

# 化学工業特論

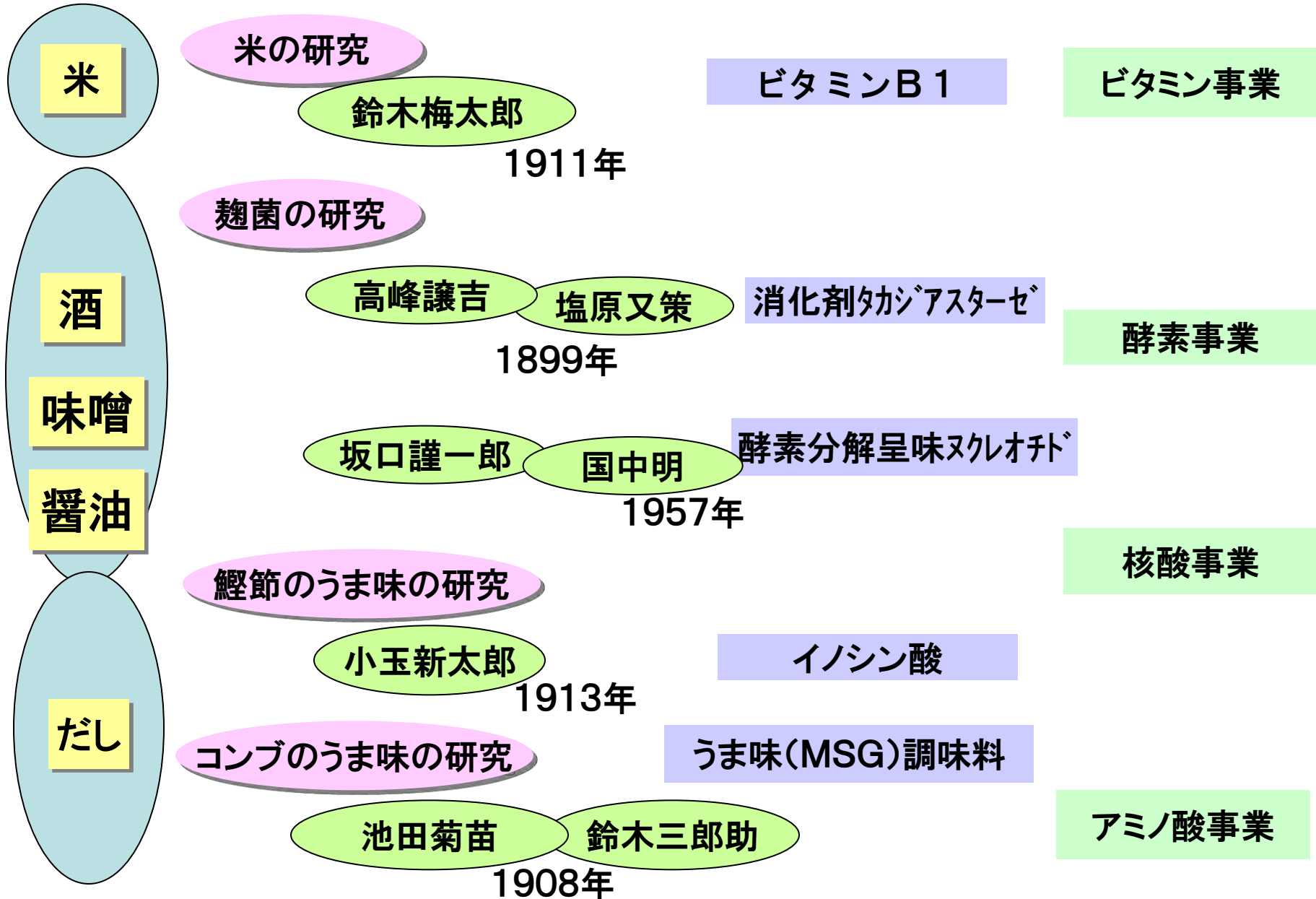
## ケミカルズが産み出す日本の力

### 機能性化学品(2)バイオテクノロジー製品

### 発酵製品      その2

平成27年12月19日  
日本大学生物資源科学部  
食品生命学科  
森永 康

# ～日本のバイオ事業は食にはじまる～



# バイオ版 「坂の上の雲」

- ・ 高峰讓吉(1894年) タカジアスターゼの発明  
工部大学校 酵素事業創生
- ・ 池田菊苗(1908年) グルタミン酸ナトリウム  
のうま味の発見と  
アミノ酸調味料の発明  
東京帝国大 理学部 アミノ酸事業創生
- ・ 鈴木梅太郎(1910年) ビタミンの発見  
東京帝国大 農学部 ビタミン事業創生

# バイオ版 「坂の上の雲」

- ・ 『まことに小さな国が、開化期を迎えようとしている。』  
(司馬遼太郎)

- ・ バイオ版 彼らの「こころざし」は.....

日本が世界列強と伍していくために

日本発の独自性ある産業を興したい

高峰讓吉

日本人の栄養不足を改善したい

池田菊苗

同上

鈴木梅太郎

# 酵素事業を創造したのは日本人

高峰讓吉（1854-1922年）

コウジの研究

- ・ コウジの酵素を利用してウィスキー醸造を効率化  
（高峰式元麴改良法）
- ・ 消化酵素「タカジアスターゼ」で特許取得し、  
ベンチャービジネス三共商店を立ち上げた  
（現在の第一三共株）
- ・ アドレナリンを発見、世界初のホルモン結晶化



# 高峰讓吉の活躍

- 1854年 加賀藩(高岡)に生まれる
- 1873年 工部大学校入学 工業化学が専門
- 1880年 英国留学
- 1887年 日本初の国際結婚 日本で最初の人造肥料会社設立
- 1890年 麴(コウジ)を安価大量生成方法を開発して特許出願
- 1891年 米国最大手ウイスキー・トラスト(シカゴ)が技術指導を依頼  
⇒ 地元業者の反感 最初の日米摩擦？
- 1894年 モルトから酵素(ジアスターゼ)を取り出し消化を助ける薬  
「タカジアスターゼ」を創製、特許出願
- 1897年 米国パーク・デービス社が「タカジアスターゼ」の「独占販売権」  
を買いたいと申し出る
- 1898年 三共商店(現第一三共株)を設立
- 1901年 パーク・デービス社技術顧問として、研究助手の上中啓三と  
ともに、アドレナリンの結晶化に成功

# アミノ酸事業を創造したのは日本人

## 池田菊苗（1864年-1936年）

- ・京都生まれの化学者 ドイツ留学
- ・コンブのうま味成分がグルタミン酸ナトリウムであることを発見  
(1908年)
- ・実業家鈴木三郎助にアミノ酸調味料事業の創業を提案(1909年)  
(現在の味の素(株))



コンブから抽出した  
グルタミン酸ナトリウム



コンブ

# 池田 菊苗:「味の素」発明の動機

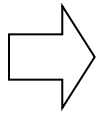
「余も亦元来**我國民の栄養不足なるを憂慮**せる一人にして、如何にして之を矯救すべきかに就て思を致したること久かりしが、終に良案を得ざりしに、此の文\*を読むに及んで、佳良にして廉価なる**調味料を造り出し滋養に富める粗食を美味ならしむる**ことも亦此の目的を達する一方案なるに想致し、前年中止せる研究を再び開始する決意を偽せり」

\* 三宅 秀 「佳味は消化を促進する」との論評(1908年)

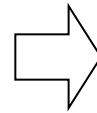


# アミノ酸工業の発展経緯

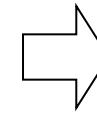
池田菊苗博士  
によるMSGの  
うま味物質とし  
ての発見  
1908年



鵜高重三博士  
によるグルタミン  
酸生産菌の発見  
1956年



- ・各種アミノ酸生  
産菌株の開発
- ・発酵生産技術
- ・酵素法の開発
- ・アミノ酸利用の  
開発



- アミノ酸事業拡大
- ・調味料
  - ・食品添加物
  - ・機能性食品素材
  - ・甘味料
  - ・飼料添加物
  - ・化成品
  - ・医薬品
  - ・医薬中間体

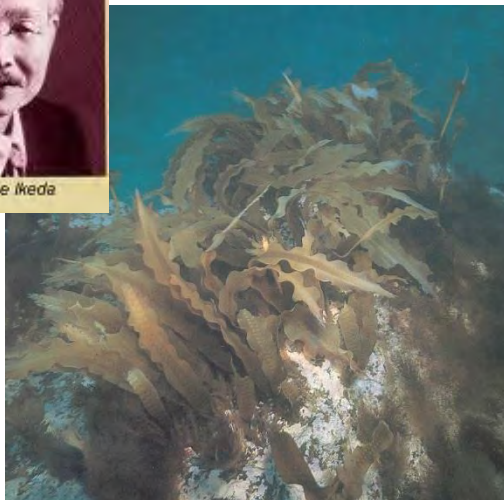
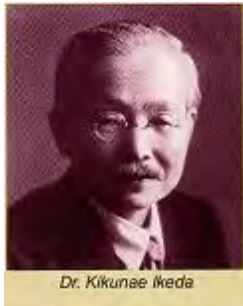
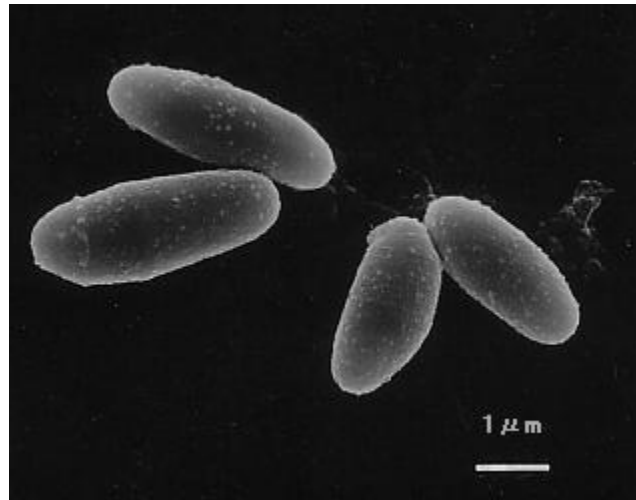


Photo by Akira Tateishi (Marine Art Center Co., Ltd.)



