

“ふなくいむし” 消化管内繊維素分解菌に 関する研究-III*

内臓酵素と細菌酵素との関係

齊藤 要・日高富男

Studies on the Cellulose Decomposing Bacteria in the
Digestive Organs of Ship-worm (*Teredo navalis* sp.)-III

Relation between the Enzyme of Digestive
Organs and Bacterial Enzyme

Kaname SAITŌ and Tomio HIDAHA

緒 言

一般に繊維質物食性の動物が繊維素を消化する機能としては、牛・馬・白蟻の如く寄生微生物がその作用に与る場合と、蝸牛等の如く酵素に依る作用と、更に之等の共同作用による場合とが考えられている。“ふなくいむし”の木材消化については従来内臓酵素に関する研究⁽¹⁾⁽²⁾に止まり、その木材消化能はむしの分泌酵素に依るものとされていたが著者の一人はさきに“ふなくいむし”消化管内より繊維素分解菌を分離し、その菌学的性質と細菌セルラーゼの特性について検索し、該菌が“ふなくいむし”の木材消化に関与し得る可能性に就いて報告し⁽³⁾⁽⁴⁾た。今回は消化管内に棲息する該繊維素分解菌が事実上消化生理に如何なる関係を有するかを識るの一助として、内臓酵素と細菌酵素との多糖類分解作用及び各種繊維質物分解能、或は両セルラーゼの pH 曲線を比較検討し、若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 酵素剤の調製

細菌酵素の調製は第2報⁽⁵⁾に準じて行い、内臓酵素剤はそれと略同様の操作で行った。即ち“ふなくいむし”肝臓部を摘出、水洗したものに海砂を加えて摺潰し之に約4倍量の水とトルオール少量を添加して氷室中に一昼夜抽出し、之を3500 r.p.m, 10分間遠心分離、其の上澄液をアセトン40%と60%に於て分別沈澱せしめ粉末乾燥剤として調製した。その精製過程、収量及び力価は Fig. 1 に示す。

2. 酵素の検出

上記アセトン60%沈澱物(Prep. II)の0.1%溶液を酵素液として使用する。細菌酵素についても同様に行う。

アミラーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、マンナーゼ、アルギナーゼ、シュウクララーゼの検出及び力価は次の如く反応液を調整し、常法の如く生成還元糖量を FOLIN-WU 氏法⁽⁶⁾

* 本報告は昭和28年11月、日本水産学会秋季大会に於て発表した。

に依り測定した。

	Substrate (mg),	Buffer sol. (cc),	Enzyme sol. (cc)
Digestion test	50	5	5
Control for enzyme sol.	—	5	5
Control for substrate	50	5	Dist. water

Buffer solution was changed in accordance to the difference of enzymes.

プロテアーゼは常法に依り Formol 滴定値で、リパーゼ、エステラーゼは常法に従い酸度で表わした。又カタラーゼは $N/100 \text{ KMnO}_4$ 滴定法にて測定した。

3. 基 質

基質としての繊維質物のうち濾紙は Toyo. F. No. 2 を粉碎したもので、ヒドロセルローズは濾紙を SCHWEITZER 試薬に溶解再生したものである。又パルプは楠材より調製したものでその一般分析値を Table 3 に示す。楡、椎の材質は鋸屑を使用し、その化学処理は夫、木材分析法⁽⁶⁾に従つて施し、とくに脱リグニン I II III とは塩化法脱リグニン処理の程度を表わし、III の段階は略、完全に脱リグニンされたものである。

上記基質に対し酵素及び細菌を作用せしめたが、酵素作用はセルラーゼの作用と同様にを行い、細菌の作用は各基質を培養液⁽³⁾に対し 5% 添加したものを 100 cc フラスコに 20 cc 宛注射して殺菌、接種、常法により 12 日間培養して基質分解程度を生成還元糖と基質減少率により観察した。

4. pH 曲 線

さきに調製した酵素剤の 0.1% 溶液についてセルラーゼ作用 pH 曲線を求め、更に “ふなくいむし” 体全体を同様抽出処理した酵素剤に就いて、又細菌酵素と内臓酵素を混合したものに就いても同様夫、のセルラーゼ pH 曲線を求めた。

