

γ -グルタミルトランスぺ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（第二報）

鈴木秀之*・木嶋恭子

京都大学大学院生命科学研究科

Development of a Method to Improve the Taste of Soy Sauce by the Addition of γ -Glutamyltranspeptidase as Glutaminase During Its Fermentation (II)

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, 65 mM glutamic acid was accumulated after 98 days of fermentation, while 115 mM glutamic acid was found by the addition of 4.1 U-GGT/190 g-moromi. Nine out of ten panel members could distinguish the taste of these and answered that they prefer the soy sauce fermented by the addition of GGT. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 42-46, 2006.

Key words: γ -glutamyltranspeptidase, glutamic acid, soy sauce fermentation, glutaminase, taste

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、さらにペプチダーゼによってアミノ酸にまで分解され、呈味性に寄与している。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量存在しないと、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ロスし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。

* 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

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、醤油もろみに添加しようという試みが行われている。しかし、食品に使えるバクテリア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)。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²⁾であることを見出した。 *Bacillus subtilis* (枯草菌) 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、この株のGGTをグルタミナーゼとして醤油醸造時に添加して、その効果を検討し、すでに報告した³⁾。また、転移活性のみを失った D445A 変異酵素⁴⁾の添加効果も合わせて検討した。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。しかし、D445A変異酵素では著しい添加効果は見られなかった。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

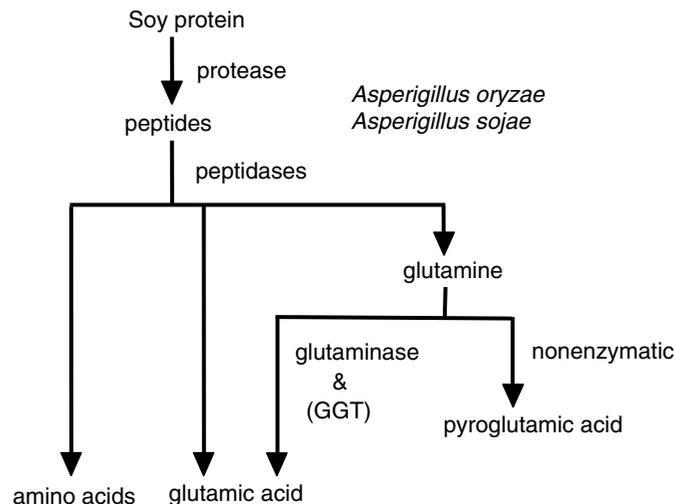


Fig. 1. Digestion of soy proteins and the related enzymes during the fermentation of soy sauce.

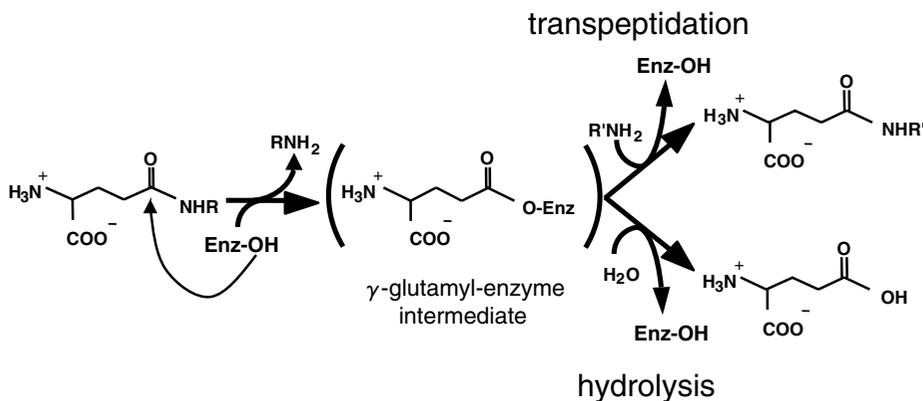


Fig. 2. Reaction mechanism of γ -glutamyltranspeptidase. The reactive OH group of GGT is the OH group of the side chain of N-terminal Thr residue of small subunit¹⁾.

