

クエン酸麹菌による液体発酵および菌体残渣利用

安藤義則*，柿元 智**，富吉彩加*，亀澤浩幸*，下野かおり*，瀬戸口眞治***

Liquid Fermentation to Produce Citric Acid by *Aspergillus niger* and Utilization of Fermentation Residue

Yoshinori ANDO, Satoshi KAKIMOTO, Ayaka TOMIYOSHI, Hiroyuki KAMESAWA and Shinji SETOGUCHI

本県では昭和30年代より麹菌固体発酵法によるクエン酸の製造が行われているが、海外製品の流入から新たな付加価値製品の開発が求められている。本研究では、果汁を原料とした麹菌液体発酵法により、付加価値の高い果汁酸味料を開発した。この果汁酸味料は、熱殺菌に耐えうるプロテアーゼ活性を持つことから、肉質を柔らかくするなど付加機能を持った調味料への展開が可能と考えられた。また、液体発酵の副産物である麹菌体から、N-アセチルグルコサミンなど機能性糖類を生産する基本技術を開発した。さらに、麹菌体のキチンは甲殻類に比べ酵素分解性が高く、N-アセチルグルコサミン生産の原料として優れていることを明らかにした。

Keyword : クエン酸, 麹菌, 液体発酵, グルコサミン

1. 緒 言

当センターで開発した麹菌固体発酵法¹⁾の普及により、本県では昭和30年代よりクエン酸の製造が行われ、県内発酵産業の一翼を担ってきた。このクエン酸は、清涼飲料水や洗浄剤など生活の様々な場面で使用されている。しかし、近年の海外産のクエン酸の流入により市場価格が下落し、世界的に中小クエン酸メーカーの事業撤退や派生商品への転換が模索されており、新たな高付加価値商品の開発が急務となっている。

本研究では、付加価値の高い製品開発を目指し、長年蓄積したクエン酸発酵技術を活かし、クエン酸麹菌の液体発酵法による果汁酸味料の開発に取り組んだ。また、液体発酵では、純度の高い菌体残渣が容易に回収されることに着目し、麹菌体細胞壁を構成するキチン、グルカンから、関節症予防²⁾などが報告されているN-アセチルグルコサミン(以下NAG)や抗腫瘍活性³⁾などが報告されているβ-グルカンなどの機能性糖類を生産する基本技術の開発にも取り組んだ。

2. 実験方法

2. 1 使用菌株

九州化工(株)が保有するクエン酸麹菌を用いた。培地への接種には、Tween20を含む滅菌水に斜面培地上の胞子を懸濁させた胞子懸濁液を用いた。

2. 2 培地

果汁培地は、ミカン、リンゴ、ブドウ、モモおよびスイ

カの濃縮果汁((株)加藤美蜂園本舗製)をBrix6%となるよう希釈し、発酵補助剤として米ぬか、CMCナトリウム塩を適宜加えて作成した。

半合成培地は、ブドウ糖 10%、ポリペプトン 1%、酵母エキス 0.05%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄・7H₂O 0.05%、CMCナトリウム塩 1%を基本とし、発酵条件の検討の際には各成分を適宜調整した。

2. 3 液体発酵試験

100mL発酵試験では、300mL容バツフル付きフラスコを用い、発酵温度は35℃、回転数は100rpmとした。

2L発酵試験では、(株)高杉製作所製ジャーファーマンタ(MBF)を用い、発酵温度は1日目を35℃、2日目以降を30℃、通気量は0.4L/min、攪拌スピードは1日目を400rpm、2日目以降を600rpm、培養日数は5日間とした。

実規模発酵試験においては、南日汽缶(株)製2M³容ジャーファーマンタを用い、発酵温度は1日目を35℃、2日目以降を30℃、通気量は2L/min、攪拌スピードは170rpm、培養日数は5日間とした。

