

その結果分離糸状菌の中から *Aspergillus* 属に属する二株 (*Asp-C*, *Asp-E*) 及び *Penicillium* 属に属する一株 (*Penicillium* PN) 計三株を顕著なペクチナーゼ生産株として選択した。その作用力は第1表の如くである。

| 菌 株 | 作用力 (A _{30'}) |
|------------------------------|-------------------------|
| <i>Aspergillus</i> C strain | 65.8 |
| <i>Aspergillus</i> E strain | 78.5 |
| <i>Penicillium</i> PN strain | 91.7 |

この結果 *Penicillium* PN 菌が最も有用であると認

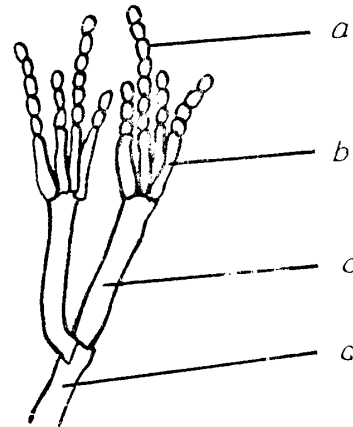
められたので該菌について諸性質を検討した。

2. 有用菌の諸性質

分離選択せるペクチナーゼ生成力の最も強力であつた *Penicillium* PN 菌の形態学的及び生理学的諸性質に就て調べた。

1) 形態的特徴としては顕微鏡写真第1図及びその模式図に示す如く *Penicillus* の分岐は不整齊状で余り拡大せず菌糸は毛氈状である。従つてほぼ *Asym-metrica* 群の *Velutina* グループに入るものと考えられる。

2) 培養的特徴について観察すると麴汁寒天培地で



第1図 *Penicillium citrinum* PN (×600)

a : conidia c : sterigmata
b : metulae d : conidiophore

はコロニーの色相は最初黄色であり、日数経過と共に暗青緑色となり、年輪状コロニーを形成し、内部より外部に至る程淡色となり、周辺部はほぼ円形整状で、裏面には皺壁が見られ、菌糸は毛氈状を呈する。*Czapeck* 寒天培地ではやや色調が濃厚となるがその他は麴汁寒天培地の場合と同様であつた。牛乳培地には僅かに生育を認める程度でありカゼインの凝固も微弱であつた。馬鈴薯培地では良好に生育し麴汁寒天培地と同様に黄色より青緑色のコロニーを示す。また色素生産性は *Czapeck* 培地を用いた場合水溶性の黄色ないし黄緑色色素を強く生産することを認めた。

3) 生理的特徴としては生育最適温度 25°C 生育温度範囲 15~30°C, 生育最適 pH 5.0, 生育 pH 範囲 3.0~7.0, ブドウ糖, 果糖, ガラクトース, キシロース, 麦芽糖, 蔗糖, 乳糖, ラフィノース, イヌリン, デンプンを醗酵する。またデンプン液化酵素, デンプン糖化酵素, タンパク分解酵素を有するが、この中タンパク分解酵素及びカタラーゼは微弱であつた。

以上の観察を基として *Raper and Thom* の検索表よりその分類学的位置を調べると、ほぼ *Penicillium citrinum* series に属すると考えられるので本菌を *Penicillium citrinum* PN 菌と称することにした。

3. 酵素の精製

(1) 酵素力価の測定

有用菌の選択に当たつては各菌の生成する酵素の作用力と、酵素量とが問題であり前述の酵素力の測定法によつて比較選択し得るが、選択した菌の培養液から酵素の分離、精製を行なう場合、最も収量よく酵素を回収精製しうる方法を見出すには、酵素量を常に指標としなければならない。よつて著者らは以下の如き力価の基準を設定し酵素量の指標とした。

i) endo-polygalacturonase 及び endo-poly-methylgalacturonase 力価

前述と同じ反応組成を用い同様にして粘度降下を測

定する方法によつたが、酵素原液を適当に希釈して基質の初粘度が半減する迄に要する時間が10~20分を要する範囲で行ない、それより計算した力価に希釈率を乗じて酵素原液の力価を求めた。なお力価の基準は酵素液 1ml が相対粘度 5.0 を示すペクチン溶液 (pH 4.0, M/25-酢酸緩衝液で調製) 1ml に作用して5分間にその相対粘度を半減する場合を1単位と規定する。従つて前述の条件で相対粘度の半減時間をTとすればその酵素液の力価Uは次式により求められる。

