

麹菌 *Aspergillus* sp. のペクチナーゼ及びセルラーゼに関する研究

佐野一成*・江藤 勸*・萩尾 隆**・久米 堯**・森口充瞭***

*食品工業部・**うすき生物科学研究所・***大分大学工学部

Characterization of pectinases and cellulases derived from *Aspergillus* sp.

Kazunari SANO*, Susumu ETO*, Takashi HAGIO**, Tskashi KUME**, Mitsuaki MORIGUCHI***

*Food Science & Technology Div. ・ **Usuki Bio Research Center, ・ ***Faculty of Engineering, Oita Univ.

要旨

醤油麹菌, 焼酎麹菌の改良育種に関する基礎的知見を得るために, 強い植物組織崩壊活性を有する融合株である PM 菌を対象として, 遺伝子の解析と諸性質の同定を行ったところ, PM 菌は遺伝的にも形質的にも一方の親株である *Aspergillus niger* に近い菌株であることが推定された。また, この菌株が産生するペクチナーゼ及びセルラーゼの精製を試みたところ, いずれも複数の活性画分が見出され, 培養液中の酵素力価も親株と同等かそれ以上に強くなっていることが確認された。

1. 緒 言

近年, 県内でも様々な分野でバイオテクノロジーに対する需要が高まってきており, 主要な食品産業である味噌・醤油, 酒造業界でも高品質・高付加価値の製品開発や製造工程の合理化, 廃棄物の減量化等に対応できる微生物の実用化が望まれている。当センターではこれまでに焼酎用酵母を中心とした研究を行ってきたが, 新たに麹菌の改良育種に関する研究に着手することにした。

醸造に用いられる麹菌 (*Aspergillus* sp.) は多くの有用な酵素を菌体外に分泌することが知られており, それらの遺伝子やタンパク質に関する研究も幅広く行われている。ペクチナーゼ及びセルラーゼはそれぞれ, 植物細胞の強固な細胞壁の構成成分であるペクチン質やセルロースを分解する酵素で, これらの作用により植物組織の強度が低下するため, 醤油諸味の压榨特性や麦焼酎のアルコール収得率の向上等に有効であるとされる。

2. 方 法

2.1 菌株

うすき生物科学研究所が細胞融合により取得している, *A. niger* IFO31125 及び *A. oryzae* UFO5888 の融合株である PM 菌を対象とした。

2.2 PM 菌の同定

2.2.1 遺伝子の比較

PCR 法を応用した RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法により行い, プライマーの数種の組合せで増幅された遺伝子を親株及び実用麹菌と比較して遺伝的距離を検討した。

2.2.2 諸性質の比較

ふすま等培地, 棉培地, 炭化醤油粕培地等にて培養し, Nelson-Somogyi 法及び粘度低下測定法により酵素活性を, また, HPLC により有機酸生成量を測定して親株と比較した。

2.2 PM 菌酵素の分離・精製

固体培養の抽出液を限外ろ過により濃縮し, イオン交換及び疎水性カラムクロマトグラフィーに供して酵素タンパク質の分離・精製を試みた。溶出はそれぞれ, NaCl と $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の直線濃度勾配により行い, 酵素活性を測定して活性画分を追跡した。

2.3 酵素タンパク質のアミノ酸配列比較

データベースに登録された *Aspergillus* 属の酵素タンパク質のアミノ酸配列を収集し, アライメントソフトを用いて相同性について検討した。

3. 結 果

3.1 PM 菌の同定

3.1.1 遺伝子の比較

RAPD 法により増幅した遺伝子の電気泳動パターンを 2 菌株間で比較して菌株固有のバンドをカウントし, 遺伝的距離の相対関係をプロットした (Fig. 1)。泳動パターンから PM 菌は両親株由来の遺伝子を有していると推定され, 数値の上からは, より *A. niger* に近い菌株であると考えられた。また, 実用麹菌についても同様に解析したところ, PM 菌は味噌・醤油用麹菌と酒造用麹菌の中間に位置していると考えられた。

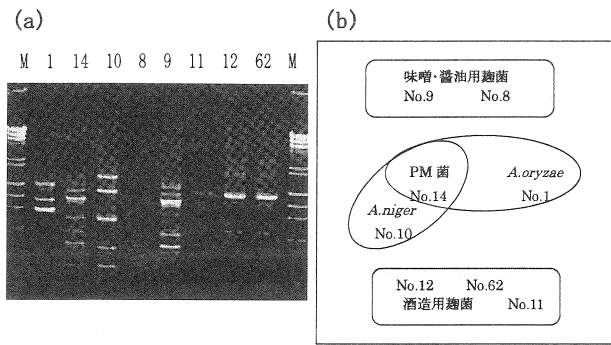


Fig. 1 増幅遺伝子の電気泳動パターンの一例 (a) と各麹菌の予想される相対的な遺伝的位置関係 (b)

