研 究 ノ ー ト

放線菌のグルコース異性化酵素生産に 対するフィチンの効果

津村信蔵*・石川雅子*

The Effects of Phytin on the Production
of Glucose Isomerisation Enzyme

NOBUZO TSUMURA and MASAKO ISHIKAWA

The effects of the addition of soluble and poor soluble salts of phytic acid to the medium for the propagation of *St. phaeochromogenus* were investigated. The addition of soluble potassium phytate did not show any promoting effects on the production of glucose isomerisation enzyme and the excess soluble phytate resulted in the decline of cell growth and of cell activity. On the other hand, the addition of poor soluble salts of phytic acid enhanced the production of the enzyme and the activity per cell weight was considerably fortified. An adequate dosage seems to be 0.2% pulverized phytate in the medium.

微生物の培養にフィチン酸やその塩類、または類縁化合物を添加すると種々な効果のあることが知られている。たとえば酵母の菌体収量とリボ核酸含量の増加¹⁾や乳酸菌の生育と乳酸の生成促進²⁾また、種々な醗酵菌に対するファージの菌体への吸着、増殖の阻止、異常醗酵の防止³⁾に効果があるという。さらに、フィチンが糸状菌の核酸分解酵素生産を増強すること⁴⁾またフォスファチジルイノシトールの添加が放線菌、細菌、糸状菌のプロテアーゼ、アミラーゼ、リパーゼ生産を高める報告⁵⁾もある。

著者らは *Streptomyces phaeochromogenus* が菌体内に生産するグルコース異性化酵素の研究を行ない、培養源としてコーンステイプリカー (C.S.L.) が有効なことを報告した⁶⁾。周知のように、CLS 中にはかなり多量のフィチン酸が含まれているので、フィチン酸およびその塩の効果を検討し、報告することとする。

1. 実験材料

試験に使用したサンプルは、遊離のフィチン酸と $K \cdot Ca \cdot Mg_4 \cdot NH_4$ -phytate (phytin-I) および $Ca \cdot Mg_4 \cdot (NH_4)_2$ -phytate (phytin-II) の3種で、フィチン酸は苛性カリで中和して可溶性の状態で使用し、phytin I, II は難溶性で、粉末状のものを培地に添加した。

2. 培養方法と活性の測定

(1) 菌株と培養法

使用菌株は *St. phaeochromogenus*, Strain SK で、1 l 中ペプトン 10 g, 肉エキス 5 g, 酵母エキス 2.5 g, NaCl 5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.23 g, グルコース 3 g, キシロース 7 g を含むものを基本培地とし、これにフィチンそのほかを 0.01~0.4% 添加して試験した。培養液 100 ml を 500 ml 容の坂口フラスコに入れ、接種して 30°C, 24 時間振盪培養した。

(2) 菌体収量と活性測定

培養液の一定量を採取して遠心分離し、洗滌後菌体を水に分散して定容とし、そのなかに含まれる菌体を 105°C, 90 分の乾燥法で測定し、培養液当たりの収量を算出した。また、難溶性の phytin を添加したときは、24 時間の培養後でも残存することがある。この場合には、正確な菌体収量の測定は困難であるが、遠心、洗滌して菌体を定容に分散させ、冷所に 15 時間前後放置して phytin を沈降させたのち、乾燥法により大よその菌体収量を測定した。

活性測定のための反応液は、終濃度としてグルコース 0.8 M, Mg^{++} 0.01 M, リン酸緩衝液 0.05 M (pH 7.5) を含み、A 法では、反応液 1 ml 中に 12.5 mg (乾物として) の菌体を加えて 60°C, 3 時間の反応を行ない、B 法では、反応液 1 ml 中に培養液 2.5 ml 中の菌体相当量を加えて、60°C, 1 時間の反応を行なった。反応液中に生成したフラクトースを定量⁶⁾し、反応液 1 ml 当たりのフラクトース生成量で活性を表示した。

3. フィチン酸の添加効果

基本培地に対してフィチン酸として 0.01~0.4% 添加、培養した場合の結果を第1表に示した。フィチン酸の添加によって、菌体収量、活性ともに、とくに増強されることはなく、添加量が多い場合にはむしろ逆に、かなり著しい阻害がみられた。

* 農林省食糧研究所 (東京都江東区塩浜1の4の12)

Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, Kōtō-ku, Tokyo.

