

家蚕組織に於ける硝酸還元作用に就て

大村, 浩久
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21314>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 14 (3), pp.407-414, 1954-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

家蚕組織に於ける硝酸還元作用に就て

大 村 浩 久

On the reduction of nitrate in silk-worm tissue

Hirohisa Omura

緒 言

先に家蚕組織に硝酸還元作用を認めたと(大村:1951), 生体内反応の大部分が酵素の触媒作用の下に進行する事は論を俟たない所であつて, 家蚕の硝酸還元作用も亦例外ではあり得ない. 所で酵素の化学的研究に際しては生細胞から抽出分離し, 結晶化乃至は出来るだけ純化した製品を用い, 単純な人工反応系による試験管内試験で個々の反応を検討し, 生体内に於けるその機能を部分的に認識し精妙な代謝の本態を推論している. 従つて酵素の生体外抽出に先ず努力が払われるが, 硝酸還元酵素に就ては古く照井(1936), 山県(1938)氏等が微生物からの抽出を行つているが, 特に戦後江上氏等(1947, 1948, 1950)によつて大腸菌並びに牛肝臓から前者に在つては超音波処理, 後者からは自己消化法により細胞外に取り出し更に硫酸沈澱法を用いて之等を精製し, その性質, 本態, 作用型式等に関し詳細な研究が進められている. 一方 Bernheim, Dixon 両氏(1928)は肝臓組織の硝酸還元酵素力は磨碎後エーテルと振り繰り返し水洗して得た粒状塊に残存する事を観察しているし, 前記諸氏にしても単なる磨碎によつて抽出したわけではない. 著者は家蚕の磨碎懸濁液を用いて硝酸還元酵素の存在を確証したのであるが, 之は消化管内容物をも含み特に食下された桑葉のために反応液は緑色を帯び, 又脱皮直後給桑前の個体を使用しても強アルカリ性黄褐色消化液の混入を免れず, 生成した NO_2 の比色測定を著しく攪乱して酵素力の判定を困難にするのみならず pH をアルカリ側に移動させる外, 種々の不純物も混合する等反応に迄影響を及ぼし試験遂行上好ましくなかつた. 従つて酵素の純化を企図したが Bernheim 氏等と同様に酵素がかなり緊密に組織に結合しているため現在迄の所細胞外抽出には成功していないが, 家蚕の飼育期間が限定されて居り, 又品種, 成長度, 飼育条件等によつても酵素力が異なるので取敢えず磨碎懸濁液を用いて実験を進めた.

実 験

1. 家蚕生体. 家蚕は当研究室に於てバイラス実験のために同一人の管理下に同一条件で, 特に病毒の感染を避ける事に注意して少数宛入念に飼育したものである. 使用に際しては通常2~3時間絶食させ, 蚕糞, 桑葉片等を除き殺菌水で繰返し十分洗滌した後少量の石英砂を加え丹念に磨碎して酵素液を調製した. 酵素力は生成した NO_2 量を以て示し, Griess 氏試薬による極めて鋭敏な比色法を採用したが, 従来使用してきた醋酸鉛による反応液の清澄は磷酸緩衝液を用うる時には磷酸鉛の白色沈澱を生ずるため使用出来な

かつた。併し氷醋酸を加えて pH を 3.8 附近にすると蛋白質は凝固沈澱して液は透明になる事が判つた。通常反応液 10 cc を 5~10 分間沸騰水に浸漬加熱して反応を停止し急冷後 10 cc に復する。此の際蛋白質の一部は凝固するが液は尙不透明である。之に 0.2 cc 氷醋酸を加えて激しく振盪した後遠心分離し透明なる上澄液を得る。液は黄色を帯び然もその色は酵素反応に由来するらしく試験液より得たものは加熱酵素液を用いた盲験のものよりも強いが、通常 NO_2 濃度 $2 \times 10^{-5} \text{M}$ 附近迄 50~100 倍稀釈後呈色測定するので支障はない。又加熱により凝固した蛋白質のみを除去した不透明な液のままでも稀釈するため別段差支えはない様であるが、スルフェニール酸醋酸溶液の添加で液は更に濁濁し色調を異にして Dubosque 比色計による比色を困難にする。併し之等の酵素剤はプロテアーゼをも含み反応液中に生じたアミノ酸と還元生成物 NO_2 とが醋酸酸性下に反応する虞れもあるので醋酸鉛を使用する事の好ましいのは云う迄もないが、今迄の経験では此の虞れも先ず少いようである。

