

Improvement of Nutritional Properties of Wheat Gluten Using *Achromobacter* Protease I

III. *In vitro* digestibility of modified wheat gluten

MASAMI YONEKURA and TETSURO NAKAYA

In order to evaluate the nutritional quality of modified wheat gluten which was enriched with L-lysine using *Achromobacter* Protease I, *in vitro* digestibility of the modified protein was investigated.

In vitro digestibility of the modified gluten by pepsin and trypsin were 85% and 66% of that of the unmodified gluten, respectively. On the other hand, the digestibility of the modified protein by pancreatin was 1.9 times that of the unmodified one.

The peptide patterns on high-performance gel filtration and reversed-phase high-performance liquid chromatography indicated that peptic digests of the modified gluten were similar to that of the unmodified protein, but tryptic and pancreatic digests of the modified gluten were not similar to those of the unmodified one, respectively. Furthermore, the modified protein was more rapidly degraded to smaller peptides by trypsin and pancreatin in comparison with the unmodified one.

These results suggest that *in vivo* digestibility of the modified gluten may be approximately equal to or greater than that of the unmodified protein, and the nutritional function of the modified protein may be different from that of the unmodified one.

In the final analysis, however, the nutritional quality of the protein must be established with feeding trials.

(Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ., No. 37, 85~94, 1989)

Azospirillum属細菌の抗生物質耐性株の分離とその性質

浅田芳宏・松前佳之

(1) 緒 言

近年、単生窒素固定菌の植物生産への利用が注目されるようになり、その生理学、生態学的研究も活発に行われるようになった¹⁾。その中で特に、植物に接種した細菌を植物根圏にいかにか定着させ得るか、この問題は植物生産にとって重大である。従って、接種菌の定着機構の解明は基礎的課題であると共に、応用面からも非常に重要な問題でもある。

前述の課題を遂行するためには、無菌植物あるいはその根を用いたモデル系を用いて、単一菌株あるいは二種以上の細菌を用いた混合系で、植物根への吸着とその増殖など細菌固有の能力、さらには、細菌の相互作用などを明らかにすることで定着機構解明への手がかりを得ることが可能となる。また、モデル系から一歩進んで自然系に近いものとしてポット実験などが必要となる。これらの実験を行う場合、主たる細菌の計数時に他の細菌株との識別が必要となる。その方法の一つとして、マーカーとして抗生物質耐性を供試菌株に附加することが有効である。

本研究では地球上に広く分布し、特に熱帯、および、亜熱帯で植物生産に実際に利用されている単生窒素固定菌Azospirillum属細菌を用いて²⁾、定着機構を解明しようとするものである。

本実験では、その前段階として、*Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*の抗生物質耐性株の分離を試み、さらに、それらの耐性株が今後の研究に用いるためには親株と同様の諸性質を有することが必要で

あるので、それらについて耐性株と親株を比較検討した。

(2) 実験方法

a) 供試菌株,

Azospirillum brasilense Sp 7 (ATCC 29145),
Azospirillum lipoferum IAM 12400を用いた。

b) 培養方法,

前培養は300ml容量三角フラスコにNF培地を100ml分注し、10分間、加圧、加熱(1.5kgf/cm², 120°C)で滅菌したものに保存用斜面培地*から1エーゼ接種し、2日間、30°Cで静置培養した。本培養は前培養と同様に行った。但し、接種は前培養を1ml接種した。NF培地の組成は1000ml当り、KH₂PO₄0.4g, K₂HPO₄0.1g, MgSO₄0.01g, NaMoO₄·2H₂O.002g, リンゴ酸ナトリウム塩0.5g, 酵母エキス0.05g, pH7.2である。*A. lipoferum*の培養時にはビオチンを10μg添加した。炭素源は必要に応じて、フラクトース,あるいは、グルコースを5g用いた。抗生物質の濃度は原則として100μg/mlで用いた。抗生物質の溶液は全てメンブレンフィルター(0.45μm)を用いてろ過し無菌化した。

c) 抗生物質感受性テストと耐性株の分離

NF培地で2日間、30°Cで供試株を前培養した後、同様の培地で本培養を3日間行った。その後、遠心集菌し、2mlの滅菌水に懸濁した。NF培地100mlに1.2%の寒天を添加した培地に前述の2mlの細胞懸濁液を手早く加え、プレートを作製した。各々濃度の抗生物質を吸収したペーパーディスクを用いて抗生物質感受性を生育阻止円形成により判定した。一方、本培養後、遠心集菌、洗浄

