HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	サメ肉腐敗の微生物化学的研究：第2報 尿素分解細菌の分離及び其のUrease Activityについて
Author(s)	木村, 喬久
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 6(4), 310-316
Issue Date	1956-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/22938
Type	departmental bulletin paper
File Information	6(4)_P310-316.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

サメ肉腐敗の微生物化学的研究

第2報　尿素分解細菌の分離及び其のUrease Activityについて

木　村　喬　久
（北海道大学水産学部水産細菌学教室）

Studies in the Bacteriological Chemistry of Shark Muscle Spoilage

II. On the isolation of urea splitting bacteria and their urease activity

Takahisa KIMURA

Abstract

In the present work, the author has isolated urea splitting bacteria from spoiling shark muscle, and observed their urease activity and other characters.

The results can be summarized as follows:

1) Twenty three strains (K1～K23) were isolated by enrichment technique with media as shown in Table 1.

2) Five strains (K6, 8, 9, 10, 13) had stronger urease activities than the other strains.

3) Among these 5 strains, only one (K8) was able to grow on medium using urea only as nitrogen source.

4) In 3 strains (K6, 8, 10) among those 5 strains, the strength of urease activity was not influenced by existence of urea in medium, on the other hand, in the 2 strains (K9, 13), the strength of the urease activity increased.

前報[1]に於て著者等はサメ肉の腐敗に於ける細菌群の消長及びサメ肉抽出液のurease活性の変化を観察して，サメ肉の腐敗に於ける尿素分解の大部分が細菌の酵素によるものであり，又細菌組成の変化とurease活性との間には密接な関係があるだろうと推論した。サメ肉の腐敗に於ける尿素分解の大部分が尿素分解細菌によるものであろうと云う事はすでに清水[2]，高橋[3]，木俣[4]等によつても報告されているところであり，一応妥当であると考えられる。然しながらサメ肉に於てどの様な種類の細菌によりどの様な条件の時に最も活潑に尿素の分解が行われるか，又腐敗生産物，防腐剤は勿論，此等細菌の生活環境の物理的，化学的条件の変化がurease活性又はurease形成能力にどの様な影響を及ぼすか等の点に就ては殆んど明らかでない。著者は以上の点を究明する事を終極の目的として，先ず本報に於ては腐敗過程に於けるサメ肉より後に述べる様な方法で，比較的尿素分解に関係の深いと思われる細菌20余株を分離し，各菌のurease活性を測定比較し，又二三の性質を観察して若干の結果が得られたので報告する。尚細菌の urease 活性に関する研究は古くMusaclusが尿中の尿素分解作用が ***Micrococcus ureae*** による事を明らかにしてから多くの研究が報告されており，最近に於てもStuart等[5]及びFerguson等[6]による ***Bacillus proteus*** のurease活性，Evelyn等[7]による ***Brucella*** の urease 活性に関する研究等が報告されている。然し之等の研究の多くは bacteria の urease により一定の細菌を他から区別する目的　即ち分類学上の目的で行われたものが多い様に思われる。

I　供試菌の分離及び分離菌の二三の性質

実　験　方　法

i）分離方法：前報の研究の実験IIに用いた試料について同様の方法，即ち，鮮度の良好なホシザメ（***Mustelus manazo*** BLEEKER）を可及的に空中細菌の汚染を防いで調理肉挽して，10gずつ殺菌綿栓フラ

スコに分け，15～20°C に貯蔵した試料を一定日数毎に無菌 homogenizer にて乳状となし，常法に従い殺菌生理的食塩水で適当に稀釈し，次に述べる様な Enrichment technique[8]により細菌を分離した。即ち Table 1に示した3種の液体培地に上記試料乳液一定量を接種し 30°C で培養を続けると，通常24～48時間にて混濁が認められるので，その一白金耳を同一組成の培地に継代培養する。2代目以後は菌の増殖が速かである故10数時間毎に2回継代を繰返した後，同一組成の固形培地を用いて常法通り平板分離を行つた。尙此の様な方法によれば殆んど大部分は同一若しくは2種程度のコロニーとなる。又Table 1に示す3種の培地を用いた理由は先ず medium I及びIIに発育する細菌は一般に尿素細菌と云われているものであり，又 medium IIIに発育する細菌は一般に non exacting bacteria と云われ，N源として栄養的に厳しくない菌で，いずれも比較的尿素分解に関係が深いと思われる事によるものである。

