HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	細菌の酵素に関する研究：第2報 Micrococcus lysodeikticusのCatalaseについて(其の1)
Author(s)	長尾, 清
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 4(1), 108-111
Issue Date	1953-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/22798
Type	departmental bulletin paper
File Information	4(1)_P108-111.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

細菌の酵素に関する研究

第2報 *Micrococcus lysodeikticus* のCatalaseについて (其の1)

長尾 清 (水産細菌学教室)

STUDIES ON THE BACTERIAL ENZYMES

2. ON THE CATALASE OF *Micrococcus lysodeikticus*. (Part I)

Kiyoshi NAGAO

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

The catalase solution was obtained by the addition of lysozyme from *Micrococcus lysodeikticus*. The optimum pH and temperature of catalase activity of *Micrococcus lysodeikticus* were measured. The optimum pH was 7.5 and the optimum temperature was 32°C.

一部嫌気性細菌を除き殆ど総ての生物はCatalaseを持つてゐる。細菌Catalaseに関しては、他の大多数の細菌酵素と同様未知の段階にある。其の主な理由は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。しかるに1930年に至りPenroseとQuastel[1]がLysozymeを用いて細菌体から酵素を抽出する事に成功した。Lysozymeは卵白から結晶状に抽出する事が出来[2](卵白の蛋白質の約3%はLysozymeである)、分子量は約17,000の低分子の塩基性蛋白質で、等電点はpH10.5—11.0であり、酸性溶液で安定、アルカリ性溶液でも比較的安定で、pH11.5に於て5～6時間Activityは減少しない[2]。Lysozymeは精巣より得られた"Spreading facter"であるHyaluronidaseと酷似している[3]。

細菌の浮游液にLysozymeを作用させると ($^{mgm.\ Lysozyme}/_{gm.\ bacteria}$) 菌体表面のMucopolysaccharideを破壊し、菌体の滲透圧に変化を来たし、細菌浮游液のTurbidityは減少する。最近Badudieri, Bietti両氏[4]は電子顕微鏡で溶菌作用を観察している。又G.H. Warren, J.G. Durso両氏[5]は海水発光細菌 *Achromobacter fischeri* に対するLysozymeの影響について電子顕微鏡で観察している。

最近Herbert[6]は *Micrococcus lysodeikticus* を水に懸濁し、Lysozymeに依り溶菌し、結晶性細菌Catalaseを抽出する事に成功した。細菌のCatalase含量は種類により異なるが、Herbertが *M. lysodeikticus* につき求めた値は約2%に達すると云う。即ち100gr.の菌体 (Dry Weight) から約2gのCatalaseが得られる。細菌1細胞のDry Weightを 2.5×16^{-13}gr.とし、Catalaseの分子量を226,000～248,000として算出すると、細菌1細胞は約20,000分子のCatalaseをもつている事になる。

著者は先ずG. Alderton氏法[2]に依り卵白よりLysozymeを結晶状に精製した。次にHerbertの方法[6]に依り結晶状Catalaseを抽出し、その化学的性質を究明し様としたがCatalaseの結晶化が困難にていずれも失敗した為、*Micrococcus lysodeikticus* をLysozymeにて溶菌し、得た酵素液について最適水素イオン濃度及び最適温度を測定した。以下実験結果について報告する。

実 験 方 法

(1) Lysozymeの精製

G. Alderton 氏法[3]に従い卵白より Lysozyme を結晶状に抽出した。

(2) 試験菌

Micrococcus lysodeikticus※ を使用した。

(3) 酵素液の調製

Bouillon Agar に *Micrococcus lysodeikticus* を接種、27°Cにて96時間 Streak Culture し、発育した菌体を白金耳で集め、水洗後、菌体 (Dry Weight 112mg) を蒸溜水 40cc に懸濁し、之に菌体の約1/1000重量の Lysozyme を添加、室温 (13°C)に100分間放置して溶菌させた。Turbidity の減少は肉眼にて明確に認められ、殆ど透明なる溶液となる。之を濾過して酵素液とした冷蔵庫中 (−2°C)に保存した。Lysozyme に依る溶菌作用は100分以上更に長時間作用させた後 Catalase Activity を測定した結果、100分間作用させたものと Activity は同一であつた。

(4) 最適水素イオン濃度の測定

N/50 H_2O_2 15cc をとり、之に Buffer 溶液 5cc を加え、25°C の恒温槽に数分間保つた後、酵素液を一定量加え、5分間作用させた後、硫酸にて酵素作用を停止させた後 KI 及 $(NH_4)_2M_0O_4$ 液を加え、N/50 $Na_2S_2O_3$ 液にて滴定した。Buffer は 0.067M 燐酸 Buffer 及び Borate と NaOH を使用した[7][8]。Buffer 溶液の差異に依り酵素の Activity に相異はなかつた。各 pH に於ける5分後の Blanktest を行い計算に入れた。pH は硝子電極を使用して測定した。