また、各菌株の培養抽出液の酵素活性及び有機酸生成量を測定した結果を Table 1 に示した。ペクチナーゼ、セルラーゼのほか、同じく植物組織の崩壊に有効なキシラナーゼについて検討したところ、PM 菌は親株のうち組織崩壊能が強い *A. niger* と同程度以上の強い活性を示した。また、有機酸生成量についても *A. niger* と傾向が類似していた。これらは、前述の遺伝子の解析結果とも一致していた。

Table 1 崩壊活性 (a) 及び有機酸生成量 (b) の比較

a	pectinase	cellulase	xylanase
PM	235	476	7.6
<i>A. niger</i>	55	295	5.3
<i>A. sojae</i>	3.1	181	4
PM/ <i>niger</i>	4.27	1.6	1.43 (U/ml)

b	pH	シュウ酸	クエン酸	リンゴ酸	フマル酸	グルコン酸	VB2
<i>A. oryzae</i>	3	1	5	189	6.4	N.D.	448
<i>A. niger</i>	1.6	461	403	10	0.7	559	6
PM	1.8	212	312	14	5.6	4156	21

(mg/100ml, VB2:μg/100ml)

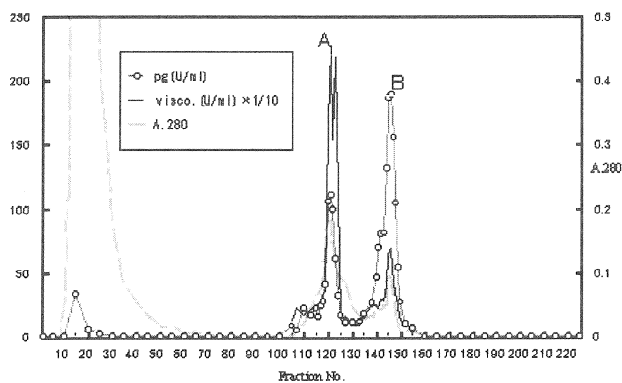


Fig. 2 ペクチナーゼ画分の精製過程 (CM-TOYOPEARL 陽イオン交換クロマト)

3.2 酵素タンパク質の分離・精製

3.2.1 ペクチナーゼの分離・精製

抽出濃縮液を CM-TOYOPEARL 陽イオン交換カラムに供した (Fig. 2)。酵素活性測定の結果、基質特異性の異なる活性ピーク A 及び B が見出された。分取した画分 A, B をさらに Butyl-TOYOPEARL カラムに供したところ、画分 A については複数の活性画分が分離された。

3.2.2 セルラーゼの分離・精製

抽出濃縮液を DEAE-TOYOPEARL 陰イオン交換カラムに供した (Fig. 3)。活性画分は素通り部分と後半に溶出した画分とに大きく分かれ、後者には複数の酵素が混在していると考えられ、精製過程の検討が必要と思われる。

3.3 酵素タンパク質のアミノ酸配列比較

ペクチン質分解酵素 (ポリガラクトナーゼ、ペクチンリアーゼ等) とセルラーゼについて検索したところ、いずれも複数の酵素が登録されていた。アライメントの結果、種間での保存領域も多く見られ、これをもとに DNA プローブを設定することも可能と考えられる。

4. まとめ

本研究では、遺伝子組換えにより麹菌を改良育種し、実用化へ向けてのデータを蓄積することを目的とする。今年度はモデルケースとしてペクチナーゼ及びセルラーゼ活性を強化した菌株の育種を目指し、必要となる知見の収集に着手した。

研究対象とした PM 菌は親株よりも有意に強い酵素活性を有していることが確認された。PM 菌の遺伝子構造を解析するための基礎的な情報を得るために、酵素タンパク質を分離・精製し、アミノ酸配列を解析することを試みたが、最終精製には至らなかった。今後はさらに精製を進め、アミノ酸配列を決定するとともに、相同性等も参考にしつつ遺伝子のクローニングに着手する予定である。

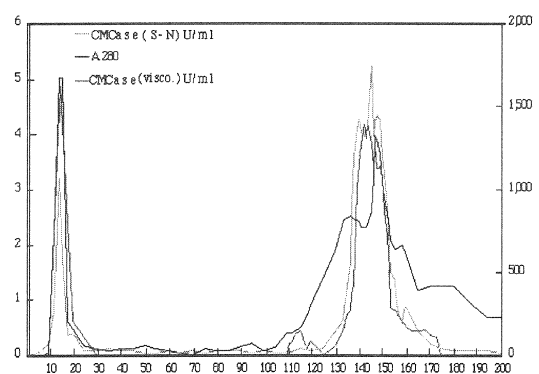


Fig. 3 セルラーゼ画分の精製過程 (DEAE-TOYOPEARL 陰イオン交換クロマト)