

麹菌 *Aspergillus oryzae* における

糖化酵素高発現及び褐変性に関する研究

Melanization and high expression of saccharifying  
enzyme in solid-state culture of *Aspergillus oryzae*

2007

岩手大学大学院 連合農学研究科  
生物資源科学専攻 生物機能開発学連合講座

岩間直子

# 目次

第1章 緒言	1
第2章 低褐変性のグルコアミラーゼ高活性変異株の育種	
I. 実験材料及び方法	7
II. 実験結果	
1. 紫外線照射変異処理による変異株の取得とグルコアミラーゼ 高活性株のスクリーニング	24
2. グルコアミラーゼ高活性及びチロシナーゼ低活性変異株の選抜	28
3. スクリーニング変異株の主要酵素活性の経時変化	36
III. 考察	42
第3章 低褐変性、高グルコアミラーゼ活性変異株を用いた製麴試験及び清酒醸 造試験	
I. 実験材料及び方法	45
II. 実験結果	
1. 変異株による実地製麴試験	52
2. 変異株の麴を用いた試験醸造	57
3. 試験醸造酒の分析評価	64
III. 考察	68

## 第4章 グルコアミラーゼの精製と諸性質の解明

I. 実験材料及び方法	70
II. 実験結果	
1. 変異株及び親株からのグルコアミラーゼの精製と分子量比較	75
2. グルコアミラーゼの熱安定性	89
III. 考察	94

## 第5章 グルコアミラーゼの構造解析

I. 実験材料及び方法	96
II. 実験結果	
1. グルコアミラーゼのアミノ酸組成	103
2. グルコアミラーゼの糖鎖構造	106
3. グルコアミラーゼ糖鎖の糖組成	121
4. グルコアミラーゼのペプチドマッピング	123
III. 考察	128

## 第6章 選抜変異株グルコアミラーゼの発現量解析

I. 実験材料及び方法	131
II. 実験結果	134
III. 考察	142

## 第7章 総括

要約	150
----	-----

引用文献 . . . . . 154

謝辞 . . . . . 164

## 第1章 緒論

麹菌は、我が国の伝統的発酵醸造産業である清酒・醤油・味噌等の製造業において古くから広く利用されてきた糸状菌である。これらの産業では、米、麦、豆等の穀類に麹菌を繁殖させる「麹造り」と呼ばれる固体培養を行って、穀類原料のデンプンやタンパク質を加水分解する各種酵素を生産させ、それらの酵素によって生成される発酵生産物が発酵食品の品質を大きく左右するのでそれぞれの発酵醸造産業に適した有用な麹菌の開発研究が進められてきた。

清酒麹菌である黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、多種多様な加水分解酵素を菌体外に高生産・分泌する<sup>1)</sup>が、この麹菌の清酒醸造における最も重要な役割は、蒸米中のデンプンから液化、糖化酵素の作用により、グルコースを生成することである。その作用は、主に $\alpha$ -アミラーゼとグルコアミラーゼにより行われる。 $\alpha$ -アミラーゼは不溶性のデンプンの $\alpha$ -1,4結合をランダムに分解し、デキストリン等の小さな分子として可溶化する作用を持つ酵素である。グルコアミラーゼ ( $\alpha$ -1,4-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3) はデンプンの非還元末端よりグルコースを1分子ずつ切り出すエキソ型のグルコシダーゼである。これらの酵素によって生成したグルコースを炭素源として、酵母のエタノール発酵により清酒醸造が行われている (Fig. 1-1)。そのような糖化と発酵が同時に進行する並行複発酵での律速段階は、グルコアミラーゼによる糖化工程であると考えられており、その活性の大小は清酒もろみの発酵速度に大きな影響を及ぼす。そのため、グルコアミラーゼは清酒醸造において最も重要な酵素とされており、グルコアミラーゼカ価は麹の大切な品質評価項目となっている。特に吟醸酒のような高品質な清酒を醸造する場合、グルコアミラーゼ活性の高い麹を製造するよう努力されている<sup>2)</sup>。

何故なら、グルコアミラーゼ活性が高いことによってもろみ中のグルコース濃度が高濃度に保たれ、そして酵母のエステラーゼ活性が促進されて吟醸酒独特の香気成分（吟醸香）が増加する効果が得られるからである。そのため、高級酒の品質の向上を図るためには、麹菌のグルコアミラーゼ活性の高い優良株を育種することが極めて重要である<sup>3)</sup>。

近年の遺伝子操作技術の発達に伴い、遺伝子組み換えを利用した麹菌の育種開発も進み<sup>4-6)</sup>、渋谷らによって *Aspergillus shirousamii* のグルコアミラーゼ遺伝子を導入し、グルコアミラーゼ活性を2倍に増大した *A. oryzae* 形質転換体等も得られている<sup>7,8)</sup>。しかし、清酒等の発酵食品醸造用の麹菌としては、そのような形質転換による遺伝子組換えを利用した菌株の使用は制限されており、現実的には実用化が不可能である。

そのため、食品の醸造用として有用な麹菌の育種法として、これまでに紫外線照射や化学薬品処理などによる人工的な突然変異により様々な変異株を取得する研究がなされてきた。井口らは *Aspergillus sojae* に X 線または紫外線を照射して親株の2~4倍も強力なプロテアーゼ活性を有する変異株を分離し<sup>9-11)</sup>、飯塚らは黒麹菌 *Aspergillus awamori* に紫外線、 $\gamma$ 線を照射してアミラーゼ力の強い菌株の育種に成功している<sup>12,13)</sup>。逆に、醤油醸造用麹菌として、変異誘発薬剤 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) による変異処理によって *A. sojae* の  $\alpha$ -アミラーゼやキシラナーゼ生産能を減少させて製麹中の糖消費量を減らし、糖の有効利用や醤油製品の着色、褐変化の低減等が行われた育種例もあり<sup>14)</sup>、様々な酵素の生産能を改良した麹菌が実用株として育種されている。

しかし、清酒用麹菌 *A. oryzae* に関しては、菌糸の細胞は多核で、無性生活環で形成される分生子の中の核数も、他の多核といわれている麹菌 *A. sojae* や *A. awamori* よりもさらに多いために特に劣性変異を取るのが難しく、変異株の単離

が非常に困難である<sup>15,16)</sup>等の理由から、従来より有用清酒麹菌の開発例は少なかった。原らが初めて清酒麹菌 *A. oryzae* の人工変異によるデフェリフェリクローム（鉄による清酒の着色の原因物質）非生産性有用変異株の開発に成功し<sup>17)</sup>、清酒麹菌有用変異株の分離法を確立してからは清酒麹菌においても様々な変異株が取得されており、五味らによってアミノ酸要求性を含む各種栄養要求性の *A. oryzae* 変異株の育種も報告されている<sup>18)</sup>。そして、近年では吟醸酒等の高級清酒醸造において有用な清酒麹菌として、グルコアミラーゼ活性の高い実用変異株の育種も人工変異によって行われるようになった。しかし、それらのグルコアミラーゼ活性の高い麹菌変異株は同時に醸造後の酒粕を褐変させ、黒粕となることが知られている。この黒粕は酒粕に残存する麴粒が黒い斑点となり、商品価値が著しく低下する現象である。村上らによって黒粕発生の原因について研究が進められ、酒粕中のチロシンが酸化されて最終的にメラニン色素が生成することにより褐変することが明らかにされている<sup>19)</sup>。そして、このメラニン生成の初発反応であるチロシンから L-DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine) への酸化反応には、麹菌のチロシナーゼ (monophenol, dihydroxyphenylalanine : oxygen oxidoreductase, EC 1.14.18.1) が関与していることが大場らによって報告された<sup>20-26)</sup>。チロシナーゼは、メラニン形成の第1段階を触媒するキーエンザイムであり、具体的には、アミノ酸の L-チロシンに酸素 1 原子を付加する Monohydroxylation 反応と、その結果生じる L-DOPA を酸化（脱水素）してドーパキノンを生じる Oxidation 反応を合わせてチロシナーゼ活性と呼んでいる。チロシナーゼによって生じたドーパキノンは、その後様々な中間体を経てメラニンが形成される (Fig. 1-2)。これまで相同組換えによるチロシナーゼ遺伝子破壊によって低褐変性の清酒麹菌を育種開発した例はあるが<sup>27)</sup>、それ以外の *A. oryzae* の高グルコアミラーゼ活性変異株は、常にチロシナーゼ活性が連動して高活性に

変異し、人工の突然変異によって褐変性の低いグルコアミラーゼ高活性変異株の取得に成功したという報告はない。

そこで、本研究では吟醸酒用の新しい実用麹菌株として、チロシナーゼ活性が低く褐変しない、高グルコアミラーゼ生産菌株を育種開発することを目的に研究を行った。この研究は以下の5つの部分から構成される。

第一に既存麹菌に紫外線照射を行うことにより変異株を取得し、その中から低チロシナーゼ、高グルコアミラーゼ活性変異株を選抜して醸造適性を検討した。

第二に実施スケールで製麹試験と清酒醸造試験を行い、変異株の吟醸酒醸造の適性について検討した。

第三に変異株のグルコアミラーゼを精製し、酵素学的諸性質を親株と比較検討した。

第四に変異株グルコアミラーゼのタンパク質一次構造や糖鎖構造について解析を行い、親株グルコアミラーゼと比較検討した。

第五に変異株のグルコアミラーゼ発現量をリアルタイム PCR によって解析し、親株のグルコアミラーゼ発現量と比較検討した。



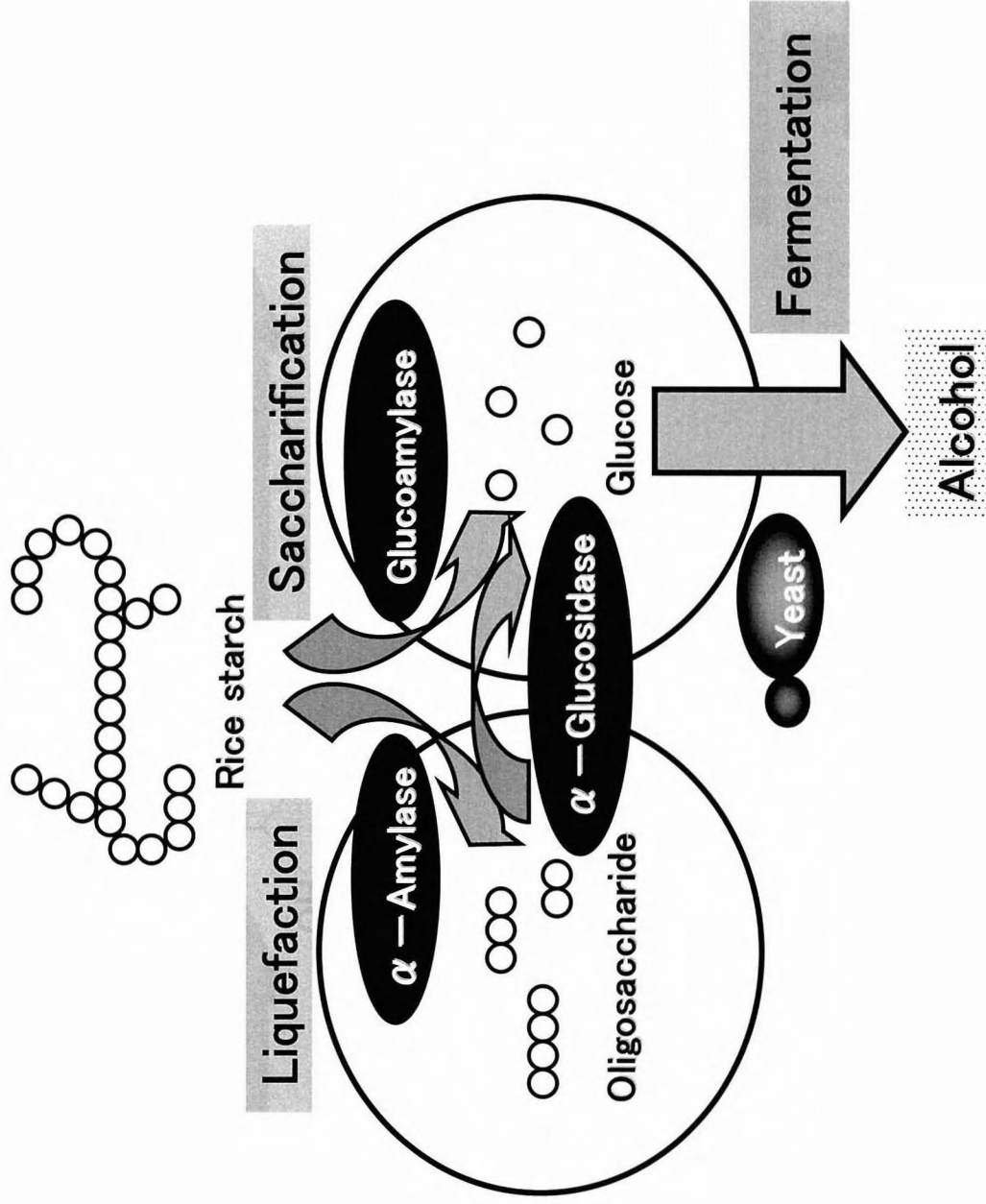


Fig. 1-1 Role of saccharifying enzymes of *A. oryzae* in sake brewing

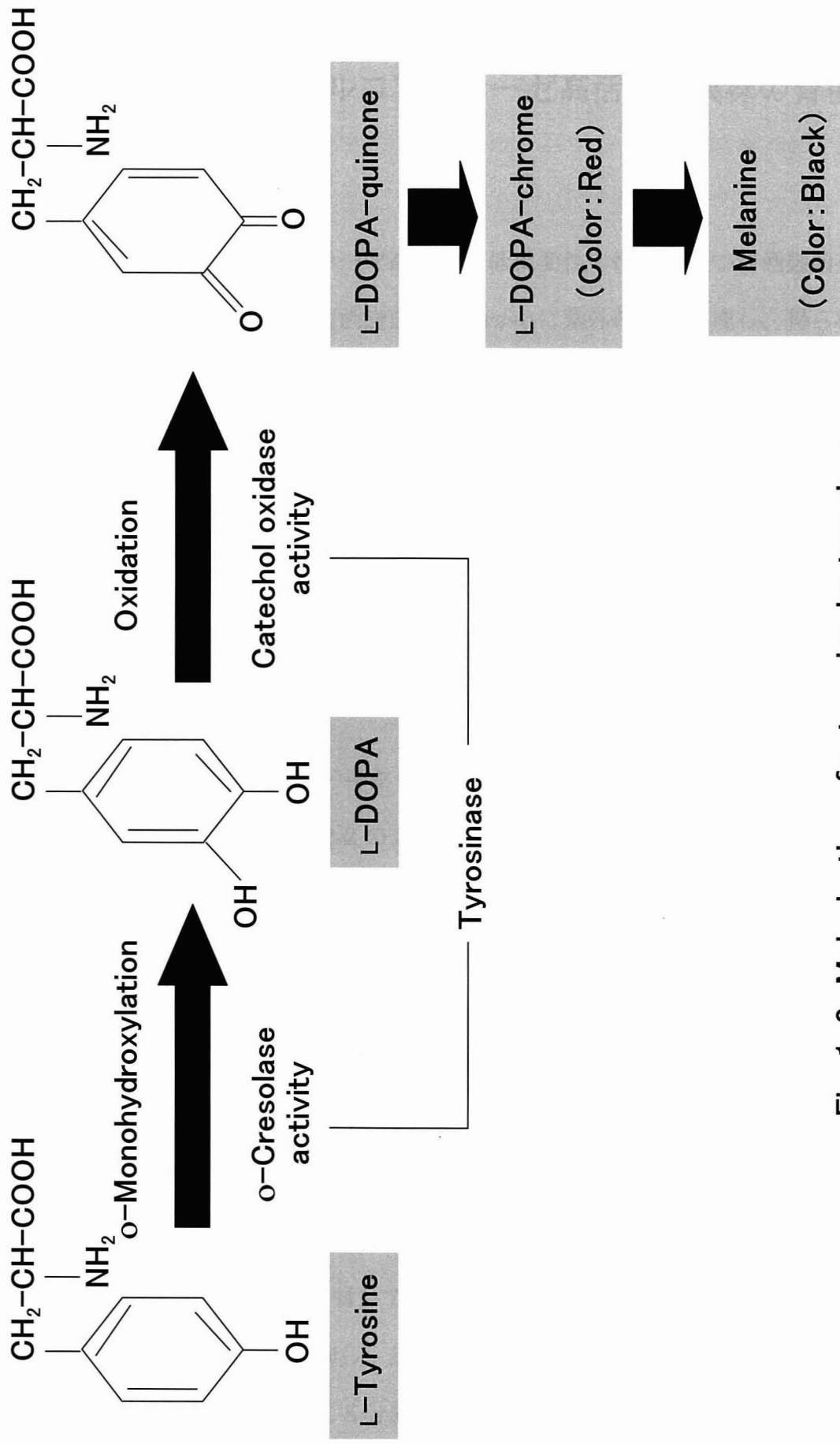


Fig. 1-2 Melanization of L-tyrosine by tyrosinase

## 第2章 低褐変性のグルコアミラーゼ高活性変異株の育種

本実験においてグルコアミラーゼ高活性、低褐変性の性質を持つ清酒麹菌有用変異株の取得を目的として、清酒麹菌 *A. oryzae* に紫外線照射処理し、得られた変異株のグルコアミラーゼとチロシナーゼと共に主要な酵素活性を測定することにより清酒醸造における総合的な適性について検討した。

### I. 実験材料及び方法

#### 1. 使用菌株

種麹メーカーである(株)アキタ今野商店から分譲して頂いた研究用菌株 *A. oryzae* No.64、No.113、No.12-2 の3菌株と、市販種麹実用菌株「氷上」および「吟香」(いずれも商品名)を加えた計5菌株の既存麹菌株を親株として使用した。

#### 2. 培地の調製

##### 1) 麹汁培地

70℃のお湯3リットルに米麹1kgを入れ、58~60℃の恒温槽で8時間程加温して麹を糖化した。糖化液をBrix計で測定して糖度が10~20°になったら濾紙で濾過した。濾液2リットルに対して卵白1個分(少しかき混ぜてほぐしておく)をタンパク質除去剤として添加し、良くかき混ぜながら加熱して卵白が凝固して浮き上がってきてから、さらに5分間以上沸騰させた。室温まで冷却し、卵白の

塊を壊さないように静かに濾過した。得られた麴汁エキスを蒸留水でショ糖度 5 ~6° に希釈調製し、寒天を 2% 加えてオートクレーブで 120°C、15 分間加圧滅菌した。滅菌後、滅菌試験管、滅菌シャーレに分注し、斜面培地、平板培地を作製した。

## 2) 米粉アミロース培地

Czapek-Dox 合成培地からショ糖を除いたミネラル培地を基本培地とした。基本培地に炭素源として米粉デンプン（アミロース）を 1% 添加した培地を米粉デンプン培地とし、スクリーニング実験に使用した。

### 【培地組成】

①米粉デンプン（アミロース）	10.0 g
②寒天	20.0 g
③NaNO <sub>3</sub>	3.0 g
④K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
⑤KCl	2.0 g
⑥MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
⑦FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g (10 mg/ml 溶液で 1 ml 相当)

上記の試薬①~⑥を蒸留水 1 リットルに溶かし、オートクレーブで加圧滅菌 (121°C、15 分) した。滅菌後、寒天が固まらない程度に冷却し、あらかじめ 0.20 μm 滅菌フィルターで濾過滅菌しておいた試薬⑦を 1 ml 添加して滅菌シャーレに流し込み平板培地を作製した。

### 3) 固体培養用 $\alpha$ 米

酒造用好適米である華吹雪の 60% 精白米を蒸してデンプンを  $\alpha$  化させ、得られた蒸米を 95°C で 20 時間温風乾燥して  $\alpha$  米を製造した。その後、メッシュ等で  $\alpha$  米の粒度をそろえて固体培養に使用した。

### 3. 変異処理

親株の変異処理は、五味らの方法<sup>18)</sup>に従って紫外線を照射することにより行った。各菌株を麴汁斜面培地試験管に接種し、30°C で 1 週間培養後、0.01% Tween80 溶液 5 ml を加え、白金耳で胞子をよく懸濁した。得られた胞子懸濁液を 3G ガラスフィルターで濾過して菌糸を取り除いた。濾過が終わった胞子懸濁液中の胞子濃度を血球計で測定し、胞子濃度が  $2 \times 10^6$  個/ml になるように 0.01% Tween80 溶液で希釈調製した。その胞子懸濁液を小シャーレに 2 ml とり、スターラーで攪拌しながら 15 W 紫外線灯で 20 cm の距離から 4~5 分間紫外線照射した。この胞子液をさらに光を遮断して 30 分間放置した。次に、変異処理胞子液 100  $\mu$ l を麴汁平板培地に塗布し、30°C で 4~5 日間培養を行って、胞子を着生させた。0.01% Tween80 溶液 20 ml を平板培地に加え、白金耳で胞子を懸濁させて 3G ガラスフィルターでろ過し、濾液を 3,000 rpm で 5 分間遠心分離して胞子を集めた。上清を捨て、滅菌水を加えて胞子を洗浄し、再び遠心分離 (3,000 rpm、5 分間) により胞子を沈殿させた。沈殿した胞子を 0.01% Tween80 溶液 100  $\mu$ l に懸濁して、変異処理胞子の懸濁溶液を得た。

### 4. 変異株のスクリーニング培養

変異処理胞子液を適宜希釈し、その 100  $\mu$ l を 1% 米粉デンプン平板培地に塗布して 30°C で 2~3 日培養後、生育を指標にして第 1 次スクリーニング (First

screening) を行った。生育が良好なコロニーをランダムに釣菌し、再び1%米粉デンプン培地プレートに植菌して30℃で2~3日培養した。コロニーが形成された培地プレートをヨウ素溶液で染色し、透明ハローの形成状態によって糖化酵素力を判定することで第2次スクリーニング (Second screening) を行った。すなわち、この平板培養においてアミラーゼが生産されれば、培地中のデンプンアミロースが分解されてコロニーの周りにヨウ素溶液で染色されない透明な部分 (ハロー) が生じてくることから、デンプンアミロース分解能力が高い菌株 (糖化酵素類の活性が高いもしくは高生産である) として、より早く大きな透明ハローを形成したコロニーを選抜した。

## 5. スクリーニング変異株の固体培養

### 1) 孢子懸濁液の調製 (前培養)

麴汁斜面培地にて各スクリーニング菌株を30℃で5~7日間培養し、滅菌水10 mlを加えて孢子を懸濁した。孢子懸濁液をガラスフィルターにて濾過し、濾液の孢子濃度をトーマの血球計測板を用いて計測した。滅菌水で孢子懸濁液を $1 \times 10^{5 \sim 6}$ 個/mlになるように希釈して5 ml調製した。

### 2) $\alpha$ 米を用いた簡易シャーレ製麴 (固体培養米麴サンプルの製造)<sup>17)</sup>

$\alpha$ 米を10 gずつ $\phi 9$  cm滅菌シャーレに取り、95℃で2時間乾熱殺菌を行った。放置して室温まで冷却後、 $\alpha$ 米をシャーレの片側によせ、浸らないようにその反対側の方に孢子懸濁液5 mlを注いだ。シャーレをゆっくり回しながら少しずつ $\alpha$ 米と孢子懸濁液をなじませながら混ぜて接種した。さらに葉さじでよく攪拌して平らに $\alpha$ 米をならしてから、Fig. 2-1に示したように調湿のために50 mlの6.5%水酸化ナトリウム溶液で満たした $\phi 15$  cmシャーレの中に入れて濾紙をは

さんで上蓋をし、30℃で培養した。培養 20～24 時間後に返しを行い、藁さじで  $\alpha$  米の固まりをほぐして米粒同士をバラバラに離すように手入れをして、再び 30℃で 42～44 時間培養を続けた。

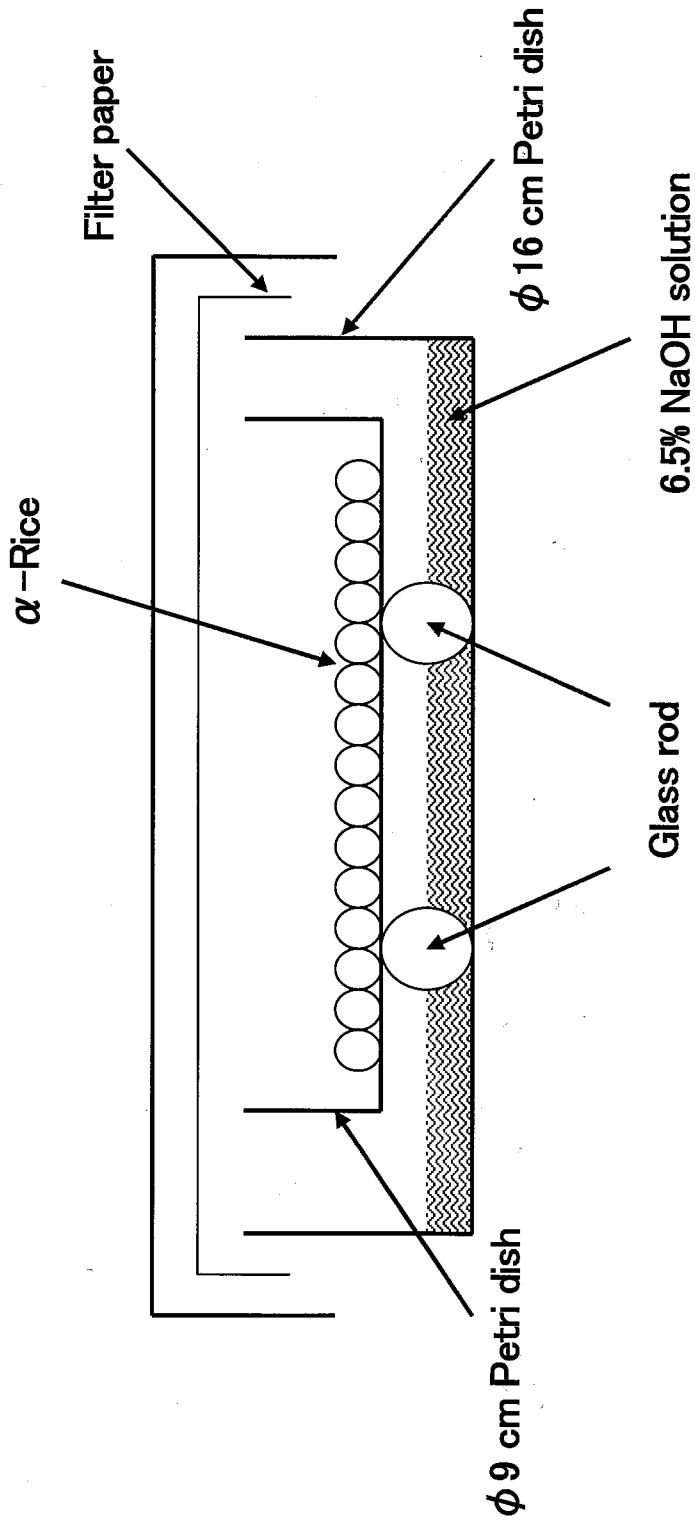


Fig. 2-1 Koji-making with  $\alpha$ -rice in petri dish



## 6. 固体培養米麴からの粗酵素溶液の調製

### 1) 菌体外粗酵素抽出液の調製<sup>28)</sup>

0.5% NaCl を含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 50 ml に固体培養米麴 10 g を浸漬して、5℃以下で一夜または 15~20℃で 3 時間時々振り混ぜながら菌体外酵素を抽出した。抽出液を濾紙で濾過して得られた濾液を菌体外酵素の粗酵素液 (5 倍抽出液) として以下のチロシナーゼ以外の酵素活性測定に用いた。

