終りに臨み始終御懇篤な御指導を賜りました朝井勇宣教授並びに攪拌動力の測定につき御協力を仰いだ合業修一助教授に厚く御礼申し上げます。

(1) 山田浩一, 高橋穰二 : 本誌, 30, 22(1956).	(5) J. White : <i>Wallerstein Labs. Commun.</i> , 14, 199 (1951).
(2) 山田浩一, 矢野俊正 : 本誌, 30, 501(1956).	
(3) 山田浩一, 高橋穰二 : 本誌, 27, 704(1953).	(6) C. M. Cooper et al. : <i>I. E. C.</i> , 36, 504 (1944).
(4) W. H. Bartholomew et al. : <i>I. E. C.</i> , 42, 1810 (1952).	

酵母によるアンモニア態窒素の利用機作に関する研究 (第 1 報)*

窒素飢餓酵母における基礎的諸条件の検討

菅原 潔, 熊谷和夫†, 志村憲助 (東北大学農学部生物化学研究室)

昭和 32 年 9 月 12 日 受 理

緒 言

高等植物及び微生物においてはアンモニウム塩, 尿素の如き比較的簡単な窒素化合物から蛋白質を容易に生成して居る事は周知の事実である。この生成反応は植物生育生理の基礎的な課題であると共に、広く窒素の同化にも関連した問題でもあるので従来多くの研究がなされ、その成果に関しては Wood⁽¹⁾, Steward⁽²⁾, Street⁽³⁾ 及び Virtanen⁽⁴⁾ 等の綜説があるが、反応機作の詳細については未だ不明の点が多い。本研究はこれらの点の詳細をより明らかにする目的で行われたもので、実験材料としては酵母 *Torula utilis* を用いた。この酵母はアンモニア態窒素の同化が特に顕著で本研究に最も適当な実験材料と考えたからである。本報ではアンモニア態窒素同化の基礎条件として、吸収量と濃度との関係、pH、温度等の影響、窒素飢餓処理時間の長さ及び嫌氣的条件による吸収量と可溶性窒素化合物の変化等について得られた結果を報告する。

実 験 方 法

供試酵母 : *Torula utilis* T. H-7 (当研究室保存のもの)

培養方法 : 次の様な合成培養基を使用した。即ち、蔗糖 50 g, KH_2PO_4 2.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6 g, MnSO_4 0.04 g を水道水 1 l に溶解した。以上の培養基に 30°, 20 時間振盪培養を行って得られた菌体を Growing cell とし次の窒素飢餓処理を行った。

窒素飢餓処理菌体 : Growing cell を上記培養基より $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ のみを除いた無窒素培養基に懸濁し 30° で 4~5 時間振盪後遠心分離し冷水で洗滌し素焼板上で水を切り、窒素飢餓処理菌体とした。この状態の酵母は水分約 70% であった。以下 wet g と記すのはこの状態の酵母である。

実験操作法 : 菌体を所定濃度のグルコース及び $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の 0.25% KH_2PO_4 溶液に懸濁し、一定時間 30° で振盪後直ちに冷却、遠心分離を行い菌体を分離し上澄液中のアンモニア量を定量した。又分離した菌体を冷水で 2 回洗滌し、熱水を加え湯煎中で時々攪拌し乍ら 10 分間加熱した後室温に放冷し遠心分離して得られる上澄液を可溶性区分とした。

分析方法 : アンモニア態窒素及びアミド態窒素の定量は Conway の微量拡散分析法⁽⁵⁾、全窒素はマイクロケルダール法、アミノ酸は paper chromatography 及び銅塩の紫外線吸収⁽¹¹⁾による方法を用いた。又核酸は、洗滌菌体を水冷下 0.5 N HClO_4 で 15 分間抽出を行い、上澄液を分離し、0.5 N HClO_4 で洗滌、これを合せて Acid soluble nucleotide とした。残渣に 0.5 N HClO_4 を加え 100°, 30 分抽出を行い冷却後遠心分離し、更に

* Studies on the Ammonia Assimilation by Yeast. Part I. Fundamental Conditions in Primary Ammonia Assimilation by Nitrogen Starved Yeast.