昭和 26 年 9 月 25 日掃き立て、2 日目から 2 齢中 (3 日間) N/30, 3 齢中 (4 日間) N/20, 4 齢になつて N/10 KNO_3 を毎日 1 回添食した区 (KNO_3 区) 並びに対照区として添食せず正常に飼育した支 115 種に就て、2 齢 4 日蚕 2.2 g (KNO_3 区 82 頭, 対照区 80 頭) を M/10 磷酸緩衝液 pH 6.2 とよく磨碎し 22 cc とした蚕体磨碎懸濁液、3 齢 2 日蚕 2.2 g (KNO_3 区 55 頭, 対照区 54 頭) の磨碎懸濁液を吸引濾過して得た 55 cc 不透明濾液並びに 4 齢 3 日に消化管を除いて得た組織 4.2 g (KNO_3 区 30 頭, 対照区 28 頭) を殺菌水で洗滌後 2% NaF 含有 M/10 磷酸緩衝液と磨碎 42 cc とし、40° に 20 時間自己消化させた後遠心分離し 42 cc に復した上澄液をそれぞれ 5 cc に 10^{-2}M となる様に $2 \times 10^{-2} \text{M}$ NaNO_2 5 cc を混合しトルオール 1 cc 添加、液面を被覆して 40° 22 時間反応させ、酵素能は磨碎懸濁液に認められたが組織片を分離した溶液中には抽出されない事を第

第 1 表. 酵 素 液 の 使 用 型 態.

 10^{-5}M NO_2 , 40°, 22 h.

酵 素 液	pH	酵素量 g	生長期	使用組織	薬品処理	区 分	生成 NO_2 , $\times 10^{-5} \text{M}$
磨碎懸濁液	6.5	0.5	2令4日	全蚕体	対照区	試 験 盲 験	329 0.4
					KNO_3 区	試 験 盲 験	315 0.4
抽出濾液	6.5	0.2	3令2日	全蚕体	対照区	試 験 盲 験	0.15 0.02
					KNO_3 区	試 験 盲 験	0.02 0.02
自己消化上澄液	6.2	0.5	4令3日	消化管 除去組織	対照区	試 験 盲 験	0 0
					KNO_3 区	試 験 盲 験	0.03 0.03

1表に示す様に観察した。尙旨験は反応液調製直後5分間沸騰水に浸漬加熱し以下同様に平行操作した。

旨験に於て煮沸するため亜硝酸呈色試薬によつて類似の色調を生じ比色を混乱させる事は家蚕の外、煙草(大村：1951)、廿日鼠肝臓アセトン粉末(大村：1952)に就ても認められたが、此の強さは殊に消化管内に桑葉片が残存する場合に著しく、更に加熱時間に影響されるので適宜選択する必要がある。そのため同上蚕4齢4日両区共にそれぞれ28頭より消化管を除いた組織各5gを50cc M/10 磷酸磨碎懸濁液とし、その5cc宛を用いて反

第2表. 煮沸時間及び氷醋酸添加の影響。
 10^{-2} M NO_3^- , 40°, 22 h, 酵素量 0.5 g.

薬品処理	加熱時間分	氷醋酸添加量 cc	pH	生成 NO_2 , $\times 10^{-5}$ M
対 照 区	0	0	6.2	359
	5	0	6.2	0.02
	10	0	6.2	0.01
	20	0	6.2	0.02
	0	0.2	3.8	0
KNO_2 区	0	0	6.2	392
	5	0	6.2	0.08
	10	0	6.2	0.08
	20	0	6.2	0.15
	0	0.2	3.8	0

応液調製直後5, 10及び20分間沸騰水に浸漬したもの並びに加熱しない反応液に就て40° 22時間後更に5分間加熱反応停止し、生成 NO_2 を測定した。又之等の反応液を煮沸する代りに氷醋酸を添加して酵素蛋白を凝固沈澱させ旨験とする事も試みた。第2表から判る様に旨験用としての加熱時間は既に5分で充分であるが、氷醋酸の添加は更に有効であり又 KNO_2 添食蚕に呈色不純物の関与の大きい事が見られた。併し何れにしても生成 NO_2 は試験区に比べると著しく少く、少くとも消化管を除いた組織の場合には20分加熱しても無視出来るものである。

