麹菌リパーゼ高生産株の育種とみその試験醸造

醸造用麹菌は、種麹メーカーによって多くの品種が開発されている。みそ醸造用種麹もそれぞれの用途に適した品種が市販されているが、酒造用との品種に比べてそれほどバラエティーが多くないのが現状である。みそ醸造にも麹菌が主要な役割を果たしており、近年みそ醸造用に着目した麹菌品種の開発が行われるようになってきた。著者は、麹菌のリパーゼについて分子生物学的な研究を実施され、リパーゼ生産性の高い品種の開発に取り組んでこられた。そこで、麹菌の高リパーゼ生産性菌株の育種ならびにみそ醸造におけるリパーゼの作用とその重要性について解説していただいた。

戸井田 仁一

1. はじめに

みその生産量は微減傾向が続いているが、それに対し業界の「みそ健康づくり委員会」ではみその機能性に着目し、効能、健康イメージをPRすることにより、消費の拡大を図っている。みその様々な機能性、効能については海老根¹⁾や渡邊²⁾の総説などでまとめられており、機能性成分の同定、機能性成分の作用機構の解明、新たな機能性やその成分の探索といった基礎的な知見が蓄積されつつある。同時に基礎研究のみならず、こうした流れに合致し、健康志向に沿って機能性を強化した製品開発が求められている。その場合、食品であるからには当然のことながら官能的にも優れている必要がある。

著者らは、数あるみその機能性成分の中で、香味成分でもある脂肪酸や脂肪酸エチルに着目している。脂肪酸や脂肪酸エチルに関しては、山本らは脂肪酸³⁾、岡崎らは脂肪酸エチル⁴⁾を抗変異原性成分として報告している。また、上岡らは脂肪酸エチルをガン細胞増殖抑制成分であると報告している⁵⁾。一方、安平らは、脂肪酸エチル量がみその官能評価結果と相関があり、香りの基礎となっていると報告しており⁶⁾、官能的にも重要な成分であると考えられる。

みその脂肪酸や脂肪酸エチルは、発酵・熟成に伴う

脂質変化によって生じる成分である⁷⁾。大西らの報告のように脂肪酸エチルの生成には、リパーゼの作用⁸⁾、エステル化のためのエタノール⁹⁾が必要であり、発酵過程を経ない生鮮食品や加工食品にはほとんど含まれていないと考えられる。また、清酒や醤油といった他の発酵食品には脂質自体ほとんどあるいは全く含まれていない。このように、脂肪酸や特に脂肪酸エチルは、みそ以外の食品には含有量が非常に少ないと考えられ、みそに特徴的な成分として興味深い。

著者らは、みそ熟成中の脂質変化を担う麹菌リパーゼに関して基礎的な研究を行ってきた。酵素の精製及び諸性質を調べることにより、基質特異性等が異なる3種類の脂質分解酵素が存在することを明らかにした^{10,11)}。更にそれらの遺伝子のクローニング・シーケンス、微生物による酵素の発現などを行った¹²⁾。

一方、機能性を強化したみその開発という点では、渡辺らが種麹メーカー所有の保存株よりみその抗変異原性に基づく麹菌を選抜しており、その麹菌はリパーゼ活性が高く、それを利用したみそは脂肪酸含量が高く、抗変異原性が向上したみそになることを報告している¹³⁾。

本稿では、香味が優れ、機能性を高めたみそを開発することを目的とし、変異処理によってリパーゼ生産性を高めた麹菌を育種するとともに、それをみそへ利

用して試験醸造を行ったところ、官能的にも良好で、ガン細胞増殖抑制能が向上したみそとなった事例¹⁴⁾を紹介したい。

2. 変異処理による麹菌リパーゼ高生産株の育種

高活性で多様性に富んだ麹菌リパーゼ高生産株の取得を目指して、変異処理による育種を行った。変異株の親株として長野県工業技術総合センター保存株である *Aspergillus oryzae* KJ44 を使用した。この胞子に対し、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) により変異処理した。

