假性酸化細菌に就て(第5報) 各種酸化細菌のグルコース及びグルコン酸酸化酵素に就て

池 田 庸 之 助 (東京大學農學部農藝化學科)

昭和 25 年 3 月 1 日 受 理

Studies on the Pseudooxidative Bacteria. Part 5.

Glucose and Gluconic Acid Oxidase of Various Oxidative Bacteria

By Yonosuke IKEDA (Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo)

酸化細菌によるグルコースの酸化生産物としては次のものが知られている。

この中 *L*-グルキユロン酸⁽¹⁾ 及び アルデヒドグルコン酸⁽²⁾ の存在に就ては異議⁽³⁾ もあるので、こゝではグルコースからグルコン酸、2-ケトグルコン酸、5-ケトグルコン酸等を生産する代表的菌株を選び、その酸化酵素能を比較すると共に著者が第1報以來研究してきた *Pseudomonas* 菌や *Serratia* 菌の酸化酵素の特異性を検討した

實 験 の 部

(1) 使用菌株

(イ) グルコースをグルコン酸に酸化するが、グルコン酸を更に酸化する能力のないもの……
……*Ps. gluconicum*

(ロ) グルコースをグルコン酸に酸化するが、グルコン酸を集積せず直ちに 2-ケトグルコン酸に酸化するもの………*G. Ps. fluorescens* lig., *S. marcescens*.

(ハ) グルコースをグルコン酸に酸化し、之を更

に 5-ケトグルコン酸に酸化するもの………*Acetobacter suboxydans*.

(2) 眞正酸化酵素能の測定 ツンベルヒ管を用い菌體酸化酵素による色素の還元時間を測り、ツンベルヒ⁽⁴⁾に倣い次の式により酵素の活性度 (*I*) を算出した。

$$I = 100 \left(\frac{1}{A} - \frac{1}{B} \right) \quad \begin{array}{l} A \text{ は還元に必要な時間} \\ B \text{ は上の対照値} \end{array}$$

併し乍らこの *I* は實際に酸化酵素に與つた酵素の酵素能 (*I_G*) のみならず、呼吸其他による酸化酵素能 (*I_A*) も含む。我々が酸化細菌の酸化酵素能を比較する場合必要なのは *I_G* であるから *I_G* は

$$I_G = I - I_A$$

として求められねばならない。併し *I_A* を求めることは困難であるから、細菌を酸化能を示さない様な状態で培養し、その場合の *I* を以て *I_A* とした。即ち *Ps. gluconicum*, *Ps. fluorescens*, *S. marcescens* 等ではブイヨン寒天上で、*A. suboxydans* は酸化能を失つた型⁽⁵⁾のものを白堊麴寒天上で培養し、その *I* を以て *I_A* とした。

(3) 菌體の調製 酵素液の代りに菌體懸濁液を使用した。炭酸石灰を加えた麴寒天上で 32° (*Ps. gluconicum*, *Ps. fluorescens* lig., *S. marcescens*), 28° (*A. suboxydans*) で培養した。但し *I_A* を求める實驗ではブイヨン寒天を用いた。培養日数は別記の如くで、へらでかきとり生理的食鹽水に懸濁し遠心分離する。こ

れを3回繰返して後 25° の振盪機上で1時間振り冷蔵庫に貯えた。使用は 12~48 時間で、この間に酵素能の大きな變化はなかつた。

(4) 色 素 1/500 モルの 2,6-dichlorphenol indophenol 及び 1/5000 モルの methylen blau を使用した。

(5) 基 質 1/5 モルのグルコース及びグルコン酸石灰を使用した。グルコースは參松製注射用、グルコン酸石灰は電解酸化法による純品を用いた。

(6) 緩衝液 2/15 モルの磷酸緩衝液を用いた。

(7) 作用條件 ツンベルヒ管の主室に 菌體 0.5 cc と緩衝液 0.5 cc を、副室に基質 0.5 cc と色素 1 cc を容れ、30° の恒温槽中で兩者合してから 3/4 量脱色されるまでの時間を測つた。3/4 脱色を終末點にとつたのはこゝまでが脱色度が時間に比例するからである。

