

## 第1章 発酵工業に利用される主要微生物

### 1.3.3 アミノ酸機能工学と風味・機能性の設計

筆者らの研究のもう一つの特徴は、酵母のアミノ酸代謝に着目し、その代謝制御機構を操作することで、発酵・醸造食品の味・風味、健康イメージなどを設計する「アミノ酸機能工学」である<sup>19)</sup>。これまで、各アミノ酸の毒性アナログに対する耐性を指標とした変異株の取得、次世代シーケンサーによる変異遺伝子の同定、酵素機能の解析などを組み合わせることで、プロリン、オルニチン、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、リジン、スレオニン、メチオニンなどを高生産する酵母を育種し、様々な産業応用を試みることで、多くの社会実装に成功してきた(表1)<sup>20)</sup>。

例えば、オルニチン高生産清酒酵母では、*N*-アセチルグルタミン酸キナーゼ Arg6 のアミノ酸置換 (Thr340Ile) によりアルギニンによるフィードバック阻害が解除され、清酒や酒粕にオルニチンが多く含まれるようになった<sup>21)</sup>。ロイシン高生産泡盛酵母では  $\alpha$ -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ Leu4 のアミノ酸置換 (Ser542Phe, Ala551Val, Gly516Ser など) により酢酸イソアミルが増加し、華やかな香りを有する泡盛の開発につながった<sup>22,23)</sup>。イソロイシン、バリン、

表1 アミノ酸機能工学による酵母育種と産業応用

アミノ酸	アミノ酸アナログ	変異の標的酵素・タンパク質 (アミノ酸置換)	主な生理機能・代謝産物	産業応用例
プロリン	アゼチジン-2-カルボン酸	$\gamma$ -グルタミルキナーゼ Pro1 (Q79H, I150T, D154N, P247S, E415K)	ストレス耐性 (浸透圧調節, ROS 除去, 細胞寿命制御, 脱水・氷結晶阻害, ケミカルシヤベロン)	パン: 冷凍・高糖生地での発酵力向上 清酒・ビール: 醸造期間短縮, エタノール増加, 酒質改善
オルニチン	アゼチジン-2-カルボン酸 カナバニン	<i>N</i> -アセチルグルタミン酸キナーゼ Arg6 (T340I, G351D)	肝臓の解毒作用の促進 アルコール性疲労の軽減	清酒・酒粕: 健康イメージ付与
ロイシン	5,5,5-トリフルオロロイシン	$\alpha$ -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ Leu4 (G516S, S542F, A551V, D578N)	分岐鎖アミノ酸 (筋肉強化, 疲労回復など) 酢酸イソアミル (バナナ香, 吟醸香) 生成	泡盛・清酒: 華やかな香り付与
イソロイシン	<i>o</i> -メチルスレオニン	スレオニンデアミナーゼ Ilv1 (H480Y)	分岐鎖アミノ酸 (筋肉強化, 疲労回復など) 酢酸 2-メチルブチル (リンゴ香) 生成	清酒: 香味性強化
バリン	ノルバリン	アセトヒドロキシン酸シンターゼ Ilv2/Ilv6 (Ilv6: A31T)	分岐鎖アミノ酸 (筋肉強化, 疲労回復など) イソブタノール・酢酸イソブチル (ナシ香)	清酒: 特徴的な香味付与 次世代バイオ燃料生産
フェニルアラニン	<i>p</i> -フルオロフェニルアラニン	転写制御因子 Aro80 (H309Q)	必須アミノ酸 酢酸 2-フェニルエチル (バラ香) 生成	清酒・ビール: バラの香り付与
リジン	S-アミノエチルシステイン	ホモクエン酸シンターゼ Lys20 (S385F)	必須アミノ酸 ストレス耐性, 疲労の回復, 肝機能の向上	泡盛: 蒸留粕の家畜飼料への転用 酵母エキス・サプリメント: 栄養強化
スレオニン	ヒドロキシノルバリン	アスパラギン酸キナーゼ Hom3 (A462T)	必須アミノ酸 脂質代謝の促進, 肝機能の維持	酵母エキス・サプリメント: 栄養強化
メチオニン	エチオニン	メチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼ Met13 (S443F)	必須アミノ酸 メチル基供与体, S-アデノシルメチオニン生成	酵母エキス・サプリメント: 栄養強化