実験結果及び考察

1. 酵素精製について

セルラーゼの精製に就いては前報⁽¹⁾の如く塩析法、吸着法、沈澱法等があるが文献⁽⁷⁾⁽⁸⁾によると未だ純粋分離には至つていない。茲に使用する酵素剤は一般酵素の検出を行う関係上 Fig. 1 に示す如き粉末酵素剤としての精製に止め各酵素剤は共にその精製程度を等しくした。

Fig. 1 に示される如く Prap. I は 6 u/mg, Prap. II は 20.5 u/mg で Prap. II は Prap. I の 3~4 倍の力価（第 2 報参照）を有する白色粉末剤を得、次の各実験には Prap. II を使用したがその酵素収率は 38% であつた。

2. 内臓酵素と細菌酵素について

“ふなくいむし” 酵素としては肝臓中にセルラーゼ以外にアミラーゼ、キシラナーゼ、アルギナーゼが検出されている⁽¹⁾⁽²⁾。今、内臓、細菌両酵素剤については是等一般酵素系の検出を行つた結果は Table 1 の如くである。大略的に内臓酵素と細菌酵素とを比較するに多糖類分解能に於ては量的相違は別として両者殆んど同じ傾向の分解を示し、共にアミラーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、マンナーゼ、アルギナーゼ、エステラーゼを認め、プロテアーゼ、リパーゼは極めて弱く、又本実験の範囲内では細菌酵素にカタラーゼを検出出来ないのに反し内臓酵素にはカタラーゼを含む結果を得た。

Fig. 1. General scheme for preparation of crude enzyme from digestive organs of ship-worm

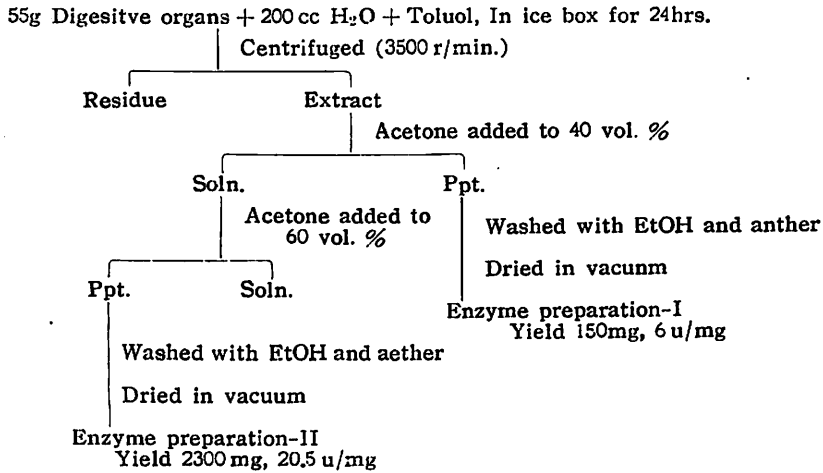


Table 1. Kind and activity of the enzymes found in crude enzyme preparations

Kind of enzymes	Unit	Activity	
		Bacterial enzyme	Enzyme of organs
Cellulase	Reducing suger (mg %)	12.0	25.0
Amylase		6.0	31.2
Xylanase		15.5	33.0
Mannase		3.8	4.8
Sucrase		3.2	6.4
Alginase		6.6	8.3
Lipase	cc of 0.1 N KOH soln.*	0.05	0.25
Esterase		1.7	0.95
Protease	cc of 0.1 N NaOH soln.**	0.1	?
Catalase	cc of 0.01 N KMnO ₄ soln.	?	1.8

* : Acidity

** : Formol titraion

茲で木材中に真正の澱粉が含有されるか否かは疑問であるが存在しても微量であろう。何れにしても両酵素共にアミラーゼは予想以上に強いものである。又「ふなくいむし」が木材の主要成分たるキシランを消化利用し得る事は想像されるが、実験の結果では他の多糖類分解能に比しより強力なる分解能を有する。この事は斯る種類の異常食性動物が六炭糖系の繊維素を分解吸収する以外に更により一層高度に五炭糖たる ペントーザンを熱源として利用し得る事を想像せられた。白蟻の木材消化について山藤・稲岡⁽⁹⁾も同様の傾向を報告している。

3. 各種繊維質物に対する酵素及び細菌の作用

Table 2 に示す如く細菌酵素と内臓酵素では各基質に対して殆んど同様の分解を示し材

Table 2. Digestive influence of emzymes and bacteria over various cellulose-materials

