

細菌粗酵素によるノリのプロトプラスト、単離細胞の作出

川村 嘉応*・馬場 裕文

Preparation of Protoplasts, Separate Cells from Porphyra Thallus by The Bacterial Crude Enzyme

Yoshio KAWAMURA*, Hirofumi BABA

Abstract

In order to prepare protoplast from Porphyra thallus, a search was undertaken to find bacteria capable of preparing protoplast.

By screenig, capable bacteria were isolated from cultured Porphyra, identified as *Vibrio sp.* by taxonomic studies. The optimum temperature, Nacl concentration, pH for growth were 27 °C in 7 ~27 °C, 2.0 %, pH 7.5. When the strain were cultured in the presence of crude fiber in the cultural medium, the enzyme activity increased by 15 days within 15 days. The activity of enzyme was the highest at 23 °C, pH 7.0.

When 1 g of the thalli was shaken in enzyme solution for 180 minites at 20 °C, pH 7.0, 1.1×10^5 protoplasts, separate cells were released. And protoplast, separate cell prepared from thalli grew in SWM-III medium and developed into thallus.

まえがき

ノリ葉体のプロトプラストの作出には、M. POLNE-FULLER¹⁾、鬼頭²⁾が市販されている Abarone acetone powder (sigma chemical KK) (以下、AAP と略す)を用い、藤田³⁾、幡手^{4,5)}は、細菌から抽出した粗酵素を使用している。しかし AAP は高価であることが欠点であり、一方、細菌から抽出した粗酵素では酵素活性が低いいためかプロトプラストが大量に得られないことが隘路になっている。ノリ葉体からプロトプラスト、単離細胞を大量に得るには、供試材料の検討とともに効率のよい安価な酵素が必要である。

筆者らは、ノリプロトプラスト、単離細胞**が大量にしかも安価に作出できる粗酵素を細菌か

ら得るため、細菌のスクリーニングを行い、作出が可能な粗酵素を分泌する菌株を得ることができた⁶⁾。

本報では、その細菌を同定し、増殖条件等を試験し、粗酵素の抽出条件、作出時の処理条件、pHの違いによる作出数について検討し、若干の知見を得たので報告する。

*：現佐賀県水産振興課

**：ここでは、プロトプラストに対して細胞壁の除去が完全でない球状の細胞をいう。

材料及び方法

1. 菌株の同定

細菌分離：細菌は佐賀県有明海で養殖し冷凍保存していた養殖ノリ葉体から1986年9月4日に分離し、供試菌株（以下、SADW-694株と略す）とした。

細菌学的性状検査：各性状検査はZoBell 2216E 培地及びそのブイヨン培地を基本とし、25°C、24～48時間培養した新鮮培養菌を用い、断わらない限り既往の方法^{7,8,9)}に準じて行った。試験中の培養温度は20°Cであった。なお、前培養及び各種試験に用いた培地はすべて熟成した海水で調製した。

運動性はSIM 培地、Ball と Sellers の半流動性培地の両培地で判定した。鞭毛染色は戸田の方法で行った。グラム染色性は日水製薬（株）製のステイナー1号で判定した。寒天上の形態はZoBell 2216E 培地上に形成される形態で判定した。

培地の生育に関する検査では、SS 寒天、マッコンキー寒天、クリステンセン・クエン酸塩寒天は栄研化学（株）製、BTB ティポール寒天、DNA 寒天は日水製薬（株）製を用いた。

生化学的性状検査のうち、チトクローム・オキシダーゼ試験、VP 試験、MR 試験、β-ガラクトシターゼ試験 (ONPG)、インドール産生試験はそれぞれ日水製薬（株）製を用いて行った。市販の培地はいずれも食塩濃度が2.0%になるように調整した。O/129感受性試験はノボジオシンを用いた。尿素分解試験はクリステンセン培地、炭水化物の分解試験はMOF 培地のブイヨンを基礎培地として行った。

2. 菌株の増殖条件

試験に用いた培養液は、人工海水を基本溶液として ZoBell 2216E 培地の液体培地とした。増殖は波長600nm における吸光値を経時的に測定し、菌量として表した。吸光値の測定には分光光度計（200-20型、日立KK）を用いた。

