

加工食品への活用を目的とした麹菌の研究 (第2報)

長沼孝多・橋本卓也・木村英生

Isolation of *Aspergillus oryzae* from Nature Field in Yamanashi Prefecture and Its Application in Food Processing (2nd Report)

Kota NAGANUMA, Takuya HASHIMOTO and Hideo KIMURA

要 約

麹菌を液体培養することにより、食品加工に有効なタンパク質分解酵素活性を有する「液体麹」の開発を試みた。各種の調製条件を検討した結果、麹菌を用いて麹を調製し、得られた麹に対して10倍量となるように蒸留水を加えて35℃で振盪培養することで、最も高い酵素活性を有する液体麹が作られた。酵素活性は培養開始後7~8日目まで最大となった。液体麹に野菜試料としてニンジン漬けを漬けたところ、ニンジン試料の遊離アミノ酸の増加が確認できた。以上の結果から、液体麹を調製し、野菜等の加工に活用する基礎的な条件が得られた。

1. 緒 言

麹¹⁾は、穀類に糸状菌を生育させたものである。麹には、糸状菌が産生するデンプン分解酵素やタンパク質分解酵素が蓄積され、わが国においては味噌、醤油、清酒等の製造に利用されてきた。我々は昨年度、新規な有用麹菌を検索するため、本県の自然環境から麹菌の分離を試み、*Aspergillus oryzae*と推察される2株を得た。

わが国における味噌や清酒などの醸造では、麹菌を原材料の一部である大豆や米等の穀類に培養(固体培養)し、醸造に必要な各種酵素活性を得ている。一方、麹を穀類を原材料としない食品の加工に使用する場合、例えば農産物を麹に漬けた麹漬のような場合では、生産物には麹由来の香味が残留することから、我々はその改善方法として麹の液体培養を検討した。

液体培養は一般的に、固体培養と比較して管理に優れ均一性が高い等の利点があるが、麹菌においては酵素活性が低く活用が難しいものであった。本研究では、麹を利用する食品加工法について検討するため、麹菌の培養に穀物を使用せず、液体で培養した際に酵素活性を有する液体麹の調製法を試験した。

2. 実験方法

2-1 供試菌株

供試麹菌として、既報²⁾の分離麹菌2株(分離株No.3, 分離株No.6)および市販の乾燥麹(1-65:徳島製麹社製)から分離した麹菌を使用した。また、標準菌株として(独)製品評価技術基盤機構から購入した *A.*

oryzae NBRC33013を使用した。

2-2 麹の調製方法

供試麹菌を麹とする場合は、岡崎³⁾の標準製麹試験法に準じて行った。まず、あらかじめ作製した麹をろ紙で覆い、40℃で3時間、さらに60℃で12時間乾燥してふるいにかけて麹菌胞子を調製した。次に、胞子を0.05% Tween80水溶液に分散後、50 mLの滅菌蒸留水に分散した。これを9 cmシャーレに入れた15 gの乾燥アルファ化米(AA-70, 徳島製麹社製)に7.5 mL接種し、恒温恒湿器(TPAC-120-20, いすゞ製作所社製)で35℃32時間培養した。乾燥麹から麹を調製する場合は、1/2量の滅菌蒸留水を加えた。

2-3 酵素活性の測定

タンパク質酵素活性の測定は、醸造分析キット(キッコーマンバイオケミファ社製)により、酸性カルボキシペプチダーゼを測定した。試料が麹の場合は、麹10 gに0.5% NaClを含む10 mM 酢酸緩衝液(pH5.0) 50 mLを加え、約4℃で一晩抽出した抽出液について測定した。液体麹の場合は、試料の上清について測定した。

2-4 液体麹の調製法の検討

下記の手法により、液体麹の調製方法の検討を行った。

2-4-1 供試麹菌を直接接種する液体麹調製法

供試麹菌を、坂ロフラスコに入れた滅菌蒸留水300 mLあるいはYM液体培地(DIFCO社製)300 mLに約 10^6 個/mLとなるように接種し、35℃で静置培養、あるいは35℃で振盪培養(120 rpm)した。

また、蒸留水あるいはYM液体培地に細菌用粉末寒

天を 0.2, 0.5, 1.0 あるいは 1.2% (w/v) 加え滅菌した培地においても、同じ条件で培養した。

2-4-2 麴を用いた液体麴調製法

調製した麴 30 g を、坂口フラスコに入れた滅菌蒸留水 270 mL に加え 10 倍量とし、35°C で静置培養、あるいは 35°C、120 rpm で振盪培養あるいは静置培養した。滅菌蒸留水に加える基質として、酒粕（白鶴酒造社製）あるいは米ぬかを使用した。また、麴 30 g を 120 mL の滅菌蒸留水に加えた場合（5 倍量）においても同様に試験を行った。

