

Actinomadura sp. 39-B の生産する溶菌酵素について*

赤木盛郎・西田淑男**

山田哲也***・久松 眞***

On the Yeast Cell Litic Enzyme Produced by *Actinomadura* sp. 39-B Strain

Morio AKAKI, Yoshio NISHIDA,**

Tetsuya YAMADA*** and Makoto HISAMATSU***

緒 言

溶菌酵素には普通 β -1,3glucanase, Mannanase, Protease が含まれていることが知られている。本報告では前に報告した土壌からの分離菌, *Actinomadura* sp. 39-B 株^{1,2)} の生産する溶菌酵素の諸性質について検討した結果を報告する。

実験の部

1. 実験材料および実験方法

1・1 粗酵素の調製

赤木ら³⁾が新たに分離・同定した菌体外蛋白質生産菌 *Trichosporon* sp. X-19 株を Capeck-DOX 改良培地 (グリシン 3.00g, K₂HPO₄ 1.00g, MgSO₄·7H₂O 0.50g, KCl 0.50g, FeSO₄ 0.01g, グルコース 30.0g, 蒸留水 1 l, pH 3.0) で培養後, 菌体と培養液を分離し, 菌体を 0.05 N NaOH で洗浄し菌体外蛋白質を溶出して集菌した。この集菌した菌を 0.9% 食塩水で 3 回洗浄後, 2 倍容の 3% NaOH に懸濁し, 沸騰湯浴中で 3 時間処理した。冷却後遠心分離 (5,000 rpm, 15 分間) により処理菌体を集め, 上澄みの NaOH を除き, 1 N HCl で中和後, 蒸留水で 5 回洗浄した後, 室温乾燥した。乾燥後, 粉碎し, 200 メッシュの篩を通過した菌体をアルカリ処理菌体とした。また赤木らが菌体外アミラーゼ生産菌として取得した *Rodosporidium* sp.

*酵母による菌体外蛋白質生産に関する研究

**愛知県食品工業試験場

***三重大学

J-5 B株および市販 Dry Yeast から同様にアルカリ処理菌体を得、酵素生産のための基質とした。

培地（アルカリ処理菌体0.5%，グルコース0.05%，Asp. 0.1%， K_2HPO_4 0.05%，pH 6.0）30 ml を100 ml 容三角フラスコに分注し、常法通り殺菌後、*Actinomadura* sp. 39-B を一白金耳接種し、30℃、60時間回転振とう培養（160 rpm）を行い前培養とした。前記の培地100 ml を500 ml 容の三角フラスコに分注し、常法通り殺菌後、前培養1 ml を接種し、30℃で回転振とう培養（160 rpm）を行った。なお、培養時間は各培地において酵素活性が最大となるまでの時間としたため、*Trichosporon* sp. X-19株のアルカリ処理菌体を培地に用いた場合51時間、*Rhodosporidium* sp. J-5 B株のアルカリ処理菌体を培地に用いた場合51時間、Dry Yeast のアルカリ処理菌体を培地に用いた場合45時間を要した。培養後、菌体を遠心分離（5,000 rpm, 15分間）により回収した。上澄液に対し微量の2-メルカプトエタノールを添加し、80%飽和硫酸塩析を行った。次に沈澱物を遠心分離（8,000 rpm, 20分間）により集め、脱イオン水に溶解後、一昼夜流水中で透析し、凍結乾燥を行い粗酵素標品とした。

1・2 各粗酵素の至適 pH, pH 安定性および熱安定性の測定

pH 3 においては、0.1Mクエン酸緩衝液、pH 4～6 においては0.1M酢酸緩衝液、pH 6～8 においては0.1Mリン酸緩衝液を使用し、溶菌酵素の測定は、田端ら⁴⁾および白石ら⁵⁾の方法に従って行った。pH 安定性は各 pH において30℃、24時間処理後の残存する活性を求めて測定した。熱安定性は pH 5.6で各温度で15分間処理後の残存する活性を求め測定した。各酵素の反応基質は各酵素を調製した時のアルカリ処理菌体を使用した。

1・3 グルカンおよびマンナンの調製

試料として大量培養した *Trichosporon* sp. X-19株, *Rhodosporidium* sp. J-5 B株の菌体および市販 Dry Yeast を使用した。菌体200g を1 l の6% NaOH に懸濁し、60℃に加熱後、3倍容の純水を加え、水冷し、遠心分離（6,000 rpm, 15分間）を行い、沈渣を1 l の純水に懸濁した。これに6% NaOH 1 l を加え3時間放置後、遠心分離（6,000 rpm, 15分間）を行った。沈渣を500 ml の純水に懸濁後80℃に加熱し、ガラスフィルターで濾過した。濾液の pH を4.5 にした後遠心分離（6,000 rpm, 15分間）を行い、残渣を500 ml の水に懸濁した。これに500 ml の6% NaOH を加え80℃で2時間処理した。これを遠心分離（6,000 rpm, 15分間）を行い、沈渣を500 ml の純水に再懸濁後、遠心分離（6,000 rpm, 15分間）をした。沈渣を2%冷酢酸500 ml で洗浄後、500 ml のエタノール、500 ml のエーテルで洗浄し粗グルカンとした。