自己消化に際しては組織磨碎物の pH 6.2, 酵素反応の温度 40° を選んだが、江上氏等(1948)が牛肝臓に就て pH 7.6, 25°, 24~30 時間の条件を用い、pH の低下を避け温度が高過ぎたり時間が長過ぎると好結果が得られないと述べているように、自己消化条件の不適切であつたためか酵素本来の特性に依るかは今後の検討に俟つが、何れにしても家蚕の硝酸還元酵素は溶液中に抽出されず組織にかなり緊密に結合している事が推定される。然るに吸引濾過によつて組織片を分離使用する事は時間を要する上操作上も困難であるので先ず10月5日掃き立て、支115種3齢4日の正常飼育蚕2.5g 33頭より M/10 磷酸緩衝液と磨碎し全量 25 cc 懸濁液とし 3,000 r.p.m. に10分間遠心分離し、緩衝液で 25 cc に復した緑色不透明の上澄液にも硝酸還元酵素力は認められず、吸引濾過の代りに遠心分離で良い事を確かめた後、翌3齢5日 4.5g (45頭) を殺菌水に磨碎懸濁し 45 cc とし(原酵素液)、此の中 30 cc を遠心分離し上澄液を原量に復す(抽出酵素液)。一方残渣も pH 6.4

の M/10 磷酸緩衝液に磨碎しながら同量に再懸濁し之を残渣酵素液とした。之等の酵素液 5 cc は何れも蚕体 0.5 g 又は之に相当する量の抽出物或は残渣を含有する。同様に 10 月 18 日掃き立て、支 115 種 3 齡 4 日蚕 (29 頭, 3.5 g) から殺菌水の代わりに磷酸緩衝液を用いて同様の処理を施して調製した各酵素液に就て硝酸還元作用を試験し、水素供与体或は他の活性物質が溶出除去されるためか、作用力は低下するが Bernheim 及び Dixon 氏が示したと同様に酵素は抽出されずに組織と結合して残存する事が判つたので或る程度精製し得る可能性を得た。又作用力は飼育時期、蚕児の齡・品種等によつても異なるので第 3 表の結果から断定は出来ないが磷酸懸濁液に於て水の場合よりも強く現われるようであ

第 3 表. 蚕体抽出効果.
 $10^{-3} M NO_3$, 40° , 22 h, pH 6.4, 酵素量 0.5 g.

酵 素 剤	酵 素 液	生成 NO_2 , $\times 10^{-5} M$	比
3 令 5 日 全 蚕 体	原 酵 素 液 (H_2O)	23.2	100
	抽出酵素液 (H_2O)	0	0
	残渣酵素液 (磷酸塩)	1.8	7.8
3 令 4 日 全 蚕 体	原 酵 素 液 (磷酸塩)	147.0	100
	抽出酵素液 (磷酸塩)	0	0
	残渣酵素液 (磷酸塩)	18.7	12.7

る。尚表には百分値は省略した。

之等の結果によつて、少くとも蚕体組織に硝酸還元酵素の存在する事は認められるが、蚕体各部に於ける分布を見るため各器官或は組織に出来るだけ細かく分けて試験すべきではあるが、過度に細分する事は酵素剤として使用する量を採る上に實際上困難であるので、組織、血液、消化管、消化液及び管内固形物(食下桑葉片)に大別して実施した。10 月 18 日掃き立て、支 115 種 NH_2OH 添食蚕に就て、組織酵素液は 5 齡 1 日、脱皮直後、給桑前の蚕児をよく洗滌した後、背部の表皮を縦に裂いて血液及び特に消化管を破らないように除き、再び水で附着血液や附風諸器官を洗滌除去して得た組織 2 g を磨碎し 20 cc M/10 磷酸懸濁液とした。血液酵素液は上記処理に当り表皮を裂くと先ず透明な血液が溢出するので此の 1 g を採り水を加えて 10 cc とした。採取中空気に接しチロシナーゼのため黒変した。蚕児は蚕の一生の中で専ら養分を摂り成長し多量の物質を体内に貯蔵して營菌並びに蛹蛾期の活動に備える期間であるので、消化器は体内に於ける最大の器官であつて、口腔・食道の 2 部から成る前部、単に胃又は中胃と称せられる太い筒形の中部、及び専ら糞塊の排泄作用を営む小・結・直の 3 腸より構成される後部に分けられる。此の中その大部分を占めるものは第 2 環節から第 9 環節に達する胃であつて、管壁は周囲の筋肉層と内側の単細胞層より成り、消化液の分泌、消化、養分の吸取も殆どここで行われる。本報で消化管と称するのは此の胃部である。供試蚕児は脱皮直後であつたので消化管は黄褐色の胃液を充滿するだけであつた。摘出した消化管を破つて消化液 1 g を採り水で 10 cc とした pH 9.5 の黄褐色透明液を消化液酵素液とし、管壁を更によく殺菌水で洗いその 1 g から調製した 10 cc 磷酸懸濁液を消化管酵素液とした。又同一家蚕 5 齡 4 日に消化管を摘出して内容物を集め遠心分離して消化液を除き残渣を 2 回殺菌水で洗滌した。家蚕に

