

[別紙 2]

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 舛田 晋

我国の醸造産業で古くから用いられている麹菌は、蒸煮した原料に分生子を接種する固体培養により醸造に必要な多種類の酵素を大量生成する。液体培養は、制御が容易で効率的な微生物培養法だが、麹菌では諸酵素の生産性が大きく低下する。これまでの改良研究で、穀皮を残した大麦玄麦を用い、各種酵素を高生産する実用的液体培養技術が開発された。何故このときに酵素が高生産されるのかを明らかにし、穀皮のないイモ類等でも酵素高生産を可能にできれば、麹菌の産業的利用の拡大・深化につながる。本論文は、この目的で行われた研究成果をまとめたもので 4 章からなる。

序章で現状を概観したのち、第 1 章では、ゲノム情報既知の *Aspergillus oryzae* RIB40 について、液体培養時のグルコアミラーゼ (GAase) と α -アミラーゼ (AAase) の生産と遺伝子発現およびメタボロームを、非粉碎玄麦と粉碎玄麦で比較検討した。GAase および AAase の培地中の活性は、培養前期は非粉碎玄麦より粉碎玄麦の方がやや高いが、培養後期になると粉碎玄麦では活性上昇が停滞するのに対し、非粉碎玄麦ではそのまま伸び続けた。非粉碎玄麦では、両酵素遺伝子の高発現とともに、胞子関連遺伝子やタンパク翻訳後修飾遺伝子の高発現、窒素代謝の維持が認められた。即ち、両酵素の高生産には、CreA や AmyR によるアミラーゼ遺伝子の発現制御のみならず、翻訳後修飾の活性化、窒素代謝の維持等が複合的に働いていると考えられた。

第 2 章では、*Aspergillus kawachii* NBRC4308 について、非粉碎玄麦および粉碎玄麦を用い、酵素活性、糖濃度、菌糸形態および遺伝子発現を詳細に解析した。非粉碎玄麦を用いた液体培養では、GAase と耐酸性 AAase が高生産され、アミラーゼ遺伝子、高親和性グルコース輸送体を含みグルコース抑制関連遺伝子の発現が高まっていた。また、培養初期に菌糸形態が変化し、固体培養で通常みられる膨潤、球状、多隔壁菌糸および分生子柄が部分的に観察された。更に、細胞周期および翻訳後修飾に関連する遺伝子発現レベルが、固体培養での遺伝子発現レベルにより近くなっていた。即ち、酵素高生産化には固体培養特有の細胞形態分化を伴う生理的变化が複合的に関係していると考えられた。

第 3 章では、麦焼酎の揮発性成分が詳細に比較解析された。新たに開発した液体麹で製造した麦焼酎と従来の焼酎は、官能的に香味上の違いはなかった。両者の揮発性成分を、新たに確立した機器分析法で解析した。先ずラボスケールで製造した焼酎の成分を比較し、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 成分に違いを見出した。次に、市販品を含む麦焼酎計 35 試料でこれら 6 成分を定量し、液体麹焼酎と固体麹焼酎で含量に違いがあることを確認した。目隠し検査で判別分析を試み

た結果、100%正しく判別できた。これら 6 成分は、液体麴焼酎と固体麴焼酎の違いを特徴づける成分であるが、官能への寄与はいずれも小さい。

第 4 章では、糖質濃度を抑制せずに酵素を高生産する液体培養法を開発した。玄麦では、穀皮により糖類の遊離を抑制してグルコース低濃度を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と考えられた。従って、固い皮を持たない原料では、糖類の遊離抑制がしにくく、酵素高生産は難しいと考えられていた。サツマイモで培養法を検討した結果、イモ濃度をやや高めにすると、GAase と耐酸性 AAase の高い活性が得られ、また、イモの品種・大きさ・形状によらなかった。さらに、振とう培養だけではなく通気攪拌培養でも高活性が得られた。グルコース濃度の経時変化を調べると、高濃度で推移していたので、玄麦の場合に考察したのとは異なる機構が考えられ、栄養成分や誘導基質の持続的供給、旺盛な増殖による酵素生産制御系の解除、また酵素生産に適した pH や浸透圧等が複合的に働き酵素高生産となると推察された。

以上、本研究で申請者は、玄麦を用いる液体培養で酵素が高生産化される機構の理解を深め、また、官能的には感知できない微量揮発性成分の違いを発見し、さらに、サツマイモのような穀皮のない原料でも酵素高生産を可能にする培養法を開発した。これらの研究成果は、麴菌による酵素生産の基礎を整えるとともに、香味のバラエティに富む焼酎製造や、規格外農産物や未利用副産物を活用した酵素生産への道を拓くなど、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。