

# 固体培養技術の社会実装チャレンジ -麴の有用性と未来像-

## シンポジウムレポート<前編>

岡山大学微生物インダストリー講座（共催：株式会社フジワラテクノアート、おかやまバイオアクティブ研究会）は11月1日、岡山大学津島キャンパスで、会場とオンラインのハイブリッド形式のシンポジウムを開催しました（おかやまバイオアクティブ研究会 第65回シンポジウムと同時開催）。

微生物インダストリー講座は、株式会社フジワラテクノアート（以下、フジワラテクノアート）からの寄付により2022年4月、岡山大学に開設されました。講座開設を記念して開催された第1回シンポジウムから3回目となる今回のテーマは、『固体培養技術の社会実装チャレンジ-麴の有用性と未来像-』。当日は、日本最大のフードテックイベント「Smart Kitchen Summit (SKS) Japan」の立役者である外村仁氏もサプライズゲストとして駆けつけてくれました。3人の登壇者と外村氏による講演、総合討論の模様をレポートします。

### はじめに

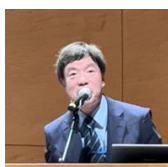
岡山大学の那須保友学長は開会の挨拶で、「アップサイクルをキーワードに開催した第2回シンポジウムから1年が経ち、第3回となる今回は、科学技術の力でアイデアを社会実装まで持っていこうという新たなチャレンジを掲げています。麴菌は大きなポテンシャルを秘めています。そこから新たな価値を生み出すことが重要です。社会実装に向けた新たな挑戦を岡山大学としてサポートします」と語りました。フジワラテクノアートの藤原加奈代表取締役副社長は、「先日、SKS Japanに参加して、日本のフードテックの可能性の中心に発酵があると感じました。未来に向けたワクワク感に触れ、背中を押されました。発酵は、日本人が大事に育んできた技術です。発酵業界で培ってきた技術をフードテックにつなげることで、日本発のフードテックを盛り上げていきたい」と意気込みを述べ、「本日のシンポジウムの内容が、参加者の皆様方の新たな商品開発や視点につながり、さらには日本と世界の食文化の発展、そして心豊かな循環型社会の実現につながるものと期待しております」と結びました。



### 麴菌の多様性が生み出す新たな醸造の世界と食文化

最初の登壇者は、大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻 麴菌育種工学寄附講座 教授の楠本 憲一氏。「麴菌の多様性が生み出す新たな醸造の世界と食文化」をテーマに講演いただきました。

麴菌は、醤油や味噌をはじめとする日本の伝統的な発酵食品に欠かせない微生物です。本日は、多様な酵素活性に着目した事例、野外由来株の分離と利用、そしてアップサイクル麴という新たな可



能性に焦点を当て、麴菌の多様性とその利用について近年の研究成果も交えながら紹介します。

麴菌は、日本の食品醸造・製造に使用される糸状菌の総称で、*Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*)、*Aspergillus sojae* (*A. sojae*)、*Aspergillus luchuensis* の3種が代表的な菌種です。麴菌は和食の風味形成に大きく貢献しており、近年では麴菌ハムや麴菌熟成チーズなど、新たな食品への応用も広がっています。

