L-リジン製造法の進歩

中山 清*

Development of L-Lysine Production Technologies

Kiyoshi NAKAYAMA*

The lack of L-lysine, an essential amino acid, in cereals provoked many studies on L-lysine production by both chemical synthesis and microbial method. However, the production of L-lysine in a large scale had to wait until 1958, when the fermentation process using a auxotrophic mutant of *Corynebacterium glutamicum* was established by Kyowa Hakko Kogyo Co.. Recently another fermentation process using a regulatory mutant of *Brevibacterium flavum* was developed by Ajinomoto Co.. Now the both processes have been further improved and are being used for the industrial production, which reached to 10,000~20,000 tons per year. The amount apt to change depending on the change of the production of soybean meal and fish meal. Very recently, third industrial process was developed by Torey Co.. In the process, racemic α -amino caprolactum synthesized from cyclohexene is converted into L-lysine by the combined action of L-aminocaprolactum hydrolase and aminocaprolactum racemase.

はじめに

L-リジンは小麦、米などの穀類その他の植物性蛋白質に不足している必須アミノ酸であり、今日および将来の食糧および飼料問題を考えるとき、L-リジンの生産の意義はきわめて大きい。L-リジンは家畜にとっても必要なアミノ酸の一つであり、飼料の蛋白源である穀類にはL-リジンがもっとも不足しているため、L-リジンの添加が飼料効率を著しく増大する。現在、世界的な肉の消費量の増大と、従来の添加剤である魚粉の生産量の低下が、飼料添加剤としてのL-リジンの需要の急速な増大を招いている。

L-リジンの大量生産は協和醗酵工業において、著者らの発明になるL-リジン醗酵法が企業化されたことに始まる。それ以前は、たとえば屠殺場でえられる血液蛋白のような蛋白の加水分解や合成によって少量が試薬用

などのためにつくられていたにすぎず、リジン醗酵開発当時（昭和33年）、国内の生産量は10t程度にすぎなかった。1965年頃から生産量は増加の一途を辿り、1973年のわが国のL-リジン生産量は約2万tに達した。協和の技術は米国 Merck 社、フランス Rhone Poulenc 社に技術輸出されたが、現在では世界の生産量のほとんど全部をわが国で占めており、製品の90%以上が輸出されている。これは生産技術の進歩による価格低下が飼料添加剤としての需要を喚起したためである。価格低下により、今日ではリジンイソシアネートから耐候性にすぐれた自動車塗料の原料となるポリウレタンをつくる技術¹⁾なども開発されている。

以下、まず工業化に至らなかったリジン生産の研究の進展を顧みたと、工業的製法を解説することにした。特に本誌の読者層を考えて醗酵の手法その他についてはなるべくわかり易く述べてみたい。

1. リジン製造法の研究の進展

1.1. 合成法 小麦を主食とする諸外国でもリジン潜在需要は早くから注目され、その生産法の開発には大

* 協和醗酵工業（株）東京研究所（XXXXXXXXXX）

* Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.（XXXXXXXXXX）

きな努力が払われた。合成法では、ナイロン原料であるカプロラクタムを出発原料として DL-リジンを合成する方法 (オランダ, Stamicarbon 社, 収率 70~90%)²⁾, フルフラールから得られるジヒドロピランを原料とする方法 (米国, Du Pont 社)³⁾, シクロヘキサノンからの

シラーゼにより不斉加水分解し L 型の α -アセチルのみを加水分解して L-体をえ, これを加水分解して L-リジンを得る方法などがその一例である。

変わったところでは, フルフラールから得られる 2-エトキシ-3,4-ジヒドロピランからジアミノピメリン酸

Fig. 1 Representative processes of lysine synthesis.

