

醤油醸造における麹菌のキシラン分解酵素、セルロース分解酵素、ペクチン分解酵素の機能解析

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	北本,則行
発行元	日本醸造協会
巻/号	103巻12号
掲載ページ	p. 913-921
発行年月	2008年12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



醤油醸造における麴菌のキシラン分解酵素，セルロース分解酵素，ペクチン分解酵素の機能解析

筆者は、麴菌ゲノム情報を利用して醤油の色や濾過特性に関与する酵素を高生産、もしくは生産しない麴菌を多数育種し、それらの育種株を用いた醤油の試験仕込みを行っている。得られた麴や醤油の成分分析から、個々の遺伝子の醤油醸造での働きを明快に評価できることを示している。一読することにより、今後の新しい分子育種の方向性もみえてくる。

北 本 則 行

はじめに

醤油醸造に関わる微生物の中で、麴菌は最も重要な微生物である。麴菌は「酵素の宝庫」と言われているように、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。製麴中に麴菌が生産する酵素の中でデンプン分解酵素、セルロース分解酵素、キシラン分解酵素、ペクチン分解酵素などの多糖類分解酵素は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っている。これらの麴菌多糖類分解酵素に関する総説や研究報告は多数あり、これらの麴菌多糖類分解酵素が醤油醸造において担っている役割について推定されてきた。麴菌における遺伝子組換え技術の最近の進歩によって特定の多糖類分解酵素を特異的に高生産する麴菌、あるいは、ほとんど生産しない麴菌を作出することが可能となってきた。ここでは遺伝子組換え麴菌を活用した麴菌多糖類分解酵素の醤油醸造における役割に関する最近の知見について紹介する。

1. *AoxlnR* 遺伝子破壊麴菌および *amyR* 遺伝子破壊麴菌の取得

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つが挙げられる。

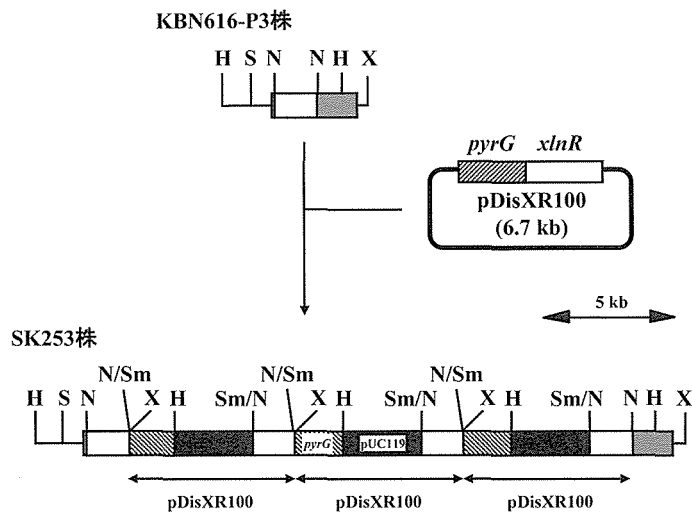
醤油原料に含まれるキシランの分解を抑制するためには、醤油麴菌のキシラン分解酵素活性を低下させる必要がある。糸状菌のキシラナーゼは糖質加水分解酵素ファミリー10および11に分類され、それぞれ4個の遺伝子が麴菌のゲノム上に見出されている。また、キシロシグラーゼは糖質加水分解酵素ファミリー3および43に分類され、5個および8個の遺伝子が麴菌のゲノム上に見出されている。醤油麴菌の主要なキシラナーゼ遺伝子およびキシロシグラーゼ遺伝子の発現は誘導発現因子、*AoXlnR* によって制御されている^{1,2)}。そこで、*AoxlnR* 遺伝子の一部分を麴菌形質転換ベクター pYRG 100 に組み込んだ *AoxlnR* 遺伝子破壊用

Functional Analysis of Xylanolytic, Cellulolytic, and Pectinolytic Enzymes from *Aspergillus oryzae* in Soy Sauce Brewing

Noriyuki KITAMOTO (Food Research Center, Aichi Industrial Technology Institute)

