

纖維素分解酵素に関する研究(第4報)

組成を異にする数種の培養液における *Irpex*-Cellulaseの産生について

西沢一俊*・田中治雄*・市川能富子*

Cellulose-splitting Enzymes. IV.

Kazutosi Nisizawa, Haruo Tanaka and Nobuko Ichikawa*: On the Cellulase Production of
Irpex lacteus in Several Culture Media of Different Composition

(1954年9月5日受理)

西沢及び協同者は最近 *Irpex*-cellulase の精製を行い、⁽¹⁾ 結晶酵素と思われる製品を得たので、さらに進んで純粋製品の物理的・化学的性質についての研究を企てた。そのためには cellulase の収量を少しでも多くする必要があり、従つて cellulase 自身の産生の最適条件を探すことも勿論必要であるが、この酵素以外の性質類の carbohydrase の産生を出来るだけ压えることが理想的である。*Irpex lacteus* の培養液中には、cellulase のほかに β -glucosidase, sucrase, amylase などが検出されるがこれらのうち、amylase は精製過程において最後まで分離し難いので、我々は相異なつた組成の数種の培養液につき、可及的に先の目的に適つた条件を見出すべく検討を加えた。

実験の部

[I] 菌の培養方法

各種培養液を 500ml のフラスコに 150ml にとり、120°C の加圧釜中で 40 分間滅菌し、冷却後 *Irpex lacteus* の菌糸を植え付け、25—28°C の恒温器中に入れて培養した。表面培養においては、容器をそのままに静置したが、深部培養においては、毎日 2、3 回容器を震盪し成育して表面に拡がるようとする菌糸を常に液面下に沈むようにした。

[II] 各酵素力の測定

適当の培養期間後、表面・深部兩種培養フラスコ各 3 個ずつを恒温器より取り出し、兩種の培養液を別々に濾過して濾紙片や菌糸から分離する。培養液中に glucose を

添加しないものはそのまま酵素液として用い、添加したものは膀胱膜中で 3—4 日間透析してから酵素液として使用した。

酵素力の測定に当つては、cellulase には PH 4.0、その他の carbohydrase には PH 4.8 の 0.1N 酢酸緩衝液を用い、何れの場合にも酵素液と基質溶液とは等量を、緩衝液はその倍量を混合した。混合液中の各基質濃度は、CMC は 0.29%、澱粉は 0.50%、蔗糖は 0.41%、salicin は 0.33% である。この酵素反応液から一定の反応時間後（多くの場合 24 時間）5—15ml を採り、Bertand 法により遊離還元糖を定量し、その際得られる銅量を以つて酵素力を比較した。

[III] 培養液の種類

A—E の各種培養液を作るに当つては、炭素源や窒素源あるいは他の成分も豊富の、穀もろ共に粉砕した麦芽粉末に対して、相異つた炭素源や窒素源を適宜配合した合成培養の場合を比較検討した。即ち穀混入の麦芽粉末に無機の磷酸及び窒素化合物の少量を添加した(A)、炭素源を glucose のみとし窒素源は無機塩のほかに尿素を加えた(B)、炭素源には glucose のほかに濾紙を加え窒素源として尿素の代りに peptone を用いた(C)、木材腐朽菌の培養によく使われる乳酸を濾紙以外に炭素源とし、窒素源としては無機塩及び peptone を使用した(D)、培養液の組成をさらに簡単にしたところの、即ち炭素源としては濾紙を乳酸、窒素源としては無機塩時に硝酸アンモニアのみを使用した場合(E)を作製した。各培養液の組成の一覧表は第 1 表のようなものである。

[IV] 各種培養液における酵素力の比較

* 信州大学繊維学部、化学研究室

A~Eの培養液中の cellulase, amylase, β -glucosidase 及び sucrase の培養日数に伴う変化を図示すれば第1~8図の如くである。これらのうち、B、C及びE培養液については、表面及び深部の兩種の場合が比較さ

