

# 一好塩性細菌の静菌液の酵素作用に 対する食塩濃度の影響について

谷 口 忠 敬

## Effect of Sodium chloride on the Enzyme Actions of Cell Suspension of a Halophile, *Vibrio* sp. No. 10

Tadataka TANIGUTI

A general survey has been made of the enzyme actions on a moderate halophile with considerable high salt requirements. The cell suspension of the test organism was able to oxidize glucose, citrate and succinate. The ability to oxidize glucose and lactate was most active in 4% NaCl solution, while a capacity to use succinate and citrate was gradually decreased by increasing the concentration of NaCl. This organism also shows to deaminate weakly the amino acids (alanine, valine, aspartic acid and leucine), but the activities of amino acid deamination varied in accordance with the change in the concentration of NaCl in the reaction mixture and with the amino acid tested as substrate. Leucine was deaminated higher than the other amino acids and its optimum pH of deamination was about pH 8.5. Enzyme activities of the cell suspension on glucose or leucine were more stable in 6% NaCl than in a low concentration of it. Leucine deaminase was unstable and the activity against this amino acid decreased rapidly in 1% NaCl.

### 緒 言

赤変色素生産性の所謂 Extreme Obligate Halophiles の酵素作用についての研究は多いようであるが、Moderate Halophiles については比較的少く *Vibrio costicola* の葡萄糖酸化<sup>1)</sup> *Micrococcus halodenitrificans* の nitritase 及び乳酸脱水素酵素<sup>2)</sup>等についての報告が見られるにすぎないようである。

先に2株の好塩性細菌の発育に対する食塩及びその含有する狭雑塩類の影響<sup>3)</sup>について試験したが、今回は *Vibrio* sp. No. 10, Facultative Halophile の細胞懸濁液を使用してその酵素作用に対する食塩濃度の影響を見た。本試験は供試細菌の作用に対する基礎的な一般知見を得る目的で行ったもので主として食塩濃度の影響を脱水素酵素及びアミノ酸脱アミノ酵素について実施した。

本文に入るに先立ち、終始懇篤な御指導を賜った本学武田教授並びに銭谷助教授に対し茲に謹んで感謝の意を表する。

### 実 験 の 部

#### 1. *Vibrio* sp. No. 10 の糖及び有機酸の脱水素作用に対する食塩濃度の影響

本菌の呼吸基質となる物質を確めるため種々の有機酸及び糖類について Thunberg 法によつて試験した。  
菌懸濁液の調製：6%食塩を含有する肉汁寒天、30°C、24時間培養から菌体のみをとり、6%食塩水で2回洗滌後、再び同液に懸濁した。菌量(乾燥重量40mg/ml)。冷蔵庫0-5°Cに貯蔵した。

脱水素作用の測定：Umbreit 等<sup>4)</sup>の方法に従い次の如く実施した。 $4/100$  Mol 基質溶液0.5 ml,  $4/15$  Mol 磷酸緩衝液(pH 7.0) 0.5 ml,  $1/20,000$  メチレンブルー液1.0ml 及び菌懸濁液1.0mlを加え、これ

に各濃度の食塩になる如く蒸留水或は食塩水を加え全量 6ml とした。30°C, 90分間反応させた。

実験結果： Table 1 に表示した如く葡萄糖，乳酸塩を強く酸化し，然もその作用食塩濃度は最適 4% であつた。且つ 1% 食塩濃度よりも 8% 食塩濃度に於てより強く脱水素する。然るにクエン酸及びコハク酸は食塩濃度の少い程よく作用する。これらの結果から見て葡萄糖，乳酸が所謂耐塩酵素の作用によるものか，或は細胞における酵素分布即ち細胞構造に起因するかは無細胞標本によらねば決定されない。又 1% 食塩濃度に於てクエン酸及びコハク酸の酸化は認められたが焦性葡萄糖の酸化は認められなかつた。

Table 1. Dehydrogenase activities of the cell suspension of *Vibrio* sp. No. 10 on the various substrates.

Substrate	NaCl% (Mol)			
	1 (0.17)	4 (0.6)	8 (1.44)	12 (2.24)
Glucose	173	413	311	35
Glycerine	3	-8	42	0
Lactate	111	195	143	95
Citrate	19	8	0	0
Acetate	-7	14	18	0
Succinate	30	20	18	0

Activities were expressed by 1000/Methylen blue-reduction time (min.).

