

研究ノート

## 米麴の糖化および発酵による抗酸化能の付与

尾関 健二<sup>1\*</sup>、桐藤 万裕<sup>1</sup>、筒井 健司<sup>1</sup>、若泉 賢功<sup>1</sup>、尾関 清子<sup>2</sup><sup>1</sup>金沢工業大学ゲノム生物工学研究所 (〒924-0838 石川県白山市八東穂 3-1)<sup>2</sup>奈良女子大学大学院人間文化研究科 (〒630-8506 奈良県奈良市北魚屋西町)

\*著者連絡先 E-mail : ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp

(受取日 : 2008 年 7 月 27 日, 受理日 : 2008 年 8 月 19 日)

要旨 : 麴菌の種類を変えて麴を調製後、麴抽出液、麴を自己消化させた糖化液(甘酒)、糖化液を清酒酵母発酵と乳酸菌発酵による抗酸化能の付与について検討した。清酒麴菌は $\alpha$ -アミラーゼ活性が高く、清酒酵母で発酵することにより抗酸化能の機能性が付与できることが分かった。一方、焼酎麴菌は糖化力の活性が高く、乳酸菌で発酵することにより抗酸化能の機能性が付与できることが分かった。抗酸化能の評価法として用いた SOD 阻害率とヒドロキシラジカル消去率はよく相関しており、ヒドロキシラジカル消去率の方法は感度が鋭敏であった。

キーワード 麴菌、麴糖化液、清酒酵母、乳酸菌、抗酸化能

## 1. 緒言

清酒麴菌 (*Aspergillus oryzae*)、醤油・味噌麴菌 (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*)、焼酎黒麴菌 (*Aspergillus awamori*)、焼酎白麴菌 (*Aspergillus kawachii*) は酵素の供給源などとして発酵産物を代表する重要な糸状菌である。また麴菌(清酒、醤油・味噌、焼酎)は国菌と認定され<sup>1)</sup>、麴菌 *A. oryzae* RIB40 は 2005 年に全ゲノムの解析情報が公開され<sup>2)</sup>、ポストゲノム時代に入っている。また麴菌は各種二次代謝産物を生産し、麴としてあるいは発酵産物としての機能性も報告されている<sup>3,4)</sup>。

一方、食品中の機能性評価法の 1 つとして抗酸化能を測定する活性酸素を消去する方法が各種報告されている<sup>5)</sup>。近年、活性酸素と老化および発ガンとの関わりが活発に研究され、その機構が解明されつつある。中でも活性酸素の 1 つであるスーパーオキシドを消去する superoxide dismutase (SOD) および

SOD 様物質があり、それによるスーパーオキシド効果の阻害率から SOD 様活性を測定する方法がある<sup>6)</sup>。また、化学発光を利用して活性酸素を測定することにより抗酸化能を評価する方法も開発されている<sup>7)</sup>。

そこで本研究では、各種麴菌を用い $\alpha$ 米で麴を調製し、麴抽出液と麴を自己消化させた糖化液(甘酒)、さらにはその清酒酵母発酵液および乳酸菌発酵液における抗酸化能の付与について検討したので報告する。

## 2. 実験方法

## (1) 製麴

Table.1 に示した各麴菌  $5.0 \times 10^6$  cells/ml を製麴水 (1%  $\text{NaNO}_3$  と 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  同量混合) 3ml に加え、精米歩合 70% の $\alpha$ 米 10g に均等に散布し、30°C で 1 日静置培養を行った。翌日スパテルで米粒同士を分散し、さらに 30°C で 1 日間静置培養を行い、麴菌が生育した麴を調製した<sup>8)</sup>。

