

# アミノ酸発酵技術の系統化調査

2

Systematic Survey of the Technical Development of Fermentative Production of Amino acids

中森 茂 Shigeru Nakamori

## ■ 要旨

アミノ酸はタンパク質の構成成分で、20種あり、様々な生物学的あるいは化学的な機能が見出され、うま味調味料、医薬品、サプリメント、飼料添加物、化成品、化粧品など、多くの用途で活用されている。これらのアミノ酸は現在、タンパク質の加水分解法、化学合成法、発酵法で生産されているが、中心は発酵法である。この発酵法、つまり微生物を活用してアミノ酸を生産するアミノ酸発酵は、日本で生まれ、進歩をとげ、今や世界のアミノ酸市場の過半を生産する技術となった。本報告では、アミノ酸発酵の技術を系統化し、現在までの歴史を辿り、さらに今後の技術的な展開を展望した。

アミノ酸の中で世界で初めて商品化されたのはグルタミン酸ナトリウムである。明治41年（1908年）、池田菊苗によって、小麦のタンパク質、グルテンから製造する方法が発明され、鈴木三郎助によってうま味調味料（「味の素」）として発売された。この事業は多くの苦難を克服して成功したが、原料の確保と、高温の塩酸を使用するため、技術的には改良の必要があった。改良は化学合成と発酵の二つのアプローチから行われた。化学合成法によるグルタミン酸製法が確立され、工場での実生産も行われたが、合成法によるグルタミン酸は消費者には受け入れられなかった。一方、新しいグルタミン酸生産菌（*Corynebacterium glutamicum*）が協和発酵で発見され、初めて発酵法による生産に成功した。アミノ酸発酵の特徴は、グルコースなど安価な原料から、穏和な条件の反応で天然型のアミノ酸が作れることである。グルタミン酸に続いて、リジン、アスパラギン酸、スレオニンなど、15余品目のアミノ酸が発酵法で生産されている。アミノ酸発酵の技術は世界的に拡大され、アミノ酸生産量は増加の傾向をたどっている。中でもグルタミン酸ナトリウムは2005年には世界で170万トンになり、なお年率3~4%の増加が見込まれている。

アミノ酸発酵技術は、生産菌の育種、大量培養法、分離精製、およびエンジニアリングの4つの要素から構成されているが、この中で、基本をなすのが生産菌株の育種である。微生物の菌体内では、アミノ酸のような代謝物の生産を調節するメカニズム、つまり代謝制御が働いている。したがって、アミノ酸生産菌の育種とは、代謝制御を克服するための、生化学や遺伝学、あるいは新しい遺伝子工学などの科学の応用技術である。

代謝制御の打破・克服は、具体的には以下のような方法で達成された。グルタミン酸発酵は、*C. glutamicum*の特性に対応した培養法を確立することによって確立された。リジンやオルニチン発酵は、代謝制御作用のあるスレオニン、あるいはアルギニンの濃度を抑えるため、*C. glutamicum*からこれらのアミノ酸要求性変異株を誘導することによって開発された。スレオニン、リジン、トリプトファンなど多くの生産株は、アミノ酸のアナログ耐性株から採取する方法が開発された。一方、グルコース以外の安価な原料をアミノ酸に変換する酵素をもつ微生物を用いる、酵素法やバイオリクターによる生産法も開発された。さらに、新しい遺伝子工学の技術の応用によって、発酵法、酵素法ともに、生産株の改良や新しい発酵生産が登場した。

大量培養法は、抗生物質生産株の培養法をベースにして、アミノ酸生産のために改良された。発酵液からのアミノ酸類の単離・精製技術は、製品の品質を決定すると共に、この段階での収率がコストに大きく影響する重要な行程である。大量培養、大量精製に関わるエンジニアリングはコンピュータ制御によるシステム開発が確立されている。

このようにして、日本で開発された技術によるアミノ酸製造工場は世界中に拡大した。原料はデンプンや粗糖、あるいは糖蜜である。このため、原料依存度が高い、あるいは消費地が海外にあるアミノ酸であるグルタミン酸、リジン、スレオニン、などは大部分が海外の工場で生産されている。

アミノ酸製造は、清酒や醤油などの醸造工場と同じように、天然型の工程で行われている。さらに、環境調和型のシステム作りが行われている。また、穀物などの原料に不足するアミノ酸を家畜の飼料に添加することは排泄物からのアンモニアの排出を削減し、環境の改善に有用である。

アミノ酸の安全性について、1970年代に消費者運動の中で議論されたが、科学的に問題がないことが証明されている。しかしながら、この運動の“後遺症”とも言うべき安全性を問題にする現象は今も根強く残っている。

商品としてのアミノ酸については、アミノ酸に替わるものがないため、将来にわたって発展が続くと考えられる。今後は原料価格の上昇が最大の問題点で、安価な原料を確保している海外メーカーとの価格と技術の競争に勝つことが、本家日本技術陣の最大の課題である。このためには、遺伝情報と遺伝子技術を活用した生産を改良する菌株育種、新しい原料の開発とそれを利用できる菌株育種、環境を重視したプロセスの開発の重要度がさらに高まる。これらの技術開発が期待される。

さらにアミノ酸を原料にしてペプチドを微生物酵素を用いて合成する技術が最近開発された。医薬品など生理活性物としての利用拡大が期待される。

## ■ Abstract

Twenty kinds of amino acids are the building blocks of proteins. Many useful characteristics have been found in amino acids, and they are used as "umami" seasoning, medicines, feed-additives, chemicals, cosmetics, and so on.

Amino acids are now manufactured by three methods: extraction from acid-hydrolysates of various proteins, chemical synthesis, and fermentation. Among these, fermentation is dominant. Amino acid fermentations, in which microbes are used to produce amino acids, was conceived in Japan and has been developed with Japanese techniques. More than 70% of the world's supplies of amino acids are now manufactured by fermentation processes.

This report provides a systematic survey of amino acids fermentation techniques, tracing the history of the development and overviewing future prospects.

Monosodium glutamic acid (MSG), which was the first amino acid to be commercialized as a seasoning in 1908 under the brand name of "Ajinomoto" by S. Suzuki, the progenitor of Ajinomoto Co., on the basis of an invention by K. Ikeda, a professor at Tokyo Imperial University. This production process, extraction from wheat and soybean proteins, continued successfully for about 50 years. However, the process had drawbacks: the high cost of raw materials and the problems of using hot hydrochloric acid in the manufacturing facilities. New approaches were searched for from the direction of both chemical synthesis and fermentation. However, the concept of producing glutamic acid by chemical synthesis was not accepted by consumers. The first successful fermentative production of glutamic acid was achieved by Kyowa Hakko in 1957, by finding a novel glutamate-producing bacterium, *Corynebacterium glutamicum*, and establishing culturing methods.

Producers of the other 15 amino acids beside glutamic acid were successfully bred by deriving auxotrophic mutants and analog-resistant mutants, and production was expanded to the industrial scale.

Techniques in fermentation are made up of four parts: breeding of producing strains, large-scale culturing, isolation and purification of amino acids from culture liquids, and plant engineering. Among these, the breeding of strains is the most important and fundamental technique. Wild type bacteria have intracellular metabolic regulation mechanisms for preventing over-production of essential metabolites such as amino acids, so the breeding of strains involves deregulating these mechanisms through the application of scientific information from biochemistry, genetics, and genetic engineering techniques.

Deregulated production achievements include the following. Glutamic acid fermentation was accomplished by culturing *C. glutamicum* under optimum conditions corresponding to its characteristics. Producers of the other 15 amino acid were derived as auxotrophic mutants and amino acid-analog resistant mutants, as mentioned above, from *C. glutamicum*, *E. coli*, *S. marcescens*, and so on. Another approach for amino acid production is the enzymatic conversion to amino acids of cheaply available materials, such as intermediates of the chemical synthesis of amino acids. Bioreactors, which contain immobilized enzymes and/or enzyme-containing bacterial cells as catalysts, have been used for long-term production with stable and repeated uses.

Breeding methods have been improved drastically by recombinant DNA techniques, which appeared in the 1970' and provided tools for the isolation, amplification, and modification of DNA. As a result, enzymes of amino acid synthesis could be changed for better production of amino acids. A genetically improved high producer of threonine was constructed by amplifying threonine-producing enzymes, and industrialized.

Large-scale cultures for amino acid production were established by modelling the techniques developed for the production of antibiotics. The productivity of amino acids was improved by supplying a high concentration of oxygen to the culture medium, by using fed-batch cultures, and so on.

The isolation and purification of amino acids accumulated in culture liquids are important steps that determine the quality and final cost of amino acids. Plant engineering for large-scale cultures and purification processes are controlled by computer-control systems.

Starch, crude sugar, and molasses are the raw materials for amino acid fermentation. In these processes, a major portion of the cost of amino acids is the price of raw materials. Thus, amino acid plants have been constructed mainly in areas, where raw materials are produced, all over the world except in Africa and Oceania. As a result, the amounts of amino acids produced in domestic plants have been reduced rapidly. The amount of amino acids produced is increasing steadily. Among them, the world supply of MSG was estimated to reach 1.7 million tons in 2005.

Fermentation processes are harmonious with the environment, like the brewing processes of "sake" and soy sauce. In the MSG plants of Ajinomoto Co. of Indonesia and Brazil, waste waters, which contains bacterial cells, ions of ammonia, potassium, and phosphate, and some minerals, are recycled on farms that produce sugar cane, coffee, and so on, as a good fertilizer.

The supplementation of amino acids, which are deficient in cereals for domestic animals, improves the amino acid balance of feeds, enabling a reduction in the release of ammonia in excrement, and reducing pollution of the atmosphere, rivers, and lakes.

In around 1970, the safety problem of amino acids arose in consumer's movements. However, the FDA concluded that all the amino acids were safe compounds, judging from many scientific demonstrations, and fair and open discussions.

Demand for amino acid will continue to increase in the future, because alternatives to them cannot be found.

A big problem, nowadays and in the future, is the rise of raw material prices, especially in competition with materials for bioethanol. Therefore, the most important subject for Japan, as a progenitor, is making use of advanced techniques to overcome foreign competitors, who have secured cheaper raw materials. For this purpose, the construction of novel producer strains having the highest yields are expected to improve metabolic flows to amino acids through the application of genetic informations and genetic techniques. It should also lead to the construction of new strains that can produce amino acids effectively from raw materials, such as biomasses, methanol, and CO<sub>2</sub>, which are not in competition with bioethanol and materials for foods.

Novel techniques for the production of peptides have been reported recently. As peptides are prepared from amino acids, the science and technology of peptides will be ranked as an extended field of amino acid fermentation. In the near future, new and big developments for peptides may be expected for physiologically active substances such as hormones.

## ■ Profile

中森 茂 Shigeru Nakamori

国立科学博物館産業技術史資料情報センター主任調査員

昭和15年9月生

昭和38(1963)年3月 京都大学農学部農芸化学科卒業

同年4月 味の素(株)入社

昭和50年1月 農学博士

平成5(1993)年3月 同社 退職

同年4月 福井県立大学生物資源学部教授

平成18年6月 同学 名誉教授

## ■ Contents

1. はじめに .....	55
2. アミノ酸について .....	56
3. アミノ酸発酵誕生の背景にあったもの .....	61
4. アミノ酸発酵の誕生 —アミノ酸生産菌のスクリーニングと菌株育種— .....	64
5. 培養技術の進展と培養装置 .....	76
6. アミノ酸の分離・精製技術の開発 .....	78
7. アミノ酸の規格 .....	80
8. アミノ酸発酵の主原料 .....	81
9. アミノ酸発酵技術の海外展開 .....	82
10. アミノ酸と環境問題 .....	84
11. アミノ酸の安全性について .....	85
12. アミノ酸発酵技術の系統化 .....	87
13. 今後の展開 .....	89
14. 謝辞 .....	91

# 1 | はじめに

---

アミノ酸はタンパク質の構成成分である。単体としても多くの有用な機能があり、うま味調味料、栄養成分として医薬品、動物用飼料添加物など、世界的に人間の福祉のために広く活用されている。最近のマスコミ等でも取り上げられるようになって、アミノ酸は一般の人々にもなじみのものになってきたが、アミノ酸に関連する技術、特に生産技術の中で中核をなす発酵法は日本で生まれ、日本の技術によって世界の生産量の過半を占めるまで成長し、産業としても世界をリードしていることはあまり知られていない。アミノ酸の機能は他の物質では代替出来ない。したがって今後、さらなる需要の増加は必至であり、産業としての発展が期待される。アミノ酸発酵が日本で誕生して50年が

経過したこの時期に、その誕生から今日までの発展を振り返り、今後の展開を展望することは意義深いことである。

本報告では、2章でアミノ酸とはどのような物質であり、どのような機能があって、どのように活用されているか、製法の変遷、生産量の推移、および本報告のメインテーマであるアミノ酸発酵技術の概略について述べ、3章では日本でアミノ酸発酵が生まれた背景にはどのような要因があったかを記す。4章以降ではアミノ酸発酵の4つの基本技術、すなわち、生産菌株のスクリーニングと育種、大量培養、分離・精製、およびエンジニアリング、の歴史と現状、技術の系統化、さらに今後の課題と展望について考察する。

# 2 | アミノ酸について

## 2.1 アミノ酸とはどのような物質か

アミノ酸とは、同じ分子の中に、アミノ基（ $-\text{NH}_2$ ）とカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）をもつ化合物の総称である。アミノ基とカルボキシル基の結合する炭素の位置によって、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、などのアミノ酸が存在する（図2.1）が、通常最も広く、あらゆる生物がもっているタンパク質の構成成分として存在するのは、 $\alpha$ -アミノ酸である。本報告ではこの $\alpha$ -アミノ酸について記述する（ $\beta$ -、 $\gamma$ -アミノ酸等については、現段階では量的な展開もないことから、特に触れない）。

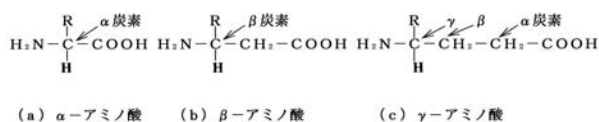


図2.1  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -アミノ酸の構造式

アミノ基の結合位置の違いによって構造が異なる。Rは側鎖で、原子団あるいは水素原子を示す。

タンパク質を構成する成分が $\alpha$ -アミノ酸であり、化学式は図2.1 (a) のように表示され、Rの違いによって通常のタンパク質に含まれるアミノ酸は20種類である。それらの名称、略号、1文字表記、構造式、分子式および分子量を表2.1に示した。これらの内、イソロイシン、スレオニン、トリプトファン、メチオニン、フェニルアラニン、バリン、リジン、ロイシンは、ヒトは自分で合成できないため、必須アミノ酸と呼ばれている。

生体内ではこれらのアミノ酸は遊離の状態で存在するものは少なく、図2.2に示すように、1つのアミノ酸のアミノ基と、別のアミノ酸のカルボキシル基が脱水縮合したペプチド結合によってつながった高分子のタンパク質として存在する。タンパク質は筋肉、血液、骨、皮膚、爪などの生体の組織とともに、調節物質であるホルモンや生体触媒である酵素を構成し、生命機能に必須の成分であることはよく知られているところである。タンパク質は、たとえば塩酸やタンパク質分解酵素によって処理すると、ペプチド結合が加水分解されてアミノ酸になる（図2.2）。実際、動物の胃や小腸などの消化管の中では、食餌として摂取されたタンパク質がペプシン、トリプシン、キモトリプシンなどのタンパク質分解酵素によって分解される。その結果、生成するそれぞれのアミノ酸は、その動物に必要な固

有のタンパク質に再構成されるのである。

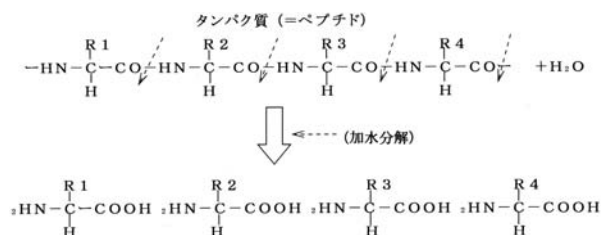


図2.2 タンパク質（＝ペプチド）の加水分解によるアミノ酸の生成

矢印（ $\swarrow$ ）の位置でペプチド結合が切断されることを示す。

タンパク質を反応容器の中で塩酸や酵素で処理して得られる分解液には、理論的には20種のアミノ酸が含まれているから、これらを分離して精製すれば、それぞれのアミノ酸が得られる。これらは白い結晶（あるいは粉末状態）で、外観だけからは、それぞれを区別することは難しいが、顕微鏡で観察すれば、それぞれ特徴的な結晶が見られる。ここでは代表として、グルタミン酸とリジンの結晶写真を示す（図2.3）。



図2.3 (1) グルタミン酸（ $\alpha$ 形）結晶写真（味の素株式会社提供）

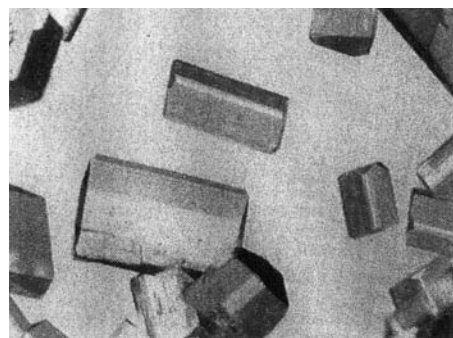


図2.3 (2) リジン塩酸塩の結晶写真（味の素株式会社提供）

アミノ酸のアミノ基、カルボキシル基、およびR（原子団、あるいは水素原子）のように、4つの異なる

表2.1 タンパク質系アミノ酸の分類、表記、化学構造、分子式および分子量

分類	名称	略号	化学構造	分子式	分子量	
中性アミノ酸	脂肪族アミノ酸	グリシン	Gly (G)	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	75.07
		アラニン	Ala (A)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	89.09
		バリン	Val (V)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3\text{-CH-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$	117.15
		ロイシン	Leu (L)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3\text{-CH-CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	131.18
		イソロイシン	Ile (I)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{-CH-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	131.18
	ヒドロキシ アミノ酸	セリン	Ser (S)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_3$	105.09
		スレオニン	Thr (T)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-CH-COOH} \\   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$	119.12
	含硫アミノ酸	システイン	CysH (C)	$\begin{array}{c} \text{HS-CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$	121.15
		シスチン	Cys (CC)	$\begin{array}{c} \text{S-CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \quad   \\ \text{NH}_2 \\ \text{S-CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$	240.30
		メチオニン	Met (M)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$	149.21
	中性アミノ酸	芳香族アミノ酸	フェニル アラニン	Phe (F)	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_2$
チロシン			Tyr (Y)	$\begin{array}{c} \text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$	181.19
トリプトファン			Trp (W)	$\begin{array}{c} \text{C}_8\text{H}_7\text{-CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	204.23
イミノ酸		プロリン	Pro (P)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-CH}_2 \\   \quad   \\ \text{CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH} \end{array}$	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$	115.13
		ヒドロキシ プロリン	Hyp (-)	$\begin{array}{c} \text{HO-CH-CH}_2 \\   \quad   \\ \text{CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH} \end{array}$	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3$	131.13
酸性アミノ酸 アミド		アスパラギン	Asn (B)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{NOC-CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$	132.12
	グルタミン	Gln (Z)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{NOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3$	146.15	
酸性アミノ酸	アスパラギン酸	Asp (D)	$\begin{array}{c} \text{HOOC-CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$	133.10	
	グルタミン酸	Glu (E)	$\begin{array}{c} \text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	147.13	
塩基性アミノ酸	リジン	Lys (K)	$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{NH}_2$	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$	146.19	
	ヒスチジン	His (H)	$\begin{array}{c} \text{HC-C-CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \quad   \\ \text{N} \quad \text{NH} \quad \text{NH}_2 \\    \\ \text{CH} \end{array}$	$\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$	155.16	
	アルギニン	Arg (R)	$\begin{array}{c} \text{NH} \\   \\ \text{H}_2\text{N-C-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH-COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$	174.20	

