

“ふなくいむし”の消化管内繊維素分解菌に関する研究—II.

細菌セルラーゼについて

日高 富男・斎藤 要

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

On the Bacterial Cellulase

Tamio HIDAOKA and Kaname SAITŌ

緒 言

従来“ふなくいむし”の木材消化については内臓酵素に関する研究に止つていたが、前報¹⁾において著者の一人は“ふなくいむし”の消化管内より分離した繊維素分解菌の細菌学的性質と、該菌が“ふなくいむし”の木材消化に関与し得る可能性について報告した。ところでセルラーゼに関しては最近或種の草食動物及び微生物等にとって消化生理上重要な意義を有する事より多くの研究がなされている。細菌セルラーゼの研究に当りこれを初めて cell-free に得たのは SIMOLA¹⁾であるが最近 WHITAKER²⁾は *Myrothecium* 属の細菌セルラーゼを硫酸とアルコールにて精製し粉末状として得ており、又岡本等³⁾は *Pseudomonas* 属の細菌より硫酸塩析法にて、西沢等⁴⁾は *Irpex* のセルラーゼを活性アルミナ等により吸着分離し、更に福本等⁵⁾も該セルラーゼを硫酸塩析法とアセトン沈澱法を併用して夫々セルラーゼの精製純化を試みたが、一般に部分的精製の域を脱し得ない現状であり、酵素の特性の究明も粗酵素剤での研究が多い。著者等もさきに分離した *Cellvibrio* 属菌のセルラーゼに若干の精製を施し、之について酵素の特性を検索して一、二の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 使用菌株 供試菌株は“ふなくいむし”の消化管内より分離した繊維素分解菌であつてその菌学的性質から *Cellvibrio* 属に属すべき菌株である。

2. 培養基及び培養法 培養基の組成は NaCl 1.0%, NaNO₃ 0.1%, MgSO₄ 0.3%, MgCl₂ 0.3%, K₂HPO₄ 0.1%, KCl 0.05%, FeSO₄ 0.001% であり之に繊維素源として粉碎濾紙 1%量を懸濁するか、又は 3%量の濾紙片を懸垂した。培養温度は 28°C、培養期間は 10 日前後である。

3. セルラーゼの力価測定法

基質：ヒドロセルローズを M/15 磷酸塩緩衝液 (pH 6.2) に 0.5%量懸濁させたものを用いた。

反応条件：基質 5 cc + 酵素液 5 cc を 37°C で 24 時間作用させて、作用後反応液中の還元糖量の増加を FOLIN WU のグルコース比色定量法⁶⁾にて測定し生成グルコース量より酵素単位を算出した。

酵素単位：上記反応条件におけるグルコースの生成量より算出し、セルローズ 25 mg よりグルコース 0.025 mg を生成するに要する酵素量を 1 単位とした。

実験結果及び考察

I. セルラーゼの生産条件

前報⁷⁾において該菌の発育に対する温度、pH、無機塩、窒素源等の必須条件を検討した際の肉眼的観察では、大体菌の発育程度に比例して培養基中の濾紙片の分解も大である事を認めている。今回は更に該菌が好気性である事より、空気との接触量を異にする各種の培養法を試み、セルラーゼを生産するに好適の条件を検索した。即ち通気培養又は振盪培養によつて菌の発育が促進される事が予測されるので、前記培養基を 300 cc 容 フラスコに 100 cc 宛分注し、それに 3 g の濾紙片を液面上に 1/3 程度出るような状態で懸垂させ静置培養するものと、別に粉碎濾紙を 1 g 懸濁させたものについて通気、振盪、静置の各種培養するものとを夫々 28°C にて培養し、培養後所定日数毎に夫々の培養液中のグルコース量と併せてその培養液をそのまま酵素液としてセルラーゼ活性度を

測定した。その結果は Fig. 1 の如くである。一般的に云つて細菌が培地中で発育する場合、その細胞物質の形成と培地中の物質の破壊との両作用が行われ、それ故発育している細胞の外では水解をうけている物質もあれば細胞内で合成されている他の物質も存在する。本実験の結果では培養日数の経過に伴い酵素力価は増加するし、同時に濾紙片を分解し生成するグルコース量も増加した。これらの増加は或日数後最高に達し、それ以後酵素力価もグルコース量も減少した。しかもこの過程は酵素力価が最高になつてから 1~2 日間のずれをもつて液中のグルコース量は最高値に達する結果となつている。こ

