

Rhizopus の乳酸醱酵に関する研究 (第3報)

Cell free extract による乳酸生成

蟹江松雄・出来三男・上床 忍

Lactic Acid Formation by a Fungus of the Genus *Rhizopus* :

3. Lactic Acid Formation with Cell Free Extract

Matsuo KANIE, Mitsuo DEKI and Shinobu UWATOKO

(Laboratory of Applied Microbiology)

微生物の細胞懸濁液を用いて或物質の代謝活性を検討する為にはまづその物質が細胞膜透過性でなければならない。しかるに代謝物質の中には非透過性のものが存在することが一般に知られており、したがって細胞懸濁液の代りに cell free extract が使用可能であればより直接的に結論が導き出される。

そのうえ cell free extract の使用にはつぎのごとき有利性が認められる。すなわち炭水化物代謝の研究にあたり、その中に細胞を懸濁するときは大量の炭水化物が細胞炭水化物として集積される。このことはかびについても DARBY 及び GODDARD⁽¹⁾(1950) が *Myrothecium verrucaria* で、また STOUT 及び KOPFLER⁽²⁾(1951) は *Penicillium chrysogenum* について認めており、また *Rhizopus* の乳酸醱酵に際して WAKSMAN 及び FOSTER⁽³⁾(1939) も認めておる。cell free extract ではこの点を顧慮しないで結果の解析を行うことが出来る。

著者達はこれらの見地から *Rhizopus* の乳酸醱酵を cell free extract を用いて研究せんとし、本報告においては cell free extract の調製条件及びその二、三の性質について吟味した結果を記載する。

実験方法

1) 菌株及び培養方法

使用菌株は著者達によつて分離された *Rhizopus oryzae* に属する一株⁽⁴⁾である。

液体培地はグルコース 5%, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.2%, KCl 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, K HPO_4 0.1%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001% からなり、保存培地としてはこれに寒天 2.5% を添加したものをを用いた。

菌体の増殖には上記液体培地 100 ml を 300 ml 容三角フラスコに入れ、15 lbs. 15 分間殺菌後 CaCO_3 を 0.5% になるように加え、保存培地で培養した孢子を接種、18 時間静置培養し、続いて 30 時間振盪 (110 往復/分) 培養した。培養温度は 30°C。培養終了後、菌体はスッチェ上に集め殺菌水で充分に洗滌、スッチェ上で圧搾可及的に脱水した。

2) Cell free extract の調製法

cell free extract としては特別な記載のないかぎり上記湿潤菌体をその 3~10 倍量の 0.03 M phosphate buffer (pH 6.8) と氷冷しながら 3 分間 glass homogenizer で磨碎し、600 × g で 10 分間遠心分離、その上澄液を用いた。

3) Cell free extract による乳酸生成

反応液は cell free extract, グルコース及び phosphate buffer (pH 6.8) からなり, また必要に応じ他の添加物を混合した. これらの濃度は実験結果の項で記載した. 大部分の実験は好氣的に行い, 一部は嫌氣的に行つた. 好氣的培養は三角フラスコに入れ振盪機上で, また嫌氣的には Thunberg 管を用い減圧下に培養した. いづれの場合にも chloramphenicol を 1 万分の 1 の割合に加えて雑菌繁殖を防いだ.

4) 定量方法

乳酸の定量は BARKER 及び SUMMERSON⁽⁶⁾ の方法にしたがい, 糖の定量は HANES⁽⁶⁾ 法を用いた.

実験結果

1) 磨碎時間と乳酸生成能との関係

菌体を 0.03 M phosphate buffer (pH 6.8) と共に homogenizer で時間を異にして磨碎し, それから得られた cell free extract を用いて乳酸生成能を試験した結果は Table 1 の通りである.

