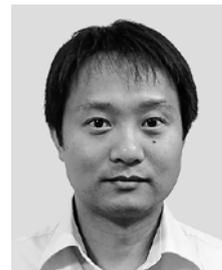


2019年度 生物工学奨励賞（江田賞） 受賞



無通風箱培養法を利用した
固体培養における
麹菌の生育と酵素生産に関する研究



伊藤 一成

Studies on mycelial growth and enzyme production of *Aspergillus oryzae*
in solid-state fermentation using non-airflow box culture method

Kazunari Ito (*Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, 5301 Haga, Kita-ku, Okayama 701-1296, Japan*) *Seibutsu-kogaku* **98**: 108–115, 2020.

はじめに

清酒や醤油、味噌などさまざまな醸造食品を製造する際に必須な麹は、その後の発酵工程で必要とされる多数の酵素類や栄養成分を供給する役割がある。麹菌を穀類に生育させる製麹（麹造り）は代表的な固体培養技術の一つであり、これまで長い年月をかけて試行錯誤を繰り返し、巧みに扱うことにより大量培養できるまで技術水準を向上させてきた。固体培養とはその名の通り、少量の水分を含む固体状の物質表面あるいは内部に微生物を生育させる培養法で、さまざまな物質生産に利用される。特に糸状菌を利用した固体培養は液体培養と比較して、培養基質当たりの菌体量が多く、培養基質の低水分にตอบสนองし、各種遺伝子が高発現するため酵素や二次代謝産物の生産性が高い¹⁻⁶⁾。また、さまざまなバイオマスとの相性が良いため、持続的な循環型社会の構築に向けた多様な物質生産への適応が大いに期待できる。固体培養は伝統的な醸造食品に利用されているその長い歴史から、これまで多くの学術研究が行われており、基礎的な知見が多数存在する。たとえば、固体培養特異的に生産される物質が散見される^{4,5)}ほか、液体培養と固体培養では、いくつかの酵素において、作用する基質および生成物が同じでも、 K_m 値、至適条件、分子量など特性が異なるものが生産される^{7,8)}。また液体培養では、細胞内に留まる酵素が固体培養では細胞外に分泌されることがある

ように遺伝子発現だけではなく、その細胞内挙動が変化する^{2,9)}、といった非常に興味深い現象が数多く見受けられる。

固体培養の問題点

こうした固体培養を産業的に利用しようとした場合、伝統的な醸造食品製造のように培養基質と菌体を含む培養物そのものを利用できる、呼吸のための酸素は大気から直接利用できるため液体培養のような酸素供給のための動力を必要としない、培養基質として安価なバイオマスを利用することができ低コスト、低水分のため生産物当たりの培養槽が小さくて済む、といった利点があるものの、培養法としては大きな問題点を抱えている。その最たるものが、物質の低移動性による培養状態の不均一性とそれに伴う再現性の低さである^{1,3)}。具体的には、発酵熱の生成拡散による品温状態の勾配と変動、水蒸気の発生拡散や結露による水分状態の勾配と変動、局所的な生育による栄養源やpHの勾配と変動などが培養ごとでバラバラに培養基質に生じてしまう。また、目的の用途に必要なとされる酵素量やその適切な酵素バランスを持つように生育をコントロールするためには、培養中に培養条件を変化させる必要があるが、固体培養は液体培養のように均一な攪拌が容易ではなく、培養基質の品温や水分などの培養管理制御が困難である⁴⁻⁶⁾。産業的利用を目指し少量で最適培養条件の検討を行う場合、これらの

問題が障壁となり試験検討自体の妥当性や信頼性が保証されず、その後の拡大適応が困難となっている。このような背景から、食品製造以外の分野では固体培養の利用が限定的で、物質生産には液体培養が採用されていることが未だ多い。

通常の固体培養である堆積式培養にはさまざまな方法があるが、基本的には容器に培養基質を数cmの厚さで盛り培養を行う。固体培養としては一番シンプルで、学術研究を目的とする場合、この手法でフラスコやシャーレを利用して少量の試験培養をすることも少なくない。このような少量の堆積式培養で均一な培養制御を行おうとした場合、培養基質の厚みを薄くすれば、ある程度は実現可能であるが、精度の高い均一な制御は難しい。清酒製造において、主に吟醸酒用の製麹で使用される麹蓋や、それよりも少し大きな麹箱を利用した製麹も同じ堆積式培養であるが、試験培養よりも規模が大きく、発酵熱の生成も大きい。それゆえ目的とする麹を造るために、人の手による攪拌（手入れ）や麹蓋の積み替え作業などによる麹の品温・水分管理^{10,11)}といった培養制御を行うことにより、最適な麹菌の増殖と酵素生産の調和を促している。そのため、それぞれの蔵に合った手法でさまざまな工夫が行われているのが現状であるが、製麹の管理制御は繊細で難しく熟練の技術を要する。一方、合理的な培養制御が可能な製麹装置が多くの蔵で導入されている。目的の温湿度に設定した空気を循環できる培養室の内部にトレイを多段に組んだ培養装置^{4,6)}、培養基質の堆積層へ目的の品温と水分になるよう設定した空気の吹き抜け通風を行う堆積通風式培養装置⁴⁾、これに培養基質の物理的な均一化を図るため攪拌機が付属した装置⁴⁾などがあるが、いずれの方法も培養基質の均一制御を達成するために容量を大きくせざるを得ず、複雑な装置を要し、物理的な攪拌による均一化は菌体破壊の影響も排除できない。したがって、固体培養の研究を進めていくためには、上記の諸問題を解消し拡大適応が可能なスケールで手軽に試験培養できる方法が必要だと考え、攪拌や通風を必要としない簡便な培養システムの構築を目指した。

