

まれる。

その成分を表3に示した。

表3 クエン酸抽出粕の成分

試料	K		T	
	風乾物中 %	無水物中 %	風乾物中 %	無水物中 %
水分	12.52	—	17.45	—
粗蛋白質	3.16	3.61	2.95	3.57
粗脂肪	1.71	1.95	1.18	1.43
粗繊維	35.94	41.08	39.59	47.96
粗灰分	10.36	11.84	4.51	5.46
可溶性無窒素物	36.31	41.54	34.32	41.57

クエン酸発酵の原料はでんぷん粕と米ぬかであり、その中ででんぷんがクエン酸となり、それが抽出回収されたもので、利用されなかった炭水化物、蛋白質のほか、菌体を含み繊維が多い。これは加圧蒸煮され、カビの作用も受けているので、バガスや他の植物茎葉に比べて消化し易い形になっている。

吸着性に富み、風乾物は、その5倍量の水を吸着保持することが出来る。従って、フィッシュ

ミールなどを原料とする吸着飼料の担体として最も適している。

表3で灰分含量に差があるのは、原料の生でんぷん粕の脱水処理の際に添加する石灰量の差によるものと考えられる。

〔あとがき〕

南九州地区に特有な発酵廃粕である甘しょうしょちゅう蒸溜粕とクエン酸抽出粕との一般分析を行なった。前者は未処理のままで、固型分が約6%あり、蛋白質に富み酵母菌体、ビタミンB群、UGFも含むので、家畜飼料として有効に利用出来る。貯蔵、脱水など検討すれば、その価値は更に増大するであろう。クエン酸抽出粕は、吸着保持力がすぐれており、栄養成分も残っているので、吸着飼料の原料として利用出来よう。

〔文献〕

- 1) 西田, 山田, 醸学11, 261 (1933)
- 2) 東大, 農芸化学実験書(上) ほか
- 3) 天野, 水沼, 金井, 発協23, 177(1965)
- 4) 日比野, 飼料工業ハンドブック P54

4.2.7 微生物の生産する酵素によるでん粉製造(第3報)

Cl. acetobutylicum S-1の生産する各種酵素組成について

浜崎幸男

〔まえがき〕

筆者は Cl. acetobutylicum S-1 がよく生いもに作用してでんぷんを遊離することに興味をおぼえ、そしてその作用が体外酵素によって起きることを認め報告した¹⁾。そして1)この細菌の生産する酵素剤を使用してのでん粉製造に関しての基礎的な知見を得ること, 2)食品加工への利用, 3)植物組織の軟化崩壊の機構を明らかにすることを目的として研究をすすめている。

本報においては、この菌が生産する酵素を硫酸塩析, エタノール沈澱によってとり出し主としてペクチン質分解酵素, およびセルラーゼ系酵素の性質について実験した結果を報告する。

実験の方法

I 酵素液の調整

Cl. acetobutylicum S-1 の砂培養を馬鈴

薯—硫酸培地²⁾ 10mlに接種し 80°で10分間加熱処理を行ない嫌気培養する。30°で約40時間培養した後同一組成の培地1ℓに移植, 同様に30°で約40時間培養する。培養後ガーゼで濾過し, 6,000 r.p.m.で15分間遠心分離を行ない得られた上澄液を酵素原液とし実験に供する。硫酸塩析は原液300mlを使いこれに0.9飽和になる様に硫酸を加えて塩析を行ない, 12,000 r.p.m.で15分間遠心分離し, 沈澱物を蒸留水に溶解しM/100-酢酸塩緩衝液(pH 6.0)を外液として氷室中で一夜透析を行ない水で100mlにした。またエタノール沈澱は70%飽和を行ない硫酸の場合と同様に処理した。

