DL-2-ヒドロキシ-3-フェニールプロピオン酸より L-フェニールアラニン生産の条件および機構の研究*

和田 決 夫

(住友化学工業株式会社医薬事業部研究部)

昭和 48 年 11 月 30 日 受理

Studies of Cultural Conditions and Mechanisms for the Production of L-Phenylalanine from Its Hydroxy Analogue

By Hiroo WADA

Research Department, Pharmaceutical Division of Sumitomo
Chemical Co., Ltd., Takarazuka, Hyogo Prefecture

Screening tests were carried out in order to obtain microorganisms capable of converting DL-2-hydroxy-3-phenylpropionic acid (HPPA) to L-phenylalanine by fermentation.

From the tests, *Pseudomonas denitrificans* IAM-1426 was chosen as a suitable strain for the conversion.

Cultural conditions of the strain for L-phenylalanine production were studied.

This strain gave 90% of theoretical yield of L-phenylalanine in 48 hours with following medium: DL-HPPA, 1.5%; glucose, 4%; corn steep liquor, 2.5%; ammonium chloride, 0.25%; pH, 7.8 with ammonia.

The conversion of DL-HPPA to L-phenylalanine was catalyzed by two enzyme systems, an NAD and NADP-nonlinked DL-HPPA dehydrogenase and a transaminase.

(Received November 30, 1973)

筆者はメチオニンのアミノ基が水酸基で置換された DL-2-ヒドロキシ-4-メチルチオ酪酸 (HMBA と略称する) を前駆物質とする L-メチオニンの発酵生産に関する研究により, *Pseudomonas denitrificans* G-132-13 株が高い変換率をもって L-メチオニンを生産するばかりか, 他の 2-ヒドロキシ酸を用いても, 相当するアミノ酸が生産されることを知り, 第 1 報⁽¹⁾ ですでに報告した。

そこで, 2-ヒドロキシ酸より L-アミノ酸の発酵生産に関する研究の一環として, DL-2-ヒドロキシ-3-フェニールプロピオン酸 (以後, HPPA と略称する) の L-フェニールアラニンへの変換を試みた。

微生物による L-フェニールアラニンの生産に関する研究としては, 朝井ら⁽²⁾ によるフェニールピルビン酸を基質として, トランスアミネーションを利用する研究,

北井ら⁽³⁾ によるフェニールピルビン酸を基質とした共軛系による方法, 千畑ら⁽⁴⁾ の D-フェニールアラニンの異性化に関する研究等のほかに, 直接発酵法としてチロシン要求変異株を用いた中山ら⁽⁵⁾ の研究などが知られているなかで, HPPA を前駆物質とする方法は新しい試みである。

本報告では, 菌株の検索, 培地組成の検討を中心とした, 培養条件の検討, および生産機構についての若干の検討結果について報告する。

実験方法および材料

1. 試薬 HPPA (断らない限りラセミ体) は, 宗像ら⁽⁶⁾ の方法で合成した。D-および L-HPPA は第 1 報⁽¹⁾ と同じく, D-および L-フェニールアラニンと亜硝酸との反応により合成した。得られたそれぞれの光学異性体の理化学的特性を Table I に示した。フェニールピルビン酸は 2-アセチルアミノシンナミン酸を合成し, こ

* 本報は「2-ヒドロキシ酸より L-アミノ酸の生成」第 3 報とする。

Table I. Physical Properties of Synthesized HPPA

HPPA	mp (°C)		[α] _D ²⁰ **		Elementary anal.			
	Obtained	Literature value*	Obtained	Literature value***	Found		Calc. for C ₉ H ₁₀ O ₃	
DL-	97~8	97~8	0	0	C, 65.01	H, 6.02	C, 65.04	H, 6.06
D-	123~5	124~6	+20.0	+20.4	C, 64.90	H, 5.96		
L-	124~5	124~5	-18.9	-20.0	C, 64.77	H, 6.06		

* I. Heilborn and H. M. Bunburg.⁽⁷⁾ ** Obtained by neutralizing the corresponding optical isomers with the equivalent amount of sodium hydroxide. *** M. Winitz *et al.*⁽⁸⁾