方法 (Food Machinery & Chemical Corp., 収率 DL-体として 63%)⁴⁾ など多くの方法が発表されている (図 1)。

これらの合成法ではいずれもラセミ型の DL-リジンが得られるので, 中間体の段階または最後に光学分割を必要がある。これには物理化学的方法と酵素法があり, 前者はジアステレオマー法と一般に呼ばれる方法で, L-グルタミン酸⁵⁾ や L-ピロリドンカルボン酸 (リジン⁶⁾ またはアミノカプロラクタム⁷⁾ で) を分割剤とする方法などがある。酵素法では, 合成法 の 中 間 体, ベンゾイル-DL-リジンをアセチル化した ϵ -ベンゾイル- α -アセチル-DL-リジンを糸状菌から得たア

Fig. 2 Chemical synthesis of lysine through diaminopimelic acid.

(DAP) を合成し、メソ-DAPの脱炭酸を微生物を用いて行って、残る DL-DAP のエピメリゼーションを行って脱炭酸工程へまわすという方法が発表されている⁹⁾ (図2)。また、DL- α -アミノカプロラクタムを *Aspergillus ustus* を用いて L-体のみを加水分解し、D-体はラセミ化してリサイクルする方法も発表されている⁹⁾。エピメリゼーションは特定条件での加熱、レジン処理などによる。アミノ酸のヒダントインが温和な条件でラセミ化しやすいことに着目して、ヒダントインの段階の不斉加水分解を微生物による方法も特許されている^{10,11)}。

光学分割は L-アミノ酸合成における最大の難所であり、光学純度、収率および経済性の三拍子揃った方法をつくりだすことは至難の業である。多くの L-アミノ酸合成法の研究はここで挫折している。Stamicarbon 社のカプロラクタムからの L-リジン合成も大規模の工業化が計画されながら遂に実現されなかった。後述の福村らにより開発された東レ法では、ラセミ化も微生物で行い、しかもラセミ化と不斉加水分解を2つの酵素源を組合せて同時に行える点に特徴があり、その収率が良好なことと光学純度の高いことから実際的な方法として完成されたものである。ごく最近 Allied Chemical 社の Sifiniades ら¹²⁾は、アミノカプロラクタム・塩化ニッケル複合体の分割とラセミ化を同時に一段で行うプロセスにより 100

%純度の L-リジンをうる方法を発表した。

1.2. 発酵法 醗酵法による L-リジン生産の研究は、1950年代の後半にカナダ、米国、日本の少くも4グループ以上により行われたとみられる。

カナダでは、Prairie Research Laboratory で微生物による必須アミノ酸の生産とその飼料への利用の研究が企てられ、*Gliocladium* の1株と *Ustilago maydis* が選択されて培養条件が検討され、それぞれ 400 μg および 700~800 $\mu\text{g/ml}$ のリジン生成が認められた¹³⁾。一方、米国の NRRL の研究者たちは、微生物菌体に必須アミノ酸の供給源を求めんとし、微生物の菌体のアミノ酸組成を研究した。微生物菌体の生産は今日飼料、蛋白源として脚光を浴びていることは周知のとおりである。

微生物の L-リジン生合成経路は 1950 年頃かしだいに解明されてきた。微生物のリジン生合成経路はほかのアミノ酸生合成経路と異なり、2つの形式がある。細菌放線菌、らん藻、*Phycomycetes* の一部および原虫ではジアミノピメリン酸を経る経路 (DAP 経路) が明らかにされた (図3)。高等植物も DAP 経路による。酵母、カビおよび *Phycomycetes* の一部、藻類の一部 (*E. nglena*) では、 α -アミノアジピン酸 (AAA) を経る経路 (AAA 経路) (図4) により合成される。AAA 経路の解明過程で、志村ら¹⁴⁾、Broquist ら^{15,16)}は、酵母を

Fig. 3. DAP pathway of lysine biosynthesis.

Fig. 4 α-Aminoadipate pathway of lysine biosynthesis.

