微生物のイヌラーゼに関する研究 (第1報)

Penicillium 属菌のイヌラーゼ生産のための基本的培養条件について

中村 豊彦, 帆足信一郎

(宮崎大学農学部農業化学科)

昭和 43 年 12 月 20 日 受 理

Studies on Microbial Inulase

Part I. Culture Conditions for Inulase Production by *Penicillium*

By Toyohiko NAKAMURA and Shin-ichiro HOASHI

Department of Agricultural Chemistry, Miyazaki University, Miyazaki

A strain of *Penicillium* species, isolated from the field of Department of Agriculture of Miyazaki University, was found to produce a strong inulin-hydrolyzing enzyme. Using this strain, the culture conditions for the production of inulin-hydrolyzing enzyme in the culture filtrate were studied.

Optimal initial pH for the production of inulase by shaking culture was 5.0 and the highest enzyme activity was obtained after a seven days culture period.

The strain of *Pen.* sp. produced inulase in large amount only when inulin was used as carbon source in culture medium. No inulase was formed when the present strain was cultured with glucose, xylose and lactose as carbon source.

The enzyme (inulase) production was found to increase significantly with the addition of corn steep liquor (1.5%) to the medium. The relationship between the inulase production and the culture age was studied. Carbon source was rapidly used for growth in the early phase of culture, and inulase production was initiated when the reducing sugar was mostly consumed.

(Received December 20, 1968)

緒 言

近年, 酵素化学の急速な進歩とともに酵素の工業的生産への機運が高まっている。イヌリン分解酵素については Green⁽¹⁾ がその存在を認めて以来, 多くの研究報告がなされている。従来, イヌラーゼ生産菌は多数知られており, *Aspergillus niger*, *Penicillium glaucum* で Bourquelot⁽²⁾ が見出し, その後 Dedonder⁽³⁾, Pringsheim⁽⁴⁾, Pigman⁽⁵⁾ が *Asp. niger* で, また酵母については Adams⁽⁶⁾, Lindner⁽⁷⁾, 朝井⁽⁸⁾, 本江⁽⁹⁾, Biswas⁽¹⁰⁾, Snyder⁽¹¹⁾などの報告があり, *Pen.* 属で朝井⁽¹²⁾ は強力な菌を見出し, イヌリンの約 80% を糖化したと報じている。

著者らはイヌリンを唯一の炭素源とした合成培地 (Table I) で土壌より広くスクリーニングを行ない, 3 つの優良菌株を分離した (Table II)。その中でイヌラ

ーゼ生成能の高い *Pen.* sp.-1 株を用いて微生物酵素の工業的生産を目的として, より多く酵素を集積せしめるための基本的培養条件の検討を行なった。その結果 2, 3 の知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 菌種の検索 分離用培地は寒天 1% を含む Table I の基本培地を用いた。学部内土壌を採取し稀釈法により 30°C で平板培養を行ない, 生育する菌を分離し, 選択された菌株は常法により純化した。

2. 培養方法 培地組成の検討のために Table I に示したイヌリン, ペプトンを主体とする基本培地を利用した。500 ml 容三角フラスコに 50 ml の培地を入れ, 120°C, 20 分殺菌後, 同寒天斜面培地に 2~3 週間培養したものを 1 白金耳接種し, 30°C, 140 rpm で回転振盪培養した。この培養濾液を酵素液として力価の測定を行

Table I. Composition of Basal Medium A for Shake Culture

Inulin	1.0%	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
Peptone	0.5	KCl	0.05
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.8	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.4	pH	6.0

Medium was autoclaved at 120°C for 20 min after the pH was adjusted to 6.0 with HCl.