$$U = 4 \times \frac{5}{T}$$

ii) exopolygalacturonase 及び exopoly-methylgalacturonase 力価

上記と同じ反応液を用い、30°C 15分間作用させた後

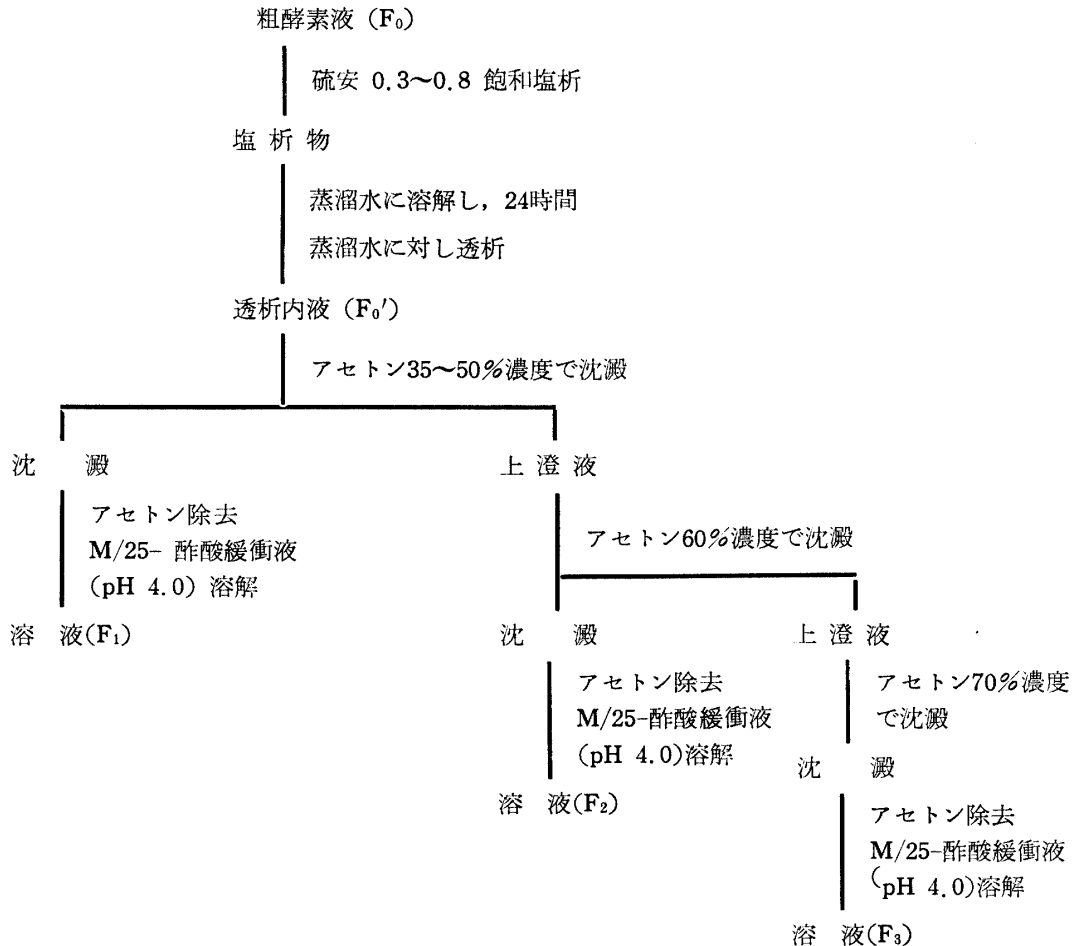
その反応液 5ml 中に生成せる還元性物質を Willstätter Schudel のヨード滴定法で測定し還元性物質をすべて galactose に換算した mg 数を以て力価を示した。

(2) 酵素の精製法

ペクチナーゼの分離精製は古くから多くの方法^{2,3,4,5,6)}が試みられているがまだ結晶化に成功していない現状である。著者らもアルコール沈澱法、リン酸石灰ゲル吸着法、アルギン酸吸着法等を試みたが純粋に精製することを得ず第2図に示す如き硫酸塩析法とアセトン分別沈澱法とを組合せて行なう方法がこの場合最も有効であつたのでこの方法によることにした。

