Mucor circinellodesを用いた米発酵物に含まれる抗酸化活性物質

*Mucor circinellodes*を用いた米発酵物に含まれる抗酸化活性物質

健康栄養学部　健康栄養学科　稲垣　秀一郎

要旨：筆者は、新規米麹の開発を試みることにより、米の用途拡大を目指している。本研究では、アジアの糖化微生物である*Mucor circinelloides*を用いて米発酵物を調製し、抗酸化活性物質の単離を試みた。試験レベルで調製した米発酵物の酢酸エチル抽出画分をシリカゲルクロマトグラフィー（Wakogel C-200）を用いて11画分に分離し、高値を示した画分7をさらにシリカゲルクロマトグラフィー（シリカゲル60）により11画分に分離した。画分7-6を高速液体クロマトグラフィーにより単一ピーク（化合物A）を分取後、質量（MS）分析および核磁気共鳴（NMR）分析により、化合物Aをチロソールと同定した。チロソールは、アミノ酸であるチロシンの代謝産物として植物や微生物により生成され、発酵食品等に含まれることが知られている化合物である。

キーワード：米麹、*Mucor circinelloides*、抗酸化活性、チロソール

背景・目的

米は日本の主食であることから、我が国における最も重要な作物として栽培されてきた。しかし昨今、食形態の欧米化により[1]、米の消費量は大幅に減少している[2]。このような食環境の変化に対応し、なおかつ日本の優れた米栽培を継承していくには、主食用以外の用途を開発し、米消費量の増加をはかることが急務である。

米麹は醤油や味噌、酒など日本の伝統的な発酵食品の製造に不可欠な食材であるが、現在それらの製造に利用されている米麹は、糖化微生物として*Aspergillus*属の糸状菌を用いたものに限られている（日本の米麹は蒸米に菌を生やしたもので、散麹といわれる）。一方、アジア諸国には*Rhizopus*属の糖化微生物を用いたインドネシアのRagiや*Mucor*属を用いたベトナムのbanh menなど、さまざまな米麹が存在している（このような米麹は、水を加えた米粉に菌を接種し丸めたもので、餅麹といわれる）[3-6]。そこで筆者は、このようなアジアの糖化微生物で純粋発酵させた米麹を開発し、種類にバリエーションを付与することができれば、米の消費拡大に貢献しうると考えた。

既報[7]において筆者は、アジア諸国において分離された糖化微生物を用いて調製した米発酵物の抗酸化活性を評価したところ、供試された発酵物のうち*Mucor circinelloides*を用いた発酵物に高い活性が認められた。近年、顕著に増加しているがんや動脈硬化などの発症には、生体内のタンパク質や脂質の酸化が密接に関与していることが明らかにされており、抗酸化活性物質はそのような疾患の予防に寄与すると考えられている[8]。そこで本研究では、*Mu. circinelloides*を用いた発酵物に含まれる抗酸化活性物質を探索し、その同定を試みた。

方法

１．供試材料および試薬

コシヒカリ（玄米）は株式会社マイセンより、*Mu. circinelloides* NBRC 4554は独立行政法人 製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターより購入した。1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl（DPPH）、2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid（MES）、Dimethyl sulfoxide（DMSO）、Wakogel C-200は和光純薬工業株式会社から購入した。Potate dexitorose agar（PDA）は関東化学株式会社から、アセトニトリルおよび4-(2-Hydroxyethyl) phenol（チロソール）はシグマ社から、シリカゲル60はメルク社から購入した。その他の試薬は全て和光純薬工業株式会社から購入した。

２．微生物の培養

PDA寒天培地（3.9 g/ 100 ml）に菌体を接種し、30℃で胞子を形成するまで約１週間培養した。

3．米発酵物の調製

粉砕した玄米20 gおよび純水100 mlを500 ml三角フラスコの中で混合し、オートクレーブ処理（121℃，20分）したものを米培地とした。培養した微生物の胞子を綿棒で滅菌水に懸濁し、1.0×10^6 CFU/mlとした菌液を米培地に0.5 ml接種後、30℃で7日間静置した。

4．抽出物の調製

液状化した発酵物の凍結乾燥物および200 mlのメタノールを500 ml容三角フラスコ内で混合し、振とう培養器を用いて100 rpm/minで24時間撹拌浸漬した。濾過により浸漬物から固形物を除いた後、その濾液から減圧濃縮および凍結乾燥により溶媒を除いたものをメタノール抽出画分とした。メタノール抽出画分の一部を純水で溶解し、等量の酢酸エチルを加えて分配抽出を行った後、酢酸エチルを減圧濃縮および凍結乾燥により除いたものを酢酸エチル抽出画分とした。

