

[J. Ferment. Technol., Vol. 54, No. 1, p. 1~10, 1976]

耐塩性 *Bacillus* 属細菌の分離とその性質\*

大亦正次郎・坂井 拓夫・笠井八重子・田島 滋

大阪府立大学農学部農芸化学科

Isolation and Characterization of a Halotolerant Strain  
of *Bacillus* Species

Shojiro Omata, Takuo Sakai, Yaeko Kasai and Shigeru Tajima

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture  
University of Osaka Prefecture, Sakai Osaka 591

A bacterium which was able to grow in high concentration of sugar was isolated from contaminated *nirin* and identified as a *Bacillus subtilis* like strain.

The strain showed halotolerance as well as osmotolerance, and was able to grow in medium containing 15% NaCl or 60% glucose. The growth in high concentration of NaCl (higher than 8%) was enhanced by some amino acids or vitamins, such as, glutamate, proline, aspartate, methionine, choline or inositol.

## 結 言

微生物は一般に高浸透圧下では生育が阻害されるが、醤油、みそなどの醸造食品の製造、食品の塩蔵および糖蔵に関連して重要な働きをする高浸透圧下でも生育し得る耐浸透圧性微生物の存在が知られている。しかし、その耐性（耐塩性、耐糖性）機構は必ずしも同一のものとは考え難く、まだ不明の点が多い。

耐塩性菌については主として醤油、味噌醸造に関与する細菌<sup>1-7)</sup>、酵母<sup>8,9)</sup>について研究がなされており、いわゆる耐塩因子<sup>3,5,10-12)</sup>について多くの報告があるが、耐塩性の定義、取扱いが極めてあいまいで、耐塩性と耐浸透圧性の関連性についても不明である。

本研究室では、混濁味淋より高い耐浸透圧性をもつ *Bacillus* 属細菌を得たが、この菌株が耐塩性をも示すことを見出した。本報では、耐塩性機構の究明の一端としてその菌株の生育に及ぼす因子について検討した。

\* 細菌の耐塩性に関する研究 (第1報)  
Studies on Halotolerance of Bacteria (I)

## 実 験 方 法

**分離用培地及び分離法** 菌株の分離源材料として、混濁した味淋を用いた。混濁味淋を無菌的に遠心し、混濁菌を集め、殺菌した2% NaCl にけん濁し、Table 1 に示す YMPG-培地で 30°C, 24時間平板培養を行なった。生育したコロニーより釣菌した後、これを再度正常な味淋に移植し、味淋中で生育した菌株について同培地で平板培養を行ない、コロニーより釣菌して2%含塩ブイオン培地で保存した。

**耐浸透圧性の検討法** ペプトン1%, 肉エキス1%からなる基礎培地 (pH 7.0) に 0.2~3M の濃度範囲で、NaCl, KCl 及び糖を添加し、試験管 (内径 2.2 cm) に 10 ml ずつ分注殺菌後、0.5% NaCl を含む基礎培地で 30°C, 24時間振盪培養したものを種菌として 0.1 ml ずつ接種し、菌の生育を平沼光電光度計 EPO-B 型を用い 660 nm における濁度を測定し生育度とした。なお、菌の生育に及ぼす種々の物質の影響についての生育試験は、Table 1 に示した種々の培地を用いた。

**菌学的性質の検討法** 菌の同定は Bergey's Man-

Table 1. Composition of basal media.

A: YMP-medium		D: GP-medium		F: Isolation medium	
Yeast ext.	0.5%	Glucose	2.0%	Peptone	1.0%
Meat ext.	1.0	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.3	Meat ext.	0.5
Peptone	1.0	KCl	0.2	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
(pH 6.6-6.8)		MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	Glucose	3.0
B: YMPG-medium		MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.005	CaCO <sub>3</sub>	1.2
Yeast ext.	0.5%	(pH 6.6-6.8)		NaCl	2.0
Meat ext.	1.0	E: FGP-medium		Agar	1.2
Peptone	1.0	Na-fumarate	0.7%	(pH 7.0)	
Glucose	0.9	Glucose	2.0		
(pH 6.6-6.8)		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.3		
C: P-medium		KCl	0.2		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.3%	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05		
KCl	0.2	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.005		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	(pH 6.6-6.8)			
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.005				
(pH 6.6-6.8)					

ual of Determinative Bacteriology 7th edition<sup>13)</sup> に従った。

#### 実験結果及び考察

**混濁味淋からの菌の分離** 混濁味淋から分離した21株のうち、典型的な11株についてそのコロニーの形状及び若干の性質を検討した。結果を Table 2 に示した。これらの菌はいずれも比較的高濃度の糖を含む培地でも生育が可能であるが、同一の浸透圧の場合、NaCl, KCl はシロ糖に比較してより強い生育阻害を示した (Table 3)。これら11株の中で、M-9 菌は最も高い耐浸透圧性を示した。この菌株は生育に対し、KCl やグルコースの至適濃度をもつが、NaCl では無添加の場合が最も生育が良好である。しかし、2.2 M とかなり高濃度の食塩存在下にも生育しうる、いわゆる耐塩性、耐浸透圧性の菌であった。

