

琉球大学学術リポジトリ

タウリン培地に生育する細菌の分離と生育条件の検討(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 当山, 清善, 当間, 孝子, 宮里, 興信, Toyama, Seizen, Toma, Takako, Miyazato, Koshin メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4425

タウリン培地に生育する細菌の分離と生育条件の検討

当山清善* 当間孝子** 宮里興信*

Seizen TOYAMA, Takako TOMA and Koshin MIYAZATO: Isolation and some growth conditions of taurine utilizing bacteria

I 緒 言

システイン、シスチンおよびメチオニン等の含硫アミノ酸の代謝については動物および微生物においてこれまで多くの研究が行なわれている(2,3,7)。また、スルホン酸基を有し、一種の含硫 ω -アミノ酸とみなされるタウリン(2-アミノエタンスルホン酸)は動物組織に比較的高濃度に生成蓄積され、その生成機構についての研究報告は多い(1,2)。しかし、タウリンの代謝に関する研究は動物および微生物においてBraunら(5)、Weltyら(10)、Peckら(8)およびKondoら(6)によって行なわれたが、詳細な代謝経路についてはまだ明らかでない。

本研究は、細菌におけるタウリンの代謝過程を調べ、関与する酵素の性質を明らかにすることを目的としている。本報においては、タウリンを含む培地に生育する細菌を土壌などから分離するとともに、分離菌株の生育条件等を検討したので報告する。

II 実 験 方 法

1. 細菌の培養法：細菌の培養に使用した培地は、肉エキス0.01%、リン酸第一カリウム0.1%、リン酸第二カリウム0.1%、食塩0.1%、硫酸マグネシウム0.01%および水道水の組成(pH7.2)を基本培地とし、炭素源および窒素源としてグリセリン、グルコース、ペプトンなどを単独にあるいは組合せて加えたものである。細菌の培養は上記培地を試験管(培地、5ml)または振とうフラスコ(培地、100ml)に入れ菌株接種後30°C、18~20時間振とう培養して行なった。

2. 細菌の分離法：炭素源および窒素源としてタウリンを含む培地を用いて、サトウキビ畑土壌および下水などの試料から集殖培養の後平板培養をくり返してタウリン培地に生育する細菌を分離した。すなわち分離用液体培地5mlを試験管に入れ、土壌などの試料約0.2gを接種し、30°Cで2~3日間振とう培養による集殖培養を4回くり返した後純粋分離を行なった。

3. 分析方法：菌体の生育度は日立分光光度計(UV 139)の610m μ における吸光度を測定し、別に作成した検量線で吸光度から換算した乾燥菌体重量を用いた。生育度は培養液1ml当りの乾燥重量(mg)で示した。細菌培養後の培養液のpHの測定はpH試験紙またはpHメーターによって行なった。

* 琉球大学農学部農芸化学科

** 現在、宝酒造株式会社中央研究所

III 実験結果および考察

1. タウリン培地に生育する細菌の分離

約40種類の土壌などの試料を分離源として、タウリンを唯一の炭素源ならびに窒素源とする培地を用い集殖培養、平板培養を行なうことによりタウリン培地に生育する細菌の分離を試みた。Table 1 は分離菌の代表的な10菌株と保存3菌株の生育度と培養後のpHを示したものである。

Table 1. Growth of bacteria in the taurine medium

Strains	Final pH of medium	Growth
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ICR-304	7.2	0.03
<i>Achromobacter superficialis</i> ICR-89	7.2	0
<i>Escherichia coli</i> ICR-1	7.2	0.03
isolated W-12	6.0	0.25
W-15	6.8	0.17
W-17	6.8	0.15
W-44	4.8	0.36
W-64	4.6	0.48
F-15	5.4	0.28
F-30	4.8	0.35
F-64	4.6	0.40
F-72	4.8	0.39
F-126	6.8	0.10

The composition of growth medium was as follows: 0.2% taurine, 0.01% meat extract, 0.1% KH_2PO_4 , 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl , 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.2. The culture was carried out at 30°C on reciprocal shaker for 20 hrs. Bacterial growth was followed by measuring the optical density at 610 $m\mu$ of the culture, and the growth was expressed as *mg* of dried weight of cells per *ml* of the culture.

