



黴類のタンニン分解酵素に関する研究（第1報）：酵素力測定法及び選択菌の酵素力

西羅, 寛
麦林, 檜太郎

(Citation)

兵庫農科大学研究報告. 農芸化学編, 1(1):6-10

(Issue Date)

1953-12

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/81008118>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81008118>



微類のタンニン分解酵素に関する研究

(第1報) 酵素力測定法及び選択菌の酵素力

西 羅 寛, 麦林 檜太郎 (醸造学講座)

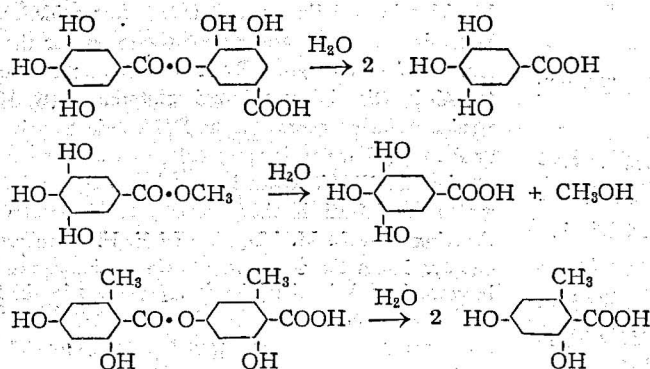
Studies on the Tannin Decomposing Enzyme of Molds.
(Part I.) Method of determination of the enzyme activity and
the tannin decomposing activity of the selected mold.

Hiroshi NISHIRA and Narataro MUGIBAYASHI

I. 緒 言

著者等は当大学の立地条件から、林産物利用加工部門の基礎的研究として、微類のタンニン分解酵素の実験を企図した。タンニン分解酵素所謂 *Tannase* とは、1786年 SCHEEL¹⁾が発見した酵素で、極めて複雑な化学集成を持ち尙化学構造の詳細は不明であるタンニンを加水分解して、没食子酸と他の物質にする酵素である。

$\text{Tannin} + n\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Gallic acid} + \text{Other substance}$
DYCKERHOFF 及 ARMBRUSTER²⁾によると *Tannase* は2つ以上の OH をもつた Phenolcarbon säure の OH に隣接せずに直接 Benzen 核に置換せる Carboxyl 基と任意の OH との間の Ester-結合に特異性を有する1種の酵素である。故に次の諸物質も基質となり得るわけである。Methyl gallate, Methyl protocatechuete, Gallotannin, Chebulinic acid, Lecanoric acid, m-Digallic acid.



今回使用の酵素は純化しておらず従つて他の諸酵素を含んでおり NICHOLSON 等³⁾が生じた没食子酸を更に分解する *Pyrogallase* を cell-free に証明しており事実今回の使用菌類が強弱はあるが没食子酸或はピロガロー

ルのみを炭素源とする培養基に生育し得た事等から、*Tannase* の語をさしひかえタンニン分解酵素と称しておく。尙普通商品のタンニンは生理的胃酸に対して病的胃酸とも言はれるピロガロール胃酸に属するガロタンニンである。今回は其の実際の及応用方面を考え日本薬局法の Tannic acid を基質として用いる事にした。

II. タンニン分解力の強い使用菌種の選択

該酵素は微類鮮苔類等に認められているのみで^{4,5)}高等の動植物組織については研究^{2,6,7)}はあるが尙疑問である。糸状菌については KNUDSON^{8,9)}の広汎な研究があり、氏によれば *Penicillium* 属, *Aspergillus* 属, *Mucor* 属その他合計 23-Strains のタンニン含有培地での試験の結果、タンニン10%の高濃度培地でも尙生育し得たものは *A. flavus*, *A. niger*, *Pen. sp. (glaucum)*, *A. oryzae* の4株であつたと報告している。小田氏¹⁰⁾は61菌株から *A. iaponicus*, *A. oryzae* *Forma Tannase* の2株を、

