

麹菌Aspergillus oryzaeカルボキシペプチダーゼO欠失株の醸造特性

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	山下,伸雄 西本,遼 玉田,佳大 窪寺,隆文 明石,貴裕
発行元	日本醸造協会
巻/号	113巻11号
掲載ページ	p. 685-691
発行年月	2018年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



麹菌 *Aspergillus oryzae* カルボキシペプチダーゼ O 欠失株の醸造特性

山下 伸雄*・西本 遼・玉田 佳大・窪寺 隆文・明石 貴裕
(白鶴酒造株式会社 研究室, 〒658-0041 神戸市東灘区住吉南町 4-5-5)

平成 29 年 12 月 1 日受理

Brewing characteristics of carboxypeptidase O deficient strains from the koji mold, *Aspergillus oryzae*

Nobuo YAMASHITA, Haruka NISHIMOTO, Yoshihiro TAMADA, Takafumi KUBODERA, Takahiro AKASHI

(Hakutsuru Sake Brewing Co., Ltd. Research dept., 4-5-5, Sumiyoshiminami-machi, Higasinada-ku, Kobe, 658-0041)

We constructed carboxypeptidase O deficient strains ($\Delta ocpO$) from a koji mold, the *Aspergillus oryzae* industrial strain, and examined their brewing characteristics. Acid carboxypeptidase (ACP) activities of the rice-koji prepared with $\Delta ocpO$ strains were significantly reduced to approximately 35% of that of the wild type parent strain, while other important enzyme activities, (glucose forming activity, α -amylase, and acid protease) were almost identical. Sake brewed using the $\Delta ocpO$ strains had almost the same general analytical values as that produced with the parent strain with the exception of a slightly lower amino acidity. All amino acids were present at lower concentrations in sake using the $\Delta ocpO$ strains except for L-arginine, which was significantly increased. The ACP substrate specificity of rice koji differed between the $\Delta ocpO$ and parent strain, which likely explain the observed increase in L-arginine. The finding that the amino acidity was only slightly lower in sake brewed with $\Delta ocpO$ strains despite significant decreases in the ACP activity of the rice koji is likely caused by the functions of the other ACP isozymes and enzymes to produce amino acids in the sake mash. Finally, a taste sensor of sake brewed with the $\Delta ocpO$ strains suggested that carboxypeptidase O affects the taste balance of the sake.

Key words : 清酒 (sake), 麹菌 (*Aspergillus oryzae*), 酸性カルボキシペプチダーゼ (acid carboxypeptidase) カルボキシペプチダーゼ O (carboxypeptidase O)

諸言

酸性カルボキシペプチダーゼ (ACP) は清酒醪中の酸性下 (pH 4.0-4.5) において、タンパク質やペプチドの C 末端からアミノ酸を遊離する。遊離したアミノ酸は酵母の栄養源になり、酒質形成の役割をする。アミノ酸は清酒に旨味コク、甘味、ほのかな苦味等の味わいを付与するが、多すぎると雑味が増し、老香の

発生や着色度の増加など貯蔵劣化の原因となる¹⁾。特に吟醸酒においては適度に低めのアミノ酸度が要求される。貯蔵劣化等の防止を目的として ACP 活性の低い麹菌株が育種された報告もある²⁾。一方、2005 年に麹菌 *A. oryzae* RIB40 の全ゲノムが報告され³⁾、12 種のセリンカルボキシペプチダーゼのホモログ配列を持つことが明らかになった。我々は、米麹培養において発現量が多いと思われる ACP ホモログ配列を、酒

