

[J. Ferment. Technol., Vol. 49, No. 10, p. 842~846, 1971]

放線菌による抗生物質醗酵における培養液中の グリセリンの定量に関する研究

岩井 譲・大村 智・秦 藤樹

(北里研究所)

The Determination of Glycerol in the Broth of an Antibiotic- Producing Fermentation Culture of *Streptomyces* sp.

Yuzuru Iwai, Satoshi Omura, and Toju Hata

(The Kitasato Institute, Shirokane, Minato-ku, Tokyo)

In the course of various fermentations for the production of antibiotics by *Streptomyces* sp., glycerol, as well as glucose, has been found to be a preferred carbon source. In order to determine glycerol in the fermentation broth, a colorimetric method based on the procedures described by West was modified with respect to the condition of oxidation of glycerol by periodic acid. It has been found that, under a mild condition of periodic acid oxidation at 0 °C for 30 min, glycerol can be determined even when glucose is present. This method was applied in the practical production of three antibiotics: cycloserine, echinomycin, and streptomycin, and the following results were obtained:

- (1) The metabolism of glycerol was more active than that of glucose or starch; during each fermentation, the glycerol in the medium was nearly consumed after 45 hours.
- (2) The peak of antibiotic production in fermented broth appeared after the glycerol consumption was completed.

緒 言

放線菌による抗生物質生産において、培地の炭素源がグルコースよりもすぐれているという報告は actinomycin 醗酵のガラクトース¹⁾, siomycin 醗酵の麦芽糖²⁾, chloramphenicol 醗酵のグリセリン³⁾等がある。我々も長い間放線菌の生産する抗生物質の研究を行っているが、種々の抗生物質醗酵において、グルコースと同様にグリセリンがすぐれた炭素源である場合が多いことを経験している。一方 streptomycin の生成に amidinotransferase⁴⁾, actinomycin 生成の phenoxazinone synthetase⁵⁾ のように各々の抗生物質醗酵に特有な key enzyme の存在が報告されているが、目的とする醗酵が順調にいとまれているか否かを検査する

のに、多くの抗生物質醗酵に共通する有力な手段はなく、菌の観察、醗酵液中の成分の変化、特に炭素源の消費⁶⁾などを測定し総合的に判断する方法をとっている。しかしながら醗酵液中のグリセリンの定量に関する詳細な報告はいまだない。

本研究ではグリセリンを炭素源とする放線菌による抗生物質醗酵において、培養液中のグリセリンの定量を West^{7,8)}らの過ヨウ素酸化で生ずるホルムアルデヒドをクロモトローブ酸で発色させる方法において、過ヨウ素酸化条件を検討し、培養液中にグルコース、デンプンをグリセリンと共存させた条件でも定量できる方法を確認した。更に実際に3種の抗生物質生産の場合において、本定量を応用し、2, 3の興味ある知見が得られたのでこれについても報告する。

実 験 方 法

1. グリセリンの定量 グリセリンを過ヨウ素酸酸化し、生ずるホルムアルデヒドをクロモトロープ酸—ホルムアルデヒド反応による比色定量法で行なった。しかしながら従来の方法^{7,8)}ではグルコースも反応するという欠点をもつので、グルコースと共存させた条件でもグリセリンの定量を可能にするため過ヨウ素酸酸化条件を検討した。過ヨウ素酸酸化反応の終了は亜ヒ酸ナトリウム添加時とした。Fig. 1 に本定量法を示す。

Fermented broth
 | diluted with water
 0.4 ml diluted sample (containing from 10 to
 60 μg of glycerol)
 | added 0.1 ml of 2.5 N H_2SO_4
 | added 0.2 ml of 0.1 M periodic acid
 | incubated at 0°C for 30 min.
 | added 0.2 ml of 1 M sodium arsenite
 | incubated at room temperature for 15 min.
 | made up to 2.0 ml with water
 2.0 ml reaction mixture
 | removed 0.5 ml aliquot
 | added 5 ml of chromotropic acid reagent
 | heated on a water bath for 30 min.
 | cooled to room temperature
 | determined OD at 570 $\text{m}\mu$

Fig. 1 Procedure of glycerol determination in fermented broth.