福本氏¹¹⁾は多数の菌株から *Penicillium* 属の強力株を夫々分離選択している。之等菌種は他の菌類と異り炭素源としてタンニンのみを加えた培地にもよく生育し得る事実に基づき、福本博士より御分譲頂いた *Penicillium sp.* (No. 80, No. 80 B', Aの3株) から、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Tannin 5%合成培地を用いてNo.80菌を選択した。(福本博士に厚く感謝申し上げる)。更に同培地を用い各種資料の中から分解力の強い菌の

分離を試みたが、得た菌株は *Penicillium sp.*, *A. oryzae sp.*, *A. niger sp.* の3種類のみであつて、その菌絲の発育と分生芽胞の形成状態から標準菌株に比べて孢子着生能の大変早く且強い *A. niger sp.* (分離10号)を

選び、標準菌株として *A. niger*, 以上3菌株を用いる事にした。

Ⅲ. タンニン分解酵素力測定法の検討

基質としてタンニンを用いたから、測定法として1)生成する没食子酸の定量, 2)未分解残タンニン量の定量が考えられる。中和滴定による FREUDENBERG 法¹²⁾及 DICKERHOFF-ARMBRUSTER 法¹⁾, 比色定量による DEYS-DIJKMAN 法, NICHOLSEN 法¹³⁾及 NICHOLSEN と NIERENSTEIN の改良法¹⁴⁾, 沃素滴定に基礎をおく FERDINAND JEAN 法¹⁵⁾, 硫酸銅その他の試薬を用いる DREAPER 法¹⁶⁾, A.O.A.C. 記載の各種の方法¹⁷⁾ 等があるが, KNUDSON⁹⁾も指摘している様に現在尙普遍適確な方法がない。福本氏¹¹⁾は LÖVENTHAL 法¹⁸⁾を, 小田氏¹⁹⁾は RHIND-SMITH 法を採用している。LÖVENTHAL 法¹⁸⁾は皮粉或はゼラチンにてタンニンを除き インヂゴカルミン を指示薬として其の前後を KMnO_4 にて滴定し, その差に係数を乗じて測定する方法であり, RHIND-SMITH 法¹⁹⁾も無脂肪のカゼインにてタンニンを除き LÖVENTHAL 法と同様にして測定する方法で, 何れにしてもタンニン吸着除去の吸着剤が問題になるわけである。住木氏²⁰⁾は鯨, 鯨, いるかの皮を用いるタンニン定量用皮粉代用品の探索を行っているが, 従来輸入している皮粉に優るものはないと報告している。他に

A.O.A.C.¹⁷⁾によると骨炭の使用も可能であるが, 今回入手出来た Caseinum nach Hammarsten, 市販カゼインを脱脂したもの, 標準として皮粉の3者について先づタンニン吸着能を比較した。その結果は Table 1. に示す様に Caseinum nach Hammarsten, 皮粉は相違がなく市販カゼインを脱脂したものは劣る事を知った。RHIND-SMITH 法使用の結果問題になるのは 1) Indigocarmin 20cc と更に蒸溜水 750cc を用いる点, 2) カゼイン 2 回吸着操作の点, 3) 終末点, 4) 吸着カゼインの濾過の点の4点である。1)2)の点は Table 2. より明らかな様に, Indigocarmin, 蒸溜水の使用量は原法の1/4量でも低濃度タンニン溶液では差異なく, 又0.1~0.15%のタンニンの低濃度であればカゼイン 1 回吸着で略脱タンニンの目的を達する事が出来た。尚1/4量使用の方が終末点明確で取扱が非常に簡便である。3)の終末点は原法その他によれば溶液の周囲に淡赤色 (faint pink color) の現われる点とあるが, 如何にしても此の点を見出し得ず, A. O. A. C. によれば「blue color が green に変化するまで KMnO_4 を加えた後, 更に数滴の KMnO_4 の添加により, golden yellow になる点が終末点」とあり, これによれば明確に知り得るので此の点を終末点とした。4) の点については, 小田氏によれば濾紙上に保った BaSO_4 層を通して濾過した (通信により御指示頂いた小田博士に感謝申し

Table 1. Comparison of Absorptive Power of Tannin-Absorbent.