マンナンはアルカリ処理した後の上澄みにフェーリング液を加え、銅とマンナン錯体を作らせて集め、これを塩酸により分解後、エタノールを加え、マンナンを析出させ粗マンナンとした。

1・4 各酵素のグリカン活性測定⁶⁾

基質としての各グリカン 2 mg/ml となるように正確にとり、酵素液 0.4 mg/ml, 30°C, pH 5.6 (0.1M 酢酸緩衝液) で 1 時間振とうしながら反応させ、生じた還元糖量をソモギネルソン法⁷⁾で測定した。1 時間反応させ 1 μ g の還元糖を生じたとき 1 unit とした。アミラーゼ活性のみ、2% 可溶性澱粉 0.5 ml に酵素液 (0.8 mg/ml) を 0.5 ml 加え、前記と同様に反応、測定した。

1・5 プロテアーゼ活性測定

プロテアーゼ活性の測定は、Kuniz⁸⁾の方法に準じて行った。酵素液 1 ml に基質 1 ml を加え、30°C, 20 分間反応後、5% TCA 3 ml を加え、1 時間室温に放置後遠心分離 (4,000 rpm, 15 分間) を行い、上澄液について 280 nm の吸光度を測定した。この測定条件で 1 分間に 280 nm の吸光度を 1.00 増加せしめる量を 1 Unit とした。中性プロテアーゼ活性測定には、基質液としてカゼイン 1 g を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 100 ml に懸濁し 15 分間沸騰湯浴中で加熱したカゼイン溶液を使用し、また、酸性でプロテアーゼ活性の測定には、基質液として前記の液を濃塩酸で pH 3.0 に調製したカゼイン溶液、さらに牛血精アルブミンを 0.1M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) に 1% となるように溶解させた溶液を使用した。

1・6 酵母生細胞に対する溶解性

供試菌として保存菌株を用い、村尾ら⁹⁾の方法を参考にして溶解性を検討した。すなわち 30 ml YM 培地、30°C, 回転振とう培養 (160 rpm) を行い、対数期初期の菌体を集菌後、純水で 3 回洗浄し、0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) に最終 O.D. (at 660nm) が、0.6~0.7 になるように懸濁させた。酵母懸濁液 2.0 ml に粗酵素液 (0.5 mg/ml) 1 ml を加え、30°C, 1 時間往復振とうしながら反応させ、濁度減少率で溶菌力を示した。

1・7 SDS 電気泳動による比較¹⁰⁾

調製した 3 種の酵素と Zymolase (キリンビール社) を試料とした。各試料につきポリアクリルアミドゲル電気泳動を次のように行い比較をした。

試料 1~2 mg を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、Table 1 に示した Sample buffer 1 ml を加え 100°C, 2 分間沸騰湯浴上で加熱し、これを泳動用の試料とした。ゲルは文献に従い 1 mm 厚ゲルを調製し、泳動条件は 100 V で数時間泳動させた。泳動後緩衝液は 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む 0.2M グリシン-トリス緩衝液 (pH 8.4) を使用した。展開後のゲルは銀染色キット (第一化学薬品) を用いて染色した。

Table 1. Composition of Sample Buffer.

0.5M Tris-HCl buffer (pH 6.8)	12.5 ml
10% SDS	20.0 ml
2-Mercaptoethanol	5.0 ml
Glycerol	10.0 ml
B.P.B (Bromphenol Blue)	0.002%