AAA, α-ケトアジピン酸または α-ヒドロキシアジピン酸を加えた培地に培養するとき、多量の L-リジンを菌体内に遊離の形で生成蓄積することを見いだした。この変換は、*Saccharomyces cerevisiae*, *Torula utilis* などの種々の酵母で認められ、L-リジンの菌体中の含量は 20% に達し、基質からの転換率は 60~83% におよんだ。

これらの研究と同じ頃、du Pont 社では大腸菌のリジン要求変異株¹⁷⁾またはリジンとヒスチジンの両方を生育に必要とする変異株^{18,19)}を用いて DAP をつくり、それを *Aerobacter aerogenes* または野生型の大腸菌のもつ DAP 脱炭酸酵素により脱炭酸して L-リジンとする方法を開発した。DAP の収量は 24 g/l にも達したが 2 段階である不利を免れず、以下に述べる著者らの直接法 (1 段階法) の出現により遂に工業化されなかった。

2. 工業的製造法

2.1. 醗酵法

2.1.1. 栄養要求変異株を用いる方法 炭水化物から醗酵法により直接 L-リジンを生産する方法は著者ら^{19,20)}により 1958 年開発された。これはグルタミン酸生産

菌として発見分離された *Corynebacterium glutamicum* (異名, *Micrococcus glutamicus*) の栄養要求性変異株を用いるもので、中でもホモセリンの合成の段階の酵素反応がブロックされた変異株を培養すると培地に加えた糖質の約 30% の収量で L-リジンを生産することの発見に基いている。他の菌種 (たとえば *Bacillus*) でもホモセリン (またはスレオニン+メチオニン) 要求性変異株が L-リジンを生成することが明らかにされて広い特許が協和醗酵に与えられた。

グルタミン酸生産菌から人工変異により誘導した L-リジン生産菌株 (ホモセリン要求変異株) を用いる L-リジンの醗酵生産のプロセスをやや詳しく説明しよう。原料としては、甘蔗廃糖蜜が一般にもっとも安価な炭素源として用いられるが、他の炭水化物原料、酢酸、エタノールなども使用できる。培養の間、培地の pH を中性付近にアンモニアまたは尿素を培養液にフィードすることにより保つ。これらの窒素化合物は同時に窒素源となるわけである。尿素は使用菌のもつウレアーゼにより加水分解されてアンモニアとなり、培地の中和、および窒素源として働く。2 kL 規模の醗酵槽 (今日実際は 200 kL 以上の大型タンクが使われている) を用いた例を説明す

る。第1次種培養の培地として、2% グルコース、1% ペプトン、0.5% 肉エキス、0.25% 塩化ナトリウムをふくんだものを用い、第2次種培養の培地は、5% (糖換算) 甘蔗廃糖蜜、2% 硫酸アンモニウム、5% コーンステープリカーおよび1% 炭酸カルシウムを含むものを用いる。凍結乾燥されて保存されている使用菌は、寒天培地(試験管中)に植えられて一夜生育後、内容が第1次種培養培地(フラスコ中)に移されて培養され、次に第2次種培養へと培養規模がスケールアップされていき、最終的に本醗酵のタンクに植菌される。醗酵培地は20% (糖換算) 甘蔗廃糖蜜と大豆粕加水分解液(たとえば6Nの硫酸で分解しアンモニア中和)1.8% (分解前的大豆粕の重量換算)をふくむ。培養は菌の増殖のため滅菌した空気を吹込みながら、また攪拌しながら28°Cで行うと図5に示したような経過により、60時間の培養で培

Fig. 5. Time course of lysine fermentation. ○—○, L-lysine; △—△, residual sugar; ×—×, cells.

養液の中に44 g/lのリジンが生成する。ここで大豆粕分解液は菌の生育に必要なスレオニンとメチオニンを供給し、また中和に用いたアンモニアが窒素源となるわけである。使用菌は生育にビオチンも必要とするが、糖蜜中のビオチンだけで充分間に合う。しかし、ビオチン含量の少ない原料、たとえば甜菜糖蜜とか、でん粉加水分解物などを用いるときはビオチンを添加する必要がある。

今日では後に述べるように、ホモセリン要求性の変異だけでなく、他の変異を加えてさらに改良された菌株が用いられている。L-リジンの収量は最初加えた糖に対し、リジン塩酸塩として30~40%がえられる。

ここで親株のグルタミン酸生産菌が変異株となることによりなぜグルタミン酸をつくらずにリジンをつくる

のかを説明しよう。

親株はビオチンを制限したり、あるいはペニシリンを培養中途に加えたりする方法で細胞膜がグルタミン酸を

Fig. 6. Regulation of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*.

