炭化水素からの L-グルタミン酸生成について

井口 喬, 早川司朗, 武田 勲 (旭化成工業株式会社技術研究所)

昭和 40 年 7 月 26 日 受 理

L-Glutamic Acid Formation from Hydrocarbons by Microorganisms

By Takashi IGUCHI, Shiro HAYAKAWA and Isao TAKEDA

Technical Research Laboratory, Asahi Chemical Industry, Co., Ltd.,
Nakadaicho, Itabashi-ku, Tokyo

Large quantities of L-glutamic acid were produced from liquid paraffins by hydrocarbon-utilizing microorganisms when penicillin was added to the growing culture. These microorganisms were distributed in wide range of gram-positive, -negative bacteria and in *Nocardia*. The gram-positive bacteria that accumulated a remarkable amount of L-glutamic acid was identified as the new species *Corynebacterium petrophilum* nov. sp.

On the production of L-glutamic acid, the effects on the additional concentration and phase of penicillin, on the organic nutrients such as corn steep liquor, and on the inorganic nitrogen sources were studied by *Cory. petrophilum* nov. sp. Various kinds of hydrocarbons were also tested. Synthetic penicillin, bacitracin, cycloserine, glycine and 5-bromouracil were effective for the accumulation of L-glutamic acid from liquid paraffin.

The action of these compounds to the L-glutamic acid production seems to be explained from the cellular permeability of L-glutamic acid. (Received July 26, 1965)

緒 言

著者らは前報^(1,2)までに炭化水素を唯一の炭素源として生育する微生物を天然から広くスクリーニングし、これを用いて、主として菌体生産並びに菌体成分といった立場から報告してきた。本報はこれから炭化水素資化性菌, なかんずく, 細菌による L-グルタミン酸の生成について検討した結果を報告する。

炭化水素からのアミノ酸の生成については, これまでに山田ら⁽³⁻⁵⁾, 椎尾⁽⁶⁾らによって 2, 3 報告されている。炭化水素資化性菌による炭化水素からのアミノ酸その他有用物質の生成は予測されるが, 炭化水素からいかに高いレベルのアミノ酸を生成するか, いかにして炭化水素の如き非水溶性基質から生成速度を高めるかに本研究の課題があると考えられ, 著者らは炭化水素からのアミノ酸の生成について, 種々検討した結果, 有機栄養源に富んだ培地で培養を行ない, 培養過程にペニシリン (G) を添加することにより, 炭化水素から著量の L-グルタミン酸を, 短時間の培養で蓄積するという知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌株 : 前報^(1,18)に報告した炭化水素資化性アミノ酸生成菌について行った。L-グルタミン酸生成能の高い 1 菌株 SB-4082 の同定は後述する。
2. 培地組成 : 本実験に使用した基本培地組成を第 1 表に示す。基本培地 A は菌の生育に適した有機栄養源の豊富な培地組成であり, 基本培地 B はペニシリン無添

第 1 表 基 本 培 地 組 成

	培地 A	培地 B
炭 素 源	5.0 g	5 g
(炭 化 水 素	5.0 ml	5 ml)
Urea	0.5 g	0.2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2 "	0.2 "
KH ₂ PO ₄	0.2 "	0.2 "
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	0.2 "	0.15 "
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.1 "	0.1 "
Fe ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺	0.001 "	0.001 "
コーン・スチープ・リカー	0.3 "	—
酵 母 エ キ ス	0.3 "	0.05 "
水 道 水	100 ml	100 ml

加において、グルタミン酸生成に良好な組成である。

3. 培養方法： 種菌として 1% グルコース液体ブイヨン培地に培養し、主発酵培地 50 ml を含む 500 ml 容肩付フラスコに 2 ml 接種し、往復式振盪機により 30° で培養した。薬剤添加の場合は、あらかじめ無菌調整したものを、主発酵の培養開始後、所定時間に添加した。

4. 炭化水素： 本実験に使用した炭化水素の単体はいずれも市販で、東京化成 GR 品を用いた。ただし *n*-ペンタデカン、*n*-ヘプタデカンは関東高压化学製のものを用いた。軽油、灯油はカフジ原油のものを使用し、各留分の主な性状を第 2 表に示した。

第 2 表 供試炭化水素の性状

			灯油	軽油
比 重	15/4°C		0.7785	0.8315
分 留 性 状	初留, °C		150	166
"	10%, "		164	231
"	50%, "		179	270
"	90%, "		200	327
"	95%, "		208	342
"	終点, "		218	359
硫 黄 分	(wt %)		0.12	1.0
飽 和 炭 化 水 素	(vol %)		84	76
オレフィン炭化水素	(vol %)		0	0
芳香族炭化水素	(vol %)		16	24

