L-システインの新製造法の開発と工業化[†]

(昭和60年度農芸化学技術賞受賞)

佐野孝之輔, 山本 泰*, 楠本勇夫*, 横関健三

(味の素株式会社中央研究所, *同九州工場)

L-システイン (L-CySH) はアミノ酸輸液, 気管支炎治療剤, 解毒剤等の医薬品用, コールドパーマ, 養毛剤等の化粧品用, ドライミルク, パンの発酵助剤等の食品用, ペットフード用等々, 多種の用途に広く利用されている重要なアミノ酸で, その需要量は年々増加しており, 1983年には全世界で1,000トン以上にも達し今後ともさらに拡大が見込まれている。

近年アミノ酸の製造技術の発展はまことにめざましいものがあり, グルタミン酸やスレオニンをはじめとする多くのものが発酵法によって, グリシン, メチオニン等が化学合成法によって多量に工業生産されている。

しかしながら L-CySH においては近代的な発酵法もしくは, 化学合成法のいずれも工業化可能な技術は開発されておらず, 依然として人毛, 羽毛, 獣毛を原料とし, 酸加水分解後, 抽出分離を行う従来からの方法があるのみであった。人毛等の供給の大部分は輸入に依存しているが, 近年その供給が不安定であり, また動物性原料の分解抽出に特有の副生物の処理が大きな問題となりつつあることと相まって, 増大する需要に対し L-CySH が十分に供給されるかという点に大きな不安があった。

このような背景の下に, われわれは L-CySH を安定かつ安価に供給するための, 近代的な工業的新製法の開発を目標とし, 本研究に着手した。

I. 本研究の位置付けと酵素基質の選択

われわれは, L-CySH の新製法として化学合成法で得られる CySH 合成中間体を酵素により L-CySH に不斉

変換するシステムを実現させようと考えた。その理由は基質が大量安価に合成できるという化学合成法の利点と, 光学特異的な触媒作用でこれらの基質を光学活性アミノ酸のみに変換しようという酵素反応法の利点との相乗効果を期待したからである。

CySH 化学合成の中間体としては, チアゾリン誘導体, アズラクトン誘導体, ヒダントイン誘導体等(図1)種々の化合物が知られているが, 本法では酵素による完全不斉水解システムを目標に定めたので, 酵素反応条件下では自発的に加水分解しないこと, すなわち基質の化学的安定性を第1のポイントにおき, さらに合成工程の短さ, 保護基導入の簡便さ, 大量合成の容易さ等の総合的な観点からの検討を加え, 最優良中間体(酵素の基質)として DL-2-アミノチアゾリン-4-カルボン酸 (DL-ATC) を選択した。

本研究の位置付けを光学分割工程, D 体化合物のラセミ化工程が複雑な従来の化学合成法と比較して図2に示した。

II. DL-ATC 新規合成法の開発

DL-ATC は従来より DL-CySH 化学合成中間体として知られていた⁽¹⁾が, 反応時に有機溶媒を用いること, 反応の各段階で生成物の単離が必要なこと, 収率が悪いこと等の欠点を有しており, 工業的製法としては満足のいくものではなかった。

われわれは, ① α, β -ジクロロプロピオン酸メチルエステル (CPM) を出発原料とし, 水溶液中, アルカリ条件下で α -クロロアクリル酸メチルエステル (CAM) に変換し(第1工程), ② これを鉍酸存在下にチオ尿素と反応させて S-(β -カルボキシル- β -クロロエチル)イソチオ尿素 (CIU) と CIU のメチルエステル (CMIU) の混合物に変換後, さらに鉍酸処理をして CIU のみに完全に交換せしめ(第2工程) ③ これを水溶液中 pH 7.5 以下

[†] A Novel Chemico-Enzymatic Process for the Commercial Production of L-Cysteine. Konosuke SANO, Tai YAMAMOTO*, Isao KUSUMOTO* and Kenzo YOKOZEKI (Central Research Laboratory and *Kyushu Factory, Ajinomoto Co., Inc., Kawasaki 210, *Saga 840-21)

