

麴菌の液体培養における  
複合酵素高生産技術の開発とその応用

2012 年 3 月

杉本 利和

# 目次

	頁
序章	・・・1
第1章 麹菌の液体培養に関する新しい方法論の構築	・・・8
第1節 難消化性デキストリンを用いる白麹菌 <i>Aspergillus kawachii</i> の液体培養法	・・・9
第1項 緒言	・・・10
第2項 材料および方法	・・・13
第3項 結果および考察	
1. 白麹菌由来粗酵素液による難消化性デキストリンの分解性	・・・18
2. 難消化性デキストリンを用いる液体培養におけるグルコアミラーゼ生産性	・・・18
3. 難消化性デキストリンを用いる回分培養の特性	・・・19
第4項 要約	・・・24
第2節 黄麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> の液体培養における難消化性デキストリンの効果検証	32
第1項 緒言	・・・33
第2項 材料および方法	・・・34
第3項 結果および考察	
1. 黄麹菌由来の糖化酵素製剤による難消化性デキストリンの分解性	・・・37
2. 難消化性デキストリンを用いる液体培養におけるデンプン分解酵素の生産性	37
第4項 要約	・・・41
第2章 大麦を用いる白麹菌の新規な液体培養法の開発	・・・45
第1項 緒言	・・・46

第2項 材料および方法	・・・48
第3項 結果および考察	
1. 大麦の液体培地中での分解性に対する搗精および粉碎加工の影響	・・・53
2. 玄麦を用いる回分培養におけるグルコアミラーゼ及び耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの 生産性	・・・53
3. 玄麦を用いる回分培養におけるグルコアミラーゼ及び耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ遺 伝子の遺伝子発現	・・・55
第4項 要約	・・・57
第3章 大麦を用いる新規な液体培養物の発酵産業への応用	・・・65
第1節 麦焼酎製造における固体麹代替物としての利用	・・・66
第1項 緒言	・・・67
第2項 材料および方法	・・・69
第3項 結果および考察	
1. 玄麦使用量と各種酵素活性の関係	・・・73
2. 植物繊維素分解活性が増強された液体麹を用いた焼酎モロミ発酵試験	・・・73
3. 新規な液体麹を用いる麦焼酎の品質評価	・・・74
第4項 要約	・・・75
第2節 キャッサバの無蒸煮同時糖化エタノール発酵における複合酵素剤 としての利用	・・・80
第1項 緒言	・・・81
第2項 材料および方法	・・・84
第3項 結果および考察	・・・89

1. 玄麦を用いる新規な液体培養法における <i>A. kawachii</i> FS005 の酵素生産挙動	・ ・ 89
2. <i>A. kawachii</i> FS005 培養液によるキャッサバの無蒸煮糖化（ラボスケール）	・ ・ 89
3. <i>A. kawachii</i> FS005 培養液によるキャッサバの無蒸煮糖化同時エタノール発酵 （ラボスケール）	・ ・ 91
4. <i>A. kawachii</i> FS005 培養液によるキャッサバの無蒸煮糖化同時エタノール発酵 の工業化に関する実現可能性の検討（パイロットプラントスケール）	・ ・ ・ 92
第4項 要約	・ ・ ・ 95
総括	・ ・ ・ 102
参考文献	・ ・ ・ 106
発表論文	・ ・ ・ 114
特許	・ ・ ・ 115
謝辞	・ ・ ・ 117

## 序章

「麹菌（こうじきん）」は、日本の伝統的な醸造産業において古くから用いられ、日本の豊かな食文化の形成に貢献してきた。また、高峰譲吉博士が 110 余年前に発明したタカジアスターゼは、麹菌を利用した工業的な酵素生産の先駆けであり、近代バイオテクノロジー研究の源流であるとも言える。このような貴重な微生物資源である麹菌は、2006 年 10 月の日本醸造学会において我が国の「国菌」に認定された。具体的には、我が国で醸造および食品等に汎用される (1)和名を黄麹菌と称する *Aspergillus oryzae*、(2)黄麹菌（オリゼー群）に分類される *Aspergillus sojae* と黄麹菌の白色変異株、(3)黒麹菌（あわもり群）に分類される *Aspergillus awamori* など、および白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* (*Aspergillus kawachii*)、のことを指す<sup>1)</sup>。

麹菌を穀類などに繁殖させたものを麹（こうじ）と呼ぶ。麹には麹菌の分泌する多種類の加水分解酵素が著量含まれるため、穀類原料中のデンプンやタンパク質、核酸を分解し、酵母、乳酸菌等の発酵微生物による発酵のための基質を提供することができる。麹菌は食履歴のある安全な微生物として欧米でも広く認められている。また、2005 年 12 月に黄麹菌 (*Aspergillus oryzae* RIB40)、2011 年 11 月に白麹菌 (*Aspergillus kawachii* NBRC4308) のゲノム配列解読が完了し、今後、ゲノム情報を利用してこれら麹菌の更なる高度利用が期待されている<sup>2,3)</sup>。

さて、我々が技術開発のメインターゲットのひとつとして考えている本格焼酎の製造においては、麹菌として白麹菌が一般的に用いられる。白麹菌は、1918 年鹿児島県の河内源一郎氏が黒麹菌から白色変異株として分離した菌株である<sup>4)</sup>。これらの麹菌は、製麹（せいきく；麹の製造工程）中に、各種分泌酵素と共にクエン酸を主体とする有機酸を著量生成することを特徴とする。この麹に含まれる有機酸によって焼酎モロミの pH が 3.0~3.5 と低くなる。本格焼酎製造は、元来、温暖な地域で行われてきたが、この強い酸性条件により腐造乳酸菌等の増殖を抑えることが可能となり、安全に焼酎醸造を行うことができる。

本格焼酎製造は、米や麦、芋といったデンプン質を含む穀類を原料とし、麹菌酵素によるデ

ンプンの糖化と酵母によるエタノール発酵が同時に進む「並行複発酵」により醸造される。よって、原料デンプンを液化ならびに糖化するデンプン分解酵素が大変重要となる。麹菌は、デンプンの液化に関わる酵素として $\alpha$ -アミラーゼ（EC3.2.1.1）を分泌生産する。 $\alpha$ -アミラーゼはデンプンの $\alpha$ -1,4 結合をランダムに加水分解する酵素である。白麹菌が分泌生産する $\alpha$ -アミラーゼは、pH 3～pH 4 の範囲で相対活性が 80%以上で、かつ残存活性も 90%以上と高く、耐酸性が高いという特徴を有している<sup>4)</sup>。 $\alpha$ -アミラーゼにより液化されたデンプン原料をさらに糖化する酵素であるグルコアミラーゼ（EC3.2.1.3）も麹菌により分泌生産される。グルコアミラーゼはデンプンの $\alpha$ -1,4 結合鎖の非還元末端からグルコース単位で加水分解する酵素である。白麹菌のグルコアミラーゼは、pH 3～pH 4 において高い安定性を示し、相対活性も高い。また、熱安定性は黄麹菌のグルコアミラーゼに比べて高いことが知られている<sup>4)</sup>。

麹菌に各種酵素を分泌生産させるための培養方法には、伝統的な麹の製法におけるような、蒸煮等の処理後の原料に麹菌の分生子を接種して培養する固体培養法（固体麹の製造）と、水に原料およびその他の栄養源を添加して液体培地を調製し、麹菌の分生子または前培養した菌糸等を接種し培養する液体培養法（液体麹の製造）がある。固体培養法は、醸造に必要な多種類の酵素を大量に生成できる大変優れた培養方法として確立している。高峰譲吉博士が発明した複合酵素製剤であるタカジアスターゼも、「フスマ麹」と呼ばれる小麦フスマを用いた固体培養法により製造されており、現在もその当時と変わらぬ製法が用いられている。これに対して、液体培養法は、通常の微生物についてであるならば、培養制御や品質管理が容易であり、効率的な酵素生産に適した培養形態であるが、麹菌の液体培養では、麹菌のアミラーゼ、セルラーゼ等の各酵素の生産プロファイルが固体培養と大きく異なるばかりか、全般的に生産性が低下することが知られている<sup>5,6)</sup>。麹菌培養における固体培養と液体培養の差異、特に固体培養の高い酵素分泌生産性に関して近年精力的に研究が進められている。一方で、もし固体培養法と同等の酵素生産能力を有する麹菌の新規な液体培養法が確立されれば、工程上のフレキシビリティの高さゆえに、様々な生産分野に応用可能であると考えられる。例えば、焼酎製造工程において麹菌の液体培養

物である液体麴が実用化できれば、以下3点のメリットが期待できる。まず1点目は、製造設備の簡素化である。麴菌の固体培養法である固体麴を大規模製造する場合は、円盤型自動製麴装置と呼ばれる特殊な機械装置が用いられている<sup>4)</sup>。穀類原料を層状に薄く堆積させた状態で麴菌を繁殖させ、酵素を分泌生産させるために、製造数量は1バッチ最大で15 t程度に限定され、このとき円盤径が12 mとなるなど装置の大型化が避けられない。液体培養装置であれば、これまで各種発酵産業で用いられてきた汎用の通気攪拌装置を用いることができると共に、15 KL程度の液体麴を製造するのに必要な発酵槽径は、円盤型製麴装置の円盤径よりも十分に小さい（おそらく、発酵槽径4 m程度で十分に足りる）。また、最大製造数量を増大させることも可能である。2点目は、製造工程の操作性が向上することである。固体麴の製造は、原料が固形状であるがゆえに、培養中の温度や湿度が不均一となるため安定的な運転管理が難しい。また、半開放系で麴菌の培養を行うため、雑菌汚染の危険性は免れられない。また、製造された麴を次工程のアルコール発酵タンクに移送する際も、固形状であるためにベルトコンベアーや空気移送装置などの麴輸送のための特殊装置を必要とする<sup>4)</sup>。一方で、液体麴の製造は、全工程が液状で行われ、かつ無菌性も高いため、厳密な培養管理が可能となるばかりか、安定的に高品質な麴を製造することができる。発酵タンク等への移送も汎用の送液ポンプを利用することができる。3点目は焼酎の新商品開発が期待できることである。従来の固体麴製造は、「種もやし」と呼ばれる市販の種麴（麴菌の孢子）を購入し、それをスターターとする固体培養により製造されるのが一般的である。種麴産業の歴史は古く、平安時代から室町時代の「麴座」まで遡ることができる<sup>7)</sup>。「種もやし」の製造は、日本国内に数社ある種麴メーカーにより行われており、特殊な製造工程およびノウハウが必要とされる。つまり、焼酎メーカー各社は市販されている種麴を用いて麴を製造しているため、麴による焼酎品質の差別化が難しいという現状がある。一方で、液体麴の製造は、大量の種麴を必要せず、少量の孢子ストックから三角フラスコ等の小スケール培養を経て、スケールアップにより実製造規模の大規模培養を容易に行うことができる。ゆえに、他社にない香味に優れた特徴を持つ麴菌を自社で育種することができれば、麴菌により差別化された新規な焼酎

を速やかに開発、製造、販売することができるようになる。

このように、麹菌の液体培養法である液体麹法は多くのメリットが期待できる製法ではあるが、実用化へは高いハードルが存在する。例えば、麹菌の液体培養法におけるグルコアミラーゼの分泌生産性は、固体培養法と比較して著しく低く、生産挙動も大きく異なると報告されている<sup>8-11)</sup>。 $\alpha$ -アミラーゼについては、最近、分子生物学的な解析が詳細に行なわれ、白麹菌は非耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼという性質の異なる 2 種類のアミラーゼをコードする遺伝子を有することが分かった。しかし、その発現様式は大きく異なっており、液体培養法では非耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼは十分に生産されるが、耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼはほとんど生産されないと報告されている<sup>12)</sup>。したがって、白麹菌の液体培養法を実用化するためには、グルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの生産性を改善しなければならない。

グルコアミラーゼや $\alpha$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼといったデンプン分解に関わる酵素の生産抑制や誘導に関わる制御の概略を Fig. 1 に示した。*Aspergillus* 属のつくるデンプン分解酵素は、培地中のグルコースの存在により強力な遺伝子発現抑制を受けることが知られている<sup>13-17)</sup>。*Aspergillus* 属におけるグルコース抑制に関与する制御因子として CreA タンパクが同定されている。CreA は Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> 型のジンクフィンガーを持つ DNA 結合タンパクであり、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の GAL 遺伝子や SUC2 遺伝子のグルコース抑制に関わる制御因子として知られている Mig1 タンパクと高い相同性を有する。麹菌においては、グルコースが存在すると CreA の働きによって炭素源の資化に関わる多くの遺伝子の発現が抑制される。よって、デンプン分解酵素を効率的に工業生産するためには、低いグルコース濃度で維持されるような液体培養プロセス制御を行うか、もしくは CreA を介した抑制を弱めるような、なんらかの菌株育種もしくは遺伝子組換え菌株の造成が必要となる<sup>18)</sup>。

一方で、マルトースやデキストリンといったデンプン関連物質が $\alpha$ -アミラーゼやグルコアミラーゼの発現を誘導することが知られている<sup>19)</sup>。*Aspergillus* 属のデンプンによる遺伝子誘導に関わる転写因子として AmyR が同定されている。AmyR は Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型のジンクフィンガーを有する

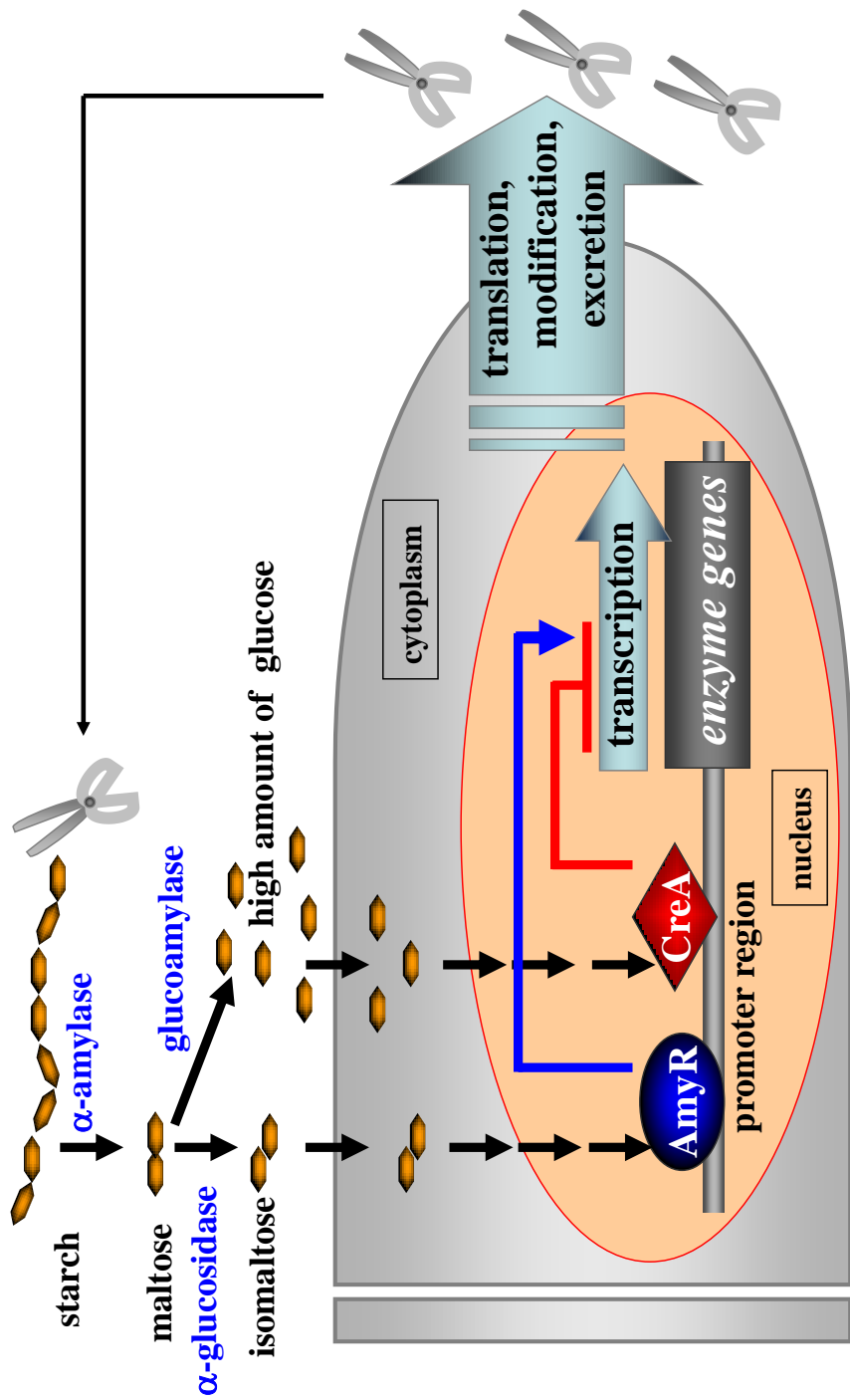


転写因子であり、*S. cerevisiae* のマルトース資化に関わる Mal activator と低いながらも相同性を有している。近年、*A. nidulans* の AmyR に関する研究において、デンプン分解物から $\alpha$ -グルコシダーゼの作用により生じるイソマルトースに応答して AmyR が核内に移行し、デンプン分解酵素の発現誘導を行うことが明らかとなった。よって、デンプン分解酵素高生産を目的とした麹菌の液体培養では、マルトースやデキストリン、デンプンが培地原料として用いられることが一般的である。しかしながら、ある一定期間の酵素生産培養が進行すると、遺伝子発現誘導に関わるデンプン関連物質自体が生産されたデンプン分解酵素により分解される。そのために遺伝子発現抑制のトリガーとなるグルコースが大量に生成し、培地中に蓄積する結果となる。つまり、従来のデンプン関連物質を用いる液体培養では酵素生産誘導と抑制が巧妙に調節されながら培養が進むため、ある水準以上の高い酵素生産を期待することは難しいといえる。

この課題に対し、数多くの研究が行われている<sup>13, 20, 21)</sup>。通常、実験室レベルで麹菌による酵素の生産量を高めるには、(1) アミラーゼの生産を誘導するがグルコースなどの抑制的糖類の生産を招かない人工的誘導物質を培養液に添加するか、(2) 目的とする遺伝子の発現に影響を及ぼすゲノム上の何らかの部位に突然変異を与え、目的酵素を大量生産することができるよう、古典的な遺伝学的方法によって麹菌を育種するか、(3) 遺伝子組換え技術を利用し、目的とする遺伝子を高発現させるように麹菌のゲノムの特定の領域を改変する、等の方法をとるのが一般的である。しかしながら、酒類醸造分野では、食品でない人工的な誘導物質や遺伝子組換え麹菌を用いることは忌避されており、また、多核細胞を有し、性的生殖環の知られていない実用麹菌を古典的遺伝学の手法で育種するには、ほとんど不可能と言って良いほどの多大な時間と人手を要することが見込まれる。それゆえ、実用上、麹菌の液体培養法が採用されることはなく、工程上の難点があっても、多種類かつ大量の酵素を生産することができる、伝統的な固体培養法が用いられてきた。実際、実用的なスケールで、固体培養法と同等レベルの加水分解酵素の生産が得られる液体培養法については、これまでほとんど知られていない。

これらの背景をふまえ、本研究では、麹菌の液体培養において酒類醸造に必要な酵素の高生産

が可能となる技術の開発を試みた。第 1 章では、これまでの液体培養法とは異なる新しい液体培養の方法論を立案した。この新しい方法論を実現する培養基質として難消化性デキストリンの可能性を検証し、液体培養におけるデンプン分解酵素生産に対する高い効果を確認した。特に、第 1 節では白麹菌 *Aspergillus kawachii* を用いて、第 2 節では黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いて検討を行った。第 2 章では、この新しい液体培養の方法論をさらに実用的な培養技術に発展させるべく、麦焼酎原料である大麦を用いた培養方法の開発を試み、大麦精白歩合とデンプン分解酵素の生産性に関係があることを見出した。これによって、これまで液体培養法では不可能だったグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの同時高生産に成功した。第 3 章では、開発された新規な麹菌の液体培養法を産業分野に応用すべく以下の 2 点の検討を行った。第 1 節では麦焼酎製造への適用を試みた。従来用いられている固体麹の代替物として新規に開発した液体麹を用いるために、デンプン分解酵素に加えてセルラーゼやキシラナーゼといった植物繊維素分解酵素も同時高生産するための培養最適化を行い、その液体麹を用いて固体麹と同等品質の麦焼酎が製造可能であることを確認した。第 2 節ではバイオエタノール製造への適用を試みた。中国や東南アジア地区でバイオエタノール原料として注目を集めているキャッサバの無蒸煮同時糖化エタノール発酵において、複合的に多種類の酵素を含む麹菌の液体培養物をオンサイトで製造し、複合酵素剤として用いる新たな発酵プロセスの実現可能性をパイロットプラントスケールにて検証した。



**Fig. 1** Regulation of gene expression of amylolytic enzymes by starch-related substrate in *koji* fungi.

## 第 1 章

### 麹菌の液体培養に関する新しい方法論の構築

## 第 1 節

難消化性デキストリンを用いる

白麹菌 *Aspergillus kawachii* の液体培養法

## 第1項 緒言

白麹菌 *Aspergillus kawachii* は伝統的な焼酎製造に用いられる糸状菌であり、黒麹菌 *Aspergillus awamori* のアルビノであることが知られている。これらの麹菌は、デンプン分解酵素である $\alpha$ -アミラーゼやグルコアミラーゼを著量生産し、特に近年では、バイオエタノール製造における穀類糖化の酵素源として利用価値が高まっている<sup>25-27)</sup>。

一般的に、*Aspergillus* 属のつくるデンプン分解酵素は、培地中のグルコースの存在により、CreA タンパクを介する強力な遺伝子発現抑制を受けることが知られている<sup>13-17)</sup>。デンプン分解酵素を効率的に工業生産するためには、低いグルコース濃度で維持されるような液体培養プロセス制御を行うか、もしくは、CreA を介した抑制を弱めるような、なんらかの菌株育種もしくは遺伝子組換え菌株の造成が必要となる<sup>18)</sup>。

一方で、マルトースやデキストリンといったデンプン関連物質が AmyR タンパクを介した遺伝子発現誘導を担うことも知られている<sup>19)</sup>。よって、デンプン分解酵素高生産を目的とした麹菌の液体培養では、マルトースやデキストリン、デンプンが培地原料として用いられる。しかしながら、ある一定期間の酵素生産培養が進行すると、遺伝子発現誘導に関わるデンプン等それ自体が生産されたデンプン分解酵素により分解され、グルコースが大量に生成する。続いて、培地中に蓄積したグルコースによりデンプン分解酵素遺伝子の発現が抑制されるため、結果的にデンプン分解酵素の生産が止まってしまうことになる。このように、従来のデンプン等を用いる液体培養では酵素生産誘導と抑制が巧妙に調節されながら培養が進むため、ある水準以上の高い酵素生産を期待することは難しいといえる。

この液体麹開発上の問題に対し、数多くの研究が行われてきた。例えば、マルトースを低濃度にかつ連続的にフィードする培養工学的なアプローチによりグルコース濃度を低く抑えようという試み<sup>20)</sup>や、マルトースアナログである $\alpha$ -メチル-D-グルコシドを用いることでグルコース生成させない方法<sup>21)</sup>、グルコース抑制が弱められたような CreA 遺伝子の突然変異体を取得する方

法<sup>13)</sup>などがこれに相当する。しかしながら、これらの方法は、複雑な培養制御を必要することや菌株育種への多大な労力を必要とするなど、汎用性の高い技術とは言い難い。さらに言うならば、麴菌の液体培養物（液体麴）を醸造産業で活用することを想定すると、食品グレードの原料を用いる簡便な回分培養法で、かつ、遺伝子組換えでない食履歴のある香味に優れた麴菌株を用いる必要がある。

以上のように、従来の麴菌液体培養に適用されてきた方法論では、我々が求める液体麴を完成させることは難しいと言える。実際、液体麴が実用レベルで行われ、酒類製造に用いられている例は無い。我々は、デンプン等を誘導基質として用いる従来の液体培養法における酵素遺伝子の厳密な制御、つまり誘導と抑制が共存していることが、酵素生産を律速している主要因であると考えた。よって、麴菌の液体培養法を再構築するに当たり、「遺伝子発現の抑制を極力免れながら誘導をかけ続ける」ことを簡便な培養方法で実現することを目指すこととした。

この新しい方法論を実現するために液体培養に用いる培地原料を再検討した。目的とする培地原料の条件は大きく3点ある。1点目が、酵素の誘導に関わる $\alpha$ -1,4および $\alpha$ -1,6グリコシド結合を有すること、そして2点目は、酵素生産に抑制的に働くグルコースが、培地中に生成、蓄積し難いことである。もちろん3点目は食品原料であることである。これらの相反する条件を満足する培地原料は存在するのであろうか？

近年、デンプンの加水分解物であるデキストリンやマルトデキストリン、コーンシロップの中に難消化性成分が存在することがわかった。難消化性成分を含むデンプン加水分解物は、“レジスタントマルトデキストリン”と呼ばれている<sup>25)</sup>。レジスタントマルトデキストリン製剤のひとつに、松谷化学工業製の難消化性デキストリン（Indigestible dextrin）（商品名：ファイバーソル2）が市販されている。難消化性デキストリンはコーンスターチを原料とし加熱工程と酵素処理工程を経て生産される。詳しい製法は米国特許 No.5620873 および No.5358729 に記載がある。平均分子量は2000であり、DE（Dextrose equivalent）は20以下である。Fig. 2に示すようなデンプンが本来もつ $\alpha$ -1,4および $\alpha$ -1,6グリコシド結合を主鎖とする構造以外に、 $\alpha$ -1,2や $\alpha$ -1,3の

グリコシド結合やレボグルコサン構造を有している<sup>26)</sup>。このように、難消化性デキストリンは分岐の多い複雑な構造のため、ヒトの消化酵素による分解を受け難い性質を有している。整腸効果、血糖調節効果作用が期待されるため、厚生労働省が一定の機能表示を許可する特定保健用食品の関与成分として利用されている。

難消化性デキストリンは、その名の通り、酵素分解し難いデキストリンであり、我々の考える新しい液体培養の方法論を実現するのに必要な性質を有すると期待できる。本章では、難消化性デキストリンを用いる麹菌の液体培養を行い、新しい方法論が実現可能かを検証することとした。そこでまず本節では、白麹菌 *Aspergillus kawachii* の液体培養において、培養挙動や酵素生産性を検討した。



## 第2項 材料および方法

### 1. 菌株

白麹菌 *Aspergillus kawachii* NBRC4308 を用いた。麹菌胞子は 30% グリセロールにて -80℃ にて保持した。使用前にポテトデキストロース寒天培地に植菌し、30℃ にて 7 日間培養した。生育した胞子を 0.1% (v/v) の Triton X-100 を含む生理食塩水で回収し、胞子懸濁液を調製した。得られた胞子懸濁液を培養試験に用いた。

### 2. フラスコ培養方法

フラスコ培養試験は、Iwashita らの方法<sup>27)</sup>をもとに若干の変更を加えた。基本培地（培地 1 L 中に下記物品を含む： 1 g Bacto-Tryptone, 5 g yeast extract, 3 g sucrose, 1 g NaNO<sub>3</sub>, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O）に、炭素源としてグルコース、デキストリン、難消化性デキストリンを添加したものを液体培地として用いた。難消化性デキストリンは、松谷化学工業製のファイバーソル 2 を使用した。炭素源の使用量は 20 g/L を基本とし、各試験目的に従い、その量を増減した。液体培地 50 ml を 200 ml 容のバッフル付き三角フラスコに張り込み、121℃, 15 分間の条件にて滅菌・冷却後、*A. kawachii* NBRC4308 の胞子懸濁液を初発胞子数が  $1 \times 10^5$  個/ml になるように植菌した。培養は、培養温度 30℃、振とう速度 120 rpm にて 72 時間行った。

### 3. 1 L ジャーファーマンターによる回分培養方法

1 L 容のジャーファーマンターを用いた回分培養試験は下記の通り行った。

1 L 容のジャーファーマンターとしてエイブル社製 Type BMJ-01NC を使い、液体培地の張り込み量は 600 ml とした。前述のフラスコ培養試験と同様の基本培地組成とし、炭素源として、培地 600 ml に対して 12 g のグルコース、デキストリン、難消化性デキストリンを添加した。この液体培地を 121℃, 15 分間の条件にて滅菌・冷却後、*A. kawachii* NBRC4308 の胞子懸

