

# 脱窒菌 (*Pseudomonas denitrificans*) に おける硝酸還元能の活性化条件について

山岡 邦雄\*, 加藤 美都子\*

The Activating Condition of Nitrate Reduction by *P. denitrificans*

Kunio Yamaoka. Mitsuko Kato

## Abstract

The study of denitrification by the cell is worth notice for its genetics and water waste treatment. Enhancement of the nitrate reducing activity is useful for these purpose.

In this study, the nitrate reducing activity in a suspension of *Pseudomonas denitrificans* was markedly enhanced in the presence of monovalent cations, and the activating conditions of nitrate reduction were reported.

## 1. 緒 論

硝酸呼吸は、ある種の生物のエネルギー獲得系として非常に重要であり、その機構の解明は我々人間にとって生物進化の面やさらには公害対策まで多くの利用価値のあるものである。<sup>1),2),3)</sup>

我々はこの脱窒菌の一種である *P. denitrificans* を用いその硝酸還元酵素の単離、酵素反応機構の制御および酵素の活性化等を目的として研究を行なっている。

今回 *P. denitrificans* を異化型硝酸還元酵素を必要とする状態で増殖させた生菌に対し、その硝酸還元能を一価カチオンにより増大させる至適条件を検討した。また精製の一段階として菌体を破碎し、細胞質と細胞膜に分け、Disc 電気泳動で分離後酵素を抽出し、その抽出液中の硝酸還元能も調べたので以下その結果を報告する。

## 2. 試料および実験方法

### (1) 使用菌株

*Pseudomonas denitrificans* ATCC 13867

### (2) 増殖条件

培養の基本的方法は Nishimura<sup>4)</sup>らの方法に従った。すなわち菌の保存および前々培養は Yeast Extract 0.5 g, Na<sub>3</sub>-Citrate 0.6 g を 100 g の水に溶した培地で行った。前培養および本培養は主に山岡ら<sup>5)</sup>の方法に従い、原則的に、KNO<sub>3</sub> 10 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, Na<sub>3</sub>-Citrate 6 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, NaCl 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mg, CaCl<sub>2</sub> 20 mg, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 1 g, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.1 mg, CoCl<sub>2</sub> 2 mg, MnCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.1 mg, Na<sub>3</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 2.5 mg, Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.2 mg を水に溶して 1 l とした培地 (pH 7.0) を用いた。培養条件は前々培養は 30°C で 16 時間振とう培養した。前培養および本培養は 30°C で 17 時間静置培養をした。また異化型の生育菌を得るため前培養、本培養では培養フラスコ中の空気を He で置換して培養を行なった。菌の濃度は 580 nm での濁度で示した。

### (3) 硝酸還元能の測定

Nishimura<sup>4)</sup>らの方法により NO<sub>3</sub><sup>-</sup> を還元して生じた NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の量を測定した。還元剤として Methyl viologen を使用した。使用する菌体量は 580 nm における濁度 OD = 1 の菌体濃度で、1.64 mg Cell/ml として計算した。NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

\* 宇部工業高等専門学校工業化学

量については比色定量を行い、540 nm における吸光度 OD=1 のとき  $\text{NO}_2^-$  濃度は 0.19 mol/l として計算した。

#### (4) 硝酸還元能のカチオンによる活性化の条件

##### ① 菌懸濁液の調製

活性化に用いる菌は対数増殖期にある菌体を集菌 (10, 000rpm×6 min) し、0.033 mol/l リン酸緩衝液 (KPB) で3回洗浄した菌体を菌体濁度 OD=1 (580 nm) に調製した。

##### ② 活性化に用いるカチオンの種類

各種電解質および非電解質について検討した。すなわち調製菌懸濁液の NaCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , KCl,  $\text{KNO}_3$ , RbCl, CsCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , Mannitol, Sorbitol 溶液中での活性化を試みた。実験はいずれも 0.5 mol/l 濃度、30°C 1時間活性化で行った。

##### ③ 一価カチオンの濃度の検討

NaCl を飽和溶液までの7段階の濃度で調製し、その溶液で菌体を懸濁して菌体濁度 OD=0.5 (580 nm) として 30°C, 1時間活性化を行い、その硝酸還元能を比較した。

##### ④ 活性化温度の検討

調製菌懸濁液に等量の 2 mol/l の NaCl 溶液を加え、0°C と 30°C で1時間活性化した。活性化後ただちに集菌、洗浄し、硝酸還元能を測定した。

##### ⑤ 活性化時間の検討

調製菌懸濁液に等量の 2 mol/l NaCl 溶液を加え 30°C で活性化の時間を 0~150分まで変化させ④と同様にして硝酸還元能を比較した。

##### ⑥ 菌体濃度の検討

1 mol/l NaCl 溶液で菌体を懸濁し、その濁度を 580 nm で OD=0.450 (菌体量 0.74 g/l), 1.125 (1.85 g/l), 1.500 (1.72 g/l), 1.800 (2.95 g/l), 2.125 (3.49 g/l), 3.300 (5.41 g/l) とし、30°C で30分活性化を行った。

