

技術講座

# 醤油醸造における麹菌多糖類分解酵素の機能解析

北本則行, 安田(吉野)庄子, 和久 豊\*

はじめに

醤油醸造に関わる微生物の中で、麹菌は最も重要な微生物である。麹菌は「酵素の宝庫」といわれているように、醤油原料となる大豆や小麦の分解に関与する酵素を多種類生産する。大豆や小麦の貯蔵炭水化物や細胞壁多糖類の分解に関わるデンプン分解酵素、セルロース分解酵素、キシラン分解酵素など多糖類分解酵素が製麹中に麹菌によって生産される。これらの麹菌多糖類分解酵素が醤油醸造において担っている役割を明らかにするために、特定の多糖類分解酵素を特異的に高生産する麹菌、あるいは、ほとんど生産しない麹菌を作出し、麹菌多糖類分解酵素の醤油醸造における役割について解析を試みた。

1. *AoxlnR* 遺伝子破壊麹菌および *amyR* 遺伝子破壊麹菌の取得

醤油の色度および色調は味や香りとともにその商品価値に大きな影響を与える因子であり、淡口醤油や白醤油の製造では着色を抑制するためにさまざまな工夫がなされている。醤油着色の主要因はアミノカルボニル反応によって生成されるメラノイジン色素であり、メラノイジン色素の生成に対する寄与率が最も高いキシロースの醤油諸味中における濃度を低下させることが醤油の着色抑制に効果的であると考えられている。醤油諸味中のキシロース濃度を低下させる方法としては、「醤油原料に含まれるキシランの分解を抑制してキシロースの遊離を減少させる方法」と「醤油諸味中のキシロースを醤油醸造に関与する微生物に積極的に利用させて減少させる方法」の2つがあげられる。

醤油原料に含まれるキシランの分解を抑制するため

には、醤油麹菌のキシラン分解酵素活性を低下させる必要がある。醤油麹菌ではキシラン分解酵素遺伝子群の発現は誘導発現因子、*AoxlnR*によって制御されている<sup>1)</sup>。そこで、*AoxlnR*遺伝子の一部分を麹菌形質転換ベクターpYRG100に組込んだ*AoxlnR*遺伝子破壊用ベクターpDisXR100でターゲティング効率の高いREMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) 法を用いて麹菌を形質転換し(図1)、*AoxlnR*遺伝子破壊麹菌( $\Delta AoxlnR$ 株)を取得した(図2, 次頁)。 $\Delta AoxlnR$ 株では、キシロシダーゼ活性およびキシラナーゼ活性が対照株と比較して約0.2%および検出限界以下へとそれぞれ低下していた。

一方、醤油諸味中のキシロースを醤油醸造に関与する微生物に積極的に利用させるためには、醤油諸味中のグルコース濃度を低下させなければならない。醤油諸味中のグルコースは醤油原料に含まれるデンプンの分解によって生成されることから、醤油麹菌のデンプン分解酵素活性を低下させる必要がある。醤油麹菌で

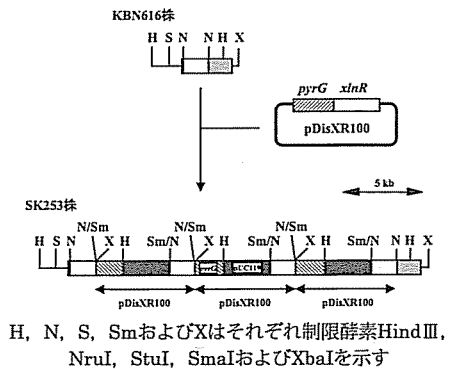


図1 *AoxlnR* 遺伝子破壊の模式図



30℃, 4日間培養後, 写真撮影を行った。キシラン+4-MUXプレートは紫外線を照射して得られる発光を写真撮影した。

図2 *AoxlnR*遺伝子破壊株の取得

はデンプン分解酵素遺伝子群の発現は誘導発現因子, *AmyR*によって制御されている<sup>2,3)</sup>。そこで, *amyR*遺伝子の内部に麹菌*pyrG*遺伝子を組み込んだ*amyR*遺伝子破壊用ベクターpDisAmR100で麹菌を形質転換し(図3), *amyR*遺伝子破壊麹菌( $\Delta amyR$ 株)を取得した(図4)。 $\Delta amyR$ 株ではタカアミラーゼ, グルコアミラーゼおよび $\alpha$ -グルコシダーゼの各遺伝子の発現量が著しく低下し, デンプンを炭素源とする液体培