れを塩酸で加水分解する方法⁽⁹⁾を用いて合成した。2,6-ジクロロフェノール・インドフェノール(以後2,6DCPIPと略称する), NAD, NADP, ピリドキサルリン酸, スコボレチン, パーオキシダーゼ, およびアミノ酸などは第2報⁽¹⁰⁾と同様にして入手した。

2. 培養および培地 菌株の第1次検索には第1報⁽¹⁾, Table I に示した培地組成のうち, DL-HMBA-CaをHPPAにかえ, その濃度を0.2%としたうえ, pHをアンモニアで所定の数値に調節したものを使用した。第1次検索で選択された菌株が, すべて細菌であったので, 同じ培地を用い, 選択された菌株間のL-フェニールアラニン生産性をより正確に定量した。これを第2次検索とする。

第1次, 2次検索は試験管培養で行なったが, その他の条件検討などには500 ml 肩付フラスコに培地50 mlを仕込んだものを使用し, 30°Cで往復振盪培養を行なった。ジャーファメンター培養については, 第2報⁽¹⁰⁾と同一条件で行なった。

無細胞抽出液の調製に供した菌株は *Pseudomonas denitrificans* IAM-1426 株で, 該菌株をHPPA, 0.1%含有グルコース肉汁培地を用いて40時間, 振盪培養し, 遠心分離して菌体を取り, 1/15Mリン酸緩衝液(pH7.8)(以後, これを単に緩衝液と呼ぶ)を用いて2回洗浄して得られた菌体を供した。

3. 菌体懸濁液, および無細胞抽出液の調製 上記の方法で調製した *Ps. denitrificans* IAM-1426 株の菌体を, 乾燥菌体にして20 mg/mlの濃度で緩衝液に懸濁したものを“菌体懸濁液 (cell suspension)”と呼ぶ。“粗酵素液 (crude extract), “上澄 (supernatant)”および“顆粒分画 (particulate)”の調製方法は第2報⁽¹⁰⁾と同じである。それぞれの分画の蛋白含量は, 粗酵素液が25 mg/ml, 上澄が16 mg/mlであり, 顆粒分画は乾物量にして8 mg/mlの濃度になるように緩衝液に懸濁した。

菌体のアルミナ磨砕は, 冷凍室で菌体ペーストと同量のアルミナとを乳鉢中で混合, 磨砕し, 緩衝液に懸濁後10,000×gで30分遠心分離し上澄を得る方法による。上澄を24時間透析し, 透析内液を無細胞抽出液とした。菌体のリゾチーム処理は, H. R. Kaback⁽¹¹⁾が提示した方法により行なった。

4. 酵素活性の測定および分析方法 脱水素酵素およびトランスアミナーゼ活性の測定は, 第2報記載⁽¹⁰⁾の方法により行なった。

D-HPPA ラセマーゼ活性の測定には, G. D. Hegeman⁽¹²⁾およびJ. DeLeyら⁽¹³⁾の方法に準じた次の方法で行なった。

ツンベルグ管の主管に10 mM-D-HPPA溶液3 ml, 緩衝液4 mlを入れ, 側管に *Ps. denitrificans* IAM-1426株の乾燥菌体10 mg/ml 懸濁液3 mlを加えた。

対照としては, 菌体懸濁液のかわりに100°C, 10分間加熱した同濃度の菌体懸濁液を加えたものを用いた。ツンベルグ管は真空化, 窒素置換, 再び真空化の後, 主管, 側管の内容物を合わせ, 30°Cで5時間インキュベートした。その後, 100°C, 10分間加熱してから遠心分離した。この上澄液の1.5 mlを取り, 0.2 mM 2,6DCPIP溶液1 mlと顆粒分画0.5 mlを加えて, 600 mμの吸光度の変化を測定した。

フェニールアラニン, HPPAおよび代謝産物の検出にはn-ブタノール, 酢酸・水=4:1:2 (v/v)を溶媒とする薄層クロマトグラフィーと, 検出試薬としてヨウ度蒸気, ニンヒドリン溶液または紫外線検出器を用いる方法を用いた。旋光度やL-フェニールアラニン量は第1報⁽¹⁾と同様の方法により糖, ケト酸の定量および菌の生育度は第2報⁽¹⁰⁾と同様の方法による。

