細菌によるフマル酸より L-グルタミン酸の生成について (第4報)*

醗酵経過と酵素活性について

青木良平, 近藤安弘, 角田俊直, 小川鉄雄 (味の素株式会社中央研究所)

昭和34年12月15日受理

著者等は第3報⁽¹⁾に於いて培養条件について述べた。即ちグルタミン酸の高収率には Heat shock が必要であること, グルコースとフマル酸のモル比が 1:2 であること, pH 調節培養を行なっても収率は向上しないこと等を述べた。

本報では比較的安定化された培養条件に於ける醗酵経過と窒素炭素バランス, *B. pumilus* の酵素活性と L-グルタミン酸生成経路の推定を行なった。以下これについて述べる。

実験並びに考察

〔I〕 醗酵経過 常用培地 (第1表) による醗酵経過を求めた。

(i) 培養条件: 使用菌株, *B. pumilus*.

10⁶/ml 菌濃度 Heat shock 60°, 20 分 →
ブイオンフマル酸培地 → ブイオンフマル酸スラント 30°, 44 時間。

第1表の培地で種培養 11 時間後同培地 (第1表) で本培養を行なった。サンプリングは 0, 20, 30, 50, 70, 90 時間にそれぞれ行なった。

(ii) 分析用試料調製: プロセスを第2表に示す如き方式で処理し, 分析に供した。

(iii) 分析法: 次の分析法により分析した。即ち

比濁: 平間光電

比濁計

pH: 試験紙

食塩: 硝酸銀により沈澱滴定。

グルコース: Fehling Lehmann School 法⁽²⁾。

窒素: ケールダール法。

L-グルタミン酸: 脱炭酸酵素による酵素法⁽³⁾。

その他のアミノ酸: ペーパークロマトと比色法。

アルコール⁽⁴⁾: 過マンガン酸加里酸化, 消費された量をチオ硫酸ソーダで測定する。

グリセリン⁽⁵⁾: カテコールで赤色を発色せしめ 510 mμ で吸光度を測定する。

第1表 常用培地成分

フマル酸	4 g/dl	糖液 (グルコースとして)	3 g/dl
KH ₂ PO ₄	0.1	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.02
NaCl	0.3	中性アミノ酸区 N 換算	0.04
KOH-NH ₃	当量中和	pH	7.0

第2表 分析用試料調製

培養液

↓ 定 量

遠心分離 (10,000 r.p.m.,
10分, 0~5°)

濾 液

菌 体

← 2 回 M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.0)

H₂SO₄ 40~60cc
↓ pH 6.5

減圧濃縮
乾

溜出液

残渣 H₂SO₄

↓ pH 1.0

水蒸気蒸溜

溜出液

残渣

50~60cc { カチオン 約 55 m.eq.
アニオン 40 m.eq. }
← 塩酸

pH 6.0

凍結保存

pH 2.0

SK #1 (100 ml / 190 m.eq.) → 吸着部アミノ酸

IR 4B (100 ml / 300 m.eq.) → 吸着部有機酸 { フマル酸, 乳酸, ビロ

グルタミン酸, ケト酸, 琥珀酸

非吸着部

糖, グリセリン

洗 液

菌 体

真空デシケター

乾 燥

乾燥菌体

m.eq.: ミリ当量

* Formation of L-Glutamic Acid from Fumaric Acid by Bacteria. Part IV. Chemical Changes in Culture and Enzymatic Activity.

By Ryohei AOKI, Yasuhiro KONDO, Toshinao TSUNODA and Tetsuo OGAWA (The Central Research Laboratory of Ajinomoto Co. Inc.)

揮発酸： 硫酸酸性水蒸気蒸溜を行い、溜出液の全酸と全塩酸の差より求めた。

不揮発性有機酸： Elution analysis⁽⁶⁾ と比色法によった。即ち

フマル酸⁽⁷⁾：Copper pyridyl reagent により copper pyridyl fumarate の complex salts を作り、この copper を sodium diethyl-dithio carbamate で発色させ 460 mμ で測った。

乳酸⁽⁸⁾：p-hydroxydiphenyl による発色を 560 mμ で測った。

Pyroglutamic acid：IR 4 B 吸着部を溶出後、加水分解前後のグルタミン酸量の差より求めた。加水分解条件⁽⁹⁾についてはすでに報告済みである。

ケト酸：2,4-dinitrophenyl hydrazone を作り、ペーパークロマトにより分離、分別定量する処であったが、絶対量が僅少であったのでまとめて α-KGA の標準曲線で算出した。

