

〔醸酵工学 第63巻 第1号 75-78. 1985〕

ノ ー ト

セロハン平板培養法による *Aspergillus niger* の生育度と
酵素活性およびクエン酸蓄積の関係

桐村光太郎・熊谷 和夫*・宇佐美昭次

早稲田大学理工学部応用化学科

Citric acid accumulation and enzyme activities with *Aspergillus niger* cultivated on cellophane membranes placed on agar media. —Note— KOHTARO KIRIMURA, KAZUO KUMAGAI*, and SHOJI USAMI (Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Engineering, Waseda University, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan) Hakkokogaku 63: 75-78. 1985.

Aspergillus niger Yang no. 2 was cultivated on cellophane membranes placed on agar media, and the colonies formed were divided into areas every incubation day. Specific activities of enzymes related to citric acid accumulation were measured in each area for 2 to 8 days. Specific activities of citrate synthase and isocitrate dehydrogenase (NADP) were low in the central area of the colony. With longer incubation, specific activity of isocitrate dehydrogenase (NADP) decreased as a whole. Isocitrate dehydrogenase (NAD) activity was not detected during the whole incubation period. The specific activity of aconitate hydratase was higher in the intermediate area of the colony than in the central and peripheral areas. Specific activities of isocitrate lyase and malate synthase in the central area of the colony were high, but that of pyruvate carboxylase was low.

筆者らは既に、クエン酸生産菌 *Aspergillus niger* Yang no. 2 を用いてグラスウールを担体とする半固体培養を行い、酵素系の消長を調べて、citrate synthase と aconitate hydratase の比活性の高レベル保持と isocitrate dehydrogenase (NADP) の比活性の抑制によってクエン酸の蓄積が誘引されることを見出した。¹⁾

糸状菌の成長をともなう培養系での酵素活性、生理活性の変化については、既にいくつかの報告がなされている。例えば Yanagita と Kogane²⁾ は、セロハン平板培養法を用いて *A. niger* の核酸と細胞壁炭水化物について円形集落内での量的分布を測定している。セロハン平板培養法では培地から菌体のみの分離、回収が容易であり、接種に *A. niger* の分生子を使用した場合、表面集落は分生子接種点を中心にして円形を

保って成長するため、ある一定時間内に成長した部分ごとに菌体を分画することも可能である。そこで筆者らはこの培養法を用いて、成長した菌体を一定時間に伸長した部分ごとに分取し、各分画におけるクエン酸蓄積に関連する主要な酵素の活性を測定し、菌体の成長にともなう酵素活性の変化とクエン酸蓄積との関係について検討した。

使用した菌株は *A. niger* Yang no. 2 で、半固体培養において高いクエン酸生産能を示した。^{3,4)}

寒天培地は、筆者らが半固体培養の研究で合成培地として使用しているものを基本として調製した。すなわち、グルコース 140 g, NH_4NO_3 2 g, KH_2PO_4 10 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, MnSO_4 14 mg を蒸留水で 1 l にしたのち、塩酸で pH 4.25 に調製し、これに寒天 20 g を溶かした。この培地 25 ml を直径 9 cm のペトリ皿にとり、凝固させたのち、その表面に蒸留水で洗浄および蒸気滅菌を行ったセロ

* 現在、住友化学工業株式会社
〒665 兵庫県宝塚市高司4-2-1

ハン膜 (Union Carbide Co. 製, 透析用) をクリーンベンチ中で密着させ, これを一昼夜 30°C に保ってセロハン膜上の水分が消失したものをセロハン培地と称した. このセロハン培地の中心に分生子を接種し, 30°C にて静置培養を行ったものを実験に供した.

菌体量の測定は, 所定日数培養を行ったのち, セロハン膜上に生育した円形集落を後述するような区分ごとに分取し, 蒸留水でよく洗浄し, 105°C で恒量として乾燥重量を求めた.

クエン酸はペンタブロムアセトン比色法⁹⁾で測定した. クエン酸全生成量を求める場合は, 培養物すべてを加温した 100 ml の蒸留水にとり寒天を完全に溶かしてからガラス繊維ろ紙 (Whatman GF/A) でろ過し, 寒天のゲル化を防ぐため, そのろ液を硫酸を用いて約 2 N 溶液としたのち定容にして測定した. 菌体内クエン酸量は, 各区分ごとに分取した集落を蒸留水でよく洗浄したのち海砂とともに乳鉢中で磨砕し, 塩酸を加えて pH を約 2 とし, 15,000 rpm にて30分間遠心分離して得られた上澄を用いて測定した.

