

カビ細胞壁溶解酵素活性に及ぼす塩類の影響と食塩含有食品の保存への応用

若山 守¹, 高木 一好¹, 矢野 成和²

¹立命館大学生命科学部, ²山形大学大学院理工学研究科

概要 我が国では、40歳以上の2人に1人が高血圧症であると言われている。高血圧症は生活習慣病の1つに数えられており、医療費の抑制の観点からもその対策は重要な課題である。原因として遺伝的要因に加え、ストレス、過労、運動不足、肥満などが挙げられるが、日本人の場合、塩分摂取量がWHOの塩分の推奨摂取量6 g/day未満を遥かに超える10 g/day前後と言われている。塩分の多い日本的な食生活も高血圧症の原因と考えられている。日本の伝統的発酵食品は高濃度の食塩を含んでいるものが多いことから、健康面からは減塩された食品として普及することが望まれる。例えば、醤油の場合、生活習慣病、特に高血圧予防や高血圧症患者のため最大50%減塩された減塩醤油が製造・市販されているが、使用期間中のカビ等微生物汚染予防の観点からこれ以上の減塩は難しい。

申請者らは、*Paenibacillus* 属および *Bacillus* 属細菌由来の α -1,3-グルカナーゼとキチナーゼを組み合わせることで、担子菌や他のカビの細胞壁を効率的に分解し、プロトプラストを生成することを明らかにしている。本研究では、特にカビの食品への汚染に着目し、これらカビの細胞壁分解酵素の高食塩濃度下での触媒特性を調べたうえで、市販の醤油ベース調味液や漬物等の高・中濃度の食塩を含有する食品へこれら酵素を添加することによるカビの繁殖抑制効果を検証することを目的として実験を行った。

今回、*Bacillus circulans* (*B. circulans*) KA-304 および *Streptomyces thermodiastaticus* (*S. thermodiastaticus*) HF3-3 由来 α -1,3-グルカナーゼとキチナーゼの活性に及ぼす食塩の影響、食塩存在下での α -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼの各種のカビに対する細胞壁溶解活性の検討、および市販のめんつゆ、つけもの等の高・中濃度の食塩を含有する食品への α -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼ添加によるカビの生育を抑制する効果を検証した。*B. circulans* KA-304 由来 α -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼ、さらに耐熱性放線菌 *S. thermodiastaticus* 由来の2種類の α -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼの耐塩性をそれぞれ調べたところ、いずれの酵素も10%以上の食塩濃度下においてもほぼ活性を維持した。

これらの酵素を用いて高・中食塩含有食品での *Aspergillus oryzae* をはじめとするカビの生育抑制効果を調べたところ、カビと食品の組合せによっては効果的にカビの生育を抑制する結果が得られたが、一方、カビの種類と食品の組合せによって、酵素による生育抑制効果に大きな違いも見られた。また、使用した酵素の由来により抑制効果にも多少の違いが見られた。

1. 研究目的

生活習慣病のうち高血圧症の原因として遺伝的要因に加え、ストレス、過労、運動不足、肥満などが挙げられており、我が国の場合、40歳以上の2人に1人が高血圧症であると言われている。塩分摂取量の多い日本的な食生活がその原因と考えられている。WHOの塩分の推奨摂取

量6 g/day未満であるのに対して、日本人の摂取量は10 g/day前後と言われている。また、日本高血圧学会の高血圧症患者に対する推奨摂取量も6 g/day未満とされている。一方、日本の食文化を代表する伝統的発酵食品醤油は、現在の日本人の食生活において欠かすことの出来ない食べ物であり、醤油をベースとした様々な調味料が利用され

ている。近年、欧米諸国においても低カロリー食として和食は人気が高まっており、和食文化がユネスコの無形文化遺産に登録されたことで、増々和食に対する関心は高まってくるものと期待される。しかし、醤油や醤油をベースとした食品は高濃度の食塩を含んでおり、上述したような健康面からは減塩された食品として普及することが望まれる。醤油の場合、生活習慣病、特に高血圧予防や高血圧症患者のため最大 50%減塩された減塩醤油が製造・市販されているが、使用期間中のカビ等微生物汚染予防の観点からこれ以上の減塩は難しい。一方で、*Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属の細菌は、カビの細胞壁(**Fig. 1**)の重要成分である α -1,3-グルカンやキチンを特異的に分解する酵素 α -1,3-グルカナナーゼとキチナーゼを分泌生産する。申請者は、*Bacillus circulans* KA-304 および *Paenibacillus glycanilyticus* FH11 由来の α -1,3-グルカナナーゼとキチナーゼを組み合わせることで、担子菌 *Schizophyllum commune* や他のカビの細胞壁を効率的に分解し、プロトプラストを生成することを明らかにしている。本研究では、*B. circulans* KA-304 および *Streptomyces thermodiastaticus* HF3-3 由来のカビ細胞壁分解酵素の高食塩濃度下での触媒特性を調べたうえで、市販の醤油ベース調味液やつけもの等の高・中濃度の食塩を含有する食品へこれら酵素を添加することによるカビの繁殖抑制効果を検証することを目的として実験を行った。

