

耐塩性 γ -グルタミルトランスペプチダーゼをグルタミナーゼとして 醤油醸造時に添加することによる呈味性改善法の開発

鈴木秀之・木嶋恭子

京都大学大学院生命科学研究科

Improvement of Taste of Soy Sauce by the Addition of Salt-Tolerant γ -Glutamyltranspeptidase as Glutaminase During its Fermentation

Hideyuki SUZUKI and Kyoko KIJIMA

Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8502

ABSTRACT

Glutaminase of *Aspergillus oryzae* is not salt-tolerant and there is almost no remaining activity in the presence of 18% salt. Therefore, not all glutamine released from soy protein during soy sauce fermentation is converted to glutamic acid which is the critical amino acid for its taste, but some are converted to tasteless pyroglutamic acid spontaneously. γ -Glutamyltranspeptidase (GGT) has glutaminase activity and GGT from *Bacillus subtilis* is quite salt-tolerant. The effect of the addition of *B. subtilis* GGT to soy sauce fermentation was investigated. Without the addition of GGT, 70 mM glutamic acid was accumulated after 4 months of fermentation, while 95 mM glutamic acid was found by the addition of 1 U/1.4 L GGT. Taste of soy sauce was evaluated after 6 months of fermentation. It was found that difference of 25 mM glutamic acid in soy sauce was difficult to distinguish and that more than 50 mM difference was required. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 35-38, 2005.

Key words : γ -glutamyltranspeptidase, glutaminase, salt-tolerant, soy sauce

醤油醸造時において、大豆たん白質は麹菌である *Aspergillus oryzae* や *sojiae* の作るプロテアーゼによってペプチドに、次いでペプチダーゼによってアミノ酸にまで分解され、呈味性に寄与する。醤油のうま味は主としてグルタミン酸の量によって決まるとされている。グルタミンはグルタミナーゼによって加水分解されてグルタミン酸になり、うま味に寄与する。しかし、

グルタミナーゼ活性が十分でないと、グルタミンは化学的に環化して、無味あるいは微酸味を呈するピログルタミン酸になってしまい、せっかくうま味となるべきものを失ってしまうことになる (Fig. 1)。醤油醸造は、雑菌の増殖を防ぐために、18% (3 M) の食塩存在下、pH 5.5で行われる。このような、高濃度の食塩存在下においては、麹菌のグルタミナーゼは強く阻害されている。そこで、耐塩性のグルタミナーゼを培養の容易なバクテリアから見つけだし、醤油諸味に添加

* 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

しようという試みが行われている。しかし、食品に使える細菌のグルタミナーゼで耐塩性のものはなかなかない。

γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) は、 γ -グルタミル化合物の γ -グルタミル基を他のアミノ酸などへ転移して新しい γ -グルタミル化合物を生成する転移反応と、その γ -グルタミル結合を加水分解する反応を触媒する酵素である (Fig. 2)。したがって、加水分解反応において基質がグルタミンであれば、反応はグルタミナーゼ反応である。私たちはバチルス属細菌のGGTが耐塩性であることを見出した。*Bacillus subtilis* 168株はゲノムプロジェクトによりゲノムの全塩基配列が分かっていること、この株では遺伝学的手法が確立していることから、本研究ではこの株のGGTを醤油醸造時に添加して、この効果を検討した。

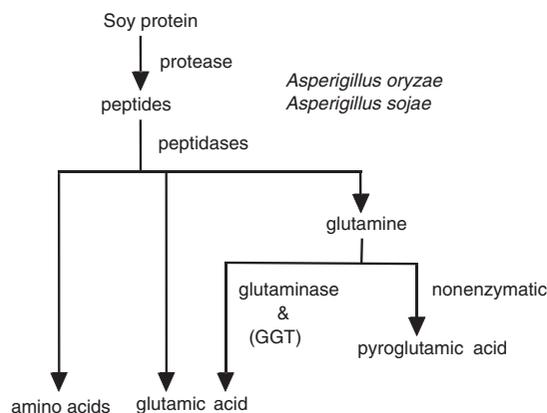


Fig. 1. Digestion of soy proteins and the related enzymes during the fermentation of soy sauce.

方 法

酵素の調製

*B. subtilis*のGGT遺伝子をプラスミドベクター上にクローニングし、GGTの発現抑制が解除された変異株に移したGGT高生産株 (MH2308株) から、*B. subtilis*のGGTを精製した。*B. subtilis*のGGTは菌体外酵素であるため、高発現株の培養上澄からすでに報告した方法²⁾に従って精製した。ただし、ギガバイトとQ-セファロースカラムを用いた。一方、転移活性を失った変異酵素D445Aは、この変異遺伝子を持つ組み換え大腸菌株 (MH2288株) のペリプラズミックフラクションから³⁾、野生型酵素と同様にギガバイトとQ-セファロースカラムを用いて精製した。

醤油の醸造方法

醤油醸造は、手造り醤油キット (マルキン製) を用いて行った。使用した7樽のロットはすべて同じになるよう購入した。水に浸漬した後煮沸した大豆と炒った後に割砕した小麦を混合し、種麴を混ぜて30℃で約45時間加湿・加温して製麴したものを乾燥させ、水分10%以下にしたものが、醤油麴としてキットに含まれていた。