5. 薬剤： 実験に用いた薬剤は市販品で、界面活性剤として、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド (CTAB), ツイン 20, 40, 60, 85, スパン 40, 60, 80 (以上東京化成製), ソフノン R2F-10, オパノール 516, トーホール N 230-X, ノナール 210 (以上東邦化学製), エマノン 112, 3113, 4115, 3299, エマルゲン 220, 920, 120 (以上花王石鹼製), 抗生物質としては下記の原末または原末の入手できなかったものは市販品を用いた。ペニシリン (G) カリウム, ペニシリン V ナトリウム, 6-アミノペニシラニックアシッド (以上東洋醸造製), パシトラシン, マイトマイシン, ネオマイシン, カルチノフィリン, チロスライシン, チロシジン, グラミシジン, ピウロマイシン, ポリミキシン B (以上 Nutritional Biochemicals Corporation 製), サイクロセリン (塩野義製薬製), クロラムフェニコール (三共製), ストレプトマイシン (万有製薬製), アクロマイシン (日本レダリー製), カナマイシン, シンセペン (以上明治製菓製) 等を用いた。

6. アミノ酸の定性： 東洋濾紙 No. 50, 展開溶媒

n-ブタノール：酢酸：水 (25：11：4) を使用、展開風乾後ニンヒドリンにより発色定性した。

7. L-グルタミン酸の定量： *E. coli* の L-グルタミン酸脱炭酸酵素による検圧測定法またはペーパークロマトグラフを用いた。ニンヒドリン発色によるデンストメーターによる測定。菌体内遊離の L-グルタミン酸量は、Gale ら⁽⁷⁾の方法に準じ、水に浮遊菌体を沸騰浴中にて、20 分加熱処理し遊離した L-グルタミン酸量をもって示した。

8. 菌体量の測定： 菌の生育度は乾燥菌体重量にて示した。炭化水素の残存の場合は、菌体をエーテルにて洗浄、乾燥後測定した。

9. 酵素蛋白量の測定： 銅-Folin 試薬⁽⁸⁾を用いた呈色法に基づく方法にて測定した。

実験結果並びに考察

I. L-グルタミン酸生成菌 SB-4082 の菌学的性質

前報^(1,18)に報告した分離株中、炭化水素からペニシリン添加時、L-グルタミン酸生成能の高い SB-4082 株の形態学的並びに生理的諸性質について調べた結果、*Corynebacterium* に属する新菌種であることがわかった。同定実験は常法⁽⁹⁾により検討した。

Description of *Corynebacterium petrophilum* nov. sp.

Type Culture : SB-4082

Rods, 0.4 to 0.6 by 0.7 to 0.9 microns. Different sizes, V form, and round edges are found. Spore not formed. Non-motile. Gram-positive. No acid fast. Metachromatic granule is not found.

Nutrient agar colonies : Circular, smooth, entire, raised to convex, yellowish orange, opaque, dull.

Nutrient agar slant : Growth poor, filiform, dull, yellowish orange, no odor, butyrous, medium unchanged.

Nutrient broth : Thin pellicle, none sediment.

Indole not produced.

Nitrites is not produced from nitrates in nitrate broth.

V.P. test : Negative.

Litmus milk : Unchanged.

Methyl red : Unchanged.

Starch not hydrolyzed.

Hydrogen sulfide not produced. (at Bact. SIM culture)

Nutrient gelatin stab: No liquefaction.

Catalase: Positive.

Urease: Positive.

Cleavage of carbohydrate in liquid culture (Neither acid nor gas is produced from carbohydrate at 48 hrs culture).

	acid	gas		acid	gas
glucose	±	—	sucrose	—	—
(4 days)					
fructose	+	—	glycerol	—	—
galactose	—	—	inosital	—	—
mannose	±	—	xylose	—	—
lactose	—	—			
maltose	—	—			

Optimum pH for growth: pH 6.0 to pH 8.0.

Optimum temperature for growth: 30° to 35°.

Aerobic.

Source: Isolated from sewage in Tokyo.

以上の菌学的性質を Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第 7 版 (1957) の分類基準に従い, 公知の菌群と異同を検討した結果, 本菌は *Corynebacterium* 属に位置づけるのが妥当と考えられた. 本菌の形態的, 生理的特徴を Bergey の分類と対比するに, これと同定すべき菌株の記載なく, さらに山田ら⁽¹⁰⁾, 飯塚ら⁽¹¹⁾により示された菌株と菌の大きさ, 形態, 硝酸塩還元能, 硫化水素産生, 澱粉液化などの点で異なり, 同一種と考えられない. 従って新菌種に属するものと認め, *Corynebacterium petrophilum* nov. sp. と命名した. なお SB-4112, 4112 S, 4064, 4019, 4019 S, 4085, 4087, 4158, 4173, 4157 S 株は SB-4082 の variation と考えられる.

