

側へ, また pH11.0 では陽極側へ移動する, リン酸緩衝液 (pH6.5) で 4 時間 15 分電気泳動を行なうと Fig. 5 に示すように陰極側に酵素活性を認めその比活性が約 3 倍に上昇することがわかった (Fig. 5).

(5) 基質特異性 0.05M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 1 ml にセルラーゼ 1000 単位を含む酵素液に天然型セルロースおよび非天然型セルロースを加えて反応した. この結果前者にはほとんど作用しないが, カルボキシメチルセルロースナトリウムやセロファンには作用することがわかった. またセロビオースにも作用しないことから本セルラーゼが Reese¹²⁾ の分類による Cx 型セルラーゼと考えられる.

総 括

リゾプス属 R-302 株がリパーゼを生産するとき同時に多量のセルラーゼを生産することを発見し, この株の好氣的培養濾液から硫酸アムモニウム沈澱法ついで duolite A-7 による脱色, さらに amberlite XE-64 吸着法で本セルラーゼを精製した.

本酵素は各種 pH, 温度に対してきわめて安定で, pH10.6 でも 1 日間その活性を保持し, また 3 時間 60°C に加温しても活性の低下が認められない. 本品の至適 pH は 4~5 であり, 至適度は 60°C である. 天然型セルロースやセロビオースに作用しないから Cx 型セルラーゼと考えられる.

最後に臨み終始御指導御鞭撻を頂いた当研究所長桑田智博士, 副所長立岡末雄博士, 部長田中邦喜博士に謹謝する. また有益な御助言を頂き本実験の御援助を賜わった島蘭平雄博士, 三宅彰博士, 松村親室長, 醸酵技術部の諸氏に感謝する.

文 献

- | | |
|---|---|
| (1) Freudenberg, K., Ploetz, T.: <i>Z. physiol. Chem.</i> , 259 , 19 (1939). | (8) 西沢, 小林, 市川: 酵素化学シンポジウム, 10 , 6 (1954). |
| (2) Ploetz, T.: <i>ibid.</i> , 261 , 183 (1939). | (9) 外山: 本誌, 33 , 266 (1955). |
| (3) Karreth, A.: <i>French Patents</i> , 767, 627 (1934). | (10) Sumner, J.B.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 65 , 393 (1925). |
| (4) Whitaker, D.R.: <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 43 , 253 (1953). | (11) Tatsuoka, S., Miyake, A., Wada, S., Imada, I., Matsumura, C.: <i>J. Biochem. (Tokyo)</i> , 46 , 575 (1959). |
| (5) 岡本, 朝井: 農化, 26 , 137 (1952). | (12) Reese, E.T., Levinson, H.S.: <i>Physiol. Plantarum</i> , 5 , 345 (1952). |
| (6) 福本, 岸: 大阪工技誌, 26 , 295 (1952). | (昭和 37, 1, 23 受付) |
| (7) Nishizawa, K.: <i>J. Biochem. (Tokyo)</i> , 42 , 825 (1955). | |

[醸工 第40巻, 第3号, p. 143~149, 1962]

(4) 糸状菌の深部培養法によるセルレースの生産

金野 範之・上田 芳子・照井 堯造 (大阪大学工学部醸酵工学教室)

Production of Cellulase in Submerged Cultures of Molds

Noriyuki Konno, Yoshiko Ueda and Gyōzō Terui

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

Studies were conducted on the submerged cultures of fungi for the production of cellulase. From among many isolates, three (*Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.* and *Aspergillus niger*) were found to be highly active in producing cellulase in 5% wheat-bran medium.

Opt. pH-values of 5.0, 5.0 and 3.7 were obtained with cellulase systems produced, respectively, by *Pen. sp.*, *Trich. sp.* and *A. niger* (Fig. 1, 2).

Culture conditions and the compositions of media adequate for cellulase formation were investigated with these strains.

Inducer or the source of inducer was necessary for the enzyme formation. Pulp powder, rayon, cotton linter etc. were effective when added to 5% wheat-bran medium (Table 2). Such inducer sources were advantageously used in conjunction with any other carbon source readily available for growth in the early phase of culture. In this case the preferential utilization of the latter substance was followed by the preferential synthesis of cellulase utilizing the inducer source.