容器 (樽) の中にミネラル塩300 gと水1.4 Lを入れて溶かし、食塩濃度21.4%の食塩水を作った。食塩水に醤油麴を入れ、よくかき混ぜ、19℃に室温を調整した部屋に静置した。

仕込みの翌日、精製した*B. subtilis*由来の野生型および変異型GGTを添加した。すでに報告している酵素活性測定条件で測定した γ -GpNAの加水分解活性 (pH 8.73, 37℃の条件下) をもとに、容器あたり、1 Uとなるよう添加した。

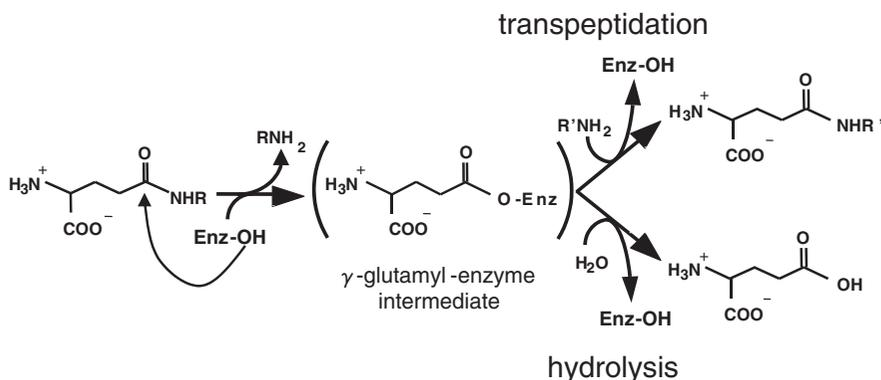


Fig. 2. Reaction mechanism of γ -glutamyltranspeptidase. The reactive OH group of GGT is the OH group of the side chain of the N-terminal Thr residue of the small subunit¹⁾.

仕込み後7日後まで毎日混ぜ、サンプリングした。
仕込み後7日目にキット付属の乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* の懸濁液1.8 mLを加え、よくかき混ぜた。

仕込み後31日後まで約7日ごとに混ぜ、サンプリングした。

仕込み後31日目にキット付属の酵母菌 *Zygosaccharomyces rouxii* の懸濁液1.48 mLを加え、よくかき混ぜた（これ以降は室温を26℃とした）。

仕込み後2ヶ月後まで約3日ごとに混ぜ、サンプリングした。

仕込み後2ヶ月後から5ヶ月後まで、約10日ごとに混ぜ、サンプリングした。

仕込み後199日後に醤油を搾るまで静置し、熟成させた。

仕込み後199日後に、モロミを搾り袋に入れてざるの上に置き、残りのモロミが入ったプラスチック容器を重りにして醤油を滲出させた。

そのうち50 mLを125 mL容のビンに入れて70℃の水浴中で3時間加熱した（火入れ）のち、室温で48時間静置した。

8,000 rpm, 4℃で20分間遠心し、上清を火入れ醤油とした。

サンプリングの方法

先を切断したチップを用いてピペットマンで、1~2 mLのもろみをサンプルチューブに取り、14,000 rpmで5分間遠心した。固体沈殿物と澄んだ醤油分と粘性の油分に分離したもののなかから、澄んだ醤油分をピペットマンで分取し、分析するまで-80℃で保存した。醤油サンプルを蒸留水で100倍に希釈した後、10分の1量の100%トリクロロ酢酸を加え、濾過によりたん白質を除き、アミノ酸分析に供した。

アミノ酸アナライザーによるアミノ酸の分析

醤油中のグルタミン酸の定量にはアミノ酸アナライザー（島津高速液体クロマトグラフ：LC-9Aアミノ酸分析システム）により、検出用試薬としてオルトフタルアルデヒドを用いて、すでに報告した方法⁹⁾により行った。検出されたアミノ酸のピークの中から、グルタミン酸のピークを読み取り、その面積を、あらかじめ調製したグルタミン酸標準液のピーク面積と比較して、生成したグルタミン酸濃度を算出した。

結果と考察

醤油中のグルタミン酸濃度の変化

Fig. 3に示すとおり、野生型のGGTを1 U添加したものにおいて、GGT非添加のものとは比べて最大20 mM程

度多くグルタミン酸が含まれており、酵素の添加効果が明らかとなった。しかし、D445A GGTを添加した醤油においては、 γ -GpNA加水分解活性を揃えて両酵素を添加したにも関わらず、野生型を添加したものと比べてグルタミン酸濃度が低かった。そのことから醤油中においてD445A GGTが期待されたグルタミナーゼ活性を保持していなかったことが示唆されたため、実際の醤油に近い条件下で両酵素の γ -GpNA加水分解およびグルタミナーゼ活性を測定した。