酵素活性の測定は, 以下に示すように行った. まず分画した集落を蒸留水および酵素活性の測定に用いる緩衝液で十分に洗浄した. ついで, 得られた試料を氷冷しながら乳鉢中で海砂とともに磨砕し, 氷冷した緩

衝液 10 ml を加えてよくかきまぜ, 15,000 rpm で 4°C にて30分間遠心分離した. この上澄の無細胞抽出液を粗酵素溶液とし, つぎの各酵素活性を 30°C にて測定した.

citrate synthase⁶⁾ (EC 4.1.3.7)

aconitate hydratase⁷⁾ (EC 4.2.1.3)

isocitrate dehydrogenase (NAD)⁸⁾ (EC 1.1.1.41)

isocitrate dehydrogenase (NADP)⁸⁾ (EC 1.1.1.42)

isocitrate lyase⁹⁾ (EC 4.1.3.1)

malate synthase⁹⁾ (EC 4.1.3.2)

pyruvate carboxylase¹⁰⁾ (EC 6.4.1.1)

なお 1 unit は 1 分間に基質 1 μ mol を変化させる, または反応物 1 μ mol を生成する酵素量として定義し, 比活性は無細胞抽出液中のタンパク量 1 mg 当たりの unit 数で表した. タンパク量は Lowry らの方法¹¹⁾で測定した.

セロハン培養の発酵経過を, セロハン膜なしの寒天培地の場合と比較して Fig. 1 に示した. セロハン培養では, セロハン膜を通して菌体は基質を吸収し, 生成物は拡散されるので, 菌体の生育はセロハン膜の透過性による影響を受けることが考えられたが, Fig. 1 より明らかなように, 菌体量, クエン酸生成量ともにセロハン膜の有無による差異はほとんど認められなかった. また, ペトリ皿上で生育している菌体は外縁部にむかってたえず新しい培地に接することができるため, 培養 8 日目までは増殖を停止しなかった.

供試菌はセロハン培地上では, 接種して発芽および

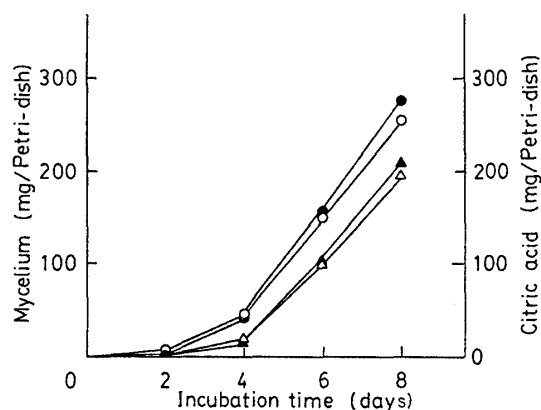


Fig. 1. Growth of *A. niger* Yang no. 2 cultivated on cellophane membranes placed on agar media.

Incubation was in Petri dishes containing 25 ml of agar medium at 30°C.

●, growth and ▲, citric acid, cultivated on cellophane membranes placed on agar media. ○, growth and △, citric acid, cultivated on agar media.

Agar medium, per l; glucose, 140 g; NH_4NO_3 , 2 g; KH_2PO_4 , 10 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 250 mg; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mg; MnSO_4 , 14 mg; agar-agar, 2 g.

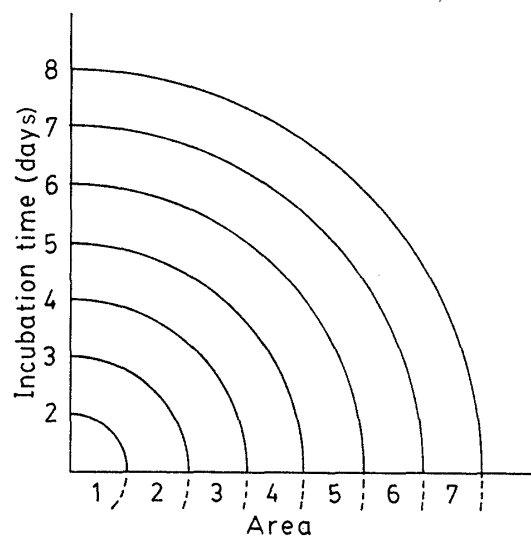


Fig. 2. Diagram of a giant colony of *A. niger* Yang no. 2 cultivated on cellophane membranes placed on agar media.