なった。

3. 酵素液の調製 上記培養で得た酵素液を1N 塩酸,あるいは1N 苛性ソーダを用いて, pH 5.0 に調整し,さらに1/16M 磷酸緩衝液(pH 5.0)を用いて酵素を希釈した。

4. 酵素活性の測定 イヌラーゼ活性はこの報告ではイヌリン分解力とシュクロース分解力の二面から測定した。

a) イヌリン分解力: 1/16M 磷酸塩緩衝液(pH 5.0)に溶解した0.5% イヌリン溶液0.5 mlに同じ緩衝液で希釈した酵素液0.5 mlを加え, 40°C, 30分間酵素反応を行ない,生成する還元糖を3,5-ジニトロサリチル酸法⁽¹³⁾により500 mμの吸光度を測って比色定量した。酵素単位は40°C, 30分間酵素反応で培養濾液1 mlあたり1分間に1 μmoleの還元糖(果糖として)を生成する酵素量で表わした。

b) シュクロース分解力: 1/16M 磷酸塩緩衝液(pH 5.0)に溶解した0.5% シュクロース溶液0.5 mlに同じ緩衝液で希釈した酵素液0.5 mlを加え, 40°C, 30分間酵素反応を行ない,イヌリンの場合と同じ方法で測定した。酵素単位は培養濾液1 mlあたり1分間に2 μmoleの還元糖(果糖として)を生成する酵素量で表わした。

5. 酵素生産培地組成の検討

a) 無機窒素源の検討: イヌリン 1%, ペプトン 0.5%, 硫酸マグネシウム 0.05%, 塩化カリ 0.05%, 硫酸第1鉄 0.001% 組成を基本培地とし,これにリン酸第1アンモン, リン酸第2アンモン, 硫酸アンモン, 硝酸アンモン, 塩化アンモン, 硝酸ナトリウム, 硝酸カリの無機窒素化合物をそれぞれ添加(窒素として1/10M および1/50M)して比較検討した。

b) 有機窒素源の検討: イヌリン 1%, リン酸第1アンモン 0.8%, リン酸第2アンモン 0.4%, 硫酸マグネシウム 0.05%, 塩化カリ 0.05%, 硫酸第1鉄 0.001% 組成を基本培地とし,これにペプトン, コーン・スチープ・リカー, 酵母エキス, NZ-アミン, 肉エキス, 尿

素などをそれぞれ0.5% および1.0% になるように添加して比較検討した。

c) 炭素源の検討: ペプトン 0.5%, リン酸第1アンモン 0.8%, リン酸第2アンモン 0.4%, 硫酸マグネシウム 0.05%, 塩化カリ 0.05%, 硫酸第1鉄 0.001% 組成を基本培地とし,これにイヌリン, ラフィノース, シュクロース, ラクトース, グルコースなど各0.5% および1.0% になるように添加して比較検討した。

d) 塩類の検討: 基本培地に含まれている硫酸マグネシウム, 塩化カリ, 硫酸第1鉄の塩類について添加量を加減して比較検討した。

e) 炭素源および窒素源の割合: リン酸第1アンモン 0.8%, リン酸第2アンモン 0.4%, 硫酸マグネシウム 0.05%, 塩化カリ 0.05%, 硫酸第1鉄 0.001% を基本培地とし,これに炭素源としてイヌリンを, 窒素源としてコーン・スチープ・リカーを用いてイヌリン, コーン・スチープ・リカー各濃度の影響を調べた。

f) 培養時間と培地中の酵素量, 糖量および窒素量との関係: イヌリン 1.0%, コーン・スチープ・リカー 1.5%, リン酸第1アンモン 1.2%, 硫酸マグネシウム 0.05%, 塩化カリ 0.05%, 硫酸第1鉄 0.001% 組成における経時変化について調べた。全窒素はミクロケルダール-ニンヒドリン呈色法⁽¹⁴⁾, 全糖は0.5N 塩酸で120°C, 60分間分解後, 3,5-ジニトロサリチル酸法により測定した。

