

Aspergillus kawachii の脂質代謝関連酵素に関する検討*

工藤 哲三^{*1}・水谷 政美^{*1}・本部 恭平^{*2}・太田 一良^{*3}

Lipase Production by *Aspergillus kawachii*

Tetsuzo KUDO, Masami MIZUTANI, Kyouhei HONBU and Kazuyoshi OHTA

焼酎製造における脂肪酸エチル生成には、こうじ菌の生産する酵素リパーゼが関与し、グリセライドからの遊離脂肪酸の生成と、その脂肪酸とエタノールから逆合成反応により脂肪酸エチルが生成されると推定された。そこで、焼酎製造用こうじ菌 *Aspergillus kawachii* の生産するリパーゼについて、2、3 検討した。こうじ菌リパーゼの抽出には、40%エタノールを含む pH5.0 の M/10 酢酸緩衝液 (含 0.5% NaCl) が有効であった。リパーゼの至適 pH は、pH4.15 と 6.32 に二つ存在し、少なくとも 2 種類のリパーゼが存在すると考えられた。米と大麦を使ったこうじ製造工程における酵素活性を比較したところ、麦こうじの方が、酸性領域でのリパーゼ活性が高かった。

キーワード：焼酎、こうじ、リパーゼ、*Aspergillus kawachii*

1 はじめに

蒸留酒である焼酎の製造においては、原料に由来する脂肪酸が、もろみ中でエタノールと結合してエチルエステルとなり、エチルアルコールとともに留出してくる。この脂肪酸エチルのうち、不飽和脂肪酸であるリノール酸エチルは、原酒貯蔵中に酸化分解を受け、油臭の原因物質であるアゼライン酸セミアルデヒド ($\text{OH}(\text{CH}_2)_7\text{COOC}_2\text{H}_5$) やヘキサナル ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CHO}$) が生成して、製品劣化を引き起こす要因となる^{1,2)}。そのため脂肪酸エチルの大部分は、貯蔵前に冷却ろ過等による除去工程が必要となる。この脂肪酸エチルの生成においては、まずこうじ菌のリパーゼ等により原料由来のトリグリセライドから遊離の脂肪酸が生成され、もろみ中のエタノールが遊離脂肪酸に結合してエステルが生成していくと推察される³⁾。このこうじ菌の生成するリパーゼについては、脂肪酸エチルの生成のみならず、発酵過程において重要な役割をはたしていると考えられる。

そこで、焼酎用麹菌として使用されている *Aspergillus kawachii* のリパーゼ生産について 2、3 の検討をおこなった。

2 実験方法

2 - 1 モデル発酵系での脂肪酸エチル生成

発酵過程における脂肪酸エチル生成の主な要因を確認するため、以下の 2 つのモデル発酵系を設定して脂肪酸エチル生成量を比較した。

2 - 1 - 1 こうじ抽出液無添加試験器

YPD 培地 100ml (グルコース 15% , 酵母エキス 1% , ペプトン 2%) に焼酎酵母 1 ml と 5 mM のパルミチン酸を加えて 28 ℃ , 3 日間培養後、脂肪酸エチル生成量を調べた。培養液にはあらかじめ加圧滅菌したセルロースパウダー (100 ~ 200 メッシュ) を分散剤として 1% 加えた。パルミチン酸のかわりにトリパルミチンを加えた系についても同様に脂肪酸エチル生成量を調べた。

2 - 1 - 2 こうじ抽出液添加試験器

pH5.0 の 0.1M 酢酸バッファー 20ml に、麹抽出液 7 ml (0.4 μ フィルターろ過) 、エタノール 10ml 及びセルロースパウダー 1g を加え、これにパルミチン酸もしくはトリパルミチンを添加して脂肪

* 食品微生物の遺伝子解析とその研究

* 1 応用微生物部

* 2 霧島酒造株

* 3 宮崎大学

酸エチル生成量を調べた。試験においては、対照として加熱処理したこうじ抽出液についても生成量を調べた。

2 - 2 発酵過程における脂肪酸エチルの測定

発酵過程における脂肪酸エチル生成量を調べるため、以下の原料配合で発酵試験を行った。一次もろみは、米こうじ300g(原料米250g相当)に水309g、焼酎酵母5mlを加えて、28℃、5日間発酵させ、2次もろみは一次発酵終了もろみに1,257gの甘藷(澱粉価30.4)と水608gを加えて28℃で発酵させ、炭酸ガス減量値による発酵経過と、脂肪酸エチル、遊離脂肪酸及びグリセライドの経時変化を調べた。