—→, Feedback inhibition; - - - ○ repression.

細胞外へ出やすくしたときに培養液中にグルタミン酸を大量生成する菌であり、このような培養上のコントロールを行わないでビオチンを充分含んだ培地で培養するとアミノ酸は蓄積しない。このようないわゆるコリネ形のグルタミン酸生産菌のL-リジン生成は図6に示したようなフィードバック調節のメカニズムで制御されていて、リジンが過剰につくられるという細菌にとっての不経済が避けられている。生体にとって重要な物質の合成はこのような、細胞の生長、増殖に不経済な過剰の合成を制御するメカニズムがあって、正常な菌を培地に培養しても生体にとって重要なアミノ酸などは細胞外にはでてこないわけである。このようなメカニズムを代謝制御あるいは生合成調節と呼んでいる。これにはいろいろのやり方があるが、もっとも重要なのは、アミノ酸のような一つの生合成の道筋(代謝経路)の最終産物が過剰にできると、その濃度増加が信号となって代謝経路の最初の方の酵素反応を阻害(フィードバック阻害あるいは末端産物阻害)するか、あるいは酵素の生成を阻害(リプレッション、抑制)する方式である。たとえば前に述べた大腸菌のリジン要求株によるDAPの蓄積の場合、リジン生合成経路の最初の反応、すなわち、アスパラギン酸セミアルデヒド(ASA)とピルビン酸の縮合を触媒する酵素は、リジンの濃度が上昇すると、ある濃度以上で急激に強く阻害をうける特性をもっているいわゆるアロステリック酵素である。この酵素は普通の酵素が放物線型の飽和曲線を示すのに対してS字状の飽和曲線を示すのである(図7)。リジンの濃度が低い間は生合成が進むが、リジンの濃度が高くなると阻害が急激に働いてリジンの過剰生成を防いでいるわけである。ASAからリジンまでの反応段階は7つあるが、その中最初の反

Fig. 7 Effect of lysine and threonine on aspartate kinase

△, lysine; □, threonine; ●, lysine+threonine. (Shiio & Miyajima (1969))

応を触媒する酵素が調節酵素となっているわけで、最初の段階が調節されることも合理的といえる。リジンをつくらなくなった大腸菌（リジン要求変異株）を、生育に必要なリジンを低濃度に供給して培養すると、リジンのフィードバックがかからない状態で生育がおこり、ブロックされた反応の前の中間体である DAP が過剰に生成して蓄積してくる（図 8）。

Fig. 8 Release of feedback regulation in a lysine auxotrophic mutant of *Escherichia coli*.

(a: wild strain; b: lysine auxotroph)

1940年代では、このようなブロックによる中間体の蓄積は水の流れがせきとめられてたまるとい程度の考えであったが、このような単純な考えでは実際の大量生成を速度的、量的に説明できない。すなわちフィードバック阻害のかかっている正常な反応速度で計算しても説明できないのである。フィードバック調節の解除による反応速度の増大によってはじめて説明される。

さて話を本筋に戻して、グルタミン酸生産菌のホモセリン要求変異株のリジン蓄積を考えよう。親株（グル

タミン酸生産菌）のリジン生合成に関連した代謝制御は図 6 に示したようになっている。大腸菌の場合と違って、リジン合成経路の最初の反応、ASA とピルビン酸の縮合反応に対するリジンのフィードバック阻害はなく、リジンの合成は共通経路の最初の反応を触媒するアスパルトキナーゼという酵素に対するスレオニンとリジンの共存による阻害（協奏的フィードバック阻害）によって制御されている。リジン単独、スレオニン単独では阻害はなく、両者の共存によってはじめて阻害されるのである。リジンだけでフィードバック阻害がかかると、リジンの過剰でスレオニンの生成までがおさえられるという不合理が避けられていると考えられる。このようにして、正常な菌ではリジンが過剰に生成しないようになっている。