2. 使用菌株 抗生物質醗酵に用いた放線菌は当研究室で分離された菌株である。Cycloserine 生産株として *Streptomyces* sp. NO. OS-1866 を、echinomycin 生産株として *Streptomyces* sp. NO. OS-1277 および streptomycin 生産株として、*Streptomyces* sp. NO. OS-786 を使用した。

3. 醗酵液中の成分の定量方法 10 ml の醗酵液を目盛つき試験管にとり、3,000 rpm, 5分遠心して得た沈澱量を菌体量とした。またグルコースは ortodin⁹⁾法で測定して求め、全糖量は N H_2SO_4 で90分間加水分解後 ortodin 法より求め、グルコースとしてあらわした。抗生物質の検定は paper disk 法で行なった。試験菌として、*Bacillus subtilis* PCI-219 を使用し、培地は echinomycin と streptomycin の検定には天然培地を、cycloserine では合成培地を用いた。

4. 醗酵 Cycloserine 醗酵にはグリセリンのみを、

echinomycin 醗酵にはグリセリンとデンプンを、streptomycin 醗酵ではグリセリンとグルコースをそれぞれ炭素源とする培地を用い、次のような条件で培養した。Krainsky 斜面培地の保存菌株より 500 ml 振盪フラスコに培地 125 ml を含むものに接種し、27°C, 48時間培養したものを種菌として用いた。本培養には種菌を1%の割合で培地15 l 含有の20 l 容jar-fermenter に接種し、温度; 27°C, 通気量; 7 l/min, 攪拌数; 240 rpm, 圧; 0.5 kg/cm², 消泡剤; adekanol LG-109 (旭電化工業株式会社製) のもとで培養し、醗酵液を経時的に取り出し実験に供した。

実験結果および考察

1. グリセリン定量における過ヨウ素酸酸化条件の検討 本定量法では過ヨウ素酸酸化条件を強くすると、グリセリン同様グルコースも反応するので、グリセリンをグルコースと共存させた場合のグリセリンの定量は不可能である。Fig. 2 は過ヨウ素酸酸化における温度の影響を示すものである。温度が上昇するに従いグルコースの O. D. 値がほぼ直線的に高くなることが認められた。

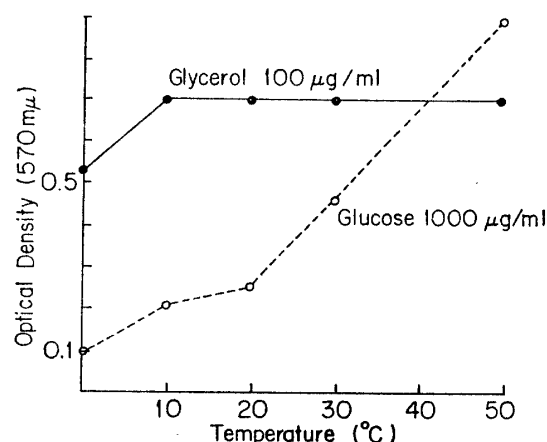


Fig. 2 Effect of the temperature of periodic acid oxidation on glycerol determination. Incubation time: 5 min.

そこでグルコースの反応が押えられ、グリセリンの酸化が充分進む条件を選ぶために、0°Cおよび15°Cの温度条件での反応時間の影響を調べて、Fig. 3 を得た。この場合グルコースの反応は15°Cに比べて、0°Cにおいて押えられるのに対し、グリセリンでは0°C, 15°Cの反応条件の差異は小さかった。更に0°C, 30分と室温での反応を考慮しての15°C, 5分および50°C, 60分の強い過ヨウ素酸酸化条件のもとに、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のグリセリンを添加させた場合のグルコースあるいはデンプン

プンの濃度変化に対する O.D. 値およびグルコースあるいはデンプンのみの系での濃度変化に対する関係を検討したところ, Fig. 4 にみられるようにデンプンは 50°C, 60 分の強い酸化条件でも反応せず, デンプンを共存させてもグリセリンの定量に影響しないことがわかった. またグルコースは 0°C, 30 分では他の条件と

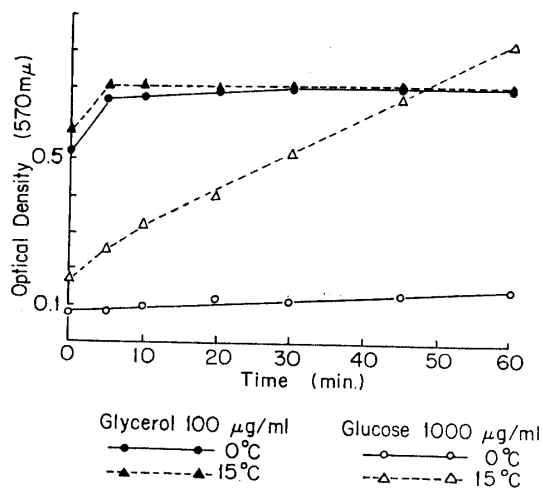


Fig. 3 Effect of time of periodic acid oxidation on glycerol determination.

