- (3) J. A. Olson, C. B. Anfinsen : *J. Biol. Chem.*, 197, 67 (1952).
- (4) H. v. Euler, E. Adler, T. Steenhoff-Eriksen : *Z. Physiol. Chem.*, 248, 227 (1937); 255, 14 (1938); 254, 61 (1938).
- (5) J. R. S. Fincham : *J. Gen. Microbiol.*, 5, 793 (1951).
- (6) J. R. S. Fincham : *ibid.*, 11, 236 (1954).
- (7) J. H. Quastel, B. Woolf : *Biochem. J.*, 20, 545 (1926).
- (8) B. Woolf : *ibid.*, 23, 472 (1929).
- (9) J. M. Wiame, A. Pierard : *Nature*, 176, 1073 (1955).
- (10) A. S. Fairhurst, H. K. King, C. E. Sewell : *J. Gen. Microbiol.*, 15, 106 (1956).
- (11) S. Otsuka, H. Yazaki, H. Nagase, K. Sakaguchi : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 3, 35 (1957).
- (12) S. Kinoshita, S. Uda, M. Shimonō : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 3, 193 (1957).
- (13) M. M. Hong, S. C. Shen, A. E. Braunstein : *Biochem. Biophys. Acta*, 36, 288 (1959).
- (14) N. O. Kaplan, S. P. Colowick, E. F. Neufeld : *J. Biol. Chem.*, 205, 1 (1953).
- (15) P. V. Vignais, P. M. Vignais : *J. Biol. Chem.*, 229, 265 (1957).

L-グルタミン酸醗酵に関する研究 (第 5 報)*

細菌によるグルタミン酸蓄積現象とビオチン

田中勝宣, 岩崎 彪, 木下祝郎 (協和醗酵東京研究所)

昭和 35 年 3 月 7 日 受 理

緒 言

前報⁽¹⁻⁴⁾に *Micrococcus glutamicus* によるグルタミン酸の生産主経路およびこれに関連する糖代謝経路の概略を明らかにし, それぞれの代謝系のグルタミン酸醗酵に於ける意義役割について論じてきた. 既報の如く本菌は通常乳酸, α -ケトグルタル酸およびコハク酸, ビルビン酸, 酢酸等の有機酸を生産し, 適当な培養条件下できわめて著量のグルタミン酸を培養液中に蓄積し, これらの醗酵生産物の量比は環境条件により左右される. この環境条件による醗酵生産物の変動性の問題を酵素もしくは酵素系の消長に伴う代謝活動様式の変化と関連づけて追求することは, グルタミン酸の蓄積機構および微生物の代謝調整機構を解明する上から甚だ重要な問題である. このような立場から本報に於いては, 先ず *M. glutamicus* No. 541 株を用い, 醗酵生産物の量比を左右する諸要因について検討し, その最も重要な要因が培地中の酸素分圧およびビオチン濃度であることを明らかにし得た. 即ち著量のグルタミン酸を生産する *Micrococcus glutamicus* に属する細菌がいずれも増殖必須因子の一つとしてビオチンを要求し, グルタミン酸の異常蓄積現象がビオチンの suboptimal level による増殖制限に起因することを明らかにした. また同様の現象をビオチン要求性の *Bacillus circulans* および *Bacillus lentus* について確認し得たのでそれ等の結果につき報告する.

実 験 方 法

供試菌株 : 当研究室保存の *Micrococcus glutamicus* に属する細菌および本菌の多数の栄養要求性変異株, 並びに Knight, Proom より分譲された Welcome Research Laboratory のビオチン要求性 *Bacillus* 属細菌の Type culture を用いた.

培養方法 : 培養には 20 ml の培地を含む 250 ml 三角フラスコを用い, 全て 30° で 200 回転毎分 (振幅半径 2.5 cm) の回転式振盪培養を行った. 培養中 urease 活性を有する細菌には 20% 尿素溶液を用い, また urease 活性のない細菌には 10% 炭酸アンモン溶液を用い, フィーディングにより phenol red を指示薬として培養液の pH をほぼ 7~8 にコントロールした. 培地組成その他培養法の詳細は実験結果に示す.

分析方法 : 培養中のアミノ酸の検出には, ブタノール : 酢酸 : 水 = 4 : 1 : 1 を溶媒とし, また有機酸の検出には, 水飽和ブタノール : 蟻酸 = 9 : 1 を溶媒とし上昇法によるペーパークロマトグラフィーを用いた. 菌体量の

* Studies on L-Glutamic Acid Fermentation. Part V. Biotin and L-Glutamic Acid Accumulation by Bacteria.

By Katsunobu TANAKA, Takeshi IWASAKI and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Fermentation Ind. Co., Ltd.)

