

各種種麴を用いた麴製造とそのリパーゼ活性

工藤 哲三*¹・水谷 政美*¹・山本 英樹*¹・竹下 淳子*²・柏田 雅徳*¹

Lypase Puroduction by Some Strains of Koji-mold Cultivated on Steamed barley

Tetsuzo KUDO, Masami MIZUTANI, Hideki YAMAMOTO
Junko TAKESHITA and Masanori KASHIWADA

醸造に用いられている10種類の種麴を使って大麦を原料とした製麴を行い、酵素活性等を比較した。その結果、焼酎製造に用いられている白麴、黒麴系種麴を用いた場合、 β -グルコシダーゼ活性や酸性領域でのリパーゼ活性が、黄麴系種麴を用いた場合より高い値を示した。

キーワード：焼酎 麴菌 リパーゼ ITS領域

1 はじめに

こうじ菌は、味噌や醤油、あるいはみりん、清酒、焼酎などの発酵食品の製造において不可欠な微生物である。このこうじ菌のつくる生産物である酵素群について検討した。特に酸性領域でのリパーゼ活性について、焼酎製造用黒麴系種麴と清酒、味噌醤油製造用の黄麴系種麴を用いて、大麦による製麴を行い、酵素活性等を比較検討した。併せて、他の酵素群の活性、菌体生成量についても測定して比較した。また、rDNAのITS領域の部分塩基配列による麴菌の分類を試みた。

2 実験方法

2-1 供試種こうじ

市販されている焼酎用の種麴菌（白麴3点、黒麴 (*Asp.awamori*, *Asp.kawachii*系) 3点)、泡盛用麴菌1点、味噌、清酒及び醤油用の黄麴菌 (*Asp.orzye*, *Asp.soya*系) 3点の計10点を用いた。

2-2 製麴法

2kgの大麦を蒸きょう後、34~37°Cで種付けし、36~42°Cで40時間培養後、品温を2時間程度33°C以下に下げ出麴とした。

2-3 麴の酵素活性等の測定法

出麴水分、酸度等は常法に準じて測定し、 α -

アミラーゼ、耐酸性 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼおよびカルボキシペプチダーゼ活性等は所定分析法に準じて測定した。

リパーゼ活性は、界面活性剤トリトンx-100をN/10 酢酸緩衝液 (0.5%NaCl含有) に0.3%加えて抽出液とし、4°Cで一晩もしくは室温で1時間抽出した。活性は2%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、透析処理した酵素液を用い、pH3.8の酸性域とpH6.8の中性域で測定した。

β -グルコシダーゼは、p-nitrophenyl- β -D-glucosideを基質として、酵素反応により遊離するp-nitrophenolを定量することにより活性を調べた^{1,2)}。また、Sakuraiら³⁾の方法により細胞壁構成成分N-acetylglucosamineを定量し、麴菌体量を推定した。

2-4 ITS領域塩基配列の比較によるこうじ菌の分類

Makimura等⁴⁾の方法により液体培養したこうじ菌体からDNAを抽出し、合成オリゴヌクレオチドプライマー18SF1と58SR1を用い、リボソーム28S rDNAの部分塩基配列をPCRにより増幅した後、サイクルシーケンス反応及びDNAシーケンサーによる塩基配列解析によりこうじ菌の分類を試みた。

*1 応用微生物部

*2 非常勤職員

3 結果及び考察

3-1 アミラーゼ, プロテアーゼ系酵素群の活性比較

アミラーゼ、プロテアーゼ系酵素群の活性等について、図1に黒麴系麴菌、白麴系麴、及び黄麴系麴菌の酵素活性の一例を示した。

α -アミラーゼは、黄麴の方が黒麴系、白麴系種麴でつくった麴より5~9倍高く、耐酸性アミラーゼは逆に黒麴、白麴の方が数倍高かった。

グルクアミラーゼは黒麴、白麴の方が黄麴よりもやや高めであった。酸性カルボキシペプチダーゼはやや黄麴の方が高い傾向にあった。 β -グルコシダーゼは黒麴、白麴の方が1.5~4倍程度、黄麴よりも高かった。また、黒麴、白麴がクエン酸を主体とする有機酸を生成するのに対し、黄麴のつくる有機酸はリンゴ酸が主体であった。