新規固体培養法の構築

固体培養では麹菌の生育が進むと発酵熱が生じ、培養基質に含まれる水分が水蒸気となって周囲の環境へ拡散する。この水蒸気の移動を緩やかに制御できれば、培養基質表面の急激な乾燥を防ぐだけでなく、培養基質全体の均一性が達成できるのではないかと考えた。そこで、木箱の上下の開口部全面に水や風は通さないが、水蒸気を通す延伸多孔質ポリテトラフルオロエチレン (ePTFE) 膜を装着

し、内部には培養基質と外部との間に一定の緩衝部ができるよう空間を設けた培養器を作製した(図1A)。この中に麹菌を接種済みの小麦ふすまを載せた円形の金属製メッシュトレイを置き、恒温恒湿槽内で培養器外部の温度と湿度を制御して静置培養を行った。比較対照として行った従来の堆積式培養の培養器には、金属製メッシュトレイと同じサイズのフタ付き金属製トレイを使用した。

トレイ培養では、同一培養器内の測定場所(図2A)によって培養基質の品温経過に差が生じたうえ、その品温が安定せず大きく変動した。培養終了時における培養基質の水分含量にもばらつきが見られ、不均一な培養状態であることが伺えた(図2C, D)。これは、発生した水蒸気が培養基質上部からのみ発散する、水蒸気が培養器内壁へ結露する、外部との熱交換が培養器表面でしか起こらない、といった結果生じたものと考えられた。また培養後、培養基質上での麹菌の生育、湿り具合など状態を見ても明らかに不均一な状態であった。一方、新しく作製した培養器を用いた培養では、同一培養器内のどの場所においてもきわめて均一な培養状態で、バッチごとでも再現性の高い品温経過と水分状態になっていた(図2C, D)。また、品温は上下に大きく変動することなく安定した経過であった。品温はピークを迎えた後速やかに低下したが、トレイ培養では緩やかに低下していた。これは培養器からの放熱がトレイ培養よりも効率的であることを示しており、培養後の麹の重量および水分含量(図3A)を見てもよく乾燥していることから、潜熱を持った水蒸気が培養器から外部に積極的に拡散していることが伺える。つまり、培養が進み発酵熱が生じると培養基質の上下から水蒸気が発生するが、培養器

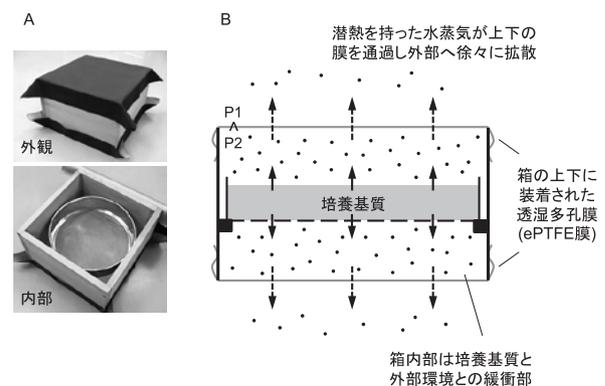


図1. 無通風箱(NAB)培養法。(A) NAB培養の培養器の外観。箱のサイズは15(H)×22(W)×22(D)cm、内部の金属製メッシュトレイは5(H)×18.5(直径)cmで、培養基質として使用した小麦ふすまは100g、培養時の厚さは約2.5cm。(B) 培養が進行した時の模式図(横から見た断面図)。生育が進むと外部の水蒸気分圧(P1)よりも内部の水蒸気分圧(P2)が上昇し、潜熱を持った水蒸気が外部へ積極的に拡散。

内部に設けた一定の緩衝部により内部全体が発生した水蒸気で満たされ、水分や品温が培養基質とともに均一化される。その後、培養器内外の水蒸気分圧の差で潜熱を持った水蒸気が培養器の上下の開口部全面に装着されたePTFE膜を徐々に通過して、培養基質全体がゆっくりと乾燥・冷却されながら均一培養が再現良く保たれたと考えられた(図1B)。この新たな固体培養を無通風箱培養[non-airflow box (NAB) culture]法と名付けた¹²⁾。さらに酵素生産についても品温や水分量と同様に確認したところ、高い均一性と再現性を示した(図2B)。

NAB培養法の培養特性と培養基質の水分量

NAB培養法による培養特性を把握するため、さまざまな条件で培養を行った。固体培養において、培養基質の水分、特に培養開始時の初期水分量の設定がもっとも重要なファクターの一つである¹³⁻¹⁶⁾。そこで初期水分量を変えて培養したところ、NAB培養法では培養終了時にどの水分量でも培養基質が非常によく乾いていることが確認できた(図3A)¹²⁾。併せて、培養器外部の相対湿度(水蒸気分圧)を変えて培養すると、NAB培養では初期水分量が同じでも、相対湿度が低いほど培養終了時の水分含量は比例して大きく低下していた(図3A)こ

