

醸造用糸状菌のグルタミン酸脱炭酸酵素活性とその特性

土谷紀美 西村賢了
(熊本県工業技術センター)

平成13年11月22日受理

Characterization of glutamate decarboxylase (GAD) in mold for brewing.

Kimi TSUCHIYA, Kenryo NISHIMURA
(Kumamoto Industrial Research Institute, 3-11-38, Higashimashi,
Kumamoto-City, Kumamoto 862-0901)

This study aimed to measure the activities of Glutamate decarboxylase (GAD), an enzyme to make γ -amino butyric acid, in 20 strains of mold which are widely used in the brewing trade, and to examine the biochemical characteristics. Mold examined in this study included 18 strains of *Aspergillus* used for making *miso*, *shoyu*, *seishu* and *shochu*, and 2 strains of *Monascus*, all of which were cultured in a YPD medium with shaking for 3 days at 30°C.

The GAD activity was higher in *Aspergillus oryzae* than that in *Monascus*. Among the *A. oryzae*, it was higher in those for *miso* (3.16 ± 0.67 U/g) and *seishu* (2.89 ± 0.09 U/g) than the remaining kinds. The GAD activities were not found in the culture medium in any molds but were in the mycelium. Although the GAD activity was not found in a reaction including only the substrate and mycelium, it was markedly increased to 6.4 U/g when 10 μ M of co-enzyme (pyridoxal-5-phosphate) was added. The GAD in *Aspergillus* might be a cell-bound apo-enzyme. Under the liquid culture, the activity per mycelial weight increased in response to the growth until 3 days after the beginning of culture, and then decreased. The optimal condition of GAD in *Aspergillus* for *miso* was 5.5 in pH and 55°C in temperature. When the mycelium was stored under low temperature conditions of 4°C, the activity of GAD increased with time.

Key words : 糸状菌, GAD, グルタミン酸脱炭酸酵素

緒 言

γ -アミノ酪酸は非タンパク性アミノ酸で、グルタミン酸脱炭酸酵素 (Glutamate decarboxylase, GAD) [EC.4.1.1.15] の作用によりグルタミン酸が脱炭酸されて生成する。GAD は植物や微生物から高等動物まで広く生物界に分布しており、起源によって MW や至適 pH, Km 値などの酵素的性質は大きく異なる¹⁻²⁾。 γ -アミノ酪酸は血圧降下作用を有する³⁻⁵⁾ことで知られ、食品への機能性の付与を目的として、紅麹⁶⁾、味噌⁷⁾、ギャバロン茶⁸⁾、米胚芽⁹⁾ やチーズ¹⁰⁾ など食品中の γ -アミノ酪酸を強化する研究が数多く

なされている。その生成酵素 GAD に関しては、大腸菌¹¹⁻¹²⁾ や乳酸菌¹³⁾ 起源の GAD が精製されているが、糸状菌のもつ GAD については報告がほとんどない。そこで、食品への機能性付与に醸造用糸状菌を利用することを目的として、紅麹菌を含めた各種醸造用糸状菌の GAD 活性を測定し、糸状菌 GAD の特性を調べた。

実験方法

1. 使用菌株

麹菌は、種麹メーカー 4 社から入手した味噌用 7 株 (全て *Aspergillus oryzae*)、醤油用 4 株 (*A. oryzae* 3

株, *Aspergillus sojae* 1株), 清酒用3株 (全て *A. oryzae*), 焼酎用4株 (*Aspergillus kawachii* 3株, *Aspergillus awamori* 1株), 並びに紅麹菌は, IFO株2株 (*Monascus purpureus* IFO 4478, *Monascus pilosus* IFO 4520) の合計20株を醸造用糸状菌として用いた。

2. 使用培地

Aspergillus 属麹菌の保存用斜面培地は, PDA培地 (栄研化学株式会社) を, *Monascus* 属紅麹菌の保存用には PDA培地に0.2% Yeast extractを加えて用いた。液体培養には YPD培地 (glucose 4%, polypeptone 1%, Yeast extract 0.5%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2% 和光純薬工業製, pH 4.7) を用いた。

3. 糸状菌の液体培養

YPD培地100mlを300mlのバッフル付き三角フラスコに入れて121°C, 15分間殺菌し, 0.9% NaCl溶液に懸濁した各糸状菌の胞子を 1×10^5 cells/mlとなるように植菌して, 30°C, 160rpm (BR-3000L, TAITEC) で通常3日間振とう培養した。液体培養中の菌体酵素活性の経時変化を見る場合は, 各々1日間から6日間培養した菌体を用いた。

4. グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 活性の測定

培養液から吸引ろ過 (SM-16510, sartorius) とナイロン材により菌体を回収し, 培養液の5倍量の0.9% NaCl溶液で洗浄した。菌体は水分を切り, 湿菌体としてGAD活性の測定に用いた。L-グルタミン酸ナトリウム1水和物を50mM (各種糸状菌GAD活性測定のみ10mM), ピリドキサールリン酸 (pyridoxal-5-phosphate, PLP) を50 μ Mとなるように100

mMリン酸緩衝液 (pH 5.5) に加えて10mlとし, 5分間保温後, 約0.5gの湿菌体を加えて攪拌, 37°C, 60分間反応させた。反応液をフィルターを通過後, 適宜希釈して γ -アミノ酪酸の定量に供した。反応液からNo.2ろ紙で菌体を回収, 凍結真空乾燥機 (DR-5, EYELA) により乾燥して乾燥菌体重量を測定した。酵素活性は1分間に1 μ molの γ -アミノ酪酸を生成する酵素量を1Uとし, 乾燥菌体g当たりの酵素活性として示した。

5. γ -アミノ酪酸の測定

γ -アミノ酪酸の定量は, AccQ・Tag™法 (Waters) により測定した。すなわち, 0.45 μ mフィルターを通過した試料10 μ lをホウ酸緩衝液70 μ lで希釈し, AccQ・Fluor試薬 (Waters) 20 μ lを添加して直ちに攪拌後, 55°C, 10分間加温して γ -アミノ酪酸を蛍光誘導体化した。高速液体クロマトグラフィーを用いて, 内部標準法により分離定量を行った。条件は次のとおり。ポンプ: Waters 616, 検出器: Waters 470 (Ex.250nm, Em.395nm), カラム: AccQ・Tag column (Waters), カラム温度: 37°C, 移動相: AccQ・Tag溶解液A (Waters) とアセトニトリルのグラジエント, 流速: 1ml/min。

実験結果

1. 各種糸状菌のGAD活性

液体培養では全ての糸状菌が問題なく増殖したが, 菌株によって菌体の形状には差異が見られた。糸状菌20株の培養3日目菌体のGAD活性を, 同じ用途の株毎に平均値 \pm 標準偏差を示した (Table 1)。*A. sojae* 及び *M. pilosus* を除いて, 用途が同じ株間では

Table 1 GAD activity in the various types of molds.

use	mold	number of strains	GAD activity ¹⁾ (U/g)
miso	<i>Aspergillus oryzae</i>	7	3.16 \pm 0.67
	<i>Aspergillus oryzae</i>	3	1.39 \pm 0.21
shoyu	<i>Aspergillus sojae</i>	1	0.68
	<i>Aspergillus oryzae</i>	3	2.89 \pm 0.09
seishu	<i>Aspergillus oryzae</i>	3	2.89 \pm 0.09
	<i>Aspergillus kawachii</i>	3	1.17 \pm 0.27
shochu	<i>Aspergillus awamori</i>	1	0.94
	<i>Aspergillus oryzae</i>	1	1.07
benikoji	<i>Monascus purpureus</i>	1	1.07
	<i>Monascus pilosus</i>	1	0.46

1) Mean \pm S.D.

比較的標準偏差が小さかった。味噌用及び清酒用麹菌のGAD活性がそれぞれ 3.16 ± 0.67 U/g, 2.89 ± 0.09 U/gで高く、両者の活性値には有意差は見られなかった。同じ *A. oryzae* でも、醤油用麹菌の活性は 1.39 ± 0.21 と、味噌や清酒用と比較して有意に低かった ($P < 0.05$, t検定法)。焼酎用の *A. kawachii* や泡盛用 *A. awamori* の活性は 1.17 ± 0.27 U/g及び 0.94 U/gと、*A. oryzae* よりも低かった。*Monascus* 属2株は、いずれの *A. oryzae* (n=13) よりもGAD活性が低かった。また、紅麹菌の培養液中にも γ -アミノ酪酸の蓄積は全く見られなかった。固体麹では *Monascus* 属は増殖が緩慢であるが、液体培養での増殖は他の *Aspergillus* 属に劣らなかった。

いずれの菌株も培養液中にはGAD活性は全く見られなかった。

以降、GAD活性が安定して高く、麹菌体の形状が取り扱いやすいピース状であった味噌用麹菌 (*A. oryzae*) を試験に供した。

2. 液体培養におけるGAD活性の経時変化

味噌用麹菌胞子を植菌後、各1日間から6日間培養した菌体のGAD活性を測定して経時変化をみた。Fig. 1に示したとおり、菌体重量当たりのGAD活性は培養3日目に最大となり、それ以降は活性が低下していった。PLP無添加の場合の酵素活性は培養を通して0.15 U/g以下だった。培養液100 ml当たりの菌体量は3日目まで増加し、5日目までほとんど変わら

