

非天然型糖質の微生物分解に関する研究

II. 微少熱量計を用いた、土壌中での非天然型
単糖類の微生物による分解速度の測定

何森 健, 梅村昭男

MICROBIAL DEGRADATION OF UNNATURAL CARBOHYDRATES.

II. Calorimetric studies on microbial degradation of
unnatural carbohydrates in soil.

Ken IZUMORI and Akio UMEMURA

Using the microcalorimetry, we studied the microbial degradation of unnatural carbohydrates in soil. Unnatural carbohydrates were degraded more slowly than natural ones. Degradation thermogram of formose that contains many kinds of natural and unnatural carbohydrates showed broad shape. It seemed that about 24% of formose added was consumed by soil microbes.

土壌中の微生物による非天然型単糖類の微生物分解の速度を微少熱量計を用いて測定した。各種の土壌で分解の速度はことなるが一般的に非天然型の糖質は天然型に比較して明かに遅れて分解される傾向が認められた。

天然型と非天然型の糖質の混合物であるホルモースの測定結果は、両者にまたがった複雑なサーモグラムをあたえた。これは構成する複雑な糖質の存在を示し、その約24%が分解されると推測することができた。

結 言

Mortlock 等^(1,2)の研究に代表されるように、微生物が各種の非天然型の有機物質に対して生育能力を獲得する現象について研究が進み、その機構が少しずつ明らかになってきている。これらの研究が発展すると、微生物の進化のメカニズムに関する知見が得られるばかりでなく、微生物からの新しい酵素の発見や利用につながると期待される。

前報⁽³⁾においては各種土壌中のペントース資化性菌の数と、土壌微生物によるペントースの分解速度に関して従来の微生物学的手法をもとに行い、天然型および非天然型のペントースの微生物による分解速度およびそれぞれを分解する微生物の数を比較検討した。その結果、それぞれを単一炭素源とした培養液に土壌を添加した場合、非天然型のペントースの方が分解される速度は遅いことが認められた。一方希釈法で測定した分解菌の数はいずれもほぼ同数であり、土壌中での微生物の有機物分解現象は単純な系による実験のみでは明確に追跡できないと考えられた。すなわち従来から用いられている一般的な微生物学的手法のみでは土壌中における微生物によるペントースの分解を正しく評価するには不十分であると思われる。そこで本研究においては、新しい手法として微少熱量計をとりあげ検討したのでその結果について報告する。

微少熱量計を用いる微生物の活性測定によって、従来の微生物学的手法では不可能な情報を得ることができる。熱測定による研究では、固体培地での微生物の生育を連続的に追跡できることが最も有利な点であり、従来の手法では不可能であった。高橋等は微少熱量計による微生物の生育の測定に関して研究を進め、その計測機器の開発を行い理論的な検討を行った^(4,5)。開発された6点式微少熱量計を用い、土壌中における各種単糖類や有機物の微生物分解過程

を詳細に検討し、理論的にもこの方法の有効性を確認している。

本研究では特に8種のペントース、4種のペンテトールおよび各種のヘキソースに注目し、その各種の土壌中での分解速度を測定することによって天然型と非天然型の単糖類の微生物分解速度を評価しようとした。またホルマリンを原料としホルモース反応によって得られ、天然型と非天然型糖質を含む多種多様な糖質からなるホルモース^(6,7)を取り上げ土壌微生物による分解の経過の追跡を試みた。

実験方法

1. 試 薬

糖質は全てSigma社製を硫酸は和光純薬社製の特級を用いた。ホルモースは静岡大学農学部の水野博士からいただいた混合糖のホルモースを用いた。

2. 土壌中での微生物による糖質分解熱の測定方法

発生する熱量は日本医化器械製六点式の微少熱量計を用いて連続的に測定した。容量20 mlのスクリュウキャップ付きのバイエルに土壌10 gを入れ、10 mgの硫酸および各種の糖質10 mgを含む3 ml水溶液を添加し30℃で測定した。ホルモースの分解の測定には約35 mgを用いた。

実験結果

1. 土壌中での微生物による8種ペントースの分解速度の測定

前報で用いた各種の土壌について8種のペントースの微生物による分解経過を測定した。

庭、校庭の土壌、山土などについて測定した。用いる土壌によって得られるサーモグラムは異なっていたが、8種のペントースの分解の順序はほぼ同一であった。すなわち分解の速度やサーモグラムの形には相違が見られたが、それぞれのペントースの分解の順序はほぼ同じであった。典型的な結果として農学部校庭の土壌の結果を図1に示した。縦軸は発生する熱量を出力の μV で表示した。

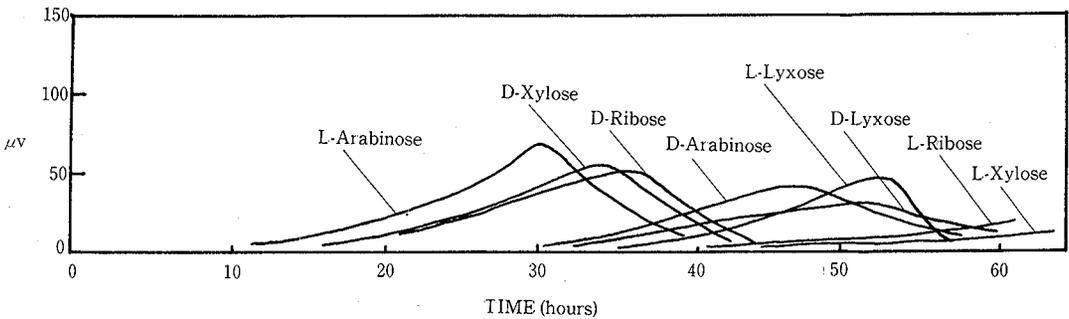


Fig 1 Degradation thermograms of eight pentoses in soil at 30°C.

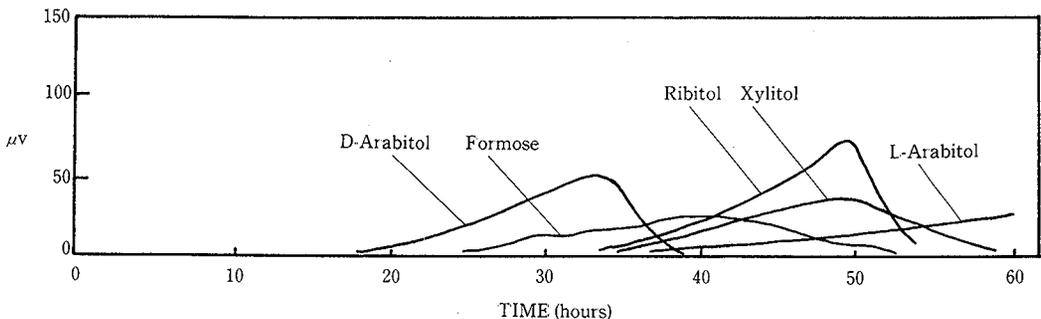


Fig 2 Degradation thermograms of four pentitols and formose in soil at 30°C.

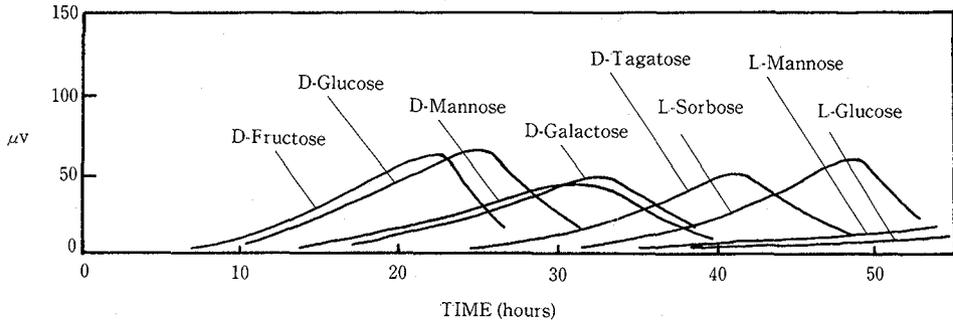


Fig. 3 Degradation thermograms of various hexoses in soil at 30°C.

天然型のペントースである L-アラビノース, D-キシロース, D-リボースは比較的速く分解が見られ, 非天然型の D-アラビノース, L-リキソース, D-リキソースの分解がこれに続いて分解された。最も分解されにくいものとして同じく非天然型の L-キシロース, L-リボースがゆっくりと分解された。

2. 土壌中での微生物による 4 種のペンチトールおよびホルモースの分解速度の測定

ペンチトールの場合も同一の条件で測定をおこない, その結果を図 2 に示した。天然型の D-アラビトールが最も速く分解が見られ, 続いてリビトール, キシリトール, L-アラビトールの順に分解が進んだ。ホルモースの場合は天然型と非天然型とに連続して発熱の山が見られその構成糖の複雑さを示しているようである。

3. 土壌中での微生物による各種ヘキソースの分解速度の測定

同様の測定条件で各種ヘキソースについて測定した結果を図 3 に示した。天然型の D-フラクトース, D-グルコース, D-マンノース, D-ガラクトース, 続いて非天然型の D-タガトース, L-ソルボースが分解された。L-グルコース, L-マンノースの分解速度は非常に遅いことが明らかとなった。

考 察

一般に自然界に多量に存在し広く分布している有機物を天然型, ほとんど存在しないかあるいは, 特殊な生物に少量局在するものを非天然型と分類することができる。本実験で示した結果から単糖類の土壌中での微生物による分解速度は, 天然型の方が明かに速いことが示された。これは前報で液体培養による通常の微生物学的手法による結果とほぼ同じ傾向であった。すなわち天然型の糖質は約 35 時間までに分解され, 非天然型のものは 40 時間以上後に分解された。分解に要する時間のみからその微生物分解の機構等を推測することは危険である。しかも得られるサーモグラムは, 代謝系も異なると予想される多種類の微生物による分解の総和として表れるので単純に解析することは不可能である。また土壌そのままの状態での微生物による糖質の分解過程を追跡しているため, 土壌粒子の中で個々の微生物が孤立して存在していると考えられ微生物間の相互作用の有無も不明であることなど複雑な要素が考えられる。

しかし自然の土壌中での各種の糖質の微生物分解速度について天然型, 非天然型という分類を行い比較すると, その分解速度に明かに差が認められることだけは確かである。前報で報告したごとく土壌中に存在する各種単糖類を分解する微生物の菌数はほぼ同数であること, および今回の結果を考慮すれば, 非天然型の糖質の分解にはいわゆる「試験管内での変異」とでも言えそうな現象が起きている可能性は否定できないと思われる。これらの機構を明確にするには, 前報で D-リキソース, L-リキソースについて検討したような個々の非天然型糖質の分解機構を詳細に検討する必要がある。

ホルモースのサーモグラムは天然型と非天然型の糖質の分解と重なった位置にその山が表れ, その中に存在する糖質の複雑な組成がうかがわれる。サーモグラムの面積測定から概算して, D-グルコースからの発熱量を 100 とするとホルモースの場合は約 24 となりホルモースの中で約 24% が土壌微生物によって分解されやすいことを示している。これはホルモースの中には微生物によって比較的容易に分解されうる糖質が約 24% 存在することを示しており, 残りの約 76% は分解されにくいものであると推測される。ホルモースの土壌中での微生物分解のように分解される基質も分解する微生物も複雑な系である場合は微少熱量計による評価以外に適当な手法は現在のところ見当たらない。

以上のように微少熱量計を用いた実験によって土壌中での天然型, 非天然型の単糖類の分解速度を比較することが

可能であった。今後微少熱量計を用いた実験結果と単一分離した微生物の個々の非天然型糖質に関する代謝酵素系の特徴を詳細に比較検討することによって、自然界に起こっていると予想される巧妙ないわゆる「試験管内での進化」に属する現象を適確に把握できると期待される。

謝 辞

微少熱量計の分析方法に関する種々の有益なご助言をいただいた大阪府立大学農学部高橋克忠博士に感謝いたします。ホルモースを譲っていただきました静岡大学農学部水野卓教授に感謝いたします。

引 用 文 献

- (1) E. J. Oliver and R. P. Mortlock. *J. Bacteriol.* **108**: 287 (1971).
- (2) E. J. ST. Martin and R. P. Mortlock. *J. Mol. Evol.* **10**: 111 (1977).
- (3) 何森 健: 香川大学農学部学術報告, **38**: 5 (1986).
- (4) K. Takakashi. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 2743 (1973).
- (5) T. Kimura and K. Takahashi. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 3083 (1985).
- (6) 上野 卓: 化学と生物, **10**: 314 (1972).
- (7) 重政好弘: 有機合成化学, **36**: 667 (1978).
(1987年5月30日受理)