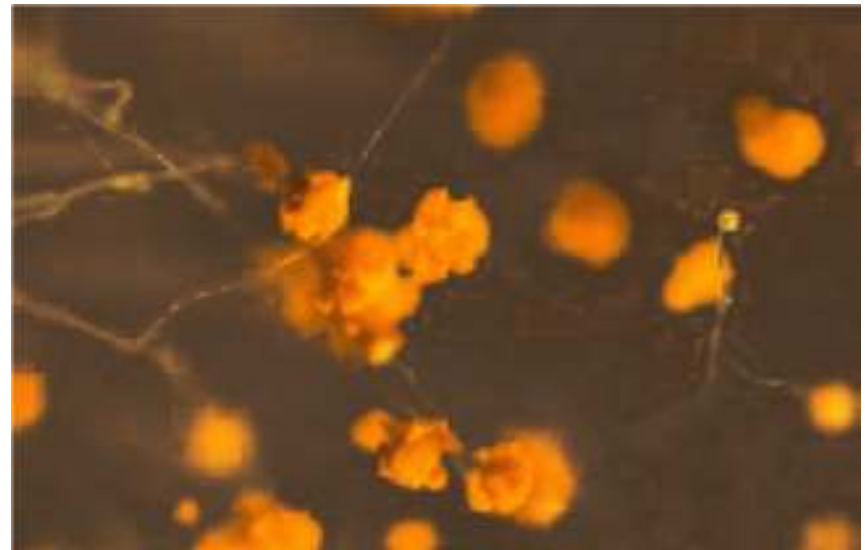
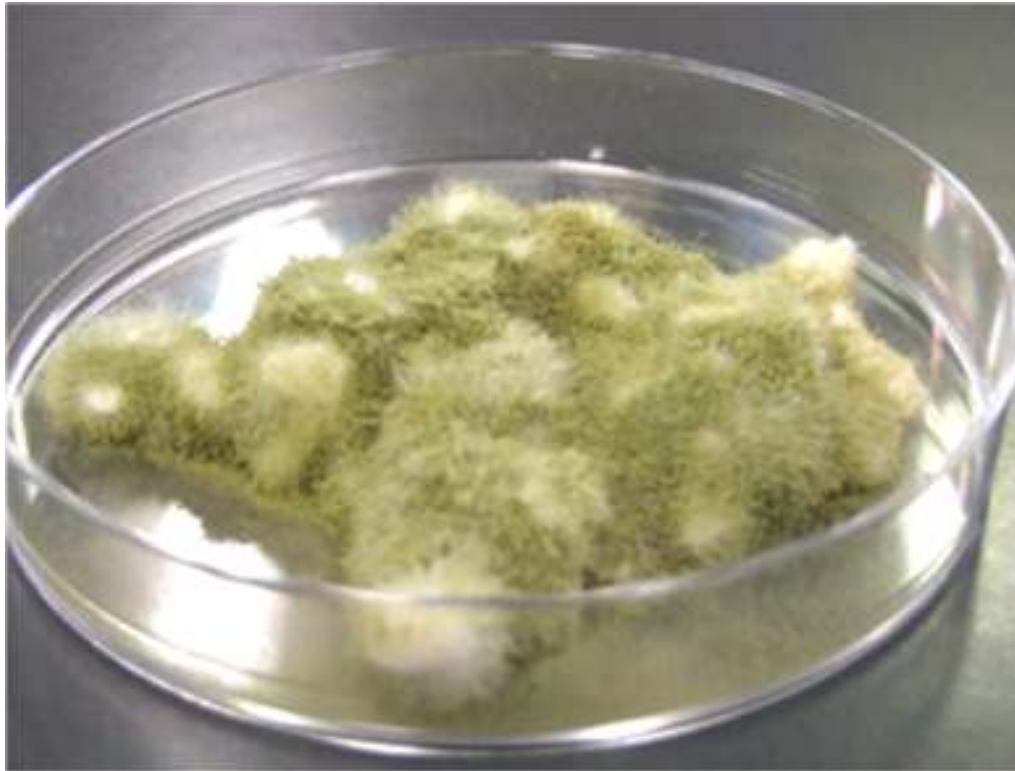