Table.1 麹菌の種類

<i>Aspergillus oryzae</i>	RIB40 (清酒) *, RIB128 (清酒) *, RIB307 (醤油) *, RIB337 (清酒・味噌) *, KBN616 (醤油) **, 強力糖化菌 3 (清酒) ***, スリーダイヤ (醤油) ***
<i>Aspergillus sojae</i>	ソーヤ No.9 (醤油) ***
<i>Aspergillus awamori</i>	KBN2012 (焼酎) **, カビ 4388 (焼酎) ***
<i>Aspergillus kawachii</i>	KBN2001 (焼酎) **, 本格焼酎 (焼酎) ***

( ) は分離源または用途

\* 独立行政法人酒類総合研究所分譲菌

\*\* 株式会社ビオック分譲菌

\*\*\* 株式会社樋口松之助商店分譲菌

(2) 麹抽出液

麹の一部を取り、その 5 倍量の抽出液 (10mM 酢酸 Buffer, pH5.0+0.5%NaCl) を加え、室温で 3 時間、時々攪拌し抽出した。抽出液を No.5A のろ紙でろ過し、 $\alpha$ -アミラーゼ活性、糖化力の活性 (共にキッコーマン醸造分析キット) および抗酸化能評価として SOD 阻害率、ヒドロキシラジカル消去率を測定した。

(3) 麹糖化液 (甘酒)

麹の一部を取り、その 5 倍量の RO 水を加え、50°C で水面が揺れるくらいの振とうで一晩自己消化させて糖化液を調製した。糖化液を No.5A のろ紙でろ過し、同様に抗酸化能を測定した。

(4) 麹糖化液培地での清酒酵母、乳酸菌発酵

麹糖化液を 0.2  $\mu$ m メンブランフィルターで滅菌した培地として、Table.2 に示す清酒酵母協会 7 号 (K7) と 9 号 (K9)、乳酸菌として市販ヨーグルト製品から分離した分離乳酸菌 A と B を植菌し、酵母は 30°C、乳酸菌は 37°C で 5 日間の振とう培養で発酵させた。また 5 日間の培養後、5000rpm で 5 分間遠心分離を行い、上清液を得た。各発酵液において同様に抗酸化能の測定を行った<sup>9,10)</sup>。

Table.2 清酒酵母と乳酸菌

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	協会 7 号、協会 9 号
<i>Lactobacillus casei</i>	分離乳酸菌 A
<i>Bifidobacterium</i> sp.	分離乳酸菌 B

(5) 抗酸化能

a. SOD 阻害率

SOD 活性検出キット (和光純薬工業) を用いて<sup>6)</sup>、キサンチンとキサンチンオキシダーゼにより生成されたスーパーオキシドアニオン O<sub>2</sub><sup>-</sup> が共存する NO<sub>2</sub>-TB を還元し、ジホルマザンを形成する。そのジホルマザン生成をスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) が阻害する程度を、阻害率として測定した。単位は阻害率 (%) である。

b. ヒドロキシラジカル消去率

抗酸化能測定キット (アロカ) を用い<sup>7)</sup>、塩化コバルト、ルミノール、過酸化水素を混ぜることにより発生した活性酸素 (ヒドロキシラジカル・OH) をルミノール発光で捉えることで、活性酸素発生量を測定して、RO 水を用いたときの発光量を基準として、サンプルとの比率として求めた。単位は消去率 (%) である。

3. 実験結果および考察

(1)  $\alpha$ -アミラーゼ

*Aspergillus oryzae*, *A. sojae* の清酒、醬

油・味噌麹菌と *A. awamori*, *A. kawachii* の焼酎麹菌で調製した麹抽出液の  $\alpha$ -アミラーゼ活性を Fig.1 に示す。