Substrate		Cellulase from bacteria	Cellulase from organs	Bacteria			
		Reducing sugar (mg %)	R. S. (mg%)	Decompn. ratio (w. %)	pH of media		
					Initial	Final	
Filter paper		9.5	6.1	38.4	22.91	6.0	5.8
Hydrocellulose		8.7	7.2	55.6	22.81	6.0	5.8
Absorbent cotton		2.5	2.5	3.7	7.14	6.0	6.0
Sulfide pulp		6.5	6.0	39.5	18.50	6.0	6.0
Soda pulp		6.1	5.0	25.1	34.62	6.2	6.2
Semichemical pulp		15.9	19.4	6.0	14.30	6.0	6.4
Japanese cypress	Original wood (13 mesh/inch)	1.0	5.2	1.4	0.0	5.8	5.8
	Treated wood (by boil. water)	0	4.3	4.6	0.30	5.8	5.8
	" (by 1 % NaOH soln.)	0	2.5	1.6	3.10	5.8	6.0
	" (by EtOH and benzene)	2.5	4.0	1.0	1.13	5.8	5.8
	Delignificated wood -I	5.2	7.5	3.9	0.0	5.8	5.8
	" -II	7.0	11.5	5.0	0.82	5.8	5.8
	" -III	7.5	12.2	6.0	0.0	5.8	5.8
	Powdered wood (60 mesh/inch)	5.2	6.0	1.3	0.0	5.8	5.8
	" (150 mesh/inch)	6.2	9.7	3.1	0.10	5.8	5.8
Pasania cuspidata	Original wood	8.7	10.7	0.0	0.0	5.8	5.8
	Treated wood (by boil. water)	1.0	2.5	0.3	0.0	5.8	5.8
	" (by 1 % NaOH soln.)	6.5	7.5	4.4	0.0	5.8	5.8
	" (by EtOH and benzene)	4.0	4.0	0.6	0.20	5.8	5.8
	Delignificated wood -I	28.4	28.4	1.5	0.62	5.8	5.8
	" -II	32.0	34.7	3.3	1.45	5.8	5.8
	" -III	42.2	37.0	17.2	2.14	5.8	5.8

Table 3. The constituents of the pulps and woods used as substrate

Sample	Ash	Extract by EtOH and benzene	Pentosan	Total cellulose	Lignin
Soda pulp	0.91	1.14	21.28	94.09	9.26
Semichemical pulp	—	—	14.00	74.91	21.14
Camphor tree	0.48	4.80	18.29	41.09	26.00
Japanese cypress	0.43	2.03	9.12	54.72	29.06
Pasania cuspidata	0.42	6.75	16.93	53.10	19.06

質の粉碎度及び脱リグニン程度が増加により分解も増し、又純粹の纖維素よりも ペントーザンを含む状態の基質の方が分解生成還元糖量は多い。之はキシラーゼが他の多糖類分解酵素よりもより強力なる事実から肯定される。一般に木粉、脱脂綿の如く自然状態に近い纖維質に対する分解は少い。更に各基質の状態から推して材質中の纖維素とリグニンとの結合を緩めるか又は除去し、或は機械的に粉碎して纖維素部分の露出を大きくする程酵素

的分解が容易である事が云えよう。細菌による分解作用も略々同様で、只、材質のリグニン結合度及び粉碎度が分解作用に及ぼす影響は酵素作用の場合に比しより顕著に現われるが、之はそれらの処理が細菌の侵入及び発育に影響し、延いては酵素生産と分解作用に大きく影響を与えるためと思われる。

4. pH 曲線の比較

細菌セルラーゼと肝臓から抽出した内臓セルラーゼとの関係を知るために両者の pH 曲

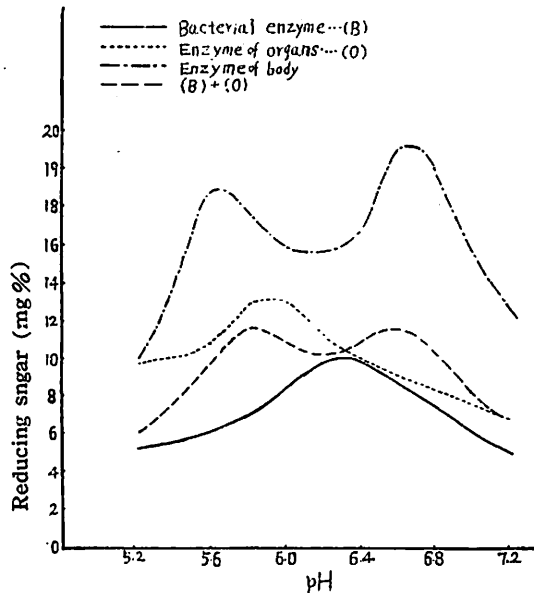


Fig. 2 The relation between optimum pH of cellulase in organs and bacteria.