II. L-グルタミン酸の生成

1. 炭化水素資化性菌による L-グルタミン酸の生成:

炭化水素資化性を有するスクリーニング株の中, 炭化水素から若干のアミノ酸を生成する株について, 培地 B を主発酵培地として, 特に L-グルタミン酸の生成能を検討した. 第 3 表に薬剤無添加での炭化水素からの L-グルタミン酸生成能を示した. 本結果から明らかなように n-ヘキサデカン, 軽油, 灯油からの L-グルタミン酸生成量は 0.1~0.4 mg/ml の低い生成能を有する株が大部分で, 2, 3 の株に n-ヘキサデカンを基質として 0.4~1.0 mg/ml の L-グルタミン酸を生成する株が見出された.

2. 有機, 無機窒素源の影響: 微生物を用いた発酵

第 3 表 炭化水素資化性アミノ酸生成菌による炭化水素からの L-グルタミン酸の生成

菌株 No.	n-Hexadecane		軽油		灯油	
	生育	L-グルタミン酸生成	生育	L-グルタミン酸生成	生育	L-グルタミン酸生成
SB-4016	+++		++	±	+++	±
-4019	+++		+++	±	+++	±
-4019-S	+++		++		+++	
-4064	+++	+	+++	+	+++	±
-4082	+++	+	+++	±	+++	±
-4085	+++		+++	±	+++	±
-4087	+++	+	+++	±	+++	±
-4089	++		++		+++	±
-4093-1	++		+		+	
-4093-2	++		+		+	
-4112	+++		+++	±	+++	±
-4112-S	+++		+++	±	++	±
-4132	+++		+++	±	++	±
-4136	++		+++	—	++	
-4157	+++	±	+++	±	+++	±
-4157-S	++		+++		++	
-4158	+++	±	+++		++	
-4171	+		+	±	+	
-4171-S	+++	±	+++		+++	
-4173	++	+	+++	±	+++	
-A 12	+++		+		+	
-4096	+++	±	++	+	++	

生育: (+) slight growth (++)~(+++) good growth

グルタミン酸: (±) 0.4 mg/ml 以下 (+) 0.4~1.0 mg/ml

発酵培地組成: 培地 B を使用, 炭化水素として n-hexadecane, 軽油, 灯油

培養条件: 振盪培養, 30°, 4 日間培養

生産において, 培地組成, 培養条件等がかなり生成量, 生成物に影響することが知られている. 第 4 表, 第 5 表に示すごとき有機, 無機窒素源の添加量による L-グルタミン酸等のアミノ酸生成に対する影響を吟味した. 本実験には SB-4082 株を用いた. また以下の実験も, 特に断らないかぎりには本菌を使用した. 有機窒素である C. S. L. 量は 0.01 g/dl 添加濃度が良好であるが, 著量の L-グルタミン酸生成は検出されなかった. 添加濃度が 0.01 g/dl を越えて増加すると L-グルタミン酸の生成量は減少し, 菌の生育増加が観察された. 本菌は糖質からの L-グルタミン酸生成菌⁽¹²⁾にみられるごとき, ビオチン要求性もなく, 2, 3 の石油資化性菌⁽⁶⁾にみられるビタミン B₁ の要求性もみられなかった. 次に無機窒素源のうち, 尿素の使用が L-グルタミン酸生成に好ましく, 添加濃度として 0.3~0.8 g/dl の範囲で著しい差が認められなかったが, 尿素単独培地では培養初期の生育が他の窒素源

第 4 表 *n*-Hexadecane からの L-グルタミン酸生成に対する C. S. L. 濃度の影響

	C. S. L. の添加濃度					
	0.001	0.005	0.01	0.02	0.05	0.1
菌の生育	++	+++	+++	+++	+++	+++
培養後 pH	5.4	5.4	5.2	5.2	5.2	6.4
L-グルタミン酸生成	++	++	+++	++	+	±
アスパラギン酸生成	+	+	++	±	±	—

アミノ酸生成: (±) 0.1 mg/ml (++) 0.1~0.2 mg/ml
 (++) 0.2~0.5 mg/ml (+++) 0.5~1.0 mg/ml
 醗酵培地: 基本培地 B 組成から成る *n*-hexadecane 培地
 培養条件: 振盪培養, 30°, 4 日間培養
 使用菌株: SB-4082

第 5 表 *n*-Hexadecane からの L-グルタミン酸生成に対する窒素源の種類並びに濃度による影響

	菌の生育	培養後の pH	L-グルタミン酸生成量	アスパラギン酸生成量
NH ₄ NO ₃	g/ml			
	0.3 ++	4.4	±	—
	0.5 ++	4.8	±	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.8 ++	4.4	±	—
	0.3 ++	4.6	—	—
	0.5 ++	4.6	—	±
NH ₄ Cl	0.8 ++	4.6	—	±
	0.3 ++	4.2	±	—
	0.5 ++	4.4	±	—
Urea	0.8 ++	4.4	±	—
	0.3 +++	6.8	+++	++
	0.5 +++	5.4	+++	+
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.8 +++	6.0	+++	+
	0.3 ++	4.5	±	±
	0.5 ++	4.2	+	±
	0.8 +++	4.6	±	±