*培地組成はNFと同じ、寒天を1.0%添加した。

した後、約 $10^9 \sim 10^{10}$ 個になるように細胞懸濁液を調製した。その0.1mlをシャーレに採り、リファンピシン、または、エリスロマイシンを $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 含むNF寒天培地(寒天1.0%)を流し込み、 30°C で6~7日間培養した。出現したコロニーをNF培地のスラントに移植し保存した。耐性の再確認は抗生物質 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 含むNF培地5mlを $180 \times 18\phi\text{mm}$ 試験管に分注したものに、細胞懸濁液 0.05ml 接種して 30°C で静置培養を行った。培養期間は3~7日間で培養後、培養菌体を位相差顕微鏡を用いて、1500倍で形態、運動性、PHBの蓄積など親株と比較検討した。二重耐性株の分離は抗生物質を入れ換えて、前述の耐性株の分離法をくり返して行った。二重耐性株の再確認は $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のリファンピシン、エリスロマイシンを含む液体NF培地を用いて行った。耐性株の出現頻度、耐性の安定性、および、生菌数の計測などの検定は稀釈平板法により行った³⁾。

d) アセチレン還元能の測定法

3日間本培養を行ったものを集菌し、炭素源を抜いたNF培地で菌体を洗浄した。同培地に懸濁し、その2mlに炭素源として $25\text{mg}/\text{ml}$ 溶液を 0.5ml 添加し、総量 2.5ml を試験管($180 \times 18\phi\text{mm}$)に分注した。それにブチルゴム栓で三方コックを取り付け、試験管内を脱窒後、ヘリウムガスを30秒注入した。さらに、アセチレンガスを最終濃度10%になるように注入し、24時間、 30°C で反応させた。その後、気相の 0.3ml を採取し、Porapak Type Rを用いたカラム($4\phi\text{mm} \times 2\text{m}$)で生成したエチレンを測定した。 N_2 ガスのflow rateは $40\text{ml}/\text{min}$ 、カラム温度は 120°C 、島津ガスクロマトグラフィー(FID)を用いた。

e) 植物切断根への吸着実験法

種子の殺菌は $0.1\% \text{HgCl}_2$ で4分間、70%エタノールで1分間、10%サラシ粉液で20分間各々処理した後、発芽用寒天培地**上で、 30°C 、2~3日間発芽させた。発芽種子は試験管($25\phi\text{mm} \times 250\text{mm}$)、あるいは、 300ml 三角フラスコに石英砂(10~15M)を入れ、さらに、植物栽培用培地を加えて殺菌したものに植え換えて、昼温 25°C 、

夜温 22°C にて、 3000ルクス の光源下で無菌的に栽培した。栽培した植物根を切断し、乾燥重量で約 30mg 相当量の生根を 0.1M リン酸緩衝液 5ml ($\text{pH}7.0$)に入れ、それに集菌、洗浄した細胞懸濁液(0.05M , $\text{pH}7.0$, リン酸緩衝液)を 1ml 加え、2時間、 30°C で恒温槽中でゆるやかに振盪しながら吸着反応を行った。反応後、70%エタノールで殺菌したガラスフィルター上で、植物切断根を滅菌水で5回洗浄し、その後、約 7g のガラスビーズと 10ml の滅菌水を入れた試験管($25\phi\text{mm} \times 250$)に切断根を入れ、3分間激しく振盪して吸着した菌を根から遊離させた。その上澄液 0.5ml を採り、稀釈平板法により生菌数を求めた。また、切断根はすでに恒量を求めた 5ml のピーカーに移し、 105°C で一昼夜乾燥させて重量を求めた。

