[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.61, No. 10, pp.1279~1284, 1987]

アスパルターゼ生成条件の検討 (Cell Reusing Process による L-アスパラギン酸の製造法に関する研究)

湯川 英明, 寺沢 真人
(三菱油化株式会社中央研究所)

昭和 62 年 6 月 15 日 受 理

Intracellular Formation of Aspartase in *Brevibacterium flavum* (Production of L-Aspartic Acid by the Cell Reusing Process)

Hideaki YUKAWA and Masato TERASAWA
Central Research Laboratory, Mitsubishi Petrochemical Co.,
Inashiki, Ibaraki 300-03

Cultural conditions were investigated in a mutant strain belonging to a *Brevibacterium* genus for high aspartase activity. When this strain was cultured on a medium containing fumaric acid, the intracellular aspartase formation was higher than without it. When this strain was cultured in a medium containing ethanol as a carbon source, it was found that the lower the concentration ratio of the nitrogen source to the carbon source, the higher the aspartase activity. Cells hyperproducing aspartase could be reused 10 times in L-aspartic acid production. We conclude that the use of cells hyperproducing aspartase was advantageous in industrial production of L-aspartic acid.
(Received June 15, 1987)

緒 言

微生物のアスパルターゼを利用して L-アスパラギン酸を製造する方法は、1928 年住木らによる酵母の静止菌体を用いたフマル酸とアンモニアからの生成⁽¹⁾を初めとしてフマル酸含有培地で培養を行う方法⁽²⁻⁴⁾、またアスパルターゼ活性の高い *E. coli* No. 2 株の凍結乾燥菌体を用いた北原ら⁽⁵⁾の方法の他、酵素源として *Pseudomonas trifolii* を用いる方法⁽⁶⁾、好熱性細菌の *Bacillus stearothermophilus* を用いる方法⁽⁷⁾、また *Alcaligenes faecalis* を用いてフマル酸の代りにマレイン酸を原料とする方法⁽⁸⁾等が報告されている。

また、アスパルターゼの酵素学的性質および物理化学的性質についても種々の知見が報告されている⁽⁹⁻¹²⁾。そのなかで、*Pseudomonas* 属細菌のアスパルターゼがマレイン酸およびアスパラギン酸により誘導的に合成されることが大和谷ら⁽¹³⁾により示唆されており、この誘導現象はアスパルターゼの酵素学的性質を解析するうえでもまた工業的な応用の面においてもきわめて興味ある問題

である。

著者らは、 α -アミノ酪酸の耐性を付与したエタノール資化性の *Brevibacterium flavum* が強いアスパルターゼ活性を有することを見出し L-アスパラギン酸の酵素的生産に関して工業的な利用の可能性について検討を進め⁽¹⁴⁻¹⁶⁾、1986 年より cell reusing process による L-アスパラギン酸の工業生産を開始した。本報では、本プロセスの有為性をさらに高めるべく、菌体内アスパルターゼ含量の増大を目的とするアスパルターゼ生成条件について検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株 自然界よりエタノール資化性菌として分離した *Brevibacterium flavum* MJ-233 より DL- α -アミノ酪酸耐性株として誘導された AB-02 株を用いた。
2. 培地および培養条件 (標準条件) 前培養は Table I-(1) の組成の培地 50 ml を 500 ml 容三角フラスコに分注し、120°C、15 分間滅菌後、1 白金耳量植菌し 30°C にて 24 時間振とう培養 (220 rpm, 70 mm

Table I. Composition of the Culture Media

	(1)	(2)
Urea	4 g	—
(HH_4) ₂ SO ₄	14 g	23 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g	0.5 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.5 g	0.5 g
Yeast extract	1 g	—
Casamino acids	1 g	—
Biotin	200 μg	200 μg
Thiamine-HCl	100 μg	100 μg
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	6 mg	20 mg
MnSO ₄ ·nH ₂ O	6 mg	20 mg
Dist. water	1000 ml	1000 ml
Ethyl alcohol	indicated in the text	
pH	8.3	7.6

Table II. Composition of the Reaction Mixture

	(1)	(2)
Aspartic acid (Na)	50 mM	—
Fumaric acid	—	860 mM
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	2 mM	7.5 mM
NH ₄ OH (25% NH ₃)	—	4 M
Tris-HCl	100 mM	—
pH	7.4 (45°C)	9.3 (45°C)

stroke) を行った。本培養は Table I-(2) の組成を基本培地として, 2 l 容発酵槽に培地 1.5 l を仕込み, 120°C, 15 分間滅菌後, 前培養物の 2(v/v) % とエタノール 2(v/v) % を添加して, 33°C で pH 7.6 (25% アンモニア水にて調節) のもと通気攪拌培養 (1000 rpm, 1 vvm) を行った。なお, 炭素源のエタノールは消費に伴い逐次添加を行い, 培養液中のエタノール濃度を 0.5 ~ 1.0 (v/v) % に調節した。