2. 実験結果

2・1 各酵素の諸性質

酵素の諸性質を検討した結果を Fig. 1～9 に示した。

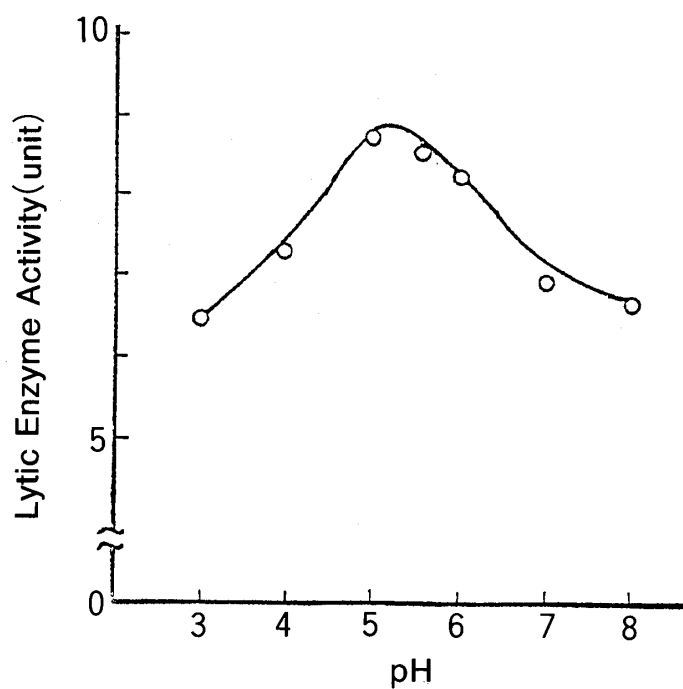


Fig. 1. Effect of pH on Lytic Enzyme.

Lytic enzyme was prepared from X-19 medium.

Lytic enzyme was estimated under the standard assay condition at various pH.

0.1M Sodium citrate buffer for pH 3.0

0.1M Acetate buffer for pH 4.0-6.0

0.1M Phosphate buffer for pH 7.0-8.0

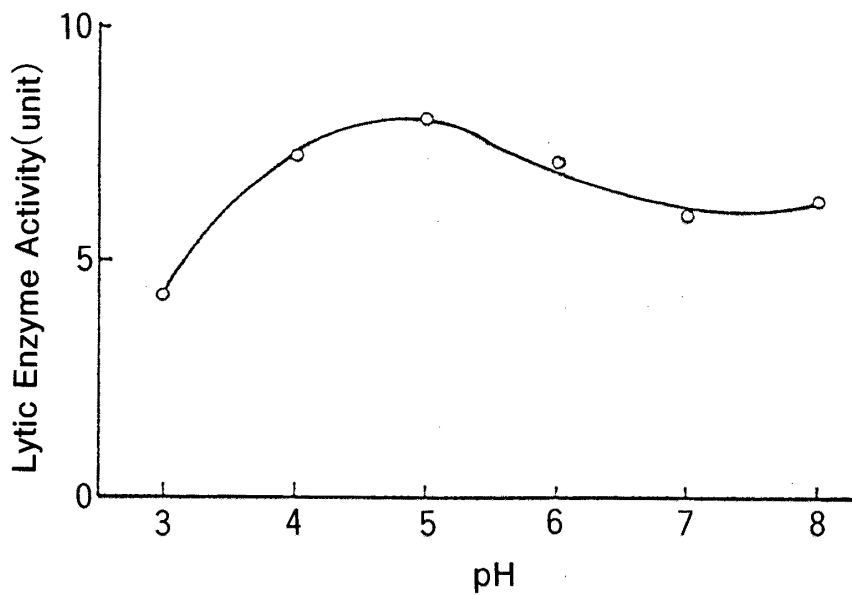


Fig. 2. Relation Between pH and Stability.
 Lytic enzyme was prepared from X-19 medium.
 Residual activity after storage for 24 hr at 30°C.
 0.1M Sodium citrate buffer for pH 3.0
 0.1M Acetate buffer for pH 4.0-6.0
 0.1M Phosphate buffer for pH 7.0-8.0

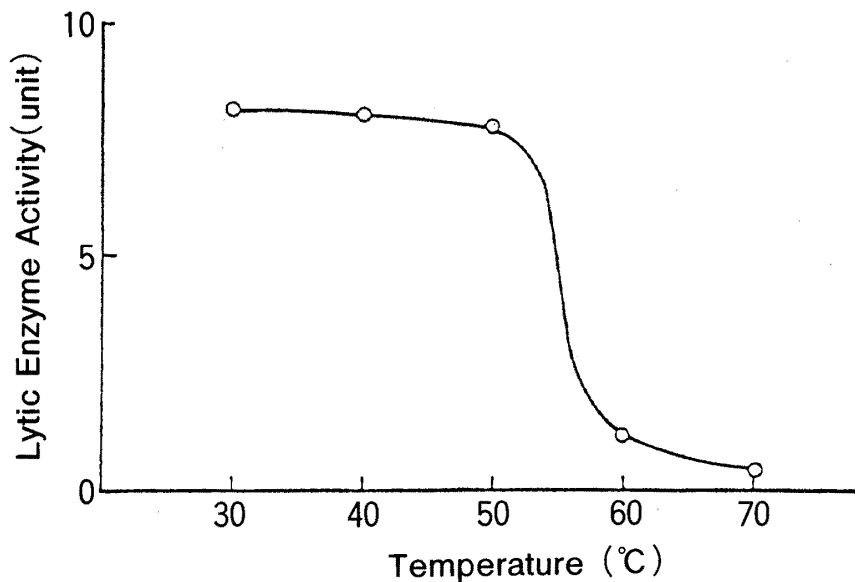


Fig. 3. Heat Stability of Lytic Enzyme Activity.
 Lytic enzyme was prepared from X-19 medium.
 The reaction mixture was incubated for 15 min at various temperatures. After incubation, residual activity was estimated under the standard assay conditions.