急速な菌糸の伸長開始には約20時間を必要とした。したがって、実際の菌糸の成長はそれ以降で顕著となった。Fig. 2は、セロハン培地上での巨大集落の拡大の様子を模式的に示したものである。この集落の1日ごとの伸長部分を中央から区分 (area) 1, 2, 3……と名付け、各部分を分取して酵素活性の測定に用いた。区分1は分生子を接種してから培養2日目までに成長した部分とし、その他の区分はその後の1日間に成長した部分とした。すなわち、培養2日目では区分1のみであり、培養3日目では区分1～2、培養8日目では区分1～7となる。本実験における区分番号は、菌糸の成熟度を必ずしも正確に反映するものではない。これは、Yanagita と Kogane²⁾ も報告しているように、菌糸がペトリ皿の水平方向のみでなく、各区分の内部でも分枝しながら増殖を続けたためで、円形集落中心部の隆起も観察された。

Fig. 3 に citrate synthase, aconitate hydratase, isocitrate dehydrogenase (NADP) の比活性の変化を示した。なお、培養全期間にわたって isocitrate dehydrogenase (NAD) の活性は認められなかった。citrate

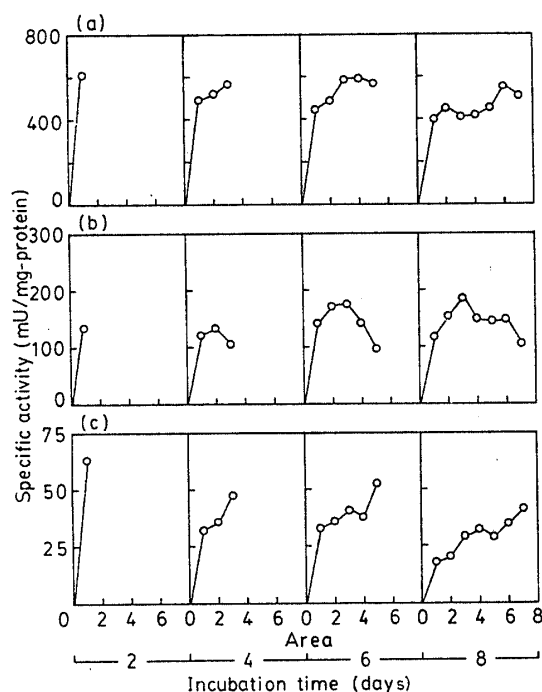


Fig. 3. Specific activities of TCA cycle enzymes in the various areas of mycelia of *A. niger* Yang no. 2 grown on cellophane membranes placed on agar media. (a) citrate synthase (b) aconitate hydratase (c) isocitrate dehydrogenase (NADP). Experimental conditions are the same as described in Fig. 1.

synthase, isocitrate dehydrogenase (NADP) の比活性の変化はほぼ同様の傾向を示し、同じ培養日数では区分番号が大きくなるにつれて比活性が大きくなる、すなわち集落中央部ほど比活性が低下している傾向が見られた。また、同じ区分番号(たとえば area 1)での比活性が、培養日数の増加にともない減少したのも、両酵素について共通した特徴であった。しかし、citrate synthase の比活性の最大値は、培養日数の増加にかかわらずほぼ同一のレベルに保たれているのに対して、isocitrate dehydrogenase (NADP) の比活性は、培養日数の増加にともない全体的に低下していた。aconitate hydratase の比活性は集落中央部と周辺部で低く、その中間部分で高い特異的变化を示した。また、その比活性は全体的にみて、培養日数にかかわらずほぼ同一のレベルに保たれていた。

Fig. 4 には、グリオキシル酸回路特有の酵素 isocitrate lyase と malate synthase, および pyruvate carboxylase の比活性の変化を示した。isocitrate lyase と malate synthase は、ともに集落中央部ほど比活性が高かった。pyruvate carboxylase は集落中央部ほど比

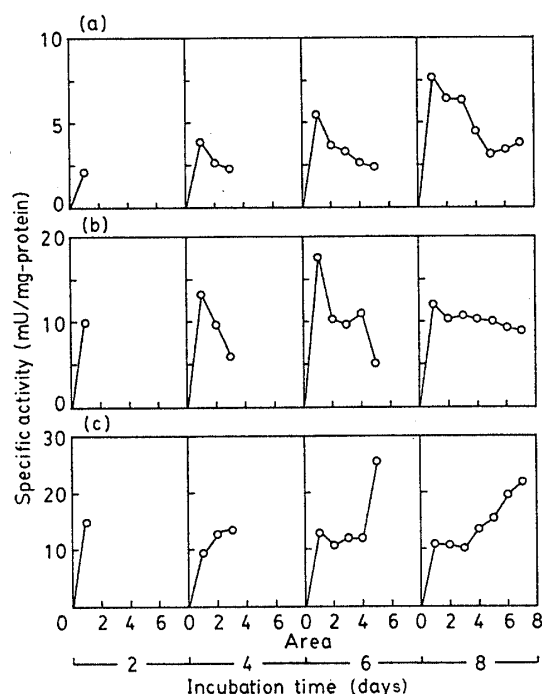


Fig. 4. Specific activities of enzymes related to the TCA cycle in the various areas of mycelia of *A. niger* Yang no. 2 grown on cellophane membranes placed on agar media. (a) isocitrate lyase (b) malate synthase (c) pyruvate carboxylase. Experimental conditions are the same as described in Fig. 1.