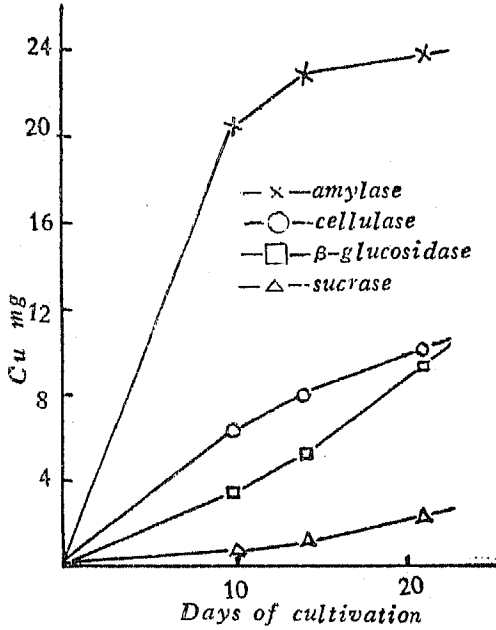


Fig. 1. Surface culture with A. Reaction time: 24 hrs.

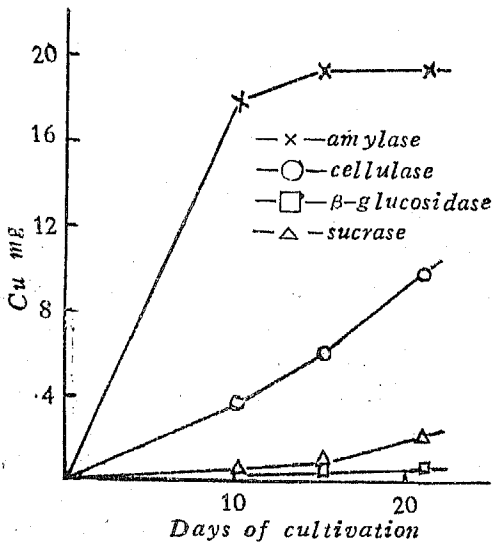


Fig. 2. Surface culture with B. Reaction time: 24 hrs.

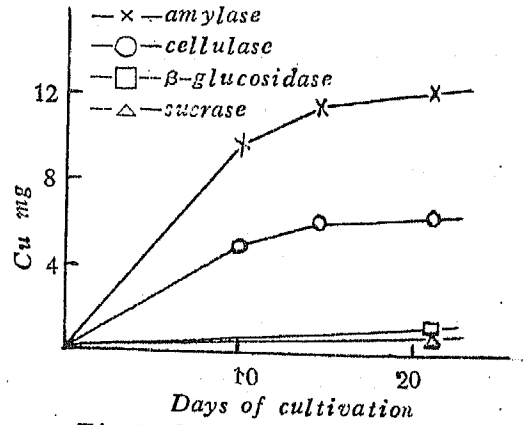


Fig. 3. Submerged culture with B. Reaction time: 24 hrs.

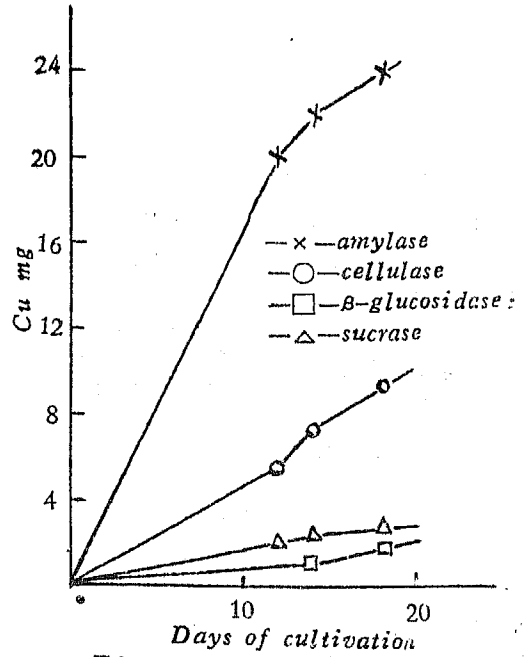
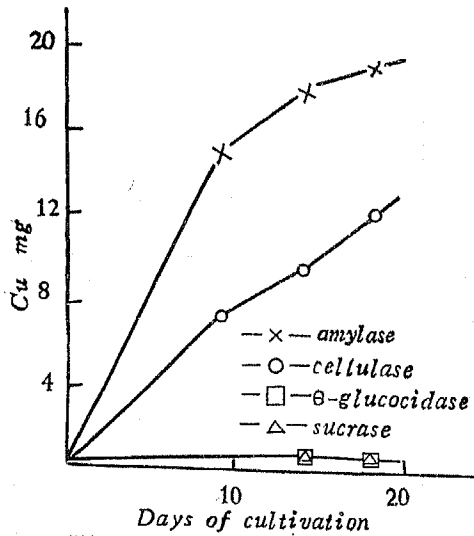


