

# 博士論文

麹菌の液体培養による酵素高生産機構解析

および新たな発展的培養技術

舩田 晋

# 目次

	頁
序章	・・・1
第1章 大麦玄麦を用いた <i>Aspergillus oryzae</i> の液体培養による酵素生産の解析	・・・6
第1項 緒言	・・・7
第2項 材料および方法	・・・8
第3項 結果および考察	
1．培地中の成分変化	・・・14
2．遺伝子発現解析およびメタボローム解析	・・・15
第4項 要約	・・・21
第2章 大麦玄麦を用いた <i>Aspergillus kawachii</i> の液体培養による酵素生産の解析	・・・58
第1項 緒言	・・・59
第2項 材料および方法	・・・60
第3項 結果	・・・64
第4項 考察	・・・66
第5項 要約	・・・70
第3章 Solid-phase microextraction および GC-MS を用いた焼酎揮発性成分の定量法開発および液 体麴による麦焼酎と固体麴による麦焼酎間での比較解析	・・・98
第1項 緒言	・・・99
第2項 材料および方法	・・・101

第3項	結果および考察	
1.	液体麹焼酎と固体麹焼酎間の差異成分に関する検索	・・・105
2.	液体麹焼酎と固体麹焼酎間の差異成分に関するターゲット定量	・・・106
3.	判別分析	・・・108
第4項	要約	・・・110
第4章	<i>Aspergillus kawachii</i> を用いた耐酸性 -アミラーゼおよびグルコアミラーゼを高生産させる 糖質遊離抑制を必要としない液体培養法の開発	・・・119
第1項	緒言	・・・120
第2項	材料および方法	・・・122
第3項	結果および考察	
1.	ASAAase および GAase 活性に及ぼす培地中のサツマイモ濃度の影響	・・・124
2.	ASAAase および GAase 活性に及ぼす培地に用いる品種の影響	・・・125
3.	ASAAase および GAase 活性に及ぼす培地に用いるサツマイモの形態の影響	・・・126
4.	通気攪拌培養の検討	・・・127
5.	培地中の糖濃度の経時的変化	・・・127
第4項	要約	・・・133
総括		・・・144
参考文献		・・・148
発表論文		・・・160

謝辭

···161

## 凡例

本論文中に以下の略号を用いた。

AAase	-amylase
ASAAase	acid-stable -amylase
CAR	carboxen
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CE-TOFMS	capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry
CE-TOF-MSD	capillary electrophoresis time-of-flight mass selective detector
dUTP	deoxyuridine triphosphate
DVB	divinylbenzene
ESI	electrospray ionization
FDA	food and drug administration
GC	gas chromatography
GC-MS	gas chromatograph mass spectrometry
GlcNAc	N-acetylglucosamine
GRAS	generally recognized as safe
GAase	glucoamylase
HS-SPME	headspace solid-phase microextraction
LOD	detection limit
LOQ	quantification limit
NRT	nitrate transporter
pDMAB	p-dimethylaminobenzaldehyde
PDMS	polydimethylsiloxane
mRNA	messenger ribonucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	saline sodium citrate buffer

## 序章

麹菌は、古来わが国の醸造をはじめ様々な食品に用いられており、わが国の豊かな食文化に貢献してきた。2006年10月の日本醸造学会において、われわれの先達が古来大切に育み、使ってきた貴重な財産「麹菌」は、わが国の「国菌」に認定された<sup>1</sup>。わが国で醸造及び食品等に汎用されている次の菌を麹菌として指すこととされている。(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、及び白麹菌 *Aspergillus luchuensis mut. Kawachii* (*Aspergillus kawachii*)。麹菌は、わが国の発酵食品の製造に長年月にわたって使用され続けており、酒造方法は、奈良時代の朝廷において法令として存在しており、味噌の記録は平安時代の延喜式に記載があるほどで、一千年もの歴史をもつ<sup>2</sup>。また、わが国では、種麹業界が種麹を保存管理し、商業的に営々と維持してきた伝統があり、歴史的に食品として安全に食べられてきたことから、アメリカ合衆国 FDA (Food and Drug Administration: 食品医薬品局) では麹菌を GRAS (Generally Recognized As Safe) のリストに掲載し、安全性を認定している。そして、麹菌はその高い安全性とタンパク生産能力から有用たんぱく質生産ホストとしても注目を集めている。2005年12月に黄麹菌 (*Aspergillus oryzae* RIB40)、2011年11月に白麹菌 (*A. kawachii* NBRC4308) のゲノム配列解読が完了し、今後ますます産業的に重要な菌として医薬品をはじめ広い分野における有用物質の生産等、さらなる高度利用が期待されている<sup>3,4</sup>。

このような麹菌を蒸した米、麦、豆などの穀物に付着させて繁殖させ、酵素を分泌させたものが麹である。麹は清酒、焼酎、泡盛のような酒類の原料として、また、酢、みりん、しょうゆ、味噌のような調味料の原料としても使われている。清酒にはアミラーゼ力が強い黄麹菌 (*A. oryzae*) が、焼酎にはクエン酸生成量が多く、アミラーゼ力が強い白麹菌 (*A. kawachii*) あるいは黒麹菌 (*A. awamori*) が、味噌やしょうゆなどの調味料には、タンパク質の分解力が強い黄麹菌 (*A. oryzae*) など、それぞれの製造に適した菌が主に使われている。

我々が技術開発の領域として考えている本格焼酎の製造においては、主として白麹菌が一般的に用いられる。焼酎造りに用いられる白麹菌と清酒造りに用いられる黄麹菌との大きな違いの一つはクエン酸の生産性にあり、黄麹菌は殆ど酸を生産しないのに対して、白麹菌は多量のクエン酸を生産する。クエ

ン酸はもろみの pH を下げる働きがあり、その結果として、焼酎造りにおいて温暖な気候の下でも雑菌の汚染を防ぎ、安定したアルコールの発酵が可能になっている。一次仕込み直後の焼酎もろみの pH は約 3.0~3.5 であるが、清酒造りに用いられる黄麹菌由来の多くの酵素がこのような低 pH 条件では速やかに失活するのに対し、焼酎造りに用いられる白麹菌の生産した酵素は失活することなく有効に作用する<sup>5</sup>。また、焼酎は米、大麦、サツマイモ等の原料から製造されるが、これら原料中の主要な糖類はデンプンであるため、酵母による発酵の前にアミラーゼによる糖化が必要とされる。従って、焼酎製造においても清酒製造と同様にグルコアミラーゼとともに  $\alpha$ -アミラーゼが極めて重要な役割を担うが、黄麹菌と白麹菌では  $\alpha$ -アミラーゼに違いがあることが知られている。すなわち、黄麹菌が 1 種類の  $\alpha$ -アミラーゼ（タカアミラーゼ）<sup>6</sup>のみを生産するのに対し、白麹菌は *asaA* によってコードされる耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼ<sup>7</sup>と *amyA* によってコードされる非耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼ<sup>8</sup>の 2 種類を生産する。この非耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼはタカアミラーゼと殆ど同じアミノ酸配列であり酵素化学的性質も類似している。一方の耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼは pH3~4 において相対活性が 80%以上で、かつ残存活性もこの範囲において 90%以上と高い。また、熱安定性とアルコール存在下における安定性も高いことが報告されている<sup>9</sup>。白麹菌の生産するグルコアミラーゼは黄麹のグルコアミラーゼ酵素と殆ど同じ耐酸性があり、pH3~4 において高い安定性を示し、相対活性も高く、熱安定性は他の麹に比べて高い<sup>10</sup>。そのため、低 pH 環境下で活性を有する耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼとグルコアミラーゼは、焼酎醸造における糖質分解に関する鍵酵素と考えられている。

麹菌の培養方法には、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と、水に原料およびその他の栄養素を添加して液体培地を調製し、麹菌の分生子又は前培養した菌糸等を接種し培養する液体培養法がある。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である。これに対して、液体培養法は培養制御や品質管理が容易であり、効率的な生産に適した培養形態であるが、液体培養では麹菌のアミラーゼ、セルラーゼ等の酵素生産挙動が固体麹と大きく異なるばかりか生産性が低下することが知られている<sup>8,11-13</sup>。鍵酵素であるグルコアミラーゼを液体培養条件下で高生産させる方法として、焙炒した穀類を培養液に添加する方法や難分解性の糖質を含有する液体培地を用いて、生産性を向上させる方法が報告されている<sup>14,15</sup>。また、特殊な培養法として多孔性膜状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遺伝子 *glaB* を発現

させて、グルコアミラーゼの生産性を向上させる方法も報告されている<sup>12</sup>。一方の耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼは、前述の非耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼとは発現様式が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  $\alpha$ -アミラーゼは生産されないと報告されているため<sup>8,16</sup>、液体培養での酵素高生産は難しいものと考えられていた。

*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って遺伝子発現抑制を受けることが知られている<sup>17-20</sup>。*Aspergillus* 属におけるグルコース抑制に関する制御因子として CreA タンパク質が同定されている。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 により炭素源資化に関わる多くの遺伝子の発現が抑制される<sup>21,22</sup>。

一方、マルトースやデキストリンのような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>23</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<sup>24,25</sup>。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 に関する研究で、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報告されている<sup>26</sup>。デンプン分解酵素の高生産を目的とした麹菌の液体培養では、発現を誘導するマルトース、デキストリンや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、ある一定期間の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を受ける。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生成され、培地中に蓄積してしまう。このような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起こりながら培養が進むため、ある水準以上の酵素生産を期待することは難しいと考えられる。そのため、麹菌の酵素の生産量を高めるには、目的とする遺伝子の発現に影響を及ぼす部位に変異を与え、目的酵素を大量生産することができるように育種した麹菌を用いたり、遺伝子組み換え技術を利用し、目的とする遺伝子を高発現させるように改変した麹菌を用いるのが一般的である。しかし、このような方法により、複数の目的酵素を大量かつ同時に高生産できる麹菌を造成するには多大な労力を伴うことが予想される。醸造産業

分野では、使用する麹菌は一般的なものであり、用いる原料も食品であることから、一度に多種類かつ大量の酵素を生産するためには、固体培養法を用いるのが常であり、液体培養法を用いることは稀であった。

麹菌の液体培養法における酵素生産に関わる技術的な困難を克服し、固体培養と同様の酵素生産能力を有する新規な液体培養法が確立されれば、産業上の有効性やフレキシビリティの高さから様々な産業分野に応用が可能であると考えられる。そこで、アサヒビール株式会社では麹菌の各種酵素の高生産を可能とする実用的な液体培養方法、特に、麦焼酎製造に必要なグルコアミラーゼと耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼの同時高生産を目的に、培養技術の開発に取り組んできた。Shoji らは精白歩合を変えた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、両活性ともに未精白の時に最も高い活性を示すことが分かり、「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が、大麦玄麦を用いることで具現化できることを示した<sup>27</sup>。また、大麦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、ラボスケールで玄麦培地による液体麹を用いて焼酎仕込試験を行い、固体麹で製造した麦焼酎との比較試験を行った結果、両者の焼酎もろみはほぼ同様の発酵経過を示し、酒質も遜色ないことを確認し、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を示した<sup>28</sup>。さらに検討を重ねた結果、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 月に上市されるに至った。また、焼酎製造以外の活用として、*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活かし、キャッサバの無蒸煮発酵を検討した。これまで、キャッサバを原料とした無蒸煮発酵が大きなスケールで成功した例はなかったが、1.6 kl 発酵スケールにおいて 10.3%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<sup>29</sup>。

以上のように、玄麦を用いる麹菌の液体培養技術は実用性のある新しい技術である。当技術に関して、何故、酵素が高生産されるのか、当液体麹を使用した焼酎では特徴的な揮発成分があるのか、固い穀皮で覆われていない他の穀物を用いても酵素高生産ができるのか、これらを明らかにすることは、当新規技術の基礎的な理解を深めると同時に、産業的利用の拡大・深化につながる意義のある取組みとなる。

このような背景から、本論文においては、まず第 1 章で、玄麦を用いた *Aspergillus oryzae* の液体培養による酵素生産の特性を、次いで第 2 章では、玄麦を用いた *Aspergillus kawachii* の液体培養による酵素生産の特性を解析した。第 3 章では、Solid-phase microextraction および GC-MS を用いた焼酎揮発性成分の定量法を開発し、液体麹による麦焼酎と固体麹による麦焼酎を比較解析した。そして第 4 章では、*Aspergillus kawachii* を用いた耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼおよびグルコアミラーゼを高生産させる糖質遊離抑制を必要としない液体培養法の開発を行った。

## 第1章

玄麦を用いた *Aspergillus oryzae* の液体培養による酵素生産の解析

## 第1項 緒言

序章に記したように麹菌の固体培養法は、醸造に必要な多種類の酵素を大量に生産できる大変優れた方法である。一方、液体培養法は培養制御や品質管理が容易であり、効率的な生産に適した培養方法であるが、固体培養法と比べ全般的に酵素生産性が低下する<sup>8,11-13</sup>。これに対し、Shojiらは用いる原料の加工処理条件を変え、大麦玄麦を原料として液体培養を行うことで酵素高生産がもたらされることを明らかにした<sup>27,28</sup>。玄麦を用いた培養により各種酵素活性が高くなる理由として、表面が穀皮で覆われた原料を用いることにより、原料のデンプンに由来する糖類の遊離が抑制され、その結果培地中のグルコース濃度が低い状態で維持されることにより、グルコアミラーゼや耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ等の生産に対するグルコース抑制が弱くなったものと推察されている。酵素が高生産される機構の詳細が明らかになれば、さらなる高生産につながることを期待されるため、産業的にも有用な知見となる。

そこで本研究において、ゲノム配列解読が完了している黄麹菌を対象に、大麦玄麦を原料とした液体培養により酵素高生産がもたらされる機構を明らかにすることを目的とした。すなわち、玄麦をそのまま用いた液体培養と玄麦を粉碎して用いた液体培養の比較を、グルコアミラーゼおよび $\alpha$ -アミラーゼ活性を指標にしながら、培養中の糖、有機酸、無機イオン等の濃度変化およびDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現やメタボローム解析を行い、玄麦を原料とした液体培養により酵素高生産がもたらされる機構を解析した。

## 第2項 材料および方法

### 1. 供試麹菌株および培養条件

全ゲノム配列解読が終了しDNA マイクロアレイが利用可能な黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 株を使用した。

培地は改変 Czapek-Dox 培地を用いた。すなわち、0.3% (w/v)  $\text{NaNO}_3$ 、0.1% (w/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05% (w/v)  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05% (w/v)  $\text{KCl}$ 、0.001% (w/v)  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (いずれも和光純薬工業) の組成に炭素源を加えた。前培養は、大麦丸麦(65%精白麦、オーストラリア産スクーナー種)8% (w/v) を含む前培養培地 100 mL を、容量 500 mL のバツフル付三角フラスコに入れ、121 °C、15 分間オートクレーブ滅菌し、室温冷却後、分生子 1 白金耳を接種した。その後、温度 30 °C、100 rpm にて 24 時間回転振とう培養を行った。本培養は 2% (w/v) 炭素源とし、大麦玄麦 (98%精白麦、オーストラリア産スクーナー種) の粉碎していない玄麦 (非粉碎玄麦) およびミルにて粉碎した玄麦 (粉碎玄麦) を用いた。上記の培地 (pH 無調整) 100 mL を 500 mL 容のバツフル付三角フラスコに入れ、121 °C、15 分間オートクレーブ滅菌し、室温冷却後、前培養液を 2mL 接種した。その後、温度 30 °C、100 rpm にて 102 時間回転振とう培養を行った。

### 2. 酵素活性試験

グルコアミラーゼ (GAase) 活性は、遠心分離 (1,670 × g、10 分間) により得た培養上清を国税庁所定分析法に従い測定した。α-アミラーゼ (AAase) 活性は、遠心分離 (1,670 × g、10 分間) により得た培養上清を α-アミラーゼ測定キット (キッコマン) を用い、キット付属の手順書に従い測定した。

### 3. 糖類定量

遠心分離 (1,670 × g、10 分間) により得た培養上清 0.3 mL を 13,200 × g、20 分の条件で遠心式フィルター (ミリポア製ウルトラフリーMC遠心式フィルターユニット、分画分子量 10,000, Millipore, Billerica, MA, USA) にて限外ろ過した。このうち 0.1 mL を内標準として L(-)-フコース

(ACROSS ORGANICS, Geel, Belgium) を 0.22% (w/v) を含有する溶液で 10 倍に希釈後、フィルター (DISMIC-13cp、孔径 0.45  $\mu\text{m}$ , ADVANTEC 東洋) を用いてろ過したものを試料溶液とした。

試料溶液を示差屈折検出器 (RID-10A, 島津製作所) が付随した高速液体クロマトグラフ装置 (島津製作所) を用いて分析した。カラムは、Aminex HPX-87H (300 mm  $\times$  7.8mm) (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) を用い、移動相は 6 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 、流速は 0.4 mL/min、オーブン温度は 65、注入量は 10  $\mu\text{L}$  とした。

#### 4. 有機酸定量

遠心分離 (1,670  $\times g$ , 10 分間) により得た培養上清を 2 mL または 0.5 mL 採取し、内標準としてピペラジン-1,4-ビス (2-エタンスルホン酸) を 200 mg/L 含有する溶液 0.5 mL を加え、ミリ Q 水で 10 mL にする。この溶液を限外ろ過フィルター (ウルトラフリー MC 遠心式フィルターユニット、分画分子量 5000, Millipore) でろ過し、試料溶液とした。

試料溶液を質量分析装置 (Agilent 1100series single quadrupole mass spectrometer, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) が付随したキャピラリー電気泳動装置 (Agilent Technologies) を用いて分析した。

カラムは、Fused silica capillary (50  $\mu\text{m}$  i.d., 100cm) (Polymicro technologies, Phoenix, AZ, USA) を用い、泳動バッファーは 20 mM ギ酸アンモニウム (pH10.0) を用い、CE 電圧は +30 kV とし、キャピラリー温度は 25 とした。

MS 条件は、イオン化モードは ESI-Negative、MS キャピラリー電圧は 3500 V、フラグメント電圧は 120 V とした。ネブライザーガス圧力、ドライガス流量、温度はそれぞれ、10 psi、10 L/min および 300 とした。シース溶液は 5 mM アンモニアを含有する 50% (v/v) メタノール-水とし、流量は 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  とした。

#### 5. 無機窒素イオン定量

遠心分離 (1,670  $\times g$ , 10 分間) により得た培養上清をミリ Q 水で 100 倍もしくは 150 倍希釈後、フィルター (DISMIC-13cp、孔径 0.45  $\mu\text{m}$ , ADVANTEC 東洋) を用いてろ過し、試料溶液とした。

また、電気伝導度検出器 (AD25, DIONEX, Sunnyvale, CA, USA) が付随したイオンクロマトグラフ装置 (DIONEX) を用いた。

アンモニウムイオン分析では、分離カラムは IonPac CS12A (DIONEX)、ガードカラムは IonPac CG12A (DIONEX)、サプレッサーは CSRS-ULTRA (DIONEX) を用い、溶離液は 20mM メタンスルホン酸溶液、流速は 1.0 mL/min、注入量は 25  $\mu$ L とした。

硝酸イオン分析では、分離カラムは IonPac AS14 (DIONEX)、ガードカラムは IonPac AG14 (DIONEX)、サプレッサーは ASRS-ULTRA (DIONEX) を用い、溶離液は 3.5 mM 炭酸ナトリウム溶液/1 mM 炭酸水素ナトリウム溶液、流速は 1.2 mL/min、注入量は 25  $\mu$ L とした。

## 6. 菌体量測定

藤井ら<sup>30</sup>の方法に従って麹菌に Yatalase (タカラバイオ) を作用させ、麹菌体から遊離する N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 量を Reissig ら<sup>31</sup>の方法により測定した。すなわち、培養液 1 mL を採取し、遠心分離 (1,770  $\times$  g, 10 分間) 後、その沈殿物に 50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 10 mL を加え洗浄した。さらに、遠心分離 (1,770  $\times$  g, 10 分間) 後、得られた沈殿物に Yatalase 20 mg を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 10 mL を加え、37  $^{\circ}$ C、4 時間酵素反応をさせた。反応終了後、遠心分離 (1,770  $\times$  g, 10 分間) して得た上清 0.5 mL を試験管にとり、0.8 M 四ホウ酸カリウム溶液 0.1 mL を加えてピー玉でふたをし、沸騰水中で 3 分間加熱した。冷却後、*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド (*p*DMAB) 試薬を 3 mL 加え、37  $^{\circ}$ C、20 分間放置し発色させた後、585 nm の吸光度を測定した。なお、*p*DMAB 試薬は 10 g の *p*DMAB を 10N 塩酸 12.5% を含む酢酸 100 mL に溶解させ冷蔵保存しておき、使用直前に酢酸で 10 倍に希釈したものをを用いた。また、乾燥菌体 1 mg あたりに含まれる GlcNAc 量は 139  $\mu$ g として換算した<sup>32</sup>。

## 7. 遺伝子発現解析

### (1) mRNA の調製

菌体は、まず培養液をステンレスメッシュ (径 2.8 mm) によりろ過して固形状の玄麦を取り除いて回収した。回収した菌体を、冷脱イオン水により洗浄したのち、ミラクロス (メルク, Whitehouse

Station, N.J., U.S.A.) で余分な水分を取り除いた後、迅速に液体窒素を用いて凍結させた。凍結させた試料をファームラボ (<http://www.fermLab.com/>) へ送付し、以降の実験を委託した。total RNA の単離は ISOGEN (和光純薬) を用い、メーカーによる手順書に従い行った。菌体は液体窒素の中で細かく粉碎し、5 mL の ISOGEN 溶液と混合した。1 mL のクロロホルムを添加し十分混合した後、懸濁液を遠心分離 (10,000 × g, 10 分間) し、上清を 2.5 mL のイソプロパノールへ移注した。混合液を室温に 10 分間放置した後、遠心分離 (10,000 × g, 10 分間) し、沈殿物を 100%エタノールで洗浄し、再度遠心分離 (10,000 × g, 3 分間) した。得られた沈殿物を 300 μL の RNA-free 水に溶解し、使用するまで-80 °Cにて保存した。

mRNA の精製は約 200 μg の total RNA より Oligotex™-dT<sup>+</sup>mRNA Purification kit (タカラバイオ) を用い、メーカーによる手順書に従い行った。

## (2) DNA マイクロアレイ実験

260 nm における吸光度にて算出した約 1 μg の mRNA を CyScribe cDNA Post Labeling Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用い、メーカーによる手順書に従い Cy3-dUTP および Cy5-dUTP による標識化を行った。標識化された相補的 DNA (cDNA) を、CyScribe GFX Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用い、メーカーによる手順書に従い精製した。精製後、Cy3-および Cy5-にて標識化された cDNA プローブを等量混合し、エッペンドルフチューブに入れ、真空ポンプを用い乾固した。

標識化されたプローブの混合物は、10.2 μL の 20×SSC、21 μL のホルムアミド、0.6 μL の salmon testes、1.8 μL の 10%SDS、26.4 μL の蒸留水からなる 60 μL のハイブリダイゼーション溶液に再懸濁させた。熱変性 (95 °C、5 分間) 後、室温にて 30 分間インキュベートし、混合溶液を 12k *Aspergillus oryzae* oligonucleotide microarray (Fermlab) へ載せた。ハイブリダイゼーション (42 °C、15 時間) 後、2×SSC および 0.03%SDS を含む緩衝液を用い室温にて 15 分間洗浄し、次に 0.2×SSC を含む緩衝液を用い 5 分間洗浄し、最後に 0.05×SSC を用い 5 分間洗浄した。残存する溶液を取り除いた後、DNA マイクロアレイスライドを GenePix 4000B scanner (Axon Instruments at Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いてスキャンした。

非粉碎玄麦を用いた液体培養と粉碎玄麦を用いた液体培養の群間の比較について、培養 22 時間後

および 54 時間後の菌体を用い、Cy5/Cy3 の Dye swap を行い、n=4 にて行った。

### (3) データ解析

スキャンしたマイクロアレイのイメージのスポットは GenePix Pro.6.0software ( Axon Instruments at Molecular Devices ) を用いて同定した。さらに、読み取ったデータは R ( 統計処理フリーソフトウェア )( <http://www.r-project.org/> ) および BioConductor ( 統計処理フリーソフトウェア )( <http://www.bioconductor.org/> ) により解析した。規格化は、locally weighted scatter plot smoothing normalization にて行い、発現比の解析はスポットが得られたものを対象にした。

## 8. 菌体抽出物のメタボローム解析

麹菌からの菌体抽出物について、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社に委託し、CE-TOFMS 測定を実施し、菌体内代謝物濃度を決定した。

培養した菌体より代謝物を文献<sup>33</sup>の方法により水・メタノール・クロロホルム混液により抽出した。

陽イオン性代謝物質の場合、装置は Agilent CE-TOF-MSD system ( Agilent Technologies ) キャピラリーは Fused silica capillary i.d. 50  $\mu$ m  $\times$  100 cm ( ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ ) 泳動バッファーおよびリンスバッファーは Cation buffer solution ( ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ; p/n:H3301-1001 ) サンプル注入は Pressure injection, 50 mbar, 15 sec、CE 電圧は Positive 30 kV、MS イオン化は ESI Positive、MS キャピラリー電圧は 4,000 V、MS スキャン範囲は m/z50-1000、シース液は CE-MS Sheath liquid ( ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ; p/n:H3301-1020 ) とした。陰イオン性代謝物質の場合、装置は Agilent CE-TOF-MSD system ( Agilent Technologies ) キャピラリーは Fused silica capillary i.d. 50  $\mu$ m  $\times$  80 cm ( ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ ) 泳動バッファーは Anion buffer solution ( ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ; p/n:H3302-1021 ) リンスバッファーは Anion conditioning solution ( ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社; p/n:H3302-1022 ) サンプル注入は Pressure injection, 50mbar, 25sec、CE 電圧は Positive 30kV、MS ionization は ESI Negative、MS キャピラリー電圧は 3,500 V、MS scan range は m/z50-1000、シース液は CE-MS Sheath liquid ( ヒューマン・メ

タボローム・テクノロジーズ; p/n:H3301-1020)とした。

非粉碎玄麦と粉碎玄麦を用いた液体培養の 54 時間後の菌体を用い、n=5 にて行った。

### 第3項 結果および考察

#### 1. 培地中の成分変化

培養時における培地あたりの GAase 活性、AAase 活性および菌体量の経時変化に関する結果を Fig. 1 に示した。粉碎玄麦を用いた液体培養の場合は、どちらの活性も 50 時間目以降上昇が停止するのに対して、非粉碎玄麦を用いた液体培養では、いずれもより長い期間上昇し続けた。また最終的な活性値も非粉碎玄麦を用いた方が高く、GAase 活性は 1.9 倍、AAase 活性は 1.4 倍高い活性値が得られた。

菌体量は培養を通じて粉碎玄麦を用いた方が多く、最終的に 1.6 倍となった。菌体当たりの GAase 活性および AAase 活性は、培養半ばまでは大差はないが、最終的には非粉碎玄麦を用いた方が GAase 活性は 3.0 倍、AAase 活性は 2.3 倍高いと換算できる。

まず炭素源について、培地中のグルコースおよび二糖に関する濃度変化を測定した ( Fig. 2A および 2B )。非粉碎玄麦を用いた場合は粉碎玄麦を用いた場合と比較して、ともにより低い値で推移し、糖濃度が抑制されていた。一方、粉碎玄麦を用いた場合は、培養前半の 22 時間目にピークとなり、30 時間目にかけて急激に減少した。そして、50 時間目以降はどちらの場合も、見かけ上ほぼゼロであった。二つの培養において濃度に違いはあったものの、ともに培養を通じてグルコースおよび二糖の濃度は比較的lowめに推移した。グルコース濃度に関しては、*A. nidulans* においてグルコース抑制がかかりにくいと報告されている<sup>22</sup>0.05-0.1%以下に対し、前期は少し低く、後期は顕著に低かった。前期においては、グルコース抑制の影響を受ける可能性が考えられたが、後期においてはどちらの場合も顕著に濃度が低くグルコース抑制の影響を受けにくいと考えられるため、非粉碎玄麦を用いた場合に酵素がより高生産化される要因はグルコース抑制以外にあることが示唆された。

炭素源に関する代謝の違いについてさらに解析を行うため、解糖系および TCA 回路上の有機酸について調べた。ピルビン酸、コハク酸、リンゴ酸に関する経時的変化を Fig. 3A-3C に示す。いずれも培養前半に違いが見られたが、特にピルビン酸では差が顕著であった。Shoji ら<sup>27</sup>の報告によれば、玄麦を粉碎することでグルコースの遊離速度が 3.3 倍になることが示されている。粉碎玄麦を用いた場合、培養前半にはグルコースの遊離速度が大きく培地中のグルコース濃度が上がり、解糖系は活発と

なりピルビン酸が生成され培地中に分泌され濃度が上がったと考えられた。コハク酸およびリンゴ酸でも、粉碎玄麦を用いた場合は解糖系が活発となり、解糖系に続く TCA 回路上のコハク酸およびリンゴ酸が生成され培地中に分泌され、濃度が高くなったと考えられた。50 時間目以降は非粉碎玄麦を用いた場合も粉碎玄麦を用いた場合も、ともに見かけ上ゼロであった。粉碎玄麦を用いた場合は菌体量が非粉碎玄麦を用いた場合よりも増加していた (Fig. 1C) が、理由として原料成分の培地への遊離が速いため、菌が速くかつ多くの栄養成分を取り込んだためであると考えられた。

次に、窒素源として培地中に含まれる硝酸イオンおよび窒素代謝物であるアンモニウムイオンについては、二つの培養間で次の違いが見られた (Fig. 4A および 4B)。すなわち硝酸イオン濃度は、非粉碎玄麦を用いた場合には培養期間全体を通して緩やかに減少していく傾向があるが、粉碎玄麦を用いた場合は、培養開始から 30 時間目ぐらいにかけて急激に下がり、その後約 500 mg/L の一定の値に落ち着いた。また、アンモニウムイオン濃度は、非粉碎玄麦を用いた場合は培養期間全体を通して見かけ上ゼロに近い値で推移したが、一方、粉碎玄麦を用いた場合は、培養 40 時間目にて増加を始め、その後最後まで上昇を続けた。粉碎玄麦を用いた場合は、炭素源の消失が速く進むため、培養途中でグルコースが不足し代謝の変化が生じた結果、アンモニウムイオン濃度が上昇したのと考えられた。このアンモニウムイオン濃度の上昇は含窒素有機物の炭素の利用を示唆していると考えられた。アンモニウムイオン濃度の上昇する時期は、粉碎玄麦を用いた場合の酵素生産の停滞が始まる時期と一致しており、この時点で栄養成分や酵素生産に関わる誘導糖が不足している可能性が推察される。このように、培養後半において粉碎玄麦を用いた場合は窒素代謝に大きな変化が生じているのに対し、非粉碎玄麦を用いた場合については窒素代謝が培養前期からあまり変わらずに維持されていると考えられた。

## 2. 遺伝子発現解析およびメタボローム解析

菌体内の遺伝子発現を調べるため DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。粉碎玄麦を用いた場合のグルコース濃度が最大となった培養前半の 22 時間目 (Fig. 2A) および、粉碎玄麦を用いた場合に酵素活性が停滞を始める後半の 54 時間目 (Fig. 1A および 1B) に実施した。遺伝子の機能は、麹菌ゲノムデータベース ([http://www.bio.nite.go.jp/dogan/MicroTop?GENOME\\_ID=ao](http://www.bio.nite.go.jp/dogan/MicroTop?GENOME_ID=ao))、

および KEGG GENOME Database ([http://www.kegg.jp/kegg-bin/show\\_organism](http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_organism)) を参照した。

粉碎玄麦を用いた場合と非粉碎玄麦を用いた場合との間に糖濃度に違いが見られた (Fig. 2A および 2B) ことより、培養前半の 22 時間目において、発現強度で 2 倍以上の違いが有り、かつ有意差 (有意水準 5%) のあった解糖系に関連した遺伝子を、培養後半の 54 時間目の結果とともに Table 1 に示した。粉碎玄麦を用いた場合、グルコース 6 リン酸イソメラーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸キナーゼが高発現していた。今回の結果は、Nakajima ら<sup>34</sup>により報告されている、グルコース存在下と非存在下における解糖系遺伝子群の発現に関するノーザン解析の結果と特徴が一致していた。前述した通り、玄麦を粉碎した場合は、粉碎しない場合と比較してグルコース濃度が高かったため、解糖系の代謝が活発になったものと考えられた。一方、これら 3 つの遺伝子発現は培養後半では粉碎玄麦と非粉碎玄麦を用いた場合との間で有意差 (有意水準 5%) は認められなかった。

また、AAase 遺伝子および GAase 遺伝子の発現について Table 2 に示した。AAase 遺伝子については Gene ID; AO090003001498 が玄麦を用いた場合に発現強度で 2 倍以上高かったが、粉碎玄麦を用いた場合はグルコース濃度がより高かったため、グルコース抑制の影響を受けた可能性が考えられた。22 時間目における培地あたりの酵素活性は、粉碎玄麦を用いた場合の方が高かったが、粉碎玄麦を用いた場合には菌体量が多い (Fig. 1C) こと等が寄与していると考えられた。一方、GAase 遺伝子に関して、この時点で *glaA* 遺伝子<sup>35</sup> および *glaB* 遺伝子<sup>36</sup> ともに有意差 (有意水準 5%) は認められなかった (Table 2)。

培養後半になると培地あたりの酵素活性について、非粉碎玄麦を用いた場合は上昇が続くのに対して、粉碎玄麦を用いた場合は停滞するというはっきりとした違いが見られ (Fig. 1A および 1B)、アミラーゼ系酵素群に関する遺伝子発現においても大きな差が見られた (Table 2)。AAase 遺伝子では AO090003001497、AO090003001498 および AO090120000196 について非粉碎玄麦を用いた場合は粉碎玄麦を用いた場合よりも発現強度が 2 倍以上高かった。興味深いことに、GAase 遺伝子に関しては、*glaA* 遺伝子に加え固体培養特異的である *glaB* 遺伝子も玄麦を用いた場合の方が発現強度が 2 倍以上高かった。非粉碎玄麦を用いた場合と粉碎玄麦を用いた場合の酵素遺伝子に関する発現の差が見られた理由については、どちらの場合も前述の通り、後期になると培地中の糖が見かけ上なくなってしまうため、CreA<sup>37,38</sup> による抑制はどちらも大きく受けなかったが、AmyR<sup>24,25,39</sup> による酵素生産の誘

導に違いがあった可能性が考えられた。すなわち、非粉碎玄麦を用いた場合は酵素生産に関わる誘導糖が存在していたが、粉碎玄麦を用いた場合はアンモニウムイオンの上昇に関して考察したように、培地中の誘導糖が消失していたことが推察された。同じく糖化酵素である  $\alpha$ -グルコシダーゼの発現について Table 3 に示した。非粉碎玄麦を用いた場合は、培養後期に AO090003001209、AO090026000034 および AO090038000234 について粉碎玄麦を用いた場合より発現強度が 2 倍以上になっていた。発現上昇した理由は AAase および GAase と同様であると推察された。

