

Corn Seed より Corn Seed Hemicellulose 分解 菌株、101号菌の分離と粗 Hemicellulase の調製

大 宮 満 男・高 橋 紀 子・小 川 サチヨ*

長崎大学教育学部家政科教室

(昭和46年10月30日受理)

Isolation of Corn Seed Hemicellulose-Decomposing Bacteria Strain (No. 101) from Corn Seed and preparation of crude Hemicellulase.

Mitsuo OOMIA, Noriko TAKAHASHI and Sachiyo OGAWA.

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

(Received October 30. 1971)

Abstract

Using a medium containing inorganic nitrogen sauce and corn seed hemicellulose only carbon sauce as a screening culture medium, we isolated a strong corn seed hemicellulose decomposing strain of wild lactic acid bacteria like from a corn seed.

For the enzyme formation three times volum of acetone was added to the filtrate (2L) of culture medium.

A small amount of white wasted precipitate was formed.

This precipitate was centrifuged and freeze-dried.

About 300 mg crude red-yellow hemicellulase powder was obtained.

An experiment on the relationship between the various concentrations of hemicellulase and viscosity of corn seed hemicellulose solution showed that the viscosity drawing rate increases to some extent with increase in enzyme concentration. The optimum ph of the enzyme action lies at about 6.0.

* 長崎短期大学 Nagasaki women's junior college. Nagasaki

諸 言

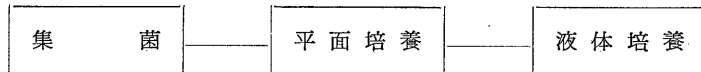
我々は今回 Corn Seed より hemicellulase を分離するにあたり、前報⁽¹⁾で述べた結果をもとにして無機チツソとして NaNO_3 、炭素源として hemicellulose (以下 Hemi. と略す) という限定された栄養源で純粋分離を試みた所、比較的早期に目的とする酵素を有する菌を分離しえた。よってその菌の菌学的性質と粗酵素について知見を得たので報告する。

実 験 の 部

実 験 方 法

1. 分解菌分離のプロセス

第1表 分解菌分離のプロセス



2. 培養液の組成

第2表 基本培地組成

K_2HPO_4	0.05%
MgSO_4	0.02%
NaNO_3	0.2 %
Hemi.	0.5 %
Phosphate Buffer PH 6.2 (0.1M)	

3. 培養法

a) 集菌……基本培地 (ただし PH 8.0のものを使用) 10ml に砕いた Corn Seed を 2g 入れ、37°C、2日間培養し、全体ににごりがあるものを2白金耳とり使用した。

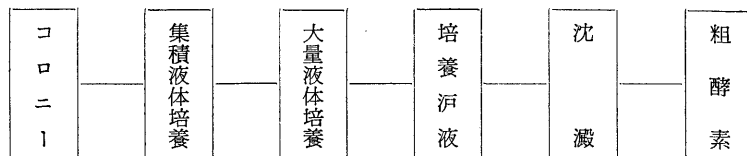
b) 平面培養……基本培地に2%の寒天を使用、好気培養とし分離1回目は集菌より、分離2回目は1回目の液体培養8日目、3、4回は各々2、3回目の液体培養4日目のを種菌とし出現 colony の2日目のを採取し使用した。

c) 液体培養……基本培地100mlをフラスコに入れ、b)で分離した colony を用い培養した。

4. 材料、測定法、酵素活性など前報に同じ⁽²⁾

5. 粗酵素生成プロセス

第3表 粗酵素生成プロセス



2 ℓ の大量培地 (組成は前と同様) に 8 日間培養した, ついで口紙で口過, 口液に 3 倍容アセトンを加えた。生成した白色, 糸くず状沈澱を軽く遠沈し, 沈澱を一昼夜凍結乾燥したところ, 約 500 mg の茶褐色粗酵素粉末を得た。そのプロセスは第 3 表に示した通りである。

6. 粗酵素の性質

a. Hemicellulase の各種濃度による

Hemi. 溶液粘度低下.

