

納豆菌の Gelatinase に就いて (第1報)

教授 蟹 江 松 雄
講師 森 原 和 之

I. 緒 論

細菌プロテアーゼが基質の種類及び環境の相違に依り酵素生成能及び酵素の種類に相違を來たす事は古來幾多の研究者に依り報告されている。

Fermi (1892) は培養基のN一源として蛋白質ならばゼラチナーゼの生成を見るがそれ以外では殆ど生成されぬ事を報じ, Drummond¹⁾ (1914)はペプトンより低分子のN一源にてはプロテアーゼの生成を見ずと發表している。Diehl (1919) がアミノ酸はプロテアーゼ生成に必須なるN一源であり且つアミノ酸の種類にて異なるプロテアーゼが生成すると云う説を提出しているのに對し, Wilson²⁾ (1930)は *B. subtilis* に就いて再検討しその事を確認する事はできなかつたと云つている。多くの研究者の一般的結論としてN一源として有機態—Nにてはプロテアーゼの生成を見るが無機態—Nにては増殖はするがプロテアーゼの生成は認められないと云う。それに対して Merrill & Clark³⁾ (1928)は *B. proteus vulgaris* を NH_4Cl 合成培養基にて培養したが、非常なる増殖は認められるがプロテアーゼは全然生成しなかつた、然るに 0.05% CaCO_3 及び 0.05% MgSO_4 と添加すると大なるゼラチナーゼの生成を認め、無機態—N培養基に於けるCa, Mgのプロテアーゼ生成に異常なる効果の示す事を報じ, Malfitano⁴⁾ (1900)の繁殖とプロテアーゼ生成が平衡關係にあると云う説に對しバクテリア數の増加はその決定的因子ではないと述べ、且つ好氣状態を好み培養表面の空氣に接する面積及び液の深さがその生成を左右し、嫌氣状態にすると殆ど生成を見ないという事から

- ① 培養基の性質
- ② 塩類含量 (Ca, Mg)
- ③ 空氣酸素の利用率

の三條件がプロテアーゼ生成の決定的因子である事を報じている。Waksman は *Asp. niger* に就いて 葡萄糖—ペプトン培養基がペプトン培養基よりも protease 生成に良好である事を認め、Raistrick & Clark⁴⁾は *B. coli* に就いてグリセリンの効果を報じている。又培養基のpHは Abbott & Gildersleeve⁵⁾ (1903)は酸性側にて良好なる生成を認め、Clark (1929)は *Proteus bacteria* に就いてそのプロテアーゼの最適pHにて最高の生成を見ると云つている。

我々は甘藷澱粉の品質向上の爲に澱粉には作用しないで、つまりアミラーゼを分泌しないで不純物特に分別不能の微量蛋白質を分解溶解せしめる細菌を検索し、その酵素液が蛋白除去に著効を呈する納豆菌 No. 8 を分離した。該菌のプロテアーゼ生成に就いて研究せんが爲に基質としてゼラチンを用い先づゼラチナーゼの測定法を確立し次に培養基の種類及び外圍の條件に依るゼラチナーゼ生成の影響を調べ Merrill & Clark の説を検討した。

I. 實 驗

(1) ゼラチナーゼ測定法

ゼラチナーゼ測定法として Clark 法をあげる事ができるが、我々はゼラチン液化に依る粘度の減少度を Ostwald の粘度計で計り、次の如くにしてその力價を決定した。

a) ゼラチン標準液の調整

一定量のゼラチンを水に 5~6 時間浸漬し軟化せしめた後湯煎にて 40°~50°C 位に暖め溶融し水を加えて 7.5% 液となし防腐劑として 0.5% の石炭酸を添加して標準液とした。

b) 酵素液及びコントロール液の調整

細菌培養液を遠心分離器で分別し液を酵素液となし、これを E 液と呼ぶ。又コントロールとしてその酵素液を煮沸 15 分で酵素を破壊した液を作り之を C 液と名付けた。

c) 酵素力價の測定法

ゼラチン標準液と E 液とを混じ作用せしめた後、その液 5 c.c. を Ostwald の粘度計に注加し、流下時間を計りその秒數を E としその比粘度を決定した。併しゼラチン粘度は pH 時間等によつて變化するから比粘度丈の測定ではゼラチナーゼによるゼラチン液化度を知る事はできない、よつてコントロールとして E 液と同一條件にて C 液に依る流下時間 C (秒) を求めた。而して次式でゼラチナーゼ力價を決定した。