実験結果

1. 菌株の検索

細菌67株, 放線菌5株, カビ7株および酵母8株

第 1 次検索に供したが, 薄層クロマトグラフィーによりフェニールアラニンの生成が検出されたのは細菌 9 株であった。それらは *Pseudomonas* 属 3 株, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Serratia*, *Escherichia* および *Corynebacterium* の各属, それぞれ 1 株ずつの合計 9 株である。

これらの菌株を第 2 次検索に供し, 定量的比較を行なったところ, 1 mg/ml 以上の L-フェニールアラニンを生産するものは, HMBA から L-メチオニンの生産株でもある *Ps. denitrificans* G-132-13 株, および *Ps. denitrificans* IAM-1426 株であった。

このように L-メチオニン生産株が HPPA を前駆物質とした場合にも, L-フェニールアラニン生産性を持つことが明らかになったので, 培地組成も L-メチオニン生産培地組成として用いたグルコース, コーンステープリカー (以後, CSL と略称する), 塩化アンモンが採用できるものと考え, これら組成の濃度に限り検討を行なった。Table II に *Ps. denitrificans* G-132-13, および *Ps. denitrificans* IAM-1426 株の L-フェニールアラニン生産性比較の結果を示した。

後者の菌株が生産性の点で, ややすぐれているところから, 以後この菌株を用いて生産条件の検討を行なった。

2. L-フェニールアラニン生産条件の検討

HPPA の至適濃度: 検討の結果を Table III に示し

Table II. Comparison of L-Phenylalanine Productivities of *Pseudomonas denitrificans* G-132-13 and IAM-1426

Strain	48 hr		72 hr		96 hr	
	Growth	L-Phe (mg/ml)	Growth	L-Phe (mg/ml)	Growth	L-Phe (mg/ml)
G-132-13	18.0	7.3	21.2	8.7	22.3	8.8
IAM-1426	19.1	8.3	22.0	9.2	22.4	9.5

Medium: glucose, 2%; CSL, 2%; NH_4Cl , 0.25%; pH, 7.8.

Table III. Effect of HPPA Concentration on L-Phenylalanine Production

HPPA (%)	48 hr		72 hr		96 hr	
	Growth	L-Phe (mg/ml)	Growth	L-Phe (mg/ml)	Growth	L-Phe (mg/ml)
1.0	17.5	7.2	23.6	9.1	24.9	9.3
1.5	15.8	9.5	24.1	13.2	24.7	13.9
2.0	11.2	5.9	14.1	6.8	15.2	7.5

Basal medium: glucose, 3%; CSL, 2%; NH_4Cl , 0.25%; pH, 7.8.

た。HPPA 2% 濃度において菌の生育阻害の傾向が認められた。1.5% を至適濃度として, 以後の検討に採用した。この濃度の培養では, 最高 13.9 mg/ml の L-フェニールアラニンが生産され, HPPA からの変換率にして 92.5% になる。

なお, HPPA はアンモニウム塩として水に溶解し, 培地の pH もアンモニヤを用い 7.8 に調節した。以後の検討にも, 同様にして pH 調節を行なった。

グルコースおよび CSL の至適濃度: 検討の結果を Table IV および Table V に示した。グルコースは 4%, CSL は 2.5% が至適濃度と思われる。塩化アンモンについては, 第 2 報⁽¹⁰⁾で示したように L-メチオニン生産にはほとんど影響がなかったことから, L-フェニールアラニン生産に当っては特に検討を行なわなかった。

以上の結果をまとめ, L-フェニールアラニン生産培地として, グルコース 4%, CSL 2.5%, 塩化アンモン 0.25%, HPPA 1.5%, pH 7.8 (アンモニヤで調節) の組成を決定した。

培養の一例: 決定された L-フェニールアラニン生産培地を用い, *Ps. denitrificans* IAM-1426 株のジャーファメンターによる培養を行なった。

培養の経時的变化を Fig. 1 に示した。

この培養で, 5 l の培養液中に 67.5 g の L-フェニールアラニンが生産された。培養液を遠心分離にかけて除菌し, 除菌液をダイヤイオン SK #1(H^+ 型)の 1 l を充

Table IV. Effect of Varing Concentration of Glucose on L-Phenylalanine Production

Glucose (%)	48 hr		72 hr		92 hr	
	Growth	L-Phe (mg/ml)	Growth	L-Phe (mg/ml)	Growth	L-Phe (mg/ml)
2.0	14.1	8.7	21.2	10.7	23.2	11.6
3.0	15.2	9.6	23.2	12.7	24.5	13.1
4.0	16.5	10.5	24.2	13.5	24.9	13.7

Basal medium: CSL, 2.5%; NH_4Cl , 0.25%; HPPA, 1.5%; pH, 7.8.

