〔農化 第 35 卷, 第 2 号, p. 146~150, 1961〕

グルタミン酸生産菌のフェニルアラニン要求変異株 による L-チロシンの蓄積

中山 清, 佐藤善六, 木下祝郎 (協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 35 年 8 月 9 日 受 理

緒 言

微生物変異株によるチロシンの蓄積については Davis⁽¹⁾ が *Escherichia coli* のフェニルアラニン要求株のチロシン分泌について簡単に触れているが, 詳細な分離同定については述べられていない. 又池田等⁽²⁾ も *Bacillus subtilis* の変異株によるチロシンの蓄積を報告している.

著者等は微生物 auxotroph を用いるアミノ酸醸酵の研究として既にグルタミン酸生産菌の変異株によるオルニチン⁽³⁾, リジン⁽⁴⁾, バリン⁽⁵⁾, ホモセリン⁽⁶⁾, フェニルアラニン⁽⁷⁾の生産について報告して来た. グルタミン酸生産菌のフェニルアラニン要求株によるチロシンの蓄積についても既に *Micrococcus glutamicus* の栄養要求性変異株とアミノ酸蓄積についての総括的報告⁽⁸⁾に於て触れた所であるが, 本報では L-チロシンの分離同定と合成培地に於ける二, 三の実験結果について述べる.

実 験 法

グルタミン酸生産菌 *Micrococcus glutamicus*^(9,10) の変異処理により多数のフェニルアラニン要求株を得た⁽⁸⁾. その中 M. 588-Co 202 及び M. 588-Co 219 のスクリーニング培養でチロシンの蓄積をペーパークロマトグラフィーにより認めた. 此等のことについては別に報告した⁽⁸⁾ので省略する. 本報では M. 588-Co 219 についての実験を述べる.

培養実験には seed 培地としてグルコース 2%, 極東肉エキス 0.5%, 極東ペプトン 1.0%, 食塩 0.025%, ビオチン 10 µg/l の組成のものを使用し, 此の培地 30 ml を 250 ml の三角フラスコに分注滅菌したものに寒天斜面から植菌して約 24 時間振盪培養したものを 10% の植菌量で醸酵培地に植菌した. 醸酵培地の組成は各表の脚註に示したものを使用した. 培養は大型試験管に 10 ml の培地を入れ, 試験管振盪機により 28° で培養した.

L-チロシンはニトロソナフトールを用いる比色法⁽¹¹⁾により定量し, 同時にペーパークロマトグラフィーを平行して行いチェックした. 芳香族アミノ酸関連物質の添加培養実験では, 添加物質の比色法によるチロシン定量に対する影響を考慮する為各添加物質の水溶液につき, 本比色法を行った場合の呈色を予め試験した. その結果は第 1 表に示した如くである. 即ち D-quinic acid, shikimic acid, phenylpyruvic acid は 2% の高濃度でも呈色は認められず, 影響はないものと考えられる. m-aminobenzoic acid, p-aminobenzoic acid, anthranilic acid, p-hydroxybenzoic acid は高濃度で赤味がかった呈色が認められたが, 実際の測定では約 70 µg/ml のチロシンが本比色法の測定範囲であって 300 µg/ml 程度のチロシン量の場合は 10 倍以上の稀釈を行ってから定量しているので, 影響は殆どないものと考えられる. ただ p-hydroxyphenylpyruvic acid では低濃度の方が呈色が著しく, 本物質を添加した培養の濾液については本比色法によるチロシンの定量は不可能であった.

第 3 表に示した芳香族アミノ酸関連物質の添加培養では, 菌体, CaCO₃ 以外の沈澱がチロシン生成の多い場合認められ, チロシンの溶解度以上のものの沈澱と考えられるので, HCl の添加によって CaCO₃ 及び沈澱を溶解したものに付き稀釈定量をした. L-チロシンの溶解度は 25° で 453 µg/ml とされているが, 実際培養液に於ける溶解度は更に高いことが実験結果から推定される.

