

エタノールを単一炭素源として増殖した *Pseudomonas fluorescens* S543 菌株によるインドール酢酸および抗カビ性抗生物質の高生産

御厨 崇広・福島 真紀・柳 英邦*
永松 康德・吉本 明弘

広島大学生物生産学部, 東広島市 739-8528
2001年9月30日 受付

要旨 エタノール資化性 *Pseudomonas fluorescens* として土壌より単離・同定した菌株をエタノールを唯一の炭素源とする培地で培養するとき, 抗カビ性抗生物質 (pyoluteorin および 2,4-diacetylphloroglucinol) と植物成長ホルモン indole-3-acetic acid を著量に共成することを認めた。本菌による抗生物質およびホルモンの生産はエタノール以外の炭素源培地で培養した場合には認められない。また, 両生産の挙動は類似しており, リン酸塩や食塩の添加で顕著に抑制され, 硫酸マグネシウムやミネラルの添加で促進されることがわかった。前駆体 L-トリプトファンを 0.1% 添加した基本エタノール培地で約 30 μ g/ml の Indole-3-acetic acid および 45 μ g/ml の pyoluteorin を生成し, それぞれ文献値をはるかに凌駕した。本菌は野菜等の植物栽培に対する biocontrol agent として有利に利用できるものと期待される。

キーワード: エタノール資化性菌, *Pseudomonas fluorescens*, インドール酢酸, pyoluteorin, 2,4-diacetylphloroglucinol, エタノール, biocontrol agent

緒 言

われわれはこれまで発酵原料としては未開のエタノールを使用して, 有用なバイオケミカルズの発酵生産を開拓中であるが, 既にバイオサーファクタントや抗生物質の生産にエタノール培地が有効であることを見出ししている (MATSUJIMA *et al.*, 1997; YUAN *et al.*, 1998; CANG *et al.*, 2000)。本報はエタノール利用菌株として土壌より単離し, *Pseudomonas fluorescens* と同定した数菌株, 特に S543 菌株, がエタノール培地で培養するとき植物成長ホルモン indole-3-acetic acid (IAA) (GRUEN, 1959) を著量に生産することを見出したので報告する。

IAA の生産は植物の生育と接点を持つ多数の微生物, 例えば rhizosphere bacteria あるいは plant-pathogenic bacteria として知られている細菌類 pseudomonads (MORDUKHOVA *et al.*, 1998; OBERHANSLI *et al.*, 1991; FETT *et al.*, 1987), xanthomonads (FETT *et al.*, 1987), *Bradyrhizobacteria* spp. (YAGI *et al.*, 2000), *Azospirillum* spp. (HARTMANN *et al.*, 1983) や *Enterobacteria* (KOGA *et al.*, 1994; MANULIS *et al.*, 1991), *Anthrobacter* spp. (FORNI *et al.*, 1992), 放線菌 (EI-SAYED *et al.*, 1987) などのほか phototrophic bacteria (RAJASEKHAR *et al.*, 1999) や pathogenic fungi (SEQUERIA, L., 1973) などの広範な微生物株で明らかにされているが, 通常その生産はグルコースやグリセロールなどの糖質炭素源培地を用い, 前駆体 L-tryptophan 存在下で培養するとき 0.1~10 μ g/ml 程度の生産が認められている。IAA 生産は病原性菌の病原性の発現に関係するとの報告があるが, その詳細は明らかではない (SURICO *et al.*, 1985; LIU *et al.*, 1982)。一方, rhizosphere bacteria の一つ *Pseudomonas fluorescens* は植物の生育の biocontrol agent として機能している見方が高まり, その応用面で注目を集めている (LAVILLE *et al.*, 1992)。当菌は抗カビ性抗生物質として HCN, phenazine-1-carboxylic acid, pyoluteorin (PLT) や 2,4-diacetyl-phloroglucinol (DAPG) 等を生産する

* 広島県芸北地域事務所地域営農課 〒731-0221 広島市安佐北区可部 4-12-12

ことが明らかにされており、植物病原性菌の植物根への感染防止に貢献していると考えられている (O'SULLIVAN and O'GARA, 1992)。われわれは先に土壤から単離したエタノール資化性 *P. fluorescens* S272 菌株がエタノール培地で特異的に PLT や DAPG を生産することを明らかにしているが (YUAN *et al.*, 1998)、これらの菌株が同時に IAA の生産能を有するとすれば、植物の病原性菌の阻止と同時に成長促進の 2 面で応用可能な菌株として有用であると考えられる。本論文ではエタノール資化性菌として単離・同定した *P. fluorescens* 菌株中にこの二面性を有する菌株が存在することを認め、特に高生産を示した S543 菌株を用いて、IAA および抗生物質の生産条件について明らかにした。

