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 3 報)*

低級脂肪酸の阻害的影響

菅 原 潔, 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

前報⁽¹⁾では酵母 *T. utilis* による $\text{NH}_3\text{-N}$ の利用に対する種々の有機酸の影響について述べ、その中で特に酢酸その他の低級脂肪酸が $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収及び菌体内の可溶性有機態窒素の利用に対し、阻害的に作用する事を報告した。脂肪酸及びその他の界面活性剤が微生物の生育を阻害する事に対しては比較的多くの研究^(2,3,4)があるが、低級脂肪酸については極めて少いので、吾々はこれら低級脂肪酸が酵母の $\text{NH}_3\text{-N}$ の同化に対する阻害機構を明らかにする目的で本実験を行った。即ち酢酸をはじめ蟻酸、酪酸、吉草酸等の $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収、酸素吸収及び菌体中の炭水化物、脂肪、可溶性窒素、核酸、アミド等の変動に及ぼす影響を検討した。その結果酢酸、酪酸等は比較的高濃度では酸素吸収を阻害するが低濃度では却って促進した。一方 $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収に対してはこの様な現象は認められず、酸素吸収を促進する低濃度範囲に於いても明らかな阻害を示す事が認められた。

実 験 方 法

供試酵母 前報⁽¹⁾と同様 *Torula utilis* を使用した。培養条件、及び窒素飢餓処理も前報⁽¹⁾と同様である。

実験操作 $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収条件は前報と同様であるが、可溶性窒素区分の抽出条件は脂肪、炭水化物等の定量の關係上第 1 図に示す方法をとった。即ち菌体 wet 2g を一定条件下に 90 分間振盪後直ちに氷冷、遠心分離しその上澄液を Fraction A とした。残った菌体を冷水で 2 回洗滌後、Yemm 等の方法⁽⁵⁾に従い 5 ml の無水アルコールを加え時々攪拌しながら 15~30 分間冷却下に放置、続いて 0.2N H_2SO_4 40 ml を添加、屢々攪拌し乍ら 0°~4° に 2~3 時間放置、遠心分離を行い、上澄液を Fraction B とした。残渣は冷水で洗滌後真空デシケーター中で乾燥し Soxhlet 脂肪抽出器によりエーテル抽出を行い粗脂肪を定量した。更にこの残渣について炭水化物を定量した。

分析方法 1) Fraction A— $\text{NH}_3\text{-N}$ 及び脂肪酸は Conway⁽⁶⁾ の微量拡散分析法により、又グルコースは通

第 1 図 試料分別操作

常の Bertrand 法により夫々定量し初濃度との差から吸収量を求めた。2) Fraction B—可溶性窒素区分であり、遊離アンモニア、アミドは Conway⁽⁶⁾ の方法で、又アミノ酸は Spies⁽⁷⁾ の銅塩の紫外線吸収による方法を用い、標準曲線にはアラニンを使用 230 mμ で測定した。3) Fraction C—Soxhlet の脂肪抽出器により粗脂肪を定量した。4) Fraction D—常法により 0.1N HCl で加水分解後 Bertrand 法により還元糖を定量し炭水化物として表した。5) RNA—Ogur, Rosen⁽⁸⁾ の方法を微生物に適

用した黒岩、堀江等の方法⁽⁹⁾によりドライアイス、エーテル処理を行って抽出定量した。

供試脂肪酸 再溜により精製し、水溶液を予め NaOH 溶液で pH 4.8 に中和してから用いた。又吉草酸は正-吉草酸を用いた。

実 験 結 果

1. 菌体内の窒素化合物の変化に対する影響 第 1 表に蟻酸、酢酸、酪酸、吉草酸等の菌体内の可溶性窒素、アミノ態窒素、アミド態窒素及び RNA 含量に及ぼす影響を示した。表から明らかな如く特に著しい影響をうける区分は見られず略吸収量に応じた変化を示した。 $\text{NH}_3\text{-N}$ の利用阻害の結果アミドの蓄積も考えられたが、

* Studies on the Ammonia Assimilation by Yeast. Part III. Inhibitory Effects of Short-Chain Fatty Acids.

