

## 納豆菌の菌体外セルラーゼおよびキシラナーゼ

大槻 耕三・河端 信・田口 邦子

### Studies on the Cellulase and Xylanase Activities in the Culture Medium of *Bacillus subtilis* var. *natto*

KOZO OHTSUKI, MAKOTO KAWABATA and KUNIKO TAGUCHI

Cellulolytic activity was observed in the culture filtrate of *Bacillus subtilis* var. *natto* IFO 3335. The maximum cellulolytic activity was obtained in the filtrate of two-days-cultured medium. This culture medium filtrate also contained an intense xylanase activity. The purification of these extracellular enzymes in the culture medium was tried by the gel chromatography of Bio-Gel P-100 and the specific activities of the enzymes was appreciably increased, although the isolation of the xylanase fraction from the cellulolytic activity fraction was not attained.

#### 緒 言

セルラーゼは広く植物体に含まれ、植物体内での消化分解や果実の熟成などに働いている。また数種の動物もセルロースを分解する微生物を体内にもっていて、セルロースの分解生成物を利用していることが知られている。微生物起源のセルラーゼについては古くから研究されてきており、またあらゆる種類の菌株が培養され利用されてきた。セルラーゼの分解機構については1950年代に仮説が出されていたが、最近になってセルラーゼそのものの単離精製が行なわれ、そのセルロース分解機構もかなりくわしく解明されつつある<sup>1)~6)</sup>。

われわれは納豆菌の粘質物についての研究<sup>7)</sup>、粘質物をセロファン膜に透析すると、しばしば4°Cの低温に於てもセロファン膜が脆くなって破れる現象を経験した。このことから納豆菌の菌体外セルロース加水分解酵素の存在を予想し、納豆菌を数種の液体培地で培養し、その濾液の酵素活性その他について検討したので報告する。納豆菌は *Bacillus subtilis* (枯草菌) の一種であって、キシランを多く含む糞に寄生し、キシランを分解する酵素を産生することも当然予想される。上記の培養液の濾液を還元糖生成能力から測定したところセルロース分解活性よりもむしろキシラン分解活性の方が強いという結果を得たので合せて報告する。

#### 実験材料および方法

##### (1) 材 料

納豆菌は武田醗酵研究所から入手した *Bacillus subtilis* var. *natto* IFO 3335である。この菌を肉エキス1%、ペプトン1%、NaCl 0.1%、粉末寒天2.5%を含む斜面培地に40°C 24時間培養した後4°Cで保存した。セルロース粉末(200mesh)は東洋濾紙社のもを、カルボキシメチルセルロース(CMC, 可溶性)は和光純薬社(大阪)のもの、キシランは半井化学薬品社(京都)の特級のものを使用した。ペプトンは共栄製薬社(東京)製で、肉エキスはミクニ化学産業社(東京)製を使用した。その他の化学試薬は半井化学薬品社製の特級のものを使用した。

##### (2) 培 養

本実験では Table I に示したような各種の液体培地を200ml ずつ作り500mlの三角フラスコに入れ綿栓をしてオートクレーブで120°C 2気圧30分間の滅菌を行ない、冷却後上記保存菌を白金耳接種し、40°Cで各時間培養する。その後8000 r. p. m. で冷却遠心分離または4°Cでの濾過によって菌体を除去し以後の実験に用いる。

##### (3) 酵素活性測定法

基質として CMC やセルロース粉末またはキシランを各種緩衝液に0.5%~1%の濃度に溶かし(セルロ

Table I. CMCase activity in various culture filtrate

	Composition of Culture Media		CMCase Activity
A	Sodium Citrate	0.5%	mg glucose eq./ml
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2.0	
	KCl	0.15	
	Mg SO <sub>4</sub>	0.05	
	CMC	0.5	
B	A+Peptone	1%	0.03
C	A+Meat Extract	1%	0.18
D	Peptone	1%	0.13
	A+Meat Extract	1	
E	NaCl	0.1%	—
	CMC	0.5	
F	E+Peptone	1%	0.23
G	E+Meat Extract	1%	—
H	Peptone	1%	0.42
	E+Meat Extract	1	