Hemicellulase 終濃度 0.05 0.1 0.2%

Hemi. 終濃度 0.16%

pH6.0 (0.1M phosphate Buffer)

温度 30±0.1°C

基質液に対する酵素液の割合 10:1

b. Hemi に対する Hemicellulase 作用におよぼす PH の影響

Hemicellulase 濃度見かけの 0.4%

Hemi. 濃度, 見かけの 0.2%

Buffer solution

PH4, 5, Acetate (0.1M)

PH6, 7, 8, phosphate (0.1M)

基質液に対する酵素液の割合 10:1

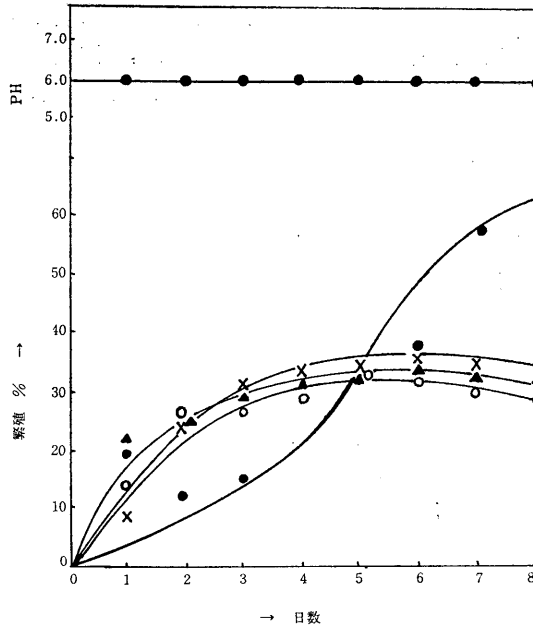
実 験 結 果

第 4 表 Colony の 形 態
(培養, 48 hrs. 後の性質)

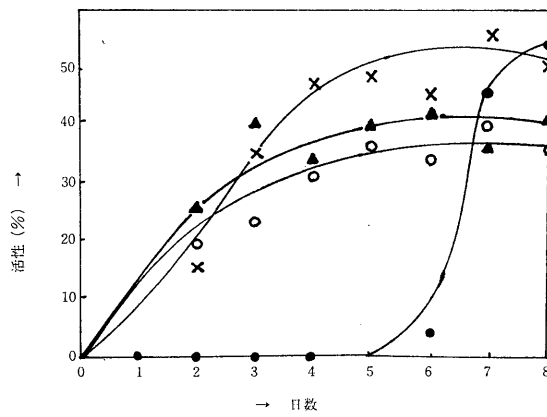
外 形	大きさ (直径)	隆 起	構 造	表 面	辺 縁	色
正 円	2 mm	薄	均 質	平 滑	平 滑	乳白色

第 5 表 Microbacterium との比較

	101 号 菌	Microbacterium (Bergey') (2)
形	単 桿(はしが丸い)	単 桿(はしが丸い)
長 さ	2~10μ	0.5~30μ
運 動 性	な し	な し
染 色	gram +	gram + メチレン青染色, 粒が出る
繁 殖	酵母水 5% の培地で表面 繁殖がみられる	ミルク or 酵母水を追加す ると表面繁殖がよくなる
酸 の 生 成	よ わ い	よ わ い
乳 酸 生 成		L 乳 酸
カ タ ラ ー ゼ	+	+
最 適 温 度		32°C



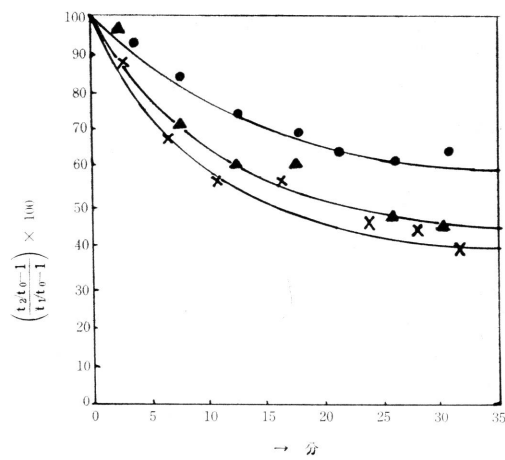
第1図 分離1～4回における繁殖, PHの相違 ●—●, 分離1回 ×—×, 分離2回 ▲—▲, 分離3回, ○—○ 分離4回



