

## 耐酸性糸状菌によるアルコール蒸留廃液濃縮物からの 高力価ペクチナーゼの生産

嶋 田 協・大 野 博 幸・松 嶋 欽 一

High Level Pectinase Production from Distillers' Solubles by Acid-resistant Fungus

Kyo SHIMADA, Hiroyuki OHNO and Kin-ichi MATSUSHIMA

### 緒 言

微生物がペクチナーゼを生産することは古くからよく知られており、例えば、かび<sup>1)</sup>、酵母<sup>2)</sup> および細菌<sup>3)</sup> 由来のそれぞれ異種のペクチナーゼについて報告されている。また、その利用面についても、果汁の清澄化やみかんの剥皮などについての多くの報告がある<sup>4)</sup>。

本研究は、耐酸性糸状菌 (pH 1.5 に生育) の酵素についての研究の一環として行なったものである。今回はペクチナーゼ生産菌の分離と、分離菌によって生産された酵素を精製しその性質を調べた。本研究の特色の一つは、使用した培地が大麦のアルコール蒸留廃液の濃縮液 (商品名サングロス濃縮液, pH 3.5) である点であり、これを使用した理由は培地が強酸性であり、また、酵素の基質となるペクチン様物質を含有するためにペクチナーゼ生産に適していると考えられたからである。

### 実験方法

#### 1. 供試菌株

東北地方の強酸性地域 (第1表) の温泉や湖沼、その他の地方の普通の土壌などから、既報<sup>5)</sup> の方法で分離した耐酸性糸状菌 (pH 1.5 に生育) 約1,000株の中から、特に斜面培養の形態的に異なっている菌株400株を選び、ペクチナーゼ生産能を比較した。その中で最も強力な菌株を選び出し、本実験に供試した。

#### 2. 培 地

サングロス株式会社製の市販品サングロス濃縮液を使用した。この液は、大麦のアルコール蒸留廃液を約10倍に濃縮したものであり、その成分分析表を第2表に示し

第1表 耐強酸性菌の分離場所

青 森 県	恐山温泉, 宇曽利湖 (pH 2.0-2.3)
	下風呂温泉 (pH 2.6)
	駒込鉱泉 (pH 0.9)
	酸ヶ湯温泉 (pH 1.2-2.8)
岩 手 県	松尾鉱山赤川 (pH 1.8-2.6)
秋 田 県	玉川温泉 (pH 1.8-2.2)
宮 城 県	大深沢 (pH 3.2)
	潟沼 (pH 1.8)
山 形 県	蔵王温泉 (pH 1.3-3.6)
福 島 県	中の沢温泉 (pH 1.5)
	酸川 (pH 2.8)

第2表 サングロス濃縮液分析表

水	分	57.9	%
粗 蛋 白		16.0	%
粗 脂 肪		2.7	%
粗 灰 分		4.2	%
粗 纖 維		0.4	%
可溶性無窒素物		18.8	%
カルシウム		60.8	mg%
リ ン		77.0	mg%
pH		3.5	

た。

#### 3. 培養方法

ペクチナーゼ強力生産菌のスクリーニングの場合には、25%サングロス液 (原液を水で4倍に希釈) を使用した。この液 4ml を径 16.5mm の試験管に入れ、往復振とう培養機 (120回/分, 振幅 7cm) で 28°C, 4日間培養した。

本培養は上記サングロス濃縮液を水で適宜希釈して、その液 30ml を 100ml 容三角フラスコに入れ、28°C で回転振とう培養 (170回/分, 振幅 7cm) を行なった。

#### 4. 酵素活性の測定

培養液を濾過し、その濾液の酵素活性を測定した。基質として柑橘ペクチン及びペクチン酸を使用し、ポリガラクトナーゼ (PG) 活性は、pH 4.0 に調整した 0.5% ペクチン酸水溶液 1 ml に酵素液 0.1 ml を加え、40°C で 10 分間作用させて生ずる還元糖を 3,5-ジニトロサリチル酸法<sup>6)</sup> で定量し、ガラクトン酸 1 mg に相当する還元力を生ずる酵素力を 1 単位とした。ペクチン粘度降下活性は、pH 4.0 に調整した 2% 柑橘ペクチン水溶液 2 ml に酵素液 0.5 ml を加え、30°C、30 分間反応させた後、2 ml のオストワルドピペットを用いて流下時間減少の比較をする簡便法により測定し活性の計算は次の式により行なった。

$$A = (T_0 - T_s) / (T_0 - T_w) \times 100$$

A: 粘度降下活性 (粘度降下率%)