By Kiyoshi SUGAWARA, Kazuo KUMAGAI and Kensuke SHIMURA (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, Japan)

† 現在宝酒造株式会社

これをもう一度繰返し合せて RNA 区分とした。RNA 及び Acid soluble nucleotide の定量は 1 N HClO₄ 中に於ける 260 m μ の吸光度を測定し、Nucleotide の平均分子吸光係数 10,816⁽⁶⁾ により算出し Nucleotide の μ M で示した。

実験結果及び考察

I. NH₃-N 濃度と吸収量との関係

第 1 図 NH₃-N 濃度と吸収量

A: グルコース添加

B: グルコース無添加の場合を示す

第 2 図 NH₃-N 濃度 (C) と吸収量 (X) との関係

A, B 及び C は夫々反応時間 5 分, 20 分, 50 分の場合を示す

第 3 図 グルコース濃度と NH₃-N 吸収量

反応条件: 菌体 wet 0.5 g, (NH₄)₂SO₄ 5 mm
KH₂PO₄ 0.25%, 全量 20 ml.

第 2 表 NH₃-N 吸収量に対する pH の影響

菌体 wet 0.4 g, M/15 Sørensen 緩衝液 5 ml, グルコース 0.1 M 濃度, NH₃-N 1 $\times$ 10⁻² M 濃度, 全液量 20 ml, 20 分振盪

pH	3.6	4.2	4.8	5.4	6.0	6.6	7.2
NH ₃ -N 吸収量 (mg-N/dry yeast 1g)	9.8	10.0	9.8	9.8	9.7	9.6	9.6

窒素飢餓処理酵母 0.5 g を, グルコース 2%, KH₂PO₄ 0.25% 及び (NH₄)₂SO₄ を含む溶液 20 ml に懸濁し, 20 分間振盪した場合の各 NH₃-N 濃度に於ける吸収量は第 1 図の如くである。図から判る如くグルコース添加の条件では略直線的関係が認められ, NH₃-N の吸収量は菌懸濁液の NH₃-N 濃度 0.5×10^{-2} M ~ 4.5×10^{-2} M では直接比例する事が見られた。又グルコースを与えない場合には NH₃-N 濃度と吸収量との間には対数曲線に近い曲線が得られ, NH₃-N 濃度を高くしても吸収量に著しい影響が見られなかった。これは NH₃-N の受容体および反応に必要な力源物質の不足によるものと考えられる。尚 NH₃-N 濃度と吸収量との関係を Freundlich の吸着等温式: $x/m = kC$ 即ち $\log x/m = \log k + \log C$ を適用して示すと, 振盪時間 5 分間の場合には直線関係が得られた(第 2 図)。この事から NH₃-N の利用の一段階として吸着現象の存在が考慮されるが, 詳細は他の機会に譲る。

2. グルコース濃度, 反応温度および pH 変化の影響

本研究の基礎的実験条件を予め決定しておく目的で NH₃-N の吸収におよぼすグルコース濃度, 反応温度および pH 変化の影響等を検討した。

グルコース濃度: 第 3 図に示す如くこの実験条件下ではグルコース濃度 0.1 M 迄はグルコース濃度により NH₃-N 吸収量が制約されて居りそれ以上の濃度では最早グルコース濃度は制限因子とはならない事が明らかとなった。従って以下の実験では 0.12 M 又はそれ以上の濃度で行った。

最適温度: NH₃-N 吸収量と反応温度との関係は

第 1 表に示す如くである。吸収の最適温度は 27° 前後に見られ, 生育の最適温度 25~30° と略一致する事が明らかとなった。

pH の影響: pH 3.4 より 7.2 に至る範囲について行った結

果は第 2 表に示す

温度	NH ₃ -N 吸収量 (mg-N/wet yeast 1g)		
	5 分	20 分	60 分
17°	0.28	0.43	0.49
27°	0.37	0.54	0.62
37°	0.28	0.43	0.51
22°	0.09	0.37	1.05
27°	0.11	0.60	1.17
32°	0.09	0.52	1.10