じるには50 mM程度の差が必要であることが分かった。

そこで、本研究では、醤油醸造時に添加する野生型GGTの量をさらに増量して、酵素無添加の場合より50 mM以上グルタミン酸を多量に蓄積したおいしいと感じられる醤油が醸造できないか検討した。併せて、なぜD445A変異酵素で添加効果が見られなかったのか検討した。

方 法

酵素の調製

*B. subtilis*のGGT遺伝子をシャトルベクターpHY300PLK (p15A and pAMa1 replicons *bla*⁺ *tet*^r)上にクローニングし、GGT遺伝子を欠損した大腸菌に導入した株 (KY102) のペリプラズミックフラクションから⁴⁾、*B. subtilis*の野生型GGTをQ-セファロースカラムクロマトグラフィーを2回行って精製した。同様に、転移活性を失った変異酵素D445Aは、この変異遺伝子を持つpHY300PLKを導入したGGT遺伝子欠損大腸菌株のペリプラズミックフラクションから精製した。

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。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1,152 gを入れて溶かし、食塩水を作った。食塩水に醤油麴 (乾燥重量800 g) を入れ、よくかき混ぜ、172.3 gずつの小分けを2つ作った。小分けの1つに野生型GGTをグルタミナーゼ活性 (グルタミンの加水分解活性を18% NaCl存在下, pH 5.5, 37℃で測定) で4.1 U添加し、よくかき混ぜた。これは既報³⁾で添加した野生型GGT濃度の100倍濃度に相当する。もう一方には酵素は添加せず、上記のGGT添加量と同体積 (17.7 mL) の2.5 mM Tris-HCl pH 8を添加し、よくかき混ぜた。これらの瓶を19℃のインキュベーター内に静置した。以降、既報の通りに醤油を醸造した。

仕込み後98日後に、モロミを遠心して上清を醤油サンプルとした。今回、火入れは行わなかった。

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中から、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、フィルトレーション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-10A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⁵⁾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

なぜD445A変異酵素で著しい添加効果は見られなかったのか

既報では γ -GpNAの加水分解活性 (0% NaCl, pH 8.73, 37℃の条件下) をもとに、野生型と変異型GGTの活性を揃えてGGTをもろみ中に添加した。その場合、醤油中のグルタミン酸濃度上昇に野生型GGTの添加は明瞭な効果が見られたが、変異型酵素の添加の効果は明らかではなかった。これは、野生型酵素と変異型酵素とでは、基質あるいはpH (醤油もろみのpHは5.5付近と報告されている) の違いに対する挙動が異なっているためではないかと推察した。

そこで、野生型と変異型のGGTについて、私たちが通常GGT活性を測定している条件下と醤油もろみ中に近い条件下で酵素活性の比較を行った (Table 1)。

その結果、食塩無添加の条件においても、変異型酵素のpH 5.5におけるグルタミナーゼ活性は野生型酵素の20分の1であった。さらに、18%食塩存在下においては、野生型酵素では食塩非存在下と同程度の活性を有するのに対して、変異型酵素では18%食塩存在下では食塩非存在下の38分の1になっていた。このため、醤油もろみ中での変異酵素の実効グルタミナーゼ活性は野生型に比べて著しく低い値となっていたことが明らかとなった。

Table 1. Comparison of GGT activities

	γ -GpNA hydrolysis activity (pH 8.73, NaCl 0%)	Glutaminase activity (pH 5.5)	
		NaCl 0%	NaCl 18%
Wild-type	1	0.53	0.58
D445A	1	0.028	0.75×10^{-3}

units

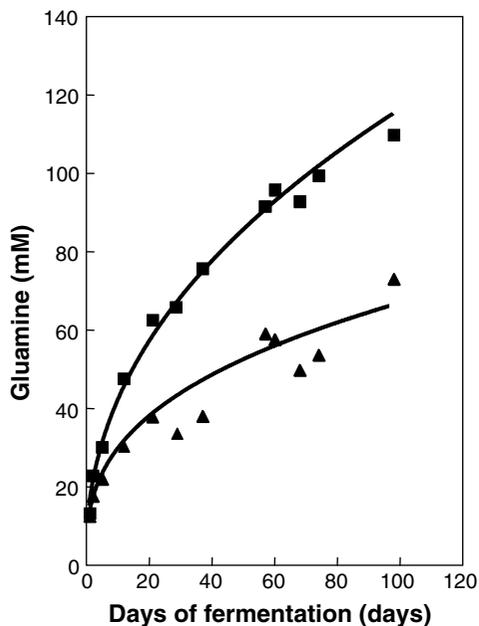


Fig. 3. Concentration of glutamic acid during soy sauce fermentation. Triangle: without addition of GGT; circle: addition of wild-type GGT (4.1 U/190 g-moromi).

