アルギン酸分解細菌に関する研究 (第 1 報)*

分離細菌の同定とそのアルギナーゼに就て

山口 和 夫 (茨城大学農学部)

昭和 32 年 10 月 7 日 受理

緒 言

アルギン酸は自然界に豊富に存在する褐藻類中にその全乾物中 20~40% 含有されている炭水化物でその構成は分子量 15,000, linkage 数 80 と考えられているポリマンヌロン酸である。

第 1 図 アルギン酸の化学構造

アルギン酸はその特性を利用して繊維、食品、化粧品或は医薬用として広汎な用途を有する。

アルギン酸を分解する酵素を大島⁽¹⁾は鮑うに、さざえ等の内臓に見出しアルギナーゼ (alginate) と命名した。アルギン酸を分解する細菌に就ては Waksman 等⁽²⁾は海水及び土壌より 4 種の菌を分離し何れも

Bacterium 属に属する新種であるとした。Thøtta, Kåss⁽³⁾ は Waksman の分離菌の菌学的性質を詳細に検討し *Alginomonas* に属する菌であるとし別に土壌より分離したアルギン酸分解細菌は *Escherichiae* の 3 属の何れにも属しないことを認め新属を設け *Alginobacter acidofaciens* と命名した。

我国に於ては吉川⁽⁴⁾は吉村の海水より分離したアルギン酸分解細菌に *Pseudomonas alginoliquefaciens* I 及び II と命名し井上、安藤⁽⁵⁾は人体腸内より分離したアルギン酸分解細菌は *Aerobacter aerogenes* 型の異型菌であるとした。これらの細菌の分泌するアルギナーゼは何れもアルギン酸の存在に於てのみ生成される適応酵素であることを認めた⁽⁵⁾。

著者はアルギン酸工場の諸材料よりアルギン酸分解細菌を分離中アルギナーゼを強力に分泌するものを認め、その菌学的性質を明らかにした結果 Kauffmann⁽⁶⁾ の分類によって *Cloaca* に属する菌であることを認めその分泌するアルギナーゼはアルギン酸以外の炭素源の存在に於いても生成される構成酵素であることを認めたのでその他の諸性質と共に報告する次第である。

実 験 の 部

1. アルギン酸分解細菌の分離 0.5% のアルギン酸ソーダを含有するペプトン水を試験管にとり、これにアルギンペースト、海水、工場溜水或は土壌を投入し 37° で 3~4 日培養後液の濁濁したものより扁平培養をくり返し 10 数種の菌を分離した。これらの細菌のアルギン酸分解能をオストワルド氏粘度計を用いて粘度の低下を測定して比較した結果、最も強力なアルギナーゼを分泌する細菌は工場溜水より分離した菌で仮りに A-10 菌とし、その菌学的性質を試験した結果は第 1 表及び下記の如くであった。

アルギン酸平板：コロニー白色、正円、周囲完全、隆起し色素を生成しない。

ペプトン水：濁濁し pellicle を生成しない。

馬鈴薯培地：灰黄色表面に著しく広がって繁殖する。

リトマス・ミルク：酸生成し凝固する。

アルギン酸：ガス及び酸を生成する。

発育条件：通常の培地に好氣的にも嫌氣的にも良く発育する。発育の至適 pH は 6.0~7.0 で pH 4.6 から 9.0 まで発育する。至適温度は 30~35° で 10° より 45° まで発育する。NaCl 濃度 1~4% で良く発育し、6% まで発育する。

死滅温度：65°, 10 分。

* Studies on the Alginic Acid Destroying Bacteria. Part I. On the Identification of one isolated Strain and its Alginase.

