

# アジアの糖化微生物を用いた米発酵物の成分組成および抗酸化活性：微生物種の違いによる比較

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-02-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 稲垣, 秀一郎 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://osaka-shoin.repo.nii.ac.jp/records/4378">https://osaka-shoin.repo.nii.ac.jp/records/4378</a>

# アジアの糖化微生物を用いた米発酵物の成分組成および抗酸化活性—微生物種の違いによる比較—

健康栄養学部 健康栄養学科 稲垣 秀一郎

要旨：筆者は、米の用途拡大を目指し、アジア諸国で見出された糖化微生物を用いて新規米麴の開発を試みている。本研究では、13種の糖化微生物を用いて調製した発酵物の還元糖、グルコース、総アミノ酸、総ポリフェノール含量、および抗酸化活性の比較を行い、用いられた微生物の分類と上記成分および活性値に関係性が見られるかについて調査した。その結果、微生物分類の近縁性と測定した成分および活性値との間に明確な関係性は見られず、近縁種でも酵素活性や物質生産能が異なり、発酵物に備わる生理活性に大きな差が生じているものと考えられた。また、原料として玄米および白米を用いた発酵物を比較することにより発酵の進行度を推測するとともに、米糠層に含まれる成分の抗酸化活性値に与える影響について考察した。その結果、白米の方がより発酵が進んでいること、そして、発酵物に見られる抗酸化活性の上昇は米糠中の成分に由来するものだけではなく、微生物の代謝産物にも大きく依存することが示唆された。

キーワード：米麴、糖化微生物、成分含量、抗酸化活性

## 背景・目的

米は、我が国の最も重要な作物として古来より栽培されてきたが、食形態の欧米化によりその消費量は近年大幅に低下している。<sup>1-2)</sup>そのため、日本における米の需要と供給のバランスを今後維持していくためには、新たな用途開発が求められる。

米麴は、醤油や味噌、酒、みりんなど日本に根づく発酵食品の材料として必要不可欠である。日本で製造される米麴は*Aspergillus*属の糸状菌を米粒に生育させた散麴(ばらこうじ)であるが、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bah menなど、水を加えた米粉に菌を接種して発酵させた多種多様な餅麴(もちこうじ)が存在している<sup>3-6)</sup>。そこで、このような餅麴の製造に用いられるアジアの糖化微生物を散麴の開発に利用することで米麴の種類に多様さを与えることができれば、米の消費拡大に貢献しうると考えた。

既報<sup>7)</sup>において、計8種類の糖化微生物を用いてそれぞれの純粋培養により米の発酵物を調製し、それらのメタノール抽出率、還元糖、グルコース、総アミノ酸、総ポリフェノール含量、および抗酸化活性を測定した。本報告ではさらに5種類の糖化微生物の結果を加え、また、各発酵物中のグルコース含量を測定する

ことで、還元糖中におけるグルコースの割合についても言及した。これらの結果をふまえ、微生物種の近縁性とそれらの成分および活性値に関連性が見られるかについて考察した。

## 方法

### 1. 供試材料

コシヒカリ(玄米)は株式会社マイセンより購入した。糖化微生物(*Aspergillus awamori* NBRC 4388、*Aspergillus kawachi* NBRC 4308、*Aspergillus oryzae* NBRC 30113、*Aspergillus sojae* NBRC 33084、*Monascus pilosus* NBRC 4520、*Mo. pilosus* NBRC 4502、*Absidia corymbifera* NBRC 32279、*Mucor circinelloides* NBRC 4554、*Rhizopus oryzae* NBRC 4706、*R. oligosporus* NBRC 8631、*Saccharomycopsis fibrifera* NBRC 1665)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。また、市販麴菌(*As.oryzae*)は株式会社 ビオックおよび株式会社 菱六(長白菌)から購入した。*As.oryzae*は我が国において清酒の製造等に用いられている微生物である。*As. sojae*は醤油麴カビといわれ、醤油製造に用いることのある微生物である。*As. awamori*、*As. kawachi*は焼酎や泡盛の製造に用いられる微生物である。*Mo. pilosus*は紅麴カビといわれ、