## 2. 葡萄糖脱水素作用に対する他の無機塩類の影響

先に *Vibrio* sp. No. 10 の発育に対し  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  が NaCl に大部分置換し得ることを確めたが更に葡萄糖脱水素作用に対する NaCl, KCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  及び  $\text{MgSO}_4$  の影響について実験 1 と同様の方法で試験した。

Table 2 に示した如く KCl 及び  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  でも NaCl に全く代用し得るに反し  $\text{MgSO}_4$  の場合は 0.6 Mol の添加で全くその作用が阻止される。即ち本菌の葡萄糖脱水素作用は発育の場合に比較して KCl の影響は比較的少いようである。

Table 2. Effect of NaCl, KCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and  $\text{MgSO}_4$  on the glucose dehydrogenase of the cell suspension of *Vibrio* sp. No. 10.

Salt added	Concentration (Mol)		
	0	0.6	1.2
0.17 Mol NaCl+NaCl	160	286	154
〃 〃 +KCl	160	275	200
〃 〃 + $\text{Na}_2\text{SO}_4$	160	241	200
〃 〃 + $\text{MgSO}_4$	160	0	0

## 3. *Vibrio* sp. No. 10 のアミノ酸脱アミノ作用に対する食塩濃度の影響

呼吸基質に続き肉類製品の変敗と最も密接な関係のあるアミノ酸に対する作用，特にアミノ酸を分解してアンモニヤを生成する作用について試験した。

菌懸濁液の調製： 実験 1 と同様に調製した。

脱アミノ作用の測定： M/10 磷酸緩衝液 3.0ml, M/25 基質溶液 0.75ml, 菌懸濁液 1.0 ml に食塩水或は蒸留水を所要食塩濃度になる如く添加し全量 10ml とした。30°C で反応させた後 15% スルフォサルチル酸 (5%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  含有) 2.5ml 宛を添加，固定してからアンモニヤ量を測定した。

アンモニアの定量は飽和硼酸緩衝液 (pH 10.1) でアルカリ性となし10分間水蒸気蒸溜後、比色法によつて測定した。

実験結果: *Vibrio* 属細菌の脱アミノ作用と食塩濃度との関係については、Iyer 等<sup>5)</sup> が *Vibrio cholerae* のアスパラギン酸脱アミノ作用は食塩がない場合には著しく不活性化され食塩の存在する場合によく脱アミノすると報告し、細胞の透過性をその原因と考えている。

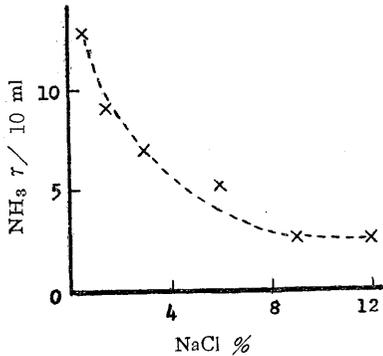


Fig. 1. Effect of the concentration of NaCl on ammonia liberation from the cell suspension of *Vibrio* sp. No. 10.

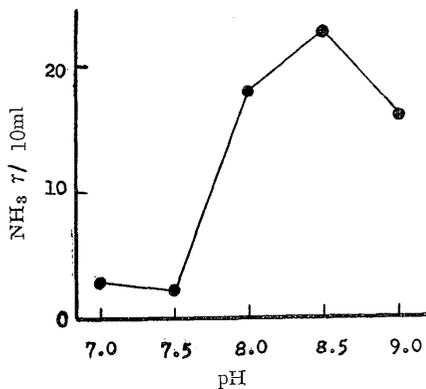


Fig. 2. Effect of pH on deamination of leucine by the cell suspension of *Vibrio* sp. No. 10 (at 30° C, 2.5 hrs.).

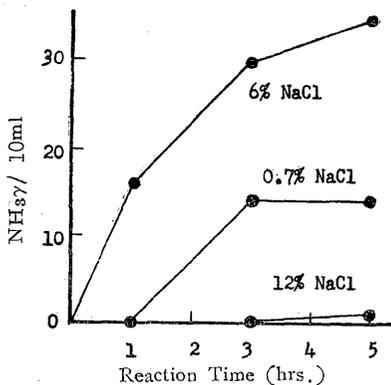


Fig. 3. Effect of deamination of leucine on the cell suspension of *Vibrio* sp. No. 10 cultured on the 6% NaCl broth agar.