ース粉末は懸濁液), これらの 1 ml に対し酵素液を 1 ml 加え 40°C の恒温浴に 3 時間インキュベートする。セルロース粉末を基質とした時は振盪する。酵素反応液に生成する還元糖は 1% 3,5-dinitrosalicylic acid (0.4% NaOH, 30% ロッシェル塩溶液)<sup>8)</sup> 2 ml を反応液に加え 5 分間沸とう浴で加熱し発色させる。冷却後 15 ml の水を加え攪拌してから日立分光光度計 (101 型) で 530 nm の吸光を測定する。盲検として各酵素液の反応時間 0 のものを上記と同じようにして発色させる。上記の反応条件で酵素液 1 ml が遊離するグルコース 1 mg 相当発色を 1 mg glucose eq./ml とする。また酵素液中のタンパク質量を Folin-Ciocalteu 試薬<sup>9)</sup> と精製卵白アルブミンを標準として定量した時の酵素活性は mg glucose eq./mg protein として表わす。

#### (4) 分子篩クロマトグラフィーによる精製

培養液中の酵素を精製するために, Bio-Gel P-100 (Bio Rad, USA) によるゲル濾過を行なった。りん酸緩衝液で平衡化した Bio-Gel P-100 (1.5 cm φ × 70 cm) に上記で得られた培養液の濾液を 10 倍にロータリーエバポレーターで濃縮しその 4~5 ml をサンプリングする。カラムからの溶出液は流動セル付の東洋濾紙社製ユビコン UV-540 で 280 nm における吸光度を連続的に測定し, また流動セル付の電気伝導度計 (エムエス機器社, 大阪) で溶出液中の塩類を検出した。

両流動セルを通過したカラムからの溶出液は 5 ml ずつをフラクションコレクターに集め, (3) と同じ方法で酵素活性及びタンパク質量を各フラクションについて定量した。

#### 結果および考察

納豆菌の保存用斜面寒天培地から Table I に示したような色々な組成の液体培地に接種し, 40°C の恒温で 2 日間静置培養した。Table I の右らんのその結果を見ると, C, D, F, H, の培地が比較的多くの CMCase を菌体外に産出していることがわかる。A~D は各種の無機塩類と窒素源と CMCase 産出のための誘導物質として CMC とを共通して添加してあるが, 納豆菌の生育のためには C, D からうかがえるように肉エキス, ペプトンの添加が効果的である。また E~H には共通して NaCl と CMC が入っているが, C, D

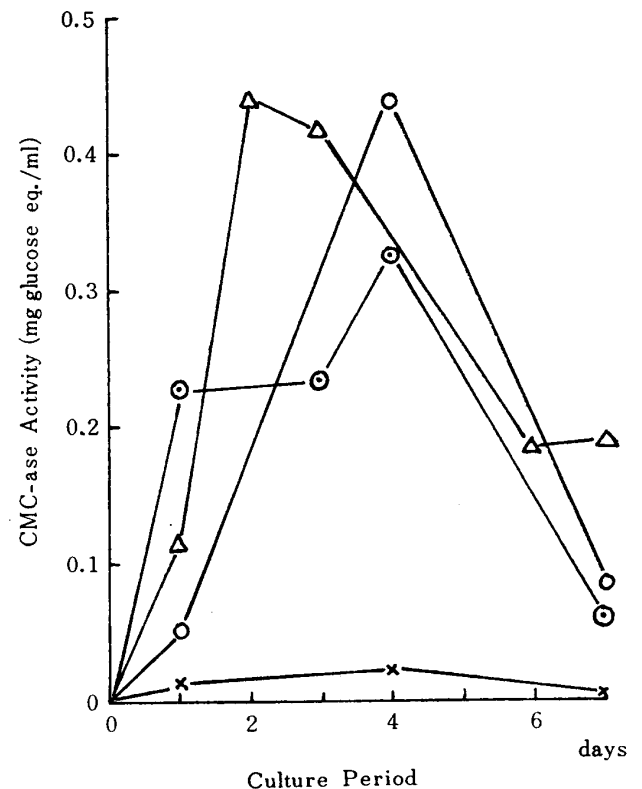


Fig. 1. Extracellular CMCase in the culture media of *Bacillus subtilis natto*. All the culture media consisted of 0.5% CMC and 0.1% NaCl; ○—○, further contained 1% meat extract; ●—●, 1% peptone; △—△, 1% meat extract and 1% peptone, and incubated at 40°C. For the CMCase assay, each culture medium was filtered and 1 ml of the filtrate was incubated with 1 ml of 0.5% CMC in 0.05 M phosphate, pH 7.0, at 40°C for 3 hrs.

