

(472)

(石松) 寒天分解細菌に関する研究 (第2報)

る。更にこれらの製品の林檎搾汁濾過試験を行い何れも促進的効果のあることを認めたが、この場合も振盪培養よりの製品は最も弱い。最後に麩麴よりの製品を林檎搾汁の清澄試験に附してその酵素供與量が清澄速度と比例することを認めた。

本研究は青森縣の委託によつて行われたもので、その間研究の遂行に對して多大の努力を拂われた故小宮山正巳氏（前青森工業試験場長）に謝意を表する。又酵素調製に際し御助言を得た東京大學農學部齋藤日向氏に深謝する。

本研究の一部は昭和26年6月青森縣主催林檎加工研究發表會で講演した。

文 献

- 1) 藤井その他：本誌，30，（1952）。

寒天分解細菌に関する研究 (第2報)

培養條件と寒天分解酵素力

石 松 一 雄

(大阪市立工業研究所)

(昭和27, 5, 28受理)

寒天分解細菌の寒天分解酵素については從來見るべき酵素化學的研究がない。著者は第1報¹⁾に述べた一新寒天分解細菌 *Vibrio agarliquefaciens* FUKUMOTO et ISHIMATSU に就て培養條件と寒天分解酵素力との関係を吟味した。

I. 2, 3の培養基と酵素力

(1) 肉汁と人工培養基の比較

豫備的試験によつて寒天分解細菌を肉汁に培養したものは寒天分解酵素作用が殆どないが、寒天含有の人工培養基に培養したものは寒天分解酵素作用があることを知つたので、兩培養基について同條件で比較培養を行いその培養濾液に就て酵素力を檢した。

Table 1. Agarase Formation on Different Culture Media

Medium Reaction time (hr)	Bouillon		Synthetic medium	
	Viscosity (sec)	Reducing sugar formed KMnO ₄ cc*	Viscosity (sec)	Reducing sugar formed KMnO ₄ cc*
0	69.2	—	70.6	—
0.5	64.8	—0.01	50.0	0.10
2	59.2	0.02	40.0	0.25
21	41.0	0.04	33.7	4.75
48	40.3	0.01	32.3	7.46
72	—	—	31.9	9.45

* KMnO₄ 1cc=2.0068mg Cu

試験方法：培養基として用いた肉汁は常法により調製したもの、人工培養基は NaCl 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NH_4Cl 0.1%, 寒天 0.5% の組成のもので加熱溶解後 pH 7.0 とし、兩者を蒸気殺菌して同一の種より接種し、30°C で 7 日間培養した後その濾液を酵素液として使用し、0.8% 寒天液 100cc, 燐酸鹽緩衝液 (pH 6.0) 50cc, 酵素液 50cc の配合で 40°C で作用させ各時間毎にオストワルド粘度計を用いて作用液 10cc の落下に要する秒数を測つて液化力を見、一方糖化作用は還元糖の生成を作用液 20cc について BERTRAND 法で定量し、 $KMnO_4$ 溶液の滴定數で比較した (寒天は市販關西産細寒天を使用)。その結果を示すと第1表の如くである。

これにより明かな様に基質である寒天を含有しない肉汁培養のものは寒天分解力は殆どなく、0.5% 寒天含有の人工培養基培養のものは明かに酵素力を認めた。

(2) 炭素源として寒天を含む肉汁、豆汁、人工培養基の比較

肉汁、豆汁 (大豆粕 5% 液を 0.2% NaOH 液で 1 時間煮沸浸出し HCl で中和した液)、人工培養基 (窒素源として Pepton を 0.2% 含有する外は前述と同様の組成) に夫々寒天を 0.5% 含有させたものを 1L 三角フラスコに 300cc づゝ入れ壓力 15lb で 30 分間殺菌したものに寒天分解細菌の肉汁試験管培養を接種し、30°C に 6 日間保つた培養濾液を酵素液とし、燐酸鹽緩衝液として pH 7.0 のものを用いた外は寒天液、酵素液を前實驗と同一の配合で 40°C で作用させ、液 10cc をとり WILLS-TÄTTER-SCHÜDEL 法によつて還元糖量を定量し N/10 I_2 液の cc 數で比較した。その結果の 1 例を示すと第 2 表の如くである。