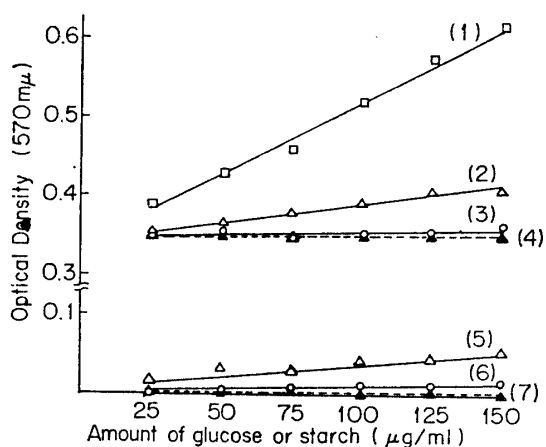


Fig. 4 Relation between amounts of glucose or starch and optical density under various conditions of periodic acid oxidation.

- I. glucose containing 50 $\mu\text{g/ml}$ of glycerol
 - (1) 50°C, 60 min.
 - (2) 15°C, 5 min.
 - (3) 0°C, 30 min.
- II. starch containing 50 $\mu\text{g/ml}$ of glycerol
 - (4) 15°C, 5 min or 50°C, 60 min.
- III. glucose alone
 - (5) 15°C, 5 min.
 - (6) 0°C, 30 min.
- IV. starch alone
 - (7) 15°C, 5 min or 50°C, 60 min.

比べてきわめて反応が押えられることを認めた. そこでグルコースの反応を押え, グリセリンの反応が充分に進む酸化条件として, 0°C, 30 分を選択した.

2. 検量線 次に過ヨウ素酸酸化条件, 0°C, 30 分を用いて, 150 $\mu\text{g/ml}$ のグルコース添加および無添加の場合のグリセリンの検量線を求めて, Fig. 5 を得た. この場合両者の間に若干の相違が認められたが, 誤差を 3% 以内に押えることができた. 一方従来法の 15°C, 5 分では 8% 誤差をもった. またデータに記載していないが, 培地に多量に存在する NaCl, KH_2PO_4 および CaCO_3 などの無機塩類の本定量方法に及ぼす影響は全く認められなかった. 以上のように本法はきわめて簡便であり, しかも短時間に多数の試料を定量できる利点を有している. そこで抗生物質醗酵において, 本定量法を用いて, 醗酵液中のグリセリンの消費を経時的に追ひ, 定量方法の妥当性を検討すると同時に, 特に抗生物質蓄積と糖消費との関係を調べる目的で次の実験を行なった.

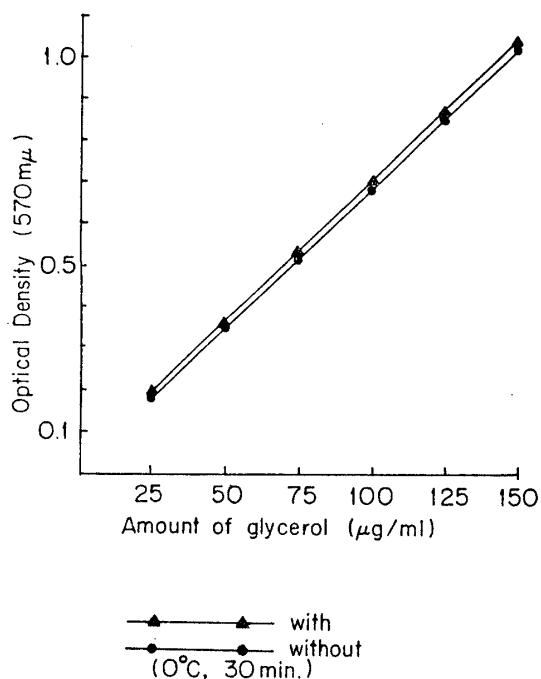


Fig. 5 Standard curve with and without 150 $\mu\text{g/ml}$ of glucose.

