

## アミラーゼ生産菌Bac. subtilis var. amyloliquefaciens FUKUMOTO K49の胞子生育因子

大村, 浩久  
九州大学農学部食糧化学教室

船越, 五郎  
アサヒビール株式会社

飯田, 昭子  
旭川大学女子短期大学部

<https://doi.org/10.15017/23048>

---

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 25 (2), pp.113-118, 1971-01. Faculty of Agriculture, Kyushu University  
バージョン：  
権利関係：



## アミラーゼ生産菌 *Bac. subtilis* var. *amyloliquefaciens* FUKUMOTO K 49 の孢子生育因子

大村 浩久, 船越 五郎\*, 飯田 昭子†

### Growth factors of spore of a strain of amylase-producing bacteria, *Bac. subtilis* var. *amyloliquefaciens* FUKUMOTO K 49

Hirohisa Omura, Goro Funakoshi  
and Akiko Iida

アミラーゼ生産菌として最もよく知られている福本菌 *Bac. subtilis* var. *amyloliquefaciens* FUKUMOTO K 49 のバクテリオファージの研究に関連してその合成培地を検討した際、本菌はロイシン要求性であつて可溶性デンプン粉を中心とする簡単な培養基にロイシンを補足すればよく生育することを確めた。しかしこの合成培地にしても孢子あるいは極めて少量の菌体を接種した場合にはその生育はほとんど認められず、菌の培養に広く用いられている大豆粕培地あるいは菌体ないし酵母の抽出液をある程度追加する必要があつた<sup>3)</sup>。これは菌が孢子から生育する場合にはロイシンのほかに他の栄養因子も必要であることを示唆するものであつて、この本体が解明されて研究に必要な合成培地が確立されたといふことができる。

### 実 験

#### 供試菌株

前報<sup>3,4)</sup>に記載した菌株を用いた。なお研究の便宜上菌にはストレプトマイシンに対する抵抗性を獲得させた。

#### 培 養 基<sup>3,4)</sup>

a) **MI 培地**：本菌の培養に普通に用いている大豆粕抽出液を中心とする培養基であつて既述の方法により調製した。

b) **FY 培地**：福本、山本<sup>1)</sup>によつて報告された本菌用の合成培養基からアルコールを省いたものであつて生菌用の最少培養基として用いた。すなわち可溶性デンプン粉 4%, クエン酸ナトリウム 0.5%, リン酸二アンモニウム 1.3%, 硫酸マグネシウム 0.02%, 塩化

カリウム 0.01% および塩化カルシウム 0.01% を含み pH を中性に調節したものである。

c) **FY-Leu 培地**：前報で確認したところに従つてロイシンを加えた合成培養基である。すなわち上記 FY 培地に 1 ml あたり 200  $\mu$ g 宛ロイシンを添加したものであつて、菌は生育するが孢子からの生育は認められないので孢子用の最少培養基として使用した。

上述のように試験にはストレプトマイシン抵抗菌を用いたので、いずれの培養基にも 1 ml あたり 200  $\mu$ g 硫酸ジヒドロストレプトマイシンを添加した。また固体培地は 1.5% 寒天を加えて調製した。

#### 孢子による auxanography

**MI 寒天斜面培地**に培養した保存菌株 1 白金耳を 10 ml MI 培地に接種し 37°C に 3 日間振盪培養する。7,000 r.p.m. で 15 分間遠心分離して孢子を沈澱させ、これを殺菌した 0.9% 食塩水でよく洗滌する。この操作を 6~7 回繰り返して灰白色の孢子を得る。こうして得た孢子は直ちに試験に用いるか、あるいはシリカゲルデシケーター中で減圧乾燥または常法により凍結乾燥したのち減圧デシケーター中に保存したが、乾燥には凍結乾燥が望ましい。Auxanography には一定量の孢子を 0.9% 食塩水 1 ml によく懸濁しその 0.2 ml を FY-Leu 寒天平板培地上（直径 9 cm シャーレ）に均一に塗布して乾燥する。これに試験液をしみ込ませたディスクペーパー（東洋科学製）をのせ 37°C に数日静置して菌の生育を試験する。

乾燥孢子は灰白色の塊状であるので、使用に際してはまずガラス棒で細かく砕き 0.9% 食塩水に懸濁し同一の濾紙で 2 回濾過したのち 610 m $\mu$  における吸光度 0.5 以上のものを調製する。一方ディスクペーパーは次のようにした。殺菌水 1 ml に適当量の供試物質を