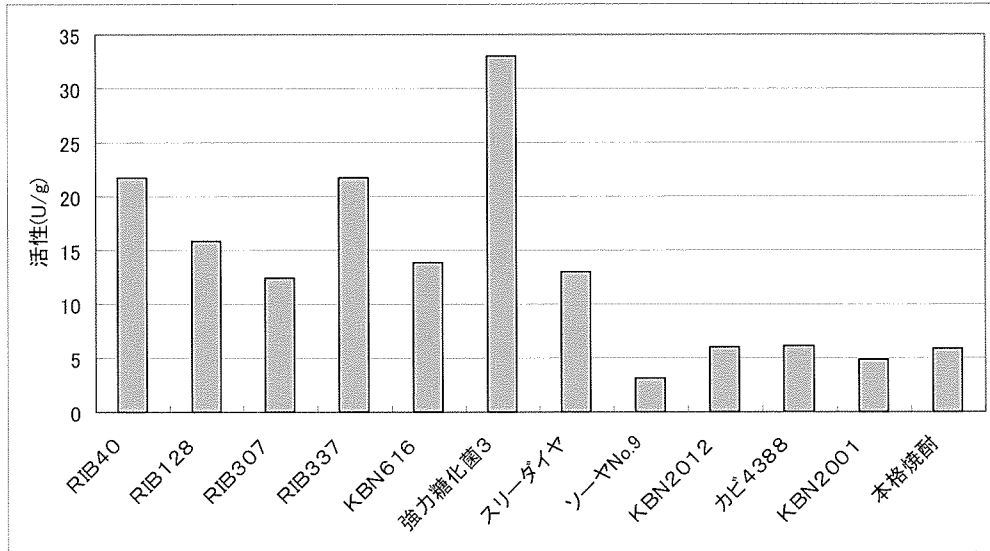


Fig.1 各種麹菌からの麹の  $\alpha$ -アミラーゼ活性

*A. oryzae* の麹菌の  $\alpha$ -アミラーゼ活性は *A. sojae* の活性よりも高くなった。また *A. oryzae* の麹菌では強力糖化菌 3、RIB337、RIB40 などの清酒麹菌の活性が高くなった。清酒麹菌の液化活性は米のデンプン質の分解に必須であると考えられ醬油麹菌である *A. sojae* よりも高くなった。