実験は、温度条件が水温、11、15、19、23、27°Cの5段階で行った。食塩濃度は0.2、1.0、2.0、3.0、4.0%の5段階として19°Cで行った。pH の試験は、pH5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、9.0の7段階として19°Cで行った。

3. 粗酵素の抽出培養期間

細菌から抽出した粗酵素を用いてプロトプラストを作出するには、一定条件で菌株を培養して粗酵素を抽出し、一定条件でノリ葉体に処理する方法がとられている。この一連の方法を確立するために、SADW-694株から粗酵素を抽出するための培養期間を検討した。

実験は、19°Cの恒温条件下で1日1回培養液を振とうし、2、4、8、15日間静置培養後に細胞壁分解能活性を測定した。

粗酵素の作成：粗酵素の作成に当たっては ZoBell 2216E 培地を基本組成として、乾燥粉末ノリを1%含んだ培地を抽出培養液として用いた。これにあらかじめ ZoBell 2216E 培地組成の液体培地で2日間培養した細菌懸濁液を入れた。培養後、培養液を遠心分離（6000～8000rpm、10°C、30分間）して得た上澄み液を硫酸アンモニウムで飽和して2時間攪拌し、その後5°C条件に一晩静置した。生じた沈澱は、遠心分離（6000～8000rpm、10°C、30分間）によって集め、0.05%トリスアミノメタンでpH7.2に調整したろ過海水80～100mlに溶解し、透析膜に入れ同海水に対して透析した。透析後、真空凍結乾燥機を用いて乾燥粉末とし、これを粗酵素とした。

細胞壁分解能活性の測定方法：反応液は0.1M MES 2.0ml、人工海水*1.5ml、粗繊維 80mg、粗酵素 20mgを混合しpH7.0に調整した。粗繊維の調整は、IRIKIら¹⁰⁾の方法によった。反応は各実験条件で6時間行い、沸騰水中で3分間加熱することによって停止した。これを遠心分離（3000rpm、10°C、5分間）し上澄液を反応試料液とし

*：20.1mM NaCl、10.9mM CaCl₂・2H₂O、24.3mM MgSO₄・7H₂O、29.5mM MgCl₂・6H₂O、462mM NaCl、蒸留水

た。細胞壁分解能はこの反応試料液の還元糖の生成量を Somogi-Nelson 法¹³⁾で測定し表示した。酵素の1単位は、グルコースに相当する還元糖の1 μg を産生した酵素の量として定義した。

4. 粗酵素の処理温度及び pH

細胞壁分解能が強い粗酵素を抽出するために温度条件を変えて培養して粗酵素を抽出し、酵素活性を処理温度毎に調べ、ノリ葉体を酵素処理するときの至適温度を検討した。また同じように pH についても検討した。

酵素処理温度については、粗酵素の抽出を pH7.5、水温11、15、19、23°Cの4段階で4日間静置培養して行い、濃度2.0%で pH7.5に調整して、水温が11、15、19、23°Cの条件で検討した。

酵素処理 pH については、粗酵素の抽出を pH7.5、水温20(±1)°Cで7日間静置培養して行い、濃度2.0%で pH7.0に調整して、水温が11、15、19、23°Cの条件で検討した。

粗酵素の作成及び細胞壁分解能活性の測定：前

述の方法に準じた。

5. プロトプラスト、単離細胞の作出

材料：作出試験に用いた葉体は、室内で殻胞子から採取した3~5 cmのナラワスサビノリ *Porphyra yezoensis* (佐賀5号)で、水温19°C、塩分濃度28.5‰、白色蛍光灯で照度3000~4000Lux、光周期11時間明期・13時間暗期の一定条件下で枝付きフラスコで通気培養した。培養液は SWM-III ** を用いた。