本論文については*印著者あてにご連絡ください。yamashita@hakutsuru.co.jp

類総合研究所の麹菌 EST データベース (<http://nrib2.nrib.go.jp/EST2/index.html>) における出現回数より予想し、麹菌の $\Delta ligD$ 株⁴⁾において特異的に欠失させた。清酒醸造の製麹工程においては固体培養特異的に発現するとされるカルボキシペプチダーゼ O1 をコードする *ocpA* (DOGAN ID AO090012000706)⁵⁾ が高発現していると考えられるが、 $\Delta ocpA$ 株の ACP 活性の低下率は野生型株の約 10% であり、 $\Delta ocpO$ 株の低下率は約 65% であった⁴⁾。この結果より、我々は *ocpO* (AO090020000351)⁵⁾ にコードされるカルボキシペプチダーゼ O が清酒醸造工程において主導的に働いている ACP と考察した。そこで $\Delta ocpO$ 株を清酒醸造用の実用株より取得し、その醸造特性について調べることにした。いくつかの興味深い知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 供試菌株及び使用培地

ocpO 遺伝子の上下流近傍領域の断片の PCR 増幅に鋳型として用いる麹菌のゲノムには *A. oryzae* RIB40 (酒類総合研究所) を使用した。遺伝子欠失に用いる宿主株には自社実用清酒麹菌 *A. oryzae* HL-1012 (wt) を用いた。また *ptrA* 遺伝子の増幅は pPTRI⁶⁾ を鋳型にした。分生子収穫のための平板培地は Difco Potato dextrose agar, ピリチアミン (PT) 耐性株を選抜する培地には再生培地 (0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PT, 1.2M D-ソルビトール, 2% グルコース, 0.6% NaNO_3 , 0.05% KCl, 0.15% KH_2PO_4 , 2mM MgSO_4 , 各種微量金属, 0.6% (上層), 2% (下層) agar) を使用した。また窒素源を変えた生育テストには, Czapek-Dox を基調とする平板培地 (2% グルコース, 0.6% 窒素源, 0.05% KCl, 0.15% KH_2PO_4 , 2mM MgSO_4 , 微量金属,

2% agar (pH 4.5)) を使用した。

2. 麹菌 *A. oryzae* からの $\Delta ocpO$ 株の取得

*ptrA*⁷⁾ をマーカーとする *ocpO* 遺伝子欠失カセットの構築は, fusion PCR 法⁸⁾ による。fusion PCR に用いたプライマーの配列を Table 1 に示す。表中のプライマー F1-R1, F2-R2, F3-R3 で増幅した 3 断片を fusion PCR で結合し, 欠失カセットを構築した。欠失カセットをプロトプラスト-PEG 法⁹⁾ で *A. oryzae* HL-1012 (wt) に導入し, PT を含む高浸透圧培地で再生した PT 耐性クローンを単離した。これらについて KOD FX Neo (東洋坊) を用いたコロニーダイレクト PCR で標的領域 (F0-R4) を増幅し, 制限酵素処理することによって判定した。

3. 製麹テストと酵素活性の測定

100 g スケールの製麹テストは, 70% 精米の白鶴餅を用い, 恒温恒湿機 SH-221 (エスベック社) を使用し, 製麹条件は 32°C (RH 95%), 19 時間 \rightarrow 35°C (RH 90%), 12 時間 \rightarrow 38°C (RH 85%) 12 時間とした¹⁰⁾。

米麹からの粗酵素液の抽出は酒類総合研究所標準分析法 (<http://www.nrib.go.jp/bun/nribanalysis.htm>) (以下標準分析法と記す) による。糖化力, α -アミラーゼ, ACP はキッコーマン社の醸造分析キット, 酸性プロテアーゼは標準分析法による。基質を変えた ACP の測定は国税庁所定分析法¹¹⁾ に記されたニンヒドリン発色法を若干改変し, pH 3.0, 37°C で 1 分間に合成ジペプチドより 1 μg のアミノ酸を遊離する酵素量を 1 Unit とした。基質として用いた合成ジペプチド (Cbz-Glu-Tyr, Bz-Gly-Arg) は株式会社研究より購入した。