$$K = \frac{\text{酵素作用液の比粘度}}{\text{コントロール液の比粘度}} = \frac{E}{C}$$

A) 酵素作用の最適 pH

15c.c. のゼラチン標準液及び 5 c.c. の E 液との混合液をつくり、各種濃度の NaOH 又は HCl 2c.c. 宛注加して pH を調節し、30°C、18 時間作用後各種濃度の NaOH、HCl 2c.c. 宛で中和し温度 25°C にてその粘度を測定した。又 C 液に就いても同様に行つた。

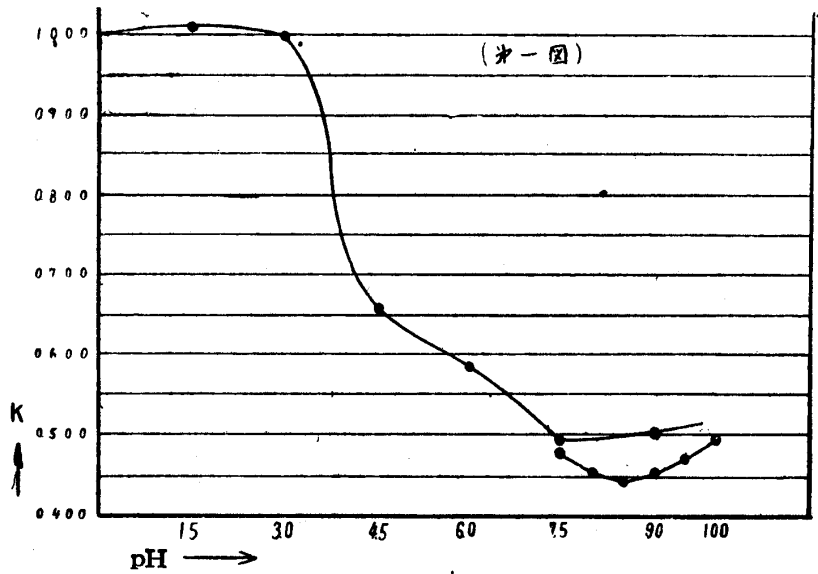
第 1 表

pH	E(秒)	C(秒)	K
1.5	60.7	60.0	1.0117
3.0	62.4	62.6	0.9968
4.5	048.	73.0	0.6575
6.0	42.3	71.0	0.5958
7.5	41.0	83.0	0.4939
9.0	35.5	70.0	0.5071

第 2 表

pH	E	C	K
7.5	60.3	125.2	0.482
8.0	58.1	126.1	0.461
8.5	56.0	122.0	0.459
9.0	56.0	120.0	0.466
9.5	56.0	116.3	0.482
10.0	51.2	101.0	0.507

第 1 表より最適 pH は 7.5~9.0 にある事が分つた爲その間隔を縮めて調べてみた。即ち 10c.c. のゼラチン標準液に 2c.c. の E 液又は C 液を混じ前と同様に各種 pH にて作用せしめた後測定した結果は次の如くである。(第 2 表)