# 効率よくグルタミン酸を作り出すには

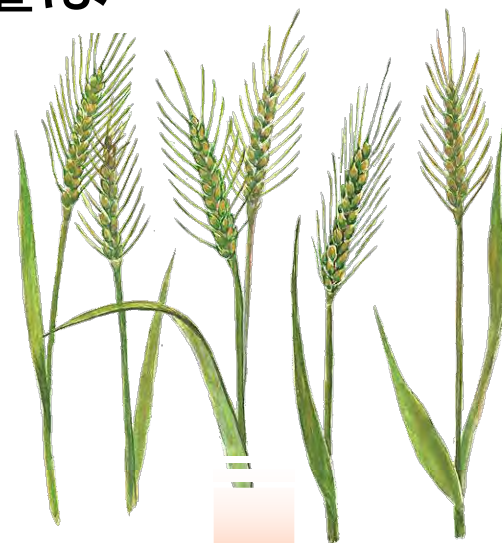
昆布



約22g

1kgから抽出できる  
グルタミン酸量は

小麦



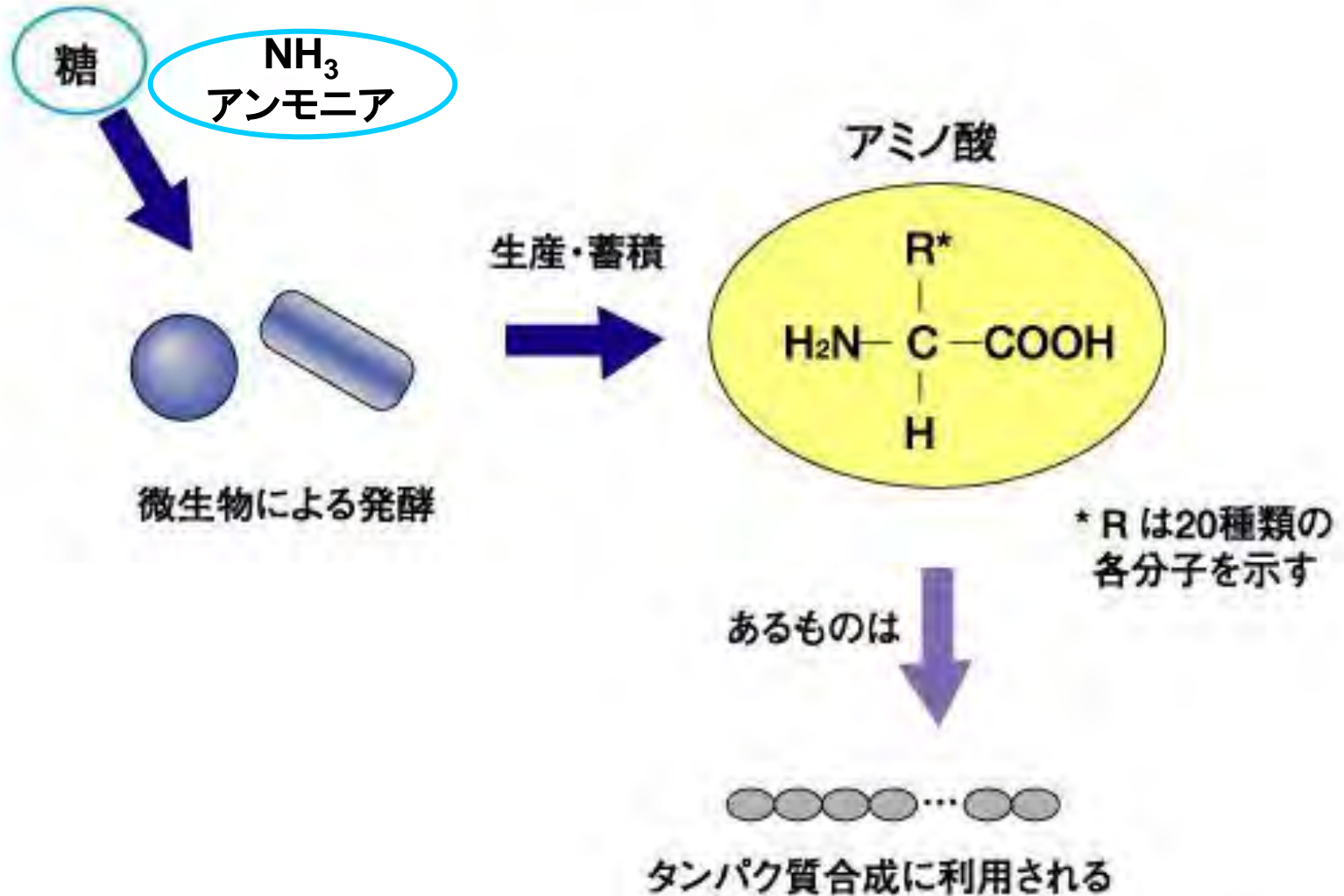
約50g

※小麦粉(全粒粉)1kgあたり

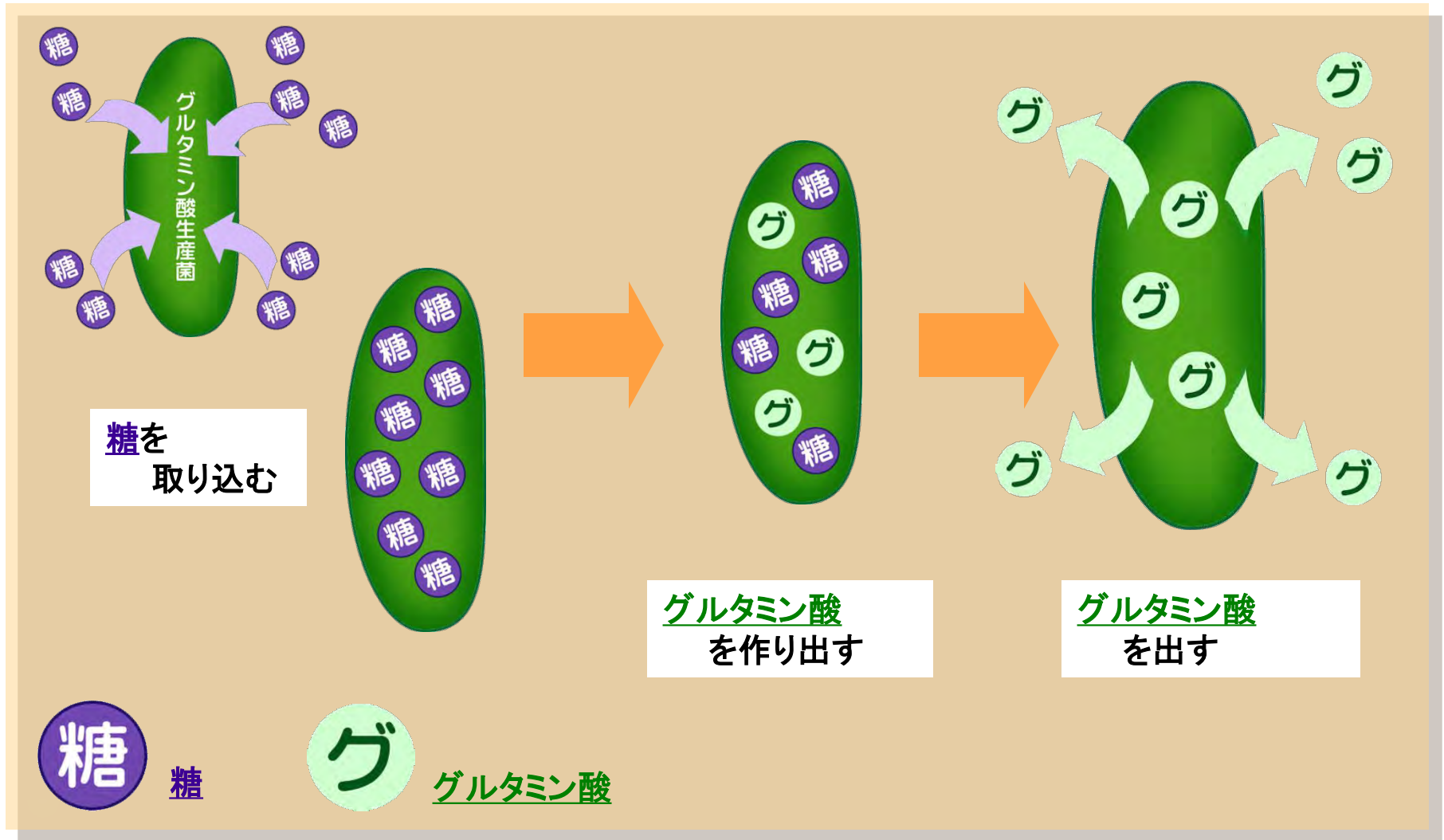
# アミノ酸発酵によるイノベーション

- 1908年: コンブのうま味物質がグルタミン酸  
アミノ酸調味料の発明(東大池田菊苗)
- 1909年: コムギ粉を原料とするアミノ酸調味料の事業化  
(味の素株)
- 1950年頃: 需要拡大で新製法が必要に  
合成法、二段発酵法の研究(味の素株)
- 1956年: 直接発酵法によるグルタミン酸ナトリウムの製法発明  
(協和発酵株木下、鶯高)
- 1959年: 直接発酵法によるグルタミン酸ナトリウムの工業生産  
(味の素株)

# アミノ酸発酵の基本原理



# グルタミン酸生産菌・発酵の様子



# アミノ酸の製法

- 直接発酵法（糖から直接生産）
  - 野生株：グルタミン酸
  - 変異株：リジン、スレオニン、グルタミン、アルギニン、ヒスチジン、フェニルアラニン、トリプトファン、イソロイシン、バリン、ロイシン、プロリン
- 酵素法（前駆体を構造変換）
  - アスパラギン酸
  - システイン

# アミノ酸の直接発酵法

炭素源、窒素源、無機塩および生育因子の存在下、  
目的アミノ酸を培地中に直接蓄積させる

(1) 野生株を用いる発酵法

(2) 代謝制御発酵法

- a) 栄養要求変異株を用いる方法
- b) アナログ耐性変異株を用いる方法
- c) 分子育種(組換えDNA利用)変異株を用いる方法

# アミノ酸の直接発酵法

## (1) 野生株を用いる方法

グルタミン酸発酵 *Corynebacterium glutamicum*

(*Brevibacterium, Micrococcus*)

特別な培地で培養して、不完全な細胞表層の細胞をつくり、グルタミン酸を細胞外に排出させる

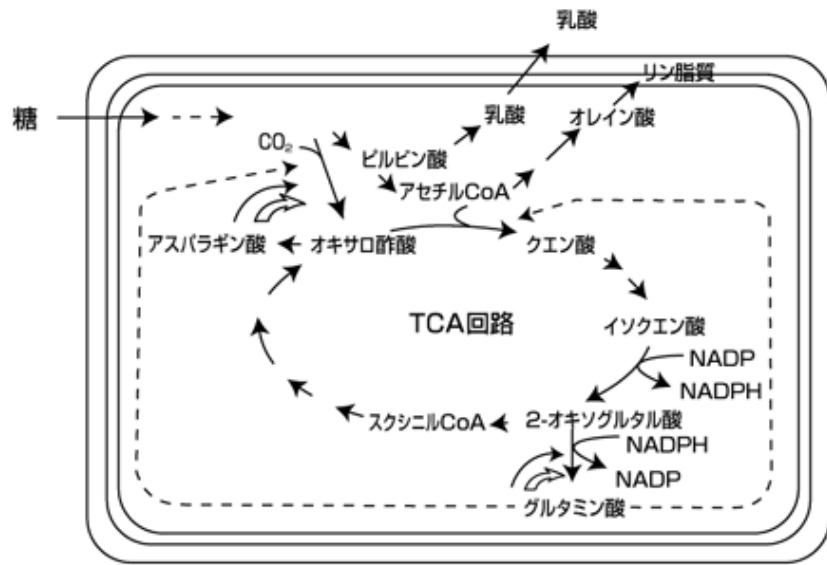
例： ビオチン制限

ペニシリン( $\beta$ -ラクタム抗生物質)添加

界面活性剤(Tween 60 など)添加

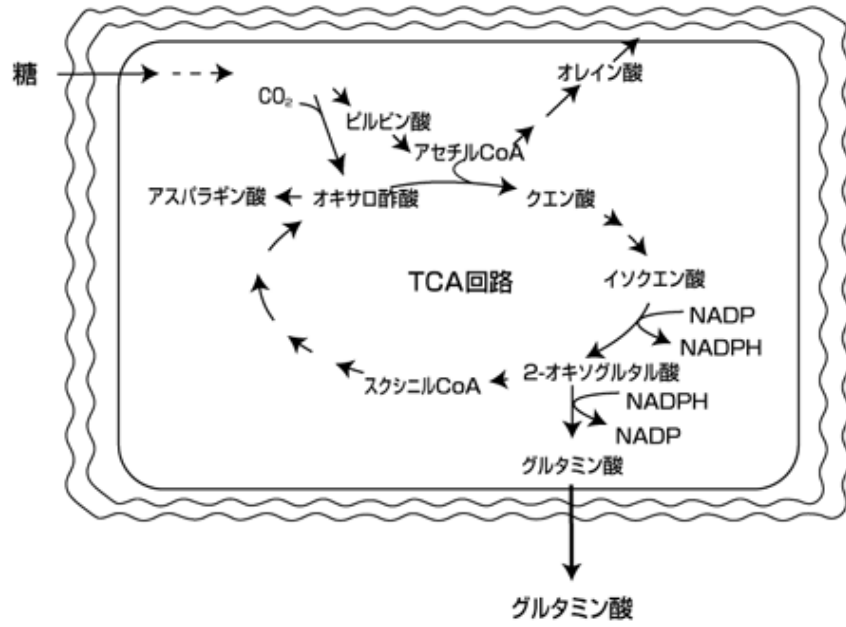
\* グルタミン酸以外のアミノ酸は野生株では生産不可能





← 阻害  
 ⇐ 抑制

正常な細胞ではグルタミン酸の細胞内濃度が高くないように代謝制御。

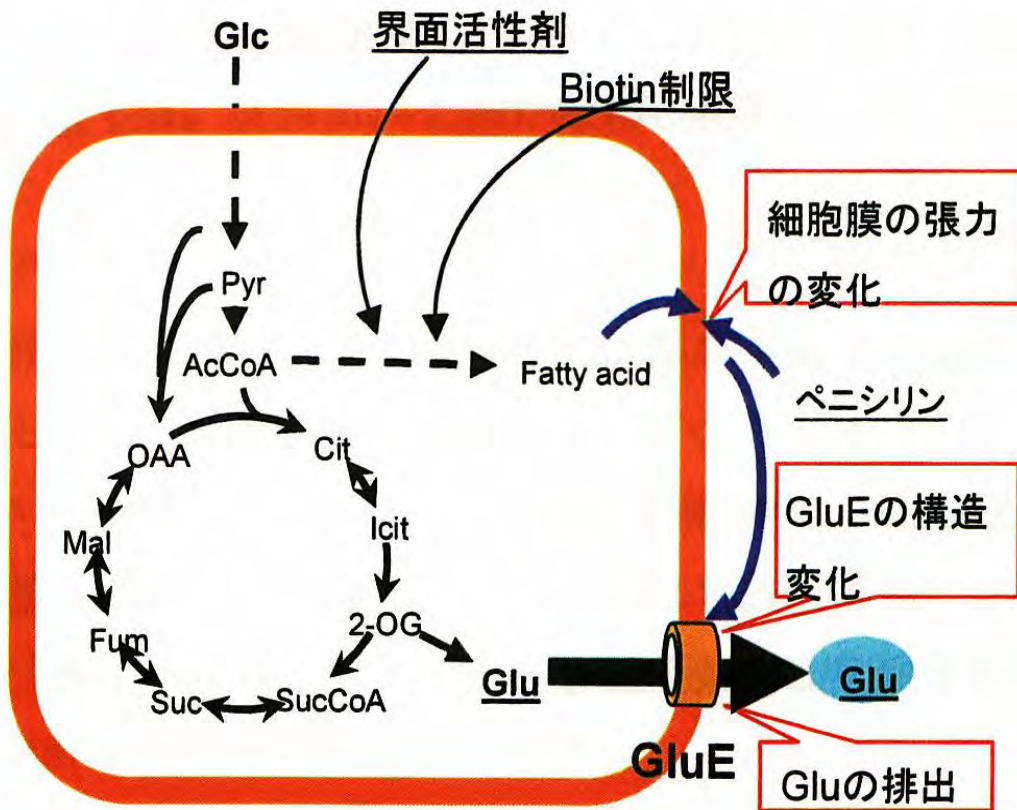


細胞壁不完全になるとグルタミン酸が細胞外へ漏れ出て、細胞内の濃度が高くないため代謝制御が利かなくなり、グルタミン酸をどんどんつくるようになる。

グルタミン酸発酵機構模式図

# コリネ型細菌のグルタミン酸生産誘導モデル

(J. Nakamura, S. Hirano, H. Ito, M. Wachi, Appl. Environ. Microbiol.(in press)より改変)



## 野生株の場合

- ・ビオチン制限、界面活性剤添加、ペニシリン添加によって細胞膜の張力が変化する
- ・GluEの立体構造が変化する
- ・グルタミン酸が排出される

## 誘導不要菌の場合

- ・変異によって既にGluEの立体構造が変化している
- ・常にグルタミン酸が排出される

# 代謝調節機構・代謝制御発酵・微生物育種

- ・代謝調節機構とは、

アミノ酸など代謝産物の生成量は、必要量だけ生成するように調節されている(酵素誘導・抑制とフィードバック阻害)

- ・代謝制御発酵とは、

野生株の代謝調節機構を人工的に改変して、代謝の流れを変え、アミノ酸などの代謝産物を過剰量生産させる方法

- ・育種とは、

野生株の遺伝子を人為的に改変すること  
植物の場合、品種改良とも呼ぶ



# 代謝調節

metabolic regulation, metabolic control

何のために代謝を調節するのか？

- 固体の維持：細胞内の恒常性 homeostasis を維持する
- 効率的な増殖：余分なものをつくらずに効率的に増殖する



1. 酵素合成の調節
2. 酵素活性の調節

# 代謝調節の方法

## 1. 酵素合成の調節 → 酵素濃度の調節

(a) 酵素誘導 enzyme induction

(b) 酵素抑制 enzyme repression

(i) 最終生産物抑制 end product repression;