琥珀酸：豚の心臓より琥珀酸脱水素酵素を調製し、酵素法により測った。

(iv) 実験結果：醗酵経過を第 1 図に示した。pH は最初 6.5 より出発し、30 時間後 pH 7.5 となり、最後に pH 9.0 に達した。原料のフマル酸は 4 g/dl、グルコースは 3 g/dl より出発し、20 時間迄は余り減少しないが、以後 50 時間迄の間に直線的に減少し、消失した。この場合、菌の比濁値は 30 時間で静止状

第 4 図 炭素成分の消長

第 5 図 炭素成分バランス

態に入り、グルタミン酸の蓄積は 20 時間より 50 時間で直線的に増加し以下静止状態に入った。次に本酸酵の主成物である窒素成分の消長を第 2 図に示した。即ちグルコース、フマル酸の消費と対比して、全窒素、アンモニア態窒素、グルタミン酸態窒素、アスパラギン酸態窒素、ピログルタミン酸態窒素、アラニン態窒素、ロイシンらしきものの窒素、菌体窒素を示している。これを次に有機態窒素に対する割合でまとめると第 3 図の如くなる。プロセス中の有機態窒素は全窒素の 62% で 70 時間で静止状態に入った。この場合グルタミン酸態窒素は 50 時間で静止状態に入り、有機態窒素の 70% を占めた。アラニン態窒素は 10% で、亦菌体アスパラギン酸、ピログルタミン酸態窒素は 5%、ロイシンらしきものの窒素は 2% 位であった。次に第 4 図は炭素成分の消長を示している。残糖は 10% で非酸酵性糖の存在によるもののようであり、亦微量に存在するが、全般的にみて無視出来る程度の濃度のものにグリセリン、アルコール、ケト酸、琥珀酸及びロイシンらしきものがある。無視出来ない(程度の)ものとして、アミノ酸では前述の通りグルタミン酸が一番多く、その 15% 程度のアラニンと 8% 程度のアスパラギン酸がある。亦有機酸では乳酸、次いで揮発

第 3 表 有機酸の生成割合

サンプル No.	有機酸	Elution analysis	比色その他
A	フマル酸	2.9×10^{-1} M/l	3.3×10^{-1} M/l
B	フマル酸	2.6×10^{-1}	2.7×10^{-1}
C	酢酸	1.7×10^{-2}	1.3×10^{-2}
	フマル酸	1.9×10^{-1}	2.0×10^{-1}
	林檎酸	8.8×10^{-3}	—
D	酢酸	6.8×10^{-3}	2.8×10^{-2}
	フマル酸	5.3×10^{-3}	1.3×10^{-2}
	林檎酸	5.9×10^{-3}	—

酸、ピログルタミン酸で、図示されているようになる。次に炭素バランスを採る。即ちグルタミン酸を基準として $C_6 \sim C_5$ のもの 1 モルは葡萄糖 1 モルに $C_3 \sim C_4$ のもの 2 モルは葡萄糖 1 モルに、亦乾燥菌体については全窒素 15% 換算のものの 50% を炭素とし、 C_6 を以て 1 モルとみて全炭素量を求めた。その結果を第 5 図に示したが、炭素収率は酸酵末期で 70~80% で、アミノ酸は最高値 63.5%、末期に 58%、有機酸は主として乳酸と揮発酸で(一応醋酸として計算)最高値 9.7%、末期は約 4% であった。菌体は 30 時間で静止状態に入るが、大

第 4 表 休止菌体の L-グルタミン酸分解能について

No.	基 質	菌 体	0 時 間			4 時 間	
			pH	O. D.	グルタミン酸	pH	グルタミン酸
1	グルタミン酸カリウム塩	+	7.6	0.147	$(1.58 \pm 0.03) \times 10^{-1}$ M/l	8.2	$(1.60 \pm 0.01) \times 10^{-1}$ M/l
2	"	—	7.7	—	$(1.60 \pm 0.00) \times 10^{-1}$	7.8	$(1.58 \pm 0.04) \times 10^{-1}$
3	"	+	8.6	0.145	$(1.63 \pm 0.00) \times 10^{-1}$	8.5	$(1.53 \pm 0.04) \times 10^{-1}$
4	"	—	8.6	—	$(1.62 \pm 0.01) \times 10^{-1}$	8.5	$(1.56 \pm 0.01) \times 10^{-1}$