プロトプラストの作出方法と計数：作出方法は、まず葉体を5~10mm²に切断した。次に10%パパイーン、0.5%デキストラン硫酸カリ、pH6.0の前処理液に、10mlあたり湿重量0.5gの割合でノリ葉体を入れ、20°Cで30分間ゆっくり振とうした。これを海水でよく洗浄し、粗酵素を2.0%、pH5.0、5.5、6.0、6.5、7.0に調整した酵素液に入れ、20°Cで3時間振とう培養を行う。これをトーマ血球計算盤を用いて計数し、ノリ湿重1g当たりの作出数に換算した。

結

1. 菌株の同定

分離した菌株の分類学的位置を決定するために形態学的、生理・生化学的性状を検査し、その主要な性状を表1~5に示した。SADW-694株は大きさ0.5~2.0×0.5~0.7 μm の桿菌で、運動性はなく、グラム染色性は陰性、糖を発酵し、オキシダーゼ試験は陽性、ガスを発生しなかった。しか

表1 形態学的性状

性状	SADW-694株
菌の形態	桿菌
大きさ (μm)	0.5~2.0 ×0.5~0.7
運動性	—
鞭毛	—
グラム染色	—
寒天上の形態	分解、粘性
Swarming	—

果

も O/129感受性試験では陽性を示した。以上の結果を清水の同定式⁴⁾によって同定すると SADW-694株は *Vibrio sp.* と思われた。

2. 菌株の増殖条件

SADW-694株の培養温度と吸光度の関係は図1に示した。SADW-694株の増殖は7~27°Cの範囲において7°Cでは殆どなかったが、温度の上昇に比例して大きくなった。

表2 培養上の性質

性状	SADW-694株
SS寒天	—
マッコンキー寒天	+
BTB ティボール寒天	+
DNA寒天	—
サイトファガ寒天	—
サイトファガ寒天 (海水)	—
クリステンセンクエン酸寒天	+

** : SWM-III組成からS-3 ビタミン類、土壌抽出液、トリス、肝臓抽出液を除いた。

表3 生化学的性状

性状	SADW-694株
カタラーゼ試験	+
チトクロームーオキシターゼ試験	+
硝酸塩還元試験	+
O-F試験	+
VP試験	-
MR試験	-
β-ガラクトシターゼ試験	+
エスクリン分解試験	+
グルコン酸酸化試験	-
デンプン加水分解試験	++
リトマスミルク試験	+
H ₂ S産生試験 (SIM)	-
O/129感受性試験	+
インドール産生試験	-
アンモニア産生試験	-
カゼインのペプトン化試験	-
アルギニン加水分解試験	-
ゼラチン液化試験	-
尿素分解試験	+
フェニルアラニンデアミナーゼ試験	-
メチレンブルー還元試験	-
TTC還元試験	-
トリアセチン消化試験	-
DNA分解試験	-
色素産生:	白
チロシン分解試験	-
ガス産生試験	-
ガス産生 (D-グルコースから)	-

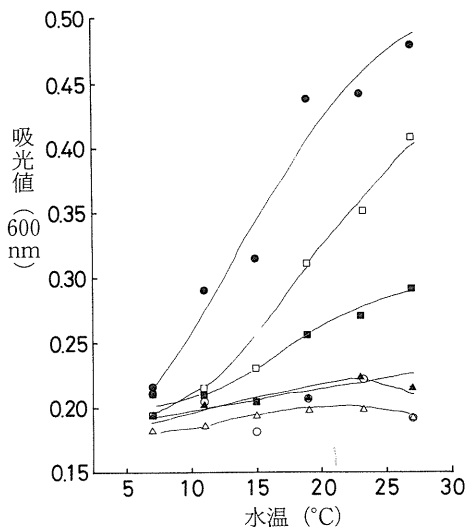


図1 SADW-694株の増殖に及ぼす水温の影響

△: 6時間後、○: 12時間後、▲: 24時間後、
■: 48時間後、□: 72時間後、●: 120時間後

表4 炭水化物分解検査

性状	SADW-694株
L-ラムノース	+
D(+)-キシロース	+
デキシトロース	+
D-フラクトース (果糖)	+
ガラクトース	+
D-マンノース	+
ラクトース モノ (乳糖)	+
マルトース (麦芽糖)	+
ラフィノース	+
デキストリン	+
デンプン	+
イヌリン	+
D-ソルビトール	+
D-ズルシトール	-
D-マニトール	+
イノシトール	-
サッカロース	+
Lナフトール	-
グルコース	+