### 2) 菌体内酵素を含む全粗酵素溶液の調製<sup>29)</sup>

固体培養米麴 10 g に 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) 10 ml を加えて乳鉢で摩砕抽出し、10,000 rpm で 10 分間遠心分離した。得られた上清液を菌体内酵素を含む全粗酵素溶液として、チロシナーゼ活性の測定に用いた。

## 7. 酵素活性の測定

### 1) グルコアミラーゼ活性の測定

グルコアミラーゼの活性測定は、国税庁所定分析法<sup>28)</sup>および岩野らの方法<sup>30-32)</sup>に従って行った。

#### ①試薬調製

2%デンプン基質溶液：可溶性デンプン 2 g を精秤し、適当量の熱水を加えてよくかき混ぜ 1~2 分間沸騰させた後、冷却して水を加えて 100 ml にメスアップした。

#### ②操作

##### I) 酵素分解反応

2%デンプン基質溶液 1.0 ml と 200 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.2 ml をそれぞれ試験管に分注して反応液を調製し、40℃で 5 分間予備加温した。反応液に酵素

液 0.1 ml を加え、40℃で 20 分間反応した。1 N 水酸化ナトリウム溶液 0.1 ml を添加して反応を停止した後、遊離グルコースが  $\alpha$  型と  $\beta$  型が平衡に達するまで 30 分間放置し、1 N 塩酸溶液 0.1 ml を加えて中和した。対照としては、反応停止液である 1 N 水酸化ナトリウム溶液を加えてから、酵素液 0.1 ml を添加した反応液を用いた。

## II) 生成グルコースの定量

酵素反応により生成したグルコース量を Glucose Test Kit (Megazyme) で測定した。

Chromogen reagent 3.0 ml (Kit 試薬) と蒸留水 0.1 ml を試験管にそれぞれ分注して定量反応液を調製した。I) で得られた酵素反応液または対照反応液 0.1 ml を添加して 40℃で 20 分間インキュベートして反応させた。反応終了後、各反応液の 510 nm の吸光度を測定した。Glucose standard (Kit 試薬) 0.1 ml を用いた同様の測定で得られた標準値をもとに、以下の計算式で生成グルコース量を求めた。標準液の対照として、標準液の代わりに蒸留水 0.1 ml を添加して同様の測定を行った。

$$\text{Glucose } (\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}) = \{A(s) - A(b)\} / \{A(\text{std}) - A(c)\} \times 100$$

A(s) : 試料の吸光度

A(b) : 対照の吸光度

A(std) : 標準液 (Glucose standard) の吸光度

A(c) : 標準液対照の吸光度

## ③活性の算出

以下の計算式で生成グルコース量より活性を算出し、可溶性デンプンから 40℃

で 60 分間に 1 mg のブドウ糖を生成する酵素量を 1 単位 (Unit:U) と定義した。

$$\text{グルコアミラーゼ活性 (U/ml)} = X1 \times (60/X2) \times (1/X3) \times X4$$

X1 : 反応液 1.5 ml 中のグルコース生成量 (mg)

X2 : 反応時間 (min)

X3 : 酵素液量 (ml)

X4 : 酵素希釈率

なお、麴 1 g あたりのグルコアミラーゼ活性は次式によって求めた。

$$\text{グルコアミラーゼ活性 (U/g 麴)} = \text{活性値 (U/ml)} \times \text{抽出率 (ml/g 麴)}$$

## 2) $\alpha$ -アミラーゼ活性の測定

$\alpha$ -アミラーゼ活性測定は、 $\alpha$ -アミラーゼ測定キット (キッコーマン) を用いて行った。

### ① 作

測定キット基質溶液 (N3-G5- $\beta$ -CNP) 0.5 ml と測定キット酵素溶液 (グルコアミラーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ) 0.5 ml をそれぞれ試験管に分注して反応液を調製し、37°C で 5 分間予備加温した。反応液に 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で 50 希釈した酵素液 0.1 ml を加え、37°C で 10 分間反応させた。測定キット反応停止液 (炭酸ナトリウム溶液) 2 ml を添加して反応を停止させた後、反応液の 400 nm での吸光度 (遊離した CNP の吸光度) を測定した。対照としては、反応停止液を加えてから、50 倍希釈酵素液 0.1 ml を添加した反応液を用いた。

## ②活性の算出

以下の計算式で活性を算出し、N3-G5-β-CNP から 37℃で 1 分間に 1 μmol の CNP を遊離する酵素量を 1 単位 (Unit : U) と定義した。

$$\alpha\text{-アミラーゼ活性 (U/ml)} = \{A(s) - A(b)\} \times X \times Y$$

A(s) : 試料の吸光度

A(b) : 対照の吸光度

X : 換算係数 (0.179)

Y : 酵素希釈率

さらに、上記の活性値を次の計算式で国税庁所定分析法による活性値へ換算した。

$$\text{国税庁所定分析法換算値 (U/ml)} = \text{キット測定活性値 (U/ml)} \times 22.2 - 0.0669$$

なお、麴 1 g あたりの α-アミラーゼ活性は次式によって求めた。

$$\alpha\text{-アミラーゼ活性 (U/g 麴)} = \text{活性値 (U/ml)} \times \text{抽出率 (ml/g 麴)}$$

## 3) 糖化力の測定

グルコアミラーゼと α-グルコシダーゼによる総合的な糖化力 (グルコース生成能力) の測定を、糖化力分別定量キット (キッコーマン) を用いて行った。

### ①操作

測定キット基質溶液 (G2-β-PNP) 0.5 ml と測定キット酵素溶液 (β-グルコシダーゼ) 0.5 ml をそれぞれ試験管に分注して反応液を調製し、37℃で 5 分間予備

加温した。反応液に蒸留水で2倍希釈した酵素液0.1 mlを加え、37℃で10分間反応させた。測定キット反応停止液（炭酸ナトリウム溶液）2 mlを添加して反応を停止させた後、反応液の400 nmでの吸光度（遊離したPNPの吸光度）を測定した。対照として、反応停止液を加えてから2倍希釈酵素液0.1 mlを添加した反応液を用いた。

## ②活性の算出

以下の計算式で活性を算出し、G2-β-PNPから37℃で1分間に1 μmolのPNPを遊離する酵素量を1単位（Unit：U）と定義した。

$$\text{糖化力 (U/ml)} = \{A(s) - A(b)\} \times X \times Y$$

A(s)：試料の吸光度

A(b)：対照の吸光度

X：換算係数（0.171）

Y：酵素希釈率

糖化力は国税庁所定分析法において分析法がないので、使用した測定キットでの分析値そのままですることとし、換算はしなかった。

なお、麴1 gあたりの糖化力は次式によって求めた。

$$\text{糖化力 (U/g 麴)} = \text{活性値 (U/ml)} \times \text{抽出率 (ml/g 麴)}$$

## 4) α-グルコシダーゼ活性の測定

α-グルコシダーゼ活性測定は、糖化力分別定量キット（キッコーマン）を用いて行った。

### ①操作

測定キット基質溶液 (PNPG) 2 ml を試験管に分注して 37℃ で 5 分間予備加温した後に、酵素液 0.1 ml を加えて 37℃ で 10 分間反応させた。測定キット反応停止液 (炭酸ナトリウム溶液) 1 ml を添加して反応を停止させた後、反応液の 400 nm での吸光度 (遊離した PNP の吸光度) を測定した。対照として、反応停止液を加えてから酵素液 0.1 ml を添加した反応液を用いた。

### ②活性の算出

以下の計算式で活性を算出し、PNPG から 37℃ で 1 分間に 1  $\mu$ mol の PNP を遊離する酵素量を 1 単位 (Unit : U) と定義した。

$$\alpha\text{-グルコシダーゼ活性 (U/ml)} = \{A(s) - A(b)\} \times X \times Y$$

A(s) : 試料の吸光度

A(b) : 対照の吸光度

X : 換算係数 (0.171)

Y : 酵素希釈率

$\alpha$ -グルコシダーゼ活性は国税庁所定分析法において分析法がないので、使用した測定キットでの分析値そのままですることとし、換算はしなかった。

なお、麴 1 g あたりの  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は次式によって求めた。

$$\alpha\text{-グルコシダーゼ活性 (U/g 麴)} = \text{活性値 (U/ml)} \times \text{抽出率 (ml/g 麴)}$$

### 5) 酸性カルボキシペプチダーゼの測定

酸性カルボキシペプチダーゼ活性測定は、酸性カルボキシペプチダーゼ測定キ

ット (キッコーマン) <sup>33)</sup>を用いて行った。

### ① 操作

測定キット基質溶液 (Cbz-Tyr-Ala、NAD<sup>+</sup>) 1 ml を試験管に分注して 37°C で 5 分間予備加温した後に、蒸留水で 5 倍に希釈した酵素液または標準液対照として蒸留水 0.1 ml を加えて 37°C で 10 分間反応させた。測定キット反応停止液 (テトラゾリウム-ナトリウム塩) 2 ml を添加して反応を停止させた後、さらに 37°C で 5 分間加温した。測定キット定量用酵素液 (アラニンデヒドロゲナーゼ) 0.1 ml を添加して 37°C で 20 分間反応後、定量用発色液 (1-メトキシ-5-メチルフェナジニウム-メトサルフェイト : PMS) 0.1 ml を添加して再び 37°C で 10 分間加温して発色させ、反応液の 460 nm での吸光度 (生成 NADH の吸光度) を測定した。同様の操作で、反応停止液を加えてから、5 倍希釈酵素液ではなく測定キット L-Ala 標準液 0.1 ml を添加して反応を行い、得られた反応液の吸光度を基準にして生成 L-Ala 量を求めた。さらに、試料の対照として、反応停止液を加えてから 5 倍希釈酵素液 0.1 ml を添加した反応液を用いた。

### ②活性の算出

以下の計算式で活性を算出し、Cbz-Tyr-Ala から 37°C で 1 分間に 1 μmol の L-Ala を遊離する酵素量を 1 単位 (Unit : U) と定義した。

酸性カルボキシペプチダーゼ活性 (U/ml)

$$= \{A(s) - A(b)\} / \{A(std) - A(c)\} \times X \times Y$$

A(s) : 試料の吸光度

A(b) : 対照の吸光度

A(std) : 標準液の吸光度

A(c) : 標準液対照の吸光度

X : 換算係数 (0.1)

Y : 酵素希釈率

さらに、上記の活性値を次の計算式で国税庁所定分析法による活性値へ換算した。

$$\text{国税庁所定分析法換算値 (U/ml)} = \text{キットによる活性値 (U/ml)} \times 2877.5$$

なお、麴 1 g あたりの酸性カルボキシペプチダーゼ活性は次式によって求めた。

酸性カルボキシペプチダーゼ活性 (U/g 麴)

$$= \text{活性値 (U/ml)} \times \text{抽出率 (ml/g 麴)}$$

## 6) チロシナーゼ活性の測定

チロシナーゼの活性は、一島らの方法<sup>34)</sup>に従って測定した。

### ①試薬調製

10 mM L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) 基質溶液 : L-DOPA 0.197 g を精秤し、蒸留水に溶かして 100 ml にメスアップした。

### ②操作

粗酵素溶液においてチロシナーゼは不活性なプロチロシナーゼの状態なので、粗酵素溶液 100  $\mu$ l に 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 3.0) を 100  $\mu$ l 加えて、0 $^{\circ}$ C (on ice) で 30 分間酸処理を行うことにより、活性化させた。その活性化粗酵素溶液に、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 800  $\mu$ l と 10 mM L-DOPA 基質溶液 1 ml を加え、40 $^{\circ}$ C で 10~30 分間反応させた。また、対照として、粗酵素溶液の代わりに蒸留水 100  $\mu$ l を用いて同様の反応を行った。反応液の 475 nm での吸光度を測定し、



生成した L-ドーパキノンの量をモル吸光係数 ( $\epsilon$ )  $36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  により求めた。

生成 L-ドーパキノン量 ( $\mu\text{mol}$ )

$$= (A(s) - A(b)) / (36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} / 1 \text{ cm}) \times 10^3 \times 2 \text{ ml}$$

A(s) : 試料の吸光度

A(b) : 対照の吸光度

### ③計算式

以下の計算式で生成 L-ドーパキノン量から活性を算出し、1分間に  $1 \mu\text{mol}$  の L-ドーパキノンを生成させる酵素量を 1 単位 (U) と定義した。

$$\text{チロシナーゼ活性 (U/ml)} = X1 \times (1 / X2) \times X3 \times (1 / X4)$$

X1 : 反応液 2 ml 中の L-生成ドーパキノン量 ( $\mu\text{mol}$ )

X2 : 酵素液量 (ml)

X3 : 酵素希釈率

X4 : 反応時間 (min)

## 8. 麹菌菌体量の測定 <sup>35-39)</sup>

米麴中の麹菌菌体量の測定は、麹菌量測定キット (キッコーマン) を用いて行った。

### 1) 測定試料 (粉碎米麴) の調製

米麴試料 5 g をシャーレにひろげ、 $95^\circ\text{C} \sim 100^\circ\text{C}$  にて 1 時間加熱乾燥した。乾燥米麴試料を粉碎器にて約 15 秒間粉碎し、粒子が残存しない程度の粉末にした。

## 2) 溶菌処理

試験管に粉碎米麴 1.0 g を秤取り、測定キット溶菌酵素液 1.0 ml 及び溶菌用緩衝液 4.0 ml を加えて反応液とし、試験管ミキサーで 15 秒攪拌後、37℃で 3 時間加温して溶菌させた。溶菌反応液 1.5 ml をエッペンチューブに移し、10,000 rpm で 10 分間遠心分離した。得られた溶菌液の上清を以下の定量操作に用いた。また、対照として、溶菌酵素液を添加せずに溶菌緩衝液 5.0 ml のみを加えて同様の処理を行って得られた上清液を用いた。

## 3) 定量操作

試験管に測定キット定量用酵素液 1.0 ml と定量用発色液 2.0 ml をそれぞれ分注して反応液を調製した。溶菌上清液または対照上清液 0.1 ml を加えて、37℃で 25 分間反応させた。反応後、反応液の 515 nm の吸光度を測定した。そして、溶菌上清液ではなく、測定キット定量用標準液 (N-アセチル-D-グルコサミン標準液) 0.1 ml を用いて同様の操作を行い測定した標準値をもとに、以下の計算式で菌体量を求めた。標準液の対照として、標準液の代わりに蒸留水 0.1 ml を添加して同様の測定を行った。

$$\begin{aligned}\text{麴菌菌体量 (mg/g 麴)} &= (A(s) - A(b)) \div (A(\text{std}) - A(c)) \times 30 \times 50 \div 139 \\ &= (A(s) - A(b)) \div (A(\text{std}) - A(c)) \times 10.79\end{aligned}$$

A(s) : 溶菌上清液の吸光度

A(b) : 対照上清液の吸光度

A(std) : 標準液の吸光度

A(c) : 標準液対照の吸光度

麴菌量は 100℃で 1 時間乾燥させた米麴 1 g 当たりの量 (mg) で表し、麴菌 1 mg 当たり 139  $\mu\text{g}$  の N-アセチル-D-グルコサミンが含まれているものとして計算した。

## 9. タンパク質の定量

タンパク質は、Bradford の方法<sup>40)</sup>に従い、Bradford Protein Assay 試薬 (Bio-Rad) を用いて牛血清アルブミン (bovine serum albumin : BSA) を標準タンパク質として測定した。

### 1) 標準スケールでの測定操作 : タンパク質濃度 125~1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$

適宜希釈したタンパク質試料またはブランクとして蒸留水 50  $\mu\text{l}$  を 1×Bradford Protein Assay 試薬 2.5 ml に添加して良く混合した。室温で少なくとも 5 分間以上放置後、一時間以内に反応混合液の 595 nm での吸光度を測定した。

### 2) マイクロスケールでの測定操作 : タンパク質濃度 1.25~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

適宜希釈したタンパク質試料または対照として蒸留水 1 ml を 1×Bradford Protein Assay 試薬 1 ml に添加して良く混合した。室温で少なくとも 5 分間以上放置後、1 時間以内に反応混合液の 595 nm での吸光度を測定した。

## 10. スクリーニング菌株の褐変性試験

本章 I.6 の 2) で各スクリーニング変異株固体培養麴から調製した摩碎抽出液 (菌体内酵素を含む全粗酵素抽出溶液) を温度 5℃で保存を行い、褐変の経過を観察した。

## II. 実験結果

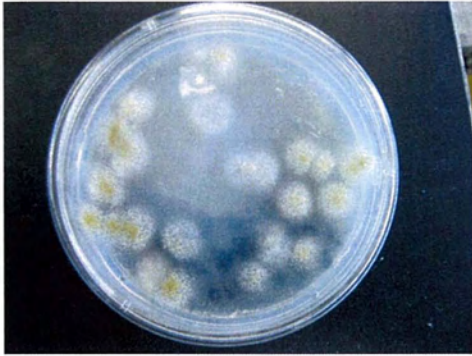
### 1. 紫外線照射処理による変異株の取得とグルコアミラーゼ高活性株のスクリーニング

親株とする 5 種類の *A. oryzae* 既存菌株の胞子懸濁液に、生存率 0.1~1% となる変異条件で紫外線照射を行い、変異株を取得した。醸造に用いる麹菌の条件としては、原料である米に優良に生育することが前提であるので、糖化酵素高活性菌株をスクリーニングする第 1 段階として、1%米粉デンプン培地プレートでの培養を行って生育能力を検討した。その結果、Fig. 2-2 に示すようにいずれの変異株群からも 20 前後のコロニーが出現し、その中から生育状態が良好であった変異株コロニーを氷上タイプ株、No.64、No.113 及び No.12-2 株由来の変異株群から 10 個ずつ、吟香株由来の変異株群からは 12 個をそれぞれ選抜し、全部で 52 コロニーを取得した。これらの中で特に No.12-2 株および氷上タイプ株からの変異株群は他の 3 菌株からの変異株群よりもかなり生育が速かった。

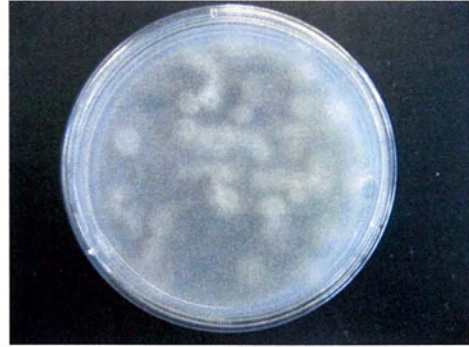
さらに、ヨード染色によるプレートアッセイで第 2 次スクリーニングを行った結果、No.12-2 株と氷上タイプ株由来の変異株は他の変異株と比較して大きい透明ハローが形成され、デンプン分解能の高さが顕著であった。また、吟香株由来の変異株群は、いずれも生育は他の変異株と比較してあまり早くなかったが、No.12-2 株や氷上タイプ株由来変異株に匹敵するかまたはそれ以上の大きさの透明ハローを形成する菌株が幾つかみられた。Fig. 2-3 にそれら各々の変異株群の中でも特に透明ハローの形成が際だっていた変異株のヨウ素染色プレートを示す。No.113 株と No.64 株からの変異株群については、いずれも生育及びハローの形成ともに概ね普通並であり、特徴的な性質を示す変異株が現れず、選抜の対象とならなかった。

これらの結果から、最終的に糖化酵素高活性変異株として、No.12-2 由来変異

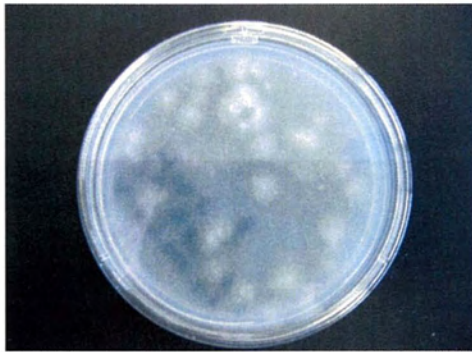
株群から 7 菌株、氷上タイプ株由来変異株群から 6 菌株、吟香株由来変異株群から 1 菌株、計 14 菌株をスクリーニング菌株として選抜した。



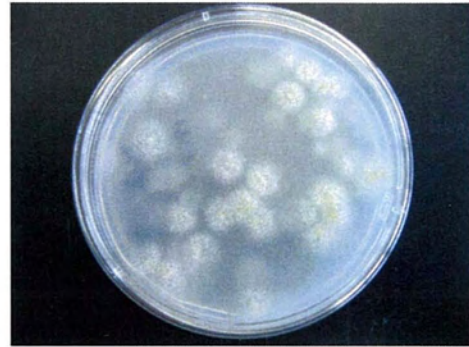
Mutant colonies from *A. oryzae* No.12-2



Mutant colonies from *A. oryzae* No.64



Mutant colonies from *A. oryzae* No.113

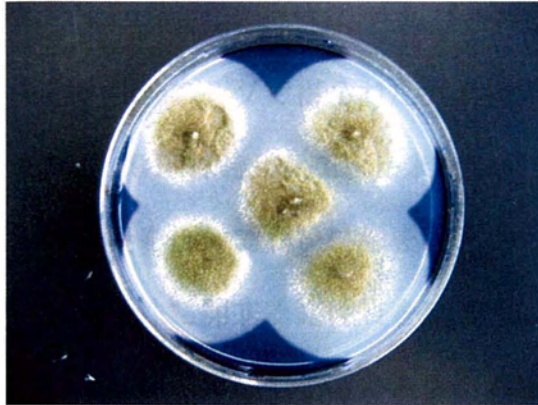


Mutant colonies from *A. oryzae* *Hikami*-type

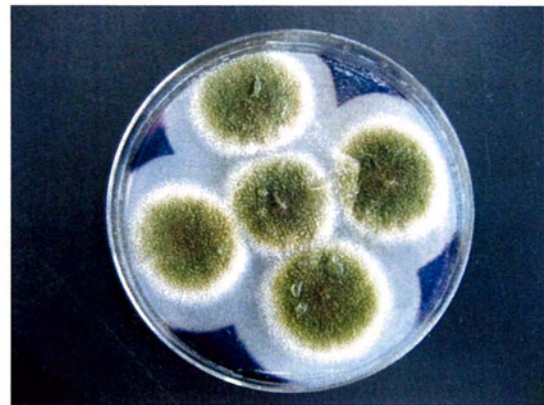


Mutant colonies from *A. oryzae* *Ginka*

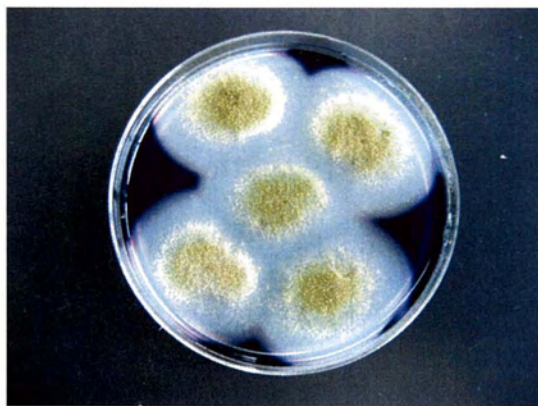
Fig. 2-2 First screening of *A. oryzae* mutants by rice starch plate assay



H-7 strain



No.12-2-9 strain



G-4 strain

Fig. 2-3 Second screening of *A. oryzae* mutants by Iodo-starch reaction

H-7 strain: *A. oryzae* *Hikami*-type mutant strain

No.12-2-9 strain: *A. oryzae* No.12-2 mutant strain

G-4 strain: *A. oryzae* *Ginka* mutant strain

## 2. グルコアミラーゼ高活性及びチロシナーゼ低活性変異株の選抜

スクリーニングで得られた変異株 14 菌株と、比較対照として親株 5 菌株を加えた計 19 菌株を用いて、 $\alpha$  米を原料とした簡易シャーレ製麴法により 44 時間の固体培養を行って実際に麴を製造し、得られた麴について生育特性や酵素力価等の醸造適性に関する諸性質を調査検討して有用な菌株の選抜を行った。

各変異株によって生育の速度に若干差があるものの、いずれの変異株も蒸し米で順調に生育し、問題なく麴となった。各固体培養麴のグルコアミラーゼとチロシナーゼの活性を測定して菌体量あたりの値を親株と比較した結果、Fig. 2-4 に示すようにいずれの変異株もグルコアミラーゼ活性が親株の 2~7 倍程度にまで高められていた。そして、これらの変異株のほとんどはグルコアミラーゼ活性の増加にほぼ比例してチロシナーゼ活性が上昇していたが、唯一 H-1 株だけはチロシナーゼ活性が親株と同じく低活性のままであり、グルコアミラーゼ活性だけが菌体量 1 mg 当たり約 3.5 倍に増加していた。それとは対照的に G-4 株は両酵素活性ともに変異株 14 菌株中最大であり、菌体量当たりのグルコアミラーゼ活性は約 4.4 倍、チロシナーゼ活性は約 36.3 倍も増加がみられた。

各変異株の固体培養麴から調製した摩碎抽出液の保存試験を行い、褐変性を調査した結果、Fig. 2-5 に示すようにチロシナーゼ活性の低い H-1 株麴の摩碎抽出液は 5℃ で 3 週間以上経過しても褐変は起こらず、低褐変性であることが確認できた。しかし、その他のチロシナーゼ活性が高いスクリーニング変異株麴の摩碎抽出液はすべて明らかに褐変した。その褐変の度合いはチロシナーゼ活性とほぼ比例した。

その他の醸造適性の指標となる主要な酵素についても各変異株での活性を測定し、有用性を検討した。No.12-2 株由来の変異株群はいずれも  $\alpha$ -アミラーゼの活性が高めの傾向がみられ、 $\alpha$ -アミラーゼに対するグルコアミラーゼの割合 (G/A



比：糖化の強さの指標)が0.2前後で比較的低く、両酵素間の活性バランスが悪かった。H-1株とH-3株は、 $\alpha$ -アミラーゼ活性が著しく低く、G/A比は0.5以上の高い値を示した (Table 2-1)。また G-4 株は、オリゴ糖の糖化酵素である $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が70 mU/mgで親株や他の変異株に比べて高く、グルコアミラーゼとの総合的な糖化力は親株の4倍の0.82 U/mg 菌体を示し、変異株の中で最大であり非常に強かった (Table 2-2)。米のタンパク質を分解する役目を果たしている酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、H-1株で若干の増加がみられたが、他の変異株では大きな変化はみられなかった (Table 2-3)。また、各変異株の菌体量と菌体外のタンパク質量及び菌体内タンパク質を含む全タンパク質量についても親株と比較した結果、Table 2-4 にまとめたように、全体的に変異株の固体培養麴1 g当たりの菌体量は、親株よりも少なめになっており、特にNo.12-2株由来の変異株7菌株とG-4株の菌体量は親株よりも30%程減少していた。一方、氷上タイプ株由来変異株6菌株とG-4株では、固体培養麴10 g当たりの菌体外のタンパク質量が約1~2 mg増加していた。菌体内タンパク質量においても、H-2株、H-9株及びG-4株において固体培養麴10 gあたり2 mg以上の増加がみられた。

