

## 身近で活躍する有用微生物 食品と有用微生物－和食文化と微生物8

# 調味料(アミノ酸発酵)と微生物

もり なが やすし  
森 永 康  
Yasushi MORINAGA

## はじめに

和食文化を支える重要な要素が「だし」である。「だし」は日本料理に個性を与え、日本人の食生活の基本を支えてきた。「だし」の原料は、言うまでもなく昆布、かつお節、そしてシイタケである。それぞれグルタミン酸ナトリウム、イノシン酸ナトリウム、グアニル酸ナトリウムがうま味成分となっている。これらの食材は古来より利用されてきた。江戸時代の料理本『新撰包丁梯』(1803年)にはかつお節、昆布、シイタケを用いた「だし」の取り方が記述されており、この時代までに「だし」が広く普及していたことがうかがわれる<sup>1)</sup>。

「だし」を科学的に解析したのは東京帝国大学の池田菊苗である。1908年に昆布だしの本体がグルタミン酸ナトリウムであることを発見し、「うま味」と名付けた。この発見の翌年1909年には、早くも鈴木商店(現 味の素(株))によりグルタミン酸ナトリウムがうま味調味料として発売された<sup>2)</sup>。その後、1913年の小玉新太郎によるかつお節のうま味成分イノシン酸塩(最初に構造決定されたのはヒスチジン塩)の発見、1957年の国中明によるシイタケのうま味成分グアニル酸塩の発見に至るまで、うま味成分はいずれも日本人研究者によって発見されている。こうした「だし」のうま味成分の発見とそれを契機とした調味料事業が、アミノ酸・核酸発酵につながり、日本の近代発酵工業の展開の礎となった。ここでは、グルタミン酸生産菌の発見の経緯、発酵のメカニズム、工業生産などについてまとめるとともに、グルタミン酸発酵を起点に展開された各種アミノ酸の代謝制御発酵技術についてもご紹介したい。

## I. うま味調味料の市場拡大と新製法の必要性

グルタミン酸ナトリウムのもともとの製法は抽出法であった。植物原料からグルタミン酸を豊富に含むタンパク質を抽出し、塩酸を用いて加水分解して、アミノ酸の混合物を得て、グルタミン酸を結晶として取り出し、水酸化ナトリウムで中和、結晶化してグルタミン酸ナトリウムを得るという方法である。最初に用いられた原料はグルタミン酸含量の多いグルテンを含む小麦であったが、その後コストダウンのために大豆が利用された<sup>2)</sup>。

抽出法は1909年以来40年以上続けられたが、調味料市場の拡大に伴い問題点が顕在化した。その第一は原料を国際相場商品の穀物に頼らざるをえず価格変動リスクを孕んでいること、第二は強酸による加水分解というスケールアップや連続化が困難なプロセスに依存していること、第三にグルタミン酸ナトリウムの製造時に発生するグルタミン酸以外の大量の副生物の有効活用を図る必要があることであった。こうした問題点の解決を目的として新製法研究が1950年頃から開始された。新製法としては合成法と発酵法が検討され、合成法については1960年にアクリルニトリルを原料とする製法が工業化されたが原料高や市場動向により優位性を失い1973年に中止となった<sup>2)</sup>。一方、発酵法は後述するように大発展を遂げることとなった。

