

## Corn seed hemicellulose 分解菌培養の培地組成と 粗酵素 hemicellulase の収量との関係について

大宮 満男・高橋 紀子・小川サチヨ\*・徳安 泰子\*

長崎大学教育学部家政科教室  
(昭和47年10月31日受理)

## The Effect of the Media of the Bacterium Which Decomposes Corn Seed Hemicellulose on the Production of Hemicellulase

Mitsuo OOMIYA, Noriko TAKAHASHI, Sachiyo OGAWA, Yasuko TOKUYASU

Department of Home Economics, Faculty of Education  
Nagasaki University, Nagasaki

(Received Oct. 31, 1972)

The bacterium which produces hemicellulase - the hydrolytic enzyme of corn seed hemicellulose - had been isolated before in this laboratory.

The composition of the medium for the incubation of this bacterium was examined to obtain more hemicellulase, especially on the carbon and nitrogen source.

After 7 days' incubation using 28 different kinds of media, cold acetone was added to 75 per cent to each clear medium and the precipitates formed were collected and lyophilized. The yield and the hemicellulase activity were measured on the crude preparation of hemicellulase obtained from each medium.

The results showed that corn seed hemicellulose and corn powder which was free from fat, starch, and pectin were suitable as the carbon source, and sodium nitrate was suitable as the nitrogen source to obtain hemicellulase in good yield.

---

\* 長崎女子短期大学 Nagasaki Women's Junior College, Nagasaki

## 緒 言

さきに、著者らは corn seed よりヘミセルロースを調製<sup>(1)</sup>した。また、このヘミセルロースを用いて同一起源の corn seed より、ヘミセルラーゼ活性を有する菌（以下、これを 101 号菌とよぶ）を分離<sup>(2)</sup>した。

今回は、この 101 号菌を用いて、粗酵素ヘミセルラーゼを多量に得るための培地組成、特に炭素源と窒素源とについて検討をおこなった。

## 実 験 方 法

### 1. 培地の組成

いずれの場合も、第 1 表に示す 4 種の物質を水道水に溶解し pH 6.2 に調整した。

第 1 表 基本培地組成

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 %
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02 %
炭 素 源	0.5 %
窒 素 源	無機窒素として 0.033%

ここで、炭素源については、corn seed より分離調製したヘミセルロースをはじめ、その構成糖および類似の調製品等 10 種を選んだ。また、窒素源としては、硝酸塩、アンモニウム塩、ペプトン等 4 種を選んだ。これらの炭素源と窒素源とを 1 種ずつ組合せることにより、No. 1 より No. 28 に至るそれぞれ組成の異なる 28 種の試験培地を作製した。

### 2. 培養法、沈澱物の生成および粗酵素標品の作製

各培地に 101 号菌（対数期のもの）を 2 白金耳ずつ接種し、37°C で 7 日間、静置培養をおこなった。

この培養液をパーライトおよびラジオライトを用いて吸引濾過し、濾液に 3 倍容の冷アセトンを加えて生じた沈澱物を冷凍遠沈で集めた。

更に、粗酵素の作製にあたっては、このアセトン沈澱物を凍結乾燥して標品とした。

### 3. 蛋白質の定量法

Lowry<sup>(3)</sup>の方法に準じておこなった。標準蛋白質として bovine serum albumin を用いた。

### 4. 酵素の作用条件および活性測定法

corn seed ヘミセルロースの 0.2% 溶液 (0.1M, pH 5.7 の phosphate buffer に溶解) を基質とし、10 ml に酵素液 1 ml を加えて 37°C にて一定時間反応させた。

#### a) 粘度法による酵素活性測定

オストワルド粘度計を用いて、上記作用条件で反応させた場合の基質溶液の粘度低下率を下式により求めて酵素活性を表わした。

$$\text{酵素活性(粘度法)} = \frac{t_1 - t_2}{t_1 - t_0} \times 100(\%)$$

- t<sub>0</sub> : phosphate buffer の落下時間
- t<sub>1</sub> : 基質溶液の落下時間
- t<sub>2</sub> : 酵素反応後, 反応液の落下時間

b) 還元力の増加による酵素活性測定

上記作用条件で一定時間酵素反応の後, ヘミセルロースの加水分解に伴う還元力の増加を Somogyi-Nelson 法<sup>(4)</sup>により定量し, キシロース当量で表現した。

実験結果

1. 培地組成のちがいによる酵素活性と生成蛋白質量

第1回試験培地における成績は第2表のとおりである。101号菌の培養液の酵素活性と, アセトン沈澱物中の蛋白質量とを測定して, それぞれの培地組成と酵素生成量との関係を知るための指標とした。

第2表 培地組成のちがいによる酵素活性と生成蛋白質量 (第1回試験)

