網糸の腐蝕に関する微生物学的研究—I*

海水性好気性繊維素分解菌の繊維素分解機構について

門 田 元

(京都大学農学部水産微生物学研究室)

Microbiological Studies on the Weakening of Netting Cords—II On the Mode of Cellulose-Degradation by the Marine Aerobic Cellulose-Decomposing Bacteria. Hajime KADOTA

The mode of cellulose-degradation by the marine aerobic cellulose-decomposing bacteria (*Vibrio purpureus*, *Vibrio purpureus* var. *albus* and *Cellvibrio flavescent* var. *marinus*) was studied by observing the changes in weight, copper number and index (*R*) of residual cellulose.

The results obtained indicate that there are distinct differences among the modes of cellulose-decomposition by the organisms employed. It is thought that the mode of attack of cellulose by *Vibrio purpureus* and *Vibrio purpureus* var. *albus* is "weathering" type and that of *Cellvibrio flavescent* var. *marinus* "liquefying" type.

前報¹⁾において著者は海水及び海水中に浸漬して腐蝕させた漁網綿糸から好気性繊維素分解細菌の分離を試み、分離した細菌の分類学上の位置を決定し、更に、海水中におけるその分布状態を検討した結果、一般に、これらの細菌は海水中に広く分布しているが、その種の構成は季節により若干異り、水温の高い夏季には *Vibrio purpureus* 及び *Vibrio purpureus* var. *albus* が多数を占め、秋から春にかけての比較的低水温の時期には *Cellvibrio flavescent* var. *marinus* が最も多く現れる事が明かになった。

本報においては、年間を通じて海水中に最も多数存在し、漁網綿糸の腐蝕に対して大きい役割を演ずるものと考えられる前記3種の細菌を用いて、綿糸腐蝕機構を明かにするための基礎的な実験を試みた。なお、本実験においては、基質の恒常性を得るために、比較的高い純度の天然繊維素たる濾紙繊維素を分解基質として使用した。

本研究に際し、御指導を賜わった木俣正夫教授に深謝する。又実験に協力された迫田敬一農学士に感謝する。

繊維素の水溶性化

先ず、これらの細菌の作用によつて繊維素の水溶性化がどの程度に行われるかを明かにするため、濾紙繊維素を添加した合成培養基を用いて、前記3種類の細菌を培養し、培養時間の経過に伴う繊維素の減少過程を観察した。

接種菌及び培養方法: *Cellvibrio flavescent* var. *marinus*, *Vibrio purpureus* 及び *Vibrio purpureus* var. *albus* の試験管培養(濾紙片添加合成培養基¹⁾に発育したもの)から2白金耳宛を下記合成培養基

1952年4月10日受理

* 文部省科学研究費による。

に接種し、25°Cにおいて培養した。

培養基：細切した濾紙（風乾状態）を正確に1g宛秤取し、これに下記組成の塩類混合液2ccを加えて乳鉢にてよく磨砕し、少量の同液を用いて乳鉢を洗滌し乍ら濾紙繊維を完全に200cc容三角フラスコに注入した後、更に同液を加えて全容を50ccとなし、綿栓を施して、常法により高压滅菌した。

塩類混合液*の組成は次の如くである。

Na NO ₃	0.5 g
K ₂ HPO ₄	1.0
Mg SO ₄ ·7H ₂ O	0.5
Fe SO ₄ ·7H ₂ O	0.01
濾過海水	1000.0

残存繊維素の定量：培養開始後0, 2, 5, 7, 10及び20日目の培養基をグラスフィルター（予め105°Cにおいて恒量となし、秤量しておいたもの）上に注ぎ出して残存繊維素を濾別し、これを1.25% H₂SO₄熱溶液200ccで洗滌後、大量の熱蒸溜水にて濾液が酸性を呈さなくなる迄洗滌し、次に1.25% NaOH熱溶液200ccにて洗滌し、再び熱蒸溜水を用いて濾液がアルカリ性を示さなくなる迄洗滌し、更に95%酒精及びエーテル10ccにて洗滌後105°Cにおいて恒量になる迄乾燥した後秤量した**。

実験結果及び考察：各菌株について、接種直後の培養基中に含まれる繊維素重量に対する、培養開始後

Table 1. Weight of residual cellulose after deterioration by marine aerobic cellulose-decomposing bacteria for 0, 2, 5, 7, 10 and 20 days. Results are shown in percent.