豆腐ようや中国の紅酒の製造に用いられている。*Ab. corymbifera*および*Mu. circinelloides*は毛カビ属に分類され、東南アジアの餅麴から分離された糖化微生物である。*R. oryzae*および*R. oligosporus*はクモノスカビ属に分類され、*R. oryzae*は東南アジアの餅麴から分離された糖化微生物であり、*R. oligosporus*はインドネシアのテンペの製造に用いられている。

## 2. 試薬

$\alpha$ -アミラーゼ、1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)、2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)、Dimethyl sulfoxide (DMSO)、ニンヒドリン、ヒドリンダンチン、2-メトキシエタノール、グルコース測定キット (ラボアッセイTMグルコース) は和光純薬株式会社から、Potate dextrose agar (PDA) は関東化学株式会社から購入した。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。

## 3. 微生物の培養

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

## 4. 米発酵物の調製

粉碎した玄米 20 gおよび純水 100 mlを500 ml容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。培養した微生物の孢子を綿棒で滅菌水に懸濁し、 $1.0 \times 10^6$  CFU/mlとした菌液 0.5 mlを米培地に接種後、30℃で7日間静置した。また、米培地のアミラーゼ処理は、2 mg/mlアミラーゼ溶液 5 mlを米培地に添加後、30℃で24時間静置することにより行った。白米を用いた*As. oryzae*発酵物の調製は、上記の玄米 20 gを白米 20 gに代替し、それ以外の処理は同様に行った。この際には、株式会社 菱六から購入した*As. oryzae*を発酵に用いた。

## 5. 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時間攪拌浸漬した。濾過により浸漬物から固形物を除いた後、その濾液を減圧濃縮および凍結乾燥したものをメタノール抽出画分とした。メタノール抽出率は以下の式により求めた。

$$\text{メタノール抽出率} = \frac{\text{メタノール抽出物量 (g)}}{\text{発酵物の凍結乾燥物量 (g)}} \times 100$$

メタノール抽出画分の一部を純水に溶解し、等量の酢酸エチルを加えて分配抽出を行った後、酢酸エチルおよび純水を減圧濃縮または凍結乾燥により除いたものをそれぞれ酢酸エチル抽出画分および水抽出画分とした。各抽出画分は100 mg/mlになるようにDMSOに溶解して各試験に用いた。

## 6. 還元糖量の測定

ソモギーネルソン法を一部改変して行った<sup>7)</sup>。2 mlのマイクロチューブに超純水 245  $\mu$ l、試料 5  $\mu$ l、およびソモギー試薬 250  $\mu$ lを混合し、沸騰水中で10分間煮沸後、氷水中で冷却した。続いて、ネルソン試薬 250  $\mu$ lを添加してよく混合後、蓋を開けて15分間室温に静置した。そのうち100  $\mu$ lを96穴マイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダー (iMark; Bio-Rad社) を用いて655nmの吸光度を測定した。各試料の還元糖量測定は、グルコース標準液を用いて作成した検量線から求めた。なお、試料は発酵物のメタノール抽出画分 (100 mg/ml) を用いた。

## 7. グルコース含量の測定

グルコース測定キットの説明書に記載されている方法を一部改変して行った。96穴マイクロプレートに試料 1  $\mu$ lおよび発色剤 150  $\mu$ lを添加し、よく混合した。37℃で5分間静置した後、540 nmの吸光度を測定した。各試料のグルコース含量測定は、グルコース標準液を用いて作成した検量線から求めた。なお、試料は発酵物のメタノール抽出画分 (100 mg/ml) を用いた。

## 8. 総アミノ酸含量の測定

ムーアらの方法を一部改変して行った<sup>8)</sup>。1.5 mlのマイクロチューブに試料溶液 5  $\mu$ lおよびニンヒドリン試薬 100  $\mu$ lを混合し、沸騰水中で10分間煮沸後、氷水中で冷却した。そのうち100  $\mu$ lを96穴マイクロプレートに移し、595 nmの吸光度を測定した。各試料の総アミノ酸含量測定は、アラニン標準液を用いて作成した検量線から求めた。なお、試料は発酵物のメタノール抽出画分 (10または100 mg/ml) を用いた。