Lactose and cellobiose seemed to have the action, though weak, as inducers for cellulase, and starch was relatively effective in the case of *Pen. sp.*

An example of the time-course of a culture of *Pen. sp.* in 20 L jar fermentor is depicted in Fig. 5, where the composition of medium used is listed.

Cellulase formation was initiated when reducing sugar was mostly consumed.

Induced mycelia harvested from a culture for cellulase production could be reused for the subsequent cultures yielding good results within a shorter time of culture. Successful reuse could be attained when the culture period was reasonably determined so that the active phase of cellulase production could be continued from culture to culture.

Reuse could be repeated three to four times without appreciable loss of productivity.

Zone electrophoretic pattern observed with cellulase preparation from a *Pen.* culture indicated the existence of two enzymes exhibiting CMC-decomposing activity. Ultraviolet induced mutants having higher activities of cellulase production were obtained from the above strains.

緒 言

近年、繊維素分解酵素、セルレースは応用面の開発とともにその工業的生産への関心が高まっている。

従来セルレース生産菌¹⁾は多数知られており、わが国では *Trichoderma*²⁾の固体培養による製造が試験的に行なわれているが、とくに糸状菌において深部培養法による生産の研究は重要である。

セルレースは適応酵素として認められ、Reese^{3,4)}は inducer の検索と共にその適応的生成について増殖と関連して検討を加えている。

我々は深部培養に適する菌種の検索と共に生産条件について検討した二、の三結果を報告する。

研究材料および方法

菌種の検索——分離用培地はパルプ粉末 (100mesh) 1%, CMC 0.5%を含む無糖 Czapek-Dox 培地、寒天 3%を用いた。市中塵埃を採取し稀釈法により 30°C で平板培養を行ない、発育する菌を分離し、選ばれた菌株は上の培地を用いて常法により純化した。

酵素力価の測定——セルレースの活性は基質を異にした種々の方法⁵⁾が多数研究されているが、この報告では CMC 分解力と濾紙分解力の 2 面から測定した。

CMC 糖化力 (CMC-SP) は 0.5% CMC 溶液 (pH 5.0) に適宜稀釈した酵素液を加え、50°C、1 時間の反応で生成する還元糖を測定して mg (グルコースとして)/ml 酵素液で表わした。CMC 液化力 (CMC-LP) については各種の pH の 1.4% CMC (日本 CMC K.K. 製) 溶液に 50°C で酵素を作用せしめて相対粘度の低下を Ostwald 粘度計で求めた。

濾紙分解力については 25ml 試験管に酵素液 5 ml, 濾紙片 (0.5 × 3 cm²), およびトルエン 3 ml を入れ 30°C で往復振盪 (試験管の傾斜 20°, 振巾 5 cm, 振動数 90 回/min.) し、経時的に濾紙片の崩壊時間、重量損失量および生成する還元糖を測定した。この場合、力価は 24 または 48 時間後に生成する還元糖量 (FD₂₄; FD₄₈) および重量損失量で表わした。

澱粉糖化力 (Starch-SP) は既法⁶⁾に準じ、40°C pH 5.0、1 時間の還元糖 (グルコースとして) mg 数/ml 酵素液で表わした。

深部培養法——rotary shaker および 20 L 容量の jar fermenter (実容 12 L) を用いて 30°C で行なつた。

菌体再利用の予備実験においては rotary shaker で所定時間前培養を行なつた後、ナイロン濾布を密着せしめ

たガラス管を培養物に挿入し、吸引して濾液を除去し、残渣を再培養する方法を用いた。

紫外線照射——常法⁷⁾に準じ、胞子を上述の分離用培地に懸垂し紫外線照射を施した。生残率は5%以下とし、分離用培地における発育速度により、生残菌株の中から、約1/1000だけ選り出した。