2. 4 機能性糖類の抽出

阿部らの考案した熱水アルカリ抽出法⁴⁾を改変し、液体発酵で得られた麹菌体からα-グルカン、β-グルカンおよびNAGの抽出を行った(図1)。まず、麹菌体を凍結乾燥し、ボールミル(CMT社製、TI-100)を用いて2分間粉砕した。粉砕菌体に蒸留水を加え121℃、30分間処理し、次いで20,000rpm、5分間遠心分離し上澄みを除くことで熱水可溶性成分を除去し、これを2回繰り返した。次に、2M NaOHを加え、4℃、24時間振とうし、次いで15,000rpm、10分間遠心分離した。遠心分離により得られた液部および沈殿部の蒸留水再懸濁液を氷酢酸で中和し、中和液を1昼夜透析

*食品・化学部

**九州化工(株)

***企画支援部(現 副所長)

した。得られた透析物を10,000rpm, 10分間遠心分離し、それぞれの沈殿部をアルカリ可溶性画分 (AS) およびアルカリ不溶性画分 (AI) とした。

キチンの膨潤化は、NaOH処理とリン酸処理とを検討した。NaOH処理は、試料である麹菌体またはAI画分に40%NaOHを加え、室温で12時間処理し、12M硫酸を用いて中和した後に、水洗することで膨潤化試料を作成した。リン酸処理は、試料に対して重量比で4倍量のリン酸を加え、室温で12時間処理し、攪拌しながら試料に対して10倍量の水を加え、遠心分離と水洗を繰り返すことでリン酸を除去し、膨潤化試料を作成した。

酵素処理は、AI画分にキチナーゼを主体とする酵素製剤であるヤタラーゼ (タカラバイオ社製), DENAZYME (ナガセケムテック社製) およびキチナーゼ (和光純薬製) をそれぞれの至適pHおよび温度で処理することでNAGを得た。

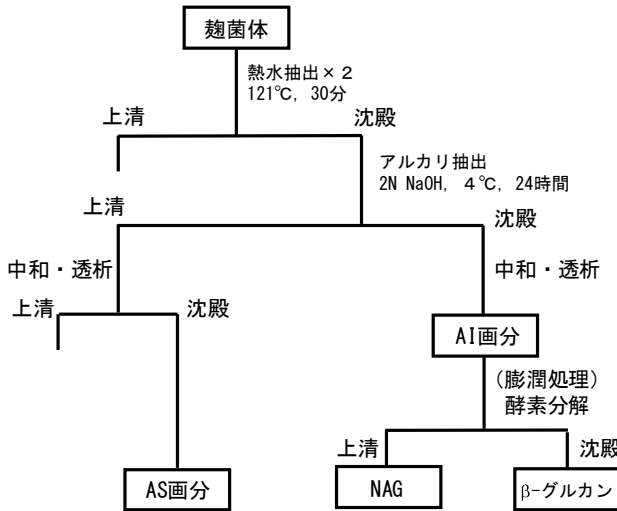


図1 機能性糖類の抽出フロー

2. 5 分析方法

菌体量は、発酵液をNo. 2ろ紙にてろ過することで菌体を回収し、ろ紙上で十分に洗浄した後に重量を測定することで求めた。乾燥菌体量は、洗浄した菌体を凍結乾燥し重量を測定することで求めた。

クエン酸濃度は、有機酸分析装置 (日本分光(株)製) を使用したpH指示薬 (BTB) 法で分析を行った。なお、カラムにShodex KC811, 移動相に過塩素酸を用いた。

細胞壁糖組成は、菌体試料をボールミル (CMT社製, TI-100) を用いて2分間粉碎し、粉碎した菌体を、25N 硫酸, 4°C, 1昼夜, さらに蒸留水で希釈後1N 硫酸, 100°C, 12時間の条件により処理し細胞壁から糖を遊離させ、硫酸バリウムで中和したものをHPLCにより測定した。HPLCは、糖分析システムICA-2000 (東亜ディーケーケー社製), カラム: PCI-520 (25°C), 溶離液: 200mM NaOH, 流速: 0.2 mL/minの条件により行った。

酵素活性のうち、α-アミラーゼ活性はキッコーマン製

のα-アミラーゼ測定キットを使用し測定した。酸性プロテアーゼ活性は国税庁所定分析法⁵⁾に従って測定した。なお、酵素の耐熱性試験では、ろ過により清澄化した発酵液を、所定の温度, 時間加熱し、加熱処理した発酵液の残存酵素活性を測定することで評価した。