T<sub>0</sub>: 熱失活させた酵素を加えたときの流下時間 (秒)

T<sub>s</sub>: 酵素を加えたときの流下時間 (秒)

T<sub>w</sub>: 基質の代りに水を用いたときの流下時間 (秒)

#### 5. 蛋白質の定量

蛋白質は 280 nm における吸光度 (O.D. 値) によって測定するか、Lowry 法<sup>7)</sup> の銅フォールン呈色法により行ない、660 nm における吸光度で測定した。

#### 6. 菌の同定方法

種々の分類学的性質の同定は菌類図鑑<sup>8)</sup> および微生物の分類と同定<sup>9)</sup> の記載に従って検討した。

### 実験結果及び考察

#### 1. ペクチナーゼ生産菌の選択

供試した 400 株の糸状菌の中で、ペクチン粘度降下率 50% 以上を示した菌株数は 30 株であった。これらの菌株は *Penicillium* 属が主体であり、*Trichoderma* 属及び *Aspergillus* 属なども数株認められた。それらの菌株の中から優良菌株として 167 号菌を選択した。本菌の酵素はエステラーゼ活性 (Jansen らの方法<sup>10)</sup>) 及びリアーゼ活性 (石井らの方法<sup>11)</sup>) を殆んど示さず、ペクチン酸を基質としたポリガラクトナーゼ活性 (PG 活性) が主体であった。したがって、以後の実験ではペクチン酸を基質として、この PG 活性を測定した。

#### 2. ポリガラクトナーゼ生産菌株 (*Pen. thomii* SAB 901-167) の同定

前記 167 号菌の菌学的性質を検討した結果、次のよう

な性質を有することが明らかになった。

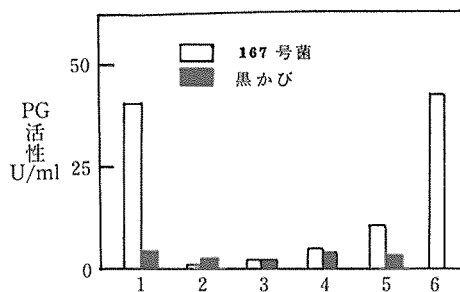
ツアベック寒天上のコロニーの発育は 28°C、1 週間後のコロニー径 2.2 cm、白色ビロード状、平滑な円型、2 週間後のコロニー径 6.5 cm、中心から 2 cm は淡緑白色分生子と気中菌糸のもり上がりが見られる。中心部は橙色の菌核を形成する。スライド標本の形態的性質は分生子柄 200~300 μm × 3~3.5 μm は基底菌糸層および気生菌糸から直生、わずかに粗面、先端部は少し太くなる場合もある。単輪生でファイアライド 9~11 μm × 2~2.5 μm、4~10 本、分生子 2~2.5 μm は短い楕円形、平滑、長い連鎖状を呈する。菌核は橙色ないし白色を呈し、50~150 μm の大きさである、最適生育温度は 26°C 付近、最適 pH は 3.5 近くにあり、生育可能 pH は pH 1.5~10.0 であった。

以上の菌学的性質を分類書<sup>8) 9)</sup> により検討し、また、当研究室の保存菌 *Penicillium thomii* Maire と較べた結果、本菌を *Penicillium thomii* series に属する菌株と同定し、これを *Penicillium thomii* SAB 901-167 と命名した (以下単に 167 号菌と略称する)。なお、この菌株は工業技術院微生物工業研究所に「微生物保管委託申請書受理番号第 6676 号 (FERM, P-6676)」として寄託した。