トリ、ジ、モノグリセライド、遊離脂肪酸、脂肪酸エチルの分離定量には、薄層クロマトグラフィで分離したスポットを、水素炎イオン化検出装置で検出定量していくイアトロスキャンMK-5(TLC/FID)(ヤترون株)を用いた。脂質は10~20gの試料を凍結乾燥後、クロロホルム:メタノール=2:1(v/v)で抽出した。展開溶媒はヘキサン:エーテル:酢酸=90:10:1(v/v/v)を用い、この溶媒組成では分離できないトリグリセライドとモノグリセライドの分離にはヘキサン:エーテル:酢酸=70:30:1(v/v/v)を用いた。

2 - 3 こうじにおけるリパーゼの抽出および活性測定法の検討

こうじの諸酵素を調べるときに用いる抽出用pH5.0のM/10酢酸緩衝液(含0.5%NaCl)を用いたところ、リパーゼ活性は検出されなかったため、ホモジナイザー(ポリトロン、モデルPT10/35:セントラル科学貿易株)により、こうじを微粉碎後、エタノールを0~50%含む同酢酸緩衝液で抽出した。

リパーゼ活性の測定には滴定法を用い、中性域と酸性域における活性を調べた。PVAを乳化剤として調製したオリーブ油乳液5mlとリン酸緩衝液(pH3.8及びpH7.0)4ml、酵素液1mlを50ml容共栓付三角フラスコ中でよく混合し、30℃で50分間反応させた。アセトン・エタノール混液20mlを加えて反応を停止させ、フェノールフタレインを加え、N/20 NaOH溶液を一定量添加後、窒素気流下でN/20 HClを用いて滴定し遊離脂肪酸

量を求めた。対照区は酵素液を加えないで同様に処理後、アセトン・エタノール混液を添加後に酵素液を加えた。活性は1分間あたりに遊離する脂肪酸量

($U = \mu\text{mol}/\text{min}$)で表示した。

2 - 4 パルミトイルセルロースの調製

Horiutiら¹⁰⁾の方法に従い、3gの脱脂綿あるいはガーゼを40mlの脱水ピリジン中で10mlのpalmitoyl chlorideと30℃、10時間反応させた。反応液を200mlのクロロホルム:エタノール=1:1で洗浄し、さらに2回100mlのエタノールで洗浄後ろ過して、50℃で乾燥させ、粗酵素液からのリパーゼの濃縮試験に用いた。

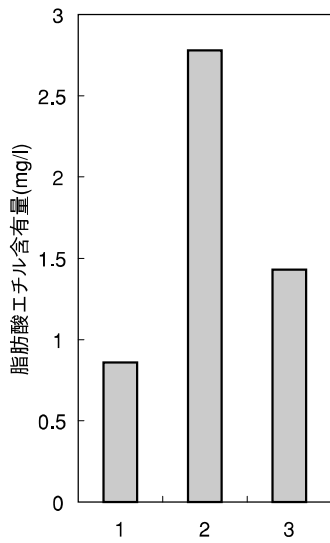
2 - 5 こうじ製造工程における諸酵素の測定

こうじ製造過程における酵素生産とその活性の経時変化を調べるために、精白米10kg及び大麦10kgを用いて常法により、米、麦こうじを調製した。種菌は白麹菌(河内源一郎商店株)を用い、経時的にサンプリングを行い、水分、酸度、グルコアミラーゼ、耐酸性 α -アミラーゼ、酸性プロテアーゼ、カルボキシペプチダーゼ及びリパーゼ活性を測定した。測定方法は、おおむね国税庁所定分析法³⁾にしたがったが、リパーゼについては、以下に述べる方法によりpH3.8、pH7.0における同活性を測定した。

3 結果及び考察

3 - 1 モデル発酵系におけるエステル生成

酵母培養用培地に遊離脂肪酸、トリグリセライドを加えたモデル系での脂肪酸エチル生成量は1mg/l以下と微量であった。一方、0.4 μm のフィルターろ過したこうじ抽出液6mlに、トリパルミチン500ppmとエタノールを10%加え30℃、72時間の反応で、32ppmのパルミチン酸エチルが生成した(図1)。この結果から、焼酎もろみ中では、トリグリセライド、遊離脂肪酸、脂肪酸エチルという、グリセライドからの脂肪酸生成と同時に、リパーゼによるエタノールと脂肪酸からのエステル合成が、同時進行していると考えられた^{4,12)}。



