東北火山灰土壌中の *Azotobacter* (II)* *Azotobacter indicum* sp. の粘質物の 2, 3 の性質

須 藤 恒 二 (東北大学農学部農芸化学科農業微生物研究室)

昭和 31 年 7 月 7 日 受理

著者はさきに東北地方の酸性火山灰土壌中から比較的酸性環境にたえる *Azotobacter* を分離し、その性質について検討を加え、*A. indicum* STARKEY et DE の一変株であると同定した。そしてこの種の耐酸性菌による酸性土壌中での窒素固定をも考慮すべきことを指摘した。又一方この菌の発見者 STARKEY ら⁽¹⁾及びその他の研究者も認めるように *A. indicum* は糖を炭素源して旺盛に生育する時に粘質物を多量に生成することを認めた。

細菌粘質物は土壌中における団粒形成時の接着剤としての役割をもつことが推定され、例えば GEORGEHAN ら⁽²⁾は levan 及び dextran が人工団粒形成能にすぐれていることを見出している。

著者の分離した *A. indicum* sp. の培養液は極めて粘稠になり、これから分離した粘質物水溶液は粘度が極めて高く、0.1% 溶液の相対粘度はほぼ 10 である。このように高い粘度を持つ粘質物について 2, 3 の検討を行って得た結果を報告する。

実 験 方 法

菌株 前報⁽³⁾に記載した酸性火山灰土壌中より分離した *A. indicum* sp. を用い、この菌を液体培養で十分生育させたものを種培養として用いた。

培地： STARKEY ら⁽¹⁾の塩液に葡萄糖 1% を加え培地とした。500 ml 容の坂口コルペンにその 100 ml を入れ 15 ポンド 10 分加熱して滅菌を行つた。

培養： 30° で振盪培養（往復）を行つた。

粘質物の分離： 菌が完全に生育を完了するのは 1 週間前後であるが、そのような培養で遠心分離を行うと菌体は沈降せず濁った層と透明な層とに分れるのみでこの 2 層は容易に混合するため、清澄な上澄の十分量を採取することは困難である。併し培養をやや古くして 2 週間以上にした後水を加えて 3~4 倍にうすめ毎分 1 万回で約 40 分遠心すると菌は沈降しほぼ清澄な上澄が得られる。

このようにして得た上澄液に 4~5 倍量のアセトンを加えると粘質物は気泡を含んだ綿状の塊として浮く。アルコールはこの作用が弱く更に多くを加える必要がある。この塊をとりわけて再び水にとかし、アセトンで再洗滌させ減圧デシケーター中で乾燥する。こうして得た粗製品は淡褐色又は淡汚緑色のかたまり又は薄片で、吸湿性も殆どなく水によく溶けてほぼ透明の液となり粘度は高い。収量は原料量の 10% をこえることはない。

還元糖の定量 糖の定量には triphenyl tetrazolium-HCl (TTC) を用いた。TTC の還元には FAIRBRIDGE ら⁽⁴⁾の法に準じて行つた。即ち適当濃度の糖液 3 ml, 約 3 N NaOH 2 ml, 0.5% TTC 1 ml を約 25 ml 容の共栓試験管にとり、沸騰湯浴中で正確に 3 分間加熱した後水酢 2 ml を加えると共に流水で急いで冷却する。この後の比色は FAHMY ら⁽⁵⁾の法に準じた。即ちトルエン 10 ml を加えてよく振盪すると生成した formazan は全部トルエン層に移行する。水を対照として同様に調製したトルエン液を標準としてこの色素液の比色を行う。濾光板は 470 m μ が適当である。色素液が濃い時は適当に稀釈して比色する。この読みを標準葡萄糖で得られた標準曲線と照合して葡萄糖として算出する。

粘度の測定： 30° の恒温槽内でオストワルドの粘度計を用いて粘度の測定を行う。

実 験 結 果

粘質物の化学組成： 一般分析の結果は第 1 表に示すようであつて、灰分含量が著しく大であり、窒素物はやや含まれるが葡萄糖として還元物を算出するとその回収率が著しく低いのが特徴であり、その他の成分を除いた約 70% に過ぎない。

* *Azotobacter* in Volcanic Ash Soil in Tohoku District (II). Slime of *Azotobacter indicum* sp.
By Tuneji SUTO (Laboratory of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture, Tohoku University)