II 酵素作用力の測定法

1 ペクチン分解酵素力の測定法

Endo-型: 1%のペクチン(柑橘, 東京化成)およびペクチン酸(東京化成)を含有する

M/10-酢酸塩緩衝液 (pH 6.0) 10mlに各酵素液 1 mlを加えて 35°で60分間反応させた後、煮沸して反応を停止し、オストワルド粘度計で 30°で粘度を測定、粘度低下率 (A%) を次式により求めた。

$$A(\%) = \frac{A_0 - A_2}{A_0 - A_1} \times 100$$

A₀: 基質+不活性酵素液, A₁: 水+

不活性酵素液, A₂: 基質+酵素液

Exo-型: 1% のペクチンおよびペクチン酸を含有するM/10-酢酸塩緩衝液 (pH6.0) 20mlに各酵素液 4 mlを加えて30°で24時間反応させ、直ちに Willstätter-Schudel 法により還元力を測り、遊離ガラクトン酸として求めた。

ペクチンエステラーゼ力: 平底試験管に直径 11mm 厚さ1.5mmの馬鈴薯切片を1枚入れこれに酵素液 1 mlを加えて 35°で反応を行なう。一定時間後、一方の端を平らにしたガラス棒で軽く押えつけ切片がつぶれたときを反応終了とし(分)で表わした。各試験区ごとに2本平行して行ないその平均をとった。

2 セルラーゼ力測定法

汙紙糖化力: 東洋汙紙製のクロマト用

Cellulose powder 50mgに2/10M-酢酸塩緩衝液 (pH 6.0) 5 ml, 酵素液 5 ml, トルオール 0.5ml をL型試験管に入れ、モノード型の恒温振盪培養器 (70r.p.m 振幅45mm) で35°6時間反応させたのち Somogyi 法により還元力を測定し、グルコースとして表わした。

汙紙崩壊力: L型試験管に東洋汙紙No. 2, 10×10mmの切片を2枚入れ、酵素液 5 ml, トルオール0.5mlを加えて35°で8時間作用させた。崩壊度は次式により求めた。

$$\text{崩壊度}(\%) = \frac{\text{作用後の面積}}{\text{作用前の汙紙の面積}} \times 100$$

CMC作用力: 0.6%のCMC (半井化学)を含んだM/10-酢酸塩緩衝液10mlに酵素液 1 mlを加えて 35°で60分間反応させる。後10分間煮沸して水冷後30°で粘度を測定しA%を求めた。また同じCMC溶液10mlに酵素液 2 mlを加え、35°で 60分間反応させた後 1 N-NaOH 1 mlを加えて反応を停止し、Somogyi 法で還元力を測定する。

マンナーゼ: 糊料として市販されているメイ

プロガム (商品名, 主としてガラクトマンナンより成る。) をそのまま使用し, CMCの場合と同様に実験を行ないA%および還元力を測定した。

キシラーゼ: 0.3%のキシラン(東京化成)を含むM/10-酢酸塩緩衝液 (pH 6.0) 10mlに酵素液 2 mlを加え, 上記の場合と同様に行なった

III 果汁に対する清澄作用

ミカンおよびリンゴの搾汁液を煮沸, 遠沈して沈澱物を除き, 上澄液10mlに酵素液 1 mlを加えて30°で24時間反応させ肉眼で観察した。

結果および考察

ペクチンおよびペクチン酸に対するEndo-型Exo-型の酵素 および ペクチンエステラーゼ力を一括して表1に示す。

		原液	エタノール沈澱区	硫安沈澱区
Endo-型 (A%)	ペクチン	31.93	21.43	15.93
	ペクチン酸	3.66	6.21	—
Exo-型 ウロン酸 mg/5ml	ペクチン	4.78	6.83	2.24
	ペクチン酸	1.07	3.33	5.13
ペクチン エステラーゼ N/50-NaOH/ml	ペクチン	0.24	0.60	0.63

表1 ペクチン分解酵素力

この表よりEndo-型の酵素においては, エタノール, 硫安両沈澱区とも原液に対する活性の低下が認められた。また硫安沈澱区ではペクチン酸に対する作用は殆んど認められなかった。この傾向は再度の実験においても認められた。これは硫安の飽和度を 100%にした場合でも同様な結果を得ている。ペクチンに対するEndo-Polygalacturonase (以下Endo-PGと略す)の低下は透析によって補欠分子が失われたためか, あるいはそれぞれの塩析濃度がいまだ不十分なために酵素の回収が十分行われなかったのかその原因は明らかでない。梶等は和紙原料の有効な醗酵精練菌としてクロストリヂウムに属する4菌株を分離し, そのPG作用に対してNi, NaCl 等が賦活作用のあることを認めている³⁾。またペクチンエステラーゼを完全に除去したEndo-PGがペクチンに対しても若干作用することも知られているが表1に示すようにペクチンエステラーゼ (PEと略す) 活性はエタ

