[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol.59, No.6, pp.605~611, 1985]

α -アミラーゼ低生産性麹菌の造成と醤油醸造への応用†

古屋 武, 野口勝美, 宮内謙吉, 内田一生

(ヤマサ醤油株式会社研究所)

昭和59年12月27日受理

Derivation of Mutants with Low α -Amylase Activity from *Aspergillus oryzae* (Studies on Breeding of *Aspergillus*. Part III)

Takeshi FURUYA, Katsumi NOGUCHI, Kenkichi MIYAUCHI
and Kazuo UCHIDA

Research Laboratories of Yamasa Shoyu Co., Choshi, Chiba 288

Mutants with low α -amylase activity were derived from *Aspergillus oryzae* in order to increase the utilization of carbohydrate in soy sauce production. A significant correlation was observed between the α -amylase activity in Koji culture and the consumption of carbohydrates. Several mutants with low α -amylase activity were selected by a primary screening test in which the clear zone on corn-starch agar was employed as a criterion. The α -amylase activity of mutants a32, a287 and a1304 was about 1:3, 1:20, and 1:150, respectively, compared with the activity of parent *Aspergillus oryzae* No.1065.

The consumption of carbohydrate during preparation of Koji by the mutants was from about 10 to 50 percent lower than that by the parent strain. The soy sauce manufactured by use of the mutants contained significantly higher amounts of compounds related to carbohydrate than that of the parent strain.
(Received December 27, 1984)

緒 言

醤油醸造用麹菌には主として *Aspergillus oryzae* と *Aspergillus sojae* が用いられており、両者は加水分解酵素の生産性⁽¹⁾ や醸造特性⁽²⁾ が異なっていることが報告されている。とくに *A. oryzae* は *A. sojae* に比べて α -アミラーゼ生産性が高く、製麹中の炭水化物消費量が多いことが特徴的である。原料の有効利用の観点からいえば、製麹中の炭水化物消費量は少ないほうが諸味に移行する炭水化物量が多くなり有利である。

これら醤油麹菌の育種は人工変異⁽³⁾ や交雑^(4,5) により行われてきたが、育種の主な目的は特定の酵素の生産性を増大させることにより歩止りの向上や成分の増強を図ることにあった。一方、清酒醸造に用いる麹菌の育種ではデフエリフェリクローム⁽⁶⁾、メバロン酸⁽⁷⁾ および酸性

カルボキシペプチダーゼ⁽⁸⁾ のように、製品の品質に負の影響を及ぼす物質の生産性が低い麹菌の造成が試みられてきた。

著者らは醤油醸造用麹菌の α -アミラーゼ生産性と炭水化物消費量について検討したところ、両者間に正の相関を認めた。そこで α -アミラーゼ低生産性変異株を造成し、醤油醸造への応用について検討したので報告する。

実験方法

1. 供試菌株 ヤマサ醤油研究所保存の醤油醸造用麹菌 62 株を用いた。 α -アミラーゼ低生産性変異株取得の親株には、そのうちの *A. oryzae* No.1065 を用いた。また、標準株として国税庁醸造試験所より分譲された *A. oryzae* RIB 609 および *A. sojae* RIB 1049 を用いた。

2. 培地 1次スクリーニング用にコーンスターチ

† 麹菌の育種に関する研究(第3報) 前報は文献(5), (9)参照。

0.6%, グルコース 1.0%, ポリペプトン 0.4%, KH_2PO_4 0.04%, K_2HPO_4 0.04%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.032%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.032%, 寒天 2.0% からなる平板培地 (pH 6.0) を使用した. 固体培養用には醤油原料培地⁽⁵⁾ を使用した.

3. 変異処理方法 既報⁽⁵⁾ に従って紫外線処理を行った.

4. 1次スクリーニング方法 分生胞子を紫外線処理 (死滅率約 99%) 後希釈して1次スクリーニング培地に播種し 28°C, 3日間培養した. コロニーの周辺にできるクリアーゾーンの小さい菌株を麹汁スラント (Bllg. 10°) に釣菌して培養, 保存し性質を検討した.

5. 酵素活性測定方法 醤油原料培地に 28°C, 72時間培養後 α -アミラーゼ活性⁽⁹⁾, プロテアーゼ活性⁽⁵⁾, グルタミンナーゼ活性⁽⁹⁾ を既報に従って測定した. グルコアミラーゼは岩野ら⁽¹⁰⁾ の方法を一部改変して測定した.