にコントロールしながらアルカリと反応させ、副反応を抑えて DL-ATC を高収率で得る (第 3 工程) 新規な反応方法を見出し、安価にして実用的な DL-ATC 製造方法を確立した (図 3)。新しく見出されたこの方法は、全工程を水溶液中で反応できる点、またそれぞれの中間体を単離することなく反応液そのままを次工程の出発物質として使用できる点、収率が高い点、さらには S 化合物特有の異臭の発生のない点等、総合的観点から実的にきわめて有利で、この方法の開発が工業化を可能ならしめた大きな要因の一つとなっている。

III. DL-ATC 不斉水解菌株の探索⁽²⁾

DL-ATC を L-CySH に不斉水解する酵素の供給源と

して微生物界を選んだ。微生物の持つ多様な触媒能のなかにこの新規な反応を触媒する可能性を求めたわけである。技術的には、DL-ATC を唯一の窒素源とする分離用培地を用いて目的の酵素を持つ微生物を選択するという着想にたち、研究所保存菌株ならびに自然界サンプルよりの微生物を数多く探索した。研究開始当初においては、DL-ATC を消費し生育する菌株は数多く見出されたものの L-CySH を生成する株は見出されなかった。その原因が、微生物の有する CySH desulfhyrase による生成 L-CySH の分解によるもの (図 4) であることをつきとめ、スクリーニング用の反応液にこの酵素の阻害であるヒドロキシルアミンを添加する工夫を加えることによって、以後の菌株探索は順調に推移した。

図 1 CySH 化学合成法の代表的中間体

図 2 化学合成法における本研究の位置づけ

図 3 DL-ATC の新規合成フロー

1. 保存菌株からの探索

筆者らの研究所保存の菌株 37 属 463 株について DL-ATC から L-CySH 生産菌株を検索した結果、13 属 22 株にその活性を見出した(表1)。表1に示したように、目的とする酵素活性を有していた菌株は *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, *Sarcina* および *Serratia* 属に属する菌株であり、グラム陰性、陽性を問わず、広い属にわたって分布していることが判明した。このなかで最も活性の強かった菌株は *Sarcina lutea* AJ-1217 であったが、低蓄積 (10 mg/ml の DL-ATC より 0.63 mg/ml の L-CySH) であったので高力価菌の分離源を広く自然界に求めることにした。

2. 自然界からの探索

自然界より広くサンプルを集め DL-ATC を唯一の N 源として生育する株を約 2000 種類分離した。これらのなかから強力な L-CySH 生成活性を有する菌株を 13 株選出して同定した結果、すべて *Pseudomonas* 属に属することが判明した。これらの株を同定した結果、1 新菌種と 3 既存菌種 (*Ps. ovalis*, *Ps. demolytica*, *Ps. cohaerens*) に帰属することが判明した。最初に分離され、かつ新菌種に属するものと判明した AJ-3854 は、チアゾリン骨格を好んで加水分解する性質に思いをこめて *Ps. thiazolinophilum* と命名した(表2)。

Ps. thiazolinophilum AJ-3854 を代表株に用いて酵素

図 4 CySH Desulfhyrase による L-CySH の分解

図 5 酵素反応経過
Pseudomonas thiazolinophilum AJ-3854 による DL-ATC から L-システイン (CySH) と L-シスチン (Cys) の生産。

反応経過を追跡した結果、DL-ATC が加水分解されるとまず本来の生成物である L-CySH が生成し、その後反応液中で空気酸化され L-シスチン (L-Cys) に変換されることが判明した。光学活性を問わず CySH, Cys を定量できる液体クロマトグラフィーによる CySH と Cys の値の和が、CySH と Cys の L 体のみを測定できる bioassay の値と良く一致することより、生成 CySH は L 体のみであること、かつ DL-ATC からの転換モル収率は 100% に達することが明らかとなった(図5)。このことは L 体の ATC のみならず D 体の ATC も L 体の CySH に変換されていることを意味しており、本菌が L-CySH への不斉変換を触媒する酵素系と基質もしくは酵素反応中間体のラセミ化を行う酵素とを兼ねそなえている当初目標にした菌株であることを示唆している。単一菌株で DL-ATC の完全不斉水解が起こるということは学問的にもきわめて興味のある事実であると同時に、実用上においてもきわめて重要な知見で、本法の工業化