Table 1.　Composition of media

Medium I	Medium II	Medium III
Urea 30g	Urea 20g	NH_4Cl 6g
K_2HPO_4 0.5g	$CaCl_2$ 0.1g	$MgSO_4$ 0.2g
$C_6H_5O_7Ca_3$ 10g	Beef ext. 5g	KH_2PO_4 3g
(Agar 20g)	NaCl 0.1g	Na_2HPO_4 6g
Water 1000ml	K_2HPO_4 1g	Glucose 4g
pH 7	$FeCl_2$ 0.01g	(Agar 20g)
	$MgSO_4$ 0.3g	Water 1000ml
	(Agar 20g)	pH 7
	Water 1000ml	
	pH 7	

ii) 分離菌の二三の性質としては先ず各菌の形態を常法により観察し，又各菌の上記3培地及び普通寒天培地に対する発育を斜面培養法により観察した。

実　験　結　果

以上の様な方法により分離した細菌は Table 2 に示す如く Bacilli 12株，Cocci 11株の計23株で，此の中 medium Iにより分離したものがK1～K3の3株，medium IIにより分離したものがK4～K16の13株，medium IIIにより分離したものがK17～K23までの7株である。以上23株の細菌は Table 2に示した様にいずれも普通寒天培地に良く発育し，前記3培地に対する発育を観察した結果を同じく Table 2に示した。即ちN源として尿素のみ含有する medium 1 にはK1，2，3，5，8，12及びK22の7株より発育し得なかつたが，N源として尿素の外に Beef extract をも含む medium II には若干の例外を除いて大部分が発育し得る，又N源として NH_4Cl のみを含む medium III には約半数の細菌が発育した。

II　分離細菌の urease 活性

実　験　方　法

i）特殊培地による定性的測定：

実験1に於て分離した細菌K1～K23の23株をScheider[9]の方法に従い，指示薬として，metacresol sulfonphthalein を含む半固体の尿素含有特殊培養基に接種し，30°C にて24時間及び48時間培養し，尿素の分解による指示薬の変化からurease活性を観察した。即ち，指示薬の変色が表面から培地の半分目までを越えるものを(++)，変色が半分目まで及ばぬものを(+)，表面だけのものを(±)，変化のないものを(−)とする。尙尿素のみを除外した同一培地を用いて培養せるものを対照とした。

ii) Warburg 検圧計による洗滌菌体浮游液 urease 活性の定量的測定：

各分離細菌を bouillon-agar 及び2%尿素添加 bouillon-agar に接種し，30°Cで22～24時間培養を行い常法に従い集菌し冷水にて3回洗滌後光電比色計により日立（C）フィルターを用いて水を blank とし透過率が30%となる様冷水に懸濁せしめ，これを酵素液として下記の如き条件で尿素の分解により生ずる CO_2 の量を Warburg 検圧計により一定時間毎に測定し，此の量を urease 活性とした。測定条件は，温度30°Cで

主 室　洗滌菌体浮游液 0.5ml，終末濃度 0.067M, phosphate buffer pH 6.9，1.1ml
側 室　2 M 尿素溶液（終末濃度 0.4M，約2％）0.4ml
副 室　20%KOH，0.4ml（O_2測定用）

であり，すべての測定は自家呼吸による O_2 の消費及び CO_2 の増加を補正した。尙個々の細菌 urease の最適反応条件が同一であると考えられず，現に内野等[10]の報告によれば数種の細菌 urease の最適反応 pH を測定し，少しずつのずれが認められたと述べているが，分離細菌23株の個々の最適反応条件をあらかじめ測定する事は技術上困難であり，又本研究の現段階に於てはそれまで厳密な測定を必要としないと思われたので，本実験に於ては上記の如く Sumner 等[11]が得た刀豆結晶 urease の最適条件である終末尿素濃度2.5%，phosphate buffer pH 6.9 をすべての菌株に適用した。又予備実験によれば各菌株により多少の相違があつたが，450mμ フィルター，10mmキユーベツトで，透過率30%の浮遊液は 1 ml 中に dry cell 1.8mg を含み，此の濃度の前後に於て浮游液中の dry cell 重量即ち濁度と吸光度とは直線的関係にあり Beer の法則が成立した。