第1表 培地組成と醱酵生産物との関係
各種栄養源の添加濃度 %

肉エキ ス	酵 母	C.S.L	NZ amine	グルタ ミン酸	α -ケ トグル タル酸	乳酸*
0.5	0.1	—	0.5	27.0	6.1	4.2
0.5	0.25	—	0.5	12.6	7.5	16.0
0.5	0.5	—	0.5	7.6	15.5	30.4
0.5	—	0.05	0.5	31.5	8.6	0.2
0.5	—	0.1	0.5	29.6	8.8	0.2
0.5	—	0.25	0.5	26.4	7.8	11.0
0.5	—	0.5	0.5	16.8	12.8	36.0

種菌培養: 2% グルコースブイヨン 24 hrs, 28° 振盪培養

醱酵基本培地組成: グルコース 10.0%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7aq.$ 0.025%, urea 0.5%

培養時間: 72 hrs, 培養中尿素フィーディングにて pH 7.0~7.5 にコントロール

* 醱酵過程で最高の値を示す。

測定は比濁法, グルタミン酸, α -ケトグルタル酸, 乳酸, グルコース等の分析は全て前報記載の方法による。

実験結果

I. 培地中の各種有機栄養源濃度による醱酵生産物の変化および醱酵経過 *M. glutamicus* No. 541 株の醱酵生産物と培地中の各種有機栄養源濃度との関係を第1表に示し, グルタミン酸醱酵経過の一例を第1図に示す。

第1表に見られるように, グルタミン酸の蓄積量は有機栄養源の種類により影響さ

れないが, これらの添加濃度と密接な関係があることがわかった。すなわち C.S.L, 酵母エキス等の栄養源の濃度には各々最適濃度があり, それより過剰に加える場合には菌の増殖は良好となるが, グルタミン酸の生成量は減少し, 乳酸, α -ケトグルタル酸の増加が認められる。またこの場合アラニンおよびコハク酸の蓄積量の増加が見られる。醱酵経過中乳酸, α -ケトグルタル酸, グルタミン酸の消長についてみると, 第1図に示す如く乳酸は増殖過程に最大に達し, グルタミン酸の生成期に再び分解利用され遂に消失するという特異な消長をたどるが, グルタミン酸ならびに α -ケトグルタル酸はともに醱酵経過中ほとんど分解利用されず, 本菌の最終醱酵生産物ともみなされる。

II. 通気および攪拌 *M. glutamicus* No. 541 株を用い, 5 l ジャーファーメンターにより醱酵生産物に対する通気攪拌条件の影響について検討した結果を第2表に示す。

結果にみられるように通気攪拌条件には明らかに最適条件があり, 一般に低攪拌の場合は乳酸が副生し易く, 高攪拌の場合は α -ケトグルタル酸の生成が増加する傾向が見られ, とともにグルタミン酸生産が減殺される。また低攪拌の場合糖消費速度が速く, 高攪拌の場合はその逆の現象が見られる。また低攪拌の場合乳酸のほかにコハク酸, アラニン, ビルビン酸の生成量の増加する傾向を認めた。

III. 各種糖類よりグルタミン酸の生産 第3表に示す如く *M. glutamicus* No. 541 株により供試糖類中グルコース, フラクトース, リボース, シュクロース, マルトースから高収率にグルタミン酸が生産され, マンノース, ガラクトース, ソルボース, ソルビトール, イノシトールより微量のグルタミン酸が生産されることを認めた。これらのグルタミン酸生産性糖類の中グルコースが収率最も良く, フラクトース,

第1図 *M. glutamicus* No. 541 株によるグルタミン酸醱酵の chemical change

培地組成: グルコース 10.0%, C.S.L 0.25%, NZ amine 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7aq.$ 0.025%, 尿素 0.5%
培養温度: 28° 振盪培養

第2表 通気, 攪拌条件と醱酵生産物

醱酵生産物 mg/ml	攪拌数 r.p.m.	350	450	600
グルタミン酸		15.0	32.0	23.0
α -ケトグルタル酸		8.0	7.5	10.2
乳酸*		23.0	4.9	1.4

培養温度 30°, 培養時間 72時間, 通気量 等量

シード培地組成: グルコース 2.0%, ペプトン 1.0%, 肉エキス 0.5%, 食塩 0.25%, pH 7.0

醱酵培地組成: グルコース 10.0%, NZ amine 0.5%, C.S.L 0.5%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7aq.$ 0.025%, urea 0.5%