実験結果

1. 生産菌種の検索

土壌よりの分離株をTable Iの基本培地を用い,回転振盪機で30°C, 4日間培養後,それぞれイヌリン分解力, シュクロース分解力について検討した。Table IIは分離菌株中酵素力価の比較的高い優良菌株について列記したものである。分離菌株のうち *Pen. sp.-1* ではイヌリン分解力が高く, *Asp. niger-1* および2ではシュクロース分解力がイヌリン分解力に比べてはるかに高い酵素活性を示した。これ以後の実験では *Pen. sp.-1* を供試菌株とした。

2. 培養液量の検討

最適通気量にするため培養液量を検討した結果, Table IIIに示したように20 ml, 50 mlで良好な結果が得られた。なお培養液量が増加するにつれてイヌリン, シュクロースに対するイヌラーゼ活性は低下をきたした。

Table II. Comparison of Enzyme Activity among Fungi

Organism	Culture period, days	pH after culture	units/ml with inulin (I)	units/ml with sucrose (S)	I/S*
<i>Asp. niger</i> -1	6	5.42	0.412	1.852	0.222
	7	5.60	0.463	1.972	0.235
	8	5.67	0.407	2.194	0.186
<i>Asp. niger</i> -2	6	5.67	0.389	1.815	0.214
	7	5.85	0.454	1.889	0.240
	8	6.10	0.398	2.194	0.182
<i>Pen. sp.</i> -1	6	6.15	0.741	0.648	1.142
	7	6.19	0.870	0.759	1.146
	8	6.20	0.815	0.639	1.275

Basal medium of Composition A was used.

Cultivation was carried out on a rotary shaker (140 rpm) at 30°C.

Inulin-hydrolyzing activity was expressed in 1 μ mole fructose/ml culture filtrate/min at 40°C and pH 5.0; substrate conc., 0.25%.

Sucrose-hydrolyzing activity was expressed in 2 μ mole fructose/ml culture filtrate/min at 40°C and pH 5.0; substrate conc., 0.25%.

* I/S expresses the ratios of hydrolysis rates with inulin and sucrose as substrate respectively.

Table III. Effect of Culture Solution Volume on the Production of Inulase by *Pen. sp.*-1

Culture solution volume	pH after culture	120 hr		I/S
		units/ml with inulin (I)	units/ml with sucrose (S)	
20	6.10	0.800	1.059	0.756
50	6.10	0.748	0.967	0.774
80	6.10	0.681	0.757	0.900
110	6.00	0.711	0.596	1.193
140	5.96	0.740	0.607	1.219
170	5.96	0.659	0.496	1.329
200	5.83	0.467	0.364	1.282
250	5.80	0.447	0.311	1.437

Cultivation was carried out for 5 days at 30°C.

Other conditions were the same as those shown in Table II.

Table IV. Effect of Initial pH on the Production of Inulase by *Pen. sp.*-1

Culture period, days	Initial pH 4.0		Initial pH 5.0		Initial pH 6.0		Initial pH 7.0	
	pH after culture	units/ml with inulin	pH after culture	units/ml with inulin	pH after culture	units/ml with inulin	pH after culture	units/ml with inulin
2	2.90	0.026	3.40	0.178	5.60	0.280	6.72	0.008
3	5.30	0.215	5.60	0.500	6.00	0.409	6.75	0.012
4	5.77	0.341	5.80	0.859	6.29	0.611	6.70	0.012
5	5.35	0.351	5.85	0.962	6.25	0.777	6.67	0.023
6	5.50	0.556	6.00	1.000	6.30	0.759	6.70	0.029
7	5.60	0.776	6.00	1.074	6.20	0.814	6.40	0.022
8	5.80	0.518	6.00	0.981	6.00	0.748	6.20	0.020

pH of medium was adjusted with 1 N HCl or 1 N NaOH.

Other conditions were the same as those shown in Table II.