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

第1表 菌体内の窒素化合物の増加に対する影響

脂肪酸	可溶性 窒素	アミノ 態窒素	アミド 態窒素	RNA 増加率
0 時間	2.36	2.04	痕跡	100%
無	8.52	3.86	0.94	200
蟻酸	3.24	2.37	—	123
酢酸	7.11	3.50	0.62	190
酪酸	3.40	2.25	0.15	100
吉草酸	3.91	2.60	—	105

第2表 グルコースの消費に対する影響

脂肪酸	グルコース消費量
無	1.66 m. mol
蟻酸	0.28
酢酸	1.94
酪酸	0.56
吉草酸	0.56

反応条件: 菌体 wet 2 g, グルコース 2%, 脂肪酸 0.02 M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.025 M, KH_2PO_4 0.25%, pH 4.8, 全量 100 ml, 30°, 90 分間振盪

第3表 低級脂肪酸の消費量

脂肪酸	消費量
蟻酸	0.175 m. mol
酢酸	0.970
酪酸	0.220
吉草酸	0.040

反応条件: 第2表と同じ

第2図 酸素吸収に対する低級脂肪酸の影響

反応条件: 菌体 (wet) 0.5%, グルコース 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.025 M, KH_2PO_4 0.25%, 脂肪酸 0.05 M, pH 4.8, 30°, 60 分, 全量 3 ml

A: 菌体のみ, B: 対照, C: + 蟻酸, D: + 酢酸, E: + 酪酸, F: $-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

て阻害効果を示したが(第4図), 0.0025~0.01 M の範囲では酸素吸収を促進した。その極大は酢酸よりも低濃度であり, 0.005 M 附近に見られ, 0.025 M 以上においては濃度の増加と共に酸素吸収が減少した。一方これらの条件下における $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収を測定した結果は第3図及び第4図に示す如く何れも $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収に対しては脂肪酸濃度の増加と共に著しい阻害が見られ, 低濃度において酸素吸収に示した様な促進作用は認められなかった。この様に酸素吸収が促進されるのに反し, 一方 $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収が阻害される現象は, $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収と酸素吸収との間に平行関係が認められた結果⁽⁹⁾とは異なる。

4. 酢酸の $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収阻害に対する pH の影響 第5図に示す如く酢酸 0.02 M の存在では pH の低下と

その様な事実は認められなかった。

2. 酸素吸収, グルコース及び脂肪酸の消費量に及ぼす影響

$\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収に際しての酸素吸収の経過を第2図に示した。蟻酸, 酪酸は酸素吸収を阻害したが, 蟻酸は特に顕著であった。これに反し酢酸は促進的效果を示した。一方グルコースの消費に対しても第2表に示す如く酢酸はグルコースの消費を促進し, 蟻酸, 酪酸及び吉草酸は阻害的效果を示した。又更に添加した脂肪酸自身の消費量については第3表に示す如くで, 酢酸はかなり消費されたが他の脂肪酸は殆ど利用されなかった。

3. $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収及び酸素吸収に対する添加脂肪酸濃度の影響

上述の結果は脂肪酸 0.05 M で行った場合であるが, 阻害作用の一因として界面活性を仮定すると, アルキル基の大きさと濃度によって異った影響が現われる事が推定される。又リノール酸, リノレイン酸等が低濃度に於いては Biotin 様の作用を示す事実⁽¹⁰⁾も知られて居るので, 酢酸, 酪酸の濃度と酸素吸収及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収との関係を検討した。その結果酸素吸収については第3図に示した。図から明らかな如く酢酸は 0.01~0.05 M の範囲では酸素吸収を促進し, 0.025 M 附近に極大が認められた。更に 0.075 M 以上では著しい阻害が見られた。又酪酸の場合には 0.05 M に於い

第3図 酸素吸収及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収に対する酢酸の濃度変化の影響

反応条件: 菌体 (wet) 5 mg, グルコース 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.025 M, KH_2PO_4 0.25%, pH 4.8, 30°, 60 分, 全量 3 ml
○—○ 酸素吸収 ×—× $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収

第 4 図 酸素吸収及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収に対する酢酸濃度変化の影響

反応条件：第 3 図に同じ

○—○ 酸素吸収，×—× $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収

第 5 図 酢酸の $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収阻害に於ける pH 変化の影響

反応条件：菌体 (wet) 2.5%，グルコース 0.04 M，酢酸 0.02 M，酢酸緩衝液 0.017 M， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.01 M，30°，40 分通気攪拌

共に $\text{NH}_3\text{-N}$ の利用は減少した。これは CH_3COOH と CH_3COO^- との相対濃度の変化に基き酢酸分子の細胞膜の透過性が増大した結果と解釈される。