### α-グルコシダーゼの多様性

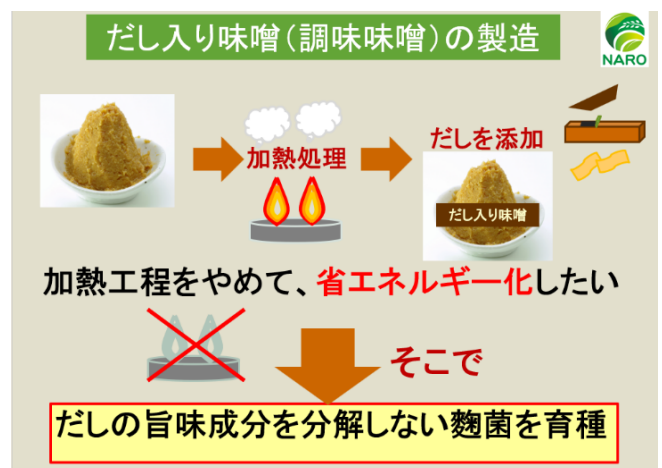
麴菌が持つα-グルコシダーゼは、マルトースなどのα-1,4-結合を加水分解するだけでなく、糖転移反応によってイソマルトトリオースなどのオリゴ糖を生成します。*A. oryzae* と *A. sojae* のα-グルコシダーゼでは、活性中心近傍のアミノ酸が1つ異なるだけで、イソマルトトリオースの生成量が大きく変化することが報告されています。わずかな遺伝子変異が酵素活性に影響を与え、食品の風味に多様性をもたらすことが示唆されます。

### 硝酸態窒素代謝の多様性

実用麴菌株の中には、硝酸塩の取り込みがうまくいかない菌株が稀に存在します。これは、硝酸の細胞内への取り込みに関わるトランスポーター遺伝子の変異が原因であることが明らかになっています。この変異は実用上の問題とはなっておらず、麴菌の多様性を示す一例と言えるでしょう。

### だし入り味噌製造における麴菌の利用

だし入り味噌の製造工程では、味噌に加熱処理を施してからだしを添加する必要があります。加熱処理せずにだしを添加すると、味噌に含まれる麴菌由来の酵素がだしの旨味成分を分解してしまうからです。そこで、われわれは、旨味成分分解酵素活性が低い麴菌株を選抜し、育種することで、加熱処理せずにだし入り味噌を製造する方法がないかを探るプロジェクトを行いました。500株以上の保存株を調査し、通常の菌類の約1/100以下のうまみ成分分解量となる麴菌を選抜した結果、加熱処理が不要なだし入り味噌用株の育種に成功しました。本株は当初は豆味噌用として開発されましたが、米味噌用についても酸性ホスファターゼという酵素の変異株を利用することで、加熱処理不要なだし入り味噌製造が可能になることがわかってきました。



## 一 麴菌熟成チーズの開発

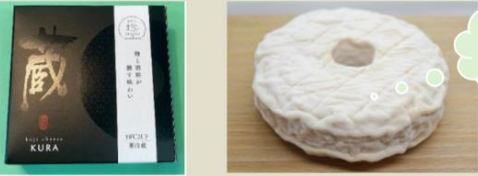
続いて、麴菌熟成チーズの開発について紹介します。日本獣医生命科学大学の佐藤薫先生を筆頭に、樋口松之助商店、蔵王酪農センター、農研機構と麴菌熟成チーズ「蔵」を開発した事例です。

チーズにさまざまな麴菌を接種してみたところ、他の麴菌株に比べてリパーゼ活性が低く、プロテアーゼ活性が高いという特徴を持つ菌株が見つかりました。その菌株は、ブルーチーズやカマンベールチーズと同等ないしより高い酵素活性があるうえ、独特の臭気を発する酪酸の生成も抑制できます。したがって、日本人好みの風味を持つチーズを開発できました。日本発の発酵食品が新たに加わったといえるでしょう。

### 麴菌の多様性とその利用

Osaka Univ

- 乳業メーカーなども参加して**麴菌チーズ用菌株と麴菌熟成チーズを開発**  
(代表者：日本獣医生命科学大学 佐藤薫先生)



固体培養!

