

研究報文

## セルラーゼ高生産組換え麴菌の利用による醤油粕の低減化

北本則行, 吉野庄子, 和久 豊\*  
(愛知県食品工業技術センター, \*株式会社 ヒオック)

日本醤油研究所雑誌

Vol. 25, No. 2, 1999

研究報文

セルラーゼ高生産組換え麴菌の利用による醤油粕の低減化

北本則行, 吉野庄子, 和久 豊\*

(愛知県食品工業技術センター, \*株式会社 ヒオック)

(平成10年10月8日受理)

Decrease of Soy Sauce Refuse by Application of a High Cellulase-Producing Recombinant *Aspergillus oryzae* Strain

Noriyuki Kitamoto, Shoko Yoshino and Yutaka Wagu\*

(Food Research Institute, Aichi Prefectural Government, \*Bioc Co.,Ltd.)

醤油粕量を減少させることを目的に造成した, エンド-1, 4-β-グルカナナーゼB 遺伝子を高発現する組換え麴菌 *Aspergillus oryzae* TB-1 株の評価を, 麴の消化試験及び諸味小仕込み試験により実施した。本菌株は液体培養と同様に醤油麴においても CMCase 活性が約50倍に上昇した。有塩下での消化試験, 醤油小仕込み試験を行ったところ, 濾過性の向上及び濾過残渣重量の減少が認められた。この結果から, TB-1 株は醤油粕量の低減に効果があることが示唆され, さらに麴菌の遺伝子は醤油粕低減に有効な手段になりうるものと考察した。

緒 言

醤油製造の副産物である醤油粕は, 年間約10万トン産生されており<sup>1)</sup>, そのほとんどが産業廃棄物として処理されている。地球的規模で環境保護への関心が高まる中で, その処理費用は年々増加しており, 企業は何らかの対策が必要となってきた。

醤油粕の有効利用については従来から多くの研究<sup>2-7)</sup>がなされており, 近年では醤油粕から生理活性物質<sup>8)</sup>や抗酸化性物質<sup>9)</sup>の検索などの研究も行われている。醤油粕の少ない醤油の製造は原料の処理と酵素利用などの点から検討され, 今までに原料中の不溶性残渣を除去すると粕量が減少する<sup>10)</sup>ことや植物組織分解酵素の強力な醤油麴の使用などが有効であること<sup>11)</sup>などが報告されている。

醤油諸味の圧搾性や醤油粕量に関与する酵素はペクチナーゼやセルラーゼが主体と考えられる<sup>11-14)</sup>。筆者らは, 醤油粕量を減少させることを目的に, 麴菌の醬

油諸味の圧搾性や醤油粕量に関与する酵素遺伝子をクローニングし, それらを用いた形質転換体の造成を行っている<sup>15-17)</sup>。本報ではエンド-1, 4-β-グルカナナーゼB 遺伝子 (*celB* gene) を導入した麴菌 (TB-1株) を用いて醤油麴を作成し, 麴の消化試験及び諸味小仕込み試験を行い, 形質転換体の有用性について検討を行った。

実 験 方 法

1. 使用菌株

醤油用種麴に使用されている *Aspergillus oryzae* KBN 616株 (株式会社ヒオック) に遺伝子マーカーとして硝酸塩非資化性 (*niaD*<sup>-</sup>) を付加した KBN616-39株にエンド-1, 4-β-グルカナナーゼB 遺伝子 (*celB* gene) を導入した麴菌 (TB-1株) を使用した。

2. 製麴

原料配合は脱脂大豆: 割砕小麦=5.5:4.5とした。原料処理は散水120%, 蒸煮を1kg/cm<sup>2</sup>で20分間行い,

製麴は恒温恒湿機(タバイエスベック株式会社, PR-4 SP)を用いて行った。製麴経過は、24時間まで28°C、以後25°Cとし、42時間で出麴とした。

### 3. 仕込み

#### (1) 消化試験

脱脂大豆41g, 割砕小麦34gを用いて作成した麴に12%食塩水180mlを加え、よく攪拌後40°Cで14日間消化を行った。

#### (2) 仕込み試験

麴1,500gに食塩水2,700ml(Bé19, 食塩濃度23%)を加え、ガラス容器に仕込みを行った。諸味は10日間15°Cに保ち、その後は、室温で発酵・熟成を行った。仕込み10日目に乳酸菌(*Tetragenococcus halophilus*)を、 $2\sim 3 \times 10^6$ /mlとなるように添加した。酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)は諸味のpHが5.5まで低下した時点で $3\sim 4 \times 10^5$ /mlとなるように添加した。