実 験 結 果

1. フェニルアラニン要求株 M. 588-Co 219 の培養濾液からの L-チロシンの分離同定 M. 588-Co 219 を合成培地で培養して得た培養濾液 2 種, 即ち 1 つは 321 µg/ml のチロシンを含有する 1.4 l と他は 187 µg/ml のチロシン含有濾液 2.4 l を合併したものから炭末吸着法⁽¹²⁾により L-チロシンの分離同定を行った. 即ち前記の

* L-Tyrosine Accumulation by Phenylalanine-less Mutant of Glutamic Acid Producing Bacteria.
By Kiyoshi NAKAYAMA, Zenroku SATO and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory,
Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)

第 1 表 比色法による L-チロシンの定量に対する芳香族
アミノ酸関連化合物の影響 (呈色)

添加物質	濃 度	2%	1%	0.5%	0.25%
D-quinic acid		—	—	—	—
m-aminobenzoic acid		+(赤)	±(赤)	±(赤)	—
p-aminobenzoic acid		+(赤)	+(赤)	±(赤)	—
shikimic acid		—	—	—	—
anthranilic acid		+(赤)	±(赤)	—	—
p-hydroxybenzoic acid		+(赤)	+(赤)	+(赤)	±(赤)
p-hydroxyphenylpyruvic acid		±(黄)	±(黄)	±(黄)	+(黄)
phenylpyruvic acid		—	—	—	—

合併培養液に予め 5% 酢酸で処理した炭末 110 g を加えて 1 時間攪拌してチロシンを炭末に吸着させた後炭末を濾別し, 500 ml の水で洗滌後, 5% フェノール含有 20% 酢酸 1.5 l で溶出し, エーテルで 2 回処理してフェノールを除いてから減圧下に約 75 ml に濃縮, 冷室に 1 夜放置後生じた微細針状結晶を濾別, 少量の水で洗滌後乾燥して粗結晶 248 mg を得た. この粗結晶 235 mg を熱水から再結させて 163 mg の結晶

を得た. この試料についての元素分析値, 赤外吸収スペクトルは L-チロシンのそれとよく一致した. 即ち試料: C 59.02%, H 6.10%, N 7.87%, $C_9H_{11}N_1O_3$ (チロシン) の理論値: C 59.66%, H 6.12%, N 7.74%, 又赤外吸収スペクトルの比較は第 1 図に示した如くである. 更に上と同様の方法で得た結晶について比旋光度を, 4 規定塩酸中 4% の濃度での測定値から計算すると $[\alpha]_D^{25} = -10.2^\circ$ で文献値と殆ど一致した.

2. ビオチンとフェニルアラニン濃度の影響 合成培地に於ける L-フェニルアラニンとビオチンの添加濃度の影響を試験した結果は第 2 表に示した如くである. 即ちビオチンは $5 \mu\text{g/l}$ 以上の添加が必要で, ビオチン無添加ではグルタミン酸が蓄積した. L-フェニルアラニンの添加量は $31.2 \mu\text{g/ml}$ が最適で過剰の添加ではチロシンの蓄積は殆ど起らなかった. L-フェニルアラニンの高濃度添加ではフェニルアラニンの培地中の残留が認めら

第 1 図 L-チロシンの赤外線吸収スペクトルによる確認 (上: 試料, 下: 標品)

第2表 L-チロシン蓄積に対するビオチン及びL-フェニルアラニン濃度の影響

	L-フェニルアラニン	cell mg/ml	L-チロシン μ g/ml	バリン	アラニン	グルタミン酸	リジン (mg/ml)
ビオチン 30 μ g/l	1000	10.4	trace	—	+++	—	++(0.9)
	500	9.6	"	—	+++	±	++
	250	9.8	"	—	+++	+	++
	125	10.6	98	+	+++	—	++(0.8)
	62.5	8.5	378	+	+++	—	++(1.6)
	31.2	11.7	680	+	+++	—	++(1.6)
	15.7	6.4	270	+	+++	—	+
	7.8	3.8	trace	+	+++	—	+
	3.9	4.6	"	—	+	—	+
	0	7.3	"	—	+	—	++~+
ビオチン 5 μ g/l	1000	9.5	trace	—	+++	—	++(0.7)
	500	11.0	"	—	+++	—	++
	250	9.6	"	±	+++	±	++
	125	8.9	79.5	±	+++	±	++(1.0)
	62.5	6.8	320	±	+++	±	++(1.1)
	31.2	5.0	572	++~+	+++	++	++(1.3)
	15.7	2.7	125	+	+	—	+(0.4)
	7.8	2.6	trace	+	+	—	—
	3.9	1.5	"	+	+	—	—
	0	0.1	"	—	+	+	+
ビオチン 0 μ g/l	1000	1.7	"	+	+	+++	±
	500~0	±	"	+	+	+++	+