**M-9 菌の菌学的性質** M-9 菌は、C-培地寒天平板上ではスムーズで無色透明の円型コロニーを形成し、時間の経過とともに半透明から淡褐色不透明でヒダのあるコロニーを形成する。また、ポリグルタミン酸を生成し、コロニーは粘性を示す。寒天平板内部では扁平なレンズ状になりその周囲は、粘質物の生成により培地は不透明となる。液体培地での静置培養では表面に生育して皮膜を形成し、培養基の混濁は起こさず、好氣的な細菌であることを示した。普通生育温度は

37~40°C で、振盪条件下では非常によく生育し、培養12~15時間で生育は最高に達する。細胞は短桿状で0.6~0.8×2.5~3.0 μm (C-培地で30°C, 24時間振盪培養した場合) である (Fig. 1)。運動性は25°C で培養した場合のみ認められ、30°C 以上では認められない。内生孢子は ellipsoidal, central localized であるが、形成し難く、C-培地寒天培地上で、37°C, 96時間以上培養した場合のみ認められた。グラム陽性で、ゼラチンを液化し、デンプンおよびクエン酸を資化し、硝酸塩還元力を持ち soybean slant 上で生育可能である。アセトインを形成するが、インドール、スカトールの形成はない。また、7%食塩存在下でもよく生育する。これらの結果から *Bacillus subtilis* 類縁菌と認められるが、確認を後報にゆずり本報では *Bacillus* sp. M-9 株とした。

本菌は合成培地によく生育するが、Mn<sup>2+</sup> により生育は促進される。Table 4 に示すように、種々の炭素源を資化し、炭素源によってはポリグルタミン酸を生成する。

**M-9 菌の生育に及ぼす高浸透圧環境を作る種々の物質の影響** M-9 菌は糖濃度の高い味淋を分離源としているが、この特性を明らかにするため高浸透圧環境を作る種々の物質の生育に及ぼす影響をしらべた。

a. NaCl の影響: Fig. 2 に示す様に NaCl は濃度の増加につれて生育を阻害し、誘導期を延長する効果

Table 2. Some characteristics and features of colonies of bacteria isolated from infected *mirin*.

Strain	Shape	Motility	Spore	Catalase	Acid formation	Colonial morphology
M-4	rod	—	—	+	—	circular, entire, raised, gray
M-5	rod	+	+	+	lactate	circular, entire, convex, gray
M-8	rod	—	—	+	—	circular, entire, pulvinate, yellowish brown
M-9	rod	+	+	+	—	circular, entire, convex or pulvinate, transparent
M-10	rod	—	—	+	—	circular, entire, convex, yellowish white, resinous
M-13	sphere	—	—	+	lactate	circular, entire, capitate, nacreous, white
M-15	rod	—	—	+	—	circular, undulate, raised, dull, gray
M-17	sphere	—	—	+	lactate	circular, entire, pulvinate, sebaceous, white
M-18	rod	—	—	+	lactate	circular, entire, convex, brown, dull
M-20	sphere	—	—	+	lactate	circular, undulate, capitate, white, ceraceous
M-21	rod	—	—	+	—	circular, entire, pulvinate, transparent, vitreous

Cultivation was carried out using C-medium agar plate at 30°C for 72 hr.

Table 3. Osmotolerance of bacteria isolated from infected *mirin*.

Strain	M-4	M-5	M-8	M-9	M-10	M-13	M-15	M-17	M-18	M-20	M-21	
<i>Osmotolerance</i>												
NaCl	Optimal	0.35M (17)	0.35	0	0	0.5 (24)	0.35	0	0	0.35	0	0.35
	Sub-lethal	1.7 (85)	1.4 (70)	2.2 (109)	2.6 (129)	2.6	1.7	1.7	2.2	1.7	3.1 (154)	2.2
KCl	Optimal	0.3 (15)	0	0.3	0.3	0.4 (20)	0	0	0	0	0	0
	Sub-lethal	1.3 (65)	0.7 (35)	2.7 (134)	2.7	2.4 (119)	1.3 (65)	1.3	3.1 (154)	1.7 (85)	3.3 (164)	2.0 (99)
Glucose	Optimal	0.6 (15)	0.7 (17)	1.0 (25)	1.1 (27)	0.4 (10)	0.4	1.0	0.6	0.3 (7)	0.4	0.1-1.1 (2-27)
	Sub-lethal	2.8 (70)	3.2 (80)	2.8	3.3 (82)	2.9 (72)	2.2 (65)	3.2	3.0 (75)	2.5 (62)	3.3	3.2

Cultivation was carried out at 30°C for 72 hr with shaking in medium containing 1% peptone, 1% meat ext. and indicated concentrations of NaCl, KCl, or glucose. Figures in parentheses show the osmotic pressure in atm of the medium

を示した。この NaCl による生育阻害は、天然の有機窒素源を含む YMP-培地より合成培地である GP-培地の方がより顕著に認められた。

b. KCl の影響: Fig. 3 に示す様に、KCl は NaCl とほぼ同様な生育阻害を示し、この場合でも YMP-培地中では GP-培地より生育阻害は低いことが認められた。

