

「味噌玉麴中の主要なホスファターゼを特定しました」

1. だし入り味噌と酵素ホスファターゼ

現在の味噌市場では「だし入り味噌」が主流となっており、味や風味の点でより品質の高いだし入り味噌の開発が求められています。生味噌にはだしを分解する酵素が活きた状態で含まれているため、だし入り味噌製造では生味噌を高温加熱して酵素を失活させる必要があります。もし高温加熱をせずにだし入り味噌を製造することが出来れば、味や風味の向上した製品開発が可能となり、加えてエネルギー経費削減の点でも大きなメリットがあります。

平成 21~23 年度に（独）農研機構 食品総合研究所、(株)ビオック、ナカモ(株)、当センターの 4 機関が共同で「麴菌ホスファターゼ生産機構の解明による低コスト省エネルギー型味噌製造技術の開発」を行いました（資料 1）。その中で当センターはだしを分解する麴菌由来の酵素ホスファターゼの解明に取り組み、味噌麴中の最も主要なホスファターゼを特定することに成功しました。

2. どのようにホスファターゼを特定したか

味噌麴中の最も主要な麴菌ホスファターゼは以下の 4 ステップで特定しました。

- (1) ターゲットとする遺伝子だけを確実に破できる味噌用麴菌の実験ツールを作製した。
- (2) かび由来の有名なホスファターゼと構造が似ている遺伝子をゲノム情報データベースから探して 13 個（A~M）を見出した。
- (3) (1)の味噌用麴菌を使って(2)の遺伝子の破壊株（ ΔA 株~ ΔM 株）を作製した。
- (4) 破壊株（ ΔA 株~ ΔM 株）を用いてフラスコ味噌麴（味噌玉麴と米麴）（図 1）を作製し、ホスファターゼ活性の変化を調べた。

（図 2）

その結果、 ΔC 株で作製した味噌玉麴中にはホスファターゼ活性が約 5%まで大幅に低下しました（図 2A ΔC 左側バー）。つまり、味噌玉麴中ではホスファターゼ C が主要なホスファターゼであると考えられました。一方、 ΔC 株で作製した米麴ではホスファターゼ活性はほとんど低下しませんでした（図 2B ΔC 左側

バー）、だし成分の分解活性（イノシン酸脱リン酸活性）を測定すると、約半分に低下していました（図 2B ΔC 右側バー）。このことから、①麴菌は複数種類のホスファターゼを生産すること、②味噌玉麴と米麴では生産されるホスファターゼの種類と構成割合が異なること、③中でもホスファターゼ C はイノシン酸分解活性が高いこと、が示唆されました。

3. ホスファターゼ C の性質

遺伝子破壊の手法によって、ホスファターゼ C が味噌玉麴中の主要なホスファターゼであると考えられました。そこで、ホスファターゼ C を大量生産する菌株を作製し、ホスファターゼ C の性質を調べました。その結果、分子量は 69.0 kDa で、至適 pH は 4.5、至適温度は 50°C でした。酵素が安定な範囲は pH 3.5~ 6.5、温度 25°C 以下でした。ホスファターゼ C はだし成分のイノシン酸およびグアニル酸に対する脱リン酸化活性が非常に高いことを明らかにしました。また、既に明らかにしたホスファターゼ A とは異なり、フィチン酸に対しては脱リン酸化活性を全く示さないことを明らかにしました（資料 2）。

4. 事業全体の成果

食総研と(株)ビオックは、米麴中と味噌玉麴中の転写産物を調べ、麴菌ホスファターゼの発現様式が異なることを明らかにしました。そしてリン酸添加とホスファターゼ C 破壊株の組み合わせで、だし成分の分解性が極めて低い米味噌製造技術を開発しました（資料 3）。

(株)ビオックは保有株のスクリーニングと紫外線照射によりホスファターゼ低生産変異株を取得し、これを用いてナカモ(株)が豆味噌の試験醸造を行いました。その結果、変異株を用いた豆味噌ではホスファターゼ活性が低下しており、ホスファターゼ失活のための条件を低温かつ短時間にするのが可能でした。そして加熱殺菌時に発生する廃棄味噌を大幅に削減、昇温および温度維持に必要なエネルギーも削減できることが判明しました。