Table 2. General characters of the isolated bacteria

Strain No.	(A)	(B)	(C)	Growth character							
				Medium (I)		Medium (II)		Medium (III)		Bouillon agar	
				24hr.	48hr.	24hr.	48hr.	24hr.	48hr.	24hr.	48hr.
K 1	C	I	3	+	+	±	±	−	±	++	++
2	C	I	3	±	+	±	±	−	−	+	+
3	C	I	3	+	+	±	±	±	±	++	++
4	B	II	1	−	−	+	+	+	++	++	++
5	C	II	5	+	+	+	+	+	+	++	++
6	C	II	5	±	±	+	+	±	±	+	++
7	C	II	5	±	±	+	+	+	+	++	++
8	B	II	15	−	+	±	+	−	−	+	+
9	C	II	11	−	±	+	+	±	+	++	++
10	B	II	11	−	±	±	+	−	−	±	+
11	C	II	21	−	±	+	++	+	+	++	++
12	C	II	24	±	+	+	+	+	+	++	++
13	B	II	24	−	−	±	+	−	−	+	+
14	B	II	24	−	−	+	++	+	+	++	++
15	B	II	21	±	±	+	+	+	+	++	++
16	B	II	5	−	−	±	+	−	−	±	+
17	B	III	1	−	−	+	+	++	++	++	++
18	B	III	17	−	−	±	±	+	+	+	+
19	B	III	17	−	−	±	±	+	+	+	+
20	B	III	28	−	−	±	+	±	+	+	+
21	C	III	28	±	±	+	+	+	+	++	++
22	C	III	1	±	+	+	+	+	+	++	++
23	B	III	2	−	−	±	+	+	+	+	+

(A) Form, B—Bacilli C—Cocci
(B) Used medium for the isolation
(C) Days of isolation
++ abundant, + moderate, ± slight, − negative

Table 3. Scheider test of the isolated bacterial urease

Strain No.	Urea cont.	Urea free
K 1	−	−
2	−	−
3	−	−
4	+	±
5	±	−
6	+	−
7	±	−
8	+	−
9	++	−
10	±	−
11	±	−
12	−	−
13	+	−
14	±	−
15	−	−
16	−	−
17	++	+
18	+	+
19	+−	++
20	−	−
21	±	−
22	±	−
23	±	−

++ colorimetric reaction (yellow to purple) diffusing from the surface and beyond half the length of the medium
+ diffusion from surface and not beyond half the length
± colorimetric change at surface
− no change

実験結果

以上の方法により各分離菌のurease活性を定性的に観察した結果は Table 3 に示した様に，urease活性が(++)と判定されるものはK 9の1株のみで，(+)と判定されるものは3株，(±)と判定されるものが若干認められた。然し此の結果のみでは確実な判定が困難の如く思われたので，前述の方法により各菌の bouillon-agar 及び2%尿素添加 bouillon-agar 上に発育せる菌体の urease 活性を定量的に測定した結果は Fig. 1 に示す如くである。 Enrichment medium として medium II を用いて分離したK6，8，9，10，13の5株は特異的に活性が強く，他の菌株に於ては特に注目すべき活性が認められなかつた。又この結果から見て明らかな如く二三の例外を除き一般に尿素添加培地に発育した菌体は普通培地に発育したものに比し若干活性度が増大しており，特にK 9及び13の2菌株に於ては顕著である。以上の事実は各菌の Q_{CO_2} (dry cell 1 mg が1時間反応して生ずる CO_2 の量，本実験に於ては最初の10分間の反応により生じた CO_2 の量から計算により求めた）を求めてみれば更に明らかに観察される（Fig. 2）次に対照として当教室保存菌種の中一般に腐敗細菌と呼ばれている *Bac. mesentericus ruber* 及び *Pseudomonas fluoresens* MIGULA 又古くから尿素細菌の代表的菌株と云われている *Bac. pasteurii* (MIQUEL) 及び Gale[12] が細菌 urease の研究に用いた *Micrococcus lysodeikticus* の尿素添加培地に発育した菌体のurease活性を前同様の方法により測定した結果は Fig. 3 に示す如くである。即ち *Micrococcus lysodeikticus* のみは中程度の活性を示したが，他の3菌は殆んど注目さるべき活性を示さなかつた。然し此の活性度も前述の5菌株の中比較的活性の低かつたK 9株に相当する程度であつた。尚 *Bac. pasteurii* の活性が弱いと云う事は意外な事実であるが本菌は東大応用微生物研究所より分譲されたもので分類学上正しい菌株であるにもかかわらず尿素添加培地に数度前培養を行つても活性の増大が認められず，分譲を受けた以前に既に酵素活性が変異したものではないかと考えられる。