*A. awamori* と *A. kawachii* の焼酎麹菌

の  $\alpha$ -アミラーゼ活性はほぼ同程度であるが、*A. oryzae* の麹菌よりはかなり低いものであった。

(2) 糖化力

グルコアミラーゼ活性を主体とする糖化力 ( $\alpha$ -グルコシダーゼ活性も含む) の活性を同様に Fig.2 に示す。

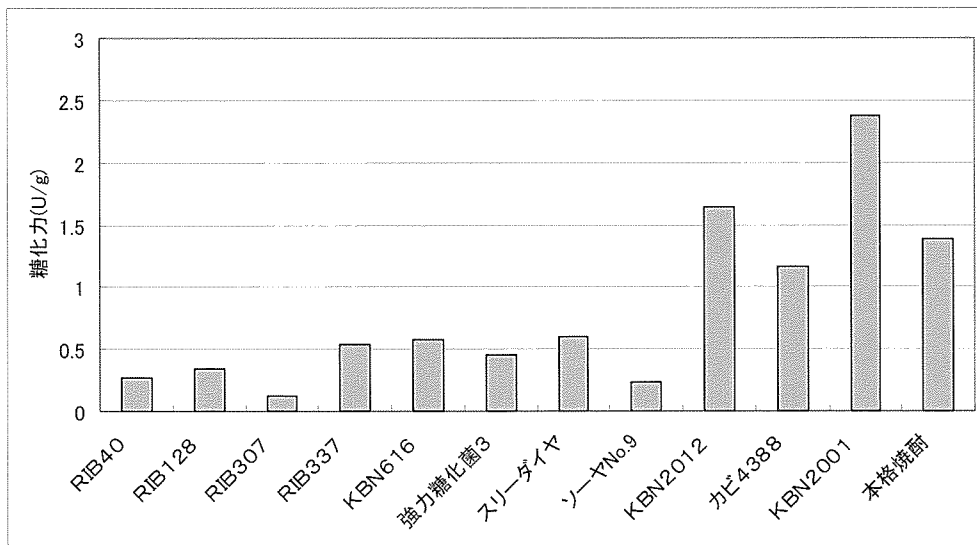


Fig.2 各種麹菌からの麹の糖化力の活性

Fig.2 より *A. oryzae* の糖化力は *A. sojae* と比べ全体的に高いものが多かった。*A. oryzae* の麹菌では、清酒と醤油麹菌ではほぼ同程度であった。清酒醸造では米のデンプン質を効率よくグルコースに変換する必要がある、 $\alpha$ -アミラーゼと糖化力が高い麹ほど効率よくデンプン質を分解できると考える。

焼酎製造には多種、多様な原料を使用されることから焼酎麹菌は原料のデンプン質を効率よく分解、グルコースに変換する必要があると推測され、糖化力を高めた焼酎麹

菌が育種されたと考えられる。

### (3) 抗酸化能

麹抽出液、麹糖化液と清酒酵母発酵での抗酸化能の変化を Fig.3 と Fig.4 に示す。また同様に乳酸菌発酵での2種類の測定法での抗酸化能の変化を Fig.5 と Fig.6 に示す。抗酸化能の測定は、Fig.5 ではスーパーオキシドアニオン ( $O_2^{\cdot-}$ ) の阻害率として、Fig.3、Fig.4、Fig.6 はヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ ) の消去率として結果を示す。

