

凍結乾燥菌の酵素的性状について

第 1 編 Sal. typhi 57S, R

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

渡 辺 俊 介

〔昭和 34 年 6 月 5 日受稿〕

目 次

| | |
|--------------------------|-------------------------------|
| I. 緒 言 | 影響 |
| II. 実験材料及び実験方法 | 3. 各基質に於ける O ₂ 消費量 |
| III. 実験成績 | 4. グルコースの酸化 |
| 1. 各菌の湿菌及び乾燥菌重量比 | IV. 総括及び考案 |
| 2. カタラーゼ活性に対する 2, 3 阻害剤の | V. 結 言 |

I. 緒 言

生物標品の貯蔵、酵素の活性保持などのため凍結乾燥法が研究、利用されており、それに関する報告は極めて多い¹⁾。

一方、細菌代謝の研究に於ても、菌体を乾燥させて表面構造を変化せしめると、基質或は阻害剤などの透過性が増大し、生菌では見られない現象が認められるようになることは周知の通りであり、例えば或種細菌で、生菌ではクエン酸は分解されないが、乾燥菌では分解されることが知られている²⁾。

細菌の乾燥法には凍結乾燥の他、真空デシケーターによる方法、アセトン乾燥法などがあるが、最も菌に対する障害の少ないものは凍結乾燥法と思われる。

筆者は数種細菌につき凍結乾燥による基質、阻害剤の透過性の変化、酵素系に対する影響を検討し、併せてこれら細菌の酵素的性状、特にグルコース酸化に於ける差異を比較することとした。

さて腸内細菌の S 型、R 型変異に関しては、古く Arkwright³⁾⁴⁾⁵⁾ 以来多くの研究があり、両型菌間の菌体表面物質の相異により平板培地上での集落の形態、生理的食塩水中での凝集性、重金属塩、或は pH の低下による凝集性に差異があり⁶⁾⁷⁾、毒性、抗元性にも差異が見られることが知られている⁸⁾⁻¹¹⁾。又当教室に於ても S. typhi 57S 型及び R 型菌を用いた実験により S 型菌は R 型菌に比しやや嫌気性に傾いていることを推定している¹²⁾。

本編に於ては S. typhi 57S 型及び R 型菌を供試

菌とし、凍結乾燥による影響を検討し、両型菌の差異を追求した。以下その結果を記して御批判を仰ぐ次第である。

II. 実験材料及び実験方法

依試細菌 Sal. typhi 57S 及び R の教室保存標準株 (夫々 S 菌、R 菌と略す)。

菌培養法: 普通寒天培地上の S 型或は R 型のコロニーを継代して純化し、同じく普通寒天平板培地を用い 37°C で 18 時間培養したものを使用した。

凍結乾燥法: 培地より集めた菌体を 2 回遠沈洗滌後、少量の蒸留水を加え、東京応用物理研究所製 RL-1,000 型凍結乾燥機により乾燥せしめた。凍結は -45 ~ -50°C で行つた。

生菌浮游液の調製 培地より集めた菌体を M/50 磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加, pH 7.2) を以て 2 回遠沈洗滌し、同一組成の緩衝液に浮游した。菌量は光電比濁計により比濁し、あらかじめ作成した標準曲線と対比して決定した。

カタラーゼ活性の測定: Warburg 検圧計を用い、H₂O₂ を M/200 となるよう添加して 10 分間に発生する O₂ 量を以て比較した。

O₂ 消費量の測定: Warburg 検圧計を用い常法¹³⁾ に従つた。

基質、阻害剤: 何れも市販品を蒸留水に溶解し、必要により NaOH 又は HCl を以て pH を修正して用いた。

グルコースの定量: 3,5-ジニトロサルチル酸に

よる比色法¹⁴⁾によつた。

焦性ブドウ酸の定量：2,4-ジニトロフェールヒドラジンを用いる比色法¹⁵⁾によつた。

乳酸の定量：p-ヒドロキシヂフェニルを用いる比色法¹⁶⁾によつた。

醋酸の定量：試料溶液を硫酸々性として水蒸気蒸溜し溜出液を M/100 NaOH を以て滴定した。

III. 実験成績

1. 各菌の湿菌及び乾燥菌重量比

細菌の湿重量と乾燥重量の関係は菌の構造、表面物質の性状などのため、菌により多少の差異があるものと考えられる。

そこで供試菌 S 及び R 菌の湿、乾重量を比較した。湿菌量測定は遠沈により 2 回洗滌した菌体の約 1 g 前後のものを燐酸緩衝液 6 ml に浮遊せしめ、これを 10,000 r. p. m 10 分間遠沈し上清をすて、遠沈管を濾紙上にさかさに立て、水分を除いてから秤量した。又乾燥菌は凍結乾燥直後に秤量した。