Table 2. Agarase Formation on Different Culture Media
(When Agar is added previously to 0.5%)

Medium Reducing sugar formed Reaction time (hr)	Synthetic medium		Extract of soy- been cake	Bouillon
	(1)	(2)	N/10 I_2	N/10 I_2
	N/10 I_2 cc	N/10 I_2 cc		
0	—	—	—	—
0.5	0.39	0.38	0.11	0.48
1	0.48	0.65	0.19	0.57
2	0.58	0.85	0.24	0.66
3	0.63	0.90	0.28	0.81
24	1.23	1.57	0.96	1.10
pH (after incubation)	6.7	6.8	6.5	6.6

この結果よりみると夫々 0.5% の寒天を含む人工培養基と肉汁とは大差なく豆汁は兩者に比して明かに劣ることを認める。

Ⅱ. 培養基中の窒素源の種類と酵素力

菌の平面培養の際に培養基の窒素源の種類により寒天の分解、液化に差のあることは既に認めていたが、培養基中に寒天を含有しないものに培養した場合は殆ど酵素力がないので 0.5% の寒天を含む人工培養基に於て窒素源に NH_4Cl , KNO_3 , Pepton を用いた場合にその酵素力にどの程度の差があるか比較試験を行つた。

實驗(1)：培養基の組成は窒素源以外は前項と同様で NH_4Cl , KNO_3 , Pepton の含量は夫々 0.10%, 0.18%, 0.16% として pH 7.0 に調節した。寒天分解細菌をこれ等の培養基に 30°C で 7 日間培養した後、その濾液を夫々酵素液として前項(2)と同様の配合〔但し寒天は水分 12.44%, 粗灰分 2.40%, 比粘度 2.20 (40°C) のアルコール沈澱法による精製寒天を用いた〕で 40°C で作用させ各

(474)

(石松) 寒 夫 分 製 細 菌 に 関 す る 研 究 (第2報)

時間毎にその20ccについて BERTRAND 法により生成還元糖量を KMnO_4 の滴定数で表わした。その結果の1例を第3表に示す。

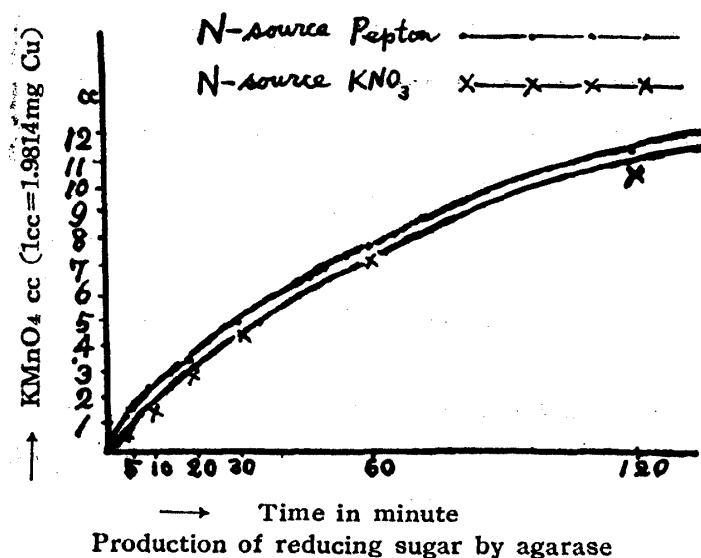
Table 3. Influence of Nitrogen Source on Agarase Formation

N-Source	NH_4Cl	Pepton	KNO_3
Reducing sugar formed	KMnO_4 cc*	KMnO_4 cc*	KMnO_4 cc*
Reaction time (hr)			
0	—	—	—
0.5	0.57	10.15	4.94
2	—	14.64	9.43
4	2.57	18.09	13.58
24	6.55	19.10	17.57
48	8.77	20.06	19.93
72	10.07	20.17	19.23

* KMnO_4 1cc=1.9814mg Cu.