原子団が結合している炭素原子は、不斉炭素原子と呼ばれる。アミノ酸のような不斉炭素をもつ化合物は、偏光を当てると一定の角度、左あるいは右に偏光面が回転する。一方をL体、他方をD体と呼ぶが、タンパク質に含まれる天然のアミノ酸はすべてL体である。

本報告の主題である発酵法によって生産されるアミノ酸はすべてL体である。本稿では原則としてL体アミノ酸の話題を中心とするが、限られた用途ではあるが、D体アミノ酸も登場する。一方、化学合成法で得られるアミノ酸は、光学異性体であるDとL体が等量混合したDL体（あるいはラセミ体）である。DL体から生物活性のあるL体を得るためには光学分割の工程が必要である。最近、量は少ないがD体アミノ酸が脳内などで発見され、それらの存在意義や機能などが明らかにされつつあるが、まだ量的な展開はないので、本報告では触れない。

## 2.2 アミノ酸にはどのような機能があり、どのように利用されているか

アミノ酸は生体内ではこのようにタンパク質の構成成分として重要な役割を果たしているが、生体外ではどのような機能があるのか、つまり、どのような利用価値があるのか。この利用価値がすなわち、アミノ酸の商品としての価値を示すものである。

アミノ酸が商品として最初に開発されたのは、グルタミン酸ナトリウム（Monosodium glutamate：MSG）である。東京帝大理学部教授であった池田菊苗によって昆布のうま味成分として発見され、小麦グルテンからの製造法が発明され<sup>①</sup>、味の素株式会社（以下味の素社）から「味の素」として発売されたもので、今日も大きな商品として世界中で使用されている。グルタミン酸とともに副生するほかのアミノ酸は、当初は特に注目されるものではなかったが、その後の栄養学、医学等の進展とともに様々な機能が見出されてその重要性が認識され、現在では以下に示すような用途が開発され、さらに拡大されつつある。このような用途に対応するために、グルタミン酸とともに、これらのアミノ酸の安価な製法開発がもとめられる所以がある。

アミノ酸の利用は機能別に大きく以下の4つに分類される<sup>②</sup>。

### 1) 呈味成分としての利用

アミノ酸は、それぞれ特有の味を示す。その代表例がMSGであり、うま味調味料として大量生産されている。ほかにグリシンやアラニンは甘み、バリンやイソロイシンは苦みを示す。アミノ酸の混合物も調味料

として活用されている。さらに、フェニルアラニンのメチルエステルとアスパラギン酸から構成されるジペプチドであるアスパルテームが低カロリーの甘味料として開発された。

### 2) 栄養成分としての利用

アミノ酸は栄養成分である。アミノ酸輸液や経腸栄養剤は、血漿、卵、人乳などのタンパク質のアミノ酸組成に合わせ、有効なアミノ酸類を組み合わせることで調合した医薬品で、手術前後の患者への栄養補給、疲労回復、強壮などのために使用されている。さらに、健康食品、スポーツ栄養食品、サプリメント、などの栄養強化あるいは食品添加物として、また、化粧品にも利用されている。一方、豚や鶏などの家畜用穀物飼料のタンパク質の栄養改善、動物細胞培養用培地成分、微生物酵素生産用培地成分など、多くの用途が開発されている。これらはアミノ酸単体としてよりも、有効なアミノ酸類を組み合わせる形で利用されている。

### 3) 薬理機能の利用

アミノ酸はまた、特有の薬理機能を示し、肝疾患治療薬（イソロイシン、バリン、ロイシン、アルギニンなど）、消化器潰瘍薬（グルタミン）、パーキンソン病治療薬（ジオキシフェニルアラニン）、気道粘液溶解剤（システイン）など医薬品の成分として利用されている。

### 4) アミノ酸の反応性の利用

アミノ酸はまた化合物として特有の反応性を示し、次のような用途に使用されている。糖尿病薬（D-フェニルアラニン）、血圧降下剤（ヒドロキシプロリン、バリン）、抗ウイルス剤（バリン）、抗生物質（D-フェニルグリシン、D-p-ヒドロキシフェニルグリシン）、などの合成医薬品原料、リアクションフレーバー（システイン）、パンの発酵助剤（システイン）、界面活性剤（N-アシルグルタミン酸）、パーマネントウェーブ液（システイン）、などの製造原料。保湿効果（プロリン）などを活用した製品への利用が行われている。また、最近開発されたペプチドの原料として利用されている。

## 2.3 アミノ酸はどのようにして製造されているか

2.2に記した池田菊苗が発明したMSGの製造法は、小麦のグルテン、あるいは大豆タンパク質を塩酸で加水分解し、分解液からMSGを分離・精製して製造する、タンパク質加水分解法である。この方法による生産は、

発酵法が確立された1960年頃までの約50年間続けられたが、この方法には後述する(3.1)のように、技術的に改良すべき点がいくつかあった。これらをクリアして新たに開発された方法が化学合成法と、本報告の主題である発酵法である。現在では、グルタミン酸をはじめ、多くのアミノ酸の生産は発酵法が中心となっているが、それぞれメリットとデメリットがあり、現在でも製法として、タンパク質加水分解法、化学合成法および発酵法の3つの方法が併存している。コストと、アミノ酸が主として食用など“口に入るもの”に使用されるため、消費者に与えるイメージを重視して製法が選ばれている。光学異性体のないグリシンや、家畜がDL体をともに利用出来るメチオニンなどは、化学合成法で、チロシン、ロイシン、アスパラギンなどはタンパク質分解法で生産されている。

主原料はタンパク質加水分解法では大豆タンパク質やカゼイン、化学合成法ではエチレンを原料にして合成されるニトリル化合物やアンモニアなど、発酵法では糖液(デンプン糖化液)、糖蜜や粗糖である。

## 2.4 アミノ酸の生産量

日本必須アミノ酸協会では、数年毎に世界のアミノ酸生産量の推定を行い公表してきた。このデータの内から、1979年と1996年の値を示したものが図2.4<sup>(3)</sup>である。この図に見られるように、DL-アラニン以外のアミノ酸の生産量がすべて大きく増加していることが一目で見て取れる。特に量的に目立つものはグルタミン酸で、1996年時点で100万トン、2005年には170万トンに達し、なお年率数%の増加が見られている。単一の化合物で、誕生から100年が経過して、なお成長を続けると言う他に例のない大きな商品である。世界にはこれまで、硫酸、尿素、ペニシリン、ナイロンなど、画期的な化合物が現われ、製品化されてきたが、いずれもこのような長期の安定した成長を示すものはない。グルタミン酸の大きな価値が特筆される。

グルタミン酸以外のアミノ酸で生産量が大きく伸展しているものに、飼料用に使用されるリジンがあり、1996年では約30万トンであるが、2005年には80万トンに、同じく飼料用に使用されるスレオニンは1996年には約4千トンに過ぎなかったが、2005年には8万トンに、トリプトファンは500トンが1800トンに達したと推定されている。低カロリー甘味料であるアスパルテームの原料として使用されるフェニルアラニンとアスパラギン酸も増加が著しい。そのほかのアミノ酸も医薬やサプリメントとして生産量が増加している。

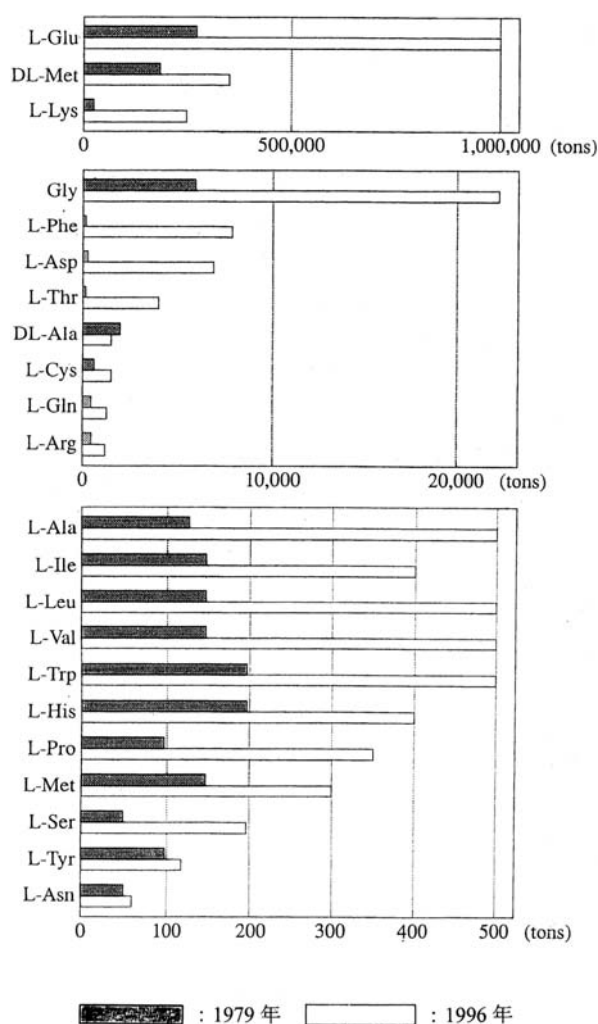


図2.4 世界の推定アミノ酸生産量<sup>(3)</sup>

## 2.5 アミノ酸の安全性について

アミノ酸が生体のタンパク質の構成成分で、安全性に問題があるとは考えられるものではなかったが、1970年ころから、食品や医薬品に使用される化合物について、安全性を問題視する世の趨勢から、アミノ酸についても例外なく問題として取り上げられることになった。たとえば、MSGを幼若マウスへ強制投与することによって、脳に障害が生じたと言う報告や、中華料理に加えられるMSGの摂取によって、いわゆる“中華料理症候群”が起ると言うような報告、などの懸念の問題である。しかしながら、日本を中心とするメーカーの地道な努力によって、このような問題は起らないことが科学的に証明され、オープンで公平な議論を通して、アメリカのFDAなどの機関から安全性に問題はないと言う結論が得られ、科学的に“安全宣言”が出された。しかしながら、世間一般にはなお安全性を信じない人が大勢いることは事実である。ただ、

1980年代に米国で発生した健康食品に含まれていたトリプトファンの分解生成物によると考えられている死亡事故は、アミノ酸製品の成分の確認の重要性をあらためて示したものととして注目された。

## 2.6 アミノ酸発酵のプロセスとは

2.4に見られるようなアミノ酸の生産量の増加には、新しい用途の開発とともに、生産技術の改良による価格の低下が大きく貢献している。アミノ酸は必要な物質ではあるが、価格が高くても需要があると言うものではなく、生産技術の改善によるコストダウンと新しい用途の開発と言う2つの要素がうまくかみ合っており、需要の拡大がもたらされたものである。

アミノ酸の生産技術には、2.3で述べたタンパク質の加水分解、発酵、合成、とこれらに関連する分離・精製、およびエンジニアリングなどの技術が関連しているが、現在最も大きな比重を占めるのが本報告のメインテーマである発酵法である。

アミノ酸発酵のプロセスの概略は図2.5の通り、要素技術として、菌株の育種、大量培養法、分離・精製技術、およびエンジニアリングがある。これらの中で、菌株育種はアミノ酸発酵を特徴づける上で、最も大きな役割を果たす根幹技術である。

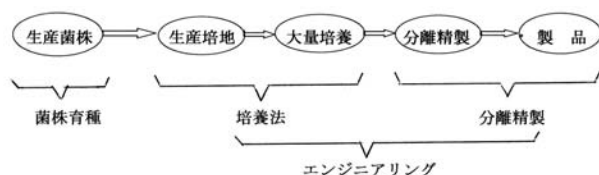


図2.5 アミノ酸発酵の概略と関連する要素技術

菌株育種とは、数マイクロン単位の小さな細菌の細胞の中で、基質（原料）であるグルコースから、生産物であるアミノ酸に至る代謝の流れをコントロールし、アミノ酸を菌体外に排出させて生産に結びつける細胞の操作技術である。具体的には、アミノ酸の代謝経路を見極め、代謝制御を除くように、細菌の細胞に突然変異や遺伝子操作などによって、生産のために有効な性質を付与してアミノ酸の生産量の増加を指標にして改良を重ねてゆく操作である。新しく得られた菌株と親株の間には外観的な変化は見られないのが通常である。このようにして得られた細菌を、最適な培養条件を設定して、 $10^{16-17}$ と言う莫大な数に増殖させて、大量のアミノ酸を生産させる技術が大量培養技術である。分離・精製技術は細菌の培養液の中に蓄積されたアミノ酸を分離して、純度がほぼ100%の結晶として精製する行程である。またエンジニアリングは大量培養と大量精製に関わる工程の操作と装置の管理である。コンピュータによるプロセス制御が行われている。小規模のラボでの実験のスケールアップとともに、この段階でしかできない技術開発課題も多く含まれている。

### <引用文献>

- (1) 池田菊苗：新調味料について、東京化学会誌、30、820、1909.
- (2) 角田俊直：アミノ酸利用の現状、(財)バイオインダストリー協会、アミノ酸核酸集談会編「発酵からニューバイオテクノロジーへ」、p. 49、1987.
- (3) 日本必須アミノ酸協会編：「アミノ酸資料集」1979、1996.



# 3 | アミノ酸発酵誕生の背景にあったもの

アミノ酸発酵は約50年前に誕生した日本のオリジナルの技術である。この技術が生まれた背景には、日本は古来からアジアのモンスーン地帯に位置する高湿の米作農業地帯にあって、清酒、味噌、醤油に代表される、微生物を活用する発酵と醸造の技術が特にすぐれていたことがあげられる。さらに、より直接的には、目的とする具体的なターゲットであるMSGがあって、発酵生産を可能にした生化学、微生物学、分子生物学のような科学の知見と、抗生物質生産株の例に見られるスクリーニングや培養法などの技術が準備されていたことである。



図3.2 池田菊苗が初めて抽出に成功した結晶具留多見酸の入ったサンプルビン（味の素株式会社提供）

## 3.1 「味の素」(MSG)の成功と技術的な問題点

アミノ酸発酵の最初のターゲットは「味の素」すなわちMSGであった。2.2に記した通り、MSGは1908年（明治41年）池田菊苗によって昆布のうま味成分として発見され、調味料として特許出願されている。後に、小麦のタンパク質であるグルテン、あるいは大豆タンパク質を塩酸で加水分解することによって製造する方法が確立されて鈴木製菓所、後の味の素株式会社の創業者である鈴木三郎助氏との共同作業による「味の素」の開発となったことは有名である。池田菊苗と二代目鈴木三郎助の写真を図3.1に示す。池田菊苗が初めて昆布から抽出して結晶化に成功したグルタミン酸（具留多見酸と記されている）のサンプルの写真を図3.2に示す。この発明は御木本幸吉の真珠、豊田佐吉の自動織機とともに、明治の三大発明とも言われている。

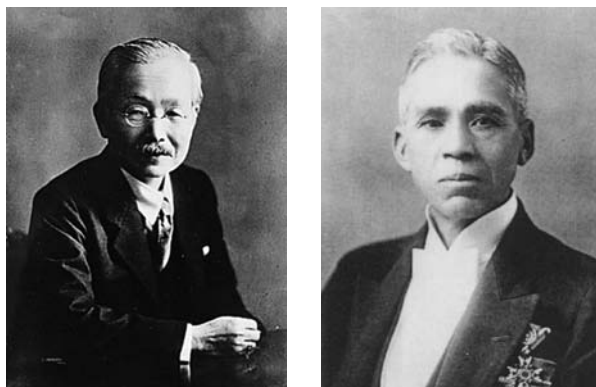


図3.1 池田菊苗博士（左）と鈴木三郎助味の素（株）二代目社長（右）（味の素株式会社提供）

「味の素」の事業化については、「味の素」が全くの新らしい商品であるため、技術、販売の両面から数多くの苦難が待ちかまえていたが、これらを克服して事業としての成功が収められた<sup>(1)</sup>。

池田菊苗は物理化学を専門にしていたので、「味の素」の発明はいわば専門外の分野で成功を収めたわけであるが、その背景には旺盛なベンチャー精神と、当時栄養的に貧しかった日本人に、「佳味は消化を促進する」と言う考えに基づいて、食事をうまくすると言うことに強い意欲を持っていたこと、さらに池田菊苗本人はもちろんのこと、日本人全体が西洋人には少ないと思われる味覚に繊細で特別な感覚をもって、調味料という商品を受け入れる素地があったことが考えられる。

創業10年ほどを経て、味の素社の業績は安定し、事業は海外にも拡大された<sup>(1)</sup>。池田菊苗の特許は1923年に期限が来たが、6年の延長が許可され、1929年に満了した結果、多くの企業がMSGの製造を始め、1930年には「味の素」以外に28の銘柄が生まれたと言う<sup>(2)</sup>。

ただ、ここで開発された製法（タンパク質分解法）には問題点が指摘されていた。ひとつは原料の問題で、小麦や大豆は輸入に依存するところが大きかったため、海外の事情によって量的な制約を受け、また国内農業保護のための輸入規制もあって、価格が高く、コストダウンが困難であった。もうひとつはタンパク質の加水分解に、高温の塩酸を使用するため、設備の腐食が大きな問題で、様々な工夫の結果、耐酸性の容器として道明寺釜が開発された。しかしこれだけでは抜本的な解決にはならず、操業の連続化や自動化が困難なこと、作業者の健康や公害への配慮の必要性、などの問題点が依然として未解決のまま残っていた。した

がって、これらの問題点をクリアできる新しい製法の開発が必要で、化学合成法と発酵法の二つのアプローチから検討された。味の素社では、1950（昭和25）年ころからこれらの研究の取り組みを開始した。

まず、化学合成法については、いくつかの方法が考案され実験されたが、これらの内から、アクリロニトリルに一酸化炭素とシアン化水素を結合させるストレッカー反応を応用した方法を完成し、同社の東海工場で行われた。この技術は、当時は無尽蔵と言われた石油製品から、食品であるグルタミン酸を作ると言う画期的な技術として称賛され、日本化学会技術賞（1964）、大河内記念生産賞（1965）を受賞した。しかしながら、短時間の内に消費者の意識は大きく変わり、「食品を化学合成法で作る」というコンセプトは受け入れられない時代になった。ほぼ同時にスタートした発酵法の進展もあって、化学合成法によるMSGの合成工場は1973年に閉鎖された<sup>③</sup>。

一方、発酵法については、その前提として微生物のアミノ酸代謝に関する生化学的な知見と、微生物学の応用であるスクリーニング法、突然変異と突然変異株の採取に関する微生物遺伝学の知見、さらに微生物の培養法など、科学と技術についての条件が必要であったが、これらの科学や技術の勃興期、あるいは充実の時期にタイミングが一致し、これらをいち早く応用してアミノ酸発酵技術の確立に結びつけたところに成功のポイントがあった。