3. 初発 pH および培養日数の影響

基本培地の pH を 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 に調節して前項に準じて 30°C で 2, 3, 4, 5, 6, 7 および 8 日間振盪培養して酵素生産を比較した. その結果を Table IV に示す. 表に示すごとく, 培養液の初発 pH は 5.0 が最適であった. 初発 pH が 4.0, 5.0 および 6.0 の場合の酵素生産は培養日数 7 日で酵素力が最大であった. 初発 pH 7.0 の場合は 6 日目で酵素力が最高になったが, それは pH 4.0, 5.0, 6.0 のそれよりはるかに劣った. 酵素生産においては培地の pH がかなりの影響を及ぼし, 初発 pH が 4.0 および 7.0 では酵素生産の低下をきたした.

4. 糖類の検討

各種糖類について検討した結果, イヌリン, シュクロース分解力とも, イヌリンを基質とした場合に著しく高い酵素活性を示した. ついでフラクトース, ラフィノース, デキストリン, シュクロース, サリシン, 可溶性澱粉の順であった. 一方, キシロース, ラクトース, マンニット, アラビノースの添加および糖類無添加では酵素生産は認められなかった. したがって *Pen. sp.*-1 の生産するイヌラーゼは誘導的に生産されるものと思われる (Table V). 菌体の生育状態と酵素生産とは密接な関係があるようである. すなわち, イヌラーゼを生産する糖添加区の菌体の生育状況は旺盛で pulp 状を呈する. これに反し, 活性を示さないラクトース, キシロース, マンニット, アラビノースの培地では pellet 状に生育している.

Table V. Effect of Various Carbon Sources on the Production of Inulase by *Pen. sp.-1*

Carbon sources	0.5%				1.0%			
	pH after culture	units/ml with inulin (I)	units/ml with sucrose (S)	I/S	pH after culture	units/ml with inulin (I)	units/ml with sucrose (S)	I/S
Salicin	5.60	0.012	0.030	0.40	5.60	0.008	0.012	0.67
Inulin	5.44	0.194	0.144	1.35	6.30	0.667	0.562	1.19
Arabinose	5.90	0.000	0.000	0.00	5.60	0.000	0.000	0.00
Raffinose	6.70	0.041	0.116	0.35	4.85	0.005	0.031	0.16
Mannit	5.50	0.000	0.000	0.00	3.97	0.000	0.000	0.00
Soluble starch	5.45	0.007	0.026	0.26	5.70	0.005	0.014	0.36
Dextrin	5.47	0.021	0.056	0.38	5.80	0.021	0.036	0.58
Lactose	6.05	0.000	0.000	0.00	6.25	0.000	0.000	0.00
Sucrose	5.85	0.024	0.012	2.00	5.60	0.007	0.002	3.50
Fructose	5.75	0.000	0.050	0.00	6.00	0.052	0.057	0.91
Galactose	4.90	0.007	0.020	0.35	4.25	0.007	0.007	1.00
Glucose	5.92	0.000	0.004	0.00	5.92	0.000	0.004	0.00
Xylose	5.33	0.000	0.000	0.00	3.82	0.000	0.000	0.00

The basal medium consisted of peptone 0.5%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.8%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KCl 0.05%, and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%.

Cultivation was carried out for 4 days at 30°C.

Other conditions were the same as those shown in Table II.

5. 無機窒素源の検討

リン酸第1アンモン, リン酸第2アンモンはいずれの濃度区のものにおいてもイヌラーゼ生産に寄与し, 硫酸アンモン, 塩化アンモンは 1/10 M で有効であった. とくにリン酸第1アンモン添加は対照に比べて 96 時間培養で約 2 倍近い酵素活性を示した. その他の窒素源においては基本培地に含まれる窒素量だけで充分であること

がわかった.