細菌の生育は培養液を直接、あるいは水で稀釈して、 660nm の吸光度を比色計で測定した。たま、乾燥菌体重量は細胞懸濁液を 105°C 一昼夜乾燥して求めた。

(3) 結果と考察

1) *A. brasilense*と*A. lipoferum*の抗生物質耐性株の分離

抗生物質耐性株の分離に当り、初めに11種の抗生物質に対するAzospirillum株の感受性を検討した。ペニシリン、アミノベンジルペニシリン、カルペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、カナマイシン、ゲンタマイシン、ナリジスク酸、スルフィソキサゾール、リファンピシンについて検討した結果、ペニシリン系では感受性は全く認められなかった。これに対し、エリスロマイシン、リファピシン、テトラサイクリン、カナマイシン、ゲンタマイシンに感受性を示した。特にエリスロマイシン、リファピシンに対し強い感受性を示した。次に最も強い感受性を示したエリスロマイシン、リファンピシンに対する自然突然変異耐性株の分離を*A. brasilense* Sp 7, *A. lipoferum* IAM 12400を用いて試みた。

抗生物質 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下の耐性株の出現頻度は*A.*

**0.5%酵母エキス、寒天1.0%, $\text{pH}7.0$

*brasilense*で $5 \sim 7 \times 10^{-9}$, *A. lipoferum*で $1 \sim 3 \times 10^{-9}$ であった。エリスロマイシン耐性株は*A. brasilense*で13株, *A. lipoferum*で8株分離され, リファンピシン耐性株は*A. brasilense*で12株, *A. lipoferum*で6株分離された。これらの株について更に抗生物質含有液体培地を用いて耐性の再確認を行うとともに, 細胞形態, 運動性, PHBの蓄積能などにより本菌の特性を示したもので選別した。次に, 抗生物質耐性のマーカーが復帰変異することで消失する可能性が考えられるので, 二重耐性株を誘導する必要がある。そこで, エリスロマイシン耐性株にはリファンピシン耐性株を, また, その逆の耐性株を得るために一連の分離操作を行った。その結果, *A. brasilense*ではNo. 10, No. 16, No. 17の3株が良好な

耐性を示す株として分離された。*A. lipoferum*ではNo. 1, No. 2, No. 3の3株が同様に分離された。これらの株について, 親株と同じ性質を有しているかどうか, アセチレン還元能, 生育能, 植物根への吸着能について以下比較検討した。

2) 抗生物質耐性株の性質

a) 生育特性

*A. brasilense*は炭素源としてグルコースを資化せず, *A. lipoferum*と異なっている²⁾。従って, 炭素源として, 糖はフラクトース, 有機酸はリンゴ酸を用いて生育特性を窒素源 (NH_4Cl) 存在, 非存在条件下で検討した。