## 9. 総ポリフェノール含量の測定

フォーリンチオカルト法<sup>9)</sup>により行った。96穴マイ

クロプレートに超純水 57.5  $\mu$ l、試料溶液 5  $\mu$ l、およびフォーリン試薬 12.5  $\mu$ lを添加後よく混合し、3分間室温に静置した。続いて、10%炭酸ナトリウムを 25  $\mu$ l添加後、よく混合し、30分間室温に静置した後、655 nmの吸光度を測定した。各試料の総ポリフェノール含量測定は、コーヒー酸標準液を用いて作成した検量線から求めた。なお、試料は発酵物の酢酸エチル抽出画分（10または100 mg/ml）を用いた。

## 10. DPPHラジカル消去活性

既報<sup>10)</sup>に準じて行った。すなわち、40  $\mu$ lの試料溶液および10  $\mu$ l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  $\mu$ lのDPPH溶液（0.5 mg/ml）を加えてよく攪拌し、30分後の540 nmの吸光度を測定した。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。本値は、低い値ほど活性が高いことを示している。なお、試料は発酵物の酢酸エチル抽出画分（10または100 mg/ml）を用いた。

### DPPHラジカル残存率

$$= \text{試料添加時の吸光度} / \text{試料無添加時の吸光度} \times 100$$

## 11. 統計処理

本研究における試験結果の数値は、3検体の平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。（表1および2の結果を除く）

## 実験結果および考察

### 1. メタノール抽出率

発酵の進行度の指標として、発酵物からのメタノール抽出率を求めた<sup>10)</sup>。表1に示すように、*Aspergillus*属の微生物は*As. sojae*を除いて高い値（30%以上）を示したが、*As. oryzae*の3種の間にも大きな差が見られた。また、*Monascus*属の2種の間にも大きな差が見られた。これらの結果から、発酵の進行度は、近縁種でも大きく異なることが示唆された。

### 2. 還元糖量

各微生物による米の糖化度の指標として、発酵物中の還元糖量を求めた。調製した米発酵物13種類のうち、紅麹菌である*Mo. pilosus* 4520（赤色色素非生産株）で最も高い値であったのに対し、色素生産株である*Mo. pilosus* 4502では極めて低い値を示した。*Aspergillus*属では、*As. sojae*を除いて全て100 mg/g

表1 各発酵物のメタノール抽出率

微生物種(試料名)	%
未発酵物	3.5
アミラーゼ処理	51.2
<i>As. oryzae</i> 市販品A	62.6
<i>As. oryzae</i> 市販品B	30.3
<i>As. oryzae</i> NBRC30113	57.2
<i>As. sojae</i>	13.2
<i>As. kawachi</i>	53.1
<i>As. awamori</i>	34.3
<i>Mo. pilosus</i> NBRC 4520	39.8
<i>Mo. pilosus</i> NBRC 4502	18.1
<i>Ab. corymbifera</i>	15.5
<i>Mu. circinelloides</i>	19.8
<i>R. oryzae</i>	58.1
<i>R. oligosporus</i>	30.4
<i>S. fibriger</i>	17.7

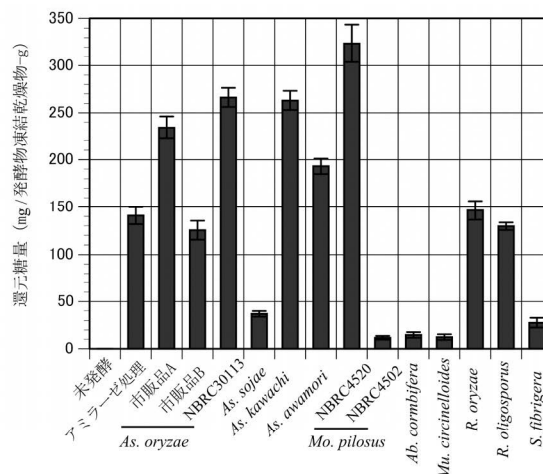


図1 各発酵物の還元糖量の比較

以上と高い値を示した。また、市販品のAとBにおいて大きな差がみられた。毛カビ属である*Ab. corymbifera*および*Mu. circinelloides*では極めて低い値であった（図1）。米麹製造には糖化能の高い微生物が適しているため、本研究結果はその指標となりうる。本結果から、麹（散麹）製造に適している糖化微生物が必ずしも*Aspergillus*属に限らないことが示された。

### 3. グルコース含量

味噌や醤油、酒等の発酵食品の製造に用いられる発酵微生物はグルコースを栄養源にして増殖するため、発酵物中のグルコース含量は米麹の品質を大きく左右する。よって、上記した還元糖量に続いて、発酵物中