第1圖にて分る如くゼラチン液化の最適 pH は 8.5 にして 3.0 以下にては不活性化する。

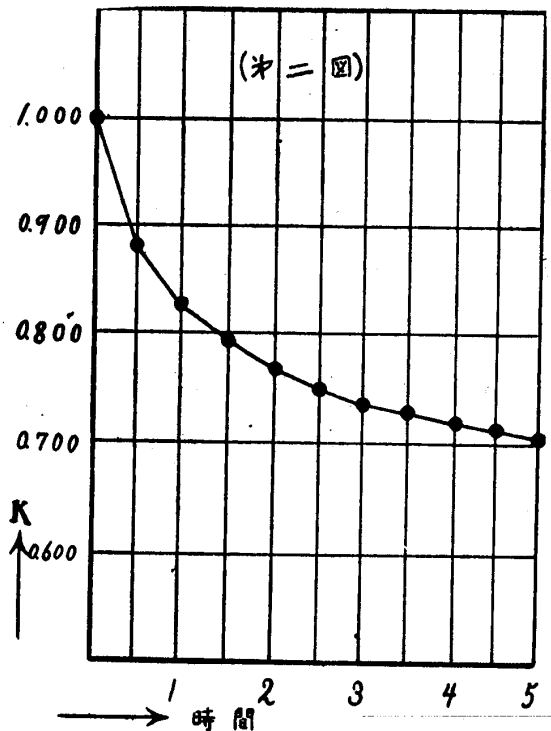
B) 作用時間と酸素力價

酵素に依るゼラチン液化度は作用時間の推移にて如何なる変化が起るかを究めんとして次の実験を行つた。100c.c. のゼラチン標準液に 20c.c. の E 液を注加し混合して N-NaOH で pH 8.5 に調整し

水槽にて 30°C に保ち 30 分おきに 5 c.c. 宛取り出し粘度を測定した。C 液に就いても同様に測定し結果は次の如くである。(第3表)

第 3 表

作用時間 (分)	E	C	K
30	70.3	79.9	0.879
60	64.2	76.7	0.837
90	60.9	76.3	0.798
120	58.2	76.0	0.766
150	56.9	75.8	0.750
180	54.6	73.8	0.740
210	53.8	74.3	0.724
240	53.2	74.3	0.716
270	52.2	74.2	0.704
300	51.9	75.0	0.692
975	45.6	72.2	0.631



第2圖に見る如く 2 時間位迄は粘度の急減を見るがそれ以上では段々カーブは緩やかになり 5 時間以上ではそれ程大きな変化は認められない。

酵素力價測定的作用時間は成る可く短時間で而も明らかに力價を認め得る點として便宜上 30 分に決定した。

C) 酵素の最適温度

5 c.c. ゼラチン標準液に E 液 2 c.c. を混じ (pH 8.5) 各種の温度にて 30 分作用せしめた後直ちに 30°C にて測定した結果は次の如くである。(第4表)

第 4 表

溫度(°C)	F	C	K
20	70.0	77.2	0.907
30	60.4	70.2	0.860
40	53.0	64.7	0.819
50	49.8	65.7	0.758
60	48.0	64.5	0.744
70	50.1	64.2	0.780
80	57.7	63.6	0.907

最適溫度は60°Cと決定した。

以上 3 種の 實驗 にてゼラチナーゼ力價測定法の大體の輪廓

が掴めたので次の如く諸條件を決めた。即ち 5 c.c. のゼラチン標準液に 2 c.c. の E 液を混じ一定量の緩衝液で pH 8.5 とにし 30°C にて 30 分作用せしめた後その 5 c.c. を Ostwald の粘度計にて 30°C にて秒數(E)を測定し、C 液に就いても同様に測定し(C)，ゼラチナーゼ力價 K は $\frac{E}{C}$ で求めた。