線を比較した処 Fig. 2 の如き結果を得た。即ち前者では pH 6.4、後者では pH 5.8 が夫々の至適 pH でその間に若干の差異が認められ、又この両酵素混合物では pH 5.8 と 6.6 との 2 点に、更に「ふなくいむし」体全体から抽出した酵素剤では pH 5.6、6.6 の二点に夫々の至適 pH が認められた。精製不十分なる酵素剤ではあるが之等の実験結果より推論すれば「ふなくいむし」体内には肝臓に由来するセルラーゼと細菌に由来するセルラーゼ、即ち他の酵素系に見られる如き α β 的な二種のセルラーゼが存在するのではないかと考えられる。従つて「ふなくいむし」の消化生理作用に関しては細菌酵素と内臓酵素とが共同作用により消化機能を営むものと推察せられるが、此点の詳細については尙追試中である。

要 約

内臓酵素、細菌酵素共にキシラナーゼが最も強く、セルラーゼ、アミラーゼが之に次ぎマンナーゼ、アルギナーゼ (Alginase) エステラーゼの存在も認められた。斯様にキシラナーゼが最も強い事より六炭糖に代り五炭糖をより高度に利用する事が推定せられる。プロテアーゼ、リパーゼの存在は疑わしく、又内臓酵素にはカタラーゼを認めたが細菌酵素

には認め得なかつた。

各種繊維質物の分解については材質の繊維素とリグニンとの結合破壊状況と粉碎度に比例して分解し、この関係は細菌の分解作用に特に顕著に影響する。

セルラーゼの pH 曲線では、細菌酵素では pH 6.4, 内臓酵素では pH 5.8 に夫々の最適 pH が認められ、上記の種々の事等により細菌セルラーゼと内臓セルラーゼとはやや性質が異なる二種のもので、“ふなくいむし” 体内では両者の共同作用により消化生理に関与するものの如くである。

最後に臨みパルプ試料を分譲下さいました鹿児島樟脳試験場次長、倉岡氏に深甚の謝意を表する。

Résumé

In the previous works we reported about the enzyme of the cellulose decomposing bacteria isolated from ship-worm.

In the present papers the authors treated the experiments carried out to find out the proportional relation between the Cellulase of bacteria and that in the body of ship-worm with the following results. (See Table 1, 2, Fig. 1, 2).

In the two prepared enzymes extracted from the ship-worm liver and from bacteria, the activity of Xylanase was more effective than in the case of other Polyase, the action of Protease and Lipase being very faint. The existence of Catalase in the bacteria was not confirmed.

As to the enzymatic hydrolysis of various cellulose by these two Cellulases, the regenerated cellulose (e.g. filter paper and Soda-pulp) was decomposed far more easily than the native cellulose (e.g. absorbent cotton), and the action of them to the woods was showed to be done in proportion to the degree of powdering and delignification.

The optimum pH of bacterial Cellulase was found to be 6.4 and that of ship-worm enzyme to lie at the two points of 5.6 and 6.6. (See Fig. 2).

From these results, the existence of some influences of the bacteria over the cellulose-decomposing action in the body of ship-worm was conjectured.

文 献

- (1) 岡田：木造船虫害防除研究者連絡通信，No. 11，p. 14~16 (1946).
- (2) 橋本，小野周：日水誌，15，(5) 253~258 (1948).
- (3) 日高：鹿大水産学部紀要，3，(1) 149~157 (1953).
- (4) 齊藤，日高：日水誌投稿済.
- (5) 齊藤：光電比色計による臨床化学検査，3版，南山堂，東京，144 (1952).
- (6) 京大：農芸化学実験法，下，産業図書，東京，841 (1951).
- (7) JAMES B., SUMNER: The Enzymes I p.731 (1951).
- (8) 福本，岸：科学と工業，26，295 (1952).
- (9) 山藤，稲岡：日農化，24，343 (1951).