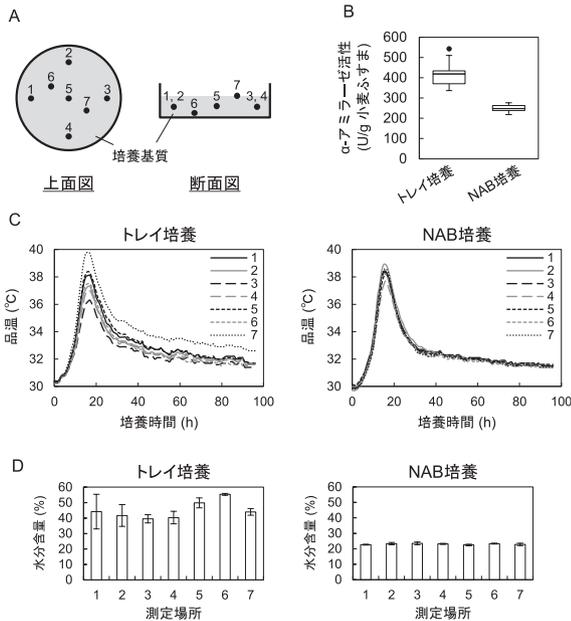


図2. NAB培養法による培養基質の均一性。(A) 培養基質内の測定場所。図中の数字はパネルC、Dの数字と一致。(B) α -アミラーゼ活性のボックスプロット。ボックスは四分位範囲、ボックスの上下のバーはそれぞれ最大値と最小値、ドットは外れ値を示す。データは4回の独立した培養から得られた活性値より算出(培養ごとにパネルAのようにサンプリング)した。(C) 培養基質の品温経過。(D) 培養後の培養基質の水分含量。データは3回の独立した培養の平均値と標準偏差を示す。いずれも30°C、95%RHで96時間培養(培養基質の初期水分量49%)した結果。

とから、培養中に培養器外部の相対湿度を変えることで培養基質の乾燥具合を制御できることがわかった¹²⁾。また、トレイ培養での酵素生産に最適な水分条件(初期水分含量、相対湿度どちらも)が、NAB培養では、より高水分側へシフトしていることも確認された(図3B)¹²⁾。これは、培養基質がよく乾くことから生じる現象であると考えられた。一般的に培養基質は低水分である方が、酵素の発現・生産は増加する傾向¹³⁻¹⁶⁾だが、厳密には酵素によって生産に最適な水分量は異なる¹³⁾。一方、培養基質の水分は酵素生産だけでなく、菌体の生育にとっても重要であり、増殖を十分に進行させるためには、ある程度の水分量が必要である。従来の固体培養法では、初期水分量を多くしすぎると、発酵熱による不必要な過熱や枯草菌などのバクテリアによるコンタミネーションを引き起こしてしまうことがあったが、NAB培養法では培養基質がよく乾燥するため、このような問題が生じ

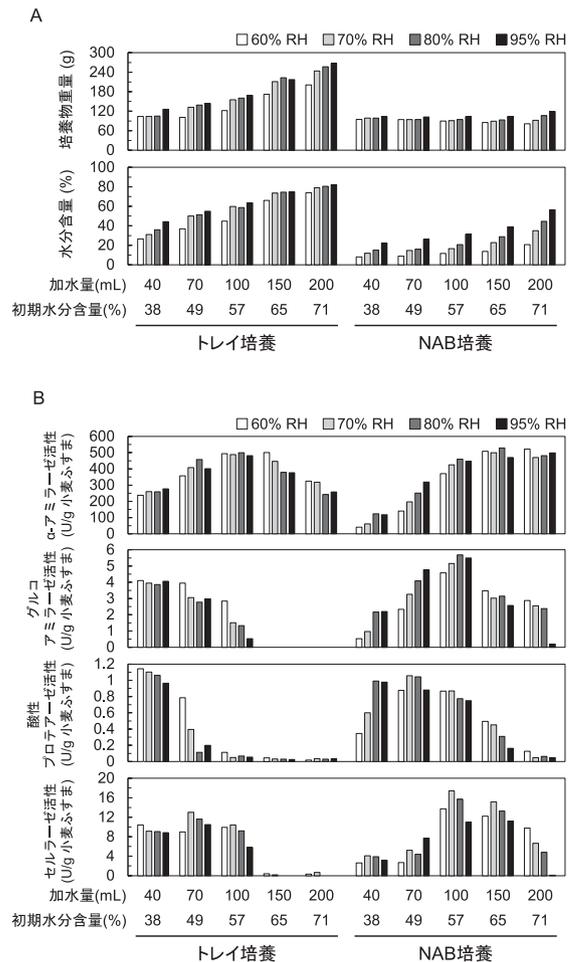


図3. 初期水分量と相対湿度ごとの培養後重量と培養基質の水分含量(A)、および酵素活性(B)。加水量(mL)は培養基質100gに添加した量を示し、初期水分含量(%)は加水量と使用した培養基質に含まれる水分量を合わせた水分含量値を示す。培養はいずれも30°Cで96時間行い、相対湿度(RH)は図中に表記した値で実施。