菌懸濁：醗酵経過の場合と同一条件で培養 50 時間行ったもの 5 本分 → 生理的食塩水 2 回洗い → 0.2 M 磷酸緩衝液 pH 8.5, 5 cc
 又は pH 7.5, 5 cc に懸濁した

グルタミン酸カリウム塩
 反応液組成：0.2 M 磷酸緩衝液 (pH 8.5 或は 7.5) + 菌液 5 cc
 約 2.14×10^{-1} M/l 15 cc

↓
 500 cc コルベンに分注

↓
 30°, 4 時間振盪

体 2~3% で、原料は非醗酵性糖による残量が 4~5% であった。尚第 3 表に有機酸の分析値として Elution analysis と他の分析法の分析値を比較表示した。

【II】 休止菌による L-グルタミン酸の代謝能について 常用培地で 50 時間培養した菌体を生理食塩水で 2 回洗滌，5 倍の菌濃度にしたものをグルタミン酸に作用させた処，4 時間の反応で第 6 表に示す如くグルタミン酸は消耗されなかった。

そこでグルタミン酸生成に関し，グルタミン酸脱水素酵素以外に大きく働いているものがあるのではないかと考え，次に各種の酵素活性を測定比較した。

【III】 *B. pumilus* の培養時間と酵素活性について 常用培地で培養 30 時間及び 70 時間の乾燥菌体を作

第 5 表 (1) 酵素活性測定反応系

酵 素	反 応 系
グルタミン酸 酸 化 能	0.033 M K-グルタメート DPN ⁺ 2.26×10^{-1} mM 0.14 M (pH 7.7) 磷酸緩衝液 乾燥菌体 13 mg/ml 20% KOH (CO ₂ 吸収用) 0.2 cc
	0.055 M 琥珀酸 K 塩 1.4×10^{-5} M チトクローム C 4×10^{-4} M CaCl ₂ 4×10^{-4} M AlCl ₃ 0.05 M (pH 7.4) 磷酸緩衝液 乾燥菌体 13 mg/ml 20% KOH (CO ₂ 吸収用) 0.2 cc
フ マ ル 酸 酸 化 能	0.05 M フマル酸 K 塩 DPN ⁺ 2.5×10^{-1} mM メチレンブルー 1.06×10^{-1} mM 0.066 M (pH 7.3) 磷酸緩衝液 乾燥菌体 13 mg/ml 20% KOH 0.2 cc
	0.025 M α-ケトグルタル酸 DPN ⁺ 75 μM L-システイン 5 mM MgCl ₂ 5 mM 0.025 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) 乾燥菌体 13 mg/ml 20% KOH 0.2 cc
グルタミン酸 脱炭酸酵素	0.033 M グルタミン酸 K 塩 0.18 M 醋酸緩衝液 (pH 4.8) 乾燥菌体 13 mg/ml
	0.026 M アスパラギン酸カリウム塩 0.05 M α-ケトグルタル酸カリウ ム塩 0.05 M 磷酸緩衝液 (pH 8.3) 乾燥菌体 13 mg/ml

第 6 図 培養時間と酵素活性

- × アルバターゼ (I+II)
- ☆ アスパルターゼ I
- アスパラギン酸-グルタミン酸トランスアミナーゼ
- ▲ アラニン-グルタミン酸トランスアミナーゼ
- ▲ 琥珀酸酸化酵素
- フマル酸酸化酵素
- △ グルタミン酸脱炭酸酵素
- α-ケトグルタル酸酸化能

第5表 (2) 酵素活性測定反応系

酵 素	反 応 系
アラニン-アスパラギン酸 パラギン酸 トランスアミナーゼ	0.026 M アスパラギン酸カリウム塩 0.05 M ビルビン酸カリウム塩 0.05 M 燐酸緩衝液 (pH 8.3) 乾燥菌体 13 mg/ml
アスパルターゼ (I+II)	10/250M フマル酸アムモニウム塩 1.3×10 ⁻¹ M アデノシン 0.05 M 燐酸緩衝液 (pH 7.5) 乾燥菌体 13 mg/ml
アスパルターゼ I	10/250M フマル酸アムモニウム塩 1.3×10 ⁻¹ M アデノシン 0.05 M 燐酸緩衝液 (pH 7.5) トルオール処理 乾燥菌体 13 mg/ml