##### ⑦ pH の検討

調製菌懸濁液に、それぞれ pH 6, 7, 8 の緩衝液 (KPB) で作った等量の 2 mol/l NaCl 溶液を加え、活性化した。活性化は 30°C で30分を行った。

#### (5) Disc 電気泳動による酵素の確認分離と抽出

##### ① 粗酵素液の調製

本培養後の菌体を集菌、洗浄後 0.033 mol/l KPB で、OD=2 (580 nm) に調整し、その調製菌懸濁液 20ml を 0°C で超音波発生装置 (トミー精工, UP-200P) を用い 50W, 5分間超音波破碎を行った。この菌破碎液を 5°C で 15,000 rpm, 10分間遠心分離し、上澄み液と沈澱に分けた。この

上澄み液を 20ml に稀釈し粗酵素液とした。

##### ② Disc 電気泳動法

粗酵素液 1 ml に対しグリセリン 0.5 ml, チオグリコール酸 (60 mol/l, pH 6.7) 0.5 ml をまぜ、中村ら<sup>7)</sup>の方法によって作ったポリアクリルアミドゲル管 1本あたりサンブルゲルとして 0.20 ml づつ細孔ゲル上加え通電した。ゲル管 1本あたりの電流は電圧 400 V のとき 2 mA とした。泳動時間は室温 25°C のとき 1時間 10分ぐらいで、先端の BPB のバンドが下の緩衝液の液面に到達した時点で電気泳動を止めた。泳動後、ガラス管からゲルをとり出し (その際 BPB のバンドに銅線でマークしておく) 0.05 mol/l KPB に浸した。

##### ③ 酵素の確認

反応液 4.9 ml (10 mol/l Methyl viologen/0.05 mol/l KPB, pH 7.2) を試験管に入れ、これに泳動したポリアクリルアミドゲルを 1本入れる。更に、チオ硫酸ナトリウム溶液 (400 mg/0.05 mol/l KPB 20 ml) を 0.1 ml 加え 30°C で 10分間静置後、0.1 mol/l  $\text{KNO}_3$  を 0.1 ml 加え、引き続き 30°C で 5分間静置する。青色に着色したゲルを 0.05 mol/l KPB に移し、脱色したバンドの Rf 値を測定する。

##### ④ 酵素の抽出

脱色した位置のバンドを切りとり、よくすりつぶした後 0.033 mol/l KPB (ポリアクリルアミドゲル 4本に対し 4 ml) で抽出し遠心分離 (10,000 rpm×5分間, 5°C) を行い上澄み液の抽出液で酵素反応を行った。また抽出する際 1 mol/l NaCl 溶液で抽出を行い、30°C で 30分静置し活性化も行った。

### 3. 結果と考察

#### (1) 活性化条件の決定

##### ① 活性化に用いるカチオンの種類

活性化の際添加するカチオンの種類を変えて活性化した結果 Table 1 のようになった。1価カチオンを用いた場合は、いずれもその硝酸還元能が 3~8 倍と増大していることがわかる。それに対し 2価カチオン  $\text{Mg}^{2+}$  は効果が認められなかった。また非電解質として Mannitol, Sorbitol を用いたが 1価カチオン程の効果は示さなかった。これらの結果からカチオンによる効果は単に浸透圧の変化によるものではなく、明らかに 1価カチオンによりその硝酸還元能が活性化されていることを示している。そこでこれ以降この活性化の機構を解明していくために、

使用しやすくかつ効果も高い NaCl を使うこととした。

② NaCl 濃度の決定

0, 0.5, 1, 2, 3, 4 mol/l と飽和溶液の各種濃度の NaCl 溶液で 30°C, 1 時間活性化し, その硝酸還元能を比較してみた。結果は Fig. 1 のとおり 2 mol/l をピークに山型の図となった。従って NaCl 1~2 mol/l 濃度で活性化を行うことに決定した。

③ 活性化時の温度

活性化を行う際さらに温度による差があるかどうかを 0°C と 30°C で検討した。結果は Fig. 2 に示すように活性化した菌は 30°C の方が硝酸還元能が高かった。これは 30°C に静置しておくとかチオンと菌体の各部位との反応が進みやすいためと考えられる。