表 1 保存菌株よりの L-CySH 生成菌株

属	被験菌株数 No.	L-CySH+ L-Cys生成株
<i>Acetobacter</i>	8	0
<i>Achromobacter</i>	6	1
<i>Aerobacter</i>	1	0
<i>Aeromonas</i>	7	0
<i>Agrobacterium</i>	6	0
<i>Alcaligenes</i>	6	1
<i>Arthrobacter</i>	9	0
<i>Bacillus</i>	19	1
<i>Brevibacterium</i>	22	1
<i>Cellulomonas</i>	1	0
<i>Citrobacter</i>	3	0
<i>Corynebacterium</i>	12	0
<i>Enterobacter</i>	23	6
<i>Erwinia</i>	4	1
<i>Escherichia</i>	44	1
<i>Flavobacterium</i>	49	1
<i>Gluconobacter</i>	4	0
<i>Kluyvera</i>	4	0
<i>Microbacterium</i>	5	0
<i>Micrococcus</i>	16	3
<i>Mycobacterium</i>	4	0
<i>Mycoplasma</i>	2	1
<i>Nocardia</i>	16	0
<i>Oerskovia</i>	2	0
<i>Planococcus</i>	13	0
<i>Propionibacterium</i>	1	0
<i>Protaminobacter</i>	3	0
<i>Proteus</i>	13	0
<i>Pseudomonas</i>	122	1
<i>Rhizobium</i>	1	0
<i>Salmonella</i>	8	0
<i>Sarcina</i>	6	3
<i>Serratia</i>	3	1
<i>Sporosarcina</i>	2	0
<i>Staphylococcus</i>	2	0
<i>Vibrio</i>	5	0
<i>Xanthomonas</i>	12	0

を可能ならしめた大きな要因の一つとなっている。

IV. DL-ATC 不斉水解に関与する酵素系⁽³⁾

DL-ATC の加水分解経路は、チアゾリン環の開裂から始まり S-カルバミルシステインもしくは N-カルバミルシステインを経由することが推定されたが、これら 2 種を基質にした時の L-CySH の生成を調べる実験と、DL-ATC を基質にしたときの酵素反応中間体を同定する実験とにより、中間体は S-カルバミルシステインであることが判明し、本開裂酵素を ATC ヒドラーゼと呼称

表 2 自然界よりの分離株の L-CySH 生成能

菌 株	L-CySH+L-Cys 生成量 (mg/ml)
<i>Pseudomonas thiazolinophilum</i>	
AJ 3854	6.05
<i>P. ovalis</i>	
AJ 3865	6.15
AJ 3867	5.69
AJ 3866	4.05
AJ 3863	3.95
AJ 3864	2.35
<i>P. desmolytica</i>	
AJ 3871	6.24
AJ 3869	6.05
AJ 3870	5.45
AJ 3868	3.63
AJ 3873	0.93
AJ 3872	0.72
<i>P. cohaerens</i>	
AJ 3874	4.74

表 3 ATC ラセマーゼ欠損株の L-CySH 生成

菌 株	基 質	L-システイ ン生成量 (mg/ml)	相対残存 ATC (%)
<i>P. thiazolinophilum</i>	L-ATC	1.58	1
AJ 3854	DL-ATC	1.85	2
<i>P. desmolytica</i>	L-ATC	1.70	9
AJ 3872	DL-ATC	0.79	56