(8) 實驗結果

Table 1. I_A of Some Oxidative Bacteria

			<i>Ps. gluconicum</i> *		<i>Ps. fluorescens</i> *		<i>S. marcescens</i> *		<i>A. suboxydans</i> **	
		Dry cells mg/cc	4.6		5.5		6.8		10.7	
		pH	5.5	7.2	5.5	7.2	5.5	7.2	5.5	7.2
Indophenol	Time to reduce	Glucose	3' 15"	3' 45"	5' 30"	8'	6'	6'	4' 15"	10'
		Gluconic acid	7'	7'	3'	8' 30"	4' 45"	5' 30"	33'	44'
		Control	5'	6' 30"	18'	46'	33'	25'	>100	>100
	Activity coeff.	Glucose	17	13*	7	12	14	13	24	10
Gluconic acid		0	0	22	10	18	14	3	2	

* Incubated on bouillon agar for 3 days

** None oxidative type. Incubated on Koji-agar (CaCO₃ added) for 7 days.

Table 2. I of *Ps. gluconicum*

[Incubated on Koji-agar (CaCO₃ added) for 7 days. Dry cell 9.5 mg/cc]

		pH	3.8	4.7	5.5	6.1	6.7	7.2	7.7	8.3
Indophenol	Time to reduce	Glucose		1' 30"	1' 30"	1' 30"	3'	4' 30"	6' 30"	6'
		Gluconic acid		6'	9'	15'	17'	24'	21'	27'
		Control		5'	9'	19'	22'	36'	38'	30'
	Activity coeff.	Glucose		47	56	60	29	19	13	14
		Gluconic acid		0	0	5	1	2	2	1
M. b.	Time to reduce	Glucose			50'			45'		
		Gluconic acid			>100'			>100'		
		Control			>100'			>100'		

Table 3. I of *Ps. fluorescens* liq.

[Incubated on Koji-agar (CaCO₃ added) for 7 days. Dry cell 9.0 mg/cc]

		pH	3.8	4.7	5.5	6.1	6.7	7.2	7.7	8.3
Indophenol	Time to reduce	Glucose	(6')	4' 15"	3' 45"	4' 45"	6' 30"	12'	18'	20'
		Gluconic acid	(0' 30")	10' 30"	0' 45"	1' 15"	2'	4' 30"	8'	12'
		Control	(11')	13' 30"	16' 30"	24' 30"	33' 30"	40'	42'	41'

Indophenol	Activity coeff.	Glucose	(7)	16	21	17	13	6	3	3
		Gluconic acid	(191)	128	128	76	47	21	10	6
M. b.	Time to reduce	Glucose			>100'			55'		
		Gluconic acid			16'			12'		
		Control			>100'			>100'		

Table 4. *I* of *S. marcescens*[Incubated on Koji-agar (CaCO₃ added) for 7 days. Dry cell 8.2 mg/cc]

		pH	3.8	4.7	5.5	6.1	6.7	7.2	7.7	8.3
Indophenol	Time to reduce	Glucose		5' 30''	12'	10'	9' 30''	13'	10'	14'
		Gluconic acid		3'	11'	6' 30''	12'	12'	14'	17'
		Control		14'	49'	57'	43'	56'	49'	50'
	Activity coeff.	Glucose		11	6	8	8	6	8	6
M. b.		Gluconic acid		26	7	14	6	6	5	4
	Time to reduce	Glucose			62'			25'		
		Gluconic acid			29'			33'		
		Control			>100'			>100'		

Table 5. *I* of *A. suboxydans*[Incubated on Koji-agar (CaCO₃ added) for 5 days. Dry cell 11.0 mg/cc]

		pH	3.8	4.7	5.5	6.1	6.7	7.2	7.8	8.3
Indophenol	Time to reduce	Glucose		0' 30''	45''	1' 30''	1' 45''	3' 30''	7'	19'
		Gluconic acid		3' 30''	3' 30''	3' 15''	23'	58'	>100'	>100'
		Control		>100	>100	>100	>100	>100	>100'	>100'
	Activity coeff.	Glucose		187	133	67	57	32	14	5
M. b.		Gluconic acid		29	29	31	4	1	0	0
	Time to reduce	Glucose			>100			>100		
		Gluconic acid			>100			>100		
		Control			>100			>100		

よつて pH=5.5 における各酸化細菌の真正酸化酵素能 I_G は前式により第6表の如くなる。Table 6. I_G of Some Oxidative Bacteria at pH 5.5

	Glucose oxidase			Gluconic acid oxidase		
	<i>I</i>	<i>I_A</i>	<i>I_G</i>	<i>I</i>	<i>I_A</i>	<i>I_G</i>
<i>A. suboxydans</i>	133	24	109	29	3	26
" " *	375	24	351	126	3	123
<i>Ps. gluconicum</i>	56	17	39	0	0	0
<i>Ps. fluorescens</i>	21	7	14	128	22	106
<i>S. marcescens</i>	6	4	- 8	7	18	-11

* Incubated on Koji agar (CaCO₃ added) for 9 days. Ca-5-ketogluconate crystallized.