基礎培地: セレロース 7.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5%, K_2HPO_4 0.05%, KH_2PO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, CaCO_3 1.0%

れたが, チロシン蓄積の大なる試験管ではフェニルアラニンの残留は認められなかった. これらの事実はチロシン生合成に於けるコントロールメカニズムの存在を推定せしめるものである.

本菌株によっても少量のL-リジン及びバリンの蓄積が起るが, その条件はビオチン, フェニルアラニン量に関してはチロシンの蓄積条件と一致していた.

3. 芳香族アミノ酸関連物質及び芳香族化合物の添加培養

Davis 等の *Escherichia coli* の芳香族アミノ酸生合成経路の研究⁽¹³⁾から, 芳香族アミノ酸の関連物質と考えられるD-quinic acid, shikimic acid, p-hydro-

第3表 芳香族アミノ酸代謝関連物質及び芳香族化合物添加の影響

添加物質		96 時間				120 時間				
		pH	cell mg/ml	L-チロシン mg/ml		pH	cell	L-チロシン		
D-quinic acid	2%	5.6	9.5	trace		5.8	+	1.426	1.640	3.066
	1	7.0	17.1	"		5.0	+	—	0.882	—
	0.5	5.4	9.5	"		5.4	±	1.321	0.820	2.141
	0.25	5.8	9.7	"		6.0	++	1.649	0.630	2.299
phenylpyruvic acid	0.5	5.8	10.7	0.066	フェニルアラニン ++					
	0.25	5.0	11.8	0.066	" +					
p-hydroxyphenylpyruvic acid	0.5	6.8	2.1	++						
	0.25	5.6	1.5	+						
shikimic acid	2	7.4	1.9	++						
	1	7.2	8.6	++		5.4	++	1.331	9.072	10.403
	0.5	5.6	6.3	++		6.8	+	1.365	5.765	7.130
m-aminobenzoic acid	0.25	5.6	9.5	++		5.5	++	1.300	1.386	2.686
	2	5.6	1.8	0.193		5.4	±	0.192	0.378	0.576
	1	5.8	4.2	0.424		5.5	±	0.512	0.504	1.018
	0.5	5.6	7.0	0.262		5.5	±	0.402	0.340	0.742
p-aminobenzoic acid	0.25	5.6	7.6	0.176		5.0	+	0.264	0.315	0.579
	2	6.0	2.5	0.138		6.2	±	0.165	0.442	0.607
	1	5.6	3.4	0.146		5.5	±	0.121	0.252	0.373
	0.5	5.6	3.2	0.156		5.8	±	0.099	0.126	0.225
o-aminobenzoic acid (anthranilic acid)	0.25	5.6	2.1	0.141		6.8	+	0.132	—	—
	2	5.6	1.5	0.132		5.6	±	0.154	0.188	0.342
	1	5.4	3.7	trace		5.4	±	0.099	0.126	0.225
	0.5	5.6	4.8	0.154		—	±	—	—	—
L-トリプトファン	0.25	5.4	4.7	trace		5.4	+	0.159	0.101	0.260
	2	5.0	9.0	0.650		5.0	++	0.403	0.682	1.085
	1	5.0	10.9	0.324		5.3	++	0.529	0.870	1.399
	0.5	5.6	9.5	0.525		5.5	+	0.610	0.882	1.492
p-hydroxybenzoic acid	0.25	5.6	9.5	0.770		5.8	±	0.562	0.442	1.004
	2	6.0	0.2	0.061		6.2	—	0.090	0.064	0.152
	1	5.8	0.6	0.165		—	+	—	—	—
	0.5	5.4	10.3	0.418		6.4	—	0.428	0.416	0.844
無添加 (8 tube 平均)	0.25	5.0	8.4	0.453		—	+	—	—	—
		5.8~6.2	10.1	0.402		6.2	+	0.379	0.300	0.679

