廃糖蜜による L-グルタミン酸醗酵 (第 4 報)*

菌体飽和-不飽和脂肪酸構成比の菌体外 L-グルタミン酸蓄積に及ぼす影響

渋谷 満, 小松謙一, 高橋秀臣, 大沢岳義 (旭化成工業株式会社食品工場研究課)

昭和 39 年 10 月 31 日 受 理

緒 言

著者らは, 前報⁽¹⁻³⁾までに *Microbacterium ammoniaphilum* を使用し, 廃糖蜜を糖源とする L-グルタミン酸 (以下 L-GA と省略する) 醗酵において, L-GA の菌体外著量蓄積に有効なポリオキシエチレン脂肪酸エステル (以下 POEFE と省略する) の化学的要件, 及び HLB 値範囲につき検討を行い, 必要な条件を明かにした。また, 培養中の菌体によるビオチン取り込みへの影響の有無を検討すると共に, この間, POEFE 自身の消長を追跡し, 大部分は菌体外に止ることが認められたが, 一部の行方は断定することができなかった。さらに, L-GA の菌体外著量蓄積に POEFE が必要とされる時間の検討を行い, 培養 5 時間程度までに添加されることが必要であることを明かにすると共に, この点についてペニシリンの場合とは著しい相違があることを認めた。

著者らは, 今回, L-GA の菌体外蓄積の有無は菌体飽和脂肪酸モル数が不飽和脂肪酸 (主としてオレイン酸) モル数を上回るか否かにかかっており, 添加 POEFE はその一部が, 菌体に強く吸着されて菌体の飽和-不飽和脂肪酸比を変えることにより L-GA の菌体外著量蓄積に寄与していることを明かにすると共に, この点に及ぼす POEFE 添加時間の影響も検討した。一方, 不飽和脂肪酸の中心をなす oleate が L-GA の細胞膜透過性を不良化せしめている可能性が認められたので報告する。

実験及び考察

実験 1) POEFE 添加の菌体脂肪酸組成に及ぼす影響

* L-Glutamic Acid Fermentation with Molasses. Part IV. Effect of Cellular Saturated-unsaturated Fatty acid Ester Ratio on the Extra-cellular Accumulation of L-Glutamate. By Mitsuru SHIBUKAWA, Ken-ichi KOMATSU, Hideomi TAKAHASHI and Takeyoshi OSAWA (Research Section, Foodstuff Plant, Asahi Chemical Industry Co., Ltd.)

廃糖蜜による L-GA 醗酵において L-GA の菌体外蓄積効果をもつ POEFE の添加によって菌体脂肪酸組成に, いかなる変化が起るかを検討するため, 次の実験を行った。

L-GA 生産菌 *Microbacterium ammoniaphilum* を第 1 表条件のジャーファーメンターで培養し, ノニオン S-6 (日本油脂製品, POE monostearate 純度 72%) 0.20% 及び, ノニオン P-6 (日本油脂製品, POE monopalmitate 純度 97%) 0.15% を, POEFE の添加による変化をより明瞭にとらえるために, 培養 4 時間に各々後添した後培養 16 時間で菌体をサンプリングし, 1,500×g, 15 分冷凍遠心後 1/3 容生理食塩水水洗後, 凍結乾燥菌体とし, この 1g を 20 ml 2N HCl に懸濁させ, 25 ml 試験管に密封, 加水分解後, Allen G. Marr 及び

第 1 表 培 養 条 件

		前 培 養	本 培 養
培 地 組 成	甜菜廃糖蜜 (全糖として)	4.0%	7.0%
	KH ₂ PO ₄	0.2	0.2
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.05	0.05
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0	0.05
	MnSO ₄ ·nH ₂ O	0	5×10 ⁻⁴
	FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0	5×10 ⁻⁴
	尿 素	0.8	0
	ビ オ チ ン	5 γ/l	10 γ/l
	POEFE	0	0 または本文記載の量
	45% 補糖液量	0	2.5 l
運 転 条 件	温 度	30°	30°
	攪 拌	400 r. p. m	400 r. p. m.
	通 気	10 l/min	10 l/min
	pH	始発 7.2 調整せず	7 → 8
	Seed 移植量	200 cm ² Roux	Jar Seed 4%
	始 発 液 量	10 l	10 l
	培 養 時 間	7 hr.	36 hr.
	培養槽容量	20 l	20 l

John L. Ingraham の方法⁽⁴⁾により, 脂肪酸メチルエステルとし, これを 0.5 ml のベンゼン溶液とし, 島津 GC-1B 型ガスクロマトグラフにより分析を行った. 第 2 表にガスクロマトグラフの条件を示した. 定性は標準脂肪酸メチルエステルの retention time との比較で行い, 定量は, methyl palmitate を基準として中西らの⁽⁵⁾ピーク面積重量測定法によった. 本報文中において, ガスクロマトグラフィーの結果はすべて methyl palmitate を C₁₆, methyl oleate を C₁₈ の如く表現する.