濁液を初発胞子数が  $1 \times 10^5$  個/ml になるように植菌した。培養は、培養温度 30℃、攪拌速度 300 rpm、通気量 300 ml/min にて 66 時間行った。

#### 4. 1 L ジャーファーマンターによる流加培養方法

流加培養についても、前述の回分培養試験と同じ型式の 1 L 容のジャーファーマンターを用いて実施した。まず、炭素源を含まない基本培地 480 ml を調製し、ジャーファーマンターに張り込んだ後、121℃、15 分間の条件にて滅菌・冷却した。12 g のグルコース、デキストリン、難消化性デキストリンを各々含む基本培地 120 ml をフィード用の培地として別途調製し、121℃、15 分間の条件にて滅菌・冷却した。流加培養は、ジャーファーマンターに張り込んだ炭素源を含まない基本培地に *A. kawachii* NBRC4308 の孢子懸濁液を初発胞子数が  $1 \times 10^5$  個/ml になるように植菌した後、炭素源を含むフィード用培地を 1.8 ml/min の速度で供給することで開始した。培養条件は、培養温度 30℃、攪拌速度 300 rpm、通気量 300 ml/min にて 66 時間培養とした。

#### 5. 難消化性デキストリンの分解性に関する試験方法

デキストリンならびに難消化性デキストリンの分解性は下記の方法により評価した。基質溶液として、2 g のデキストリンもしくは難消化性デキストリンを蒸留水に溶解し、90 ml にフィルアップした。この溶液を 121℃、15 分間の条件にて滅菌・冷却することで基質溶液を調製した。酵素溶液として、*A. kawachii* NBRC4308 を液体培養した培養上清を使用した。具体的には前述のフラスコ培養試験に記載の方法に従い、20 g/L の難消化性デキストリンを含む基本培地で 72 時間培養した培養上清を回収し、0.22  $\mu$ m のメンブランフィルター（日本ミリポア社製）を用いて除菌した。分解反応は、90 ml の基質溶液と 5 ml の 200 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0)、ならびに 5 ml の酵素溶液を無菌的に混合することで開始した。酵素反応は 30℃ 一定の条件で、6 時間行った。反応開始後、経時的にサンプリングを行い、反応溶液中のグ

ルコース生成量を測定した。

## 6. 分析方法

### (1) グルコアミラーゼ活性測定方法

回収された培養液を  $3000\times g$ , 10 分間の条件で麹菌体と上清液を遠心分離後、上清液を酵素活性測定用サンプルとして用いた。

グルコアミラーゼ活性は、キッコーマン社製の糖化力分別定量キットを用いて測定した。本キットの測定原理は以下の通りである。まず、基質である 4-ニトロフェニル $\beta$ -D-マルトシド (G2- $\beta$ -PNP) と培養上清に含まれるグルコアミラーゼならびに $\alpha$ -グルコシダーゼが作用して、4-ニトロフェニル $\beta$ -D-グルコシド (G1- $\beta$ -PNP) が生成する。G1- $\beta$ -PNP にはグルコアミラーゼと $\alpha$ -グルコシダーゼは作用せず、試薬として添加する $\beta$ -グルコシダーゼのみが作用して、発色基である 4-ニトロフェノール (PNP) が遊離する。炭酸ナトリウムを添加することで反応を停止させ、波長 400nm で吸光度を測定すれば、PNP のミリモル吸光係数 18.1 l/mmol/cm を用いて遊離した PNP 量を測定することができる。ここでの PNP 遊離はグルコアミラーゼと $\alpha$ -グルコシダーゼ活性によるため、別途 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性のみを測定し、この活性値を糖化力活性から差し引くことでグルコアミラーゼ活性のみを分別定量することができる。 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は、4-ニトロフェニル $\alpha$ -グルコシド (PNPG) を基質として培養上清液と作用させたときに遊離する PNP 量を吸光度測定することにより定量することで算出する。

具体的には、キットのプロトコールに従い、次のような操作および活性値の算出を行った。まず、糖化力測定用基質溶液 (4-ニトロフェニル $\beta$ -D-マルトシド ; G2- $\beta$ -PNP) 0.5 ml と糖化力測定用酵素溶液 ( $\beta$ -グルコシダーゼ) 0.5 ml を小試験管に混合することで反応液を調製した。反応液を 37℃で 5 分間予備加熱した後、測定用サンプル (上清液を蒸留水で 2 倍に希釈) を 0.1 ml を加えて反応を開始した。37℃で 10 分間正確に反応させた後、糖化力測定用反

反応停止液（炭酸ナトリウム溶液）2.0 ml を加え、反応を停止した。反応終了後、吸光度測定用セルに入れ、400 nm の波長で吸光度（Es）を測定した。ブランク値の測定は、上記反応液を 37℃で 15 分間加温後、反応停止液 2.0 ml を加えた後に、さらに測定用サンプル 0.1 ml を加え、400 nm の波長で吸光度（Eb）を測定した。続いて、 $\alpha$ -グルコシダーゼ測定用基質溶液（4-ニトロフェニル $\alpha$ -グルコシド；PNPG）2.0 ml を小試験管に分注し、5 分間予備加熱した後、測定サンプル（上清液）0.1 ml を加えて反応を開始した。37℃で 10 分間正確に反応させた後、 $\alpha$ -グルコシダーゼ測定用反応停止液（炭酸ナトリウム溶液）1.0 ml を加え、反応を停止した。反応終了後、吸光度測定用セルに入れ、400 nm の波長で吸光度（E2s）を測定した。ブランク値の測定は、上記反応液を 37℃で 15 分間加温後、反応停止液 1.0 ml を加えた後に、さらに測定用サンプル 0.1 ml を加え、400 nm の波長で吸光度（E2b）を測定した。最後に測定キットプロトコールに記載の以下の計算式を用いてグルコアミラーゼ活性の算出を行った。

$$\text{グルコアミラーゼ活性 (U/ml)} = (5.85 \times \Delta E - 14.1 \times \Delta E2) / 34.22$$

$$\text{但し、} \Delta E = (E_s - E_b) \times 2, \Delta E2 = E_{2s} - E_{2b}$$

グルコアミラーゼ活性 1 単位は、37℃条件下にて 1 分間に G2- $\beta$ -PNP から 1  $\mu$ mol の PNP を遊離する活性として定義した。

## (2) グルコース分析方法

グルコースの定量には、グルコース定量キットであるグルコース CII-テストワコー（和光純薬社製）を用いた。具体的にはサンプル液 20  $\mu$ l にキットに同梱の発色試薬 3 ml をよく混合した後、37℃で 20 分間加温し、分光光度計を用いて 505 nm の吸光度を測定した。別の対照として発色試薬のみ 3 ml を 37℃、20 分間加温したものについても上記と同様の操作で吸光度を測定した。グルコース濃度を算定する検量線は、キット同梱のグルコース標準液を蒸留水で希釈し、これを試料として用い、上記と同様の操作で吸光度を測定することで作成した。

### (3) マルトオリゴ糖分析方法

マルトオリゴ糖は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。具体的には、Aminex HPX-42A (300 × 7.8 mm I.D., Bio-Rad 社製) を用い、示差屈折検出器 RID-10A (島津製作所製) により検出した。移動相 H<sub>2</sub>O、流速 0.5 ml/min、カラム温度 80°C、サンプル注入量は 5 µl とした。サンプルである培養上清は、ポアサイズ 0.45 µm のメンブランフィルター (DISMIC-13cp, アドバンテック社製) にて濾過後に分析に供した。

### (4) 菌体量測定方法

麹菌体量は乾燥菌体重量として測定した。具体的には、培養サンプルを実験用不織布であるミラクロス (EMD Biosciences 社製) にて濾過することで湿菌体を回収した。次に、湿菌体を水で 3 回洗浄後、105°C にて恒量となるまで約 6 時間乾燥することで乾燥菌体重量を得た。

### 第3項 結果および考察

#### 1. 白麹菌由来粗酵素液による難消化性デキストリンの分解性

白麹菌由来の酵素によるデキストリンと難消化性デキストリンの分解反応の経時変化を Fig. 3 に示した。なお本試験では、275 mU/ml のグルコアミラーゼ活性を有する *A. kawachii* NBRC4308 の培養上清液を酵素溶液として用いた。難消化性デキストリンを基質として用いた場合、反応開始後から1時間は直線的にグルコースを生成し、その後の2～6時間目までは、グルコース生成量が低下するものの、直線的にグルコースを生成した。難消化性デキストリンは重合度 (DP) で、1.5% DP1、2.5% DP2、4.0% DP3、12.0% DP4-6、ならびに 80% の DP7+ のマルトオリゴ糖を含有すると報告されている<sup>26)</sup>。反応初期の1時間くらいに DP1 や DP2 画分からグルコースが速やかに生成し、その後、反応2～6時間の間に、DP3、DP4-6 ならびに DP7 以上の難消化性画分が分解されはじめたために、グルコースが緩やかに生成したと考察された。反応2～6時間のデキストリンからのグルコース生成速度は 0.477 mg/ml/h なのに対して、難消化性デキストリンのそれは 0.100 mg/ml/h であり、難消化性デキストリンはデキストリンに比べて、白麹菌酵素により分解され難い性質を持つことが明らかとなった。

#### 2. 難消化性デキストリンを用いる液体培養のグルコアミラーゼ生産

グルコース、デキストリン、および難消化性デキストリンを炭素源として用いたときの、グルコアミラーゼ生産性を Table 1 に示した。本試験においては、炭素源を添加していない基本培地のための培養結果を対照区とした。20 g/L のグルコースを添加すると、対照区に比べてグルコアミラーゼ活性が著しく低下した。一方、20 g/L のデキストリンを添加すると対照区に比べてグルコアミラーゼ活性が向上した。また、乾燥菌体重量はグルコースとデキストリンを用いる培養でほぼ同じ値を示した。難消化性デキストリンを添加した場合、グルコアミラーゼ活性はデキストリン添加培養に比べて 2.6 倍に向上した。このとき乾燥菌体重量はデ

キシトリン培養の 51%に低下した。よって、菌体あたりのグルコアミラーゼ生産性は、デキシトリン培養が 11.0 mU/mg-DW であったのに対して、難消化性デキシトリン培養で 56.1 mU/mg-DW と、約 5 倍向上した。さらに、デキシトリンと難消化性デキシトリンを混合して添加する培養試験を行ってみると、菌体あたりのグルコアミラーゼ生産性は、難消化性デキシトリンの使用量が増えるに従い、上昇する傾向が確認された。培養液あたりの最も高いグルコアミラーゼ活性を達成したのはデキシトリン 5 g/L と難消化性デキシトリン 15 g/L の割合で混合した場合の 281.2 mU/ml であった。この培地条件は、菌体に対する酵素生産誘導を高いレベルに保ちながら、バッチあたりの酵素生産性を高めることのできる実用的なグルコアミラーゼ高生産技術として大変有効であるといえる。一方、難消化性デキシトリンを用いる場合であっても、その添加量が増え過ぎると、菌体あたりのグルコアミラーゼ生産性が低下する傾向が確認された。たとえば、難消化性デキシトリン 100 g/L では 11.0 mU/mg-DW の生産性となった。今回使用した難消化性デキシトリンであるファイバーソル 2 にはデキシトリン様の消化性画分が約 20% 存在する<sup>26)</sup>。おそらく、これらの消化性画分より遊離したグルコースが、グルコアミラーゼ生産に対して抑制的に働いたと考察される。つまり、グルコアミラーゼ生産はグルコースによるカタボライト抑制に大きく支配されており、誘導基質が存在してもグルコース共存下では酵素生産フェーズに移行しないことを示唆している。Fig. 3 で示したように、難消化性デキシトリンの白麹菌酵素反応によるグルコース生成速度は、デキシトリンの 5 分の 1 であった。100 g/L 難消化性デキシトリン培養と、20 g/L デキシトリン培養の菌体あたりのグルコアミラーゼ生産性がほぼ同等であることが、先の仮説を裏付けていると考えられる。

### 3. 難消化性デキシトリンを用いる回分培養の特性

Fig. 4 に 1L ジャーファーマンターを用いた培養試験結果を示した。デキシトリンと難消化性デキシトリンを含む培地を用いた回分培養 66 時間目のグルコアミラーゼ活性は 140.2 mU/ml

と 368.4 mU/ml となった。培地中のグルコース濃度の変化を経時的に追跡した結果、培養 23 時間目に最大となり、各々 5.14 g/l と 1.25 g/l であった。難消化性デキストリンを用いた培養は、簡便な回分培養でありながら、グルコース濃度を低く維持できることが示された。また、このグルコース低濃度培養が、グルコアミラーゼ高生産に寄与していることが示唆された。逆に、デキストリン培養におけるグルコアミラーゼ生産が難消化性デキストリンほど上昇しないのは、培養前期のグルコース濃度上昇に起因すると考えられた。そこで、グルコアミラーゼ生産に大きく関与すると考えられるグルコース濃度を低く保つことを目的に、グルコースならびにデキストリンを一定速度で連続フィードする流加培養を試みた。グルコース流加培養におけるグルコース濃度は培養 23 時間目で 6.39 g/l であり、デキストリン回分培養と同等のレベルに維持することができた。しかしながら、グルコアミラーゼ生産はグルコース回分培養と同等レベルの 12.8 mU/ml であった。おそらく、グルコアミラーゼ高生産のためには、誘導基質であるマルトースなどが存在し、かつ抑制基質であるグルコースの濃度が低く維持されていることが重要であると推察された。一方、デキストリン流加培養では、培地中のグルコース濃度が 2.38 g/l と難消化性デキストリン回分培養と同等に低く維持された。その結果、培養 66 時間目のグルコアミラーゼ活性値は 280.4 mU/ml となり、デキストリン回分培養と比較して 2 倍程度上昇した。しかし、難消化性デキストリン回分培養の 368.4 mU/ml には及ばなかった。これは、デキストリン流加培養 42.5 時間目以後に活性が伸びなかったことに要因があると考えられた。培養 42.5~66 時間の間のグルコアミラーゼ生産速度は、難消化性デキストリン回分培養が 11.5 mU/ml/h であるのに対して、デキストリン流加培養では 6.5 mU/ml/h にとどまった。

これまで、*A. kawachii* の液体培養において、グルコース濃度とグルコアミラーゼ生産性の関係について詳細に検討された報告は少ない。Nagamine ら<sup>28)</sup>は、*A. kawachii* の液体培養において、2%グルコース培地では酵素生産性が下がり、特にグルコアミラーゼはほとんど生産されないと報告しているが、グルコアミラーゼ生産が回復するグルコース濃度については議論



されていない。一方、*A. kawachii* の近縁種である *A. niger* においては、グルコアミラーゼの遺伝子発現やグルコアミラーゼ生産条件における菌体内代謝物挙動に関する検討の中で、培地の炭素源濃度の影響が報告されている。Ganzlin ら<sup>29)</sup>は、マルトース濃度を低く制御する low-maltose feeding protocol 流加培養においてグルコアミラーゼ遺伝子 *glaA* の発現が上昇するが、マルトース濃度を 2 g/L 以上に維持する high-maltose feeding protocol 流加培養では *glaA* 発現が著しく低下すると報告している。培養系内のグルコース濃度は low-maltose feeding protocol を用いた培養では培養全期間を通してほぼ不検出なのに対し、high-maltose feeding protocol を用いた培養では培養初期から上昇し続け、培養 23 時間目には 7 g/L 程度にまで達した。このときの *glaA* 遺伝子の発現量は 2.5 倍の差が確認された。また別の報告では、グルコース 2 g/L のフィード溶液を希釈率 0.1/h で供給する連続培養において安定的なグルコアミラーゼ生産を達成している<sup>30)</sup>。これらの報告が、*A. niger* のグルコアミラーゼ生産においてグルコース抑制が解除される最少のグルコース濃度を明確に示しているわけではないが、少なくともグルコアミラーゼ高生産のためには培地グルコース濃度を 2 g/L 以下に維持することが必要であると考えられる。これは、*A. niger* と遺伝的にも近い *A. kawachii* においても同様であると推察される。よって、難消化性デキストリンを用いる方法は、酵素生産が抑制される条件以下にグルコース濃度を維持できる簡便な回分培養法であり、グルコアミラーゼ生産には適した培養方法であると言える。

Fig. 5 は、デキストリン回分培養、デキストリン流加培養、および難消化性デキストリン回分培養における培養液中のマルトオリゴ糖の変化を示している。デキストリン流加培養ではマルトオリゴ糖はほとんど検出されなかった。これは、麹菌によるデキストリンの分解ならびに消費速度とデキストリンの流加速度がほぼ釣り合っていたためと考えられる。一方、難消化性デキストリン回分培養では、著量のマルトオリゴ糖が培養終了時まで検出された。特に、3~6 糖および 7 糖以上のマルトオリゴ糖が高い残存量を保ちながら培養が進行するため、これらの画分から酵素誘導に関わるマルトースなどの 2 糖が継続的に供給されていると

考察された。一方で、従来行われてきた麹菌の液体培養法であるデキストリン回分培養は、マルトオリゴ糖量はある程度高く保ちながら培養することができるが、デキストリンの酵素分解に伴うグルコース生成量が大きいこと、結果として、培養前半の培地グルコース濃度の上昇によりグルコアミラーゼ生産が抑制されてしまったと考えられた。

Fig. 6 は、麹菌体量に対するグルコアミラーゼの比生産速度ならびに対糖収率の関係を示している。グルコースが炭素源として用いられた場合、回分培養、流加培養ともにグルコアミラーゼの比生産速度ならびに対糖収率は非常に低かった。デキストリン回分培養の場合は、グルコースを用いた培養に比べ、その値は高くなることが確認された。デキストリン流加培養の場合、グルコアミラーゼの比生産速度ならびに対糖収率共に、デキストリン回分培養に比べて2倍程度向上し、かつ、僅かではあるが菌体量の増加にともない向上する傾向が認められた。一方、難消化性デキストリン回分培養では菌体量の増加にともない、比生産速度ならびに対糖収率が著しく向上することが分かった。デキストリン回分培養と難消化性デキストリン回分培養の42.5時間目における菌体量はほぼ同等であったが、この時点で既に両者の菌体内の生理状態が異なり始めていることが強く示唆される。Guido ら<sup>30)</sup>は、培地グルコース濃度を低く保つことによるグルコアミラーゼ生産条件のとき、菌体内代謝物の中で酸化的ペントースリン酸回路のフラックスが上昇することを見出している。これは、低グルコース濃度環境においては単純な遺伝子発現のグルコース抑制解除が起こるだけではなく、菌体内NADPH 再酸化が亢進し、麹菌体内の生理状態が大きく変化することを示唆している。難消化性デキストリンを用いた場合の菌体内代謝物の変化とグルコアミラーゼ生産との関係性に大変興味もたれる。

Kato ら<sup>19)</sup>は *A. nidulans* を用いて転写因子 AmyR の詳細な解析を行い、マルトースに $\alpha$ -グルコシダーゼが作用することにより生成するイソマルトースが AmyR タンパクの核移行シグナルであると報告している。おそらく *A. kawachii* や *A. niger* の AmyR も同様の制御を受けていると推察される。難消化性デキストリンは、 $\alpha$ -1, 6 グリコシド結合を有するので直接的

に2糖のイソマルトースを供給することもできるし、 $\alpha$ -1, 4 グリコシド結合をもつ2糖であるマルトースから $\alpha$ -グルコシダーゼの作用でイソマルトースを供給することも可能である。最近、*A. niger* の AmyR 制御機構に関して別の観点から非常に興味深い研究が報告された<sup>31)</sup>。その中で、AmyR をマルチコピーで導入した高発現株を用いた培養を行った際に、25 mM グルコース培地において AmyR 遺伝子の強い発現が観察され、グルコアミラーゼ遺伝子 *glA* や  $\alpha$ -グルコシダーゼ遺伝子 *agdA*、アミラーゼ遺伝子 *amyA* も同様に強く発現していることが明らかとなった。これらの遺伝子発現レベルは 25 mM マルトース培地と同程度であり、低濃度のグルコース自体が AmyR を活性化する可能性が示された。また、Yuan ら<sup>32)</sup> は *A. niger* の AmyR 破壊株においてグルコース高親和性ヘキソーストランスポーター遺伝子の発現が低下することを報告しており、これは低グルコース濃度環境における *A. niger* のグルコースの取り込みと AmyR が関係している可能性を示唆している。

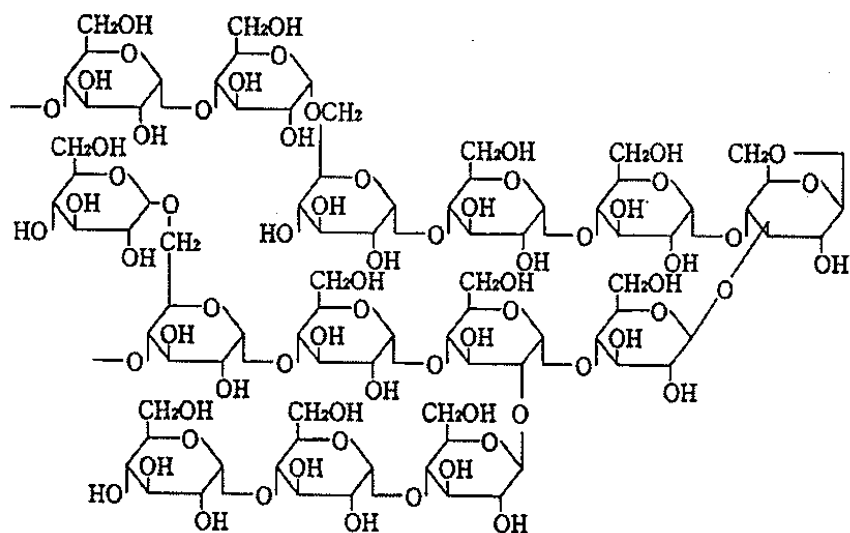
難消化性デキストリンを用いた *A. kawachii* 液体培養は、イソマルトースを十分に供給できる上、グルコースが低濃度で維持されるため、AmyR による各種遺伝子誘導が強く起こり、かつ CreA を介して抑制状態にあった遺伝子の抑制解除も起こっていると推察される。また、低グルコース環境特有の AmyR 活性化が起こっているとすれば、グルコアミラーゼ生産には非常に適した培養環境であると言える。今後、難消化性デキストリンを用いた液体培養における菌体の生理状態をメタボロームやトランスクリプトームの手法で解析を進め、麹菌グルコアミラーゼ生産における新しい培養制御法の構築につなげたいと考えている。

## 第4項 要約

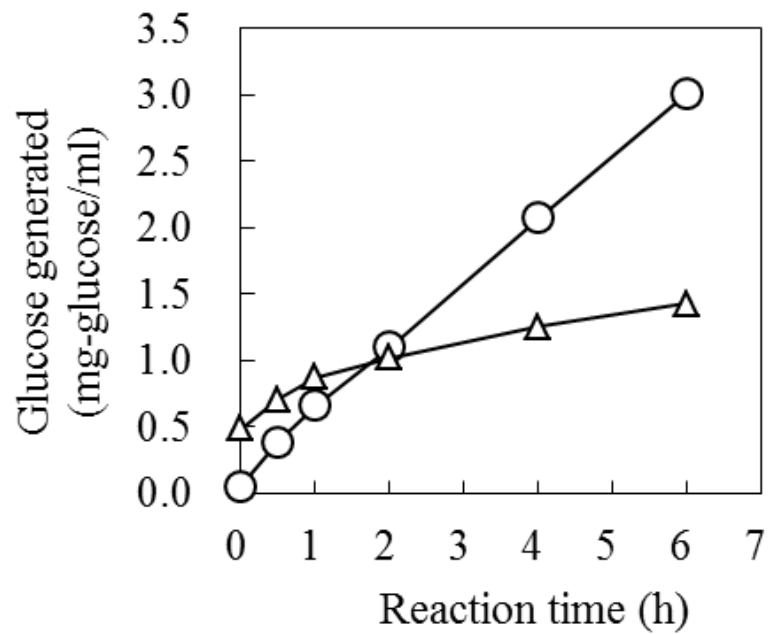
麹菌の液体培養において、培地炭素源として難消化性デキストリンを用いる培養方法を検討した。難消化性デキストリンは、白麹菌由来の酵素に対して難消化性を示し、デキストリンと比較して5分の1程度の分解性しか示さなかった。難消化性デキストリンを用いた *A. kawachii* NBRC4308 の液体培養をフラスコスケールで行ったところ、デキストリン添加培養に比べて培養上清中のグルコアミラーゼ活性は2.6倍に、菌体あたりのグルコアミラーゼ生産性は約5倍に上昇した。続いて、1L ジャーファーメンターを用いた詳細な培養解析を実施した。デキストリンと難消化性デキストリンを含む培地を用いた回分培養66時間目のグルコアミラーゼ活性は140.2 mU/ml と368.4 mU/ml であった。培地中のグルコース濃度の変化を経時的に追跡した結果、培養23時間目に最大となり、各々5.14 g/l と1.25 g/l であった。難消化性デキストリンを用いた培養は、簡便な回分培養でありながら、グルコース濃度を低く維持できることが示された。そこで、グルコアミラーゼの生産性に大きく関与すると考えられるグルコースの濃度を低く保つことを目的に、グルコースならびにデキストリンを一定速度で連続フィードする流加培養を試みた。グルコース流加培養において、培地中のグルコース濃度をデキストリン回分培養と同等のレベルに維持することができたが、グルコアミラーゼ活性はグルコース回分培養と同等レベルにとどまり、デキストリン回分培養には大きく及ばなかった。一方、デキストリン流加培養では、培地中のグルコース濃度を難消化性デキストリン回分培養と同様に低く維持することができた。培養66時間目のグルコアミラーゼ活性値はデキストリン回分培養の約2倍にまで上昇したものの、難消化性デキストリンのそれには及ばなかった。培養液中のマルトオリゴ糖の変化を確認したところ、デキストリン流加培養ではマルトオリゴ糖はほとんど検出されなかったのに対し、難消化性デキストリン回分培養では、著量のマルトオリゴ糖が培養終了時まで検出された。よって、難消化性デキストリン回分培養では、液体培養における全てのフェーズで転写因子である *AmyR* を介した酵素発現誘導が高いレベルで行われていると推察された。さらに、難消化性デキストリンの分解にと

なうグルコースの生成が少ないために、麹菌へのグルコース供給量が麹菌による消費量を超えないような培養環境が簡単に構築されたと推察された。結果として、培地中のグルコース濃度も低く維持され、グルコース抑制に関わる **CreA** の影響が最小限に抑えられた状態で培養が進行したと考えられた。

*A. kawachii* の液体培養におけるグルコアミラーゼ生産を向上させる条件として、①グルコアミラーゼ遺伝子の発現に対する抑制基質であるグルコースが欠乏し、かつ誘導基質であるデキストリンが共存していること、②さらに誘導基質が培地中に存在し続けることが重要であることが分かった。これらの一見両立し得ない液体培養環境を、難消化性デキストリンという培養基質を用いることで簡便に構築できることを初めて見出した。これにより、当初提案した「抑制を極力免れながら誘導をかけ続ける」という新しい液体培養の方法論を実際の培養方法として具現化することができた。



**Fig. 2 Estimated structural formula of Fibersol-2 <sup>26)</sup> .**



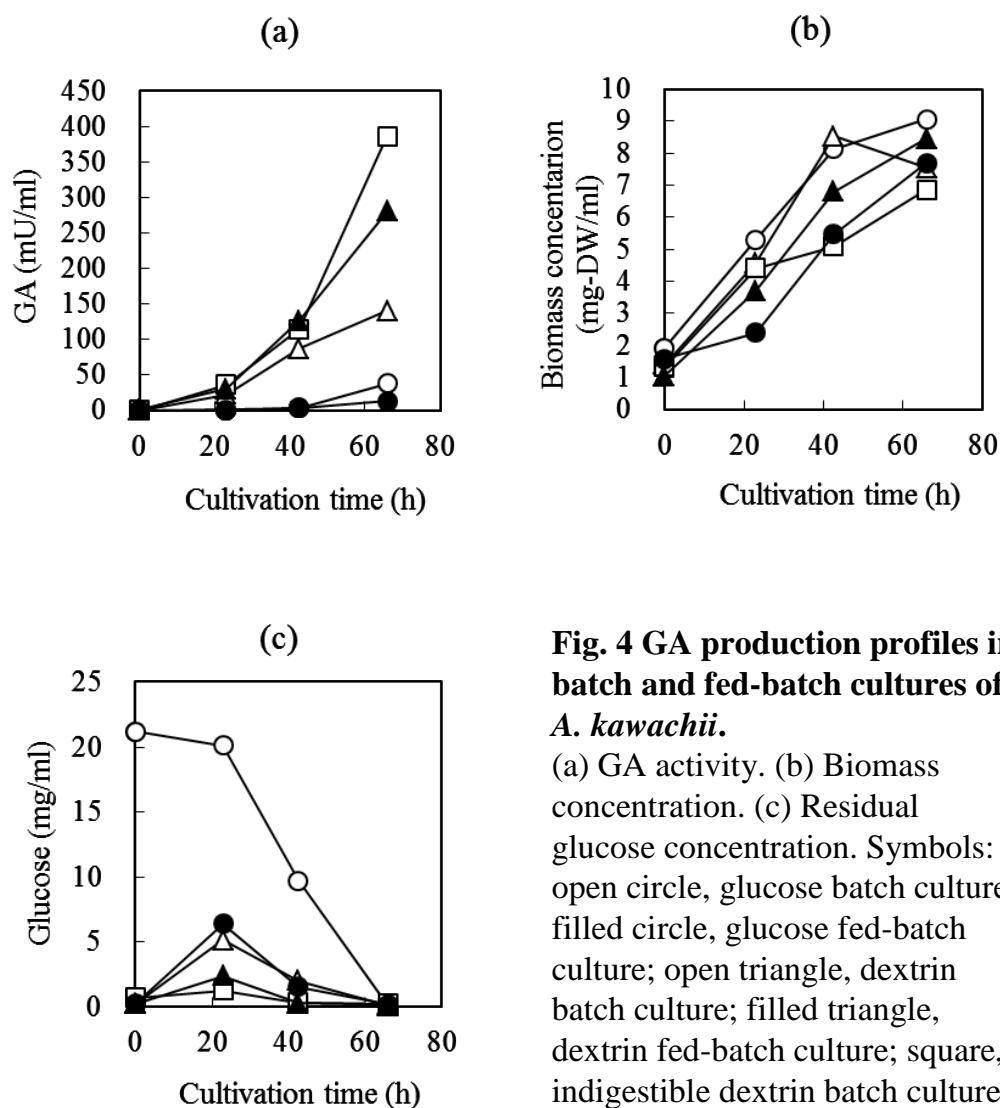
**Fig. 3 Time course of glucose production during enzymatic hydrolysis of dextrin and indigestible dextrin.** Symbols: circle, dextrin; triangle, indigestible dextrin.