3. グリセリンを炭素源とする醗酵 グリセリンを主炭素源とする *Streptomyces* sp. NO. OS-1866 による cycloserine 醗酵の経過を Fig. 6 に示す. グリセリンの急激な消費に伴い抗生物質の蓄積および菌体量の増大が観察され, グリセリンが完全に消費されて, 約 15 時間のち最高の抗菌活性を認めた.

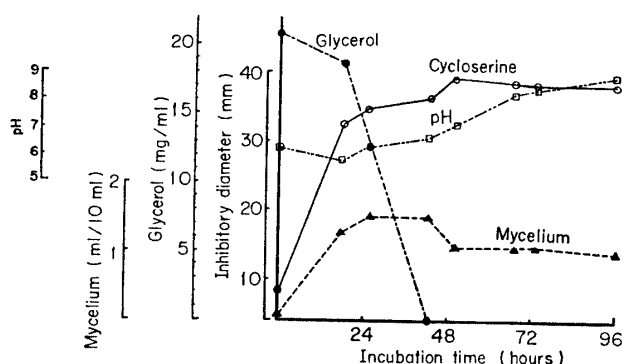


Fig. 6 Cycloserine fermentation.

The medium was composed of 2 % glycerol, 0.5 % peptone, 0.5 % meat extract, 0.3 % dry yeast, 0.5 % NaCl, and 0.3 % CaCO_3 .

4. グリセリンとデンプンを炭素源とする醗酵

Streptomyces sp. NO. OS-1277 によるグリセリンとデンプンを主炭素源とする echinomycin 醗酵の経過を Fig. 7 に示す。Cycloserine 醗酵同様グリセリンの急激な消費が認められ、45時間のちには完全に代謝されたのに対し、デンプンの消費は緩慢でその消費が低下した後に、抗生物質生産が最大に達した。しかし本培地中には炭素源としての 1 %デンプンの他に窒素源として添加している大豆粉（窒素含量；3.51% (w/w), 小川産業株式会社製）中に酸加水分解で 61% (w/w) のグルコースを生成する多糖類が含有されている。培養開始時不溶物として存在する大豆粉が菌の活発な代謝に伴い次第に培地中に可溶性物質として溶解資化されるものと思われる。不溶物を除去して試料に供している我々の分析方法では見掛け上はデンプン消費がかなり培養初期の段階で停止した状態にあると推察された。

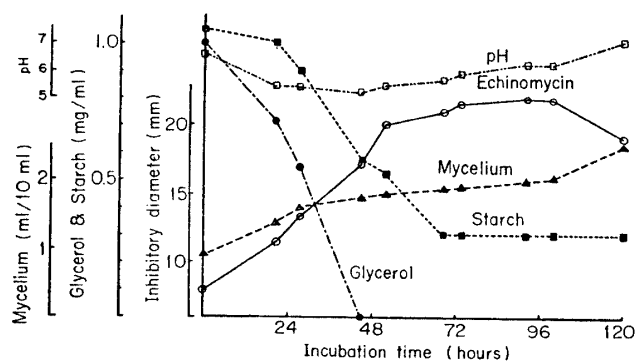


Fig. 7 Echinomycin fermentation.

The medium was composed of 1 % glycerol, 1 % starch, 2 % soy bean, 0.2 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.3 % dry yeast, 0.1 % K_2HPO_4 , 0.5 % NaCl, and 0.3 % CaCO_3 .

5. グリセリンとグルコースを炭素源とする醗酵

グリセリンとグルコースを主炭素源とする培地を用いて、*Streptomyces* sp. NO. OS-786 による streptomycin 醗酵を検討した。その培養経過を Fig. 8 に示す。図から明らかなように、前述の cycloserine, echinomycin 醗酵同様に、グリセリンは45時間ではほぼ完全に消費された。このように菌株および培地組成の異なる抗生物質醗酵において、グリセリンの代謝速度がほぼ等しいことが認められた。また興味あることはグルコースの代謝がグリセリンのそれよりもおくれる現象が観察されたことである。