(5) 最適温度の測定

実験に使用した酵素液は最適水素イオン濃度測定に使用したもので、調製後18時間経過したものである。0°Cより40°Cの間に8点をとり、前回と同様の方法にて Catalase 活性度を測定した。

実験結果並びに考察

(1) 最適水素イオン濃度

Table 1, 2, 3 に実験結果を表示した。

以上の実験結果から最適水素イオン濃度は pH 7.5 附近にある。

Table 1. The effect of pH on the catalase activity of *Micrococcus lysodeikticus* *

pH	Reaction Time (Min.)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 0 min. (A)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 5 min. later.(B)	(A)−(B)
5.0	5	14.60	0.96	13.64
6.0	5	14.60	0.25	14.35
7.0	5	14.60	0.14	14.46
8.0	5	14.60	0.15	14.45
9.0	5	14.60	0.20	14.40
10.0	5	14.60	0.25	14.35
11.0	5	14.60	0.30	14.30

* N/50 H_2O_2 15cc., buffer solution 5cc., enzyme solution 1cc. was used.

※ Origin; Dept. Bacteriology, Washington University, School of Medicine.St. Louis. Mo, U. S. A. (1951, 21/IX)

Table 2. The effect of pH on the catalase activity of *M. lysodeikticus* **

pH	Reaction Time (Min.)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 0 min. (A)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 5 min. later.(B)	(A)-(B)
5.0	5	14.60	7.50	7.10
6.0	5	14.60	7.20	7.40
7.0	5	14.60	1.10	13.50
8.0	5	14.60	0.60	14.40
9.0	5	14.60	1.60	13.00
10.0	5	14.60	1.70	12.90
11.0	5	14.60	1.80	12.80

** N/50 H_2O_2 15cc., buffer solution 5cc., enzyme solution 0.2cc. was used.

Table 3. The effect of pH on the catalase activity of *M. lysodeikticus* ***

pH	Reaction Time (Min.)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 0 min. (A)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 5 min. later. (B)	(A)-(B)
7.0	5	14.60	1.20	13.40
7.3	5	14.60	0.80	13.80
7.5	5	14.60	0.60	14.00
7.8	5	14.60	1.30	13.30
8.0	5	14.60	1.70	12.90
8.2	5	14.60	2.00	12.60
8.4	5	14.60	2.10	12.50
8.6	5	14.60	2.30	12.30
8.8	5	14.60	2.90	11.70
9.0	5	14.60	4.40	10.20

*** N/50 H_2O_2 15cc., buffer solution 5cc., enzyme solution 0.2cc. was used.

(2) 最適溫度

Table 4 に実験結果を表示した。

以上の実験結果から最適溫度は 32°C 附近にある。

Table 4. The effect of temperature on the catalase activity of *M. lysodeikticus* ****

pH	Reaction Time (Min.)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 0 min. (A)	cc. of $Na_2S_2O_3$ at 5 min. later. (B)	(A)-(B)
0 C	5	14.60	9.60	5.00
10	5	14.60	9.40	5.20
20	5	14.60	9.00	5.60
25	5	14.60	8.60	6.00
30	5	14.60	8.50	6.10
32	5	14.60	8.40	6.20
35	5	14.60	8.50	6.10
40	5	14.60	8.70	5.90

**** N/50 H_2O_2 15cc., buffer solution 5cc., enzyme solution 0.2cc. was used.

要　　約

Micrococcus lysodeikticus を Lysozyme にて溶菌し、得た酵素液について最適水素イオン濃度と最適溫度を測定した。即ち最適水素イオン濃度は pH 7.5 附近、最適溫度は 32°C 附近にある。

終りに臨み、試験菌株を分譲下された Prof. Samuel J. Ajl 氏 (Washington University). 文献複写の労を賜はつた阪大微生物病研究所、天野恒久氏に厚く謝意を表する。

文　　献

(1) Penrose M. and Quastel, J. H : Proc. Roy. Soc., B **107**, (1930) 168.
(2) Gordon Alderton, W. H. Ward, and H. L. Fevold : J. Biol. Chem., **157** (1945) 43.
(3) Felix Haurowitz (1950) : Chemistry and Biology of Proteins.
(4) Badudieri and Bietti : Archives of Ophthalmology (1948)
(5) George H. Warren, and Jame G. Durso : J. Bact., **64** (1952) 483.
(6) Herbert, D., and A. J. Pinsent : Nature, **160** (1947) 125.
(7) Clark, W. M. (1920) : The Determination of Hydrogen Ions. Williams and Wilkins, Baltimore.
(8) W. W. Umbreit, R. H. Burris and J. F. Stauffer (1951) : Manometric Techniques and Tissue Metabolism.

(水産科学研究所業績 第171号)