

306. ストレプトマイシンの生合成

(第6報) ストレプトマイシン前駆体をストレプトマイシンに転換する酵素の精製ならびにその性質

広大, 工, 醸酵 ○浄原 法蔵, 新見 治
能美 良作

目的 *S. griseus* によるストレプトマイシン (SM) 生合成経路上の中間物質 (L 成分: 既報) を SM に転換する酵素の精製と性質を究明することを目的とす。

方法 28°C, 24時間振盪培養した *S. griseus* の菌体を超音波で磨砕し, CM-cellulose イオン交換体を通過させて不純物を除く。次いで60%飽和硫酸塩析, Tris 緩衝液中で透析後 DEAE-cellulose イオン交換体に吸着させ, NaCl を含む Tris 緩衝液で gradient elution chromatography を行ない活性画分をうる。

結果 上記透析後に酵素比活性は2~3倍に上昇しさらに DEAE- イオン交換体クロマトグラフィーでの1% NaCl (Tris 緩衝液中) 溶出区分で十数倍に上昇した。

この酵素は $Mg^{2+}(10^{-2}M)$ または $Co^{2+}(10^{-3}M)$ によって活性が著しく増大する。また熱処理を行なうと65°Cで完全に失活するがこの際 $10^{-3}M$ の $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ を加えておくと保護作用があり失活温度は75°Cとなる。

本酵素液は基質 L 成分に作用して SM を生成する際に等モルの Pi を遊離する。さらに P-nitro phenylphosphate (P-NPP) に対してアルカリホスファターゼ活性を示す, このことより本酵素液の kinetics を検討し, intestinal アルカリホスファターゼと比較した。

307. 放線菌によるコリンならびにポルフィリン系化合物の生成

(第1報) 補酵素型 B_{12} と Coproporphyrin の生成

京大, 工, 工化 ○佐藤 一精, 清水 祥一
福井 三郎

目的 放線菌の多くが抗生物質生産の副産物として B_{12} を生成することが知られて以来 (Rickes ら(1948)), B_{12} の放線菌による醸酵生産の研究が1950年代に多数発表された。しかし生成した B_{12} の型, その放線菌の生理における役割, 生合成機構などについてはほと

んど知られていない。本報では, まず放線菌の生産する B_{12} の型を菌体部および培養液について調べて, B_{12} 補酵素 (DBCC) が菌体内の B_{12} の主体であることを確認した。この研究中, 特別の条件で培養液中に Coproporphyrin が多量に蓄積することを認めた。 B_{12} のコリン核の生合成は, 一般にポルフィリン核と同様に, succinyl CoA + Glycine $\rightarrow \alpha$ -Amino- β -keto-adipate $\rightarrow \delta$ -Aminolevulinat $\rightarrow$ porphobilinogen の経路で行なわれ, そののちコリン核合成と roporphyrin 合成の経路に分岐するものと考えられている。この事実から, 放線菌におけるコリン化合物とポルフィリン系化合物生合成の関係をしらべることは興味深い。

方法 主として *streptomyces olivaceus* (協和醸酵より分与の605株) を用い, 他に603株や東大応微研0012株について比較した。培地はグルコースをC源とする waksman 培地, それに乳糖, $Ca CO_3$ を加えた改変培地, およびグリセリン培地を用いた。

結果 改変培地で大量に培養してえた菌体中の B_{12} は, エタノール抽出後, フェノール精製処理, イオン交換セルロースクロマトグラフなどで精製し, 沪紙電気泳動, 沪紙クロマトグラフ, 吸収スペクトル, 補酵素活性試験, ならびに分解物中の DBI の検出などを行なった。この結果菌体中の B_{12} がほとんど DBCC であることを証明した。

グルコース培地では一般に B_{12} も少なく, ポルフィリンの生成もほとんどなかったが, 改変培地では B_{12} ポルフィリンともに多量に蓄積され, さらにグリセリン培地ではとくにポルフィリンが $10\mu g/ml$ 以上に達した。このものをメチルエステルに誘導し, IR などの理化学的方法により coproporphyrin であることを明らかにした。なおグリセリン培地に B_{12} を添加しても影響はなかったが, Co^{2+} 塩の添加は増殖の lag を著しく短縮するとともに, 醸酵液の著しい赤色をおこした。これは, おそらくポルフィリン系物質と Co 間のキレート化合物生成によるものと推定される。 Fe^{2+} 塩を添加した時には遊離型ポルフィリンの蓄積はきわめて少なくなり, lag の短縮はみられなかった。これらの事実にもとずき CO^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} の添加, 酸素供給などが放線菌におけるコリン化合物とポルフィリン化合物の生成におよぼす影響につき検討を加える。

