

焼酎こうじのリパーゼ活性

工藤 哲三・水谷 政美・山本 英樹

Extraction and Assay of Lipase Activity Produced by *Aspergillus kawachii*

Tetsuzo KUDO, Masami MIZUTANI, Hideki YAMAMOTO

焼酎こうじ菌の生産するリパーゼについて、こうじからの抽出法等を検討したところ、トリトンx-100を0.3%含むN/10 酢酸緩衝液（0.5%NaCl含む）による抽出法により、高い活性を有する抽出液が得られた。抽出液はpH 3～6.5の酸性から中性域付近まで活性が幅広くあり、複数のリパーゼの存在が示唆された。

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

1 はじめに

前報において、焼酎こうじの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（0.5%NaCl含む）が有効であることを報告した¹⁾。しかしながら、焼酎こうじから抽出したリパーゼは、低温においてもエタノール溶液中で、速やかに失活した。そこでエタノールに替わる抽出法について検討したところ、界面活性剤トリトンx-100を含む緩衝液により、比較的安定したリパーゼ抽出液を得ることができた。

2 実験方法

2-1 焼酎こうじのリパーゼ抽出法の検討

こうじ菌の生産する主な酵素群は、一般にpH5.0のM/10酢酸緩衝液（0.5%NaCl含む）を用いて、室温抽出で3時間、あるいは5℃以下で20時間で抽出できる²⁾。しかしながら、リパーゼ活性は同抽出液中にはほとんど見出せなかった。そこで、エタノールを40%含む同緩衝液で抽出することによりリパーゼの抽出が可能であることを前報で報告した。しかしながら、5℃以下での20時間の抽出法では、同活性がかなり低下したので、同抽出は失活を招いていると考えられた。こうじ菌を蒸した米や麦に繁殖させる固体発酵こうじでは、リパーゼは脂質と共存していると考えられる。そこで、界面活性剤であるトリトンx-100を用いた抽

出法について検討した。

リパーゼ活性の測定には、乳化系を用い中性域と酸性域における活性を調べた。PVA（ポリビニルアルコール）を乳化剤として調製したオリーブ油乳液5mlとMcIlvaine緩衝液（pH3.8）もしくはリン酸緩衝液（pH7.0）を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/20NaOH溶液を一定量添加後、窒素気流下でN/20HCl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N/20HClの滴定量で表示した。

2-2 Toriton-x100による室温抽出における抽出時間の検討

麦こうじ（種こうじとして河内源一郎商店(株)白こうじ使用）20gを100mlの0.3%トリトンx-100を含むpH5.0酢酸緩衝液（0.5%NaCl含む）で緩やかに攪拌しつつ室温抽出し、経時的に試料採取し上澄液1mlを用いて、活性を30℃50分で測定した。対照として40%エタノール含有同緩衝液による抽出液も同様に測定した。

2-3 乳化系による酵素活性測定時間の再検討

酵素活性を調べる反応時間を20分～80分まで変えて脂肪酸生成量を調べた。

2-4 乳化系におけるpHと酵素活性

M/10クエン酸とM/5Na₂HPO₄で調製されるMcIlvaine緩衝液でオリーブ油乳液のpHを3~8にかえて30℃、50分反応後、逆滴定により遊離脂肪酸を求め、酸性~中性域における酵素活性を見た。

3 結果及び考察

3-1 リパーゼ抽出法の検討

種々の抽出法により4℃、20時間でのリパーゼの抽出を試み、得られた抽出液の活性を比較した。その結果を図1に示す。固体発酵法により、こうじ菌を繁殖させたこうじからの酵素抽出に、通常用いられる0.5%NaClを含む酢酸緩衝液では、ほとんどリパーゼ活性は見いだせなかった。また、トリトンx-100を1%含む同緩衝液も活性はかなり小さかった。これは、高い濃度のトリトンx-100が酵素活性に影響を与えているものと考えられた。0.7%~0.2%の濃度のトリトンx-100では0.3%で最も酵素活性が高かった。

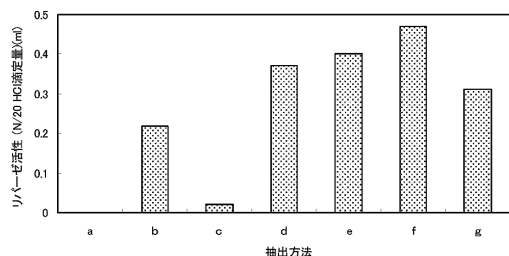


図1 焼酎こうじのリパーゼ抽出法の検討

a: N/10酢酸緩衝液 (0.5%NaCl含) b: 40%エタノール含有緩衝液
 c: トリトンx-100 1%含有緩衝液 d: トリトンx-100 0.7%含有緩衝液
 e: トリトンx-100 0.5%含有緩衝液 f: トリトンx-100 0.3%含有緩衝液
 g: トリトンx-100 0.2%含有緩衝液

