4) Iron, in the form of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, had little effect on the tannase formation.

5) Stimulating effect of various kinds of phenols upon tannase formation was examined, and it was presumed that gallic acid is the smallest structural unit effective as inducer.

6) Various tannins such as Turkish allotannin, sumach tannin and myrobalan tannin, which are similar to Chinese gallotannin in structure, could give rise to tannase formation.

The above results are consistent with the view that this enzyme is an inducible (or adaptive) enzyme. In designation of this enzyme, the author has an intention to propose that "gallo-" is prefixed to tannase to compose the name gallo-tannase to this enzyme.

緒 言

著者はタンニン添加麩を用いた固体培養¹⁾, タンニン添加サベック・ドックス培地 (以下サ・ド培地と記す) を使用した液体静置培養及び液体静置第二次培養²⁾ における該酵素生産条件についての研究, 並びにペーパークロマトグラフィによる該酵素生産条件の解析^{3,4)} を行ない, 液体培養における場合も固体培養におけると同様に, この酵素はタンニンあるいはその酵素的分解産物である没食子酸が培地中に存在する時のみ生産される所謂適応酵素であること, 又液体培養において菌体内に生産されると同様によく培地中にも生産分泌される酵素であること等について既報した。

(138) (西羅) 液体培養におけるタンニン分解酵素の生産条件について (その2)

今回は液体振盪第二次培養における該酵素生産条件について、更に検討を加えたので、これ等の結果について報告する。

実験の部

A. 実験方法

(1) 使用菌株及び使用タンニン：著者等が試験した中で酵素生産の最も強いと考えられる *Penicillium sp.* No. 80 B' 菌。使用基質は五倍子より調製されたガロタンニンである。

(2) 液体振盪培養法及び酵素液の調製：500mlの肩付振盪培養フラスコに、サ・ド糖5%培養基（あるいは麦芽汁）50mlを入れ常法殺菌後、菌株移植、27°Cで2～3日間振盪培養（振巾8cm，振盪往復回数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（この場合菌体は湿潤状態で約2.2g前後、乾物で420mg）、炭素源としての葡萄糖をタンニンで置換した0.5%タンニン・サ・ド培地で、所要日数振盪第二次培養を行なった。このようにして得た第二次培養菌体を静置培養の場合⁹⁾と同様に、蒸留水でよく洗滌し、次いで圧搾して水分を除き、菌体重量の20～30倍量のN/10磷酸緩衝液（pH5.8）とトルオール0.5mlを加え、25°C、24時間抽出、次いで濾過した液をそのまま酵素液として使用した。一方培養液の酵素活性測定には、濾過して菌体を除いた濾液をそのまま酵素液として用いた。

(3) 酵素力の測定方法：塩酸キニンによるタンニン沈澱反応の利用に基づく著者等の案出した測定方法⁹⁾ならびにブローム・チモール・ブルーを指示薬として、タンニンが酵素的分解を受けて生じる没食子酸を、苛性ソーダ溶液で滴定する酸滴定法⁶⁾によつた。反応液の組成は、前者の測定法による時は0.6%タンニン溶液5ml，N/10磷酸緩衝液（pH5.8）2ml，所要量の酵素液，トルオール数滴，全容量10ml，終末基質濃度0.3%である。後者の場合は2%タンニン溶液5ml，N/10磷酸緩衝液（pH5.8）5ml，蒸留水10ml，酵素液5ml，トルオール0.5ml，全容量25ml，終末基質濃度0.4%である。反応温度は40°C。

B. 実験結果

(1) 前培養日数の長短が酵素生産に及ぼす影響

前培養2日目，3日目，4日目の各菌体を用いて，0.5%タンニン添加・サ・ド培地で，第二次振盪培養を1日，2日，3日，4日行ない，各々の場合の培養液及び各二次培養菌体の抽出液の酵素力を，塩酸キニン沈澱反応による上記の方法で測定比較した。

(a) 培養液の酵素力

酵素力の単位は，培養液10mlが，40°Cで24時間及び48時間に分解するタンニンの量をもつて示した。その結果はFig. 1に示す如くである。

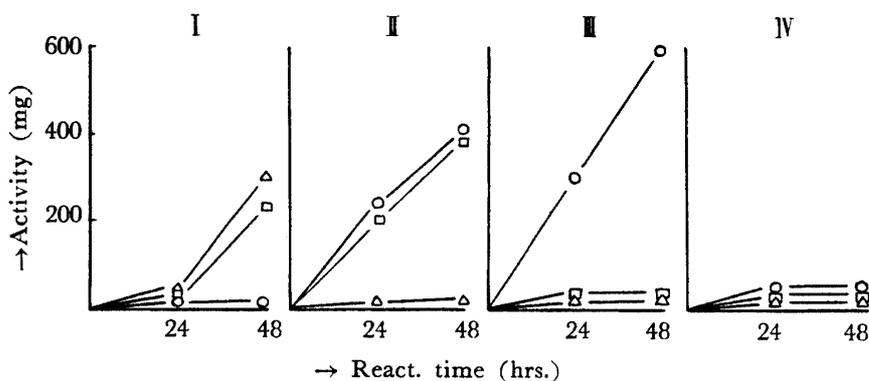


Fig. 1. Influence of the age of pre-culture on the enzyme formation. (Activity of culture liquid).