ネガティブフィードバック抑制 negative feedback repression

(ii) カタボライト抑制 catabolite repression

## 2. 酵素活性の調節

(a) 最終生産物阻害 end product inhibition;

ネガティブフィードバック阻害 negative feedback repression

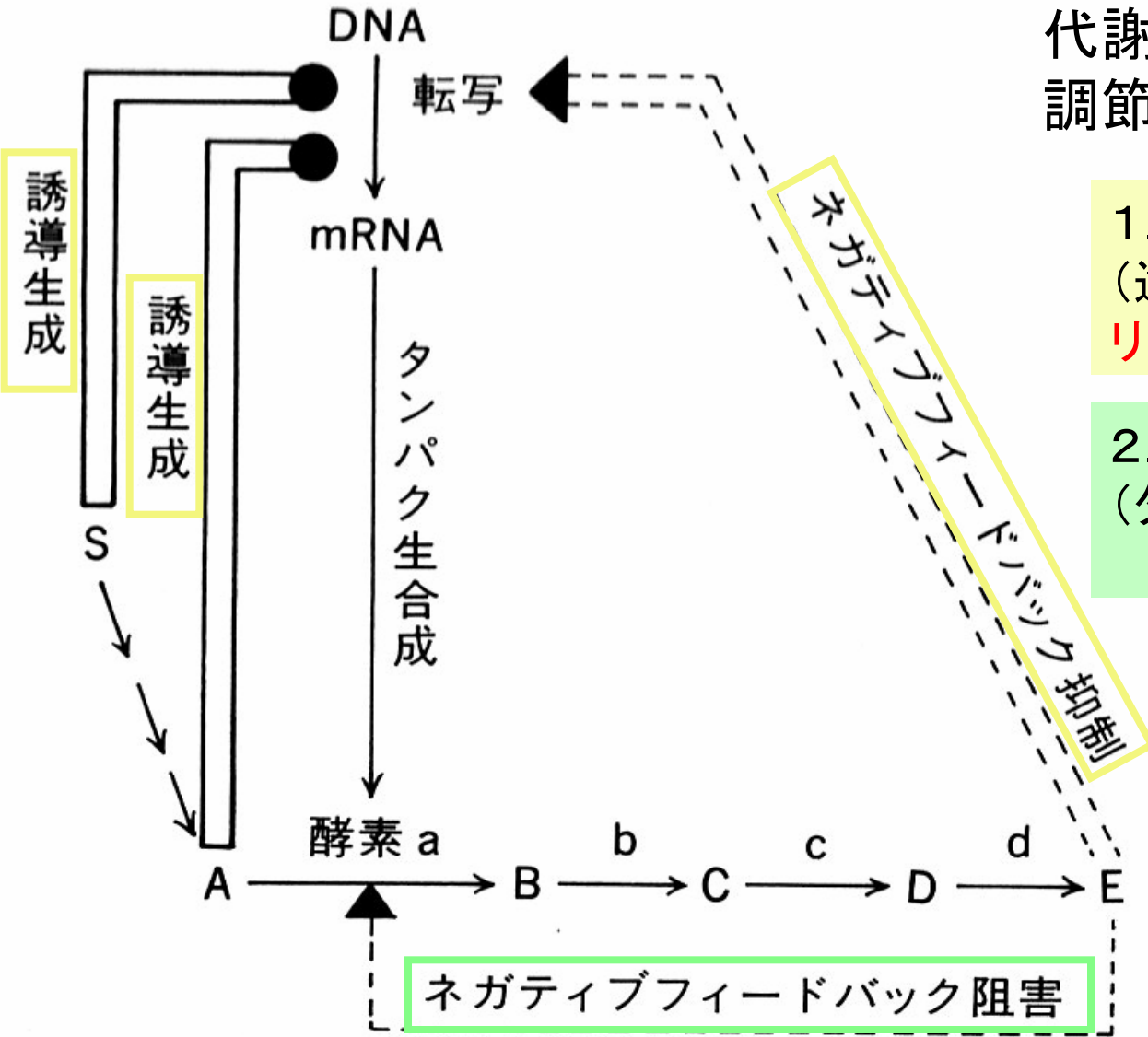
(b) 補酵素レベルでの活性調節

代謝は2つのメカニズムで調節されている

1. 酵素の誘導生成の調節  
(遺伝子発現段階)  
リプレッション repression

2. 酵素活性の調節  
(タンパク質の機能発現段階)  
インヒビション inhibition

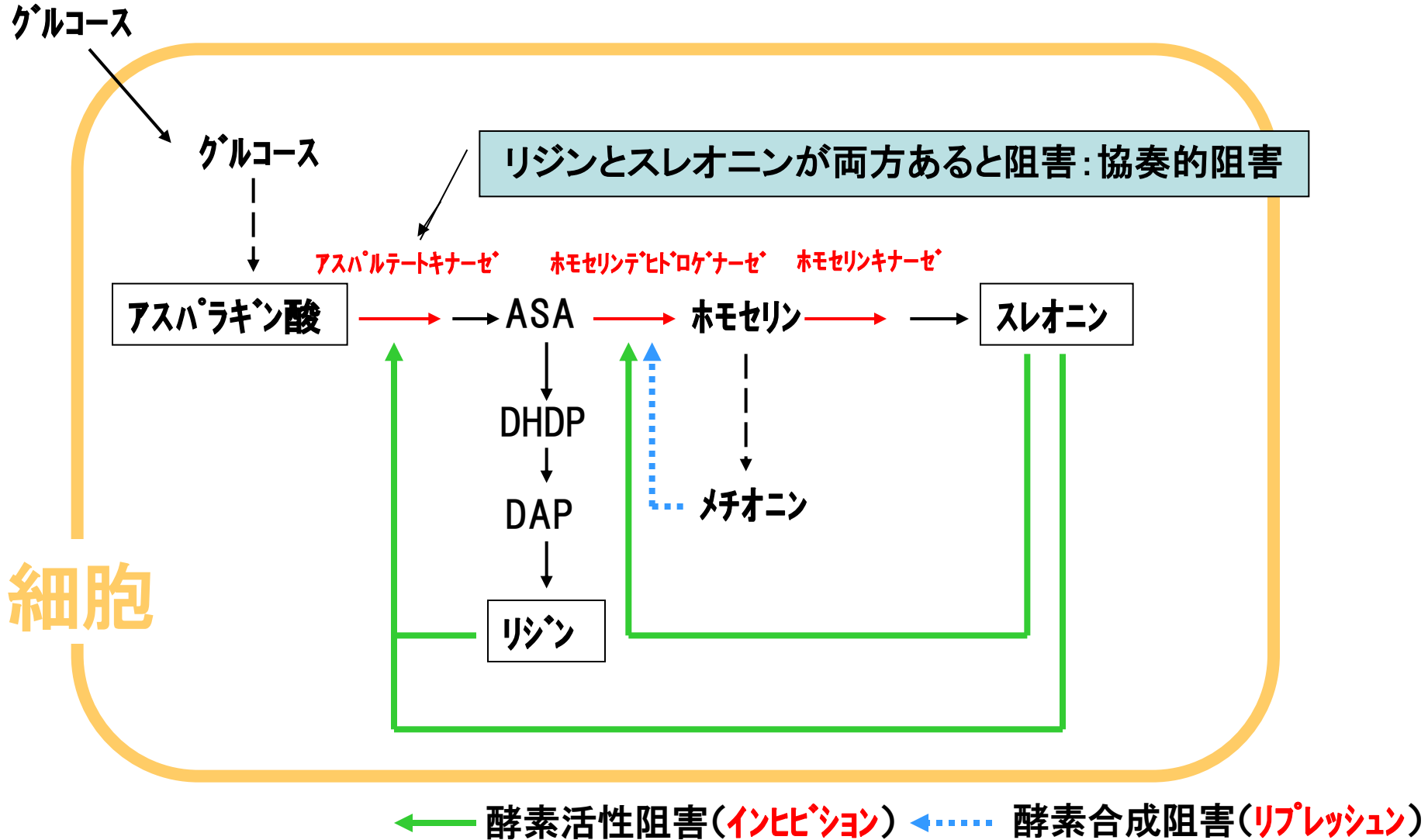
抑制的に調節  
ネガティブ(負の)  
フィードバック  
抑制 or 阻害



代謝調節機構の関係 (S: A の前駆体, あるいは構造類縁体)

# 代謝制御によるアミノ酸発酵

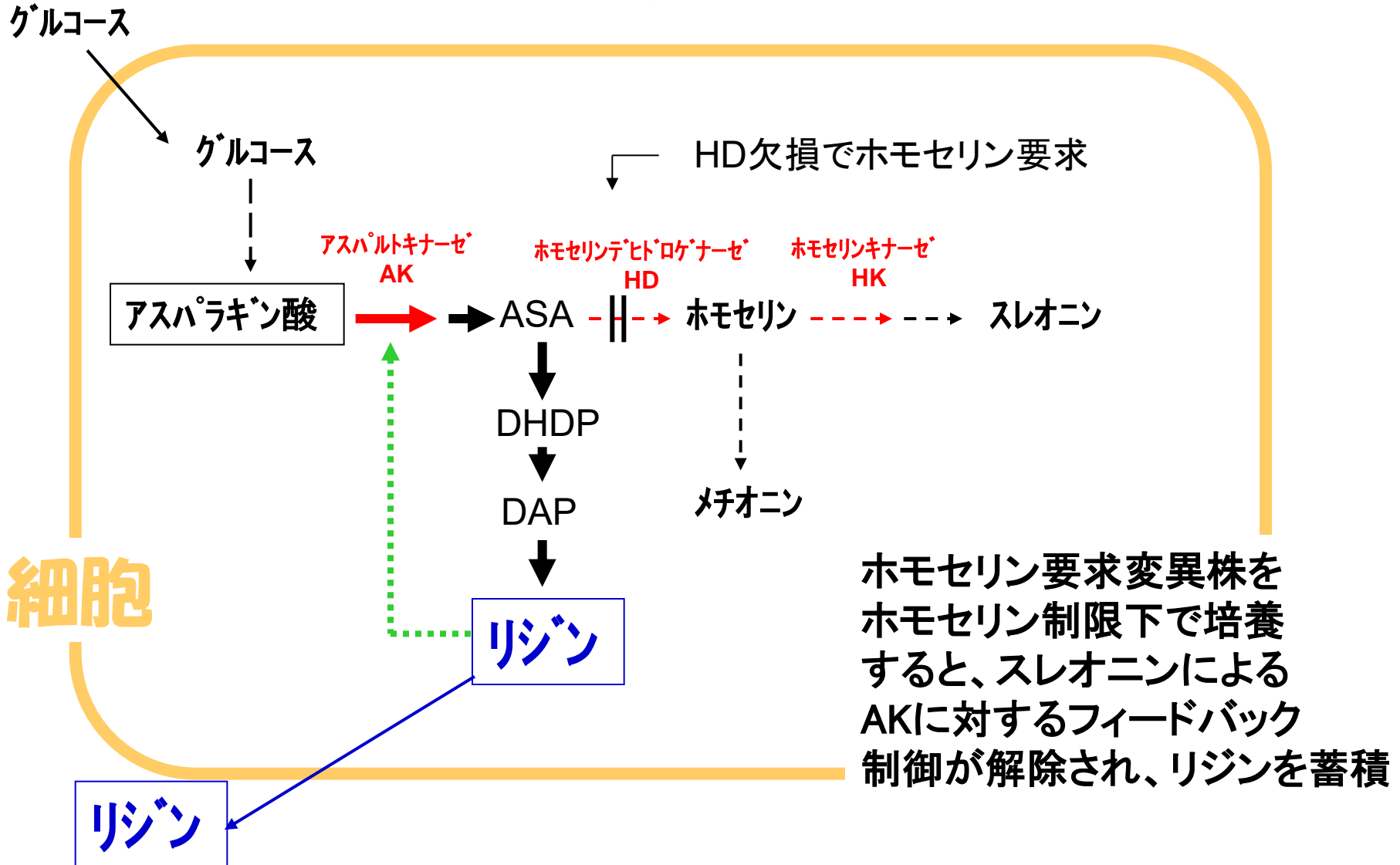
*Brevibacterium lactofermentum* の  
リジンおよびスレオニン生合成系の代謝調節



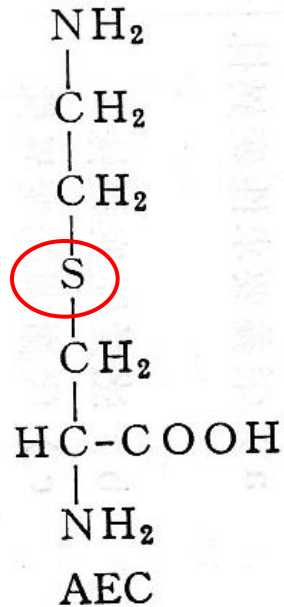
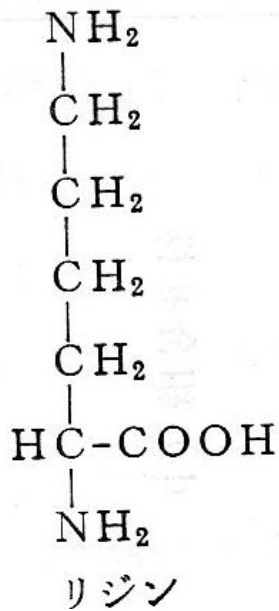