6. 有機窒素源の検討

コーン・スチープ・リカーは 0.5%, 1.0% 添加ともとくに効果があり, ついで肉エキス 1.0%, 0.5%, ペプトン 0.5% の順で効果的であった (Table VII). ペプトン 1.0% 添加は菌体の生育を阻害し, 酵素生産も僅少にとどまった. 有機窒素無添加では酵素は生産されなかつ

Table VI. Effect of Various Inorganic Nitrogen Sources on the Production of Inulase by *Pen. sp.-1*

Inorganic nitrogen sources	Concentration (M)	96 hr			144 hr		
		units/ml with inulin (I)	units/ml with sucrose (S)	I/S	units/ml with inulin (I)	units/ml with sucrose (S)	I/S
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1/10	0.833	1.000	0.83	0.851	0.930	0.86
	1/50	0.344	0.333	1.03	0.611	0.991	0.62
NH_4Cl	1/10	0.787	0.888	0.89	0.746	0.929	0.80
	1/50	0.772	0.494	1.56	0.453	0.593	0.76
NH_4NO_3	1/10	0.683	0.787	0.87	0.483	0.796	0.61
	1/50	0.600	0.722	0.83	0.295	0.542	0.55
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1/10	1.055	0.898	1.17	0.990	0.633	1.19
	1/50	1.000	0.950	1.05	0.722	0.958	0.75
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1/10	1.185	0.805	1.46	1.380	0.968	1.43
	1/50	1.185	1.000	1.18	1.185	0.995	1.19
NaNO_3	1/10	0.759	0.500	1.52	0.289	0.293	0.99
	1/50	0.900	0.594	1.51	0.630	0.756	0.86
KNO_3	1/10	0.555	0.537	1.03	0.157	0.240	0.63
	1/50	0.981	0.794	1.23	0.611	0.648	0.94
Control		0.611	0.597	1.02	0.759	0.595	1.28

The basal medium consisted of inulin 1.0%, peptone 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KCl 0.05% and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%.

Cultivation was carried out for 4 and 6 days at 30°C.

Other conditions were the same as those shown in Table II.

Table VII. Effect of Various Organic Nitrogen Sources on the Production of Inulase by *Pen. sp.-1*

Organic nitrogen sources	Concentration %	46 hr				144 hr			
		pH after culture	units/ml with inulin (I)	units/ml with sucrose (S)	I/S	pH after culture	units/ml with inulin (I)	units/ml with sucrose (S)	I/S
Meat ex.	0.5	5.91	0.667	0.644	1.04	6.05	0.667	0.637	1.05
	1.0	6.15	0.933	0.689	1.35	6.30	0.944	0.706	1.34
Peptone	0.5	6.20	0.574	0.574	1.00	6.29	0.759	0.593	1.28
	1.0	5.39	0.009	0.103	0.087	5.00	0.124	0.069	1.80
NZ-amine	0.5	6.32	0.305	0.208	1.47	6.36	0.352	0.227	1.55
	1.0	6.60	0.231	0.194	1.19	6.70	0.333	0.204	1.63
Corn steep liquor	0.5	5.77	0.744	0.806	0.92	6.00	0.944	1.111	0.85
	1.0	6.10	1.200	0.826	1.45	6.25	1.120	0.824	1.36
Yeast ex.	0.5	6.12	0.096	0.093	1.03	6.20	0.191	0.125	1.53
	1.0	6.40	0.154	0.254	0.61	6.45	0.411	0.281	1.46
Urea	0.5	6.16	0.133	0.088	1.51	6.26	0.152	0.105	1.45
	1.0	6.40	0.104	0.085	1.22	6.38	0.167	0.134	1.25
None		3.50	0.012	0.007	1.71	4.68	0.000	0.000	0.00

The basal medium consisted of inulin 1.0%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.8%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KCl 0.05% and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%.

Cultivation was carried out for 4 and 6 days at 30°C.

Other conditions were the same as those shown in Table II.