また酵素の分泌生成は前述の液体培地使用による振盪培養法より麩麴法による場合が有効であつたので麩

第2図 酵素精製法



麴より抽出せる液を用いた。すなわち麩 10g に 9ml 撒水し殺菌後接種し 30°C 3日培養後 0.9% 食塩水 50ml で 30°C 1時間抽出しその沝液を粗酵素液として使用した。次に粗酵素液に硫酸を加え0.3~0.8飽和区分で塩析する部分を取り蒸溜水に溶解し透析後アセトンを加えアセトン濃度35~50%の間で沈澱する区分を F₁

としさらにアセトンを加え、60%及び70%濃度で沈澱する区分をそれぞれ F₂、F₃ とし各区分の酵素力価を調べると F₁ 区分に最も多量の endo 型酵素が回収される事が認められた。いま酵素精製過程中的力価変遷の一例を示すと第2表の如くであつた。

なお exo 型酵素はこの方法では充分に分別し得な

第2表 酵素精製過程の力価

| 区分 | 容量 | exo 型酵素 | | | endo 型酵素 | | |
|-----------------|------|------------|-----|----------------|------------|-------|----------------|
| | | 力価 unit/ml | 全力価 | 単位力価 unit/N-mg | 力価 unit/ml | 全力価 | 単位力価 unit/N-mg |
| F ₀ | 1000 | 0.73 | 730 | 1.1 | 33.9 | 33900 | 52.0 |
| F _{0'} | 375 | — | — | — | 55.1 | 20700 | — |
| F ₁ | 120 | 1.63 | 200 | 4.8 | 106.3 | 12800 | 315.4 |
| F ₂ | 40 | 4.60 | 185 | 6.8 | 50.4 | 2000 | 74.9 |
| F ₃ | 4.5 | 2.05 | 92 | 4.2 | 3.4 | 150 | 7.0 |

つたが元来本菌は exo 型酵素力が微弱でありかつまた醗酵精練の作用としては endo 型酵素が問題視されるべきであるから F₁ 区分を再精製せる酵素を用いて諸性質を検討した。

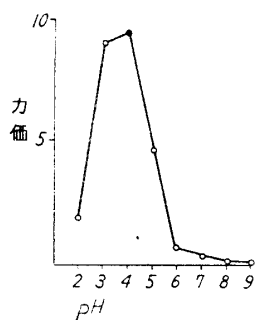
4. 酵素の性質

1) 作用最適 pH

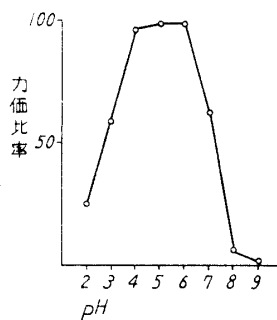
精製酵素液をおのおの所定の pH 緩衝液を用いて希釈し各 pH における酵素力を測定した結果第3図の如くであり pH 3~4 が最適であると認めた。

2) pH に対する安定性

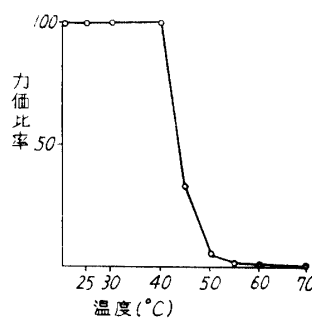
酵素液を各 pH 調節の後、0°C、24時間放置し、それぞれ pH 4.0 に調節した後各容積を一定とし、力価を測定し無処理の場合を 100 とした比率で示すと第4図の如くであった。



第3図 作用最適 pH
pH2~7 マックイルベン緩衝液
pH6~9 KH₂PO₄-Na₂B₄O₇ 緩衝液



第4図 pH に対する安定性
(0°C 24時間処理)



第5図 熱に対する安定性
(10分処理)

