

# エチル- $\alpha$ -D-グルコシドを生産する麹菌の育種

都築 正男<sup>\*1)</sup>

## Breeding of the Koji to produce Ethyl- $\alpha$ -D-glucoside

TSUDUKI Masao<sup>\*1)</sup>

近年、食品成分の生理機能が注目されており、その中で糖質についても様々な生理機能があることが明らかにされている。清酒やみりんなどに少量含まれるエチル- $\alpha$ -D-グルコシド ( $\alpha$ EG) は肌の保湿効果があると考えられており、機能性素材として期待されている糖である。本研究では  $\alpha$ EG が食品や化粧品原料などに利用されることを目指して、 $\alpha$ EG を高生産する微生物の選抜と育種を行った。

### 1. 緒言

近年、国民の健康に対する意識の向上により、食品に含まれる成分の健康機能性が大きく注目されている。機能性をもつ食品成分は、素材中に元々含まれる成分に加え、加工や発酵で生じる成分がある。

エチル- $\alpha$ -D-グルコシド ( $\alpha$ EG) は、日本酒やみりんなどに 0.2~0.7 % 程度含まれることが知られており、即効性の甘味と遅効性の苦味を呈する成分である<sup>1)</sup>。日本酒のもろみの中では、麹菌の  $\alpha$ -グルコシダーゼの糖転移反応により、マルトオリゴ糖とエタノールを基質として  $\alpha$ EG が生成される<sup>2,3)</sup>。この  $\alpha$ EG は、肌の保湿や肌荒れ改善、糖質の吸収阻害、腸内細菌叢の改善、消臭、味質の改善など様々な機能性が確認されており、新たな甘味素材として期待される糖質である<sup>1,3)~6)</sup>。特に注目されるのが、肌への機能性で、皮膚の真皮層のコラーゲン量を増加する整肌効果<sup>7)</sup>があり、冬期に起こりやすいヒビ・あかぎれ、更に加齢やステロイド長期服用による皮膚の菲薄化などを改善し、QOL の向上に役立つと考えられる。

本研究では、整肌効果をもつ  $\alpha$ EG を高生産する微生物の育成を目的とし、日本酒等に使用する麹菌を中心とした糸状菌を用いて  $\alpha$ EG 高生産菌を選抜した。また突然変異処理で  $\alpha$ EG 生成能が上がることを期待できる<sup>8)</sup>ため、選抜した菌株を突然変異処理し、 $\alpha$ EG 生成能が向上した菌株を得たので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 使用菌株

選抜、育種に使用した糸状菌は、以下のとおりである。 ; *Aspergillus oryzae* var. *brunneus* RIB40 株, *Aspergillus luchuensis* RIB2005 株, *A. luchuensis* RIB2501 株, *Aspergillus niger* RIB2013 株, *Aspergillus tubingens* RIB2036 株,

*Aspergillus kawachii* SC60 株 (以上, (独) 酒類総合研究所より入手), *A. oryzae* HO117 株 ((株) 菱六より入手), *A. kawachii* JCM22250 株, *A. kawachii* JCM22251 株 (以上, (国研) 理化学研究所より入手), *A. kawachii* MAFF111184 株 ((国研) 農業・食品産業技術総合研究機構より入手), *Trichoderma viride* NBRC31337 株 ((独) 製品評価技術基盤機構より入手)。

#### 2.2 培地

糸状菌の増殖にはポテトデキストロース寒天培地 (以下 PDA 培地, 日水製薬 (株) 製) を使用した。 $\alpha$ EG の生成および酵素活性測定用培地には、MPYC 培地 (2 % マルトース, 0.5 % ペプトン, 0.1 % 酵母エキス, 0.3 % コーンステープリカー, 0.1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 %  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) で生育した菌体を使用した。