培地中の無機窒素成分の経時的変化の違いが見られた (Fig. 4A および 4B) ことより、培養後半における無機窒素に関する培遺伝子発現について、発現強度で 2 倍以上の違いがあり、かつ有意差 (有意水準 5%) のあった遺伝子を、培養前半の 22 時間目の結果とともに Table 4 に示した。玄麦を用いた場合は粉碎玄麦を用いた場合と比べ、硝酸の取り込みに関係する硝酸トランスポーター (AO090012000623, AO090012000169) 硝酸レダクターゼ (AO090012000626) アンモニアトランスポーター (AO090001000707, AO090023000411, AO090038000314) またアンモニアとグルタミン酸からグルタミンを生合成するグルタミンシンセターゼ遺伝子 (AO090009000269) の発現強度が 2 倍以上になっていた。*A. oryzae* の硝酸トランスポーター遺伝子は NRT2 型 NRT (nitrate transporter) に分類され、*A. nidulans* の硝酸トランスポーター *crnA* と相同性が極めて高い。当硝酸トランスポーターは *AreA* により制御されている<sup>40</sup>と報告されている。同じく硝酸レダクターゼにおいても有意差が認められた。粉碎玄麦を用いた場合と非粉碎玄麦を用いた場合において、培地中の無機窒素成分の経時的変化の違いに加え、関連する遺伝子発現にも違いが見られた。後期の遺伝子発現と同じタイミングで菌体抽出物のメタボローム解析を行った結果を Table 5 および 6 に示す。全てのアミノ酸において粉碎玄麦を用いた場合は非粉碎玄麦を用いた場合より多いことを確認した。粉碎玄麦を用いた場合の方が多かった理由として、培養初期より大麦から栄養成分が速く遊離してくるため、それまでの培養期間においてアミノ酸を貯め込んだのに対し、一方の非粉碎玄麦を用いた場合は、大麦から栄養成分が緩やかに遊離してくるため、粉碎玄麦の場合と比較して菌体内にアミノ酸の蓄積が少なかったと推察された。また、メタボロームの結果を利用し、アデニル酸のエネルギーチャージを  $[(ATP) + 1/2 (ADP)] / [(ATP) + (ADP) + (AMP)]$ <sup>41</sup>にて算出し粉碎玄麦と非粉碎玄麦の場合とを比較すると、粉碎玄麦を用いた場合は 0.93 であったのに対し非粉碎玄麦を用いた場合は 0.90 であ

り、やや粉碎玄麦を用いた場合の方が高い傾向があった。他の代謝物については、粉碎玄麦を用いた場合は非粉碎玄麦を用いた場合よりもヌクレオチド、ヌクレオシド、リン酸化有機酸、核酸塩基、CoA類、有機酸、ニコチンアミド補酵素など一般的に菌体内の代謝物濃度が高いため、54 時間目の時点では粉碎玄麦を用いた場合の方が菌体の活性がやや高いと推察される。しかし、粉碎玄麦を用いた場合は54 時間目以降、酵素生産も停滞し始め (Fig. 1A および 1B)、アンモニウムイオン濃度が立ち上がる (Fig. 4B) ことから、培地中の栄養成分が消失し含窒素有機物の炭素を利用し始めると考えられる。このため、菌体内代謝物濃度や活性もこの後急速に低下し始めると推察される。一方の非粉碎玄麦を用いた場合は、酵素生産が続き (Fig. 1A および 1B)、アンモニウムイオン濃度も低いまま維持される (Fig. 4B) ことから、菌体内の代謝物をあまり蓄積することなく、54 時間目以降も栄養成分を緩やかに取り込みながら培養期間全体を通して酵素生産に必要な代謝の活性を維持できることが酵素高生産につながっている可能性が推察された。

ここで、培養前半および後半において2つの培養条件にて比較し、発現比の異なる遺伝子上位100位を示す (Table 7および8)。培養前半において、非粉碎玄麦にて発現の高かった遺伝子としてヒドロフォピン (AO090012000370)、MYB family conidiophore development protein FlbD (AO090005000765) のような分生子形成に関係する遺伝子、高親和性グルコーストランスポーター (AO090003001556)、F-Box タンパク質 (AO090003001005) 等がみられた。培養後半において、非粉碎玄麦にて高かった遺伝子として  $\alpha$ -グルコシダーゼ (AO090038000234、AO090026000034)、GAase (AO090010000746、AO090003000321)、AAase (AO090120000196、AO090003001498) のような糖質分解酵素、硝酸イオントランスポーター (AO090012000623)、硝酸レダクターゼ (AO090012000626)、アンモニウムトランスポーター (AO090001000707、AO090038000314) のような無機窒素の輸送や代謝に関係する遺伝子、タンパク質の分泌輸送に関係するendoplasmic reticulum resident kdel protein (AO090102000071) 等が、また粉碎玄麦にて高かった遺伝子として細胞周期に関係するcyclin dependent kinase (AO090026000669) 等がみられた。これまで触れてこなかった遺伝子について以下述べる。培養前半において非粉碎玄麦にてヒドロフォピン、MYB family conidiophore development protein FlbD、また100位には入っていなかったがラッカーゼ (AO090166000081) 等、分生子形成に関係する遺伝子、また、F-Box タンパク質、100位には入っ

ていなかったがタンパク質のフォールディングを助けるシャペロンの一つである *bipA*

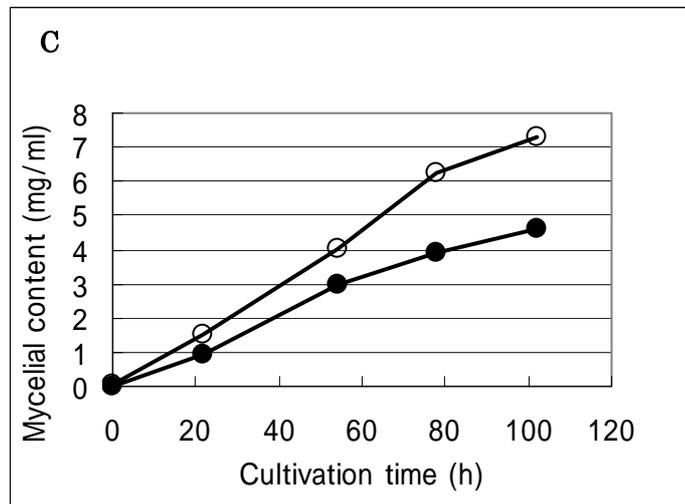
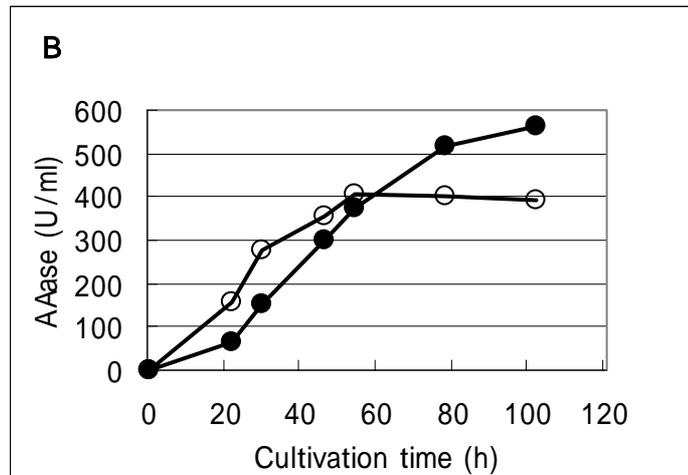
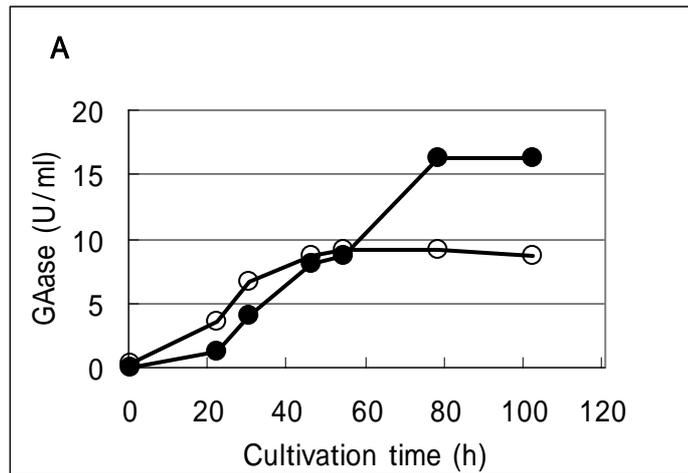
(AO090003000257) が粉碎玄麦よりも高発現していた。ケモスタットによる比増殖速度をゼロに近づける液体培養により、*A. niger*の液体培養における分生子形成および二次代謝を誘導することが報告されているが<sup>42</sup>、この制限された培養条件下では、翻訳後修飾の誘導は分生子形成と相互関係にあり、翻訳後修飾を活性化させることがハイドロフォピンなどの分生子形成関連タンパク質の生産に有用であることが示されている。本研究において、非粉碎玄麦を使用した液体培養での分生子形成に関わる遺伝子や *bipA* の高発現により翻訳後修飾が活性化された可能性がある。一方、培養後半の非粉碎玄麦において、タンパク質の分泌輸送に関係する endoplasmic reticulum resident kdel protein 遺伝子が高発現していたことにより、分泌輸送が活性化された可能性がある。また、粉碎玄麦にて細胞周期に関係する cyclin dependent kinase の高発現がみられた。液体培養においては、菌体が増殖し過ぎると培地の粘性が上がり酸素供給がしにくくなり、また栄養成分も菌体増殖に使われてしまうため、過度な増殖は酵素生産にとって好ましくない。Fig. 1C に示したように菌体量は非粉碎玄麦の方が少なく、非粉碎玄麦において細胞周期に関係する cyclin dependent kinase が低発現であったことが増殖抑制につながり、酵素生産に正に寄与した可能性も推察される。これらの結果が複合的にアミラーゼ系酵素の高生産に寄与した可能性がある。上述の知見は、これまでの AmyR と CreA で説明されてきた従来のアミラーゼ系酵素発現様式や Sudoら<sup>43,44</sup> が報告している菌体内のグリコーゲンに関する代謝以外の新しい知見である。

以上より、*A. oryzae* による非粉碎玄麦を用いた液体培養により酵素が高生産される理由として以下のような仮説を考察した。まず培養前半では、粉碎玄麦を用いた培養では糖濃度が上がり、解糖系の代謝が活発になる。一方、非粉碎玄麦を用いた場合は、糖濃度が上がらず、また分生子形成が促され翻訳後修飾が活性化される。培養後半になると粉碎玄麦を用いた培養では、栄養成分が枯渇することから窒素化合物に関する代謝に大きな変化が生じるとともに、酵素生産が誘導されず酵素活性が停滞する。一方、玄麦を用いた場合は、グルコース濃度が低く維持され、酵素生産に関わる誘導糖や栄養成分が供給され続けるため、アミラーゼ系酵素遺伝子が高発現し、菌全体の代謝系の必要な活性が維持される。また、分泌輸送に関わる遺伝子は発現上昇し、増殖を促進する遺伝子発現は低下する。これらが複合的に関与して酵素高生産へつながっている。

本研究において、非粉碎玄麦を用いた液体培養において酵素高生産をもたらす機構を解析した。解析の結果、培養期間全体を通してグルコース濃度は低く維持されながら誘導糖が供給されるため、CreA による抑制を受けず、AmyR により酵素生産が誘導され、アミラーゼ系酵素遺伝子が高発現する。また、分生子形成が促され翻訳後修飾や分泌輸送が活性化される。さらに栄養成分が供給され続けるため、代謝系の活性は保たれる。これらが複合的に関与して酵素高生産につながっているという新しい機構を考察した。

## 第4項 要約

これまで Shoji ら<sup>27</sup>は、*A. kawachii*の液体培養において穀皮によりデンプン質が覆われた状態の大麥(大麥玄麥)を用いることで酵素高生産が可能になることを報告した。本機構を明らかにするため、酵素生産に関するより詳細な解析を行った。ゲノム解析が完了し、DNA マイクロアレイの利用が可能な *A. oryzae* RIB40 について、玄麥および粉碎した玄麥を用い、メタボローム解析および遺伝子発現の面から解析を行った。培養前半では、粉碎玄麥を用いた培養は糖濃度が上がるため、解糖系の代謝が活発になる一方、玄麥を用いた場合は、糖濃度が上がらず、また、分生子形成が促され翻訳後修飾が活性化される。培養後期においては、粉碎玄麥を用いた培養は、原料からの糖をはじめとする栄養成分の消失が速い。栄養成分が不足することから窒素化合物に関する代謝に大きな変化が生じ、酵素生産に関わる誘導糖も消失するため酵素生産が停滞する。一方、玄麥を用いた場合は、糖類をはじめとする栄養成分の遊離が遅くグルコース濃度が低く維持され、栄養成分や酵素生産に関わる誘導糖が緩やかに長く供給され続けることが可能である。その結果として、菌全体の代謝系の必要な活性が維持されながら、CreA によるグルコース抑制を受けず、また AmyR により酵素生産が誘導され続け、アミラーゼ系酵素遺伝子が発現上昇する。また、分生子形成が促され翻訳後修飾や分泌輸送に関わる遺伝子も発現上昇する。以上のように CreA および AmyR によるアミラーゼ系酵素遺伝子の発現上昇に加え、翻訳後修飾や分泌輸送の活性化、そして培養期間を通じた代謝系の維持が複合的に関与して酵素高生産につながっているという新しい機構を考察した。この機構は、AmyR と CreA で説明されてきた従来のアミラーゼ系酵素発現様式に対して新たな一面をもつ機構である。

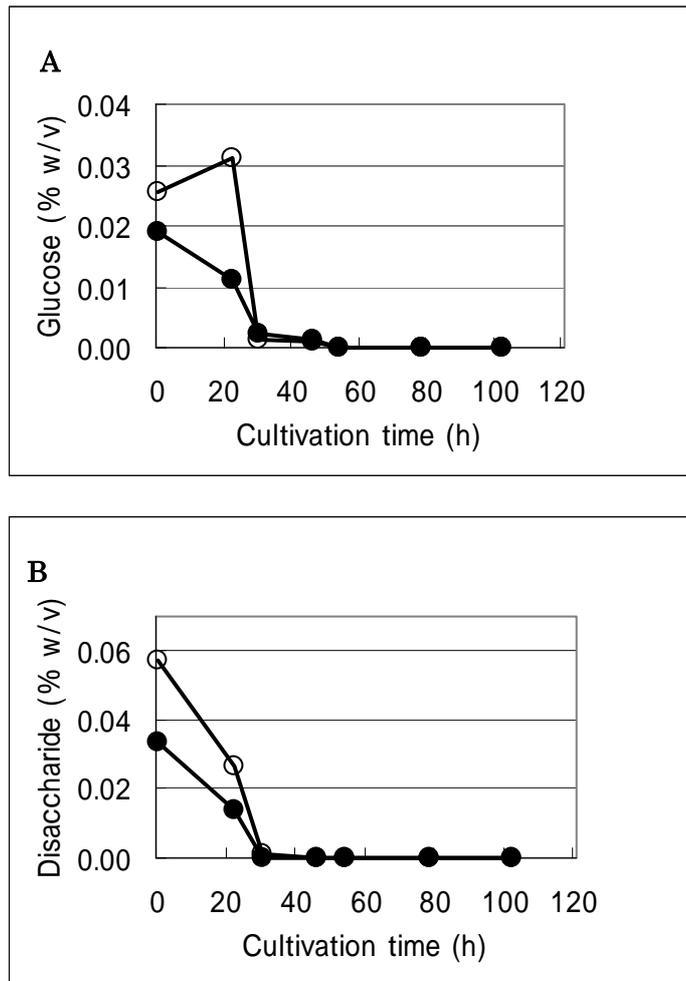


**Fig. 1. Time course of enzyme activity in culture and mycelial weight.**

*A. oryzae* RIB40 strain was cultured with rotary shaking in 100 mL of a modified

Czapek-Dox medium at 30°C for 102 hours. Unmilled whole barley and milled whole barley were used as the carbon sources.

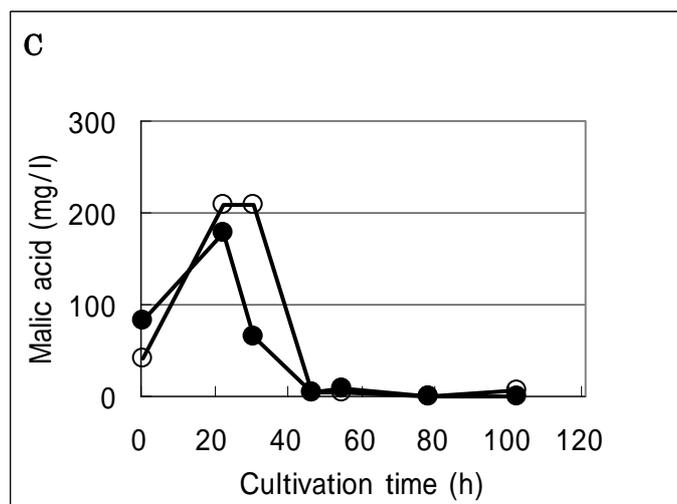
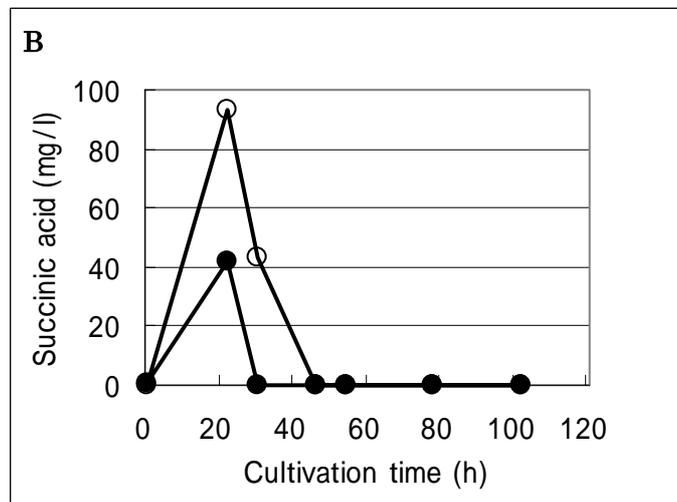
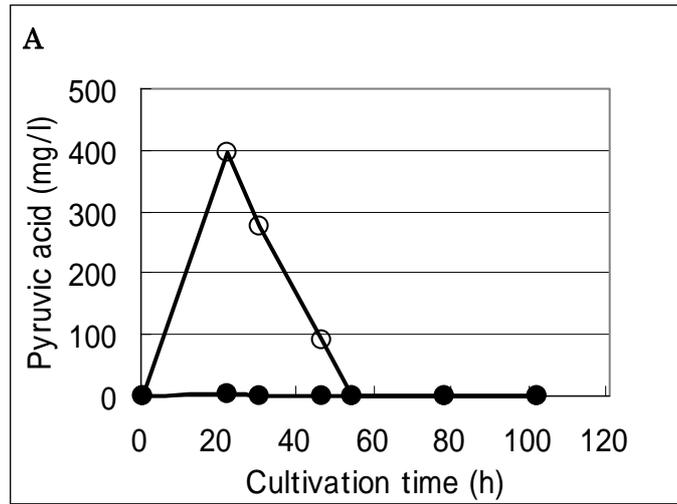
(A) GAase activity, (B) AAase activity, and (C) Mycelial content. Symbols: ,  
Unmilled whole barley; , Milled whole barley.



**Fig. 2. Time course of sugar concentration in culture.**

*A. oryzae* RIB40 strain was cultured with rotary shaking in 100 mL of a modified Czapek-Dox medium at 30°C for 102 hours. Unmilled whole barley and milled whole barley were used as the carbon sources.

(A) Glucose and (B) Disaccharide. Symbols:  $\circ$ , Unmilled whole barley;  $\bullet$ , Milled whole barley.

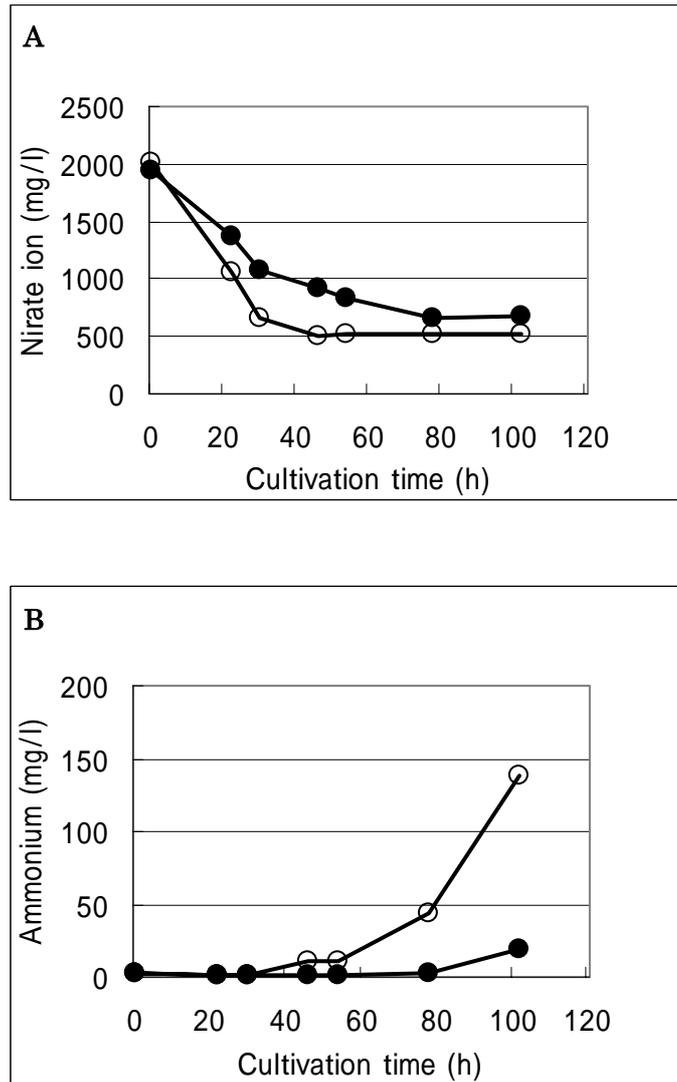


**Fig. 3. Time courses of concentrations of organic acids in culture.**

*A. oryzae* RIB40 strain was cultured with rotary shaking in 100 mL of a modified

Czapek-Dox medium at 30°C for 102 hours. Unmilled whole barley and milled whole barley were used as the carbon sources.

(A) Pyruvic acid, (B) Succinic acid, and (C) Malic acid. Symbols:     , Unmilled whole barley;     , Milled whole barley.



**Fig. 4. Time courses of concentrations of nitrogen ions in culture.**

*A. oryzae* RIB40 strain was cultured with rotary shaking in 100 mL of a modified Czapek-Dox medium at 30°C for 102 hours. Unmilled whole barley and milled whole barley were used as the carbon sources.

(A) Nitrate ion and (B) Ammonium. Symbols:  $\circ$ , Unmilled whole barley;  $\bullet$ , Milled whole barley.

**Table 1. Difference in the glycolytic gene group expression intensity (at 22 and 54 hours of culture).**

Gene ID	Function description	at 22 hours		at 54 hours	
		Fold change <sup>a</sup>	adj. <i>P</i> Val <sup>b</sup>	Fold change <sup>a</sup>	adj. <i>P</i> Val <sup>b</sup>
AO090011000659	Glucose-6-phosphate isomerase	0.39	0.010	0.84	0.233
AO090005000003	Hexokinase	0.40	0.014	1.06	0.758
AO090005001556	Pyruvate kinase	0.49	0.045	0.94	0.652

a: The expression ratio (unmilled whole barley / milled whole barley).

b: Corrected *p*-value with multiple comparison taken into consideration.

**Table 2. Difference in alpha-amylase and glucoamylase gene group expression intensity (at 22 and 54 hours of culture).**

Gene ID	Function description	at 22 hours		at 54 hours	
		Fold change <sup>a</sup>	adj. <i>P</i> .Val <sup>b</sup>	Fold change <sup>a</sup>	adj. <i>P</i> .Val <sup>b</sup>
AO090003001497	alpha-amylase	0.58	0.087	3.68	0.016
AO090003001498	alpha-amylase	2.31	0.027	6.03	0.005
AO090005001193	alpha-amylase	0.84	0.517	1.17	0.255
AO090120000196	alpha-amylase A type-1/2	1.23	0.651	7.69	0.002
AO090010000746	glucoamylase ( <i>glaA</i> )	1.13	0.585	10.79	0.006
AO090003000321	glucoamylase ( <i>glaB</i> )	1.86	0.072	4.62	0.003

a: The expression ratio (unmilled whole barley / milled whole barley).

b: Corrected *p*-value with multiple comparison taken into consideration.

**Table 3. Difference in alpha-glucosidase gene group expression intensity (at 22 and 54 hours of culture).**

Gene ID	Function description	at 22 hours		at 54 hours	
		Fold change <sup>a</sup>	adj. <i>P</i> .Val <sup>b</sup>	Fold change <sup>a</sup>	adj. <i>P</i> .Val <sup>b</sup>
AO090003001209	alpha-glucosidase	0.36	0.018	2.89	0.002
AO090005001084	alpha/beta-glucosidase agdC	1.66	0.098	0.72	0.033
AO090020000176	alpha-glucosidase	NA <sup>c</sup>	NA <sup>c</sup>	NA <sup>c</sup>	NA <sup>c</sup>
AO090023000288	alpha-glucosidase	1.06	0.913	1.33	0.189
AO090026000034	alpha-glucosidase	3.25	0.035	8.40	0.012
AO090038000234	alpha-glucosidase	17.89	0.021	35.20	0.001
AO090103000129	alpha-glucosidase	NA <sup>c</sup>	NA <sup>c</sup>	1.62	0.121
AO090103000378	alpha-glucosidase	3.68	0.009	1.49	0.131
AO090701000558	alpha-glucosidase	1.28	0.421	0.99	0.964

a: The expression ratio (unmilled whole barley / milled whole barley).

b: Corrected *p*-value with multiple comparison taken into consideration.

c: Not available

**Table 4. Difference of inorganic nitrogen metabolism-related gene group expression intensity (at 22 and 54 hours of culture).**

Gene ID	Function description	at 22 hours		at 54 hours	
		Fold change <sup>a</sup>	adj. <i>P</i> Val <sup>b</sup>	Fold change <sup>a</sup>	adj. <i>P</i> Val <sup>b</sup>
AO090012000623	nitrate transporter	0.68	0.252	31.48	0.005
AO090012000169	formate/nitrate family transporter	0.28	0.036	2.87	0.027
AO090012000626	nitrate reductase [NADPH]	1.25	0.572	37.51	0.003
AO090001000707	ammonium transporter 2	0.99	0.969	41.96	0.012
AO090023000411	ammonium transporter	0.26	0.017	2.76	0.057
AO090038000314	ammonium transporter 1	0.31	0.030	17.98	0.001
AO090009000269	glutamine synthetase	0.72	0.174	2.73	0.004
AO090011000308	glutamine synthetase	0.18	0.003	0.79	0.106

a: The expression ratio (unmilled whole barley / milled whole barley).

b: Corrected *p*-value with multiple comparison taken into consideration.

**Table 5. Measured values of major metabolites <sup>a</sup> (Positive ion mode) .**

(nmol/g)

Metabolite	Unmilled whole barley		Milled whole barley	
	Mean	SD	Mean	SD
<b>Amino Acids</b>				
Gly	572.0	222.6	1276.4	346.6
-Ala	83.6	37.2	263.8	63.6
Ala	1568.2	791.7	3453.4	820.3
-Aminobutyric acid	297.4	212.6	1404.6	1736.5
Ser	1331.4	470.6	2728.8	815.7
Pro	459.4	182.6	1181.0	322.0
Val	305.0	120.3	1010.2	336.2
Homoserine	11.2	3.4	14.7	6.3
Thr	568.0	234.0	1869.4	451.3
Cys	ND	-	2.2	0.7
Hydroxyproline	7.4	2.9	9.3	2.6
Ile	205.2	84.3	528.6	141.7
Leu	212.8	91.0	477.2	152.8
Asn	556.8	235.3	2247.8	704.4
Ornithine	91.4	39.8	698.2	364.3
Asp	2832.8	720.0	3471.2	1277.4
Gln	5974.6	2400.6	14004.6	4569.8
Lys	515.6	250.7	2702.6	731.1
Glu	10398.8	3254.9	15846.8	4950.5
Met	61.4	24.2	113.4	34.4
His	395.0	182.6	2222.6	476.9

Phe	95.8	45.9	201.8	82.7
Arg	160.8	81.7	1534.4	597.3
Citrulline	4.8	1.8	7.7	4.7
Tyr	199.4	91.9	408.0	142.5
Trp	28.0	14.1	64.6	21.2
<b>Amines</b>				
Putrescine	28.4	10.4	30.2	8.6
Spermidine	10.4	3.4	15.4	4.5
Spermine	ND	-	0.6	0.2
<b>Nucleobase</b>				
Cytosine	ND	-	ND	-
Uracil	ND	-	ND	-
Adenine	0.4	0.3	0.7	0.2
Guanine	ND	-	ND	-
<b>Nucleosides</b>				
Cytidine	1.1	0.7	1.5	0.6
Uridine	ND	-	ND	-
Adenosine	0.9	0.4	0.8	0.3
Inosine	ND	-	0.3	0.7
Guanosine	1.6	0.9	2.7	1.0
<b>Others</b>				
Creatinine	ND	-	0.1	0.1
Creatine	ND	-	ND	-
Hypoxanthine	ND	-	ND	-
Anthranilic acid	ND	-	ND	-
Tyramine	ND	-	ND	-

DOPA	ND	-	ND	-
Carnosine	ND	-	0.4	0.9
Glutathione(GSSG)	203.0	92.1	247.4	76.9
Glutathione (GSH)	114.2	53.2	510.0	105.6
S-Adenosylmethionine	21.2	5.8	35.4	8.4

---

<sup>a</sup> Amount of compounds contained in the mycelia 1g (nmol).

**Table 6. Measured values of major metabolites <sup>a</sup> (Negative ion mode).**

(nmol/g)

Metabolite	Unmilled whole barley		Milled whole barley	
	Mean	SD	Mean	SD
<b>Phosphorylated Organic</b>				
<b>Acids</b>				
Phosphoenolpyruvic acid	34.2	12.8	53.6	24.6
Dihydroxyacetone phosphate	15.2	3.6	20.4	4.3
Glycerol 3-phosphate	50.4	16.7	79.6	23.6
3-Phosphoglyceric acid	97.0	28.8	132.4	51.9
Erythrose 4-phosphate	ND	-	ND	-
Ribulose 5-phosphate	15.4	6.5	16.0	5.1
Ribose 5-phosphate	4.0	1.5	4.0	1.4
G6P	170.4	101.6	249.0	107.6
F6P	55.2	34.4	78.0	39.9
G1P	10.4	5.6	14.5	7.7
6-Phosphogluconic acid	10.1	4.5	19.0	6.3
Sedoheptulose 7-phosphate	44.4	30.3	50.2	23.3
Fructose 1,6-diphosphate	6.9	1.7	6.2	2.5
<b>CoA</b>				
CoA	1.2	0.9	3.8	1.3
Acetyl CoA	3.5	1.3	5.1	2.3
Malonyl CoA	ND	-	ND	-
Succinyl CoA	ND	-	ND	-
<b>Organic Acids</b>				

Glyoxylic acid	ND	-	1.0	2.1
Glycolic acid	16.2	23.0	29.2	27.9
Pyruvic acid	54.4	17.2	86.4	17.5
Lactic acid	588.2	242.2	989.0	818.3
Fumaric acid	821.2	273.2	1065.0	244.2
2-Oxoisovaleric acid	2.9	1.7	15.1	15.1
Succinic acid	157.2	57.6	260.0	55.7
Malic acid	2978.0	1016.5	3318.2	664.5
2-Oxoglutaric acid	200.8	72.5	174.2	39.4
cis-Aconitic acid	59.2	22.2	67.8	13.1
Citric acid	1944.2	710.1	2222.8	450.1
Isocitric acid	39.4	16.1	50.0	8.4
Gluconic acid	15.6	5.6	11.4	4.1

#### **Nicotinamide Coenzyme**

NAD+	59.4	14.9	99.0	32.6
NADH	5.8	1.9	7.6	1.6
NADP+	5.6	1.9	9.4	3.2
NADPH	15.2	3.0	29.4	8.9
FAD	4.2	1.5	9.7	3.9

#### **Nucleotides**

dTMP	ND	-	ND	-
CMP	1.9	1.1	2.2	0.4
cAMP	ND	-	0.9	1.6
cGMP	ND	-	7.2	1.7
AMP	12.2	7.5	13.8	2.7
IMP	1.5	1.3	1.8	1.3

GMP	1.7	1.0	2.0	0.4
PRPP	2.2	2.2	5.1	1.8
dTDP	ND	-	ND	-
CDP	4.5	2.0	5.6	1.8
ADP	74.2	31.8	97.0	29.7
GDP	16.8	5.6	25.6	7.4
dCTP	ND	-	0.5	0.5
dTTP	0.6	0.6	1.4	0.5
CTP	23.0	6.0	41.8	13.9
UTP	59.6	16.1	73.4	26.0
dATP	0.3	0.5	0.6	0.7
ATP	417.0	108.8	746.4	233.4
GTP	47.4	11.2	92.6	32.2

---

<sup>a</sup> Amount of compounds contained in the mycelia 1g (nmol).