表から明らかなように、タウリンを資化して生育する菌株の培養後の培地のpHが酸性になるので資化性菌株の分離にあたってはpHの低下を目安とすることができる。比較のために用いた3保存菌株はほとんど生育がみられなかった。土壌から分離された菌株ではW-64が最も生育がよく培地のpHも4.6に低下した。また、培地組成としてタウリンとともにグリセリンを加えると菌株の生育が高められる。培地にグリセリンを加えることにより生育が高められた菌株はW-64、F-64およびF-72の3菌株である。

2. 各種培地におけるW-64菌株の生育

土壌から分離したW-64菌株はタウリンを唯一の炭素源および窒素源とした培地およびタウリンとグ

リセリンを含む培地に最もよい生育を示したので、次にグリセリンおよびペプトンを含む培地における本菌株の生育を調べた。培地は、基本培地にタウリン0.2%、グリセリン1.0%およびペプトン0.2%加えた組成である。その結果は Table 2 に示した。表から明らかなように、W-64菌株の生育はグリセリンとタウリンを含む培地よりもグリセリンとペプトンを含む培地において良好であり、生育後のpH低下もみられない。従って、W-64菌株はタウリンを唯一の炭素源および窒素源として資化し生育することができるのであるが、栄養源としてはタウリンよりも資化利用されやすいペプトンなどを含む培地において生育が良好である。

Table 2. Growth of W-64 strain in the various medium

Medium	Final pH of medium	Growth
Taurine	4.6	0.45
Glycerin-taurine	4.4	1.60
Glycerin-peptone	7.6	2.75

The composition of growth medium and conditions are the same as shown in Table 1 except that 1.0% glycerin and 0.2% peptone are added.

3. W-64菌株の生育曲線

W-64菌株の各種培地における生育を調べた結果、タウリンのみを含む培地よりもグリセリン-ペプトンを含む培地で良好な生育を示したので、次に本菌株の各培養時間における生育およびpHの変化を調べた。Fig. 1 は炭素源としてグリセリンを用い、窒素源としてタウリンとペプトンを含む培地における培養時間と生育およびpHの変化の関係を調べた結果である。グリセリン-タウリン培地における生育は培養24時間目で最高に達した。培地のpHは生育とともに急激に低下し、最高の生育を示す培養24時間目でpH4.0に低下した。本培地組成において、生育が最高に達した時生育曲線が低下するのは培地のpHが酸性のためか、あるいはその他の原因で溶菌現象を起こしたのか明らかでない。一方、グリセリン-ペプトン培地における本菌株の生育は培養時間とともに増大し、培養24時間目で最高の増殖を示しそれ以後培養48時間まで僅かながら増殖した。培地のpHは7.2から8.0に変化した。以上のことから W-64菌株の生育曲線は培地組成によつて異なることが明らかになったのであるが、これは炭素源および窒素源の濃度を固定した場合の結果である。多量の菌体を得る目的での培地組成はグリセリン-ペプトン培地が良好である。タウリンを含む培地における本菌株の生育をたかめるためには培地のpHを低下せしめない手段を講ずる必要がある。タウリン資化菌体の生理的性質については検討中である。

4. W-64菌株の生育培地組成の検討

タウリンを窒素源とした培地におけるW-64菌株の生育は生育とともに培地のpHが低下するため著しく阻害され、菌体収量が悪い。一方、グリセリン-ペプトン培地においては生育が高められる。本菌株のタウリン-ピルビン酸アミノ基転移反応を触媒する酵素活性を調べた結果、グリセリン-ペプトン培地から得た休止細胞は本酵素活性を有することが明らかになった(9)。従つて菌体収量が比較的高い値を示すグリセリン-ペプトン培地を用い、W-64菌株の最適生育培地組成の検討を行なった。