した。ATC のアナログ数種を合成して検討したが、いずれも加水分解されず特異性の高い酵素と推定された。

次いで DL-ATC が化学量論的に L-CySH に変換される事実に着目し、基質 ATC のレベルか中間体 S-カルバミルシステインのレベルでラセミ化が起きていることを予想し、この点を検討した。中間体 S-カルバミルシステインを同定した結果、L 体であることにより、この段階でのラセミ化ではなく、したがって基質 ATC レベルでラセミ化が起きているものと考えられた。さらに、酵素反応と同一の条件下あるいはさらにラセミ化の起こりやすい高 pH においても化学的にはラセミ化しないという実験結果(図 6)より、ATC のラセミ化は酵素的に起きているものと結論づけられ、この酵素を ATC ラセマーゼと呼称した。一方、*Ps. desmolytica* AJ-3872 が、L-ATC からはモル収率約 100% で L-CySH を生成するのに対し、DL-ATC からはモル収率約 50% しか生成しないこと(表 3)は、自然界に ATC ラセマーゼ

が存在することを強く示唆している。なおこのラセマーゼはヒドロキシルアミン存在下でも良く作用し、従来知られているアミノ酸ラセマーゼとは性質が異なるものと

図 6 ATCの化学的ラセミ化

化学的ラセミ化を Perkin-Elmer 旋光計 (40°C, $C=0.5\%$, $l=1$) で計測した。サンプル組成: L-または D-ATC 0.5%, KH_2PO_4 1%, $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 0.14%, pH 8.2 または 10.65。

図 7 L-CySH 生成経路とこれに関与する酵素系

図 8 至適誘導物質濃度

誘導物質 (DL-ATC) の初濃度と誘導活性の関係。*Ps. thiazolinophilum* AJ-3854; 15 hr 培養未処理菌体を酵素源として使用。

考えられ非常に興味深い。

酵素反応の最終工程である S-カルバミル-L-システインからの L-CySH の生成反応は、非酵素反応でも起こるが、酵素液の添加により著しく促進されるので酵素反応と考え S-カルバミルシステインヒドラーゼと呼称した。

以上の実験結果をふまえ、*Ps. thiazolinophilum* AJ-3854 における L-CySH 生成系は 3 つのおそらく新規な酵素が連動するまことにユニークな系で、図 7 のようにまとめることができる。

V. L-CySH 生産条件の検討⁽⁴⁾

1. 培養条件の検討

図 8 に示したように、L-CySH を生成する酵素は培地に DL-ATC を添加したときに初めて出現する典型的な

図 9 酵素生産経過

Ps. thiazolinophilum AJ-3854 の培養菌体を酵素源として使用。

図 10 酵素生産に及ぼす Mn^{2+} の影響

Mn^{2+} の初濃度 ○: 無添加, ●: 0.1 mM, ■: 0.5 mM, △: 1 mM, ▲: 5 mM, □: 10 mM, ×: 20 mM. 未処理菌体を使用.

図 11 誘導物質添加時期検討

誘導物質 (ATC) を対数中期 (13 hr) に添加. DL-ATC-3 H₂O の濃度 ●: 0.4%, ▲: 0.2%, ■: 無添加. 未処理菌体を使用.

誘導酵素であり、誘導物質である DL-ATC (3 水塩) の必要量は 5 mg/ml であった。酵素生産経過は図 9 に示したが、対数増殖後期 (培養 13 時間後) に酵素生産量は最大となった。培地成分については、酵母エキスの添加が有効であることが判明したので、この促進物質を解明するため、最少培地へのアミノ酸、核酸、ビタミン、金属イオンの添加効果を調べた結果、とくに、グルタミン酸、ロイシン、プロリン、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mo^{6+} に強い効果が見出された。 Mn^{2+} の添加至適量を検討した結果、0.5 mM 以上の添加で、酵素生産量は無添加の 2 倍以上に達した (図 10)。図 10 において、生産された酵素が増殖定常期に入って不活性化される現象を回避する目的で、誘導物質の添加時期を検討した結果、対数増殖後期 (培養 13 時間後) に添加した場合、初発添加に比べ酵素生産量が増加し、かつ生産された酵素の不活性化を防止できることが判明した (図 11)。

図 12 ヒドロキシルアミン添加、無添加での L-CySH 生成経過

酵素反応: 30°C, 7 hr. 反応液組成: 1% DL-ATC-3 H₂O, 1% KH₂PO₄, 5% 菌体懸濁液, ヒドロキシルアミン 20 mM (0.14%).