酒やパン、納豆などの発酵食品では、製品改

良のための知見を得るツールとして微生物の遺伝子破壊・高発現の実験系が活用されています。当センターは味噌の麹菌実用株における遺伝子破壊の実験系を確立し、味噌玉麹中の主要なホスファターゼを特定することが出来ました。今後も本技術を生かして業界の未解決課題への取り組みを進めたいと考えています。

資料

1 : あいち産業科学技術総合センター食品工業技術センターニュース平成 24 年 9 月号

(http://www.aichi-inst.jp/shokuhin/other/up_docs/news1209-2.pdf)

2 : Yoshino-Yasuda S. *et al.*, Characterization of acid phosphatase (AphC) from the *miso koji* mold, *Aspergillus oryzae* KBN630: AphC is mainly responsible for both acid phosphatase activity and 5'-IMP dephosphorylation activity in soy bean-*koji* culture. *Food Sci. Technol. Res.*, **20**, 367-374. 2014.

3 : Marui J. *et al.*, Reduction of the degradation activity of umami-enhancing purinic ribonucleotide supplement in *miso* by the targeted suppression of acid phosphatases in the *Aspergillus oryzae* starter culture. *Int J Food Microbiol.* **166**: 238-243. 2013



図 1 フラスコ味噌玉麹（左）と米麹（右）の例

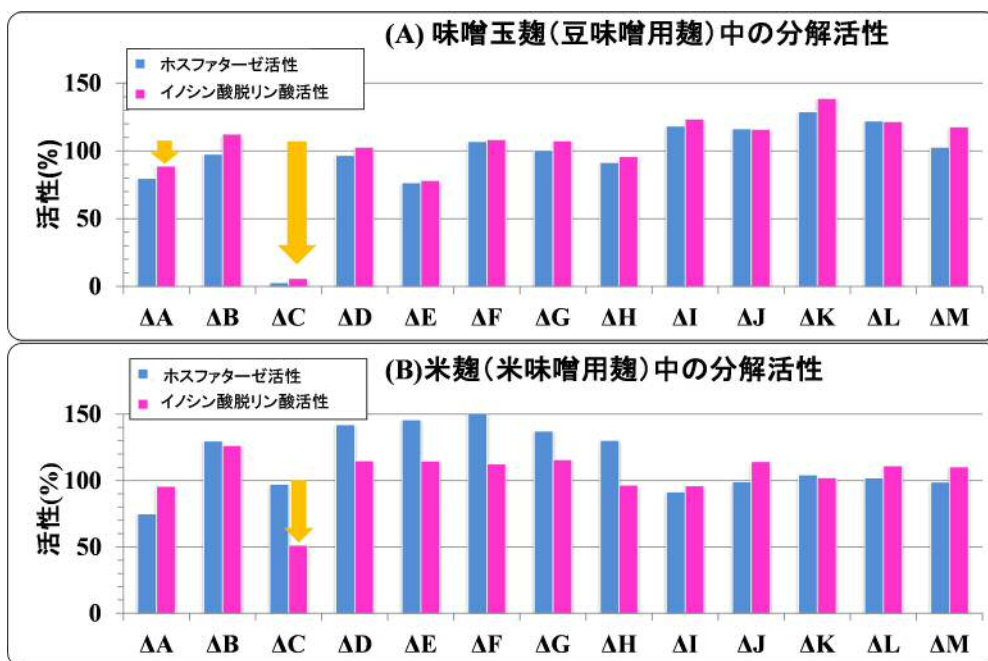


図 2 破壊株で作製したフラスコ味噌麹の活性変化

発酵バイオ技術室：安田庄子

研究テーマ：味噌・醤油用麹菌の解析と育種、有用微生物の食品への利用

担当分野：発酵調味食品の製造技術、バイオテクノロジー