表1 醤油麹における $\Delta AoxlnR$ 株および $\Delta amyR$ 株の酵素活性

酵素活性 (units/g 麹)	対照株	$\Delta AoxlnR$	$\Delta amyR$
全プロテアーゼ	576	563	459
LAP I	9.60	9.7	12.9
LAP II	1.27	1.76	1.94
$\alpha$ -アミラーゼ	87.7	87.9	2.6
グルコアミラーゼ	4.59	4.68	ND
$\alpha$ -グルコシダーゼ	0.57	0.53	0.10
CMC液化酵素	0.467	0.148	0.989
CMC糖化酵素	0.41	0.10	0.93
キシラナーゼ	175	34	448
キシロシダーゼ	2.71	0.74	3.06

ND : 検出限界以下

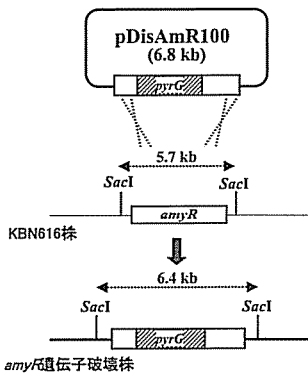
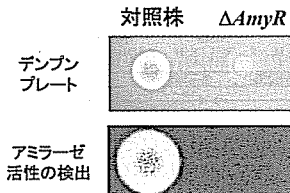


図3 *amyR*遺伝子破壊の模式図



デンプン最小寒天培地で30℃, 2日間培養後, ヨウ素デンプン反応によりアミラーゼ活性を検出した。

図4 *amyR*遺伝子破壊株の取得

養では $\alpha$ -アミラーゼ活性およびグルコアミラーゼ活性は検出されなかった。

## 2. $\Delta AoxlnR$ 株および $\Delta amyR$ 株の醤油醸造特性

醤油麹における $\Delta AoxlnR$ 株および $\Delta amyR$ 株の各種酵素活性を表1に示した。 $\Delta AoxlnR$ 株では対照株に比べキシラナーゼ活性が19%, キシロシダーゼ活性が27%, セルロース液化酵素活性が32%, セルロース糖化酵素活性が24%に低下していた。タンパク質分解酵素活性およびデンプン分解酵素活性については対照株と $\Delta AoxlnR$ 株において大きな変化は認められなかった。*AoxlnR*はいくつかのセルロース分解酵素遺伝子の発現を制御しているため<sup>9)</sup>, *AoxlnR*遺伝子を破壊することによってセルロース分解酵素遺伝子の発現が抑制され, セルロース分解酵素活性がキシラン分解酵素活性と共に低下したと考えられる。しかし,

液体培養ほどにキシラン分解酵素活性の低下が観察されなかったことは、キシラン分解酵素遺伝子群の発現制御機構が固体培養と液体培養では異なっている可能性を示している。

一方、 $\Delta amyR$ 株ではデンプン分解酵素活性が液体培養と同様に顕著に低下し、対照株に比べ $\alpha$ -アミラーゼ活性が3.0%、グルコアミラーゼ活性が検出限界以下、 $\alpha$ -グルコシダーゼ活性が18%にそれぞれ低下していた。また、対照株に比べ全プロテアーゼ活性、LAP I活性およびLAP II活性が80%、134%および153%に、セルロース液化酵素活性およびセルロース糖化酵素活性が212%および227%に、キシラナーゼ活性およびキシロリダーゼ活性が256%および113%にいずれも増加していた。デンプン分解酵素活性が極度に低下したことによってデンプンからのグルコースの遊離が抑制され、これらの遺伝子発現に関してグルコースによるカタボライト抑制がかからなくなった結果、遺伝子発現量が増加したためにこれらの酵素活性が上昇したと考えられる。あるいは、麹菌が炭素源としてデンプンを利用することができなくなり、アミノ酸あるいは他の糖類からエネルギーを獲得するためにこれらの酵素活性が上昇したとも考えられる。これらのことから醤油麹においても両株が目的通りの表現型を示すことが明らかとなった。