**Table 7. The top 100 genes with highest fold changes (at 22 h of culture)**

unmilled whole barley &gt; milled whole barley

	Gene name	Function description <sup>a</sup>	Fold change <sup>b</sup>	adj. <i>P</i> -Val <sup>c</sup>
1	AO090012000370	hydrophobin	170.13	0.002
2	AO090005000502	lectin	91.92	0.002
3	AO090026000408	hypothetical protein	72.05	0.003
4	AO090001000260	cytochrome P450	69.49	0.004
5	AO090011000461	hypothetical protein	51.37	0.002
6	AO090026000576	hypothetical protein	47.67	0.003
7	AO090701000316	oxaloacetate acetylhydrolase	47.66	0.002
8	AO090701000528	O-methyltransferase	45.93	0.003
9	AO090103000161	protein kinase domain protein	41.31	0.025
10	AO090120000454	hypothetical protein	36.31	0.005
11	AO090701000400	beta-fructofuranosidase	29.58	0.004
12	AO090103000248	MFS transporter	29.18	0.023
13	AO090011000020	galactose oxidase	28.03	0.003
14	AO090011000912	hypothetical protein	27.24	0.018
15	AO090003001302	hypothetical protein	26.41	0.002
16	AO090012000164	hypothetical protein	23.51	0.007
17	AO090701000640	hmg-CoA reductase	23.42	0.002
18	AO090023000238	hypothetical protein	22.68	0.004
19	AO090011000053	hypothetical protein	20.14	0.003
20	AO090005001318	hypothetical protein	18.66	0.002
21	AO090038000234	alpha-glucosidase	17.89	0.021

22	AO090012000396	hypothetical protein	17.77	0.010
23	AO090102000457	hypothetical protein	17.49	0.003
24	AO090020000381	amine oxidase, flavin-containing superfamily	16.94	0.002
25	AO090023000021	methyltransferase family protein	16.86	0.002
26	AO090701000644	mono- and diacylglycerol lipase	16.06	0.002
27	AO090005000241	hypothetical protein	15.81	0.004
28	AO090020000179	molybdopterin synthase catalytic subunit	15.79	0.025
29	AO090026000589	hypothetical protein	15.66	0.007
30	AO090026000095	hypothetical protein	15.56	0.004
31	AO090138000122	hypothetical protein	15.15	0.006
32	AO090103000244	hypothetical protein	15.04	0.002
33	AO090026000043	hypothetical protein	14.37	0.002
34	AO090011000829	hypothetical protein	14.32	0.002
35	AO090003001461	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	13.95	0.003
36	AO090120000158	beta-galactosidase B	13.68	0.011
37	AO090701000530	polyketide synthase	13.01	0.003
38	AO090038000061	tyrosinase	12.93	0.009
39	AO090026000409	hypothetical protein	12.80	0.002
40	AO090012000397	hypothetical protein	12.08	0.002
41	AO090001000058	hypothetical protein	11.88	0.014
42	AO090005000254	viral-enhancing factor	11.83	0.039
43	AO090103000108	hypothetical protein	11.75	0.002
44	AO090038000233	MFS alpha-glucoside transporter	11.59	0.031

45	AO090009000116	hypothetical protein	11.54	0.008
46	AO090003001556	glucose transporter rco-3	11.13	0.034
47	AO090003001005	F-box domain protein	10.84	0.008
48	AO090003000174	phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	10.69	0.013
49	AO090001000063	cell wall glycosyl hydrolase YteR	10.53	0.044
50	AO090005000387	hypothetical protein	10.39	0.005
51	AO090003000310	alternative oxidase	10.22	0.031
52	AO090020000693	hypothetical protein	9.96	0.008
53	AO090023000328	hypothetical protein	9.88	0.046
54	AO090012000445	beta-galactosidase E	9.84	0.006
55	AO090003000018	heat shock protein	9.60	0.035
56	AO090701000525	oxidoreductase FAD-binding protein	9.51	0.004
57	AO090701000109	hypothetical protein	9.41	0.003
58	AO090023000260	thioredoxin reductase GlT	9.32	0.009
59	AO090003001296	zinc-regulated transporter 1	9.27	0.036
60	AO090010000640	L-amino acid oxidase LaoA	9.17	0.016
61	AO090003001036	oryzin	9.04	0.002
62	AO090001000189	fucose-specific lectin FleA	8.75	0.002
63	AO090001000173	Zn <sup>2+</sup> dependent hydrolase	8.66	0.050
64	AO090012000066	O-methylsterigmatocystin oxidoreductase	8.65	0.005
65	AO090103000145	hypothetical protein	8.38	0.009
66	AO090010000280	hypothetical protein	8.36	0.006
67	AO090026000585	nonribosomal peptide synthase	8.14	0.005

68	AO090023000386	hypothetical protein	8.09	0.006
69	AO090001000073	secretory phospholipase A2	8.04	0.011
70	AO090020000210	tartrate dehydrogenase/decarboxylase ttuC	7.98	0.005
71	AO090005000765	MYB family conidiophore development protein FlbD	7.96	0.002
72	AO090005000064	endo-arabinase	7.91	0.002
73	AO090138000055	arabinan endo-1,5-alpha-L-arabinosidase C	7.74	0.012
74	AO090020000420	hypothetical protein	7.72	0.005
75	AO090010000704	hypothetical protein	7.69	0.035
76	AO090010000712	2OG-Fe(II) oxygenase family oxidoreductase	7.68	0.004
77	AO090009000036	hypothetical protein	7.64	0.002
78	AO090003000681	hypothetical protein	7.60	0.005
79	AO090701000317	hypothetical protein	7.52	0.007
80	AO090038000223	beta-glucosidase G	7.49	0.023
81	AO090120000378	arrestin (or S-antigen), N-terminal domain protein	7.36	0.035
82	AO090020000640	extracellular invertase	7.11	0.007
83	AO090701000326	hypothetical protein	7.08	0.005
84	AO090138000024	sensor histidine kinase/response regulator	7.05	0.037
85	AO090005000641	C2H2 finger domain protein	6.95	0.003
86	AO090023000641	nucleolar GTP-binding protein 2	6.79	0.034
87	AO090701000529	metallo-beta-lactamase domain	6.78	0.006

		protein		
88	AO090038000156	hypothetical protein	6.62	0.005
89	AO090038000389	ABC multidrug transporter	6.51	0.010
90	AO090005000471	siderochrome-iron transporter (Sit1)	6.46	0.007
91	AO090011000054	hypothetical protein	6.31	0.006
92	AO090102000125	succinate/fumarate transporter	6.31	0.025
93	AO090009000308	folylpolyglutamate synthase	6.29	0.010
94	AO090003001003	thermoresistant gluconokinase family protein	6.29	0.023
95	AO090011000818	hypothetical protein	6.27	0.015
96	AO090012000742	hypothetical protein	6.19	0.004
97	AO090011000119	cell wall serine-threonine-rich galactomannoprotein Mp1	6.14	0.044
98	AO090001000749	ATP-dependent RNA helicase dbp3	6.09	0.040
99	AO090103000465	hypothetical protein	6.06	0.010
100	AO090020000542	hypothetical protein	6.02	0.009

unmilled whole barley < milled whole barley

	Gene name	Function description <sup>a</sup>	Fold change <sup>b</sup>	adj. <i>P</i> -Val <sup>c</sup>
1	AO090120000106	cytochrome P450 monooxygenase	0.05	0.011
2	AO090701000440	hypothetical protein short-chain	0.06	0.002
3	AO090011000302	dehydrogenase/reductase family protein	0.07	0.005

4	AO090103000387	hypothetical protein	0.07	0.006
5	AO090023000033	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	0.07	0.007
6	AO090020000444	L-kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase	0.08	0.006
7	AO090020000493	isovaleryl-CoA dehydrogenase 2	0.08	0.004
8	AO090026000800	blasticidin-S deaminase	0.10	0.004
9	AO090011000328	hypothetical protein	0.10	0.047
10	AO090003000230	hypothetical protein	0.11	0.003
11	AO090701000437	hypothetical protein	0.11	0.010
12	AO090005000307	UMTA methyltransferase family protein	0.11	0.010
13	AO090001000555	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha	0.11	0.008
14	AO090003001415	cytochrome P450 monooxygenase	0.12	0.002
15	AO090011000870	allantoate transporter	0.12	0.018
16	AO090010000495	GNAT family acetyltransferase	0.12	0.002
17	AO090012000351	hypothetical protein	0.12	0.006
18	AO090012000055	GNAT family acetyltransferase	0.12	0.021
19	AO090003000208	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	0.13	0.003
20	AO090010000642	hypothetical protein	0.13	0.015
21	AO090701000436	cytochrome P450 oxidoreductase	0.13	0.023
22	AO090701000806	competence/damage-inducible protein CinA	0.13	0.006
23	AO090003001008	biotin-dependent 2-oxo acid dehydrogenases acyltransferase	0.13	0.003

24	AO090011000444	hypothetical protein	0.14	0.003
25	AO090003000854	urea active transporter 1	0.14	0.028
26	AO090005001066	ABC transporter	0.14	0.003
27	AO090012000973	hypothetical protein	0.14	0.003
28	AO090701000373	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	0.15	0.003
29	AO090009000148	aspartic-type endopeptidase opsB	0.15	0.007
30	AO090012000315	oligopeptide transporter family	0.15	0.002
31	AO090102000498	aromatic amino acid aminotransferase	0.15	0.003
32	AO090010000350	bicyclomycin resistance protein	0.15	0.010
33	AO090023000349	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta	0.15	0.015
34	AO090012000017	expressed protein	0.16	0.018
35	AO090102000360	protein NMT1	0.16	0.003
36	AO090701000435	hypothetical protein	0.16	0.032
37	AO090102000261	ankyrin repeat-containing protein	0.16	0.009
38	AO090103000468	hexose carrier protein	0.17	0.027
39	AO090010000229	MFS peptide transporter Ptr2	0.17	0.003
40	AO090020000533	hypothetical protein	0.17	0.009
41	AO090020000492	methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain	0.17	0.011
42	AO090011000408	cyclase	0.17	0.003
43	AO090009000101	hypothetical protein	0.17	0.034
44	AO090701000577	phenazine biosynthesis-like protein	0.17	0.007
45	AO090003000496	MFS allantoate transporter	0.17	0.009

46	AO090701000359	inositol-3-phosphate synthase	0.17	0.025
47	AO090003000866	hypothetical protein	0.18	0.003
48	AO090005000941	GNAT family acetyltransferase	0.18	0.017
49	AO090003000627	RTA1 domain protein	0.18	0.003
50	AO090026000245	L-kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase	0.18	0.002
51	AO090011000307	class I glutamine amidotransferase	0.18	0.009
52	AO090701000360	1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase	0.18	0.012
53	AO090011000308	glutamine synthetase	0.18	0.003
54	AO090011000337	ferric-chelate reductase	0.19	0.010
55	AO090012000130	aldehyde dehydrogenase family protein	0.19	0.018
56	AO090020000495	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit alpha (MccA)	0.19	0.016
57	AO090001000083	hypothetical protein	0.20	0.016
58	AO090010000052	arylamine N-acetyltransferase 2	0.20	0.015
59	AO090010000139	hypothetical protein	0.20	0.034
60	AO090023000450	benzoate 4-monooxygenase cytochrome P450	0.21	0.005
61	AO090012000526	transketolase	0.21	0.008
62	AO090005000497	threonine aldolase	0.21	0.022
63	AO090010000535	hypothetical protein	0.21	0.032
64	AO090113000064	oligopeptide transporter	0.21	0.007
65	AO090120000084	aminotransferase	0.21	0.007
66	AO090011000581	hypothetical protein	0.21	0.019

67	AO090003000211	fumarylacetoacetase	0.21	0.007
68	AO090026000499	protein arv1	0.22	0.014
69	AO090005000972	UDP-glucose dehydrogenase	0.22	0.040
70	AO090103000477	GNAT family N-acetyltransferase	0.22	0.011
71	AO090005000652	hypothetical protein	0.22	0.006
72	AO090103000367	ferric-chelate reductase	0.23	0.011
73	AO090005000534	hypothetical protein	0.23	0.025
74	AO090011000472	formamidase	0.23	0.014
75	AO090011000817	nickel transport protein	0.23	0.005
76	AO090020000684	benzoate 4-monooxygenase cytochrome P450	0.23	0.017
77	AO090005000965	AAA family ATPase	0.23	0.025
78	AO090003000610	GNAT family acetyltransferase	0.23	0.031
79	AO090003001388	hypothetical protein	0.23	0.032
80	AO090010000670	cytochrome P450 monooxygenase	0.23	0.012
81	AO090003001237	ABC transporter	0.23	0.010
82	AO090120000068	catalase R	0.24	0.005
83	AO090011000799	thiamine biosynthetic bifunctional enzyme	0.24	0.006
84	AO090009000135	succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+]	0.24	0.026
85	AO090003001367	short-chain alcohol dehydrogenase	0.24	0.026
86	AO090701000307	primary amine oxidase 2	0.24	0.024
87	AO090009000289	thioredoxin reductase	0.24	0.022
88	AO090005000691	hypothetical protein	0.24	0.009
89	AO090005000277	S-formylglutathione hydrolase	0.25	0.017

90	AO090011000301	C6 transcription factor	0.25	0.021
91	AO090012000313	hypothetical protein	0.25	0.015
92	AO090020000324	MFS monosaccharide transporter	0.25	0.018
93	AO090023000382	hypothetical protein	0.25	0.013
94	AO090011000417	hypothetical protein	0.25	0.004
95	AO090009000314	methylnalonnate-semialdehyde dehydrogenase [acylating]	0.25	0.043
96	AO090001000233	saccharopine dehydrogenase [NADP+, L-glutamate-forming]	0.25	0.010
97	AO090701000456	hypothetical protein	0.26	0.009
98	AO090009000015	amino acid transporter	0.26	0.011
99	AO090009000138	MFS monocarboxylate transporter	0.26	0.010
100	AO090003000475	general amidase	0.26	0.027

---

a: Function descriptions were investigated using KEGG database.

b: The expression ratio (unmilled whole barley / milled whole barley).

c: Corrected *p*-value with multiple comparison taken into consideration.

**Table 8. The top 100 genes with highest fold changes (at 54 h of culture)**

unmilled whole barley &gt; milled whole barley

	Gene name	Function description <sup>a</sup>	Fold change <sup>b</sup>	adj. <i>P</i> -Val <sup>c</sup>
1	AO090010000752	CobW domain protein	161.57	0.001
2	AO090026000102	endoglucanase A	57.37	0.003
3	AO090120000026	endo-1,4-beta-xylanase A	55.51	0.001
4	AO090003000018	heat shock protein	54.03	0.001
5	AO090001000289	O-methyltransferase B	53.99	0.002
6	AO090026000408	hypothetical protein	47.53	0.001
7	AO090001000707	ammonium transporter 2	41.96	0.012
8	AO090012000626	nitrate reductase [NADPH]	37.51	0.003
9	AO090038000234	alpha-glucosidase	35.20	0.001
10	AO090003000661	pyruvate decarboxylase	34.01	0.005
11	AO090012000623	nitrate transporter	31.48	0.005
12	AO090023000021	methyltransferase family protein	29.75	0.002
13	AO090010000240	hypothetical protein	28.85	0.016
14	AO090005000583	hypothetical protein	28.69	0.008
15	AO090020000106	pre-mRNA splicing factor	28.18	0.001
16	AO090003000124	NAD dependent epimerase/dehydratase	27.32	0.018
17	AO090701000554	heat shock protein	23.44	0.003
18	AO090003000613	FAD binding domain protein	21.65	0.002
19	AO090011000912	hypothetical protein	18.62	0.001
20	AO090038000314	ammonium transporter 1	17.98	0.001

21	AO090102000334	hypothetical protein	17.69	0.004
22	AO090001000061	sugar transporter	17.47	0.013
23	AO090701000316	oxaloacetate acetylhydrolase	16.78	0.004
24	AO090001000287	alcohol dehydrogenase	16.41	0.014
25	AO090010000133	GTP-binding protein rhoA	15.80	0.021
26	AO090038000471	alpha/beta-glucosidase agdC	15.68	0.001
27	AO090005000939	major allergen Asp f 2	15.58	0.001
28	AO090003001296	zinc-regulated transporter 1	15.21	0.002
29	AO090011000085	hypothetical protein	14.78	0.008
30	AO090005000294	C6 transcription factor	14.64	0.001
31	AO090038000281	hypothetical protein	14.35	0.017
32	AO090010000640	L-amino acid oxidase LaoA	14.34	0.002
33	AO090012000673	mercuric reductase	13.81	0.016
34	AO090026000055	cyanovirin-N	13.80	0.001
35	AO090003001455	sirQ protein	13.57	0.022
36	AO090003001556	glucose transporter rco-3	13.15	0.004
37	AO090005000074	glucose transporter rco-3	13.03	0.001
38	AO090009000634	alcohol dehydrogenase 2	12.24	0.001
39	AO090103000423	endo-1,4-beta-xylanase F1	11.42	0.020
40	AO090020000105	protein mannosyltransferase 1	11.40	0.017
41	AO090001000159	Zn <sup>2+</sup> dependent hydrolase	11.20	0.014
42	AO090001000282	MFS monocarboxylate transporter	10.90	0.017
43	AO090010000372	hypothetical protein	10.80	0.002
44	AO090010000746	glucoamylase	10.79	0.006
45	AO090010000690	C-14 sterol reductase	10.75	0.025
46	AO090010000314	endo-beta-1,4-glucanase celB	10.33	0.001

47	AO090003000984	hypothetical protein	9.89	0.007
48	AO090005001280	GPI anchored cell wall protein	9.56	0.001
49	AO090038000061	tyrosinase	9.50	0.004
50	AO090701000618	hypothetical protein	9.22	0.002
51	AO090020000103	palmitoyltransferase erf2	9.05	0.002
52	AO090005001239	hypothetical protein	8.88	0.013
53	AO090026000582	hypothetical protein	8.67	0.001
54	AO090120000445	hypothetical protein	8.62	0.028
55	AO090103000226	ABC multidrug transporter	8.54	0.028
56	AO090011000141	BNR/Asp-box repeat domain protein	8.51	0.003
57	AO090010000576	hypothetical protein	8.46	0.028
58	AO090102000466	N-methyltransferase	8.41	0.002
59	AO090026000034	alpha-glucosidase	8.40	0.012
60	AO090003001374	hypothetical protein	8.19	0.011
61	AO090001000260	cytochrome P450	8.18	0.006
62	AO090012000794	extracellular dioxygenase	7.99	0.006
63	AO090124000057	hypothetical protein	7.82	0.030
64	AO090023000188	efflux pump antibiotic resistance protein	7.76	0.030
65	AO090120000196	alpha-amylase A type-1/2	7.69	0.002
66	AO090012000603	aspartate aminotransferase	7.54	0.031
67	AO090010000129	alkanesulfonate monooxygenase	7.51	0.031
68	AO090020000347	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	7.49	0.002
69	AO090005001318	hypothetical protein	7.38	0.001

70	AO090124000001	hypothetical protein	7.37	0.031
71	AO090001000295	carnitine acetyl transferase	7.37	0.002
72	AO090038000212	hypothetical protein	7.30	0.001
73	AO090012000888	hypothetical protein	7.15	0.003
74	AO090005001211	ubiD family decarboxylase	7.09	0.048
75	AO090023000238	hypothetical protein	7.08	0.002
76	AO090011000225	chitin binding domain protein Peritrophin-A	7.06	0.008
77	AO090011000448	vitamin H transporter SF, putative sulfite reductase alpha	6.99	0.002
78	AO090001000571	subunit-FAD and NAD binding oxydoreductase	6.95	0.007
79	AO090001000286	hypothetical protein	6.92	0.017
80	AO090020000276	hypothetical protein	6.88	0.002
81	AO090011000284	hypothetical protein	6.82	0.013
82	AO090011000175	hypothetical protein	6.68	0.033
83	AO090003001302	hypothetical protein	6.57	0.001
84	AO090020000239	nmrA-like family protein	6.48	0.034
85	AO090701000194	hypothetical protein	6.47	0.002
86	AO090005000940	ZIP Zinc transporter	6.41	0.005
87	AO090026000494	MFS monosaccharide transporter	6.41	0.015
88	AO090010000656	hypothetical protein	6.27	0.003
89	AO090001000208	endo-1,4-beta-xylanase C	6.21	0.022
90	AO090102000457	hypothetical protein	6.20	0.001
91	AO090038000171	acetamidase	6.17	0.018
92	AO090003001498	alpha-amylase	6.03	0.005

93	AO090102000458	hypothetical protein	5.98	0.001
94	AO090701000165	hypothetical protein	5.95	0.016
95	AO090023000424	tyrosinase	5.93	0.036
96	AO090026000046	NADH oxidase	5.92	0.036
97	AO090103000150	hypothetical protein	5.92	0.003
98	AO090011000202	flavoheomprotein	5.88	0.006
99	AO090020000615	hypothetical protein	5.84	0.043
100	AO090102000071	endoplasmic reticulum-resident kdel protein	5.82	0.004

unmilled whole barley < milled whole barley

	Gene name	Function description <sup>a</sup>	Fold change <sup>b</sup>	adj. <i>P</i> .Val <sup>c</sup>
1	AO090010000122	mannan endo-1,4-beta-mannosidase F	0.03	0.030
2	AO090120000106	cytochrome P450 monooxygenase	0.05	0.004
3	AO090038000444	mannan endo-1,4-beta-mannosidase F	0.05	0.025
4	AO090701000437	hypothetical protein	0.06	0.001
5	AO090001000232	MSF oligopeptide transporter	0.07	0.021
6	AO090003000208	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	0.07	0.002
7	AO090102000067	2-amino-3-carboxymuconate-6 -semialdehyde decarboxylase	0.07	0.007
8	AO090005000740	beta-mannosidase B	0.10	0.041
9	AO090001000229	hypothetical protein	0.10	0.025
10	AO090038000445	hypothetical protein	0.10	0.034
11	AO090120000214	copper transporter family protein	0.10	0.002
12	AO090701000436	cytochrome P450 oxidoreductase	0.12	0.002
13	AO090005000560	glycosidase crf1	0.12	0.029

14	AO090010000722	catalase-peroxidase	0.12	0.002
15	AO090020000544	MFS multidrug transporter	0.13	0.030
16	AO090701000906	Zn(II)2Cys6 transcription factor	0.13	0.042
17	AO090010000603	chloride channel protein	0.13	0.015
18	AO090009000067	extracellular dihydrogeodin oxidase/laccase	0.13	0.031
19	AO090009000236	hypothetical protein	0.15	0.001
20	AO090701000181	hypothetical protein	0.15	0.033
21	AO090011000337	ferric-chelate reductase	0.15	0.005
22	AO090102000327	phosphatidylserine decarboxylase family protein	0.16	0.002
23	AO090003001502	acyltransferase	0.16	0.034
24	AO090009000129	hypothetical protein	0.16	0.005
25	AO090005000266	coiled-coil domain-containing protein MTMR15	0.17	0.036
26	AO090103000363	hypothetical protein	0.17	0.037
27	AO090023000044	2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase	0.17	0.002
28	AO090020000685	hypothetical protein	0.18	0.002
29	AO090009000457	immunogenic protein	0.18	0.001
30	AO090038000578	indoleamine 2,3-dioxygenase family protein	0.18	0.003
31	AO090005001248	short/branched chain specific acyl-CoA dehydrogenase	0.18	0.038
32	AO090001000544	beta-glucosidase F	0.19	0.004
33	AO090020000289	glutaminase GtaA	0.20	0.013

34	AO090003000888	alcohol dehydrogenase, zinc-containing	0.20	0.001
35	AO090005000364	ferric-chelate reductase (Fre2)	0.20	0.024
36	AO090103000294	hypothetical protein	0.20	0.042
37	AO090103000242	feruloyl esterase B precursor	0.20	0.042
38	AO090003000209	hypothetical protein	0.21	0.006
39	AO090023000111	hypothetical protein	0.22	0.045
40	AO090003000475	general amidase	0.22	0.008
41	AO090001000555	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha	0.22	0.005
42	AO090012000097	MFS myo-inositol transporter	0.22	0.008
43	AO090701000225	electron transfer flavoprotein subunit beta	0.22	0.045
44	AO090038000540	cholinesterase	0.23	0.003
45	AO090003000816	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	0.23	0.002
46	AO090003001049	Leucine Rich Repeat domain protein	0.23	0.002
47	AO090020000367	monocarboxylate transporter	0.23	0.047
48	AO090011000097	efflux pump antibiotic resistance protein	0.23	0.047
49	AO090701000435	hypothetical protein	0.23	0.005
50	AO090005000536	K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter	0.23	0.004
51	AO090005001467	cell wall protein	0.24	0.002
52	AO090026000804	endo-arabinase	0.24	0.002
53	AO090120000135	aspartate aminotransferase, cytoplasmic	0.24	0.002
54	AO090103000367	ferric-chelate reductase	0.24	0.002

55	AO090005000962	high-affinity hexose transporter	0.24	0.006
56	AO090120000260	glycosyl hydrolase	0.25	0.007
57	AO090005000988	hypothetical protein	0.25	0.009
58	AO090023000349	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta	0.25	0.010
59	AO090003000823	hypothetical protein	0.25	0.010
60	AO090001000117	tyrosinase	0.25	0.006
61	AO090005000987	ABC multidrug transporter	0.25	0.008
62	AO090026000669	cyclin dependent kinase (Pho85)	0.25	0.007
63	AO090005001553	endo-beta-1,4-glucanase B	0.25	0.024
64	AO090011000119	cell wall serine-threonine-rich galactomannoprotein Mp1	0.26	0.002
65	AO090012000217	GNAT family acetyltransferase	0.26	0.004
66	AO090138000100	hypothetical protein	0.26	0.032
67	AO090001000083	hypothetical protein	0.26	0.013
68	AO090003001482	oligopeptide transporter	0.26	0.022
69	AO090001000526	M protein repeat protein	0.26	0.004
70	AO090001000549	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase;	0.27	0.003
71	AO090012000193	urease accessory protein UreD	0.27	0.011
72	AO090020000627	mitotic spindle checkpoint component mad2	0.27	0.012
73	AO090012000465	O-methylsterigmatocystin oxidoreductase	0.27	0.006
74	AO090023000602	dipeptidyl peptidase 4	0.27	0.002
75	AO090005000497	threonine aldolase	0.28	0.004

76	AO090005001552	cellulose-binding GDSL lipase/acylhydrolase	0.28	0.046
77	AO090001000447	alcohol oxidase	0.28	0.008
78	AO090012000123	monocarboxylate transporter	0.28	0.042
79	AO090023000674	RING finger protein	0.28	0.015
80	AO090010000684	alpha-galactosidase C	0.29	0.015
81	AO090011000892	hypothetical protein	0.29	0.003
82	AO090009000216	hypothetical protein	0.29	0.004
83	AO090003001509	hypothetical protein	0.29	0.006
84	AO090020000692	CP2 transcription factor	0.29	0.013
85	AO090701000893	pentachlorophenol 4-monooxygenase	0.29	0.016
86	AO090166000089	hypothetical protein	0.29	0.014
87	AO090011000286	aspartate aminotransferase	0.29	0.013
88	AO090003001008	biotin-dependent 2-oxo acid dehydrogenases acyltransferase	0.29	0.006
89	AO090001000550	proline oxidase Put1	0.29	0.005
90	AO090026000461	hypothetical protein	0.30	0.006
91	AO090012000289	autophagy-related protein 22-2	0.30	0.006
92	AO090120000083	serine/threonine protein kinase	0.31	0.027
93	AO090001000463	zinc-binding oxidoreductase	0.31	0.010
94	AO090023000628	ornithine aminotransferase	0.31	0.004
95	AO090102000058	cellobiose dehydrogenase	0.31	0.010
96	AO090026000245	L-kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase	0.31	0.007
97	AO090038000025	monooxygenase	0.31	0.006
98	AO090005000743	sugar transporter	0.31	0.034

99	AO090003000825	endo-1,3 (4)-beta-glucanase	0.31	0.013
100	AO090038000362	nuclear localization protein	0.31	0.006

---

a: Function descriptions were investigated using KEGG database.

b: The expression ratio (unmilled whole barley / milled whole barley).

c: Corrected  $p$ -value with multiple comparison taken into consideration.

## 第2章

玄麦を用いた *Aspergillus kawachii* の液体培養による酵素生産の解析

## 第 1 項 緒言

アスペルギルス属をはじめとする糸状菌は、酵素や有機酸、二次代謝生産物等の産業的な生産に有用な微生物である。*A. kawachii* は系統発生的に *A. niger*<sup>45</sup> に類似しており、大量のタンパク質を分泌し、日本の伝統的な蒸留酒である焼酎製造に利用されている。*A. kawachii* を用いた液体培養は、通常用いられる固体培養と比べて培養上の管理が容易であるが、酵素生産性は一般的に固体培養に比べ低い<sup>8,11-13</sup>。Shoji らは、これまでに表面が穀皮で覆われている玄麦を利用した *A. kawachii* によるアミラーゼ高生産の新たな液体培養技術について報告しており<sup>27,28</sup>、また、Sugimoto らは *A. kawachii* による玄麦を用いた液体培養により、アミラーゼに加え、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、キシラナーゼも高活性化され、各種酵素を有する複合酵素の生産が可能であることを報告している<sup>29</sup>。*A. kawachii* により生産される GAase および耐酸性  $\alpha$  アミラーゼ (ASAAase) は低 pH 環境で安定しているため、穀物でんぷんを分解するこれら両酵素は焼酎製造の発酵工程において特に重要な酵素である。アスペルギルス属のアミラーゼ発現系は、AmyR<sup>24,25</sup> および CreA<sup>19,22</sup> により説明されてきた。AmyR はでんぷん分解酵素の遺伝子発現に関与する転写活性化因子の 1 つであり、イソマルトース等により活性化される<sup>26</sup>。一方の CreA はグルコース濃度で制御されるカタボライトリプレッサーの 1 つである。Sugimoto ら<sup>46</sup> は、難消化性デキストリンを用いた培養によりグルコースを低濃度で維持することで、*A. kawachii* によるアミラーゼ系酵素が高生産されることを報告している。他方、糸状菌によるタンパク質生産に、タンパク質分泌に関わる翻訳後経路が転写制御と同様に關係しており、また、固体培養や液体培養下での制限培養における翻訳後経路は、菌の形態変化に關係することが報告されている<sup>42,47</sup>。本研究では、*A. kawachii* による GAase および ASAAase の高生産機構を解析するため、酵素活性、糖濃度、菌形態および遺伝子発現について詳細な解析を行った。

## 第2項 材料および方法

### 1. 供試麹菌株および培養条件

*A. kawachii* NBRC 4308 株を用いた。液体培養は回転式振とう培養機（タイテック株式会社）を用いて行った。前培養は、8% (w/v) 大麦丸麦( 65% (w/w) 精白麦、オーストラリア産スクーナー種 )、0.2% (w/v)  $\text{KNO}_3$  および 0.3% (w/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を含む培地 40 mL を、容量 200 mL のバツフル付三角フラスコ( AGC Techno Glass ) に入れ、121 15 分間オートクレーブ滅菌し、室温冷却後、ディスポループで分生子を接種し、回転式振とう培養機を用いて 37 24 時間、回転数 120 rpm で培養した。本培養は、3% (w/v) 大麦玄麦( 98% (w/w) 精白麦、オーストラリア産スクーナー種 ) または粉碎大麦玄麦、0.4% (w/v)  $\text{KNO}_3$  および 0.6% (w/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を含む培地 40 mL を、容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに入れ、121 15 分間オートクレーブ滅菌し、室温冷却後、前述の前培養液 2% (v/v) を接種し、回転式振とう培養機を用いて 37 72 時間、回転数 120 rpm で培養した。固体培養は、岡崎らの方法<sup>48</sup>を用いて行った。すなわち、精白大麦を洗浄して水に 1 時間浸漬した後、40 分かけて完全に水切りし、120 10 分間オートクレーブ滅菌した。滅菌した大麦を 95 3 時間かけ乾燥した後に室温保存した。15 g の大麦を蓋付 9 cm ガラス製ペトリ皿に入れ、95 3 時間インキュベートし、室温冷却後、 $1.5 \times 10^6$  個の分生分生子を含む蒸留水 6.795 mL を加え、大麦と完全に混合した。培養は温度 37 相対湿度 95% のもとで、蓋付ステンレス製チャンバーおよび 1.62N NaOH 溶液を用いて行った。全ての試薬は和光純薬工業株式会社製を用いた。

### 2. 菌体量測定

菌体量は第 1 章と同様の方法にて測定した。固体培養の粉碎には細胞破砕機マルチビーズ・ショッカー<sup>®</sup>（安井器械株式会社）を使用し、液体窒素で冷却しながら行った。

### 3. 酵素活性試験

GAase 活性は国税庁所定分析法に従い、ASAAase 活性は文献<sup>27</sup>の方法に従い測定した。液体培養においては、細胞壁にトラップされたアミラーゼ系酵素が高い割合で存在することが報告されているため<sup>49</sup>、GAase 活性および ASAAase 活性は培養上清中に存在している酵素活性および細胞壁にトラップされている酵素活性の総量で示した。液体培養の細胞壁にトラップされた酵素活性は、Nagamine ら<sup>50</sup>の方法を用いて測定した。すなわち、液体培養物をミラクロス・フィルター (Merck KGaA) でろ過し、残余分から玄麦粒を除去後、冷却した 0.8 M NaCl を含む 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で菌体を洗浄し、残った緩衝液をミラクロスで除去した。10 mg/mL ヤタラーゼ (タカラバイオ株式会社) を含む酢酸緩衝液に菌体を懸濁し、適度に振とうしながら 30 3 時間反応させた。酵素反応終了後、遠心分離 (1,800 × g, 5 min, 4 °C) により得た上清に存在する酵素活性を測定した。固体培養については、培養物の 5 倍量の 0.5% NaCl を含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用い、適度に振とうしながら 10 で 4 時間抽出し、遠心分離 (1,800 × g, 5 min, 4 °C) により得た上清に存在する酵素活性を測定した。

#### 4. 糖類定量

グルコース、マルトースおよびマルトトリオースは第 1 章と同様の方法にて HPLC を用いて液体培養上清について測定した。サンプル中のアミラーゼを不活化するために、培養液を Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液で最終濃度が 0.1 M となるよう希釈し、次いで遠心限外ろ過を行った。液体培地中でのんぶん濃度測定は、冷蔵した試料に 99.5% エタノールを最終濃度 80% (v/v) となるよう混合し、室温にて 30 分間置いた。遠心分離 (1,800 × g, 10 min) により得た不溶性沈殿物に総でんぶん量測定キット (Megazyme International) 付属の耐熱性 α-アミラーゼ溶液を添加し 6 分間沸騰させた後、溶液を冷却し当キット付属のアミログルコシダーゼ溶液を用いて 50 30 分間反応させた。遠心分離 (1,800 × g, 5 min) により得た上清中のグルコースをグルコース CH・テスト・ワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。

#### 5. RNA 前処理

液体培養から菌体を回収するために、培養物をミラクロスでろ過後、玄麦粒を除去した。菌体は冷却

した脱イオン水で洗浄し、残った水をミラクロスで除去した後、液体窒素で急速凍結させた。菌体を液体窒素で冷却しながら、凍結サンプルをマルチビーズ・ショッカー®で粉砕した。total RNA を Plant RNeasy®Kit ( QIAGEN GmbH ) を用い、キット付属の手順書に従い得た。サンプルの質および量を Nanodrop ND-1000 ( Thermo Fisher Scientific Inc. ) Agilent 2100 bioanalyzer および RNA 6000 NanoLabChip®Kit ( Agilent Technologies, Inc. ) を用いて確認後、全 RNA を DNA マイクロアレイ分析に用いた。

## 6. 遺伝子発現解析

非粉砕玄麦、粉砕玄麦を含む液体培養および固体培養 (  $n = 4$  ) について、各培養時間における全 RNA 量を用いたマイクロアレイ実験で比較した。マイクロアレイの設計、実験および発現量の定量はタカラバイオ株式会社に委託した。カスタムマイクロアレイは、アジレント社のオンライン設計ツールである eArray を用いて設計した。各マイクロアレイ (  $8 \times 15 \text{ k}$  ) に、*A. kawachii* NBRC 4308 のオープンリーディングフレームを示す 60-mer オリゴヌクレオチドを有するスポットを搭載させた。0.1 $\mu\text{g}$  の全 RNA サンプルから Cy3 で標識した cRNA を合成するため Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color ( Agilent Technologies, Inc. ) を使用した。合計 0.6 $\mu\text{g}$  の cRNA を、Gene Expression Hybridization kit ( Agilent Technologies, Inc. ) で混合し、ハイブリダイゼーション後にスライドを Gene Expression Wash Buffer kit ( Agilent Technologies, Inc. ) 中で洗浄した。Feature Extraction Software ( Agilent Technologies, Inc. ) を用いて、アレイ中の各スポット強度の検出および測定を行った。バックグラウンド補正、データ正規化および品質評価についても、同ソフトウェアを用いて実施した。各アレイの全プローブ平均強度を 2,500 で固定し、全アレイ・プローブ強度を平均強度によりスケール変更することで測定した信号強度を正規化した。各実験群の正規化された強度を、平均値 $\pm$ 標準誤差 ( SEM ) で表記した。

## 7. 顕微鏡観察

液体培養した菌体を、Leica DFC3000FX camera ( Leica Microsystems GmbH )、DM5000B microscope ( 同社 ) および IM50 ver. 4.0 ソフトウェア ( 同社 ) を使用して撮影した。

