- (8) R. T. DIMLER, W. C. SCHAFFER, C. S. WISE, C. E. RIST *Anal. Chem.*, 24, 1411 (1952).
- (9) T. J. OTTERBACH *Org. Syn.*, 1st ed., 382 (1934).
- (10) D. D. REYNOLDS, W. L. EVANS : *J. Am. Chem. Soc.*, 60, 2559 (1938).
- (11) K. FREUDERG, A. NOE, E. KNOFF : *Ber.*, 60, 238 (1927).
- (12) M. GOMBERG : *Ber.*, 33, 3144 (1900).
- (13) B. HELFERICH, H. COLLATZ *Ber.*, 61, 1640 (1928).
- (14) B. HELFERICH, W. KLEIN : *Ann.*, 450, 219 (1926).
- (15) K. H. MEYER *Org. Syn.*, 1st ed., 382 (1934).
- (註) 本文内容は昭和 30 年 5 月 22 日付で Jeffies. WYMAN (Biol. Lab. Harvard University U. S. A.) に私信した。
- 訂正 : 前報の Summary の最後の行の the next は the following に訂正します

微生物によるアルギン酸の分解 (第 1 報)*

Aerobacter aerogenes 型 Y-11 菌によるアルギン酸分解と アルギナーゼの適応的生成

井上勝弘, 安藤芳明 (北海道立衛生研究所)

I. 緒 言

アルギン酸は褐藻類のセルロース膜間を占める膠状物質にして、細胞膜中に塩の形にて存しており、その化学構造は *d*-マンヌロン酸が β -1,4 結合せるポリウロナイドと考えられている。

さきに大島⁽¹⁾はアワビ、ウニ等の海産物の内臓にアルギン酸を著しく分解する酵素の存在することを発見し、之をアルギナーゼと命名した。アルギナーゼは褐藻類を食物とする海産軟体動物の内臓に共通に見出されている⁽²⁾。遠藤⁽³⁾は多数の腐敗細菌についてそのアルギン酸分解能の有無を調べ、*Micro. citreus*, *Micro. ochraceus*, *Esch. coli communior*, その他、数種の細菌にアルギン酸の分解能を認めたと報告している。WAKSMAN, CAREY, ALLEN⁽⁴⁾は海水及び土壌よりアルギン酸を分解する数種の細菌を分離し、WAKSMAN, ALLEN⁽⁵⁾は細菌の粗酵素製品を用いて、その酵素作用を検し、該酵素がアルギン酸を分解して小分子のウロナイドにするが、単一のウロン酸にはしないと述べた。最近 KOOIMAN⁽⁶⁾は、土壌から分離した細菌の粗酵素製品を用いて、アルギン酸をマンヌロン酸にまで分解すること、中間物として oligomannuronides をペーパークロマトグラフィによつて証明したと報告している。

著者等は人体腸内よりアルギン酸を分解する *Aerobacter aerogenes* 型細菌を分離し、これらの細菌のアルギン酸代謝様式について若干の知見を得たのでここに報告する。

II. 実 験 の 部

(1) 各種腸内細菌及び腐敗細菌によるアルギン酸分解能の検索 : 遠藤⁽³⁾によれば一般の腐敗細菌の中には程度の差こそあれ、アルギン酸分解能を有する細菌が多く存在すると報告している。著者等は当研究所、北大農学部応用菌学科、国立栄研に保存された菌株を用いて、そのアルギン酸分解能の有無を検した。

分解能の有無の判定は A 培地((NH₄)₂HPO₄ 5 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7 H₂O 0.5 g, NaCl 1 g, FeSO₄·7 H₂O 0.02 g, Na-アルギネート 10 g, H₂O 1000 cc : pH 7.2) に 0.5% の割合にペプトンを加え、37° で 20 日間培養し、粘度の低下及び還元力の出現を観察した。第 1 表に示す如く、15 菌株中アルギン酸分解能を認めたものは国立栄養研究所より恵与された *Aerobacter cloacae* 型のみであつた。