**Table 1 Effect of carbon sources on glucoamylase (GA) activity and cell growth of *A. kawachii*.**

Submerged culture was carried out in 50 ml of a basal medium containing the indicated additional carbon sources and concentrations. The culture without an additional carbon source was indicated as (-). The additional carbon sources used were glucose (Glc), dextrin (Dex), indigestible dextrin (IDex).

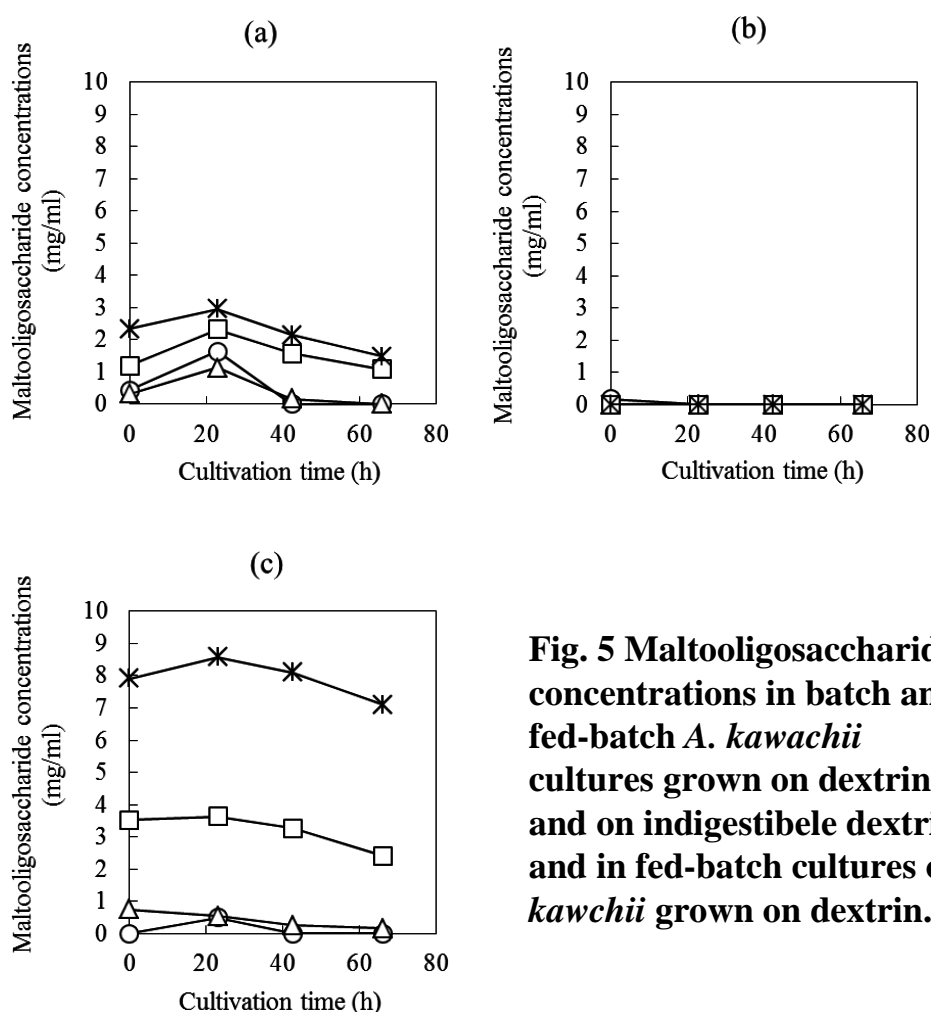
Additional carbon source	GA activity (mU/ml)	Biomass (mg-DW/ml)	GA productivity (mU/mg-DW)
—	23.1	1.5	14.9
20 g/L Glc	1.7	9.2	0.18
20 g/L Dex	105.1	9.5	11.0
15 g/L Dex + 5 g/L IDex	153.0	9.1	16.8
10 g/L Dex + 10 g/L IDex	134.2	7.8	17.2
5 g/L Dex + 15 g/L IDex	281.2	6.5	43.2
20 g/L IDex	275.2	4.9	56.1
50 g/L IDex	206.0	8.2	25.1
100 g/L IDex	111.1	10.1	11.0





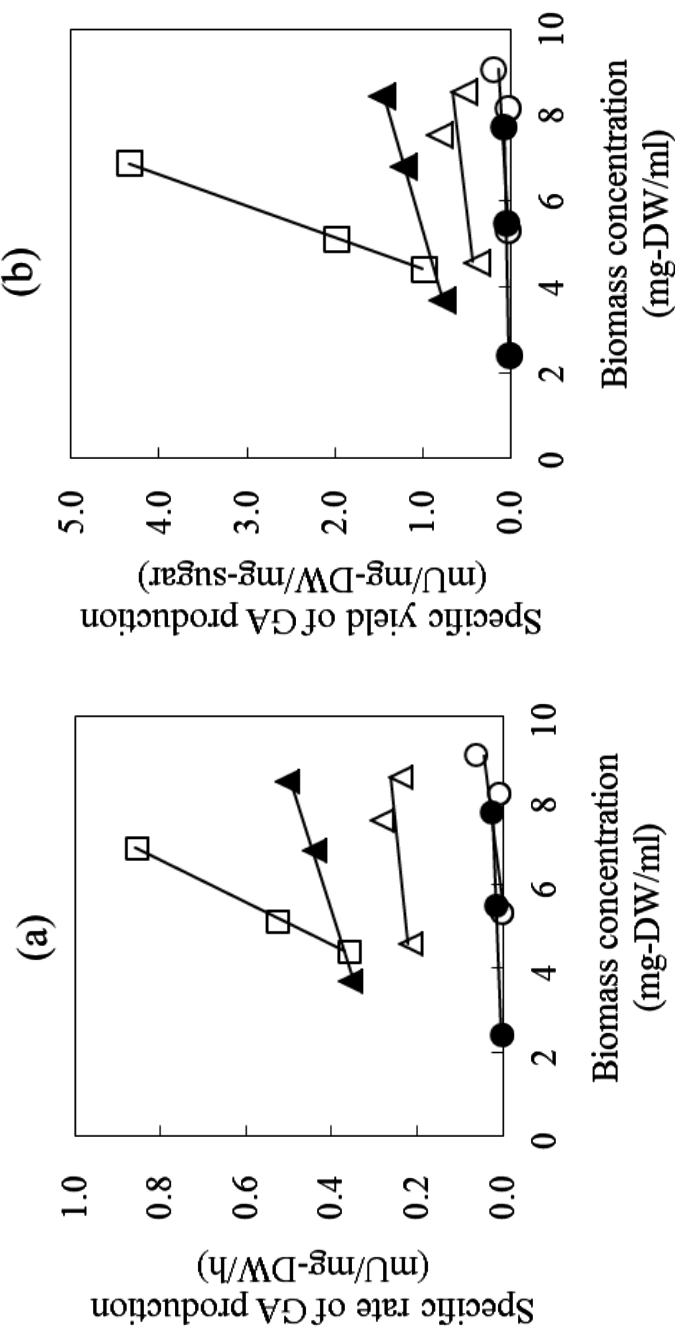
**Fig. 4 GA production profiles in batch and fed-batch cultures of *A. kawachii*.**

(a) GA activity. (b) Biomass concentration. (c) Residual glucose concentration. Symbols: open circle, glucose batch culture; filled circle, glucose fed-batch culture; open triangle, dextrin batch culture; filled triangle, dextrin fed-batch culture; square, indigestible dextrin batch culture.



**Fig. 5 Maltoligosaccharide concentrations in batch and fed-batch *A. kawachii* cultures grown on dextrin and on indigestible dextrin and in fed-batch cultures of *A. kawachii* grown on dextrin.**

Batch and fed-batch cultures of *A. kawachii* were grown as shown in Fig. 3. Maltoligosaccharide concentrations in the culture supernatants were analyzed by high-performance liquid chromatography. (a) dextrin batch culture, (b) dextrin fed-batch culture, (c) indigestible dextrin batch culture. Symbols: open circle, DP2; open triangle, DP3; open square, DP4-6; asterisk, DP7+.



**Fig. 6 Relationships between the specific rate of GA production, the specific yield of GA production and the biomass concentration in batch and fed-batch cultures of *A. kawachii*.**  
 (a) Relationship between the specific rate of GA production and biomass concentration. (b) Relationship between specific yield of GA production and biomass concentration. Open circle, glucose batch culture; filled circle, dextrin batch culture; open triangle, glucose fed-batch culture; filled triangle, dextrin fed-batch culture.

## 第2節

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の液体培養における

難消化性デキストリンの効果検証

## 第1項 緒言

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、清酒、味噌、醤油などの日本の発酵食品に長年使用されてきており、米国 FDA の GRAS にも認定されるなど、その安全性が広く認められている<sup>33)</sup>。*A. oryzae* は液体培養においてデンプン分解酵素である $\alpha$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、ならびにグルコアミラーゼを培地中に分泌生産する。*A. oryzae* のデンプン分解酵素発現は、培地中にグルコースが存在すると CreA タンパクを介して著しく抑制されることが知られている<sup>14, 20)</sup>。デンプン分解酵素の工業生産においては、グルコース濃度を低く制御する等の多大な努力が不可欠である。一方、デンプン、デキストリン、マルトースが、デンプン分解酵素の生産性を上昇させることも古くから知られており、この酵素誘導に AmyR と呼ばれる転写因子が関わっていることが分かっている<sup>34, 35)</sup>。しかしながら、デンプン等の誘導基質は生産されたデンプン分解酵素により速やかに分解を受けてしまい、実際の培養では培地中に著量のグルコースが蓄積する傾向が認められる。つまり、従来一般的に行われてきたデンプンやデキストリン、マルトースを用いる液体培養では、前述のような酵素生産誘導と抑制が共存するため、デンプン分解酵素の生産は厳密な調節を受けている。

著者らはこれまでに、白麹菌 *A. kawachii* の液体培養によるグルコアミラーゼ生産において、難消化性デキストリンが前述の問題を克服できる良好な誘導基質であることを初めて見出した。しかしながら、*A. kawachii* 以外の麹菌においても同様のことが言えるのか、それとも *A. kawachii* 特有の現象なのかについては不明であった。そこで本節では、麹菌の代表株である *A. oryzae* の液体培養においても第1章1節で提案した新規な液体培養の方法論が適用可能か検証することとし、難消化性デキストリンを用いた液体培養におけるグルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、 $\alpha$ -アミラーゼの生産性を検討した。

## 第2項 材料および方法

### 1. 菌株

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 (独立行政法人酒類総合研究所保存株)を用いた。麹菌胞子は 30% グリセロールにて -80℃ にて保持した。使用前にポテトデキストロース寒天培地に植菌し、30℃ にて 7 日間培養した。生育した胞子を 0.1% (v/v) の Triton X-100 を含む生理食塩水で回収し、胞子懸濁液を調製した。得られた胞子懸濁液を培養試験に用いた。

### 2. 培地および培養条件

フラスコ培養試験は、Iwashita らの方法<sup>27)</sup>をもとに若干の変更を加えた。基本培地（培地 1 L 中に下記物品を含む： 1 g Bacto-Tryptone, 5 g yeast extract, 3 g sucrose, 1 g NaNO<sub>3</sub>, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O）に、20 g の各種炭素源を添加した。炭素源としてグルコース、マルトース、デキストリン、難消化性デキストリンを用いた。難消化性デキストリンは、松谷化学工業製のファイバーソル 2 を使用した。液体培地 50 ml を 200 ml 容のバッフル付き三角フラスコに張り込み、121℃, 15 分間の条件にて滅菌・冷却後、*A. oryzae* RIB40 の胞子懸濁液を初発胞子数が 1×10<sup>5</sup> 個/ml になるように植菌した。培養は、培養温度 30℃、振とう速度 120 rpm にて 72 時間行った。

### 3. 難消化性デキストリンの分解性試験

マルトース、デキストリンならびに難消化性デキストリンの分解性は下記の方法により評価した。基質溶液として、2 g のマルトース、デキストリンもしくは難消化性デキストリンを蒸留水に溶解し、90 ml にフィルアップした。この溶液を 121℃, 15 分間の条件にて滅菌・冷却することで基質溶液を調製した。酵素溶液として、黄麹菌由来の粉末酵素製剤であるグルク 100（天野エンザイム社製）を用いた。具体的には、グルク 100 を 0.1 g/l で蒸留水に溶解

後、0.22  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルター（日本ミリポア社製）を用いて除菌した。分解反応は、90 ml の基質溶液と 5 ml の 200 mM 酢酸緩衝液(pH 5.0)、ならびに 5 ml の酵素溶液を無菌的に混合することで開始した。酵素反応は 37°C 一定の条件で、6 時間行った。反応終了後の反応液中のグルコース生成量を計測した。加水分解度は、下記の式により算出した。

$$\text{加水分解度(\%)} = [\text{生成グルコース量 (g/ml)} \times 100] / [\text{基質量 2 (g)} \times 1.1] \times 100$$

#### 4. グルコアミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼおよび $\alpha$ -アミラーゼ活性測定方法

グルコアミラーゼおよび $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は、キッコーマン社製の糖化力分別定量キットを使用した。詳細は第 1 章 1 節 2 項－6(1)に記載の通りである。グルコアミラーゼ活性 1 単位は、37°C 条件下にて 1 分間に G2- $\beta$ -PNP から 1  $\mu\text{mol}$  の PNP を遊離する活性として定義した。また、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性 1 単位は、37°C 条件下にて 1 分間に 4-ニトロフェニル $\alpha$ -グルコシドから 1  $\mu\text{mol}$  の PNP を遊離する活性として定義した。

$\alpha$ -アミラーゼ活性は、キッコーマン社製の $\alpha$ -アミラーゼ測定キットを用いた。具体的には、合成基質である 2-クロロ-4-ニトロフェニル 6<sup>5</sup>-アジド-6<sup>5</sup>-デオキシ- $\beta$ -マルトペンタオシド (N3-G5- $\beta$ -CNP) は、培養上清中の  $\alpha$ -アミラーゼによって分解され、2-クロロ-4-ニトロフェニル  $\beta$ -マルトトリオシド (G3- $\beta$ -CNP) と 2-クロロ-4-ニトロフェニル  $\beta$ -マルトシド (G2- $\beta$ -CNP) を生じる。これらに測定キットに共役酵素として含まれているグルコアミラーゼと $\beta$ -グルコシダーゼが作用して、発色基 2-クロロ-4-ニトロフェノール (CNP) が遊離する。ここに炭酸ナトリウムを添加することで反応を停止させ、波長 400nm で吸光度を測定すれば、CNP のミリモル吸光係数 17.3 l/mmol/cm を用いて遊離した CNP 量を測定することができる。

具体的には、キットのプロトコールに従い、次のような操作および活性値の算出を行った。まず、 $\alpha$ -アミラーゼ測定用基質溶液（2-クロロ-4-ニトロフェニル 6<sup>5</sup>-アジド-6<sup>5</sup>-デオキシ- $\beta$ -マルトペンタオシド；N3-G5- $\beta$ -CNP）0.5 ml と $\alpha$ -アミラーゼ測定用酵素溶液（グルコアミラーゼと $\beta$ -グルコシダーゼ）0.5 ml を小試験管に混合することで反応液を調製した。反応液を

37℃で 5 分間予備加熱した後、測定用サンプル（上清液を蒸留水で 50 倍に希釈）を 0.1 ml を加えて反応を開始した。37℃で 10 分間正確に反応させた後、 $\alpha$ -アミラーゼ測定用反応停止液（炭酸ナトリウム溶液）2.0 ml を加え、反応を停止した。反応終了後、吸光度測定用セルに入れ、400 nm の波長で吸光度（Es）を測定した。ブランク値の測定は、上記反応液を 37℃で 15 分間加温後、反応停止液 2.0 ml を加えた後に、さらに測定用サンプル 0.1 ml を加え、400 nm の波長で吸光度（Eb）を測定した。最後に測定キットプロトコールに記載の以下の計算式を用いて $\alpha$ -アミラーゼ活性の算出を行った。

$$\alpha\text{-アミラーゼ活性 (U/ml)} = (E_s - E_b) \times 0.179 \times 50$$

$\alpha$ -アミラーゼ活性 1 単位は、37℃条件下にて 1 分間に N3-G5 - $\beta$ -CNP から 1  $\mu$ mol の CNP を遊離する活性として定義した。

## 5. グルコース分析方法

第 1 章 1 節 2 項－6(2)に記載の方法と同様に測定した。

## 6. 菌体量測定方法

第 1 章 1 節 2 項－6(4)に記載の方法と同様に測定した。



### 第3項 結果および考察

#### 1. 黄麹菌由来の糖化酵素製剤による難消化性デキストリンの分解性

第1章1節の結果によれば、白麹菌の培養上清を粗酵素液として用いた分解試験において、難消化性デキストリンのグルコース生成速度はデキストリンの約5分の1であった。本試験においては、黄麹菌由来の酵素製剤であるグルク100を酵素液として用いて、その分解性を評価した（Fig. 7）。その結果、マルトースとデキストリンの分解度は各々84%と67%であった。一方、難消化性デキストリンの分解度は10%であった。これらの結果により、難消化性デキストリンは黄麹菌酵素によっても分解されにくい性質を有することが分かった。

#### 2. 難消化性デキストリンを用いる液体培養におけるデンプン分解酵素の生産性

Table 2 にグルコース、マルトース、デキストリン、難消化性デキストリンを用いて *A. oryzae* RIB40 を回分培養した場合の、 $\alpha$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、グルコアミラーゼ活性ならびに乾燥菌体重量の結果を示した。グルコースを用いる回分培養に比べて、マルトースやデキストリンを用いる回分培養では $\alpha$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、グルコアミラーゼ活性の上昇が確認された。これらデータは、Minetoki ら<sup>36)</sup>が *A. oryzae* のデンプン分解酵素がデキストリンで誘導されるとした報告と同様の結果となった。一方、難消化性デキストリンを用いるとデキストリンに比べて $\alpha$ -アミラーゼ活性が3.6倍、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が2.7倍に向上した。Carlsen ら<sup>37)</sup>はグルコース濃度を制御するケモスタット培養法を用いた *A. oryzae* による $\alpha$ -アミラーゼ生産において培地中のグルコース濃度が10 mg/lを超えると $\alpha$ -アミラーゼ生産が顕著な抑制を受けると報告している。同様の *A. niger* における研究<sup>30)</sup>では、グルコアミラーゼ高生産させるためにグルコース濃度2 g/lを目安とした培養制御が行われているので、*A. oryzae* の方が培地中のグルコース濃度に対して厳密な制御を受

けていると言える。難消化性デキストリンを用いた回分培養において $\alpha$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼの生産性が上昇していることを考慮すると、グルコース濃度は低いレベルで維持されていたと推察された。しかしながら、培養中のグルコース濃度についてデータ未取得であるため、今後詳細な培養解析を行い、グルコース濃度と $\alpha$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ生産性の関係について明らかにしたいと考えている。

さらに、難消化性デキストリンを用いる培養におけるグルコアミラーゼ生産については顕著な高生産効果が認められ、難消化性デキストリン回分培養でのグルコアミラーゼ活性はデキストリン回分培養の 55 倍に達した。*A. oryzae* の回分培養において、このような高い酵素活性が得られた例はこれまで報告されていない。最も近い研究事例として、*A. oryzae* RIB642 の流加培養においてグルコース比消費速度を制御パラメーターとする高度な手法を用いて、高いグルコアミラーゼ生産性をあげた報告がある<sup>38)</sup>。その中で、グルコース比消費速度を 0.023 g-glucose/g-cell/h という低いレベルに制御する流加培養を行い、培養系内のグルコースがほとんど不検出の状態となったとき、0.8 U/g/DW/h という高いグルコアミラーゼ生産性を達成したと報告している。一方で我々の試験においては、難消化性デキストリンを用いるだけの簡便な回分培養法であるにも関わらず、1.35 U/g/DW/h という高いグルコアミラーゼ生産性を得ることができており、*A. oryzae* による工業的なグルコアミラーゼ生産に十分なインパクトを与える実用性の高い培養方法であるといえる。このように、難消化性デキストリンを用いた培養におけるグルコアミラーゼの生産性が、 $\alpha$ -アミラーゼや $\alpha$ -グルコシダーゼよりも顕著に上昇したことは非常に興味深いことである。Carlsen ら<sup>39)</sup> は、*A. oryzae* を用いてグルコース濃度を 10 mg/l 以下に制御するケモスタット培養を行った場合、マルトースやマルトデキストリンを用いたケモスタット培養と同様の高い $\alpha$ -アミラーゼ生産が可能となることを明らかにしている。また最近、vanKuyk ら<sup>31)</sup> が *A.niger* の AmyR 制御においても低グルコース濃度培養に対する同様の応答制御を報告しており、このような低グルコース濃度環境における AmyR 活性化と難消化性デキストリンを用いる液体培養に

おけるグルコアミラーゼ生産性向上とが関連しているのかどうかに興味もたれる。Ishida ら<sup>10)</sup>の報告によれば、*A. oryzae* のグルコアミラーゼには固体培養特異的に発現する *glaB* 遺伝子が存在する。*glaB* の発現を誘導する因子として、マルトースの存在、高温培養、菌糸成長に対する物理的障壁、低い水分活性など、固体麴の製麴条件によく合致するものが明らかにされている。さらに Biesebeke ら<sup>40)</sup> は小麦フスマを用いた固体培養と液体培養において *glaB* の発現を詳細に解析しており、*glaB* が発現する固体培養では培地中のグルコース濃度が 0.05 g/l 以下であったのに対し、*glaB* の発現しない液体培養ではグルコース濃度は最大で 0.23 g/l に達したと報告した。この原因として、固体培地が液体培地に比べて水分活性が低く、物質の拡散速度が遅いためとである考察している。このような固体培養における低い物質拡散性が、麴菌への糖質供給に様々な影響を与えると予想される。固体培地における酵素の拡散速度は液体培地に比べて遅くなり、その結果、基質であるデンプンとの接触頻度は著しく低下すると考えられる。よって、固体培地におけるグルコース生成速度は液体培地に比べて遅くなると推察される。そのような状況の中、麴菌によるグルコースの取り込みは変わらず行われ、特に酵素生産とグルコースの取り込みが盛んに行われている菌糸の先端近傍のマイクロな場では、グルコース供給が律速の培養となっている可能性が高い。さらに、分解途上のマルトデキストリンは麴菌に取り込まれないため、麴菌体の周辺に高い濃度で存在すると推察される。Fig. 8 に示すように、難消化性デキストリンを用いる回分培養では低いグルコース濃度かつ高いマルトデキストリン濃度の環境で培養が進行している。前述した固体培養環境で想定される現象と照らし合わせると、難消化性デキストリンを用いる液体培養は、炭素源の資化という観点においては、固体培養と類似の環境を提供できている可能性が高いと思われる。今後は、難消化性デキストリンを用いた液体培養における *glaB* 遺伝子の発現状況を確認すると共に、難消化性デキストリンを用いる液体培養法を一般的な液体培養法と固体培養法の間隔的な培養法と位置付けて詳細に解析することで、麴菌の液体培養における高効率な物質生産技術の発展に寄与できると考えている。

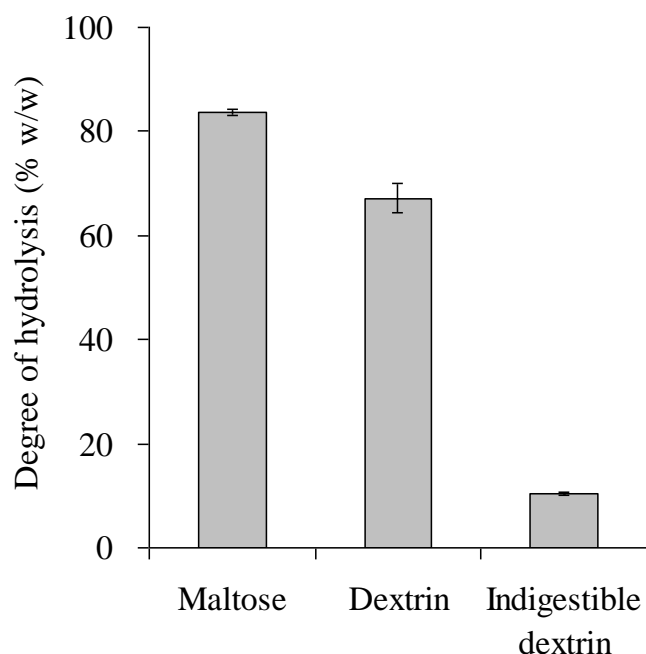
また、難消化性デキストリンを用いる培養法は、麹菌の酵素生産だけでなく、糸状菌による異種タンパク発現生産においても使用できる可能性が高いと考えられる。*A. oryzae* を異種タンパク発現の宿主とする場合は、発現プロモーターとして $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 (*amyB*) やグルコアミラーゼ遺伝子 (*glaA*) が用いられることが多く、デキストリンやデンプンを培地炭素源とすることが効果的である<sup>41)</sup>。難消化性デキストリンを用いる培養においては、*amyB* や *glaA* が高発現している可能性が高いので、結果として異種タンパクの生産性向上が期待できると考えられる。

さらに、難消化性デキストリン回分培養の工業利用における利点が見出された。それは培養における麹菌体量が約 3 分の 1 にまで低下することである。一般的に、糸状菌の培養において菌体量が増え過ぎてしまうと、培養液の見かけ粘度が上昇し、それによって酸素供給能力の低下が起こることが知られている<sup>42)</sup>。好気的な培養において十分な酸素供給は菌体の活性化に大変重要な因子であるといえる<sup>43)</sup>。例えば、溶存酸素濃度を適切なレベルに保つために、流加培養において炭素源の供給速度を調整するなどの手段が取られることもある<sup>44)</sup>。我々の難消化性デキストリンを用いる回分培養では、デキストリンを用いる回分培養に比べて、菌体量を低く抑えることができ、工業的な酵素生産における培養液レオロジーの改善に大きく貢献できると考えられる。

以上のように、酵素生産に関わる「抑制を極力免れながら誘導をかけ続ける」という液体培養の方法論は、*A. oryzae* の液体培養においても難消化性デキストリンを用いることで具現化することができ、デンプン分解酵素の高生産を可能とすることが検証された。

## 第4項 要約

*A. oryzae* の回分式の液体培養において、炭素源として難消化性デキストリンを用いた場合の $\alpha$ -アミラーゼ、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、グルコアミラーゼ生産性について、グルコースやマルトース、デキストリンを用いた培養と比較した。難消化性デキストリンを用いるとデキストリンに比べて、 $\alpha$ -アミラーゼ活性が 3.6 倍、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が 2.7 倍に向上することが確認され、第 1 章 1 節における *A. kawachii* のグルコアミラーゼ生産に対するものと同様の効果が得られた。一方で、*A. oryzae* のグルコアミラーゼ生産については異なる現象が認められ、難消化性デキストリン回分培養でのグルコアミラーゼ活性はデキストリン回分培養の 55 倍に達した。さらに、難消化性デキストリン回分培養において、麹菌体量が約 3 分の 1 にまで低下することが確認され、工業的な酵素生産における培養液レオロジーの改善に大きく貢献できると考えられた。



**Fig. 7 The hydrolysis of indigestible dextrin using Gluc-100, an amylolytic enzyme preparation from *A. oryzae*.**

The hydrolyzing reaction was carried out at 37°C for 6 h under aseptic condition. The degree of hydrolysis was shown by the percentage of the amount of glucose generated by the reaction to the amount of substrate used in the reaction. The error bars are the standard deviation from the mean of three replicates.