(2) 種々の培養條件に依るゼラチナーゼの生成、消滅に就いて

納豆菌 No. 8 のゼラチナーゼ生成に對し培養基及びその他の條件が如何に影響するかを研究せんとして以下の實驗を行つた。

A) 各種培養基に依る培養日數と繁殖及びゼラチナーゼの生成。

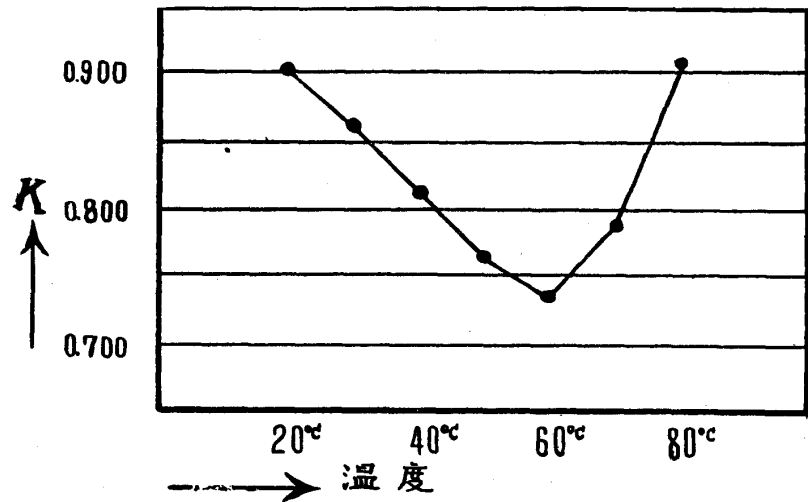
a) 蛋白質，ペプトン培養基。

- ① ブイヨン
- ② 2% ペプトン + 1% NaCl
- ③ 1% ゼラチン + 無機培養基
- ④ 1% ペプトン + 無機培養基
- ⑤ ① + 1% 葡萄糖
- ⑥ ② + 1% 葡萄糖
- ⑦ ③ + 1% 葡萄糖
- ⑧ ④ + 1% 葡萄糖

但し無機培養基	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.5%
	KH ₂ PO ₄	0.1%
	NaCl	0.1%
	MgSO ₄	0.025%

を調整し同容同型の 650c.c. Erlenmeyer flask に各種の上記培養基 100c.c. 宛注加し (深さ 1.9cm, 液の表面積 84.9cm²) pH 7.0 にし常法の如く殺菌し各々同種培養基にて 3 日間 2 回の馴馳培養液の一金耳を接種して 37°C にて培養した。

第 3 圖



ゼラチナーゼ測定には皮膜を壊さぬ様培養液の一定量を取り出し測定した。(第5表)

第 5 表

培養基番號	培養日數 1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	7 日
1) 皮 膜	卅	卅	卅	士	士	士
pH	6.8	7.7	8.3	8.3	8.7	8.7
K	0.976	0.930	0.939	0.924	0.930	0.933
2) 皮 膜	卍	卅	卅	士	士	士
pH	7.5	8.1	8.6	8.7	8.7	8.8
K	0.762	0.740	0.724	0.719	0.739	0.730
3) 皮 膜	+	卅	卍	士	士	士
pH	6.8	7.1	7.5	7.5	7.8	7.8
K	0.994	0.994	1.000	1.000	1.000	0.997
4) 皮 膜	卅	卍	卍	+	+	士
pH	7.2	7.9	8.2	8.2	8.2	0.2
K	0.795	0.783	0.779	0.788	0.793	0.815
5) 皮 膜	卍	卍	卍	卍	卍	士
pH	5.9	6.5	8.0	8.5	8.5	8.7
K	1.000	0.916	0.827	0.850	0.834	0.792
6) 皮 膜	卅	卅	卍	卍	卍	士
pH	5.9	6.6	7.7	8.3	8.4	8.6
K	0.847	0.803	0.764	0.725	0.736	0.744
7) 皮 膜	卍	卍	卍	卍	卍	士
pH	6.3	6.8	7.4	7.7	7.8	7.8
K	0.887	0.846	0.800	0.760	0.769	0.785
8) 皮 膜	卍	卍	卍	卍	士	士
pH	5.9	6.5	6.7	7.3	7.3	7.4
K	0.914	0.866	0.708	0.670	0.658	0.691

上表の結果より繁殖の程度を判断する皮膜形成は1~2日目に最高に達し3~5日目頃より破壊され、沈降を始め液を混濁せしむ。又pHは無糖培養基にては中性よりアルカリ側に變化し5日目頃迄には最高に達しそれ以上は變化しない。即ち緩衝液のない①②は8.7邊に達し緩衝液の③~④は7.8~8.2と少し低いpH價を示す。一方含糖培養基は厚い皮膜を長期間形成し無糖培養基よりも旺盛なる發育を示す。pH價は1~2日目迄は酸性側に赴き3日目頃からアルカリ側に變じ漸時無糖培養基と同様の推移を辿つて5~7日目には緩衝液のない⑤⑥は8.6~8.7を緩衝液⑦⑧は7.4~7.8の

pH値を示す。又ゼラチナーゼ力價Kは無糖培養基にては1日目に既に極小に達し以後餘り變化はなく、含糖培養基にては4~5日目迄減少を續けその頃極小に達し以後變化はない。