親株*A. brasilense* Sp7の生育曲線を図1-A, Bに示した。窒素源非存在下での生育は, 炭素源としてリンゴ

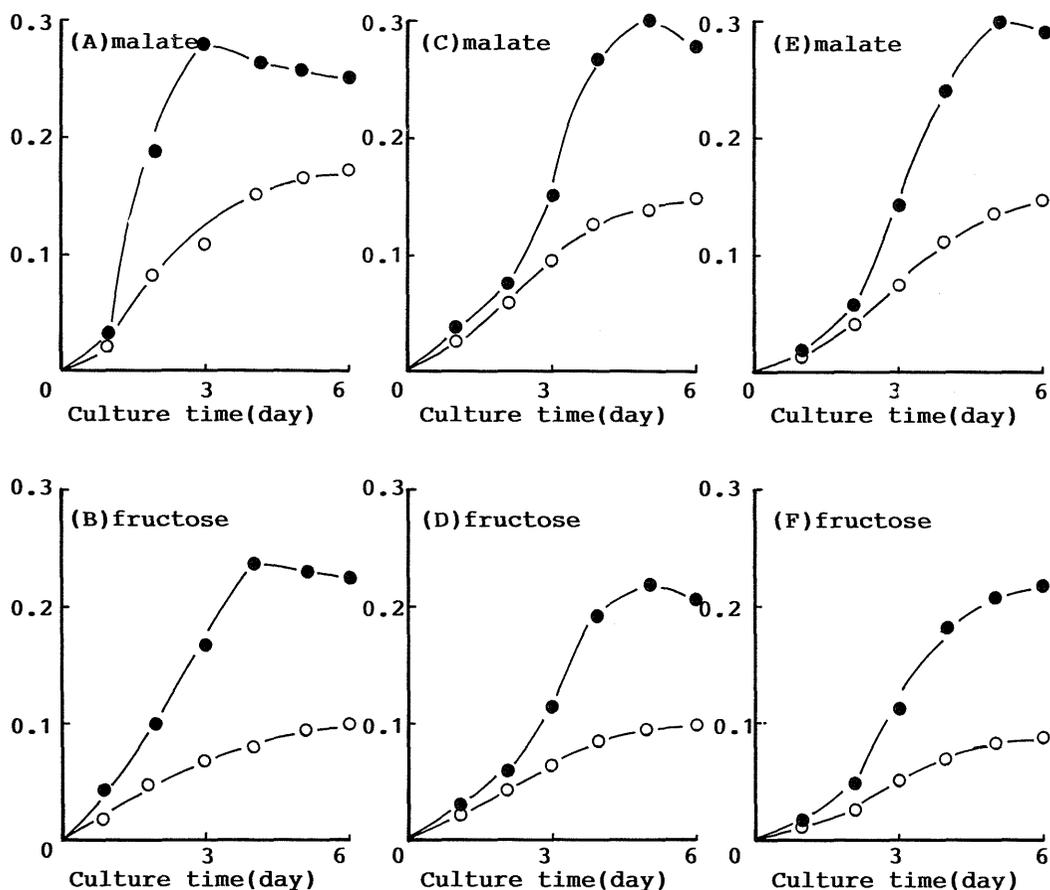


Fig. 1 Growth of *Azospirillum brasilense* Sp7(A, B), *A. brasilense* NO. 16(C, D) and *A. brasilense* NO. 17(E, F) on NF-medium(○) or NF-medium with 0.05% of NH_4Cl (●).

酸を用いた方が、フラクトースを用いたものに比べて良好であった。一方、窒素源の存在下で生育が促進される現象は、リンゴ酸、フラクトース両炭素源の場合に認められた。同様の実験を *A. brasilense* No. 16, No. 17 について行った (図 1-C, D, E, F)。No. 16, No. 17 株共に親株に比べて若干生育の立ち上りが遅れるが、全体的にみて生育曲線のパターン、および、塩化アンモンによる生育促進などほぼ同一と見なし得る結果であった。また、炭素源の違いによる生育曲線のパターンなど、変動も認められなかった。他方、*A. lipoferum* は炭素源としてグルコースを資化するので、リンゴ酸、フラクトース、グルコースの三種の炭素源についてその生育曲線を探求した。

A. lipoferum IAM 12400 の生育は窒素源非存在の場

合、リンゴ酸培地の生育が最も良好で、次にグルコース培地における生育であり、フラクトースではリンゴ酸培地の生育の約 1/2 に抑制されていた (図 2-A, B, C)。塩化アンモン添加は全ての場合、生育は促進されたが、特にリンゴ酸の場合においてその促進効果が大で他の約 2 倍以上であった。この様なパターンは *A. lipoferum* No. 1 株でも認められ、親株と同一であることが示された (図 2-D, E, F)。若干の差はあれ、*A. lipoferum* No. 2 (図 3-A, B, C), *A. lipoferum* No. 3 でも同様の結果が得られた (図 3-D, E, F)。

以上の結果から、*A. brasilense* No. 16, No. 17 株の生育特性は親株 *A. brasilense* Sp 7 と同一であると判断された。また、*A. lipoferum* No. 1, No. 2, No. 3 株についても *A. lipoferum* IAM 12400 と同様の生育特性を

