

納豆菌の Gelatinase について (第3報)*

Gelatinase 両作用の変動について

蟹江松雄・森原和之・木佐貫操

I. 緒 言

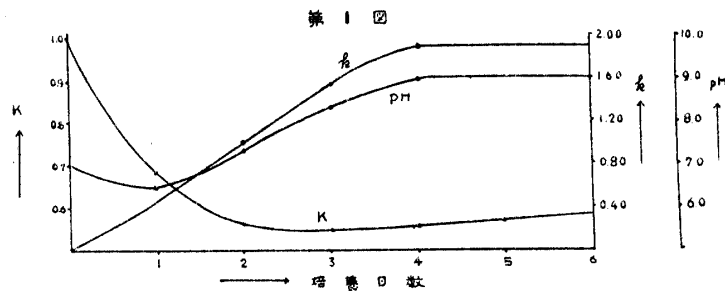
前報¹⁾において納豆菌 No. 8 の gelatinase 中には phenylhydrazine に対する行動を異にする二酵素が存在して、各その作用に特徴のあること、従つてその組成比に変動を来した場合には全体の酵素作用の測定を一作用だけですることは危険であることを指摘した。一方細菌の protease 系が培養条件に応じて生産される酵素の種類と量を異にするという報告は数多い。²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾ 本報では二三の培養条件における培養液について粘度の低下度 (K) 及びアミノ酸生成量 (k) を測定して両酵素の生成状態を検討した。

1. 実験及び考察

培養液は 5% 大豆粕浸出液⁶⁾を用い、酵素液は培養濾液を使用し、K 及び k の測定は前報¹⁾に従つた。

(1) 培養日数と gelatinase の両作用

培養日数を異にした培養液の酵素力価を測定した結果は第 1 図に示す通りである。



菌の増殖は 3 日目頃最高に達し、それ以上は変化なく 5 日目頃から皮膜が沈降し始める。図から粘度の低下作用 (K) は培養 2~3 日目に最高に達するが、アミノ酸の生成作用 (k) は 4~5 日目頃最高に達し、各の力価が最高値を示す時期に 1~2 日のズレのあることが判る。両作用が並行的に高められないことは繁殖の初期において特にはつきりしており、皮膜形成直後 (培養 15 時間位) の培養液について測定すると既に相当の K 値を示すに拘わらず k は殆ど零であるという結果に屢々遭遇した。

以上の事実から gelatinase の酵素組成は培養日数によつて変動があるだろうことが予想される。そこで 1 日, 3 日, 5 日間培養の酵素液について前報¹⁾の如く, phenylhydrazine 1.0% の

* 第 2 報, 第 3 報は昭和 25 年 5 月日農化大会にて講演済。

存在及び無添加において生成したアミノ酸の $\text{NH}_2\text{-N}$ 量を測定し gelatinase I 及び II に分配すれば第1表の如くである。

第1表 培養日数を異にした培養液の酵素力価比 (アミノ酸生成量 k 及び生成比 %)

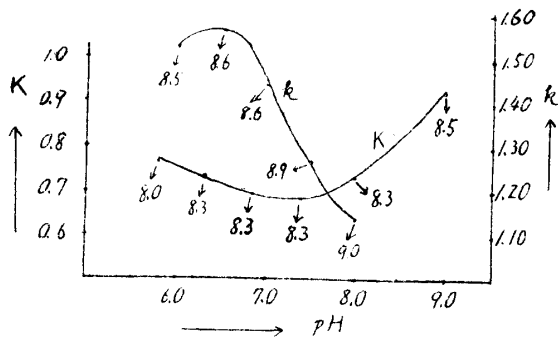
酵素の種類	1 日		3 日		5 日	
	k	生成比	k	生成比	k	生成比
I	0.02	5	0.19	12	0.46	24
II	0.42	95	1.38	88	1.44	76

即ち繁殖の初期においては gelatinase I の生産は極僅かであるが培養の進行につれて増加する割合は II より大である。これに反して II は既に培養の初期において多量に生産され以後の増加度も余り大きくない。I と II は明かに生成の時期を異にするものと考えられる。