Age of pre-culture in CZAPEK-DOX's medium, —○— : 2days, —□— : 3days, —△— : 4days. Activity is expressed in mg of tannin hydrolyzed by 10ml of culture liquid at 40°C for 24 and 48 hrs. Replacement shaking culture period in CZAPEK-DOX's medium containing 0.5% tannin— I : 1day, II : 2days, III : 3days, IV : 4days.

又 Table 1 に，各二次培養液の FeCl₃ 及 KCN び呈色物質とタンニンの培養日数の経過に伴う消長が示されている。

前培養3日目，4日目の各菌体の場合，前培養2日目の若い菌体に比して，タンニンの分解更に生じた没食子酸の分解消失が早く，二次培養1日目で既に塩酸キニンによるタンニンの沈澱反応は認められず，二次培養2日目で，タンニンより生じた没食子酸は殆んど分解消費し尽されている。Fig. 1 に示される如く，前培養2日目の若い菌体を用

Table 1. Change of phenolic substance in culture liquid during replacement shaking culture.

Pre-culture : 5% glucose CZAPEK-DOX's medium. Secondary culture : 0.5% tannin CZAPEK-DOX's medium.

| Age of used mycelium in per-culture days | 2 | | | | 3 | | | | 4 | | | |
|--|---|----|-----|----|---|-----|-----|----|---|----|-----|----|
| | I | II | III | IV | I | II | III | IV | I | II | III | IV |
| Age of replacement shaking culture in days | | | | | | | | | | | | |
| FeCl ₃ -colouring substances (Tannin and gallic acid) | + | + | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - |
| KCN-colouring substance (Gallic acid) | + | + | - | - | + | (+) | - | - | + | - | - | - |
| Precipitate by quinine hydrochloride (Tannin) | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Detection of gallic acid by papar chromatography | + | + | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - |

いた時は、二次培養における酵素生産は、二次培養1日目では殆んど認められず、2日目特に3日目で最大に達する。これに比し、前培養3日目、4日目の老菌体では、二次培養1日目で既に相当量生産し、前培養の長い4日目の菌体の場合は、二次培養2日目で既に殆んど酵素活性が消滅しており、3日目、4日目では、二次培養液中に該酵素活性は全く認められない。尚Fig. 1, Table 1からも明らかなる如く、タンニンの代謝分解と該酵素生産との間には密接な相関関係の存在することが考えられる。

(b) 菌体抽出液の酵素力

酵素力単位の表示は、所要日数培養後の各取得菌体量の20倍量に相当する磷酸緩衝液で抽出、その抽出液10mlが上記の条件で、分解するタンニン量で示した。

Fig. 2に示す如く、培養液の場合と同様、老細胞の方が若細胞に比して適応し易く、且つ酵素生産の発現が早い。液体振盪二次培養においても、麩固体培養及び液体静置培養の場合に得られた結果と同様に、該酵素の生産は対応基質の存在に依存する適応酵素であり、且つ菌体内は勿論培地中にもよく生産されるが、該酵素の適応的生産の対応基質に対する顕著な依存性は、液体振盪第二次培養での培養液中の酵素の消長において特に明らかに見られる。

細菌を用いた蛋白合成の研究において、Growth phase と適応酵素生産能について、Old cell と Young cell のアミノ酸プールにおける比較が行なわれ、Old cell の適応能の増大理由が検討されているが⁷⁾、該酵素生産実験においても、前培養菌体の若い場合には、タンニンあるいは没食子酸の分解質化が幾分老細胞にくらべて遅れ、前培養の古い菌体の方がより適応し易い結果を得た。

(2) 第二次培養液の窒素源添加の有無が酵素生産に及ぼす影響。

前培養は麦芽汁で2日、二次培養はFig. 3に示す基本培地に0.5%に相当するタンニンを添加した培地、二次培養に使用した菌体量は各々2.2g (乾物で420mg)。酵素力測定は塩酸キニン沈澱反応による法、酵素力価表示法は前記と同様。但し菌体抽出液の酵素力は、菌体重量の30倍に相当する磷酸緩衝液にて抽出、この液の10mlが上記条件において分解するタンニン量にて示した。Fig. 3及びFig. 4に示される如く、該酵素の生産には、生産誘起物質の外に窒素源の存在を必要とし、窒素源の効果は特に培養液中の酵素の消長において顕著に見られる。

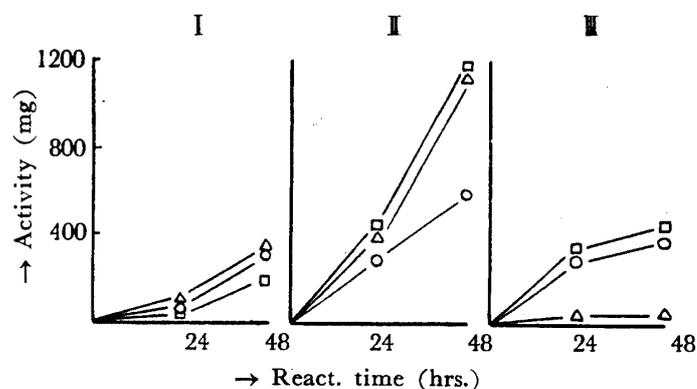


Fig. 2. Influence of the age of pre-culture on the enzyme formation. (Activity of mycelium extract).