\* アサヒビール株式会社

† 旧姓西岡, 旭川大学女子短期大学部

溶解し小蒸発皿に移す。これにディスクペーパーを浸し加熱蒸発する。乾固する直前にペーパーを小試験管に移し殺菌する。このようにして作った試料は無菌的に保存すれば 1 ヶ月程度はそのまま供試することができる。

#### 菌数および孢子数の計測

液体培養における細菌および孢子の数は 610 mμ の吸光度を測定し前報<sup>3)</sup> 記載の標準曲線から概略の値を求めた。この曲線は吸光値と Thoma 血球計で求めた値との関係を示すものであつて、吸光値 0.005 ないし 0.2 付近では 1 ml あたり 10<sup>7</sup> を中心としてほぼ直線関係が認められる。

#### 結果および考察

##### 乾燥孢子の発芽率

試験に用いた乾燥孢子の発芽率は次のようにしてあらかじめ求めた。適当量の乾燥孢子を 10 ml 0.9 % 食塩水に懸濁して洗滌する。2 回繰り返したのち吸光度を 0.4~0.6 になるように再懸濁する。孢子生育因子が不明であるので酵母抽出液 (オリエンタル酵母工業製酵母エキス粉末) を用いることとし、1 % 酵母抽出液を含む FY-Leu 培地 7 ml に孢子懸濁液 3 ml を加え 37°C で 5 時間振盪する。経時的に 0.7 ml 宛とり出し、これに 6.3 ml の 0.9 % 食塩水を加えた 10 倍稀釈液についてその吸光度を測定した。その結果を第 1 表に示す。

孢子接種後発芽にともなつて吸光度は若干低下し本菌の場合 2 時間後に最低に達し以後菌の生育に従い吸光度は再び上昇した。この結果から蜂須賀の式<sup>2)</sup>

$$Gt = \frac{A_0 - A_t}{0.7(A_0 - a)} \times 100$$

Table 1. Variation of the optical density during the growth of bacteria from spores.

| Test    | a    | A <sub>0</sub> | A <sub>t</sub> |      |      |      |      |
|---------|------|----------------|----------------|------|------|------|------|
|         |      |                | 1              | 2    | 3    | 4    | 5    |
| 1       | 1.06 | 2.65           | 2.49           | 2.30 | 2.67 | 3.38 | 4.40 |
| 2       | 1.04 | 2.62           | 2.50           | 2.36 | 2.59 | 3.30 | 4.23 |
| Average | 1.05 | 2.64           | 2.50           | 2.33 | 2.63 | 3.34 | 4.32 |

a: Optical density of the medium.

A<sub>0</sub>: Optical density of the medium inoculated with the spores (before incubation).

A<sub>t</sub>: Optical density of the medium inoculated with the spores (after incubation at 37°C for t hour).

Yeast extract was added into FY-Leu medium as growth factor of the spores.

Rate of germination was calculated to be 27.5 % according to Hachisuka's

equation  $G_t = \frac{A_0 - A_t}{0.7(A_0 - a)} \times 100$ .

に従つて発芽率を求めると 23.5 % ないし 31.4 %, 平均 27.5 % 程度であつた。

##### 酵母抽出液中の生育因子の検索

本菌の孢子に対する生育因子が酵母抽出液ないし菌体抽出液に含まれていることは前報に記載した通りである。そこでまず市販酵母抽出液についてこの生育因子の検索分離を試みた。

市販酵母エキス粉末に 2 倍量以下の 95 % アルコールを加えて 60°C で 10 分間加熱抽出する。残渣をさらに 3~4 回同様に抽出をくり返したのち、最後に 95°C 以上の温湯に 10 分間浸して高温で抽出し直ちに吸引濾過する。抽出液を温湯上で蒸発し 300~500 ml に濃縮する。これに活性炭を加え熱いうちに吸引濾過して脱色する。さらに蒸発乾固しないように減圧下に速やかに濃縮して 50~100 ml とし、2 倍容以上の水飽和ブタノールとともに分液ロート中で振盪する。4 回くり返したのち、水層をクロロホルムと振盪して残存するブタノールを除く。最後に湯浴上常圧ないし減圧で濃縮して淡黄色透明の抽出液を得た。これをさらにセファデックス G-15 を用いて精製した。すなわち 1 cm×30 cm のカラム上に投与し、水で流速 30 ml/hr. で溶出し 3 ml 宛集めた。その各々について孢子からの生育能とニンヒドリン発色を試験した。その結果を第 2 表に示す。