試醸醤油の成分分析値を表2に示すが、総窒素量および窒素利用率は対照株、 $\Delta AoxInR$ 株および $\Delta amyR$ 株の間で大きな差は認められなかった。色度は対照株の17番に対し、 $\Delta AoxInR$ 株では19番、 $\Delta amyR$ 株では22番となっており、 $\Delta AoxInR$ 株および $\Delta amyR$ 株を使用することによって着色を抑制することが可能であることが示された。低キシラン分解活性変異株および $\alpha$ -アミラーゼ低生産株による醤油の淡色化が報告されており<sup>30)</sup>、得られた結果はそれを裏付けるものであった。 $\Delta AoxInR$ 株より $\Delta amyR$ 株の方が淡色化に効果的であるという結果であるが、 $\Delta AoxInR$ 株のキシラン分解酵素活性が $\Delta amyR$ 株のデンプン分解酵素活性ほど対照株に比べて著しく低下していない。そのため、キシランの分解が十分に抑制されていない可能性が考えられ、キシラン分解酵素の影響についてはさらに検討を要するものと思われる。

表2  $\Delta AoxInR$ 株および $\Delta amyR$ 株により醸造された醤油の分析値

	対照株	$\Delta AoxInR$	$\Delta amyR$
総窒素(%)	1.76	1.75	1.77
食塩(%)	17.10	17.04	17.12
アルコール(%)	3.15	3.11	2.72
還元糖(%)	1.34	1.65	3.63
グルタミン酸(%)	1.60	1.62	1.75
グルタミン酸/総窒素	0.91	0.93	0.99
pH	5.16	5.19	5.29
色度	17	19	22
窒素利用率(%)	92.7	93.6	93.2
火入れ歪量(ppm)	175	185	90

$\Delta AoxInR$ 株と対照株との間ではグルタミン酸などの諸成分はほぼ同じ値であったが、 $\Delta amyR$ 株では対照株に比べ還元糖およびグルタミン酸が高くなり、火入れ歪量が少ないことが示された。このような結果から、 $\Delta AoxInR$ 株を使用すれば色の淡い醤油の醸造が可能となり、 $\Delta amyR$ 株を使用すれば甘味およびうま味が増強され、火入れ歪が少い色の淡い醤油の醸造が可能となると考えられる。

$\Delta amyR$ 株は対照株に比べセルロース分解酵素やキシラン分解酵素などの植物細胞壁分解酵素の活性が上昇しており、圧搾性(自然垂れ)の向上が期待された。そこで、濾布を用いた自然垂れ試験を行い、簡易的に圧搾性を評価した。自然垂れ開始約2時間後から液汁量に差が出始め、最終的に $\Delta amyR$ 株の液汁量は対照株及び $\Delta AoxInR$ 株の約1.2倍となった(図5)。自然垂れの向上は、作業時間の短縮、諸味充填量の増加、液汁歩合の向上などの実製造に向けて大きな利点をもた

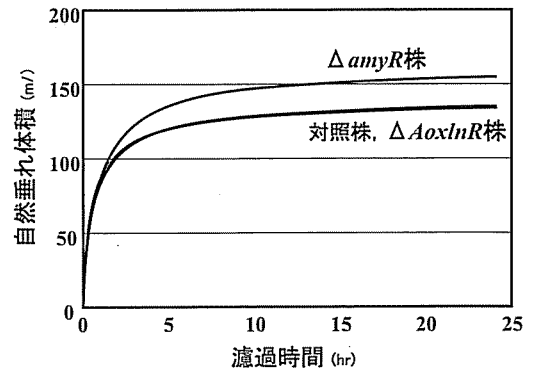


図5 諸味の自然垂れ試験

らす可能性を示唆している。この結果から、 $\Delta amyR$ 株は品質向上ばかりでなく圧搾工程の改善にも有用であることが期待される。

AoXlnRやAmyRのような転写調節因子は複数の遺伝子の発現を制御しているため、転写調節因子をコードする遺伝子を破壊あるいは過剰発現させればその転写調節因子によって発現が制御されている複数の遺伝子の発現を大きく変化させることができる。その結果、これまででないような性質の麹菌を容易に取得することが可能であり、転写調節因子を標的とする遺伝子組換えは麹菌の育種技術にとって大変重要な技術の1つであると考えられる。

