

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}・黒木 加奈子^{*1}・工藤 哲三^{*1}

Investigation of Functionality Produced by *Koji*

Hiroshi OCHI, Masami MIZUTANI, Hideki YAMAMOTO,
Kanakano KUROKI and Tetsuzo KUDO

麹菌の酵素及び機能性物質の生産性について調査を行った。14種類の種麹菌から4種類の種麹菌を選抜し、米、大麦、おから、米ぬかを原料とし製麹を行い、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、ペプチド生成量の測定を行った。その結果、おから、米ぬかを原料にした麹は、米、麦を用いた麹よりも酸性プロテアーゼが大きく増加していた。また、ACE阻害活性も高く、ペプチド量も大きく増加しており、原料自体には見られない低分子ペプチドが生成することが確認できた。

キーワード：麹、抗酸化活性、ACE、プロテアーゼ、ペプチド

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。当県においても、黄麹菌(*Asp. oryzae*)や白麹菌(*Asp. kawachii*)黒麹菌(*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、機能性を有した発酵食品の開発を目的として、麹の種類及び原料の違いによる酵素生産性、抗酸化活性及びACE阻害活性、ペプチド生成量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、清酒及び醤油用黄麹9種の計14種の酵素生産性等を検討した前報¹⁾の結果から白麹K、黒麹A、黄麹O、黄麹Sの4種類を選抜して用いた。

2-2 各種麹の製麹

麹原料には α 化米、 α 化麦、おから(凍結乾燥物)、米ぬかをを用いた。 α 化米、 α 化麦は原料重量に対して35%、おから、米ぬかは30%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℃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^{2,3)}に従い測定した。中性プロテアーゼは基準みそ分析法⁴⁾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⁵⁾の方法に準じて測定した。

すなわち、麹5gに25mLの80%エタノール水溶液を加えて室温で60分間攪拌した後、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(株)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, ナルジェヌンクインターナショナル, Immuno Mini NJ-2300)

* 発酵微生物のつくる機能性物質とその利用(第2報)

*1 応用微生物部

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分間攪拌した後、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^{6,7)}の方法に準じて評価した。

すなわち、試料溶液70μLとACE溶液（0.05 units/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1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面積

表1 高速液体クロマトグラフィー測定条件

HPLC	ChromNAV PU-2089(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

2-6 ペプチド分析

麴重量に対して10倍量の蒸留水で抽出を行い、ろ液を試料溶液とし、高速液体クロマトグラフィーにより表2の条件でペプチドの測定を行った。ペプチドの確認は0.2%ニンヒドリン溶液による呈色反応により行った。

表2 高速液体クロマトグラフィー測定条件

HPLC	ChromNAV PU-2089(日本分光株製)
カラム	Shodex PROTEIN KW-803 (4.6×250mm,昭和電工株製)
移動相	蒸留水
流速	1.0mL/min
カラム温度	30℃
検出波長	280nm

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は、米、麦を原料にした場合と比較して、おから、米ぬかを用いた白麴、黒麴において高い値を示した。また、米ぬかは黄麴O、Sでも若干の酸生成が確認された（表3）。

酸性プロテアーゼは、おからの白麴Kで99,000 U/g麴、黒麴Aで100,000 U/g麴、米ぬかの白麴Kで65,000 U/g麴、黒麴Aで56,000 U/g麴と非常に高い値を示した（図1）。これは、タンパク源が多い環境に適応するため、麹菌のプロテアーゼが多く誘導されたためと考えられた。

中性プロテアーゼは、味噌、醤油製造に使用される黄麴において高く、黄麴O、Sで高い値を示した（図2）。

表3 各種麴の酸度

供試麴	酸度			
	米	麦	おから	米ぬか
白麴K	2.3	2.1	2.3	5.5
黒麴A	3.0	2.3	4.5	4.3
黄麴O	0.0	0.1	0.0	1.4
黄麴S	0.0	0.1	0.9	1.7