2. 研究方法

2.1 実験試薬

α -1,3-グルカンは、*Streptococcus mutans* のグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子を大腸菌 *Rosetta gami B* で発現させた組換え酵素を調製し、スクロースを基質とする酵素反応により文献^[1]の方法に従い合成した。本研究で使用した α -1,3-グルカナナーゼのうち、*Bacillus circulans* KA-304 株由来の酵素 (Agl-KA) は、Yano らの方法に従い^[2]組換え大腸菌 *Rosetta gami B* を LB 培地にて培養後、抽出・精製した。*S. thermodiastaticus* 由来の 2 種類の α -1,3-グルカナナーゼは、共に、酵素合成した α -1,3-グルカンを単一の炭素源とする酵素発現誘導液体培地 (1.0% α -1,3-glucan, 0.05% K_2HPO_4 , 0.05% KH_2PO_4 , 0.01% yeast extract, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, and 0.05% KCl) にて *S. thermodiastaticus* を 50°C で 3 日間培養して得

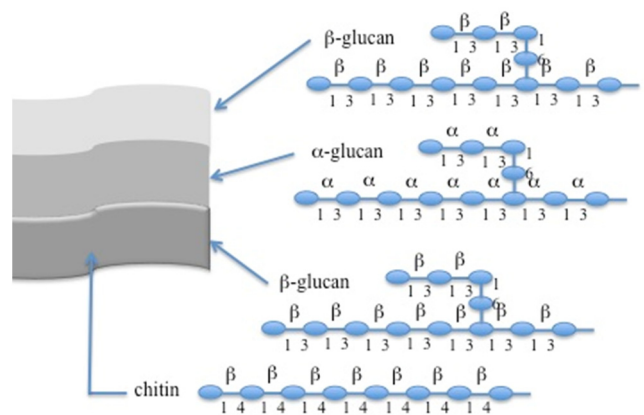


Fig. 1. Schematic structure of fungal cell wall

られた上清から精製した。上清に対して 80%飽和硫酸アンモニウム沈殿の回収、透析後に DEAE-cellulofine (pH8.0) に供した後の 100 mM NaCl 溶出画分を Butyl-Toyopearl (pH 7.0) に供した。25%飽和硫酸アンモニウムを含む緩衝液で洗浄後、20%および 16%の硫酸アンモニウム濃度の溶出画分において、2種類の α -1,3-グルカナナーゼ (AglST1 と AglST2) をそれぞれ回収し、実験に用いた。本研究で使用したキチナーゼのうち、*Bacillus circulans* KA-304 株由来の酵素 Chi-KA は、Yano らの方法に従い^[3]組換え大腸菌 *Rosetta gami B* を LB 培地にて培養後、抽出・精製し、組換えキチナーゼ (Chi-KA) として用いた。*S. thermodiastaticus* 由来のキチナーゼ (Chi-ST1) は、パウダーキチンを単一の炭素源とする酵素発現誘導液体培地 (1.0% powder chitin, 0.05% K_2HPO_4 , 0.05% KH_2PO_4 , 0.3% ammonium sulfate, 0.1% yeast extract and 0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) にて *S. thermodiastaticus* を 50°C で 5 日間培養して得られた上清から、ポリエチレングリコール濃縮、DEAE-cellufine (pH8.0) および Hitrap-Q のステップを経て精製したものを用いた。使用したカビ (糸状菌) は、*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* および *Rhizopus oryzae* を用いた。また、食塩含有食品としては、市販の減塩醤油、めんつゆ及びつけものを用いた。

2.2 実験手順

2.2.1 *B. circulans* KA-304 および *S. thermodiastaticus* HF3-3 由来 α -1,3-グルカナナーゼ (Agl-KA, Agl-ST1, Agl-ST2) とキチナーゼ (Chi-KA, Chi-ST1) の活性に及ぼす食塩の影響

α -1,3-グルカナーゼ (Agl-KA, Agl-ST1, Agl-ST2) およびキチナーゼ (Chi-KA, Chi-ST1) の活性に及ぼす食塩の影響について検討した。0-20%の範囲の食塩存在下において各酵素反応を行った際の酵素活性の変化を調べた。 α -1,3-グルカナーゼ、キチナーゼともに、100 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.5-6.0)、0.2-0.5%多糖基質 (α -1,3-グルカン, コロイダルキチン) および各濃度食塩を含む反応液で 30°C, 30 分間の反応を行った。