Organism inoculated	Incubation time in days					
	0	2	5	7	10	20
<i>Cellvibrio flav.</i> var. <i>marinus</i>	100	98.3	96.2	95.3	93.3	87.3
<i>Vibrio purpureus</i>	100	98.7	98.4	96.3	95.4	90.7
<i>Vibrio purpureus</i> var. <i>albus</i>	100	99.2	98.7	98.5	97.8	96.5

2, 5, 7, 10及び20日目の培養基中に残存する繊維素重量の比率を%で表示するとTable 1の如くなる。

Table 1から明かなように、いずれの菌株においても繊維素の水溶性化は極めて緩慢に進行し、20日間培養後もなお最低87%以上の繊維素が残存している。

然し一方肉眼及び顕微鏡観察によれば、繊維素がなお98%以上残存する

2乃至5日目の培養においてさえ、既に残存繊維素は相当顕著な変化を示し、又濾紙片をそのまま添加して同様の条件下で培養した場合には培養液中の濾紙片は手付の振盪により2乃至5日目から切断する。

更にTable 1によれば、使用した3菌株のうちでは*Cellvibrio flavescens* var. *marinus*が最もすみやかに繊維素を溶解するが、前報に示したように同様の条件下で手付の振盪により濾紙片が切断する迄に要する培養日数は*Cellvibrio flavescens* var. *marinus*では5日、*Vibrio purpureus*及び*Vibrio purpureus* var. *albus*では2日であり、*Vibrio*属の両菌株の方が遙にすみやかに濾紙片を切断させる。従つて濾紙繊維の切断を促す変化と、繊維素の水溶性化を促す変化との間には直接の關聯性が存在しないものと考えてよいであろう。又以上の事実からこれらの細菌による繊維素分解過程では、繊維素の水溶性化は緩慢であつても、液化しない程度的高分子状態における変化が残存繊維素自体の中に比較的速かに進行するのではあるまいか。***

* 予め30分間加圧滅菌操作を施し、生ずる沈澱を濾別した後使用した。

** 以上の操作により残存繊維素に附着している細菌細胞の大部分が濾液中に洗い落され、又繊維素は完全にフィルターに残る事が顕微鏡観察により明かになった。

*** *Cellvibrio flavescens* var. *marinus*と*Vibrio*属の両菌株とでは、その繊維素分解機構に差がある（以下3頁脚註へ）

残存繊維素の変質

敝上の結果から残存繊維素の諸性質の検討を試みた。

残存繊維素の変質を知る指標として、銅価及び稀酸分解速度 恒数変化率²⁾ をえらび、培養日数の経過に伴う、これらの値の変化を測定観察した。

1. 銅価の変化

接種菌及び培養方法: *Cellvibrio flavesceus* var. *marinus*, *Vibrio purpureus* 及び *Vibrio purpureus* var. *albus* の試験管培養から 8 白金耳宛を下記培養基に接種し、25°C において培養し、培養開始後 0, 2, 5 及び 10 日目に定量を試みた。

培養基: 繊維素の水溶性化に関する実験と同操作を施した同組成の培養基 200 cc を用いた。

培養後の処理: 処定日数培養後、培養フラスコをよく振盪混和し、培養基約 50 cc をグラスフィルター上に注ぎ出し、フィルター上に残った繊維素を大量の熱蒸溜水を用いて、C.I. の反応が消失する迄洗滌後、風乾して銅価測定用の試料とした。

銅価の測定: 前記風乾試料 0.25 g について HEYES³⁾ の方法に従つて ミクロの 規模において測定した。

実験結果及び考察: 得られた結果は Table. 2 に示す如くである。但し表中の値は 105°C, 3 時間乾燥した試料 100 g が消費する銅量を g で表示したものである。

Table 2 から明かなように、いずれの菌株も残存繊維素を変質させ、銅価を高める作用を示すが、培養日数の経過に伴う銅価の変化は Table 1 に示した残存繊維素重量の変化とは相当異つた傾向を有する事がわかる。即ち残存繊維素を最もすみやかに減少させる *Cellvibrio flavesceus* var. *marinus* の場合には銅価の増加は残存繊維素減少率のより低い *Vibrio* 属 2 菌株に比して遙に僅少である。

一方銅価の増加傾向は振盪による濾紙片切断の傾向とほぼ一致する。

この事から *Vibrio* 属 2 菌株による分解においては繊維素の水溶性化を来すような低分子化合物への分解反応は緩徐であるのに反し、銅価の増加を来すような高分子分解産物を生成するような反応が比較的速に行われ、*Cellvibrio flavesceus* var. *marinus* の場合にはその反対の傾向があるものと考えられる。

2. 稀酸分解速度 恒数変化率

照井氏ら²⁾ は非典型的繊維素分解細菌の繊維素に対する挙動の研究において、残存繊維素の変質を量的に表示する方法として、稀酸分解における速度恒数変化率 R を測定し、 R が正の値を示せば、残存繊維素が化学的に脆弱化せる事が指示されると述べているが、著者も、同氏の方法に従つて残存繊維素の変質の指標

Table 2. Copper number of residual cellulose after deterioration by marine aerobic cellulose-decomposing organisms for 0, 2, 5 and 10 days.