### 4. 麴の酵素活性の分析

#### (1) 粗酵素液の調整

しょうゆ試験法<sup>19)</sup>に準じた。

#### (2) 総プロテアーゼ

しょうゆ試験法<sup>19)</sup>に準じた。

#### (3) $\alpha$ -アミラーゼ及びグルコアミラーゼ

国税庁所定分析法<sup>19)</sup>に準じた。

#### (4) ペプチダーゼ

酸性カルボキシペプチダーゼ及びアミノペプチダーゼは、中台ら<sup>20)</sup>の方法により測定した。

#### (5) CMC液化力(CMCase活性)

Ohmiyaら<sup>21)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、1%カルボキシメチルセルロース溶液(50mM酢酸緩衝液, pH4.0, Cellogen WS-C, 第一製薬工業株式会社)5mlに酵素液1mlを加え40°Cで反応した後、溶液の粘度を測定した。熱処理した酵素液を使用し同様に操作後、粘度を測定、盲検値とした。粘度の測定は円錐平板型回転式粘度計(株式会社トキメック社, E型粘度計)を使用して行った。酵素活性は次式により算出した。

$$\text{CMCase活性} = \left[ \frac{1}{\eta_s} - \frac{1}{\eta_0} \right] \times (1/\text{反応時間 [分]})$$

$\eta_s$  = 反応液の粘度,  $\eta_0$  = 盲検値

#### (6) CMC糖化力

0.5%カルボキシメチルセルロース溶液(50mM酢酸緩衝液, pH4.0, Cellogen WS-C, 第一製薬工業株式会社)1mlに酵素液1mlを加え、40°Cで60分間反応させた時に生成する還元糖量をSomogi-Nelson法<sup>22)</sup>にて測定した。酵素活性の表示は本条件でグルコース1mg相当の還元糖を生成する酵素量を1単位とした。

#### (7) ペクチンリアーゼ

Albersheim等<sup>23)</sup>の方法に準じ、一部改変して行った。すなわち、0.5%ペクチン(50mM酢酸緩衝液, pH4.0, 1%エタノール含有, From Citrus Fruits, SIGMA)2mlに酵素液0.5mlを加え40°Cで60分間反応させた後、20mM塩酸10mlを加えて反応を停止し、235nmにおける吸光度を測定した。酵素活性は本条件下で吸光度を1.00増加させる酵素量を1単位とした。

#### (8) ペクチン液化力

1.2%ペクチン(50mM酢酸緩衝液, pH4.0, 1.5%エタノール含有, From Citrus Fruits, SIGMA)を基質として、(6)と同様に測定した。

#### (9) ペクチン糖化酵素

(7)と同じ基質を用いて、(6)と同様に測定した。

#### (10) ペクチン酸液化力

1.2%ペクチン酸(0.1M酢酸緩衝液, pH4.0, ナカライテスク)を基質として、(5)と同様に測定した。

#### (11) ペクチン酸糖化力

0.6%ペクチン酸(0.1M酢酸緩衝液, pH4.0, ナカライテスク)を用いて基質として、(6)と同様に測定した。

### 5. 醤油麴消化液及び醤油諸味の分析

#### (1) 液量及び残渣重量の測定

液量は、消化液の場合には消化液全量、醤油諸味の場合には諸味100mlを、濾紙(アドバンテック No.5 A, 直径240mm)を用いて3時間濾過した時の、濾液容量で示した。残渣重量は濾過後の消化残渣を十分に洗浄し、100°Cで7時間真空乾燥した後、測定した。

#### (2) 消化試験及び小仕込み試験の成分

全窒素(T.N), フォルモール窒素(F.N), 全糖, 還元糖, グルタミン酸量はしょうゆ試験法により、また、 $\Delta A$ は茂田井らの方法<sup>24)</sup>により測定した。