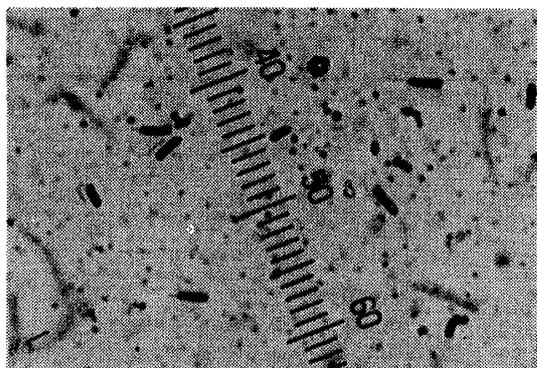


Fig. 1. Micrograph of strain M-9.

c. グルコースの影響：NaCl と KCl の場合と同様に YMP、P-培地を基礎培地とし、これにグルコースを添加し、その濃度と生育の関係を調べ、Fig. 4 に示す結果を得た。YMP-培地を基礎培地とした場合には、30°C、37°C では 3M のグルコース存在下で生育可能であるが、25°C ではもはや 3M のグルコース中では生育し得ない。この場合にも、NaCl、KCl の存在下と同様に温度依存性が認められた。P-培地を基礎培地とした場合、グルコースによる生育阻害は著しく、2M のグルコース存在下では 30°C でのみ生育可能であった。また、シ・糖はグルコースより低い濃度で生育を阻害し、2M 濃度 (68.5%) で本菌は生育し得なかった (Fig. 5)。

d. グリセロールおよびポリエチレングライコール

(PEG 400) の影響について：グリセロールは比較的生育阻害が低く、本菌は 3.3M 濃度でもよく生育したが、4M 濃度では生育が著しく阻害された。一方、ポリエチレングライコールは著しく生育阻害を示し、0.5M 濃度ですでに生育を阻害した (Fig. 6)。

以上の様に、同一浸透圧でもそれを作る培地によって生育阻害作用は異なり、NaCl や KCl の方が、グルコースやシ・糖より低い浸透圧で強い毒性を示した。また、非電解質でもポリエチレングライコールはこの生育阻害作用が強かった。大西<sup>14)</sup> は酵母の生育が同一浸透圧下でも、それを作る培地の種類により異なり、塩より糖の方が毒性が少ないことを示し、その理由として酵母の生育が浸透圧のみでなく、培地自体の毒作用あるいはイオンとしての固有の作用が関与しているであろうと指摘している。また、高浸透圧糖培地に生育する一つの理由として、糖が急速に資化され、培地中の濃度低下にともなう浸透圧の低下が起こることにあると説明している。しかし、本菌では次に示す osmotic shock 耐性が誘導期に適応的に獲得されると考えられ、その時期には糖の消費は少なく、浸透圧の低下は無視できると考えられる。また、非電解質であるポリエチレングライコール (PEG 400) が非常に低い濃度で本菌の生育を阻害することから、本菌の生育には浸透圧とともに培地固有の性質が影響を及ぼすことが推測される。

Table 4. Utilization of various sugars and organic acids as a sole carbon source by strain M-9.

C-source	Growth (OD at 660 nm)	Final pH	Polyglutamic acid production	C-source	Growth (OD at 660 nm)	Final pH	Polyglutamic acid production
Sorbose	—	—	—	Starch	0.62	5.7	++
Xylose	0.71	5.0	—	Glycerol	0.89	5.0	+
Rhamnose	0.31	6.4	—	Fumarate	0.78	9.0	—
Arabinose	0.32	6.4	—	Citrate	0.45	8.3	—
Mannitol	0.45	6.4	—	Pyruvate	0.70	8.4	—
Sorbitol	0.45	6.4	—	Acetate	—	—	—
Mannose	0.99	4.0	—	Succinate	0.65	8.8	—
Galactose	0.43	6.1	—	Malonate	—	—	—
Fructose	0.83	4.2	+	Malate	0.54	8.0	—
Glucose	1.00	4.8	++	Malcate	—	—	—
Maltose	0.89	4.9	++	$\alpha$ -Ketoglutarate	0.46	7.3	—
Sucrose	1.20	4.2	++	Glutamate	0.73	8.4	+
Lactose	0.53	6.0	—				

Cultivation was carried out at 30°C for 72 hr (with shaking) in medium containing 1.3%  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0.2%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and 0.005%  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  besides the above carbon sources (1%).

