



| | |
|------------------|---|
| Title | サメ肉腐敗の微生物化学的研究：第3報 尿素分解菌の尿素分解能力に及ぼす水素イオン濃度の影響について |
| Author(s) | 木村, 喬久; KIMURA, Takahisa |
| Citation | 北海道大學水産學部研究彙報, 8(2), 158-162 |
| Issue Date | 1957-08 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/22998 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 8(2)_P158-162.pdf |



サメ肉腐敗の微生物化学的研究

第3報 尿素分解菌の尿素分解能力に及ぼす水素イオン濃度の影響について

木 村 喬 久

(北海道大学水産学部細菌学教室)

Studies in the Bacteriological Chemistry of Shark Muscle Spoilage

III. On the effects of pH upon the abilities of the ureasplitting bacteria isolated from spoiling shark muscle

Takahisa KIMURA

Abstract

In the present work, the author has observed the effect of pH upon the ability to decompose urea possessed by K-10 strain, which has especially stronger urease activity than the other four isolated urea-splitting bacteria.

The results can be summarized as follows;

- 1) The multiplication of this strain has been excellent at the range from 6 to 8 of pH values, and optimum growth pH at pH 7.9.
- 2) In this strain, optimum pH of urease activity lay within range of pH 7.0 to pH 8.2, and it changed slightly to the alkali side in accompaniment with increment of substrate concentration in reaction mixture.

This phenomenon was remarkable below 2% of substrate concentration, and in the case of 6% of substrate concentration, optimum pH lay pH 7.6, and in 0.6% at pH 7.6.

- 3) In this strain, the optimum pH in respect to ability of decomposition of urea will lay near pH 7.9, from the results obtained as above.

前報¹⁾に於て、著者は腐敗進行過程中に於ける鮫肉より尿素分解に比較的關係が深いと思われた細菌23株を分離し、その中5株が特異的にurease活性が強く、これ等の細菌は鮫肉に於ける尿素分解に主要な役割をなすであろうと報告した。本報に於てはその5株の中、就中活性の強いと思われたK-10株の尿素分解能力に及ぼす水素イオン濃度の影響について、2、3の実験を試みた。こゝでurease活性と云わず特に尿素分解能力としたのは菌体urease活性そのものが尿素分解能力を左右することは勿論であるが、一方その菌の発育の良否もその能力に大なる影響を及ぼすものと考えられるからである。細菌のurease活性に及ぼす水素イオン濃度の影響に関し内野等²⁾は*Bac. subtilis*等8菌種の乾燥菌体浮遊液のurease活性と水素イオン濃度との関係について報告してその至適水素イオン濃度は*Bac. proteus*ではpH 6~7、*Bac. coli*及び*Bac. typhi*はpH 6~8、*Bac. pyocyaneus*及び*Bac. prodigiosus*はpH 7~8、*Bac. subtilis*、*Staph. aureus*及び*Bac. dysenteriae*はpH 8であると述べて居る。又Lyubimov³⁾は*Microc. ureae*に於けるureaseの至適水素イオン濃度はpH 7より幾分低いところであると述べて居る。いずれにしろ菌種によりその至適水素イオン濃度が異なる事は明らかである。又Sumner等⁴⁾は大豆結晶ureaseの至適水素イオン濃度は基質尿素の濃度により変化すると報告している。本報に於てはこの点についても検討を行った。尙本実験に供試したK-10株の一