#### 3. ポリガラクトナーゼ生産条件

種々の液体培地を用いて 167 号菌の PG 生産量を比較した。本菌はサングロス培地に非常によく生育し、著量の PG を生産することが分かり (第 1 図)、この培地の使用は廃物利用の点からだけでなく、従来から酵素生産の優れた培地とされている穀麹培養法に匹敵する好適材料であると考えられる。

なお、対照に用いた黒かび (*Aspergillus niger* van



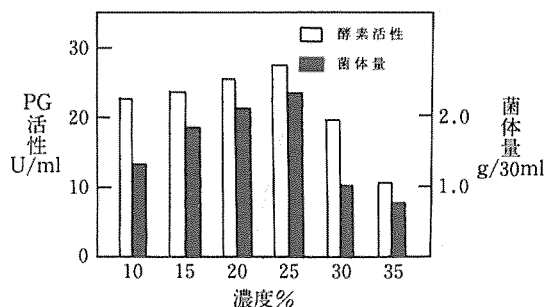
第1図 種々の培地におけるポリガラクトナーゼ生産

1. 25% サングロス 2. ツアベック液 3. スカ 2% 懸濁液 4. 小麦フスマ 2% 懸濁液 5. ブドウ糖・ペプトン 1% 液 6. 小麦フスマ固体培養 (10倍抽出液) (培地 30 ml, ロータリーシェーカー)

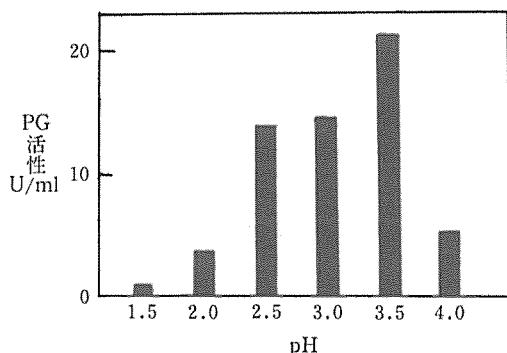
Tieghem) は生育は良好であったが、PG 生産は殆どなかった。

次に、PG 生産に及ぼすサングロス濃度の影響を第2図に示した。25%濃度(水で4倍に希釈)が最適であり、それ以上の濃度になると生育が悪くなり、PG 生産量も低下した。

さらに、25%濃度のサングロス培地の初発 pH を変えて PG 生産量を比較した結果、第3図に示したように、pH 2.5~3.5 の酸性側の培地が生産量が大きかった。また、10%サングロス培地に、ペクチン、ガラクトン酸、ブドウ糖などをそれぞれ0.1~1.0%添加すると、PG 生産量は僅かに増加したが、酵素の基質となるペクチン酸を添加すると PG 生産は激減し、0.1%添加区でも生産量は微量となった。窒素源として、硫酸、尿素、ペクトン、酵母エキスを0.1% (窒素として) 添加した場合には、菌の生育は良好となり、約2倍に菌体量が増加したが、PG 生産量は殆んど増加せず、逆に硫酸添加区では約30%減少した。結局、最適培地としては、サングロス



第2図 サングロス濃度とポリガラクトンナーゼ生産 (培地 30 ml, ロータリーシェーカー)

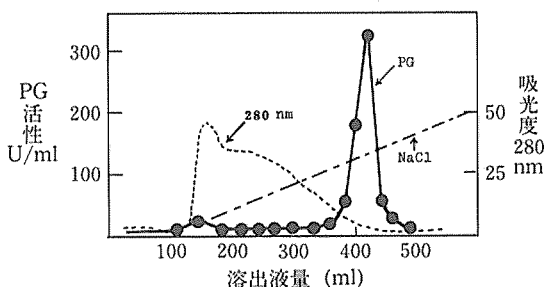


第3図 培地の初発 pH とポリガラクトンナーゼ生産 (培地 30 ml, ロータリーシェーカー)