Activity is expressed in mg of tannin hydrolyzed by 10ml of mycelium extract at 40°C for 24 and 48hrs. The extract was obtained by treating mycelia with 20-fold by weight of N/10 phosphate buffer. Other signs are the same as in fig. 1.

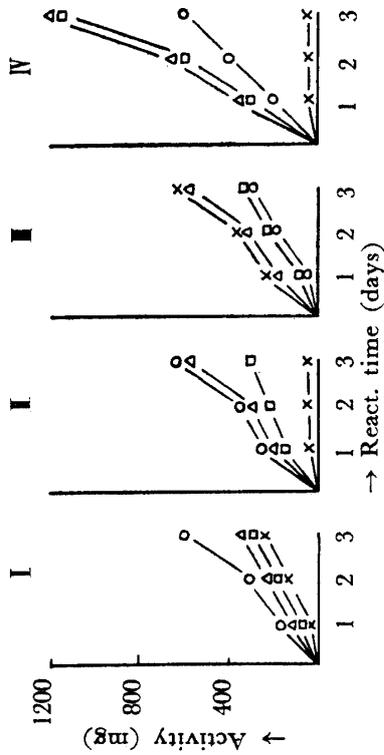


Fig. 4. Influence of nitrogen source on the enzyme formation. (Activities of mycelium extract). Other signs are the same as in fig. 3. Activity: tannin (mg) hydrolyzed by 10ml of mycelium extract (obtained by extracting with thirty times by weight of N/10 phosphate buffer) at 40°C for 1, 2 and 3 days.

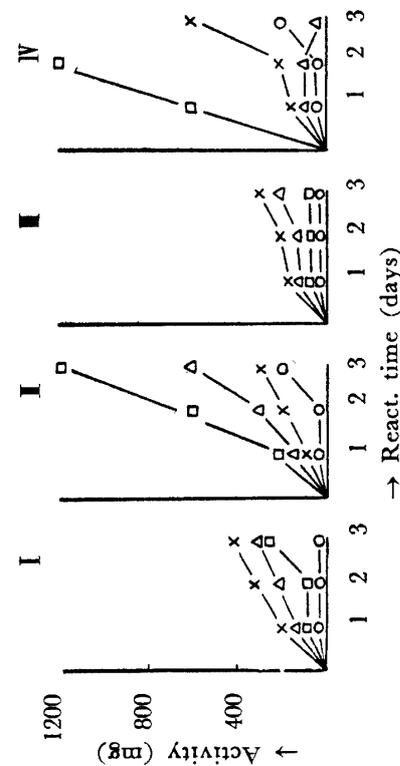


Fig. 3. Influence of nitrogen source on the enzyme formation. (Activities of culture liquid are shown).

Pre-culture medium: malt extract. Secondary culture tannin-medium (0.5%)—I: N/10 phosphate buffer (pH 5.8), II: N/10 phosphate buffer with polycepton (0.1%), III: Czapek-DOX's medium without NaNO_3 , IV: Czapek-DOX's medium with NaNO_3 (0.2%). Secondary culture period, —○—: 1 day, —□—: 2 days, —△—: 3 days, —×—: 4 days. Expression of activity is the same as in fig. 1.

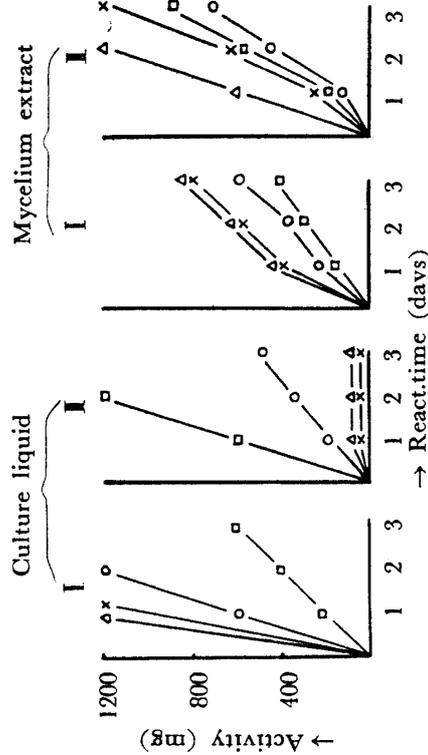


Fig. 5. Comparison of organic nitrogen sources with inorganic ones in their effectiveness on the enzyme formation. Pre-culture: 2 days in 5% glucose Czapek-DOX's medium. Nitrogen sources in secondary culture with 0.5% tannin medium, —○—: NaNO_3 , —□—: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, —△—: aspartic acid, —×—: glutamic acid. Secondary culturing period; I: 2 days, II: 3 days. Expressions of activities are the same as in Fig. 3 and 4.