#### 8. 統計解析

群間の統計比較は、ソフトウェア SPSS ver.11.5 ( IBM ) を用いて独立スチューデント  $t$  検定および一元配置分散分析法で行った。群間の多重比較はダネット検定で行った。有意水準は  $P < 0.05$  とした。

### 第3項 結果

液体培養では非粉碎玄麦および粉碎玄麦を含む培地にて、固体培養では精白大麦を含む培地にて *A. kawachii* を培養した。GAase 活性 (Fig. 5a)、ASAAase 活性 (Fig. 5b)、培養液中の乾燥菌体量 (Fig. 5c) および液体培養上清の pH (Fig. 5d) に関する経時的変化を示す。液体培養の GAase および ASAAase 活性は、培養上清中に存在する酵素および細胞壁にトラップされた酵素の総活性として表示した。GAase および ASAAase は、非粉碎玄麦を用いた液体培養および固体培養において高生産された。固体培養での菌体量は培養中期から増加し、同時期に両アミラーゼ活性も急激に増加した。液体培養における培養後期での菌体量は粉碎玄麦よりも非粉碎玄麦を用いた場合の方が低かった。

液体培地中のグルコース (Fig. 6a)、マルトース (Fig. 6b)、マルトトリオース (Fig. 6c) およびでんぷん (Fig. 6d) 濃度の経時的変化を示す。非粉碎玄麦を使用した場合は粉碎玄麦を使用した場合に比べて培地中のグルコース濃度は低かったが、マルトトリオースおよびでんぷん濃度は高かった。

GAase (Fig. 7a) および ASAAase (Fig. 7b) の遺伝子発現レベルの経時変化を示す。非粉碎玄麦を使用した場合は両酵素の発現レベルが培養中期で著しく高まっていた。

非粉碎玄麦を用いた液体培養での酵素活性が上昇し始める 18 時間目、および粉碎玄麦を用いた液体培養での酵素活性が停滞し始める 30 時間目において、発現の比の異なる遺伝子について上位 100 位を示した (Table 9 および 10)。遺伝子の機能は NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>)、KEGG GENOME Database ([http://www.kegg.jp/kegg-bin/show\\_organism](http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_organism)) を参照した。18 時間目において非粉碎玄麦にて発現の高かった遺伝子として、糖輸送体、マルトース輸送体、ハイドロフォピン等が、また粉碎玄麦にて高かった遺伝子としてクエン酸シンターゼ、F box domain, cyclin like、キシラナーゼ等がみられた。30 時間目においては非粉碎玄麦にて高かった遺伝子として  $\alpha$ -グルコシダーゼ、GAase、ASAAase、エンドグルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、キシラナーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、リパーゼ、ラッカーゼ等が、また粉碎玄麦にて高かった遺伝子として糖輸送体、アミノ酸輸送体等がみられた。

18時間目において糖輸送体に関する遺伝子発現に大きな差がみられたことより、グルコース濃度に関係する遺伝子である低親和性グルコース輸送体 (Fig. 8a)、高親和性グルコース輸送体 (Fig. 8b)、パーオキシダーゼ/カタラーゼ1 (Fig. 8c) および予測糖輸送体 (Fig. 8d) の遺伝子発現レベルの経時的変化を示す。低親和性グルコース輸送体の遺伝子発現は、培地中の細胞外グルコース濃度を反映するが<sup>51</sup>、培養初期から中期にかけて非粉碎玄麦を使った場合は粉碎玄麦を使用した場合よりも少なかった。対照的に、培養初期から中期にかけての CreA 依存性グルコース抑制遺伝子である<sup>52,53</sup> 高親和性グルコース輸送体とパーオキシダーゼ/カタラーゼ1 および predicted sugar transporter の遺伝子発現レベルは、非粉碎玄麦を用いた場合は粉碎玄麦を使用した場合よりも高く、また固体培養の場合よりも高かった。

18時間目における非粉碎玄麦および粉碎玄麦を用いた場合の液体培養の菌の形態を示す (Fig. 9a および 9b)、非粉碎玄麦を用いた場合に膨潤、球状または多隔壁の菌糸が観察され、さらに分生子柄およびフィアライドが部分的に形成されていた。

18時間目において細胞周期に関連する F box domain, cyclin like に関する遺伝子発現に大きな差がみられたことより、サイクリン様の F-ボックス・ドメイン (Fig. 10a) および有糸分裂の負の調整因子 (Fig. 10b) の、また 18時間目においてヒドロフォピン、30時間目においてラッカーゼに関する遺伝子発現に大きな差がみられたことより、同じく分生子形成に関連する調整タンパク質 *brlA* (Fig. 10c)、ラッカーゼ (Fig. 10d) およびヒドロフォピン (Fig. 10e) の遺伝子発現レベルの経時変化を示す。非粉碎玄麦を使用した場合、細胞周期関連遺伝子の発現レベルが変化し、固体培養での発現レベルにより近くなっていた。分生子形成関連遺伝子の発現レベルもまた変化し、培養初期においては固体培養での発現レベルと同じくらい上昇していた。第1章にて *A. oryzae* を用いた培養において重要と考えられた、翻訳後修飾に関連する遺伝子の発現レベルの経時的変化を示す (Fig. 11a-11c)。非粉碎玄麦を使用した場合、タンパク質ジスルフィド・イソメラーゼ (Fig. 11a)、カルネキシン相同体 (Fig. 11b) および小胞体シャペロン *bipA* (Fig. 11c) の遺伝子発現レベルは、培養初期から中期にかけて粉碎玄麦を使用した場合の発現レベルより高かったが、固体培養時の発現レベルよりは低かった。

## 第4項 考察

液体培養は、伝統的に焼酎製造で用いられている固体培養よりも培養上の管理が容易であり、玄麦を使用することで複雑な流加培養や連続培養をすることなく回分培養により酵素高生産が可能となる。本研究で使用した大麦量は、固体培養で 69% (w/w)、液体培養では 3% (w/v) であり、大麦の初期量あたりの最終 ASAAase 活性は、固体培養で 60 units/g、非粉碎玄麦を使用した液体培養では 1,330 units/g であったため、ASAAase 活性に関して液体培養は大麦をより有効に利用しているといえる。

培養中期から後期にかけて固体培養と同様に、非粉碎玄麦を使用した場合の液体培養において GAase および ASAAase が高生産され (Fig. 5a および 5b) 培養初期から中期にかけてこれら酵素遺伝子の発現レベルも高まっていた (Fig. 7a および 7b) ｡ これらの結果より、非粉碎玄麦を使用した液体培養での GAase および ASAAase の生産は遺伝子転写レベルでの制御が関係していることが推察される。液体培養において細胞壁にトラップされた GAase の割合が培養中期では多いことが報告されているが<sup>49</sup>、本研究での非粉碎玄麦を用いた場合において、細胞壁にトラップされた GAase 活性の割合は培養時間 32 時間目で約 31%、72 時間目で約 9%であり、本研究においても培養中期に GAase が細胞壁に多くの割合でトラップされていることが確認された。培養上清中の GAase 活性および細胞壁にトラップされている GAase 活性の総量の経時的变化は、ASAAase 活性の総量の経時的变化と類似しており (Fig. 5a および 5b) ｡ また遺伝子発現レベルの経時的变化も同様であった (Fig. 7a および 7b) ｡ これらの結果より、両酵素が同様な制御システムにより制御されていることが推察された。アミラーゼ系酵素の誘導は転写因子 AmyR で説明されてきているが<sup>24,25</sup>、転写が AmyR の調節性核局在化により制御され、核内蓄積はイソマルトースやマルトオリゴ糖により引き起こされる<sup>26,54</sup>。非粉碎玄麦を使用した場合は粉碎玄麦を使用した場合に比べ、マルトトリオース濃度は培養中期でより高かった (Fig. 6c) ｡ その一方で、マルトース濃度は培養中期においてほとんどゼロで (Fig. 6b) ｡ またグルコースも同様にほとんどゼロであった (Fig. 6a) ｡ ことより、これら糖類がマルトオリゴ糖のような糖類から生成されるとすぐに菌に取り込まれたと考えられた。これらの結果は、アミラーゼ系酵素遺伝子の発現上昇に AmyR が関係していることを示唆

している。他方、アミラーゼ系酵素遺伝子発現の抑制系として転写因子 CreA が報告されているが<sup>19,22</sup>、当因子はカーボンカタボライト抑制に関わる因子でグルコース濃度により制御される。非粉碎玄麦を使用した場合は粉碎玄麦を使用した場合に比べて、培養中のグルコース濃度は培養初期から中期では低かった (Fig. 6a) ことに加えて、高親和性グルコース輸送体<sup>52</sup> やパーオキシダーゼ / カタラーゼ<sup>53</sup> のような CreA に関連するグルコース抑制に関する遺伝子の発現レベルは高く (Fig. 8b および 8c)、一方、低親和性グルコース輸送体<sup>51</sup> の発現レベルは初期では低かった (Fig. 8a)。これら発現レベルの差異は、非粉碎玄麦を使用した場合は粉碎玄麦を使用した場合と比べ、グルコースが低濃度で維持されている (Fig. 6a) ことと関係があると推察される。またこれらの結果より、培養中期においてアミラーゼ遺伝子の発現レベルが際立って上昇したのは、AmyR による誘導および CreA によるグルコース抑制の解除の両方によるものと推察される。Sugimoto ら<sup>46</sup> は、難消化デキストリンを用いた回分培養でアミラーゼが高生産されること、またデキストリン添加が制限された流加培養でもアミラーゼの高生産が可能であることを報告しているが、これらの結果も CreA および AmyR に関係するものと考えられる。非粉碎玄麦を用いた液体培養はグルコースを低濃度に維持しながら誘導糖の供給を続けるものであるが、これはデキストリン添加が制限された流加培養と類似していると考えられる。

翻訳後修飾に関連する遺伝子の発現レベルは、培養初期から中期にかけて非粉碎玄麦を用いた液体培養において高かった (Fig. 11a-11c)。翻訳後修飾に関連する遺伝子の発現が高まることで、*A. awamori*<sup>55</sup>、*A. niger*<sup>56</sup> および *Trichoderma reesei*<sup>57</sup> によるタンパク質生産が改善されることが報告されている。本研究においても、翻訳後修飾機構の活性化により、培養初期から中期にかけて非粉碎玄麦を使用した液体培養において両アミラーゼ酵素の生産が高まった可能性があると考えられる。

菌体の形態は、培養初期において非粉碎玄麦を用いた液体培養で著しく変化しており (Fig. 9a および 9b) また、*brlA* 等の分生子形成に関連する遺伝子の発現レベルが培養初期において固体培養と同様に高まっていたが (Fig. 10c-10e)、当現象は培養中期から後期においては観察されなかった。*brlA* はアスペルギルス属の分生子形成調節遺伝子の 1 つであり<sup>58</sup>、飢餓ストレス信号が形態変化を誘発し *brlA* 経路で分生子形成を引き起こすことが報告されている<sup>59</sup>。本研究における非粉碎玄麦を用いた液体培養の培

養初期においては、培地中の GAase および ASAAase 活性は低く (Fig. 5a および 5b) さらにグルコース濃度も低かった (Fig. 6a) ため、飢餓信号が発せられた可能性がある。培養中期には菌は飢餓から脱したと考えられ、マルトオリゴ糖濃度が上昇し (Fig. 6c) 菌体量も増加した (Fig. 5c)。非粉碎玄麦を使用することで、培養初期の糖類は低濃度で維持され、細胞周期や形態に関連する遺伝子発現が変動した。多分岐菌糸などの変化した形態とタンパク質の高生産性との関係は既に報告されているが<sup>60</sup>、その理由はタンパク質分泌機能の変化によるものである。非粉碎玄麦を使用することで形態が変化し、タンパク質分泌の特性が変わった可能性がある。また、第 1 章でも述べたがケモスタットによる比増殖速度をゼロに近づける液体培養により、*A. niger* の液体培養における分生子形成および二次代謝を誘導することが報告されているが<sup>42</sup>、この制限された培養条件下では、翻訳後修飾の誘導は分生子形成と相互関係にあり、翻訳後修飾を活性化させることがハイドロフォビンなどの分生子形成関連タンパク質の生産に有効であることが示されている。培養初期における非粉碎玄麦を使用した液体培養での分生子形成は翻訳後修飾の活性化をもたらす可能性があり、その結果としてアミラーゼ系酵素の生産が高まったことに寄与した可能性がある。

固体培養は、各種酵素が高生産されることから伝統的な焼酎醸造に利用されているが、本研究においても非粉碎玄麦を使用した液体培養と同様に固体培養でも GAase および ASAAase の高生産が確認された (Fig. 5a および 5b)。興味深いことに、両アミラーゼ酵素遺伝子の発現レベルは固体培養では低く (Fig. 7a および 7b)、グルコース抑制関連遺伝子の発現レベルもまた同様に固体培養では低レベルであった (Fig. 8a-8d)。一方、固体培養での翻訳後修飾に関連する遺伝子の発現は、培養期間を通じて高いレベルにあった (Fig. 11a-11c)。また、固体培養においては液体培養よりも細胞壁にトラップされている酵素の割合が少ないことが報告されている<sup>49</sup>。これらのことから、固体培養においてアミラーゼ系酵素が高生産される理由として、固体培養特有の効率的な生産システムが存在することが推察される。固体培養および液体培養におけるアミラーゼ系酵素の生産の特性の差を理解するためには、さらなる研究が必要である。

非粉碎玄麦を用いた液体培養では、粉碎玄麦使用時および固体培養時より菌体量は少なかった (Fig.

5c) 細胞周期に関わる遺伝子の発現レベルは培養初期から中期にかけて変動し (Fig. 10a および 10b) 培養初期の発現レベルは固体培養の場合並みであった。乾燥菌体量あたりの最終 ASAAase 活性は粉碎玄麦使用時で 3.6 units/mg、固体培養で 5.9 units/mg、非粉碎玄麦使用時で 10.5 units/mg であった。液体培養においては、菌体が増殖しすぎると培地の粘性が上がり酸素供給がしにくくなり、また、栄養成分も菌体増殖に使われてしまうため、増殖抑制がアミラーゼ生産に正に寄与した可能性が推察された。

Table 10 に示したが、30 時間目における非粉碎玄麦での高発現した遺伝子として  $\alpha$ -グルコシダーゼ、GAase、ASAAase、エンドグルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、キシラナーゼ、酸性プロテアーゼ、ペプチダーゼ、リパーゼ等がみられ、焼酎製造に必要な酵素群の遺伝子が玄麦を用いた培養により発現上昇していたことが確認された。Sugimoto ら<sup>29</sup>は、玄麦を用いた液体培養により、アミラーゼ酵素、酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼの酵素活性が高まることを報告しているが、焼酎製造に必要な酵素遺伝子発現も上昇することが確認された。

一方、焼酎製造にとって重要なクエン酸については、18 時間目における粉碎玄麦にてクエン酸シンターゼ遺伝子の高発現がみられたが、一方の非粉碎玄麦においてはクエン酸生成が低く、培養終了時にはクエン酸が検出されなかった。液体培養によるクエン酸発酵のための標準的な条件として糖やデンプン濃度は 150~200g/L (最低でも 50g/L) と報告されているが<sup>61</sup>、本研究での培養条件は玄麦 3% (w/vol) であり培地中のでんぷん質が少ないので生産されなかったことを、その理由として推察した。

最後に玄麦を用いた液体培養におけるアミラーゼ高生産機構の考察されるモデルを示す (Fig. 12) 培養初期においては菌の形態と遺伝子発現の変化を通じ増殖が低下し、また培養初期から中期にかけて翻訳後修飾に関する遺伝子が発現上昇する。増殖低下や翻訳後修飾に関する遺伝子発現の変化は固体培養でも観察された現象である。また、培養を通じてグルコースが低濃度で維持されることで CreA によるグルコース抑制が解除され、同時に酵素生産に関わる誘導性糖が持続的に供給されることで AmyR による誘導により酵素生産につながる。さらに栄養成分の供給が続くので酵素生産が続く。これらのことが複合的に関与しながらアミラーゼ高生産へとつながっていることが推察され、*A. oryzae* と同じ特徴を有する機構であると考えられた。

## 第5項 要約

Shoji らは、表面が穀皮で覆われている玄麦を用いた *A. kawachii* によるアミラーゼを高生産させる新たな液体培養技術について報告している。本研究では、*A. kawachii* を用いた当培養法による GAase および ASAAase の高生産機構を解析するため、酵素活性、糖濃度、菌の形態および遺伝子発現に関する詳細な解析を行った。非粉碎玄麦を用いた液体培養において GAase および ASAAase が高生産され、アミラーゼ系酵素遺伝子および高親和性グルコース輸送体およびペルオキシダーゼ/カタラーゼを含むグルコース抑制に関する遺伝子の発現レベルが高まっていた。グルコースは低濃度で維持されながら、酵素生産に関わる誘導糖は供給され続けていた。また、非粉碎玄麦を用いた液体培養初期において菌体の形態は変化し、固体培養にて通常形成するような膨潤、球状、多隔壁菌糸および分生子柄が部分的に観察された。さらに、細胞周期および翻訳後修飾に関連する遺伝子の発現レベルが変化し、固体培養での遺伝子発現レベルにより近くなっていた。これらの知見から、非粉碎玄麦を用いた液体培養での両アミラーゼ系酵素の高生産化は CreA によるグルコース抑制の解除および AmyR の誘導によるアミラーゼ遺伝子の発現上昇、固体培養で生じるような増殖低下や翻訳後修飾に関する遺伝子発現の変化、また、代謝系の活性維持等が複合的に関係していることが考えられ、*A. oryzae* と同じ特徴を有する機構であると考えられた。

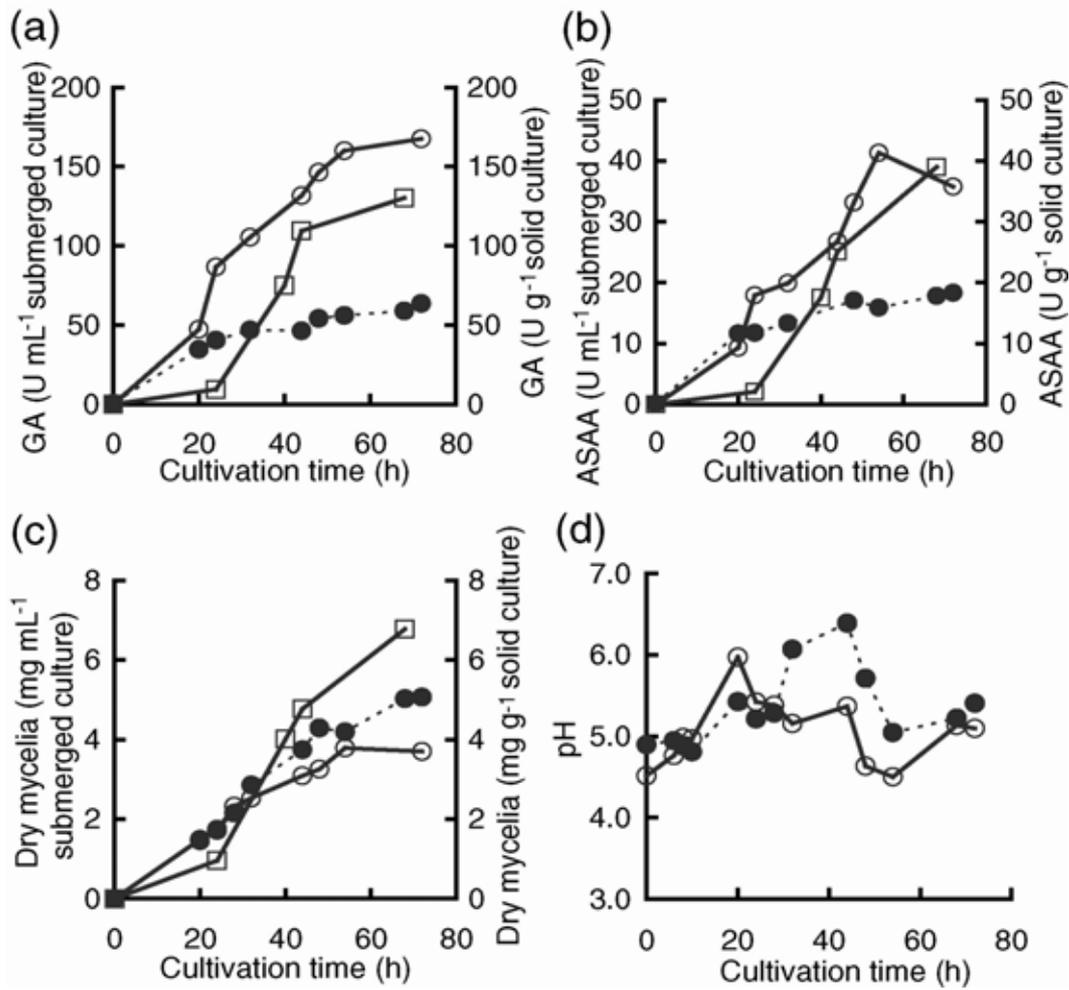


Fig. 5. Comparison of the time courses of GA (a) and acid-stable  $\alpha$ -amylase (ASAA) (b) activities, dry mycelia weight (c), and pH (d). Amylase activity, which was the total of that in the culture supernatant and that of enzymes trapped in the cell walls, was shown.

*A. kawachii* was grown in submerged cultures using WB (○) and MB (●), and in a solid culture (□).

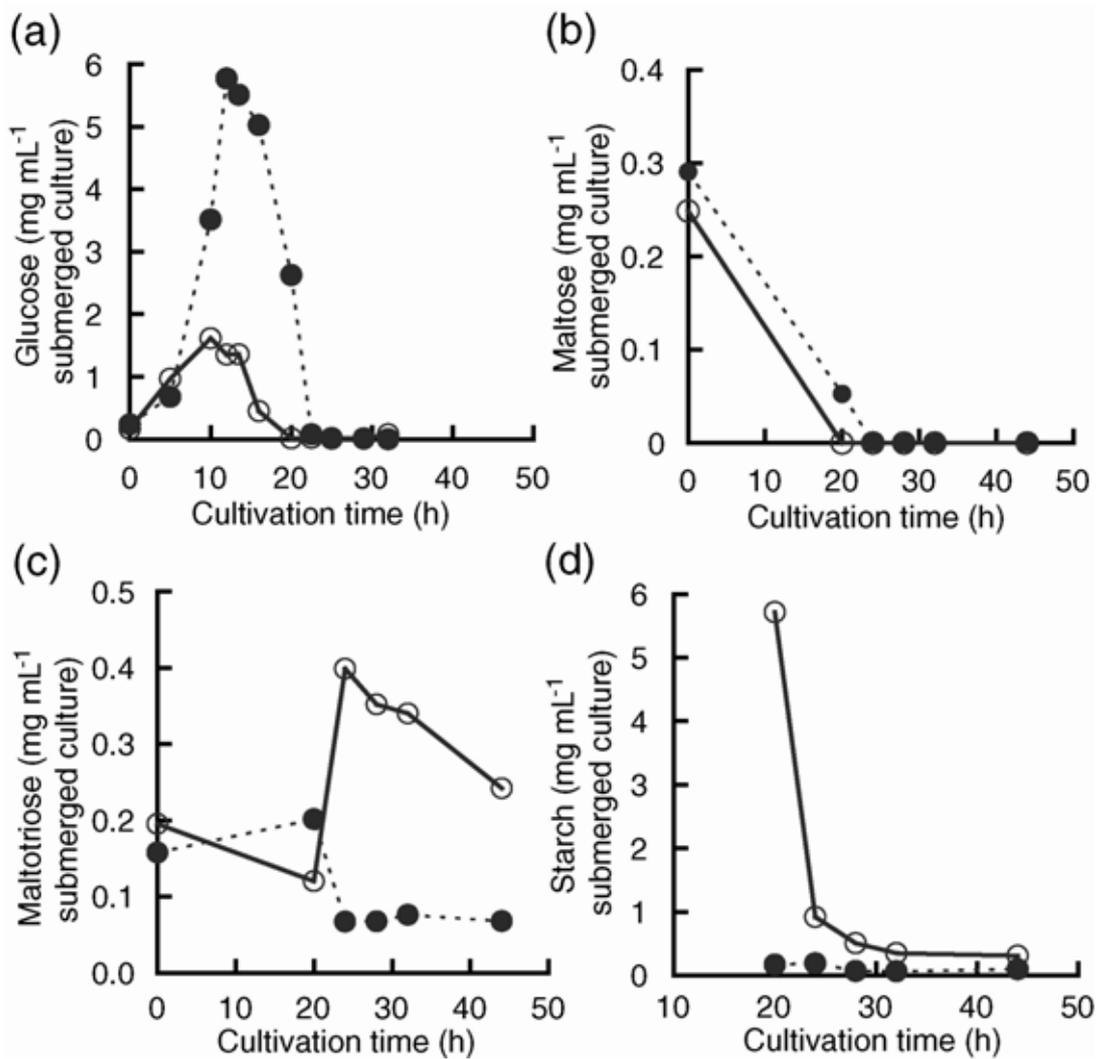
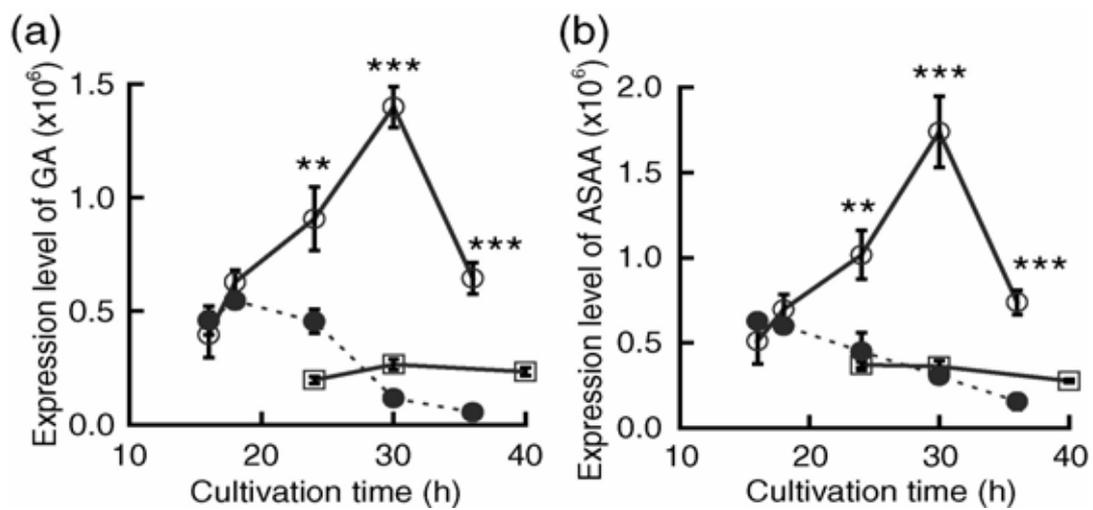


Fig. 6. Comparison of the time courses of glucose (a), maltotriose (b) and starch (c) in submerged cultures.

*A. kawachii* was grown in submerged cultures using WB (○) and MB (●), and in a solid culture (□).



**Fig. 7.** Comparison of the time courses of the gene expression levels of GA (a) and ASAA (b). *A. kawachii* was grown in submerged cultures using WB (○) and MB (●), and in a solid culture (□). Values were shown as the mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. in a submerged culture using MB.

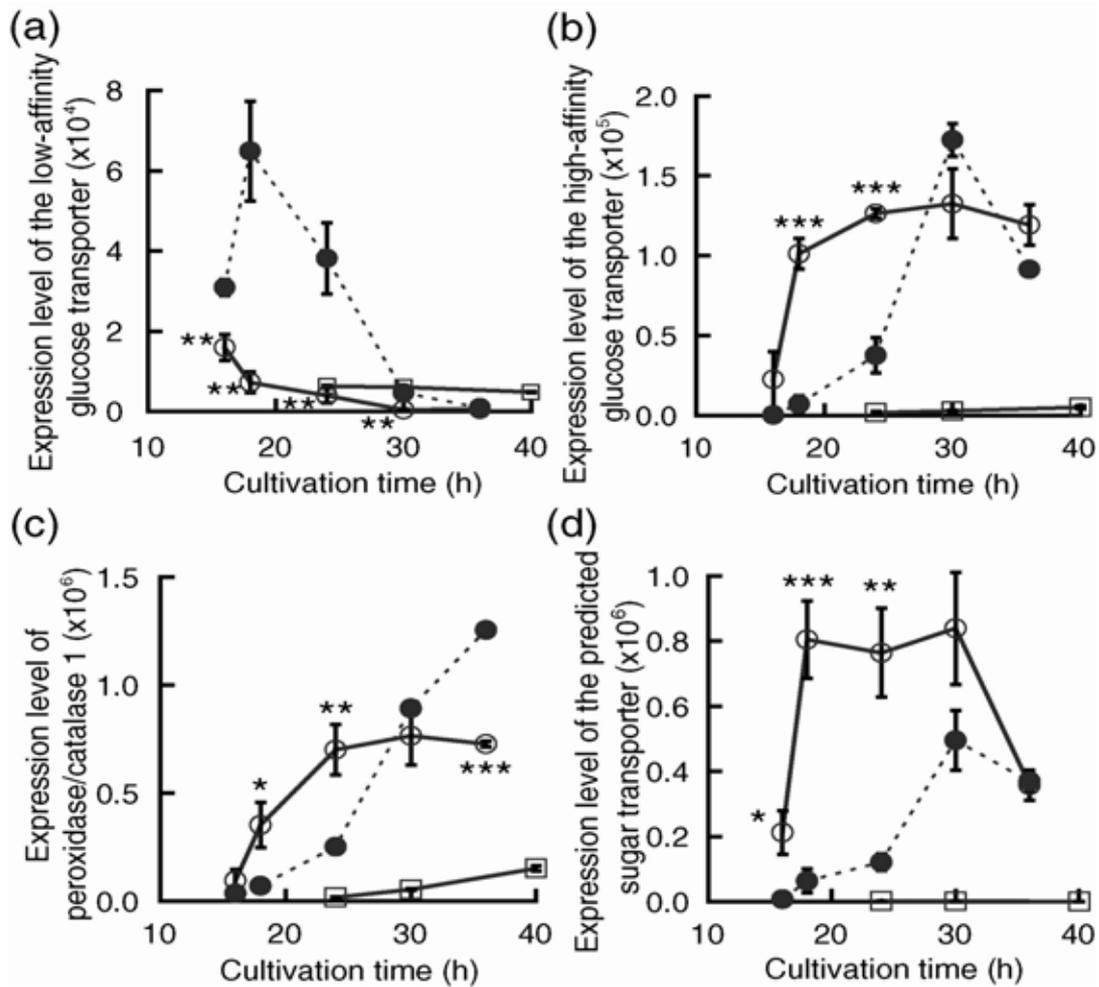
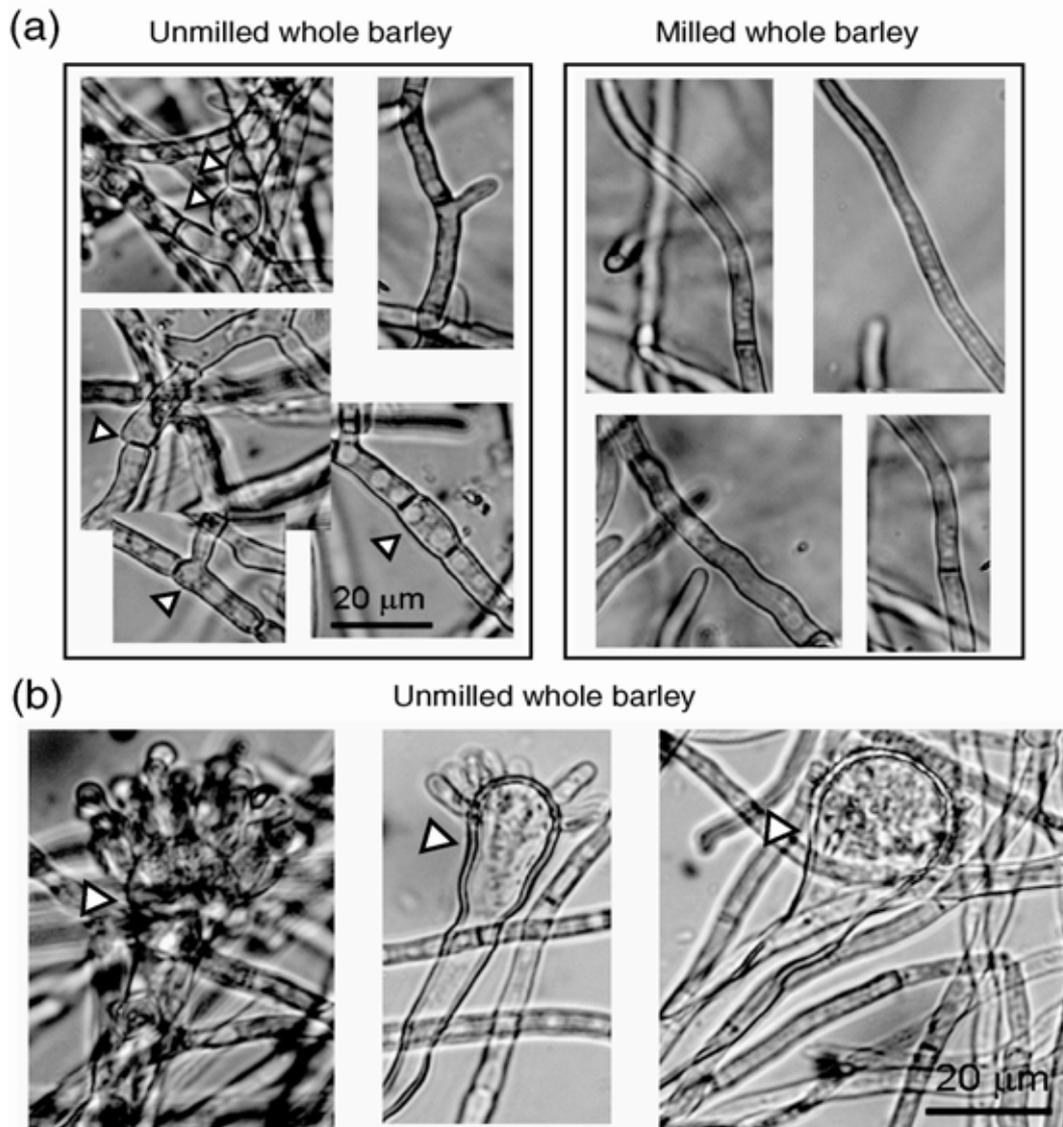
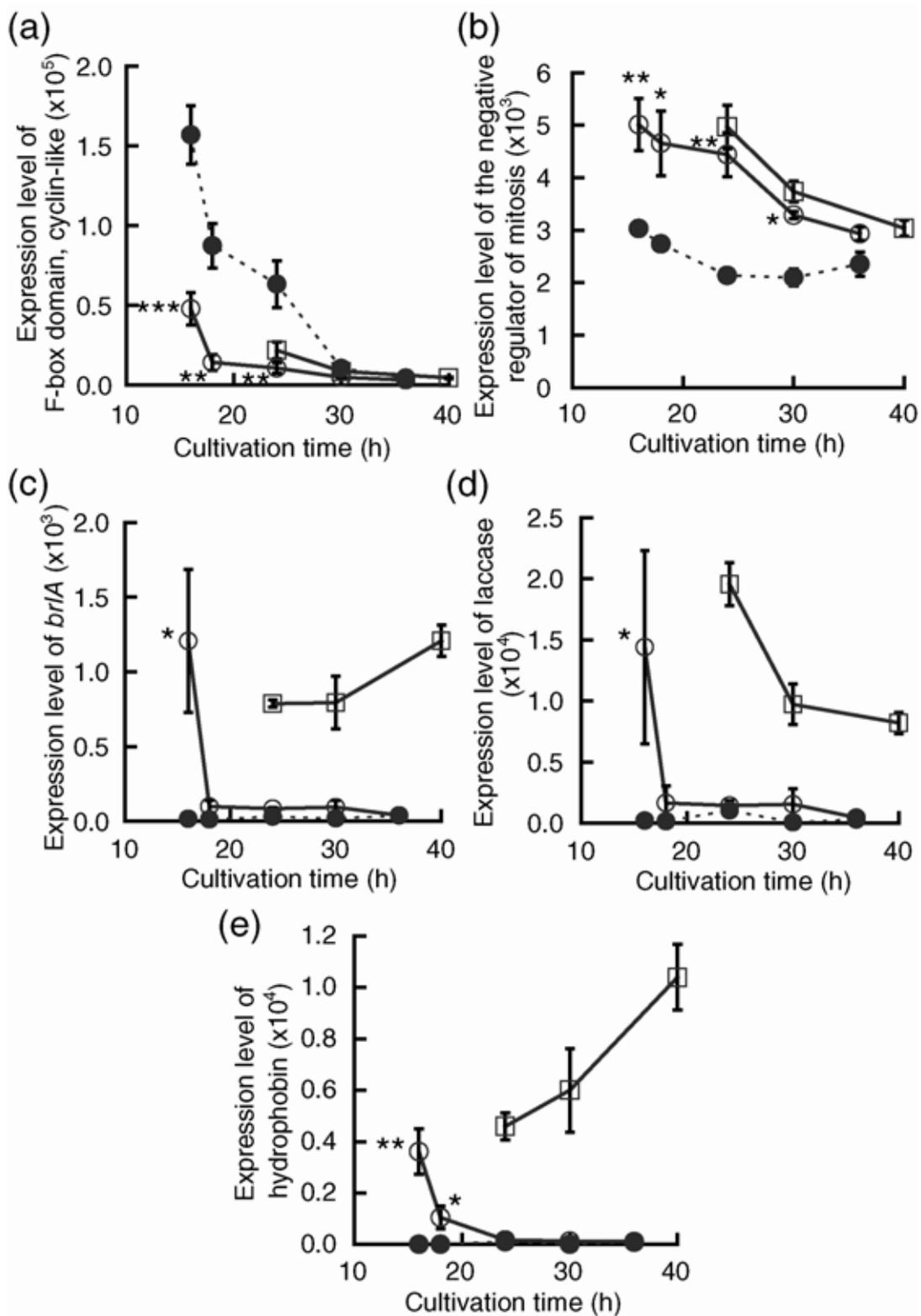


Fig. 8. Comparison of the time courses of the gene expression levels of the glucose responsible genes, the low-affinity glucose transporter (a), high-affinity glucose transporter (b), peroxidase/catalase 1 (c) and predicted sugar transporter (d).