アミノ酸生成: (±) 0.1 以下, (++) 0.1~0.2, (+++) 0.2~0.5,
 (++) 0.5~1.0 mg/ml

醗酵培地: 基本培地 B 組成から成る *n*-hexadecane 培地
 培養条件: 振盪培養, 30°, 4 日間培養
 使用菌株: SB-4082

第 6 表 *n*-Hexadecane からの L-グルタミン酸の生成に対する薬剤の添加効果

薬 剤	添 加 薬 剤		生成 L-グルタミン酸量
	濃 度	添 加 時 間	
	mg/ml	hrs	mg/ml
CTAB	1.0	13	0.9
ソ フ ノ ン R 2 F-10	1.0	13	±
オバノール 516	1.0	13	0.6
ト ホ ー ル N 230-X	1.0	13	±
ノ ナ ー ル 210	1.0	13	0.9
エ マ ノ ン 112	1.0	13	0.9
" 3113	1.0	13	1.2
" 4115	1.0	13	0.9
" 3299	1.0	13	0.9
エマルゲン 220	1.0	13	0.9
" 920	1.0	13	0.9
" 120	1.0	13	0.3
ツ イ ン 20	1.0	13	0.3
" 40	1.0	13	1.5
" 60	1.0	13	1.2
" 85	1.0	13	0.9
ス パ ン 40	1.0	13	0.9
" 60	1.0	13	0.8
" 80	1.0	13	0.9
	μg/ml		
クロラムフェニコール	50	13	±
アクトマイシン	50	13	±
ストレプトマイシン	50	13	±
カナマイシン	50	13	±
	unit/ml		
ペニシリン(G) カリウム	50	13	5.0
無 添 加	—	—	0.9

(±): 0.3 mg/ml 以下の L-グルタミン酸生成

醗酵培地: 基本培地 A 組成から成る *n*-hexadecane 培地
 培養条件: 振盪培養, 30°, 5 日培養
 使用菌株: SB-4082

添加培地より比較的緩慢であるので、尿素と他の無機窒素源の併用が好ましいと考えられた。

3. 薬剤の選択: 前項で培地組成の変化による炭化水素からの L-グルタミン酸生成を検討したが、効果的な結果が得られなかった。そこで基質の炭化水素を微生物に作用されやすいと考えられる -OH, -COOH の導入されたミリスチルアルコール、パルミチールアルコール、ミリスチックアシド、パルミチックアシドに代替したり、200 kc の音波処理、あるいは種々の界面活性剤添加による基質の乳化した状態での L-グルタミン酸生成について検討したが、予期した結果が得られなかった。一方、発酵過程に種々の薬剤添加による L-グルタミン酸分解系の阻止、あるいは L-グルタミン酸の膜透過性の促進な

どを目的として薬剤を検索したところ、第 6 表に示したごとく、界面活性剤の中にも若干の効果を示すものもあったが、ペニシリン (G) カリウムの添加が L-グルタミン酸蓄積に著効を示すことが見出された。

これより先に、E. F. Gale⁽⁷⁾ らにより *Staphylococcus faecalis* を用い、抗生物質、界面活性剤などで処理することにより、菌体内のアミノ酸の菌体外への漏洩、菌体外からのアミノ酸の透過について詳細に報告されている。またペニシリンによる細胞壁の形成阻害について、J. Lederberg⁽¹³⁾, J. Johnson^(14,15) らにより報告されている。本発酵におけるペニシリンの作用を考えると、細胞膜になんらかの変化を及ぼし、L-グルタミン酸生成に有利な結果を導いたものと考えられる。

4. 培地組成, ペニシリン量ならびに添加時間と L-グルタミン酸の生成量の関係: 前項でペニシリンを培養過程に添加することにより, 炭化水素からの L-グルタミン酸生成に良好な結果をもたらすことが判明した. 次にペニシリンの添加条件について検討した. その結果, ペニシリンの添加時間と L-グルタミン酸生成について第 7 表に示したごとく, 本実験範囲では添加時間による影

第 7 表 *n*-Hexadecane からの L-グルタミン酸生成に対するペニシリン (G) カリウムの添加濃度と添加時間の影響

	添加ペニシリン		菌の 生育	培養後 の pH	L-グルタ ミン酸生成量
	濃度	添加時間			
	unit/ml	hrs			mg/ml
培地 A	50	12	卅	5.0	8.0
"	50	16	卅	8.4	7.0
"	50	20	卅	5.0	8.0
"	50	24	卅	5.0	8.2
培地 B	50	16	卅	5.1	4.9
"	50	20	卅	5.0	5.1
"	50	24	卅	5.0	2.3
"	50	30	卅	5.1	2.5