*Vibrio* sp. No. 10 ではグリシン、アラニン、ヴァリン、ロイシン、グルタミン酸及びアスパラギン酸等から脱アミノするが一般に強力ではない。本試験の場合は基質無添加の場合にもアンモニアが僅かに検出され、これは十分に休止細胞となつていないためか又は Plasmolysis の影響と考えられる。その関係を図示すると Fig. 1 の如くである。即ち低濃度食塩中では基質無添加でもより多くのアンモニアが認められる。この原因として細胞内部からアンモニアが漏洩したか、内部または漏洩したアミノ酸類の脱アミノによつたかは明らかではない。

アミノ酸脱アミノ作用と食塩濃度の影響についてはアミノ酸の種類によつて異なる様で例えばアスパラギン酸は3% NaCl にて最もよく脱アミノするに比較し、ヴァリン、ロイシン及びグルタミン酸は6-9% に至適濃度をもつ。

ロイシンについて稍々詳しく試験した結果について述べると、6% NaCl を含有する場合にその至適 pH は8.5であつて *E. coli* における如くアルカリ側に於て最もよく作用する (Fig. 2)。

至適濃度 (6% NaCl) で培養した場合の食塩濃度の影響は Fig. 3 の如くで6% NaCl で最もよく発生し、12% NaCl 中では殆どロイシンからアンモニアを生成しない。然るに12% NaCl で培養した場合は Fig. 4 の如く12% NaCl に於ても脱アミノを行う。發育濃度以下の食塩中でより多く脱アミノ作用の行われるのは恐らく Fig. 1 の結果と併せ考え細胞膜の透過性が

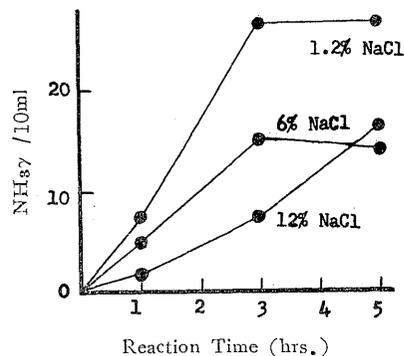


Fig. 4. Effect of deamination of leucine on the cell suspension of *Vibrio* sp. No. 10 cultured on the 12% NaCl broth agar.

乱れ、その影響によるものと推察される。即ち好塩性細菌の細胞は高濃度食塩よりも低濃度食塩に於て Plasmoptysis 等の影響を一層多くうけるようである。

#### 4. 静菌液の葡萄糖脱水素及びロイシン脱アミノ作用の安定性について

*Vibrio* sp. No. 10 の呼吸及び脱アミノ作用についての基礎的試験を菌懸濁液で実施したが更に無細胞標本に入るに先立ち菌懸濁液の安定性について試験してみた。

菌懸濁液の調製： 実験1と同様の方法で各食塩濃度の懸濁液を調製し 7°C に貯蔵した。

脱水素及び脱アミノ作用の測定： 6%食塩濃度、30°C で反応させ実験1及び3と同一の方法により測定した。

実験結果： 菌懸濁液の葡萄糖脱水素作用の安定性は Fig. 5 に示した如く 6%食塩水中に於て4日間は安定であつたが、1.5%食塩水中では4日後にその作用は最高を示しそれ以後は急激に低下した。これは恐らく、Plasmoptysis 等の影響によるものと思われる。

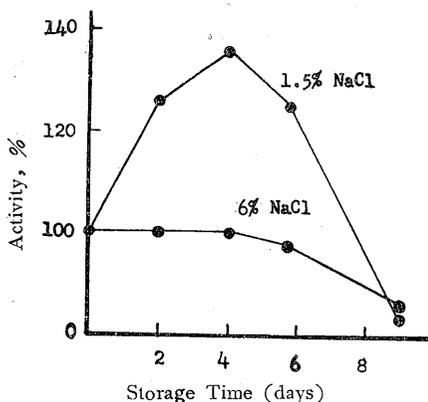


Fig. 5. Stability of glucose dehydrogenase activity of the cell suspension of *Vibrio* sp. No. 10 at 7°C.

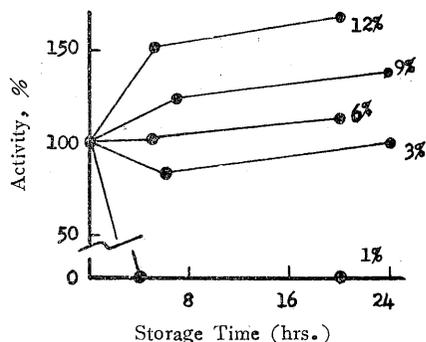


Fig. 6. Stability of leucine deaminase activity of the cell suspension of *Vibrio* sp. No. 10 at 7°C. Per cent shows the concentration of sodium chloride.