溶出画分 No. 4~6 において孢子に対する生育因子が含まれることが示された。しかもこの画分は淡黄色を呈し、またニンヒドリンによつて呈色した。さらにその紫外線吸収スペクトルは 260 mμ に極大値、237 mμ に極小値を持ち核酸のスペクトルと類似することにも認められた。しかし市販カザミノ酸でもほぼ類似のスペクトルが観察されたがゲル濾過の様相も考えると

Table 2. Auxanography of filtrate of yeast extract through Sephadex G 15.

| Fraction No.       | 1 ~ 3 | 4 ~ 6       | 7 ~ 10 | 11 ~ 50 |
|--------------------|-------|-------------|--------|---------|
| Growth from spores | —     | ++          | —      | —       |
| Color              | —     | pale yellow | —      | —       |
| Ninhydrin test     | ±     | +++         | ±      | —       |

Powder of commercial yeast extract was extracted with 95 % ethanol at 60°C for 10 min. and repeated 4 times. The residue was finally extracted at higher temperature. Combined extract was concentrated, decolorized with charcoal powder and further concentrated. It was then extracted with H<sub>2</sub>O-saturated butanol, repeated 4 times, extracted with chloroform and evaporated to obtain a clear pale yellow concentrate. The concentrate was filtered through a column, 1×30 cm, of Sephadex G 15 with a rate of 30 ml/hr. using H<sub>2</sub>O as solvent and every 3 ml fraction was obtained. For each fraction, growth factor for spore and ninhydrin test were examined.

Table 3. Auxanography of active fraction after re-gel filtration through Sephadex G 50.

| Fraction No.       | 1     | 2     | 3           | 4      | 5      | 6           | 7     | 8     |
|--------------------|-------|-------|-------------|--------|--------|-------------|-------|-------|
| Growth from spores | —     | —     | ±           | ++     | ++     | ±           | —     | —     |
| Color              | —     | —     | pale yellow | yellow | yellow | pale yellow | —     | —     |
| Ninhydrin test     | —     | —     | +           | +++    | +++    | ++          | ++    | —     |
| OD <sub>260</sub>  | 0.055 | 0.060 | 0.090       | ∞      | ∞      | 0.500       | 0.385 | 0.190 |

Active fractions, No. 4~6, in Table 2 were employed for re-gelfiltration through a column, 1×30 cm, of Sephadex G 50 with a rate of 30 ml/hr using H<sub>2</sub>O as solvent and growth factor, ninhydrin test and optical density at 260 mμ were examined for every 3 ml fraction.

Table 4. Auxanography of active fraction after re-gel filtration through Sephadex G 75.

| Fraction No.       | 1     | 2     | 3           | 4      | 5      | 6     | 7     | 8     |
|--------------------|-------|-------|-------------|--------|--------|-------|-------|-------|
| Growth from spores | —     | —     | ±           | ++     | ++     | —     | —     | —     |
| Color              | —     | —     | pale yellow | yellow | yellow | —     | —     | —     |
| Ninhydrin test     | —     | ±     | ++          | +++    | +++    | +     | ±     | —     |
| OD <sub>260</sub>  | 0.025 | 0.110 | 1.154       | ∞      | ∞      | 0.652 | 0.156 | 0.092 |

Re-gel filtration and auxanography were carried out as in Table 3 except a column, 1×50 cm, of Sephadex G 75 was employed.

これは核酸ないしタンパク質系の物質であろうと推定される。

そこで次に上記有効フラクション (No. 4~6) をセファデックス G 50, 30 cm カラムまたは G 75, 50 cm カラムを用いて再びゲル濾過を行ない活性を試験し, 第3表および第4表に示した。

なお具体的に第1図にこの第4表の auxanogram を示した。

いずれにしても活性部分は黄色を呈し 260 mμ に強い吸光度を持つとともにニンヒドリンによつて呈色する。従つて酵母抽出物中の有効因子は一種の核タンパク質であろうと推定される。

