

〔生物工学会誌 第73巻 第2号 97-104. 1995〕

清酒麴中の α -グルコシダーゼ活性と清酒醸造における働き森本 良久[§]・北本勝ひこ*・藤田 義人^{§§}
五味 勝也・熊谷知栄子国税庁醸造試験所
〒114 東京都北区滝野川2-6-30

(平成6年10月4日受付 平成7年1月12日受理)

Activity of α -Glucosidase in Sake *Koji* and Its Role during Sake Brewing

YOSHIHISA MORIMOTO, KATSUHIKO KITAMOTO,* YOSHITO FUJITA, KATSUYA GOMI, and CHIEKO KUMAGAI (National Research Institute of Brewing, 2-6-30 Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114) Seibutsu-kogaku 73: 97-104, 1995.

Enzyme activities of *koji* samples from 12 sake breweries were determined, and the relationship between their production conditions was analyzed. α -Glucosidase activity showed a high correlation with glucoamylase and α -amylase, and was especially in the case of the latter. *Ginjo koji* had higher relative activity of α -glucosidase to α -amylase, suggesting that α -glucosidase may play an important role in *ginjo* (high-quality) sake brewing. Addition of purified α -glucosidase to *koji* enzyme solution increased the glucoamylase activity. Glucose was produced by the addition of both purified α -glucosidase and purified α -amylase to starch solution, but not by the addition of only α -glucosidase. These results indicate that the conventional method for measuring glucoamylase activity measures not only glucoamylase but also α -glucosidase activity. The contribution rate of α -glucosidase to glucoamylase was estimated to be 10-20% of the glucoamylase enzyme activity of *koji* determined by the conventional method.

[Key words: sake brewing, *koji*, α -glucosidase, *Aspergillus oryzae*]

清酒醸造において蒸米の溶解糖化は、麴中の α -アミラーゼとグルコアミラーゼの作用によって行われているとされている。¹⁾ α -アミラーゼによりデンプン分子の α -1,4 結合はランダムに切断されて順次小さな分子になり、グルコアミラーゼによりデキストリン分子の非還元末端からグルコース単位で切断されていく。この両酵素に関しては非常に多くの研究があり、我々も麴菌 *Aspergillus oryzae* の α -アミラーゼ遺伝子 (*amyB*), グルコアミラーゼ遺伝子 (*glaA*) をクローニングし、その構造と機能についてさまざまな解析を行っている。²⁻⁹⁾

一方麴菌などの多くの糸状菌は、これらの他に α -グルコシダーゼを生産することが知られている。麴菌

の α -グルコシダーゼはグルコシルトランスフェラーゼ、またはトランスグルコシダーゼとも呼ばれているもので、マルトースやオリゴ糖などから α -1,4 結合したグルコース残基を他の物質に転移する作用をもつ。清酒醸中では、転移する受容体が水るときグルコース1分子が生成し、エタノールるときエチル- α -D-グルコシドが、¹⁰⁾ グルコースや他のオリゴ糖のときはイソマルトースや種々のオリゴ糖がそれぞれ生成する。このうち糖転移作用については、布川と岩野らによる多くの研究がある。^{11,12)}

最近我々は、*A. oryzae* から α -グルコシダーゼ遺伝子 (*agdA*) をクローニングし、その誘導発現が *amyB*, *glaA* と同様にマルトースのようなオリゴ糖により起こり、転写レベルで制御されていることを見いだしている。また、これら3種のアミラーゼ遺伝子の塩基配列の決定から、プロモーター領域には共通の配列が3

* 連絡先, Corresponding author.

§ 現所属, 日本清酒(株).

§§ 現所属, 福井県食品加工研究所.

箇所存在することも判明した。¹³⁾ これらのことから、 α -グルコシダーゼも他の2つのアミラーゼと共に、麴製造中に誘導生産され、清酒醸造でも重要な働きをしていると考えられた。

そこで、 α -グルコシダーゼの清酒醸造での働きを明らかにするために、吟醸酒用麴を含む種々のタイプの清酒麴中の α -グルコシダーゼ活性を調べるとともに、精製酵素を用いて本酵素の糖化酵素としての寄与について解析したので報告する。

実験方法

麴および清酒試料 吟醸酒および普通酒用麴試料は、全国の12の酒造場で平成4酒造年度に、留麴として実際に酒造に用いた麴(吟醸麴12点、普通麴13点)を使用した。また、同一製造場で製造された清酒試料(同一ロットの麴を使用したもの)についてエチル- α -D-グルコシドなどの定量に使用した。

