

[J. Ferment. Technol., Vol. 53, No. 5, p. 256~263, 1975]

Oerskovia sp. CK 株の生産する酵母細胞壁溶解酵素の 産生条件および粗酵素の諸性質*

小幡 孝之・山下 孝一・布川弥太郎

国税庁醸造試験所

Culture Conditions for the Production of Yeast Lytic Enzymes from *Oerskovia* sp. CK and Some Properties of the Crude Enzymes*

Takaji Obata, Koichi Yamashita, and Yataro Nunokawa

The National Research Institute of Brewing, Takinogawa, Kita-ku, Tokyo.

The culture filtrate of the CK strain, belonging to the genus *Oerskovia*, exhibited high lytic activity toward logarithmic or stationary phase cells of many species of yeast, when the yeast cells were used as substrate. Culturing conditions of the CK strain giving the optimum production of the cell wall lytic enzyme were investigated. It was found that glucan, the main component of yeast cell wall, and laminarin whose structure is similar to glucan, were effective inducers of enzyme production. Addition of NaNO_3 , KNO_3 , or $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ to the medium promoted the enzyme production, owing to maintenance of the broth pH around neutrality. The enzyme production was also enhanced when the medium was sterilized at pH 11.0 and readjusted to pH 7.0. This enzyme preparation showed β -1,3-glucanase, β -1,6-glucanase, mannanase, protease, and amylase activities. Optimum pH and optimum temperature of the lytic activity were 6.0–9.0 and 30°–40°C. This lytic activity was stable at pH 6.0–10.0, but was completely lost on treatment at 50°C for 15 min. The activity was also severely inhibited by 10^{-4} M HgCl_2 .

緒 言

前報¹⁾において酵母マンナン分解酵素生産菌として分離された CK 株が分類学的な検討の結果 *Oerskovia* 属に属する放線菌と同定された。本属に属する菌株の分離例は本邦では本菌が最初の極めて特異な菌であり、しかも酵母菌体を基質として本菌を培養した場合に多種の酵母生細胞に作用する強力な細胞壁溶解酵素を生産する興味深い菌株でもある。これまでに溶解酵素を生産する微生物は数多く知られているが、*Oerskovia* 属

に属する菌株としては、Mann ら²⁾が報告しているのが唯一である。しかしそこでは粗酵素の酵母細胞に対する作用を電子顕微鏡で観察した結果、および数種の酵母に対する溶解作用を調べたにとどまり、酵素の諸性質、精製方法等については記述されていない。そこで本菌の生産する溶解酵素の構成酵素群およびそれらの性質を明らかにするため検討することとした。まず本報では酵素生産の増大を目的とし、その条件設定さらに溶菌スペクトラム、培養濾液を粗酵素としたその諸性質について報告する。

実 験 方 法

培地および培養方法 協会7号乾燥酵母 1%,

* *Oerskovia* sp. ck 株の生産する酵母細胞壁溶解酵素に関する研究 (第2報)
Production of Yeast Lytic Enzymes by a Strain Belonging to the Genus *Oerskovia* (II).

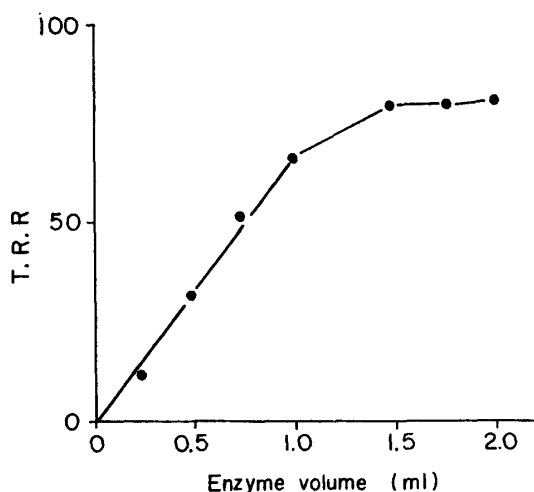


Fig. 1. Relation between the enzyme concentration and the lytic activity.

Lytic activity was expressed by T.R.R. (Turbidity Reduction Rate). Refer to the text.

KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%を含む pH 7.0 に調整した培地を前培養, 酵素生産用とし, これに寒天 2%を加えたものを菌株保存培地とした. 殺菌は 120°C , 15分間行った. 培養方法は寒天培地上で24時間生育させた菌を20時間振盪前培養し, それを酵素生産培地に1%接種し24時間振盪培養した. 培養温度は全て 30°C で行った.