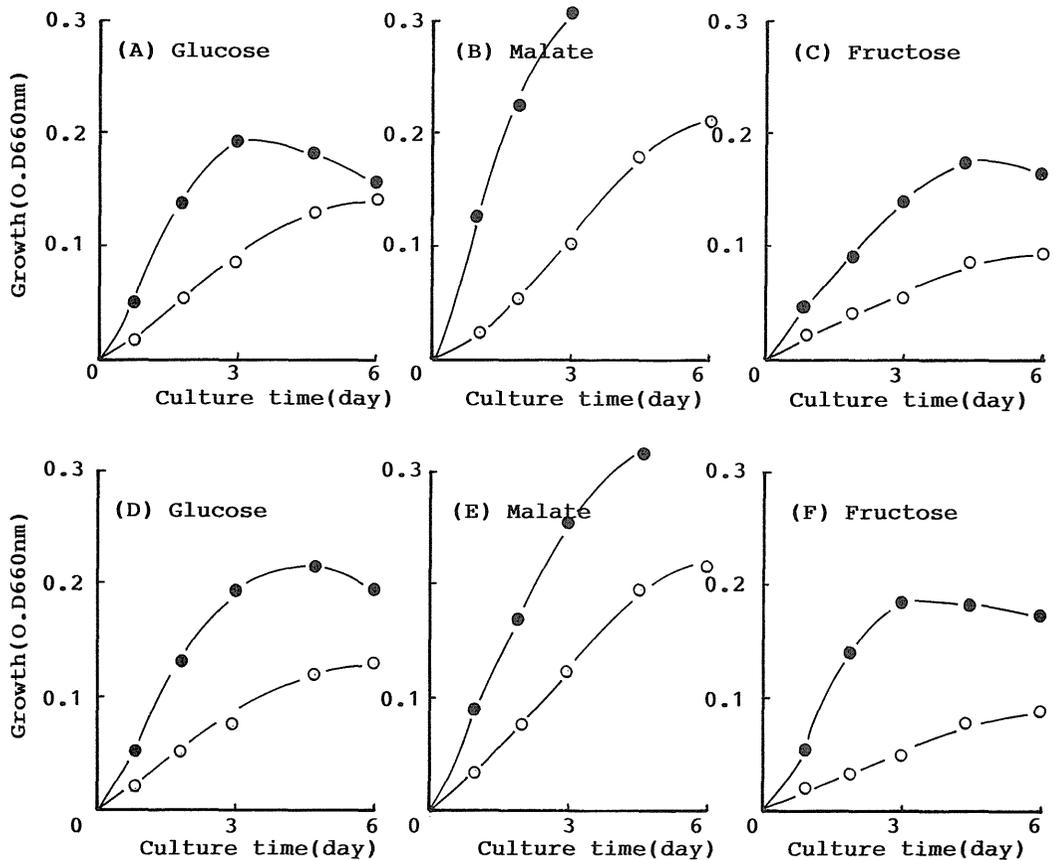


Fig. 2 Growth curves of *Azospirillum lipoferum* ATCC 21907 (A, B, C) and *Azospirillum lipoferum* NO. 1 (D, E, F) on NF-medium (○) or NF-medium with 0.05% of NH_4Cl (●).

