

9040 耐塩性醬油乳酸菌の酸素関連酵素に対する食塩の影響に関する研究

谷口 正之(新潟大学)

研究目的

本研究は、いわゆる”カタラーゼ陰性の通性嫌気性微生物”である耐塩性乳酸菌を研究対象として、乳酸菌の酸素代謝機構について解明することを究極の目的としている。そこで、耐塩性乳酸菌に関するこれまでの研究成果を基礎として、1) 耐塩性乳酸菌 *Pediococcus halophilus* の好気条件下における増殖特性を食塩濃度を変えて検討し、代謝産物の変化を明らかにする。2) 酸素代謝に関連する酵素(スーパーオキシドジスムターゼ(SOD), NADHオキシダーゼ)の生成に対する酸素の影響について明らかにする。3) 酸素代謝に関連する酵素(SOD、NADHオキシダーゼ)の活性に対する食塩濃度の影響を明らかにする。4) 酸素消費速度に及ぼす諸因子について明らかにする。以上の4点について検討した。

研究方法

耐塩性乳酸菌として *Pediococcus halophilus* IAM1676 を使用した。酸素関連酵素として、SODはキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系を用いたチトクロームC法により、NADHオキシダーゼはNADHの340 nmにおける吸光度の変化から測定した。菌体当たりの酸素消費速度は生物用酸素モニター(YSI model 5300)を用いて溶存酸素濃度の減少速度から求めた。代謝産物としての乳酸および酢酸の濃度はそれぞれBarkerの方法を用いた比色法およびUV検出器を用いたHPLCにより定量した。

研究結果および考察1. 耐塩性乳酸菌の増殖および糖代謝に対する酸素の影響

耐塩性乳酸菌は食塩濃度が低い嫌気培養において1モルのグルコースから1.7モル以上の乳酸を生成し、ホモ型醗酵を行った。しかし、好気条件下では酢酸の生成が観察され、酸素の有無によってホモ型からヘテロ型への代謝の変換が確認できた。

2. 酸素関連酵素の活性に対する酸素および食塩濃度の影響

食塩濃度を変えたMRS培地を用いて、嫌気的および好氣的に *P. halophilus* を培養した時の酸素関連酵素の活性を測定した。好気培養における酸素関連酵素の比活性は、嫌気培養における値とほぼ同一であり、酸素によってこれらの酵素の菌体内蛋白質当たりの含量は増加しなかった。また、好気、嫌気条件にかかわらず、培養時の食塩濃度が高くなるにつれて菌体内のNADHオキシダーゼおよびSODの比活性は低下した。

3. 耐塩性乳酸菌の酸素消費速度

酸素消費速度は中性付近で最大となった。また、酸素消費速度は好氣的に培養した菌体の方が速くなり、特に食塩濃度を0%として培養した菌体は5%とした場合に比べて酸素消費速度は著しく速くなった。

9040 耐塩性醤油乳酸菌の酸素関連酵素に対する食塩の影響に関する研究

谷口 正之(新潟大学)

1. 研究目的

醤油製造上重要な微生物である耐塩性乳酸菌は、生育にとって最適な食塩濃度は約5%であることが知られているが、通常の醤油製造において用いられる食塩濃度は18%である。このように醤油製造に用いられる高食塩濃度の条件は、必ずしもこの乳酸菌の増殖にとって最適ではない。そこで、我々は既に耐塩性乳酸菌として *Pediococcus halophilus* を選択し、生体触媒としての微生物菌体を醤油生産条件に迅速に適応できる状態、高速にかつ高濃度に生産するための培養方法について検討した。すなわち、食塩濃度を順次増加させることによって耐塩性を付与し、同時に代謝産物の除去と新鮮培地の供給を連続的に行うことによって迅速に高濃度菌体を生産できる濾過培養方式(濃度勾配培養法と呼ぶ)について検討し、次の諸点を明らかにした。¹⁻³⁾

- 1) *P. halophilus* の食塩に対する耐性を、植え変えた後に生育を開始するまでの誘導時間の長さに関して検討した結果、植え変え前後における食塩濃度の差が大きくなるにつれて、増殖を開始するまでの誘導時間が長くなった。例えば、5%から18%食塩を含む培地へ植え変えた場合には10時間以上の誘導時間が認められた。一方、同一濃度の食塩を含む培地間で植え変えた場合には、ほとんど誘導期間が認められず直ちに増殖を開始した。
- 2) 比増殖速度に対する食塩濃度の影響を検討した。また、初期に加える乳酸濃度を0から30 g/lまで変化させて、それぞれ食塩濃度の影響を検討した。その結果、増殖にとって最適な食塩濃度はいずれの乳酸濃度の場合にも5%であった。また、食塩濃度が5%から増加するにつれて、および乳酸濃度が増加するにつれて、比増殖速度は低下した。
- 3) 濃度勾配培養において食塩濃度を順次増加させることによって耐塩性を付与でき、同時に代謝産物の除去と新鮮培地の供給を連続的に行うことによって迅速に高濃度菌体を生産できた。したがって、濃度勾配培養法は耐塩性乳酸菌の効率的な生産を可能とした。本研究は、いわゆる”カタラーゼ陰性の通性嫌気性微生物”である耐塩性乳酸菌を研究対象として、酸素に適応するための耐塩性生物の進化過程と酸素代謝機構の関連について解明することを究極の目的としている。そこで、耐塩性乳酸菌に関するこれまでの研究成果を基礎として、以下の4点について検討した。