試験培地		7日間培養後		試験培地		7日間培養後	
No	C-源 N-源	培地 100 ml 中 生成蛋白質量 (mg)	粘度法による 酵素活性 (%)	No	C-源 N-源	培地 100 ml 中 生成蛋白質量 (mg)	粘度法による 酵素活性 (%)
№1	キシロース NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2	10.3	№13	キシロース NaNO <sub>3</sub>	—	4.7
№2	アラビノース NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8	1.8	№14	アラビノース NaNO <sub>3</sub>	—	1.6
№3	グルコース NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	9.7	№15	グルコース NaNO <sub>3</sub>	0.3	3.2
№4	ガラクトース NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6	4.2	№16	ガラクトース NaNO <sub>3</sub>	0.9	4.0
№5	可溶性デンプン NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.4	4.2	№17	可溶性デンプン NaNO <sub>3</sub>	0.6	4.5
№6	ヘミセルロース NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.7	14.8	№18	ヘミセルロース NaNO <sub>3</sub>	5.2	59.8
№7	キシロース (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.9	3.4	№19	キシロース ペプトン	1.1	5.9
№8	アラビノース (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.9	8.9	№20	アラビノース ペプトン	0.9	1.5
№9	グルコース (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	3.1	№21	グルコース ペプトン	1.4	5.9
№10	ガラクトース (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.8	2.9	№22	ガラクトース ペプトン	2.4	1.1
№11	可溶性デンプン (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.4	3.0	№23	可溶性デンプン ペプトン	2.2	6.6
№12	ヘミセルロース (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.9	17.1	№24	ヘミセルロース ペプトン	4.3	25.6

corn seed ヘミセルロースを炭素源とした場合が, いずれも好成绩を収めたが, 中でも炭素源に NaNO<sub>3</sub> を用いた場合が, 酵素活性が著しく高く, また蛋白質量も多かった。

このことは, 101号菌を分離する段階<sup>(2)</sup>で用いた炭素源, 窒素源と一致している。故に, 以後, 窒素源としては NaNO<sub>3</sub> を使用することとし, 更に, 炭素源として corn seed に由来する物質, あるいは類似の物質について検索することとした。

第2回試験培地における成績は第3表のとおりである。

酵素活性および蛋白質量ともに, 脱ペクチン・コーン粉末を炭素源とした場合が好成绩を示し, ヘミセルロースとほとんどかわらないことがわかった。

第3表 培地組成のちがいでによる酵素活性と生成蛋白質量  
(第2回試験)

試験培地		7日間培養後	
No	C-源	培地100ml中 生成蛋白質量 (mg)	粘度法による 酵素活性 (%)
No25	コーン粉末	11.5	3.8
No26	脱澱粉・コーン粉末 (コーン粉末より脂肪・澱粉除去)	3.4	8.2
No27	脱ペクチン・コーン粉末 (コーン粉末より脂肪・澱粉・ペクチン除去)	4.7	○69.9
No18	ヘミセルロース	4.0	○71.3
No28	キシラン	2.9	○11.2

## 2. 粗酵素の収量

前記28種の試験培地のうち、酵素活性および蛋白質収量の良好なものから、炭素源を3種選んで、培養後、同一方法で得たアセトン沈澱物を凍結乾燥して粗酵素(粗ヘミセルラーゼ)標品とした。培養液1リットルより得られた粗酵素の収量は第4表のとおりである。

第4表 粗酵素の収量

粗酵素の記号	培地のC-源	培地1000mlより得られた 粗酵素収量 (mg)
(P)	脱ペクチン・コーン粉末	441
(H)	ヘミセルロース	1,179
(X)	キシラン	510

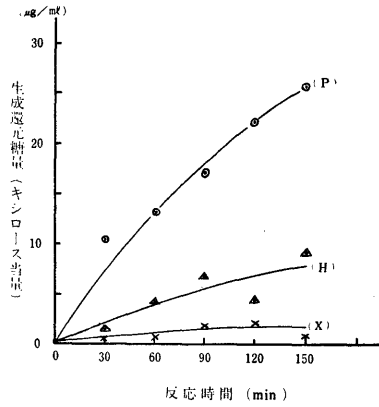
## 3. 粗酵素の基質分解度(ヘミセルラーゼ活性)

凍結乾燥して得られた粗酵素の0.1%溶液(0.1M, pH7.0のphosphate bufferに溶解)を用いて活性を測定した。

粘度法および還元力測定法による酵素活性の測定結果を第5表および第1図に示す。

第5表 粗酵素のヘミセルラーゼ活性(粘度法)

粗酵素の種類	酵素活性(粘度法)	
	30分反応	60分反応
(P) 脱ペクチン・コーン粉末培地より得たもの	38.1%	65.9%
(H) ヘミセルロース培地より得たもの	35.7	44.2
(X) キシラン培地より得たもの	7.7	9.3

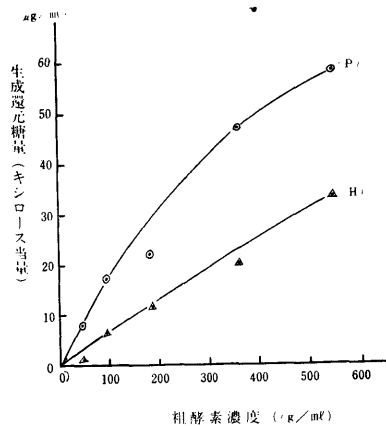


第1図 粗酵素のヘミセルラーゼ活性 (Time course)