* 乳酸は醱酵経過で最高の値を示す。

第 3 表 各種糖類からの醗酵生産物

供試糖類	増殖	残糖	グルタ ミン酸	α -ケトグル タル酸	乳酸
グルコース	++	0.2	26.5	4.9	0.3
フラクトース	++	2.8	15.5	7.5	0.6
シュクロース	++	1.0	11.8	12.0	17.0
マルトース	++	1.7	13.9	6.2	5.9
マンノース	++	6.2	1.9	2.3	0.0
ガラクトース	+	8.2	2.3	0.0	0.0
ソルボース	+	7.4	1.4	1.1	0.0
リボース	++	1.1	15.3	11.0	2.8
ソルビトール	+	—	1.9	3.6	—
イノシトール	+	—	1.8	1.8	—

(+) slight growth (++) good growth

醗酵培地組成: 各種糖類 10.0%, NZ amine 0.5%, C.S.L 0.25%,
 K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7aq.$ 0.025%, urea 0.5%

振盪培養, 培養時間 72時間, 培養温度 28°

リボース, シュクロース, マルトースからはグルコースの約 50~80%の収率が得られ, これらの糖類に於いては α -ケトグルタル酸および乳酸の蓄積量の多い傾向を認めた。

IV. *Micrococcus glutamicus* の増殖および醗酵生産物と Biotin との関係 既述の如く培地中の各種有機栄養源濃度により, 本菌の増殖および醗酵生産物の量比に著しい変動が見られたので, 合成培地を設定し, 培地諸成分中の醗酵転換因子について追求した。

第 4 表に示す如く *Micrococcus glutamicus* No. 541 株は, 増殖必須因子としてビオチンを要求することが明らかとなったので,

合成培地を用い, 培地中のビオチン濃度に対する growth response について検討した。即ち第 2 図に示す如く

第 2 図 *M. glutamicus* No. 541 株のビオチンに対する growth response

基本培地組成: 第 5 表に同じ, 30° 振盪培養

(1) ビオチン 0.05 γ /l (4) ビオチン 5.0 γ /l
(2) " 1.0 γ /l (5) " 10 γ /l
(3) " 2.5 γ /l (6) " 25 γ /l

第 4 表 *M. glutamicus* No. 541 株の

栄養要求 培地組成	増殖
M. M.	—
M. M. + V.	+
M. M. + A. A.	±
M. M. + O. B.	—
M. M. + V. + O. B.	+
M. M. + V. + A. A.	+
M. M. + A. A. + O. B.	±
Complete Medium	+
M. M. + V. — リボフラビン	+
" — サイアミン	+
" — <i>p</i> -アミノ安息香酸	+
" — ビリドキシン	+
" — ビリドキサール	+
" — <i>dl</i> -パントトテン酸	+
" — ニコチン酸	+
" — ビオチン	—
" — 葉酸	+
" — ビリドキサミン	+

M. M.: Minimal medium

グルコース 5.0%, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.1%,
 KH_2PO_4 0.05%, $FeSO_4 \cdot 7aq.$ 0.001%,
 $MgSO_4 \cdot 7aq.$ 0.025%, $MnSO_4 \cdot 4aq.$ 0.001%

V.: ビタミン (表中のビタミン 10 種を含む)

A. A.: Vitamin free casamino acid

O. B.: Organic Base

(—) not growth

(±) extremely slight growth

(+) good growth

28°, 48 時間振盪培養

本菌は増殖因子としてビオチンが存在する場合, グルコース, 燐酸カリ, 硫酸マグネシウム, 硫酸マンガン, 硫酸鉄およびアンモニア源を含む純合成培地に発育することが判明した。また図に示す如く本菌は好適な条件下に於いてはビオチン 10~20 γ /l 濃度に於いて最大増殖量に達し, それ以下のビオチン濃度に対してはほぼ定量的な growth response を示す。

第 5 表に示す如く, ビオチンの増殖因子としての効果はビオチン要求性の酵母, 乳酸菌等で知られている如く一部アスパラギン酸またはオレイン酸等の高級脂

第 5 表 *M. glutamicus* No. 541 株のアスパラギン酸およびオレイン酸に対する growth response

growth factor	growth (比濁度)
無 添 加	3
ビオチン 10 γ /l	103
L-アスパラギン酸 1 mg/10 ml	12
オレイン酸ソーダ 300 γ /10 ml	38
オレイン酸ソーダ 3 mg/10 ml	65
ビオチン 10 γ /l + アスパラギン酸 1 mg/10 ml	110
ビオチン 10 γ /l + アスパラギン酸 1 mg/10 ml	118

基本培地組成: グルコース 10.0%, K_2HPO_4 0.05%, KH_2PO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7aq.$ 0.025%, $FeSO_4 \cdot 7aq.$ 0.001%,
 $MnSO_4 \cdot 4aq.$ 0.001%, urea 0.5%