4. 小仕込テスト

総米 400 g の小仕込テストは Kitamoto らの方法¹²⁾ で行った。酵母は自社実用清酒酵母 HL-171 を用い,

Table 1 Primers used for developing the deletion cassette

Primer	Application	Sequence (5'-3')
<i>ocpO</i> _F1	Amplification of <i>ocpO</i> deletion cassette ($\Delta ocpO$: <i>ptrA</i>)	GATGCTGCTCTTGCTTATGCCGGAC
<i>ocpO</i> _R1	〃	ccaatgggatcccgtaatcaCAGATTGAACAAGGAACCCG
<i>ocpO</i> _F2	〃	CGGGTTCCTTGTCAATCTGtgattacgggatccattgg
<i>ocpO</i> _R2	〃	ctatgcagtgtatcctccccATGGGGTGACGATGAGCCGC
<i>ocpO</i> _F3	〃	GCGGCTCATCGTCACCCCATggggaggatacactgcatag
<i>ocpO</i> _R3	〃	ACATAGCCCTTGCGGGGATATATC
<i>ocpO</i> _F0	Identification of <i>ocpO</i> deletion	CGTGGATTGATACTCGGCAGAAGC
<i>ocpO</i> _R4	〃	ATACTTGAGTGCCAAGACACCTCG

*Lowercase; region of *ptrA*

掛米は70%精米の日本晴、品温は15℃一定とした。炭酸ガス減量が125 gになった時点で上槽した。上清と酒粕の分離は遠心分離機を用いた。

5. 一般およびアミノ酸組成分析

一般分析(日本酒度, アルコール, 酸度, アミノ酸度, 色度)は標準分析法によった。アミノ酸組成分析はProminence Amino Acid Analyzer System(島津製作所社)を用いた。

6. 味覚センサー¹³⁾による酒質評価

製成酒の味覚評価にはTaste Sensing System TS-5000Z(インテリジェントセンサーテクノロジー社)を用いた。方法は同社のプロトコールによった。

実験結果と考察

1. $\Delta ocpO$ 株の取得と確認

欠失カセット($\Delta ocpO::ptrA$)を作成し, *A. oryzae* HL-1012 (wt) に導入することで, 多くのPT耐性クローンを得た。このうち53クローンを単離し,

コロニーダイレクトPCRで標的領域(約6 kb)を増幅させた。野生型にはなく, *ocpO* が *ptrA* で置き換わった株の標的領域にのみ一か所存在する *SphI* 部位で制限酵素処理した。この結果, 3株($\Delta ocpO$ -16, 31, 44)が予想した位置で切断され, *ocpO* 遺伝子欠失株と考えられた(Fig. 1)。このうち2株($\Delta ocpO$ -16, 31)がCzapek-Dox (CD) 平板培地において親株同様正常に生育した。1株は生育が悪かったため除いた。しかしこれらの $\Delta ocpO$ 株は窒素源をNaNO₃からCbz-Glu-Tyrに置き換えた場合, 親株より生育が劣っていた。(Fig. 2)。窒素源をCbz-Glu-Tyrに置換した場合, 生育が親株やRIB40株より弱くなったのは $\Delta ocpO$ 株においてACP活性が低下したためと考えられる。

2. $\Delta ocpO$ 株を用いた製麴テスト

ocpO の欠失が確認できた2株($\Delta ocpO$ -16, 31)を用いて100 gスケールの製麴テストを行った。米麴の活性を測定した結果, ACPが親株の約35%と顕著