於ては高等動物の咀嚼とは異りその大體は唯嚙み切るだけの作用をするに過ぎず、所謂蚕食された桑葉小片は唾液で潤されて多少化学的变化を受けるとはいへ、得られた消化管内内容物は依然桑葉の外観を保つて居り消化を受けつつある状態と見る事が出来る。此の1.5gをよく磨碎し水で15ccとした緑色不透明の液を消化管内固形物酵素液とした、之等の酵素液の硝酸還元酵素は第4表に示すように組織並びに消化管にのみ検出された。

第4表. 蚕体内分布.
10⁻²M NO₃, 40°, 17.5 h, 酵素量 0.5 g.

部 位	組 織	血 液	消 化 液	消 化 管	消化管内固形物
令	5 令 1 日				5 令 4 日
pH	6.0	5.8	9.5	6.0	5.8
生成 NO ₂ , ×10 ⁻⁴ M	350	0	0	102	0

当研究室に於てヒドロキシルアミン、アセトオキシム並びに亜硝酸塩の添食によつて家蚕にバイラス病を発生させ得る事が見出されたが、硝酸よりアンモニアに至る還元系列の中間に位置すると考えられる之等バイラス誘起物質とでも云い得る諸薬品が硝酸還元酵素にも何等かの影響を及ぼす事は容易に予想される所であつて、酵素剤に用いる家蚕の部位によつて薬品の影響が異なる事を実際に観察した。従つて試験の目的に応じ適宜選択して酵素液を調製しなければならない。例えば10月18日掃き立て、支115種、2齡中(3日間)N/30, 3齡中(4日間)N/20, 4齡 N/10 NH₂OH 添食蚕及びその対照蚕に就て4齡1日に給桑添食3時間後、両区共に各7頭1.5g及び同じく前者25頭、後者28頭よりの消化管除去組織各1.5gからそれぞれ15ccの磨碎懸濁液を調製しその硝酸還元酵素に就て第5表の結果を得た。即ち全蚕体酵素ではNH₂OH区は著しく作用力が弱く不活性化されたかの嚙を示すが消化管並びに血液を除いた組織のみに就て見ると却つて活性化されていて、食下されたNH₂OH自体若くはその消化液又は血液内成分との結合物が酵素反応を阻害するように考えられる。

第5表. NH₂OH添食の影響.
10⁻²M NO₃, 40°, 17.5 h, 酵素量 0.5 g.

酵 素 剤	pH	薬 品 添 食	生成 NO ₂ , ×10 ⁻⁴ M
全 蚕 体	6.4	対 照 区	124
		NH ₂ OH 区	6
消化管除去組織	6.4	対 照 区	304
		NH ₂ OH 区	416

II. アセトン粉末. 蚕は柘共の他二三の植物を多少摂取するとはいえ、専ら桑葉を唯一の飼料とするためその飼育可能期間は桑葉の繁茂する時期に限定され、5月から10月に至る6ヶ月であるが、養蚕家は勞力、氣候、桑園管理等の関係から春蚕1回秋蚕2回を普通としているようである。当研究室に於ては少数宛10日乃至2週間毎に卵を冷蔵庫より取出して催青孵化させ桑葉の入手可能な時期を通じ継続して飼育するので、大略所望の

