



Title	細菌の酵素に関する研究：第1報 塩辛より分離せる二、三の細菌のCatalaseに就て
Author(s)	長尾, 清; NAGAO, Kiyoshi; 木村, 喬久 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 1(2), 86-89
Issue Date	1951-02
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/22682">https://hdl.handle.net/2115/22682</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	1(2)_86_89.pdf



# 細菌の酵素に關する研究

第1報 塩辛より分離せる二、三の細菌のCatalaseに就て

長尾 清・木村 喬久・清野 彰 (水産細菌教室)

## STUDIES ON ENZYMES OF BACTERIA.

### 1. ON THE CATALASE OF BACTERIA WHICH WERE ISOLATED FROM SHIOKARA OR "SOUSED SQUID."

Kiyoshi NAGAO, Takahisa KIMURA and Akira SEINO  
(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

In this report, the authors used first bacteria which isolated from the Shiokara or "Soused Squid" and made Exoenzyme and Endoenzyme-solution of catalase by using the technique for destroying the cell wall of the bacteria by grinding with quartz sand. The value of Cat-f (Catalase coefficient) and the Optimum pH in each solution were measured.

## 1 緒 言

一部嫌気性細菌を除き殆ど全ての生物は Catalase を持つてゐる。細菌に Catalase が存在する事を初めて発見したのは Gottstein<sup>1)</sup> (1893) である。其れ以後細菌 Catalase に就て多くの研究がなされたが、微生物から純粹に Catalase を抽出する事も、又其の化学的性質も明らかにされて居ない。他の大多数の細菌酵素に就いても同様未知の段階にある。其の主な理由は勿論細菌の細胞から之等細菌酵素を破壊せずに抽出する事が困難であるからである。細菌の細胞を破壊して内生酵素を抽出する為に縦糸行はれた方法は、自己消化法、乾燥法、硝子球で振盪する方法、粉末硝子で挽き碎く方法或は Rollercrushing mill を用いたり、超碎解機を用いる方法があつた。

最近 Herbert<sup>2)</sup> (1947) は Lysozyme<sup>3) 4)</sup> により溶菌し、細菌から結晶性細菌カタラーゼを抽出する事に成功した。即ち *Micrococcus lysodeikticus* を水に懸濁し Lysozyme により溶菌し pH5.6 において半量の alcohol を加え、生じた沈澱を除去する。上澄液に更に Chloroform を加えて沈澱を除き硫酸アムモニウムで処理し液を2層に別ける。上層につき Chloroform 硫酸アムモニウム処理を繰り返した後透析する。透析後硫酸アムモニウムで処理して結晶化して居る。

細菌の Catalase 含量は種類により異なるが、Herbert が *Micrococcus lysodeikticus* につき求めた値は約2%に達するという。この Catalase 含量は1分間に菌体量の47倍量の過酸化水素(0°, 0.01M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を分解する事が出来る。この様に多量の過酸化水素が生体代謝の結果生成されるとは考えられない。近年に至り Keilin, Hartree 両氏<sup>5) 6)</sup> (1936, 1945) は或る種の Oxydase に依る基質の酸化過程に少量の Catalase を加える事により種々の Alcohol 類が酸化されることを見出し Catalase の生理作用研究に一步を進めた。

著者等は Lysozyme に関する詳細な報告を見る事が出来なかつたので、Herbert の方法に依り結晶性 Catalase を抽出する事が出来ず、止むを得ず予備実験として塩率より分離した結菌を用い、菌体を海砂で挽き<sup>7)</sup> 内生酵素液を、又細菌を培養した培養基を濾過して外生酵素液を調製し、夫々に就きカタラーゼ活性度及び其の最適水素イオン濃度を測定した。

本研究は文部省科学研究費によつて行つたものである。

## 2 実験結果並びに考察

### I. 酵素液の調製法

細菌の生成する酵素には Endoenzymes (Intracellular Enzymes) 及 Exoenzymes (Extracellular Enzymes) とがあり、著者等はイカ塩率の熟成期間中これより分離した細菌<sup>9)</sup> 即ち *Bac. mycoides*, *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus fuscus* を用いて下記の方法に依り Endoenzyme Solution 及 Exoenzyme Solution を調製した。

(a) Exoenzyme Solution: 300<sup>cc</sup> 容三角フラスコに入れた約 200<sup>cc</sup> の普通 Bouillon 培養基に上記の菌各々 1 白金耳づゝ接種し 37°C、4 日間培養後濾過し濾液に少量の Toluol を加え、これを Exoenzyme Solution とした。

(b) Endoenzyme Solution: <sup>7)</sup> Exoenzyme Solution 調製の際、Bouillon 培養基の表面に発育せる菌苔、及び遠心分離器にて分けた菌苔を蒸留水にて洗い、再び遠心分離器にて菌体を分け後乳鉢にて少量の海砂を混じ<sup>6)</sup> 6<sup>cc</sup> の Glycerin を注加しつゝ挽き碎き、少量の水を加えて 37°C の恒温器中に 15 時間保つた後遠心分離し、上澄液を濾過し、濾液に水を加えて全容を 200<sup>cc</sup> とし Endoenzyme Solution とした。