6. 走査電子顕微鏡観察方法⁽¹¹⁾ ツァベック培地のスラントに 28°C, 2週間培養して着生した麹菌の分生胞子をグルタルアルデヒドで固定し, エタノールにより脱水後炭酸ガス臨界点乾燥および金イオンスパッタリング処理を行い, 走査電子顕微鏡 (日本電子製, JSM-T 20) により倍率 10,000 倍で観察した.

7. 還元糖, エタノール, 乳酸, 全炭水化物および澱粉の定量方法 還元糖はレーン法⁽¹²⁾, エタノールはガスクロマト法⁽¹³⁾, 乳酸は高速液体クロマト法⁽¹⁴⁾, 全炭水化物および澱粉は基準しょうゆ分析法⁽¹²⁾ に記載の方法により定量した.

8. 生育速度および分生胞子数の測定方法 生育速度は麹汁平板培地 (Bllg. 10°) および醤油原料平板培地に 30°C, 96時間培養しコロニーの直径を測定した. 醤油原料平板培地は直径 9 cm のペトリ皿に脱脂大豆粉末 5 g と炒ごう割砕小麦 5 g をとり 14 ml の水を加えてペースト状とし 120°C, 40分間殺菌して調製した. 分生胞子数は 500 ml 容三角フラスコに麹 20 g をとり 14 ml 散水後 120°C, 15分間殺菌して1白金耳の分生胞子を接種し 28°C, 96時間培養後ヘマチトメーターで測定した.

9. 製麹および仕込試験方法 製麹試験に用いた装置を Fig. 1 に示した. 製麹は既報⁽⁵⁾ に従って行った. 麹の発熱量は以下の方法により測定した. すなわち, 麹層を通過する前後の空気のエンタルピーの変化を乾球温度および湿球温度から空気線図⁽¹⁵⁾ を用いて求め, 麹層を通過する空気流量と原料乾物量から原料乾物 1 kg 当

Fig. 1. Schematic Diagram of Koji Culture Apparatus Capable of Measuring Metabolic Heat. 1, fan; 2, cooler; 3, heater; 4, water; 5, air; 6, two-fluid nozzle; 7, air flow meter; 8, dry-bulb; 9, wet-bulb; 10, Koji bed; 11, recorder.

Fig. 2. Correlation between α -Amylase Activity and Carbohydrate Consumption in Various Strains of *Aspergillus*. The α -amylase activity was assayed according to the method described previously⁽⁹⁾ and carbohydrate was determined by the standard analytical method of soy sauce⁽¹²⁾. Carbohydrate consumption ratio was calculated by the following equation:

$$\text{Percentage of carbohydrate consumption} = \frac{A-B}{A} \times 100 (\%)$$

A, carbohydrate in raw material;

B, carbohydrate in Koji.

りの麹の発熱量を算出した.

仕込みは麹 10 kg を 24.5% 食塩水 15.2 l で直径 15 cm の円筒型塩化ビニル製容器に仕込み 15°C で 20 日間, 以後 28°C で行った.

Fig.3. Clear Zones on the Primary Screening Medium. Composition of the primary screening medium was shown in the text. The plates were incubated at 28°C for 3 days and the plates were treated with iodine solution in order to take distinct photographs.

Fig.4. Scanning Electron Micrographs of Conidia. The scale length in the figure was 10 μ m.

実 験 結 果

1. α -アミラーゼ生産性と炭水化物消費量

醤油醗造用麹菌 62 株について醤油原料培地を用いて 28°C, 72 時間フラスコ培養を行い, α -アミラーゼ活性と炭水化物消費率の関係を調べ Fig. 2 に示した. 両者間に有意(危険率 1%)の正の相関が認められ, α -アミラーゼ生産性の低い麹菌は炭水化物消費量が少ないことが判明した.

2. α -アミラーゼ生産性とクリアーゾーン

1. の結果から α -アミラーゼ生産能の異なる 4 株 No. 916 (4.50×10^5 unit/g), No. 1065 (2.09×10^5 unit/g), No. 824 (4.02×10^4 unit/g) および No. 74 (6.51×10^3 unit/g) を用いて 1 次スクリーニング培地上でコロニーの周辺にできる クリアーゾーンの大きさを比較した. Fig. 3 に示すように α -アミラーゼ生産性の低下とともにクリアーゾーンは小さくなり, クリアーゾーンを指標にすれば α -アミラーゼ低生産性変異株をプレート上で 1 次スクリーニングすることが可能であることが判明した.

