

## 341 フェニルピルビン酸からのフェニルアラニン生産

(協和醗酵・東京研・四日市研) 穴澤秀治, 荒木和美, 伊藤幸良, 尾関紀嗣

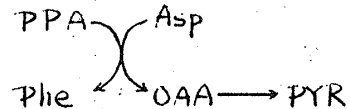
〔目的〕 フェニルピルビン酸 (PPA) は、フェニルアラニン (Phe) 生合成経路の最終の中間体であり、トランスアミナーゼ反応によって容易に Phe へ変換される。この PPA を用い、Phe 生産させる試みは、古くに行われていたが (1)、我々は、短時間に、高濃度の Phe を蓄積させ、さらに、基質である PPA の転換率を向上させる事を目的に、菌株の選抜、反応条件の検討を行った。

〔方法〕 菌の培養中に PPA を添加する方法 (フィード法)、培養・集菌した菌体を PPA を含む反応液へ懸濁する方法 (酵素法) の二つあり、Phe 生産を行なわせた。Phe 等のアミノ酸はペーパークロマトグラフィーで、有機酸は高速液体クロマトグラフィーで分析した。

〔結果〕 培養中に PPA を添加した時に、Phe を蓄積する微生物が、多種にわたって存在する事を見出した。その中から、高い Phe 蓄積を示した *Citrobacter freundii*、遺伝学的解析の進んでいる *E. coli*、生育量の高い *Corynebacterium glutamicum* を選び、フィード法による Phe 生産を行った。PPA を少量ずつ分割して添加することから、いずれの菌株においても、高濃度の Phe 蓄積が可能となった。*C. freundii* KY 3579 株が、24 時間で 17.2 g/l、PPA の転換率 94% の Phe を蓄積した。*E. coli* ATCC 11303 株が、78 時間で 21.7 g/l、転換率 79%、*C. glutamicum* ATCC 13032 株も 78 時間で 17.7 g/l、転換率 73% の Phe 生成を示した。さらに、*C. glutamicum* にフェニルアラニンアナログ耐性と付与した変異株を用い、糖源からの Phe 直接醗酵をさせる際に、PPA の添加により Phe 蓄積量を 25% 増加させることができた。しかし、いずれの場合も、PPA の添加により菌の生育が低下するため、適切なフィード量、時期を設定する必要がある。

PPA とグルタミン酸 (Glu) からピリドキサルリン酸 (PLP) を含む緩衝液中に菌体を懸濁した時にも、数多くの Phe 生成を示す菌株を見出した。やはり、*C. freundii* KY 3579 が高い Phe 生産能を示した。反応最適条件を検討したところ、アミノ基供与体としての Glu を PPA の 2 倍量、PLP 50 μM、40°C、pH 8.4 であり、この条件下で、24 時間で最高 89 g/l の Phe を蓄積した。反応の最初の 1 時間で 30 g/l、4 時間で 55 g/l と急速な Phe 生成を示し、最終的な PPA の転換率は 65~75% であった。(2)

Glu の代わりにアスパラギン酸 (Asp) をアミノ基供与体として用いると、PPA の転換率が著しく (90% 以上) 向上した。そこで、Asp と PPA より Phe を生成する菌株を検索したところ、再び、*C. freundii* KY 3579 株が選抜された。同様に、菌体懸濁液へ、PPA、その 2 倍量の Asp、PLP 50 μM を加え、最適反応条件 (pH 8.4、40°C) で 1 時間に 8 g/l、8 時間で 46 g/l の Phe が蓄積した。この時、PPA は残存せず、原料の転換率が高いことがわかった。また、副生することが予想されたオキサロ酢酸 (OAA) の代わりに、ピルビン酸 (PYR) が蓄積した。反応後に、OAA を予め加えておくと、Phe の生成が抑えられた。このことから、PPA の Phe への高い転換率は、反応生成物の一つである OAA が PYR へ分解されるため、反応平衡が Phe 生成へ傾いたことによると考えらる。



このように、トランスアミナーゼ反応を応用した本プロセスは、基質の転換率、反応速度、蓄積濃度とも優れ、副生するピルビン酸の利用も考えらる。可能性はさらに広がることと考へらる。

(1) T. Asai, K. Aida, K. Oishi; J. Gen. Appl. Microbiol., 5(3): 150 1959

(2) 穴澤, 荒木, 伊藤, 尾関; 昭和 59 年度 日本醗酵工学会要旨集 p 155

Phenylalanine Production from Phenylpyruvate

Hideharu ANAZAWA, Kazumi ARAKI, Yukiyoshi ITOH, Toshitsugu OZEKI

(Tokyo Research Laboratories, KYOWA HAKKO KOGYO Co. Ltd., Asahi-cho, Machida-shi, Tokyo 194)