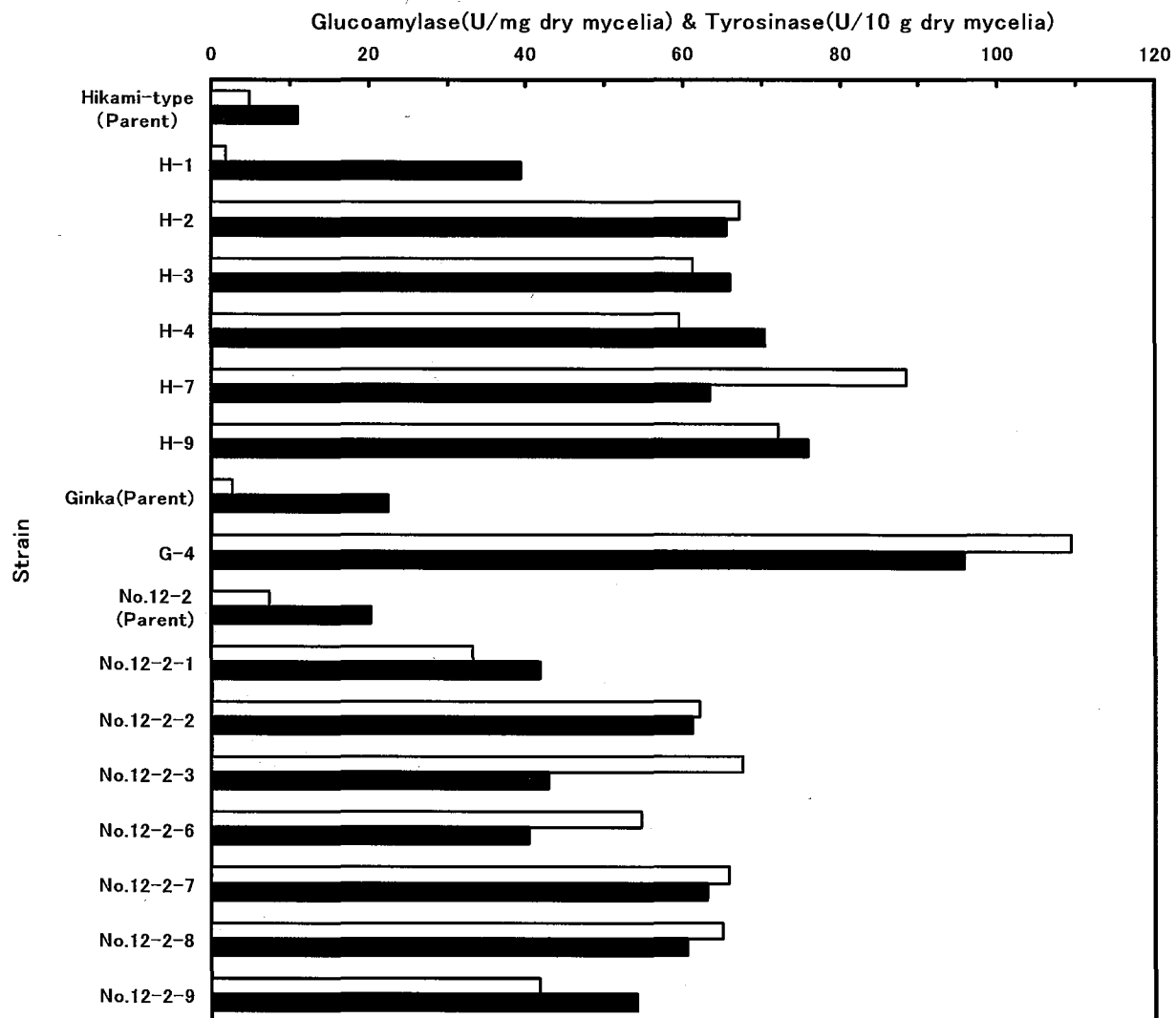
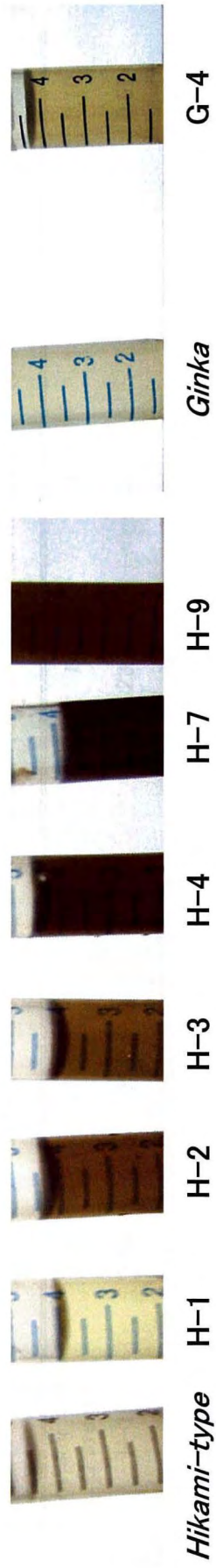


Fig. 2-4 Glucoamylase and tyrosinase activities of parent strains and mutant strains

□ : Tyrosinase activity, ■ : Glucoamylase activity



(Parent strain)



(Parent strain)

Fig. 2-5 Melanization tests of *koji* extract from parent strains and mutant strains

Table 2-1 Saccharifying enzyme activities of parent strains and mutant strains in solid-state culture for 44 h (1)

Strain	$\alpha$ -Amylase			Glucoamylase			G/A ratio
	(U/g dry koji) (U/mg protein)	(U/mg dry mycelia)	(U/g dry koji) (U/mg protein)	(U/mg dry mycelia)	(U/mg dry mycelia)	(U/mg dry mycelia)	
<i>Hikami-type</i> (Parent)	800	1182	110	79	117	11	0.10
H-1	463	653	77	236	332	39	0.51
H-2	1334	1286	214	409	394	65	0.31
H-3	290	324	45	429	480	66	1.48
H-4	1022	1008	151	476	470	70	0.47
H-7	1066	868	147	458	373	63	0.43
H-9	1006	1025	168	455	464	76	0.45
<i>Ginka</i> (Parent)	692	1139	105	148	243	22	0.21
G-4	1089	1086	220	473	472	96	0.43
No.12-2 (Parent)	758	1271	112	136	229	20	0.18
No.12-2-1	1071	1972	254	176	324	42	0.16
No.12-2-2	1221	1660	276	271	368	61	0.22
No.12-2-3	1056	2032	240	188	361	43	0.18
No.12-2-6	1023	1851	250	165	298	40	0.16
No.12-2-7	684	966	159	270	382	63	0.40
No.12-2-8	754	1023	171	267	363	61	0.35
No.12-2-9	1131	1751	276	222	344	54	0.20

G/A ratio: Glucoamylase activity /  $\alpha$ -Amylase activity

Table 2-2 Saccharifying enzyme activities of parent strains and mutant strains in solid-state culture for 44 h (2)

Strain	Saccharification activity			$\alpha$ -Glucosidase	
	(U/g dry koji) (U/mg protein)	(U/mg dry mycelia) (U/mg protein)	(U/g dry koji) (U/mg protein)	(U/mg dry mycelia) (U/mg protein)	(mU/mg dry mycelia)
<i>Hikami-type</i> (Parent)	1.03	1.52	0.14	0.20	27
H-1	2.21	3.12	0.37	0.24	40
H-2	3.52	3.40	0.56	0.29	46
H-3	3.69	4.13	0.57	0.30	46
H-4	4.04	3.99	0.60	0.31	46
H-7	3.85	3.14	0.53	0.28	39
H-9	3.84	3.91	0.64	0.29	48
<i>Ginka</i> (Parent)	1.43	2.35	0.22	0.17	25
G-4	4.08	4.07	0.82	0.33	68
No.12-2 (Parent)	1.37	0.23	0.20	0.18	26
No.12-2-1	1.49	0.28	0.35	0.12	27
No.12-2-2	2.26	0.31	0.51	0.16	36
No.12-2-3	1.61	0.31	0.37	0.13	30
No.12-2-6	1.45	0.26	0.35	0.13	31
No.12-2-7	2.35	0.33	0.55	0.20	46
No.12-2-8	2.32	0.31	0.52	0.19	44
No.12-2-9	1.90	0.29	0.46	0.15	37

**Table 2-3 Tyrosinase and acid carboxypeptidase activities of parent strains and mutant strains in solid-state culture for 44 h**

Strain	Tyrosinase		Acid carboxypeptidase	
	(mU/mg protein) (U/g dry mycelia)	(U/g dry <i>kaji</i> ) (U/mg protein) (U/mg dry mycelia)	(U/g dry <i>kaji</i> ) (U/mg protein) (U/mg dry mycelia)	(U/mg dry mycelia)
<i>Hikami-type</i> (Parent)	2.2	0.5	8623	12747
H-1	0.8	0.2	11577	16340
H-2	16.4	6.7	9589	9249
H-3	31.7	6.1	10732	11999
H-4	23.6	6.0	9061	8941
H-7	35.0	8.8	11647	9490
H-9	19.8	7.2	8978	9148
<i>Ginka</i> (Parent)	1.3	0.3	10190	16760
G-4	28.9	10.9	9029	9006
No.12-2 (Parent)	3.4	0.7	6734	16180
No.12-2-1	14.5	3.3	3431	6835
No.12-2-2	19.2	6.2	7002	9329
No.12-2-3	23.7	6.8	4692	8746
No.12-2-6	19.0	5.5	4501	8346
No.12-2-7	25.1	6.5	6660	9704
No.12-2-8	22.7	6.5	4448	8863
No.12-2-9	13.9	4.2	3859	8859

Table 2-4 Mycelia weight and total protein of parent strains and mutant strains in solid-state culture for 44 h

Strain	Mycelia weight	Protein		Moisture
	(mg/g koji)	Extracellular (mg/10 g koji)	Total <sup>※1</sup> (mg/10 g koji)	(%)
<i>Hikami-type</i> (Parent)	7.2	4.8	11.7	28.5
H-1	6.0	4.9	9.5	31.2
H-2	6.2	7.2	17.7	30.5
H-3	6.5	6.3	8.8	29.6
H-4	6.8	7.0	11.8	30.7
H-7	7.2	8.5	12.6	31.0
H-9	6.0	6.8	15.1	30.9
<i>Ginka</i> (Parent)	6.6	4.3	9.4	29.2
G-4	4.9	6.8	12.8	31.8
No.12-2 (Parent)	6.8	4.2	10.2	30.2
No.12-2-1	4.2	3.7	6.6	31.4
No.12-2-2	4.4	4.9	9.6	32.8
No.12-2-3	4.4	3.6	8.7	30.1
No.12-2-6	4.1	3.6	7.8	34.1
No.12-2-7	4.3	4.8	7.6	32.3
No.12-2-8	4.4	5.0	8.6	31.9
No.12-2-9	4.1	4.4	8.3	32.6

※1 : Total protein including intracellular protein

### 3. スクリーニング変異株の主要酵素活性の経時変化

変異株として選抜した 14 菌株の中で、チロシナーゼ低活性であった H-1 株と、特にグルコアミラーゼ活性及び G/A 比が高かった H-3 株、H-7 株、H-9 株、G-4 株、No.12-2-7 株の計 6 菌株を 30℃で簡易シャーレ製麹法により固体培養し、経時的に菌の生育、グルコアミラーゼ活性とチロシナーゼ活性を測定した。菌体量及び菌体外タンパク質と全タンパク質量（菌体内タンパク質を含む）の結果をそれぞれ Fig. 2-6、2-7、2-8 に示す。いずれのスクリーニング変異株も培養開始後 32 時間目から生育及び菌体内外でのタンパク質生産が旺盛になり、培養 44 時間目まで増加が続いた。それらの増加に伴い、Fig. 2-9 に示すようにグルコアミラーゼ活性も増加して培養後期 40 時間目以降に最も高くなり、活性発現の経時変化は各変異株でほぼ似通っていた。H-1 株のチロシナーゼ活性は培養過程でわずかに増加したが、44 時間後でも植菌時とほとんど同じであり、培養中一貫して活性が低いままであった。それに対して H-1 株以外の変異株では、チロシナーゼ活性はグルコアミラーゼ活性と同様に生育と共に増加し、菌体の増殖が落ち着いた 44 時間培養後においてもまだ増加する傾向がみられた (Fig. 2-10)。



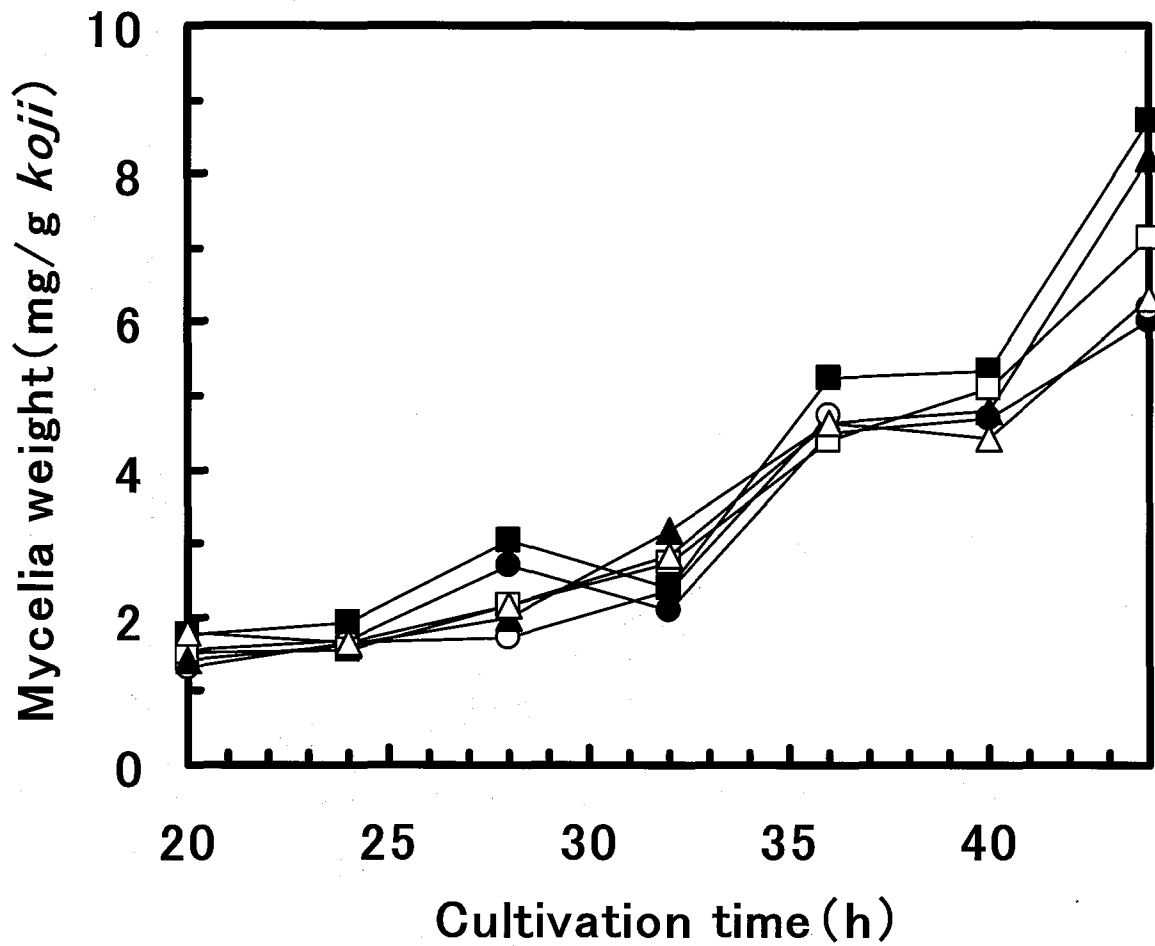


Fig. 2-6 Mycelia weight during the solid-state culture of mutant strains

● : H-1 strain, ○ : H-3 strain, ■ : H-7 strain, □ : H-9 strain,  
 ▲ : G-4 strain, △ : No.12-2-7 strain

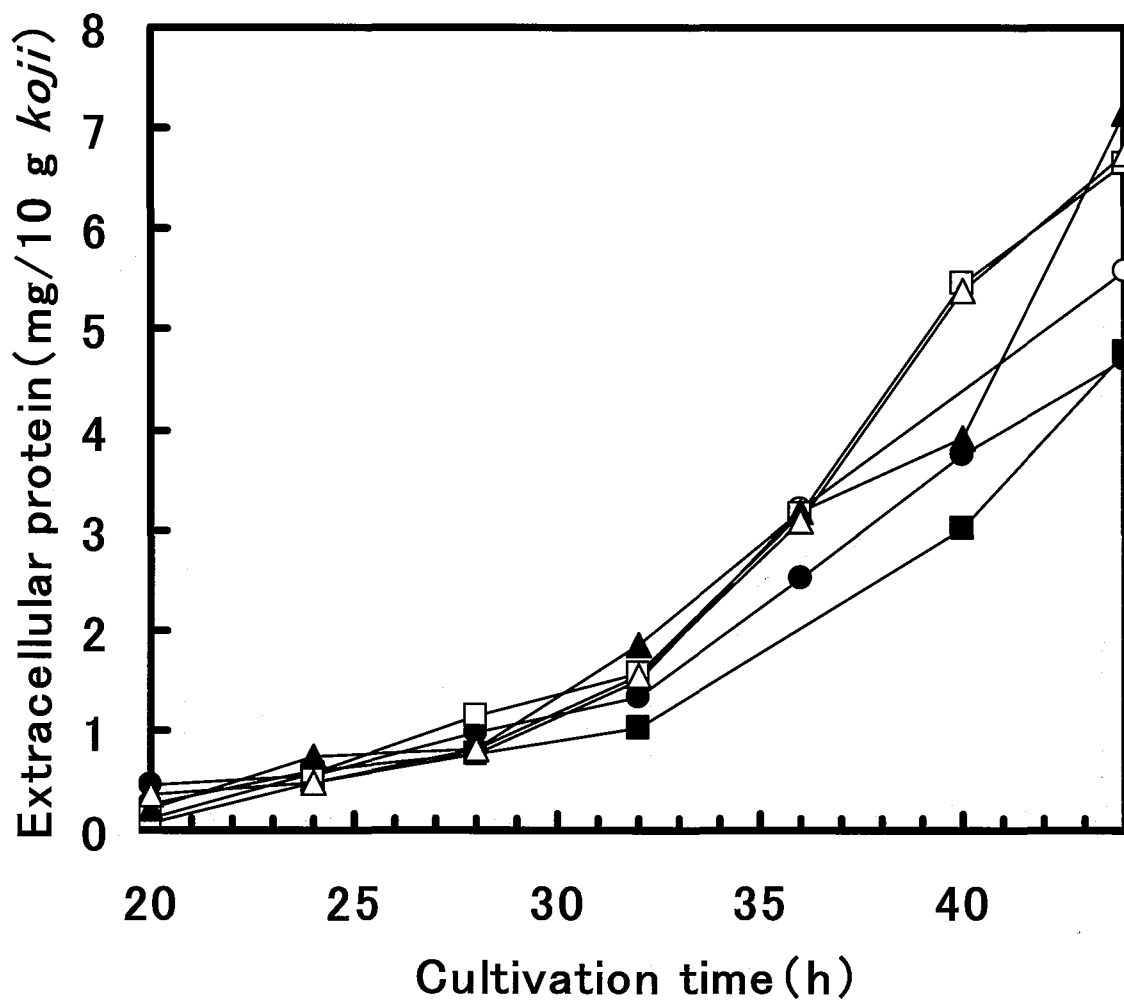


Fig. 2-7 Amounts of extracellular protein during the solid-state culture of mutant strains

● : H-1 strain, ○ : H-3 strain, ■ : H-7 strain, □ : H-9 strain,  
 ▲ : G-4 strain, △ : No.12-2-7 strain

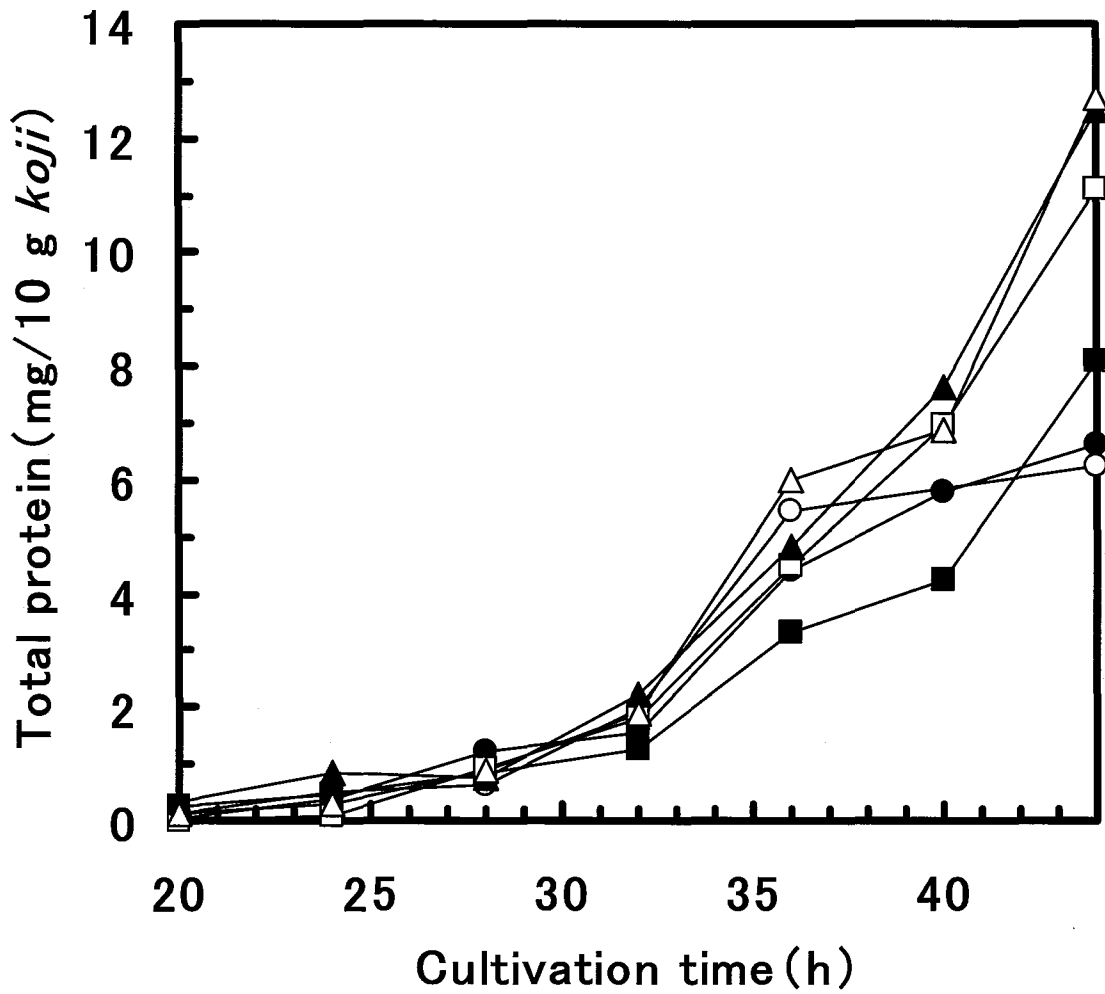


Fig. 2-8 Amounts of total protein (including intracellular protein) during the solid-state culture of mutant strains

●:H-1 strain、○:H-3 strain、■:H-7 strain、□:H-9 strain、  
▲:G-4 strain、△:No.12-2-7 strain

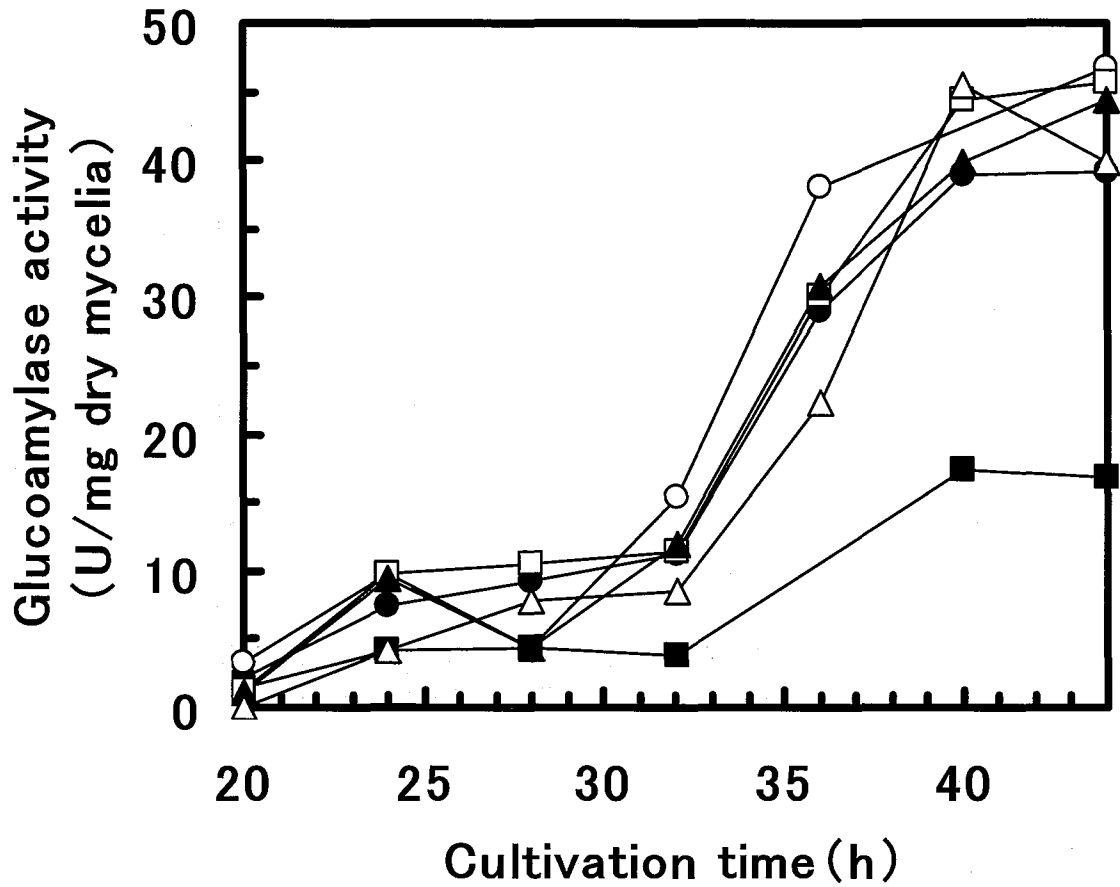


Fig. 2-9 Glucoamylase activity during the solid-state culture of mutant strains

● : H-1 strain, ○ : H-3 strain, ■ : H-7 strain, □ : H-9 strain,  
 ▲ : G-4 strain, △ : No.12-2-7 strain

