

麹菌により生産される機能性の検索*

越智 洋*¹・水谷 政美*¹・山本 英樹*¹・高山 清子*¹・工藤 哲三*¹

Investigation of Functionality Produced by Koji

Hiroshi OCHI, Masami MIZUTANI, Hideki YAMAMOTO, Kiyoko TAKAYAMA and Tetsuzo KUDO

麹菌の酵素および機能性物質の生産性について調査を行った。14 種類の種麹菌を使用し、製麹後の各種麹のプロテアーゼ活性、抗酸化活性 (DPPH ラジカル消去活性) およびアンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性の測定を行った。その結果、白米や麦自体には抗酸化活性はないが、麹にすることにより抗酸化活性が発現することが確認された。また、ACE 阻害活性の発現は麹の種類により活性値が異なっていた。

キーワード：麹、抗酸化活性、ACE、プロテアーゼ

1 はじめに

麹菌は、食品製造用微生物としての安全性が広く認められており、従来から味噌・醤油、酒類あるいは食酢、甘酒、みりん製造に使用され、最近では酵素製剤の生産や、加工食品、医薬品製造にまで使用されている。

本県においても、黄麹菌 (*Asp.oryzae*) や白麹菌、黒麹菌 (*Asp.kawachii*, *Asp.awamori*) が味噌や焼酎などの発酵食品製造に利用されている。

本研究では、麹の種類の違いによる酵素生産性、抗酸化活性及び ACE 阻害活性を比較検討したので報告する。

2 実験方法

2-1 供試種麹

市販されている焼酎用の種麹菌 5 種 (白麹 3 種、黒麹 2 種)、味噌、清酒および醤油用黄麹 9 種の計 14 種を用いた (表 1)。

表 1 供試種麹の種類

種麹	菌種	種麹	菌種
白麹 1	<i>Asp. Kawachii</i>	黄麹 3	<i>Asp. oryzae</i>
白麹 2	<i>Asp. awamori</i>	黄麹 4	<i>Asp. oryzae</i>
白麹 3	<i>Asp. awamori</i>	黄麹 5	<i>Asp. oryzae</i>
黒麹 1	<i>Asp. awamori</i>	黄麹 6	<i>Asp. oryzae</i>
黒麹 2	<i>Asp. awamori</i>	黄麹 7	<i>Asp. oryzae</i>
黄麹 1	<i>Asp. oryzae</i>	黄麹 8	<i>Asp. oryzae</i>
黄麹 2	<i>Asp. oryzae</i>	黄麹 9	<i>Asp. sojae</i>

* 発酵微生物のつくる機能性物質とその利用

*1 応用微生物部

2-2 各種麹の製麹

麹原料には α 化米と α 化麦を用い、原料重量に対して 35% の加水を行い、オートクレーブ滅菌後、麹原料とした。それぞれの原料に各種種麹を混合し、ガラスシャーレにおいて 37 °C の恒温器で約 45 時間培養後、室温で 2 時間程度枯らしを行い出麹とした。

2-3 麹の酵素活性測定

酸度、酸性プロテアーゼは国税庁所定分析法^{1,2)} に従い測定した。中性プロテアーゼは基準みそ分析法³⁾ に従い測定した。

2-4 麹の抗酸化活性測定 (DPPH ラジカル消去活性)

DPPH ラジカル消去活性は、須田⁴⁾ の方法に準じて測定した。

麹 5g に 25mL の 80% エタノール溶液を加えて室温で 60 分間かくはんした後、0.45 μ m フィルターでろ過し、試料抽出液とした。DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, 和光純薬製) 溶液の 520nm における吸光度を 96 穴マイクロプレート法 (マイクロプレートリーダー、ナルジェヌクインターナショナル、Immuno Mini NJ-2300) にて測定した。DPPH ラジカル消去活性は、粉末試料絶乾物 1g 当たりの Trolox (Aldrich) 相当量として表示した。

2-5 麴のACE阻害活性測定

麴 3g に pH を調整した 15mL の蒸留水（白、黒麴用は希 NaOH で pH7 に、黄麴用は希 HCl で pH4 に調整）を加え、室温で 60 分間かくはんした後、ろ液を試料溶液とした。試料溶液の ACE 阻害活性測定は、HORIUCHI ら^{4,5)}の方法に準じて評価した。