### 3.2 生化学、微生物学の進展

1930～50年には生物の体内における物質代謝に関する研究が大きく進展し、グルコースが分解される解糖経路、TCA（Tri-carboxylic acid）サイクルなどの重要な反応経路やそれらの生化学的な意義が解明された。当然これらと深く関連しているアミノ酸の代謝についての知見も集積された。さらに1960年以降はアミノ酸などの代謝調節についてジャコブとモノー（F. Jacob & J. Monod）らのオペロン説に代表される酵素合成の調節やフィードバック阻害のような負のフィードバック制御（negative feedback control）の存在とメカニズムの全貌が明らかになった。つまり、アミノ酸の生体内での合成は、アミノ酸自身が合成反応を触媒する酵素の生成と活性を調節する代謝制御に深く関わっている（4.3参照）。したがって、アミノ酸自身の制御作用を除かなければアミノ酸の過剰生産、つまり

アミノ酸発酵は成立しないと言うことが明らかになった。これらの知見はアミノ酸発酵を可能にする作戦を考える前提条件として準備されたわけである。

### 3.3 分子生物学、微生物遺伝学の進展

遺伝子の本体がDNAであることがアベリー（O. Avery）らの肺炎双球菌の形質転換で証明され、1953年にはワトソンとクリック（J. Watson & F. Crick）によって、DNAは二重らせん構造をもち、DNAに含まれる遺伝情報がRNAへ転写され、これがタンパク質に翻訳されると言う、セントラルドグマのメカニズムが明らかにされ、これらを契機に分子生物学という大きな研究分野が拓かれた。さらに、突然変異がDNA上での塩基配列の変化によって引き起こされること、突然変異は紫外線やX線、あるいは化学物質による処理によって高頻度で発生することなど、突然変異株の採取と利用に大きな道が開かれ、細菌の突然変異株を活用するアミノ酸発酵の技術開発に必要なツールが準備された。ただ、突然変異株の利用はグルタミン酸発酵とは直接関係はなく、後のリジン発酵以降から始まる。

### 3.4 微生物のスクリーニング技術／ 抗生物質の発見と生産プロセスの開発

フレミング（A. Fleming）が、青カビがペニシリンを生産することを発見したのは1929年であるが、1940年ころにはフローリー（H. W. Florey）らによってペニシリンの生産が実用化レベルにまで改良され、第二次大戦の傷病兵の感染症の治療に大きな威力を発揮したと言われている。それ以来、ワックスマン（S. A. Waksman）によるストレプトマイシンや、さらにクロラムフェニコール、オーレオマイシン、など多くの抗生物質の発見が相次ぎ、1940年から1980年ころまでは抗生物質の全盛時代が続いた。これらの発見は微生物研究者にとっては大きな夢を与えた。応用微生物学の泰斗で、多くの実績を残した東大教授坂口謹一郎をして、「微生物に期待して裏切られたことはない」と言わしめたと言われている。このように、微生物は多様で、その数は無限と言われるので、その中にはアミノ酸を生産するものが存在してもおかしくはないと考えた研究者もいたに違いない。このように、抗生物質の発見から微生物のスクリーニング法を学ぶところは大きかったと考えられる。

### 3.5 大量培養技術の進展

3.4のとおり、抗生物質は青カビや放線菌を用いて生産されるが、このために通気攪拌培養を行うジャーフェメンターや発酵タンクが開発された。我が国では昭和20年代に多くの企業がペニシリン発酵の技術開発に参加したが、この経験はアミノ酸発酵の確立には大きな威力を発揮した。

#### <引用文献>

- (1) 味の素（株）：「味をたがやすー味の素八十年史ー」、pp. 48～102、1990年7月。
- (2) 太田静行：うま味調味料の知識、p. 4、幸書房、1992年6月。
- (3) 味の素（株） 研究所50年史「“あしたのもと”を求めて」、p. 100、2006年9月。

# 4 | アミノ酸発酵の誕生—アミノ酸生産菌のスクリーニングと菌株育種—

## 4.1 二段発酵法によるグルタミン酸生産

グルタミン酸は生体内のTCAサイクル（図4.1）の反応で生成する2-オキソグルタル酸（以下2OG= $\alpha$ -ケトグルタル酸）にアミノ基を導入することによって生成することが知られていた。また、2OGが発酵法で作られることもすでに知られていた。このように、グルタミン酸の生産は、生化学的な代謝経路から見ると、“ほぼ手の届く距離にある”と考えられ、多くの研究者が注目していた目標であったらしい。まずこの2OGの生産量を増やしアミノ化する二段発酵が味の素社や協和発酵工業株式会社（以下協和発酵社）などで検討された。味の素社は専門の先発メーカーとして技術開発の必要性をもっていたことは上述の通りであるが、協和発酵社はグルタミン酸に関しては新規参入者であり、MSG製造上の問題点を抱えていた訳ではない。発酵技術をもつ同社としては、当初新しい研

究テーマとして、第二次世界大戦後の日本の栄養問題に対応する目的で、発酵技術でタンパク質を生産することを目的としていたが、目的をタンパク質からグルタミン酸に変更して研究を開始した<sup>(1)</sup>。

2OGの生産量はかなり上昇したがアミノ化についての結果については報告されていない。その間に次に記す直接発酵法が成功し、この方法は中止されたためと考えられる。

## 4.2 直接発酵法によるグルタミン酸生産

### 4-2-1 グルタミン酸生産菌の発見

協和発酵社では上記の二段発酵のほかに、直接グルタミン酸を生産する菌株のスクリーニングに成功し、初めてグルタミン酸発酵と言う新しい発酵法の確立に成功した<sup>(2)</sup>。

当時の常識では、グルコースから直接グルタミン酸のようなアミノ酸が生成することは考えられなかった。したがって、この試みは文字通り常識への挑戦であったが、研究者にはグルタミン酸菌が得られるという確信があったのかもしれない。この成功のポイントは的確な菌株のスクリーニングの方法にあり、バイオアッセイと呼ばれるアミノ酸の定量法を巧みに応用したところにあった。つまり、乳酸菌の中には生育にアミノ酸を要求するものがあり、要求するアミノ酸量と生育量が比例関係にあるので、この関係を利用してアミノ酸を定量するのがバイオアッセイである。具体的には、数種類のアミノ酸を生育に要求する乳酸菌を、グルタミン酸だけを除いた寒天培地上に予め塗布した上に、天然から採取した微生物を培養した。グルタミン酸を生成するものは、その周りに乳酸菌の生育円が観察できるので、直ちに検出できるシステムである。こうして短時間の内に、生育円が出来たものが採取され、液体の培養でグルタミン酸を生産していることが確認された<sup>(3)</sup>。

この菌株は顕微鏡観察で球状を呈していたことから、球菌に分類され *Micrococcus glutamicus* と命名された新しい菌株であったが、培養条件の違いによって変形することが観察され、後に *Corynebacterium glutamicum* と改名された。



図4.1 TCAサイクルとグルタミン酸の位置関係

① クエン酸シンターゼ、② アコニット酸ヒドラーゼ、③ イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、④ 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体、⑤ スクシニル-CoA シンターゼ、⑥ コハク酸デヒドロゲナーゼ複合体、⑦ フマル酸ヒドラーゼ、⑧ リンゴ酸デヒドロゲナーゼ ⑨ グルタミン酸デヒドロゲナーゼ

培養は、必要な栄養成分の添加量を変化させるいくつかの組み合わせの培地を用いて行われたが、この中

で、ビタミンの一種であるビオチンの添加量が重要な因子であることが見出された。つまり、この菌株はビオチンを生育に要求するのでビオチンを培地に加えなければならないが、その濃度が極めて重要で、濃度が $10\mu\text{g}/\text{l}$ 以上になるとグルタミン酸は全く生産されないが、 $3\mu\text{g}/\text{l}$ 程度で培養することによって、グルコース $100\text{g}$ から $1\text{liter}$ 当たり $40\sim 50\text{g}$ のグルタミン酸を生産するのである<sup>(4)</sup>。

協和発酵社はフラスコのレベルでの実験結果をパイロットプラントで再現した後、1956（昭和31）年9月21日にグルタミン酸発酵の成功と、同社がMSG業界に参入する意志のあることを新聞発表した。このグルタミン酸発酵の確立がアミノ酸発酵の創始とされている。このグルタミン酸菌の発見は、グルタミン酸だけではなく、多くのアミノ酸を発酵法で作るという、まったく新しい概念の技術分野を拓ききっかけを作った点で甚だ大きい意義をもっている。

この協和発酵社の発表は味の素社をはじめ、MSGの先発メーカーには衝撃を与えた。味の素社と三楽酒造社では、昭和29年（1954年）に出願されていた多田靖次、中山大樹の「 $\alpha$ -ケトグルタル酸生産株を窒素を多く含む培地で培養することによる製法」（多田特許）の権利を譲り受けて特許的な対応をとった。それと同時に、それぞれの企業や大学では新菌の開発が精力的に行われた。その結果、味の素社と三楽酒造社からは *Brevibacterium flavum*、*Brevibacterium lactofermentum*、旭化成社から *Microbacterium ammoniaphilum*、武田薬品工業社から *Brevibacterium thiogenitalis*、東大から *Brevibacterium divaricatum* などの菌株が相次いで発見された。これらの菌株は (1) 好気条件下でグルタミン酸を生産する、(2) 生育にビオチンを要求する、(3) 細菌の分類の指標となるグラム染色試験に陽性を示す、(4) 胞子を形成しない、(5)

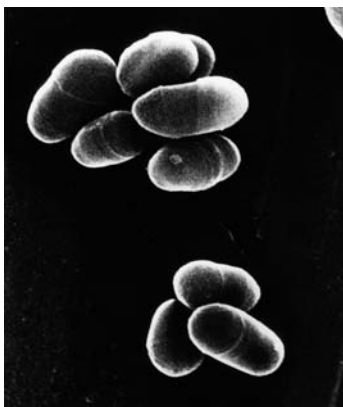


図4.2(1) *Corynebacterium glutamicum*の電子顕微鏡写真  
(協和発酵工業株式会社提供)

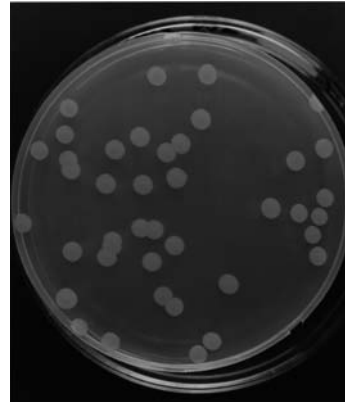


図4.2(2) *Corynebacterium glutamicum*のコロニー写真  
(協和発酵工業株式会社提供)

運動性がない、(6) 形態は短棒状ないし球状を示す、など分類学的な特性が類似しているということで、1980年代になって、*Corynebacterium glutamicum*に名称を統一することが推奨されるようになり、現在では一般的にこの名前が使用されるようになっている。

これらの菌株はグルタミン酸の生産に使用されただけではなく、4.5、4.7に記すように、この株を親株として、リジン、スレオニン、フェニルアラニンなど、多くのアミノ酸を生産する変異株が誘導された。

協和発酵社はグルタミン酸発酵の発明によって大河内記念賞（1958年）、科学技術庁長官賞（1960年）、さらに1966年には、4.5に記すオルニチン、リジン発酵を含めたアミノ酸発酵の確立で、学士院賞を受けた。

1957年から5年間、協和発酵社の発酵法で作られたグルタミン酸は全量を味の素社へ納入する契約が交わされたが、精製工程の不調によるトラブルなどがあり、計画通りの製品の納入が進まなかったこともあって、1961年味の素社は協和発酵社の特許に抵触しない製法を開発したとして、契約は解除された。協和発酵社はその後、武田薬品社の核酸系調味料「いの一番」用にMSGを供給することになったが、1966年には武田薬品社も自社で開発した菌株を用いてMSGを生産することになり、協和発酵社からの供給は中止された<sup>(5)</sup>。これらのやりとりの中で菌株に関する特許係争が生じることとなった。

#### 4-2-2 グルタミン酸生産菌の培養技術

グルタミン酸生産のための大量培養法については、抗生物質発酵の開発に使用されていたフラスコやジャーファーメンターを用いておこなわれた。その結果、4-2-1に記した通り、最大生産量を得るためには、ビオチン濃度を $3\mu\text{g}/\text{l}$ 程度に制限することがポイントであることが明らかにされた<sup>(4)</sup>が、安価な原料で

ある糖蜜にはビオチンが高濃度含まれるために、グルタミン酸生産に使用できないという大きな問題点があった。この実用上の問題点に対しては、協和発酵社の技術を導入したメルク社では、糖蜜を用いる培養に低濃度のペニシリンを添加することによって、ビオチン濃度が高くてもグルタミン酸ができることを証明して、糖蜜の使用を可能にする技術の開発に成功した<sup>(6)</sup>。一方、味の素社では界面活性剤を添加する方法が開発された<sup>(7)</sup>。

#### 4-2-3 グルタミン酸生産のメカニズム

なぜこのような高濃度のグルタミン酸が蓄積するかは、実用的にも、学術的にも大きな関心事項であり、この解明のために多くの研究が行われてきた。4-2-2の通り、グルタミン酸を大量に生産させる培養法とは、①ビオチン濃度を低く抑えて培養すること、②ビオチン濃度が高いときには培地にペニシリン、あるいは界面活性剤を加えることに要約される。その後の研究で明らかにされたことは、

1) 野生型の菌株では、グルタミン酸はその生合成に関わる酵素の活性を阻害し、また酵素の生成を抑制する、つまり後述(4.3)の代謝制御が機能していることで、これらは*B. flavum*で示された。

2) グルタミン酸生産条件下では、菌体内で合成されたグルタミン酸の菌体外への排出が促進されると同時に、代謝の流れがグルタミン酸に向かって優勢に進行していることである。

2) については、ビオチンは細胞膜を構成している脂肪酸の合成にかかわる因子である、したがって、ビオチンを制限することは脂肪酸の合成、つまり細胞膜合成を制限することを意味する。またペニシリンや界面活性剤を加えることも同様の効果を示す。したがって細胞膜が重要な役割を果たしていることが示された<sup>(12)</sup>が、この細胞膜の排出機能について、最近の味の素社と東工大の共同研究で、グルタミン酸を生産している時に、メカノセンシティブチャンネルに対応すると考えられる遺伝子に変異が起っていることが見出された。メカノセンシティブチャンネルとは、細菌の細胞膜が浸透圧の変化を感知して、対応する溶質(この場合はグルタミン酸)を細胞の外に排出する機能をもつチャンネル(通路)のことである。この変異株ではチャンネルが常時“on”の状態、野生株ではグルタミン酸の生産を誘導する(上の①、②)条件下で“on”となって、グルタミン酸が排出されると説明されている<sup>(8)</sup>。

#### 4-2-4 グルタミン酸生産菌の学術研究

4-2-1で述べた通り、*C. glutamicum*や*B. flavum*のようなグルタミン酸菌は、グルタミン酸の生産だけではなく、その後の研究でリジンなど、多くの他のアミノ酸を生産する変異株の親株となった極めて重要な菌株であり、本菌に関する学術的な研究が広範におこなわれた。アミノ酸生産株の育種のほか、分類学、アミノ酸代謝、遺伝子操作システム、あるいはゲノム解析などについて膨大な研究が日本を中心に進められた。これらの研究成果は成書にまとめられている<sup>(9)・(10)・(11)</sup>。

#### 4-2-5 グルタミン酸発酵技術の海外展開

協和発酵社の技術はアメリカの大手化学会社であるメルク社や台湾の企業に技術供与されたと言われている。

一方、味の素社は国内工場生産を始めるとともに、早くも1960年代のはじめにはタイ、マレーシア、フィリピン、イタリアなどに、MSG工場の建設と言う方法で積極的な海外展開を開始した。MSGの価格は原料に大きく依存するため、今日では国内工場はほとんどなくなり、糖蜜やデンプンの生産地である東南アジア、ブラジル、米国、および台湾や中国に広がり、2.4の説明の通り、グルタミン酸発酵はMSGの2005年の推定年産170万トンに達する世界的に大きな発酵産業へと発展した。

#### 4-2-6 アミノ酸発酵研究の産学連携

グルタミン酸発酵の成功をきっかけに、東大の坂口謹一郎教授の発案で、アミノ酸の発酵法による生産技術を日本独自の産業に育成しようと、全国の主要大学を網羅した文部省のアミノ酸研究班が昭和33年にスタートした。この研究発表の場として「アミノ酸集談会」が発足し、この会には産業界からも積極的な参加があり、活発な研究と討論が行われた。この会は後に「アミノ酸核酸集談会」、現在は(財)バイオインダストリー協会の中の「発酵と代謝研究会」と名称は変更されたが、我が国のアミノ酸発酵研究の推進力として活発な活動が続けられている。

### 4.3 アミノ酸の過剰生産を妨げる代謝制御とは

アミノ酸の生産については代謝制御が深く関わっている(3.2)のでその概略を記す。

微生物は、アミノ酸のような生命活動に必須の代謝物は過剰に生産されないように調節するメカニズムを備えている。これが代謝制御である。

グルタミン酸発酵と同じように、発酵と言うプロセ

スで人間にとっての有用物質を生産するアルコール発酵がある。これは酵母菌の働きによって、グルコースから炭酸ガスとともに、アルコールを生成する反応であるが、アルコールは酵母菌が増殖のためのエネルギーを獲得するための反応の副産物として生産されるものである。したがって、この反応には代謝制御は働かない。これに対して、グルタミン酸はタンパク質の素材として不可欠の物質であり、これを過剰に生産して排出することは細菌にとって不合理なことである。これを防止するためのメカニズムが代謝制御である。このように、微生物を用いて有用物質を作る点では同じであるが、アルコール発酵とアミノ酸発酵とは内容的に異なるものである。

この代謝制御作用のため、通常の野生型の微生物を通常の方法で培養してもアミノ酸が過剰に生産されることはない（例外的に、野生型の *C. glutamicum* を培養すると代謝制御作用の弱いアラニンとバリンが少量蓄積することがある）。

微生物におけるアミノ酸の生合成経路とその制御の概略は1955～1960年代に明らかにされ（図4.3）、また、そのメカニズムも分子生物学的な研究で明らかにされた。ここで示された調節機能が最終生産物、つまりアミノ酸、によるフィードバック阻害（feedback inhibition）と酵素合成のリプレッション（repression：抑制）である。たとえば図4.4に示すように、Aというスタート物質からEという最終産物が合成される代謝経路で、Eが過剰に生産されて濃度が高くなるとA→B

の反応を触媒する酵素（a）に直接結合して活性を阻害するのがフィードバック阻害、AからEに至る反応を触媒する酵素（a～d）の生成を抑えるのがリプレッションである。このように、Eの濃度が高い場合にはA→Eの反応は停止するが、やがてEが消費され濃度が低くなってくるとこれらの制御が解除されて、合成が再開される。

一般的にA→Bの反応に関わる初発の酵素（a）は鍵酵素（key enzyme）と呼ばれ、aにはAが結合する活性部位と、最終生産物Eが結合する制御部位があり、Eが結合することによって酵素タンパク質の立体構造が変化してAが結合できなくなり、反応を阻害する。このような酵素はアロステリック酵素と呼ばれている。フィードバック阻害がEと酵素の直接の結合であるのに対して、リプレッションはmRNAの転写を介して酵素の生成を抑えるので、より間接的な制御である。また、大腸菌などグラム陰性菌では、生産物であるアミノ酸を分解する反応が見られるが、これも代謝制御である。

このように、アミノ酸を過剰に生産するためには、これらの代謝制御を打破、克服することが必須の条件である。これまでに行われてきた具体的な代謝制御の克服方法は、以下の通りである。