*A. kawachii* was grown in submerged cultures using WB ( $\circ$ ) and MB ( $\bullet$ ), and in a solid culture ( $\square$ ). Values were shown as the mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  and \* $P < 0.05$  vs. in a submerged culture using MB.

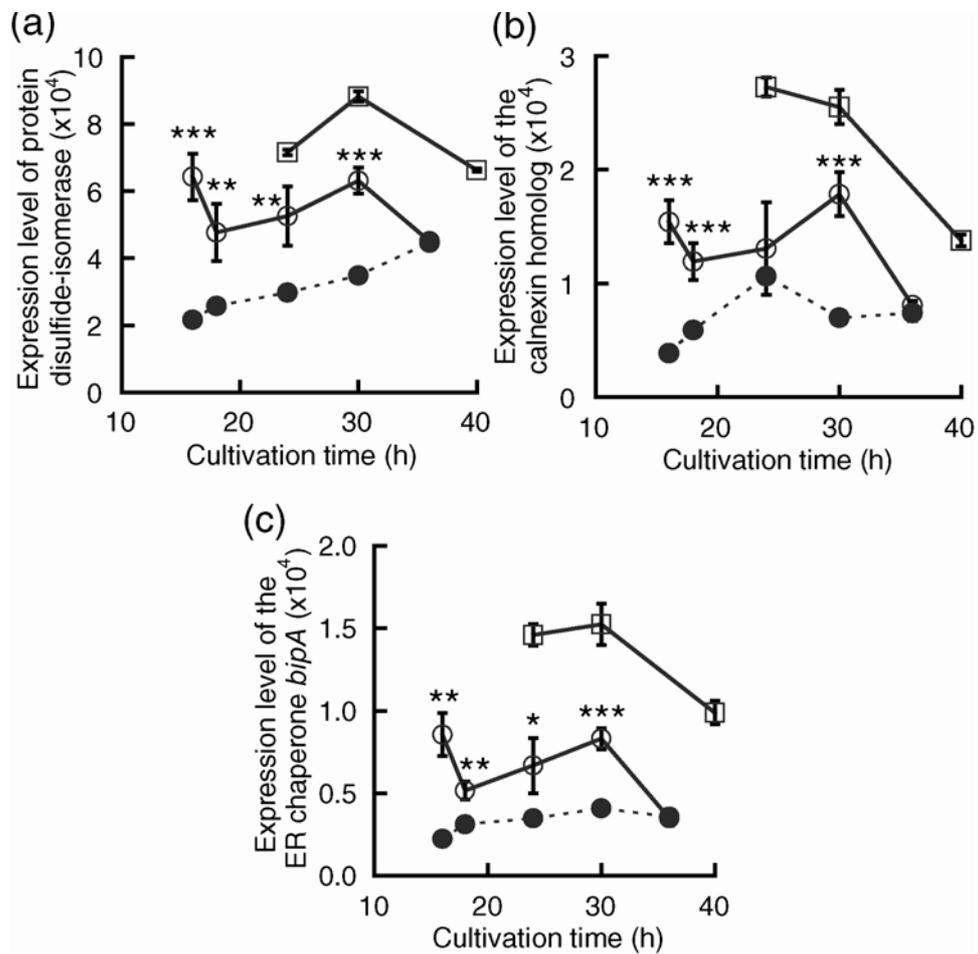


**Fig. 9.** Morphological alterations in mycelia in submerged cultures using WB: (a) *A. kawachii* was grown in submerged cultures using WB (left) and MB (right) for 18 h. Arrows showed swollen, bulbous or multi-septum hyphae; (b) formation of conidiophores in submerged cultures using WB at 18 h. Arrows showed conidiophores and phialides. Bars showed 20 μm.



**Fig. 10. Comparison of the time courses of the gene expression levels of cell cycle and sporulation-related genes. Gene expression levels of F-box domain, cyclin-like (a), negative regulator of mitosis (b), regulatory protein *brlA* (c), laccase (d), and hydrophobin (e).**

*A. kawachii* was grown in submerged cultures using WB (○) and MB (●), and in a solid culture (□). Values were shown as the mean ± SEM,  $n = 4$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$  vs. in a submerged culture using MB.



**Fig. 11. Comparison of the time courses of the gene expression levels of post-translational modification-related genes: protein disulfide-isomerase (a), the calnexin homolog (b) and ER resident chaperone *bipA* (c).**

*A. kawachii* was grown in submerged cultures with WB ( $\circ$ ) and MB ( $\bullet$ ), and in a solid culture ( $\square$ ). Values were shown as the mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. in a submerged culture using MB.

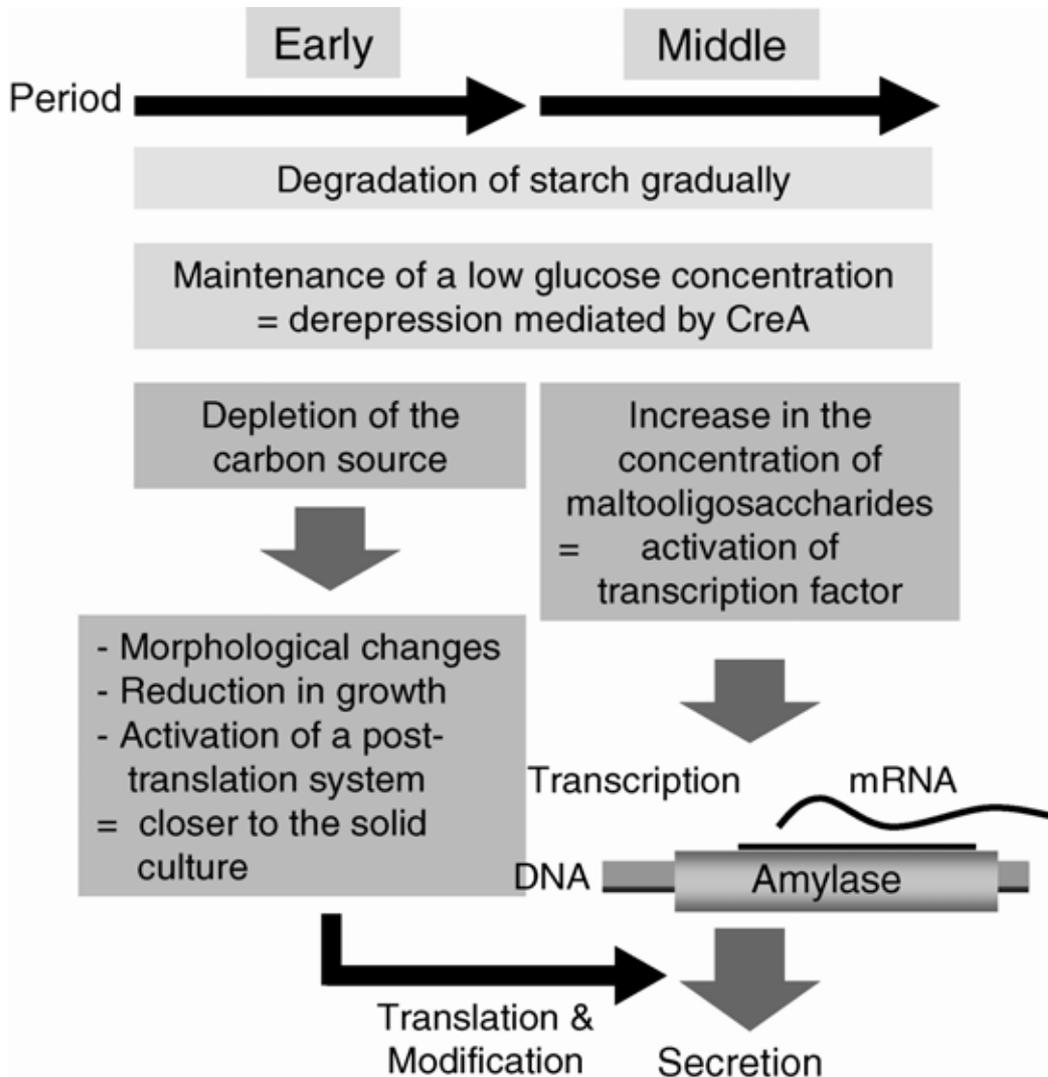


Fig. 12. Model of the effects of high amylase production using WB in a submerged culture.

**Table 9. The top 100 genes with highest fold changes (at 18 h of culture)**

unmilled whole barley &gt; milled whole barley

	Function description <sup>a</sup>	Fold change <sup>b</sup>	adj. <i>P</i> Val <sup>c</sup>
1	aspergillopepsin-2 heavy chain	1294.56	0.018
2	cell wall protein	934.24	0.021
3	MFS lactose permease	310.93	0.018
4	short-chain dehydrogenase/reductase family protein	299.89	0.021
5	TrkA-N domain dehydrogenase	262.77	0.032
6	alpha-L-arabinofuranosidase B	262.44	0.033
7	hypothetical protein	245.87	0.021
8	MFS sugar transporter	245.31	0.020
9	sugar transporter	150.63	0.041
10	extracellular protein	124.45	0.021
11	hydrophobin	88.83	0.021
12	sugar transporter	85.41	0.043
13	MFS multidrug transporter	84.69	0.025
14	beta-glucosidase 1B	82.13	0.020
15	TrkA-N domain dehydrogenase	81.93	0.039
16	MFS multidrug transporter	72.75	0.026
17	O-methyltransferase	67.30	0.024
18	MFS multidrug transporter	63.99	0.021
19	hypothetical protein	63.42	0.047

20	FAD dependent oxidoreductase	60.22	0.032
21	alcohol dehydrogenase	55.24	0.024
22	glycosyl hydrolase, family 18	54.52	0.023
23	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	53.69	0.038
24	hypothetical protein	53.33	0.030
25	MFS multidrug transporter	50.26	0.024
26	extracellular serine-rich protein	48.13	0.034
27	alpha-L-arabinofuranosidase A	47.96	0.026
28	integral membrane protein (Pth11)	46.59	0.024
29	alpha-N-arabinofuranosidase A	44.91	0.024
30	carboxylic acid transporter	42.90	0.021
31	alpha-N-arabinofuranosidase C	42.52	0.020
32	MFS quinate transporter	42.44	0.047
33	alpha-L-arabinofuranosidase A	38.39	0.026
34	alpha-glucosidase	38.23	0.044
35	endoglucanase-4	38.00	0.036
36	endoglucanase C	37.97	0.021
37	alpha-L-arabinofuranosidase A	36.94	0.026
38	branched-chain-amino-acid aminotransferase TOXF	35.12	0.049
39	sugar transporter	33.25	0.023
40	hypothetical protein	32.14	0.029
41	sugar transporter (High-affinity glucose transporter)	31.76	0.028
42	chitin binding domain protein Peritrophin-A	31.10	0.032
43	esterase	29.46	0.024

44	polyketide synthase	29.07	0.041
45	hypothetical protein	28.65	0.020
46	hypothetical protein	28.30	0.037
47	beta-mannosidase B	27.48	0.018
48	beta-galactosidase E	27.10	0.024
49	maltose permease	26.52	0.021
50	endo-beta-1, 4-glucanase (eg1)	26.07	0.021
51	acetoacetyl-CoA synthase	25.74	0.046
52	hypothetical protein	25.45	0.033
53	monooxygenase	24.69	0.030
54	LipA and NB-ARC domain protein	24.60	0.030
55	fatty acid synthase beta subunit	22.53	0.025
56	steroid monooxygenase	22.53	0.030
57	acetylxylylan esterase A	22.49	0.025
58	sugar transporter	22.29	0.026
59	beta-glucosidase J	22.10	0.032
60	hypothetical protein	20.81	0.026
61	sugar transporter	19.95	0.026
62	sugar transporter	19.57	0.026
63	alpha-galactosidase D	18.95	0.018
64	polyketide synthase	18.73	0.043
65	MFS sugar transporter	18.07	0.030
66	MFS sugar transporter	18.00	0.030
67	alpha/beta-glucosidase agdC	17.98	0.030

68	hypothetical protein	17.44	0.047
69	extracellular invertase	17.36	0.031
70	pectinesterase A	17.17	0.024
71	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	16.73	0.020
72	phenol monooxygenase	16.51	0.021
73	cutinase	15.46	0.032
74	dihydrodipicolinate synthase	15.21	0.038
75	Zn(II)2Cys6 transcription factor	15.13	0.035
76	hypothetical protein	15.08	0.033
77	MFS monosaccharide transporter (Hxt8)	14.75	0.037
78	MFS monosaccharide transporter	14.61	0.048
79	xyloglucanase	14.57	0.021
80	maltose permease	14.36	0.025
81	GMC oxidoreductase	14.12	0.041
82	C6 zinc finger domain protein	13.94	0.033
83	Zn(II)2Cys6 transcription factor	13.71	0.033
84	DEAD/DEAH box helicase	13.70	0.025
85	hypothetical protein	13.25	0.021
86	hypothetical protein	13.02	0.021
87	hypothetical protein	12.68	0.035
88	quininate permease	12.67	0.025
89	allantoate permease	12.55	0.035
90	hypothetical protein	12.50	0.022
91	sugar transporter	12.35	0.035

92	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase C	12.31	0.020
93	C2H2 type zinc finger domain protein	12.22	0.044
94	2-oxoglutarate/malate carrier protein	12.10	0.035
95	2-haloalkanoic acid dehalogenase	12.03	0.020
96	3-isopropylmalate dehydrogenase B	11.97	0.026
97	hypothetical protein	11.89	0.033
98	hypothetical protein	11.77	0.033
99	MFS monosaccharide transporter	11.76	0.045
100	dihydroflavonal-4-reductase	11.72	0.045

unmilled whole barley < milled whole barley

	Function description <sup>a</sup>	Fold change <sup>b</sup>	adj. <i>P</i> -Val <sup>c</sup>
1	citrate synthase	0.01	0.025
2	hypothetical protein	0.01	0.022
3	MFS transporter	0.02	0.021
4	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	0.02	0.026
5	2-methylcitrate dehydratase	0.03	0.042
6	glucose oxidase	0.04	0.047
7	sterigmatocystin biosynthesis fatty acid synthase subunit beta	0.04	0.037
8	quinone oxidoreductase	0.05	0.039
9	carnitiny-CoA dehydratase	0.06	0.020
10	alcohol dehydrogenase	0.06	0.032

11	integral membrane protein	0.06	0.024
12	fungal cellulose binding domain protein	0.06	0.021
13	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	0.07	0.034
14	siderophore iron transporter mirB	0.07	0.025
15	glutamate decarboxylase 1	0.07	0.021
16	HECT-type ubiquitin ligase-interacting protein creD	0.08	0.029
17	hypothetical protein	0.08	0.032
18	flavohepotein	0.09	0.030
19	siderophore biosynthesis acetylase AceI	0.09	0.020
20	o-methyltransferase	0.09	0.021
21	hypothetical protein	0.09	0.021
22	IgE-binding protein	0.10	0.049
23	esterase	0.10	0.021
24	MFS monosaccharide transporter	0.10	0.021
	Low-affinity glucose transporter HXT3		
25	endo-1,4-beta-xylanase B precursor, mRNA	0.11	0.036
26	cytochrome P450 monooxygenase	0.11	0.028
27	choline transport protein	0.11	0.029
28	6-phosphogluconate dehydrogenase	0.11	0.029
29	phosphoketolase	0.12	0.041
30	trehalose synthase (Ccg-9)	0.12	0.026
31	choline transport protein	0.12	0.044
32	MFS monosaccharide transporter	0.12	0.029
33	D-xylulose reductase A	0.12	0.035

34	inositol-3-phosphate synthase	0.13	0.039
35	phosphatidylserine decarboxylase family protein	0.13	0.025
36	translation initiation factor eIF-2B subunit family protein	0.13	0.021
37	trehalose synthase (Ccg-9)	0.13	0.029
38	alpha-L-arabinofuranosidase E	0.13	0.027
39	cycloheximide resistance protein	0.14	0.038
40	sugar transporter	0.14	0.044
41	pyruvate decarboxylase	0.14	0.029
42	F-box domain, cyclin-like	0.14	0.030
43	hypothetical protein	0.15	0.024
44	drug resistance protein	0.15	0.032
45	MFS transporter	0.15	0.045
46	long-chain-fatty-acid-CoA ligase	0.15	0.021
47	xylanase A	0.15	0.030
48	MFS transporter	0.16	0.049
49	endo-1,4-beta-xylanase F1	0.16	0.034
50	mannose-6-phosphate isomerase, class I	0.16	0.026
51	nonribosomal siderophore peptide synthase Sid2	0.16	0.024
52	endopolygalacturonase C	0.17	0.044
53	aryl-alcohol dehydrogenase	0.17	0.023
54	xylanase A	0.17	0.032
55	xylanase A	0.17	0.029
56	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	0.17	0.030

57	siderochrome-iron transporter	0.17	0.021
58	hypothetical protein	0.18	0.020
59	siderochrome-iron transporter	0.19	0.021
60	hypothetical protein	0.19	0.020
61	pentatricopeptide repeat protein	0.19	0.045
62	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	0.19	0.037
63	glycosyl hydrolase	0.19	0.046
64	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0.19	0.023
65	alpha-1,3 glucan synthases	0.20	0.041
66	hypothetical protein	0.20	0.021
67	hypothetical protein	0.20	0.018
68	integral membrane protein	0.20	0.020
69	ornithine-N5-oxygenase	0.20	0.025
70	squalene epoxidase	0.20	0.032
71	hypothetical protein	0.21	0.028
72	hypothetical protein	0.21	0.032
73	hypothetical protein	0.21	0.024
74	MFS transporter	0.21	0.021
75	hypothetical protein	0.21	0.037
76	non-classical export protein Nce2	0.21	0.022
77	aspartyl protease	0.21	0.024
78	sugar transporter	0.21	0.045
79	hypothetical protein	0.21	0.039
80	hypothetical protein	0.21	0.021

81	serine-type carboxypeptidase F	0.22	0.026
82	hypothetical protein	0.22	0.024
83	arylsulfatase	0.22	0.028
84	BTB/POZ domain protein	0.22	0.018
85	rhamnogalacturonase B	0.23	0.030
86	hypothetical protein	0.23	0.023
87	IQ calmodulin-binding motif protein	0.23	0.038
88	coproporphyrinogen-III oxidase	0.23	0.036
89	hypothetical protein	0.24	0.025
90	hypothetical protein	0.24	0.029
91	arrestin (or S-antigen), N-terminal domain protein	0.24	0.024
92	proline oxidase	0.25	0.029
93	N amino acid transport system protein	0.25	0.024
94	hypothetical protein	0.25	0.037
95	MFS transporter	0.25	0.043
96	cytochrome c oxidase assembly protein	0.25	0.034
97	histone-lysine N-methyltransferase	0.25	0.035
98	hypothetical protein	0.25	0.021
99	polyketide synthase	0.25	0.027
100	Internal transcribed spacer 1 (ITS1) and 18SrRNA and 5.8S rRNA	0.25	0.038

---

a: Function descriptions were investigated using NCBI and KEGG databases.

b: The expression ratio (unmilled whole barley / milled whole barley).

c: Corrected *p*-value with multiple comparison taken into consideration.

**Table 10. The top 100 genes with highest fold changes (at 30 h of culture)**

unmilled whole barley &gt; milled whole barley

	Function description <sup>a</sup>	Fold change <sup>b</sup>	adj. <i>P</i> Val <sup>c</sup>
1	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family	615.81	0.002
2	MFS transporter	538.11	0.000
3	hypothetical protein	108.76	0.001
4	alpha-glucosidase	83.88	0.000
5	sugar transporter	74.22	0.007
6	hypothetical protein	65.13	0.002
7	hypothetical protein	54.15	0.000
8	TrkA-N domain dehydrogenase	48.80	0.013
9	hypothetical protein	46.52	0.000
10	alpha-glucosidase	41.91	0.000
11	hypothetical protein	40.59	0.001
12	cutinase	40.35	0.010
13	endo-xylogalacturonan hydrolase	39.99	0.004
14	polyketide synthase	37.63	0.001
15	hypothetical protein	37.15	0.000
16	alcohol oxidase	36.46	0.035
17	hypothetical protein,	31.91	0.002
18	NADH-cytochrome B5 reductase	31.33	0.001
19	beta-hexosaminidase	29.69	0.003

20	hypothetical protein	29.66	0.001
21	integral membrane PTH11-like protein,	25.30	0.004
22	hypothetical protein	24.03	0.002
23	RHS Repeat protein	24.03	0.002
24	alpha-galactosidase/alpha-n-acetylgalactosaminidase	23.16	0.000
25	alpha/beta-glucosidase agdC	22.65	0.003
26	beta-glucosidase M	21.17	0.011
27	phthalate transporter	20.12	0.001
28	alpha-galactosidase A	19.82	0.001
29	beta-glucosidase M	19.73	0.014
30	hypothetical protein	18.75	0.019
31	TrkA-N domain dehydrogenase	17.43	0.009
32	hypothetical protein	17.35	0.001
33	endoglucanase-4	16.46	0.002
34	aspergillopepsin A-like aspartic endopeptidase	15.82	0.001
35	aspergillopepsin-2 heavy chain	15.75	0.026
36	integral membrane protein	15.53	0.003
37	hypothetical protein	15.27	0.002
38	extracellular endo-1,5-alpha-L-arabinase	15.19	0.002
39	alpha-1,2-mannosidase	15.01	0.010
40	siderophore iron transporter	14.11	0.019
41	monocarboxylate transporter	13.70	0.003
42	lipase	13.14	0.006
43	laccase-1	12.63	0.048

44	monocarboxylate transporter	12.20	0.003
45	polyketide synthase	12.00	0.033
46	glycosyl hydrolase	11.95	0.021
47	glucoamylase	11.50	0.001
48	inulinase	11.31	0.002
49	hypothetical protein	11.21	0.013
50	endoglucanase-4	11.14	0.001
51	integral membrane protein	11.03	0.002
52	alpha-amylase A type-1/2	10.72	0.001
53	tripeptidyl-peptidase sed2	10.56	0.006
54	acid alpha amylase	10.51	0.001
55	sugar transporter	10.49	0.007
56	hypothetical protein	10.46	0.001
57	acid-stable alpha-amylase	10.46	0.001
58	hypothetical protein	10.34	0.003
59	integral membrane protein	10.33	0.019
60	laccase-1	10.23	0.042
61	hypothetical protein	10.12	0.007
62	pectinesterase A	10.02	0.010
63	hypothetical protein	9.84	0.002
64	hypothetical protein	9.81	0.002
65	endo-beta-1,4-glucanase	9.51	0.033
66	xylanase A	9.41	0.005
67	alcohol dehydrogenase 2	9.41	0.003

68	hypothetical protein	9.08	0.005
69	beta-lactamase domain-containing protein	9.03	0.009
70	alpha-glucosidase	8.96	0.001
71	lipase	8.85	0.011
72	extracellular GDSL-like lipase/acylhydrolase	8.75	0.002
73	tripeptidyl-peptidase sed2	8.57	0.009
74	superoxide dismutase [Cu-Zn]	8.53	0.001
75	tripeptidyl-peptidase sed2	8.49	0.008
76	endoglucanase-4	8.47	0.001
77	tripeptidyl-peptidase sed2	8.41	0.013
78	O-methyltransferase	8.23	0.004
79	FAD dependent oxidoreductase	8.22	0.025
80	xylanase A	8.05	0.005
81	polyketide synthase	7.87	0.013
82	tripeptidyl-peptidase sed2	7.87	0.008
83	xylanase A precursor	7.80	0.006
84	acid alpha amylase	7.79	0.001
85	acid-stable alpha-amylase	7.66	0.001
86	l-fucose permease	7.56	0.013
87	transglycosidase, GH16 family	7.55	0.034
88	spherulin 4-like cell surface protein	7.50	0.002
89	endo-1,4-beta-xylanase F1	7.11	0.015
90	alpha-glucosidase	7.05	0.018
91	oligopeptide transporter	6.99	0.037

92	pepsin-2 heavy chain	6.98	0.032
93	alpha-amylase A type-1/2	6.94	0.000
94	macrolide phosphotransferase k	6.59	0.017
95	hypothetical protein	6.51	0.006
96	geranylgeranyl pyrophosphate synthase	6.36	0.011
97	hypothetical protein	6.30	0.016
98	nmrA-like family protein	6.26	0.042
99	chitin binding protein	6.24	0.003
100	hypothetical protein	6.02	0.005

---

unmilled whole barley < milled whole barley

	Function description <sup>a</sup>	Fold change <sup>b</sup>	adj. <i>P</i> -Val <sup>c</sup>
1	cysteine synthase B	9.E-04	0.001
2	cysteine synthase B	4.E-03	0.001
3	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase B	0.01	0.001
4	endo-beta-1,4-glucanase A	0.02	0.002
5	MFS drug transporter, mRNA	0.02	0.000
6	hexose carrier protein	0.02	0.022
7	siderophore iron transporter mirB	0.02	0.005
8	D-xylulose reductase A, mRNA	0.02	0.000
9	siderophore iron transporter mirB, mRNA	0.03	0.003
10	ferric-chelate reductase, mRNA	0.03	0.003
11	siderophore biosynthesis acetylase AceI, mRNA	0.03	0.002

12	endoglucanase-4	0.04	0.049
13	aspergillopepsin-2 heavy chain	0.04	0.009
14	zinc-regulated transporter 1	0.04	0.009
15	MFS drug transporter	0.04	0.000
16	ferric-chelate reductase	0.04	0.002
17	ABC transporter	0.05	0.001
18	copper transporter family protein	0.05	0.007
19	hypothetical protein	0.05	0.017
20	hypothetical protein	0.06	0.002
21	MFS alpha-glucoside transporter	0.06	0.020
22	alternative oxidase	0.06	0.008
23	metalloreductase	0.06	0.009
24	siderophore iron transporter mirB	0.06	0.001
25	nonribosomal siderophore peptide synthase Sid2	0.06	0.002
26	malate synthase, glyoxysomal	0.06	0.000
27	metalloreductase	0.06	0.009
28	hypothetical protein	0.07	0.040
29	O-methyltransferase B	0.07	0.001
30	malate synthase, glyoxysomal	0.07	0.001
31	carnitiny-CoA dehydratase	0.07	0.001
32	hypothetical protein	0.08	0.001
33	CobW domain protein	0.08	0.009
34	sugar transporter	0.08	0.000
35	mannan endo-1,4-beta-mannosidase E	0.08	0.002

36	polyketide synthase	0.09	0.028
37	beta-glucosidase 1B	0.09	0.021
38	MFS sugar transporter	0.09	0.003
39	MFS monosaccharide transporter, mRNA Low-affinity glucose transporter HXT3	0.09	0.002
40	mannan endo-1,4-beta-mannosidase F	0.09	0.005
41	MFS transporter	0.09	0.012
42	sugar transporter	0.09	0.001
43	agmatinase 1	0.09	0.002
44	hypothetical protein	0.10	0.002
45	esterase	0.10	0.000
46	isocitrate lyase	0.10	0.006
47	tyrosinase	0.10	0.001
48	flotillin domain protein	0.10	0.012
49	hypothetical protein	0.10	0.004
50	hypothetical protein	0.10	0.040
51	polyketide synthase	0.11	0.033
52	hypothetical protein	0.11	0.015
53	monooxygenase	0.11	0.019
54	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	0.11	0.005
55	polyketide synthase	0.11	0.032
56	D-lactate dehydrogenase	0.11	0.011
57	MFS monosaccharide transporter	0.11	0.004
58	hypothetical protein	0.11	0.030

59	alpha-L-arabinofuranosidase A	0.11	0.023
60	NRPS-like enzyme	0.11	0.005
61	salicylate 1-monooxygenase SalA	0.11	0.048
62	MFS sugar transporter	0.11	0.011
63	flavin-containing amine oxidase	0.11	0.003
64	FAD dependent oxidoreductase	0.11	0.009
65	alpha-N-arabinofuranosidase A	0.12	0.026
66	hypothetical protein	0.12	0.002
67	1,4-beta-D-glucan cellobiohydrolase C	0.12	0.030
68	hypothetical protein	0.12	0.002
69	oxidoreductase	0.12	0.013
70	hypothetical protein	0.12	0.021
71	flavoheprotein	0.12	0.010
72	alpha-L-arabinofuranosidase A	0.13	0.025
73	alpha-L-arabinofuranosidase A	0.13	0.023
74	MFS monocarboxylate transporter	0.13	0.015
75	sugar transporter	0.13	0.009
76	FAD binding domain protein	0.13	0.011
77	MFS sugar transporter	0.13	0.005
78	hypothetical protein	0.14	0.001
79	AMP-binding enzyme, mRNA	0.14	0.002
80	hypothetical protein	0.14	0.002
81	tyrosine decarboxylase	0.14	0.001
82	aspartate aminotransferase	0.15	0.005

83	hypothetical protein	0.15	0.004
84	potassium transporter	0.15	0.001
85	multidrug resistance protein 1, 2, 3 (p glycoprotein 1, 2, 3)	0.15	0.004
86	amino acid transporter	0.15	0.009
87	predicted protein	0.15	0.006
88	hypothetical protein	0.15	0.005
89	hypothetical protein	0.15	0.017
90	ubiD family decarboxylase	0.15	0.019
91	myosin-cross-reactive antigen family protein	0.16	0.007
92	succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1	0.16	0.003
93	hypothetical protein	0.16	0.007
94	phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP]	0.16	0.039
95	amino acid transporter	0.16	0.002
96	hypothetical protein	0.16	0.002
97	stress responsive A/B barrel domain protein	0.17	0.001
98	FAD dependent oxidoreductase	0.17	0.001
99	monocarboxylate transporter	0.17	0.009
100	amino acid transporter	0.17	0.002

---

a: Function descriptions were investigated using NCBI and KEGG databases.

b: The expression ratio (unmilled whole barley / milled whole barley).

c: Corrected *p*-value with multiple comparison taken into consideration.