**Table 2 Amylolytic enzyme productions in *A. oryzae* RIB40 in submerged batch culture using various carbon sources**

Carbon source	Enzyme activities			Biomass (g DW/l)
	Glucoamylase (mU/ml)	$\alpha$ -Glucosidase (mU/ml)	$\alpha$ -Amylase (U/ml)	
Glucose	1.5 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.2	9.4 $\pm$ 1.0
Maltose	5.7 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.4	9.4 $\pm$ 0.9
Dextrin	5.4 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.4	7.8 $\pm$ 0.3	8.8 $\pm$ 1.2
Indigestible dextrin	301 $\pm$ 12	7.0 $\pm$ 0.5	27.7 $\pm$ 1.9	3.1 $\pm$ 0.2

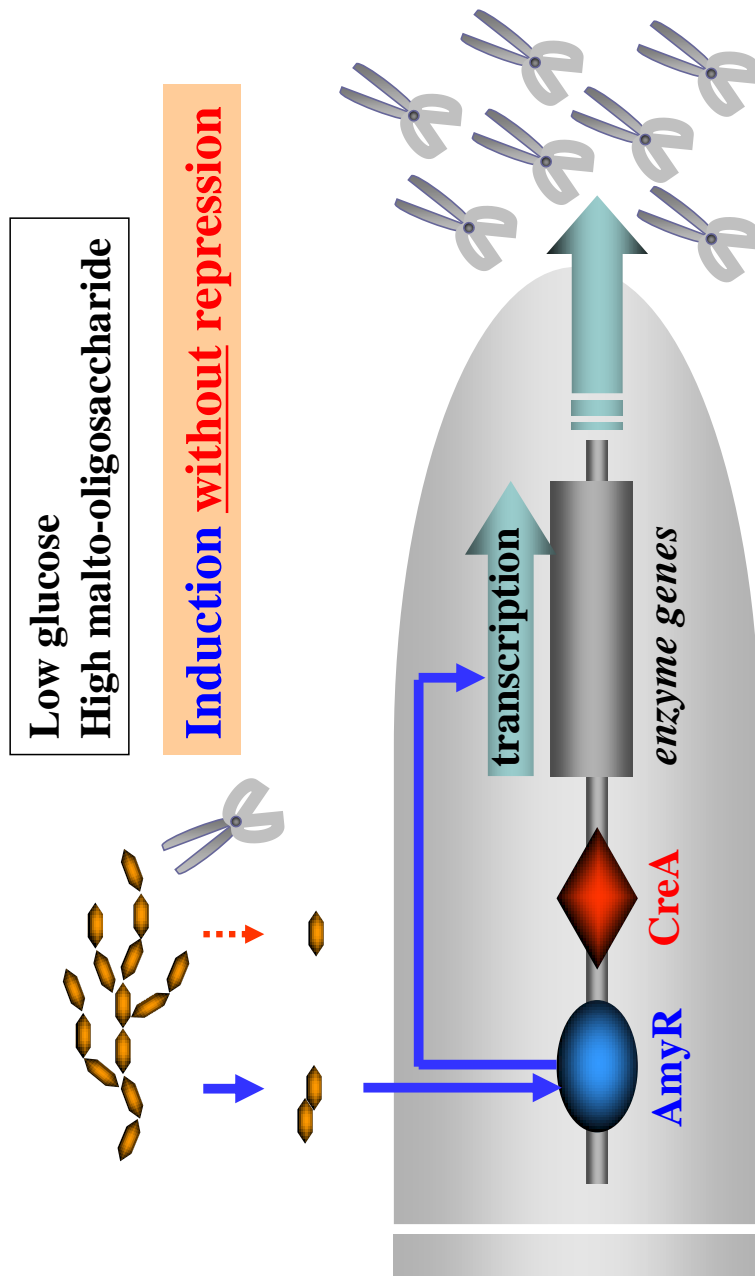


Fig. 8 Estimated mechanisms of hyper enzyme production by using indigestible dextrin.



## 第2章

### 大麦を用いる白麹菌の新規な液体培養法の開発

## 第1項 緒言

清酒や焼酎等の並行複発酵によりデンプン質からアルコールを生成する醸造工程において、酵母へのグルコース供給に影響を与える麹菌のデンプン分解酵素は大変重要である。つまり、焼酎醸造ではグルコアミラーゼや耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼが鍵酵素であるといえる。麹菌の液体培養におけるデンプン分解酵素の生産性は、固体培養に比べて圧倒的に低いため、酒類製造に麹菌の液体培養法が用いられることは無かった。

近年、この課題を解決すべく、多くの研究者で検討が進められてきた。例えば、麹菌の液体培養においてグルコアミラーゼ活性を向上させる方法として、秦ら<sup>45)</sup>は菌糸の生育にストレスを与えながら麹菌を培養する方法を報告している。すなわち、多孔性膜上または空隙を有する包括固定化剤中で培養してグルコアミラーゼをコードする新規遺伝子 *glaB* を発現させて同酵素活性を高めるものであるが、これには特殊な培養装置が必要となる。山中ら<sup>46)</sup>は、焙炒した穀類を麹菌培養液に添加する方法を報告しているが、穀類を焙炒するという新たな工程が加わり、そのための新たな設備も必要となる。また、耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼを高生産させる方法として、ペプトンやクエン酸緩衝液を含む合成培地を用いる方法が検討されているものの、培養時間が100時間以上かかるなど、実際の焼酎醸造に適用するためのハードルは高いといえる<sup>47-49)</sup>。以上のように、酒類製造に使用することができるグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ活性が高い麹菌培養物を簡便にかつ安価に製造する方法が望まれているが、現在までそのような方法は知られていない。

第1章において、難消化性デキストリンを炭素源として用いる麹菌の液体培養法を行うと、培地グルコース濃度を低く維持することが可能となり、グルコアミラーゼ生産の著しい向上が認められた。また、グルコアミラーゼ以外にもデンプン分解に関わる $\alpha$ -グルコシダーゼや $\alpha$ -アミラーゼ等も同様の制御を受けることが確認された。

しかしながら、実際の焼酎醸造においては、酒税法に記載の要件に従って「こうじ」を製造す

ることが必須となる。例えば、酒税法・第1章・第3条・第26項には「こうじ」の定義が記載されており、それによれば、「こうじとは、でんぷん質物その他政令で定める物品にかび類を繁殖させたもので、でんぷん質物を糖化させることができるものをいう」とある。従来の固体培養法で用いられている米や麦といった穀類原料は酒税法上の「でんぷん質物」に相当する。一方、第1章で効果の確認された難消化性デキストリンは「でんぷん質物」ではなく、「でんぷん質物分解物」と解釈される。よって、酒類製造に用いる麹菌液体培養物（液体麹）を完成させるためには、米や麦といった穀類を用いて第1章で提案した新しい液体培養の方法論を具現化する必要がある。また、培地に用いることのできる副原料についても、前述の「その他政令で定める物品」として酒税法及び酒類行政関係法令等解釈通達・第2編・第3条・5項(8)に規定されており、これらを用いて製造することが望まれる。当然、これまで検討されているようなペプトンやクエン酸緩衝液を用いるような合成培地を用いることは難しい。

本章の目的は、新しい液体培養の方法論に基づいて、酒税法に規定された範疇で簡便な培養方法を構築し、焼酎醸造に必須であるグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼを同時に高生産できる製造技術を開発することにある。

## 第2項 材料および方法

### 1. 大麦の搗精および粉碎方法

大麦の搗精にはサタケ製テストミル TM05C を用いた。玄麦 100 g を金剛ロール#30 にて回転数 1150 rpm の条件で搗精した。搗精した大麦の精白歩合は下記の式で表した。

$$\text{精白歩合(\%)} = \text{搗精後大麦の重量 (g)} / 100 \text{ (g)} \times 100$$

大麦の粉碎は、大阪ケミカル製マグナムブレンダーMB-911 を用いた。玄麦 100 g を 2 分間処理した。

### 2. 搗精大麦の染色方法

農林水産省・農業研究センターにて考案された「搗精度評価性能向上のために改良したニュー MG 試薬染色法」にて染色した<sup>50)</sup>。具体的には、染色試薬として、New-MG 原液（和光純薬社製）とメチルアルコールを混合比が 1 : 1 で混合したものを用いた。この染色試薬は、大麦の果皮、種皮部を緑色に、胚乳部をピンク色に染色する。

染色の際は、大麦試料 5 g を 1 回水に浸し、直ちに水切りしたのち、染色試薬 5 ml を加え、2 分間振とうした。これを 5 回エタノール洗浄し、ろ紙の上に並べ、風乾した。

### 3. 大麦の酵素分解性試験

各精白麦（未粉碎品、粉碎品）1 g と水 47.5 ml を 200 ml 容バッフル付三角フラスコに入れ、121°C、15 分間オートクレーブ処理した。酵素溶液として、黄麹菌由来の粉末酵素製剤であるグルク 100（天野エンザイム社製）を用いた。具体的には、グルク 100 を 0.1 g/L で蒸留水に溶解後、孔径 0.22 μm のメンブランフィルター（日本ミリポア社製）を用いて除菌した。酵素溶液 2.5 ml を前述の 200 ml 容バッフル付三角フラスコに無菌的に添加した。37°C、100 rpm で 3 時間振とうし、遠心分離後、上清中のグルコース濃度をグルコース CII-テストワコー（和光純薬製）

により測定した。

#### 4. 菌株

*Aspergillus kawachii* NBRC4308 を用いた。菌株の取り扱い方法は、第 1 章 1 節 2 項-1 に記載と同様の方法による。

#### 5. 培地および培養条件

液体培養における主原料として玄麦（98%精白大麦、オーストラリア産スクーナー種、竹之内穀類産業より入手）を用いた。また、ミネラル分ならびに窒素源を補給する目的で、0.2% (w/v)のリン酸 2 水素カリウム（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、和光純薬製、食品添加物グレード）ならびに 0.3% (w/v)の硝酸カリウム（ $\text{KNO}_3$ 、和光純薬製、食品添加物グレード）を併用した。なお、リン酸 2 水素カリウムならびに硝酸カリウムは、酒税法及び酒類行政関係法令等解釈通達・第 2 編・第 3 条・7 項(2)に記載されており、製品表示することなく酒類製造へ使用することができる。

液体培養は、前培養と本培養からなる 2 ステップの培養とした。培養方法は以下のとおり行った。

(1) 前培養方法： 丸麦（65%精白麦、オーストラリア産スクーナー種、高畑精麦より入手）を 8% (w/v)含む前培養用培地を作製し、121℃で 15 分間オートクレーブ滅菌した後、*A. kawachii* NBRC4308 孢子懸濁液を  $1 \times 10^6$  個/ml-培地になるように植菌した。植菌後、37℃、100 rpm の条件で 24 時間回転振とう培養した。

(2) 本培養方法： 本培養は 500 ml 容三角フラスコスケールで行なった。まず、2% (w/v)玄麦と 0.2% (w/v)の第 1 リン酸カリウムならびに 0.3% (w/v)の硝酸カリウムを含む培地を作製し、121℃で 15 分間オートクレーブ滅菌した後、前記の前培養液を本培養液容量に対して 2% (v/v)植菌した。培養条件は、500 ml 容三角フラスコ培養においては、培地 100 ml を張り込み、

37℃、100 rpm の条件で 48 時間回転振とう培養した。

#### 6. グルコアミラーゼおよび耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ活性測定

グルコアミラーゼ活性は、キッコーマン社製の糖化力分別定量キットを用いて測定した。詳細は第 1 章 1 節 2 項-6(1)に記載の通りである。なお、本法による測定値を国税庁所定分析法<sup>51)</sup>で定められる酵素単位に換算することで定量値とした。具体的にはキットプロトコールに記載の下記の換算式を用いた。

グルコアミラーゼ活性値 (U/ml) =

$$144.6 \times \text{キット法によるグルコアミラーゼ活性値 (U/ml)}$$

耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの酵素活性の測定は、Nagamine ら<sup>28)</sup>の方法を若干改良し、培養物を酸処理することで非耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼを失活させた後、 $\alpha$ -アミラーゼ測定キット(キッコーマン製)を用いて耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼを測定した。より具体的には、培養物を遠心分離し、上清を回収した。回収された上清部分 1 ml に 9 ml の 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 3) を添加し、37℃で 1 時間酸処理を行なった後に、 $\alpha$ -アミラーゼ測定キット (キッコーマン製) を用いて測定した。詳細は第 1 章 2 節 2 項-4 に記載の通りである。なお、本法による測定値を国税庁所定分析法<sup>51)</sup>で定められる酵素単位に換算することで定量値とした。具体的にはキットプロトコールに記載の下記の換算式を用いた。

耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ活性値 (U/ml) =

$$22.2 \times \text{キット法による耐酸性}\alpha\text{-アミラーゼ活性値 (U/ml)}$$

#### 7. グルコース測定方法

第 1 章 1 節 2 項-6(2)に記載の方法と同様に測定した。

#### 8. 定量 PCR による酵素遺伝子発現解析

#### (1) 培養条件

培地の組成は、玄麦 2% (w/v)、硝酸カリウム 0.2% (w/v)、第 1 リン酸カリウム 0.3% (w/v)とした。この培地 100 ml を 500 ml 容三角フラスコに張り込み、121℃で 15 分間オートクレーブ滅菌した。*A. kawachii* NBRC4308 孢子懸濁液を  $1 \times 10^6$  個/ml-培地になるように植菌し、37℃で 18 時間、100 rpm で回転振とう培養した。また、比較対照として、玄麦の代わりに丸麦（65%精白麦）もしくは玄麦・粉碎品を培地に用いた試験を行った。

#### (2) Total RNA 調製

培養終了後の菌体をすばやく回収し、液体窒素存在下で十分に粉碎した。粉碎した麹菌体から、total RNA 抽出キット（RNeasy Plant mini kit、QIAGEN 社製）を用いてプロトコールに従い total RNA を調製した。

#### (2) cDNA 調製

得られた total RNA から、High-capacity cDNA Archive Kit（Applied Biosystems 社製）を用いてプロトコールに従い cDNA を合成した。

#### (3) 定量リアルタイム PCR

得られた cDNA をテンプレートとし、下記の目的酵素遺伝子の塩基配列を基に設計したプライマーを用いた定量リアルタイム PCR を行うことにより、酵素遺伝子の発現量を定量した。定量リアルタイム PCR に用いたプライマーは、Primer Express ソフトウェア（Applied Biosystems 社製）を用いて設計した。具体的なプライマー配列は以下の通りとした。比較定量法内部標準として、ヒストンをコードする *H2A* 遺伝子を用いた。なお、リアルタイム定量 PCR 試薬として SYBR Green PCR Master Mix（Applied Biosystems 社製）を用い、添付のプロトコールに従い PCR 反応およびシグナル検出を行った。なお、PCR 反応およびシグナルの検出には ABI PRISM 7700（Applied Biosystems 社製）を用いた。

#### (4) 使用遺伝子およびプライマー配列

(a) グルコアミラーゼ *gla-1* (GenBank, Accession No.D00427)

フォワードプライマー; 1589-ccagctcgacctatagcagcat

リバースプライマー; 1761-aagtctgatggcgacgagct

このプライマー対は、上記 *gla-1* (GenBank, Accession No.D00427) のうち 1589～1780 番目からなる DNA 断片を増幅するように設計されたものである。

(b) 耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼ *asaA* (GenBank, Accession No.AB008370)

フォワードプライマー; 994-cggcacggcagatgatc

リバースプライマー; 1044-gaatgtacctcatggtcgacgtc

このプライマー対は、上記 *asaA* (GenBank, Accession No.AB008370) のうち 994～1066 番目からなる DNA 断片を増幅するように設計されたものである。

(c) ヒストン *H2A* (GenBank, Accession No. Y15320)

フォワードプライマー; 289-actgaacaagctcctgggtca

リバースプライマー; 322-ccagggtggtgtcctcccc

このプライマー対は、上記 *H2A* (GenBank, Accession No.Y15320) のうち 289～340 番目からなる DNA 断片を増幅するように設計されたものである。



### 第3項 結果および考察

#### 1. 大麦の液体培地中での分解性に対する搗精および粉碎加工の影響

Fig. 9 にサタケ製テストミルを用いた大麦搗精における精白歩合と搗精時間の関係を示した。これによると、精白歩合 90.5%（搗精時間 20 秒）の辺りで大麦の搗精し易さが変化することが示された。一般的に大麦表面にある外皮は総重量の 10%程度であることが知られており、それに照らすと、前述の搗精しやすさの変曲点は、大麦外皮が剥離するタイミングに相当すると考察された。Fig. 10 に精白大麦の New-MG 染色結果を示す。精白歩合 95～90.5%付近で大麦外皮が剥離し、緑色に染色される種皮、果皮、アリューロン層が見え始めていることが確認できた。しかし、この時点ではピンク色に染色される胚乳層の露出は少なかった。さらに搗精を進めた精白歩合 81%くらいから胚乳層が確認されはじめた。Fig. 11 に精白歩合と酵素分解によるグルコース生成の関係を示した。未粉碎大麦の場合、精白歩合 60～75%での生成量は 1300 mg/100 ml 程度であった。精白歩合 75～85%を変曲点とし、精白歩合 85～100%（未精白）にかけて徐々にグルコース生成量が減少した。これは Fig. 9 や Fig. 10 から示される大麦表面の物理的・生化学的な状態が影響していると考察された。さらに、粉碎大麦の場合は、精白歩合 60～100%の範囲でグルコース生成量は 1200～1400 mg/100 ml と大差なく、未粉碎大麦で確認された変曲点や生成量減少などは確認されなかった。以上の結果より、大麦を搗精することにより、大麦の物理的強度もしくはデンプンと糖化酵素の接触頻度が変化する可能性が示唆された。

#### 2. 玄麦を用いる回分培養におけるグルコアミラーゼおよび耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの生産性

Fig. 12 に、各種精白大麦を用いて白麹菌の液体培養を場合の、精白歩合とグルコアミラーゼおよび耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ活性の関係を示す。未粉碎大麦を用いた場合、グルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ共に、精白歩合 75%くらいから酵素生産性の向上が認められ、玄麦のとき最も高い活性を示した。つまり、Fig. 11 で示した酵素分解によるグルコース生成挙動と逆相関の

関係となった。一方で、粉碎大麦を用いた場合は、酵素生産性の向上が認められなかった。このように、玄麦であっても粉碎されると酵素活性が上昇しないことから、未粉碎玄麦で酵素生産性が向上する理由が糠成分などの栄養成分が単純に増強されたためではないことが明らかとなった。Fig. 13 に、玄麦の未粉碎品または粉碎品を用いて培養を行ったときの、培地グルコース濃度の推移を示した。粉碎玄麦を用いた場合、培養 12 時間目の培地グルコース濃度が 6.0 g/l まで上昇したのに対し、未粉碎玄麦では 1.8 g/l であり、低い濃度に維持されていることが分かった。これまで *A. niger* のケモスタット培養によるグルコアミラーゼ生産においてグルコース濃度を 2.0 g/l 以下に制御する方法が好適であると報告されていることから<sup>30,31)</sup>、玄麦を用いる回分培養で確認された低い培地グルコース濃度は、グルコアミラーゼを高生産させるのに十分な濃度であると考えられた。Sudo ら<sup>47-49)</sup>は液体培養における耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの生産様式について、デキストリンを誘導物質として含む合成培地を用いて検討している。その中で、耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼは誘導物質存在下で菌体内グリコーゲン含量が低下した時点から生産が開始されること、そしてグリコーゲン含量が培地グルコース濃度と菌体増殖速度に影響されることを明らかにしている。生産開始以降、耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼはほぼ増殖連動型で生産され、生産開始時点で低下し始めたグリコーゲン含量がその後低いレベルで推移した場合のみ良好に生産されるものの、増加した場合は抑制されることを確認している。また、固体培養においても菌体内グリコーゲン含量が低下した時期から耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ生産が開始されることも明らかにしている。さらに、固体培養が液体培養に比べて耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの生産性が高い理由に関して、固体培養と液体培養における菌体内グリコーゲン低下時期の差異に着目した考察を行っている。つまり、固体培養では培養開始直後に速やかに菌体内グリコーゲン含量が低下するため酵素生産の開始時期が早く、その後菌体が増殖するので高い耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ生産速度に達するのに対し、液体培養では増殖期に遅れて菌体内グリコーゲン含量が低下するため生産速度が上がらないのではないかと考察した。このように従来の液体培養において早期の菌体内グリコーゲン含量の低下が起らない原因は、麹菌が速やかな炭素源枯渇状態に移行しないからではないかと我々は考えてい

る。粉碎玄麦やデンプンを炭素源として用いた場合、これらが酵素分解されて生じたグルコースが培地中に培養の早い段階から蓄積し始め、むしろ菌体内グリコーゲン含量は上昇する傾向にあると推察される。一方で、玄麦を用いた場合は、培地中のグルコース濃度が低く推移するため、麹菌が対数増殖を始める時点で十分なグルコース濃度の状態に達し、前述の Sudo らによって提案された耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの生産条件を十分に満たしている可能性が高いのではないかと考えている。今後、玄麦を用いる培養における菌体内メタボローム解析を進め、グリコーゲンをはじめとする菌体内代謝物と耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ生産の関係を明らかにしていきたい。

### 3. 玄麦を用いる回分培養におけるグルコアミラーゼおよび耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の遺伝子発現

Fig. 14 に玄麦の未粉碎品および粉碎品を用いて培養を行った場合のグルコアミラーゼ遺伝子および耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の発現量を定量リアルタイム PCR により測定した結果を示した。未粉碎玄麦を用いた場合のグルコアミラーゼ遺伝子発現は、粉碎玄麦を用いたときに比べて約 19 倍上昇することが分かった。同様に耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子発現も約 6 倍上昇した。このように未粉碎玄麦を用いる液体培養においては、酵素遺伝子の転写レベルで発現誘導が起こっていることが示された。培養に用いる炭素源の物理的な状態により、麹菌液体培養の酵素遺伝子発現ならびに酵素タンパク生産が顕著な影響を受けるという報告例は無く、非常に興味深い現象であるといえる。

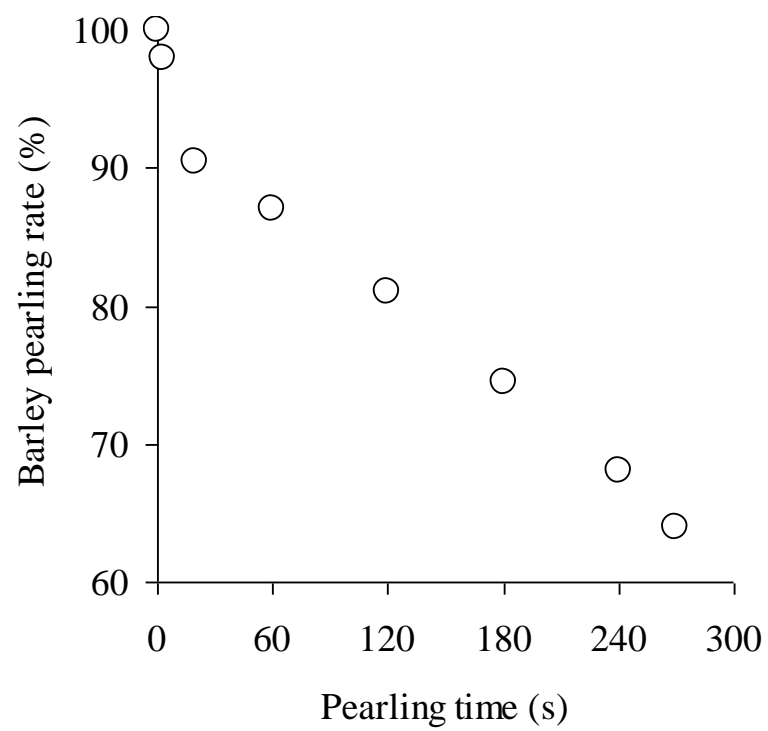
Fig. 15 に玄麦を用いた麹菌の液体培養において推定される酵素高生産の仕組みを概略した。炭素源として培地に用いた大麦デンプン質は大麦の外皮に覆われているため、大麦デンプン質の培地中への過度なデンプン漏出が抑えられながら培養が進行していると思われる。第 1 章で提案した新しい液体培養の方法論に則って考察すると、大麦デンプン質は物理的および酵素化学的に加水分解を受けにくい状態にあり、難消化性デキストリンと近い麹菌酵素分解性を示すと考えられる。その結果、培養中の培地グルコース濃度が低く維持され、酵素生産抑制が解除されたと考

察される。また、大麦デンプン質は培養中に少しずつ培地に漏れ出すため、持続的な発現誘導に寄与している可能性も高い。

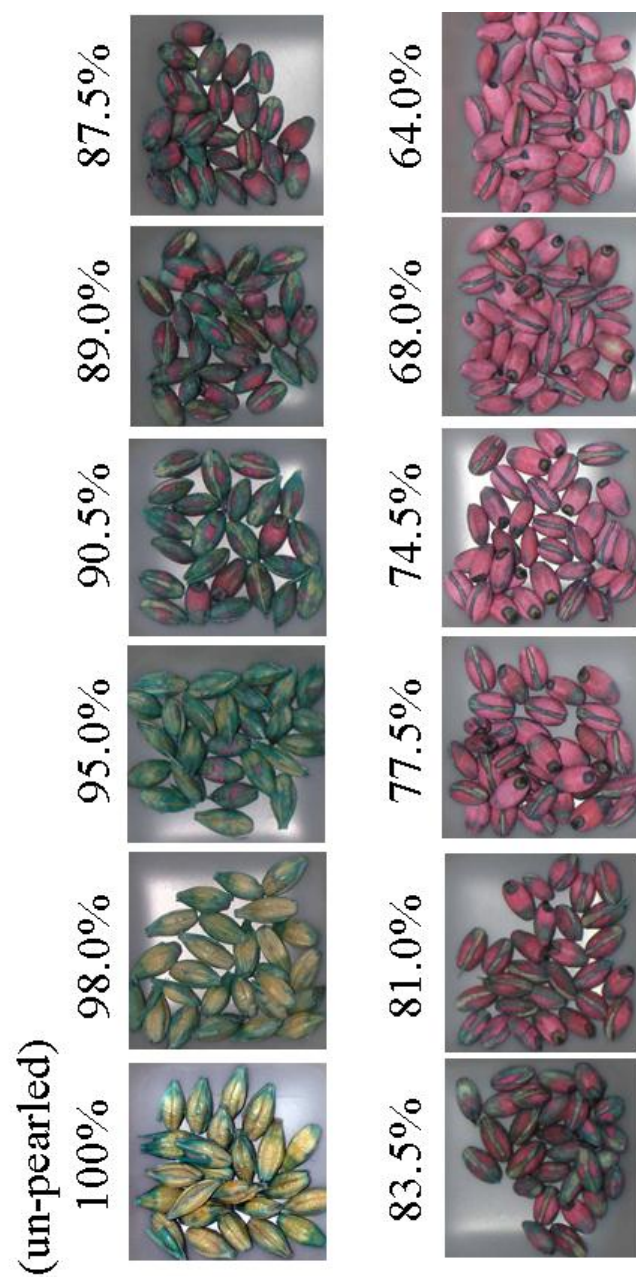
一般的に焼酎の固体麹製造に用いられる 65%精白大麦で液体培養を行っても、麦焼酎製造に必要なグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼを同時に高含有する液体培養物は製造できなかった。培地原料に未粉碎の玄麦を用いることで、初めてグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの同時高生産に成功した。このとき、麹菌へのグルコース供給が緩やかになると共に、酵素生産誘導物質が持続的に供給され、良好な液体培養環境が構築されたと考えられた。未粉碎の玄麦を用いる液体培養法は、難消化性デキストリンを用いる液体培養で確立した新しい方法論を一般的な穀類原料で具現化したものであり、汎用性の高い培養法であると考えている。固体麹が産業上の利用価値が高いのは、数多くの酵素を多量に同時高生産できるということにある。未粉碎玄麦を培養原料と用いる新規な液体培養法により製造される液体麹は、酵素生産性という面において、固体麹に並びうる能力を獲得したと考えている。

