

平成29年度

戦略的基盤技術高度化・連携支援事業

戦略的基盤技術高度化支援事業

「バイオマス分解酵素の大量生産を可能とする固体培養技術の実用化開発」

研究開発成果等報告書

平成30年3月

担当局 中国経済産業局

補助事業者 公益財団法人岡山県産業振興財団

目次

第1章 研究開発の概要

1. 研究開発の背景・研究目的および目標

- 1-1. 研究開発の背景
- 1-2. 研究開発の動向および目的
- 1-3. 研究開発の目標

2. 研究実施体制（研究組織・管理体制、研究者氏名、アドバイザー）

- 2-1. 研究実施体制
- 2-2. 研究開発体制図
- 2-3. 研究実施場所一覧
- 2-4. 管理・研究者氏名

3. 成果概要

- 3-1. 複合酵素遺伝子を高発現するセルフクローニング麹菌の取得
- 3-2. 複合酵素を高生産可能とするセルフクローニング麹菌の固体培養条件の確立
- 3-3. 複合酵素の大量生産を実現する固体培養技術の実用化開発

4. 当該研究開発の連絡窓口

第2章 本論

1. 複合酵素遺伝子を高発現するセルフクローニング麹菌の取得

- 1-1. 菜種油粕分解性の検証
- 1-2. 菜種油粕の分解に有効な酵素遺伝子の選定
- 1-3. 菜種油粕分解に適した酵素遺伝子の高生産麹菌の造成
- 1-4. 麹菌高発現遺伝子組換え株の培養物を用いた菜種油粕分解性の評価
- 1-5. セルフクローニング株の作製を目的とした遺伝子導入技術の開発
- 1-6. セルフクローニング株抽出粗酵素による菜種油粕の分解性検証

2. 複合酵素を高生産可能とするセルフクローニング麹菌の固体培養条件の確立

- 2-1. 固体培養条件の検討を可能とする固体培養法の開発
- 2-2. 固体培養装置小型試験機を用いた試験培養と均一性の評価
- 2-3. 小型試験機を用いた固体培養制御の実施

- 2-4. セルフクローニング株の固体培養制御
- 2-5. 育種株の有用性評価と複合酵素の同時高生産
- 2-6. 複合酵素の安定性評価と活性保持の条件検討

- 3. 複合酵素の大量生産を実現する固体培養技術の実用化開発
 - 3-1. 実用化規模の固体培養装置の仕様検討（機械の仕様検討）
 - 3-2. 実用化規模の固体培養装置の仕様検討（制御の仕様検討）
 - 3-3. 実用化規模の固体培養装置を用いた試験培養
 - 3-4. AOK11 野生株と単独酵素を高発現するセルフクローニング株の比較
 - 3-5. AOK11 野生株と2種類の酵素を高発現するセルフクローニング株の比較
 - 3-6. 実用化規模の固体培養装置の制御開発（ワンパス制御の確立）
 - 3-7. 実用化規模の固体培養装置の装置開発（散水パイプの導入）
 - 3-8. セルフクローニング株の最適培養条件の検討
 - 3-8-1. 人工ルーメン法による菜種油粕の消化率の評価方法
 - 3-8-2. 培養初期の水分の検討
 - 3-8-3. 培養後半の品温の検討

第3章 全体総括

第1章

研究開発の概要

1. 研究開発の背景・研究目的および目標

1-1. 研究開発の背景

特定ものづくり基盤技術高度化指針

(十一) バイオに係る技術に関する事項

1 バイオに係る技術において達成すべき高度化目標

(4) 川下分野特有の事項

2) 環境・エネルギー分野に関する事項

①川下製造業者等の特有の課題及びニーズ

ア. 未利用バイオマスの利用

日本の醸造文化と麹菌

日本の醸造文化を代表する味噌・醤油・清酒・焼酎・酢などの醸造食品を製造するために欠かせない「麹づくり」の技術は、日本が古くから培ってきた世界に誇る伝統的な技術である。日本の醸造文化は今や世界的に広がり、各国で醸造食品を中心とした日本食がブームとなっている。醸造文化の「麹づくり」は、麹菌を固体培養することで、発酵に必要な酵素を麹菌に生産させる工程である。日本の国菌である麹菌は、酵素の生産性が極めて高く、また多種多様な酵素遺伝子を保有していることから、「酵素の宝庫」として醸造以外の分野でも幅広く利用されている。日本が有する麹菌の固体培養技術は世界一を誇るものであり、今後
も日本が固体培養技術で世界をリードし続けていくためには、麹菌のポテンシャルを利用し
た新たな技術開発が必要不可欠である。その新技術は、「食の安心・安全」と「豊かな食生活」をもたらす革新的な技術として、日本の食文化だけでなく、世界の食文化にも波及的な効果を与えるものである。

麹菌が生産するバイオマス分解酵素の利用

日本は地下資源には乏しいが、国土の67%を森林が占めており、バイオマス資源は豊富である。バイオマス資源は化石資源に代わる再生可能な生物資源として、世界的にも注目され続けている。しかしながら、未だにバイオマスは有効利用されていないのが現状である。バイオマスの主成分はセルロース系の有機物であるが、この有機物を有効利用できる物質まで分解しなければならない。バイオマスを分解するには酵素処理が必須であるが、問題点が2つある。1つ目は精製された酵素は大変高価であること、2つ目は効率よく酵素を作用させるためにはバイオマスの前処理（熱処理、酸・アルカリ処理など）が必要であることが挙げられる。特に、前処理なしで単一酵素処理するだけではバイオマスは分解できないため、複数の酵素で段階的に処理する必要がある。すなわち、コストと手間の問題がバイオマスの有効利用を阻んでいるといえる。

そこで解決策として考えたのが、麹菌が生産する多種多様なバイオマス分解酵素の利用である。「麹づくり」で培ってきた固体培養技術を活かし、麹菌のバイオマス分解酵素を組み

合わせた複合酵素を大量生産することができれば、低コストかつ簡便にバイオマスを有効利用することができる。

川下製造業者等の抱える課題およびニーズ

世界人口が急増する近年、穀類不足による食糧難が問題視されている。一方、世界人口の多くを占める新興国における中間層および富裕層の増加に伴い、世界的に肉消費量が増加している。肉の生産には、カロリーベースでは穀類をそのまま食する何倍もの穀類を必要とするため、飼料として穀類を大量消費せざるを得ない状況である。すなわち、食糧難となる可能性を秘めながら、一方で肉生産のために多くの穀類を消費するため、飼料価格は年々高騰し続けている。飼料価格の高騰は農家にとって死活問題であるが、我が国は飼料の大部分を輸入に頼っているため、安価かつ国内で安定供給可能な飼料が求められている。

食油メーカーは、搾油後の大豆油粕や菜種油粕を飼料として農家に販売している。大豆油粕は栄養価が高く、嗜好性や消化性も良いため飼料価値が高い。しかし、菜種油粕は栄養価が高いにもかかわらず、難分解成分を多く含むため消化性が悪く、飼料価値が低い。また菜種油粕の難分解成分の1つは、他の飼料に含まれるタンパク質などの栄養素の吸収を阻害することから、家畜への給餌量が制限されている。これらの理由から、菜種油粕の国内在庫は年々増加し、過剰な在庫は菜種油粕の販売価格を押し下げるという悪循環をもたらしている。また、菜種油粕の輸出価格は、国内販売価格よりもさらに低い。しかし、今後も国内での需要が見込めない限り、利益が少ない輸出に頼らざるを得ない状況である。

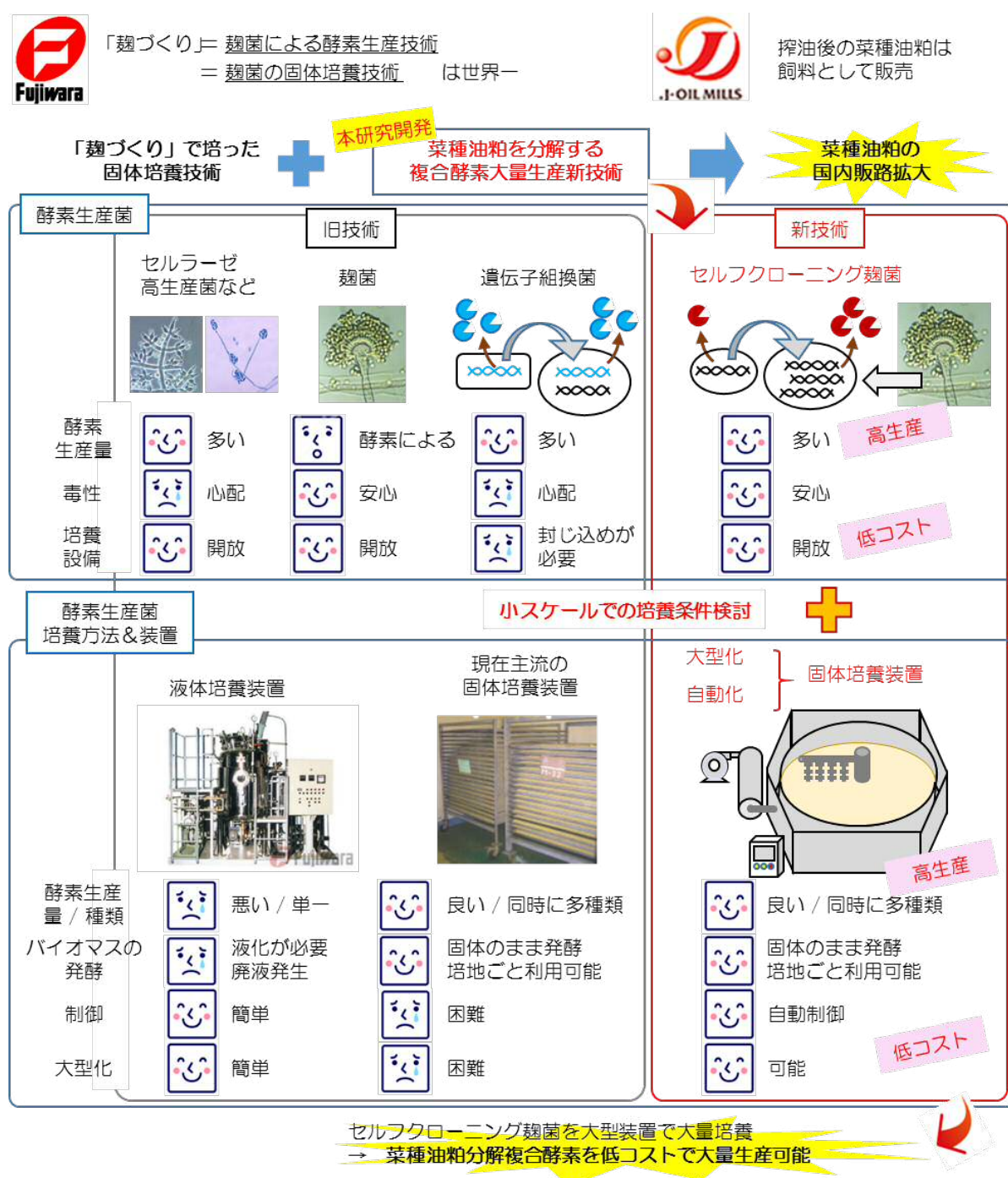
食油メーカーは基本的に、食油の需要に応じて搾油量を決定する。もし、このまま菜種油粕の国内在庫が増え続ければ、在庫調整のために菜種油の搾油量を減らさざるを得ない。国内の食油メーカーからは、菜種油粕に付加価値をつけ、未利用の菜種油粕を有効利用したい、というニーズがある。そこで、株式会社フジワラテクノアートが「麹づくり」で培ってきた麹菌の固体培養技術を活かし、菜種油粕を有効利用できる新技術を開発する。

1-2. 研究開発の動向および目的

菜種油粕の有効利用と飼料効率の向上

本研究開発では、菜種油粕を再資源化するために必要な複合酵素を大量生産する技術の実用化開発を行う。具体的には、安全なセルフクローニング技術と、麹菌の固体培養技術を組み合わせた「セルフクローニング麹菌固体培養技術」によって、菜種油粕を効率良く分解できる複合酵素を含む機能性飼料を安価、効率的かつ安全に大量生産する（図1）。

図1. 研究開発の概要



この機能性飼料を菜種油粕と共に家畜に与えれば、菜種油粕の難分解成分が効率的に分解され、菜種油粕の消化率を向上させることができるとともに、他の栄養素の吸収を阻害することがなくなるため、家畜への給餌量の制限も無くなると考えられる。すなわち、菜種油粕の飼料価値が向上することで、過剰にある在庫を飼料としてすべて消費することができるだけでなく、これまで輸入に頼っていた高価な飼料の代替飼料として利用することができる。未利用バイオマスの1つであり、過剰に在庫がある菜種油粕を有効利用できるとともに、安価かつ国内で安定供給できる飼料として、菜種油粕の付加価値が高まることが期待される。

さらに、機能性飼料には麹菌が本来生産する様々なバイオマス分解酵素（複合酵素）が大量に含まれている。この複合酵素により、菜種油粕以外の飼料も分解効率が向上すると考えられる。すなわち、粗飼料や濃厚飼料など家畜飼料全体の飼料効率が向上することで、飼料コスト低減による家畜の生産性向上が期待される。この新技術を実用化することで、「食の安心・安全」と「豊かな食生活」を実現する。