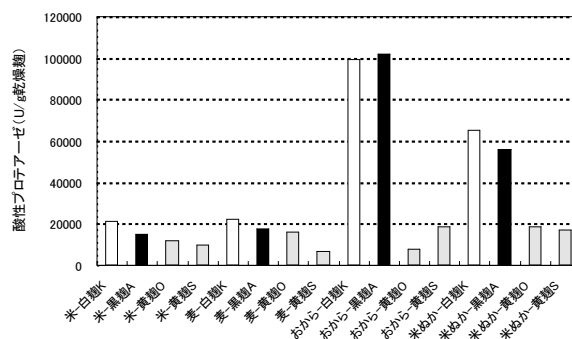


図1 酸性プロテアーゼ活性

（グラフ中の米-白麴Kは原料に米、種麴に白麴Kの使用を表す）

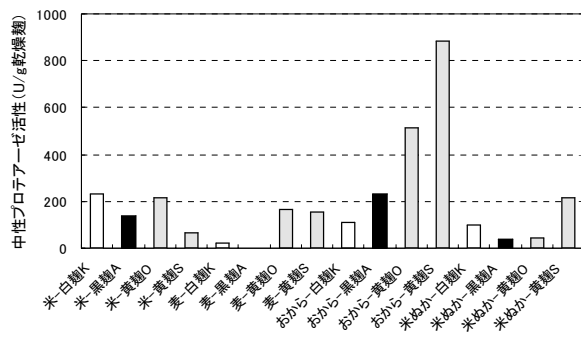


図2 中性プロテアーゼ活性

3-2 麹の抗酸化活性 (DPPHラジカル消去活性)

DPPHラジカル消去活性については、米、麦、おから自体には活性がなかったが、これらに麹菌を培養することにより活性が発現した。米ぬかはその自体に若干の活性が認められたが、麹にすることにより活性が高くなった (表4)。中でも白麹K、黒麹Aにおいて他の麹と比較して高い活性が認められた。また、米ぬか自体に認められた抗酸化活性は米ぬかに含まれるフェルラ酸⁸⁾によるものと考えられた。

表4 各種麹の抗酸化活性

供試麹	抗酸化活性 ($\mu\text{mol-Trolox}$ 相当量/乾燥g)			
	米	麦	おから	米ぬか
原料	0.0	0.0	0.0	1.0
白麹K	2.8	0.1	1.4	4.7
黒麹A	2.9	1.3	3.1	4.9
黄麹O	1.2	1.0	1.4	1.6
黄麹S	0.1	0.3	1.0	3.2

3-3 麹のACE阻害活性

ACE阻害活性はACEを50%阻害するのに必要な試料量である IC_{50} で示した (表5)。それぞれの原料において最も活性が高かったものは、おからでは黒麹Aが3.9mg/ml、米ぬかでは黄麹Oが7.7mg/ml、米、麦では黒麹Aがそれぞれ、5.2mg/ml、26.5mg/mlであった。最も活性が高いおからの黒麹は血圧降下作用があるとされる味噌のACE阻害活性⁷⁾と同等以上の活性が認められた。

表5 各種麹のACE阻害活性

	IC_{50} (mg/ml)			
	米麹	麦麹	おから麹	米ぬか麹
白麹K	12.3	51.9	10.8	20.8
黒麹A	5.2	26.5	3.9	18.5
黄麹O	153.5	109.4	32.6	71.9
黄麹S	34.6	30.1	14.8	7.7
原料	N.D.	N.D.	66.9	N.D.

3-4 麹のペプチド分析

ニンヒドリン反応により確認した生成ペプチドについて、ピーク面積の総和で比較すると、ペプチド量は原料自体より麹にしたものの方が高くなる傾向にあり、原料と比較すると米ぬかの白麹K、黒麹Aで原料の5倍~7倍に、おからの黄麹9で3.5倍になっていた。また、原料自体には見られなかった低分子ペプチドも確認された (図3, 4)。麹にすることにより新たに生成した低分子ペプチドの多いものが、ACE阻害活性が高くなる傾向が認められた (図5)。