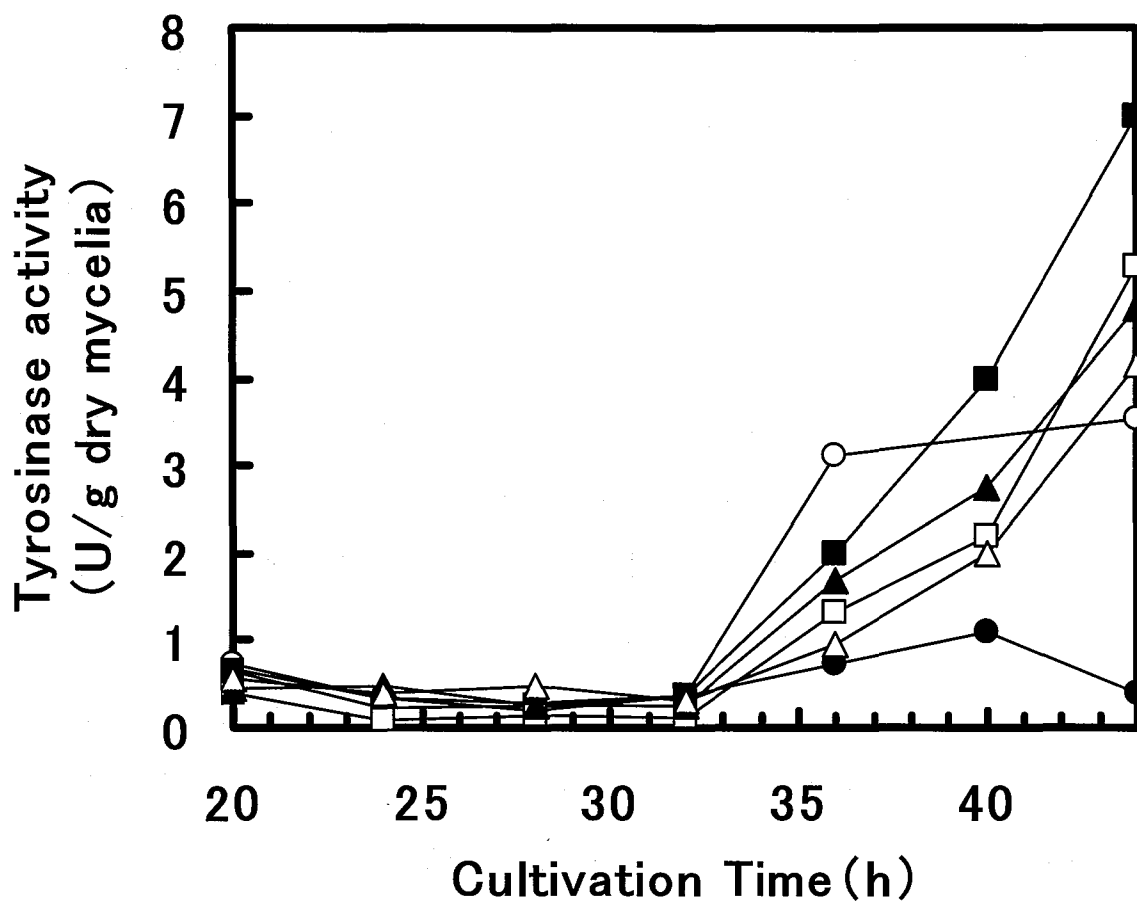


Fig. 2-10 Tyrosinase activity during the solid-state culture of mutant strains

● : H-1 strain, ○ : H-3 strain, ■ : H-7 strain, □ : H-9 strain,  
 ▲ : G-4 strain, △ : No.12-2-7 strain

### III. 考察

これまでに、麴菌の育種方法として原らは致死率 0.1~1%になる程度の強度で紫外線照射を行うことにより、様々なタイプの変異株ができることを報告しているが<sup>17)</sup>、本研究においても既存の 5 つの麴菌株に紫外線照射して突然変異を誘発することにより変異株を取得することに成功した。得られた変異株の中から、清酒醸造用麴菌として必要不可欠な特性として、米デンプン培地に生育が優秀なものを第 1 次スクリーニングで 52 菌株取得し、さらにヨード染色によるプレートアッセイスクリーニング（第 2 次スクリーニング）で高いデンプン分解能力が認められた 14 菌株に絞った。麴菌は、米等での固体培養した場合、主に  $\alpha$ -アミラーゼとグルコアミラーゼによってデンプンの分解を行っていることが明らかにされているので、得られたスクリーニング変異株はそれらの糖化酵素活性が高く、本研究で目的とするグルコアミラーゼ活性の高い菌株がその中に存在している可能性が高いと考えられた。

よって、実際に各スクリーニング変異株について固体培養を行い、得られた米麴のグルコアミラーゼの活性を測定した結果、14 菌株すべてが親株よりも菌体量あたりで約 2 倍以上活性が高く、グルコアミラーゼ高活性変異株であった。既存のグルコアミラーゼ高活性菌株の多くは褐変の原因となるチロシナーゼ活性も高く、両酵素において何らかの関連性があるのではないかと推測されているが、本研究で獲得した変異株でも同様にグルコアミラーゼと連動してチロシナーゼ活性の増加が認められ、あらためてグルコアミラーゼとチロシナーゼは共通の制御機構が働いている可能性が示唆された。

しかし、スクリーニングされたグルコアミラーゼ高活性変異株の中で、唯一 H-1 株のチロシナーゼ活性は親株と同じく低く、この菌株の固体培養麴では褐変が起こらないものと期待された。そのため、H-1 株の固体培養麴の褐変性を検討

した結果、やはり褐変は生じず、確かに低褐変性であったことから、低褐変性なグルコアミラーゼ高活性麹菌株として H-1 株が非常に有望であると考えられる。一方、その他のグルコアミラーゼ高活性変異株は、チロシナーゼ活性が高いため、麹が強く褐変されるので、実用性において大きな問題があると考えられる。

さらに、上記の酵素以外の麹菌の醸造適性を判定する指標となる主要な酵素の活性に関する結果から、G/A 比が低い No.12-2 由来の変異株は、デンプンを液化する酵素である  $\alpha$ -アミラーゼ側に活性のバランスが偏っており、米が溶け過ぎて雑味成分が多く溶け出してしまうため、酒の味が雑になってしまうと考えられ、高品質な清酒の醸造には適さないと判断した。逆に H-3 株に関しては、特に高い G/A 比を示していることから糖化に優れると思われたが、 $\alpha$ -アミラーゼ活性が低すぎるため実用的にみて使用できないと考えられた。また、G-4 株においてはグルコースの生成に関わるグルコアミラーゼと  $\alpha$ -グルコシダーゼの両方の酵素活性が高いことから、他のグルコアミラーゼ高活性菌株よりも総合的なグルコース生産能力がかなり高いことが示唆された。

氷上タイプ株由来変異株 6 菌株と G-4 菌株において、菌体量が増加していないにもかかわらず、菌体内や菌体外のタンパク質量が親株と比較して明らかに増加していることから、これらのスクリーニング変異株ではグルコアミラーゼ等の酵素タンパク質の発現量や菌体外への分泌量が増大している可能性が考えられる。

H-1 株とグルコアミラーゼ活性が特に高いスクリーニング変異株 H-3 株、H-7 株、H-9 株、G-4 株、No.12-2-7 株の固体培養におけるグルコアミラーゼ活性とチロシナーゼ活性の経時変化は菌株によって違いはなく、培養 44 時間目でほぼ最大活性となることがわかったので、これらの菌株の最適な培養時間としては少なくとも 44 時間必要であることが確認できた。

以上の結果から総合的に判断して、スクリーニングされたグルコアミラーゼ高

活性変異株 14 菌株のうちで、氷上タイプ株由来の変異株である H-1 株が、グルコアミラーゼ活性が高くかつ低褐変性なこれまでにない新しい麹菌株として最も有力であり、実用化の可能性が高いと推測されたので、最終的にこの菌株を選択した。さらにチロシナーゼ活性の及ぼす影響や、グルコアミラーゼとチロシナーゼの関連性を解明するための比較対照材料として、チロシナーゼ及びグルコアミラーゼともに高活性な変異株である G-4 株についても着目して、H-1 株と同様に検討を進めていくことにした。



## 第3章 低褐変性、高グルコアミラーゼ活性変異株を用いた製麴試験及び清酒醸造試験

グルコアミラーゼ高活性変異株は香気成分の高い高級酒の醸造に有用であると考えられ、これまでに数多く育種されてきたが、それらの変異株はいずれも高いチロシナーゼ活性を示すことが報告されている。第2章で取得したグルコアミラーゼ高活性変異株の大半もこれまでの報告と同じようにチロシナーゼの活性が高かった。しかし、その中で H-1 株はチロシナーゼが親株と同じく低活性であり、固体培養麴が褐変しないことを明らかにした。

本章では、H-1 株と対照としてチロシナーゼ高活性変異株 G-4 株及び各親株を用い、実地レベルでの米麴の製造試験と清酒醸造試験を行って、実地レベルの製麴条件で実際に現れるグルコアミラーゼ、チロシナーゼ及び主要な酵素の活性の特徴を明らかにし、清酒醸造適性の比較検討を行った。

### I. 実験材料及び方法

#### 1. 使用する麴菌株、酵母及び原料米

製麴試験の麴菌株として、第2章で選抜した低褐変性、高グルコアミラーゼ活性変異株 H-1 株と高褐変性、高グルコアミラーゼ活性変異株 G-4 株、及び対照としてそれぞれの選抜変異株の親株である氷上タイプ株と吟香株の計4菌株を用いた。試験醸造の酵母は当研究室が保有しているカプロン酸エチル高生産酵母変異株 3703-7 株を使用した。原料米はすべて酒造好適米「華想い」の40%精白米を使用した。

## 2. 実地製麴試験

### 1) 各麴菌株の種麴の製造<sup>2)</sup>

#### ①胞子懸濁液の調製

麴汁斜面培地（第2章 I.2 の1））に各菌株を接種し、30℃、5～7 日間胞子が着生するまで培養し、滅菌水 10 ml を加えて胞子を懸濁させた。

#### ②シャーレ培地の調製

97～95%精白の玄米 20 g をぬるま湯に 30 分以上浸漬させて濾紙で水気を切り、9 cm シャーレに移した。木灰 0.2 g（玄米重量の 1%）を添加して玄米全体に行き渡るようにまんべんなく混ぜ、オートクレーブにより 121℃で 20 分間加圧滅菌した。

#### ③シャーレスケールでの種麴培養操作

滅菌した②のシャーレ培地に、胞子懸濁液 5 ml～10 ml を加えて玄米全体に均一になじませてシャーレの蓋をし、30℃で 5 日間程培養した。十分に胞子が着生した後、45℃で余分な水分を飛ばして乾燥させた。

### 2) 実地スケールでの製麴試験

製麴試験は、1) で製造した各選抜変異株及び親株の種麴を 6 g 用い、32℃に冷ました蒸米 20 kg に種麴の胞子を接種して蓋麴法により行った。

## 3. 米麴の酵素活性測定

### 1) 菌体外粗酵素溶液の調製

第2章 I.6 の1) に従って調製した。

## 2) 酵素活性の測定

米麴の各酵素活性は、第2章 I.7 に従って測定した。

## 4. 米麴の麴菌菌体量の測定

米麴中の麴菌菌体量は、麴菌量測定キット（キッコーマン）を用い、第2章 I.8 に従って測定した。

## 5. タンパク質の定量

タンパク質の定量は、第2章 I.9 に従って行った。

## 6. 清酒醸造試験

### 1) 酵母の培養

麴汁液体培地（第2章 I.2 の1）を用いてカプロン酸エチル高生産酵母変異株 3703-7 株を2～3日間静置培養した。

### 2) 清酒醸造もろみの仕込み

製麴試験で得られた各選抜変異株米麴と1) で培養した酵母培養液を用い、Table 3-1 に示す3段階の仕込み配合（汲水歩合 135%、麴歩合 22%）で総米 90 kg の試験醸造を行った。対照として、親株の氷上タイプ株と吟香株の各米麴を用いて同様の試験仕込みを行った。

**Table 3-1 Proportion of raw materials used in sake brewing**

	Seed mash	1st addition	2nd addition	3rd addition	Total
Total rice	4 kg	11 kg	25 kg	50 kg	90 kg
Steamed rice	0 kg	11 kg	18 kg	41 kg	70 kg
Rice <i>koji</i>	4 kg	—	7 kg	9 kg	20 kg
Water	20 kg	—	33 kg	67 kg	120 kg
Lactic acid	54 ml	—	—	—	54 ml
Yeast culture	500 ml	—	—	—	500 ml

## 7. 試験醸造酒の成分分析

試験醸造過程のもろみ及び醸造後の生成酒の一般成分の分析は国税庁所定分析法<sup>28)</sup>に従った。

### 1) アルコール濃度の測定

簡易アルコール分析器アルコメイト AL-2 (理研計器) を用いて気化法によるアルコール濃度測定を行った。アルコールを含有した試料をシリンジ (100  $\mu$ l) を用いてアルコメイト AL-2 の蒸発皿に注入し、アルコールを一定容量の気化槽内に加熱蒸発させ、発生した蒸気中のアルコール濃度をアルコール化学センサで計測した。

### 2) 日本酒度の測定

日本酒度の測定は、密度比重計 DA-310 (京都電子工業) によって試料の比重

を計測し、その比重から次式によって求めた。

$$\text{日本酒度} = (1/\text{比重} - 1) \times 1443$$

※日本酒度とは、清酒の比重を表示するために特に設けられた単位であり、測定温度 15℃で 4℃の純水と同じ重さのもの（比重 1 のもの）を日本酒度（±0）とする。それより比重が軽いものは正の値となり、重いものは負の値となる。

### 3) Brix（シヨ糖度）の測定

Brix はデジタル糖度計 PR-301（ATAGO）を用いて、試料の光屈折率により測定した。単位は、水に溶解しているシヨ糖の重量%として表した。

### 4) 還元糖の定量

還元糖は、Somogyi-Nelson 法<sup>4)</sup>によって測定した。

#### ①銅試薬の調製

A 液：15%硫酸銅五水和物（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）溶液

B 液：無水炭酸ナトリウム 25 g、酒石酸カリウムナトリウム四水和物（ $\text{KOOCC}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ）25 g、炭酸水素ナトリウム 20 g、無水硫酸ナトリウム 200 g を蒸留水に溶かして 1000 ml にメスアップした。

使用直前に A 液と B 液を 1：25 の割合で混ぜ銅試薬とした。

#### ②ネルソン試薬の調製

モリブデン酸アンモニウム四水和物（ $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ）25 g を蒸留水 900 ml に溶解し、これに濃硫酸 42 g 及び予め 50 ml の蒸留水に溶かしておいたヒ酸二ナトリウム七水和物（ $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ）3 g を加え、蒸留水で 1000 ml

にメスアップした。

### ③反応操作

栓付き試験管に試料 1 ml 及び銅試薬 1 ml を加え、栓をして沸騰湯浴中で 10 分間煮沸した。煮沸後、流水で急冷してネルソン試薬 1 ml を加えて素早く混合し、数分間放置後蒸留水 7 ml を加えて希釈し、最終反応液量を 10 ml とした。15 分以上放置後、500 nm における吸光度を測定した。予め 15~300  $\mu\text{g/ml}$  濃度のグルコース標準液を用いて作成した検量線より検体中の還元糖量を求めた。

### 5) グルコースの定量

Glucose Test Kit (Megazyme 製) を用い、第 2 章 I.7 の 1) に従って測定した。

### 6) 酸度 (総酸量) の測定

#### ①ブロームチモール・ブルー (BTB) + ニュートラルレッド (NR) 混合指示薬の調製

BTB 0.2 g 及び NR 0.1 g をエチルアルコール 300 ml に溶解した。

#### ②フェノールフタレイン指示薬の調製

フェノールフタレイン 0.5 g をエチルアルコール 50 ml に溶解した。

#### ③水酸化ナトリウムの力価の標定

0.1 N フタル酸水素カリウム ( $\text{C}_6\text{H}_4(\text{COOK})(\text{COOH})$ 、M.W.=204.22) 標準液 25 ml にフェノールフタレイン指示薬 2 滴を加え、標定しようとする 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で淡桃色を呈するまで滴定した。その滴定量 (ml) を  $m$  とし、力価  $F$  を次式により求めた。

$$F = 0.1 \text{ N フタル酸水素カリウム標準液体積 } 25 \text{ (ml)} / m \text{ (ml)}$$

## ②滴定操作

試料 10 ml をホールピペット等で正確にとり、BTB+NR 混合指示薬 2～3 滴を加え、1/10 N 水酸化ナトリウム溶液で淡緑色を呈するまでの滴定量 (ml) を a とし、次式により酸度を求めた。

$$\text{酸度} = a \times F \text{ (小数点以下 2 位を四捨五入)}$$

## 7) アミノ酸度の測定

### ①中性ホルマリン溶液の調製

ホルマリン 50 ml にフェノールフタレイン指示薬 (本章 I.7 の 6)) 2～3 滴を加え、0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で淡桃色になるまで中和したものに蒸留水を加えて 100 ml にメスアップした。この溶液は、要時調製した。

### ②滴定操作

試料 10 ml をホールピペット等で正確にとり、フェノールフタレイン指示薬 (本章 I.7 の 6)) 2～3 滴を加えて淡桃色になるまで 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液 (力価の標定は本章 I.7 の 6) に従う) で中和した。この溶液にさらに中性ホルマリン溶液 5 ml を加え、ここで遊離した酸を 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で淡桃色になるまで滴定した。この滴定量 (ml) を a とし、次式によりアミノ酸度を求めた。

$$\text{アミノ酸度} = a \times F \text{ (小数点以下 2 位を四捨五入)}$$

## 7) 香気成分の定量

香気成分の定量分析はガスクロマトグラフ (ヘッドスペース法) <sup>42)</sup>により以下

の条件で行った。試料 3 ml を 10 ml 容バイアル瓶にいれ、NaCl 1 g 及び内部標準物質 200  $\mu$ l を添加し、ブチルゴム栓を付けてアルミシールで密封後、オートサンプラーにセットした。試料は 80 $^{\circ}$ C、20 分加熱後、ヘッドスペース 10  $\mu$ l がガスクロマトグラフに導入された。内部標準物質は、アルコール類の内部標準物質として n-アミルアルコール 50 ppm を、エステル類の内部標準物質としてカプロン酸メチル 100 ppm をそれぞれ用いた。

#### ガスクロマトグラフ条件

- ・分析装置：HP 7694 型 (HEWLETT PACKARD, USA)
- ・カラム：HP INNOWAX (Polyethylene Glycol) 30m
- ・検出器：FID
- ・オープン初期温度：50 $^{\circ}$ C
- ・昇温：10.0 $^{\circ}$ C/分
- ・終温：230 $^{\circ}$ C (5 分間保持)
- ・カラム流速：4.22 ml/分
- ・インジェクター温度：250 $^{\circ}$ C
- ・検出器温度：300 $^{\circ}$ C

## II. 実験結果

### 1. 変異株による実地製麴試験

親株（氷上タイプ株及び吟香株）と変異株（H-1 株及び G-4 株）の実地スケールの製麴試験を行い、生育に伴う麴の温度経過を観察した。両変異株の麴は Fig. 3-1 に示すようにいずれも温度経過は順調に推移したが、温度上昇の立ち上がり



が親株とは若干異なった。H-1 株は親株（氷上タイプ株）よりも温度の立ち上がりが遅く、緩やかな温度上昇を示し、菌糸の生育が蒸し米にまわるのがやや遅れ気味であった。G-4 株は親株よりも温度上昇が早い立ち上がりを示し、他の菌株よりも蒸し米への菌糸のまわりが早かった。

製造した各菌株の米麴の酵素活性を測定した結果、Table 3-2 に示すようにグルコアミラーゼ活性は、親株の氷上タイプ株と吟香株の米麴ではそれぞれ 27 U/mg 菌体と 31 U/mg 菌体であったが、変異株 H-1 株と G-4 株の米麴ではそれぞれ 52 U/mg 菌体と 70 U/mg 菌体で、活性は約 2 倍高かった。同時に両変異株米麴は糖化力全体 (Saccharifying activity) や G/A 比も親株米麴より高い値を示し、H-1 株はそれぞれ 1.9 倍と 2.1 倍、G-4 株はそれぞれ 1.9 倍と 1.7 倍であった。また、H-1 株米麴のチロシナーゼ活性は、Table 3-3 に示すように 1.8 U/g 菌体であったのに対して G-4 株米麴では 25 U/g 菌体で、約 14 倍高かった。両変異株米麴は親株米麴よりも菌体量が麴 1 g 当たり約 1 mg 少なく、菌体外及び全タンパク質量 (菌体内タンパク質を含む) は 1.5~2 倍多かった。これらの結果は、第 2 章で行った小スケールでの簡易製麴の場合とほぼ同様の特徴であった。

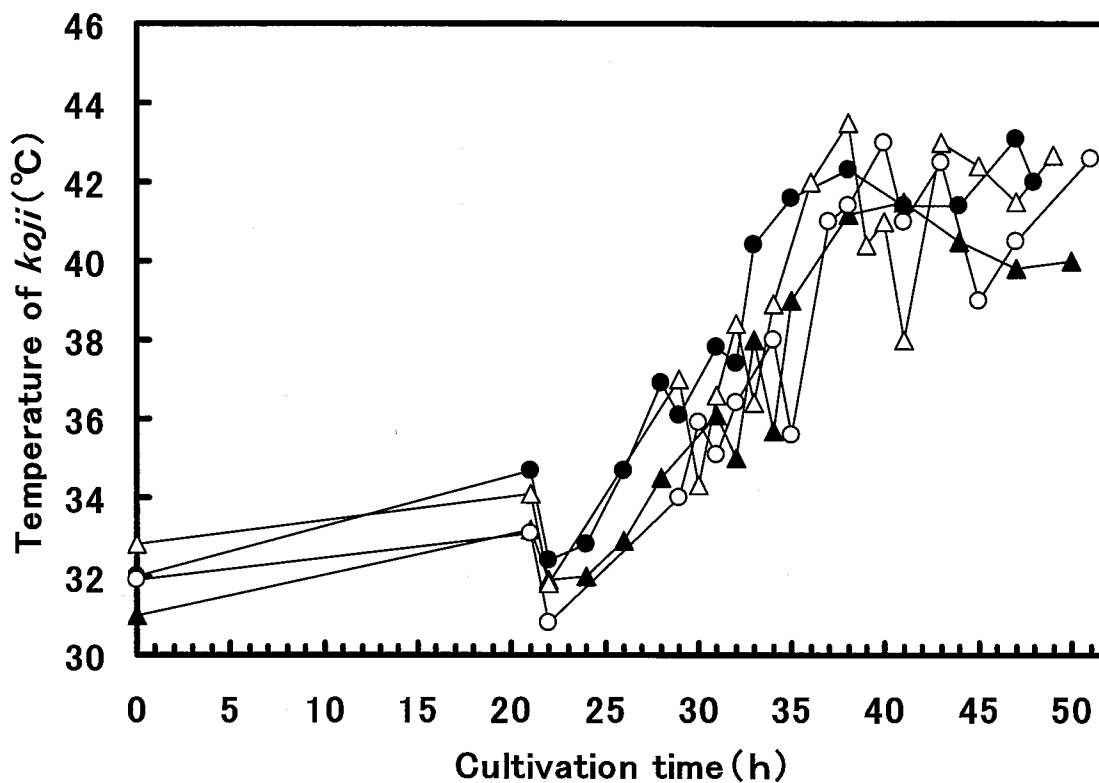


Fig. 3-1 Temperature of *koji* during the *Koji* making by selected parent strains and mutant strains

- : *Hikami-type* strain (parent strain)
- : H-1 strain
- ▲ : *Ginka* strain (parent strain)
- △ : G-4 strain

**Table 3-2 Enzyme activities of rice *koji* made by selected parent strains and mutant strains**

Strain	$\alpha$ -Amylase		Glucoamylase		$\alpha$ -Glucosidase		Saccharifying activity		G/A ratio
	(U/g dry <i>koji</i> )	(U/mg dry mycelia)	(U/g dry <i>koji</i> )	(U/mg dry mycelia)	(U/g dry <i>koji</i> )	(mU/mg dry mycelia)	(U/g dry <i>koji</i> )	(U/mg dry mycelia)	
<i>Hikami-type</i>	1349	219	166	27	0.20	32	1.80	0.29	0.14
H-1	933	176	276	52	0.23	44	2.94	0.55	0.29
<i>Ginka</i>	1406	204	216	31	0.23	34	2.06	0.30	0.15
G-4	1341	260	362	70	0.24	47	2.97	0.57	0.26

Table 3-3 Enzyme activities, mycelia weight and protein of rice *koji* made by selected parent strains and mutant strains

Strain	Tyrosinase		Acid carboxypeptidase		Moisture (%)	Mycelia weight (mg/g dry <i>koji</i> )	Protein	
	(U/mg dry <i>koji</i> )	(U/g dry mycelia)	(U/g dry <i>koji</i> )	(U/mg dry mycelia)			Extracellular (mg/10 g <i>koji</i> )	Total <sup>※1</sup> (mg/10 g <i>koji</i> )
<i>Hikami-type</i>	7	1.2	3898	633	26.0	6.2	3.1	4.9
H-1	10	1.8	4393	829	25.5	5.3	4.8	6.3
<i>Ginka</i>	17	2.5	4054	590	26.1	6.9	3.9	5.0
G-4	129	25.0	4328	838	26.7	5.2	6.8	9.6

※1: Total protein including intracellular protein

## 2. 変異株の麴を用いた試験醸造

親株（氷上タイプ株及び吟香株）と変異株（H-1株及びG-4株）の各米麴を用いて清酒醸造を行った。変異株のもろみはいずれも発酵による温度上昇が親株のもろみと同様の経過をたどり、順調に醸造が進行した（Fig. 3-2）。両変異株の米麴を用いたもろみ中のアルコール濃度は、Fig. 3-3に示すようにいずれも親株米麴を用いたもろみよりも全般に低く推移し、わずかに発酵が弱めであった。また、全還元糖とグルコース濃度は、Fig. 3-4とFig. 3-5に示すように両変異株米麴を用いたもろみの方が親株米麴のもろみと比べて終期まで高く推移した。すなわち、醸造6日目には親株米麴のもろみのグルコース濃度がそれぞれ8%と6%であったのに対して、両変異株米麴のもろみでは12%を越える高濃度であり、最終時（27日目）においても4%と高い濃度であった。そして、酵母が生産する酸類によるもろみの酸度の経過は、変異株米麴と親株米麴のもろみで大きな違いはなかったが、アミノ酸度は変異株米麴のもろみの方が親株米麴のもろみより高く推移した（Fig. 3-6及びFig. 3-7）。