表5 有機酸利用検査

性状	SADW-694株
ラクテイト	-
安息香酸	-

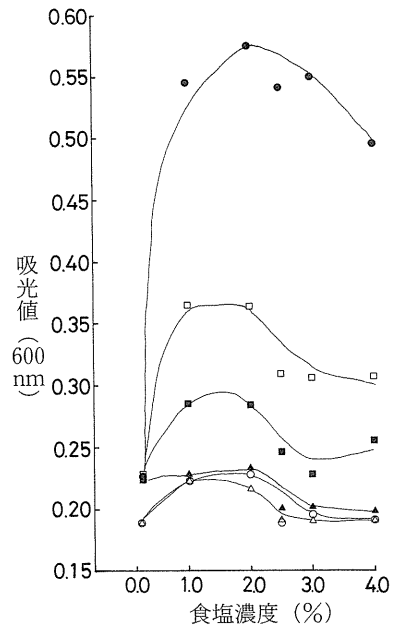


図2 SADW-694株の増殖に及ぼす食塩濃度の影響

△: 6時間後、○: 12時間後、▲: 24時間後、
■: 48時間後、□: 72時間後、●: 120時間後

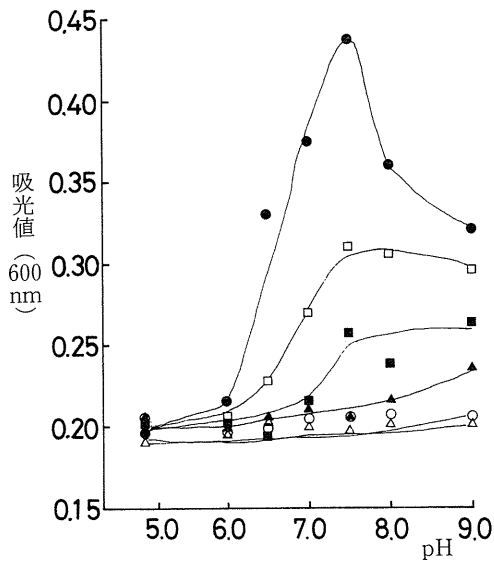


図3 SADW-694株の増殖に及ぼすpHの影響
 △：6時間後、○：12時間後、▲：24時間後、
 ■：48時間後、□：72時間後、●：120時間後

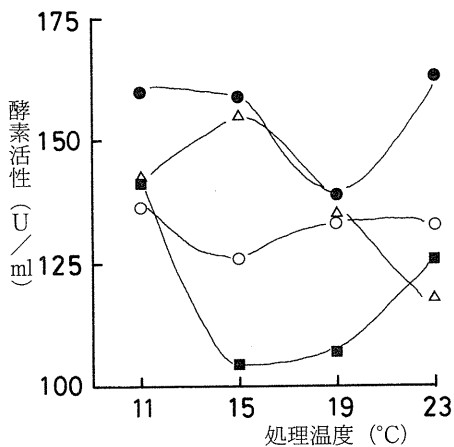


図5 温度別における細胞壁分解活性
 ●：11°C、■：15°C、△：19°C、○：23°C

SADW-694株の食塩濃度と吸光度の関係は図2に示した。食塩濃度0.2%ではわずかに増殖したにとどまったが、1.0~3.0%の範囲で高い傾向にあり、2.0%で最大値を示した。