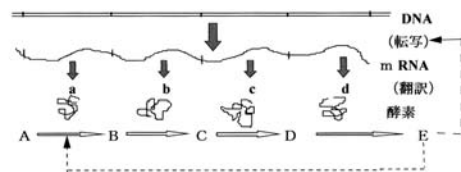


図4.4 フィードバック阻害とリプレッション（酵素生成の抑制）の略図

出発物質Aから最終産物E（アミノ酸）に至る生合成反応で、フィードバック阻害とはEがA→Bの反応を触媒する酵素aを阻害する現象。リプレッションは、EがDNAの遺伝情報をmRNAに転写する段階で作用し、タンパク質（＝酵素）a～dの生成を抑える現象を示す。

→ : 生合成反応、← : フィードバック阻害、- - - : リプレッション

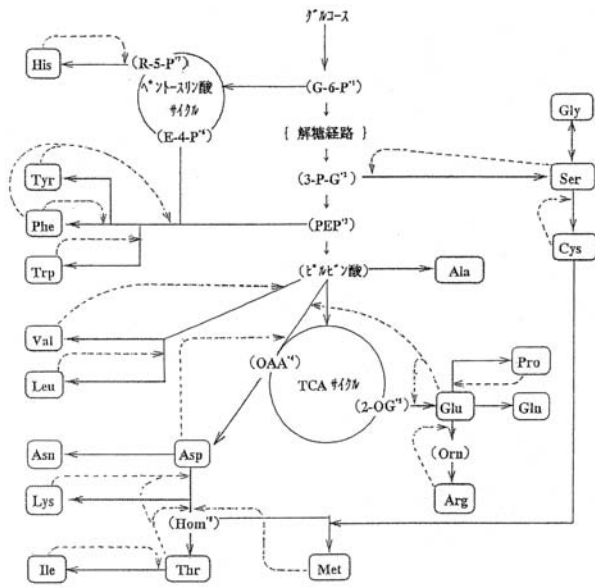


図4.3 微生物におけるアミノ酸生合成と制御の概略図

○ : アミノ酸、( ) : 中間体、→ : 生合成経路、  
- - - : 主なフィードバック制御

\* 1 : グルコース-6-リン酸、\* 2 : 3-ホスホグリセリン酸、\* 3 : ホスホエノールピルビン酸、\* 4 : ホスホピルビン酸、\* 5 : 2-オキソグリセリン酸、\* 6 : エリスロース-4-リン酸、\* 7 : リボース-5-リン酸、\* 8 : ホモセリン

## 4.4 代謝制御の克服（1） グルタミン酸排出の促進

4.3で述べたような代謝制御はグルタミン酸菌のグルタミン酸の生合成系でも確認されているにも拘わらず、グルタミン酸の大量生産が起るのは、4-2-3で述べた通り、グルタミン酸の菌体外への排出、つまり細胞膜の透過性が向上していることが明らかにされていた<sup>(12)</sup>。このグルタミン酸の排出についての分子レベルでの解析が進み、排出のチャンネルの存在が示唆されている<sup>(8)</sup>。

## 4.5 代謝制御の克服 (2) 栄養要求性変異株を用いる生産

変異株とは、親株とは異なる性質をもつ子株で、その性質が遺伝するものを言うが、栄養要求変異株とは、アミノ酸などの代謝物の合成に関わる酵素が遺伝的に欠損し、その代謝物が合成出来なくなったため、栄養物として生育に要求するようになった変異株のことである。特定の反応をブロックするような目的でこの変異株を誘導することが行われる。ここに述べる方法は、栄養要求性変異株を用いて、フィードバック阻害因子となるアミノ酸の濃度を低くしてフィードバック阻害を除いてアミノ酸を過剰に生産する方法である。

### 4-5-1 オルニチン

協和発酵社ではグルタミン酸生産菌の発見に力を得て、他のアミノ酸生産菌を土壌など自然界からスクリーニングすることを試みたが、この試みは成功しなかったようだ。また、4.3に記した通り、その後も野生型の微生物がグルタミン酸、アラニン、バリン以外のアミノ酸を過剰に生産したと言う報告はない。上に述べた代謝制御の知見から考えれば、生産菌が得られないことは当然の結果である。一方、アミノ酸の生合成経路をブロックした大腸菌の栄養要求変異株では、ブロックされた反応の前の中間体を分泌するという報告が出されていたが、同社ではこれらを手がかりに、グルタミン酸菌 *C. glutamicum* を親株として各種の栄養要求変異株を採取し、それらの生産物を調べたところ、アルギニン要求株がオルニチンを、ホモセリン要求株がリジンを、スレオニン要求株がホモセリンを、チロシン要求株がフェニルアラニンを、それぞれ生産することを見出した。これらの内オルニチン<sup>(13)</sup>とリジン<sup>(14)</sup>が生産量も多く、実用に供され、オルニチンとリジン発酵が誕生した。これらは単に生合成がブロックされて中間体が蓄積するというのではなく、アミノ酸の生合成にかかるフィードバック阻害が除かれたことによって過剰生産が起ったことを示すものである。

図4.5に示すように、野生株のアルギニンの生合成は初発酵素であるN-acetylglutamate synthaseがアルギニンによってフィードバック阻害されるとともに、生合成にかかる一連の酵素の合成のリプレッションによって制御されている。オルニチンの次の反応を触媒するornithine carbamoyl transferase (OTC) が欠損したアルギニン要求株を、アルギニンを低濃度に制限して培養することによって、アルギニンによるフィードバック阻害とリプレッションが除かれ、相対的にN-

acetylglutamate synthaseの活性が上昇するが、OTCが欠損しているため、過剰に生産されたオルニチンが蓄積したと説明される。このアルギニン要求性変異株を用いるオルニチン生産量は、対グルコースモル収率36%の高率であった<sup>(13)</sup>。

オルニチンはタンパク質に含まれるアミノ酸ではないが、アミノ酸輸液の成分として用いられるほか、アスパラギン酸との塩が肝機能改善薬として利用されている。

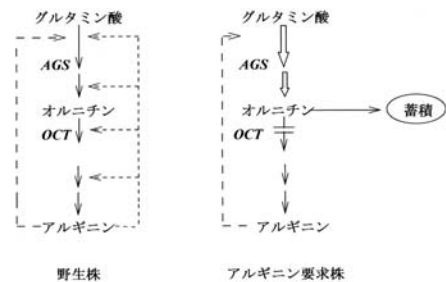


図4.5 *C. glutamicum*におけるアルギニンの生合成制御とアルギニン要求株によるオルニチン生産<sup>(10)</sup>

→、⇌：生合成反応、---→：フィードバック阻害、  
-----→：酵素合成の抑制、AGS：N-acetylglutamate synthase、  
OCT：ornithine carbamoyl transferase  
アルギニン要求株ではOCTが欠損して(⇌)で表示、アルギニンを低濃度に制限して培養できるのでAGSのフィードバック阻害と一連の酵素合成の抑制がなくなり、酵素活性が高まり(⇌)で表示、過剰に生産されたオルニチンが蓄積されることを示す。

### 4-5-2 リジン

一方、図4.6に示すように、野生型の *C. glutamicum* では、リジン、スレオニン、メチオニン合成の初発酵素である aspartokinase がリジンとスレオニン両者が共存する時に協奏的にフィードバック阻害される。ホモセリン脱水素酵素が欠損しているホモセリン要求株を、ホモセリン (あるいはスレオニンとメチオニン) を低濃度で培養すると、スレオニン濃度が低いため aspartokinase のフィードバック阻害がなくなり、中

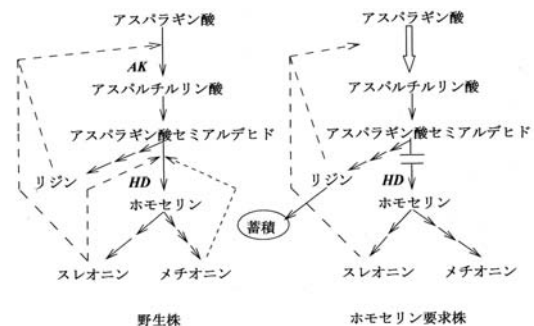


図4.6 *C. glutamicum*におけるリジン、スレオニン、メチオニン生合成の制御とホモセリン要求株によるリジン生産<sup>(11)</sup>

→、⇌：生合成反応、---→：フィードバック阻害、  
-----→：酵素合成の抑制、AK：アスパルトキナーゼ、HD：ホモセリン脱水素酵素  
ホモセリン要求株ではHDが欠損して(⇌)で表示、スレオニンとメチオニンを低濃度に制限して培養するとAKにかかるフィードバック阻害がなくなり、AK活性が高まり(⇌)で表示、アスパラギン酸セミアルデヒドを経由して過剰に生産されたリジンが蓄積されることを示す。



間体アスパラギン酸セミアルデヒドが過剰に生産されるが、ホモセリン脱水素酵素が欠損しているため、スレオニンには変換されず、リジンに流れて過剰生産となって蓄積するわけである<sup>(14)</sup>。

#### 4-5-3 その他のアミノ酸

これらの成功例から、さらに種々の栄養要求性の変異株が採取され、イソロイシン要求株からプロリン生産株が<sup>(15)</sup>、またアルギニン要求株からシトルリン生産株<sup>(16)</sup>などが得られた。

これらの栄養要求性変異株による生産は、歴史的に重要な発見であるため取り上げた。しかし、この栄養要求性変異株を用いる方法は、最高の生産を得るための要求物質の最適な濃度コントロールがやっかいなうえに、自ずから限界があった、つまり、アミノ酸要求性にするはそのアミノ酸の合成をブロックされているため、これらの生産株は得られないことを示している。これらの欠点を一挙に解決したのが4.7に記すアナログ耐性株の活用であった。

### 4.6 代謝制御の克服 (3) 中間代謝物を変換する生産

アミノ酸の代謝制御は主として合成反応の初発酵素の阻害で行われている<sup>(4.3)</sup>。したがって、初発酵素以降の反応、あるいはサイドにある物質からの生成反応には基本的に制御は働かないので、この位置にあるアミノ酸の前駆体や中間体をアミノ酸に変換することは可能と考えられた。スレオニンの前駆体であるホモセリンをスレオニンに、トリプトファン前駆体であるアンスラニル酸、あるいはインドールをトリプトファンに、フマル酸をアスパラギン酸に、グリシンをセリンに、化学合成した $\alpha$ -アミノ酪酸をイソロイシンに変換するなどの例である。方法はこれらの前駆体や中間体を基質(原料)としてアミノ酸に変換できる菌株をスクリーニングするもので、これは代謝制御を受ける鍵酵素を巧妙に回避して反応を進めようとするものである。こうして目的とする生産株が得られたが、これらの方法の多くは実用化されなかった。その理由は、原料として使用する前駆体や中間体が高価であったことと、4.7に記すアナログ耐性変異株を用いて多くのアミノ酸の直接発酵が程なく確立されたためである。実用化に成功したのは、フマル酸のように比較的安価に得られる原料からのアスパラギン酸、アラニン生産、アナログ耐性変異株で採取できない、D-p-ヒドロキシフェニルグリシンやシステインである。これらは4.8で詳細に記す酵素法

による生産法として実用化された。また、アナログ耐性株の検討が遅かったセリンはしばらくの間、グリシンを原料とする方法で生産された。

### 4.7 代謝制御の克服 (4) アナログ耐性変異株を用いる生産

アナログとは、天然のアミノ酸や核酸塩基の構造類似体で、主に医薬品や代謝研究の材料として使用されている。たとえばアミノ酸では、メチオニンに対応するエチオニン、スレオニンに対応する $\alpha$ -アミノ- $\beta$ -ヒドロキシバレリアン酸(AHV)、リジンに対応するS-(2-アミノエチルシステイン)[AEC]などの例がある。それらの構造式を、対応する天然のアミノ酸と対比して図4.7に示す。

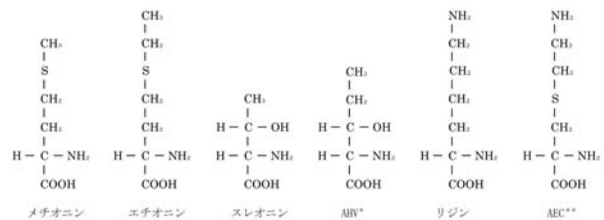


図4.7 アミノ酸アナログ構造式の例

\*AHV:  $\alpha$ -アミノ- $\beta$ -ヒドロキシ酪酸  
\*\*AEC: S-(2-アミノエチル)システイン

野生型の細菌はアナログを加えた最少培地(微生物の生育に必要な最少の成分だけを含む培地)では生育できないが、ここに対応するアミノ酸を補給すると生育が回復する。これはアナログが、本物のアミノ酸に“似て非なるもの”であるため、生体内ではアミノ酸をタンパク質に構成するために取り込む反応(アミノアシルtRNA合成酵素)や、鍵酵素をフィードバック阻害する反応で、本物のアミノ酸と拮抗して妨害するためである。したがって、アナログを含む培地で生育できるアナログ耐性変異株を取れば、その中にはその妨害を克服するに足る本物のアミノ酸を過剰に生産する変異株が得られると考えられる。このように、1960年代のはじめには、*E. coli*などのアミノ酸アナログ耐性株が各種のアミノ酸を過剰生産して“分泌”するという報告が出されていた。分泌ということは文字通り微量で、これらの報告に量的な記載はなかった。エチオニン耐性株によるメチオニン、AHV耐性株によるスレオニン、5-メチルトリプトファン耐性株によるトリプトファンの分泌などの例である(後年著者が、*E. coli*のAHV耐性株がスレオニンを分泌することを最初に報告したコーエン博士(G. N. Cohen)をパリのパスツール研究所に訪ねた時に、「このような研究が高売の“タネ”になるとは思いも寄らなかった

よ」と笑っていた)。

味の素社では*Brevibacterium flavum* (*C. glutamicum*) を親株としてAHV耐性変異株を誘導し、この中から大量のスレオニンを生産する株を得た。先に報告されていた“分泌”程度ではなかったのである。この生産株を用いるスレオニン発酵は直ちに工業化された。アナログ耐性株を用いるアミノ酸発酵の最初の工業化の成功である。この変異株では図4.6に示した、スレオニンによるホモセリン脱水素酵素のフィードバック阻害が遺伝的に除かれ、阻害に対する感受性が親株に比較して約1,300倍低下したことがスレオニン生産の原因であることが示され、生産と酵素活性の相関性が明らかにされた。さらに後の研究によって、この変異はホモセリン脱水素酵素の制御領域にあるアミノ酸配列の中の1つのアミノ酸残基の置換によるものであることが示された。同時に得られた、*E. coli* K-12株からのスレオニン生産株は15年後に遺伝子工学の応用による改良に活用された<sup>(17)</sup>。

スレオニン発酵の成功を嚆矢として、味の素社、協和発酵社、田辺製薬社(現在は田辺三菱製薬(株))となっているが、元の社名で表記する)などの各社から、各種のアミノ酸に対応するアナログ耐性株によるアミノ酸生産が報告された。報告は多数に上るが、これらの中から主として工業化に直結していると考えられるものを表4.1に示す。

このように、アナログ耐性株の活用によって、多く

のアミノ酸発酵が実現されることになった。*B. flavum*から得られたリジン生産株では鍵酵素であるaspartokinaseのリジン+スレオニンによるフィードバック阻害、*C. glutamicum*から得られたヒスチジン生産株では同じく鍵酵素であるATP-phosphoribosyltransferaseのヒスチジンによる阻害が除かれているように、多くは各アミノ酸の合成の初発の鍵酵素の活性がアミノ酸のフィードバック阻害や酵素合成の抑制が除かれていることが明らかにされている。また田辺製薬社の研究成果は腸内細菌*Serratia marcescens*を親株として使用したところに特徴がある。この株は*E. coli*に似て、ファージを用いる形質導入ができる性質があり、この性質を利用してフィードバック阻害と酵素合成のリプレッションを除いた変異株の造成もなされている。

## 4.8 酵素法とバイオリクターによる生産

酵素法は微生物の酵素、あるいは酵素を含む菌体を触媒として使用し、グルコース以外の原料、たとえば、代謝経路上の中間体、化学合成の中間体、などをアミノ酸に変換して生産する4.6で記した方法の応用展開技術である。発酵法が菌体の増殖を伴ってアミノ酸を生産するのに対して、酵素法では増殖した菌体を触媒として使用する点で、両法に若干の違いはあるが、本報告では酵素法も広義の発酵法として扱っている。この

表4.1 アナログ耐性変異株として得られたアミノ酸生産株

アミノ酸	使用アナログ	菌 株	文 献
スレオニン	α-アミノ-β-ヒト <sup>*</sup> ロキハ <sup>*</sup> レリアン酸	<i>E. coli</i>	I. Shio and S. Nakamori <sup>(18)</sup>
		<i>B. flavum</i>	I. Shio and S. Nakamori <sup>(19)</sup>
		<i>C. glutamicum</i>	H. Kase <i>et al.</i> <sup>(20)</sup>
		<i>S. marcescens</i> *	S. Komatsubara, <i>et al.</i> <sup>(21)</sup>
リジン	S-(2-アミノエチル)ステイン	<i>B. flavum</i>	K. Sano and I. Shio <sup>(22)</sup>
		<i>B. lactofermentum</i>	O. Tosaka <i>et al.</i> <sup>(23)</sup>
イソロイシン	AHV+o-チルスレオニン AHV+エチオニン イロイシンハイト <sup>*</sup> ロキム酸	<i>B. flavum</i>	I. Shio <i>et al.</i> <sup>(24)</sup>
		<i>B. flavum</i>	S. Ikeda <i>et al.</i> <sup>(25)</sup>
		<i>S. marcescens</i> *	M. Kisumi, <i>et al.</i> <sup>(26)</sup>
ヒスチジン	1,2,4-トリアゾ <sup>*</sup> -ルアラニン 2-チアゾ <sup>*</sup> -ルアラニン	<i>C. glutamicum</i>	K. Araki <i>et al.</i> <sup>(27)</sup>
		<i>B. flavum</i>	H. Kamijyo <i>et al.</i> <sup>(28)</sup>
トリプトファン	5-フロトリプトファンなど 5-フロトリプトファンなど	<i>B. subtilis</i> *	I. Shio <i>et al.</i> <sup>(29)</sup>
		<i>B. flavum</i>	I. Shio <i>et al.</i> <sup>(30)</sup>
フェニルアラニン	p-フロフェニルアラニンなど	<i>B. lactofermentum</i>	T. Tsuchida <i>et al.</i> <sup>(31)</sup>
プロリン	3,4-デヒト <sup>*</sup> ロ <sup>*</sup> ロリン	<i>B. flavum</i>	S. Nakamori <i>et al.</i> <sup>(32)</sup>
アルギニン	D-Ser, D-Arg, など 2-チアゾ <sup>*</sup> -ルアラニン	<i>C. glutamicum</i>	N. Nakayama <i>et al.</i> <sup>(33)</sup>
		<i>B. flavum</i>	K. Kubota <i>et al.</i> <sup>(34)</sup>
グルタミン	チアゾ <sup>*</sup> ア <sup>*</sup> ニン	<i>B. flavum</i>	T. Tsuchida <i>et al.</i> <sup>(35)</sup>
バリン	α-アミノ酪酸 2-チアゾ <sup>*</sup> -ルアラニン	<i>S. marcescens</i> *	M. Kisumi <i>et al.</i> <sup>(36)</sup>
		<i>B. lactofermentum</i>	T. Tsuchida <i>et al.</i> <sup>(37)</sup>
ロイシン	α-アミノ酪酸	<i>S. marcescens</i> *	M. Kisumi <i>et al.</i> <sup>(38)</sup>
セリン	アチ <sup>*</sup> セリン	<i>B. flavum</i>	W. Hibino <i>et al.</i> <sup>(39)</sup>