(Suzuki et al. 2021, Tomita et al. 2022, Hagi et al. 2022, Hayashida et al. 2023)

日本獣医生命科学大学、樋口松之助商店、蔵王酪農センター、農研機構との共同研究

## 一 野外由来麴菌株の分離と利用

近年、各地の醸造産業振興を目的として、地域独自の麴菌株を探索する動きが活発化しています。われわれの寄附講座の研究にも、野外の菌株から麴菌がどのように進化して“家畜化”したかを探索の研究があります。

野生由来のアスペルギルスから菌株を分離するうえでは、毒素非産生菌である麴菌と、農産物汚染・食品汚染・飼料汚染の原因となるアフラトキシン産生菌とを明確に区別する必要があります。しかしながら、両者は形態的に非常に似通っています。

そこで、詳細に調べた結果、約 20 段階の酵素反応によって複雑な構造の有機化合物アフラトキシンが合成されることがわかりました。また、おおよその遺伝子の酵素反応産物もわかっています。われわれの研究では、麴菌とその類縁菌であるアフラトキシン産生菌との遺伝子構造の違いを世界で初めて解明し、麴菌の家畜化過程の一端を提唱できました。

その後さらに解明が進み、ゲノム配列レベルで *A. oryzae* 株と判断できるようになりました。新潟県との共同研究では、土壌や稲穂から分離した麴菌株のゲノム解析を行い、既知の *A. oryzae* 株とは異なる系統の株を発見しました。例えば、新潟県の佐渡島で分離された試料は、オリゼ株の配列を特徴づけるゲノム配列を持ちながらも、どの系統にも属さない新系統の菌株が発見されました。

このように、野外環境には多様な遺伝的背景を持つ麴菌が存在することが示唆されています。今後も、さまざまな菌株が野外環境から分離され、新たな機能を持つ麴菌が見出されることを期待しています。

## 一 麴菌利用の未来像「アップサイクル麴」

最後に、3D バイオプリンティング技術と麴菌発酵を組み合わせた、新たな麴菌の固体培養法について紹介します。特許出願済みの同技術は、米飯等に水を混ぜて練り、成形可能にしたものを 3D プリンタにインプットして成形することで、穀類ではなく粉体を使って固体培養を実現できる技術です。

この技術を用いることで、穀物以外の基質を用いた麴の製造が可能になります。気候変動で気温が高温化するなか、米の生産量が減少し、

味噌などの製造にも影響が出ています。穀類を使わずに麴菌の固体培養ができる新たな技術は、食料安全保障に貢献できる技術であり、海外市場に展開できる可能性も秘めています。また、食品副産物を発酵食品の原料としてアップサイクルし、フードロス削減にも貢献できるのではと期待しています。

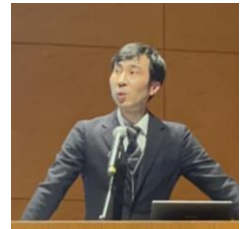
## 一 まとめ

麴菌は、多様な酵素活性を持ち、さまざまな発酵食品の製造に利用されています。また、伝統的な利用だけでなく、3D プリンティングのような新たな技術と掛け合わせるにより、さらなる可能性も広がっています。今後、麴菌の多様性がより深く理解され、食文化のさらなる発展に貢献することが期待されます。

## 「日本の食文化を守り育てるために、麴発酵ができること」

楠本氏に続く登壇者は、株式会社ぐるなびイノベーション事業部 新規事業推進室の澤田和典氏。「日本の食文化を守り育てるために、麴発酵ができること」をテーマに講演いただきました。

ぐるなびは、「日本の食文化を守り育てる」という創業からつなぐ想いと、「食でつなぐ。人を満たす。」という存在意義のもと、さまざまな事業を展開しています。今回は、麴発酵を中心に食文化調査の内容を紹介するとともに、東京科学大学（旧・東京工業大学）との共同研究による麴菌のゲノム解析、そしてゲノム情報を活かした産業応用への取り組み事例についてお伝えできればと思います。



## 一 ぐるなびの取り組み

ぐるなびは、飲食店情報サイト「楽天ぐるなび」の運営をはじめ、優れた日本の食文化を記録する「今年の一皿」や若手料理人コンペティション「RED U-35」、訪日外国人向け観光情報サイト「LIVE JAPAN」など、食文化振興のための多様な事業を行っています。これらの事業はすべて、「日本の食文化を守り育てる」という創業からつなぐ想いに基づいています。