(2) 培養液の始発 pH と gelatinase の両作用

各種 pH に調節した 5% 大豆粕培養液に同種培養液に 2 回馴養した菌を接種培養して両作用を測定した結果は第2図の如くである。

第2図



K ; 3日間培養液
k ; 5日間培養液
→ ; 測定時の培養液のpH

左図から両作用に対する始発 pH の傾向はやゝ異なることを知る。即ち粘度低下作用は pH 7.0 ~ 7.5 附近の始発 pH を最適とし、アミノ酸生成作用は pH 6.5 附近のそれを最適とする。始発 pH が 7.0 ~ 7.5 の 1 ~ 2 日目の培養基の pH は 6.5 ~ 7.5 であり、始発 pH が 6.5 附近の 2 ~ 3 日目の pH は 7.5 ~ 8.2 であつて、夫々この時期に gelatinase II 及 I が生産されると思われる(1)の結果から、両酵素の生成される最適の pH は多少異り、gelatinase II は

I より幾分酸性条件を好適とするものであると推論出来る。

(3) 培養温度と gelatinase の両作用

各種温度で培養し日数の経過と共に gelatinase の両作用を測定した結果は第2表及び第3表の如くである。

高温における力価の減少が粘度低下作用において著しいのはこれを主として司る gelatinase II が耐熱性において劣つている事実と一致する。¹⁾又 K の価から gelatinase II の生成には 37° が最適

第2表 各種培養温度における粘度低下作用

培養温度 (°C.)	2 日			3 日			4 日		
	皮膜	pH	K	皮膜	pH	K	皮膜	pH	K
30	卍	7.5	0.919	卍	7.9	0.715	卍	8.0	0.691
37	卍	7.8	0.723	卍	8.3	0.650	卍	8.3	0.666
40	卍	7.8	0.852	卍	8.3	0.765	卍	8.4	0.793

第3表 各種培養温度におけるアミノ酸生成作用

培養温度 (°C.)	2 日			4 日			6 日		
	皮膜	pH	k	皮膜	pH	k	皮膜	pH	k
30	卍	7.7	0.10	卍	8.5	0.85	卍	8.7	1.06
38	卍	8.0	0.16	卍	8.7	0.95	卍	8.7	0.95
45	卍	8.3	0.35	卍	8.7	0.73	卍	8.7	0.70

と思われるが、これに対し gelatinase I は k の値からむしろ 30°C. 辺が好適と思われる。II が熱に弱い性質を考え合わせる時このことは一層確実となる。

以上の如く gelatinase の両作用は培養日数から見ても、始発 pH から見ても、又培養温度から見ても並行的な変動を示さず、前報¹⁾で指摘した gelatinase I 及び II が夫々幾分異つた条件下で生成されることを結論せしむるものである。

これ等の結果から当然培養基の組成も亦両酵素の生成に変動を与えるものと予想されるが次の如き二三の条件では変動を見出すことは出来なかつた。

培養基その1; 大豆粕濃度を変えた場合 (第4表)

第4表 大豆粕濃度の影響

大豆粕濃度 (%)	3 日				5 日			
	皮膜	pH	K	k	皮膜	pH	K	k
1	±	5.7	1.000	0.00	±	6.0	0.981	0.23
5	卅	8.0	0.689	1.33	卅	8.6	0.718	1.70
10	卍	8.0	0.614	2.38	卍	8.6	0.630	2.59
20	卍	8.2	0.494	2.64	卍	8.6	0.587	3.01

濃度が大となるに従つて K, k 共に増大する。

培養基その2; 5% 大豆粕培養基に NaCl 添加 (第5表)

第5表 食塩の効果

NaCl (%)	3 日		5 日	
	K	k	K	k
0.0	0.765	1.90	0.833	1.82
0.5	0.792	1.52	0.847	1.79
1.0	0.780	1.87	0.809	1.96
2.0	0.965	0.80	0.917	0.94

2% NaCl の存在では増殖並びに両作用共抑制され 1% 以下では両作用共殆ど影響は見られな

い。
培養基その3; 5% 大豆粕培養基に CaCO₃ 添加 (第6表)

培養基その4; 5% 大豆培養基に磷酸塩添加 (第7表)

第6表 炭酸石灰の効果

CaCO ₃ (%)	3 日		5 日	
	K	k	K	k
0.00	0.732	1.40	0.779	1.64
0.10	0.630	1.82	0.666	2.40
0.20	0.621	1.86	0.640	2.48