By Kazuo YAMAGUCHI (Agricultural Faculty of Ibaraki University)

第1表 A-10 菌の菌学的性質

分離菌株	菌型	グラム染色	Kligler 培地		SIM 培地			Simmons 培地	ブドー糖 燐酸塩		ゼラチン 液化	IMViC			硝酸塩還元	ソノトマス乳	カタラーゼ
			高層	斜面	インドール	運動性	H ₂ S		VP	MR		—	—	—			
A-10	短桿	—	YG	Y	—	+	—	+	+	—	+	—	—	—	+	+	+
(周毛)																	
分離菌株	乳糖	グルコース	キシロース	アノビス	蔗糖	マルトース	ガクトース	グリセリン	イノシット	マンニット	可溶性澱粉						
A-10	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—						

2. A-10 菌の同定 A-10 菌はグラム陰性、無芽胞の短桿菌 (0.4~0.5×0.8~1.0 μ) でブドー糖及び乳糖を発酵し酸及びガスを生成し硝酸塩を還元するから Bergey⁽⁷⁾ の分類に従えば *Enterobacteriaceae* の *Escherichae* に属する。この中第1表の如く IMViC — — + + でゼラチンを液化しグリセリンを発酵して酸を生成するから *Aerobacter cloacae* に属する。*Enterobacteriaceae* に属する所謂腸内細菌については現在 Kauffmann の分類⁽⁶⁾ が国際的に信頼されている。Kauffmann の分類に従えば第1表の如く IMViC 及び H₂S 生産能 — — + + で *Klebsiella* 或は *Cloaca* の何れかに属するが本菌は運動性でゼラチン液化能を有するから *Cloaca* に属し、その他の生物学的性状より *Cloaca cloacae* に属すると考えられるので本菌を *Cloaca cloacae* A-10 と命名することにした。

3. A-10 菌の分泌するアルギナーゼについて

(1) 至適温度： アルギナーゼ測定はアルギン酸の分解によって生ずる粘度の低下をオストワルド氏粘度計を用いて、一定容量の溶液の落下時間を計り水に対する比粘度を以て比較した。

酵素液の調整：0.5% アルギン酸ソーダを含有するペプトン水に A-10 菌を接種し 30°, 48 時間培養後菌体を除去し濾液にメタノール 3 倍量を加え生ずる白色沈澱を濾別し減圧乾燥しこの一定量を pH 7.2 の燐酸緩衝液に溶解し酵素液とした。

測定：1% アルギン酸ソーダ液 10 cc に酵素液 10 cc を加え温度を変えて 24 時間後粘度の低下を 25° で比較した (対照の比粘度は 23.2)。その結果は第2表及び第2図の如くであった。至適温度は 35~40° である。

第2図 アルギナーゼに及ぼす温度の影響

第3図 アルギナーゼに及ぼす pH の影響

(2) 至適 pH： 上記と同様にして pH を変えて粘度の低下を比較した (対照の比粘度は 23.2)。その結果は第3表、第3図の如くであった。至適 pH は 7.0~7.4 である。

(3) 培地中の炭水化物のアルギナーゼの生成に及ぼす影響

第2表 アルギナーゼに及ぼす温度の影響

温度	比粘度
25°	2.1
30	1.8
35	1.4
40	1.5
50	2.9

チャベック液の蔗糖の代りに各種炭水化物を1%宛加え pH 7.0 にした培養液に A-10 菌を接種し 35°, 48 時間培養後菌体を遠心分離して除去した濾液について前記と同様にしてアルギナーゼを試験した。その結果は第4表の如くであった。

第3表 アルギナーゼに及ぼす pH の影響

pH	比粘度
4.6	3.4
5.0	2.8
5.5	2.0
6.4	1.6
6.8	1.5
7.0	1.4
7.4	1.4
8.0	2.1

第4表 培地中の炭水化物のアルギナーゼに及ぼす影響

炭 素 源	比粘度
グ ル コ ー ス	1.3
ラ タ ト ー ス	1.3
ガ ラ ク ト ー ス	1.1
マ ン ノ ー ス	1.2
キ シ ロ ー ス	1.1
ア ラ ビ ノ ー ス	1.3
アルギン酸ソーダ	1.2
対 照	23.2

第 5 表 アルギン酸分解過程に於ける
粘度の変化と還元糖の生成

時間	比粘度	KMnO ₄ cc
0	31.0	—
24	3.1	—
40	1.3	—
48	1.1	trace
72	1.1	1.2
96	1.1	1.8

(KMnO₄ 1 cc=5 mg Cu) 第 4 図 A-10 菌によるアルギン酸の分解
経過 (粘度と還元力の変化)