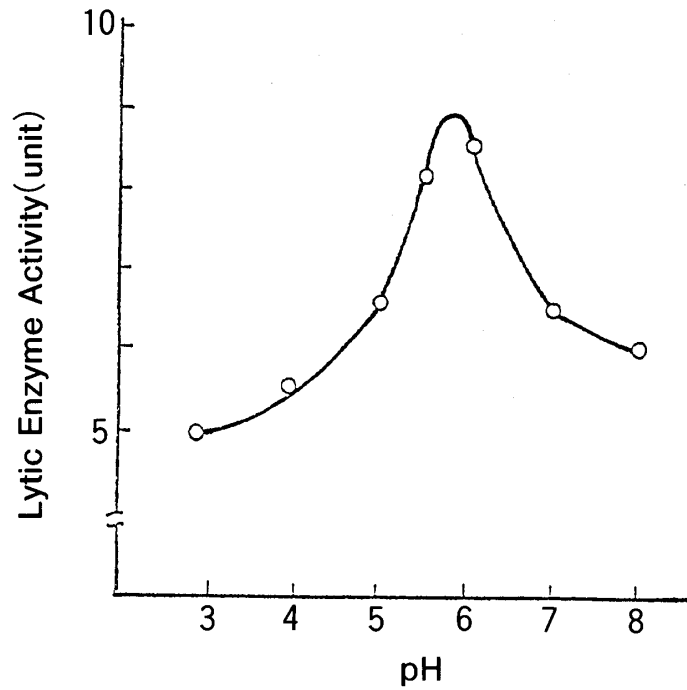


Fig. 4. Effect of pH on Lytic Enzyme.
 Lytic enzyme was prepared from J-5B medium.
 Lytic enzyme was estimated under the standard assay condition at various pH.
 0.1M Sodium citrate buffer for pH 3.0
 0.1M Acetate buffer for pH 4.0-6.0
 0.1M Phosphate buffer for pH 7.0-8.0

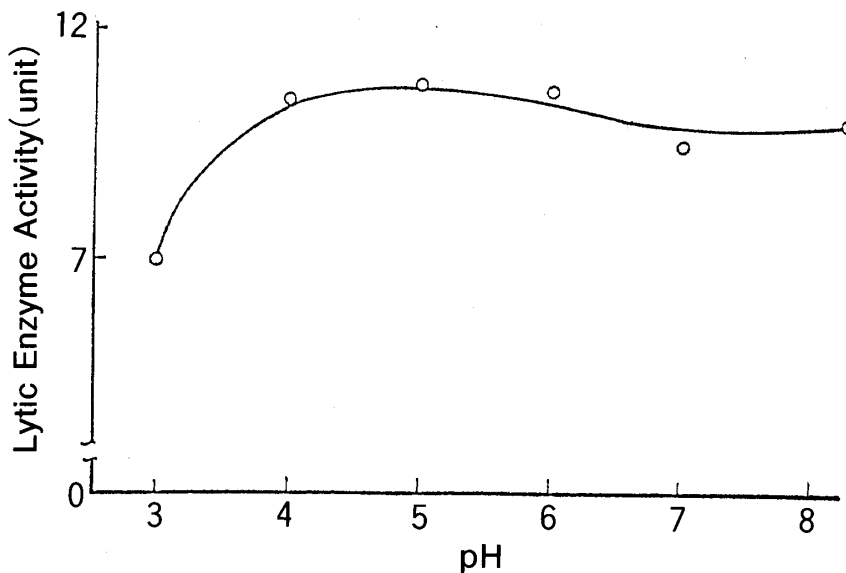


Fig. 5. Relation Between pH and Stability.
 Lytic enzyme was prepared from J-5B medium.
 Residual activity after storage for 24 hr at 30°C.
 0.1M Sodium citrate buffer for pH 3.0
 0.1M Acetate buffer for pH 4.0-6.0
 0.1M Phosphate buffer for pH 7.0-8.0