2. 2. 2 カビに対する様々な濃度食塩存在下での α -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼ細胞壁溶解活性の検討

被験菌として, *Aspergillus oryzae* を用いて, α -1,3-グルカナーゼ (Agl-KA, Agl-ST1, Agl-ST2) およびキチナーゼ (Chi-KA, Chi-ST1) を適宜組み合わせることで, 食塩存在下, 効率的なカビ細胞壁に対する溶解条件を検討した。食塩を終濃度 0-10%になるよう添加したポテト培地に (PDA 培地) に適量量のキチナーゼならびに α -1,3-グルカナーゼを添加しものに *A. oryzae* を適量接種し, 30°C で 1~2 日間保温した。両酵素の代わりに緩衝液を添加したものをコントロールとして, カビの生育度合いを比較した。

2. 2. 3 市販のめんつゆ, つけもの等の高濃度の食塩を含有する食品への α -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼ添加による保存性向上効果の検証

日常的に食品を汚染する頻度の高いカビとして, 麹菌の属する *Aspergillus* 属の他, *Penicillium* 属, *Cladosporium* 属, *Mucor* 属, *Rhizopus* 属, *Fusarium* 属および *Trichoderma* 属が知られている。今回は, これらのうち, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* および *Rhizopus*

oryzae にカビを絞り, 市販の減塩醤油, めんつゆ, つけもの等の比較的塩分の高い食品を対象として, α -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼの添加効果を調べた。

めんつゆおよびつけもの汁の原液または適当希釈液を基本培地として, そこに α -1,3-グルカナーゼ (Agl-KA, Agl-ST1, Agl-ST2) およびキチナーゼ (Chi-KA, Chi-ST1) を適宜組み合わせることで添加した後, *A. oryzae*, *A. niger* および *R. oryzae* を被験菌として適量接種した。30°C, 1~5 日間程度保温し, 食塩濃度ならびに酵素の添加効果を定性的ならびに定量的に評価した。

3. 結果

3. 1 *B. circulans* KA-304 および *S. thermodiastaticus* HF3-3 由来 α -1,3-グルカナーゼ (Agl-KA, Agl-ST1, Agl-ST2) とキチナーゼ (Chi-KA, Chi-ST1) の活性に及ぼす食塩の影響

α -1,3-グルカナーゼ (Agl-KA, Agl-ST1, Agl-ST2) とキチナーゼ (Chi-KA, Chi-ST1) のすべての酵素について, 反応液中の食塩濃度を 0~20%の範囲に設定して各酵素反応に及ぼす影響を調べたところ, すべての酵素が少なくとも食塩濃度 10%でほぼ 90~100%の活性を示すことが明らかとなった (Fig. 2)。食塩が酵素活性に及ぼす影響は様々な酵素で調べられているが, 今回調べた酵素のように高い食塩存在下でもほぼ活性が低下しない酵素^[4,5]から比較的低い食塩濃度でも著しく活性が低下するものまで存在する^[6,7]。 α -1,3-グルカナーゼとキチナーゼが一般的に高い耐塩性を有しているのか, あるいは今回調べた Agl-KA, Agl-ST1, Agl-ST2 および Chi-KA, Chi-ST1 が, 特別に高い耐性を有しているのかは, 我々の報告以外

