

# Corn Seed より Corn Seed Hemicellulose 分解菌株の分離

大宮満男\*・高橋紀子\*・小川サチヨ\*\*

(昭和45年10月30日受理)

## Isolation Techniques of Corn Seed Hemicellulose- Decomposing Bacteria from Corn Seed

Mitsuo OOMIYA, Noriko TAKAHASHI and Sachiyo OGAWA

(Recived 30 Oct 1970)

### Abstract

It is not adequate to use the organic substances for nitrogen sources on the seeds strains multiplating cultivation in the isolatin techniques of the corn seed hemicellulose-decomposing bacteria from corn seed.

The following components was employed as a basal medium throughout this work:  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $NaNO_3$  added hemicellulose, ca. 0.5%.

### 緒 言

最近 hemicellulose に関しては *Asp. niger*<sup>(1~5)</sup>, *Rhizopus niveus*<sup>(6)</sup> *Streptomyces Xylophagus*<sup>(7)</sup> などについて活発な研究が行われ幾多の成果が得られている。著者らは Corn seed より調製した hemicellulose (以下 Hemi. と略す)を用い同一起源の Corn seed に付着する細菌より hemicellulase を有する細菌を分離する実験を行なってきた。野生の菌を人工の培地のにのせるため種々の困難があったが、今回、定常的に分離する方法を見出した。よって分離プロセスの内、集菌(菌の Select. 培養)における培養液の組成の検討を中心にして菌株分離の様相を報告する。

### 実 験 の 部

#### 実験方法

##### 1. 分解菌分離のプロセス

\* 長崎大学教育学部家政科教室

\*\* 長崎女子短大

第1表 分解菌分離プロセス

	集 菌		純 粋 分 離	
培 養 プロセス	無 菌 水 集 積 培 養	液 体 培 養 に よる菌の Select	平 面 培 養	液 体 培 養

## 2. 材料 Corn seed

阿蘇産(昭和41年度)早玉種, 50Kgより適宜使用した。

## 3. 集菌方法

## a. 無菌水集積培養

70%アルコールで表面のかびを除き荒砕きした Corn seed 2 gを0.1M P. Buffer PH 8.0の無菌水10ml, 37°C, 2日間, 試験管中で培養, Incubationの初期よく振ってやる。培養液の状態として全体がにごり, 表面にうす膜ができ, PH6.0位にさがっている菌を2白金耳とって使用した。

## b. Select. 培養

## 1) 培養液の組成

第2表 基本培地(I)組成

No.	①	②	③	④	⑤	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.025 <sup>g</sup>	〃	〃	〃	〃	
MgSO <sub>4</sub>	0.01	〃	〃	〃	〃	
NaNO <sub>3</sub>	0.1	〃	〃	〃	〃	
有 機 N	ペプトン	0	(0.1%) 50mg	(0.2) 100	(0.5) 250	(1.0) 500
	肉エキス	0	50	100	250	500
	酵母エキス	0	50	100	250	500
	カザミノ酸	0	50	100	250	500
Buffer PH6.2 P. (0.1M)	50 <sup>ml</sup>	50	50	50	50	

第3表 基本培地(II)組成

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.025 g
MgSO <sub>4</sub>	0.01
NaNO <sub>3</sub>	0.1
Buffer PH 6.2 P. (0.1M)	50ml

Corn seedより実験室にて分離した Hemi. (キシロース, アラビノース, 約90~95%, 残りはグルコース, ガラクトース, ガラクトウロン酸<sup>(8)</sup>)を基本培地(I)の場合0.1, 0.2%添加。(II)の場合0.1, 0.2, 0.5, 1.0%添加した。

## 2) 培養法

前記a)の菌を移し, 37°C5日間培養したものを経時的にPH, 濁度, 粘度をはかり観察した。

## 4. 純粋分離

## d. 平面培養

前の基本培地(II)に Hemi. 0.5%添加したものを使用, 寒天濃度は1.5%であった。嫌気培養は重層法を用い上層寒天は0.6%濃度とした。

## e. 液体培養

基本培地(II)の組成と同じでd)で分離した colony を用い培養した。

5. 測定法

粘度…… $t_1$ —Ostwald 粘度計 ( $t_0$  No. 2, 2'34", No. 4, 2'46") に 10ml の Substrate (PH 5.7 0.1MP. Buffer に Hemi. 0.2% 溶解したもの) を入れ,  $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , 水槽に 5 分恒温にして測定した落下時間。