材料と方法

1. エタノール資化性 *P. fluorescens* 菌株

エタノール資化性 *P. fluorescens* 菌株 S272, S337, S352 および S543 菌株は 2% エタノール添加合成寒天上でコロニーを形成し得る菌株として、広島県賀茂郡豊栄、同東広島市八本松、同東広島市高屋および同比婆郡東城町から採取した土壤からそれぞれ単離したものである。*P. fluorescens* IFO3080, IFO3507 および IFO13922 は発酵研究所より入手した。これらの菌株は YPG 寒天培地 (yeast extract 0.5%, Polypepton 1.0%, glucose 1.0%, agar 1.5%, pH 7.2) に継代し、5℃ で保存した。これを同 YPG 液体培地 5ml を分注・滅菌した試験管 (内径 16mm×180mm) に接種し、30℃ で一夜振盪培養 (130rpm) して種菌を作成した。この培養液と滅菌 40% glycerol を 1:1 に混合し、1ml ずつエッペンドルフチューブに分注し、-80℃ で凍結保存した。種母培養は上記の試験管培地に融解種菌液の 50ml を接種し、一夜振盪培養したものをを用いた。

2. 培地および培養条件

使用した基本培地は以下の組成であった。エタノール 1.5% (v/v), Polypepton 0.5% (w/v), yeast extract 0.1% (w/v), NaCl 0.1% (w/v), KH_2PO_4 0.05% (w/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% (w/v), ミネラル混液 0.1% (v/v) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の各 0.3 g を 100ml の脱イオン水に溶解した液) で水道水に溶解し、pH は 7.2 に調整した。L-トリプトファンは 0.1% 添加した。

培養試験では培地の 5ml を分注・滅菌した試験管 (上述) に凍結種母の 50ml を接種し、28℃ で 3 日間、往復振盪培養した。

3. 増殖度の測定

培養液を採取し脱イオン水で 5~10 倍に希釈し、島津製分光光度計 (UV-160A) で OD_{600} (濁度) を測定した。

4. IAA 及び抗生物質 (PLT, DAPG) の粗抽出

培養液 1.0ml をとり 3000rpm で 10 分間遠心した。この上清の 0.5ml に 0.2M Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.0) 0.1ml を加え、酢酸エチルを 1.0ml 加えて攪拌した。3000rpm で 10 分間遠心して分離する溶媒層 1 を別取し、残る水層には 0.1M HCl を 0.35ml 加え pH を約 2.5 とし、酢酸エチルを 1.0ml 加え攪拌・抽出し、遠心して溶媒層 2 を得た。溶媒層 1 は抗生物質 pyoluteorin (PLT) を含み、溶媒層 2 は indole-3-acetic acid (IAA) および 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) を含み、それぞれ当該産物の測定用のサンプルとした。

5. IAA 及び抗生物質 (PLT, DAPG) の定量

溶媒層 1 および 2 をそれぞれ濃縮乾固し、微量の酢酸エチルに溶解してシリカゲル 70F₂₅₄TLC プレート (200×200mm) (和光純薬) の下端より 15mm 位に 15mm 間隔に全量をスポットした。このプレートをクロロホルム：メタノール：水：酢酸 (80:15:2:1) の展開液で展開・風乾させた。これに発色試液 (エタノール 90 ml 中に *p*-anisaldehyde 5ml および濃硫酸 5ml を加え混合) を噴霧した後、約 100℃ で 3 分間加熱して IAA および抗生物質 (PLT, DAPG) を発色させた。このプレートを TLC スキャナー (Shimadzu CS-930) を用いて 520nm でスキャンし、IAA はの標準品の種々濃度の TLC のスキャン値で作成した検量線

から量を算出した。本法では IAA $1 \mu\text{g/spot} \sim 20 \mu\text{g/spot}$ の範囲内で直線関係が得られた。PLT および DAPG は、当該スポットのスキャン値（面積積分値）の読み10,000 を 1U とした換算値で便宜上示した。なお、HPLC 法 (YUAN *et al.*, 1998) による一部重複測定により、PLT の 1U は約 1.8mg に、DAPG の 1U 約 3.5mg に相当すると考えられた。

6. IAA の培養調製

IAA の単離・同定のため、0.1% L-tryptophan を添加した基本培地の 50ml を分注・殺菌した 500-ml 容三角フラスコの 20本に、それぞれ S543 菌株の凍結種母 0.5ml を接種し、28°C で 3 日間往復振とう培養した。培養液を集め遠心して培養上清を採取し、1N 塩酸で pH を 3.0 に調製した後、クロロホルム 20ml で 2 回抽出した。クロロホルム層を混合し、濃縮乾固して IAA を含む粗抽出物 (850mg) を取得した。これをクロロホルム 10ml に溶解した後、同溶媒で作成したシリカゲルカラム (径 20mm×300mm, ワコーゲル C-200) に吸着させ、クロロホルム-メタノール (100:5) の 50ml で洗浄し、クロロホルム-メタノール-水 (100:10:1) で溶出した。IAA 溶出画分を濃縮乾固後、分取用メルク TLC プレート (PF₂₅₄) を用いて精製した。展開溶媒にはクロロホルム-酢酸エチル-ギ酸 (5:4:1) を用いた。IAA 分画帯をかきとりクロロホルム-メタノール (3:1) で溶出し、濃縮乾固して純粋な IAA 22mg を得た。

