

[J. Ferment. Technol., Vol. 50, No. 1, p. 1~6, 1972]

Ashbya gossypii によるリボフラビン生成 機構に関する研究

(第 4 報) 紫外線照射変異株の生理的性質について

小野崎博通・南 公子

(相山女学園大学家政学部食物学教室)

Studies on the Mechanism of Riboflavin Biosynthesis by *Ashbya gossypii*

(IV) Comparison of the Physiological and Biochemical Characteristics between
a Mutant Obtained by UV-irradiation and the Parental Strain

Hiromichi Onozaki and Kimiko Minami

(Department of Food and Nutrition, Sugiyama University, Nagoya)

A mutant strain of *A. gossypii* (W) obtained by ultraviolet irradiation synthesized considerably less riboflavin than the parental strain (Y). On the metabolism of glucose, both R.Q. values and the amount of anaerobic CO₂ evolved by the mutant were more than 2 times that of the parental strain. The mutant strain, in submerged culture produced large amounts of ethanol and acetic acid.

The results infer that the mutant strain might have more fermentative systems while the parental strain has more oxidative systems.

緒 言

著者らは *A. gossypii* によるリボフラビン (B₂) 合成を微生物生理の面から究明することを目的として、本菌の発育ならびに代謝と B₂ 生成との関係について研究を続けてきたのであるが¹⁾、今回は B₂ 生成株を紫外線照射して得た白色変異株と元の黄色株との生理的性質を比較した。

Kaprálék²⁾ は本菌の類縁菌である *Eremothecium ashbyi* の B₂ 生産が三倍も異なる二種のタイプの菌株を比較して、この両者の間には B₂ の生成およびピルビン酸を基質とした時の酸素呼吸量の差異をのぞいて生理的性質にあまり差がないとしている。

Goodwin³⁾ によれば *A. gossypii* は *E. ashbyi* にくらべて自然変異しにくいとしているが、Pridham and

Raper⁴⁾ は紫外線および X 線照射などにより安定した B₂ 生成能力の大きい変異株が得られるとのべている。

本報告では紫外線照射によって B₂ 生成能力を失った変異株と親株との間の菌体発育、B₂ 生成、培養液の pH、グルコースの好気的および嫌氣的代謝、それに発酵生産物等について比較検討した結果を報告する。

実験方法

1. 供試菌 *Ashbya gossypii* は(財)発酵研究所(IFO 0560)より分譲を受けた後、約20日ごとに増殖培地に移植培養して保存してあったものである。
2. 増殖培地 グルコース 2%, ポリペプトン 0.5%, 酵母エキス 0.3%, 麦芽エキス 0.3% (固体培地の場合はこれに寒天 2% を添加する) からなる組成の培地を 121°C, 15 分間オートクレーブした。

3. 紫外線照射変異株 上記増殖培地をペトリ皿(直径11 cm)に流し固めた平面培地上に供試菌胞子の生理食塩水懸濁液 1 ml ずつを注ぎ分散させ, 15 cmの距離から紫外線を50秒間照射した。紫外線照射にはアクメ紫外線応用鑑識器(島津製作所, 200V, 3 A)を使用した。照射後 30°C に 24~48時間培養し, 生じたコロニーの中には原株に比して白色を呈するコロニーが約 0.5%の割合で認められたが, これらを白金線で釣って新しい斜面培地に植えて培養した。平板培養法で一度純粋分離を行なった後, 斜面培地に累代培養した。このようにして得た白色変異株は B₂ 生成能を完全に失ったというわけではなく, 培養初期はコロニー全体が白色であるが, 次第に部分的に B₂ 生成にもとづく黄色を呈するようになる。それまでの期間が親株にくらべると長く, 2週間以上を要する場合が多い。その中でも特に白色の持続時間が長い1株を約3年間累代培養してきたものを白色変異株(W)とし, 親株を(Y)とした。

4. 菌体量 振盪フラスコ中の前記増殖培地 100 ml に供試菌斜面培養より接種し, 48時間30°Cで振盪培養(振幅 7 cm, 120回往復/分)した前培養より一定量ずつ新しい同培地に接種し30°Cで振盪培養して得た培養液を吸引し過し, 洗滌した菌体を秤量びんに採り 80°Cで24時間乾燥して乾燥菌体量を測定した。

5. 総 B₂ 量 培養液を過して, 菌体に 0.25N H₂SO₄を加えて80°C, 15分間浸出した後, 濾液および浸出液を合して一定容とし, それから一部採ってルミフラビン蛍光法¹⁾により総 B₂ 量を測定した。蛍光の測定には日立蛍光光度計 203 型を使用した。