第 6 表 液状酵素剤による粘度の変化

経過時間	0	24	48
比粘度	23.2	1.3	1.2

第 7 表 固状酵素剤による粘度の変化

経過時間	0	24	48
比粘度	23.8	1.4	1.2

Cloaca cloacae A-10 (×1200)

24 時間後著しい粘度の低下をみた。

(2) 固状酵素剤：小麦麩 100 g に水 80 cc を大型シャーレ中に混和し加圧殺菌後、A-10 菌懸濁液 20 cc を撒布し 25°, 2 日培養した後 40° 以下にて減圧乾燥した。その 100 g を pH 7.1 の磷酸緩衝液 1,000 cc に 3 時間浸漬し浸出液の 100 cc を 1% アルギン酸ソーダ液 100 cc に加えて 35° に incubate して粘度の低下を 25° で測定した。その結果は第 7 表の如くであった。

24 時間で著しい粘度の低下をみた。

総 括

アルギン酸工場内の溜水よりアルギン酸分解能の強い細菌 A-10 菌を分離しその菌学的性質を明らかにすると共に本菌の分泌するアルギナーゼの諸性質を検討し次の様な結果を得た。

(1) A-10 菌の菌学的性質を明らかにし Kauffmann の分類に従って *Cloaca cloacae* strain であると判断した。

(2) *Cloaca cloacae* A-10 のアルギナーゼはアルギン酸のみならず各種炭水化物の存在に於て生成される構

第 4 表の如く各種炭水化物の存在でアルギナーゼが生成されることが分った。従って A-10 菌の生産するアルギナーゼはアルギナーゼを基質とするのみ生産される適応酵素でなく、構成的性格を有するものと考えられる。Waksman が海水より分離した細菌もグルコース等の存在でアルギナーゼを生産することが報告されている⁽²⁾。これは井上等⁽⁶⁾の *Aerobacter aerogenes* Y-11 及び吉川⁽⁸⁾の *Pseudomonas alginoliquefaciens* I のアルギナーゼの生成は炭素源としてアルギン酸の存在を必要とし他の炭水化物の存在では全く生成されない。即ち適応的性格を有するのと異なる点である。

(4) A-10 菌によるアルギン酸の分解：キシロース 1% を含有するペプトン水 100 cc に A-10 菌を接種し、35° で 24 時間培養後遠心分離し濾液にアセトン 3 倍量を加え生ずる沈澱をデシケーター中で真空乾燥して(収量 100mg)。この粗酵素を 50 cc の磷酸緩衝液 (pH 7.2) にとかし 1% アルギン酸ソーダ液 50 cc に加え 35° に incubate して 96 時間培養し粘度の低下及び還元力の生成を観察した(対照の比粘度は 31.0)。その結果は第 5 表及び第 4 図の如くであった。

第 4 図に見られる如く、時間の経過と共に粘度は低下し 48 時間後に比粘度は約 1 となり水の如くなる。還元糖は分解初期には見られないが 48 時間後に生成をみた。A-10 菌によるアルギン酸の分解経過をみると、アルギン酸を低分子に分解して粘性を減ずる酵素と更に小さい分子に分解して還元力を生ぜしめる酵素との 2 種の存在が推定される。このことは井上等同 *Aerobacter aerogenes* Y-11 に於て認めている。

4. アルギナーゼの試験

(1) 液状酵素剤：ペプトン水 10cc に A-10 菌を接種し、35°, 24 時間培養後ペプトン水 100 cc に移植、35°, 24 時間培養後培養液共ペプトン水 1,000 cc に移し 35°, 48 時間培養し、培養濾液を粗酵素液とした。

1% アルギン酸ソーダ 100 cc (予め pH 7.2 の磷酸緩衝液に溶解) に酵素液 100 cc を加え 35° に incubate して粘度の低下を 25° で測定した。その結果は第 6 表の如くであった。

成的性格を有する酵素である。

(3) *Cloaca cloacae* A-10 のアルギナーゼは分解の初期に於て著しくアルギン酸を低分子に分解して粘度を低下せしめる酵素と、更に小さい分子に分解して還元糖を生成する酵素の 2 種が存在し、後者は分解の初期に於て殆んど生成されず粘度の著しく低下した時期より徐々に作用するものと推定される。