麴の試験製造 麴エキス培地上のコロニーから麴菌 *A. oryzae* の胞子を0.01% Tween80 水溶液中にかきとり、ガラスフィルター3G1にてろ過し、ろ液を胞子懸濁液とした。これをペトリ皿に5g計り取った精米歩合70%の日本晴の α 米と無洗米無蒸煮白米(以下生米)に接種した。これを、32~40°C、相対湿度75~90%で45時間保ち、製造した麴を α -グルコシダーゼなどのアミラーゼの酵素活性の測定に用いた。

麴の酵素力価測定 グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ、酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼについては国税庁所定分析法¹⁴⁾に従って測定した。 α -グルコシダーゼはOdaらの方法¹⁵⁾により測定した。すなわち、酵素液0.05mlを、5mMの

-ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド(*p*-NPG)を含む50mMリン酸緩衝液(pH 6.8)1.0mlに加え、30°Cで10分間反応させた。3% Na₂CO₃を加えて反応を停止し、410nmにおける吸光度を測定した。酵素力は、37°Cで1時間に1mgの

-ニトロフェノールを遊離する活性をもって1単位とした。

エチル- α -D-グルコシドの定量 エチル- α -D-グルコシドの定量は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて行った。装置は送液ポンプCCPM(東ソー(株))を用い、YMC-pack polyamine-II カラム(ϕ 4.6mm×250mm、(株)ワイエムシー)にて、水-アセトニトリル(35:65 v/v)を移動相として流速0.8ml/minで溶出し、示差屈折検出器ERC-7520(エルマエンジニアリング(株))にて検出を行った。検量線作成の

際のエチル- α -D-グルコシドの標準物質は岡と佐藤の方法¹⁶⁾により作成された結晶標品と和光純薬(株)製のものを使用した。

α -グルコシダーゼの精製 *agdA* 遺伝子を多コピー持つ α -グルコシダーゼ高生産性の *A. oryzae* 形質転換株 M-2-3 pTGF7-3¹³⁾ の胞子を1%ポリペプトンを含み、炭素源としてスクロースの代わりに3%マルトースを加えたCzapek-Dox 培地1lに接種し30°Cで3日間培養した。培養液をガラスフィルターでろ過して菌体を分離し、培養上清をミニタンろ過システムで限外ろ過膜を通過させることによりタンパク溶液を濃縮した。濃縮液は10mMの酢酸緩衝液に対して1晩透析した。透析物はButyl TOYOPEARL 650Mによる疎水クロマトグラフィーに供した。溶出には40~0%飽和硫酸濃度勾配により行い、透析後ゲルろ過を行った。

α -グルコシダーゼの添加実験 麴の糖化力における α -グルコシダーゼの寄与率を調べるために、グルコアミラーゼ活性測定時に精製 α -グルコシダーゼを添加する実験を行った。国税庁所定分析法では、グルコアミラーゼ活性測定の反応混合液として2%デンプン溶液1ml、0.2M酢酸緩衝液200 μ lと麴抽出液100 μ lを使用する。このとき使用する麴抽出液として100 μ lを加え、さらに精製 α -グルコシダーゼを活性にしてそれぞれ0.033, 0.065, 0.130Uを含む酢酸緩衝液100 μ lを添加した。続いて、40°Cで20分反応し、2N NaOH 0.1mlで反応停止、2N HCl 0.1mlで中和後、生成されたグルコースを定量しグルコアミラーゼ活性を求めた。このとき、反応混合液量は所定分析法の1500 μ lより100 μ l多くなり1600 μ lとなるので、定量したグルコース量に1600/1500を乗じて換算して求めた。

精製 α -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼによるグルコース生成能測定 結晶 α -アミラーゼ標品を用いて0, 50, 100, 150U/mlの α -アミラーゼ活性を持つ溶液を作成した。この溶液と、精製 α -グルコシダーゼ標品を活性にして0~0.3U/mlで6段階に変化させた溶液との混合液(合計量100 μ l)を2%デンプン溶液に添加し、所定分析法によるグルコアミラーゼ活性測定に従い、40°Cで20分間作用させ、生成したグルコースを定量した。

実験結果

麴試料の各酵素活性 吟醸酒用麴および普通酒用

Table 1. Production conditions and enzyme activities of *ginjo koji* using white rice with low polishing ratio.