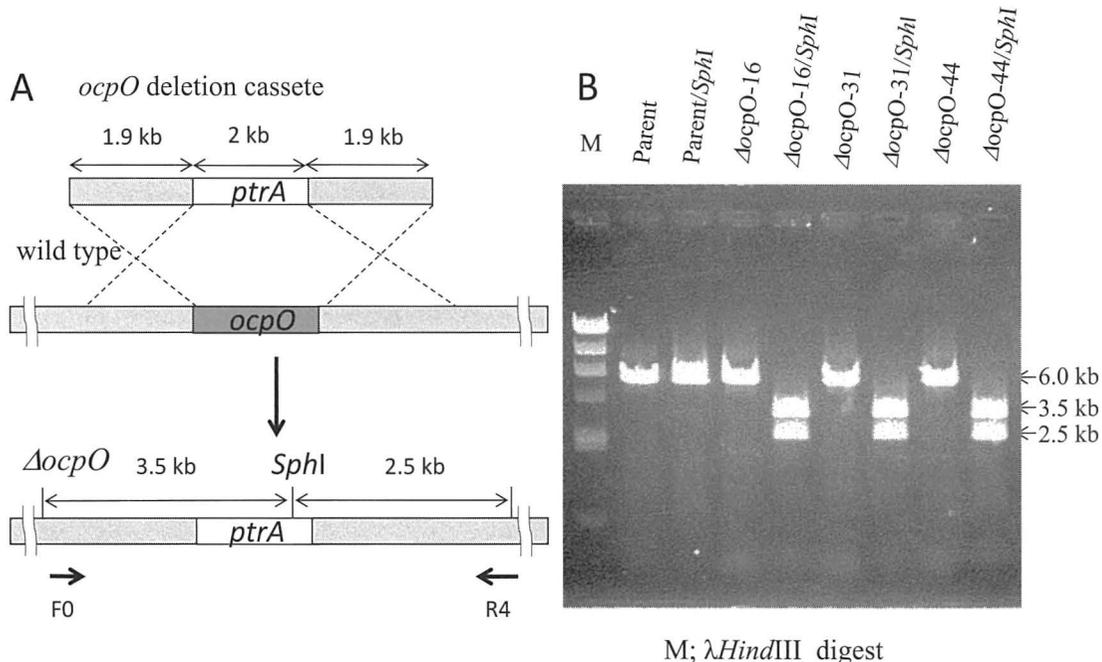


Fig. 1 Generation and detection of *ocpO* deletants ($\Delta ocpO$) from the wild type *Aspergillus oryzae* strain. (A) The *ocpO* open reading frame (ORF) region of *Aspergillus oryzae* HL-1012 (wt) was deleted by homologous recombination at the 5' - and 3' -flanking regions of *ocpO* with an *ocpO* deletion cassette. The arrows (F0, R4) represent primers designed from outside the deletion cassette region. (B) The F0-R4 region amplified by colony-direct PCR with the conidia of each strain was digested with *SphI*.

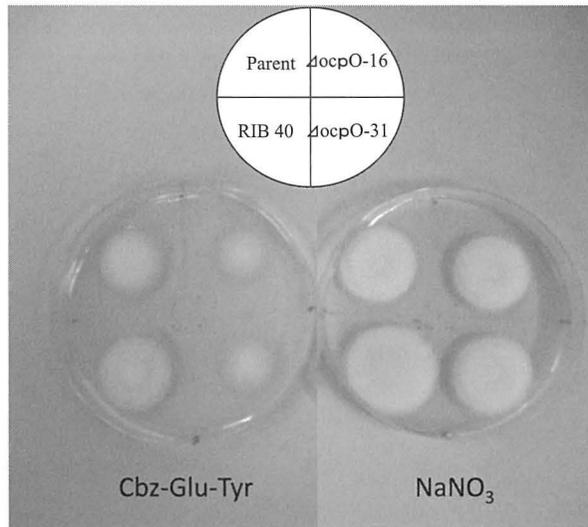


Fig. 2 Differences of individual strain growths among different nitrogen sources. Each nitrogen source was adjusted at 0.6%. Each strain was cultured at 30°C for 5d (pH 4.5).