麹菌のアミラーゼ検出実験

****実験プロトコル2: 麹菌の蒸し米培養からアミラーゼを抽出・検出する****



○ 麹菌 *Aspergillus oryzae* は、清酒・味噌・しょう油の醸造に欠かすことのできないカビであり、2006年に日本醸造学会より「日本の国菌」に認定されている

◆ 炊飯器で炊いた白米(10 g)に麹菌の分生子を振りかけて、30℃, 5日間培養。

◆ 白色部分は菌糸。一般に孢子と呼ばれる分生子が形成されると緑黄色に見える。

◆ 低倍率の顕微鏡により、直径0.2 mm程度の分生子頭が観察できる。

◆ 分生子頭には直径5 - 8 μmの分生子が数千個着生している

プロトコル

炊飯器で炊いた米に麹菌を接種する



30°Cまたは室温で培養する（5-7日間）



培地に水を加え、破碎・ろ過してアミラーゼ溶液を抽出



アミラーゼ溶液によりデンプン培地に絵を描く



アミラーゼ活性により絵がうかびあがる



デンプン入りのアクリルアミドゲルを作製



アミラーゼ溶液を電気泳動



活性染色によりアミラーゼのバンドを検出



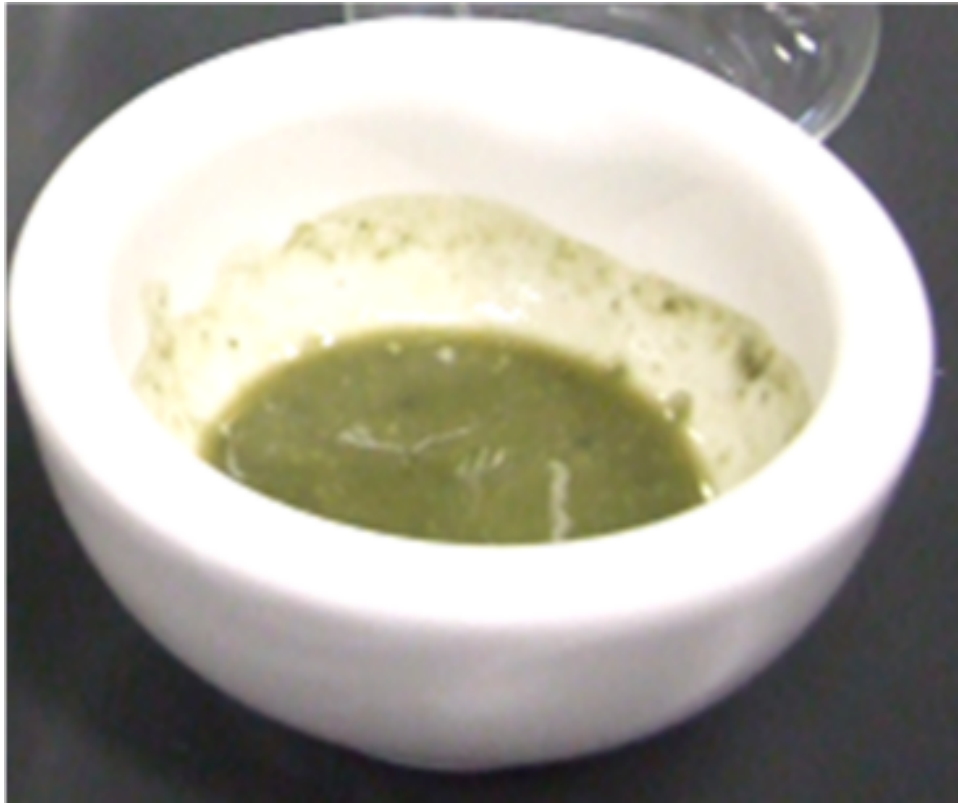
アミラーゼ活性の定量分析



アミラーゼ抽出実験
(高校で簡単に実施できる)

アミラーゼの電気泳動
アミラーゼの活性測定
(大学で実施)