Sort of Absorbent		Caseinum nach Hammarsten	Hide Powder	Commercial Casein (Fat-free)
0.1% KMnO_4 cc (Corresponding to Absorbed Tannin)	Once Absorption	3.75	3.4	1.6
	Twice Absorption	5.25	5.1	2.7
Absorbed Tannin mg.		126.0	122.4	64.8

Experimental Condition: Total vol. 25 cc $\left\{ \begin{array}{l} \text{Ca. 1\% Tannic acid sol.} \cdots \cdots \cdots 20\text{cc} \\ \frac{\text{N}}{10} \text{-Posphate buffer (pH 5.8)} \cdots \cdots \cdots 4\text{cc} \\ \text{Distil. Water} \cdots \cdots \cdots \cdots \cdots \cdots 1\text{cc} \end{array} \right\}$ 1g. of Absorbent was used everytime.

Table 2. Comparison of Quantity of Reagent and Frequency of Operation by Absorbent in Rhind-Smith's Method.

Conc. of Tannin ca. %	Quantity of Reagent	KMnO_4 (0.1%) cc. Corresponding to absorbed tannin	
		Once Absorption	Twice Absorption
0.1	Indigo ca. 5cc + Distil. w. 180cc	2.75	2.80
	Indigo ca. 20cc + Distil. w. 750cc	2.80	2.85
0.3	Indigo ca. 5cc + Distil. w. 180cc	8.10	8.60
	Indigo ca. 20cc + Distil. w. 750cc	8.00	8.50
0.5	Indigo ca. 5cc + Distil. w. 180cc	15.00	16.60

上げる)との事であるが、東洋濾紙 No. 5C のみで充分その目的を達する事を知った。以上の点を考慮に入れて次の様に RHIND-SMITH 法を少し変えて用いる事にした。即ち該酵素液と基質タンニン、緩衝液、トルオールを加え恒温水槽にて所定の温度に保ちタンニンの減少量を測定する。試薬1. 約 0.1% KMnO_4 液: 既知濃度の蓚酸アンモニウムにて其の濃度を決定する。試薬 2. 0.5% Indigo-carmin 液: 稀硫酸溶液とする。この溶液を指示薬として用いるのであるが先づ此の指示薬によつて使用される KMnO_4 溶液の量を測定する。その為に此の指示薬液5ccを1L容 磁製ビーカーに取り蒸留水 180cc を加えよく振盪しながら KMnO_4 溶液にて滴定する。其の終末点は前述の通りである。此の滴定で指示薬によつて消費される KMnO_4 溶液の量を知る。タンニンの定量法。反応混液25~20cc をとり、其中4cc を磁製ビーカー(1L容)にビベットし、これに Indigo-carmin 液5cc と蒸留水180cc とを加え前述の如く KMnO_4 溶液にて滴定する。次に残りの21cc~16cc に Caseinum nach Hammarsten 1g を加えて良く振盪し 15 分間放置後東洋濾紙 No. 5C にて濾過する。この様にしてタンニンが除去された後の濾液中より4cc をビベットし前述の如く KMnO_4 溶液にて滴定する。前後2回の滴定値の差が未分解残タンニンの量を示す。蓚酸アンモニウム 1g はガロタンニン 0.4648g に相当する。

IV. RHIND-SMITH 法によるタンニン分解酵素力実験

酵素液の調整。種々実験の結果、蓚5gに所用量のタンニンを加え(対照はこの場合タンニンを加えない)水道水 4.5 cm^3 を添加してよく混合し、15 lbs 30 分加圧殺菌後、新しい麵汁培養菌株を1白金鈎移植、30°C で所用日数(2~3日培養が最適であつた)培養した。この様にして得た