第1表 フィチン酸の添加効果

No.	フィチン酸 添加量 (%)	母液 pH	菌体量 (mg/100ml)	活性* (A法)
1	0	6.6	400	64
2	0.01	6.9	390	60
3	0.05	6.5	460	64
4	0.1	5.0	320	34
5	0.2	5.0	240	33
6	0.4	6.2	60	15

注: * フラクトース mg/12.5 mg Cell/3hr.

添2表 難溶性 phytin の添加効果 (1)

No.	添 加 量 (%)	母 液 pH	菌 体 量* (mg/100ml)	活 性* (A法)
1	0	4.6	380	59
2	phytin-I	0.1	720	74
3	"	0.2	640	72
4	"	0.4	820	72
5	phytin-II	0.2	700	74
6	"	0.4	720	—

注: * phytin の残量混在

** フラクトース mg/12.5 mg Cell/3hr.

4. 難溶性 Phytin の添加効果

次に、難溶性 phytin を添加、培養したところ、活性において著しい効果がみられた (第2表)。培養液に、0.1% 以上の phytin を添加した場合は、24 時間振盪培養後にも phytin は一部残存しており第2表の菌体量の数値は phytin を含んだもので過大になっている。しかし、活性は phytin を含むものを全部菌体として計算し測定した値であるから、対照に比し phytin-I および II を添加したものはいずれも著しい効果を示すものと考えられる。著者らはかねて、A法による活性測定で約 60 mg のフラクテース生成を示す菌体の活性を標準としているが、phytin 添加培養の菌体活性は標準より遙かに高く、ほとんど反応の平衡に達している (0.8 M グルコース反応液の平衡(52%フラクトース)⁷⁾では 74.8 mg フラクトース生成)。そこで phytin II を使用し、添加量の種類を細分して培養し測定法を変えた場合の結果を第3表に示した。難溶性 phytin の添加効果は培地に対し 0.05% 添加から見られるが、0.2% 前後の添加で充分であると考えられる。

phytin II を 0.2% 添加し 24 時間培養した培養液 5 および 10 ml 分の菌体を 10 g のグルコースを含む溶液 (50 w/w %) に作用させた結果 60°C, 40 時間の反応で、それぞれ 39.5% および 51.1% の異性化率を示し、後者

第3表 難溶性 phytin の添加効果 (2)

No.	phytin-II 添 加 量 (%)	母 液 pH	菌 体 量* (mg/100ml)	活 性** A	活 性** a
1	0	6.7	503	63	45
2	0.01	7.4	560	60	30
3	0.05	7.5	560	70	51
4	0.1	7.4	610	72	55
5	0.2	7.5	660	74	56
6	0.3	7.5	560	76	62

注: * Culture 28 hr. phytin 残量沈澱後測定

**A: フラクトース mg/12.5 mg Cell/3hr.

a: フラクトース mg/5.0 mg Cell/3hr.

の場合はほぼ反応の平衡に達した。

5. 培養液の pH に対する影響

第2, 3表で明らかのように、難溶性 phytin を添加培養すると、培養終了時の母液 pH が対照に比して高くなる。

異性化酵素を目的とする本菌株の培養においては、細菌の性状や通気条件に関連して培養液の pH 変化が異なり、これが培養管理のひとつのめやすになっている⁸⁾。すなわち、培養液の pH は初期に 0.3~0.5 の上昇を示してのち、酸性側に低下し、終期に再び上昇して pH 6.5~7.5 で培養を終るのが普通であるが、条件によっては、終期の pH 上昇までに長時間 (30~40 時間) を要する場合があり、このような場合には一般に、菌体収量、活性ともに劣ることが多い。これをさけるために、ジャーファーメンターによる培養では、通気量の調節やアルカリによる pH 調整を行なうのであるが、難溶性 phytin の添加は、この場合著効がある。第1, 2図に振盪培養およびジャーファーメンターによる培養に phytin を添加したときの結果を示した。いずれの場合にも、対照の pH が酸性側に低下して回復が遅れているのに対して phytin 添加区は pH の再上昇が順調で活性も良好である。つまり phytin 添加によって、培養管理が著しく簡易化されることになる。

