



細菌アルギン酸分解酵素(alginase)の生産条件について (その3)

吉川, 三吉
渡辺, 憲

(Citation)

兵庫農科大学研究報告. 農芸化学編, 3(2):92-96

(Issue Date)

1958-12

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCOI)

<https://doi.org/10.24546/81008183>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81008183>



細菌アルギン酸分解酵素 (alginate) の 生産条件について (その 3)

吉川三吉・渡辺 憲

Studies on the Mechanism of Alginate Production by Bacteria (Part III)

Mitsuyoshi YOSHIKAWA and Ken WATANABE

緒 言

既報^{1,2)}ではアルギン酸分解細菌の培養の際の物理的条件或は培養液の各組成がアルギン酸分解酵素 (alginate) の産生に及ぼす影響についてしらべ、この細菌の生産する alginate は WAKSMAN 氏³⁾の菌株の生産する酵素とは異り、適応酵素に属するものであること、また、かなり浸透圧の高い培養液でよく増殖することを報告した。

本報では既報の結果に基いて alginate の産生に必要な、或は極めて有効と思われる各種塩類についてそれぞれの至適濃度を検討し、alginate の産生に最もよいと思われる培養液を決定したのでその結果をここに報告する。

実験及び結果

本実験には前報²⁾同様 *Pseudomonas alginoliquefaciens* No. 1²⁾の菌株を使用した。酵素生産量は 100ml 三角コルベンに 20ml の各培養液を入れ、この菌を接種して 28°~30°C で培養し、毎日酵素活性度を測定して、最大に達した時の値をもつてその培養液の酵素活性度とした。

酵素活性度は 1% アルギン酸ソーダ 10ml, 磷酸緩衝液 (pH=7.2) 5ml 及び酵素液 (培養濾液) の適宜の量を試験管にとり、水を加えて全量を 20ml とし、更に 3% となるだけの食塩を添加し、1ml のトルオールを加えて恒温水槽中で 40°C で 16 時間保持して後、70°C の湯浴中に 60 分浸して酵素を不活性化し、この消化液の粘

度をオストワルドの粘度計を用いて 40°C で測定し、その粘土変化%を $\frac{V_0 - V_t}{V_0 - V} \times 100$ (V_0 , V_t , V_s はそれぞれ、基質に不活性化酵素を加えたもの、消化液、及び、不活性化酵素に基質の代りに蒸留水を加えたものの流下時間 (秒)) から算出し、その結果 50% だけの粘度変化を生ぜしめるのに必要な酵素量を 1 単位としてあらわした。この測定に際し、粘度の高すぎるアルギン酸ソーダ溶液は適宜の時間 100° に加熱することにより、粘度を低下させ、つねにはぼ一定の粘性のものを使用した (この場合、酵素液の粘度がほとんど水のそれに等しいか極めて稀釈した酵素液を用いたときには、5ml の測定値が V_0 では 175~185 秒、 V_s では 37 秒であった)。

また、さきに培養液の至適食塩濃度¹⁾を求めたがこれと等浸透圧の培養液が常によいとは限らないので以下の実験ではそれぞれの場合について食塩或は硫酸ソーダの至適濃度を求めた。

基本培養液 培養液中のアルギン酸ソーダの濃度を 0.005M* から逐次増加していくと、alginate の生産量はアルギン酸ソーダの濃度 0.2~0.3M* に達するまで急激な増加を示すが、更に濃度を高くすると、菌の増殖が緩慢となり、従つて alginate の生産も遅れ、窒素源その他塩類を増減しても殆んど効果が見られなかつた。そこで蒸留水にアルギン酸ソーダを溶解して 0.3M* とし、これに NaNO_3 0.1M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002M, K_2HPO_4 0.006M 及び種々の量の食塩を加え、pH を塩酸又は苛性ソーダで 7.2~7.4 に調整した培養液について

Table 1. Optimum Salt Concentration in a Standard Medium.

NaCl (M)	0.2	0.3	0.4	0.5	0.55	0.6	0.7
Final pH	9.2	9.0	9.0	9.2	9.2	9.4	9.4
Enzyme activity (unit/ml)	5	6	8	8	7	7	6
Incubation period (days)	7	7	9	10	12	14	21

Table 2. Standard Medium.