Koji	Polishing ratio (%)	Tane-koji (g/100 kg rice)	Koji-making period (h)	Max. temp. (°C)	Enzyme activity (U/g-dry matter)					I/II	III/II [$\times 10^2$]
					I	II	III	IV	V		
A	38	20	48	44	117	355	0.614	2946	4600	0.330	0.173
B	45	30	48	43	115	312	0.826	3700	4375	0.369	0.265
C	35	15	51	42	123	437	0.778	3711	4788	0.281	0.178
D	35	20	55.5	43	126	446	1.105	3303	5733	0.283	0.248
E	35	15	55	41.5	104	357	0.898	3270	3927	0.291	0.252
F	35	30	54.5	42.5	116	354	0.866	3436	4419	0.328	0.245
G	40	20	53	42	87	375	0.678	2991	3926	0.232	0.181
H	40	30	52	42	112	382	0.722	2690	4051	0.293	0.189
I	40	30	54	44	116	316	0.890	4043	4210	0.367	0.282
J	39	20	55	44	115	395	0.586	3483	3577	0.291	0.148
K	50	10	53	41	126	481	1.053	3644	7194	0.262	0.219
L	40	30	56	43	65	571	1.456	4124	8321	0.114	0.255
Average	39.3	22.5	52.9	42.7	110	398	0.873	3445	4927	0.287	0.220
σ	4.3	6.9	2.6	1.0	17	71	0.232	415	1388	0.065	0.042

Max. temp.: Max. temperature during *koji* making process. I, Glucoamylase; II, α -amylase; III, α -glucosidase; IV, acid protease; V, acid carboxypeptidase. σ : Standard deviation.

麴試料の製麴条件と麴の各酵素活性測定の結果を Table 1, 2 に示した. 吟醸麴12点の平均精米歩合は約40%であり, グルコアミラーゼ, α -アミラーゼ, α -グルコシダーゼの活性はそれぞれ 110, 398, 0.873 U/g

麴という結果であった. また酸性プロテアーゼ, 酸性カルボキシペプチダーゼは平均でそれぞれ 3445, 4927 U/g 麴であった. 一方, 普通麴13点の平均精米歩合は65%であり, グルコアミラーゼ, α -アミラー

Table 2. Production conditions and enzyme activities of *futsu koji* using white rice with moderate polishing ratio.

Koji	Polishing ratio (%)	Tane-koji (g/100 kg rice)	Koji-making period (h)	Max. temp. (°C)	Enzyme activity (U/g-dry matter)					I/II	III/II [$\times 10^2$]
					I	II	III	IV	V		
M	65	21.6	42	40	175	879	0.977	2481	3165	0.199	0.111
N	63	60	47	42	151	786	1.017	3052	5109	0.192	0.129
O	65	35	48	43	75	523	0.295	2570	2615	0.143	0.056
P	65	100	47	42.5	129	937	0.738	2633	2622	0.138	0.079
Q	65	60	46	42	149	1014	1.328	2708	1707	0.147	0.131
R	65	60	46.5	41	119	739	1.005	2749	3627	0.161	0.136
S	70	100	46	42	198	1310	1.572	3674	3533	0.151	0.120
T	70	80	45	41	187	1222	1.109	3367	3162	0.153	0.091
U	60	60	45.5	42	149	795	0.830	2852	2199	0.187	0.104
V	58	50	46	42	117	675	0.718	2910	1286	0.173	0.106
W	70	80	48	42	109	993	1.137	2880	3661	0.110	0.115
X	60	70	45.5	42	148	1091	0.993	3576	2531	0.136	0.091
Y	70	80	46.5	42.5	189	1340	1.177	3316	2125	0.141	0.088
Average	65.1	65.9	46.1	41.8	146	946	0.992	2982	2872	0.156	0.104
σ	4.0	21.9	1.5	0.7	34	239	0.300	372	958	0.024	0.022

Max. temp., I-V, and σ were described in Table 1.