麵麴を乳鉢にてよく碎磨して1%食塩水 30 cm^3 を加え、25°C で3~4時間抽出(トルオール添加のもと)濾過し濾液をそのまま酵素液とした。a) タンニン添加麵麴と蓚のみの麴との分解力の比較試験。反応混液組成: 基質0.1% タンニン溶液10cc, 酵素液2cc, 磷酸緩衝液 $\frac{N}{10}$ 溶液(pH 5.8)²⁾ を2cc, 蒸留水 4cc, トルオールを1~2 滴, 総容 20cc, 作用温度 40°C³⁾, 作用時間48時間, 以上の条件における諸実験の中 No. 80 菌種についての1例をあげると Table 3. の如くである。タンニン分解酵素はタンニンの存在する時にのみ產生される所謂適応的に產生される酵素である。Asp. niger, 分離10号も適応的酵素の点に於ては同様な結果を得た。b) 酵素と基質濃度との関係。各種条件は a) と同じ。但し基質濃度のみを1.5%, 1%, 0.5%, 0.1% とかえて実験した。タンニンは蛋白質系統の洗滌剤でもあり、現在までの知見により加水分解酵素の殆んど大部分が蛋白質に密接な関係のある物質とすれば、尙更該酵素の基質濃度が問題になる。この実験が Table 4. で、0.1% では明らかに分解作用を認めるが0.5% では稍弱く、それ以上の基質濃度では認めなかつた。c) 時間的経過に伴うタンニン分解酵素力試験。基質濃度0.1%, 1%, 2% については Table 5. の如く、1%, 2%, 基質濃度では、たとえ作用時間が5日でも分解を認めない。0.1% では48時間或はそれ以内で分解し得る最高に達する様である。基質濃度0.3% (RHIND-SMITH の用いている濃度)での実験は Fig. 1. (A)(B) の如く、使用した3菌株の中分離10号が最もタンニン分解力強く No. 80 は比較的徐々に分解、最後には3菌株共に略同程度まで分解し得る。併し培養日数の長い麴では (B) の如くタンニン分解力は減少するが No. 80 では特に甚しい。d) 製麴に際しタンニン添加量の該酵素生産に及ぼす影響。前述の試験結果の如く該酵

Table 3. Enzymic Hydrolysis of 0.05% Solution of Tannin.

	Control	Sort of Fusuma-Koji (added or not tannin per. 5g fusuma)		
		Fusuma only	0.01g Tannin	0.1g Tannin
Quantity of non-hydrolyzed tannin (mg.)	5.28	5.56	1.44	0.48

Pen. sp. No. 80 strain used.

Table 4. Relation Between Tannin Decomposing Enzyme and Concentration of Substrate. (No. 80 strain)

cc of Enzyme Solution added	Control	1 cc			
Concentration of Substrate ca. %	1	1.5	1	0.5	0.1
0.1% KMnO_4 cc (Corresponding to non-hydrolyzed tannin)	3.0	2.7	2.7	2.0	1.9
FeCl_3 -Reaction (After Preparation by Absorbent)	—	—	±	+	卅

Table 5. Enzymic Hydrolysis of Tannin-solution.
(A) 1% and 2% Solution of Tannin.

	Conc. (%)	1	2
	Time(days)		
Quantity of non-hydrolyzed tannin(in 100cc)	0	0.648	1.248
	1	0.600	1.392
	2	0.600	1.296
g.	5	0.624	1.296

No. 80 Strain used.

(B) 0.1% Solution of Tannin.

	Heat-treat.	none	1min. in boiling water
	Time(days)		
Quantity of non-hydrolyzed tannin (in 100cc)	0	67.2	67.2
	1	33.6	67.2
	2	31.2	62.6
mg.	3	28.8	64.8
	4	31.2	64.8

Reaction Mixture Sol.; Tannin 1g, 2g or 0.1g, Distil. w. 75cc, Phosphate buffer 20cc. Enzyme sol. 5cc, Total vol. 100cc. Toruol 1cc.