# アミノ酸の代謝制御発酵(栄養要求株)

## *C. glutamicum* の ホモセリン要求変異株によるリジンの生産



## アミノ酸のアナログの例



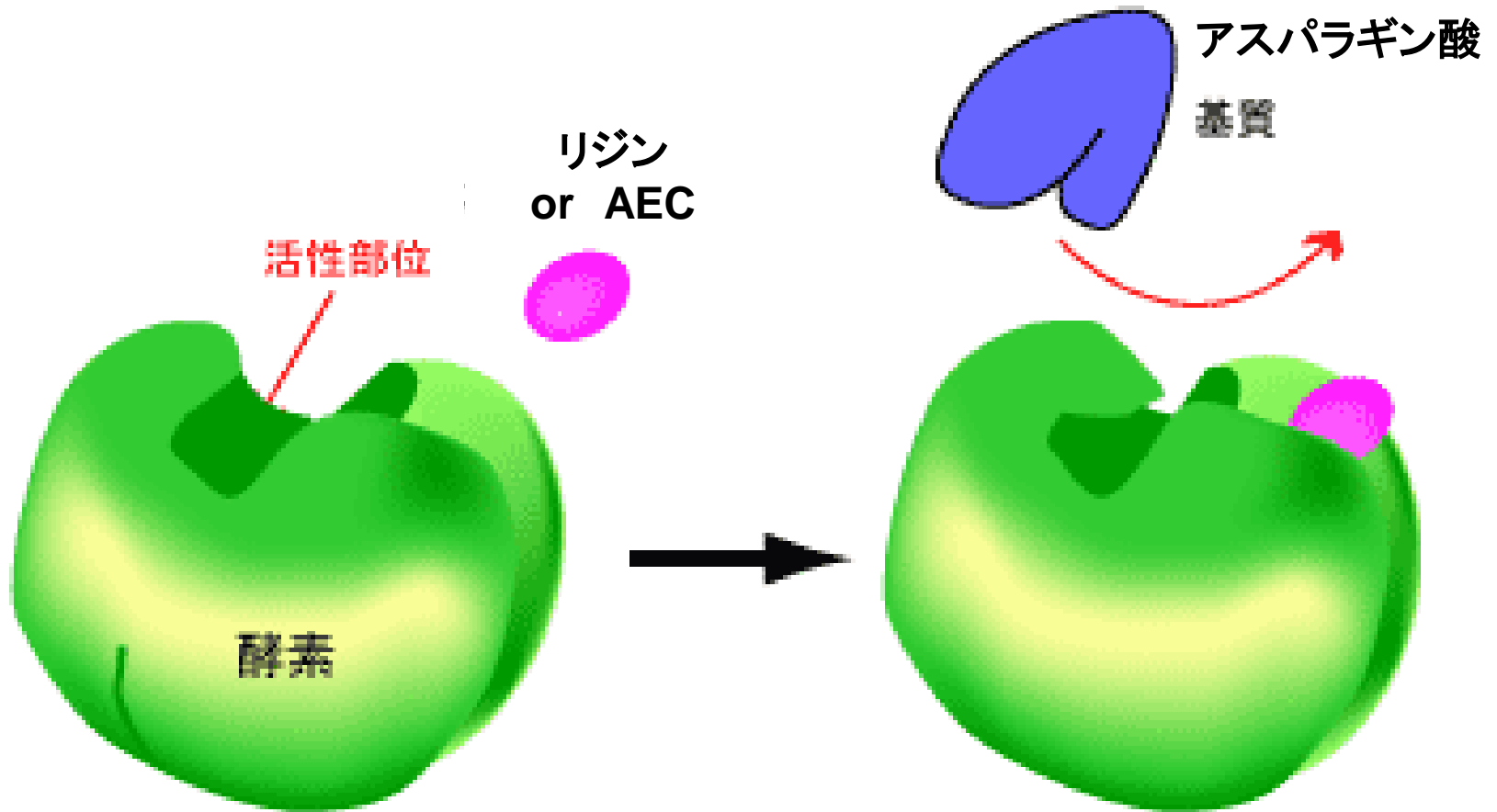
リジンおよびそのアナログ AEC

天然型アミノ酸とは一部の構造が異なるが、酵素のアロステリック部位に結合してアミノ酸合成を阻害する

**野生株:** アナログが存在するとアスパルトキナーゼが働かなくなると、リジンが合成できなくなる  
⇒ 死ぬ

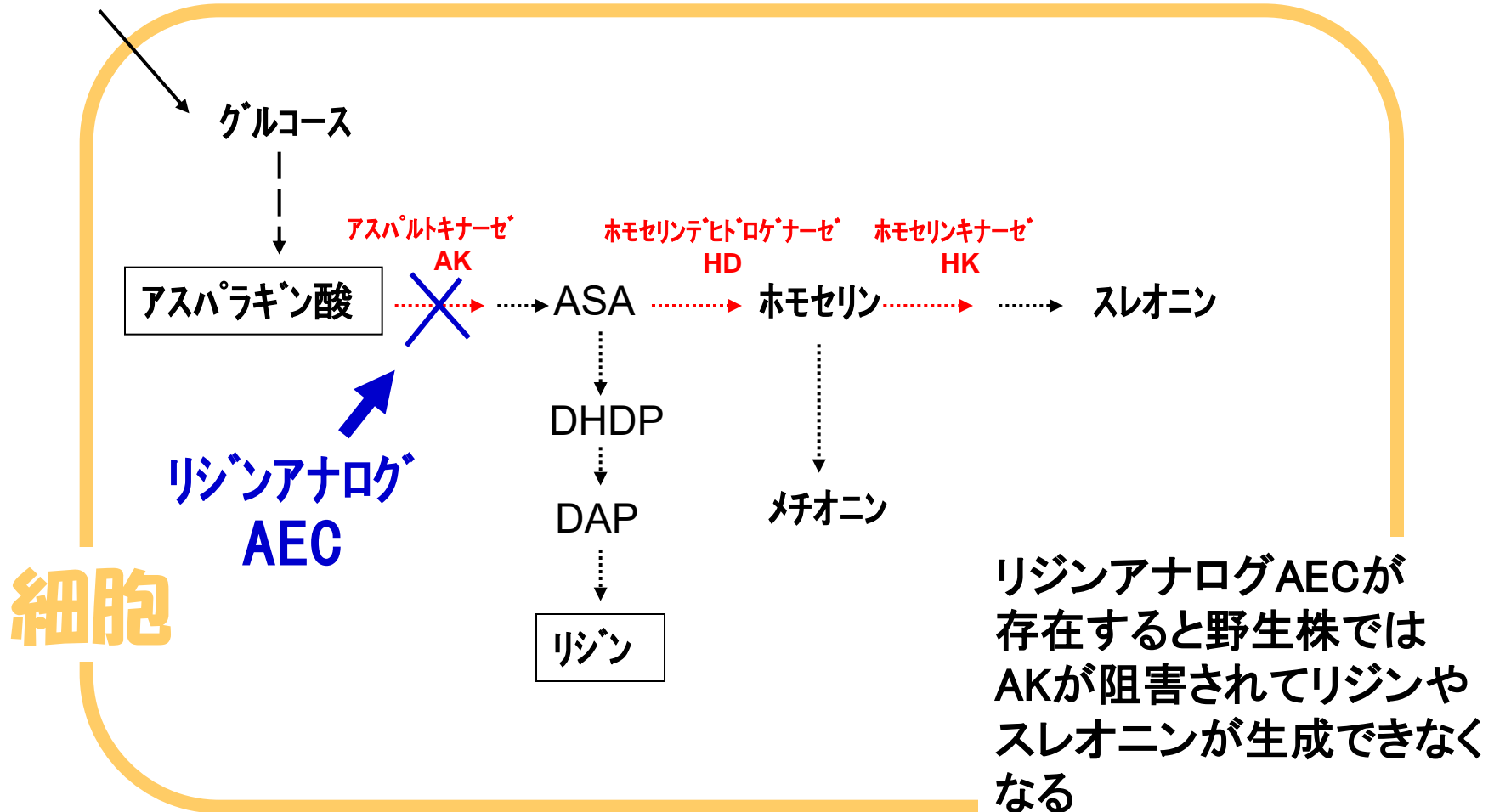
**アナログ耐性株:** アナログが存在してもアスパルトキナーゼが働くのでリジンが合成できる ⇒ 死なない

# アスパルトキナーゼのリジンやAECによる阻害 (非拮抗的阻害 noncompetitive inhibition)



# *C. glutamicum* 野生株の リジンアナログ存在下でのリジン及びスレオニン合成系

グルコース

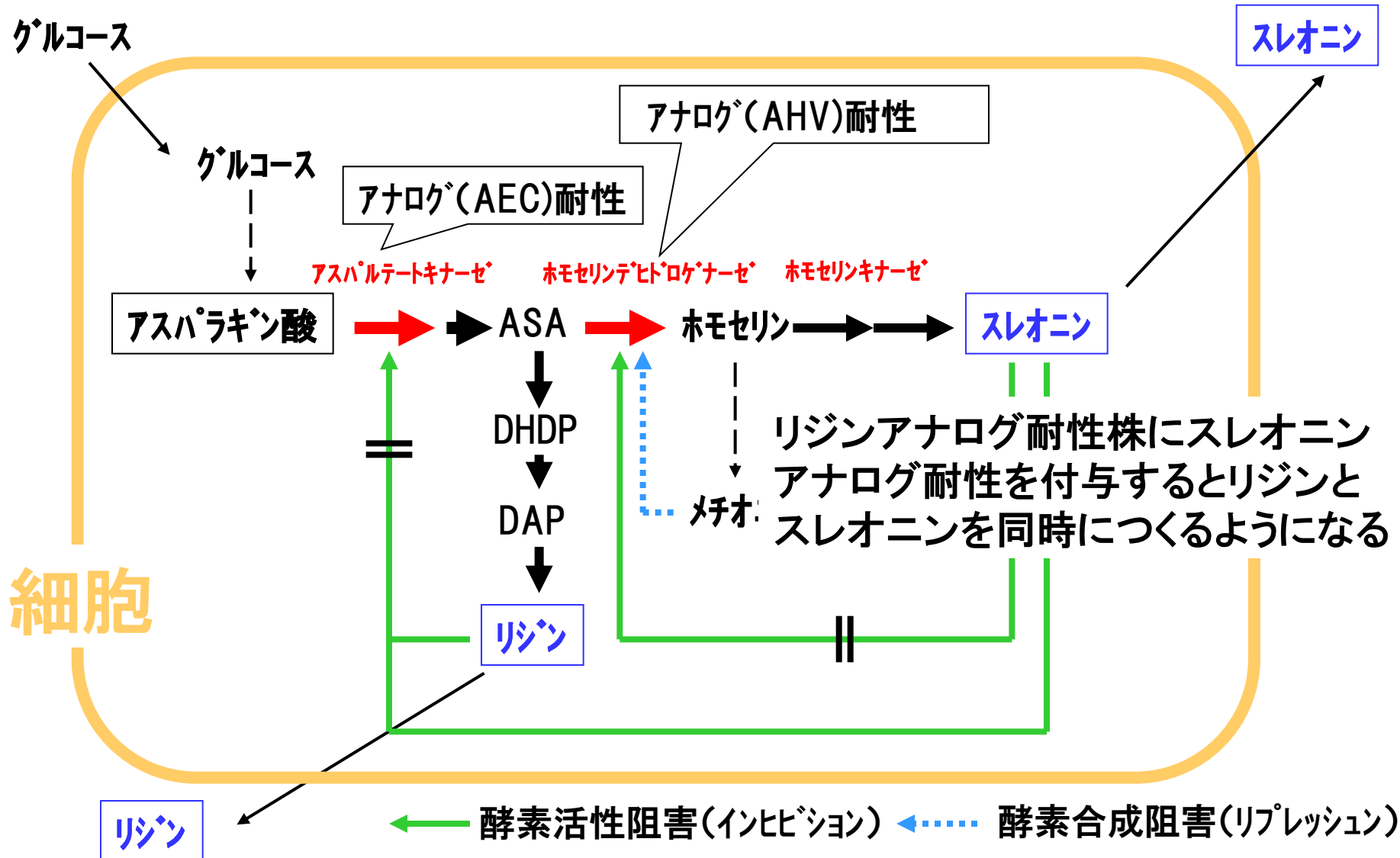




# 代謝制御によるアミノ酸発酵

*Brevibacterium lactofermentum* の

リジン・スレオニン生合成系の代謝調節とリジン・スレオニン同時生産性変異株



# アミノ酸の代謝制御発酵

## 分子育種(組換えDNA利用)変異株を用いる方法

アミノ酸生合成系の律速酵素反応などを組換えDNA技術を応用して分子レベルで改良 (設計おりの変異を誘導)

