

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

麹菌により生産される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、米ぬかを原料とし通常の固体麹による製麹を行った。このうちACE阻害活性が最も高いおからを原料に用いた黒麹のペプチドについて検討を行った。この麹の水抽出液をゲルろ過することにより8つの画分でACE阻害活性が確認され、そのいずれも大きな活性の低下はほとんどなく、体内消化液耐性が高いことが確認された。

キーワード：麹，ACE，ペプチド，人工消化液

1 はじめに

麹菌は、味噌・醤油・酒類あるいは食酢、甘酒、みりん等の発酵食品に広く使用されており、食品製造用微生物としての安全性が広く認められている。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阻害活性を比較検討し、最もACE阻害活性の高かったおからを原料に用いた黒麹について、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、これらの中で最もACE阻害活性の高かった黒麹Aを試験に用いた。

2-2 おから麹の製麹

原料にはおから(凍結乾燥物)を用い、原料重量に対して30%の加水を行い、オートクレーブ滅菌後、麹原料とした。原料に黒麹Aを接種し、ガラスシャーレにおいて37℃で約45時間培養後、室温で約2時間枯らしを行い出麹とした。

2-3 おから麹の分析

酸度は国税庁所定分析法²⁾に従い測定し、水分は赤外線水分計を用いて測定した。

2-4 ペプチドの分画・分取

おからを原料にした黒麹Aを麹重量の5倍量の蒸留水を加え、室温で抽出し、沸騰水浴中で酵素失活を行い、麹抽出液とした。さらに抽出液を凍結乾燥後、水に溶解させ濃縮液とし、ゲルろ過クロマトグラフィーにより表1の条件で分画した。分画は1画分15mlとし70画分分取し、波長280nmにおける吸光度とACE阻害活性を測定した。

表1 ゲルろ過クロマトグラフィー条件

使用樹脂	トヨパールHW-50
カラムサイズ	ID2.2cm×80cm
移動相	100mM リン酸 buffer(PH7.0)
流速	1.0mL/min
カラム温度	室温
検出波長	280nm

* 発酵微生物のつくる機能性物質とその利用 (第3報)

*1 応用微生物部

2-5 ACE阻害活性測定

麴3gにpHを調整した15mLの蒸留水（希NaOHでpH7に）を加え、室温で60分間攪拌した後、ろ過し、熱失活したものを試料溶液とした。試料溶液のACE阻害活性測定は、HORIUCHIら^{3,4)}の方法に準じて評価した。

すなわち、試料溶液70 μ LとACE溶液（0.05unit s/mL, Sigma社製）100 μ Lを37 $^{\circ}$ C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）30 μ Lを加えて、37 $^{\circ}$ C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	COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 \times 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 $^{\circ}$ C
検出波長	228nm

2-6 ペプチドの体内消化液耐性試験

2-5で調製したおから麴抽出試料溶液中のペプチドが消化器官で消化酵素の影響を受けずに、活性を維持できるか検討するため、瀧口ら^{5),6)}の方法により消化酵素を作用させ、作用後の抽出液のACE阻害率を求め、消化液作用前後での比較を行った。モデル胃液としてペプシンをモデル腸液としてパンクレアチンを用いた。

2-6-1 ペプシン耐性試験

耐性試験に使用する8%(W/V)ペプシン溶液は、蒸留水にペプシン（和光純薬工業(株)製）を溶解させ、3MHClでpHを2.0に調整した。耐性試験は、麴抽出液に8%(W/V)ペプシン溶液を1%添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間振とうした。反応後、沸騰湯浴中で10分間加熱処理により反応を停止させ、4000回転で10分間遠心分離し、上澄液を得て、ACE阻害率を求めた。

2-6-2 パンクレアチン耐性試験

耐性試験に使用する1%(W/V)パンクレアチン溶液は、蒸留水にパンクレアチン（和光純薬工業(株)製）を溶解させ、3MNaOHでpHを7.0に調整した。耐性試験は、2-5-1でペプシン処理した麴抽出液に1%(W/V)パンクレアチン溶液を0.2%添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間振とうした。反応後、沸騰湯浴中で10分間加熱処理により反応を停止させ、4000回転で10分間遠心分離し、上澄液を得て、ACE阻害率を求めた。