麴菌の蒸し米培養の処理



- ◆ 培地の米粒（約5 g）ごと乳鉢を用いて良くすりつぶし、約10 mLの水を加えて、コーヒーフィルターなどの目の粗い紙でろ過する。
- ◆ 得られたろ液を「アミラーゼ液」として以下の実験に使用する。

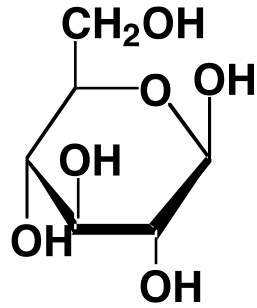
アミラーゼであぶり出し



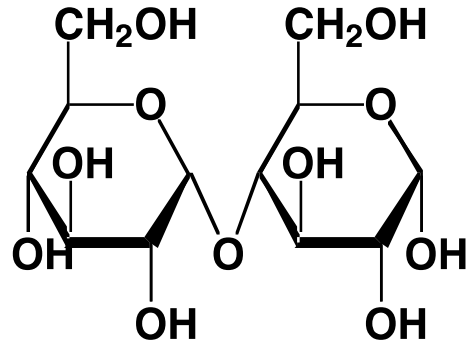
指導：神奈川総合高校 石橋篤教諭

- ◆ 蒸し米培養のろ液を綿棒につけて、デンプンプレート（1%片栗粉、1%棒寒天）に絵を描く
- ◆ 30 – 37℃に15 – 30分保温した後、ルゴール液を5 – 10 mL流し込むと、ろ液をつけたところのデンプンが分解されて透明になり、あぶり出しのように絵が浮かび上がる。

デンプンとアミラーゼ

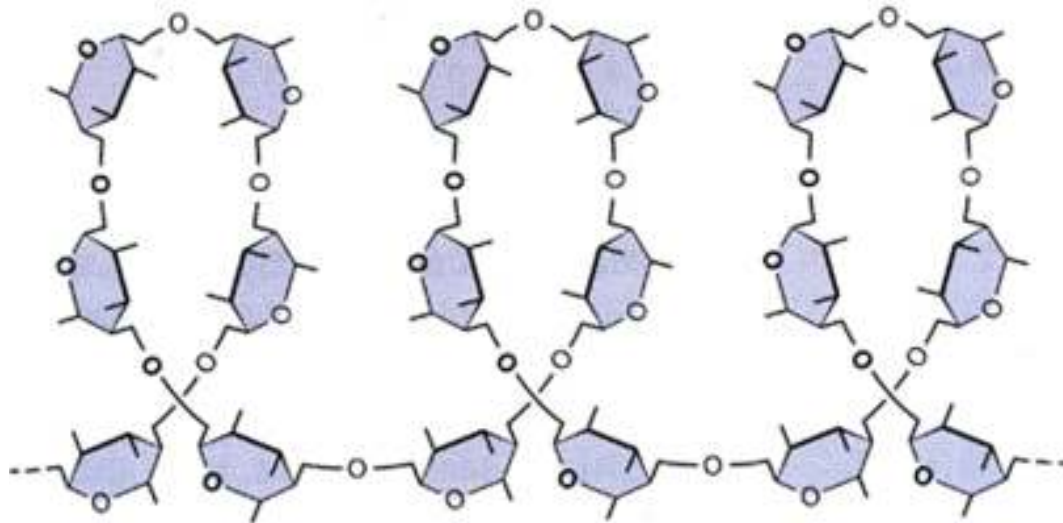


グルコース
(Glucose)