第7表 磷酸ソーダの効果

Na ₂ HPO ₄ (%)	3 日		5 日	
	K	k	K	k
0.0	0.745	1.49	0.772	1.57
0.5	0.702	1.58	0.683	2.31

CaCO₃ の添加は無機培養基では gelatinase の生成に不可欠の条件であつたが⁵⁷⁾、大豆粕培養基においても効果のあることを認めた。然しこの場合も両作用共に増加を認めた。

磷酸塩の効果は Moycho⁸⁾ の結果とは反するが深部培養による加茂氏等⁹⁾の結果と一致する。然しこの場合もどちらか一方の酵素生成により有効であるという結果は得られなかつた。

II. 要 約

納豆菌 No. 8 を 5% 大豆粕浸出液に培養した培養液の gelatinase 力価を粘度低下度とアミノ酸生成量とから測定して、

(1) 粘度低下作用は培養の初期に著しい増加を見るが、アミノ酸生成作用は1~2日遅れて著しい増加を見る。

(2) 培養基の始発 pH については粘度低下作用は 7.0~7.5 附近を、アミノ酸生成作用は 6.5 附近を最適とするが、酵素の生成される時期の pH は前者では 6.5~7.5 後者では 7.5~8.2 である。

(3) 粘度低下作用は 37°C に培養された時最も大きな値を示すが、アミノ酸生成作用は 30°C 辺での培養が好適である。

結果から粘度低下を主として司る gelatinase II はアミノ酸生成作用の大きい gelatinase I に比較して培養のより早期に、より酸性条件で、且より高温培養で生成されることを推論した。

又培養基の組成と両酵素の変動との関係を見出そうとして、(1) 各種の濃度の大豆粕培養基、及び 5% 大豆粕培養基に (2) NaCl の添加、(3) CaCO₃ の添加、(4) Na₂HPO₄ の添加を試みて両作用を測定した。その結果大豆粕は濃度の異なる程、又 (3) (4) は何れも添加時に力価の上昇を見たが、増加は並行的で一作用の生成丈に特に有効な培養基の組成を見付けることは出来なかつた。又 1% 及びそれ以下の食塩の添加の効果は見られなかつた。

文 献

- 1) 蟹江・森原; 鹿大農学部学術報告 **1**, 80 (昭27)
- 2) A.I. Virtanen and J. Tarnanen; *Z. physiol. chem.* **204**, 247 (1932)
- 3) G. Gorbach and E. Pirch; *Enzymologia* **2**, 92 (1937)
- 4) A.I. Virtanen and O. Suolahti; *Enzymologia* **2**, 89 (1937)
- 5) A.T. Merrill and W.M. Clark; *J. Bact.* **15**, 267 (1928)
- 6) 福本; 日農化 **19**, 789 (昭18)
- 7) 蟹江・森原; 鹿農専学術報告 **15**, 104 (昭24)
- 8) C. Oppenheimer; *Die Fermente und ihre Wirkungen* **II**, 949
- 9) 加茂・火口; 醸酵工学 **28**, 201 (1950)

Résumé**On the Gelatinase of *Bac. natto*.****III. Dissimilarity of Production of the Gelatinase Components.**

Matsuo KANIE, Kazuyuki MORIHARA and Misao KISANUKI

Both the liquefying and the amino acids forming actions of the gelatinase activity of the cultures of *Bac. natto* No. 8 on 5% soy bean cake extract were measured and it was observed that:

(1) the former action was markedly increased at the early stage of incubation, while the latter was delayed by 1–2 days, (2) the former was displayed most actively with the cultures of initial pH 7.0–7.5, while the latter pH 6.5, but pH at the period when the liquefying activity increased was 6.5–7.5 and the corresponding pH in the case of the amino acids forming activity was 7.5–8.2 and (3) the strength of the former was more remarkable when incubated at 37°C., while the latter was at 30°C. From these results gelatinase II (liquefying enzyme) is suggested to be produced at earlier stage, in more acidic medium, and at higher temperature than gelatinase I (amino acids forming enzyme).

The modification of the media to stimulate the production of only one of the gelatinase components was attempted, by means of increase of the concentration of soy bean cake extract and addition of CaCO_3 or Na_2HPO_4 to 5% soy bean cake extract. Every mean fairly increased both activities, without having the effect restricted to the single one. Effect of NaCl added to and under one per cent was not apparent.