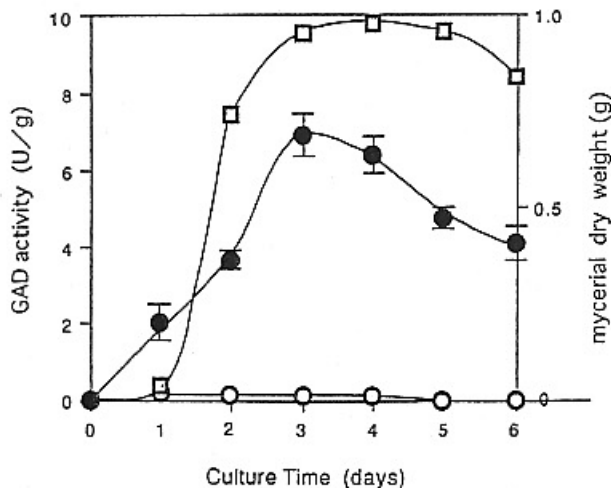


Fig. 1 Time course of GAD activity and mycelial weight in liquid culture.

GAD activity per mycelial weight with 50 μ M PLP (●), without PLP (○), mycelial dry weight (□)

ず6日目になると減少した。

3. 麹菌GADの至適pH及び至適温度

味噌用麹菌GADの至適pHを検討するために、反応液のpHを0.1 M phosphate bufferで各々5.3~8.1の範囲に、また、0.1 M acetate bufferで各々4.2~6.0の範囲に調整して酵素反応を行った。最も高い活性を100とした時の相対活性をFig. 2に示した。pH 5.5が至適pHと考えられ、pH 7.5以上で活性は消失した。また、至適温度を検討するために、pH 5.5において酵素反応を各4°C~60°Cの範囲で行った結果、55°Cで最大活性を示した (Fig. 3)。

4. 麹菌GADの低温下での活性化

液体培養により得られた菌体に何も処理を加えず、PLP無添加で低温下(4°C)に静置保存した場合、GAD活性が低温下での時間に比例して増え続け、静置3日間で約3倍に、10日間で約10倍となった(約60 U/g, Fig. 4)。培養液中の γ -アミノ酪酸量及び菌体量は変化しなかった。同じく30°C, 55°Cで7日間保存試験を行ったが、30°Cでは保存前の活性とほとんど変わらず、55°Cでは活性は消失していた。

考 察

麹菌のGADは菌体に保持されている¹⁴⁾ため、GAD活性測定には菌体を用いる必要がある。しかし、麹菌を固体培養した場合、菌体重量を正確に得ることが難しく、菌体重量当たりの酵素活性の比較が困難である。そこで、今回は液体培養で得られた菌体を用いて各種糸状菌の有するGAD活性を測定した。

固体培養による麹菌GADについては、米麹抽出液

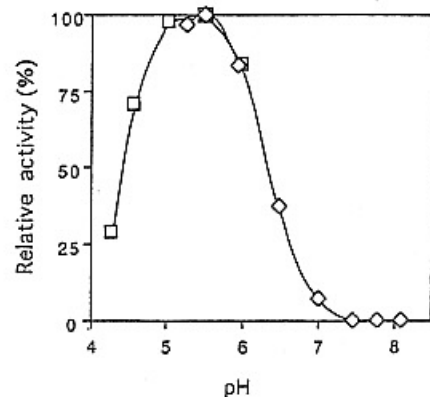


Fig. 2 Effect of pH on GAD activity. 0.1 M acetate buffer (□), 0.1 M phosphate buffer (◇)

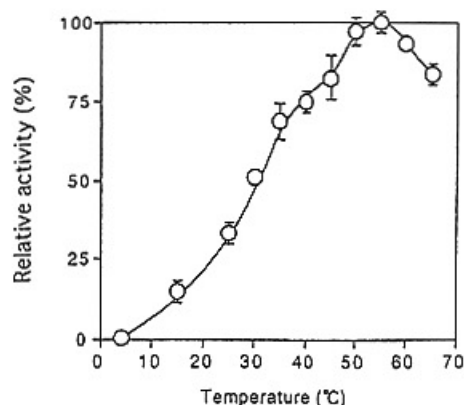


Fig. 3 Effect of temperature on GAD activity.