ない。したがって、初期水分量をより高水分側へ設定でき、十分に菌体を生育させることが可能なうえ、培養中に水分量が大きく減少するため、高水分から低水分まで水分要求性の異なる酵素を複数かつ効率的に同時生産させることが期待できる。このように本法を利用して水分量を適切に調節できれば、物質生産における有効な手段になりうると言える。また、これまで難しかった新たな培養条件の設定が可能になったことで、麹菌の生育や酵素生産に関わる影響因子をこれまでより幅広く解析することができるようになり、固体培養技術のさらなる進展も期待される。

効率的な菌体生育と酵素生産

トレイ培養に比べ、NAB培養では培養基質当たりで換算すると、どの酵素においても生産効率が上昇していることが確認され¹²⁾、効率的な酵素生産という観点でもNAB培養法の優位性が見られた。NAB培養法が従来の固体培養法と大きく異なる部分は培養基質の水分量変化であり、図3Aで示すようにどの培養条件でも培養基質がよく乾く。そこで、培養基質が乾くことによる影響を明らかにするため、どの酵素も全体的に高い生産性を示した温度と湿度の条件の下、酵素生産および麹菌の生育について培養経過ごとに詳細な解析を行った¹⁷⁾。どの酵素でもNAB培養ではトレイ培養よりも生産開始時期が早く(24時間前後)、このときの生産速度が短時間で急激に上昇していた(図4)。菌体の生育を見てみると、18~24時間付近で急激に増えており、両者の経過はおおよそ相関していることが分かった(図5A)。水分状態の解析から、品温が最高に達する18~24時間付近で培養

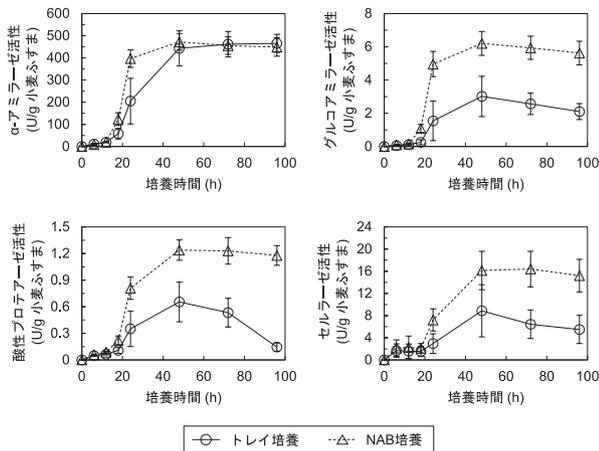


図4. 培養時間ごとの酵素生産。上段α-アミラーゼとグルコアミラーゼは24 hでほぼピークを迎え、下段酸性プロテアーゼとセルラーゼは48 hでピークを迎えた。データは7回の独立した培養(25 °C, 95 % RH, 培養基質の初期水分量57 %)から得られた活性値の平均と標準偏差を示す。

物の重量と水分含量が急激に減少している(図5B, C)ことと、水分活性値が18時間付近で麹菌の生育に最適な水分活性値である0.98~0.99^{18,19)}を迎えていることが分かった(図5D)。すなわち、培養基質が徐々に乾き、対数増殖期を迎える時間帯に最適な水分活性となって菌体増殖が活発になった結果、タンパク質合成も盛んになり、その後の急激な酵素生産速度の上昇につながっていると示唆された¹⁷⁾。このように、培養基質がよく乾燥し、その乾燥具合を制御できるNAB培養法は、使用する糸状菌の菌体生育と水分活性の最適なタイミングを探ることができる。これと目的とする酵素の生産に適した条件を設定できれば、さらなる効率的な酵素生産が望める。

培養基質の水分量を低下させる培養制御

清酒製造の製麹工程において、製麹中期から後期にかけて品温を上昇させ、麹を乾燥させる操作が重要であるとされている。この操作によりグルコアミラーゼの生産が促進される²⁰⁾ように、効率的な酵素生産のためには、培養基質の水分量を適度に低下させることが重要であることはよく知られている。しかし、初期水分量を変化させた報告は数多くあるが、培養中における水分量の変化と酵素生産の関係を具体的に明らかにした報告はほとんど見当たらない。これは上述の通り、従来の固体培養法では再現性が低く、均一な培養制御を行うことは困難なため評価が難しいことが要因である。NAB培養法では、培養器外部の相対湿度(水蒸気分圧)を変えることにより、培養基質の乾燥具合を制御できる(図3A)¹²⁾ことから、培養中に培養器外部の環境を変えれば、培養状態を均一に保ちつつ培養制御が可能になる。そこで、NAB培

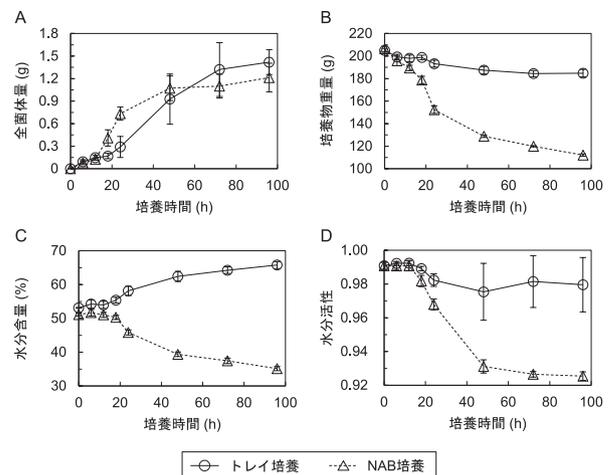


図5. 培養時間ごとの全菌体量 (A)、培養物重量 (B)、水分含量 (C)、水分活性 (D)。データは7回の独立した培養(25 °C, 95 % RH, 初期水分量57 %)から得られた値の平均と標準偏差を示す。