アミノ酸アナログ耐性を指標とした育種により、アミノ酸代謝を改変した酵母を取得できる。これにより香気成分や機能性物質の生成が変化し、発酵・醸造食品の発酵力向上、香味付与、健康イメージ付与、栄養強化などの高付加価値化が可能となる。

### 第3章 発酵プロセス

生じた際、数分から数秒単位で状況が変化することがある。このような場合、瞬時に事態を把握し、対応策を講じることが求められる。

#### 1.5 スケールアップ

図2にスケールが異なる代表的な通気攪拌槽の構造の模式図を示した。培養のスケールを変化させると、物質や熱の移動距離や水圧等が変化するため、すべての物理化学パラメーターを同一条件に設定することができない<sup>16)</sup>。そのため、培養する微生物の特性に応じて、影響度が最も高い物理化学パラメーターを基準にスケールアップ条件を検討する。好気性微生物のスケールアップは酸素移動容量計数  $k_La$ 、嫌気性微生物の場合は攪拌所用動力を基準にスケールアップするのが基本とされる。生物化学工学分野の検討により、相似形でのスケールアップ条件の計算方法は成書に記載の通りである<sup>16)</sup>。しかしながら、実際の培養槽は相似形でないことがほとんどである。実験的に求めた  $k_La$  や過去の培養結果を参考におおよその対応を経験的に決定する場合もある。また、大型化すると物質移動や熱移動の距離が大きくなるので、完全混合が達成できない場合がある。比表面積が小さくなるため、冷却能力も小さくなる。そのため、加熱滅菌での熱プロファイルが変化し、小スケールと同じように培地調合しても組成が変化してしまうことがある。また、培地調合槽や予備槽の設置状況によっては、実験室で設定した調整方法に準じた培地調合も困難な場合がある。これらの理由から、実機での生産においては、小スケール実験と比べて、体積あたりの生産性が悪化することが多い。プロセス開発の早い段階から実製造設備の制約を考慮した検討を行い、目標より余裕を持った生産効率が達成できなければ、実機レベルで十分な生産効率が達成できないことにも留意する必要がある。