考　　察

以上の実験結果から明らかな如く比較的尿素分解に関係が深いのではないかと云う予想のもとに分離した細菌23株の中特にurease活性の強かつたものは5株のみで他は殆んど注目すべき活性が認められず，此等5株はすべて Enrichment medium として medium II により分離されたものでK8株を除く他の4株はN源として尿素のみの medium I には殆んど発育を示さなかつた事と，又 Enrichment medium として medium I により分離された3株及び他の medium により分離されたものの中 medium I に発育可能だつた4株の計7株

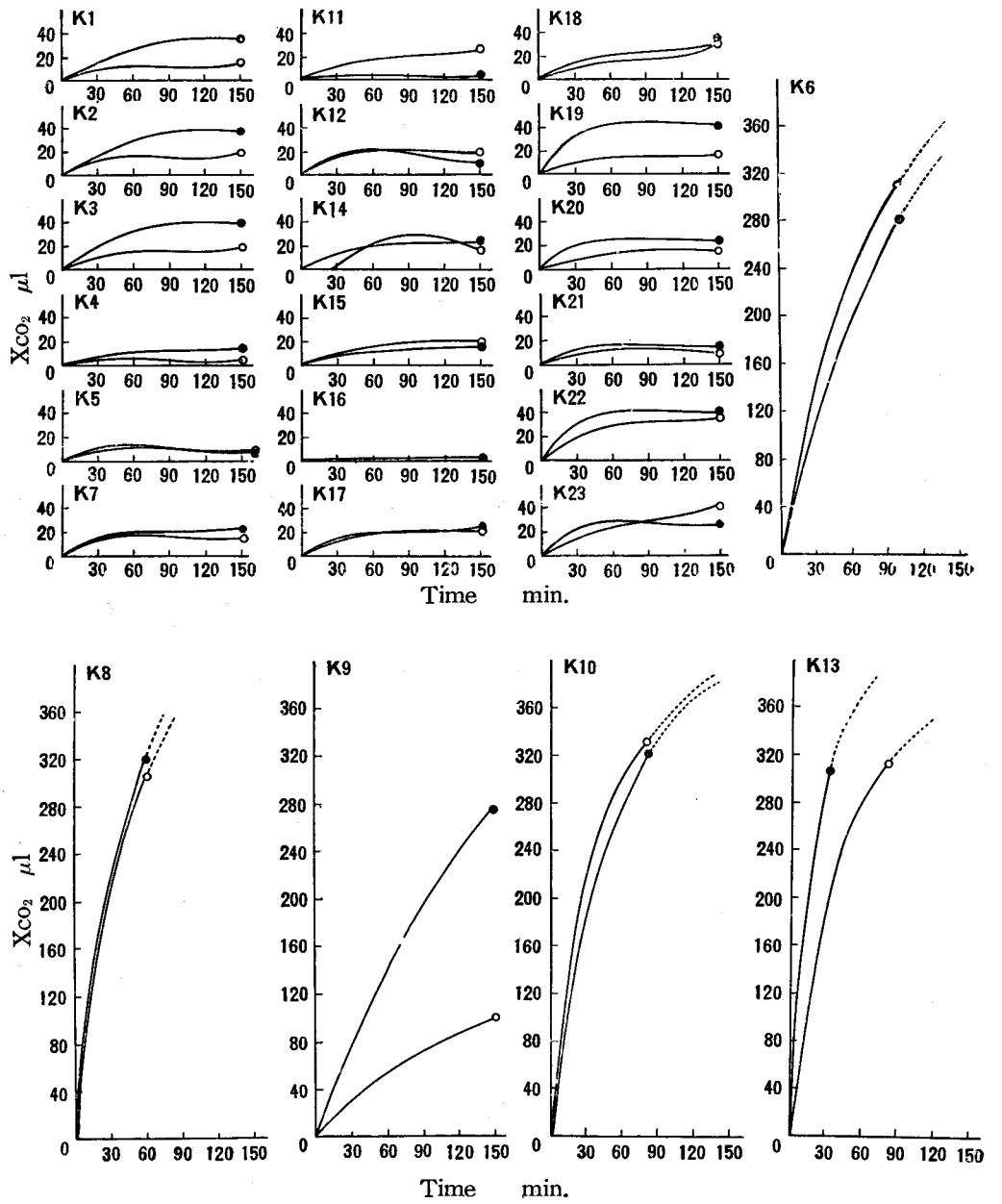

Fig. 1. The urease activity of cell suspention of the isolated bacteria that was estimated at 10 minuts intervals in reaction by Warburg's apparatus at pH 7.1 and 30°C