ホモセリン要求変異株は、ASA からのホモセリンの生成を触媒する酵素、ホモセリンデヒドロゲナーゼの活性がない（できなくなっている）か、非常に低くなったために生育にその後の物質、ホモセリンか、スレオニンとメチオニンの両方を培地に加えてやるが必要になった変異株である（このような、生育に既成の栄養物質を必要とする変異株を栄養要求性変異株という）。すなわち、生合成経路はホモセリンの前でブロックされ、スレオニンは自ら合成しないので、外から加えるスレオニンの濃度をしばってやればフィードバック阻害はかからないわけで、従ってアスパラギン酸からアスパルチルリン酸の生成は増大した速度で進み、リジンが生成蓄積してくるわけである。ここでスレオニン要求もリジンをつくるのではないかと考えられようが、まさにそのとおりである。ただし、スレオニン要求株ではホモセリンも生成してリジンの収量はホモセリン要求株に劣る。

2.1.2. アナログ抵抗性変異株を用いる方法 コリネ形グルタミン酸生産菌のリジン生合成の調節カニズムは上に述べたようなものであることが、著者ら²¹⁾により *C. glutamicum* で、また後に *Brevibacterium flavum* で椎尾ら²²⁾により明らかにされた。アスパルトキナーゼのような調節酵素が変異によりフィードバック阻害に対する感受性は失なって、しかも触媒機能は維持している形に変わることが大腸菌などで明らかにされ、そのような変異株の選別法として、アナログ抵抗性を利用する方法が数種のアミノ酸などで明らかにされていた²³⁾。そこでフィードバック阻害をうけなくなったアスパルトキナーゼをつくる変異株をリジンのアナログに対する抵抗性を利用して選択分離すれば、その変異株の中には高率にリジンをつくる変異株が期待される。

1970年にいたり、佐野、椎尾²⁴⁾は *B. flavum* の変異

株からスレオニンと 5-(β -アミノエチル)-L-システイン (AEC) の存在下でも生育する株としてリジン生産菌の分離に成功した。代表株 FA-3 は糖蜜培地 (糖 13%) で 32 g/l のリジン (塩酸塩) を生成した。

AEC (チアリジンともいう) は、L-リジンの構造アナログであって、フィードバック阻害ではリジンと同じ働きをする。すなわち、スレオニンとの共存でアスパルトキナーゼを阻害し、一方蛋白合成にはリジンの代用をしえないので、リジン (メチオニンやスレオニンも一ただしスレオニンは外から加えたスレオニンにより満足される) はつくられないので菌は生育しえないわけである。ところが変異株の中にはアスパルトキナーゼがフィードバック阻害に抵抗性に突然変異しているものがあって、そのような変異株はスレオニンと AEC の共存下にも生育してくるので、容易に選択分離することができる。アナログ抵抗性となるメカニズムには、フィードバック阻害に対する脱感作だけでなく、アナログが細胞の中に入らなくなる (透過性変異) とか、アナログをこわして不活化するようなこともあり、アナログ抵抗性株がすべてリジンを生産するわけにはいかぬが、アナログ抵抗性株を培養してみればリジンを生産する株は高率にみいだせるものである。このようにしてえられたリジン生産株のリジン生合成の調節はアスパルトキナーゼの段階が解除されて 図 9 のようになり、一方、スレオニンのホモセ

2.1.3. 栄養要求性とアナログ抵抗性を組合せた変異株を用いる方法 アナログ抵抗性により選抜できる調節メカニズムの変異した変異株 (調節変異株) では、栄養要求性がない利点があるが、生育 (すなわち蛋白合成) が多すぎるとリジンの収量は低下するので、生育をコントロールする工夫が必要である。一方、栄養要求性変異株を用いる方法では栄養源を添加する必要があり、またその添加量をコントロールする必要がある。このようなことから今日では、いずれの方向からの菌株改良も、リジン生産性の向上に細かく寄与する他の種類のアナログ耐性、薬剤耐性や、栄養要求性など種々の変異形質を加えて微細に改良された菌株が用いられているようで、これらに関して多数の特許が出願公告されている。また培養に抗生物質を添加して生育を抑制して、菌体増殖に消費される基質をリジン生成へ有効に向ける試み²⁹⁾がされている。