溶解活性測定法 協会7号酵母をグルコース 2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04%, イーストエキス 0.5%, ポリペプトン 0.5%を含む培地で 30°C , 8時間振盪培養した対数期の菌体を遠心分離で集め水洗したものを用いて反応基質とした. 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7) に基質酵母を 660nm での吸収が, 吸光度で2.0になるよう懸濁した菌体溶液 2ml に, 適当に希釈した酵素液 2ml を加え, L字型試験管中でモノー式振盪機によりゆるやかに振盪しながら 30°C , 1時間反応させた. 酵素液としては培養液を用いた. 溶液活性は次のように求めた.

$$\text{濁度減少率}^{\text{③}} (\text{T.R.R.}) = (\text{OD}_0 - \text{OD}_t) / \text{OD}_0 \times 100$$

$$\text{溶解活性} = \text{T.R.R.} \times \text{希釈率}$$

OD_0 : 反応混液の 660nm での吸光度

OD_t : 1時間反応後の 660nm での吸光度

酵素液には培養液を $10,000 \times g$, 10分間の遠心分離により除菌したものを用いたが, 溶解活性測定の際 Fig. 1 に示される通り T.R.R. が65以上になると酵素量と比例しなくなるので, 65以下になるよう調整した.

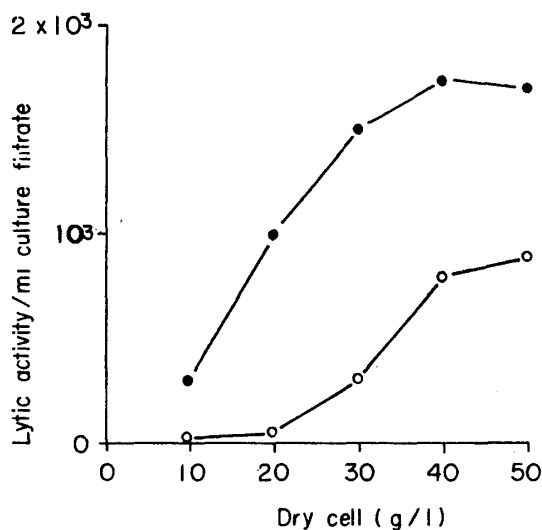


Fig. 2. Effect of yeast concentration on production of the lytic enzyme.

Various amounts of yeast cells were added to the medium containing 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Cultivation was carried out at 30°C with shaking for 24 hrs or 48 hrs, 24 hrs (●), 48 hrs (○).

実験結果および考察

培養条件の検討

1. 基質酵母量の影響: 酵素生産培養を24時間行った場合の最適基質酵母量の検討を行った. Fig. 2 に示す通り 40 g/l が適当であった. なお培養時間を延長して48時間培養したところ溶解活性に減少の傾向が見られた.

2. 窒素源の影響: 培地に酵母菌体が基質として加えられているので窒素量としては十分と考えられるが, さらに無機窒素を添加した場合の効果を調べた. 各化合物中の窒素量がほぼ同一となるよう加えて培養した際の酵素活性および培養終了時の pH を Table 1 に示した. NaNO_3 , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 等は酵素生産を促進したが, その他の化合物は阻害的であり, また培地の pH はいずれも培養開始時よりかなり低下していた. そこで CaCO_3 を 2%加え pH の低下を抑えて培養を行ったところ, Table 1 に見られるように添加化合物の間には差はなく同程度にまで酵素活性は上昇した. このことから NaNO_3 等の添加による効果は窒素源としての効果ではなく培養中の pH の低下を防ぎその経過が酵素生産に適していたためと思われる.

3. 炭素源の影響: これまで知られている溶解酵素は培地に細胞壁成分を加えて培養した場合に誘導的に生産されるという報告が大部分で, Okazaki^③ の Mi-

Table 1. Effect of nitrogen sources on the enzyme production.