(2) アルギン酸分解細菌の分離 : 数人の健康成人の 10⁻¹ 倍稀釈便液の 1 cc をアルギン酸を唯一の炭素源とする A 培地に加え、37° で数日間培養し、この中、粘度の低下せる培地から数白金耳を新たな A 培地に移植し、以後同様な方法で数回撰択培養を繰返した後、著しく粘度を低下し、且つフェーリング液を還元するように

* Decomposition of Alginic Acid by Microorganisms. Part I. Decomposition of Alginic Acid by *Aerobacter aerogenes* Type Y-11 Strain and Adaptive Formation of Alginase.
By Katsuhiro INOUE and Yoshiaki ANDO (Institute of Public Health, Hokkaido)

第 1 表 各種細菌株のアルギン酸の水解

使用菌株	アルギン酸の水解	使用菌株	アルギン酸の水解
<i>Esch. coli communior</i> (北衛研)	—	<i>B. mesentericus</i> (北衛研)	—
<i>Esch. coli</i> 1 (北衛研)	—	<i>B. megatherium</i> (北衛研)	—
<i>Esch. coli</i> 2 (北衛研)	—	<i>S. marcescens</i> (北衛研)	—
<i>A. aerogenes</i> 1 (北衛研)	—	<i>S. marcescens</i> (北大応菌)	—
<i>A. aerogenes</i> 2 (北衛研)	—	<i>Pseudo. fluorescens</i> (北大応菌)	—
<i>A. aerogenes</i> 3 (北衛研)	—	<i>Proteus</i> sp. No. 1 (北衛研)	—
<i>A. cloacae</i> (国立栄研)	+	<i>Proteus</i> sp. No. 2 (北衛研)	—
<i>B. subtilis</i> (北大応菌)	—		

第 2 表 分離菌の一般生物学的性状と糖質の醗酵

分 離 菌 株	グ ラ ム 陰 性 桿 状 菌	運 動	IMVIC	シ ス テ ム (PAAR)	マ ン ニ ュ ー シ ュ	ゼ ラ チ ン	硝 酸 還 元	リ ト マ ス 牛 乳 凝 固
Y-11	+	+	—	—	+	+	+	+ ⁵ + ⁶
K-12	+	+	—	—	+	+	+	+ ⁵ + ⁶
A-16	+	+	—	—	+	+	+	+ ⁵ + ⁶

分 離 菌 株	ア ノ ラ ビ ス	葡 萄 糖	乳 糖	蔗 糖	ガ ト ラ ク ス	マ ー ル ス	ラ ノ フ イ ス	グ リ セ ン	デ ト キ リ	澱 粉
Y-11	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.
K-12	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.
A-16	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.	A.G.

(A: 酸, G: ガス)

第 3 表 人糞便中のアルギン酸分解細菌の分布

被 検 者	アルギン酸分解細菌の存在の有無	最少 1 個の分解菌を含む便量
A ♂ 47	+	10 mg
B ♂ 29	+	10
C ♂ 26	—	—
D ♂ 16	+	100
E ♂ 13	+	100
F ♂ 9	+	100

見た。その結果は第 3 表に示す如くアルギン酸分解細菌は被検者 6 人中 5 人までの糞便中に検出され、又該菌の検出された 5 人の糞便は 10^{-2} ~ 10^{-3} 倍稀釈便液までアルギン酸分解細菌が検出せられたから 1 g 中の人糞便中には約 100~1000 個程のアルギン酸分解細菌が存在するものと思われる。

(5) *Aerobacter aerogenes* 型 Y-11 菌によるアルギン酸分解様式 細菌によるアルギン酸分解様式については、その報告も少く、又細菌の種類によっても異なるものと思われる。著者等は分離細菌の 1 株 Y-11 菌によるアルギン酸の分解様式を粘度の低下、還元力の変化、又ペーパークロマトグラフィによつて、その分解生成物を経時的に追跡することによつて検討を加えた。即ち 1 l の平底フラスコに 800 cc の A 培地を入れ、常法によつて滅菌した後、Y-11 菌の数白金耳を移植し 37°, 25 日間培養し、経時的に培養液を採取し、以下の実験に供した。