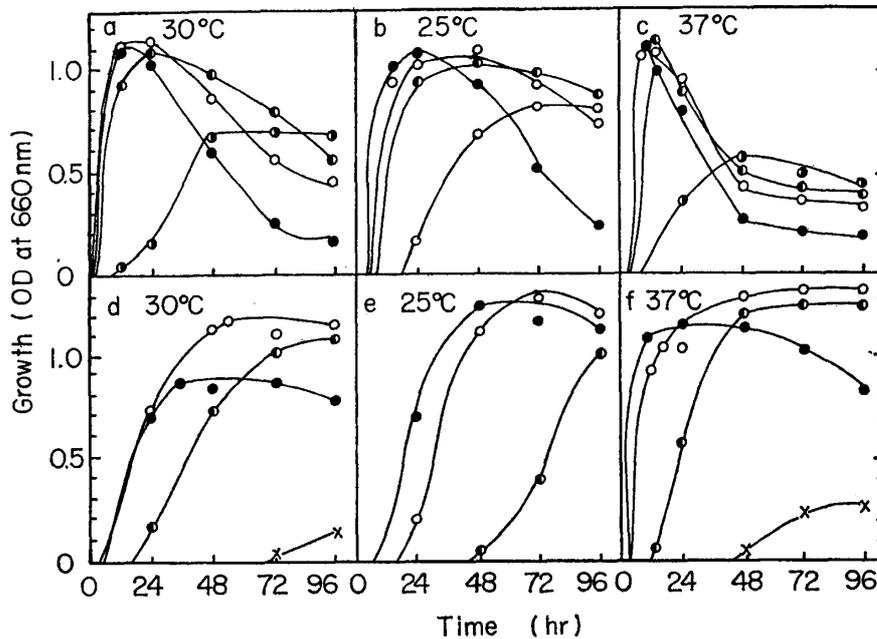


Fig. 2. Effect of NaCl concentration on growth of strain M-9 at various temperatures. The culture medium contained indicated amount of NaCl in YMP-medium (a-c) and GP-medium (d-f), and cultivation was carried out at indicated temperature with shaking.

●; 0 M, ○; 0.5 M, ◐; 1.0 M, ×; 1.5 M, ◑; 2.0 M.

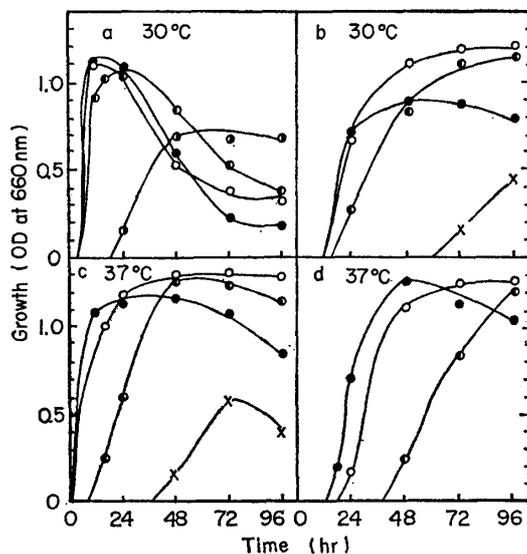


Fig. 3. Effect of concentration of KCl on growth of strain M-9 at various temperature.

The culture medium contained indicated amount of KCl in YMP-medium (a and c) and GP-medium (b and d), and cultivation was carried out at indicated temperature with shaking.

●; 0 M, ○; 0.5 M, ◐; 1.0 M, ×; 1.5 M, ◑; 2.0 M.

Osmotic shock による生菌数の変化について, 本菌を食塩濃度 0 と 12% (約 2.5 M) の二種類の培地で,

Scheme 1 に従って逐次移植し, 夫々の区分について希釈法により生菌数の変化を調べた. その結果 Table 5 に示す様に本菌の osmotic shock 耐性は食塩無添加の培地に植え継ぐことにより, 徐々に低下することがみられた. すなわち, 高張液から低張液へ移植した際の生菌数の減少はわずかであるが, 逆に, 低張液から高張液に移植した際, 生菌数の減少は大きく, その減少度は低張液で植え継いだほど大きいことが認められた. また, Fig. 7 は Scheme 1 に示した各区分の 10% の食塩存在下における生育曲線を示したが, このグラフから, 食塩環境下に植えつぐことにより生育の誘導期の時間が短縮されることが認められ, 本菌の NaCl に対する耐性が生育の誘導期に適応的に獲得されることが推測された.

e. 耐塩性の因子について: Fig. 2 に示した様に, GP-培地での食塩による生育阻害は, YMP-培地でのそれに比べ著しい. これは培地中の栄養源に影響されているものと考えられたので, 耐塩性に関与する物質を検索した.

(i) クエン酸とフマル酸の効果: 種々の有機源の効果を検討したが, クエン酸とフマル酸が特に効果的であった (Fig. 8). すなわち, 両者は本菌の食塩環境下での生育を促進し, 10%食塩存在下でグルコースの

