放線菌によるラフィノースの分解に関する研究 (第 3 報)*

 α -ガラクトシダーゼの生成

鈴木英雄, 小沢良子, 田辺 脩 (工業技術院発酵研究所)

昭和 39 年 6 月 10 日 受理

緒 言

われわれは甜菜糖蜜中のラフィノースを微生物の生産する α -ガラクトシダーゼ (α -D-galactoside galactohydase) でガラクトースとシュクロースに分解し, ラフィノースのシュクロース結晶化妨害作用を除去するとともにシュクロースの増収をはかるという目的で, 土壌よりこの目的に適した放線菌 3 株を分離⁽¹⁾, これらの菌株の同定⁽²⁾をおこなった。

これら 3 菌株のうちの 1 株 (*Streptomyces olivaceus* group) は α -ガラクトシダーゼのほとんど大部分を培地中に生成するという特徴を有しているので, この菌株を使用して α -ガラクトシダーゼの生成について研究をおこなった。

微生物の α -ガラクトシダーゼの生成条件に関する研究は比較的少なく, C. J. Porter ら⁽³⁾, R. Sheinin ら^(4,5) は *E. coli* の α -ガラクトシダーゼの生成が α -ガラクトシドや β -ガラクトシドによって促進されると報告し, D. S. Hognes ら⁽⁶⁾ は *Aerobacter aerogenes* の α -ガラクトシダーゼの生成がガラクトース, α -ガラクトシドにより促進されるが β -ガラクトシドによっては促進されないと報告している。

しかしながら Bailey ら⁽⁷⁾ は *Streptococcus bovis* の α -ガラクトシダーゼは構成酵素であると報告している。

酵母に関しては下面酵母には広くこの酵素が存在し, 構成酵素と考えられているが黴および放線菌の α -ガラクトシダーゼの生成に関する研究はみあたらない。

われわれは放線菌の α -ガラクトシダーゼの生成条件

について研究をおこなった結果, この酵素がガラクトース, ラクトース, メリビオース, ラフィノースによって induction される inducible enzyme であることを認めたので比較的安価なラクトースを原料とする α -ガラクトシダーゼの生成の基礎条件について研究をおこなった。本報ではこれらの結果について報告する。

実験方法

(1) 菌株: *Streptomyces olivaceus* group に属すると同定⁽²⁾した菌株。

(2) 培養: 培養中の pH の変動をなるべく防止するため培養液にはすべて磷酸緩衝液を M/10 になるように添加した。培養液 25 ml を 100 ml の三角フラスコに入れ, 30°, 72 時間振盪培養した。振幅は 35 mm, 振盪回数は 160 r. p. m. として実験をおこなった。

(3) α -ガラクトシダーゼ活性の測定: 第 1 報⁽¹⁾記載の方法によった。 α -ガラクトシダーゼ活性は外生酵素と内生酵素との和をもって表示した。

(4) 還元糖の測定: Somogyi 変法により定量し, マルトース量であらわした。

(5) ラフィノースの定量: 第 1 報⁽¹⁾と同様に測定した。

実験の部

1. 炭素源との関係

α -ガラクトシダーゼの生成と炭素源との関係について実験をおこなった。培地の炭素源濃度は 0.5% とした。ただしラフィノースはこの菌株ではガラクトース部分しか利用されない⁽¹⁾ので 1.5% 添加した。その結果を第 1 表に示した。

ガラクトース, ラクトース, メリビオース, ラフィノースは α -ガラクトシダーゼの生成を促進した。しかしその他の炭素源は α -ガラクトシダーゼの生成をほとんど促進しなかった。

これらの現象はこの菌株の α -ガラクトシダーゼが

* Studies on the Decomposition of Raffinose by Actinomycetes. Part III. Formation of α -Galactosidase.

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

inducible enzy-

me であることを
示すものである。

第 1 表 炭素源との関係

種 類	α -ガラクト シダーゼ	糖消費 (%)
無 添 加	18	—
2. ラクトース		
D-キシロース	10	55
を使用した		
L-アラビノース	2	56
α -ガラクトシ		
D-グルコース	21	98
ダーゼの生成		
D-ガラクトース	376	85
D-フルクトース	5	89
条件		
D-マンノース	0	98
ラクトースがラ		
マルトース	4	66
フィノース, メリ		
イソマルトース	4	19
セロビオース	7	98
ビオースと同程度		
ラクトース	586	50
に α -ガラクトシ		
メリビオース	615	98
ダーゼを生成する		
ラフィノース	538	30
可溶性でんぷん	24	98
点からラクトース		
グリコーゲン	6	98
を炭素源とする α		
デキストラン	7	2

-ガラクトシダー
ゼの生成を考え、
培養の諸条件について研究をおこなった。

(1) ラクトース濃度との関係 : 酵素生成の最適糖
濃度を求めるため、0.5~7.5% のラクトース濃度につ
いて研究をおこなった。その結果を第 2 表に示した。