- 1) 耐塩性乳酸菌 *Pediococcus halophilus* の好気条件下における増殖特性を食塩濃度を変えて検討し、代謝産物の変化を明らかにする。

- 2) 酸素代謝に関連する酵素（スーパーオキシドジスムターゼ、NADHオキシダーゼ）の生成に対する酸素の影響について明らかにする。
- 3) 酸素代謝に関連する酵素（スーパーオキシドジスムターゼ、NADHオキシダーゼ）の活性に対する食塩濃度の影響を明らかにする。
- 4) 酸素消費速度に及ぼす諸因子について検討する。

2. 研究方法

使用菌株 耐塩性乳酸菌として *Pediococcus halophilus* IAM 1676 を使用した。

培養方法 培養は2リットルの醗酵槽（バイオリアクターTBR-2、サクラ精機）を用いて実容積1リットルとして行った。培地はMRS培地を用いて、好氣的（空気を通気）および嫌氣的（窒素を通気）条件下で30℃にて培養を行った。空気および窒素の通気は0.2vvmの割合で行った。

粗酵素液の調製 サプリングした培養液を冷却遠心分離して培養液より菌体を集めた。集めた菌体は50mMりん酸緩衝液（pH 7.8）に懸濁した後、超音波破碎機（INSONATOR Model 201M, 久保田製作所）を用いて破壊した。破壊後の懸濁液は冷却遠心分離して細胞断片を除去した。得られた上澄液を粗酵素液として酵素活性の測定に用いた。

酵素活性の測定 酸素関連酵素としてスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）とNADHオキシダーゼ活性を測定した。

- 1) SODはMcCordらの方法⁴⁾にしたがってキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系を用いたチトクロームC法により行った。1ユニットは還元型のチトクロームCの生成量を50%阻害する酵素量とした。
- 2) NADHオキシダーゼはNADHの340 nmにおける吸光度の変化から測定した。1ユニットは1分間に1 nmolのNADHをNADに酸化する酵素量とした。

酸素消費速度の測定 生物用酸素モニター（YSI model 5300）を用いて溶存酸素濃度の減少速度から菌体当たりの酸素消費速度を測定した。

分析方法

- 1) 菌体濃度の測定 菌体濃度は660 nmにおける濁度を測定することにより求めた。また必要に応じて培養液を遠心分離して集菌した後、一夜乾燥することにより乾燥菌体重量を求めた。
- 2) 代謝産物濃度の定量 培養液を遠心分離して菌体を除去した後、得られた上澄液について乳酸および酢酸濃度をそれぞれBarkerの方法⁵⁾を用いた比色法およびUV検出器を用いたHPLCにより定量した。

3. 研究結果および考察

3. 1 耐塩性乳酸菌の増殖および糖代謝に対する酸素の影響

*P. halophilus*を、食塩濃度を変えたMRS培地を用いて嫌気的および好氣的に培養した。嫌気培養では窒素を、好気培養では空気をそれぞれ0.2vvmの割合で通気した。図1～4は嫌気培養および好気培養の培養経過を示す。図1は増殖を、図2はグルコースの消費率を、図3は酢酸の生成量を、図4は乳酸の生成量をそれぞれ示す。*P. halophilus*の増殖速度は、嫌気、好気にかかわらず、食塩濃度が高くなるにつれて低下した。また、同一食塩濃度で比較した場合には、予想に反して好気培養の方が増殖速度が速く、かつ最終的な菌体濃度は高くなった。これらの生育量の差は、グルコースの消費量の相違とよい対応を示している。すなわち、同一食塩濃度の場合、好気培養の方がグルコース消費量は多くなり、また嫌気、好気培養とも食塩濃度が高いほどグルコースの消費速度は遅くなった。図3の結果から明らかなように、嫌気培養においては全く酢酸は生成していないが、好気培養の場合には酢酸が生成した。また、培地の食塩濃度を5または10%とした好気培養において、一旦生成した乳酸が増殖の定常期において減少した。酢酸、乳酸以外の代謝産物としてギ酸およびピルビン酸などの生成が考えられるため、今後検討する必要がある。