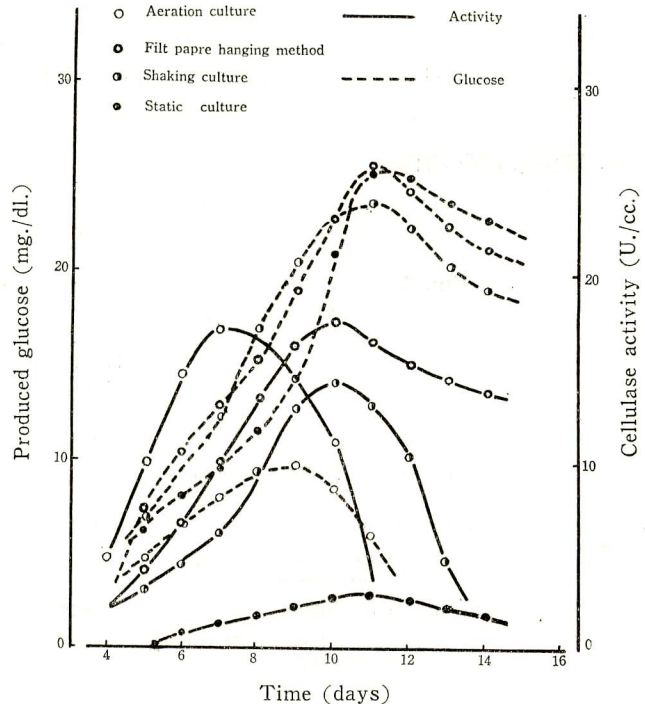


Fig. 1. Influences of culture method on the cellulase production

の現象から発育初期の培養液には殆んどその酵素活性はなく、培養に伴う菌の発育により酵素は次第に作られその作用によつて培養基中の濾紙を分解して生成グルコース量は漸増する。そしてそれらの量は細胞分裂が停止する時期に最大となる傾向が見られた。細菌の発育中に培養基の理化学的性質が細胞の物質代謝によつて常に変化し、培養基中のグルコースが或時期に減少し始める原因としては、グルコースが高分子化合物に変化する合成過程とより低分子のものに分解する過程とが考えられるが、この種の菌は一般に酸化細菌として知られているから後者の過程がより有力なものであろう。又菌の発育過程によつて培養液の酵素量が著しく変化し、

特に発育が弱つた後に酵素活性が低下する傾向がみられるのは、細胞が死滅して酵素蛋白質自体の変性や自己消化等が起るためであろう。

グルコース量と酵素力価との関係を夫々の培養法についてみれば、その間に大きな相違がみられた。即ち空気接触量の大きい通気培養法では培養液中のグルコース量は極めて少いが酵素力価は高く、その力価は培養後7~8日間で、グルコース量は培養後9日間で夫々最高に達している。静置法では通気法とは逆に酵素力価は低くグルコース量は高くなっている。その最高期は培養11日後であつた。又濾紙懸垂法、振盪法ではかなり空気接触量が大なる為、通気法に類似した結果が得られた。斯様に空気接触量の異なる培養法で培養液中のグルコース量に対し酵素力価は大である。これらの事より酵素の生産は培養条件が好氣的である程良好で、その条件においてその培養液中の濾紙片はグルコースより更に低分子のものに分解せられる事が推察される。培養基のpHは5.8~6.0で培養経過によるpHの変動はpH値にして±0.2程度であつた。

以上述べた如く通気法と濾紙懸垂法とでは殆んど同程度の酵素生産を示すが、最高値に達する迄に懸垂法では11日間であるのに対し通気法では7日間で、培養時間を著しく短縮する事が出来る。しかし培養操作の簡便さにおいては懸垂法がまさる。

II. 細菌酵素剤の調製法

前述の如くセルラーゼの精製は部分的精製に止まつているが、本実験でも精製細菌セルラーゼの性質を知る為と酵素活性保持の目的で若干の精製を施して粉末剤として保存し実験に供し

Fig. 2. General scheme for preparation of cellulase from the cultur solutions.