7. 試薬ほか

IAA, *p*-anisaldehyde, TLC プレート および カラムクロマトグラフィー用シリカゲル C-200 は和光純薬より購入した。PLT および DAPG は *Ps. fluorescens* S272 の培養により調製した (YUAN *et al.*, 1998)。

8. 機器分析

¹H および ¹³C NMR は JELG5X500 で測定した。サンプルは CDCl₃-DMSO-d₆ (9:1) に溶解した。FABMS は JEL SX102A でマトリックスとしてグリセロールを用いて測定した。測定は機器分析センターで行った。

結 果

1. エタノール資化性 *P. fluorescens* 単離株の菌学的同定

本研究に供した *P. fluorescens* 菌の 4 菌株 (S272, S337, S352 および S543) は 2% エタノール合成培地上で増殖するコロニーから、抗菌活性を有する菌株を一次選抜し、ついで TLC アッセイにより抗生物質 PLT を生産する菌株として単離したもので、採取した数百土壌サンプルから単離した約 1500 株中で検出された当該菌株 8 株中の 4 菌株である。PLT の生産性および斜面培養で強い蛍光を有することから *Pseudomonas fluorescens* と推定したが、菌学的同定試験の結果、以下の菌学的性状を有することから Bergey's manual of systematic bacteriology (edited by SNEATH *et al.*) に基づき判定し、*P. fluorescens* である

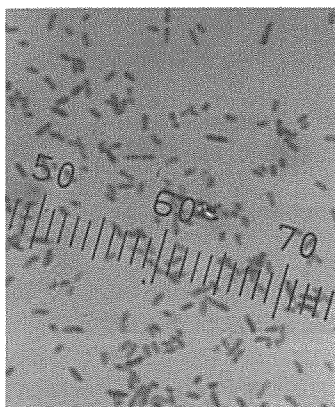


Fig. 1. Microscopic photograph of *P. fluorescens* strain S543.

と同定した。

コロニーの形態は円形，扁平で，その表面は平滑である。また，バター質，半透明で湿光を有し，ベージュ色を呈する。細胞の形態は長桿菌で $0.4\ \mu\text{m}$ の幅を有し，運動性で，孢子形成能のないグラム陽性菌である。図1に代表菌株 S543 の顕微鏡写真を示す。

生理学的性状では，オキシダーゼ活性，硝酸塩還元能，アルギニン分解能およびゼラチン液化能を有し，インドール産生能，グルコース酸化能（嫌気下），ウレアーゼ活性，エスクリン加水分解能および β -ガラクトシダーゼ活性に対しては陰性である。また，炭素源の資化性では，グルコース，マンノース，マンニトール，N-アセチルグルコサミン，グルコン酸カルシウム，n-カプリン酸，dl-リンゴ酸，クエン酸ナトリウムを同化でき，アラビノース，マルトース，アジピン酸および酢酸フェニルを同化できない。

2. エタノール資化性 *P. fluorescens* 単離菌の IAA 生産能

単離したエタノール資化性 *P. fluorescens* 菌の4菌株を，0.1% tryptophan 添加のエタノール培地に培養し，その上清を EtOAc で分別抽出し，TLC を行って *p*-anisaldehyde 試薬を噴霧し加熱発色するとき，図2に示すように Rf 値で0.64（赤紫色），0.58（褐色）および0.53（褐色）を示す特徴的な発色スポットのいずれかの生産が認められた。これらは同時に展開した標準品 IAA，PLT および DAPG に一致した。この TLC 分析によりエタノール資化性4菌株および発酵研究所から入手した *P. fluorescens* 菌株3種について同エタノール培地で培養した場合の IAA および PLT 生産能について調べた結果を表1に示す。単離4菌株中3菌株（S337，S352 および S543）に IAA 生産が認められ，S272 菌株には明確な IAA 生産が認められなかった。一方，発酵研究所より入手した3菌株は同エタノール基本培地での増殖は悪く，また IAA および PLT の生産は認められなかった。

IAA に相当するスポット物質に関しては，S543 菌株を大量培養し，培養上清から溶媒抽出し，シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製取得し，FABMS および ^1H および ^{13}C NMR 等の機器分析を行った結果，