Sodium alginate	0.3M*
NaNO ₃	0.1M
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.002M
K ₂ HPO ₄	0.006M
NaCl	0.4M
pH	7.2~7.4

alginate の産生に対する食塩の至適濃度を求め、これを以下の実験の基本培養液 (第2表) とした。そして第1表に見られるように 0.4~0.5M で alginate の生産量が最大となり、このときの各塩類の集計モル濃度は前報²⁾の基本培養液の場合と同様 0.8~0.9M となつた。

アンモニア塩類の至適濃度 培養液中の窒素源としては有機態窒素よりアンモニア態窒素の方のよいことがわかっている²⁾のでアンモニア態無基塩のうち、塩化アン

Table 3 Effect of Ammonium Salt Concentration on Alginate Production.

1. NH₄Cl

NH ₄ Cl (M)	0.1													
Sodium alginate (M*)	0.2				0.3				0.4					
NaCl (M)	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.4	0.5	0.6	0.7	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
Final pH	9.0	8.8	8.8	8.8	8.6	9.0	9.0	9.0	9.0	9.4	9.2	9.2	9.0	8.6
Enzyme activity (unit/ml)	14	16	17	15	13	18	19	17	14	7	15	18	16	6.7
Incubation period (days)	5	5	7	7	7~9	7	8	8	8	10	10	10~12	10~15	13~15

NH ₄ Cl (M)	0.2								0.4							
Sodium alginate (M*)	0.2				0.4				0.2				0.4			
NaCl (M)	0.4	0.5	0.6	0.7	0.2	0.3	0.4	0.5	0.3	0.4	0.5	0.3	0.4	0.5		
Final pH	8.8	8.8	8.8	8.6	9.0	9.2	9.2	9.0	8.4	8.4	8.4	7.4	8.6	8.6		
Enzyme activity (unit/ml)	14	15	17	13	15	18	19	18	15	18	17	19	20	17		
Incubation period (days)	6	6	6	6	9	10	10	10	7	7	7	10	10	10~11		

NH ₄ Cl (M)	0.6																	
Sodium alginate (M*)	0.2						0.3						0.4					
NaCl (M)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.1	0.2	0.3	0.4	0.1	0.2	0.3	0.4				
Final pH	no growth																	
Enzyme activity (unit/ml)	7.6	7.6	6.8	6.8	5.6	7.6	7.2	6.2	5.2	7.6	7.7	7.4	7.0					
Incubation period (days)	15	15	11	8	8	14	20	18	8	17	19	16	7					
Incubation period (days)	7	7	7	9	9	7	8	8	12	8	10	10	15					

2. (NH₄)₂SO₄

(NH ₄) ₂ SO ₄ (M)	0.1												0.2				0.3							
NaCl (M)	0.3	0.4	0.5	0.6	0.3	0.4	0.5	0.6	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8									
Final pH	8.8	8.8	8.8	8.8	7.4	7.8	8.0	8.0	5.6	5.8	6.6	7.4	7.6	7.6	7.4									
Enzyme activity (unit/ml)	16	23	21	17	17	29	30	28	4	14	17	32	34	34	31									
Incubation period (days)	7	7	7~10	10	7	7~10	7~10	10	7	7	7	9	9	12	14									

3. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (M)	0.1				0.2						0.3
NaCl (M)	0.5	0.6	0.7	0.9	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	0.5~1.2
Final pH	6.2	8.6	8.6	8.6	7.6	7.4	8.2	8.4	8.4	8.2	
Enzyme activity (unit/ml)	5	27	26	23	11	10	25	30	29	11	no growth
Incubation period (days)	7	10	10	10	10	10	10	10~ 12	23	23	or very slowly

モン、硫酸、燐酸アンモンの3種についてしらべた。

基本培養液中の硝酸ソーダの代りに塩化アンモンを用いた場合、濃度が高くなると培養液のpHが酸性に傾き易く、従つて菌の増殖が悪いが0.1~0.6 Mの濃度間ではalginaseの産生に及ぼす顕著な効果は殆んど見られなかつた(第3表その1参照)。

硫酸の場合も濃度を増すと培養液が酸性になり易い傾向にあるが塩化アンモンの場合とは違つて0.3 M以下の濃度では硫酸濃度の増加と共にalginaseの産生が顕著に増加した(第3表その2参照)。