### 第3章

Solid-phase microextraction および GC-MS を用いた焼酎揮発性成分の  
定量法開発および液体麴による麦焼酎と固体麴による麦焼酎間での  
比較解析

## 第1項 緒言

従来の麹菌を用いた液体培養による酵素生産は、アミラーゼ、セルラーゼ等の酵素生産挙動が固体培養時と大きく異なり、また、全般的に生産性が低下することが知られている<sup>8,11-13</sup>。そのため、醸造産業分野では固体麹を用いる方が一般的であり、液体麹を利用することは稀であった。これに対し、Shojiらは用いる原料の加工処理条件を変え、大麦玄麦を原料として液体培養を行うことで GAase および ASAAase 両酵素の高生産がもたらされることを明らかにし<sup>27</sup>、当液体培養物を用いることによって焼酎製造が可能であることを示した<sup>28</sup>。

当液体培養法による液体麹を用いて製造した焼酎は、従来の固体麹を用いて製造した焼酎と香味の面で官能的に違いのないものであった<sup>62</sup>。香味上官能的に違いのない液体麹を用いて製造した焼酎（液体麹麦焼酎）と固体麹を用いて製造した焼酎（固体麹麦焼酎）の揮発性成分においては、特徴的な違いが何かあるのだろうか？その違いを探索するため、両者の揮発性成分に関する比較を行うこととした。アルコール飲料の揮発性成分の分析には通常ガスクロマトグラフィ（GC）が使用されるが、分析対象となる成分を抽出および濃縮するために、液液抽出や固相抽出等の前処理が必要である。焼酎の揮発性成分は、これまで、PorapakQ 樹脂充填の固相抽出を用いた前処理による GC 分析により得た詳細な報告がなされているが<sup>63</sup>、溶媒を用いる固相抽出法は手間と時間を要するため多数の試料を分析する場合には適した方法とはいえない。

これに対して、固相マイクロ抽出法（Solid Phase Micro Extraction: SPME）は、カナダのウォータールー大学の J.Pawliszyn ら<sup>64</sup>によって 1989 年に開発され、1993 年から市販が開始された比較的新しい固相抽出法の一つである。SPME 法は、シリンジのニードル部にポリメチルシロキサンなどの GC キャピラリーカラムの液相に相当するものを化学結合し、液体や固体のヘッドスペースに曝したり、あるいは、直接液体試料に浸漬して目的成分を抽出後、その全量を GC または LC に注入して分析するものである。抽出、濃縮、GC/LC への注入の全てを一工程で行うため溶媒を使用する必要がなく、また、抽出試料の全量を注入する分析のため高感度でもあり、さらに安価、迅速、簡便、自動化が可能などの利

点がある。分析対象に応じた液相の選択や前処理法の検討を十分に行えば、スクリーニングだけでなく精確な定量も可能である。SPME 法は以上のような理由から、アルコール飲料をはじめとする様々な食品の揮発性成分の分析にも使用されている<sup>65-71</sup>。そこで本研究において、headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) 法により、液体麹を用いて製造した焼酎（液体麹焼酎）と固体麹を用いて製造した焼酎（固体麹焼酎）との間で検出可能な全揮発性成分の比較を行い、差異成分を検索した。次に、差異成分を対象とした定量分析方法の妥当性評価を行い、分析方法を確立後、市販品等 35 種類の麦焼酎試料を対象に差異成分の定量を行った。さらに、差異成分の定量値を用い、焼酎試料が液体麹焼酎と固体麹焼酎のうちどちらの群に属するかを予測することができるかどうか、判別分析による液体麹麦焼酎と固体麹麦焼酎への群分けを試みた。

## 第2項 材料および方法

### 1. 試薬

乳酸エチル、安息香酸エチル、3-メチル-1-ペンタノール、3,7-ジメチル-6-オクテン-1-オール(シトロネロール)、酢酸 $\gamma$ -フェネチルは和光純薬工業社製を用い、コハク酸ジエチル、シクロヘキサノールは関東化学社製を用いた。すべての試薬は特級以上のものを用いた。HS-SPME-GC-MS分析にて使用した水はMilli-Qシステム(Millipore, Milford, MA, USA)によって処理されたものを用いた。

### 2. 供試麹菌株および酵母菌株

麹造りには白麹菌である *Aspergillus kawachii* NBRC4308 を用い、発酵には鹿児島酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いた。

### 3. 玄麦を用いた液体麹の製造

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、大麦玄麦が 10% (w/v) になるように加えた液体培地を調製した。玄麦は国産二条大麦の未精白のものを使用した。次いで、この調製した液体培地 100 mL を 500 mL 容のバツフル付三角フラスコに入れ、121 $^{\circ}$ C、15 分間オートクレーブ滅菌し、室温まで冷却した。この液体培地に対して、国産二条大麦を 70% 精白した丸麦 8% (w/v) を含む液体培地にて白麹菌を前培養した培養液を 1.0% (v/v) になるように接種した。その後、温度 37 $^{\circ}$ C、100 rpm にて 48 時間回転振とう培養を行い、液体麹を得た。

### 4. 液体麹による麦焼酎の製造

上記のようにして得られた液体麹を用いて仕込みを行なった。仕込み配合を Table 11 に示すが、固体麹を用いた麦焼酎の製法と麦および水の使用量をなるべく揃えたものとし、pH を下げるため 90% 乳酸を 0.044% 添加した。発酵温度を 25 $^{\circ}$ C に保ち、一次仕込み 5 日間、二次仕込み 2 日間、三次仕込

み 13 日間の三段仕込みを行なった。なお、掛け麦としては、国産二条大麦を 70% 精白した丸麦を水で洗淨後、60 分間浸漬、水切りを 30 分間行なった後、35 分間蒸きょうしたものを用いた。発酵終了後、もろみを圧力 -650 mmHg にて減圧蒸留し、留液の量が蒸留開始前のもろみの量に対して 40%となったところで蒸留を終了した。得られた留液をアルコール度数 25%となるよう和水し、麦焼酎を得た。

#### 5. 固体麹の製造

国産二条大麦を 70% 精白した丸麦を用い、洗麦後、40 分間浸漬、30 分間水切りを行い、40 分間蒸煮後、40 まで放冷し、精白麦 1 kg あたり 1 g の種麹を植菌した。40 、相対湿度 95% で 24 時間、その後 35 、相対湿度 95%で 6 時間、さらに 30 、相対湿度 90% で 18 時間培養し、固体麹を得た。

#### 6. 固体麹による麦焼酎の製造

仕込み配合を Table 11 に示した。また、発酵条件および蒸留条件は液体麹仕込みの場合と同一とした。液体麹仕込みの場合と同様に、得られた留液をアルコール度数 25%となるよう和水し、麦焼酎を得た。

#### 7. 焼酎試料

液体麹焼酎と固体麹焼酎間の差異成分に関する検索は、上記のように原料である大麦および水の使用量を揃えた仕込みにてラボスケールで製造して得た液体麹焼酎と固体麹焼酎を各 2 ロットずつ用いた。また、液体麹焼酎と固体麹焼酎間の差異成分に関する定量では合計 35 種の焼酎試料を用いた。液体麹焼酎としては、10 試料（アサヒビール社製造品）、固体麹焼酎としては 25 試料（うち 7 試料はアサヒビール社製造品、18 試料は市販品）を用いた。アサヒビール社製造品の焼酎試料は全て産業的スケールで製造されたものを用いた。

#### 8. HS-SPME-GC-MS 分析

#### 1)液体麴焼酎および固体麴焼酎の差異成分に関する検索

20mL 容 SPME 用バイアルに焼酎試料 1.4 mL 採取し、水により 7.0 mL となるよう希釈した後、内標準溶液（シクロヘキサノール 500 mg/L）14  $\mu$ L および塩化ナトリウム 3.0 g を添加し、ボルテック スミキサーを用いて十分攪拌後、HS-SPME-GC-MS 分析に供した。

SPME ファイバーは、50/30  $\mu$ m PDMS/DVB/CAR (polydimethylsiloxane/divinylbenzen /carboxen) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いた。抽出は Combi Pal GC 用オートサン プラー (AMR) を用い、ヘッドスペースからのサンプリングを 40、60 min、500 rpm にて攪拌しな がら行った。抽出後、SPME ファイバーを GC の注入口に挿入し、250、3 min、splitless モードで 注入した。GC-MS 分析は質量分析装置 (Agilent 5973; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) が 付随したガスクロマトグラフ装置 (Agilent 6890) を用いて分析した。カラムは DB-FFAP (30 m  $\times$  0.25 mmID, 膜厚 0.25  $\mu$ m; Agilent Technologies) を用いた。オープンの温度プログラムは、40 で 4 min 保持し、2.5 /min で 180 まで昇温し、2 min 保持後、さらに 8 /min で 230 まで昇温させ 2 min 保持した。キャリアガスとしてヘリウムを用い、流速 1.6 mL/min とした。MS 条件は 70 eV での Electron-Impact 法にて行い、スキャンモード (スキャン範囲 : 40-500 m/z at 0.6sec/scan) にて測定し た。

データ収集およびデータ処理は ChemStation chromatography software (Agilent Technologies) を 用いた。揮発性成分に含まれる未知化合物の同定には HP Wiley Spectral Library あるいは NIST Library にあるマススペクトルと比較することで行った。また標品入手が可能な場合は、標品に対する保 持時間およびマススペクトルの比較も行った。

#### 2)液体麴焼酎と固体麴焼酎間の差異成分に関する定量

乳酸エチル、安息香酸エチル、3-メチル-1-ペンタノール、コハク酸ジエチルおよびシトロネロールに ついては、20 mL 容 SPME 用バイアルに焼酎試料 1.4mL 採取し、水により 7.0 mL となるよう希釈し た後、内標準液（シクロヘキサノール 500 mg/L）14  $\mu$ L および塩化ナトリウム 3.0 g を添加し、ボル

テックスミキサーを用いて十分攪拌したものを分析用試料とした。酢酸  $\gamma$ -フェネチルは 20 mL 容 SPME 用バイアルに焼酎試料 140  $\mu$ L を採取し、水により 7.0 mL となるよう希釈した後、内標準液 14  $\mu$ L および塩化ナトリウム 3.0 g を添加し、ボルテックスミキサーを用いて十分攪拌したものを分析用試料とした。SPME 条件に関するヘッドスペースからのサンプリングは 40、30 min、500 rpm にて攪拌しながら行い、注入条件は上記条件と同じとした。GC-MS 分析は、オープンの温度プログラムは、40 で 4 min 保持し、7  $^{\circ}$ C/min で 230 まで昇温させ 2 min 保持した。その他の条件は差異成分に関する検索で用いた条件と同じとした。MS 条件は選択イオンモニタリングモードにて測定した。各化合物の定量イオン、確認イオンについて、乳酸エチルでは 56, 69 (m/z)、3-メチル-1-ペンタノールでは 45, 75 (m/z)、安息香酸エチルでは 150, 122 (m/z)、コハク酸ジエチルでは 101, 129 (m/z)、シトロネロールでは 69, 95 (m/z)、酢酸  $\gamma$ -フェネチルでは 104, 91 (m/z)、シクロヘキサノール (内標) では 82, 57 (m/z) とした。

## 9. 統計処理

基本的な統計処理は Excel2000 (Microsoft; Redmond, WA, USA) を、判別分析は JUSE-StatWorks/V4.0 (日科技連) を用いた。

### 第3項 結果および考察

#### 1. 液体麹焼酎と固体麹焼酎間の差異成分に関する検索

当実験には香味上官能的に違いのない焼酎試料を用いた<sup>62</sup>。Table 11にも示したが液体麹焼酎を製造するにあたり、液体麹造りとして玄麦を使用しており、またもろみのpHを下げるため90%乳酸を0.044%添加しているため、固体麹と液体麹を用いた方法間の厳密な比較ではなく、固体麹と液体麹で製造してできた製品の比較として行った。HS-SPME-GC-MS測定を行った後トータルイオン・クロマトグラムより網羅的にピークを拾い、内標準を用いた相対面積値を算出し、液体麹焼酎と固体麹焼酎間で対応するピーク同士を比較した。HS-SPME-GC-MS測定により、得られたトータルイオン・クロマトグラム上の62ピークについて化合物の推定ができた。既報の文献<sup>65,68</sup>を参照すると、HS-SPME-GC-MS法の併行精度は、大きな場合でも10%程度である。用いた方法の併行精度を10%と仮定した場合、併行精度の3倍にあたる30%以上相対面積値において異なった成分は、試料中の濃度に違いがあると推定されるため、2ロットのいずれにおいても30%以上異なった成分を差異成分として抽出することとした。検出された62ピークのうち、乳酸エチル、3-メチル-1-ペンタノール、安息香酸エチルを液体麹焼酎により多く含まれる成分として、またコハク酸ジエチル、シトロネロールおよび酢酸 $\gamma$ -フェネチルを固体麹焼酎により多く含まれる成分として抽出した (Fig. 13.)。これらの成分はいずれも、焼酎を含む他の酒類において既に検出が報告されている一般的な成分である<sup>72</sup>。

乳酸エチルは乳酸とエタノールのエステル化により生成されと考えられ、清酒において発酵中に増加すると報告されている<sup>73</sup>。液体麹焼酎の仕込み時に乳酸を0.044% (w/v) 添加していることから、主にもろみ中の乳酸濃度の違い等により、液体麹焼酎に多く含有されたと推察される。安息香酸エチルについてはフェノール酸が穀物の穀皮等に多く含まれているという報告<sup>74,75</sup>がある。穀皮を有する玄麦を用いる液体麹では、安息香酸エチルの前駆体がより多く含まれていることが考えられる。そのため、液体麹焼酎により多く含有されたと推察される。コハク酸ジエチルはコハク酸とエタノールのエステル化により生成されと考えられ、清酒において発酵前期で急増し、その後末期になるにつれて減少すること

が報告されている<sup>73</sup>。また、コハク酸は主に酵母によって生成される<sup>76</sup>。もろみ中でのコハク酸生成量、あるいはエステル化の違いや発酵後半における減少の違い等により、固体麹焼酎により多く含有されたと推察される。シトロネロールはゲラニオールおよびネロールがもろみ中で酵母により変換されて生成されることが報告されている<sup>77</sup>。また、ゲラニオールからシトロネロールへの変換は好気条件などによる酵母の生理状態に依存することも報告されている<sup>78</sup>。仕込条件の違いによる発酵過程におけるもろみ中の成分の経時的変化や好気条件などの差異等により、固体麹焼酎に多く含有されたと推察される。酢酸  $\gamma$ -フェネチルは清酒においてアルコールアセチルトランスフェラーゼによってアセチル CoA と  $\gamma$ -フェネチルアルコールから生成されることが報告されている<sup>79</sup>。発酵過程におけるアセチル CoA あるいは  $\gamma$ -フェネチルアルコール量やその前駆体であるフェニルアラニン量の違い、さらにはエステル化の違い等により、固体麹焼酎に多く含有されたと推察される。3-メチル-1-ペンタノールは生成過程について不明なことが多い。

発酵終了時の pH は液体麹焼酎では 4.23、固体麹焼酎では 4.13 であった。大麦の穀皮等原料に由来する成分の違い、仕込み条件の違いから来るもろみ中の成分の経時的な変化の違い、そしてそれらの違いに起因する酵母の生理状態の違い等が、並行複発酵過程において複雑に関与しながら、液体麹焼酎と固体麹焼酎間で微量成分に差異を生じさせたことが考えられる。しかし、詳細を明らかにするためにはさらなる検討が必要である。

## 2. 液体麹焼酎と固体麹焼酎間の差異成分に関するターゲット定量

### 1) 方法の妥当性評価

HS-SPME-GC-MS 法の妥当性を評価した。方法の評価にあたり、併行精度、直線性、検出限界、定量限界について調査した。併行精度については焼酎試料を用いて  $n=6$  で行った。直線性について、乳酸エチルについては 0.1 ~ 10 (mg/L)、3-メチル-1-ペンタノールについては 0.005 ~ 0.2 (mg/L)、安息香酸エチルについては 0.0004 ~ 0.02 (mg/L)、コハク酸ジエチルについては 0.05 ~ 1 (mg/L)、シトロネロールについては 0.001 ~ 0.02 (mg/L)、酢酸  $\gamma$ -フェネチルについては 0.02 ~ 0.1 (mg/L) の範囲となるよう各成分

5水準における濃度を調製し、焼酎試料を用いて実施した。検出限界についてはS/N(シグナル/ノイズ)=3、定量限界についてはS/N=10となる濃度を算出した(n=6)。乳酸エチル、3-メチル-1-ペンタノール、安息香酸エチル、コハク酸ジエチル、シトロネロールの場合は、試料測定時におけるマトリックス中のエタノール濃度に合わせて5%エタノール溶液を用い、酢酸-フェネチルの場合も、同様に試料測定時におけるマトリックス中のエタノール濃度に合わせて0.5%エタノール溶液を用いた。

結果をTable 12に、またクロマトグラムの例をFig. 14に示す。併行精度についてはすべての化合物で8.0%以下、相関係数(r)は0.994以上と良好であり、またLODおよびLOQからも十分な感度であることが確認できた。これらの結果より、今回確立したHS-SPME-GC-MS法が焼酎試料の分析に適していることが確認できた。

## 2) 定量結果

液体麹および固体麹を用いて工業スケールにて製造された焼酎試料35点を用い、乳酸エチル、安息香酸エチル、3-メチル-1-ペンタノール、コハク酸ジエチル、シトロネロールおよび酢酸-フェネチルを定量した結果をTable 13に示す。定量は標準添加法により行った。これら成分のうち、麦焼酎における安息香酸エチルおよびシトロネロールの定量値に関する報告はこれまでなかったため、新しい報告となる。また、試料中の各成分の平均値および範囲をTable 14に示す。

液体麹焼酎により多く含まれる成分として抽出した乳酸エチル、3-メチル-1-ペンタノールおよび安息香酸エチルについては、市販品も含めた試料群の平均値においても、液体麹焼酎の方が高い値を示した。また、固体麹焼酎により多く含まれる成分として抽出したコハク酸ジエチル、シトロネロールおよび酢酸-フェネチルについても、市販品も含めた試料群の平均値においても固体麹焼酎の方が高い値を示した。市販品にもあてはまることから、差異成分として抽出した6つの化合物は液体麹焼酎や固体麹焼酎製品の特徴成分として、一般性があると推察された。

次にあくまで参考程度であるが、これまで報告のある官能閾値と焼酎試料における定量値を比較することによって、これらの成分について焼酎の香りへの影響について考察してみる。これらの成分のう

ち官能閾値に関する報告があるのは、乳酸エチル（清酒）、シトロネロール（芋焼酎）、酢酸 フェネチル（清酒）の3成分についてであり、乳酸エチルは、50～250 mg/L（清酒）<sup>80</sup>、シトロネロールは0.15 mg/L（芋焼酎）<sup>81</sup>、酢酸 フェネチルは3～5 mg/L（清酒）<sup>80</sup>である。酢酸 フェネチルについて、一部の焼酎試料にて官能閾値に近い定量値のものが存在するが、他の成分についてはこれらの成分の定量値は官能閾値に比べて低く、官能閾値の面からも麦焼酎の香気に重大な影響はしていないものと推察された。このことは、液体麴焼酎と固体麴焼酎間の差異成分に関する検索で用いた、ラボスケールにて原料を揃えて製造した液体麴焼酎と固体麴焼酎間で官能的に差がなかったことと整合性がある。

### 3. 判別分析

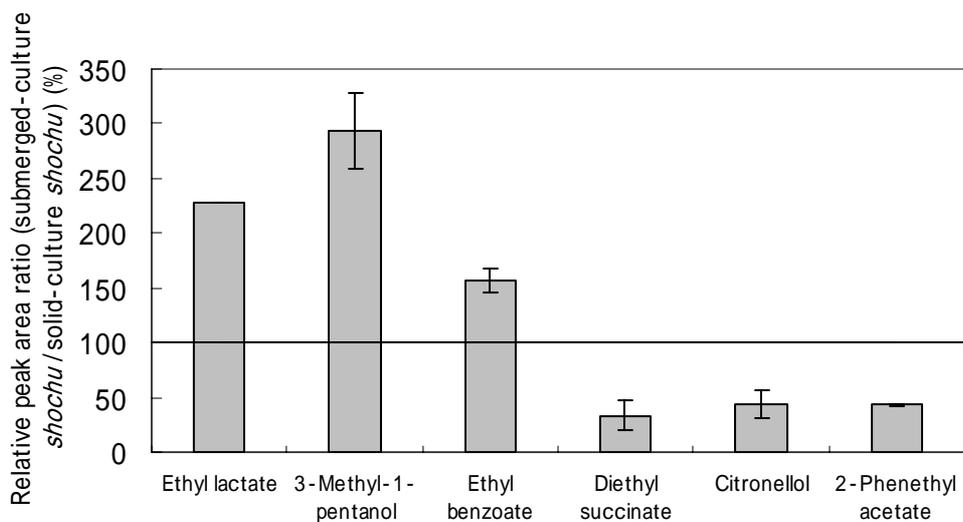
判別分析は、標本がどの群に属するかが明確である学習データを用いて判別モデルを構築し、そのモデルを用いてまだ分類されていない標本がどの群に帰属するかを判別する方法である。化学成分を用いた食品に関する判別分析の事例は多く報告されており、アルコール飲料では、ワインにおいて HS-SPME-GC 法を用いた解析が特に多く報告<sup>82-85</sup>されている。申請者は、差異のあった6成分の定量値を用いて判別分析により液体麴焼酎と固体麴焼酎への群分けができるかどうか検討した。

液体麴焼酎および固体麴焼酎の判別が可能であるかどうか、各差異成分に関する定量値を説明変数として用い、マハラノビスの汎距離を用いた方法にて行った。ステップワイズ変数選択により6成分すべてを説明変数として採用することとした。最初に、2群の判別モデルによる分類を行い、さらに得られた判別モデルを検証するため Leave-one-out cross-validation を行った。Leave-one-out cross-validation は、判別式の妥当性を検証する手法として、元のデータから1つだけ外して判別式を得、外したデータを新たなデータとして適用した際に妥当な結果が得られるかを検証する方法である。結果を Table 15 に示す。判別式の妥当性は、判別的中率（判別結果が正しいデータの個数 / 全体の個数）などで評価されるが、分析試料35点について、上記6成分を用いた判別により、2群の判別モデルによる分類および cross-validation のいずれにおいても35試料全てについて正しく判別され、判別の中率は100%であり良好な結果であった。

本章では、液体麩麦焼酎と固体麩麦焼酎に関する差異成分として乳酸エチル、3-メチル-1-ペンタノール、安息香酸エチル、コハク酸ジエチル、シトロネロールおよび酢酸  $\gamma$ -フェネチルを抽出し、それらの成分を簡便・迅速定量できる方法を開発した。そして、それらを定量し市販焼酎も含め特徴的な成分であることを確認した。また、それらの定量値を用いた判別分析により、麩に関する液体麩焼酎と固体麩焼酎の違いも明瞭に群分けできることがわかった。液体麩焼酎と固体麩焼酎において、6成分に差異が生じた詳細な理由の解明をするにはさらなる研究が必要であるが、官能的な寄与はいずれも小さいものと考えられた。

## 第 4 項 要約

これまで Shoji ら<sup>27</sup> は玄麦を用いた新たな液体培養方法により得た液体麹を用いて焼酎製造を行い、従来の固体麹を用いて製造した焼酎と香味上官能的に違いのないものを得ている。液体麹を用いて製造した焼酎（液体麹焼酎）と伝統的な製法である固体麹を用いて製造した焼酎（固体麹焼酎）の製品としての揮発性成分の違いを明らかにすることを目的として、HS-SPME-GC-MS 法による簡便かつ迅速な焼酎試料の揮発性成分に関する分析法を確立し、液体麹焼酎と固体麹焼酎間において成分を比較した。その結果、乳酸エチル、3-メチル-1-ペンタノール、安息香酸エチルを液体麹焼酎により多く含まれる成分として、またコハク酸ジエチル、シトロネロールおよび酢酸  $\gamma$ -フェネチルを固体麹焼酎により多く含まれる成分として違いを見出した。さらに、市販品を含めた麦焼酎<sup>35</sup> 試料を対象にこれら 6 成分の定量を行ったところ、液体麹焼酎および固体麹焼酎の間で違いが見られた。官能評価および定量の結果より、これら 6 成分は官能的な寄与は小さいものと考えられた。さらに定量値を用いた判別分析による液体麹麦焼酎と固体麹麦焼酎への群分けを試みた結果、100%正しく群分けができた。

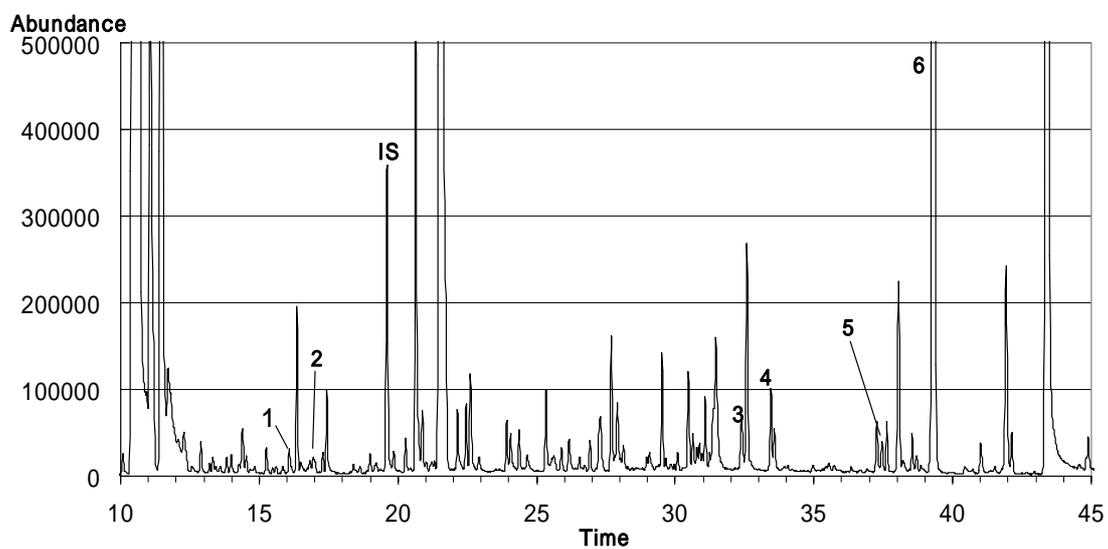


**Fig. 13. Compounds showing significant differences in content between the submerged-culture *shochu* and the solid-culture *shochu*.**

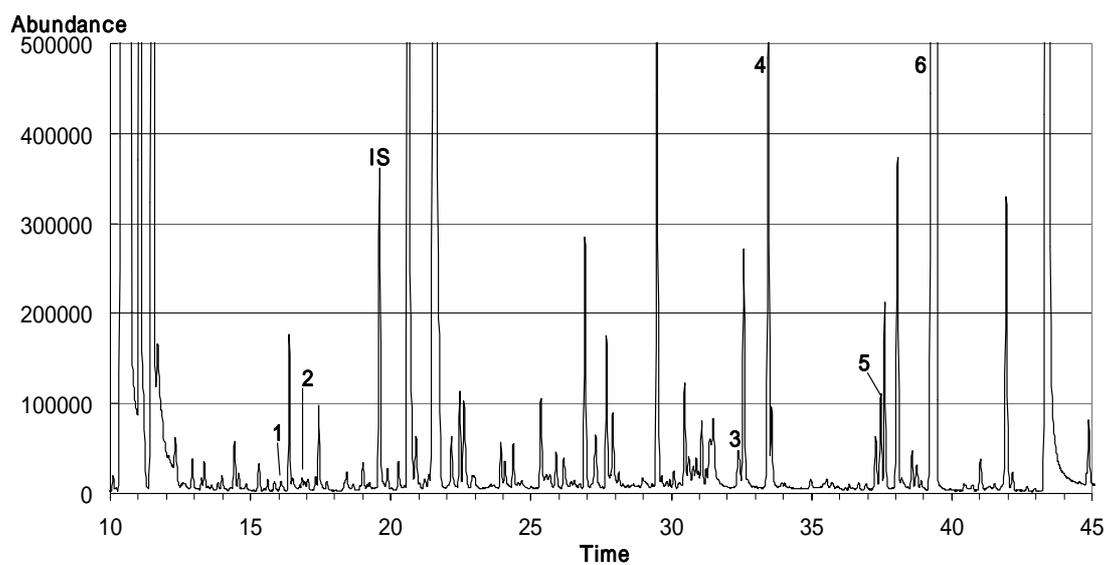
The areas of all the corresponding peaks from the total ion chromatograms of the two types of *shochu* were obtained, and the relative area (the peak area of a certain compound/peak area of internal standard solution) was calculated. The obtained values were compared between the submerged-culture *shochu* and the solid-culture *shochu*. The average values are presented.

The error bars provide the maximum and minimum deviation.

(A)



(B)



**Fig. 14. Total ion chromatogram of volatile compounds in the submerged-culture *shochu* (A) and the solid-culture *shochu*. (B).**

Key: 1, 3-methyl-1-pentanol; 2, ethyl lactate; 3, ethyl benzoate; 4, diethyl succinate; 5, citronellol; 6, 2-phenethyl acetate; IS: cyclohexanol.

**Table 11. Proportion of raw materials in brewing using submerged and solid-state culture of *koji* mold.**

	1 st addition	2 nd addition	3 rd addition	Total
<i>Submerged culture</i>				
<i>Koji</i> mold (mL)	500	-	-	500
Barley (g)	263	508	508	1279
Water (mL)	321	766	273	1360
90% Lactate (mL)	1.4	-	-	1.4
<i>Solid-state culture</i>				
Barley for <i>koji</i> (g)	313	-	-	313
Barley (g)	-	508	508	1016
Water (mL)	500	766	594	1860

**Table 12. Repeatability, correlation coefficient, limit of detection, and limit of quantification of six compounds obtained by HS-SPME-GC-MS.**

Compound	Repeatability (%)	Correlation coefficient (r)	limit of detection <sup>a</sup> (mg/L)	limit of quantification <sup>a</sup> (mg/L)
Ethyl lactate	7.0	0.998	0.01 (0.07)	0.05 (0.2)
3-Methyl-1-pentanol	6.9	0.995	0.0004 (0.002)	0.001 (0.007)
Ethyl benzoate	7.1	0.998	0.00004 (0.0002)	0.0001 (0.0007)
Diethyl succinate	7.6	0.999	0.001 (0.004)	0.003 (0.01)
Citronellol	8.0	0.999	0.0001 (0.0005)	0.0003 (0.002)
2-Phenethyl acetate	4.4	0.994	0.00003 (0.001)	0.00008 (0.004)

<sup>a</sup>Values in parentheses are converted with respect to *shochu* concentration before dilution.

**Table 13. Measured values of six compounds showing significant differences in contents between submerged-culture *shochu* and solid-culture *shochu*.**

Sample <sup>a</sup>	Ethyl lactate	3-Methyl-1	Ethyl benzoate	Diethyl succinate	Citronellol	2-Phenethyl-
	(mg/L)	-pentanol (mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	acetate (mg/L)
Submerged-culture 1	13.6	0.01	0.0009	0.03	0.002	0.38
Submerged-culture 2	17.8	0.03	0.0016	0.05	0.004	0.39
Submerged-culture 3	5.3	0.08	0.0036	0.16	0.003	1.15
Submerged-culture 4	6.0	0.07	0.0049	0.37	0.008	1.01
Submerged-culture 5	7.0	0.41	0.0020	0.11	0.002	0.53
Submerged-culture 6	7.1	0.38	0.0031	0.14	0.004	0.53
Submerged-culture 7	4.0	0.05	0.0031	0.12	0.003	0.60
Submerged-culture 8	6.1	0.04	0.0057	0.23	0.005	1.24
Submerged-culture 9	9.9	0.32	0.0028	0.16	0.005	0.65
Submerged-culture 10	7.1	0.03	0.0039	0.09	0.003	0.90
Solid-culture 11	2.2	0.03	0.0006	0.51	0.004	0.54
Solid-culture 12	2.2	0.02	ND <sup>b</sup>	0.58	0.005	0.70
Solid-culture 13	1.4	0.04	ND <sup>b</sup>	0.35	0.004	1.63
Solid-culture 14	2.1	0.03	ND <sup>b</sup>	0.37	0.004	1.39
Solid-culture 15	1.5	0.04	0.0009	0.46	0.013	1.55
Solid-culture 16	1.2	0.03	0.0021	0.53	0.009	2.27
Solid-culture 17	2.3	0.05	0.0019	0.60	0.014	2.80
Solid-culture 18	ND <sup>b</sup>	0.01	0.0010	0.40	0.009	0.07
Solid-culture 19	ND <sup>b</sup>	0.01	0.0009	0.19	0.012	0.17

Solid-culture 20	2.8	0.01	0.0036	0.54	0.014	2.41
Solid-culture 21	3.1	0.01	0.0022	0.68	0.011	2.01
Solid-culture 22	1.2	0.02	0.0018	0.27	0.014	1.73
Solid-culture 23	0.5	0.03	0.0018	0.28	0.007	0.91
Solid-culture 24	ND <sup>b</sup>	0.02	0.0008	0.19	0.012	0.23
Solid-culture 25	ND <sup>b</sup>	0.01	ND <sup>b</sup>	0.02	0.009	0.03
Solid-culture 26	0.8	0.05	0.0014	0.15	0.006	0.77
Solid-culture 27	ND <sup>b</sup>	0.01	0.0014	0.10	0.013	0.13
Solid-culture 28	ND <sup>b</sup>	0.01	0.0012	0.09	0.006	0.17
Solid-culture 29	0.4	0.01	0.0020	0.31	0.009	0.33
Solid-culture 30	ND <sup>b</sup>	0.01	0.0010	0.14	0.012	0.15
Solid-culture 31	2.5	0.02	0.0026	0.53	0.010	1.39
Solid-culture 32	3.0	0.03	0.0012	0.69	0.005	1.48
Solid-culture 33	1.7	0.02	0.0016	0.44	0.006	3.22
Solid-culture 34	3.4	0.02	0.0026	0.56	0.008	2.40
Solid-culture 35	1.0	0.03	0.0019	0.92	0.011	1.66

---

<sup>a</sup>Submerged-culture, submerged-culture *shochu*; Solid-culture, solid-culture *shochu*.

<sup>b</sup>Lower than limit of quantification.

**Table 14. Means and ranges of six compounds showing significant differences in contents between submerged-culture *shochu* and solid-culture *shochu*.**

Compound	Submerged-culture <i>shochu</i>		Solid-culture <i>shochu</i>	
	Mean (mg/L)	Range (mg/L)	Mean (mg/L)	Range (mg/L)
Ethyl lactate	8.4	4.0-17.8	1.8	0 <sup>a</sup> -3.4
3-methyl-1-pentanol	0.1	0.01-0.41	0.02	0.01-0.05
Ethyl benzoate	0.0032	0.0009 -0.0057	0.0016	0 <sup>a</sup> -0.0036
Diethyl succinate	0.15	0.03-0.37	0.40	0.02-0.92
Citronellol	0.004	0.002-0.008	0.009	0.004-0.014
2-phenethyl acetate	0.74	0.38-1.24	1.20	0.03-3.22

<sup>a</sup>Lower than limit of quantification.

