[農化 第 37 卷, 第 10 号, p. 623~625, 1963]

放線菌によるラフィノースの分解に関する研究 (第 1 報)*

菌 株 の 分 離, 選 択

鈴木 英雄, 田 辺 脩 (工業技術院発酵研究所)

昭和 38 年 5 月 21 日 受 理

ラフィノースは invertase によってメリビオースとフルクトースに, α -ガラクトシダーゼによってシュクロースとガラクトースに分解される。微生物の invertase についてはかなり多くの研究がなされているが, α -ガラクトシダーゼについての研究はきわめて少ない。その存在も brewers' yeast^(1,2), *Asp. niger*⁽³⁾, *Asp. oryzae*⁽⁴⁾, *Pen. paxilli*⁽⁵⁾, *E. coli*⁽⁶⁾, *Aerobacter aerogenes*⁽⁷⁾ など^(8,9)に報告されている程度である。

そこで微生物の α -ガラクトシダーゼについて, その生成, 性質などについて研究を行ない, その成果をビート製糖工業に応用し, ビート糖製造上問題となるラフィノースの障害を除去しようとして研究に着手した。まずラフィノースをシュクロースに分解するため強力な α -ガラクトシダーゼを持ち, invertase を持たない菌株の分離, 選択を行なった。Benedict ら⁽¹⁰⁾の放線菌の炭素源利用性についての研究報告から *Streptomyces* に属する菌株の中にシュクロースを利用しない菌株が比較的多いことが推測できた。

また友杉ら⁽¹¹⁾も放線菌 *Streptomyces viridochromogenes* をラフィノースを炭素源とする培地に培養し, ラフィノースがシュクロースに分解されることを報告している。これらの点から α -ガラクトシダーゼを持ち invertase を持たない放線菌の存在の可能性が大であるので, 土壌から放線菌を対象にして菌の分離を行なった。

本報においては土壌から分離した放線菌のうちの 3 株が培地のラフィノースをシュクロースに分解し, 理論の約 95% 程度のシュクロースを培地に蓄積したので, それらについて報告する。

実 験 方 法

(1) 放線菌の分離, 選択: ラフィノースを唯一の炭素源とする培地で土壌から放線菌を分離した。この培地に生育したコロニーをとり, グルコースを含む培地に移し, 30° で 7 日間生育させ, その孢子または菌体をシュクロースを唯一の炭素源とする検定培地に移植し, 30° で 10 日間培養し, 生育しない菌を目的の菌とした。使用した培地組成を第 1 表に示した。

第 1 表 使 用 培 地 組 成

- (1) 分離培地: ラフィノース 1 g, NH_4Cl 0.05 g, KH_2PO_4 0.05 g, 寒天 2 g, 蒸溜水 100 ml.
- (2) 孢子着生培地: グルコース 1 g, ペプトン 0.2 g, 肉エキス 0.1 g, 酵母エキス 0.1 g, 寒天 2 g, 蒸溜水 100 ml.
- (3) 検定培地: シュクロース 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.264 g, KH_2PO_4 0.238 g, K_2HPO_4 0.565 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.64 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.11 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.79 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 mg, 寒天 2 g, 蒸溜水 100 ml.

(2) 放線菌の振盪培養: ラフィノース 1%, グルコース 0.3%, ペプトン 0.3%, 肉エキス 0.3%, KH_2PO_4 0.1% の培地に放線菌を移植し 30° で 160 r. p. m., 振幅半径 35 mm の振盪培養を行なった。

(3) ラフィノース, シュクロースの定量: 試料をペーパークロマトグラフィーで展開し, ラフィノース, シュクロース区分を切抜き溶出し, システイン-カルバザール法⁽¹²⁾により定量した。発色は 60°, 10 分間加熱法を用いた。溶媒の組成はブタノール 6:ピリジン 4:水 3 であった。

(4) 転化糖の定量: 試料を塩酸で湯せん中で 30 分間加熱し, 中和後 Somogyi 変法で転化糖量を測定した。

(5) 酵素液の調製: 外生酵素液は培養濾液をそのまま使用した。内生酵素液は菌体を充分水洗した後乳鉢中で海砂とともにまさいし, 培地の液量と同量の蒸溜水を加えトルオールを加えて 5° で 12 時間抽出させたもの

* Studies on the Decomposition of Raffinose by α -Galactosidase of *Actinomycetes*. Part I. Isolation and Selection of Strain.