#### 2.3 糸状菌の突然変異

菌体を PDA 斜面培地で 30 °C, 7 日間培養したものに 0.01 % Tween 80 を加えて白金耳で分生子を懸濁し, 1G3 ガラスフィルターでろ過して分生子を集めた。集めた分生子の懸濁液をシャーレに 2 mL 入れ, 15 W の UV ランプを 5 分間照射後, 暗黒下に 30 分置き, PDA 平板培地に塗布し, 30 °C で 3~4 日培養し, 変異株を得た<sup>8)</sup>。

#### 2.4 糖化力・ $\alpha$ -グルコシダーゼ活性

MPYC 培地で培養した菌体 1 g に, 0.5 % 塩化ナトリウムを含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を加え, 5 °C で一晩浸出し, 3500 rpm, 10 分, 遠心分離した上清を酵素液とした。この酵素液の酵素活性を糖化力分別定量キット (キッコーマンバイオケミファ (株) 製) を用いて測定した。 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性は, 4-ニトロフェニル  $\alpha$ -グルコシドを基質として 37 °C, 10 分間反応し, 反応停止後 400 nm の吸光度を測定して求めた。糖化力は 4-ニトロフェニル  $\beta$ -マルトシ

\*1) バイオ・食品グループ

ドを基質として 37℃, 10 分間反応し, 反応停止後 400 nm の吸光度を測定して求めた.

## 2.5 αEG の生成試験

MPYC 培地で培養した菌体をろ過して集め, 生理食塩水で洗浄し, 菌体を乳鉢ですり潰した. すり潰した菌体 0.5 g に, 30 % エタノールに 5 % マルトース (以下, マルトース基質) または 5 % デンプン (以下, デンプン基質) を加えた反応液 5 mL を入れ, 30℃, 24 時間反応させた<sup>9)</sup>. 反応後 3500 rpm, 10 分間遠心分離し, 上清と等量のアセトニトリルを加え, フィルターろ過後, 5 倍希釈して UPLC (Waters 社製) で分析した. 分析条件は以下のとおりである. カラム: ACQUITY UPLC BEH Amide 2.1 × 150 mm ID, 検出器: ELSD (Gain 200, Pressure 40psi, ドリフトチューブ 40℃), 溶離液: A: 80/20 アセトニトリル/水, 0.2% トリエチルアミン, B: 30/70 アセトニトリル/水, 0.2% トリエチルアミン, グラジエント: A:B = 80:20 → 30:70 流速: 0.12 mL/min., カラム温度: 35℃.

## 3. 結果および考察

### 3.1 糸状菌の αEG 生成量の比較と選抜

*A. oryzae* var. *brunneus* RIB40 株, *A. oryzae* HO117 株, *A. luchuensis* RIB2005 株, *A. luchuensis* RIB2501 株, *A. niger* RIB2013 株, *A. tubingens* RIB2036 株, *A. kawachii* SC60 株, *T. viride* NBRC31337 株の菌糸体を用いて, マルトース基質とデンプン基質により, αEG の生成量を比較した.

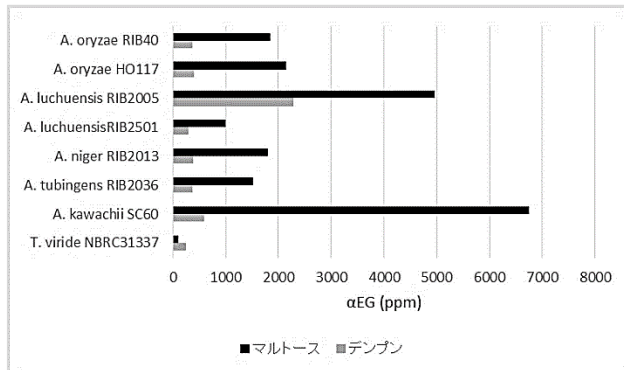


図 1 糸状菌 8 種類の αEG 生成量

結果を図 1 に示す. マルトース基質で αEG 生成量が最も多いのは *A. kawachii* SC60 株 (6750 ppm), 次いで, *A. luchuensis* RIB2005 株 (4960 ppm) であった. 一方, デンプン基質で αEG 生成量が最も多いのは *A. luchuensis* RIB2005 株 (2150 ppm) で, マルトース基質の 1/2 以下の生成量に留まった. 使用菌株の比較では, 7 菌株と異なる *Trichoderma* 属の NBRC31337 株は, マルトース基質, デンプン基質とも αEG の生成量が著しく少なかった. 同種の菌株間の比較では *A. oryzae* では 2 菌株間での αEG の生成量に大きな違