(3) 酵素生産に及ぼす有機窒素と無機窒素の影響の比較

前培養: 5%葡萄糖サ・ド培地. 二次培養: 0.5% タンニンサ・ド基本培地に各試験窒素源を添加したもの (NaNO_3 及び $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ は 0.1g/50ml, アスパラギン酸及びグルタミン酸は 0.2g/50ml). 酵素力測定及びその表示法等は上記と全く同じ.

Fig. 5 に示す如く, 該酵素生産には無機窒素より有機窒素がより良好であるが, その中でアスパラギン酸, グルタミン酸は NaNO_3 や $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ に比して特に秀れている. 菌の増殖には有機窒素が無機窒素に比し, より有効に関係することが考えられるが, 炭素源としてのタンニン添加量は 0.5% の少量であり, 事実二次培養に用いた 2.25g (乾物として 420mg) の菌体量が, 第二次振盪培養 2 日目で 2.24g (乾物として 400mg) で殆んど増殖を示さず, むしろ菌体重量は減少している傾向にあつた. それ

にも不拘, アスパラギン酸, グルタミン酸の有機窒素の場合には甚しく該酵素生産を促した. かく本実験の二次培養では殆んど菌体量の甚しい増加は認められないので, 一応酵素生産に及ぼす菌体の増殖量の影響は無視し得ることが考えられる.

(4) 2, 4-ジニトロフェノールの添加が酵素生産に及ぼす影響

Table 2. Influence of 2,4-dinitrophenol on the decomposition of tannin during secondary culture.

Pre-culture ; 2 days in malt extract. Secondary culture medium : 0.5% tannin CZAPEK-DOX's medium.

| Age of secondary shaking culture in days | Control | | | | | D.N.P. (M/2500) | | | | |
|--|---------|----|-----|----|-----|-----------------|----|-----|----|---|
| | I | II | III | IV | V | I | II | III | IV | V |
| FeCl ₃ -colouring substances (Tannin and gallic acid) | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - |
| KCN-colouring substance (Gallic acid) | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - |
| Detection of gallic acid by paper chromatography | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - |
| Precipitate by quinine hydrochloride (Tannin) | - | - | - | - | - | (-) | - | - | - | - |
| Autolysis of mycelia | - | - | + | ++ | ### | - | - | - | - | - |

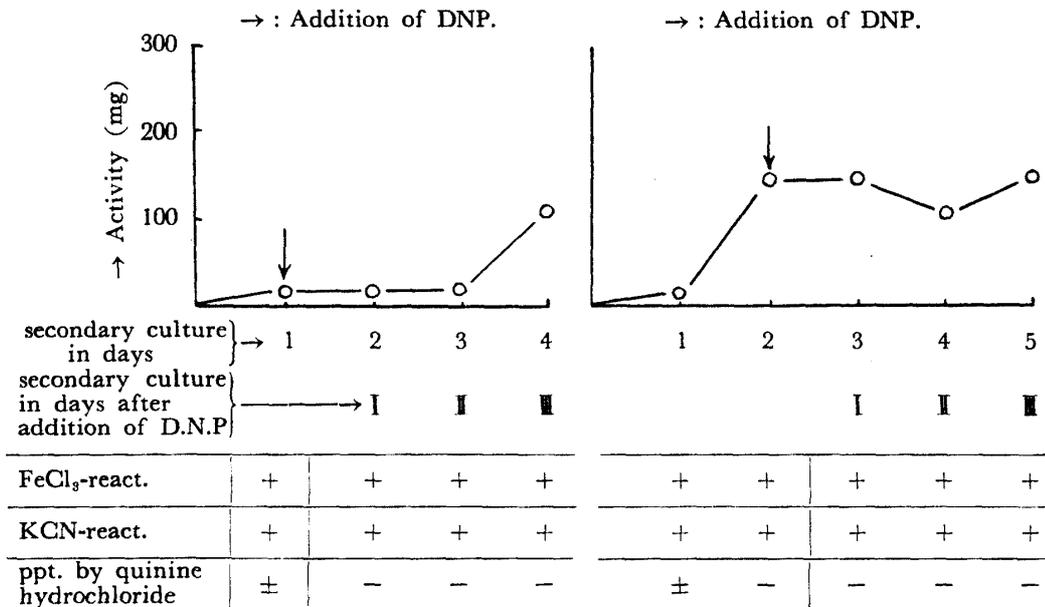


Fig.6. Influence of 2,4-dinitrophenol on the enzyme formation. (Activities of culture liquid are shown).

Pre-culture : 2days in malt extract. Secondary culture medium : 0.5% tannin CZAPEK-DOX's medium.

麦芽汁前培養2日からの菌体2.8g(乾物量530mg)使用。二次培養:0.5%タンニン-サ・ド培地。酵素力は培養液10mlが40°C, 24時間で分解するタンニン量で以て示した。

Table 2 に示す如く, 2,4-ジニトロフェノールの添加は, タンニンの構成成分への分解には余り影響しないが, タンニン分解の結果生じたフェノール性物質(没食子酸その他)の, その後の分解資化を長びかせ, 従つて酵素の生産期間を緩漫に延長せしめる。しかし Fig.6 に示す如く, 未だ酵素の充分に発現していない二次培養1日目の添加は酵素生産惹起の時期をおくらせるが, 既に発現した2日目の添加においては, その酵素活性を長く持続せしめる。既報⁹⁾の如く, タンニン及びタンニン分解産物没食子酸が培地中にて分解消失すると, 直ちにそれと平併して酵素活性が減少あるいは消滅する。本実験ではタンニンの分解によつて生じた没食子酸の資化が, 添加ジニトロフェノールによつて阻害されるために, 従つて基質に依存性の強い該酵素活性が(活性は余り強くはないが)長く持続的に生産発現しているものと考えられる。

(142)

(西羅) 液体培養におけるタンニン分解酵素の生産条件について (その2)

Table 3. Effects of various phenolic substances on the enzyme formation.