By Hideo SUZUKI and Osamu TANABE (Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology)

をそのまま使用した。

(6) α -ガラクトシダーゼの測定方法: 1% メリビオースを含む M/15 磷酸緩衝液 (pH 5.2) 1 ml に酵素液 1 ml を加え, 40°, 2 時間反応後, 加熱により酵素作用を停止させ pH 7.0 とした後グルコース量 (A μ g) をグルコースオキシダーゼ (Worthington Biochem. Corp. 製 glucostat) で測定した。

一方対照として M/15 磷酸緩衝液 1 ml に酵素液 1 ml を加えたものについても同様に操作し, そのグルコース量 (B μ g) を測定した。酵素液 1 ml の α -galactosidase activity はつぎの計算により求めた。

$$(A \mu\text{g} - B \mu\text{g}) \times \text{酵素液の稀釈倍数} = \text{酵素液 1 ml の } \alpha\text{-ガラクトシダーゼの単位}$$

酵素濃度と反応生成物であるグルコース量とはグルコース量 200 μ g 程度までは直線関係が認められるので, 酵素液はあらかじめ 1 ml 中 200 単位以下になるように稀釈した後測定を行なわねばならない。

従って酵素液の稀釈倍数を最後に乗ねばならない。内生酵素液を使用した場合は Ba(OH)₂ 溶液と ZnSO₄ 溶液とで反応液を除蛋白した後グルコースの定量を行なった。

実験結果

(1) 菌株の分離, 選択: ラフィノースに生育し, シュクロースに生育しない菌株を対象に分離を行なった。まずラフィノースを唯一の炭素源とする培地を使用して土壌から放線菌を分離した。つぎにこの培地に生育したコロニーをグルコースを炭素源とする培地に移植し 30° で 7 日間培養した。着生した孢子, また孢子を着生しない菌株では菌体をシュクロースを唯一の炭素源とする検定培地に移植し 30°, 10 日間培養し, 生育しない菌株を目的の菌株とした。

この結果, 土壌から分離した放線菌約 400 株のうち 9 株は検定培地にわずかしこ生育せず, シュクロースを利用しにくい菌株と考えられた。しかしこの培地に全く生育しない菌株は見当らなかった。

(2) 培養によるラフィノースの分解: この 9 株をラフィノースを含む培地で振盪培養し, 培養液のペーパークロマトグラフからラフィノースの分解, シュクロースの蓄積を定性的に試験した。発色はレゾルシン-トリクロル酢酸溶液を使用した。

この結果から No. 26, No. 49, No. 132 の 3 株がラフィノースをほとんど分解し, シュクロースを相当に蓄積していることが認められた。これらの菌株の菌学的性質は次報に報告する。

つぎにこの 3 株をラフィノースを含む培地で 96 時間振盪培養し, 培養濾液のラフィノース量, シュクロース量を定量した。その結果を第 2 表に示した。

第2表　ラフィノース、シュクロースの定量								第3表　α-ガラクトシダーゼの定量					
菌株 番号	ラフィノース (mg/100 ml)				シュクロース (mg/100 ml)			菌株 番号	最終 pH	α-ガラクト シダーゼ			菌体重量 (mg/ 100 ml)
	培養前	培養後	分解量	分解率	培養後	理論量	蓄積率			外生	内生	解	
26	1108.5	24.6	1083.9	97.8	633.0	624.1	101.4	26	8.1	532	6	538	256
49	1108.5	23.0	1085.5	97.9	592.0	625.0	94.7	49	7.0	293	181	474	284
132	1108.5	0	1108.5	100.0	609.0	638.3	95.4	132	7.6	324	61	385	240

この結果から 3 株はいずれも培地のラフィノースをほとんど分解し, 理論量の約 95% 程度のシュクロースを培地に蓄積した。

(3) α -Galactosidase activity: つぎにこれら 3 株の生成する α -galactosidase activity の測定を行なった。

ラフィノースを含む培地で 72 時間振盪培養後, 外生酵素, 内生酵素を測定した。その結果を第 3 表に示した。

この結果から No. 26 は外生にほとんどの α -ガラクトシダーゼを生成し, 内生にはわずかの酵素しか認められなかった。しかし No. 49 と No. 132 は形態上同じ種に属する菌株と考えられるが, とともに内生にかなりの α -ガラクトシダーゼが認められた。これらの点から No. 26 を今後の実験に使用することとした。