そこで市販酵母 RNA と 18 種のアミノ酸 (第5表) とを混合して菌の生育を試験した結果, 生育度の再現

性は乏しかつたが, いずれも孢子からの生育は認められた。

次に核酸あるいはタンパク質の何れが有効であるかを明らかにするために酵母抽出液をフェノール処理によつて分画し活性を試験した。市販酵母エキスポ末を2倍容の水に懸濁しこれに等量の 90 % (w/v) フェノールを添加し室温で2時間攪拌する。9,000 r.p.m. で30分間遠心分離し変性タンパク質を含む中間層ならびに DNA およびタンパク質を含む下層 (フェノール層) を除く。活性は上層 (水層) に含まれニンヒドリンにより呈色することが認められた。水層について上記フェノール処理を3回くり返してタンパク質を十分に除いたのち, この水層に2%になるように食塩を加えさらに2倍量のエタノールを加えて RNA を沈

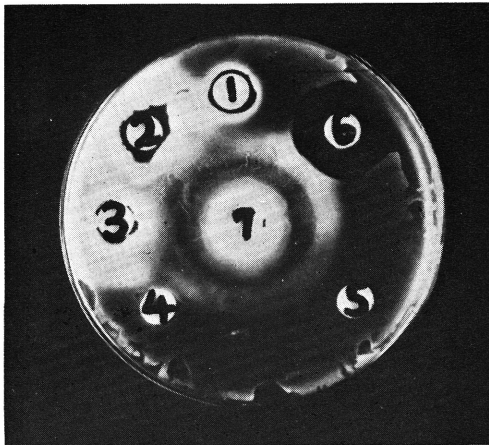


Fig. 1. Auxanography of active fraction of yeast extract.

Spores were spread on agar plate of FY-Leu medium. Samples adsorbed to paper disc was separately put on the plate and incubated at 37°C for a few days.

FY-Leu medium contains 4% soluble starch, 1.3% ammonium phosphate, 0.5% sodium citrate, 0.02% magnesium sulfate, 0.01% potassium chloride, 0.01% calcium chloride and 200  $\mu$ g leucine per ml. This medium is employed as common medium for fresh cell and as the minimal medium for spores throughout the investigation.

Samples were obtained as in Table 4.

- ① No. 1~2, ② No. 3, ③ No. 4~5,
- ④ No. 6, ⑤ No. 7~19, ⑥ No. 20~70.
- ⑦ original yeast extract.

澱させる。この沈澱を75%エタノールで洗滌したのち水にとかし、さらにエーテルで振盪してエタノールを除く。こうして得たRNA溶液は多糖類も含むがニンヒドリンでは呈色しなかつた。一方エタノールでRNAを沈澱させた濾液はニンヒドリンで呈色したので減圧濃縮してアルコールを際き上記RNA溶液とともに試験に用いた。

第2図に示すようにRNA区には効果はないが、これを除いた濾液に活性が認められた。尚比較のために市販酵母RNAも試験したが効果はなかつた。このことから酵母抽出物中の核タンパク質に活性は認められるが有効因子はタンパク部であること、ならびにそれは必ずしもタンパク質である必要はなく低分子のアミノ酸の混合物であればよいと思われる。

核酸系物質に効果がないことはさらにアデニン、グアニン、ウラシル、シトシン、チミン、これらの混合物およびさらにD-リボースを加えたもの、RNAを1N

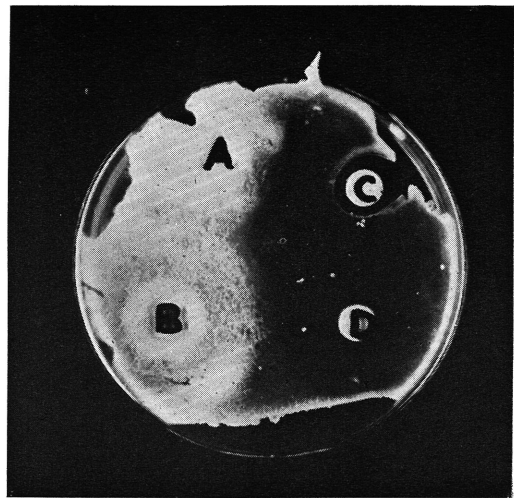


Fig. 2. Auxanography of fractions obtained by phenol-treatment of yeast extract.

Auxanography was carried out as in Fig. 1. Yeast extract was treated principally according to the procedure for preparing RNA. Powder of yeast extract was dissolved in 2 volumes of  $H_2O$ , mixed with a equal volume of 90% phenol and stirred at room temperature for 2hrs. The mixture was centrifuged at 9,000 r.p.m. to remove DNA and denatured protein. Into  $H_2O$ -layer (A, ninhydrin test positive), after repeating phenol treatment, 2% NaCl was dissolved and 2 volumes of ethanol were then added to precipitate RNA. RNA was washed with 75% ethanol and dissolved in  $H_2O$ . The RNA solution was washed with ether to remove ethanol (C, ninhydrin test negative). Filtrate removed RNA was concentrated (B, ninhydrin test positive). For comparison, commercial yeast RNA (D) was also examined.