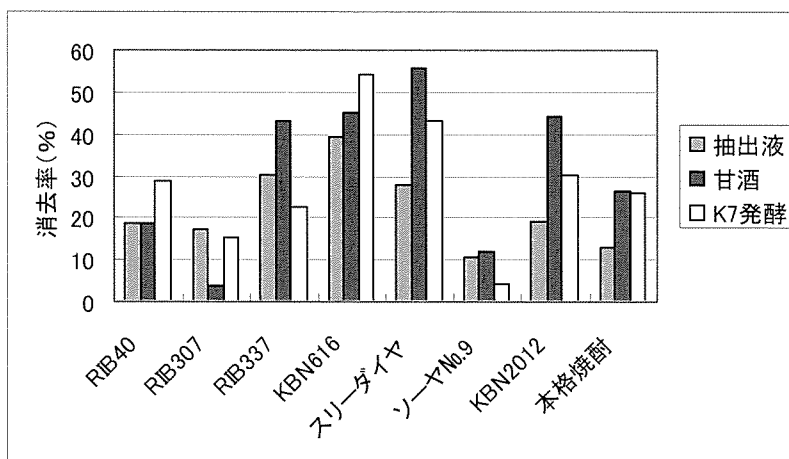


Fig.3 清酒酵母 (K7) 発酵での抗酸化能変化

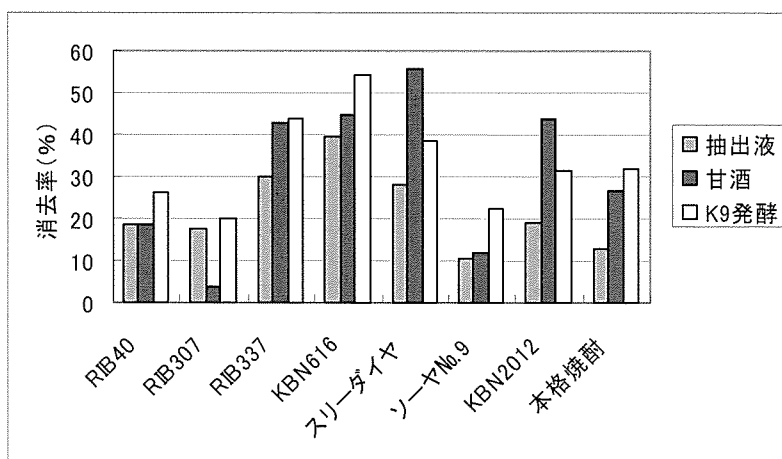


Fig.4 清酒酵母 (K9) 発酵での抗酸化能変化

麹抽出液で比較すると、KBN616 が最も抗酸化能が高く、麹菌の種類で抗酸化能に差があることが分かった。麹糖化後の甘酒で比較

すると、スリーダイヤ、KBN616、RIB337 の麹菌で大きく増加し、麹を自己消化させた糖化液にすることにより抗酸化能が付与でき

るものが多くなった。清酒酵母による発酵後で比較すると、K7、K9ともにKBN616のラジカル消去率が高くなり、発酵することにより抗酸化能が付与できることが分かった。

一方、スリーダイヤではK7、K9酵母ともに、発酵により抗酸化能の減少が見られ、

発酵産物に抗酸化能を阻害する物質が生産していることが示唆される。

清酒中にはフェルラ酸などの抗酸化物質が報告されているが<sup>11,12)</sup>、麹菌の代謝物、清酒酵母の発酵産物で抗酸化能が大きく変化することは興味深い結果であった。

