

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 舩田 晋

1. 背景

麹菌は日本の伝統的な醸造産業において古くから用いられており、安全な微生物として広く認められている。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一方、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。麹菌による酵素生産性については液体培養よりも固体培養の方が優れていると考えられているが、液体培養法は効率的な生産に適した培養形態であるため、醸造業界では昔から液体培養での酵素生産性を向上させる試みがなされてきた。しかし、醸造に利用できるまでに至った例は殆どなかった。麹菌の液体培養法における酵素生産に関する技術的な困難を克服し、固体培養と同様の酵素生産性を有する新規な液体培養法を確立することができれば、産業上の有用性やフレキシビリティの高さから様々な産業分野への応用が可能であると考えられる。これまでにアサヒビール株式会社は、表面に穀皮を残した状態の大麦玄麦（以下「玄麦」と記す）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た。当技術により、液体麹を用いても固体麹で製造した麦焼酎と同等の焼酎製造が可能であることを示し、さらに、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も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、「*Aspergillus oryzae*による玄麦を用いた酵素生産の解析」、「液体麹および固体麹により製造した麦焼酎における揮発性成分の比較解析」、「糖質遊離抑制を必要としない酵素高生産を可能とする液体培養法の開発」について研究を行った。

2. *Aspergillus oryzae*による玄麦を用いた酵素生産の解析

麹菌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、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、粉碎しない玄麦（非粉碎玄麦）および粉碎した玄麦（粉碎玄麦）

を用い、遺伝子発現およびメタボロームにより解析を行った。グルコアミラーゼ (GAase) および α -アミラーゼ (AAase) の培地中の活性値は、培養前期は非粉碎玄麦を用いた場合より粉碎玄麦を用いた場合の方がやや高いが、培養後期になると粉碎玄麦を用いた場合は活性値が停滞してしまうのに対して、非粉碎玄麦を用いた場合は、そのまま伸び続けた。非粉碎玄麦を用いた場合、培養後期において GAase および AAase の高生産とともに、これら酵素群の遺伝子レベルでの高発現が確認された。さらに、非粉碎玄麦を用いた場合は、後期においても硝酸イオンが取込まれ続けながらアンモニウムイオン濃度が低値で維持されており、窒素代謝の維持が酵素高生産と関係していることが推察され、従来からいわれているアミラーゼ系酵素に対する転写促進因子である AmyR と抑制因子である CreA による制御以外の機構も関係していることが考えられた。すなわち、糖質をはじめとする栄養成分の遊離が緩やかでグルコース濃度が低く維持されるため培養期間全体を通してグルコース抑制を受けず、また、培養後期においても酵素生産が誘導され続けながら、窒素代謝をはじめとする菌全体の代謝系の活性が維持できているため酵素高生産に繋がっていることが考察された。窒素代謝に違いが現れていることは新たな知見であり、培地中の硝酸イオンやアンモニウムイオン等を指標とした培養条件検討や培養管理につながるものと考えられる。

3. 液体麹および固体麹により製造した麦焼酎における揮発性成分の比較解析

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麦焼酎は、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。香味上官能的に違いのない液体麹を用いて製造した麦焼酎 (液体麹麦焼酎) と固体麹を用いて製造した麦焼酎 (固体麹麦焼酎) 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、headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS)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、まずラボスケールにて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 β -フェネチルの 6 成分について違いを見出した。次に、市販品を含めた麦焼酎計 35 試料を対象にこれら 6 成分の定量を行い、液体麹焼酎と固体麹焼酎中の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焼酎と固体麹焼酎への判別分析を試みた結果、100%正しく判別ができた。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違いを特徴づける成分であることが確認できた。なお、これら 6 成分の官能への寄与については、液体培養方法による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比較からいずれも寄与は小さいものであると考えられた。

4. 糖質遊離抑制を必要としない酵素高生産を可能とする液体培養法の開発

玄麦を用いた液体培養において、原料からの糖類の遊離を抑制することで、培養期間を通じてグルコース濃度を低く維持しながら栄養成分や酵素生産の誘導基質を供給し続けることが重要な条件であった。一方で、固い皮を持たない原料については、糖類の遊離抑制がしにくいいため酵素を高生産させることが難しいと考えられていた。本研究にて、サツマイモのような固い皮を持たない原料を用いた場合でも酵素高生産を可能とするべく培養方法の検討を行った結果、サツマイモ濃度をやや高めにすることによって、耐酸性 α -アミラーゼ (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、また、サツマイモの品種の違いや原料の大きさや形態によらず高い活性値が得られることがわかった。さらに、振とう培養だけでなく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り、サツマイモ濃度を高めた培地条件を用いることにより培養方法によらず同様の酵素高生産をもたらす機構が働いていたと考えられた。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、グルコース濃度が低く維持されるため培養期間全体を通してグルコース抑制を受けず、また、窒素代謝をはじめとする菌全体の代謝系の活性が維持されつつ酵素生産が誘導され続ける機構とは異なる機構が考えられた。すなわち、栄養成分や誘導基質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、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関与して酵素高生産となる機構が推察された。

本研究により、玄麦を原料として用いる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を持た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法を開発することが出来た。液体培養に関する焼酎製造への産業的な利用について、サツマイモのような固い皮を持た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を実現する多様なサツマイモ品種を用いた液体麹造りによる焼酎製造が期待される。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、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。また、製造した酵素が多種類酵素であることから、その特徴を活かした利用技術についても様々な可能性が考えられる。本研究を通して、当液体培養技術の基礎的な理解を深めることができたと同時に、産業的活用に多くの可能性があることを明らかにすることができた。当液体培養技術のさらなる産業的利用につながるものと期待される。

以上