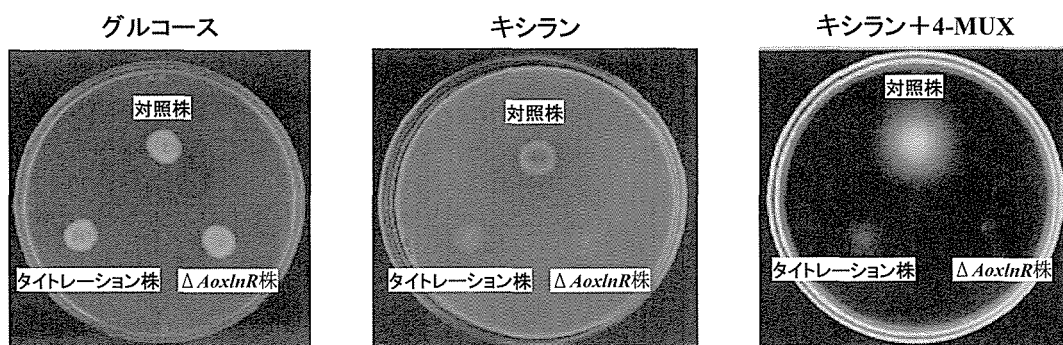
ベクター pDisXR 100 でターゲットインテグレーション効率の高い REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) 法を用いて麹菌を形質転換し (第 1 図), *AoxlnR* 遺伝子破壊麹菌 ($\Delta AoxlnR$ 株) が取得された (第 2 図)³⁾。 $\Delta AoxlnR$ 株では, キシラナーゼ活性およびキシロシダーゼ活性が対照株と比較して約 0.2% および検出限界以下へとそれぞれ低下していた。

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。醤油麹菌ではデンプン分解酵素遺伝子群の発現は誘導発現因子,



第 1 図 *AoxlnR* 遺伝子破壊の模式図

H, N, S, Sm 及び X はそれぞれ制限酵素 *Hind* III, *Nru* I, *Stu* I, *Sma* I 及び *Xba* I を示す。pDisXR 100 を制限酵素 *Sph* I とともに *A. oryzae* KBN 6161-P 3 株に導入することによって, キシラン分解酵素活性の低下した SK 253 株が得られた。サザンブロット解析の結果, 3 コピーの pDisXR 100 が *AoxlnR* 遺伝子内に組み込まれていた。



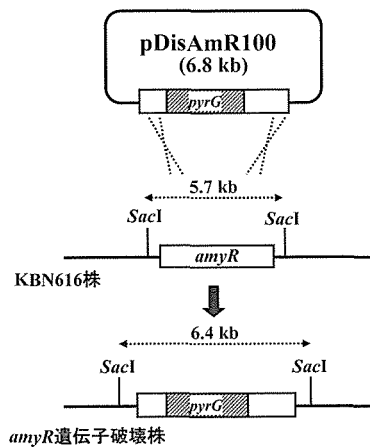
第 2 図 *AoxlnR* 遺伝子破壊株の取得

30°C で 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。タイトレーション株には 150 コピー以上の *xynFI* 遺伝子プロモーター部分が導入されており, AoXlnR タンパク質が過剰に存在する *xynFI* 遺伝子プロモーター部分に結合するためキシラン分解酵素活性が低下する。

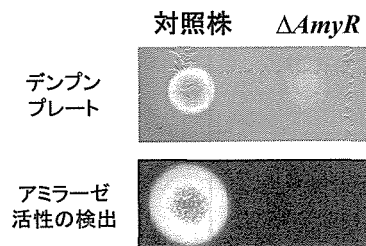
AmyR によって制御されている^{4,5)}。そこで、*amyR* 遺伝子の内部に麹菌 *pyrG* 遺伝子を組み込んだ *amyR* 遺伝子破壊用ベクター pDisAmR 100 で麹菌を形質転換し (第 3 図), *amyR* 遺伝子破壊麹菌 ($\Delta amyR$ 株) が取得された (第 4 図)⁶⁾。デンプンを炭素源とするポリペプトン培地での液体培養では、ポリペプトンを栄養源として生育することができるので、 $\Delta amyR$ 株は対照株と同様な生育を示した。しかし、 $\Delta amyR$ 株ではタカアミラーゼ、グルコアミラーゼおよび α -グルコシダーゼの各遺伝子の発現量が著しく低下し、 α -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第 1 表に示した。醤油麹における対照株、



第 3 図 *amyR* 遺伝子破壊の模式図



第 4 図 *amyR* 遺伝子破壊株の取得
デンプン最少寒天培地で 30°C, 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。

$\Delta AoxlnR$ 株および $\Delta amyR$ 株の生育はほぼ同程度であった。しかし、 $\Delta AoxlnR$ 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⁷⁾, *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 α -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、 α -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シダーゼ活性が 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