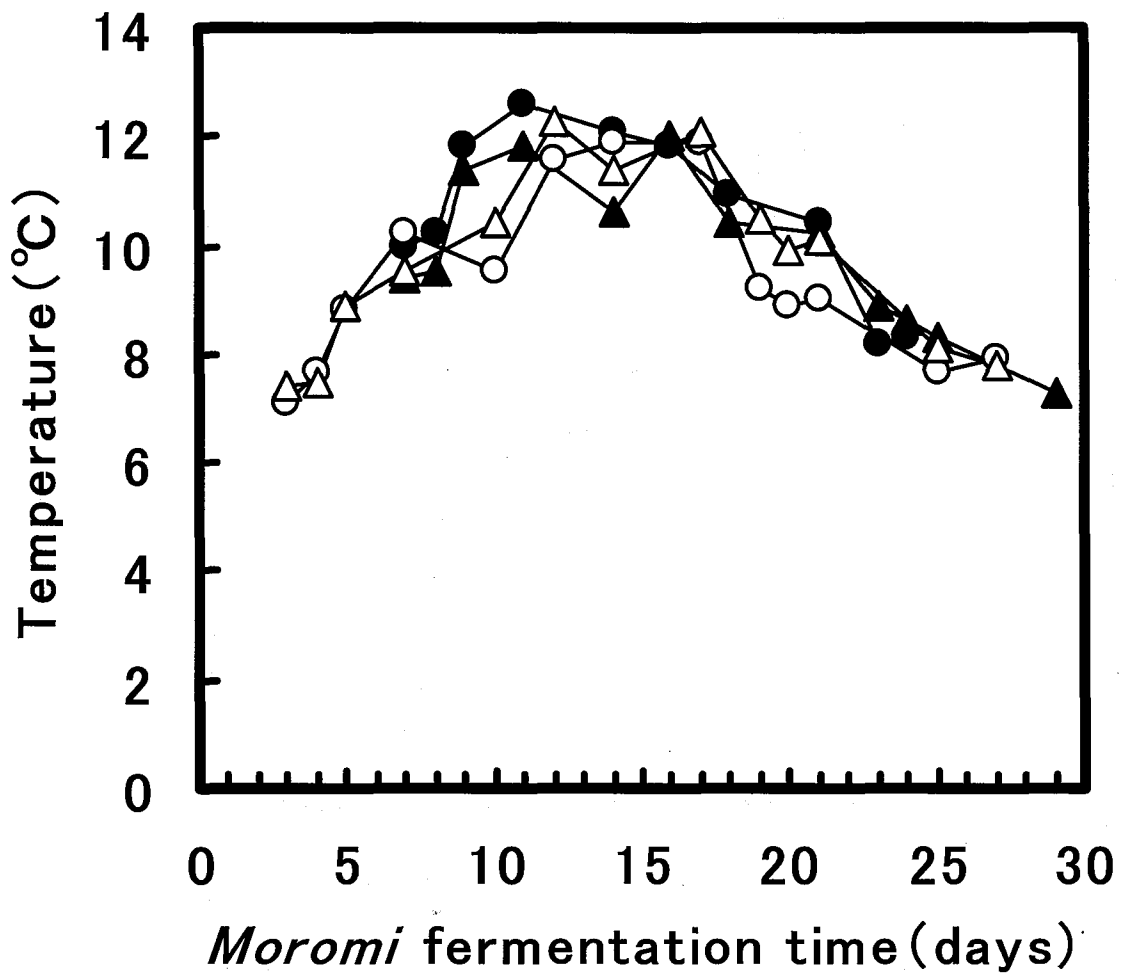


Fig. 3-2 Time courses of temperature in *moromi* during sake brewing test using parent strains and mutant strains

● : *Hikami-type* strain (parent strain)

○ : H-1 strain

▲ : *Ginka* strain (parent strain)

△ : G-4 strain

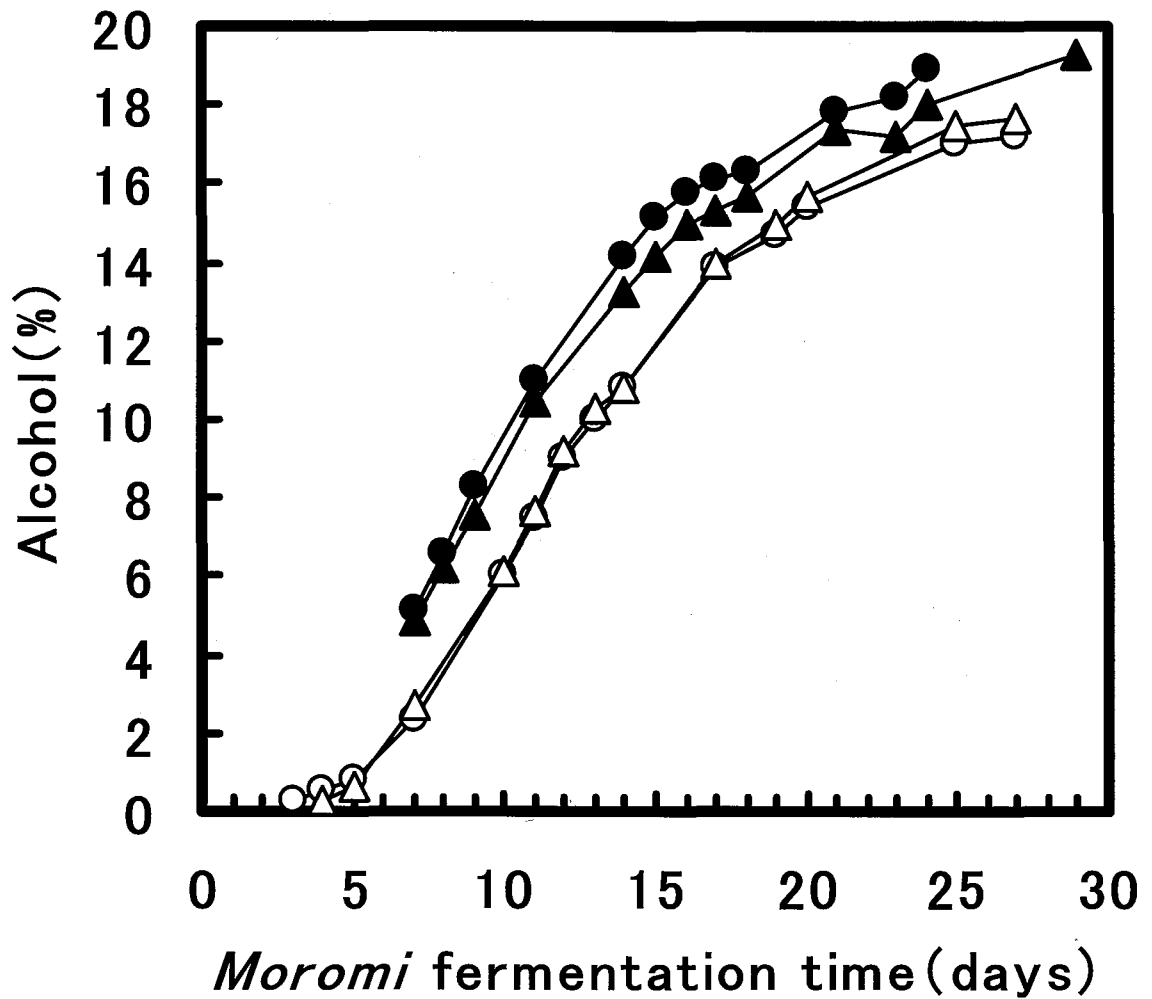


Fig. 3-3 Time courses of alcohol in *moromi* during sake brewing test using parent strains and mutant strains

- : *Hikami-type* strain (parent strain)
- : H-1 strain
- ▲ : *Ginka* strain (parent strain)
- △ : G-4 strain

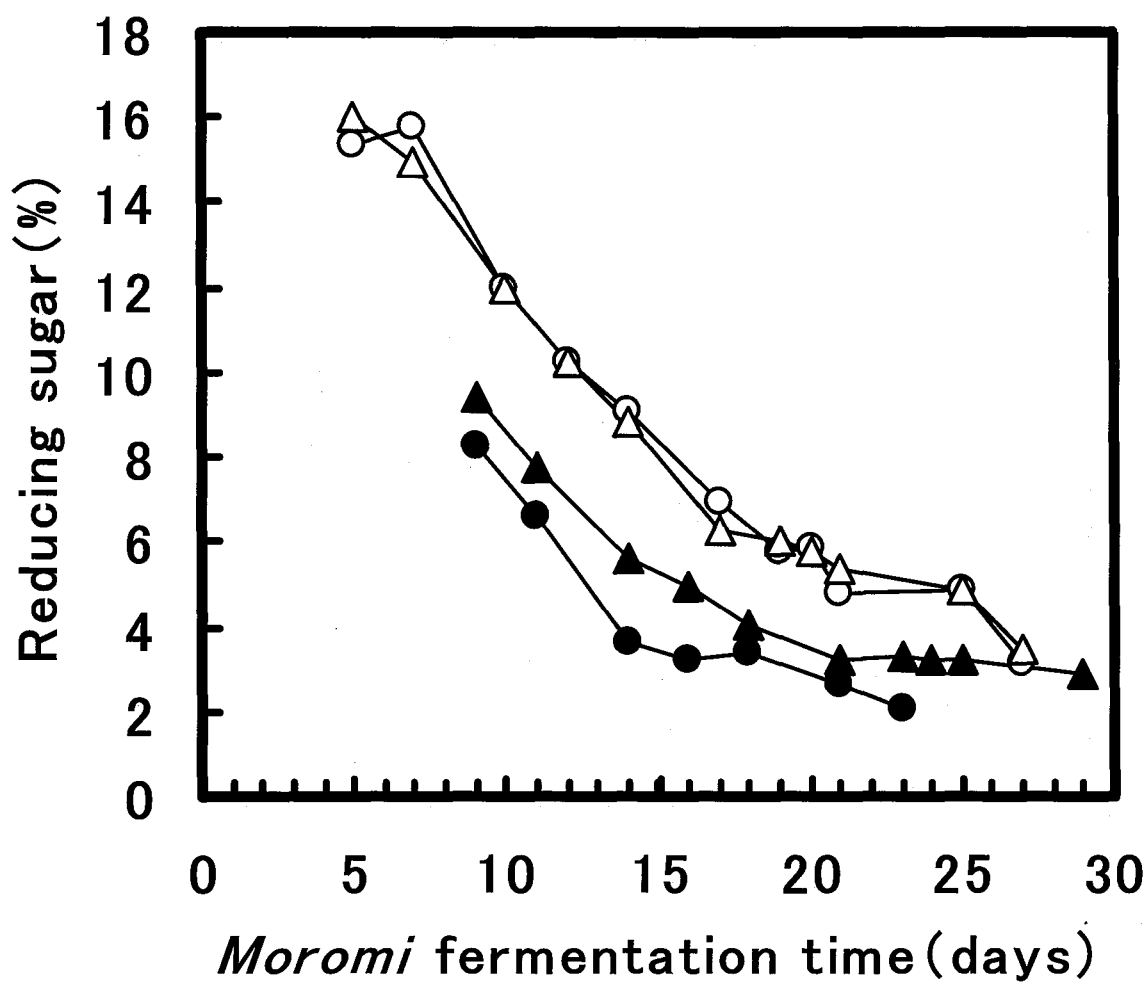


Fig. 3-4 Time courses of reducing sugar in *moromi* during sake brewing test using parent strains and mutant strains

● : *Hikami-type* strain (parent strain)

○ : H-1 strain

▲ : *Ginka* strain (parent strain)

△ : G-4 strain



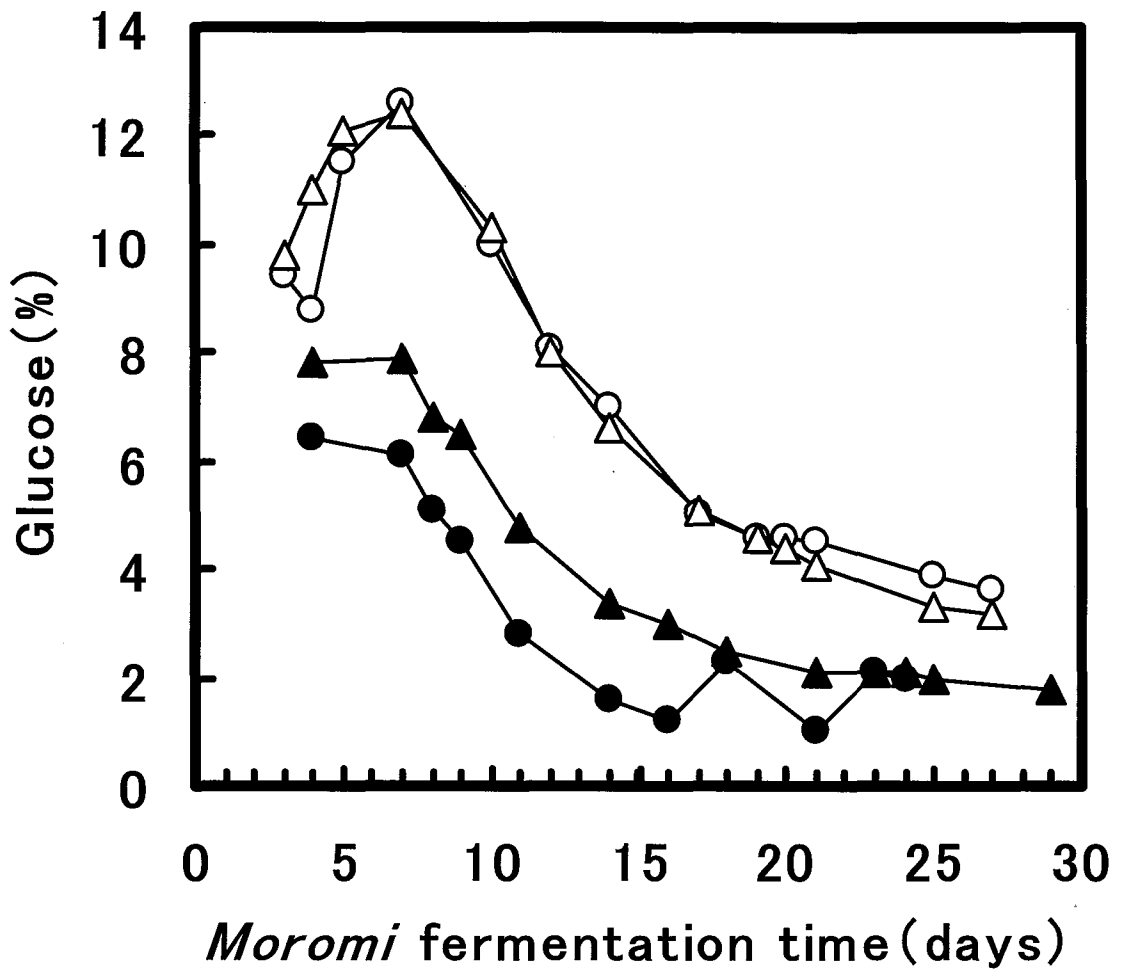


Fig. 3-5 Time courses of glucose in *moromi* during sake brewing test using parent strains and mutant strains

- : *Hikami-type* strain (parent strain)
- : H-1 strain
- ▲ : *Ginka* strain (parent strain)
- △ : G-4 strain

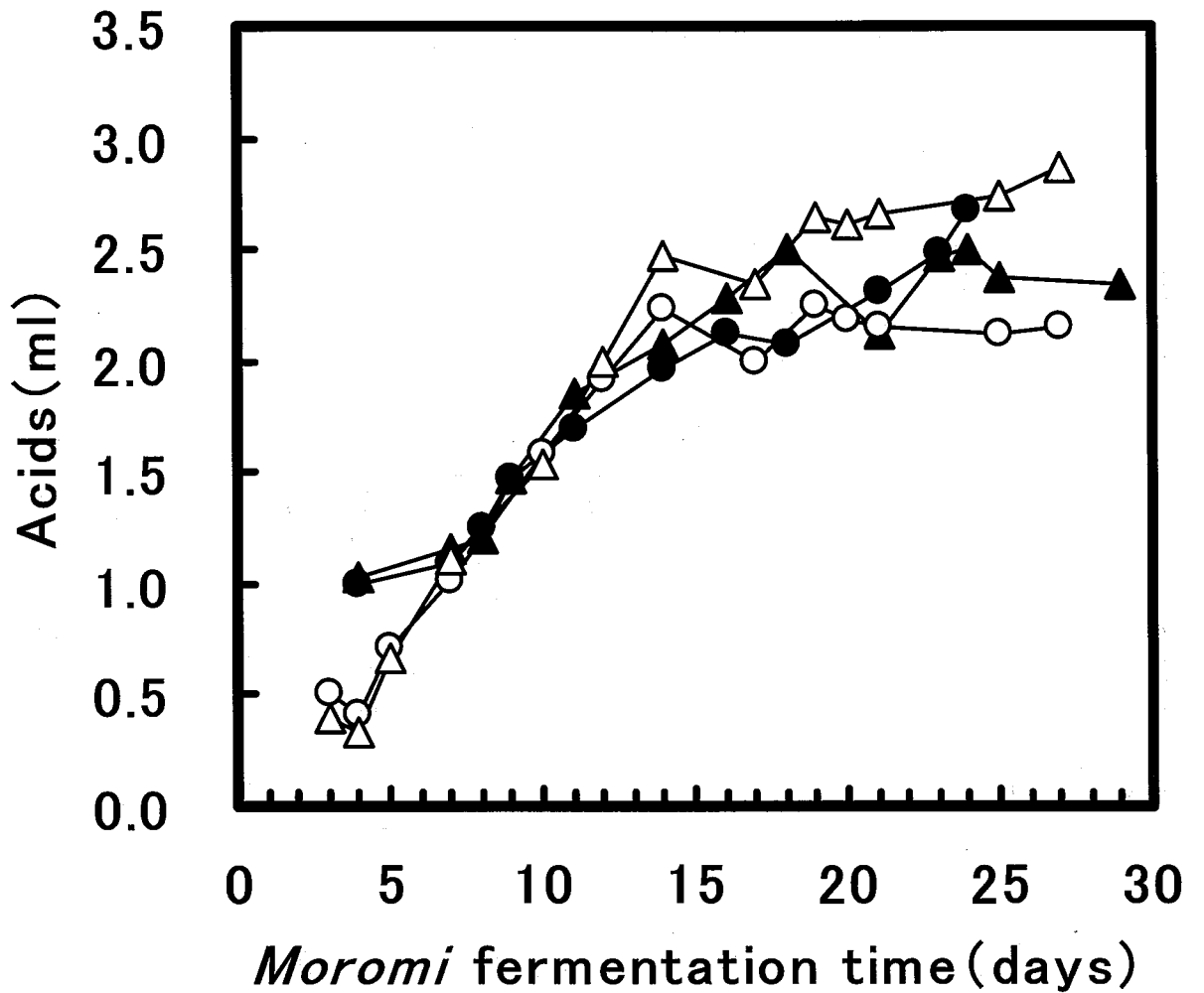


Fig. 3-6 Time courses of acids in *moromi* during sake brewing test using parent strains and mutant strains

- : *Hikami-type* strain (parent strain)
- : H-1 strain
- ▲ : *Ginka* strain (parent strain)
- △ : G-4 strain

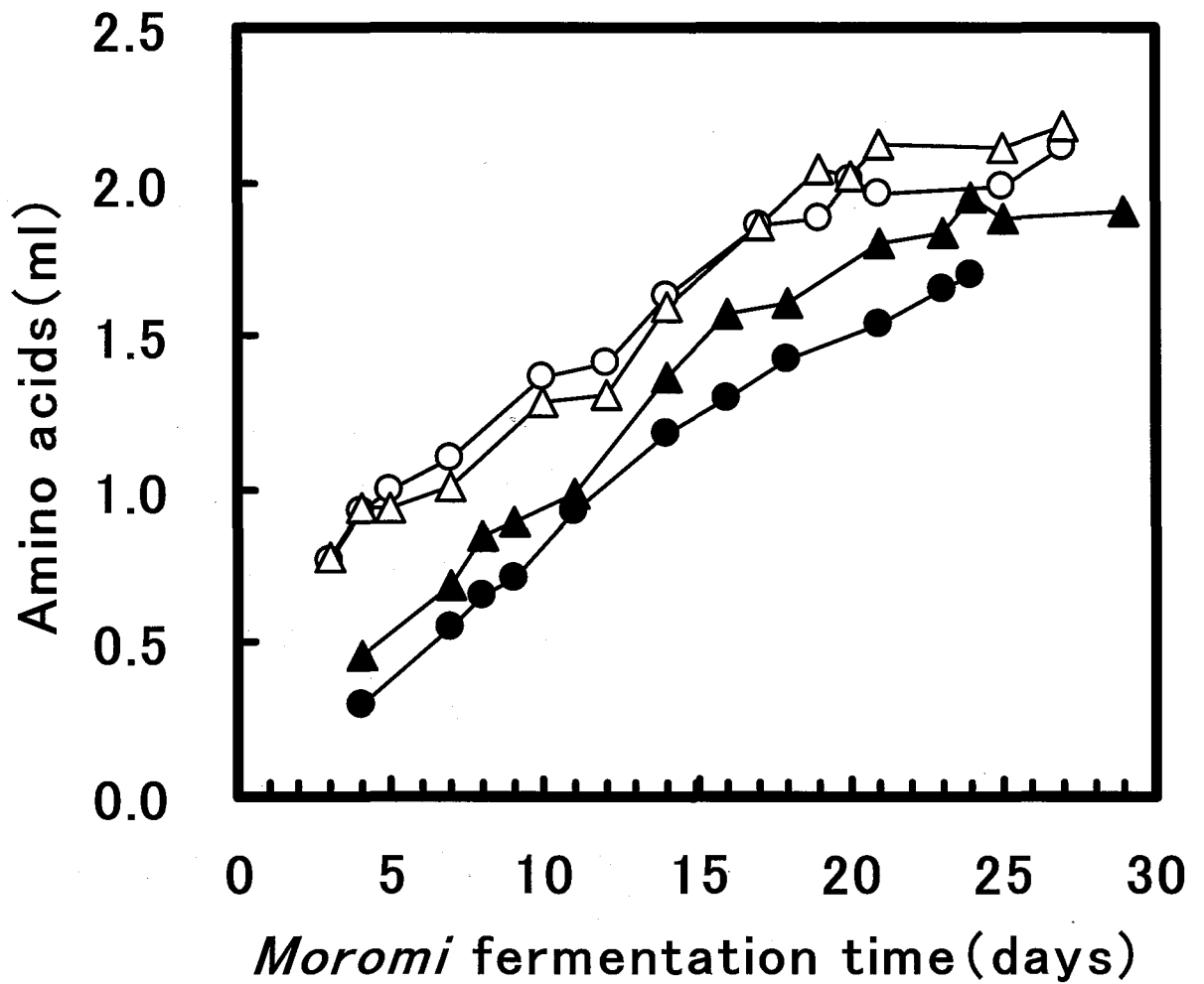


Fig. 3-7 Time courses of amino acids in *moromi* during sake brewing test using parent strains and mutant strains

- : *Hikami-type* strain (parent strain)
- : H-1 strain
- ▲ : *Ginka* strain (parent strain)
- △ : G-4 strain

### 3. 試験醸造酒の分析評価

親株及び変異株の米麴で仕込んだもろみを醸造 26 日から 29 日目で各々上槽し、得られた各生成酒の一般成分を分析した。その結果を Table 3-4 に示す。変異株米麴の生成酒に含まれるグルコース濃度はいずれも 3%以上であり、対照の親株米麴の生成酒が 1~2%であるのに対してかなり高い値を示しており、還元糖に占めるグルコースの割合も 70%以上で非常に高く、もろみでの傾向と同様であった。変異株米麴の生成酒の日本酒度は-8 から -10 で、かなり負（甘めの領域）に傾いておりエキス分が多かった。酸度及びアミノ酸度は変異株米麴の生成酒が 0.2 ~0.5ml 高めであった。変異株米麴の生成酒は 17%以上のアルコール濃度であり、親株米麴の生成酒と同等のアルコールが生産された。

変異株米麴の生成酒に含まれる香気成分のうちカプロン酸エチル生成量は、親株の氷上タイプ株と吟香株は、それぞれ 2.3 ppm、0.9 ppm であったのに対して変異株の H-1 株は 2.5 ppm、G-4 株は 2.9 ppm であり、明らかに親株米麴の生成酒よりも多かった。清酒の香りのバランスの指標として用いられる E-A 比も両変異菌株米麴の生成酒が明らかに高かった (Table 3-5)。

また、チロシナーゼ低活性である H-1 株米麴による醸造後の酒粕は Fig. 3-8 に示すように一ヶ月以上冷蔵してもほとんど褐変が見られなかった。一方チロシナーゼ活性の高い G-4 株米麴により得られた酒粕は強く褐変が現れた。

Table 3-4 Components of sake brewed by selected parent strains and mutant strains

Strain	Alcohol (%)	Sake meter	Brix (%)	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)	Glucose (%)	Reducing sugar (%)	Glucose/Reducing sugar (%)
<i>Hikami-type</i>	18.4	0	12.9	2.1	1.8	1.5	3.7	40.9
H-1	17.0	-10	13.5	1.9	2.0	3.7	4.4	71.6
<i>Ginka</i>	18.8	0	12.9	2.0	2.0	2.0	3.3	60.1
G-4	17.2	-8	13.3	2.5	2.3	3.2	4.8	66.8

Table 3-5 Flavor of sake brewed by parent strains and mutant strains

Strain	Isoamyl acetate (ppm)	Isoamyl alcohol (ppm)	Ethyl caproate (ppm)	E-A ratio
<i>Hikami-type</i>	5.0	143.0	2.3	3.5
H-1	4.9	127.4	2.5	3.8
<i>Ginka</i>	3.5	140.0	0.9	2.5
G-4	4.9	124.5	2.9	3.9

E-A ratio: isoamyl acetate / isoamyl alcohol × 100



H-1 strain



G-4 strain

Fig. 3-8 Melanization of sake cakes brewed by mutant strains  
(Storage condition: 5°C, 4 weeks)

### III. 考察

親株と変異株を蒸し米に培養し、実地スケールでの製麴試験を行った。H-1 株は親株氷上タイプ株に対して生育の立ち上がりが遅く、G-4 株は親株吟香株に対して速いなど親株に対する変異株の菌糸の伸長速度が若干異なったが、特に大きな違いはなくいずれも順調に米麴を製造することができた。製造した両変異株米麴のグルコアミラーゼ活性は高く保持され、チロシナーゼ活性は小スケールでの簡易製麴と同様に H-1 株は低活性で、G-4 株は高い活性を示した。これらの結果は変異株による実地スケールでの麴製造が実用可能であることを示唆している。

変異株と親株の米麴での醸造により得られた生成酒の香気成分を分析した結果、両変異株米麴を用いた生成酒のカプロン酸エチル生成量はいずれも親株米麴で醸造した生成酒よりも多く、特に G-4 株米麴の生成酒は親株米麴の生成酒に対して 3.2 倍の生成量があり、増加が顕著であった。村中らは本研究の醸造試験で使用した 3703-7 株酵母のカプロン酸エチル生産について、今回の親株麴のもろみ程度のグルコース濃度 6~8%よりは変異株麴もろみのように 10~12%の高い濃度のほうがカプロン酸エチルは多く生成されることを報告している<sup>43)</sup>。従って、G-4 株で製造した米麴のグルコアミラーゼ活性が親株や H-1 株の米麴よりも高い活性を持つことによって、もろみ中のグルコース濃度がより高濃度になっていることにより、カプロン酸エチル生成量が上昇したものと推察される。また、これらの結果は変異株米麴の高いグルコアミラーゼ活性によって芳醇な生成酒が醸造されることを示唆している。