酸酵培地: 基本培地組成 A, B から成る *n*-hexadecane 培地
培養条件: 振盪培養, 30°, 3 日培養
使用菌株: SB-4082

第 1 図 SB-4082 の生育ならびに L-グルタミン酸生成に対するペニシリン (G) の影響

醱酵培地：基本培地Aから成る		<i>n</i> -hexadecane 培地
	ペニシリン量 (u/ml)	L-グルタミン酸生成量 (mg/ml)
○—○	0	0.4
×—×	0.5	0.6
△—△	1.0	0.7
□—□	5	1.8
●—●	10	2.1
※—※	25	4.5
①—①	50	8.0
⊙—⊙	100	6.1

響は判然としなかった. これに対し薬剤無添加において, L-グルタミン酸生成に不利な条件と考えられた有機窒素量の多い培地組成, すなわち酵母エキス 0.3 g/dl, C.S.L. 0.3 g/dl 添加培地をもちい, ペニシリンを添加培養することにより著量の L-グルタミン酸を生成することが認められた. 第 1 図はペニシリン濃度と菌の生育, L-グルタミン酸生成の関係を示した. ペニシリン添加濃度の増加に対し, 生育の減少, L-グルタミン酸の著しい増加が検出され, 至適ペニシリン濃度は 25~100 単位/ml と考えられる.

5. *n*-ヘキサデカンからの L-グルタミン酸生成の培養経過: 第 2 図は SB-4082 株によるペニシリン添加による *n*-ヘキサデカンからの L-グルタミン酸生成の培養経過を示した. ペニシリンは 50 単位/ml を培養 15 時間後に添加した. 菌の生育は培養 30 時間で最高となり, それ以後減ずる. 一方 pH の経過は本培地組成では培養初期に下り, 菌の増殖に伴い, ウレアーゼ活性により pH がアルカリサイドに傾き, 以後グルタミン酸生成に伴い pH が下る. L-グルタミン酸の生成は培養 30 時間以後急激に増加, 培養 3 日で最高値となった.

6. *n*-飽和炭化水素の炭素数とその資化性および L-グルタミン酸生成: 従来の報告^(16,17)によれば, 微生物

第 2 図 *n*-Hexadecane からの L-グルタミン酸生成の培養経過

酸酵条件: 培地組成 A から成る培地にて培養, 16 時間後ペニシリン (G) 50 u/ml 添加, 30° にて振盪培養した.
使用菌株: SB-4082

—x— 生育 —●— pH —○— L-グルタミン酸

第 3 図 n -飽和炭化水素の炭素数による L-グルタミン酸生成に及ぼす影響

醗酵培地：基本培地組成 A から成る n -飽和炭化水素培地
培養条件：培養 16 時間後ペニシリン (G) カリウム
50 unit/ml 添加, 30°, 3 日振盪培養
使用菌株：SB-4082

の種類により資化し得る炭化水素の種類もかなり異なることが報告されている。著者ら⁽¹⁾も同様の結果を炭化水素資化性酵母について得た。資化性が異なれば当然生成される L-グルタミン酸量も変化することが考えられる。 n -飽和炭化水素の炭素数とその資化性および L-グルタミン酸生成との関係について検討した結果を第 3 図に示した。炭化水素に対する本菌の生育は炭素数 $nC_{10} \sim nC_{17}$ に検出され、特に $nC_{14} \sim nC_{17}$ に良好な生育が認められた。これに対し L-グルタミン酸生成は生育に対応し増加することが判った。なかんずく、 nC_{15} , nC_{16} , nC_{17} から著量の蓄積が認められた。

7. 各種基質からの L-グルタミン酸生成：前項で n -飽和炭化水素の炭素数と L-グルタミン酸生成の関連について述べた。次に不飽和の炭化水素、酸、アルコールに対する挙動、その他、側鎖炭化水素に対する影響について検討した。第 8 表の結果から不飽和炭化水素のうち、 C_{16-1} に対し、生育および L-グルタミン酸の生成が検出された。他の不飽和炭化水素、酸、アルコールには資化性および L-グルタミン酸生成はほとんど検出されなかった。本菌

第 8 表 各種基質に対する生育ならびに L-グルタミン酸生成

炭 素 源	生 育	L-グルタミン酸生成 mg/ml
n -テトラデカン $CH_3(CH_2)_{12}CH_3$	+	8.1
n -ヘキサデカン $CH_3(CH_2)_{14}CH_3$	+	7.9
テトラデセン-1 $CH_3(CH_2)_{11}CH=CH_2$	+	±
ヘキサデセン-1 $CH_3(CH_2)_{13}CH=CH_2$	+	3.2
ミリスチン酸 $CH_3(CH_2)_{12} \cdot COOH$	±	±
パルミチン酸 $CH_3(CH_2)_{14} \cdot COOH$	—	±
ミリスチルアルコール $CH_3(CH_2)_{12} \cdot CH_2OH$	—	—
パルミチルアルコール $CH_3(CH_2)_{14} \cdot CH_2OH$	+	—
n -ドデカン $CH_3(CH_2)_{10}CH_3$	+	4.1
イソドデカン $(CH_3)_2C_{10}H_{20}$	+	±
ヘプタ・メチル・ノナン $(CH_3)_7C_9H_{18}$	±	—
グルコース	+	1.4
無 添 加	—	—

