

難消化性澱粉分解酵素生産糸状菌株の探索

伊藤俊彦¹, 大阪朝美¹, 広幡千紘¹, 野口巧実¹, 藤田直子², 橋爪克己¹¹ 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科² 秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科

筆者らは米澱粉の生合成に関与する酵素遺伝子が欠損した変異体を多数保持しており、これまでに変異体米の醸造特性について調べたことを目的とした製麴試験および小仕込み試験を実施し、変異体米は掛米として用いると発酵速度が穏やかで、最終的な炭酸ガスの減量が少なく酒化率が低下した。一方、麴米として用いると変異体米を用いた系においても発酵経過は順調であった。これらの結果は、変異体米に含まれる澱粉が難消化性であることを示し、また、変異体米を麴米に用いることで、変異体米に含まれる難消化性澱粉が消化されることを示している (伊藤ら, 2017)。このように難消化性を示す変異体米に含まれる澱粉を消化可能な酵素の探索は、昨今問題となっている高温登熟障害米対策に有効であると考えられる。本研究では麴菌として清酒用麴菌を含め6種の *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*) および焼酎用麴菌 (*A. luchuensis*)、原料米として形質の大きく異なる5品種を用いた麴を製麴し、各種酵素活性測定および消化試験を行った。その結果、焼酎用麴菌を用いた麴に強い難消化性澱粉分解活性が認められた。

キーワード: 難消化性米, 麴酵素, 清酒醸造

我々は澱粉生合成関連酵素の各種アイソザイムを欠損したイネの変異体を有しており (藤田, 2011)、このイネが生産する米は澱粉生合成関連酵素欠損のために親株と比較し、デンプンの構造や組成、蛋白含有量に変化が生じていることが分かっている。これら変異体米の大きな特徴はアミロース含有量が多く、アミロペクチンの短鎖長の割合が減少し、長鎖長の割合が増加していることである (Asai *et al.*, 2014)。澱粉はグルコースが α -1,4結合し連なったアミロースと α -1,6側鎖の枝分かれ構造をもつアミロペクチンとで構成されており、アミロースは長い分子構造を有しているために隣り合う分子同士や脂質との再会合を起しやすく、老化しやすい。通常の粳米ではアミロースの含有量は20%程度なのに対して変異米は30~46%もの高い割合で含有している。

これら超高アミロース含有の変異体米に含まれる難消化性澱粉を消化可能な酵素の発現は、昨今の地球温暖化の進行とともに問題となっている高温登

熟障害米による酒化率低下の解決策に繋がると期待される。本研究では難消化性澱粉分解酵素高生産株の探索を目的として、麴菌8株、麴米5品種を用いて製麴し、各種麴に含まれる酵素活性を比較した。更に、酵素活性が高いことが認められた麴の原料米消化能力を評価するため、蒸米消化試験をした。

材料と方法

原料米

原料米に用いた品種は以下に示す5品種である。

日本晴：各澱粉生合成関連酵素欠損変異体の野生型親品種でジャポニカ米である。

秋田酒こまち：秋田県で品種改良された酒造好適米であり、玄米は大粒で外観品質に優れ、眼状の心白の発現が良好で、粗蛋白質含量が低い特徴を持ち、日本晴と同様ジャポニカ米に属する。

△SSIIIa変異体米(e1)：スターチシンターゼ(SS) IIIa欠損変異体イネの胚乳種子。(Fujita *et al.*, 2007)。

△SSIIIa/△SSIVb 変異体米 (#2012) : SSIIIa および IVb が欠損した澱粉生合成関連酵素二重欠損変異体イネの胚乳種子 (藤田, 2013).

△SSIIIa/△BE II b 変異体米 (#4019) : SSIIIa と枝作り酵素 (BE) II b を同時に欠損させた変異体イネの胚乳種子 (Asai *et al*, 2014).