ガスクロマトグラフの結果を第 1 図に示す. 第 1 図により培養 16 時間の菌体脂肪酸組成間の相違は, 全く添加 POEFE の構成脂肪酸の相違に由来することは明かである. ただし, このデータのみでは, 菌体分離時に混入した菌体外 POEFE がガスクロマトのサンプル中に全く無いとはいえないので, この点の検討を含めて次の実験を行った.

実験 2) POEFE 添加時, 菌体脂肪酸組成の経時変化

実験 1) と同一方法で *M. ammoniaphilum* を培養し, ガスクロマトグラフ用試料の調製法は, 実験 1) と, 全く同一の方法のものと, 菌体分離後, 1/3 容生理食塩水による水洗, 遠沈をさらに 3 回 (計 4 回) 繰り返した以外は, 同一方法のものと二通りとし, POEFE 添加 5 分前 (培養約 4 時間) 15 分後, 2 時間後, 4 時間後, 6 時間後, 8

第 2 表 ガスクロマトグラフ使用条件

カラム	0.75 m × 3
カラム充填剤	Shimalite B-polyester Succinate
サンプル投入室 温度	280°
カラム室 温度	215°
ディテクター室 温度	260°
キャリアガス 流速	He 64 ml/min
サンプル量	0.02 ml
チャート送り速度	10 mm/min

第 1 図 培養 16 時間菌体の脂肪酸ガスクロマトグラム

L-GA の () 内は対使用糖効率

第 2 図 生成 L-GA 値及び菌体重量の経時変化

—●— 無添加 - - -●- - - P-6 添加 ●..... S-6 添加
 ×——× 乾燥菌体

時間後, 及び培養終了時(培養 36 時間)にサンプリングを行った。

本実験の培養経過は第2図に示す通りである。

なお本報文中における L-GA 定量はすべてワールブルグ検圧法によった。

まず, 実験 1) において懸念された付着混入の問題について検討を行った。各 POEFE 添加実験のいずれのサンプリング時間についても検討を行ったが, 最も問題となる POEFE 添加直後の場合を POE monostearate について示せば, 第3図の如く添加直前の $C_{16} : C_{18} : C_{18}^-$ 9.01 mg : trace : 12.0mg から添加直後1回水洗菌体の 10.3 : 3.2 : 12.4 に急変しているが, この菌体をさらに3回水

洗しても, この比は, 10.8 : 3.0 : 12.6 とサンプリング誤差, 及び測定誤差以上には変っていない。この関係は酸酵終了時に至る POE-monostearate 添加後のどの時間についても, また POE-monopalmitate 添加後のどの時間についても認められた。すなわち, POEFE 添加後に現われる C_{18} または C_{16} のヤマは単なる混入の結果とは考えられず, 固い付着によるものと推定される。

次に, POEFE 添加前及び後の菌体脂肪酸組成の変化を各サンプルのガスクロマトグラムについて検討したが, 実験 1) に記した方法で定量した各脂肪酸の乾燥菌体 1g 当り, 及び元の培地 100 ml 当りの値を第3表に示す。

第3表に示した結果について若干説明を行えば,

1) 一般に, 本実験における菌体主要脂肪酸は, C_{18} , 及び C_{16} であり, C_{14} , C_{16}^- は POEFE 添加の場合も含めてどの場合も 0 または trace (0.5 mg/dry cell g 以下) であり, C_{18} も本来はこれらと同程度である。 C_{12} は若干高いものもあるが, 菌体 1g 当りの最高値 (POEFE 添加直前) 0.87 mg 最も含有比の高い場合 (POEFE 無添加の培養終了時) でも, 重