## 第4項 要約

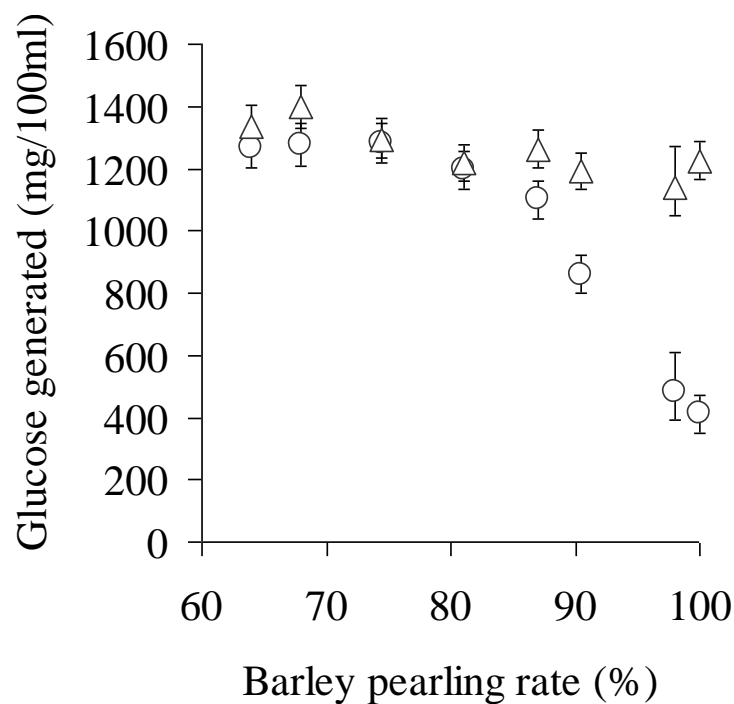
グルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの同時高生産を目的に、大麦を用いる新規な液体培養法を検討した。モデル反応系にて、精白歩合の異なる精白大麦から酵素分解により生成されるグルコース量を測定したところ、精白歩合 85~100%（玄麦）にかけてグルコース生成量が徐々に減少することが分かった。通常焼酎製造に用いられる 65%精白大麦はグルコース生成量が高かった。大麦を搗精することにより、大麦の物理的強度もしくはデンプン層と糖化酵素の接触頻度が変化する可能性が示唆された。続いて、各種精白大麦を用いて白麹菌の液体培養を行い、精白歩合とグルコアミラーゼおよび耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ活性の関係を調べた。未粉碎大麦を用いた場合、グルコアミラーゼおよび耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼともに、精白歩合 75%くらいから酵素生産性の向上が認められ、玄麦のとき最も高い活性を示した。一方で、粉碎大麦を用いた場合は、酵素生産性の向上が認められなかった。玄麦の未粉碎品または粉碎品を用いた培養における培地中のグルコース濃度は、未粉碎玄麦を用いた場合に低く維持され、最大でも 1.8 g/l を超えないことが確認された。また、玄麦を用いた液体培養における白麹菌の遺伝子発現を解析したところ、未粉碎玄麦を用いた場合の遺伝子発現は粉碎玄麦を用いたときに比べて、グルコアミラーゼ遺伝子で約 19 倍、耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子で約 6 倍上昇していることが分かった。以上のように、デンプン分解酵素であるグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼが同時に高生産可能な焼酎白麹菌の液体培養法として、培地原料に未粉碎の玄麦を用いる新規な液体培養法を開発した。このとき、液体培養における培地へのグルコースの供給が緩やかになると共に、必要十分なデンプンを培地へ供給でき、酵素生産にとって良好な液体培養環境を提供できると考えられた。本方法が開発されたことにより、第1章において難消化性デキストリンを用いて初めて達成された新規な液体培養の方法論が、焼酎原料である大麦においても具現化され、麹菌の酵素生産に対して効果的に作用することが示された。



**Fig. 9 Relationship between barley pearling rate and pearling time during the barley pearling by Test-Mill TM05C.**



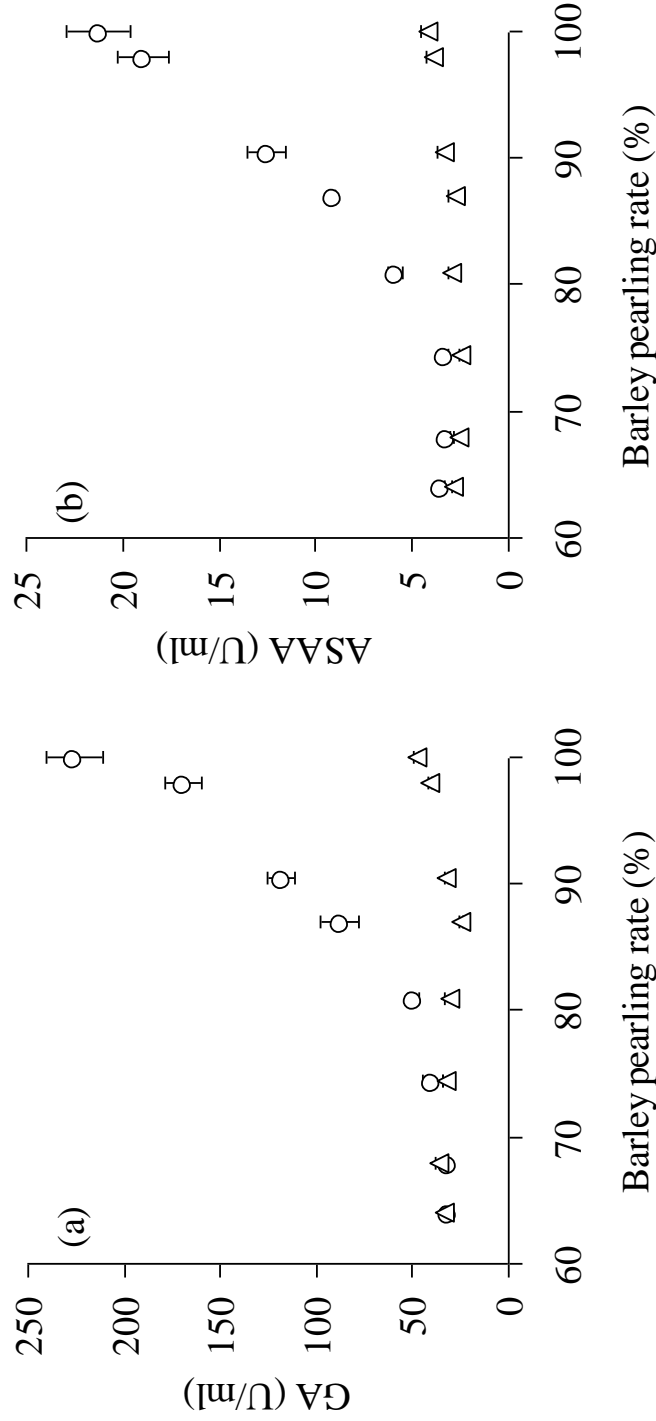
**Fig. 10 Pearled barleys stained by New-MG solution.**



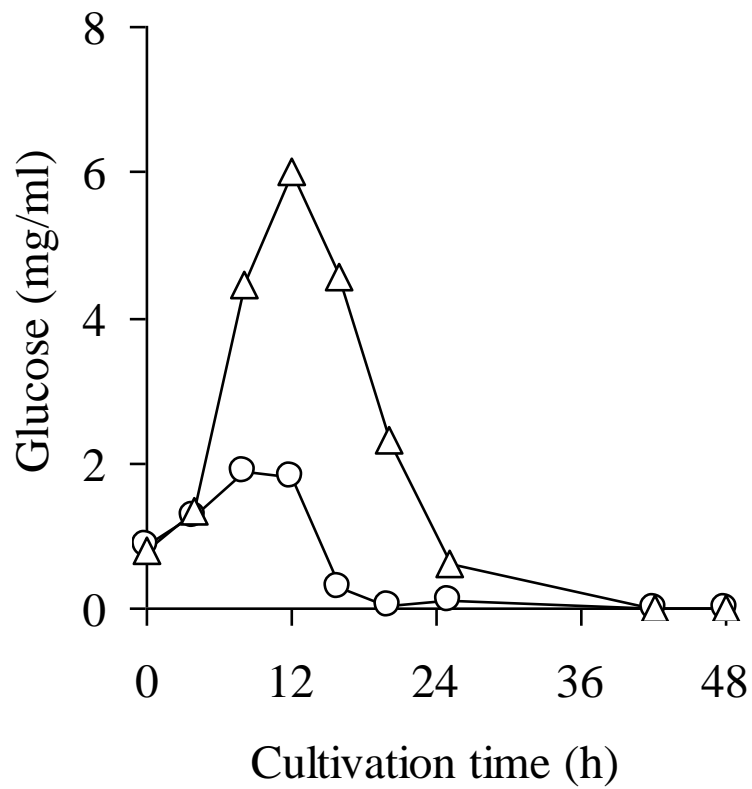
**Fig. 11 The hydrolysis of various pearled barleys using Gluc-100, an amylolytic enzyme preparation.**

The hydrolyzing reaction was carried out at 37°C for 3 h under aseptic condition. The degree of hydrolysis was shown by the amount of glucose generated by the reaction. Symbols: circles, un-milled barley; triangles, milled barley

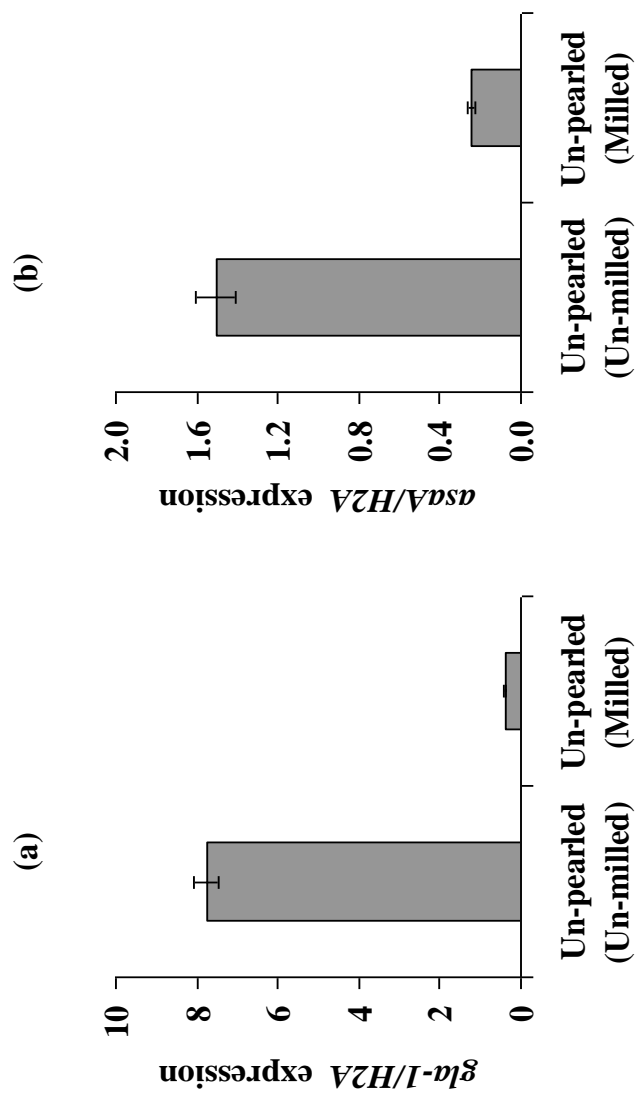




**Fig. 12 Relationships between the glucoamylase activity, the acid-stable  $\alpha$ -amylase and the barley pearling rate in the submerged culture of *A. kawachii*. (a) glucoamylase (GA), (b) acid-stable  $\alpha$ -amylase (ASAA)**  
 Symbols: circles, un-milled barley; triangles, milled barley

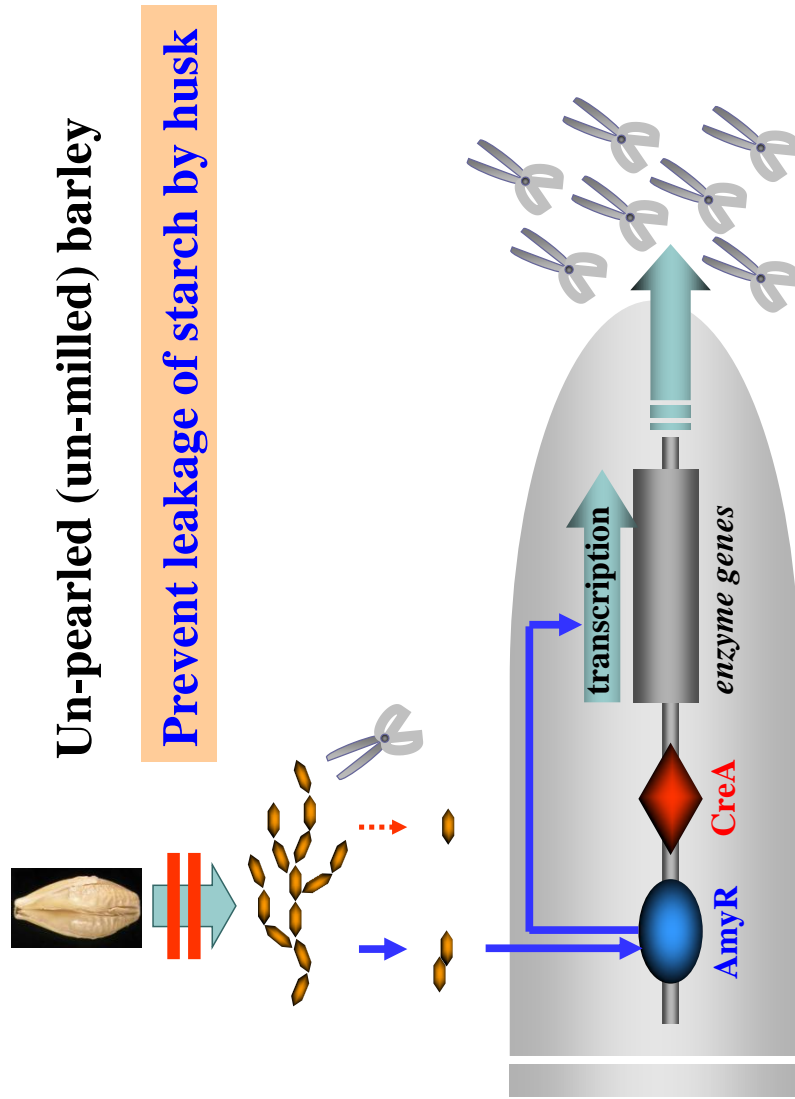


**Fig. 13 Comparison of residual glucose concentrations in supernatant of submerged culture of *A. kawachii* NBRC4308 using crude barley and milled crude barley.**  
 Symbols: circles, un-pearled barley; triangles, milled un-peeled barley.



**Fig. 14 Expression of glucoamylase gene (*gla-I*) and acid-stable  $\alpha$ -amylase gene (*asaA*) in the submerged culture of *A. kawachii* NBRC4308 using un-peeled barleys.**

(a) glucoamylase gene (*gla-I*), (b) acid-stable  $\alpha$ -amylase gene (*asaA*)



**Fig. 15** Estimated mechanisms of hyper enzyme production by using crude barley.

## 第3章

大麦を用いる新規な液体培養物の発酵産業への応用

## 第 1 節

麦焼酎製造における固体麹代替物としての利用

## 第1項 緒言

第2章で、培養原料として表面が外皮で覆われた大麦を含む液体培地で白麹菌を培養して、培養物中にグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼとを同時に生成、蓄積させることが可能な液体培養法を開発した。本技術の主要な展開先として我々が目指している麦焼酎製造において、開発された液体麹を固体麹代替物として利用するためには、グルコアミラーゼや耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ以外の酵素活性についても高めておく必要がある。特に、麦焼酎製造においては、原料である麦に含まれる繊維成分の分解が良好に進まないと、発酵モロミの粘度が上昇し、結果としてアルコール収得量の低下が起こってしまう。また、このような粘度の高いモロミは、のちの蒸留工程において蒸留釜内での焦げ付きにより、製成される麦焼酎の品質が損なわれる等の問題がある。これは実用化の上で大きな課題であり、良好な酒質をもつ麦焼酎を製造するためにも解決しておかなければならない。これまでに、清酒や焼酎製造におけるアルコール収得量の向上を目的に、麹の生産する植物繊維素分解酵素に関する研究が行なわれており、清酒製造の際に植物繊維素分解酵素であるセルロース分解酵素、キシラン分解酵素、ペクチン分解酵素を添加すると、清酒モロミの原料利用率が向上することが報告されている<sup>52, 53)</sup>。また、*Trichoderma viride* のセルロース分解酵素遺伝子を導入した遺伝子組換え焼酎麹菌を造成し、それを用いた焼酎製造で焼酎のアルコール収量が向上することも報告されている<sup>54)</sup>。しかしながら、我々が目的とする新規な液体培養物を用いる焼酎製造工程において、セルラーゼ等の高価な植物繊維素分解酵素剤を添加することはコストアップにつながり好ましく無い。また、遺伝子組換え焼酎麹菌を使用することに対する消費者のコンセンサスを得ることは難しいと考えられる。さらに、実際の焼酎製造に応用するための配慮すべき点として、第2章でふれた酒税法を考慮した原料を用いる培養方法であることが必須である。また、固体麹の製造工程に替わる方法として実用化を目指す場合には、固体麹と同等の42時間以内に各種の酵素活性が焼酎醸造に必要なレベルにまで高まっている必要がある。

そこで本章では、玄麦を用いる白麹菌の液体培養法において、培養 42 時間以内にグルコアミラーゼや耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼが同時生産されるような培地条件の最適化を行った。さらに、最適化された新規な液体培養物を麦焼酎製造における固体麹の代替として用いることができるかをラボスケールで検証した。



## 第2項 材料および方法

### 1. 菌株

麹菌は、*Aspergillus kawachii* NBRC4308 を用いた。酵母は、日本醸造協会より頒布される焼酎酵母 SH-4 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いた。

### 2. 培養方法

(1) 前培養方法; 65%精白大麦 8 g と水 100 ml を 500 ml 容バッフル付三角フラスコに張り込み、121℃、15 分間オートクレーブ滅菌を行ったものを前培養培地とした。この前培養培地に白麹菌 *A. kawachii* NBRC4308 の孢子を  $1 \times 10^6$  個/ml になるように植菌し、37℃、24 時間、100 rpm で回転振とう培養することにより前培養液を得た。

(2) 本培養方法 ; 玄麦を、表 1 に示すように 2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4% (w/v) の割合で、それぞれ硝酸カリウム 0.2% (w/v)、リン酸 2 水素カリウム 0.3% (w/v) を添加した水に加えて、7 種類の液体培地を調製した。

それぞれの液体培地について、調製した液体培地 3000 ml を 5000 ml 容ジャーファーマンター (丸菱バイオエンジニア製) に張り込み、121℃、15 分間オートクレーブ滅菌して本培養培地とした。この本培養培地へ、上記の前培養液を 30 ml 接種した。その後、温度 37℃、攪拌速度 300 rpm、通気量 0.5 vvm にて 42 時間培養を行い、麹菌培養物 (液体麹) を得た。

### 3. 酵素活性の測定方法

#### (1) グルコミラーゼ活性および耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ

グルコアミラーゼ活性および耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ活性は、第 2 章第 2 項-6 に記載の方法により測定した。

## (2) セルラーゼ活性

セルラーゼ活性は、カルボキシメチルセルロース（CMC）を基質とした酵素分解により生成する還元糖を 3,5-ジニトロサリチル酸（DNS）と反応させ、540 nm の吸光度の増加で定量する方法により測定した。より具体的には、1% (w/v) CMC 基質溶液 [シグマ社製 low viscosity を 100 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）に溶解] 1 ml に培養液 1 ml を加えて、40℃にて正確に 10 分間酵素反応を行なわせた後、DNS 試薬（DNS 0.75%、水酸化ナトリウム 1.2%、酒石酸ナトリウムカリウム 4 水和物 22.5%、乳糖 1 水和物 0.3%を含む）4 ml を加えてよく混合し、反応を停止した。反応停止液に含まれる還元糖量を定量するために、反応停止液を沸騰水浴中で 15 分間正確に加熱した。続いて、室温まで冷却した後、540 nm の吸光度を測定した。この測定値を、別途作成したグルコース濃度と 540 nm の吸光度の関係を示す検量線を用いてグルコースに相当する還元糖量として定量した。1 単位のセルラーゼ活性は、1 分間に 1  $\mu$ mol のグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量として表した。1 単位のセルラーゼ活性は、40℃、10 分間の反応条件下で、1 分間に 1  $\mu$ mol のグルコースに相当する還元糖を生成する酵素量として表した。

## (3) キシラナーゼ活性

キシラナーゼ活性は、oat spelts 由来のキシランを基質とした酵素分解により生成した還元糖を DNS と反応させ、540 nm の吸光度の増加で定量した。より具体的には 1%キシラン基質溶液 [シグマ社製 Xylan,from oat spelts を 200 mM 酢酸緩衝液（pH 4.5）に溶解] 1.9 ml に培養液 0.1 ml を加えて、40℃にて正確に 10 分間酵素反応を行なわせた後、DNS 試薬（DNS 0.75%、水酸化ナトリウム 1.2%、酒石酸ナトリウムカリウム 4 水和物 22.5%、乳糖 1 水和物 0.3%を含む）4 ml を加えてよく混合し、反応を停止した。反応停止液に含まれる還元糖量を定量するために、反応停止液を沸騰水浴中で 15 分間正確に加熱した。続いて、室温まで冷却した後、540 nm の吸光度を測定した。この測定値を、別途作成したキシロース濃度と 540 nm の吸光度の関係を示す検量線を用いてキシロースに相当する還元糖量として定量した。1 単位のキシラナーゼ活性は、40℃、10

分間の反応条件下で、1 分間に 1  $\mu\text{mol}$  のキシロースに相当する還元糖を生成する酵素量として表した。

#### 4. 液体麴を用いた焼酎モロミ発酵試験方法 I (300 ml スケール)

玄麦を 2.0% (w/v)、1.7% (w/v)、1.4% (w/v) 加えて調製した液体培地で培養して得られた麴菌培養物（液体麴）を用いてアルコール発酵を行った。液体麴の 70 ml を用いて、総麦 184.6 g の仕込みを行ない、発酵温度を 25°C に保ち、1 次仕込み 5 日間、2 次仕込み 2 日間、3 次仕込み 13 日間の 3 段仕込みを行なった。尚、掛け麦としては、オーストラリア産スターリング種を 65% 精白したものを水で洗浄後、60 分間浸漬、水切り 30 分間行なった後、35 分間蒸きょうしたものをを用いた。また、1 次仕込みにおいて、掛麦 42.4 g を仕込んだ。なお、酵母は YPD 培地で 30°C、48 時間静置培養したものを 50  $\mu\text{l}$  植菌した。

#### 5. 液体麴を用いた焼酎モロミ発酵試験方法 II (4000 ml スケール)

液体麴を用いた焼酎の品質評価、および固体麴焼酎との比較を行うために下記の方法にて 4000 ml スケールの焼酎製造試験を行った。具体的には、液体麴 500 ml を用いて、総麦 1328.6 g の仕込みを行なった。また、発酵温度は 25°C 一定とし、1 次仕込み 5 日間、2 次仕込み 2 日間、3 次仕込み 13 日間の三段仕込みを行なった。尚、掛け麦としては、丸麦を水で洗浄後、45 分間浸漬、水切り 30 分間行なった後、40 分間蒸きょうしたものをを用いた。また、1 次仕込みにおいて、液体麴からの麦持ち込み量 10 g では発酵を行なうのに不十分なため、固体麴仕込みと同量の麦が入るよう掛け麦 302.9 g を仕込んだ。なお、酵母は、YPD 培地で 30°C、48 時間静置培養したものを 500  $\mu\text{l}$  植菌した。また、対照仕込みとして、固体麴の麴麦を用いた焼酎製造を行なった。固体麴の製造方法は、丸麦を洗麦後、45 分間浸漬、30 分間水切り、40 分間蒸煮後、40°C まで放冷し、精白大麦 1 kg あたり 1 g の種麴を植菌し、40°C・相対湿度 95% で 24 時間、35°C・相対湿度 95% で 6 時間、30°C・相対湿度 90% で 18 時間培養した。尚、発酵条件等は上記の仕込

み（液体麴仕込み）と同一とした。

アルコール発酵を終えた焼酎モロミ 3000 ml を小型の蒸留器にて減圧蒸留した。減圧度 -0.08MPa、冷却水温度 15℃の条件にて減圧蒸留し、約 1200 ml の留出アルコールを回収した。回収したアルコールはエタノール濃度 25% (v/v)に和水後、分析および官能評価に供した。

### 第3項 結果および考察

#### 1. 玄麦使用量と各種酵素活性の関係

Table 3 に培養 42 時間後の各種酵素活性値を示した。玄麦使用量 2.0% (w/v) の場合、グルコアミラーゼや耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの生産性は高いが、セルラーゼやキシラナーゼはほとんど生成されなかった。ところが、玄麦使用量を減らすに従い、酵素活性バランスの変化が認められた。セルラーゼ、キシラナーゼ活性は、玄麦使用量 1.8% (w/v) を境に上昇し、1.7% (w/v) で最大になった。セルラーゼやキシラナーゼは、培地中のデンプン質が枯渇した後に、誘導的に生産され始めたと推察された。おそらく、2.0% (w/v) 玄麦培地では、培養 42 時間という限られた培養時間内に、デンプンの枯渇が起こらず、セルラーゼ、キシラナーゼ生産期に入らなかったと考察された。つまり、1.7% (w/v) 玄麦培地は、培養 42 時間以内に各種酵素の生産誘導を可能とする実用的な培地組成であることがわかった。

#### 2. 植物繊維素分解活性が増強された液体麹を用いた焼酎モロミ発酵試験

2.0% (w/v)、1.7% (w/v) および 1.4% (w/v) 玄麦培地により作製した液体麹を用いて、300 ml スケールの焼酎モロミ発酵試験を実施した。Fig. 16a に示すように、各試験区とも発酵経過は順調であったが、各種酵素がバランス良く生成された 1.7% (w/v) 玄麦培地による液体麹を用いた試験区の発酵が特に良好であった。Fig. 16b に発酵終了モロミの粘度を示した。2.0% (w/v) 玄麦培地による液体麹を用いたモロミの粘度は 191 cp であり、やや粘り気のある状態だった。一方、1.7% (w/v) 玄麦培地による液体麹を用いたモロミの粘度は 62 cp であり、サラサラな液性であった。発酵終了モロミのアルコール度数は、2.0% (w/v)、1.7% (w/v) および 1.4% (w/v) 液体麹の順に、18.0% (v/v)、19.2% (v/v) および 18.6% (v/v) であり、1.7% (w/v) 玄麦使用区で良好な結果となった。

### 3. 新規な液体麴を用いる麦焼酎の品質評価

固体麴と液体麴を用いた 4000 ml スケールの発酵試験の経過を Fig. 17 に示した。固体麴を使用した対照仕込みと液体麴を用いた仕込みはほぼ同様の発酵経過を示した。また、Table 4 に示すように、得られた最終モロミのアルコール度数は液体麴 18.9% (v/v)、固体麴 18.6% (v/v) と同等であった。また、減圧蒸留後の焼酎原酒の香気成分を GC にて分析したところ、香気成分に大差がないことも確認された。次に、パネラー8 名による採点法（5 点評価法、1：良～5：悪）により官能評価を行なった。官能評価の結果、液体麴麦焼酎は固体麴麦焼酎に比べ若干すっきりとした酒質ではあるが、同等の品質との評価であった。