実験条件

- 1 遊離脂肪酸添加、こうじ抽出液無添加
- 2 遊離脂肪酸、こうじ抽出液添加
- 3 トリグリセライド、こうじ抽出液添加

図1 こうじ抽出液が脂肪酸エチル生成に与える影響

3 - 2 もろみ製造工程における脂肪酸エチル生成
米麹に水と酵母を加えて一次もろみをつくり、これに甘藷を加えて二次もろみを調製し、脂肪酸エチルの生成状況を調べた。一次もろみでは、オレイン酸、リノール酸及びパルミチン酸の各エチルエステルは発酵の進行とともに増加していった(図2)。

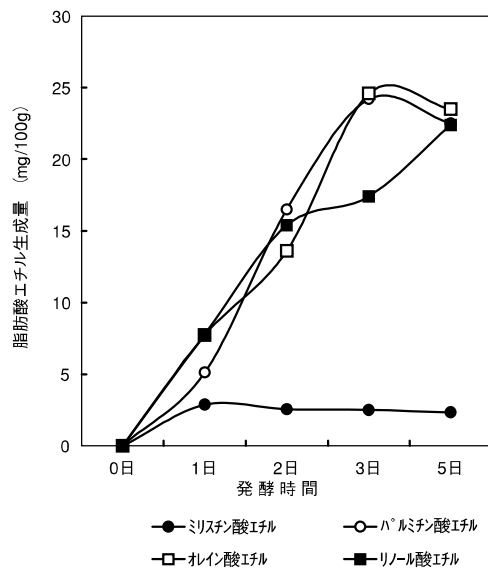


図2 一次もろみにおける脂肪酸エチルの変化

二次もろみにおいては、図3に示すようにパルミチン酸エチルなどは減少傾向にあった。

このことは、リパーゼの油脂に対する分解反応は絶えず逆反応を伴い、遊離脂肪酸と脂肪酸のエステル化反応が可逆的な反応であることから、もろみ中においてエチルエステルの分解、合成が常におこり、エタノール濃度や、温度等の諸条件により生成量に変化が生じると考えられた。図4には、イアトロスキャンで測定した一次もろみの発酵過程におけるトリグリセライド、脂肪酸エチル等の変化を示した。一次もろみ発酵開始時には脂肪酸エチルはほとんど検出できないが、24時間後には脂肪酸エチル生成が確認でき、発酵終了時まで増加傾向にあった。一方、遊離脂肪酸は減少傾向にあり、ジグリセライドはほとんど検出されず、モノグリセライドも発酵期間を通じてわずかな検出量であった。