図 13 L-CySH 製造フロー

2. 酵素反応条件の検討

AJ-3854 を用いる酵素反応での最大の問題は、スクリーニング時と同じく、ビタミン B₆ を補酵素とする CySH desulfhydrase による生成 L-CySH の分解であったが、この反応系へ、B₆ 酵素阻害剤であるヒドロキシルアミンの添加を試みた結果、20 mM の添加で L-CySH 分解を完全に抑制することができた。このときの酵素反応経過をヒドロキシルアミン添加、無添加と比較し図 12 に示した。また反応至適 pH は 8~9、至適温度は 40°C

付近であり、酵素系の安定域は pH 6~10, 温度 40°C 以下であった。以上の検討で得た至適条件下では、40 mg/ml の DL-ATC・3 H₂O よりモル収率約 100% で 31 mg/ml の L-CySH が生成された（酸化されて L-Cys として生成）。また CySH desulfhydrase の欠損変異株の取得にも成功しており、この場合にはヒドロキシルアミンの添加の必要は全くなかった。

V. 工業化

工業化にあたっては、スケールアップに伴う種々の問題、含硫化合物特有の諸問題等、予期しえたこと、しえなかったことの数々の難題を一つずつ解決し、装置、操作等プロセス全般にわたって、安全と環境保全面にはとくに重点をおいて検討を加え、ここに工業的に価値ある L-CySH の新製造法を確立した。工業的プロセスの概要を図 13 に示したが、ここでは本プロセス開発上のキーポイントをいくつか紹介する。

まず DL-ATC の不斉水解工程であるが、酵素反応を効率良く進めるためには、生成した L-CySH を通気酸化により L-Cys に変換することが望ましい。しかし本酵素系は酸化には鋭敏である。したがって酵素反応と酸化反応を両立するためには、精密な酸素濃度管理が必要となり、多くの基礎データ・スケールアップデータの採取と厳密な装置設計、工程管理が必要であった。また単離精製工程においても、本アミノ酸が鉄イオンを吸着しやすい性質を有するため、各工程の材質の選定、培地由来の鉄イオンの淘汰のための晶析条件の詳細な検討等が必要であった。さらに環境保全対策面においては、微量ではあるが、酵素誘導時に ATC が分解されて発生する

硫化水素の対策、含硫化合物を含む廃液の処理条件の確立等に多くのデータ採取とこれらを反映した装置設計を行い万全を期し、運転管理条件を確立した。かくして 1982 年春より味の素(株)九州工場でコマーシャルプラントが稼動し、以来、数百トンの規模で順調かつ安定に生産されている。

以上、述べたように化学合成法と生物・酵素反応の利点を組み合わせ、さらに相乗効果を発揮させるという目標の下に価値ある新しい L-CySH の工業技術を開発し、安全、安定な工業生産を実用化した。また本技術を応用展開した、去痰剤として有用な S-カルボキシメチル-L-システインの直接製造方法の確立にも成功しており、これらの技術が“化学と生物”の在り方、“化学”と“生物”との総合力の発揮という観点から大きな意義と示唆を与えるものであると信ずる。

終りに、本研究、開発、工業化を遂行するにあたり、多大の御協力をいただきました本社、研究所、工場の皆様に心から感謝いたします。

- (1) H. Behringer and P. Zillikens : *Ann. Chem.*, **574**, 140 (1951).
- (2) K. Sano, K. Yokozeki, F. Tamura, N. Yasuda, I. Noda and K. Mitsugi : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2315 (1978).
- (3) K. Sano, C. Eguchi, N. Yasuda and K. Mitsugi : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2373 (1979).
- (4) K. Sano and K. Mitsugi : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 2315 (1978).