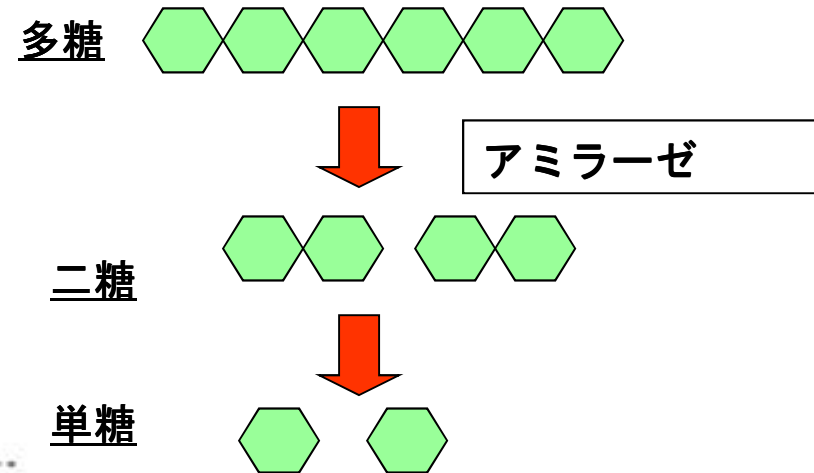


麦芽糖(Maltose)

- ◆ グルコース（ブドウ糖）はもっとも基本的な単糖である。
- ◆ グルコースが連結してできた多糖は細胞内のエネルギー源として蓄えられる。
- ◆ デンプンはグルコースが α -1,4結合により連結したものである。

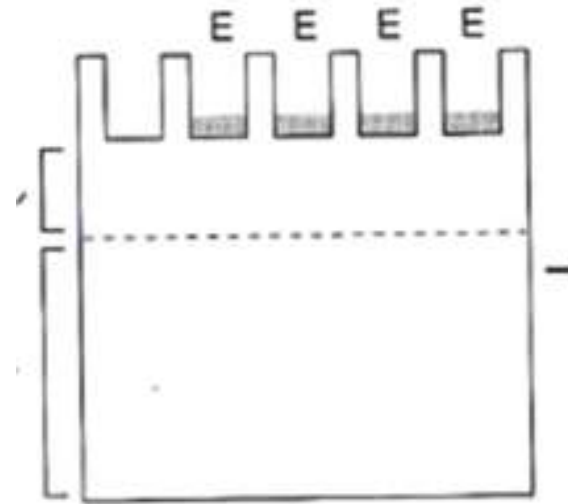
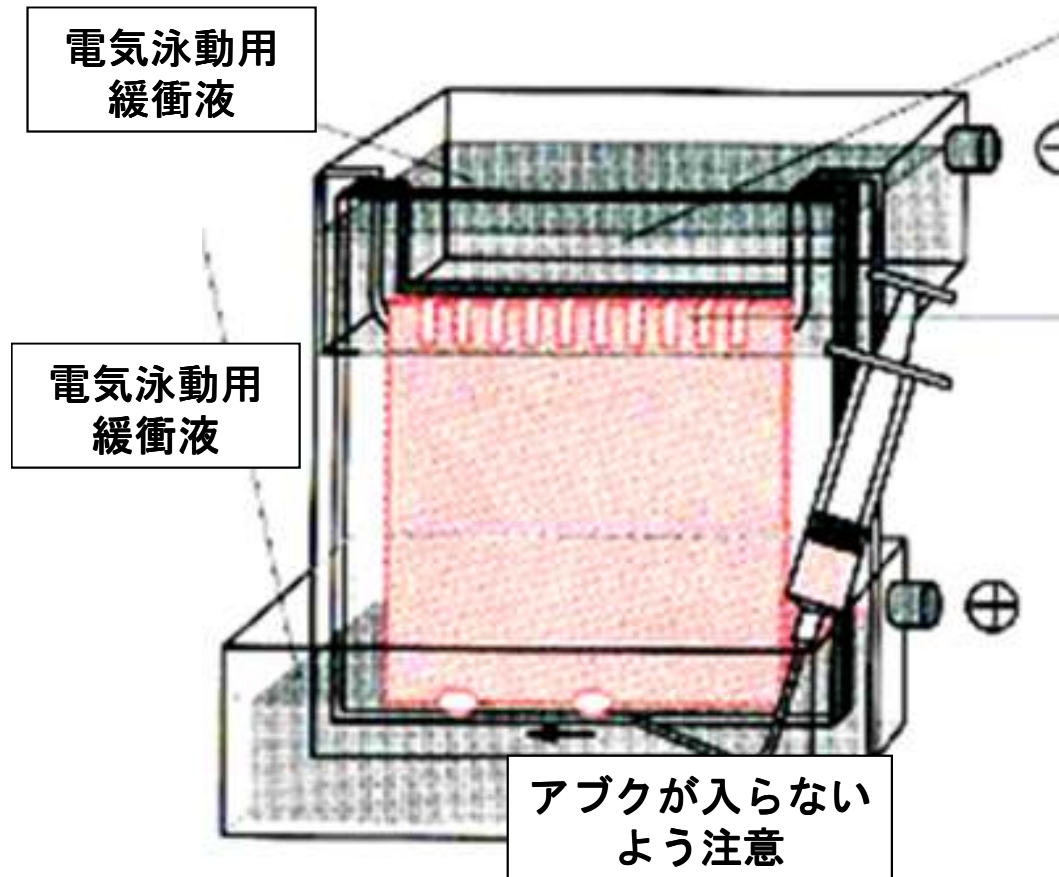