菌株改良の一例を示すと、*C. glutamicum* のホモセリン、ロイシン二重要求性でチアリジン抵抗性の株は糖蜜培地 (糖 10%) で 39.5 g/l のリジンを生成し、一方、ホモセリン、ロイシン二重要求性のみの形質の株では 34.5 g/l の収量であった。

リジン生産に寄与する多重の形質のついた菌株は、連続醗酵中でも復帰変異により生産性を失う危険性が低下しており、また、たとえば、ホモセリン要求株でも、スレオニン・アナログ抵抗性となった株は、培地中のスレオニン濃度の変動に対して生産が抵抗性となり、培地原料の差異による生産の変動がおこりにくくなっている²⁷⁾。要求性のみの場合でも、ホモセリンデヒドロゲナーゼとスレオニン、イソロイシン、メチオニンの各合成のいずれかと、二重にブロックされた変異株を用いて復帰変異の率を下げ醗酵での L-リジン収量を上げる方法が特許されている²⁸⁾。

2.1.4. 原料の転換 *C. glutamicum* や *B. flavum* のような、いわゆるコリネ形のグルタミン酸生産菌は、炭素源として、酢酸やエタノールも利用できるもので、これらを炭素

Fig. 9 Release of feedback regulation in a thialysine resistant mutant of *Brevibacterium flavum*.

リン・キナーゼおよびホモセリン・デヒドロゲナーゼに対するフィードバック阻害や、メチオニンのホモセリンデヒドロゲナーゼに対する抑制があって異常にスレオニンやメチオニンの合成されることは防がれているので、合成は専らリジンの方へと進んでリジンが大量に生成されてくるわけである。ホモセリン要求株の場合に比してリジンの収量がやや悪いようである。しかし、反面、栄養要求性がないので要求物質を加えてやる必要がない利点もある。

源として L-リジンをつくることもできる。もちろん、最適の菌株は選択によりえられ、瀬戸ら²⁹⁾は酢酸酸化菌として分離した菌 (*Corynebacterium acetophilum*) からホモセリン要求株としてリジン生産菌を誘導している。図 10 には *B. flavum* のホモセリン要求株 (リーキー型) で同時にスレオニン合成もブロックされた変異株を用いた、酢酸から L-リジン生産の例³⁰⁾を示した。培地は、0.7% 酢酸、0.2% リン酸第一カリ、0.04% 硫酸マグネシウム 7 水塩、0.001% 硫酸第一鉄 7 水塩、

Fig. 10 Fermentative production of L-lysine from acetic acid

○—○, L-lysine; △---△, residual acetic acid; ×····×, growth.

0.001% 硫酸マンガン4水塩, 3.5% の大豆蛋白分解物 3.0% のグルコース, 50 μg/l のビオチン, 40 μg/l のチアミン塩酸塩をふくむ pH 6.0 のものを使用する。この培地に植菌して, 33°C で培養を行い, 酢酸を含む溶液を培地の pH が 7.4 に保たれるよう自動的にフィードしていく。このフィード溶液は, 100 : 25 のモル比で酢酸アンモニウムを, また 3% のグルコースを含む液で酢酸としての濃度 60% のものを使用する。醗酵中に酢酸は消費されて 48 時間で L-リジン濃度は 75 g/l に達した。これは供給した酢酸とグルコースの重量に対し 29% の収率である。

n-パラフィンからの発酵法によるリジン製造のプロセスも数多く特許出願公告されているが, 実質的生産の

I. Chemical reaction

II. Enzymic reaction

Fig. 11 Lysine production by combination of chemical and enzymic reactions.