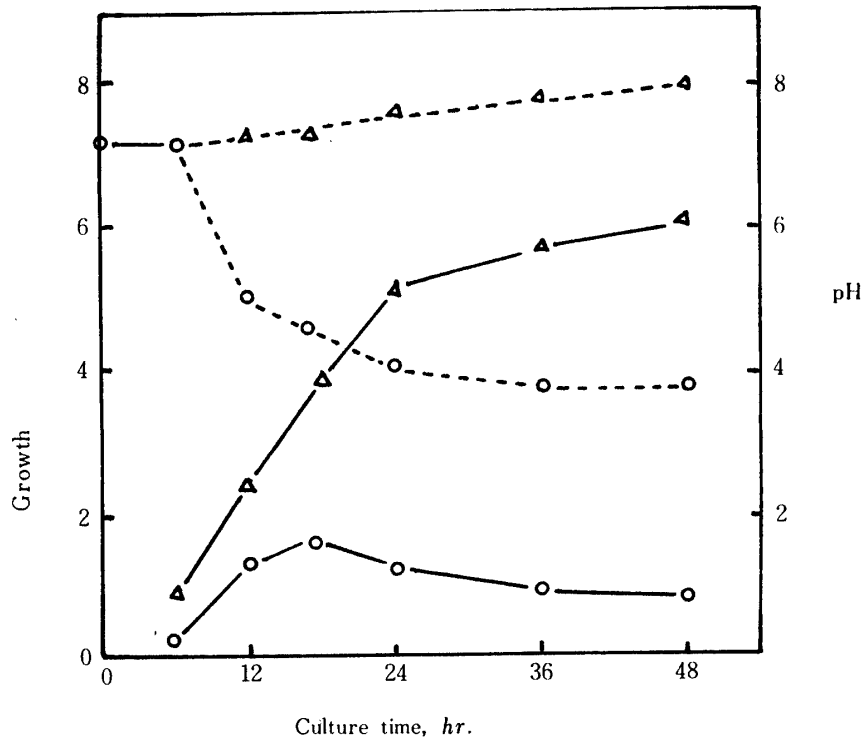


Fig. 1. Growth of W-64 strain in the glycerin-aurine and glycerin-peptone medium

The composition of growth medium and culture conditions are the same as shown in Table 1 and 2.

Glycerin-aurine medium : growth (○—○), pH(○—○)

Glycerin-peptone medium : growth (△—△), pH(△—△)

(1) グリセリン： 実験方法で述べた無機塩類を含む基本組成に0.1%のペプトンを加え、各種濃度のグリセリンを含む培地におけるW-64菌株の培養20時間における生育とpHの変化を調べた。その結果はFig. 2に示す。培地にペプトンが0.1%含まれているのでグリセリン無添加の場合でも生育はいくらかみられるが、グリセリンを加えても生育の増大はみられない。培地のpHは0.5%グリセリン濃度で7.2から7.0に低下した。従ってグリセリンの生育最適濃度は0.5%である。

(2) ペプトン： グリセリン濃度を0.5%を含む基本培地組成に各種濃度のペプトンを加えた培地におけるW-64菌株の生育とpHの変化を調べたのがFig. 3である。図から明らかなように、培地中のペプトン濃度が増すに従って生育が著しく高められ、ペプトン濃度が0.5%で生育は最高に達する。ペプトン濃度をさらに高めても生育は増大しない。一方、培地のpHは最高の生育を示す0.5%のペプトン濃度で7.2から7.5に上昇し、ペプトン濃度が高くなるに従い8.6まで上昇した。本菌株の生育に適するペプトン濃度は0.5%である。

(3) リン酸第一カリウムおよびリン酸第二カリウム：次に、菌株の生育に最適濃度である0.5%のグリセリンおよびペプトンを含む培地における塩類の濃度と生育との関係について調べた。リン酸第一カリウムの濃度について調べた結果はFig. 4に示す如くである。生育最適濃度は0.1%にあり、濃度が高くなると生育が抑えられる。本実験においては、基本培地にはリン酸第二カリウムを0.1%含んでい