時期に所望の齡の蚕兒を利用出来たが年間を通じて飼育する事は不可能であり、10月下旬には飼育室の保温を必要とし特に桑葉の質が低下するため生育が著しく悪くなる。桑葉を冷蔵庫に貯蔵して翌年2月中旬迄飼育を続けた事もあつたが勞のみ多くして生長不良は更に甚だしく正常な生理状態を保つてゐると思われなかつた。通常当研究室に於ては4月末より12月に至る間30回前後の飼育を行い、従つて此の期間が生体を用いての試験可能な期間でもあつた。普通1回に数個分の卵を孵化するが幼虫期に1万倍にもなるという程生育の烈しい動物であるので生長に伴つて甚しく過剰になる。従つて必要数のみを残して余分はアセトン乾燥粉末を作つて保存し当教室に於ける他の酵素試験に使用してきたが、此の粉末にも硝酸還元酵素力が残存する事を認めた。2~3時間絶食させた後生体をよく水洗し乳鉢で十分磨砕し約5倍量のアセトンを加えて脱水し迅速に吸引濾過する。残渣を再び磨砕しながらアセトン添加並びに吸引濾過を行う。3乃至5回繰返すと、白色の乾燥粉末を得る。之をデンケーター中で数日間減圧下にアセトン臭の無くなる迄乾燥を継続した後室温に保存する。勿論消化管を除去した組織のみに就て更に氷冷下に氷冷アセトンを用いて操作する事が好ましいのは当然である。蚕兒の成分は生長時期によつてかなりの変動はあるが、概略体重の80%は水分であり残り20%の乾物中その約70%が蛋白質、各10%が脂肪、灰分及び炭水化物其の他であるが、アセトン粉末の収量は数%に過ぎなかつた。全蚕體の場合は消化管内にある食下された桑葉のためにアセトン抽出液は綠色を呈し又組織のみの場合は黄色であるが、回数を重ねるに伴つて無色になる。之と共に脱水度も進むので濾液の色はアセトン処理の回数を決定する一助の目安となる。尙前者の場合完全に桑葉片の色を除く事は困難であつて製品は僅かに綠色を帯びている。又表皮のみは粉砕されずに残り易いので特に入念に磨砕するか乾燥後磨砕若くは篩別する。こうして得られた粉末は勿論酵素力の低下は免れないが耐久製品として長期間室温に保存出来る。酵素懸濁液調製に際しては著しく膨潤するので5cc当り0.5乃至0.1g用いるのが取扱に

も便利であり反応力も十分であつた。調製後4ヶ月の日115、4齡4日蚕アセトン粉末のM/10磷酸懸濁液の硝酸還元力とNO₂濃度との關係を第6表に、又生体の場合と同様に水及び磷酸緩衝液で磨砕抽出されず酵素力が残渣に残る事は第7表に示す。

第6表. NO₂濃度と酵素力。
35°, 19h, pH 6.8, 酵素量 0.1g.

NO ₂ 濃度 M	生成 NO ₂ , ×10 ⁻³ M
10 ⁻¹	5.27
10 ⁻²	2.88
10 ⁻³	0.176

第7表. アセトン粉末抽出効果。
10⁻²M NO₂, 40°, 22h, 酵素量 0.1g.

酵 素 液	溶 媒	pH	生成 NO ₂ , ×10 ⁻⁵ M
抽出酵素液	H ₂ O	6.0	0.05
残渣酵素液		5.8	182
抽出酵素液	磷 酸 塩	6.0	0.1
残渣酵素液		6.0	222

此の場合は調製後約1年半を経過した太平×長安種、4齢2日蚕のアセトン粉末 0.3 g を水及び M/10 磷酸緩衝液で生体に做つてそれぞれ 15 cc の抽出液及び残渣懸濁液を調製し酵素液とした。尙此の場合に於ても作用力は磷酸懸濁液に於て水の場合よりも若干強く現われた。