Organism inoculated	Incubation time in days			
	0	2	5	10
<i>Cellvibrio flav.</i> var. <i>marinus</i>	1.03	1.08	1.13	1.14
<i>Vibrio purpureus</i>	1.03	1.17	1.32	1.46
<i>Vibrio purpureus</i> var. <i>albus</i>	1.03	1.12	1.26	1.34
Control (uninoculated)	1.03	1.03	1.03	1.03

(前頁脚註 *** の続き) らしい事は試験管培養における濾紙片切断状態の肉眼観察によつても予想される。と云うのは *Cellvibrio* 属の菌株では濾紙片が次第に薄くなつて切断するが、*Vibrio* 属の両菌株ではむしろ膨潤したような外観を呈して切断する。残存繊維素を顕微鏡観察した場合にも *Vibrio* 属の両菌株では明かに濾紙繊維の膨潤がみられるが、*Cellvibrio* では膨潤は観察されない。更に又、これらの細菌が繊維素寒天平板¹⁾ 上に生育した場合、その集落周辺に生成する clear zone の大きさは *Cellvibrio flavesceus* var. *marinus* において最も大きく、*Vibrio purpureus* ではやゝ小さく、*Vibrio purpureus* var. *albus* では殆ど認められない程度である。

として R の測定を試みた。

接種菌及び培養方法: 実験 1 の方法を踏襲した。

培養基: 実験 1 と同組成の培養基を用いた。

培養後の処理: 実験 1 の方法に従った。

稀酸分解速度恒数変化率の測定: 風乾試料 0.5g を正確に 100 cc 容三角フラスコに採り、 $2N-H_2SO_4$ 25cc を加え、煮沸水浴中還流下に 90 分間加熱した後、直ちに冷却し、 $2N-NaOH$ にて中和して全容を 100cc に充たし、これを濾過して濾液 10cc をとり WILLSTÄTTER-SCHUEDEL 法⁴⁾ により還元糖量を求め、還元糖を全部葡萄糖と自做し、次式に従つて 1 分子分解恒数 K を求めた。即ち

$$K = \frac{1}{t} \ln \frac{1}{1-0.9X}$$

$$= -\frac{1}{t} \ln(1-0.9X)$$

但し t =時間(分), X =繊維素 1g より生じた葡萄糖の重量(g)である。

Table 3 Index (R) of residual cellulose after deterioration by marine aerobic cellulose-decomposing bacteria for 5, 7 and 20 days. Index(R) was defined as follows:

$$R = \frac{K-K_0}{K_0} \times 100$$

where K is a velocity constant of hydrolysis of residual cellulose with $2N-H_2SO_4$ at $100^\circ C$, and K_0 is that of intact one in a control.

Organism inoculated	Incubation time in days		
	5	7	20
<i>Cellvibrio flav.</i> var. <i>marinus</i>	6.8	20.1	31.6
<i>Vibrio purpureus</i>	33.4	40.2	50.7
<i>Vibrio purpureus</i> var. <i>albus</i>	20.1	33.4	41.0

高分子分解産物を生成する傾向の強い事がわかる。

総 括

以上の実験から明かなように、*Cellvibrio flavescens* var. *marinus* と *Vibrio* に属する 2 菌株の間には、その繊維素分解型式に著しい差があるが、これは両者の cellulase 組成が異つている事を示すものであろう。最近、微生物の cellulase について、照井氏ら²⁾⁵⁾は所謂液化型の他に風化型とも云うべき高分子化合物生成型のものが存在する事を指摘している。又 REESE 氏ら⁶⁾⁷⁾⁸⁾によれば微生物による繊維素の分解は、2つの段階に分けられる。即ち第 1 段階においては酵素 C_1 の作用により native cellulose が straight chain fragments $(C_6H_{10}O_5)_n$ に迄分解され、それは更に第 2 段階において酵素 C_2 により cellobiose 乃至 glucose に迄分解されるのであると。