第 1 表 醤油麹における $\Delta AoxlnR$ 株及び $\Delta amyR$ 株の酵素活性

酵素活性 (units/g koji)	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
α -アミラーゼ	87.7	87.9	2.6
グルコアミラーゼ	4.59	4.68	ND
α -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

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。

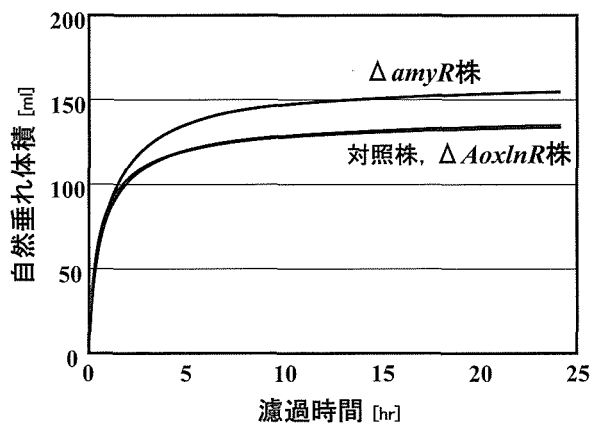
試醸醤油の成分分析値を第2表に示すが、総窒素量および窒素利用率は対照株、 $\Delta AoxlnR$ 株および $\Delta amyR$ 株の間で大きな差は認められなかった。色度は対照株の17番に対し、 $\Delta AoxlnR$ 株では19番、 $\Delta amyR$ 株では22番となっており、 $\Delta AoxlnR$ 株および $\Delta amyR$ 株を使用することによって着色を抑制することが可能であることが示された。低キシラン分解活性変異株および α -アミラーゼ低生産株による醤油の淡色化が報告されており^{8,9)}、得られた結果はそれを裏付けるものであった。 $\Delta AoxlnR$ 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、 $\Delta AoxlnR$ 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。 $\Delta AoxlnR$ 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

れ滓量が少ないことが示された。このような結果から、 $\Delta AoxlnR$ 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、火入れ滓が少な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始め、最終的に $\Delta amyR$ 株の液汁量は対照株および $\Delta AoxlnR$ 株の約1.2倍となった（第5図）。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らす可能性を示唆している。この結果から、

第2表 $\Delta AoxlnR$ 株及び $\Delta amyR$ 株により醸造された醤油の分析値

	対照株	$\Delta AoxlnR$	$\Delta amyR$
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
火入れ滓量 (ppm)	175	185	90



第5図 諸味の自然垂れ試験

$\Delta amyR$ 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、これまでに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%を大豆および小麦由来する多糖類が占めている¹⁰⁾。したが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、醤油麹菌のセルロース分解酵素遺伝子がクローニングされそれらの遺伝子構造の解析が行われた(第3

表)。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¹¹⁾、あるいは *TEF1* 遺伝子プロモーター¹²⁾ を用いてこれらのセルラーゼ遺伝子の高発現が試みられた。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¹³⁾ 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およ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¹⁴⁾。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 *TEF1* 遺伝子プロモーターを用いてセルラーゼ C 遺伝子¹⁵⁾、セルラーゼ D 遺伝子¹⁶⁾ およびセルラーゼ E 遺伝子¹⁷⁾ を高発現させた場合には、他の酵素活性に影響を与えずに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(第4表)¹⁸⁾。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持つプロテアーゼ、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。

麹菌のゲノム上には19個のセルラーゼ遺伝子が存在し、糖質加水分解酵素ファミリー5, 6, 7, 12 および61の遺伝子がそれぞれ4個, 1個, 3個, 3個および8個見出されている。*celA* 遺伝子はファミリー12、*celB* 遺伝子、*celC* 遺伝子および *celD* 遺伝子はファミリー7、*celE* 遺伝子はファミリー5に分類される。

第3表 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	239	416	465	454	333
(成熟タンパク質)	(223)	(399)	(440)	(437)	(306)
推定分子量	26,096	44,462	49,450	48,104	37,029
(成熟タンパク質)	(24,477)	(46,128)	(46,904)	(46,128)	(34,714)
N型糖鎖付加部位	2	8	3	2	2