Table 3. Correlation coefficient between *koji*-making conditions and enzyme activities.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 Polishing ratio											
2 <i>Tane koji</i>	0.810**										
3 Time	-0.832**	-0.620**									
4 Max. temp.	-0.451*	-0.172	0.456*								
5 Glucoamylase	0.580**	0.561**	-0.631**	-0.402*							
6 α -Amylase	0.870**	0.865**	-0.709**	-0.409*	0.756**						
7 α -Glucosidase	0.306	0.412*	-0.095	-0.294	0.467*	0.570**					
8 APase	-0.423*	-0.186	0.510**	0.346	-0.049	-0.168	0.371				
9 ACPase	-0.543**	-0.501*	0.646**	0.134	-0.396*	-0.464*	0.249	0.577**			
10 5/6	-0.791**	-0.699**	0.531**	0.392	-0.246	-0.788**	-0.392	0.316	0.307		
11 7/6	-0.818**	-0.657**	0.776**	0.307	-0.443*	-0.719**	0.099	0.593**	0.686**	0.739**	

* $r(5\%)=0.396$; ** $r(1\%)=0.505$, $n=25$.

ぜ、 α -グルコシダーゼの活性は平均でそれぞれ 146, 946, 0.992 U/g 麴という結果であった。また酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼは平均でそれぞれ 2982, 2872 U/g 麴であった。

普通麴に比較して吟醸麴では、 α -アミラーゼ活性が顕著に低いに対してグルコアミラーゼはそれほど低くはない。その結果として α -アミラーゼに対するグルコアミラーゼの比(G/ α -A比)が吟醸麴で0.287(平均値)と、普通麴の0.156に比べ高くなり、一般に言われている吟醸麴としての特徴を表していた。それに対して α -グルコシダーゼも吟醸麴でわずかに低い程度で、やはり結果として α -アミラーゼに対する α -グルコシダーゼの比(α -G/ α -A比)が吟醸麴で0.220(平

均値)と、普通麴の0.104に比べ高くなっていった。

麴の製造条件と酵素活性の相関分析 吟醸、普通麴計25点の製造条件4項目(精米歩合、種麴接種量、製麴時間、製麴中の最高温度)、酵素活性値7項目(グルコアミラーゼ、 α -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ、G/ α -A比、 α -G/ α -A比)の計11項目について相関分析を行った(Table 3)。 α -グルコシダーゼはグルコアミラーゼ、 α -アミラーゼと高い相関を示し、特に α -アミラーゼとは危険率1%で有意な正の相関があった($r=0.570$)。また精米歩合は α -アミラーゼと非常に高い正の相関を示した($r=0.870$)。このことは、精米歩合が低下すれば α -アミラーゼは低下することを示し、

Table 4. Amount of glucose, maltose, and ethyl- α -D-glucoside in *ginjo-syu* and *futsu-syu*.

<i>Ginjo-syu</i> (high-quality sake)				<i>Futsu-syu</i> (ordinary sake)			
Sample	Glucose (%)	Maltose (%)	α -EG (%)*	Sample	Glucose (%)	Maltose (%)	α -EG (%)*
1	1.2	0.2	0.3	1	0.9	0.3	0.8
2	1.7	0.2	0.4	2	2.9	0.2	0.3
3	1.8	0.2	0.3	3	1.9	0.3	0.4
4	1.7	0.2	0.3	4	1.5	0.1	0.6
5	1.8	0.3	0.4	5	1.2	0.3	0.5
6	1.6	0.2	0.1	6	2.1	0.3	0.3
7	1.7	0.2	0.4	7	0.9	0.3	0.5
8	1.3	tr	0.3	8	0.9	0.2	0.5
9	2.6	tr	0.4	9	1.6	0.3	0.5
Average	1.71	0.17	0.32	Average	1.54	0.26	0.49

* Ethyl- α -D-glucoside.

Table 5. Purification of α -glucosidase from culture broth of *A. oryzae* M-2-3 pTGF7-3.

	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude extract	12.9	79.1	0.163	1.00	100
Butyl-TOYOPEARL 650M	4.55	0.408	11.2	68.7	35.3
Gel-filtration	3.26	0.161	20.3	125	25.3

最近の大吟醸酒に使用される35%というような低精米歩合の麴は α -アミラーゼが低いことをよく説明する。さらに、グルコアミラーゼとも同様に正の相関を示した($r=0.580$)が、 α -グルコシダーゼとは相関が認められなかった($r=0.306$)。しかし α -G/ α -A比は、G/ α -A比と同様に精米歩合と危険率1%で有意な負の相関が認められた($r=-0.818$)。すなわち精米歩合が低くなると α -グルコシダーゼ活性が相対的に高くなることを意味しており、吟醸酒製造での本酵素の何らかの働きを示唆するものであった。