## II. 二段発酵法の研究とグルタミン酸生産菌の発見

グルタミン酸の生合成経路を図1に示す。糖を原

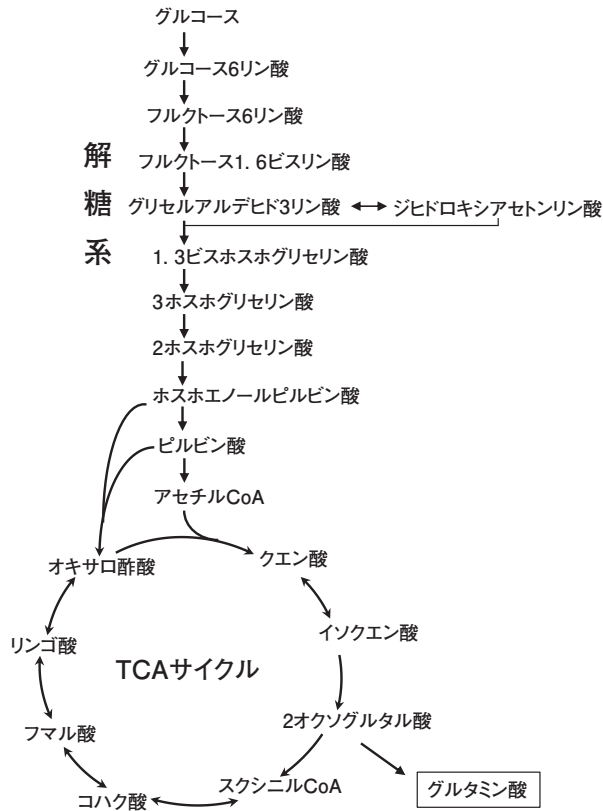


図1 グルタミン酸の生合成経路

料とした場合、解糖系、TCA回路を経て2-オクソグルタル酸が生成され、これがアミノ化されてグルタミン酸が生成される。

発酵法では、まずグルタミン酸生合成の前駆体である2-オクソグルタル酸を発酵生産し、グルタミン酸脱水素酵素を用いてアミノ化してグルタミン酸をつくるという二段発酵法が検討された。当初、グルタミン酸を直接一段発酵でつくる製法が検討されなかった背景には、微生物が生育に重要なグルタミン酸を細胞外に分泌するはずはない、との当時の発酵学の常識があったと考えられる。

1956年頃、二段発酵法は工業化可能なレベルまで到達していたが、糖原料からの効率的な直接発酵法によるグルタミン酸ナトリウム製法が発表され状況が一変した。直接発酵法は二段発酵法に比べ生産効率やコスト面で断然優位性が高い。

実は直接発酵法については、1954年に関連特許が出願されており<sup>3,4)</sup>、すでにその可能性は示唆されていたが、実用化可能なレベルのグルタミン酸生産菌が協和発酵(株)(現 協和発酵キリン(株))により新聞発表されたのは1956年であった。1957年に

は同社および東京大学から論文が公表された<sup>5,6)</sup>。

革新的な直接発酵によるグルタミン酸生産菌が発見された背景には、バイオアッセイによるアミノ酸定量法を巧みに取り込んだスクリーニング法があった。グルタミン酸を生育に必要とする乳酸菌を指標菌として、土壌などから分離した微生物のコロニーが生成するグルタミン酸を検出するという当時としては最新の技術がスクリーニングに用いられた。さらに、グルタミン酸生産評価に用いられた培地が、ビオチンなどのビタミンが含まれていない合成培地であったことが、思ってもみなかった結果をもたらした。後でわかったことだが、グルタミン酸生産菌はビオチンを微量含む培地でのみグルタミン酸を分泌生産するという特徴をもっていたのである。たまたま使用した培地がグルタミン生産に適した培地であったという幸運に恵まれた発見であった。

最初に発見された微生物は *Micrococcus glutamicus*<sup>5)</sup> あるいは *Micrococcus varians*<sup>6)</sup> と呼ばれ、ほどなくして *Brevibacterium flavum* や *Brevibacterium lactofermentum* などの優良菌株が相次いで発見されたが<sup>3)</sup>、いずれもグラム陽性菌で、類似した菌学的特徴をもち、その後の詳細な分類学的研究によって、コリネ型菌と呼ばれる一群の微生物であることがわかり、最終的に *Corynebacterium glutamicum* と呼ばれる一菌種に統合された<sup>7)</sup>。

### Ⅲ. グルタミン酸発酵の成立要因

グルタミン酸生産菌は炭素源と窒素源を細胞内に取り込んで、グルタミン酸に変換して細胞外に蓄積する。その機序については、生産菌発見の当初より大きな関心を持たれていた。グルタミン酸生産菌は生育にビタミンの一種ビオチンを要求する。そこで、ビオチン制限環境で生育すると脂肪酸合成が抑制され、その結果細胞膜が不完全となるため、細胞外にグルタミン酸が漏出してくると考えられてきた<sup>8)</sup>。

グルタミン酸発酵では製造コストに原料糖の占める割合が大きい。したがって、より安価なサトウキビや甜菜の廃糖蜜の利用が検討された。しかし、廃糖蜜には高濃度のビオチンが含まれ、そのまま使用したのでは、グルタミン酸は蓄積されない。そこでさまざまな検討が行われた結果、増殖初期に細胞壁合成阻害剤のペニシリンを添加すると高濃度ビオチ