以上の實驗よりゼラチナーゼ生成を良好たらしめる條件として次の事が結論される。

1. ペプトン培養基が蛋白質培養基に比し大なる効果を有す。
2. 同種の培養基にては葡萄糖添加はその生成を一層促進させる。
3. 同種の培養基にては緩衝液の存在は一般にその生成を良好たらしめる。

b) 無機態N-合成培養基

- ① 1% 葡萄糖+無機培養基
- ② 1% グリセリン+無機培養基
- ③ 1% 乳酸(中性塩)+無機培養基
- ④ 1% 醋酸(中性塩)+無機培養基
- ⑤ 1% クエン酸(中性塩)+無機培養基
- ⑥ 1% 酒石酸(中性塩)+無機培養基

註) 無機培養基はa)と同様である。

以上の培養基を調整しpH7.0になしa)と同様に37°Cにて培養し、皮膜、pH、Kを調べた結果は次の如くである。(第6表)

第 6 表

培養基番號	培養日數 1日	2日	3日	5日
1) 皮膜	卅	卍	卍	+
pH	6.3	5.9	5.9	6.3
K	0.988	0.910	0.756	0.754
2) 皮膜	±	+	+	+
pH	6.5	5.8	5.8	5.7
K	0.975	0.958	0.960	0.969
3) 皮膜	±	±	±	±
4) 皮膜	±	±	±	±
5) 皮膜	±	±	±	±
6) 皮膜	±	±	±	±

左表の如くC-源として葡萄糖にては旺盛なる繁殖と大なるゼラチナーゼの生成を見るが、グリセリンにては繁殖、ゼラチナーゼ共に遙かに劣り、更に有機酸中性塩にては全然繁殖が認められない。以上より次の事が結論し得る。

無機培養基+C-源にてはC-源の種類にて繁殖、K價を異にし、葡萄糖>グリセリンの順序で有機酸にては全然繁殖しない。

c) その他の培養基

- ① Na₂HPO₄ · 2H₂O 0.88%
- KH₂PO₄ 0.2
- アスパラギン 0.1

- | | |
|--|------|
| 葡萄糖 | 0.1 |
| グリセリン | 0.1 |
| ② Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O | 1.0% |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2 |
| アスパラギン | 1.0 |
| 葡萄糖 | 1.0 |

③ Na_2HPO_4	1.0%
KH_2PO_4	0.2
葡 萄 糖	1.0
NH_4Cl	1.0

如上の培養基を調整し、a), b) と同様に培養し測定した結果は次の如くである。(第7表)

第 7 表

培養基番號	培養日數 1日	2日	3日	5日
1) 皮 膜	+	+	+	±
pH	6.6	5.8	5.8	6.8
K	0.998	1.000	1.000	0.992
2) 皮 膜	卅	+	+	+
pH	7.0	5.7	5.8	7.6
K	1.010	1.011	1.000	1.001
3) 皮 膜	卍	卅	卅	+
pH	5.8	5.4	5.4	5.5
K	1.010	1.001	1.000	1.000

左表の如く繁殖はするが、特に③は旺盛なる繁殖を示すも全然ゼラチナーゼの生成を認める事ができなかつた。以上より次の事が結論し得る。

N一源としてアスパラギン、又は NH_4Cl にては菌の増殖は認めるがゼラチナーゼの生成を見ない。

d) CaCO_3 及び MgSO_4 の効果。

c) の①②③培養基は繁殖は示すも全然ゼラチナーゼの生成は認められず、一方b) の①培養基は旺盛なる繁殖と大なるゼラチナーゼの生成が認められたが、これは0.025% MgSO_4 の効果に非ずやと考えられ、Clark氏の述べる CaCO_3 , MgSO_4 の効果を検討する爲に次の実験を行つた。

- ① b) ①培養基— MgSO_4
- ② b) ①培養基— MgSO_4) + 0.05% MgSO_4
- ③ (") + $\begin{cases} 0.05\% \text{MgSO}_4 \\ 0.05\% \text{CaCO}_3 \end{cases}$
- ④ c) ① + 0.05% MgSO_4 + 0.05% CaCO_3
- ⑤ c) ② + " + "
- ⑥ c) ③ + " + "

以上の培養基を調整し常法の如く培養してその力價を調べた。(但し この場合 45°C にて培養した。) (第8表)