3. 実験結果

3. 1 各種果汁による小規模液体発酵試験

各種果汁を用いた2L液体発酵試験を行い、果汁毎に最も高いクエン酸濃度が得られた発酵条件でのクエン酸濃度, および菌体量を図2に示す。スイカ以外の果汁で、目標とするクエン酸濃度3%に達した。ブドウとミカンの発酵液については果汁の香りが残っていた。このときの、菌体量を比較したところ, 99~152gとかなりの幅があった。これは、発酵初発の炭素源, 窒素源の量に左右されていると考えられた。

3. 2 実規模液体発酵試験

小規模試験で最もクエン酸濃度が高かったブドウ果汁を用いた2M³規模の液体発酵試験を行った。発酵中におけるクエン酸, α-アミラーゼおよびプロテアーゼ活性の消長を図3に示す。クエン酸については、発酵3日ほどで目標の3%に達した。酵素活性については発酵2日ほどで最大となったが、その後α-アミラーゼは減少し、プロテアーゼは活性を維持した。白麹菌 (*Aspergillus kawachi*) の液体

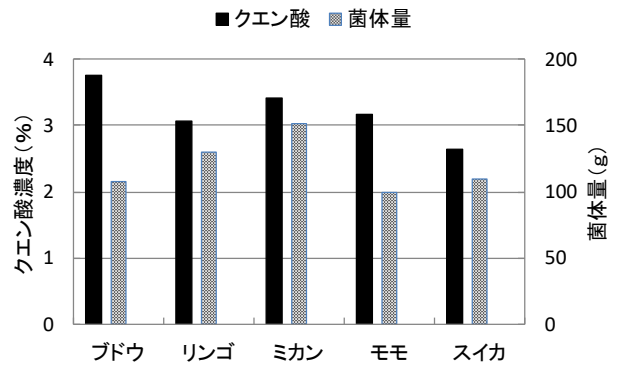


図2 各種果汁による液体発酵

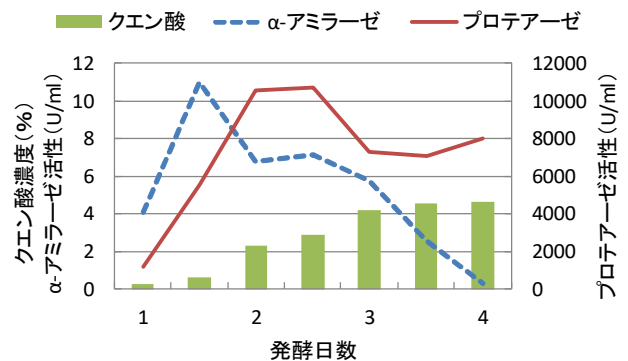


図3 発酵中におけるクエン酸, 酵素の消長

培養では、耐酸性 α -アミラーゼは生産されず非耐酸性 α -アミラーゼが生産されることが知られている⁹⁾。今回の結果から、クエン酸麹菌による液体培養においても非耐酸性 α -アミラーゼが生産され、培養液中のクエン酸濃度が上昇するに従い、その活性が低下していったと推察された。

プロテアーゼの耐熱性試験における、加熱温度と残存プロテアーゼ活性との関係を図4に示す。100°Cの条件では完全に失活したものの、85°Cまでの条件では50%程度の活性を維持した。次に、加熱時間と残存プロテアーゼ活性との関係を図5に示す。65°Cの加熱時間が長くなるに従い残存活性は低下した。常温流通を可能とする清涼飲料水の殺菌基準は、pH4.0未満で65°C10分である。この条件であっても果汁発酵液のプロテアーゼ活性は50%程度残存していることが分かった。このことから、「塩麹」のような肉を柔らかくし旨味を引き出すといった付加機能を持った調味料への展開が可能と考えられた。

3. 3 液体発酵の条件と麹菌細胞壁構造への影響評価

液体発酵の条件が菌体回収量や麹菌細胞壁組成(キチン、グルカン)にどのような影響を与えるかを調べるため、半合成培地中の炭素源(ブドウ糖)、窒素源(ポリペプトン)および増粘剤(CMC)濃度を変え、100mL規模の発酵試験を行い菌体の回収量を比較した。その結果を図6に示す。炭