試料溶液 70μL と ACE 溶液（0.05units/mL, Sigma 社製）100μL を 37℃で 5 分間インキュベートした後、12.5mmol/L Bz-Gly-His-Leu（(株)ペプチド研究所製）30μL を加えて、37℃で 30 分間反応させ、3%メタリン酸溶液を加え、反応を停止させた。得られた反応液は、高速液体クロマトグラフィーにより、生成した馬尿酸を表 2 の条件で定量した。

なお、ACE 阻害率の算出は、次式で求めた。

$$\text{ACE 阻害率(\%)} = \{(B-A)/(B-C)\} \times 100$$

A：試料溶液を用いた場合の馬尿酸のピーク面積

B：試料溶液の代わりに蒸留水を用いた場合の馬尿酸のピーク面積

C：試料溶液にあらかじめ反応停止液を加えた場合の馬尿酸のピーク面積

表 2 高速液体クロマトグラフィー測定条件

HPLC	GULLIVER PU-980(日本分光(株)製)
カラム	COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6×150mm,ナカライテスク(株)製)
移動相	A 10mM potassium phosphate buffer(pH2.8) B 99.8% acetonitrile (A:B=80:20)
流速	0.5mL/min
カラム温度	40℃
検出波長	228nm

3 結果および考察

3-1 麴の酵素生産性

調製した麴の出麴酸度、酸性プロテアーゼ活性、中性プロテアーゼ活性測定の結果を表 3 に示した。

出麴酸度は焼酎製造に用いられる白麴と黒麴において高い値を示し、中でも白麴 2, 3 において高い値を示した。黄麴の酸生成は認められなかった。

酸性プロテアーゼは、米麴では、白麴 1, 3 および黒麴 1 が高い値を示した。麦麴では、白麴 1, 2, 黒麴 1 及び黄麴 8 が高い値を示した。黄麴 9 は米麴、麦麴のどちらにおいても他と比較して活性が低かった。

中性プロテアーゼは、麦麴より米麴の方が高い活性を示し、中でも白麴 1、黄麴 5, 6, 7 が高い値を示した。

3-2 麴の抗酸化活性(DPPHラジカル消去活性)

DPPH ラジカル消去活性については、原料の米、麦では活性がみられなかったが、麴にすることによって活性が発現した。このことは、米、麦を麴にすることにより抗酸化物質が生産されたことを示唆していた。

米麴では、白麴 1、黒麴 1, 2、黄麴 2 において他と比較して高い活性が認められた。麦麴については、白麴 3, 黒麴 2, 黄麴 7 において若干の活性が確認された（表 3）。

表 3 各種麴の酵素活性等の比較

供試麴	酸度		酸性プロテアーゼ(U/g乾燥麴)		中性プロテアーゼ(U/g乾燥麴)		DPPHラジカル消去活性(μmol-Trolox相当量/乾燥g)	
	米	麦	米	麦	米	麦	米	麦
白麴1	2.25	2.14	21178	22165	231	20	2.81	0.06
白麴2	4.18	2.47	16388	20393	111	26	1.71	0.25
白麴3	3.64	3.22	22620	13921	112	10 >	1.84	1.04
黒麴1	1.57	0.96	22025	27019	179	71	2.74	0.12
黒麴2	3.00	2.32	15100	17781	136	10 >	2.87	1.25
黄麴1	0.06	0.11	15322	14534	111	103	1.26	0.07
黄麴2	0.11	0.43	14672	10164	126	83	2.51	0.39
黄麴3	0.11	0.11	11514	10135	10 >	38	1.81	0.65
黄麴4	0.06	0.11	14214	12896	10 >	75	0.73	0.58
黄麴5	0.32	0.13	9361	15704	258	149	1.36	0.70
黄麴6	0.02	0.01	11353	12569	415	51	0.52	0.68
黄麴7	0.04	0.05	12047	16177	216	165	1.15	1.02
黄麴8	0.02	0.05	12782	20255	143	133	0.68	0.84
黄麴9	0.04	0.05	9864	6485	67	154	0.09	0.31