中にはほとんど活性がなかったことが報告されている¹⁴⁾が、液体培養においても、いずれの菌株も培養液中にはGAD活性を全く有さず、糸状菌GADは遊離型ではないことが確認できた。

いずれの菌株も補酵素PLPを添加しない場合の酵素活性が0.1 U/g以下あるいは全く検出できなかったが、PLPの存在下では顕著に酵素活性が現れたことから、液体培養による糸状菌のGADは、ほとんどが補酵素を伴わないアポ酵素の状態で菌体に存在すると考えられた。Ohtsubo等は米胚芽中のGADについて報告している¹⁵⁾が、PLPを加えない場合でも活性は約4 U/gと、PLP 50 μ M添加時の約半分の活性を有している。一方、味噌用麹菌体のGADは、PLP無添加時0.1 U/gだったが、10 μ M添加時6.4 U/g、50 μ M添加時8.0 U/gと米胚芽GADと同等の活性が現れた。米胚芽には豊富に含まれるビタミンB6群が、糸状菌体にはほとんど含まれないために、PLP無添加時にはGADが基質に作用できなかったと推察される。つまり、糸状菌を用いた醸造工程における γ -アミノ酪酸生成の律速因子は、糸状菌の有するGAD活性ではなく、原料や微生物の有する補酵素濃度であると思われる。

液体培養で得られた糸状菌においては、醸造業界で日常的に利用されている*A. oryzae*が、アポ酵素の状態では*Monascus*属よりも高いGAD活性を有することが明らかとなり、 γ -アミノ酪酸の生産に関して紅麹菌に劣らない微生物素材であると思われた。

培養時、菌体の増殖とともにGADは生成され、定常期に入ると酵素活性は徐々に低下した。紅麹菌の固体培養時においても、培養途中(5日目)で最大活性を示し、その後活性の低下が見られている¹⁶⁾。本試験

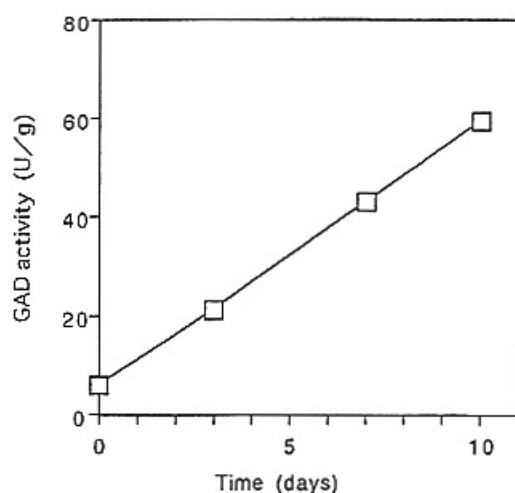


Fig. 4 Time course of GAD activity during storage at a low temperature of 4°C.

では培養開始時に4.7だったpHが終了時には6.6まで上昇しており、GAD活性の変動には酵素生成におけるpHの影響が加わっている可能性があり、今後検討が必要である。

GAD活性の詳細な至適条件は、精製酵素での検討が必要であるが、今回菌体に結合した状態で至適pHと至適温度を測定したところ、pH 5.5及び55°Cだった。糸状菌の精製GADについての報告はまだ見られないが、乳酸菌(*Lactobacillus brevis*) GADはpH 4.2、30°C¹⁷⁾、大腸菌(*Escherichia coli*) GADの至適pHはpH 3.8¹¹⁾、植物(カボチャ果肉) GADの至適pHはpH 5.8及び至適温度60°C¹⁷⁾と報告されており、この点に関して麹菌GADは原核微生物のGADよりも植物GADに性質が類似していた。

菌体に結合したGADは、液体培養後、静置低温条件下で活性が増大する現象が見られた。少なくとも10日目までは日数に比例して酵素活性が増加した。植物では、大豆の葉において低温条件下で γ -アミノ酪酸を蓄積することが報告されている¹⁸⁾が、その理由は明らかにされていない。低温下でのGADの活性化と、麹菌における γ -アミノ酪酸の役割との関連性に興味を持たれるところである。

γ -アミノ酪酸高含有食品については、ラットにおける経口試験により、紅麹⁹⁾やギャバロン茶⁹⁾の血圧降下作用が確認されており、また、ヒトにおける経口試験により、米胚芽の更年期障害低減作用が確認されている¹⁹⁾。今回の試験では、低温保存並びに補酵素の添加により、味噌用麹菌のGAD活性は約0.1 U/gか