第6表 培地中のビオチン濃度による醗酵生産物の変化

ビオチン濃度 γ/l	残糖 グルコース %	pH	L-グルタミン酸 mg/ml	α-ケトグルタル酸 mg/ml	乳酸* mg/ml
0.0	8.5	8.90	1.3	trace	trace
0.5	2.5	8.60	17.0	3.0	7.6
1.0	0.5	8.37	25.0	4.6	7.4
2.5	0.4	8.21	30.8	10.1	6.9
5.0	0.1	8.17	10.8	7.0	13.7
10.0	0.2	8.37	6.7	8.0	20.5
25.0	0.1	8.83	7.5	10.1	23.1
50.0	0.1	8.42	5.7	6.2	30.0

* 乳酸は醗酵経過中の最大の値を示す

基礎培地組成: グルコース 10.0%, K_2HPO_4 0.05%, KH_2PO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7aq$ 0.025%, $FeSO_4 \cdot 7aq$ 0.001%, $MnSO_4 \cdot 7aq$ 0.001%, urea 0.5%
30°, 振盪培養, 培養時間 72時間

も増加する傾向が見られ, グルタミン酸の蓄積はビオチンの suboptimal な条件下に於ける増殖制限下において最も顕著であることが判明した. また過剰量のビオチンの存在下では, アラニン, アスパルギン酸, コハク酸の蓄積量の増加する傾向が見られ, 微量のリンゴ酸も培養液中に検出される.

他の *Micrococcus glutamicus* に属する多数の細菌についても全く同様の現象が見られ, 本菌によるグルタミン酸の異常蓄積現象が, 増殖必須因子の一つであるビオチンの suboptimal な条件下に於ける増殖制限に起因すること, および醗酵生産物の転換因子の一つとしてビオチンがきわめて重要な役割をなしていることを証明し得

第7表 *M. glutamicus* No. 541 株による醗酵生産物に対する各種金属

イオンの影響

添加金属イオン	pH	残糖 %	グルタミン酸 mg/ml	α-ケトグルタル酸 mg/ml	乳酸 mg/ml
無 添 加	8.46	0.3	25.4	16.6	0.5
Na ⁺ NaCl 1/6 mol	8.51	0.3	20.2	3.7	0.4
K ⁺ KCl 1/6 mol	8.40	0.3	24.2	3.4	0.5
Mg ⁺⁺ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.02 μM	8.29	0.2	26.8	2.8	0.3
Mn ⁺⁺ $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.02 μM	8.23	0.2	28.8	3.6	0.4
Fe ⁺⁺ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02 μM	8.45	0.3	24.2	6.2	5.3
Co ⁺⁺ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.02 μM	8.37	0.2	31.9	2.7	0.3
Ni ⁺⁺ $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02 μM	8.07	0.2	29.8	3.5	0.4
Cu ⁺⁺ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.02 μM	8.38	0.2	28.6	3.0	0.2
Zn ⁺⁺ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02 μM	8.35	0.2	27.6	3.4	0.2
Mo (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O 0.02 μM	8.51	0.2	27.8	2.5	0.8

基礎培地組成: グルコース 10.0%, K_2HPO_4 0.05%, KH_2PO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7aq$ 0.025%, $MnSO_4 \cdot 4aq$ 0.001%, $FeSO_4 \cdot 7aq$ 0.001%, ビオチン 2.5 γ/l, urea 0.5%
培養時間 72 hrs, 30°, 振盪培養第8表 *M. glutamicus* No. 541 株によるグルタ

ミン酸生産に対する各種ビタミンの影響

添加ビタミン 10 γ/dl	生成グルタミン酸 mg/ml	生成 α-ケトグルタル酸 mg/ml	生成乳酸 mg/ml
無 添 加	26.1	2.6	0.5
チアミン	26.3	4.7	0.4
p-アミノ安息香酸	26.7	3.3	0.4
ビリドキサール	30.7	3.3	0.3
ビリドキシン	23.6	2.7	0.5
dl-パントテン酸	22.8	2.8	0.2
ニコチン酸	25.8	2.5	0.5
ビリドキサミン	25.4	3.3	0.3
リボフラビン	21.2	2.3	0.5
葉酸	27.1	2.5	0.4

基礎培地組成: グルコース 10.0%, K_2HPO_4 0.05%, KH_2PO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7aq$ 0.025%, $MnSO_4 \cdot 4aq$ 0.001%, $FeSO_4 \cdot 7aq$ 0.001%, ビオチン 2.5 γ/l, 尿素 0.5%
培養時間 72 hrs, 30°, 振盪培養

脂肪酸類により代替せられる(5~6).

上記の如く, 本菌がビオチンを要求し, 培地中のビオチン量にはほぼ定量的な growth response を示すことを明らかにし得たので, 合成培地を用い種々のビオチン濃度における醗酵生産物について検討した. 実験結果を第6表に示す.