2-5 液体麴の野菜類への利用

調製した液体麴 180 mL に対し、約 1 cm 各に切断したニンジン 20 g を加え、15°C で 14 時間浸漬を行ったものを試料とした。対照として、麴 180 g に漬込したものを調製した。

試料は、全自動アミノ酸分析機（JLC-500/V2, 日本電子社製）で遊離アミノ酸含有量を測定した。遊離アミノ酸測定用試料の調製は、漬込後の試料を裁断し、70%エタノールにより加熱環流抽出⁴⁾を行い、抽出液を減圧乾固（40°C）した後に 0.01N 塩酸に溶解した。

3. 結果

3-1 供試麴菌を用いて調製した麴の酵素活性

供試した分離株 No.3, 分離株 No.6, 乾燥麴および *A. oryzae* NBRC33013 を用いて調製した麴の酸性カルボキシペプチダーゼ酵素活性を表 1 に示した。

分離株 No.6 は、比較的高い酵素活性を示した。

表 1 供試菌で調製した麴の酸性カルボキシペプチダーゼ活性

供試菌の種類	酸性カルボキシ ペプチダーゼ活性
	(U/g・麴)
分離株 No.3	1732
分離株 No.6	2477
乾燥麴	1165
<i>A. oryzae</i> NBRC33013	1208

3-2 液体麴調製法の検討

供試麴菌を直接培養液に接種する液体麴調製を検討したところ、いずれの条件においても酵素活性はほとんど認められなかった（図表省略）。なお、培地調製時に寒天を加えた試験系の場合、寒天濃度を増加させるにしたがい、一部の酵素活性（ α -アミラーゼ活性）が増加する傾向が認められたが、その活性は低かった。したがって、本法による液体麴の調製は困難と判断した。

一方、麴を用いた液体麴調製法を検討し、市販乾燥麴を液体培地に添加して培養した場合の酵素活性を図 1 に示した。乾燥麴において、蒸留水、酒粕あるいは米ぬかを加えた蒸留水での培養を行ったところ、特に蒸留水において 6 日の振盪培養を行った際に酵素活性の上昇が認められた。

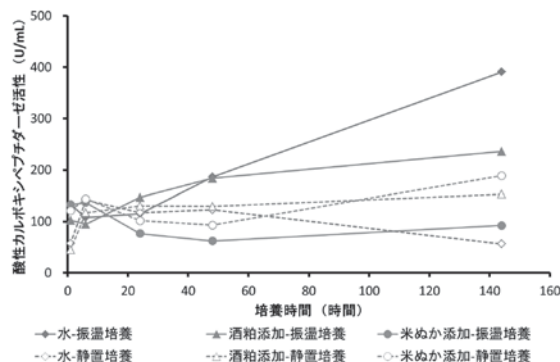


図1 基質による液体麴の酵素活性の違い（乾燥麴）

また、乾燥麴と蒸留水の比率を変えた場合の酵素活性を図 2 に示した。蒸留水の比率が 5 倍量の場合、10 倍量の場合と比較して液体麴の酵素活性は高まらず、およそ半分以下であった。

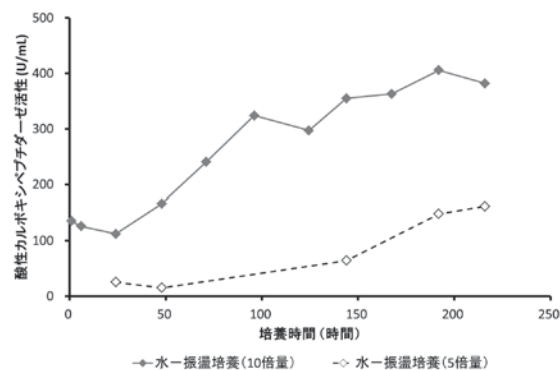


図 2 水の比率による液体麴の酵素活性の違い（乾燥麴）

図 3 に、調製した液体麴の外観を示した。米粒の周りに、球状に麴菌の繁殖が認められた。なお、蒸留水の比率が 5 倍量の場合、この繁殖は認められなかった。



図 3 米粒に球状に繁殖した麴菌

そこで、分離菌 No.3 および No.6 を用いて麴を調製し、同様に 10 倍量の滅菌蒸留水で振盪培養を行った(図 4)。分離株 2 株においても、同様の方法で酵素活性が高まることが確認できた。