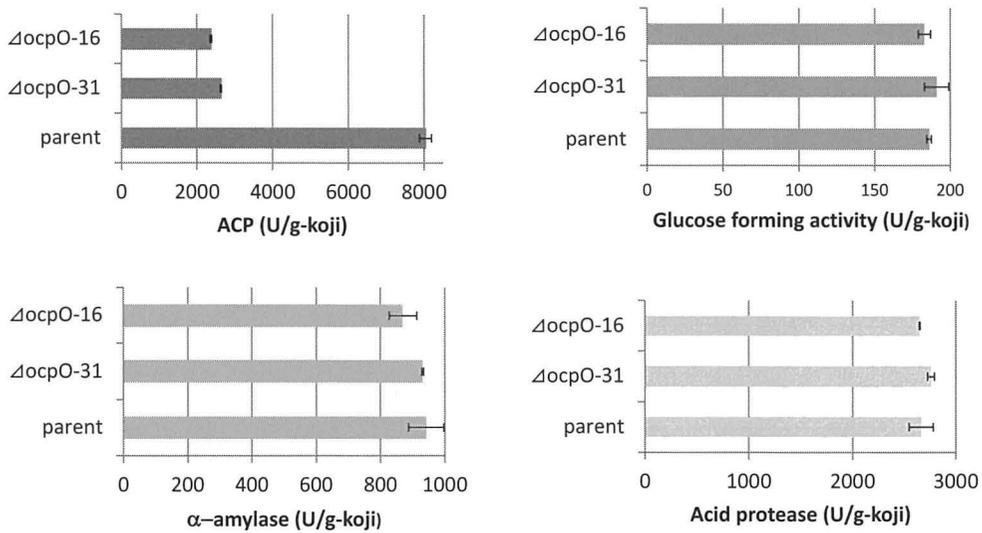


Fig. 3 Enzyme activities of the rice-koji prepared with $\Delta ocpO$ and parent strains.

Cbz-Glu-Tyr

Bz-Gly-Arg

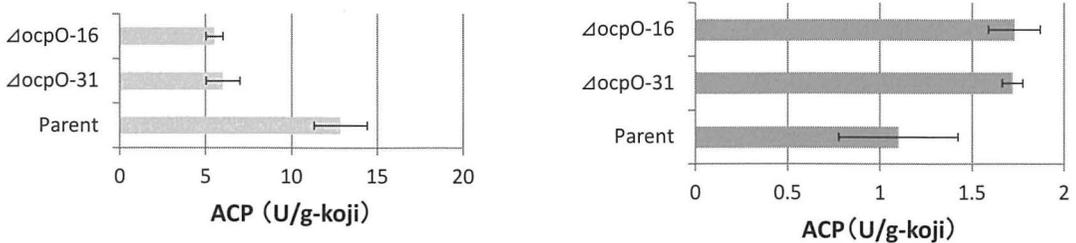


Fig. 4 Changes of Acid-carboxipeptidase (ACP) substrate specificity of $\Delta ocpO$ and parent strains.

に低下していた。一方、糖化力、 α -アミラーゼおよび酸性プロテアーゼについては親株とほぼ同レベルであった (Fig. 3)。また ACP の基質を醸造分析キットの Cbz-Tyr-Ala から、Cbz-Glu-Tyr および Bz-Gly-Arg に変えた結果、 $\Delta ocpO$ 株は、Cbz-Glu-Tyr に対しては、親株に比べ、反応性が低下していたが、Bz-Gly-Arg に対しては上昇していた (Fig. 4)。Cbz-Glu-Tyr は所定分析法における ACP 活性の基質であり、その減少率 (60-65%) は醸造分析キットでの結果と概ね一致した。Morita らは、OcpA (カルボキシペプチダーゼ O1) は OcpO (カルボキシペプチダーゼ O) に比べ、Cbz-Glu-Tyr に対しては若干低い、Bz-Gly-Arg に対しては約 10 倍以上高くなると報告している¹⁴⁾。よってこの変化はカルボキシペプチダーゼ O が欠失することによって、カルボキシペプチダーゼ O1 等の特性がより顕著に表れてきたものと推察される。ACP のアインザイム群は、その基質特異性は異

なっていることが分かっている¹⁴⁾。

3. $\Delta ocpO$ 株を用いた総米 400 g の小仕込テスト

ocpO 株より得た米麴を用いて、清酒醸造テストを行った。 $\Delta ocpO$ 株は親株とほぼ同等の発酵経過をたどり、留後 12 日目で揃って上槽した。得られた清酒をろ過し、新酒の状態一般分析した結果、アミノ酸度が約 1 割低い程度で日本酒度、アルコール (v/v)、酸度、色度は親株と $\Delta ocpO$ 株の間でほぼ変わらなかった (Table 2)。なお小仕込テストは 3 回行ったが、3 回とも $\Delta ocpO$ 株のアミノ酸度は親株より約 1 割低く、危険率 0.1% 未満で有意差があった ($p < 0.001$)。またアミノ酸組成分析を行った所、 $\Delta ocpO$ 株は、測定できたほとんどのアミノ酸で親株に比べ減少していた。一方、L-アルギニン約 20-25% 親株より増加していた (Table 3)。L-アルギニンが増加した原因は、酵母の発酵性は変わらなかったことから酵母からの漏出ではなく、麹菌の ACP において基質特異性が変化

