

研究論文

糖化酵素高生産麹菌の育種選抜

伊藤彰敏*¹、三井俊*¹、沖塚翔太*¹Breeding of a Strain of *Sake-koji* with High Productivity of Saccharifying EnzymeAkitoshi ITO*¹, Shun MITSUI*¹ and Shota OKITSUKA*¹Food Research Center*¹

高品質純米酒製造に不可欠な糖化酵素を高生産する麹菌の育種選抜を行った。*Aspergillus oryzae* KBN1015 を UV 照射して得られた変異株に対し、ヨウ素デンプン反応及び簡易シャーレ製麹法によるスクリーニングを実施し、フラスコ製麹法による有望株の酵素活性値を比較検討した結果、育種目標である糖化酵素活性値 300U/g 麹を示す KBN1015-26 が選抜された。さらに新規に構築した選択培地により、チロシナーゼを低減化させた KBN1015-26-1 を取得することができた。培養条件を検討した結果、培養 35 時間後、40℃で 15 時間以上経過させることにより、褐変性が低く、グルコアミラーゼ活性 300U/g 麹を示す良質麹が得られた。

1. はじめに

清酒業界のトレンドは、消費者の本物志向を反映し、醸造用アルコールを原料として添加しない、純米酒にシフトしている。

高品質な純米酒醸造を行う際に最も重要なことは、アルコール発酵基質となるグルコースが、酒もろみ中に安定的に供給されることである。もろみ中へのグルコース供給の不順は、酵母によるアルコール発酵の停滞や香気生成不良の原因となるため、純米酒の品質低下につながる。もろみ中へのグルコース供給を担うのが、麹のアミラーゼ系酵素であることを踏まえ、麹の糖化力高め、高品質な純米酒醸造を可能とする糖化酵素高生産麹菌の育種選抜について検討を行った。

近年酒粕は、栄養価や機能性が注目され、需要が拡大しているが、チロシナーゼ活性の高い麹を清酒製造に使用した場合、副産物として製成する酒粕が褐変化(黒粕)し、製品価値が低下することが問題となっている。そこで、糖化酵素高生産麹菌の育種とともに、チロシナーゼ活性の低減化を試みた。

2. 実験方法

2.1 供試菌株

種麹メーカーである(株)ビオック(豊橋市)より供試された、G/A(グルコアミラーゼ活性/ α -アミラーゼ活性)比の高い保存株 *Aspergillus oryzae* KBN1015 株(以下 KBN1015)を使用した。

2.2 試料米

愛知県酒造好適米品種「夢吟香」50%白米の蒸米を 95℃で熱風乾燥し、水分 5%の α 化米を調製した。

2.3 紫外線照射法による変異株の取得

シャーレ(ϕ 90mm)に孢子懸濁液(10^8 /mL)をとり、攪拌しながら 25cm の距離から 15W の紫外線ランプで所定時間照射を行った(生存率 0.1%)。1 時間光遮断した後、Czapek-Dox 寒天平板培地(0.3%TritonX-100 含む)に塗抹し、30℃、48 時間培養し、出現したコロニーから変異株を取得した¹⁾。

2.3.1 デンプン分解能試験による選抜

UV 変異株のコロニーを炭素源を可溶性デンプン 1%に制限した Czapek-Dox 改変平板培地に釣菌し、30℃、24 時間培養した後、ヨウ素溶液(I₂-KI 溶液)で染色した。その際、検出されるハローの大きさが親株より大きいコロニーを選抜した²⁾。

2.3.2 チロシン資化能試験による選抜

UV 変異処理を行った孢子懸濁液を窒素源をチロシン 200ppm に制限した Czapek-Dox 改変平板培地(以下チロシン培地)に塗抹し、30℃、48 時間培養した後、コロニーの小さいものを選抜した。

2.4 酵素活性測定

2.4.1 選抜コロニーの孢子的着生

選抜コロニーを麹エキス斜面培地に釣菌し、30℃、5 日間培養し、孢子を着生させた。スラントに 0.1%Tween80 溶液 10mL を加えて孢子を懸濁し、滅菌

*¹ 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室

処理済の No.2 ろ紙でろ過し、ろ液を孢子懸濁液（10⁶ mL）として以下の試験に供した。

2.4.2 簡易シャーレ製麹試験

α 化米 2g を時計皿にとり、ガラス棒の台座を敷いたシャーレ（φ90mm）中に入れ、90℃で2時間乾熱殺菌した。放冷後、調湿のためシャーレ底部に 1N NaOH10mL を加えた後、α 化米に 1mL の孢子懸濁水を接種し、35℃で45時間培養した³⁾。