ノール沈澱区、硫安沈澱区とも原液に比して高められているにもかかわらずその効果が粘度低下に影響していない。Nagel and Vaughn⁴⁾は *Bacillus polymyxa* についての研究で透析中にその活性がかなり低下することを指摘し、これはあるcofactorが透析により失われたかあるいは、変化したためであろうとしている。そしてその一つとして Ca^{++} の効果を認めている。またこの表からも分るようにペクチンおよびペクチン酸に対するこの菌の酵素作用は後者よりも前者に対して粘度低下、還元基の生成がともに大きくこの点棍等が分離した菌と特徴を異にしている。Seegmiller and Jansen⁵⁾ は市販の酵素剤を水抽出して硫安で 0.9飽和となし、ついでこの沈澱物を硫安で 0.4飽和を行ないこの操作をくり返すことによりペクチン酸よりペクチンに対する粘度低下活性力が大きい標品を得て Polymethylgalacturonase (以下PMGと略す) としている。そしてその最適pHは6.0附近であることを報告している。筆者の場合においても別の実験でペクチンに対する粘度低下率の最適pHは6.0であった。しかし表1でみられるようにPE活性も認められるので彼等のPMGに相当するような酵素であるかどうかは今後精製を行なった上で検討する必要がある。

なおまた、ペクチンに対する粘度低下率が低いことからしてmacerating enzymeがPG作用を示しているのではないかとも思われる⁶⁾。

次に表2にマセレーション力について示した

区 別	分	75	85	95	105
原 液	1	—	+	++	
	2	+	+	++	
エタノール区	1	—	++		
	2	+	++		
硫 安 区	1	—	—	+	++
	2	—	+	+	++

表2 マセレーション力

—: 変化なし +: 割れ目を生ずる
++: 完全に砕ける

表2で明らかなようにエタノール沈澱区が硫

安塩析区より、マセレーション力が高いことが観察された。棍は、*Cl. felsineum* の macerating enzyme と PG をイオン交換樹脂を使って分別し前者が植物組織を崩壊させることを述べている⁷⁾。またカビによる場合には Endo-PG と ペクチンエステラーゼとの共同作用であるとも考えられているが、硫安塩析による場合に何故マセレーション力が弱くなるかは表1にみられる Endo-PG 作用の低下によるのか、または透析によって活性が低下するためかは今後の検討にまつべきものと考えられる。さらにこの菌の果汁清澄作用をみるために、ミカン、リンゴ果汁を作製し作用させたがいずれも効果はなかった。これは恐らくpHによるものと考えられる。これらの酵素作用の大体は中性附近にあるものと推測される。果汁の清澄にはいろいろの原因が考えられるが、主としてペクチン分解酵素が関与していることは明らかなようである⁸⁾。このことから考えるとこの菌のペクテス分解力が非常に弱いためであるとも考えられる。次にカビの生産するセルラーゼについては多くの研究があり、その酵素剤も市販されているが筆者は植物とくに甘藷に直接作用してでん粉を遊離せしめる現象をペクチン分解酵素およびセルラーゼ系の酵素について総合的な立場から検討をすすめているものである。濾紙崩壊力ならびに濾紙糖化力、CMCに対する液化力および糖化力を表3にまたメイプロガム、キシランに対する結果を表4に示した。これで見ると濾紙に対する崩壊力は原液ではその作用が僅かに認められたにすぎないが、エタノール沈澱、および硫安塩析により明らかに作用が認められ特に後者において著しかった。これに反して濾紙に対する糖化力の面ではエタノール沈澱区では原液の約3.7倍に達しているのに対して硫安塩析区では僅かにその1/10しか認められない。エタノール、硫安区は原液の約3倍に濃縮されていることを考えると後者におけるこの現象は顕著なものである。