Pre-culture : 3 days in malt extract. Secondary culture : 3 days in Czapek-Dox's medium added with substance (0.3%) to be tested, unless other wise specified. Activity was measured acidimetrically⁶⁾ and expressed in per cent of tannin decomposed. ppt. : precipitate by quinine hydrochloride. Other conditions are the same as in Fig.7.

| Phenolic substances as inducer and the structures | Tannin (Penta- di-galloyl glucose) 0.6g/100ml | Gallic acid 0.6g/100ml COOH | Salicylic acid COOH | Protocate- chuic acid COOH | Benzoic acid COOH | Pyrocate- chin OH | Resorcin OH | Hydro- quinone OH | Pyrogallol OH | Phloro- glucin OH | Mixture of benzoic acid and pyrogallol | Reaction time (hrs.) and decomposition of tannin (%) |
|---|---|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|-------------------------|------------------|-------------------------|--|---|
| | | | | | | | | | | | | |
| 1 hrs. | 6.89 | 7.89 | 0.98 | 0.98 | 5.90 | 7.87 | 10.83 | 6.89 | 0.97 | 2.95 | 0.98 | |
| 3 | 14.77 | 14.77 | 3.93 | 2.46 | 8.86 | 3.93 | 11.81 | 9.84 | 11.75 | 6.89 | 2.95 | |
| 5 | 20.68 | 16.74 | 4.92 | 2.46 | 6.89 | 7.89 | 11.81 | 9.84 | 12.73 | 6.89 | 3.93 | |
| 7 | 24.62 | 16.74 | 6.89 | 2.46 | 6.89 | 7.89 | 6.89 | 6.89 | 24.48 | 2.95 | 3.93 | |
| 24 | 65.99 | 55.15 | 26.59 | 14.77 | 6.89 | 5.90 | 11.81 | 14.77 | 20.56 | 2.95 | 0.98 | |
| ppt. | - | ± | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| 48 | 76.82 | 71.90 | 33.48 | 29.54 | 13.78 | 17.72 | 22.65 | 26.59 | 22.16 | 7.89 | 14.77 | |
| ppt. | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| 24 | 70.91 | 65.95 | 2.95 | 14.77 | 0.00 | 0.98 | 0.98 | 0.00 | 0.97 | 0.00 | 5.90 | |
| ppt. | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| 48 | 84.70 | 79.77 | 14.77 | 22.16 | 6.89 | 18.71 | 8.86 | 7.89 | 4.92 | 14.77 | 7.87 | |
| ppt. | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |

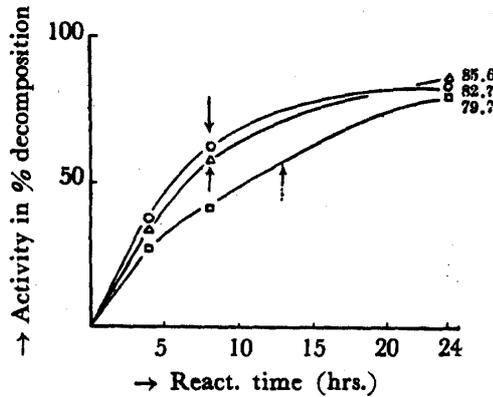


Fig. 7. Influence of Fe on the enzyme formation.

(Activities of mycelium extract are shown).

Pre-culture and secondary culture, —○— : CZAPEK-DOX's medium without FeSO₄, —△— : CZAPEK-DOX's medium with FeSO₄, —□— : CZAPEK-DOX's medium without FeSO₄, and with α,α'-dipyridyl in secondary culture. Arrows show the time-points at which precipitation by quinine hydrochloride became negative.

(5) 酵素生産に及ぼす鉄の影響

FeSO₄を除いたサ・ド培地(葡萄糖5%)にて前培養した菌体を更に FeSO₄を除去したタンニンサ・ド培地(タンニン0.5%)で二次培養し, 得た菌体の抽出液及び, 一方前記の二次培養液に α,α'-デピリジール(0.15%溶液を50ml培養基に対して10ml

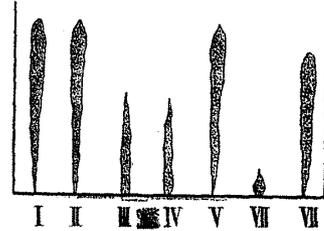


Fig. 8. Paper chromatograms of various tannin.

