[農化 第 40 卷, 第 10 号, p. 377~380, 1966]

グルタミン酸生産菌の変異株を用いる L-チトルリン醗酵

中山 清, 萩野 浩志 (協和醗酵工業株式会社東京研究所)

昭和 49 年 5 月 19 日 受理

Accumulation of L-Citrulline by a Mutant of a Glutamic Acid-Producing Bacterium

By Kiyoshi NAKAYAMA and Hiroshi HAGINO

Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

An arginine-requiring mutant of a glutamic acid-producing bacterium, *Corynebacterium glutamicum* (syn. *Micrococcus glutamicus*) KY 9396, was found to accumulate a large quantity of an amino acid in the culture medium. The amino acid was isolated in crystalline form from the culture medium and was identified as L-citrulline by its melting point, elementary analysis, infrared absorption spectrum and optical rotation.

The cultural conditions for L-citrulline production by this mutant were investigated. In synthetic media, arginine concentration remarkably affected L-citrulline accumulation. The L-citrulline accumulation was maximum at a suboptimum concentration of arginine for the growth of the microorganism, namely 125 micrograms per milliliter. L-Citrulline yield increased as the concentrations of potassium phosphate in the medium decreased until both mono- and dipotassium phosphate became to the level of 0.025%. It was noted that L-glutamic acid accumulation decreased with the increase of L-citrulline accumulation. Replacement of arginine in the medium with yeast extract markedly increased the L-citrulline accumulation. Thus, the amount of L-citrulline accumulation reached to a level of 10.7 milligrams per milliliter with the medium containing 10% of glucose. (Received May 19, 1966)

緒 言

チトルリンはアルギニン生合成の前駆物質であるとともに、尿素サイクルを構成する重要なアミノ酸であり、天然には瓜科の植物の種子、その他に存在することが知られている。微生物によるチトルリンの生成については、奥村ら⁽¹⁾が最近 *Bacillus subtilis* のアルギニン要求株が著量の L-チトルリンを培養液中に蓄積することを報告している。著者らは、グルタミン酸生産菌である *Corynebacterium glutamicum* (syn. *Micrococcus glutamicus*) から紫外線照射により誘導されたアルギニン要求変異株が、培地中に著量の L-チトルリンを蓄積することを見出した。本報では、生成した L-チトルリンの分離、同定と L-チトルリンの若干の生成条件の検討結果を報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株 : *Corynebacterium glutamicum* KY 9005 から紫外線照射により得られたアルギニン要求変

異株 KY 9396 株を使用した。

2. 培養方法 : Boiullon 寒天斜面から 1 白金耳をとり、グルコース 2%, ペプトン 1%, 酵母エキス 1%, NaCl 0.25% (殺菌前 pH 7.2~7.4) の組成の種培養培地に植菌し、24 時間振盪培養したものをグルコース 10%, KH_2PO_4 0.05%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2%, CaCO_3 3%, ビオチン 30 $\mu\text{g/l}$, 適量の L-アルギニン (殺菌前 pH 7.2~7.4) を含む基礎醗酵培地を 20 ml 入れた 250 ml 三角フラスコに 2 ml 宛植菌し、30° で 96 時間振盪培養した。

3. 分 析 法

1) 生育量 : 培養液を遠沈して上澄を除いた沈殿より炭酸カルシウムを溶解した後に、菌体懸濁液の 660 m μ 吸光度を測定し、別に作成した菌体量と吸光度の関係曲線を用いて乾燥菌体重量で表わした。

2) グルコースの定量 : Somogyi 法⁽²⁾を用いて定量した。

3) チトルリンの定量: カルバミド化合物の呈色反応である Fearon 反応を用いた Archibald の方法⁽³⁾の改変法⁽⁴⁾により, 光電比色法で定量した。得られた標準曲線は Fig. 1 に示した*。なお醗酵濾液中のチトルリン以外の化合物による定量の妨害も考えられたが, 実験に使用した菌株 KY 9396 株の親株を同培地条件下で培養し, その培養液から作成したチトルリンの定量標準曲線と水溶液から作成した標準曲線は一致し, 培養濾液中にチトルリンの定量を妨害する物質の存在は認められなかった。なお培地に窒素源として尿素を用いた場合は, 尿素によりチトルリンの定量が妨害されるので, ペーパークロマトグラフィーによる分離を行なった後, ニンヒドリンにて発色, 比色する方法⁽⁵⁾で定量した。なおグルタミン酸も同様のニンヒドリン法⁽⁶⁾により定量した。

Fig. 1. Calibration Curve for Citrulline Assay.