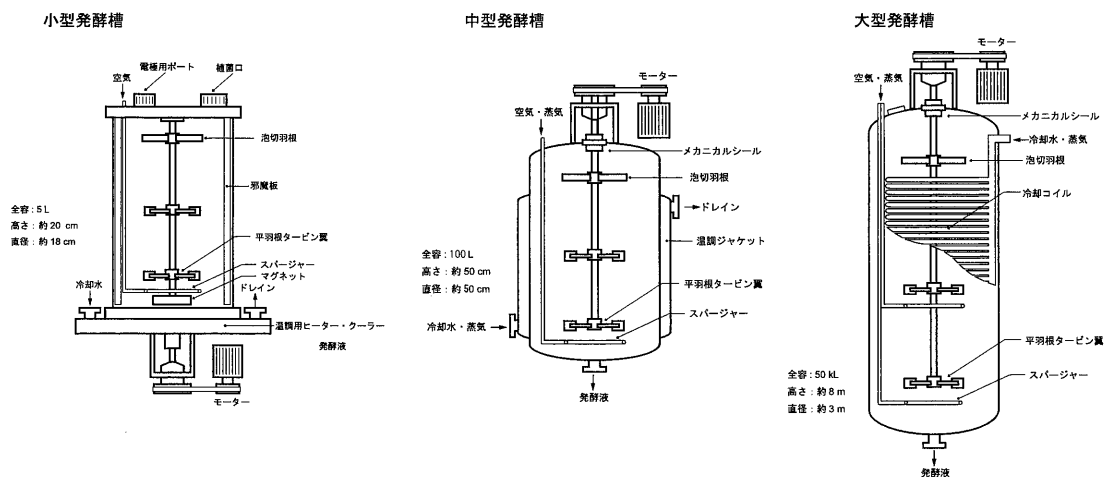


図2 代表的な通気攪拌槽の構造とサイズ

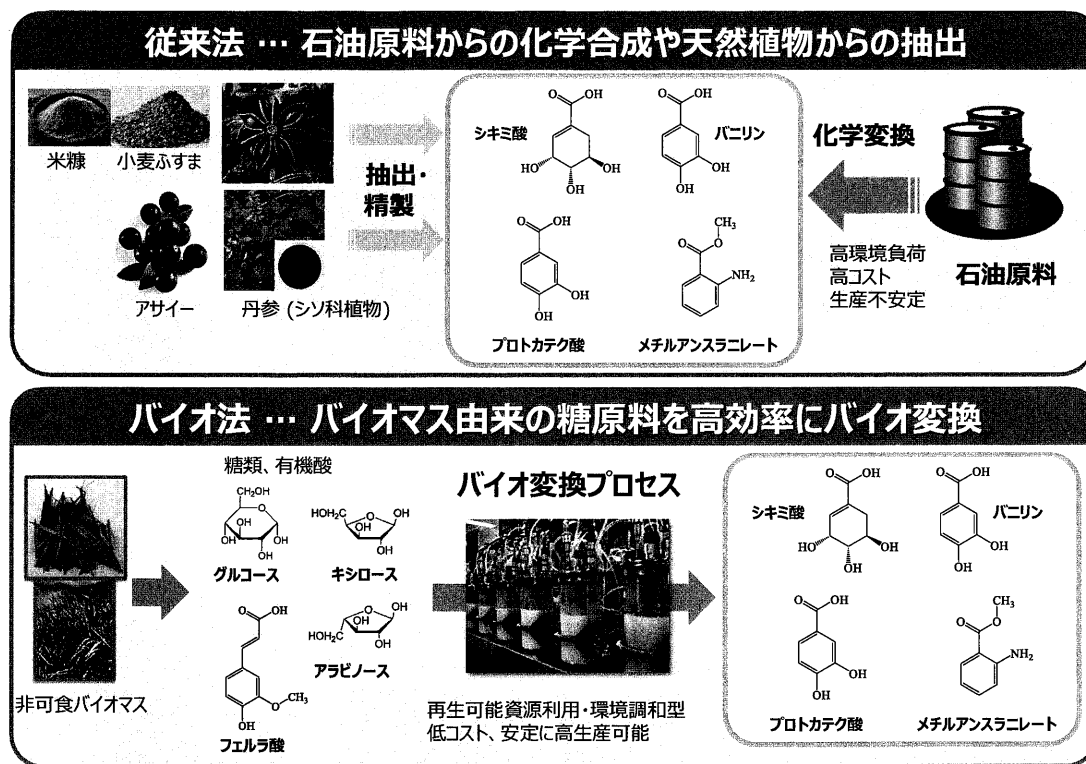


図1 医薬・化粧品、香料の原料となる芳香族化合物の生産方法

## 1.2 シキミ酸およびプロトカテク酸高生産菌の分子育種<sup>3)</sup>

### 1.2.1 シキミ酸経路を介した芳香族化合物生産

植物や微生物が生成する多種多様な芳香族系化合物の多くはシキミ酸経路を共通の起点として生合成される。この経路は、解糖系のホスホエノールピルビン酸 (PEP) とペントースリン酸経路のエリトース-4-リン酸 (E4P) を前駆体とし、芳香族アミノ酸やビタミン K (メナキノン)、葉酸、シデロフォアといった細胞の生存に不可欠な化合物を供給する。この経路の中間代謝産物であるシキミ酸は、環状ヒドロキシ酸の一種であり、抗インフルエンザ薬「タミフル」の合成原料として欠かせない存在であり、さらに美白・育毛効果や抗炎症作用といった多様な薬理活性を有することから、医薬・化粧品分野での需要が高い (図2)<sup>6)</sup>。また、シキミ酸経路から派生して生成するプロトカテク酸 (3,4-ジヒドロキシ安息香酸; PCA) も、抗菌、抗ウイルス、抗癌作用など広範な生理活性を示し、バイオポリマー原料や香料合成のハブ化合物としても有望視されている (図2)<sup>7,8)</sup>。

### 1.2.2 シキミ酸高生産菌の分子育種

野生型株のコリネ型細菌において、シキミ酸はシキミ酸経路の代謝中間体として速やかに変換されるため、細胞内に蓄積することはない。シキミ酸の高蓄積を実現するためには、まずシキミ