Fig. 4. Surface culture with C. Reaction time: 24 hrs.

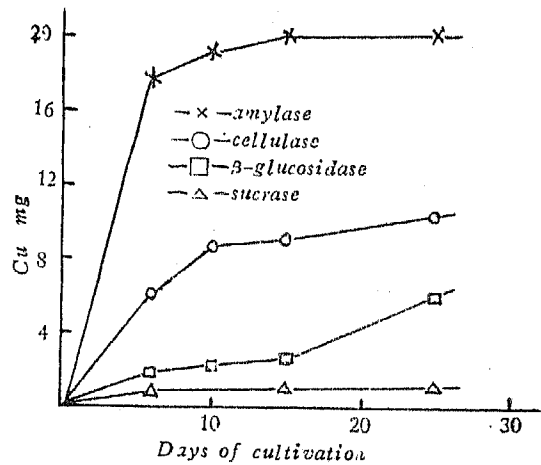
れている。各図中の縦軸上の Cu mg は濾液及応液 5ml に対する数値である。各図におけるそれぞれの曲線から先ず表面培養においては、次のようなことが指摘される (1)培養液Aにおいては他のものより特に β -glucosidase の産生が多い。また菌糸の発育は最も良好であるが、cellulase の産生は濾紙のみを炭素源としたものに比べ

Table 1. Composition of Each Culture Medium

Sort of culture medium	A	B	C	D	E
Composition					
C-origin (g)	malt powder with crushed hull, 10	Glucose, 5.0	Glucose, 5.0 Filter paper, 3.0	Lactic acid, 0.15 Filter paper, 3.0	Lactic acid, 0.15 Filter paper, 3.0
N-origin (g)		(NH ₄) ₂ HPO ₄ , 0.1 KNO ₃ , 0.03	Urea, 0.25 NH ₄ Cl, 0.25	Peptone, 0.25 NH ₄ Cl, 0.25	Peptone, 0.66 NH ₄ NO ₃ , 0.6
Other inorganic salts (g)	K ₂ HPO ₄ , 0.3 MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.075	K ₂ HPO ₄ , 0.3 MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.075	K ₂ HPO ₄ , 0.3 MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.075	K ₂ HPO ₄ , 0.3 MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.075	K ₂ HPO ₄ , 0.3 MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.075
Water (ml)	150	150	150	150	150

Fig. 5. Submerged culture with C.
Reaction time: 24 hrs.

てむしろ悪い。amylase の産生は培養日数10日までは順調に増大するが、それ以後はほとんど停止する。Sucrase は培養日数 20 日に及んでも培養液の方へは殆んど出て来ない。(2)炭素源が glucose のみ若しくはこれに濾紙を入れた C 培養液においては、amylase, cellulase の両者は A と殆んど同じ産生傾向であつたが β-glucosidase の方は sucrase と同様 20 日以上になつても培養液は出て来ない。(3) E 培養液に於ては菌糸の發育は悪いが、各酵素の産生傾向は A の場合と殆んど同様であつた。(4) D 培養液においては 10~14 日培養までは amylase

Fig. 6. Surface culture with D.
Reaction time: 24 hrs.