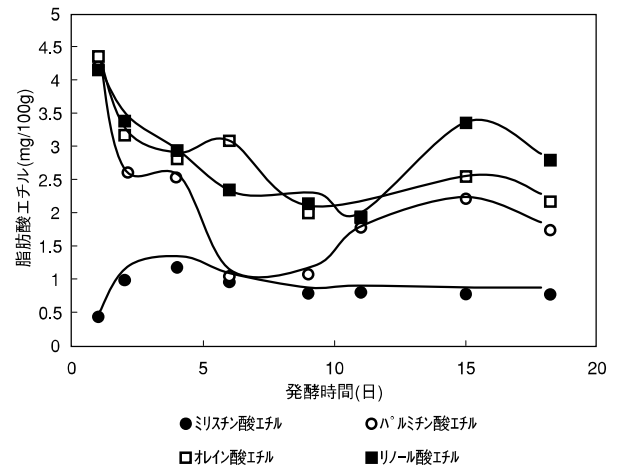
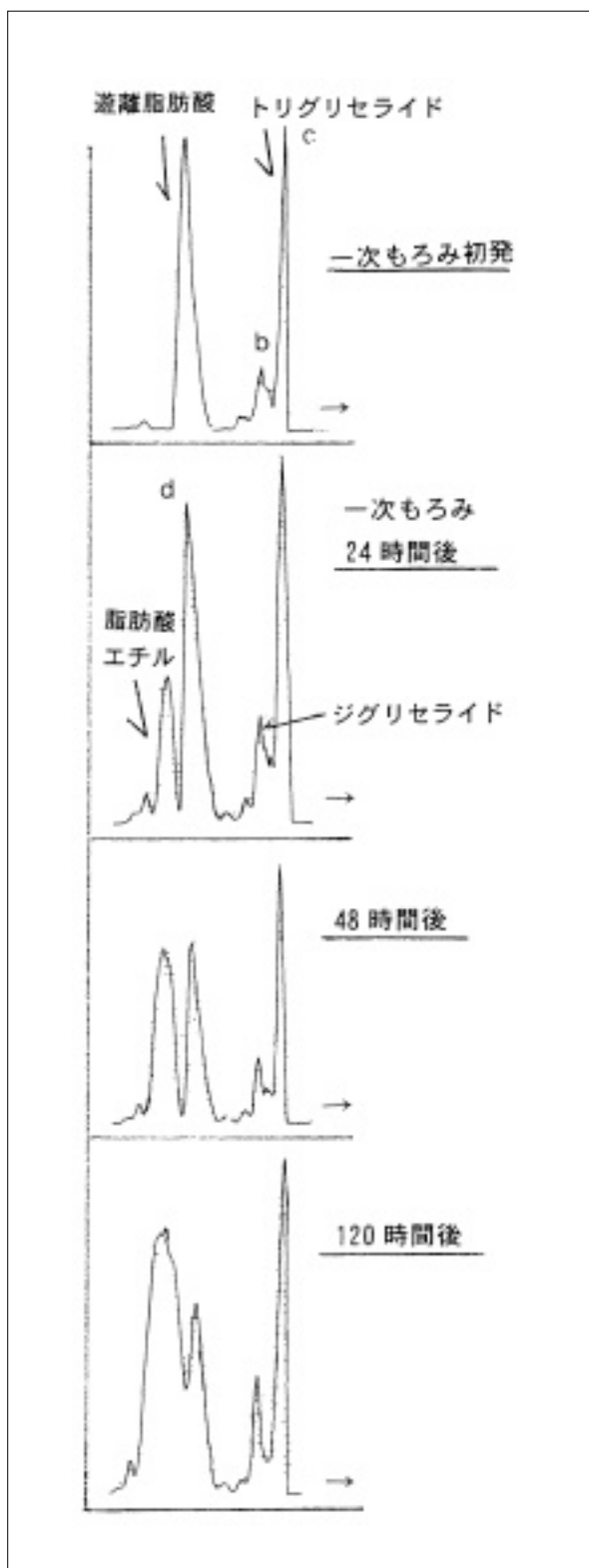


図3 二次もろみにおける脂肪酸エチルの変化

3 - 3 こうじ菌の生産するリパーゼ活性の測定法に関する検討

こうじ菌の生産する酵素群は、一般にpH5.0のM/10酢酸緩衝液(含0.5%NaCl)により、容易に抽出できるが、リパーゼ活性は同抽出液では見出せなかった。そこで、ホモジナイザーによる微粉碎後、エタノールを0~50%含む同酢酸緩衝液で3、14時間抽出し、リパーゼ活性を調べた。