Table 4. Effect of Asparagin (as N-Source) on Agarase Formation

Reducing sugar formed	(1)	(2)
Reaction time (hr)	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc
0	—	—
0.5	1.43	0.81
1	1.61	1.27
2	1.85	1.56
24	2.91	3.04



これによれば上記人工培養基に於ては窒素源としては NH_4Cl は Pepton 及び KNO_3 に劣り、72時間後に於て略兩者の半量の還元糖を生成するに過ぎない。なお Pepton と KNO_3 に就てはこの場合では Pepton の方がやゝ良好な結果を示している。

実験(2)：なお上記の実験と別個に窒素源として Asparagin を用い同様の人工培養基で 30°C にて6日間培養したものに就て同様の配合で寒天に作用させた(但しこの際基質寒天としては細寒天を使用した)。その結果を示すと第4表の如くである。但しこれは WILLSTÄTTER-SCHUDEL 法によつて定量し糖量を N/10 I₂ cc 数で示したものである。

後報に於て述べるが酵素分解液の還元糖量を定量するのに BERTRAND 法(全還元糖定量)と WILLSTÄTTER-SCHUDEL 法(全アルドース定量)とでは後者の方が数%多い結果を見ることから実験(1)の窒素源として KNO_3 , Pepton を用いた場合の値と比較してみると大體同じ位の酵素力であると考えられる。

実験(3)：実験(2)に於て既述の0.5%寒天含有人工培養基で Pepton, KNO_3 を窒素源としたものの酵素力が割合に強いことを知つたが、実験(1)の場合と同様の培養基組成で 30°C で5日間培養したものについて窒素源として KNO_3 と Pepton を用いたものの

酵素力の比較を時間の経過と共に BERTRAND 法により KMnO_4 の cc 数で見た結果を圖示すれば次の通りである。酵素液、緩衝液、寒天液の配合は、實驗(1)と同様であるが使用寒天は精製粉末寒天〔水分14.28%, 粗灰分2.46%, 比粘度1.77 (40°C)〕である。

この場合も Pepton が幾分 KNO_3 よりも酵素力生成に優れていた。

實驗(4)：本實驗では前述の人工培養基に於て Pepton 0.2% と同一窒素量を含む各種無機窒素源及び尿素を使用して酵素力の比較試験を行つた。その1例を示すと第5表の如くである。

Table 5. Influence of Various Nitrogen Sources on Agarase Formation

N-source	$(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	KNO_3	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	NaNO_3	NH_4Cl	Pepton	$\text{CO}-(\text{NH}_2)_2$
Reducing sugar formed	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc
Reaction time (hr)								
0	—	—	—	—	—	—	—	—
0.5	0.48	0.36	0.25	0.36	0.34	0.10	1.10	0.27
2	1.21	0.83	0.86	0.74	0.85	0.17	2.14	0.55
24	2.83	2.68	2.23	2.73	2.60	2.45	2.70	2.47

これによれば上記の中では Pepton が最もよく、無機窒素源は一般にこれより少し劣るのが認められ、無機窒素源の中で NH_4Cl 使用のものは酵素力が最も弱い（なお僅かに条件を変えて $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を使用した別箇の實驗では Pepton 使用のものと差がない酵素力を有することも認めている）。

Ⅱ. 培養基中の窒素源の使用量と酵素力

前項の人工培養基中の窒素源である KNO_3 及び Pepton の量を増加した場合酵素力の増加を來すか否かに就て實驗した。

實驗(1)：既述の0.5%寒天含有の人工培養基に於て Pepton の添加を0.15%, 0.3%, 0.5%, 0.7%としたものに寒天分解細菌を30°Cで4日間培養したものに就てその酵素力を比較した。即ち前項の如き配合割合（但し寒天は市販細寒天を使用）とし、40°Cで作用させ各時間毎にその20cc をとり、生成還元糖を WILLSTÄTTER-SCHUDEL 法による N/10 I₂ 液の cc 数で示した結果は第6表の如くである。なお培養後の pH は Pepton の使出量の増加とともに次の如く少しずつ高まつた。