このような実験を 3 回くり返したところ、S 菌では第 1 表の通りであり、平均湿菌量 0.900 g に相当

第 1 表 湿菌量と乾燥菌量の関係
S

| | | 湿菌重量 | 乾燥菌重量 |
|-----|---|--------|--------|
| 実 験 | 1 | 0.650g | 0.120g |
| " | 2 | 0.920g | 0.190g |
| " | 3 | 1.130g | 0.230g |
| 平 均 | | 0.900g | 0.180g |

する乾燥菌重量は 0.180 g であり、R 菌では第 2 表の如く、平均湿菌量 0.990 g に対する乾燥菌重量は 0.200 g であつて S, R 両菌共に乾燥菌量は湿菌量の約 1/5 となつた。

第 2 表 湿菌量と乾燥菌量の関係
R

| | | 湿菌重量 | 乾燥菌重量 |
|-----|---|--------|--------|
| 実 験 | 1 | 1.320g | 0.260g |
| " | 2 | 0.780g | 0.160g |
| " | 3 | 0.870g | 0.180g |
| 平 均 | | 0.990g | 0.200g |

2. カタラーゼ活性に対する 2, 3 阻害剤の影響 細菌の表面構造は凍結乾燥によつて当然変性乃至

は変形することが考えられ、従つて乾燥菌は生菌に比し基質、阻害剤などの菌体内への透過性に變化が起きるものと予想される。

そこで先づカタラーゼ活性を指標として、KCN, NaN₃, NaF, ヒドロキシルアミン (HXA と略す) の阻害作用を生菌及び乾燥菌につき比較した。

カタラーゼ活性の測定は実験方法の項に記した如く Warburg 検圧計を用い、その主室に菌液及び阻害剤を入れてよく接触せしめ、15 分後に側室より H₂O₂ を混入して O₂ 発生量を測定した。菌量は前述の実験により乾燥重量が湿菌量の約 1/5 であることを知つたので生菌は湿菌量 5 mg/cup, 乾燥菌は 1 mg/cup とし、又 pH による阻害剤の影響の差異をも見るため pH 7.2 の場合、5.5 の場合につき同様の実験を行つた。

S 菌については第 3 表に示す如くであり、阻害剤無添加の対照では pH 7.2 で生菌 169 μ l, 乾燥菌 119 μ l であり、pH 5.5 では生菌 152 μ l, 乾燥菌 102 μ l であつて何れも乾燥菌の方がややカタラーゼ活性が低い。而して KCN は阻害作用が比較的小であり 10⁻²M でも一般に 50% 前後の阻害が見られるに過ぎず生菌と乾燥菌間に阻害度の差異は余り見られなかつた。

NaN₃ の阻害作用は一般に著しく、pH 7.2 では 10⁻⁴M で、pH 5.5 では 10⁻⁵M で殆んど完全に両菌のカタラーゼ作用を阻害し、それよりも稀い濃度

第 3 表 カタラーゼ活性に対する阻害剤の影響
S

| 阻害剤 | O ₂ 発生量 μ l | pH 7.2 | | pH 5.5 | |
|-------------------------------------|----------------------------|--------|-----|--------|-----|
| | | 生 菌 | 乾燥菌 | 生 菌 | 乾燥菌 |
| 無 し | | 169 | 119 | 152 | 102 |
| KCN 10 ⁻² M | | 67 | 41 | 59 | 46 |
| " 10 ⁻³ M | | 124 | 98 | 99 | 87 |
| " 10 ⁻⁴ M | | 172 | 109 | 141 | 109 |
| NaN ₃ 10 ⁻⁴ M | | 13 | 12 | 2 | 4 |
| " 10 ⁻⁵ M | | 103 | 44 | 13 | 17 |
| " 10 ⁻⁶ M | | 171 | 91 | 142 | 71 |
| NaF 10 ⁻² M | | 141 | 101 | 83 | 33 |
| " 10 ⁻³ M | | 173 | 116 | 152 | 91 |
| HXA 10 ⁻³ M | | 92 | 5 | 106 | 21 |
| " 10 ⁻⁴ M | | 128 | 12 | 142 | 69 |
| " 10 ⁻⁵ M | | 174 | 124 | 161 | 102 |

