

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 杉本 利和

麹菌の液体培養法は、酵素生産性が低いという理由から酒類の大規模製造に実用化されてこなかった。本論文は、麹菌の液体培養法における各種酵素の高生産を目的に、麹菌の液体培養の新しい方法論を提案し、それに基づいた培養技術を開発した内容についてまとめたものである。さらに、新規に開発した麹菌の液体培養物（液体麹）を麦焼酎製造やバイオエタノール製造などの産業分野への応用を検討し、その結果を報告している。

第1章では、「酵素生産に関する発現抑制を極力免れながら誘導を続け続ける」という液体培養の新しい方法論を簡便に実現するために、難消化性デキストリンを炭素源として用いる培養方法を検討している。デキストリンまたは難消化性デキストリンを含む培地で白麹菌 *Aspergillus kawachii* の回分培養を行ったところ、66 時間目のグルコアミラーゼ活性は 140.2 mU/ml と 368.4 mU/ml となり、難消化性デキストリンを含む培地を用いることで大幅に向上することを確認した。培地中のグルコース濃度を経時的に調査した結果、培養 23 時間目に各々 5.14 mg/ml と 1.25 mg/ml となり、難消化性デキストリンを用いるとグルコース濃度が低く維持されることが示された。培地中のマルトオリゴ糖濃度を測定したところ、難消化性デキストリンを用いる培養では培養終了時まで 7 糖以上の長鎖マルトオリゴ糖が著量検出されることが分かった。このように、難消化性デキストリンを用いることで、酵素生産に抑制的なグルコースの濃度を低く抑えながら、誘導的に作用するマルトオリゴ糖濃度を高く維持し続けることができ、先に提案した新しい液体培養の方法論を達成できることを確認できた。

第2章では、さらに実用的な培養技術に発展させるべく、大麦を用いる液体培養において前述の方法論を具現化するための技術開発を行っている。大麦の酵素分解性とグルコース生成に着目した検討を行った結果、大麦精白歩合 85% から未精白にかけて酵素分解を受け難くなり、グルコース生成量が減少することを見出した。続いて、各種精白大麦を用いて白麹菌 *A. kawachii* 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、精白歩合 75% くらいから酵素生産性の向上がみられ、未精白大麦（玄麦）のとき最も高い活性を示すことが分かった。さらに、遺伝子発現解析により、酵素遺伝子の転写誘導により酵素高生産されることが示唆された。これまで白麹菌 *A. kawachii* の液体培養においてグルコアミラーゼと耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼの同時高生産に成功した例は無く、本法が完成したことにより、液体麹を用いる酒類製造の道が大きく開かれた。

第3章では、玄麦を用いる液体麹法の発酵産業への応用を試みている。

まず第1節では、麦焼酎製造に必須なデンプン分解酵素と植物繊維素分解酵素が同時高生産

できる液体培養法の開発を試みた。培地への玄麦使用量と各種酵素活性の関係を調べた結果、玄麦使用量を 2.0% (w/v) から 1.7% (w/v) に減らした場合に、グルコアミラーゼ、耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼが同時に高生産されることが分かった。これらの液体麴を用いて、300 ml スケールの焼酎モロミ発酵試験を行った結果、1.7% (w/v) 玄麦培地による液体麴を用いた場合にアルコール収得量、モロミ粘度ともに良好となった。また、4000 ml スケールにて焼酎仕込み試験を行い、液体麴を用いて固体麴と同等品質の麦焼酎が製造可能なことを確認できた。

続いて第 2 節では、液体麴を用いてキャッサバの無蒸煮同時糖化エタノール発酵を試みた。まず、液体麴によりキャッサバの無蒸煮糖化が可能かどうかをラボスケール試験により評価したところ、高いグルコース生成と遊離アミノ酸生成が確認された。次に、フラスコスケールにて、無蒸煮同時糖化エタノール発酵の試験を行った結果、液体麴を用いた場合の発酵歩合は 92.3% と良好であった。最後に、工業化の実現可能性を検討するために、モロミ総量 1612 L のパイロットプラントスケール試験を行ったところ、10.3% (v/v) のエタノールを収得し、発酵歩合 92.7% と非常に良好な結果を得た。よって、本法が実現可能性の高いバイオエタノール製造技術であることを示すことができた。

本研究の成果は、新規な液体培養の方法論に基づく培養技術により、麴菌の液体培養における複合的な酵素の同時高生産を達成し、麦焼酎製造やバイオエタノール製造へ応用可能な生産技術を完成したものであり、学術上・応用上に貢献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。