ン存在下でも高効率にグルタミン酸が生産可能なことが示された<sup>9)</sup>。また培地に Tween40 などの界面活性剤を加えるとビオチン制限下同様にグルタミン酸発酵が成立することが明らかにされた。こうした界面活性剤などはビオチン欠乏と同様に細胞膜を不完全化して、グルタミン酸の漏出を誘起すると考えられた<sup>10,11)</sup>。こうして、安価な糖原料から商業的に有利にグルタミン酸が製造可能となった。

その後、グルタミン酸排出に関するトランスポーターの存在を示す報告が出され<sup>12)</sup>、さらに近年になって、味の素(株)と東工大の共同研究によって、界面活性剤無添加でもビオチン含有培地でグルタミン酸を生産することのできる変異株について詳細な解析がなされた結果、メカノセンシティブチャンネルに関する遺伝子に変異が起こっていることが明らかにされた<sup>13)</sup>。メカノセンシティブチャンネルとは、細胞が細胞内の浸透圧の変化に应答して、グルタミン酸などの浸透圧調節作用をもつ溶質を細胞外に排出するための通路である。細胞膜に存在するトランスポーターで、細胞内の浸透圧が上昇して細胞膜の張力が変化すると開くと考えられている。つまり、グルタミン酸が高濃度に貯まり細胞内の浸透圧が高くなると、細胞膜の張力が高まりチャンネルが開いて、グルタミン酸が細胞外に排出される。一方、グルタミン酸濃度が低く浸透圧が低い時には膜の張力が低いためチャンネルは閉まったままで、グルタミン酸は排出されない。これに対して、変異株ではこのチャンネルが変異して常時開きっぱなしのため、グルタミン酸濃度が低くても、細胞外に排出してしまう(図2)。かつて細胞からの漏出と考えられていたグルタミン酸の細胞外への蓄積は、単なる漏出によるのではなく、細胞膜が異常となって張力が低下した結果、メカノセンシティブチャンネルが開いて、グルタミン酸が排出されたためと解釈される。グルタミン酸生産菌の発見以来50年、ようやくグルタミン酸生産機構の詳細が分かりつつある<sup>14)</sup>。

#### IV. グルタミン酸ナトリウムの工業的製法

グルタミン酸発酵の炭素源としては、サトウキビや甜菜から砂糖を製造する際の副産物の廃糖蜜や、キャッサバやトウモロコシのデンプンを酵素で加水分解して得られる糖液が用いられる。一方、窒素源

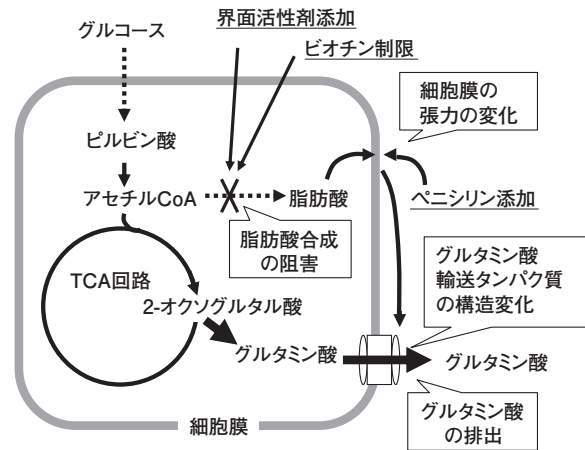


図2 *Corynebacterium glutamicum*のグルタミン酸生産誘導のモデル<sup>14)</sup>より引用

としてはアンモニアなどの無機態窒素を用いることができる。この他にリン酸塩、マグネシウム塩、生育促進のためのビタミン(ビオチンは制限量)や金属などの微量栄養素を必要とする。

グルタミン酸発酵は、アルコール発酵などとは異なり、酸素を必要とする好気発酵である。したがって、大規模生産には、通気攪拌効率の高い攪拌羽根を備えた大型発酵槽が必要となる。実際には数百kL以上のスケールの発酵槽が用いられることが多い。