第2燐酸アンモンの場合(基本培養液中の硝酸ソーダ及び第2燐酸カリの代りに第2燐酸アンモン及び0.003 M塩化カリを用いた)。やはり硫酸のようにアンモニア塩の増加と共にalginaseの産生が上昇し、硫酸の場合にも劣らないよい結果が観察されたが0.3 M以上では増殖が極めておそく或は増殖しなかつたりしてalginaseの産生も必ずしもよくなかつた。またこの場合燐酸アンモンの低濃度のときの至適食塩濃度と同じ食塩濃度に於て

は燐酸アンモンの濃度増加に伴いalginaseの生産は減少する傾向にあり、次の燐酸カリの場合にも見られるように多量の燐酸はalginaseの産生を阻害する傾向にあるが食塩濃度を増加して培養液の浸透圧を高めることによりある程度防ぐことができるようである(第3表その3参照)。

第2燐酸カリの至適濃度 少量の燐酸はこの菌の培養には必要であるが、0.003~0.006 M以上では濃度の増加と共にalginaseの産生が抑制されることは既に報告したが²⁾ 今度の場合も全く同様の傾向が観察された。また燐酸アンモンの場合のように燐酸カリの濃度の増加と共に食塩至適濃度の上昇することが見られた(第4表参照)。

硫酸マグネシウムの濃度の影響 硫酸マグネシウムの濃度を増加すると培養液の混濁度から約0.1 Mまで菌の増殖が盛になることが観察されるが、alginaseの産生に対する至適濃度は前報²⁾の場合同様0.04~0.05 M附近であつた。(第5表参照)。

炭酸カルシウムの影響 アルギン酸ソーダの濃度の低

Table 4. Effect of K_2HPO_4 Concentration on Alginase Production

K_2HPO_4 (M)	0.006	0.056					0.256				
NaCl (M)	0.4	0.4	0.5	0.6	0.7	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	
Final pH	9.0	9.2	9.2	9.2	9.2	9.0	9.0	9.0	9.2	9.2	
Enzyme activity (unit/ml)	9	1.5	8	7	6	1	3.5	1.5	2	1	
Incubation period (days)	8	7	10	12	14	13	15	21	23	23	

Table 5. Effect of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Concentration on Alginase Production.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (M)	0.002	0.052					0.102			
NaCl (M)	0.4	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.2	0.3	0.4	0.5
Final pH	9.0	7.4	9.2	9.0	9.0	9.0	9.2	9.2	9.2	9.2
Enzyme activity (unit/ml)	7	8	12	14	14	10	9	10	12	8.5
Incubation period (days)	9	10	10~ 12	12~ 16	12~ 16	12~ 16	10	10	12	10~ 14

Table 6. Effect of Sodium Sulfate on Alginase Production.

NaNO ₃ (M)	0.1					0.1					
(NH ₄) ₂ SO ₄ (M)	—					—					
Na ₂ SO ₄ (M)	—	0.2	0.25	0.29	0.34	—	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4
NaCl (M)	0.4	—	—	—	—	0.4	—	—	—	—	—
Final pH	9.7	9.2	9.4	9.2	8.8	9.0	8.9	8.8	8.6	8.9	8.9
Enzyme activity (unit/ml)	8.5	10	15	12	11	24	37	35	44	46.5	45
Incubation period (days)	10	7	7	7	7	7	6	6	6	7	7
(NH ₄) ₂ SO ₄ (M)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
MgSO ₄ · 7H ₂ O (M)	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042
Na ₂ SO ₄ (M)	—	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.3	0.35	0.4	—	—
NaCl (M)	0.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Final pH	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	7.8	5.4	—
Enzyme activity ₁ (unit/ml)	29	59	61	63	55	54	52	6	—	—	—
Incubation period (days)	9	10	10	10	10	10	10	9	7	—	—

いときには炭酸カルシウムの添加により, alginase の生産量がかなり増し, 培養日数も無添加の場合と殆んど変わらなかった²⁾のでアルギン酸ソーダ 0.3M 濃度の場合について重ねて実験を行つたが, 炭酸カルシウム 0.02~0.08M/l の添加により, 菌の増殖が遅れ, alginase の生産量も必ずしも増加しなかつた。