I ; chinese gallotannin. II : Turkish gallotannin. III : myrobalan tannin. IV : mimosarinde tannin. V : sumach tannin. VI : valonea tannin. VII : *Aralia chinensis* var. *grabrescens matsum* tannin. Developing method : one dimensional ascending method. Solvent system : n-BuOH-AcOH-HOH (4 : 1 : 1). Spray reagent : 0.1% FeCl₃ in 30% methanol.

Table 4. Inducing effect of three kinds of tannin.

Pre-culture : 3 days in malt extract. Secondary culture : 2 days in CZAPEK-DOX's medium with each tannin (0.5%). Other experimental conditions are the same as in Table 3.

| Tannin used in secondary culture as inducer | | Chinese gallotannin | | Turkish gallotannin | | Sumach tannin | |
|--|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------|
| Substrate of enzyme reaction | | Chinese gallotannin | Turkish gallotannin | Chinese gallotannin | Turkish gallotannin | Chinese gallotannin | |
| Reaction time (hrs.) and gallic acid (mg) formed from tannin (200mg) | Culture liquid | 2 hrs. | 3.4 | 6.8 | 0.0 | 0.0 | |
| | | 6 | 18.7 | 27.2 | 1.7 | 0.0 | 3.4 |
| | | 8 | 22.1 | 28.9 | 3.4 | 0.0 | |
| | | 24 | 107.1 | 59.5 | 30.6 | 39.1 | 11.9 |
| | | ppt. | — | — | + | + | + |
| | | 48 | 122.4 | 71.4 | 59.5 | 45.9 | 22.1 |
| | Mycelium extract | ppt. | — | — | + | + | + |
| | | 2 | 20.4 | 30.6 | 24.6 | 26.3 | |
| | | 6 | 49.3 | 42.5 | 52.7 | 49.3 | |
| | | 8 | 54.4 | 66.3 | 64.6 | 52.7 | 88.4 |
| | | 24 | 117.3 | 88.4 | 127.5 | 85.0 | 134.3 |
| | | ppt. | — | — | — | — | — |
| | 48 | 129.2 | 96.9 | 139.4 | 93.5 | 136.0 | |
| | ppt. | — | — | — | — | — | |

(144) (西羅) 液体培養におけるタンニン分解酵素の生産条件について (その2)

添加)を加え、二次培養した菌体の抽出液について、各酵素力を対照(前培養:通常のサ・ド0.5%葡萄糖培地、二次培養:0.5%タンニン-サ・ド培地)菌体抽出液と比較した。酵素力は酸滴定法によつて測定し、タンニンの分解率で示した。その結果は Fig.7 に示す如くで、該酵素生産には鉄の影響は余り考えられない。

(6) フェノール性物質の相違が酵素生産に及ぼす影響

前培養:麦芽汁にて3日培養。二次培養:サ・ド各試験物質0.3%(タンニンと没食子酸の場合は0.6%)添加培地にて、前培養菌体各1gを用い、3日培養。培養液及び菌体抽出液の酵素力測定は酸滴定法によつた。

その結果は Table 3 に示す如く、タンニン及び没食子酸以外は見るとべき酵素生産刺激を認めない。尚この酵素刺激の構造単位については後に考察する。

(7) タンニンの種類の相違がタンニン分解酵素生産に及ぼす影響

二次培養には、麦芽汁による前培養3日菌体2.8gを用いた。酵素力測定は酸滴定により、活性表示は200mgタンニンから酵素分解によつて生じた没食子酸のmg量で表わした。

各種タンニンの一次元ペーパークロマトグラムは Fig.8 に示す如くである。そのペーパークロマトグラムの類似している五倍子、没食子、スマックの各タンニンを用いて、前述の如き二次培養(各タンニン濃度は0.6%)を行ない、得た培養液及び菌体抽出液を酵素液として、タンニンの酵素的分解を行なつた結果は Table 4 に示す如くである。

構造上類似性のある没食子タンニン(Pentagalloyl glucoseが主成分)、スマック・タンニン(Pentagalloyl glucose)は五倍子タンニン(Pentadigalloyl glucose)と同様によく酵素生産を刺激する。ミロバラン(Chebulinic acid)、ミモサ(ワットル樹皮タンニン、Phloroglucin, Protocatechuic acidを主成分)、ヴェロニヤ(Ellagic acidの含量大)、タラ(タラノキのタンニン、Protocatechuic acidを含有)の各タンニンの、該酵素の生産に対する適応的の刺激効果は、前3者に比し、それ程強くはなかつた。尚五倍子タンニンの場合は培養液、菌体内共に強い酵素活性を認めたと、没食子、スマック各タンニンの場合は菌体抽出液の方により強い活性が認められた。

(附記) 麩固体培養における各種タンニンの添加が酵素生産に及ぼす影響

上記は液体振盪二次培養における場合であるが、既報^{1,2)}と同様の麩固体培養において、各種タンニンの添加の該酵素生産に及ぼす影響の相違を試験した。その結果は Table 5 に示す如くである。

Table 5. Effect of various tannins as inducers in solid culture with wheat-bran.

Quantity of tannin added: 0.2g/5g wheat-bran. Age of culture: 4 days. Preparation of enzyme soln.: the same method as in previous report³⁾. Decomposition of tannin (%) was measured by acidimetric method⁶⁾.