3 結果および考察

3-1 おから麴の分析

おからを原料にした黒麴Aの出麴酸度は、3.4、出麴水分は18.7%で、若干乾燥した麴であった。

3-2 ペプチドの分画・分取

おからを原料にした黒麴Aの抽出液をクロマトグラフィーにより70画分に分離した結果を図1に示した。縦軸に各画分の280nmの吸光度を横軸に画分をまた、ACE阻害活性の認められた8つの画分を①～⑧で示した。280nmの吸収とACE阻害活性は、ほとんど一致していたが、⑤は280nmの吸収がないことからトリプトファン、フェニルアラニン、チロシン等の芳香族アミノ酸を含まないペプチドと推定された。また、⑧については、他のピークと比較して、溶出時間が遅いことから、製麴工程中に生成した低分子のペプチドであると推定された。

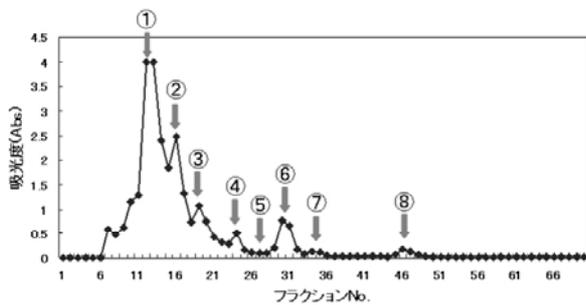


図1 おから麹抽出液のゲルろ過クロマトグラフ

3-3 体内消化液耐性試験

ACE阻害活性が確認された①～⑧画分の体内消化液耐性試験の結果を図2に示した。①、③、⑦については、ペプシン処理、パンクレアチン処理と処理を経る毎に若干の活性低下がみられた。②については、処理を経る毎に活性が高くなっており、それぞれの処理によりACE阻害活性が高いペプチドに変化したことも考えられた。⑧については、体内消化液処理前、処理後を含めて最も高いACE阻害活性を示し、ACE阻害活性が高く、体内消化液耐性が高いペプチドであることが考えられた。これらのことから、得られたペプチドは、大きな活性の低下はほとんどなく、ペプシン処理、パンクレアチン処理後もほぼACE阻害活性を維持しており、体内消化液耐性が高いことが確認された。

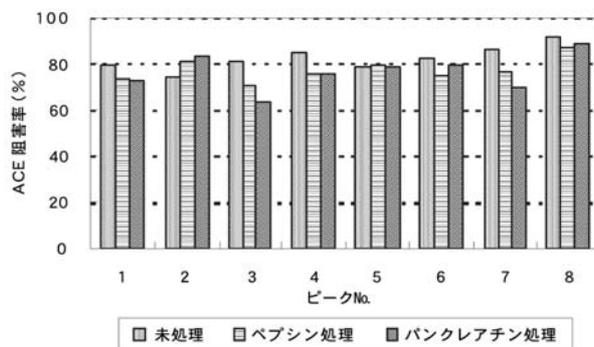


図2 各画分の体内消化液耐性試験後のACE阻害活性

4 まとめ

おからを原料にし、種麹に黒麹 A を用いて製麹したおから麹の麹抽出液について以下の結果を

得た。

①ゲルろ過クロマトグラフによりペプチド分画を行ったところ、ACE 阻害活性の高い8つの画分が確認された。8つの画分のうち7つの画分は、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン等の芳香族アミノ酸を含み、1つの画分は同アミノ酸を含まないペプチドと推定された。

②得られたペプチドは、大きな活性の低下はほとんどなく、ペプシン処理、パンクレアチン処理後もほぼACE阻害活性を維持しており、体内消化液耐性が高いことが確認された。

これらのことから、おからを原料にして製造した麹を用いる発酵食品は、経口摂取した際、消化器官で分解されず、ペプチドとして体内において血圧降下能を維持することが期待された。

5 参考文献

- 1) 越智洋, 水谷政美, 山本英樹, 黒木加奈子, 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, 53, 91-94(2008)
- 2) 第四回改正国税庁所定分析法注解, 221-222(2003)
- 3) M. HORIUCHI, K. FUJIWARA, T. TERASHIMA and T. ISO, J. chromatogr. 233, 123-130(1982)
- 4) 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, 49-54(2004)
- 5) 瀧口隆一, 鈴木豊, 腸内細菌学雑誌, 14, 11-18(2000)
- 6) 木村功, 大島久華, 上枝加代子, 香川典子, 合田奈苗: 香川県産業技術センター研究報告, 4, 55-57(2004)