6. pH 日立・堀場 M5 型 pH メーターを使用し, 直接に培養液の pH を測定した。

7. ピルビン酸 Friedmann-Haugen 法の改良法⁵⁾で定量した。すなわち培養濾液 2 ml に10%トリクロル酢酸 10 ml を加えて除タンパクし, 上清 8 ml を約 25 ml 容の沈澱管にとり, 25°Cにおいて DNP 試薬(2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 0.5 g を 2N HCl に溶解して 100 ml としたもの) 0.7 ml を添加して 25°C, 5分間反応させる。キシロール 8 ml を加えて毛細管から空気を送入し, 3分間強く攪拌した後二層に分離した上層のキシロール部に水 3 ml ずつ加えて数回キシロール層を洗滌し, 水層を除去する。つぎに10%炭酸ナトリウム溶液 6 ml を加え毛細管で3分間通気攪拌し二層に分離した水層から 5 ml とり, 400mμの波長で比色定量した。

8. アンモニア Conway の微量拡散法とインドフェノール法との組合わせによる方法⁶⁾で定量した。す

なわち培養濾液 0.5 ml から生ずるアンモニアを微量拡散器中で 0.005N H₂SO₄ 1 ml に吸収させ (38°C, 2時間) たものをインドフェノール法によって625mμの波長で比色定量した。

9. アルコール類のガスクロマトグラフィー 培養濾液 100 ml を10% NaOH で中和して直火で蒸溜し中性溜液 50 ml を得, これを試料としてガスクロマトグラフィーを行なった。得られたクロマトグラムのピーク面積は半値幅法によって求め, 同時に測定した各アルコール標準液との保持時間およびピーク面積の比から定性ならびに定量を行なった。装置は島津 GC 4A型を使用した。ガスクロマトグラフィーの実施条件はつぎの通りである。

カラム; ステンレス 3mm×3m,

カラム充填剤; Diasolid L に Carbowax 20M を 10%塗布したもの(日本クロマト),

カラム温度; 90°C, 恒温,

検出器; 水素炎イオン型,

窒素ガスの流速; 40 ml/min,

試料注入量; 1 μl.

10. 揮発性脂肪酸のペーパークロマトグラフィー

培養濾液中の酢酸など揮発性脂肪酸の検出には培地 100 ml より得られた培養濾液を硫酸酸性にして水蒸気蒸溜を行ない溜液 300 ml を得, これを 0.1N NaOH で中和滴定して酸度測定の終わったものを減圧濃縮して約 50 ml とし, エーテル抽出液を濃縮して少量としたものを試料として Manganelli and Brofazi の方法⁷⁾によってペーパークロマトグラフィーを行なった。すなわち試料溶液および種々の酸の標準液をエチルアミン溶液で pH 8.0 から 9.0 に調節し, これらを東洋濾紙 No. 50 の一端から 6 cm のところにスポットし, それがかわいた後, 展開溶媒として *n*-ブタノール: 水(1:1)の上層 490 ml に33.3%エチルアミン 10 ml を加えて振った上層を使用し下降法で展開した。乾燥後クロルフェノールレッド(200 mg/100 ml 95%エタノール)の浅い液槽に濾紙をつけて風乾する。酸類のエチルアミン塩は黄色をバックに紫色のスポットとなってあらわれる。

11. QO₂ および QCO₂ 変異株および親株の洗滌菌体または無細胞抽出液によるグルコースあるいはピルビン酸を基質とした時の QO₂ および QCO₂ は, 前報¹⁾のようにしてワールブルグ検圧計によって測定した。

12. 洗滌菌体 前記増殖培地 100 ml に30°C, 24時間振盪培養した菌体を過し, 洗滌後生理食塩水に懸濁してさらに30°Cで24時間 starved culture を行なった洗滌菌体を過し, 生理食塩水 40 ml に懸濁して供試

した。

13. 無細胞抽出液 増殖培地 100 ml に30°C, 24時間振盪培養した菌体を濾過し, 生理食塩水で洗滌した後, 乳鉢中で菌体に 10 ml の緩衝液 (検圧実験に使用するものと同じ) およびアルミナを加えて磨砕した。その後遠心分離 (9000 rpm, 40分) を行ない上澄液を酵素原液とし, これを5倍に希釈したものをワールブルグ実験に使用した。