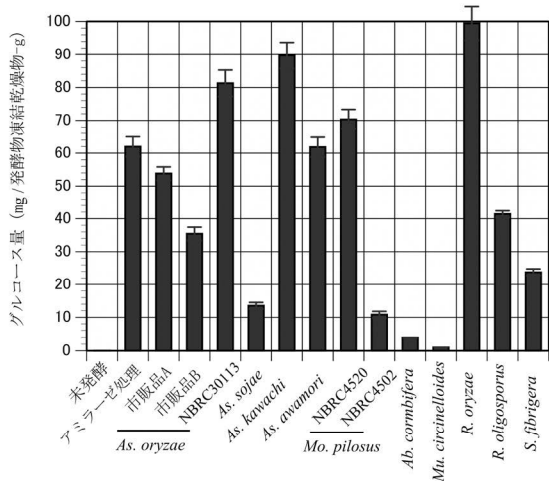


図2 各発酵物のグルコース含量の比較

表2 各発酵物中の還元糖量中に含まれるグルコースの割合 (%)

微生物種	%
アミラーゼ処理	44.0
<i>As. oryzae</i> 市販品A	23.0
<i>As. oryzae</i> 市販品B	28.3
<i>As. oryzae</i> NBRC30113	31.2
<i>As. sojae</i>	36.8
<i>As. kawachi</i>	34.1
<i>As. awamori</i>	32.0
<i>Mo. pilosus</i> NBRC 4520	21.7
<i>Mo. pilosus</i> NBRC 4502	92.2
<i>Ab. corymbifera</i>	26.3
<i>Mu. circinelloides</i>	8.0
<i>R. oryzae</i>	67.9
<i>R. oligosporus</i>	31.9
<i>S. fibrigera</i>	86.1

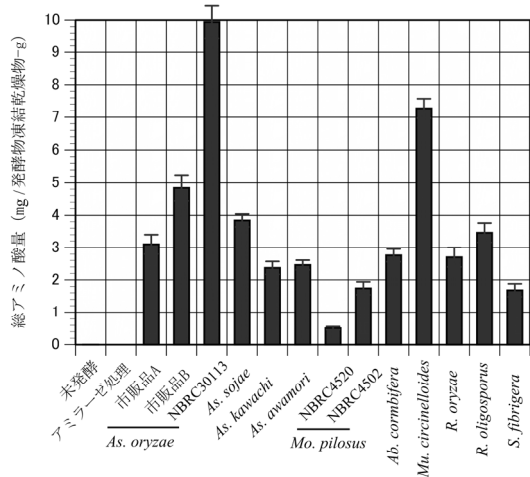


図3 各発酵物の総アミノ酸含量の比較

のグルコース含量を測定した(図2)。また、還元糖量中に含まれるグルコースの割合を表2に示した。全試料のうち、*R. oryzae*を用いた発酵物は還元糖量およびグルコース量がともに高い値を示したことから、*As. oryzae*とともに米麴(散麴)製造に適している可能性が示された。

#### 4. 総アミノ酸含量

調製した米発酵物中の総アミノ酸含量は*As. oryzae* NBRC 30113および*Mu. circinelloides*で極めて高い値を示した(図3)。また、3種類の*As. oryzae*の間でアミノ酸含量は大きく異なり、同属間においてもタンパク質分解能に大きな差があることが示唆された。

#### 5. 総ポリフェノール含量

本試験には発酵物の酢酸エチル抽出画分を用い、疎水性のポリフェノールを検出対象とした。図4に示したように、総ポリフェノール含量は各発酵物の間で大きく異なり、その中で*As. awamori*、*Mo. pilosus* NBRC4502で高い値を示した。一方、*Ab. corymbifera*では極めて低い値であった。穀物の発酵によるポリフェノール含量の増加については、米糠層に含まれるタンパク質結合性のポリフェノールが発酵により遊離することに起因するとの報告がある<sup>11)</sup>。本研究におけるポリフェノール含量の増加も、同様の原因が考えられるが、微生物の生成物に由来する可能性も考えられるため、後述において、原料に玄米および白米を用いた際の発酵物中の成分および抗酸化活性について比較をした。