2.4.3 フラスコ製麹試験

α 化米 20g を滅菌広口フラスコ（300mL 容）に入れ、10mL の孢子懸濁水を添加し、恒温恒湿器中で、35℃（RH95%）から40℃（RH65%）に品温を上昇させ、45時間培養した。

2.4.4 アミラーゼ活性の測定

出麹試料に対し、5倍量の0.5%NaCl（pH5、0.2M 酢酸緩衝液5%含む）を加え、5℃で一夜抽出した。抽出液を No.5C ろ紙でろ過し、得られたろ液を酵素液として、酵素測定キット（キッコーマン（株）製）により、α-アミラーゼ及びグルコアミラーゼを測定した。

2.4.5 チロシナーゼ活性の測定

チロシンを基質として酵素反応を行った後、チロシナーゼの阻害剤であるメタ亜硫酸カリウムで反応を停止し、生成したドーパの量を ARNOW の多価フェノール反応により510nmの比色値で評価した⁴⁾。

2.5 麹の増殖活性測定

麹試料を25倍量の0.5N 過塩素酸で熱水抽出し、ろ液の比色値（260nm）を増殖量として評価した⁵⁾。

3. 実験結果及び考察

3.1 糖化酵素活性値による有望株の選抜

3.1.1 県内酒造会社製造麹の糖化酵素活性値の現状把握と目標値の設定

平成20-22 酒造年度に県内酒造メーカー15社で製造された95の麹試料（精米歩合35-55%純米・吟醸酒レベル）の糖化酵素（グルコアミラーゼ）活性を図1に示す。

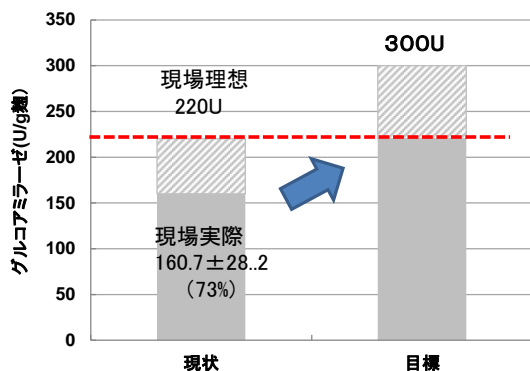


図1 県内酒造会社製造麹のグルコアミラーゼ活性値

純米酒醸造における麹のグルコアミラーゼ活性値として220U/g 麹が理想値とされているが、現状では、160U±28.2U/g 麹で、理想値の73%にとどまっている。

現場状況を踏まえ、理想値である220U/g 麹のグルコアミラーゼ活性値を実現するため、グルコアミラーゼ活性値300U/g 麹を麹菌の育種目標値として設定した。

3.1.2 デンプン分解能による選抜

KBN1015の孢子懸濁液に対し、生存率0.1%の条件で、2回の紫外線照射を行い、429株の変異株を取得した。

変異株において、ヨウ素デンプン反応を利用したプレートアッセイを行った結果を表1に示す。429株のUV変異株について、親株であるKBN1015と比較し、反応ハローの大きい102株を選抜した。

表1 デンプン分解能による有望株の選抜

	UV変異株	プレートアッセイ
1回目	204	43
2回目	225	59
計	429	102

3.1.3 簡易シャーレ製麹試験による選抜

プレートアッセイにより選抜された102株について、簡易シャーレ製麹試験を行い、出麹試料のグルコアミラーゼ活性を測定した。選抜株の酵素活性値の比較を図2に示す。親株KBN1015（196U/g 麹）より活性値の高い菌株は50株であった。育種目標値である300U/g 麹を超える選抜株は認められなかったが、現場理想値である220U/g 麹より有意に高い活性値である250-300U/g 麹区分に5株の有望株を認めた。

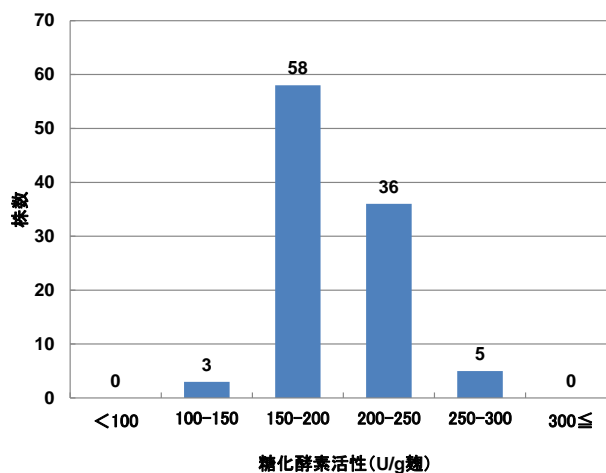


図2 選抜株の糖化酵素活性値の比較

3.1.4 フラスコ製麹試験による選抜

簡易シャーレ製麹試験により選抜した 5 株について、フラスコ製麹試験を行い、出麹試料の酵素活性値を比較検討した結果を表 2 に示す。

選抜株はすべて、親株 KBN1015 より α -アミラーゼ及びグルコアミラーゼ活性ともに高い値であった。また、良質麹の指標となる G/A 比も、親株より高い値を示した。