実 験 結 果

(1) 生産菌種の検索

市中塵埃よりの分離株を5%黴培地で30°C rotary shaker で5日間培養後、それぞれ CMC 分解力、濾紙分解力、澱粉糖化力について検討した。第1表は分離株中酵素力価の比較的高いものについて列記したものである。

分離菌株の内 *Penicillium* sp. および *Trichoderma* sp. では CMC 分解力、濾紙分解力がかかなり高いものが見出される。高力価の菌の分布は *Trichoderma* が広いことが認められるが、澱粉糖化力は *Penicillium* sp. が最高である。*Aspergillus niger* は CMC 分解力、濾紙分解力共に前2者より劣っているが生産酵素が対酸的に進行する特徴がある。以後、*Penicillium* sp., *Trichoderma* sp. および *Asp. niger* について、それぞれ高力価を示す菌株に限定して実験を行なった。

(2) 生産するセルレース系の性質

3菌種の生産する酵素の CMC 分解力について最適pHを求めたのがFig. 1である。*Penicillium* sp. および

Table 1. Comparison of enzyme activity among isolates.

Organism	CMC-SP		FD ₄₈		Starch-SP	
	max.	min.	max.	min.	max.	min.
<i>Asp. niger</i>	81	47	7.05	1.9	101	27
<i>Penicillium</i>	280	33	10.3	1.9	300	18
<i>Chaetomium</i>	15.5	1.3	3.7	0.7	—	—
<i>Trichoderma</i>	286	37	11.3	2.2	86	24
<i>Laetiporus</i>	40.8		3.0		—	
<i>Poria</i>	11.7		1.42		—	

CMC-SP : CMC-saccharifying activity expressed in mg red. sugar (as glucose)/ml enzyme solution/hr at 50°C and pH5.0 ; substrate conc. ; 0.5%.

FD₄₈ : filter paper-decomposing activity expressed in mg red. sugar (as glucose)/5ml enzyme solution in 48 hr at 30°C ; substrate : Toyoroshi No.2, 0.5×3cm in size.

Starch-SP : starch saccharifying activity expressed in mg red. sugar (as glucose)/ml enzyme solution/hr at 40°C and pH5.0 with 1% soluble starch as substrate.

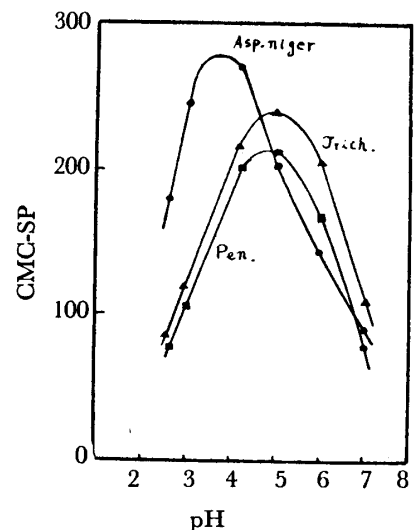


Fig.1. Effect of pH upon CMC decomposition with cellulases of various fungi.

Trichoderma sp. ではpH5.0附近にあるが、*Asp. niger* ではpH3.7が最適である。さらに *Asp. niger* の酵素はpH 3においても前2者に比べ活性の低下率は著しく小さい。*Penicillium* sp. の培養濾液の CMC に対する糖化力、液化力、および濾紙に対する糖化力、重量減少度について最適pHを検討したのがFig. 2である。各活性とも5.0附近に最適pHを有し、CMC と濾紙繊維との差は認められなかつた。当該酵素試料のゾーン電気泳動を行なうとFig. 3の如く澱粉糖化力は-8.7cmに1ヶの peak を示すが、CMC 糖化力を測定すると-10cm区分と-28cm区分とに peak を示した。10cm区分においては濾紙の崩壊現象が認められたが、-28cm区分では実験範囲では認められなかつた。後者の場合酵素量が少ないため濾紙活性を認め難かつたとの懸念がある。

Penicillium sp. の酵素標品を用いて濾紙分解過程を追求すれば、Fig. 4のように、最初1時間以内に急速な濾紙の重量損失および糖の生成が起り、その間に濾紙崩壊現象が認められ、その後、引続き分解が進行する。したがって崩壊現象においては濾紙繊維中、酵素により比較的作用され易い区分の分解が支配的な役割を演じていると思われる。

