

令和元年6月21日現在

機関番号：34409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16298

研究課題名(和文) 発酵食品の機能性に寄与するアミノ酸代謝物の網羅的解析と機能性食品開発への応用

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the amino acid metabolites which contribute functionality of fermented food, and application to the development of functional food.

研究代表者

稲垣 秀一郎 (Inagaki, Shyuichiro)

大阪樟蔭女子大学・健康栄養学部・講師

研究者番号：20575774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、米の消費量の低下が顕著となり、米の用途拡大が求められている。本研究では、新規米発酵食材の開発を目指し、アジアのさまざまな糖化微生物を用いて調製した米発酵物の成分分析および機能性調査を行った。成分分析においては、糖化微生物種の近縁性によって糖化能やアミノ酸生成能に相関が見られるかに着目したが、一定の傾向はあるものの例外も存在していることから、一概に法則性があるという結論には至らなかった。機能性評価の一つとして測定したDPPHラジカル活性では、試験した13種の微生物の酢酸エチル抽出物のなかでAspergillus awamoriに最も強い活性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、日本の米消費量の低下を改善し、米の用途拡大をはかるため、新規米発酵食材の開発を目指したものである。近年の国民の食へのこだわりと健康志向の観点から、米の発酵食材の多様化と機能性の向上が実現すれば、農業の活性化と食品産業の発展に大いに貢献できると考えている。また、本研究結果から、さまざまな米の微生物発酵物に多様な二次代謝産物の生成が期待され、発酵食品の健康機能の解明の観点からも大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, a decline of consumption of rice is conspicuous. Thus, increasing the consumption of rice is an important subject. 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 the species of organism used in the fermentation and the values measured in the assays were certainly observed. Among thirteen saccharifying organisms tested in this study, most potent antioxidant activity was showed in the rice product fermented with Aspergillus awamori.

研究分野：食品化学

キーワード：発酵食品 機能性 アミノ酸代謝物

1. 研究開始当初の背景

(1) 新規米発酵食品の開発

米は日本人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古来より全国的に栽培されてきた。しかし昨今、米の消費量低下や異常気象が原因となり、余剰米や規格外米等の未利用米が急激に増加しているため、主食用以外の用途を開発し米の消費量を拡大することが急務となっている。米麹は、味噌や醤油、酒等、日本の伝統的な食品の製造に欠かせない食材であるが、日本の米麹は *Aspergillus* 属のカビを用いたもの（散麹）に限られている。一方で、アジア諸国に目を向けると、タイの Luck Pang やインドネシアの Ragi、ブータンの Chang poo 等、さまざまな米麹（餅麹）が存在し、これらの米麹から *Rhizopus* 属のカビや *Saccharomycopsis* 属の酵母等、多様な糖化微生物が分離されている。

(2) 発酵食品の機能性

発酵食品の保健機能は、その発酵過程で微生物により生成される代謝産物に一部起因すると考えられている^{1), 2)}。しかしながら、発酵食品の機能性に寄与している普遍的な物質は見出されていない。これまで申請者は、大豆煮汁発酵物中に生成されるトリプトファンやトリプタミン等のタンパク質（アミノ酸）の代謝物が機能性の科学的根拠となる可能性を示している³⁾。

2. 研究の目的

上記の背景をふまえ、機能性を有する新規米発酵食材の開発を目指し、アジアの糖化微生物を用いて調製した米発酵物の成分分析およびアミノ酸代謝物に着目した機能性評価を実施した。

3. 研究の方法

(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、市販麹菌（*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。

(2) 試薬

-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™ 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。培養した微生物の胞子を綿棒で滅菌水に懸濁し、 1.0×10^6 CFU/ml とした菌液 0.5 μl 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。

(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。

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

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) 各種成分分析および生理活性測定

還元糖の測定はソモギーネルソン法を一部改変して行った。グルコース含量の測定はグルコース測定キット（和光純薬）を用いた。総アミノ酸含量の測定はムーアらの方法を一部改変して行った。総ポリフェノール含量の測定はフォーリンチオカルト法により行った。DPPH ラジカル消去活性の測定は既報³⁾に準じて行った。

(7) 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 ± 標準誤差で表した。（表 1 および 2 の結果を除く）

4. 研究成果

(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。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。

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. fibrigera</i>	17.7

表 1 メタノール抽出率

(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* を除き全て 100 mg/g 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）製造に適する糖化微生物は必ずしも *Aspergillus* 属に限らないと推察された。