④ 活性化の時間

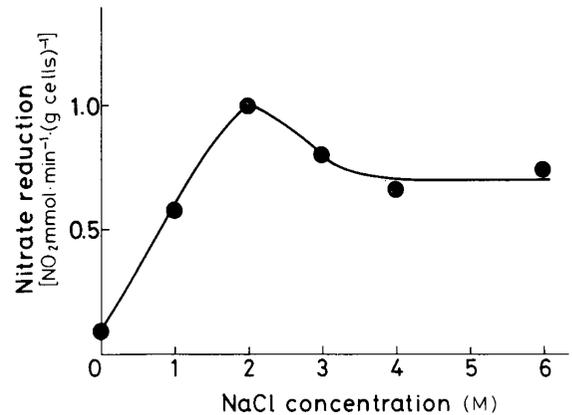
活性化を NaCl 1 mol/l 溶液添加状態で, 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150 分と静置時間を変化させてみた。結果は Fig. 3 に示した。NaCl を添加しない菌体は 150 分後も還元能はほぼ変わらず, NaCl 添加菌体は 30 分までに急速に活性が上昇し, その後の変化はあまりなかった。このことから活性化時間は 30 分で充分なことがわかった。なお 0 分から 8 分までの変化も測定してみた。結果は Fig. 4 のとおりとなった。

**Table 1** Effects of various salts and sugaralcohols on nitrate reducing activity in *Pseudomonas denitrificans* cells

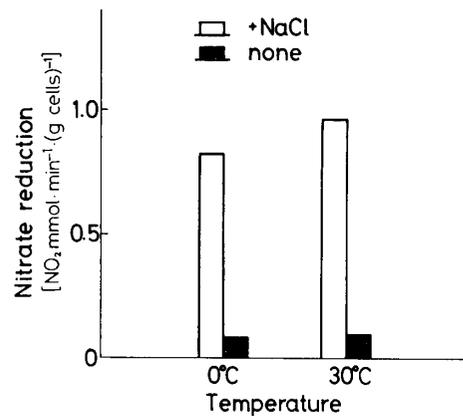
Incubation of cells* with	Nitrate reduction [mol·min <sup>-1</sup> ·(g cells) <sup>-1</sup> ] Methyl viologen**
(0.5M)	
None	62
NaCl	415
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	477
KCl	306
KNO <sub>3</sub>	198
RbCl	224
CsCl	308
NH <sub>4</sub> Cl	260
MgCl <sub>2</sub>	62
MgSO <sub>4</sub>	56
Mannitol	112
Sorbitol	118

\* 30°C, 1 h

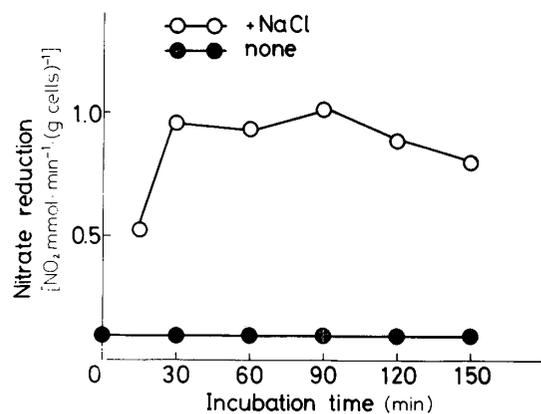
\*\* Electron donor



**Fig. 1** Effect of NaCl concentration on nitrate reduction



**Fig. 2** Effect of temperature on activation of nitrate reduction



**Fig. 3** Effect of incubation time on activation of nitrate reduction

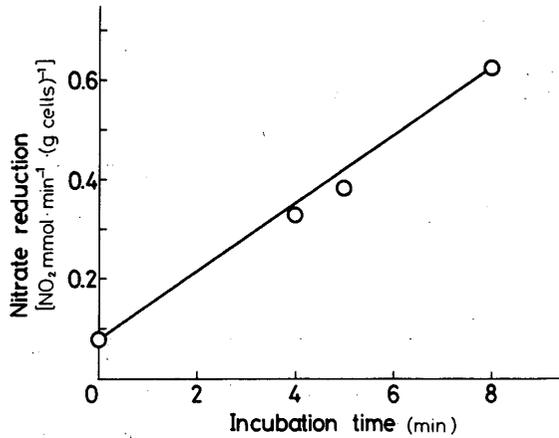


Fig. 4 Effect of incubation time on activation of nitrate reduction

#### ⑤ 活性化時の菌体の濃度

菌懸濁液の濃度を NaCl 1 mol/l 溶液で 0.74, 1.85, 2.46, 2.95, 3.49, 5.41 g/l に変化させ 30°C, 30 分活性化し, その相違を比較したところ Fig. 5 に示すように活性化時における菌の濃度による差はほとんどなかった。このことから活性化の際は, 実験的に行いやすい 1.64 g/l (OD<sub>580nm</sub> = 1) を使うこととした。