醗酵培地：基本培地 A から成る上記炭素源培地

培養条件：培養 16 時間後ペニシリン (G) カリウム 50 unit/ml 添加, 30°, 3 日振盪培養

使用菌株：SB-4082

はまた、ペニシリン添加下でグルコースから L-グルタミン酸の生成が見られた。

8. 他の炭化水素資化性菌の L-グルタミン酸生成に及ぼすペニシリンの効果：上述の結果から明らかなように、培地 A のごとき有機窒素源に富んだ炭化水素を唯一の炭素源とした培地に培養し、ペニシリン (G) 50 単位/ml を 16 時間後に添加、培養することにより、炭化水素

第 9 表 ペニシリン添加条件下での炭化水素からの L-グルタミン酸生成株の主な生理的性質の違い

グラム染色	硝酸還元性	糖からの酸の生成			菌株 No.	L-グルタミン酸生成量	
		グルコース	シュクロース			n-C ₁₆	グルコース
細菌							
- <i>Nocardia</i>	+	-	+	+	SB-4082	9.0	1.2
	-	-	-	+	-4112	13.0	
	-	-	-	+	-4112-S	10.0	
	-	-	-	-	-4064	9.1	
	-	-	-	-	-4019	11.2	
	-	-	-	-	-4019-S	3.9	
	-	-	-	-	-4085	10.1	
	-	-	-	-	-4087	4.2	
	-	-	-	-	-4158	8.1	
	-	-	-	-	-4173	2.1	
	-	-	-	-	-4157-S	10.3	
	-	+	+	+	-A 12	11.9	
	-	-	-	-	-4089	1.4	
	-	-	-	-	-4016	1.9	1.6
	-	-	-	-	-4010	2.2	1.4

醗酵培地：基本培地組成 A から成る n -hexadecane またはグルコース培地

培養条件：培養 16 時間後ペニシリン (G) カリウム 50 unit/ml 添加, 30°, 3 日振盪培養

から著量の L-グルタミン酸を生成することが認められた。かかるペニシリン効果が, 第 3 表に示した他の炭化水素資化性菌について得られるかどうかについて検討した。第 9 表に示したごとく, 他の菌株についても, L-グルタミン酸生成に対し, ペニシリン効果が検出された。表示菌株を大別すると細菌と *Nocardia* に分類された。細菌の中には, グラム染色陽性, 陰性の株に分類され, 陽性の中には硝酸還元性において陽性のものと陰性の株が検出された。炭化水素からペニシリン添加時において, L-グルタミン酸生成株は比較的広範囲のタイプの菌に分布していることが判明した。またペニシリン添加時, グルコースからの L-グルタミン酸の生成は, グラム染色陽性, 陰性の細菌, *Nocardia* のいずれにも検出された。

ペニシリン添加時, 炭化水素資化性菌による炭化水素からの L-グルタミン酸生成株のうち, 生成能の高い株はいずれもグラム染色陽性の細菌に属し, *Corynebacterium petrophilum* nov. sp., または近縁の株であることが判明した。これらの菌株によるグルコースからのペニシリン添加時の L-グルタミン酸生成能は, 炭化水素 (nC_{16}) に比し低いことがわかる。このことは炭化水素資化性菌からの L-グルタミン酸生成の特徴の一つとしてあげることができる。またこれまでの糖質よりの L-グルタミン酸生成株とは菌学的に全く異なり, かかる炭化水素からの L-グルタミン酸の著量の蓄積は興味ある現象と考えられ, 糖質からの L-グルタミン酸生成株と比較検討することは, L-グルタミン酸発酵の機構の解明に役立つものと考えられる。

9. 抗生物質と L-グルタミン酸生成: 著者らは先報⁽¹⁸⁾で, 本発酵におけるペニシリンの作用について, ペニシリン添加, 無添加により生育した細胞をもちい, 基質, α -ケトグルタレートからの L-グルタミン酸生成に対する両細胞の活性およびペニシリン無添加で生育した細胞内の遊離の L-グルタミン酸の膜透過に対するペニシリンの影響について検討した結果, ペニシリンはグルタミン酸の膜透過に関与していることが想定された。ペニシリンの微生物に対する作用は細胞壁の合成阻害が一般に考えられている, ペニシリンの他に, バシトラシン, サイクロセリン, グリシンも同じような作用が報告されている⁽¹⁹⁻²⁴⁾。5-フッ化ウラシルも細胞壁の合成阻害が考えられている^(25,26)。これら細胞壁合成阻害剤を含む, 抗生物質などによる L-グルタミン酸生成について検討した結果を第 10 表に示した。ペニシリン以外にバシ