$t_2$ —上記のものに酵素液 (培養液) 1 ml 加え混合し,  $37^\circ\text{C}$  恒温器中にて 30 分間反応させた後,  $t_1$  と同様水槽中で測定した落下時間。濁度……100—T, 光度計 (東京光電式, 7 形), 使用した培養液の透過率 (T) を 100 とした。

PH……東洋濾紙, PH 試験紙

6. 酵素活性(%) =  $\frac{t_1 - t_2}{t_1 - t_0} \times 100$  とした。

実験結果

I. 基本培地 (I) を使用して菌を Select 培養した場合の  $t_1 - t_2$  値の一例

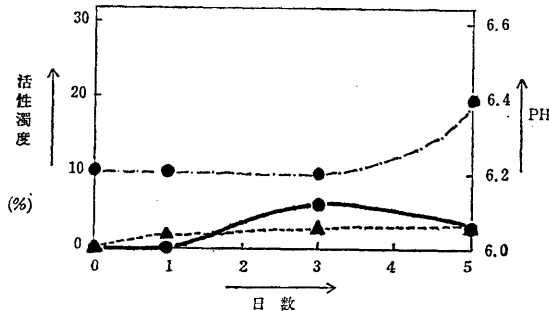
第4表 培養1日目の  $t_1 - t_2$

No.	Hemi なし	" 0.1%	" 0.2%
①	3"	1	0
②	13	3	11
③	8	2	10
④	5	0	11
⑤	16	0	10

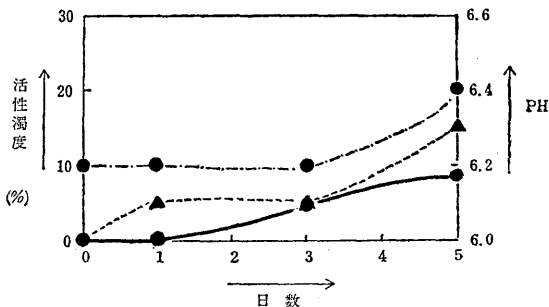
第5表 培養3日目の  $t_1 - t_2$

No.	Heim なし	" 0.1%	" 0.2%
①	1"	1	7
②	16	15	11
③	21	22	14
④	23	22	17
⑤	19	22	11

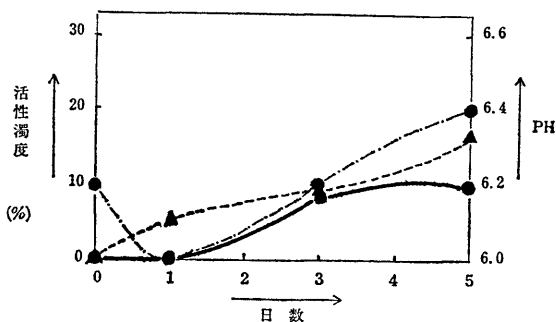
II. 基本培地 (II) を使い Select 培養した場合の酵素活性率, PH, 濁度の経時変化



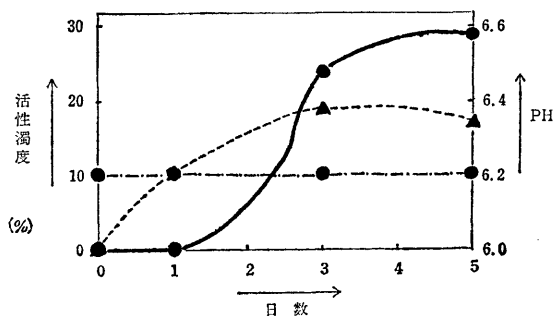
第1図 Hemi. なしの場合の活性, 濁度, PH の経時変化  
—●—活性, --▲--濁度, ---●--- PH



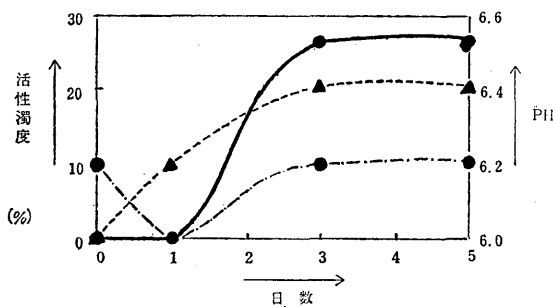
第2図 Hemi. 0.1% 添加の場合の活性, 濁度, PH の経時変化  
—●—活性, --▲--濁度, ---●--- PH