第6表に示す如く過剰量のビオチン存在下では, 菌体増殖は旺盛であるが, グルタミン酸の蓄積量は少なく, 著量の乳酸が蓄積し, また α-ケトグルタル酸の生成量

更に本菌の醗酵生産物に対す

る金属イオンおよびB群ビタミンの影響について検討した結果を第7表および第8表に示す. 実験結果に示す如くビオチンの如くグルタミン酸の蓄積に顕著な影響を与えるものは見出されなかった.

V. *M. glutamicus* の栄養

要求性変異株によるグルタミン酸の生産と栄養素量との関係

微生物による代謝生産物の異常蓄積現象, すなわち醗酵と菌体

増殖とは正反対の物質代謝様式であり, 菌体増殖に多量の原料が使用せられればそれだけ醗酵生産物が減少することは自明の理であるが, 以上明らかにしたグルタミン酸醗酵におけるビオチンの意義は単に増殖量の制限によるのみでなく, 本質的な菌の生理作用転換因子として作用している如く見える. すなわちビオチンはかたや本菌の正常の分裂増殖といった物質代謝に必須の物質でありながら, その suboptimal な条件下では菌体合成への生理作用は極端に制限され, 原料の30%以上にも上る部分がグルタミン酸の生産に切り換えられるのである. この間の事情を更に詳細に追求する目的で, 中山等により分離された多数の栄養要求性変異株を用い, グルタミン酸の蓄積量, 菌体増殖と培地中の必須栄養素量との関係について検討した.

第 3 図 *M. glutamicus* のチアミン要求性変異株によるグルタミン酸生産に対するチアミンおよびビオチン量の影響

□ 増殖 ■ 生成グルタミン酸

基礎培地組成: グルコース 10%, KH_2PO_4 0.05%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{aq}$ 0.025%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{aq}$ 0.001%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{aq}$ 0.001%, urea 0.5%
30°, 72 時間振盪培養

第 9 表 ビオチン要求性 *Bacillus* 属細菌のグルタミン酸生産能

供試菌株	栄 養 要 求	グルタミン酸生産能
<i>B. circulans</i> CN 2719	NH_4	±
2718	ビオチン	卅
2923	"	+
3377	"	+
2720	チアミン	+
2721	"	卅
2848	"	卅
2905	"	+
2925	"	卅
3378	"	+
2924	アミノ酸	卅
2849	"	卅
<i>B. firmus</i> CN 2196	"	+
3318	"	+
<i>B. lentus</i> CN 2750	チアミン	卅
2789	"	卅
<i>B. pumilus</i> CN 2733	"	+
787	"	+
2731	"	+
2732	"	+
<i>B. coagulans</i> CN 2202	チアミン	+
<i>B. macerans</i> CN 1013	"	+
2204	"	+
2614	"	+
<i>B. pastenrii</i> CN 2713	チアミン, ニコチン酸	±
2716	ビオチン, チアミン, アミノ酸	+

グルタミン酸生産能の試験用培地組成: グルコース 50 g, K_2HPO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{aq}$ 0.5 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{aq}$ 0.02 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{aq}$ 0.02 g, ビオチン 1.0 μg, チアミン 2.0 mg, ニコチン酸 2.0 mg, NZ-amine 5.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10.0 g, urea 3.0 g, 1000 ml 水道水
30°, 48時間, 振盪培養

(±) trace (十) 1 mg/ml 以上 (卅) 5 mg/ml 以上 (卅) 10 mg/ml 以上

第 3 図にビオチンおよびチアミンを要求する変異株を用いて行った実験結果の一例を示す。

実験結果に見る如く, 用いた菌株は 10~25 γ/l のビオチン存在下で, 500 γ/l のチアミン濃度下で最大増殖量に達し, それ以下のチアミン濃度ではビオチン同様比例的な growth responseを示すが, チアミンの suboptimal な条件下では単に増殖の阻害が起るのみでなく, グルタミン酸の生産も著しく阻害されることが見られ, ビオチンの如く菌体生成の抑制効果がグルタミン酸の増量となって現われるといった効果はみられない。同様のことが, リボフラビン要求性変異株ならびに他の栄養要求性変異株についても認められる。

以上の実験結果より, グルタミン酸酸酵に於けるビオチンの役割は, 単に菌体増殖量のコントロールによるのみではなく, 本菌の代謝経路上のビオチン関与の酵素または酵素系をビオチンの制限によってコントロールすることにより, グルタミン酸合成系の活動を助長し, 逆にグルタミン酸の分解利用酵素系の活動を抑制するものと解釈することができ, 生体内に於けるビオチンの重要な生理的役割の一端がうかがわれる。