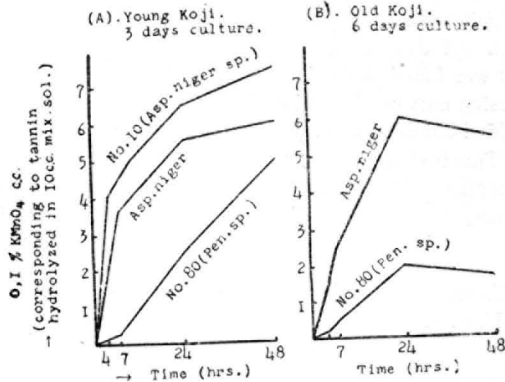


Fig. 1. (A), (B)

Enzymic Hydrolysis of 0.3% Solution of Tannin. Comp. of medium; 5g. Fusuma 0.1g. Tannin Tap W. 4.5cc.

Reaction mix. sol.; Total vol. 100cc.
0.6% tannin sol. 50cc.
N
10 Phosphate buffer (pH5.8) ... 20cc.
Distil. W. 20cc.
Enzyme sol. 10cc.
Toruol 1cc.

素は適応的に産生される酵素で Fig. 2. (A) (B) の如く製麹の際のタンニン添加は幾分菌の生育を制御するが、菌株の發育を甚しく害しない程度に添加量の高い方がその産生力は強い。e) 該酵素液の熱処理による影響。RHIND-SMITH 法による該酵素力測定の際酵素力を停止さ

(A) No.10(Asp.niger sp.) (B) No.80(Pen.sp.)
2 days culture. 3 days culture.

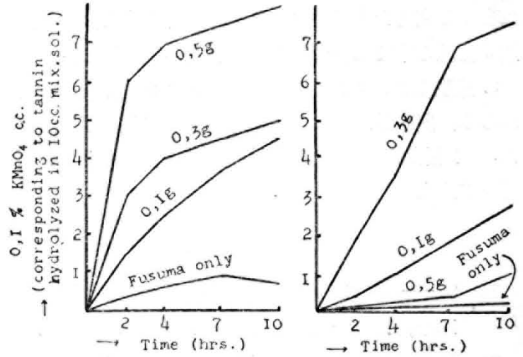


Fig. 2. (A); (B).

Effect of Tannin Added (On the Enzyme Produced in the Preparation of Fusuma Koji) Experimental conditions are the same as in Fig. 1.

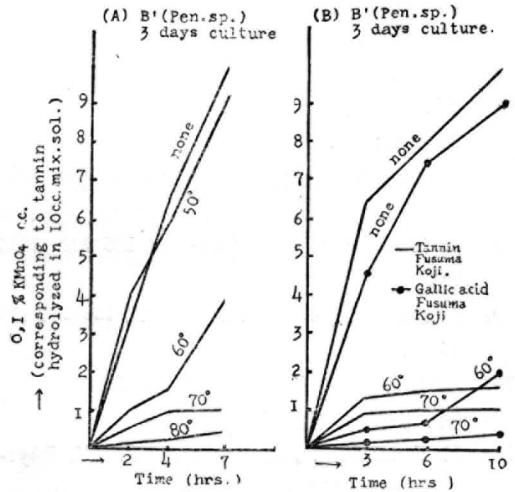


Fig. 3. (A), (B).

Effect of Heat Treatment of Enzyme Solution. Heat treatment; 5 min. in boiling water.

Experimental conditions are the same as in Fig. 1.