一方CMCに対する液化力、糖化力ではエタノール、硫安区においては 大差は認められない。

	原液	エタノール区	硫酸区
濾紙崩壊度(%)	—	43.17	75.4
セルローズパウダー糖化力(グルコース) $\text{mg}/10\text{ml}$	1.315	4.832	0.135
液化力(A%)	93.43	97.46	96.04
C M C 糖化力(グルコース) $\text{mg}/10\text{ml}$	3.559	5.735	5.224

表3 濾紙に対する作用力およびCMCase力

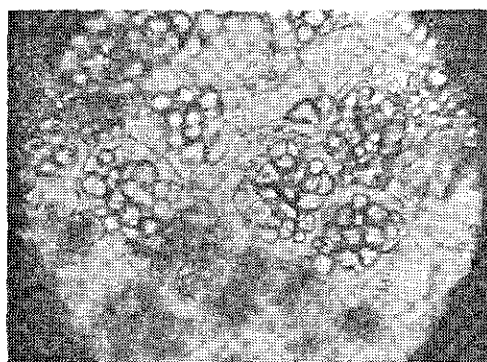
	原液	エタノール区	硫酸区
メイプロガム 崩壊力(A%)	6.564	77.54	80.29
還元力	0.500	1.303	0.93
キシラン還元力	3.012	4.075	3.718

表4 メイプロガム、キシランに対する作用

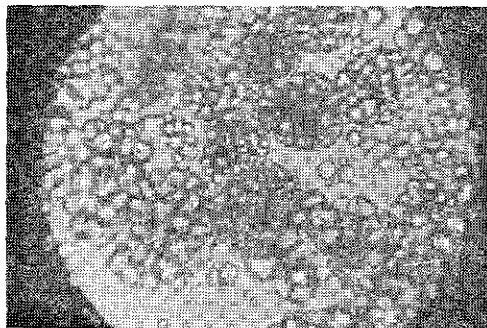
表4に示したメイプロガムはイナゴマメから作られたものと聞いている。イナゴマメ・ガラクトマンナンは β -1,4-マンナンを主鎖とし、これに6- α -ガラクトシル基が側鎖として結合(ガラクトース残基/マンノース残基:約 $\frac{1}{6}$)した比較的単純な構造の複合多糖類である⁹⁾。メイプロガムに対して粘度低下率が大きいことは、でんぷんに対する α -アミラーゼ、ペクチンまたはペクチン酸に対するendo-PG作用と同様に考えて、 β -1,4結合を数個のマンノース単位に切っていく酵素作用のあることを指示している。セルラーゼは複雑な性質を有し、その酵素組成についても現在種々の説がある。ここでは表3にみられるようにこの菌のセルラーゼ系酵素では濾紙およびCMCの両方に共に働く酵素を含んでいるが後者に対する作用が一層強いものであると考えられる。そしてCMCaseの基質に対する特異性が広いためこの酵素が濾紙にも作用しているのかも知れない。すなわちこの酵素は広い特異性を持ちそのためにC₁(天然セルローズに対する作用力)とC_x(CMCに対する作用力)の両方の性質を持っていることも考えられるがこの点についてはなお検討する必要がある。一般に細菌によるセルラーゼ産出は増殖後期に培養液中に著しい量のセルラーゼが遊離されるといわれている¹⁰⁾。本実験においては培養時間を約40時間と定めてすすめているがこの点についての検討も又ペクチン分解酵素およびセルローズ分解酵素産生の面から必要であろうと考える。

最後に甘藷切片に作用させた場合の顕微鏡写真を図1に示す。これによれば最初みられた細胞膜が消えてでんぷん粒が遊離していることがわかる。外山等は¹¹⁾ *Trichoderma cellulase* についてセルラーゼ成分とそれらの植物細胞壁分解性について研究を行ない植物性食品の柔組織の細胞壁の分解に最も寄与するセルラーゼは濾紙崩壊性セルラーゼであると述べている。本実験によりこの菌にも濾紙崩壊性セルラーゼの存在が明らかとなったが、更にこれら酵素の分離精製を行なった上でないと外山等の結果と一致するとは断言できない。