た。酵素生産には有機窒素物の存在が必要である。

7. 塩類の検討

基本培地に含まれている硫酸マグネシウム、塩化カリ、硫酸第 1 鉄の濃度について、前項に準じ、30°C で 96 時間培養したときの酵素力を測定した。その結果 Table VIII に示すごとく、濃度を変えてもあまり影響がなかった。

8. 炭素源と窒素源の割合

炭素源としてイヌリンを、窒素源としてコーン・ステープ・リカーを用い、リン酸第 1 アンモン 0.8%, リン酸第 2 アンモン

0.4%, 硫酸マグネシウム 0.05%, 塩化カリ 0.05%, 硫酸第 1 鉄 0.001%,

pH 5.0 においてイヌリ

ンとコーン・ステープ・リカーの各濃度の割合を

調べた。各培養液におけ

る酵素力について Table

IX に示す。コーン・ス

テープ・リカーの少ない

(0.5~1.0%) ときはイ

ヌリンの多いほど酵素

活性は低くなり、2% 以

Table VIII. Effect of Various Salts on the Production of Inulase by *Pen. sp.-1*

Salts added	Concentration M	pH after culture	units/ml with inulin (I)	units/ml with sucrose (S)	I/S
KCl	1/100	6.16	0.422	0.370	1.140
	1/500	6.16	0.373	0.319	1.169
	1/1000	6.15	0.373	0.337	1.106
MgSO_4	1/100	6.03	0.527	0.559	0.941
	1/250	6.12	0.343	0.363	0.906
	1/1000	6.16	0.304	0.206	1.475
FeSO_4	1/10,000	6.16	0.385	0.433	0.889
	1/50,000	6.20	0.452	0.411	1.043
	1/100,000	6.15	0.467	0.459	1.017
Control		6.17	0.563	0.619	0.910

Salts were added to salt-free basal medium A.

Cultivation was carried out for 4 days at 30°C.

Other conditions were the same as those shown in Table II.

Table IX. Effect of Various Concentrations of Inulin and Corn Steep Liquor on the Production of Inulase by *Pen. sp.-1*

Inulin %	Corn steep liquor							
	0.5%		1.0%		1.5%		2.0%	
	units/ml with inulin	units/ml with sucrose	units/ml with inulin	units/ml with sucrose	units/ml with inulin	units/ml with sucrose	units/ml with inulin	units/ml with sucrose
0.5	0.907	0.666	1.843	1.055	1.444	0.990	1.296	0.926
1.0	0.289	0.481	1.233	0.883	2.111	1.203	1.518	0.977
1.5	0.044	0.072	0.537	0.708	1.657	1.092	1.574	0.958
2.0	0.000	0.000	0.211	0.378	0.926	0.991	1.333	0.880
3.0	0.000	0.000	0.000	0.010	0.185	0.222	0.583	0.713

The basal medium consisted of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.8%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KCl 0.05% and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%.

Cultivation was carried out for 6 days at 30°C with pH 5.0.

Other conditions were the same as those shown in Table II.

上では酵素は生産されなかった。コーン・スチープ・リカーが1.5%以上の場合はイヌリン添加1.0~1.5%が高いイヌリン分解力を示した。このようにイヌリンとコーン・スチープ・リカーの濃度比によって生産される酵素量もまた異なってくる。Table Iの基本培地で生産されるイヌラーゼ活性に比べてこの培地(イヌリン1.0%, コーン・スチープ・リカー1.5%)では2倍以上の活性を示した。またI/Sから比較してみてもやはり2倍近いイヌリン分解力を示している。以上のようにI/S比が高くなったことは私たちの研究目的から考えて望ましいことである。

9. 酵素生産の経時曲線

これまでの培養条件検討の結果から次の培地 (Table

Table X. Composition of Basal Medium B for Shake Culture		X)
Inulin	1.0 %	X)を選定し、この培地を用いて振盪培養を行ない、生産されるイヌラーゼ量、培養液のpH、糖および窒素の経時曲線について検討した。その結果をFig. 1に示す。イヌラーゼは24時間頃よりその生産が始まり、96~168時間にピークを示し以後は減少した。全糖は菌体の繁殖に伴って最初急激に減少し、48時間後にはほとんどなくなる。遊離糖は24時間では増加し48時間後は再び減少しほとんどなくなる。酵素の産生と全糖の消費とほぼ並行している。窒素と酵素産生との関係はあまりはっきりしない。
Corn steep liquor	1.5	
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.2	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05	
KCl	0.05	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001	
pH	5.0	
Corn steep liquor contains 38.5 mg total nitrogen per gram.		