● the cell grew on 2% urea containing bouillon agar
○ the cell grew on urea-free bouillon agar

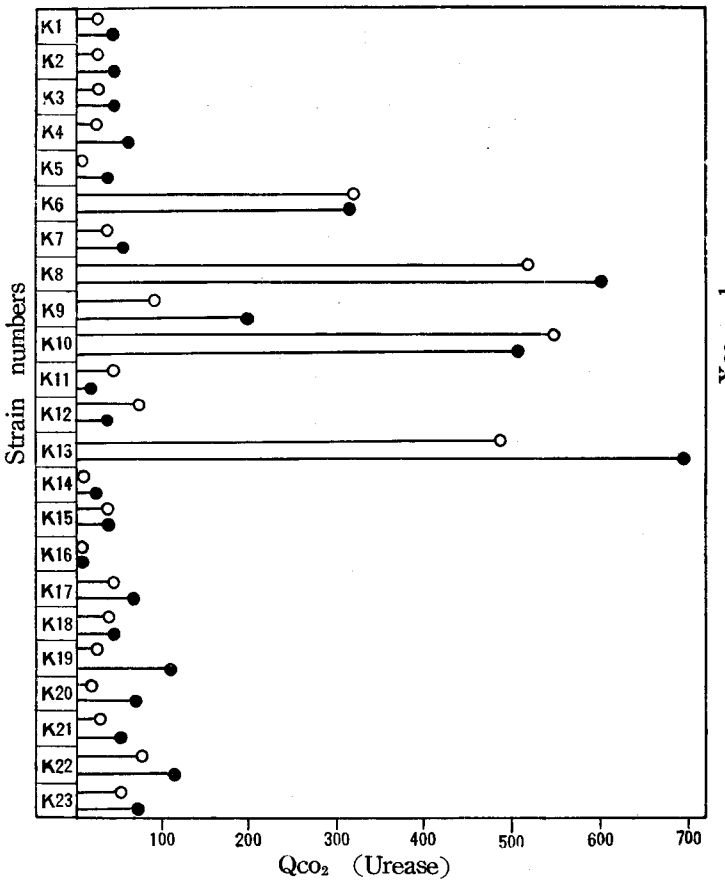

Fig. 2. The QCO_2 (urease) of the isolated bacteria

These were calculated from the initial 10 minutes reaction.

● the cell grew on 2% urea containing bouillon agar

○ the cell grew on urea-free bouillon agar

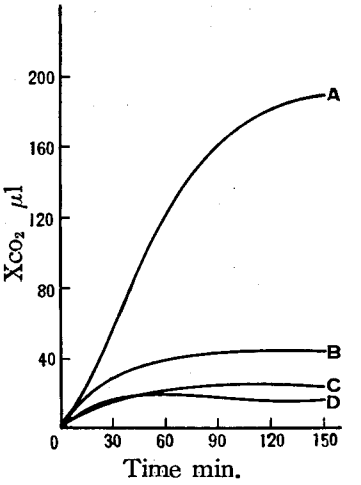

Fig. 3. The urease activity of cell of 4 species of preserved cultures which grew on 2% urea containing bouillon agar

These results were estimated in Fig. 1.

(A) *Micrococcus lysodeikticus*
(B) *Bac. mesentericus ruber*
(C) *Bac. pasteurii* (*Miquel*)
(D) *Pseudomonas fluorescens Migula*

の中K 8 株を除く他の菌株には殆んど活性が認められなかつた事からN源として尿素のみを含む培地に発育し得る細菌と云えども必ずしもurease活性が強いとは限らず大多数は尿素を増殖に利用する際分解と云う過程を取らず他の方法により直接利用するものではないかと考えられる。木俣等[13]及び Zobell等[14]は海洋に於ける尿素分解細菌に関する研究を行い尿素分解細菌は次の3型に分類されると指摘している。即ち

a) N源として尿素のみでも充分発育を遂げるが強力なる尿素分解作用を営まぬもの

b) N源として尿素のみでも充分発育し且つ旺盛な尿素分解を行うもの

c) N源として尿素のみが存在する場合には全く又は殆んど発育しないが他の有機分解物が共存すれば充分発育し且つ旺盛な尿素分解を行うもの，等である。

併し著者等の分離した前述の5株の中K 8 株はb)に属するものと思われ又K6，9，10，13の4株はc)に又 K1，2，3，5，14，22はa)に属するものではないかと考えられる。然し前記5株はいずれも全然尿素を含まぬ培地に発育した菌体でも相当のurease活性が認められ，特にK6，8，10の3株は尿素を含む培地に発育した菌体も，含まぬ培地に発育した菌体も殆んど同程度の活性を示し発育の際の存在には殆んど無関係の