第4表 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 koji)	対照株	TCC-93	TCD-48	E-1
全プロテアーゼ	589	525	540	472
LAP I	3,314	3,107	2,819	3,049
LAP II	0.491	0.575	0.604	0.435
α -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
エンドグルカナナーゼ	1.4	2.7	2.0	45.5
エキソグルカナナーゼ	11.8	31.6	14.6	16.9

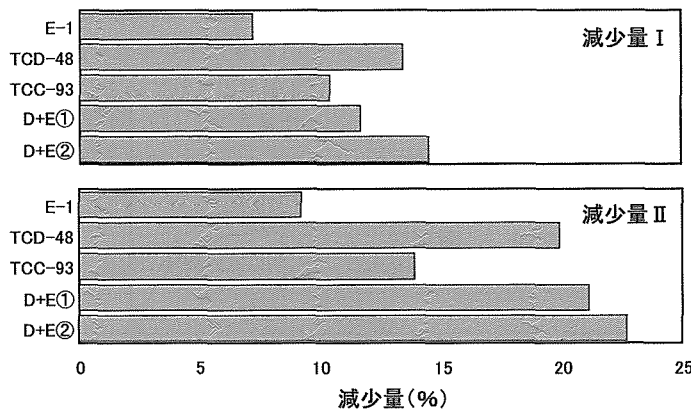
バイオマス糖化の観点からセルロース結合ドメインを持ったセルラーゼをコードする遺伝子を中心に高発現が試みられているが、一部のセルラーゼ遺伝子を除いて高発現化には成功していない¹⁹⁾。使用するプロモーター、あるいは、宿主として用いる麹菌などがセルラーゼ遺伝子の高発現化に重要であると考えられ、種々の試みが行われている。

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、液量あたりの粕減少量 II を第 6 図に示す。同一諸味量あたりの粕減少量 I、液量あたりの粕減少量 II はいずれの株でも減少しており、既に報告している TB1 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あたりでは 13.4%、液量あたりでは 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、TCD-48 株と E-1 株の混合使用を検討した。種麹接種時（各菌株 5×10^5 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



第6図 セルラーゼ遺伝子高発現麹菌の醤油粕減少量

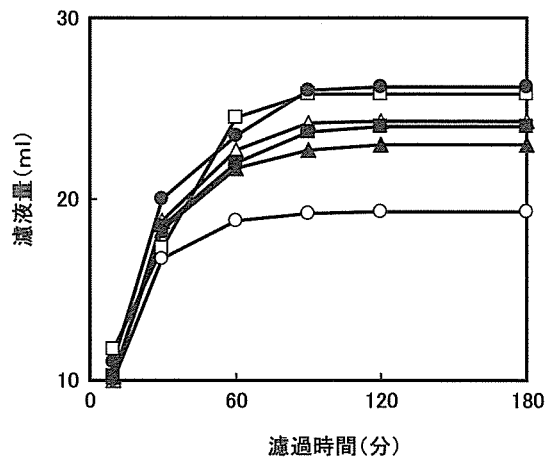
減少量 I は諸味 100 g あたりに発生する粕の減少量，減少量 II は濾液 100 ml あたりに発生する粕量の減少量を表す。TCD-48 と E-1 の種麹混合は D+E ①，TCD-48 と E-1 の麹混合は D+E ②と略した。

第5表 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	ΔA	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：OD 530，Glu：mg-グルタミン酸/ml，FN（ホルモール態窒素）：%，Alc：g-エタノール/100 ml



第7図 セルラーゼ遺伝子高発現麹菌を用いた醤油諸味の濾液量

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

ころ、同一諸味量あたりの粕減少量I、液量あたりの粕減少量IIはいずれの場合でもさらに減少しており、液量あたりでは麹混合で23.1%、種麹混合で21.1%の減少となった(第6図)。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。したがって、TCD-48株とE-1株との混合割合やTA 31株(セルラーゼA遺伝子高発現株)¹⁰⁾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第5表に示した。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。第7図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株の混合は麹区分、種麹区分ともTCD-48株単独使用を上回っていた。