図1の結果から比増殖速度を求め、増殖に対する食塩濃度の影響を図5にまとめた。好気培養における比増殖速度は食塩濃度の増加につれて低下した。一方、嫌気培養における比増殖速度は、好気培養に比べて低くなったが、同様に食塩濃度の増加につれて低下した。表1は増殖量、グルコースの消費量および代謝産物の生成量をまとめた結果を示す。代謝産物の生成量は消費したグルコースに対するモル比として表した。図2～4で示したように、嫌気培養における代謝産物は乳酸が主であり、酢酸の生成は認められなかった。しかし、好氣的に培養することによって酢酸の生成が観察された。また、嫌気、好気培養とも培地中の食塩濃度が高くなるにつれて消費したグルコースに対する乳酸の生成量は減少した。

以上のように、耐塩性乳酸菌は食塩濃度が低い嫌気培養において1モルのグルコースから1.7モル以上の乳酸を生成し、ホモ型醗酵を行った。しかし、好気条件下では酢酸の生成が観察され、酸素の有無によってホモ型からヘテロ型への代謝の変換が確認できた。「Bergey's manual」において*P. halophilus*はカタラーゼおよびチトクローム系を有しない通性嫌気性のホモ型球菌として分類されている。しかし、本研究の結果から*P. halophilus*の糖代謝は酸素の存在によって促進され、かつ増殖量が増加したことから、本菌は酸素に対する何等かの防御機構を備えているばかりでなく解糖系以外のATP生成系の存在が示唆された。また、増殖量は食塩濃度が5%の時最も多いが、嫌気、好気にかかわらず食塩濃度が増加するにつれて消費したグルコースに対する増殖収率は低下し、興味あることに乳酸の生成量も低下した。これらの間には何等かの関係があるものと考えられる。特に、