養法を利用して培養中の培養基質の乾燥と酵素生産について調べることにした²¹⁾。NAB培養法では菌体の増殖が早く、培養24時間以降でその量があまり変わらない(図5A)ことを踏まえ、24時間までは培養器外部の相対湿度を95%のまま変えることなく菌体の増殖を図り、24時間以降は培養終了時に相対湿度を目的の数値になるよう徐々に低下させ、培養器外部の水蒸気分圧を下げた。この変化により、培養器内部に充満した水蒸気を外部へより積極的に放出させ、培養基質の乾燥具合を制御した。最終相対湿度が低いほど、培養終了時の培養基質に含まれる水分量は比例して低下しており、想定通り水分量を変化させることができた(図6A)。菌体量は、低い相対湿度で若干の低下は認められたが、それほど大きな違いがなかったことを確認した(図6B)。このときの酵素生産は酵素によっては大小あるものの、いずれの酵素も乾燥させた場合(最終相対湿度が80%のときが最大)の方が増加していた(図6C)。しかし60%のように乾燥させすぎた場合には、あまり変化が見られなかった。このほか、培養中の相対湿度変化をさまざまなパターンで試してみたが、急激に低下させるよりも緩やかに低下させ、培養基質を徐々に乾燥させた場合に酵素生産性が大きく増加した。以上の結果から、菌体量は同じでも、

乾く程度の違いにより酵素生産量が変化し、適度な乾燥が酵素生産の促進因子となっていることが確認できた。また、酵素によって生産に最適な水分量は異なる^{12,13)}が、培養中に乾燥させた場合には、どの酵素でもほぼ区別なく同じような乾燥具合(本実験の条件では最終相対湿度80%の時)で菌体当たりの生産量が増加した。そのため、初期水分量に対する細胞応答と培養中の水分量変化に係る細胞応答が異なっている可能性が示唆された。NAB培養法での培養制御と評価で、効率的な酵素生産のためには培養温度や相対湿度はもちろんのこと、培養基質の初期水分量に加え、乾燥を開始するタイミングとその乾燥経過が重要であることが確認できた。このように、固体培養を培養基質の均一性と再現性が保証されたNAB培養法で行うことで、以前までは大まかに認識されていた固体培養の現象を、より信頼性の高い現象として提示できるようになった。したがって、本法が今後の固体培養の理解と発展に大きく貢献できると考えている。

米麴の試験製麴への応用

伝統的な醸造食品で必須な製麴に、NAB培養法による制御と評価を応用できれば、製麴技術の向上や製品の品質改善に役に立つのではないかと考えている。清酒に目を向けると多くの製造現場では、長年培ってきた杜氏の経験と勘に頼った製造が行われており、科学的根拠に基づく評価が未だ十分ではない。特に麴の品質は、発酵の型や製成酒の酒質に大きな影響を及ぼすなど、最終製品の品質を大きく左右する²²⁾。目的にあった品質の麴を製造するための試験を行うとき、現場レベルの規模で行うことは現実的に難しい。したがって、小さな規模で行わざるを得ないが、両者の培養規模はまったく異なるため、発熱を中心とするさまざまな培養状態の違いから、試験結果を製造現場にスムーズに反映できないことが多い。製造現場では熟練した杜氏が自身の流儀で、品温経過や麴の破精(麴菌が蒸米に菌糸を伸ばし増殖して白く観察される現象)などを確認しながら一連の作業を行い^{10,11)}、目的にあった麴に仕上げている。このとき、複雑で繊細な作業やさまざまな条件が品質結果に与えた影響について正確に判断できないことも多く、かえって目的とする品質の麴の安定的な製造を難しくさせている。そのため、均一な培養制御を可能にしたNAB培養法を試験製麴に利用できれば、不安定要素を抑制した一定の条件下で試験を行うことができることから、試験製麴の条件と結果(麴)を科学的根拠に基づいて結びつけることが可能になると考えた。すなわち、これまで科学的根拠が不十分だった製麴工程において信頼性の高いさまざまな解析が可能になるうえ、構築したNAB培養法が中