リパーゼ高生産株は、0.1%NaNO₃, 0.1%KH₂PO₄, 0.05%MgSO₄・7H₂O, 2% ポリペプトン, 0.5% 酵母エキス, 0.5% オリーブ油, 1% ラウリン酸ビニル, 1% 胆汁末から成る選択用寒天培地により 30℃, 3 日程度培養した後、コロニー周辺のハローが大きな株を 1 次スクリーニングした。さらに、それらについて米 100g 程度を使用して小型シャーレ内で製麹試験を実施し、活性測定により 2 次スクリーニングした。麹のリパーゼ活性は、オリーブ油を基質とするアルカリ滴定法により測定した¹⁰⁾。その結果、親株である KJ44 の活性は 0.13U/g, 市販麹であるヒグチモヤシ BF-1 は 0.12U/g であるのに対し、0.41U/g と 3 倍程度に高生産する NT12 株を選抜した。

3. 製麹試験及びみその小仕込試験

麹菌リパーゼ高生産株の NT12 株を玄米に生育させ、胞子形成後ふるいにふるって胞子を集め、種麹とした。米を常法に従って処理し、小型自動製麹装置を用いて 37℃, 42 時間製麹した。製麹試験、仕込試験は実用的な観点から実用株と比較するため、味噌製造に広く使用され、先のシャーレ試験において KJ44 株と同程度のリパーゼ活性を有していたヒグチモヤシ BF-1 を対照株として用いた。NT12 株は対照株である BF 菌より製麹工程中全般的に生育が緩慢であり、麹の締まりは弱く、破精まわりもやや劣っていた。第 1 表に麹の酵素活性測定結果を示した。麹の分析は基準みそ分析法等^{10,15,16)}に従った。NT12 株は BF 菌に比べ、麹の pH が低く、生育が緩慢なため水分は高めであった。リパーゼ活性はシャーレでの製麹試験と同程度の約 3 倍、プロテアーゼは若干低めであり、キシラナーゼは約 2 倍であった。

小仕込試験は、第 2 表の配合（麹歩合 10 割、予定水分 48%, 予定塩分 12%）によりみそを仕込み、30℃, 60 日間熟成させた。熟成 60 日におけるみその成分分析結果及び官能評価結果を示した（第 3 表、第 4 表）。みその成分は、基準みそ分析法¹⁵⁾により分析した。

全般的に試験区と対照区の成分値は、それほど大きな差異はなかった。色について Y 値はほぼ同じだったのに対し、色のさを示す x や y がやや高めであ

第 1 表 麹の酵素活性

	pH	水分 (%)	リパーゼ (U/g)	プロテアーゼ (U/g)	キシラナーゼ (U/g)
BF	5.70	24.3	0.13	62	0.16
NT12	5.42	26.0	0.40	50	0.38

第 2 表 みその仕込配合

蒸煮大豆	5.2 kg
米麹	2.86 kg
並塩	1.24 kg
種水(酵母含む)	1.07 L
合計	10.4 kg

第 3 表 みその成分分析値(熟成 60 日)

	pH	水分 (%)	食塩 (%)	Y (%)	x	y	アルコール (%)	TN (%)	FN (%)	WSN (%)
BF	5.22	47.1	13.4	26.2	0.461	0.426	1.99	1.79	0.38	1.24
NT12	5.24	46.0	13.1	26.3	0.467	0.429	2.04	1.76	0.35	1.14

第 4 表 みその官能評価(5 点法, 対照区を 3 点とした相対評価)

	色	香り	味	組成	総合
BF	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
NT12	2.2	2.2	2.3	2.7	2.3

り、ホルモール窒素（FN）や水溶性窒素（WSN）の値が低めであった。窒素関連成分が低いのは、プロテアーゼがやや低い影響であると考えられる。

官能評価では試験区は総合的にやや良い評価を得た。色は成分値通りさえがやや強く、香りはやや特徴が感じられたものの良好であった。味は旨味不足のような窒素関連成分が低い影響は特には感じられず、組成とともに対照区とそれほど変わらない印象であった。色のさえが強いのはキシラナーゼなどのヘミセルラーゼの活性が高い影響であることが考えられる。