2016 年からは東京科学大学と共同で、日本の食文化の基盤である発酵に着目し、発酵微生物科学に基づく新たな価値創造を目指した「ぐるなび食の価値創成共同研究講座」を立ち上げました。

## 一 食文化調査

2017 年から 2019 年にかけて、東京工業大学と長浜バイオ大学の学生計 59 名が中心となり、25 道府県の発酵性調味料、漬物、郷土料理を対象とした食文化調査を実施しました。調査対象には、味噌、醤油、日本酒など、日本全国で広く見られる麴発酵食品もあれば、かんずりやなれずしのように特定の地域に固有の食品も含まれます。本日は、味噌となれずしの調査結果に焦点を当ててご紹介いたします。

## 麴発酵食品の地域比較



- 日本各地に特徴的な味噌文化
  - 「兵糧」を起源とする味噌は辛口
    - 各地の戦国武将が徳川東康の好物だった「八丁味噌」を手本にした、という話が各地に伝わる
  - ハレの日の食事や経済商品を起源とする味噌は甘口
    - 「甘さ」には価値があった
    - 贅沢な食事の材料として利用された



出典：食の価値創成共同研究講座食文化調査

味噌は地域によって辛口と甘口に大別され、その分布は関ヶ原を境に東西で異なる傾向が見られました。東日本には、兵糧食に由来する辛口の味噌が多い一方で、西日本には、宮中の料理や外貨を稼ぐための商品として使われる甘口の味噌が広く普及しています。甘口味噌は、贅沢な食品としての役割を担っていたようです。

また、なれずしは魚を保存するための発酵技術ですが、地域によって乳酸発酵のみを用いるところと、麴を併用するところがありました。温暖な地域では麴を使わない傾向があり、これは麴の効きすぎを防ぐためと考えられます。一方、麴をつかう寒冷な地域でも、麴の使用量には地域差がありました。米の生産が難しい地域では使用量が少なく、米が豊富に手に入り、麴を多用できるということは、豊かさの象徴とされていました。

これらの調査結果は、麴が日本の食文化において豊かさや価値の象徴として重要な役割を果たしてきたことを示しています。しかし、現代社会においては「麴は豊かさの象徴」と聞いてもピンとこないかもしれません。それは、社会的な価値観が変容しているからであり、伝統的な食文化の継承が難しくなっていることにつながっているのでしょう。先人の知恵に学び、伝統的な技術と食文化を守り伝えていくことが重要です。

### 一 麴菌のゲノム解析

東京工業大学との共同研究では、日本の主要な種麴屋から提供された約 100 株の麴菌を用いてゲノム解析を行いました。解析の結果、麴菌の遺伝子のクラスタ分けは、酒、味噌、醤油といった麴の用途によってゆるやかに分けられることが明らかになりました。味噌麴と酒麴の差は明確ではありませんが、こと醤油に関しては、他の用途のものと明確に区別されました。

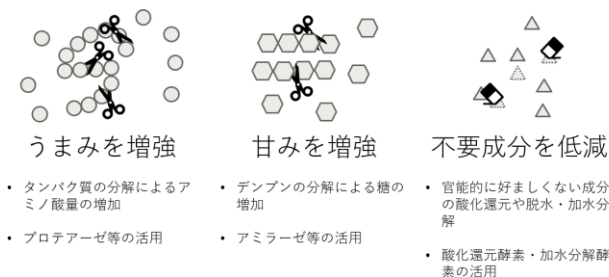
また、解析の結果から、麴菌に共通する、重要な役割を果たす単一コピー遺伝子に関して、株間の違いはとても小さいことがわかりました。これは、種麴屋さんが代々、重要な形質を担う遺伝子が変質しないよう、麴菌を大切に育種してきたことを示唆しています。