3-2 室温抽出における抽出時間の検討

室温抽出における抽出時間とリパーゼ活性について検討した。40%エタノールを含む緩衝液による抽出法では抽出時間が255分になると活性は半減したものの、0.3%トリトンx-100を用いる抽出法では35分~255分でほとんど活性は変わらなかった。このことからトリトンx-100を用いる抽出では、こうじを粉碎等の処理をせずに1時間程度で抽出できると考えられた。ただ抽出時間をさらに長くすると活性が低下したことから3時間以内の抽出が適していると思われる。

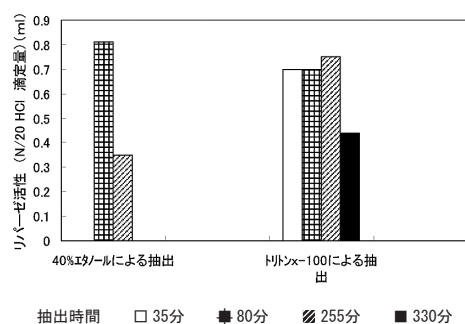


図2 室温抽出におけるこうじからのリパーゼ抽出時間の検討

3-3 乳化法における酵素反応時間の検討

ポリビニルアルコールを乳化剤に用いた乳化系によるリパーゼを測定しているが、反応時間と遊離脂肪酸生成量について再検討した。その結果を図3に示す。30℃において50分までの反応では反応時間と遊離脂肪酸量にほぼ直線の関係が得られたことから、反応時間は50分とした。

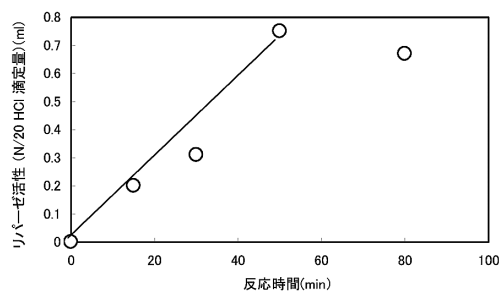
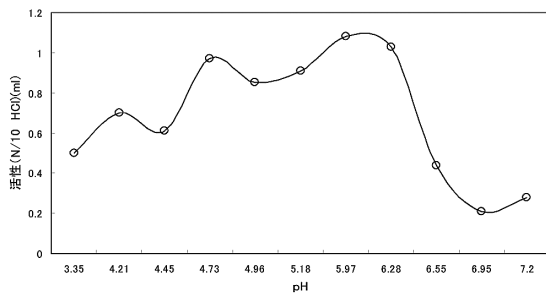


図3 リパーゼ活性測定における反応時間の検討

PVAを乳化材として調製したオリーブ油乳液5mlとMcIlvaine緩衝液(pH3.8)を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℃で反応させ定期的に試料を採取し、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/20NaOH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、その滴定値をそのまま活性値として表示した。

3-4 こうじ菌のリパーゼ活性とpH

図4に乳化系のpHを変えて活性を測定した結果を示した。酸性側から中性域にかけてリパーゼ活性があり、いくつかのリパーゼの混在が示唆された^{3,4,5,6)}。



0.3%トリトンx-100を含むpH5.0酢酸緩衝液で45分間抽出したこうじ抽出液を用いてオリーブ油乳化液pHをMcIlvaine緩衝液を用いて調整して30℃、50分反応後の遊離脂肪酸量を逆滴定で求めた。

図4 こうじ菌のリパーゼ活性とpH

4 まとめ

焼酎こうじ菌の生産するリパーゼについて、固体発酵こうじからの抽出法等について検討し以下の結果を得た。

- 1) トリトンx-100を0.3%含むN/10 酢酸緩衝液(0.5%NaCl含む)による抽出法により、高い活性を有する抽出液が得られた。
- 2) 0.3%トリトンx-100を用いた抽出法における抽出時間は、4℃で20時間、室温では1時間が適していた。
- 3) 抽出液はpH3~6.5の酸性、中性域付近まで活性が幅広くあり、複数のリパーゼの存在が示唆された。

5 文献

- 1) 工藤哲三, 水谷政美, 本部恭平, 太田一良, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, **46**, 59 (2001)
- 2) 第4回改正国税庁所定分析法注解: 注解編集委員会 (1993)
- 3) Variketta, M Haridasan Namboodiri, Rajagopal Chattopadhyaya, *Lipids*, **35**, 5 (2000)
- 4) Yosifumi Horiuti, Sigeyuki Imamura, *J. Biochem*, **81**, 1639 (1977)
- 5) Mahmoud K. Tahoun, M. F. Ei-Kady, A. A. Wahba, *Microbios*, **47**, 45 (1986)
- 6) Atsushi Tsuchiya, Hidekazu Nakazawa, Jinichi Toida, Kunio Ohnishi, Junichi Sekiguchi, *FEMS Microbiology Letters*, **143**, 63 (1996)