この場合にも適用し得るものとすれば, NH₃-N 吸収に対する細胞膜の透過性は少くともこの pH 範囲に関する限りあまり問題とはならないと考えられる。以後本実験に於ては菌懸濁液の pH は総て 4.7~5.0 とした。

3. 窒素飢餓処理時間と NH₃-N 吸収量との関係

第3表 菌体の窒素含量に対する窒素飢餓処理時間の影響

時間	全窒素*	可溶性窒素*
0	8.2~6.2	1.00~0.80
5	5.9~4.8	0.78~0.68
10	4.0~3.2	0.65~0.51

* 乾燥菌体 100 mg 当りの mg-N で示す。
数字は3~4回の実験結果の最高最低で示した。

窒素飢餓処理により菌体中の全窒素量および可溶性窒素量は漸次減少する(第3表)。この際の $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収量を菌体の総窒素当りで示すと第4図(A)の如く窒素飢餓が進み、菌体中の窒素含量が少なくなる程 $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収量が大となった。同時に Warburg 検圧計により酸素吸収量を測定した結果は第4図(B)の如くで $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収と略平行した傾向が見られた。

更に $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収量と菌体内可溶性窒素の増加量との関係を示すと第5図の如くである。すなわち4時間窒素飢餓処理を行った菌体では可溶性窒素のみならず不溶性窒素区分(吸収した $\text{NH}_3\text{-N}$ 量と菌体内可溶性窒素の増加量との差)も15分後に於てすでに明らかに増加して居るが、一方12時間窒素飢餓処理を行ったものでは吸収初期の30分位迄は吸収された窒素の大部分は先ず可溶性窒素区分の増加となって現れ、或る量に達してはじめて不溶性窒素区分が増加してくる。不溶性窒素区分の大部分を蛋白質態窒素と仮定すると蛋白質の生成に先立って、 $\text{NH}_3\text{-N}$ より可溶性窒素化合物が合成され、然る後このものが蛋白質移行するものと考えられる。

又 $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収後の可溶性区分についてアミノ酸をペーパークロマトグラフィーにより定量した結果、グルタミン、グルタミン酸およびアラニンが特に顕著に増加しておる事を認めた。この結果は Roin⁽⁹⁾、Virtanen⁽⁹⁾、Yemm⁽¹⁰⁾ 等の結果とよく一致して居る。又 Nucleotide, RNA について定量した結果は第6図に示す如く著しい増加が認められ、Acid soluble nucleotide に特に多かった。

4. 嫌気的条件の影響 酵母による $\text{NH}_3\text{-N}$ の同化に際しては酸素の消費量が著しく増大し、両者の間に密接な関係の存在する事は上述の如くであるが、本実験に於いては $\text{NH}_3\text{-N}$ の同化反応を中断する目的で $\text{NH}_3\text{-N}$ の同化に阻害的と推定される嫌気的条件を与え、その際の $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収量と同化の中間代謝物質を含む菌体内の可溶性窒素の変化について検索した。その結果を第7図に示す。この図から知られる如く $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収は嫌気的条件により著しく抑制される。又可溶性窒素は殆ど増加を示さず吸収された $\text{NH}_3\text{-N}$ の大部分は不溶性窒素区分の増加として現われた。正常に生育した菌体の様に比較的可溶性窒素量の多いものではむしろ嫌気的条件により可溶性窒素の減少すら見られた。尚可溶性窒素が吸収初期に一時的に増加する現象を認めたがこれは $\text{NH}_3\text{-N}$ の受容体となり得る代謝物質が菌体内に少量残存して居た為と考えられる。上述の結果から嫌気的条件は $\text{NH}_3\text{-N}$

第4図 菌体の窒素含有量と $\text{NH}_3\text{-N}$ 及び酸素吸収量との関係

○: グルコース添加, ●: グルコース無添加, 反応時間 60 分
反応条件: 菌体 wet 20 mg, 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 ml, 20% グルコース
0.2 ml, 全量を 0.3% KH_2PO_4 溶液で 2.7 ml とす。

第5図 窒素飢餓処理時間と可溶性窒素増加量との関係

窒素飢餓処理時間: (A) 4 時間, (B) 12 時間

○: $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収量, △: 可溶性窒素増加量

反応条件: 菌体 wet 1.2 g, グルコース 5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 mM, KH_2PO_4 0.25%, 全量 40 ml.