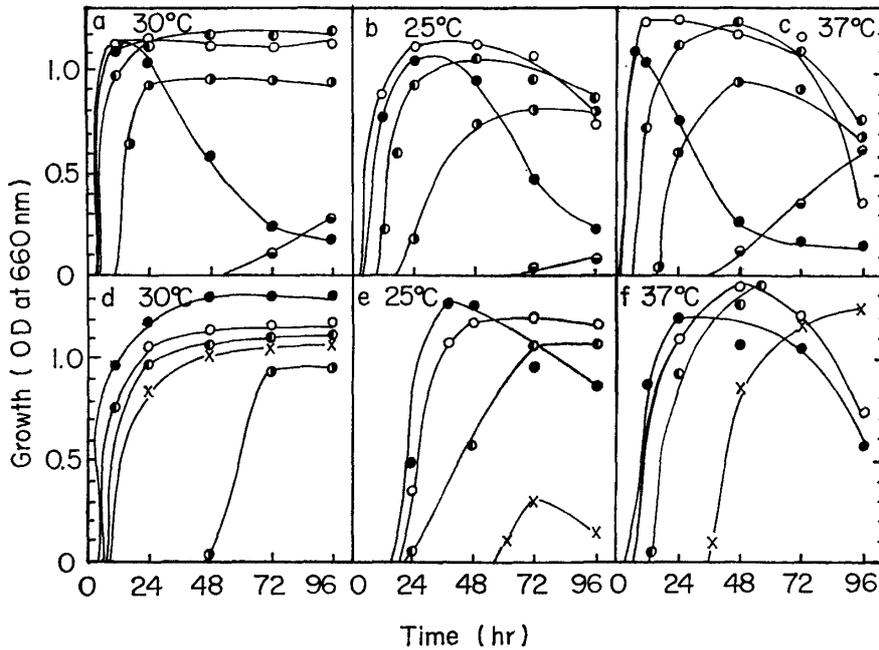


Fig. 4. Effect of glucose concentration on growth of strain M-9 at various temperatures. The culture medium contained indicated amount of glucose in YMP-medium (a-c) and GP-medium (d-f), and cultivation was carried out at indicated temperature with shaking.  
●; 0M, ○; 0.5M, ◐; 1.0M, ×; 1.5M, ◑; 2.0M, ◒; 3.0M.

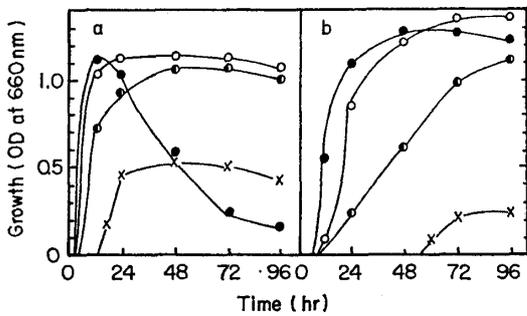


Fig. 5. Effect of sucrose concentration on growth of strain M-9 at 30°C. The culture medium contained indicated amount of sucrose in YMP-medium (a) and P-medium (b), and cultivation was carried out at 30°C.  
●; 0M, ○; 0.5M, ◐; 1.0M, ×; 1.5M.

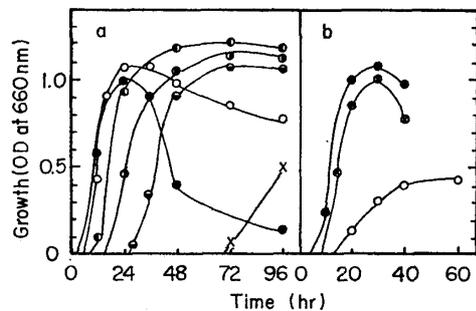
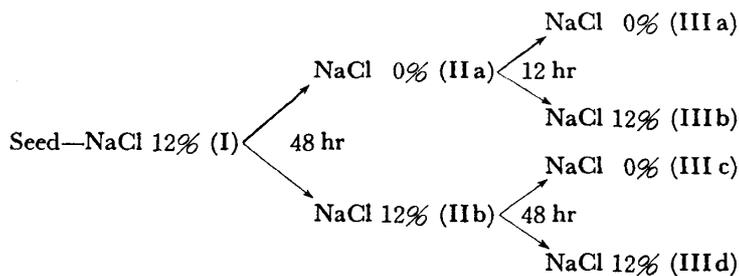


Fig. 6. Effect of glycerol and polyethyleneglycol (PEG #400) concentration on growth of strain M-9. The culture medium contained indicated amount of glycerol in P-medium (a) or PEG #400 in FGP-medium (b). Cultivation was carried out at 30°C on shaking.  
●; 0M, ⊗; 0.2M, ○; 0.5M, ◐; 1.0M, ◑; 2M, ◒; 3.3M, ◓; 4.0M, ×.



Scheme 1

Table 5. Acquisition of salt tolerance of strain M-9 depending upon cultural environment.

Fraction No.	Cell number/ml						
	I	IIa	IIb	IIIa	IIIb	IIIc	IIId
NaCl conc. in plating medium							
a) 0%	$2.5 \times 10^7$	$3.0 \times 10^8$	$4.6 \times 10^7$	$2.3 \times 10^9$	$2.8 \times 10^7$	$4.5 \times 10^8$	$2.9 \times 10^7$
b) 10%	$8.7 \times 10^7$	$6.5 \times 10^6$	$1.5 \times 10^8$	$1.3 \times 10^5$	$9.3 \times 10^7$	$5.3 \times 10^4$	$1.8 \times 10^8$
12%	0	0	0	0	0	0	0

Each fraction was cultivated on YMPG-medium agar plate supplemented with 0, 10 or 12% NaCl and cultivation was carried out at 30°C for 18 hr (a) and 36 hr (b).

