Microbacterium ammoniaphilum のアルギニンハイドロキサメイト 抵抗性変異株によるアラニンの生産

好田 肇, 中山 清
(協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 50 年 5 月 15 日 受理

Production of Alanine by Arginine Hydroxamate-resistant Mutants of *Microbacterium ammoniaphilum*

By Hajime YOSHIDA and Kiyoshi NAKAYAMA
Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Machida-shi, Tokyo

Most of the arginine hydroxamate-resistant mutants derived from *Microbacterium ammoniaphilum* produced a large amount of DL-alanine in a molasses medium, while they produced a little amount of alanine in a glucose medium. The cause of difference was investigated with one of the mutants, MAH 2-22. The production of a large amount of alanine was noted with the addition of Zn^{2+} into the glucose medium. Mn^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Li^+ , W^{6+} or Mg^{2+} was partially substituted for Zn^{2+} . From these results and other considerations the difference of alanine production between the molasses medium and the glucose medium seems to be attributable to the metal ions contained in the medium. Addition of sodium pyruvate or ammonium lactate increased alanine production. The yield of alanine reached 47 mg/ml in a medium containing 10% glucose supplemented with 10 mg/l of $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$. It increased to 60 mg/ml with the addition of 1% ammonium lactate.

(Received May 15, 1975)

緒 言

微生物を用いるアラニンの生産に関しては、L-アスパラギン酸、フマル酸より、酵素法により L-アラニンを生産する方法⁽¹⁻³⁾のほか、直接糖質より、培地中にアラニンを生産させる方法が数多く報告されている。報告されたもののうちアラニン生産量の比較的多いものは、*Pseudomonas* sp.⁽⁴⁾, *Fusarium moniliforme*⁽⁵⁾, *Corynebacterium gelatinosum*⁽⁶⁾, *Brevibacterium pentosaminoacidicum*⁽⁷⁾, *Bacillus coagulans*⁽⁸⁾, *C. fascians*⁽⁹⁾などである。アラニン生成量については *C. gelatinosum* および *Brev. pentoso-aminoacidicum* による 40 mg/ml が最大である。これらのうち、鮫島ら⁽⁴⁾の *Pseudomonas* sp. では L-アラニン、Yamada ら⁽⁹⁾の *C. fascians* では、D-アラニンであることが確認されているが、その他は DL-アラニンであるか、または光学活性については記載

がない。

著者らは、種々の微生物から L-アルギニン生産菌株をうる目的で、種々の微生物を親株として N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 処理により、各種の L-アルギニンアナログ抵抗性変異株を誘導分離した。誘導した変異株を培養したところ、*Microbacterium ammoniaphilum* のアルギニンハイドロキサメイト抵抗性変異株の中に、糖蜜培地で著量のアラニンを生産する株が、高頻度で存在することをみいだした。それらの変異株中、アラニン生産量の高かった MAH 2-22 を用いて、培養条件の検討をグルコース培地で行なったところ、金属イオンの添加が、アラニン生産にきわめて大きな影響を与え、なかでも Zn^{2+} の効果が顕著であることをみいだし、グルコース 10% の培地に $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l を添加したとき、約 47 mg/ml の生成をみとめた。さらに乳酸 1% の添加で、約 60 mg/ml の生成に達すると

いう興味ある現象をみいだしたので、ここに報告する。

実験方法

1. 使用菌株 培養実験に使用した菌株は、*M. ammoniaphilum* KY 10155 (野生株) と、KY 10155 より、NTG 処理により変異誘導した MAH 2-22 (アルギニンハイドロキサメイト抵抗性変異株) である。

2. 変異株の誘導 プイヨンスラント上で 30°C, 24 時間生育させた菌体を、NTG 2 mg/ml を含む Tris-Maleate 緩衝液 (pH 6.0) 中に懸濁し、室温に 20 分間放置後、3000 rpm で 15 分間遠沈し、再び Tris-Maleate 緩衝液中に懸濁し、アルギニンハイドロキサメイト 2 mg/ml あるいは、4 mg/ml 含んだ最小寒天培地に $10^6 \sim 10^7$ cells を接種し、数日後に生育したコロニーを釣菌し、変異株として分離した。