第3図 水洗回数による脂肪酸構成比の変化

第3表 菌体脂肪酸量

	無 添 加						S-6 0.20% 添加						P-6 0.15% 添加					
	C_{18}^-		C_{18}		C_{16}		C_{18}^-		C_{18}		C_{16}		C_{18}^-		C_{18}		C_{16}	
	A*	B**	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
添 加 前	11.8	7.31	trace	—	8.35	5.17	12.0	7.56	trace	—	8.60	5.42	12.9	8.93	trace	—	9.41	6.59
添加15分後	12.5	8.62	trace	—	9.32	6.42	12.4	8.75	3.17	2.23	10.3	7.25	13.0	10.15	trace	—	14.2	11.10
添加2時間後	10.7	26.0	trace	—	8.17	19.9	7.35	12.8	3.22	5.41	6.38	10.7	6.25	10.58	trace	0.63	7.91	13.38
4時間後	11.1	38.4	trace	—	8.08	27.9	6.09	12.9	2.62	5.55	5.62	11.9	6.20	12.28	trace	0.67	8.06	16.00
6時間後	10.6	41.0	trace	—	7.76	30.0	6.18	13.0	2.98	6.26	5.82	12.2	5.88	12.08	trace	0.62	7.52	15.75
8時間後	10.7	40.9	trace	—	8.75	33.4	6.21	13.7	2.66	5.85	6.11	13.4	6.40	13.18	trace	0.58	8.30	17.05
酸酵終了時	8.61	34.9	trace	—	7.48	30.3	6.30	18.4	2.01	5.89	5.18	15.2	6.75	18.6	trace	0.58	7.61	21.10

* A : 乾燥菌体 1g 当りの mg 量。

** B : 元の培地 100 ml 当りの mg 量。

量で全脂肪酸の4%程度であり考察の結果にほとんど影響を与えないものとして表中に記載しなかった。

2) 添加した POEFE または、その構成脂肪酸の一部は、添加後直ちに菌体に吸着または取り込まれる。

3) POEFE 添加後は、どの場合も醗酵終了時まで定性的には、本質的な差は認められないが、醗酵末期では、 C_{18} の少ないものは多い方向へ、多いものは少ない方向へ変化する傾向が認められる。

4) POEFE 無添加の菌にあっては、添加したものに比し C_{18} 量は多いが、同時に C_{16} の量も多く、総じて脂肪酸含量が高い。

5) 投入 POEFE の吸着または取り込み率を POE monostearate の場合についてみると、最も多い時(添加後6時間) methyl stearate として 6.26 mg/dl となり、全投入 S-6 量を純度を考慮して、methyl stearate に換算すれば、49.2 mg/dl であるから、12.7% に相当する。これは、第2報において行方を断定し得なかった投入 S-6 の一部に当るものと考えられる。

次に、第3表に示した結果を飽和脂肪酸対不飽和脂肪酸の比という観点から整理し、存在する飽和脂肪酸のモル数を C_{18} 1モルに対する比として表わしたものを第4図に示す。

第2図と第4図の対照から明かな如く、L-GA 菌体外著量蓄積と、菌体飽和-不飽和脂肪酸モル比は完全に対応しており、本実験の条件については、この比が1.0を

越えることが、すなわち、飽和脂肪酸モル数が不飽和のそれを上回ることが、L-GA の菌体外著量蓄積に密接に関係していることが示された。

結局、POEFE の添加が biotin rich の培地において L-GA の菌体外著量蓄積に有効であるのは、添加によって菌体脂肪酸構成比を変え、飽和-不飽和モル比を 1.0 以上にすることによるものであることが明かとなった。

実験3) POEFE 添加時間の菌体脂肪酸組成に及ぼす影響

著者らは、前報⁽⁹⁾において L-GA の菌体外著量蓄積に必要な POEFE の存在時間を検討したが、このうち存在開始時間としては、フラスコ段階では、最も遅い場合で培養5時間程度までであった。ジャーファーメンターにおいては、これよりも幾分幅があるようであるが、この場合でも培養12時間の POEFE 添加では、L-GA の菌体外蓄積はもはや起らない。

このような現象を説明するため、第1表の条件で *M. ammoniaphilum* を培養し、培養12時間に POEFE としてノニオン S-6 を培地中 0.20% になるように添加した。添加2時間後に実験1)に記した方法で集菌以下の操作を行い、菌体脂肪酸のガスクロマトグラフィーを行った。この結果と前述の POEFE を培養4時間に添加し2時間後に採取したものとの比較を第5図に示した。

第5図に明かな如く最適範囲を外れた時期、すなわち第1表の条件では培養8時間以降の POEFE 添加はもはや

菌体脂肪酸組成に大きな変化を与えることができない。すなわち飽和-不飽和脂肪酸比はノニオン S-6 0.20% 程度の添加では、逆転することなく、従って、この時点から L-GA の菌体外蓄積が新たに開始されることがないものと考察される。