せる為に煮沸水中で1分間熱処理を行つているが、更に酵素液を各温度に熱処理して、該酵素の熱による破壊温度限界を試験した。結果は Fig. 3. (A) (B) の如し。60°C 熱処理では尚酵素力は残るが、70°C 以上では殆んど破壊されて了う。当初文献記載その他により反応温度60°C で予備試験を行つていたがこれは適確でない事を知つた。(尚 Fig. 3. に示す使用菌 B' 及び没食子酸添加麹菌については第2報で報告する。)

V. 綜 括

1. 使用菌株として *Penicillium sp.* (No. 80), 分離

10号(*Asp. niger* sp.), 標準菌株として *Asp. niger* の3菌株を分離又は選択し, Rhind-Smith 法を検討してそれを少し変えた方法でタンニン分解酵素力を試験し, 使用3菌株の中では分離10号が一番強い事を知った。

2. 微類のタンニン分解酵素はタンニンの存在した場合にのみ, 所謂適応的に産生される酵素である事を確認した。(本報告は昭和27年11月1日, 日本農芸化学会関西支部秋季大会に於て講演済)。

文 献

- 1) SCHEEL, K.: Über das Wesentliche Galläpfelsalz, *Crell's Chem., Ann.* 1, 3-12 (1787).
- 2) H. DYCKERHOFF, R. ARMBRUSTER: *Z. Physiol. Chem.*, 219, 38-56 (1933).
- 3) W. N. NICHOLSEN, M. NIERENSTEIN C. S.: *Biochem. J.*, 25, 752-755 (1931).
- 4) A. RIPPET, J. KESLIG: *Arch. Mikrobiol.*, 1, 60 (1930).
- 5) K. FREUDENBERG, E. VOLLBRECHT: *Z. Physiol. Chem.*, 116, 275 (1921).
- 6) MÖRNER: *H.*, 16, 255 (1892).
- 7) SEBURIG, MORDHORST: *Biochem. Z.*, 100, 204 (1919).
- 8) L. KNUDSON: *J. Biol. Chem.*, 14, 185-202 (1913 b),
- 9) L. KUNDSON: *J Biol. Chem.*, 14, 159-184 (1913 a).
- 10) 小田, 池田, 谷本: 醸工, 27, 16 (1949),
- 11) 福本寿一郎: 未発表.
- 12) K. FREUDENBERG, E. VOLLBRECHT: *Z. Physiol. Chem.*, 116, 277 (1921).
- 13) W. N. NICHOMSEN: *Analyst*, 2, 48 (1923).
- 14) W. N. NICHOLSEN, D. RHIND: *Analyst.*, 49, 505 (1925).
- 15) F. JEAN: *Chem. Centralbl.*, pp, 1107-08 (1900).
- 16) W. P. DREAPER: *Chem. News.* xc, pp, 111-112 (1904).
- 16) Methods of Analysis A.O.A.C., 11, 27, 11, 28, 9, 37, 9, 38, 14, 37, 14, 39, 28, 15 (1950).
- 18) LÖWENTHAL: *Z. Anal. Chem.*, 91, (1881). Skinner: "Official and Tentative Methods of Analysis", 4th edit. (1925).
- 19) D. RHIND, and F. E. SMITH: *Biochem. J.*, 16, 1 (1922).
- 中沢亮治氏編: 醸酵工業便覧, 447 (1949)
- 20) 住木, 塩田, 荻野: 農化, 19, 618 (1943).

Summary

Among many strains of *Aspergillus* and *Penicillium* fungi, it was found that three strains; *Asp. niger* No. 10, *Asp. niger* and *Pen. sp.* No. 80; can grow more luxurly on the specific culture medium, which contains 5% tannic acid as solely carbon-source. Of these three strains of fungi, *Asp. niger* No. 10 was found to produce most active tannin-decomposing enzyme, determined its activity by the modified Rhind-Smith method.

Tannin-decomposing enzyme was recognized as a adaptive nature, as it was never produced in the ordinary "Fusuma" medium, unless a small amount of tannic acid was added.

(LABORATORY OF FERMENTATION TECHNOLOGY HYOGO UNIV. OF AGR.)