報文としては富田ら³¹⁾により ε-N-アセチルリジン 41 g/l とリジン 9 g/l の生成が *Corynebacterium hydrocarboclastus* のチアリジン抵抗性変異株で報告されているのみである。変わったところでは, 安息香酸からのリジン合成の特許も出願されている³²⁾。

2.2. 合成と酵素法の組合せ法 東レではシクロヘキセンが容易にえられるという事情から, その利用研究の1つとして L-リジン合成が取りあげられ, 図 11 に示すようなアミノカプロラクタムの新合成法が開発された。これと平行して光学分割が検討されたが, 物理化学的手段では満足すべき成果がえられなかった。そこで酵素法が着目された。すでに 1962 年に Seto³⁾ は DL-α-アミノ-ε-カプロラクタムからのリジン生産を研究し, *Aspergillus ustus* というカビがアミノカプロラクタムの L-型だけを加水分解して L-リジンに変換することを認め, 残る D-型をラセミ化後リサイクルする方法の特許をえている。しかし収量が低く満足すべきものでなかった。福村³³⁾は, L-アミノカプロラクタムを L-リジンに加水分解する微生物を検索し, *Cryptococcus laurentii*, *Candida humicola*, *Trichosporon cutaneum* などにその活性を認めた³⁴⁾。ついで D-アミノカプロラクタムをラセミ化する菌を検索し *Achromobacter obae* nov. sp., *A. cycloclastus*, *Alcaligenes faecalis*, *Flavobacterium arborescens* をえた³⁵⁾。

それぞれの代表菌である *Achromobacter obae* と *Cryptococcus laurentii* のラセミ化および加水分解の最適 pH は, それぞれ 8.0 および 9.0 ときわめて近く, pH 8.0 と 9.0 の間では両反応が同時に能率よく進行する。塩酸で pH 8.0 に調節した 10% DL-アミノカプロラクタム水溶液に *C. laurentii* のアセトン乾燥菌体 0.1 g と *A. obae* の凍結乾燥菌体 0.1 g を加えて 40°C でゆるく振とうして反応を続けると, 25 時間で基質の 99.8% が L-リジンに転換した。反応後モノ塩酸塩として分離したリジンの光学純度は 99.5% であった。細菌のラセミ化活性の持続時間は 30 時間以上, 酵母の反応液中の水解活性の持続時間は 100 時間以上であり, この酵素法が工業化の条件を備えているものと判断される。

C. laurentii は L-α-アミノ

カプロラクタム、グルコースおよび他の成分をふくむ培地中で誘導的に L-アミノカプロラクタム・ヒドロラーゼ³⁶⁾をつくり、*A. obae* は、D-および L- α -アミノカプロラクタムの何れを誘導源としてもアミノカプロラクタム・ラセマーゼ³⁷⁾をつくる³⁸⁾。

東レ法では、従来合成法の泣き所であった光学分割の問題が、新しい酵素法により見事解決されたわけであるが、 α -アミノカプロラクタムの製造コストは東レの場合のように特別の原料事情の有利な背景がないと、コスト的に発酵法よりやや不利であろう。しかし、発酵法の原料価格の変動、廃液処理コストなどから優劣は変化する可能性もないではない。発酵法が糖蜜の処理、リジンの精製法などについて新しい技術を生みだすこともこの問題の変化の要因となろう。

おわりに

L-リジンの発酵生産は、合理的意図によって変異手法により目的とする微生物を誘導して開発に成功した発酵生産の最初のものである。これを契機として、分子生物学的な微生物遺伝、代謝調節、生化学の知識に立って新しい発酵プロセスを開発することがアミノ酸、核酸関連物質の分野で成功をおさめて各種のアミノ酸、核酸関連物質が発酵法で生産されるようになった。

発酵生産の利点の一つは、酵素反応に基く、自然の不斉合成反応の利用であり、合成と発酵の有機的結合によって今後さらに新しい有用物質の工業生産プロセスが創成されることを願ってやまない。

(昭和51年7月28日受理)