### 実験結果及び考察

1. 組換え麹菌の醤油麹における酵素活性

大豆使用量5.5gでフラスコを使用した時の組換え麹菌 TB-1株の酵素活性を表1に示した。TB-1株は *A. oryzae* KBN616株よりクローニングしたエンド-1, 4-β-グルカナーゼ B 遺伝子をタカーアミラーゼ A 遺伝子のプロモーターの下流に連結した融合遺伝子を、選択マーカーに硝酸還元酵素遺伝子 (*niaD*) を使用して形質転換した菌株であり、液体培養において CMC 液化力 (以下 CMCase 活性) が約500倍にまで上昇することが確認されている<sup>19)</sup>。表1に示すようにTB-1株のCMCase 活性は親株に比べ、約50倍と高くなっており、固体培養においても液体培養と同様に活性が上昇することが確認された。CMC 糖化力が親株に比べ1.6倍上昇しているが、これは CMCase 活性が50倍と強力になっていることから、酵素測定時にこの酵素が基質に作用したため、基質の分解が促進されたものと推定される。また、TB-1株は親株に比べ α-アミラーゼ活性が30%、グルコアミラーゼ活性が50%低い結果となった。

このようにアミラーゼ遺伝子プロモーターを多コピ一麹菌に導入した際にアミラーゼ活性が低下する例は、

グルコアミラーゼ遺伝子を導入した形質転換株における α-アミラーゼ活性<sup>25)</sup>や、α-グルコシダーゼ遺伝子を導入したときの α-アミラーゼ、グルコアミラーゼ活性<sup>26)</sup>などで報告されており、それらが転写因子 (AmyRp) のタイトレーション現象に起因するものと推定されている<sup>27)</sup>。今回の形質転換で使用したプロモーターにも AmyRp の結合する共通配列<sup>27,28)</sup>が存在する事から、TB-1株の α-アミラーゼ、グルコアミラーゼ活性の低下も AmyRp のタイトレーションが原因と推定され、今後確認する予定である。醤油醸造に重要な役割を果たすプロテアーゼ、ペプチダーゼ活性また、ペクチン、ペクチン酸分解酵素活性については親株と TB-1株で変化は認められなかった。なお、データは示していないが、KBN616-39株 (*niaD*<sup>-</sup>) とその親株である KBN616 株の醤油麹における各種酵素活性は同レベルであり、遺伝子マーカー付与による酵素活性の変化は認められていない。

2. 醤油麹消化試験及び醤油小仕込み試験

醤油麹を有塩下で消化した時の濾液上清量、消化残渣及び消化液の成分について表2に示した。TB-1株は

表1 組換え麹菌の醤油麹における酵素活性

	TP	AA	GA	LAP	CMC. ly	CMC. sa	PL	P. ly	P. sa	PA. ly	PA. sa
TB-1	544	2094	148	3889	68.7	7.4	7.7	0.9	87.	3.1	35
616-39	589	2941	271	3313	1.4	4.6	7.2	1.7	79	2.0	38

TP: Total protease (pH7.0), AA: α-amylase, GA: glucoamylase, LAP: Leucin-aminopeptidase, CMC.ly: CMC liquefying activity, CMC.sa: CMC saccharifying activity, PL: pectin lyase, P.ly: Pectin liquefying activity, P.sa: Pectin saccharifying activity, PA.ly: Pectin acid liquefying activity, PA.sa: Pectin acid saccharifying activity

表2 消化後の液量、残渣及び消化液の成分

	濾 過		消 化 液				
	液量 (ml)	残渣 (g)	F. N (%)	T. N (%)	グルタミン酸 (mg/ml)	全 糖 (mg/ml)	還元糖 (mg/ml)
TB-1	89.3	30.8	0.825	1.861	92	98.5	11.0
616-39	85.8	32.7	0.806	1.783	90	92	11.0