第4表 カタラーゼ活性に対する阻害剤の影響
R

| 阻害剤 | O ₂ 発生量 μ l | pH 7.2 | | pH 5.5 | |
|-------------------------------------|----------------------------|--------|-----|--------|-----|
| | | 生 菌 | 乾燥菌 | 生 菌 | 乾燥菌 |
| 無 し | | 243 | 184 | 232 | 173 |
| KCN 10 ⁻² M | | 68 | 59 | 87 | 41 |
| “ 10 ⁻³ M | | 129 | 117 | 171 | 83 |
| “ 10 ⁻⁴ M | | 196 | 212 | 206 | 169 |
| NaN ₃ 10 ⁻⁴ M | | 58 | 25 | 7 | 9 |
| “ 10 ⁻⁵ M | | 148 | 105 | 18 | 17 |
| “ 10 ⁻⁶ M | | 201 | 226 | 149 | 72 |
| NaF 10 ⁻² M | | 232 | 246 | 29 | 31 |
| “ 10 ⁻³ M | | 221 | 237 | 220 | 177 |
| HXA 10 ⁻³ M | | 23 | 9 | 54 | 9 |
| “ 10 ⁻⁴ M | | 97 | 17 | 107 | 31 |
| “ 10 ⁻⁵ M | | 209 | 42 | 219 | 52 |

pH 7.2 では 10⁻⁵M, pH 5.5 では 10⁻⁶M では生菌、乾燥菌間の阻害度の差が明らかに現われ、両菌共に乾燥菌に対する阻害の方が強かつた。NaF は pH 7.2 では 10⁻²M に於ても殆んど影響を与えないが pH 5.5 では 50% 前後の阻害を示し、乾燥菌に対する影響の方がやや大であつた。

HXA は NaN₃ とは逆に pH 7.2 に於ける方が阻害が強く現われ、特に乾燥菌に対する影響の方が遙かに大であつて、10⁻⁴M で生菌では殆んど影響が見られないが、乾燥菌では著明な抑制が認められた。

R 菌については第 4 表に示した如くであり、S 菌に比し阻害剤無添加の対照の O₂ 発生は大であり pH 7.2 で生菌 243 μ l, 乾燥菌 184 μ l, pH 5.5 で生菌 232 μ l, 乾燥菌 173 μ l であり、R 菌は S 菌よりカタラーゼ活性が大であると言える。然し阻害剤の影響に於ては、S 菌（前表）との相異は全く見られなかつた。S 菌に於けると同様、KCN の影響は比較的少く生菌、乾燥菌間の差異は殆んど見られず、NaN₃ の阻害作用は極めて大であり、且つ pH 5.5 の方が一般に阻害は強く現われ、又生菌よりも乾燥菌の方が影響され易かつた。NaF も pH 5.5 の方が影響が大であり、乾燥菌は生菌よりも阻害度が大であつた。HXA の影響は pH 7.2 の方が大であり、乾燥菌は生菌に比し著しく阻害が大であつた。

3. 各基質に於ける O₂ 消費量

以上の如くカタラーゼ活性に対する 2, 3 阻害剤

の影響が生菌、乾燥菌間に差異があり、凍結乾燥により阻害剤の菌体内への透過性が変化すると推定される。そこで次に各基質に於ける O₂ 消費量が生菌、乾燥菌でどう異なるかを見て、酵素活性の変化及び基質の菌体内への透過性の変化を推定する手がかりとした。

この実験を行うに先立ち生菌及び乾燥菌の O₂ 消費量と菌量の関係をグルコース、コハク酸を基質とした場合及び基質無添加の場合につき検討した。基質は終濃度 M/100 とし、生菌は湿菌量 15 mg/cup, 乾燥菌はそれに相当する乾燥菌量 3 mg/cup の場合、30 mg/cup の場合について行つた。pH 7.2, 測定時間は 1 時間とした。結果は第 5 表に示す如くであり、S 菌では生菌 15 mg/cup の基質無添加の O₂ 消費は 39 μ l, グルコース、コハク酸添加では夫々 312 μ l, 129 μ l であり、この菌量に相当する乾燥菌量 3 mg/cup の O₂ 消費は夫々 14, 52, 36 μ l で生菌に比し著しく低く、R 菌でも同様で生菌では夫々 43, 332, 196 μ l であるのに対し乾燥菌 3 mg/cup では夫々 13, 24, 39 μ l であつた。乾燥菌をこの 10 倍量用いると S 菌では夫々 119, 412, 286 μ l, R 菌では夫々 121, 216, 324 μ l となり生菌の O₂ 消費と大体同程度の活性を示した。

