麴のリパーゼ活性に及ぼす培地成分の影響†

国本正彦*・星野 保**・金庭正樹*

Effect of Medium Components on Lipase Activity in "Koji"

Masahiko KUNIMOTO*, Tamotsu HOSHINO** and Masaki KANENIWA*

* Shimonoseki University of Fisheries, 2-7-1, Nagatahoncho, Shimonoseki-shi, Yamaguchi, 759-65

** Faculty of Fisheries, Hokkaido University, 3-1, Minato-cho, Hakodate-shi, Hokkaido, 041

Lipase activity were examined in "Rice koji", "Soybean koji", "Okara koji" and "Sardine koji", molded with *Aspergillus oryzae*. "Soybean koji", "Okara koji" and "Sardine koji" exhibited the lipase activity, while, the activity was negligible in "Rice koji".

Futhermore, effect of olive oil and pepton on the lipase activity was examined by using a mycelium. When *A. oryzae* was cultivated in the malt extract-dextrose medium, the lipase activity was not detectable. While, when the mycelium subsequently cultivated in the medium containing pepton, the lipase activity was high, but low in the medium containing olive oil. Lipase activity was mainly influenced by the nitrogenous compound in "Koji" such as pepton.

(Received May 1, 1990)

イワシミールに *Aspergillus oryzae* を接種して製麴した麴は製麴前に比べ脂質含量が著しく減少する。これは製麴中にミールの脂質がこの菌により分解されたためであり、この脂質の分解にはリパーゼが関与していることを既に報告した¹⁾。一方、麴のリパーゼに関する報告は少なく、豆みそについての岡田ら²⁾とみそ玉麴についての KIUCHI ら³⁾の報告があるに過ぎず、さらに異なる基質を用いた麴のリパーゼを検討した研究はみあた

らない。そこで、本研究では成分の異なる米、大豆、オカラおよびイワシミールを基質として *A. oryzae* IFO 4202 を接種して製麴し、基質の成分と麴のリパーゼ活性との関係について検討し、さらに、リパーゼ活性の発現に及ぼす脂質とタンパク質関連物質としてのペプトンの影響について検討した。

1. 実験方法

1. 供試菌株と製麴

供試菌株は *Aspergillus oryzae* IFO 4202 株を用いた。米麴の製麴は1986年長野県産多用途米破碎精米(精白度90%)を一晩水に浸せきした後、水切りし、120℃、30分間加熱滅菌したものに供試菌を接種して28℃で培養することにより行った。大豆麴は1986年産十勝大豆(豊鈴)を水に浸せきし、重量が1.5倍になるまで吸水させたものを120℃、20分間蒸煮した。このものをチョッパー(5mmスクリーン)を通して造粒し、120℃、30分間加熱滅菌後、供試菌を振種し、28℃で製麴した。オカラ麴は乾燥オカラ(みずず豆腐株式会社製)を水分含量50%になるよう加水した後、120℃、30分間加熱滅菌し、供試菌を接種して28℃で製麴した。イワシ麴は、前報¹⁾と同様に製麴した。

2. *A. oryzae* の培養

麦芽エキス-グルコース培地で28℃、48時間振とう培養して菌糸体を調製した。この菌糸体を、脂質を含む培地で培養する場合は、ツァベックドック培地から糖を除いた培地に移植して28℃、6時間前培養を行った後、脂質濃度2.5%になるよう3%のポリビニルアルコールで乳化した25%とオリーブ油乳化液を添加して、さらに培養した。菌糸体をペプトンを含む培地で培養する場合は、ツァベックドック培地から硝酸ナトリウムを除いた培地で6時間前培養した後、ペプトン濃度1%になるようにペプトンを添加して、さらに培養した。このとき、2.5gの湿菌糸体を50mlの培地で培養した。

3. リパーゼの抽出とリパーゼ活性の測定

前報¹⁾と同様に、麴5gを蒸留水15mlとともに氷冷下で5分間ホモジナイズした後、5℃で6000×g、15分間遠心分離し、上澄液を粗酵素液とした。オカラ麴の場合は、麴5gに蒸留水15mlを加え、海砂とともに乳鉢で15分間磨砕し、ガーゼでろ過して得たろ液を遠心分離し、上澄液を粗酵素液とした。また、培養液の場合は、培地を菌糸体とともに氷冷下で5分間ホモジナイ

† *Aspergillus oryzae* のリパーゼに関する研究(第2報)(前報、文献1))

* 水産大学校(〒759-65 山口県下関市吉見永田本町1944)

** 北海道大学水産学部(〒041 北海道函館市港町3-1-1)

ズし、これを東洋ろ紙 No. 2 でろ過し、得られたろ液を粗酵素とした。リパーゼ活性の測定は前報と同様に Dole の方法⁴⁾ に準拠して行い、生成した脂肪酸を中和するために要した 0.01 N NaOH の ml 数を見掛けのリパーゼ活性とした。

2. 結果および考察

基質として成分の異なる米、大豆、オカラおよびイワシミールを原料として製麴した麴のリパーゼ活性を Table 1 に示した。この結果から大豆、オカラおよびイワシミールの麴には高いリパーゼ活性が認められたが、米麴では殆ど認められなかった。リパーゼ活性の弱い米麴の基質である米の成分を大豆、オカラおよびイワシミールの成分と比較すると、米では炭水化物が主成分でタンパク質が少なく、脂質は殆ど含まれていない⁵⁾。このことから、基質成分の脂質またはタンパク質関連物質がリパーゼ活性の発現に影響しているものと推察された。そこで、さらにタンパク質関連物質としてペプトンを脂質としてオリーブ油を添加した培地でリパーゼ活性に及ぼすペプトンとオリーブ油の影響を検討した。