### ・遺伝子増幅効果

増幅したい酵素の遺伝子をプラスミドや染色体に組み込んで数を増やす

### ・プロモータ増強

増幅したい酵素の遺伝子の発現制御機構を改変して発現を増やす

### ・部位特異的変異によるフィードバック制御解除

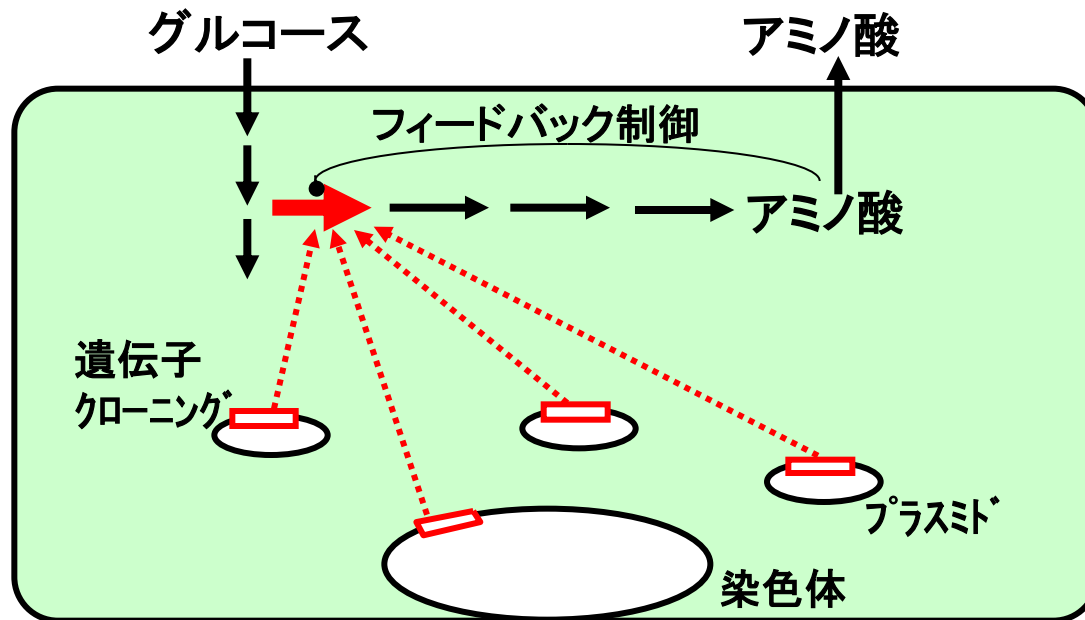
酵素のアロステリック部位のアミノ酸残基を特異的に変える

### ・分解系や副反応系の遺伝子破壊

目的アミノ酸の生産に好ましくない酵素の遺伝子を破壊する

# アミノ酸発酵への組換えDNA技術の応用

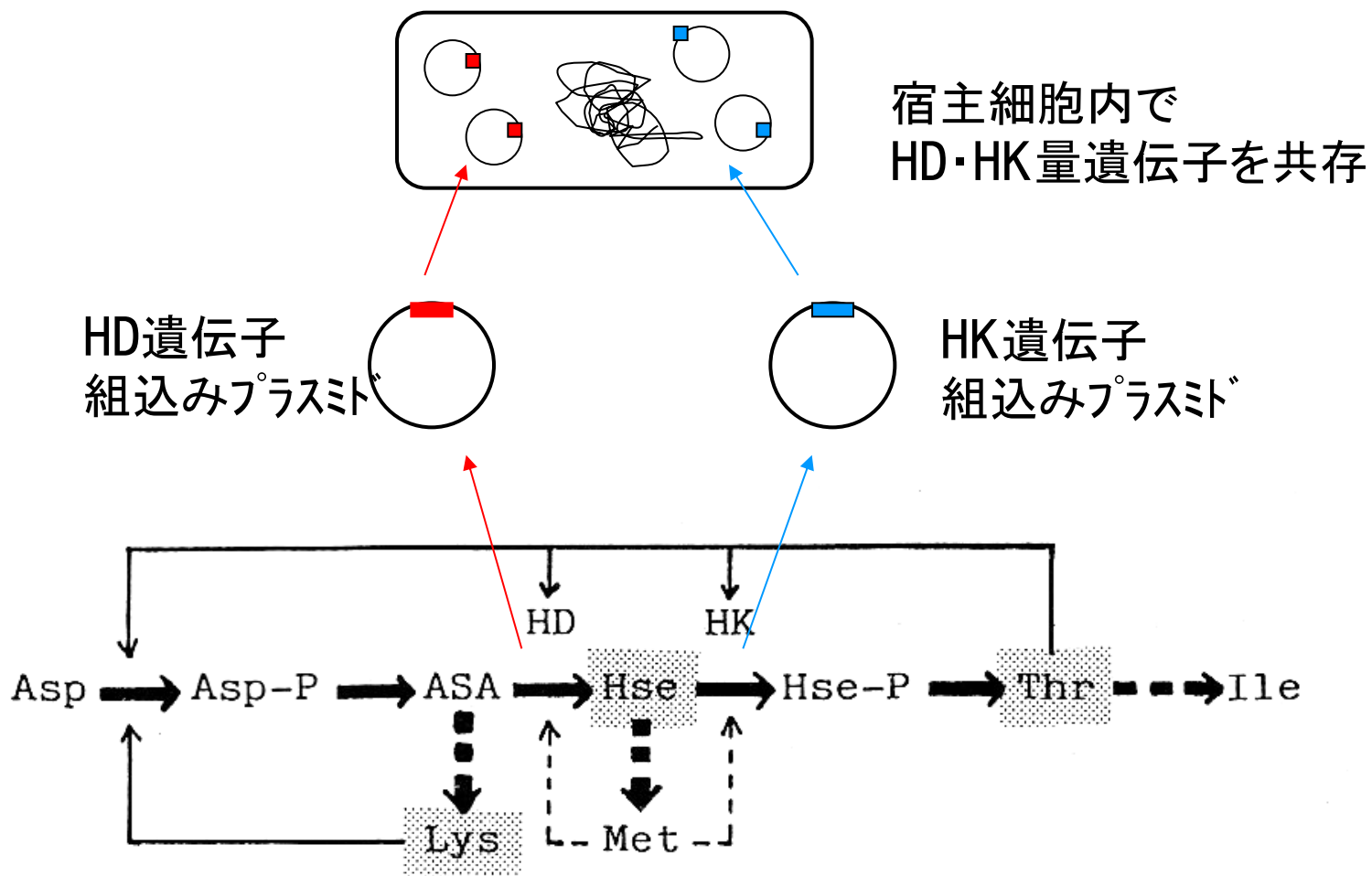
目的代謝系の増強：  
プラスミドによる遺伝子増幅  
染色体上での遺伝子増幅  
プロモータ改変による発現向上  
キー酵素の改変によるフィード  
バック制御の解除





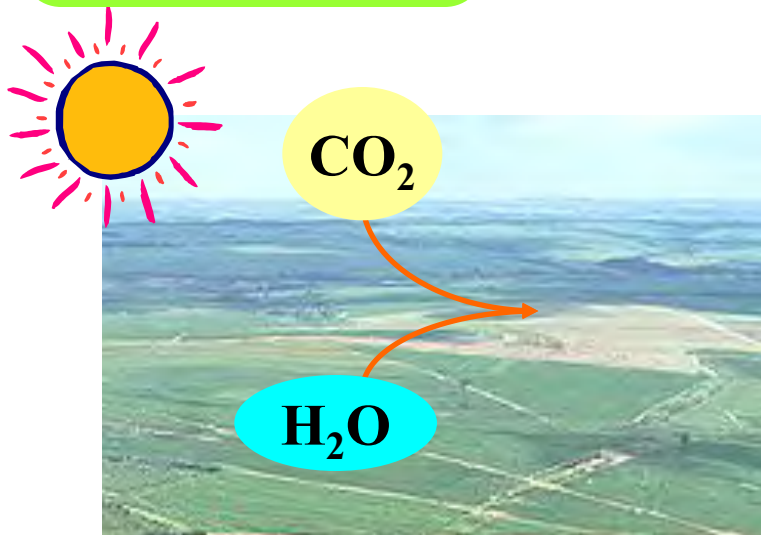
# 分子育種の例

## スレオニン合成遺伝子の導入によるスレオニン生産の改良



# 発酵法アミノ酸の原料

炭素源



穀物は太陽光と大地で育つ

窒素源

$\text{NH}_3$ , Urea



サトウキビ



糖液  
糖蜜



キャッサバ

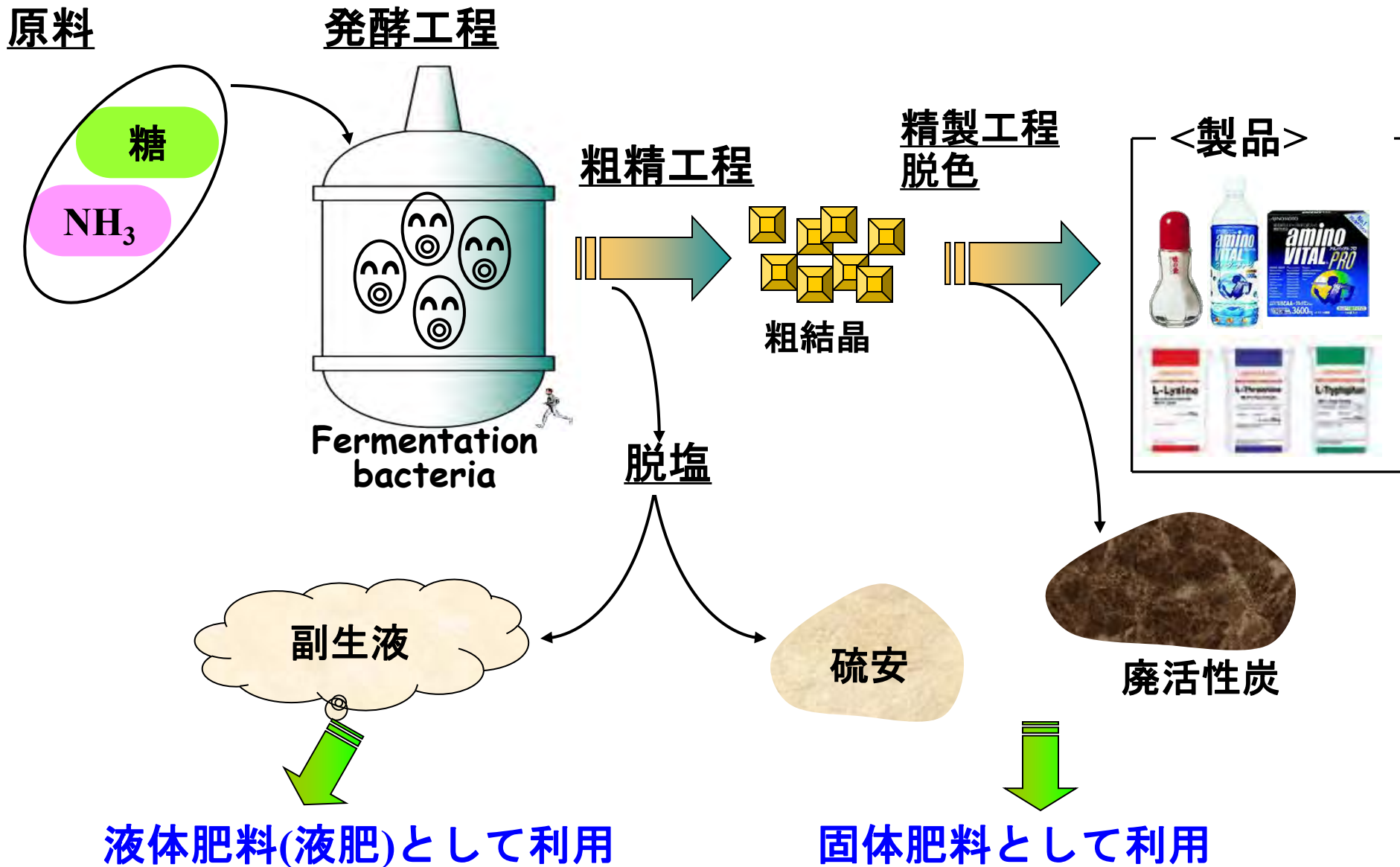


デンプン

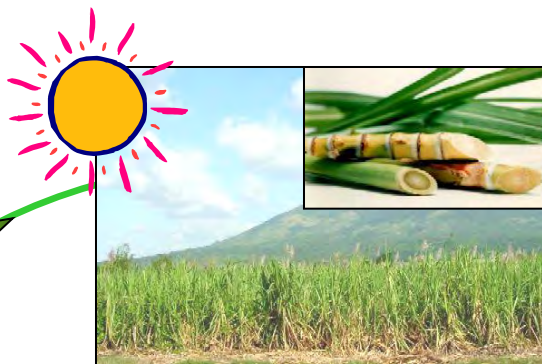


トウモロコシ

# 発酵法アミノ酸の製造プロセス



# アミノ酸製造における物質循環“バイオサイクル”



サトウキビ農場：50万ha  
サトウキビ：3800万t

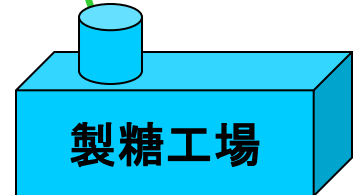
化学肥料と発生CO<sub>2</sub>  
(化学肥料製造時)の削減

35万haのサトウキビ畑  
に有機肥料を施肥

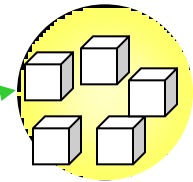


液体肥料  
160万t

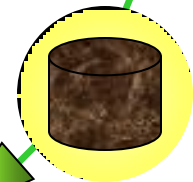
バイオサイクル



製糖工場



粗糖  
420万t



ケーン・モラッセ  
150万t



味の素  
の工場

副生物  
160万t



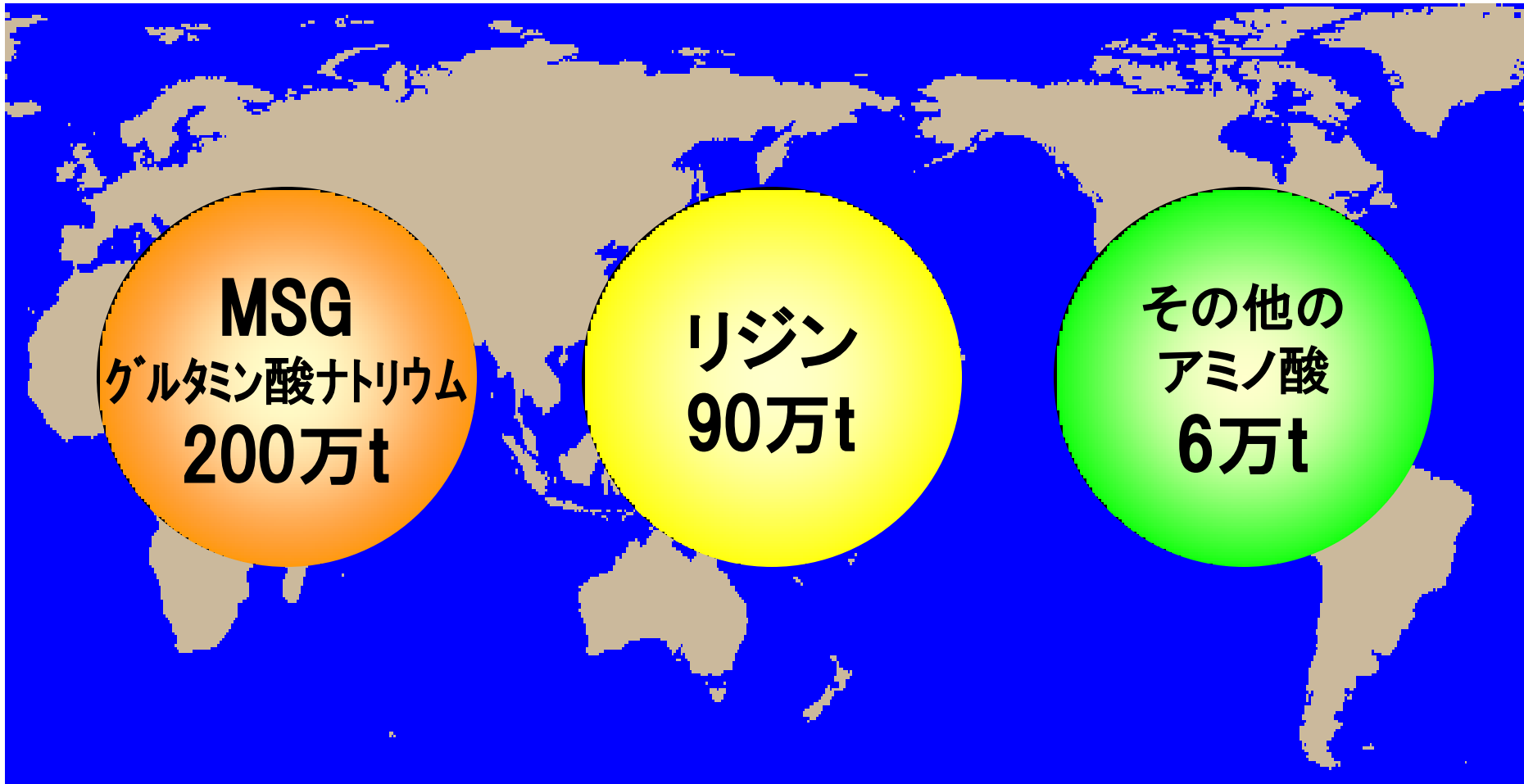
アミノ酸  
50万t

# 発酵法によるアミノ酸の製造法は. . . .

---

植物由来原料を使用し  
エネルギー消費が少なく  
副生物のリサイクルが可能で  
地球の物質循環に組み込むことができる  
持続可能な(Sustainable)  
バイオプロセス