Table 1. Intracellular citric acid accumulation.

Area	Dry mycelium (mg)	Intracellular citric acid	
		(mg)	(mg/g of dry mycelium)
1	4.8	0.21	43.8
2	25.0	0.80	32.0
3	63.8	1.81	28.3
4	64.2	2.16	33.7
5	58.8	2.25	38.2
6	56.0	2.34	41.8
7	15.0	0.78	52.0

Incubations were carried out at 30°C for 8 days.

活性が低下していた。

酵素活性の変化と菌体内クエン酸量との関係を調べるため、Table 1 に培養 8 日目の各区分の菌体内クエン酸量を示した。乾燥菌体量自体はコロニーの中央部、周辺部で小さかったが、乾燥菌体量当たりの菌体内クエン酸含量は集落中央部、周辺部で高く、その中間部分で低かった。この変動は aconitate hydratase の比活性の変動 (Fig. 3(b)) と正反対の関係となった。

以上の結果より、菌体の成長にともない各区分におけるクエン酸蓄積に関連する酵素群の活性がそれぞれ特徴をもって変化していることがわかった。すなわち、aconitate hydratase の比活性はほぼ同一のレベルに保たれていたが、培養日数の増加とともに isocitrate dehydrogenase (NADP) の比活性は全体的に低下し、しかもこの活性が低下している区分では、グリオキシル酸回路の isocitrate lyase と malate synthase の活性が高まっていた。したがって isocitrate dehydrogenase の活性低下が、TCA 回路の正常な運行をさまたげてクエン酸の蓄積を誘引するとともに、側路としてのグリオキシル酸回路を一部活性化したものと推察された。これらの結論は、既報¹⁾の半固体培養における結果と一致していた。また、aconitate hydratase の比活性は isocitrate dehydrogenase (NADP) と同調性を示さないこと、さらに菌体内のクエン酸含量と正反対に対応することから考えて、aconitate hydratase は菌体内クエン酸量を調節していることが推測された。pyruvate carboxylase は、citrate synthase と類似する比活性の変化を示したことから、クエン酸合成へのオキザロ酢酸の補充作用を活発に行っていると考えられた。

要 約

A. niger Yang no. 2 のセロハン平板培養を行い、成長した円形集落を一定時間内に伸長した部分ごとに分取し、各区分におけるクエン酸蓄積に関連する主要な酵素の活性を測定した。

citrate synthase と isocitrate dehydrogenase (NADP) の比活性は集落の中央部で低下しており、isocitrate dehydrogenase (NADP) の比活性は培養日数が増加するにつれて全体的に低下した。isocitrate dehydrogenase (NAD) の活性は、培養全期間を通じて認められなかった。aconitate hydratase の比活性は、集落の中央部と周辺部ではその中間部分に比べて低く、この特異的な変動は菌体内クエン酸含量と正反対の傾向を示した。isocitrate lyase と malate synthase では集落中央部で比活性が高く、pyruvate carboxylase では集落中央部で比活性が低下していた。

この報文の概要は、昭和58年度日本醸酵工学会大会において発表した。

文 献

- 1) 桐村光太郎, 熊谷和夫, 森貞信也, 河邊誠一郎, 宇佐美昭次: 醸酵工学, 62, 127 (1984).
- 2) Yanagita, T., Kogane, F.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 8, 201 (1962).
- 3) 宇佐美昭次, 福富直樹: 醸酵工学, 55, 44(1977).
- 4) 熊谷和夫, 宇佐美昭次, 服部達彦: 醸酵工学, 59, 461 (1981).
- 5) 楠瀬正道: 蛋白質・核酸・酵素, 2, 50 (1957).
- 6) Srere, P. A., Brazil, H., Gonen, L.: *Acta Chem. Scand.*, 17, S129 (1963).
- 7) Anfinsen, C. B.: *Methods in Enzymology*, (Colowick, S. P., Kaplan, N. O.), Vol. I, p. 695, Academic Press, New York (1955).
- 8) Kornberg, A.: *Methods in Enzymology*, (Colowick, S. P., Kaplan, N. O.), Vol. I, p. 695, Academic Press, New York (1955).
- 9) Dixon, G. H., Kornberg, H. L.: *Biochem. J.*, 72, 3 (1959).
- 10) Young, M. R., Tolhert, B., Utter, M. F.: *Methods in Enzymology*, (Lowenstein, J. M.), Vol. XIII, p. 250, Academic Press, New York (1969).
- 11) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).

(昭59. 6. 25受付)