以上の結果より、大麦使用量を最適化することで、グルコアミラーゼや耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ以外にも、セルラーゼ、キシラナーゼの同時高生産が可能であることが示された。また、新規に開発された液体麴を用いて、固体麴と同等の麦焼酎製造が可能であることが示された。本方法は、酒税法を考慮した原料にて実施可能であり、かつ固体麴と同等の培養時間で培養が終了することから、既存の固体麴製造工程と代替できる実現可能性の高い方法であるといえる。

我々はさらに検討を進め、本方法を活用した本格麦焼酎である「本格麦焼酎のか・灌水麴仕込み」を 2007 年 7 月に上市した（参考 URL：<http://www.asahibeer.co.jp/news/2007/0626.html>）。

## 第4項 要約

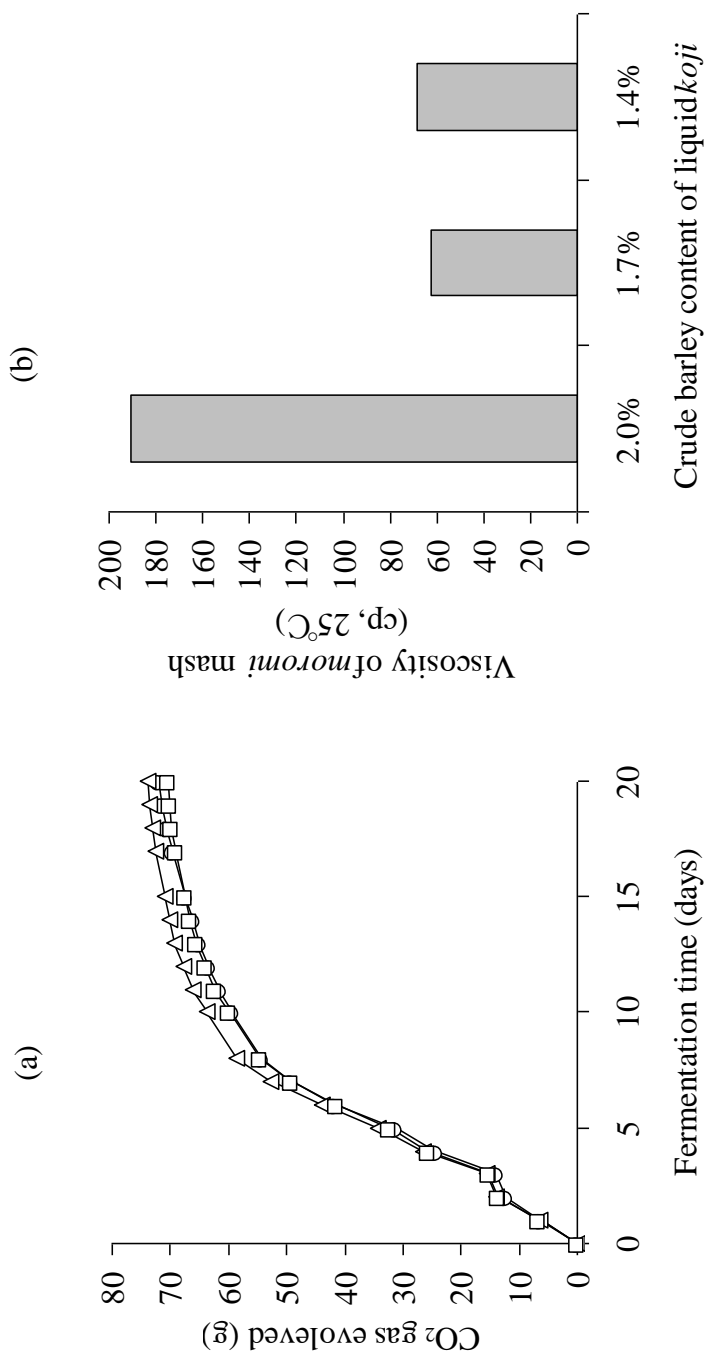
第2章で開発した玄麦を用いる新規な液体培養方法をもとに、酒税法ならびに培養時間の制約を考慮しながら、麦焼酎製造に必須なデンプン分解酵素と植物繊維素分解酵素が同時高生産できる培養方法の開発を試みた。培地への玄麦使用量と各種酵素活性の関係を調べた結果、玄麦使用量を2.0% (w/v)から1.7% (w/v)に減らした場合に、培養42時間以内に、グルコアミラーゼ、耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼの同時高生産が可能となることがわかった。2.0% (w/v)、1.7% (w/v)および1.4% (w/v)玄麦培地を用いて作製した液体麴を用いて、300 ml スケールの焼酎モロミ発酵試験を実施した結果、1.7% (w/v)玄麦培地による液体麴を用いた試験区が、アルコール収得量が多く、かつモロミ粘度も低く、良好であった。さらに、4000 ml スケールにて焼酎仕込み試験を行い、固体麴で作製した麦焼酎との比較を行った結果、両者の焼酎モロミはほぼ同様の発酵経過を示し、麦焼酎の酒質も大差がなかった。以上の結果より、酒税法を考慮した原料にて42時間培養した液体麴を用いて、固体麴と同等の麦焼酎製造が可能であることが示され、実現可能性の高い液体麴製造法を確立することができた。本方法を用いた本格麦焼酎である「本格麦焼酎かのか・灌水麴仕込み」がアサヒビール株式会社より2007年7月に上市された（参考URL：<http://www.asahibeer.co.jp/news/2007/0626.html>）。

**Table 3 Enzymatic activities in *A. kawachii* NBRC4308 in submerged batch culture using various contents of crude barleys.**

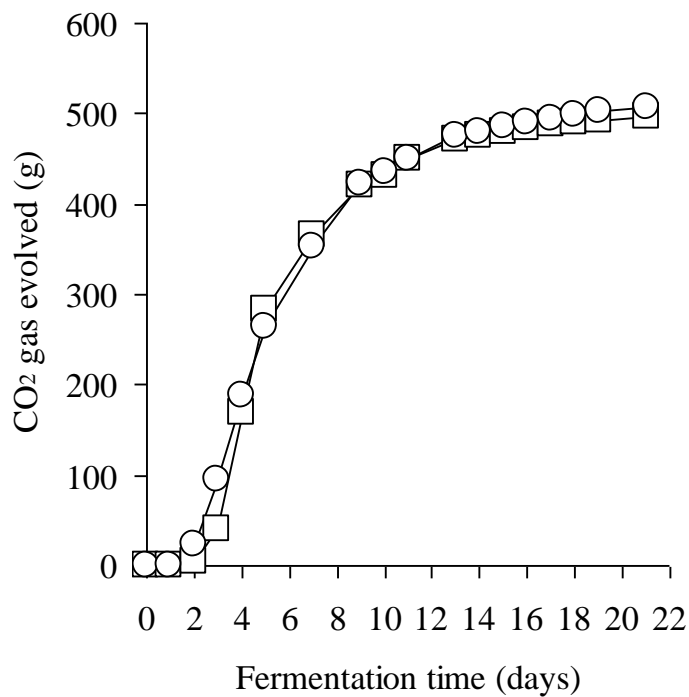
GA, glucoamylase; ASAA, acid-stable  $\alpha$ -amylase;  
CEL, cellulase; XYN, xylanase.

Crude barley content (%)	Enzymatic activities (U/ml)			
	GA	ASAA	CEL	XYN
2.0	212.3	12.3	0.07	3.3
1.9	223.5	11.4	0.08	3.6
1.8	224.5	10.6	0.15	6.4
1.7	213.3	10.2	0.20	8.9
1.6	204.6	9.5	0.17	8.7
1.5	194.5	8.5	0.16	8.0
1.4	187.4	7.4	0.14	7.0





**Fig. 16 Fermentation profiles of barely *shochu moromi* mash using liquid *koji*.** (a) CO<sub>2</sub> gas evolved during *shochu moromi* fermentation using various liquid *koji*. Symbols: circles, liquid *koji* contained 2.0% crude barley; triangles, liquid *koji* contained 1.7% crude barley; squares, liquid *koji* contained 1.4% crude barley. (b) Viscosity of finished *shochu moromi* mash using various liquid *koji*.



**Fig. 17 Comparison of fermentation profiles of *shochu moromi* mash using solid *koji* and liquid *koji*.**

Symbols: circles, solid *koji*; squares, liquid *koji*.

**Table 4 Comparison of the qualities of barley *shochu* prepared by solid *koji* and liquid *koji*.  
*n*-PrOH, *n*-propanol; *i*-BuOH, *i*-butanol; *i*-AmOH, *i*-amyl alcohol;  $\beta$ -PheOH,  $\beta$ -phenylethyl alcohol**

(a) Analysis of the finished <i>shochu moromi</i> mash					
	Alc. (%v/v)	Flavour componets (ppm)			
		<i>n</i> -PrOH	<i>i</i> -BuOH	<i>i</i> -AmOH	$\beta$ -PheOH
Solid <i>koji</i>	18.6	368	315	929	122
Liquid <i>koji</i>	18.9	359	288	740	96

(b) Sensory evaluation of <i>shochu</i> (Alc. 25%)		
Sensory evaluation (n=8)		
	Average point	Coments
Solid <i>koji</i>	3.0	flowery
Liquid <i>koji</i>	3.0	flowery, clearly

## 第2節

キャッサバの無蒸煮同時糖化エタノール発酵における  
複合酵素剤としての利用

## 第1項 緒言

様々なデンプン質原料を用いた発酵法による工業的なバイオエタノール製造法について、数多くの報告がなされている。その中でも、キャッサバは 30% (w/w)以上という高いデンプン含量を有しており、また乾燥キャッサバについては、80% (w/w)の発酵性糖を含んでいるため、安価な発酵原料として近年注目されており、大きい市場が期待できる中国においてもその利用が検討され始めている。中国ではこれまでコーン、小麦、キャッサバがバイオエタノール用穀類として使用されてきたが、2007 年に中国政府は、食との競合の観点から現在稼働中の特定の工場以外でのコーンと小麦からのバイオエタノール製造を禁止した。現在の第 11 期 5 ヶ年計画に含まれる中国の再生可能エネルギー政策では、キャッサバが最も有望なバイオエタノール原料の一つとして考えられている<sup>55)</sup>。

このようなデンプンを含む穀類原料からのエタノール製造における最近の技術開発は、発酵効率を上げ、製造コストを削減するということに主眼が置かれている。その中でも無蒸煮の生デンプンを用いる同時糖化エタノール発酵技術 (Simultaneous Saccharification and Fermentation: SSF) は、大変注目されている。この技術は、従来型の高温糖化を主体とする方法に比べて、設備投資コストの削減や工程の簡略化、発酵収率の向上、発酵期間の短縮、高濃度仕込みへの適用など、多くのメリットを提供できる。この SSF 技術分野において重要な役割を担う酵素について、最近、米国ジェネンコア社から革新的な酵素製剤である STARGEN<sup>TM</sup> 001 が上市され、特に北米におけるコーンからのバイオエタノール製造での使用が広がっている。STARGEN<sup>TM</sup> 001 は 2 種類の酵素を含む酵素製剤である。1 つ目が、*Aspergillus niger* 由来のグルコアミラーゼであり、もう 1 つが、*Trichoderma reesei* にて発現させた *A. kawachii* 由来の耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼである。これらの酵素は協調的に生デンプンに作用しており、グルコアミラーゼが小さく深いピンホールをデンプン顆粒に開け、その穴を耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼが広げていくと報告されている<sup>56)</sup>。しかしながら、キャッサバに含まれるデンプンは、コーンなどに含まれるデンプンに比べて、デンプン

顆粒が大きく、セルロースなどとマトリクスをなす複雑な構造であることから、酵素製剤の多量な添加が必要であることが課題となっている。この問題を解決する目的で STARGEN<sup>TM</sup> 001 を用いる糖化処理方法の最適化検討が現在も精力的に行われている<sup>57, 58)</sup>。

一方で、STARGEN<sup>TM</sup> 001 などの酵素製剤の替わりに、バイオエタノール製造を行う現地で種々の酵素を複合的に含む糸状菌等の培養物を製造する“複合酵素のオンサイト製造プロセス”を活用する動きも出てきている。特に、木質等のセルロースからバイオエタノールを製造する際に必要となるセルラーゼをオンサイト製造する研究は高い注目を集めている。複合酵素オンサイト製造のメリットとして、酵素製剤を製造する際の濃縮にかかるエネルギーやコストが低減できることなどが挙げられ、セルロース系バイオエタノール研究においてはライフサイクルアセスメント (LCA) や経済性の観点から各種実証試験が進められている<sup>59)</sup>。同様に、キャッサバを用いたバイオエタノール製造においても *Penicillium* sp. や *A. niger* などの糸状菌を用いて複合酵素をオンサイト製造し、無蒸煮同時糖化発酵する研究が始められているが、未だフラスコスケール試験に留まっており、工業的な製造に向けてパイロットプラントスケールなどでの実証試験が強く望まれている<sup>60, 61)</sup>。

*A. kawachii* のグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼは、生デンプン吸着能を有していることが既に報告されており、穀類を用いる無蒸煮糖化ならびにエタノール発酵法において有用な酵素であるといえる<sup>25, 62)</sup>。しかしながら、耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼは固体培養特異的に発現する酵素であることがよく知られており<sup>25)</sup>、液体培養での効率的な生産は難しいとされてきた。STARGEN<sup>TM</sup> 001 に含有される耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼは、タンパク分泌能の高い *T. reesei* に遺伝子組換えにより異種タンパク発現させ、液体培養にて生産したものである。よって、非遺伝子組換えの *A. kawachii* のにおける液体培養において耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼを高生産し、無蒸煮同時糖化エタノール発酵に適用した例は未だ報告されていない。第2章で述べたように、我々は玄麦を用いる新規な液体培養法において、デンプンの無蒸煮糖化に必須のグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの同時高生産を可能とした。また、第3章第1節で示したように、産業利用という点で麦

焼酎製造において実用化に成功している。

そこで本節では、玄麦を用いる新規な液体培養法により複合酵素をオンサイトで生産し、それを用いてキャッサバを無蒸煮同時糖化エタノール発酵するプロセスの可能性をパイロットプラントスケールで検証した。

## 第2項 材料および方法

### 1. 実験材料

インドネシア産のキャッサバ粉を篠崎香料（株）より入手した。収穫したキャッサバを天日干しにより水分含量が 10%(w/w)以下になるまで乾燥した後、ハンマーミルにて粉碎し、50-100 メッシュ（30-150  $\mu\text{m}$ ）にて篩にかけることで製造されたキャッサバ粉を用いた。

### 2. 菌株

複合酵素生産は、アサヒビール株式会社保有の白麹菌である *Aspergillus kawachii* FS005 株を用いた。エタノール発酵には、Lesaffre 社製の市販乾燥酵母である Ethanol Red を用いた。

### 3. 麹菌の培養方法（ラボスケール）

1) 前培養方法； 65%精白大麦 8 g と水 100 ml を 500 ml バッフル付三角フラスコに張り込み、121°C、15 分間オートクレーブ滅菌を行って、前培養培地とした。この前培養培地に *A. kawachii* FS005 胞子を  $1 \times 10^5$  個/ml になるように植菌し、37°C、100 rpm で 24 時間振とう培養することにより、前培養液を得た。

2) 本培養方法； 改変 Czapec-Dox 培地（培地 1 L 中に下記物品を含む： 25 g 玄麦、3 g 硝酸ナトリウム、1 g リン酸水素 2 カリウム、0.5 g 硫酸マグネシウム、0.5 g 塩化カリウム、0.01 g 硫酸鉄、5 g 小麦ふすま[昭和産業製]）を用いた。改変 Czapec-Dox 培地 100 ml を 500 ml バッフル付三角フラスコに張り込み、121°C、15 分間オートクレーブ滅菌を行った。前述の前培養液 2 ml を植菌し、37°C、100 rpm で 72 時間振とう培養した。

### 4. キャッサバの無蒸煮糖化試験方法（ラボスケール）

キャッサバの無蒸煮糖化試験は、無蒸煮条件下で発酵原料であるキャッサバ粉と複合酵素を含有する *A. kawachii* FS005 の液体培養液を混合し、反応させることで行った。比較検討のために、



市販酵素剤であるジェネンコア社 STARGEN™ 001 を用いる無蒸煮糖化試験も実施した。具体的な反応溶液の調製および反応は下記の通り行った。まず、基質溶液として 30 g のキャッサバ粉を 140 ml の 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) と混合し、500 ml 容の三角フラスコに張り込んだ。酵素溶液として *A. kawachii* FS005 液体培養液 10 ml もしくは 0.1 ml の STARGEN™ 001 を含む溶液 10 ml を用いた。基質溶液と酵素溶液を混合し、酵素反応を開始した。酵素反応は恒温振とう機 (MIR-220R、サンヨー製) を用いて、50℃、150 rpm の条件で行った。酵素反応開始 1 時間後、反応液 1.5 ml を回収し、3000×g、10 分間遠心分離することで、上清を得た。得られた上清のグルコース濃度と遊離アミノ酸濃度 (Free Amino Nitrogen; FAN) を測定した。

#### 5. キャッサバ粉を用いた無蒸煮同時糖化エタノール発酵試験 (ラボスケール)

ラボスケールでのキャッサバからの無蒸煮同時糖化エタノール発酵試験は下記の通りに行った。まず、30 g のキャッサバ粉と水 140 ml を混合し、500 ml 容の三角フラスコに張り込んだ。さらに、*A. kawachii* FS005 液体培養液 10 ml もしくは 0.1 ml の STARGEN™ 001 を含む溶液 10 ml を添加した。続いて、発酵を阻害する乳酸菌の汚染を防ぐ目的で、90% (w/v) 醸造用乳酸 (武蔵野化学製) 0.15 ml を添加し、混合液の pH を 4.0 付近に調整した。最後に、2 ml の水に懸濁した乾燥酵母 0.2 g 添加することで発酵モロミを調製した。また、必要に応じて、窒素源を補充する目的で 0.15 g の尿素を添加した。発酵試験は、恒温振とう機 (MIR-220R、サンヨー製) を用いて、37℃一定の静置条件にて行った。発酵開始後、18、42、66 および 85 時間目に 3 ml の発酵モロミを回収し、3000×g、10 分間遠心分離することで、発酵モロミ上清を得た。得られた上清のグルコース濃度、キシロース濃度ならびにエタノール濃度を測定した。

#### 6. キャッサバ粉を用いた無蒸煮同時糖化エタノール発酵試験 (パイロットプラントスケール)

パイロットプラントスケールでの *A. kawachii* FS005 の液体培養による複合酵素の製造を下記の通り行った。

1) 前々培養方法； 65%精白大麦 8 g と水 100 ml を 500 ml 容バッフル付三角フラスコに張り込み、121℃、15 分間オートクレーブ滅菌を行って、前培養培地とした。この前培養培地に *A. kawachii* FS005 胞子を  $1 \times 10^5$  個/ml になるように植菌し、37℃、24 時間、100 rpm で振とう培養することにより、前々培養液を得た。

2) 前培養方法； 第 2 項 3-2)に記載の改変 Czapec-Dox 培地を用いた。改変 Czapec-Dox 培地 3000 ml を 5000 ml 容の卓上型ジャーフェーマンター (Bioneer-N500、丸菱バイオエンジニア製) に張り込み、121℃、15 分間オートクレーブ滅菌を行った。前述の前々培養液 60 ml を植菌し、培養温度 37℃、攪拌速度 250 rpm、通気量 3000 ml/min の条件で 24 時間通気攪拌培養した。

3) 本培養方法； 第 2 項 3-2)に記載の改変 Czapec-Dox 培地を用いた。改変 Czapec-Dox 培地 60 L を 90 L 容のジャーフェーマンター (Type KMJ-90MST、MBS 社製) に張り込み、121℃、20 分間高圧蒸気滅菌を行った。前述の前培養液 1.2 L を植菌し、培養温度 37℃、攪拌速度 150 rpm、通気量 60 L/min の条件で 66 時間通気攪拌培養した。同時に 2 セットの培養を行い、トータルで 120 L の *A. kawachii* FS005 培養液を得た。

引き続き、得られた *A. kawachii* FS005 培養液を各種の酵素活性を有する複合酵素液として用い、キャッサバからの無蒸煮同時糖化によるエタノール製造を試みた。具体的には、キャッサバ粉 124 kg を水 731 L および *A. kawachii* FS005 培養液 106 L をミキシングタンクで混合後、90% (w/v)醸造用乳酸 0.98 L を添加して、混合液の pH を 4.0 に調整した。その後、0.8 L の水に懸濁した乾燥酵母 20 g を添加することで 1 次モロミを調製した。1 次発酵は発酵温度 37℃の静置条件にて 36 時間行った。この 1 次モロミに、キャッサバ粉 208 kg および水 560 L を追加添加した。さらに、モロミ pH を 4.0 に調整する目的で、90% (w/v)醸造用乳酸 0.62 L を添加することで 2 次モロミを調製した。2 次発酵は発酵温度 37℃の静置条件にて 114 時間行った。

## 7. 分析方法

### 1) 酵素活性測定方法

グルコミラーゼ活性、酸性カルボキシペプチダーゼ活性、酸性プロテアーゼ活性は、国税庁所定分析法<sup>51)</sup>に従って測定した。グルコアミラーゼ活性は、可溶性デンプンから 40℃で 60 分間に 1mg のブドウ糖を生成する活性を 1 単位と定義した。酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、カルボベンゾキシ-グルタミル-チロシンから 30℃で 60 分間に 1 µg のチロシンを生成する活性を 1 単位と定義した。酸性プロテアーゼ活性は、40℃で 60 分間に 1 µg のチロシン相当量の呈色を示す活性を 1 単位と定義した。

耐酸性α-アミラーゼの酵素活性の測定は、第 2 章第 2 項-6 に記載の方法で測定した。

植物繊維素分解酵素として、セルラーゼ活性とキシラナーゼ活性を測定した。測定方法は、第 3 章第 1 節第 2 項-2, 3 に記載の方法に従った。

## 2) グルコース、キシロースおよびエタノールの分析方法

示差屈折計 (RID-10A、島津製作所製) を用いた高速液体クロマトグラフィーシステムにより分析した。分離カラムとして、Aminex HPX-87H (300 mm×7.8 mm I.D.、Bio-Rad 社製) を用いた。移動相は 5 mM 硫酸を用い、流速 0.6 ml/min、カラム温度 50℃の条件にて分析した。供試サンプルとして、回収した発酵モロミ上清を蒸留水で 10 倍に希釈した後、ポアサイズ 0.45 µm のフィルターユニット (DISMIC-13c、アドバンテック製) にてろ過したものを用いた。サンプルインジェクション量は 10 µl とした。

## 3) 遊離アミノ酸 (FAN) の分析方法

FAN は Lie ら<sup>63)</sup>のニンヒドリン発色法により分析した。

## 4) 酵母数の計測方法

酵母数は、国税庁所定分析法<sup>51)</sup>に記載の方法に従い、トーマ氏血球計数器を用いて測定した。また、0.01% (w/v)メチレンブルー溶液にて死滅酵母を染色することで、生菌のみをカウントした。

#### 5) 細菌数の計測方法

細菌数は、Difco lactobacilli MRS broth (Becton Dickinson 製) に 50 ppm 濃度でシクロヘキシミドを添加した 2 % 寒天培地を用いた。発酵モロミを生理食塩水にて 100 倍に希釈した後、寒天培地に 100  $\mu$ l 塗布し、37℃で 2 日間培養後、生育してきたコロニー数をカウントした。

### 第3項 結果および考察

#### 1. 玄麦を用いる新規な液体培養法における *A. kawachii* FS005 の酵素生産挙動

予備検討結果より、*A. kawachii* FS005 は *A. kawachii* NBRC4308 よりも酵素生産性に優れていることが確認されたので、本試験で使用菌株として採用した。また、本試験は、第2章で配慮したような酒税法上の制約がないため、培地組成ならびに培養時間の変更を行った。予備試験の結果、玄麦と小麦フスマを併用する改変 Czapek-Dox 培地が良好な結果となったので、本培養培地として用い、培養時間については焼酎製造用途の培養 42 時間から 24~30 時間延長し、66~72 時間とした。

第2章にて述べたように、*A. kawachii* NBRC4308 による液体培養において玄麦を培地に用いるとグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼが同時に酵素生産された。本試験においては、*A. kawachii* FS005 株を用い、玄麦もしくは粉碎玄麦を炭素源として液体培養した場合のデンプン分解酵素、タンパク分解酵素、植物繊維素分解酵素の生産挙動を確認した (Fig. 18)。玄麦を培地に用いた場合、*A. kawachii* NBRC4308 で確認されたのと同様に、*A. kawachii* FS005 においてもグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの同時高生産が認められた。また、酸性カルボキシペプチダーゼや酸性プロテアーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼも顕著に生産されることが分かった。これとは対照的に粉碎玄麦を用いると、これら全ての酵素活性が低下し、グルコアミラーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ、キシラナーゼは3分の1程度の活性となった。さらに、耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼや酸性プロテアーゼはほとんど生産されなかった。以上の結果より、*A. kawachii* FS005 による新規な液体培養法によって各種酵素を含有する複合酵素を製造可能なことが明らかとなった。

#### 2. *A. kawachii* FS005 培養液によるキャッサバの無蒸煮糖化 (ラボスケール)

生デンプン分解能を有するグルコアミラーゼや耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼを主体とし、プロテアーゼ

やセルラーゼ活性等を含有する複合酵素組成物が作製できたので、キャッサバの無蒸煮糖化が可能かどうかをラボスケール試験により評価した。比較対照として市販酵素製剤である STARGEN™ 001 を用いた試験も行った。Table 5 は、無蒸煮条件での酵素糖化によるキャッサバからのグルコースと遊離アミノ酸の生成速度を示している。玄麦使用の *A. kawachii* FS005 培養液と STARGEN™ 001 による糖化におけるグルコース生成速度は 37.7 mg/l/h および 42.2 mg/l/h であった。一方で、粉碎玄麦使用の *A. kawachii* FS005 培養液では 7.6 mg/l/h となり、玄麦使用の場合の 5 分の 1 程度にまで低下した。Fig. 18 に示した通り、粉碎玄麦を使用したときのグルコアミラーゼ活性は、玄麦した場合の 3 分の 1 程度であり、耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼがほとんど検出されなかった。つまり、*A. kawachii* FS005 培養液を用いた無蒸煮糖化におけるグルコース生成には、グルコアミラーゼが主体となり糖化を進め、そこに耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼが補助的に作用していることが示唆された。このようなグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの協調的な作用は STARGEN™ 001 において同様であることが Shariffa ら<sup>56)</sup>により報告されている。今回行った試験条件において、我々の *A. kawachii* FS005 培養物も STARGEN™ 001 と同等の糖化性能を有していることが示された。

玄麦を用いた *A. kawachii* FS005 培養液、粉碎大麦を用いた *A. kawachii* FS005 培養液ならびに STARGEN™ 001 によるキャッサバの無蒸煮糖化における遊離アミノ酸の生成速度は、各々、118.7 mg/l/h、48.6 mg/l/h ならびに 58.1 mg/l/h であった。STARGEN™ 001 はグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼを主体とする酵素製剤であり、その他の酵素活性をほとんど含有していないと思われる。そのため、STARGEN™ 001 を用いる穀類の無蒸煮糖化においては、*A. niger* 由来の酸性プロテアーゼを併用する方が効果的であると報告されている<sup>64, 65)</sup>。玄麦を用いた *A. kawachii* FS005 培養液は、酸性プロテアーゼや酸性カルボキシペプチダーゼ活性を有しており、これがキャッサバの無蒸煮糖化において遊離アミノ酸生成に寄与していると推察された。

以上結果より、*A. kawachii* FS005 培養液は、キャッサバの無蒸煮糖化条件において、STARGEN™ 001 と同等の糖化性能を持ち、STARGEN™ 001 よりも高いアミノ酸生成能を有す