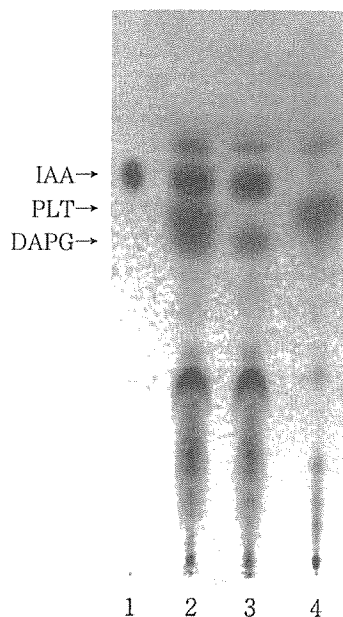


Fig. 2. TLC of secondary metabolites produced by ethanol-utilizing *P. fluorescens* strain S543 when it was grown on ethanol as a sole carbon source.

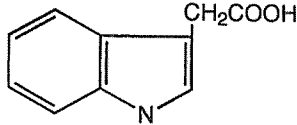
Silica gel plate 70F₂₅₄ and CHCl₃-MeOH-H₂O-AcOH (80: 15: 2: 1) as a solvent system were used. 1. authentic sample of IAA, 2. whole extract from culture filtrate at pH 7.0 with EtOAc, 3. extract from culture filtrate at pH 10 with EtOAc, 4. extract from aqueous layer of 3 at pH 2.5 with EtOAc.

Table 1. IAA or PLT production when *P. fluorescens* strains were cultivated in the basal ethanol medium for 3 days

<i>P. fluorescens</i> strain	Growth (OD ₆₀₀)	IAA	PLT
S272	2.2	-	+
S337	3.3	+	+
S352	3.0	+	+
S543	3.2	+	+
IFO3081	0.6	-	-
IFO3507	1.6	-	-
IFO13922	2.1	-	-

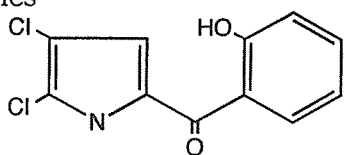
Cultural filtrates were extracted with EtOAc and followed by TLC as described in Materials and Methods. IAA and PLT were detected as spots of R_f values of 0.64 (reddish violet) and 0.58 (orange), respectively, when coloured with *p*-anisaldehyde reagent.

Table 2. Identification data of IAA produced by *P. fluorescens* strain S543 and structures of antibiotics co-produced.

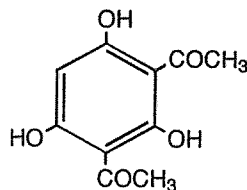
Appearance	white amorphous powder	 <p>Indole-3-acetic acid (IAA)</p>
Molecular formula	C ₁₀ H ₉ NO ₂ (mw. 175)	
FABMS	<i>m/z</i> 176[M+H] ⁺ , 130[M-COOH] ⁺	
NMR* δ H	3.70 (2H, s) 7.03 (1H, t, <i>J</i> =8.1 Hz) 7.11 (1H, d, <i>J</i> =1.5 Hz) 7.16 (1H, d, <i>J</i> =8.1 Hz) 7.36 (1H, d, <i>J</i> =8.1 Hz) 7.57 (1H, d, <i>J</i> =8.1 Hz) 10.10 (1H, brs)	
δ c	31.3, 107.9, 111.4, 118.6, 118.8 121.3, 123.5, 127.2, 136.3, 173.9	

*CDCl₃-DMSO-*d*₆ (9:1)

Antibiotics



Pyoluteorin (PLT)



2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG)

表2に示したとおり IAA であることが確認された。高分解能 FABMS により、本物質は分子式 C₁₀H₉NO₂ (mw. 175) を有し、*m/z* 176[M+H]⁺ に親ピーク、*m/z* 130[M-COOH]⁺ に特徴的なイオンピークを認めた (BADENOCH-JONES *et al.*, 1982)。¹H および ¹³C NMR では、相当する 8 個のプロトンシグナルおよび 10 個のカーボンシグナルが IAA として帰属された。また、共成する PTL および DAPG は先に S272 菌株の生産物として同定されたものと HPLC 分析での R_f 値、R_f 値および発色性がそれぞれ一致することから同一と判定した (Yuan *et al.*, 1998)。

3. IAA および抗生物質生産と培地組成 (炭素源と窒素源)

エタノール資化性 *P. fluorescens* 単離株のうち、IAA および抗生物質に対し高生産能を有する S543 菌株を用いて基本培地の炭素源エタノールをその他の炭素源に代えた培地で培養し、IAA および抗生物質 PLT