液を単に水で希釈し10~25%濃度にするだけで充分であることが分かった。

#### 4. 精製酵素の性質

酵素の精製は10%サングロス液で167号菌を振とう培養し、得られた3 l の培養液 (PG 活性39,960単位、比活性 0.86 U/mg) にアセトン50%を加え、酵素を沈澱させ、Sephadex G-50 でゲル濾過し、ついで第4図に示したように SP-Sephadex C-50 カラムに吸着、溶出し、10%の収率で精製酵素 (3,860単位、比活性 750 U/mg) を得た。これをアクリルアミドスラブゲル電気泳動にかけたところ単一の酵素蛋白のバンドを示した。

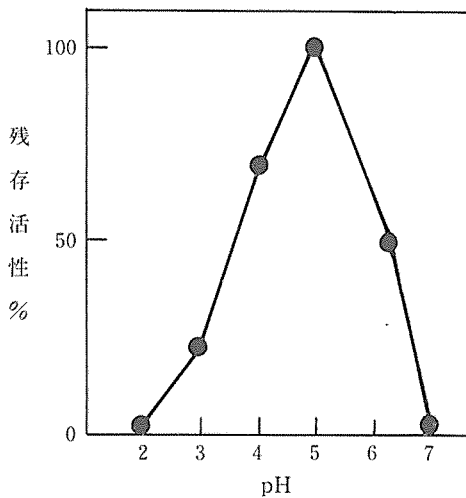


第4図 SP セファデックス C-50 によるポリガラクトンナーゼの精製 (カラム: 2.5×30 cm, 0.02 M 酢酸緩衝液, pH 4.0)

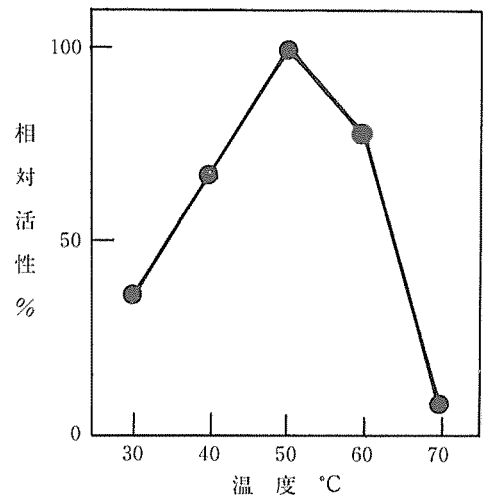
得られた精製酵素の分子量は沈降平衡法により約34,000と算出された。基質に対する作用は、ペクチン酸に特によく作用するが、ペクチンを基質とした場合には、ガラクトン酸の生成活性はペクチン酸の場合の約4%にすぎず、メチルエステルの存在が加水分解反応を低下させると考えられる。また、ペクチン酸からの生成物をペーパークロマトグラフィーにより調べた結果、本酵素はエンド型のポリガラクトンナーゼであることが分かった。

ペクチン酸を基質とした場合の酵素的な性質について第5図~第8図に示した。それぞれの性質をセルロシン (*Aspergillus niger* の市販酵素標品, 上田化学 KK) と比較して実験した結果作用最適 pH は5付近であり、セルロシンの最適 pH 4 付近よりアルカリ側であった。

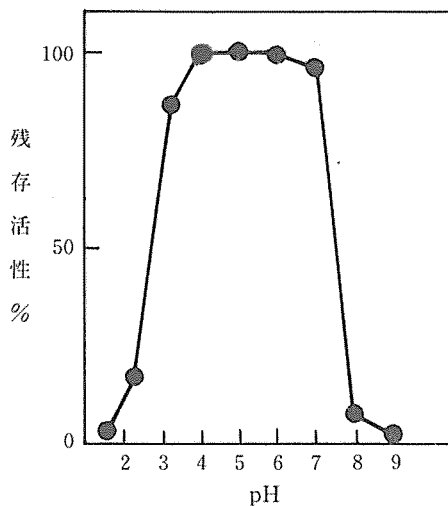
pH 安定性は、30°C, 17時間後の残存活性を測定すると、第6図のごとくであり、セルロシンに較べて酸性側で不安定であった。最適温度は第7図に示すごとく、50°C 付近にあり、セルロシンの場合とほぼ同様であったが、熱安定性は第8図に示すように 50°C, 10分で失