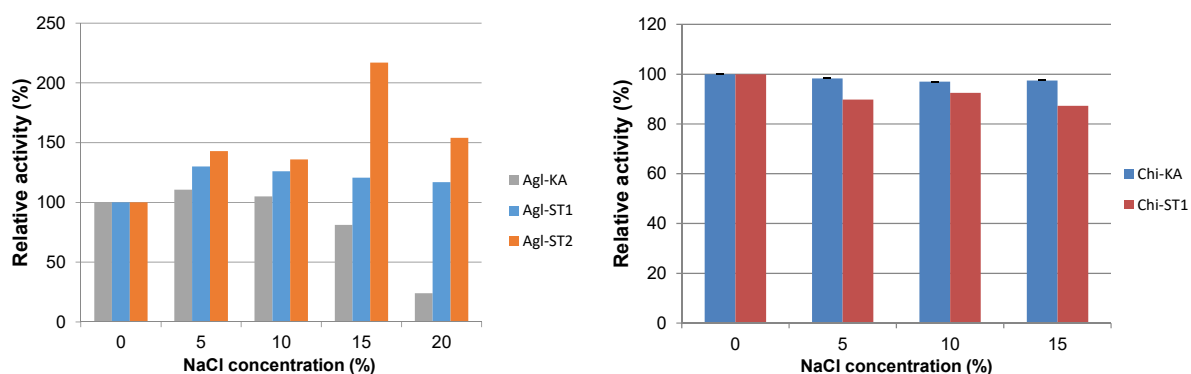


Fig. 2. Effect of NaCl on activities of α -1,3-glucanases and chitinases

にこのような視点で研究を行った事例が無いので不明である。今回の結果から、*B. circulans* KA-304 および *S. thermodiastaticus* HF3-3 由来 α -1,3-グルカナーゼ (Agl-KA, Agl-ST1, Agl-ST2) とキチナーゼ (Chi-KA, Chi-ST1) のいずれの酵素も、高濃度の塩を含む食品中で有効に機能する可能性が示された。

3. 2 カビに対する様々な濃度の食塩存在下での α -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼ細胞壁溶解活性の検討

食塩を終濃度 0, 2, 4, 6, 8, 10% になるよう添加したポテト培地に (PDA 培地) 5 mL に *B. circulans* KA-304 由来のキチナーゼ (0.15 U/mL) ならびに α -1,3-グルカナーゼ (0.12 U/mL) を添加しものに被験カビとして *A. oryzae* を適量接種し、30°C、2 日間保温した。酵素の代わりに緩衝液を添加したコントロールとカビの生育度合いを比較した。その結果、Fig. 3 に示されているように、保温1日目において、コントロール(酵素無添加, 左側 3 本)では明らかなカビの生育が観察されたのに対して、酵素を添加した方(右側 3 本)ではカビの生育はほぼ観察されなかった。しかし、保温2日目では、酵素を添加した方でも若干のカビの生育が認められた。今回の実験で用いた PDA 培地はカビの標準生育培地で大変生育しやすい環境であることから、高濃度食塩下、かつキチナーゼならびに α -1,3-グルカナーゼが存在するなかでも、生育が可能であったものと

考えられる。いずれにせよ、今回の実験の結果より、キチナーゼならびに α -1,3-グルカナーゼがカビの生育を効果的に抑制することが示された。

3. 3 市販のめんつゆ、つけもの等の高濃度の食塩を含有する食品への α -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼ添加による保存性向上効果の検証

A. oryzae, *A. niger* および *R. oryzae* に被験カビを絞りを、市販のめんつゆ、漬物等の比較的塩分の高い食品を対象として、 α -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼの添加効果を調べた。

3. 3. 1 めんつゆに対する α -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼの添加効果

市販の3倍濃縮めんつゆ(塩濃度 11.2%)の原液、2倍希釈液、3倍希釈液および10倍希釈液に対して *B. circulans* KA-304 由来の α -1,3-グルカナーゼ (0.087 U/mL) ならびにキチナーゼ (0.035 U/mL) を添加したものにカビ (*A. oryzae*) を適量植菌し、30°C で数日間保温した。酵素の代わりに緩衝液を添加したコントロールとカビの生育度合いを比較した。その結果、原液では酵素添加の有無によらずカビの生育は見られなかったが、2倍希釈液、3倍希釈液および10倍希釈液では、保温2日目から酵素無添加ではカビの生育が明瞭に観察されたのに対して、酵素を添加したものでは、2倍希釈液、3倍希釈液では保温4日目まででカビの生育は見られなかった (Fig. 4)。

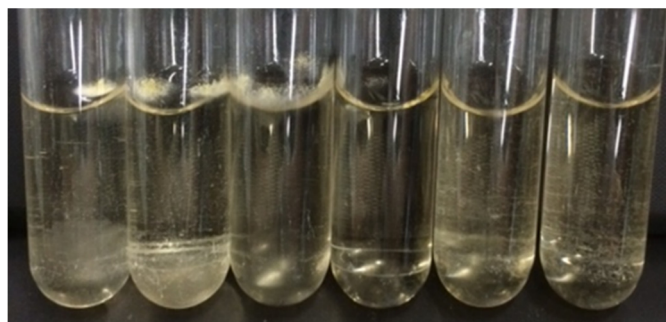


Fig. 3. Effect of α -1,3-glucanase and chitinase on fungous growth in PDA medium containing 10% NaCl

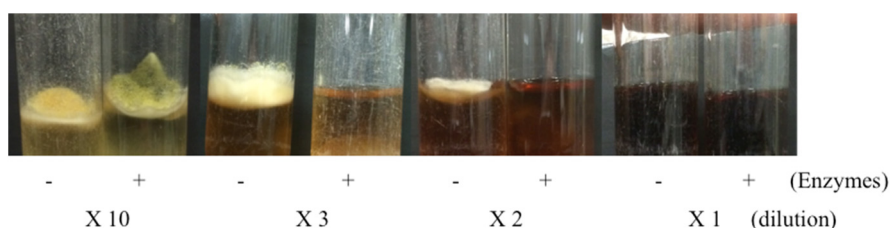


Fig. 4. Effect of α -1,3-glucanase and chitinase on fungous growth in mentsuyu (noodle soup)