酵素生産における液体培養法と固体培養法

一般的に酵素の生産方法には、液体培養法と固体培養法がある。世界的に見ると、酵素を工業生産する場合は簡便な液体培養法が用いられているが、液体培養法は酵素の生産性が低く、複数の酵素を同時生産することが難しい。さらに、酵素を精製する手間とコストがかかる上に、培養後の液体培地は廃液となる。また、液体培養法において酵素生産する場合カビなどの菌が用いられるが、目的の酵素を効率的に生産するために遺伝子組換えされた菌が用いられることが多い。

一方、固体培養法は、日本の醸造文化において「麹づくり」として幅広く利用されており、酵素の生産性が高く、複数の酵素を同時に生産することが可能である。また液体培養法と異なり、酵素の精製や粉末化の必要がなく、培養物をそのまま利用できる。これらの利点がありながら固体培養法が一般的でない理由は、固体培養法は比較的開放系で培養するため遺伝子組換えされた菌の自然界への漏出防止に過大な安全対策が必要になるためである。また最も大きな問題点は、固体培養装置を大型化した際の培養制御が難しいことである。

世界的には、*Aspergillus niger* 等を用いた液体培養法による酵素生産がメジャーであるが、*Aspergillus* 属の中には発ガン性を有する強力なカビ毒を生産するものがあり、安全性に問題がある。一方、麹菌 *Aspergillus oryzae* は、古くから日本の醸造分野で利用されている安全性の高い菌であるとともに、ゲノム解析でカビ毒生産遺伝子が欠落していることが明確であり *Aspergillus* 属の中でも特異的に安全性を持つことが証明されている。また *A. oryzae* は、群を抜いて高い酵素生産性を持ち、さらにセルラーゼ群、ヘミセルラーゼ群およびキシラナーゼ群など、バイオマス分解に有効な酵素遺伝子を多数保有している。そこで *A. oryzae* が保有するバイオマス分解酵素遺伝子の中から、目的に応じた複合酵素を選び、セルフクローニング技術によりそれらの複合酵素をより高生産するよう遺伝子改変すれば、目的の複合酵素を効率的かつ安全に大量生産することができる。したがって、セルフクローニングした安全な *A. oryzae* を、開放系である固体培養法による酵素生産に用いれば、人にも環境にも安全であり、生産設備コストが安価である。

大型化した固体培養装置の実用化開発

株式会社フジワラテクノアートは、醸造食品製造設備のパイオニア企業である。醸造食品の製造において最も重要な工程である「麹づくり」に必要不可欠な固体培養装置において、国内シェア80%以上、海外20数カ国へ輸出するなど、国内だけでなく海外でも他社の追随を許さない実績と技術の蓄積がある。近年では、海外の醸造食品メーカーから大型の固体培養装置をコンスタントに受注している。麹の大量生産には大型化した固体培養装置が必要であるが、前述した通り大型化した際の培養制御は非常に困難である。しかし、株式会社フジワラテクノアートは固体培養技術に係る数多くの特許を有しており、長年培ってきたノウハウと革新的なアイデアにより、2012年に世界で初めて直径20mに及ぶ超大型の完全自動化された固体培養装置の実用化に成功した。

麹の大量生産を実現するためには、単に大型化・自動化された装置を製作するだけでなく、目的に応じた培養条件を検討し実現することが必須である。すなわち、大型化された装置において、目的とする麹菌が目的とする酵素を最も効率良く生産できるよう、綿密かつ自動で培養制御できるノウハウが必要不可欠である。株式会社フジワラテクノアートは、培養スケールや培養する麹菌の種類を問わず、目的に応じた高品質かつ高効率な「麹づくり」を目指し、その中で最も難しいとされる培養制御に係る技術開発を積極的に行っている。

株式会社フジワラテクノアートがこれまでに大型化した固体培養装置で製麹したのは野生株の麹菌であり、セルフクローニング麹菌を用いた実用化規模の固体培養はまだ行ったことがない。遺伝子組換え技術とは異なり、科学的に安全性が認められているセルフクローニング技術と、遺伝子学的に安全な麹菌を組み合わせたセルフクローニング麹菌は、機能性飼料（畜産業界）だけでなく食品加工業界における酵素生産に最適である。本研究開発において、セルフクローニング麹菌の固体培養により、食品加工業界にも応用できる複合酵素を安価、効率的かつ安全に大量生産する新技術を実用化し、「食の安心・安全」と「豊かな食生活」を実現する。

1－3. 研究開発の目標

研究開発の高度化目標

(十一) バイオに係る技術に関する事項

(4) 川下分野特有の事項

2) 環境・エネルギー分野に関する事項

②高度化目標

イ. 廃棄されていた生物資源の再資源化に係る技術の確立

未利用バイオマスの1つである菜種油粕の有効利用に係る技術の高度化を目標とする。菜種油粕は国内に在庫が過剰にあり、また飼料としての栄養価を十分に有していながら、その消化性の悪さゆえに飼料としての利用価値が低い。前述した通り、麹菌はバイオマス分解酵素遺伝子を多数保有しており、その中には菜種油粕を効率的に分解できる酵素遺伝子がある。本研究開発は、セルフクローニング技術と固体培養技術により、麹菌のバイオマス分解酵素を含む機能性飼料を安価、安全かつ効率的に大量生産できる技術を提供する。

機能性飼料には麹菌が生産する様々な複合酵素が含まれている。この複合酵素により、(1) 菜種油粕の飼料効率向上(未利用バイオマスの有効利用)ならびに(2) 家畜飼料全体の飼料効率向上(飼料コスト低減による家畜の生産性向上)が期待できる。

技術的目標値

上記の目標を達成するため、下記の通り具体的な技術目標値を設ける。

【1. 複合酵素遺伝子を高発現するセルフクローニング麹菌の取得】

技術的目標値：麹菌が有するバイオマス分解酵素遺伝子群の中から、菜種油粕を最も効率良く分解する酵素の組合せ(複合酵素)を少なくとも3パターン選定し、その複合酵素遺伝子を高発現する麹菌をセルフクローニング技術により取得する。

【2. 複合酵素を高生産可能とするセルフクローニング麹菌の固体培養条件の確立】

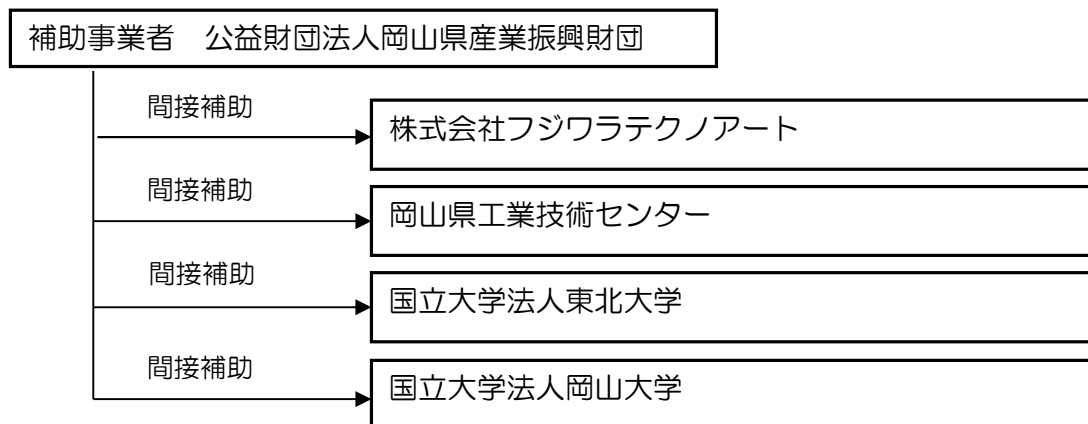
技術的目標値：上記【1】で取得したセルフクローニング麹菌が複合酵素を高生産する培養技術を確立する。培地であるフスマを100g培養できる固体培養装置小型試験機を製作し、セルフクローニング麹菌が複合酵素を高生産できる最適培養条件を検討する。

【3. 複合酵素の大量生産を実現する固体培養技術の実用化開発】

技術的目標値：フスマを160kg培養できる固体培養装置を製作し、実用化規模の装置で複合酵素の大量生産を実現する固体培養技術の開発を行う。そして、実用化規模の装置で大量生産した機能性飼料に含まれる複合酵素が、菜種油粕の分解に有効であることを実証する。具体的には、複合酵素により菜種油粕の飼料効率を15%以上向上させることを目標とする。

2. 研究実施体制（研究組織・管理体制、研究者氏名、アドバイザー）

2-1. 研究実施体制



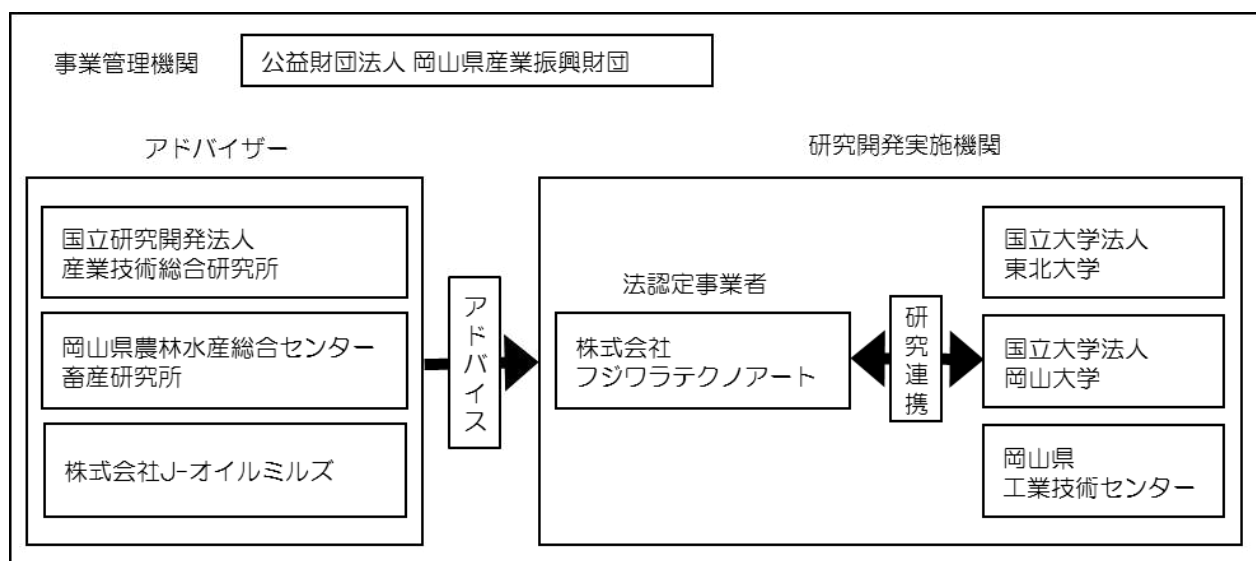
総括研究代表者（PL）

株式会社フジワラテクノアート 技術開発部 部長 森 章

副総括研究代表者（SL）

岡山県工業技術センター 研究開発部 専門研究員 三宅 剛史

2-2. 研究開発体制図



2-3. 研究実施場所一覧

名称	所在地
株式会社フジワラテクノアート	岡山県岡山市北区富吉2827-3
岡山県工業技術センター	岡山県岡山市北区芳賀5301
国立大学法人 東北大学	仙台市青葉区荒巻字青葉468-1
国立大学法人 岡山大学	岡山県岡山市北区津島中1-1-1

2-4. 管理・研究者氏名

【補助事業者】 公益財団法人岡山県産業振興財団

管理員

氏 名	所属・役職
本位田 和昭	副理事
入江 栄治	ものづくり支援部 次長
藤井 宜美	ものづくり支援部 研究開発支援課 主任
赤木 亮介	ものづくり支援部 研究開発支援課 主事
松下 英雄	ものづくり支援部 研究開発支援課 事業推進員

【間接補助事業者】

研究員

株式会社フジワラテクノアート

氏 名	所属・役職
森 章	技術開発部・部長
高橋 佐都子	技術開発部・係長
久岡 玲子	経営企画室・係長
山本 竜徳	技術開発部・係長
井上 周子	技術開発部・係長