Marks, (+) and (-), show the positive and negative precipitation reaction, respectively, by quinine hydrochloride.

| Tannin used as the inducer | Decomposition of chinese gallotannin (%) | | | | | | | |
|----------------------------|--|---------------------|------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------|---------|
| | Chinese gallotannin | Turkish gallotannin | Myrobalan tannin | "Tara" tannin* | Mimosa-rinde tannin | Valonea tannin | Sumach tannin | |
| Reaction time (hrs.) | 1 | 24.6(+) | 24.6(+) | 18.4(+) | 12.3(+) | 6.15(+) | 12.3(+) | 6.15(+) |
| | 2.5 | 36.9(+) | 30.7(+) | 43.1(+) | 24.6(+) | 12.3(+) | 30.7(+) | 18.4(+) |
| | 5 | 61.5(-) | 39.3(+) | 59.1(-) | 55.4(±) | 30.7(+) | 43.1(+) | 43.1(+) |
| | 7 | 67.7(-) | 55.4(-) | 67.7(-) | 61.5(-) | 36.9(+) | 54.1(±) | 55.4(±) |
| | 9 | 68.9(-) | 67.7(-) | 67.7(-) | 67.7(-) | 43.1(+) | 61.5(-) | 55.4(-) |
| | 24 | 67.7(-) | 61.5(-) | 67.7(-) | 67.7(-) | 59.1(±) | 61.5(-) | 61.5(-) |

* *Aralia chinensis* var. *grabrescens* matsum tannin.

各タンニン添加量は5g麩に対して0.2g。酵素力測定は酸滴定法、活性の表示はタンニンの分解率で示した。

分子中に Gallotannin 構造を持つ五倍子、没食子、ミロバラン、スマック各タンニンは、いずれもよく酵素の生産を刺激するが、タラ、ミモサ、ヴェロニヤは劣る。但し液体振盪二次培養における程顕著な差は表われない。

考 察

既述の如く、該酵素は培地中に対応基質タンニンの存在する時にのみ所謂適応的に生産される酵素であるが、タンニンのみでなくその酵素的分解産物である没食子酸もタンニンと同様によく該酵素生産を刺戟する。没食子酸の構造から少なくとも該酵素生産刺戟には、ベンゼン核上の $-OH$ と $-COOH$ の両基の必要が考えられる。かかる関点から、生産刺戟の予想される各種フェノール性物質について、その効果を試験したのが Table 3 である。先づ $-OH$ のみの効果であるが、ベンゼン核上に 2 個の $-OH$ を有するブレンッカテキン、ヒドロキノン、レゾルシンは勿論、3 個の $-OH$ を持つフロログルシン及び没食子酸が脱炭酸された構造のピロガロールは共にその生産刺戟性は微弱である。従つて次に $-COOH$ 基の影響が考えられる。しかし $-COOH$ 1 個を持つ安息香酸には顕著な酵素生産刺戟は認められないので、 $-COOH$ 基単独の効果は考えられない。故に刺戟有効物質としては少なくとも $-OH$ と $-COOH$ の両基の必須性が推定出来る。しかしピロガロールと安息香酸の混合基質の場合も酵素生産を誘起せしめない。このことから $-OH$ と $-COOH$ とは同一ベンゼン核上に配置されていることが必要である。しかし同じベンゼン核上に $-OH$ と $-COOH$ の両基を持つサリチル酸、プロトカテキン酸にはその刺戟的效果が認められない事実から、少なくとも同じベンゼン核上に $-OH$ と $-COOH$ の両基を有し、且つ $-OH$ の数及びそれ等各基のベンゼン核上における配置が、該酵素の生産刺戟と重要な関係を持つているということが推定され、該酵素の生産刺戟の最小構造単位は没食子酸であると考えられる。

Table 5 の示すタンニンの種類の相違が酵素生産に及ぼす影響において、所謂 Gallotannin 結合を有する構造類似のタンニン (五倍子、没食子、ミロバラン等) はよく該酵素生産を刺戟する。しかしその構造が異なるミモサ、タラ、ヴァロニヤ等の各タンニンは該酵素の惹起効果が微弱である。この様な刺戟効果の強弱は麩固体培地におけるよりも、液体振盪第二次培養においてより顕著に認めることが出来る (上記フェノール性物質の刺戟試験においても同様の傾向が認められた)。これは恐らく培養方法の相違に原因する外に、固体培養の場合は、麩中に含有されることが予想される未知の物質特にフェノール性物質の影響に基因するものと推定される。

Table 4 に示される如く、五倍子と没食子の各タンニンは、培地への同量添加でも、没食子タンニンの方が酵素生産刺戟性が弱い。これは多分、五倍子タンニンは Pentadigalloyl glucose であり、没食子の方は Pentagalloyl glucose と考えられているように、タンニン中の構成成分として結合している没食子酸含量の多少に関係しているものと思われる。従つて没食子酸含量の少ない没食子タンニンの刺戟能が、没食子含量の大きい五倍子タンニンのそれよりも微弱であると言うことが考えられる。