なお、減塩醤油については、色素の関係上、カビの生育状況の確認が難しいことから割愛した。

3. 3. 2 酵素濃度の検討

めんつゆを被験食品とし、 α -1,3-グルカナーゼならびにキチナーゼの濃度を変えて添加することにより、カビの生育抑制に及ぼす酵素濃度の影響について調べた。めんつゆの原液3倍希釈液(食する際のつゆ濃度)5 mL に対して、 α -1,3-グルカナーゼの濃度を 0, 0.025, 0.05, 0.1 (U/mL) に設定し、キチナーゼ濃度は 0, 0.02, 0.04 (U/mL) に設定した。被験カビとしては、*A. oryzae* を適当量接種し、カビの生育度合いを観察した。その結果、酵素を添加することによって、明確なカビの生育抑制は見られたが、今回用いた酵素濃度の範囲においては、 α -1,3-グルカナーゼの添加量によるカビの生育抑制効果の差はほとんど見られなかったが、キチナーゼについては濃度が高い方がより効果的であった。このことから、めんつゆにおける *A. oryzae* の生育に関しては、今回用いた酵素量で

一定の抑制効果が得られることが示された。

3. 3. 3 カビ生育抑制効果に及ぼす酵素の種類の影響

めんつゆを被験食品とし、用いる α -1,3-グルカナーゼならびにキチナーゼの種類を変えて添加することにより、カビの生育抑制に及ぼす酵素種の影響について調べた。

Fig. 5 に示した培養装置に、めんつゆの原液3倍希釈液(食する際のつゆ濃度)、 α -1,3-グルカナーゼおよびキチナーゼを添加したものを用意し、被験カビとして *A. oryzae* を適当量接種した。30°C, 4 日間保温したのち、カビの生育度合いを観察した。酵素としては、*B. circulans* KA-304 由来の α -1,3-グルカナーゼ(Agl-KA)ならびにキチナーゼ(Chi-KA)の組合せと *S. thermophilus* HF3-3 由来 α -1,3-グルカナーゼ(Agl-ST1, Agl-ST2)とキチナーゼ(Chi-ST1)の組合せを用いて、カビ生育抑制効果を生育阻害率で評価した。生育阻害率は、培養後の菌体重量の減少度合いをコントロールと比較することで求めた。結果を Table 1 および Table 2 に示した。

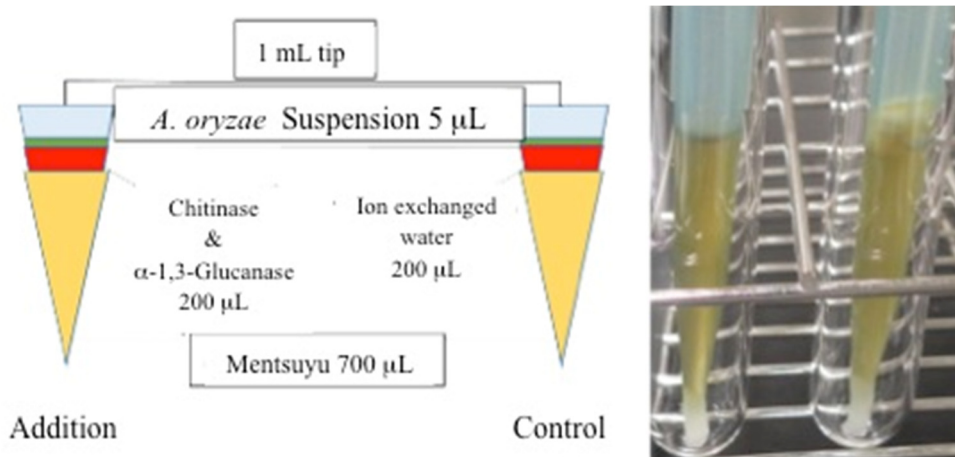


Fig. 5. Apparatus for cultivation and harvest of fungi in mentsuyu (noodle soup)

Table 1

Enzymes	Agl-KA+Chi-KA
Inhibition (%)	92.7
Agl-KA: 0.1 U/mL, Chi-KA: 0.05 U/mL	

Table 2

Enzymes	Chi-ST1	Agl-ST1+Chi-ST1	Agl-ST2+Chi-ST1
Inhibition (%)	24.6	73.5	62.5
Agl-ST1: 0.23 U/mL, Agl-ST2: 0.18 U/mL, Chi-ST1: 0.12 U/mL			