### 3. セルロース分解酵素遺伝子高発現麹菌の取得

醤油製造の副産物として年間約10万トン排出されている醤油粕は家畜飼料や肥料として従来はその一部が利用されてきたが、近年は国内の畜産業の衰退や安価な輸入飼料の増加により、家畜飼料としての利用は減少傾向にある。そのため醤油粕の大半は産業廃棄物として埋没処理・焼却処理されている。醤油粕の焼却処理では醤油粕に含まれる食塩のために焼却炉の損傷がひどく、また、埋没処理では有機物含量が高いために環境汚染の原因となっている。そのため、醤油粕の低減化および高度利用が強く望まれているが、根本的な問題解決には至っていない。

水洗醤油粕は大豆および小麦に由来する多糖類やタンパク質、酵母、麹菌細胞壁などから構成されているが、その約55%を大豆および小麦に由来する多糖類が占めている<sup>7)</sup>。従って、この多糖類を効率よく分解することができれば、醤油粕を低減化させることが十分可能になると思われる。このようなことから、我々

表3 麹菌セルラーゼ遺伝子の構造

	<i>celA</i>	<i>celB</i>	<i>celC</i>	<i>celD</i>	<i>celE</i>
塩基数	877	1,483	1,395	1,483	1,362
イントロン数	2	0	0	2	5
アミノ酸数 (成熟タンパク質)	239 (223)	416 (399)	465 (440)	454 (437)	333 (306)
推定分子量 (成熟タンパク質)	26,096 (24,477)	44,462 (46,128)	49,450 (46,904)	48,104 (46,128)	37,029 (34,714)
N型糖鎖付加部位	2	8	3	2	2

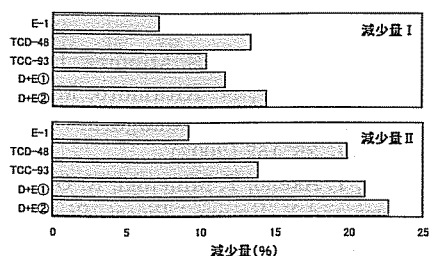
表4 醤油麹におけるセルラーゼ遺伝子高発現麹菌の酵素活性

酵素活性 (units/g 麹)	対照株	TCC-93	TCD-48	E-1
全プロテアーゼ	589	525	540	472
Pep.B	0.491	0.575	0.604	0.435
LAPase	3,314	3,107	2,819	3,049
$\alpha$ -アミラーゼ	2,941	2,537	2,558	2,355
グルコアミラーゼ	315	281	279	290
エンドグルカナーゼ	1.4	2.7	2.0	45.5
エキソグルカナーゼ	11.8	31.6	14.6	16.9

は醤油麹菌のセルロース分解酵素遺伝子のクローニングを行い、それらの遺伝子構造の解析を行った(表3)。セルロース分解酵素を高生産する麹菌を取得するために、麹菌の強力なプロモーターであるタカアミラーゼA遺伝子プロモーター<sup>9)</sup>、あるいは*TEF 1* 遺伝子プロモーター<sup>9)</sup>を用いてこれらのセルラーゼ遺伝子を高発現させた。タカアミラーゼA遺伝子プロモーターを用いてセルラーゼB遺伝子<sup>10)</sup>を高発現させた場合には、AmyRのタイトレーションによって醤油麹においてアミラーゼ活性及びグルコアミラーゼ活性の低下(対照株の71%および55%)が認められた<sup>11)</sup>。しかし、その遺伝子発現に特定の誘導発現因子を必要としない*TEF 1* 遺伝子プロモーターを用いてセルラーゼC遺伝子<sup>12)</sup>、セルラーゼD遺伝子<sup>13)</sup>およびセルラーゼE遺伝子<sup>14)</sup>を高発現させた場合には、他の酵素活性に影響を与えることなく固体培養においても液体培養時と同様に高いセルラーゼ活性が得られた(表4)。対照株と比較してエキソグルカナーゼ活性はTCC-93株(セルラーゼC遺伝子高発現株)で268%、TCD-48株(セルラーゼD遺伝子高発現株)で124%、E-1株(セルラーゼE遺伝子高発現株)で143%、エンドグルカナーゼ活性はTCC-93株で193%、TCD-48株で143%、E-1株で3,250%にそれぞれ上昇していた。一方、醤油醸造に重要な役割をもつプロテアーゼ、ペプチダーゼ、アミラーゼなどの活性値は対照株と同程度の活性値であり、予想したようにセルラーゼ遺伝子高発現化の影響を受けていなかった。

