

〔醸酵工学 第65巻 第2号 127-130. 1987〕

## ノ ー ト

*Erwinia carotovora* の発酵槽培養における  
呼吸の休止現象

福岡 聡・小林 良生

四国工業技術試験所

Characteristic behavior of the respiration pause of *Erwinia carotovora*.—Note— SATOSHI FUKUOKA and YOSHINARI KOBAYASHI (Government Industrial Research Institute, Shikoku 2-3-3, Hananomiya-cho, Takamatsu 761, Japan) Hakkokogaku 65: 127-130. 1987.

*Erwinia carotovora* GIR1044 (FERM P-7576) was found to show characteristic respiration behavior during cultivation. The bacterium was cultivated in a jar-fermentor on basal medium using pectin as the carbon source, and the DO course of the culture solution traced. About nine hours after inoculation the DO increased rapidly for a few minutes; this was caused by a respiration pause. This phenomenon is most likely related to the degradation of pectin in the medium.

著者らは、靱皮繊維の生化学パルプ化の研究において、*Erwinia carotovora* 起源のエンド-ペクチン酸リアーゼ (poly(1,4- $\alpha$ -D-galacturonide) lyase, EC 4.2.2.2, *endo*-PATE と略称する) の生産を検討し、前報<sup>1)</sup>で同菌株の培養における最適酵素生産の条件を、培地および培養方法から明らかにした。引き続き、同菌株の培養において、培地の DO、および排ガス中の酸素と炭酸ガス濃度の変化を追跡した。その結果、炭素源にペクチン質を用いると、培養開始9時間前後に呼吸を一時的に休止することがわかった。この現象、および同現象を起こす要因を培地成分などから検討したので報告する。

本報告で使用した菌株は、前報<sup>1)</sup>と同様に *E. carotovora* GIR 1044 (微工研菌寄第7576号) である。同菌株の培養は主に Nasuno と Starr の培地<sup>2)</sup>を改良した基本培地を使用した。以下にその組成を示す。ペクチン 5 g, グルタミン酸ナトリウム (1水和物) 5 g, 硫酸 3 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.4 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g および蒸留水 1 l。ペクチン酸を炭素源に用いた場合は蒸留水 1 l 当たり 5 g, また、グリセロールおよびフルクトースを用いた場合はそれぞれ 20 g を同量のグルタミン酸ナトリウム (1水和物) と共に用いた。

この場合も無機塩類は基本培地と同一とした。培地の pH は特に調整すること無く用いたが、ペクチン酸の場合は、滅菌前に NaOH 溶液により 7.0 に調整した。培養実験は前報<sup>1)</sup>と同様に基本培地 5 l を 10 l 容量の発酵槽 (関東理器製) に入れ、121°C で15分間滅菌した後、基本培地を用いて調製した前培養液を 2% 接種し、28°C の下で、かくはん速度 480 rpm, 通気量 0.5 vvm を基本的な培養条件 (以下、基本条件と呼ぶ) として培養した。

DO の測定は発酵槽用の DO 電極 (オリエンタル電気製, LP 特型), 排ガス中の酸素および炭酸ガス濃度の測定は、酸素分析計 (堀場製作所製, PMA-200), および赤外線分析計 (同社製, VIA-300) を使用した。無機塩類の濃度は、リン酸塩はモリブデンブルー法<sup>3)</sup>により、またマグネシウム塩はキシリジンブルー法<sup>4)</sup>により測定した。

培地 DO の経時変化に与える培地成分の影響は、以下の培地を用いて検討した。(1) 基本培地の成分のうち1種類が欠けている培地、(2) 誘導的炭素源のペクチン酸、および非誘導的に *endo*-PATE を生産させる場合に用いられるグリセロールやフルクトースなどを炭素源とする培地、(3) 誘導的炭素源のペクチンと

非誘導的炭素源のグリセロールなどを複合させた培地。

ペクチン質のゲルろ過は培養液を  $9000\times g$  にて10分間遠心分離し、得られた上澄液 10 ml を凍結乾燥した後、1 ml の蒸留水に溶解し、セファローズ CL 6B (ファルマシア社製) 70 ml を充てんした内径 16 mm のカラムに展開した。ペクチン質の溶出はカルパゾール-硫酸法<sup>5)</sup>により総ガラクトuron酸量を測定するとともに、簡易法として全有機炭素 (TOC) の分析によって調べた。