反応系 全量は 3.0cc でワールブルグ検圧装置を用いて行った。

(註) トランスアミナーゼ

アスパラギン酸-グルタミン酸トランスアミナーゼ

アスパラギン酸+α-ケトグルタル酸→グルタミン酸測定

アラニン-アスパラギン酸トランスアミナーゼ

アスパラギン酸+ビルビン酸→アラニン測定

アスパルターゼ (I) 及び (I+II) 共に

フマル酸アンモニウム→アスパラギン酸生成量測定

(3) 乾燥菌体による酵素活性を求めた処, アスパルターゼ, アスパラギン酸-グルタミン酸トランスアミナーゼが強力で, これのグルタミン酸生成への関与が考えられた。

本研究に関し御指導を頂いた東大農学部有馬啓教授に深甚の謝意を表します。

(1) 青木良平, 近藤安弘, 角田俊直, 小川鉄雄:

日農化関東支部例会発表 (1959年1月)。

(2) 東大農芸化学教室編: 実験農芸化学, p. 587.

(3) 赤堀四郎: 酵素研究法, 2巻, p. 714.

(4) 東大農芸化学教室編: 実験農芸化学, p. 228.

(5) S. C. Harvey, Velma Higby: *Arch. Biochem.*, 30, 14 (1951).

(6) W. A. Bulen et al.: *Anal. Chem.*, 24,

No. 1 (1952).

(7) L. M. Marshall, J. M. Orten: *Arch. Biochem.*, 24, 110 (1949).

(8) S. B. Barker, W. H. Summerson: *J. B. C.*, 138, 535 (1941).

(9) 小川鉄雄, 角田俊直, 青木良平, 近藤安弘: 本誌, 30, 519 (1956).

り第5表に示してある測定項目をその反応系で測定した。その結果第6図に消費基質 μM あるいは生成基質 μM /乾燥菌体窒素 1mg-10分の単位で各酵素活性を示した。

以上よりみて, アスパルターゼ及びアスパラギン酸-グルタミン酸-トランスアミナーゼの活性が非常に大きく, グルタミン酸生成に関与しているものと推定される。

要 約

B. pumilus によるフマル酸より L-グルタミン酸の生成に於いて

(1) 常用培地に於ける醗酵経過, 窒素炭素バランスを求めた。

(2) 休止菌による L-グルタミン酸の代謝能を調べた処, 殆んど代謝しなかった。

Clostridium aurantiacum の醗酵生産物について*

難波康之祐, 古坂澄石 (東北大学農学研究部)

倉島健次, 須藤恒二 (東北大学農学部)

昭和35年1月16日受理

緒

論

前報において, 水田土壤中に棲生する窒素固定性 *Clostridium* 菌計測の際に, 橙黄色の集落を形成し, 著量の粘質物を分泌する菌株を単離し, 該菌の形態学的, 生理学的特徴より新種と認め, *Clostridium aurantiacum* と命名した事を報告した⁽¹⁾。

さきに見られたように本菌株は, アセトンを殆んど集積せず, かなり高い醗酵率でブタノールを集積し, ブタノール工業上又種々の醗酵性を示す *Clostridium* 属菌の一員としても興味ある菌株なので, 各種の炭素源及び窒素源における醗酵生産物及び醗酵の経時的経過を調べ, 若干の知見を得たのでここに報告する。

実

験

供試菌株: 前報と同じく *Cl. aurantiacum* O株及び O-1株 (白色粘質物生産菌株) を用いた⁽¹⁾。

培養法: 前報と同じく⁽¹⁾培地は *Cl. pasteurianum* 用塩類及び Starkey 塩類を基本とし, 炭素源試験の際

* Studies on the Fermentation Products of *Clostridium aurantiacum*.

By Yasunosuke NAMBA and Chōseki FURUSAKA (Institute for Agricultural Research, Tohoku University), Kenji KURASHIMA and Tuneji SUTO (Faculty of Agriculture, Tohoku University)