\*現在使用されていないと思われる

*B. flavum*、*B. lactofermentum*は現在*C. glutamicum*の呼称が奨められているが、原報にしたがって旧名で記載した。

方法による主な研究成果には以下のようなものがある。

#### 4-8-1 アミノアシラーゼによるDL-アミノ酸からL-アミノ酸の生産

発酵法によるアミノ酸生産が本格化する以前には、化学合成法によるアミノ酸の生産研究が最も進んでいたが、この方法で合成されるアミノ酸はDL（ラセミ）体である。DL体合成の段階までは比較的簡単にできるが、DL体を天然型のL体に変換する光学分割がなかなかの難題で、工業化までには至るものは多くはなかった。ここに田辺製薬社で開発された方法が、DL-アミノ酸から簡単に合成されるN-アシル-DL-アミノ酸を糸状菌 (*Aspergillus oryzae*) から得られる酵素、アミノアシラーゼによって不斉加水分解する方法である。この酵素はN-アシル-DL-アミノ酸のアシル基を脱離する反応を触媒するが、この酵素がL体だけに作用し、D体には作用しない特徴を利用する。分解されないで残るD体は加熱してラセミ化してDL体とする。この反応を繰り返して最終的に全部をL体に変換する方法である（図4.8）。酵素法で成功した最初のL体アミノ酸生産の例で、主としてL体が要求されるアミノ酸輸液などに使用されるL-メチオニン、フェニルアラニン、バリンなどがこの方法で生産された。

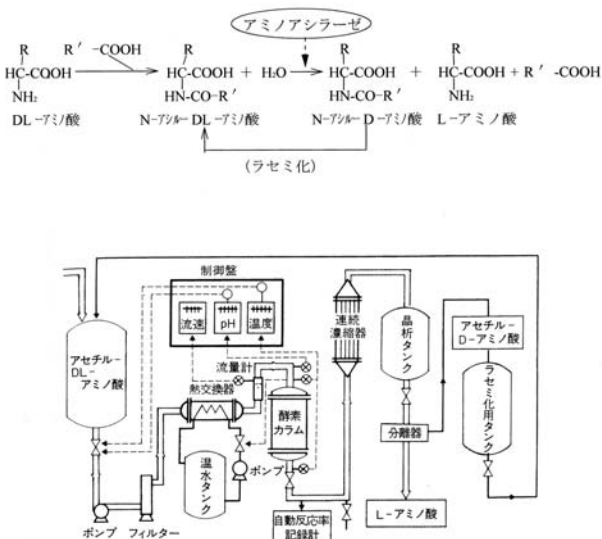


図4.8 アミノアシラーゼによるDL-アミノ酸からL-アミノ酸の生成反応式と製造装置のフローダイアグラム<sup>(40)</sup>

酵素は水溶液の状態で使用するため、安定性が低い上に、固体触媒のように繰り返して連続使用はできないという難点がある。この問題を一挙に解決し、固体触媒のように取り扱うことを可能にしたのが酵素の固定化技術である。このような固定化酵素を利用する反応はバイオリアクターと呼ばれている。酵素の固定化

は、酵素をイオン交換樹脂のような高分子の担体に結合する、グルタルアルデヒドのような結合剤を用いて連結する、あるいはリポソームのような二重層膜やカラギーナン、ポリアクリルアミドなどの高分子で包括する方法で行われる。包括法では酵素ばかりではなく、酵素を含む菌体も対象になる。

アミノアシラーゼに関してはDEAE-Sephadexにイオン結合で固定化したバイオリクターによるL体アミノ酸の連続生産が1969年田辺製薬社で成功している<sup>(40)</sup>。

#### 4-8-2 アスパラギン酸、アラニン

アスパラギン酸はアミノ酸輸液、経口・経腸栄養剤など臨床栄養剤の成分、アルギニン、オルニチンとの塩の形で疲労回復・肝機能改善剤などの医薬用に、また酸味、こく味を与える調味料として使用されるほかに、甘味料であるアスパルテームの原料として大きな需要がある。アラニンはアミノ酸輸液、経口・経腸栄養剤などの医薬用に使用される。

1959年、京大北原覚雄ら、および田辺製薬社は、大腸菌を使用してフマル酸からアスパラギンを生産する方法を報告した。この反応を触媒する酵素はアスパルターゼである。田辺製薬社では1973年に固定化アスパルターゼを用いる連続生産の工業化に成功している<sup>(41)</sup>（図4.9）。

田辺製薬社ではまた、アスパラギン酸をアラニンに変換する酵素、アスパラギン酸デカルボキシラーゼを生産する *Pseudomonas dacunhae* を見出し、アスパラギン酸からアラニンを生産するプロセスの開発にも成功している<sup>(42)</sup>（図4.9）。

発酵法によるグルコースを原料とするアスパラギン酸の生産は収率が低く、またアラニンの生産は、生産物がDL体であるため、アスパラギン酸、アラニンとも、この酵素法で工業生産されている。

同社ではアスパルターゼおよびアスパラギン酸デカルボキシラーゼを含む菌体をポリアクリルアミドで（後にはκ-カラギーナンで）包括して固定化し、フマル酸を原料として、アスパラギン酸およびアラニンの長期安定な連続生産に成功している<sup>(43)</sup>。この反応システムを図4.9に示す。

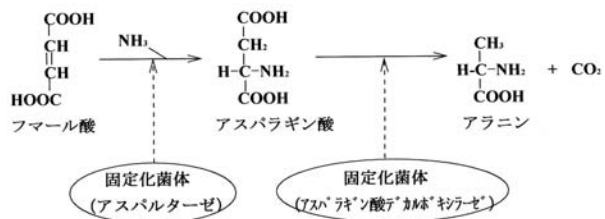


図4.9 酵素を含む固定化菌体によるフマル酸からアスパラギン酸とアラニンの生産

### 4-8-3 ジオキシフェニルアラニン(Dioxyphenylalanine)

ジオキシフェニルアラニン（以下DOPA）は脳の神経機能を制御するドーパミンなどの一連の化合物の前駆体のアミノ酸で、パーキンソン病などの老人性脳神経障害にすぐれた効果を示す医薬品である。微生物の生命活動とは関係のないアミノ酸であるため、直接発酵法で作ることは不可能であるが、微生物の酵素を用いる合成法が開発されている。チロシンをβ位で分解する以下の反応（図4.10）を触媒する酵素、β-チロシナーゼを*Citrobacter intermedius*や*Erwinia herbicola*などの細菌が生産することが京大の山田秀明らによって見出された<sup>(44)</sup>。この反応の逆反応によって、チロシンがフェノール、ピルビン酸、アンモニアから合成されることが同じグループで示されたが、この酵素は基質特異性が広く、以下の反応のように、フェノールに変えてピロカテコールを原料にすることによってDOPAが合成された（図4.11）。このプロセスは味の素社で1992年に工業化された<sup>(45)</sup>。

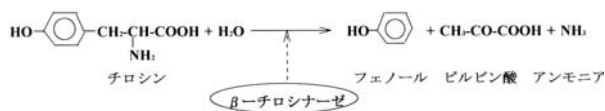


図4.10 β-チロシナーゼによるチロシンの分解反応

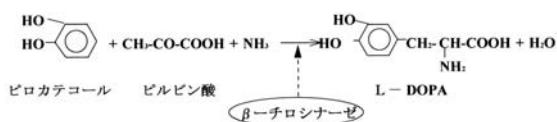


図4.11 β-チロシナーゼの逆反応によるDOPAの合成

### 4-8-4 システイン

システインは輸液成分、肝機能改善剤、色素沈着改善剤、パンの発酵助剤、またこのアセチル誘導体は去痰剤の原料になるなど、多くの用途がある。システインはシステイン含量が高い毛髪やケラチンを塩酸で加水分解して製造されている。発酵法による生産はまだ確立されていない。システイン化学合成の中間体であるDL-2-アミノチアゾリン-4-カルボン酸（以下DL-ATC）を微生物の酵素を用いて不斉加水分解してL体のシステインを得る酵素法が味の素社で開発された<sup>(46)</sup>。酵素の生産菌*Pseudomonas thiazolinophilum*はDL-ATCを唯一のN源として利用して生育できる細菌としてスクリーニングされたもので、以下の反応に関わるATCラセマーゼ、ヒドロラーゼという酵素をもつと推定されている（図4.12）。この製法は味の素社で1982年に工業化された。

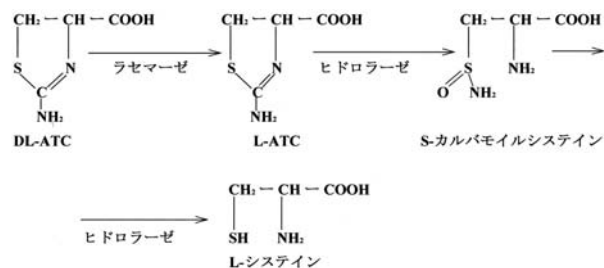


図4.12 酵素法によるDL-ATCからL-システインの生産

ATC: 2-アミノチアゾリン-4-カルボン酸

### 4-8-5 D-p-ヒドロキシフェニルグリシン

D-p-ヒドロキシフェニルグリシン（以下D-HPG）は天然のアミノ酸ではなく、半合成ペニシリンであるアモキシシリンの成分として開発されたD体のアミノ酸である。アモキシシリンはペニシリン骨格である6-アミノペニシラン酸の6位のアミノ基にD-HPGを導入して合成される。

5位置置ヒダントインはアミノ酸の化学合成法の中間体で、これを酵素的に不斉加水分解してL-アミノ酸を得る方法はいくつか報告されていたが、D体のアミノ酸を特異的に生成する酵素、ヒダントイナーゼを生産する微生物が京大山田秀明らによってスクリーニングされた<sup>(47)</sup>。これらの微生物の中から、DL-5-(p-ヒドロキシフェニル)ヒダントインをD-N-カルバモイル-p-ヒドロキシフェニルグリシンに変換する最も高い活性をもつ*Pseudomonas putida*が選ばれた。D-N-カルバモイル-p-ヒドロキシフェニルグリシンをD-HPGに変換する脱カルバモイル反応は酸性条件下に亜硝酸で処理する方法で行われた。このD-HPGの工業生産はカネカ社で行われ、次に示すこの生産プロセス（図4.13）はシンガポールの工場稼働している。

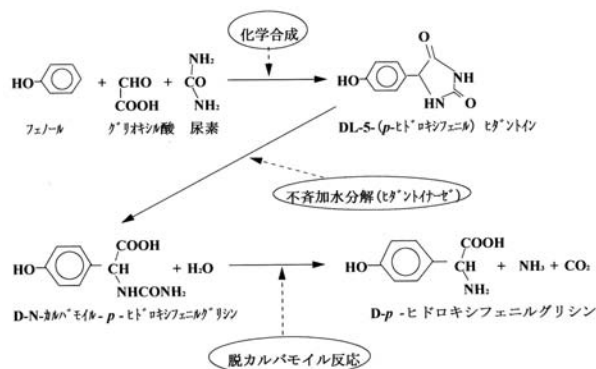


図4.13 D-p-ヒドロキシフェニルグリシンの合成反応

このプロセスの最終段階の脱カルバモイルの反応は、当初は上記の通り、酸性条件下に亜硝酸で処理することによって行われていたが、この方法では反応収率が低く、副生成物が多く、また酸、アルカリの多用による環境負荷が大きいと言う問題点があった。カネカ社では、この反応を触媒する酵素、D-カルバミラーゼをもつ細菌、*Agrobacterium* sp.をスクリーニングし、このD-カルバミラーゼ遺伝子を*E. coli*でクローニングして発現させることに成功した。このことによって、ヒダントイナーゼをもつ*Pseudomonas putida*とカルバミラーゼをもつ*E. coli*を、それぞれ固定化して、バイオリクターのシステムで生産する方法が確立された<sup>(48)</sup>。

#### 4-8-6 リジン

東レ社では、ナイロンの原料であるDL- $\alpha$ -アミノ- $\epsilon$ -カプロラクタム（以下ACL）から、酵素法によってL-リジンを製造するシステムを開発した<sup>(49)</sup>。図4.14に示すように、反応はACLラセマーゼ活性をもつ細菌、*Achromobacter obae*とACLを加水分解するヒドロラーゼをもつ酵母菌、*Cryptococcus laurentii*を選択して、これらの組み合わせによって、DL-ACLをほぼ定量的にL-リジンに変換するものである。この方法は宝酒造と共同で一時工業化されたが現在は行われていない。

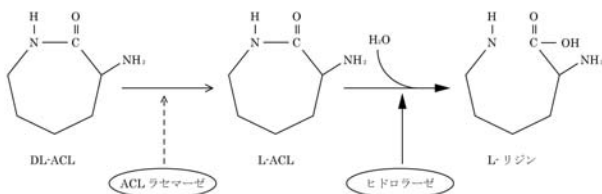


図4.14 酵素法によるDL- $\alpha$ -アミノ- $\epsilon$ -カプロラクタムからのL-リジン生産

ACL:  $\alpha$ -アミノ- $\epsilon$ -カプロラクタム

## 4.9 遺伝子工学（組換えDNA）技術の応用による生産菌株の改良

1970～1980年にほぼ確立された遺伝子工学の技術は、特定の遺伝子を単離し、これを解析、改変、増幅するなど、様々な応用を可能にした。アミノ酸の過剰生産に必要な条件は3.3に示された通り、各アミノ酸による代謝制御を除き、アミノ酸生合成の酵素活性を向上させることにあるので、遺伝子を特定するクローニングによって遺伝子の産物である酵素を改変したり、また酵素の生産量を増強することが可能になること、このことはアミノ酸の生合成を増強できることを

示し、生産株の育種と改良には極めて応用範囲の広い技術を提供することになった。

遺伝子工学の技術が確立された当初は、異種の遺伝子をもつ生物の安全性や生態系に与える影響等の懸念から、遺伝子組換え実験に関する実験指針が制定され、さらに2004年には「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称カルタヘナ議定書担保法）として法制化されたが、菌株や遺伝子の由来が明確にされている場合には安全性に問題がないので、適宜実験が承認されて実用化が進んでいる。

*E. coli* K-12株は安全性が証明され、材料と手法に関する情報が豊富で、遺伝子操作の技術がもっとも応用しやすい菌株で、現在も世界中で広く使用されている菌株である。この菌株を用いる生産株の改良や、新しいアミノ酸発酵も生まれている。

一方、アミノ酸発酵の主役である*C. glutamicum*ではゲノム解析が終わり、また*Brevibacterium*とともに、ベクターの構築や、遺伝子の導入法などの遺伝子操作のシステム開発が行われ、このシステムを活用してスレオニンやフェニルアラニンなど生産の向上が示されたが、実用化までには至っていない。

#### 4-9-1 スレオニン

味の素社では*E. coli* K-12株からスレオニン生産菌を、アナログであるAHV耐性変異株として得ていた<sup>18)</sup>。4.7で述べた通り、この変異株ではスレオニン合成の鍵酵素であるホモセリン脱水素酵素がスレオニンによるフィードバック阻害に非感受性に脱感作されている。ロシアの国立研究所Genetikaではこの情報をもとに、独自にスレオニン生産株を採取し、これに遺伝子操作の技術を応用して脱感作されたホモセリン脱水素酵素遺伝子を増幅することによってスレオニンの生産量が親株の3倍程度向上し、グルコース6.2%を含む培地の培養によって20g/Lになったことを報告した<sup>(50)</sup>。

味の素社でも同様に*E. coli* K-12株のスレオニン生産株の遺伝子を増幅し、スレオニンの生産量が親株の3倍程度向上することを示し、さらにジャーフェメンタの培養によって55g/Lの生産量を得た<sup>(51)</sup>。

後年、味の素社ではGenetika研究所から菌株を導入して改良した。つまり、HDの遺伝子はベクターとして用いられているプラスミド上に組み込まれているが、たびたびプラスミドの不安定性とともにスレオニン生産の力価が低下することがあったが、これをMuファージを用いるクローニングによって染色体上に組換えて安定性を向上させることに成功した<sup>(52)</sup>。菌株

育種の概略を図4.15に示す。この菌株は安全性に関するデータも提示して、フランス政府の承認を得て、1991年に味の素社の合弁会社であるフランスのユーロリジン社で工業化された。遺伝子工学の手法で得られた菌株の最初の工業化の例と考えられる。

#### 4-9-2 リジン、トリプトファン

味の素では、特に外部発表は行われていないが、農林省農業資材審議会飼料分科会や通産省の指針適合確認で認可を得て<sup>(53)</sup>、*E. coli* K-12株を用いる遺伝子操作技術の応用による、リジン、トリプトファン生産株の改良を進めていると考えられる。

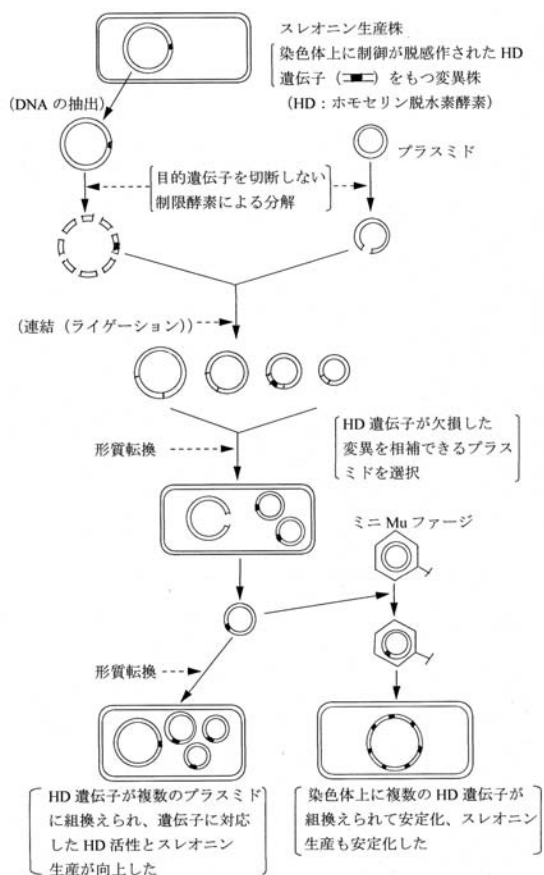


図4.15 組換えDNA技術によるスレオニン生産株改良の模式図

### 4.10 遺伝子工学の応用による新しいアミノ酸生産

#### 4-10-1 ヒドロキシプロリン

このアミノ酸は動物のコラーゲンの主成分で、これまでコラーゲンの加水分解物から抽出する方法で、世界では数百トンが生産され、医薬品の原料として使用されている。このアミノ酸は微生物の生命活動とは無関係のため、微生物による直接発酵で生産することは不可能である。協和発酵社で開発された技術は、異種

の微生物の機能を、組換え技術によって組み合わせて可能としたものである。

ヒドロキシプロリンの化学構造には、DL体のほかに、水酸基が3と4の炭素の位置に入ること、さらに水酸基とカルボキシル基がcisとtransに位置するかによって8つの異性体が存在するが、生物活性のあるものはtrans-4-ヒドロキシプロリンである。

協和発酵社が開発した方法は、プロリンの4の炭素に水酸基を導入する酵素、プロリン4-ヒドロキシラーゼを生産する放線菌 (*Dactylosporangium* sp.) をスクリーニングし、この遺伝子をクローニングして、別途*E. coli*から育種したプロリン生産株に導入して、プロリンに水酸基を付加するものである。この株のプロリンからの変換率100%、40g/Lの発酵成績で、遺伝子組換え体の工業化指針に適合し、実用生産が行われている<sup>(54)</sup>。

#### 4-10-2 D-p-ヒドロキシフェニルグリシン

4-8-5に記述した通り、カネカで開発されたD-HPGの合成プロセスの内、後段の脱カルバモイルの反応は、この反応を触媒するD-カルバミラーゼの遺伝子を*Agrobacterium* sp. の細菌から得て、*E. coli*で発現させ、この菌体を酵素源として生産プロセスを確立したものである。

#### <引用文献>

- (1) 木下祝郎：アミノ酸発酵の発見と進歩、(財)バイオインダストリー協会、アミノ酸核酸集談会編「発酵からニューバイオテクノロジーへ」、p. 7、1987.
- (2) S. Kinosita *et al.* : J. Gen. Appl. Microbiol., 3, 193, 1957.
- (3) S. Udaka : J. Bacteriol., 79, 754, 1960.
- (4) 田中勝宣ら：日本農芸化学会誌、34, 593, 1960.
- (5) 協和発酵工業社史、「それからそれへ」、協和発酵50年の軌跡と新世紀への礎、p. 67, 2000年9月.
- (6) N. L. Sommerson and T. Phillips : 特公昭37-1965.
- (7) K. Takinami *et al.* : Agric. Biol. Chem., 27, 858, 1963.
- (8) J. Nakamura, *et al.* : Appl. Environ. Microbiol., 73, 4491, 2007.
- (9) アミノ酸核酸集談会編：「アミノ酸発酵」上、下巻、共立出版、1972年.
- (10) 相田、滝波、千畑、中山、山田編：「アミノ酸発酵」、学会出版センター、1986年.