さらに、発酵液からグルタミン酸ナトリウムをとりだすダウンストリーム工程も大変重要である。発酵液に含まれるグルタミン酸は酸性条件下で等電点晶析により粗結晶として回収された後、精製、中和、脱色などを経て高純度のグルタミン酸ナトリウムの結晶として製品化される。

このダウンストリーム工程では大量の副生物が発生する。副生物はサトウキビなどの原料の未利用成分やアンモニウム塩などで、肥料として利用可能なものである。グルタミン酸ナトリウム製造工場の多くは、サトウキビやトウモロコシなどの原料産地に立地しており、工場近傍の耕作地に副生物を肥料として還元している。こうした原料生産と連動した生産システムは、地球環境に優しい資源循環型システムである。

グルタミン酸ナトリウム生産量は全世界で年間180万トン(2008年)に達し<sup>14)</sup>、発酵規模はおそらくエタノールに次いで大きく、コモディティケミカルと言っても良い生産量に達している。



## V. グルタミン酸発酵からアミノ酸の代謝制御発酵への展開

グルタミン酸発酵に次いで、その他のアミノ酸についても発酵で工業生産を目指そうとする動きが活発化した。この機運に呼応して、文部省の「アミノ酸発酵に関する基礎的研究」という研究班が1957年度に組織された。また、研究発表の場として「アミノ酸集談会」が1959年発足し、産学交流が活発に展開された。その結果、基礎から応用、実用化段階につながるシームレスな研究者、技術者のネットワークが形成されることになった。当時としては画期的な産学官連携の取り組みであった<sup>15)</sup>。

微生物にとってアミノ酸はタンパク質などの生体成分の構成要素としてきわめて重要で、かつその生成にはエネルギーが必要なため、アミノ酸を過剰生産しないように巧みな制御機構が備わっている。したがって、微生物の細胞外に大量にアミノ酸を分泌生産させるには、人工的に制御が効かない状況をつくる必要がある。こうして有用物質生産を可能にする発酵技術を代謝制御発酵と呼ぶ。

代謝制御発酵技術の背景には、1955年頃からのアミノ酸の生合成経路に関する研究と、1960年以降のJacob, J. & Monod, J. のオペロン説などの酵素合成の制御や酵素のフィードバック阻害に関する

知見の集積があった。当時、微生物におけるアミノ酸生合成系が主に最終代謝産物であるアミノ酸による酵素合成のフィードバック抑制と、酵素活性のフィードバック阻害という2つの機構によって制御されているということが明らかにされつつあった(図3)。微生物にアミノ酸を過剰生産させるには、こうした制御機構を破壊する必要があった。

最初に検討されたのは栄養要求性変異株の誘導であった。例としてホモセリン要求変異株によるリジン発酵について説明する。*C. glutamicum* の野生株のリジン生合成系は図4に示すように、鍵となる酵素アスパルトキナーゼ (AK) がアスパラギン酸系列の2つのアミノ酸リジン、スレオニンの共存下で協

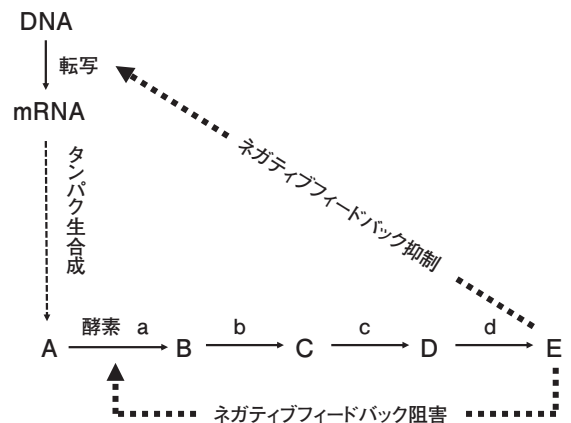
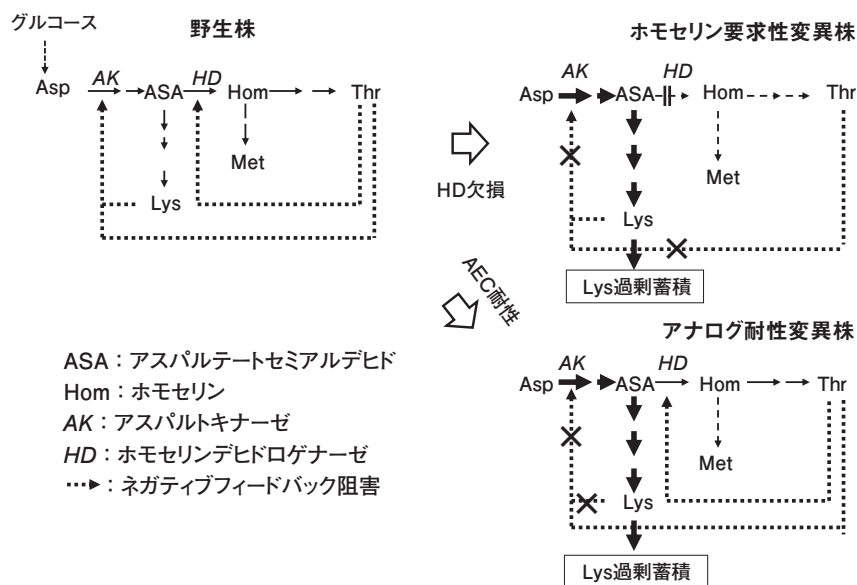