粘度の測定 オストワルド粘度計を使用し、培養液 10 cc の 25° における流下時間を測定して比粘度をもつて表わした (第 1 図参照)。

還元力の測定: BERTRAND 法によつて測定し $M/100$ $KMnO_4$ の適定値をもつて示した (第 1 図参照)。

(6) ペーパークロマトグラフィによる分解生成物の確認: 培養液をザイツの濾過器を用いて菌体を除き、その約 10~20 cc に稀硫酸を加え、未分解のアルギン酸を沈澱除去し濾液にバリタ水を加えて過剰の硫酸を除き減圧濃縮して乾固せる残渣に再び少量の稀硫酸を適下し供試液とした。展開は東洋濾紙 No. 50 を使い、*n*-ブタノール、酢酸、水 (5:2:3) の溶媒で 1 次元で展開し、室温で 1 夜 (12~16 時間) 放置し、アニリン・ハイドロジェン・フタレイト試薬により発色させた。その結果は第 2 図に示す。

なつた培地から稀釈液をつくり、その 1 白金耳を寒天加 A 培地平板に塗抹培養し、生じた白色微少の多数の集落を釣菌し、A 培地に移植し、アルギン酸を分解するのを確かめたものを、普通寒天斜面に移植して、保存菌株とした。保存菌株としたものは Y-11, K-12, A-16 の 3 株である。

(3) 分離細菌の分類学上の位置: 分離菌は総てアルギン酸を唯一の炭素源とする培地に発育し、速やかにアルギン酸を分解する。分離菌は、第 2 表に示す如くグラム陰性無芽胞の短桿菌で、乳糖を分解し、IMVIC システム (PAAR) — — + + で *Aerobacter* 群に属し、他の生物学的性状より観察して *Aerobacter aerogenes* 型の異型菌であると診断した。

(4) 人糞便中に存在するアルギン酸分解細菌の分布状態 前記の如く人糞便中からアルギン酸分解細菌を分離し得たが、個人差による人糞便中のアルギン酸分解細菌の有無を検するとともに、数量的にどの

程度に出現してくるかを検討するため次の実験を行つた。即ち被検便としては 9~48 才にわたる 6 人の健康人の糞便を、各個無菌的に採取し、その 1 g を 9 cc の生理的食塩水に投じ、滅菌海砂とともに磨碎振盪して 10^{-1} 倍稀釈便液をつくり、以下 10 倍稀釈法によつて 10^{-5} まで段階的に稀釈便液をつくる。それらの各稀釈便液を A 培地に 1 cc 宛加え 6 日間 37° に培養し、その後同一培地へ数回培養を繰返して、アルギン酸分解細菌の存在の有無を

第1図 Y-11 株のアルギン酸の分解
(粘度と還元力の変化)

△—△, ○—○ 粘度, ▲—▲, ●—● 還元力

第2図 Y-11 株の発育過程におけるアルギン酸
分解生産物のペーパークロマトグラム

1 培養前	5 培養10日目	A Ba-マンノロネート
2 培養2日目	6 培養14日目	B Na-
3 培養4日目	7 培養16日目	C マンヌロン酸 (ラクトン)
4 培養8日目	8 培養20日目	D アラビノース

Y-11 菌を接種後 1~2 日で培地の粘度は速やかに低下し, 5 日後にはその比粘度は殆ど 1 となり, 未分解のアルギン酸は全く認められない (稀硫酸により沈澱せず)。又培養 3~4 日目頃より徐々に培地の還元力は増加し, 10 日目で最高に達し以後漸減する。培養 20 日目には培養液の還元力は殆ど消失する。

各培養基におけるアルギン酸分解生成物の確認は主としてペーパークロマトグラフィによつたが, 第2図に示すように接種前の培養液には勿論何等のスポットを生じる物質もない。接種後 2 日目粘度が最初の 2/3 に減じた培養液では $R_F=0.05$, $R_F=0.10$ の2つのスポットが現われる。比粘度が完全に 1 となつた 4 日目の培養液では $R_F=0.2$ に新たなスポットが現われ, 以後培地の還元力が増加し, 更に還元力が減少し始める 12 日目頃まで, マット上に $R_F=0.05$, $R_F=0.10 \sim 0.11$, $R_F=0.17 \sim 0.20$, $R_F=0.23 \sim 0.26$ の明かに異なる4つのスポットが確認された。以後, 培地の還元性物質が最高時の半分以下に減少する 14 日目頃より $R_F=0.05$ のスポットが消失し, 更に次の $R_F=0.10$ のスポットが消え, 最後に培地の還元性物質が殆ど消失した 18~20 日目頃ではマット上のスポットは全く消失してしまう。同時に展開したマンヌロン酸は $R_F=0.26$ であり, 前記のマット上の最上端のスポットの R_F と一致する。他の3つのスポットは恐らくアルギン酸がマンヌロン酸へ分解される場合の中間生成物で下よりテトラ, トリ, ジ, マンヌロナイドと推定されるが, これ等の確認は逐次実験により明かにした