3. 定量法 L-アスパラギン酸は, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8042 を用いる微生物定量法⁽¹⁷⁾および高速液体クロマトグラフィー (島津 LC-5 A) による o-フタル酸アルデヒド蛍光分析⁽¹⁸⁾を行った。

4. 酵素活性測定法 アスパルターゼ活性の測定は, Table II-(1) の反応液 10 ml に培養菌体の 0.3 g (湿菌体) を懸濁液 45°C にて 30 分間振とう反応を行い, 反応の停止 (4.5 (w/v) % 過塩素酸溶液を 10 ml 添加) 後, 遠心分離 (8000 rpm, 15 分間, 室温) にて得られた上清液中の L-アスパラギン酸の減少量を測定することにより行った。酵素活性は 1 g 湿菌体当り, 1 時間に消失する L-アスパラギン酸量をもって算出した。

5. L-アスパラギン酸の生産反応条件 菌体内フマルゼ活性の除去は前報⁽¹⁵⁾に記載の方法により行った。処理菌体を L-アスパラギン酸の生産反応に供した。反応は, 2 l 容発酵槽を用いて Table II-(2) の組成液 1 l に上記処理菌体の 30 g 湿菌体を懸濁させ, 45°C にて 20 時間行った。反応終了後遠心分離 (8000 rpm, 15 分間, 4°C) にて集菌し, 菌体を繰り返し反応に供した。

6. 試薬 コーンスティブリカー (CSL) は日本食品化工より, また酵母エキスをおよびカザミノ酸は Difco Laboratories より購入し, その他の試薬は和光純薬工業製を用いた。

結果および考察

1. アスパルターゼ生成に及ぼす炭素源の影響

Pseudomonas 属細菌のアスパルターゼはマレイン酸および L-アスパラギン酸を単一炭素源とする培地にて効果的に誘導されること⁽¹³⁾や *E. coli* B 株のアスパルターゼは *E. coli* B 株を L-アスパラギン酸を単一炭素源とする培地にて培養した場合にグルコース基質の場合の約 10 倍に酵素活性が増大する⁽¹⁹⁾ことが報告されている。したがって, まず本菌株のアスパルターゼについてその生成に及ぼす炭素源の影響について検討を加えた。

結果は, Fig. 1 に示したごとくフマル酸を単一炭素源とした場合には, エタノール基質に比し約 30% のアスパルターゼ生成の増大が認められた。一方, L-アスパラギン酸とマレイン酸をおのおの単一炭素源とした場合には, 菌体増殖はほとんど見られず, 本菌にとって L-アスパラギン酸およびマレイン酸はきわめて資化しにくい基質であることが明らかであった。また, アスパルターゼ生成の増大も認められなかった。

2. アスパルターゼ生成に及ぼす窒素源の影響

アスパルターゼ生成に及ぼす窒素源の種類の影響について検討した。窒素源としては, 硫酸アンモニウム, 塩化アンモニウム, 硝酸アンモニウムを選び, 各アンモニウム塩は窒素濃度として 350 mM になるように基本培地に添加した。

結果は, Fig. 2 に示すとおりで, 硫酸アンモニウムと塩化アンモニウムは窒素態として良好に利用されたが, 硝酸アンモニウムは利用されにくいことが明らかとなった。硫酸アンモニウムと塩化アンモニウムではアスパルターゼ生成に差異は認められなかった。

Fig.1. Effect of Carbon Source on Aspartase Activity and Cell Growth. Cultivation was carried out with 2liter jar fermentor on the basal medium except for the substrate employed. The substrate employed was 2 (v/v)% ethanol, 1 (w/v)% L-aspartic acid, 0.5 (w/v)% fumaric acid and 0.5 (w/v)% maleic acid. The activity of aspartase obtained in the cells cultured for 40 hr on the basal medium was taken as 100%.

Fig.2. Effect of Nitrogen Source on Aspartase Activity and Cell Growth. Cultivation was carried out with 2liter jar fermentor for 40 hr on the basal medium except for the nitrogen source employed. The nitrogen source employed was 350 mmol/liter as nitrogen concentration. The activity of aspartase and cell growth obtained in the cells cultured on the basal medium containing (NH₄)₂SO₄ were taken as 100%. □, Relative activity of aspartase; ■, relative growth.