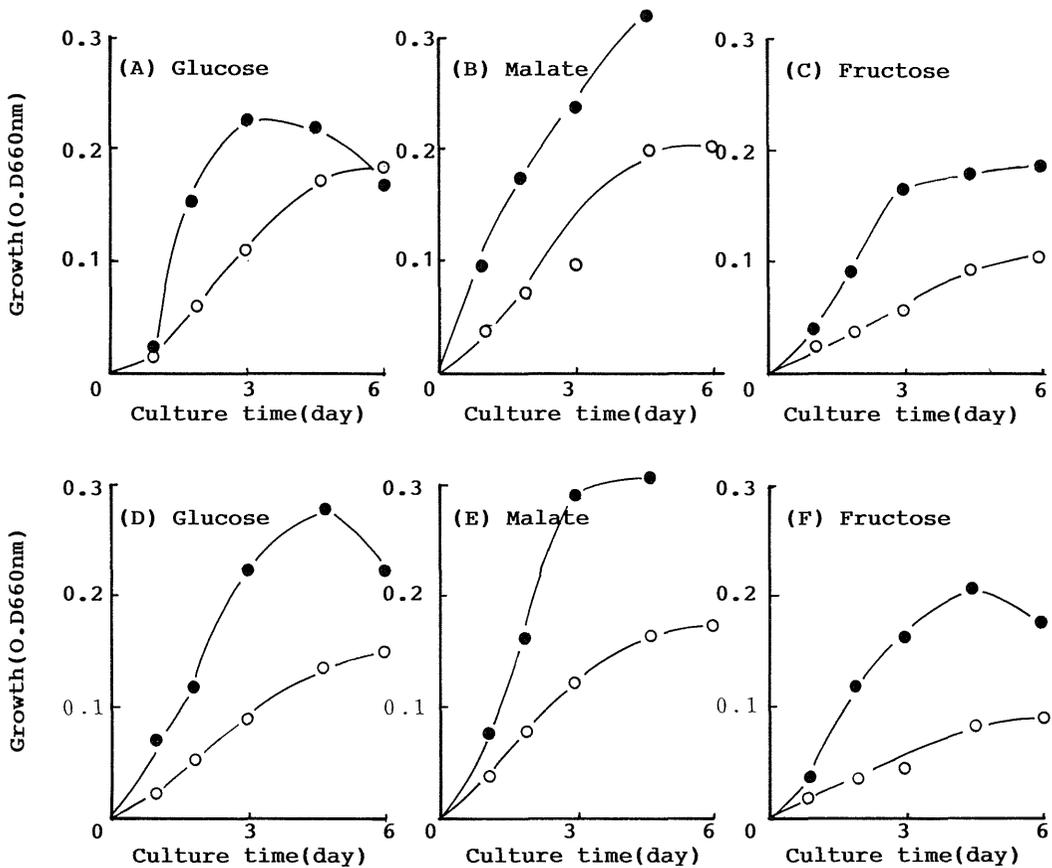


Fig. 3 Growth curves of *Azospirillum lipoferum* NO. 2(A, B, C) and *Azospirillum lipoferum* NO. 3(D, E, F) on NF-medium(○) or NF-medium with 0.05% of NH_4Cl (●).

認めた。

b) 窒素固定能 (アセチレン還元能)

リファンピシン、エリスロマイシン、二重耐性株の窒素固定能について親株と比較検討した。

A. brasilense Sp 7のアセチレン還元能 (ARA) は2.41nmol/mg/hrであるのに対し、No. 16, No. 17両株のARAは3.02, 3.26と近い値を示したが、No. 10の値は0.09と他の株に比べて異っていた(表-1)。一方、3株共、塩化アンモン存在下でそのARAは全て阻害された。

A. lipoferum IAM 12400のARAは1.30で耐性株のNo. 1は1.26, No. 2は3.44, No. 3株は1.61であった(表-1)。若干の差はあるものの全てのARAは塩化アンモンで*A. brasilense*株同様に阻害された。ARAで見ると

A. lipoferum No. 1, No. 3が*A. brasilense*ではNo. 16, No. 17株が各親株に類似していた。

c) 植物根への吸着能

植物根への定着機構を検討するに当たり、まず第一に植物根への吸着能は重要な要因と考えられる。そこで、第三の性質として親株を耐性株との比較検討を行った。トウモロコシ、陸稲、キャベツの無菌植物根を切断し、それぞれへの各菌株の吸着能を表-2に示した。トウモロコシ根への吸着能は*A. brasilense* Sp 7, No 16, No. 17共に $6 \sim 7 \times 10^9$ で、陸稲では $1 \sim 1.5 \times 10^9$ と各株ともほぼ同じ値を示した。キャベツではNo. 17株の値が 4.5×10^9 と他の2株に比べて低い値を示したが、全体的にみて菌株間での大きい差異は認められなかった。従っ

Table 1 Activity of acetylene reduction with various antibiotic resistant of *Azospirillum lipoferum* and *A. brasilense*

Strain	ARA (C ₂ H ₄ nmol/mg/h)	
	without NH ₄ Cl	with NH ₄ Cl
<i>A. lipoferum</i> IAM 12400	1.30	0.10
<i>A. lipoferum</i> NO. 1	1.26	0.20
<i>A. lipoferum</i> NO. 2	3.44	0.30
<i>A. lipoferum</i> NO. 3	1.61	0.05
<i>A. brasilense</i> ATCC 29145	2.41	0.15
<i>A. brasilense</i> NO. 10	0.09	0
<i>A. brasilense</i> NO. 16	3.02	0.20
<i>A. brasilense</i> NO. 17	3.26	0.30

Cells were grown on NF-medium. Incubation was carried out at 30°C for 24 hours and then ethylene produced in gaseous phase was measured by gas chromatography.