の生産について調べた(表3)。本菌を含むエタノール資化性菌株はエタノールを炭素源とするとき最も好適な増殖が得られ、PLT と IAA の生産が認められたが、その他の炭素源グルコース、グリセリン、フルクトースおよびガラクトース等の糖質炭素源を用いた場合には、若干増殖面で劣るものもあるが、すべて IAA および抗生物質の明確な生産を認めなかった。従って、エタノール資化性 *P. fluorescens* 菌株による IAA や抗生物質 PLT の生産はエタノールを炭素源として培養した場合にのみ認められる特異的な現象であることがわかった。この場合、IAA の蓄積は $20 \mu\text{g/ml}$ 前後を記録し、糖質培地を用いた既報の *P. fluorescens* 通常菌株による生産量 ($10 \mu\text{g/ml}$ 以下) に比べてきわめて高い (2 倍以上)。また、共成する PLT の生産も同様に 2~20 倍高かった。

一方、培地の窒素源の IAA 生産に対する効果をみるため、基本培地のポリペプトンを硝酸アンモニウム、大豆粉あるいはグルテンミールに代え、3 濃度レベル (0.3%, 0.5% および 1.0%) で培養試験を行った(表4)。IAA 生産は現行のポリペプトンの使用が良好であった。この場合、濃度は 0.3% 程度が適切で 28mg/ml の生産量となったが、1% の高濃度添加はむしろ不適で、その生産量は 1/3 に低下した。また、抗生物質の生産も同様に 0.3% 添加が最適で、PLT 25U (約 $25 \mu\text{g}$)/ml および DAPG 45U (約 $158 \mu\text{g}$)/ml の生

Table 3. Effect of carbon sources in medium on IAA and PLT productions by *P. fluorescens* strain S543

Carbon source	Growth (OD ₆₀₀)	IAA ($\mu\text{g/ml}$)	PL (U/ml)
Ethanol	3.4	19.1	35
Glucose	2.8	0	0
Glycerol	2.4	0	0
Fructose	2.4	0	0
Mannose	2.4	0	0
Galactose	2.1	0	0
Maltose	1.7	0	0
Lactose	2.3	0	0
Sodium Acetate	1.6	0	0

Various carbon sources as indicated were added in place of ethanol in the basal medium and their effects on IAA and antibiotic productions were determined after 3-day cultivation.

Table 4. Effect of nitrogen sources in medium on IAA and antibiotics productions by *P. fluorescens* strain S543

N source	(w/v) %	Growth (OD ₆₀₀)	IAA ($\mu\text{g/ml}$)	PLT		DAPG
				(U/ml)		
NH ₄ NO ₃	0.3	1.5	6	10		13
Polypepton	0.3	3.5	28	25		45
	0.5	3.1	30	11		20
	1.0	3.9	9	8		14
Soybean meal	0.3	1.4	8	42		25
	0.5	2.0	6	41		23
	1.0	4.7	22	9		44
Gluten meal	0.3	1.5	2	39		9
	0.5	2.3	2	20		8
	1.0	3.5	21	3		23

Three nitrogen sources were added at the indicated concentrations in place of Polypepton of the basal medium and their effects on IAA and antibiotic productions were determined after 3-day cultivation.

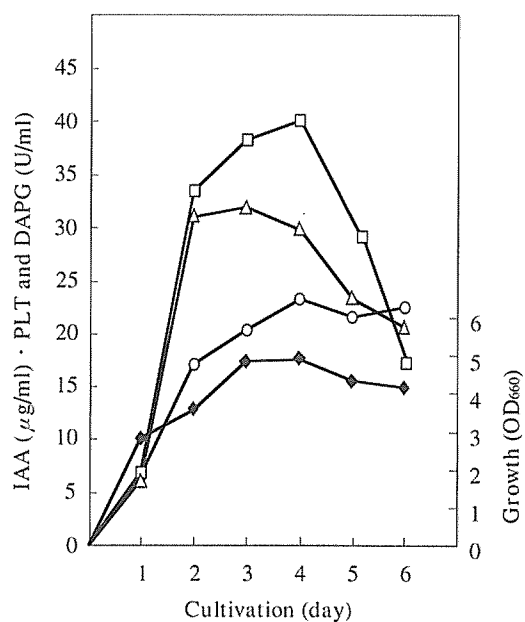


Fig. 3. Time course in IAA and antibiotic productions by *P. fluorescens* strain S543 grown on ethanol as a sole carbon source.

Strain S543 was cultivated for 6 days in the basal ethanol medium, and bacterial growth and productions of IAA and antibiotics were daily determined.

Symbols were: \square —, PLT; \triangle —, DAPG; \circ —, IAA; \blacksquare —, growth.