と F, H を比べると H の CMCase 産出が最大であることから A に示したような無機塩類よりも肉エキス、ペプトンが存在する方がこの酵素の産生に効果があることがわかった。

E~H の各種液体培地に納豆菌を接種し、これら培地の静置培養時間と菌体外 CMCase 活性の変化を調べた結果を Fig. 1 に示した。E の NaCl と CMC だけからなる培地 (×—×) に生育する納豆菌は 1~7 日間に殆んど CMCase を産出していない。この培地に更に肉エキスを加えたもの (○—○) には酵素活性が見られ 4 日目に最大となった。またペプトンを加えたもの (●—●) も 4 日目に最大となり以後は減少した。肉エキスとペプトンを添加した培地 (△—△) には強い酵素活性が培養時間の早い時期に見られ、それ以後は減少する。これらの結果から、納豆菌を NaCl, CMC, 肉エキス, ペプトンからなる液体培地で 2 日間培養することにした。

上記の実験はいずれも静置培養であったが、振盪培養の効果を見るために次の実験を行なった。肉エキス 1%, ペプトン 1%, NaCl 0.5% の液体培地 100ml を 300ml 容三角フラスコに入れ納豆菌を接種し 40°C で 1~2 日間振盪培養する。対照とし同時に別の三角フラスコに同じ培地を入れ 2 日間 40°C で静置培養した。その結果振盪培養 1 日目で対照のほぼ 70% の CMCase 活性が得られ、振盪 2 日目には対照の 140% の酵素活

性が得られた。また静置培養の際には培養表面上に見られた膜は、振盪培養の時には生成しなかった。

上述の実験ではいずれも CMC を誘導物質として用

Table II. CMCase activity and Cellulase activity of culture filtrate

Composition of Culture Media	Activity	
	CMCase	Cellulose Powder-lytic
NaCl 0.1%	mg glucose eq./ml	
Peptone 1.0	0.49	0.30
Meat Extract 1.0		
Cellulose Powder 0.5		
NaCl 0.1%	0.45	0.17
Pepton 0.5		
Meat Extract 0.5		
Cellulose Powder 1.0		

Table III. CMCase, Cellulase and Xylanase activities of culture filtrate

Substrate	Activity
CMC	mg glucose eq./mg Protein 0.467
Cellulose Powder	0.395
Xylan	1.447