これらの結果は、遺伝子全体のほんの 15% の情報をもとにした部分的な結果にすぎません。しかしながら、ゲノム解析によってこれだけの知見が得られました。これらの知見は、新たな麴菌の開発や既存の麴菌の改良に役立つ可能性がありますし、残り 85% の情報からさらなる知見が得られる可能性もあります。これまで慣習的に定められてきた用途とは異なる用途で麴菌が使われることで、新たに花開く可能性もあるでしょう。

### 一 ゲノム情報を活用した食品開発

ゲノム情報は、食品開発においても有用なツールとなります。我々は、麴菌を用いたうまみ増強、甘み増強、不要成分低減といった食品開発の試みを行っています。今回は、うまみ増強の成功例と不要成分低減の失敗例をそれぞれご紹介します。

麴発酵を新規食品開発に活かす



0307

23

うまみ増強の例として、不二製油と共同研究で豆乳チーズ「ソイデリス麴」を開発した例が挙げられます。この商品開発では、ゲノムデータと発酵データ（代謝産物のデータ）を組み合わせてスクリーニングと官能評価を重ねることで、最適な麴菌株を選抜しました。その結

果、乳酸菌と麴菌のダブル発酵により遊離アミノ酸が従来の約 6 倍になった豆乳クリームチーズを開発、上市することに成功しました。

一方、不要成分低減の試みとして、豆乳の豆臭さを解消する取り組みを行いました。麴菌株によって官能評価に有意な差が出たものの、大豆臭の低減には差がなく、さらには官能評価者の和食文化との関わり方によって味覚の感じ方に有意な差が出ることも明らかになりました。また、大豆臭を低減しようとする、大豆臭とは関係ない「渋み」が増加してしまう傾向があり、一つの形質のみを麴発酵で改善する難しさにも直面しました。

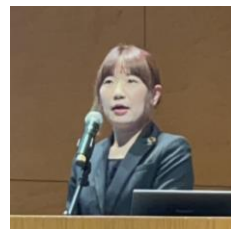
### 一 まとめと今後の展望

日本の食文化における麴の役割と、ゲノム解析による麴菌の理解、そして食品開発への応用について述べてきました。麴発酵は日本の食文化を支える重要な技術であり、日本各地に脈々と受け継がれてきました。ゲノム解析からは、種麴屋さんが麴の重要な遺伝的形質を不断の努力によって維持してきたことが見えてきました。そんな麴を使った発酵を、いかに食品開発に活かせるかは、アイデア次第です。これまでの麴菌の使い方には固定観念が潜んでいるかもしれませんし、これまでと異なる使い方によって新たな価値を生み出せる可能性もあります。文化は、受け入れられることで受け継がれていきます。麴発酵の技術と食文化を守りながらも、今の時代に合わせた変化も求められているのかもしれません。

### セルフレコーディング麴菌を用いた飼料酵素の高効率生産に関する研究

3 人目の登壇者は、株式会社フジワラテクノアート プロセス開発部課長の妹尾佐都子氏。フジワラテクノアート株式会社(岡山県岡山市北区)は、創業 91 年の醸造機械、食品機械、固体培養関連機器等の設計・開発・製造・販売を行う機械メーカーです。国内外の大手食品・醸造メーカー 1500 社以上と取引があり、主力製品である製麴装置は国内シェア約 80% を誇ります。

同社は、長年培ってきた麴菌の固体培養技術を醸造以外の分野にも応用すべく、さまざまな取り組みを行っています。講演では、その一例として、「畜産飼料への応用を目指した複数のバイオマス分解酵素を高生産するセルフレコーディング麴菌株の造成」について報告しました。



### 一 研究の背景

本研究開発は、平成 27 年度に採択された戦略的基盤技術高度化支援事業(旧サポイン事業)を契機に始動しました。当時、国内で過剰に未利用資源として残されていた菜種油粕の有効利用が課題となっていました。そこで、本研究では、油粕の分解を促進する複合酵素を麴菌の固体培養によって高生産させることで、この課題の解決を目指しました。本事業は、フジワラテクノアートを中心に、東北大学、岡山大学、岡山県工業技術センターと共同で、約 3 年間にわたり取り組んできた事業です。