エチル- α -D-グルコシドの定量 α -グルコシダーゼ活性が吟醸麴で相対的に高いならば、醪中で生成するエチル- α -D-グルコシドは、普通酒よりも吟醸酒中に多く含まれるのではないかと考え、同一ロットの麴を使用して製造された製成酒中のエチル- α -D-グルコシドを定量した(Table 4)。その結果、絶対量やグルコースに対する相対量でも吟醸酒は、普通酒よりエチル- α -D-グルコシドが少なかった。このことは、吟醸麴中の α -グルコシダーゼ活性の働きは、糖転移作用

のひとつであるエチル- α -D-グルコシドの生成には、あまり寄与していないことを示唆している。

α -グルコシダーゼの部分精製 後の実験に使用するため α -グルコシダーゼ高生産性の*A. oryzae*形質転換株 M-2-3 pTGF7-3¹³⁾の培養液を出発材料として疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過を経て、最終的に回収率25%で125倍に精製した標品を得た(Table 5)。この精製標品中には α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼ活性は検出されなかった。同菌株は、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼの生産量が比較的少なく、これら両酵素の活性を持たない最終標品を比較的容易に得ることができた。

糖化工程における α -グルコシダーゼの寄与率推定 国税庁所定分析法¹⁴⁾によるグルコアミラーゼ活性測定において、麴からの抽出液を酵素液として使用した反応混合液にこの精製した α -グルコシダーゼ溶液を、最終力価としてもとの酵素液に含まれる α -グルコシダーゼ力価の数倍から数十倍になるように添加し、グルコアミラーゼ活性を測定した(Fig. 1)。 α -グルコシ

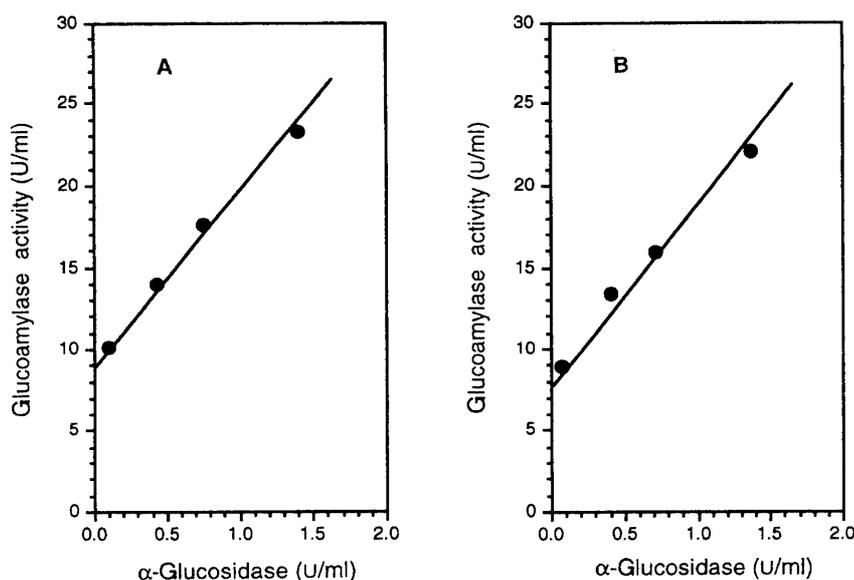


Fig. 1. Effect of α -glucosidase using the conventional method for measuring glucoamylase activity of *koji*. A, *Koji* sample N in Table 1; B, *koji* sample P in Table 1.

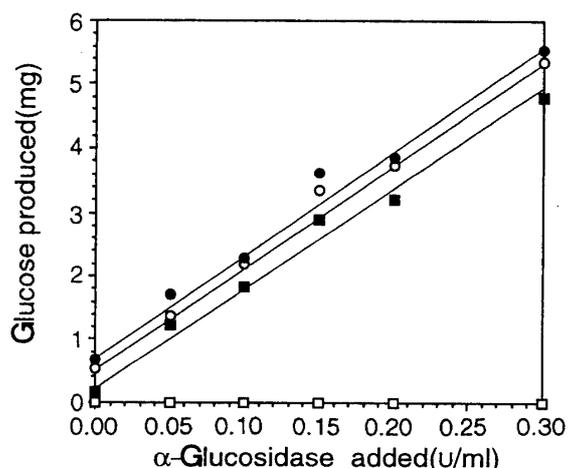


Fig. 2. Glucose production with both α -glucosidase and α -amylase from *koji* mold (*A. oryzae*). Purified α -glucosidase solution was added to 2% starch solution with 150 U/ml (\bullet), 100 U/ml (\circ), 50 U/ml (\blacksquare), or without (\square) α -amylase.

