ノート

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi*
Vol. 55, No. 2, pp. 133~135, 1981]

Acinetobacter calcoaceticus S5 の

エチオニン耐性変異株による

エタノールからの

L-メチオニン生成

西村行正, 谷口典央, 飯塚 廣

(東京理科大学理工学部)

昭和 55 年 8 月 8 日 受理

L-Methionine Formation from Ethanol
by DL-Ethionine-Resistant Mutant of
Acinetobacter calcoaceticus S5

Yukimasa NISHIMURA, Norio TANIGUCHI
and Hiroshi IIZUKA

*Institute of Applied Biology, Science University
of Tokyo, Noda, Chiba 278*

With the intention of producing methionine directly by fermentation from ethanol as a sole carbon source, we induced a DL-ethionine-resistant mutant S5-Ethio^r-3 by ultraviolet rays from the parent strain S5, one of *Acinetobacter calcoaceticus*, a hydrocarbon-utilizing, flavin nucleotide-forming organism.

The mutant S5-Ethio^r-3 showed to be resistant to DL-ethionine about ten times than the parent strain S5.

It was estimated from bioassay that the mutant produced L-methionine of 40 mg/liter in the culture broth using the ethanol-mineral medium.

(Received August 8, 1980)

アナログ耐性変異株を用いたアミノ酸生成に関しては、フェニルアラニンをはじめ各種アミノ酸について知られている。メチオニンに関しては、Adelberg⁽³⁾により *Escherichia coli*, Musilkova ら⁽⁴⁾により *Torula utilis*, Sorsoli ら⁽⁵⁾により *Saccharomyces cerevisiae*, Metzenberg ら⁽⁶⁾により *Neurospora crassa*, Scherr ら⁽⁷⁾により *Hansenula valbyensis*, Kase ら⁽⁸⁾により *Corynebacterium glutamicum* のおのおのエチオニン耐性株について、また Cohen ら⁽⁹⁾および Rowbury⁽¹⁰⁾

により *E. coli* のノルロイシン耐性株について、などの報告がある。本報では細菌によるエタノールの利用を目的として、既報^(1,2)の炭化水素資化性、フラビン・ヌクレオチド (FAD および FMN) 生成細菌 *Acinetobacter calcoaceticus* S5 株から紫外線照射によって得た DL-エチオニン耐性変異株によるエタノールからの L-メチオニンの直接生成について述べる。

変異株の誘導は以下の方法で行った。NH₄NO₃ 3g, K₂HPO₄ 3g, MgSO₄·7H₂O 1g, NaCl 0.5g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, コハク酸ナトリウム 10g, 水 1l (pH 7.0) からなる最小培地に DL-エチオニンを培地 20ml 当り 30~100mg 添加した寒天平板培地を作り、その上に同培地で一昼夜前培養した菌体の懸濁水を塗布した後、紫外線 (ナショナル殺菌灯 GL-10) を約 20cm の距離より 30~50 秒間照射した。この条件で DL-エチオニン濃度を漸次大きくして紫外線照射を行い、エチオニン耐性株 S5-Ethio^r-3 を得た。

得られた変異株 S5-Ethio^r-3 および親株 S5 について、前記最小培地にリンゴ酸ナトリウムを 0.1g/100ml 添加したものを用いて、DL-エチオニン 10mg/ml 濃度までにおける耐性試験を行った。生育度は、30°C で 8 時間試験管振盪培養を行った後、570nm における吸光度測定により比較した。

変異株および親株の DL-エチオニンに対する耐性は Fig. 1 に示される。親株はエチオニン添加により急激に生育が悪くなるが、変異株においては、DL-エチオニン濃度が約 2mg/ml 程度まで生育促進効果が認められ、以後徐々に生育阻害効果が現われる。変異株は DL-エチオニン 6~8mg/ml 濃度において親株の約 10 倍の耐性を示した。

変異株および親株の培養濾液中のアミノ酸の定性試験は薄層クロマトグラフィーで行った。前記最小培地の炭素源をエタノール (2% v/v) に変え、500ml 三角フラスコで 30°C, 3 日間回転振盪培養 (220rpm) を行って得られた培養濾液について、イオン交換樹脂処理により脱塩を行い薄層クロマトグラフィー用試料とした。薄層には Kieselgel 60 (Merck) を用い、展開溶媒には n-ブタノール-酢酸-水 (4:1:1) およびフェノール-水 (3:1) を用いた。