a: トリグリセライド b: シグリセライド
c: モノグリセライド d: 遊離脂肪酸
e: 脂肪酸エチルエステル

図4 一次もろみにおける脂質の変化

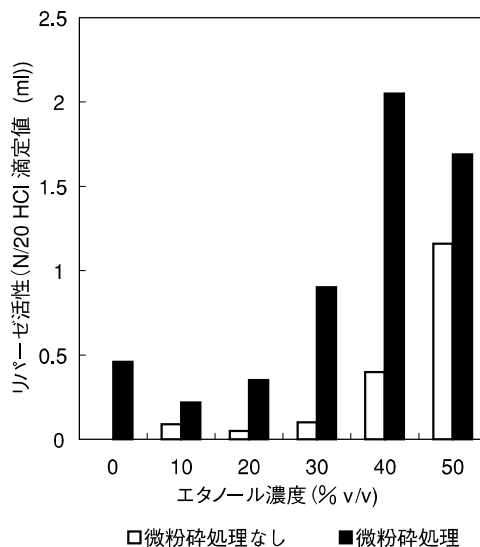


図5 酵素抽出液のエタノール濃度がリパーゼ活性に与える影響

その結果を図5に示す。活性測定は30 , 140分反応後、反応を停止し、10mlのN/20 NaOHを加え、窒素気流下でN/20 HClによる逆滴定法で行った。その結果、ホモジナイズした試料を用いた場合、抽出液中のエタノール濃度が高くなるにつれリパーゼ活性が上昇し、40%の時に最大となり、50%では低下してきた。ホモジナイズ処理をしない試料でも、抽出液のエタノール濃度が高まる程活性はあがっていくがホモジナイズ処理をした試料より活性は低かった。以後、エタノール濃度40%の抽出液を用いることにした。また、リパーゼ活性に与えるpHの影響を調べたところ、pH4.15付近の酸性域とpH6.32の中性域に高い活性が見られ、少なくとも2種類のリパーゼの存在が考えられた。

3 - 4 こうじ製造工程における酵素活性の変化

大麦及び米による総原料重量10kgでこうじを製造し、諸酵素の生成状況を調べた。図7に大麦こうじにおける水分含量の変化と酸の生成状況を、図8に大麦こうじの糖化酵素、図9には蛋白分解関連酵素を、そして図10には、米こうじと麦こうじの酸性域と中性域のリパーゼ活性を示した。Aspergillus kawachiiのグルコアミラーゼや α -アミラーゼについては、Aspergillus oryzeと比較して耐酸性が高いことが報告されている¹⁴⁾が、リパーゼについても、pH3.8で活性が高いことな

だから、耐酸性を有しているものと考えられる。

大麦こうじの方が、酸性域のリパーゼ活性がかなり高かった。中性域では米こうじのリパーゼ活性の方が高くなった。また、パルミトイルセルロースのリパーゼへの親和性を利用して吸着させ、トリトンX-100等に溶出することにより、こうじ菌リパーゼは容易に濃縮できた。

すでにAspergillus oryzaeについては2種類のリパーゼが単離、精製及びクローニングされており^{5,6,12)}、Aspergillus kawachiiの近縁種であるAspergillus nigerでは、膜結合性リパーゼ⁶⁾や耐酸性リパーゼ^{7,8)}あるいは耐熱性リパーゼ⁹⁾の存在が指摘されている。クエン酸酸性下で発酵が進行する焼酎もろみにおいては、耐酸性を有するリパーゼが活性を保持して機能しているのではないかと考えられる。今後、こうじ菌リパーゼの酵素化学的諸性質の解析や、リパーゼ遺伝子のこうじ製造工程における発現等について解明したい。