図3 微生物の代謝制御機構



ASA: アスパルテートセミアルデヒド  
 Hom: ホモセリン  
 AK: アスパルトキナーゼ  
 HD: ホモセリンデヒドロゲナーゼ  
 ...▶: ネガティブフィードバック阻害

図4 アスパラギン酸系アミノ酸の代謝制御機構と栄養要求変異株・アナログ耐性変異株によるリジン生産

奏的にフィードバック阻害を受ける。そこで、スレオニンとメチオニンの前駆体であるホモセリンの合成に必要なホモセリンデヒドロゲナーゼ (HD) を破壊すると、スレオニンがつかれなくなり、AK に対する協奏的阻害が解除され、リジンの生合成経路が強化されてリジンの過剰生産が起こる。こうした栄養要求変異株の利用でリジン以外にもオルニチン、プロリン、トリプトファンなどのアミノ酸が生産可能となった。

次に開発されたのはアナログ耐性変異株を用いる方法である。アナログとは天然のアミノ酸などの構造類似体で、例えば、アミノ酸のスレオニンやリジンに対応したアナログとして  $\alpha$ -アミノ-ヒドロキシバレリアン酸 (AHV) や S-(2-アミノエチルシステイン) (AEC) が知られている。AHV はスレオニンよりも炭素鎖が一つ長い非天然型アミノ酸でスレオニンのアナログである。また、AEC はリジンの  $\gamma$  位のメチレンが硫黄に置換されたものでリジンのアナログである。これらのアナログはタンパク質合成を阻害したり、鍵酵素をフィードバック阻害したりして、微生物の生育を阻害する。そこで、アナログを含む培地で生育可能な耐性変異株を誘導すると、その中には、アナログの作用を抑えるのに十分な量のアミノ酸を生成する能力をもつものがあることになる。こうしたアナログ耐性変異株によるアミノ酸生産は大腸菌で最初に報告されたが、その蓄積レベルは微量であった。この考え方が、味の素(株)の研究者らによってグルタミン酸生産菌(当時の *B. flavum* など)に応用され、アナログ耐性のアミノ酸生産菌が次々と育種され工業利用された。アナログ耐性変異株についてリジン発酵を例に説明する(図4)。野生株の場合、AEC 存在下では AEC がリジンと同様に AK に結合して活性を阻害するため、リジンを生合成できず、生育できない。一方、AEC 耐性変異株の中には、AK のアミノ酸配列が変異して、タンパク構造が変化し、AEC が結合しなくなったものがある。こうした変異株は AK にリジンが結合しないので協奏的フィードバック阻害が働かず、リジンを過剰生産する。アナログ耐性変異株はその後、さまざまなアミノ酸や核酸の生産菌の育種技術に応用され、工業生産に適した菌株を生み出してきた。詳細は成書をご参照いただきたい<sup>16)</sup>。