### II. Cat-f 値の測定及び結果

200<sup>cc</sup> 容の三角フラスコに N/50 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20<sup>cc</sup> をとり、これに M/15 Sørensen 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 5<sup>cc</sup> を加え、25°C の恒温水槽中に数分間保つた後、酵素液 1<sup>cc</sup> を加え、一定時間作用させた後、10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10<sup>cc</sup> を加え、酵素作用を停止せしめた後、2% KJ 25<sup>cc</sup> 及び IN (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> MoO<sub>4</sub> 液数滴を加え室温にて 10 分間放置した後、可溶性澱粉を指示薬として N/50 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 液にて滴定する。今この反応を一次反応と仮定すると、そのカタラーゼ活性度は下の如くなる。

Table 1. Cat-f value of Each bacteria.

		t	a	a-x	Cat-f
<i>Bac. mycoides</i>	Exoenzyme Solution	5	19.0	15.9	0.0154
	Endoenzyme Solution	5	20.5	18.3	0.0976
<i>Bac. subtilis</i>	Exoenzyme Solution	5	19.0	13.8	0.0277
	Endoenzyme Solution	5	20.5	18.1	0.0107
<i>Bac. mesentericus fuscus</i>	Exoenzyme Solution	5	19.0	13.7	0.0279
	Endoenzyme Solution	5	20.5	16.5	0.0188

$$\text{Cat-f} = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$$

t : 経過時間 (分)

a : 0 分の時の Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> の滴定値

a-x : t 分後の Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> の滴定値

上記の方法に依り各菌の Endoenzyme Solution 及び Exoenzyme Solution の Cat-f 値を測定した結果は第 1 表のようになる。

### Ⅲ. 最適水素イオン濃度の測定及び結果

200cc 容の三角フラスコに前回同様 N/50 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25cc を取り、これに M/50 Sørensen 磷酸緩衝液 (pH 4.5~9.0 の間に12点即ち pH 4.5, 5.5, 5.8, 6.0, 6.2, 6.5, 6.7, 7.0, 7.4, 8.0, 8.4, 9.0 の各緩衝液) 5cc を加え、25°Cの恒温水槽中に一定時間保つた後、活性度測定の場合と同様に沃度滴定法により未分解の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を測定し、分解された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に相当する N/50 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> の cc数即ち a-(a-x) を以て各 pH に於ける Catalase 作用を比較した。

上記の方法に依り、各菌の Endoenzyme solution 及び Exoenzyme solution に就て a-(a-x) を測定した結果は第2表のようになる。

Table 2. a-(a-x) value of Each bacteria.

pH	<i>Bac. mycoides</i>		<i>Bac. subtilis</i>		<i>Bac. mesentericus fuscus</i>	
	Exo-enzyme Solution	Endo-enzyme Solution	Exo-enzyme Solution	Endo-enzyme Solution	Exo-enzyme Solution	Endo-enzyme Solution
4.5	—	5.8	18.9	10.9	—	—
5.5	4.7	—	20.7	12.3	27.1	2.5
5.8	4.9	6.4	—	—	27.4	2.8
6.0	5.4	—	21.7	13.1	—	3.0
6.2	—	6.5	—	—	27.4	—
6.5	5.5	6.6	22.4	13.4	—	3.3
6.7	—	6.8	—	—	27.4	—
7.0	5.9	8.4	22.4	14.2	28.3	3.3
7.4	5.1	—	22.8	13.9	28.8	2.8
8.0	5.1	9.6	23.1	13.8	28.6	2.8
8.4	6.0	7.4	21.3	13.0	—	2.7
9.0	—	—	—	—	26.5	—

以上の結果から各菌の最適水素イオン濃度は *Bac. mycoides* の Exoenzyme は pH 7.0 附近、Endoenzyme は pH 8.0 附近にあり、*Bac. subtilis* の Exoenzyme は pH 8.0 附近、Endoenzyme は pH 7.0 附近にあり、*Bac. mesentericus fuscus* の Exoenzyme は pH 7.5 附近、Endoenzyme は pH 7.0 附近にある事を知つた。

Virtanen, Karström<sup>9)</sup> が或る細菌 Catalase の最適水素イオン濃度を測定した結果 Opt pH 7.0 であると報告して居る。又 Stapp<sup>10)</sup> も同様の研究に対して Opt pH 6.~7.5 であると報告して居る。

著者等の測定結果は之等諸氏の測定結果と大体一致した結果を得た。

### 3 總 括

以上を要約すれば次の如くなる。

I. イカ塩辛の熟成期間中これより分離した細菌を用い Endoenzyme solution 及び Exoenzyme solution を調製し各菌の Cat-f 値を測定した。

II. 各菌の酵素液の最適水素イオン濃度を測定した。其の結果 Opt. pH 7.0~8.0 であつた。

### 4 文 献

- (1) Gottstein, A : Virchows Arch., 133, 295 (1893)
- (2) Denis, Herbert., and A. J. Pinsent : Nature, 160, (1947), 125
- (3) Heming, A : Proc. Roy. Soc., B. 93, (1922), 306

- (4) Alderton, G., and Fevold, H. L., : J. Biol. Chem., 164, (1946), 1
- (5) Keilin, D. and E. F. Hartree : Proc. Roy. Soc., L. B. 119, (1936), 141
- (6) Keilin, D. and E. F. Hartree : Bioch. J., 39, (1945), 293
- (7) 米田隆平 : 醸造学雑誌 Vol. 14, No. 4, (1936), 315
- (8) 長尾、木村 : 水産学雑誌 Vol. 54, (1949), 21
- (9) Virtanen, A. I. and Karström, H. : Biochem. Ztschr., 161, 9~46
- (10) Stapp, C. : Centbl. Bakt (etc.), Abt. 1, Orig., 92, 161~193

(水産科学研究所業績第51号)