第5表 生菌、乾燥菌の菌量と O₂ 消費量の関係

| | S | | | R | | |
|-------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | 生菌 15mg /cup | 乾燥菌 3mg /cup | 乾燥菌 30mg /cup | 生菌 15mg /cup | 乾燥菌 3mg /cup | 乾燥菌 30mg /cup |
| 基質なし | 39 | 14 | 119 | 43 | 13 | 121 |
| グルコース | 312 | 52 | 412 | 332 | 24 | 216 |
| コハク酸 | 129 | 36 | 286 | 196 | 39 | 324 |

そこで菌量を生菌湿菌量 15 mg/cup, 乾燥菌 30 mg/cup とし、基質をグルコース、グルコン酸、リボース、乳酸、焦性ブドウ酸、醋酸、クエン酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、マロン酸の 12 種として pH 7.2 及び 5.5 に於ける O₂ 消費量（1 時間値）を測定したところ次の結果となつた。

S 菌では第 6 表の如く、pH 7.2, 5.5 共に乾燥菌は基質無添加の対照（endogenous）が著しく大であり、乳酸、焦性ブドウ酸、醋酸を基質とした O₂ 消費が一般に低下しているのが認められ、特に焦性ブドウ酸の場合に著しかつた。又グルコン酸、クエン酸、酒石酸、マロン酸など生菌で O₂ 消費の認められないものでは乾燥菌に於てもやはり O₂ 消費は見

第6表 各基質に於ける O₂ 消費

S

| | pH 7.2 | | pH 5.5 | |
|--------|--------|-----|--------|-----|
| | 生 菌 | 乾燥菌 | 生 菌 | 乾燥菌 |
| な し | 37 | 127 | 31 | 109 |
| グルコース | 296 | 418 | 289 | 361 |
| グルコン酸 | 37 | 129 | 42 | 122 |
| リボース | 39 | 141 | 38 | 118 |
| 乳酸 | 117 | 187 | 129 | 134 |
| 焦性ブドウ酸 | 98 | 172 | 60 | 141 |
| 醋酸 | 82 | 146 | 51 | 147 |
| クエン酸 | 37 | 117 | 31 | 109 |
| コハク酸 | 131 | 202 | 99 | 189 |
| フマル酸 | 69 | 163 | 54 | 137 |
| リンゴ酸 | 55 | 160 | 55 | 134 |
| 酒石酸 | 37 | 127 | 44 | 108 |
| マロン酸 | 38 | 122 | 47 | 109 |

られなかつた。

R菌では第7表に示す如く、pH 7.2, 5.5共に乾燥菌の対照 (endogenous) の O₂ 消費が著しく大であることはS菌の場合と同様である。

而してS菌の場合と異つてグルコースを基質とした O₂ 消費が乾燥菌で著しく低下していることであり、又生菌では O₂ 消費の認められないグルコン酸、クエン酸を基質とした場合、乾燥菌では O₂ 消費が対照より大となることであつた。然し酒石酸、マロン酸では乾燥菌に於てもやはり O₂ 消費は認められ

第7表 各基質に於ける O₂ 消費

S

| | pH 7.2 | | pH 5.5 | |
|--------|--------|-----|--------|-----|
| | 生 菌 | 乾燥菌 | 生 菌 | 乾燥菌 |
| な し | 38 | 132 | 31 | 117 |
| グルコース | 349 | 207 | 298 | 193 |
| グルコン酸 | 41 | 166 | 37 | 149 |
| リギース | 47 | 161 | 71 | 153 |
| 乳酸 | 406 | 293 | 410 | 286 |
| 焦性ブドウ酸 | 339 | 176 | 354 | 177 |
| 醋酸 | 87 | 191 | 82 | 169 |
| クエン酸 | 37 | 169 | 20 | 156 |
| コハク酸 | 246 | 229 | 221 | 195 |
| フマル酸 | 187 | 201 | 92 | 198 |
| リンゴ酸 | 165 | 207 | 85 | 178 |
| 酒石酸 | 29 | 126 | 19 | 117 |
| マロン酸 | 28 | 129 | 17 | 115 |

第8表 O₂ 消費に対する前処理 (基質を加えないで振盪) の影響

| 基 質 | 前処理 | S | | R | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 生菌 | 乾燥菌 | 生菌 | 乾燥菌 |
| 基質なし | なし | 41 | 126 | 39 | 136 |
| | 30分 | 12 | 41 | 13 | 44 |
| グルコース | なし | 287 | 409 | 337 | 216 |
| | 30分 | 237 | 291 | 262 | 132 |
| コハク酸 | なし | 136 | 197 | 231 | 267 |
| | 30分 | 107 | 92 | 154 | 146 |