この結果より、 α -1,3-グルカナーゼとキチナーゼを組み合わせて用いることにより、カビの生育抑制効果が高まることが示された。また、Agl-KA と Chi-KA の組合せの方が、Agl-ST と Chi-ST1 との組合せよりも生育抑制効果が高いことが示された。Agl-KA と Chi-KA は基質結合ドメインをそれぞれ持っているのに対して、Agl-ST と Chi-ST1 は基質結合ドメインをともに持っていないと考えられ、この基質結合ドメインの有無が生育抑制効果に差が生じる原因として考えられる。

3. 3. 4 カビの種類による細胞壁溶解酵素の生育抑制効果への影響

被験カビを *A. niger* に変えて、より効果的な *A. oryzae* に対する生育抑制効果が認められた *B. circulans* KA-304 由来の α -1,3-グルカナーゼ (Agl-KA) ならびにキチナーゼ (Chi-KA) の組合せで、それぞれ 0.1 U/mL と 0.05 U/mL を添加することで生育抑制効果を調べた。その結果、*A. niger* では、生育が何らかの影響を受けている様子は観察されたが、生育速度が早く、十分な菌糸の生育が確認された (Fig. 6)。

3. 3. 5 顕微鏡によるカビ生育抑制効果の観察

B. circulans KA-304 由来の α -1,3-グルカナーゼ

(Agl-KA) ならびにキチナーゼ (Chi-KA) の組合せで、それぞれ 0.1 U/mL と 0.05 U/mL を添加した PDA 培地および“めんつゆ”3 倍希釈液に被験菌として *A. oryzae* を植菌した。酵素無添加の培地に *A. oryzae* を植菌したものをコントロールとした。30°C、96 時間保温した後、光学顕微鏡下で菌糸の様子を観察した (Fig. 7)。酵素を添加した方では、コントロールと比べて、菌糸の形状、菌糸表面の状態変化が見て取れ、カビの生育抑制が酵素の働きによる細胞壁の損傷によることが強く示唆された。

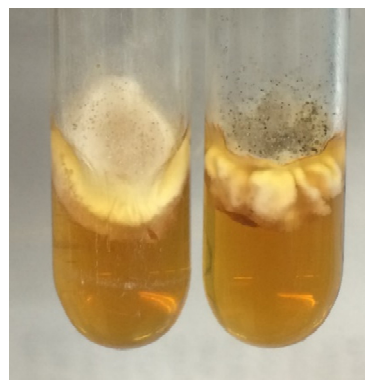


Fig. 6. Effect of the enzymes on growth of *A. niger* in mentsuyu

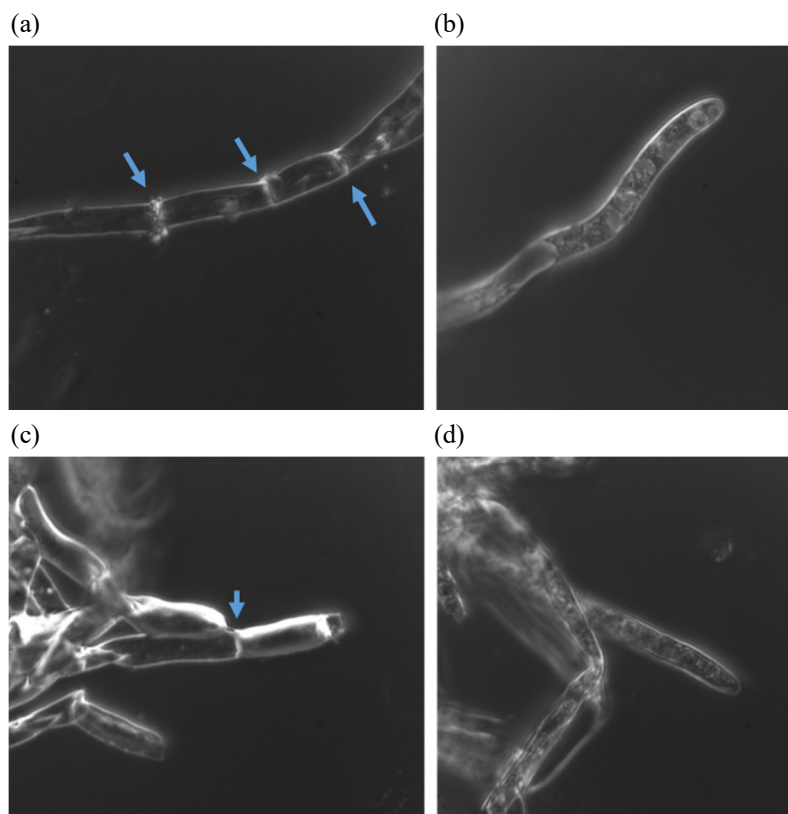


Fig. 7. Microphotograph of treated (a, c) and untreated (b, d) *A. oryzae* with the enzymes