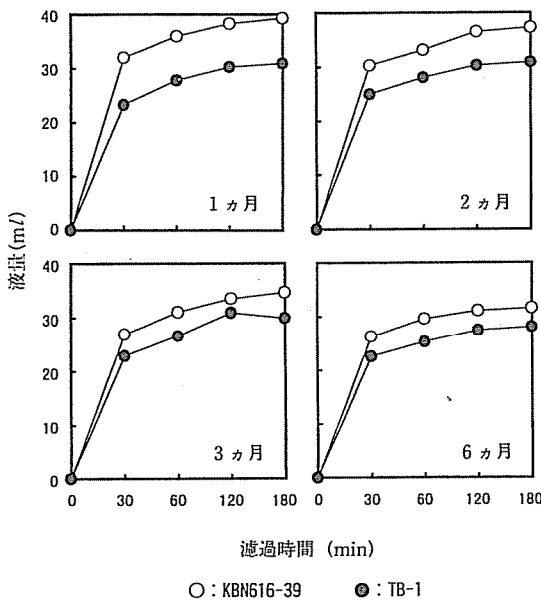


図1 小仕込み試験における濾過速度

親株である KBN616-39 に比べ消化後の濾液量が 4% 多く、消化残渣の重量は 6% 少なくなっていた。また、フォルモール窒素、総窒素、グルタミン酸量および全糖量においても親株に比べ高くなっており、本菌株を利用することにより、当初目的とした醤油粕量の減少だけでなく、濾過性や窒素利用率なども向上する可能性が示唆された。

消化試験の結果から TB-1 株の有効性が示唆されたので醤油の小仕込み試験を行い、濾過性と成分変化について検討を行った。経時的な濾過速度を図 1 に示した。醤油諸味の濾液量は、濾過開始から 30 分間で、1 ヶ月諸味で 37%、6 ヶ月諸味で 16% 多くなり、3 時間濾過後もその差は維持されていた。中台<sup>29)</sup>は醤油諸味の圧搾における自然垂れに対する麴菌酵素系の統計的解析を行い、CMC 液化酵素が自然垂れに対して最も寄与率が高いことを報告している。TB-1 株はエンド-1、4- $\beta$ -グルカナラーゼ B 遺伝子 (*celB* gene) を導入した麴菌で、親株に比べ CMCase が約 50 倍強力な菌株であり、それ以外の主な酵素の活性値に変化は認められない。このことから、TB-1 株の濾液量の増加は CMC 液化活

性の増加によるものと考えられる。

今回測定した濾液量は醤油諸味圧搾工程の自然垂れに相当するものといえる。自然垂れは圧搾の機械化に際して注入速度に影響し<sup>30)</sup>、また、自動計量機を備えた大型自動式圧搾機では揚槽中の自然垂れの量や流下速度が規定の通り出ないと、性能が十分に発揮できないことが多い<sup>31)</sup>など、圧搾工程に与える影響は大きいとされる。今回遺伝子組換え技術により造成した TB-1 株を使用した諸味の濾液量(自然垂れ量)が増加する結果が得られたことは、本菌株を用いることにより圧搾工程が改善される可能性を示すものであり、さらに、遺伝子組換え技術を用いた麴菌の育種改良が醤油製造工程中、最も困難とされる圧搾工程の改善に有用であることを示すものといえる。

表 3 に諸味の成分分析結果を示した。本表における液量は遠心分離(3000 rpm, 10分)後の遠心上清容量を表しているが、図 1 に示した濾過液量と同様に TB-1 株が KBN616-39 に比べ、容量が多い結果となった。

表 3 小仕込み試験における諸味成分の変化

		1 ヶ月	2 ヶ月	3 ヶ月	6 ヶ月
液量 (ml)	TB-1	29.3	32.9	36.5	36.6
	616-39	25.4	30.2	32.0	32.6
T.N (%)	TB-1	1.450	1.457	1.487	1.533
	616-39	1.505	1.524	1.553	1.555
F.N (%)	TB-1	0.728	0.820	0.868	0.924
	616-39	0.748	0.804	0.860	0.896
グルタミン酸 (mg/ml)	TB-1	10.3	11.1	11.5	12.0
	616-39	10.8	11.2	11.4	11.6
全糖 (mg/ml)	TB-1	95.3	45.4	24.6	24.3
	616-39	106.6	47.2	32.9	24.3
還元糖 (mg/ml)	TB-1	82.8	31.4	19.0	18.8
	616-39	76.4	37.3	21.8	19.2
OD550	TB-1	0.507	0.765	0.825	0.963
	616-39	0.530	0.785	0.890	1.045
$\Delta A$	TB-1	0.46	0.45	0.45	0.48
	616-39	0.53	0.52	0.52	0.54
濾過残渣 (g)	TB-1	—	—	—	7.5
	616-39	—	—	—	9.3