なかつた。

乳酸、焦性ブドウ酸、醋酸を基質とした O₂ 消費は生菌に比し乾燥菌では著しく低下し、特に焦性ブドウ酸に於て著しい点はS菌と同様であつた。

なお生菌の O₂ 消費を基質別に見ると、R菌ではS菌に比し焦性ブドウ酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸などで O₂ 消費がかなり大である傾向が認められた。

次にマロン酸のコハク酸々化阻害の有無を生菌、乾燥菌につき比較した。

以下の実験を行うに当り、前述の如く乾燥菌では対照 (endogenous) の O₂ 消費が著しく大であり、基質添加の影響が不明瞭であるので、これを低下させるため、基質を添加しないで30分間 37°C で振盪し、遠沈後菌体を再び緩衝液に浮遊せしめたものを用いることとした。生菌でも同様の操作を行うこととした。

先づこの前処理 (30分間の振盪) の影響を基質無添加の対照及びグルコース、コハク酸を基質とした場合の O₂ 消費について見ると第8表の如くであり、S, R菌共に30分間振盪により endogenous は著明に低下し、グルコース、コハク酸を基質とした O₂ 消費も低下するが、基質添加の影響が明瞭となつた。以後の実験はこのような前処理 (30分振盪) を行つた菌体を用いて行うこととした。

さてマロン酸はコハク酸脱水素酵素を拮抗的に阻害することが知られているが、生菌でマロン酸による阻害が現われず、これはマロン酸の菌体内への透過が困難なためであるとされている。乾燥菌に於てはどうかをみると第9表の如くであつた。

この実験ではマロン酸は終濃度 M/30, M/100, M/300 とし Warburg 検圧計の容器の主室に菌液と共に入れ15分後に側室よりコハク酸 (終濃度

第9表 コハク酸々化のロマン酸による阻害
S

| | pH 7.2 | | pH 5.5 | |
|----------------|--------|-----|--------|-----|
| | 生菌 | 乾燥菌 | 生菌 | 乾燥菌 |
| コハク酸 | 113 | 96 | 107 | 92 |
| 〃 + マロン酸 M/30 | 110 | 37 | 102 | 29 |
| 〃 + マロン酸 M/100 | 117 | 94 | 109 | 54 |
| 〃 + マロン酸 M/300 | 116 | 90 | 108 | 86 |

R

| | pH 7.2 | | pH 5.5 | |
|----------------|--------|-----|--------|-----|
| | 生菌 | 乾燥菌 | 生菌 | 乾燥菌 |
| コハク酸 | 162 | 143 | 154 | 121 |
| 〃 + マロン酸 M/30 | 169 | 58 | 156 | 47 |
| 〃 + マロン酸 M/100 | 167 | 91 | 155 | 81 |
| 〃 + マロン酸 M/300 | 172 | 127 | 156 | 116 |

M/100) を混入して O₂ 消費量 (1 時間値) を測定した。菌量は生菌 15 mg/cup, 乾燥菌 30 mg/cup とした。

S, R 菌共に pH 7.2, 5.5 に於て生菌では何れの濃度でもマロン酸はコハク酸を基質とした O₂ 消費を阻害しないが, 乾燥菌では M/30 で 60% 程度, M/100 では 40% 程度の阻害を示し, M/300 では阻害は僅かであった。然し S 菌, R 菌間には有意の差異は認められなかつた。

4. グルコースの酸化

以上主として阻害剤, 或は基質の菌体内への透過性を生菌, 乾燥菌につき比較して来たが, 次に凍結乾燥により菌の酵素系, 特にグルコースの酸化様式が如何に変化するかを検討した。即ち菌に阻害剤として KCN, NaN₃, モノヨード醋酸 (MIA と略), 2,4-ジニトロフェノール (DNP と略), 亜砒酸 (arsen と略) を加えた場合及び阻害剤無添加の場合についてグルコースの酸化に於ける量的関係を見た。