Table 5. Effect of inorganic ingredients in medium on IAA and antibiotic productions by *P. fluorescens* strain S543

medium	Inorganic compound	(w/v) %	Growth (OD ₆₀₀)	IAA (μg/ml)	Antibiotics (U/ml)	
					PLT	DAPG
Basal medium	not varied	-	3.3	16	23	25
	KH ₂ PO ₄	0	3.1	28	43	41
		0.05	3.1	15	28	26
		0.1	3.1	9	16	19
		0.2	2.4	2	10	10
	MgSO ₄	0	2.5	10	18	16
		0.05	2.4	15	23	25
		0.1	2.6	20	45	23
		0.2	2.9	24	34	20
	NaCl	0	3.2	20	35	25
		0.05	3.1	17	33	20
		0.1	2.6	9	12	7
		0.2	3.0	2	14	7
	Mineral solution	0	2.8	15	28	25
		0.1*	2.7	25	43	37
0.2*		2.7	28	41	43	

* v/v %

Concentrations of respective inorganic ingredients added in the basal medium were varied and their effects on IAA and antibiotic productions were determined after 3-day cultivation.

産を認めた。しかし、特に増殖性で劣る無機窒素源（硝酸アンモニウム）やその他の有機態窒素源（大豆粉やグルテンミール）では IAA 生産が低く、高生産には高濃度（1%）の添加が必要であった。また、この場合でも抗生物質生産にはむしろ低濃度添加（0.3%）が良好であった。

図3は基本培地で培養した場合の IAA および抗生物質生産の経時変化を見たもので、増殖はほぼ3日で定常に達するが、IAA 蓄積量は増殖度に相応して徐々に増加し、4日目に最大値を示したのち一定値を保ったが、PLT および DAPG は対数増殖期に急速に生産され、3日目に最大値に至ったのち以降は急激に減少する傾向を示し、両者の生産・蓄積形態に微妙な差異があることがわかった。

4. IAA および抗生物質生産と培地組成（無機成分）

基本培地中の各無機成分（リン酸1カリ、硫酸マグネシウム、食塩およびミネラル混液）について、4濃度レベル（無添加、0.05%、0.1%、0.2%）で培養試験を行い各無機成分の IAA 及び抗生物質生産に与える影響を調べた（表5）。リン酸1カリと食塩の添加は濃度比例的に IAA 生産を低下させること、また、同時に抗生物質の生産にも抑制効果を示すことがわかった。一方、硫酸マグネシウムの添加は IAA 生産に有効であることがわかった。また、ミネラル混液（ Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} および CO_2^{+} ）の添加も IAA 生産に有効であった。従って、少なくとも基本培地からリン酸1カリと食塩の除去が、IAA および 両抗生物質生産に有効であることがわかった。両組成を除去した改良培地での IAA 生産は $30\sim 40\ \mu\text{g/ml}$ の高レベルとなり、約 $60\ \mu\text{g/ml}$ (33U/ml) の PLT および $290\ \mu\text{g/ml}$ (83U/ml) の DAPG を共成した。

5. エタノール及びトリプトファン濃度と IAA 生産

IAA 生産に対する炭素源エタノールの添加濃度および IAA 前駆体 L-トリプトファンの添加濃度について調べた結果を、それぞれ図4 A および B に示した。基本培地のエタノール濃度を5段階（0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%）に設定し、あるいは L-トリプトファン濃度を5段階（0、0.05%、0.1%、0.2% および 0.3%）に設定して3日間培養し、IAA および抗生物質の生産量を測定した。本菌株のエタノール耐性はおよそ3%で2.5% エタノール培地でも十分に増殖するが、IAA 生産はエタノール濃度には相応せず0.5%～2.0% でほぼ近似値を示したが、抗生物質生産についてはエタノール添加濃度に比例して増加し、PLT につ

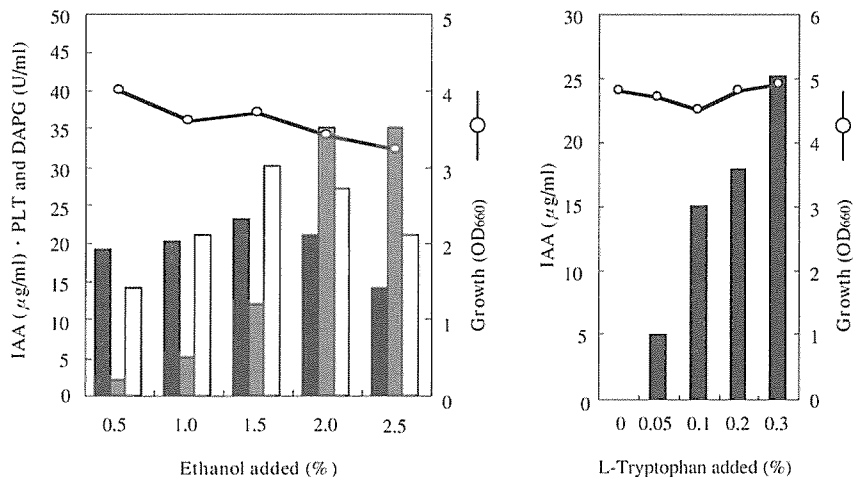


Fig. 4. Effects of concentration of ethanol (A) or L-tryptophan (B) on production of IAA and antibiotics by *P. fluorescens* strain S543.