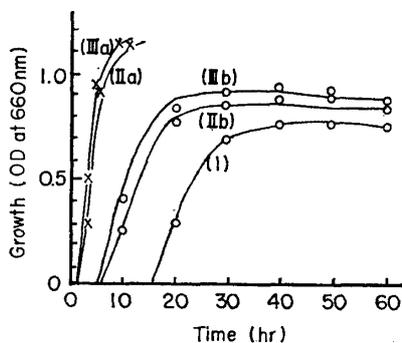


Fig. 7. Growth curves for strain M-9 in each fraction in Scheme 1.

みを炭素源とした場合には、ほとんど生育し得ないが、これにフマル酸あるいはクエン酸を添加すると生育が認められた。特にフマル酸が有効であった。

(ii) 酵母エキスの影響：GP-培地に炭素源としてフマル酸を加えた培地での本菌の生育が、酵母エキス

の添加によって著しく促進されることを見出した。そこで、酵母エキス中の有効成分の検索を試みた。すなわち、酵母エキスの主成分をアミノ酸群、ビタミン群、核酸塩基群の3グループに分け、夫々の添加効果を調べた。この場合、アミノ酸混合物としては、カザミノ酸 (vitamin-free) 0.5%, ビタミン、核酸塩基は夫々酵母エキス1%中の含量に相当する様に調製した。

Fig. 9 に示した様に、ビタミン混液、アミノ酸混液により高濃度食塩存在下での生育が促進されたい。

(iii) アミノ酸の効果：高濃度食塩存在下での本菌の生育が、アミノ酸混合物の添加によって促進されることが明らかとなったが、酵母エキス中のアミノ酸をグルタミン酸族、アスパラギン酸族、ピルビン酸族、芳香族アミノ酸族、含硫アミノ酸族に大別し、それらの添加効果を検討した結果、グルタミン酸族およびアスパラギン酸族のアミノ酸のうち、グルタミン酸、プロリン、アスパラギン酸、メチオニンが有効であるこ

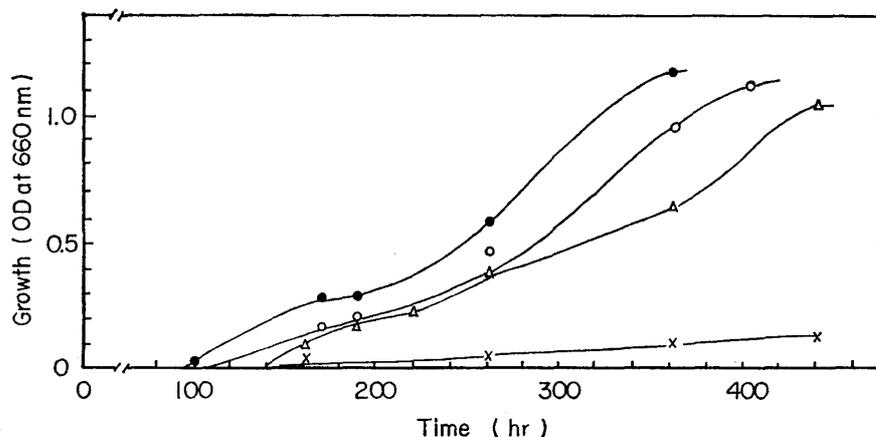


Fig. 8. Effect of citrate and fumarate on growth of strain M-9 in saline environment. The culture medium contained 10% NaCl and indicated amount of citrate or fumarate in GP-medium. Cultivation was carried out at 30°C with shaking. ●; 50mM Fumarate addition, ○; 33.4mM Citrate addition, △; 50mM Fumarate and 33.4mM Citrate addition, ×; No addition.

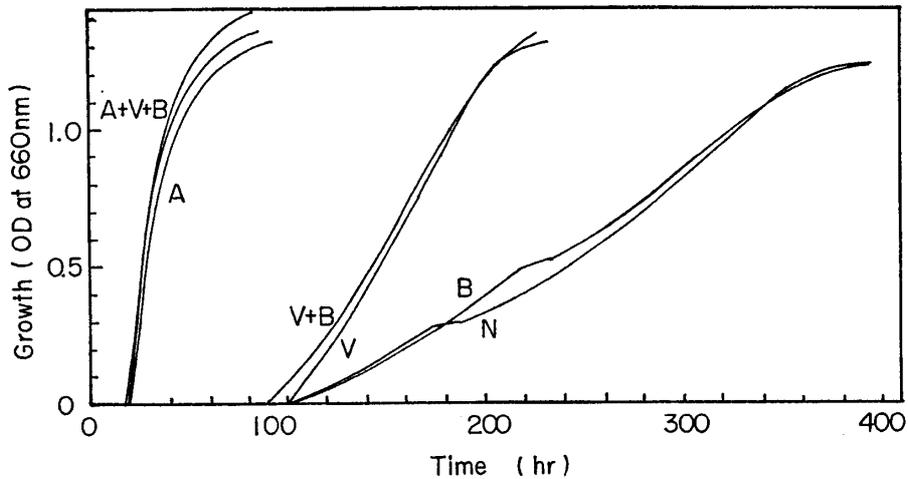


Fig. 9. Effect of yeast extract and their component on growth of strain M-9 in saline environment.