Table V. Effect of Varing Concentrations of CSL on L-Phenylalanine Production

CSL (%)	48 hr		72 hr		96 hr	
	Growth	L-Phe (mg/ml)	Growth	L-Phe (mg/ml)	Growth	L-Phe (mg/ml)
2.0	16.5	10.1	23.5	13.0	24.8	13.4
2.5	16.7	11.2	24.7	13.7	25.8	13.8
3.0	17.0	11.0	24.7	13.6	26.0	13.7

Basal medium: glucose, 4%; NH_4Cl , 0.25%; HPPA, 1.5%; pH, 7.8.

Fig. 1. Time Course of L-Phenylalanine Production.

Production medium: HPPA, 1.5%; glucose, 4%; CSL, 2.5%; NH_4Cl , 0.25%; pH, 7.8.

填したカラムに流して、アミノ酸を吸着させた。以後、アンモニアで溶出、濃縮、活性炭による脱色、そして結晶化と第1報⁽¹⁾のL-メチオニンの単離、精製方法に従って処理し、58.9 gの結晶を得た。

この結晶は薄層クロマトグラフィーでL-フェニールアラニンの R_f 値の位置に単一のスポットを示した。

旋光度および分析結果は、次のとおりであった。

$$[\alpha]_D^{20} = -34.2 \quad (c=2, \text{水})$$

元素分析値(%) Found C, 65.31; H, 6.73; N, 8.52
 $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}$ としての計算値 C, 65.43; H, 6.71; N, 8.48

このほか、赤外線吸収スペクトルでも、L-フェニールアラニンであることを確認した。

HPPAの各光学異性体を用いた培養: L-フェニールアラニン生産に及ぼすHPPAの光学異性体の影響について試験した。培地としてはL-フェニールアラニン生産培地を用い、HPPAはTable Iに示した各光学異性体を供試した。培養の結果をFig. 2に示した。L-フェニールアラニンへの変換速度を比較するとD-HPPAが最も速く、次にDL-体、L-体の順であった。しかし、培養後期のL-フェニールアラニン生産量は、いずれの異性体を用いても、ほぼ等しい値に近づいた。

Fig. 2. L-Phenylalanine Production from D-, L-, or DL-HPPA.

Medium: as noted in Fig. 1.

●—● D-HPPA, ○—○ DL-HPPA,
 △—△ L-HPPA.

3. L-フェニールアラニン生産に關与する酵素系

Ps. denitrificans IAM-1426株は、HPPAを効率よくL-フェニールアラニンに変換することが明らかになった。ここで、この変換に關与する酵素系について、若干の検討を行なった。

i. HPPA脱水素酵素

菌体懸濁液による反応: HPPA不含ブイオン培地、およびL-フェニールアラニン生産培地を用いて、30時間、振盪培養して得られた菌体を用い、HPPAの各光学異性

Table VI. Phenylpyruvate Formation by the Cells Grown in the Presence or Absence of HPPA

Optical isomer of HPPA	Culture media for growth	Phenylpyruvate formed ($\mu\text{moles/ml}$)
DL-	bouillon	10.5
D-		26.5
L-		4.8
DL-	Phe production medium	16.1
D-		29.4
L-		5.3

Reaction mixture contained in 2 ml; 0.1 mmole of HPPA, 15 mg of dry cells, and 1/15 mmole of potassium phosphate buffer (pH, 7.8). After the aerobic incubation for 2 hr at 30°C, the reaction mixtures were centrifuged and the upper fractions were subjected to the assay of phenylpyruvate.

Fig. 3. Thin-layer Chromatogram of the Reaction Mixture and Standard Compounds.