Nitrogen sources		No addition		CaCO ₃ addition	
		Final pH	T.R.R./ml culture filtrate	Final pH	T.R.R./ml culture filtrate
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0 g/l	5.3	4	7.5	78
NaNO ₃	6.3	7.7	80	7.8	76
KNO ₃	7.5	7.6	78	7.8	80
NH ₄ Cl	4.0	5.4	4	7.3	78
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5.0	6.6	84	6.8	84
CH ₃ COONH ₄	5.7	5.9	8	6.9	78
None		6.2	65	6.8	64

The CK strain was aerobically cultured for 24 hr at 30°C in the basal medium containing 4% dry yeast, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, and 0.01% CaCl₂ at pH 7. T. R. R. is the lytic activity (see the text).

crotopolyspora sp. が starch を基質として培養した場合でも溶解酵素を著量に生産するという報告は数少ない例の一つである。そこで本菌を細胞壁成分およびその他の炭素源を基質として培養した際の酵素生産に対する影響を調べた。なお yeast glucan, yeast mannan は協会7号酵母から Peat ら⁴⁾の方法により調製し、また前報¹⁾で報告した通り本菌は非抗酸性であるので、培養中に pH が低下するのを防ぐため、CaCO₃を2%加えた。結果を Table 2 に示した。検討した炭素源では laminarin にかんりの効果が見られたが yeast glucan と代替できるものはなかった。また本菌においても溶解酵素は誘導的に生産されると考えられるが、Table 2 の結果から誘導基質としては酵母細胞壁の主要成分の一つである β -1,3-glucan の効果が大きいことがわかった。

4. pH の影響：窒素源の影響を調べた際、培養時の pH が酵素生産に大きな影響を与えることが示唆されたので、ここでその検討を行い Fig. 3 に結果を示した。培養基を各 pH に塩酸または苛性ソーダーで調製した後、autoclave で 120°C, 15分間殺菌した。殺菌後の pH は Fig. 3 のカッコ内に示した数値に変化していた。図に見られる通り検討した pH 域においては 6~10 まで生産される酵素活性は漸増であったが pH 11 で急激に増大した。本菌が十分に生育できる pH 域は前報¹⁾で 5~9 と報告したが、Fig. 3 が示す通り高い活性を示した培地の初発 pH は 9.7 であった。そこで殺菌後に pH を 7 に再調製して培養すれば更に生産の増大が期待されたので検討を行い、その結果を Fig. 4 に示した。pH 10, 11 と高い pH で殺菌した後に pH 7 に再調製した培地は再調製しない場合より生

Table 2. Effect of various carbon sources on the enzyme production.

Substrate	T.R.R./ml culture filtrate
Starch	0
Dextran	0
Dextrin	0
Cellulose	10
Glucosamine	17
Yeast glucan	75
Yeast mannan	30
Laminarin	40
Glucose	20
Mannose	10
Mannitol	15
Galactose	0
Arabinose	0
Raffinose	0
Lactose	0
Maltose	0
Sorbose	0
Saccharose	0
CMC	0
Chitin	0

The medium containing 2% yeast extracts, 0.75% KNO₃, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.01% CaCl₂·2H₂O, and 2% CaCO₃ was supplemented with 0.5% of various carbon sources. T.R.R. is the lytic activity (see the text).

産は約 2 倍に増大した。またここに図示していないが培養中の pH の影響を調べるために小型 jar fermenter (500 ml 容, pH controller 付) を用いて検討した。

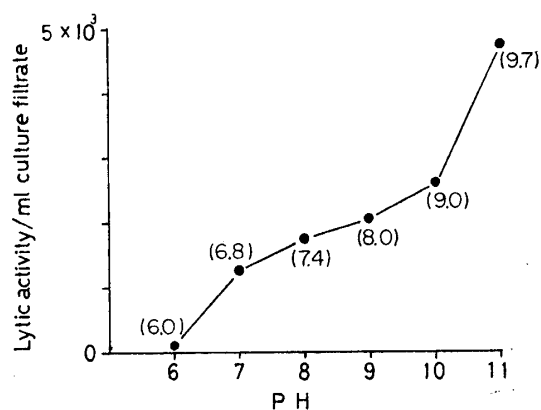


Fig. 3. Effect of initial pH on the enzyme production.

The initial pH of the medium containing 4% dry yeast, 0.75% KNO₃, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, and 0.01% CaCl₂·2H₂O was adjusted variously. Cultivation was continued for 24 hr at 30°C with shaking. Inoculum for 50 ml medium was 0.5 ml of preincubation medium. The figures in parentheses indicate the pH of the medium after sterilization at each pH.