SADW-694株のpHと吸光度の関係は図3に示した。これから菌の増殖は、pH5.0~9.0の範囲では、5.0、6.0において殆どみられなかったが、

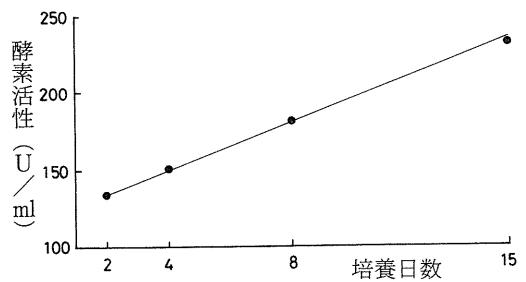


図4 培養期間別の細胞壁分解活性

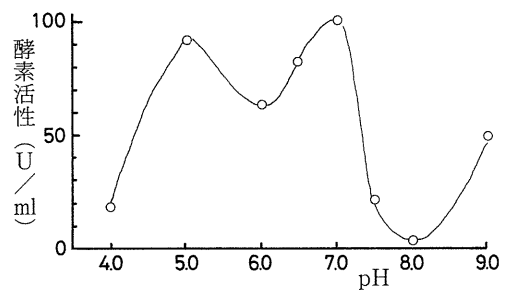


図6 pH別の細胞壁分解活性

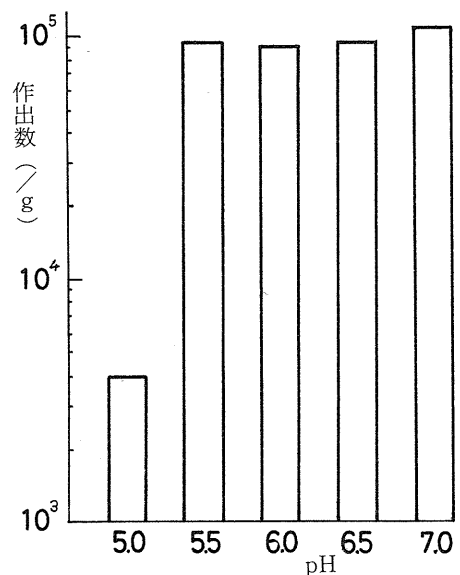


図7 pH別のプロトプラスト、単離細胞の作出数

6.5~9.0で可能で、7.5で最も大きかった。

SADW-694の至適増殖条件については、水温は7~27°Cの範囲では27°C、食塩濃度は2.0%、pHは7.5が良いと思われた。

3. 粗酵素の抽出培養期間

培養期間毎における細胞壁分解能活性は図4に示した。2日間培養後には約130U/mlを示し、4、8、15日と培養期間が長くなるにしたがい活性は高くなり、15日後には約220U/mlを示した。これらの結果から、より活性の高い酵素を得るには、15日の培養期間内では抽出培養期間を長くする方が良い結果が得られると思われた。

4. 粗酵素の抽出温度及びpH

細菌を培養し抽出した時の温度毎に酵素を処理する時の温度を変えて酵素活性を測定した結果は

図5に示した。抽出温度11°Cで得られた粗酵素が、いずれの処理温度でも活性は高く、その中でも処理を23°Cで行うと良い結果が得られることが明らかとなった。ついで酵素活性が高い値を示したのは抽出を19°Cで行い、15°Cで処理した時であった。

酵素のpHを変えて酵素活性を測定した結果を図6に示した。pH5.0、7.0にピークがあり、7.0で最大値101U/mlを示した。

5. 細菌粗酵素によるプロトプラストの作出

SADW-694株から抽出した粗酵素を用いた時の作出数に及ぼすpHの影響は図7に示した。pH5.0~7.0で約 10^5 /gのプロトプラスト、単離細胞が作出され、pH7.0で最大値 1.1×10^5 /gを示した。なお作出されたプロトプラスト、単離細胞は、SWM-IIIの培養液中で生長した。

考 察

プロトプラストの作出が可能な酵素が得られる細菌として、今までに *Pseudomonas* sp.⁵⁾、*Aeromonas* sp.^{6,7)}などがあげられている。今回、得られた菌株は *Vibrio* sp. と考えられ、従来から使用されてきた細菌とは異なっており、今後も細菌からより活性の高い酵素の探索は可能であると思われる。ノリ葉体の細胞壁はβ-1, 4-マンナン、β-1, 3-キシラン、ポルフィランなどから構成されているため¹²⁾、幡手ら⁹⁾はプロトプラストの作出に必要な酵素の種類としてマンナーゼ、キシラナーゼ、ポルフィラナーゼの全てが不可欠であるとしている。筆者らは、SADW-694株から抽出した粗酵素を用いて、これらの酵素に関する詳細な検討は実施していない。しかし今回得られた粗酵素でプロトプラストが作出できたことからいずれの酵素も持っていると考えられる。