Fig.3. Effect of CSL Concentration on Aspartase Activity and Cell Growth. Cultivation was carried out with 2liter jar fermentor for 40 hr on the basal medium containing CSL. The aspartase activity obtained in the cells cultured on the basal medium was taken as 100%. □, Relative activity of aspartase; ■, growth.

3. アスパルターゼ生成および菌体増殖に及ぼす天然栄養源の影響

Fig.1 に示したごとく最少培地における菌体増殖度は低いいため、菌体収量の向上を目的として天然栄養源の影響

について検討した。天然栄養源としては、安価で工業的に利用可能な CSL を用いた。

結果は、Fig.3 に示したとおりで、CSL 5 g/l 以上の

Fig. 4. Effect of Concentration of Sodium Ammonium on Aspartase Activity and Cell Growth. Cultivation was carried out with 2 liter jar fermentor for 40 hr on the basal medium containing 5 g/liter of CSL modified by varying the concentration of sodium ammonium. The aspartase activity and cell growth obtained in the cells cultured on the basal medium containing 5 g/liter of CSL were taken as 100%. □, Relative activity of aspartase; ■, relative growth.

添加では、菌体増殖性は良好で、培養 40 時間では CSL 無添加の場合に比し菌体増殖度は約 10 倍に向上した。一方、アスパルターゼの生成は、CSL の添加の有無にかかわらず一定となり、CSL 中にアスパルターゼに対するリプレッサー様因子は含まれていないことが明らかであった。したがって次の検討では基本培地に CSL 5 g/l を添加した培地を用いた。

4. アスパルターゼ生成に及ぼす窒素源濃度の影響

大和谷ら⁽¹³⁾は *Pseudomonas* 属細菌の培養に際し培地中の炭素源濃度に対する窒素の濃度比率が高いほどアスパルターゼ生成が高まることを報告しており、窒素源濃度がアスパルターゼ生成に大きく影響することを示唆している。したがって本菌株のアスパルターゼ生成に対する至適条件を設定する目的で窒素源濃度の影響について検討した。

結果は Fig. 4 に示したごとく本菌株のアスパルターゼ生成は硫酸アンモニウムの濃度により変動することが明らかになった。培地中の濃度を 2 g/l に低下させた場合には、10 g/l あるいは 23 g/l の場合に比しアスパルターゼ生成は約 30% 増大した。

以上の結果よりアスパルターゼ生成のための培地としては Table I-(2) の硫酸アンモニウム濃度を 2 g/l に

Fig. 5. Effects of Temperature and pH of Cultivation on Aspartase Activity. Cultivation was carried out with 2 liter jar fermentor for 40 hr on the medium A (indicated in the text) under the standard condition except for temperature or pH.

して、CSL 5 g/l を添加した培地組成（以下 A 培地とする）を設定した。

5. アスパルターゼ生成に及ぼす培養温度および pH の影響

結果は Fig. 5 に示したとおりで、アスパルターゼ生成に対する至適培養温度は 33°C、また至適 pH 域は 7.6~7.8 であった。また菌体増殖度に対する至適温度域は 30~33°C、また至適 pH 域は 7.3~7.6 であった。したがって、至適条件として温度 33°C、pH 7.6 に設定した。

6. アスパルターゼ生成に及ぼすフマル酸の添加効果

本菌株はフマル酸を単一炭素源として増殖した場合、菌体内アスパルターゼ生成が増強されることは前述したとおりであるが、菌体収量が低いという問題がある。したがって、菌体高収量下でアスパルターゼ高含有菌体を調製する目的で、A 培地にフマル酸を 5 g/l の濃度で添加した培地を用いてアスパルターゼ生成に及ぼすフマル酸の添加効果について検討した。

結果は、Fig. 6 に示したとおりで、フマル酸を主炭素源としない場合においても培養 40 時間でのアスパルターゼ生成は、フマル酸無添加の場合の約 1.3 倍に増大することが明らかで、さらにフマル酸添加による菌体増殖度も約 30% 向上したため、培養液 1 l 当りのアスパルターゼ全活性と比較するとフマル酸添加培養では無添加の約 1.7 倍に増大した。従来、アスパラギン酸やマレイン酸を主炭素源とした場合にのみ菌体内アスパルターゼ生成の増大が報告されていたが、本結果のように、フマ

Fig. 6. Effect of Fumaric Acid on Aspartase Activity. Cultivation was carried out with 2 liter jar fermentor on the medium A and A containing fumaric acid (5 g/liter). The aspartase activity obtained in the cells cultured on a medium without fumaric acid for 40 hr was taken as 100%.