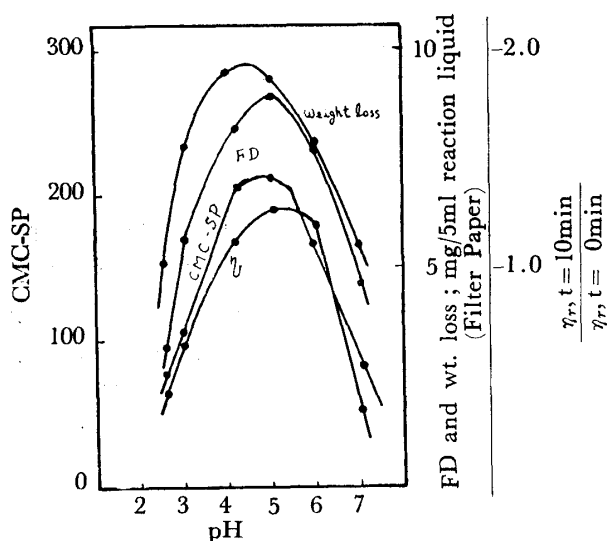


Fig. 2. Effect of pH upon activities of cellulase preparation measured by various methods (*Penicillium sp.*)

Weight loss : loss in weight of filter paper as a measure of activity.

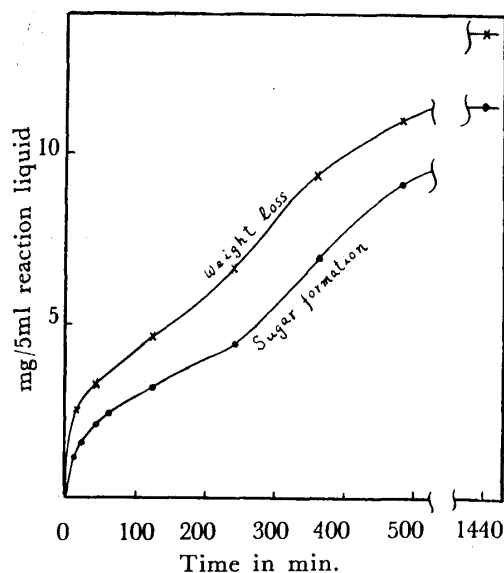


Fig. 4. Time-course of filter paper decomposition by enzyme preparation from a culture of *Penicillium sp.*

(3) 深部培養条件

高力価の生産培地としては麩を主原料としたものが好適であつたので、麩5%を用いたものを基本培地とし、これに各種セルロース含有天然物を添加した結果をTable 2に示す。パルプ粉末(100mesh)が最も効果があり、ついで濾紙、レイオンが効果を示した。麩自体にセルロースは含まれているので無添加でも酵素生産はあるが、パルプ粉末などの添加は inducer の生成に、より好適であつたとも考えられる。

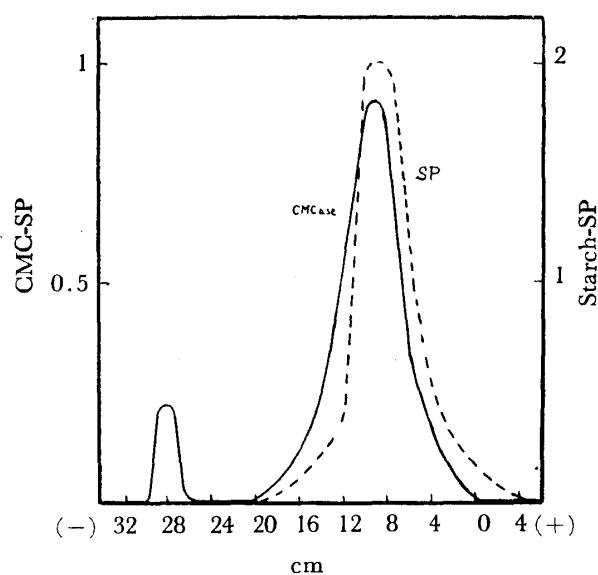


Fig. 3. Zone electrophoretic pattern of enzyme preparation from *Penicillium* culture. Conditions of electrophoresis : pH5.0, 13mA/cm², <5°C, 17hr, with starch as supporter.