Table VII. HPPA Dehydrogenase Activity of Crude Extract

Optical isomer of HPPA	Phenylpyruvate formed ($\mu\text{mole/ml/hr}$)	Enzyme activity measured by 2,6-DCPIP ($\times 10^2$)
L-	1.28	2.09
D-	0.22	0.31
DL-	0.46	0.96

Reaction mixture contained, in 3 ml : 10 μ moles of HPPA, 5 mg (as protein) of crude extract, 1/15 mmole of potassium phosphate buffer (pH, 7.8). For 2,6-DCPIP assay, 0.2 μ mole of 2,6-DCPIP and 3 μ moles of potassium cyanide were added to the above reaction mixture. The reaction was carried out at room temperature.

体に対する作用を調べた。結果を Table VI に示した。

いずれの菌体も D-HPPA に対し最も強い脱水素活性をもっており、Fig. 2 の結果が裏付けられた。

いずれの培養菌体も同程度の脱水素酵素活性を示し、該酵素は構成酵素と考えられる。

反応液の薄層クロマトグラムを Fig. 3 に示した。これからも中間体として、フェニールビルビン酸が生成していることが証明された。

粗酵素液による脱水素反応：粗酵素液を用い、HPPA の各光学異性体に対する脱水素能を調べた。その結果は Table VII に示したように、菌体を用いた Table VI の結果とは逆に、L-HPPA が最も脱水素を受けやすく、ついで DL-, D-体の順となった。D-体に対する酵素が音波処理で失活したことも予測されるので、アルミナ磨砕で得られた無細胞抽出を用い、同じ実験を試みたが、同

Table VIII. Phenylpyruvate Formation by the Cells Treated with Lysozyme

Optical isomer of HPPA	Phenylpyruvate formed ($\mu\text{ moles/ml}$)
L-	22.5
D-	20.1

Reaction mixture contained, in 2 ml ; 0.1 mmole of HPPA, 15 mg of the treated cells, and 0.1 mmole of potassium phosphate buffer (pH, 7.8). The reaction and the assay of phenylpyruvate were carried out by the same method as noted in Table VI.

Table IX. HPPA Dehydrogenase Activities of Supernatant and Particulate

Enzyme source	Supernatant ($\times 10^{-2}$)	Particulate ($\times 10^{-2}$)
HPPA		
D-	0.61	0.00
L-	0.53	5.98

Reaction mixture contained, in 3 ml ; 5 μ moles of HPPA, 0.2 μ mole of 2,6-DCPIP, 1/15 mmole of potassium phosphate buffer (pH 7.8), and 5 mg (as protein) of supernatant or particulate.

様の結果が得られた。

脱水素酵素は不安定であるが、なかでも D-HPPA に対する粗酵素液の活性は、その傾向が強いようである。

ここで、光学異性体の菌体内への透過性を調べるために、リゾチーム処理を施した菌体を用い D-HPPA および L-HPPA 脱水素酵素活性を検討した。結果を Table VIII に示した。Table VI と Table VIII の結果を比較すると、リゾチーム処理により L-HPPA に対する脱水素酵素活性は 4 倍ほど増強され、D-HPPA に対する活性とはほぼ同等の値となった。

これより、無処理菌体に対する D-体と L-体の透過性には差があることが推測される。

粗酵素液を用いて脱水素酵素の至適 pH を調べたところ、D-HPPA および L-HPPA 脱水素酵素能は、ともに pH 8.0 付近が最大であった。

上澄および顆粒分画の酵素活性：両分画のもつ D-および L-HPPA 脱水素酵素活性を測定し、結果を Table IX に示した。

このように上澄には、いずれの基質に対する酵素活性も微弱であり顆粒分画には D-HPPA 脱水素酵素活性は検出できず、強い L-HPPA 脱水素酵素活性が認められた。

D-HPPA のラセミ化酵素の存在：菌体には D-体に対する強い活性が認められるにもかかわらず、無細胞抽出液では活性が弱いところから、マンデル酸に見られるよ

Fig. 4. Difference Spectrum of "Particulate" in the Presence of HPPA.

Both control and experimental cuvettes contained, in 3 ml: 1/15 mmole of potassium phosphate (pH 7.8), 3 μ moles of potassium cyanide and 4 mg of "particulate." Instrument was adjusted so that no difference spectrum was observed when an oxidized sample was measured versus itself. Ten μ moles of L-HPPA in 0.3 ml was then added to the experimental cuvette and 0.3 ml of water to the reference cell. After 30 min from the L-HPPA addition, the difference spectrum was observed.