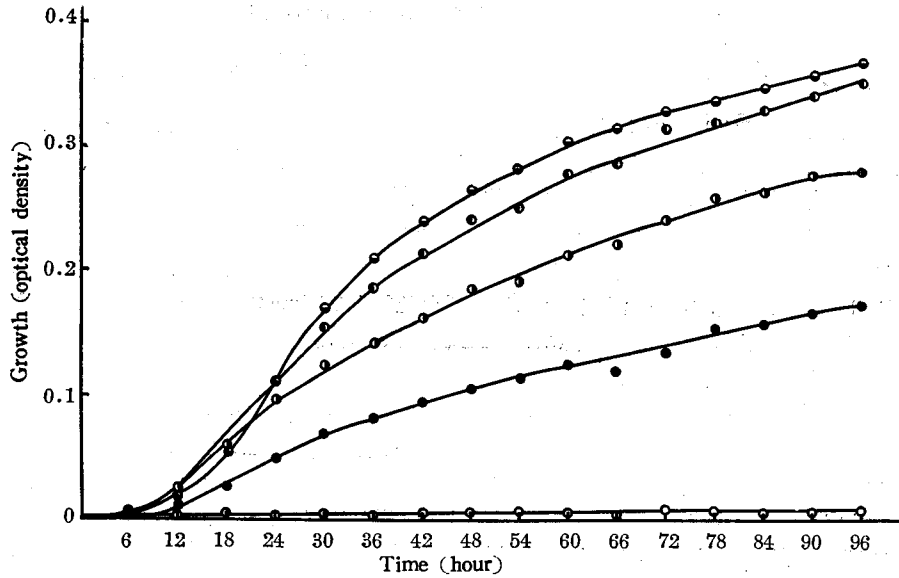


Fig. 1 The effect of hydrogen ion concentration on the growth rate of K-10 strain, at pH 5.8~7.8 with 0.067M phosphate buffer solution

○ pH 5.8 ● pH 6.4 ◐ pH 6.8 ◑ pH 7.5 ◒ pH 7.8

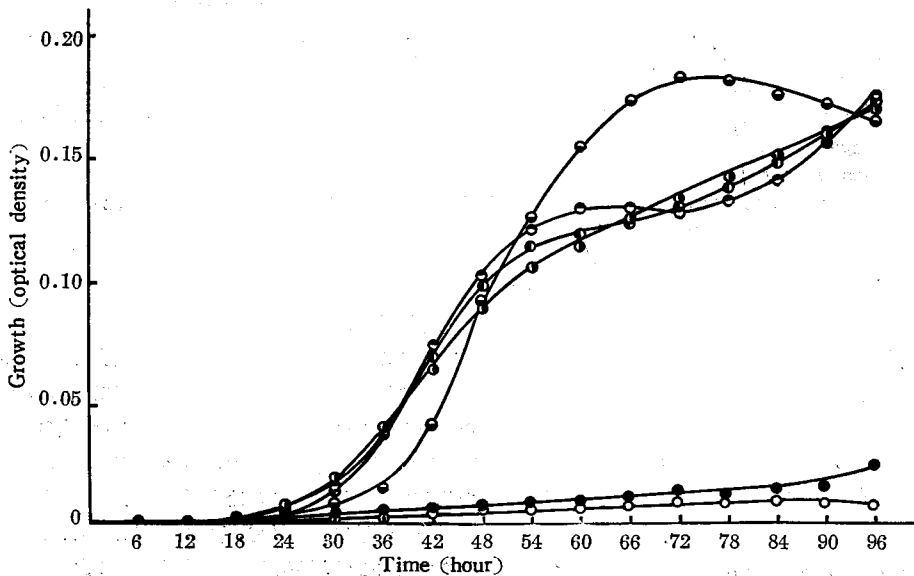


Fig. 2 The effect of hydrogen ion concentration on the growth rate of K-10 strain, at pH 6.8~8.8 with 0.067M KH_2PO_4 +0.034M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ buffer solution

◐ pH 6.8 ◑ pH 7.2 ◒ pH 7.5 ◓ pH 7.9 ● pH 8.4 ○ pH 8.8

般性質は古くから強力な urease 活性を有するとされて居る *Bac. proteus*, *Bac. ureae* 或は *Pseudomonas ureae* とは明らかに異つた桿菌であり、本供試菌株の分類学上の位置については後報に於て報告する予定である。

実験 I K-10株の発育に及ぼす培地水素イオン濃度の影響

a) 使用培地

普通濃度の倍の濃度に調製した3% pepton水に、pH5.8~7.8では終末0.067Mの磷酸ソーダ・磷酸カリ緩衝液、pH6.8~8.8では終末0.067M磷酸カリ、0.034M 硼砂緩衝液を等量混合し、15ポンド20分間の加熱による少量の沈澱を濾別し、之を光学的に均一な比色用試験管に10cc宛分注して使用した。