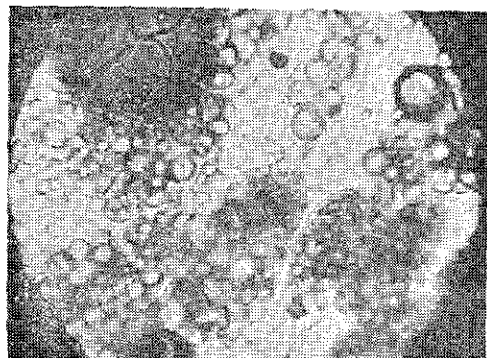
図1



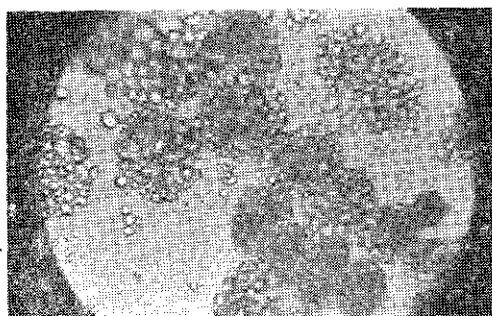
原液 0時間



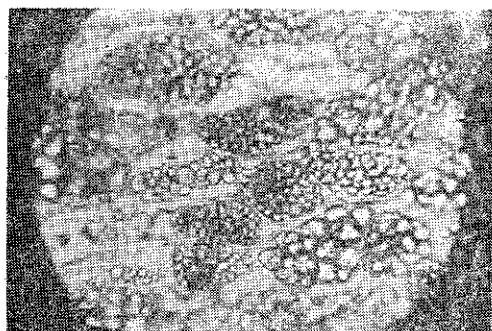
原液 20時間



アルコール区 0時間



アルコール区 20 時間



硫安区 0 時間



硫安区 20 時間

あとがき

Cl. acetobutylicum S-1 の有する酵素組成について、エタノールによる沈澱、および硫安塩析によって粗酵素標品を得た。これを使ってペクチン質分解酵素およびセルラーゼ系酵素

について検討した結果次のことが明らかになった。

- 1 ペクチンおよびペクチン酸に対する粘度低下率は一般に弱く特に後者に対する作用力は微弱であった。また Exo- 型の酵素作用も存在し、ペクチンエステラーゼ力は僅かであるがその存在が認められた。
- 2 マセレーション力は認められたが果汁に対する清澄作用は認められなかった。
- 3 濾紙に対する作用力、CMCase, ガラクトマンナーゼ, キシラナーゼの存在が明らかとなった。
- 4 甘藷切片に対してはいずれも作用力を有しでん粉の遊離を顕微鏡写真によって認めた。

文 献

- 1) 浜崎幸男, 松久保好太朗, 川原一, 昭和39年10月, 日農化西日本支部大会発表 (宮崎)
- 2) 本江元吉, 長田健: 農化, 32, 454 (1958)
- 3) 梶 明: 農化, 27, 699 (1953)
- 4) C.W. Nagel and R.H. Vaughn, Arch. Bioch. Biophys. 93, 344 (1961)
- 5) Seegmiller C.G. and Jansen, E. F.; J. Biol. chem. 195, 327 (1952)
- 6) Akira Kaji; Bull. Agr. chem. Soc. Japan, 23, 131 (1959)
- 7) Akira Kaji; ibid, 20, 8 (1956)
- 8) 真部正敏, 梶 明, 樽谷隆之: 食品工誌, 13269 (1966)
- 9) 柴田有康, 長山久美子, 富金原孝: 昭和41年日農化大会講演要旨集 P88
- 10) 丹羽富造, 西沢一俊: 醸工協誌, 23, 485 (1965)
- 11) 小川喜八郎, 外山信男: 醸工, 43, 661 (1965)

4. 2. 8 微生物の生産する酵素によるでんぶん製造 (第4報) 2・3の黒カビの生産するペクチナーゼ系酵素および セルラーゼ系酵素について

浜 崎 幸 男

まえがき

筆者は前報において 甘藷精練菌 Cl. aceto-
butylicum S-1 の産生する酵素についてそ
の組成を調べ明らかにした。細菌以外の微生物

によっても生いもから直接でんぶんを遊離せし
めるものが見出されている。例えば外山等の
Trichoderma 属および Asp. niger 製剤等があ
る。Asp. niger 製剤にはアミラーゼが含まれ