実際の醤油の環境に近いpH 5.5, NaCl 18%では、はじめに醤油に加える際に参考にしたpH 8.73, NaCl 0%での γ -GpNA加水分解活性と比べてどの程度活性があるのか調べた。緩衝液は、pH 8.73のTris-HCおよびpH 5.5のNa-succinateを最終25 mMとなるように使用した。その結果、pH 8.73, NaCl 0%のときの野生型のグルタミナーゼ活性を100としたときの相対活性で、野生型では54.6であったのに対して、変異型ではわずか10.0であった。このことから、今回の醤油醸造の条件では、添加したD445A GGTのグルタミナーゼ活性は野生型の二割弱しかなかったことが分かった。

呈味性試験

グルタミン酸が多い醤油は本当においしいと感じられるのかを確かめるために、それぞれの醤油について火入れ前と火入れ後のものについて官能検査を行った。官能検査は、GGT非添加、野生型添加および変異型添加の醤油それぞれの火入れ前と火入れ後のもの計

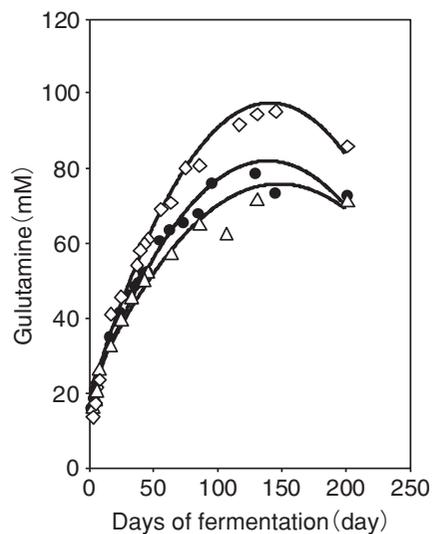


Fig. 3. Concentration of glutamic acid during soy sauce fermentation. Triangle: without addition of GGT; circle, addition of D445A mutant GGT; diamond: addition of wild-type GGT.

6種類を聞き味してもらい、GGT非添加で火入れ前のものと比べてそのほかの醤油の香り、うま味、塩味および総合的なおいしさの相対評価を5段階の数値で表してもらった方法で行った。なおこの検査は16名の成人男女に協力してもらった。

結果は示さないが、グルタミン酸濃度とうま味の強さには相関が見られなかった。このことから今回の官能試験では、醤油中のグルタミン酸濃度の差がうま味の差として感知されなかったと考えられた。

6名の人にGGT非添加の醤油にグルタミン酸ナトリウムを25 mMあるいは50 mM加えたものと、何も加えなかったもののうま味を比べてもらい、どちらがうま味を強く感じるかを答えてもらう試験を行った結果、6名中4名は何も加えなかった醤油の方が25 mM加え

たものよりうま味を強く感じると答えた。一方、50 mM添加したものは、非添加のものに比べてうま味が強いと全員が感じた。このことから醤油中ではグルタミン酸濃度の25 mMの差は認識しがたいものであることが分かった。今回の官能検査で使用した試料のなかでグルタミン酸濃度の差は約20 mMであるから、差の小さい試料間のグルタミン酸濃度が識別され、うまみの差として評価されなかったことは仕方がなかったと考えられた。

以上のことから、GGTを添加したことでグルタミン酸濃度が上昇した醤油が、うま味も向上したと認識されるためには、さらにグルタミン酸濃度(50 mM程度)が増大することが必要であることがわかった。

要 約

麹菌のグルタミナーゼは耐塩性でなく醤油醸造時の18%食塩存在下では、その活性はごくわずかであるため、遊離されたグルタミンのすべてがグルタミン酸とはならず、化学的に無味のピログルタミン酸になり、うま味に十分寄与できないとされている。γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)はグルタミナーゼ活性を持ち、枯草菌のGGTは極めて耐塩性であることから、枯草菌のGGTをグルタミナーゼとして醤油醸造時に添加することを検討した。GGT無添加の場合、醸造4ヶ月目にグルタミン酸の蓄積が70 mMであったものが、1 U/1.4 Lの野生型GGT添加系では95 mMになった。醸造開始6ヶ月後に、呈味性試験をしたところ、25 mM程度のグルタミン酸濃度の差はなかなか識別できず、おいしいと感じるには50 mM程度の差が必要であることが分かった。

文 献

- 1) Inoue M, Hiratake J, Suzuki H, Kumagai H and Sakata K (2000): Identification of catalytic nucleophile of *Escherichia coli* γ-glutamyltranspeptidase by γ-monofluorophosphono derivative of glutamic acid: N-terminal Thr-391 in small subunit is the nucleophile. *Biochemistry*, **39**, 7764-7771.
- 2) Minami H, Suzuki H and Kumagai H (2003): Salt-tolerant γ-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* 168 with glutaminase activity. *Enzyme Microb Technol*, **32**, 431-438.
- 3) Minami H, Suzuki H and Kumagai H (2003): A mutant *Bacillus subtilis* γ-glutamyltranspeptidase specialized in hydrolysis activity. *FEMS Microbiol Lett*, **224**, 169-173.
- 4) Suzuki H, Izuka S, Minami H, Miyakawa N, Ishihara S and Kumagai H (2003): Use of bacterial γ-glutamyltranspeptidase for enzymatic synthesis of γ-D-glutamyl compounds. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 6399-6404.