國宗 祥子	技術開発部・係員
河内 沙織	技術開発部・係員
栢野 由香	技術開発部・係員

岡山県工業技術センター

氏 名	所属・役職
三宅 剛史	研究開発部 専門研究員
伊藤 一成	研究開発部 研究員
谷野 有佳	研究開発部 技師

国立大学法人東北大学

氏 名	所属・役職
五味 勝也	大学院農学研究科・教授
渡部 昭	大学院農学研究科・助教
新谷 智子	大学院農学研究科・技術補佐員

国立大学法人岡山大学

氏 名	所属・役職
神崎 浩	大学院環境生命科学研究科長

3. 成果概要

3-1. 複合酵素遺伝子を高発現するセルフクローニング麹菌の取得

国内食油メーカーでは、搾油後の大豆油粕や菜種油粕を飼料として農家に販売している。大豆油粕は栄養価が高く、嗜好性や消化性も良いため飼料価値が高い。一方、菜種油粕はタンパク質飼料として大豆油粕の粗タンパク質（CP）含有量 50%程度と比較しても、40%程度と高く、タンパク質飼料として利用可能な性質を備えているにもかかわらず、可消化養分総量（TDN）含量が大豆油粕に比較して低いことから難分解性成分が多く含まれ、消化性が悪く飼料価値が低いとされる。そこで、菜種油粕の飼料価値を下げる要因と考えられる物質（阻害成分）の分解除去と、飼料価値を上げる糖質の分解促進に着目し、麹菌に高発現させる酵素を検討した。一般的に、バイオマス資源の有効利用には、バイオマスの主成分ともいえるセルロース系有機物の分解目的での酵素処理が必須である。これは菜種油粕に対しても同様と考えられ、菜種油粕の阻害成分の分解除去と、有効成分の分解による利用促進を酵素処理によって進めることが可能と考えられる。

本研究開発では、まず麹菌培養物の菜種油粕分解性について検証した。菜種油粕分解の評価は、難分解性を示す阻害成分の分解除去と、有効成分の分解利用の両方について行った。評価の流れは、該当酵素（阻害成分分解酵素系および有効成分分解酵素系）の市販精製品による菜種油粕分解の調査後、麹菌培養物を仮定し、培養物抽出粗酵素による菜種油粕分解性を調査した。麹菌株種は、野生株、遺伝子組換えにより目的酵素 1 種を高発現した各高発現株、セルフクローニング技術により目的の酵素を 1 種〜3 種高発現させた各株を用いた。遺伝子組換え高発現株では各目的酵素の特性の検討を行うとともに、各酵素を組み合わせた場合の菜種油粕の分解性評価を行い、最終的に複合酵素を高生産するセルフクローニング株を用いて菜種油粕の分解性評価を実施した。

岡山大学における市販の酵素剤を用いた研究により、菜種油粕中の成分を分解することが確認された複数の酵素（阻害成分分解酵素系および有効成分分解酵素系）について、麹菌のゲノムデータベースからそれらの酵素活性を持つ可能性のある酵素遺伝子を探索した。そして、セルフクローニング麹菌を取得するため、PCR によって遺伝子発現用カセットならびに選択マーカーの DNA 断片を増幅、麹菌に導入する手法を開発した。その手法を用いて、2 種類（ダブル）および 3 種類（トリプル）の酵素を高生産するセルフクローニング株の造成を目指した。

発現カセットはプロモーター、ターミネーター、酵素遺伝子の DNA 断片のそれぞれを PCR で増幅し、それらを連結することで作製した。麹菌ゲノムを鋳型に PCR で増幅した選択マーカーの DNA 断片と一緒に発現カセットを麹菌に導入して高発現株の取得を試みた。その結果、40 株以上のセルフクローニング株の造成に成功した。本手法は PCR のみで高発現カセットを作製でき、複数の高発現カセットも効率は高くないが、短時間で複数の酵素遺伝子高発現セルフクローニング株を得ることができることから、有用な手法として今後も利用できるものと期待される。

3-2. 複合酵素を高生産可能とするセルフクローニング麹菌の固体培養条件の確立

実用化規模での複合酵素の高生産に必要な最適な固体培養制御を実現するためには、小規模試験による様々な検討が必要である。しかしながら固体培養には、物質移動の低さから、均一で再現良く培養することが難しく、しかもその培養状態を任意に制御することが難しいという培養法としての致命的な欠点がある。この影響は小規模試験であればあるほど大きく、結果、これから導き出された最適な制御条件を実用化規模に適用することができないのが現状である。本研究では、これらの問題を解消できる小型試験機の考案開発を行った。

発熱量と増殖に要する時間を検討し、フスマ 100g に 100%(v/w)の水を加えて 20 分煮沸後、別途準備した種フスマを 2%(w/w)の割合で加え、開始の環境温湿度を 25℃, 95%rh に設定し 4 日間の培養を行う条件を基本培養条件として設定した。物質の低移動から不均一となる固体培養基質の品温や水分を均一状態に保つために、無通風式箱培養を採用した。そして、変動する発熱体である固体培養基質に対する任意で自動の品温制御を可能とするために、ベクトル制御方式の品温制御を採用し、攪拌を可能とする固体培養装置小型試験機を考案・開発した。これを用いて、実際に発熱している固体培養基質に対して設定通りの品温に任意で制御できることを確認した。フスマ 100g に対し小型試験機を用いた試験培養を実施し、設定通りの品温パターンでの品温制御が実現できることを示すとともに、均一な品温と水分状態を達成することができた。すなわち、無通風式箱培養とベクトル制御方式の品温制御を採用することにより、発熱状態によらず均一で任意の設定品温通りの品温制御を自動で可能とする小型試験機の開発に成功した。本装置は、湿度と温度による制御が可能であることから、様々な品温と水分パターンとなる培養状態の制御が可能である。これにより、実用化に必要な、効率的な菌体増殖と酵素生産に向けた培養条件の最適化の検討が可能となった。

開発した小型試験機を用いて東北大学で育種されたセルフクローニング株の固体培養制御を実施し、実用化に必要な、効率的な菌体増殖と酵素生産に向けた培養条件最適化の検討を行った。複数の育種株について最適化試験を行ったが、液体培養と固体培養、単独、2 重複合、プロモーター種類、組込み位置やコピー数などの違いにより、それぞれ目的の酵素を高生産させる最適化条件（もしくはその要因）が異なることが分かった。東北大学で、構築に成功した 3 重複合セルフクローニング株を合わせて、多くの候補株が育種できていることから、上記の違いを考慮しつつ、固体培養で最も高い生産性を示す株の比較評価とその最適化が必要である。一方で、培養時間が長くなると酵素活性が低下する問題が確認されたことから、培養物の保存流通も含めた安定性の確保が必要であると考えられた。

そこで、東北大学で育種に成功した様々なセルフクローニング株について酵素生産性を評価し、有用な株のスクリーニングを実施した。そして、①構築したカセットから目的の酵素がバランス良く高生産されていること、②タンパク質の分泌が良好であること、③菌の生育に問題がないことを総合的に勘案し、候補株の選択を行い、最終的に、岡山大学における菜種油粕に対する消化性評価の結果と合わせて、2-4 株、3-12 株、3-26 株の 3 株を有用株として決定した。

有用株のうち、2-4 株を用いて初期水分の再検討を実施したところ、初期水分の減少により目的酵素の生産性が増加した。そこで、初期水分を 70%加水で設定し、品温のベクトル制御を試みたところ、基本の品温パターンで 24 時間の培養を行ったときに目的酵素が最大の生産性を示した。同様に 3-12 株と 3-26 株について、初期水分の減少（70%加水）とその品温のベクトル制御（基本）による効果

を評価した。その結果、株により最適条件やそのときの複合酵素の生産比などはやや異なるものの、適切な初期水分の設定と品温（ベクトル）制御を行うことにより、目的とする複合酵素の同時高生産を達成できることが示された。

一方で、培養時間が長くなると酵素活性が低下する問題が確認され、培養物の保存流通も含めた安定性の確保という課題が新たに生じたことから、固体培養物中における複合酵素の安定性を評価し、その活性を保持するための条件について検討を行った。抽出液を用いた耐熱性の評価から、酵素によっては熱に弱いものがあることが分かった。しかし、この影響は固体培養物中では緩和されること、水分が少ない方が熱の影響は小さくなることが確認できた。そして、水分 13%以下を目指して乾燥を行ったところ、乾燥を伴うことで熱の影響はさらに緩和され、60℃処理（30 分）でも乾燥後の活性を保持できることが示された。

3-3. 複合酵素の大量生産を実現する固体培養技術の実用化開発

これまでに株式会社フジワラテクノアートが「麹づくり」で培ってきた麹菌の固体培養技術を活かし、複合酵素の大量生産を可能とする実用化規模の固体培養装置を製作した（写真1）。

直径1.2mの培養槽に160kg（元重量）のフスマを盛り込むと、堆積層厚は約60cmとなる。この高層堆積のフスマを自動で手入れ可能とする豎型スクリュース式（ターナー式）攪拌機を設けた。また品温制御は、高層堆積かつ発熱量が多い麹菌の固体培養に対応したベクトル制御方式を開発した。さらに、酵素生産に適した固体培養装置を目指して、ワンパス制御や散水パイプの導入など、制御開発・装置開発を行った。

写真1. 実用化規模の固体培養装置



まず AOK11 野生株とセルフクローニング株の比較を行うため、まず AOK11 野生株を用いた培養でベースとなる品温パターンを決定した。続いて、ベースの品温パターンで単独酵素を高発現するセルフクローニング株および2種類の酵素を高発現するセルフクローニング株（プロモーターの異なる2種類の菌株）を培養した。培養中の品温経過は、すべてのセルフクローニング株においてベースの品温パターンで培養した AOK11 野生株の品温経過と同じであった。すなわち、AOK11 野生株と同様の品温パターンで、セルフクローニング株も制御可能であることがわかった。また、経時的に培養物をサンプリングし、各サンプルの菌体数や酵素活性を測定した結果、AOK11 野生株と比較してセルフクローニング株は目的の酵素活性が有意に高いことがわかった。

次にセルフクローニング株の最適培養条件を検討するため、40菌株以上のセルフクローニング株の中から、菜種油粕の分解に有効な菌株3種類を選抜し、その3菌株の中から最も菜種油粕の消化促進効

果が高い菌株と、その最適培養条件を特定した。菜種油粕の消化率の評価には、人工ルーメン法を用いた。まず、選抜した3菌株について培養初期の水分を検討した。その結果、3菌株とも同じ傾向が見られ、初期水分50%の方が初期水分60%よりも目的の酵素活性は高かったが、菜種油粕の消化促進効果は初期水分60%の方が高いことが示唆された。次に、3菌株の中で最も菜種油粕の消化促進効果が高い菌株を選抜し、その菌株について培養後半の品温を検討した。その結果、酵素生産が盛んであると考えられる培養後半の品温を変えることにより酵素によって活性が異なることが示唆された。また、培養後半の品温を下げた方が、菜種油粕に対する消化促進効果が高いことがわかった。

本研究開発において、菜種油粕の消化促進に寄与する酵素は特定できなかったが、人工ルーメン法にて機能性を評価したどのセルフクローニング株においても、コントロールに比べ菜種油粕の消化促進効果があった。また、どのセルフクローニング株においても、AOK11 野生株に比べて同等以上の菜種油粕の消化促進効果があった。これらのことから、麹菌が生産する未知の酵素と、高発現させた酵素の一部が複合的に働き、菜種油粕の消化を促進していると考えられる。

4. 当該研究開発の連絡窓口

管理法人：公益財団法人岡山県産業振興財団

所在地：〒701-1221 岡山県岡山市北区芳賀 5301 テクノサポート岡山 3F

担当者：ものづくり支援部 次長 入江栄治

連絡先：TEL：086-286-9651

E-mail：bay@optic.or.jp

研究機関：株式会社フジワラテクノアート

所在地：〒701-1133 岡山県岡山市北区富吉 2827-3

担当者：技術開発部・高橋 佐都子

連絡先：TEL：086-294-1527

E-mail：takahasi@fujiwara-jp.com

第2章

本 論

1. 複合酵素遺伝子を高発現するセルフクローニング麹菌の取得

1-1. 菜種油粕分解性の検証

まず、麹菌培養物の菜種油粕分解性について検証するにあたり、菜種油粕中の阻害成分および有効成分を定量した。菜種油粕からの抽出と定量的結果、菜種油粕中の阻害成分 T は 1.13%、阻害成分 PA は 1.59%であった。一方、目的の有効成分である糖質成分 X および糖質成分 P に関しては、抽出方法の探索に難航し定量はできなかったが、文献調査の結果から、糖質成分 X および糖質成分 P の酵素分解が有効であることが判明した。これらのことから、阻害成分 T、阻害成分 PA、糖質成分 X および糖質成分 P の分解酵素（それぞれ酵素 T、酵素 PA、酵素 X および酵素 P）に着目し、菜種油粕分解性を検証した。

次に、市販の酵素剤を用いて菜種油粕の分解性を検証した。菜種油粕に対する複数の市販精製酵素反応の結果、反応後の菜種油粕の残留率はコントロールに比較していずれも低下した。中でも、糖質成分 P の分解に有効な 2 つの酵素の活性（酵素 P1 活性および酵素 P2 活性）と、その他の酵素の併用が菜種油粕の分解に有効であると考えられる。また、阻害成分 PA については、酵素 PA の添加により分解生成物が増加したことから、複数種の酵素を併用しても酵素 PA による阻害成分 PA の分解性が大きく阻害されないと考えられる。さらに、有効成分については酵素 PA と酵素 X の併用で他と比較して分解生成物の量が少なかったことから、有効成分の分解に関しては酵素 T と酵素 P 系（酵素 P1 および酵素 P2）が有効であると考えられる。なお、阻害成分 T については、複数種添加しても分解生成物の量には影響がなかった。