Strain S543 was cultivated for 3 days in the basal medium in which the concentration of ethanol or L-tryptophan was varied as indicated and productions of IAA and antibiotics were determined.

■, IAA; ▨, PLT; □, DAPG.

いては 2.0% あるいは 2.5% エタノールで最大値に、DAPG についても 1.5% あるいは 2.0% エタノール培地で最大となった。

一方、L-トリプトファン添加濃度では添加濃度に応じて IAA の総生産が増加したが、効率的添加濃度としては 0.1% の添加が最適であった。また、本菌は L-トリプトファン無添加培地でも およそ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 程度の IAA 生産が認められた。

考 察

本報では、エタノールを炭素源として利用して有用バイオケミカルズを生産する微生物スクリーニングにおいて、土壌から単離・同定したしたエタノール資化性 *P. fluorescens* 菌株が抗カビ性抗生物質 PLT および DAPG の生産に加えて前駆体 L-トリプトファンの添加培養で著量の IAA を生産することを見出した。本菌は、通常の *P. fluorescens* 菌に比べエタノールに耐性を示し、その資化性も高いが、その他の糖質炭素源でも増殖する。しかし、本菌による IAA 生産は、抗生物質生産と同様、炭素源としてエタノールを使用した場合にのみ特異的に認められ、その他の糖質培地での培養では認められなかった。*P. fluorescens* が糖質培地で IAA や当該抗生物質を生産することはよく知られているが、これらは別個に研究されており、1 菌株による共生成物としての報告はない。また、それらの生産量は、それぞれ 0.5~10 $\mu\text{g/ml}$ (FETT *et al.*, 1987; OBERHÄSLI *et al.*, 1991; MORDNKHOVA *et al.*, 1998) および 0.1~20 $\mu\text{g/ml}$ (PLT) (YUAN *et al.*, 1998) と報告されている。エタノール資化性 *P. fluorescens* S543 菌株では基本的なエタノール培地での培養で、およそ 30 $\mu\text{g/ml}$ の IAA と同時に 45mg/ml (PLT) および 160 $\mu\text{g/ml}$ (DAPG) の抗生物質の生産を認めた。通常の *P. fluorescens* 3 菌株をエタノール培地で培養しても IAA および 当該抗生物質の生産は認められず、本菌株は両活性物質の生産能においてこれまでに未単離の優れた菌株であることがわかった。また、本菌株による両活性物質の生産条件が、生成促進と阻害面の両面において、一致することから、それらの生産が同一の制御機構下にあることを示している。この点は、今後これらの物質の発酵生産や菌株自身の利用を図る上で有利である。抗カビ性抗生物質の生産能を有することから根留菌としての *P. fluorescens* が病原菌から植物を防御する biocontrol agent として働いていると考えられ、農作物の生産改善への応用が図られているが、本菌株が IAA および抗カビ性抗生物質を共成し、かつ高生産能を有することから、病原性菌からの防御と植物成長の両面について貢献し得る有利な素材として今後の作物栽培への応用が期待される。

謝 辞

IAA の構造決定については広島大学機器分析センター太田伸二助教授にご協力頂きました。心より深謝申し上げます。

引 用 文 献

- BADENOCH-JONES, J., R.E. SUMMONS, B. ENTSCH, B.G. ROFE, C.W. PARKER and D.S. LETHAM, 1982. Mass spectrometric identification of indole compounds produced by Rhizobium strains. *Biomed. Mass Spectrum*, **9**, 429-437.
- CANG, S., K. SANADA, O. JOHDO, S. OHTA, Y. NAGAMATSU and A. YOSHIMOTO, 2000. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* from ethanol substrate. *Biotechnol. Lett.*, **22**, 1761-1765.
- EI-SAYED, M.A., L.R.G. VALADON and A. EI-SHANSHOURY, 1987. Biosynthesis and metabolism of indole-3-acetic acid production in *Streptomyces mutabilis* and *Streptomyces atroolivaceus*. *Microbios.*, **67**, 159-164.
- FETT, W.F., S.F.OSMAN and M.F. DUNN, 1887. Auxin production of plan-pathogenic pseudomonads and xanthomonads. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1839-1845.
- FORNI, C., J. RIOV, M. GRILLI CALOA and E. TEL-OR, 1992. Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Arthrobacter* species isolated from *Azolla*. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 377-381.
- GRUEN, H.E., 1959. Auxina and fungi. *Annu. Rev. Plant physiol.*, **10**, 405-440.
- HARTMANN A., MAHAVIR SINGH and W. KLINGMÜLLER, 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum*

- mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.*, **29**, 916-923.
- KOGA J., K. SYONO, T. ICHIKAWA and T. ADACHI, 1994. Involvement of L-tryptophan aminotransferase in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1209**, 241- 249.
- LAVILLE, J., C. VOISARD, C. KEEL, M. MAURHOFER, G. DÉFAGO and D. HAAS, 1992. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 1562-1566.
- LIU, S.T., K.L. PERRY, C.L. SCHARDL, and C.I. KADO, 1982. *Agrobacterium* Ti plasmid indolacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 2812-2816.
- MANULIS, S., L. VALINSKI, Y. GAFNI and J. HERSHENHORN, 1991. Indole-3-acetic acid biopathways in *Erwinia herbicola* in relation to pathogenicity on *Gypsophila paniculata*. *Physiol. Mol. Plant Physiol.*, **39**, 161-171.
- MATSUFUJII, M., K. NAKATA and A. YOSHIMOTO, 1997. High production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnol. Lett.*, **19**, 1213-1215.
- MORDUKHOVA, E.A., V.V. KOCHETKEV, F.Ya. POLIKARPOVA and A.M. BORONIN, 1998. Synthesis of indolyl-3-acetic acid by Rhizosphere pseudomonads: Effects of naphthalene biodegradation. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **34**, 261-265.
- NAKATA, K., A. YOSHIMOTO and Y. YAMADA, 1999. Promotion of antibiotic production by high ethanol, high NaCl concentration, or heat shock in *Pseudomonas fluorescens* S272. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 293-297.
- OBERHÄNSLI, T., G. DÉFAGO and D. HAAS, 1991. Indole-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHAO of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 2273-2279.
- O'SULLIVAN, D.J. and O'GARA, F., 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogenms. *Microbiol. Rev.*, **56**, 662-676.
- RAJASEKHAR, N., Ch. SASIKALA and Ch.V. RAMANA, 1999. Photoproduction of indole 3-acetic acid by *Rhodobacter sphaeroides* from indole and glycine. *Biotechnol. Lett.*, **21**, 543-545.
- SEQUERIA, L., 1973. Hormone metabolism in diseased plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **24**, 353-380.
- SNEATH, P.H.A., N.S. MAIR, M.E. SHARPE and J.G. HOLT (editors), 1996. Bergy's manual of systematic bacteriology, Vol. 2. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- SURICO, G., N.S. IACOBELLIS, and A. SASTO, 1985. Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Physiol. Plant Pathol.*, **26**, 309-320.
- TIEN, T.M., M.H. GASKINS and D.H. HUBBELL, 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilens* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 1016-1024.
- YAGI, K., T. MATSUMOTO, T. CHUJO, H. NOJIMA, T. OMORI, K. MINAMISAWA, M. NISHIYAMA and H. YAMANE, 2000. Isolation and characterization of low-indole-3-acetic acid-producing mutants from *Bradyrhizobium elkanii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1359-1364.
- YUAN, Z., S. CANG, M. MATSUFUJII, K. NAKATA, Y. NAGAMATSU and A. YOSHIMOTO, 1998. High production of pyoluteorin and diacetylphloroglucinol by *Pseudomonas fluorescens* S272 grown ethanol as a sole carbon source. *J. Ferm. Bioeng.*, **86**, 611-613.

Production of plant hormone and antifungal antibiotics by *Pseudomonas fluorescens* S543 grown on ethanol

Takahiro MIKURIYA, Maki FUKUSHIMA, Hidekuni YANAGI*
Yasunori NAGAMATSU and Akihiro YOSHIMOTO

*Faculty of Applied Biological Sciences, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan*

Ethanol-utilizing bacterial strain S543 which was isolated from a soil sample and identified as *Pseudomonas fluorescens* co-produced a plant hormone indole-3-acetic acid and antifungal antibiotics (pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol) at considerable amounts when grown on ethanol as a sole carbon source. These bioactive compounds were never produced when the bacteria was grown on any other carbon source than ethanol. Inorganic phosphate or sodium chloride was inhibitory on the production of both the hormone and antibiotics while magnesium ion was stimulatory. Productions of indole-3-acetic acid and pyoluteorin by strain S543 grown in the 1.5% ethanol medium with supplemented with 0.1% L-tryptophan were 30 mg/ml and 45 mg/ml, respectively, both being much more than those in the literatures. It was considered that strain S543 was very profitable for use as a biocontrol agent because of the co-production and the high yields of both the metabolites.

Key words: ethanol-utilizing bacteria, *Pseudomonas fluorescens*, indole-3-acetic acid, pyoluteorin, 2,4-diacetylphloroglucinol, ethanol, biocontrol agent

* Farming Division, Geihoku Local Office, 4-12-1, Kabe, Hirishima, 731-0221, Japan