基礎培地: セレロース 7.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5%, KH_2PO_4 0.05%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, ビオチン 30 μ g/l, CaCO_3 1.0%, L-フェニルアラニン 40 μ g/ml

第 2 図 *M. glutamicus* の芳香族アミノ酸生成経路推定図

xyphenylpyruvic acid, phenylpyruvic acid, *p*-aminobenzoic acid, anthranilic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, L-トリプトファン及び *m*-aminobenzoic acid を添加して培養した。その結果は第 3 表に示した如くである。即ち shikimic acid, *p*-hydroxyphenylpyruvic acid には顕著な添加効果が認められ、*E. coli* の場合と同様本菌でも両物質はチロシン生成の前駆物質と推定される。又 quinic acid にも添加効果が認められ *Aerobacter* の場合と同様、直接の前駆物質ではないにせよ生成に関連ある物質と考えられる。L-トリプトファンにも若干の効果が認められた。又 phenylpyruvic acid 添加ではチロシンは生成せず、フェニルアラニンの生成が認められた。

考 察

Micrococcus glutamicus のフェニルアラニン要求変異株 *M. 581-Co 219* による L-チロシンの蓄積を合成培地の培養濾液から L-チロシンを分離同定して証明した。本菌株による L-チロシンの蓄積は shikimic acid, *p*-hydroxyphenylpyruvic acid の添加によって顕著に増加し、D-quinic acid も又蓄積を増大した。phenylpyruvic acid の添加ではチロシンの蓄積は増大せず、フェニルアラニンの顕著な蓄積が認められた。このことは本菌株の L-フェニルアラニン生成に於ける block の位置は phenylpyruvic acid の前と考えさせる。*E. coli*, *Neurospora*⁽¹⁴⁾ の芳香族アミノ酸生成経路の知識から本菌の芳香族アミノ酸生成経路も *E. coli* と同様第 2 図の如く推定される。第 2 図には前報^(7,8)の実験事実をも総括して各変異株の block の推定位置をも示した。

M. 588-Co 219 のチロシン蓄積はフェニルアラニンの適量の添加で起り、過剰添加でフェニルアラニンが培養液中に残存する場合はチロシンの蓄積は起らなかった。このことはフェニルアラニンによるチロシン蓄積のコントロールを推定せしめるものである。

上に述べた芳香族アミノ酸生成経路、チロシン蓄積のメカニズムについては更に検討したいと考えている。

要 約

(1) グルタミン酸生産菌 *Micrococcus glutamicus* のフェニルアラニン要求変異株が L-チロシンを蓄積することを合成培地から L-チロシンを分離同定して証明した。

(2) チロシンを蓄積するフェニルアラニン要求株 *M. 588-Co 219* の合成培地に於ける培養実験で

(イ) ビオチンが微量の場合はグルタミン酸が蓄積し、ビオチンが充分でフェニルアラニンの添加量が適量の場合にチロシンが蓄積した。フェニルアラニンの過剰ではチロシンの蓄積は起らなかった。

(ロ) Shikimic acid, *p*-hydroxyphenylpyruvic acid の添加は著しくチロシンの蓄積を増大し、両者は本菌のチロシン生成の前駆物質と考えられた。D-quinic acid, L-トリプトファンの添加もチロシン蓄積増大に効果

があった。phenylpyruvic acid の添加はフェニルアラニンの蓄積をもたらし、本菌株のフェニルアラニン生合成経路の block の位置は phenylpyruvic acid の前と考えられた。