b) 発育速度の測定法

上記培地に培養した供試菌の48時間培養液を適宜稀釈し、その0.1cc宛を上記培地に接種し、35°Cの恒温器中で発育せしめ、6時間毎にその濁濁状態をA. K. A. 光電比色計で750m μ フィルターを使用して吸光度を測定する事により直接測定した。尙予備実験によればこの波長では培地自体による光吸収はほとんどみとめられず、濁濁度と吸光度は直線的関係にあつた。

c) 実験結果

以上の如き方法によりpH5.8~7.8及び6.8~8.8に於けるK-10株の発育を比較測定した結果は、Fig. 1及びFig. 2に示す通りである。即ち0.067M磷酸カリ・磷酸ソーダ緩衝液を用いたpH5.8~7.8の実験ではFig. 1に示す如くいずれのpHに於ても約6時間のlag phaseの後に発育を始め、培地のpHがアルカリ性に傾くにつれてその発育が旺盛となり、pH7.8で最も旺盛な発育を示し、pH5.8に於てはほとんどこの測定操作では測定し得る程度の発育を示さなかつた。同様に0.067M磷酸カリ、0.034M 硼砂緩衝液で行つたpH6.8~8.8の実験ではFig. 2に示す如くいずれのpHに於ても約24時間のlag phaseの後に発育を始め、Fig. 1

の場合と同様に、pH7.9に於ては他のpHより幾分lag phaseが長い、最も急速な発育を示し更にアルカリ度が高まりpH8.4となると酸性側同様にほとんど発育が見受けられなかつた。即ち本菌種は約6~8のpH領域で発育良好にして、特にpH7.9附近に於て最も旺盛なる発育が認められた。

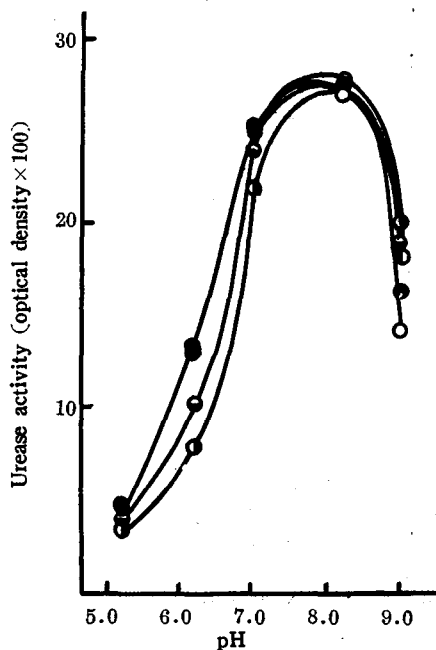


Fig. 3 The effect of hydrogen ion concentration and substrate concentration on the urease activity of intact cell suspension of K-10 strain, pH 5.2-9.0, substrate concentration 2%-10%

○ substrate 10% ● substrate 6%
 ◐ " 2% ◑ " 8%
 ◑ " 4%

実験II K-10株の菌浮遊液 urease 活性に及ぼす水素イオン濃度の影響及び基質濃度との関係

a) 酵素液の調製

前報¹⁾の結果によれば、本菌株の発育の際に於ける培地中の尿素の存否は菌体 urease 活性にほとんど影響をあたえなかつたので、本実験に於ては常法の如く普通肉汁寒天斜面培地に於ける30°C約24時間の培養菌を集菌し洗滌後調製せる冷水浮遊液を酵素液として供試した。予備実験に於て、菌体浮遊液及び凍結乾燥菌体を夫々+5°C以下の冷暗所及び室温に放置せる場合に浮遊液の場合では急速に不活性化するに反し乾燥菌体の場合は冷暗所に保存すれば約5ヶ月後に於ても最初の程度度の活性を示し、相当の安定度を有することが判つたので本実験に於ては発育の際の条件差による影響を除くためにあらかじめ凍結乾燥し+5°C以下に保存した菌体を用に臨み5mg/ccの濃度に冷水に浮