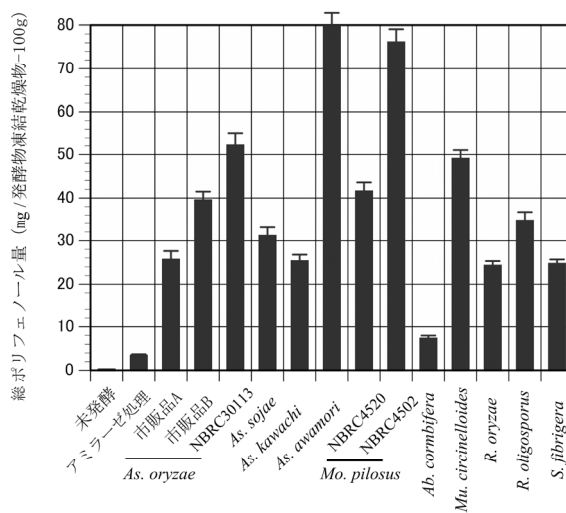


図4 各発酵物の総ポリフェノール量の比較

## 6. DPPHラジカル消去活性

抗酸化活性の指標としてDPPHラジカル消去活性を測定した。図5に示したように、焼酎製造に用いられる*As. awamori*で極めて高い活性を示した。また、*As. oryzae*の3種で活性が大きく異なり、総ポリフェノール含量と相関することが示された。*As. awamori*を用いた発酵物の生理活性についてはいくつかの報告がある。たとえば、泡盛の発酵残渣から ethyl 2-pyrrolidione-5-carboxylate や ethyl p-hydroxyphenyllactate等の抗酸化成分が単離されている<sup>12)</sup>。また、ライチ果皮抽出物の*As. awamori*発酵物が高い抗酸化活性およびDNA保護効果をもつことが示されている<sup>13)</sup>。さらに、黒豆の*As. awamori*発酵物のメタノール抽出物には抗変異原性効果が見出されている<sup>14)</sup>。本実験による結果や以上のような過去の報告から、発酵による代謝産物の生産性は微生物種によって大きく異なり、発酵物の生理活性に関する特徴についても、用いられた微生物の性質に依存するものと推察された。