照井氏は蠶のアセトン又は酒精耐久製品から酵素の生体外抽出に成功しているが、蚕体では上記方法で作製したアセトン乾燥粉末から抽出されなかつた。

総 括

1. 家蚕の硝酸還元酵素は組織並びに消化管に存在し血液、消化液及び食下された消化管内の桑葉片には検出されなかつた。
2. 酵素は組織にかなり緊密に結合し磨碎によつては水又は磷酸緩衝液で抽出されなかつた。併し酵素力は減少した。
3. NH_2OH 添食蚕の全蚕体を酵素剤とした場合は作用力は著しく減少するかの観を示したが組織のみでは却て活性化された。
4. アセトン乾燥粉末は長期間保存し得る酵素剤として有効であり、又酵素は生体同様抽出されなかつた。

文 献

- Bernheim, F. & Dixon, M. (1928) : *Biochem. J.*, **22**, 125.
 江上不二夫, 佐藤 了 (1947) : *日化*, **68**, 39.
 江上不二夫, 佐藤 了 (1948) : *日化*, **69**, 160.
 江上不二夫, 鈴木 旺, 丹羽 充, 佐藤 了 (1950) : *日化*, **71**, 226.
 大村浩久 (1951) : *農化*, **24**, 380.
 大村浩久 (1952) : *九大農*, 学芸雑誌, **12**, 327.
 照井龜造 (1936) : *醸造*, **14**, 233.
 山県春次 (1938) : *Acta Phytochim.*, **10**, 283.

S u m m a r y

The estimation of the nitrate reductase of the silk-worm was carried out as previously reported (Yamafuji, Omura & Sakamoto, *Enzymologia*, **15**, 210, 1952). 5 cc of enzyme solution was mixed thoroughly with 5 cc of $2 \times 10^{-2} \text{M}$ NaNO_3 solution in test tube, then was added 1 cc of toluene to cover the surface of reaction mixture. Tubes were allowed to stand in incubator at 40° for 22 hrs. After the reaction had been over the tubes were heated at 100° for 5 min. to stop the reaction, cooled rapidly with flowing water, restored to original volume 10 cc. A few drops of Pb-acetate solution, if water was used as solvent, or 0.2 cc of conc. acetic acid in case of phosphate buffer, were added

and centrifuged. The clear supernatant liquid obtained was diluted so as to have the final concentration of NO_2 formed about $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, added Griess's reagent and the intensity of the red colour developed was compared with that of the standard NO_2 solution with concentration of $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ by the Dubosque's colourimeter as usual. As the enzyme solution for this study, the following preparations were tested; 10% (w/v) suspension of whole body of worm which had been prepared by grinding the larvae with small amount of quartz sand and suspended in water or M/10 phosphate buffer, pH 6.4; filtrate of supernatant liquid of the above suspension; and supernatant solution of digestive-canal-free tissue homogenate which was autolyzed at 40° for 20 hrs. under the presence of 2% NaF. It was observed that there are NO_2 -formations from NO_3 by the first but not by the others and by all four enzyme solutions which were heated at 100° for 5 min. before beginning of the reaction as control. Namely, that the enzyme would be associated with tissue fairly closely and that it is impossible to extract by grinding were confirmed. In this work, therefore, the suspension of the ground chyme of tissue was used as enzyme solution.

It was previously reported that when ground mass of worm was heated for too long period, the red colour which developed with Griess's reagent disturbed the determination of NO_2 . If digestive-canal-free tissue was used, however, the intensity of the disturbing colour was negligible after heating even for 20 min.

Then the effect of extraction of the tissue on the enzymatic activity was studied. The 10% (w/v) tissue suspension in water or phosphate buffer was prepared as above, agitated thoroughly and centrifuged. The cloudy extract was restored with same solvent to original volume and the residue was also resuspended. The reaction of these enzymes was compared. The amount of NO_2 produced by catalytic action of resuspension was about 8~10% of that in original one and of course the extract showed no activity.

The nitrate reductase in the silk-worm was existing in the tissue and in the wall of the digestive canal but not in the blood, digestive-juice with high alkalinity, or in the solid in canal which was fine debris of mulberry leaves eaten. The enzymatic activity of the worm homogenate in the phosphate buffer was higher than that in water. It seemed that although hydroxylamine feeding brings about the decrease of the reductase activity by whole body, the enzyme in the alimentary-tract-free tissue was activated.

The ground mass of worm was repeatedly dehydrated with a large volume of acetone, dried in vacuo and pulverized. This acetone-dried powder also retained the ability of catalyzing the conversion of NO_3 to NO_2 for many months at room temperature and I was unable to extract the enzyme from this powder as living tissue.