1-2. 菜種油粕の分解に有効な酵素遺伝子の選定

岡山大学における市販の酵素剤を用いた酵素反応により、酵素 T、酵素 PA、酵素 X および酵素 P が菜種油粕中の成分を分解することが確認できたため、麹菌のゲノムデータベースから上記 4 種類の酵素活性を持つ酵素遺伝子を探索した。麹菌ゲノムデータベース (<http://www.aspgd.org/>) 等を利用して、酵素 T、酵素 PA、酵素 X、酵素 P をコードする遺伝子を探索した結果、酵素 T は 3 種類、酵素 PA は 1 種類、酵素 X は 8 種類、酵素 P は 41 種類の候補酵素遺伝子を見出した。

1-3. 菜種油粕分解に適した酵素遺伝子の高生産麹菌の造成

選定した酵素のうち、実際に菜種油粕の分解に有効な酵素を特定するため、また最も菜種油粕を分解する酵素の組み合わせを検討するため、それぞれの酵素を高生産させることを目的にして高生産株を造成した。選択した遺伝子の全てについて麹菌由来の改変高発現用プロモーター、ターミネーターおよび目的の酵素遺伝子からなる遺伝子発現力セットを作製し、麹菌に導入した。こうして造成した高発現株の中から、目的酵素の高生産と活性が認められた複数の高生産株について、岡山大学での菜種油粕分解性評価に使用するため、岡山県工業技術センターにおいて小スケールの固体培養による目的酵素の高生産を依頼した。

1-4. 麹菌高発現遺伝子組換え株の培養物を用いた菜種油粕分解性の評価

東北大学で造成した麹菌の高発現遺伝子組換え株を小スケールで固体培養して得られた酵素抽出液について、各酵素活性を測定した結果、酵素 T2、酵素 PA、酵素 X1 および X2、酵素 P1 および P2

において、野生株と比較して大幅な各酵素活性の発現を確認した。

組換えにより酵素活性が発現しやすいと考えられた上記酵素の組換え株の培養抽出液を用いて、菜種油粕の分解性を確認した。その結果、酵素 PA では野生株と比較した酵素活性の上昇で分解生成物が野生株抽出液添加の 7.83 倍に増加した。一方、その他の酵素では、酵素活性が大幅に上昇しても該当する分解生成物の増加は野生株抽出液添加に比較して 1.1~1.9 倍の増加であった。この結果より、酵素 PA については酵素活性の上昇が菜種油粕中の阻害物質 P の分解促進に有効であることを確認した。また、酵素 T2 高発現遺伝子組換え株と市販精製酵素では、菜種油粕残留率は酵素 T2 高発現遺伝子組換え株で低下したものの、糖質分解生成物は市販精製酵素の方が高い結果となり、酵素 T2 高発現遺伝子組換え株では糖質分解とは異なるメカニズムで残留率が低下している可能性が考えられる。酵素 PA は、市販精製酵素に比較して添加ユニット量が少なくても、残留率が低下し、分解生成物含有量が増加したことから、酵素 PA 高発現遺伝子組換え株の酵素 PA 以外の酵素による分解促進効果があると考えられる。

糖質分解に係る酵素 X については、市販精製酵素に比較して酵素 X2 高発現遺伝子組換え株で残留率が高い結果であり、これは該当酵素に由来するものも考えられるが、酵素 X2 高発現遺伝子組換え株での糖質分解生成物の増加は、酵素 PA と同様に酵素 X2 以外の酵素の影響もあると考えられる。同じく糖質分解に係る酵素 P については、市販精製酵素に比較して酵素 P1 高発現遺伝子組換え株は菜種油粕分解性が低い結果であった。これは該当酵素に由来する影響や酵素 P1 以外の酵素の影響によるものと考えられる。

1-5. セルフクローニング株の作製を目的とした遺伝子導入技術の開発

セルフクローニング株の作製の方法はいくつか考えられるが、初めに PCR によって遺伝子発現用カセットならびに選択マーカーの DNA 断片を増幅して、麹菌に導入する手法について検討した。目的の酵素遺伝子のコード領域を PCR で増幅して高発現用ベクターの高発現用プロモーターの下流に連結した。高発現プラスミドを麹菌の宿主株 AOK11niaD に導入し、得られた形質転換体のゲノムを鋳型に用いて PCR を行うことにより、目的の高発現用プラスミドが導入されていることを確認した。得られた形質転換体による酵素タンパク質の生産性について、液体培養の培養上清中のタンパク質の SDS-PAGE を行った。

まず、単一の酵素を高発現する（シングル）セルフクローニング株として、酵素 T2 をターゲットとした。その結果、*amyB* プロモーターを使用した発現カセットでは 14 株中 2 株、*enoA* プロモーター使用発現カセットでも 11 株中 2 株が酵素 T2 高発現セルフクローニング株として取得できた。酵素 T2 の場合、セルフクローニング株の取得率はあまり高くなかった。同様にして、酵素 T1 の高発現セルフクローニング株の作製を試みたが *amyB* プロモーターを使用した発現カセットでは株が得られず、*enoA* プロモーターを用いた発現カセットではセルフクローニング株を得ることができた。

上記の通り得られたシングルセルフクローニング株を宿主にして、ピリチアミン耐性遺伝子 *ptrA* を選択マーカーに用いて、もう 1 種類の酵素発現カセットを導入し、2 種類の酵素を高発現する（ダブル）セルフクローニング株の取得を試みた。しかし、取得率が高くなかったことから、別の手法によってもダブルセルフクローニング株の取得を試みた。それは、2 種類の発現カセットを同時に麹菌宿主株に導入する手法である。この手法を選んだ理由は、2 種類の発現カセットのどちらか一方でも導入された株が得られれば、シングルセルフクローニング株として利用可能であり、さらに両方の発現カセット

が同時に導入された株が得られれば、複数の酵素生産セルフクローニング株の取得が短期間で達成できるからである。この方法の利点は、発現カセットはプロモーター、ターミネーター、酵素遺伝子のコード領域の3種類をPCRで増幅しそれを連結させておけば、何種類も作製して用意しておくことができるので、発現カセットをどのように組み合わせるかで、目的とする複数の酵素生産セルフクローニング株の取得が可能である。

後者の手法により、*niaD* 遺伝子を選択マーカーとして用いて形質転換体を得た。それらのゲノムを鋳型にしてそれぞれの高発現カセットが導入されているかどうかPCRにより調べたところ、調べた形質転換体は8株と少なかったにもかかわらず、1株に2種類の発現カセットがともに導入されていたことから、比較的効率よくダブルセルフクローニング株が得られる可能性が示唆された。次に、得られたダブルセルフクローニング株をYPM培地で培養した上清中のタンパク質をSDS-PAGEにかけて、酵素の生産性を調べた結果、目的の酵素に該当するシグナルが得られ、2種類の酵素を高生産するセルフクローニング株が得られたことが示された。

同時に2種類の発現カセットを導入する手法によりダブルセルフクローニング株が得られたことから、*niaD* 遺伝子を選択マーカーにして得られたこれらの株を宿主にして、*ptrA* 遺伝子を選択マーカーにしてさらにもう1種類の酵素発現カセットを導入することにより、3種類の酵素を高発現する（トリプル）セルフクローニング株の取得も試みた。その結果、多数のトリプルセルフクローニング株を得ることに成功した。

上記のように、PCR法により発現カセット作製と2種類の麹菌由来の選択マーカーを利用することにより、目的酵素のシングル、ダブル、トリプルのセルフクローニング株の取得に成功した。本手法を用いれば、比較的効率よく多数の酵素高発現カセットを導入したセルフクローニング株を得ることができると考えられる。麹菌が生産する酵素は多数知られているが、菜種油粕の他にもバイオマス系の食品加工副産物や廃棄物などの分解に有効な酵素がさらに見出されれば、本手法を利用して複数種類の酵素を同時に高生産できるセルフクローニング株の造成が可能になるものと期待される。

1-6. セルフクローニング株抽出粗酵素による菜種油粕の分解性検証

東北大学にて取得した複数の酵素（複合酵素）を高生産可能とするセルフクローニング麹菌の各株を、岡山県工業技術センターで小スケールにて固体培養した抽出粗酵素液を用いて、菜種油粕分解性を検証した。菜種油粕分解性の検証には、セルフクローニング株のうち、2-1株（酵素X2/酵素PA高生産株④）、2-4株（酵素PA/酵素P1高生産株④）、2-7株（酵素X2/酵素PA⑥）、3-12株（酵素T1/酵素X2、酵素PA高生産株⑧）、3-19株（酵素PA/酵素X2/酵素T2高生産株⑧）、3-26株（酵素PA/酵素X2/酵素P2高生産株①）を供試した。該当セルフクローニング株について、培養違いの抽出粗酵素液のうち、酵素活性が高いもの等を適宜選択し、菜種油粕と反応させた。その結果、目的の酵素を高発現させたセルフクローニング株の培養抽出粗酵素では、いずれの株種でも野生株に比較して菜種油粕残留率が低下することを確認した。また、供試したセルフクローニング株はいずれも野生株と比較して該当する反応生成物が増加することを確認した。

すなわち、麹菌培養抽出粗酵素を添加しないコントロール区と比較して、野生株の培養抽出粗酵素でも、残留率の低下と、該当する反応生成物の増加を確認したことから、菜種油粕分解に有効であると考

えられるが、さらにセルフクローニング株の場合は菜種油粕分解に有効であることが示唆された。

一方、セルフクローニング株で高発現させた酵素と同ユニット量の市販精製酵素を添加した条件では、いずれの株種でもセルフクローニング株供試に比較して残留率も高く、分解生成物量も少なく、菜種油粕の分解が進んでいないと考えられ、菜種油粕分解には本論では未着目の麹菌由来の酵素の影響があると考えられる。

以上のことから、菜種油粕分解促進には麹菌野生株でも有効で、セルフクローニング株であればより有効性が高い可能性がある

【菜種油粕の分解性比較】

コントロール（未添加）＜ 市販精製酵素 ＜ 麹菌野生株 ＜ 麹菌セルフクローニング株

2. 複合酵素を高生産可能とするセルフクローニング麹菌の固体培養条件の確立

2-1. 固体培養条件の検討を可能とする固体培養法の開発

小規模試験において発熱状態の違いがおよぼす影響を把握するとともに、任意の条件設定とその詳細な制御を自動で可能とする固体培養装置小型試験機の考案開発を行った。小規模試験と実機における最大の違いは、スケールの違いによる発熱状態の違いである。従って小型試験機の開発においても、予備検証として、この違いがおよぼす影響を把握しておくことは必要である。そこでまず、均一で再現性の高い固体培養が可能な無通風式箱培養を用いて、基質と堆積厚を変えることで発熱状態の違う固体培養を実施し、培養経過の観察と酵素生産に対する影響の把握を行った。その結果、最適条件の検討には、発熱状態の違いによらず、毎回同一で任意の設定品温通りの固体培養が実施できることが必須であること、さらに、水分状態を適切に制御する必要性があることが明確になった。従ってこれらの制御について固体培養装置小型試験機での実現を目指した。

まず我々が有する技術ノウハウから、固体培養には、均一で再現性の高い固体培養が可能な無通風式箱培養を採用することにした（写真2）。

写真2. 固体培養装置小型試験機



そして先の堆積厚を変えた検証から、この後の目的（様々な制御を試みる）も勘案して、小規模試験にはフスマ 100g スケールの培養が最も適していると判断した（よく増殖・発熱し、菌体にダメージをおよぼすほど発熱が過剰でない）。無通風式箱培養を採用することで、外部（培養槽）の温湿度を変

えることにより品温を変えることが可能である。この培養状態を任意に制御するために、制御部に、培養経過を把握しながら温度と湿度の管理が自動で制御できるプログラムが必要である。そこで、変動する発熱体である固体培養基質に対する任意で自動の品温制御を可能とするベクトル制御方式の品温制御を採用した。無通風式箱培養を実施する培養槽は、ベクトル制御方式の詳細な品温制御を達成するために高性能な温湿度制御が可能な仕様とし、扉には外部から固体培地の攪拌を可能とする開閉口を設けた。そして、変動する発熱体（フスマ培養物）に対するベクトル制御方式における温湿度制御の基準値を決定した。これにより、フスマ 100g スケールとした固体培養で発生する変動発熱量をうけた任意で自動の品温制御が可能になった。

2-2. 固体培養装置小型試験機を用いた試験培養と均一性の評価

ベクトル制御方式では、変動する発熱を予測演算し湿度と温度による制御を行うことで詳細な品温制御を可能としている。今回は今後の基準とするために湿度による制御を限定した。その結果、発熱状態に対する理にかなった温度の制御が実現でき、設定品温パターンに良く沿った形で品温経過が推移した。すなわちこれで、設定品温通りに任意の品温制御が自動で可能となったといえる。

次に、小型試験機を用いた試験培養における均一性の評価を行った。その結果、異なる場所の品温経過と水分状態の経過はともによく一致していたことから、均一な培養状態の管理制御が達成できていることが示された。また、これにともない菌体増殖とタンパク質生産の経過もよく一致する傾向となり、さらに過去の標準的知見と比べても均一な酵素生産を実現できていた。すなわち考案製作した小型試験機により、発熱状態によらず均一で任意の品温制御が自動で可能となった。今回採用したベクトル制御方式は、温度と湿度の制御により、詳細な品温制御を可能とする原理であることから、温度と湿度の制御範囲をそれぞれ設定することで、品温制御に加えた水分制御も可能とする。これにより、開発できた固体培養装置小型試験機を用いて、効率的な菌体増殖と酵素生産を実現できる品温と水分の制御パターンの検討が可能となった。