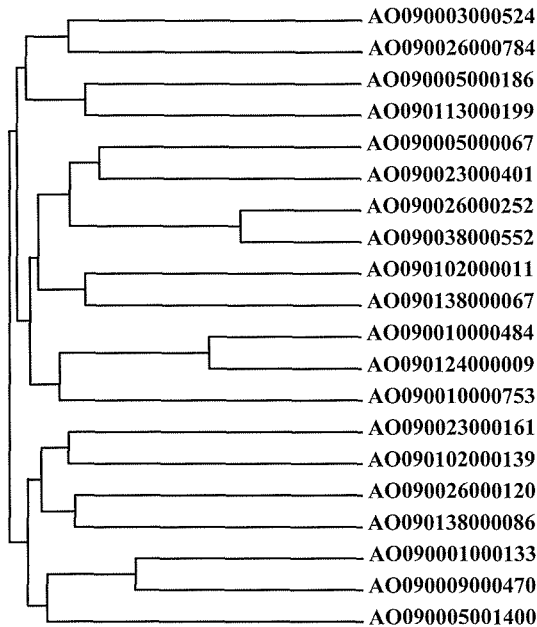
以上の結果から、セルラーゼ高生産麹菌の使用は圧搾作業時間の短縮、諸味充填量の増加、液汁歩合の向上など圧搾工程の改善にも有用である可能性が示唆された。

5. ペクチン分解酵素遺伝子高発現麹菌の取得

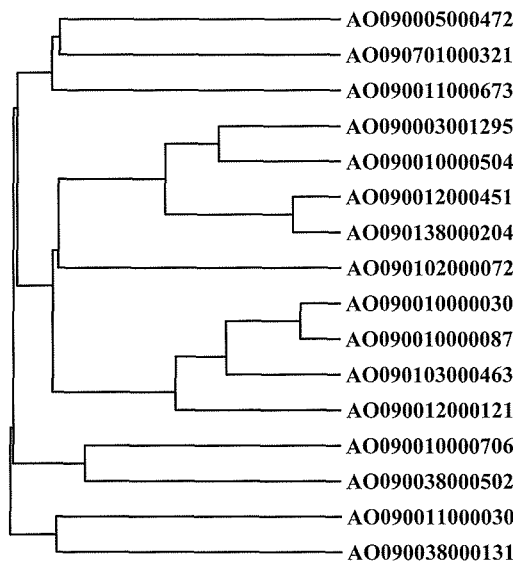
大豆多糖類の醤油麹菌酵素による分解特性と醤油諸味の難圧搾性についての一連の研究から、大豆多糖類の約30%を占める大豆ペクチンはその中の3分の2が酸性多糖類となって醤油中のコク、テリ等粘稠性関連物質となり、残りの3分の1が粕中の酸性多糖類となることが明らかとされている。大豆ペクチンに由来する酸性多糖類は17.5%の食塩溶液中でゲルを形成することが特徴的で、このことが醤油諸味の難圧搾性の主原因の一つとなっていると推測されている。そこで、醤油諸味の圧搾性の改善に向けた大豆ペクチンの分解率向上および醤油粕低減化という2つの観点から、醤油麹菌の5個のペクチン分解酵素遺伝子（2個のポリガラクトナーゼ遺伝子^{12,20)}、2個のペクチンリアーゼ遺伝子^{21,22)}、1個のペクチンメチルエステラーゼ遺伝子²³⁾）がクローニングされ、麹菌の強力なプロモーターである *TEFI* 遺伝子プロモーターを用いてこれらのペクチン分解酵素遺伝子の高発現が試みられた。ペクチン分解酵素遺伝子高発現麹菌は液体培養、固体培養のどちらにおいても高いペクチン分解酵素活性を示した。小仕込み試験の結果から醤油麹菌のペクチン分解酵素活性を高めることにより醤油諸味の粘度が大きく低下し、醤油諸味の圧搾性の改善に効果があることが明らかになった。しかし、醤油粕量の有意な低減効果は認められなかった。ペクチンは極めて複雑な構造を有する多糖類であるため、ペクチンの効率的分解には複数のペクチン分解酵素が必要であることを示唆しているかもしれない。

麹菌のゲノム上には5個のペクチンメチルエステラーゼ遺伝子、20個のポリガラクトナーゼ遺伝子（第8図）および16個のペクチン（ペクチン酸）リアーゼ（第9図）が見出されている。醤油麹菌のペクチン分解酵素活性はあまり高くないが、ペクチナーゼ製剤の生産菌として用いられている *Aspergillus niger* とほぼ同数のペクチン分解酵素遺伝子を麹菌は有している。このことは、麹菌が潜在的なペクチン分解酵素生産菌であることを示唆している。したがって、麹菌