#### ⑥ 活性化時の pH

活性化の際反応液の pH の影響について調べた。結果は Table 2 に示すとおり pH が高い方がやや活性が高いが, 大きな差はみられなかった。従って pH 7 で活性化を行うこととした。

#### (2) Disc 電気泳動による粗酵素の確認・分離と抽出について

ポリアクリルアミドゲルを使って粗酵素液を Disc 電気泳動で分離し, 酵素反応を行い着色した結果脱色された 1 本のバンドを認めた。バンドの幅は約 1mm で境界は sharp であり Rf 値は 0.35 であった。このバンド部分を前後 1mm づつ余裕をもって切り取り 0.033 mol/l KPB で抽出し, 硝酸還元能の測定をしたら 0.021 mol/g Cell · min であり; その時 whole cell の硝酸還元能は 0.050 mol/g Cell · min となり抽出粗酵素の方が低かった。また 1 mol/l の NaCl 溶液で活性化を行なったが有意の差は認められなかった。以上の実験結果から *P. denitrificans* における硝酸還元能を 1 価カチオンで活性化するための条件として菌は濁度 OD=1 (580 nm) に調製し NaCl 1 ~ 2 mol/l 溶液に調整後 (pH 7), 30°C, 30 分間静置して活性化すると最も効率が良いと思われる。また Disc 電気泳動による酵素の単離はバンドの巾が広い事や, 一度

に多量に取れない事もあり, まだその硝酸還元能の比較までには到っていない。さらに今回泳動したのは細胞質

Table 2 Effect of pH on activation of nitrate reduction

pH	Nitrate reduction*	
	1M NaCl	None
6	1.304	0.174
7	1.326	0.181
8	1.661	0.213

\* [NO<sub>2</sub> mmol · min<sup>-1</sup> · (g cells)<sup>-1</sup>]

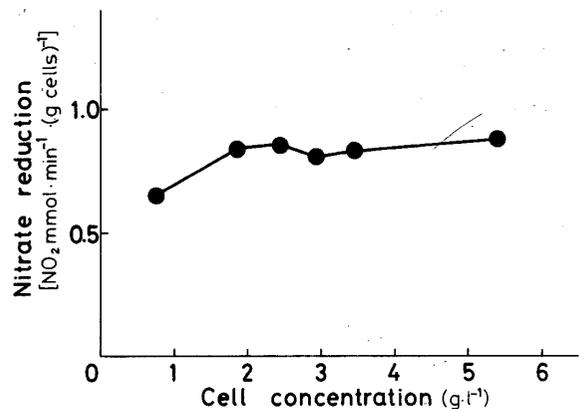


Fig. 5 Effect of cell concentration on nitrate reduction

であり, 従来から注目している細胞膜の抽出液も泳動して比較する必要がある。そのためには, 大型の電気泳動装置を用い泳動条件等を決定し, 酵素を大量に抽出したい。また一部ポリアクリルアミドゲルから抽出した粗酵素液を NaCl で活性化してみたが, ほとんど効果が上らなかった。しかしこのことは細胞質にある硝酸還元酵素が 1 価カチオンにより活性化されないという結論には, すぐにはつながらないと考えられる。従ってこれからは単離した硝酸還元酵素が 1 価カチオンにより活性化される条件についても検討したいと考えている。酵素の単離・精製と共に今後の課題である。

#### 4. 要 約

*P. denitrificans* を異化型条件にして増殖し, その硝酸

還元能を高めるには、1価のカチオンである NaCl を 1 ~ 2 mol/l にした溶液で、菌濃度を 1.64 g/l に調製し、30°C で 30 分間 (pH 7) で活性化するのが最も効率が良いことがわかった。

また粗酵素液も直接活性化を試みたが、はっきりとした結論を得るには到らなかった。

### 謝 辞

本研究にあたり御指導いただきました京都大学工学部上原悌次郎助教授に深く感謝いたします。また実験等で協力して下さった本校柿並孝明技官、卒業生の永富実君、佐川功君に厚くお礼を申し上げます。

### 参 考 文 献

- 1) 山中健生 生化学 Vol 48, No. 5, (1976)
- 2) C. C. Delwiche et al. Ann. Rev. Microbiol. 30, 241 ~ 62 (1976)
- 3) Julian Biotech. and Bioeng. 18, (1976)
- 4) Yushi Nishimura Biochem. Biophys. Res. Comm. 87, 140 (1979)
- 5) 山岡邦雄 宇部工業高等専門学校研究報告 26 (1980)
- 6) 山岡邦雄 宇部工業高等専門学校研究報告 28 (1982)
- 7) 中村正二郎 臨床病理, 特集11: 77~82, (1966)  
(昭和58年9月5日受理)