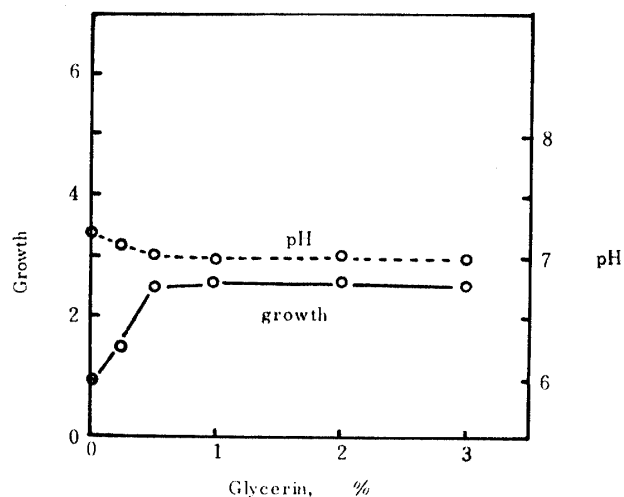


Fig. 2. Effect of glycerin concentration in the medium on the growth of W-64 strain

The composition of growth medium and culture conditions are the same as shown in Table 1 except 0.1% peptone and various glycerin concentration.

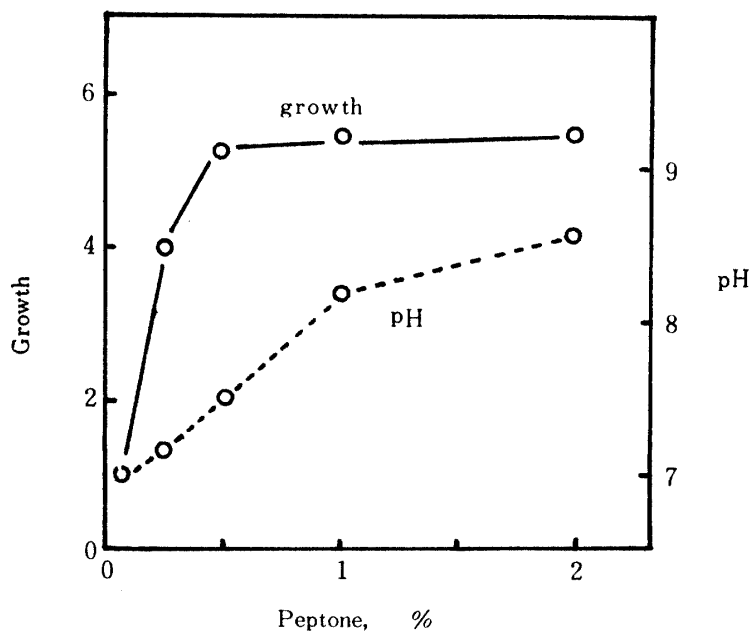


Fig. 3. Effect of peptone concentration in the medium on the growth of W-64 strain

The composition of growth medium and culture conditions are the same as shown in Fig 2 except 0.5% glycerin and various peptone concentrations.

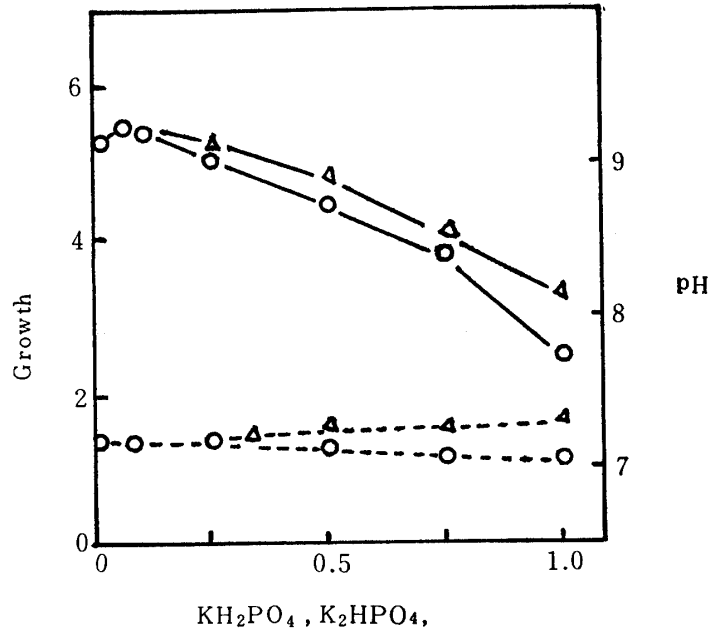


Fig. 4. Effect of KH_2PO_4 and K_2HPO_4 concentration on the growth of W-64 strain