ロイシン脱アミノ作用については Fig. 6 に示した。即ち 6%食塩水中では24時間貯蔵後も安定であつたが、12%食塩水では5時間後に明らかに作用が高まり、1%食塩水中では4時間後にその作用は全く認められなかつた。Egami等<sup>6)7)</sup> は大部分の halophilic enzyme は蒸溜水により不可逆的に不活性化されることを報告しているが、本試験の場合はロイシン脱アミノ酵素自身が低濃度食塩に於て不安定なものか Plasmoptysis 等の影響により阻害物質が遊離したためかは明らかではないから無細胞標本について明らかにすべきであると思う。

## 考 察

一般に微生物は高濃度食塩によつて Plasmolysis をおこすが供試好塩細菌の場合には高濃度食塩の方が発育に好適の様であり、至適発育濃度以上の場合よりも低浸透圧にさらされた場合はその影響を多くうけるようである。

Robinson 等<sup>8)</sup> は *Micrococcus halodenitrificans* について細胞内の食塩濃度は環境のそれよりも低く nitritase 及び乳酸脱水素酵素は至適発育食塩濃度には耐え得ない事を報告しているが、好塩性細菌に耐塩性酵素が存在する事は既に明らかにされ Baxter 等<sup>9)</sup> は *Vibrio costicolus*, *Pseudomonas salinaria* 及び *Escherichia coli* のグリセリン脱水素酵素における最大作用食塩濃度は夫々発育至適濃度の約半分であつたとし、山田等<sup>10)</sup> は同一細菌について耐塩性の葡萄糖脱水素酵素及び非耐塩性の蟻酸脱水素酵素の存在を報告している。

*Vibrio* sp. No. 10 の静菌液については葡萄糖及び乳酸等の脱水素作用やロイシン等の脱アミノ作用は至適発育濃度（6% NaCl）付近でよく作用し少くとも他のクエン酸及びコハク酸の脱水素作用よりも比較的高い食塩濃度にその最大作用を示したがこれが耐塩性酵素によるか否かは明らかではない。

細胞中に於ける酵素は種類によつてその分布或は結合状態が異なり、また基質によつても透過性の相違がある。食塩は濃度によつて細胞に Plasmolysis 或は Plasmoptysis を引起し、細胞構造の攪乱や透過障害等の複雑な作用によつて酵素に種々の影響をもたらすものと思われる。

供試菌の酵素作用は基質によつて耐塩的或は非耐塩的性質を示したが、これは種々の要因が関係するから更に酵素液について確かめるべきであろう。

## 要 約

*Vibrio* sp. No. 10. Moderate Halophile の静菌液の酵素作用に対する食塩濃度の影響を見た。

1) 葡萄糖、乳酸、クエン酸及びコハク酸等を酸化し、この内葡萄糖及び乳酸の脱水素作用は4% NaCl で最大であつたが、クエン酸及びコハク酸は低濃度食塩程その作用が強かつた。

2) ロイシン、ヴァリン、アラニン及びアスパラギン酸等を脱アミノしたがその作用は弱くロイシンは比較的強かつた。6% NaCl におけるロイシン脱アミノ作用の至適 pH は8.5附近にあり、又その至適食塩濃度は培養食塩濃度により影響された。

3) 静菌液のロイシン脱アミノ及び葡萄糖脱水素作用は低濃度食塩よりも6% NaCl に於て安定であり、殊にロイシン脱アミノ作用は1% NaCl に於て速かにその作用が低下した。

## 文 献

- 1) FLANNERY, W.L., DOETSCH, R.N., and HANSEN, P.A. : J. Bact., **66**, 526~529 (1953)
- 2) ROBINSON, J. : Canadian Journal of Botany, **30**, 155~163 (1952)
- 3) 谷口忠敬:長崎大学水産学部研究報告, **7**, 113~116 (1958)
- 4) UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H., and STAUFFER, J.F. : "Manometric Techniques and Tissue metabolism", P. 105 (1951)
- 5) IYER, S. N., DUDANI, A., MURTI, C. R. K., and SHRIVASTAVA, D. L. : Enzymologia, **16**, 285~288 (1954)
- 6) EGAMI, F., YAMADA, T., and CHIO, I. : Compt. rend. soc. biol., **147**, 1531~1533 (1953)
- 7) Flannery W. L. : Bact. Rev., **20**, 54 (1956)
- 8) ROBINSON, J., GIBBONS, N. E., and THATCHER, F. S. : J. Bact., **64**, 69~77 (1952)
- 9) BAXTER, R. M., and GIBBONS, N. E. : Can. J. Biochem. and Physiol., **32**, 206~217 (1954)
- 10) YAMADA, T., and ASANO, A. : J. Biochem. (Japan), **41**, 639~645 (1954)