3. α -アミラーゼ低生産性株の性質

No. 1065 を最初の親株として α -アミラーゼ低生産性

株 a 32 を取得し, 次に a 32 を親株として a 287 と a 1304 を取得した. これらの株の性質について以下に記載する.

(1) 加水分解酵素活性 変異株の α -アミラーゼ, グルコアミラーゼ, プロテアーゼおよびグルタミナーゼの活性を Table I に示した. α -アミラーゼでは No. 1065 に比べ a 32 は約 1/3, a 287 は約 1/20, a 1304 は約 1/150 に減少した. グルコアミラーゼは α -アミラーゼ活性の低い菌株のほうが高かったが, α -アミラーゼの場合のような顕著な変化は見られなかった. a 1304 ではプロテアーゼ活性がやや増加しグルタミナーゼ活性はやや減少したが, 他の株ではプロテアーゼとグルタミナーゼの変化は僅少であった.

(2) 分生孢子表面の状態 標準株, 最初の親株および変異株の分生孢子の走査電子顕微鏡写真を Fig. 4 に示した. No. 1065 および変異株の分生孢子の表面の状態は, 標準株の *A. oryzae* RIB 609 に類似していた.

(3) 生育速度, 分生孢子数, 乾物および炭水化物消費率 No. 1065 と比べ変異株の生育速度の劣化はいずれの培地でもほとんど認められなかった. 分生孢子数でも同様の傾向を示した. また, 醤油原料培地を用いたフラスコ培養 (28°C, 72 時間) の乾物および炭水化

Table I. Activities of Several Enzymes Produced by Mutants

Strain No.	α -Amylase ($\times 10^3$ unit/g)	Glucosylase ($\times 10^3$ unit/g)	Protease ($\times 10^3$ unit/g)	Glutaminase ($\times 10^1$ unit/g)
a 32	68.1	3.92	1.14	1.28
a 287	11.6	5.16	1.04	1.34
a 1304	1.4	6.39	1.61	1.04
1065	209	5.68	1.05	1.28

The strain a 287 and a 1304 were derived from the strain a 32 which had been derived from the parent strain *Aspergillus oryzae* No. 1065.

The glucosylase activity was assayed according to the Iwano's method⁽¹⁰⁾ with some modification, and the protease⁽⁵⁾ and glutaminase⁽⁹⁾ activities according to the method described previously.

Table II. Growth, Sporulation, Consumption of Dry Mass and Carbohydrate of Mutants

Strain No.	Growth (mm)		Sporulation ($\times 10^3$ /g)	Consumption ratio (%)	
	Koji extract medium	Shoyu Koji material medium		Dry mass	Carbohydrate
a 32	64.0	49.2	1.89	27.0	60.1
a 287	65.8	50.7	1.63	25.9	57.3
a 1304	66.5	51.0	1.66	21.8	46.5
1065	65.4	51.1	1.75	28.8	64.8

Growth is expressed in terms of the diameter of colonies cultured at 28°C for 4 days on the above indicated medium. Sporulation is expressed in terms of the number of conidia of wheat bran Koji cultured at 28°C for 4 days.

Table III. Shoyu Koji Culture in Pilot-Scale by Use of Mutants with Low α -Amylase Activity

Strain No.	α -Amylase ($\times 10^8$ unit/g)	Consumption ratio (%)		Metabolic heat		
		Dry mass	Carbohydrate	Maximum Age of culture (hr)	Value (kcal/kg·hr)	Total value (kcal/kg)
a 32	67.2	11.4	30.2	22.5	36.5	597
a 287	11.0	9.8	27.1	23.0	33.0	568
a 1304	2.0	7.3	15.7	24.0	31.5	389
1065	162	12.0	33.1	22.0	38.0	649

Metabolic heat was calculated by the following equation :

$$Q = \frac{G(t_2 - t_1)}{W}$$

Q : Metabolic heat of Koji (kcal/kg·hr).

t_1 : Enthalpy of supplied air (kcal/kg).

t_2 : Enthalpy of passed air (kcal/kg).

G : Mass velocity of air (kg/hr).

W : Dry mass of raw material (kg).

Table IV. Carbohydrate and Their Related Compounds in Shoyu Mash

Strain No.	Solution				Residue	
	Reducing sugar (A) (%)	Ethanol (B) (%)	Lactic acid (C) (%)	A + 2B + C	Carbohydrate (%)	Starch (%)
a 32	3.21	1.96	0.82	7.95	15.1	0.95
a 287	3.17	1.97	0.86	7.97	15.0	0.95
a 1304	4.56	1.88	0.89	9.21	15.7	1.00
1065	3.11	1.79	0.70	7.39	15.5	0.98

The reducing sugar and the starch were determined by the standard analytical method of soy sauce⁽¹²⁾. Ethanol and lactic acid were determined with a gas chromatography⁽¹³⁾ and a high-performance liquid chromatography⁽¹⁴⁾, respectively.

