

酵素成分の混合物のように思われる。

(4) 動物起源のセルラーゼは、CMC や Walsyth cellulose のほかに天然セルロースにも作用し、cello-dextrin (DP=25) や Walsyth cellulose からその最終生成物として、セロビオースが多く生じた。それゆえこの動物性セルラーゼは、基質特異性の幅が非常に広いものと思われる。

53. *Pseudomonas* セルラーゼの誘導生成

山根 国男, 鈴木 恕, 山口 和男
塚田美重子, ○西沢 一俊

(東京教育大学理学部植物学科)

Inducted Formation of Cellulases
in *Pseudomonas fluorescens* var.
cellulosa by some Disaccharides

Kunio Yamane, Hiroshi Suzuki, Kazuo
Yamaguchi, Mieko Tsukada, and
Kazutosi Nisizawa

(Botanical Institute, Tokyo Kyoiku University)

Pseudomonas fluorescens var. *cellulosa* におけるセルラーゼの生成はC源によって非常に左右される。たとえば、沪紙をC源にすると培養液中にむしろ多く、デンプンではむしろ菌体内に多い。しかし、沪紙をC源にするとデンプンの場合の約10倍の酵素量が生成される。したがって沪紙培養の場合にはセルロース系糖類が酵素生成になんらかの影響をおよぼすものと考えられる。

これらの点を明らかにする目的で succinate をC源とした菌体を洗滌し、その suspension にセルロース系糖類 ($G_1 \sim G_4$) を加え、38°Cで振盪処理を行なった。定時間後に菌体と処理液に分け、それぞれ酵素活性を CMC 粘度低下力で測定した。その結果、これらの糖は全く影響を持たないことが示された。

一方 Reese は *Trichoderma viride* の菌糸 suspension を用い、cellulase inducer が sophorose であることを報告している。我々は全てのグルコ二糖類や数種のヘテログリコシドについて実験した結果、sophorose および gentiobiose のみが明確な誘導効果を示し、sophorose では対照の約3.5倍(菌体外)、約2倍(菌体内)、gentiobiose では約2.8倍(菌体外)、

約1.8倍(菌体内)の酵素が生成されることを知った。これらの糖と同時に succinate (0.1%) を加えた場合には、いずれの生産もさらに約1.5倍も増大されることが判った。また、誘導効果を持たないものでは succinate の影響が認められないので、sophorose, gentiobiose がエネルギー源になって効果を現わすとは考え難い。

それゆえにこれらの二糖類はセルラーゼ生成の誘導に密接な関係を持つものと思われるので、目下これらの糖類とセルラーゼの isozyme 生成などの関係をさらに追求している。

54. *Aspergillus saitoi* の生産するセルロース分解酵素の研究

(第5報) セルロース分解酵素生産における培養条件

○松村 親, 前島 一孝
(武田薬品工業㈱研究所)

Studies on Cellulolytic Enzymes
Produced by *Aspergillus saitoi*

(V) Influence of Culture Conditions on
Enzyme Production

Chikashi Matsumura and Kazutaka
Maejima

(Research Laboratories, Takeda Chemical
Industries, Ltd., Osaka)

著者らはこれまでの報告で *Aspergillus saitoi* の生産するセルロース分解酵素系について研究を行ない、その中の酵素の1つ CMC-ase を結晶状に単離し、その諸性質について検討してきた。今回はこれらのセルロース分解酵素生産における培養条件を、振盪培養法およびタンク培養法で検討した結果について報告する。

振盪培養法で CMC-ase 生産の種々培養条件を検討した結果、一般に糸状菌の通気培養法による菌体内物質生産には有機態窒素源を比較的多量に必要とするが、セルロース分解酵素生産の場合には特にこの傾向が著しかった。また、有機態窒素のほかにリン酸アンモニウムの添加量が *Asp. oryzae* の α -amylase の生産に著しく影響することが知られているが、*Asp. saitoi* の cellulase 生産の場合には比較的影響が少なく、一方糖の代謝を抑制し酵素の生産量を高めるために硫酸アンモニウムの添加が有効であった。次に菌

(94)