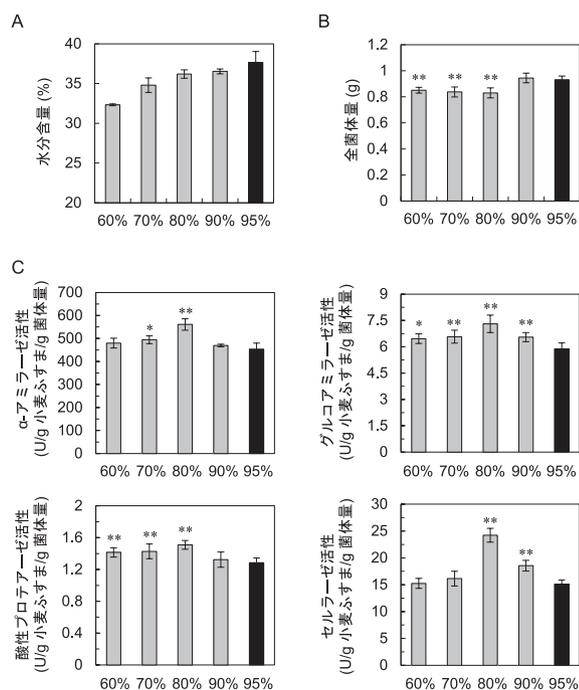


図6. 培養中に培養基質を乾燥させたときの影響。培養後の培養基質の水分含量(A)、全菌体量(B)および培養後の酵素生産(C)。いずれも25°C、95%RH、培養基質の初期水分量57%で24時間培養した後、培養器外部の相対湿度を48時間かけて図中の数値へ徐々に低下させた結果。データは3回の独立した培養の平均値と標準偏差。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ は乾燥なし(黒色のバー)との比較。

規模スケールのため、得られた結果を製造現場へ反映させることも容易になる。そこで、NAB培養法による固体培養が、清酒製造現場を反映した麴造りを再現でき、米麴の試験製麴法として妥当であるのか検討を行った²³⁾。酒造好適米である雄町(精米歩合60%)を培養基質とし、蒸し上げ後の吸水歩合を約33 wt%なるように調整した。これに麴菌の胞子を接種、温度と湿度は製造現場での製麴の品温経過を参考にして、できるだけ単純に設定した(図7A)。品温は設定温度が上昇し始めた後の28時間から設定温度を超え、その差は徐々に拡大し、設定温度が40°Cで一定になった後も品温は約43°Cで出麴まで保持されており(図7A)、活発に麴菌が生育していることが示唆された。品温が設定温度を超える30時間付近に着目すると、培養器内の相対湿度が少し低下し始めており、積極的に水分が培養器外部へ拡散していることが窺えた。各水分パラメータを見ても、水分含量、米に対する吸水の歩合、水分活性いずれも同じタイミングで減少が見られ始め(図7B)、製造現場の製麴経過をよく再現できていると思われた。できあがった麴の状貌を見ると、

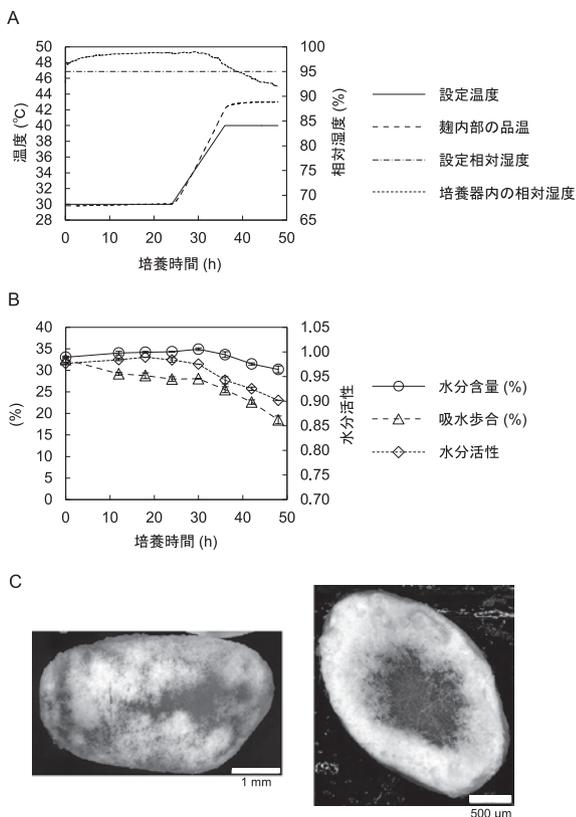


図7. 米麴の試験製麴。(A) 設定温湿度と品温及び培養器内の湿度経過。はじめに30°Cで24時間、その後12時間かけて40°Cまで上昇させ、さらに40°Cで12時間培養する計48時間のプログラムを組み、この間相対湿度は95%一定にした(基本形の製麴設定)。(B) 各種水分パラメータ経過。データは10回の独立した培養から得られた値の平均と標準偏差を示す。(C) 出麴時の麴表面(左)と麴切片(右)の破精の様子。

破精回り(米粒表面への破精の広がり)は正常な麴として問題なく、破精込み(米粒内部への菌糸の入り込み)具合も十分で(図7C)、局所的な不均一さは見られなかった。また、製造現場の麴と比較しても高い酵素力価と適度な酵素バランスを有し、再現性も高かった。これらの結果から、NAB培養法は米麴の試験製麴法として利用可能であると判断した。さらに本製麴条件を基本形(base)として、製造現場で行われている製麴中期から後期で麴の水分量を積極的に低下させる経過の再現を試みた。本実験では、仕舞仕事後を想定した36時間から乾燥を開始するdry1と、仲仕事後を想定した30時間から乾燥を開始するdry2の二つの乾燥経過を設定した。図8Aに示すように、これらの時間から培養器外部の相対湿度を低下させ、製麴が進み上昇している水蒸気分圧を製麴開始時の値まで下げた。この制御で、培養器外部の水蒸気分圧が低下し内部との差が大きくなり、培養器内部に充満した水蒸気が外部へ積極的に拡散する。両経過とも狙い通り、baseの経過と比較して乾燥を開始した時間から培養器内の相対湿度が大きく低下し(図8B)、麴の水分を有意に減少させることができた(図8C-E)。このようにNAB培養法を利用した米麴の試験製麴は、水蒸気分圧を変化させることにより培養を制御できるため、製造現場ごとで異なるさまざまな製麴工程の再現が可能である。