3. 培地および培養方法 30°C で 24 時間培養したプイヨンスラント上の菌体を、グルコース 2%, ペプトン 1%, 酵母エキス 1%, NaCl 0.5% (pH 7.2) の組成よりなる種培地に 1 白金耳植菌して、30°C で 24 時間振盪培養後、これを発酵培地に 10% の割合で植菌して、30°C で 96 時間振盪培養した。発酵培地の組成は、各 Table および Fig. の注に記した。種培地は、大型試験管 (25 mm×19 cm) に 10 ml または、300 ml 容三角フラスコに 50 ml、発酵培地は、特にことわらない限り、大型試験管に 5 ml 分注したものを用いた。

4. 分析法 菌体の生育は、培養液中の炭酸カルシウムを希塩酸で溶解後、20 倍または 100 倍に希釈し、660 mμ の吸光値を測定した。

アラニンの定量は、*n*-ブタノール-酢酸-水 (4:1:2) または、エタノール-水-アンモニア (18:1:1) のソルベント系で、ペーパークロマトグラフィーを行ない、風乾後ニンヒドリン-アセトン溶液に浸し、アミノ酸を発色後、アラニン該当部分を切り抜き、硝酸銅-メタノール溶液で抽出後、506 mμ で比色定量した。

比旋光度の測定は、実験結果の項に記載した方法に従って、アラニンを結晶状に単離し、パーキンエルマー 141 型旋光度計で行なった。

実験結果

1. アラニン生産の第1スクリーニング

M. ammoniaphilum KY 10155 (野生株) から変異誘導したアルギニンハイドロキサメイト抵抗性変異株を、

Table I. Alanine Production by Arginine Hydroxamate-resistant Mutants of *Microbacterium ammoniaphilum*

Strains	Alanine produced (mg/ml)	
	(M)	(A)
KY 10155 (wild type)	trace	—
MAH 2-2 (Arg ^h x ^R) ^{a)}	16.0	± ^{b)}
MAH 2-6 (")	9.0	—
MAH 2-12 (")	17.0	trace
MAH 2-13 (")	18.0	±
MAH 2-22 (")	23.5	±
MAH 2-23 (")	17.5	±
MAH 4-1 (")	13.5	trace

^{a)} Arg^hx^R: arginine hydroxamate-resistant,

^{b)} ±: <1 mg/ml.

Medium, (M): molasses 10% (as sugar), (NH₄)₂SO₄ 3%, KH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.025%, CaCO₃ 3%, (pH 7.2). (A): glucose 10%, (NH₄)₂SO₄ 3%, KH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, biotin 30 μg/l, trace element soln. 1 ml/l, CaCO₃ 3%, (pH 7.2).

グルコース培地と廃糖蜜培地で培養したところ、廃糖蜜培地で著量のアラニンを生産する株が高頻度で得られた。生産量の多かった代表的な株のアラニン生産を、親株と比較した結果を Table I に示した。親株は、廃糖蜜培地で痕跡量のアラニンしか蓄積しないが、変異株は 9~23.5 mg/ml のアラニンを培地中に蓄積した。なかでも MAH 2-22 は、最も高いアラニン生産を示した。しかし、これら変異株も、グルコース培地ではきわめて少量のアラニンしか生産しなかった。グルコース培地と廃糖蜜培地で、アラニン生産に差を生ずる原因をしらべるために、MAH 2-22 を用いて、培養条件の検討を行なった。

