

# 製麴中における過剰な発酵熱発生メカニズムの解明

水谷 治  
琉球大学 農学部

## 研究の目的

黄麴菌や黒麴菌は、製麴時に多量の糖質分解酵素によって澱粉を分解し、分解産物をエネルギー源として利用している。一方で、製麴中の麴の特徴として多量の熱を発生することが一般的に知られており、麴菌の生育や酵素生産の観点から品温管理が醸造の現場では重要となっている。麴菌の生育に適した温度は 30°C 付近であるのに対して、製麴では最高品温が 40°C を超える。この温度は澱粉分解酵素の発現温度帯であることから利点となるが、麴菌の死滅が 40°C 付近から始まるため、この品温が長時間続くことは麴菌生育の観点からは欠点といえる。麴菌の発酵熱は品温管理を行わなければ、菌自身が生育できない温度に達し、明らかに過剰となる。しかしながら、この過剰な発熱メカニズムは未だ不明となっており、このメカニズムの解明は、発酵分野における新しい知見をもたらす可能性があると思われる。そこで本研究では、製麴中における過剰な発酵熱を引き起す原因遺伝子の同定を目的として、発芽時に雪を溶かすザゼンソウなどの植物で発熱に関与していると報告されている代替酸化酵素 (Alternative Oxidase : Aox) (図 1A) に焦点をあて、麴菌 Aox と発酵熱との関係を明らかにすることとした。

## 方法

*Aspergillus niger* における既知の *aoxA* をテンプレートに黄麴菌、黒麴菌ゲノムより検索し、それぞれ *AoaoxA*, *AlaoxA* と命名した。それぞれの遺伝子に対して、相同組換え効率が上昇した株、*AoΔligD* 及び *AlΔligD* 株<sup>1,2)</sup> を宿主に破壊株の造成を行った。また、黄麴菌では、*AoaoxA* 過剰発現株も造成した。得られた破壊株や過剰発現株に対して、製麴を行い、品温経過を観察した。しかしながら、手入れによる温度変化が激しく、*aoxA* 遺伝子が発熱に関与しているかはわからなかった。そこで、延伸多孔質ポリテトラフルオロエチレン (ePTFE) 膜を用いた無通風箱培養法<sup>3)</sup> を参考に手入れをせずに品温をモニタリングする方法を構築した。

## 結果

### 1. 麴菌 *aoxA* 遺伝子破壊株の造成と表現型解析

代替酸化酵素 Aox が麴菌において発酵熱に関与するかを調べるために、黄麴菌 *aoxA* 遺伝子破壊株 ( $\Delta aoxA$ )、*aoxA* 過剰発現株 (OE*aoxA*)、黒麴菌 *aoxA* 遺伝子破壊株を造成した。破壊した遺伝子が Aox 活性を失っているかを調べるため、シアン等の呼吸活性阻害剤下で破壊株の表現型を観察した。通常、ミトコンドリア電子伝達

系の複合体酵素阻害剤存在下では、呼吸が阻害されるが、Aox が存在すると、代替酸化酵素として働き、生育が可能となる。複合体 IV 阻害剤であるアジ化ナトリウムに対して、*aoxA* 破壊株群の表現型を観察した結果、*AoΔaoxA*, *AlΔaoxA* とともに感受性を示した (図 1B)。このことから、本遺伝子は Aox 活性を有することが示唆された。一方、*AoΔaoxA* 株を用いて、活性酸素ストレスや低温、高温ストレス等の環境下で親株との表現型の違いを調べたが、親株と比較してその違いは観察されなかった。

## 2. *aoxA* 遺伝子破壊株を用いた製麴試験

*aoxA* 遺伝子が発酵熱に関与しているかを調べるために、黄麴菌、黒麴菌の *aoxA* 破壊株及び、黄麴菌 *aoxA* 過剰発現株の製麴試験を行った。無痛風箱培養と小型温度データロガーを用いたシステムにより手入りをせずに品温経過を観察した。その結果、黄麴菌 *aoxA* 破壊株、過剰発現株では親株とほぼ同様な品温経過を、黒麴菌 *aoxA* 破壊株においても破壊株の方が、品温経過が若干高くなる傾向が見られたが、48 h の出麴時には親株と同程度の品温であった (図 1C)。一方、得られた各株の米麴の酵素力価を測定した所、親株と比較して大きな変化はなかった。