いが見られず, *A. luchuensis* では, 白色変異株である 2501 株はマルトース基質, デンプン基質ともに 2005 株の 1/5 程度の αEG 生成量であった. 以上からマルトース基質で *A. kawachii* SC60 株が αEG 高生産菌株であると判断した.

αEG の生成試験では菌体をろ過して集めるが, このとき自然ろ過により集菌したため, 実験ごとに菌体に含まれる水分のばらつきが生じた. *A. kawachii* SC60 株について, 同一菌株で同一条件で反応させたにも関わらず, αEG の生成量は図 1 の実験では約 6750 ppm であったが, 図 2 や図 7 の実験では約 3200 ppm であった. 一方, 図 9 の実験では SC60 株の αEG 測定を複数回行ったが, 吸引ろ過により菌体に含まれる水分がほぼ同等になったため, ばらつきが少なく, いずれも約 7900 ppm となった.

### 3.2 *Aspergillus kawachii* の菌株間の αEG 生成量の比較

*A. kawachii* SC60 株が αEG 高生産菌株であることから, *A. kawachii* の菌株間で αEG の生成量を比較した. その結果を図 2 に示す. SC60 株はマルトース基質で約 3200 ppm, デンプン基質で約 1500 ppm の αEG を生成し, 今回比較した 4 菌株で最も多い生成量であった. JCM22250 株はマルトース基質で SC60 株の 2/3 程度の量であった. JCM22251 株は, マルトース基質とデンプン基質の差が少なく, いずれも 2000 ppm 弱の αEG の生成量であった. MAFF111184 株は αEG の生成量が 200~300 ppm と非常に少なく, JCM22251 株と同様に基質の差が少なかった. この結果より *A. kawachii* の菌株間では αEG の生成量の差が大きく, *A. kawachii* SC60 株を αEG の生成量の多い菌株として次の実験に使用した.

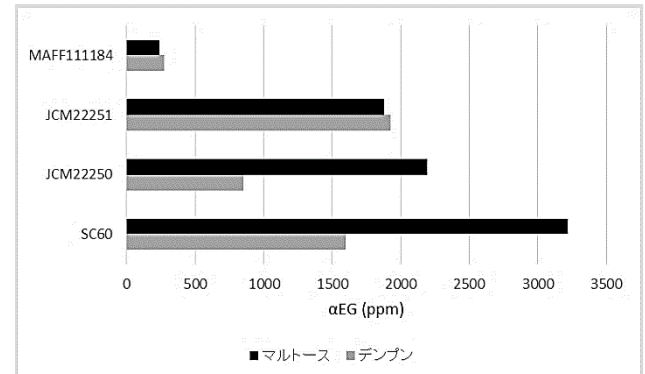


図 2 *A. kawachii* 4 菌株の αEG 生成量

### 3.3 突然変異処理による αEG 生成の変化と高生産株育成

マルトース基質で最も多く αEG を生成した *A. kawachii* SC60 株とデンプン基質で最も多く αEG を生成した *A. kawachii* JCM22251 株を用いて紫外線照射により突然変異処理を行った. 変異株は SC60 株では 39 個体, JCM22251 株では 36 個体得られた. これらの酵素活性を糖化力分別定量キットで測定した.