食塩の代りに硫酸ソーダの用いた場合 前報²⁾及び上述の結果から, どの塩類も食塩と置換し得る等滲透圧の濃度に至るまで濃度を増加することは alginase の生産量を減じ, 従つて陽イオン中ではナトリウムイオンが最もよいことが推測される。また窒素源として同じアンモニウム塩でありながら硫酸の場合は塩化アンモンに較べて常に alginase の産生に効果的であるので NaCl の塩素イオンの代りに 2 価の陰イオンをもつ硫酸ソーダを用いて両者の alginase の産生に及ぼす影響を観察した。第 6 表その 1 及びその 2 に示すように硫酸ソーダを用いた場合は食塩の場合にくらべて明らかに alginase の生産量の増大が認められた。そして長期間培養を延長しても食塩の場合に比して alginase の減少率も極めて小であつた。

また以上の結果から alginase の産生に最もよいと思われる培養基は第 6 表その 2 に見られる (NH₄)₂SO₄ 0.3M, MgSO₄ · 7H₂O 0.042M, K₂HPO₄ 0.006M, アル

ギン酸ソーダ 0.3M*, Na₂SO₄ 0.2M, pH=7.2~7.4 で最初用いた培養液^{1,2)}アルギン酸ソーダ 2%, NaNO₃ 0.025M, MgSO₄ · 7H₂O 0.002M, K₂HPO₄ 0.006M, NaCl 0.7M, pH=7.2~7.4 の組成をもつ場合の 10~15 倍の alginase を生産した。

要 約

アルギン酸分解細菌 *Pseudomonas alginoliquefaciens* No. 1 の菌株を用いてアルギン酸分解酵素 (alginase) の産生条件について研究してきたが, この菌株では適応酵素であり, アルギン酸ソーダの濃度の増加と共に alginase 生産量も増大するので主としてアルギン酸ソーダ 0.3M* の場合について alginase の産生に有効と思われる塩類についてその影響を観察した。

1. 培養液中の窒素源としてアンモニア塩のうち塩化アンモン, 硫酸, 燐酸アンモンについて観察したが, 後二者はそれぞれ 0.3M 及び 0.2M に至るまで濃度の増加と共に alginase の生産量の増大を示したが塩化アンモンの場合には明らかな影響は見られなかつた。

2. 燐酸カリは少量は必要であるが, 燐酸アンモンの場合同様, これら燐酸塩を増加すると食塩の至適濃度もまた上昇する傾向が観察された。

3. 硫酸マグネシウムの至量濃度は 0.004~0.05M であり, また炭酸カルシウムの添加は高濃度のアルギン酸

ソーダを用いた場合には芳しくなかつた。

4. 食塩の代りに硫酸ソーダを使用するとき, alginaseの生産は明らかに上昇し, 長期間培養を延長しても alginase の減少率は食塩の場合よりもはるかに小であり, Na^+ 及び SO_4^- イオンは alginase の産生或は保護作用に効果的であこと思われた。

また以上の結果から $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.042M, K_2HPO_4 0.006M, アルギン酸ソーダ 0.3M*, Na_2SO_4 0.2M, $\text{pH}=7.2\sim 7.4$ の培養液が alginase の産生に最もよく, 最初に使用した培養液 (アルギン酸ソーダ 2%, NaNO_3 0.025M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002M, K_2HPO_4 0.006M, NaCl 0.7M, $\text{pH}=7.2\sim 7.4$) の場合の10~15倍の alginase を生産した。

(* アルギン酸は多塩基性酸の高分子化合物であるが, 便宜上, マヌロン酸の1分子無水物 (一塩基酸) のグラム分子量を1Mとして計算した)。

終りに臨み, 終始御鞭撻をいただいた本学々長三宅捷先生 吉村貞彦教授に対して衷心より感謝の意を表す。

(生物化学講座, 昭 33. 8. 30受理)

文 献

- 1) 吉川: 兵庫農大研報, 2 (農化編), 8(1955).
- 2) 吉川: 兵庫農大研報, 2 (農化編), 118 (1956).
- 3) S. A. WAKSMAN and M. C. ALLEN: *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 2701 (1934).
- 4) M. YOSHIKAWA: *Sc. Rep. Hyogo Univ. Agr.*, 1 (Series: *Agr. Chem.*), 50 (1954).

Summary

Pseudomonas alginoliquefaciens No. 1 were cultured under various conditions. A large amount of alginase was produced in a medium containing 0.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.042M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.006M K_2HPO_4 , 0.3M* sodium alginate and 0.2M Na_2SO_4 , and its activity was 10~15 times higher than that of the enzyme produced in the medium (containing 2% sodium alginate, 0.025 M NaNO_3 , 0.002M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.006M K_2HPO_4 and 0.7M NaCl), used previously.

(Biochemical Laboratory)