2-3. 小型試験機を用いた固体培養制御の実施

実用化規模での複数酵素の高生産に必要な最適な固体培養制御を実現するためには、小規模試験による様々な検討が必要である。しかしながら固体培養には、物質移動の低さから、均一で再現良く培養することが難しく、しかもその培養状態を任意に制御することが難しいという培養法としての致命的な欠点がある。この影響は小規模試験であればあるほど大きく、結果、これから導き出された最適とされる制御条件を実用化規模に適用することができないのが現状である。これらの問題を解消するための小型試験機の考案開発を行い、無通風式箱培養とベクトル制御方式の品温制御を採用することで、発熱状態によらず均一で任意の設定品温通りの品温制御を自動で可能とする小型試験機の開発に成功した。本装置は、湿度と温度による制御が可能であることから、様々な品温と水分パターンとなる培養状態の制御が可能である。そこで、本装置を用いて東北大学で育種されたセルフクローニング株の固体培養制御を実施し、実用化に必要な、効率的な菌体増殖と酵素生産に向けた培養条件最適化の検討を行った。

2-4. セルフクローニング株の固体培養制御

amyB プロモーターの下流に酵素 T2 をつないだカセットを組み込んで育種された単独セルフクローニング株を用いて、目的酵素を高生産するための最適化試験を行ったところ、緩高 48 時間の培養で、最大の活性（親株比で最大 20 倍以上、放置比で約 1.8 倍）がみられた。

また、amyB プロモーターの下流にそれぞれ酵素 X2 および酵素 PA を、enoA プロモーターの下流にそれぞれ酵素 X2 および酵素 PA をつないだカセットを組み込んで育種された 2 重複合セルフクローニング株を用いて、目的の複合酵素を高生産するための最適化試験を行ったところ、最大の酵素 X2 生産がみられたのは enoA プロモーター株の急高 24 時間の培養で、このときの酵素 X2 の生産性は、親株比で最大 1.8 倍以上、放置比で約 1.3 倍となっていた。一方、最大の酵素 PA 生産がみられたのは amyB プロモーター株の緩高 24 時間の培養で、このときの酵素 PA の生産性は、親株比で最大 6 倍以上、放置比で約 2 倍となっていた。

上記 3 つの育種株について最適化試験を行ったが、液体培養と固体培養、単独、2 重複合、プロモーター種類、組み込み位置やコピー数、などの違いにより、それぞれ目的の酵素を高生産させる最適化条件（もしくはその要因）が異なることが分かった。東北大学で、構築に成功した 3 重複合セルフクローニング株を合わせて、多くの候補株が育種できていることから、上記の違いを考慮しつつ、固体培養で最も高い生産性を示す株の比較評価とその最適化が必要である。一方で、培養時間が長くなると酵素活性が低下する問題が確認されたことから、培養物の保存流通も含めた安定性の確保が必要であると考えられた。

2-5. 育種株の有用性評価と複合酵素の同時高生産

東北大学で育種に成功した様々な組み合わせの 2 重複合（9 株）および 3 重複合（31 株）セルフクローニング株について酵素生産性を評価し、有用な株のスクリーニングを実施した。そして、①構築したカセットから目的の酵素がバランス良く高生産されていること、②タンパク質の分泌が良好であること、③菌の生育に問題がないことを総合的に勘案し、候補株の選択を行い、最終的に、岡山大学における菜種油粕に対する消化性評価の結果と合わせて、2-4 株（酵素 PA の生産性はやや低いものの酵素 P1 の生産性が高い）、3-12 株（酵素 PA と酵素 X2 の生産性がバランス良く、酵素 T1 も生産）、3-26 株（酵素 PA、酵素 X2、酵素 P2 の生産性がバランス良く高い）の 3 株を有用株として決定した。

有用株のうち、2-4 株を用いて初期水分の再検討を実施したところ、初期水分の減少によりいずれの目的酵素の生産性も増加した。そこで、初期水分を 70%加水で設定し、品温のベクトル制御を試みたところ、基本の品温パターンで 24 時間の培養を行ったときにいずれの目的酵素もともに最大の生産性を示した。このとき、放置（100%加水、25℃、95%rh）比で、酵素 PA と酵素 P1 がそれぞれ約 2.2 倍と約 1.9 倍、親株比（概算）で最大 8 倍以上と最大 15 倍以上となっており、複合酵素の同時高生産を達成することができた。同時に、培養時間の短縮（1/2～1/4 以下）による生産の効率化も見込まれた。

同様に 3-12 株および 3-26 株について、初期水分の減少（70%加水）とその品温のベクトル制御（基本）による効果を評価した。その結果、3-12 株では酵素 PA、酵素 X2 および酵素 T1 の

生産性が、3-26株では、酵素PA、酵素X2 および酵素P2（70%加水時）の生産性が、いずれも大きく増加した。株により、最適条件やそのときの複合酵素の生産比などはやや異なるものの、適切な初期水分の設定と品温（ベクトル）制御を行うことにより、目的とする複合酵素の同時高生産を達成できることが示された。

2-6. 複合酵素の安定性評価と活性保持の条件検討

培養時間が長くなると酵素活性が低下する問題が確認され、培養物の保存流通も含めた安定性の確保という課題が新たに生じたことから、固体培養物中における複合酵素の安定性を評価し、その活性を保持するための条件について検討を行った。抽出液を用いた耐熱性の評価から、酵素PA、酵素P1 および酵素T1 が熱に弱いことが分かった。しかし、この影響は固体培養物中では緩和されること、水分が少ない方が熱の影響は小さくなることが確認できた。そして、水分13%以下を目指して乾燥を行ったところ、乾燥を伴うことで熱の影響はさらに緩和され、60℃処理（30分）でも乾燥後の活性を保持できることが示された。

これらのことから、低水分に乾燥すれば、高生産された目的の複合酵素が活性を維持したままの状態、培養物（機能性飼料）を保存流通することが可能となる。すなわち、コストのかからない常温での保存流通が可能となり、これは事業化および普及化の観点から非常に有効であると考えられる。

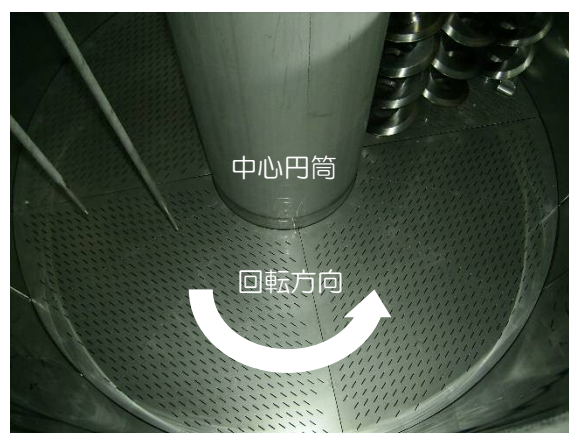
3. 複合酵素の大量生産を実現する固体培養技術の実用化開発

3-1. 実用化規模の固体培養装置の仕様検討（機械の仕様検討）

固体培養により酵素生産する際、生産性を高め生産コストを下げるためには、固体培養装置の大型化（＝大量生産）と自動化（＝人件費削減および高い再現性）が必要である。

固体培養装置の培養床（写真3）の直径は、大きければ大きいほど生産性が高くなる一方で、培養床を水平に保つのが難しくなる。しかし、培養床が水平でないと、機械的に不具合が生じるだけでなく、固体培地の堆積層厚が不均一になり、均一な培養制御も困難になる。一度の培養で大量生産するためには、固体培地の堆積層厚を高層堆積にする必要があるが、高層堆積の固体培地を均一に自動攪拌することは非常に困難である。さらに、高層堆積の固体培地の荷重に耐え、水平を維持できる培養床でなければならない。

写真3. 培養床



そこで、まず実用化規模の固体培養装置のハード（機械）の仕様を検討した。事業化可能な培養スケールにおいて機能性飼料の固体培養技術を実用化開発するために、フスマの盛込み後の堆積層厚が60cmとなる直径1.2mの培養槽を設計した。これは、フスマ（元重量）160kgに相当するが、原料処理後は水分が増加するため、盛込み時の重量は288kg（元原料の水分10%、蒸煮後の水分50%とした場合）となる。この荷重に耐えつつ、培養中も高い平面度を維持できるステンレス製の強靱な培養床を設計した。さらに、「麴づくり」で最も過酷な作業とも言える固体培地の手入れを自動で行うため、60cmという高層堆積のフスマを自動手入れ可能とする縦型スクリー式（ターナー式）攪拌機（写真4）を設計した。攪拌機は通常の培養工程では培養槽上部に位置しており、手入れ工程になると自動的に個々のスクリーが回転しながら下降する。同時に、培養槽（側壁および培養床）も固体培地とともにゆっくり回転する。培養槽が1回転する間に、下降した攪拌機によって固体培地が手入れされる。このとき、培養槽の内側（中心円筒側）と外側（側壁側）とで移動速度が異なる固体培地を均一に攪拌できるよう、攪拌機の個々のスクリーはそれぞれ回転速度が異なるよう設計した。外側に位置するスクリーの回転速度を最も速く、内側に位置するスクリーの回転速度を最も遅くすることにより、効率良く手入れすることができる。また、個々のスクリーと中心円筒、側壁および培養床との間隔が広いと、その部分の固体培地は手入れができないため、極めて高い精度でそれぞれの隙間が最小限となるよう設計した。

写真4. ターナー式攪拌



3-2. 実用化規模の固体培養装置の仕様検討（制御の仕様検討）

仮に装置の大型化ができたとしても、大型化した装置で培養条件を均一に自動制御するのは非常に困難である。古くから職人がノウハウや勘に頼ってきた「麴づくり」を完全に自動化するためには、固体培養装置や制御プログラム、そして培養する麴菌の特性を知り尽くした者でなければ実現できない。目的とする麴をつくる（＝目的の酵素を麴菌に生産させる）ためには、厳密な温湿度管理ができる設備だけでなく、それを制御できるプログラムと詳細設定が非常に重要である。とりわけ、固体培地が高層堆積になると、その品温管理はより一層難しくなる。さらに、発熱量が多い固体培養になると、その品温管理は困難を極める。醤油醸造等で使用される野生の麴菌であっても難しい麴の温湿度管理を、本研究ではまだ実績のないセルフクローニング麴菌で実現しなければならない。

そこで、装置の仕様検討に続きソフト（制御）の仕様を検討した。培養床下に設けた送風湿度センサーで培養時の送風湿度を測定しつつ、空気および水の噴出量を制御できる二流体ノズルを用いた送風湿度コントロールシステムを開発した。さらに、最も困難とされる麴の温度管理には、高層堆積かつ発熱量が多く、その発熱量が培養時間の経過とともに変動する固体培養にも対応できるよう、最新のベクトル制御を開発した。ベクトル制御とは、過去から現在までの変動する品温データをもとに、未来の品温を予測して、麴が目的とする品温となるよう送風湿度をコントロールするものである。今回は、高層堆積かつ発熱量が多い固体培養であっても、厳密に温度コントロールできるよう補正を加えた最新のベクトル制御方式を開発した。

3-3. 実用化規模の固体培養装置を用いた試験培養

上記3-1 および3-2 記載の仕様通り作製した実用化規模の固体培養装置を用いて、麴菌の試験培養を行った。目標はフスマ160kg（元重量）を用い、堆積層厚60cmの培養において麴の品温を制御することであるが、まずは目標の半分量であるフスマ80kg（元重量）を用いて試験培養を行った。最初の試験培養では、既知の麴菌を用いることとし、AOK11 野生株に性質の似た毛足の短い味噌用麴菌、山吹3号（秋田今野）を使用した。

水分11%の元フスマ80kg に対し70%加水して攪拌した後、5回に分けて蒸煮処理を行った。蒸煮条件は吹き抜け3分間、0.2MPa 加圧蒸煮3分間とした。5回の蒸煮処理が完了した後、フスマが30℃前後になるまで冷却し、山吹3号28g（孢子数3.5×10⁵個/フスマ1g相当）を種付けし、均一になるよう丁寧に混ぜ合わせ、培養床へ盛り込んだ。盛込み時の堆積層厚は31cm、水分は50%であった。

試験培養ではベクトル制御設定、品温パターンおよび手入れ時間は任意とし、62時間で出麴を行った。出麴時の水分は27%、麴の色や香りも問題なく良好であった。種菌の種類や加水量などの条件が変われば、培養中の送風量、麴の品温設定などの条件も変わるため、本培養前には検討すべき項目が多数あるが、山吹3号を用いた試験培養では任意の条件で温湿度を制御できることを確認した。