Fig. 2 に示されるように、上記 2 種類の展開溶媒を用いた薄層クロマトグラフィーにおいて、変異株については、標準試料の L-メチオニンと一致する R_f の位置に

Fig. 1. Growth of the Parent Strain S5 and the Mutant S5-Ethio^r-3 in Gradient Concentration of DL-Ethionine Added to the Medium. ○—○, S5; ●—●, S5-Ethio^r-3. Medium: NH₄NO₃ 0.3g, K₂HPO₄ 0.3g, MgSO₄·7H₂O 0.1g, NaCl 0.05g, FeSO₄·7H₂O 0.001g, succinate 1.0g, malate 0.1g, underground water 100ml, pH 7.0. Cultivation was carried out by shaking using the test tubes for 8 hr at 30°C. The mutant showed the resistance of about ten times of that of the parent strain in concentration of DL-ethionine 6~8 mg/ml.

ニンヒドリン陽性のスポットが認められた。親株については、この位置にスポットは認められなかった。薄層クロマトグラフィーで認められた変異株のアミノ酸がL-メチオニンであることは、その培養濾液によるL-メチオニン要求株 (*Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8042) の生育支持によって確認された。

変異株によるL-メチオニンの生成量は、若干の培養条件の検討を行った結果、下記の培養条件で、培養液中に40 mg/lであることをbioassayにより認めた。なお標準試料L-メチオニンは、和光純薬工業株式会社の試薬特級を用いた。

培地: (NH₄)₂HPO₄ 0.5g, (NH₂)₂CO 0.1g, K₂HPO₄ 0.3g, MgSO₄·7H₂O 0.1g, NaCl 0.05g, FeSO₄·7H₂O 0.001g, エタノール 3ml, 地下水 100ml (pH 7.0)。

培養: 500ml 三角フラスコを用い 30°C で3日間回転振盪培養 (220rpm) を行った。エタノールは初め培地 100ml 当り 2ml 添加し、2日間培養後、さらに 1ml

Fig. 2. R_f Values in Ascending Thin-layer Chromatography of Amino Acids Formed by the Parent Strain S5 and the DL-Ethionine-resistant mutant S5-Ethio^r-3. Thin-layer of Kieselgel 60 of Merck was used, and it was developed respectively with two developers, *n*-butanol-acetic acid-water (4:1:1) and phenol-water (3:1), at room temperature. One of the ninhydrin-positive spots from the mutant coincided with that of the authentic methionine respectively in above two developers, but on the parent strain it was not seen such spot.

添加した。

本研究に用いた *Acinetobacter calcoaceticus* S5 株のエチオニン耐性変異株がメチオニンを菌体外に生成蓄積したことから、本細菌の場合も、これまで *E. coli*⁽¹¹⁾をはじめとして報告されているメチオニン生成に関する代謝調節機構と類似した機構が存在するものと考えられる。

L-メチオニン生成量に関しては、さらに強いエチオニン耐性株を得ること、他のアナログ耐性株を得ること、同系列の他アミノ酸要求株を得ることおよび培養条件として、エタノールの添加方法の検討、corn steep liquor、酵母エキスなど有機栄養源の添加、あるいはビタミン添加などによりL-メチオニン生成を増大させることができるものと思われる。

本報の概要は、昭和 55 年度日本農芸化学会大会で報告した。

-
- (1) 西村行正, 飯塚 廣: 農化, **46**, 639 (1972).
 - (2) Y. Nishimura and H. Iizuka: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **22**, 79 (1976).
 - (3) E. A. Adelberg: *J. Bacteriol.*, **76**, 326 (1958).
 - (4) M. Musilkova and Z. Fenc: *C. A.*, **62**, 8157 (1965).
 - (5) W. A. Sorsoli, K. D. Spence and L. W. Parks: *J. Bacteriol.*, **88**, 20 (1964).

- (6) R. L. Metzenberg, M. S. Kappy and J. W. Parson: *Science*, **145**, 1434 (1964).
- (7) G. H. Scherr and M. E. Rafelson: *Devs. Ind. Microbiol.*, **7**, 97 (1966).
- (8) H. Kase and K. Nakayama: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 153 (1975).
- (9) G. N. Cohen and F. Jacob: *Compt. Rend.*, **248**, 3490 (1959).
- (10) R. J. Rowbury: *Nature*, **206**, 962 (1965).
- (11) L. W. Lee, J. M. Ravel and W. Shive: *J. Biol. Chem.*, **241**, 5479 (1966).