第 10 表 抗生物質等と L-グルタミン酸生成の関連性

抗生物質等	添加濃度	生育	L-グルタミン酸生成
ペニシリン	50 u/ml	++	++
バシトラシン	5 "	++	++
サイクロセリン	50 γ /ml	++	±
グリシン	10^{-8} M	++	+
5-プロモウラシル	10^{-8} M	++	±
ポリミキシン	5 u/ml	++	—
マイトマイシン	5 "	++	—
ネオマイシン	5 "	+	—
カルジノフィリン	5 "	++	—
チロスライシン	5 "	++	—
クロシジン	5 "	++	—
グラミシジン	5 "	++	—
ビウロマイシン	5 "	++	±
無添加		++	—

醗酵培地: 基本培地 A の組成から成る *n*-hexadecane 培地
培養条件: 培養 16 時間後, 上記抗生物質等を所定濃度添加, 30°, 3 日振盪培養
使用菌株: SB-4082

ランシン, その他上述の細胞壁合成阻害剤の中に L-グルタミン酸生成に効果を及ぼすものが見出された。次にペニシリン⁽¹⁸⁾の場合と同様に, 細胞内の遊離の L-グルタミン酸の膜透過に対するバシトラシンの影響について検討した (第 11 表)。バシトラシンと菌体を 30 分間反応することに

第 11 表 菌体内遊離のグルタミン酸の膜透過に対するバシトラシンの影響

バシトラシン濃度	L-グルタミン酸量	
	細胞内	細胞外
u/ml	μ mole/100 mg protein	
0	206.4	72.6
5	100.1	176.0
50	83.2	204.9

反応: 洗浄菌体 100mg (wt) とバシトラシンを M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 中にて 30°, 30 分反応した。液量は 4 ml とする。

洗浄菌体: SB-4082 を培地組成 A から成る *n*-hexadecane 培地で 3 日培養し, 遠沈洗浄したものを使用した。

より, 細胞内の L-グルタミン酸が細胞外に透過することが認められた。

炭化水素からの L-グルタミン酸生成に, ペニシリンの添加が特に効果が著しかった。そこでペニシリン (G) の類似物質について, 本効果を吟味した。第 12 表に示したごとく, 6-アミノペニシラニン酸以外の物質に L-グルタミン酸生成に効果がみられた。

本実験結果から, 細胞壁の合成阻害剤と一般に考えられているペニシリン, バシトラシンなどが, 炭化水素からの L-グルタミン酸生成に有効であるという知見が得られた。また菌体をこれらペニシリン, バシトラシンと 30 分反応することにより, 細胞内の遊離の L-グルタミン酸が顕著に透過することから考え, これら抗生物質の

第 12 表 炭化水素からの L-グルタミン酸生成に対するペニシリン (G) の類似化合物による効果

ペニシリン (G) 類似化合物	添加濃度	生育	L-グルタミン酸生成量 mg/ml
ペニシリン (G) -CH ₂ -CO-6 APA	50 u/ml	++	8.2
6-アミノペニシラニン酸 (6 APA)	50 r/ml	+++	0.4
シンセペン -O-CH(CH ₃)-CO-6 APA	50 u/ml	++	9.1
バイシリン Pe(G) [-CH ₂ -NH(CH ₂) ₂ -NH-CH ₂ -] Pe(G)	50 "	++	6.7
ペニシリン V -O-CH ₂ -CO-6 APA	50 "	++	8.0
ペニシリン V-Na	50 "	++	6.5

醗酵培地：基本培地 A から成る *n*-hexadecane 培地

培養条件：培養 16 時間後、上記ペニシリン類似化合物を添加、30°, 3 日培養した。

使用菌株：SB-4082

本発酵における作用は、単に細胞壁への作用のみでは解決できず、細胞膜に何らかの損傷が与えられた結果、L-グルタミン酸の透過性が改善されたものと想像されるが、この点に関しては将来解決される問題と考えられる。

要 約

(1) 天然からスクリーニングした炭化水素資化性菌のうち、L-グルタミン酸生成能の高い SB-4082 株について菌学的性質を検討し、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology の第 7 版と比較対照した結果、新菌種と認め、*Corynebacterium petrophilum* nov. sp. と命名した。

(2) 炭化水素資化性のアミノ酸生成株 20 数株について、炭化水素からの L-グルタミン酸生成能を検討したところ、大半の株が 0.1~0.5 mg/ml 以下の低い生成能であった。

(3) SB-4082 株を用い、培地中の有機、無機窒素源の影響について検討したところ、C.S.L. 0.01 g/dl、無機窒素として尿素の添加が L-グルタミン酸の生成に良好で、この C.S.L. 量は、菌の最大増殖量以下の量である。