308. 乳酸逐次添加通気培養法による酵母 cytochrome C 含量の増加

京大, 工, 工化 ○上野 進, 角野 一成
谷 喜雄, 福井 三郎

(16)

目的 嫌気培養酵母の cytochrome c (以下 cyt. C) 含量は検出されないほど微量であるが、好気条件では、呼吸系の増大により cyt. c 含量が増加する。さらに清酒酵母を乳酸添加培地で通気培養したものの cyt. c 含量が著しく大きいことは、著者らがすでに報告したとおりである。しかし乳酸添加による cyt. c 量の増加は一過性であるために工業的には、菌体の採取の時期が問題となる。本報では、cyt. c 量を高い状態のまま持続させる試みを行なった。

方法 清酒酵母、パン酵母または *Candida albicans* を糖濃度 5% の完全合成培地で振盪培養または *jar-fermenter* により通気培養した。酵母菌体中の cyt. c の抽出は大林法に従い、cetyltrimethylammonium bromide を用い、抽出液の吸光度から、cyt. c 含量を算出した。また島津製のマルチパーパス自記分光光度計 MPS-50 型を用いて、直接菌体内の cyt. c を定量した。なお、本実験で採用した定量方法による吸収物質が本当に cyt. c であるかどうかを確かめるため、抽出液を樹脂精製して得られたもののスペクトル、アセトン-HCl 液への不溶性、および蛋白部を取除いた heme 部を pyridine と反応させて得た pyridine-ferrohemochrome のスペクトルなどから cyt. c であることを確認した。

結果 菌体の cyt. c におよぼす乳酸の作用は菌種により異なり、*C. albicans* では乳酸をほとんど利用できないのに反して、清酒酵母、パン酵母などでは糖消費後、乳酸を消費して、増殖曲線は Moncd の“diauxie”型となり、その時の cyt. c 含量の経時変化をみると、乳酸利用の対数期で急激に増加し、ふたたび減少する。そこで乳酸を逐次添加して培地の乳酸濃度を約 0.5% に保つと、ある程度の増減はあるが cyt. c 量は高い値を維持することができた。この方法は cyt. c の工業生産に有効な方法であろうと思われる。さらに乳酸を添加して通気培養を行なった際の cyt. c 量の変化を追跡するために島津製マルチパーパス自記分光光度計を使用して全菌体のままで測定した。この方法により、嫌気条件下ではっきりと現われない cyt. c の吸収が、好気条件で速やかに出現し、さらに乳酸を添加して通気した場合は著しく増大し、吸光値から算出すると乳酸無添加の場合に比し約 2 倍量となった。

11.00

309. 麴酸醱酵に関する研究

(第1報) 麴酸生産条件の検討

理研、醱酵 ○北田 牧夫, 上山 英夫
鈴木 衿子, 富金原 孝

目的 麴酸は *Asp. oryzae* の生産物であることが齊藤により発見されて以来、多くの研究者によって醱酵機構の検討がなされてきた。特に1953~56にArnsteinらは放射性同位元素を用いグルコースから麴酸生成の主要経路は炭素鎖の分解なしの直接的なものであることなどその醱酵機構の概要を明らかにした。このような研究にもかかわらず麴酸醱酵がいまだあまり問題とされていないのは麴酸の工業的価値が認められていないことの他に麴酸が主に表面培養によって生産されるからと考えられる。深部培養に関する研究としては Kluyver および飴山らの報告をみるのみである。演者らは深部培養でもかなり顕著に麴酸を生産する *Asp. oryzae* 69 株を入手したので今回は主に深部培養で麴酸の生産に影響する2・3の要因について検討した結果につき報告する。

方法 使用菌株は *Asp. oryzae* 69 株。麴酸の定量は $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 溶液で発色させ 500 m μ の吸収で測定。糖は Bertrand 氏変法で測定し、麴酸のもつ還元力はさし引いた。pH はガラス電極法でまた菌体量は減圧下で乾燥後秤量した。培養方法は 300 ml および 500 ml 容エーレンマイヤーフラスコで 30°C, 7 日間振盪培養した。

結果 グルコース濃度に関して2.5, 5, 10, 15%について検討したところ 10%にて最高の生産をみた。窒素源では peptone, NH_4NO_3 について検討し peptone 0.5%, NH_4NO_3 0.06%で最大の蓄積をみた。窒素源の量を制限すると麴酸収量の増大が推測される。次に麴酸生産期の洗滌菌体を用いて同様な検討を行なった。

310. トリプトファン醱酵に関する研究

(続報) 増殖停止期以後の基質逐次添加について
阪大、工、醱酵 藤田 正憲, ○新津 尚
照井 堯造

目的 前報により、トリプトファン醱酵の最適溶存酸素準位は、培養前期において 0.1~0.2 m MO_2/l 程度であって、この条件下では比増殖率 μ が 0 に近い