	Total Volume (cc.)	Activity (U./cc.)	Total activity (U.)	Cellulase yield (%)
Cultur solutions	1250	15.4	19250	100
Centrifuged (3500 r.p.m), 15 min.				
Bacterial cells (dumped)	1248	15.2	18969	98
Supernatant				
Vacuum concentration, at 35~37°C.				
Concentrated solution	640	23.8	15232	79
Acetone added to 40 vol. %, chilled				
Precipitation (dissolved)	50	25.2	1275	6
Supernatant				
Acetone added to 60 vol. %, chilled				
Supernatant (dumped)	50	155.1	7305	38
Precipitation (dissolved)				

た。その精製法及び収量は Fig. 2 の如くである。

濾紙懸垂法にて11日間培養した液を3,500 r.p.m.にて15分間遠心沈澱し、その上清液を37°Cで約1/2量に減圧濃縮した後、所定量の冷アセトン添加によつて2部の分別沈澱物を得た。この中アセトン40~60%での沈澱区分はセルラーゼの純度高く、アセトン量40%以下

の沈澱区分の約5倍の力価を有する白色粉末である。この酵素精製操作における酵素収量は38%前後であり、この処理により培養液そのまゝの酵素力価に比し、10倍程度の力価を示す安定なる製剤を得た。

III. セルラーゼ作用に及ぼす pH と温度の影響

上記酵素剤を0.5%に溶解して酵素液として使用し、二、三の酵素的性質を検討した結果はFig. 3及び4の如くである。

先づFig. 3は前述の作用条件で24時間反応させた場合の温度曲線であるが35~40°Cでは活性度の差は少く、37°Cが最適温度であつて、55°C以上では活性度は急激に弱まつた。又所定温度に10分間加熱した時の安定度曲線では50°C以上の加熱から急速に破壊されて、60°Cで1/2、70°Cでは殆んど破壊されてしまう結果になつている。なお低温に対しては-8°C位で緩慢凍結しても酵素力価の損失は見られなかつた。次にFig. 4は常法による酵素活性のpH曲線であつて、この結果より作用の最適はpH 6.2~6.4である事が知られた。又酵素液のpHをN/10 NaOH又はN/10 HClで各種の所定pHとし、30°Cで12時間放置した後各々pHを6.2に調整して活性度を測定した結果、pH 5.8~7.0の間では差異がないがpH 4.5以下とpH 7.8以上においては漸次活性度は弱くなり、特にアルカリ側においては破壊の度合が大きかつた。