Table 2. Effect of added cellulose in various forms upon the production of cellulase. These substances were added to 5% wheat-bran medium.

Substance	CMC-SP	
	<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>
No addition	150	132
Sawdust	162	140
Filter paper	230	206
Pulp powder (100.mesh)	290	285
Cupurus ammonium rayon	205	203
Cotton linter	185	200

Table 3. Effect of various carbon sources upon the production of cellulase.

Carbon source was added to sugar-free Czapek-Dox medium.

Culture : 14days at 30°C.

Carbon source (1%)	<i>Trichoderma sp.</i>		<i>Penicillium sp.</i>	
	CMC-SP	Starch-SP	CMC-SP	Starch-SP
Cellulose	310	57	270	270
Lactose	96	57	180	145
Maltose	69	75	—	—
Glucose	60	56	180	155
Starch	69	102	230	240
Xylose	18	45	—	—
Ribose	0	48	—	—
Cellobiose	85	51	—	—

各種炭素源 1% 添加の影響を調べた (第 3 表) ところセルロースが最も有効であり, 乳糖, セロビオースがこれに次ぐものであつた. これらは主として, inducer としての効果を示すものと見做される. その他の炭素源の添加は菌体増殖に偏る傾向を示し, 酵素の生産には効果を示さなかつた.

各種有機窒素源および栄養源の影響 (Table 4) は *Penicillium sp.* においては yeast ext., corn steep liquor, peptone などは効果を示したが, *Asb. niger* では影響せず, *Trichoderma sp.* ではむしろ pH 低下に基く生産の阻止が認められる.

Table 4. Effect of organic nitrogen sources upon the production of cellulase.

Nitrogenous substances were added to 5% wheat-bran medium.

Nitrogenous substance	<i>Trichoderma sp.</i>			<i>Penicillium sp.</i>			<i>A. niger</i>		
	pH	CMC-SP	Starch-SP	pH	CMC-SP	Starch-SP	pH	CMC-SP	Starch-SP
Non	6.6	286	86	6.0	200	300	4.0	81	110
Peptone	8.0	285	48	6.2	310	218	4.0	80	152
CSL	7.8	57	57	4.2	300	48	4.0	82	149
CDS	2.4	57	96	4.8	324	136	4.0	70	140
Na-glutamate	8.8	30	0	5.4	350	290	—	—	—
Skim-milk powder	7.8	129	64	5.8	290	390	4.0	80	176
Yeast ex.	8.0	42	0	4.6	400	210	4.2	80	144

Table 5. Effect of pH of medium upon the production of cellulase.

In 5% wheat-bran medium for 5days at 30°C.

Initial pH	<i>Trichoderma sp.</i>			<i>Penicillium sp.</i>		
	final pH	CMC-SP	Starch-SP	final pH	CMC-SP	Starch-SP
2.6	2.6	72	53	6.6	140	380
3.0	6.6	140	200	6.4	240	284
4.2	7.0	105	147	6.4	238	230
5.0	6.8	120	153	6.2	238	284
6.0	6.8	220	160	6.4	228	310
7.0	7.0	180	160	6.2	180	220

酵素生産においては培地 pH がかなりの影響を及ぼし, 初期 pH が 3 以下および 6 以上では酵素生産の低下を来たした (Table 5). 培地 pH 経過としては初期を 5.0~6.0 にして終末は 7 以下にするのが好適であつた.

以上の培地組成を検討した結果に基いて 20L jar fermenter (実容 12L) を用いて *Penicillium sp.* の培養を試み

た (Fig. 5). 培地組成は麩 5%, パルプ粉末 1%, NaNO_3 0.3%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{aq.}$ 2.2%, クエン酸 0.8%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{aq.}$ 0.05%, pH 5.0, 30°C で培養した. 燐酸塩とクエン酸塩の添加量は培養途中で pH 調節を実施する場合には著しく低下し得る.