3. 3. 6 つけものに対する α -1, 3-グルカナーゼおよびキチナーゼの添加効果

つけもの汁(塩濃度約 4%, 保存料無添加)の原液, 2 倍希釈液, 4 倍希釈液および 10 倍希釈液に対して *B. circulans* KA-304 由来の α -1,3-グルカナーゼ(0.05 U/mL) ならびにキチナーゼ(0.1 U/mL)を添加したものにカビ(*A. oryzae*)を適量植菌し, 30°Cで数日間保温した。酵素の代わりに緩衝液を添加したコントロールとカビの生育度合いを比較した。その結果, 酵素を添加したものについては, 無添加のものと比較して若干の生育抑制が認められたものの, 十分な菌糸の生育が確認された(**Fig. 8**)。このことから, 被験食品の種類によって構成成分の種類, 濃度等の違いにより, 被験カビ生育ならびに酵素活性が大きな影響を受けることが示唆された。

4. 考 察

カビの細胞壁構成成分の分解活性を有する 2 種類の酵素, α -1,3-グルカナーゼならびにキチナーゼを用いて, 比較的高濃度の食塩を含有する食品中でのカビの生育抑制効果を検討した。その結果, *A. oryzae* に関してはカビの PDA 培地およびめんつゆにおいて, 酵素による明確な生育抑制効果が認められたものの, *A. niger* では抑制効果は認められなかった。一方, つけもの汁では両菌に対する抑制効果は認められなかった。また, *R. oryzae* は, PDA を除くいずれの被験食品においても生育が抑制された。今回, α -1,3-グルカナーゼに関しては 3 種類, キ

チナーゼについては 2 種類の酵素を用いたが, 酵素の違いによるカビ生育抑制効果の違いは少しながら見られた。この違いは, 基質結合ドメインの有無に由来するものと推測された。被験菌の生育特性上の違いや被験食品中の塩分濃度や構成成分の違い等が生育抑制に影響している可能性が考えられた。

5. 今後の課題

考察のところで述べたように, 今回の実験結果から, 被験菌ならびに被験食品の違いにより, カビの生育抑制効果の表れ方に明確な差が生じることが判明した。今回の実験では, 細胞壁溶解酵素(α -1,3-グルカナーゼならびにキチナーゼ)の効き目に差が生じた原因の解明には至っていない。将来的に, 細胞壁溶解酵素の食品保存への応用を目指すうえで, このような差が生じる原因を解明する必要がある。今後は, 今回の結果をもとに, 生育抑制効果が認められる菌と認められない菌の生育特性上の違いを明らかにするとともに, 同じ被験菌に対して異なる生育抑制効果が認められる食品について, 塩分濃度や構成成分等を比較分析する。今回は, 比較的高い食塩を含む食品の減塩化に伴うカビの汚染予防に α -1,3-グルカナーゼの添加効果を検討したが, α -1,3-グルカナーゼは, う蝕性菌 *Streptococcus mutans* の生産するバイオフィーム成分を分解し, 歯垢形成を阻害する作用を持つことから, 耐塩性を有している本酵素は歯磨き粉の成分への利用も今後期待できる。

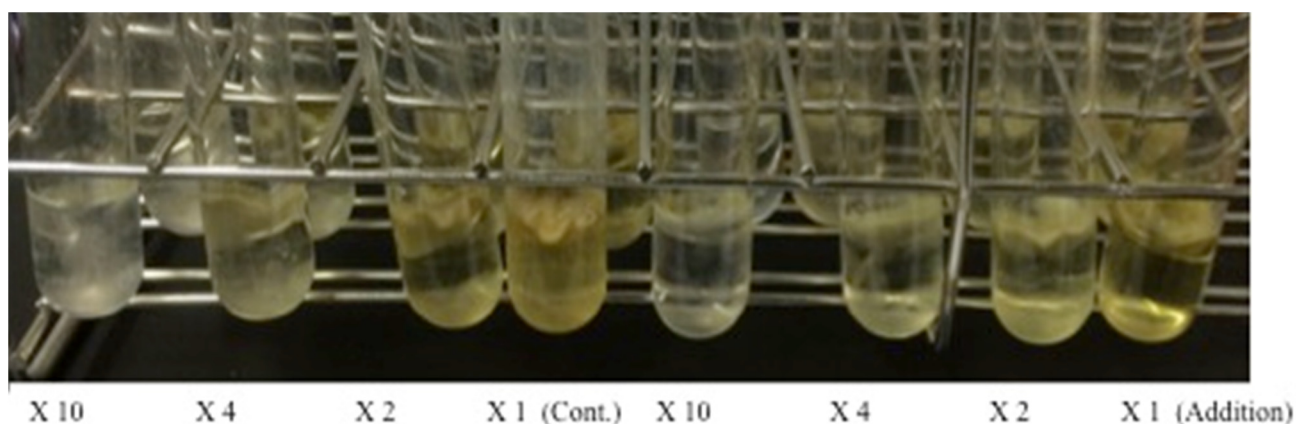


Fig. 8. Effect of enzyme concentrations on fungous growth in mentsuyu

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大な支援を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に心より感謝申し上げます。