No.26 (KBN1015-26) は、グルコアミラーゼ活性値が 302U/g 麹を示し、育種目標値である 300U/g 麹を実現する菌株であった。

なお、KBN1015-26 は中毛菌で、製麹過程における増殖及び破精込みは標準型であったが、麹酵素抽出液のろ過残渣に褐変性が認められた。

表 2 有望株の酵素活性値の比較

選抜株No.	α -アミラーゼ (U/g麹)	グルコアミラーゼ (U/g麹)	G/A
1015 (親株)	743	203	0.27
11	901	271	0.30
26	961	302	0.31
48	923	284	0.31
55	855	254	0.30
59	798	229	0.29

G/A:グルコアミラーゼ活性/ α -アミラーゼ活性

ーは、チロシン資化能が低い(チロシナーゼ活性が低い)ものと判断される。

チロシン培地により選抜された 10 株について、簡易シャーレ製麹試験を行い、出麹試料のチロシナーゼ及びグルコアミラーゼ活性を測定した結果を表 4 に示す。選抜 10 株のうち 8 株は、親株 KBN1015-26 よりチロシナーゼ活性が低かった。KBN1015-26-1 は、育種目標値であるグルコアミラーゼ活性 300U/g 麹以上を示し、チロシナーゼ活性が親株より低い有望株であった。

表 4 選抜株の酵素活性値の比較

選抜株	チロシナーゼ (OD510)	グルコアミラーゼ (U/g麹)
26-1	0.182	300
26-2	0.204	310
26-3	0.215	305
26-4	0.225	301
26-5	0.227	285
26-6	0.229	299
26-7	0.241	295
26-8	0.248	305
KBN1015-26 (親株)	0.251	302
26-9	0.255	310
26-10	0.257	304

3.2 チロシナーゼ活性値による選抜

3.2.1 県内酒造会社製造麹のチロシナーゼ活性値

平成 23 酒造年度に県内酒造メーカー 15 社で製造された 48 の麹試料(精米歩合 35-55%純米・吟醸酒レベル(褐変性麹菌使用))のチロシナーゼ活性を表 3 に示す。

黒粕生成麹のチロシナーゼ活性は、黒粕非生成麹より高い値を示した。黒粕非生成麹の最大値は 0.201 であった。

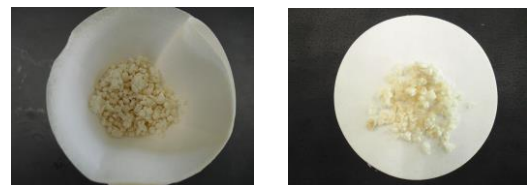
表 3 県内酒造会社製造麹のチロシナーゼ活性値

		黒粕生成麹	黒粕非生成麹
麹試料数		45	3
チロシナーゼ (OD510)	最大値	0.355	0.201
	最小値	0.252	0.015

3.2.2 チロシン培地及び簡易シャーレ製麹試験によるチロシナーゼ低減株の選抜

KBN1015-26 について、生存率 0.1%の条件で紫外線照射を行い、チロシン培地に塗抹、出現した小コロニーを無作為に 10 株選抜した。チロシナーゼの基質はチロシンであり、チロシン培地上での生育度の低い小コロニ

出麹試料の水抽出液残渣を一昼夜置いたときの状態を図 3 に示す。KBN1015-26-1 の出麹水抽出残渣は、褐変性が認められなかった。



親株 KBN1015-26株 チロシナーゼ低減株 KBN1015-26-1株

図 3 水抽出残渣の状貌比較

3.3 KBN1015-26-1 株の増殖活性

簡易シャーレ製麹試験により、35℃一定で製麹を行い、増殖経過を比較した結果を図 4 に示す。

KBN1015-26-1 は、親株より増殖がやや遅れる傾向にあった。しかし、菌体量は少ないものの、表 4 のとおり麹あたりの酵素活性が親株より高いことから、菌体あたりの酵素生産性が高いことが示唆された。また、麹菌体に含まれる不飽和脂肪酸が酵母の香气生成を抑制するため、吟醸酒製造においては菌体量が少ないことが望ましいことが報告されている⁶⁾。よって、麹菌の酵素生産性