変異株の α-グルコシダーゼ活性を図 3~4 に示す. 酵素活性は SC60 株, JCM22251 株共に親株より低くなっている

ものが大半であったが、親株より  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が高い菌株が、SC60 株由来の変異株で 8 個体、JCM22251 株由来の変異株で 1 個体得られた。特に SC60 株由来の変異株では親株の 5.2 倍の酵素活性をもつ菌株 (SC60UV-2 株) が得られた。次に、変異株の糖化力を図 5~6 に示す。なお

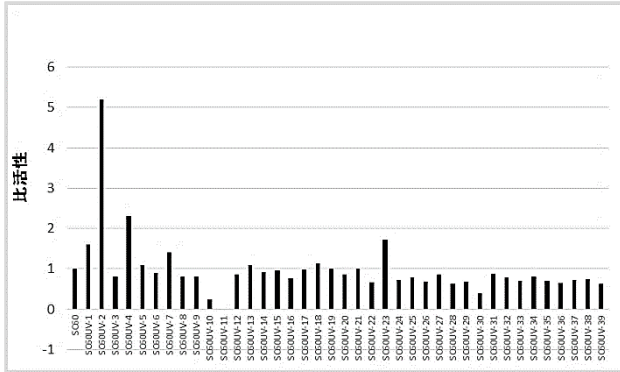


図 3 SC60 株由来変異株の  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性

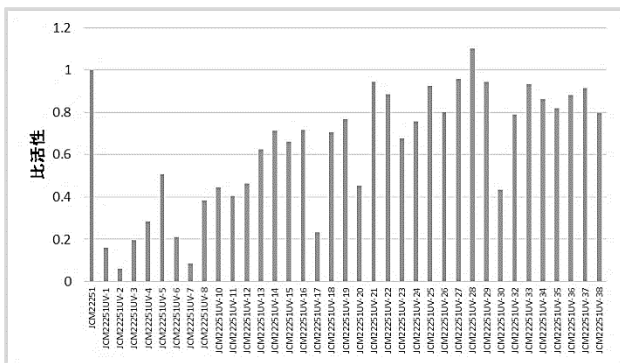


図 4 JCM22251 株由来変異株の  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性

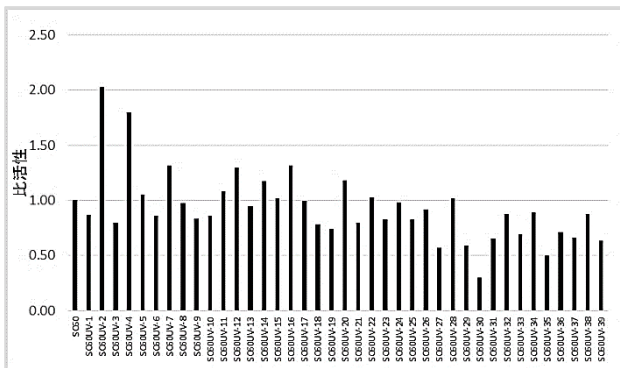


図 5 SC60 株由来変異株の糖化力

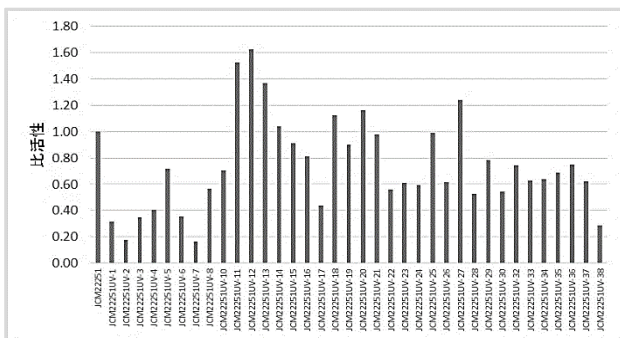


図 6 JCM22251 株由来変異株の糖化力

糖化力はグルコアミラーゼと  $\alpha$ -グルコシダーゼをあわせた活性である。親株より糖化力が高い菌株は、SC60 株由来の変異株で 9 個体、JCM22251 株由来の変異株で 6 個体得られた。