### 4. セルラーゼ遺伝子高発現麹菌の醤油醸造

TCC-93株、TCD-48株およびE-1株を用いた小仕



減少量 I は諸味100gあたりに発生する粕の減少量, 減少量 II は濾液100ml/ 当りに発生する粕量の減少量を表す。TCD-48とE-1の種麹混合はD+E①, TCD-48とE-1の麹混合はD+E②と略した。

図6 セルラーゼ遺伝子高発現麹菌の醤油粕減少量

込み試験を行なった時の同一諸味量あたりの粕減少量 I, 液量当たりの粕減少量 II を図 6 に示す。同一諸味量当たりの粕減少量 I, 液量当たりの粕減少量 II はいずれの株でも減少しており, 既に報告している TB 1 株を用いた結果を含めて考慮すると, 麹菌のセルラーゼ活性を上昇させることが醤油粕量を減少させるためには重要であると推察された。3 株の中では TCD-48 株が最も減少量が多く同一諸味量当たりでは 13.4%, 液量当たりでは 19.9% の減少であった。セルラーゼ D はエキソ型セルラーゼ, セロビオヒドロラーゼであり, セルロースの低分子化への寄与率は低いと思われる。しかし, セルラーゼ D はセルロース吸着力が高いため, セルラーゼ D を高生産させることがセルロース分解を促進させ, その結果として醤油粕量の減

少につながったと考えられる。

セルロースの分解にはエキソ型セルラーゼとエンド型セルラーゼを相乗的に作用させることが効果的である。そこで, セルラーゼ D とエンド型セルラーゼを組み合わせれば, さらに醤油粕を減少させることができると考え, TCD48 株と E-1 株の混合使用を検討した。種麹接種時 (各菌株  $5 \times 10^5$  個ずつ接種) および仕込み段階 (麹重量で同量ずつ混合) で混合したところ, 同一諸味量当たりの粕減少量 I, 液量当たりの粕減少量 II はいずれの場合でもさらに減少しており, 液量当たりでは麹混合で 23.1%, 種麹混合で 21.1% の減少となった (図 6)。エキソ型セルラーゼとエンド型セルラーゼの相乗作用によって, セルロースの分解率が上昇した結果, 粕量がさらに減少したと考えられる。エキソ型セルラーゼとエンド型セルラーゼの相乗度は混合比やエンド型セルラーゼの種類によって異なる。従って, TCD-48 株と E-1 株との混合割合や TA31 株 (セルラーゼ A 遺伝子高発現株)<sup>10)</sup> あるいは TB 1 株 (セルラーゼ B 遺伝子高発現株) との混合を検討することにより, さらに粕量を減少させることも可能かもしれない。

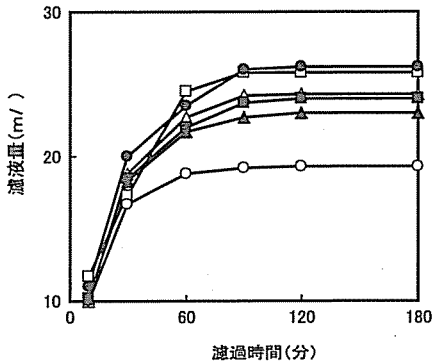
TCC-93 株, TCD-48 株および E-1 株を使用した試醸醤油の成分分析結果を表 5 に示した。対照株と比較して総窒素, 全糖, グルタミン酸濃度, ホルモール窒素などで高い値が得られた。このことは, セルラーゼ遺伝子高発現麹菌を使用することにより原料の分解