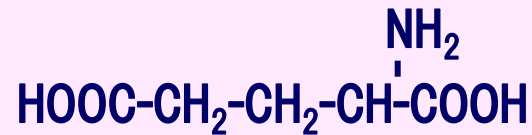
# 世界におけるアミノ酸の生産量



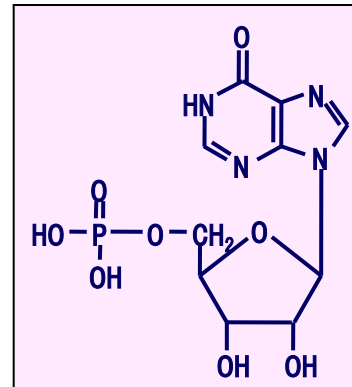
約 300 万 t のアミノ酸が生産されている (DL-メチオニンを除く)

# うま味調味料

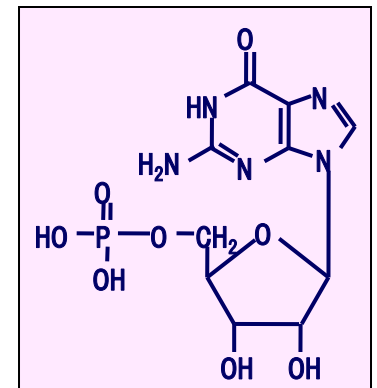
1908年 昆布のうま味成分  
**グルタミン酸**  
(池田菊苗博士)



1913年 カツオのうま味成分  
**イノシン酸**  
(小玉新太郎博士)



1960年 干し椎茸のうま味成分  
**グアニル酸**  
(国中明博士)



# 呈味性 5'-リボヌクレオチド

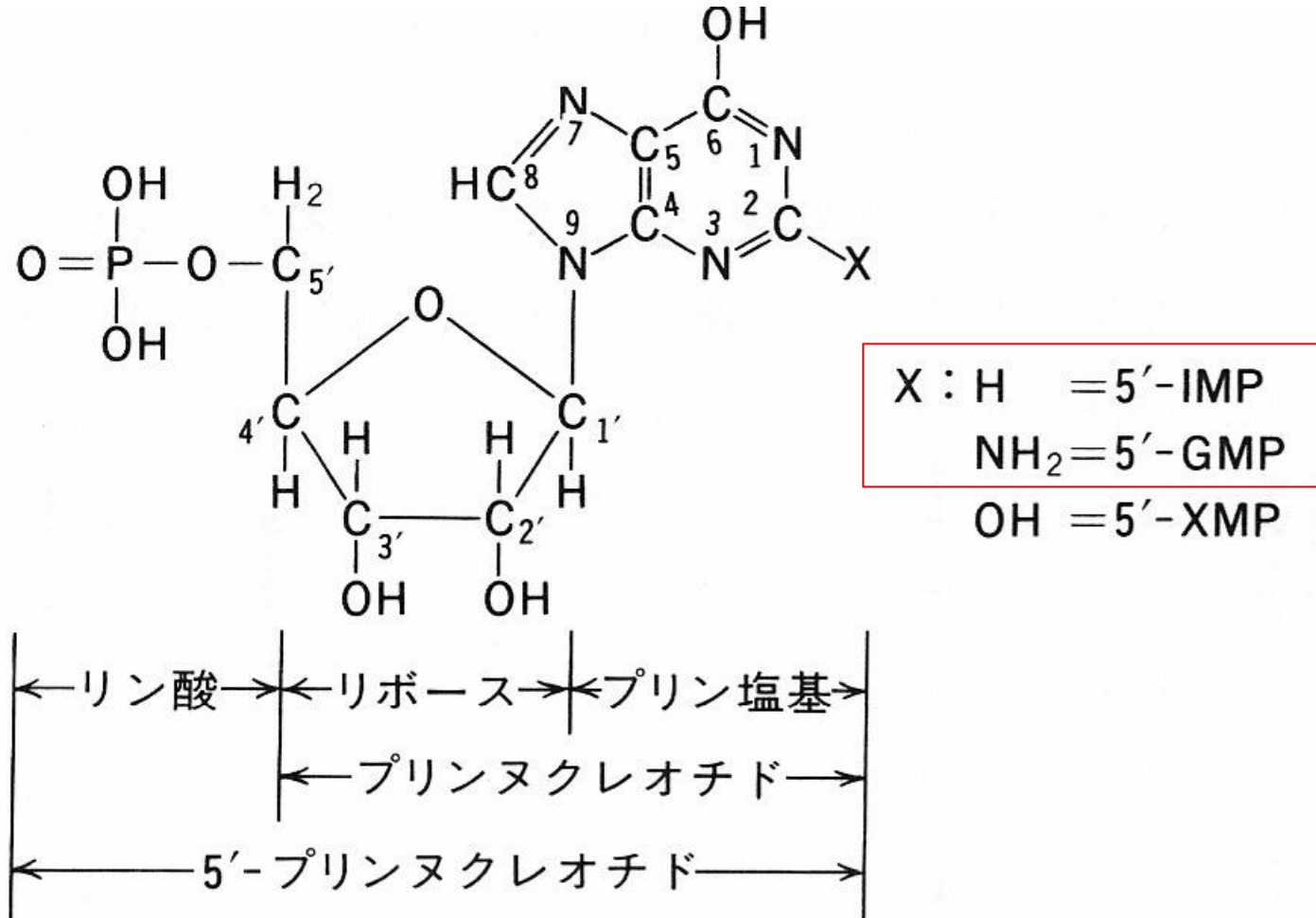
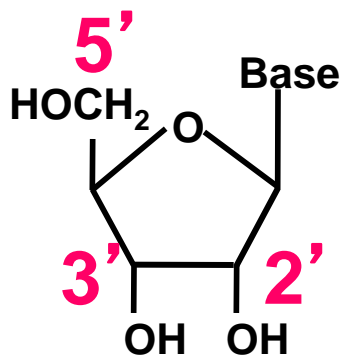


図 7-2 呈味性ヌクレオチドの構造

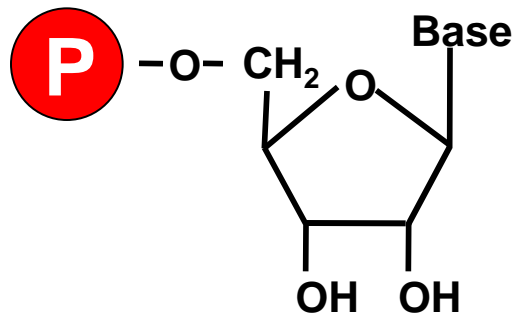


# リン酸化反応と位置特異性

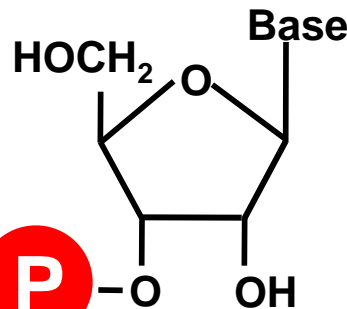


イノシン  
グアノシン

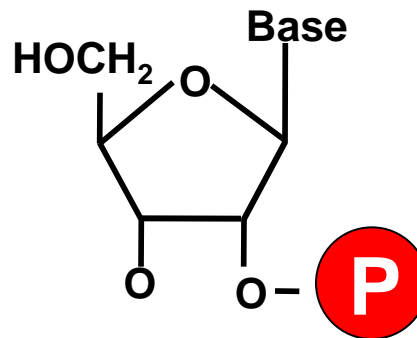
リン酸化



うま味がある



無味



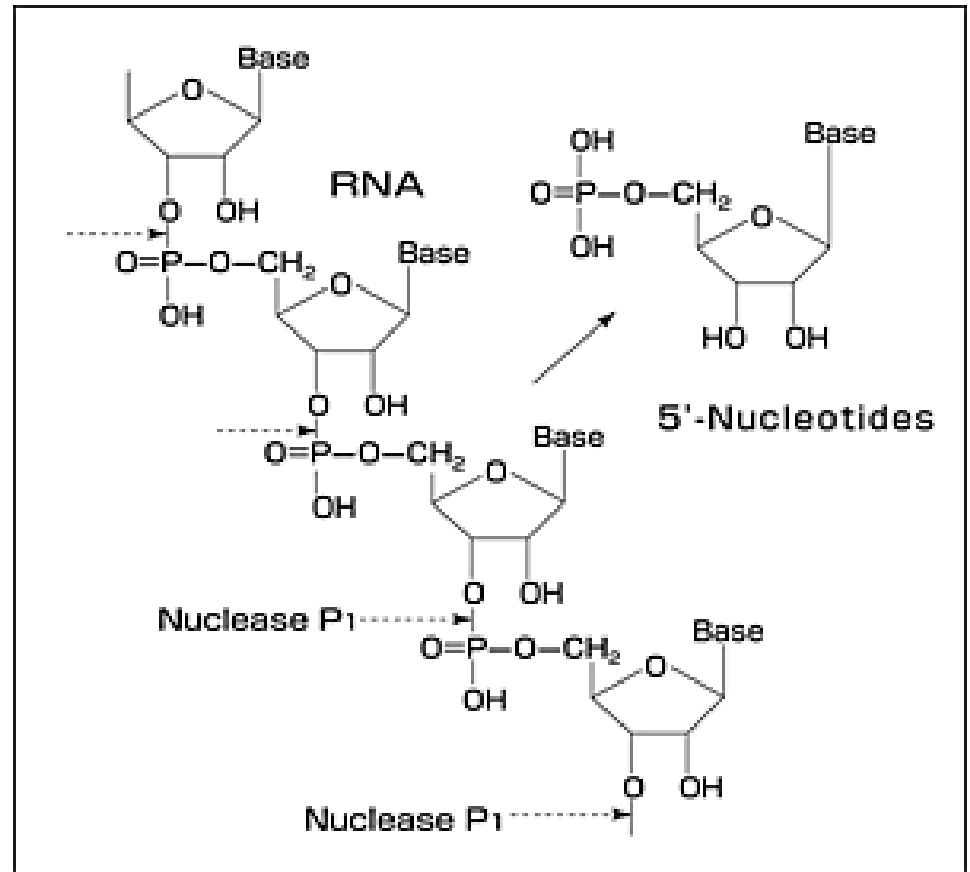
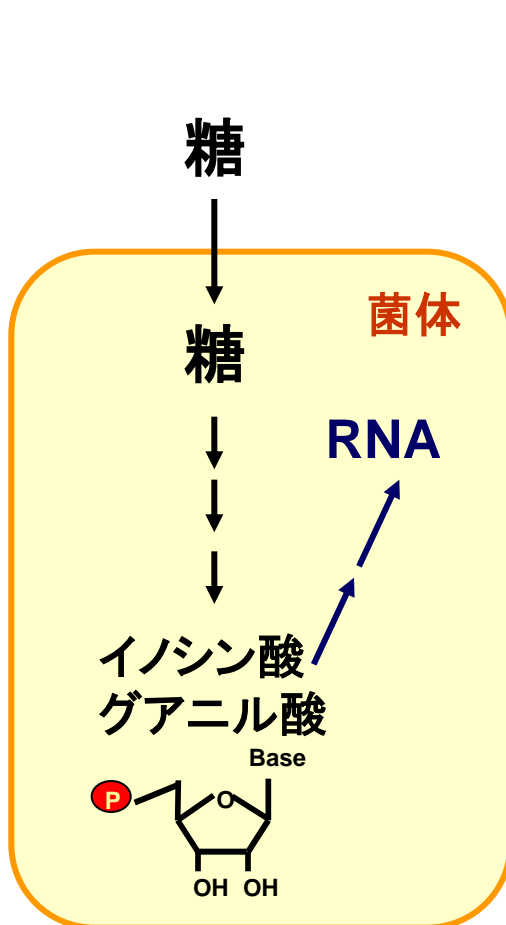
無味

# 代表的なプリンヌクレオチドの工業的製法

製法	生産物
RNA酵素分解法	イノシン酸/ グアニル酸
直接発酵法	イノシン酸
キサンチル酸発酵 + 酵素的アミノ化法	グアニル酸
イバシン/ グアバシン発酵 + 化学的リン酸化法	イノシン酸/ グアニル酸
イバシン発酵 + 酵素的リン酸化法	イノシン酸