素源の増加に伴い菌体量は大きく増加した。また、増粘剤の増加に伴い菌体量はわずかに増加した。一方、窒素源については、ポリペプトン2%としたとき最大となり、それ以上窒素源を増やすと菌体量は緩やかに減少した。これらを考慮に入れた培地組成を設計することで、菌体を原料とした機能性糖類の回収率向上とコスト低減につながると考えられた。

次に、細胞壁の糖組成を発酵条件で制御することを目的として、上述の試験で得られた麹菌体並びに基準半合成培地で培養日数を変化させた麹菌体の細胞壁糖組成を調べた。細胞壁の糖組成を図7に、熱水アルカリ抽出による α -グルカンとキチンを主体とする画分(AS)と β -グルカンとキチンの画分(AI)の比率を図8に示す。発酵日数が増えるに従い、AI画分およびグルコサミンは増加しAS画分は減少した。これは、菌体が成熟すると β -グルカンとキチンが増加することを示す。また、糖濃度が増えるに従い、NAG量が増加したがAI画分は減少した。これは、糖濃度が高いと菌体の増殖過程で α -グルカンとキチンが増加し、逆に糖濃度が低いと β -グルカンが優位に増加することを示す。従って、菌体の β -グルカンのみを増加させるには糖濃度の低い条件で発酵することが有効であることが分かった。一方、窒素源、増粘剤の濃度は細胞壁組成に明確な影響は認められなかった。

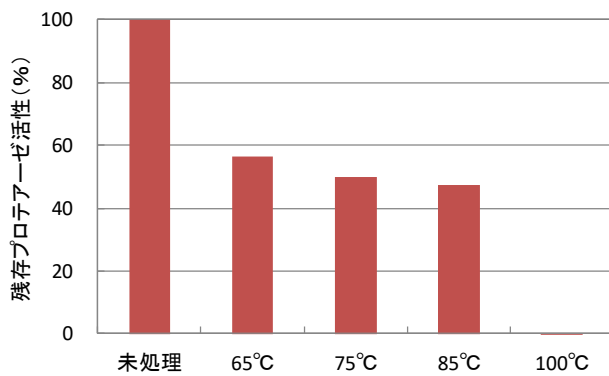


図4 加熱温度と残存プロテアーゼ活性
(加熱時間: 5分)

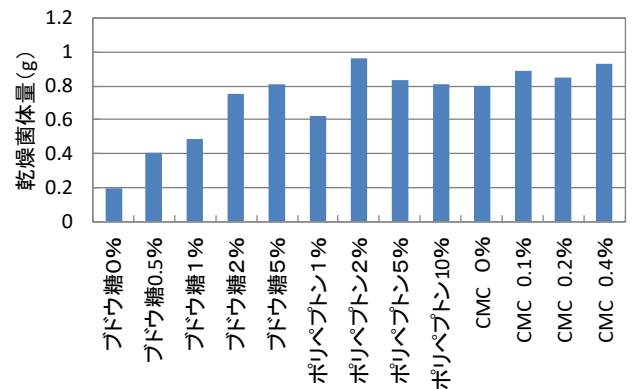


図6 発酵条件と菌体量

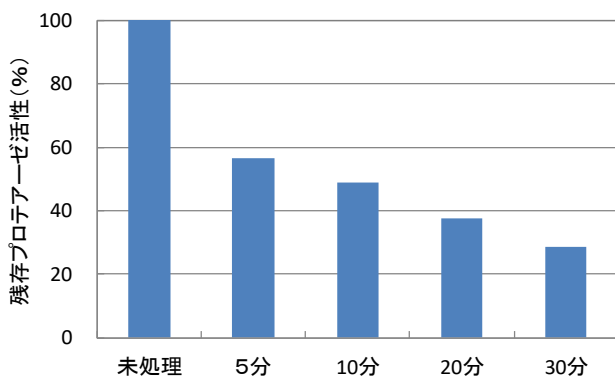


図5 加熱時間と残存プロテアーゼ活性
(加熱温度: 65°C)