- (11) K. Aida, I. Chibata, K. Nakayama, K. Takinami, and H. Yamada (Eds.): *Biotechnology of amino acid production*, Kodansha, Tokyo, and Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, 1986.
- (12) I. Shiio, *et al.* : *J. Biochem.*, 53, 333, 1963.
- (13) S. Udaka, *et al.* : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 4, 272, 1958.
- (14) K. Nakayama, *et al.* : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 7, 145, 1961.
- (15) F. Yoshinaga, *et al.* : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 12, 219, 1966.
- (16) S. Okumura, *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 28, 742, 1964.
- (17) 中森 茂：相田 浩他編「アミノ酸発酵」、p. 307, 学会出版センター、1986年。
- (18) I. Shiio, *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 33, 1152, 1969.
- (19) I. Shiio, *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 34, 448, 1970.
- (20) H. Kase, *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 36, 1611, 1972.
- (21) S. Komatsubara, *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 834, 1978.
- (22) K. Sano, *et al.* : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 16, 373, 1970.
- (23) O. Tosaka, *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1773, 1978.
- (24) I. Shiio, *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2053, 1973.
- (25) S. Ikeda, *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 40, 511, 1976.
- (26) M. Kisumi, *et al.* : *J. Bacteriol.*, 110, 761, 1972.
- (27) K. Araki, *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 35, 2081, 1971.
- (28) 上条弘隆ら：日本農芸化学会講演要旨集、p. 112, 1973.
- (29) I. Shiio, *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 36, 2315, 1972.
- (30) I. Shiio, *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 37, 1991, 1973
- (31) 土田隆康ら：特許出願公開昭和49-116294..
- (32) S. Nakamori, *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 46, 487, 1982.
- (33) K. Nakayama, *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 36, 1675, 1972.
- (34) K. Kubota, *et al.* : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 19, 339, 1973.
- (35) T. Tsuchida, *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2089, 1987.
- (36) M. Kisumi, *et al.* : *Amino Acid and Nucleic Acid 発酵と代謝*, 19, 1, 1969.
- (37) T. Tsuchida, *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 39, 1319, 1975.
- (38) M. Kisumi, *et al.* : *J. Biochem.*, 73, 107, 1973.
- (39) 日比野ら：日本農芸化学会講演要旨集、p.247, 2000年。
- (40) 土佐哲也：バイオリアクターの工業化、現代化学、p. 50、1992年9月。
- (41) T. Tosa, *et al.* : *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 1973.
- (42) K. Yamamoto, *et al.* : *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 2945, 1980.
- (43) T. Sato, *et al.* : *Enzyme Engineering*, 6, 271, 1982.
- (44) H. Kumagai, *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 34, 266, 1969.
- (45) 江井 仁ら：バイオサイエンスとインダストリー、54, 11, 1996.
- (46) K. Sano *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 806, 1977.
- (47) H. Yamada *et al.* : *J. Ferment. Technol.*, 56, 484, 1978.
- (48) 高橋里美：日本農芸化学会誌、74, 961, 2000.
- (49) T. Fukumura : *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1327, 1977.
- (50) V. G. Debabov *et al.* : *Proceedings of IVth International Symposium on GIM (Kyoto)* , p. 254, 1982.
- (51) K. Miwa *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2329, 1983.
- (52) O. Kurahashi *et al.* : *Proceedings of VIth International Symposium on GIM (Strasbourg)*, p. 178, 1988.
- (53) 日経バイオ年鑑2004, p. 575.
- (54) Shibasaki *et al.* : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 64, 746, 2000.

# 5 培養技術の進展と培養装置

大量培養では、スクリーニングされたり育種され菌株の、試験管あるいはフラスコのレベルで得られた実験結果を大型のジャーフェメンタやタンクでの培養にスケールアップして再現するとともに、試験管やフラスコのレベルの実験では出来ない培養技術の開発を行う。

現在アミノ酸発酵で一般的に行われている大量培養装置のアウトラインを図5.1に示す。基本的には抗生物質の生産のために開発された深部培養システムをベースに確立された。

アミノ酸発酵では酸素の供給が不足すると、コハク酸や乳酸が生成して、グルタミン酸の収率が大きく低下する。*Brevibacterium flavum*、*B. lactofermentum* (*C. glutamicum*) から誘導されたアミノ酸生産株のアミノ酸生産に対する酸素濃度の影響について詳しく検討されている。グルタミン酸をはじめ、グルタミン酸を経由して生合成されるグルタミン、アルギニン、プロリンでは高い酸素濃度で、バリン、フェニルアラニンなどでは低い濃度で最大の生産を示した<sup>(2)</sup>。

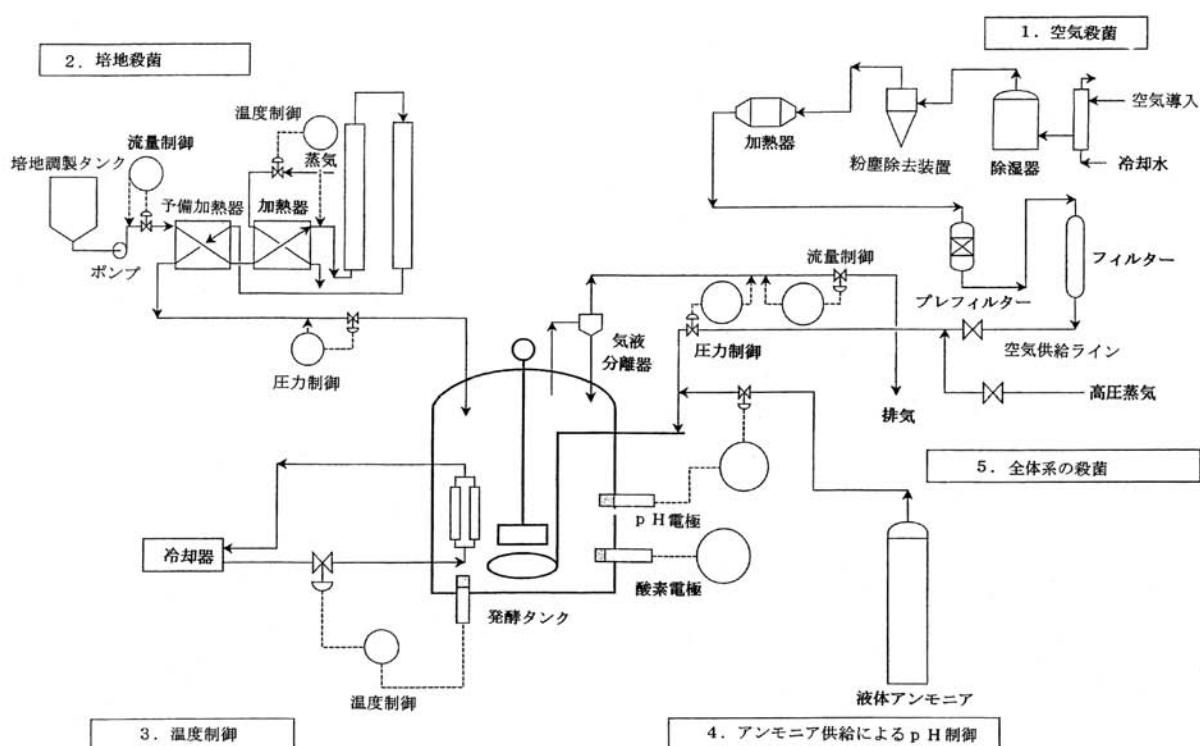


図5.1 大量培養装置の略図 (文献<sup>(1)</sup>より)

システムの構成要素は大きく分けて5つあり、①空気殺菌 ②培地殺菌 ③温度コントロール ④pHコントロール⑤全体系の殺菌である。これらによって、中央に位置する発酵タンクで行われる通気攪拌培養をコントロールするシステムである。すべてコンピュータ制御で行われている。この中では以下のような技術開発が行われた。

酸素は溶解度が低いため、高い酸素濃度が要求される場合にはこの供給が発酵生産性のネックになるが、この技術課題に対して、培養攪拌のためのタービン翼を大型にすることによって酸素供給能を向上させることに成功している<sup>(3)</sup>。また空気中の酸素分圧を高めるため液体酸素を使用したり、酸素富化装置の活用による向上が検討されている。

## 5.1 酸素の供給法

酸素は細菌の呼吸によるエネルギー獲得に必要であるだけでなく、アミノ酸の成分として、炭素源である糖分に次いで大量に消費される原料である。グルタ

## 5.2 フェッドバッチ培養法 (Fed-batch=流加培養法)

この手法は、通常のパッチ式の回分培養法に対して、培養の経過とともに主原料の糖分が消費された時点で、別途糖分を追加して培養を続け、目的とする生産



物の蓄積濃度を高め、バッチ当たりの生産性を高めた改良法である。この方法は抗生物質の発酵生産で開発されたものであるが、味の素社ではグルタミン酸はじめアミノ酸の生産にこの技術を応用し、さらに、追加した液量に相当する液量を引き抜くことによって生産性を高めている<sup>(3)</sup>。

### 5.3 培養液の浸透圧の調節

味の素ではまた、グルタミン酸はじめアミノ酸の蓄積量は一定時間で頭打ちの状態になる。これは細菌細胞の生産活性の低下に由来するが、この原因のひとつが培養液の浸透圧の上昇であることを明らかにし、この対応策として糖分の濃度を徐々に添加する方法や、グリシンペタインを添加する方法で生産速度を高めた。

### 5.4 発泡の制御

発酵の種類によっては大量の発泡が起る。発泡の原因は複雑で、培地成分、菌体成分、アミノ酸やその他の生産物、温度、pHなどの組み合わせによって影響され、特定されていない。このためアミノ酸の種類や菌株の種類の違いによって、突発的に発泡することが希ではない。発泡が多い場合は、発酵タンクから発酵液の吹き出しが起り、雑菌の汚染の原因となり、発

酵液量を減らさなければならないことになる。液量を減らすことは、とりもなおさず生産性が下がることである。この問題に対しては、消泡剤等で処理するほか、排気とともに泡をサイクロンに導いて、機械的に破泡する技術も開発された<sup>(3)</sup>。

これらの培養技術は基本的には上記のとおり、ペニシリン発酵の工業化の時に大きな進展があり、その知見がアミノ酸発酵に应用され、主としてグルタミン酸発酵を題材にして開発されたが、当然ながらグルタミン酸以外のアミノ酸の発酵プロセスに広く应用されている。

これらの大量培養、さらに分離・精製工程も含めて多くの設備が装置されている。これらの管理はコンピュータで制御されている<sup>(4)</sup>。

#### <引用文献>

- (1) S. Nakamori and H. Shibai: R&D Trend Analysis, 「Biotechnology in Japan」, p. 84, KRI, Jan. 2001.
- (2) 明石邦彦ら: 相田 浩他編「アミノ酸発酵」、p. 127, 学会出版センター、1986年
- (3) 味の素株式会社 研究所50年史“あしたのものを求めて”、p. 135、136, 2006年9月。
- (4) 後藤祐二: 相田 浩他編「アミノ酸発酵」、p. 145, 学会出版センター、1986年

# 6 | アミノ酸の分離・精製技術の開発

アミノ酸発酵の、いわゆるダウンストリーム（下流）の技術が、培養液やバイオリクターの反応液からアミノ酸を分離・精製して回収する工程で、その内容はアミノ酸の脱色と晶析、さらに省力化などの技術である。この工程は製品の品質を決定すると共に、この収率の良否はコストに大きな影響を与える重要なプロセスである。この技術は学会等で報告されるものは少なく、ノウハウに近いものが多く、社史等からの資料を引用する。以下に発酵液からのグルタミン酸とリジンの分離・精製、および酵素法によってフマル酸から生産されるアスパラギン酸の分離・精製について記した。それ以外のアミノ酸の場合も、概ねこれらに大同小異である。

## 6.1 グルタミン酸ナトリウム

分離・精製工程の概略を図6.1に示す。グルタミン酸発酵が出来た当初から発酵母液からグルタミン酸の塩酸塩として回収する方法が行われてきた。その後グルタミン酸の $\alpha$ 形結晶から $\beta$ 形結晶へ転移させることで、不純物の淘汰を向上させる技術が開発されている。さらに発酵母液から濃縮晶析することで $\alpha$ 形結晶を回収する技術が開発された。この技術によってグルタミン酸の回収率が向上すると共に、培養液の濃縮で生じていたアンモニアの飛散が抑えられる利点も得られた。

## 6.2 リジン塩酸塩

リジン塩酸塩の分離・精製工程の概略を図6.2に示す。この工程でも、生産性の向上、省エネルギーと環境への影響の最少化が技術開発の大きな課題である。このプロセスはイオン交換樹脂による処理が中心で、初期には大型の樹脂塔に樹脂を充填して、培養液、溶離液、再生液をバルブの切換えにより順次流す方法が行われていたが、この方法では長時間を要し、生産性が低いため、培養液、溶離液、再生液を高速で通液し、各液が流れる小型のカラムを順次切換えてゆく連続操作ができる技術が開発された。

また、生産菌株として*E. coli*が導入されるようになって、この菌株の除菌がマイクロフィルトレーション膜によって行われるようになり、さらに樹脂操作が簡略化された<sup>(3)</sup>。

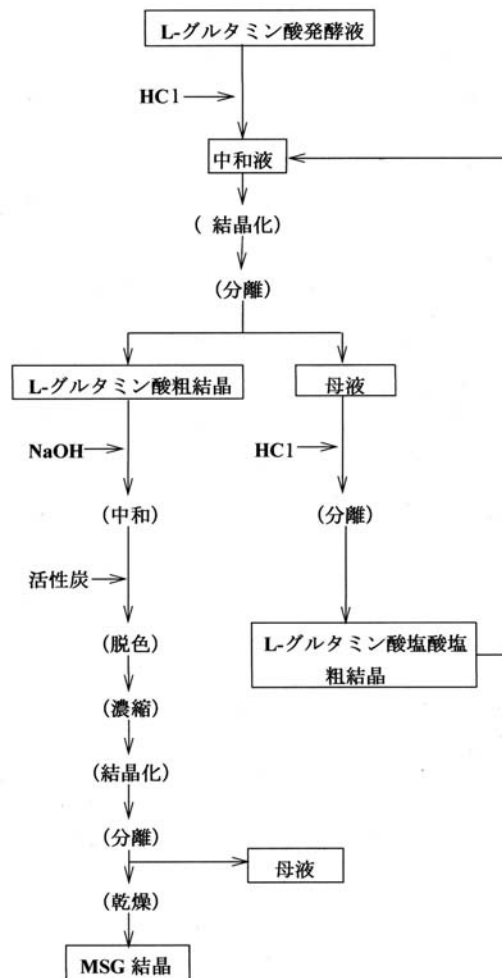


図6.1 L-グルタミン酸ナトリウムの精製と分離工程<sup>(1)</sup>

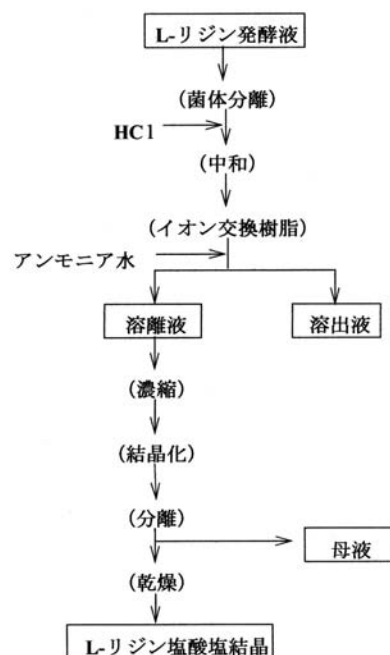


図6.2 L-リジン塩酸塩の精製と分離工程<sup>(2)</sup>

## 6.3 アスパラギン酸

アスパラギン酸はアスパルターゼ活性をもつ *E. coli* の固定化菌体を用いるバイオリアクターで、フマル酸を原料にして生産されるので、グルタミン酸やリジンの培養液のように、菌体、培地成分、菌体から分泌される副生産物が含まれないため、反応液の組成は培養液よりはるかに単純で、処理操作は容易である。アスパラギン酸の分離・精製工程の概略を図6.3に示した。

<引用文献>

- (1) 伊藤寿夫：化学工学会編「バイオプロセス便覧」、p. 236, 1996.
- (2) 川喜田哲哉：化学工学会編「バイオプロセス便覧」、p. 289, 1996.
- (3) 味の素株式会社 研究所50年史“あしたのものを求めて”、p. 135、136, 2006年9月.
- (4) 梅村 勲：化学工学会編「バイオプロセス便覧」、p. 71, 1996.