続いて熟成 60 日のみそより脂質をエーテル抽出し、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸及び脂肪酸エチル含量を定量した（第 1 図）。試験区のみそに含まれる全脂肪酸量は対照区よりやや低かったものの、全脂肪酸エチル量は 1.1 倍程度に増加していた。また、試験区は脂肪酸と脂肪酸エチルの合計量も若干増加していた。しかし、リパーゼ活性が 3 倍程度であることに比べると脂肪酸エチルなどの増加率は低い結果にとどまり、期待したほどの効果ではなかった。その原因はいくつか考えられるが、これは NT12 株がどのような種類のリパーゼを高生産しているのかと関連があると考えている。先に述べたように著者らは基質特異性が異なる 3 種類の麹菌の脂質分解酵素を確認している他に、石田らによる別のリパーゼに関する特許出願があり¹⁷⁾、麹菌ゲノム解析の結果でも存在が予測されているなど、多数のリパーゼが存在すると考えられる。今回の試験後の継続的な試験により、NT12 株の麹の酵素活性についてトリオレインに対してあまり作用していないデータが得られており、例えばこの NT12

はモノ及びジグリセリドリパーゼのようなリパーゼが主として高生産されている可能性がある。

一般的にみその脂質は熟成に伴い、リパーゼの作用によりトリグリセリドから脂肪酸、更に脂肪酸エチルへ変化する⁷⁾。NT12 株では最終的に脂肪酸エチルなどの含量を増加させる効果はそれほど高くなかったが、第 1 図の脂質組成を見ると、こうした脂肪酸から脂肪酸エチルへの脂質変化が促進されていると考えられる。

4. 試験醸造したみその機能性

試験醸造したみそより抽出した脂質について、抗変異原性及びガン細胞増殖抑制能を評価した。また、脂質に含まれる脂肪酸及び脂肪酸エチルの各成分の活性を調べるため、それらの市販試薬をあわせて評価した。

抗変異原性は、菌株を *Salmonella typhimurium* TA100（ヒスチジン要求性株）、変異原としてベンゾピレンを用いた Ames 試験のプレインキュベーション法により評価した。

その結果を第 2 図、第 3 図に示した。試薬の評価では、オレイン酸以外は脂肪酸、脂肪酸エチルともに不飽和度が上がるほど抗変異原性が増加し、リノレン酸エチル以外は脂肪酸エチルより脂肪酸の方が抗変異原性は高い傾向にあった。今回検討した試薬の中ではリノレン酸エチルが最も高い活性を示した。また、みそ抽出脂質の比較では、濃度によって多少異なるものの、全体的に試験区と対照区の抗変異原性はほぼ同程度であり、変異株による効果は認められなかった。これは、試験区のみそは抗変異原性の高い脂肪酸の含量が対照区より少なく、抗変異原性の低い脂肪酸エチルが 1.1

第 1 図 みその脂肪酸及び脂肪酸エチル含量

倍程度と多かったことから、結果的に両者の抗変異原性はそれほど変わらなかったと考えている。

ガン細胞増殖抑制能は上岡らの方法⁴⁾に準じて評価した。すなわち、ヒト肺扁平上皮ガン細胞 RERF-LC-AI に対し、脂質、L-ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC)、Tween80 からなる複合脂質膜を添加することにより、細胞増殖に与える影響を Cell counting kit-8 により評価した。試薬の活性は、ウェルあたりの添加濃度を $4\mu\text{g}/110\mu\text{l}$ として評価した。

その結果を第4図、第5図に示した。試薬の評価では、脂肪酸、脂肪酸エチルともに不飽和度が上がるほど増殖抑制能が増加し、オレイン酸エチル以外は脂肪酸より脂肪酸エチルの方が増殖抑制能は高い傾向にあった。リノレン酸エチルが最も増殖抑制能が高く、これらは上岡ら⁴⁾の報告と合致していた。みそ等からの

抽出脂質の比較では、コントロールである大豆油も添加量を増やすと増殖抑制能が増加していたものの、みそ由来の脂質は大豆油に比べ高い増殖抑制能を示していた。これはみその熟成に伴う脂肪酸や脂肪酸エチルの増加に起因すると考えられる。また、試験区と対照区の比較では試験区のみそは増殖抑制能がやや向上しており、変異株による効果が認められた。これは NT12 株のみそは脂肪酸が少なく、抑制能が高い脂肪酸エチルが多いためと考えられる。

5. おわりに

香味が優れ、機能性を高めたみそを開発することを目的とし、変異処理により麹菌リパーゼ高生産株を育種した。保存株である麹菌 *Aspergillus oryzae* KJ44 を変異処理、スクリーニングし、リパーゼ活性が対照