物消費率は α -アミラーゼ活性の低下とともに減少した (Table II).

(4) 製麹試験 α -アミラーゼ活性, 乾物および炭水化物消費率, 製麹中の発熱量を Table III に示した. α -アミラーゼ活性は No. 1065 に比べ a 32 は約 1/2.5, a 287 は約 1/15, a 1304 は約 1/80 となりフラスコ培養に比べ活性の減少割合は低下した. 乾物および炭水化物消費率はフラスコ培養と同様に α -アミラーゼが低下するに従って減少したが, 消費率はフラスコ培養に比べ約 1/2 以下にすぎなかった. α -アミラーゼが低下するにつれて発熱のピークの到来は遅れ, ピーク時の発熱量および全発熱量は減少した. 製麹中の変異株の生育状況や出麹の外観は No. 1065 と大差なかった.

(5) 仕込試験 仕込後 5 か月経過の諸味液汁成分 (T. N. 1.55% 当りに補正) と粕中の全炭水化物および澱粉量を Table IV に示した. 還元糖は a 1304 が最も多かったが他の株では No. 1065 と大差なかった. α -アミラーゼ低生産性株のエタノールおよび乳酸量は No. 1065 よりやや多くまた還元糖, エタノールおよび乳酸

量から算出した炭水化物由来の成分の量も No. 1065 と比べて a 32, a 287 は約 8%, a 1304 では約 25% 多くなった. 粕中の全炭水化物および澱粉量は No. 1065 と α -アミラーゼ低生産性株間で差は認められなかった.

考 察

醤油はその農林規格⁽¹⁶⁾ に全窒素分が含まれていることや歩止りを表すのに窒素利用率が用いられているように, その製造において窒素成分は最も重要な成分である. したがって醤油醸造用麹菌の育種, 改良においてもプロテアーゼ^(3,17), ペプチダーゼ⁽¹⁸⁾, グルタミンナーゼ⁽¹⁹⁾などの生産性を向上させる研究が大勢を占めてきた.

一方, 炭水化物は醤油の原料の約 50% を占めており⁽²⁰⁾ 醤油中の糖, アルコール, 有機酸およびそれらから導かれた変換物質などの炭水化物由来の成分は甘味や酸味などの呈味に貢献するばかりでなく, 香氣成分としても重要な役割を果たしている. しかし醤油醸造における炭水化物の有効利用に関する研究は窒素成分の場合に比べきわめて少なく, 麹菌の植物組織分解酵素⁽²¹⁾ や小

麦の焙炒法⁽²²⁾の研究などが行われているにすぎない。その原因としては炭水化物由来の成分が多岐にわたっており全量を把握することがかなり困難であること、それらの成分がアルコール分を除いては農林規格に含まれていないことなどが考えられる。原料処理法や菌株の改良による窒素利用率の向上に伴い諸味液汁中の全窒素は増加しつつあるが、その際製品の全窒素を一定に調整すると炭水化物由来の成分は含量が低下する。このような情勢下において炭水化物の有効利用について研究することは醤油産業にとって必須であると考えられる。

林ら⁽²⁾は *A. oryzae* が *A. sojae* に比べ製麴中の炭水化物消費量が多いことを報告している。醤油は伝統的な調味食品であり各メーカーにより風味や香気異なっており、その原因の1つに使用する麴菌の相違があげられる。麴中の麴菌の菌体量は 14~18%⁽²³⁾ にも達し、麴菌の生産物や自己消化物は風味や香気に重要な役割を果たしている。酵素の生産性や醸造特性を改良する場合に全く異なった系統の菌株を使用せず、同一の親株から誘導された変異株や交雑株を造成して使用するのはいこれらの理由によるものである。

著者らは原料中の炭水化物を有効に利用し、醤油中の炭水化物の成分を増加させる方法について検討した。麴菌の α -アミラーゼ生産性と炭水化物消費量の関係を調べたところ両者間に正の相関が認められた。これは原料の炭水化物の約 60% を占める澱粉⁽²⁰⁾ が麴菌によって利用される際に、最初に α -アミラーゼにより分解されるために低生産性株では炭水化物消費量が減少するものと推察される。