2. アラニン発酵に対する微量金属の影響

グルコース培地を基礎培地として、それに trace element solution (Na₂B₄O₇·10H₂O 88 mg, (NH₄)₆Mo₇O₂₇·4H₂O 37 mg, ZnSO₄·7H₂O 8.8 mg, CuSO₄·5H₂O 270 mg, MnCl₂·4H₂O 7.2 mg, FeCl₃·6H₂O 970 mg を蒸留水 1 l に溶解) の成分金属をそれぞれ 10 mg/l ずつ添加して、MAH 2-22 によるアラニン生産への影響をしらべた。その結果を Table II に示した。Zn²⁺ および Mn²⁺ の添加は、本菌の生育およびアラニンの生産に著しい効果を示した。なかでも、Zn²⁺ のアラニン生産に対する効果は、きわめて著しかった。trace element solution の添加効果は低かったが、これは Zn²⁺, Mn²⁺ の含量が低いためと考えられる。

Table II. Effect of Metal Ion on Alanine Production

Addition	Conc.	Growth O.D./100	Alanine produced mg/ml
None		0.09	2.7
Trace element soln.	1 ml/l	0.12	4.3
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10 H ₂ O	10 mg/l	0.11	2.0
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₇ ·4 H ₂ O	"	0.09	2.8
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	"	0.21	46.7
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	"	0.10	2.0
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	"	0.21	18.5
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	"	0.14	0.3

Basal medium: glucose 10%, (NH₄)₂SO₄ 3%, KH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄·7 H₂O 0.025%, biotin 30 μg/l, CaCO₃ 3%, (pH 7.2).

Zn²⁺ がアラニン生産にきわめて顕著な効果を示したので, Zn²⁺ の濃度を種々変えて, アラニン生産への影響をしらべた. 培養 96 時間のアラニン生成量と Zn²⁺ 濃度の関係を Fig. 1 に示す. 高濃度の Zn²⁺ の存在が, 本菌の生育, アラニン生産を良好にした. 一方, 親株 KY

Fig. 1. Effect of Zinc Ion on Alanine Production.

The medium described in the legend of Table II was used for basal medium.

○—○ alanine, ●---● growth.

Fig. 2. Effect of Metal Ion on Alanine Production.

The medium described in the legend of Table II was used for basal medium.

(a) effect of cobalt ion, (b) effect of barium ion,

(c) effect of nickel ion.

ZnSO₄·7 H₂O: ●—● 0, ×---× 10 mg/l.

10155 についても, 同様の実験を行なったところ, いずれの Zn²⁺ 濃度でもアラニンの生産量は 1 mg/ml 以下で, しかも高濃度の Zn²⁺ 存在下では, 生育の減少が認められた.

次に, trace element solution 成分金属以外の金属の添加効果についてしらべた. しらべた金属としては, Na⁺, Li⁺, K⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, W⁶⁺ である. Li²⁺, Mg²⁺, W⁶⁺ などにも若干の添加効果がみとめられたが, その効果が顕著であった Co²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺ のアラニン生産への効果を, Fig. 2 の (a), (b), (c) に示した. Co²⁺, Ba²⁺ は, 単独添加で著しい効果がみとめられた. Ni²⁺ は, Zn²⁺ との共存下で著しい効果があった. また Co²⁺ は, Zn²⁺ との共存下では, 高濃度で著しい阻害がみとめられた.

3. 炭素源の種類および濃度のアラニン生産への影響

種々の炭素源を用いた場合のアラニン生産量を Table

Table III. Effect of Carbon Source on Alanine Production

Carbon source	Conc. %	Growth O.D./100	Alanine produced mg/ml
Molasses	10	0.32	17.0
Glucose ^{a)}	"	0.17	31.3
Sucrose ^{a)}	"	0.09	25.8
Fructose ^{a)}	"	0.04	9.8
Maltose ^{a)}	"	0.21	2.5
Mannitol ^{a)}	"	0.15	8.5
Mannose ^{a)}	"	0.27	6.8

Basal medium: (NH₄)₂SO₄ 3%, KH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄·7 H₂O 0.025%, biotin 30 μg/l, CaCO₃ 3%, (pH 7.2).