以上の育種技術に加えて、その後、組換え DNA

を応用した分子育種と呼ばれる方法が登場して、一段と精緻な育種が可能となった。分子育種とは特定の遺伝子を単離し、配列を解析、改変、増幅するなどして生物の機能を高める方法だが、遺伝子増幅やプロモータ改変による鍵酵素の高活性化、部位特異的変異を用いた鍵酵素のフィードバック阻害の解除、遺伝子破壊によるアミノ酸の分解系や副反応系の破壊など、さまざまな取り組みが行われている<sup>17)</sup>。組換え DNA 技術としては異種組換えと同種組換え(セルフクロニング)の二つがある。異種組換えは異種の DNA のハイブリッドを宿主に導入する方法で、天然には存在し得ない遺伝子をもった組換え体生物を作り出すことになるので、安全性や生態系への影響を考慮して、取扱いの際には環境中に排出されないよう封じ込めが必要とされている。一方セルフクロニングは、同種の DNA を組換えて宿主に導入する方法なので、得られる形質転換体は自然界にも存在し得るもので、特段の封じ込めは不要である。アミノ酸のような量産製品の製造に、封じ込めに対応可能な高価な装置を用いることは実用上困難である。したがって、アミノ酸生産菌の分子育種にはセルフクロニングが用いられている。

## おわりに

グルタミン酸発酵の工業化がどのような波及効果をもたらしたかについて考察してみた。グルタミン酸をはじめとして各種アミノ酸発酵が開発された結果、飼料、医薬、化粧品、など食品分野以外の多様な分野でのアミノ酸利用が広がったことも大きな波及効果だが、高品質で安価なグルタミン酸ナトリウムが安定的に利用できるようになったことは食品産業に大きな変革をもたらした。

現在グルタミン酸ナトリウムは、うま味調味料単体あるいはイノシン酸やグアニル酸を複合した複合調味料として利用されるだけでなく、各種の風味調味料(グルタミン酸ナトリウムにかつお節、昆布、シイタケなど天然だし原料の粉末やエキスなどを混合したもの)の素材としてもさまざまな形態で利用されている。これに加えて、インスタントラーメン、粉末スープ、カレー・ルウ、冷凍食品、惣菜類、漬物など、ありとあらゆる加工食品の製造にも用いられている。これらの中には安価、高品質なグルタミ

ン酸ナトリウムが利用可能になって初めて製品化できたものが多い。例えば、インスタントラーメンやカップラーメンが工業製品として大量消費可能になった背景には、麺の加工技術の開発は勿論のことだが、スープ製造に安価なグルタミン酸ナトリウムが利用可能であったことが大きく寄与している。

こうしてみると、約 100 年前のグルタミン酸ナトリウムのうま味調味料としての発明や約 50 年前のグルタミン酸生産菌の発明が、私たちの生活にもたらした波及効果はきわめて大きく、まさに日本が生み出したイノベーションの典型とって良いであろう。

## 文 献

- 1) おいしさの科学シリーズ、Vol.4(株)エヌ・ティー・エス発行、2012；pp.72-73.
- 2) 味の素(株)発行、挑戦者の系譜—味の素グループの百年；2009.
- 3) アミノ酸・核酸集談会編、アミノ酸発酵(上)、1972；pp1-8.
- 4) 中森茂、国立科学博物館技術の系統化調査報告、2008；11, 55-90.
- 5) Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1957；3, 193.
- 6) Asai, T., Aida, K., Oishi, K., *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, 1957；21, 134.
- 7) Liebl, W., et al., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1991；41, 255.
- 8) 田中勝宣、ほか、*日本農芸化学会誌*, 1960；34, 593.
- 9) Somerson, N. L., Phillips, T, 1962, 特公昭 37-1965
- 10) 山田浩一、ほか、*醗酵協会誌*, 1962；20, 348.
- 11) Takinami, K., et al., *Agric. Biol. Chem.*, 1963；27, 858.
- 12) Hoischen, C. and Kramer, R., *J. Bacteriol.*, 1990；172, 3409.
- 13) Nakamura, J., Hirano, S., Ito, H., and Wachi, M., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007；73, 2291.
- 14) 中村 純、*化学と生物*, 2008；46, 78.
- 15) 発酵からニューバイオテクノロジーへ—アミノ酸・核酸集談会30周年記念講演集—、*バイオインダストリー協会編*；1988.
- 16) 相田 浩、他、*アミノ酸発酵*、学会出版センター；1986.
- 17) Sano, K., *Rcombinant microbes for industrial and agricultural applications*, Ed. Murooka, Y., Imanaka, T., Marcel Dekker, Inc., 1994；pp.485.