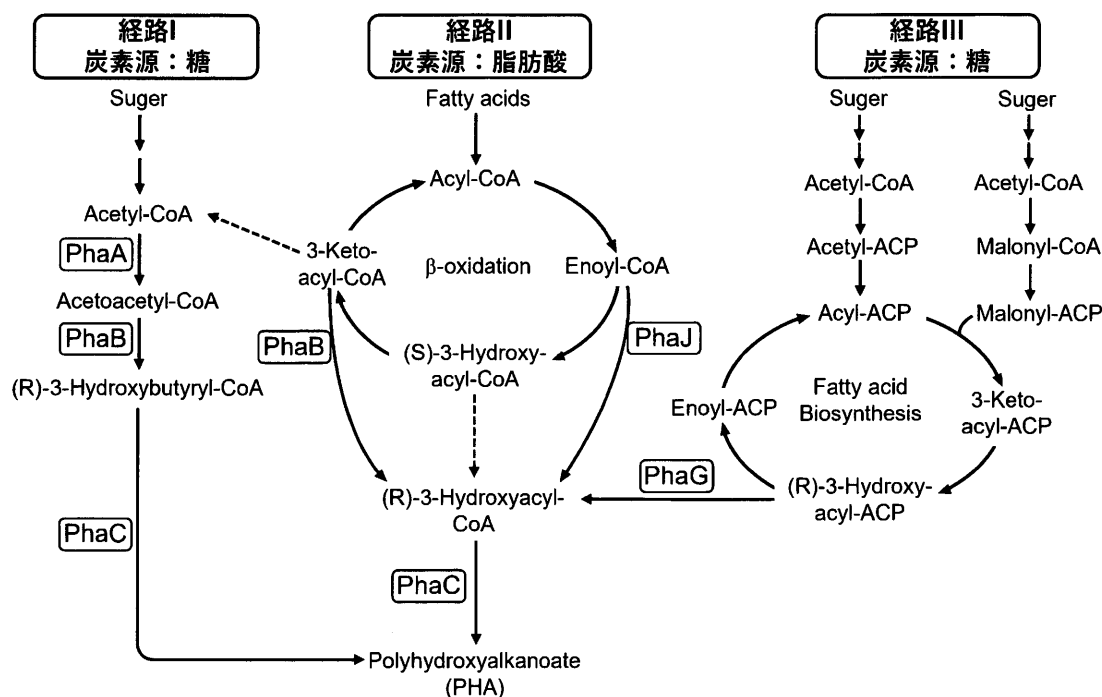


図3 PHA合成経路

経路I：アセトアセチル合成経路，経路II：脂肪酸の $\beta$ 酸化経路，経路III：脂肪酸生合成経路

化炭素を炭素源とし固定化できる。水素酸化細菌 *Cupriavidus necator* H16 は、二酸化炭素を含むガス培養条件下において、窒素またはリン源枯渇に伴い細胞増殖期と PHB 生産期が明確に切り替わる<sup>21)</sup>。そのため、細胞の増殖と PHA 生産効率の両面から PHA 高生産に向けた研究が進められている。

### 1.1.3 ポリブチレンサクシネート (PBS)

PBS は、コハク酸と 1,4-ブタンジオール (BDO) の重縮合反応によって生成される脂肪族ポリエステルである (図4)。原料になるコハク酸の製造は、主に石油由来の化学合成法と微生物発酵法がある。石油由来の化学合成法は、ベンゼンまたは n-ブタンの酸化から無水マレイン酸を生成し、触媒存在下での水素化によりコハク酸が生産される。一方、微生物発酵法は、グルコース、デンプン、キシロースなどを用いた微生物発酵によってコハク酸を生産する。コハク酸生産微生物として *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniciproducens* などがあり、*E. coli* などの菌株の遺伝子改変により高効率コハク酸生産株が報告されている<sup>22)</sup>。また、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 による光合成と二酸化炭素からのコハク酸の生産も報告されている<sup>23)</sup>。

もう1つの原料である BDO は、大部分が化石資源から生産される。BDO の生産方法として、(i) ホルムアルデヒドとアセチレンを原料とする Reppe プロセス、(ii) n-ブタンを原料とす