5．DPPHラジカル消去活性

既報[7]に準じて行った。すなわち、40 μlの試料溶液および10 μlのMESバッファー（pH 6.0）を96穴マイクロプレートに添加後、50 μlの0.5 mg/ml DPPH溶液を加えてよく撹拌し、30分後の540 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー（iMark; Bio-Rad社）を用いて測定した。試料溶液添加および無添加（DMSOを添加）時の吸光度を用い、以下の計算式によりDPPHラジカル残存率を求めた。なお、本値は低い値ほど活性が高いことを示している。

DPPHラジカル残存率
＝試料添加時の吸光度／試料無添加時の吸光度×100

6．オープンカラムクロマトグラフィー

クロマト管（30 × 600 mm）に固体相として試料重量の20倍のシリカゲル（Wakogel C-200）を、ヘキサンに溶解後に充填した。試料を等量のWakogel C-200に吸着させ、クロマト管に重層した。移動相にはヘキサン/酢酸エチル/メタノールを用い、20%ステップワイズにより11画分を得た。得られた画分は減圧濃縮または凍結乾燥により溶媒を除いた。乾燥物を100 mg/mlになるようにDMSOに溶解し、DPPHラジカル消去活性の測定に供した。また、活性画分をさらに分画するため、固体相にシリカゲル60を、移動相にはクロロホルム/メタノールを用い、10%ステップワイズにより11画分を得た。得られた画分は減圧濃縮または凍結乾燥により溶媒を除き、100 mg/mlになるようにDMSOに溶解後，DPPHラジカル消去活性の測定に供した。

7．高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析および分取

HPLCシステム（島津製作所）を用いて、以下の条件により単一成分を分離した。

カラム：COSMOSIL 5C18-MS-Ⅱカラム（4.6 × 250 mm，5 μm粒子サイズ; ナカライテスク株式会社）
移動相：（A）超純水（0.1% TFA）
　　　　(B)アセトニトリル（0.1% TFA）
流速：1.0ml / 分
条件：1-5分　100% A（アイソクラティック）
　　　5-10分　0-9% B（直線的グラジエント）
　　　10-20分 9%B（アイソクラティック）
　　　20-27分 9-11%B（アイソクラティック）
　　　27-40分 11-18%B（直線的グラジエント）
　　　40-50分 18%B（アイソクラティック）
　　　50-60分 18-100%（直線的グラジエント）
カラム温度：40℃
検出波長：270 nm

単一ピーク画分を含む移動相を分取し、減圧濃縮および凍結乾燥により溶媒を除いた後、100 mg/mlになるようにDMSOに溶解し、DPPHラジカル消去活性の測定に供した。

8．液体クロマトグラフィー質量分析計（LC-MS）分析

1 mg/mlとなるように80%エタノールに溶解した試料をLC-MS（Quattro micro API; Waters社）に供した。イオン化はエレクトロスプレーイオン化（ESI）法により、コーン電圧は30Vで行った。

9．核磁気共鳴（NMR）分析

1 mg/mlとなるように重水素化ジメチルスルホキシド（DMSO-d_6）に溶解した試料を^{1}H-NMRおよび^{13}C-NMR分析に供した。なお、分析にはBruker DRX500（日本ハイテクサイエンス社）を用いた。

結果

1．Wakogel C-200およびシリカゲル60を用いて調製した分画物のDPPHラジカル消去活性

*Mu. circinelloides*を用いて調製した発酵物および未発酵物の酢酸エチル抽出画分をWakogel C-200を用いたオープンクロマトグラフィーにより11画分に分画し（計22画分）、発酵物および未発酵試料の対応画分のDPPHラジカル消去活性を比較した（表1）。その結果、画分7において、発酵物の残存率が未発酵に比べて顕著に低い値（高い活性）を示したことから、本画分をさらにシリカゲル60により11画分に分画し、両試料の対応画分のDPPHラジカル消去活性を比較した（表2）。その結果、画分7-6において発酵物の残存率が未発酵に比べて顕著に低い値（高い活性）を示した。