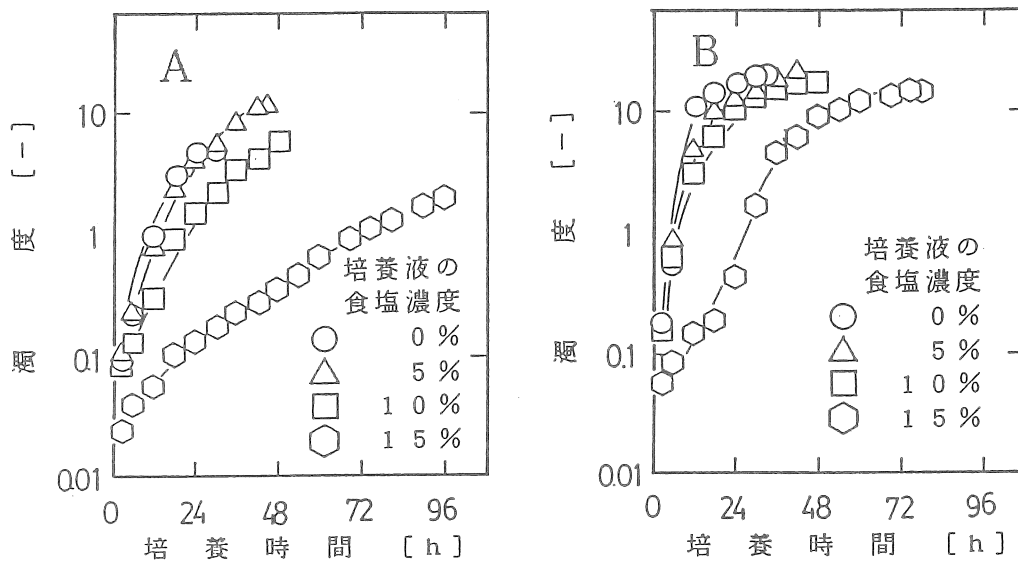


図1 嫌気培養と好気培養の比較 --- 菌体の生育量 ---
 (A) 嫌気培養 (B) 好気培養

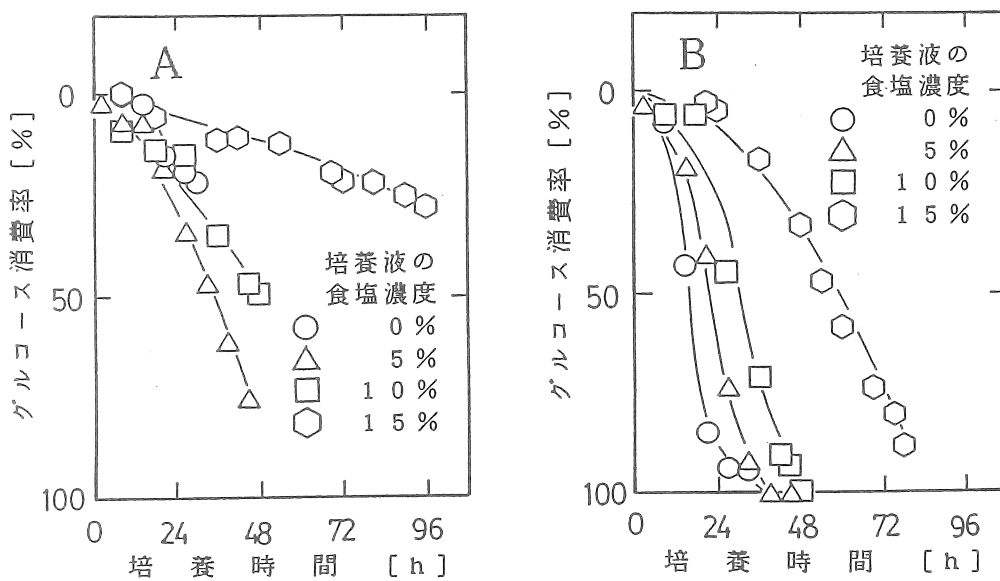


図2 嫌気培養と好気培養の比較 --- グルコースの消費率 ---
 (A) 嫌気培養 (B) 好気培養

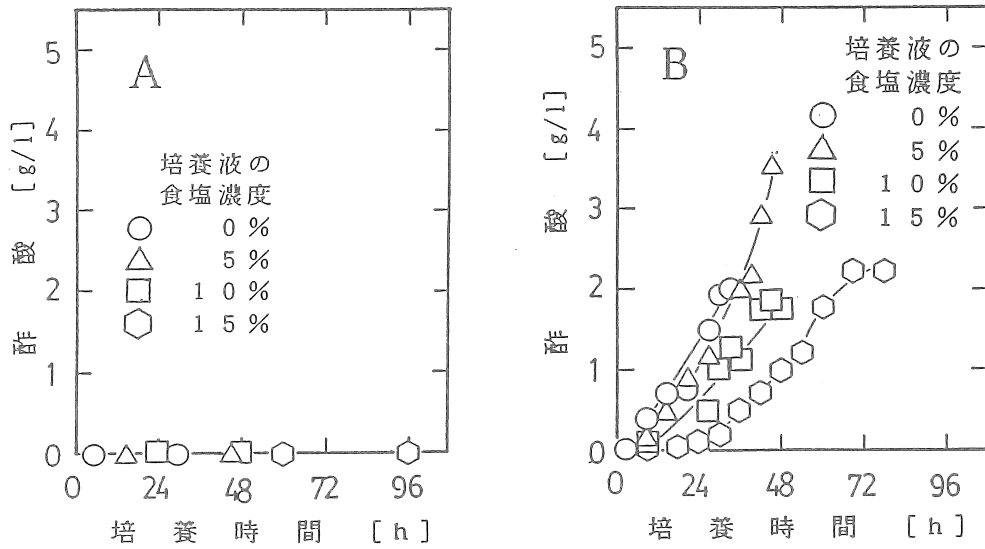


図3 嫌気培養と好気培養の比較 --- 酢酸の生成量 ---
 (A) 嫌気培養 (B) 好気培養

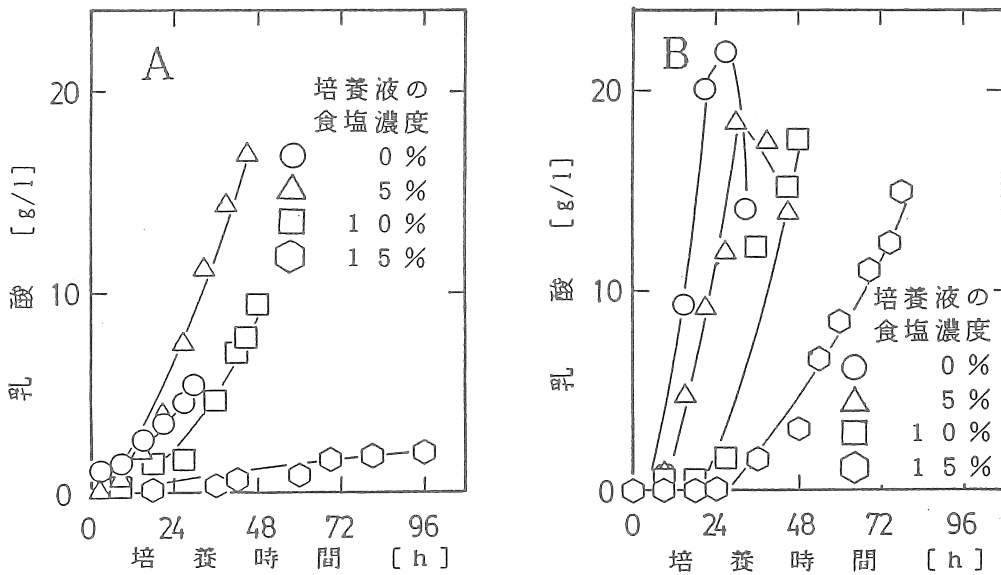


図4 嫌気培養と好気培養の比較 --- 乳酸の生成量 ---
 (A) 嫌気培養 (B) 好気培養

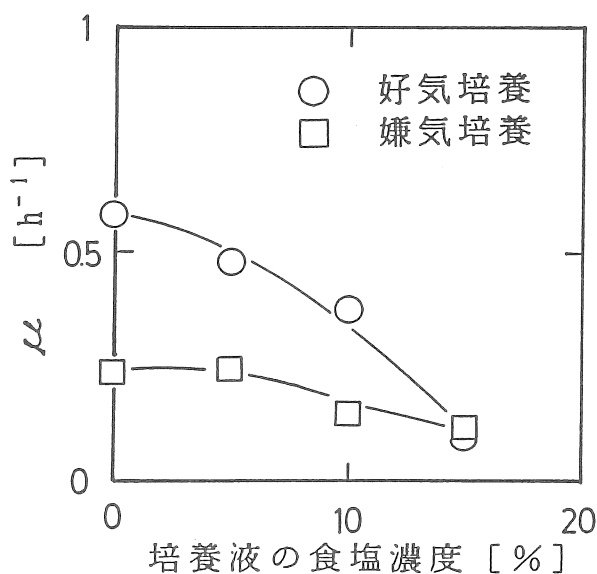


図5 比増殖速度に対する培養時の食塩濃度の影響

表1 培養条件による代謝産物の変化

培養条件		培養時間 [h]	菌体濃度 [g/l]	グルコース 消費量 [mol/l]	生成酸量 [mol/mol consumed glucose]	
通気 [0.2vvm]	食塩濃度 [%]				乳酸	酢酸
好気 (空気)	0	27	5.20	0.14	1.74	0.18
	5	39	5.64	0.15	1.32	0.24
	10	48	4.87	0.16	1.13	0.19
	15	78	4.46	0.14	1.15	0.33
嫌気 (窒素)	0	27	1.05	0.027	1.88	ND*
	5	39	2.50	0.092	1.75	ND
	10	48	1.50	0.077	1.39	ND
	15	96	0.49	0.047	1.04	ND

*ND : Not detected.

好気条件下における代謝、エネルギー生成および酸素耐性に対する食塩濃度の影響を今後検討することは有意義であると考えられる。

3. 2 酸素関連酵素の活性に対する酸素および食塩濃度の影響