麴菌

麴菌には No.5 (*Aspergillus oryzae* :秋田今野商店), AOK3P-T (*Aspergillus oryzae* :秋田今野商店), AOK214-T (*Aspergillus oryzae* :秋田今野商店), AOK68-S (*Aspergillus oryzae* :秋田今野商店), AOK118-T (*Aspergillus oryzae* :秋田今野商店), AOK132-S (*Aspergillus oryzae* :秋田今野商店), AOK150-T (*Aspergillus oryzae* :秋田今野商店) 及び焼酎用白麴菌 (*Aspergillus luchuensis* :秋田今野商店) を用いた.

1. 各種麴菌が生成する酵素の比較

製麴試験.

製麴方法 (シャーレ法)

各麴米品種は 100 g ずつ秤量し洗米, 浸漬を行い, 浸漬米吸水率を調整した後, 甑にて浸漬米を 50 分蒸した. 蒸上がり直後, 蒸米を熱風乾燥機 (95°C/15 hr) にて α 化した. 種麴菌はそれぞれ 0.05% TWEEN80 30 ml に 1.2 mg の分生胞子を懸濁し, 白米重量当たり 0.2% となるように調整した. α 米をそれぞれ 10 g ずつシャーレに秤量し分生胞子懸濁液 5 ml を加えた. 種切り後, 35°C で 24 時間, 手入れ後 35°C に維持して 19 時間後に出麴とした.

麴酵素活性測定.

抽出及び透析

麴酵素抽出液は 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 50 ml に塩化ナトリウム 5 g を添加し蒸留水で 1 L にメスアップして調製した. 酵素抽出は 50 ml ファルコンチューブに麴を各 4 g ずつ秤量し, 麴酵素抽出液を 25 ml 分注し, 30 分間放置後に攪拌し, 室温で 3 時放置した. その後, 10,000 rpm で 5 分間遠心分離し上清を得た. 上清液 10 ml を size27 の透析チューブに入れ 10 mM の酢酸緩衝液に対して一晩透析した. 透析チューブ内の溶液を蒸留水で 20 ml に定容し酵

素液とした. 酵素液は -20°C で凍結保存した.

グルコアミラーゼ活性および α -アミラーゼ活性は国税庁所定分析法に準じて測定し, ペプチダーゼ総合活性は高橋ら (2008) の方法を一部変更して測定した. すなわち, 米グルテリン溶液 250 μ l と 0.1 M 乳酸緩衝液 (pH 4.0) 250 μ l をマイクロチューブに取り, 攪拌後アルミブロック上で 40°C, 5 分余熱し, その後酵素液 50 μ l 添加し, 10 分間酵素反応後, 0.4 M TCA 500 μ l 加えて反応を停止した. 次に 10,000 rpm, 10 分間遠心分離し, TCA 沈殿画分を取り除いた. 酵素ブランクは米グルテリン溶液 250 μ l, 0.1 M 乳酸緩衝液 250 μ l に TCA 500 μ l 加えた後に酵素液 50 μ l 加え室温に静置して遠心分離し, 沈殿画分を取り除いた. アルギニン標準物質及び遠心分離上澄みをマイクロプレートに 100 μ l とり, 更にニンヒドリン試薬を 100 μ l 加え, 80°C の恒温器で 20 分呈色反応した. 室温まで冷ましてからマイクロプレートリーダー (TECAN) で 570 nm の吸光度を測定した.

2. 麴の消化試験

種麴株及び原料米品種.

AOK3P-T, AOK214-T, 白麴菌および黄麴菌対象株として No.5 を使用した.

麴米として秋田酒こまち, 日本晴, Δ SSIIIa (e1), Δ SS III a/ Δ SSIV b (#2012) および Δ SS III a/ Δ BE II b (#4019) の 90% (見かけの精米歩合) 精白米を使用した.

製麴方法.

麴米は吸水率 30% を目標にそれぞれ洗米及び吸水を行った. 吸水を終えた麴米を甑にて 50 分蒸きょうした. その後, 蒸米を 40°C 以下に放冷し, 種を切った. 種切り後, 31°C で 24 時間, 手入れ後に 38°C に維持して 20 時間後に出麴とした.

消化試験方法.