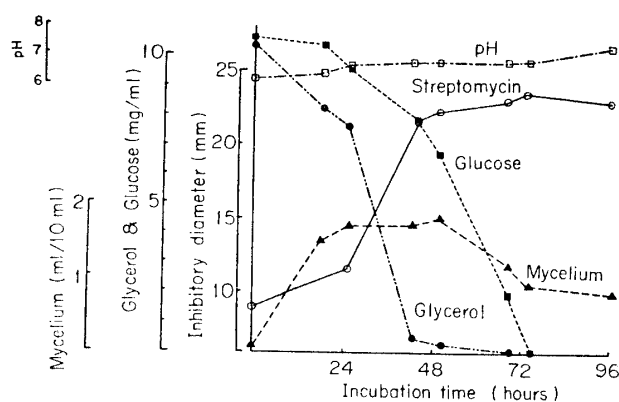


Fig. 8 Streptomycin fermentation.

The medium was composed of 1 % glycerol, 1 % glucose, 0.5 % peptone, 0.5 % meat extract, 0.3 % dry yeast, 0.5 % NaCl, and 0.3 % CaCO_3 .

醗酵は増殖過程と生産過程が同一槽内で行なわれるのが普通で、菌体増殖のよいものが必ずしも生産性のよさと結びつかない。一方放線菌による抗生物質生産の場合は増殖速度の活発な trophophase ならびにそれから引き続く増殖速度が低下し、抗生物質生産が活発となる idiophase の2つの phase が知られているが、この trophophase から idiophase への順調な転換こそ抗生物質生産に大切な要素とされている。また actinomycin 醗酵でガラクトースがグルコースより炭素源としてすぐれているのは、ガラクトースがグルコースより代謝がゆるやかで idiophase の時期に移っても十分な炭素源を供給できるからとしている¹⁰⁾。しかしながら本実験でみるようにグルコースの消費がグリセリンのそれよりもおくれ、しかもグルコースよりもグリセリンが抗生物質生産にすぐれている場合、上記のような説明は不十分であると思われる。また実験を行なった3種の抗生物質醗酵においては糖消費が完全に終了したのち抗生物質生産が最高に達した。

総 括

醗酵液中のグリセリンの定量, 特にグルコース共存下での定量を過ヨウ素酸化で生ずるホルムアルデヒドをクロモトロープ酸で発色させる West らの方法をもとに検討した。その結果, 0°C, 30 分の過ヨウ素酸化条件で行なう醗酵液中のグリセリンの比色定量法を確立した。更に 3 種類の抗生物質醗酵で本定量法を応用し, 次の知見を得た。

- 1) グリセリンの消費はグルコース, デンプンのそれよりも活発で, いづれの醗酵においてもほぼ45時間のうちに完全に消費された。
- 2) 糖消費が完全に終了したのち, 抗生物質の蓄積が最高に達した。

終りにのぞみ, 本研究に際し, 実験に協力された北里大学学生的小林和子氏, 北里研究所の増間倅郎氏, 宇佐見弘氏に深謝致します。

文 献

- 1) Katz, E., Pienta, P., Sivak, A.: *Appl. Microbiol.*, **6**, 236 (1958).
- 2) Kimura, A.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 845 (1967).
- 3) Smith, C. G., Hinman, J. W.: *Prog. Ind. Microbiol.*, **4**, 137 (1963).
- 4) Walker, J. B., Hnilica, V. S.: *Biochem. Biophys. Acta*, **89**, 473 (1964).
- 5) Katz, E.: *Antibiotics*, (Gottlieb, D., Shaw, P. D.), Vol. **2**, 276, Springer-verlag. Berlin, New York (1967).
- 6) Omura, S., Iwai, Y., Nakagawa, A., Otani, M., Hata, T., Ito, S. and Matsuya, T.: *J. Antibiotics*, **24**, 353 (1971).
- 7) West, C. D., Rapaport, S.: *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, **70**, 141 (1949).
- 8) Burton, R. M.: *Methods in Enzymology* (Colowick S. P., Kaplan, N. O.), Vol. **3**, 43, Academic press, New York and London (1957).
- 9) Hyvarinen, A., Nikkila, E. A.: *Clinica Chemica Acta*, **7**, 140 (1962).
- 10) Demain A. L.: *Lloydia*, **31**, 395 (1968).

(昭46.5.14受付)