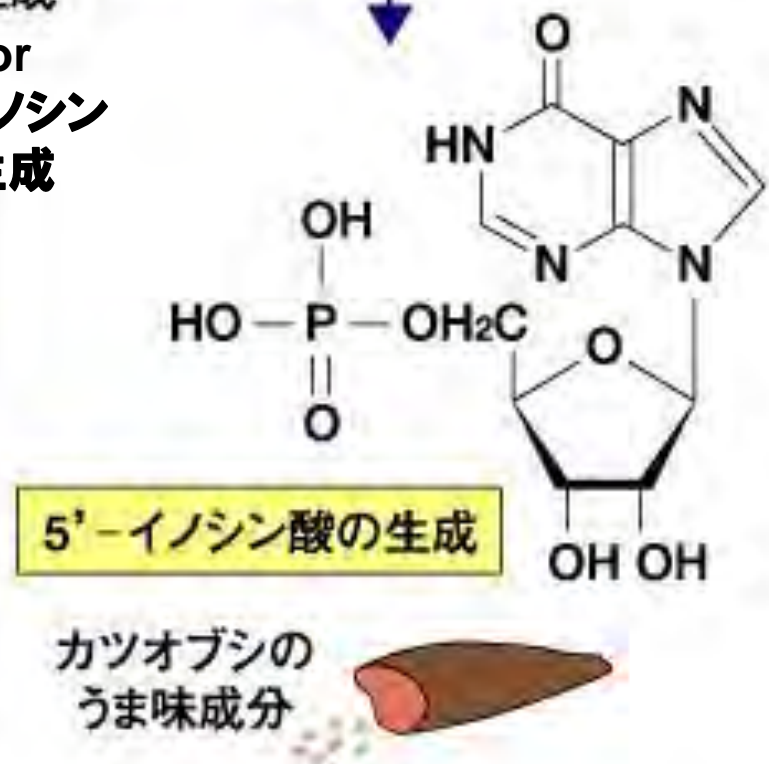
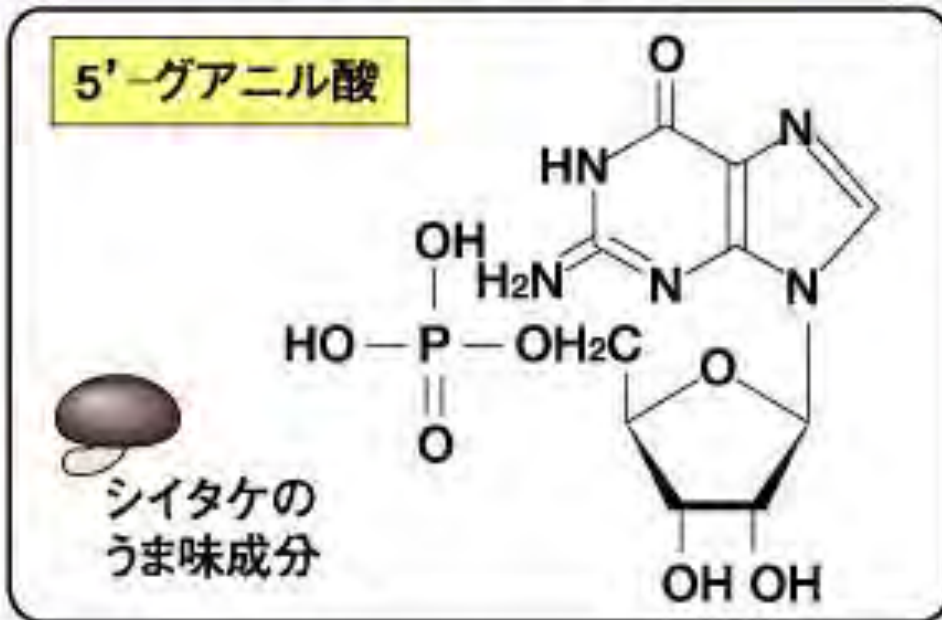
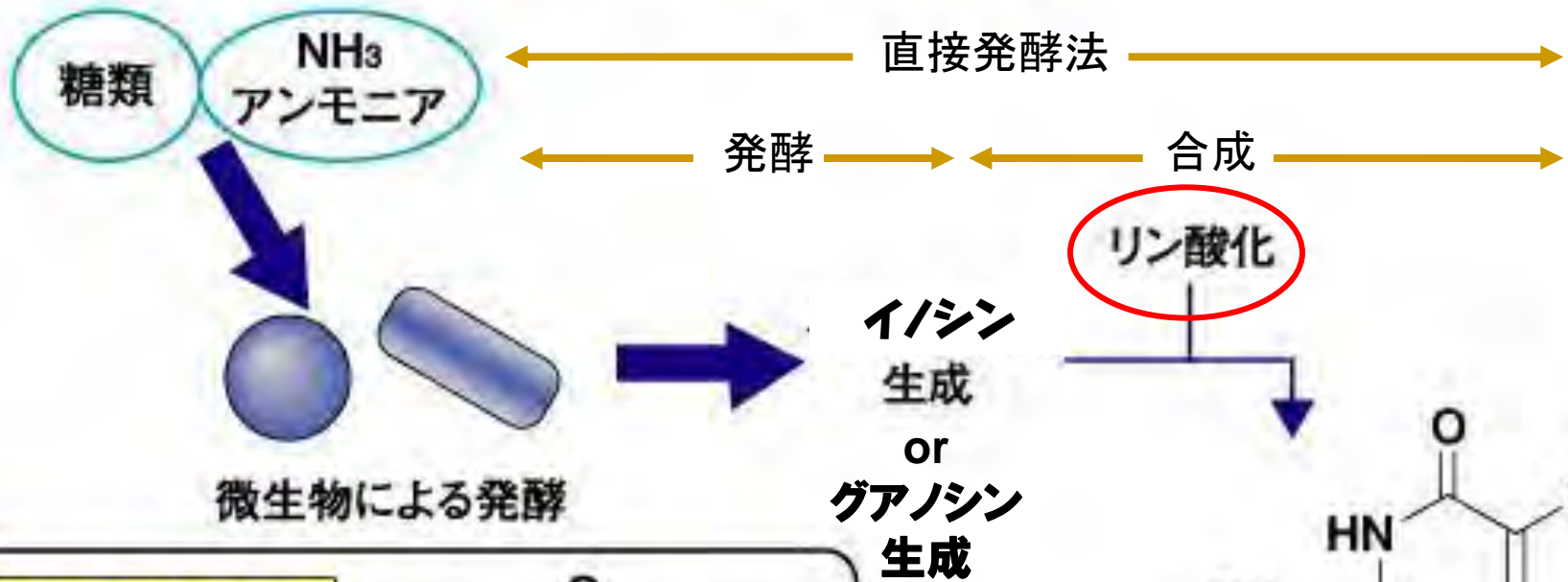
# 代表的なイノシン酸/グアニル酸の製法