Table 6. Effect of Varied Amount of Pepton on Agarase Formation

Pepton %	0.15	0.30	0.50	0.70
Reducing sugar formed	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc
Reaction time (hr)				
0	—	—	—	—
0.5	0.44	0.59	0.48	0.46
1	0.60	0.77	0.63	0.59
24	1.41	1.64	1.62	1.17
pH (after incubation)	7.0~7.1	7.1	7.3	7.5

この結果から見ると0.30%のものが最良好のやうであるがその差は僅かであり Pepton の0.15

(476)

(石松) 寒天分解細菌に関する研究 (第2報)

%以上の添加は特に酵素力を増加しないものと考えられる。

実験(2)：実験(1)と同様に人工培養基に於て KNO_3 の量の影響を試みた。その結果を第7表に示す。

Table 7. Effect of Varied Amount of KNO_3 on Agarase Formation (1)

KNO_3 %	0.10	0.20	0.30	0.50
Reducing sugar formed	N/10 I			
Reaction time (hr)				
0	-			
0.5	0.11			
1	0.11			
24	0.91			
pH (after incubation)	7.0			

この結果から みれば菌の繁殖は いづれも充分でなく やや酵素力が弱かつたが0.5%のものの24時間後の値が他より低かつた外はこの範囲内では KNO_3 の量の影響は多く認められなかつた。

実験(3)：実験(3)に於ては KNO_3 の量を既述の人工培養基の組成で0.1%としたもの、その2倍及び3倍にすると同時に寒天以外の成分をも夫々2倍及び3倍とした培養基について30°Cで7日間培養したものに就て同様に試験した結果は第8表の如くである。

Table 8. Effect of Varied Amount of KNO_3 on Agarase Formation (2)

KNO_3 %	0.10	0.20	0.30
Reducing sugar formed	N/10 I ₂ cc		
Reaction time (hr)			
0	-	-	-
0.5	0.40	0.25	0.33
1	0.64	0.37	0.58
24	1.64	1.36	1.64

この結果から 0.1%以上には KNO_3 の量及び他の成分量を一齊に増加しても酵素力に關係がないことを認めた。本項では培養基中の窒素源の量と酵素力との關係をみたが、以上諸實驗の結果から Pepton の場合 0.15~0.7%で大差なく、0.15~0.30%以上の添加は

特に酵素力を増加しない。 KNO_3 の場合はこれも0.1~0.3%で大差なく、0.5%では反つて酵素力をやや阻害する傾向がある。 KNO_3 の量を0.1~0.3%の間に増加する場合、寒天以外の他の成分を平行的に増加しても酵素力に變化を認めなかつた。

IV. 培養基中の炭素源の種類と酵素力

寒天分解細菌の寒天分解酵素力は培養基中に寒天が存在しないと極めて微弱であることを既に認めたが、培養基中の炭素源の種類と寒天分解酵素生産との關係を明かにするため各種の炭水化物を炭素源として使用した人工培養基に本菌を培養してその酵素力を比較した。

実験(1)

培養基：基本培養基として K_2HPO_4 0.1%, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 0.15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, NaCl 0.1%含有のものをうい各種炭水化物1% (但し寒天は0.4%, 蒟蒻マンナンは0.2%) を添加し、水道水を用いてpH7.1~7.2に調節した。

培養条件：100 cc三角フラスコに上記培養基30 ccを入れ常法により殺菌し、寒天分解細菌の肉

汁寒天斜面培養より2白金耳ずつ接種して30°Cに5日間培養した。

酵素力の比較試験：培養濾液20ccを0.8%寒天液50cc，磷酸鹽緩衝液（pH7.0）30ccと配合して40°Cで作用させ30分，1時間及び24時間後その20cc中の生成還元糖量を WILLSTÄTTER-SCHUDEL 法によつて定量比較した。多数の實驗を行つたがその1例を示すと第9表の如くである。