### 一 飼料酵素の選定とセルフレコーディング技術

われわれはまず、飼料添加物に指定されている 13 種類の酵素に着目しました。飼料添加物とは、飼料の栄養成分の有効利用を促進する飼料酵素ことです。これらのうち 12 種類は麴菌 (*Aspergillus oryzae*) が関連遺伝子を保有していることが知られています。麴菌は、固体培養において高い酵素生産能力を有します。われわれは、麴菌のさらなる生産性向上を目指し、セルフレコーディング技術に注目しました。

遺伝子を高発現させる技術としては、一般的に、遺伝子組換え技術が用いられます。しかしながら、異種生物間の遺伝子組換えは GMO に該当し、実用化において安全対策や設備面での課題が生じます。一方、セルフクロニング技術なら、同種生物内での遺伝子組換えであるため、GMO に該当せず、過度な安全対策は不要になりますし、培養装置の大型化も可能になります。本研究では、この安全なセルフクロニング技術と長年培われてきた固体培養技術を組み合わせることで、飼料酵素の効率的な生産を目指しました。

### 一 研究の目的

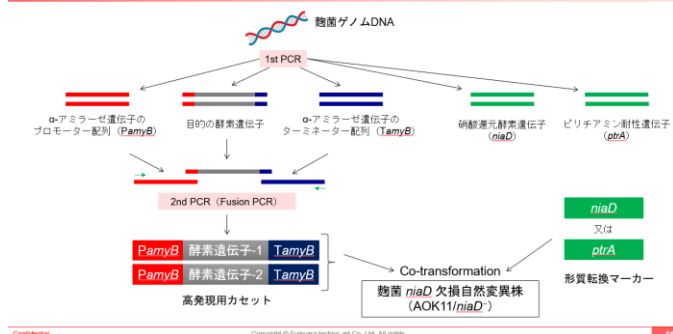
*Aspergillus oryzae* の強力な発現プロモーターである *amyB* プロモーターを用いて、フィターゼ、キシラナーゼ、ポリガラクトクトロナーゼ、パクチンリアーゼの 4 種類から 2 種類または 3 種類を同時に高生産するセルフクロニング麹菌株を造成すること、そして、造成された菌株の酵素生産性を評価し、「飼料酵素の効率的な生産」という最終目標を踏まえて、これらの菌株の産業的価値を示すことを目的としました。

### 一 セルフクロニング麹菌株の造成

セルフクロニング麹菌株の造成では、PCR 法を用いることとしました。

1st PCR では、*A. oryzae* ゲノム DNA から  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のプロモーター配列とターミネーター配列、そして目的の酵素遺伝子の断片を増幅します。同時に、形質転換マーカーとして、硝酸還元酵素遺伝子(*niaD*)とピリチアミン耐性遺伝子(*ptrA*)を増幅しました。2nd PCR では、1st PCR 産物を混合し、フュージョン PCR により高発現カセットを作成しました。その後、任意の 2 種類の高発現カセットと *niaD* 断片を混合し、麹菌の *niaD* 欠損自然変異株である AOK11/*niaD* に導入し、コ・トランスフォーメーション (Co-transformation) をしました。

### PCR法を活用したセルフクロニング麹菌株の造成



この結果、2 種類の高発現カセットとマーカー全てが導入されたダブルセルフクロニング株 (2-4 株) が得られることになります。仮にどちらか一方のカセットだけが導入された場合、1 つの遺伝酵素だけが高発現するシングルセルフクロニング株が得られます。そうした場合には、続く 2 回目の形質転換で得られたシングルセルフクロニング株を親株として用い、1 回目とは異なる組み合わせの高発現カセットを 2 種類、そしてもう一方の変質転換マーカー *ptrA* を同時にトランスフォーメーションします。最終的に 2 回行うことで、3 つの酵素遺伝子が高発現したトリプルセルフクロニング株 (3-26 株) が得られることになります。