て、No. 16, No. 17両株共に親株と同じ吸着能を有すると判断された。

他方、*A. lipoferum* No. 1, No. 2, No. 3株のトウモロコシに対する吸着能は親株の値に比べて約1.5~2.0倍と強いが、キャベツの吸着能はほぼ同じ値であった。また、No. 1株を除いて、陸稲への吸着能はほぼ同じ値を示した。3株の植物に対する吸着能のパターンはほぼ3株とも同じであった。

d) 生菌数測定時における回収率

分離したリファンピシン、エリスロマイシン2重耐性株の植物根吸着能の判定時に両抗生物質存在下で生菌数を測定し、他の菌と区別して算出する必要がある。この場合、総菌数が生菌数として十分に回収されるためには抗生物質への安定性と回収率が問題となる。そこで、抗生物質存在下、3回植え継いだ菌株を用いて、5連で3回総菌数と生菌数を求めた。その結果を表-3に示した。

Table 2 Adhesion of *A. brasilense* and *A. lipoferum* to plant roots

Strain	Adhesion(bacteria x 10 ⁹ /mg dry roots)		
	Corn	Upland rice	Chinese cabbage
<i>A. brasilense</i> ATCC 29145	5.9 ± 0.2	1.27 ± 0.2	7.64 ± 1.3
<i>A. brasilense</i> NO. 16	6.7 ± 0.3	1.55 ± 0.07	7.85 ± 0.68
<i>A. brasilense</i> NO. 17	7.4 ± 0.3	1.02 ± 0.07	4.52 ± 0.36
<i>A. lipoferum</i> IAM 12400	4.52 ± 0.13	0.25 ± 0.02	7.41 ± 0.04
<i>A. lipoferum</i> NO. 1	6.59 ± 0.17	0.107 ± 0.006	6.9 ± 0.77
<i>A. lipoferum</i> NO. 2	8.79 ± 0.27	0.29 ± 0.012	8.54 ± 0.77
<i>A. lipoferum</i> NO. 3	8.05 ± 0.33	0.33 ± 0.003	6.45 ± 0.059

Table 3 Recovery of mutants on NF-medium with antibiotics

Strain	Total cell number ¹⁾	Cell number on NF+AB medium ²⁾	Recovery (%)
<i>A. brasilense</i> NO. 16	34.8 ± 4.2	18.1 ± 2.1	56
<i>A. brasilense</i> NO. 17	93.0 ± 1.33	94.1 ± 1.1	100
<i>A. lipoferum</i> NO. 1	28.0 ± 7.2	24.3 ± 5.6	87
<i>A. lipoferum</i> NO. 2	35.0 ± 3.6	35.0 ± 3.8	100
<i>A. lipoferum</i> NO. 3	52.4 ± 5.5	52.5 ± 4.8	100

1) x10⁸, NF-medium was used in experiments of counting total cell number.

2) NF-medium with 100μg/ml of antibiotics.

A. brasilense No. 16は総菌数に対する耐性株の生菌数の回収率は56%と低下し、復帰変異などによる不安定さが明らかになった。*A. lipoferum* No. 1も若干不安定であるが他の*A. lipoferum* No. 2, No. 3, *A. brasilense* No. 17株は安定で100%の回収率を得た。

以上の耐性株の諸性質について親株と比較検討した結果、総合的にみて、*A. brasilense* No. 17株と*A. lipoferum* NO. 3株が最適であると判明した。従って、以後の研究はこれら2株を用いることにした。

文 献

- 1) Skinner F.A. and P. Uomalea ed, Nitrogen Fixation with Non-legumes, 1986, Martinus Nijhoff Publishers.
- 2) Krieg N.R. and J. Döbereiner, Azospirillum, p. 94, N.R. Krieg and J.G. Halt, ed., Bergey's manual of Systematic Bacteriology, vol 1, 1984, Williams and Wilkins Co.
- 3) 微生物研究法懇談会編, 微生物実験法, p. 199, 1982, 講談社サイエンティフィック.

Isolation and Characterization of Antibiotic Resistant

Mutants of Azospirillum

YOSHIHIRO ASADA and YOSHIYUKI MATUMAE

Departement of agricultural chemistry, Faculty of agriculture, Ibaraki university

For measuring real viable cell number of Azospirillum in experiments of mixed inoculation or culture, it is necessary to distinguish Azospirillum from other bacteria.

Thus, we have isolated two mutants of *A. brasilense* and three mutants of *A. lipoferum* which were resistant to rifampicin and erythromycin. It was examined whether or physiological characters of these rif^r, ery^r mutants were basically same as those of parent strains, *A. brasilense* ATCC 29145 and *A. lipoferum* IAM 12400. Then, it was confirmed that mutants have same characters as those of parents: ability of adhesion to plant root, growth pattern, carbon assimilation and nitrogen fixation were same in mutants and parents.

Therefore, it could be possible to use these mutants in experiments of mixed inoculation or culture.