^{a)} supplemented with ZnSO₄·7 H₂O at 10 mg/l.

Fig. 3. Effect of Glucose Concentration on Alanine Production.

The medium described in the legend of Table III was used for basal medium.

Table IV. Effect of Nitrogen Source on Alanine Production

Nitrogen source	Conc. %	Growth O.D./100	Alanine produced mg/ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	0.33	7.8
	3	0.29	20.8
	4	0.27	22.0
$\text{CH}_3\text{COONH}_2$	2	0.05	—
	4	0.05	—
NH_4NO_3	2	0.28	7.3
	3	0.25	15.5
	4	0.23	19.0
NH_4Cl	2	0.25	11.5
	3	0.22	13.0
	4	0.15	13.0
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	0.5	0.35	—
	1	0.35	0.5
	2	0.35	3.5

Basal medium: glucose 10%, KH_2PO_4 0.05%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, biotin 30 $\mu\text{g/l}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l, CaCO_3 3%, (pH 7.2).

III に示した。炭素源としては、グルコースが最も良く、シュクロースでは、生育は悪いが、アラニン生産量はグルコースについて高かった。グルコース濃度をかえて、アラニン生産への影響をしらべた。Fig. 3 に示したように、糖濃度 15% までは、糖濃度に比例してアラニン生産量も増加したが、20% では若干低下した。

4. 窒素源の種類と濃度のアラニン生産への影響

窒素源としては、Table IV に示したように、硫酸がアラニン生産に最も良く、また低濃度ではアラニンの生産量は低く、高濃度の窒素源の存在がアラニン生産に良好であった。

5. アラニン生産におけるピルビン酸ソーダおよび乳酸アンモニウムの添加効果

ピルビン酸は、アラニン生合成の前駆物質であり、alanine dehydrogenase または alanine transaminase の作用により、1段階の反応でアラニンになることが知られている。また乳酸は、lactic dehydrogenase の作用により、1段階の反応でピルビン酸になることが知られている。また実際に、*Pseudomonas* sp. を用いるアラニン発酵において、ピルビン酸、乳酸の添加が、顕著な効果を示したことを、鮫島ら⁽⁴⁾は報告している。本菌によるアラニン生産へのピルビン酸ソーダ、乳酸アンモニウムの添加効果を Fig. 4 の (a), (b) に示した。ピルビン酸ソーダ、乳酸アンモニウムの添加効果はきわめて顕著であり、特に乳酸アンモニウムの効果は著しかった。しかし、乳酸アンモニウムの効果は、 Zn^{2+} 濃度が 5 mg/l,

Table V. Effect of Aeration on Alanine Production

Vessel	Volume ml	Growth O.D./20	Alanine produced mg/ml
Large test tube	5	0.44	18.9
	10	0.26	15.0
300 ml Erlenmeyer flask	10	0.45	27.6
	20	0.44	22.3
	30	0.34	14.3
300 ml Erlenmeyer flask with baffling plate	40	0.23	12.9
	10	0.49	22.7
	20	0.41	22.8
	30	0.47	25.8
	40	0.42	22.0

Medium: glucose 10%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3%, KH_2PO_4 0.05%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, biotin 30 $\mu\text{g/l}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg/l, CaCO_3 3%, (pH 7.2).

Fig. 4. Effect of Pyruvate or Lactate on Alanine Production.

The medium described in the legend of Table V was used for basal medium.

(a) effect of sodium pyruvate, (b) effect of ammonium lactate.

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: ●—● 5 mg/l, ○---○ 10 mg/l, ×---× 30 mg/l, ⊙.....⊙ 50 mg/l.