如くであり，此等の菌株に於てはureaseは構成酵素的に生産されるものではないかと考えられる。一方K9，13の2株に於ては尿素を含む培地に発育した菌体は明らかに活性が増大を示しており特にK 9株に於ては著しく，此等2菌株に於てureaseが適応的に増大されたものであろうと考えられる。いずれにしろ腐敗過程に於けるサメ肉から特異的にurease活性の強い細菌5株を分離する事が出来，此等の活性はFig. 3に示す様な他の一般腐敗細菌のそれに比しはるかに強力であると云う事実から考えて此等の細菌がサメ肉の腐敗に於ける尿素分解に主要な役割をなしているだらうと云う事は当然考えられる事で，今後此等の細菌のureaseの特異性並びに生活環境の物理化学的条件がurease生産にどの様な影響を及ぼすかを究明する事により板鰓類魚肉のammonia発生機構解明の一助となり得ると考えられる。

要　　約

前報に引続き腐敗進行過程に於けるサメ肉より Table 1 に示す3種の培地を用い，Enrichment technique により比較的尿素分解に関係の深いと思われる細菌23株を分離し，そのurease活性を観察せるに23株の細菌の中K6，8，9，10，13 の計5株が特異的に活性が強く，此の5種の中N源として尿素のみの培地に発育し得たものはK 8の1株のみであつた。又K6，8，10の3株に於ては培地中の尿素の存在にその活性度は殆んと影響されず此の3株に於てはureaseは構成酵素的に形成され，又K9，13 の2株に於ては培地に尿素を添加する事により活性度が増大し，此等に於ては適応的に形成するものと考えられる。いずれにしろ此の様な活性度の高い菌種はサメ肉腐敗に於ける尿素分解の主要な役割をなすであらうと推察した。

終りに臨み，本報告の御校閲を賜つた本学谷川教授，直接実験の御指導を賜つた本学故長尾助教授，菌株（*Bac. pasteurii MIQUEL*）の分譲を賜つた東京大学応用微生物研究所飯塚助教授並びに実験の一部を担当された本学学生川村善造の諸氏に深甚の謝意を表する次第である。

尚本研究費の一部は文部省科学研究助成金に依るものであり，茲に感謝の意を表する。

文　　献

1) 木村喬久・長尾　清（1955）北大水産彙報 **5**, 352.
2) 清水　亘・日引重幸（1951）日水誌 **19**, 139.
3) 高橋豊雄・田中武夫（1951）日水誌 **15**, 777.
4) Kimata, M. & Hata, Y. (1953) *Res. Inst. Food. Sci., Kyoto Univ.* **5**, 55.
5) Stuart, C. A. & Van Stratum, E. & Rustigian, R. (1945) *J. Bact.* **49**, 437.
6) Ferguson, W. W. & Hook, A. E. (1943) *J. Lab. Clin. Med.* **28**, 1715.
7) Evelyn, S. & Juanita, W. (1951) *J. Bact.* **62**, 591.
8) 佐竹一夫・林　誠・安藤宗八・竹内秀夫・藤田久稔（1952）千葉大学腐敗研究報告 **5**, 79.
9) Scheider, M. D. & Gunderson. M. F. (1946) *J. Bact.* **52**, 303.
10) Utzino, S. & Imaizumi, M. & Nakayama, M. (1938) *J. Biochem.* **27**, 257.
11) Sumner, B. J. & Holloway, G. R. (1928) *J. Biol. Chem.* **76**, 149.
12) Gale, E. F. & Helen, M. R. E. (1942) *Biochem. J.* **36**, 600.
13) 木俣正夫・畑　幸彦（1927）日本海区水産研究所創立三週年記念論文集 135.
14) Zobell, C. E. & Fetham, C. B. (1935) *Science* **81**, 234.