ダーゼの添加量に応じて、グルコアミラーゼ活性のみかけの測定値は増加し、確かにグルコース生成に α -グルコシダーゼが寄与していることが明らかとなった。 α -グルコシダーゼ活性（麴抽出液中にふくまれている活性と添加した酵素活性の和）をx軸、グルコアミラーゼ活性をy軸にとり、この結果と、添加前の麴抽出液がもっていた力価の点をプロットして直線で結ぶと、y軸との交点（ α -グルコシダーゼ活性0）のグルコアミラーゼ活性値が、その麴抽出液がもっていたグルコアミラーゼのみのグルコース生成能であると推定される。図の2つの試料(A, B)ではその値は添加せずに求めたグルコアミラーゼ活性値がAで10.1, Bで8.9であったので、Fig. 1から外挿法で求めた値である8.8, 7.8から計算すると87.1, 87.6%であった。その他10数種類の麴試料について行った同様の実験でも85~90%という推定値が得られた。すなわち、生成したグルコースの約10%は α -グルコシダーゼの寄与によるものと推定された。このことは、現在所定分析法で測定しているグルコアミラーゼ活性は、厳密には麴抽出液中のグルコース生成能であり、それはグルコアミラーゼと α -グルコシダーゼによっていることを意味している。

次に、精製した α -グルコシダーゼ溶液と、すでに精製され結晶化されている*A. oryzae*起源の α -アミラーゼを混合して酵素液を作り、両酵素からのグルコース生成を測定した(Fig. 2)。 α -アミラーゼは最終濃度として0~150 U/mlで4段階、 α -グルコシダー

Table 6. Effect of α -glucosidase on analysis of glucoamylase activity of *ginjo-koji*.

Sample	Enzyme activity (U/g-dry matter)		Effect of α -glucosidase (%) on glucose production (II/I)
	I	II	
A	117	12	10.3
B	115	15	13.0
C	123	14	11.3
D	126	18	14.3
E	104	16	15.4
F	116	15	12.9
G	87	13	14.9
H	112	14	12.5
I	116	15	12.9
J	115	12	10.4
K	126	17	13.5
L	65	26	40.0
Average	110	15.6	14.2

I: Glucoamylase activity of *ginjo-koji* samples analysed according to The Official Methods of Analysis of the National Tax Administration Agency of Japan, 3rd ed. II: Values converted by Fig. 3 from glucose amount produced by α -glucosidase and α -amylase of *koji*. Samples A-L are described in Table 1.

ゼは0~0.3 U/mlで6段階に変化させた酵素液を作成し、2%デンプンを基質として40°Cで反応させてグルコース生成を測定した。その結果、 α -アミラーゼを含まない α -グルコシダーゼ単独の酵素液ではグルコース生成は見られなかった。しかし α -アミラーゼと α -グルコシダーゼを含む酵素液は α -グルコシダーゼ添加量に応じてグルコースを多く生成した。また、この関係には直線性が認められ、これを検量線として先の吟醸麴、普通麴試料の酵素活性結果(Table 1, 2)から α -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼの2酵素によるグルコース生成能を推定し、グルコアミラーゼ力価に換算した(Table 6, 7)。その結果吟醸、普通麴共に、グルコアミラーゼ活性とされた値のうち10~20%がこの2酵素の働きによるものと推定された。

試験製造した麴の酵素活性測定 Table 3から精米歩合が低くなると α -グルコシダーゼ活性が相対的に高くなることが明らかになり、吟醸酒造りにおける本酵素の何らかの働きが示唆された。一般に吟醸造りにおいては精米歩合が低い白米を使用するとともに、製麴においては米の中心まで十分に蒸せていないような硬い蒸米を使用することも多い。そこで、デンプン

Table 7. Effect of α -glucosidase on analysis of glucoamylase activity of *futsu-koji*.

