

# 麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来耐塩性グルタミンナーゼの醤油醸造への応用

吉宗 一晃  
(産業技術総合研究所)

## 研究の目的

グルタミンナーゼは醤油の主要な旨味成分であるグルタミン酸を生成することから、醤油醸造において最も重要な酵素の一つである<sup>1)</sup>。しかし麹菌*Aspergillus oryzae*由来の既知グルタミンナーゼは醤油の様な高濃度食塩存在下でその活性が著しく低下する<sup>2)</sup>。醤油醸造中に高濃度食塩存在下でも活性が低下しない耐塩性グルタミンナーゼを添加すると醤油中のグルタミン酸濃度が高まる報告も有ることから<sup>3)</sup>、耐塩性グルタミンナーゼは醤油の高品質化等に有用であると考えられる。これまで我々は麹菌*A. oryzae* RIB40株のゲノムから新規グルタミンナーゼAoGlsを見出し、AoGlsが既知の麹菌由来グルタミンナーゼより高い耐塩性を有することを明らかにしている<sup>4)</sup>。本研究では耐塩性グルタミンナーゼAoGlsを含む麹菌*A. oryzae*由来グルタミンナーゼの醤油醸造への応用を目的としてそれら酵素の発現条件の検討を行った。

## 方法

*A. oryzae* RIB40株は独立行政法人酒類総合研究所より分与頂いた。培養は全て30°Cで行い、培地としてふすま培地(ふすまの等重量の0.17Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.2)を加えたもの)、麦芽エキス培地(1% malt extract, 0.1% 酵母エキス)もしくは、LB培地(1%ペプトン、0.5%酵母エキス、1%食塩)を塩酸もしくは水酸化ナトリウムで目的のpHに調整して用いた。

ふすま培地から菌体外酵素の抽出は等重量の10mM トリス(pH9.0)を加え、4°Cで一晩攪拌後、ガーゼでろ過後、遠心分離後の上清を酵素液とした。麦芽エキス及びLB寒天培地から菌体内酵素の抽出は寒天培地上にセロハンを載せ培養し菌体を回収した。この菌体を液体窒素で凍結させ、等重量の海砂及び10mM トリス(pH9.0)を入れ良くすり潰した。遠心後の上清を菌体内酵素とした。

グルタミンナーゼ活性は100mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)、30mM L-グルタミンを含む反応液に酵素溶液を加え、30°C、10分反応後、3分間煮沸により反応を停止し、反応液中のL-グルタミン酸濃度をグルタミン酸脱水素酵素(GIDH)を用いて定量した<sup>5)</sup>。1分間に1  $\mu$ molのL-グルタミン酸を生成するのに必要な酵素量を1Uとした。比活性はタンパク質1mgあたりの単位数で表した。タンパク質濃度の定量はBCA protein assay kit(PIERCE社)を用いて行った。

*A. oryzae* RIB40株由来酵素のAoGlsの検出にはウエスタンブロット法を用いた。抗原は精製したヒスチジンタグ結合型AoGlsを用い、ウサギからAoGls抗体を得た(北海道システムサイエンス社)。*A. oryzae*由来酵素をSDS-PAGEで分離後、電気的に転写したPVDF膜にAoGls抗体を一次抗体、イミュンスターGAR(Bio-Rad社)を二次抗体とし

てイミュンスターHRPケミルミネセントキット(Bio-Rad社)を用いてHyperfilm ECL (GEヘルスケアバイオサイエンス社)に感光させ、AoGlsの存在を確認した。

## 結果

### 1) 菌体外グルタミナーゼ

*A. oryzae* RIB40株を培養したふすま培地を10mM トリス(pH9.0)で抽出した液からは5mU/mgの活性が検出された。この菌体外グルタミナーゼは不安定で、安定pH(9.0)においても4°Cで24時間放置すると残存活性は76%となった。この酵素をQ-セファロース及びブチルトヨパールで部分精製すると安定化し4°Cではほとんど失活しなくなった。このことから*A. oryzae* RIB40株の菌体外グルタミナーゼはその菌体外プロテアーゼ等により容易に分解されることが予想される。一方、麦芽エキス及び、LB液体培地の*A. oryzae* RIB40株培養液からはグルタミナーゼ活性は検出されなかった。グルタミナーゼ活性は上記培地のpHを5,7及び9にしても活性は検出されず、50mM L-グルタミンを上記培地に添加しても検出されなかった。液体培地ではグルタミナーゼがプロテアーゼにより分解されやすく、その活性が検出されないことも考えられた。

### 2) 菌体内グルタミナーゼ

菌体内グルタミナーゼの比活性は菌体外グルタミナーゼの場合と比較してやや高かった。麦芽エキス寒天培地(比活性1mU/mg以下)よりもLB寒天培地で高い活性が見られ、LB寒天培地ではpH5(11mU/mg)及び7(10mU/mg)よりもpH9(16mU/mg)で高い比活性が得られた。この菌体内酵素30 $\mu$ gに対してウエスタンブロット法によりAoGlsの有無を調べたところ、AoGlsは検出されなかった。今回のウエスタンブロット法では*Escherichia coli*に発現させた10ngの組換えAoGlsが検出できたことから、LB寒天培地で培養した*A. oryzae* RIB40株の菌体内酵素30 $\mu$ g中にAoGlsは10ng以下で有ることが示された。AoGlsの比活性を増尾らの報告と同じ730U/mgと考えた場合<sup>6)</sup>、LB寒天培地で培養した*A. oryzae* RIB40株菌体内で主なグルタミナーゼ活性を有するタンパク質はAoGlsではないことが示唆された。AoGlsは耐塩性グルタミナーゼであることからAoGlsの発現条件の検討が必要である。また組換えAoGlsに対する抗体が*A. oryzae* RIB40株のAoGlsと反応しないことも考えられるため、今後さらなる検討が必要である。

## 結論

*A. oryzae* RIB40株の菌体内及び菌体外グルタミナーゼの誘導条件検討、特に耐塩性グルタミナーゼAoGlsの誘導条件検討を行った。ふすま培地で培養した時に菌体外グルタミナーゼ活性が得られたが、今回試みた液体培地で培養した際にはグルタミナーゼ活性を得ることが出来なかった。LB寒天培地(pH9.0)で培養した*A. oryzae* RIB40株の菌体内グルタミナーゼ活性は16mU/mgであったが、ウエスタンブロッティング法でAoGlsの存在を確認できなかった。今後、AoGlsの誘導培養条件をさらに検討する必要がある。

## 文献

1) R. Nandakumar, K. Yoshimune, M. Wakayama, M. Moriguchi, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **23**,

87-100 (2003)

2) T. Yano, M. Ito, K. Tomita, H. Kumagai, T. Tochikura, *J. Ferment. Technol.*, **66**, 137-143 (1988)

3) M. Wakayama, T. Yamagata, A. Kamemura, N. Bootim, S. Yano, T. Tachiki, K. Yoshimune, M. Moriguchi, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 383-390 (2005)

4) N. Masuo, K. Yoshimune, K. Ito, K. Matsushima, Y. Koyama, M. Moriguchi, *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 576-578 (2005)

5) K. Yoshimune, R. Yamashita, N. Masuo, M. Wakayama, M. Moriguchi, *Extremophiles*, **8**, 441-446 (2004)

6) N. Masuo, K. Ito, K. Yoshimune, M. Hoshino, K. Matsushima, Y. Koyama, M. Moriguchi, *Protein Expr. Purif.*, **38**, 272- 278 (2004)