うにラセマーゼが存在することも考えられる。さいわいに、顆粒分画に D-体に対する酵素活性が認められないことから、嫌氣的に D-HPPA と菌体とを接触させ、ついで L-HPPA の存在を顆粒分画と 2,6 DCPIP を用いて測定する方法により、菌体のもつラセマーゼ活性を測定した。嫌気条件下の反応という制約はあるが、ラセマーゼを検出することができなかった。

HPPA 脱水素酵素の co factor について: 第2報⁽¹⁰⁾の場合と同様に、まず粗酵素液を用いて、NAD や NADP の水素受容体としての関与を検討したが、HPPA のいずれの光学異性体を基質にしても、助酵素の還元は認められなかった。

また、脱水素反応により過酸化水素を生成する酸素オキシドリダクターゼの活性は、パーオキシダーゼによるスコポレチンの酸化と共転させて測定したが、活性を検出することができなかった。

次に、顆粒分画による L-HPPA 脱水素反応を差スペクトルの測定により追跡した。その結果、Fig. 4 に示した 419, 523 および 551 mμ に吸収を示すスペクトラムが得られた。これは、この脱水素系の電子受容体としてチトクローム系が関与していることを示唆している。

D-HPPA 脱水素酵素については、無細胞抽出液中の活性が弱いうえ、不安定であるため、十分な検討ができ

Table X. Transaminase Activity of Grude Extract

Amino donor	Activity*	Amino donor	Activity*
Alanine	1.1	Leucine	1.4
Aspartate	0.8	Lysine	1.0
Glutamate	0.6	Methionine	1.0
Glutamine	0.5	Threonine	0.8
Isoleucine	1.4	Valine	1.2

* Activity; L-phenylalanine formed (μ moles) per mg of protein per hr. Reaction mixture: 100 mM phenylpyruvate, 1 ml; 100 mM L-amino acid, 1 ml; pyridoxal phosphate (500 μ g/ml), 0.1 ml; crude extract (5 mg of protein/ml), 1 ml; 1/15 M phosphate buffer (pH, 7.8), 1.9 ml. After incubation for 2 hr at 30°C, L-phenylalanine formed was assayed.

なかった。

ii. トランスアミナーゼ活性: 各種アミノ酸をアミノ供与体とする KMBA との間のトランスアミナーゼ活性を、粗酵素液について測定した。結果は、Table X に示したとおりである。ロイシン、イソロイシン等がアミノ供与体としてすぐれていた。

考 察

Pseudomonas denitrificans IAM-1426 株を用いて、第1報⁽¹⁾、および第2報⁽¹⁰⁾で報告した L-メチオニン生産と同様に HPPA から、きわめて効率よく L-フェニールアラニンが生産されることを知った。L-メチオニンの場合には、基質の光学分割が不成功に終わったが、HPPA については D-体、L-体を得ることができた。L-フェニールアラニン生成速度が D-HPPA を用いたときと L-HPPA を用いた場合、異なる結果を得たが、L-メチオニンの生産についても同様の現象が起こっているものと考えられる。

大林ら⁽¹⁴⁾は乳酸の乳酸菌への透過性が、D-体と L-体で異なることを明らかにしている。*Ps. denitrificans* IAM-1426 株は菌体を用いた場合、D-HPPA に対する脱水素酵素活性は L-HPPA に対するその約 6 倍の活性を示すが、リゾチーム処理菌体を用いると両基質に対する脱水素酵素活性は、あまり差が認められない。このような結果より、L-HPPA の菌体内透過については、何らかの permeability barrier が存在することが推測される。

L-HPPA 脱水素酵素については顆粒分画に含まれ、NAD や NADP の関与しない、チトクローム系の関与

を示す脱水素酵素であることが推察される結果を得たが、D-HPPA 脱水素反応を触媒する酵素については、酵素が不安定であることもあずかり、十分検討することができなかった。

乳酸やマンデル酸に対しては、ラセマーゼの存在がすでに知られている。菌体と顆粒分画の D-および L-HPPA に対する酵素活性を利用して、菌体を持つかも知れないラセマーゼ活性を測定したが、採用した実験方法では検出することができなかった。