産生は cellulase と同程度あるいはむしろこれより悪く、それ以後になり漸く順調な増大を示した。この点他の培養液の場合と趣を異にする。次に深部培養については次のようなことが指摘される。(1)いずれの培養液においても菌糸の發育は一般的に悪く、各酵素力も一般的には弱い。E 培養液においては cellulase の産生は表面培養の場合よりむしろ旺盛である。(2) E 培養液における amylase の産生は β-glucosidase や sucrase と同様著しく抑えられ、従つて cellulase よりも遙かに微弱であつた。即ち E における深部培養は、一見 cellulase のみが優勢的に産生されるような結果であつた。

以上の結果から他の酵素は比較的弱く cellulase は比

較的強いような培養には、現在のところE培養液中の深部培養が最も適しているように思われる。

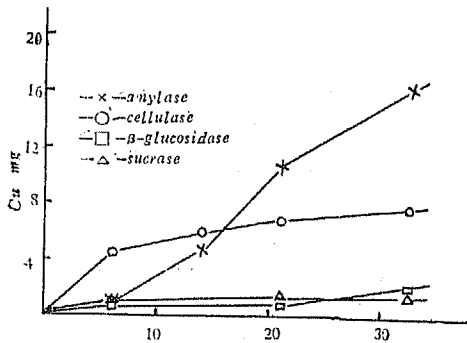


Fig. 7. Surface culture with E. Reaction time: 10 hrs.

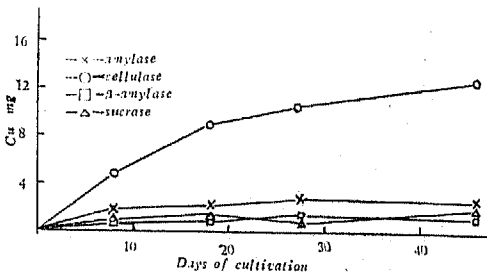


Fig. 8. Submerged culture with E. Reaction time: 6 hrs.

議 論

酵素の産生量は他の条件を一定しても、その時の菌糸の発育状態により著しく左右されるので、培養液相互においてこれを量的に比較することは菌糸の量を正確に測る必要がある。然し一つの培養液における各酵素の産生状況を比較するには、今回の我々が行った方法でも大体その傾向は知ることが出来る。炭素源として濾紙のみを用い窒素源としては硝酸アンモニアのような無機塩を用いて深部培養すれば、いずれも *exo-enzyme* でありながら *amylase* の産生は極端に圧えられるのに反し、*cellulase* の方はむしろ増大する現象は注目すべき事実であるがこれに対する解釈は現在の我々の実験からは何

ら与えることは出来ない。然しながら、震盪と通気により深部に培養する方法は一般に行われているもので、これは結局深部に菌糸を沈めることにより菌糸の濾紙面上における発育を催し、ひいては *cellulase* の産生を速進させるものではなからうかと臆測される。

摘 要

cellulase の精製を目的として、炭素源や窒素源のそれぞれ異つた数種の培養液に *Irpex lacteus* を培養し、それから産生される *cellulase* 並びにそのほか二・三の *carbohydrase* の消長を観察したところ、次の組成の培養液中で震盪しながら深部培養するのが最も有効であることが判つた。乳酸 0.15~0.30g, 濾紙 3.0g, 硝酸アンモニア 0.6g, 第2磷酸カリ0.3g, 硫酸マグネシウム 0.075g, 水 150ml。

文 献

- (1) 西沢一俊・小林敏雄・市川能富子, 酵素化学シンポジウム, 7月(1954)名古屋, 講演。
- (2) 福本寿一郎・岸清: 大阪工試報, 26, 295 (1952)。
- (3) D. R. Whitaker, Arch. Biochem. and Biophys., 43, 253(1953)。

Summary

The production of *cellulase* from *Irpex lacteus* grown in the culture media of several sorts has been investigated with a view of serving the purification of this enzyme. It has been found that the submerged cultivation in a medium of the following composition is most suitable for this purpose among the present tests. Filter paper 3.0g, lactic acid 0.15~0.3g, ammonium nitrate 0.6g, secondary phosphate 0.3g, and magnesium sulfate 0.075g per 150ml of water.

(Chemical Laboratory, Faculty of Textile and Sericulture, Shinshu University)