Fig. 3 の実験において, 各 pH で培地を殺菌すると先に示したように pH は低下するが, そのままの pH を維持して培養を続けたところ, pH 10 の殺菌培地 (初始 pH 9) が最高の活性を示した. 小型 jar fermenter による培養と振盪培養とは通気量を同一にしていなかったため直接比較はできないが, この結果と Fig. 4 の結果から考察すると培地を高 pH 領域で殺菌したことが酵素生産を高めた主因と考えられる. さらにその直接的な原因を推察すると, 酵母菌体をアルカリで加熱処理すると中性付近で処理するより菌体成分の抽出・分解が促進されて, 1) CK 株の生育あるいは酵素生産の初期誘導に効果的に作用する分解物が生成された. 2) 細胞壁成分が部分分解されて基質構成成分が変化しその結果誘導される酵素群の比が変わった, 等が溶解活性の上昇をもたらした原因として考えられるが, さらに検討を必要とする. なお Tanaka ら⁵⁾は β -1,3-glucan を主成分とした 3 種の polysaccharide を基質として, *Bacillus circulans* WL 12 を培養すると β -1,3-glucanase 群の生成比は基質によって異なることを報告している.

経時的培養経過 これまでの実験で設定された培地に *Oerskovia* sp. CK 株を振盪培養し, 酵素生産時の菌の生育, pH, 溶解活性等の経時変化について Fig. 5

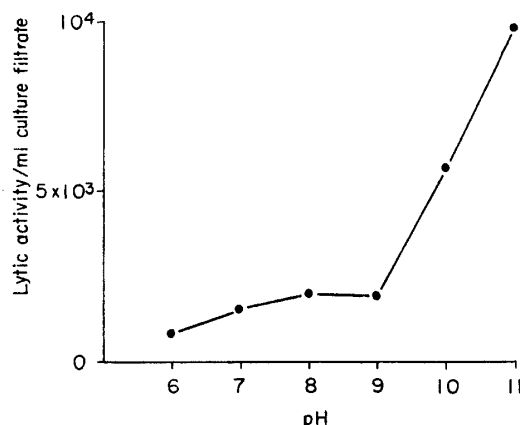


Fig. 4. Effect of sterilization pH of the medium on the enzyme production.

The cultural conditions were the same as shown in Fig. 3, except that the medium was readjusted to pH 7.0, after the medium was sterilized at the pH indicated in the figure.

に結果を示した. 菌の生育は濁度により測定した. 培地中では基質酵母が分解され濁度が減少する一方, 生産菌が増殖して増加する両者の和が測定されるので明確に現われてはいないが, 菌の生育と共に酵素生産は増加している. 培養後20時間で定常期に入り溶解活性も少し遅れて最大となるが以後漸減した. 溶解活性が培養後期に減少する傾向は, Kitamura ら⁶⁾が *Arthrobacter luteus*, Doi ら⁷⁾が *Arthrobacter* sp. の培養中に観察している. しかし図示していないが, 協会7号酵母の glucan を基質とし遊離する直接還元糖量を glu-

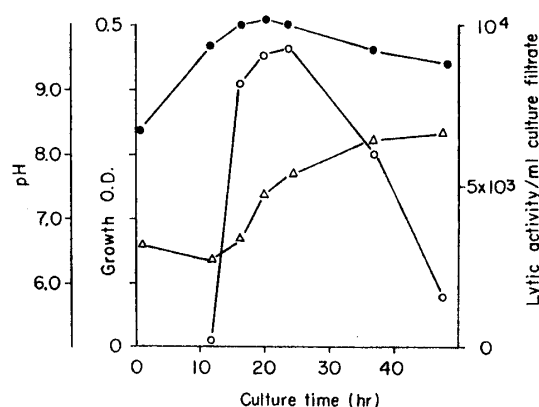


Fig. 5. Time course of the lytic enzyme production by the CK strain.

The cultural conditions were the same as shown in the Fig. 3, except that the medium was readjusted to pH 7, after the medium was sterilized at pH 11. Lytic activity (○), Growth (●), pH (△).

Table 3. Lytic spectra of the crude lytic enzyme preparation.