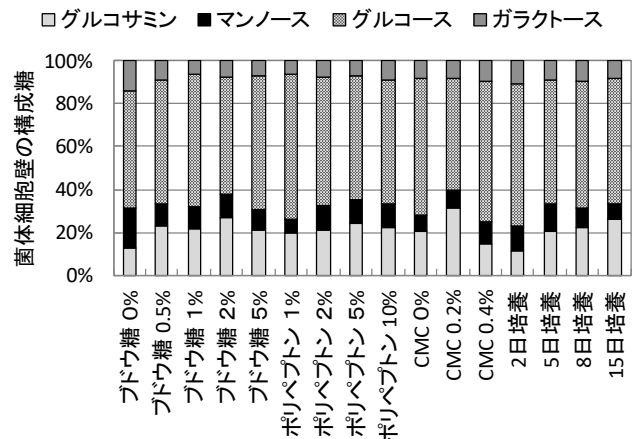


図7 発酵条件と菌体の糖組成

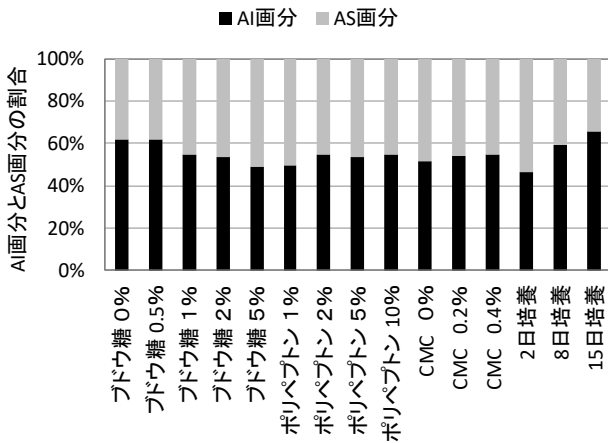


図8 発酵条件と菌体AI, AS画分の割合

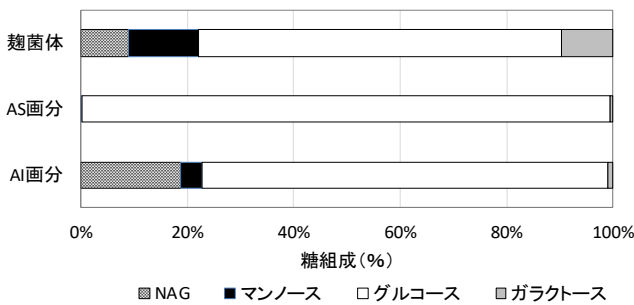


図9 2 M³発酵の麹菌体および中間産物の糖組成

以上のことから、発酵条件により有用性の高いNAG、β-グルカンなど目的とする機能性糖類の濃度を増やすことができることを明らかにした。

3. 4 多糖類の高純度化・回収率向上技術の検討

2 M³液体発酵による菌体残渣（ブドウ果汁培地）を熱水アルカリ抽出したところ、AS画分が18.2%、AI画分が47%得られた。この各画分の糖組成を調べた結果を図9に示す。AS画分は、グルコースが99%であり、純度の高いα-グルカンが得られていることが分かった。一方、AI画分では、NAGが19%、グルコースが76%であり、α-グルカンが除去されたことにより、NAGおよびβ-グルカンの割合が相対的に高まった。

次に、AI画分から酵素処理によりNAGを生成させた。その結果を表1に示す。酵素①（ヤタラーゼ）では、純度が50%、出発菌体に含まれるNAGの71%にあたる量を回収した。酵素②（DENAZYME）では、純度が90%、回収率51%であった。酵素③（キチナーゼ）では、純度が100%、回収率は22%であった。酵素①については、キチナーゼ活性に加えてβ-グルカナーゼ活性がわずかにあるため、キチンだけではなく、β-グルカンも分解され、NAGの純度が低下したと考えられた。なお、甲殻類由来の精製キチン（和光純薬製）からNAGを生成させた場合の回収率は酵素①で20%、酵素②で10%であったことから、麹菌体のキチンの酵