以上によって、難溶性 phytin の添加効果はかなり顕著なものがあり、また添加の結果として培養液の pH 変化が制御されることは明らかである。いっぽう、可溶性フィチン酸塩には添加の効果は認められない。そこで、培養液の pH 低下を抑制する目的で、炭酸カルシウムを添加試験したところ、第4表に示すようにかなりの効果が認められたが、phytin の効果には及ばない。第3表の結果をみても phytin 添加効果の発現と pH の変化は

第1図 振盪培養の経時変化
C, 対照 P, phytin-II 添加 (0.2%)

第2図 ジャーファーマンター培養の pH 変化

C, 対照 P, phytin-II 添加 (0.2%)
5l ジャーファーマンターに 2.5l 仕込み, 当
量通気, 200 rpm, 30°C で培養

第4表 無機塩の第加効果

添 加 塩 類	菌株 No. 6		菌株 No. 7	
	母液 pH	比活性**	母液 pH	比活性**
対 照	6.7	100	6.6	100
phytin-II 0.2%	7.1	160	7.1	220
炭酸カルシウム 0.1%	7.1	130	7.3	170
硫酸コバルト*	—	—	7.0	80
磷酸コバルト*	—	—	6.9	140
燐酸コバルト*	6.1	110	6.1	140

注: * Co²⁺ として 10⁻³M 添加

** B法で測定し, 対照を 100 とした値

必ずしも併行していない。これらのことから phytin 添加効果の一因は pH 制御によると認められるが全部ではないと考えられる。

いっぽう, phytin には金属キレート作用のあることが知られており, 本実験の場合にも CoCl₂ として添加したコバルトは一部不溶性 phytin に吸着される。すなわち, 基本培地に phytin-II を 0.2% 添加し, 120°C で殺菌したのち不溶性の phytin を分離洗滌し, このなかに含まれるコバルトを原子吸光法で測定したところ, 当初添加したコバルトの 11~12% が吸着されていた。また, 第4表に示したようにコバルトを難溶性の磷酸塩や燐酸塩として添加すると対照に比し賦活効果がみられるが, 硫酸コバルトのように易溶性のコバルト塩には効果が認められない。

基本培地に添加している 10⁻³M のコバルト濃度は, これを 2×10⁻³M とすると細胞増殖が著しく抑制されることから, かなり極限に近いものと考えられるので, 上述の結果から phytin のキレート作用もある程度賦活に關与するものと推定される。

6. 要 約

放線菌 *Streptomyces phaeochromogenus* のグルコース異性化酵素生産に対するフィチン酸塩の効果を試験した。可溶性フィチン酸塩は酵素生産に対してほとんど効果はなく, 添加量が多いと, 菌体収量や活性に対して阻害作用がある。これに対して難溶性 phytin の添加は酵素生産を増進する効果があり, とくに単位菌体当りの活性に著しい効果がある。phytin の添加によって, 培養液の pH が著しく酸性側に傾くことが抑制され, これが添加効果の一因と考えられるが, ほかに難溶性 phytin がコバルトイオンを吸着することも, 効果の発現に關与するものと推定される。

終りに, コバルト測定に御協力を頂いた堤忠一技官に謝意を表します。

文 献

- 1) 木村午朗・野田栄一: 特許公報, 昭 42-8908.
- 2) 菊野正隆: 特許公報, 昭 40-27306.
- 3) 沖 俊一・宮地昇・尾崎浅一郎: 特許公報, 昭40-27296.
- 4) 藤島鉄郎・鈴木守郎: 昭和 43 年 4 月 4 日, 日農化大会講演.
- 5) 福島男児・内田金治・林 和也・安田 敦・荒井晃: 特許公報, 昭 41-144.
- 6) 津村信蔵・坂倉悦子・石川雅子・佐藤友太郎: 醗協誌, 23, 516 (1965).
- 7) TSUMURA, N., SATO, T.: *Agr. Biol. Chem.*, 29, (12), 1129 (1965).
- 8) TSUMURA, N., HAGI, M., SATO, T.: *Agr. Biol. Chem.*, 31, (8), 902 (1967).

(1969 年 4 月 12 日受理)