## 7. *As. oryzae*発酵物における各成分および抗酸化活性の原料（玄米または白米）による相違

玄米を用いた発酵物には米糠中の成分がそのまま含

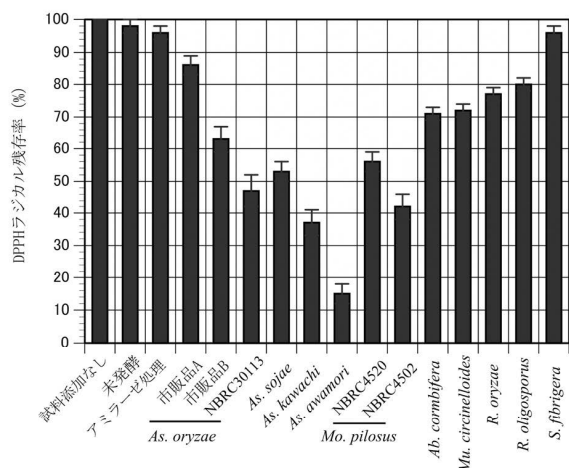


図5 各発酵物のDPPHラジカル消去活性の比較

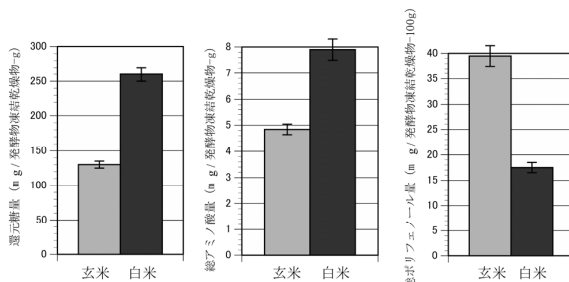


図6 玄米および白米発酵物の各成分値の比較

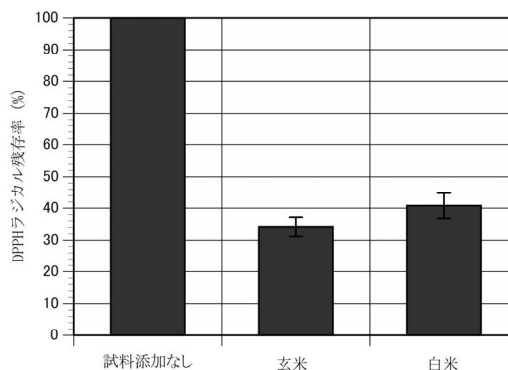


図7 玄米および白米発酵物のDPPHラジカル消去活性の比較

有されると考えられる。そこで、玄米および白米を用いた*As. oryzae*発酵物の各成分および抗酸化活性を測定し、発酵の進行度への影響を調べるとともに、抗酸化活性が糠成分のみでなく発酵代謝物に由来する可能性について考察した。還元糖および総アミノ酸含量は白米発酵物において玄米発酵物よりも高い値を示した。これにより、発酵の進行度は白米を用いた際、玄米を用いたときよりも進んでいることが示された。一方、総ポリフェノール含量は玄米発酵物において白米発酵物よりも高い値を示した(図6)。これは、玄米の糠層に含まれるポリフェノールによるものと考えられる。また、玄米および白米発酵物のDPPHラジカル消去活性を比較したところ、有意な差は見られなかった(図7)。以上の結果から、玄米を用いた発酵物に見られる抗酸化活性は糠に含まれるポリフェノールによるものだけに限らず、微生物の代謝産物に大部分由来していると考えられた。

## おわりに

本研究では、新規米麹の開発を目的として、13種の糖化微生物を用い、それぞれの純粋培養により米発酵物を調製し、それらのメタノール抽出率、還元糖量、総アミノ酸量、総ポリフェノール含量、および抗酸化活性を測定した。本研究における一連の結果から、微生物種の近縁性と成分量および抗酸化活性の間に明確な関連性は認められなかった。よって、近縁種であっても酵素活性や物質生産能が異なり、発酵物に備わる生理活性にも差異が生じているものと考えられる。

新規米麹の実用化を進める際、微生物の高い糖化能が不可欠であるが、必ずしも生理活性の付与に優れた微生物に高い糖化能が備わっているとは限らない。よって今後は、米麹製造における複数種の糖化微生物の使用が発酵の進行や生理活性に与える影響についても調査していきたい。

## 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) Nelson, N., A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, 375-380 (1944).
- 8) Moore, S. and Stein, W.H., A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 211, 907-913 (1954).
- 9) Singleton, V.L. and Rossi, J.A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158 (1965).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) Takaya, Y., Furukawa, T., Miura, S., Akutagawa, T., Hotta, Y., Ishikawa, N. and Niwa, M., Antioxidant constituents in distillation of Awamori spirits. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 75-79 (2007).
- 13) Lin, S., Yang, B., Chen, F., Jiang, G., Li, G., Duan, X. and Jiang, Y., Enhanced DPPH radical scavenging activity and DNA protection effect of litchi pericarp extract by *Aspergillus awamori* bioconversion. *Chem. Cent. J.*, 6, 108 (2012).
- 14) Hung, Y.H., Huang, H.Y. and Chou, C.C., Mutagenic and antimutagenic effects of methanol extracts of unfermented and fermented black soybean. *Int. J. Food Microbiol.*, 118, 62-68 (2007).

## **Comparison of Composition and Antioxidant Activity in Rice Products Purely Fermented with Saccharifying Organisms from Asian Country**

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

### Abstract

The author aims the development of novel rice fermented product (molded rice; rice koji) using various saccharifying organisms in Asian countries. In this study, reducing sugar, total amino acid and total polyphenol contents, and antioxidant activity of fermented rice products purely using thirteen saccharifying organisms were evaluated and these results were compared. As the result, no relation between species of organism used in the fermentation and the values measured in the assays were certainly observed. These suggest that the composition and physiological activity in fermented products are different even in using related species. Next, reducing sugar, total amino acid and total polyphenol contents, and antioxidant activities of fermented products using polished or unpolished rice as a raw material were compared. It was suggested that fermentation advanced in the product with polished rice more than with unpolished rice. No difference were observed between antioxidant activities of the product fermented with polished and unpolished rice. These results suggest that the antioxidant activity of the fermented product with unpolished rice is not attributed to the bran ingredients. The metabolites produced by organism in the process of fermentation may relate the activity.

Keywords: molded rice, saccharifying organism, composition, antioxidant activity