Table 1. Effect of homogenization time on lactic acid formation with cell free extract

Expt. No.	Homogenization time (min.)	Glucose consumed (mM)	Lactic acid formed (mM)	Conversion (%)
1	1	0.48	0.62	64.6
	3	2.33	2.89	62.0
	5	2.04	2.13	52.2
	7	1.98	2.01	50.8
2	1	1.26	0.55	21.8
	3	2.18	3.78	86.7
	5	0.27	0.08	14.8
	7	0.06	0.05	41.6

Reaction mixture contained 0.3 mmoles phosphate buffer at pH 6.8, 50 mg glucose, and cell free extract in a total volume of 10 ml. Extract was prepared in the presence of 0.03 M phosphate buffer at pH 6.8 from 4 gm of intact cell in Expt. 1 and 0.38 gm in Expt. 2 respectively. Incubated aerobically for 20 hours at 30°C.

両実験とも磨碎時間, 磨碎量によつてかなり著しい相違が見られるが, homogenizer の性能等によつても相違が認められた. しかし適当な条件を選択すれば細胞懸濁液で得られる乳酸生成率⁽⁷⁾と同程度の乳酸生成が認められる. この際 $10^{-3}M$ cysteine 添加の下での磨碎の影響は見られず, また嫌氣的培養ではいづれの磨碎時間のものについてもグルコースの消費及び乳酸生成が全然認められなかつた. Table 1 の結果から以後の実験は磨碎時間 3 分間を適用した.

尚 3 分間磨碎の cell free extract を用いた反応液の全窒素を測定した結果は実験 1 で 10 ml 当り 10.7 mg, 実験 2 で 10 ml 当り 8.2 mg であつた.

2) 磨碎時の phosphate buffer の濃度の影響

glass homogenizer で磨碎するときの phosphate buffer (pH 6.8) の濃度を換え, 反応液の濃度も磨碎時の濃度と同一にして乳酸生成能を測定した結果は Table 2 に示す通りである.

Table 2. Effect of the phosphate buffer concentration in homogenization and reaction on lactic acid formation with cell free extract

Phosphate buffer concentration (M)	Glucose consumed (mM)	Lactic acid formed (mM)	Conversion (%)
0.003	1.58	2.15	68.0
0.03	2.18	3.78	86.7
0.3	0.16	0.15	46.9

Conditions are similar to Table 1 except that extract was prepared from 0.38 gm of intact cell in the presence of the respective concentration of phosphate buffer and the reaction was carried out in the identical concentration of phosphate buffer with that in homogenization.

Table 2 から 0.03 M phosphate buffer が最適であることを知つたが、この濃度が磨砕条件に好適なのか、または反応に好適なのかを知る為に磨砕時は 0.003 M phosphate buffer (pH 6.8) を使用し、反応液の濃度を変えた結果は Table 3 に示す通りである。

Table 3. Effect of phosphate buffer concentration in reaction mixture on lactic acid formation with cell free extract

Phosphate buffer concentration (M)	Glucose consumed (mM)	Lactic acid formed (mM)	Conversion (%)
0.003	4.45	4.9	55.1
0.03	5.65	5.3	46.9
0.3	3.75	2.2	29.3
3.0	2.90	1.3	22.4

Conditions are similar to Table 1 except the phosphate buffer concentration in reaction mixture and that extract was prepared from 4 gm of intact cell in the presence of 0.003 M phosphate buffer.

Table 2 及び 3 を見ると phosphate buffer の濃度の影響は磨砕時よりも反応時に大きいと考えることが出来る。Table 2 及び 3 の結果から以後の実験には磨砕にも反応にも 0.03 M phosphate buffer を使用することとした。

3) 放置による不活性化

磨砕直後と chloramphenicol 添加の下に室温及び氷室にそれぞれ 24 時間放置後の乳酸生成能を比較すると Table 4 の通りである。

Table 4. Stability of cell free extract

Condition	Glucose consumed (mM)	Lactic acid formed (mM)	Conversion (%)
Control	3.95	4.78	60.5
24 hrs, at 5°C	3.05	2.44	40.0
24 hrs, at room temperature (about 25°C)	0.28	0.04	7.1

Conditions are similar to Table 1 except that extract was prepared from 4 gm of intact cell.