濃度 2.5% で最高の酵素活性がえられ、5% ではやや
劣り、7.5% では酵素の生成は著しく低下した。

(2) 培養 pH との関係 : 酵素生成の最適 pH を求
めるため、pH を 5.8~8.1 に調節した培地を使用して

第 2 表 ラクトース濃度との関係

濃 度 (%)	消 費 糖 (mg/100ml)	α -ガラクト シダーゼ	菌体重量 (mg/100ml)
0.5	155	571	144
1.0	380	947	174
2.5	668	1618	264
5.0	943	1496	228
7.5	563	181	172

培地組成 : ラクトース 0.5~7.5%, ペプトン 0.3%, 肉エキス 0.3%
を含む M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.0)

第 3 表 培養 pH と の 関 係

pH		糖消費 (%)	α -ガラクト シダーゼ	菌体重量 (mg/100ml)
初発	最終			
5.8	6.1	19	955	264
7.0	6.9	33	1792	368
7.8	8.6	7	174	32
8.1	8.9	7	143	16

培地組成 : ラクトース 2.5%, ペプトン 0.3%, 肉エキス 0.3% を含む
M/10 磷酸緩衝液 (pH 5.8~8.1)

研究をおこなった。その結果を第 3 表に示した。

初発 pH 5.8, 7.0 では培養中の pH の変動も比較的
に少なかったが、初発 pH 7.8 および 8.1 の場合は pH
の変動がやや多く正確に pH を制御できなかった。

初発 pH 5.8 と 7.0 では 7.0 の方が菌体の増殖、酵
素の生成ともに優れていたため、以後の実験は初発 pH
を 7.0 として培養をおこなうこととした。

(3) 窒素源との関係 : 酵素生成と窒素源の種類と
の関係について研究をおこなった。培地中の窒素量が
80 mg/100 ml になるように窒素化合物を添加して実験
した。その結果を第 4 表に示した。

第 4 表 窒 素 源 と の 関 係

種 類	糖消費 (%)	α -ガラクト シダーゼ	菌体重量 (mg/100ml)
ベ プ ト ン	48	2084	264
酵 母 エ キ ス	70	2031	658
肉 エ キ ス	48	1601	408
NZ-ア ミ ン	42	718	471
アスパラギン酸	11	308	97
カザミノ酸	12	154	142
カゼイン	0	0	0
酒石酸アンモン	0	0	0
硫酸アンモン	0	0	0
硝酸ソーダ	0	0	0

培地組成 : ラクトース 2.5 g, 窒素化合物 (N 80 mg), KCl 0.05 g,
MgSO₄·7H₂O 0.05 g, FeSO₄·7H₂O 1 mg を含む M/10
磷酸緩衝液 (pH 7.0) 100 ml

ペプトン、酵母エキスが特に優れ、約 2000 単位の酵
素活性がえられ、肉エキスでは約 1600 単位の活性がえ
られた。これらの窒素源はいずれも酵素の生成に適して
いた。

しかし NZ アミン (カゼインのパンクレアチン加水分
解物, Baltimore Biological laboratory 製品) では、菌
体の増殖は前者に劣らなかったが、酵素の生成はペプト
ンの場合の約 1/3 にすぎなかった。

カザミノ酸 (Difco 社製品), L-アスパラギン酸では菌
体の増殖も悪く、酵素の生成もわずかであった。

カゼイン、酒石酸アンモン、無機窒素化合物では菌体
の増殖がほとんど認められなかった。

(4) ビタミン類などとの関係 : ビタミン類などの
添加により酵素の生成が増加するかについて研究をおこ
なった。ビタミン類 2 mg を培地 100 ml に添加してそ
の効果を検討した。その結果を第 5 表に示した。

ビタミン類を添加しても酵素の生成はほとんど増加し

第 5 表 ビタミン類などとの関係

種 類	糖消費 (%)	α -ガラクトシダーゼ	菌体重量 (mg/100ml)
無 添 加	22	1909	228
ニコチン酸アミド	22	2122	308
イノシトール	22	1899	296
ビオチン	22	2216	304
ビタミン B ₁	23	2261	280
ビタミン B ₂	21	1487	276
ビタミン B ₆	20	1808	252
ビタミン B ₁₂	23	1444	319
葉 酸	24	2014	296
パントテン酸 Ca	16	1650	224
パラアミノ安息香酸	24	2259	320

培地組成: ラクトース 2.5 g, ペプトン 0.3 g, 肉エキス 0.3 g, ビタミン類など 2 mg を含む M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 100 ml