い。以上の成績から, *A. aerogenes* 型 Y-11 菌による分解は次の如く行われるものであろう。

(A) 初期における粘度の急激な低下, その際に殆ど還元力を生じないこと, 又分解生成物に分子の大きいもののみが見出されることから, アルギン酸は初め大きく分割を受け幾つかの小分子のウロナイドを生ずるものと思われる。(B) これらの小分子のウロナイドは細かくグリコサイド結合を切れ, 単一のウロン酸を生ずる。この事は還元力の急激な上昇及びマンヌロン酸がペーパークロマトグラムで明かに確認されることによつて推察される。更にこれらのマンヌロン酸が何等かの形で代謝消費される。*Bact. terestalginiticum* によるアルギン酸代謝の最終生産物は酢酸であるというが, Y-11 菌については目下不明である。かように Y-11 菌はアルギン酸をマンヌロン酸にまで分解するが, これ等の代謝に関与する酵素は単一の酵素系によるものでなく, 恐らく2種の酵素作用によるものと考えられる。このことはペクチン分解に関与する酵素群の中に polygalacturonic acid を部分的に大きく分割して粘度を低下する depolymelase と粘度の低下と還元力の増加を同時に行う pectin polygalacturonase 等の存在が見られるように, アルギン酸を大きな単位に分割して粘度を減ずる酵素と更に小さな単位に分割し還元力を著しく増大する酵素が存在し, 細菌の生長過程において逐次的に形成されるものであろう。

(7) Y-11 菌によるアルギン酸分解酵素の適応的生成: Y-11 菌は基質, 即ちアルギン酸の存在において初めてアルギン酸を分解する酵素 (この場合は粘度を低下する酵素) を分泌し, これを含みぬグイオン培地, KOSER の培地等には全く分泌しない。故に該酵素は適応的性格を有するものと思われる。WAKSMAN の分離せる海水中的細菌はアルギン酸を炭素源とするよりは, むしろ葡萄糖, 澱粉を含有せる培地に培養した方が, アルギン酸分解酵素を多量に生成するというから, この菌の酵素は構成的性格を有するものと思われる。著者等は

第 4 表 *Aerobacter aerogenes* 型 Y-11株のアルギナーゼ生産に対する
培地中の炭水化物の影響

炭 素 源	アルギナーゼの 生産 (外生酵素)
Na-アルギネート	卅
Na-マンヌロネート	卅
d-マンヌロン酸	無
d-Manno. sacch. acid	〃
l-Manno. sacch. acid	〃
澱 粉	〃
デキストリン	〃
葡 萄 糖	〃
マンノース	〃
ガラクトース	〃
乳 糖	〃
アラビノース	〃
グリセリン	〃
クエン酸ソーダ	〃
ペ ク チ ン	〃
アラビヤゴム	〃
ペ プ ト ン	〃

第 3 図 培地を異にする場合の発育途上における Y-11 株の
酵素力の変遷

○—○ アルギン酸, △—△ マンヌロン酸, □—□ グルコース

第 4 図 アルギナーゼ (外生酵素) の熱
抵抗

□ 粗酵素, ■ 透析粗酵素

必須であり, 他の炭素源ではいずれもアルギン酸分解酵素の生成を見ることが出来なかつた. 即ち Y-11 菌においてはアルギン酸分解酵素 (粘度を低下させる) の形成は基質又はその分解生成物の存在が必要である.