10 mg/l といった比較的低濃度のときに限られ、 Zn^{2+} の濃度の高いときには、むしろ阻害的であった。一方、ピルビン酸ソーダの効果は、 Zn^{2+} 濃度によって、それほど大きな影響をうけなかった。

6. アラニン生産に対する通気量の影響

Table V に示すような種々の通気条件下でのアラニンの生産量をしらべた。通気量は、ある程度高い場合の方がアラニン生産は良好で、通気が低い条件では、生育、アラニン生産とも減少した。

7. アラニン生産への各種天然栄養源の添加効果

各種天然栄養源のアラニン生産への添加効果をしらべた。Table VI に示したように、天然栄養源の添加は、生育を良好にしたが、アラニン生産には、カザミノ酸以外は阻害的であった。カザミノ酸の添加は、アラニンの

Table VI. Effect of Nutrients on Alanine Production

Nutrients	Conc. %	Growth O.D./20	Alanine produced mg/ml
None		0.32	10.5
Corn steep liquor	0.2	0.35	6.7
	0.5	0.38	2.8
	1.0	0.63	0.5
Yeast extract	0.2	0.35	3.1
	0.5	0.38	2.7
	1.0	0.63	2.7
Meat extract	0.2	0.29	5.8
	0.5	0.29	6.3
	1.0	0.34	5.3
Peptone	0.2	0.30	3.5
	0.5	0.35	2.0
	1.0	0.65	1.3
Casamino acids	0.2	0.54	16.2
	0.5	0.64	19.8
	1.0	0.70	20.5

The medium described in the legend of Table V was used for basal medium.

生産量を増加させた。

8. アラニンの単離・精製

MAH 2-22 をグルコース培地 (Zn^{2+} 10 mg/l 含有) を用い 30°C で、フラスコ培養を行ない、96 時間目の培養液を集めて遠心分離し、その上澄液から Fig. 5 に示す方法に従ってアラニンを結晶状に単離した。単離した結晶につき、パーキンエルマー 141 型旋光度計で比旋光度を測定した。その結果を Table VII に示した。比旋

Table VII. Specific Rotatory Power of Alanine

Specific rotatory power		
Alanine produced by MAH 2-22	$[\alpha]_D^{25} = 0$	(in 1N HCl) c, 2.0
Authentic L-alanine	$[\alpha]_D^{25} = +13.5$	(in 1N HCl) c, 2.0
L-Alanine in the literature	$[\alpha]_D^{25} = +14.7$	(in 1N HCl) c, 5.7

光度から明らかなように、MAH 2-22 により生産されるアラニンは DL-型であった。

考 察

M. ammoniaphilum のアルギニンハイドロキサメイト抵抗性変異株の中に、糖蜜培地で著量のアラニンを生産する株が高頻度でえられた。しかしこれらの変異株は、グルコース培地では、少量のアラニンしか生成しなかった。糖蜜培地とグルコース培地におけるアラニン生産性の差の原因をしらべるため、MAH 2-22 を用いグルコース培地におけるアラニン生産条件を検討した結果、グルコース培地でのアラニンの著量蓄積には、 Zn^{2+} の添加が必要であることがわかった。この Zn^{2+} の効果は、 Ba^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Li^{+} , W^{6+} など一部代替された。また Ni^{2+} は、 Zn^{2+} と共存させるとアラニン生産量を増加させた。 Co^{2+} は、 Zn^{2+} と共存させた場合、高濃度添加ではアラニン生産を著しく阻害した。糖蜜中には、 Zn^{2+} や Mn^{2+} が比較적著量含有されているため、糖蜜培地で、著量のアラニンが生産されるものと考えられる。一方、親株である野生株 KY 10155 は、 Zn^{2+} をはじめとする各種金属イオンの添加・無添加にかかわらず、著量のアラニンを生産しなかった。従って変異株のアラニン生産性は、アルギニンハイドロキサメイト抵抗性を獲得した際に、同時に獲得されたものと考えられる。しかし、アルギニンハイドロキサメイト抵抗性とアラニン生産性および金属イオンのアラニン生産への効果などの関連は不明である。金属イオンのアラニン生産への添加効果としては、F. moniliforme における Zn^{2+} ⁽⁶⁾, Brev. pentoso-aminoacidicum における Mn^{2+} ⁽⁷⁾ などが報告されているが、いずれも現象の報告にとどまっている。MAH 2-22 によるアラニン生産への Zn^{2+} はかの金属イオンの効果の原因としては、これら金属のアラニン生合成系酵素への直接の影響のほか、透過性の問題などが考えられるが、現在までのところ不明である。