2．HPLC分析および分取画分のDPPHラジカル消去活性

オープンカラムクロマトグラフィーにより分画した画分のうち、DPPHラジカル消去活性が高値を示した画分7-6をHPLC分析に供し、検出された4つの単一ピーク画分（化合物A～D）を分取した（図1）。

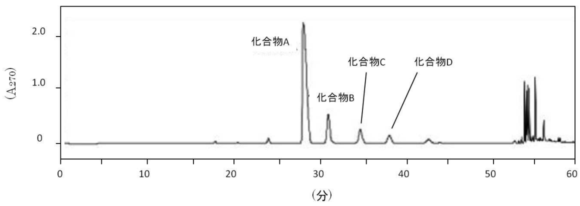

図1　画分7-6のHPLCクロマトグラム

3．化合物Aの構造解析

HPLC分析により検出された単一ピークのうち、構造解析を行うために十分な重量が分取された化合物A（リテンションタイム28分）の構造解析を行った。LC-MS解析においてはポジティブモード（MS+）ではm/z 121.11、ネガティブモード（MS－）ではm/z 137.07の基準ピークが検出された（図2）。次に^{1}H-NMR分析および^{13}C-NMR分析を行った。以下にそのスペクトルデータを示す。

表1　Wakogel C-200を用いたオープンクロマトグラフィーにより分画した発酵物および未発酵物の各11画分のDPPHラジカル消去活性の比較（対応画分を網掛で示した）

	画分	溶媒組成（%） ヘキサン	酢酸エチル	メタノール	ラジカル残存率（%）
未発酵物	1	100	0	0	100
	2	80	20	0	68.1
	3	60	40	0	86
	4	40	60	0	13.6
	5	20	80	0	91.2
	6	0	100	0	61.6
	7	0	80	20	74.5
	8	0	60	40	83.2
	9	0	40	60	90.1
	10	0	20	80	90.5
	11	0	0	100	95.5
発酵物	1	100	0	0	100
	2	80	20	0	96.8
	3	60	40	0	86
	4	40	60	0	16.2
	5	20	80	0	74.5
	6	0	100	0	71.8
	7	0	80	20	32.4
	8	0	60	40	77.7
	9	0	40	60	93.9
	10	0	20	80	90.7
	11	0	0	100	95

表2　シリカゲル60を用いたオープンクロマトグラフィーにより分画した発酵物および未発酵物の各11画分のDPPHラジカル消去活性の比較（対応画分を網掛で示した）

	画分	溶媒組成（%） クロロホルム	メタノール	ラジカル残存率（%）
未発酵物	7-1	100	0	100
	7-2	90	10	100
	7-3	80	20	95.4
	7-4	70	30	80.3
	7-5	60	40	79.4
	7-6	50	50	76
	7-7	40	60	76
	7-8	30	70	87.1
	7-9	20	80	100
	7-10	10	90	98.7
	7-11	0	100	100
発酵物	7-1	100	0	100
	7-2	90	10	98.3
	7-3	80	20	89.4
	7-4	70	30	73.8
	7-5	60	40	78.3
	7-6	50	50	15.1
	7-7	40	60	64.2
	7-8	30	70	100
	7-9	20	80	64.2
	7-10	10	90	89.2
	7-11	0	100	100

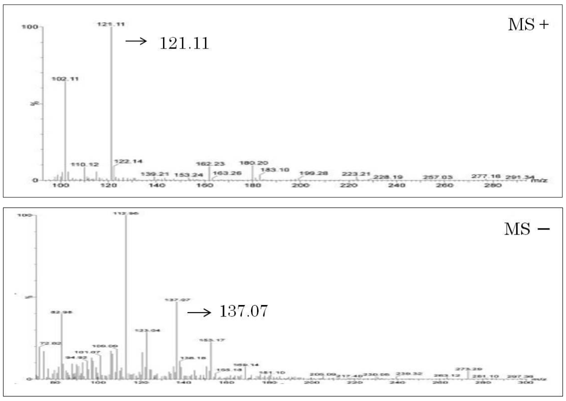

図２　化合物AのMSスペクトル

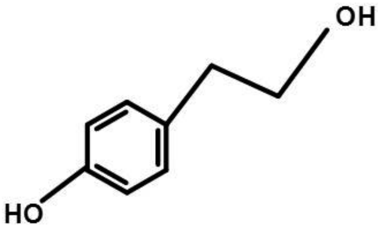

図３　チロソールの構造

δ H: 9.13（1H，s）、6.98（2H，d，J=8.5 Hz）、6.65（2H，d，J=6.5 Hz）、4.58（1H，t，J=5 Hz）、3.51（2H，q，J=7.5 Hz）、2.59（2H，t，J=7.5 Hz）
δ C: 155.65、129.89、129.63、115.12、62.83、38.49