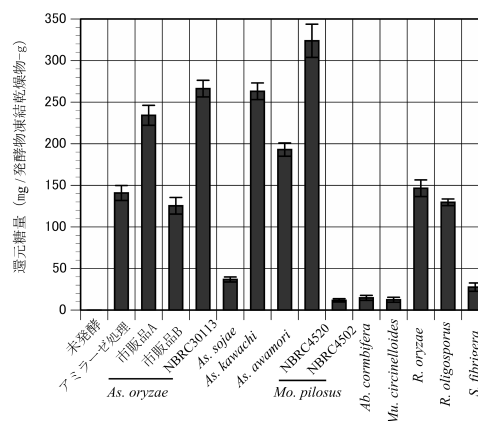


図1 各発酵物の還元糖量の比較

(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* とともに米麹（散麹）製造に適している可能性が示された。

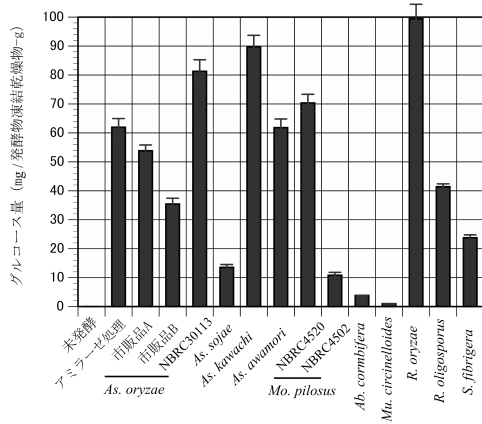


図2 各発酵物のグルコース含量の比較

(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中で大きく異なり、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。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。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、

(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、その活性は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。また、ライチ果皮抽出物の *As.*

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

表2 各発酵物中の還元糖量に含まれるグルコースの割合

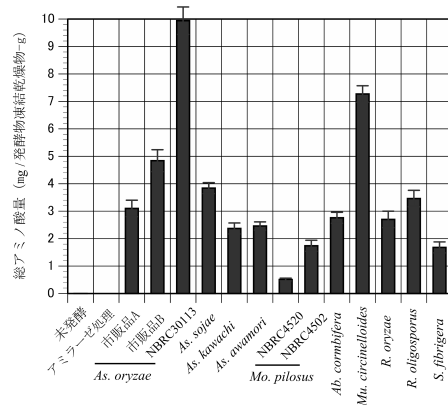


図3 各発酵物の総アミノ酸含量の比較

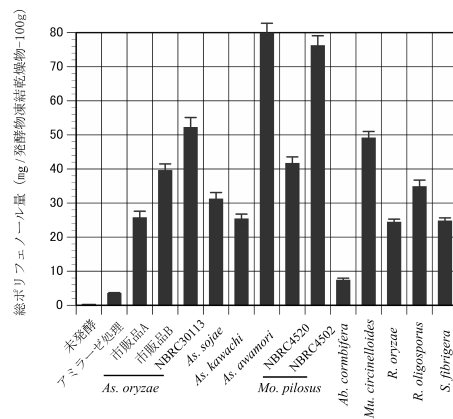


図4 各発酵物の総ポリフェノール量の比較

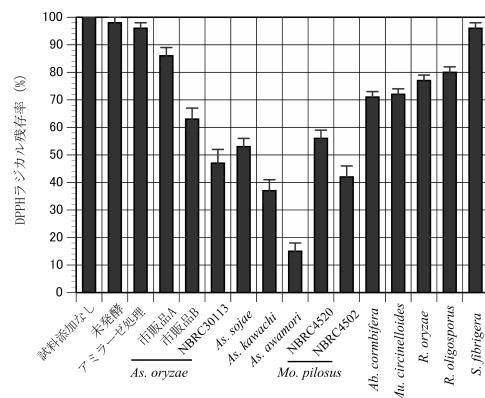


図5 各発酵物のDPPHラジカル消去活性の比較

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。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。このような過去の報告および本実験による結果から、近縁種であっても、微生物による代謝物の生産性の相違は顕著であると推察された。よって、発酵物の機能性に関する特性についても、発酵に用いられた微生物種における代謝産物の生産性に依存するものと考えられた。

< 引用文献 >

- 1) 江崎秀男, 川岸舜朗, 井上昂, 大澤俊彦, 味噌中のオルトジヒドロキシソフラボンとその抗酸化性, 日本食品科学工学会誌, 48, 51-57 (2001).
- 2) Nohynek G J, Kirkland D, Marzin D, Toutain H, Leclerc-Ribaud C, Jinnai H
An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid[5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. *Food Chem. Toxicol.* 42, 93-105 (2004).
- 3) 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).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

稲垣 秀一郎, *Mucor circinellodes* を用いた米発酵物に含まれる抗酸化活性成分, 大阪樟蔭女子大学研究紀要第 9 巻, 285-290 (2019). 査読なし, <http://id.nii.ac.jp/1072/00004343/>

稲垣 秀一郎, 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, 大阪樟蔭女子大学研究紀要第 9 巻, 291-297 (2019). 査読なし, <http://id.nii.ac.jp/1072/00004344/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし