AICA-riboside の醗酵生産に関する研究 (第 5 報)

酪酸による孢子形成抑制の作用機作について

木下一幹, 安永昌博, 酒井 迪, 城 照雄

(味の素株式会社中央研究所)

昭和 43 年 12 月 27 日 受 理

Studies on the Fermentative Production of AICA-riboside

Part V. On the Control Mechanism of Butyric Acid to Sporulation

By Kazumoto KINOSHITA, Masahiro YASUNAGA, Susumu SAKAI and Teruo SHIRO

Central Research Laboratories of Ajinomoto Co., Inc.

It was shown in a previous paper that some reagents had been selected for control of sporulation without inhibition of AICA-riboside production. Among these reagents, butyric acid was expected to be used at commercial plant by virtue of the economical price and the easiness of treatment.

Because of this, it was necessary for us particularly to know the control mechanism of butyric acid to sporulation in the fermentation.

The experimental results indicated that the butyric acid was not decomposed and assimilated in the fermentation, that it had the effect on sporulation only when being existed at the latter half of log phase, and that it inhibited the endogenous oxygen uptake of washed cells harvested at 10 hr culture.

In view of results described above, as to antisporeforming action of butyric acid, it could be suggested that the oxidative reactions for sporulation were controlled by the adsorption of a small portion of butyric acid on cells in the culture broth. So the excessive addition of butyric acid would have caused not only the control of sporulation but also the inhibition of AICA-riboside production.

(Received December 27, 1968)

緒 言

前報⁽¹⁾において、培養中の孢子形成を抑制して AICA-riboside 醗酵を正常に行なわせるためには低級脂肪酸、界面活性剤、抗生物質を添加する方法が有効であることを述べ、さらに著者らはこれら孢子形成抑制剤の中から実用性を考慮に入れて検討したすえに酪酸を用いることに決めた。本報では、培地中に添加された酪酸がどのようにして孢子形成抑制効果を示すものか検討した結果を述べる。

低級脂肪酸の微生物に対する作用については Wyss ら⁽²⁾の報告があり、とくにプロピオン酸については低毒性の抗微生物薬剤として食品に使用されるため、その作用機作については詳細な研究がなされているようである⁽³⁾。しかし酪酸が孢子形成に及ぼす影響を醗酵の場で検討した例は未だ見られない。

実 験 方 法

1. 使用菌株 *Bacillus megaterium* MA 336 (AT CC 15117)⁽⁴⁾。

2. 培養方法 前報⁽⁴⁾に従って行なった。洗浄菌体を用いる実験には培養 10 時間目の培養液から集菌し、0.5% 塩化カリ溶液で 2 回洗浄したものを用いた。

3. 分析方法 孢子形成率、菌の生育、グルコース、AICA-riboside は前報⁽⁴⁾に従って行なった。酪酸の定量は次のように行なった。すなわち、培養液 100 ml を遠心分離により上清と菌体に分けて、菌体は純水で 3 回洗浄して洗浄液と上清を合わせて硫酸酸性で水蒸気蒸溜する。溜分 500 ml を 5N 苛性カリで pH 7.2 に調節した後、5 ml になるまで減圧濃縮する。濃縮液を 5N 硫酸で pH 1~2 に調節し、2 倍量のエーテルで 4 回抽出する。抽出液を窒素ガス気流下で濃縮し正確に 20 ml にす

る。これを試料にしてガスクロマトグラフィ-⁽⁵⁾により定量した。回収率は 96~98% であった。

ポリヒドロキシ酪酸の分析は Law & Slepecky の方法⁽⁶⁾に従った。

菌体の酸素吸収速度はワルブルグ検圧法により行なった。

実験結果および考察

1. 酪酸の添加量の影響

酪酸を培養開始時から添加した場合、それが醗酵に及ぼす影響は Table I に示すようになる。AICA-riboside 醗酵に対する酪酸の至適量は 0.2~0.3 mg/ml で、この添加量るとき胞子形成も抑制され、菌の生育、グルコースの資化、AICA-riboside の蓄積は正常に行なわれる。この量より少ないと胞子が形成され、多量に添加すると菌の生育、AICA-riboside の蓄積までも阻害される。ただしグルコースの資化性だけは酪酸によって阻害されないことは興味深い。このときの培養液にはグルコースの酸化生成物であるグルコン酸が多量に蓄積していることを別の実験で確認している。

Table I. Influence of Butyric Acid Concentration on Spore Formation and AICA-R Fermentation

Butyric acid mg/ml	Spore formed %	Growth O. D.	Residual glucose g/l	AICA-R produced g/l
0	60	0.66	12.2	12.0
0.1	40	0.64	8.0	12.2
0.2	5	0.63	7.6	13.4
0.3	0	0.64	7.2	13.2
0.5	0	0.65	7.2	11.9
1.0	0	0.50	7.0	8.0
3.0	0	0.35	5.6	0.9

Fermentation was carried out at 31°C for 68 hr. Butyric acid was added at zero time.

2. 酪酸の存在時期の影響

次に添加された酪酸が培養中のどのような時期に存在すれば胞子形成抑制効果を示すか検討した。方法は酪酸を添加した培養と添加しない培養とを同一条件で並行して行なって、設定した培養時間に2つとも無菌的に培養液を遠心分離して、各々菌体と上清に分ける。菌体は速やかに 0.5% KCl で2回洗浄し、菌体と上清をたがいに組み替えて培養液とする。さらに醗酵を続ける。このよ

Table II. Influence of the Period Containing Butyric Acid in Culture Broth on Spore Formation and AICA-R Fermentation

Butyric acid mg/ml	Culture time, hr				Spore formed %	Growth O. D.	Residual glucose g/l	AICA-R produced g/l
	0	10	15	68				
0					40	0.62	15.6	11.8
0.3					0	0.64	5.6	14.4
0.3					0	0.58	4.8	13.8
0.3					30	0.59	4.2	10.0
0.3					40	0.62	5.0	11.3
0.3					40	0.58	12.0	12.2
0.3					40	0.60	13.2	12.0
0.3					0	0.61	9.9	14.9
0.3					5	0.59	9.2	14.6
3.0					0	0.35	5.6	1.1
3.0					40	0.64	5.9	6.2
3.0					20	0.38	31.8	5.5
3.0					5	0.52	3.7	13.6

■ Butyric acid was contained in culture broth.

うな方法で種々の培養時間の菌と上清の組み替え実験を行なって Table II に示すような結果を得た。この結果から注目されるのは培養 10 時間および培養 15 時間における組み替えの実験で、このときの菌の状態は培養 10 時間では生育が対数増殖期の中頃で、まだ胞子は顕微鏡により認められない。培養 15 時間では生育もほぼ定期に達した頃で胞子が認められる時期である。この時期に注目して酪酸 0.3 mg/ml 添加区をみると、酪酸が培養始めから培養 15 時間、あるいは培養 10 時間から培養終了時まで培地中に存在すれば胞子形成抑制効果があることが判った。さらに、この事実は培養 10 時間から培養 15 時間の短い時間に限って酪酸が培地中であっても胞子形成は抑制されるという推察を容易に示唆する。この実験を行なったところ、確かに短時間の存在で抑制効果を示すことが判った。このことを確認するために AICA-riboside 生成に阻害的である酪酸 3.0 mg/ml 添加で同様な実験を行なった。培養開始時から培養 10 時間まで、あるいは培養 15 時間以後に酪酸が存在しても胞子形成が抑制されず、菌の生育阻害、AICA-riboside の蓄積阻害を起こすにすぎない。しかし培養 10 時間から 15 時間に限って存在するときには胞子形成が抑制され、しかも発酵は正常に進む。これらの実験から胞子形成に対する酪酸の抑制作用は培養中のある時期に限って働いていることが明らかになった。いいかえれば醗酵は菌の生育期、不確定胞子形成期⁽⁷⁾、AICA-riboside 生成期の3つに区分され、不確定胞子形成期に胞子形成制御法を適用すれば AICA-riboside 生成にほとんど影響を与えないで胞子形成を抑制できるであろうという重要な知見を得た。

Fig.1. Change in Butyric Acid Concentration during AICA-R Fermentation.

Fermentation was carried out at 31°C for 68 hr. Supernatant of culture broth was analysed.

3. 添加酪酸の培養液中における挙動

添加した酪酸が菌によってどのような変化を受けるか、胞子形成抑制機作を推察するために必要であったので培地中の酪酸濃度を分析した。Fig. 1 に示したように、添加された酪酸は培養終了時にも、添加量がほとんどそのまま培地中に残っていて減少量は僅かに 0.02~0.04 mg/ml であった。別に酪酸無添加の培養を行なって、この菌による培養中の酪酸の副生を調べたが、ガスクロマトグラム上で検出できなかった。

以上の結果から、添加された酪酸は菌によって分解あるいは取込まれることはないことが明らかになり、このため、酪酸が菌体内の酵素反応を直接阻害するのではなく、菌体表面に作用し、間接的に菌体内の胞子形成を抑制するものと考えた。

4. Replacement culture における酪酸の胞子形成抑制効果

栄養型菌の代謝は培養 10 時間頃に胞子形成の代謝へ転換しようとする不安定な時期になる。この時期に酪酸が培地中に存在すれば胞子形成が起こらないことはすでに述べた。しかし、これらの知見はいずれも培養系による実験から得られた結果で、胞子形成に対してはより単純な系で確認することが必要と考え、洗浄菌体を滅菌水に懸濁し、好氣的に振盪する replacement culture 法で酪酸の胞子形成抑制効果を検討した。Table III に示したように、酪酸を添加しなければ菌体はすべて胞子化

Table III. Influence of Butyric Acid on Spore Formation in Distilled Water

Treatment	Conc. mg/ml	Spore formed		PHB* in cells** mg/1 g DCW
		8 hr %	24 hr %	
Control		100	100	45
Butyric acid was added {	0.5	0	60	
	3.0	0	20	146
Anaerobic condition by N ₂ gas		0	0	135

* Poly hydroxy butyric acid, determined by the spectrophotometric method of Law and Slepecky.

** After shaking for 8 hr.

10 hr cultured washed cells (120 mg DCW/20 ml distilled water, pH 6.5) were shaken at 31°C for 24 hr.

する。一方、酪酸を添加すれば菌の胞子化は抑制され酪酸が胞子形成の代謝を抑制していることが判る。ただし培養系と異なり長時間の反応により胞子化が起こるが、これは反応液にグルコース等のエネルギー源がないため⁽⁸⁾菌体内の代謝が不可逆的に胞子形成へ進むものと考えられる。別に酸素供給を行わない実験も行なったが Foster らの報告⁽⁸⁾にあるように、酸素欠乏状態では本菌も胞子形成が行なわれなかった。さらに *Bacillus megaterium* の胞子形成に関係していると報告⁽⁹⁾されている polyhydroxybutyric acid の定量を行なったところ、乾燥菌体量 1 g につき反応開始時に 225 mg あったものが胞子を形成した場合 45 mg とほとんど分解したのに対し、酪酸添加区、酸素欠乏区では 140 mg と分解が少ないことが判った。polyhydroxybutyric acid の分解は酸化反応とされているが、酪酸もまた菌体内の酸化反応を抑制するのであろうと考えた。

5. 酪酸による菌体内酸化反応の抑制とその可逆性

酪酸が菌体内酸化反応を抑制するという推察を確認するため、検圧法により内因性酸素吸収の酪酸による抑制を測定した。Table IV にその結果を示した。酪酸が菌体内の内因性酸素吸収を抑制することは明らかである。その抑制度は pH により変わることも判った。この点に関しては、一般に有機酸の菌体に対する作用がその未解離分子によるといわれる⁽¹⁰⁾ことと一致するようである。酪酸の解離恒数は 1.52×10^{-5} であるから pH 5.8 では中和されてない未解離の酪酸分子が存在し、pH 7.0 ではほとんど中和されて未解離分子がなく、この量の差によって酸素吸収の抑制に pH の違いが出ると考えられる。

Table V には酪酸による内因性酸素吸収の抑制が可

Table IV. Inhibition of Butyric Acid on Endogenous Oxygen Uptake

Butyric acid mg/ml	Endogenous O ₂ uptake μl/60 min		
	pH 5.8	pH 6.4	pH 7.0
0	163	171	164
0.5	124	153	144
1.0	112	146	140
2.0	91	136	132
3.0	82	129	131

The oxygen uptake was measured manometrically at 31°C.

Reaction mixture: 10 hr cultured washed cells 2.5 mg (DCW), 1/10 M phosphate buffer 1.5 ml, butyric acid solution 0.5 ml, 20% KOH 0.2, total volume 2.7 ml.

Table V. Reversibility of the Inhibition on Endogenous Oxygen Uptake

Treatment	Butyric acid (pH 5.8) mg/ml	Endogenous O ₂ uptake μl/60 min
Control	0	124
	2.0	80
Pre contact*	0	138
	1.0	109
	2.0	96
	3.0	73

The experimental condition as is used in Table 4. (buffer was used at pH 5.8)

* 10 hr cultured washed cells were mixed to 8.8 mg/ml of butyric acid (pH 5.8) at 31°C for 60 min the cells were separated and washed with distilled water.