総窒素量は TB-1株が親株に比べ、やや低く、ホルモール窒素、グルタミン酸量はやや高い結果となった。総窒素量が低い値を示したのは、液量が増加したために見せかけ上の窒素濃度が低下したためと考えられる。すなわち、6ヵ月目の濾液中の総窒素量を比較すると TB-1株が561mg, KBN616-39が507mg となり、TB-1株の方が窒素量は高い。これは高生産された CMCase により大豆細胞壁の分解が進み、内部タンパク質を露出させてプロテアーゼに作用を受けやすくしたためと推定される。

全糖、還元糖は TB-1株が親株に比べ、低い傾向を示した。全糖、還元糖量にこのように差が生じたのは、CMCase の働きにより諸味の粘度が低下し、乳酸菌、酵母の発酵が旺盛となり、糖の消費が進んだことなどが原因ではないかと思われる。色の濃淡を示す指標として使用した550nm 吸光度と色調の指標となる  $\Delta A$  の値は、いずれの時期においても TB-1株が低い値を示し、TB-1株を使用した諸味液汁の色がうすく、赤味が強い傾向を示した。醤油の色はアミノ化合物と還元糖によるメイラード反応によると考えられることから、液中の総窒素濃度と還元糖量の少ない TB-1株の方がメイラード反応による褐変物質の生成量が少ないためと考えられる。また、 $\Delta A$  が低くなっているのは、諸味液中の糖量が少ないことから酵母などの発酵が旺盛であったためと推定されるが、この点については今後検討をする予定である。

仕込み6ヵ月目の諸味100ml を濾過したときの濾過残渣重量は TB-1株が7.5g, 親株である KBN616-39株が9.3g と、TB-1株が約20%少なくなった。

中台<sup>29)</sup>は自然垂れと同様に醤油諸味の圧搾における粕重量に対する麹菌酵素系の統計的解析を行い、ペクチン液化酵素(寄与率31.1%)CMC液化酵素(同30.9%)と報告しており、CMCaseが自然垂れに対して最も寄与率が高いことを報告している。TB-1株のペクチン液化酵素活性は親株である KBN616-38株と変わりはないことから、今回の濾過残渣重量の減少はCMC液化酵素活性の増加によるものと考えられる。

以上の結果から、本実験の TB-1株を実際の醤油醸造に使用した場合に醤油粕量の低減に効果があることが期待される。さらに、醤油粕低減に麹菌の遺伝子組

換え技術が有効な手段になりうる可能性を示唆するものである。

筆者らは現在、今回のエンド-1, 4- $\beta$ -グルカナーゼ B 活性に続き、ペクチンリアーゼ、ポリガラクトナーゼ、ペクチンメチルエステラーゼなどの圧搾性に関与する酵素のクローニング及びそれらを用いた麹菌の形質転換を行っており<sup>16,17,32)</sup>、今後さらに醤油粕量減少の可能性を追求すると共に、各種酵素を高発現する麹菌を用いて各種酵素の原料分解特性を解明する予定である。

## 要 約

- 1) 醤油粕量を減少させることを目的に造成した TB-1株(エンド-1, 4- $\beta$ -グルカナーゼ B 遺伝子(*celB* gene)を導入した麹菌)の評価を、麴の消化試験及び諸味小仕込み試験により実施した。
- 2) 組換え麹菌 TB-1株を用いた醤油麴の CMCase 活性は親株に比べ約50倍上昇した。 $\alpha$ -アミラーゼ活性とグルコアミラーゼ活性が低下していたが、その他主要酵素活性に差は認められなかった。
- 3) 醤油麴を有塩下で消化した結果、TB-1株は親株に比べ消化後の濾液量が4%多く、消化残渣の重量は6%少なく、本菌株の有用性が示唆された。
- 4) 醤油の小仕込み試験を行った結果、TB-1株を用いた諸味の濾過液量は親株に比べ多くなっていた。また、仕込み6ヵ月目の諸味濾過残渣重量は、約20%少なくなった。
- 5) 以上の結果から、TB-1株は醤油粕量の低減に効果があることが示唆された。さらに、麹菌の遺伝子組換え技術が醤油粕低減に有効な手段になりうるものと考察した。