すなわち 25°C 前後で 24 時間 放置による失活は極めて 顕著であるが、氷室中での 放置でも 乳酸生成能は かなり 著しく 減少することを 知る。

4) Cell free extract の超遠心分離

cell free extract を 80,000 × g で遠心分離して沈澱部分と上澄液に分ち、前者は再び 0.03 M phosphate buffer で洗滌後、0.03 M phosphate buffer に懸濁して乳酸生成能を試験した。

Table 5. Lactic acid formation with the ultracentrifuged sediment of cell free extract

Enzyme solution	Addition	Glucose consumed (mM)	Lactic acid formed (mM)	Conversion (%)
P	—	1.68	0.16	4.8
"	MgCl ₂	4.24	1.95	23.0
"	DPN	6.50	1.90	14.6
"	Pyruvic acid	1.84	0.28	7.7
"	MgCl ₂ + DPN	6.68	2.82	21.1
"	MgCl ₂ + pyruvic acid	4.60	2.49	27.1
"	DPN + pyruvic acid	6.39	3.13	24.5
"	MgCl ₂ + pyruvic acid + DPN	6.62	9.59	72.4
"	MgCl ₂ + malic acid + DPN	5.37	8.03	74.8
P + S	—	6.00	7.60	63.3
S	—	0.72	0.00	0.0
Cell free extract	—	8.24	11.59	70.3

Concentration of the reaction mixture: phosphate buffer (pH6.8), 0.03 M; glucose, 0.5%; DPN, 5 mg%; MgCl₂ · 5H₂O, 5 × 10⁻³M; pyruvic, 5 × 10⁻⁴M and malic acid, 5 × 10⁻⁴M. Total volume: 10 ml. Each enzyme solution corresponded in quantity to the extract prepared from 8 gm of intact cell. P and S are sediment and supernatant respectively centrifuged for 30 minutes at 80,000 × g. Incubated aerobically for 20 hours at 30°C.

Table 5 からわかるように沈澱部分又は上澄液だけでは乳酸生成は殆んど又は全く認められないが両者の混合によつては生成能が復活する。さらに沈澱部分に cofactor として MgCl₂, diphosphopyridine nucleotide (DPN), pyruvic acid 又は malic acid を添加すると cell free extract と同程度の乳酸生成が認められるが、各々単独又は二者の添加では促進効果は僅少に過ぎ

Table 6. Lactic acid formation with the dialyzed extract

Enzyme solution	Addition	Glucose consumed (mM)	Lactic acid formed (mM)	Conversion (%)
Dialyzed ext.	—	0.40	0.00	0.0
Dialyzed ext.	MgCl ₂ + DPN + malic acid	5.70	7.24	63.5
Cell free extract	—	9.22	11.12	60.3

Conditions are similar to Table 5.

Dialysis was carried out against distilled water for 24 hours at 5°C.

ないことを知った。pyruvic acid, malic acid からは cell free extract でほぼ 1 mole: 1 mole の割合で乳酸生成を認める⁽⁷⁾が、この実験では添加モル数が生成乳酸モル数の 1/16 又はそれ以下であるので、恐らく Sparker として役立つのであろう。尚 cell free extract を氷室内で 24 時間 蒸溜水に対して透析後、その容量及び phosphate buffer 濃度を出発時のそれに調製した液についても実験を試みた。その結果は Table 6 の通りでやはり三者の共存で cell free extract の活性にまで高められることを知った。