REESE 氏の説を適用すれば、照井氏らの風化型繊維素分解細菌は C_1 型酵素を生産するが C_2 型酵素を全く、或は殆ど生産しない細菌であると考えられる。然し、一般には風化型と液化型との間に厳密な限界があるわけではなく、 C_1 型酵素と C_2 型酵素との構成比率により種々の中間段階が存在するものと考えられる。妥当であろう。

著者の実験においては、いずれの菌株の場合にも残存繊維が変質し、高分子化合物生成型の分解が行われ

無接種にて平行処理せる対照の恒数 K_0 を同様にして求め、次式により恒数変化率を算出した

$$R = \frac{K-K_0}{K_0} \times 100$$

実験結果: Table 3 に示す如くである。

Table 3 によれば、いずれの菌株においても、残存繊維素の稀酸分解速度恒数変化率 R は常に正の値を示し、残存繊維素は化学的にも明かに脆弱化している事がわかる。又 R の値は使用した 3 菌株のうちでは *Vibrio purpureus* において最も大であり *Cellvibrio flavescens* var. *marinus* において最も小さいが、この傾向は Table 2 に示した銅価の傾向とよく一致し、この点からも *Vibrio* 属 2 菌株においては特に

るが、*Vibrio* に属する両菌株は特にこの傾向が強く、照井氏の所謂風化型繊維素分解菌と称し得るものと考えられ、一方 *Cellvibrio flavescent* var. *marinus* はこの傾向が弱く、一般の液化型繊維素分解細菌に属するものと思われる。

繊維の抗張力は繊維素の水溶性化を待つ迄もなく、その風化と共に減少するものと考えられるから、微生物による漁網綿糸の腐蝕作用を考える場合には繊維素分解の第1段階たる C₁ 型酵素による分解が問題となる。従つて繊維素溶解作用の弱い *Vibrio* 属両菌株が *Cellvibrio flavescent* var. *marinus* よりも漁網綿糸腐蝕作用が劣つてゐるとは考えられず、むしろその逆に、高分子化合物生成型の分解が後者より遙に強いが故に漁網綿糸腐蝕作用は後者をしのぐものと考えられる。一般に繊維素分解細菌の漁網綿糸腐蝕作用の強弱を判定する場合に、繊維素寒天平板上に生ずる clear zone の大小、或は残存繊維素減少率の大小のみを以て、その基準にする事は極めて危険であらう。

要 約

年間を通じて海水中に多数存在し、漁網綿糸の腐蝕に対し大きい役割を演ずるものと考えられる好気性繊維素分解細菌のうち、夏季に多く出現する *Vibrio purpureus* 及び *Vibrio purpureus* var. *albus*、秋、冬及び春季に多い *Cellvibrio flavescent* var. *marinus* を用いて、その繊維素分解機構を残存繊維素の重量、銅価及び稀酸分解速度恒数変化率の測定により検討した結果、いずれの菌株の場合にも残存繊維素が変質し、高分子化合物生成型の分解が行われるが、特に *Vibrio* 属両菌株においてはこの傾向が強く、これらは所謂風化型繊維素分解細菌に属する事が明かになつた。*Cellvibrio flavescent* var. *marinus* においてはこの傾向が弱く、これは一般の液化型繊維素分解細菌に属せしめるべきものと考えられる。又 *Vibrio* 属両菌株の繊維素液化力は *Cellvibrio flavescent* var. *marinus* に劣るが、繊維の抗張力を低下せしめる原因となる高分子化合物生成型又は風化型の繊維素分解力は後者よりも遙に強力である事が判明した。

文 献

- 1) 門田: 日水誌, **16** (12), 63—70 (1951).
- 2) 照井, 藤原: 醗酵工学誌, **27**, 10—15 (1949).
- 3) HEYES, T. F.: *Jour. Soc. Chem Ind.*, **47** (90T) (1928).
- 4) WILLSTÄTTER, R. U. SCHUDEL, G.: *Ber.*, **51**, 780 (1918).
- 5) 照井, 藤原, 川井: 醗酵工学誌, **27**, 203—207 (1949).
- 6) REESE, E. T., SIN, R. G., and LEVINSON, H. S.: *Jour. Bact.* **59**, 425—497 (1950).
- 7) LEVINSON, H. S., and REESE, E. T.: *Jour. Gen. Physiol.*, **33**, 601—628, (1950).
- 8) LEVINSON, H. S., MANDELS, G. R., and REESE, E. T.: *Arch. Biochem. and Biophys.*, **31**, 351—365, (1951).