(8) **アルギン酸分解酵素の熱抵抗性** A 培地に Y-11 菌を移植し 37°, 4 日間培養して得た培養液をザイツ濾過器にて濾過せる培養濾液を, そのまま粗酵素液とし, その酵素活性の温度に対する影響を見た. 即ち粗酵素液を沸騰水中に 15, 30, 60, 90, 120 分間保持した後急冷し, 前記の如く, その酵素力を測定した.

第 4 図に示すように Y-11 菌のアルギン酸分解酵素は熱に対して極めて安定であり, その酵素活性は 100°, 30 分の熱処置によつてもなお 50% を保持し, 100°, 120 分の加熱によつて初めてその活性が失われる. 該酵素液は 48 時間透析しても, その酵素活性は殆ど失われないが, 熱抵抗性は著しく弱まり 100°, 15 分の加熱で初めの酵素活性の約 80% が失われ, 100°, 60 分で殆ど失われる. 以上の実験により, 該酵素は塩類による保護作用があるものと思われる (第 4 図参照).

Y-11 菌のアルギン酸分解酵素の生成に及ぼす 17 種の炭素源の影響について検討を加えた. 実験方法は 100 cc のペプトン水に各 0.5% になるように各種炭素源を加え, 37° で 4 日間培養し, 48 時間及び 4 日後の培養液を取り菌体をザイツ濾過器で濾別し, 粗酵素液としてその酵素力を測定した. 酵素力の測定は次の如くして行つた. 即ち粗酵素液 10 cc, M/15 磷酸緩衝液 (pH=7.2) に 1% の割合でアルギン酸ソーダを溶かした基質溶液 10 cc の割合で混合し, トルエンを加え 37°, 60 分, 24 時間反応させ反応前及び反応後の反応液の粘度を 25° でオストワルド粘度計で測定し, 次の計算式によつて酵素力を見た. $A = \frac{T_0 - T_{1hr}}{T_0 - T_a} \times 100$ (A は酵素力, T_0 は反応前の反応液の落下時間, T_{1hr} は反応 1 時間後の反応液の落下時間, T_a は純水の落下時間)

その結果は第 4 表, 第 3 図に示す如く, 炭素源としてアルギン酸或はその分解生成物であるマンヌロン酸が該酵素の生成に

III. 要 約

著者等は人糞便よりアルギン酸を適応的に分解する細菌を分離し、その性状及び該細菌によるアルギン酸の分解様式を検討し、次の如き知見を得た。

(I) 分離細菌は総て *Aerobacter aerogenes* 型の異型菌に属し、多くの健康人の糞便中に見出される。該菌の最大出現稀釈度は 10^{-2} ~ 10^{-3} , 糞便にして最少 100~10 mg に出現する。

(II) 分離細菌 Y-11 菌はアルギン酸を分解して、小分子のウロナイドを経て単一のウロン酸を生じ、更にウロン酸をも代謝消費する。

(III) 分離細菌 Y-11 菌のアルギン酸分解酵素(細胞外に分泌され粘度を著しく低下させる作用のあるもの)は適応酵素であり、該酵素の形成は、炭素源としてアルギン酸及びその分解生成物を必要とする。

(IV) 分離菌 Y-11 菌が培養濾液に分泌するアルギン酸分解酵素は 100° , 120 分の熱処理によつて初めて酵素活性が失われる耐熱性酵素である。

終りに色色と御教示を戴いた北大水産学部斎藤恒行教授、又菌株の御恵与並びに分離菌の分類に御教示を戴いた国立栄研井上憲政博士、菌株を御恵与下さった北大農学部応用菌学科の諸氏に感謝致します。

本研究の要旨は昭和 31 年 4 月 1 日の日本農芸化学会大会の講演会にて発表したものである。

(1) 大島幸吉 本誌, 7, 332 (1931).

(2) 遠藤庄三 動物学誌, 46, 351 (1934).
大島幸吉, 板谷真一: 札幌農林学会報, 27, 132 (1936).

(3) 遠藤庄三 植物学誌, 55, 39 (1941).

(4) S. A. WAKSMAN, C. L. CAREY, M. C.

ALLEN: *J. Bact.*, 28, 213 (1934).

(5) S. A. WAKSMAN, M. C. ALLEN: *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 2701 (1934).

(6) P. KOOIMAN *Biochim. et Biophys. Acta*, 13, 338 (1954).