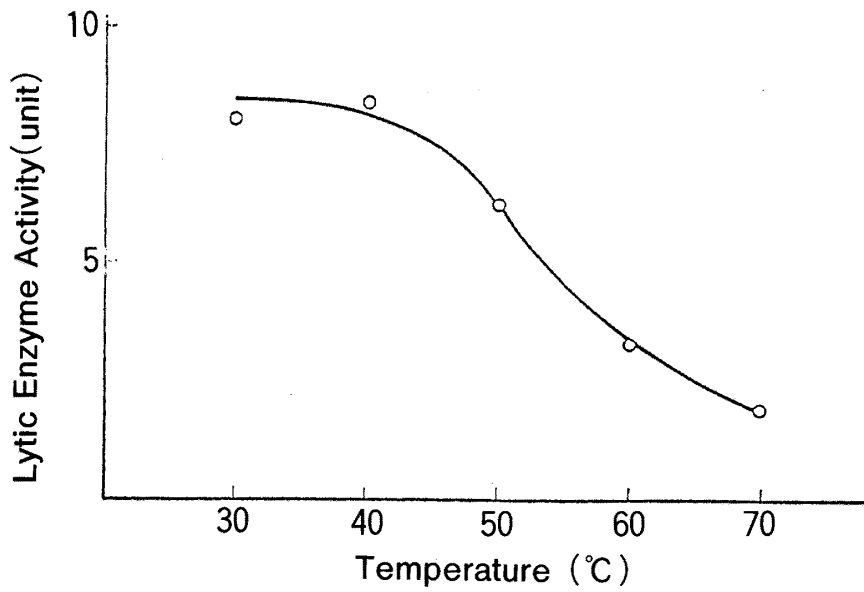


Fig. 6. Heat Stability of Lytic Enzyme Activity.

Lytic enzyme was prepared from J-5B medium.

The reaction mixture was incubated for 15 min at various temperatures. After incubation, residual activity was estimated under the standard assay conditions.

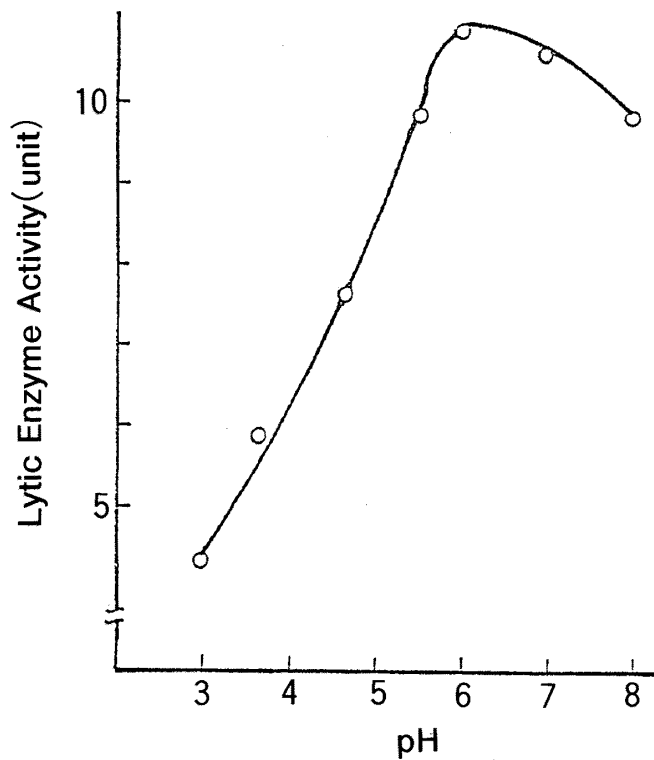


Fig. 7. Effect of pH on Lytic Enzyme.

Lytic enzyme was prepared from Dry Yeast medium.

Lytic enzyme was estimated under the standard assay condition at various pH.

