

# 脱窒菌(*Pseudomonas denitrificans*)の硝酸還元酵素活性 に対するアルキルアンモニウム塩の効果

山岡邦雄\* 加藤美都子\* 三戸留美\*\*

The effect of alkyl ammonium salts on the nitrate reduction  
in *Pseudomonas denitrificans*

K. Yamaoka, M. Kato, R. Mito

## Abstract

The study of denitrification by the cell is worth notice for its genetics and water waste treatment. Stimulation of denitrification ability is useful for these purpose. Monovalent cation enhanced nitrate reductase activity.

In this study, alkylammonium salts were examined extensively and some effective alkyl groups were studied.

## 1. 緒論

硝酸呼吸は生物のエネルギー獲得系として非常に重要であり、その機構の解明はそれ自身意味があるばかりでなく、生物進化の問題や公害対策の面からも大いに興味を持たれるものである。<sup>1)2)3)4)</sup>

我々は脱窒菌である *Pseudomonas denitrificans* を用い、その硝酸還元機構の制御及び活性化等を目的として実験を行っている。その結果一価カチオン処理により *P. denitrificans* の硝酸還元能力が著しく増大することを認めた。<sup>5)</sup>

また一価カチオン処理後の菌体中における一価カチオン分布についても報告した。<sup>6)</sup>

しかしながら従来一価カチオン処理に使用するカチオンとしては NaCl や LiCl などを代表とする金属イオンを中心に検討を加えてきたので、今回は各種のアルキル基を含むアルキルアンモニウム塩についてその硝酸還元能に与える影響を検討した。その結果、ある種のアルキル基の存在が *P. denitrificans* の硝酸還元能の活性化に大きな影響を与えていることが推定された。一方各種アル

コールとカチオンの効果を検討した結果からもアルキル基の効果を推定出来、一価カチオンによる活性化機構の解明に関して新しい可能性が考えられた。

## 2. 試料および実験方法

### (1) 使用菌株

*Pseudomonas denitrificans* ATCC13867

### (2) 培養条件

培養の基本的方法は Nishimura ら<sup>7)</sup>の方法に依った。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>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.6 g を水100 ml に溶かした培地を用いた。前培養および本培養には原則的に KNO<sub>3</sub> 10.0 g, NH<sub>4</sub>Cl 1.0 g, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O 6.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 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 1.0 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.1 mg, MnCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1 mg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 2.0 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.5 mg, Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>·nH<sub>2</sub>O 0.2 mg を水で溶かし、1 ℓ にした培地を用いた (pH 7.0)。

培養条件としては前々培養は30°C, 16時間振とうし前培養および本培養については培養フラスコ中の空気を He gas で置換後30°C, 16時間静置培養し、対数増殖期

\* 宇部工業高等専門学校工業化学科

\*\* 日本科学冶金株式会社

の菌体を得た。菌の増殖度は580 nmでの濁度で測定した。対数増殖期の菌体は集菌後 pH 7.0,  $33 \text{ mol} \cdot \ell^{-1}$  のリン酸緩衝溶液（以下 KPB と略す）で3回洗浄後、同緩衝溶液に懸濁させた。

### (3) 硝酸還元酵素活性測定

硝酸還元酵素活性の測定は  $\text{NO}_3^-$  を還元して生じる  $\text{NO}_2^-$  を発色測定する方法を用いた。方法は山岡ら<sup>8)</sup>に従った。

### (4) 活性化の方法

本培養後、集菌洗浄した菌懸濁液に各種の塩水溶液を加え、 $30^\circ\text{C}$  で1時間静置した。その後集菌・洗浄して菌懸濁液を得た。これを whole cell の処理菌体とした。

### (5) 活性化に用いる試薬

whole cell の活性化の際に用いる各種アルキルアンモニウム塩水溶液の調整は、まずメチル誘導体であるモノ、ジ、トリ、テトラメチルアンモニウム塩、エチル誘導体であるモノ、ジ、トリ、テトラエチルアンモニウム塩について、各々  $0.25, 0.5, 1.0 \text{ mol} \cdot \ell^{-1}$  の濃度で活性化を行った。さらにメチル、エチル、プロピル、ブチルアンモニウム塩を用い、各々  $0.25, 0.5, 1.0 \text{ mol} \cdot \ell^{-1}$  の溶液で活性化を試みた。直鎖状アルコール水溶液処理の場合は、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールの各  $0.1, 0.2, 0.3, 0.5 \text{ mol} \cdot \ell^{-1}$  水溶液を使って活性化を行なわせた。これらすべての場合、例えばメチルアルコール  $0.1 \text{ mol} \cdot \ell^{-1}$  での活性化は、濃度調整