続いて、目標とするフスマ160kg（元重量）を用いてAOK11 野生株の試験培養をおこなった。水分11%の元フスマ160kg に対し112%加水して攪拌した後、10回に分けて蒸煮処理を行った。蒸煮条件は上記と同様にした。5回の蒸煮・冷却処理が完了した時点で、1回目の種付けを行った。AOK11 野生株80g（孢子数1.2×10⁶個/フスマ1g相当）を種付けし、均一になるよう丁寧

に混ぜ合わせ、培養床へ盛り込んだ。同様に、残り5回の蒸煮・冷却処理が完了したら、2回目の種付けを行い、培養床へ盛り込んだ。種付け・盛込みを2回に分けたのは、10回の蒸煮・冷却処理を行うためには時間を要するため、最初に処理したフスマを最後まで置いておくと温度が下がりすぎることで、また大量のフスマに対して一度で均一に種付けすることが困難であることによる。盛込み時の堆積層厚は58cm、水分は60%であった。

1回目のAOK11野生株を用いた試験培養も、ベクトル制御設定、品温パターンおよび手入れ時間は任意とし、62時間出麴を行った。出麴時の水分は26%、麴の色や香りも問題なく良好であった。これにより、目標通り高層堆積の培養であっても温湿度を制御できることを確認した。

3-4. AOK11野生株と単独酵素を高発現するセルフクローニング株の比較

AOK11野生株とセルフクローニング株の比較を行うため、まずAOK11野生株を用いた培養でベースとなる品温パターンを決定した。続いて、ベースの品温パターンで単独酵素（酵素T2）を高発現するセルフクローニング株を培養した。それぞれの培養で使用したフスマのロット、原料処理の諸条件、1回目と2回目の種付けの間隔、1回目の種付けから製麴開始までの時間など、培養に影響を及ぼす可能性のある要素はできるだけ同じになるようにした。ベースの品温パターンで培養したAOK11野生株の品温経過を図2、酵素T2高発現セルフクローニング株の品温経過を図3に示す。

図2. AOK11野生株の品温経過

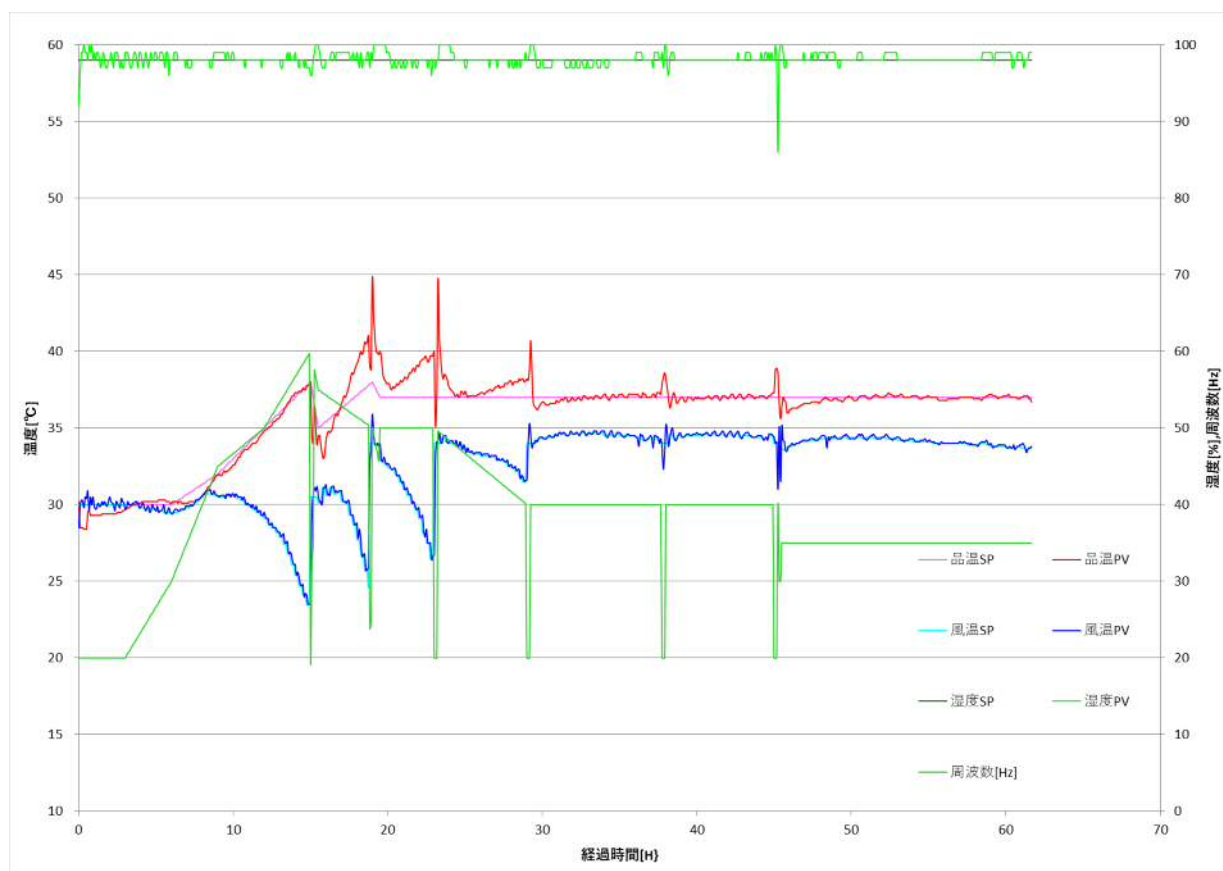


図3. 酵素 T2 高発現セルフクローニング株の品温経過

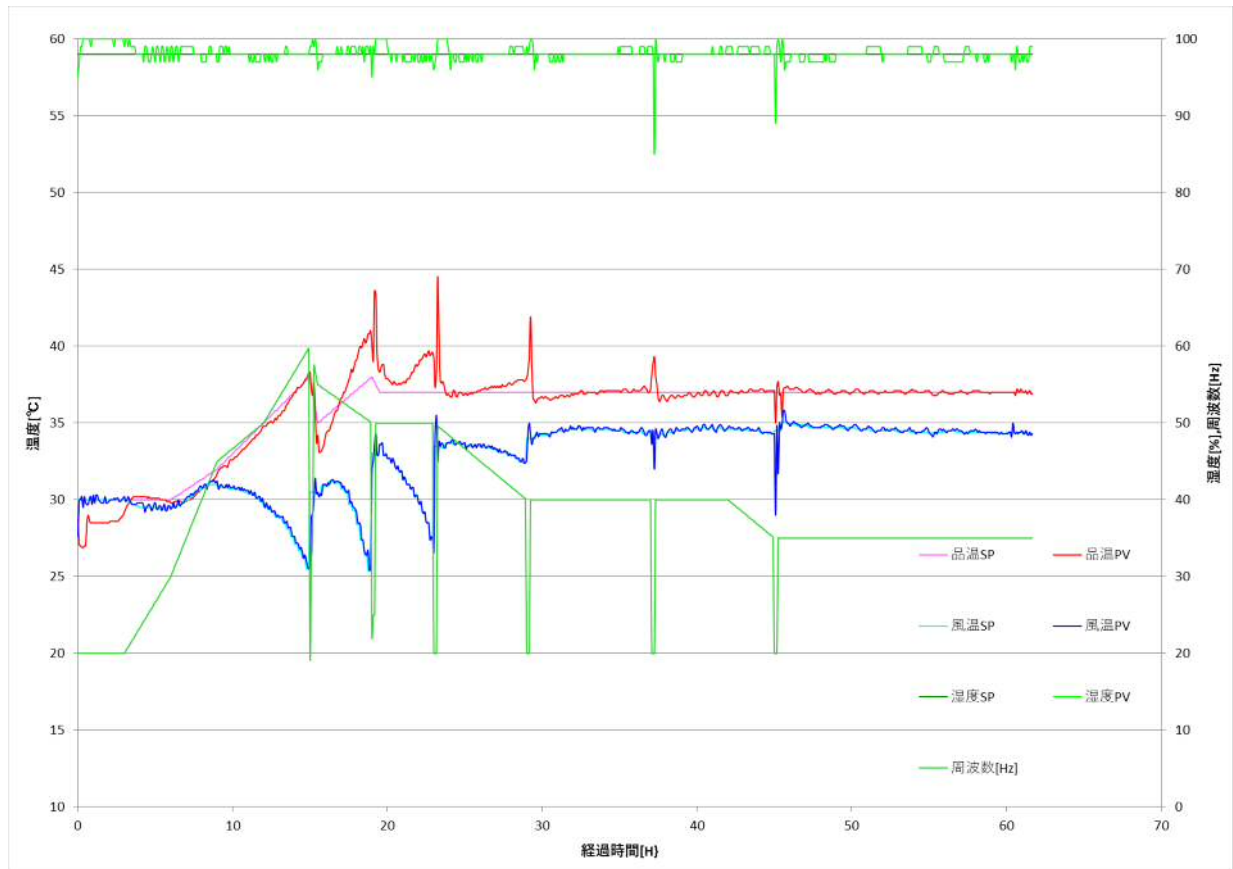


図2と図3を比較すると、酵素 T2 高発現セルフクローニング株の品温経過はAOK 11 野生株とほぼ同じである。すなわち、実用化規模の固体培養装置を用いた高層堆積の培養では、セルフクローニング株であってもAOK 11 野生株と同様に品温制御可能であることがわかった。

また、麹に含まれる菌体量・総タンパク量および各酵素活性を調べた。その結果、菌体量・総タンパク量・麹菌が多く生産する α アミラーゼ等は、AOK 11 野生株と酵素 T2 高発現セルフクローニング株に大きな差は見られなかったが、酵素 T2 活性はセルフクローニング株の方が有意に高かった（野生株と比較して20倍以上）。このことから、AOK 11 野生株と同様の品温経過を辿った酵素 T2 高発現セルフクローニング株は、目的とする酵素 T2 を高生産するとともに、菌体増殖能力やタンパク質生産能力、 α アミラーゼ等の麹菌が多く生産する酵素類の活性はAOK 11 野生株と同等であることが示唆された。

3-5. AOK11 野生株と2種類の酵素を高発現するセルフクローニング株の比較

次に、ベースの品温パターンで2種類の酵素を高発現するセルフクローニング株（プロモーターの異なる2種類の菌株：amyB プロモーターの下流にそれぞれ酵素 X2 および酵素 PA を、enoA プロモーターの下流にそれぞれ酵素 X2 および酵素 PA をつないだカセットを導入したダブルセルフクローニング株）を培養した。ベースの品温パターンで培養した酵素 X2／酵素 PA 高発現 amyB プロモーター株の品温経過を図4、酵素 X2／酵素 PA 高発現 enoA プロモーター株の品温経過を図5に示す。