実験結果

1. 培養経過 *A. gossypii* の親株 (Y) および変異株 (W) の振盪培養中における菌体発育, 総 B₂ 生成量, pH の変化, ピルビン酸ならびにアンモニアの生成量等について比較した。結果は Fig. 1 および 2 にみられる通りで, 培地 100 ml から得られる乾燥菌体量は48時間前後でY株の方が約20%多いが, その後Y株は自己消化の傾向が強い。総 B₂ 量はY株は最高 1.06 mg の生成がみられたが, W株の場合は痕跡程度であった。pH は両者とも大体24時間までは同程度に低下し約4.5附近からY株の方はまた上昇し pH 8 近くで一定となるのに対し, W株では pH 4 前後のまま持続する。ピルビン酸はY株の場合には72時間で最高の 380 $\mu\text{g/l}$ に達するが, W株では24時間で 120 $\mu\text{g/l}$ で, その後減少する。アンモニアについては, 培養48時間位までは両者とも生成量わずかであるが, その後Y株は急激にアンモニア生成量が増加し5日後には25 mg/l に達するがW株におけるアンモニア生成量の増加はごくわずかで 5 mg/l までである。

2. QO_2 および QCO_2 Y株およびW株の洗滌菌体によるグルコースの好氣的ならびに嫌氣的代謝の割合をワールブルグ検圧計によって測定して比較した。その結果は Table 1 に示した通りで, グルコース 酸化

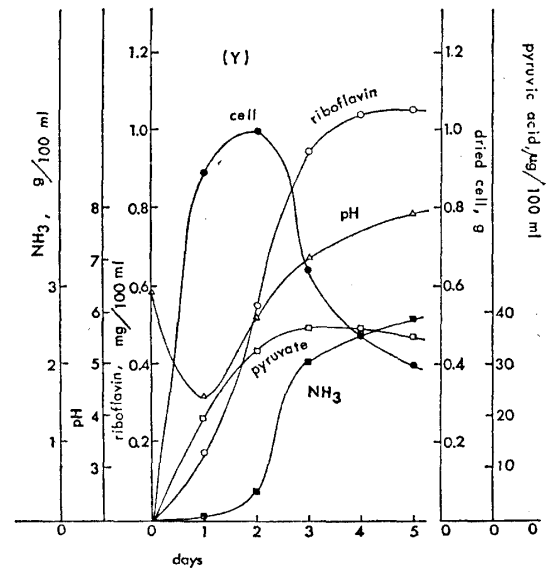


Fig. 1. Time course of submerged culture of *A. gossypii* Y (wild type) strain.

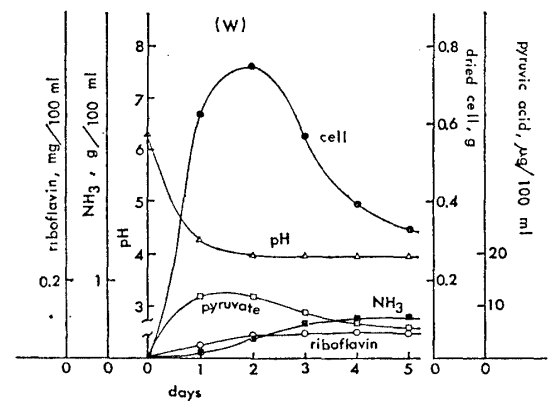


Fig. 2. Time course of submerged culture of a mutant W of *A. gossypii*.

の QO_2 はW株の方が低いにもかかわらず QCO_2 は逆にY株の方が低い値を示している。すなわち60分にお

Table 1. QO_2 and QCO_2 of resting cells on glucose and of cell free extracts on pyruvate.

substrate	glucose			pyruvate	
	resting cell			cell free extract	
gas phase	air			N ₂	
	QO_2^*	QCO_2^{**}	RQ	QCO_2^{**}	QCO_2^{*3}
Y	7.1	13.1	1.85	14.3	72.3
W	4.1	17.0	4.15	34.0	95.8

* $\text{QO}_2 = \text{O}_2 \mu\text{l/mg}$ (dried cell)/hr.

** $\text{QCO}_2 = \text{CO}_2 \mu\text{l/mg}$ (dried cell)/hr.

*3 $\text{QCO}_2 = \text{CO}_2 \mu\text{l/mg}$ N/hr.