Table 9. Effect of Various Carbon Sources on Agarase Formation

C-Source	None (basal medium)	Glucose	Galactose	Xylose	Sucrose	Dulcitol	Lactose	Starch	Inulin	Konjak mannan	Agar	
											(1)	(2)
Reducing sugar formed	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc
Reaction time (hr)												
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	-0.02	0.00	0.00	-0.01	-0.01	0.05	0.00	-0.01	0.02	0.13	0.26	0.49
1	-0.01	-0.01	0.00	0.01	0.05	0.07	0.02	0.05	0.04	0.38	0.47	0.89
24	0.31	0.59	0.01	-0.01	0.20	0.59	0.30	0.44	0.54	2.23	2.73	2.71
pH (after incubation)	7.2	6.0	6.0	6.0	6.1	7.1	6.1	6.2	7.2	6.2	6.0	6.0

この結果からみれば寒天分解酵素生産には炭素源として寒天を用いた場合がもつとも適し，ついで蒟蒻マンナンが良く他の炭素源の場合は著しく酵素力が弱く，ガラクトース，キシロースの如く炭素源を含まぬ場合よりも劣るものもみられる。なお多くの實驗例で各々數字的に多少の差があり，且つ基本培養基よりも僅かに酵素生成の多い場合もあつたが大體の傾向は略同一であつた。又蒟蒻マンナンを炭素源に用いた場合寒天に比較して少しく劣る程度の場合も1，2あつたが，多くの場合寒天に比べると酵素生産に於て相當遜色のあることが認められた。

備考：寒天分解細菌の繁殖状態は寒天及び蒟蒻マンナンを炭素源として用いた場合は良好であるが，他の炭素源ではやや潤澤する程度の繁殖状態であつた。

窒素源として $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ の代りに $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 又は Pepton を用いた人工培養基についても同様の實驗を試みたが，同傾向の結果であつた。

實驗(2)：實驗(1)と同様の基本培養基を用い，これに炭素源として寒天を0.2%ずつ添加したものに更に各種の炭素源を實驗(1)と同様の割合に加えて培養（200cc三角フラスコに60ccずつ分

Table 10. Effect of Various Carbon Sources on Agarase Formation in Presence of 0.2% Agar

C-Source	None (basal medium)	Agar		Xylose	Glucose	Galactose	Sucrose	Lactose	Dulcitol	Starch	Inulin	Konjak mannan	*Hydroly- sate of agar by agarase
		(1)	(2)										
Reducing sugar formed	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc	N/10 I ² cc
Reaction time (hr)													
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.5	0.01	0.41	0.45	0.01	-0.01	0.01	0.00	0.06	0.20	0.01	0.19	0.03	0.03
1	0.01	0.91	0.77	0.00	0.02	-0.01	0.00	0.08	0.40	0.01	0.36	0.08	0.05
24	0.19	2.37	3.19	-0.01	0.21	0.48	0.25	0.18	2.21	0.20	2.00	1.33	0.18
pH (after incubation)	7.2	6.0	6.3	5.8	5.8	5.5	6.2	7.4	7.2	5.4	6.1	5.4	6.2

* Contain 0.61g reducing sugar per 100cc as galactose.

(478)

(石松) 寒天分解細菌に関する研究 (第2報)

注) した場合の寒天分解酵素力の比較を実験(1)に従って行つた。その際の菌の繁殖状態は外觀的には一應何れも良好のやうに見受けられた。その結果の1例を第10表に示す。

この結果から寒天0.2%を含有させた培養基に上記炭素源を添加して培養すれば酵素力の増強は全然なくむしろ一般に抑制作用が顯著で、葡萄糖、蔗糖、乳糖、澱粉等の添加したものは炭素源を全然含まない基本培養基と變らない程度で、キシロース添加の場合は本実験では基本培養基より更に低い酵素力を示し、イヌリン及びズルチットは酵素生産の抑制度合が軽い。蒟蒻マンナン添加の場合はイヌリン及びズルチット添加の場合よりむしろ酸素生成が妨げられる傾向が認められる。