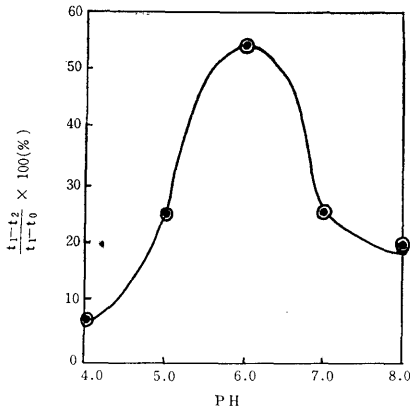
第2図 分離1～4回における酵素活性の相違, ●—●, 分離1回, ×—×, 分離2回, ▲—▲, 分離3回, ○—○, 分離4回



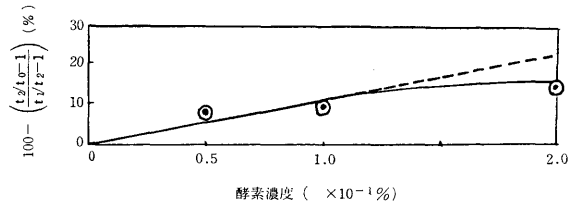
第3図 101号菌, gram染色, 2日目.



第4図 Hemicellulase の各種濃度による Hemi. 溶液粘度低下
 ●—● Hemicellulase 終濃度 0.05%, ▲—▲ 同 0.1%
 ×—× 同 0.2%



第5図 Hemi. に対する Hemicellulase 作用におよぼす PH の影響



第6図 Hemi. 溶液の粘度低下におよぼす Hemicellulase 濃度の影響
反応時間 5分

考 察

I. チッ源として NaNO_3 、炭素源として Hemi. だけという培地で分離を行った所、分離1回目では Corn Seed に附着している幾多の菌の繁殖が見られるが2回目よりすでに菌が単一化されている所から特定の栄養源のもとでは容易に分離出来ることを確認した。ただし、本培地は純粹分離には適当であるが回を重ねていくうちに繁殖それにともなって酵素活性が少しずつ悪くなっている点から菌の生育という面での培地組成の検討が必要である。

II. 分離した菌は桿菌でしかも長さを異にするという点などから Bergey⁽³⁾ の *Microbacterium* に性質がよくており、又 PH の変動があまりないことから酸の生成が弱いという結果が得られ、総合すると野生乳酸菌の一種だと思われる。

III. 繁殖と酵素活性の図に見られるように曲線がよくにていることからこの菌の出す酵素は菌体外酵素だといえる。

IV. 101号菌培養液より acetone powder として得られた粗 Hemicellulase は終濃度 0.2% 以下の範囲で粘度低下率と酵素濃度との間に直線関係が認められる。よって粘度法による酵素活性測定は可能である。

V. 本酵素の最適 PH は 6.0 付近の様である。分解菌の繁殖中の PH とも一致していることは興味のある点である。

総 括

I. Hemi. と NaNO_3 を主栄養とした培地で分離すると Corn Seed より容易に Hemicellulase を有する菌を分離出来る。

II. 分離菌は種子などに附着している野生の乳酸菌だと思われる。

III. Hemicellulase 活性のある acetone powder の生成が可能で酵素活性は粘度法が採用出来、最適 PH は 6.0 付近である。

参 考 文 献

- 1) 大宮満男・高橋紀子・小川サチヨ：長大教育自然科学研究報告 22(1971)95—99
- 2) R. S. Breed etc : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (Williams and Wilkins Co.) 1957, P600
- 3) 岩崎照雄：九州大学農学部生物化学教室論文 第5号 (1964)