The culture medium contained indicated substances and 10% NaCl in FGP-medium. Cultivation was carried out at 30°C with shaking.

Addition; Y: Yeast ext., A: Amino acids mix., V: Vitamin mix., B: Base mix., N: None.

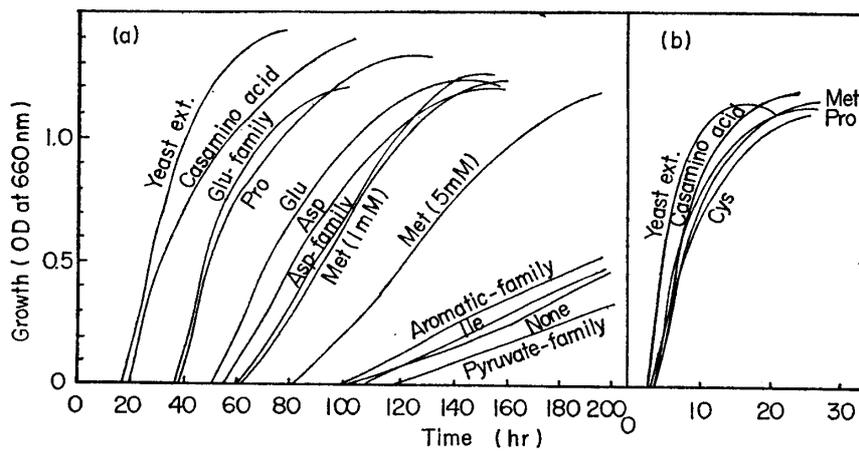


Fig. 10. Effect of amino acids on growth of strain M-9.

Besides indicated substances the culture medium contained 10% NaCl (a) or 0% NaCl (b) in FGP-medium, and cultivation was carried out at 30°C with shaking.

とが明らかとなった (Fig. 10).

(iv) ビタミン類の効果: ビタミン類の効果を検討したところ, Table 6 に示す様に, 本菌の高濃度食塩存在下での生育が, コリンにより著しく促進され, イノシトール, ニコチン酸にも生育促進効果が認められた. さらに, コリン類似の物質であるベタイン, エタノールアミン, 効果について検討したが, Fig. 11 に示す様にベタインにコリンと同様の効果が認められたが, エタノールアミンは効果を示さなかった. コリン, ベタインは食塩の無添加の場合には, 生育促進作用はなく, 高濃度の添加によって, むしろ生育を阻害した.

(v) 含硫アミノ酸の効果: メチオニンが本菌の高濃度食塩存在下での生育を促進することを認めたが, 他の含硫アミノ酸, 例えばシステイン, シスチンは食塩無添加の場合には影響を及ぼさないが, 高濃度食塩存在下では比較的低濃度の添加で生育を阻害した. この生育阻害は, コリンあるいはプロリンにより回復された. メチオニンはアスパラギン酸よりホモセリンを経て生成される. また, この経路を経ないでアスパラギン酸より生成されるリジン, スレオニン, イソロイシンが耐塩因子とならないことから, アスパラギン酸やホモセリンの耐塩因子としての効果は, メチオニンとなって作用するとも考えられる. プロリンが耐塩性に

Table 6. Effect of vitamins on growth of strain M-9.

Vitamin added	Concent. ( $\mu\text{M}$ )	Growth (OD at 660 nm)					
		NaCl 10%				NaCl 0%	
		48 hr <sup>a)</sup>		72 hr <sup>a)</sup>		12 hr	24 hr
		S.A. <sup>b)</sup>	S.O. <sup>b)</sup>	S.A. <sup>b)</sup>	S.O. <sup>b)</sup>	S.A. <sup>b)</sup>	S.A. <sup>b)</sup>
Vit. B <sub>1</sub>	0.79	0	0.156	0	0.667	0.050	0.690
Vit. B <sub>2</sub>	0.84	0	0.288	0	0.886	0.057	0.760
Vit. B <sub>6</sub>	2.2	0	0.307	0	0.886	0.059	0.808
Ca-pantothenate	1.08	0	0.214	0	0.806	0.070	0.910
	5.4	0			0.360(120hr)		
Biotin	0.05	0	0.241	0	0.796	0.039	0.741
Nicotinic acid	0.43	0	0.027	0	0.337	0.134	1.025
Inositol	200	0	0	0.210(120hr)	0.198	0.038	0.692
	1000	0		0.280			
	5000	0		0.290(120hr)			
Choline	10	0		0.020			
	100	0.060		0.493			
	500	0.401		0.920		0.029	0.340
Vit. B <sub>12</sub>	0.005	0		0.321(120hr)		0.040	0.802
Betaine	500	0.100		0.530		0.040	0.520
None		0	0.320	0	0.870	0.075	0.908

The culture medium contained indicated vitamins in FGP-medium with indicated amount of NaCl, and cultivation was carried out at 30°C for indicated period with shaking.

a) culture period (hr); b) S.A.: single addition; S.O.: single omission.