これらの結果から、化合物Aをチロソールと同定した（図３）。チロソールのスペクトルデータ[9-11]を以下に示す。

δ H: 9.14（1H，s）、7.08（2H，d，J=8.4 Hz）、6.76（2H，d，J=7.8 Hz）、4.59（1H，t，J=5.2 Hz）、3.81（2H，d，J=6.6 Hz）、2.76（2H，t，J=6.6 Hz）
δ C: 154.29、130.86、131.04、116.13、64.58、34.19

考察

本研究では、*Mu. circinelloides*を用いて調製した米発酵物から抗酸化活性物質であチロソールを単離同定した。

*Mucor*属の糸状菌は自然界に広く分布し、中国の豆鼓や腐乳などの製造に用いられている。*Mu. circinelloides*はベトナムの米麹であるbanh menから分離された糖化微生物である[6]。筆者は先行研究において、アジア圏内で分離されている計８種の糖化微生物（*Aspergillus oryzae*、*Monascus pilosus*、*Absidia corymbifera*、*Mucor circinelloides*、*Mucor racemosus*、*Rhizopus oryzae*、*Rhizopus oligosporus*、*Saccharomycopsis fibrigera*）を用いて調製した米発酵物の還元糖、総アミノ酸、総ポリフェノール含量、およびDPPHラジカル消去活性の測定値を比較した。その結果、*Mu. circinelloides*を用いた米発酵物では、還元糖量は低い値であったものの、アミノ酸含量およびポリフェノール含量が顕著に高い値を示した。また、抗酸化活性は試験に供した８種類のうち、さまざまな健康機能がすでに報告[12]されている*Mo. pilosus*に次いで高い値を示した。これらの結果から、*Mu. circinelloides*は発酵過程に代謝産物として抗酸化活性物質を生成している可能性が示されたことから、本研究では、*Mu. circinelloides*の米発酵物に含まれる抗酸化活性物質の単離を試みた。

本研究において分離同定されたチロソールはオリーブ油やワイン、焼酎の残渣などに含まれることが知られており[13-14]、抗酸化活性や悪玉コレステロールの抑制効果などがすでに報告されている[15-17]。本研究において、未発酵物の酢酸エチル抽出画分には検出されなかったことから、チロソールは*Mu. circinelloides*によって発酵過程に生成される代謝産物であると推察された。発酵食品に備わる機能性に関しては、用いられる微生物による直接的な作用（プロバイオティクス）や、生産される酵素や代謝産物に起因するといわれている[18-19]。本研究では、*Mu. circinelloides*を用いて米を発酵させることにより抗酸化活性が上昇し、その上昇にチロソールが寄与している可能性が示されたが、その寄与率については明確にできなかった。

*Mu. circinelloides*はエタノール生産菌として知られ、β-カロテンやγ-リノレン酸、β-グルコシダーゼ等を生産することが知られており[20-21]、物質の生産能が高い糖化微生物であると考えられる。今後、チロソール以外の抗酸化活性物質の同定を試みることで、*Mu. circinelloides*を用いた米の発酵による抗酸化活性上昇の全容を解明したい。

参考文献

１）Watanabe, T., Food and Disease: The etiological background of so-called lifestyle-related diseases, *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 57, 15-19 (2004).
２）農林水産省，農林水産統計平成22年度，国内産米・麦類の検査数量．http://www.maff.go.jp/j/seisan/kikaku/pdf/data01.pdf
３）Hesseltine, C.W., Rogers, R. and Winarno, F.G., Microbiological studies on amylolytic oriental

fermentation starters. *Mycopathologia*, 101, 141-155 (1988).

4) Uchimura, T., Kojima, Y. and Kozaki, M., Studies on the main saccharifying microorganism in the Chinese starter of Bhutan,"Chang poo". *J. Brew. Soc. Japan*, 85, 881-887 (1990).

5) Uchimura, T., Takagi, S., Watanabe, K. and Kozaki, M., Absidia sp. in the Chinese starter (Nuruk) in Korea. *J. Brew. Soc. Japan*, 85, 888-894 (1990).

6) Lee, A.C. and Fujio, Y., Microflora of banh men, a fermentation starter from Vietnam. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15, 51-55 (1999).