ける RQ (Q_{CO_2}/Q_{O_2}) を計算すると W 株は Y 株の約 2 倍となっている。またマノメーターおよび容器内の気相を窒素ガスで置換して嫌氣的条件下で生ずる CO_2 量を両者の間で比較したところ W 株は Y 株の約 2.4 倍の CO_2 を生成した。さらに Y 株および W 株の 24 時間培養の菌体より調製した無細胞抽出液を酵素材料としてピルビン酸を基質として嫌氣的条件下で生成する CO_2 量を測定して比較した。この場合、両者の CO_2 生成量の差は洗滌菌体によるグルコースの嫌氣的代謝の時ほどではないが、やはり W 株の方が Y 株に比べて CO_2 生成量大であった。

3. 発酵生産物 ワールブルグ実験より *A. gossypii* は好氣的条件下での糖代謝では RQ が高く、また嫌氣的に CO_2 を多く生成し、この傾向は特に W 株において著しいところからそれぞれの菌株の発酵生産物を検索し定量を行なった。すなわち各々の培養液を蒸溜して得た中性溜液についてガスクロマトグラフィーを行なって、同じ条件で実施した標準物質との保持時間の関係から生成物の同定を行ない、ピーク面積比から定量を行なった。

その結果は Fig. 3 にみられるように、発酵液の中

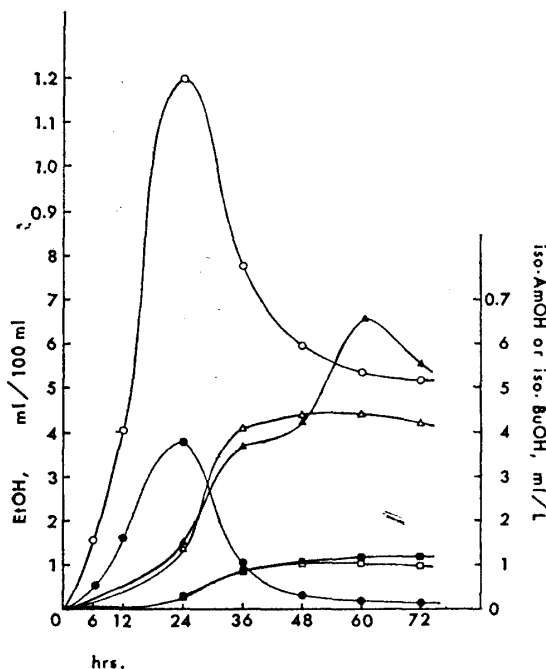


Fig. 3. Comparison of alcohol production between a mutant (W) and a wild (Y) strain.

- ethanol (Y)
- ethanol (W)
- isobutanol (Y)
- isobutanol (W)
- ▲—▲ isoamyl alcohol (W)
- △—△ isoamyl alcohol (W)

性区分中にはエタノール、イソブタノールおよびイソアミルアルコールが検出され、特に W 株の場合エタノールの生成が著しいことが注目される。このエタノールの生成は培養初期に多く漸減している。また Y 株および W 株の培養液を硫酸々性にして水蒸気蒸留して得た溜液中の揮発性脂肪酸をペーパークロマトグラフィーで検索したところ Fig. 4 にみられるように W 株では酢酸のみが検出されたが、Y 株の場合は培養初期においては酢酸のみがごく微量認められ、後になってイソ吉草酸およびイソ酪酸も生成されることが認められた。溜液に対する 0.1 N NaOH の滴定酸度は Fig. 5 にみられるように培養 24 時間前後から増加して 4 日ないし 5 日で一定に達するが、その場合 W 株は Y 株にくらべ約 5 倍もの滴定酸度を示した。

考 察

ここに供試した *A. gossypii* の紫外線照射変異株 (W) は、分離してから約 3 年間、斜面培地に 2 週間の間隔で移植を続けてきたのであるが、その植え替え時における観察では、コロニーの中央部および周辺部がわずかに黄色を帯びている状態で、Pridham and Raper⁴⁾ の分類に従えば “Substrains synthesizing considerably less riboflavin than the parent strain” のカテゴリーに属するものと思われる。振盪培養における

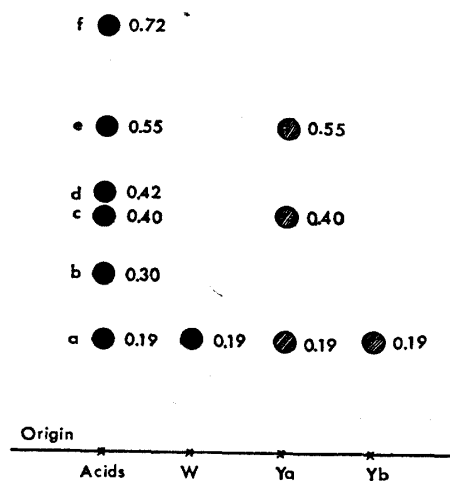


Fig. 4. Paper chromatogram of volatile acids of the cultured medium of *A. gossypii*.