0.1M Sodium citrate buffer for pH 3.0

0.1M Acetate buffer for pH 4.0-6.0

0.1M Phosphate buffer for pH 7.0-8.0

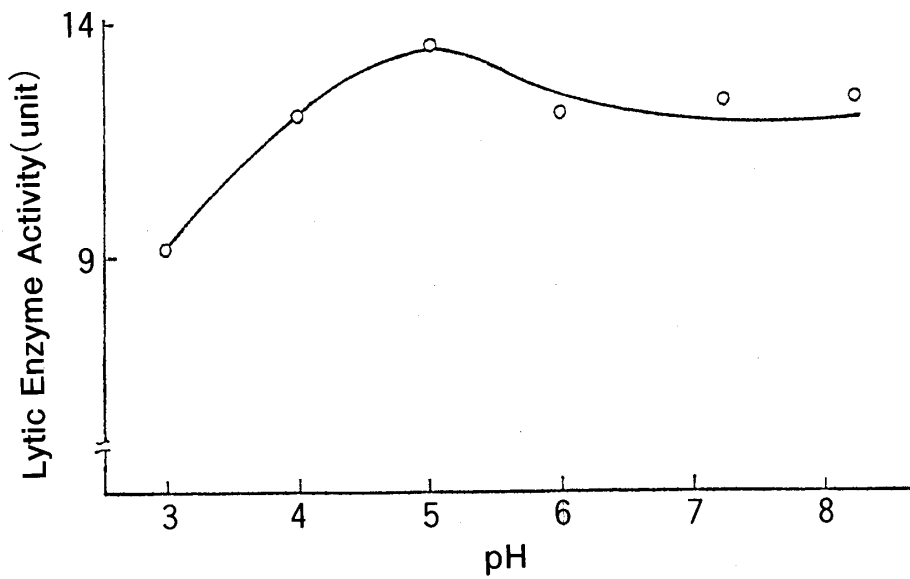


Fig. 8. Relation Between pH and Stability.
 Lytic enzyme was prepared from Dry Yeast medium.
 Residual activity after storage for 24 hr at 30°C.
 0.1M Sodium citrate buffer for pH 3.0
 0.1M Acetate buffer for pH 4.0-6.0
 0.1M Phosphate buffer for pH 7.0-8.0

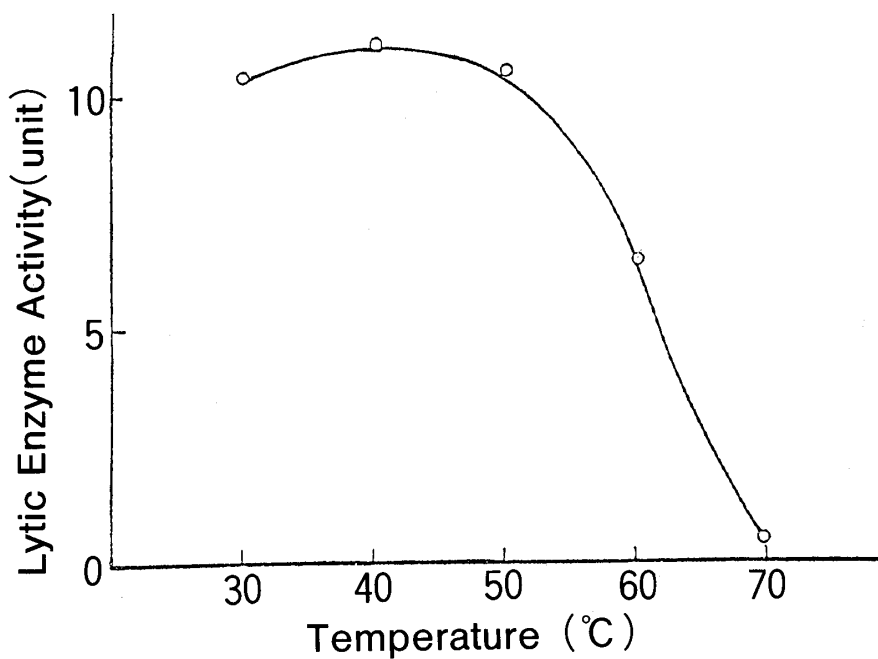


Fig. 9. Heat Stability of Lytic Enzyme Activity.
 Lytic enzyme was prepared from Dry Yeast medium.
 The reaction mixture was incubated for 15 min at various temperatures. After incubation, residual activity was estimated under the standard assay conditions.

Trichosporon sp. X-19を培地として調製した酵素は至適 pH 5～6, 安定 pH 域は pH 4～8, 熱安定性は50℃までは安定であったが70℃で完全に失活した。(Fig. 1～Fig. 3)

Rhodospiridium sp. J-5 B株を培地として調製した酵素は至適 pH 6付近, 安定 pH 域は pH 4～8, 熱安定性は45℃付近まで安定であった。(Fig. 4～Fig. 6)

Dry Yeast を培地として調製した酵素は至適 pH 6.2付近, 安定 pH 域は pH 4～8, 熱安定性は50℃までは安定であったが70℃で完全に失活した。(Fig. 7～Fig. 9)

2・2 酵素のグリカン活性

種類のグリカン分解性を検討した結果を Table 2 に示した。

Table 2. Hydrolytic Activity on Glycan.

Substrate	Enzyme (<i>Actionomadura</i>)			Zymolyase (units/g)	
	X-19 Medium (units/g)	J-5B Medium (units/g)	Dry Yeast Medium (units/g)		
β -1, 2-Glucan	0.0	0.0	0.0	0.0	X10 ⁵
β -1, 3-Glucan	3.7	7.3	3.4	32.9	
β -1, 6-Glucan	0.0	0.2	0.3	0.1	
X-19 Glucan	0.7	1.7	0.3	9.7	
Dry Yeast Glucan	0.8	2.1	0.7	9.8	
J-5B Glucan	0.1	1.3	0.1	2.0	
Cellulose	0.1	0.5	0.3	0.5	
Chitin	0.0	0.0	0.0	0.0	
Yeast Mannan	0.0	0.0	0.0	0.0	
X-19 Mannan	0.0	1.2	0.4	0.5	
Dry Yeast Mannan	0.0	0.4	0.0	0.1	
J-5B Mannan	0.5	4.7	1.2	0.5	
Soluble Starch	0.9	94.8	4.8	0.0	