**Table 15. Original and cross-validated classification matrices.**

	Assigned category		Hits(%)
	Submerged-culture	Solid-culture <i>shochu</i>	
<i>Original</i>			
Submerged-culture	10	0	100.0
Solid-culture <i>shochu</i>	0	25	100.0
	overall		100.0
<i>Cross-validated</i>			
Submerged-culture	10	0	100.0
Solid-culture <i>shochu</i>	0	25	100.0
	overall		100.0

## 第4章

*Aspergillus kawachii*を用いた耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼおよびグルコアミラーゼを高生産させる糖質遊離抑制を必要としない液体培養法の開発

## 第1項 緒言

麹菌の培養方法には、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と、水に原料及びその他の栄養源を添加して液体培地を調製し、麹菌の分生子又は前培養した菌糸等を接種し培養する液体培養法がある。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である。これに対して、液体培養法は、効率的な生産に適した培養形態であるが、一般的にアミラーゼ、セルラーゼ等の生産性が低下することが報告されている<sup>8,11-13,86</sup>。

これに対し、Shoji らは大麦玄麦を用いて *A. kawachii* を液体培養することにより、焼酎醸造をはじめとするアルコール発酵において鍵酵素となる ASAAase および GAase を同時に高生産する新規な液体培養法を確立し、当液体培養物を麹として用いることで焼酎製造が可能である<sup>27,28</sup> ことを報告した。この培養法は、表面が穀皮で覆われた原料を用いることにより、原料内部のデンプンに由来する糖類の遊離が抑制され、培地中のグルコース濃度が低い状態で維持されることにより、グルコース抑制を受けずに酵素生産が誘導され続けるためアミラーゼ系遺伝子が高発現し、同時に翻訳後修飾も活性化される。また、培養期間にわたって菌の代謝が維持できるため酵素高生産が可能になっていると考えられる。一方、固い皮をもたない穀物を原料とする場合はグルコース濃度を低い状態で長く維持することが難しいため、当手法を適用しにくい。すなわち、グルコース抑制を回避するためグルコースを低濃度にするためには培地の原料濃度を下げる必要があるが、固い皮がないため栄養成分が速く遊離し枯渇するため、菌の代謝の維持ができず酵素活性が上がらないことが予想される。一方、培地の原料濃度を上げてしまうとグルコース濃度が上がるためグルコース抑制を受けてしまい、酵素活性が上がりにくいことが予想される。仮にこれらの問題を克服し、固い皮を持たない穀物を原料とした場合でも液体培養により高い酵素活性を得ることができれば、多様な原料を用いた麹造りが可能となるため香味に特徴のある酒造り等への応用が期待できる。特に芋焼酎は、焼酎乙類において原料別課税移出数量ベースで2011年では203,914klに達しており、2010年以降麦焼酎を抜いて国内最大となっているカテゴリーである<sup>87</sup>。そこで本章ではサツマイモを原料とし、焼酎製造に用いられる *A. kawachii* を用い ASAAase および GAase を同時に高

生産することが可能な新規液体培養法について検討した。また、培養中の糖濃度と ASAAase および GAase 活性の経時変化を調査し、サツマイモを原料とした場合の酵素高生産の機構について考察した。

## 第2項 材料および方法

### 1. 原料

生のサツマイモ(コガネセンガン, デンプン価 28.9%; ベニアズマ, デンプン価 25.2%; アケムラサキ, デンプン価 30.1%; ジョイホワイト, デンプン価 33.0%)、大麦玄麦、大麦丸麦、精白米、コーングリッツ、そば、アズキは市場より入手した。

### 2. 供試麹菌株および培養条件

供試麹菌株として、*Aspergillus kawachii* NBRC4308株を用いた。

前培養は、8% (w/v) 丸麦 (65%精白麦、オーストラリア産スクーナー種)、0.2% (w/v)  $\text{KNO}_3$  および 0.3% (w/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を含む前培養培地 100 mL を、容量 500 mL のバツフル付三角フラスコに入れ、121℃、15 分間オートクレーブ滅菌し、室温冷却後、分生子 1 白金耳を接種した。その後、温度 37℃、100 rpm にて 24 時間回転振とう培養を行った。本培養は、0.4% (w/v)  $\text{KNO}_3$ 、0.6% (w/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を含む培地 100 mL に適量のサツマイモ、または 3% (w/v) 大麦玄麦 (98%精白麦、オーストラリア産スクーナー種) を添加し、容量 500 mL のバツフル付三角フラスコに入れ、121℃、15 分間オートクレーブ滅菌し、前培養液を 2 mL 植菌し、37℃、100 rpm にて 72 時間回転振とう培養を行った。また、上記と同様の組成を有する培地 50 mL に 15% (w/v) 小麦粉、15% (w/v) 大麦丸麦、15% (w/v) 精白米、15% (w/v) コーングリッツ、15% (w/v) そば粉、15% (w/v) 粉砕したアズキを添加し、容量 200 mL のバツフル付三角フラスコに入れ同様に滅菌し、前培養液を 1 mL 植菌し、同様の条件で回転振とう培養を行った。通気攪拌培養は、5,000 mL 容のジャーフェーマンター (Bioneer-N500、丸菱バイオエンジ) を用いた。0.4% (w/v)  $\text{KNO}_3$ 、0.6% (w/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を含む培地 3,000 mL に 18% (w/v) サツマイモを添加し、121℃、15 分間オートクレーブ滅菌し、前培養液を 45 mL 植菌し、37℃、回転数 350 rpm、通気速度 3,000 mL/min にて通気攪拌培養を行った。

### 3. 酵素活性試験

ASAAase 活性および GAase 活性は、遠心分離 (1,670 × *g*, 10 分間) により得た培養上清に存在する活性を測定した。ASAAase 活性は文献<sup>27</sup>の方法に従い測定し、GAase 活性は文献<sup>88</sup>の方法に従い測定した。

#### 4. グルコースおよびマルトースの定量

遠心分離 (1,670 × *g*, 10 分間) により得た培養上清 0.3 mL を 13,200 × *g*, 20 分の条件で遠心式フィルター (ミリポア製ウルトラフリーMC 遠心式フィルターユニット、分画分子量 10,000, Millipore, Billerica, MA, USA) にて限外ろ過した。このうち 0.1 mL を 10 倍に希釈後、フィルター (DISMIC-13cp、孔径 0.45 μm, ADVANTEC 東洋) を用いてろ過したものを試料溶液とした。

試料溶液を示差屈折検出器 (RID-10A; 島津製作所) が付随した高速液体クロマトグラフ装置 (島津製作所) を用いて分析した。カラムは Aminex HPX-87H (300 mm × 7.8 mm) (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) を用い、移動相は 6 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、流速は 0.4 mL/min、オーブン温度は 65 °C、注入量は 10 μL とした。

#### 5. 菌体量測定

第 1 章と同様の方法にて測定した。

### 第3項 結果および考察

#### 1. ASAAase および GAase 活性に及ぼす培地中のサツマイモ濃度の影響

玄麦を用いた液体培養において酵素高生産化させるポイントが糖質の遊離を抑えグルコースを低濃度で維持することであったため、最初に次のような検討を行った。すなわち、表皮で覆われている割合の多い部位を用いた検討、サツマイモ内在性の $\alpha$ -アミラーゼによりでんぷんの分解が進まないよう内在性 $\alpha$ -アミラーゼを予め失活させる検討、 $\alpha$ -アミラーゼが欠失しているサツマイモ品種を用いた検討、オートクレーブによりサツマイモの組織が軟化しないよう培地中のミネラルの種類や濃度を調整する検討等を行った。しかし、ASAAaseおよびGAaseの高活性は得られなかった。さらなる検討の結果、培地中のサツマイモの濃度が酵素活性に影響することを見出した。

まず、酵素活性が高まるサツマイモ濃度があるかどうか、また、糖質の遊離に影響を与える可能性のあるサツマイモの皮のある部位と皮のない部位で違いがあるかどうか両方の部位を用いて検討した。本培養培地に用いるサツマイモの濃度について、先端を含む皮のある部位 (Fig. 15A) を用いた場合は3% (w/v) から80% (w/v) の範囲で、皮のない肉質部 (Fig. 15B) を用いた場合は5% (w/v) から80% (w/v) の範囲で検討した。また、炭素源としたサツマイモは芋焼酎造りで最もよく用いられるコガネセンガンを用いた。先端部を含む部位を用いた場合のASAAaseおよびGAase活性についてFig. 16に、肉質部を用いた場合の結果についてFig. 17に示す。先端を含む部位を用いた場合はASAAaseおよびGAase活性のいずれも、濃度が3% (w/v) から20% (w/v) の範囲で濃度の増加とともに酵素活性の上昇が認められ、一方、30% (w/v) を超えると酵素活性の低下が認められた。肉質部を用いた場合はASAAaseおよびGAase活性のいずれも、サツマイモ濃度が5% (w/v) から30% (w/v) の範囲で濃度の増加とともに酵素活性の増加が認められ、40% (w/v) を超えると酵素活性の低下が認められた。特に、肉質部を用いた場合において、濃度30% (w/v) の条件にて、72時間後にASAAase活性は51 units/mL、GAase活性は188 units/mLに達し、検討した条件の中で最も高い活性が得られた。また、肉質部を用いたサツマイモ濃度20% (w/v) の条件の場合において、ASAAase活性は51 units/mL、

GAase活性は174 units/mLが得られ、 Sugimotoら<sup>29</sup>の液体培養で得られたASAAase活性36 units/mLおよびGAase活性144 units/mLを上回った。焼酎製造に必要な仕込み活性は、 $\alpha$ -アミラーゼでは約20 units/mL、グルコアミラーゼでは約30 units/mLと推定されている<sup>89</sup>が、今回得られた活性値はそれらを大きく上回っており、産業的にも利用可能な活性値がサツマイモ濃度20% (w/v) において得られたと考えられる。一方、培地中のデンプン濃度については、サツマイモ20% (w/v) の場合はデンプン濃度が5.8% (w/v) であるのに対し、玄麦2.5% (w/v) の場合は、糖質含量の割合を66.9%<sup>90</sup> とするとデンプン濃度は1.7% (w/v) となり、サツマイモの場合の方がデンプン濃度の高い条件での培養であった。また、先端を含む部位を用いた場合と皮のない肉質部を用いた場合とで、得られた酵素活性の最大値がほぼ一致した。これまでアミラーゼ系酵素はグルコース濃度が上がるとグルコース抑制により酵素生産が低下してしまうため、酵素生産を上げるにはグルコース濃度が上がらないような炭素源濃度が好ましいと考えてきたが、サツマイモ濃度がやや高めといえる20~30% (w/v) までにはサツマイモ濃度の増加とともに酵素活性が上がるのがわかった。酵素活性が上がった理由として、グルコース抑制がかかりながらも酵素生産が強く誘導されたこと、あるいはASAAaseは増殖連動型で生産される酵素である<sup>43</sup>ため、過度にならない程度まで菌体量が増加したことが酵素活性の上昇に寄与した可能性が推察された。一方、30% (w/v)を超えると酵素活性の低下が認められたが、菌体量が増え過ぎ十分な酸素供給ができなくなったこと等の可能性が推察された。先端を含む部位を用いた場合と皮のない肉質部を用いた場合とで、得られた酵素活性の最大値や酵素活性の最大値を与えるサツマイモ濃度がほぼ一致したのは、サツマイモの皮の有無によらずグルコース抑制や糖による酵素生産誘導の影響を同じように受けたためであると考えられた。なお、サツマイモの先端部は芋焼酎の製造の際に苦味の原因になりやすいため切除されることが多い<sup>91</sup>が、先端を含む部位を用いても酵素が高生産できるという今回の知見は、産業的に廃棄される先端部を麹以外の酵素剤製造等の培地原料として有効利用できる可能性を示唆している。

## 2. ASAAase および GAase 活性に及ぼす培地に用いる品種の影響

サツマイモ濃度をある程度高めることによって産業的に利用可能な酵素活性値が得られることがわかったので、品種による違いがあるかどうかを確認するため、芋焼酎造りに使用されるコガネセンガン、アケムラサキ、ジョイホホワイト、および、日本でよく流通している品種であるベニアズマの4種類のサツマイモを用いて培養し、得られた培養液のASAAaseおよびGAase活性を測定した。いずれの品種についても皮の無い肉質部を用い、濃度は先の肉質部を用いた実験において最も高い酵素活性が得られた30% (w/v) とした。得られた培養液上清のASAAaseおよびGAase活性の測定結果をFig. 18に示した。品種間でASAAaseおよびGAase活性に大きな違いは無く、また十分に高い活性が得られたことから、品種に関係なく産業的な利用が可能な液体麹が得られることが推察された。

### 3. ASAAase および GAase 活性に及ぼす培地に用いるサツマイモの形態の影響

玄麦を用いた液体培養において、玄麦を細かく粉碎した場合は ASAAase および GAase 活性が低下することが *A. kawachii* を用いた培養において<sup>27,29</sup>、また *A. oryzae* を用いた培養において<sup>92</sup> 報告されている。低下する理由として第 1 章にて述べたように、玄麦を粉碎した場合、栄養成分の遊離が速いため培養期間にわたり酵素生産に関わる誘導糖や栄養成分を供給し続けることが困難になるためと考えられる。サツマイモの場合では形態によって活性が影響されるかどうかを確認するため、サツマイモの形態を変えて培養した場合の ASAAase および GAase 活性を比較した。濃度は先の肉質部を用いた実験において最も高い酵素活性が得られた条件である 30% (w/v) に揃え、30 g × 1 個、10 g × 3 個、5 g × 6 個、1 g × 30 個および 0.1 g × 300 個の場合について比較した。炭素源としたサツマイモはコガネセンガンの皮のない肉質部を用いた。得られた培養液の ASAAase および GAase 活性を Fig. 19 に示す。一定の大きさを有する塊として用いた場合でも細断した場合でも、ASAAase および GAase 活性の違いは少なく、ともに高い活性が得られた。このことより、サツマイモを用いた場合は、玄麦を用いた培養で酵素高生産がもたらされた機構とは異なる機構により酵素高生産がもたらされていることが推察された。

#### 4. 通気攪拌培養の検討

フラスコスケールでの振とう培養にて酵素が高生産されることがわかったが、産業的に利用するためにはジャーファーメンターによる通気攪拌培養にて高活性が得られる必要がある。濃度は予備検討で良好な結果を与えたサツマイモ 18% (w/v) を用いて通気攪拌培養を行った。炭素源としてコガネセンガンの皮のない肉質部を用いた。その結果、培養 72 時間目で ASAAase 活性は 21 units/mL、GA 活性は 83 units/mL が、培養 120 時間目で ASAAase 活性は 35 units/mL、GAase 活性は 119 units/mL と比較的高い活性値が得られた。今回の培地条件を振とう培養だけではなくジャーファーメンターによる通気攪拌培養へ適用しても高い酵素活性が得られることがわかったことから、産業利用の可能性が確認でき、また培養の方法によらず同様の機構により酵素高生産がもたらされたと考えられた。

#### 5. 培地中の糖濃度の経時的変化

これまでの結果より、炭素源としてサツマイモを用いた場合は玄麦を用いた場合と異なり、培養中の糖濃度が高まっていることが推察された。特に ASAAase について、グルコース濃度が高まる液体培養条件下で産業的に利用可能な高活性値が得られた報告は過去にない。サツマイモを用いた場合において、糖濃度と ASAAase や GAase の高活性化との関係を確認するため *A. kawachii* を用い、炭素源として 20% (w/v) サツマイモ (コガネセンガン) および 3% (w/v) 玄麦を用いて、これら 2 つの条件下における酵素活性値と培地中の糖濃度の経時的変化を比較した。炭素源濃度はサツマイモと玄麦を用いた場合での酵素活性がほぼ揃うように設定した。培地あたりの ASAAase 活性および GAase 活性に関する 24 時間おきの経時的変化を Fig. 20 に示した。72 時間後の ASAAase 活性は玄麦を用いた場合の方がやや高い活性を示したが、サツマイモを用いた場合も玄麦を用いた場合も、GAase 活性および ASAAase 活性について、ほぼ同じような経時的変化を示した。すなわち、両活性とも 24 時間目まではゆるやかに上昇し、24 時間目以降から 72 時間目にかけて急速に上昇していた。

また、72 時間後の菌体量について、サツマイモを用いた場合は 6.1 mg/mL、玄麦を用いた場合は 4.9 mg/mL となり、サツマイモを用いた場合は玄麦を用いた場合の 1.2 倍であった。サツマイモを用

いた場合は玄麦を用いた場合に対して、菌体量当たりの酵素活性について ASAAase 活性は 0.56 倍、GA 活性は 0.95 倍となった。菌体量当たりの酵素活性について GA 活性はほぼ同等であったが、ASAAase 活性では違いが認められた。

次に、培地中の糖としてグルコースおよびマルトースに関する 24 時間おきの経時的変化を Fig. 21 に示した。玄麦を用いた場合は培養を通して、グルコースおよびマルトースのいずれも見かけ上ゼロであり、これまでの報告<sup>27,92</sup>と同様であった。これに対して、サツマイモを用いた場合には、マルトースは培養開始時には 1.6% (w/v) であり、24 時間目以降は見かけ上ゼロであった。また、グルコースは培養開始時にゼロであったが、培養 24 時間目および 48 時間目において 3%(w/v) を超えており、72 時間後でも 1.8% (w/v) であった。培養開始時のマルトース濃度が 1.6% (w/v) であった理由としては、オートクレーブ中にサツマイモに含まれる内在性の  $\alpha$ -アミラーゼにより、デンプンからマルトースが生成したためと考えられた。マルトースが培養開始から 24 時間目にかけて減少したことは、*A. kawachii* により生成された酵素によりグルコースにまで分解されたり、あるいはそのまま菌にとりこまれたためであると考えられた。また、グルコースの濃度は 24 時間目以降、高い濃度で推移した。玄麦を用いた場合の糖濃度は極めて低い一方で、サツマイモを用いた場合は糖濃度が高目に推移することが観察され、2 つの条件で糖濃度の経時的変化に明らかな違いが認められた。グルコース濃度の経時的変化に明らかな違いが認められた理由として、玄麦は穀皮があるため糖質の遊離が緩やかであり、酵素分解を受けた後速やかに菌に取り込まれてしまうため濃度が上がらないのに対して、サツマイモの場合は穀皮がないため糖質の遊離が速く、しかも Table 16 に示したようにサツマイモを用いた培地では糖質の量が玄麦を用いた培地よりも 2.9 倍多かったので、菌により取り込まれながらも培養期間全体にわたってアミラーゼ系酵素によってグルコースへと分解されていくためグルコース濃度が高めに推移したと考えられた。加えて *A. kawachii* の場合は GAase 活性が第 1 章での *A. oryzae* の場合よりも約 10 倍高いこともグルコース濃度が高めに推移することに寄与している可能性があると考えられた。また培地中のグルコース濃度が高まった結果、浸透圧ストレスにより糖の取り込みがやや遅くなった可能性も推察された。第 1 章および第 2 章において、玄麦を用いた液体培養に関する酵素高生

産の機構については、糖類をはじめとする栄養成分の遊離が緩やかであるためグルコース濃度が低く維持されており、代謝系の必要な活性が維持されつつ、グルコース抑制を受けずに酵素生産が誘導され続け、さらに翻訳後修飾も活性化されて酵素高生産へつながっていると考察した。今回のサツマイモを用いた場合ではグルコース濃度が高めに推移していたため、玄麦を用いた場合とは別の機構が働いていたことが強く示唆された。

*Aspergillus* 属における糖質分解酵素の発現については、特に *A. oryzae* について詳細に解析されているが<sup>93</sup>、一般にアミラーゼの発現はデンプン、デキストリン、マルトースやグルコース等によって誘導され<sup>18,24,25</sup>、グルコースの添加によって抑制される<sup>38,94</sup>ことが知られている。一方、Sudoら<sup>43,44</sup>は *A. kawachii* を用いた液体培養においては、デキストリン、マルトース、デンプンやグルコースを炭素源として用いた場合に ASAAase が高生産されること、また、*A. kawachii* による ASAAase 生産は、培地中のグルコース濃度により影響されるだけでなく、菌の増殖が旺盛であれば ASAAase 生産に関わる制御系が解除されやすく高生産につながることを考察している。Iwanoら<sup>9</sup>は *A. kawachii* の ASAAase は pH6 以上で活性が低下することを報告している。Itoら<sup>16</sup>は *A. kawachii* ではグルコースを炭素源として培養した場合でもマルトースを炭素源とした場合と大差なくグルコアミラーゼが生産されることを報告している。

サツマイモを炭素源とした *A. kawachii* による今回の培養条件において ASAAase および GAase が高生産化された理由として、培地中のサツマイモの濃度がやや高めである上、糖質の分解が徐々に進むため誘導糖であるマルトース、デキストリン、グルコース等が培養期間全体を通じて供給されたこと、栄養成分も同様に培養期間全体を通じて供給されたこと、菌の増殖が旺盛であったため ASAAase 生産に関わる制御系が解除されやすかった一方で、菌が過度に増殖し過ぎなかったことで必要量の酸素供給ができたことがまず考えられる。Table 16 に示すように糖質について、サツマイモの場合は 5.8% (w/v) と玄麦の場合の 2.0% (w/v) と比べ 2.9 倍多かったため栄養成分の供給源としても十分であったため菌体を旺盛に増殖させることができ、誘導糖の供給も培養期間全体にわたってできたと考えられる。また、糖質とタンパク質の比がサツマイモの場合は玄麦の場合と比較して 3.7 倍高く、しか

もサツマイモの場合は脂質も少なかったことから菌体の過度な増殖を抑えることができ、これにより酸素の必要な供給ができたと考えられる。また、酵素生産に適した pH や浸透圧環境となっていたこと、菌種が *A. kawachii* であったためグルコース濃度が高まっても *A. oryzae* よりも酵素が生産されやすかった等のことも複合的に関与している可能性が推察された。グルコース濃度が高まると酵素生産に対して抑制的に働くため一般的に酵素生産が低下するが、今回の培養条件下ではそれ以上に酵素生産を促進させる環境条件、すなわち、誘導糖や栄養成分の持続的な供給、旺盛な増殖による酵素生産制御系の解除や過度にならない菌体量となる等の条件、pH や浸透圧条件が整っていたと考えられた。さらに酵素生産効率を上げるには、菌体量と酸素供給のバランスをとるための原料の C/N 比の調整、ポリオール等の副産物代謝の調整等が考えられる。すなわち、サツマイモ量と酵素活性の関係についてはサツマイモ濃度 20 ~ 30% (w/v) が適切な濃度であることを見出し、またサツマイモを用いることで酵素活性が高まった理由として菌体を旺盛に増殖させながらも、最終的な菌体量が過度に増えなかった点を推察した。菌体量に影響する N 源については、0.4% (w/v)  $\text{KNO}_3$  と固定して検討したため、より高活性が得られる N 源の種類や濃度条件が存在する可能性がある。また、Diano ら<sup>95</sup> は *A. niger* を用いた培養にて培地のグルコース濃度が高まるとポリオール等の副生成物が増えることを報告しており、Pederson ら<sup>96</sup> は *A. niger* に関する流加培養による GAase 生産にとって酸素制限と浸透圧およびポリオールのような副産物代謝がプロセスの効率にとって重要であることを報告している。今回の試験において、浸透圧が糖類の取り込み速度へ影響していることも考えられ、浸透圧が適度に高まることにより玄麦を用いた場合のような糖の緩やかな取り込みが続き、代謝が維持されることで酵素生産の持続に寄与している可能性も推察された。サツマイモ濃度を高めたことで浸透圧が上がりポリオール生成が高まっていたのではないかと推察するが、副生成物の生成量をモニタリングしながら調整することにより酵素生産の効率がより向上する可能性がある。また、予備的な結果であるが、同様の培養条件により、小麦粉、精白した大麦、精白米、コーングリッツ、そばのような穀類、あるいはアズキのような豆類を炭素源として用いた場合においても同様に、ASAAase 活性および GAase 活性について高い活性値が得られており (Table 17)、さつまいもの場合と同様の機構で穀類や豆類の場合も

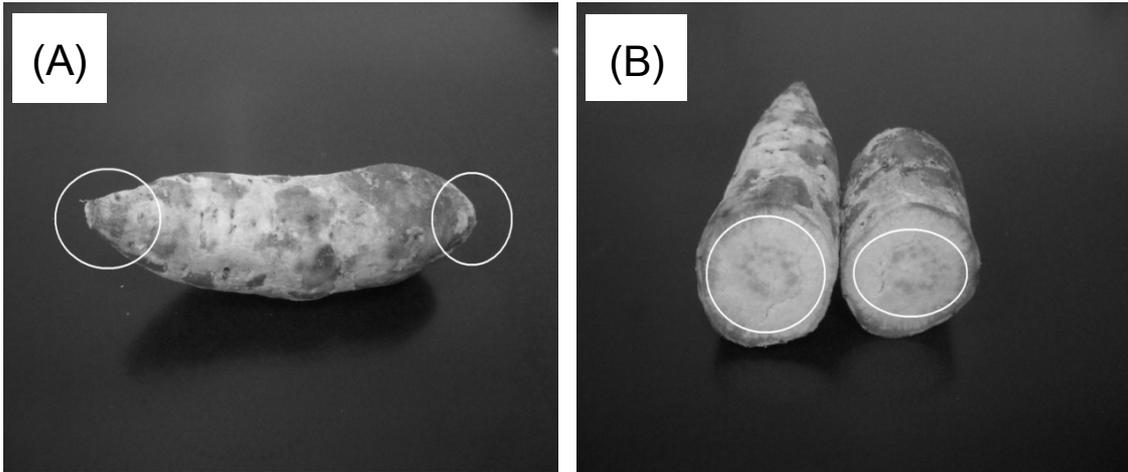
酵素高生産につながっていると考えられた。サツマイモの場合と ASAAase 活性や GAase 活性は同等であったが、Table 18 に示すように穀類や豆類の濃度が 15% (w/v) の場合は糖質の濃度が 8.2~11.4% (w/v) であるのに対しサツマイモ 20% (w/v) では糖質の濃度が 5.8% (w/v) であり、糖質あたりの生産性はサツマイモの方が高い傾向があった。一方、タンパク質の濃度については、穀類や豆類では 1.02~3.05% (w/v) であるのに対し、サツマイモの場合は 0.24% (w/v) とかなりサツマイモの場合の方が低かった。サツマイモの方が糖質あたりの生産性が高かった理由として、菌体の増殖が過度にならないよう抑えながら、ASAAase や GAase の誘導糖を供給することができたためであると考えられ、サツマイモはこれらの穀類や豆類の中で高いアミラーゼ系酵素活性を得るのに適した原料であると考えられる。なお、穀類や豆類を用いた培地はタンパク質が多かったためかオートクレーブ後に培地が固まりやすい傾向にあるため、このまま通気攪拌培養の実施は困難であり、実用化するにはさらなる検討が必要であると考えられる。

本研究において、サツマイモを液体培養の炭素源として用いた場合でも、培地への添加量を調整することで ASAAase 活性および GAase 活性について高い活性が得られることが明らかとなった。また、産業的に廃棄されることの多い芋の先端部を用いた場合でも、皮のない肉質部を用いた場合でも、高い活性が得られた。特に産業的に廃棄されることの多い先端を含む部位を用いた場合でも高い酵素活性が得られたことは、世界的に生産量が 1 億 657 万トンで、大麦にほぼ匹敵する主要農産物であるサツマイモ<sup>97</sup> を培地原料として麹以外の酵素剤製造等への産業的な有効利用が期待される。また、これまでサツマイモを原料とした固体培養による芋麹の研究により、全量芋を用いた純芋焼酎が特徴的な酒質をもつことが報告<sup>98</sup> されているが、液体麹によっても麹原料として用いるサツマイモの特性を活かした特徴的な酒質をもつ純芋焼酎造りが期待される。しかも、サツマイモの品種によらず高い活性が得られたことから、様々な品種を用いた麹造りが可能となることが期待される。原料として用いるサツマイモの品種により芋焼酎製品での異なる香味が得られることがこれまで報告<sup>99,100</sup> されていることから、麹造りに様々な品種のサツマイモを用いることが可能になることで、より多様な特徴を有する芋焼酎造りに繋がることを期待される。さらに、サツマイモを細かくした場合でも、一定の大きさ

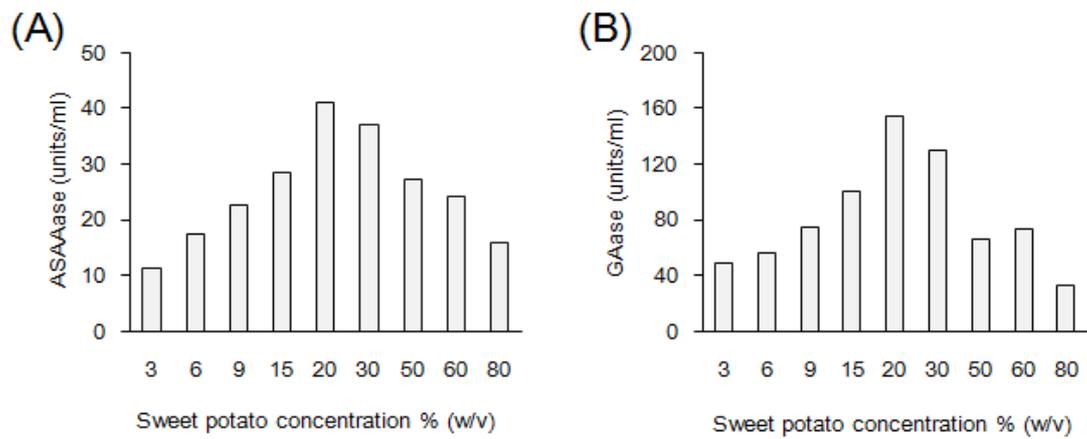
を有する塊として用いた場合でも同様の活性が得られ、原料として用いるサツマイモに対し加工の自由度があることがわかった。玄麦を用いた液体培養と比較するため、培養中の糖濃度の経時的な変化を調べた結果、培養途中でグルコースの濃度が 3% (w/v) にまで達していたため、これまで Shoji ら<sup>27</sup>が報告してきた玄麦を用いた糖の遊離抑制による酵素高生産とは異なる機構、すなわち誘導糖や栄養成分の培養期間を通じた持続的な供給、旺盛な増殖による酵素生産制御系の解除、過度にならない菌体増殖による酵素供給の確保、また酵素生産に適した pH や浸透圧等が複合的に関係していると考えられた。今後、*A. kawachii* のゲノムを用いて、トランスクリプトーム解析やメタボローム解析等により、サツマイモによる酵素高生産がもたらされた機構解析について検討を行うことを考えている。なお、今回の方法で得られた培養液を用いて焼酎造りが可能であることをアサヒビール株式会社では既に確認している。

## 第4項 要約

大麦玄麦を用いて *A. kawachii* を液体培養することにより、ASAAase や GAase を同時に高生産させる液体培養法が確立されたが、酵素を高生産させるためには、培養期間中のグルコース濃度を低く維持しながら培養期間を通じて酵素生産に関わる誘導糖や栄養成分を供給することが重要な条件であった。大麦のような固い穀皮で覆われた原料では、原料のデンプンに由来する糖類の遊離を抑制し、培地中のグルコース濃度を低い状態で維持することにより酵素を高生産させることが可能であるが、固い皮をもたない原料では、培養期間中のグルコース濃度を低い状態で維持しながら誘導糖や栄養成分を供給し続けることが難しい。本研究では、サツマイモのような固い皮のない原料を用いた場合でも酵素高生産が可能となる培養方法の検討を行い、サツマイモ濃度をやや高めにすることによって酵素を高生産させることが可能となることを見出した。ASAAase 活性および GAase 活性について、産業的利用が可能な高い活性値が得られ、最大でそれぞれ 51 units/mL、188 units/mL であった。また、サツマイモの品種の違いやサツマイモの大きさや形態によらず高い活性が得られ、通気攪拌培養においても高い活性が得られた。サツマイモを用いた場合の培養中のグルコース濃度の経時変化を調べた結果、高い濃度で推移していたことが確認されたことから、玄麦を用いた場合に考察してきた機構とは異なる機構、すなわち、誘導糖や栄養成分の培養期間を通じた持続的な供給、旺盛な増殖による酵素生産制御系の解除、過度にならない菌体増殖による酵素供給の確保、また酵素生産に適した pH や浸透圧等が複合的に関与して酵素高生産となる機構が推察された。

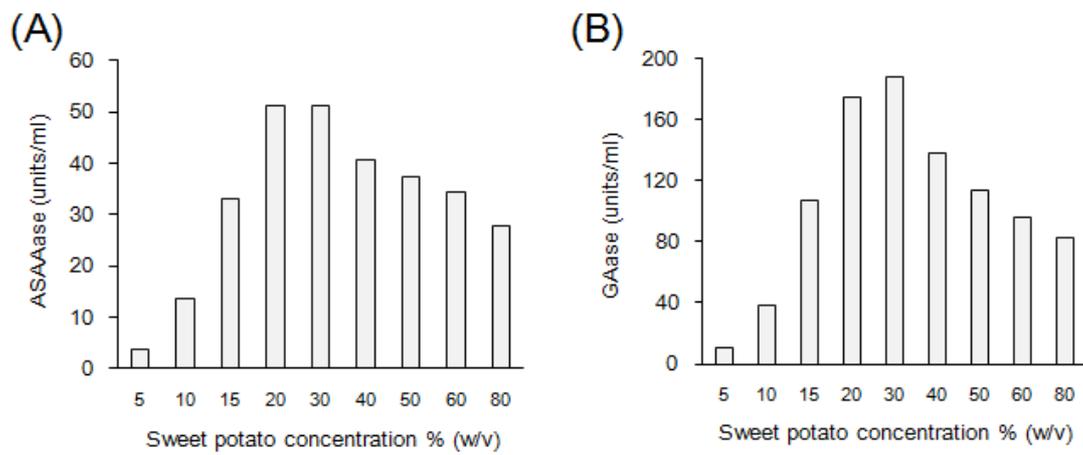


**Fig. 15.** Sweet potato. A, Tip portion. B, Skinless flesh.



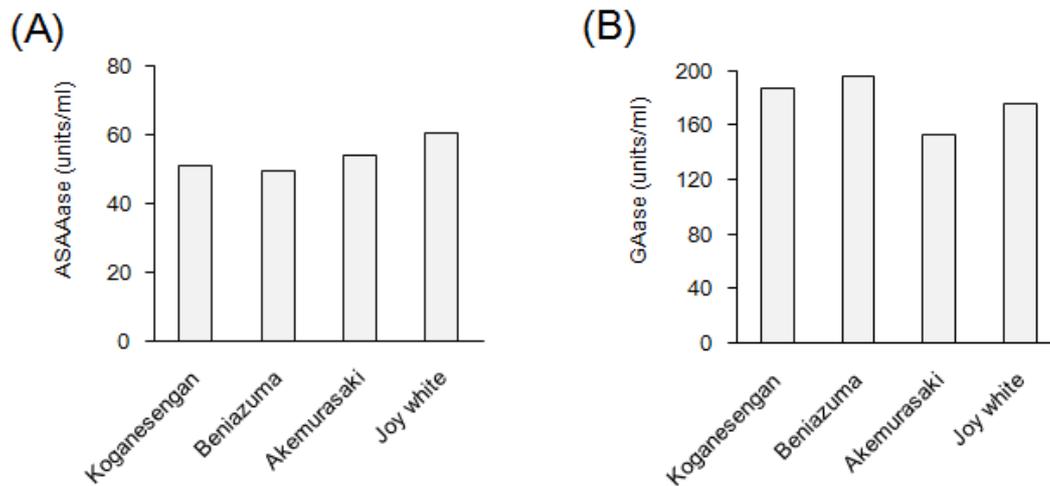
**Fig. 16. Enzyme activities in *A. kawachii* NBRC 4308 strain culture supernatant.**

*A. kawachii* was cultured at 37°C for 72 h by rotational shaking in a 100 mL medium containing 0.4% (w/v) KNO<sub>3</sub>, and 0.6% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> with the tip portion of sweet potato as the carbon source. **A**, ASAAase activity. **B**, GAase activity.



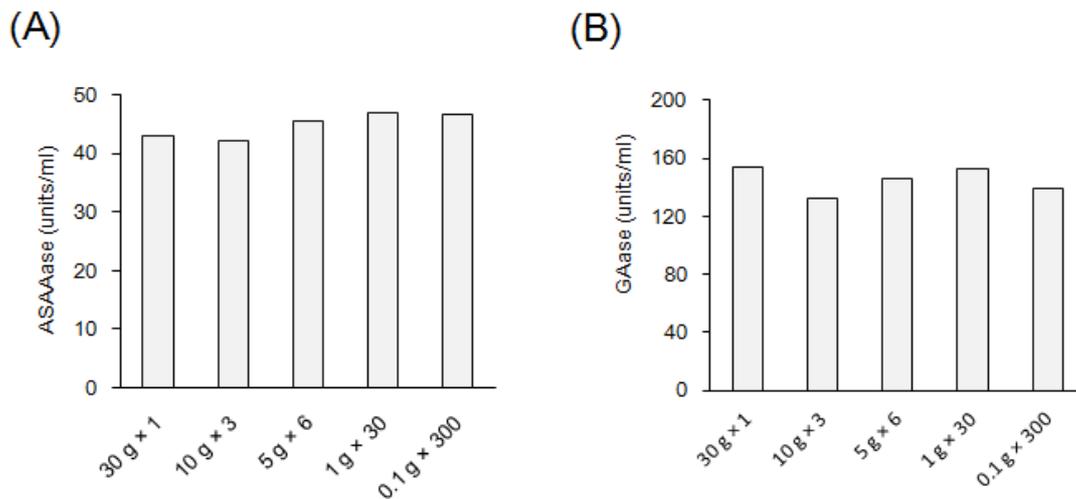
**Fig. 17. Enzyme activities in *A. kawachii* NBRC 4308 strain culture supernatant.**

*A. kawachii* was cultured at 37°C for 72 h by rotational shaking in a 100 mL medium containing 0.4% (w/v)  $\text{KNO}_3$  and 0.6% (w/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  with the skinless sweet potato flesh as the carbon source. **A**, ASAAase activity. **B**, GAase activity.