ル酸を主炭素源としない場合においてもアスパルターゼ生成に有効であるという事実はきわめて興味深いものである。

さらに、本条件により調製された菌体のアスパルターゼ含量の向上を確認するため、L-アスパラギン酸の生産反応を実施した。

7. L-アスパラギン酸の生産反応

菌体繰返し反応法 (cell reusing process) による L-アスパラギン酸の生産反応を行った。反応には、加温処理により副反応酵素活性 (フマラーゼ) を除去した菌体を用いた。フマル酸無添加で培養した菌体を用いた場合には、8 回の繰返し利用が可能であったが、一方、フマル酸添加培養菌体では、Table III に示したごとく少な

Table III. The Production of L-Aspartic Acid by Cell Reusing Process

Run	Production of L-aspartic acid (mM)	Run	Production of L-aspartic acid (mM)
1	820	6	825
2	825	7	825
3	825	8	825
4	825	9	825
5	825	10	825

くとも 10 回の繰返し利用が可能であった。各反応に供した菌体量および反応時間に差異のないことから培地へのフマル酸の添加は菌体内アスパルターゼ生成の増強に有効であることが確認された。なお、初回の反応でもリンゴ酸の副生はほとんど認められず、いずれの反応でも L-アスパラギン酸はほぼ量論的に生産された。

要 約

菌体の繰返し反応法 (cell reusing process) による L-アスパラギン酸の生産に関して、菌体内アスパルターゼ生成の増強を目的とする酵素生成条件の検討を行った。

(1) エタノールを主炭素源とする培地に培養した場合、培地中の窒素源の濃度が低いほどアスパルターゼ生成が増大した。

(2) エタノールを主炭素源とし、さらにフマル酸を添加した培地にて培養した場合、アスパルターゼ生成の増強と菌体増殖度の向上が認められた。

(3) アスパルターゼ生成の至適条件にて培養した菌体を用いた L-アスパラギン酸の生産では少なくとも 10 回の菌体の繰返し利用が可能となった。

以上、本研究では、プロセスの最適化を図るべくアスパルターゼ高含有菌体を得る目的でアスパルターゼの至適生成条件の設定を行った。

本方法により菌体内アスパルターゼ含量が増大した菌体を安価に調製することが可能となり、L-アスパラギン酸の工業的生産に関して cell reusing process の有効性をさらに高められることが示唆された。

終りに臨み、本研究の遂行にあたり、協力いただきました三菱油化株式会社中央研究所、奈良昭一氏および福島真樹子氏に深く感謝いたします。

- (1) 住木諭介：酸協，**23**, 33 (1928)。
- (2) M. Kisumi, Y. Ashitaga and I. Chibata : *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **24**, 296 (1960)。
- (3) 木下祝郎，中山 清，北田宗平：酸協，**16**, 517 (1958)。
- (4) 渡辺史郎，大沢岳義，信国胤生：農化，**38**, 434 (1964)。
- (5) 大林 晃，岩野貞雄，日下 巖，北原覚雄：農化，**34**, 16 (1960)。
- (6) 高橋雅弘，日野哲雄，奥村信二，三浦八十治，石田守良：Amino Acids 酸酵と代謝，**7**, 23 (1963)。

- (7) Y. Suzuki, T. Yasui, Y. Mino and S. Abe : *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 23 (1980).
- (8) Y. Takamura, I. Kitamura, M. Iikura, K. Kino and A. Ozaki : *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 338 (1966).
- (9) 赤城千尋, 砂原憲之, 岩雲誠次 : *Amino Acid and Nucleic Acid*, **11**, 139 (1965).
- (10) F. B. Rudolph and H. J. Fromm : *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 92 (1971).
- (11) S. Suzuki, J. Yamaguchi and M. Tokushige : *Biochim. Biophys. Acta*, **321**, 369 (1973).
- (12) Y. Watanabe, M. Iwakura, M. Tokushige and G. Eguchi : *Biochim. Biophys. Acta*, **661**, 261 (1981).
- (13) 大和谷三郎, 垣沼淳司, 金丸恒雄, 鈴木 勝武田研究所年報, **25**, 32 (1966).
- (14) 湯川英明, 山田誠一郎, 奈良昭一, 寺沢真人, 高山義博 : 農化, **59**, 31 (1985).
- (15) 湯川英明, 奈良昭一, 寺沢真人, 高山義博 : 農化, **59**, 279 (1985).
- (16) M. Terasawa, H. Yukawa and Y. Takayama : *Process Biochem.*, **120**, 124 (1985).
- (17) アミノ酸・核酸集談会編 : 「アミノ酸発酵」上, 共立出版, 1972, p. 358.
- (18) P. Lindroth and K. Mopper : *Anal. Chem.*, **51**, 1338 (1979).
- (19) N. Nishimura and M. Kisumi : *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 1072 (1984).