7) Inagaki, S., Kato, T. and Mori, S., Composition and Antioxidant Activity of Rice Fermented with Saccharifying Organisms from Asian Countries. *Food Sci. Technol. Res.*, 19, 893-899 (2013).

8) Nagata, K., Hasegawa, T., Hirokado, Y., Kiyama, K. and Othsuki, C., Lifestyle-related diseases and oxidative stress regulation system. *J. Psychosom. Med.*, 48, 177-183 (2008).

9) 独立行政法人産業技術総合研究所，有機化合物のスペクトルデータベース (SDBS)． http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

10) Takaya, Y., Furukawa, T., Miura, S., Akutagawa, T., Hotta, Y., Ishikawa, N. and Niwa, M., Antioxidant constituents in disrillation residue of awamori spirits. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 75-79 (2007).

11) Owen, R., Mier, W., Giacosa, A. and Hull, W., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Identification of Lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry*, 46, 976-988 (2000).

12) Cheng, C. and Pan, T. M., Protective effect of Monascus fermented red mold rice against alcoholic liver disease by attenuating oxidative stress and inflammatory response. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 9950-9957 (2011).

13) Fito, M., Torre, R., Farre, M., Khymenetz, Olha., Marrugat, Jaime., Covas, M., Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 43, 375-381 (2007).

14) Seki, T., Morimura, S., Tabata, S., Tang, Y., Shigematsu, T. and Kida, K., Antioxidant activity of vinegar produced from distilled residues of the Japanese liquor shochu. *J. Agric Food Chem.*, 56, 3785-90 (2008).

15) Giovannini, C., Straface, E., Modesti, D., Coni, E., Cantafora, A., Vincenzi, M., Malorni, W., Masella, R., Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells. *J. Nutr.*, 129, 1269-1277 (1999).

16) Vissers M. N., Zock P. L. and Katan M. B., Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Euro. J. Clin. Nutri.*, 58, 955–965 (2004).

17) Benedetto, R.D., Varı, R., Scazzocchio, B., Filesi, C., Santangelo, C., Giovannini, C., Matarreso, P., Archivio M.D. and Masella, R., Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness. *Nut. Metabo. Cardi. Diseases*, 17, 535-545 (2006).

18) Ohtsuki, T., Akiyama, J., Shimoyama, T., Yazaki, S., Ui, S., Hirose, Y. and Mimura, A., Increased production of antioxidative sesaminol glucosides from sesame oil cake through fermentation by *Bacillus circulans* strain YUS-2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 2304-2306 (2003).

19) 早川潔，上野義栄，河村眞也，谷口良三，小田耕平，乳酸菌による γ-アミノ酪酸の生産．生物工学会誌，75，239-244（1997）．

20) Kato, Y., Nomura, T., Ogita, S., Takano, M. and Hoshino, K., Two new β-glucosidases from ethanol-fermenting fungus Mucor circinelloides NBRC 4572: enzyme purification, functional characterization, and molecular cloning of the gene. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 10045-10056 (2013).

21) Certik, M., Adamechova, Z. and Guothova, L., Simultaneous enrichment of cereals with polyunsaturated fatty acids and pigments by fungal solid state fermentations. *J. Biotechnol.*, 168, 130-134 (2013).

Antioxidant Contained in Rice Product Fermented with *Mucor circinelloides*

Faculty of Health and Nutrition, Department of Health and Nutrition
Shyuichiro INAGAKI

Abstract

The auther aims the development of novel processed rice product for improving the decrease of rice consumption. In this study, an antioxidant was founded from the rice fermented with *Mucor circinelloides*, which has isolated from banh men, a molded rice product in Vietnum. The ethyl acetate extract from the rice experimentally fermented with *Mucor circinelloides* was fractionated to eleven fractions by first step silica gel chromatography using Wakogel C-200. Fraction 7, showing high antioxidant activity in first step silica gel chromatography, was further fractionated to eleven fractions by second step silica gel chromatography using Silicagel 60. Fraction 7-6, showing high antioxidant activity in second step silica gel chromatography, was fractionated by high performance liquid chromatography, and single peak (compound A) was prepared. By structural analysis using MS and nuclear magnetic resonance (NMR), compound A was identified as tyrosol. Tyrosol has known as a metabolite produced by plant and microorganism from tyrosine.

Keywords: molded rice, *Mucor circinelloides*, antioxidant activity, Tyrosol