10 l 容量の発酵槽で、基本培地 5 l を用いて、基本条件で、培養した場合の培地 DO, および排ガス中の酸素と炭酸ガス濃度の経時変化を Fig. 1 に示す。培養開始時の DO は水温が  $28^{\circ}\text{C}$ , 1 気圧における飽和溶解酸素量の 7.8 ppm に設定した。培養の進行とともに DO は低下し、8時間45分後には 3.6 ppm を示したが、続く数分間で 6.3 ppm まで上昇した。上昇を停止した後は再び低下した。10時間40分後頃より DO は 2 ppm ほどで定常状態となった。引き続き培養を継続すると、13時間40分後に DO は再び数分間で 4 ppm ほど上昇し、それ以後はゆるやかに DO の飽和量に向かった。

培養の途中、排ガス中の酸素と炭酸ガス濃度を測定すると、酸素は DO と類似の挙動を示し、8時間45分後には空気中の平衡濃度より 0.70% 低い値を示したが、続く数分間で 0.32% にまで回復した。一方、炭酸ガスは酸素とは逆の挙動を示し、0.76% を示していた

のが、0.36% に低下した。また、13時間40分後には酸素濃度は上昇し、炭酸ガス濃度は下降した。

以上のように、培地中の DO, 排ガス中の酸素および炭酸ガス濃度のいずれも同一の時刻に変化し、空気中の酸素濃度の低下と DO の低下とは呼応しており、また、DO が低くなると炭酸ガス濃度は高くなったことから、DO は呼吸の指標として用いられることが分かった。最初に DO が上昇した培養開始 8 時間45分前後は、前報<sup>1)</sup>の基本培地を用いた培養の経時変化では対数増殖期の途中で、菌体数などへの著しい影響などは観察されなかった。また、同時刻頃よりペクチン質の資化、および *endo*-PATE の生産は向上した。以上の結果から、DO が上昇した数分間は呼吸を休止していると推測された。一方、2 回目の DO の上昇は、ほとんど同時に菌の増殖も停止したことからペクチン質が消失し、培養が終了したためと考えられる。

呼吸を休止する原因に培地成分の濃度変化、および変性が考えられた。しかし、無機塩の場合は13時間30分後でも、マグネシウム塩では初期値の50%、リン酸塩では90%残存していたことから、濃度変化の影響は小さいと推測される。続いて、培地の他の成分の影響を、基本培地の各成分のうち1種を含まない培地を調製し、基本条件で培養することにより検討した。ペクチン、あるいはグルタミン酸ナトリウムを含まない場合は、呼吸の休止に関連した DO の上昇は全く観察されなかった。その他の無機塩の場合は、呼吸の休止に関連した DO の上昇が観察されたものの、上昇幅、発現の時刻などに著しい変化が見られた。このことから、呼吸の休止は基本培地を用いた最適培養条件下で起きる現象であると推測された。ペクチンを含まない培地では、菌は増殖せず、DO の上昇も観察されなかった。一方、グルタミン酸ナトリウムを含まない場合は、培養開始 8 時間頃までは、菌の増殖は正常に進行し、基本培地と類似の DO 経時変化を示した。この場合に、DO の上昇が観察されなかったのは、pH が 4.2 まで低下し、それ以降もほとんど変化しなかったことから培養が継続されなかったと考えられる。また、培地の TOC, およびペクチン質量共に 8 時間以降は変化が見られなかった。

次に、使用した菌株は誘導的あるいは、非誘導的炭素源のいずれを用いても *endo*-PATE を生産する<sup>1)</sup>ことから、炭素源のペクチンに代えてペクチン酸、グリセロールおよびフルクトースを用いて基本条件で培養し、DO の経時変化を調べた。結果は Fig. 2 に示す