実験4) グルコース培地生育菌の飽和-不飽和脂肪酸構成比

実験2)において明かにされた菌体飽和-不飽和脂肪酸モル比の L-GA 菌体外著量蓄積のための

第4図 GA 生産菌における飽和-不飽和脂肪酸モル比

□ C_{18} ■ C_{16} ▨ C_{18}

第5図 POEFE 添加時期の菌体脂肪酸組成に及ぼす影響

〰〰〰 C₁₈ メチルエステル 〰〰〰 C₁₈ メチルエステル
 □ C₁₆ メチルエステル ↓ 吸着 POEFE (ノニオンS-6)

条件が、一般に成り立つかどうかを検討するため、POEFE を使用しないグルコース培地について実験を行った。実験条件は第4表に示す。運転条件は第1表の条件によった。

サンプリングは、培養 12 時間、24 時間、及び醗酵終了時間に行い、実験 1) の方法でガスクロマトグラム用サンプルを調製した。

培養時間間の差は、後報にゆずり、培養 12 時間菌体に関するデータを第6図に示す。第6図から明かな如く、グルコース培地においても、菌体飽和-不飽和脂肪酸モル比が 1.0 を越えることが、L-GA の菌体外著量蓄積

第4表 グルコース培地組成及び結果

培養条件	バイオチン	
	suboptimal	rich
グルコース	5.0 %	同 左
KH ₂ PO ₄	0.25	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.10	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001	
MnSO ₄ ·nH ₂ O	0.002	
バイオチン	2.5 γ/l	20 γ/l
45% 補糖液量	2.5 l	2.5 l
結 果	醗酵12時間 { L-GA 量 1.81 g/dl 乾燥菌体 1.03 "	0.39 g/dl 2.43 "
	醗酵終了時 { 醗酵時間 48 hr. L-GA 量 7.02 g/dl 乾燥菌体 1.38 "	36 hr. 0.67 g/dl 2.75 "

と対応していることが示された。これらの結果を総合すれば、L-GA 生産菌による L-GA の菌体外蓄積の有無を決めるものは菌体飽和脂肪酸モル数と不飽和脂肪酸モル数の大小関係、すなわち、前者の後者に対するモル比が 1.0 を越えるか否かであることが明かとなった。

実験 5) L-GA の細胞膜透過に及ぼす構成脂肪酸とくに oleate の影響

次に菌体飽和-不飽和脂肪酸モル比がどのような理由で L-GA の菌体外蓄積に関与しているかを明かにするため、細胞膜透過性の問題を検討した。透過性の一指標と考えられている Gale ら^(6,7)の方法を参照して次のような実験を行った。すなわち、第1表条件で、*M. ammoniaphilum* を培養し培養 4 時間に POEFE (ノニオン S-6) 0.15% を添加した後、培養 12 時間に集菌 (1,500 × g 10 分) し、3 回生理食塩水で洗滌後、菌体を生理食塩水に懸濁させ、100° 10 分煮沸した後、菌を除去し、この抽出液 (表中「3 回洗後抽出液」) 及び水洗液 (表中「3 回目洗液」) を濃縮して、L-GA を定量した。4 回水洗液も同様の操作を行った。同一操作を POEFE 無添加のものについても行った。同時に、これら菌体の飽和-不飽和脂肪酸比を定量した。これらの結果を第5表にまとめた。

第5表より oleate の優る菌体中には L-GA が多

第6図 グルコース培地における菌体脂肪酸

く残っているにもかかわらず、水洗流出 L-GA 量はむしろ少ない。

第 5 表 菌体飽和-不飽和脂肪酸モル比と L-GA 透過性

POEFE (ノニオン S-6)	0.15%	無添加
菌体飽和-不飽和脂肪酸モル比	1.38	0.89
菌体濃度 g/原培養液 100 ml	1.8	3.6
發酵終了時 L-GA mg/ml	6.4	74.8
L-GA		
3 回目洗液	0.9	0.2
4 回目洗液	0.4	0.2
mg/g 菌体		
3 回洗後抽出液	1.2	4.2
4 回洗後抽出液	1.0	3.8

すなわち、この場合、L-GA の細胞の内から外への透過性は、飽和脂肪酸の優る菌体に比し悪くなっているといえる。次に遊離の oleate の細胞膜透過性に及ぼす影響を検討した。