デンプン(Starch)



- ◆ デンプンを麦芽糖やグルコースに分解する酵素がアミラーゼである

アミラーゼ活性染色



【分離ゲル】

10% Acrylamide mix

0.375 M Tris-HCl (pH8.8)

0.5% 可溶性デンプン

【電気泳動用緩衝液】

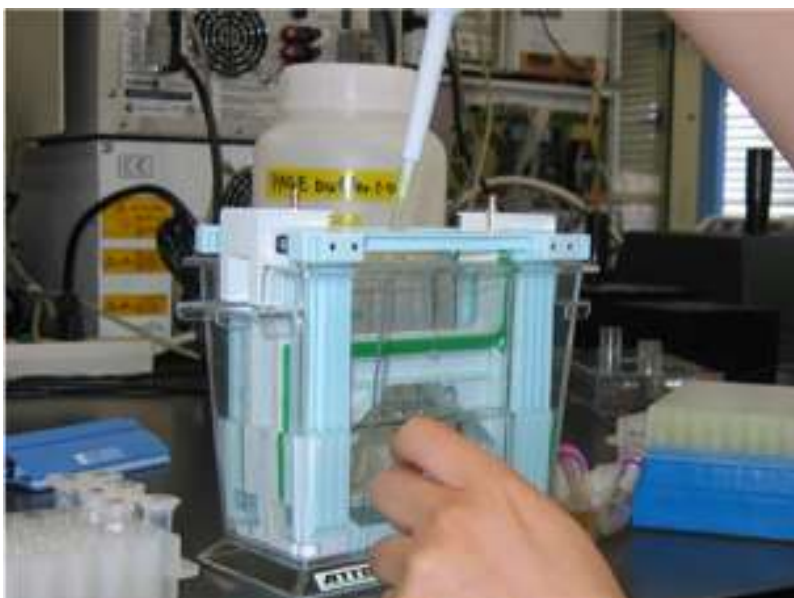
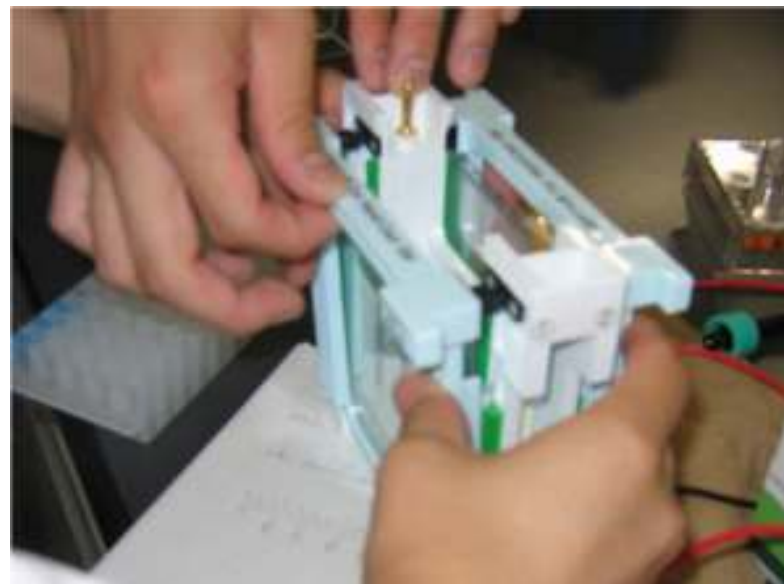
25 mM Tris base