第 6 表 金属イオンとの関係

種 類	濃 度	糖消費 (%)	α -ガラクトシダーゼ	菌体重量 (mg/100 ml)
無 添 加	—	15	1360	208
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	2×10 ⁻⁴ M	15	1183	176
	2×10 ⁻³ M	4	197	112
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	2×10 ⁻⁴ M	21	1601	280
	2×10 ⁻³ M	10	553	96
MgSO ₄ ·5 H ₂ O	2×10 ⁻⁴ M	34	1590	416
	2×10 ⁻³ M	23	1390	334
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	2×10 ⁻⁴ M	15	1719	248
	2×10 ⁻³ M	19	2072	256
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	2×10 ⁻⁴ M	12	1345	184
	2×10 ⁻³ M	11	1093	200
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	2×10 ⁻⁴ M	9	58	104
	2×10 ⁻³ M	4	0	僅少
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	2×10 ⁻⁴ M	33	590	226
	2×10 ⁻³ M	9	0	僅少

培地組成: ラクトース 2.5 g, ペプトン 0.3 g, 肉エキス 0.3 g, 金属イオン 2×10⁻³M~2×10⁻⁴M を含む M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 100 ml.

なかった。

(5) 金属イオンとの関係: 微量の金属イオンと酵素の生成との関係について研究をおこなった。金属イオン 2×10⁻³M~2×10⁻⁴M を添加してその効果を検討した。その結果を第 6 表に示した。

Mn⁺⁺ は酵素の生成をやや促進した。

Mg⁺⁺ と Zn⁺⁺ はいずれも酵素の生成にほとんど影響を与えなかった。

Ca⁺⁺ と Fe⁺⁺ は 2×10⁻⁴M では酵素の生成に影響を与えなかったが, 2×10⁻³M では菌体の増殖を阻害し, 酵素の生成も低下した。

Cu⁺⁺ は 2×10⁻⁴M で酵素の生成を阻害し, Co⁺⁺ は

第 1 図 培養日数との関係

培地組成: ラクトース 2.5%, ペプトン 0.3%, 肉エキス 0.3% を含む M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.0)

2×10⁻⁴M で菌体の増殖, 酵素の生成をともに阻害した。

(6) 培養時間との関係: 培養時間と酵素生成との関係について研究をおこなった。その結果を第 1 図に示した。

酵素の生成は培養 72 時間で停止し, 以後活性はほとんど一定であった。

菌体重量は 72 時間で最高に達し, 以後減少していった。これらの点から培養時間は 72 時間が適当であった。

(7) 粗酵素によるラフィノースの分解: ラクトースを炭素源として培養した培養濾液 100 ml に硫酸 54 g の割合で添加し, 5° で 16 時間放置し, 濾過し, 沈殿を蒸留水で溶解し, 透析し, 透析内液を減圧濃縮して粗酵素液を調製し, ラフィノースの分解率との関係を研究した。その結果を第 2 図に示した。

第 2 図 ラフィノースの酵素分解

5,000 単位の酵素液 1 ml を 5% ラフィノースを含む M/15 磷酸緩衝液 1 ml (pH 5.2) と反応させた結果, 反応 48 時間でラフィノースの 92% は分解された。10,000 単位, 72 時間で 100% 分解された。

なお使用した粗酵素液にはインペルターゼ活性は認められなかった。

要 約

Streptomyces olivaceus group に属すると同定した放線菌 (インベルターゼを生産しない) の α -ガラクトシダーゼの生成について研究した.

本菌株の α -ガラクトシダーゼの生成はガラクトース, ラクトース, メリビオース, ラフィノースにより促進され, その他の糖類では促進されなかった.

(2) ラクトースを炭素源とする α -ガラクトシダーゼの生成条件を研究し, つぎの結果をえた.

i) 糖濃度 2.5% で最高の活性がえられた.
ii) 培養中の pH の変動は初発 pH 5.8 と 7.0 では少なかったが, 7.8 と 8.1 ではやや大きかった.

初発 pH 5.8 と 7.0 では後者の方が酵素の生成に適していた.

iii) 窒素源としてはペプトン, 酵母エキスが特に優れ, 肉エキスも優れていた.

iv) ビタミン類を添加しても酵素の生成はほとんど増

加しなかった.

v) Mn^{++} は酵素の生成をやや促進した.

vi) 培養時間は 72 時間が適当であった.

vii) 粗酵素液 1 ml (10,000 単位) と 5% ラフィノース 1 ml とを反応させた結果 (37°, pH 5.2, 72 時間) ラフィノースは 100% ガラクトースとシュクロースに分解された.

(1) 鈴木英雄, 田辺 脩 : 本誌, **37**, 623 (1963).

(2) 鈴木英雄, 小沢良子, 田辺 脩 : 本誌, **38**, 334 (1964).

(3) C. J. Porter, R. Holmes, B. F. Crocker : *J. Gen. Physiol.*, **37**, 271 (1953).

(4) R. Sheinin, K. McQuillen : *Bioch. Biophys. Acta*, **31**, 72 (1959).

(5) R. Sheinin, B. F. Crocker : *Can. J. Biochem and physiol.*, **39**, 63 (1961).

(6) D. S. Hogness, E. H. Battley : *Federation Proc.*, **16**, 197 (1957).

(7) R. W. Bailey : *Biochem. J.*, **86**, 509 (1963).