すなわち、第 1 表の条件の培養液に培養 4 時間目にノニオン S-6, 0.15% を添加し、培養 12 時間菌体を 1,500 ×g, 10 分で冷凍遠心分離し、これを 1/2 容の M/15 phosphate buffer (pH 7.6) に懸濁させた後、二分し、一方はそのまま、他方は、これに Na-oleate (キンダ化学製品) 0.1% を加え、共に振盪培養機で 30°, 30 分振盪後、前記条件で遠心分離し、その後は前記実験と全く同様の操作を行った。

なお、3 回水洗後の菌体について、菌体飽和-不飽和脂肪酸モル比を、既述の方法でガスクロマトグラムより求めた。

これらの結果は第 6 表にまとめた。

第 6 表 Oleate の L-GA 透過性に及ぼす影響

Na-Oleate	無添加	0.10%
菌体飽和-不飽和脂肪酸モル比	1.33	0.91
L-GA		
2 回目洗液	0.9	0.5
3 回目洗液	0.3	0.3
mg/g 菌体		
3 回洗後抽出液	1.2	12.0
4 回洗後抽出液	1.1	12.0

第 6 表に示した結果から、添加された oleate の一部は菌体に吸着され L-GA の細胞膜透過性を妨げるような役割をしている可能性が示された。

要 約

Microbacterium ammoniaphilum を使用し、廃糖蜜を糖源とする L-GA 發酵においては、POEFE の添加によって初めて L-GA の菌体外著量蓄積が起ることは、

すでに著者らが報告した通りであるが、そのメカニズムを追求するため POE monostearate 及び POE monopalmitate 添加菌体の脂肪酸組成を POEFE 無添加のそれと比較すると共に、結果の確認のためさらにグルコース培地の場合と比較した。

すなわち、ジャーファーメンターを上記目的に沿うよう運転し、それぞれ POEFE 添加前後から發酵終了時まで 7 回にわたってサンプリングし、冷凍遠心分離後、凍結乾燥し、加水分解後試料を調製して、ガスクロマトグラフィーを行った。

その結果、次の諸点が明かとなった。

(1) 無添加菌体の脂肪酸は主として oleate と palmitate からなるが、POEFE を添加すると POEFE を構成する脂肪酸が直ちに菌体脂肪酸中に現われ、菌体脂肪酸構成比に変化を与える。

(2) この量は最大時で全添加量の約 13% 程度であった。

(3) これは数回的水洗によって脱着せず培養液中の POEFE の単純な混入とは考えられない。

(4) 添加後の各脂肪酸の構成比は、發酵終了まではほぼ不変であるが、oleate の少ないものは多い方向へ、多いものは少なくなる方向へ幾分変化することが認められた。

(5) 飽和脂肪酸のモル数の大小関係は L-GA の菌体外著量蓄積と完全に対応しており、その比が 1 を超えることが蓄積の必要条件である。

POEFE の添加は、この比が 1 以下のものを逆転させることによって L-GA の菌体外蓄積に寄与していることが明かとなった。しかし添加時期が遅れた場合はこのような逆転が起るに到らないことが示された。

(6) 飽和-不飽和脂肪酸比と L-GA の菌体外蓄積の関係は POEFE を使用しないグルコースによる L-GA 發酵においても成り立つことを確認した。

続いて不飽和脂肪酸 (主として oleate) の優る菌体が L-GA の菌体外蓄積を妨げる理由を明かにするため、この比と L-GA の細胞膜透過性の関係について検討した。

終りに、終始御指導御鞭撻をいただいた当社宮井恭一食品事業部次長、山本外男食品工場長、並びに川野義男参事に深謝いたします。

(1) 渋谷 満, 大沢岳義, 信国胤生, 山本外男: 本誌, 38, 285 (1964).

- (2) 渋谷 満, 小松謙一, 大沢岳義, 山本外男: 本誌, **38**, 291 (1964).
- (3) 渋谷 満, 小松謙一, 大沢岳義, 山本外男: 本誌, **38**, 323 (1964).
- (4) A. G. Marr, J. L. Ingraham: *J. Bacteriol.*, **84**, 1261 (1962).
- (5) 中西武雄, 中江利孝: 本誌, **36**, 988 (1962).
- (6) J. C. Freeland, E. F. Gale: *Biochem. J.*, **41**, 135 (1947).
- (7) E. F. Gale: *J. Gen. Microbiol.*, **3**, 369 (1949).
-