(3) *Micrococcus glutamicus* の芳香族アミノ酸生合成経路について考察した。

(1) B. D. Davis : <i>Experientia</i> , 6, 41 (1950).	昭和 35 年度農化大会講演.
(2) 朝井勇宣 : <i>Amino Acids</i> , 1, 1 (1959).	(9) S. Kinoshita, K. Nakayama, S. Akita : <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 22, 176 (1958).
(3) S. Kinoshita, K. Nakayama, S. Udaka : <i>J. Gen. Appl. Microbiol.</i> , 3, 276 (1957).	(10) 木下祝郎, 板垣史郎, 中山 清 : <i>Amino Acids</i> , 2, 42 (1960).
(4) S. Kinoshita, K. Nakayama, S. Kitada : <i>ibid.</i> , 4, 128 (1958); 中山 清, 北田宗平, 木下祝郎 : <i>Amino Acids</i> , 2, 105 (1960).	(11) S. Udenfriend, J. R. Copper : <i>J. Biol. Chem.</i> , 196, 227 (1952).
(5) 中山 清, 北田宗平, 木下祝郎 : <i>Amino Acids</i> , 2, 77 (1960).	(12) S. M. Partridge : <i>Biochem. J.</i> , 49, 153 (1951); 蛋白質化学, 共立出版, Vol. 1 (1954).
(6) S. Kinoshita, H. Samejima, K. Nakayama, C. Fujita, T. Nara : <i>J. Gen. Appl. Microbiol.</i> , 6, 193 (1960).	(13) B. D. Davis : <i>The Harvey Lectures</i> , 1954~55. p. 230.
(7) 中山 清, 佐藤善六, 木下祝郎 : 本誌, 36, 142 (1961).	(14) E. L. Tatum, S. R. Gross, G. Ehrensward, L. Garnjobst : <i>Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.</i> , 40, 271 (1954).
(8) 中山 清, 北田宗平, 佐藤善六, 木下祝郎 :	

〔農化 第 35 卷, 第 2 号, p. 150~155, 1961〕

酪農乳酸菌の凍結乾燥に関する研究 (第 2 報)*

凍結乾燥菌の生理的性質ならびに生酸活性

森地敏樹, 矢野信礼, 入江良三郎, 見坊 寛 (農業技術研究所畜産化学部)

昭和 35 年 8 月 8 日 受理

前報⁽¹⁾において凍結乾燥した酪農乳酸菌は保存中に対数的に死滅し、その死滅率は乳酸菌の凍結乾燥法および乾燥菌の保存条件の適否を定量的に比較するすぐれた指標となることを報告した。本報では凍結乾燥乳酸菌の生理的性質、生酸活性ならびに牛乳培地における発育経過を中心に検討した結果を報告する。

実 験 方 法

試験菌株は前報と同じく *Streptococcus cremoris* H 61 および *Lactobacillus bulgaricus* B-1 である。実験材料としては乳酸菌を脱脂乳培養のまま、あるいは培養を脱脂乳で種々の割合に希釈したものおよび NaOH で種の pH に調整したものを前報の方法で凍結乾燥し、減圧下で打栓して保存したものを用いた。

凍結乾燥乳酸菌は室温の蒸溜水を加えて乾燥前の容量に還元し、以後の実験に供した。

生理的性質としては、分類上重要な性質と乳加工のスターターとして重要な性質を検討した。実験方法はすべてこれまで小沢および著者⁽²⁾らが用いてきたものと同じである。

乾燥乳酸菌の発育経過を検討する培養基としては、無脂固形分濃度 10% の還元脱脂乳を用いた。生菌数測定培地は前報と同様である。

実験結果および考察

(1) 生理的性質 凍結乾燥乳酸菌を 0° に 8~15 か月, 10° に 12 か月, 30° に 2 か月保存して、その生理的性質を乾燥前のものと比較した結果は第 1 表の通りである。すなわち食塩、色素、薬剤に対する耐性、酸生成力、炭水化物発酵性などは、乾燥前に比較してほとんど変化がみられず、ただ乾燥菌を直接、試験培地に接種した場合に、菌の発育がおくれただけであった。還元培養を数回脱脂乳に植えついだものの生理的性質は、乾燥前と比較してまったく変化が認められなかった。これらの結果は Sharpe ら⁽³⁾が菌株保存の目的で多数の *lactobacilli*

* Studies on the Lyophilization of Lactic Starter Organisms. Part II. Physiological Characteristics and Acid Producing Activities of lyophilized Cultures.

By Toshiki MORICHI, Nobuhiro YANO, Ryozauro IRIE and Hiroshi KEMBO (National Institute of Agricultural Sciences, Chiba)