した菌懸濁液  $5 \text{ ml}$  に  $0.2 \text{ mol} \cdot \ell^{-1}$  メチルアルコール  $5 \text{ ml}$  を加えるというやり方で行った。またアルコールと塩化ナトリウムの混合水溶液調整の場合は、 $4 \text{ mol} \cdot \ell^{-1}$  のブタノール  $2.5 \text{ ml}$  と  $4 \text{ mol} \cdot \ell^{-1}$  の塩化ナトリウム  $2.5 \text{ ml}$  の混合溶液中に濁度を約1に調整した菌懸濁液  $5 \text{ ml}$  を入れて活性化を行った。

## 3. 結果と考察

(1) 対数増殖期の菌体を集菌、洗浄後各種塩類水溶液、及びマンニトール、ソルビトール水溶液に懸濁し、 $30^\circ\text{C}$ , 1h 放置した。処理菌体を更に集菌、洗浄後その硝酸還元酵素活性を測定した。Table 1 に示すように、各種一価カチオンが硝酸還元能を促進したが二価カチオンの  $\text{Mg}^{2+}$  は効果を示さなかった。

更に非電解質として Mannitol, Sorbitol を用いたがその効果は一価カチオンのそれに比べると著しく低かった。このカチオン効果の原因に硝酸還元酵素自身が活性化された可能性が考えられたが<sup>9)</sup> 活性化の機構については不明のままであった。

(2) Table 1 に示したカチオンはアンモニウムイオンを除きすべて金属イオンである。そこでアルキル基の効果を検討するためアンモニウム塩のアルキル誘導体について検討した。まず各種メチルアンモニウム塩の効果を調べた。即ち、モノ、ジ、トリ、テトラメチルアンモニ

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

Supplements (0.5 M)	Nitrate reduction [units (mg · cells) <sup>-1</sup> ]	
	Methyl viologen	Formate
None	0.062	0.027
NaCl	0.415	0.180
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.447	0.230
LiCl	0.376	0.202
KCl	0.306	0.170
KNO <sub>3</sub>	0.198	0.122
RbCl	0.224	0.126
CsCl	0.308	0.144
NH <sub>4</sub> Cl	0.260	0.143
MgCl <sub>2</sub>	0.062	0.041
MgSO <sub>4</sub>	0.056	0.014
Mannitol	0.112	0.057
Sorbitol	0.118	0.054

ウム塩の水溶液で菌体をカチオン処理したところ、Fig 1に示すようにジメチルアンモニウム塩は常に高活性を示したが、トリ、テトラ誘導体はバラツキが大きい値を示した。

(3) 次に各種エチルアンモニウム塩について検討した。(2)と同様にモノ、ジ、トリ、テトラエチルアンモニウム塩の水溶液中で菌体をカチオン処理したところ、Fig 2に示すようにモノエチルアンモニウム塩が高活性を示した。一方トリ、テトラ誘導体はバラツキを示した。

(4) Fig 1, Fig 2に示すようにアルキル基の効果は炭素数と関連があると考えられたので次に炭素数の異なる各種モノアルキルアンモニウム塩について検討した。即ち、メチル、エチル、プロピル、ブチルアンモニウム塩水溶液中で菌体を処理後その硝酸還元酵素活性を測定した。Fig 3に示すように炭素数3のプロピルアンモニウム塩が常に高い値を示しブチル誘導体はバラツキの大きい結果となった。

(2), (3), (4)の結果からアルキルアンモニウム塩は炭素数が2か3の基を持つ場合に有効なことがわかった。このことは異化型硝酸還元酵素が菌体の膜に存在すること、及び膜の脂肪成分と考え合わせ、アルキル基の疎水性が膜との親和力を強め、アンモニウムイオンが作用し易い状況を作ったとも考えられる。一方、テトラメチルアンモニウム塩やテトラエチルアンモニウム塩の効果が大きなバラツキを示したことは分子の大きさとの関係も考えられるが今後の検討課題でもある。