(4) *Cloaca cloacae* A-10 のアルギナーゼの至適 pH 及び至適温度は夫々 7.0~7.4 及び 35~40° であった。

(5) *Cloaca cloacae* A-10 を使用して液状及び固状の酵素剤を試製して強力なアルギナーゼを有することを認めた。

終りに臨み御指導、御懇諭を賜っている青山教授並びに御助言を賜った東大坂口教授に感謝の意を表します。又試料の採取その他御便宜を与えられた君津化学工業株式会社社長笠原文雄氏に感謝致します。

(1) 大島幸吉：本誌，7，332 (1931)。	(5) 井上勝弘，安藤芳明：本誌，30，742 (1956)。
(2) S. A. Waksman, C. L. Carey, M. C. Allen：
J. Bact., 28, 213 (1934)。	(6) F. Kauffmann：Zbl. Bakt. I. Orig., 165,
344 (1956)。
(3) Th. Thøtta, E. Kåss：C. A. 41, 791 (1947)；
Anhandl. Norske Vindehøps-Akad. Oslo
Univ. Mat.-Naturv. Klasse, No. 5, 1-20
(1945)。	坂崎利一，波岡茂郎：腸内細菌検査法。
北里研究所：腸内細菌検査の手引。
(4) 吉川三吉：兵庫農大報，1，50 (1954)。	(7) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (6th Ed.)
	(8) 吉川三吉：兵庫農大報，2，118 (1956)。

麴菌プロテアーゼの消化作用に関する研究 各種プロテアーゼの分離精製およびその消化作用について

三 浦 勇 吉 (三共高峰研究所)

昭和 32 年 10 月 7 日 受 理

緒 言

タカジアスターゼのごとき麴菌を利用した消化剤には最近 3 種のプロテアーゼの存在が知られている⁽¹⁻³⁾。

すなわちアルカリ性側で作用するアルカリ性プロテアーゼ、中性附近で作用して金属を必要とする中性プロテアーゼ、酸性側で作用する酸性プロテアーゼである。これら 3 種の酵素を分離精製し実際の食品蛋白である肉類、卵、穀物蛋白等に対してそれぞれどのような消化作用を示すかをしらべた。

実 験 の 部

アルカリ性プロテアーゼおよび中性プロテアーゼの分離精製 第 1 表のごとき組成の磷酸濃度および pH の高い培地に当社保存の *Aspergillus oryzae* No. 433 を 30° で 3 日間振盪培養する⁽⁴⁾。pH は培地を殺菌後調整し、培地の糖による褐色化を防いだ。培養後菌体を濾別し、濾液は試薬罐に入れ寒剤で周囲から冷却し、柱状に凍結させる。中央部に凍結しにくい濃厚液が残る。つぎに罐を倒立させて徐々に融解させると、初めに融解してくる部分には極めて濃厚な液が得られる。約 75% の酵素収率で液の体積を 1/3 に濃縮し得る。この濃縮液を第 1 図のごとき方法で分離精製を行った。アルカリ性プロテアーゼは培養液 11 より 60~70 mg、力価収率約 20%、窒素当り活性度は培養濾液の 9~10 倍、中性プロテアーゼは同じく 11 より約 10 mg、窒素当り活性度は 30~35 倍。

アルカリ性プロテアーゼと中性プロテアーゼの力価測定 酵素活性はカゼインを基質とし、5% 三塩化醋酸に可溶性になったペプチド量をフォリン・フェノール試薬による呈色法⁽⁵⁾で測定して表わした。

アルカリ性プロテアーゼは最適 pH は 9 附近であるが、pH 7~9 にかけて平坦に近く、中性プロテアーゼは最適 pH は 6 附近であるが、pH 5~7 の間では大差がない。したがって酵素の精製実験では便宜上両者とも pH 7

* The Digestive Action of Proteases from *Aspergillus oryzae*. The Separation and Purification of Proteases and their Digestive Action.
By Yukichi MIURA (Sankyo Takamine Laboratory)