Strain		Susceptibility (T.R.R.)	
		8 hr cultured cells	30hr cultured cells
<i>Saké yeast</i>	Kyokai 7	82.0	62.0
<i>Saké yeast</i>	Awanashi 7	91.0	62.0
<i>Beer yeast</i>	RIB 6518	72.0	15.0
<i>Beer yeast</i>	RIB 6520	68.0	40.0
<i>Wine yeast</i>	RIB 6604	84.2	10.4
<i>Baker's yeast</i>	RIB 6706	85.1	71.7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IAM 4009	68.5	5.0
<i>S. cerevisiae</i>	IAM 4017	76.5	4.0
<i>S. cerevisiae</i>	L 8256	86.0	25.5
<i>S. cerevisiae</i>	L 17807	84.0	71.5
<i>S. cerevisiae</i>	1450-3B	91.5	70.0
<i>S. lactis</i>	AJ 4069	78.3	72.7
<i>S. rouxii</i>	AJ 5289	80.9	46.1
<i>S. rouxii</i>	AJ 14004	68.0	77.4
<i>S. pastori</i>	IFO 1013	25.0	7.5
<i>S. rosei</i>	IAM 4416	61.5	16.0
<i>S. fermentati</i>	IAM 4394	85.0	13.5
<i>S. fragilis</i>	NCYC 175	7.0	6.5
<i>S. italicus</i>	IFO 0725	92.0	61.0
<i>S. carlsbergensis</i>	AJ 5993	78.3	59.0
<i>S. chevalieri</i>	IAM 4616	84.5	6.0
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	IAM 4879	61.0	6.5
<i>Debaryomyces hansenii</i>	IAM 4356	61.0	60.5
<i>D. subglobus</i>	AJ 5462	20.0	64.6
<i>Schwanniomyces acidentalis</i>	AJ 4288	33.3	23.9
<i>Hansenula anomala</i>	IAM 4213	92.5	53.0
<i>H. capsulata</i>	AJ 5622	22.7	25.6
<i>Pichia kudriavzevii</i>	AJ 4146	78.6	23.5
<i>P. polymorpha</i>	AJ 5535	26.6	0
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	AJ 5323	69.7	33.9
<i>Cryptococcus albidus</i>	AJ 5222	0	0
<i>Torulopsis candida</i>	IFO 0380	66.5	82.0
<i>T. famata</i>	AJ 4342	11.3	13.9
<i>T. colliculosa</i>	IAM 4426	10.0	3.0
<i>Candida pelliculosa</i>	IFO 0963	75.0	56.5
<i>C. pseudotropicalis</i>	IAM 4829	91.5	84.0
<i>C. pulcherrima</i>	IFO 0561	68.5	31.0
<i>C. robusta</i>	IFO 0279	86.0	9.0
<i>C. tropicalis</i>	AJ 4468	77.0	17.5
<i>C. utilis</i>	AJ 5734	78.0	63.0
<i>C. guilliermondii</i>	AJ 4498	7.1	50.0
<i>Rhodotorula glutinus</i>	AJ 5215	0	0
<i>R. rubra</i>	AJ 5318	0	0
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	AJ 5022	7.6	17.5
<i>Kloeckera apiculata</i>	AJ 4798	85.6	40.4
<i>Trigonopsis variabilis</i>	AJ 4876	52.0	15.8

The reaction mixture containing 2 ml of the enzyme and 2 ml of yeast cell suspension (OD=2.0 at 660 nm) was incubated at 30°C for 2 hr. The susceptibility was expressed by T.R.R.

canase 活性とみなして経時的に追跡したところ, 溶解活性と共に増加して最大となるまでは同じ傾向であったがそれ以後漸減しなかった. この両者の活性の差は溶解作用に glucanase 以外の酵素が関与しているため, または Doi ら⁷⁾ が述べているように glucanase 群の比が培養の経過と共に変化するため等と考えられるが今後検討して明らかにしたい. pH は初発の 7 から培養途中一時低下した後, しだいに微アルカリ性へと変化した.