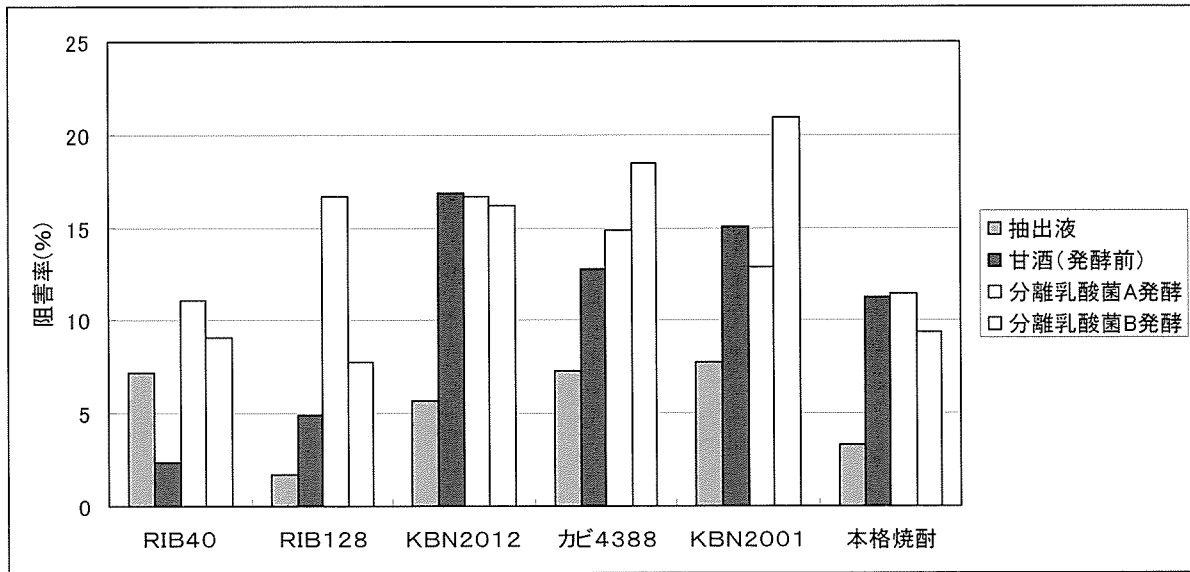


Fig.5 乳酸菌発酵での抗酸化能 (SOD 阻害率) 変化

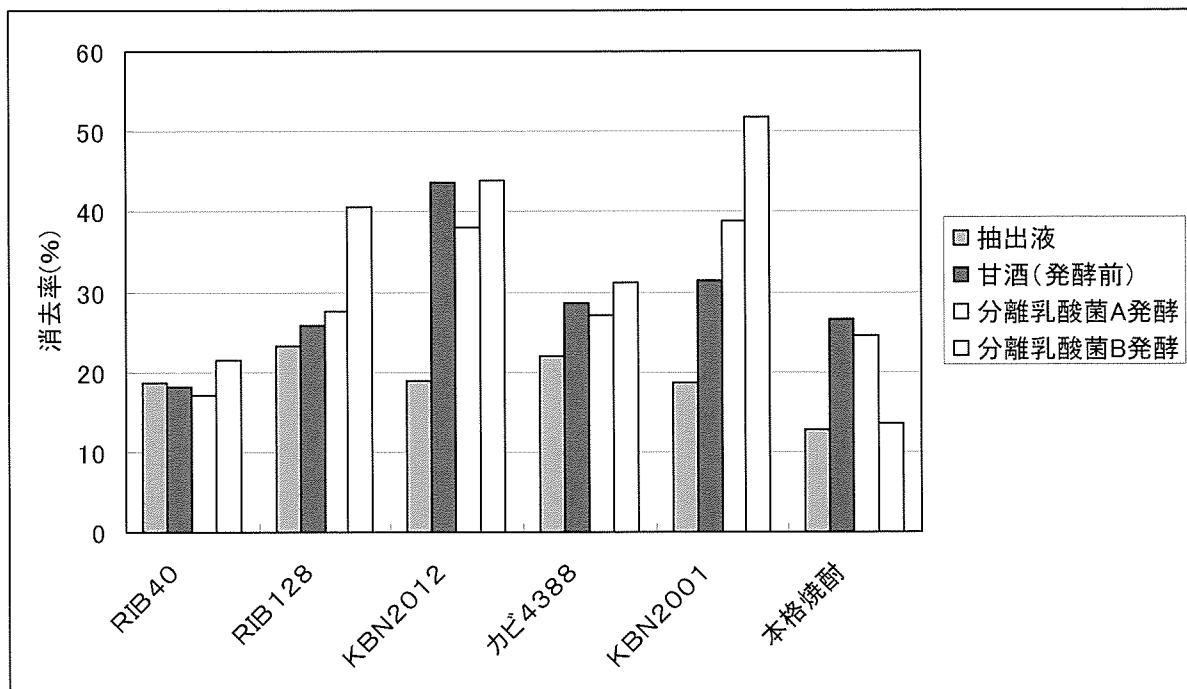


Fig.6 乳酸菌発酵での抗酸化能変化

Fig.5は乳酸菌による発酵前後でSOD阻害率を比較したものであり、焼酎麹菌であるKBN2001の分離乳酸菌Bによる発酵での抗酸化能の付与が最も高くなった。Fig.6はヒドロキシラジカル消去率の変化であるが同様な結果であった。KBN2012、カビ4388も同じ焼酎麹菌であり、ほぼ同様な結果が得られた。焼酎麹菌はクエン酸などの生産能力が高いが、その糖化液を利用した乳酸菌発酵液は抗酸化能も高くなり、機能性付与が期待できる。

Fig.3、Fig.4とFig.6は抗酸化能測定キットでの測定結果であり、酵母と乳酸菌で発酵後を比較すると酵母発酵では、清酒麹菌と酵母の組合せの抗酸化能が高くなり、 $\alpha$ -アミラーゼ活性が高い麹菌ほど発酵後の抗酸化能の付与が高くなる傾向であった。これに対して乳酸発酵では、焼酎麹菌と乳酸菌の組合せの抗酸化能が高くなり、糖化力の活性が高い焼酎麹菌が発酵後の抗酸化能の付与が高くなる傾向を示した。

ヒドロキシラジカル消去率の測定法は従来よく利用されているSOD阻害活性と良く相関しており、ヒドロキシラジカル消去率の抗酸化能は相対値が高くなり、感度が鋭敏な方法であることが分かった。

麹菌と清酒酵母の組合せは日本酒として定着しているが、新たに麹菌と乳酸菌の組合せによる発酵によって、抗酸化能という機能性付与が可能であることが分かり、新規な機能性飲料の開発が期待される。