Solvent: *n*-butanol-water (1:1).

W, W strain (7 days culture); Ya, wild Y strain (7 days culture); Yb, Y strain (2 days culture).

Acids: a, acetic acid; b, propionic acid; c, isobutyric acid; d, *n*-butyric acid; e, isovaleric acid; f, *n*-caproic acid.

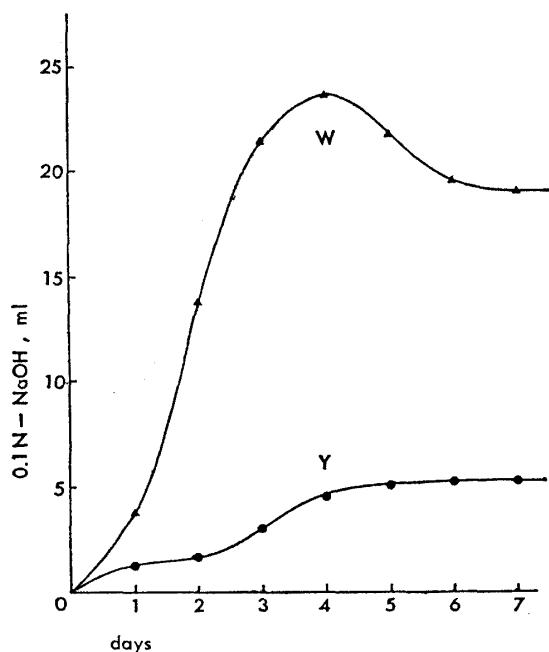


Fig. 5. Titration curves of acidic distillates obtained from the cultured medium of *A. gossypii*.

Y: wild type W: mutant W

W株の B_2 生成は痕跡程度にすぎず親株 (Y) と大きな相違がみられる (Figs. 1, 2). 菌体発育は Y 株の方が勝るが, これはまた自己消化の傾向も強く, 振盪培養において W 株は pellet の状態を長く続けるのに対し, Y 株の菌体はすみやかに崩壊していき培養液の汚濁も困難となる. 培養がすすむにつれて Y 株の培養液中のアンモニア生成量が増大するのはこの自己消化と関連が深いものと思われる. また培養中の pH 曲線についてみると, 培養初期の 24 時間位までは Y 株も W 株も pH が低下する. これはピルビン酸の生成によるためと思われるが, その後 Y 株では pH の上昇がみられ, これは Mickelson⁸⁾ の結果と一致する. この原因としては自己消化等によって生じたアンモニアの蓄積が考えられる. それに比べて W 株の方は pH が低下したままであるが, これはアンモニア生成量が少ない上に, 酢酸を多量に生成する (Fig. 5) ためと思われる.

検圧実験の結果, 好氣的条件下におけるグルコース分解の際, Q_{O_2} に比べて Q_{CO_2} の方が大であることは W も Y も同様であり (Table 1), この点 Mickelson も本菌の好氣的なグルコース分解の初期の pathway が酵母のアルコール発酵に類似することを指摘している⁸⁾. 著者らの実験では特に W 株の場合, Y 株の約 2 倍の RQ であった. 嫌氣的条件下におけるグルコース分解の際の CO_2 生成量, さらにピルビン酸の嫌氣

的分解における CO_2 生成量等も W 株の方が大であった.

以上のことから Y 株および W 株によるグルコース代謝の中間生成物の種類およびその量を比較するために発酵生産物について検討した. 培養液の中性溜液をガスクロマトグラフィーで分析した結果, 両株ともエタノールの生成がみられるが, その蓄積量が最大に達する培養 24 時間では W 株は Y 株の約 4 倍も多くのエタノール量であり, その後徐々に減っているのに対し, Y 株の場合は急減する (Fig. 3). 本菌が少量のエタノールを生成することは Mickelson⁸⁾ も認めており, 生成したアルコールは強力な好氣的代謝系によって CO_2 に酸化されるとのべている. W 株のエタノール蓄積量が大であるのはその生成系の活性の強いことも考えられるが, 生成したエタノールの代謝系が親株にくらべて変異株では大きく変ったということも十分考えられる.