## 酵母RNAの酵素的分解



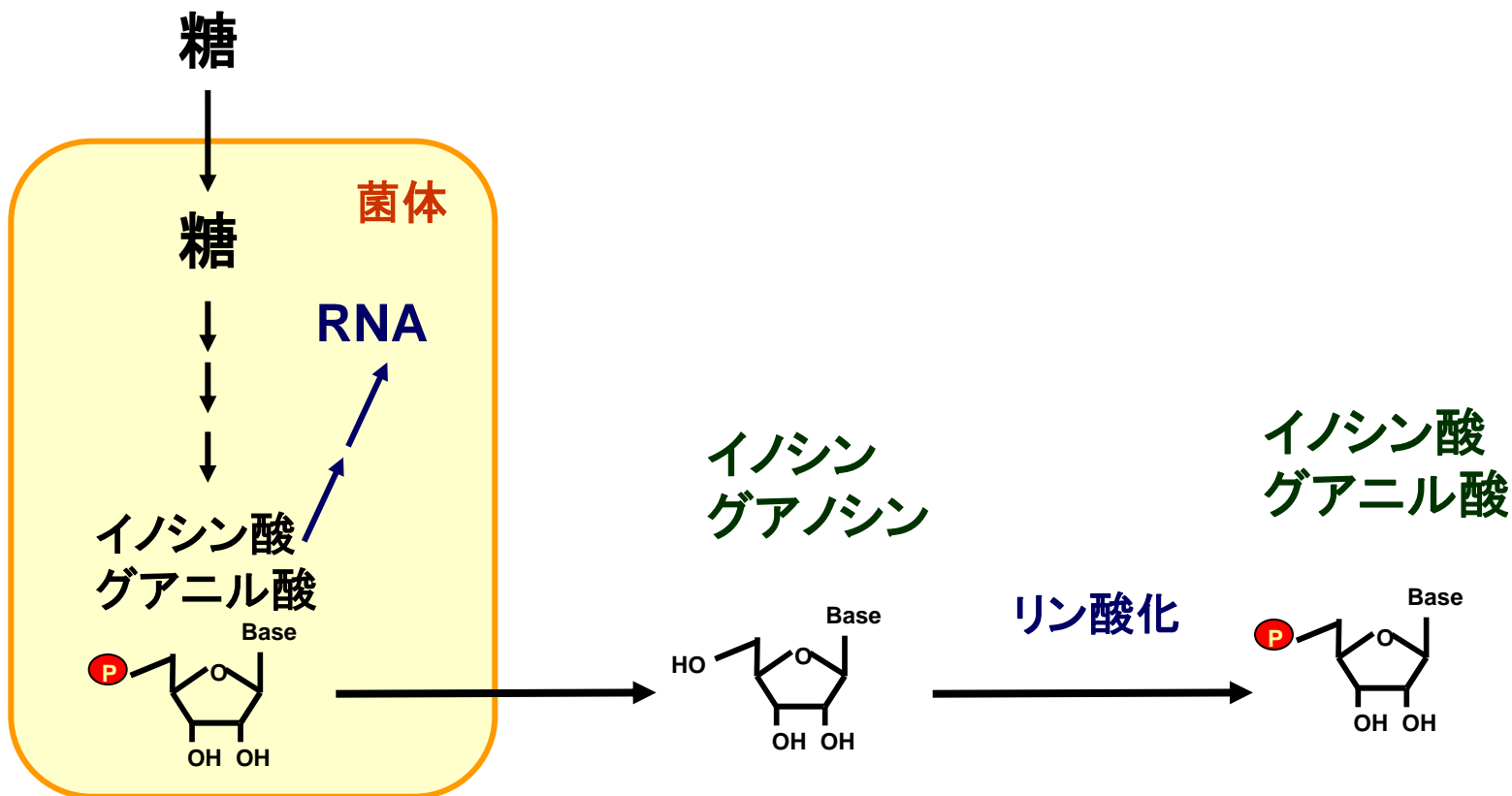
欠点：副産物が多く効率的でない

# 直接発酵法 及び 発酵・合成折衷法

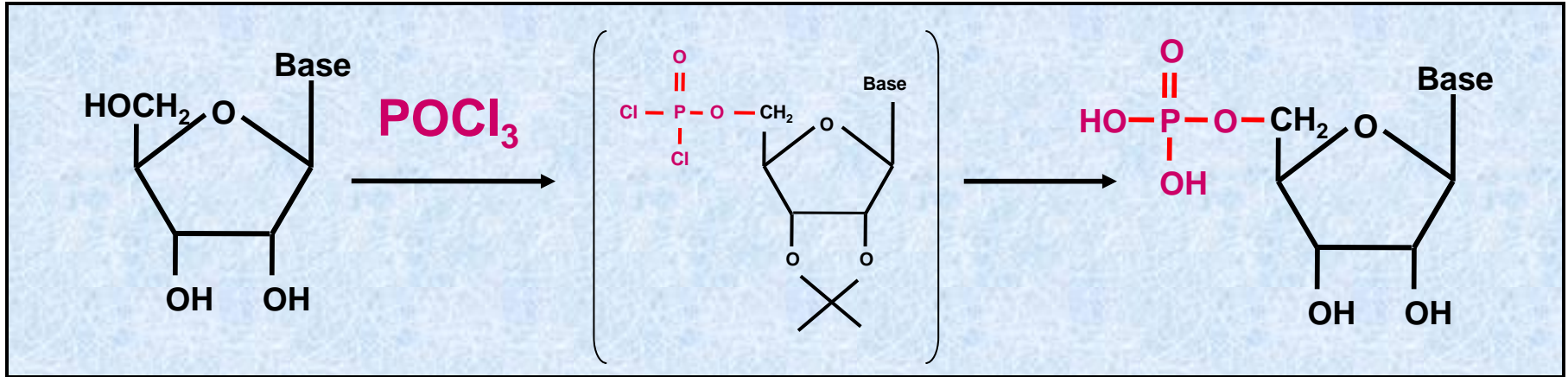


# 代表的なイノシン酸/グアニル酸の製法

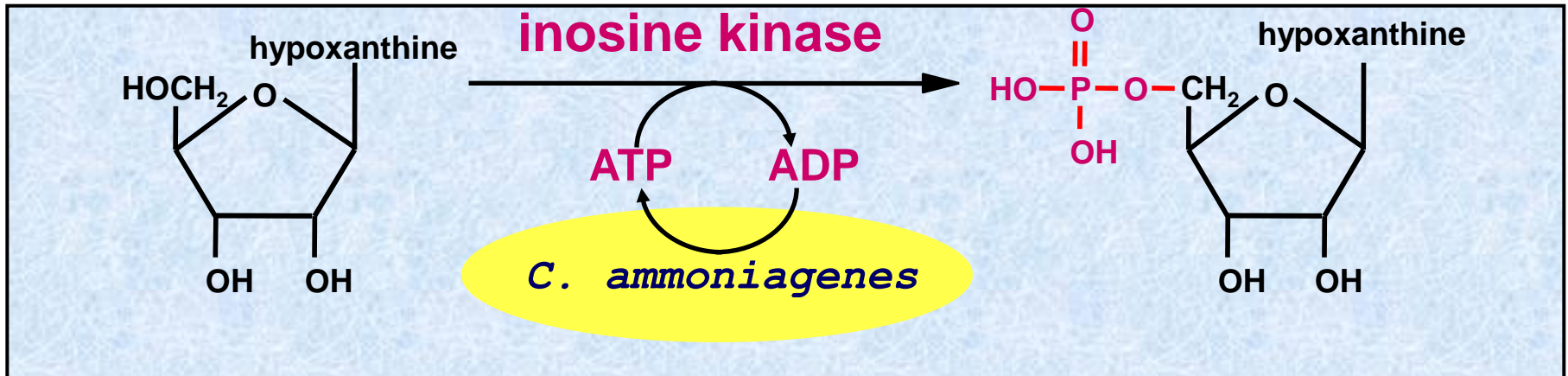
## イノシン/グアノシン発酵＋リン酸化



## 化学的リン酸化法



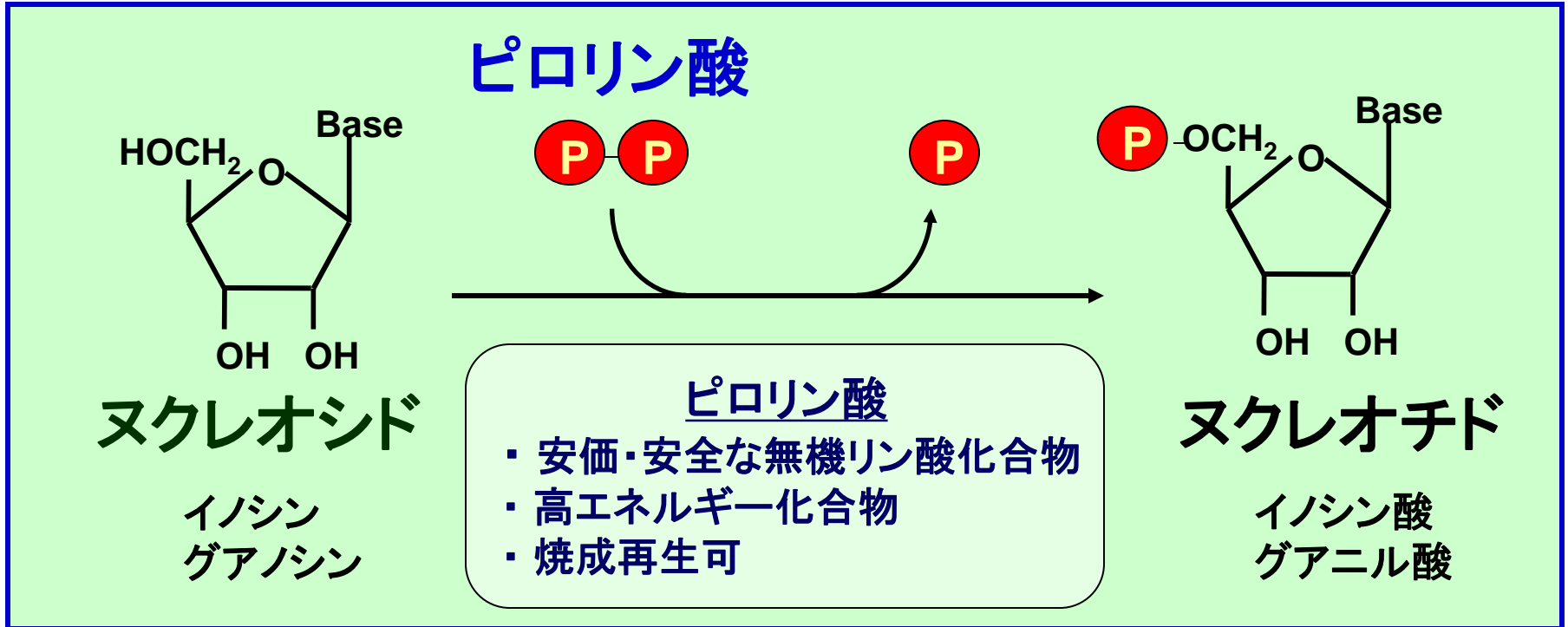
## 酵素的リン酸化法



## イソシグアバシンのリン酸化

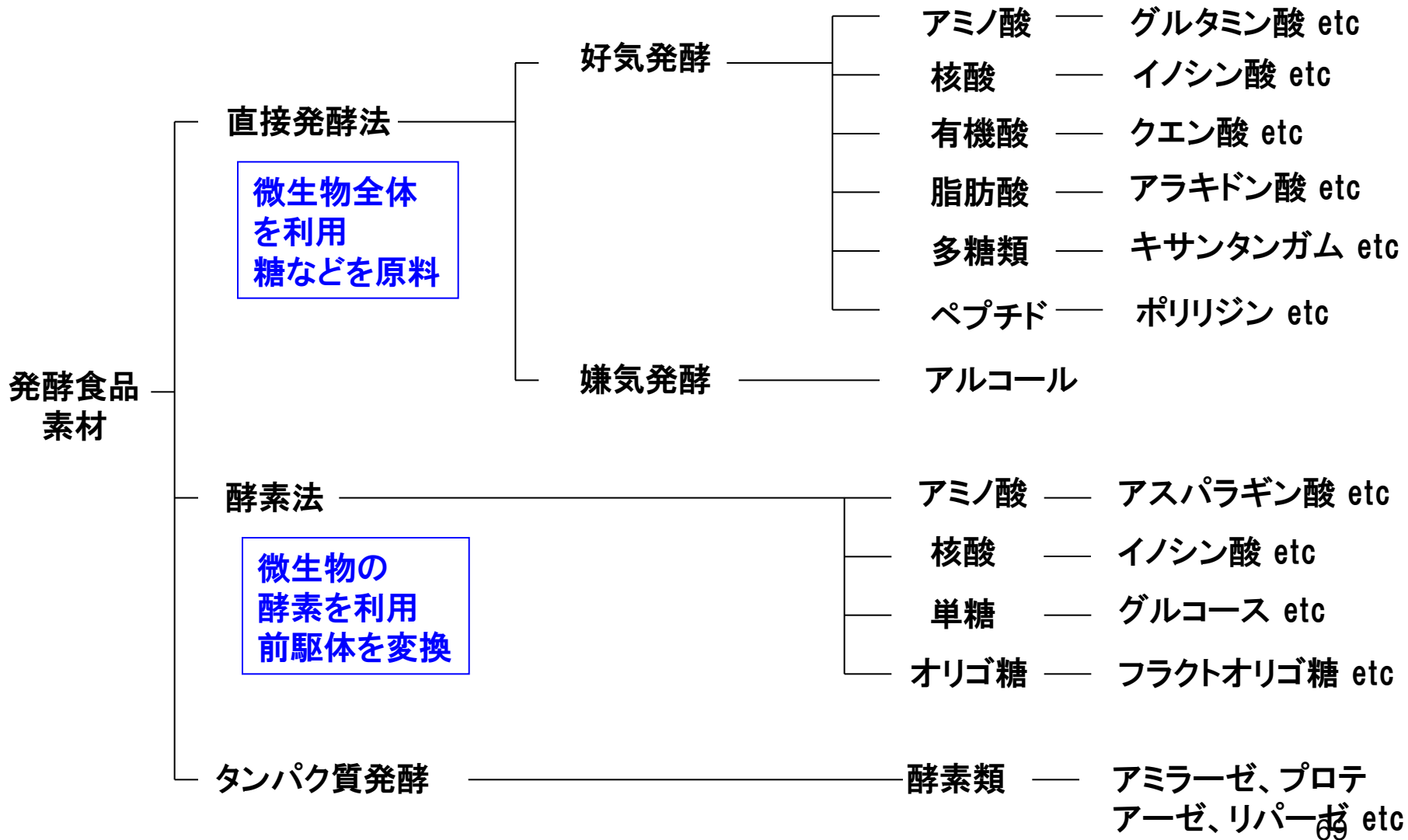
# 最新の製法

## ピロリン酸をもちいた酵素合成法



*Morganella morganii* のリン酸基転移酵素を利用

# 発酵技術と発酵素材（方法による系統分類）





# <低分子発酵>

## 1. アルコール

## 2. 有機酸

### ・解糖系、クエン酸回路の利用

① 乳酸

② クエン酸

③ コハク酸

④ フマル酸

⑤ リンゴ酸

⑥ イタコン酸

### ・直接酸化の利用

① 酢酸

② グルコン酸

エタノールやグルコースを酸化

# <低分子発酵>

## 3.アミノ酸

- ①グルタミン酸 (調味料)
- ②リジン (飼料)
- ③スレオニン (飼料)
- ④アミノ酸の酵素合成 (医薬用アミノ酸など)

## 4.核酸(ヌクレオチド) (調味料)

- ①RNA分解
- ②IMP生産…糖 ⇒ イノシン ⇒ イノシン酸
- ③GMP生産…糖 ⇒ グアノシン ⇒ グアノシン発酵
- ④IMP(イノシン酸)直接発酵法

# <低分子発酵>

## 5. 抗生物質

### ① $\beta$ -ラクタム系

- ・ペニシリンG
- ・半合成ペニシリン（メチシリン、アンピシリン）
- ・セファロスポリン類（ノカルジシンA）
- ・スルファセジン（チエナマイシン、クラブラン酸）
- ・アミドグリコシド系（ストレプトマイシン、カナマイシン）
- ・マクロライド系（大環状ラクトン）： エリスロマイシン
- ・テトラサイクリン類：
  - オーレオマイシン（クロルテトラサイクリン）
  - テラマイシン（オキシテトラサイクリン）
  - アクロマイシン（テトラサイクリン）
- ・クロラムフェニコール（クロロマイセチン）

# <低分子発酵>

## 6. 抗カビ剤

### ①抗水虫剤

Griseofulvin

水虫、リンゴツル病、メロンツル病

Variotin

水虫(毒性少ない)

Pyrolnitrin

水虫

### ②農薬

Blasticidin S

イモチ病

Kasugamycin

イモチ病(低毒性)

Polyoxins

イネ紋枯病、キチン合成阻害

## 7. 制ガン剤

Actinomycin D

DNA直接結合、RNA合成阻害

Mitomycin C

Bleomycin

## <低分子発酵>

### 8.ビタミン類

- ① ビタミンB<sub>2</sub> (リボフラビン): 栄養強化剤、医薬、飼料
- ② ビタミンB12 (シアノコバラミン): 欠乏で悪性貧血、医薬、飼料
- ③ ビタミンC (アスコルビン酸): 医薬、飼料、抗壊血病、栄養強化剤、食品の酸化防止剤  
(ソルボース発酵 *Gluconobacter suboxydans* など)
- ④ イソビタミンC (D-アラボアスコルビン酸) 抗酸化力が強い  
2-ケトグルコン酸発酵 —— *Pseudomonas fluorescens*、*Serratia marcescens*  
直接発酵 —— *Penicillium notatum*
- ⑤  $\beta$ -カロテン (プロビタミンA) … 飼料
- ⑥ エルゴステロール (プロビタミンD)

## <低分子発酵>

### 9. ステロイド類…発酵＋化学合成

- ①水酸化反応——プロゲステロン(11 $\alpha$ の水酸化)
- ②脱水素反応——ハイドコルチゾン(C、脱水素反応)

### 10. 植物ホルモン

- ①ジベレリン…生長促進
- ②アブシジン酸…休眠、生理的落果

### 11. 酵素阻害剤

- ①プロテアーゼ阻害剤: 胃炎、膵炎、火傷、血液凝固防止
- ②アミラーゼ阻害剤: 脂肪過多症、糖尿病
- ③HMG-CoAレダクターゼ阻害剤:  
コンパクチン(コレステロール合成系)

## <高分子発酵>

### 1.多糖

①デキストラン: *Leuconostoc mesenteroides*,  
*L.dextranicum*

グルコース  $\alpha$ -1,6主鎖、 $\alpha$ -1,3主鎖

分子量数百万～数千万 糖度、水溶性

アイスクリーム、シロップ、ゼリー、血漿増量剤

②セルロース (バクテリアセルロース):  
*Acetobacter pasteurianus(xylinum)*  
ナタデココ、スピーカー振動版

③PHA (ポリ $\beta$ -ヒドロキシ酪酸などアルカノエート):  
*Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens*  
3-ヒドロキシ吉草酸などの共重合物

# <高分子発酵>

## 2.微生物酵素

### ①アミラーゼ

細菌： $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ *Bacillus*、*Clostridium*

糸状菌： $\alpha$ -アミラーゼ主体 *Aspergillus oryzae*

$\beta$ -アミラーゼ主体 *Rhizopus delmer* など

グルコアミラーゼ *A.awamori*、*A.inui*

### ②CGTase(サイクロマルトデキストリングルカントランスフェラーゼ)：*B. macerans*

サイクロデキストリンを作る。

用途…ワサビ、ニンニク、色素（安定化）、  
ドレッシング、ケーキ、ハム（乳化）

### ③セルラーゼ…糸状菌、放線菌

endo- $\beta$ -1,4-glucanase

cellobiohydrolase ( $\beta$ -glucosidase)

用途…食品、果汁混濁防止、飼料添加剤、布加工



## <高分子発酵>

- ④グルコースイソメラーゼ: *Streptomyces cinereus*, *Lactobacillus brevis*,  
*Bacillus megaterium*  
グルコース⇔フルクトース(1:1) 転化糖(異性化糖)——砂糖と同等の甘味
- ⑤キシロースイソメラーゼ: キシロース⇔キシルロース
- ⑥プロテアーゼ: タンパク質分解 (ペプチド結合切断)  
用途…消化剤、消炎剤、皮革加工、製パン、ビール・清酒の 混濁防止、味噌・醤油の速醸、食肉軟化、洗剤  
サチライシン: *B.subtilis* アルカリセリンプロテアーゼ  
消炎剤: *Serratia marcescense*  
酸性プロテアーゼ (pH4): *A.oryzae*  
中性・アルカリ性プロテアーゼ (pH7): *A.niger*
- ⑦凝乳酵素——カゼインを凝集  
*Rhizomucor pussilus*, *R.miehei*, *Mucor rennin* (キモシン)
- ⑧リパーゼ——脂肪→脂肪酸+グリセロール  
*A.niger*, *C.cylindracea*, *C.paralipolytica*, *P.cyclopium*,  
*R.delmer*, *Humicola lanuginosa*

- ⑨ラクターゼ ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ): *S. fragilis*, *A. niger*  
用途…生乳の乳糖分解、アイスクリーム (乳糖晶出防止、甘味増強)
- ⑩グルコースオキシダーゼ: *A. niger* など  
グルコース +  $O_2$   $\rightarrow$  グルコノラクトン +  $H_2O_2$   
用途…食品中の酸素除去、グルコース除去
- ⑪ペクチナーゼ: 果汁の清澄  
プロトペクチナーゼ: ペクチンの可溶化  
ペクチンエステラーゼ: メチルエステル加水分解  
ポリガラクトツロナーゼ: ペクチンの分解 (ペクチン  $\rightarrow$  ポリガラクトツロン酸)
- ⑫ナリンキナーゼ: *A. niger*  
ナリンギン (夏みかん、グレープフルーツの苦味) の  
分解 用途…マーマレードの苦味除去
- ⑬ニトリルヒドラターゼ: *Rhodococcus*  
 $CH_2=CH-CN + H_2O \rightarrow CH_2=CHCONH$  (アクリルアミド)