実験(1), (2)の結果及び他の数回の実験より寒天分解細菌の培養に當り炭素源として寒天を使用すれば寒天分解酵素の生産は顯著であり、蒟蒻マンナンでも或程度の酵素の生産がみられるがキシロース、葡萄糖、ガラクトース、乳糖、蔗糖、澱粉、イヌリン、ズルチット、寒天分解物等では寒天分解酵素の生成は著しく抑制され、特に單糖類、複糖類等の低分子の糖類で顯著な傾向が現れる。

V. 培養基中の寒天の量と酵素力

前実験から寒天分解酵素は基質に適應的に生成せられると一應考えられるが、進んで培養基の寒天の量と酵素力生成とは如何なる関係があるかを見るために次の如く實驗した。

前述の人工培養基で寒天の使用量を0, 0.3, 0.5, 1.0%としたものを加熱溶解後pH7.2とし、夫々1立三角フラスコ2個に250 cc宛入れ殺菌後、寒天分解細菌

Agar %		0	0.3	0.5	0.8	1.0
pH	(1)	7.2	7.1	6.9	6.8	6.7~6.8
	(2)	7.0	6.7	7.0	7.0	6.3~6.4

の肉汁試験管培養を接種して30°Cで5日間培養した濾液を酵素液とした。なお培養後のpHは上の如くであつた。

酵素力を第(Ⅲ)項の場合と同様に試験した結果の1例は第11表の如くであつた。

Table 11. Agarase Formation on Varied Amount of Agar in Medium

Agar %		0	0.3	0.5	0.8	1.0
Reaction time (hr)	Reducing sugar formed	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc
0		—	—	—	—	—
0.5		0.06	0.48	1.00	0.58	0.97
1		0.04	0.75	1.35	1.00	1.35
2		0.07	1.05	1.53	1.23	1.43
3		0.11	1.24	1.54	1.33	1.45
5		0.07	1.37	1.54	1.44	1.43
24		0.31	1.72	1.58	1.52	1.44

この結果では0.5%のものが最も酵素力が強いが、その他の多くの実験から一般としては0.3~1.0%の含有量では著しい差はなく、0.5%で大體酵素力は最大に達するものと思われる。

VI. 培養日数と酵素力

寒天分解細菌を人工培養基に培養する場合にその日数と酵素力との関係を見るため次の實驗を行つた。

試験方法：培養基に前項と同様の人工培養基を用い窒素源としては Pepton を0.16%，寒天は0.5%を含有させたもので1立三角フラスコに300ccづゝ入れ、常法の如く殺菌後、菌を接種し30°Cに一定日数保つた後、これを取り出しその濾液に就て前項同様の配合で酵素力を比較した(第12表)。この際使用した寒天は精製粉末寒天で水分12.44%であつた。但し定量は BERTRAND 法により KMnO_4 の滴定数によつて表した。

Table 12. Relation between Incubation Period and Agarase Formation

Incubation period (day)		2	3	4	5	6	7	10
Reaction time (hr)	Reducing sugar formed	KMnO_4 cc	KMnO_4 cc	KMnO_4 cc	KMnO_4 cc	KMnO_4 cc	KMnO_4 cc	KMnO_4 cc
(1)	0	—	—	—	—	—	—	—
	0.5	0.16	0.58	0.18	0.78	1.75	1.16	0.27
	2	1.79	1.19	1.20	1.91	1.74	2.41	—
	24	5.18	4.72	5.90	5.41	4.68	5.99	5.08
	pH (after incubation)	6.3	6.2	6.2	6.1	6.1	6.0	5.8
(2)	0	—	—	—	—	—	—	—
	1	1.18	2.14	0.28	0.81	0.82	1.79	1.98
	3	2.16	3.16	2.95	4.07	2.57	3.00	4.23
	4	8.68	9.53	7.57	8.82	6.52	6.83	8.63
	pH (after incubation)	6.3	6.2	6.0	5.6	5.6	5.5	5.5