Table 2 General analysis brewed with the $\Delta ocpO$ strains

Strain	Sake-meter (\pm)	Ethanol (%)	Acidity (ml)	Amino-acidity (ml)	Abs.430
$\Delta ocpO$ -16	- 7.2	18.1	2.4	1.8	0.034
$\Delta ocpO$ -31	- 7.5	18.0	2.4	1.8	0.033
Parent	- 7.3	18.1	2.4	2.0	0.036

Fermentation period is all 12d after *Tome-zoe*.

Table 3 Amino acid composition in the sake

Amino acid	Parent (ppm)	$\Delta ocpO$ -16 (ppm)	Change in rate* (%)	$\Delta ocpO$ -31 (ppm)	Change in rate (%)
Asp	70	58	- 17	64	- 9
Thr	37	34	- 8	34	- 8
Ser	65	60	- 8	61	- 6
Asn	105	94	- 10	94	- 10
Glu	272	251	- 8	248	- 9
Gln	125	107	- 14	109	- 13
Pro	171	153	- 11	155	- 9
Gly	150	132	- 12	133	- 11
Ala	296	270	- 9	279	- 6
Val	95	79	- 17	81	- 15
Cys	43	36	- 16	35	- 19
Ile	54	46	- 15	46	- 15
Leu	122	101	- 17	103	- 16
Tyr	125	101	- 19	103	- 18
Phe	82	65	- 21	66	- 20
His	3	3	0	3	0
Lys	111	106	- 5	107	- 4
Arg	314	368	+ 17	397	+ 26

*Change in rate = $\Delta ocpO$ (ppm) - parent(ppm) / parent(ppm) * 100

Table 4 Results of the taste sensor analysis of small-scale-brewed sake

Strain	Sourness	Bitterness (Initialtaste)	Astringency (Initialtaste)	Umami (Initialtaste)	Saltiness	Bitterness (Aftertaste)	Astringency (Aftertaste)	Richness (Aftertaste)
$\Delta ocpO$ -16	0.31	0.07	- 0.02	- 0.18	0.05	0.06	- 0.04	0.04
$\Delta ocpO$ -31	0.26	0.10	- 0.02	- 0.16	0.01	0.04	- 0.04	0.09
parent	0	0	0	0	0	0	0	0.0

*Values shown are the means from three independent experiments and indicate relative scores compared with the parent.

したことによることが強く示唆された。

4. $\Delta ocpO$ 株を用いた清酒の酒質評価

味覚センサーを用いて、酒質評価を行った。結果を Table 4 に示す。評価は 3 回分析した結果の平均値を示す (1 回あたり $n = 3$, テスト酒のロットは 3 回とも異なる)。 $\Delta ocpO$ 株は親株に比べ、変動の上昇はそれほど大きくないものの酸味が強くなることについて安定した再現性が見られた。滴定酸度は親株と $\Delta ocpO$ 株間で変わらないことから、アミノ酸、ジペプチドが減少したことによる緩衝能の低下が考えられる。ジペプチドはデータを示さないが、LC-MS/MS により得られたジペプチド群のピーク面積値の低下より、全体的にやや減少していることを確認している。また旨味 (先味) の減少も再現性が見られた。これはアミノ酸の減少が影響していると考えられる。苦味雑味 (先味), 渋味刺激, 苦味 (後味), 渋味 (後味), 旨味コク (後味) についても親株と $\Delta ocpO$ 株との間に変動が見られた。苦味 (先味) の増加は L-アルギニンの増加によるものと推察できるが、変動のレベルが小さいことから、明瞭な考察は出来なかった。しかしながらカルボキシペプチダーゼ O が欠失することで味のバランスが変動すると考えられる。