遊せしめて供試した。

b) 酵素活性の測定法

上記酵素液を用い Ambrose⁵⁾ の方法を若干改良した Nessler 比色法により測定した。即ち各濃度の基質尿素液 0.5cc と終末 $M/3$ の pH 値を有する磷酸緩衝液 1cc 宛を試験管にとり 30°C の恒温に保ち 10 分後に酵素液 0.5cc 宛を添加し 20 分間反応せしめた後更に $N/1$ HCl 1cc 宛を添加して反応をとめ、濾過した後濾液 1cc に水 18cc を加え之に Nessler 試薬を 1cc 宛添加して 10 分後に 430m μ フィルターを用い A. K. A 光電比色計により吸光度を測定しこの吸光度から 0 時の吸光度を差引いたものを酵素活性度として表わした。

c) 実験結果

以上の如き方法により菌体浮游液の urease 活性と水素イオン濃度及び基質濃度の影響を観察した結果は、Fig. 3, Fig. 4 及び Fig. 5 に示す通りである。即ち基質濃度が比較的高い 2% から 10% で、pH 5.2 から 9.0 の場合での活性は Fig. 5 に示す如くで最適水素イオン濃度はいずれの基質濃度の場合も pH 7~8 にあるようであるが、基質濃度がうすくなるにしたがい pH 8 の方に幾分移動を示した。次に基質濃度を 2% 以下とした場合の活性は Fig. 4 に示す如くで明らかに基質濃度が減少するにしたがつて最適水素イオン濃度は pH

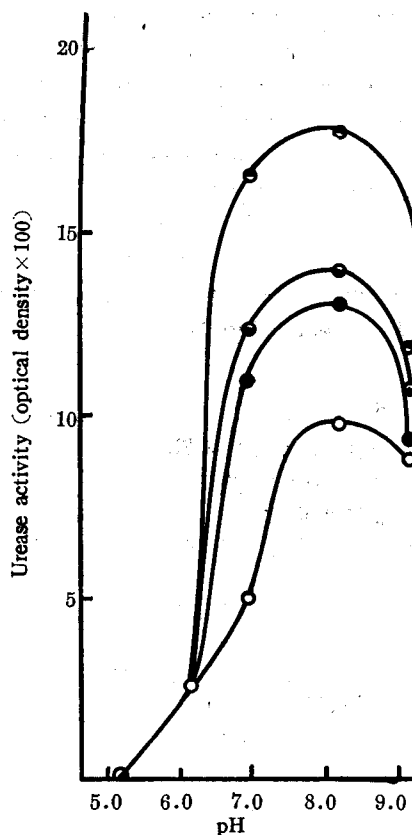


Fig. 4 The effect of hydrogen ion concentration and substrate concentration on the urease activity of intact cell suspension of K-10 strain, pH 5.2-9.0. substrate concentration 0.6%-2.0%

○ substrate 0.6% ● substrate 1.6%
● " 1.0% ○ " 2.0%

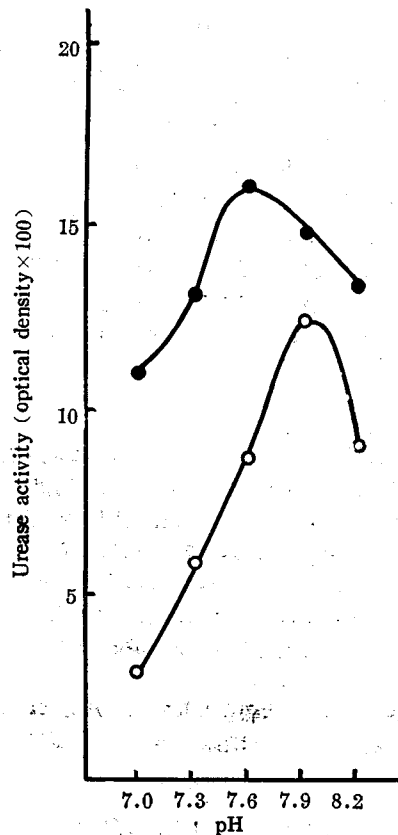


Fig 5 The variation in optimum hydrogen ion concentration of K-10 strain's intact cell suspension caused by substrate concentration

● substrate 6.0%
○ " 0.6%

8.2の側に移動し pH7.0での活性と pH8.2での活性の差は基質濃度の減少と平行して大きくなった。又 pH 7.0から pH8.2の間に於ける活性度を見るためにその間を更に細分して基質濃度 6%及び0.6%の際の至適水素濃度をよりこまかく検討した結果は、Fig. 5に示す通りである。即ち、基質濃度が高い時はその活性は pH7.6附近で、又低濃度の場合は pH7.9で最大となり、且ついずれの結果から見ても基質濃度が減少するにつれて活性も低下を示した。又 Fig. 3及び Fig. 4に見る如く pH 5以下の酸性域に於ては極端に活性は減少し、ほとんど之が認められなくなった。