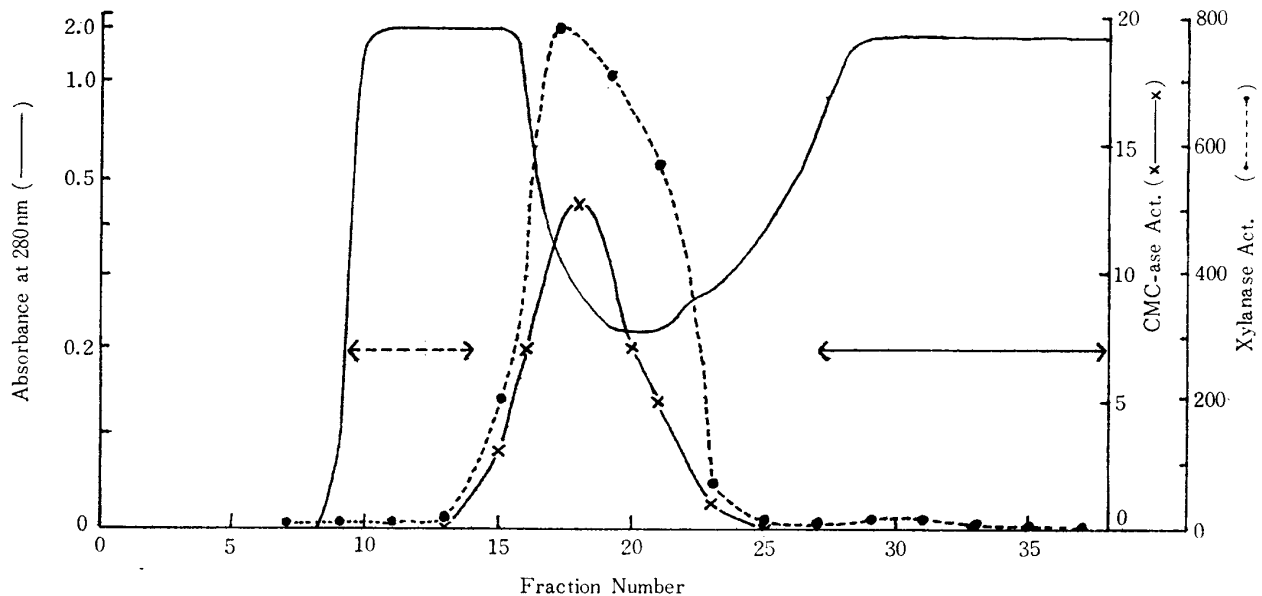


Fig. 2. Gel chromatography on Bio-Gel P-100 of culture medium filtrate. Five ml of the concentrated filtrate (10 fold) of culture medium was applied on a column of Bio-Gel P-100 (1.5cmφ × 70cm) eluted with 0.05 M phosphate, pH 7.0. The marks (←.....→) and (←——→) represent turbid fractions and brown-colored fraction respectively. CMCase activity, (×——×) mg glucose eq./mg of protein. Xylanase activity, (●.....●) mg glucose eq./mg of protein.

いたが、セルロース粉末を誘導物質として培地に添加した実験の結果を Table II に示した。ここでは40°Cで2日間の振盪培養を行なった。この結果還元糖生成能力から見た場合この条件下で培養した納豆菌の菌体外酵素としてはセルラーゼ活性よりも CMCase 活性の方が強いことがわかった。また Table III には 0.5% CMC を誘導物質とし0.1% NaCl, 1%肉エキス, 1%ペプトンの条件で納豆菌を2日間40°Cで振盪培養した培養液の各種基質に対する活性を還元糖生成能力で示した。この酵素液でもセルロースに対する活性(セルラーゼ活性)よりも CMC に対する活性の方が強いことがわかった。さらにキシランに対する活性(キシラナーゼ活性)はこれらいずれの活性よりも約3~3.5倍強いことがわかる。他の微生物起源のセルラーゼの最近の報告では<sup>1)~6)</sup>セルラーゼ活性と CMCase 活性とは別種の酵素によるとされている。またキシラナーゼ活性と CMCase 活性は同一酵素によるとされている<sup>10)11)</sup>。現在のところ本納豆菌の菌体外の酵素は分離精製がなされていないので Table III の活性は何種類の酵素によるものかは明らかでない。