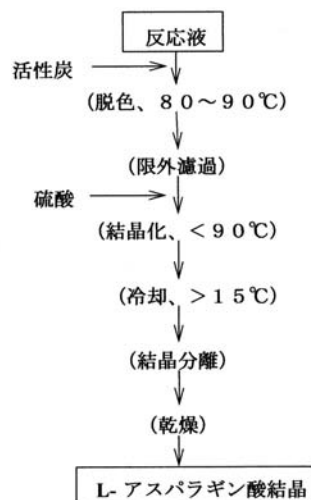


図6.3 L-アスパラギン酸の精製と分離工程<sup>(4)</sup>

# 7 | アミノ酸の規格

アミノ酸の規格は各種の公定書に記載されている（日本薬局方、日本薬局方外医薬品規格、日本薬品添加物規格、日本食品添加物公定書、など）。また、企業が独自に規定を定めている。ここでは味の素社が採用しているアミノ酸の規格試験を紹介する。主な項目と内容は次の通りである<sup>①</sup>。

## 比旋光度 $[\alpha]_D^{20}$

アミノ酸の光学純度決定の一手段で、旋光計によって測定する。旋光度測定は温度20℃、層長100mm、光線はナトリウムスペクトルD線で行う。

## 溶状

試料溶液における濁りおよび色の限度試験である。試験法は白色の背景を用い濁りおよび色を目視で観察するほか、分光光度計より溶媒を対照として10mmのセルを用いて測定波長430nmにおける透過率を測定する。

## 塩化物 (Cl)

試料中に混在する塩化物 (Clとして) の限度試験、また試料中に成分として存在する塩化物の定量試験。試験法は限度試験として硝酸銀、定量試験としてはホルハルト法を用いている。

## アンモニウム (NH<sub>4</sub>)

試料中に混在するアンモニウム (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>として) の限度試験で、試験法は試料溶液を蒸留した後に、フェノールペンタシアノトロシル鉄酸ナトリウムと次亜塩素酸ナトリウム・水酸化ナトリウム混液を用いるインドフェノール法で行う。

## 硫酸塩 (SO<sub>4</sub>)

試料中に混在する硫酸塩 (SO<sub>4</sub>として) の限度試験で、試験法は塩化バリウムを用いる。

## 鉄 (Fe)

試料中に混在する鉄 (Feとして) の限度試験で、試験法は1,10-フェenantロリンを用いる。

## 重金属 (Pb)

試料中に混在する重金属の限度試験。この重金属とは、酸性で硫化ナトリウム溶液によって呈色する金属性混在物を言い、その限度は鉛の量として表わす。

## ヒ素 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

試料中に混在するヒ素の限度試験。その限度は三酸

化二ヒ素 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) の量として表わす。

## 他のアミノ酸

試料中に混在する他のアミノ酸を分離検出する方法。試験法は薄層クロマトグラフ法で、ガラス板上に薄く展開したシリカゲル等の薄層を固定相とし、これに試料をスポットして乾燥した後、その下部を展開溶媒液に浸すと試料は溶媒との間で分配抽出され移動する。ニンヒドリン試液を噴霧し、発色したアミノ酸の移動距離と溶媒の動いた距離の比率から試料に含まれるアミノ酸を特定する方法である。

## 乾燥減量

乾燥によって失われる試料中の水分、結晶水の全部または一部および揮発性物質などの量を測定する。

## 水分

試料中に含まれる水分を滴定法（カールフィッシャー法）によって測定する方法である。

## 強熱残分（硫酸塩）

550℃～650℃で恒量になるまで強熱した際に揮発せず残留する物質の量を硫酸塩として測定する。

## 含量

非水滴定法：非水溶媒（通常は酢酸）に溶解したアミノ酸を塩基として、過塩素酸で滴定し、電位差の変化を測定する。

中和滴定法：酸性アミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸）では、水に溶解したアミノ酸を酸として、水酸化ナトリウム溶液で滴定し、指示薬フェノールフタレインで定量、あるいは電位差の変化を測定する。

ヨウ素滴定法：システインではヨウ素との反応を利用し、過量のヨウ素をチオ硫酸ナトリウム液で滴定する。

## pH

ガラス電極によるpH計を用いて測定する。

## エンドトキシン（注射薬用）

グラム陰性菌由来のエンドトキシンを検出する方法で、カプトガニの血球抽出成分より調製されたライセート試薬を用いる。

## <引用文献>

- (1) 味の素株式会社アミノ酸部編：Ajinomoto's Amino Acids Handbook, pp. 71~73, 2003年1月。

# 8 | アミノ酸発酵の主原料

アミノ酸発酵の原料は主原料である炭素源のほかに、窒素源としてのアンモニア、アミノ酸混合物、ミネラル成分としてリン酸、カリウム、マグネシウム、鉄、マンガン、ビタミン類としてビオチン、チアミン、などである。さらにグルタミン酸発酵では、界面活性剤や $\beta$ -ラクタム抗生物質も使用される。これらの内、最も大きな比率を占めるのが炭素源である。炭素源以外の成分は量的に多くはないので記述は省略する。また、本報告では酵素法によるアミノ酸の生産も、広義のアミノ酸発酵に含めてきたが、酵素法の主原料はアミノ酸の種類によって多岐にわたるので触れない。したがって、直接発酵法の主原料とは炭素源を意味する。

表8.1には炭素源の原料、あるいは原料の候補として上げられるものについて、現状と問題点などを示した。発酵プロセスの原料は主としてグルコースであり、デンプン系と糖質系が中心である。デンプンは酵素(アミラーゼ)で糖化して用いられる。糖質系はサトウキビ(ケーン)から得られる粗糖とモラセス(糖蜜)である。モラセスはサトウキビとサトウ大根(ビート)からの粗糖結晶を採取した残液の晶析母液で、前者はケーンモラセス、後者はビートモラセスで、比較的安価に得られるものである。成分はともに蔗糖、グルコース、果糖である。表8.1に示す原料の内、酢酸とエタノールはグルタミン酸菌が利用(資化)できる原料である。メタノール、n-パラフィン(n-アルカン)はこれらを資化できる微生物を別途スクリーニングして、この中から生

産株を育種する方法が行われる。

現在の大きな問題点は、石油資源が世界的に高騰している中で、デンプン、粗糖、モラセスがいずれもバイオエタノールの原料としての需要が高まり、価格が高騰していることである。したがって、今後の大きな課題のひとつは、食料やエネルギーと競合しない、たとえばバイオマス、メタノール、二酸化炭素などのような未利用材料を原料として開発することである。

表8.1 アミノ酸発酵で使用される、あるいは候補となる主要な炭素源の現状と問題点

炭素源	現状と問題点
デンプン系 トウモロコシ キャサバ サゴヤシ、など	酵素(アミラーゼ)によって糖化して、現在のアミノ酸発酵で広く使用されている。バイオエタノールとの競合による価格の上昇が大きな問題点である。
糖質系 ケーンモラセス ビートモラセス 粗糖(蔗糖)	モラセスは砂糖の結晶母液で成分は蔗糖、ブドウ糖、果糖。グルタミン酸、リジン発酵で使用されている。価格の上昇が大きな問題点である。
その他の原料	
酢酸	モラセスのような着色のある混合物に較べて、水溶性で純系のため、操作性やアミノ酸の精製のためにはすぐれた原料であり、一時期グルタミン酸、リジン、スレオニン発酵で実用化されたが、オイルショック(1980年)以降は価格上昇のため使用は中止された。
メタノール	純系のため、操作性やアミノ酸の精製のためにはすぐれ、デンプン系、糖質系原料の価格上昇で注目されているが現時点では生産性低く、今後の検討課題である。
エタノール	純系のため、操作性やアミノ酸の精製のためにはすぐれ一時実用化が検討されたが、現在は中止されている。
n-パラフィン (n-アルカン)	オイルショック(1980年)以前は有望な原料として注目されたが、価格上昇と消費者の忌避のため研究段階から中止されている。
セルロース系原料 (バイオマス)	稲わら、羽から、バガス、廃材など再生可能な資源として注目されているが、集荷と糖化がネックとなっている。
二酸化炭素	究極の理想的な原料と考えられるが、現状では生産率が低く、今後の研究課題である。

# 9 | アミノ酸発酵技術の海外展開

協和発酵社は1957年に開発したグルタミン酸発酵技術を、1958年にアメリカのMerck社に、また同じころに台湾の味王醗酵に、同社はまた、リジン発酵の技術も1958年にMerck社に技術輸出したと言われている。

一方、味の素社のグルタミン酸発酵技術の海外展開の戦略は工場の建設であり、1961年にはタイ、1962年にはマレーシア、フィリピン、イタリー、1968年にはペルー、1969年にはインドネシア、1974年にはブラジルなど、さらにアメリカ、中国、ベトナムなど、次々に積極的な展開を進めた。

味の素社はまた、飼料に用いられるリジンの発酵についても、1974年にフランスにユーロリジン社を設立して生産を開始したほか、1984年にはアメリカ（アイオワ州）にハートランドリジン社、さらにブラジル、タイ、イタリア、中国などに進出している。フランスとアメリカではリジンのほかに、飼料用のスレオニン、トリプトファンの生産も開始している。これらのアミノ酸発酵技術の海外展開が成功して2.4に記した世界のアミノ酸生産量の増加につながっている。

一方、協和発酵社はハンガリーにリジン、アメリカ、メキシコにリジン、スレオニン、トリプトファン発酵技術で進出していたが、日経バイオ年鑑<sup>(1)</sup>によれば、メキシコは2004年3月に閉鎖、ハンガリーでもリジン、スレオニン、トリプトファンに関する知的財産を含めて、全株式をDegussa社に売却、アメリカのバイオキョウワ社でも、設備のリストラが課題であると報じられており、企業によって業績に明暗が分かれている。

医薬用のアミノ酸類については、味の素社はアメリカ（ノースカロライナ州）の工場をはじめ、中国、ブラジルで増産を進めている。対する協和発酵社は上のように、アメリカでは不調が伝えられているが、中国（上海協和）で増産を進めている。

表9.1には世界の主なアミノ酸工場の分布、生産品目と生産能力（推定を含む）の概略を示した。

これらの工場で稼働しているプロセスの大部分は日本の技術に基づいているが、海外のメーカーは、安価な原料を武器にして、特許切れの日本の技術を活用して生産している例が多い。中国はMSGの生産と消費の大国で、世界の生産量のおよそ1/3がこの国で消費されている。1980年の生産量は約3万トンであったものが、1997年には約60万トンと約20倍に増加した。生活水準の向上、食生活の向上に伴い、さらなる需要の増加が予想されていると言うが、メーカ

表9.1 世界の主なアミノ酸工場の分布と生産品目、生産能力

国名	会社名(系列名)	地方名	生産品目	生産能力(トン/年) (推定値含む)
ブラジル	味の素味の素	Sao Paulo	Glu	90,000
		"	various	2,000
		Laranjal	Glu	80,000
		Paulista	Lys	60,000
		Valparaiso	Thr	13,000
		Pederneiras	Lys	60,000
中国	菱花味精集団	山東省済寧市	Glu	140,000
	蓮花味精集団	華南省項城市	"	120,000
	紅梅味精集団	遼寧省瀋陽市	"	50,000
	広州奥桑味精	広東省広州市	"	40,000
	菊花味精	江蘇省張家港	"	40,000
	GBT	"	Lys	240,000
	大成生化科技集団(有)	長春市	"	120,000
	豊原生物化学	安徽省	"	20,000
	巨能集団	山東省	"	20,000
	四川川化味の素	四川省成都市	"	30,000
フランス	味の素ユーロリジン	Amiens	Lys	70,000
		"	Thr	35,000
		"	Trp	3,000
		Nales	Glu	65,000
ドイツ	Degussa	Frankfurt	Met	222,000
ハンガリー	協和発酵	Kaba	Lys	(撤退)
イタリー	味の素ヒイリッ	Bottrighe	Lys	30,000
インドネシア	Cheil Sugar	Pasuruan	Glu	50,000
		"	Lys	100,000
		"	Thr	10,000
		Slavaya	Glu	50,000
		Miwon Indonesia	"	Glu
日本	味の素	川崎	various	—
		佐賀	Phe, Arg, Asp, Cys	—
		山口	various	—
韓国	Cheil Sugar	—	Glu	60,000
		Desan	Phe	4,000
		BASF	Lys	70,000
マレーシア	味の素	Kuala Lumpur	Glu	15,000
メキシコ	協和発酵	—	Lys	(撤退)
		—	Thr	—
フィリピン	味の素	Manila	Glu	20,000
ペルー	味の素	Lima	Glu	10,000
スロバキア	Degussa	Slovenska Lupca	Lys	10,000
		"	Thr	3,000
		"	Trp	400
タイ	味の素	Bangkok	Glu	90,000
		Kamphaengphet	Glu	40,000
		Patontani	Lys	50,000
台湾	味の素	—	Glu	100,000
		Iowa	Glu	40,000
		North Carolina	various	—
		Iowa	Lys	50,000
		"	Thr	40,000
		Missouri	Lys	(撤退)
		"	Thr	—
ADM	Illinois	Lys	160,000	
ベトナム	味の素	—	Glu	60,000
		Vedan	"	200,000
		Miwon	"	20,000

http://www.ajinomoto.co.jp/kyushu/info.html  
 http://www.ajinomoto.co.jp/kawasaki/profile.html  
 http://www.kyowa.co.jp/csr/sustain/report/houfu.html  
 http://www.ajinomoto.com/ar/1\_r/pdf/fact/Feed-useAA-Oct2007.pdf#search=  
 の他、食品科学新聞、日刊工業新聞、化学工業日報などの記事に基づいた。

ーは表9.1に示した大手の他に約100社があり、優勝劣敗の厳しい競争がある上に、環境問題への対応が求められるようになり、大手メーカーへの集約化が始まっていると言う<sup>(2)</sup>。盛んな海外での展開に対応して、現在（2007年）日本国内のアミノ酸生産は少なくなっているが、これはアミノ酸発酵が原料依存の技術であり、また大きい市場が海外にあり、人件費も安いと言う事情からすれば、自然の成り行きとも言える。

田辺製薬社では、1980年代まではアミノ酸発酵関連

の研究発表が活発に行われていたが、最近途絶えている。三菱との企業統合によって経営方針の変更があり、研究開発の目標を医薬品に特化している可能性が考えられる。

#### <引用文献>

- (1) 日経バイオ年鑑2005：p. 538.
- (2) 松永収二：中国の「味精」産業、  
[http://www.cin.or.jp/beijing/members/quarterly/industry99\\_1.htm](http://www.cin.or.jp/beijing/members/quarterly/industry99_1.htm)（2008/01/31）

# 10 | アミノ酸と環境問題

## 10.1 発酵プロセス

発酵工程自体は、酒や醤油の醸造などと同じような天然型のプロセスで、環境への問題となるような点はない。さらに、より積極的に環境に調和したシステム作りが行われている。たとえば味の素社のインドネシアやブラジルの工場で行われている、サトウキビを原料とするグルタミン酸発酵プロセスでは、図10.1に示すように、グルタミン酸の生産過程で、副生物として発生する菌体、アンモニア、リン酸、カリウム、マグネシウム、などが含まれる廃液は、ほぼ完全に肥料として畑に還元されるシステムが確立されている。この資源循環型生産工程はバイオサイクルと呼ばれている。さらに、この副生物を利用した肥料は、農産物の収量、品質の向上に有効という結果を得て、サトウキビに限らず、トウモロコシ、コーヒー、果樹や花卉に広く活用されている<sup>(1)</sup>。

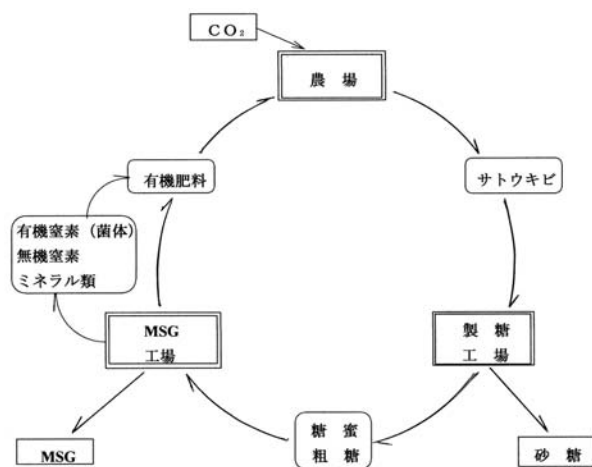


図10.1 アミノ酸発酵工場における原料と副生物のサイクルシステム（文献<sup>(1)</sup>より改変）

## 10.2 飼料へのアミノ酸の補給による家畜のアンモニア放出量低減効果

家畜の排泄物からの窒素（アンモニア）の放出は大気や、河川や湖沼の水質など、環境汚染の原因の一つと考えられている。窒素の放出の原因は飼料のアミノ酸のアンバランスに基づいている。飼料に使用されるトウモロコシなどの穀物のアミノ酸組成は、卵や乳のアミノ酸組成と比較すると特定のアミノ酸が不足するため、アミノ酸バランスが悪い。このため、ほかのアミノ酸が多くても利用されずにアンモニアに分解されて排泄されてしまう。これが窒素放出の原因となっている。したがって、トウモロコシなどに不足するリジンやスレオニンを飼料に補給することによって栄養の改善がはかれるとともに、アミノ酸の利用が向上して、窒素の放出量が大幅に減少するのである<sup>(2)</sup>。このように、アミノ酸の有効活用は環境の維持に役立っている。

### <引用文献>

- (1) 味の素（株）広報部：「アミノ酸博覧会」、p. 17, 2004年9月。
- (2) 味の素（株）広報部：「アミノ酸博覧会」、p. 15, 2004年9月。



# 11 | アミノ酸の安全性について

## 11.1 MSGの安全性についての論議

アミノ酸が食品や飼料として日常的にタンパク質、あるいは遊離の形で摂取される栄養素であって、薬物のように摂取が日常的でないものに較べて、安全性は極めて高いと考えられる。しかし1960年代後半から世界的に広がった、医薬品や食品添加物等に使用されている化合物の安全性についての関心や懸念がアミノ酸にも及んで来るようになった。そのような状況の中で、MSGに関して次のような2つのレポートが出された。

①中華料理に多用されるようになったMSGの摂取が原因で、顔のほてり、頭痛、動悸など、いわゆる中華料理症候群が生じたという報告<sup>(1)</sup>

②生後間もない幼若マウスに大量（0.5–4.0g/kg体重）のMSGを強制的に投与すると、脳の視床下部や網膜の内層の神経細胞死が起るとい報告<sup>(2)</sup>である。

新聞等はこれらの報告を大きく取り上げ、特に朝日新聞は一面に大々的に「グルタミン酸ソーダよお前もか」（発がん性の問題ありとして販売が禁止されたサイクラミン酸ソーダ（チクロ）に準えた）とセンセーショナルに報道した。②のオルニー（J. W. Olney）の結果を踏まえて、米国上院栄養食品委員会はベビーフードにMSGを使用しないよう勧告した。

WHO/FAO合同食品添加物専門家委員会JECFA（Joint Expert Committee on Food Additives）は1970年6月にMSGの許容1日摂取量（ADI: acceptable daily intake）を120mg/kg体重とすることを勧告した。また米国ではネーダー（R. Nadar）らがリードする消費者運動が高まりを見せる中で、GRAS（Generally recognized as safe；一般的に安全と見なされる）物質とされてきた食品添加物や医薬品についても再評価が開始された。

これに対して、世界のMSGメーカー会議は国際グルタミン酸技術会議を結成し、科学的でかつ、公平なデータの集積を進めるとともに、オープンなシンポジウムを開催するなど、妥当性のある判断をもとめる活動をおこなった。その結果、MSGを経口で摂取する条件では神経毒性は認められない、プラセボを用いる二重盲検比較試験で、上に報告されたようなMSG摂取と有害現象（いわゆる中華料理症候群）には相関性がないことを実証した結果<sup>(3),(4)</sup>を報告した。FDAは1980年5月、ベビーフードも含めて、「現行の使用レベ

ルで食品添加物として安全である」という最終結論を発表した。

このように、科学的にはMSGの「安全宣言」が出されたが、いまだにMSG有害説は広く行き渡っており、“当社（当店）の製品には化学調味料は使われておりません”ということがうたい文句にされている商品や店があるし、また著者自身が行った学生へのアンケート調査によっても、9割以上の学生がMSGは“身体に良くない”と言う印象をもっている。正しい理解が必要で、このための広報活動が重要な役割を果たすと思われる。好き嫌いは別として、間違った理解に基づく根強い反対意識が蔓延している現状には問題がある。