The composition of growth medium and culture conditions are the same as shown in Fig. 2 except 0.5% glycerin, 0.5% peptone, and various concentrations of KH_2PO_4 and K_2HPO_4

KH_2PO_4 ; growth (O—O), pH(O—O). K_2HPO_4 ; growth(Δ—Δ), pH(Δ—Δ).

るので無添加の場合でも生育がみられる。リン酸第一カリウムの濃度を0.1%として、各種濃度のリン酸第二カリウムを添加した培地における生育も0.1%付近に最適濃度があり高濃度の培地では生育が抑制される。培地のpHは、両リン酸塩とも大きな変化はみられない。従つて、菌株の生育を最高にするために加える両リン酸塩の濃度は0.1%で十分である。

(4) 食塩および硫酸マグネシウム濃度：グリセリン0.5%，ペプトン0.5%，第一および第二リン酸カリウム各々0.1%，硫酸マグネシウム0.01%および肉エキス0.01%を含む培地に各種濃度の食塩を加えた培地におけるW-64菌株の生育とpHの変化を調べた。その結果はFig. 5に示す如くである。上記組成の培地に食塩0.25%まで加えても菌株の生育には変化がみられず、0.5%以上の濃度を含む培地では生育が阻害される。食塩濃度が高くなると培地のpHが上昇した。従つて本菌株の生育には培地に食塩を加える必要がない。同じく硫酸マグネシウムの濃度について調べた結果がFig. 6である。図から明らかのように生育最適濃度は0.05から0.01%付近にあることがわかった。この濃度においては培地のpHはほとんど変化しない。

以上の実験結果から、本菌株の培地組成は次のように設定される。グリセリン0.5%，ペプトン0.5% 第一および第二リン酸カリウム各々0.1%，硫酸マグネシウム0.01%および肉エキス0.01%。なお、本培地組成から肉エキスを除くと菌株の生育度は約20%低下した、また肉エキスの代りに酵母エキス

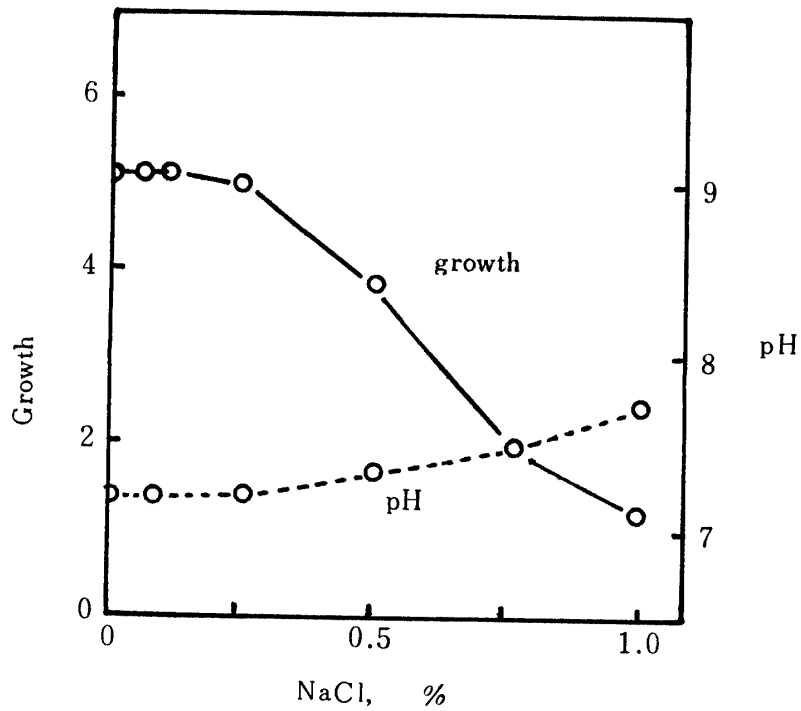


Fig. 5. Effect of NaCl concentration in the medium on the growth of W-64 strain
 The composition of growth medium and culture conditions are the same as shown in Fig. 4 except 0.1% KH_2PO_4 , 0.1% K_2HPO_4 , and various NaCl concentrations.