KMnO_4 1cc=1.9814mg Cu

VII. 所謂アミノ酸及びエチルアルコール添加の影響

福本氏²⁾は *Bac. amyloliquefaciens* に就てその培養基中に所謂アミノ酸、アルコール等の或量の存在はその酵素力に好結果をもたらす殊にエチルアルコールの2%量の添加は酵素力の倍加をもたらすことを報告したが寒天分解酵素に就てかかる事實の有無を吟味した。

(1) アミノ酸添加と酵素力

実験方法：人工培養基 (K_2HPO_4 0.1%, NaCl 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, Pepton 0.2%, 寒天 0.5%, pH 7.1) 300cc宛を1立三角フラスコに入れ鰯ミール570gを20% HCl 4倍量で加水分解後中和した濾液を濃縮し100ccとしたアミノ酸液 (100cc中全窒素約4.8g) を一定量添加し常法の如く殺菌して寒天分解細菌を接種し、30°Cに5日間培養した液に就て前項の如く40°Cで寒天に

Table 13. Effect of Addition of Hydrolysate of Sardine Meal with Hydrochloric Acid on Agarase Formation

Hydrolysate of sardine meal cc		0	2	5	10
Reaction time (hr)	Reducing sugar formed	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc
0		—	—	—	—
0.5		0.49	0.63	0.54	0.20
1		0.66	0.90	0.77	0.32
24		1.38	1.20	1.32	1.18
pH (after incubation)		7.1	7.2	7.5	8.2

(480)

(石松) 寒天分解細菌に関する研究 (第2報)

作用させ、酵素力は WILLSTÄTTER-SCHUDEL 法によつて20cc中の還元糖を定量し N/10 I₂ の cc 数で示して比較した。その結果の1例は第13表の如くである。

この結果よりみれば2cc添加の場合やや対照より早期に良結果を示したが、一般に特に酵素力強化の効果は見られない。

(2) エチルアルコール添加と酵素力

前述の人工培養基にエチルアルコールを添加して寒天分解細菌を培養したものについて、酵素力を比較した(実験方法は(1)と全く同様)。結果の1例を示すと第14表の如くである。

Table 14. Effect of Addition of Ethylalcohol on Agarase Formation

Ethylalcohol % Reducing sugar formed Reaction time (hr)	0		0.3		0.5	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc	N/10 I ₂ cc
0	-	-	-	-	-	-
0.5	0.74	0.46	0.38	0.49	0.60	0.57
1	0.98	0.68	0.52	0.76	0.70	0.79
24	1.54	1.72	1.31	1.78	1.25	1.65
pH (after incubation)	7.1	7.1	7.0	7.0	7.0	7.0

この結果からエチルアルコールの0.3~0.5%の添加は酵素の生成に影響はない。

考 察

本寒天分解細菌は肉汁寒天に斜面培養すればよく繁殖し、寒天を分解して劃線に沿つて溝を生ずることは第1報に述べた如くであるが、單に肉汁に液體培養した場合は濁濁はするが寒天分解酵素力は殆どない。即ち培養基の組成、ことに炭素源は寒天分解酵素の分泌に至大の關係があつて人工培養基(K₂HPO₄ 0.1%, NaCl 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, (NH₄)₃PO₄ 0.15%又は Pepton 0.2%, pH 7.0~7.1)を用いた場合でも炭素源として寒天を含まない場合は寒天分解酵素力は皆無か極めて微弱である。この場合寒天が存在すれば酵素の生産は顯著である。寒天以外の炭水化物を炭素源として使用した場合蒟蒻マンナンは或程度酵素力を示し、ズルチツト、イヌリン、澱粉ではやや酵素生産を認めた實驗例もあつたが概して微弱で、キシロース、ガラクトース、葡萄糖、乳糖、蔗糖、寒天分解物等では酵素の生産は炭素源を全然含まないものと大差ないか又はこれより反つて劣る結果を得た。又炭素源として寒天0.2%を含んだ培養基に更に糖類を添加すると酵素生産が著しく抑制される。これらのことから寒天分解酵素は所謂基質に適應して生成する酵素であると考えられる。