## 結論

以上より、麴菌の Aox が発酵熱に関与しているというデータは、現在のところ得られなかった。この結果は、糸状菌の Aox は、シアン耐性呼吸には関与するものの、植物のものとは異なり、発熱には Aox 以外の因子が関与している可能性が考えられた。今後は、固体発酵において *AlaoxA* 遺伝子が黒麴菌の有機酸代謝に与える影響を調べつつ、新たな発酵熱に関与する遺伝子の探索を行っていきたい。

## 文献

- 1) Mizutani, O., *et al.* (2008) A defect of LigD (human Lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene-targeting in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **45**: 878-89.
- 2) Takahashi, T., Mizutani, O., Shiraishi, Y., Yamada, O. (2011) Development of an efficient gene-targeting system in *Aspergillus luchuensis* by deletion of the non-homologous end joining system. *J. Biosci. Bioeng.* **112**: 529-34.
- 3) Ito, K., Gomi, K., Kariyama, M., Miyake, T. (2017) Quantitative evaluation of haze formation of koji and progression of internal haze by drying of koji during koji making. *J. Biosci. Bioeng.* **124**: 62-70

## 謝辞

ePTFE 膜を分与して頂いた伊藤一成博士に心より感謝申し上げます。

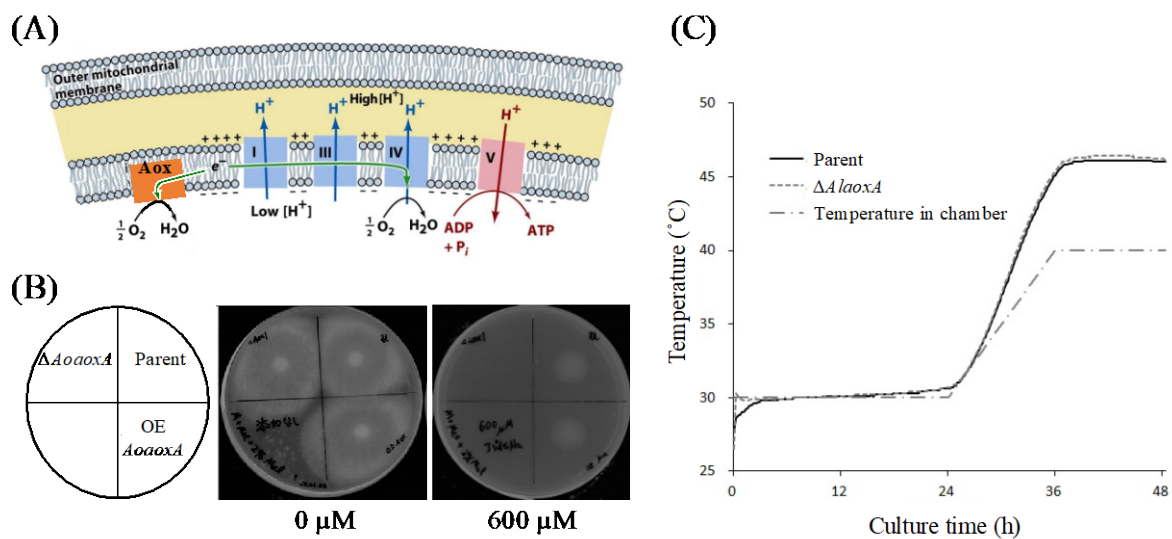


図 1. 代替酸化酵素の模式図と研究結果

(A). 代替酸化酵素 (Aox) のミトコンドリア内での局在と役割を示した模式図。

(B) *AoxA* 破壊株及び過剰発現株のアジ化ナトリウム存在下における表現型。

(C) *AoxA* 破壊株における製麹時の品温経過。