5. 菌体の粗脂肪、炭水化物の変化に対する影響

低級脂肪酸は乳脂の前駆物質であると言われ、又 *Sacch. cerevisiae* でも酢酸が脂肪の生成を促進するとの報告⁽¹¹⁾もあり、脂肪酸添加により $\text{NH}_3\text{-N}$ の利用が減少するのは代謝が脂肪生成に偏った結果とも想像されるので菌体内の粗脂肪の変化を比較した。その結果は第 4 表に示す如く脂肪酸無添加、即ちグルコースだけの場合が最大であり、脂肪生成の促進作用は認められなかった。次に炭水化物の変化が注目されるが、その結果は第 5 表の如く酢酸、吉草酸では殆んどその増加が認められず、蟻酸では減少すら認められたが、酢酸では僅か乍ら増加して居た。

第 4 表 低級脂肪酸の菌体粗脂肪含量におよぼす影響

脂肪酸	粗脂肪
0 時間	8.3 mg
無(グルコースのみ)	10.8
蟻酸	9.5
酢酸	8.7
酪酸	9.0
吉草酸	9.1

反応条件：菌体(wet) 2%， KH_2PO_4 0.25%， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.025 M，グルコース 2%，脂肪酸 0.05 M，pH 4.8，30°，90 分振盪

第 5 表 低級脂肪酸の菌体炭水化物生成に対する影響

脂肪酸	炭水化物量
0 時間	230 mg
無	250
蟻酸	200
酢酸	276
酪酸	210
吉草酸	235

反応条件：第 4 表に同じ

考 察

以上述べた低級脂肪酸の $\text{NH}_3\text{-N}$ の利用に対する阻害的影響の要因を大別して、1) $\text{NH}_3\text{-N}$ 同化に関連した炭水化物代謝に対する影響、2) $\text{NH}_3\text{-N}$ 同化に關与する酵素系に対する直接の影響、3) 細胞膜の透過性に対する影響等が推定される。1) の炭水化物代謝に対する影響については、酸素吸収の面からは脂肪酸の高濃度で著しい阻害を示すが、低濃度では逆に促進する結果が得られた(第 3 図、第 4 図)。しかし $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収はこの低濃度範囲においても既に著しい阻害をうけた。この現象は脂肪酸が力源代謝を抑制した結果として $\text{NH}_3\text{-N}$ の同化を阻害するものではない事を示して居る。次にこれらの脂肪酸の添加によって脂肪又は炭水化物の生成に關係する代謝系が促進され、その結果として $\text{NH}_3\text{-N}$ の受容体となるべき炭水化物の中間代謝生成物の減少が考えられる。しかし実験の結果(第 4 表、第 5 表)は脂肪、炭水化物共に蓄積は認められず、この可能性は少いと考えられる。尚その他の原因による受容体の減少も考えられるが将来の研究に待たねばならない。次に 2) の $\text{NH}_3\text{-N}$ 同化に關与した酵素系に直接影響を及ぼす事を考慮すると、脂肪酸と蛋白質の結合に關係する諸性質^(12,13,14)と微生物及び酵素作用に対する脂肪酸の阻害効果に關係する諸性質^(4,15)との間には類似した關係が見られて居る。更に界面活性剤と蛋白質との結合は静電結合によるものであり、その結合がアルキル基間の Van der Waals' force により更に安定化されるものと説明されている⁽¹⁷⁾。Samson 等⁽¹⁶⁾も *Sacch. cerevisiae* の酸素吸収、酸素吸収及び解糖作用に対する低級脂肪酸の阻害的影響は、酵素或はその他の蛋白質との結合によるものと考えて居る。吾々の実験においても酢酸、酪酸等が低濃度では酸素吸収を促進し、一方 $\text{NH}_3\text{-N}$ 吸収を阻害する事実が認められて居るのでこの様な酵素蛋白質と低級脂肪酸の結合によるものと考えるのが妥当のように思われる。そして一方において酸素吸収を促進し又一方に於いて $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収を阻害すると言う事は、恐らく 1) 蛋白質に対する脂肪酸の結合位置と活性中心との關係、2) 蛋白質の種類による脂肪酸に対する親和力の差異によるものと推定されるが、詳細は今後