(5) 疎水基としてのアルキル基の作用が考えられたので、各種直鎖状アルコールを用いその効果を検討した。

Fig 4に示すように、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールについて効果を調べたところ、ブタノールがかなりの効果を示した。そこでブタノールと塩化ナトリウムを共存させその影響を検討したところFig 5に示す結果となった。ブタノール、塩化ナトリウム各々をそれぞれ単独で使用した場合に比べ両者を共存させるとその効果が著しく高くなることが認められた。

プロパノールをブタノールの代りに用いた実験では効果は認められなかった。(結果略)

アルキルアンモニウム塩の場合のアルキル基の効果と考え合わせると、このブタノールの効果は細胞膜の疎水性基とアルキル基が何らかの相互作用を行い、共存するNa<sup>+</sup>が作用しやすくしたと推定される。一方ブタノールに存在する水酸基はメタノール、エタノールが効果

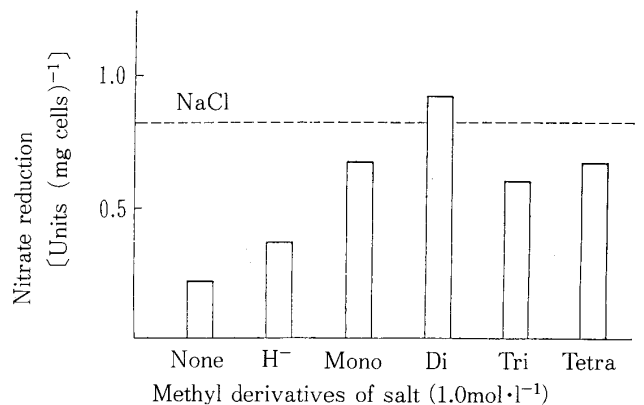


Fig. 1 Effect of methyl ammonium salts

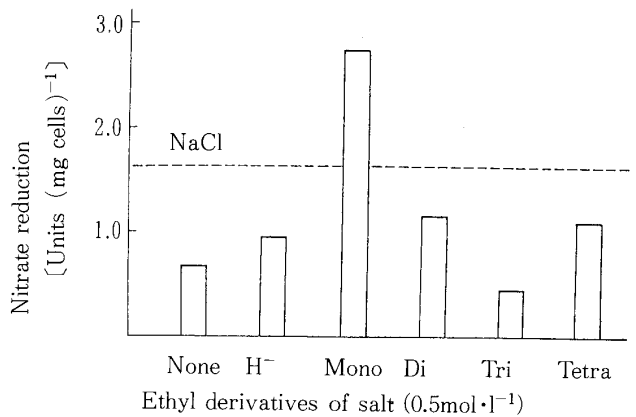


Fig. 2 Effect of ethyl ammonium salts

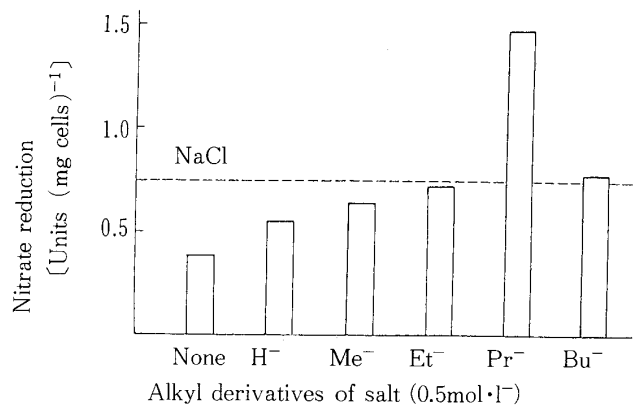


Fig. 3 Effect of monoalkyl ammonium salts

を示さないことから考えて直接関係しないと考えられる。即ち、異化型条件下で生育させた*P. denitrificans*はその異化型硝酸還元酵素は膜に存在しており、アルキルアンモニウム塩の場合炭素数2, 3のアルキル基がその疎水性のため細胞膜と親和力を持ち、硝酸還元活性に一価カチオンが影響を与えると考えられる。一方、ブタノールと塩化ナトリウムを共に用いた場合ブタノールの疎水