第 6 図 Acid soluble nucleotides 及び RNA の増加

(A): Acid soluble nucleotides, (B): RNA

反応条件: 菌体 wet 0.22 g (N 飢餓処理 4 時間後), グルコース 5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 35 mM, KH_2PO_4 0.25%, 全量 10 ml, 30° 振盪。 第 7 図 $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収及び菌体内可溶性窒素量の変化に対する嫌氣的条件の影響(A): 好氣的条件, (B): 嫌氣的条件 (N_2 置換)○: $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収量, △: 可溶性窒素の増加量反応条件: 菌体 wet 1.2 g (N 飢餓処理 4 時間後), グルコース 5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 mM, KH_2PO_4 0.25%, 全量 40 ml

の吸収および $\text{NH}_3\text{-N}$ より可溶性窒素化合物の生成の段階に対して阻害的に作用し, 可溶性窒素化合物より不溶性窒素化合物 (蛋白質) の生成反応には比較的影響が少いものと推定される。尚可溶性窒素化合物の内容の詳細については以後の報告に譲る。

要 約

Torula utilis による $\text{NH}_3\text{-N}$ の利用機作に関する研究の基礎的諸条件について, 窒素飢餓処理菌体を用い菌懸濁液の $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度, pH, 温度, グルコース濃度及び嫌氣的条件等の影響につ

いて検索した。その結果

(1) (i) $0.5 \times 10^{-2} \text{ M} \sim 4.5 \times 10^{-2} \text{ M}$ の $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度範囲では $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収は略濃度に比例し, (ii) pH 3.4~7.2 の範囲では殆ど吸収量に変化なく, (iii) 最適温度は 25~30° であった。

(2) 又 $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収はグルコースの存在により著しく促進され。

(3) 窒素飢餓が進み菌体の窒素含量が少くなる程 $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収が大となり, 酸素吸収も同様に増大する事を示し, 両者の間に平行関係のある事を認めた。

(4) 窒素化合物の中特に増加量の著しいものとしてはグルタミン, グルタミン酸, アラニン及び酸可溶性ヌクレオチドであり又 RNA の増加も多かった。

(5) 吸収された $\text{NH}_3\text{-N}$ は先ず可溶性窒素区分の増加として現れるが, 嫌氣的条

件によりこれが著しく阻害される事を明らかにした。

本実験に際し振盪機の使用その他の便宜を与えられ且種々御教示戴いた東北大学教授植村定治郎先生はじめ同研究室の各位に衷心より感謝の意を表します。

- (1) J. G. Wood : *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 4, 1 (1953).
- (2) F. C. Steward, H. E. Street : *Ann. Rev. Biochem.*, 16, 471 (1947).
- (3) H. E. Street : *Advances in Enzymology*, 9, 391 (1949).
- (4) A. E. Virtanen, N. Rautanen : *The Enzymes*, II, 1089 (1952).
- (5) E. J. Conway : *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error* (1950), London.
- (6) M. Ogur, G. Rosen : *Arch. Biochem.*, 25, 262 (1950).
- (7) H. A. Krebs, S. Gurin, L. V. Eggleston : *Biochem. J.*, 51, 614 (1952).
- (8) P. Roin : *Ann. Acad. Sci. Fennicae*, Ser. A, II, *Chem.*, No. 26, 83 (1947); C. A.,

- 42, 6887^a (1948). 57, 495 (1954).
 (9) A. I. Virtanen, T. Z. Csáky, N. Rautanen : (11) J. R. Spies : *J. Biol. Chem.*, 195, 65
Biochim. et Biophys. Acta, 3, 208 (1948). (1952).
 (10) E. W. Yemm, B. F. Folkes : *Biochem. J.*