食塩濃度を変えたMRS培地を用いて、嫌気的および好气的に*P. halophilus*を培養した時の酸素関連酵素の活性を測定した。菌体内のNADHオキシダーゼおよびSOD活性を酸素関連酵素として測定した。図6は培養期間中の両酵素の蛋白質当たりの比活性の変化を示す。また、表2は比活性がほぼ一定となった期間における平均値を示す。培養初期および食塩濃度が高い場合には菌体量が少なく、酵素活性および蛋白質濃度の測定は困難であり、測定値は若干ばらついている。しかし、好気培養における酸素関連酵素の比活性は、嫌気培養における値とほぼ同一であり、酸素によってこれらの酵素の菌体内蛋白質当たりの含量は増加しなかった。

図7は横軸に培養時の食塩濃度を取り、酸素関連酵素の比活性の変化をまとめた結果を示す。好気、嫌気条件にかかわらず、培養時の食塩濃度が高くなるにつれて菌体内のNADHオキシダーゼおよびSODの比活性は低下した。培養液中の食塩濃度に変化しても菌体当たりの蛋白質含量はほとんど変わらないことから、食塩濃度の増加につれて酵素の生成量自体が減少したと考えられる。

3. 3 耐塩性乳酸菌の酸素消費速度

耐塩性乳酸菌の酸素消費速度に及ぼす諸因子について検討した。図8は酸素消費速度に及ぼすpHの影響を検討した結果を示す。食塩濃度を5%または10%として嫌気的および好气的に培養した菌体をそれぞれ洗浄し、食塩を含まない各緩衝液（グルコースを含む）に懸濁した後、生物用酸素モニターを用いて菌体当たりの酸素消費速度を測定した。いずれの条件においても酸素消費速度は中性付近で最大となった。また、これらの測定結果から、1) 酸素消費速度は好气的に培養した菌体の方が速い、2) 食塩濃度を0%として培養した菌体の方が5%とした場合に比べて酸素消費速度は速い、ことがわかった。

図9は酸素消費速度に及ぼす食塩濃度の影響を検討した結果を示す。測定は緩衝液中の食塩濃度を変えてpH7で行った。食塩を含まない培地で調製した菌体を除いて、嫌気培養によって調製した菌体の酸素消費速度は、好気培養によって調製した菌体の速度に比べて低くなった。また、食塩を含まない培地で調製した菌体の酸素消費速度は、嫌気、好気にかかわらず、食塩を含む培地で調製した菌体に比べて著しく高くなった。さらに、食塩を含まない培地で調製した菌体の酸素消費速度は、特に測定時の緩衝液中の食塩濃度に大きく影響され、食塩濃度が増加するにつれて減少した。