HCl で 100°C 1 時間加水分解後 1N NaOH で中和した塩基およびモノヌクレオシド混合物, RNA を 0.3N KOH で 37°C 18 時間加水分解後 60% 過塩素酸で中和したモノヌクレオチド類, DNA, DNA を 60% 過塩素酸で封管中 100°C 1 時間加熱分解し稀釈後 0.3 N KOH で中和した塩基類, その他ニコチン酸アミド, FAD, FMN, リボフラビンないし NAD 等について試験したが、いずれも菌の生育は認められないことから明らかである。また胞子から発芽にともなつて排出されるといわれるジピコリン酸なども同様に無効であつた。

第2図から一応有効因子はアミノ酸であると推定されたが、その場合核酸の共存が必要であるか否かをさ

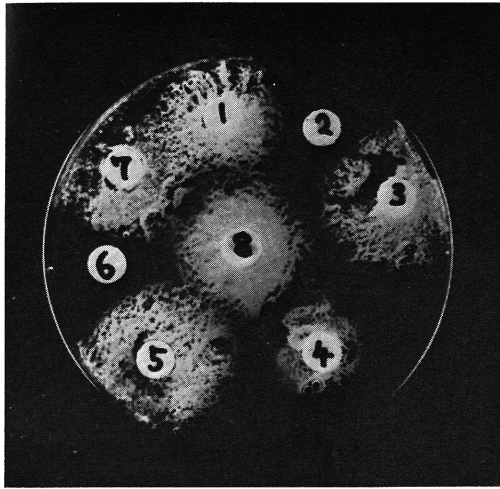


Fig. 3. Auxanography of mixture of amino acids and RNA.

Auxanography was carried out as in Fig. 1.

- ① mixture of 18 amino acids (cited in Table 5)
- ② Hydrolysate of commercial yeast RNA
- ③ RNA+commercial casamino acids⑦
- ④ RNA+amino acid mixture①
- ⑤ mononucleotides⑥ + commercial casamino acids⑦
- ⑥ mononucleotides
- ⑦ commercial casamino acids
- ⑧ original yeast extract

らに試験した。その結果第3図に示すようにアミノ酸混合物ないしカザミノ酸単独で菌の生育は認められ核酸は必要でないことが示された。

#### アミノ酸混合液の auxanography

有効画分は常にニンヒドリンで発色する事およびフェノール処理からアミノ酸である事が推定されたが、個々のアミノ酸単独では効果がない事は前報<sup>3)</sup>で既に確かめられている。そこで次に第5表に示すアミノ酸混合液について auxanography を行なつた。

第4図に示すように菌の顕著な生育は No. 7 で認められ、ヒスチジン、アスパラギン酸、イソロイシン、バリン、アルギニンの混合物が有効であつた。

註) No. 4 でも菌の生育があつたが、培地に用い

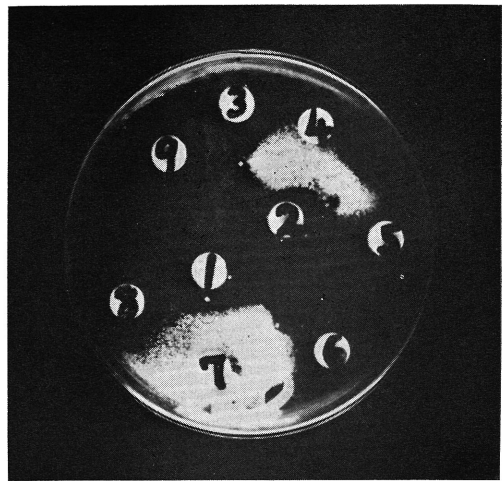


Fig. 4. Auxanography of Amino acid mixtures.

Auxanography was carried out as in Fig. 1.

Composition of amino acid mixtures was cited in Table 5.