192 mM Glycine

◆ 分離ゲルに**SDS**を含まない未変性アクリルアミド溶液に可溶性デンプンを**0.5%**加えた活性染色ゲルを作製する。

◆ 通常の**SDS-PAGE**と同様の手順で「アミラーゼ液」をチャージし、電気泳動を行う。

電気泳動



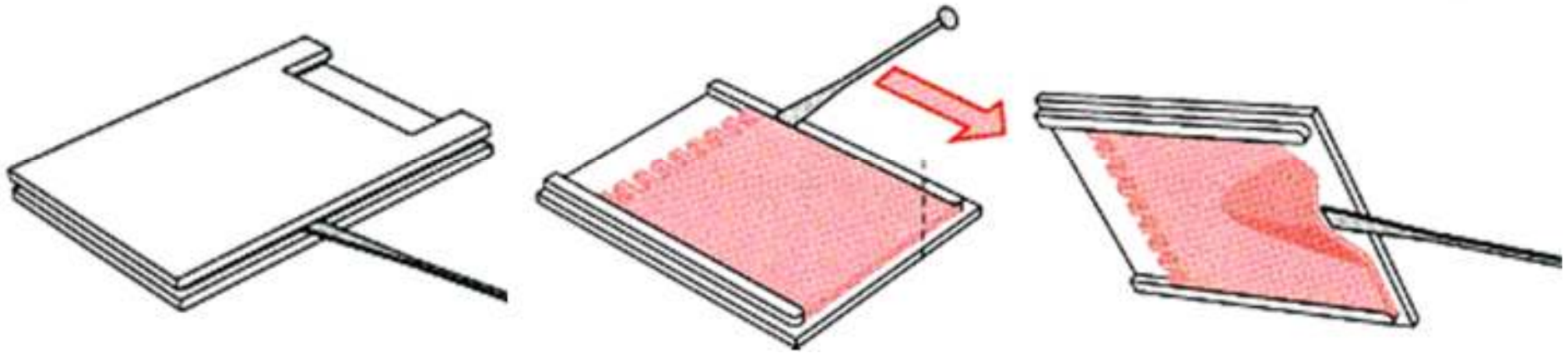
【左上】「アミラーゼ液」を、マイクロピペッターを用いて一定量ずつ測り取る。

【右上】電気泳動槽を組み立てる

【左下】アクリルアミドのゲルに「アミラーゼ液」を注入する。

◆ 「アミラーゼ液」 0.1 mLに、20%グリセロール溶液（色素入り）0.1 mLに加えて、電気泳動サンプルを調製する。

アクリルアミドゲルの処理



◆ 電気泳動が終了したら、柔らかいゲルが傷つかないように慎重にガラス板からはがす。

【ルゴール液】アミラーゼ検出用

0.1 g I₂ (ヨウ素)

2.0 g KI (ヨウ化カリウム)