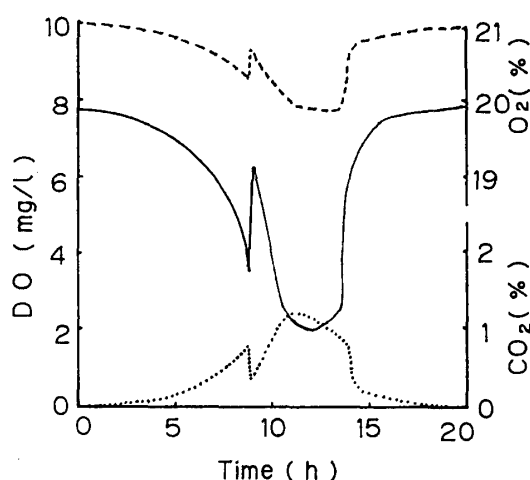


Fig. 1. Course of the respiration of *E. carotovora* cultivated on basal medium using pectin as carbon source.

—, DO; ----, oxygen content of the outlet gas; ·····, carbon dioxide content of the outlet gas.

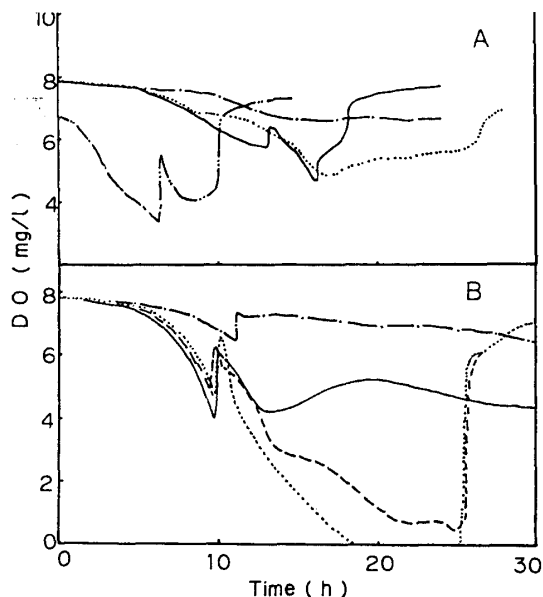


Fig. 2. Course of the DO during cultivation. Panel A, cultivated on a medium using glycerol, fructose, or pectic acid as its carbon source. —, pectic acid; ·····, glycerol medium; —·—, fructose medium; —··—, pectin added into the fermentor after 24h cultivation on fructose medium. Panel B, cultivated on a mixture of pectin and non-inducible carbon source. ·····, glycerol; —·—, fructose; —, sorbitol; —··—, xylose.

ように、ペクチン酸ではペクチンを用いた場合と類似した DO の経時変化を示した。一方、グリセロールやフルクトースの場合は、呼吸の休止に関連した DO の上昇は観察されなかった。しかし、フルクトースを炭素源に用いた培地で培養し、24時間後にペクチン18 gを含む水溶液1 lを加え、0.3%のペクチン培地として培養を継続したところ、Fig. 2 に示すように、投入6時間30分後に DO が 2.2 ppm 上昇し、基本培地培養と類似した DO の経時変化を示した。

また、培地に誘導的、あるいは非誘導的に *endo-PATE* を生産する場合に用いられる炭素源の2種類を複合させて培養した。その結果を Fig. 2 に示す。Fig. 1 の基本培地培養での結果と比較すると、いずれも培養開始9時間前後までは類似した変化を示した。炭素源を異ならせても DO の経時変化が大きく異ならなかったのは、非誘導的炭素源は前報<sup>1)</sup>と同様に、いずれも資化速度が遅く、培養の初期段階ではペクチンを単独で炭素源に用いた条件に近いから、呼吸の休止が起きたと考えられる。