3-3 麴のACE阻害活性

麴の抽出には、pH を調整した蒸留水を用い、最も ACE 阻害活性が高く発現する pH の蒸留水を選択した。データは記載していないが、白、黒麴においては pH7、黄麴においては、pH4 が最も阻害活性が高い値を示した。

ACE 阻害活性は米麴、麦麴のどちらにおいても、白麴 1, 2, 3、黒麴 1, 2 および黄麴 9 が高い値を示した。特に米麴の白麴 2, 黒麴 2 が、ACE 阻害率 90%と非常に高い値を示した。(図 1, 2) ACE 阻害活性を示す物質としては、タンパク質がプロテアーゼ等により分解されてできるペプチド等が考えられた。しかし、測定結果をみると、酸性プロテアーゼ活性と ACE 阻害活性には、相関があるとは言えなかった。このことから ACE 阻害活性を有する物質の生産には、酸性プロテアーゼ以外の酵素等の関与も考えられた。

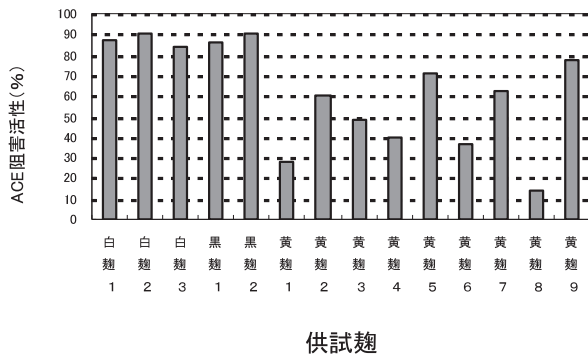


図 1 米麴のACE阻害活性

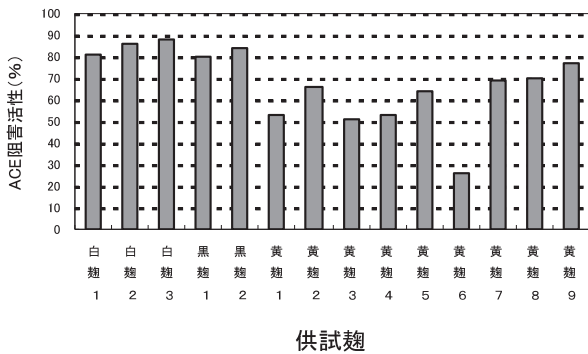


図 2 麦麴のACE阻害活性

4 まとめ

14 種類の種麴を用い米麴、麦麴の製麴を行い、酵素生産性等を測定し以下の結果を得た。

- ①酸度については、米、麦共に焼酎製造に用いられる白麴、黒麴が全般的に高い数値を示し、黄麴の酸生成は認められなかった。
- ②酸性プロテアーゼは、米、麦共に白麴、黒麴において高い値を示した。
- ③中性プロテアーゼは、白および黒麴では、米が高い活性を示したが、黄麴ではその傾向は認められなかった。
- ③ DPPH ラジカル消去活性については、原料の米、麦では活性がみられなかったが、麴にすることによって活性が発現した。特に白および黒麴を用いての米麴で活性が高くなった。
- ④ ACE 阻害活性については、米、麦共に白麴、黒麴において高い値を示した。

5 参考文献

- 1) 第四回改正国税庁所定分析法注解, p.221-222 (2003)
- 2) 第四回改正国税庁所定分析法注解, p.181-183 (2003)
- 3) みそ技術ハンドブック 付 基準みそ分析法, p.51-53(1995)
- 4) 須田郁夫, 食品機能研究法, 光琳, p.218-221 (2000)
- 5) M.HORIUCHI, K.FUJIWARA, T.TERASHIMA and T.ISO, J.chromatogr.233, p.123-130(1982)
- 6) 道島俊英, 林美央, 勝山陽子, 附木貴行, 日比野剛, 川嶋正男, 矢野俊博, 榎本俊樹, 石川県工業試験場研究報告, 53, p.49-54 (2004)