今後は抗酸化能以外の機能性についても、今回の糖化・発酵の組合せのものが高い活性を有するかなど幅広く研究を進める必要があると考えている。

#### 4. 謝辞

各種麹菌の分譲をしていただいた独立行政

法人酒類総合研究所、株式会社ビオック、株式会社樋口松之助商店に感謝申し上げます。

#### 5. 文献

- 1) 一島英治：日本の国菌コウジキン，日本醸造協会誌，99，83（2004）.
- 2) Machida, M. et al.: Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*, *Nature*, 438, 1157-1162 (2005).
- 3) 北本勝ひこ監修：発酵・醸造食品の最新技術と機能性，pp.266-275（2006）シーエムシー出版.
- 4) 北本勝ひこ：醸造物の機能性，pp.4-11（2007）日本醸造協会.
- 5) 浅田浩二、中野稔、柿沼カツ子：活性酸素測定マニュアル，pp.1-7（2005）講談社.
- 6) Ukeda, H., Kawana, D., Maeda, S and Sawamura, M.: Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 485-488 (1999).
- 7) 抗酸化能測定キット「ラジカルキャッチ」取扱説明書：アロカ.
- 8) 尾関健二、幸田明生、峰時俊貴、浜地正昭、熊谷知栄子：*Bacillus licheniformis*由来耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼを生産する麹菌の育種と液化仕込への利用，日本生物工学会誌，76，301-307（1998）.
- 9) 尾関健二：赤ヌカからの機能性食品素材の開発，日本醸造協会誌，103，321-326（2008）.
- 10) Park, E.K., Sung, J.H., Trinh, H.T., Bae, E.A., Yun, H.K., Hong, S.S., Kim, D.H.: Lactic acid bacterial fermentation increases the anti-allergic effects of

- Ixeris dentate*, *J. Microbiol. Biotechnol.*,  
18, 308-313 (2008).
- 11) 村上英也：麹学, pp.130-155 (1986) 日本醸造協会.
- 12) 太田剛雄、高下秀春、轟木康市、岩野君夫、大場俊輝：清酒中に存在する抗酸化性物質, 日本醸造協会誌, 87, 922-926 (1992).

責任編集者： 高橋 砂織

Production of antioxidant by the rice *koji*, saccharification of the rice *koji* and fermentation of  
saccharified the rice *koji*.

Kenji OZEKI<sup>1\*</sup>, Kazuhiro KIRIFUJI<sup>1</sup>, Kenji TSUTSUI<sup>1</sup>, Masanori WAKAIZUMI<sup>1</sup> and  
Kiyoko OZEKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Genome Biotechnology Laboratory of Kanazawa Institute of Technology  
3-1 Yatsukaho, Hakusan, Ishikawa 924-0838, Japan

<sup>2</sup>Graduate School of Humanities and Sciences, Nara Women's University  
Kitauoya-nishimachi, Nara 630-8506, Japan

\* E-mail: ozeki@neptune.kanazawa-it.ac.jp

ABSTRACT

We prepared the *Aspergillus* sp. rice *koji* and examined the antioxidant activities of the rice *koji* extract, saccharified solution of the rice *koji*, and of the following solution fermented by *sake* yeast or the lactic acid bacterium. The *A. oryzae* rice *koji* were shown to provide high  $\alpha$ -amylase activity and the production of antioxidant by *sake* yeast fermentation. On the other hand, the *A. awamori* and *A. kawachii* rice *koji* were shown to have high saccharifying activity and the production of antioxidant by the lactic acid bacterium fermentation. It was revealed that the measurement of hydroperoxy radical elimination rate correlated to the SOD inhibition rate that we have used as evaluation method of the antioxidative activity, and that the method of the hydroperoxy radical elimination rate permitted more sensitive assay.

Key words: *Aspergillus* sp., saccharified rice *koji*, *sake* yeast, lactic acid bacterium, antioxidant