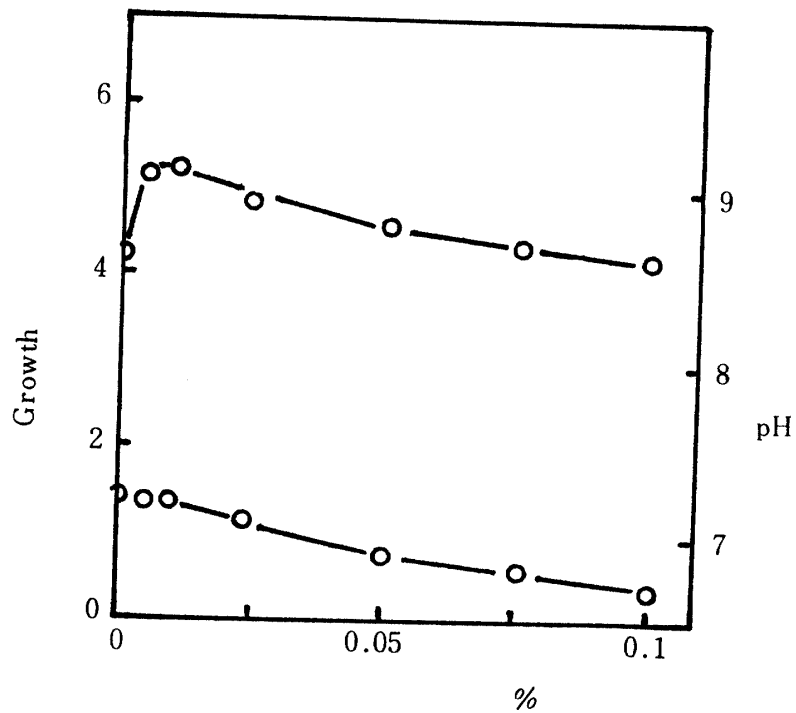


Fig. 6. Effect of magnesium sulfate concentration in the medium on the growth of W-64 strain

The composition of growth medium and culture conditions are the same as shown in Fig. 5. except various concentrations of magnesium sulfate, but sodium chloride is removed.

0.01%を含む上記培地でも同程度の生育がみられた。

5 W-64菌株の生育におよぼすpHの影響

上記の設定培地を用いて、各種pHの培地におけるW-64菌株の生育状態を調べた。培地の始発pHの調製は塩酸とカセイソーダを用いて行なった。その結果はFig. 7に示す。菌体生育後の培地のpHについても図示してある。図から明らかなように、本菌株はpH 5から8までの範囲で生育が良好で、pH 4以下あるいはpH 9以上では全くあるいはほとんど生育しない。Fig. 1で示した如く、タウリンを唯一の窒素源とした培地における本菌株の生育が著しく阻害されるのは培地のpHが低下するためであろう。

