

1Mp01 有用物質生産菌の中核代謝強化に関する基盤研究

○横田 篤
(北大院・農・微生物生理学)
yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp

生物反応を利用するバイオプロセスは、化学反応に比べて反応速度が遅いこと、低収率であることが実用化の妨げになっている。このため演者は大腸菌 K-12 株とグルタミン酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* を用い、物質生産活性の強化に関する基盤研究を展開してきた。その要点は、(1) 中核代謝の強化により発酵原料の速やかな消費と前駆体供給の増強を図る点、また、その実現手段として「エネルギー代謝制御」の有効性を実証した点である。今日、有用物質発酵生産の効率化研究において、中核代謝カーボンフローの強化や NADH 等の補酵素リサイクルの円滑化は常套手段であるが、演者の研究がその端緒を拓いたといっても過言ではない。さらに、(2) エネルギー代謝制御にともなう大腸菌とグルタミン酸生産菌の代謝変動に関して、多くの新知見を得て両者の代謝特性の差異を明らかにし、発酵工業上ならびに学術に貢献した。

1. 大腸菌

1970 年代までの研究で、本菌の中核代謝は解糖系酵素の ADP や AMP による活性化、ピルビン酸脱水素酵素複合体や TCA サイクル酵素の NADH による阻害など、エネルギー代謝関連物質により制御されることが示されていた。演者は細胞のエネルギー充足度の低下が中核代謝の活性化につながると予想し、エネルギー獲得の最重要システムである酸化的リン酸化の抑制を試みた。酸化的リン酸化は呼吸鎖によるプロトン駆動力の形成と、それを用いた F_0F_1 -ATPase による ATP 合成の二段階からなっており、それぞれをターゲットとして検討した。

1-1. F_0F_1 -ATPase 欠損株：本酵素欠損株のエネルギー獲得は基質レベルのリン酸化に依存する。このため、生育の著しい低下が懸念されたが、実際には解糖反応（基質レベルのリン酸化）の上昇により実用レベルの生育が確保され、ピルビン酸生産菌に応用した場合には、生産効率が大幅に改善された。その後、野生株から別に構築した単純な欠損株を連続培養して、網羅的解析を含む生理学的解析を行った。その結果、解糖フラックスの増大、TCA サイクルフラックスの抑制、呼吸活性の上昇、それらを説明する多くの遺伝子発現の変動が観察され、それまで未解明であったエネルギー欠乏ストレスに対する大腸菌の恒常性維持機構が明らかにされた¹⁾。

1-2. 呼吸鎖変異株：プロトン駆動力の形成効率を低下させる呼吸鎖変異を導入した場合には、菌体当たりの糖消費活性が上昇し、プロトン駆動力形成効率と糖代謝活性の間に負の相関が観察された。さらに呼吸鎖酵素の活性変動や代謝産物の変動についても新知見が得られるなど、大腸菌のエネルギー代謝と物質生産の新たな理解に貢献した²⁾。

2. グルタミン酸生産菌

大腸菌の知見から類推し、 F_0F_1 -ATPase 欠損株を取得したところ、本菌の場合にも菌体当たりの糖消費活性や呼吸活性が増大した。その後、欠損株の糖代謝活性の上昇機構について、網羅的解析や生化学的解析を行ったところ、大腸菌とは異なる興味深い変化を見出した。最大の特徴は TCA サイクル酵素の発現増大であり、なかでも本菌に特徴的なリンゴ酸とオキサロ酢酸間のシャトル反応に共役した NADH 再酸化系の発現上昇が顕著であった。さらにピルビン酸と乳酸間のシャトル反応に共役した NADH 再酸化系の発現上昇や、呼吸鎖成分の特徴的な変動が見出された。これらの変化は呼吸活性の上昇を説明するのみならず、TCA サイクルの頑強性を示しており、本菌が本質的に TCA サイクル関連中間体の発酵生産に適していることが示唆された³⁾。

- 1) J. Bacteriol. **188**:6869-6876 (2006).
2) J. Biotechnol. **158**:215-223 (2012).
3) J. Biosci. Bioeng. **113**:467-473 (2012).