徳田らの報告<sup>9)</sup>では  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性と  $\alpha$ EG 生成量の相関は低いとの結果が得られているが、酵素活性が高いものは  $\alpha$ EG の生成量が多い傾向があるので、酵素活性が元株の 1.1 倍以上あった変異株について  $\alpha$ EG の生成量を測定した (図 7~8)。SC60 株由来の変異株では、親株より多く  $\alpha$ EG を生成した菌株が 2 菌株、同等であった菌株が 2 菌株であった。 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が元株の 5.2 倍あった SC60UV-2 株は、多くの  $\alpha$ EG が生成されることが期待されたが、親株の 1.1 倍の増加に留まった。JCM22251 株由来の変異株では、 $\alpha$ EG の生成量は親株とほぼ同等か、それ以下であった。親株とほぼ同等であった菌株が 1 菌株 (JCM22251UV-11 株) あったが、JCM22251UV-11 株はデンプンを基質とすると親株の半分程度の  $\alpha$ EG 生成量であった。

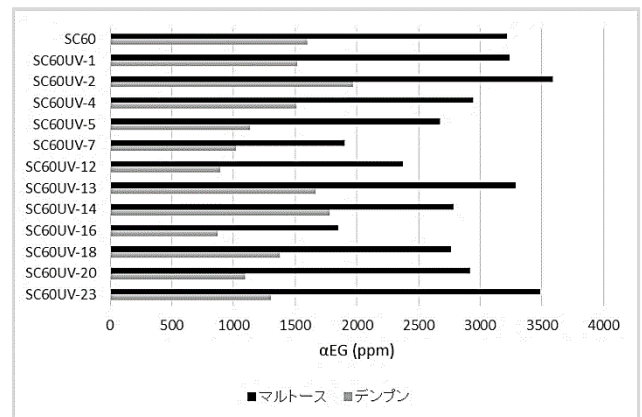


図 7 SC60 株由来変異株の  $\alpha$ EG 生成量

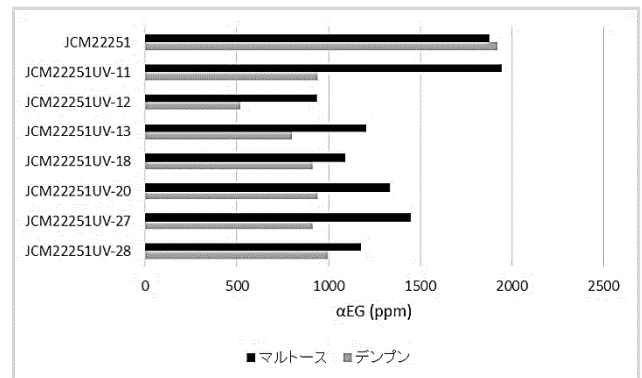


図 8 JCM22251 株由来変異株の  $\alpha$ EG 生成量

そこで SC60UV-2 株よりも多くの  $\alpha$ EG を生産する菌株を得るために、SC60UV-2 株を親株として再度紫外線照射を行い、55 個体の変異株を獲得した。この 55 個体の  $\alpha$ EG の生成量を分析したところ、SC60 株よりも多く  $\alpha$ EG を生成する菌株が 23 個体得られたものの、SC60UV-2 株よりも多くの  $\alpha$ EG を生成したものは 1 個体 (SC60UV-2-53 株) のみ

であった(図9)。SC60UV-2-53株は、SC60株と比較すると1.6倍以上の $\alpha$ EGを生成し、反応液中に約13000ppm含まれた。SC60UV-2-53株の $\alpha$ EG生成能力の向上のメカニズムの解明については今後の検討課題であるが、 $\alpha$ EGは $\alpha$ -グルコシダーゼの糖転移反応により生成するので、高生産性の変異株においては $\alpha$ -グルコシダーゼのアミノ酸置換などにより糖転移反応が進みやすくなったか、転写制御の変化が生じて酵素量が増加している可能性が考えられる。