白米重量 50 g の麴を 300% の汲み水 (150 ml) で 55°C, 17 時間消化した. 消化後消化液を 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過した後に, DIGITAL REFRACTOMETER PR-101 を使用して糖化液の糖度を測定した.

結果及び考察

製麴の状況および麴の酵素活性

麴米品種によって気中菌糸量、生育に差が認められた。秋田酒こまちに比べ、変異体米の生育が良好であった。また、麴菌株を比較すると白麴菌と AOK-3PT は一部に胞子の形成が確認できるなど、他の株と比較し生育速度が速かった。

AOK3P-T, AOK214-T が変異体米系統を麴米に使用した場合、高い酵素活性を示した。一方、AOK68-S など麴米に変異体米系統を使用すると活性が低くなる菌株も見られた (Table 1, 2, 3)。これは難消化性である変異体米系統において十分に生育できないため

表 1 α -アミラーゼ活性測定値 (U/g-koji)

	秋田 酒こまち	日本晴	e1	#2012	#4019
No. 5	395	953	1259	1747	1297
白麴	51	236	191	236	335
AOK3P-T	969	1536	2059	2292	2260
AOK214-T	1167	1562	1830	2247	2317
AOK68-S	140	252	137	880	214
AOK118-T	182	1148	363	905	634
AOK132-S	660	1291	1705	1925	1756
AOK150-T	1250	1447	1030	886	440

表 2 グルコアミラーゼ活性測定値 (U/g-koji)

	秋田 酒こまち	日本晴	e1	#2012	#4019
No. 5	254	306	336	355	417
白麴	166	394	406	358	379
AOK3P-T	440	482	417	449	449
AOK214-T	339	331	355	368	369
AOK68-S	74	166	101	337	93
AOK118-T	260	269	352	373	310
AOK132-S	89	358	134	284	223
AOK150-T	92	197	218	238	182

表 3 ペプチダーゼ総合活性測定値 (U/g-koji)

	秋田 酒こまち	日本晴	e1	#2012	#4019
No. 5	9	30	39.8	50.4	37.2
白麴	4	6.7	6.4	20.2	23
AOK3P-T	18.3	21.6	49.1	58.8	66.7
AOK214-T	15.4	26.5	24.3	43.9	50.7
AOK68-S	0	4.8	3.9	24.3	4.8
AOK118-T	4	17.8	25.6	32.7	36.9
AOK132-S	1.5	17.9	5.4	22.8	15.1
AOK150-T	5.2	17.9	26.4	38.1	26.6

に活性が低くなったと考えられた。

麴の消化試験

変異体米の °Brix 値が No.5 と比較し AOK3P-T, AOK214-T で比較的高い値を示した (Table 4)。このことから酵素活性の高い麴菌の使用により難消化性の変異体米の溶けが改善されることを確認した。また、シャーレ法による麴菌の選抜では酵素活性の低かった白麴菌が高い消化性を示したが、米自体を基質とする消化試験では多くの酵素が働くため、単純に酵素活性測定結果との比較することは困難であると考えられた。

表 4 麴の自己消化試験における消化液の °Brix

	秋田 酒こまち	日本晴	e1	#2012	#4019
No. 5	19.9	20.2	17.8	14.6	11.1
白麴	22.3	20.7	20.0	19.4	18.0
AOK3-PT	21.8	21.0	18.9	16.6	15.7
AOK214-T	21.2	22.5	18.9	15.2	13.9

表 5 麴の自己消化試験における消化液のグルコース濃度 (mg/ml)

	秋田 酒こまち	日本晴	e1	#2012	#4019
No. 5	4.4	4.5	4.3	3.2	3.2
白麴	4.2	4.3	3.5	3.7	3.4
AOK3-PT	4.5	4.1	3.7	2.8	3.5
AOK214-T	6.9	4.7	3.9	2.9	2.8

また、原料米#4019 の消化試験後のグルコース濃度を比較すると (Table 5), *A. oryzae* の白色変異体である AOK3-PT が最も高い値を示し、°Brix 値が最も高い値を示した白麴菌の値は他の麴菌と同程度になっている。このことから、白麴菌が生成する酵素群は変異体米の澱粉を液化することが出来るが、グルコースまでの分解速度が遅いことが示唆された。また、#4019 が有する澱粉は白麴菌以外の麴菌が生成する酵素群では液化されにくく、その後のグルコース単位までの分解は速やかに行われていと推察した。