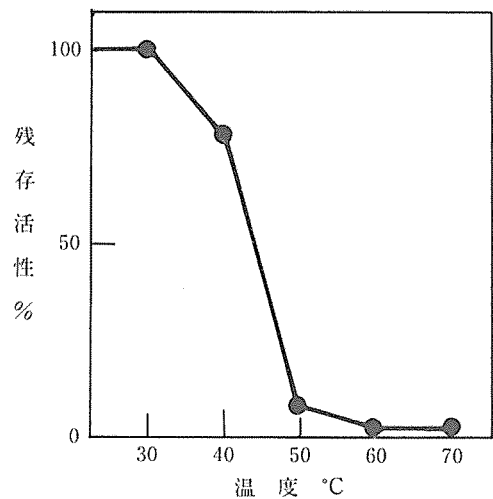
第5図 ポリガラクトナーゼの至適 pH  
(40°C, 10分反応)



第7図 ポリガラクトナーゼの至適温度  
(10分反応)



第6図 ポリガラクトナーゼの pH 安定性  
(30°C, 17時間処理)



第8図 ポリガラクトナーゼの耐熱性  
(10分処理)

活し、セルロシンよりも不安定であった。

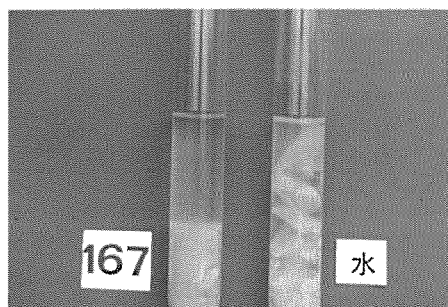
##### 5. 本菌の酵素利用に関する一考察

ペクチナーゼの利用の一つとして、みかん内果皮の除去が考えられているが、本酵素がその目的に適しているか否かを試験した。第9図に示したごとく、本菌の培養液を5倍に希釈した濃度でも、2時間後には内果皮がその原型を保っておらず、強力な崩壊活性を有することが分かった。したがって、みかんの剥皮に本酵素を利用することが可能であるが、この点について、さらに本酵

素の諸性質を市販の種々のペクチナーゼ標品の性質（パンフレット）と比較したのが第3表である。著者らの *Penicillium* ペクチナーゼは他のカビのペクチナーゼよりも、最適 pH 及び安定 pH はアルカリ側にあり、また温度安定性も劣っており、新ペクチナーゼであることが分かった。このように pH 3.5 以下で不安定であり、失活することから、みかん内果皮を剥皮処理する際に本酵素を用いれば、処理後微量の pH 調整剤（塩酸水溶液など）の添加により酵素反応を停止させることが可能

第3表 精製酵素と市販酵素との性質の比較

酵 素 (製造会社名)	167 号 菌 精製ポリガラクトナーゼ	市 販 ペ ク チ ナ ー ゼ 標 品		
		可溶性ペクチナーゼ (田辺製薬KK)	可溶性スクラーゼS (三共KK)	ペクチナーゼ (東洋醸造KK)
菌 種 名	<i>Penicillium thomii</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Coniothyrium diploidiella</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
最 適pH	5.0	3.5~4.5	3.5~4.5	2.5
最 適 温度	50℃	40~50℃	45~50℃	40~50℃
pH安定性	4.0~7.5	3.0~5.0	3.0~5.0	2.0~8.0
熱安定性	30℃	40℃	40℃	50℃



第9図 みかん内果皮崩壊作用

内果皮3袋, 40℃, 2時間作用

167: 167号菌培養液の5倍希釈液 10 ml

水: 酵素の代りに水 10 ml を対照とした。

であり、みかんの砂のうまでも分解して製品の劣悪化の原因となる残存酵素の影響を少なくすることが出来る。したがって、他の酵素剤と比較して有利であると考えられる。

なお、本菌のポリガラクトナーゼ生産能と他の菌の生産能とを比較するため、辻阪ら<sup>12)</sup>の報告と同様にし、数培養により酵素を生産させて測定した結果、同報告の優良菌と同程度の生産能を有することが分かった。