の研究を待たねばならない。

低濃度と高濃度における界面活性剤（ラウリル硫酸）と蛋白質との間の結合の差異について、Neurath, Putnam 等⁽¹⁸⁾によると、低濃度では蛋白質の正電荷の一部分のみが結合に関与し、蛋白質分子の形状、大きさに変化を生じないが、高濃度では第二次的な結合により複合体を生ずる。又 Steinhardt⁽¹⁹⁾によると高濃度では、アミド-N やペプチドグループの N 原子と静電結合するものであると説明して居るが、吾々の実験結果でも高濃度で著しい阻害を示して居るのはこのような性質によるものと考えられる。

要 約

NH₃-N の同化に対する低級脂肪酸の阻害機作を明らかにする目的で本実験を行った。その結果、

- (1) 菌体内の可溶性窒素、アミノ酸窒素、アミド及び RNA の変化については特に著しい蓄積を示す物質も、又著しく減少する物質も認められなかった。
- (2) 酸素吸収、グルコースの消費に対しては供試脂肪酸濃度 0.05 M では酢酸のみが促進効果があり、その他の脂肪酸は何れも阻害的に作用した。
- (3) 添加した脂肪酸の消費についても上述の結果と同じ傾向を示し、酢酸は良く利用されたが他の脂肪酸の消費は極めて少かった。
- (4) 酸素吸収と NH₃-N 吸収との間の相関々係を酢酸、酪酸の濃度変化について検討した結果では、何れも或る濃度範囲では酸素吸収を促進し、濃度の増加と共に著しく減少した。一方同一条件下での NH₃-N 吸収は酸素吸収を促進する濃度範囲でも既に阻害が認められ、両者の間に平行関係は見られなかった。
- (5) 菌体内の粗脂肪の増加に対しては何れも促進作用を認めず、僅かに阻害する事を認めた。又炭水化物の増加については酢酸が稍促進的に働き、他の脂肪酸は何れも著しく阻害を示した。
- (6) 以上の結果に基づきその阻害機構について若干の考察を述べた。

本実験に際し振盪機の使用その他の便宜を与えられ且つ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。又実験の御援助を頂いた林 弘一氏に併せて感謝致します。尚本研究は文部省科学研究助成補助金によったもので感謝の意を表します。

昭和 30 年 3 月 31 日、日本農芸化学会大会で発表した。

(1) 菅原 潔, 熊谷和夫, 志村憲助 : 本誌, 32, 348 (1958).	(11) A.G.C. White, C.H. Werkman : <i>Arch. Biochem.</i> , 13, 27 (1947).
(2) Z. Barker, R.W. Harison, B.F. Miller : <i>J. Exptl. Med.</i> , 73, 249 (1941).	(12) G.A. Ballou, P.D. Boyer, M. Luck : <i>J. Biol. Chem.</i> , 159, 111 (1945).
(3) W. V. Cruess : <i>Advances in Enzymol.</i> , 3, 349 (1943).	(13) P. D. Boyer, F. G. Lum, G. A. Ballou, J. M. Luck, R. G. Rice : <i>J. Biol. Chem.</i> , 162, 181 (1946).
(4) R. D. Hotchkiss : <i>Ann. N. Y. Acad. Sci.</i> , 46, 479 (1946).	(14) P. D. Boyer, G. A. Ballou, J. M. Luck : <i>J. Biol. Chem.</i> , 167, 407 (1947).
(5) E. W. Yemm, B. F. Folkes : <i>Biochem. J.</i> , 57, 495 (1954).	(15) 間瀬泰男 : 醸工, 32, 272 (1954).
(6) E. J. Conway : <i>Microdiffusion Analysis and Volumetric Error</i> (1950).	(16) F. E. Samson, A. M. Katz, D. L. Harris : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 54, 406 (1955).
(7) J. R. Spies : <i>J. Biol. Chem.</i> , 195, 65 (1952).	(17) F. W. Putnam : <i>Advances in Protein Chem.</i> , 4, 79 (1948).
(8) M. Ogur, G. Rosen : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 25, 262 (1950).	(18) H. Neurath, F. W. Putnam : <i>J. Biol. Chem.</i> , 160, 397 (1945).
(9) Y. Kuroiwa, Y. Horie : <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 19, 35 (1955).	(19) J. Steinhardt : <i>Ann. Rev. Biochem.</i> , 14, 145 (1945).
(10) C. Nieman : <i>Bacteriol. Rev.</i> , 18, 147 (1954).	