(Although growth with No. 4 was observed, it was then found that a Ileu was contaminated in Leu employed for minimal medium)

たロイシンに僅かではあるがイソロイシンが夾雑するためであることがわかつた。

そこで最後に上記有効なアミノ酸混合液から第6表のように1つ宛省略したものについて重ねて菌の生育を試験した。

Table 6. Auxanography of amino acid mixture.

| No. | His | Asp | Ileu | Val | Arg | Growth |
|-----|-----|-----|------|-----|-----|--------|
| 1   | —   | +   | +    | +   | +   | +      |
| 2   | +   | —   | +    | +   | +   | +      |
| 3   | +   | +   | —    | +   | +   | —      |
| 4   | +   | +   | +    | —   | +   | —      |
| 5   | +   | +   | +    | +   | —   | +      |
| 6   | +   | +   | +    | +   | +   | +      |

第5図から明白のようにイソロイシンまたはバリンの何れかが欠けても菌の生育は認められなかつた。またこの両者だけの混合物についても同じように菌の生

Table 5. Composition of amino acid mixture for auxanography.

| No. | 1   | 2   | 3       | 4   | 5   |
|-----|-----|-----|---------|-----|-----|
| 6   | Hyp | Met | Cys-Cys | Lys | Pro |
| 7   | His | Asp | Ileu    | Val | Arg |
| 8   | Phe | Tyr | Try     | Thr |     |
| 9   | Glu | Ser | Ala     | Gly |     |

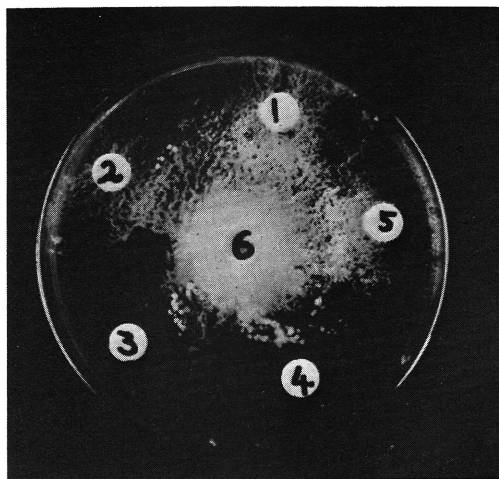


Fig. 5. Auxanography of active amino acid mixture.

Auxanography was carried out as in Fig. 1. Composition of amino acid mixture was cited in Table 6.

育が認められた。こうして福本菌の孢子からの生育にはイソロイシンとバリンの両者を必要とすることが確かめられた。しかしこれらのアミノ酸が孢子の発芽に必要なのかあるいは発芽初期にこの合成能が不十分なために補足しなければならないかはさらに検討しなければなら

ばならない。いずれにしてもロイシン、イソロイシン、バリンという分岐モノアミノ酸が福本菌の生菌ないし孢子の生育に必要な事は興味深い。

### 総 括

ロイシン要求性である福本菌の孢子からの生育に必要な因子を酵母抽出物で検索した。さらにアミノ酸混液の auxanography によって有効因子はイソロイシンおよびバリンであつてその何れを欠いても生育は認められなかつた。

研究に際し種々御助言をいただいた福岡大学薬学部渡辺健治助教授ならびに供試した菌株を頂戴した大阪市立大学福本寿一郎教授に感謝申し上げる。

(食糧化学教室)

### 文 献

- 1) 福本寿一郎, 山本武彦 (1957) 農化, **31**, 421.
- 2) Hachisuka, Y., Asano, N., Kato, N., Okajima, M., Kitaori, M., Kuno, T. (1955). J. Bact., **69**, 399.
- 3) 小島吉男, 桑畑克彦, 大村浩久 (1968). 九大農学芸誌, **23**, 135.
- 4) 小島吉男, 桑畑克彦, 大村浩久 (1969). 九大農学芸誌, **24**, 7.

### Summary

Leucine is the essential growth factor of a strain of amylase-producing bacteria, *Bac. subtilis* var. *amyloliquefaciens* FUKUMOTO K 49. However, some factor contained in the cell or yeast extract is additionally necessary for growth from spore of K 49. The factor was then explored in commercial powder of yeast extract. Active fraction was obtained by alcohol extraction followed with gel filtration through Sephadex G 15, 50 or 75 and presumed to be nucleoprotein by estimation of ninhydrin test and optical density. However, after phenol treatment of yeast extract according to the procedure preparing RNA, it was found that nucleic acid is not necessary for the growth.

Then auxanography for growth factor of spore of K 49 was carried out with amino acids and disclosed that both isoleucine and valine are indispensable for the growth and one of them could not be omitted.

Laboratory of Food Chemistry,  
Department of Food Science and Technology,  
Kyushu University