表3は酸素消費に対する呼吸系阻害剤の影響を示す。食塩を5%含む培地で嫌気的および好气的に培養した菌体について酸素消費速度を測定した。基質はグルコースおよび乳酸

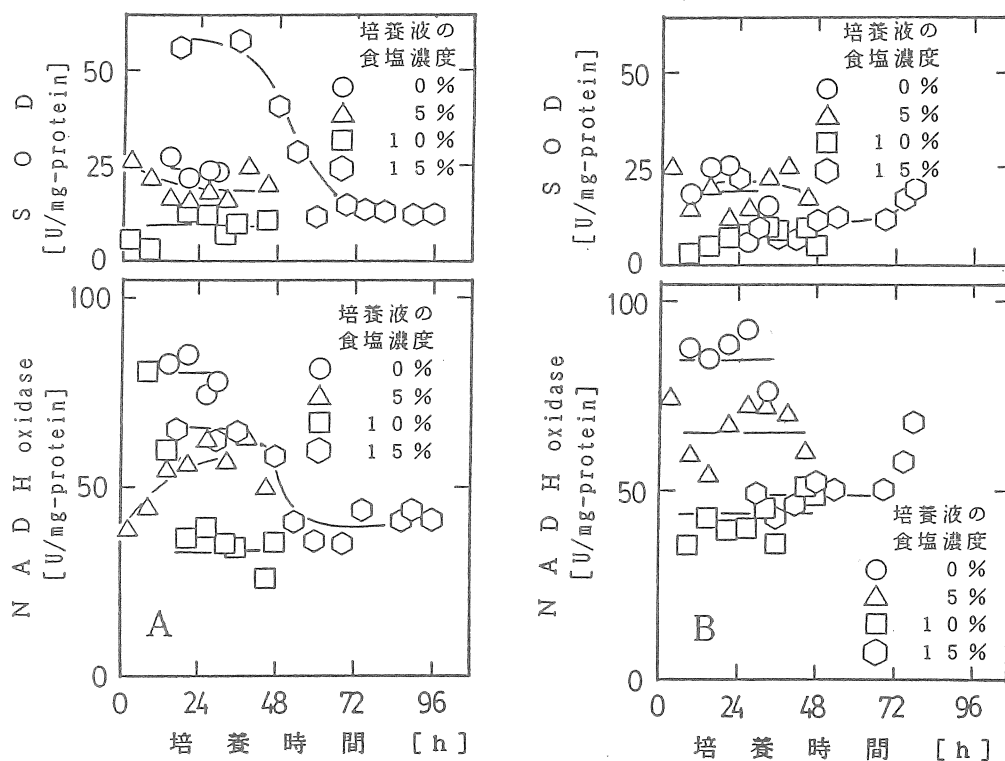


図6 嫌気培養と好気培養の比較 --- 酸素関連酵素の活性 ---
 (A) 嫌気培養 (B) 好気培養

表2 酸素関連酵素の活性に対する培養条件の影響

培養条件		S O D [U/mg-protein]	N A D H oxidase [U/mg-protein]
通気 [0.2vvm]	食塩濃度 [%]		
好気 (空気)	0	21.4	89.5
	5	19.5	69.5
	10	8.32	44.4
	15	12.0	51.2
嫌気 (窒素)	0	24.5	86.2
	5	19.1	57.6
	10	13.1	34.9
	15	12.7	42.4