表1 NAGの回収率および純度

	酵素①	酵素②	酵素③
麹菌体由来	71 (純度50%)	51 (純度90%)	22 (純度100%)
甲殻類由来	20	10	—

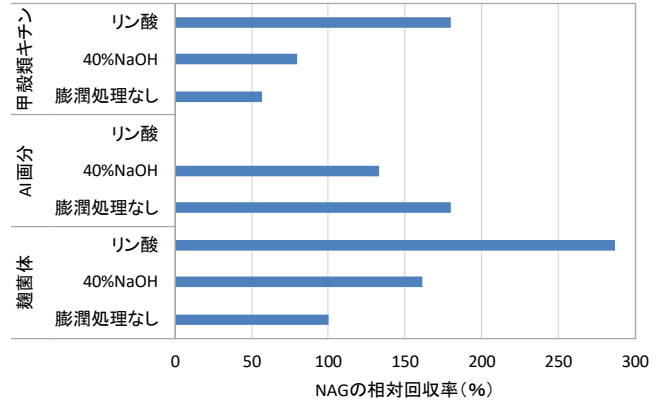


図10 膨潤化処理によるNAGの回収率向上
(麹菌体の膨潤化処理なしの回収率を100とする)

素分解性は非常に高いことが分かった。

次に、AI画分からのNAG回収率向上を図るため、キチンの膨潤化処理を行った。麹菌体およびAI画分のそれぞれを、40%NaOH処理、リン酸処理したものを、酵素②により分解しNAGの回収率を比較した。その結果を図10に示す。甲殻類由来のキチンは、膨潤化処理によりNAGの回収量が40% NaOH処理で無処理の約1.5倍、リン酸処理で約3倍向上した。麹菌体も同様に、40%NaOH処理で無処理の約1.5倍、リン酸処理で約3倍向上した。このことから、麹菌体のキチンが甲殻類由来のキチンより、NAGの回収率が高い、すなわち酵素の分解を受けやすいことが明らかとなった。

一方、麹菌体を熱水アルカリ処理しキチンを濃縮したAI画分は膨潤化処理を経なくても、甲殻類キチンを膨潤化した場合と同等の回収率を示すことが分かった。熱水アルカリ抽出により夾雑物の除去とある程度の膨潤化ができたことで酵素の分解効率が高まったと考えられた。逆に、理由は不明であるがAI画分を膨潤化すると回収率が低下した。

また、麹菌体そのままをリン酸処理することで、極めて高いNAG回収率を達成することができた。このことから、麹菌体をリン酸で膨潤化、酵素処理でNAGを回収した後に、アルカリ抽出でα-グルカンとβ-グルカンを分画する方法もコストが見合えば有効であると考えられた。

4. 結 言

クエン酸麹菌による液体発酵により、プロテアーゼ活性を持ち果汁の風味を有する新規な果汁酸味料を開発した。この果汁酸味料は、熱殺菌に耐えうるプロテアーゼ活性を

持つことから、肉質を柔らかくするなど付加機能を持った調味料への展開が可能と考えられた。また、この液体発酵残渣である麹菌体から、NAGなど機能性糖類を生産する基本技術を開発した。さらに、麹菌体キチンは甲殻類に比べ酵素分解性が高く、NAG生産の原料として優れていることを明らかにした。甲殻類アレルギーフリーであることも勘案すると優位性が非常に高いと考えられる。

謝 辞

本研究の一部は、科学技術振興機構マッチングプランナープログラム、(公財)かごしま産業支援センター重点業種研究開発支援事業の助成を受けて実施しました。また、東北大学農学部・阿部敬悦教授にご助言をいただきました。ここに深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 川原一：鹿児島県工業試験場業務報告書，1，23(1953)
- 2) 長岡功：日本食生活学会誌，19，2(2008)
- 3) 武田陽一：Trends in Glycoscience and Glycotechnology，26，171 (2014)
- 4) 阿部敬悦ら：特許 第4595074号(2010)
- 5) 注解編集委員会編，第四回改訂国税庁所定分析法注解 (財団法人日本醸造協会，東京) (1993)
- 6) K.Nsgamineら：Biosci.Biotechnol.Biochem.，67，2194 (2003)