る複合酵素剤として十分に利用できることが明らかとなった。

### 3. *A. kawachii* FS005 培養液によるキャッサバの無蒸煮糖化同時エタノール発酵 (ラボスケール)

続いて、キャッサバ固形分 18.2% (w/v)を含むモロミ 165 ml の試験系にて、キャッサバの無蒸煮同時糖化エタノール発酵の試験を行った。前述の糖化試験において、キャッサバ重量に対して、*A. kawachii* FS005 培養液を 33% (v/w)、STARGEN™ 001 を 0.33% (v/w)用いたとき、ほぼ同等のグルコース生成速度が得られたので、本試験においても、この酵素使用比率を採用した。Fig. 19a にエタノール生成の経時変化を示した。*A. kawachii* FS005 培養液と STARGEN™ 001 を比較すると、糖化速度が同等であるにもかかわらず、STARGEN™ 001 を用いたモロミの発酵が緩慢であった。このとき Fig. 19b に示すように、STARGEN™ 001 を用いたモロミにおいては、エタノール生成の不足に見合うグルコースが検出されており、同時糖化発酵が順調に進んでいないことが明らかとなった。エタノール発酵 85 時間目での発酵歩合は、*A. kawachii* FS005 培養液を用いたモロミが 92.3%であったのに対し、STARGEN™ 001 を用いたモロミでは 84.6%と低調であった (Table 6)。一方で、STARGEN™ 001 を用いたモロミに窒素源として 0.1% (w/v)の尿素を添加した試験区においては、発酵性が顕著に回復し、発酵歩合は 89.7%となった (Fig 19a)。キャッサバはタンパク含量が少なく、かつ分解され難いために、酵母の生育および発酵を健全に保つ目的で窒素源が補助的に添加されることが多い<sup>60)</sup>。*A. kawachii* FS005 培養液は、プロテアーゼ等の酵素を複合的に含有しているので、糖化工程において同時に遊離アミノ酸も生成しやすく、そのために窒素源の補填なしに健全なエタノール発酵が達成できたと推察された。

Rattanachomsri ら<sup>61)</sup>は、*A. niger* BCC17849 液体培養液由来の複合酵素を用いてキャッサバパルプからのラボスケールでのエタノール発酵について報告している。*A. niger* BCC17849 液体培養液由来の複合酵素は、セルラーゼやキシラナーゼ、ペクチナーゼといった酵素活性を有しており、これらが複雑な繊維組成のキャッサバ組織からデンプン顆粒を効率的にリリースし、デンプン分解酵素の働きを補助することが示されている。Fig. 19c に示すように、*A. kawachii* FS005 培養液

を用いたモロミにおいては、STARGEN™ 001 では検出されないキシロースの生成が確認された。Fig. 18e や Fig. 18f で示したように、*A. kawachii* FS005 培養液はセルラーゼ活性やキシラナーゼ活性を有している。これらの酵素が協調的に作用して、デンプン顆粒と複雑に絡んだ繊維組織からキシロースを生成するとともに、繊維構造をほぐしたと推察された。*A. kawachii* FS005 培養液を用いたモロミの発酵歩合が STARGEN™ 001 を用いたモロミよりも高いのは、このような複雑な構造のデンプン質を有効に利用できたためと考察された。今後、正確なグルコース収率やキシロース収率を確認することで、複合酵素を用いたキャッサバの無蒸煮糖化におけるセルラーゼやキシラナーゼ等の役割を明らかにし、効率的な糖化工程の構築に繋がると考えられる。

近年、デンプン質原料からのエタノール製造について、高濃度仕込みに関する研究が注目を集めている。多くのデンプン質原料において高濃度仕込みを行う場合、モロミ粘度上昇という問題を避けて通れない。この問題解決手段として、セルラーゼ、キシラナーゼ、アラビナーゼ、ペクチナーゼ等の繊維素分解酵素を併用することが行われている<sup>67)</sup>。今後、キャッサバ高濃度仕込み系において *A. kawachii* FS005 培養液の有効性を確認していきたい。

#### 4. *A. kawachii* FS005 培養液によるキャッサバの無蒸煮糖化同時エタノール発酵の工業化に関する実現可能性の検討（パイロットプラントスケール）

これまでに糸状菌培養物を複合酵素とするキャッサバの無蒸煮糖化同時エタノール発酵に関してはラボスケールでの報告があるのみで、工業化に向けた実証試験報告例はない<sup>53, 54)</sup>。そこで本試験において、Fig. 20 に示すようなパイロットプラントスケールでの実証試験を行った。具体的には、90 L 容ジャーファーマンターでの *A. kawachii* FS005 によるオンサイト複合酵素生産工程（Fig. 20a）とキャッサバ粉と水を 500 L 容の混合タンクで混ぜた後、3000 L 容量のシリンドロコニカルタンクで行う無蒸煮同時糖化エタノール発酵工程（Fig. 20b）からなる。

まず、*A. kawachii* FS005 による液体培養を行ったところ、培養 66 時間目の酵素活性は、グルコアミラーゼ 144 U/ml、耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼ 36 U/ml、酸性カルボキシペプチダーゼ 3974 U/ml、



酸性プロテアーゼ 13277 U/ml、セルラーゼ 0.42 U/ml、キシラナーゼ 10.5 U/ml であった。さらに、キャッサバに対する無蒸煮糖化性能を評価したところ、グルコース生成速度 41.4 mg/l/h、FAN 生成速度 135.5 mg/l/h であった。これらの結果は、第 3 項 1 および 2 で行ったラボスケールで行った試験結果と比較しても同等以上であったので、スケールアップは問題無く行うことができた と判断した。よって、この *A. kawachii* FS005 の液体培養物を濃縮等の処理を行うことなく、オンサイト製造した複合酵素剤として、直ちに無蒸煮同時糖化エタノール発酵工程に使用した。

続いて、キャッサバの無蒸煮同時糖化エタノール発酵を行うための仕込み作業を行った。大規模スケールで無蒸煮同時糖化エタノール発酵を行う上でクリアしなくてはならない技術的な課題の一つとして、雑菌汚染によるエタノール発酵不良が挙げられる。我々が予備的に行った試験においても、*Lactobacillus* 属乳酸菌の汚染による著しい発酵停滞と収率低下が確認された（データ示さず）。無蒸煮同時糖化エタノール発酵は、非加熱の発酵原料を用いるため、原料に付着する各種微生物がモロミに持ち込まれることは回避しがたい。また、発酵温度 37℃は乳酸菌の至適増殖温度でもあるため、仕込み直後の微生物叢において、エタノール発酵酵母をいかに迅速に優占種とできるかが鍵となる。本研究においては、このような乳酸菌の汚染を防ぐ目的で、モロミの pH を 4 以下で管理する 2 段仕込み法を採用することとした。1 次仕込みおよび発酵工程においてエタノール発酵酵母の増殖を促し、それに続く 2 次仕込みおよび発酵工程において健全に増殖した酵母により効率的にエタノールが生成されるような発酵管理をおこなった。その結果、1 次仕込み直後において  $5 \times 10^5$  cells/ml であった初発酵母数は、1 次発酵 36 時間後には、 $9 \times 10^7$  cells/ml にまで増加した。一方で、乳酸菌数は、初発  $5 \times 10^4$  cells/ml であったにも関わらず、それ以降は  $1 \times 10^5$  cells/ml に増殖を抑えることができた。これは、1 次仕込みにおいて対モロミ 0.1% (v/v) 添加された醸造用乳酸の効果により、モロミ pH を 3.2~3.6 で制御できたことに起因すると考えられる。

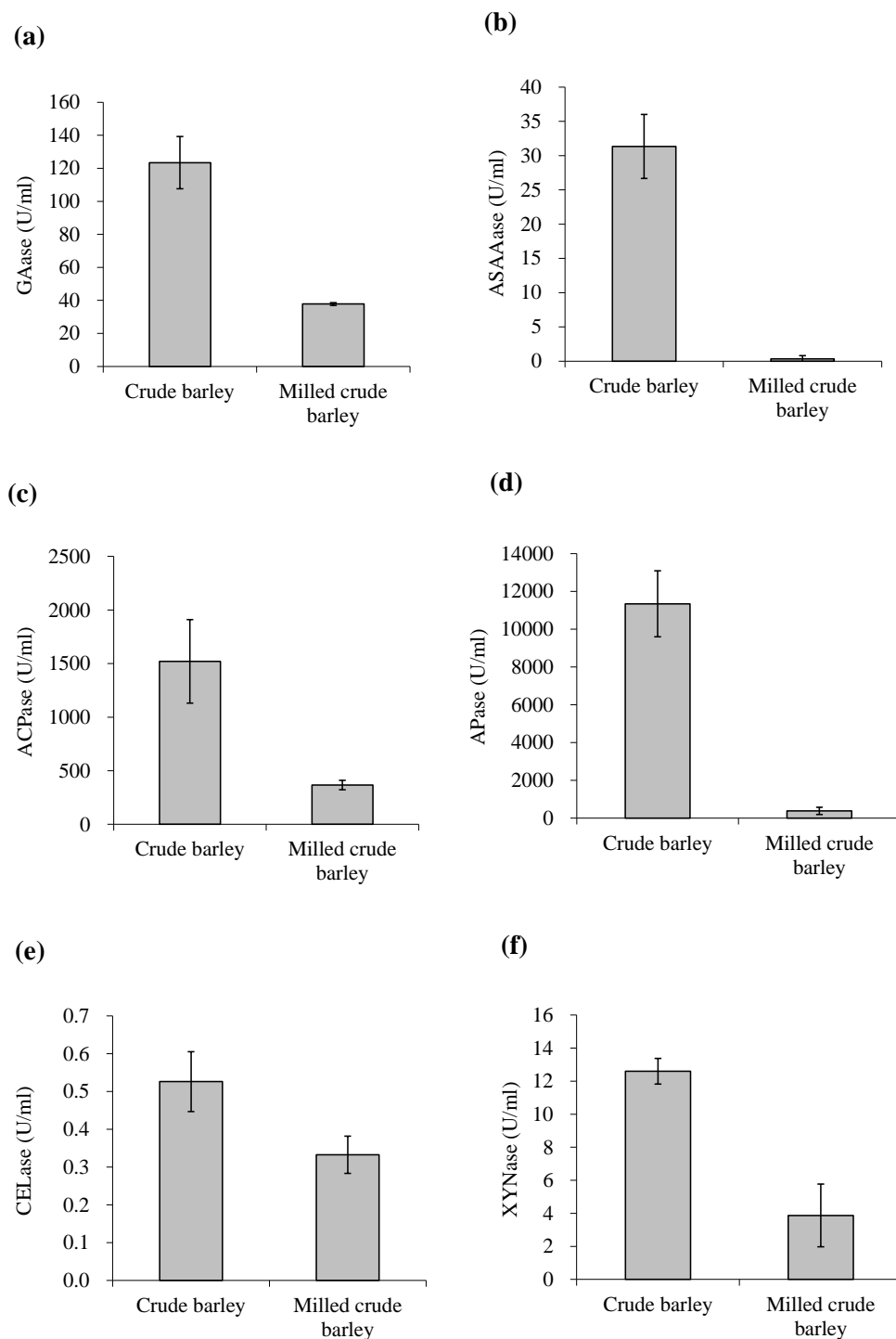
Fig. 21 にエタノールの主発酵工程である 2 次仕込み以後のモロミ発酵挙動について示した。引き続き、モロミ pH を 4 以下に保ったことで、乳酸菌数は酵母数の 1000 分の 1 程度に抑えな

がら発酵を進めることができた。その結果、2 次仕込み後 114 時間で、キャッサバ固形分 20.6% (w/v) のモロミ 1612 L において 10.3% (v/v) のエタノールを得ることができた。発酵歩合は理論収率の 92.7% となった。

このように、パイロットプラントスケールにおいてオンサイト製造した *A. kawachii* 液体培養物を複合酵素剤として用いるキャッサバの無蒸煮同時糖化エタノール発酵に成功した。複合酵素を含む *A. kawachii* 液体培養物は、キャッサバに限らず、デンプン質を含むさまざまな穀類の無蒸煮糖化に有効であると考えられる。今後、さらに大規模な工業スケールでの製造を実現するために、*A. kawachii* の液体培養条件や無蒸煮同時糖化エタノール発酵工程の最適化等を行うとともに、経済性や LCA の観点から、本製法を評価していくことが必要であると考えている。

## 第4項 要約

*A. kawachii* が生産するグルコアミラーゼと耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼの持つ生デンプン分解能を最大限に活用すべく、新規に開発した液体培養物を複合酵素剤としてキャッサバの無蒸煮同時糖化エタノール発酵へ応用することを試みた。まず、*A. kawachii* FS005 を炭素源として玄麦を含む改変 Czapek-Dox 培地にて液体培養し、各種酵素生産性を確認した。玄麦を用いた場合、*A. kawachii* NBRC4308 で確認されたのと同様に、*A. kawachii* FS005 液体培養においてもグルコアミラーゼと耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼの同時高生産が確認された。さらに、酸性カルボキシペプチダーゼや酸性プロテアーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼも顕著に生産されることが分かった。続いて、これらの液体培養物を用いてキャッサバの無蒸煮糖化が可能かどうかをラボスケール試験により評価した。比較対照として市販酵素製剤である STARGEN<sup>TM</sup> 001 を用いた試験も行った。玄麦使用の *A. kawachii* FS005 培養液と STARGEN<sup>TM</sup> 001 による糖化におけるグルコース生成速度は同等であったが、粉碎玄麦使用の *A. kawachii* FS005 培養液では、玄麦使用の場合の 5 分の 1 程度にまで低下した。また、玄麦を用いた *A. kawachii* FS005 培養液によるキャッサバの無蒸煮糖化における遊離アミノ酸の生成速度は、STARGEN<sup>TM</sup> 001 や粉碎玄麦使用の *A. kawachii* FS005 培養液に比べて 2 倍程度高かった。次に、モロミ 165 ml のフラスコスケールにて、キャッサバの無蒸煮同時糖化エタノール発酵の試験を行ったところ、玄麦を用いた *A. kawachii* FS005 培養液による発酵終了モロミの発酵歩合は 92.3% と良好であった。最後に、工業化の実現可能性を検討するために、パイロットプラントスケールでの実証試験を行った。その結果、*A. kawachii* FS005 培養液 106 L およびキャッサバ粉 332 kg を含むモロミ 1612 L において、10.3% (v/v) のエタノールを収得し、発酵歩合は 92.7% を達成した。これまでに糸状菌培養物を複合酵素とするキャッサバの無蒸煮糖化同時エタノール発酵に関してはラボスケールでの報告のみであったため、本法が工業化に向け実現可能性の高い製造方法であることが実証された。



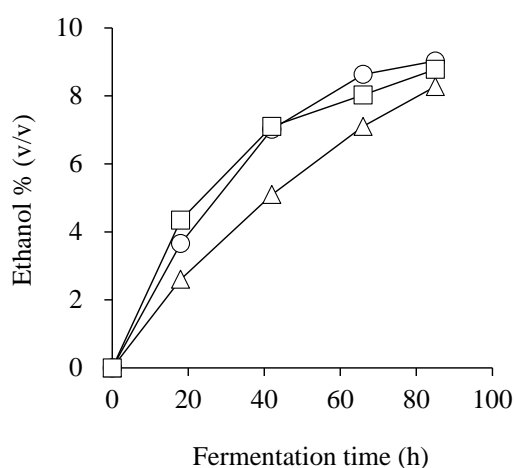
**Fig. 18 Enzyme activities in the culture broth of *A. kawachii* FS005 grown on crude barley or milled crude barley.**

(a) glucoamylase; (b) acid-stable  $\alpha$ -amylase; (c) acid carboxypeptidase; (d) acid protease; (e) cellulase; (f) xylanase. Values are means  $\pm$  S.D from three replications.

**Table 5 Glucose and free amino nitrogen (FAN) production during enzymatic hydrolysis of raw cassava flour using *A. kawachii* FS005 culture broth and a commercial enzyme, STARGEN™ 001.**  
 Saccharification in the absence of enzyme addition is indicated as (—). Values are means  $\pm$  S.D from three replications.

	Production rate (mg/L/h)	
	Glucose	FAN
—	2.8 $\pm$ 0.3	28.7 $\pm$ 7.8
STARGEN™ 001	42.2 $\pm$ 1.7	58.1 $\pm$ 17.7
Crude barley-grown <i>A. kawachii</i> culture broth	37.7 $\pm$ 3.2	118.7 $\pm$ 19.6
Milled crude barley-grown <i>A. kawachii</i> culture broth	7.6 $\pm$ 1.3	48.6 $\pm$ 6.7

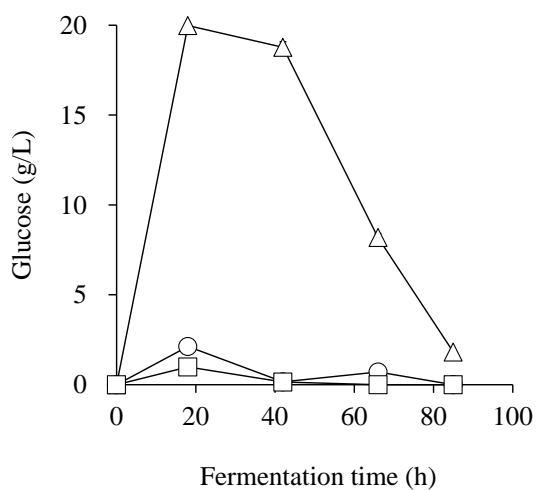
(a)



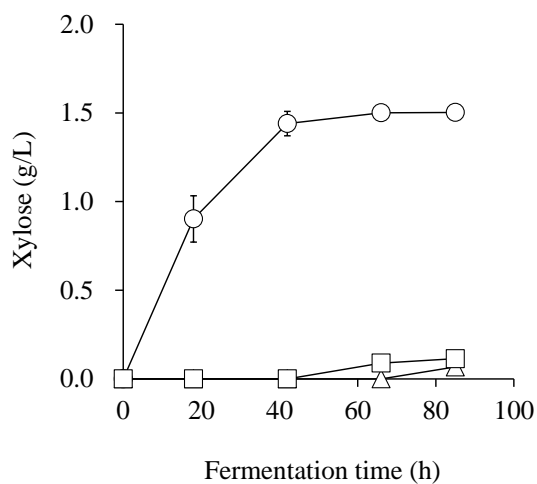
**Fig. 19 Fermentation profiles for SSF of raw cassava flour.**

(a) ethanol; (b) glucose; (c) xylose  
Symbols: circles, multi-activity enzyme preparation from *A. kawachii* FS005; triangles, STARGENT<sup>TM</sup> 001; squares, STARGENT<sup>TM</sup> 001 supplemented with 0.1% (w/v) urea. Values are means  $\pm$  S.D from three replications.

(b)

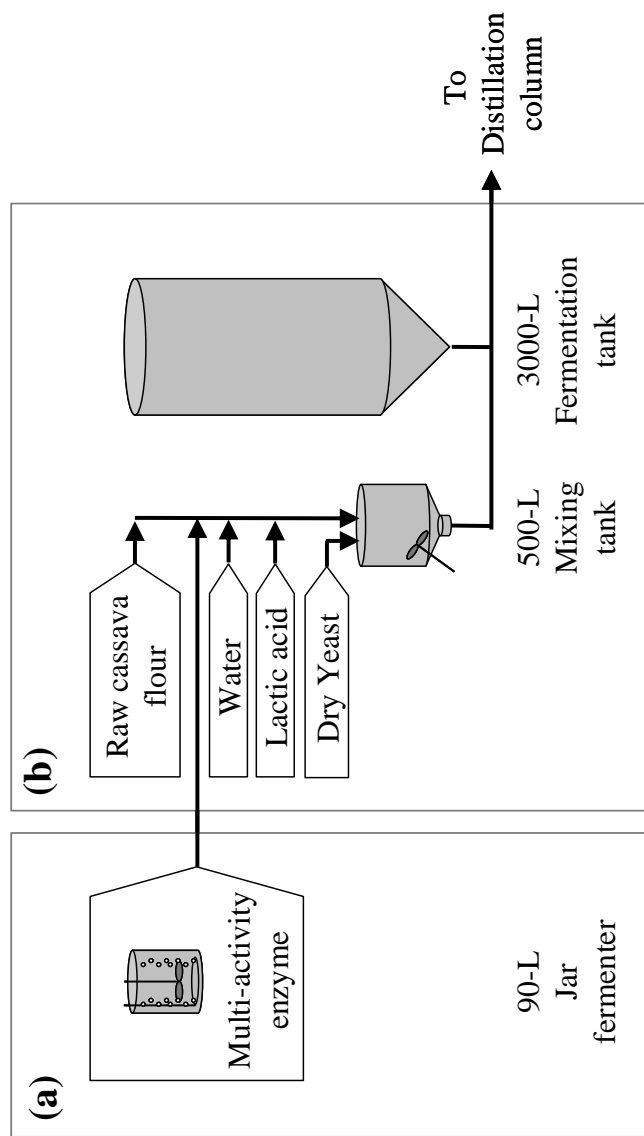


(c)



**Table 6 Ethanol yields during SSF processing of raw cassava flour using *A. kawachii* FS005 culture broth as a multi-activity enzyme preparation.**

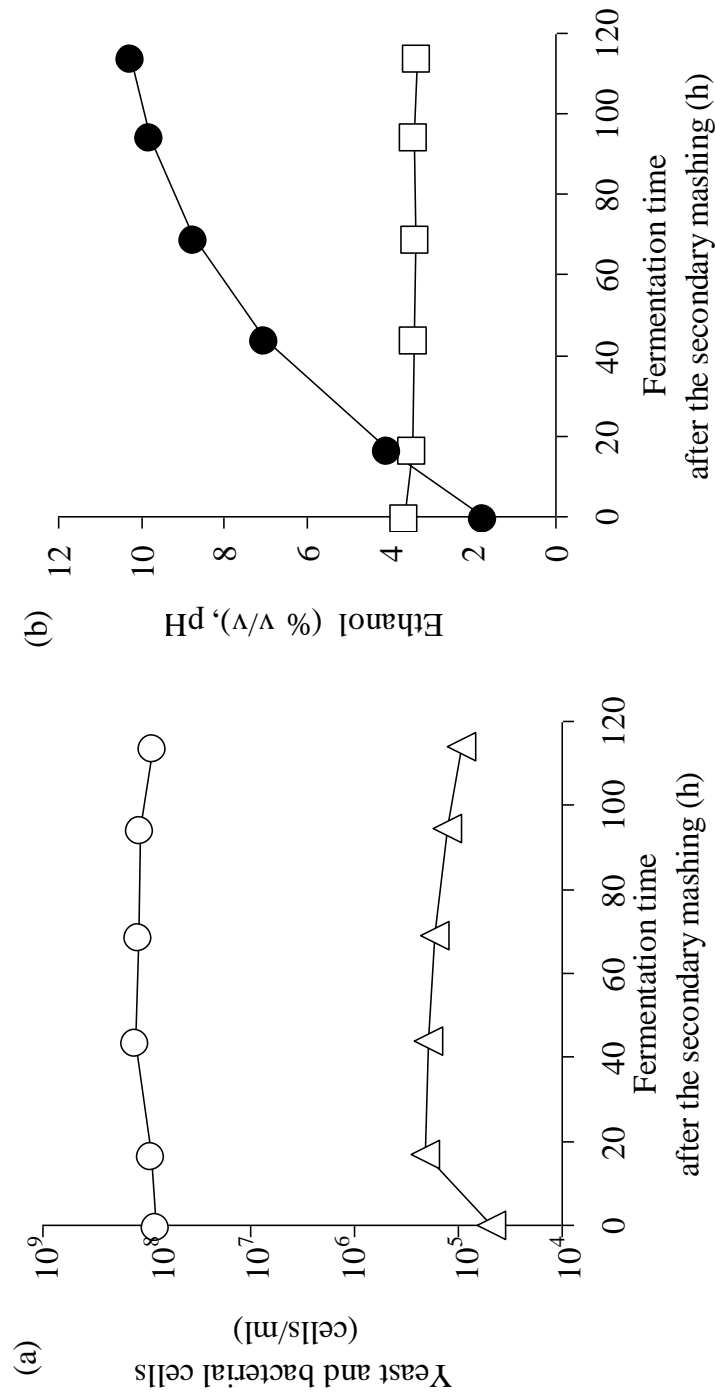
	Ethanol % (v/v)	Fermentation efficiency (% theor.)
STARGEN™ 001	8.28±0.04	84.6±0.10
STARGEN™ 001 with urea	8.78±0.10	89.7±0.26
Multi-activity enzyme preparation from <i>A. kawachii</i>	9.03±0.21	92.3±0.55



**Fig. 20 Schematic of SSF processing of raw cassava flour to ethanol using a multi-activity enzyme preparation from *A. kawachii* on a pilot plant scale.**

(a) Production process for the multi-activity enzyme preparation, (b) SSF process for raw cassava flour.





**Fig. 21 Fermentation profiles of raw cassava flour subjected to SSF processing to ethanol using a multi-activity enzyme preparation from *A. kawachii* FS005 on a pilot plant scale.**

(a) Viable yeast and bacteria; (b) Ethanol concentration and pH of the secondary mash; Symbols: open circles, viable yeast; open triangles, viable bacteria; open squares, pH of fermenting mash; closed circles, ethanol in fermenting mash.