Composition of reaction mixture : lytic enzyme solution (0.4mg/ml) 0.5ml
substrate (4mg/ml) 0.5ml

Incubation : 30℃, pH 5.6, for 1 hr

One Unit : μ g of reducing sugar liberated for 1 hr

各酵素の活性にはかなりの差があることが判明した。

2・3 酵素のプロテアーゼ活性

種種の蛋白質分解性を検討した結果を Table 3 に示した。

Table 3. Protease Activity.

Substrate	Enzyme (<i>Actionomadura</i>)			Zymolyase (units/g)
	X-19 Medium (units/g)	J-5B Medium (units/g)	Dry Yeast Medium (units/g)	
Casein (pH 7.5)	10.5	92.0	52.5	21.2
Casein (pH 3.0)	1.0	23.5	18.3	1.5
Bovine Serum Albumin (pH 3.0)	0.0	0.0	0.0	0.0

Trichosporon sp. X-19株以外を培地として調製した酵素は、酸性プロテアーゼ活性が高かった。また中性プロテアーゼ活性にかなりの差がみられた。

2・4 酵母生細胞に対する溶菌性

各種酵母の生細胞に対する溶菌性を検討した結果を Table 4 に示した。

Table 4. Degradation of Various Yeast Cell with Lytic Enzyme.

Yeast strain	Degree of Lysis (% reduction in O.D.)			Zymolyase
	Enzyme (<i>Actionomadura</i>)			
	X-19 Medium	J-5B Medium	Dry Yeast Medium	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OUT 7024	32	7	7	44
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OUT 7031	10	7	4	87
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OUT 7062	0	0	5	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OUT 7070	6	0	7	9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OUT 7857	14	8	12	5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kyokai No.6	4	0	4	27
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kyokai No.7	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kyokai No.8	4	0	0	72
<i>Candida tropicalis</i> 6019	21	18	8	36
<i>Candida utilis</i> 6020	9	0	16	70
<i>Mycotorula japonica</i> 6226	54	59	60	66
<i>Mycotorula japonica</i> 6229	28	17	27	57
<i>Debaryomyces cantarellii</i> C.B.S 4350	0	0	0	0
<i>Pichia farinosa</i> P-112	11	4	5	8
<i>Rhodotorula</i> sp. Z-13	5	4	3	8
<i>Rhodospiridium</i> sp. J-5B	4	4	0	11
<i>Trichosporon</i> sp. X-19	12	6	9	8

Composition of reaction mixture : lytic enzyme solution
(0.5mg/ml) 1.0 ml

yeast suspension
(pH 5.6) 2.0 ml

The reaction mixture was
incubated at 30°C for 1
hr with shaking.