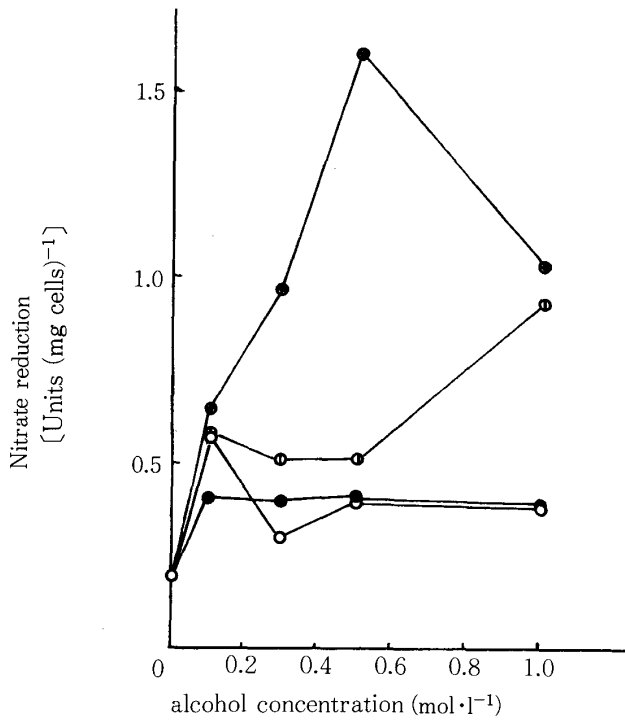


Fig. 4 The effect of some alcohols on nitrate reduction

● : methanol ○ : ethanol  
 ⊖ : propanol ⊙ : butanol

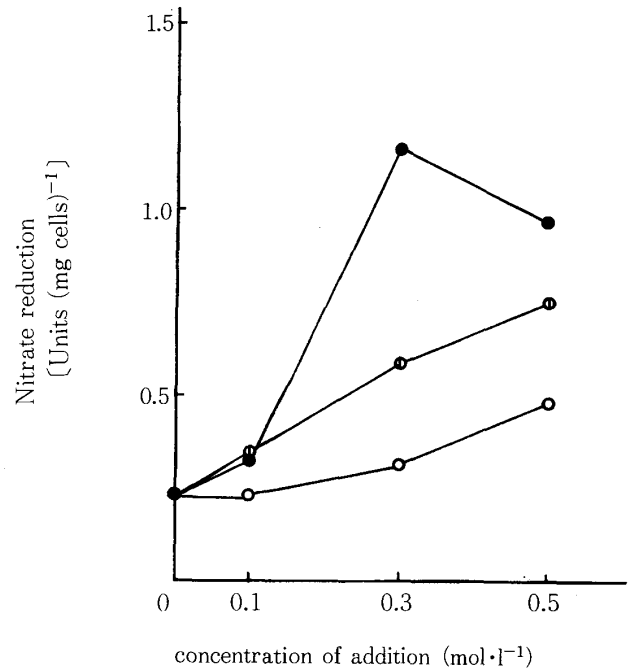


Fig. 5 The effect to butanol on cation treatment

○ : butanol ⊖ : NaCl  
 ● : butanol+NaCl

性基が細胞膜に作用し共存する Na<sup>+</sup> の効果を高めたものと推定した。

4. 謝 辞

本研究にあたり有意義な助言を与え、かつ実験に助力してくれた宇部工業高等専門学校工業化学科卒業生笹尾健臣、中野勲、須藤佳寿美、高木晃諸氏に深謝する。

5. 参 考 文 献

1) 山中健生 生化学 Vol 48, No. 5, (1976)  
 2) C. C. Delwiche and Barbara A Bryan Ann. Rev. Microbiol. 30, 241~62 (1976)  
 3) Nishio T., Koike I., Hattori A. Estimates of denitrification and nitrification in coastal and estuarine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 45 No. 2, 444-450 (1983)

4) Storch T. A., Dunham V. L. Impact of iron discharges from wastewater treatment plants on algal growth and species composition. PB Rep. No. PB-81-120602, 107, (1980)  
 5) 山岡邦雄 宇部工業高等専門学校研究報告 Vol 26 (1980)  
 6) 山岡邦雄, 加藤美都子, 兼安気郎 宇部工業高等専門学校研究報告 Vol 31 (1985)  
 7) Yushi Nishimura et al. Biochem, Biophys, Res. Comm. 87, 140 (1979)  
 8) 山岡邦雄, 加藤美都子 宇部工業高等専門学校研究報告 Vol 30 (1984)

(昭和60年9月17日受理)