ら最大で 60 U/g に飛躍的に上昇し、醸造用糸状菌の有する機能に関して有用な結果が得られた。味噌用や清酒用の *A. oryzae* は GAD 活性が高く、 γ -アミノ酪酸生産及び機能性食品製造を目的とした微生物の利用にこれらの醸造用糸状菌が適していることが示唆された。

要 約

醸造業界で一般的に利用されている醸造用糸状菌の GAD 活性とその特性について調べた。

18 株の醸造用麹菌（味噌用、醤油用、清酒用、焼酎用）と紅麹菌 2 株を用いて、液体培養で得られた菌体の GAD 活性を比較したところ、味噌用麹菌と清酒用麹菌が活性が高く、比較すると同じ *A. oryzae* でも醤油麹菌の活性は低かった。紅麹菌 2 株の GAD 活性は、この培養条件下ではいずれの *A. oryzae* よりも低かった。

培養液中には GAD 活性は見られず、麹菌 GAD は非遊離型であった。また、基質と菌体のみ反応では活性はほとんど見られず、補酵素ピリドキサルリン酸の添加により活性が見られたことから、麹菌 GAD のほとんどは補酵素を伴わないアポ酵素の状態で菌体に存在すると考えられた。

液体培養では、菌体の増殖に伴って菌体重量当たりの GAD 活性も増加し、培養 3 日目の菌体が最も活性が高く、以降定常期には低下した。味噌用麹菌 GAD の至適 pH は 5.5、至適温度は 55°C だった。培養菌体の GAD は培養後低温静置条件下 (4°C) の保存時間に比例して顕著に活性化された。

味噌用や清酒用の *A. oryzae* は、GAD 活性が潜在的に高いことが明らかとなった。GAD は血圧降下作用を有する γ -アミノ酪酸の生成酵素であり、食品への機能性付与や γ -アミノ酪酸生産にこれらの醸造用糸状菌が利用できると思われる。

謝 辞

この研究は、文部科学省の委託研究事業である地域先導研究事業の中で行われたものであり、ご指導いただいた崇城大学応用微生物工学科教授岩原正直先生にお礼申し上げます。また、実験に協力いただいた立山陽子氏に感謝します。

文 献

- 1) 丸尾文治, 田宮信雄監修: 酵素ハンドブック, p 634, 朝倉書店 (1987)
- 2) H. Ueno: J. Mol. Catal. Enzym., 10, 67-79 (2000)
- 3) H. C. Stanton: Arch. Int. Pharmacodyn., 143, 195-204 (1963)
- 4) 塚田祐三: 日医誌, 42, 571-579 (1959)
- 5) 井上清, 向山美雄, 辻啓介, 田辺伸和, 高橋誠, 阿部士郎, 樽井庄一: 医学と薬学, 31, 231-240 (1994)
- 6) 辻啓介: 醸協, 89, 207-211 (1994)
- 7) 宮間浩一, 阿久津智美, 渡辺恒夫, 岡本竹己: 味噌の科学と技術, 46, 168 (1998)
- 8) 大森正司, 矢野とし子, 岡本順子, 津志田藤二郎, 村井敏信, 樋口満: 農化, 61, 1449-1451 (1987)
- 9) 三枝貴代: 生物と化学, 33, 211-212 (1995)
- 10) M Nomura, Y Someya, S Furukawa, I Suzuki: Anim.Sci. J., 70, 397-402 (1999)
- 11) R. Shukuya and G. W. Schwert: J. Biol. Chem., 235, 1649-1652 (1960)
- 12) M. L. Fonda: Methods Enzymol., 113, 11-16 (1985)
- 13) Y. Ueno, K. Hayakawa, S. Takahashi, and K. Oda: Biosci. Biotechnol. Biochem., 61, 1168-1171 (1997)
- 14) 片岡浩平, 岩井洋子, 家村芳次, 原昌道: 醸協, 91, 658 (1996)
- 15) S. Ohtsubo, S. Asano, K. Sato, and I. Matsumoto: Food Sci. Technol. Res., 6, 208-211 (2000)
- 16) I. Kono and K. Himeno: Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 617-619 (2000)
- 17) T. Matsumoto, I. Yamaura and M. Funatsu: Agric. Biol. Chem., 50, 1413-1417 (1986)
- 18) W. Wallace, J. Secor and L. E. Schrader: Plant Physiol., 75, 170-175 (1984)
- 19) 岡田忠司, 杉下朋子, 村上太郎, 村井弘道, 三枝貴代, 堀野俊郎, 小野田明彦, 梶本修身, 高橋励, 高橋丈夫: 食科工, 47, 596-603 (2000)