D-アミノ酸酸化酵素が D-2-ヒドロキシ酸酸化酵素活性をもつという直井⁽¹⁵⁾の報告があることから、乾燥菌体を用いて、D-フェニールアラニン酸化酵素活性を測定した。その結果、D-HPPA 脱水素酵素活性の約 5% 程度の活性を検出したに過ぎず、D-フェニールアラニン酸化酵素が D-HPPA 脱水素酵素の役割を演じているとは考えられない。脱水素酵素については、さらに酵素を精製して検討を行ないたい。

要 約

HPPA から L-フェニールアラニンを生産する菌株を検索し、*Pseudomonas denitrificans* G-132-13 および IAM-1426 株が強い活性をもつことを知った。

後者を用いて培養条件の検討を行ない、グルコース 4%, CSL 2.5%, 塩化アンモン 0.25%, HPPA 1.5%, pH 7.8 (アンモニアで調節)を生産培地組成と決定した。この培地を用いることにより、48 時間培養で 13.9 mg/ml の L-フェニールアラニンが生産された。

D-および L-HPPA の L-フェニールアラニンへの変換速度が異なるが、これは L-HPPA に対する菌体の膜 permeability barrier によるものと推測される。

L-HPPA 脱水素酵素は顆粒分画に存在し、電子受容体としてチトクローム系の関与が示唆されたが、D-HPPA 脱水素酵素については今後の検討課題である。

トランスアミネーションのアミノ供与体としてはロイシンやイソロイシンが適し、HPPA から L-フェニールアラニンの生産は脱水素によるフェニールビルビン酸の生成と、続くトランスアミネーションの 2 段階の酵素反応により成立していることが明らかになった。

終りにのぞみ、本研究に対し有益なご助言を賜った東京大学、有馬啓教授に深甚の謝意を表します。

また、発酵部門の研究にご協力いただいた当社主任研究員補、脇村淳氏、試料の合成でご協力いただいた当社茨木工場製造課長、宗像和雄氏、同じく秋山久雄氏に厚く感謝いたします。

- (1) 和田洪夫：農化，48，297 (1974)。
- (2) 朝井勇宜，相田 浩，大石邦夫：Amino Acids, 2, 114 (1960)。
- (3) 北井淳夫，喜多村敏，宮地 昇：ibid., 5, 61 (1962)。
- (4) 千畑 一郎，土佐 哲也，佐野隆二郎：Amino Acids and Nucleic Acids, 11, 163 (1965)。
- (5) 中山 清，佐藤善六，木下祝郎：農化，35，142 (1961)。
- (6) 宗像和雄，森山 勲：特公昭 40-12785 (日本特許第 459529)。
- (7) I. Heiborn and H.M. Bunburg: Dictionary of Organic Compounds, II, 772。
- (8) M. Winitz, L.B. Frankenthal, N. Izumiya, S.M. Birnbaum, C.G. Baker and J.P. Greenstein: J. Am. Chem. Soc., 78, 2423 (1956)。
- (9) R.M. Herbst and D. Shemin: Org. Syn., Coll. Vol. II, 1961, p. 519。
- (10) 和田洪夫：農化，48，303 (1974)。
- (11) H.R. Kaback: Methods in Enzymology, XXII, 102 (1971)。
- (12) G.D. Hegeman: J. Bacteriol., 91, 1140 (1966)。
- (13) J. DeLey and J. Schel: Biochim. Biophys. Acta, 35, 154 (1959)。
- (14) 大林 晃，岩野貞雄，北原覚雄：農化，34，16 (1960)。
- (15) 直井 信：生化学，37，173 (1965)。

〔追記〕本研究に用いた *Pseudomonas denitrificans* IAM 1426 株は、昭和 37 年駒形和男博士（味の素株式会社中央研究所，現在東京大学応用微生物研究所）よりご恵与いただいた。同博士に厚く感謝いたします。

なお、*Pseudomonas denitrificans* IAM 1426 株は同博士らにより再同定が行なわれ、その結果 *Alcaligenes faecalis* IAM 1426 と改められている。著者の不注意をお詫びし、同博士をはじめ関係各位にご迷惑をおかけしたことを深謝いたします。