菌量は生菌では湿菌量 15 mg/cup, 乾燥菌では乾燥菌量 30 mg/cup とし, 阻害剤は Warburg 検圧計の主室に菌液と共に入れ, 15 分後に側室よりグルコース (終濃度 M/100) を混入し, 2 時間振盪して O₂ 消費量を測定, 更に遠沈上清中のグルコース消費量, 分解産物としての焦性ブドー酸, 乳酸, 醋酸蓄積量を定量した。

pH 7.2 とし, 阻害剤は種々の濃度で実験して最

適濃度を決定し, KCN 10⁻³M, NaN₃ 10⁻²M, MIA 10⁻⁴M, DNP 10⁻³M, Arsen 10⁻³M に於ける成績を表示した。

結果は S 菌では第 10 表に見られる如くであり, 生

第 10 表 グルコース酸化とこれに対する阻害剤の影響
S

| 菌・基質・阻害剤 | 定量値 μM/ml | O ₂ 消費 | グルコース消費 | 焦性ブドー酸蓄積 | 乳酸蓄積 | 醋酸蓄積 |
|----------|--------------------|-------------------|---------|----------|------|------|
| | | | | | | |
| 生菌 | グルコース | 21.4 | 15.2 | 1.8 | 1.7 | 1.3 |
| 〃 | + KCN | 8.2 | 7.1 | 2.9 | 7.3 | 1.8 |
| 〃 | + NaN ₃ | 26.1 | 15.6 | 10.2 | 0 | 5.6 |
| 〃 | + MIA | 5.1 | 3.2 | 0 | 0.3 | 1.5 |
| 〃 | + DNP | 19.5 | 15.4 | 18.1 | 6.2 | 1.6 |
| 〃 | + arsen | 14.6 | 14.2 | 18.0 | 5.1 | 1.5 |
| 乾燥菌 | グルコース | 19.5 | 16.9 | 15.2 | 1.8 | 3.2 |
| 〃 | + KCN | 8.0 | 7.5 | 5.1 | 4.8 | 1.9 |
| 〃 | + NaN ₃ | 13.6 | 10.1 | 12.4 | 0 | 5.3 |
| 〃 | + MIA | 5.9 | 3.4 | 0.2 | 0.2 | 1.5 |
| 〃 | + DNP | 17.8 | 16.8 | 18.4 | 7.1 | 3.4 |
| 〃 | + arsen | 19.7 | 17.2 | 19.7 | 6.0 | 3.3 |

菌では阻害剤無添加 (対照) では O₂ 消費 21.4 μM, グルコース消費 15.2 μM, 焦性ブドー酸, 乳酸, 醋酸蓄積は夫々 1.8, 1.7, 1.3 μM であり, 乾燥菌では O₂ 消費, グルコース消費は夫々 19.5, 16.9 μM で生菌に比し O₂ 消費に対するグルコース消費の割合が大であり, 又焦性ブドー酸, 乳酸, 醋酸蓄積は夫々 15.2, 1.8, 3.2 μM となり生菌に比し焦性ブドー酸蓄積が著しく大であつた。

KCN 添加では生菌に於ては O₂ 消費 8.2 μM, グルコース消費 7.1 μM で何れも KCN によりかなり阻害されているがグルコース消費に対する阻害度は O₂ 消費に対する阻害度に比しやや小であつた。又各分解産物蓄積は大となり, 特に乳酸蓄積の増大は顕著であつた。乾燥菌に於ても大体同様の傾向が見られるが, 乾燥菌ではもともと対照の分解産物蓄積が大であるので, KCN 添加による分解産物蓄積の増大は生菌に於けるほど著明ではなかつた。

NaN₃ 添加では乾燥菌は生菌に比し O₂ 消費, グルコース消費に対する NaN₃ の阻害度は大であり, 又生菌, 乾燥菌共に醋酸蓄積の増大が見られた。

MIA 添加では, 生菌, 乾燥菌共に O₂ 消費, グルコース消費, 分解産物蓄積は強く抑制され, 両菌

間の差異は見られなかった。

DNP 添加では、O₂ 消費、グルコース消費に対する阻害は小であるが、焦性ブドー酸、乳酸蓄積は増大し、生、乾両菌共に C₃ 化合物である焦性ブドー酸、乳酸蓄積量の合計はグルコース 1M に対し 2M 近くになった。

arsen 添加では、O₂ 消費は生菌で 14.6 μM、乾燥菌で 19.7 μM となり、乾燥菌に比し生菌に於ける阻害度はかなり大であり、又両菌共 O₂ 消費に対するグルコース消費量の割合は増大し、且つ焦性ブドー酸蓄積は著明に増大し、焦性ブドー酸、乳酸蓄積の合計はグルコース 1M に対し 2M 近くに及んだ。