第 1 表 粗粘質物の化学的組成

水分	全窒素	灰分	炭水化合物(葡萄糖として)
4.23%	0.48%	9.57%	57%

第 2 表 粘質物加水分解物の呈色反応

試 薬	反 応	色 調	溶媒層の色調
MOLISCH	+		
ナフトレゾルシン	+	赤紫→暗緑	<div> { アルコール 緑 エーテル 赤紫 ベンゼール 淡赤紫 </div>
SELIWANOFF	—		
PINOFF	—		
オルシン	+	青	アミルアルコール 青
アニリン	+		
フロログルシン	+	褐	アミルアルコール 褐
アセトン	—		
ニンヒドリン	—		

第 3 表 加水分解物中還元性物質のイオン交換樹脂への吸着

	原液	陽イオン交換	陰イオン交換
葡萄糖価 mg/ml	0.24	0.22	0.0

第 1 図 加水分解時の還元力の推移

加水分解物の呈色反応：細菌粘質物については糖、アミノ糖、ウロン酸等を主成分とすることが知られているのでこの粘質物の加水分解を行い呈色反応を試みた。封管中で硫酸濃度 $2N$ とし、沸騰湯煎中で加水分解した時の還元力の推移は第 1 図になすようである。粘度は加熱後 3 分で水のそれとほぼ等しくなるが還元力は 1 時間を経ないと見られない。その上昇は 5 時間目まで続き、その後低下する。

従つて $2N$ 硫酸で約 5 時間加水分解した分解液をバリタと炭酸バリウムで硫酸を除くと同時に中和し、沈澱洗液を濾液と合せて減圧濃縮して得た液について諸種の呈色反応を行つた。その結果は第 2 表に示すようであつて、ナフトレゾルシンの反応からウロン酸と推定されるものが含まれていることが認められる。SELIWANOFF 及び PINOFF の反応からケト糖の存在は疑わしい。オルシン及びアニリン反応から 5 炭糖又はそれと共通の反応を持つウロン酸の存在を推定し得る。同時に行つたアラビノースのフロログルシン反応の呈色は赤紫色、キシローズのそれは暗青色であつたが、この液のそれは褐色でむしろ葡萄糖の呈色に似ている。アセトン反応がないのでメチルペントースは含まれていないと推定される。

ニンヒドリン反応が陰性であるのでこの加水分解液中にはアミノ酸又はアミノ糖の存在は疑われるが、粘質物中には 0.48% の窒素が含まれている。この窒素物が加熱によつて容易に還元性物質と結合するものであれば、この反応のみでアミノ酸等の有無について論ずることはできない。

イオン交換樹脂との反応：イオン交換樹脂塔を通じた流下液について還元力を検した結果は第 3 表に示すようである。陽イオン交換樹脂塔 (Amberlite IR-120) を通過させても還元力は殆ど減少しないのに反し、陰イオン交換樹脂塔 (Amberlite IRA-400) を通じた流下液の還元力は全く消失する。この樹脂を稀アルカリで洗う

と還元力は稀アルカリ液に移る。従つて反応液中の還元力は酸性基と全く行動を共にすることが認められ、呈色反応の結果からもウロン酸に基くものと推定される。

粘質物溶液の粘度と物理条件との関係

0.1% 水溶液についての温度変化と相対粘度変化との関係では第 4 表に示すように温度が高くなるとやや低下する傾向がみられる。

又種種の pH の磷酸塩緩衝液中に $12.5\text{ mg}\%$ の濃度にとかした粘質物溶液の粘度は第 5 表に見られるように pH 4~8 で

第 4 表 温度の粘質物溶液の粘度に及ぼす影響

温 度	10°	15	20	25	30	35	40
流時 { 水	24.4	21.7	19.5	17.6	15.9	14.8	13.6
下間 { 0.1% 水溶液	254.4	220.0	195.0	172.4	154.3	136.7	122.5
相 対 粘 度	10.4	10.1	10.0	9.8	9.7	9.2	9.0

第 5 表 pH の粘質物溶液の粘度に及ぼす影響

pH	7.9	7.1	6.1	5.2	3.9	3.2	2.1
相 対 粘 度	2.49	2.41	2.44	2.48	2.40	2.28	1.85

第 6 表 粘質物溶液の濃度と粘度

濃度 mg/100 ml	100	50	12.5	6.3	3.2	1.6	0.8	0.4
相対粘度 η_r	10.89	4.52	2.43	1.72	1.36	1.18	1.09	1.03
比 粘 度 η_{r-1}	9.89	3.52	1.43	0.72	0.36	0.18	0.09	0.03
($\eta_r - 1$)/mg	0.0989	0.0704	0.114	0.114	0.113	0.113	0.113	0.075