酵母生細胞に対する溶菌性は、酵素により差がみられたが、種類の酵母生細胞に作用することがわかった。

2・5 酵素の SDS 電気泳動による比較

各酵素を SDS 電気泳動で比較した結果を Photo. 1 に示した。

その結果、バンドに少々がちがいがみられた。

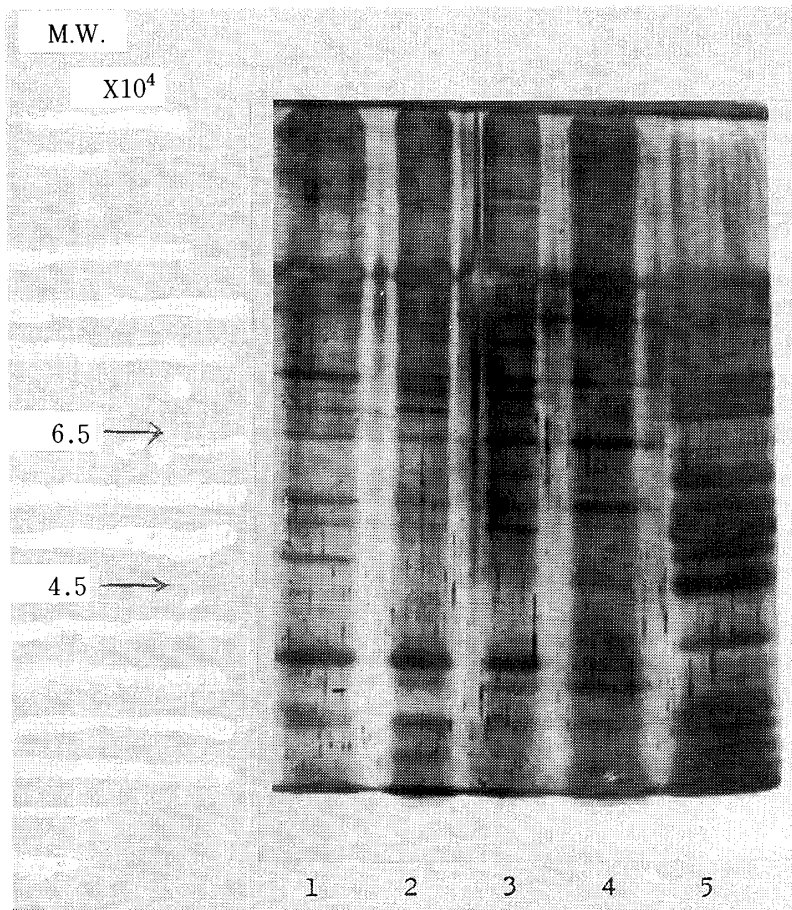


Photo. 1. SDS Electrophoretic Pattern of Lytic Enzyme.

- 1 : Dry Yeast medium
- 2 : J-5B medium
- 3 : X-19 medium
- 4 : Dry Yeast medium
- 5 : Zymolyase

考 察

酵母細胞壁溶解の主体をなすのは, endo β -1, 3 glucanase であるが, 酵母の種類, 培養条件, 増殖の Age が溶菌の難易に大きく影響することが知られている。長崎ら¹¹⁾は Glucanase の作用を著しく促進する因子を見出し, Phosphomannanase と同定した。その他酵母細胞壁の溶解に関与する因子として, β -1, 6 glucanase, exo β -1, 3 glucanase, Protease, Mannanase, Chitinase, Lipase, Phospholipase があると考えられている。本研究において Protease と種類の Glycan の分解性について検討したが, さらに他の活性についても検討する必要があると思われる。また本酵素の場合強力な Amylase 活性がみられた。

田端ら⁴⁾は酵母細胞壁溶解酵素が酵母 Glucan により誘導されることを報告しているが, 本実験の場合も炭素源として用いたアルカリ処理菌体により酵素の SDS-ポリアクリルアミドゲルの電気泳動パターンが異なることからグルカンを主体とするアルカリ処理菌体により誘導されていることが考えられた。

酵母生菌体への作用を検討した結果, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mycotorula japonica* に対してすぐれた溶菌力を示し, *Candida utilis*, *Pichia farinosa*, *Rhizopus* sp. Z-13株, *Rodospiridium* sp. J-5 B株, *Trichosporon* sp. X-19株に対しては弱い溶菌力を示した。

Ricks ら¹²⁾はアメリカ西部における大麦を含む養鶏飼料をそのまま与えるより水に浸漬してから与えると栄養効果が高くなると報告し, 江幡¹³⁾は β -1, 3 glucanase 活性がこの効果に関与していることを確かめたが, 本酵素の場合, その至適 pH が酸性側にあり, さらに生細胞に対して強い溶菌性を示すことから食品工業への利用等が期待される。

要 約

細胞壁溶解酵素につき検討し, 酵素を得るための培地に炭素源として加えたアルカリ処理菌体により, グリカンの分解性, protease 活性, 酵母生細胞への溶菌性に差が認められた。また SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターンにも差が認められた。

文 献

- 1) 赤木盛郎, 西田淑男, 小林裕志, 久松 眞, 山田哲也: 日本農芸化学会関西支部・中部支部合同大会およびシンポジウム講演要旨集, P34, 1984
- 2) 赤木盛郎, 西田淑男, 久松 眞, 山田哲也, : 本誌, 12, (1992)
- 3) 赤木盛郎, 河村龍二郎, 山田哲也: 農化, 58, 153 (1984)
- 4) 田端司郎, 照井堯造: 醸酵工学, 40, 366 (1962)
- 5) 白石 淳, 藤井久雄: 農化, 52, 553 (1978)
- 6) K. KITAMURA, T. KANEKO and Y. YAMAMOTO: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 18, 57 (1972)

- 7) 福井作蔵：還元糖の定量法, P10, 東京大学出版会, 1973
- 8) KUNIZ, M : *J. Gen. Physiol.*, 30, 291 (1941)
- 9) S. MURAO, R. YAMAMOTO and M. ARAI : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 23 (1976)
- 10) LAEMLI, U. K. : *Nature*, 227, 680 (1970)
- 11) 長崎 亀：溶菌酵素, P169, 講談社, 1977
- 12) RICKES, E. L., HAM, E. A. and MOSOATELLI, E. A. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 69, 371 (1962)
- 13) 江幡淳子：大阪市大家政学部紀要, 第16巻, 1, 1968