結論

麴米を比較するとアミロース含有量が高く、アミ

ロペクチン側鎖が伸長した変異体米#4019 を使用すると α -アミラーゼやグルコアミラーゼといった澱粉分解に関与する酵素だけでなく、タンパク質分解を司るペプチダーゼ総合活性も高くなった。一方、麴菌株を比較すると酵素生産は清酒用麴菌及び AOK3P-T や AOK214-T (*A. oryzae*) が優れていた。しかし、麴を自己消化させた際に得られる $^{\circ}$ Brix 値は難消化性を示す#4019 を使用した際に白麴で特に高くなった。昨今問題となっている高温登熟障害米による酒化率（原料米から造れる清酒量）低下の主な原因はデンプンのアミロペクチン鎖長の伸長であると推察されており（奥田 2012）酒化率の低下は酒造業経営に大きな影響を及ぼすが、本研究において白麴菌が生産する酵素は難消化性澱粉を効率よく消化する能力を持つことが示された。この難消化性澱粉消化機構を解明し、酵素剤等に応用することで高温登熟障害米の対策に寄与することが期待される。

文献

- 伊藤俊彦, 藤原淳一, 野口巧実, 藤田直子, 橋爪克己 (2017). 「難消化性米が清酒製造へ及ぼす影響」『秋田県立大学ウェブジャーナル B』4,p125-130
- Asai, H., Abe, N., Mastusima, R., Crofts, N., Oitome, F., Nakamura, Y., and Fujita, N., (2014) Deficiencies in both starch synthase IIIa and branching enzyme IIb lead to a significant increase in amylose in SSIIainactive japonica rice seed. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 65, No. 18, p. 5497-5507
- Fujita, Y., Yoshida, M., Konda, T., Saitou, K., Utsumi, Y., Tokunaga, Y., Nishi, A., Satoh, H., Park, J., Jane, J., Miyano, A., Hirochika, H., and Nakamura, Y. (2007) Characterization of SSIIIa-Deficient Mutants of Rice: The Function of SSIIIa and Pleiotropic Effects by SSIIIa Deficiency in the Rice Endosperm. *Plant Physiology*, Vol.114, No.4, p.2009-2023
- 高橋仁, 伊藤俊彦, 中沢伸重, 岩野君夫 (2006) .「米タンパク質を基質とした清酒麴のペプチダーゼ総合活性の測定法」『日本醸造協会誌』103(8),

638-645

藤田直子 (2013) 「澱粉変異体米の解析と利用」『化学と生物』 Vol.51, No.6, p.400-407

奥田将生 (2012) 「米のデンプン構造と醸造特性・気象条件との関係」『生物工学』 90, p.227-230

〔平成 30 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 30 年 7 月 10 日受理〕

Investigation of *koji*-mold with resistant starch solubilizing activity

Toshihiko Ito¹, Tomomi Osaka¹, Chihiro Hirohata¹, Takumi Noguchi¹,
Naoko Fujita², Katsumi Hashizume¹

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource, Akita Prefectural University

² Department of Biological Production, Faculty of Bioresource, Akita Prefectural University

The digestibility of the rice grain is closely associated with the utilization of rice starch in the brewing of *Japanese sake*. It also affects enzyme production in the production of *koji*. The authors produced *koji* using 8 strains of *koji*-mold and 3 varieties of mutant rice that contained different lengths of amylopectin side chains and dissimilar ratios of amylose. The process revealed that amylase activity was dependant on the length of the amylopectin side chain and the amylose content of rice. The *koji* of *Aspergillus luchuensis* was found to be the most powerful among the 8 strains of *koji*-mold in the self-digestion test. From these results, it can be posited that amylases from *A. luchuensis* may be useful for the more efficient digestion of high-temperature damaged rice in sake brewing.

Keywords: resistant starch, koji enzyme, brewing sake