

大腸菌のグルタミン酸代謝とその 定量分析への応用補遺

岡山大学医学部微生物学教室（指導：村上栄教授）

矢 部 芳 郎

秋 田 悦 示

秋 田 和 男

〔昭和32年8月9日受稿〕

結 言

秋田¹⁾は著者等の教室保存の大腸菌, *Bacillus coli communis* を用いて, そのグルタミン酸代謝の生理面を追究し, 更にそれを拡げてグルタミン酸の定量分析への応用に迄及ぼした。

著者等は秋田の方法を實際面, 殊にピルヴィン酸共存下にグルタミン酸を定量するのに応用するに当つて²⁾, 更に深く検討し, より有利な方法を得たので追加報告する。

実験材料及び方法

供試細菌： 教室保存の大腸菌 *Bacillus coli communis*.

培養方法： 実験結果の項に記述。

菌量測定： 島津光電比濁計を用い, 比濁法によつた。

活性測定： ワールブルグ検圧計を用い, 常法に従つて行つた。

実 験 結 果

第一節 グルタミン酸定量用大腸菌調製法

普通寒天平板上に 37°C で18時間培養した大腸菌の1白金耳量を秋田の半合成培地(表1) 500 ml に接種し, 通気しないで, 37°C に於て20時間培養した。こゝに増殖した菌を遠心分離で採取後, 0.02M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) で2回洗滌し, 蒸留水に浮游して静止菌液とした。

表1 半合成培地

ベプトン	0.5 %
グルコース	0.8 "
グルタミン酸ソーダ*	0.5 "
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.8 "
KH ₂ PO ₄	0.8 "
ピリドキシン	0.001 "
水道水	
塩酸で pH5.0 に修正	

* グルタミン酸ソーダは市販の“味の元”でよい。

第二節 グルタミン酸脱炭酸活性

第一節に記述した如くして得られた菌を使用して, 表2に示した実験を行つた。

即ち, 臭化セチルトリメチルアンモニウム存在下には, そのない場合に比して極めて速かに, 而も完全にグルタミン酸を脱炭酸し, 定量的に炭酸ガスを発生した。

尚この菌のグルタミン酸脱炭酸活性は pH 5.0 に於て最も強く発揮され, pH 4.6 に於ては著しく低減された。

第三節 菌の活性の基質特異性

表3にみる如く, この菌はグルタミン酸に対して非常に強い活性を示したが, ピルヴィン酸に対しては, 臭化セチルトリメチルアンモニウム存在下に於ても全く活性を示さなかつた。又, 少々大量の菌を用いたときは, 10分間以内に 10 μM のグルタミン酸を完全に脱炭酸し定量的に炭酸ガスを発生した。

表 2 大腸菌のグルタミン酸脱炭酸活性と臭化セチルトリメチルアンモニウム

		容 器 内 容 ml				
		A	B	C	D	E
L-グルタミン酸 (0.1M)				0.1	0.1	0.1
フタル酸緩衝液 (pH5.0, 0.2M)		2.0	2.0	2.0	2.0	2.0*
大腸菌液 (湿菌量10~20mg/ml)		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
臭化セチルトリメチルアンモニウム (0.02M)			0.3		0.3	0.3
蒸	溜 水	0.5	0.2	0.4	0.1	0.1
炭酸ガス発生量 μ l	10 分	2	2	36	146	2
	20 〃	2	2	56	199	4
	30 〃	3	3	74	216	4
	40 〃	3	4	92	218	6

グルタミン酸を完全に脱炭酸した場合の炭酸ガス発生量理論値=224 μ l

* フタル酸緩衝液 (pH4.6, 0.2M)

表 3 グルタミン酸定量用大腸菌の基質特異性

		容 器 内 容 ml			
		A	B	C	D
L-グルタミン酸 (0.1M)			0.1		0.1
ピルグイン酸 (0.1M)				0.1	0.1
フタル酸緩衝液 (pH5.0, 0.2M)		2.0	2.0	2.0	2.0
大腸菌液 (湿菌量20~30mg/ml)		0.5	0.5	0.5	0.5
臭化セチルトリメチルアンモニウム (0.02M)		0.3	0.3	0.3	0.3
蒸	溜 水	0.2	0.1	0.1	
炭酸ガス発生量 μ l	5 分	2	202	2	204
	10 〃	2	216	2	218

グルタミン酸を完全に脱炭酸した場合の炭酸ガス発生量理論値=224 μ l

総括及び考按

大腸菌を用いてするグルタミン酸の定量法には、Ayen Gar 等³⁾及び秋田¹⁾の報告がある。然しそれらの方法に於ては、グルタミン酸定量用の大腸菌を調製するに当つて、寒天培地より合成或は半合成培地へ2代継代培養を行つており、その間約40~60時間を必要としている。現在の著者等の追試実験に於ては、菌を2代も液体培養を継代する必要はなく、半合成液体培地に1代(約20時間)培養するのみで、グルタミン酸脱炭酸活性の高い、而も、グルタミン酸に対して特異性のある(少なくともピルグイン酸に対しては活性をもたない)

菌を得る事が出来た。そしてこうして得られた菌は臭化セチルトリメチルアンモニウムの存在下に極めて速かにグルタミン酸を脱炭酸して定量的に炭酸ガスを発生した。

従つて、現在の著者等の方法によれば、グルタミン酸定量用の菌調製のための時間が大きく短縮され、その操作も非常に簡易となる。

以上より、現在の著者等の方法は、グルタミン酸定量の実際面に応用するに当つて、従来の諸方法に比し、更に有利な方法であると考えられる。

結 論

普通寒天平板上より、ピリドキソン含有半

合成液体培地に1代分離培養した大腸菌 *B. coli communis* はグルタミン酸に対し、pH 5.0 に於て強い脱炭酸活性を示し、臭化セチルトリメチルアンモニウム存在下に、グルタミン酸を脱炭酸して定量的に炭酸ガスを発

生する。尚この菌はピルビン酸に対して活性を示さない。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師村上栄教授に深甚の謝意を表し、併せて御協力下さつた元井氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 秋田：岡山医学会雑誌, 69, 541, 1957.
- 2) Yabe, Y.. *Japan. J. Microbiol.*, in press.
- 3) AyenGar, P., Roberts, E. and Ramasarma, G. B.: *J. Biol. Chem.*, 193, 781, 1951.

Supplement to the Studies on Glutamic Acid Metabolism of *Bacillus Coli Communis* and Its Application to the Analysis of Glutamic Acid

By

Yoshiro Yabe
Yoshimi Akita
Kazuo Akita

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director: Professor Dr. Sakae Murakami)

Akita (1957), one of the present authors, reported on glutamic acid metabolism of *Bacillus coli communis* and its application to the analysis of glutamic acid.

In order to apply the method reported by Akita to a practical use, the authors reinvestigated and somewhat improved the method.

The cells of *B. coli communis* cultured only once in the pyridoxinecontaining semi-synthetic liquid medium showed a high glutamic decarboxylase activity at pH 5.0, and evolved in a very short time carbon dioxide quantitatively from glutamic acid in the presence of cetyltrimethylammonium bromide. The cells, however, showed no activity to pyruvic acid.