一般成分の分析結果から、変異株米麴の生成酒は、もろみでの傾向と同様に糖類、特にグルコース濃度が対照の親株米麴の生成酒よりもかなり高くなり、日本酒度が負の領域になっていることからエキス分の高い甘めのタイプの清酒になることが明らかとなった。変異株 H-1 株と G-4 株の米麴の生成酒は、還元糖に占め



るグルコースの割合が顕著に高くなっており、糖化酵素類に占めるグルコアミラーゼの比率の高さが表れていた。これらの結果から、両変異株の糖化力は非常に強いので、仕込みに用いる際に従来の種麹菌の場合の仕込配合よりも麹歩合を減少させることが可能であると考えられ、それによりコストダウンや作業の低減にもつながるものと期待される。また、変異株米麹の生成酒は実用的には十分なレベルのアルコール濃度があり、親株米麹の生成酒と比較しても遜色のない良好な酒質であることが確認された。

H-1 株米麹を使用して醸造された酒粕に褐変は見られなかった。H-1 株は実地レベルで使用しても低褐変性であることが実証された。それとは対照的に、チロシナーゼ活性の高い G-4 株米麹で醸造された酒粕は褐変することが実地レベルで明らかにされた。

以上の結果を総合的に考察すると変異株 H-1 株と G-4 株のグルコアミラーゼ活性とチロシナーゼ活性は、簡易シャーレ製麹実験室レベルと清酒醸造実地レベルでの結果が示すように再現性実験により安定した性質であることが確認され、高いグルコアミラーゼ活性を持つ麹菌株は吟醸酒醸造に適した麹菌であることを示唆している。実施レベルでの醸造試験で、グルコアミラーゼ高活性で酒粕が褐変しない H-1 株は香気成分の高い芳醇な酒を醸造するうえで実的に優れた麹菌株であるものと考えられた。

## 第4章 グルコアミラーゼの精製と諸性質の解明

第2、3章で、低褐変性、高グルコアミラーゼ活性変異株 H-1 株及び高褐変性、高グルコアミラーゼ活性変異株 G-4 株を用いて実地スケールで製麴した米麴は、前者は低褐変性でグルコアミラーゼ活性が高く、後者は高褐変性で高グルコアミラーゼ活性の麴であり、それらの米麴で醸造した清酒は、酒粕の褐変性は異なりましたが、親株の米麴で醸造した清酒よりもいずれも香気成分が高く、品質が良いことを明らかにした。

本章では、変異株の高グルコアミラーゼ活性の要因を解明するために米麴からグルコアミラーゼを精製し、比活性や分子量及び熱安定性など酵素の特徴を親株のグルコアミラーゼと比較検討した。

### I. 実験材料及び方法

#### 1. 使用菌株

低褐変性、高グルコアミラーゼ活性変異株 H-1 株と高褐変性、高グルコアミラーゼ活性変異株 G-4 株及び対照としてそれぞれの変異株の親株である氷上タイプ株と吟香株の計 4 菌株を用いた。

#### 2. グルコアミラーゼの精製

##### 1) 変異株及び親株の固体培養（米麴の製造）

第3章 I.2 に従って変異株及び親株の大量固体培養を行い、各菌株それぞれ米麴 5 kg を製造した。

## 2) 菌体外粗酵素抽出溶液の調製

親株の固体培養麹 1,750 g、選抜変異株の固体培養麹 2,000 g それぞれから 6 リットルの 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で一昼夜振とうしながら菌体外酵素を抽出した。抽出液をさらにホロファイバーシステム CH2 (MILLIPORE) により脱塩濃縮して菌体外粗酵素抽出液を調製し、グルコアミラーゼの精製に用いた。

## 3) DEAE-Sepharose Fast Flow カラムによる陰イオン交換クロマトグラフィー

濃縮後の各菌体外粗酵素抽出溶液を 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した DEAE-Sepharose Fast Flow カラム (Amersham Biosciences、内径 3.0 cm×高さ 30 cm) に添加し、210 ml/h の速度で同緩衝液により洗浄し、非吸着画分として 10ml ずつ分取した。約 1200 ml 洗浄後、0~0.5 M NaCl 濃度 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) のリニアグラジェントにより溶出を行い、10 ml ずつ分取した。分取した非吸着とグラジェント溶出の各画分のタンパク質濃度を測定してタンパク質溶出ピークを検出し、さらに各画分のグルコアミラーゼ活性を第 2 章 I.7 の 1) に従って測定して活性画分を集め、限外濾過により脱塩濃縮した。

## 4) Sephacryl S-300 カラムによるゲル濾過クロマトグラフィー

DEAE-Sepharose Fast Flow により溶出された活性画分の脱塩濃縮試料を 0.1 M NaCl を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した Sephacryl S-300 カラム (Amersham Biosciences、内径 2.5 cm×高さ 115 cm) に添加し、0.6 ml/min の速度で平衡化と同じ緩衝液を流して分子篩いによる分離を行い、5.9 ml ずつ分取した。分取した各溶出画分のタンパク質濃度を測定してタンパク質溶出ピークを検出し、さらに各溶出画分のグルコアミラーゼ活性を第 2 章 I.7 の 1) に従って測定して活性画分を集めた。

### 3. ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

による分子量測定

SDS-PAGE は Laemmli<sup>44)</sup>の方法に従って行った。

#### 1) 試薬

##### ①ポリアクリルアミドゲル

既製の 12.5%ポリアクリルアミドゲル e-PAGEL (ATTO) を使用した。

##### ②試料変性剤

以下の組成の Ez-Apply (ATTO) 試薬を使用した。

- 100 mM Tris-HCl (pH 8.8)
- 2% SDS (w/v)
- 20% Sucrose (w/v)
- 0.06% Bromo phenol blue (BPB)
- 100 mM Dithiothreitol (DTT)

##### ③泳動用緩衝液

以下の組成の 1×Ez-Run (ATTO) 溶液を使用

- 25 mM Tris
- 0.192 M Glycine
- 0.1% SDS (w/v)

##### ④CBB 染色液

Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad) 染色液を使用した。

### ⑤分子量マーカー

Low Molecular Weight Calibration Kit (Amersham Biosciences) を使用し、以下の6種類の分子量マーカータンパク質の粉末が入っている1バイアルに蒸留水 100  $\mu$ l と試料変性剤 100  $\mu$ l を加えて溶解し、5分間煮沸して変性させた。

- ・ Phosphorylase b : 97,000 Da
- ・ Albumin : 66,000 Da
- ・ Ovalbumin : 45,000 Da
- ・ Carbonic anhydrase : 30,000 Da
- ・ Trypsin inhibitor : 20,100 Da
- ・  $\alpha$ -Lactalbumin : 14,400 Da

### 2) 試料の調製

タンパク質 20  $\mu$ g 程度を含む試料溶液 5~10  $\mu$ l に等量の試料変性剤 (ATTO) を加え、5分間煮沸して変性させた。

### 3) 分析操作

ミニスラブ電気泳動装置 AE-6530 (ATTO) の泳動槽に 12.5%既製ポリアクリルアミドゲルをセットし、コームを外して上下の泳動槽に泳動用緩衝液を満たした。ゲルのウェルに調製した試料 (20  $\mu$ l 以下) 及び分子量マーカー (1~5  $\mu$ l) を添加して、20 mA の定電流でマーカーBPB 色素がゲルの下端近くまで泳動されるまで約1時間泳動した。

泳動終了後、ゲルを蒸留水で洗浄してから CBB 染色液で約1時間染色し、蒸留水で不要部分の色素を除いた。

#### 4. グルコアミラーゼ活性の熱安定性の検討

親株及び変異株の精製グルコアミラーゼ試料 100  $\mu$ l (50 mM 酢酸緩衝液、pH 5.0) を恒温水槽で 30、40、50、60、70 $^{\circ}$ C で 10 分間、20 分間及び 40 分間熱処理した後、第 2 章 I.7 の 1) に従って残存しているグルコアミラーゼ活性を測定した。未加熱の精製グルコアミラーゼ試料の活性値を 100% として熱安定性曲線を作成した。

#### 5. CD スペクトルによる熱変性曲線の分析

##### 1) CD スペクトル分析試料の調製

各変異株及び親株の精製グルコアミラーゼ標品を透析膜を用いて蒸留水で 12 時間以上透析して脱塩し、凍結乾燥した。この試料 1 mg を MiliQ 水を用いて作製した 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1 ml に溶解し、1 mg/ml 濃度の CD スペクトル試料溶液とした。

##### 2) CD スペクトル分析操作

CD スペクトル試料 1 ml と、対照として 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1 ml をそれぞれ脱気してから測定に使用した。

パスツールピペットで 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1 ml を専用の角形石英セルに静かに入れ、JASCO J-725 CD spectropolarimeter (日本電子) 装置に装着して以下に示した条件で測定した。同条件で試料も測定し、試料の 219 nm 波長での測定値から対照の 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) の 219 nm での測定値を差し引いた CD スペクトルをデータとして使用した。

## CD スペクトル測定条件

- Date mode : CD
- Ch2-mode : HT
- Range : 240-190 nm
- Band width : 2.0 nm
- Resolution : 1 nm
- Accumulation : 20
- Sensitivity : 50 mdeg
- Response : 1 sec
- Speed : 200 nm/min

また、同試料の熱変性曲線を作製するため、30℃及び40℃～64℃の2℃間隔の各温度で、アルミニウム加熱ブロックを用いて5分間熱処理した試料のCDスペクトルを上記の条件で測定した。この場合も、各試料の219 nm波長でのCDスペクトルの測定値から対照の20 mM酢酸緩衝液(pH 5.0)の219 nmでの測定値を差し引いた結果をデータとして使用した。

## II. 実験結果

### 1. 変異株及び親株からのグルコアミラーゼの精製と分子量比較

各菌株の米麴から調製した菌体外粗酵素抽出液の全活性は130,000～340,000 U、全タンパク質は約500～900 mg、比活性は約230～380 U/mgであった。限外濾過で50 ml以下の液量に濃縮した各菌体外粗酵素抽出液を、まずDEAE-Sepharose Fast Flowカラムでの陰イオン交換クロマトグラフィーによ

って精製分離した。各菌株の菌体外粗酵素抽出液の DEAE-Sepharose Fast Flow カラムクロマトグラフィーによるグラジエント溶出画分のクロマトパターンを Fig. 4-1~4-4 に示す。いずれも非吸着画分にグルコアミラーゼ活性の溶出は認められず、0~0.5 M の NaCl 濃度のグラジエントによって、グルコアミラーゼ活性がグラジエント前半 (0~0.3 M NaCl 相当) で溶出された。各菌株のグルコアミラーゼ活性画分 (Fr. 30~60) を回収して Sephacryl S-300 によるゲル濾過クロマトグラフィーを行い、さらに精製分離した。Fig. 4-5~4-8 に各菌株のグルコアミラーゼ活性画分の、Sephacryl S-300 クロマトグラフィーによるクロマトパターンを示す。各菌株のグルコアミラーゼ活性画分は、いずれも 1 本のタンパク質ピークとして認められ、活性ピークとほぼ一致していることから精製が完全になされたと考えられた。そのため、活性ピークが最大の 71 本目のフラクションを単一のグルコアミラーゼ最終精製標品とした。ピークのクロマトパターンは親株と変異株で同様であり、ほぼ同じ分画位置で溶出された。

各菌株のグルコアミラーゼを 2 回のカラムクロマトグラフィーによって精製した各ステップのタンパク質と比活性を Table 4-1~4-4 に示す。DEAE-Sepharose Fast Flow カラムクロマトグラフィーにより得られた変異株 H-1 株と G-4 株の精製グルコアミラーゼの全タンパク質量は、それぞれ 381 mg (190.5 mg/kg 麴) と 373 mg (186.5 mg/kg 麴) であり、親株の氷上タイプ株及び吟香株の全タンパク質量 134 mg (76.6 mg/kg 麴) と 201 mg (114.9 mg/kg 麴) よりも明らかに多かった。

各菌株の精製グルコアミラーゼの比活性は、H-1 株は 756 U/mg、親株の氷上タイプ株は 764 U/mg であり、ほとんど同じ比活性であった。同様に G-4 株とその親株の吟香株の精製グルコアミラーゼの場合においても、比活性はそれぞれ 763 U/mg と 803 U/mg でほとんど違いはなかった。



また、各菌株の精製グルコアミラーゼについて SDS-PAGE 分析を行い、精製度と分子量を測定した。その結果を Fig. 4-9 に示す。いずれの菌株の精製グルコアミラーゼにおいてもブロードな 1 本のバンドのみが認められた。変異株の精製グルコアミラーゼの分子量は泳動度から 70~95 kDa と推定され、親株の同酵素（推定分子量：65~95 kDa）と比較すると泳動度が明らかに異なっていて、検出されたバンドの下端位置の推定分子量が約 5 kDa 程大きく、分子量分布状態が変化しているように見受けられた。

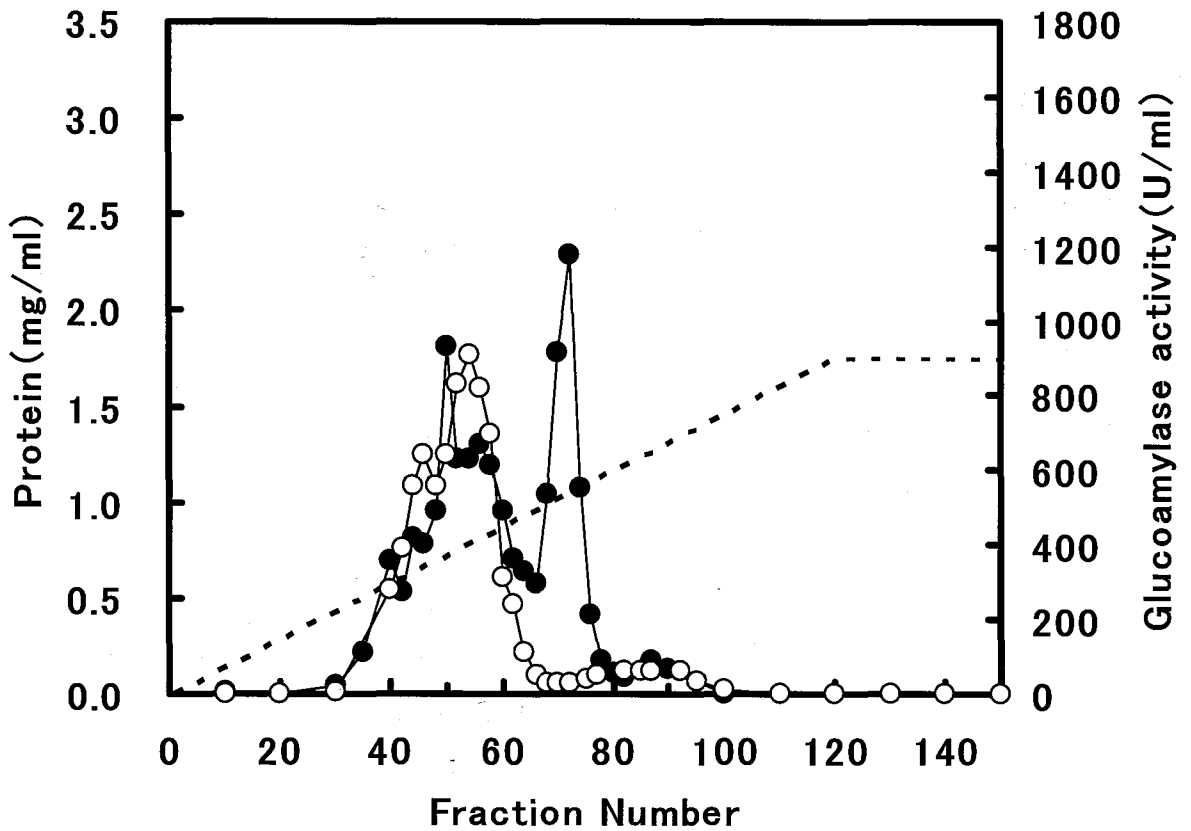


Fig. 4-1 DEAE-Sepharose Fast Flow column chromatography of glucoamylase from *Hikami-type* strain

● : Protein

○ : Glucoamylase activity

----- : NaCl concentration (0 - 0.5 M)

Fraction volume: 10 ml/tube

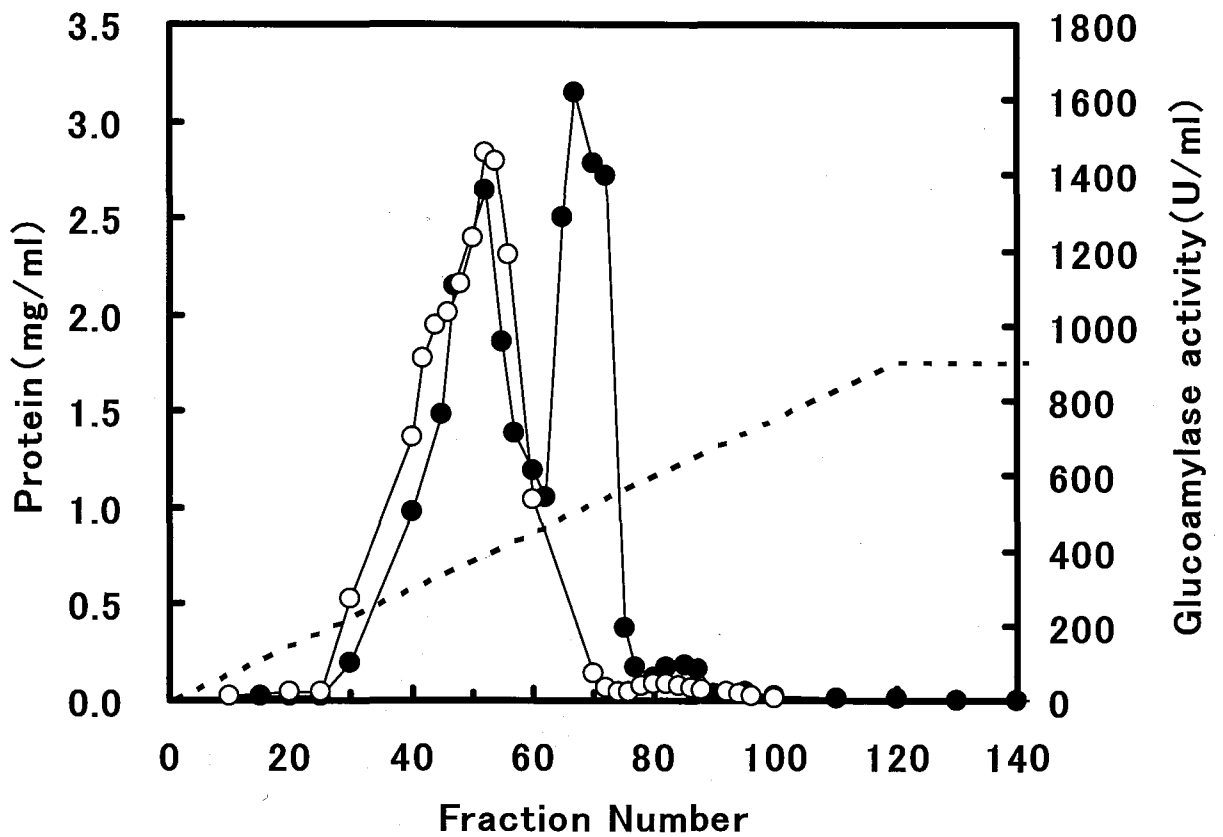


Fig. 4-2 DEAE-Sepharose Fast Flow column chromatography of glucoamylase from H-1 strain

- : Protein
- : Glucoamylase activity
- : NaCl concentration (0 - 0.5 M)

Fraction volume: 10 ml/tube

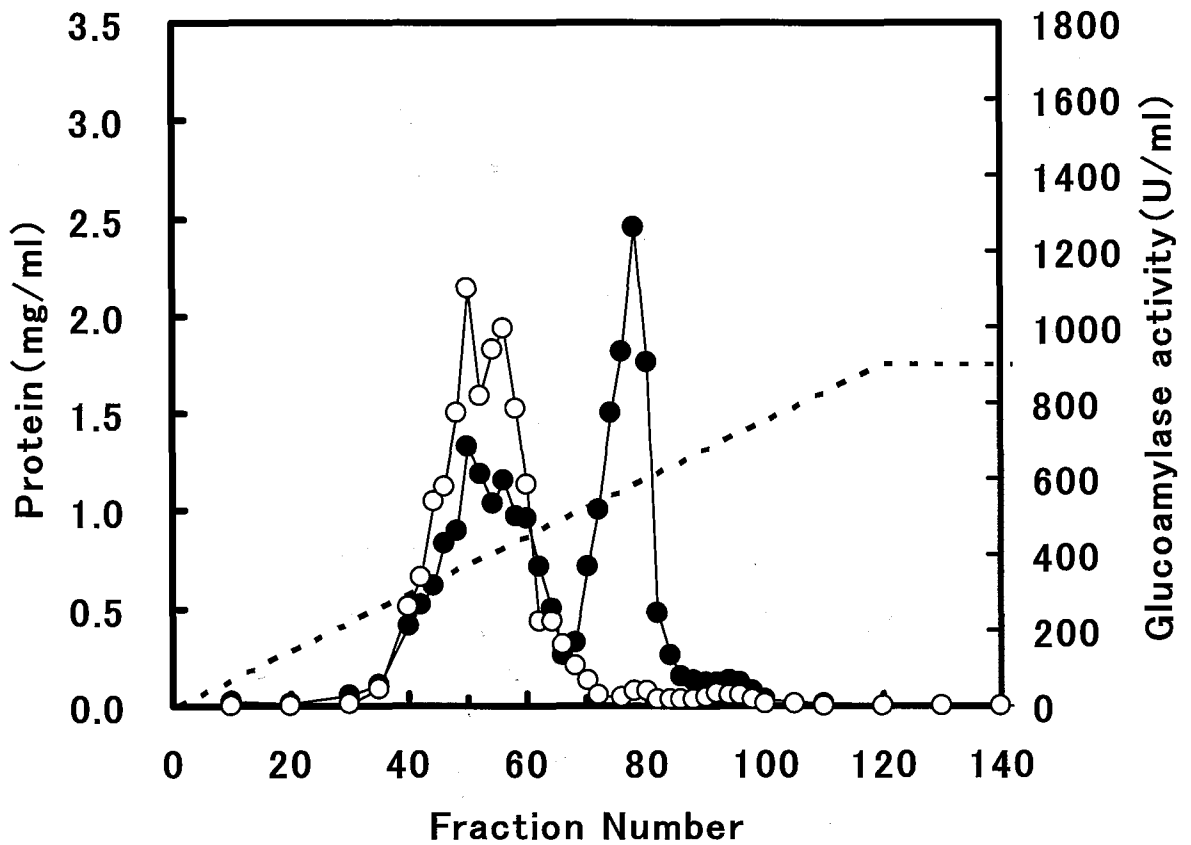


Fig. 4-3 DEAE-Sepharose Fast Flow column chromatography of glucoamylase from *Ginka* strain

- : Protein
- : Glucoamylase activity
- : NaCl concentration (0 - 0.5 M)

Fraction volume: 10 ml/tube

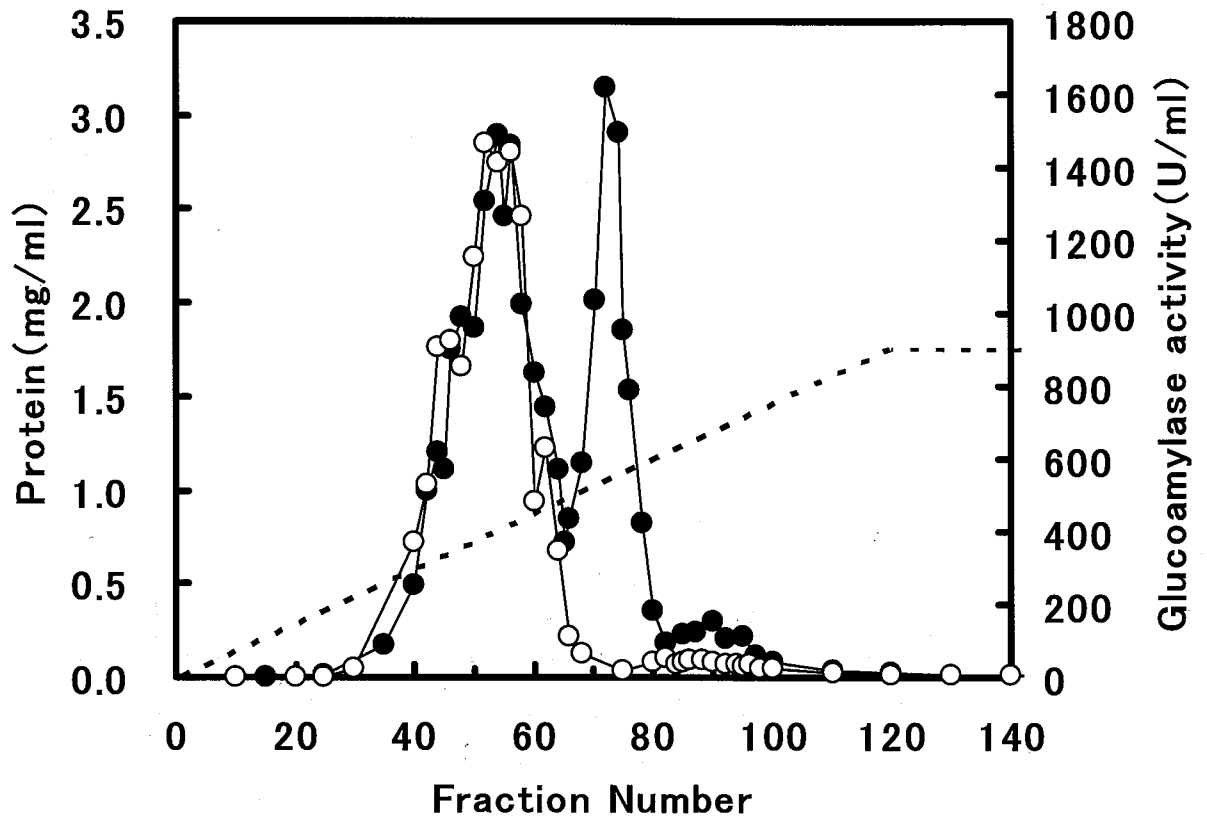


Fig. 4-4 DEAE-Sepharose Fast Flow column chromatography of glucoamylase from G-4 strain

● : Protein

○ : Glucoamylase activity

----- : NaCl concentration (0 - 0.5 M)