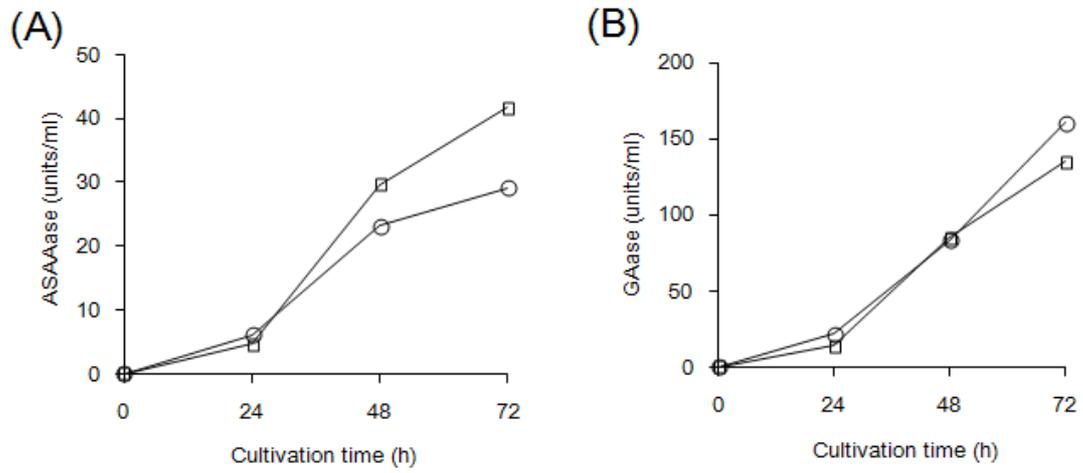
**Fig. 18. Comparison of ASAAase and GAase activities between sweet potato varieties.**

*A. kawachiii* NBRC4308 strain was cultured at 37°C for 72 h by rotational shaking in a 100 mL medium containing 0.4% (w/v) KNO<sub>3</sub>, and 0.6% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> with skinless sweet potato flesh as the carbon source. **A**, ASAAase activity. **B**, GAase activity.



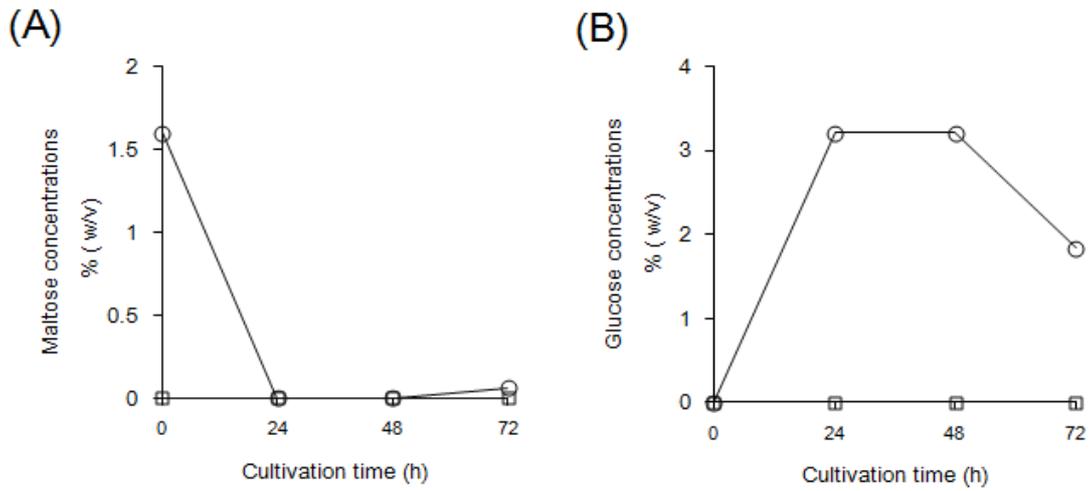
**Fig. 19. Comparison of ASAAase and GAase activities for different configurations of weights and numbers of sweet potatoes.**

*A. kawachiii* NBRC4308 strain was cultured at 37°C for 72 h by rotational shaking in a 100 mL medium containing 0.4% (w/v) KNO<sub>3</sub> and 0.6% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> with skinless sweet potato flesh as the carbon source. **A**, ASAAase activity. **B**, GAase activity.



**Fig. 20. Changes in enzyme activities in the culture solution over time.**

*A. kawachiii* NBRC4308 strain was cultured at 37°C for 72 h by rotational shaking in a 100-mL medium containing 0.4% (w/v) KNO<sub>3</sub> and 0.6% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> with 20% sweet potato and 3% (w/v) crude barley as the carbon sources. **A**, ASAAase activity. **B**, GAase activity. (○), sweet potato; (□), crude barley.



**Fig. 21. Changes in maltose and glucose concentration in the culture solution over time.**

*A. kawachiii* NBRC4308 strain was cultured at 37°C for 72 h by rotational shaking in a 100 mL medium containing 0.4% (w/v) KNO<sub>3</sub> and 0.6% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> with 20% (w/v) sweet potato and 3% (w/v) crude barley as the carbon sources. **A**, Maltose concentrations. **B**, Glucose concentrations: (○), sweet potato; (□), crude barley.

**Table 16. Component content derived from raw materials (per 100mL medium) .**

	Carbohydrates (Non-Fibrous)	Protein	Lipid	Phosphorus	Potassium	Calcium	Iron
	g			mg			
20% Sweet potatoes	5.74	0.24	0.04	8.8	92.0	6.4	0.10
3% Crude barley	2.01	0.30	0.08	9.6	14.4	1.2	0.14

**Table 17. ASAAase and GAase activity using cereals and bean as the carbon source.**

Carbon source	Concentration % (w/v)	ASAAase activity (units/mL)	GAase activity (units/mL)
Wheat flour	15	35	123
Polished white barley	15	36	100
Polished white rice	15	42	144
Corn grits	15	36	129
Buckwheat flour	15	55	156
Crushed adzuki beans	15	36	95

*A. kawachiii* NBRC4308 strain was cultured at 37°C for 72 h by rotational shaking in a 50 mL medium containing 0.4% (w/v) KNO<sub>3</sub> and 0.6% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> with cereals and bean as the carbon source.

**Table 18. Carbohydrates and protein content derived from raw materials (per 100mL medium).**

Carbon source	Carbohydrates (Non-Fibrous)*	Protein *
15% Wheat flour	11.1	1.32
15% Polished white barley	11.0	1.32
15% Polished white rice	11.3	1.02
15% Corn grits	11.4	1.23
15% Buckwheat flour	10.3	1.82
15% Crushed adzuki bean	8.2	3.05
20% Sweet potatoes	5.7	0.24
3% Crude barley	2.0	0.30

\*Values are calculated based on the literature data<sup>71</sup>.

## 総括

Shoji らは玄麦を用いた麹菌の液体培養法による各種酵素の高生産を可能とする実用的な培養技術を開発し<sup>27</sup>、液体麹を用いても固体麹で製造した麦焼酎と同等の麦焼酎製造が可能であることを示し<sup>28</sup>、さらに当技術を利用し、Sugimoto ら<sup>29</sup>は生デンプン分解能を活かしたキャッサバの無蒸煮発酵について良好な結果を得ている。以上のように、玄麦を用いる麹菌の液体培養技術は実用性の期待される新しい技術である。当技術に関して、何故、酵素が高生産されるのか、当液体麹を使用した焼酎では特徴的な揮発成分があるのか、固い穀皮で覆われていない他の穀物を用いても酵素高生産ができるのか、これらを明らかにすることは、当技術の基礎的な理解を深めると同時に、産業的利用の拡大・深化につながる意義のある取組みとなる。

こうした背景から、本論文においては、「玄麦を用いた *Aspergillus oryzae* の液体培養による酵素生産の解析」、「玄麦を用いた *Aspergillus kawachii* の液体培養による酵素生産の解析」、「Solid-phase microextraction および GC-MS を用いた焼酎揮発性成分の定量法開発および液体麹による麦焼酎と固体麹による麦焼酎間での比較解析」、「*Aspergillus kawachii* を用いた耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼおよびグルコアミラーゼを高生産させる糖質遊離抑制を必要としない液体培養法の開発」について研究を行った。

第1章では、「玄麦を用いた *Aspergillus oryzae* の液体培養による酵素生産の解析」について検討を行い、*A. oryzae* を用いた液体培養において、玄麦を原料として用いることで酵素高生産化される機構を明らかにすることを目的に解析を行った。ゲノム情報が既知であり、マイクロアレイにて遺伝子発現解析が可能な *A. oryzae* RIB40 について玄麦および粉碎した玄麦を用い、遺伝子発現およびメタボローム解析を行った。解析の結果より、玄麦を用いた場合は、培養期間全体を通してグルコース濃度が低く維持されながら誘導糖が供給されるため、CreA による抑制を受けず、AmyR により酵素生産が誘導され、アミラーゼ系酵素遺伝子が高発現する。また、分生子形成が促され翻訳後修飾や分泌輸送が活性化される。さらに栄養成分が供給され続けるため、代謝系の活性は保たれる。これらが複合的に関与して酵素高生産につながっているという新しい機構を考察した。

第2章では、「玄麦を用いた *Aspergillus kawachii* の液体培養による酵素生産の解析」について検討を行い、*A. kawachii* を用いた液体培養において酵素高生産化される機構を明らかにすることを目的に解析を行った。玄麦を用いた培養ではアミラーゼ系酵素遺伝子の発現上昇が見られ、また、形態については膨潤、球状、多隔壁菌糸および分生子柄が部分的に形成されていた。細胞周期および翻訳後修飾に関連する遺伝子の発現は変化し、固体培養の発現レベルと類似していた。アミラーゼ系酵素遺伝子の発現上昇と固体培養に見られるような菌の形態変化による翻訳後修飾の活性化や増殖抑制、さらに培養期間を通じた代謝系の活性維持が複合的に酵素高生産化に関与していることが推察され、*A. oryzae* の場合と共通した特徴を有していると考えられた。また、 $\alpha$ -グルコシダーゼ、GAase、ASAAase、エンドグルカナーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、キシラナーゼ、プロテアーゼ、ペプチダーゼ、リパーゼ等の焼酎製造に必要な酵素群遺伝子が玄麦を用いた液体培養により発現上昇することが確認された。

第3章では、「Solid-phase microextraction および GC-MS を用いた焼酎揮発性成分の定量法開発および液体麹による麦焼酎と固体麹による麦焼酎間での比較解析」について検討を行った。今回開発した液体培養法による液体麹を用いて製造した焼酎は、従来の固体麹を用いて製造した焼酎と香味上官能的に違いのないものであった。官能的に違いのない液体麹を用いて製造した焼酎（液体麹麦焼酎）と伝統的な製法である固体麹を用いて製造した焼酎（固体麹麦焼酎）の製品間の揮発性成分における違いを探索するため、両者の揮発性成分に関する比較を行うことを目的とした。これまで、焼酎の揮発成分を簡便・迅速な前処理で一斉に分析する方法は報告されていなかったため、HS-SPME-GC-MS による方法を確立し焼酎の揮発成分を簡便・迅速な前処理で一斉に分析することを可能にした。HS-SPME-GC-MS 法により、最初に、原料を揃えて製造した液体麹焼酎と固体麹焼酎間において成分を比較し、乳酸エチル、安息香酸エチル、3-メチル-1-ペンタノール、コハク酸ジエチル、シトロネロールおよび酢酸  $\beta$ -フェネチルの6成分について違いを見出した。市販品を含めた麦焼酎計35試料を対象にそれら6成分の定量を行い、液体麹焼酎と従来からの固体麹焼酎における含量に違いがあることを確認した。さらに、市販品を含めた麦焼酎試料を対象にこれら6成分を用いた液体麹麦焼酎と固体麹麦焼酎への判別分析を試みた結果、明瞭に判別ができた。以上のことより、これら6成分は、液体麹焼酎および固体麹焼酎の製品

間の違いを特徴づける成分であることが確認できた。一方、官能への寄与は、液体麹を用いて製造した焼酎と固体麹を用いて製造した焼酎との間に官能的に違いがなかったことや文献で報告されている成分の官能閾値と定量値との関係から、いずれも寄与は小さいものであると考えられた。なお、液体麹焼酎と固体麹焼酎において、6成分に差異が生じた詳細な理由の解明するにはさらなる検討が必要である。

そして第4章では、「*Aspergillus kawachii*を用いた耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼおよびグルコアミラーゼを高生産させる糖質遊離抑制を必要としない液体培養法の開発」について検討した。Shojiら<sup>27</sup>は玄麦を用いた液体培養による酵素高生産技術を開発したが、大麦のような固い穀皮で覆われた原料を用い、原料からの糖類の遊離を抑制することでグルコース濃度を低く維持し、酵素生産に関わる誘導糖や栄養成分を培養期間にわたり供給し続けることが酵素を高生産化させる大きな要因であると考えられる。従って、固い皮をもたない原料では糖類の遊離抑制により酵素を高生産させることが難しい。本研究にて、サツマイモのような固い皮のない原料を用いた場合でも酵素高生産が可能となるよう培養条件の検討を行った結果、サツマイモ濃度をやや高めにするることによって、ASAAase および GAase の両酵素を同時に高生産させることが可能となることを見出した。培養中のグルコース濃度の経時的变化を調べた結果、高めの濃度で推移していたことが確認され、玄麦で高活性が得られた場合の機構とは異なる機構が推察された。すなわち誘導糖や栄養成分の培養期間を通した持続的な供給、旺盛な増殖による酵素生産制御系の解除、適度な菌体増殖による酵素供給の確保、また酵素生産に適した pH や浸透圧等が複合的に寄与している機構が推察された。本液体培養法は、玄麦や難消化性デキストリン<sup>46</sup>を使用したグルコース濃度を低く抑える培養法とは異なる機構による方法であるため、グルコース濃度を低く維持し続ける必要がないため使用原料を多様化できる可能性がある。サツマイモを用いた液体培養による酵素高生産機構については、今後より詳細な解析を検討したい。

本研究によって、玄麦を用いた液体培養により酵素高生産化される機構に対する理解が深まり、また、液体麹焼酎と固体麹焼酎間での微量の揮発性成分の違いを明らかにすることができた。さらに、サツマイモのような固い皮のない原料を用いた場合でも酵素高生産が可能となる培養方法を開発することが出来た。玄麦を用いた液体培養法における酵素が高生産化される機構解析の結果から、アミラーゼ系酵素

遺伝子の発現上昇、翻訳後修飾等に関わる遺伝子の発現上昇や増殖抑制、そして培養期間を通じた代謝系の活性維持が複合的に関与して酵素高生産につながっているという新しい機構を考察した。また、液体麹焼酎と固体麹焼酎間での微量の揮発性成分の比較により差異のあった成分を見出したが、それらの成分の官能的な寄与は小さいものと考えられた。液体培養による多様な香味をもつ焼酎製造を考える場合は、第4章で扱ったように液体培養の原料についてバリエーションがあるという点が役立つと考えられる。すなわち、サツマイモのような原料を用いた場合でも酵素高生産が可能となる培養方法が開発できたことにより、香味のバラエティに富む焼酎の実現につながる多様なサツマイモ品種を用いた液体麹造りや各種穀類を用いた特色のある液体麹造りが期待される。そして、酵素製造の観点からは、地球環境を配慮した原料を用いた酵素製造への利用が考えられる。特に、芋の先端部のような産業に利用されていない原料、食料と競合しない原料、規格外農産物、副産物などの活用に道を拓く技術として期待される。以上のように麹菌の液体培養法は非常にフレキシビリティがあり、また産業的活用に多くの可能性が期待できる培養法であることが明らかとなった。

本研究により、当液体培養技術の基礎的な理解を深めると同時に、産業的利用の拡大・深化につながる知見を得ることができた。今後は液体麹および固体麹の高品質化や酵素高生産に関わるより高度な技術開発、さらにはこれらの技術を用いて得られる酵素群を高度に利用する技術開発に取り組んでいきたい。

## 参考文献

1. <http://www.jozo.or.jp/koujikinnituite2.pdf>
2. 小泉 武夫 麹カビと麹の話, 光琳: 1984
3. 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, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., 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, J.R., 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*, 438, 1157-1161 (2005)
4. Futagami, T., Mori, K., Yamashita, A., Wada, S., Kajiwara, 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)
5. 本格焼酎製造技術, 財団法人日本醸造協会; 1991
6. Tada, S., Iimura, Y., Gomi, K., Takahashi, K., Hara, S. and Yoshizawa, K., Cloning and nucleotide sequence of the genomic Taka-amylase A gene of RT *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 593-599 (1989)

7. Kaneko, A., Sudo, S., Takayasu-Sakamoto, Y., and Tamura, G., 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)
8. 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)
9. 岩野君夫, 三上重明, 福田清治, 椎木敏, 島田豊明, 焼酎白麹の各種酵素の諸性質について. 醸協, 81(7), 490-494 (1986)
10. 岩野 君夫, 岡田 光司, 三上 重明, 椎木 敏, 梗米を利用した味醂製造について. 醸協, 84(4), 259-263 (1989)
11. Hata, Y., Ishida, H., Kojima, Y., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K. and Imayasu, S., Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Bioeng.*, 84, 532-537 (1997)
12. 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)
13. 山根 雄一, 福田 央, 三上 重明, 木崎 康造, 若林 三郎, 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が生産するセルラーゼの性質とその清酒もろみ醸造への効果. 醸協, 99(2), 84-92 (2004)
14. 液体麹及びそれを用いた酒類の製造方法, 特開 2001, 321154
15. 麹菌の培養方法, 特開 2003, 265165

16. 伊藤 清, 焼酎麹菌の酵素生産の特徴. 醸協, 100(12), 838-847 (2005)
17. Agger, T., Petersen, J., O'Connor, SM., Murphy, R., Kelly, J., 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)
18. Carlsen, M. and Nielsen, J., Influence of carbon source on alpha- amylase production by *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, 346-349 (2001)
19. Drysdale, M.R., Kolze, S.E. and Kelly, J.M., The *Aspergillus niger* carbon catabolite repressor encoding gene, *creA*. *Gene*, 130, 241-245 (1993)
20. Ilyes, H., Fekete, E., Karaffa, L., Fekete, E., Sandor, E., Szentirmai, A. and Kubicek, C., CreA-mediated carbon catabolite repression of beta-galactosidase formation in *Aspergillus nidulans* is growth rate dependent. *FEMS Microbiol. Lett.*, 235, 147-151 (2004)
21. Felenbok, B. and Kelly, J., *The Mycota III: biochemistry and molecular biology*. Springer-Verlag: Berlin, Germany, 1996
22. Ruijiter, G.J.G. and Visser, J., Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 151, 103-114 (1997)
23. Kato, N., Murakoshi, Y., Kato, M., Kobayashi, T. and Tsukagoshi, N., Isomaltose formed by  $\alpha$ -glucosidase triggers amylase induction in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.*, 42, 43-50 (2002)
24. 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.*, 64, 816-827 (2000)

25. Peterson, K.L., Lehmbeck, J. and Christensen, T., A new transcriptional activator for amylase genes in *Aspergillus*. *Mol. Gen. Genet.*, 262, 668-676 (1999)
26. Makita, T., Katsuyama, Y., Tani, S., Suzuki, H., Kato, N., Todd, R.B., Hynes, M.J., Tsukagoshi, N., Kato, M., and Kobayashi, T., Inducer-dependent nuclear localization of a Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> transcriptional activator, AmyR, in *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 391-399 (2009)
27. Shoji, H., Sugimoto, T., Hosoi, K., Shibata, K., Tanabe, M. and Kawatsura, K., Simultaneous production of glucoamylase and acid-stable  $\alpha$ -amylase using novel submerged culture of *Aspergillus kawachii* NBRC4308. *J. Biosci. Bioeng.*, 103, 203-205 (2007)
28. 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(2), 109-114 (2007)
29. 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)
30. 藤井 史子, 尾関 健二, 神田 晃敬, 浜地 正昭, 布川 弥太郎, 市販酵素剤を利用した麹菌体量簡易測定法. 醸協, 87(10), 757-759 (1992)
31. Reissig, J.L., Strominger, J.L. and Leloir, L.F., A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.*, 217, 959-966 (1955)
32. 五味 勝也, 岡崎 直人, 田中 利雄, 熊谷 知栄子, 井上 博, 飯村 穰, 原 昌道, 麹菌細胞壁溶解酵素を用いた米麹中の菌体量の測定. 醸協, 82(2), 130-133 (1987)

33. Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., Tomita, M., and Nishioka, T., Simultaneous determination of anionic intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 74, 2233-2239 (2002)
34. Nakajima, K., Kunihiro, S., Sano, M., Zhang, Y., Eto, S., Chang, Y.C., Suzuki, T., Jigami, Y. and Machida, M., Comprehensive cloning and expression analysis of glycolytic genes from the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*. *Curr. Genet.*, 37, 322-327 (2000)
35. Kitamoto, K, Gomi, K, Kumagai, C, Tamura, G, and Hara, S., The glucoamylase cDNA from *Aspergillus oryzae*: its cloning, nucleotide sequence, and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 941-949 (1991)
36. Hata, Y., Ishida, H., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K. and Imayasu, S., Nucleotide sequence of an alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Gene.*, 207, 127-134 (1998)
37. Dowzer, C.E. and Kelly, J. M., Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. *Curr Genet.*, 15, 457-459 (1989)
38. Dowzer, C.E. and Kelly, J.M., Analysis of the *creA* gene, a regulator of a carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.*, 11, 5701-5709 (1991)
39. Tani, S., Katsuyama, Y., Hayashi, T., Suzuki, H., Kato, M., Kobayashi, T. and Tsukagoshi, N., Characterization of the *amyR* gene encoding a transcriptional activator for the amylase genes in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.*, 39, 10-15 (2001)
40. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press: 2010

41. Chapman, A.G., Fall, L., and Atkinson, D., E., Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J Bacteriol.* 108, 1072-1086 (1971)
42. Jørgensen, T.R., Nitsche, B.M., Lamers, G.E., Arentshorst, M., van den Hondel, C.A., and Ram, A.F., Transcriptomic insights into the physiology of *Aspergillus niger* approaching a specific growth rate of zero, *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5344-5355 (2010)
43. Sudo, S., Ishikawa, T., Takayasu-Sakamoto, Y., Sato, K. and Oba, T., Characteristics of acid-stable  $\alpha$ -amylase production by submerged cultures of *Aspergillus kawachii*. *J. Ferment. Bioeng.*, 76, 105-110 (1993)
44. Sudo, S., Ishikawa, T., Sato, K. and Oba, T., Comparison of acid-stable  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus kawachii* in solid-state and submerged cultures. *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 483-489 (1994)
45. Yamada, O., Takara, R., Hamada, R., Hayashi, R., Tsukahara, M., and Mikami, S., Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety, *J. Biosci. Bioeng.* 112, 233-237 (2011)
46. 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)
47. Ye, L., Pan, L., A comparison of the unfolded protein response in solid-state with submerged cultures of *Aspergillus oryzae*, *Biosci. Biotech. Biochem.* 72, 2998-3001 (2008)
48. 岡崎直人, 弘中吉雄, 嶋崎順一, 菅間誠之助, 蒸米上における麹菌の増殖-3. 醸協, 73(5), 402-404 (1978)

49. 加藤拓, 下飯仁, 伊藤清, 麹菌細胞壁への酵素のトラップ. 醸協, 100(5), 355-361 (2005)
50. 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)
51. Torres, N.V., Riol-Cimas, J.M., Wolschek, M., and Kubicek, C.P., Glucose transport by *Aspergillus niger*: The low-affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 790-794 (1996)
52. MacCabe, A.P., Miró, P., Ventura, L. , and Ramón, D., Glucose uptake in germinating *Aspergillus nidulans* conidia: Involvement of the *creA* and *sorA* genes, *Microbiology.* 149, 2129-2136 (2003)
53. Scherer, M., Wei, H., Liese, R., and Fischer, R.. *Aspergillus nidulans* catalase-peroxidase gene (*cpeA*) is transcriptionally induced during sexual development through the transcription factor StuA, *Eukaryot. Cell.* 1, 725-735 (2002)
54. Murakoshi, Y., Makita, T., Kato, M. , and Kobayashi, T. , Comparison and characterization of  $\alpha$ -amylase inducers in *Aspergillus nidulans* based on nuclear localization of AmyR, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1629-1635 (2012)
55. Valkonen, M., Ward, M., Wang, H., Penttilä, M., and Saloheimo, M., Improvement of foreign-protein production in *Aspergillus niger* var. *awamori* by constitutive induction of the unfolded-protein response, *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6979-6986 (2003)
56. Ngiam, C., Jeenes, D.J., Punt, P.J., van den Hondel, C.A., and Archer, D.B., Characterization of a foldase, protein disulfide isomerase A, in the protein secretory pathway of *Aspergillus niger*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 775-782 (2000)

57. Saloheimo, M., Lund, M., and Penttila, M.E., The protein disulphide isomerase gene of the fungus *Trichoderma reesei* is induced by endoplasmic reticulum stress and regulated by the carbon source, *Mol. Gen. Genet.* 262, 35-45 (1999)
58. Yamada, O., Lee, B.R., Gomi, K., and Iimura, Y., Cloning and functional analysis of the *Aspergillus oryzae* conidiation regulator gene *brlA* by its disruption and misscheduled expression, *J. Biosci. Bioeng.* 87, 424-429 (1999)
59. Skromne, I., Sanchez, O., and Aguirre, J., Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans brlA* regulatory gene, *Microbiology* 141, 21-28 (1995)
60. Wosten, H.A.B., Moukha, S.M., Sietsma, J.H., and Wessels, J.G.H., Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*, *J. Gen. Microbiol.* 137, 2017-2023 (1991)
61. 桐村光太郎, 服部貴澄, 木野邦器, クエン酸発酵の分子機構に関する新たな視点. *バイオサイエンスとインダストリー.* 64(1), 17-21 (2006)
62. 小路博志 液体麹の焼酎製造への利用について, *生物工程*, 90, 238-241 (2012)
63. Sakaida, H., Nakahara, N., Watashi, N., Kai, T., Nakashima, Y., Sakakibara, Y., Nishiyama, K., Fukuda, N. and Suiko, M., Characteristic flavor of buckwheat *shochu* and comparison of volatile compounds from variety cereal *shochu*. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, 50, 555-562 (2003)
64. Arthur, C.L. and Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, 62, 2145-2148 (1990)
65. Wang, L., Xu, Y., Zhao, G. and Li, J., Rapid analysis of flavor volatiles in apple wine using headspace solid-phase microextraction. *J. Inst. Brew.*, 110, 57-65 (2004)

66. Marti, M.P., Mestres, M., Sala, C., Busto, O. and Guasch, J., Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extraction dilution analysis applied to the characterization of wine aroma. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7861-7865 (2003)
67. Fitzgerald, G., James, K.J., MacNamara, K., and Stack, M.A., Characterization of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 896, 351-359 (2000)
68. Vas, G., Gal, L., Harangi, J., Dobo, A. and Vekey, K., Determination of aroma compounds of Bläufrankich wines extracted by solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. Sci.*, 36, 505-510 (1996)
69. Jelen, H.H., Wlazly, K., Wasowicz, E. and Kaminski, E., Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer: Comparison with static headspace method. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1469-1473 (1998)
70. Balasubramanian, S. and Panigrahi, S., Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food Bioprocess Technol.*, 4, 1-26 (2011)
71. Heaven, M., W. and Nash, D., Recent analyses using solid phase microextraction in industries related to food made into or from liquids. *Food Control*, 27, 214-227 (2012)
72. 醸造の事典, 朝倉書店 ;1988
73. 池見元宏, 斎藤久一, 小泉武夫, 野白 喜久雄, 清酒もろみにおける香気成分の動向 I 吟醸もろみの高級アルコール類およびエステル類の経日変化. 醸協, 79(2), 119-123 (1984)

74. Yu, J., Vasanthan, T. and Temelli, F., Analysis of phenolic acids in barley by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4352-4358 (2001)
75. Kahkonen, M.P., Hopita, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. and Heinonen, M., Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3954-3962 (1999)
76. 醸造物の成分, 財団法人日本醸造協会; 1999
77. 太田剛雄, 甘藷焼酎の香気. 醸協, 86(4), 250-254 (1991)
78. Vaudano, E., Moruno, E.G. and Stefano, R.D., Modulation of geraniol metabolism during alcohol fermentation. *J. Inst. Brew.*, 110, 213-219 (2004)
79. 秋田 修, 蓮尾 徹夫, 宮野 信之, 吉沢, 糖化後発酵法における中高沸点香気成分と酵母による酢酸-フェネチルの生成. 醸協, 82(5), 369-374 (1987)
80. 高橋 康次郎, 求められる清酒の機能性. 醸協, 85(5), 286-292 (1990)
81. 神渡巧, 瀬戸口真治, 高峯和則, 緒方新一郎, ストレスを受けた焼酎原料サツマイモのモノテルペンアルコール含量と芋焼酎の香気特性. 醸協, 100(7), 520-526 (2005)
82. Falque, E. and Fernandez, E., Volatile components of Loureira, Dona Branca, and Treixadura wines. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 538-543 (2002)
83. Falque, E. and Fernandez, E., Volatile profile and differentiation between Albarino wines from different origins. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 43, 464-475 (2008)

84. Camara, J.S. and Marques, J.C., Multivariate analysis for the classification and differentiation of Madeira wines according to main grape varieties. *Talanta*, 68, 1512-1521 (2006)
85. Camara, J.S., Alves, M.A. and Marques, J.C., Classification of Boal, Malvazia, Sercial and Verdelho wines based on terpenoid patterns. *Food. Chem.*, 101, 475-484 (2007)
86. Ishida, H., Hata, Y., Kawato, A., Abe, Y., Suginami, K. and Imayasu, S., Identification of functional elements that regulate the glucoamylase-encoding gene (*glbA*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *Curr. Genet.*, 37, 373-379 (2000)
87. 酒類食品統計年報 12-13年版, 株式会社 日刊経済通信社: 2012
88. 西谷尚道, 第4回改定国税庁所定分析法注解. 日本醸造協会: 東京, 1993
89. 岩野 君夫, 三上 重明, 福田 清治, 能勢 晶, 椎木 敏, 焼酎白麹の各種酵素生産に及ぼす製麹条件の影響. 醸協, 82(3), 200-204 (1987)
90. 四訂 日本食品標準成分表, 科学技術庁資源調査会: 1997
91. 瀬戸口 眞治, 本格いも焼酎. 醸協, 94(4), 269-273 (1999)
92. Masuda, S., Kikuchi, K., Matsumoto, Y., Sugimoto, T., Shoji, H. and Tanabe, M., Analysis of enzyme production by submerged culture of *Aspergillus oryzae* using whole barley. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 73, 2190-2195 (2009)
93. Tsukagoshi, N., Kobayashi, T. and Kato, M., Regulation of the amyolytic and (hemi-) cellulolytic genes in *Aspergilli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 47, 1-19 (2001)

94. Kato, M., Sekine, K. and Tsukagoshi, N., Sequence specific binding sites in the Takaamylase A G2 promoter for the CreA repressor mediating carbon catabolite repression. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 1776-1779 (1996)
95. Diano, A., Bekker-Jensen, S., Dynesen, J., and Nielsen, J., Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism. *Biotechnol Bioeng.*, 94, 899-908 (2006)
96. Pedersen, L., Hansen, K., Nielsen, J., Lantz, A.E. and Thykaer, J., Industrial glucoamylase fed-batch benefits from oxygen limitation and high osmolarity. *Biotechnol. Bioeng.*, 109, 116-124 (2011)
97. <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>
98. 岩崎功, 藤田聡, 長友正弘, 垂水彰二, 高橋康次郎, 純芋焼酎の製造に関する研究 (第1報) 芋麹の開発とその特性について. 醸協, 98(5), 367-375 (2003)
99. 神渡巧, 瀬戸口眞治, 上回次郎, 瀬戸口智子 緒方新一郎, 芋焼酎の酒質に及ぼすサツマイモ品種の影響と特徴香成分の検索. 醸協, 101(6), 437-445 (2006)
100. 神渡巧, 瀬戸口智子, 上田次郎, 吉永優, 緒方新一郎, 瀬戸口眞治, 高峯和則, 鮫島吉廣, 原料サツマイモの特性と芋焼酎の特徴香成分. 醸協, 104(1), 49-56 (2009)

## 発表論文

**Masuda, S., Kikuchi, K., Matsumoto, Y., Sugimoto, T., Shoji, H. and Tanabe, M.,** Analysis of enzyme production by submerged culture of *Aspergillus oryzae* using whole barley. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 2190-2195 (2009)

**Masuda, S., Ozaki, K., Kuriyama, H., Sugimoto, T., Shoji, H., Tanabe, M., Kitagawa, Y. and Yamashita, H.,** Classification of Barley Shochu samples produced using submerged culture and solid-state culture of Koji mold by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Inst. Brew.*, 116, 170–176 (2010)

**Masuda, S., Shoji, H.,** Development of a submerged culture method for high production of acid-stable  $\alpha$ -amylase and glucoamylase using *Aspergillus kawachii* without glucose concentration control. *J. Inst. Brew.*, 118, 346–351 (2012)

**Sunagawa, T., Masuda, S., Shoji, H.,** Gene expression and fungal morphology in submerged culture using whole barley of *Aspergillus kawachii*. *J. Agr. Sci. Technol. A*, 4, 13-26 (2014)

## 謝辞

本論文を作成するにあたり、終始ご指導とご高配を賜りました東京大学 依田幸司教授に深甚なる謝意を表します。

本研究は著者が2005年以来、アサヒビール株式会社・分析技術研究所、酒類技術研究所、アサヒグループホールディングス株式会社・基盤技術研究所にて行った成果であります。

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・川面克行代表取締役副社長、大竹康之執行役員、アサヒビール株式会社・柴田和憲常務取締役兼常務執行役員、青木賢吉執行役員、相澤正幸酒類技術研究所長に深く感謝致します。

多くの場面でご助言、ご指導を賜りましたニッカウヰスキー株式会社OB・田辺正行氏、アサヒグループホールディングス株式会社・神田智正研究開発戦略部長、アサヒビール株式会社OB・山下博博士、アサヒフードアンドヘルスケア株式会社・清水健一調味料事業本部顧問、北川泰調味料事業本部長、アサヒグループホールディングス株式会社・福田和郎イノベーション研究所長、アサヒビール株式会社酒類技術研究所・小路博志酒類技術第二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ご指導を頂き、心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、数々のご協力を頂きましたアサヒビール株式会社・砂川忠弘博士、菊池かおり氏、アサヒグループホールディングス株式会社・安原貴臣氏、酒井範夫氏、上野貴生博士、尾崎一隆氏、アサヒビール株式会社・尾形智夫博士、鯉川彰博士、栗山英俊氏、ニッカウヰスキー株式会社・細井健二氏、杉本利和博士、アサヒビール株式会社OG・松本裕子氏に感謝致します。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ス株式会社、アサヒビール株式会社、ニッカウヰ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。