試験製麴を利用した米麴の評価

麴の品質評価の判断基準としてもっとも重要視される酵素力価の他に、製造現場ではリアルタイムに肉眼で確認できる破精がその基準の一つとして多用されている。

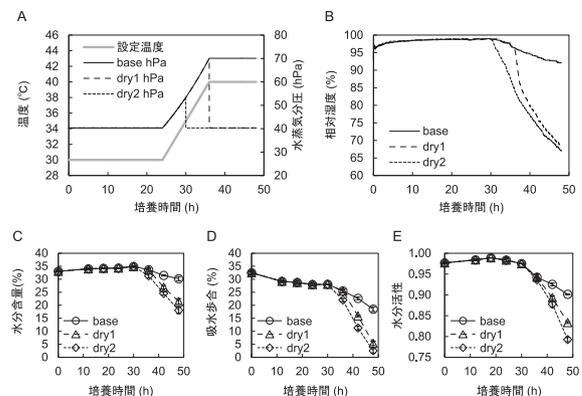


図8. 製麴中の積極的な麴の乾燥。(A) 各製麴条件での水蒸気分圧変化。太線は恒温恒湿槽の設定温度、各経過の水蒸気分圧は温度と相対湿度から算出した。(B) NAB培養器内の相対湿度変化。(C) 水分含量経過。(D) 吸水歩合経過。(E) 水分活性経過。図7で示す基本形の製麴はbase、36時間から乾燥させた製麴はdry1、30時間から乾燥させた製麴はdry2である。データは10回の独立した培養から算出した中央値の平均と標準偏差を示す。

破精の観察や、大まかな破精具合と一部の酵素生産の関連性について報告は存在する²⁴⁻²⁸⁾が、培養全体(バッチ)としての破精の評価、破精と麹菌の生育、破精と酵素生産に関する詳細な報告はほとんど見られない。これは、粒ごとにバラバラな破精の全体としての数値化が非常に困難であることと、従来の固体培養法では均一で再現性の高い培養制御が難しいため評価に値する米麹を取得できないことが、より踏み込んだ研究へ進展しなかった原因だと思われる。そこで破精については、デジタルマイクロスコープを用いた迅速で簡便な数値化が可能な破精の評価法を確立²³⁾し、この破精の評価法と、目的とする米麹の取得を可能にしたNAB培養による試験製麹法を組み合わせ、製麹工程における麹菌の破精と生育について解析した²³⁾。製麹後期に麹を積極的に乾燥させたdry1は、基本形のbaseと比較して出麹時における破精回りに差がほとんど見られなかったが、破精込みはこれまでの認識の通り増加しており、麹を乾燥させることにより破精込みが有意に進行することを初めて数値的に示すことができた(図9)²³⁾。一方、菌体量は大きな変化がなく、菌体量当たりの酵素力価も多少の増加が見られたものの顕著な変化はなかった(データは示さない)。製麹中期からの乾燥であるdry2では、dry1よりも破精込みの程度が低かった。これは、菌体が活発に増殖している期間に乾燥を開始した影響で出麹時の菌体量が若干少なかったことが原因と考えられた。それでも積極的に乾燥させなかった場合のbaseの破精込みより増加していた(図9)²³⁾。酵素力価と破精の関係は現在のところ精査中であるが、NAB培養法の利用により目的とするさまざまな条件での試験製麹が可能になったことから、NAB培養法がこれまで難しいとされた培養全体としての破精の評価にも活用できるようになった。

おわりに

NAB培養法は、従来の固体培養試験において懸案事項だった培養基質の不均一性や低い再現性を補うだけでなく、積極的な培養制御も実現可能にした。本培養法が多様な物質生産の発展に大きく貢献できる基盤技術として活用され、将来的には作業性、再現性、制御性に優れた固体培養のモデルになりうるだけでなく、これまでにない麹菌の潜在能力も引き出すことができるのではないかと期待している。学術的研究に目を向けると、麹菌の生理現象についてはこれまでに明らかにされてきた多くの知見がある。現在これらをもとにして、NAB培養法を活用し分子生物学的アプローチを含むさまざまな手法で固体培養に関する研究、特に製麹工程における麹の品質安定・向上のための研究を進めており、得られた知見