第3図 Hemi. 0.2%添加の場合の活性, 濁度, PH の経時変化  
—●—活性, --▲--濁度, ---●--- PH

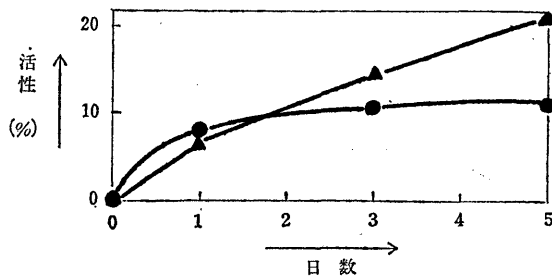


第4図 Hemi. 0.5%添加の場合の活性, 濁度, PH の経時変化  
—●—活性, --▲--濁度, ---●--- PH



第5図 Hemi. 1.0%添加の場合の活性, 濁度, PH の経時変化  
—●—活性, --▲--濁度, ---●--- PH

Ⅲ. 純粋分離した Colony の粘度低下率の経時変化



第6図 分離 colony の総合結果 —●—嫌気培養, —▲—好気培養

## 考 察

I. 4種類の有機N物を0.1%から1.0%まで濃度を変えて培養した結果、 $t_1-t_2$  (即ち粘度低下秒数) に及ぼす影響の一例から分る様に、0.1%, 0.2%の濃さで加えた Hemi. の影響が全然見えなかった。この様な事実はこれまでの実験においてしばしば見られた。これらに関して山田ら<sup>(9)</sup>が高温性繊維素分解菌の分離において、ペプトン+肉汁、のごときは雑菌の増殖のみをうながし、繊維素分解に悪影響があると指摘している場合と非常に似ている。本実験でも集菌の段階での有機N物の使用は全く不適當であると思う。

II. 基本培地(II)の  $K_2HPO_4$ , 0.05%,  $MgSO_4$ , 0.01%,  $NaNO_3$ , 0.2%<sup>(10)</sup>は繊維素分解菌に適する培地組成を借用した。Hemicellulase 活性と培地 Hemi 濃度は0.5%まで平行しており1.0%になると頭打ちが見られた。繁殖についても同様の傾向であった。PH については0.5%の場合、PH6.2で変わらないのが注目される。とにかくC源としては完全な Hemi. のみで分解菌が繁殖していることは明瞭である。

III. 基本培地(II)で Hemi. 分解菌の集菌強化の可能性が判ったので、これを菌種として純粋分離を試みた。さてIIの実験において菌の繁殖の様子は液全体に濁りを生じていた事から嫌気性菌の存在も考えられ、純粋分離にあたって、好気、嫌気両培養法を用いた。その結果出現した colony 何れも活性が認められた。ただ活性ののび方からみると好気培養の方がよかった。坂口<sup>(11)</sup> が乳酸菌などで野生のものに好気性のものが散見され、現在実用化されている乳酸菌ももとは栄養要求の少ない好気性のものではなかったかなどと考察している事と関連して極めて興味深い点である。

## 総 括

1. Corn seed より Corn seed Hemi. 分解菌分離に当って、集菌の段階での有機N物の使用は不適當である。
2.  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $NaNO_3$  に Hemi. を0.5%程度加えたもので、Hemi. 分解菌の純粋分離が可能である。

## 参 考 文 献

- 1) 井上雅資, 岡田茂孝, 福本寿一郎: 日本農芸化学会大会講演 ('69)
- 2) 竹西繁行, 辻阪好夫, 松山圭一郎, 福本寿一郎: 日本農芸化学会大会講演 ('69)
- 3) 辻阪好夫, 竹西繁行, 松山圭一郎, 福本寿一郎: 日本農芸化学会大会講演 ('69)
- 4) 岡田茂孝, 井上雅資, 福本寿一郎: 農化., 43, 99~104 ('69)
- 5) 井上雅資, 福本寿一郎: 農化., 44, 1~7 ('70)
- 6) 橋本揚之助, 福本寿一郎: 農化., 43, 317~332 ('69)
- 7) Hiroshi Iizuka and Tosihiro Kawaminami: *Agr. Biol. Chem.*, 29, 520~524 ('65)
- 8) 大宮満男, 野口道子: 日本栄養・食糧学会総会(第21回)講演要旨, p18 ('67)
- 9) 山田浩一, 藤本義典, 船田譲: 農化., 25, 200 ('51)
- 10) 微生物学ハンドブック編集委員会: 微生物学ハンドブック(技報堂)1966, p1383
- 11) 坂口健二: 乳酸菌の研究(東京大学出版会)1966, p111