Fraction volume : 10 ml/tube

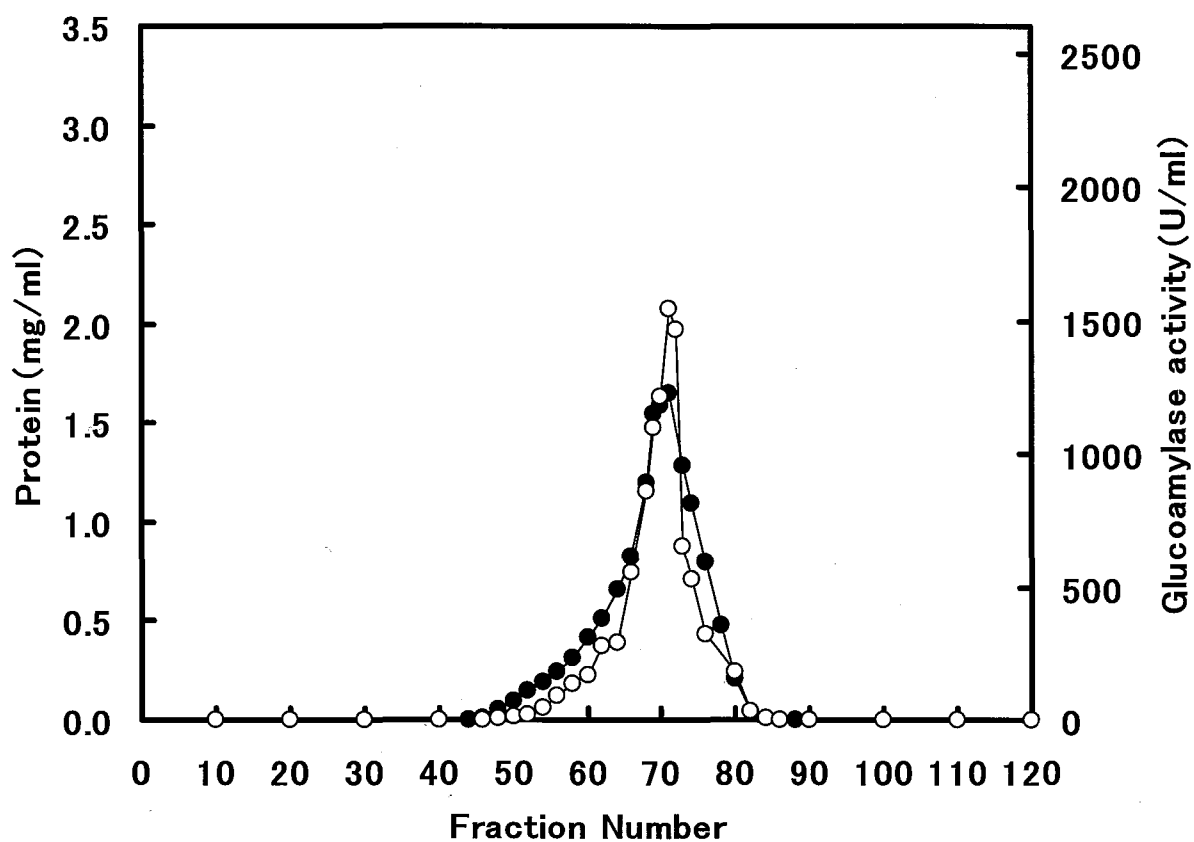


Fig. 4-5 Sephacryl S-300 column chromatography  
glucoamylase from *Hikami-type* strain

● : Protein

○ : Glucoamylase activity

Fraction volume: 5.9 ml/tube

Vo: 265 ml (Fr. 45)

Vt: 562 ml (Fr. 95)

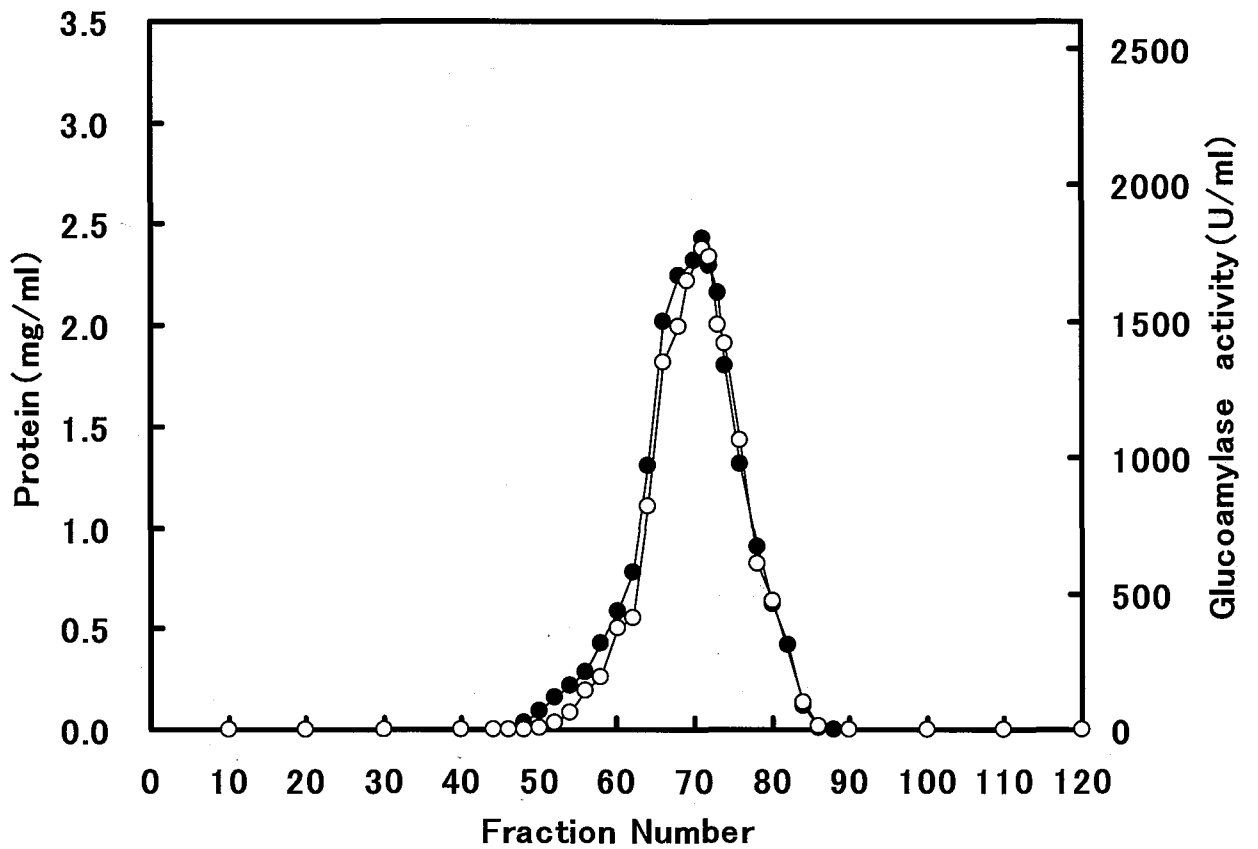


Fig. 4-6 Sephacryl S-300 column chromatography of glucoamylase from H-1 strain

● : Protein

○ : Glucoamylase activity

Fraction volume: 5.9 ml/tube

Vo: 265 ml (Fr. 45)

Vt: 562 ml (Fr. 95)

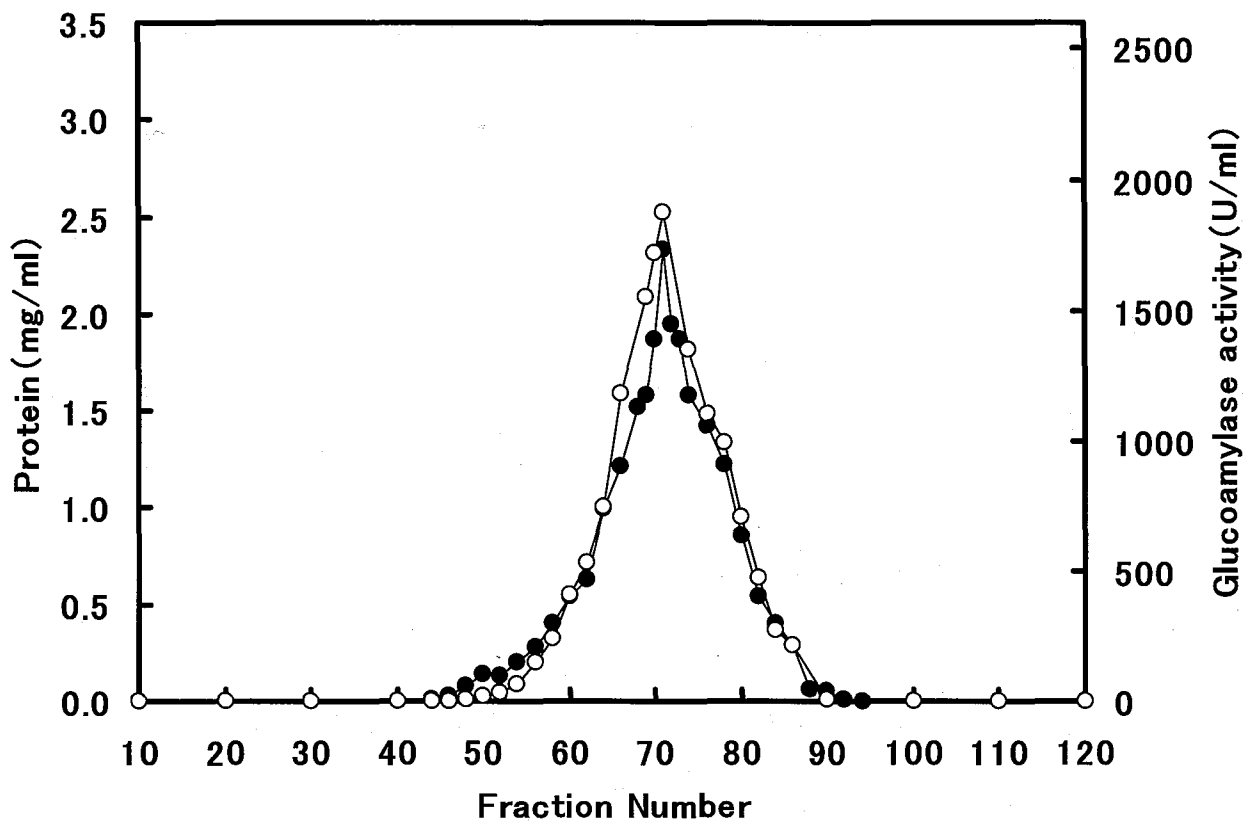


Fig. 4-7 Sephacryl S-300 column chromatography of glucoamylase from *Ginka* strain

● : Protein

○ : Glucoamylase activity

Fraction volume: 5.9 ml/tube

Vo: 265 ml (Fr. 45)

Vt: 562 ml (Fr. 95)



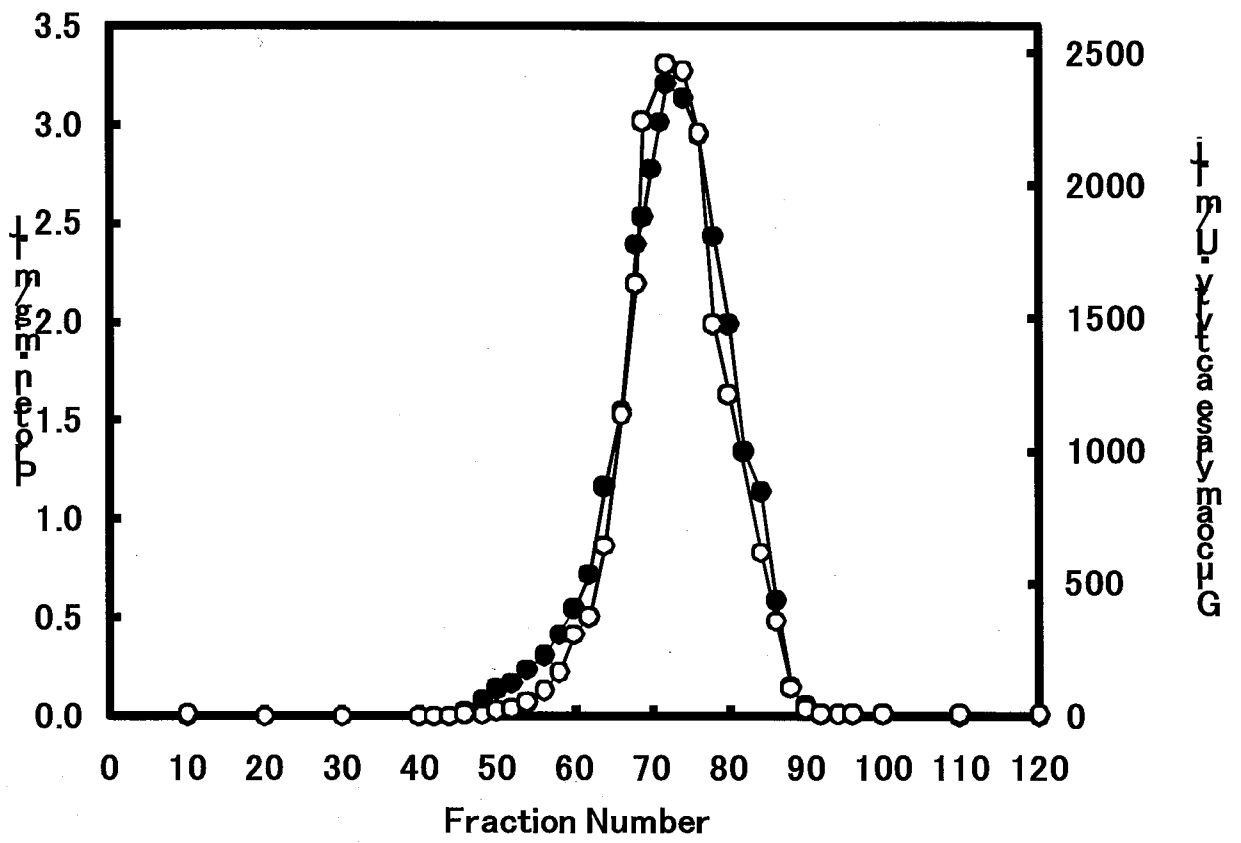


Fig. 4-8 Sephacryl S-300 column chromatography of glucoamylase from G-4 strain

- : Protein
- : Glucoamylase activity
- Fraction volume: 5.9 ml/tube
- Vo: 265 ml (Fr. 45)
- Vt: 562 ml (Fr. 95)

**Table 4-1 Purification step of glucoamylase from *Hikami-type* strain (parent strain)**

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg of protein)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme extract	126499	490	259	100	1.0
Ultrafiltration	95569	410	233	76	0.9
DEAE-Sephrose FF	85190	134	634	67	2.4
Sephacryl S-300(fr.71)	7148	9	764	6	2.9

**Table 4-2 Purification step of glucoamylase from H-1 strain**

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg of protein)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme extract	338756	884	383	100	1.0
Ultrafiltration	331074	775	427	98	1.1
DEAE-Sephrose FF	286000	381	751	84	2.0
Sephacryl S-300(fr.71)	10438	14	756	3	2.0

**Table 4-3 Purification step of glucoamylase from *Ginka* strain (parent strain)**

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg of protein)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme extract	158729	699	227	100	1.0
Ultrafiltration	154583	535	289	97	1.3
DEAE-Sephrose FF	140042	201	698	88	3.1
Sephacryl S-300(fr.71)	11047	14	803	7	3.5

**Table 4-4 Purification step of glucoamylase from G-4 strain**

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg of protein)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme extract	329972	955	346	100	1.0
Ultrafiltration	294005	629	467	89	1.3
DEAE-Sephrose FF	259804	373	697	79	2.0
Sephacryl S-300(fr.71)	14452	19	763	4	2.2

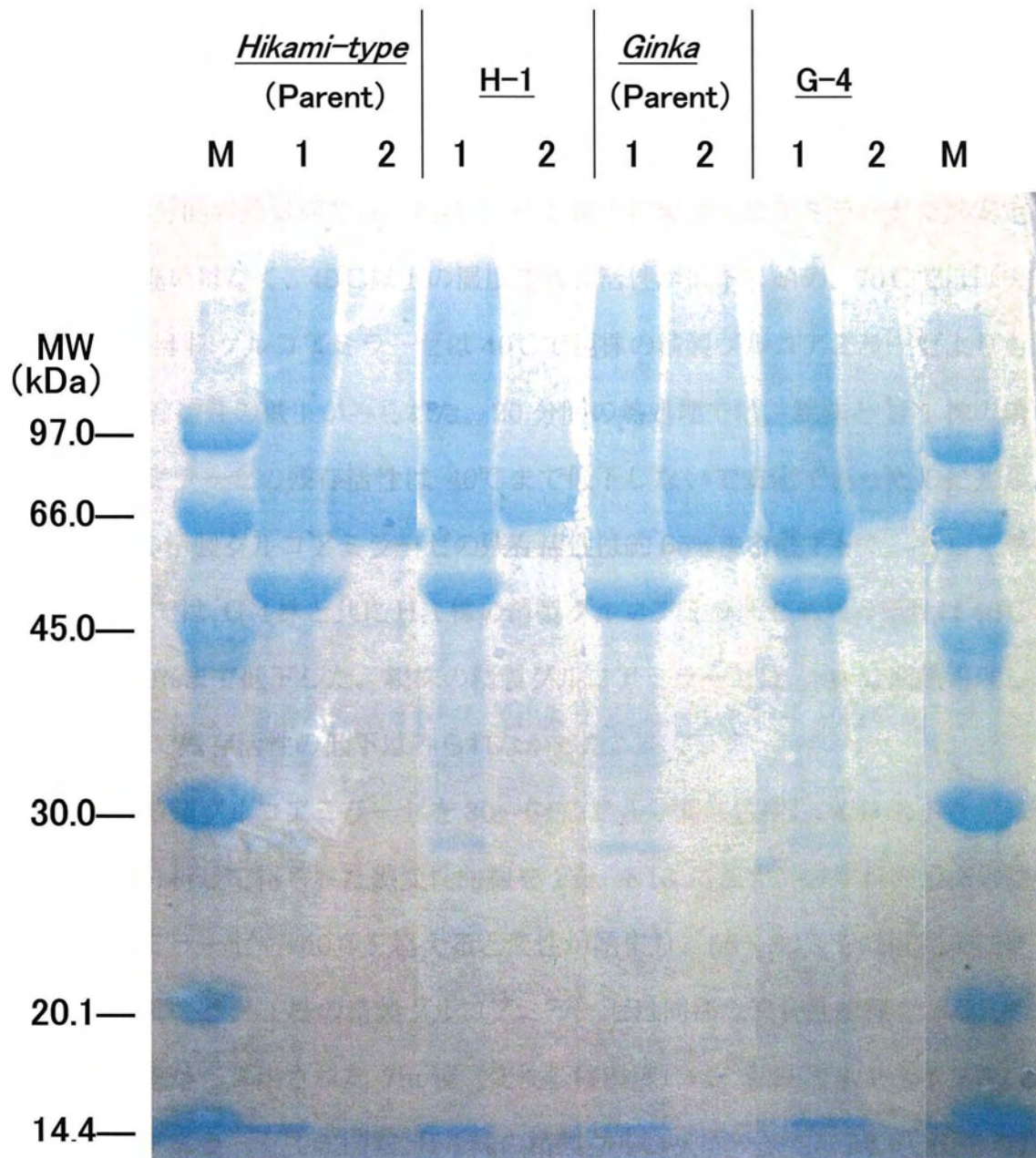


Fig. 4-9 SDS-PAGE of glucoamylases purified from parent strains and mutant strains by CBB stain

Lane 1: Crude extracellular enzyme extract

Lane 2: Purified glucoamylase

M: Marker protein

## 2. グルコアミラーゼの熱安定性

各菌株の精製グルコアミラーゼを 30、40、50、60、70℃の各温度で 10 分間、20 分間及び 40 分間熱処理し、熱安定性を測定した。その結果を Fig. 4-10~4-12 に示す。10 分間の熱処理では、親株と H-1 株の精製グルコアミラーゼで熱安定性に大きな違いはなく、40℃以上の温度で残存活性が低下し始め、70℃でほぼ失活したが、G-4 株グルコアミラーゼは 40℃で親株の精製グルコアミラーゼよりも約 20%の残存活性の低下がみられた。20 分間の熱処理では、親株と H-1 株の精製グルコアミラーゼの残存活性は 40℃まで低下しないで安定であったのに対して、G-4 株の精製グルコアミラーゼの残存活性は約 65%まで低下した。そして熱処理 40 分間では、G-4 株と共に H-1 株の精製グルコアミラーゼも残存活性は 40℃で約 60~70%まで低下した。親株の精製グルコアミラーゼは、40 分間熱処理しても 40℃まで残存活性の低下はみられなかった。

各菌株の精製グルコアミラーゼを 30~64℃で 5 分間熱処理し、CD スペクトルの変化率を分析して得られた熱変性曲線を Fig. 4-13 に示す。いずれの菌株の精製グルコアミラーゼも 40℃を超えると変性が始まり、58~60℃でほぼ完全に変性した。両親株と H-1 株の精製グルコアミラーゼは同様な熱変性曲線を示し、その熱変性曲線から算出された  $T_m$  値（変性転移温度）は、親株の氷上タイプ株の精製グルコアミラーゼで 53.7℃、H-1 株の精製グルコアミラーゼで 53.6℃であり、ほとんど同じ結果であった。一方、G-4 株の精製グルコアミラーゼの  $T_m$  値は 52.8℃であり、親株の吟香株の精製グルコアミラーゼの  $T_m$  値 53.3℃よりも 0.5℃程低かったが大きな変化ではなかった。

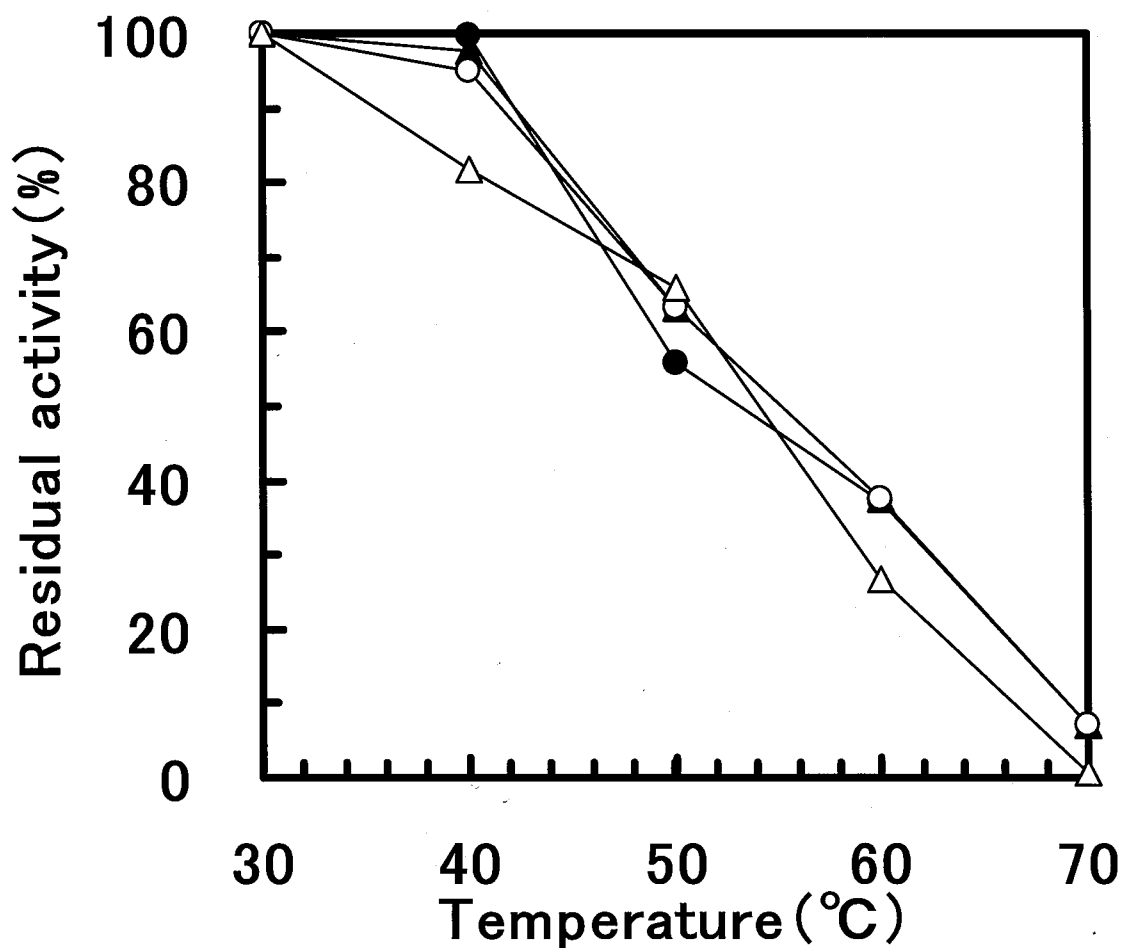


Fig. 4-10 Thermal stability of glucoamylase from parent strains and mutant strains on heat treatment for 10 min

● : *Hikami-type* strain (parent strain)

○ : H-1 strain

▲ : *Ginka* strain (parent strain)

△ : G-4 strain

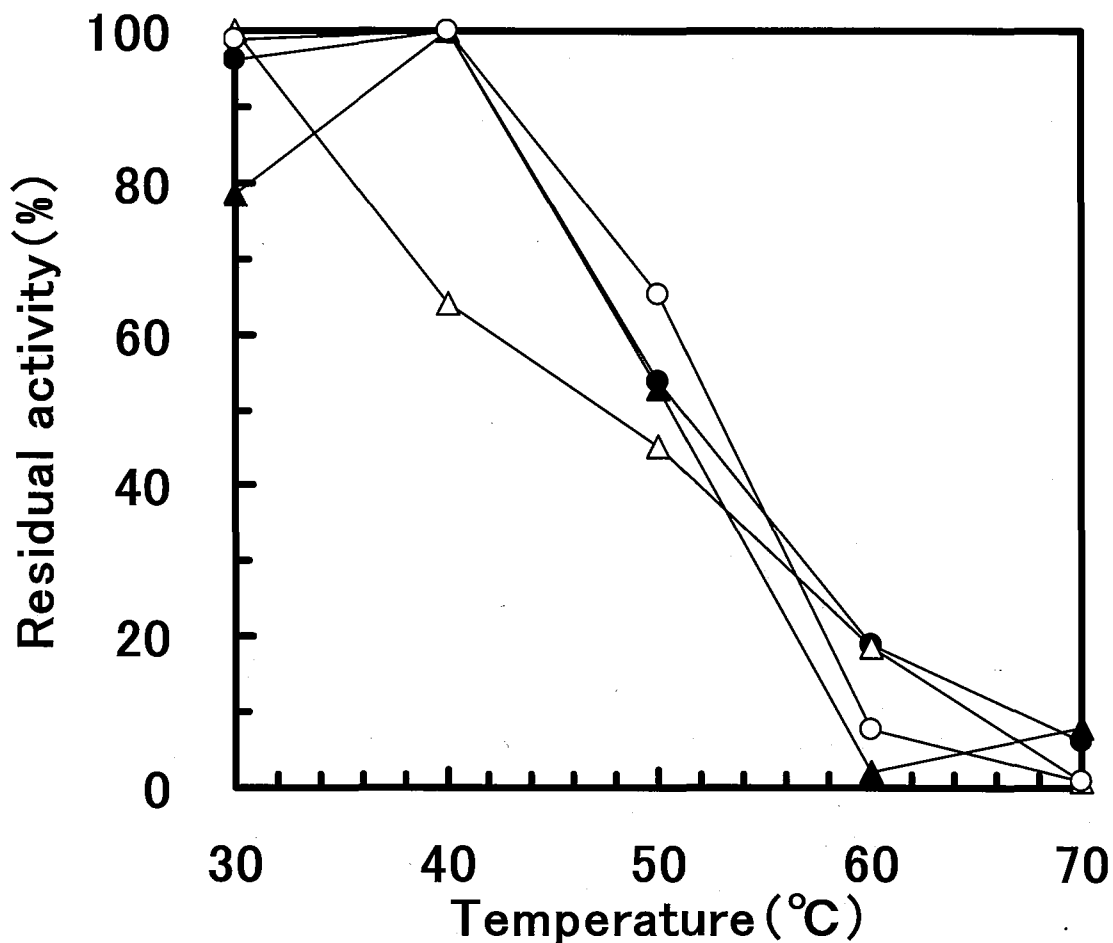


Fig. 4-11 Thermal stability of glucoamylase from parent strains and mutant strains on heat treatment for 20 min