図4. 酵素 X2／酵素 PA 高発現 amyB プロモーター株の品温経過

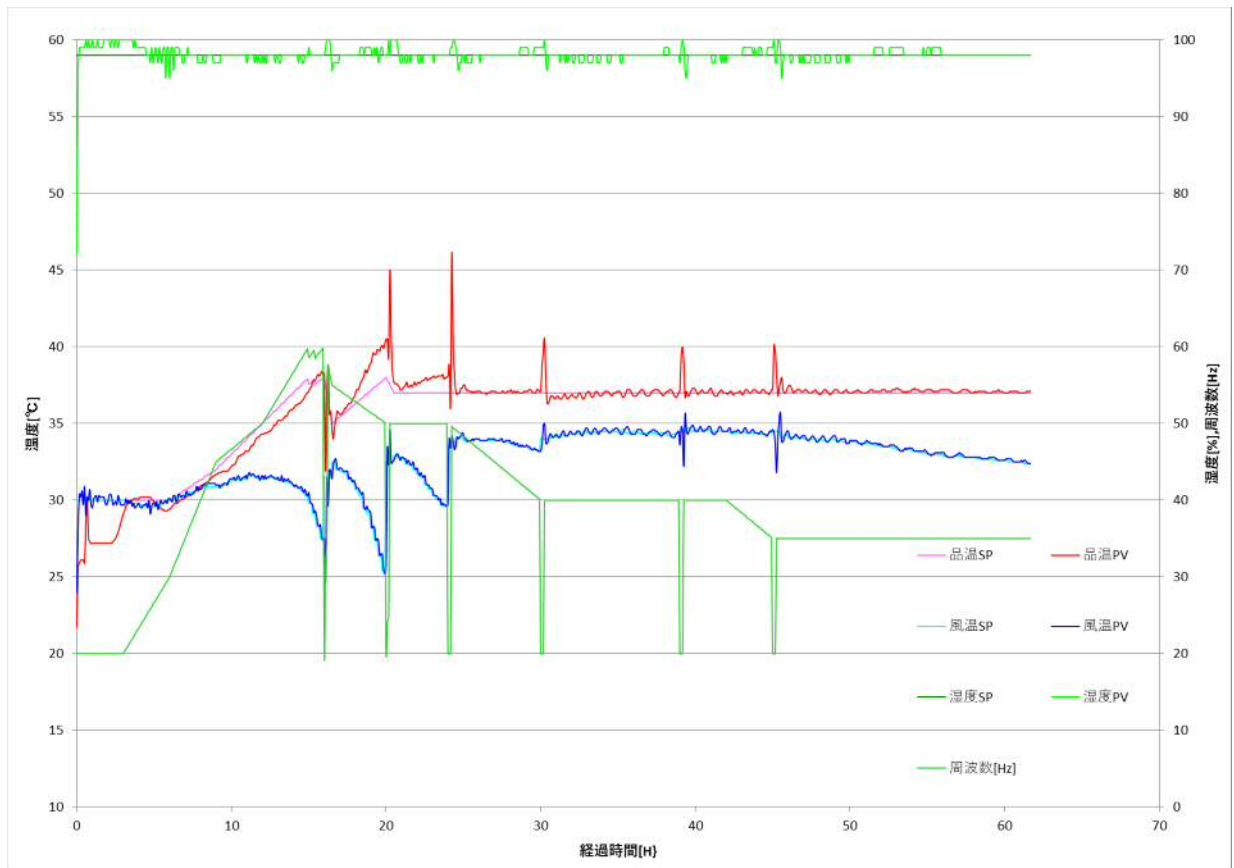


図5. 酵素 X2／酵素 PA 高発現 enoA プロモーター株の品温経過

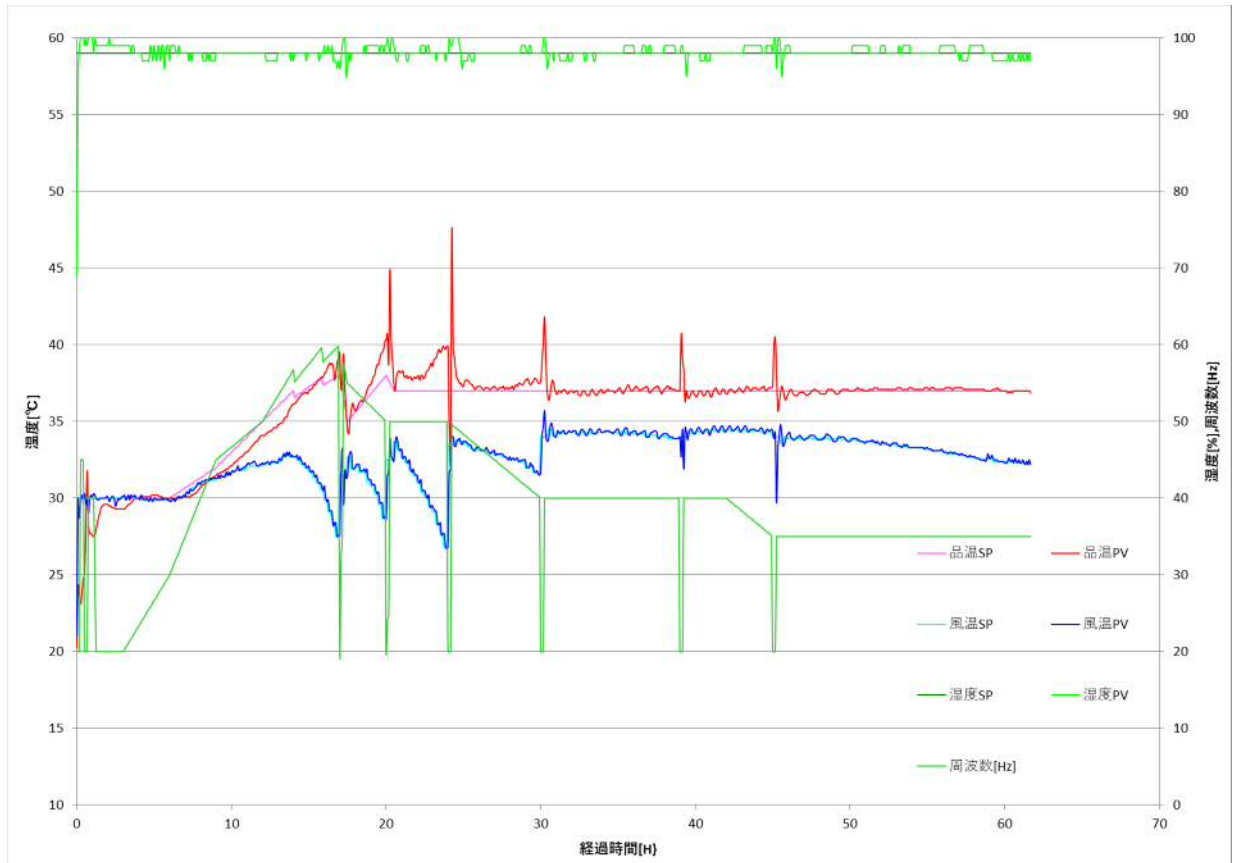


図2と図4および図5を比較すると、2種類の酵素を高発現するセルフクロニング株（酵素 X2／酵素 PA 高発現 amyB プロモーター株および酵素 X2／酵素 PA 高発現 enoA プロモーター株）の品温経過も AOK 1 1 野生株とほぼ同じである。すなわち、実用化規模の固体培養装置を用いた高層堆積の培養では、それぞれプロモーターが異なるダブルセルフクロニング株であっても AOK 1 1 野生株と同様に品温制御可能であることがわかった。

また、麴に含まれる菌体量・総タンパク量および各酵素活性を調べた。その結果、AOK 1 1 野生株と比較していずれのダブルセルフクロニング株も、目的の酵素（酵素 X2 および酵素 PA）活性が有意に高いことが分かった。菌体量・総タンパク量および目的酵素以外の酵素活性については、多少のバラつきはあるものの、AOK 1 1 野生株とほぼ同等であることがわかった。

プロモーターの違いによる酵素活性の大きな差は特に見られなかった。わずかに amyB プロモーター株の方が酵素 PA 活性が高く、enoA プロモーター株の方が酵素 X2 活性が高かった。この結果は、岡山県工業技術センターでの小型試験機における培養結果と同じ傾向であるが、これがプロモーターの影響によるものか、高発現カセットが導入された場所やコピー数の影響によるものか、明確ではない。

次に、麴の経時変化を写真5に示す（左から順に、盛り込み時・培養24時間後・培養45時間後・培養62時間後）。

写真5. 麴の経時変化



写真5は enoA プロモーター株培養時のサンプルであるが、AOK 1 1 野生株およびその他のセルフクロニング株も同様で、時間の経過とともに乾燥により白く変化していった。培養後半は、菌糸により全体的により白くなっていったが、孢子形成はほとんど見られなかった。麴の水分は、数パーセントの差はあるものの、時間の経過とともに減っていく傾向は同じであり、菌株により特に大きな差は見られなかった。

3-6. 実用化規模の固体培養装置の制御開発（ワンパス制御の確立）

固体培養の際に注意しなければならないのが、雑菌による麴の汚染である。目的とする麴菌以外の雑菌が繁殖することにより、麴菌の生育や酵素生産に悪影響を及ぼすことがある。雑菌汚染の原因の1つが、空調設備自体（特にダクト内）の汚染である。これは培養時に送風する空気の一部または全部を再

利用（循環）することにより発生しやすくなる。雑菌汚染を防止するためには、送風する空気をワンパスにすること、すなわち除菌フィルターを通した清潔な空気を100%導入すると効果的である。

酵素生産を目的とする固体培養の現場では、送風空気のワンパス制御が望まれている。このワンパス制御は、循環している温湿度が整った空気を再利用せず、100%新鮮な外気を導入するため、送風空気の温湿度を管理するために、より複雑な制御システムが必要とされる。送風空気を再利用する場合は、還ってきた空気の温湿度は再送風する空気の温湿度と大きくかけ離れていないため、温湿度を微調整する程度で良い。しかし、100%新鮮な外気を導入する場合は、外気の温湿度によって送風する空気の温湿度が大きく影響を受けるため、目的の温湿度の空気を送風するための制御が非常に複雑である。

ワンパス制御を確立するため、通常の温度調整に用いる加温スチーム（生蒸気）に加え、装置の乾燥工程で用いているフィンヒーターと、昨年度導入した冷却設備を利用した。まず、吸気ダクトに設けられているフィンヒーターとウォーターコイルにより、外気を加温・冷却して大まかに温度調整した後、通常の温度調節に用いる加温スチームにより、送風空気の温度を微調整するようにした。さらに、送風空気の温度に大きく影響する湿度も同時に微調整できるような加湿制御方法（ベクトル加湿制御）を検討した。これにより、設備の追加や改造を行うことなく実用化規模の固体培養装置のワンパス制御を確立した。

3-7. 実用化規模の固体培養装置の装置開発（散水パイプの導入）

固体培養において、培養時間の経過とともに培地の水分が減少していく傾向がある。特に大型の固体培養装置では、麹菌の発熱による水分蒸発や、基質通風による水分蒸発により、麹の乾燥が顕著に見られる。酵素生産を目的とする固体培養の現場では、培養の途中で麹に加水することで水分を保ち、酵素生産を促すことがしばしばある。

本研究開発において、実用化規模の固体培養装置でも培養途中に加水できるように、散水パイプの導入を検討した（写真6）。

写真6. 散水パイプ



加水する上で重要なのは、麴に均一に散水すること、また散水後にパイプから滴を落とさないこと（滴が落ちると雑菌繁殖の原因となる）である。まず、均一に散水するために、噴霧量が異なる3つの高圧ノズルを設けた散水パイプを、手入れ機の（培養槽の回転方向の）上流側に配置した。それぞれ3つの高圧ノズルからは、粒子の細かい水が扇状に噴霧され、培養槽が一回転する間に内周側と外周側の麴が均等に加水されるように計算されている。なお、加水量は送液ポンプの周波数によって任意に変更できる。さらに、加水ムラが無いよう、散水後の麴はすぐ下流の手入れ機で攪拌される。また、必要量が散水された後、散水パイプの給水口に圧縮エアを供給し、散水パイプ内に残った水をすべて吐き出すことで、高圧ノズルの先端から滴が落ちないように工夫した。

3-8. セルフクローニング株の最適培養条件の検討

これまでに、実用化規模の固体培養装置を用いた複数のセルフクローニング株の培養において、目的とする酵素が高生産されることが明らかになった。本研究開発において、東北大学で取得したセルフクローニング株は40菌株以上ある。全菌株について実用化規模の固体培養装置で培養し、その麴の機能性を評価すること、そして各菌株の最適培養条件を検討することは困難である。そこで、全菌株の中から菜種油粕の分解に有効と思われる菌株3種類を選抜し、その3菌株の中から最も菜種油粕の消化促進効果が高い菌株と、その最適培養条件を特定することにした。実用化規模の固体培養装置で培養した3菌株の麴の機能性評価、すなわち菜種油粕の消化率の評価には、人工ルーメン法を用いた。まず、選抜した3菌株について培養初期の水分を検討し、その中で最も菜種油粕の消化促進効果が高い菌株および水分条件において、培養後半の品温を検討した。

3-8-1. 人工ルーメン法による菜種油粕の消化率の評価方法

菜種油粕の消化率を評価するため、人工ルーメン法を用いた。人工ルーメン法とは、牛などの反芻動物の第一胃（ルーメン）を人工的に再現し、*in vitro* で飼料の消化試験を行う方法の1つである。人工ルーメン法には、消化試験装置 ANKOM DAISY II インビトロインキュベーターを用いた（写真7）。

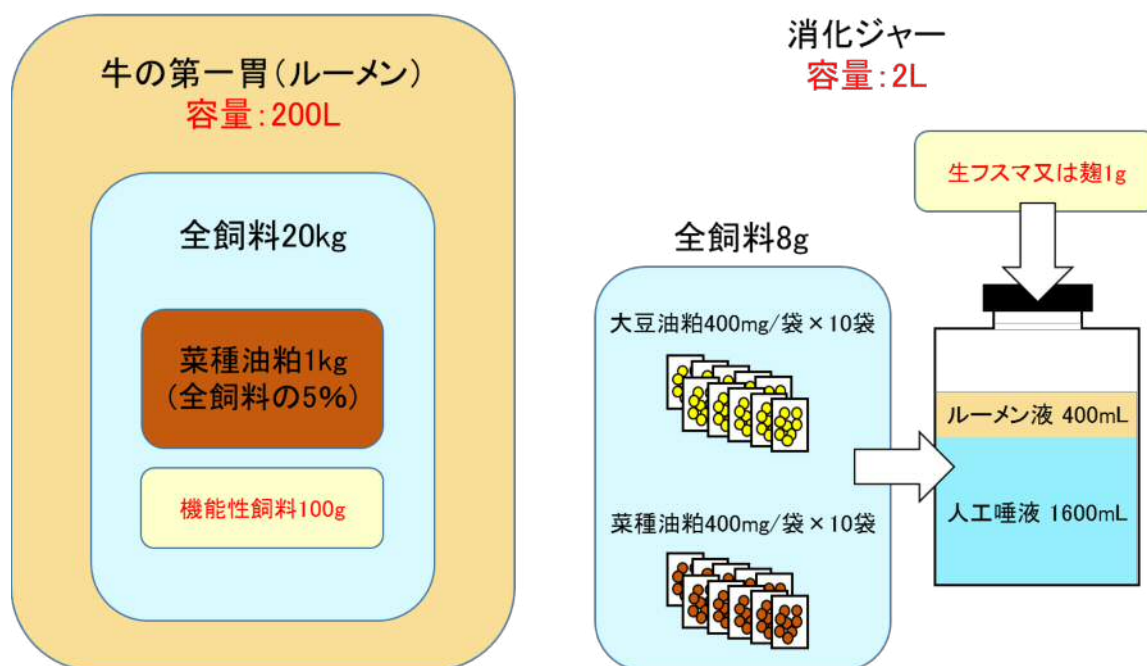
写真7. ANKOM DAISY II インビトロインキュベーター



インキュベーターには4個の消化ジャーがセットできる。消化ジャーはガラス製の瓶で、1個の消化ジャーにルーメンジュース（牛のルーメンより採取した胃液を濾したもの）400mL、人工唾液（牛の唾液を人工的に調製したもの）1600mL、消化させたい飼料を封入したサンプルバッグ（ポリエステル製メッシュバッグに飼料を封入したもの）を入れる。サンプルバッグに封入する飼料の種類やサンプルバッグの数は任意であるが、今回は消化率を比較したい菜種油粕と大豆油粕を400mg/バッグ封入したものを各10個ずつ消化ジャーに入れた。サンプルバッグと飼料はそれぞれ重量を正確に測定しておき、消化反応後の飼料の重量変化により消化率を算出する。今回は麴の機能性を評価するため、4個の消化ジャーに①生フスマ（コントロール）、②AOK11 野生株の麴、③および④セルフクローニング株の麴を各1gずつ添加した。そして最後に、消化ジャーをルーメンと同じ嫌気条件にするため二酸化炭素を封入して、39℃に保ったインキュベーターで48時間反応させた。