第4図 ビオチン要求性細菌によるグルタミン酸生産に対するビオチンの効果

□ 増殖 ■ グルタミン酸

基礎培地組成: グルコース 5.0%, K_2HPO_4 0.15%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7aq.$ 0.075%, $MnSO_4 \cdot 4aq.$ 0.002%, $FeSO_4 \cdot 7aq.$ 0.002%, $Na_2MoO_4 \cdot 2aq.$ 0.001%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%, vitamin free casamino acid 0.5%, urea 0.5%

30°, 72 時間, 振盪培養

第10表 *Bacillus lentus* CN 2750 によるグルタミン酸生産に対するビオチンおよびチアミン量の影響

培養72時間に於けるグルタミン酸の生成量 mg/ml

チアミン μg/l	25	50	100	250	500	1000
ビオチン μg/l	1.0	1.1	6.6	10.0	14.0	18.0
2.5	1.3	2.9	9.6	5.7	3.7	2.5
25	1.7	1.7	1.1	3.0	3.1	2.3

基礎培養基組成: グルコース 5%, K_2HPO_4 0.15%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7aq.$ 0.075%, $MnSO_4 \cdot 4aq.$ 0.002%, $FeSO_4 \cdot 7aq.$ 0.002%, $Na_2MoO_4 \cdot 2aq.$ 0.001%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%, vitamin free casamino acid 0.5%, 尿素 0.5%

培養中尿素フィーディングにて pH を 7.0~8.0 にコントロール
30°, 振盪培養

グルタミン酸の生産はかえって阻害され, *M. glutamicus* に於ける場合に見られたようにビオチンはこれらの細菌の生理作用転換因子として, きわめて重要な役割をなしていることが結論される。

また十分量のビオチンが存在し, チアミンの suboptimal な条件では *B. lentus* によりアラニンの生成量の多いことが注目された。

考 察

アンモニア同化による微生物の増殖過程に於いて微量のグルタミン酸が培養液中に蓄積する現象は, 微生物界に広く, 細菌, 酵母, 黴, 放線菌等について見られ^(11,12), このことは一般的にいうとグルタミン酸の生合成速度が蛋白合成への分解利用速度に比し, 遙かに速いことに起因するものであろう。しかし糖の代謝主要生産物として著量のグルタミン酸を蓄積する菌株は比較的少なく, グルタミン酸の著量蓄積現象は既に報告した如く, 第一

VI. ビオチン要求性 *Bacillus* 属細菌によるグルタミン酸の蓄積現象

Bacillus 属細菌によるグルタミン酸の蓄積現象については, 朝井等⁽⁷⁾, 尾崎等⁽⁸⁾, Foster 等⁽⁹⁾により報告されており, また *Bacillus* 属細菌の栄養要求については Knight, Proom 等⁽¹⁰⁾の詳細な研究がある。著者等は同氏等より分譲されたビオチン要求性 *Bacillus* 属細菌によるグルタミン酸生産能につき検討した結果, 第9表に示す如く *Bacillus circulans* および *Bacillus lentus* が強いグルタミン酸生産能を有すことを認めたので, これらのビオチン要求性の *Bacillus circulans* および *Bacillus lentus* の代表株についてグルタミン酸の生産とビオチンとの関係について追求した。

実験結果を第4図に示す。実験結果に示す如く *B. circulans*, *B. lentus* は *M. glutamicus* の場合と同様に, 培地中のビオチン量に対して比例的な growth response を示し, グルタミン酸の蓄積はいずれもビオチンの subop-

timal な濃度に於ける増殖制限下で著しく, 過剰量のビオチン存在下では良好な増殖によりグルタミン酸の蓄積はきわめて微量であり, これらの細菌によるグルタミン酸の異常蓄積現象もビオチンの suboptimal な条件下に於ける増殖制限に起因することを明らかにし得た。

また *Bacillus lentus* は urease 活性を有し, 適当な培養条件下で対初糖 30% 以上のグルタミン酸を培養液中に蓄積し得ることを認めた。

Bacillus lentus はビオチンの他にチアミンおよびアミノ酸を要求するが, 第10表に示す如く, チアミンの suboptimal level による増殖制限下ではグルタ

義的には菌株の生理的特性に起因するものと考えられる。しかし前報に於いて指摘した如く、一般に多くの細菌は糖代謝系として E.M.P. と H.M.S. の両者を有し、末端酸化系としても、グルタミン酸の生合成系である TCA サイクルの他に DCA cycle⁽¹³⁾ 或いはグリオキシル酸サイクル等⁽¹⁴⁾の代謝系が同時に存在し、代謝の流れがどの経路をより多く選ぶかは、主として環境条件により支配されるものと考えられる。従って環境条件によるこれらの糖代謝系の変換によりグルタミン酸の生合成が大きく影響されることは当然予想されるところである。