また Y 株も W 株も中性溜液中にエタノールのほかに, 培養後期になってイソブタノールおよびイソアミルアルコールが検出され, その生成量は両株の間に差異はない.

W 株において生成したエタノールの漸減に続いて相当量の酢酸の生成が認められた (Figs. 4, 5) のに対し, Y 株では酢酸は痕跡程度である. これに関連して Kaprálek²⁾ によれば, *E. ashbyi* ではピルビン酸を酢酸にまで酸化脱炭酸することができないとしている.

A. gossypii についての見解を得ていないが, 親株と変異株とではこの代謝系が変換したことが示唆される.

A. gossypii の培養液中にエタノールおよび酢酸のほかイソブタノール, イソアミルアルコール, イソ酪酸およびイソ吉草酸等が存在することは, それ等の生成過程についてはまた後にゆずるとして, これ等の成分は *A. gossypii* の培養液が一種の芳香を生ずるその香気成分を構成しているものと思われる.

以上本研究に供試した変異株 W 株が親株 Y 株と顕著に変異した点は B_2 生成能のほかに呼吸代謝系の変換ならびにそれにともなう発酵生産物の相違があげられる. これらの両者間の相違がいかにも本菌の B_2 生成能に関連性があるか, また B_2 生成能を支配する因子は何かというようなことなどについて現在の段階ではまだ明確にできない. Kaprálek²⁾ は *E. ashbyi* についてなぜこの微生物が B_2 のような生理的に活性の高い化合物を多量に生成するかを詳細に検討した中で該菌の末端呼吸系は培養初期にはチトクローム系であるが次第にフラボプロテイン系にシフトされるとしている.

Y株およびW株の呼吸系の変換と B_2 生成能の相違とが密接な関係を有すると思われるが、この点はさらに追及を続けて行きたいと思っている。

要 約

A. gossypii を紫外線照射して得た白色変異株(W)と親株(Y)との生理的性質を比較して次のような諸結果を得た。

1. W株は固体培地上の発育は外観的にY株と大差ないが、 B_2 生成能はかなり低く、約20日間の培養後の観察ではコロニーの周辺と中央部がやや黄色をおびるようになる。振盪培養では B_2 をY株が約 10 mg/l 生成する間にW株は痕跡程度である。
2. 菌体発育はY株の方がまさるが、この方はまた自己消化も早い。この間W株の菌体は pellet 状を保つ。
3. 振盪培養中の培養液の pH 曲線はY株とW株とではかなり相違し培養初期に低下した pH はY株ではその後上昇するのに対し、W株では低い pH を持続する。
4. 培地中のピルビン酸の蓄積についてはY株では時間とともに増加し72時間では 380 $\mu\text{g/l}$ に達するのに対し、W株では24時間で 120 $\mu\text{g/l}$ でその後減少する。
5. 培養液中に蓄積するアンモニア量を比較したところ培養48時間位は両者ともわずかであるがその後Y株は急激に増加し、菌体の自己消化そして pH の上昇と比例する。
6. 検圧実験の結果、グルコース酸化の際の RQ はW株の方がY株の約2倍にもなり、また嫌氣的にもW

株はY株の2倍以上の CO_2 を生成した。

7. 両者の発酵生成物の種類ならびに量を比較検討したところ、W株ではエタノールおよび酢酸を多量に生成し、Y株ではピルビン酸の蓄積がみられた。また両者ともイソブタノールおよびイソアミルアルコールが培養液中に検出された。

終りに臨み終始御指導御鞭撻を賜った岐阜大学友枝幹夫教授に深謝いたします。

文 献

- 1) 小野崎：ビタミン, **21**, 508 (1960), **22**, 85 (1961).
 - 2) Kaprálek, F.: *J. Gen. Microbiol.*, **29**, 403 (1962).
 - 3) Goodwin, T.W.: *The Biosynthesis of Vitamins and Related Compounds*, p. 26, Academic Press, N. Y. (1963).
 - 4) Pridham, T.G., Raper, K.B.: *Mycologia*, **44**, 452 (1952).
 - 5) 実験農芸化学, 東大農化編, 下巻, p. 514, 朝倉書店 (1960).
 - 6) 波多野, 桐田: 化学の領域, 増刊34, p. 46, 南江堂 (1958).
 - 7) Manganelli, R.M., Brofazi, F.R.: *Anal. Chem.*, **29**, 1441 (1957).
 - 8) Mickelson, M.N.: *J. Bacteriol.*, **59**, 659 (1950).
- (昭46.9.13受付)