この内容は平成10年度日本醤油研究所第48回研究発表会(三重大会)で発表したものである。

## 文 献

- 1) 日本醤油協会, 全国醤油工業協同組合連合会: 「しょうゆ粕」の処理方法についての実態調査(1991)
- 2) 福岡真介: 本誌, 4, 68 (1978)
- 3) 江口卯三夫: 本誌, 4, 142 (1978)

- 4) 門脇 清：本誌, 4, 237 (1978)
- 5) 木村延二郎：本誌, 5, 178 (1979)
- 6) 田畑武夫, 野村文雄, 兼重勲二：本誌, 5, 10 (1979)
- 7) 佐々原浩幸：香川県食品試験場研究報告, 86, 39 (1993)
- 8) 宮城県醤油醸造協同組合編：宮城県中小企業高度化事業報告書 (1987)
- 9) 松田茂樹, 湯之上雅子：本誌, 23, 263 (1997)
- 10) キノエネ醤油株式会社：「しょうゆ製造業第3次構造改善計画(知識集約化)研究結果報告書(昭和53年度)」, 全国醤油工業協同組合連合会, p.20 (1978)
- 11) 石井茂孝, 菊池忠昭, 大上忠男, 横塚 保：農化, 46, 349 (1972)
- 12) 久保田啓一, 野田義治, 奈良原英樹, 木村延二郎：第24回日醬研発表会要旨 p.26 (1986)
- 13) 中台忠信, 相島鐵朗：農化, 57, 307 (1983)
- 14) S. Ishi and T. Yokotsuka : *Agric. Biol. Chem.*, 35, 1157 (1971)
- 15) N. Kitamoto, M. Go, T. Shibayama, T. Kimura, Y. Kito, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 538 (1996)
- 16) N. Kitamoto, J. Matsui, Y. Kawai, A. Kato, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 85 (1998)
- 17) N. Kitamoto, H. Okada, S. Yoshino, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi : *Biosci. Biotech. Biochem.*, 63, 120 (1999)
- 18) しょうゆ試験法編集委員会編：しょうゆ試験法, 勸日本醤油研究所 (1985)
- 19) 注解編集委員会編：第4回改訂国税庁所定分析法注解, 勸日本醸造協会 (1993)
- 20) 中台忠信, 那須野精一, 井口信義：調味科学, 18, 435 (1971)
- 21) K. Omiya, K. Maeda and S. Shimizu : *Carbohydr. Res.*, 166, 145 (1987)
- 22) 福井作蔵：還元糖の定量法, 東京大学出版会 (1969)
- 23) P. Albersheim and U. Killias : *Arch. Biochem. Biophys.*, 97, 107 (1962)
- 24) 茂田井弘, 井上 進, 西沢嘉彦：農化, 46, 631 (1972)
- 25) Y. Hata, K. Tsuchiya, K. Kitamoto, K. Gomi, C. Kumagai, G. Tamura and S. Hara : *Gene*, 108, 145 (1991)
- 26) 峰時俊貴, 熊谷知栄子, 五味勝也, 北本勝ひこ, 高橋康次郎, 田村學造：1996年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p.107 (1996)
- 27) 五味勝也：1998年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p.440 (1998)
- 28) 小林哲夫, 塚越規弘：1998年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p.441 (1998)
- 29) 中台忠信：本誌, 10, 43 (1984)
- 30) 大川澄雄：調味科学, No.3, 15 (1972)
- 31) 枋倉辰六朗編：増補「醤油の科学と技術」, 勸日本醸造協会(1994)
- 32) 北本則行, 吉野庄子：1997年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p.63 (1997)