還元糖は培養 20 時間ではほぼ最低値まで減少し, pH は初期に 5 より 3.7 まで低下する. 還元糖低下後, pH は再

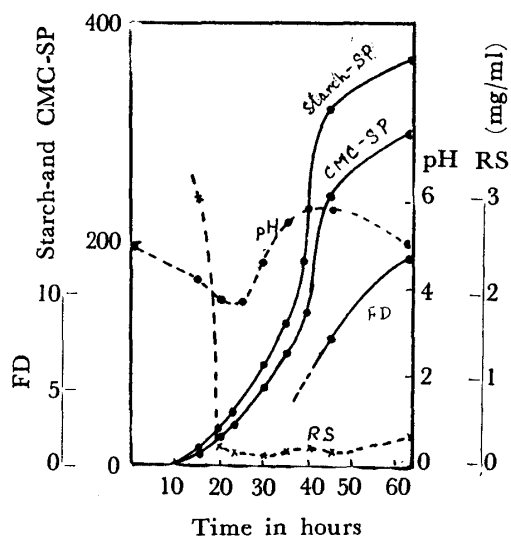


Fig. 5. Time-course of submerged culture of *Penicillium* sp. medium : cf. Table 6.

び上昇しこの過程において澱粉糖化力および CMC 糖化力の生成が活発になる。培養60時間で CMC 糖化力 280 単位、澱粉糖化力 400 単位程度のものが得られた。濾紙分解力は45時間附近より顕著に認められ、60時間ではほぼ最高値に達し、CMC 糖化力とはほぼ同じ挙動を示した。

酵素の生産性の向上のためにはセルレース生産機構を獲得した既適応菌体を再利用する方法が適当であり、その条件について *Trichoderma* sp. を用いて検討した (Table 6)。

前培養 2 日および 3 日では培養 phase が若いので、菌体再利用を行なつた場合、高力価は得られず、5 日では菌体老化で再利用が不可能であつた。前培養 4 日が適当であるが、再利用の間隔を 2 日にすると、再利用の回数を重ねるにしたがつて菌体 phase が若返る傾向を示し酵素力価は減少した。

実験範囲において前培養 4 日、再利用間隔 3 日が最適であり、ほぼ酵素生産期の phase を持続せしめ得ることを認めたので、これを連続培養のための一資料とし得る。

(4) 紫外線照射による菌株の酵素生産力の向上

Table 6. Cellulase production by reused mycelia (*Trichoderma*).

Medium : wheat-bran (5%), pulp powder (1%), NaNO_3 (0.3%), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.3%), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{aq.}$ (2.2%), citric acid (0.8%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{aq.}$ (0.05%).

Preculture (days)	Reused culture (days)	Times of reuse	CMC-SP	Starch-SP	Final pH
4	2	1	162	48	6.3
		2	117	50	6.4
		3	105	43	6.0
		4	93	48	5.2
4	3	1	144	54	6.4
		2	132	48	6.4
		3	114	42	6.6
2	2	1	45	27	3.5
		2	72	24	3.6
		3	45	30	4.0
3	2	1	72	32	3.8
		2	72	23	3.8
		3	66	59	3.6
3	4	1	75	16	3.2
		2	84	24	4.4

Penicillium sp. および *Trichoderma* sp. について紫外線照射を行ない30℃でパルプ粉末 (100mesh), CMC を含む無糖 Czapek-Dox 寒天培地で発育せしめ3日間で生ずる colony 中の大きさにより前記の割合で選択を行なつた。選択菌株につき麩パルプ培地で深部培養を行なつて力価を測定した。

Trichoderma では累代照射により色調が緑色から黄色に変化する傾向を示した。

Table 7 に示したように *Trichoderma* および *Penicillium* 両者において特に著しく高い生産力を示す変異株は得

Table 7. Cellulase-producing activity of ultraviolet induced mutants.

Spores were treated with a dose giving rise to a killing rate more than 95%, and colonies rapidly grown on pulp powder containing C.D.-medium (sugar omitted) were selected. The above procedure was repeated.