考 察

上記の結果は *Rhizopus oryzae* に属する一株からの cell free extract が細胞懸濁液とほぼ同じ収量で好氣的に乳酸を生成することを示すものである。しかもこの系は極めて不安定であり、磨碎条件によつても放置によつても容易に失活するものである。しかしこのかびの乳酸生成系が cell free extract では勿論、さらに 80,000 × g 30 分間の遠心分離で得られる沈澱部分 (particle) と MgCl₂, DPN, pyruvic acid (又は malic acid) の共存下に再現されることはこのかびの乳酸生成経路を検討する上に有用であらう。磨碎条件や放置による失活はこの particle と関聯をもつた性質であると考えれば理解されるように思われる。

cell free extract による乳酸生成が好氣的条件下にのみ認められ、嫌氣的にはグルコースの消費の全然認められないことはこのかびの細胞懸濁液による、又は growing culture における乳酸生成が酸素の存在で高められるという結果 (WAKSMAN 等,⁽³⁾ 坂口等,⁽¹⁰⁾ 蟹江等⁽⁸⁾) を一層強調するものであり、この乳酸生成に酸素の関与が極めて重要な意義をもつことを示すものである。

また particle による乳酸生成が他の cofactor の共存下で pyruvic acid または malic acid によつて促進されることはこれらの酸を含んだ系 (C₄ デカルボン酸回路またはトリカルボン酸回路) が重要な位置を占めることを示唆するものである。すでに C₄ デカルボン酸回路がこのかびの乳酸生成系に果している役割については CARSON 等,⁽¹¹⁾ 北原等⁽¹²⁾ が報告している。

総 括

Rhizopus oryzae に属する一株からの cell free extract は細胞懸濁液とほぼ同じ収量で好氣的に乳酸を生成することを明らかにした。しかしこの系は極めて不安定で、調製条件によつてもその活性を異にし、又室温では 24 時間で殆んど完全に失活し、氷室 (5°C) でも活性のかなり著しい減退が認められた。

この cell free extract は 80,000 × g 30 分間の遠心分離によつて、沈澱部分と上澄液に分けるか、または蒸溜水に対し透析すると、乳酸生成能を示さなくなるが、遠心分離の沈澱部分または透析残液に MgCl₂, DPN 及び pyruvic acid または malic acid を加えると活性が復活されることを知り、かくてこの反応を推進する系は particle と cofactor から組立てられることを明らかにした。

文 献

- 1) DARBY, R. T. and GODDARD, D. R.: *Am. J. Botany*, **37**, 379 (1950).
- 2) STOUT, H. A. and KOFFLER, H.: *J. Bact.*, **62**, 253 (1951).
- 3) WAKSMAN, S. A. and FOSTER, J. W.: *J. Agr. Res.*, **57**, 873 (1939).
- 4) 蟹江松雄・出来三男: 鹿大農学術報告, **6**, 58 (1957).

- 5) BARKER, S. B. and SUMMERSON, W. H.: *J. Biol. Chem.*, **138**, 535 (1941).
- 6) HANES, C. S.: *Biochem. J.* **23**, 99 (1929).
- 7) 蟹江松雄・出来三男・上床忍：日農化大会（昭33年5月京都）で発表.
- 8) 蟹江松雄・出来三男：鹿大農學術報告, **5**, 127 (1956).
- 9) HEATH, E. C. and KOFFLER, H.: *J. Bact.*, **71**, 174 (1956).
- 10) 坂口謹一郎・古坂澄石・高橋甫：日農化, **25**, 150 (1951).
- 11) CARSON, S. F., FOSTER, J. W., JEFFERSON, W. E., PHARES, E. F. and ANTHONY, D. S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **33**, 448 (1951).
- 12) 北原覚雄・福井作蔵：醸工, **28**, 338 (1950).

Résumé

A cell free extract from a strain of *Rhizopus oryzae* was found to produce lactic acid aerobically as much as the resting cell. But this system was extremely labile, varying the activity according to the preparing conditions, and was almost inactivated by keeping for 24 hours at a room temperature (about 25°C). The activity decreased fairly even at 5°C in a refrigerator.

When the cell free extract was centrifuged for 30 minutes at 80,000 × *g* or was dialyzed against distilled water, the precipitate or the dialyzed extract lost the lactic acid forming capacity, but was recovered by the simultaneous addition of MgCl₂, DPN, and pyruvic acid or malic acid. Thus the presence of particle bound system which carries out the reactions by the aid of the cofactors was demonstrated.