この結果酵素は pH 3~6 の範囲で安定であることが認められた。

3) 熱に対する安定性

酵素液を湯浴中で各温度に10分間処理した後急冷し、その力価を測定し無処理液の力価との比を求めた結果第5図の如くであった。

すなわち 40°C 付近までは安定であるが 45°C 以上になると急激に失活し 55°C において殆どその活性が

第3表 金属イオンの影響

| 金属イオン | 力価比率 | 金属イオン | 力価比率 |
|---|-------|---|------|
| K ⁺ KCl 10 ⁻² M | 117.9 | Ni ⁺⁺ NiCl ₂ 10 ⁻³ M | 80.7 |
| Na ⁺ NaCl " | 110.4 | Pb ⁺⁺ Pb(CH ₃ COO) ₂ " | 54.8 |
| Ca ⁺⁺ CaCl ₂ 10 ⁻³ M | 125.0 | Al ⁺⁺⁺ AlCl ₃ " | 37.0 |
| Ba ⁺⁺ BaCl ₂ " | 123.8 | Fe ⁺⁺ FeSO ₄ " | 20.5 |
| NH ₄ ⁺ NH ₄ Cl " | 104.3 | Cu ⁺⁺ CuCl ₂ " | 13.6 |
| Mg ⁺⁺ MgSO ₄ " | 93.4 | Hg ⁺⁺ HgCl ₂ " | 9.9 |
| Zn ⁺⁺ ZnSO ₄ " | 110.7 | Sn ⁺⁺ SnCl ₂ " | 6.4 |
| Mn ⁺⁺ MnSO ₄ " | 87.0 | Ag ⁺ AgNO ₃ " | 2.6 |
| Co ⁺⁺ CoCl ₂ " | 98.6 | 無添加 | 100 |

失われることが認められた。

4) 金属イオンによる影響

精製酵素液 1ml に各種金属塩溶液各 1ml 加え、

0°C 24時間放置後その力価を測定し、無処理液の力価との比を求めた。

上記の結果 Ca⁺⁺ 及び Ba⁺⁺ はやや賦活作用を示し、Ag⁺、Sn⁺⁺、Hg⁺⁺、Cu⁺⁺、Fe⁺⁺、Al⁺⁺⁺ はこの順序に強い阻害作用を示すが他の金属イオンは特に認むべき影響を示さなかつた。

5) 他の試薬による影響

金属イオン以外のものでペクチナーゼに影響を与えるものとして報告されている各種の試薬

に就て上記と同じ方法によつてその酵素作用に及ぼす影響を検討した。

この結果酸化還元剤によつても大きな影響は見られず僅かに SDS においてのみ強い阻害的影響が見られた。併しながら、EDTA、クエン酸による影響は殆ど認められず従つて金属酵素とは考えられず、SDS による強い阻害的影響もこの物質の特性と見るべきであろう。

第4表 他の試薬の影響

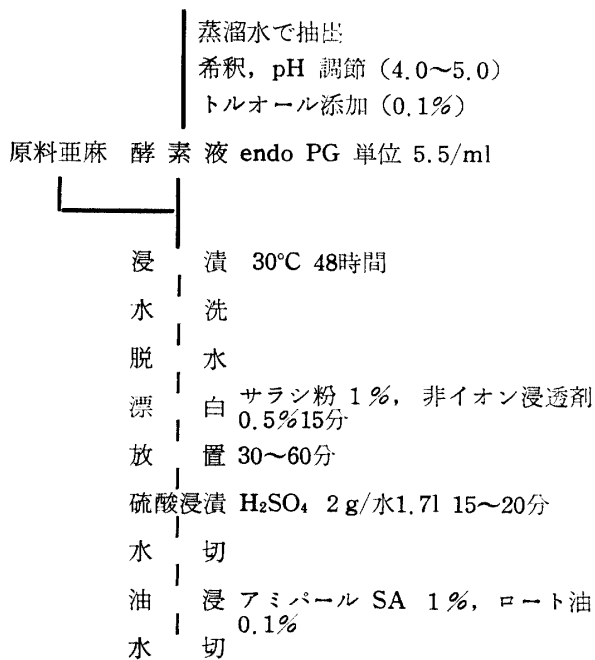
| 添加物質 | 力価比率 | 添加物質 | 力価比率 |
|---|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
| Na ₂ S ₂ O ₃ | 10 ⁻³ M 105.1 | EDTA | 10 ⁻³ M 102.3 |
| チオグリコー ル酸ソーダ | 〃 94.9 | クエン酸 | 〃 103.6 |
| KCN | 〃 92.9 | SDS | 〃 11.7 |
| グルタチオン | 〃 86.2 | CH ₂ ICOOH | 〃 97.5 |
| システイン 塩酸塩 | 〃 81.1 | KIO ₃ | 〃 96.9 |
| K ₂ Cr ₂ O ₇ | 〃 101.5 | 無添加 | 100 |