の繁殖を増大させる手段として生産される有機酸の中和に炭酸カルシウムを用いることは培養液の pH の低下を妨げ酵素生産に悪影響をおよぼす、酵素生産時の pH は 3.0~4.0 に維持することが必要であった。さらに、適応酵素としての生産に関しては基質である沪紙末、CMC-Na 末を添加すると若干酵素の生産の増加あるいは促進が認められた。

これらの結果に基づいて培養液組成を定めタンク培養法を検討した結果、セルロース分解酵素系は沪紙崩壊酵素 (C_1)、CMC-ase (C_x)、 β -glucosidase の順に生産され、これらの酵素系によって *asp. saitoi* が天然繊維をつぎつぎに glucose まで分解することが推定された。さらに、培養の始発 pH は低い程酵素は早く生産されるが、菌の糖代謝は遅れ、菌体量の増加も少なくない。また、上記 3 酵素生産のための始発至適 pH はそれぞれ 4.0~5.0, 3.0~4.0, 3.0 付近であった。

55. セルラーゼ作用の動力学的解析

○雨村 明倫, 照井 堯造

(大阪大学工学部醸酵工学教室)

Kinetic Studies of Cellulase Action

Akinori Amemura and Gyoza Terui

(Dept. Ferment. Technol., Facult. Engin.,
Osaka Univ.)

目 的

青カビの生産するセルラーゼ系が不溶基質として存在するセルロース (パルプ繊維) に作用する場合の動力学解析を行なうことを目的としている。一部概報した反応の生成物阻害効果のほかに 2, 3 の新しい知見について報告する。

方 法

Penicillium variable に属する 1 株の生産するセルラーゼ系を精製して用いた。その際、主としてセルロース溶解量をグルコースの定量から求め得るように、 C_1 活性に対して C_x やセロビアーゼ活性が充分に存在し、分解中間体が無視され得るような反応系を用いたが残存基質量によっても検討した。反応基質としては主として 150 メッシュの精製パルプ粉末を用い、また、比較のため他種繊維をも用いた。反応は 30°C 振とう攪拌によって行なった。

結 果

セルラーゼパルプのような固相界面で行なわれる反応系においても反応速度は Langmuir の吸着式の変形とみなし得る Michaelis-Menten の式に見かけ上従うことがわかり、 K_m 相当値が得られるが、これは Michaelis 本来の意味と対比するためにも拮抗阻害の研究は興味がある。酵素作用を受け易い基質の amorphous 区分の有効な吸着の site の大部分は酵素反応との関係において平等に取扱い得るという仮定にたち、また crystal と amorphous 区分との比が酵素反応過程においては一定であるというパルプについての既報の実験結果をもとにすれば実験結果を説明するに足る簡単な定式化ができるが、この妥当な条件範囲を決定することも重要である。なお、見かけの K_m の値 $K_m' = 3.57$ (g/l) であった。生成物グルコースによる反応の阻害効果は顕著であり、残存基質濃度 $[S]$ と反応速度 $d[S]/dt$ との間には次のような関係が認められた。ただし、阻害物の濃度 $[I] = c([S]_0 - [S])$ で表わされる (c は比例定数)。

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{V'[S]}{K_m'(1 + \left(1 + \frac{c([S]_0 - [S])}{K_i}\right) + [S])}$$

また、新たに阻害物として濃度 $[I]$ のグルコースを加えた場合にも上の K_i 値を用いて予期通りの結果を得た。また、上式は amorphous 区分の存在率 (α) との関係を検討したものであり、すなわち拮抗阻害のないときの式が

$$-\alpha \frac{d[S]}{dt} = \frac{V \alpha [S]}{K_m + \alpha [S]}$$

$$\therefore -\frac{d[S]}{dt} - \frac{\frac{1}{\alpha} V [S]}{\frac{K_m}{\alpha} + [S]} = \frac{V' [S]}{K_m' + [S]}$$

で表わされる。

α がほぼ一定という前記の条件では拮抗阻害式中の K_m' は K_m と同様に取扱い得るわけで、上の拮抗阻害式が成立することも首肯できる。

さらに他種繊維についての比較も 2, 3 つけ加え検討する予定である。

56. ひいろたけ酵素の生産と応用

(第 5 報) セルラーゼ系の分離精製 (その 2)

○奈良 潔, 畚野 剛, 吉野 弘

(武田薬品工業株式会社技術本部・醸酵技術部)