Sample	Enzyme activity (U/g-dry matter)		Effect of α -glucosidase (%) on glucose production (II/I)
	I	II	
M	175	20	11.4
N	151	21	13.9
O	75	8	10.7
P	129	17	13.9
Q	149	27	18.1
R	119	20	16.8
S	198	32	16.2
T	187	24	12.8
U	149	18	12.1
V	117	15	12.8
W	109	23	21.8
X	149	21	14.2
Y	189	23	12.2
Average	146	20.7	14.2

Samples M-Y are described in Table 2.

I and II are the same as in Table 6.

の状態によるグルコアミラーゼ, α -アミラーゼ, α -グルコシダーゼ生産の違いを比較検討するため, 試験製造した α 米麴, 生米麴の酵素活性を測定した (Table 8). その結果 α -アミラーゼ, グルコアミラーゼはあまり違いはなかったが, α -グルコシダーゼは生米麴で α 米麴の約2倍の活性を示した.

考 察

清酒麴中にはエンド型およびエキソ型のアミラーゼである α -アミラーゼとグルコアミラーゼが存在する. しかし, その存在量は少ないものの, さらにもう1つのアミラーゼである α -グルコシダーゼも存在することが知られている. 主要な前2者のアミラーゼに比べ, α -グルコシダーゼの清酒醸造における働きについては不明な点が多い. 岩野ら^{11,12)}は, *A. niger*由来の α -グルコシダーゼ精製酵素を用いて役割を検討している. 清酒醸造での主要な働きは糖転移作用であり, isomaltose, panose, isomaltotrioseなどのオリゴ糖とエチル- α -D-グルコシドを生成することであると報告している. また, 蒸米の溶解・糖化に関する α -グルコシダーゼの働きはほとんどないと報告している.¹²⁾しかし, Fig. 2に示したように, α -グルコシダーゼ単独ではデンプンからのグルコース生成は認められないも

Table 8. Amylase activities of steamed and raw rice *koji*.

Treatment	Glucoamylase (U/g-dry matter)	α -Amylase (U/g-dry matter)	α -Glucosidase (U/g-dry matter)
Steamed	225	1441	1.114
Non-steamed	259	1623	2.207

の, α -アミラーゼとの共存下では顕著なグルコースの生成が認められた. 麴のグルコアミラーゼ活性を測定するときには麴からの酵素抽出液を用いるので, 当然ながらグルコアミラーゼの他に, α -アミラーゼと α -グルコシダーゼが共存していることになる. これまで, α -グルコシダーゼによるグルコース生成を考慮していないので, 所定分析法¹⁴⁾で測定しているグルコアミラーゼ活性はグルコアミラーゼそのものを表すと思われていた. しかし, 実際には麴によるグルコース生成能を見ているのであり, 今回の結果から α -グルコシダーゼの寄与を無視することはできないと考えられる. この寄与率を推定するために行った添加実験と再構成実験の結果から, グルコース生成には10~20%程度の α -グルコシダーゼの活性が関与していると推定された. 近年の吟醸酒製造の増加から, 吟醸用麴に対する関心が高まっており, その1つの具備すべき条件として α -アミラーゼに対するグルコアミラーゼの相対力価が高いことが言われており, グルコアミラーゼ活性の強い麴菌の育種も進められている.¹⁶⁾しかし, これまで見落としていた α -グルコシダーゼを標的とした育種が有効かもしれない.

清酒麴は通常, 蒸米に種麴を散布して製造する. しかし, 生米を用いても麴をつくれることはすでに知られており,¹⁷⁾このことは*A. oryzae*が生デンプンを利用する酵素を生産していることを示している. 我々は, クローニングしたグルコアミラーゼ遺伝子の塩基配列から*A. niger*のグルコアミラーゼと高い相同性をもつこと, 生デンプンを分解するために必要なC-末端ドメインをもつことを明らかにした.⁴⁾そこで, 生米での増殖ではこの生デンプン分解活性を持ったグルコアミラーゼが誘導生産されるという想定の下で, 生米と α 米で5gのスケールで麴の試験製造を行った. 麴の酵素活性を測定したところ, 予想に反してグルコアミラーゼ活性はそれほど高くなかったが, α -グルコシダーゼ活性が約2倍の活性を示した (Table 8). この抽出液をSDS-PAGE電気泳動に供したところ (data not shown) グルコアミラーゼの65 kDのバンドと90-