6. 文 献

- [1] Suyotha W, Yano S, Takagi K, Rattanakit-Chandet N, Tachiki T, Wakayama M, Domain structure and function of α -1,3-glucanase from *Bacillus circulans* KA-304, an enzyme essential for degrading Basidiomycete cell walls. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77 (3), 639-647, 2013.
- [2] Yano S, Wakayama M, Tachiki T, Cloning and expression of an α -1,3-glucanase gene from *Bacillus circulans* KA-304: the enzyme participates in protoplast formation of *Schizophyllum commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (7), 1754-1763, 2006.
- [3] Yano S, Suyotha W, Honda A, Takagi K, Rattanakit-Chandet N, Wakayama M, Tachiki T, N-Terminal region of chitinase I of *Bacillus circulans* KA-304 contained new chitin-binding domain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75 (2), 299-304, 2011.
- [4] Moriguchi M, Sakai K, Tateyama R, Furuta Y, Wakayama M, Isolation and characterization of salt-tolerant glutaminases from marine *Micrococcus luteus* K-3. *J. Ferment. Bioeng.*, 77 (6), 621-625, 1994.
- [5] Onishi Y, Yano S, Thongsanit J, Takagi K, Yoshimune K, Wakayama M, Expression in *Escherichia coli* of a gene encoding type II L-asparaginase from *Bacillus subtilis*, and characterization of its unique properties. *Ann Microbiol.*, 61, 517-524, 2011.
- [6] Yano T, Ito M, Tomita K, Kumagai H, Tochikura T, Purification and properties of glutaminase from *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment Technol.*, 66, 137-143, 1988.
- [7] Yano S, Minato R, Thongsanit J, Tachiki T, Wakayama M, Overexpression of type I L-asparaginase of *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*, rapid purification and characterization of recombinant type I L-asparaginase. *Ann Microbiol.*, 58, 711-716, 2008.

Effect of Salts on Activities of Fungal Cell-Wall Lytic Enzymes and Their Application for Preservation of Salt-Containing Food

Mamoru Wakayama¹, Kazuyoshi Takagi¹, Shigekazu Yano²

¹ Ritsumeikan University, ² Yamagata University

Summary

In Japan, it is thought that one of the causes of hypertension among life style related diseases is Japanese dietary habit taking in food containing relatively high amount of salt. While salt intake recommended by WHO is less than 6 g/day, the average of Japanese salt intake is around 10 g/day. Soy sauce, one of typical traditional fermented foods, representing Japanese food culture is necessary for Japanese life style and a wider variety of ingredients made from soy sauce have been used. But soy sauce and soy sauce-based food necessarily contain high concentration of salt. Prevention of life style related diseases, in particular hypertension, 50% reduced salt soy sauce is commercially available. On the other hand, it is difficult to conduct further reduction of salt concentration of soy sauce from the viewpoint of prevention of microbial pollution such as fungous propagation during the period of use. It has been known that some of *Bacillus* sp. and *Paenibacillus* sp. produce α -1,3-glucanases and chitinases, which degrade the significant constituents of fungous cell wall, α -1,3-glucan and chitin, respectively.

In this study, we focused on α -1,3-glucanases and chitinases from *B. circulans* KA-304 and *Streptomyces thermodiasticus* HF3-3. The effects of these enzymes on growth inhibition of fungi in food containing relatively high concentration of salt were investigated. As a result, growth inhibitory effect against *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* by these enzymes in PDA medium and mentsuyu (noodle soup) was obviously observed, but little growth inhibitory effect against *A. niger* by these enzymes in both media was observed. Also little growth inhibitory effect against both fungi by these enzymes in tsukemono (pickled vegetables) was observed. Three types of α -1,3-glucanases and two types of chitinases were used in this study and effect of enzyme type on growth inhibition against fungi was scarcely observed. However, it was shown that growth inhibitory effect by the enzymes was significantly affected by types of fungi and subjected foods. Growth characteristics of the fungi and components and NaCl concentration of the subjected food might affect growth inhibition of fungi in food by the enzymes.