実験結果

I. L-チトルリンの分離, 同定

醗酵濾液中に存在するアミノ酸はチトルリンの他に, リジン, オルニチン, グルタミン酸, バリン, アラニン, プロリンの存在が認められた。Fig. 2 に示したごとく, 強酸性陽イオン交換樹脂 Diaion SK-1 (NH_4^+ 型)を用い, 塩基性アミノ酸を除いて得た酸性, 中性アミノ酸区分をさらに Diaion SK-1 (H^+ 型)に吸着し, 1 N- NH_4OH で溶出した溶液に塩基性炭酸銅を加え, アミノ酸銅塩をえた。各アミノ酸銅塩のメタノール, 水に対する溶解性の差を利用して L-チトルリンの銅塩結晶を分離した。さらにチトルリン銅塩を脱銅した後, 溶液にエタノールを添加して粗結晶をえ, 再結晶後, 純結晶をえた。

この結晶は融点 221.0° , 元素分析値は $\text{C}=39.97\%$, $\text{H}=7.57\%$, $\text{O}=23.57\%$ (理論値, $\text{C}=41.13\%$, $\text{H}=7.48$

Fig. 2. Isolation of L-Citrulline from Fermentation Broth.

%, $\text{O}=23.99\%$), 比旋光度は $[\alpha]_D^{25.6^\circ} = +24.1^\circ$ ($c=2$, 1 N-HCl) を示し, 赤外線吸収スペクトルはチトルリン標品のそれと一致し, L-チトルリンと同定した。

II. 培養条件の検討

1. アルギニン濃度と L-チトルリン蓄積の関係

KY 9396 株は生育に L-アルギニンを必要とする。添加アルギニン濃度の L-チトルリン蓄積に及ぼす影響を検討した。結果は Fig. 3 に示したように, L-チトルリンの蓄積は培地中の L-アルギニンが $125 \mu\text{g/ml}$ 付近で最大となり, L-アルギニンがそれ以上またはそれ以下の濃度においては減少を示し, 生育に subotimum のアルギニンの存在が L-チトルリン蓄積に適當であることが認められた。なお $125 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度における生育レ

Fig. 3. Effect of Arginine Concentration on Growth and L-Citrulline Accumulation.
— Citrulline, Growth (Dried cell weight)

* Fig. 1 に示したごとく, 反応液 6.25 ml あたり $0.02 \sim 0.08 \text{ mg}$ のチトルリン濃度で Beer の法則に従った。

スポンズ曲線の異常については、アルギニン低濃度の場合の復帰変異の可能性も考えられるが、追究はしなかった。

2. 硫安濃度と糖濃度の L-チトルリン蓄積への関係

窒素源の L-チトルリン蓄積に及ぼす影響を検討したところ、窒素源としては硫安、尿素が良好であった。窒素源に硫安を用い、炭素源にグルコースを用いてグルコース濃度と硫安濃度との関係を L-アルギニン 125 $\mu\text{g/ml}$ を添加した合成培地で検討した。結果は Fig. 4 に示したごとく、グルコース 5~10% で、硫安濃度の 2% 付近で L-チトルリン蓄積に適當であった。

Fig. 4. Effect of Glucose and Ammonium Sulfate Concentration on L-Citrulline Accumulation.

Concentration of glucose in the medium :
—○— 10% —△— 7.5% —×— 5.0%

3. 無機塩濃度の検討

リン酸塩濃度とマグネシウム塩濃度の L-チトルリン蓄積に及ぼす影響を検討するために、L-アルギニンを

Fig. 5. Effect of Potassium Phosphate on L-Citrulline Accumulation.

MgSO₄·7H₂O concentration :
—●— 0.025% —△— 0.1% —×— 0.5%

Fig. 6. Effect of Magnesium Sulfate on L-Citrulline Accumulation.

KH₂PO₄ and K₂HPO₄ concentration :
—●— 0.025% —○— 0.05%
—▲— 0.1% —×— 0.5%

Fig. 7. Effect of Potassium Phosphate on Glutamic Acid Production.