130 kD のスミアなバンドには変化は見られなかったが、108 kD の位置に生米でのみ明瞭なバンドが認められた。この位置は、精製酵素の添加実験でも α -グルコシダーゼの位置に完全に一致することを確認している。意外なことに、生米で α -グルコシダーゼが誘導生産されていることを示唆する結果であった。吟醸麴では、杜氏の流儀にもよるが一般に非常に硬い蒸米で製麴することが多い。蒸米の中心に白く蒸せていない部分があるものも珍しくない。今回の実験ではまだ不十分であるが、吟醸麴のような低精米歩合の白米を使用する清酒製造では、 α -グルコシダーゼがこれまで考えられていた以上に重要な働きをしているのかもしれないことを示唆している。このような点から、麴中の α -グルコシダーゼの活性測定は α -アミラーゼやグルコアミラーゼと同様に清酒製造の工程管理の上で重要であると思われる。

要 約

1. 全国の清酒製造場（12場）の麴（吟醸酒用、普通酒用）について、 α -グルコシダーゼ、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼなどの酵素活性を測定するとともに、製麴条件との関係について解析した。
2. 麴中の α -グルコシダーゼ活性はグルコアミラーゼ、 α -アミラーゼともに正の相関が認められ、特に後者との間に高い相関を示した。
3. α -アミラーゼは精米歩合と高い相関を示し、吟醸用麴のような低精米歩合のものでは活性が著しく低くなるのに対し、 α -グルコシダーゼの活性低下は顕著ではなかった。このことは、普通麴に比して吟醸麴で α -グルコシダーゼの相対的活性が高くなることから、吟醸酒製造では α -グルコシダーゼが重要な働きをしていることが考えられた。
4. 精製した α -グルコシダーゼを用いた麴抽出液添加実験から、 α -グルコシダーゼがグルコース生成に寄与していることを示した。
5. 精製 α -グルコシダーゼ単独では、デンプンからグルコースの生成は認められなかったが、 α -アミラーゼとの共存下ではグルコース生成が認められた。
6. 通常麴中の存在量から α -グルコシダーゼの

グルコース生成活性は、グルコアミラーゼ活性として測定される値の10~20%程度と推定され、清酒醪中での糖化工程でも無視できない働きをしていると考えられた。

最後に、麴、生成酒試料をお送り頂いた全国の酒造場の皆様、精製 α -アミラーゼ標品を供与して頂いた大阪大学蛋白研究所の戸田弘子博士に感謝いたします。

文 献

- 1) 西谷尚道：清酒製造技術，p. 91-124，日本醸造協会，東京（1979）。
- 2) Tada, S., Iimura, Y., Gomi, K., Takahashi, K., Hara, S., Yoshizawa, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 593-599 (1989).
- 3) Nagashima, T., Tada, S., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Toda, H.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 207-210 (1992).
- 4) Hata, Y., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G., Hara, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 941-949 (1991).
- 5) Hata, Y., Tsuchiya, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., Tamura, G., Hara, S.: *Gene*, **108**, 145-150 (1991).
- 6) Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., Tamura, G., Hara, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1939-1941 (1991).
- 7) Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Takahashi, K., Hara, S.: *Mol. Gen. Genet.*, **229**, 301-306 (1991).
- 8) Tsuchiya, K., Tada, S., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., Tamura, G.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1849-1853 (1992).
- 9) Hata, Y., Kitamoto, K., Gomi, K., Kumagai, C., Tamura, G.: *Curr. Genet.*, **22**, 85-91 (1992).
- 10) 岡 智，佐藤 信：農化，**50**，455-461 (1976)。
- 11) 岩野君雄，柴田和宏，光永邦晴，布川弥太郎：醸協，**72**，517-520 (1977)。
- 12) 岩野君雄，柴田和宏，布川弥太郎：醸協，**72**，521-525 (1977)。
- 13) 峰時俊貴，田村學造，五味勝也，北本勝ひこ，熊谷知栄子：農芸化学会大会要旨集，p. 412 (1993)。
- 14) 国税庁所定分析法注解：日本醸造協会，東京 (1993)。
- 15) Oda, Y., Iwamoto, H., Hiromi, K., Tonomura, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1902-1905 (1993).
- 16) 五味勝也，飯村 穰，原 昌道：醸協，**82**，792-797 (1987)。
- 17) 田中利雄，岡崎直人：醸酵工学，**60**，11-17 (1982)。