培養基中の寒天量(0.3~1%)と酵素力の關係を検した結果及び其他の數多くの實驗から炭素源としての寒天は0.3~1.0%で大差なく、0.5%以上の添加は寒天分解酵素力の増強を示さない。

培養基中に0.2%程度の寒天の存在で相當強い酵素力を示すので寒天分解酵素の生産に炭素源として寒天は必要であるが、少量で足りることが窺える。培養基中の窒素源の種類は菌の繁殖にも關係があるが寒天分解酵素の分泌に相當影響がある。Pepton, Asparagin の如き有機窒素源は極めて良好であるが大豆蛋白質は本菌には利用され難い傾向が認められる。無機窒素源もよく利用され、(NH₄)₃PO₄, (NH₄)₂HPO₄, KNO₃, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄等は相當よく寒天分解酵素を生産し、(NH₄)₂HPO₄を用いた場合、Peptonを用いた場合と同程度の結果をも得ている。NH₄Clは窒素源としてやや劣るがこれはCl⁻の影響と考えられる。

窒素源の使用量と酵素力の関係は Pepton の場合は、0.1~0.3%の間で大差がなく、0.5%ではやや酵素力低下の傾向が見られた。即ち Pepton では0.15%, KNO_3 では0.1%の添加で十分であると考えられる。培養日数と寒天分解酵素の分泌量の関係は2~10日間に就ては明確な関係は見られないが他の数多くの実験結果から5~7日間の培養で酵素力は大體最高に達することが認められる。

Bac. amyloliquefaciens FUKUMOTO 及びこれに類似する細菌は培養基にエチルアルコールを1~2%添加すると Amylase 生成量を著しく増大する事実があるが、本菌の寒天分解酵素生成についてはその効果は認められず、なお所謂アミノ酸（フィッシュミールを鹽酸分解で調製）の添加も酵素力を増強することがなく本菌に對しては兩者はその酵素生産に特別の意味をもたないことが考えられる。

總 括

1. 本菌の寒天分解酵素は所謂基質に適應して生成する酵素である。培養基の炭素源として寒天量は0.5%前後が適當である。
2. 培養基中に炭素源として寒天が存在しても同時に糖類が炭素源として共存すると酵素力は著しく抑制される。
3. 培養基の窒素源として Pepton, Asparagin 等の有機窒素源は最も好適で $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等の無機窒素源も寒天分解酵素生成に有効であるが、 NH_4Cl はこれらに比して劣る。寒天を含む肉汁は人工培養基と略同様の酵素生産を示したが、寒天を含む豆汁は培養基としてはやや劣る。
4. 培養基中の窒素源の量と酵素力との関係は Pepton では0.15~0.7%の間で特に酵素生産に差がなく、 KNO_3 も0.1~0.5%の間で酵素力に差を認めない。
5. 培養期間と培養液中の寒天分解酵素力との間には明瞭な関係は見られないが大凡5~7日間で酵素力は最大に達する。
6. 培養基にエチルアルコール及び所謂アミノ酸を添加しても酵素力の増強は認められない。

(附記) Agarase の酵素力の表現は寒天の酵素分解による生成還元糖はガラクトースでないこと、本菌の長期保存中に酵素力を増強したこと等の理由で實驗時期、培養基の種類によつて KMnO_4 或は I_2 液の滴定數の差によつた。

終りに臨み終始御指導を賜つた福本博士並びに御助言、御校閲を戴いた恩師山崎何恵先生に深謝する。

(本報の概要は昭和18年7月3日日本農藝化學會關西支部例会、昭和19年5月7日同關西支部例会並びに昭和25年4月10日日本農藝化學會に於て講演した。)

文 献

- 1) 福本, 石松: 大工研報, 13, 1, 昭26 (1951).
- 2) 福本: 大工研報, 9, 45, 50, 昭18 (1943).