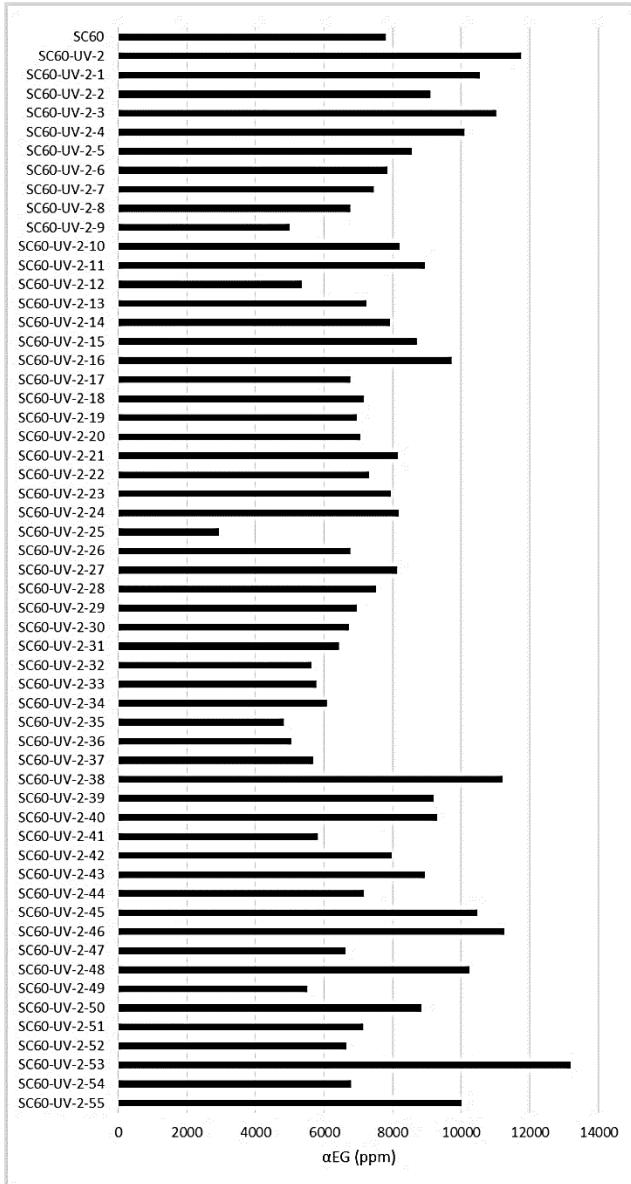


図9 SC60UV-2株由来変異株の $\alpha$ EG生成量

#### 4. 結言

本研究で機能性の糖類である $\alpha$ EGを高生産する糸状菌の選抜と育種を行った。主な結果は次の通りである。

- (1) 発酵食品で使用する糸状菌を中心に6種8菌株の糸状菌の $\alpha$ EGの生成量を比較すると*A. kawachii*に属する菌株が高生産であった。
- (2) *A. kawachii*の4菌株ではSC60株が $\alpha$ EGを最も多く生産する菌株であった。
- (3) *A. kawachii* SC60株の紫外線照射で、 $\alpha$ EG生成能が親株の1.6倍に向上した変異株を得た。

#### 参考文献

- 1) 岡智；日本醸造協会誌(72), 631-635, 1977
- 2) Takenaka, F., Uchiyama, H., and Imamura, T. ; Biosci. Biotchnol. Biochem., (64), 378-385, 2000
- 3) 岡智, 岩野君夫, 布川弥太郎；農芸化学学会誌(50), 463-468, 1976
- 4) 芳川憲司, 池田潔昭, 谷川弘晃, 山本一也, 宮本博文, 岡田茂孝；日本食品工業学会誌(41), 878-885, 1994
- 5) Takenaka, F., and Uchiyama, H. ; Biosci. Biotchnol. Biochem., (65), 1458-1463, 2001
- 6) Kitamura, N., Ota, Y., Haratake, A., Ikemoto, T., Tanno, O., and Horikoshi, T. ; Skin Pharmacol. (10), 153-158, 1997
- 7) Bogaki, T., Mitani, K., Oura, Y., and Ozeki, K. ; Biosci. Biotchnol. Biochem., (81), 1706-1711, 2017
- 8) 今野宏；FFI Journal, (221), 42-50, 2016
- 9) 徳田宏晴；醸造協会誌(114), 79-87, 2019