著者等は実験結果に示したように、*Micrococcus glutamicus* による醗酵生産物の量比の転換因子として培地中の酸素分圧およびビオチン量がきわめて重要であることを明らかにし、更にビオチンを増殖必須因子の一つとして要求し、且グルタミン酸生産能を有する微生物即ち *Micrococcus glutamicus* に属する細菌、*Bacillus circulans* および *Bacillus lentus* に属する細菌によるグルタミン酸の異常蓄積現象が、いずれもビオチンの suboptimal level に於ける増殖制限に起因することを証明した。以上の実験結果さらに最近多くの研究者等⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ より *Brevibacterium* 属細菌として報告された多数のグルタミン酸生産菌がいずれもビオチンを増殖必須因子の一つとして要求する事実、また K. C. Chao, J. W. Foster 等⁽⁹⁾ がビオチン要求性のグラム陰性有孢子桿菌が糖質およびアンモニア源より高収率にグルタミン酸を生産し、グルタミン酸蓄積現象とビオチンとの間に著者等の見出した事実と同様の関係のあることを報告していること等より考えて、グルタミン酸醗酵に於けるビオチンの役割は普遍的なものと考えられる。

また糖質およびアンモニア源より著量のグルタミン酸を生成蓄積する多くの細菌が、増殖必須因子の一つとしてビオチンを要求し、グルタミン酸の異常蓄積現象がビオチンの suboptimal level に於ける増殖制限に起因することは、グルタミン酸の蓄積現象がビオチン関与の一つ或いはそれ以上の酵素系の阻害により起ることを意味し、グルタミン酸の蓄積機構および生体内に於けるビオチンの役割の解明にきわめて興味ある問題を提供している。

従来、ビオチンの欠乏条件下に於ける代謝生産物の蓄積現象に関しては、例えば香月等⁽¹⁹⁾ は *Piricularia oryzae* を用い、ビオチン欠乏条件下の培養液中に α -ケトグルタル酸、ピルビン酸およびジメチルピルビン酸の蓄積する事実を見出し、また Rose および Nickerson 等⁽²⁰⁾ はビオチン要求性酵母によるニコチン酸の蓄積現象がビオチンの欠乏症状によることを明らかにし、ニコチン酸の蓄積がビオチン関与の酵素系の阻害によるものとの見解を発表している。

生体内に於けるビオチンの生理的役割に関しては多くの文献および総説^(21,22) があり、炭酸ガス固定脱離反応、アミノ基転移反応、解糖作用、コハク酸酸化反応、脂肪の代謝また蛋白合成に関与する等極めて広範な作用が知られているが、その作用機構および役割に関しては未だ定説が得られておらず、グルタミン酸醗酵に於けるビオチンの役割の解明は、生体内のビオチンの代謝機能の理解のために役立つであろう。

要 約

(1) *Micrococcus glutamicus* の醗酵生産物であるグルタミン酸、 α -ケトグルタル酸、乳酸等の量比は環境条件により異なり、醗酵生産物の転換因子として酸素分圧、ビオチンが重要な役割をなすことを認めた。醗酵経過中グルタミン酸、 α -ケトグルタル酸の分解利用は見られないが、乳酸は増殖期に最大に達し再び分解利用される。

(2) 各種糖類よりグルタミン酸の生産、グルタミン酸蓄積に対する各種重金属イオン、B 群ビタミンの影響につき検討し、グルタミン酸生産性糖類の中グルコースが最良であること、重金属イオンおよびビオチン以外の B 群ビタミンにグルタミン酸の蓄積を顕著に阻害するものがないことを認めた。

(3) *Micrococcus glutamicus* に属する細菌は増殖必須因子の一つとしてビオチンを要求し、グルタミン酸の異常蓄積現象がビオチンの suboptimal な条件に於ける増殖制限によることを明らかにし、過剰量のビオチン存在下では旺盛な菌体増殖と共に著量の乳酸が蓄積し、グルタミン酸の蓄積量は少ないことを認めた。

(4) ビオチン要求性の *Bacillus circulans* および *Bacillus lentus* により糖質およびアンモニア源より高収率にグルタミン酸が生産されることを明らかにし、これらの細菌によるグルタミン酸の異常蓄積現象もビオチンの suboptimal な条件による増殖制限に起因することを証明した。

(5) グルタミン酸醗酵に於けるビオチンの役割は、単に増殖量の制限によるものではなく、グルタミン酸の生合成と分解反応に関与するビオチン関与の酵素もしくは酵素系のコントロールによるものと結論される。