## 総括

麹菌の液体培養法は、酵素生産性が低いという理由から酒類の大規模製造に実用化されてこなかった。本論文は、麹菌の液体培養法における各種酵素の高生産を目的に、麹菌の液体培養の新しい方法論を提案し、それに基づいた培養技術を開発した内容についてまとめたものである。さらに、新規に開発した麹菌の液体培養物を麦焼酎製造やバイオエタノール製造といった産業分野に応用するための実現可能性の検証を行った。

第1章第1節では、「酵素生産に関する発現抑制を極力免れながら誘導をかけ続ける」という新規な液体培養の方法論を提案し、これを簡便に実現する方法として、難消化性デキストリンを培地炭素源として用いる培養方法を検討した。*A. kawachii* NBRC4308 の回分培養をデキストリンと難消化性デキストリンを含む培地で行ったところ、66 時間目のグルコアミラーゼ活性は 140.2 mU/ml と 368.4 mU/ml となり、難消化性デキストリンを含む培地を用いることで大幅に向上できることを確認した。培地中のグルコース濃度の変化を経時的に追跡した結果、培養 23 時間目に各々 5.14 mg/ml と 1.25 mg/ml となり、難消化性デキストリンを用いた培養は、簡便な回分培養でありながら、酵素生産に抑制的に働くグルコースの濃度を低く維持できることが示された。一方、デキストリン流加培養を行うことで、培地中のグルコース濃度は 2.38 mg/ml と低く維持することができたが、グルコアミラーゼ活性値は 280.4 mU/ml となり、難消化性デキストリン回分培養よりも低い結果となった。酵素生産を誘導すると考えられる培養液中のマルトオリゴ糖の変化を確認したところ、デキストリン流加培養ではほとんど検出されず、一方の難消化性デキストリン回分培養では培養終了時まで著量検出された。このように、難消化性デキストリンを用いることで、酵素生産に抑制的なグルコースの濃度を低く抑えながら、誘導的に作用するマルトオリゴ糖濃度を高く維持し続けることができ、先に提案した新しい液体培養の方法論を簡便な回分培養で達成することができた。これにより、*A. kawachii* の液体培養におけるグルコアミラーゼ生産性が顕著に向上することが確認された。さらに、第1章第2節では、難消化性デキストリンを用いる

新規な液体培養の方法論が、代表的な麹菌である *A. oryzae* の回分培養においても高い効果を示すことが認められ、デキストリンを用いる培養に比べて、 $\alpha$ -アミラーゼ活性が 3.6 倍、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が 2.7 倍に向上することが分かった。グルコアミラーゼ活性に至っては、デキストリン回分培養の 55 倍に達した。さらに、難消化性デキストリン回分培養では麹菌体量が約 3 分の 1 にまで低下することが確認され、工業的な酵素生産における培養液レオロジーの改善に大きく貢献できると考えられた。このように難消化性デキストリンを用いる培養方法は、多くの麹菌の物質生産性を大きく向上させる可能性を秘めた実用的な液体培養法であることが示された。

第 2 章では、さらに実用的な段階に進めるべく、難消化性デキストリンで達成したのと同様の方法論を、大麦を培地に用いる液体培養において具現化するための培養方法を検討した。特に、麦焼酎製造をターゲットとしたグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの同時高生産を目的に、培養技術の開発を試みた。カギとなる培地炭素源の酵素分解性とグルコース生成に着目した検討を行ったところ、大麦精白歩合と酵素分解により生成されるグルコース量に関係があることが分かった。すなわち、大麦精白歩合 85% から未精白（玄麦）にかけて酵素分解を受け難くなり、グルコース生成量の減少が認められた。一方で、焼酎製造に一般的に用いられる形態である 65% 精白大麦はグルコース生成量が高かった。続いて、各種精白大麦を用いて白麹菌の液体培養を行い、精白歩合とグルコアミラーゼおよび耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ活性の関係を調べたところ、グルコアミラーゼおよび耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ共に、精白歩合 75% くらいから酵素生産性の向上がみられ、未精白（玄麦）のとき最も高い活性を示すことが分かった。一方で、玄麦を粉砕してしまうと酵素活性の向上が認められなかった。また、玄麦を用いた培養においては、培地中のグルコース濃度が粉砕玄麦を用いる場合に比べて低く維持されることが確認された。さらに、リアルタイム定量 PCR による遺伝子発現解析により、酵素高生産は酵素遺伝子の転写レベルで誘導に起因することも示された。本方法が開発されたことにより、第 1 章において難消化性デキストリンを用いて初めて達成された新規な液体培養の方法論が、焼酎原料である大麦を用いても同様に具現化できることが示された。これまで麹菌の液体培養においてグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラ

ーゼの同時高生産に成功した報告事例は無く、液体麹を用いる酒類製造の道が大きく開けた。

第3章では、玄麦を用いる麹菌の液体培養法を発酵産業分野に実用化することを目的に、培養法のブラッシュアップを行うとともに、工業化の実現可能性検証を行った。まず第1節では、酒税法ならびに培養時間の制約を考慮しながら、麦焼酎製造に必須なデンプン分解酵素と植物繊維素分解酵素が同時高生産できる液体培養法の開発を試み、従来の固体麹と代替できる液体麹を製造可能か検討した。培地への玄麦使用量と各種酵素活性の関係を調べた結果、玄麦使用量を 2.0% (w/v) から 1.7% (w/v) に減らした場合に、グルコアミラーゼ、耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼが同時に高生産されることが分かった。2.0% (w/v)、1.7% (w/v) および 1.4% (w/v) 玄麦培地を用いて作製した液体麹を用いて、300 ml スケールの焼酎モロミ発酵試験を実施した結果、1.7% (w/v) 玄麦培地による液体麹を用いた場合にアルコール収得量、モロミ粘度ともに良好であった。引き続き 4000 ml スケールにて焼酎仕込み試験を行い、固体麹で作製した麦焼酎との比較を行った結果、両者の焼酎モロミはほぼ同様の発酵経過を示し、麦焼酎の酒質も遜色無いことが分かった。以上の結果より、酒税法を考慮した原料にて 42 時間培養した液体麹を用いて、固体麹と同等の麦焼酎製造が可能であることが示された。さらに検討を重ね、液体麹法を初めて商業的に実用化した本格麦焼酎である「本格麦焼酎かのか・灌水麹仕込み」がアサヒビール株式会社より 2007 年 7 月に上市された。続いて第2節では、*A. kawachii* が生産するグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼのもつ生デンプン分解能を最大限に活用すべく、キャッサバの無蒸煮同時糖化エタノール発酵へ応用することを試みた。まず、*A. kawachii* FS005 株を用い、玄麦と小麦フスマを併用する改変 Czapek-Dox 培地にて、各種酵素生産性を確認したところ、グルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ、酸性プロテアーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼが同時に高生産されることを確認した。続いて、この液体培養物を用いてキャッサバの無蒸煮糖化が可能かどうかをラボスケール試験により評価した。*A. kawachii* FS005 液体培養物を用いたキャッサバの無蒸煮糖化におけるグルコース生成速度は、STARGEN<sup>TM</sup> 001 を用いた場合と同等であり、遊離アミノ酸の生成速度は、STARGEN<sup>TM</sup> 001 に比べて 2 倍高かった。次に、

モロミ 165 ml のフラスコスケールにて、キャッサバの無蒸煮同時糖化エタノール発酵の試験を行った結果、*A. kawachii* FS005 液体培養物を用いた発酵終了モロミの発酵歩合は 92.3% と良好であった。最後に、工業化の実現可能性を検討するために、パイロットプラントスケールでの実証試験を行った。*A. kawachii* FS005 液体培養物 106 L およびキャッサバ粉 332 kg を含むモロミ 1612 L において、10.3% (v/v) のエタノールを収得し、発酵歩合は 92.7% と非常に良好な結果を得た。これまでに糸状菌培養物を複合酵素剤とするキャッサバの無蒸煮糖化同時エタノール発酵に関してはラボスケールでの報告のみであったため、本法が工業化に向けた実現可能性が非常に高い製造法であることが示された。

本研究によって、これまで困難といわれていた麹菌の液体培養における各種酵素の同時高生産が、新規な液体培養の方法論に基づく培養技術により達成された。これは、培地炭素源として難消化性デキストリンや玄麦を用いるだけの簡便な回分培養法であり、非常に実用性の高い麹菌培養技術であると考えられる。今後、酵素生産だけでなく、付加価値の高い異種タンパク生産などの分野へも応用されることを期待したい。今回開発した玄麦を用いる麹菌の新規な液体培養技術は、従来の麦焼酎製造だけでなく、バイオエタノール製造へも十分に応用可能な複合酵素生産技術であることが示された。麦焼酎製造に関しては 2007 年に実用化も完了し、現在も培養技術の高度化が進められている。バイオエタノール製造に関しては、中国や東南アジア地区で作付けの多い有望な発酵基質であるキャッサバを用いた無蒸煮同時糖化エタノール発酵に十分応用可能であることがパイロットプラントスケールで実証され、今後さらなるスケールアップ研究を進めていく予定である。

本研究を通して、麹菌の液体培養物である「液体麹」が固体培養物である「固体麹」に酵素生産性という観点ではかなり近づいたと考えている。今後は、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム等のオミクス技術を駆使し、今回開発された液体麹培養法と伝統的な固体麹培養法を比較解析し、いまだ謎の多い固体培養特異的な遺伝子発現の特徴を明らかにするとともに、液体麹ならびに固体麹の高品質化を目指した技術開発をさらに進めていきたい。

## 参考文献

- 1) 一島英治: 巻頭随想 醸協, 99 (2004)
- 2) Machida M., Asai K., Sano M., Tanaka T., Kumagai T., Terai G., Kusumoto K., Arima T., Akita O., Kashiwagi Y., Abe K., Gomi K., Horiuchi H., Kitamoto K., Kobayashi T., Takeuchi M., Denning DW., Galagan JE., Nierman WC., Yu J., Archer DB., Bennett JW., Bhatnagar D., Cleveland TE., Fedorova ND., Gotoh O., Horikawa H., Hosoyama A., Ichinomiya M., Igarashi R., Iwashita K., Juvvadi PR., Kato M., Kato Y., Kin T., Kokubun A., Maeda H., Maeyama N., Maruyama J., Nagasaki H., Nakajima T., Oda K., Okada K., Paulsen I., Sakamoto K., Sawano T., Takahashi M., Takase K., Terabayashi Y., Wortman JR., Yamada O., Yamagata Y., Anazawa H., Hata Y., Koide Y., Komori T., Koyama Y., Minetoki T., Suharnan S., Tanaka A., Isono K., Kuhara S., Ogasawara N. and Kikuchi H.: Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*., *Nature*, 428, 1157-1161 (2005)
- 3) Futagami T., Mori K., Yamashita A., Wada H., Kajiware Y., Takashita H., Omori T., Takegawa K., Tashiro K., Kuhara S. and Goto M.: Genome sequence of the white koji mold *Aspergillus kawachii* IFO 4308, used for brewing the Japanese distilled spirit *shochu*., *Eukaryot. Cell*, 10, 1586-1587 (2011)
- 4) 本格焼酎製造技術, 財団法人日本醸造協会 (1991)
- 5) Iwashita K., Todoroki K., Kimura H., Shimoi H. and Ito K.: Purification and characterization of extracellular and cell wall bound beta-glucosidases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1938-1946 (1998)
- 6) 山根雄一: 液体培地による麹造りに向けて バイオサイエンスとインダストリー, 61, 37-38 (2003)
- 7) 小泉武夫: 麹カビと麹の話, 光琳テクノブックシリーズ (1998)

- 8) **Hata Y., Ishida H., Kojima Y., Ichikawa E., Kawato A., Suginami K. and Imayasu S.:** Comparison of two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (*koji*) and in submerged culture., *J. Ferment. Bioeng.*, 84, 532-537 (1997)
- 9) **Hata Y., Ishida H., Ichikawa E., Kawato A., Suginami K., Imayasu S.:** Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. , *Gene*, 207, 127-134 (1998)
- 10) **Ishida H., Hata Y., Ichikawa E., Kawato A., Suginami K. and Imayasu S.:** Regulation of the glucoamylase-encoding gene (*glaB*), expressed in solid-state culture (*koji*) of *Aspergillus oryzae*., *J. Ferment. Bioeng.*, 86, 301-307 (1998)
- 11) **Ishida H., Hata Y., Kawato A., Abe Y., Suginami K. and Imayasu S.:** Identification of functional elements that regulate the glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*., *Curr. Genet.*, 37, 373-379 (2000)
- 12) **Nagamine K., Murashima K., Kato T., Shimoi H. and Ito K.:** Mode of alpha-amylase production by the shochu koji mold *Aspergillus kawachii*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 2194-2202 (2003)
- 13) **Agger T., Petersen JB., O'Connor SM., Murphy RL., Kelly JM. and Nielsen J.:** Physiological characterisation of recombinant *Aspergillus nidulans* strains with different *creA* genotypes expressing *A. oryzae* alpha-amylase., *J. Biotechnol.*, 3, 279-285 (2002)
- 14) **Carlsen M. and Nielsen J.:** Influence of carbon source on alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae*., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 3, 346-349 (2001)
- 15) **Drysdale MR., Kolze SE. and Kelly JM.:** The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*., *Gene*, 2, 241-245 (1993)
- 16) **Ilyes H., Fekete E., Karaffa L., Fekete E., Sandor E., Szentirmai A. and Kubicek CP.:** CreA-mediated carbon catabolite repression of beta-galactosidase formation in *Aspergillus nidulans* is growth rate dependent., *FEMS Microbiol. Lett.*, 1, 147-151 (2004)

- 17) **Karaffa L., Fekete E., Sandor E., Sepsi A., Seiboth B., Szentirmai A. and Kubicek CP.:** Carbon catabolite repression in the regulation of beta-galactosidase activity in *Aspergillus nidulans.*, *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.*, 2-3, 261-265 (2002)
- 18) **MacCabe AP., Orejas M., Tamayo EN., Villanueva A. and Ramon D.:** Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans.*, *J. Biotechnol.*, 1, 43-54 (2002)
- 19) **Kato N., Murakoshi Y., Kato M., Kobayashi T. and Tsukagoshi N.:** Isomaltose formed by alpha-glucosidases triggers amylase induction in *Aspergillus nidulans.*, *Curr. Genet.*, 1, 43-50 (2002)
- 20) **Agger T., Spohr AB. and Nielsen J.:** alpha-Amylase production in high cell density submerged cultivation of *Aspergillus oryzae* and *A. nidulans.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1, 81-84 (2001)
- 21) **Goto CE., Barbosa EP., Kistner LC, Moreira FG., Lenartovicz V. and Peralta RM.:** Production of amylase by *Aspergillus fumigatus* utilizing alpha-methyl-D-glycoside, a synthetic analogue of maltose, as substrate., *FEMS Microbiol. Lett.*, 2, 139-143 (1998)
- 22) **Goto M., Kuwano E., Kanlayakrit W. and Hayashida S.:** Role of the carbohydrate moiety of a glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *kawachi* in the digestion of raw starch., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59, 16-20 (1995)
- 23) **Rajoka MI., Yasmin A. and Latif F.:** Kinetics of enhanced ethanol productivity using raw starch hydrolyzing glucoamylase from *Aspergillus niger* mutant produced in solid state fermentation., *Lett. Appl. Microbiol.*, 39, 13-18 (2004)
- 24) **Vu VH., Pham TA. and Kim K.:** Improvement of fungal strain by repeated and sequential mutagenesis and optimization of solid state fermentation for the hyper-production of raw-starch-digesting enzyme., *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 718-726 (2010)
- 25) **Prosky L.:** What is dietary fiber? *J. AOAC Int.*, 4, 985-987 (2000)



- 26) **Ohkuma K. and Wakabayashi S.:** Fibersol-2: a Soluble, Non-digestible, Starch-derived Dietary Fibre. McCleary BV. and Prosky L. (ed), *Advanced Dietary Fibre Technology*, Blackwell Science, Oxford, 509-552 (2001)
- 27) **Iwashita K., Todoroki K., Kimura H., Shimoi H. and Ito K.:** Purification and characterization of extracellular and cell wall bound beta-glucosidases from *Aspergillus kawachii*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1938-1946 (1998)
- 28) **Nagamine K., Murashima K., Kato T., Shimoi H. and Ito K.:** Mode of alpha-amylase production by the shochu koji mold *Aspergillus kawachii*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 10, 2194-2202 (2003)
- 29) **Ganzlin M. and Rinas U.:** In-depth analysis of the *Aspergillus niger* glucoamylase (*glaA*) promoter performance using high-throughput screening and controlled bioreactor cultivation techniques., *J. Biotechnol.*, 135, 266-271 (2008)
- 30) **Guido M., Alex D., Andreas G., Martin K., Yvonne G., Rochus J., Petra D., Ezequiel FL., Bernd N. and Dietmar C.:** Hempela Metabolic flux analysis using stoichiometric models for *Aspergillus niger*: Comparison under glucoamylase-producing and non-producing conditions., *J Biotechnol.*, 132, 405-417 (2007)
- 31) **vanKuyk P., Benen J., Wosten H., Visser J. and Vries R.:** A broader role for AmyR in *Aspergillus niger*: regulation of the utilization of D-glucose or D-galactose containing oligo- and polysaccharides., *Appl Microbiol Biotechnol.*, Doi: 10.1007/s00253-011-3550-6 (2011)
- 32) **Yuan XL., van der Kaaij RM., van den Hondel CA., Punt PJ., van der maarel MJ., Dijkhuizen L. and Ram AF.:** *Aspergillus niger* genome-wide analysis reveals a large number of novel  $\alpha$ -glucan acting enzyme with unexpected expression profiles., *Mol Gent Genomics.*, 279, 545-561 (2008)
- 33) **Barbesgard P., Heldt-Hansen HP. and Didenrichsen B.:** On the safety of *Aspergillus oryzae* ; a review., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 569-572 (1992)
- 34) **Gomi K., Akeno T., Minetoki T., Ozeki K., Kumagai C., Okazaki N. and Iimura Y.:** Molecular

- cloning and characterization of a transcriptional activator gene, *amyR*, involved in the amylolytic gene expression in *Aspergillus oryzae*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 4, 816-827 (2000)
- 35) **Petersen KL., Lehmbeck J. and Christensen T.:** A new transcriptional activator for amylase genes in *Aspergillus*., *Mol. Gen. Genet.*, 4-5, 668-676 (1999)
- 36) **Minetoki T., Gomi K., Kitamoto K., Kumagai C. and Tamura G.:** Characteristic expression of three amylase-encoding genes, *agdA*, *amyB*, and *glaA* in *Aspergillus oryzae* transformants containing multiple copies of the *agdA* gene., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 12, 2251-2254 (1995)
- 37) **Carlsen M., Nielsen J. and Villadsen J.:** Growth and  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* during continuous cultivation., *J Biotechnol.*, 45, 81-93 (1996)
- 38) **Imai Y., Suzuki M., Masamoto M., Nagayasu K. and Kishimoto M.:** Glucoamylase production of *Aspergillus oryzae* in fed-batch culture using a statistical regression model., *J. Ferment. Bioeng.*, 78, 310-314 (1994)
- 39) **Carlsen M. and Nielsen J.:** Influence of carbon source on  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae*., *Appl Microbiol Biotechnol.*, 57, 346-349 (2001)
- 40) **te Biesebeke R., van Biezen N., de Vos WM., van den Hondel CA. and Punt PJ.:** Different control mechanisms regulate glucoamylase and protease gene transcription in *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation., *Appl Microbiol Biotechnol.*, 67, 75-82 (2004)
- 41) **Nakajima K., Asakura T., Maruyama J., Morita Y., Oike H., Shimizu-Ibuka A., Misaka T., Sorimachi H., Arai S., Kitamoto K. and Abe K.:** Extracellular production of neoculin, a sweet-tasting heterodimeric protein with taste-modifying activity, by *Aspergillus oryzae*., *Appl. Environ. Microbiol.*, 5, 3716-3723 (2006)
- 42) **Agger T., Petersen JB., O'Connor SM., Murphy RL., Kelly JM. and Nielsen J.:** Physiological characterisation of recombinant *Aspergillus nidulans* strains with different *creA* genotypes expressing *A. oryzae* alpha-amylase., *J. Biotechnol.*, 3, 279-285 (2002)

- 43) **Garcia-Ochota F. and Gomez E.:** Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial process: An overview., *Biotechnol. Adv.*, 27, 153-176 (2009)
- 44) **Li ZJ., Shukala V., Fordyce AP., Pedersen AG., Wenger KS. and Marten MR.:** Fungal morphology and fragmentation behavior in a fed-batch *Aspergillus oryzae* fermentation at the production scale., *Biotechnol. Bioeng.*, 70, 300-312 (2000)
- 45) 秦洋二, 石田博樹, 市川英治, 川戸章嗣, 杉並孝二, 今安聰: 麹菌の培養方法, 特許 4011182 号
- 46) 山中寿城, 矢野駿太郎, 黒瀬直孝, 川北貞夫, 垂水彰二: 液体麹及びそれを用いた酒類の製造方法, 特許 4204174 号
- 47) **Sudo S., Ishikawa T., Takayasu-Sakamoto Y., Sato K. and Obe T.:** Characteristics of acid-stable  $\alpha$ -amylase production by submerged culture of *Aspergillus kawachii*., *J. Ferment. Bioeng.*, 76, 105-110 (1993)
- 48) **Sudo S., Ishikawa T., Sato K. and Obe T.:** Comparison of acid-stable  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus kawachii* in solid-state and submerged cultures., *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 483-489 (1994)
- 49) **Sudo S., Ishikawa T., Sato K. and Obe T.:** Growth of submerged mycelia of *Aspergillus kawachii* in solid-state culture., *J. Ferment. Bioeng.*, 79, 252-256 (1995)
- 50) 井尻勉, 三枝貴代, 石田哲也: 搗精度評価性能向上のために改良したニューMG試薬染色法., *農業成果情報*, 1999, 18-19 (2000)
- 51) 第4回改正国税庁所定分析法注解 財団法人日本醸造協会
- 52) 吉沢潔, 百瀬洋夫, 蓮尾徹夫: セルラーゼおよびヘミセルラーゼ製剤を用いた試験醸造., *醸協*, 76, 284-286 (1981)
- 53) 福田央, 日吉智, 砂川英之, 田中健太郎, 藤田仁, 山根雄一, 若林三郎: 植物細胞壁溶解酵素の添加による清酒もろみにおける原料利用率の向上., *生物工学*, 79, 299-302 (2001)
- 54) **Nomachi W., Urago K., Oka T., Ekino K., Matsuda M., Goto M. and Furukawa K.:** Molecular

- breeding of *Aspergillus kawachii* overproducing cellulase and its application to brewing barley *shochu*., *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 382-387 (2002)
- 55) **Wang F., Xiong XR. and Liu CZ.**, Biofuels in China: opportunities and challenges., *In Vitro Cell Dev Biol Plunt.*, 45, 342-349 (2009)
- 56) **Shariffa YN., Karim AA., Fazilah A. and Zaidul ISM.**: Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature., *Food Hydrocoll.*, 23, 434-440 (2009)
- 57) **Nitayavardhana S., Shrestha P., Rasmussen ML., Lamsal BP., van Leeuwen JH. and Khanal SK.**: Ultrasound improved ethanol fermentation from cassava chips in cassava-based ethanol plants., *Bioresour. Technol.*, 101, 2741-2747 (2010)
- 58) **Shanavasa S., Padmaja GA., Moorthy SN., Sajeeva MS. and Sheriffa JT.**: Process optimization for bioethanol production from cassava starch using novel eco-friendly enzymes., *Biomass and Bioenergy* 35, 901-909 (2011)
- 59) **Barta Z., Kovacs K., Reczey K. and Zacchi G.**: Process design and economics of on-site cellulase production on various carbon sources in a softwood-based ethanol plant. *Enzyme Res.*,  
Doi:10.4061/2010/734182 (2010)
- 60) **Lin HJ., Xian L., Zhang QJ., Luo XM., Xu QS., Yang Q., Duan CJ., Liu JL., Tang JL. and Feng JX.**: Production of raw cassava starch-degrading enzyme by *Penicillium* and its use in conversion of raw cassava flour to ethanol., *J. Ind .Microbiol. Biotechnol.*, Doi:10.1007/s10295-010-0910-7 (2010)
- 61) **Rattanachomsri U., Tanapongpipat S., Eurwilaichitr L. and Champreda V.**: Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*., *J. Biosci. Bioeng.*, 107, 488-439 (2009)

- 62) **Kaneko A., Sudo S., Sakamoto Y., Tamura G., Ishikawa T. and Ohba T.:** Molecular cloning and determination of the nucleotide sequence of a gene encoding an acid-stable  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus kawachii*., *J. Ferment. Bioeng.*, 81, 292-298 (1996)
- 63) **Lie S.:** The EBC-ninhydrin method for determination of free alpha amino nitrogen., *J. Inst. Brew.*, 73, 37-41 (1973)
- 64) **Gibreel A., Sandercock JR., Lan J., Goonewardene LA., Zijlstra RT., Curtis JM. and Bressler DC.:** Fermentation of barley by using *Saccharomyces cerevisiae*: examination of barley as a feedstock for bio-ethanol production and value-added products., *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 1363-1373 (2008)
- 65) **Szymanowska D. and Grajek W.:** Fed-batch simultaneous saccharification and ethanol fermentation of native corn starch., *ACTA Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 8, 5-16 (2009)
- 66) **Xiao D., Wu S., Zhu X., Chen Y. and Guo X.:** Effects of soya fatty acids on cassava ethanol fermentation., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160, 410-420 (2010)
- 67) **Puligundla P., Smogrovicova D., Obulam VS. and Ko S.:** Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Doi:10.1007/s10295-011-0999-3 (2011)

## 発表論文

1. **Sugimoto T., Horaguchi K. and Shoji H.:** Indigestible dextrin stimulates glucoamylase production in submerged culture of *Aspergillus kawachii*., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 1985-1991 (2011)
2. **Sugimoto T. and Shoji H.:** Indigestible dextrin is an excellent inducer for alpha-amylase, alpha-glucosidase and glucoamylase production in a submerged culture of *Aspergillus oryzae*., *Biotechnol. Lett.*, 34, 347-351 (2012)
3. **Shoji H., Sugimoto T., Hosoi K., Shibata K., Tanabe M., and Kawatsura K.:** Simultaneous production of glucoamylase and acid-stable a-amylase using novel submerged culture of *Aspergillus kawachii*., *J.Biosci. Bioeng.*, 103, 203-205 (2007)
4. 小路博志, 杉本利和, 細井健二, 柴田和憲, 田邊正行, 川面克行: 麹菌で酵素を量産, 醸協, 102, 109-114 (2007)
5. **Sugimoto T., Makita T., Watanabe K. and Shoji H.:** Production of multiple extracellular enzyme activities by novel submerged culture of *Aspergillus kawachii* for ethanol production from raw cassava flour., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39, 605-612 (2012)

## 特許

### 1. 難消化性デキストリンを用いる新規な液体培養法に関する特許

杉本利和, 洞口健一, 長谷川裕寿: 麹菌の培養方法, 特許第 4087624 号

杉本利和, 長谷川裕寿: 酵素生産性調整方法, 特開 2005-295871 号

杉本利和, 長谷川裕寿, 徳永税, 斎藤知明, 麹菌の培養方法、それにより得られた麹菌培養物  
およびそれを用いた発酵飲食品の製造方法, 特開 2004-267065 号

### 2. 玄麦を用いる新規な液体培養法に関する特許

杉本利和, 小路博志: 液体麹の製造方法, 特許第 3718677 号

杉本利和, 小路博志: 糸状菌培養物の製造方法, 特開 2007-319167 号

杉本利和, 小路博志: 黄麹菌を用いた液体麹の製造方法, 特許第 4068649 号

杉本利和, 小路博志: 液体麹の製造方法, 特開 2007-097462 号

### 3. 玄麦を用いる新規な液体麹による麦焼酎製造法に関する特許

杉本利和, 小路博志: 植物繊維溶解酵素が増強された液体麹の製造方法、該方法により得られ  
た液体麹およびその用途, 特許第 4113252 号

### 4. 新規な液体培養方法及びその利用に関する特許

杉本利和, 小路博志: 玄米を用いる液体麹の製造方法, 特許第 3718678 号

杉本利和, 小路博志: 豆類又は芋類を用いる液体麹の製造法, 特許第 3718679 号

杉本利和, 小路博志: 雑穀類を用いる液体麹の製造法, 特許第 3718681 号

杉本利和, 小路博志: 液体麹の製造方法, 特許第 4083194 号

小路博志, 杉本利和: 組換えタンパクの製造方法, 特許第 4096009 号

杉本利和, 小路博志, 洞口健一: 液体麴を用いた穀類又は芋類の液化方法, 特許第 4096026 号

杉本利和, 小路博志: 液体麴を用いた穀物酢の製造方法, 特許第 4418783 号

杉本利和, 小路博志: 液体麴の製造方法, 特許第 4482365 号

杉本利和, 小路博志: 液体種麴の製造方法並びに該液体種麴を使用した液体麴の製造方法, 特許第 4482366 号

杉本利和, 小路博志: 液体麴酒母の製造方法とそれを用いた酒類の製造方法, 特許第 4489488 号

杉本利和, 小路博志: 上面ビール酵母を用いた焼酎の製造方法, 特許第 4652804 号

杉本利和, 小路博志: 純芋焼酎の製造方法, 特許第 4723325 号

松木理恵, 杉本利和, 小路博志: 液体麴を用いた清酒の製造方法, 特許第 4723340 号

小路博志, 杉本利和: 液体麴を用いたみその製造方法, 特許第 4755869 号

杉本利和, 小路博志: 液体麴を用いた醤油の製造方法, 特許第 4759349 号

杉本利和, 小路博志: 液体麴の連続製造方法, 特開 2007-089404 号

杉本利和, 小路博志: 液体麴と固体麴を併用した酒類の製造方法, 特開 2006-180809 号



## 謝辞

本論文を作成にするにあたり、終始ご指導とご高配を賜りました東京大学・太田明徳教授に深甚なる謝意を表します。

本研究は著者が 2002 年以来、協和発酵工業株式会社・食品酒類研究所ならびにアサヒビール株式会社・醸造研究所にて行った成果であります。この研究を始める機会を与えてくださいましたアサヒフードアンドヘルスケア株式会社・清水健一博士、サントネージュワイン株式会社・長谷川裕寿代表取締役社長兼工場長に深く感謝致します。

本研究の遂行、ならびに本論文作成に格別のご理解とご高配を賜りましたアサヒグループホールディングス株式会社・川面克行常務取締役兼常務執行役員、青木賢吉執行役員、アサヒビール株式会社・柴田和憲研究生産本部長、ニッカウキスキー株式会社・佐藤学取締役に深く感謝致します。

基礎研究から実用化研究に至る多くの場面でご助言、ご指導を賜りましたニッカウキスキー株式会社 OB・田邊正行氏、ニッカウキスキー株式会社・細井健二技術開発部長、アサヒビール株式会社・小路博志ワイン&スピリッツ技術部長に深く感謝致します。特に、小路博志博士には、共同研究者として常に暖かい激励と熱いご指導を頂き、心より御礼申し上げます。

本研究の遂行のあたり、数々のご協力を頂きましたアサヒグループホールディング株式会社・福田和郎博士、安原貴臣氏、酒井範夫氏、上野貴生博士、舩田晋氏、牧田智裕氏、アサヒビール株式会社・尾形智夫博士、洞口健一氏、石引智子氏、渡邊航太郎氏、菊池かおり氏、遠藤昌宏氏に感謝いたします。また、ご支援を頂きましたアサヒグループホールディング株式会社、アサヒビール株式会社、ニッカウキスキー株式会社の多くの皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、心の支えになり、研究生活をサポートしてくれた家族に感謝致します。