● : *Hikami-type* strain (parent strain)

○ : H-1 strain

▲ : *Ginka* strain (parent strain)

△ : G-4 strain

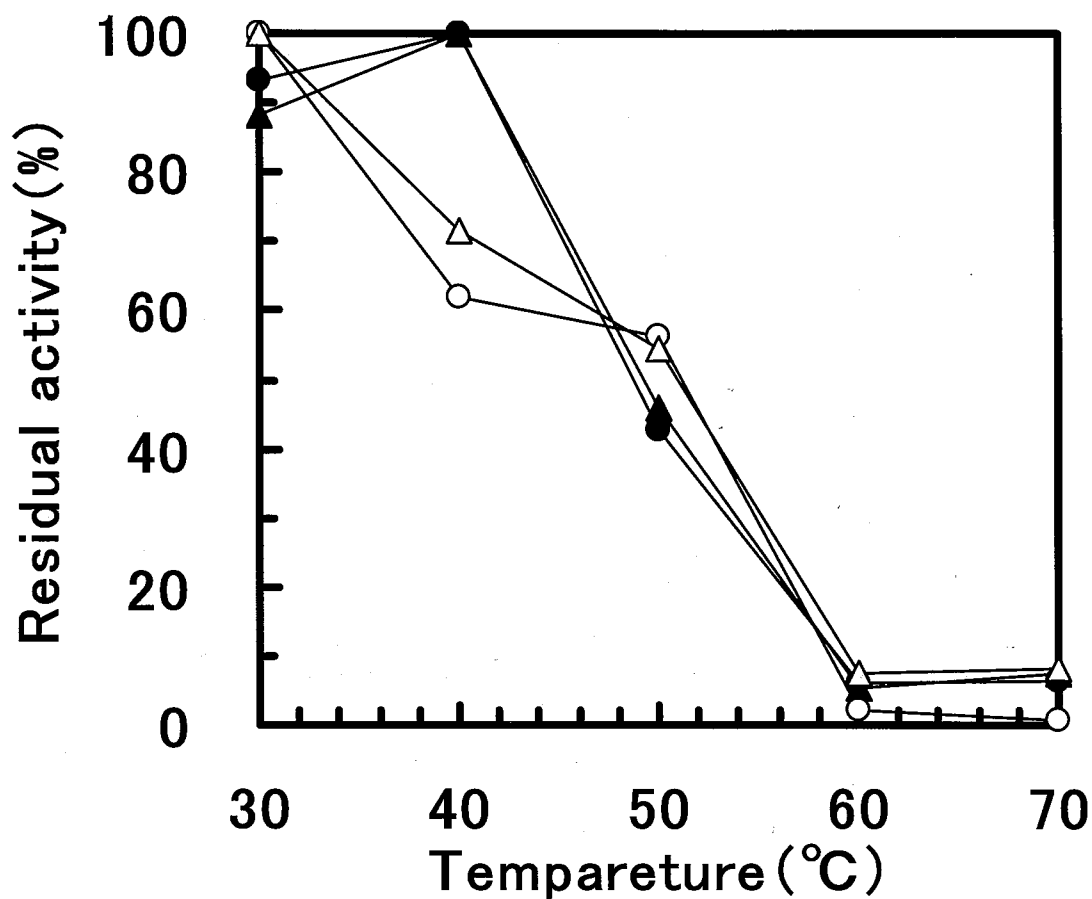


Fig. 4-12 Thermal stability of glucoamylase from parent strains and mutant strains on heat treatment for 40 min

● : *Hikami-type* strain (parent strain)

○ : H-1 strain

▲ : *Ginka* strain (parent strain)

△ : G-4 strain



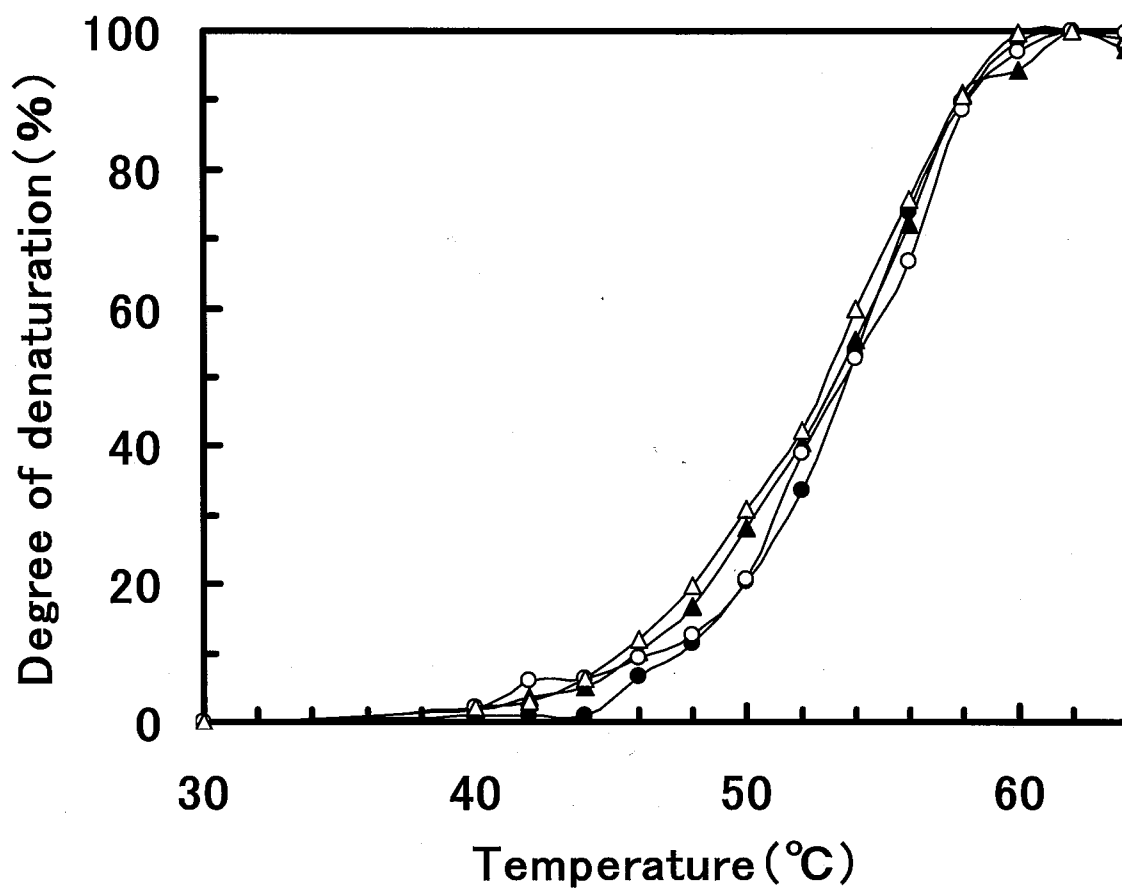


Fig. 4-13 Heat denaturation of glucoamylase from parent strains and mutant strains

● : *Hikami-type* strain (parent strain)

○ : H-1 strain

▲ : *Ginka* strain (parent strain)

△ : G-4 strain

### III. 考察

変異株と親株の菌体外粗酵素抽出液から陰イオン交換及びゲル濾過クロマトグラフィーによりグルコアミラーゼを精製し、いずれも SDS-PAGE で 1 本のタンパク質バンドを示す、単一の精製酵素標品を得ることが出来た。陰イオン交換及びゲル濾過クロマトグラフィーでのクロマトパターンは親株と変異株で同様であり、グルコアミラーゼ活性画分が同じ分画位置 (Fr. 71) で溶出されたことから、各菌株のグルコアミラーゼの等電点や分子サイズは大きくは変わらないと考えられる。

DEAE-Sepharose Fast Flow カラムによるクロマトグラフィーで得られた精製グルコアミラーゼのタンパク質量 (Table 4-1~4-4) と、精製に用いた各米麴 1 g 当たりの菌体量が H-1 株で 6 mg、G-4 株で 4.9 mg、氷上タイプ株で 7.2 mg と吟香株で 6.6 mg であることから算出すると、H-1 株と親株の氷上タイプ株の菌体 1 mg 当たりのグルコアミラーゼ生産量 (protein) はそれぞれ 0.031 mg と 0.01 mg であり、H-1 株が親株に対して 3.1 倍高かった。また G-4 株と親株の吟香株の場合では、グルコアミラーゼ生産量はそれぞれ 0.038 mg と 0.017 mg であり、G-4 株は親株に対して 2.2 倍高かったことから、両変異株のグルコアミラーゼの生産量が増加していることが示唆される。

得られた両変異株の精製グルコアミラーゼの比活性はそれぞれの親株の精製グルコアミラーゼとほとんど違いはなかった。変異株のグルコアミラーゼが変異によって比活性に大きな影響を受けていないと推察される。また、各菌株の精製グルコアミラーゼの SDS-PAGE 分析において、いずれも単一の精製標品であることが確認され、不均一な糖鎖の影響でかなりブロードなバンドとして検出された。変異株の精製グルコアミラーゼの電気泳動度は親株の場合と明らかに異なっており、低分子側の推定分子量が約 5 kDa 変化していることから、変異株のグルコア

ミラーゼでは糖鎖の不均一状態が変化して、泳動度による見かけ上の分子量分布がより高分子側に傾いているかまたは一次構造に何らかの変異が起きているものと考えられる。

変異株の精製グルコアミラーゼは、熱安定性が親株よりも低いことを明らかにした。40℃でG-4株は10分間、H-1株は40分間熱処理することにより残存活性が低下したのに対して親株は変化がなく、安定であった。しかし、CDスペクトル分析によって各菌株の精製グルコアミラーゼの立体構造の熱変性を解析した結果、変異株の精製グルコアミラーゼの  $T_m$  値はそれぞれの親株グルコアミラーゼの  $T_m$  値とほとんど同じであり、熱安定性の違いを裏付けるような大きな変化はみられなかった。

以上の結果、変異株のグルコアミラーゼの比活性が親株と比べて明らかな差異が無かったことから、グルコアミラーゼのタンパク質構造等が変化して比活性が高められたことによって活性が増加したのではなく、菌体当たりのグルコアミラーゼの生成量が増加したによって活性が増加したことを示唆している。また、変異株、特にG-4株のグルコアミラーゼは、親株と比べて熱安定性が低かったことから糖鎖等タンパク質立体構造の安定性に関わる部分に変異を受けている可能性が示唆される<sup>45)</sup>。

## 第5章 グルコアミラーゼの構造解析

変異株H-1株とG-4株は親株氷上タイプ株と吟香株よりもグルコアミラーゼを多量に生産するが、変異株のグルコアミラーゼは親株のグルコアミラーゼと比活性に大きな違いはないものの、電気泳動による推定分子量が異なり、また熱安定性が弱いことを第4章で明らかにした。本章では、それらの諸性質の変化の原因を明らかにするために、変異株と親株のグルコアミラーゼのアミノ酸組成や糖鎖の糖組成の比較を行い、タンパク質一次構造や糖鎖構造について検討した。

### I. 実験材料及び方法

#### 1. グルコアミラーゼ分析試料溶液の調製

第4章で獲得した変異株(H-1株とG-4株)及び親株(氷上タイプ株と吟香株)のグルコアミラーゼ精製標品1mlを透析して脱塩後、凍結乾燥した。凍結乾燥試料の重量をはかり、試料濃度が1mg/mlになるようにMiliQ水に溶解し、分析用の試料溶液とした。

#### 2. グルコアミラーゼのアミノ酸組成分析

##### 1) 加水分解

グルコアミラーゼ試料溶液250 $\mu$ l(250 $\mu$ g相当量)を5ml用加水分解チューブ(PIERCE)に入れて凍結乾燥し、5.6N定沸点HCl400 $\mu$ lに溶解した。加水分解チューブ内を脱気した後密閉し、試料をブロックヒーターで110 $^{\circ}$ C、20時間加熱して加水分解した。加水分解終了後、エバポレーターで減圧乾固して塩酸

を取り除き、MiliQ 水 1 ml に溶解して試料溶液とした。

## 2) アミノ酸分析

加水分解により得られたグルコアミラーゼ試料溶液 100  $\mu$ l をアミノ酸分析計 JLC-500/V (JEOL) に注入して、アミノ酸量を測定した。

## 3. グルコアミラーゼの脱糖鎖酵素処理<sup>46)</sup>

### 1) Endoglycosidase H (Endo H) による脱糖鎖処理

*Streptomyces plicatus* 由来 Endoglycosidase H (Endo H, NEW ENGLAND BioLabs) を用い、以下の変性条件及び非変性条件で脱糖鎖処理を行った。

#### ① Endo H 酵素溶液及び緩衝液の組成

使用した Endo H 酵素溶液及び付属緩衝液の組成は以下のとおりである。

- ・ Endo H 酵素溶液 : 10,000 U (500,000 U/ml)
- ・ 10×Glycoprotein Denaturing Buffer : 5% SDS、10%  $\beta$ -mercaptoethanol
- ・ 10×G5 Buffer : 0.5 M クエン酸ナトリウム (pH 5.5)

#### ② SDS 変性条件での Endo H 処理

グルコアミラーゼ試料溶液 20  $\mu$ l (20  $\mu$ g 相当) に 10×Glycoprotein Denaturing Buffer 2  $\mu$ l を添加し、100°C で 10 分間煮沸して変性処理した。変性処理後、10×G5 Buffer 2  $\mu$ l と Endo H 1  $\mu$ l (500 U 相当) を添加して 37°C で 1、6、20 時間以上反応させた。

#### ③ 非変性条件での Endo H 処理

グルコアミラーゼ試料溶液 20  $\mu$ l (20  $\mu$ g 相当) に 10×G5 Buffer 2  $\mu$ l と Endo H 1  $\mu$ l (500 U 相当) を添加して 37°C で 12、20、40 時間反応させた。

## 2) N-Glycosidase F による脱糖鎖処理

*Flavobacterium meningosepticum* 由来 N-Glycosifase F (PNGase F、NEW ENGLAND BioLabs) を用い、以下の変性条件及び非変性条件で脱糖鎖処理を行った。

### ①PNGase F 酵素溶液及び緩衝液の組成

使用した PNGase F 酵素溶液及び付属緩衝液の組成は以下のとおりである。

- ・ PNGase F 酵素溶液：15,000 U (500,000 U/ml)
- ・ 10×Glycoprotein Denaturing Buffer：5% SDS、0.4 M DTT
- ・ 10×G7 Buffer：0.5 M リン酸ナトリウム (pH 7.5)
- ・ 安定化剤：10% NP-40

### ②SDS 変性条件での PNGase F 処理

グルコアミラーゼ試料溶液 22.5  $\mu$ l (22.5  $\mu$ g 相当) に 10×Glycoprotein Denaturing Buffer 2.5  $\mu$ l を添加し、100℃で10分間煮沸して変性処理した。変性処理後、10×G7 Buffer 2.5  $\mu$ l、10% NP-40 2.5  $\mu$ l 及び PNGase F 1  $\mu$ l (500 U 相当) を添加して 37℃で1、6 及び 20 時間以上反応させた。

### ③非変性条件での PNGase F 処理

グルコアミラーゼ試料溶液 22.5  $\mu$ l (22.5  $\mu$ g 相当) に 10×G7 Buffer 2.5  $\mu$ l、10%NP-40 2.5  $\mu$ l 及び PNGase F 1  $\mu$ l (500 U 相当) を添加して 37℃で12、20 及び 40 時間反応させた。

## 3) Glycopeptidase A による脱糖鎖処理

*Almond* 由来 Glycopeptidase A (PNGase A、生化学工業) を用い、以下の変性条件及び非変性条件で脱糖鎖処理を行った。

#### ①PNGase A 酵素溶液の調製

酵素粉末 1 バイアル (10 mU 相当) に 0.1% BSA 溶液 200  $\mu$ l を添加して完全に溶解し、50 mU/ml 濃度の PNGase A 酵素溶液を調製した。

#### ②SDS 変性条件での PNGase A 処理

グルコアミラーゼ試料溶液 25  $\mu$ l (25  $\mu$ g 相当) に 0.5% SDS 溶液 40  $\mu$ l を添加し、100°C で 5 分間煮沸して変性処理した。変性処理後、50 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.0) 240  $\mu$ l を添加して SDS 濃度を希釈し、PNGase A 5  $\mu$ l (0.25 mU 相当) を添加して 37°C で 12、20 及び 40 時間反応させた。

#### ③非変性条件での PNGase A 処理

グルコアミラーゼ試料溶液 25  $\mu$ l (25  $\mu$ g 相当) に 0.1 M クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.0) 5  $\mu$ l と PNGase A 5  $\mu$ l (0.25 mU 相当) を添加して 37°C で 12、20 及び 40 時間反応させた。

### 4. 脱糖鎖グルコアミラーゼの SDS-PAGE 分析

脱糖鎖処理した各グルコアミラーゼ試料を 5~20  $\mu$ l 用いて、第 4 章 I.3 に従って SDS-PAGE 分析を行った。

#### 1) CBB 染色

Bio-SafeCoomassie (Bio-Rad) を用い、第 4 章 I.3 の 3) に従って染色を行った。

#### 2) Periodic acid-Schiff (PAS) 染色

Zacharius らによる方法<sup>47,48)</sup>に従って糖タンパク質の PAS 染色を行った。

電気泳動後のゲルを 12.5% トリクロロ酢酸溶液 (固定液) 200 ml に浸して 30 分間振とうした。ゲルを蒸留水 200 ml 中に移して、15 秒間振とうして軽く洗浄

した。1%過ヨウ素酸を含む3%酢酸溶液200 ml中にゲルを移して浸し、50分間振とうして酸化処理を行った。蒸留水300 mlによる10分間の振とう洗浄を6回繰り返して、ゲルを洗浄した。蒸留水を取り除き、Schiff試薬（和光純薬）200 ml中にゲルを浸し、遮光して50分間振とうを行い染色した。染色したゲルを0.5%メタ重亜硫酸ナトリウム200 mlで10分間×3回繰り返して振とう洗浄した。さらに蒸留水200 mlで染色ゲルを振とう洗浄して過剰の染色を除いた。

## 5. グルコアミラーゼ糖鎖の糖組成分析<sup>46,49)</sup>

### 1) 加水分解

グルコアミラーゼ試料溶液250  $\mu$ l (250  $\mu$ g 相当量) を8 ml用加水分解チューブ (PIERCE) に入れて凍結乾燥し、4 N 定沸点 HCl 1.12 ml に溶解した。加水分解チューブ内を脱気した後密閉し、試料をブロックヒーターで100 $^{\circ}$ C、5時間加熱して加水分解した。

### 2) N-アセチル化処理

加水分解試料溶液をエバポレーターで減圧乾固して塩酸を取り除き、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 500  $\mu$ l を添加して完全に溶解した。氷冷しながら無水酢酸を5分間隔で5  $\mu$ l ずつ5回添加し、最後にさらに無水酢酸25  $\mu$ l を添加して約1時間攪拌した。反応液をイオン交換樹脂パック AG 50W $\times$ 8 100-200 mesh (0.8 $\times$ 4 cm、Bio-Rad) に添加してアミノ酸等を吸着させて取り除き、MiliQ 水20 ml で溶出を行った。溶出液をエバポレーターで減圧乾固し、MiliQ 水1 ml を添加して完全に溶解させた。



### 3) ピリジルアミノ化処理

N-アセチル化試料溶液 50  $\mu$ l を凍結乾燥して単糖分析用 PALSTATION Pyridylamination Reagent Kit (TaKaRa) の試薬を添加し、ピリジルアミノ化装置 PALSTATION 4000 (TaKaRa) を用いてピリジルアミノ化を行った。ピリジルアミノ化後の残さに MiliQ 水 100  $\mu$ l を添加して完全に溶解させた。

### 2) HPLC 分析

ピリジルアミノ化試料溶液を MiliQ 水で 5 倍希釈し、以下の条件でピリジルアミノ化単糖の HPLC 分析を行った。単糖の定量には、PA-N-Acetylgalactosamine、PA-Rhamnose、PA-Xylose、PA-N-Acetylglucosamine、PA-Ribose、PA-Glucose、PA-Mannose、PA-Fucose、PA-Galactose の 9 単糖を含む、ピリジルアミノ化単糖標準液 PA-Monosaccharide mixture (1 pmol/ $\mu$ l、TaKaRa) を使用した。

#### HPLC 分析条件

- ・ポンプ : L-6200 Intelligent Pump (HITACHI)
- ・検出器 : F-1050 Fluorescence Spectrometer (HITACHI)
- ・カラム : 糖質分析用カラム PALPAK TypeA  
(内径 4.6 mm×高さ 150 mm、TaKaRa)
- ・溶離液 : 0.7 M K-Borate buffer (pH 9.0) / アセトニトリル (90/10 v/v)
- ・流速 : 0.3 ml/min
- ・励起波長 : 310 nm
- ・検出波長 : 380 nm
- ・カラム温度 : 65°C
- ・注入量 : 10  $\mu$ l

## 6. グルコアミラーゼ酵素消化断片の逆相 HPLC による分離

### 1) グルコアミラーゼの酵素消化

#### ①リシルエンドペプチダーゼの調製

*Achromobacter lyticus* M497-1 由来リシルエンドペプチダーゼ (和光純薬) 凍結乾燥粉末 20 µg/vial に 2 mmol/l Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 1 ml を添加し、完全に溶解させて酵素溶液 (20 µg/ml) を調製した。

#### ②酵素消化反応

各グルコアミラーゼ試料溶液 200 µl (200 µg 相当) を 100°C で 10 分間熱処理して熱変性させた。熱変性後、2 mol/l 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール緩衝液 (pH 9.5) 27 µl とリシルエンドペプチダーゼ溶液 43 µl (0.8 µg 相当) を添加し、30°C で 4 時間及び 24 時間酵素消化した。反応後、反応液をミニカラムで脱塩して遠心エバポレーターで濃縮乾燥した。

### 2) 逆相 HPLC 分析

#### ①酵素消化試料の分析前処理

1) の酵素消化乾燥試料に MiliQ 水 25 µl を添加して完全に溶解させ、0.45 µm フィルターに通して不純物を取り除き、HPLC 分析用試料溶液を調製した。

#### ②逆相 HPLC 分析操作

試料溶液 20 µl (酵素消化物 200 µg 相当) を用い、以下の条件で逆相 HPLC 分析を行った。

## HPLC 分析条件

- ・ポンプ : Waters 626
- ・検出器 : Waters 2487 2波長 UV 検出器
- ・カラム : YMC-Pack Pro C18 (内径 1.0 mm×高さ 100 mm)
- ・検出波長 : 215 nm
- ・流速 : 50  $\mu$ l/min
- ・溶離液 : (A 液) 0.05% 蟻酸 / H<sub>2</sub>O  
(B 液) 0.05% 蟻酸 / アセトニトリル

グラジエント:	時間 (min)	A 液 (%)	B 液 (%)
	0	95	5
	10	95	5
	260	20	80
	270	10	90
	300	10	90

## II. 実験結果

### 1. グルコアミラーゼのアミノ酸組成

変異株及び親株のグルコアミラーゼを構成しているアミノ酸を分析し、変異株と親株の比較を行った。その結果を Table 5-1 に示す。アミノ酸組成は、それぞれのタンパク質全体における各アミノ酸のモル数の割合 (mol%) で表した。変異株グルコアミラーゼはいずれもそれぞれの親株グルコアミラーゼと大半のアミノ酸の組成量はほぼ同じであったが、いくつかのアミノ酸で有意な違いが認められた。特にセリンの組成量で顕著な差異が生じており、親株グルコアミラーゼに

比べてH-1株グルコアミラーゼは2.8 mol%、G-4株グルコアミラーゼは1.8 mol%の減少が起こっていることが明らかとなった。これまでに明らかにされている *A. oryzae* のグルコアミラーゼ遺伝子 *glaB* から推定される全アミノ酸残基数(493残基)<sup>50)</sup> をもとに、両変異株グルコアミラーゼのセリン組成量 (mol%) の減少量を残基数に換算した場合、H-1株グルコアミラーゼは約14残基、G-4株グルコアミラーゼは約9残基相当の減少が起こっていることになる。アラニンやスレオニンの組成量も両変異株グルコアミラーゼで同様の減少傾向がみられ、親株グルコアミラーゼよりもそれぞれ0.4~1 mol%少なかった。一方、わずかではあるがバリンやイソロイシンの組成量は両変異株グルコアミラーゼの方が0.2~0.6 mol%多かった。

以上のように両変異株グルコアミラーゼのアミノ酸組成の増減はほぼ共通した傾向が見られたが、プロリンの組成量は両変異株グルコアミラーゼ間で異なっており、親株グルコアミラーゼと比べてH-1株グルコアミラーゼは0.3 mol%減少したのに対してG-4株グルコアミラーゼでは0.3 mol%多かった。

Table 5-1 Amino acid composition of glucoamylases from parent strains and selected mutant strains

Amino acid	<i>Hikami-type</i> (parent)	H-1	<i>Ginka</i> (parent)	G-4
	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)
Asp	10.4	10.4	10.5	10.3
Thr	6.0	5.4	6.2	5.8
Ser	9.6	6.8	9.9	8.1
Glu	11.1	11.2	11.3	11.0
Gly	9.1	9.0	9.2	8.9
Ala	10.6	9.6	10.7	9.8
Val	6.1	6.7	6.1	6.4
Cys	0.5	0.4	0.4	0.4
Met	0.3	0.2	0.3	0.2
Ileu	2.8	3.1	2.8	3.0
Leu	6.7	6.8	6.7	6.7
Tyr	4.0	4.0	3.9	4.0
Phe	3.4	3.5	3.4	3.4
His	0.8	0.9	0.8	0.9
Lys	3.1	3.2	3.2	3.2
Trp	—	—	—	—
Arg	2.3	2.3	2.2	2.2
Pro	3.8	3.5	3.4	3.7