考 察

実験 I の結果によれば K-10株の発育至適水素イオン濃度は pH7.9附近にあり、pH5.8以下の酸性領域又は pH8.4以上のアルカリ領域に於ては発育が阻害され又実験 II の結果によれば urease 活性の至適水素イオン濃度は、Sumner 等⁴⁾が提唱する如く基質濃度の影響を受けるが pH 7~8にあり、基質濃度終末 2%以下に於てその影響は特に著しかった。即ち基質濃度を低くするにつれ至適水素イオン濃度は幾分アルカリ性側に移動した。又酸性側に於てその影響は大であつた。又基質濃度が終末 6%では pH7.6前後、0.6%では pH 7.9前後に於てそれぞれ最大の活性を示し、須山等⁹⁾が報告している鮫肉の尿素含量 2%もしくはそれ以下に於ては pH7.6から pH7.9の前後で最も活性が大である。以上の結果から考察すると本菌株の尿素分解能力は pH7.0から pH8.2の間に於て最も大きく、特に鮫肉中の尿素濃度(2%前後)の点から考えて至適水素イオン濃度は pH7.9附近にあるのではなからうかと思考される。又 pH 5程度の酸性になると尿素分解能力は著しく阻害を受けるのであるが、大石⁹⁾の研究からも明らかな如く極めて新鮮な鮫肉に於ては其の水素イオン濃度は pH5.6位の酸性域にあり、鮮度の低下にともない急速にアルカリ性に移動するので、先に著者の提唱した如く若しこの K-10株の如き細菌が鮫肉に於ける尿素の分解に主要な役割をなしているとすれば可及的新鮮な時期に於て、換言すれば鮫肉の水素イオン濃度が pH 5 附近にある時期に何らかの手段を用いて、この種の細菌の発育を阻止するならば相当効果的に尿素分解を阻止し得ることが考えられ、又逆に鮮度低下による鮫肉 pH のアルカリ性への移動はこれ等細菌による尿素の分解に対し好条件を与える結果となるものと考えられる。

要 約

前報¹⁾に於いて報告した鮫肉より分離せる尿素分解菌中、就中 urease 活性の強いと思われる K-10株の尿素分解能力に及ぼす水素イオン濃度の影響について観察したの如き結果を得た。

- 1) K-10株は pH6から pH8の間に於て発育が旺盛で、発育の至適水素イオン濃度は pH7.9前後にある。
- 2) K-10株の urease 活性の至適水素イオン濃度は pH7.0から pH8.2の間にあり、反応時の基質濃度が大きくなるにつれアルカリ性側に幾分移動する。この現象は基質濃度終末 2%以下で著しく 6%では pH7.6、0.6%では pH7.9附近で最も活性が大である。
- 3) 1)、2)の結果から K-10株の尿素分解能力の至適水素イオン濃度は pH7.9前後にあるものと考えられる。

終りに臨み、本報告の御校閲及び御指導を賜つた本学谷川教授並びに坂井助教授に深甚の謝意を表する。

(本論文の要旨は昭和31年度日本水産学会年会、1956年4月、に於て報告した。)

文 献

- 1) 木村喬久 (1956). 北大水産彙報 6, 310.
- 2) Utzino, S., Imaizumi, M., Nakayama, M. (1938). *J. Biochem.* 27, 257.
- 3) Lyubimov, V. T. (1955). *Mikrobiologiya* 2, 160.
- 4) Sumner, J. B., Howell, St. F. (1934). *J. Biol. Chem.* 104, 619.
- 5) Ambrose, J. F. (1950). *J. Am. Chem. Soc.* 72, 317.
- 6) 須山三千三, 徳広 真, 須山善雄 (1950). 日水会誌 16, 211.
- 7) ————, ———— (1954). 日水会誌 19, 935.
- 8) Suyama, M., Tokuh'ro, T. (1954). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 19, 935.
- 9) 大石圭一. 私信.