(4) 培養の経時分析: ラフィノースを含む培地に No. 26 を移植し, 振盪培養し, pH, 菌体重量, α -galactosidase activity, ラフィノースの分解率について経時分析を行なった。その結果を第 1 図に示した。この結果からラフィノースは培養後 72 時間で完全にシュクロースに分解された。 α -ガラクトシダーゼの生成は培養後 72 時間で最高に達し, しだいに減少し, pH 9.0 付近になると急速に低下した。

(5) シュクロース共存の場合のラフィノースの分解: シュクロース共存の場合にもラフィノースが分解さ

第 4 表 シュクロース共存の場合の
シュクロースの蓄積

シュクロース 濃度	培養前 (g/100 ml)		培養後 (g/100 ml)	
	シュクロース	ラフィノース	シュクロース	理論シュクロース
0	—	1.0	0.544	0.576
2.5	2.441	1.0	2.796	3.017
5.0	4.874	1.0	5.164	5.450
7.5	7.322	1.0	7.659	7.898

分解し、還元糖量を定量し転化糖として表示し、この値からシュクロース量を計算により求めた。その結果を第 4 表に示した。この結果からシュクロースの蓄積は理論値には達しなかったが、最初与えたシュクロース量よりも若干増加していることが認められた。これはこの菌が微弱ではあるがシュクロースを利用するためと考えられた。

要 約

ラフィノースをシュクロースに分解する目的のため α-ガラクトシダーゼを持ち、invertase を持たない放線菌を土壌より

検索した。

- (1) 約 400 株の放線菌を土壌から分離し、シュクロースにほとんど増殖しない菌株 9 株をえた。
- (2) このうちの 3 株は培地に使用した 1% のラフィノースを 4 日間の振盪培養でほとんど完全にシュクロースに分解し、理論の約 95% 程度のシュクロースを培地に蓄積した。
- (3) 3 株の α-ガラクトシダーゼを測定した結果、No. 26 では α-ガラクトシダーゼの大部分が培地中に存在し、内生の α-ガラクトシダーゼはわずかししか認められなかった。しかし他の 2 株 No. 49, No. 132 ではかなりの内生の α-ガラクトシダーゼが認められた。
- (4) ラフィノースを含む培地に No. 26 を培養したときの培養経過を経時的に分析した。
- (5) ラフィノース 1% とシュクロース 2.5~7.5% 共存の培地に No. 26 を培養した結果、シュクロース共存の場合でもラフィノースはほとんど完全に分解された。しかしシュクロースの蓄積は理論値には達しなかった。

本研究は昭和 38 年 4 月 2 日、日本農芸化学会大会で講演した。

- (1) A. Bau : *Chem. Ztg.*, **19**, 1873 (1895).
- (2) E. Fischer, P. Lindner : *Ber.*, **28**, 3034 (1895).
- (3) E. Hofmann : *Biochem. Z.*, **273**, 198 (1934).
- (4) R. Weidnagen, A. Renner : *Z. Wirtschaftsgruppe Zucker-ind.*, **86**, 22 (1936).
- (5) J. E. Courtois, C. Carrere, F. Petek : *Bull. Soc. chim. biol.*, **41**, 1251 (1959).
- (6) E. Hoeckner : *Z. Hyg. Infektionskrankh.*, **129**, 519 (1949).
- (7) D. S. Hogness, E. H. Battley : *Federation Proc.*, **16**, 197 (1957).
- (8) Burckhart Helferich : *Ber. Verhandl. sächs. Akad. Wiss. Leipzig, Math.-phys. Kl.*, **95**, 135 (1943).
- (9) C. Carrère, S. Lambin, J. E. Courtois : *Compt. rend. soc. biol.*, **154**, 1747 (1960).
- (10) R. G. Benedict et al. : *Appl. Microbiol.*, **3**, 1 (1955).
- (11) 友杉 喬, 宮沢利男 : 台糖研, **19**, 214 (1961).
- (12) Z. Dishe, E. Borenfreund : *J. Biol. Chem.*, **192**, 583 (1951).