は殆ど変動がないが、pH 3 以下では著明に粘度が低下する。

粘度と濃度との関係： 種類の濃度の粘質物溶液についての粘度測定の結果は第 6 表に示すようであつて 100 ml 当り 12.5 mg 乃至 0.8 mg の範囲では $(\eta_r - 1)/C$ は一定となり、次式が成立し得る。

$$(\eta_r - 1)/C = K_m M \quad (1)$$

ここで η_r は相対粘度、 C は濃度、 K_m は恒数、 M は分子量

上の式は高分子鎖状化合物について成立するから、逆にこの粘質物は鎖状であることが推定される。しかし溶媒・溶質共に極性があるから直に断定はできない。

考 察

細菌粘質物は *B. anthracis* の粘質物のようにグルタミン酸の重合物を除いては一般に糖類即ち単糖、アミノ糖、ウロン酸等の成分より成ることが知られているが、dextran, levan における葡萄糖及び果糖のような単一の糖から成るものは少く、これらが組み合わされて粘質物が構成されることが多い。*A. chroococcum* の粘質物についての COOPER ら⁽⁶⁾の研究でも葡萄糖とウロン酸をその成分として認めており、この *A. indicum* sp. の粘質物のようにその大部分がウロン酸のみより成る細菌粘質物に知られていない。これに反し植物粘質物のペクチンはガラクトuron酸のみより、アルギン酸はマンニuron酸のみよりなつていたので、供試の粘質物はむしろこれに近いと考えられるが粘度については遙かに高いのが特徴的である。

この菌における粘質物は糖を炭素源とする時のみならず、酪酸、ピルビン酸又は乳酸を炭素源とする時も生成されるので、糖から直接酸化によつてウロン酸が生成するよりもむしろ低分子化合物の縮合によつて形成される途が考えられる。

主としてウロン酸よりなる重合物であるためにこの粘質物は上記したように灰分が非常に高いと考えられるが、240 V の電圧で電気透析を行うと粘質物は陽極側のセロファン膜に附着するが、ミリアンメーターで殆ど電流の流れが感ぜられない迄透析を行つてもその灰分は殆ど減少しない故にこの程度の電圧では遊離の酸の形になし得ないものと考えられる。加水分解の過程で見られたように強酸で処理すると速かに粘度が低下するが、これは陽イオン離脱に基くものであろう。

粘度と濃度との関係からこの粘質物は長鎖状分子構造をもつことが推定されるが、(1) 式に SCHWEIZER 試薬中の繊維素について求められた K_m の値を代入して分子量を計算すると 22,500 となるから、GERGHEGAN ら⁽⁴⁾が同様の仮定のもとに dextran, levan について得た値の約 2 倍となる。従つてウロン酸残基約 110 の縮合物であると推定されるが、分子量については他の適当な方法を用いて測定する必要がある。培養基中に粘質物が生産される時は菌体の分離を著しく困難にし、その後の代謝能検索を不可能にする場合が多い。この菌においては前に述べたように新しい培養は高速遠心によつて 2 層に分かれても、粘質物は菌体と共に下層に移行するようで、上澄部に粘度は殆ど見られない。従つて菌体と粘質物との分離は殆ど不可能である。2 週間程度になると粘質物は菌体から離脱すると考えられるが、約半年放置した培養でも上澄は、やはり粘稠であり、殆ど粘質物の分解は行われていないと考えられる。

これに反し、新しい培養についてアセトンを加え、粘質物と菌体を共に沈澱させ、沈澱物に水を加え約 5 日室温に放置すると殆ど粘度が消失する。かかる操作で粘質物分解酵素を分離し得る可能性があるが、これを用いて新しい培養を短時間処理し菌に損傷を与えることなしに分離し得るならば代謝能検索に利する所が大であらう。この点は今後検討を加える予定である。