第2図 脂肪酸、脂肪酸エチル試薬の抗変異原性
変異処理液での試薬添加濃度： $0.1\text{mg}/720\mu\text{l}$

第3図 みそ抽出脂質の抗変異原性

第4図 脂肪酸、脂肪酸エチル試薬のガン細胞増殖抑制
ウェルあたりの試薬添加濃度： $4\mu\text{g}/110\mu\text{l}$

第5図 みそ等からの抽出脂質によるガン細胞増殖抑制

株の約3倍生産するNT12株を選抜した。

次いで、この変異株を用いて小仕込試験を実施し、みその品質や機能性を評価した。NT12株を種麹とするみその仕込試験においても、リパーゼ活性は対照株の約3倍であった。みその成分はxやyが高めで、FNやWSNの値が低めであった。官能評価では、色のさえが強く、香りはやや特徴が感じられたものの良好であり、総合的にもやや良い評価を得た。NT12株のみその全脂肪酸量は対照区よりやや少なかったものの、全脂肪酸エチルは1.1倍程度に増加した。NT12株のみそは対照区と比べ抗変異原性はほとんど変わらなかったが、ガン細胞増殖抑制能はやや向上しており変異株による効果が認められた。これらの機能性の結果は脂肪酸と脂肪酸エチルの含量の比率を反映した結果と考えられる。

なお、今回育種したNT12株については、その後工場規模での仕込試験を実施するとともに、県内メーカーの実醸造にも使用された。工場規模の仕込試験においても今回紹介した小仕込試験と同様な傾向のみそとなり、実醸造に使用したメーカーからも高評価を得た。

ただし、NT12株について、生育特性が劣ること、プロテアーゼはやや低めであること、活性に比べて脂肪酸や脂肪酸エチル含量の増加が少なかったことなどは今後の検討課題である。

ところで、変異処理による麹菌の育種は、清酒酵母の育種などの華々しい成果に比べるとまだまだ事例が少ない感がある。多核であるなど麹菌は酵母に比べると取り扱いが厄介で成果が出にくい。しかしながら、醸造・発酵の世界では1麹2もと3造り、あるいは1麹2糶3火入れなどと言われるように、麹が非常に重要であることは疑いの余地がない。麹菌の酵素生産性などの諸性質が発酵食品の品質に及ぼす影響を考えると、それに焦点を当てた育種は価値があり、実用化の可能性も大きいと思われる。麹菌の育種を通じて、多

様性に富む優れた発酵食品の開発に役立つことができれば幸いである。

＜長野県工業技術総合センター 食品技術部門＞

参考文献

- 1) 海老根 英雄：味噌の科学と技術，**43**, 1-26 (1995)
- 2) 渡邊敦光：醸協，**105**, 714-722 (2010)
- 3) 山本和子，大崎好子，加藤哲夫，西島基弘，宮崎利夫：味噌の科学と技術，**42**, 65-70 (1994)
- 4) 岡崎秀，秋葉美智子，木村修一：昭和59年度日本農芸化学会大会講演要旨集，1995, p636
- 5) 上岡龍一，後藤浩一，山内彰雄：醸協，**100**, 771-776 (2005)
- 6) 安平仁美：醸協，**75**, 506-515 (1980)
- 7) 大西邦男：醸協，**78**, 848-853 (1983)
- 8) 大西邦男：日食工誌，**29**, 85-92 (1982)
- 9) 大西邦男：日食工誌，**30**, 88-93 (1983)
- 10) J. Toida, K. Kondou, M. Fukuzawa, K. Ohnishi, J. Sekiguchi: *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1199-1203 (1995)
- 11) J. Toida, Y. Arikawa, K. Kondou, M. Fukuzawa, J. Sekiguchi: *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**, 759-763 (1998)
- 12) J. Toida, M. Fukuzawa, G. Kobayashi, K. Ito, J. Sekiguchi: *FEMS Microbiol. Lett.*, **189**, 159-164 (2000)
- 13) 渡辺隆幸，尾張かおる，堀 一之，高橋光一：日本食品科学工学会誌，**51**, 698-702 (2004)
- 14) 戸井田仁一，蟻川幸彦：長野県工業技術総合センター研究報告，**5**, F4-F7 (2010)
- 15) 全国味噌技術会編：基準みそ分析法 (1995)
- 16) 日本醤油研究所編：しょうゆ試験法 (1985)
- 17) 石田博樹，秦 洋二，川戸章嗣，秋田 修：特許公開 2002 - 186483