## 11.2 アミノ酸の安全性データ

各種アミノ酸のLD<sub>50</sub>値（Lethal Dose<sub>50</sub>：投与された実験動物の50%が致死する被検物の投与量＝急性毒性）を表11.1に示す。比較のために通常の食品などに使用される食塩や酢酸の値を示したが、ほとんどのアミノ酸の値はこれよりも高い、つまり安全性はきわめて高いことを示している。

そのほか、MSGについては、亜急性毒性試験（ラットを使用、1～3ヶ月連続投与して、体重や内臓諸器官の変化や病理組織学的な検査などを行う試験）、さらにマウス、ラット、イヌを用いた2年間の慢性毒性試験、発ガン性試験が行われ、いずれもコントロールと比較して、全く変化が見られないことが証明されている<sup>(6)</sup>。

表11.1 アミノ酸と他の食品成分のLD<sub>50</sub>値<sup>(5)</sup>

物質名	LD <sub>50</sub> 値 (g/kg体重、ラット経口投与)
食塩	3.0
Cys	3.1
酢酸	3.3
ビタミンB <sub>12</sub>	4.0
炭酸ナトリウム	4.1
ナイアシン	7.0
Lys	10.6
(Cys) <sub>2</sub>	11.2
クエン酸	11.7
ビタミンC	11.9
グリセロール	12.6
Ser	14.0
Arg, Phe, Gly	16.0
Ala, Asn, Ile, Gln, Glu, Thr, Tyr, Trp, Val, His, Pro, Met, Leu	> 16.0
蔗糖	29.7

アミノ酸はすべてL体について調べたものである。

### 11.3 トリプトファンから派生した化合物の問題

アミノ酸から副生した物質によるものと推定されている事故の例がある。1980年代のはじめ、米国では健康食品に使用された、特定のロットのトリプトファンが原因と思われるEMS（Eosynthiolamyologia syndrome：好酸球増多・筋肉痛症候群）が発生し、30余名の死者が出る事故があった。原因と考えられる物質が比較的短時間の内に、エチレンビストリプトファンとフェニルアミノアラニンと同定された。これらの化合物は、純度の低い特定ロットのトリプトファンを使用した製品から検出されたことから、不純物の中でトリプトファンが変化して生成したと考えられた。この事故によって供給者の昭和電工社には高額の損害補償金が課せられた。アミノ酸の種類にもよるが、製品の純度と内容についての品質管理の重要性が特に強調された事故例である。

#### <引用文献>

- (1) R. H. M. Kwok : Chinese-restaurant syndrome, *New Engl. J. Med.*, 278, 796, 1968.
- (2) J. W. Olney : Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate : *Science* 164, 719, 1969.
- (3) Y. Takasaki : Studies on brain lesions after administration of monosodium glutamate to mice. II. Absence of brain damage following administration of monosodium glutamate in the diet. *Toxicology*, 9, 307, 1978.
- (4) R. S. Geha, *et al.*, : Multicenter, double-blind, placebo-controlled, multiple-challenge evaluation of reported reactions to monosodium glutamate. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106, 973, 2000.
- (5) 味の素株式会社アミノ酸部編：Ajinomoto's Amino Acids Handbook, pp. 74~75, 2003年1月。
- (6) 太田静行：うま味調味料の知識、pp. 100~103、幸書房、1992年6月。

# 12 | アミノ酸発酵技術の系統化

アミノ酸の工業生産が始まって100年、発酵法による工業生産が始まって50年が経過した。ともに日本で生まれた独創的な技術である。アミノ酸の製法は現在発酵法が中心になってきたが、タンパク質分解法、化学合成法の3法があり、それぞれ多くの科学と技術の背景の中から生まれ発展してきた。本報告の主題である発酵法を中心として、技術の系統を図12.1にまとめた。

1908年にタンパク質分解法でグルタミン酸の製造が行われ、初めてアミノ酸が商品化された。この方法による生産は1960年ころまで続けられた。つまり、そのころに革新的な発酵法が順次確立され、それに代わってタンパク質分解法で製造されるアミノ酸は減ってきたが、現在もチロシン、ロイシン、システイン、アスパラギンなどはタンパク質分解法で作られている。この方法で確立されたアミノ酸の分離と精製の技術は発酵法で活用された。

タンパク質分解法の問題点をクリアして開発されたグルタミン酸の化学合成法による製造法は、合成化学を背景に生まれた技術であり、一時工業化されたが、消費者に受け入れられず、撤退することになった。現在、グリシン、DL-メチオニン、DL-アラニンなどは化学合成法で製造されている。

発酵法の流れはグルタミン酸菌の発見と言う大きな成果に始まり、今もアミノ酸発酵の中心に位置づけられるグルタミン酸発酵から始まった。この技術が生まれた背景にあったものは、グルタミン酸ナトリウム（「味の素」）と言う、当時ビジネスとして成功していた魅力的なターゲットがあって、多くの研究者の関心を集めていたことと、そのグルタミン酸

の生産にアプローチする手段としての科学や技術、すなわち、微生物学、生化学、分子生物学を背景とする菌株スクリーニングと培養技術があった。この技術開発は先駆する抗生物質の発酵生産の影響を大きく受けたと考えられる。

当時グルコースから直接グルタミン酸が出来るとは考えられなかったようで、“常識への挑戦”が功を奏してグルタミン酸菌と言う新しい菌株の分離に成功した。成功のポイントはスクリーニング法にあった。この技術が、グルタミン酸の専業ではなく、発酵と言う技術を持っていた協和発酵社から生まれたことも興味深いところである。培養液からのグルタミン酸の分離と精製技術はタンパク質分解法で確立された技術が活用された。

グルタミン酸菌からは栄養要求性変異株、アナログ耐性変異株を誘導する方法で、特に後者からは、多くのアミノ酸生産株が得られ、アミノ酸発酵が一斉に開花した。一方、酵素法に用いられる菌株がスクリーニングされ、酵素法が進化したバイオリクターを用いる製法も確立された。さらに、1980年代に登場した遺伝子工学は、いわば、これらの技術の“上乘せ”の技術として、従来の生産菌株の上に、すでに大きな進展をもたらしているが、さらに将来の技術開発に期待される場所は大きい。このようにして、アミノ酸の品目では約75%、量的には約85%が発酵法と酵素法で製造されるようになった。

人口の増加に伴って、アミノ酸発酵はさらに量的な拡大が続くと考えられる。一方、アミノ酸を原料として生産されるペプチド合成技術が最近確立され、大きく発展する可能性も考えられる。

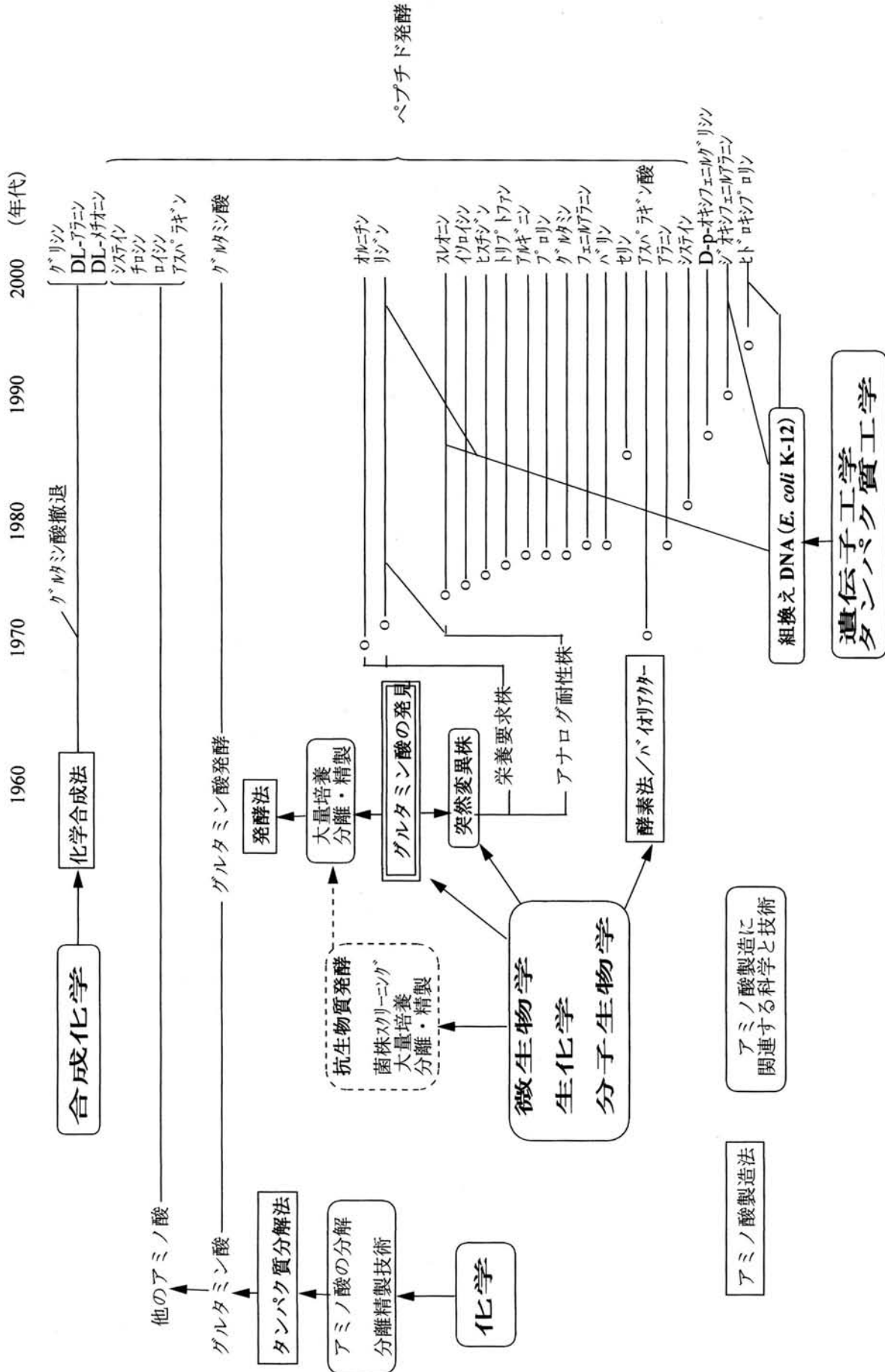


図12.1 アミノ酸発酵技術の系統化

# 13 | 今後の展開

アミノ酸発酵は日本で生まれた独創的な技術であり、現在ではその技術が世界中で展開され、医療や食糧の供給に貢献している。それらの技術の中心に日本があって、世界をリードしている。アミノ酸が基本的には天然の化合物で、特に栄養的にはタンパク質成分として代替が不可能なため、今後に予想される世界の人口の増加と食糧の不足から、さらに需要が増えることは間違いない。

大きな成長が見込まれる市場があって、しかも優位な技術があれば、当然経営的には大きな収益が上げられていると考えられるが、実情は必ずしもその通りには行かないようである。その主な原因は原料価格の上昇と製品価格の下落である。特に生産量が多く、コストに占める原料費の割合が大きいグルタミン酸やリジンについては、すでに基本特許の期間が終わり、先発の優位性がなくなってきているため、安価な原料をもつ海外企業との競争が厳しくなっている。このため、コストの上昇分を簡単に製品価格に転嫁できる状況にはなく、したがって、収率の向上、主副原料の効率的な使用、エネルギーの削減、副産物の削減と環境調和型のプロセス開発など、さらなるコストダウンと生産の効率化が求められているわけである。

コストダウンに技術開発の占める比重は甚だ大きいですが、どのような改良や開発の可能性があるかを考えてみたい。

## 13.1 菌株育種／既存生産株の改良

技術的な改良の可能性がなお考えられる分野である。すなわち、DNAの情報とDNA技術を活用する新しい技術に基づいて、細菌の菌体内での代謝の流れと、DNA、mRNAからタンパク質、中間体などの動向を網羅的に解析して、最終的に生産株の代謝全体の最適化を図ろうとする試みである。これらの試みの中からは、すでにいくつかの有力な結果が得られている。たとえば、培養の後期に生産能が「頭打ち」状態になるのは一般的な傾向であるが、この時期に発現量が上昇する遺伝子*rmf*を特定し、この遺伝子を欠損させることによって、頭打ちを抑え、アミノ酸の生産能を高めた。また、TCAサイクルを含めた関連の酵素遺伝子の発現を制御する遺伝子*arc*を欠損させることによって、TCAサイクル関連の酵素活性を高め、TCAサイクルを経由して生合成されるグルタミン酸、アルギニ

ン、リジンなどの生産能を高める、などの研究成果が出されている。

さらに、微生物による物質生産には常に問題になっていた、細胞からの物質の排出についても、関連する遺伝子が同定され、この遺伝子を増幅することによる排出効果の向上、つまりアミノ酸生産能の向上が示された<sup>(1)</sup>。一方、ミニマムゲノムファクトリーとして、有用物質生産に必要な最少限のゲノム（遺伝子のセット）をもつ微生物を作り出して効率的な生産を目指すと言う挑戦的な試みも行われている<sup>(2)</sup>。これらの研究成果が実用化されて、さらなる生産の向上が期待される。

## 13.2 菌株育種／新しい原料の開発と利用

近年、バイオエタノールが急激に話題になってきたが、原油価格の上昇が続く限り、アミノ酸発酵の主原料であるデンプン、糖質はたえずバイオエタノールおよび食糧と競合する関係にあって、価格の上昇が問題になる。このためにはデンプン、糖質以外の原料の利用を考える必要がある。たとえば、メタノール資化能のある微生物からの生産株の育種、あるいはCO<sub>2</sub>が利用できる光合成細菌からの生産株の育種も検討する価値がある。稲ワラ、籾ガラ、サトウキビ軸、廃材などのバイオマスの活用も考えられる。これは材料の糖化と集荷が課題と言われているが、アミノ酸発酵の原料としての開発が期待される。

## 13.3 培養技術

連続培養は雑菌汚染の問題などが解決されていないため、活性汚泥のプロセス以外に、物質生産のプロセスでは実用化されたものはないが、省エネルギー、省資源の視点からは最も期待される技術である。

## 13.4 分離・精製技術

この技術の完成度はかなり高く、抜本的な改良等に期待は薄いと考えられる。精製段階での副生物を減らす方法として、酸性下での培養が考えられている。たとえば、現行のグルタミン酸発酵では、アンモニアで中和して中性下で培養し、結晶化は硫酸を加えて行い、最終的にはNaOHで中和してMSGとするが、副生物が

硫安となる。これが酸性条件下で培養できれば硫安の副生が無くなるという考え方である<sup>(1)</sup>。

## 13.5 環境問題

発酵工場では原料と廃棄物がリサイクルされる、環境調和型のシステムを作り上げられたことは本文で紹介した。今後はさらにこのシステムを、より完成の度を上げることが期待される。すでに味の素社では発酵工場から出る廃液の肥料としての高度利用を目的に、インドネシアの農事試験場と連携して、「キャッサバ高収量技術の普及プロジェクト」を発足させた<sup>(1)</sup>。

そのほか、たとえば砂糖を抽出したサトウキビの本体（バイオマス）の燃料化あるいは糖化、工場から排出されるCO<sub>2</sub>の減量化などが今後の課題として考えられる。

このような技術課題に挑戦し、日本のアミノ酸発酵技術の優位性が維持、発展されることを期待したい。

## 13.6 ペプチド技術への展開

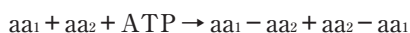
アミノ酸と深い関わりがある物質にペプチドがある。ペプチドは、ひとつの $\alpha$ -アミノ酸のカルボキシル基ともうひとつの $\alpha$ -アミノ酸のアミノ基が脱水縮合して生じるアミノ酸のつながった物質で（図2.2参照）、ホルモンなど、多くの生理的な機能があり、医薬品などとして期待されているが、これまで化学合成法による小規模の調製は行われているが、官能基への保護基の導入や脱離など、やっかいな問題があって、実用生産は行われていない。これに対して最近、生化学的な手法で生産する方法が開発されて注目されている。方法のひとつは味の素社の開発になるもので、遊離のアミノ酸（aa<sub>1</sub>）にアミノ酸のメチルエステル

（aa<sub>2</sub>-COOCH<sub>3</sub>）から、次のようなペプチド合成反応を触媒する微生物酵素のスクリーニングに成功したものである<sup>(3)</sup>。



このように、ペプチドの鎖を順次延長出来る方法である。

一方、協発酵社で開発された方法は、遊離のアミノ酸にエネルギー源としてATPを関与させる酵素反応<sup>(4)</sup>で、次のように、結合の仕方でも正逆2種のペプチドができることになり、狙った特定のペプチドの収率は低くなると考えられる。



これらの技術開発によって、ペプチド生産が実現したことは、無限のアミノ酸の組み合わせの中から有望なペプチドが見出される可能性が高くなったことを示し、近い将来ペプチド発酵と言われる技術分野が生まれる可能性が高いことを示している。

<引用文献>

- (1) 倉橋 修：アミノ酸発酵の進化と未来、発酵と代謝研究会シンポジウム講演要旨集、p. 25、2007年7月13日。
- (2) 穴澤秀次：発酵工業における新世紀の技術展開、発酵と代謝研究会シンポジウム講演要旨集、p. 31、2007年7月13日。
- (3) K. Yokozeki and S. Hara : J. Biotechnology, 115, 211, 2005.
- (4) K. Tabata, *et al* : J. Bacteriol., 187, 5195, 2005.

# 14 | 謝辞

資料収集等について以下の方々のご協力いただきました。厚く御礼申し上げます。

味の素株式会社	都河龍一郎、倉橋 修、宇多川隆
協和発酵工業株式会社	手柴貞夫、落合恵子
田辺三菱製薬株式会社	土佐哲也（元田辺製薬（株）副会長）、松前裕明
(財)バイオインダストリー協会	清水栄厚

## 登録候補一覧

No.	名称	資料形態	所在地	製作者	製作年	コメント
1	日本最古(池田菊苗氏が調製した)グルタミン酸のサンプル	展示	AJINOMOTO「食とくらしの小さな博物館」、東京都港区	池田菊苗	1908	大きな商品となった「味の素」の材料で、コンブから抽出された最初のグルタミン酸
2	道明寺ガメ	実物	AJINOMOTO「食とくらしの小さな博物館」、東京都港区	不明	1912-1925	塩酸に耐える耐酸性の反応容器として開発された記念すべきカメである。
3	固定化酵素切断機	実物	山口田辺製薬(株)、山陽小野田市	田辺製薬(株)	1974-1976	酵素の固定化ではパイオニアである田辺製薬(株)で製作された記念すべき一品である。

本報告書は平成19年度科学研究費補助金特定領域研究『日本の技術革新—経験蓄積と知識基盤化—』  
計画研究「産業技術史資料に基づいた日本の技術革新に関する研究」(17074009)の研究成果である。

## 国立科学博物館 技術の系統化調査報告 第11集

---

平成20(2008)年3月19日

- 編集 独立行政法人 国立科学博物館  
産業技術史資料情報センター  
(担当:コーディネイト・エディット 永田 宇征、エディット 大倉敏彦・久保田稔男)
- 発行 独立行政法人 国立科学博物館  
〒110-8718 東京都台東区上野公園 7-20  
TEL: 03-3822-0111
- デザイン・印刷 株式会社ジェイ・スパーク