すでに報告したように²⁾, 枯草菌のGGTの転移活性は酸性条件下では極めて低いことを考えれば, 醤油もろみ中にD445A変異型酵素を添加する必要は特になく, 野生型酵素の添加効果を検討するだけで十分であると判断した。

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4.1 U/190 g-moromi添加したものにおいて, GGT非添加のもの比べて最大50 mM程度多くグルタミン酸が含まれており, 酵素の添加が醤油中のグルタミン酸濃度の増大に効果があることが明らかとなった。

呈味性試験

GGTを添加してグルタミン酸が多くなった醤油が本当に人々においしいと感じられるかを確かめるために, 醤油の官能検査を行った。官能検査は, GGT添加, 無添加の醤油2種類を聞き味してもらい, いずれの醤油のうま味が強いのか? いずれの醤油をおいしいと思うのか? について, 10名の成人男女に尋ねた。

Fig. 4に結果を示したが, 10人中9人が, 醸造時にGGTを添加した醤油の方がうま味が強く, おいしいと答えた。この官能試験の結果から, 醤油醸造時に十分量のGGTを添加することは, 呈味性の観点からも効果的であることが示された。

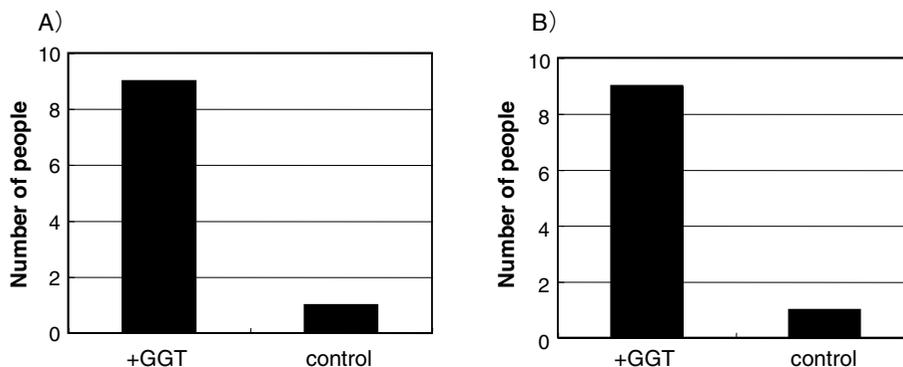


Fig. 4. Effect of the addition of GGT to soy sauce moromi during fermentation: on more umami taste (A) and preference (B).

要 約

麹菌のグルタミン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) はグルタミンナーゼ活性を持ち, 枯草菌のGGTは極めて耐塩性であることを見出したことから, 枯草菌のGGTをグルタミン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，醸造開始98日目にグルタミン酸の蓄積が65 mMであったものが，4.1 U/190 g-moromiの野生型GGT添加系では115 mMになった。醸造開始98日後に醤油を絞り，呈味性試験をしたところ，10人のパネルメンバーのうち9人までが，GGTを添加した方がうま味が強く，おいしいと答えた。このことから醤油醸造時のもろみに枯草菌由来のGGTを添加することは，醤油中のグルタミン酸濃度を上昇させ呈味性改善に効果があることが明らかとなった。

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) 鈴木秀之，木嶋恭子 (2005): 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. 大豆たん白質研究, **8**, 35-38.
- 4) Minami H, Suzuki H and Kumagai H (2003): A mutant *Bacillus subtilis* γ -glutamyltranspeptidase specialized in hydrolysis activity. *FEMS Microbiol Lett*, **224**, 169-173.
- 5) 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.