Fundamental studies on the enhancement of central metabolism in bacteria producing useful metabolites

○Atsushi Yokota
(Lab. Microb. Physiol., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, central metabolism, H^+ -ATPase

1Mp02 新規液体麹の開発と発酵飲食品への展開

○小路 博志¹, 杉本 利和², 舩田 晋¹, 上野 貴生³
(¹アサヒビール株式会社, ²ニッカウキスキー株式会社, ³アサヒフードアンドヘルスケア株式会社)
hiroshi.shoji@asahibeer.co.jp

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（固体麹）と、水に原料及びその他の栄養源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（液体麹）がある。固体培養法の特徴は、醸造に必要な多種類の酵素を大量に生成できるが、大規模生産に不向きであること、麹原料は蒸すことが可能な小片であり、麹菌が生育しやすいように原料内部がある程度露出している必要がある。液体培養法の特徴は、培養制御や品質管理が容易で、大規模生産にも適し、麹原料も選択しないが、アミラーゼ、セルラーゼ等の複数の酵素を同時に大量生産させることが困難であることが知られていた。液体培養法では培地が攪拌されているため、酵素が少量生産された時点で、培地原料の分解が急激に進む。特にデンプン分解に伴い生成するグルコースにより、糖質分解酵素等の生産が抑制されることが知られていた。

我々は、発酵飲食品分野ではあまり使用されてこなかった液体麹技術を完成させ、産業上の有効性やフレキシビリティの高さを生かし、様々な産業分野に応用しようと考えた。

まずは焼酎用白麹菌を用いた、焼酎用液体麹の開発に取り組んだ。焼酎醸造はバクテリアの増殖を抑制するため、低い pH にて発酵させる。このような発酵条件での糖質分解の鍵酵素となるのは耐酸性 α -アミラーゼである。しかしながら、耐酸性 α -アミラーゼを工業スケールの液体培養法で生産する事は報告されてなかった。他にも、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼも必要である。各種基質が誘導に必要であろうと推測されるし、グルコース濃度を高めすぎないことも重要であろうと考えられた。結論として、固体培養法では通常あまり用いられない未精白大麦（玄麦）を用いると、耐酸性 α -アミラーゼに加え、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、セルラーゼが固体麹並みに高生産された。遺伝子解析、メタボローム解析により、玄麦を麹原料に用いることにより、培養中の麹原料溶解を緩やかにさせ、麹菌の増殖を抑制しながら培養させていることが判明した。この液体麹を用いて、ラボレベルで焼酎を生産すると、固体麹を用いた場合と同様に発酵が進んだ。出来上がった焼酎の品質も差が認められなかった。スケールアップ検討を進め、現場レベルでも容易に液体麹を生産できるシステムを構築した。

以降様々な発酵飲食品への展開を進め、以下のことが判明した。我々が開発した技術の第一の特徴として、穀皮にて覆われた状態の穀類（玄大麦、粳穀付米や玄米、未加工の豆類・イモ類・雑穀等）を液体培地原料として用い、各種酵素を高生産させることが挙げられる。第二の特徴として、各麹菌（白麹菌、黒麹菌、黄麹菌、紅麹菌）を用いて、各種酵素の高生産が可能であることが挙げられる。これら液体麹を用いて、焼酎、清酒・甘酒・しょうゆ・みそ・みりん・醸造酢等の発酵飲食品を生産できた。従来品と同等の品質とすることも可能であるし、麹原料や麹菌株により（酵素バランスや得られた麹の香気が変化する）、新しい香味を有する発酵飲食品の開発も可能となる。この技術に応用した新しい提案である「本格麦焼酎のか」も上市した。無蒸煮発酵原料を用いたエタノール生産についても検討しており、引き続き新しい展開を模索していきたいと考えている。

Development of a novel submerged culture of *koji* mold and its application

○Hiroshi Shoji¹, Toshikazu Sugimoto², Susumu Masuda¹, Takao Ueno³
(¹Asahi Breweries, Ltd., ²The Nikka Whisky Distilling Co., Ltd, ³Asahi Food & Healthcare Co., Ltd)

Key words submerged cultivation, *Aspergillus*, enzyme, fermentation