R 菌については第11表に示す如くであり、阻害剤

第11表 グルコース酸化とこれに対する阻害剤の影響 R

| 菌・基質・阻害剤 | | 定量値 μM/ml | O ₂ 消費 | グルコース消費 | 蓄性酸蓄積 | 乳酸蓄積 | 醋酸蓄積 |
|----------|----------------------|-----------|-------------------|---------|-------|------|------|
| | | R | | | | | |
| 生菌 | グルコース | | 23.9 | 11.1 | 0.7 | 0.2 | 0.9 |
| | " + KCN | | 11.2 | 8.0 | 3.1 | 3.8 | 1.2 |
| | " + NaN ₃ | | 22.8 | 10.2 | 5.9 | 0 | 3.9 |
| | " + MIA | | 5.8 | 3.6 | 0 | 0 | 1.3 |
| | " + DNP | | 24.2 | 12.4 | 11.4 | 2.0 | 1.7 |
| | " + arsen | | 15.4 | 12.1 | 11.9 | 1.9 | 1.4 |
| 乾燥菌 | グルコース | | 12.0 | 7.4 | 5.1 | 0.2 | 1.8 |
| | " + KCN | | 5.1 | 4.0 | 6.9 | 0.9 | 1.4 |
| | " + NaN ₃ | | 8.9 | 5.1 | 7.6 | 0 | 2.1 |
| | " + MIA | | 4.1 | 3.2 | 0 | 0 | 0.8 |
| | " + DNP | | 12.4 | 7.6 | 11.9 | 1.8 | 0.9 |
| | " + arsen | | 12.8 | 7.3 | 12.5 | 1.5 | 0.8 |

無添加の対照では、生菌に於て O₂ 消費 23.9 μM、グルコース消費 11.1 μM となり S 菌の場合に比し O₂ 消費に対するグルコース消費はかなり小であり、焦性ブドー酸、乳酸、醋酸蓄積は夫々 0.7, 0.2, 0.9 μM で S 菌に比し何れも少かつた。又乾燥菌では O₂ 消費は 12.0 μM で生菌に比しかなり低下しており、グルコース消費は 7.4 μM で O₂ 消費に対するグルコース消費の割合は生菌に於けるよりはかなり大となり、S 菌の乾燥菌に於ける所見に接近していた。又焦性ブドー酸、乳酸、醋酸蓄積は夫々 5.1, 0.2, 1.8 μM であり、乳酸蓄積は S 菌の場合に比し小であつた。

KCN 添加では生菌、乾燥菌共に O₂ 消費、グルコース消費共にかなり抑制され、焦性ブドー酸、乳

酸、醋酸蓄積は増大するが、これらの増大は S 菌に於けるより一般に小であり、特に乳酸蓄積増大は S 菌の場合よりかなり少いようであつた。

NaN₃ 添加では S 菌に於けると同様乾燥菌では生菌に比し O₂ 消費、グルコース消費に対する阻害度は大であり焦性ブドー酸、醋酸蓄積は増大し、乳酸蓄積は減少した。

MIA 添加では S 菌と同様両菌共 O₂ 消費、グルコース消費は著しく阻害され、又各分解産物蓄積も減少した。

DNP 添加では両菌共に O₂ 消費、グルコース消費に対する影響は比較的少いが、焦性ブドー酸、乳酸蓄積は増大した。然し乳酸蓄積の増大は S 菌に於けるよりは少いようであつた。

C₃ 化合物である焦性ブドー酸、乳酸蓄積の合計は生菌ではグルコース 1M 当り 1M を僅かに上廻る程度であるのに対し乾燥菌では 2M 近くになった。

arsen 添加では、O₂ 消費に対する阻害は生菌の方が乾燥菌に於けるよりはるかに大であり、焦性ブドー酸、乳酸蓄積の合計は、DNP 添加に於けると同様、生菌ではグルコース 1M に対し 1M 程度、乾燥菌では 2M 近くになって生菌と乾燥菌ではこの量的関係が幾分異なるようであつた。

IV. 総括及び考案

チフス菌の S 型、R 型の間には表面構造、並びに酵素的性状に若干の差異があることが知られているが、凍結乾燥の操作による影響が如何に異なるかを検討した。

先づカタラーゼ活性を例にとり、これに対する数種阻害剤の影響が凍結乾燥により如何に変化するかを見ることにより、これら阻害剤の菌体表面透過性の変化を類推すると、KCN では S、R 型菌共に生菌、乾燥菌間に阻害度の差は見られないが、NaN₃、NaF、HXA では何れも乾燥菌の方が阻害効果が大きく、凍結乾燥により菌の表面構造が変化し、これらの菌体内への浸入が容易になることがうかがわれる。