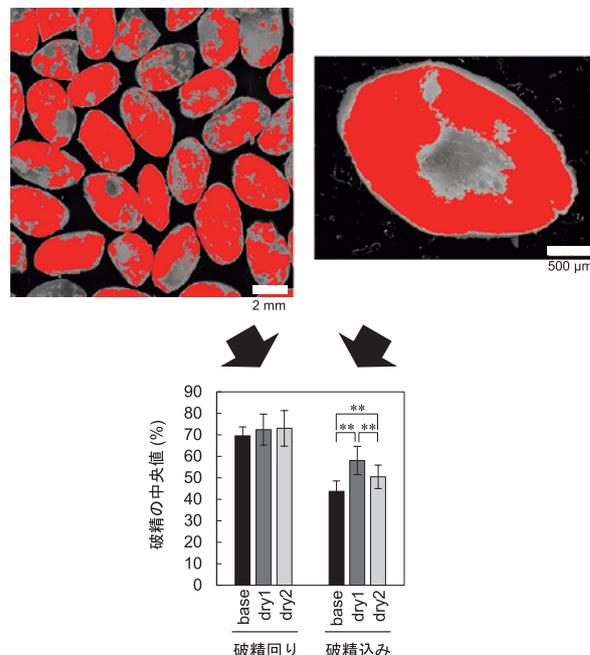


図9. 破精の数値化. デジタルマイクロスコープと画像と画像処理ソフトによる数値化. 左が破精回り, 右が破精込みの画像で破精と判断された部分を赤色で示す. データは出麹時(48時間)の麹からランダムに選択された100粒分の破精の割合(全体の面積に対する破精の面積から算出)の中央値で、10回の独立した培養から算出した中央値の平均と標準偏差を示す. ** $p < 0.01$.

を製造現場の皆様へ幾分かでも還元できればと思っている。固体培養に関する研究は、まだスタートラインに立ったばかりである。

謝 辞

本研究の実施に当たり、長年お力添えをいただいている五味勝也先生(東北大学大学院農学研究所, 教授)には、貴重なご助言とご協力を賜りました。心より御礼申し上げます。また長きにわたって、岡山県工業技術センターでの研究にご協力いただいている狩山昌弘様(株式会社フジワラテクノアート, 常務取締役)をはじめ、同社社員の皆様に厚く御礼申し上げます。平素より当センターの研究活動にご支援をいただいている、岡山県酒造組合をはじめとした岡山県内の酒造会社の皆様に心より感謝致します。また、本研究の実施の機会やサポートをしていただいている岡山県工業技術センターの三宅剛史博士、谷野有佳博士をはじめとする職員の皆様に深く感謝致します。本研究の一部は、経済産業省の戦略的基盤技術高度化支援事業で実施されたものです。

文 献

- 1) Hölker, U., Höfer, M., and Lenz, J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 175–186 (2004).
- 2) Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., Akita, O., and Iwashita, K.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 3448–3457 (2006).
- 3) Krishna, C.: *Crit. Rev. Biotechnol.*, **25**, 1–30 (2005).

- 4) 佐藤和夫：日本醸造協会誌, **87**, 558–565 (1992).
- 5) Barrios-González, J.: *Process Biochem.*, **47** 175–185 (2012).
- 6) Couto, S. R. and Sanromán, M. A.: *J. Food Eng.*, **76**, 291–302 (2006).
- 7) Hata, Y., Ishida, H., Kojima, Y., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., and Imayasu, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 532–537 (1997).
- 8) Acunã -Argüelles, M. E., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., and Favela-Torres, E.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 808–814 (1995).
- 9) Lehka, P. K. and Lonsane, B. K.: *Process Biochem.*, **29**, 497–503 (1994).
- 10) 川瀬直樹：日本醸造協会誌, **93**, 257–262 (1998).
- 11) 梅田紀彦：増補改訂 最新酒造講本, pp. 78–104, 日本醸造協会 (1996).
- 12) Ito, K., Kawase, T., Sammoto, H., Gomi, K., Kariyama, M., and Miyake, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 300–305 (2011).
- 13) Kobayashi, A., Sano, M., Oda, K., Hisada, H., Hata, Y., and Ohhashi, S.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1797–1799 (2007).
- 14) te Biesebeke, R., van Biezen, N., de Vos, W. M., van den Hondel, C. A., and Punt, P. J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, 75–82 (2005).
- 15) Yamane, Y., Fujita, J., Shimizu, R., Hiyoshi, A., Fukuda, H., Kizaki, Y., and Wakabayashi, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **93**, 9–14 (2002).
- 16) Ishida, H., Hata, Y., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., and Imayasu, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, 301–307 (1998).
- 17) Ito, K., Gomi, K., Kariyama, M., and Miyake, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 585–590 (2013).
- 18) Gibson, A. M., Baranyi, J., Pitt, J. I., Eyles, M. J., and Roberts, T. A.: *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 419–431 (1994).
- 19) 奈良原英樹：日本醸造協会誌, **83**, 729–733 (1988).
- 20) 秦 洋二, 石田博樹：日本醸造協会誌, **93**, 922–931 (1998).
- 21) Ito, K., Gomi, K., Kariyama, M., and Miyake, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 674–677 (2015).
- 22) 菅間誠之助, 岡崎直人：日本醸造協会雑誌, **77**, 145–151 (1982).
- 23) Ito, K., Gomi, K., Kariyama, M., and Miyake, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 62–70 (2017).
- 24) 松永恒司, 古川恵司, 原 昌道：日本醸造協会誌, **97**, 721–826 (2002).
- 25) 須藤茂俊, 小関卓也, 木崎康造：日本醸造協会誌, **97**, 369–376 (2002).
- 26) 柳内敏靖, 福田 潔, 長野知子, 中村智美, 宮脇美津子, 清川良文, 若井芳則：日本醸造協会誌, **88**, 559–564 (1993).
- 27) Ito, K., Kimizuka, A., Okazaki, N., and Kobayashi, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 7–13 (1989).
- 28) 本多裕之, 大楠栄治, 花井泰三, 西田潔男, 深谷伊和男, 小林 猛：生物工学, **73**, 409–412 (1995).