表 5 セルラーゼ遺伝子高発現麹菌を用いた醤油の成分分析

	総窒素	酸度	還元糖	全糖	色度	$\Delta A$	Glu	FN	Alc	pH
TCC-93	1.57	20.0	21.3	28.2	2.374	0.528	16.0	0.866	3.27	4.95
TCD-48	1.56	19.8	22.0	28.6	2.498	0.524	16.1	0.863	3.26	4.95
E-1	1.57	19.4	19.7	30.1	2.327	0.530	16.9	0.868	3.26	4.97
D+E①	1.57	19.9	26.0	30.5	2.651	0.518	16.3	0.865	3.19	4.94
D+E②	1.59	19.0	20.2	28.0	2.506	0.527	16.3	0.865	3.32	4.94
Control	1.55	19.8	22.7	27.4	2.420	0.529	16.0	0.843	3.22	4.96

①: 種麹混合 ②: 麹混合

表示単位; 総窒素: %, 酸度: ml-N/10 NaOH, 還元糖・全糖: mg/ml, 色度: OD530  
Glu: mg-グルタミン酸/ml, FN (ホルモール窒素): %, Alc: g-エタノール/100ml



■: TCC-93, △: TCD-48, ▲: E-1, ●: TCD-48+E-1 (種麴混合), □: TCD-48+E-1 (麴混合), ○: 対照株

図7 セルラーゼ遺伝子高発現麴菌を用いた醤油諸味の濾液量

が促進されたためと考えられる。TB 1 株やセルロース分解酵素活性が上昇した  $\Delta amyR$  株を使用した場合には、諸味の濾過速度が上昇し、圧搾性が向上した。TCC-93株、TCD-48株およびE-1株を使用した場合も同様な結果が期待されたので、経時的な濾過速度について検討を行った。図7に示すようにいずれの株でも濾過速度（濾過開始から1時間後の濾液量）が速くなっており、特にTCD-48株では1.3倍早くなった。さらにTCD-48株とE-1株の混合は麴区分、種麴区分ともTCD-48株単独使用を上回っていた。以上の結果から、セルラーゼ高生産麴菌の使用は圧搾作業時間の短縮、諸味充填量の増加、液汁歩合の向上など圧搾工程の改善にも有用である可能性が示唆された。

本研究によって麴菌多糖類分解酵素の醤油醸造における役割の一部を解明することができた。今後、麴菌ゲノム情報を活用し、麴菌多糖類分解酵素群の醤油醸造における役割を解明することによって、醤油業界の発展に貢献したい。

## 文 献

- 1) J. Marui, A. Tanaka, S. Mimura, L. H. de Graaff, J. Visser, N. Kitamoto, M. Kato, T. Kobayashi and N. Tsukagoshi : *Fungal Genet. Biol.*, 35, 157 (2002)
- 2) K. Gomi, T. Akeno, T. Minetoki, K. Ozeki, C. Kumagai and Y. Iimura : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 816 (2000)
- 3) K. L. Petersen, J. Lehmbeck and T. Christensen : *Mol. Gen. Genet.*, 262, 668 (1999)
- 4) J. Marui, N. Kitamoto, M. Kato, T. Kobayashi and N. Tsukagoshi : *FEBS Lett.*, 528, 279 (2002)
- 5) 中田佳幸, 森下めぐみ, 橋本忠明, 辻 安信 : 醸協, 94, 346 (1999)
- 6) 渡部 潤, 赤川 巧, 山崎達雄, 浦 哲二:本誌, 30, 248 (2004)
- 7) 菊地忠昭:本誌, 3, 154 (1977)
- 8) N. Tsukagoshi, M. Furukawa, H. Nagaba, N. Kirita, A. Tsuboi and S. Udaka : *Gene*, 84, 319 (1989)
- 9) N. Kitamoto, J. Matsui, Y. Kawai, A. Kato, S. Yoshino, K. Ohmiya, N. Tsukagoshi : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 85 (1998)
- 10) N. Kitamoto, M. Go, T. Shibayama, T. Kimura, Y. Kito, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 538 (1996)
- 11) 北本則行, 吉野庄子, 和久 豊:本誌, 25, 55 (1999)
- 12) 北本則行, 木村哲哉, 鬼頭幸男, 大宮邦雄, 吉田政次:日本農芸化学会1995年度大会講演要旨集, 94 (1995)
- 13) 松井淳子, 安田(吉野)庄子, 和久 豊, 北本則行:平成13年度日本生物工学会大会講演要旨集, 234 (2001)
- 14) 安田(吉野)庄子, 北本則行:平成16年度日本生物工学会大会講演要旨集, 136 (2004)