文 献

- 1) I.D. ガーバー, R.A. ガッサー, D. ワッサーマン, 日特公, 昭 37-1668 (1964); 日特公 昭 42-8710 (1967); 日特公 昭 43-18559 (1968); 日特公 昭 43-1640 (1968)
- 2) N.V. Stamicarbon 社, 日特公 昭 37-7243 (1963); 日特公 昭 37-11108 (1962); 日特公 昭 38-22859 (1963); 日特公 昭 39-15842 (1964); 日特公 昭 44-15764 (1969)
- 3) A.O. Rogers, *USP* 2,564,647 (1951); *USP* 2,564,649 (1951)
- 4) A.F. Fries, F.E. Gould, G.S. Johnson, H.K. Latourette, H. Stange, *Chem. Ind. (London)*, **1959**, 996
- 5) M.C. Baker, N. Falls, *USP* 2,942,024 (1960)
- 6) J.E. Nelemans et al., *USP* 3,105,067 (1963)
- 7) C.M. Brenner et al., *USP* 3,275,615 (1958)
- 8) B. Gorton, J.N. Coken, H.P. Bowder, C.W. Defiebre, *Ind. Eng. Chem. Product Res. Devel.*, **2**, 308 (1963)
- 9) T.A. Seto, *USP* 3,056,729 (1962)
- 10) 中山清, 萩野浩志, 日特公 昭 45-8633 (1970)
- 11) 都河竜一郎, 奥村信二, 根来英二, 日特公 昭 42-13850 (1967)
- 12) S. Sifiniades, W. J. Boyle, J.F. Peppen, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 3738 (1976)
- 13) M. Richards, R.H. Haskins, *Can. J. Microbiol.*, **3**, 543 (1957)
- 14) 匂坂勝之助, 志村憲助, 農化, **31**, 110 (1957)
- 15) H.P. Broquist, A.V. Siffey, A.M. Albrecht, *Appl. Microbiol.*, **9**, 1 (1961)
- 16) A.L. Jensen, P. Shu, *Appl. Microbiol.*, **9**, 12 (1961)
- 17) L.E. Casida, *UPS* 2,771,396 (1956)
- 18) H.T. Huang, J.M. Griffin, J.H. Fried, *USP* 2,955,968 (1960)
- 19) S. Kinoshita, K. Nakayama, S. Kitada, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **4**, 128 (1958)
- 20) K. Nakayama, S. Kitada, S. Kinoshita, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **7**, 145 (1961)
- 21) K. Nakayama, H. Tanaka, H. Hagino, S. Kinoshita, *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 611 (1966)
- 22) I. Shio, R. Miyajima, *J. Biochem.*, **65**, 849 (1969)
- 23) 中山清, 発酵協会誌, **25**, 223 (1967)
- 24) K. Sano, I. Shio, *J. Gen. App. Microbiol.* **16** 373 (1970)
- 25) 吉原康彦, 戸坂修, 久保田浩二, 広瀬義夫, 昭50 発酵工学会, (昭50, 10月30日, 大阪) 要旨 p. 84
- 26) K. Nakayama, K. Araki, *UPS* 3,708,395 (1973)
- 27) K. Nakayama, *Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today.*, (Ed. G. Terui) *Soc. Ferment. Technol. Jpn.*, 433 (1972)
- 28) H.B. Woodruff, M. Jackson, *UPS* 3,524,797 (1970)
- 29) K. Seto, T. Harada, 発酵工学雑誌, **47**, 558 (1969)
- 30) K. Tanaka, T. Suzuki, S. Okumura, 5th *World Petroleum Congress, Proceeding*, No. 5, Applied Science Publ. Ltd., London, 165 (1971)
- 31) 富田房男, 鈴木武夫, 古屋晃, *Amino Acid and Nucleic Acid*, No. 32, 1 (1975)
- 32) K. Tanno, Y. Ikeno, *USP* 3,816,255 (1974)
- 33) 福村隆, 第23回アミノ酸核酸集談会シンポジウム, (昭49年12月2日) 要旨 p. 1
- 34) T. Fukumura, *USP* 3,770,585 (1973)
- 35) T. Fukumura, *USP* 3,796,632 (1974)
- 36) 福村隆, 日特公 昭 48-28678 (1973)
- 37) 福村隆, 日特公 昭 47-41555 (1972)
- 38) 佐藤英次, 川端康郎, 福村隆, 第23回アミノ酸核酸集談会シンポジウム, (昭49年12月2日) 要旨 p. 2