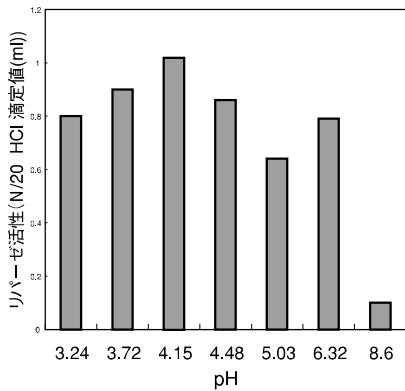


図6 リパーゼ活性のpHによる変化

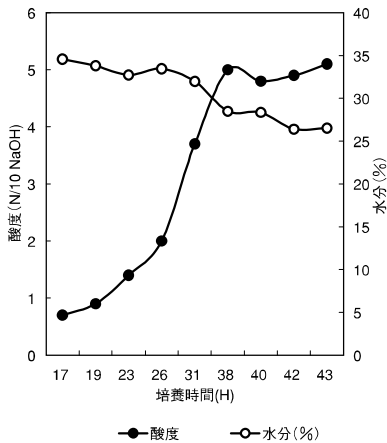


図7 麦こうじ製造工程における酸の生成及び水分含量の変化

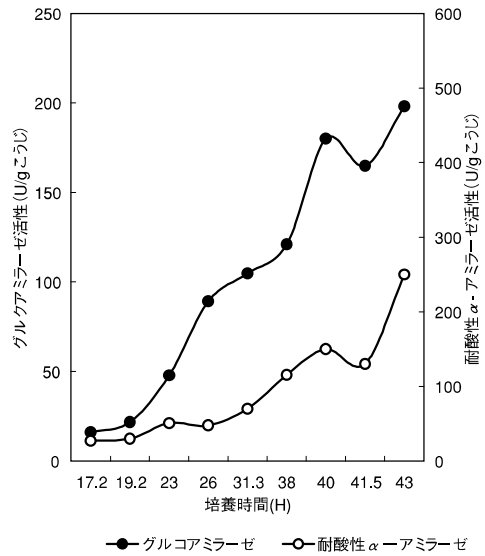


図8 こうじ製造工程における糖化酵素の生成

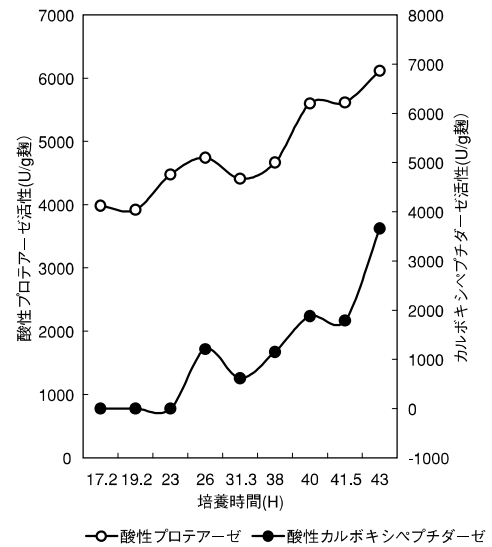


図9 こうじ製造工程における蛋白分解酵素の生成

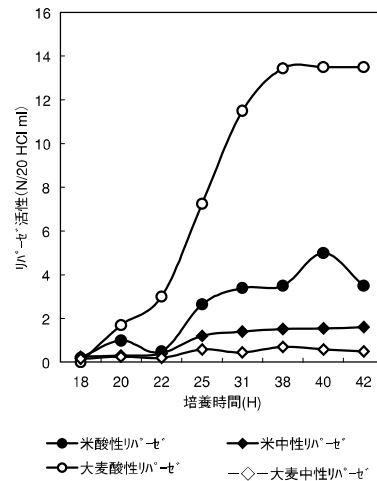


図10 こうじ製造工程におけるリパーゼの生成

要約

脂肪酸エチル生成に関与するこうじ菌のリパーゼについて検討し以下のような結果を得た。

- (1) 甘藷製もろみにおける脂肪酸エチル生成は、一次もろみでは増大し、二次もろみでは幾分減少傾向にあった。
- (2) リパーゼの抽出にはエタノール40%を含む緩衝液の使用とホモジナイズ処理が有効であった。
- (3) リパーゼ活性はpH4.15とpH6.32での活性が高かった。

文献

- 1) 西谷尚道, 菅間誠之助: 醸協, 73, 844~849 (1978)
- 2) 西谷尚道 他: 醸工, 56, 182~187 (1978)
- 3) 第4回改正国税庁所定分析法注解: 注解編集委員会 (1993)
- 4) 岩井美恵子: リパーゼその基礎と応用, p256 (1991) 幸書房
- 5) Kunio Ohnishi, Yohko Yoshida, and Junichi Sekiguchi: J. Fermentation and Bioengineering 77(5)490~495(1994)
- 6) Kunio Ohnishi, Jinichi Toida, Hidekazu

Nakazawa: FEMS Microbiology Letters, 126, 145~150 (1995)

- 7) Akio Sugihara, Yuji Shimada, Yoshio Tominaga: J. Agri. Biol. Chem, 1591~1592 (1988)
- 8) K. Torossian, A. W. Bell: Biotechnology Applied Biochemistry, 13, 205~211 (1991)
- 9) Variketta, M. Haridasan Namboodiri, Rajagopal Chattopadhyaya: Lipids, 35, (5)(2000)
- 10) Yosifumi Horiuti, Sigeyuki Imamura: J. Biochem, 81, 1639~1649 (1977)
- 11) Mahmoud K. Tahoun, M.F. El-Kady A. A. Wahba: Microbios, 47, 45~51, (1986)
- 12) Atsushi Tsuchiya, Hidekazu Nakazawa, Jinichi Toida, Kunio Ohnishi, Junichi Sekiguchi: FEMS Microbiology Letters, 143, 63~67 (1996)
- 13) 石川雄章, 吉沢淑: 農化, 50, 13(3)1~136 (1976)
- 14) 岩野君夫, 三上重明, 福田清治, 椎木 敏, 島田豊明: 醸協, 81, 490~494 (1986)