### 一 酵素生産性の評価

次に、高発現酵素の mRNA の発現解析を行いました。実験方法としては、YPM 液体培地に培地 50mL あたり分生子  $2.0 \times 10^6$  個を植菌し、30°C で 24 時間振盪培養して得られた麹菌の菌糸体から速やかに抽出した mRNA を用い、リアルタイム PCR によって発現解析しました。解析の結果、造成されたセルフクロニング株には、ワイルドタイプに比べて、目的の酵素遺伝子が高発現していることを確認できまし

た。結論として、安全性、そしてセルフクロニング麹菌株の獲得効率、および目的の遺伝子の発現効率の高さから、この手法の有効性は高く評価できると考えます。

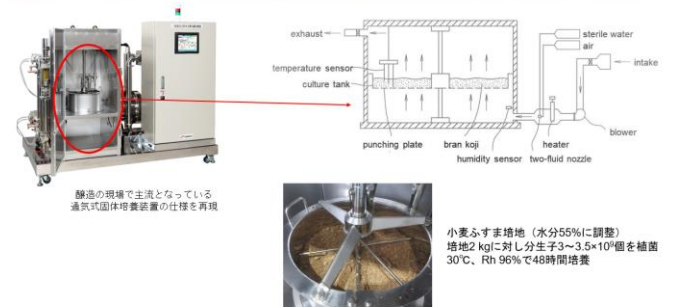
### 一 セルフクロニング麹菌株の酵素生産性の評価

セルフクロニング麹菌株の酵素生産性の評価も行いました。まずは、先ほどと同様に YPM 液体培地を用いて一般的な液体培養における酵素生産性を評価したところ、得られたセルフクロニング株それぞれについて、目的の酵素、遺伝子、酵素活性がワイルドタイプと比較して高いことがわかりました。この酵素活性の測定結果は、前に示した RNA 発現解析の傾向と一致しています。

続いて、固体培養(小麦フスマ基質、水分含量 55%および 65%)による酵素生産性を評価しました。結果、得られたセルフクロニング株それぞれについて、目的の酵素の活性が高く、液体培養の傾向や RNA 発現解析の傾向とも一致していることがわかりました。

最後に、パイロットスケール固体培養装置(通気式)を用いた固体培養の酵素生産性を評価しました。こちらも、得られたセルフクロニング株それぞれについて、目的の酵素の活性がワイルドタイプより高いこと、液体培養の傾向や RNA 発現解析の傾向とも一致していることがわかりました。また、先ほどの固体培養の結果と比較すると、菌体量と各酵素の活性いずれについてもより高い値を示していることがわかりました。通気式固体培養は、フラスコ培養の無通気式の固体培養に比べて菌増殖がより制御され、より活発に行われた結果、目的の酵素生産がより効率的に行われたためであると考えられます。

### パイロットスケールの固体培養装置



醸造の現場で主流となっている通気式固体培養装置の仕様を再現

### 一 まとめ

PCR 法を用いて、同時に複数の酵素を高生産できるセルフクロニング麹菌株を多数造成することができました。また、通気式の固体培養装置を用いることで、これらのセルフクロニング麹菌株が目的の酵素を効率よく高生産できることを確認しました。これらの結果は、セルフクロニング麹菌が飼料酵素の効率的な生産手段となり、畜産分野において産業的価値の高い菌株であることを示唆しています。フジワラテクノアートでは、直径 20m の世界最大級の固体培養装置を実用化した実績があります。このような大型の機械装置を用いて麹菌を生育することにより、飼料酵素のような優良酵素をより低コストで量産できます。本研究は、フジワラテクノアートが取り組む固体培養技術の応用例の一部です。わたしたちは、今後も岡山大学と連携し、さらなる技術開発と社会実装を進めてまいります。