溶菌スペクトラム 種々の酵母に対する溶解酵素の作用を調べ Table 3 に示した. 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7) に 660 nm の吸光度で 2.0 となるよう各酵母を懸濁し, その 2 ml に培養液 2 ml を加え, 30°C, 2 時間反応させてその T.R.R. を測った. 基質酵母は 8 時間振盪培養したものを対数期, 30 時間振盪培養したものを定常期の菌体とした. T.R.R. が 60 以上の酵母はほとんど溶解していた. 本酵素は多種類の酵母に溶解活性を示し, 対数期の菌体はもとより定常期の菌体に対してもかなりの活性を有していた. これまで報告されている通り酵素に対する感受性と酵母の分類に関連性は見られなかった. *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, および *Cryptococcus albidus* には age にかかわらず全く溶解作用を示さなかった. 土屋⁸⁾ の血清学的分類によると *Rhodotorula* と *Cryptococcus* とはそれぞれが他の酵母群と異なった group を形成していると述べており, 本酵素の感受性と血清的分類とに共通性が見られることは興味深い. *Pichia polymorpha* の定常期菌体にも活性を示さなかったが, 対数期の菌体を溶解していることから本菌は培養が進むにつれて細胞表面に変化が起り, 酵素作用を受け難くなったのであろう.

また対数期の菌体の方が定常期の菌体より酵素に対する感受性が高いのが一般的であるが, Table 3 に見られるように *Debaryomyces subglobosus*, *Torulopsis candida*, *Candida guilliermondii* および *Brettanomyces bruxellensis* 等は定常期の菌体の方が感受性が高かった. 現在まで報告されている酵素で定常期の菌体の方を良く溶解するというものは, 岡崎ら⁹⁾ の *Micropolyspora* sp. が生産する酵素しか知られていないが, 本酵素の他の酵母に対する作用からみて, これら 4 種の strain が特殊なためにこのような結果が得られたものと思われる. *Saccharomyces fragilis* は snail enzyme や他の溶解酵素に対して感受性の高い菌株として知られているが, Monreal ら¹⁰⁾ によると *Micromonospora chalybeata* から得た β -1,3-glucanase を作用させると protoplast は生成したが, 細胞壁は残し電子顕微鏡で観察したところ, 局部的に作用を受けているにすぎなかったとの報告もある. 本実験での *S. fragilis* がかなりの抵抗性を示しているのは, Monreal らが用いた strain に近い性質を持った strain であり本酵素の特殊性によるものではないと思われる.

粗酵素の諸性質 本菌の生産する溶解酵素の種々の基質に対する作用, 酵素の最適 pH, pH 安定性, 熱安定性, 金属の影響等について検討した. 酵素には培養液を透析したもの, また硫酸塩析 (0.4 飽和) 後透析したものを用いた.

1. 酵素の種類 酵母菌体の溶解は複数の酵素が関与し, その相互作用により速やかに進行するとの報告^{11,12)}があるので, ここで本酵素に含まれている酵素の種類を調べた. 基質に主として溶解に関連していると考えられる試料を用い, 検討した結果を Table 4 に

Table 4. Hydrolysis of various substrates by the lytic enzyme.

Substrate	Hydrolysis	Estimation
Yeast glucan	+	Fehling solution
Yeast mannan	+	Fehling solution
Laminarin	+	Fehling solution
Pustulan	+	Fehling solution
Colloidal chitin	±	Fehling solution
Soluble starch	+	Fehling solution
Na-CMC	—	Fehling solution
Milk casein	+	Phenol reagent

The reaction mixture containing 2 ml of 0.2% substrate in 0.1 M phosphate buffer at pH 7 and 0.5 ml of the dialyzed lytic enzyme were incubated for 1 hr at 30°C.

示した。本酵素には β -1,3-glucanase, β -1,6-glucanase, protease, mannanase, amylase 活性が認められた。Chitinase 活性は弱く24時間の反応で認められる程度であった。各活性は0.2%の基質を含む2mlの緩衝液(0.1M リン酸緩衝液, pH 7)に酵素液0.5mlを加え30°C, 1時間反応させた後, 多糖類は生成した還元力をFehling 溶液で, また protease 活性は phenol 試薬により判定した。現在まで知られている溶解酵素のうち, protease 活性が溶解作用の主要な役割をはたして

いるという報告^{3,11,13,14}は幾つかあるが, 本酵素において, protease 活性が弱いことを考えると溶解作用の主体は protease ではないと思われる。

2. 最適温度および pH: pH 7 で1時間酵素反応を行った場合の最適温度を求め Fig. 6 に示した。30~40°C が最適であった。次に 30°C, 1時間の反応における夫々の pH での酵素活性を求め Fig. 7 に示した。緩衝液は tartrate, acetate, phosphate, tris-HCl, Na-carbonate の各 0.1 M 溶液を用いた。最適 pH は 6~