まず、麦芽エキス-グルコース培地で 25°C、72 時間振

Table 1 Lipase activity in some kinds of materials molded, "Koji"

Molding time (h)	Materials			
	Rice	Soybean	Okara	Sardine meal
48	0.5	1.3	9.2	9.3
72	0.6	5.1	4.4	2.9
96	0.5	2.2	3.0	2.2

Materials were molded for 48, 72 and 96 hours at 28°C. Crude enzyme was prepared as follow; 5 g of "Rice, soybean and sardine koji" was homogenized with 15 ml of water, respectively. After subsequent centrifugation, the supernatant was obtained as crude enzyme. For "Okara koji", 5 g of "Koji", 15 ml of water and sea sand were homogenized in mortar, and then homogenate was filtered through gauze. Furthermore, this filtrate was centrifuged as the same manner as the mentioned above. Enzymic reaction was carried out in the medium containing 2 ml of olive oil emulsion, 1 ml of 0.4 M phosphate buffer (pH 7.0) and 1 ml of crude enzyme at 37°C for 60 minutes, and activity was presented as milliliters of 0.01 N NaOH required for titrate the free fatty acid liberated from substrate.

とう培養して菌糸体を調製したが、この培地での培養では菌糸体にも培地にもリパーゼ活性は認められなかった。このリパーゼ活性のない菌糸体を、ツァペック-ドック培地の硝酸ナトリウムの代わりにペプトンを 1% になるように添加した培地とグルコースの代わりに 2.5% になるようにオリーブ油を添加した培地に移し、さらに 25°C で培養した結果を Fig. 1 に示した。脂質を添加した場合もペプトンを添加した場合もリパーゼ活性が発現した。しかし、脂質を添加した場合のリパーゼ活性は弱かった。微生物のリパーゼ生産に及ぼす脂質の影響については、脂質の添加がリパーゼ生産を誘導する場合⁷⁻¹⁰⁾と、反対に、阻害する場合がある¹¹⁾¹²⁾。A. oryzae では培地への脂質の添加によるリパーゼ生産の阻害はなかったが、促進も殆ど認められなかった。ペプトンを添加した場合には活性が強く、窒素源としてのペプトンがリパーゼ活性の発現に大きく関与していた。一般に微生物のリパーゼ生産には窒素源濃度の高い培地が用いられることが多いが、しかし、Mucor lipolyticus⁸⁾ ではペプトンがリパーゼの生産を阻害することが報告されており、微生物によりリパーゼ生産に及ぼすペプトンの影響が異なるものと考えられる。A. oryzae ではタンパク質関連物質であるペプトンがリパーゼの生産を促進することから、米麴ではリパーゼ活性が弱く、大豆、オカラおよびイワシミールの麴でリパーゼ活性が強いのは基質のタ

Fig. 1 Effects of olive oil and pepton on lipase activity in *Aspergillus oryzae*

Crude enzyme was prepared to homogenize the medium together with mycelium, and filtered through Toyo No. 2 filter paper. Lipase activity was assayed in the same manner as shown in Table 1.

○—○: pepton added,
△—△: olive oil added.

ンパク質関連物質の影響であると推察される。

3. 要 約

米, 大豆, オカラおよびマイワシミールを基質にした麴のリパーゼ活性を調べた結果, 大豆, オカラおよびマイワシ麴ではリパーゼ活性が高かったが, 米麴では活性は殆ど認められなかった。また, *Aspergillus oryzae* のリパーゼ活性の発現に及ぼす培地中の脂質とペプトンの影響を検討した結果, 培地中へのペプトンの添加によりリパーゼ活性が発現した。この結果から, 麴中のリパーゼ活性の発現には原料中のタンパク質関連物質が影響しているものと推察した。一方, リパーゼ活性の発現への脂質の影響はペプトンの場合に比べ小さかった。

本研究を行うにあたり, 終始有益な御助言を賜った北海道大学水産学部信濃晴雄教授ならびに東海物産株式会社食品研究所長望月 務博士に心より謝意を表す。本研究は小森記念財団学術研究助成金に依った。

文 献

- 1) 国本正彦・星野 保・中野道紀: 日水誌, 55, 1097 (1989).

- 2) 岡田安司・横尾良夫・竹内徳男: 日食工誌, 22, 379 (1975).
- 3) KIUCHI, K., OHTA, T. and EBINE, H.: *J. Ferment. Technol.*, 53, 869 (1975).
- 4) 藤井節郎・奥田拓道: 脂質代謝実験法, (共立出版, 東京), p. 137 (1967).
- 5) 科学技術庁資源調査会編: 四訂日本食品成分表, (大蔵省印刷局, 東京), p. 50, 98-100, 108 (1982).
- 6) OHTA, Y., SUZUKI, M. and YAMADA, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 32, 390 (1968).
- 7) TSUJISAKA, Y., IWAI, M., FUKUMOTO, J. and OKAMOTO, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, 37, 837 (1973).
- 8) NAGAOKA, K., YAMADA, Y. and KOAZE, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, 33, 299 (1969).
- 9) 仲 恭寛・天野 滋・山下孝二: 油化学, 35, 459 (1986).
- 10) 山田浩一・町田晴夫・東 俊彦・植田克子: 農化, 37, 645 (1963).
- 11) EITENMILLER, R.R., VAKIL, J.R. and SHAHANI, K.M.: *J. Food Sci.*, 35, 130 (1970).

(平成 2 年 5 月 1 日受理)