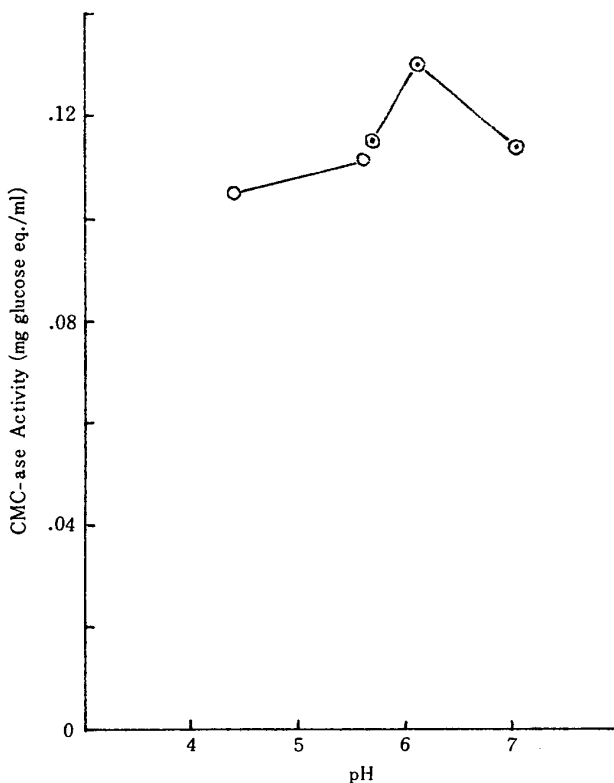


Fig. 3. Effect of pH on the activity of CMCase. Purified culture filtrate by Bio-Gel P-100 was pooled. The enzyme (0.25 ml), various buffer (0.5 ml) and 1% CMC (0.25 ml) were incubated at 40°C for 3 hrs. ●—●, Phosphate buffer; ○—○, Acetate buffer.

培養液には可溶性の CMC やペプトンその他の物が酵素液と混在するので、Bio-Gel P-100 による精製を試みた。(Fig. 2) 酵素活性は P-100 の void volume からかなり遅れて14~24本に溶出される。このゲル濾過によりキシラナーゼ活性と CMCase 活性とは互いに分離することはできなかったが、得られた酵素の各フラクションは Table III の活性と比べると CMCase で最高28倍、キシラナーゼ活性で約570倍活性が上昇した。Table III の比活性は mg タンパク質当りで表現しているが、培養液には肉エキス、ペプトンがまだ残っていると思われるため、Fig. 2でこれらを除去すると比活性が飛躍的に上昇するのは当然であろう。このゲル濾過によって少しの濁りや茶色の着色や27~35本に溶出される塩類を比較的容易に取り除くことができた。Fig. 2で得られた酵素の pH-CMCase 曲線 (Fig. 3) から、pH 4~7の間では pH 6.0で最高の活性を示した。

## 要 約

納豆菌の菌体外セルラーゼを得るために各種液体培地で培養し、それらの濾液の CMCase 活性を測定して検討した。その結果肉エキス、ペプトン、CMC, を含む培地で40°C2日間振盪培養すると最大の酵素活性を得ることができた。この酵素には CMCase だけでなくセルロース粉末分解活性も見られさらにキシラナーゼ活性が CMCase 活性の約3倍も含まれることが明らかとなった。CMCase 活性とキシラナーゼ活性とは今回は互いに分離することはできなかったが Bio-Gel P-100によりそれぞれの比活性をかなり上昇させることができた。

おわりに、この研究に御協力戴きました上田あつ子氏に感謝致します。(1976年7月31日受理)

## 文 献

- 1) T. Yoshikawa, H. Suzuki and K. Nishizawa, *J. Biochem.*, **75**, 531 (1974)
- 2) 西沢一俊, セルラーゼ, 化学の領域選書8, 南江堂 (1974)
- 3) T. M. Wood and S. I. McCrae, *Biochem. J.*, **128**, 1183, (1972)
- 4) G. Halliwell and M. Griffin, *Biochem. J.*, **135**, 587, (1973)
- 5) L. E. R. Berghem and L. G. Pettersson, *Eur. J. Biochem.*, **37**, 21 (1973)
- 6) L. E. R. Berghem, L. G. Pettersson and U-B. Axiö-Fredriksson, *Eur. J. Biochem.*, **53**, 55 (1975)

- 7) a. 林 義男, 河端 信, 田口邦子, 京都府立大学学術報告, 理学・生活科学, **22**, 13 (1971)  
b. 田口邦子, 河端 信, 京都府立大学学術報告, 理学・生活科学, **25**, 7 (1974)
- 8) a. 農芸化学実験書第2巻 p. 619 京都大学農学部 農芸化学教室編  
b. 福井作蔵, 還元糖の定量法, 生物化学実験法, 瓜谷, 志村, 中村, 船津編, 東京大学出版会 (1969)
- 9) O. Folin and V. J. Ciocalteu, *J. Biol. Chem.*, **73**, 627 (1927)
- 10) S. Shikata and K. Nishizawa, *J. Biochem.*, **78**, 499 (1975)
- 11) T. Kanda, K. Wakabayashi, K. Nishizawa, *J. Biochem.*, **79**, 989 (1976)