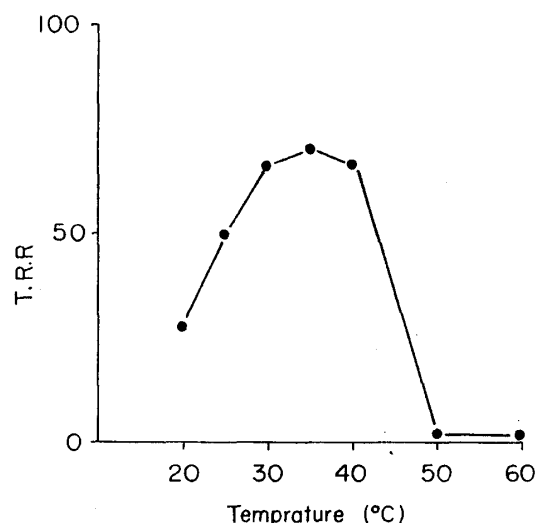


Fig. 6. Effect of temperature on the lytic activity.

Reaction mixtures containing 2 ml of the enzyme and 2 ml of yeast cell suspension (OD=2.0 at 660 nm) were incubated at various temperatures for 1 hr at pH 7.

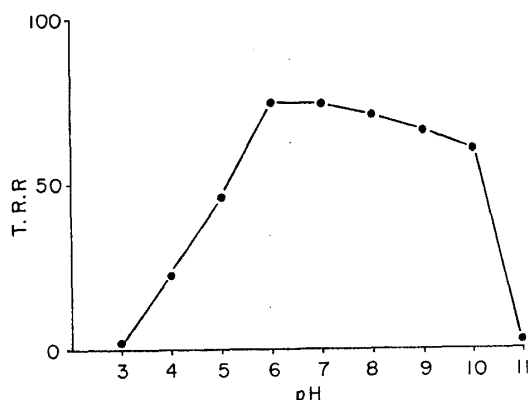


Fig. 7. Effect of pH on the lytic activity.

The reaction mixtures consisted of 2 ml of enzyme solution and 2 ml of cell suspension in buffers of various pH. Buffers used were 0.1 M tartrate (pH 3.0), 0.1 M acetate (pH 4.0-5.0), 0.1 M phosphate (pH 6.0-7.0), 0.1 M tris-HCl (pH 9.0), and 0.1 M Na-carbonate (pH 10.0-11.0).

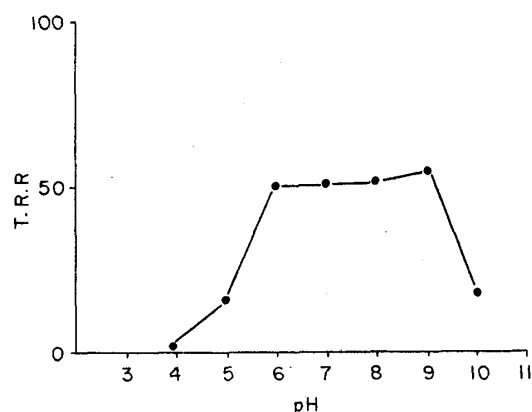


Fig. 8. The pH stability of the lytic enzyme.

Mixtures containing 1 ml of buffer solution of various pH and 1 ml of enzyme were allowed to stand for 72 hrs at 5°C, and the residual activity was assayed. Buffers used were the same as described in Fig. 6, except that buffers were diluted to 0.01 M.

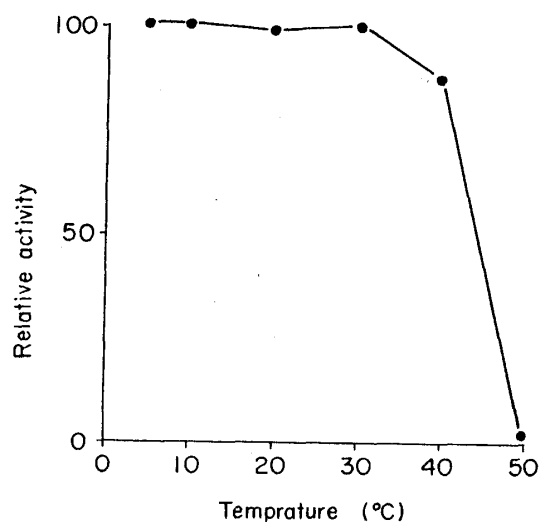


Fig. 9. The thermal stability of the lytic enzyme.