第8表の如くb)①培養基— MgSO_4 にては増殖はするがゼラチナーゼの生成を見ず、更に CaCO_3 , 及び MgSO_4 を添加すると MgSO_4 單獨より更に効果のある事が分つた。又 c) ①②③は CaCO_3 及び MgSO_4 の添加にてゼラチナーゼの生成を認め特に⑥が良好である事が分つた。以上より次の事を結論し得る。

無機態—N, アスパラギン含有培養基に對し、 CaCO_3 及び MgSO_4 の添加はゼラチナーゼ生成に効果を有し、且つその決定的因子の一つである。かくしてClark氏の説の妥當なる事を我々の實驗は認めた。

第 8 表

培養基番號	培養日數 1日	2日	3日	5日
1) 皮膚	+	+	卅	±
pH	6.4	6.0	6.0	6.0
K	0.983	0.988	1.000	1.000
2) 皮膚	+	卅	卅	+
pH	6.1	5.6	5.8	6.0
K	0.978	0.951	0.945	0.981
3) 皮膚	卅	卅	卅	卅
pH	6.0	5.8	6.1	6.0
K	0.976	0.880	0.857	0.944
4) 皮膚	+	+	+	±
pH	6.5	6.5	6.7	7.2
K	0.977	0.955	0.993	0.998
5) 皮膚	卅	+	卅	±
pH	6.3	5.8	6.4	8.2
K	0.978	0.955	0.958	0.985
6) 皮膚	卅	卅	卅	+
pH	5.9	5.8	5.7	6.0
K	0.944	0.934	0.923	0.963

第 9 表

	K	k'	$\frac{K}{k'}$
A	1.000	1.000	1.000
B	0.903	0.905	0.997
C	0.938	0.938	1.000

CaCO₃ 及び MgSO₄ の効果は培養中にゼラチナーゼ生成を起さしめる。而してそれ等の塩類はゼラチナーゼの賦活、又は抑制作用を示さない。

B) 温度及び pH のゼラチナーゼ生成に対する影響。

a) 温度

同容同型の 650c.c. Erlenmeyer flask に 100c.c. のペプトン培養基を入れ、pH 7.0 にして殺菌し、該菌の殺菌水稀釋液一白金耳を接種し 28°C, 37°C, 45°C にて培養した結果は次の如くである。

第10表より、45°C にては初期の繁殖、ゼラチナーゼの生成共に早く既に 1 日目には最高に達し以後減少する。37°C にては 2~3 日目に最高に達し 28°C にてはずつと遅れ、繁殖は 3~4 日目に最高に達しゼラチナーゼは 6 日に至るも猶生成を続けている。上の結果では結論を出し得ないが K 價及び生成の日數より最適温度を 37°C と決定した。

かく CaCO₃ 及び MgSO₄ の効果を検したのであるが、その効果は培養中にゼラチナーゼの生成を起さしめるのか或いはある種培養基にて不活性化した酵素に對し賦活作用を有するのであるかを解決せんとして次の實驗を行つた。

	A	B	C
CaCO ₃	—	0.05%	—
MgSO ₄	—	—	0.05%

上記の如く三種の塩類を c) ③培養基に添加して常法の如く 37°C にて培養し、4 日間培養後その各々の K 價を求めた後次の如く各々に塩類を添加し、

$$A' = A \text{ 培養基} + \begin{cases} 0.05\% \text{ CaCO}_3 \\ 0.05\% \text{ MgSO}_4 \end{cases}$$

$$B' = B \text{ 培養基} + 0.05\% \text{ MgSO}_4$$

$$C' = C \text{ 培養基} + 0.05\% \text{ CaCO}_3$$

それ等の K 價を求め (便宜上 k' とする) 細菌液に塩類を添加した場合としない場合の K 價の比を求めた結果は次表の如くである。(第 9 表)

第 9 表に見る如く比が 1.0 であるという事は CaCO₃, MgSO₄ がゼラチナーゼに對して賦活作用も抑制作用も示さない事が明らかになり次の事が結論し得る。