次に基質別 O₂ 消費を比較すると、乾燥菌では S、R 型菌共に一般に生菌に比し O₂ 消費は低下しており、例えばグルコース、コハク酸を基質とした O₂ 消費は生菌の 1/10 程度となり、特に焦性ブドー酸、醋酸を基質とした O₂ 消費の低下が著しい。これは焦性ブドー酸々化には多くの補助因子を必要とするため凍結乾燥による障害が特に著しいためと考えら

れる。

而してS型, R型菌を比較すると, グルコースを基質としたO₂消費の乾燥による低下はR型菌の方が著しく, S, R型菌間のグルコース酸化に於ける酵素的差異がうかがわれる。

又R型菌ではグルコン酸, クエン酸を基質としたO₂消費は生菌では見られないに拘わらず, 乾燥菌では明らかに認められ, これら基質の菌体表面透過が乾燥により容易になると考えられ, 更にこのことから生菌では見られなかつたS, R型菌間の差異が見出された。同様にマロン酸の透過性も乾燥によつて増大し, S, R型菌共にコハク酸々化のマロン酸による阻害は生菌では見られないが, 乾燥菌では認められるようになる。

次にグルコース酸化について見ると, 両菌共に乾燥菌では生菌に比しグルコース酸化に於ける分解産物, 特に焦性ブドウ酸の蓄積が著しく大であり, グルコース酸化経路中焦酸ブドウ酸々化の段階が最も障害され易いものと見做される。而してS型菌では生菌, 乾燥菌共に KCN 添加によつて乳酸蓄積が増大し, arsen 添加では焦性ブドウ酸蓄積が大となり, 共にグルコース消費 1M につき C₃ 化合物である焦性ブドウ酸, 乳酸蓄積の合計は 2M 近くなる。

これに対しR型菌では, 生菌に於ては KCN 或は arsen 添加で焦性ブドウ酸, 乳酸蓄積の合計はグルコース消費 1M につき 1M を僅かに上廻るにすぎないが, 乾燥菌では 2M 近くなつてS型菌に於ける所見に接近する。

従つてS型菌では生菌, 乾燥菌共にグルコース酸化は主として Embden-Meyerhof 経路によると見做され, 一方R型菌では前述の如くグルコン酸, クエン酸々化の酵素活性がS型菌より大であることな

どを考え合せて, 生菌では Embden-Meyerhof 経路以外のものの存在が推定され, 且つ焦性ブドウ酸以下の完全酸化もS型菌よりやや発達していると考えられる。

而してこれは凍結乾燥により不活化されS型菌の所見に接近するのではないかと想像される。

V. 結 言

Sal. typhi 57 S型, R型菌を供試菌とし, 凍結乾燥による, 基質, 阻害剤の透過性の変化, 酵素系に対する影響を検討し, 併せて両菌の酵素的差異を追求めて次の結果を得た。

1. 両菌共凍結乾燥により NaN₃, NaF, HXA の菌体表面透過性は増大する。
2. 両供試菌の生菌はグルコン酸, クエン酸を酸化し得ないが, R型菌の乾燥菌体は僅かながら酸化しうる。
3. 両菌共乾燥菌では焦性ブドウ酸々化能が著しく低下している。
4. グルコース酸化に於ける量的関係から, R型菌の生菌体は Embden-Meyerhof 経路以外に他の経路, 恐らく Warburg-Dickens 経路も存在し, 乾燥菌体は両供試菌共主として Embden-Meyerhof 経路によるものと推定される。

The Enzymatic Properties of Freezing-dried Cells

Part I *Sal. typhi* 57 S and R

By

Syunsuke WATANABE

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Sakae MURAKAMI)

Using the standard strains of *Sal. typhi* 57 S and R taken from the departmental stock, the author investigated the effects of freezing-drying treatment of bacteria on the specificity of their substrates, the permeability of inhibitors, and the properties of enzyme system, and also observed the differences in enzymatic properties of two strains. The following results were obtained.

- 1) It was observed the increased permeability of the surface of cells treated by freezing-drying method to inhibitors; NaN_3 , NaF and HXA.
 - 2) Both strains of bacteria tested could not oxydize gluconate and citrate in fresh state, whil the freezing-dried cells of *Sal. typhi* 57 R could that in some extent.
 - 3) There was marked decrease of the oxydation capacity for pyruvate by the freezing-dried cells of both strains.
 - 4) From the viewpoint of stoichiometrical studies, it could posturate the presence of different pathway for the degradation of glucose besides Embden-Myerhof's pathway, presumably Warburg-Dicken's shunt, in the fresh cells of *Sal. typhi* 57 R. But in the freezing-dried cells of both strains the degradation might be carried out through Embden-Myerhof's pathway.
-