総 括

1. *A. indicum* sp. の培養液を 3~4 倍に稀釈して遠心により粗粘質を菌体と分離し得た。
2. この物質は酸で加水分解すると還元性物質を生ずるが、このものは長時間の加熱で還元力を失い易い。更に呈色反応、イオン交換樹脂への吸着からウロン酸であることが認められた。
3. 粘質物水溶液の粘度は極めて高く 0.1% 溶液では相対粘度は約 10 である。温度の変化で相対粘度はあまり変動しないが、pH 3 以下では急速に低下する。陽イオンの離脱が粘度低下の一因であると考えられる。比粘度は 100 ml 当り 12.5~0.8 mg の範囲では濃度に比例し

$$(\eta_r - 1)/C = K_m M$$

の式が成立し、粘質物分子は長鎖状であると推定された。

終りに御懇篤な御指導を賜った植村教授に深謝すると共に、呈色試薬を分与された山根助教授、実験の便宜を与えられた東北大学農学研究所に謝意を表する。

(1) R. L. STARKEY, P. K. DE <i>Soil Sci.</i> , 47, 329 (1939).	BOOTH : <i>Biochem. J.</i> , 49, 423 (1951).
(2) M. J. GEORGEHAN, R. C. BIAN : <i>Biochem. J.</i> , 43, 5 (1948).	(5) A. R. FAHMY, E. O'F, WALSH <i>Biochem. J.</i> , 51, 55 (1952).
(3) 須藤恒二 : 本誌, 29, 177 (1955).	(6) E. A. COOPER, W. D. DAKER, M. STACEY : <i>Biochem. J.</i> , 32, 1752 (1938).
(4) R. A. FAIRBRIDGE, K. J. WILLIS, R. G.	

東北火山灰土壌中の *Azotobacter* (III)*

Azotobacter indicum sp. の含窒素培地での生育

須 藤 恒 二 (東北大学農学部農芸化学科農業微生物研究室)

昭和 31 年 7 月 18 日 受 理

著者がさきに東北地方の酸性火山灰土壌から分離した *Azotobacter indicum* sp. は無窒素培地では極めて徐々に生育し、糖を加えてもブイヨン寒天には生育しないのに反して麴汁寒天には旺盛に生育する⁽¹⁾。この菌の発見者 STARKEY 及び DE⁽²⁾ もこの菌が加糖ブイヨンには僅かか或は殆ど生育しないのに反し、トマト汁を加えたペプトン水又はうすめた麦芽汁に生育するのを認めている。*Azotobacter* は一般に有機態の窒素物の利用性の低いことは多くの研究者によつて認められている。併し *A. indicum* sp. を麴汁に振盪培養すると著しく lag を短縮するので有機態の窒素の存在する時それを利用することが考えられる。同時に酵母等に見られるように有機態窒素を利用する時に生長素因子に対する要求も生じてくる可能性がある。他方窒素固定菌の窒素固定作用は結合態の窒素特に無機態の窒素のある時阻害されることは周知のことである。併しこの生育過程に及ぼす影響については研究されている所が少い。菌の生育に及ぼす窒素物及びその他の生長素因子の影響を検討し、更にそれが菌の代謝能の如何なる変化に基くかを知るならば窒素固定の機作解明の一助となし得ると考え、*A. indicum* sp. が麴汁ではよく生育し、加糖ブイヨンでは生育しない点、窒素物の生育促進及び阻害特にアミノ酸の効果について検討を行つた結果を報告する。

実 験 方 法

培地はすべて第 I 報の組成の基本塩液⁽¹⁾に目的に応じて炭素物及び含窒素物を加えて調製した。麴汁は Bllg 7° のものを用い、加糖ブイヨンは特別の場合以外は葡萄糖 1%, 肉エキス (極東) 1%, ペプトン (極東) 1%, 食塩 0.5% の組成のものを用いた。殺菌はいずれも 15 ポンド, 10 分間加熱して行つた。

培養は静置及び振盪で行い、後者の場合は緒方の小型培養管⁽³⁾の径 16~18 mm, 長さ 200 mm のものに培地を 7~10 ml 入れた。生育はこの管について経時的に直接その濁度を光電比色計で濾光板 660 mμ のものを用い測定した。比色計は Evelyn, 日立及び自製のものを用いた。

培養温度は 30° である。

種には無窒素葡萄糖培地で十分生育させた培養を用い、無菌ピペットで接種した。

実験結果及び考察

A. 予備試験

1% の葡萄糖を含む無窒素培地での生育の状況は第 1 図に示すように、静置では培養当初から生育を開始するのに反して振盪では明かな誘導期を示す。又前者では生育の進行は極めてゆるやかであり 2 週間に至つても完了しないのに反し後者では生育を開始するとその進行は速かであり、又早く完了する。従つて実験にはすべて振盪培養を用い lag の長短及び生育速度によつて比較を行つた。

* *Azotobacter* in Volcanic Ash Soil in Tohoku District (III). Growth of *Azotobacter indicum* sp. in Media Containing Combined Nitrogen.
By Tuneji SUTO (Laboratory of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture, Tohoku University)