After standing the enzyme solution in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.0 for 15 minutes at various temperatures, the residual activity was assayed.

Table 5. Effect of various metal salts on the activity of the lytic enzyme.

Metal salt	T.R.R.	Relative activity
FeSO ₄ ·7H ₂ O	40	125
MnSO ₄ ·4H ₂ O	26	81
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	32	100
CaCl ₂ ·2H ₂ O	40	125
CuSO ₄ ·5H ₂ O	34	106
Pb(NO ₃) ₂	26	81
Li ₂ SO ₄ ·H ₂ O	34	104
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	26	81
HgCl ₂	0	0
SnCl ₂ ·2H ₂ O	30	93
None	32	100

Concentration of each metal ion in the reaction mixture was 10⁻⁴ M.

9の間に認められた。

3. pH および温度安定性：pH 安定性は酵素を各 pH に調製し 5°C, 72時間放置後その残存活性を pH 7, 30°C で測定し結果を Fig. 8 に示した。pH 6~10 で安定であった。熱安定性は pH 7 で各温度に15分間保った後残存活性を測定した。その結果を Fig. 9 に示した。40°C 15分間の加熱で活性の減少が見られ、50°C, 15分間の処理で活性は失われた。

4. 金属の影響：酵素反応系に 10⁻⁴ M の金属が含まれるよう添加してその影響を調べ Table 5 に示した。HgCl₂ によって完全に阻害された以外には他の金属によりほとんど影響を受けないようである。

要 約

1. *Oerskovia* sp. と同定された CK 株の溶解酵素生産には酵母菌体を必要とし、その最適基質量は、24時間培養の場合、40 g/l であった。添加した無機窒素源では NaNO₃, (NH₄)₂HPO₄, KNO₃ に効果があった。

2. 培地を pH 11 に調製し、120°C, 15分間殺菌した後、pH 7 に再調製して培養することにより酵素生産を高めることができた。

3. 本粗酵素には β-1,3-glucanase, β-1,6-glucanase, mannanase, protease および amylase の諸活性があった。chitinase 活性は微弱であった。

4. 本粗酵素は多種類の酵母生菌体に作用し、対数期および定常期の両期の菌体を共に溶解した。しかし検討した酵母の中で、*Rhodotorula glutinis*, *Rhodotolura rubra*, および *Cryptococcus albidus* には作用しなかった。また *Pichia polymorpha* の定常期菌体にも作用しなかった。

5. 本粗酵素の溶解における最適 pH は 6~9 に認められ、pH 6~10 で安定であった。また 40°C, 15分の処理で活性の低下が見られ、50°C, 15分の加熱で失活した。10⁻⁴ M の HgCl₂ で酵素は完全に阻害を受けた。

文 献

- 1) 幸村, 加納, 山田, 熊谷, 山下, 布川: 醸工, **53**, 249 (1975).
- 2) Mann, J. W., Heintz, C. E., Macmillan, J. D.: *J. Bacteriol.*, **111**, 821 (1972).
- 3) Okazaki, H.: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 405 (1972).
- 4) Edwards, T. E.: *Method in Carbohydrate Chemistry* (Whistler, R. L.) Vol. 5, 178, Academic Press, New York and London (1965).
- 5) Tanaka, H., Kobayashi, Y., Ogasawara, N.: *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 967 (1974).
- 6) Kitamura, K., Kaneko, T., Yamamoto, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **18**, 57 (1972).
- 7) Doi, K., Doi, A., Fukui, T.: *J. Biochem.*, **73**, 667 (1973).
- 8) 土屋: 酵母学(橋谷義孝) 100 岩波書店 (1967).
- 9) 岡崎, 飯塚: 醸工, **50**, 228 (1972).
- 10) Monreal, J., Uruburu, F. D., Villanueva, J. R.: *J. Bacteriol.*, **94**, 241 (1967).
- 11) Sugimoto, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1111 (1967).
- 12) Yamamoto, S., Nagasaki, S.: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 127 (1972).
- 13) Furuya, A., Ikeda, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **6**, 40 (1960).
- 14) 津村, 石川: 醸酵工学大会講演要旨集 p. 119 (1973).

(昭49.12.20受付)