鮫島らは、Pseudomonas sp. を用いるアラニン生産に

Fig. 5. Isolation Process of Alanine from Culture Broth.

において、乳酸アンモニウムまたはピルビン酸ソーダの添加が、顕著な効果を示したことを報告している⁽⁴⁾。MAH 2-22 によるアラニン生産においても、乳酸アンモニウムまたはピルビン酸ソーダの添加は、顕著な効果を示した。特に、乳酸アンモニウムの効果は大であった。これらの物質は、アラニン生合成の前駆体として利用されているものと考えられる。

なお本実験を通して、MAH 2-22 によるグルコース培地でのアラニンの生産力価は、培養により大きく変動した。 Zn^{2+} , Mn^{2+} , 乳酸アンモニウムの添加で、多少の力価の安定化がはかれたが、比較的力価の安定している糖蜜培地での生産と比較した場合、まだ不安定である。この力価不安定の原因は、現在のところ不明である。

要 旨

Microbacterium ammoniaphilum のアルギニンハイドロキサメイト抵抗性変異株の中に、高頻度で著量の DL-アラニンを糖蜜培地で生産する菌株のあることを見出した。それらのアラニン生産菌株のうちの 1 株 MAH 2-22 を用いて、アラニン生産条件の検討を行なった。

(1) 本菌によるグルコース培地でのアラニン著量蓄積には、 Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Li^{+} , Mg^{2+} または W^{6+} などの金属イオンを適当量添加してやる必要があるが、また各金属間の量比もアラニン生産に重大な影響を与えた。なかでも Zn^{2+} の添加効果は顕著で、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg/l 添加したとき、アラニンの生産量は最高

47 mg/ml に達した。

(2) 本菌におけるアラニン生産において、乳酸アンモニウム、ピルビン酸ソーダの添加は、顕著な添加効果を示した。特に、乳酸アンモニウムの効果は大きく、グルコース 10% の培地に、1% 添加したときのアラニン生産量は、60 mg/ml に達した。

本実験で使用したアルギニンハイドロキサメイトを合成して下さった当研究所の中溝喜博博士、高橋俊仲氏および、アラニンの比旋光度測定についてご教示いただいた樋口浩氏に感謝いたします。

- (1) 渡辺史朗, 一色貞夫, 大沢岳義, 山本外男: 醸工, **43**, 95 (1965).
- (2) 渡辺史朗, 一色貞夫, 大沢岳義, 山本外男: 同上, **43**, 697 (1965).
- (3) I. Chibata, T. Kakimoto and J. Kato: *Appl. Microbiol.*, **13**, 638 (1965).
- (4) 鯨島広年, 奈良 高, 藤田忠三, 木下祝郎: 農化, **34**, 832 (1964).
- (5) S. L. Carito and M. A. Pisano: *Appl. Microbiol.*, **14**, 39 (1966).
- (6) 北井淳夫, 刀根 弘, 佐々木浩, 宮地 昇, 山野井照雄: 農化, **35**, 862 (1961).
- (7) Y. Hirose and K. Yamada: *Agr. Biol. Chem.*, **25**, 410 (1961).
- (8) T. Matsumoto, T. Yano and K. Yamada: *ibid.*, **31**, 1381 (1967).
- (9) S. Yamada, H. Maeyashiki, M. Wada and I. Chibata: *Appl. Microbiol.*, **25**, 636 (1973).