(4) SB-4082 株を用い、L-グルタミン酸生成に有効な薬剤の選択を行ったところ、ペニシリン (G) の添加が特に有効であった。

(5) ペニシリン (G) の添加量、添加時期および培地組成と L-グルタミン酸生成について調べたところ、添加量は 25~100 単位/ml が好ましく、添加時期の影響は比較的少なく、培地中の有機窒素に富んだ条件が、L-グルタミン酸生成に良好な結果を及ぼすことが判明した。

(6) *n*-飽和炭化水素の炭素数と

L-グルタミン酸生成の関係について調べた。菌の生育は $nC_{10} \sim nC_{17}$ に検出され、特に $nC_{14} \sim nC_{17}$ に良好であった。これに対し、L-グルタミン酸の生成量は大体生育に対応して増加し、なかんずく、 nC_{16} 、 nC_{17} に著量の生成が見出された。

(7) 各種基質からの L-グルタミン酸生成を検討したところ、不飽和炭化水素の C_{16-1} から検出され、他の酸、アルコールなどから検出されなかった。

(8) 炭化水素からの L-グルタミン酸生成に対するペニシリン効果について、他のスクリーニング株について調べたところ、グラム染色陽性、陰性の細菌ならびに *Nocardia* に認められ、中でも SB-4112 株は nC_{16} 3.9 g/dl から 3 日培養で 13.0 mg/ml の L-グルタミン酸を生成蓄積することが検出された。

(9) ペニシリン (G) 以外の細胞壁合成阻害剤として認められている抗生物質などの中にも L-グルタミン酸生成に効果的なものを選出された。

(10) ペニシリン (G) の類似物質により、ペニシリン (G) と同様、炭化水素からの L-グルタミン酸生成に著効を示した。

終りに臨み、本研究中終始御指導、御鞭撻をいただいた当研究所鈴木明所長、村越昌彦次長、ならびに妹尾三郎主事に謝意を表します。

(本報は、昭和 39 年 9 月 29 日の日本農芸化学会 関西支部例会、昭和 40 年 4 月 4 日の日本農芸化学会大会にて講演したものの一部である。)

- (1) 井口 喬、川村武志、堀口貞由、早川司朗、武田 勲：農芸化学会大会講演、1964 年 7 月 21 日。
- (2) 水野雅之、下島幸路、井口 喬、武田 勲：同上、1964 年 7 月 21 日。
- (3) 山田浩一：発酵協会誌, **21**, 31 (1962)。
- (4) 山田浩一、高橋稷二、小林加悦、今田幸男：発酵と代謝, **7**, 79 (1963)。
- (5) 高橋稷二、小林加悦、今田幸男、山田浩一：Amino Acid and Nucleic Acid, **10**, 1 (1964)。
- (6) I. Shio, S. Otsuka, et al.: J. Gen. Appl. Microbiol., **9**, 23 (1963)。
- (7) E. F. Gale, E. S. Taylor: J. Gen. Microbiol.,

- 1, 77 (1947).
(8) O. Folin, V. Ciocalteu : *J. Biol. Chem.*, **73**, 627 (1927).
(9) H. J. Conn : *Manual of Microbiological Methods* (1957).
(10) K. Yamada, J. Takahashi, K. Kobayashi : *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 773 (1963).
(11) H. Iizuka, K. Komagata : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10**, 207 (1964).
(12) 田中勝宣, 岩崎 彪, 木下祝郎 : 本誌, **34**, 593 (1960).
(13) J. Lederberg : *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.*, **42**, 574 (1959).
(14) J. Roberts, M. J. Johnson : *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, 458 (1962).
(15) E. B. Wylie, M. J. Johnson : *ibid.*, **59**, 450 (1962).
(16) C. E. Zobell : *Bact. Rev.*, **10**, 1 (1946).
(17) L. D. Bushnell, H. F. Hass : *J. Bact.*, **41**, 653 (1941).
(18) T. Iguchi, I. Takeda, S. Seno : *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 689 (1965).
(19) J. T. Park : *J. Biol. Chem.*, **194**, 877, 885, 897 (1952).
(20) J. T. Park, J. L. Strominger : *Science*, **125**, 99 (1957).
(21) J. T. Strominger : *J. Biol. Chem.*, **234**, 1520 (1959).
(22) J. L. Strominger, R. H. Threnn : *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 280 (1959).
(23) J. L. Strominger, R. H. Threnn : *ibid.*, **36**, 83 (1959).
(24) J. L. Strominger, R. H. Threnn, S. S. Scott : *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 3803 (1959).
(25) A. Tomasz, E. Borek : *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.*, **46**, 324 (1960).
(26) H. J. Rogers, H. R. Perkins : *Biochem. J.*, **77**, 448 (1960).
-