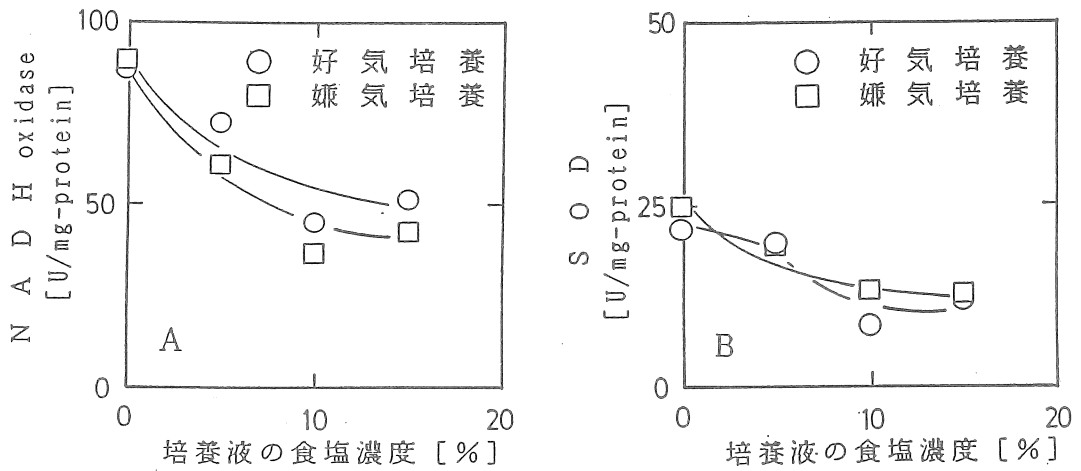


図7 酸素関連酵素活性に対する培養時の食塩濃度の影響
 (A) NADH oxidase
 (B) SOD

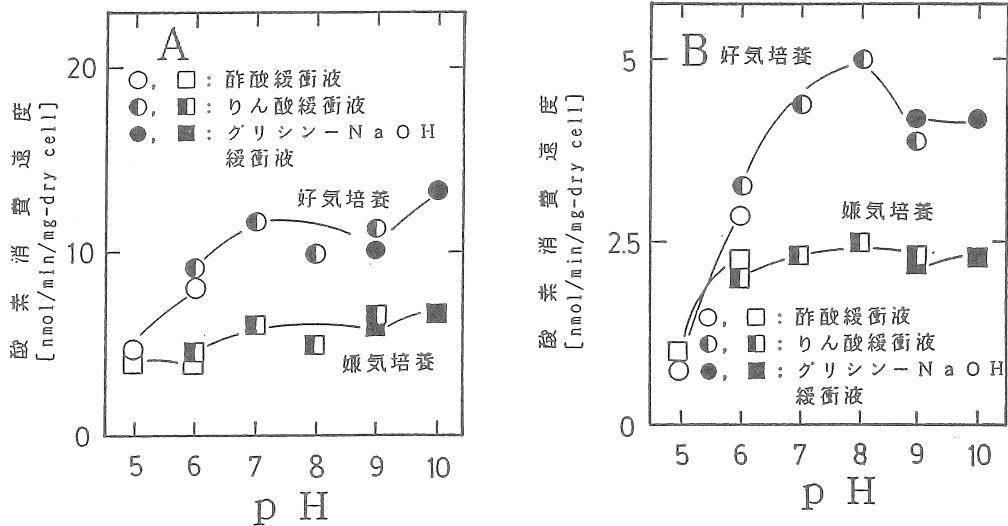


図8 酸素消費速度に対するpHの影響

(A) 5%食塩を含む培地で調製した菌体を使用
 (B) 10%食塩を含む培地で調製した菌体を使用

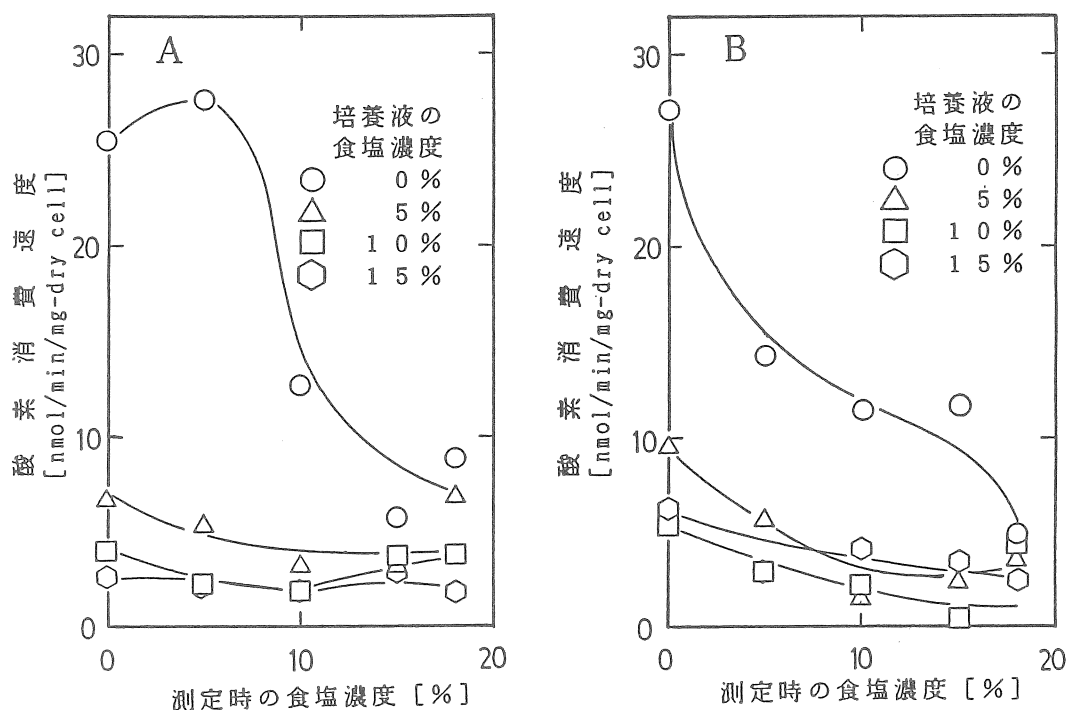


図9 酸素消費速度に対する食塩濃度の影響

- (A) 各濃度の食塩を含む培地を用いて嫌気培養した菌体を使用
- (B) 各濃度の食塩を含む培地を用いて好気培養した菌体を使用

表3 酸素消費に対する阻害剤の影響

菌体の調製条件	阻害剤 (1mM)	菌体当たりの酸素消費速度	
		グルコース	乳酸
		[nmol/min/mg-dry cell]	
好気	--	7.10	0.23
(空気通気)	KCN	6.39	0.19
食塩 5%	NaN ₃	5.93	0.23
嫌気	--	3.87	0.21
(窒素通気)	KCN	3.46	0.21
食塩 5%	NaN ₃	3.72	0.21