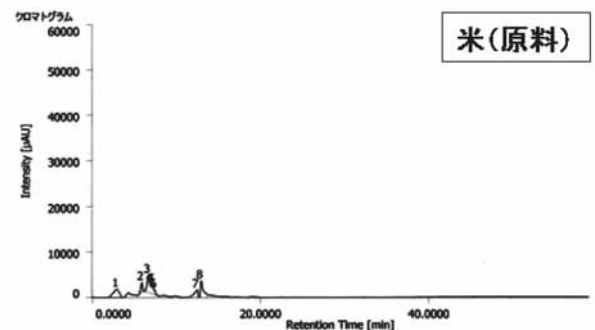


図3 米のゲルろ過クロマトグラフィー

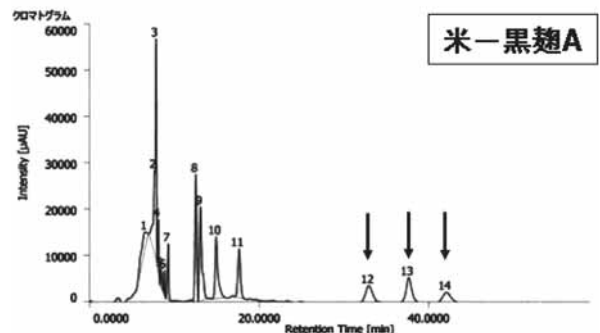


図4 米 - 黒麹Aのゲルろ過クロマトグラフィー (図中の矢印は新たに出来たペプチドを表す)

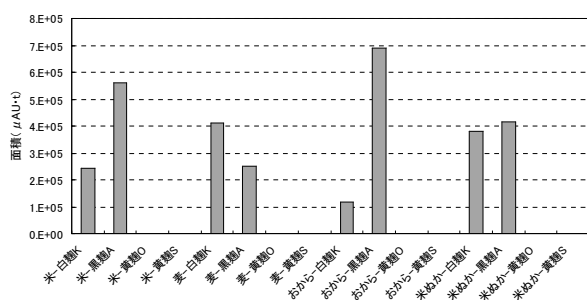


図5 各種麹と低分子ペプチド量

4 まとめ

14種類の種麹から選抜した4種類の種麹を用い、米、麦、おから、米ぬかを原料に製麹を行い、酵素生産性、機能性を検討し以下の結果を得た。

酸度については、米、麦と比較して、おから、米ぬかにおいて全体的に高い値を示した。

酸性プロテアーゼは、おから、米ぬかの白麹K、黒麹Aで米、麦と比較して、3～7倍高い値を示した。中性プロテアーゼは、おからの黄麹O、Sにおいて高い値を示した。

DPPHラジカル消去活性については、原料の米、麦、おからでは活性がみられなかったが、これらに麹菌を培養することにより活性が発現した。米ぬかの白麹K、黒麹Aが他と比較して高い値を示した。

ACE阻害活性については、他の原料を用いた場合と比較しておから原料で高い活性を示したが、黄麹Sにおいては、米ぬかを原料にしたものが高い活性を示した。

麹にすることにより新たに生成した低分子ペプチドが多いものが、ACE阻害活性が高い傾向にあった。

5 参考文献

- 1) 越智洋, 水谷政美, 山本英樹, 高山清子, 工藤哲三, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 52, 91-93 (2007)
- 2) 第四回改正国税庁所定分析法注解, 221-222 (2003)
- 3) 第四回改正国税庁所定分析法注解, 181-183 (2003)
- 4) みそ技術ハンドブック 付 基準みそ分析法, 51-53 (1995)
- 5) 須田郁夫, 食品機能研究法, 光琳, 218-221 (2000)
- 6) M. HORIUCHI, K. FUJIWARA, T. TERASHIMA and T. ISO, *J. chromatogr.*, 233, 123-130 (1982)
- 7) 道畠俊英, 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, 49-54 (2004)
- 8) 野村英作, 細田朝夫, 柏田歩, 築野卓夫, 森下比出子, 谷口久次, 和歌山県工業技術センター研究報告, 17-19 (2002)