後には減少した。全糖は菌体の繁殖に伴って最初急激に減少し、48時間後にはほとんどなくなる。遊離糖は24時間では増加し48時間後は再び減少しほとんどなくなる。酵素の産生と全糖の消費とほぼ並行している。窒素と酵素産生との関係はあまりはっきりしない。

考 察

この研究はイヌラーゼの液体培養法について工業的生産の見地から、酵素生産に関する種々の基礎的培養条件について2, 3の検討を行なったものである。

検索、分離した菌株中 *Pen. sp.-1* の液体培養濾液はイヌリン、シュクロースに対する分解力が高く、そのI/S比は144時間培養で1.14であった。初発pHと培養日数との関係では、最大の酵素力はpH 5.0、7日培養で得られた。

種々の炭素源の影響を検討した結果、イヌリンを添加した培地でイヌラーゼが多量に産生された。ついでフラクトース、ラフィノース、デキストリン、デンプンなどもわずかではあるがイヌラーゼを生産したが、アラビノー

Fig. 1. The Relationship between the Inulase Production and the Culture Age of *Penicillium sp.-1*.

Basal medium of Composition B was used. Determination of enzyme activities and sugar were carried out by DNS-500 mμ method.

Total nitrogen was assayed by micro Kjeldahl-Ninhydrin method (570 mμ).

Other conditions were the same as those shown in Table II.

Curve :

- (1) Activity on inulin ○—○
- (2) Activity on sucrose △—△
- (3) T.N. (total nitrogen) □—□
- (4) F.R.S. (free reducing sugar) ▲—▲
- (5) T.S. (total sugar) ●—●
- (6) pH x.....x

ス、マンニット、ラクトース、グルコース、キシロースでは酵素生産は認められなかった。したがって *Pen. sp.-1* の生産するイヌラーゼはイヌリンを基質として誘導的に生成される酵素と思われる。なお、Snyder ら⁽¹¹⁾は *Saccharomyces fragilis* の生産するイヌラーゼはイヌリンを添加した培地で生産されることを報告しているが、これは著者らの実験結果と共通している。強力な酵素生産にはイヌリン等の誘導基質の添加が必要である。

無機、有機窒素化合物については Table VI, VII に示したように、無機窒素化合物としてはとくにリン酸第1アンモン (1/10 M) がよく、基本培地Aの約2倍のイヌラーゼ活性を示した。またI/Sからみてもイヌリン分解力の高い酵素を生産することを認めた。有機窒素化合物としてはコーン・スチープ・リカー (0.5% および 1.0%) が著しい効果を示し、ついで肉エキス (0.5% および 1.0%)、ペプトン (0.5%) の順で効果的であった。有機窒素化合物無添加の培地ではイヌラーゼの生産はほとんど認められず、したがって多量のイヌラーゼ生産に

は有機窒素化合物の存在が必要であることを認めた。

Anderson ら⁽¹⁵⁾は *Penicillium* 属菌のエネルギー源、炭素源、窒素源としてシュクロース、デンプン、デキストリン、コーン・スチープ・リカー、アミノ酸、タンパク質、ペプトン、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 等がよく利用され、ことにコーン・スチープ・リカーが有効であったと報告しているが、これは著者らの得た結果ともかなりよく一致するものと観察された。