のペクチン分解酵素の中から醤油粕に含まれる酸性多糖類分解の鍵となる酵素を特定することができれば、醤油粕量を大きく低減させることも十分期待できる。



第8図 麹菌のポリガラクトナーゼの系統樹



第9図 麹菌のペクチン（ペクチン酸）リアーゼの系統樹

6. おわりに

ku70 遺伝子破壊株を用いた高頻度相同組換え技術²⁴⁾、Latour 法によるゲノムからの遺伝子削除技術²⁵⁾などの新たな遺伝子操作技術が醤油麹菌においても開発されている。また、醤油麹中の麹菌分泌タンパク質のプロテオーム解析²⁶⁾や DNA マイクロアレイ解析による製麹工程における醤油麹菌遺伝子の発現プロファイリング²⁷⁾なども報告されている。今後、特定の性質だけを変化させた醤油麹菌のプロテオーム解析や DNA マイクロアレイ解析によって、麹菌多糖類分解酵素群を含めて麹菌酵素の醤油醸造における役割が解明されることを期待したい。

<愛知県産業技術研究所 食品工業技術センター>

参考文献

- 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) 野口祐司, 佐野元昭, 加藤雅士, 小林哲夫 : 第 6 回糸状菌分子生物学コンファレンス講演要旨集, 77 (2006)
- 3) 北本則行, 安田 (吉野) 庄子, 畑本修, 増田力 : 醬研, **32**, 33 (2006)
- 4) K. Gomi, T. Akeno, T. Minetoki, K. Ozeki, C. Kumagai and Y. Iimura : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 816 (2000)
- 5) K. L. Petersen, J. Lehmbeck and T. Christensen : *Mol. Gen. Genet.*, **262**, 668 (1999)
- 6) 北本則行, 安田 (吉野) 庄子, 畑本修, 増田力 : 醬研, **32**, 87 (2006)
- 7) J. Marui, N. Kitamoto, M. Kato, T. Kobayashi and N. Tsukagoshi : *FEBS Lett.*, **528**, 279 (2002)
- 8) 中田佳幸, 森下めぐみ, 橋本忠明, 辻安信 : 醸協, **94**, 346 (1999)
- 9) 渡部潤, 赤川巧, 山崎達雄, 浦哲二 : 醬研, **30**, 248 (2004)
- 10) 菊地忠昭 : 醬研, **3**, 154 (1977)
- 11) N. Tsukagoshi, M. Furukawa, H. Nagaba, N. Kirita, A. Tsuboi and S. Udaka : *Gene*, **84**, 319 (1989)
- 12) N. Kitamoto, J. Matsui, Y. Kawai, A. Kato, S. Yoshino, K. Ohmiya, N. Tsukagoshi : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 85 (1998)
- 13) N. Kitamoto, M. Go, T. Shibayama, T. Kimura, Y. Kito, K. Ohmiya and N. Tsukagoshi : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 538 (1996)
- 14) 北本則行, 吉野庄子, 和久豊 : 醬研, **25**, 55 (1999)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 北本則行, 安田 (吉野) 庄子, 山脇加奈子, 和久豊 : 醬研, **33**, 35 (2007)
- 19) 坂東弘樹, 久田博元, 石田博樹, 秦洋二 : 第 7 回糸状菌分子生物学コンファレンス講演要旨集, 65 (2007)
- 20) N. Kitamoto, T. Kimura, Y. Kito, K. Ohmiya, and N. Tsukagoshi : *FEMS Microbiol. Lett.*, **111** : 37 (1993)
- 21) N. Kitamoto, S. Yoshino-Yasuda, K. Ohmiya, and N. Tsukagoshi : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 209 (2001)
- 22) N. Kitamoto, S. Yoshino-Yasuda, K. Ohmiya, and N. Tsukagoshi : *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 378 (2001)
- 23) N. Kitamoto, H. Okada, S. Yoshino, K. Ohmiya, and N. Tsukagoshi : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 120 (1999)
- 24) 北本則行, 安田庄子 : 愛知産技研研究報告, **7**, 印刷中 (2008)
- 25) 北本則行, 安田 (吉野) 庄子 : 日本農芸化学会 2008 年度大会講演要旨集, 117 (2008)
- 26) 渡部潤, 赤川巧, 山崎達雄, 織田健, 坂本和俊, 山田修, 秋田修 : 日本農芸化学会 2006 年度大会講演要旨集, 84 (2006)
- 27) 真岸範浩, 橋本忠明, 岩下和裕, 濱田涼子, 古林万木夫, 三上重明 : 平成 20 年度日本生物工学会大会講演要旨集, 150 (2008)