表1 アミラーゼ, プロテアーゼ系酵素活性等の比較

	α -アミラーゼ	耐酸性 α -アミラーゼ	グルクアミラーゼ (Unit/g麴)	酸性プロテアーゼ	酸性カルボキシペプチダーゼ	β -グルコシダーゼ (%麴乾物)	N-アセチルグルコサミン	クエン酸 (mg/麴100g)	リンゴ酸
白麴 1	58	78	184	4,824	4,440	796	2.8	963	40
白麴 2	39	116	62	5,088	1,860	429	2.1	248	54
白麴 3	56	74	169	3,996	1,810	319	1.6	349	22
黒麴 1	44	96	104	3,936	1,884	734	2.3	1,146	34
黒麴 2	30	164	41	2,340	1,800	318	1.8	367	28
黒麴 3	39	119	107	3,120	1,594	441	2.2	371	55
黒麴 4	43	117	86	3,216	2,000	526	1.9	368	17
黄麴 1	382	31	67	6,096	14,621	190	2.0	—	20
醤油麴 1	148	52	59	3,672	1,901	189	2.5	—	64

3-2 リパーゼ活性

これまでの試験で、麴菌の生産するリパーゼは、エタノールや界面活性剤を含んだ緩衝液でないほとんど抽出できなかつた^{5,6)}。そこでトリトンx-100を0.3%含むN/10酢酸緩衝液(0.5%NaCl含む)を用いて抽出した。黄麴系麴菌には、酸性領域でのリパーゼ活性がほとんど見いだせなかつたのに対し、黒麴、白麴系麴菌では両者ともに活性を有していた(図1)。

3-3 ITS領域を用いたこうじ菌の分類

こうじ菌のITS領域の塩基配列の違いを利用して、こうじ菌の種属分類を試みたところ、*Asp. oryzae*(黄麴菌)と*Asp. kawachii*(白麴菌)、*Asp. awamori*(黒麴菌)は明確に区別できた。しかしながら、*Asp. kawachii*と*Asp. awamori*は区別できず、市販種こうじ及び標準株として供試したIFO4033, 4388, 6082, 4308株等のいわゆる

白こうじと黒こうじについてもITS領域での判別は不可能であった。

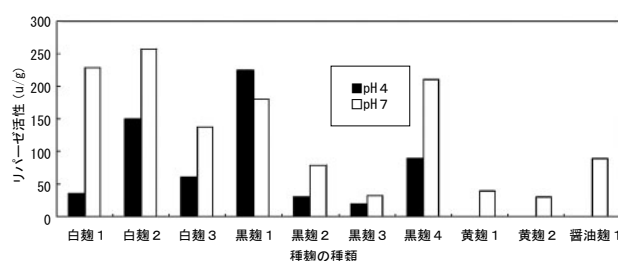


図1 pH 4, pH 7におけるリパーゼ活性

4 まとめ

黒麹系麹菌と黄麹系麹菌では、アミラーゼ、プロテアーゼ活性等の異なることは、これまでの多くの試験研究で指摘されている。今回の試験では β -グルコシダーゼ活性についても違いが見られること、酸性域でのリパーゼ活性が黒麹、白麹系麹菌で検出されるのに対し、黄麹系麹菌では全く見いだされなかった。

5 参考文献

- 1) 土壤微生物実験法, 養賢堂, p367(1992)
- 2) 太田剛他, 醸協, **86**(7), p536-539(1991)
- 3) Y.Sakurai etc, *Agri. Biol. Chem.*, **41**(4), 619(1977)
- 4) K.Makimura etc, *J. Clinical, Microbiology*, **37**(4), 920~924(1999)
- 5) 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**, 159(2001)
- 6) 工藤哲三・水谷政美・山本英樹, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, **48**, 143(2003)