(P)…脱ペクチンコーン粉末培地より得た粗酵素  
 (H)…ヘミセルロース培地より得た粗酵素  
 (X)…キシラン培地より得た粗酵素

第6表 酵素活性(粘度法)に及ぼす酵素濃度の影響

粗酵素の種類	反応液の酵素濃度	酵素活性(粘度法)	
		30分反応	90分反応
(P) 脱ペクチン・コーン粉末培地より得たもの	540 $\mu\text{g/ml}$	60.6%	82.6%
	360	44.9	72.5
	90	38.1	65.9
	50	43.6	58.0
(H) ヘミセルロース培地より得たもの	540 $\mu\text{g/ml}$	67.0%	70.8%
	360	55.3	63.8
	90	35.7	44.2
	50	20.5	35.1



第2図 酵素活性に及ぼす酵素濃度の影響

脱ペクチン・コーン粉末培地より得た粗酵素 (P) が酵素活性はもっとも良好であり、キシラン培地より得た粗酵素 (X) は比較的低い活性を示した。また、第1図にみられるごとく、時間経過とともにヘミセルロースの加水分解が、ほぼ直線的に進行している。

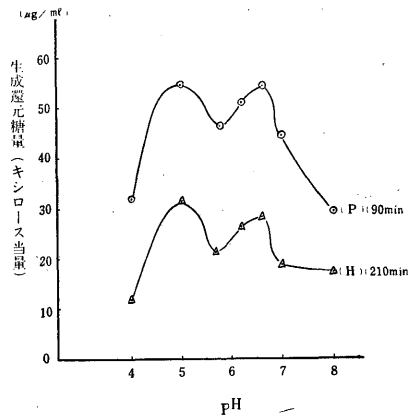
#### 4. 粗酵素の濃度と基質分解度

粗酵素の濃度をかえて、それが基質分解度に及ぼす影響をしらべた。

酵素の濃度が増すほど基質分解度が大きくなっており、粘度法と還元力測定法の結果は同じ傾向を示している。

#### 5. 粗酵素の活性と pH 依存度

pH をかえて酵素反応をおこなわせ、その活性と pH の関係をしらべた。すなわち、基質として 0.2% ヘミセルロース溶液を用いたが、この溶媒に各 pH の 0.1 M buffer を使用した。pH 5.7 以上は phosphate buffer, pH 5.0 以下は acetate buffer を用いた。



第3図 酵素活性に及ぼす pH の影響

pH 5.0 および pH 6.5 附近に 2 つのピークがある。このことから少なくとも 2 種以上のヘミセルラーゼが混在していると思われる。

## 考 察

1. 粗酵素(ヘミセルラーゼ)を多量に得るための培地の炭素源および窒素源としては、101 号菌の分離の段階で用いたと同じヘミセルロースと  $\text{NaNO}_3$  が良好であった。

2. corn seed よりヘミセルロースを分離調製する過程で、corn seed の粉末より脂肪、澱粉、ペクチン等を除去したものが、ヘミセルロースと同様に、粗酵素生成のための炭素源として適していることがわかった。しかし、澱粉やペクチン等の炭素源を含んだ場合は不適當であった。このことから、ヘミセルラーゼは、一種の適応酵素である可能性が推論される。

3. 粗酵素標品の 2・3 の性質をしらべたが、これらは目的のヘミセルラーゼを含有していることが明らかである。

## 総 括

さきに corn seed より調製したヘミセルロースを、分解・資化し得る菌を分離したが、この菌を用いて、粗酵素ヘミセルラーゼを得る目的で、培地組成、特に炭素源と窒素源について検討をおこなった。

炭素源として corn seed より調製したヘミセルロースおよび類似の物質 10 種を選んだ。窒素源としては硝酸塩、アンモニウム塩、ペプトン等 4 種を選んだ。

以上、炭素源、窒素源を異にする 28 種の試験培地にそれぞれ菌を接種し、37°C、7 日間静置培養の後、培養液中に生じた粗酵素の量と、ヘミセルラーゼ活性とを測定した。

実験結果より、培地組成の炭素源としては、ヘミセルロースか、少なくとも corn seed より脂肪、澱粉、ペクチン等を除去したものがよく、また、窒素源としては、菌の分離の段階で使用したと同じ  $\text{NaNO}_3$  が最も良好であると考えられた。

なお、培養液から得た粗酵素は、酵素活性からみてヘミセルラーゼを含有しており、少なくとも 2 種以上のヘミセルラーゼが混在していると思われるので、今後、更に精製していきたいと思っている。

## 文 献

- (1) 大宮満男；熊本大・教・自然・紀要 No.10-1, 23-38 ('62)
- (2) 大宮満男, 高橋紀子, 小川サチヨ；長崎大・教・自然・紀要 No.23, 143-9 ('72)
- (3) 水島三一郎, 赤堀四郎；蛋白質化学②, 共立 ('54) P.120
- (4) 日本化学会編；実験化学講座, 23, 丸善 ('62) P.417-8