最初の親株である *A. oryzae* No. 1065 株では製麴中に原料中の炭水化物の約 33% が消費されたが、 α -アミラーゼ生産性が低下するに従って消費量が減少し、a 1304 では消費量が No. 1065 の約 1/2 となった。これらの株では製麴中の発熱量も減少し、通風製麴における堆積量の増加などの製麴管理上の有利な点も当然期待される。

α -アミラーゼ低生産性株は諸味中で澱粉の分解性が劣ることが懸念されたが、粕中の残存澱粉量は No. 1065 と差がなかった。この原因については、諸味中の澱粉の分解が長時間にわたって徐々に行われるため a 1304 のような低レベルでも活性の必要量を満たしているためと考えられるが、低生産性株においては同時に酵素系に変化が生じ分解の経路が異なっている可能性もあるので

今後検討したい。諸味中の炭水化物由来成分の増加による呈味や香気への影響についてはスケールアップ試験を行い検討する予定である。

要 約

(1) 醤油醸造用麴菌 62 株について α -アミラーゼ生産性と炭水化物消費量の関係を調べたところ両者間に正の相関が認められた。

(2) α -アミラーゼ低生産性株のスクリーニングを行い最初の親株である *A. oryzae* No. 1065 の約 1/3~1/150 の低生産性株を取得した。

(3) これらの α -アミラーゼ低生産性株のグルコアミラーゼ、プロテアーゼおよびグルタミナーゼ活性には α -アミラーゼのような顕著な変化は認められなかった。

(4) α -アミラーゼ低生産性株は製麴試験においても炭水化物消費量および製麴中の発熱量が少なかった。

(5) 諸味液汁中の炭水化物由来の成分が α -アミラーゼ低生産性株では 8~25% 増加した。粕中の炭水化物および澱粉量は最初の親株と差がなかった。

終りに臨み、実験を御指導いただきました東京大学名誉教授池田庸之助先生、東京大学教授齋藤日向先生に厚く御礼申し上げます。

本報告の概要は昭和 59 年度日本農芸化学会大会（東京）で発表した。

- (1) 寺田 勝, 林 和也, 水沼武二: 醬研, **6**, 75 (1980).
- (2) 林 和也, 寺田 勝, 水沼武二: 醬研, **7**, 166 (1981).
- (3) 井口信義: 農化, **29**, 73 (1955).
- (4) K. Uchida, C. Ishitani, Y. Ikeda and K. Sakaguchi: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **4**, 31 (1958).
- (5) 古屋 武, 石毛雅夫, 内田一生, 吉野 宏: 農化, **57**, 1 (1983).
- (6) 原 昌道, 管間誠之助, 本郷和男, 大場俊輝, 長谷川佳広, 村上英也: 醸工, **52**, 306 (1974).
- (7) 原 昌道, 管間誠之助, 村上英也: 醸工, **53**, 12 (1975).
- (8) 田中利雄, 岡崎直人, 五味勝也, 今野 宏, 井出光彦: 醸協, **79**, 274 (1984).
- (9) 佐々木正治, 内田一生, 吉野 宏: 農化, **58**, 463 (1984).
- (10) 岩野君夫, 風間敬夫, 布川弥太郎: 醸協, **71**, 383 (1976).
- (11) 坂口 弘: 「走査電子顕微鏡」, 日本電子顕微鏡

- 学会関東支部編，共立出版，1976，p.93.
- (12) 日本醤油技術会編集兼発行：「基準しょうゆ分析法」，1966，p.15，45.
- (13) 浜野光年，奥原 章，青山康雄，斉藤伸生：調味科学，**18**，No. 3，72 (1971).
- (14) 小倉 勝，吉田昭治，吉野 宏：醬研，**5**，114 (1979).
- (15) 井上宇市：「新版空気調和ハンドブック」，丸善，1967，p.19.
- (16) 農林水産省告示第288号，昭和55年3月7日付官報.
- (17) H. Sekine, S. Nasuno and N. Iguchi : *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1477 (1969).
- (18) T. Nakadai and S. Nasuno : *J. Ferment. Technol.*, **55**, 273 (1977).
- (19) S. Yamamoto and H. Hirooka : *J. Ferment. Technol.*, **52**, 564 (1974).
- (20) 福島男児，横塚 保：「新版醸造成分一覧」，日本醸造協会編集兼発行，1977，p.356.
- (21) 石井茂孝，菊池忠昭，大上忠男，横塚 保：農化，**46**，349 (1972).
- (22) 相羽富夫：醸協，**77**，698 (1982).
- (23) 小崎道雄，北原覚雄：日食工誌，**21**，28(1974).
-