逆的であることを示した。あらかじめ 9 mg/ml の酪酸を菌と接触させて酸素吸収を抑制しても遠心分離による洗浄によってその抑制は解除され、酪酸を添加すれば再び抑制される。この結果は菌体と酪酸の結合が非常に弱いことを示唆するもので、さきに培養実験でえられた酪酸が菌体に取り込まれて作用するのではなく、菌体表面に吸着して作用を及ぼすという推察を支持する。

6. 飽和脂肪酸の内因性酸素吸収の阻害性

酪酸が菌体の内因性酸素吸収を抑制することが明らかになったので、前報で検討した飽和脂肪酸について同様に酸素吸収の抑制度を測定し孢子形成抑制能との関係を検討した。脂肪酸は 0.3 mg/ml を培養開始時から添加して培養し、24 時間培養時の孢子形成率を測定、一方、培養 10 時間目の菌を集菌し、この洗浄菌体について添加脂肪酸の酸素吸収抑制を測定した。Table VI にその結果を示した。酸素吸収の抑制性と孢子形成抑制性の関係が明らかになり、炭素数が 3 から 9 までの脂肪酸は菌体

Table VI. Relation of Endogenous Oxygen Uptake to Spore Formation in the Fatty Acid Inhibition

Fatty acid (0.3 mg/ml)	Endogenous O ₂ uptake μl/60 min	Spore formed %
Control	100	40
Acetic acid	124	50
Propionic acid	76	0
Butyric acid	72	0
Valeric acid	73	0
Caproic acid	80	0
Heptyric acid	86	0
Caprylic acid	82	0
Pelargonic acid	82	0
Capric acid	101	30
Lauric acid	100	30
Myristic acid	101	20
Palmitic acid	102	40
Stearic acid	101	30

Fermentation was carried out at 31°C for 68 hr. Spore formation in culture broth was counted and oxygen uptake was measured as is used in Table 4.

の内因性酸素吸収を阻害し孢子形成を抑制したが、炭素数 10 以上の脂肪酸には酸素吸収および孢子形成に対し何らの作用も示さなかった。

要 約

(1) 添加された酪酸は培養中、菌によって分解、同化されないことを明らかにした。

(2) 培養が生育期、不確定孢子形成期、AICA-riboside 生成期に三分されることを明らかにし、孢子形成を抑制するためには不確定孢子形成期に酪酸が存在すれば十分であることを明らかにした。

(3) Replacement culture においても酪酸は孢子形成を抑制することを明らかにし、酪酸の菌体に対する作用は菌の内因性酸素吸収を抑制することであると推察した。すなわち、酪酸は菌に対し酸化反応を抑える作用をもっていて、その抑制度は添加量によって制御できて、酪酸による抑制に感受性の強い反応が孢子形成に関係する部分と考えられる。したがって添加量を多くすれば AICA-riboside 生成に関係する酸化反応も抑制されて AICA-riboside の蓄積がなくなるのであろう。

(4) 酪酸で観察された内因性酸素吸収の抑制と孢子形成抑制能との関係が他の飽和脂肪酸についても観察された。

終りに臨み、御懇篤な御指導を賜った東京大学山田浩

一教授, 大阪大学奥貫一男教授に深く感謝いたします.

-
(1) 木下一幹, 酒井 迪, 安永昌博, 佐々木弘, 城照雄: 農化, 43 , 404 (1969).	(5) L. V. Packett <i>et al.</i> : <i>Appl. Microbiol.</i> , 13 , 22 (1965).
(2) D. Wyss <i>et al.</i> : <i>Arch. Biochem.</i> , 7 , 415 (1945).	(6) J. J. Law <i>et al.</i> : <i>J. Bacteriol.</i> , 82 , 33 (1961).
(3) F. E. Samson <i>et al.</i> : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 54 , 406 (1955).	(7) 蜂須賀養悦: 芽胞, 岩波書店, 71 (1962).
(4) 木下一幹, 西山 徹, 釣 治夫, 小西真八, 城照雄, 岡田 弘: 農化, 42 , 523 (1968).	(8) J. W. Foster <i>et al.</i> : <i>J. Gen. Physiol.</i> , 35 , 907 (1952).
	(9) R. A. Slepecky <i>et al.</i> : <i>J. Bacteriol.</i> , 82 , 37 (1961).
	(10) E. S. Barron <i>et al.</i> : <i>Arch. Biochem.</i> , 29 , 130 (1950).
-