酵母によるアンモニア態窒素の利用機作に関する研究 (第 2 報)*

有機酸の影響について

菅原 潔, 熊谷和夫†, 志村憲助 (東北大学農学部生物化学研究室)

昭和 32 年 9 月 12 日 受 理

緒 言

NH₃-N の同化にはエネルギーを必要とし、又同時に NH₃-N は炭素化合物と結合してはじめて有機化合物となるのであるから前報に引続き基礎条件検討の一環として NH₃-N の同化に及ぼすエネルギー源及び炭素骨格源物質と推定される各種有機酸の影響について検討した。従来酵母の有機酸代謝に関しては数多くの報告があるが、窒素代謝との関係についての報告は極めて少く、これに関連したものとして間瀬⁽¹⁾のパン酵母の増殖に対する影響を調べた報告がある程度である。尚有機酸の影響を検討するに当り次の事を考慮して行ったので附記する。即ち一般にアニオンの吸収はエネルギーを必要とすると言われ、グルタミン酸の摂取も解糖作用或は ATP の共存下で進行する Active transport である事が示されて居る⁽²⁾。この様な事から本報の実験では常にグルコースの存在下で行った。しかし又酵母の酒精酸化が比較的少量のグルコースで抑制されると言う照井等⁽³⁾の報告もあるので、グルコースは必要最少量をもって実験の基準量とした。

実験材料及び方法

供試酵母：菌株 *Torula utilis* 培養基組成、培養方法及び窒素飢餓処理等の諸条件は前報⁽⁴⁾と同様で、窒素飢餓処理後直ちに使用した。有機酸特に Di- 或は Tri-carbon 酸は酵母の原形質膜の透過性が屢々代謝の制限因子となり、その影響を除くため予め液体空気⁽⁵⁾、ドライアイス⁽⁶⁾等で低温処理を施すと良いとされて居る。しかし一方かかる低温処理により他の酸化酵素系の活性を低下する危険性⁽⁶⁾があるので本実験ではこれらの処理を行わない菌体を用いる事にした。

実験方法：実験操作及び分析方法は略前報⁽⁴⁾に準じて行った。

添加有機酸：水溶液とし NaOH で予め pH 4.8 に中和してから使用した。

グルコース濃度：供試酵母にグルコースを全く添加しない場合でも NH₃-N の吸収が見られるが、グルコース添加により促進される。供試酵母 0.5 g(wet)/20 ml, NH₃-N 吸収 40 分間に於いて、グルコース濃度 M/100 で NH₃-N 吸収が大体一定値に達したので、この濃度をもってグルコースの基準量とした。

有機酸添加の条件：次の [1] 及び [2] の条件下で行った。

[1] グルコース濃度を二、三の有機酸で代置した場合：上述の基準グルコース量を次の (A) 及び (B) の各条件下で部分的に置換して行った。

(A) 窒素飢餓処理後の NH₃-N 吸収時に添加した場合：有機酸としてはクエン酸、ピルビン酸及び酢酸を用いた。反応液の組成は菌体 0.5 g(wet), KH₂PO₄ 0.25%, (NH₄)₂SO₄ M/200 濃度で全量を 200 ml とし 30° で振盪を行った。

(B) 窒素飢餓処理中に添加した場合：此の処理期間中のグルコースの基準量は菌体 wet 1 g/20 ml で M/10 濃度であり、前述の (A) の場合と同様にこのグルコース量を有機酸で種々の割合に置換して窒素飢餓処理を 4 時間行い、その後の NH₃-N 吸収量に対する影響を比較した。反応系の組成は、かくして得た菌体をそのまま洗滌して KH₂PO₄ 0.25%, (NH₄)₂SO₄ M/200 濃度の溶液に懸濁し全量を 20 ml とし 30° で振盪を行った。有

* Studies on the Ammonia Assimilation by Yeast. Part II. Effects of Organic Acids.

By Kiyoshi SUGAWARA, Kazuo KUMAGAI and Kensuke SHIMURA (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai, Japan)

† 現在宝酒造株式会社