今回の人工ルーメン法における消化ジャーと実際のルーメンを比較するための模式図を示す（図6）。左がルーメン、右が消化ジャーを表している。ルーメンの容量が約200Lと考えると、消化ジャーはその1/100スケールの2Lである。牛が1日に摂取する飼料（濃厚飼料と粗飼料の合計）が約20kgとすると、菜種油粕の給餌量は多くても全飼料の5%（約1kg）程度である。また、機能性飼料は全飼料の0.5%（約100g）と仮定した。消化ジャーにおいて、機能性飼料に当たる麴（コントロールの場合は生フスマ）は、ルーメンの1/100である1gとした。

図6. ルーメンと消化ジャーの比較



予備試験において、セルフクローニング株の麴を用いて菜種油粕と大豆油粕の消化率を比較した。人工ルーメン法のマニュアル通りに試験を実施し、48時間反応後の消化率を測定した。セルフクローニング株の麴を添加した消化ジャーでは、生フスマを添加した消化ジャーに比べて、菜種油粕や大豆油粕の消化が促進されることが予想されたが、結果は4個の消化ジャーの間で消化率の差は無かった。これ

は、48時間の間に反応が完全に進み、消化率が頭打ちになっていると考えられる。

一般的に人工ルーメン法は、目的の飼料の最終的な消化率を飼料ごとに比較するために用いられる。したがって、本研究開発のように消化ジャーに添加物を加え、消化ジャーごとに飼料の消化率の差を見るためには、マニュアル通りの方法は適していないと判断した。そこで、反応が完全に進む前に消化率を測定するため、24時間反応後にサンプルバッグを回収した。しかし、24時間でも消化率は頭打ちになっていた（菜種油粕、大豆油粕ともに）。これは、ルーメン細菌の働きが活発なためと考えられる。そこで、消化ジャーに入れるルーメンジュースの量を減らすことにした。ルーメンジュースと人工唾液の比率はマニュアル通りとし、ルーメンジュースを水で希釈して使用することとした。ルーメンジュースを2～4倍希釈して予備試験を実施した結果、4倍希釈が最も24時間反応後の差が見やすいことがわかった。

本研究開発において、麴の機能性評価のための人工ルーメン法では、ルーメンジュースを水で4倍希釈して使用するとともに、菜種油粕および大豆油粕の各10個ずつあるサンプルバッグのうち、24時間反応後に各5個ずつ、48時間反応後に残りの各5個ずつを回収し、消化ジャーごとに菜種油粕および大豆油粕の消化率を比較することとした。

3-8-2. 培養初期の水分の検討

選抜した3菌株について培養初期の水分を検討した（選抜方法および選抜菌株の詳細は2-5項を参照）。初期水分60%（112%加水）と初期水分50%（70%加水）において、ベースの品温パターンで培養し、各酵素活性を測定した。その結果、初期水分60%よりも初期水分50%の方が目的の酵素の活性が高いことがわかった。多少酵素によって差はあるものの、この傾向は3菌株とも同じであった。なお、3-12株の酵素T1活性は検出することができなかった。また、菌体量および総タンパク質量に大きな差は見られなかった。今回の結果から、培養初期の水分を変えると酵素によって活性が異なる可能性があることが示唆された。

次に、これらの麴の機能性を評価するため、人工ルーメン法を実施した。そして、この酵素活性の違いが飼料に対する消化促進効果に影響するか確認した。その結果、初期水分50%よりも初期水分60%の方が菜種油粕の消化促進効果が高いことが分かった（コントロールの菜種油粕消化率に対し、初期水分50%は最大9.8%アップ、初期水分60%は最大12.5%アップ）。この傾向は3菌株とも同じであり、また大豆油粕に対しても初期水分60%の方が消化促進効果が高かった（コントロールの大豆油粕消化率に対し、初期水分50%は最大9.1%アップ、初期水分60%は+14.6%アップ）。人工ルーメン法におけるルーメンジュース（ルーメン細菌叢）の影響は大きく、試験のバッチが異なるとルーメンジュースの採取日も異なるため、バッチが異なる試験の消化率を比較することはできない。しかし、コントロールである生フスマを添加した消化ジャーと、麴を添加した消化ジャーの比較は可能である。今回の結果から、生フスマよりも麴を添加した方が飼料の消化促進効果が高くなること、またいずれのセルフクロニング株においても、初期水分50%よりも初期水分60%の方が飼料に対する消化促進効果が高くなることが示唆された。

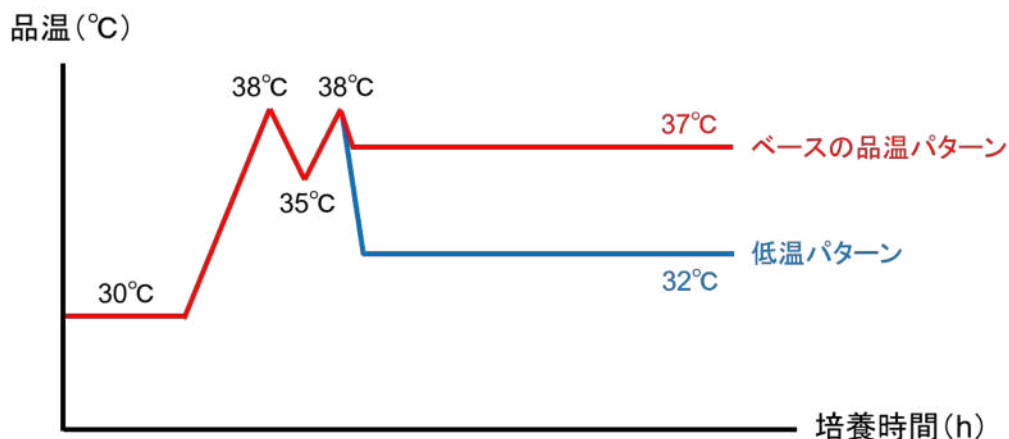
先述した通り、バッチが異なる試験の消化率を比較することはできない。したがって、3菌株の中で最も菜種油粕の消化促進効果が高い菌株を決定するため、改めてそれぞれ初期水分60%の麴を用いて

人工ルーメン法を実施した。その結果、3-1 2株が最も菜種油粕の消化促進効果が高いことが分かった。また、大豆油粕に対しても3-1 2株が最も消化促進効果が高かった。今回の結果から、初期水分60%で培養した場合、いずれのセルフクローニング株においてもAOK11 野生株より飼料に対する消化促進効果が高くなること、中でも3-1 2株が最も飼料に対する消化促進効果が高くなることが示唆された。

3-8-3. 培養後半の品温の検討

初期水分60%において、最も飼料に対する消化促進効果が高かった3-1 2株について、培養後半の品温を検討した。これまでベースの品温パターン（培養後半の品温37℃）で培養してきたが、酵素生産が盛んであると考えられる培養後半の品温を32℃に下げた低温パターンで培養した（図7）。そして、各酵素活性および飼料に対する消化促進効果がどのように変化するか評価した。

図7. 培養後半の品温の検討



3-1 2株において、ベースの品温パターン（後半品温37℃）と低温パターン（後半品温32℃）の各酵素活性を比較した。その結果、後半品温32℃の方が酵素X2活性が有意に高いことが分かった。今回の結果から、酵素生産が盛んであると考えられる培養後半の品温を変えると酵素によって活性が異なる可能性があることが示唆された。

次に、これらの麴の機能性を評価するため、人工ルーメン法を実施した。その結果、後半品温37℃よりも後半品温32℃の方が菜種油粕の消化促進効果が高いことが分かった（コントロールの菜種油粕消化率に対し、後半品温37℃は11.5%アップ、後半品温32℃は12.3%アップ）。しかし、大豆油粕に対しては、若干ではあるが後半品温37℃の方が消化促進効果が高かった（コントロールの大豆油粕消化率に対し、後半品温37℃は12.5%アップ、後半品温32℃は12.2%アップ）。後半品温の違いにより、酵素によっては活性が異なる可能性があることから、これらの麴の間で菜種油粕と大豆油粕に対する反応性に差が出たのかもしれない。

これまでの結果から、複合酵素を高生産するセルフクローニング株において、高発現させた目的の酵素の活性が高ければ、必ずしも菜種油粕の消化促進効果が高くなるとは言い切れない。そこで、目的の酵素以外の酵素活性についてもいくつか調べた。しかし、それらの酵素活性と菜種油粕に対する反応性の関係は見出されなかった。

本研究開発において、菜種油粕の消化促進に寄与する酵素は特定できなかったが、人工ルーメン法にて機能性を評価したどのセルフクローニング株においても、コントロールに比べて菜種油粕の消化促進効果があった。また、どのセルフクローニング株においても、AOK11 野生株に比べて同等以上の菜種油粕の消化促進効果があった。これらのことから、まだ活性を測定していない未知の酵素と、高発現させた酵素の一部が複合的に働き、菜種油粕や大豆油粕の消化を促進していると考えられる。

第3章

全体総括

本研究開発において、PCR 法により発現カセット作製と 2 種類の麹菌由来の選択マーカーを利用することにより、複数の酵素を同時に高生産可能とするセルフクローニング株を取得することができた。この手法によれば、利用できる麹菌の形質転換用の選択マーカーの数を検討する必要があるものの、多数の酵素高発現カセットを導入したセルフクローニング株を得ることができると考えられる。本研究開発では菜種油粕に着目し、菜種油粕分解性をアップさせるために、阻害成分 T および PA と有効成分 X および P の分解に有効な酵素の組み合わせを検討した。今後も菜種油粕の他にもバイオマス系の食品加工副産物や廃棄物などの分解に有効な酵素が多数見出されれば、本手法を利用して複数の酵素を同時に高生産できるセルフクローニング株の造成が可能となる。

また、本研究開発において新たに開発した固体培養法とその制御は、これまでの固体培養の問題点①均一で再現良く培養することが困難である、②培養状態を任意に制御することが困難である、という培養法としての致命的な欠点を克服し、均一で再現良い培養と任意制御、これによる安定した酵素生産を可能としたことに大きな意義がある。そして、菜種油粕の分解に効果がある複合酵素を評価選択した上で、それらを様々な組み合わせで同時に生産できる麹菌を育種し、本固体培養法に適應させ生産性を評価するとともに、固体培養条件の最適化により、複合酵素の同時高生産を達成することができた。さらに、培養後に適切に乾燥させることにより、培養物の保存流通も含めた安定性を確保できることも確認できた。すなわち、これら一連の新たな技術開発を実現すると同時に効果を実証することに成功した。

最終目標である「複合酵素の大量生産」は、実用化規模の固体培養装置により実現された。すなわち、本研究開発において、初めてセルフクローニング麹菌と大型化かつ自動化された固体培養装置を組み合わせた新しい固体培養技術の開発に成功した。事業化可能な培養スケールにおいて、セルフクローニング麹菌の大量培養に成功したことで、セルフクローニング麹菌と大型化かつ自動化された固体培養装置を組み合わせた新技術の実用化は大きく前進したものとする。本研究開発において、菜種油粕の消化促進に寄与する酵素は特定できなかったが、人工ルーメン法にて機能性を評価したどのセルフクローニング株においても、コントロールに比べ菜種油粕の消化促進効果があった。また、どのセルフクローニング株においても、AOK11 野生株に比べて同等以上の菜種油粕の消化促進効果があった。これらのことから、麹菌が生産する未知の酵素と、高発現させた酵素の一部が複合的に働き、菜種油粕の消化を促進していると考えられる。さらに、その効果は菜種油粕だけでなく大豆油粕にも見られた。したがって、菜種油粕以外の飼料に対しても消化促進効果が大きいと期待できるものとする。

以上