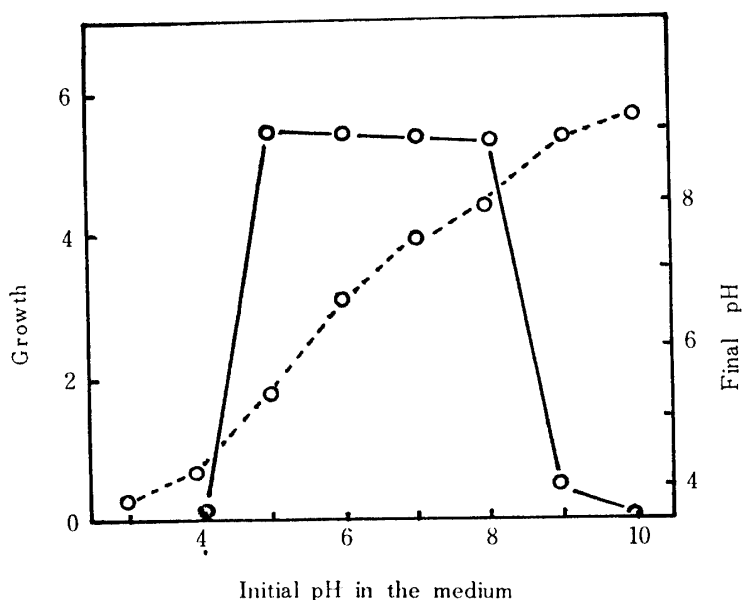


Fig. 7. Effect of initial pH in the medium on the growth of W-64 strain.

The composition of the growth medium was as follows: 0.5% glycerin, 0.5% peptone, 0.05% potassium dihydrogen phosphate, 0.1% dipotassium phosphate, 0.005% magnesium sulfate, and 0.005% meat extract. The bacteria were grown at the indicated pH. Other conditions are the same as shown in Table 1.

IV 要 約

タウリンを含む培地に生育する細菌を分離するとともに生育条件を検討し次の結果を得た。

1. 土壌などの試料からタウリンを唯一の炭素源および窒素源として生育する細菌10株が分離された。タウリンを含む培地で分離菌株が生育すると培地のpHが低下し生育が阻害される。グリセリンおよびペプトンを含む培地における分離菌株の生育は良好であった。

2. タウリンを含む培地で比較的生育が良好であった分離菌W-64菌株について生育条件を調べ、新しくグリセリン-ペプトン含有生育培地組成を設定した。本菌株は、培地のpHが7から8の範囲でよく生育した。

本研究にあたり、御助言をいただいた京都大学化学研究所左右田健次助教授に厚く感謝します。

文 献

1. Awapara, J. 1957 Absorption of injected taurine by rat organs, *J. Biol. chem.*, **225** : 877~882
2. 旭正 1957 亜硫酸酸化酵素系, 蛋白質・核酸・酵素 **2** : 22—30
3. 赤堀四郎編 1962 アミノ酸シリーズ第5集, 南江堂
4. Braun, R. and Fromageot, P. 1961 Deamination of taurine by *Aspergillus niger*, *Biochim. Biophys. Acta*, **62** : 544~555
5. Ikeda, K., Yamada, H. and Tanaka, S. 1963 Bacterial degradation of taurine, *J. Biochem.*, **54** : 312~316
6. Kondo, H., Anada, H., Ohshima, K. and Ishimoto, M. 1971 Formation of sulfoacetaldehyde from taurine in bacterial extracts, *J. Biochem.*, **69** : 621~623
7. Meister, A. 1965 "Biochemistry of the amino acids", 2nd ed., Academic Press Inc., New York
8. Peck, E. J. and Awapara, J. 1967 Formation of taurine and isethionic acid in rat brain, *Biochim. Biophys. Acta*, **141** : 499~506
9. 当山清善, 当間孝子, 宮里興信 1973 細菌の細胞懸濁液によるタウリン—ピルビン酸アミノ基転移反応について, 琉球大学農学部学術報告 **23** : 105~113
10. Welty, J. D., Read, W.O. and Shaw, E. H. 1962 Isolation of 2-hydroxyethanesulfonic acid (Isethionic acid) from dog heart, *J. Biol. Chem.*, **237** : 1160~1162

Summary

1. Bacteria which actively utilize taurine as a sole carbon and nitrogen source, were isolated from soil materials. When the bacteria grew in the taurine medium, the pH decreased and the growth was inhibited. The bacteria actively grew in the medium containing glycerin and peptone.
2. The growth conditions of F-64 strain, a bacterium of the isolated, were examined. The strain grew in the pH of the glycerin-peptone medium 7 to 8 region.