考 察

以上の結果を先ず各菌についてみるに

(1) *A. suboxydans* は培養の前期、即ち 5-ケトグルコン酸石灰が析出してこない前の菌體はグルコン酸酸化酵素能が弱い。これは *A. suboxydans* のグルコン酸酸化酵素はグルコースが完全にグルコン酸に酸化されてのち活性化されるとゆう KLUYVER⁽⁵⁾, BATLIN⁽⁶⁾, STUBBS⁽⁷⁾等の説と一致する。

(2) *Ps. gluconicum* ではグルコース酸化酵素の存在はみられるがグルコン酸酸化酵素能を缺く。これが特長的であるが、しかしグルコース酸化酵素といえども他の醋酸菌、グルコン酸菌に比しその order は一段と低い。

(3) *Ps. fluorescens* ではグルコース酸化酵素よりもグルコン酸酸化酵素能の方が強い。このためグルコースは一度グルコン酸に酸化されても集積せずに 2-ケトグルコン酸に酸化されると思われる。又この菌のグルコン酸酸化酵素能が *A. suboxydans* のグルコン酸酸化酵素と同じ order を持っていることは注目すべきである。

(4) *S. marcescens* のグルコース及びグルコン酸酸化酵素の I_G がマイナスなのは、この菌の酸化酵素が白堊麹寒天とか、ブイヨン寒天上とかの培養では活性化されないためではないだろうか。前報で述べた如くこの菌は好氣的条件下に於て 2-ケトグルコン酸を嫌氣的条件下に於てアセトインをつくるという二様の代謝形式をとる。

(5) 以上の種の菌を比較するに *A. suboxydans* と後3者とでは菌學的に又生理的に大きく分けられること前報⁽⁸⁾の如くであるが、又酸化的性質に於てもグルコン酸菌のそれに比し一段低い order にある如く思われる。即ち *Ps* 菌や *Serratia* 菌の酸化能は醋酸菌、グルコン酸菌のそれと比肩し、分類の標準となることは困難であり、もし特に酸化能の面から求めるとしたら *Ps. fluorescens* のグルコン酸酸化酵素にこそ求めらるべきと考える。

(6) 最後に *Ps.* 菌の酸化酵素はメチレンブラウ還元が困難な點よりして一般の醋酸菌、グルコン酸菌より高い酸化還元電位を必要とする如く觀察されたが、これらが色素生産性と如何なる關係にあるかは明らかでない。

(1) 高橋、朝井：農化誌，7，1 (1931)

(2) BERNHAUER und IRRGANG: *Biochem. Z.*, 280, 360 (1935)

(3) 近藤、成田：藥學誌，63, 289 (1943)

(4) ZUNBERG: *Die Methodik der Fermente* IV, 1128 (1938)

(5) KLUYVER and BAEZEADT: *Rec. trav. Chem.*, 57, 609 (1938)

(6) BUTLIN: *Biochem. J.*, 30, 1870 (1936); 32, 508 (1938)

(7) STUBBS, LOCKWOOD, ROE, TABENKIN and WOOD: *Ind. Eng. Chem.*, 31, 1318 (1940)

(8) 池田：農化誌

Summary

Glucose and gluconic acid oxidases of three types of oxidative bacteria were studied by Zunberg method.

(1) *A. suboxydans*, which oxidizes glucose to gluconic acid and gluconic acid to 5-ketogluconic acid, has powerfull glucose oxidase, and the gluconic acid oxidase appears later.

(2) *Ps. gluconicum*, which oxidizes glucose to gluconic acid, has glucose oxidase but not so active as *A. suboxydans*. The gluconic acid oxidase is absent.

(3) *Ps. fluorescens*, which oxidizes glucoses to gluconic acid and gluconic acid to 2-ketogluconic acid, has powerfull gluconic acid oxidase, but the glucose oxidase is very poor.

(4) Glucose and gluconic acid oxidase of *S. marcescens*, which oxidizes glucose to 2-ketogluconic acid by submerged culture, are not detectable. Author thinks that oxidases of this bacteria are not so constitutive as others.