300 mL H₂O

アミラーゼの検出

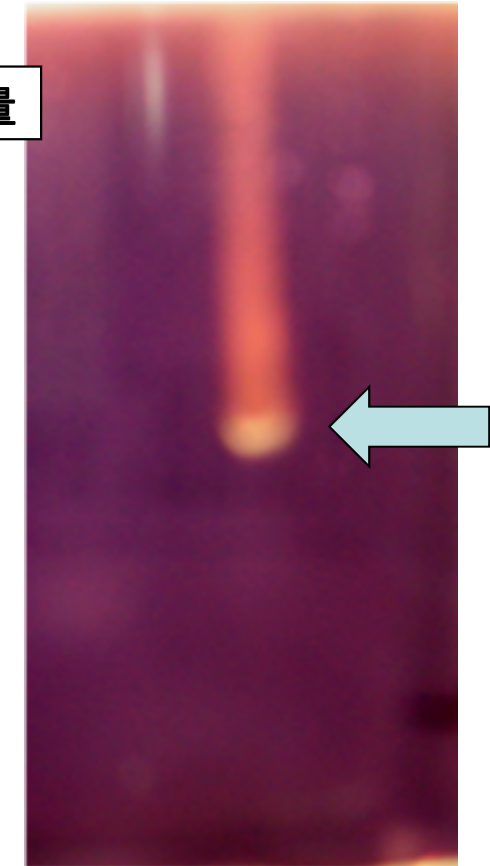


分子量

大



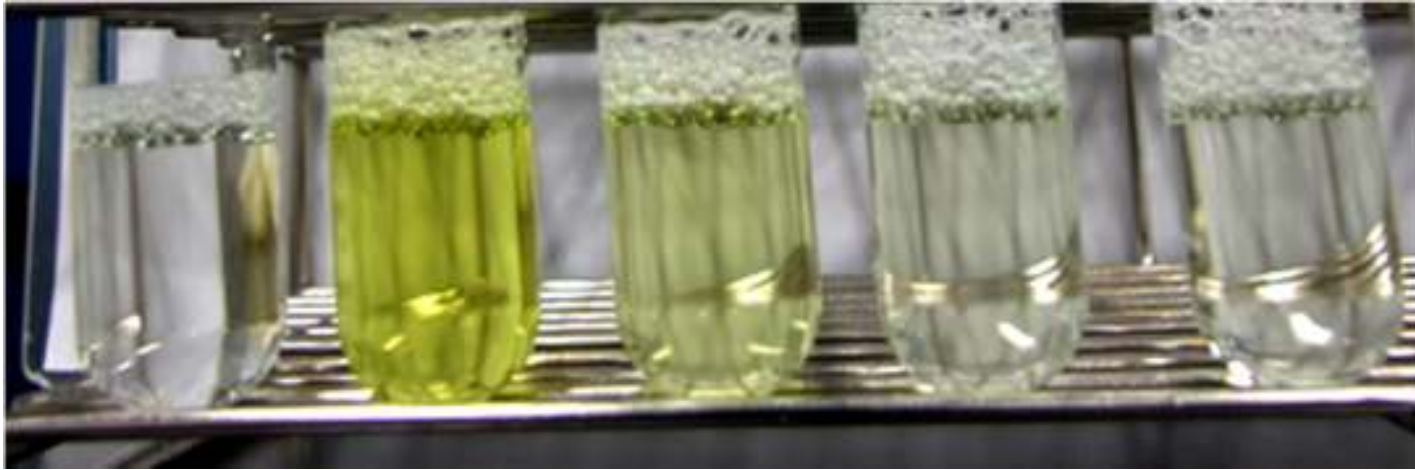
小



◆ 電気泳動が終了したゲルを、**pH7**の緩衝液に漬けて**30°C**、**15分間**静置する。この間にアミラーゼが作用してゲルの中のデンプンを分解する。

◆ ゲルをヨウ素を含むルゴール液につける。デンプンがヨウ素に反応して青紫色に染まる。アミラーゼが働いたところはデンプンが消費されているので白く抜けて観察される

アミラーゼ活性測定



Blank

原液

10倍希釈液

50倍希釈液

100倍希釈液

○ N3-G5- β -CNP (2-クロロ-4-ニトロフェニル 6⁵アジド-6⁵-デオキシ- β -マルトペンタオシド) を基質とし、1分間に1 μ molのCNP (黄色)を遊離する力価を α -アミラーゼ1 unitと定義する。

◆ 麹菌抽出物中の α -アミラーゼの測定専用の、Kikkoman醸造分析用「 α -アミラーゼ測定キット」を用いて、「アミラーゼ液」に含まれる α -アミラーゼの活性を測定

○ Kikkoman Corp.商品コード:60213使用説明書に従った。

◆ 「アミラーゼ液」中の α -アミラーゼの活性は12.6 unit/mL と算出された