培地の種類を変えて培養した結果から、培養開始9

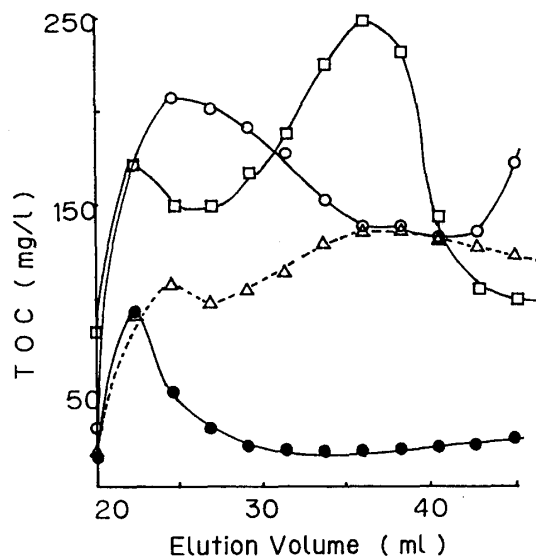


Fig. 3. Chromatography of the culture solution. Condensed culture solutions (10 ml to 1 ml) were put on a Sepharose CL-6B column. —○—, just after inoculation; —□—, after 8.5 h; —△—, after 9 h; —●—, after 16 h.

時間前後に呼吸を休止するのは、ペクチン質を炭素源に用いた場合であり、ペクチン質が資化される過程で呼吸の休止に関与する物質を生成していると推測された。ペクチン質のオリゴマーの中には横塚ら<sup>6)</sup>が報告しているように、抗菌活性を示すものがあることから、呼吸の休止とペクチン質の抗菌活性とは関連していると予想された。ペクチン質の抗菌活性は pH が 7 以上では認められていない<sup>6,7)</sup>ことから、基本培地の植菌前の pH を NaOH 溶液で 7.5 に調整して培養を行った。その結果、DO の経時変化は Fig. 1 の pH を調整していない場合 (初発 pH 6.0) とほとんど同様に推移し呼吸の休止が起きた。pH は培養開始直後より緩やかに下降し、呼吸の休止が起きた8時間35分後に 6.9 を示し、それ以降は上昇に転じた。pH は最も低いところでも 6.9 であったことから、横塚ら<sup>6)</sup>が報告しているペクチン質の抗菌活性とは機構が異なっていると推測される。

呼吸の休止を起こすのはペクチン質を炭素源に用いた場合だけであることから、次にペクチンの資化の過程を、培養の各時刻における分子量分布の変化により調べた。基本培地を用いて基本条件で培養し、途中適時分取した試料のゲルろ過の溶出パターンを TOC 値で Fig. 3 に示す。培養開始直後には 25 ml 付近に見られたピークは、8時間30分後には 38 ml へと移動した。しかし、それ以降は急速に 38 ml の位置のピーク

は低くなった。同ピーク付近の溶出物質は、カルバゾール硫酸法による分析結果からペクチン質であることが分かった。つまり、培養の初期にペクチンは低分子化され、呼吸を休止するのと同じ時刻頃にその蓄積が最大となると推測される。DO が2回めに上昇した16時間後は、38 ml 付近での溶出は確認されなかった。分子量既知の標準物質として $\beta$ -シクロデキストリンを用いて同様にゲルろ過を行った場合は、65 ml 付近に溶出したことから、38 ml 付近の画分はこれよりも分子量の大きいオリゴマーと推測される。

*E. carotovora* の基本培地培養においては、前培養の接種により *endo*-PATE が初発力価で0.8単位/ml程度含まれる。この酵素によって、培養開始直後よりペクチン質は低分子化し、オリゴマーの蓄積が9時間前後に最大となり一時的に呼吸を休止する。しかし、同菌株はペクチン質を栄養源に利用していることから、生成したオリゴマーは逐次に生成している酵素および

菌体によって速やかに分解摂取されるため、一旦呼吸を休止しても、数分間のうちに再び活発に呼吸活動を開始すると考えられる。

#### 文 献

- 1) 福岡 聡, 小林良生: 醸酵工学, **64**, 261 (1986).
- 2) Nasuno, S., Starr, M. P.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 5298 (1966).
- 3) Taussky, H. H., Shorr, E.: *J. Biol. Chem.*, **202**, 675 (1953).
- 4) Mann, C. K., Yoe, J. H.: *Analytica Chimica Acta*, **16**, 155 (1957).
- 5) Dische, Z., Landsberg, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 193 (1957).
- 6) 横塚弘毅, 松土俊秀, 櫛田忠衛, 稲峰成男, 中島智恭: 醸酵工学, **62**, 1 (1984).
- 7) El-Nakeeb, M. A., Yousef, R. T.: *Planta Med.*, **18**, 295 (1970).

(昭61. 8. 19受付)