5. 酵素精練

亜麻原料の醱酵精練に関しては既に著者の一人中浜^{7,8,9)}が有用菌をみつけその工業化にかなりの成果を挙げてきたが、新たに糸状菌の酵素精練法を企画しそれに関する基礎的実験を行なった。

すなわちまず常法に従つて *Penicillium citrinum* PN 菌の醗酵を作り蒸留水で酵素を抽出し endo PG 単位 5.5/ml になる如く希釈し pH 4.0~5.0 に調節して Toluol を 0.1% 添加、酵素液の 5% 重量の原料亜麻を浸漬し 30°C 48時間浸漬する。一方アルカリ処理では原料100に対しカセイソーダ3.5、水1400を加え 2.5 時間煮沸する。これらの処理後は第6図に示す如く、いずれも同様に脱水、漂白、油浸、水切、乾燥、叩解を行なつて製品とした。この途中経過の原料の状態を比較すると第5表の如くであつた。

第6図 亜麻酵素精練操作概要



乾燥
叩解
製品

第5表 原料処理法の比較

| 処理 段階 | 酵素処理 | | アルカリ処理 | | 無処理 | |
|----------|----------|-----------------|----------|-----------------|----------|-----------------|
| | 重量 変化 | ペクチ ン分解 率 | 重量 変化 | ペクチ ン分解 率 | 重量 変化 | ペクチ ン分解 率 |
| 麻原料 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 |
| 精練後 | 78.2 | 57.6 | 74.4 | 37.3 | 84.7 | 8.7 |
| 漂白後 | 75.0 | — | 67.7 | — | 78.5 | — |
| 製品 | 72.3 | 57.6 | 67.7 | 66.2 | 76.1 | 32.8 |

表の数字は酵素処理の場合もアルカリ処理の場合もそれぞれ最も適度と考え得る処理について比較したものである。すなわち酵素処理における原料ペクチンの分解率はアルカリ処理のものより大きくまた観察による試料の繊維状態も前者の方が優れていたが最終製品においてはアルカリ処理の方がややペクチン分解率は大となり重量の減少も大きい。この事実は酵素精練の場合はこの操作だけで充分ペクチンが分解除去され以後の操作での損失は殆ど僅少である、それに反してアルカリ処理の場合は精練以後の操作でもペクチン及びその他繊維質までも除去されるものと認められ、従つて製品の歩留りをよくし繊維質の損傷を可及的に少なくする様に精練を行なうにはアルカリ処理法よりも酵素精練法の方が優れている事を認めた。

文 献

- Behrens : Centralb. Bakt., 8, 295 (1902)
- H. Lineweaver, R. Jang and E. F. Jansen : Arch. Biochem., 20, 137 (1949)
- R. J. McColloch and Z. I. Kertesz : J. Biol. Chem., 160, 149 (1945)
- C. G. Seegmiller and E. F. Jansen : J. Biol. Chem., 195, 327 (1952)
- A. Endo : Agr and Biol. Chem., 25, 394 (1961)
- W. Reid : Biochem. J., 50, 289 (1952)
- 中浜敏雄 : 日農化, 15, 323 (1939)
- 中浜敏雄 : 日農化, 15, 328 (1939)
- 中浜敏雄 : 日農化, 16, 39 (1940)

Summary

We would find a new method of enzymatic retting for flaxes and separated a strain of the mold which produced a large quantities of the actual enzyme. The strain was tested for the morphological and taxonomical properties, and it was recognized that it was belonged to the genus of *Penicillium citrinum* series. The enzyme of this strain (named *Penicillium citrinum* PN) was eluated from the cultured materials on wheat bran and was partialy purifild by salting out in 0.3~0.8 saturation of ammonium sulfate and by fractionary precipitation in 35~50% concentration of acetone. This enzyme showed the action of endopolylgalacturonase and endopolymethylga-

lacturonase and had in pH 3~4 on reaction optimum. This enzyme was inactivated by Ag^+ , Sn^{++} , Hg^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} , Al^{+++} and SDS (sodium dodecyl sulfate) but not other metalic ions, chelating agents and oxydation reduction agents. In order to test the availability of this enzyme for the refining of flax fibre materials, we compared with the enzymatic retting and chemical retting used alkali on the scale of pilot plant. By the enzymatic treatment we found not only the suitable quantities of pectin materials was decomposed, but also the yield of product was larger than by the chemical treatment.