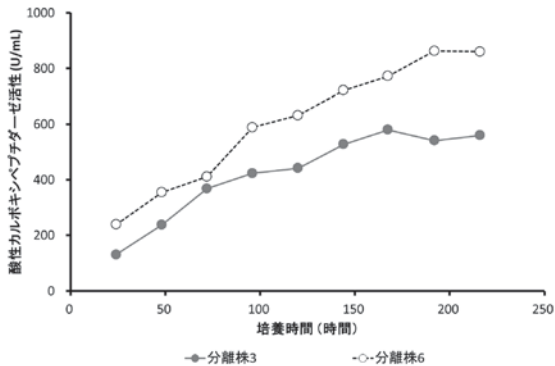


図 4 分離菌による液体麴の酵素活性

3-3 液体麴の野菜類への利用

ニンジンを野菜試料として、乾燥麴で調製した麴および液体麴に 14 時間漬けた後の遊離アミノ酸の含有量を図 5 に示した。

麴および液体麴に漬けることにより、漬け込み前のニンジン試料と比較して遊離アミノ酸の総量が増加した。増加したアミノ酸の傾向は麴漬け込み区と液体麴漬け込み区でやや異なり、麴漬け込み区では特にグルタミン酸の増加が認められ、液体麴漬け込み区では、アルギニンやチロシン、ロイシンなどが検出された。なお、アラニンはどちらでも増加した。麴と液体麴では、そのプロテアーゼが作用する基質が異なることが推察された。

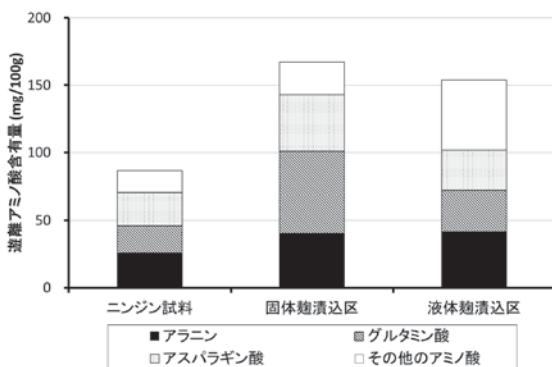


図 5 漬込後のニンジンにおける遊離アミノ酸含有量

4. 考 察

麴菌を液体培養し、食品加工に有効なタンパク質分解酵素活性を有する液体麴の調製を目的として、培養法や基質などを検討した。その結果、麴菌から麴を調製し、蒸留水を 10 倍量となるように加え、35℃で振盪培養す

ることで、酵素活性をもつ液体を調製することができた。

液体麴の酵素活性は、培養後 24 時間程度は麴の酵素活性(表 1)の 10 分の 1 程度であり、液体麴の希釈倍率(10 倍)とほぼ同程度であることから、麴の酵素が抽出されている可能性が考えられた。一方、培養時間とともに酵素活性が上昇していることから、少なくとも培養 48 時間以降は、培養とともに生産された酵素が存在するものと推察された。

前述したとおり、麴菌は液体培養の場合に酵素活性が低いことが知られている。この理由の一つとして、遺伝子発現の挙動が挙げられる。例えばグルコアミラーゼ活性には固体培養(特に米麴培養)でのみ特異的に発現する遺伝子が同定⁵⁾されている。この酵素は、難消化性基質を加えることで、活性が高まることが報告⁶⁾⁷⁾されている。しかし今回の検討においては、麴菌から孢子を調製し液体培養する方法において、麴菌にとって難消化性のタンパク質(プロラミン)を含むと考えられた酒粕の添加を試みたが、大きな効果は認められなかった。

調製した液体麴を使い、野菜の漬け込みを行ったところ、野菜の遊離アミノ酸が増加した。このことから、液体麴はタンパク質分解酵素活性を有しており、野菜類の加工に活用できることが示唆された。

5. 結 言

1. 液体麴の調製法を検討した。麴に 10 倍量となるように水を加えて 35℃で振とう培養することにより、タンパク質分解酵素活性が認められた。
2. 液体麴を用いた野菜の漬込において、遊離アミノ酸の増加が認められた。

参考文献

- 1) 村上英也: 麴学, 日本醸造協会 (1986)
- 2) 長沼孝多, 橋本卓也, 木村英生: 加工食品への活用を目的とした麴菌の研究, 山梨県工業技術センター研究報告, No.29, pp.14-16 (2015)
- 3) 岡崎直人: 標準製麴試験法, 醸協, 74 (11), pp.738-739 (1979)
- 4) (社) 日本食品科学工学会: 新・食品分析法 (株) 光琳, 東京 (1996)
- 5) 秦洋二: 麴菌の固体培養での遺伝子発現特性, 日農化会誌, 76 (8), pp.715-718 (2002)
- 6) 小路博志, 杉本利和, 舛田晋, 上野貴生: 新規液体麴の開発と発酵食品への展開, 生物工学会誌, 91 (2), pp.73-79 (2013)
- 7) 麴菌の培養方法: 公開特許公報, 特開 2003-265165