Organism	Times of irradiat.	CMC-SP (max.)	Starch-SP (max.)	FD (max.)
<i>Penicillium</i>	1	190	104	8.6
	2	270	270	12
	3	294	330	9.6
<i>Trichoderma</i>	1	204	60	8
	2	264	117	10.5
	3	272	80	—

場合でもそれに inducer 源として良好なパルプ粉末(100mesh)を添加したものが好結果を与えた。種々の炭素源の影響を検討した結果、高度の増殖に適するものは induction が低調であり、強力な酵素生産には菌体が作用し易いセルロースを主成分とする物質が必要のようである。有機窒素源の添加は *Penicillium sp.* において特に効果的であった。*Trichoderma sp.* では強力な代謝の結果、pH 低下を来し、そのままでは高収量は得られなかったが、なお培養中の pH 調節を試みる必要がある。

(3) *Penicillium sp.* を供用し、20L jar fermentor の培養により、60時間では CMC 糖化力単位として 300 単位が得られ、これは天然繊維に対しても、かなりの作用を示すものであった。経時変化をみるに、酵素の生成は還元糖の最低位になった後に促進されるものである。したがって、培養前期においては、増殖に利用され易い炭素源の摂取が活発であり、それが消失した後に、酵素生産が起るものであつて、Monod⁹⁾の主張している炭素源の preferential utilization の現象と考えらる。したがって、我々が既に発表した細菌アミラーゼ⁹⁾、や黒カビ糖化酵素¹⁰⁾の生産においては、増殖基質と inducer とは同一炭素源であるので、セルレース生産とは幾分様相を異にするものであると考えられる。セルロースを増殖および inducer の炭素源として用いることは増殖速度が著しく低下するものであり、工業的な酵素生産の面からみれば不相当であつて、増殖を旺盛ならしむると共に酵素の生産も高めるような培養管理の必要性が感じられる。ここに既適応菌体を再利用することは induction の lag をなくすると共に基質利用率の向上をもたらすことは論を待たないが、二、三の予備的研究の結果酵素生産期の phase を持続せしめるような条件が求められ、この条件はかなりの厳密さを要求することが察知された。

(4) 紫外線照射による菌株の改良を試みた結果、累代照射によつて、生産力の良好な数種の菌株が得られた。

文 献

- (1) Siu, R.G.H.: Microbial Decomposition of Cellulase, Reinhold Publishing Corp., New York (1951).
- (2) 外山: 大阪醸造学会第 8 回シンポジウム 1 頁, (1960).
- (3) Mandels, M., Reese, E.T.: *J. Bact.*, **73**, 269 (1959).
- (4) Mandels, M., Reese, E.T.: *J. Bact.*, **79**, 816 (1960).
- (5) Pigman, W.: *The Enzyme*, (Summer, J.B., Myrback, K.) Vol. I, 725, Academic Press Inc., Publishers, New York (1950).
- (6) 照井, 金野: 大阪醸造学会第 8 回シンポジウム 39 頁, (1960).
- (7) 黒田: 本誌, **38**, 364 (1960).
- (8) Monod, J.: *Growth*, **11**, 223 (1947).
- (9) 照井, 金野: 本誌, **39**, 375 (1961).
- (10) 照井, 金野: 大阪醸造学会第 9 回シンポジウム 36 頁, (1961).

(昭和37, 1, 29 受付)

られなかつたが累代照射によつて良好な菌株が得られ生産力は安定であつた。

総括および考察

この研究はセルレースの深部培養法について工業的生産の見地から二、三の検討を行なつたものである。

(1) 検索分離した菌株中 *Penicillium sp.*, および *Trichoderma sp.* の深部培養濾液は CMC, 天然セルロース両者に対する分解力が高くその最適 pH は 5.0 であり, *Asp. niger* では対酸性の酵素 (最適 pH 3.7) を生産し, 三者共セルレース生産菌として良好である。

(2) これら菌株のセルレースは適応酵素であり inducer ないしは inducer 源を加用する必要がある。生産培地としては麩を主原料とした