第 10 表

温度	日数	1日	2日	3日	5日	6日
28°C	皮膜	±	+	卍	卍	卍
	pH	7.6	7.7	8.5	8.5	8.5
	K	1.000	0.954	0.935	0.914	0.897
37°C	皮膜	卍	卍	卍	+	±
	pH	7.6	8.0	8.5	8.7	8.7
	K	0.994	0.890	0.892	0.905	0.912
45°C	皮膜	卍	卍	+	±	±
	pH	7.9	8.4	8.6	8.8	8.8
	K	0.903	0.907	0.937	0.942	0.950

第 11 表

pH	日数	1日	2日	3日	5日
5.5	皮膜	±	±	±	±
	pH	6.2	7.7	8.3	8.6
	K	1.000	0.808	0.802	0.827
7.5	皮膜	卍	卍	卍	+
	pH	7.6	7.7	8.3	8.6
	K	0.954	0.865	0.875	0.889
8.0	皮膜	卍	卍	+	+
	pH	7.7	7.7	8.5	8.6
	K	0.978	0.877	0.908	0.918
8.7	皮膜	±	+	卍	±
	pH	—	8.5	8.5	8.6
	K	—	0.975	0.929	0.944
9.0	皮膜	±	±	±	±

b) 培養基のpH

650c.c. Erlenmeyer flask に 100c.c. のペプトン培養基を入れpHを調整して殺菌後pHを調べ37°Cにて培養した結果は次の如くである。(第11表)

左表よりpH5.5及びpH6.8にては全然繁殖を認められない。K價よりゼラチナーゼ生成の最適pHを6.2と決定した。

Ⅱ. 總 括

甘藷澱粉中の不純物である蛋白質を除去する目的で我々の分離した納豆菌 No. 8 について其の proteinase を gelatin 溶液に作用せしめ粘度の變化を測定する事によつて検討した。

(1) gelatinase 作用の最適温度は 60°C であり、最適 pH は 8.5 であつた。

(2) 各種培養基の相違による gelatinase 生成を試験し、ペプトン (1~2%) 培養基が最も良好であり、之に葡萄糖を添加すれば更に高められる事を知つた。之に反しアスパラギン又は無機窒素培養基では全然 gelatinase の生成が認められないが之に MgSO₄ 又は CaCO₃ 及び MgSO₄ を添加すると gelatinase の生成が認められる事を知つた。

且つ此の CaCO₃, MgSO₄ の効果は gelatinase の賦活剤でなく酵素生成に與るものである事を知つた。

(3) gelatinase 生成の培養基の最適 pH は 6.2 であり、培養の最適温度は 37°C である事を知つた。

参 考 文 献

- 1) Drummond, J.M; Biochem. Jour. 8, 38 (1914)
- 2) Elizabeth D, Wilson; Jour. Bact. 20, 41 (1930)
- 3) Merrill and Clark; Jour. Bact. 15, 267 (1928)
- 4) Raistrick and Clark; Biochem. Jour. 15, 76 (1921)
- 5) Abbott and Gildersleeve; Jour. Med. Res. 10, 42 (1903)
- 6) Clark; Abst. Bact. 4, 2 (1920)

Résumé
On the Gelatinase of *Bac. Natto*. (I)

M. Kanie and K. Morihara.

We isolated *Bac. Natto* No. 8 which had the satisfactory result to dissolve the protein of the sweet-potato starch, that is, one impurity of the starch; investigated the proteinase of this bacteria and the proteinase production on various conditions.

The cultural media of *Bac. Natto* No. 8 in peptone solution were used as enzyme solution and the enzyme activity was compared one another by measuring the viscosity of the gelatine solution with Ostwald's viscosimeter, and the optimum temperature and PH of the gelatinase activity were observed to be at 60°C. and PH 8.5 respectively.

We examined the gelatinase production by this bacteria in ordinary protein containing media and in synthetic media which contain inorganic nitrogen and various carbon compounds, and also examined the influences of PH of medium and incubation temperature.

Among the various nitrogen sources, peptone medium (1.0—2.0%) was most effective to produce the gelatinase and addition of glucose (1.0%) to it was still more effective.

Asparagine or inorganic-nitrogen medium could not produce the gelatinase, but by adding CaCO_3 and MgSO_4 to each medium, it was able to produce the gelatinase.

The effect of CaCO_3 and MgSO_4 is not the gelatinase activator but its producer.

The optimum PH of the cultural medium for the gelatinase production was 6.2, and the optimum temperature was 37°C.