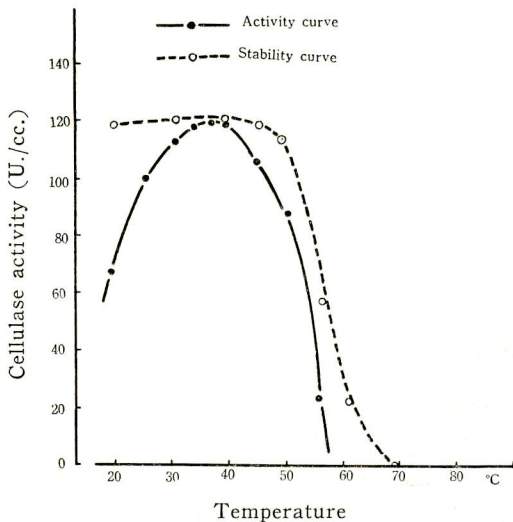


Fig. 3. Influences of temperature on the cellulase activity of bacterial enzyme

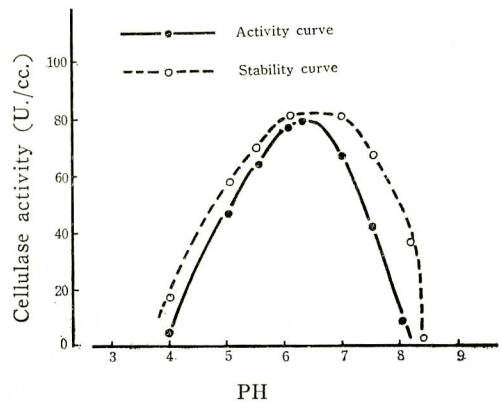


Fig. 4. Influences of pH on the cellulase activity of bacterial enzyme

IV. セルラーゼ活性に及ぼす金属塩の影響

従来 Irpex のセルラーゼが Mn^{++} によつて著しく活性化される事が知られているが本セルラーゼについても Mn^{++} 及び数種の金属塩の影響を調べた。即ち反応液に対して各種塩類濃度が夫々 M/50~M/1,000 になる如く添加し常法の如く力価を測定し、無添加の力価を100として活性度比として表わしたものはTable 1の如くである。 Mn^{++} によつて若干の賦活作用が見られるが Fe^{++} では M/200 以上では返つて阻害作用があり、 Cu^{++} では M/1,000 でも阻害し、M/200 以上では殆んど活性がみられなかつた。之等塩類の影響は該酵素の純度、又は酵

素濃度等の因子が関係し一概には云えないが、本細菌セルラーゼは Mn^{++} による賦活作用が *Irpex* のセルラーゼよりも弱いものと考えられる。

Table 1. Effect of Mn^{++} , Cu^{++} and Fe^{++} on the cellulase activity*

Ions**	Conc. (Mol)	1/1000	1/500	1/200	1/100	1/50
Mn^{++}		110	110	120	130	130
Fe^{++}		120	110	91	91	59
Cu^{++}		94	40	0	0	0

* Relative values for the activity (100) of enzyme solution without adding above salts.

** Sulfate.

要 約

“ふなくいむし”の消化管内より分離した *Cellvibrio* 属菌の細菌セルラーゼの生産条件及び該セルラーゼの二、三の性質を検索し次の結果を得た。

1. 該菌は好気性菌であり空気接触量が大なる程酵素生産は増大した。
2. 該菌セルラーゼのアセトンによる分別沈澱処理を行つた処、アセトン量 40~60% の沈澱処理により高純度の粉末製剤が得られた。
3. 本セルラーゼの最適温度は 37°C で最適 pH は 6.2~6.4 であつた。40°C 以下の温度ではその活性は安定であるが、50°C 以上で急激に破壊される。又 pH 4.5 以下 pH 7.8 以上では不安定となる結果であつた。
4. 該セルラーゼの本実験条件下における Mn^{++} の賦活作用は微弱であつた。

本研究に際し種々御指導を賜つた本学高田幸二教授に深甚の謝意を表する。

R é s u m é

In the present paper, the authors studied on the productive process and enzymic property of bacterial cellulase of Genus *Cellvibrio* isolated from the digestive organs of ship-worm. And the following results were obtained.

- 1) The enzyme productivity of the bacteria under cultivation becomes higher in proportion to the increase of the air dimension touched with the bacteria.
- 2) By using precipitation method with acetone 40-60% the cellulase is to be highly purified from the culture solution.
- 3) The optimum pH of the cellulase lies within the range of 6.2-6.4, and 37°C. is its optimum temperature.

Its activity is stabilized, under pH 5.8-7.0; but it begins to decrease at pH 4.5 and pH 7.8 respectively.

Though its stabilization is kept firm, under low temperature; its denaturalization begins on being boiled, for 10 minuts, above the temperature 65° C.

文 献

- 1) P. E. SIMOLA: “Über den Abbau der Cellulose durch Microorganismen” (1931), (文献 3 より引用)
- 2) D. R. WHITAKER: *Nature*, **168**, 1070 (1951).
- 3) 岡本辰夫, 朝井勇宣: 農化, **26**, 137 (1952).
- 4) 西沢一俊, 小林敏雄: 農化, **27**, 239 (1953).
- 5) 福本寿一郎, 岸 清: 科学と工業, **26**, 295 (1952).
- 6) 齊藤正行: 光電比色計による臨床化学検査, 3版, 南山堂, 東京, (1952), pp. 144.
- 7) 日高富男: 本誌, **3**, (1) 149 (1953).