終りに本研究に鞭撻と発表の許可を与えられた協和醗酵加藤社長、桑田専務、渡辺専務、佐藤研究開発部長に

感謝致します。

尚, 本研究は昭和 34 年 7 月, 農化関東支部第 194 回講演会に於いて発表した。

- (1) S. Kinoshita, K. Tanaka, S. Udaka, S. Akita : Proceeding of the Intern. Symp. Enz. Chem., 2, 464 (1957).
- (2) 木下祝郎, 田中勝宣, 鶴高重三, 秋田定夫, 斎藤 健, 岩崎 彪 : 醸酵協会誌, 16, 1 (1958).
- (3) 木下祝郎, 田中勝宣, 秋田定夫 : 本誌, 34, 589 (1960).
- (4) 田中勝宣, 秋田定夫, 木村一雄, 木下祝郎 : *Amino Acids*, No.1, 62 (1959).
- (5) S. A. Koser et al. : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 51, 204 (1942).
- (6) V. R. William, E. A. Fieger : *J. Biol. Chem.*, 170, 399 (1947).
- (7) 相田 浩, 大石邦夫, 朝井勇宣 : 本誌, 34, 70 (1960).
- (8) 尾崎浅一郎, 宮地 昇, 松井俊規, 河野景明, 角田俊直, 奥村信二, 岡田 弘 : 農化関東支部第 192 回講演会 (1959. VI).
- (9) K. C. Chao, J. W. Foster : *J. Bacteriol.*, 77, 715 (1959).
- (10) H. Proom, B. C. J. G. Knight : *J. Gen. Microbiol.*, 13, 474 (1955).
- (11) S. Kinoshita, S. Udaka, M. Shimono : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 3, 193 (1957).
- (12) 朝井勇宣, 相田 浩, 大石邦夫 : 醸酵協会誌, 15, 71 (1957).
- (13) E. S. G. Barron et al. : *Arch. Biochem.*, 29, 130 (1950).
- (14) H. L. Kornberg, H. A. Krebs : *Nature*, 179, 989 (1957).
- (15) 奥村信二, 都河竜一郎, 角田俊直, 松井俊規, 河野景明, 宮地 昇 : 農化関東支部第 192 回講演会 (1959, V).
- (16) 小川知可良, 大出通資, 緑川義教 : *Amino Acids*, 1, 45 (1959).
- (17) 蘇 遠 志, 山田浩一 : *Amino Acids*, 1, 38 (1959).
- (18) 太田修二, 田中政民 : *Amino Acids*, 1, 50 (1959).
- (19) H. Katsuki : *J. Biochem.*, 46, 621 (1959).
- (20) A. H. Rose, W. J. Nickerson : *J. Bacteriol.*, 72, 324 (1956).
- (21) H. C. Lichstein : *Vitamine and Hormone*, 9, 27 (1951).
- (22) W. H. Sebrell, R. S. Robert : *The Vitamine*, Vol. 1, 525 (1954).

L-グルタミン酸醸酵に関する研究 (第 6 報)*

Micrococcus glutamicus の代謝に於けるビオチンの役割

田中勝宣, 秋田定夫, 木村一雄, 木下祝郎 (協和醸酵東京研究所)

昭和 35 年 3 月 7 日 受 理

緒 言

前報⁽¹⁾に於いてビオチンを増殖必須因子の一つとして要求し, 且グルタミン酸の生産能を有する微生物, 例えば *Micrococcus glutamicus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lentus* によるグルタミン酸の異常蓄積現象がいずれもビオチンの不足条件による増殖制限に起因することを確認し, これがビオチン関与の酵素系のコントロールによることを述べた。

また *Micrococcus glutamicus* に於いては培地のビオチン, 酸素, NH_4^+ の諸因子の変化により, グルタミン酸醸酵, 乳酸醸酵, α -ケトグルタル酸醸酵へ各々醸酵主要生産物の転換現象が見られる。

本報に於いては *Micrococcus glutamicus* による醸酵転換現象および本菌の代謝に於けるビオチンの機能につき検討し, グルタミン酸醸酵に於けるビオチンの役割につき二, 三の知見を得たのでここに報告す。

実 験 方 法

供試菌株および培養方法 : 実験には全て *Micrococcus glutamicus* No. 541 株を用い, 培養方法および分析方法は前報と同様の方法によった。

ビオチン欠乏菌および正常菌の調製方法 : グルコース 2.0%, ペプトン 1.0%, 肉エキス 0.5%, 食塩 0.25%

* Studies on L-Glutamic Acid Fermentation. Part VI. The Role of Biotin in Metabolism of *Micrococcus glutamicus*.

By Katsunobu TANAKA, Sadao AKITA, Kazuo KIMURA and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Fermentation Industry Co., Ltd.)