MgSO₄·7H₂O concentration in the medium :
—●— 0.025% —▲— 0.05% —×— 0.25%

125 $\mu\text{g/ml}$ 添加した合成培地でリン酸一カリ、リン酸二カリ、硫酸マグネシウムの添加濃度につき実験した。結果は Fig. 5 に示したように、リン酸塩濃度は L-チトルリンの蓄積に大きな影響を与え、リン酸一カリ、リン酸二カリの濃度がともに 0.025% のとき、L-チトルリンの蓄積量は最大となった。Fig. 6 は硫酸マグネシウム濃度を横軸にとった L-チトルリン蓄積量との関係を示すが、硫酸マグネシウム 0.1% 付近で L-チトルリンの蓄積量

の増加が認められた。Fig. 7はリン酸塩濃度とL-グルタミン酸生成量との関係を示すが、リン酸一カリ、リン酸二カリの濃度が、ともに0.05%付近でL-グルタミン酸の生成量は多く、L-チトルリンの蓄積量の高いリン酸塩濃度0.025%ではその生成はほとんど認められなかった。この関係は対照的で、L-グルタミン酸がL-チトルリンの前駆物質であることを考えると興味ある現象である。

4. 天然栄養物の添加とL-チトルリン蓄積

アミノ酸を培地に単独に添加した場合、ある種のアミノ酸はこの菌株の生育量を増加させ、L-チトルリンの蓄積量も増加することが認められた。これらのアミノ酸を含み、またこの菌株の生育に必要なアルギニンをも含む天然栄養物を添加することにより、L-チトルリン蓄積への効果を検討した。Table Iはペプトン、酵母エキス、コーン・スチープ・リカーを添加した場合の結果を示す。各天然栄養物を添加することにより生育量は増加を示し、酵母エキス1%を添加した場合にはL-チトルリン10.7mg/mlの蓄積を示した。

Table I. EFFECT OF SOME NUTRIENTS ON L-CITRULLINE ACCUMULATION

	Concentration (%)	Growth (mg/ml)	L-Citrulline (mg/ml)
Peptone	2.0	7.6	1.70
	1.0	7.4	2.18
	0.5	4.5	3.28
	0.25	7.8	1.95
Yeast Extract	2.0	7.7	1.68
	1.0	9.0	10.7
	0.5	10.5	4.17
	0.25	8.9	2.25
C. S. L.	2.0	15.0	1.63
	1.0	14.5	1.93
	0.5	8.9	2.25
	0.25	6.7	1.40
Arginine 125 μ g/ml	—	2.6	1.85

Basal medium : Glucose 10%, KH_2PO_4 0.025%, K_2HPO_4 0.025%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2%, biotin 30 μ g/l, CaCO_3 3%.

5. 醗酵経過

L-チトルリンの醗酵経過の1例をFig. 8に示した。L-チトルリンの蓄積量は培養96時間までは生育量の増加と並行して増加を示し、培養開始後120時間で最大となった。

要 約

(1) *Corynebacterium glutamicum* のアルギニン要

Fig. 8. Time Course of L-Citrulline Accumulation.

—○— L-Citrulline, —x— Dried cell weight, —△— Residual glucose

求変異株 KY 9396 株がL-チトルリンを蓄積することを培養液から結晶を分離し、融点、元素分析値、赤外線吸収スペクトル、旋光度からの同定により確認した。

(2) 若干の培養条件を検討した。L-チトルリンの蓄積は培地中のL-アルギニンが生育に suboptimum のとき良好であり、窒素源として硫酸、尿素が好適であった。培地中の無機リン酸塩濃度がL-チトルリン蓄積に顕著な影響を与え、リン酸濃度が低いときグルタミン酸の生成は減少を示し、L-チトルリンの蓄積は増加した。培地にアルギニン源として酵母エキスを添加することにより、L-チトルリンの蓄積が顕著に増加することが認められた。

かくして、培養条件を検討した結果、グルコースを10%含む培地を使用した場合、10.7mg/mlのL-チトルリンの蓄積を認めた。

終りに臨み、本研究に御指導、御鞭撻賜わった当研究所長木下祝郎博士に深謝いたします。

この報文の要約は昭和41年4月1日、日本農芸化学会大会で発表した。

- (1) M. Shibuya, M. Ishida, S. Konishi, T. Shiro, S. Okumura : *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 742 (1964); *Amino Acids and Nucleic Acids*, **12**, 49 (1965).
- (2) M. Somogyi : *J. Biol. Chem.*, **160**, 61 (1945).
- (3) R. M. Archibald : *ibid.*, **156**, 121 (1944).
- (4) P. McLean, F. Novella, M. W. Gurney : *Biochem. J.*, **94**, 422 (1965).
- (5) 波多野博行, 江 頭 暁 : 化学の領域, 増刊 33, 生化学領域における光電比色法, 各論 1, p. 56.