尚タンニンと言つてもそのオリジンによつて構造は区々まちまちである。従つて従来所謂タンナーゼ (Tannase) と称せられている酵素が、これ等総てのタンニンと呼ばれている物質に作用するわけのものではなく、上述の如く、実際的にはガロタンニン (Gallotannin) 構造を持つているタンニン (典型的なものは五倍子、没食子の各タンニン) をよく分解するのである。(従つてこの点の混同を避けるために著者は、従来称せられている Tannase に Gallo- の語を附して、"Gallotannase" という呼名の提唱を考えているが、あらためて報告する予定である)。故にタンナーゼによつて分解され得るタンニンは、その分子中にガロタンニン構造を持つことは勿論であるが、一方或る未知タンニンが該酵素生産を顕著に刺戟するその様なタンニンであれば、その構造中に少なくともガロタンニン構造を含むと言うことが逆に推定出来るわけである。

要 約

Penicillium sp. No. 80B' 菌を用い、0.5%タンニン添加サベック・ドックス培地における第二次液体振盪培養によつて、該酵素の生産条件を検討して、次のことを明らかにした。

- (1) 前培養日数の長短は、菌の基質タンニンに対する適応能に影響を及ぼし、老細胞の場合は若細胞に比較して該酵素生産が早く惹起された。
- (2) 強い酵素生産には、窒素源の添加を必要とし、且つ $NaNO_3$ や $(NH_4)_2SO_4$ の如き無機窒素よりもアスパラギン酸、グルタミン酸の如き有機窒素がより有効であることが認められた。
- (3) 二次培養液への 2,4-チニトロフェノールの添加は、基質タンニンの没食子酸への分解には余り甚しい影響は認められないが、タンニンが分解して出来る没食子酸の其の後の代謝を阻害し、従つて酵素生産は弱いが、しかしその活性が比較的長く持続される。

(146) (前田, 江口) 酒類中の遊離L-グルタミン酸について

(4) 鉄の存在の有無は, 該酵素生産に対して, 殆んど影響がなかつた.

(5) 該酵素の生産を刺激する各種フェノール性物質について試験し, この酵素生産を惹起せしめる最小の構造単位は没食子酸であることを推定した.

(6) 五倍子タンニンと類似の構造を持つ没食子, スマック, ミロバラン等の各タンニンは, 五倍子タンニンと同様に, 該酵素生産を誘起せしめた.

(7) 該酵素の生産に対する各種フェノール性物質の効果, 構造を異にする各種タンニンの影響などの実験結果に基づいて, 該酵素の適応的生産を考察した.

終りに臨み, この研究を行なうに当つて終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜つた当教室麦林教授及び大阪市大福本教授に深謝致します. 又各種タンニンの貴重な資料を御恵与頂いた大日本製菓の小路治氏に厚く御礼申し上げます. 本報告の一部分は京都大学における昭和32年4月10日の日本農芸化学大会にて発表した. 尚“黴類のタンニン分解酵素に関する研究”第4報を“液体培養におけるタンニン分解酵素生産条件について”の(その1)とする.

文 献

- 1) 西羅, 麦林: 兵農大研報(農化編), 1, 6 (1953), 2, 1 (1955). 2) 西羅, 麦林: Ibid., 2, 87 (1956).
 3) 西羅: 本誌, 37, 85 (1959). 4) 西羅: 本誌, 37, 89 (1959). 5) 麦林, 西羅, 久保: 兵農大研報(農化編), 2, 5 (1955). 6) 西羅, 麦林: Ibid., 4, 39 (1959). 7) 蛋・核・酵: 2, 66 (1957) (第29回日本生化学会総会記). (昭和35, 9, 12 受付)

酒類中の遊離L-グルタミン酸について

前田 清一・江口 貞也 (味の素株式会社食品研究室)

Free L-Glutamic Acid Contents of Alcoholic Beverages

Seiichi MAEDA and Sadanari EGUCHI

(Food Research Laboratory, Ajinomoto Co. Tokyo Japan)

Free L-glutamic acid is believed to be one of the most important flavoring of alcoholic beverages. With this in mind, we have determined by microbiological assay methods the contents of free L-glutamic acid in alcoholic beverages including refined Japanese sake, synthetic sake, beer, wine, "mirin" (sweet sake) and "akazake".

The followings are our findings:

1) The contents of L-glutamic acid in alcoholic beverages widely differ according to the characteristics of the alcoholic beverages.

2) Refined Japanese sake and synthetic sake contain more of free L-glutamic acid than beer and wine. Also "mirin" and "akazake", used mainly for seasoning, contain more of free L-glutamic acid than refined Japanese sake and synthetic sake.

3) Japanese wine contains distinctly less free L-glutamic acid than foreign products. This may be attributed to a difference in the qualities of grapes used as raw materials in Japan.

結 言

酒類の旨味成分は各種アミノ酸, 有機酸, 糖類などであると推定されているが, 各種アミノ酸中グルタミン酸は酒類中の旨味成分として特に注目されるものの一つであるため, 酒類中の遊離L-グルタミン酸含有量については既に数種の報告¹⁻⁴⁾が発表せられているが, 本実験においては清酒, 合成酒, ビール, ブドー酒, 味淋, 赤酒などの遊離L-グルタミン酸含有量を微生物定量法により測定し, 比較検討を行なつた結果を報告する.