菌株の増殖に適する条件と酵素活性を高めるための菌株の培養条件については、HAYASHIら¹³⁾

察

も異なることを報告し、今回、SADW-694株を用いた実験でも同様のことが認められたことから、酵素活性を増強させる手法の開発が必要である。

SADW-694株から抽出した粗酵素を1gの葉体に処理した場合には 10^5 /gのプロトプラスト、単離細胞が得られたが、この作出数はAAPを用いて作出した時の数に比べると少ないようである⁶⁾。今後、粗酵素の精製方法、使用量などの検討を行うとともに、新たな細菌由来の酵素の探索も必要である。

ノリ葉体からプロトプラスト、単離細胞を作出する酵素などは、ノリの細胞学・育種学・病理学研究の一助にもなり得る。さらにノリを破壊する酵素などは、余剰ノリを家畜の飼料として軟化加工して活用するなど他産業への応用にもつながると思われ、今後とも酵素の探索や酵素に関した研究を進めて行く必要がある。

要 約

1. プロトプラスト、単離細胞の作出が可能な粗

酵素を分泌する SADW-694株は、*Vibrio* sp. で

あった。

2. SADW-694株から得た粗酵素の酵素活性は、粗酵素の抽出を11°Cで15日間行い、処理を23°Cで行うと良い結果が得られた。

謝

最後に、本研究を行うに当たり懇切なご指導とご助言を頂いた西海区水産研究所 鬼頭鈞室長、

3. SADW-694株から抽出した粗酵素をノリ葉体に処理すると、1gあたり 1.1×10^5 のプロトプラスト、単離細胞が作出でき、培養液中で生長した。

辞

また細菌や酵素に関するご助言を頂いた高知大学農学部 楠田理一教授に深く感謝致します。

文

- 1) M. POLNE-FULLER and A. GIBOR 1984: Developmental studies in *Porphyra*. I. Blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion, and protoplast regeneration. *J. Phycol.*, 609-616.
- 2) 鬼頭鈞 1985: ノリのプロトプラストの作出と個体の再生. *研究ジャーナル*, 8(9), 20-24.
- 3) 藤田雄二・右田清治 1985: 数種海藻からのプロトプラストの分離と培養. *長崎大学水産学部研究報告*, 57, 39-45.
- 4) 幡手英雄・青木恭彦・荒木利芳・北御門学 1986: 細菌起源のスサビノリ細胞壁溶解酵素の調整. *日水誌*, 52(3), 545-548.
- 5) 荒木利芳・青木恭彦・北御門学 1987: スサビノリ野生株とアサクサノリ緑色変異株からのプロトプラストの作出と再生. *日水誌*, 53(9), 1623-1627.
- 6) 佐賀県有明水産試験場 1987: ノリのプロトプラスト、単離細胞及び組織片の培養による優良株ク

献

- ローン種苗化技術開発研究. 地域バイオテクノロジー研究開発促進事業報告書, 1-18.
- 7) 坂崎利一 1982: 新細菌培地学講座 上, 下. 近代出版, 東京.
- 8) 医科学研究所学友会編 1985: 細菌学実習提要. 丸善, 東京.
- 9) 門田元・多賀信夫編 1985: 海洋微生物研究法. 学会出版センター, 東京.
- 10) Y. IRIKI, T. SUZUKI, K. NISHIZAWA and T. MIWA 1960: Xylan of siphonaceous green algae. *Nature*, 187, 82-83.
- 11) 福井作蔵 1982: 還元糖の定量. 生物化学実験法, 学会出版センター, 東京, 8-14.
- 12) 入来義彦 1965: 藻類のキシランとマンナン. *タンパク質核酸酵素*, 14(2), 147-153.
- 13) S. HAYASHI, T. SAKATA, Z. OOSHIRO and H. KITO 1984: Enzymes digesting the crude fiber isorated from cultured *Nori* (*Porphyra* sp.). *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 33(1), 107-133.