を用いた。酸素消費速度はKCNおよび NaN_3 存在下でもほとんど低下せず、KCNおよび NaN_2 による酸素消費の阻害は認められなかった。このようにチトクロームオキシダーゼの阻害剤によって酸素消費が阻害されないことから、本菌の酸素消費はチトクローム酵素系に依存しないことがわかった。

以上の結果より、各種条件下で培養した菌体の無細胞抽出液を用いて測定したNADHオキシダーゼの活性(表2)と図9で示した休止菌体による酸素消費速度の間には同様な傾向があり、*P. halophilus*の酸素消費にはNADHオキシダーゼが主要な役割をしていると推定される。また、無細胞抽出液のNADHオキシダーゼ活性および休止菌体の酸素消費に対して培養時の食塩濃度が大きく影響していることが明かとなった。

4. 今後の課題

耐塩性乳酸菌は、いわゆる”カタラーゼ陰性の通性嫌気性微生物”と分類されており、好気的な培養を試みた研究⁶⁾はほとんどない。耐塩性乳酸菌に関する本研究成果を基礎として、以下の課題について今後更に検討する必要がある。

- 1) 耐塩性乳酸菌*Pediococcus halophilus*の好気条件下における代謝の変化を乳酸、酢酸以外の代謝産物も定量し、明らかにする。また、好気条件下におけるエネルギー生成および酸素耐性に対する食塩濃度の影響を検討する。
- 2) 酸素代謝に関連する酵素(スーパーオキシドジスムターゼ、NADHオキシダーゼ)の生合成に対する酸素分圧の影響について明らかにする。
- 3) NADHオキシダーゼの酵素化学的な性質を明らかにする。

5. 参考文献

- 1) M. Taniguchi, K. Hoshino, K. Shimizu, I. Nakagawa, Y. Takahashi and M. Fujii : J. Ferment. Technol., **66**, 633 (1988).
- 2) 谷口正之、星野一宏、藤井盈宏 : ケミカルエンジニアリング 第33巻12号 p.960 (1988).
- 3) 谷口正之 : 国眼孝雄、松本幹治編著『メンブレンバイオリアクター応用ハンドブック』サイエンスフォーラム p.172-177 (1990).
- 4) J. M. McCord and I. Fridovich : J. Biol. Chem., **244**, 6049(1969).
- 5) S. B. Barker : Methods in Enzymology, **3**, 241 (1957).
- 6) C. Kanbe and K. Uchida : Agric. Biol. Chem., **49**, 2931 (1985).

Effect of NaCl Concentration on Activities of Enzymes Related to
Oxygen Metabolism in a Halo-Tolerant Lactic Acid Bacterium

Masayuki Taniguchi

Department of Material and Chemical Engineering,
Faculty of Engineering,
Niigata University

S u m m a r y

A salt-tolerant lactic acid bacterium, Pediococcus halophilus, plays a significant role in the brewing of soy sauce. This bacterium is a typically facultative anaerobic bacterium. Therefore, there are few studies on the oxygen metabolism in P. halophilus cells grown under aerobic conditions. In this work, effects of salt concentration of culture broth and oxygen supply on activities of enzymes related to oxygen metabolism in the cells were studied.

Under anaerobic conditions, the bacterium produced more than 1.7 mole of lactic acid from 1 mole of glucose consumed. However, the production of acetic acid was observed in an aerobic culture. The change of sugar metabolism by existence of oxygen was experimentally confirmed. Activities of superoxide dismutase (SOD) and NADH oxidase, enzymes related to oxygen metabolism, per protein of cell-free extracts prepared from the anaerobically grown cells were as high as those prepared from the aerobically grown ones. There was no or little influence of oxygen on production of SOD and NADH oxidase by the cells. However, specific activities per protein of SOD and NADH oxidase were gradually decreased with increasing salt concentration of culture broth.

The optimum pH of oxygen consumption rate by the resting cells was 7 to 8. The oxygen consumption rate by the resting cells prepared from an aerobical culture was faster than that from an anaerobical culture. Especially, the oxygen consumption rate by the resting cells prepared from the culture without salt was remarkably higher as compared with those from the culture with salt.