及び増殖の観点から、本研究により育種した KBN1015-26-1 は、高級酒製造への応用が期待された。

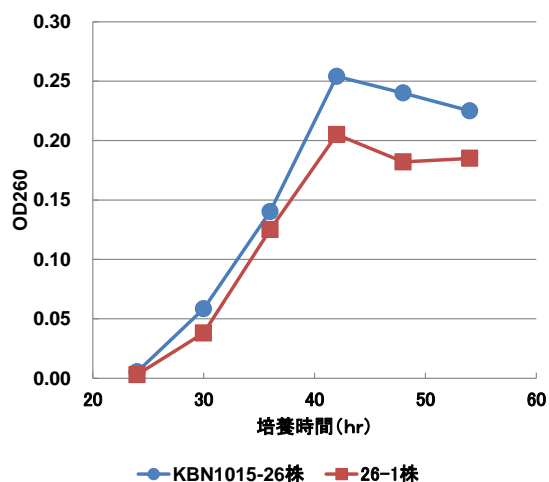


図4 増殖活性の比較

3.4 培養条件の検討

高品質麴の製麴では、培養 35 時間後の仕舞仕事以降、最高温度 40℃超の品温を保持させ、グルコアミラーゼを高生産させるプロセスを経る。

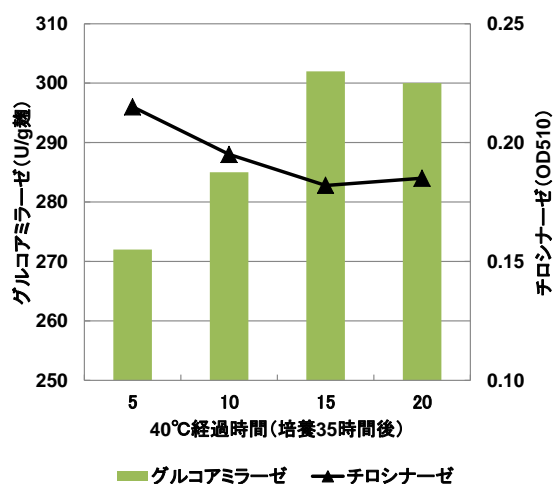


図5 培養条件の違いによる各種酵素活性値の比較

KBN1015-26-1 について、シャーレ製麴を行い、培養 35 時間後、40℃の保持時間を変化させたときのグルコアミ

ラーゼ活性及びチロシナーゼ活性の推移を、図5に示す。40℃経過時間が長期化することで、グルコアミラーゼ活性は増加傾向を示したが、チロシナーゼ活性は低下傾向を示した。

以上から、培養条件で 40℃での保持時間を 15 時間とすることにより、糖化酵素活性 300U/g 麴以上、チロシナーゼ活性 0.2 (OD510) 以下の製麴が可能であることを確認した。

4. 結び

(株) ピオック保存株 *Aspergillus oryzae* KBN1015 の紫外線照射変異株に対し、ヨウ素デンプン反応を利用したプレートアッセイと簡易シャーレ製麴試験法よりグルコアミラーゼ高生産麴菌の育種選抜を行った。その結果、育種目標値 300U/g 麴を示す有望株 KBN1015-26 を取得することができた。

KBN1015-26 の紫外線照射変異株に対し、チロシン資化能を利用したプレートアッセイと簡易シャーレ製麴試験法によるチロシナーゼ低減株の育種選抜を行った。その結果、育種目標値である糖化酵素 300U/g 麴以上で、褐変性を示さない KBN1015-26-1 を取得することができた。

KBN1015-26-1 を種麴とし、40℃経過時間を 15 時間に設定する製麴法を組み合わせることで、グルコアミラーゼ高活性かつチロシナーゼ活性低減麴の製麴が可能であり、高品質な特定名称酒製造への利用が期待できる。

文献

- 1) 五味勝也, 飯島譲, 辻巖, 井上博, 原昌道: 日本醸造協会誌, **82**, 425(1987)
- 2) 岩間直子, 齋藤知明: 日本醸造協会誌, **103**, 904(2008)
- 3) 岡崎直人: 日本醸造協会誌, **74**, 738(1974)
- 4) 大場俊輝, 佐藤和夫, 鹿毛政史, 原昌道, 菅間誠之助: 日本醸造協会誌, **69**, 56(1974)
- 5) 大内弘造, 石戸輝雄, 菅間誠之助, 野白喜久雄: 日本醸造協会誌, **62**, 1029(1967)
- 6) 吉沢淑, 石川雄: 醗酵工学会誌, **63**, 161(1985)