コーン・スチープ・リカーおよびイヌリンの両濃度を变化させ、併用の効果について検討した。Table IX に示したように、コーン・スチープ・リカー 1.5%、イヌリン 1.0% で最大の活性が得られた。その値は基本培地 A で生産されるイヌラーゼ活性に比べて 2 倍以上の高活性力を示した。これまでの培養条件の検討の結果、基本培地 B (Table X) を選定し、この培地を用いてイヌラーゼ生産における糖類と窒素の経時変化について検討を加えた (Fig. 1)。その結果、全糖は 24 時間で菌体の繁殖に伴って急激に減少し、それにつれて遊離糖は増加を示している。48 時間後には全糖、遊離糖の漸減に伴ってイヌラーゼ生産が開始されている。これは Monod⁽¹⁶⁾の主張している炭素源の preferential utilization の現象と考えられる。全窒素についてはイヌラーゼの生産が開始された 48 時間に減少し、培養時間の経過に伴って再び増加を示した。微生物酵素の工業化への機運が高まり、イヌラーゼに対する用途も大きく、フラクトースを生成する酵素として多くの人々により研究、報告された。フラクトースはブドウ糖に比べはるかに甘味強く栄養価値も高い糖である。

以上の観点から、われわれの酵素の生産を高めるような基本的培養条件についての研究は意義あるものと思われる。

要 約

著者らは土壌より分離した最も強力なイヌリン分解力をもつ *Penicillium* sp.-1 の菌株を用いて、酵素生産に関する種々の培養条件の検討を行ない、次のとき結論を得た。

(1) *Penicillium* sp.-1 はイヌラーゼ生成能の高い菌株である。

(2) 培地の初発 pH は 5.0 付近、その条件での最高

の酵素力は 7 日培養で得られる。

(3) 炭素源としてイヌリンを用いたときのみイヌラーゼは多量生産された。イヌリンはイヌラーゼ生産のための誘導物質である。

(4) 有機あるいは無機窒素源としてはコーン・スチープ・リカー、肉エキス、ペプトン、リン酸第 1 アンモン、リン酸第 2 アンモンがよく、中でも多大の酵素生産には有機窒素物の存在が必要である。

(5) イヌリンとコーン・スチープ・リカーの配合比はイヌリン 1.0%、コーン・スチープ・リカー 1.5% が最大の酵素力を示した。

終りにご指導をいただいた中津誠一郎教授、および実験に助力された西田雅治、池内昌三両君に厚く感謝する。

なお、本報告は昭和 43 年度農芸化学会西日本支部大会で講演した。

- (1) J. R. Green : *Ann. Bot.*, **1**, 223 (1887).
- (2) E. Bourquelot : *Comptes rendus Acad. Sci.*, **116**, 1143 (1893).
- (3) R. Dedonder : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **34**, 157 (1952).
- (4) H. Pringsheim : *Ber.*, **65**, 1242 (1932).
- (5) W. W. Pigman : *J. Res. Natl. Bur. Stds.*, **30**, 159 (1943).
- (6) M. Adams, N. K. Richtmyer and C. S. Hudson : *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1369 (1943).
- (7) P. Lindner : *Ws. Brau.*, **17**, 713 (1900).
- (8) 朝井勇宣 : 醸工, **16**, 511 (1938).
- (9) 本江元吉 : 農化, **18**, 981 (1942).
- (10) M. M. Biswas : *Indian J. Appl. Chem.*, **26** (3), 56 (1963).
- (11) H. E. Snyder and H. J. Phaff : *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **26**, 433 (1960).
- (12) 朝井勇宣 : 農化, **13**, 1165 (1937).
- (13) 福井作蔵 : 化学と生物, **3** (9), 37 (1965).
- (14) 波多野博行, 鷹野重威 : 化学の領域, 増刊 **47**, 29 (1961).
- (15) R. F. Anderson, L. M. Whitmore, Jr., W. E. Brown, W. H. Peterson, B. W. Churchill, F. R. Roegner, T. H. Campbell, M. P. Backus and J. F. Stauffer : *Ind. Eng. Chem.*, **45**, 768 (1953).
- (16) J. Monod : *Growth.*, **11**, 223 (1947).