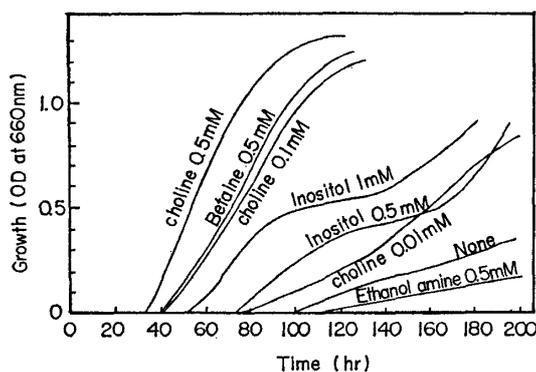


Fig. 11. Effect of choline, betaine and inositol on growth of strain M-9 in saline environment.

The culture medium contained 10% NaCl and indicated substances in FGP-medium.

関与している事実については、すでに杉森らが耐塩性乳酸菌 *Tetracoccus* No. 100 の高濃度食塩存在下での生育が、L-プロリンによって促進されることを認め<sup>4)</sup>、これは主要酵素の塩阻害がプロリンによって回復されること、あるいは、菌の生理学上重要な乳酸脱水酵素

の活性を増大させることなどがあると報告している。<sup>15,16)</sup> 本菌ではこの様な現象は認められなかったが、本研究室で分離された耐塩性乳酸菌 *Tetracoccus soyae* においても高濃度食塩下での生育が、セリンと少量のプロリンの添加によって助長され、<sup>17)</sup> この時、少量のプロリンの添加でセリンの取込みが増大することを認めた。<sup>18)</sup>

コリンの耐塩性因子としての報告は多く、佐藤ら<sup>19)</sup> は、*Saccharomyces rouxii* の耐塩性がコリン、イノシールで増大すると報告している。また、上野<sup>3)</sup> は、*Tetracoccus soyae* の高濃度食塩存在下での生育が、コリン、ベタインによって促進されると報告している。しかし、その作用機作は全く不明である。コリンは脂質の構成々分として、また、メチル基供与体として重要な物質であり、メチル化反応を通じてメチオニンと密接な関係をもっていると考えられている。従って、コリンあるいはベタインの効果は、メチオニンの前駆体としての効果とも理解できる。しかし、本菌の高濃度食塩存在下での生育が、システイン (あるいはシスチン) によって阻害され、この阻害はコリンあるいはプ

ロリンによってのみ回復され、ペタイン、メチオニンでは回復されないことから考察すると、コリン自体の作用とも考えられる。この点については、今後検討すべき問題である。

### 要 約

混濁味淋より、高い耐浸透圧性をもち、しかも耐塩性を示す一菌株 *Bacillus* sp. を分離し、その性質を検討し、次の結果を得た。

- 1) 分離菌は、15% NaCl 環境下及び60%グルコース環境下で生育可能な耐塩性及び耐浸透圧性を有することが特徴的であった。
- 2) 本菌の生育に及ぼす NaCl, KCl, グルコース, ポリエチレングライコール, ショ糖及びグリセロールの影響を調べた結果、同一浸透圧でもそれを作る培地によって生育阻害は異なり、NaCl や KCl の方がグルコースやショ糖より強い毒性を示すことが明らかとなった。
- 3) 本菌の NaCl に対する耐性は、適応的に獲得され、その獲得は誘導期で行なわれることが認められた。
- 4) NaCl による生育阻害が培地中の栄養源に影響されることがわかったので、耐塩性に関する物質を検索したところ、フマル酸、酵母エキス中のアミノ酸群（グルタミン酸、プロリン、アスパラギン酸、メチオニン）とビタミン類（コリン、イノシトール、ニコチン酸）が有効な物質として認められた。

本報の要旨の一部は農芸化学会48年度大会で報告した。

### 文 献

- 1) 上野, 大亦: 醸工, **39**, 360 (1961).
- 2) 上野, 川合, 大亦: 醸工, **39**, 383 (1961).
- 3) 上野, 大阪府大紀要 (1964).
- 4) 杉森, 上瀬: 醸工, **48**, 218 (1970).
- 5) 坂口: 農化, **28**, 758 (1954).
- 6) 飯塚, 山里: 農化, **33**, 379 (1959).
- 7) 好井, 中野: 醸工, **34**, 348 (1956).
- 8) Onishi, H.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **21**, 143 (1957).
- 9) 大西: 野田醤油研究報告, 第2号 (1961).
- 10) 佐藤, 山田, 植村: 農化, **30**, 492 (1956).
- 11) 植村: 調味科学, **5**, 96 (1957).
- 12) 好井: 醸協, **60**, 353 (1965).
- 13) Smith, N.R., Gordon, R.E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, (Breed, R.S., Murray, E.G.D., Smith, N.R.), 7th ed., p. 614. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A. (1957).
- 14) Onishi, H.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **21**, 137 (1957).
- 15) 上瀬, 杉森: 醸工, **49**, 302 (1971).
- 16) 上瀬, 杉森: 醸工, **49**, 861 (1971).
- 17) 大亦, 笠井, 坂井, 川崎: 醸工, **52**, 619 (1974).
- 18) 笠井, 坂井, 大亦: 醸工, (投稿中).
- 19) Sato, M. & Uemura, T.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **33**, 13 (1959).

(昭50.11. 8受付)