### 要 約

1. 耐酸性糸状菌400株の中からポリガラクトナーゼ生産能の高い菌株を選び出し、その菌学的諸性質を検討した結果、*Penicillium thomii* seriesに属する菌株であることを同定し、*Penicillium thomii* SAB 901-167と命名した。

2. 本菌のポリガラクトナーゼ生産条件について検討した結果、サングロス液（大麦アルコール蒸留廃液の濃縮液）の25%濃度の培地が最も生産量が高く、固体培養の小麦フスマに匹敵する好材料であることを明らかに

した。この培地を用いた場合、他の炭素源や窒素源を添加してもあまり酵素生産量は増加せず、ペクチン酸や硫酸の添加によりかえって生産量は激減した。また、培地のpHを2.5~3.5とした場合に生産量は最も高かった。

3. 本菌のポリガラクトナーゼをSP-Sephadex C-50カラムクロマトグラフィーにより精製し、電気泳動的に単一の標品とした。この精製酵素の分子量は約34,000であり、ペクチン酸に特によく作用するエンド型のポリガラクトナーゼであることが分かった。

4. 酵素的な諸性質は最適 pH 5.0、最適温度 50℃、pH安定性4.0~7.5および熱安定性は30℃であり、他の市販のペクチナーゼ（*Aspergillus niger*, *Coniothyrium diploidiella*, *Fusarium moniliforme* 由来）と較べてかなり不安定な酵素であることが分かった。

### 謝 辞

本研究を行なうにあたり、菌株の同定に御協力頂いたサントリー株式会社天知輝夫氏に感謝いたします。

本研究の一部は昭和55、56年度文部省科学研究費補助金エネルギー特別研究によって行なわれた。

### 文 献

- 1) 斉藤日向, 蓑田泰治, 丸茂博太: 農化, **28**, 810, 1954.
- 2) DEMAIN, A. L. and H. J. PHAFF: J. Biol. Chem., **210**, 381, 1954.
- 3) 梶 明: 農化, **27**, 699, 1953.
- 4) 相沢孝亮, 小野正之, 手塚隆久, 柳田藤治: 酵素利用ハンドブック, 東京, 地人書館, p. 323, 1980.
- 5) 松嶋欽一, 森 育久, 伊藤成人, 嶋田 協: 農化, **54**, 875, 1980.
- 6) BITTER T. and H. M. MUIR: Anal. Biochem., **4**, 330, 1962.
- 7) LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and

- R. J. RANDALL: J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
- 8) 宇田川俊一, 椿 啓介: 菌類図鑑 (下), 東京, 講談社, p. 1117, 1978.
- 9) 長谷川武治: 微生物の分類と同定, 東京, 東京大学出版会, p. 9, 1975.
- 10) JANSEN E. F. and L. R. MACDONNELL: Arch. Bio-chem., 8, 97, 1945.
- 11) 石井茂孝, 川村 敏, 横塚 保: 農化, 44, 299, 1970.
- 12) 辻阪好夫, 奥村 晋, 竹西繁行, 岡田茂孝: 醗酵 51, 464, 1973.

### Summary

A fungus which is capable of producing high level of pectinase (Polygalacturonase) from distillers' soluble was selected among 400 strains of acid-resistant fungi. The fungus was found to belong to *Penicillium thomii* on the basis of taxonomic observations and named *Penicillium thomii* SAB 901-167.

The effects of culture conditions on the galacturonase production by the fungus were studied. 25% "SANGUROSU" (a distillers' soluble from Suntory Limited) liquid (pH 3.5) was the best condition for the enzyme production.

The enzyme was purified by acetone precipitation, Sephadex G-50 gel filtration and SP-Sephadex C-50 column chromatography. The purified enzyme was homogenous in polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 34,000.

Optimum pH and temperature of the enzyme activity on pectic acid were found to be pH 5.0 and 50°C. The enzyme was unstable at below pH 3.5 and at above pH 8.0 (30°C, 17 hr), and its activity was gradually lost by standing at 40°C (pH 5.0).