要 約

清酒麹菌 HL-1012 (wt) より、カルボキシペプチダーゼ O をコードする $ocpO$ の欠失株 ($\Delta ocpO$) を取得し、その醸造特性について検討した。

- (1) $\Delta ocpO$ 株を用い調製した米麴の ACP 活性は親株の約 35% に大きく低減していたが、その他の主要活性は親株と同レベルであった。このことからカルボキシペプチダーゼ O の ACP 活性への寄与率は非常に大きいと考えられた。基質を変えて ACP 活性を測定した結果、 $\Delta ocpO$ 株は親株との間で見かけ上の基質特異性の変化が見られた。
- (2) 小仕込試験を行った結果、 $\Delta ocpO$ 株の発酵経過

は親株と変わらず、一般分析値においてはアミノ酸度が 1 割程度低いこと以外、大きな差はなかった。アミノ酸組成分析においては大半のアミノ酸が減少していたが、L-アルギニンは 20-25% ほど増加していた。発酵経過に差がなかったことから、ACP の見かけの基質特異性の変化が影響していることが示唆された。 $\Delta ocpO$ 株の小仕込み酒を味覚センサーで評価した結果、親株に比べ、やや酸味が強くなり、若干旨味が低下する傾向が見られた。これよりカルボキシペプチダーゼ O が欠失することで味のバランスが変動すると考えられた。

- (3) 米麴の ACP 活性が大きく低下したにも関わらず、製成酒のアミノ酸度はやや減少するにとどまったことから、他の ACP アイソザイム等が $ocpO$ の欠失を補うべく清酒醪中で働いていると考えられた。

参考文献

- 1) 奥田 将生：醸協, **105** (5), 262-72 (2010)
- 2) 田中利雄, 岡崎直人, 五味勝也, 今野 宏, 井出 光彦：醸協, **79** (4), 274-78 (1984)
- 3) Machida M. and 63 authors.: *Nature*, **438**, 1157-61 (2005)
- 4) 山下 伸雄, 岩下 和裕, 山田 修, 西村 顕：第 62 回日本生物工学会大会講演要旨集, 93 (2010)
- 5) Mizutani O., Kudo Y., Saito A., Matsuura T., Inoue H., Abe K., Gomi K.: *Fungal Genet. Biol.*, **45** (6), 878-89 (2008)
- 6) Morita H., Kuriyama K., Akiyama H., Okamoto A., Yamagata Y., Kusumoto K., Koide Y., Ishida H., Takeuchi M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74** (5), 1000-6 (2010)
- 7) Morita H., Okamoto A., Yamagata Y., Kusumoto K., Koide Y., Ishida H., Takeuchi M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 335-496 (2009)

- 8) Kubodera T., Yamashita N., Nishimura A. : *Biosci. Biotechnol Biochem.*, **66** (2) , 404-6 (2002)
 - 9) Kubodera T., Yamashita N., Nishimura A. : *Biosci. Biotechnol Biochem.*, **64** (7) , 1416-21 (2000)
 - 10) 遠藤路子, 藤田晃子, 磯谷敦子, 神田涼子, 岩下和裕, 山田 修, 岩田 博, 須藤茂俊 : 醸協, **106** (8), 556-61 (2011)
 - 11) Gomi K., Imura Y., Hara S.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2549-55 (1987)
 - 12) 山下伸雄、窪寺隆文、西村 顕 : 生物工程, **78** (8), 311-15 (2000)
 - 13) 第四回国税庁所定分析法注解 (日本醸造協会 東京) p.226-28 (1993)
 - 14) Kitamoto K., Oda-Miyazaki K., Gomi K., Kumagai C.: *J. Fement. Bioeng.*, **75** (5) , 359-63 (1993)
 - 15) 豊田健太郎, 池崎秀和, 平林和之, 三村昭彦, 那須賢二, 戸塚 昭 : 醸協, **111** (1) 49-58 (2016)
 - 16) Morita H., Abo H. Okamoto A., Maeda H., Yamagata Y., Kusumoto K., Amano H., Ishida H., Takeuchi M. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75** (4) , 662-68 (2011)
-