

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 1 日現在

機関番号：34436

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750038

研究課題名(和文)アミン化合物に着目した、発酵による機能性向上機構の解明と新規米発酵食材の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism by which fermented food represent the health-promoting effect, focusing on biological amine, and development of new fermented rice products.

研究代表者

稲垣 秀一郎 (Inagaki, Shuuichiro)

羽衣国際大学・人間生活学部・講師

研究者番号：20575774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アジアの発酵食品から分離されているさまざまな微生物を用いて米発酵物を製造し、その成分分析および生理活性を評価した。いずれの発酵物においても未発酵物と比較してポリフェノール、アミノ酸含量、還元糖量などの含有量が増加しており、微生物による活発な代謝活性が生じていることが示された。特に2種のRhizopusを用いた発酵物では高値を示した。生理活性評価では、抗酸化活性および脂肪分解活性が発酵によって有意に上昇することを明らかにし、特にMucor cillcinelloidesを用いた発酵物において顕著であり、これらの生理活性を有する新規米発酵食材を開発するためのスターターとして有望であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We prepared fermented rice products using various microorganisms found in Asian countries, and evaluated composition such as total polyphenol, amino acid, reducing sugar and their biological activity including anti-oxidant and lipolytic activity. A high extent of saccharification and increased levels of total amino acids and total polyphenols were found in Rhizopus-fermented rice samples. Ethyl acetate extracts of rice fermented with A. corymbifera and M. circinelloides had enhanced antioxidant activity compared to unfermented rice. Also in evaluation on lipolytic effect, M. circinelloides exerted significant effect. From these results, M. circinelloides is candidates for starter organisms in pure or blended cultures for the development of fermented rice products with antioxidant and lipolytic activity.

研究分野：食品化学

キーワード：発酵食品 機能性 アミン化合物

1. 研究開始当初の背景

(1) 長い歴史の中で発酵食品の保健機能は人々に認知されているが、その科学的な根拠について核心に迫る説明はまだない。われわれはこれまでの研究において、発酵食品に含まれるアミン化合物(タンパク質の代謝物)の機能性について報告してきたが、その例として、大豆煮汁を用いて製造した醸造酢に含まれるアミン化合物であるトリプトファンは U937 細胞に対してアポトーシス誘導効果をもつことを報告している。

(2) 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. 研究の目的

(1) アミン化合物は、腐敗物では有害成分として取り扱われるものであるが、発酵食品では健康機能に関与しているのではないかという仮説のもと、発酵食品中のアミン化合物を検出・測定し、機能性を評価することで、本物質が発酵食品に備わる機能性にいかに寄与しているかを検証することを目的とした。

(2) アジアの糖化微生物で純粋発酵させた米麹を製造し、それらに保健機能を見出すことができれば新規米発酵食材の開発を飛躍的に進展させることができると考え、さまざまな米麹を製造し、それらの保健機能を前記したアミン化合物に着目して調査することを目指した。

3. 研究の方法

(1) アジアの糖化微生物を用いた米発酵物の製造

玄米 20 g をミルサーで粉碎し、500 ml 三角フラスコに入れ、蒸留水 100 ml を加えた後にオートクレーブ処理(121℃, 40 min)したものを米培地とした。米培地に糖化微生物(*Aspergillus oryzae*, *Monascus pilosus* NBRC 4520, *Absidia corymbifera* NBRC 32279, *Mucor circinelloides* NBRC 4554, *Mucor racemosus* NBRC 4581, *Rhizopus oligosporus* NBRC 8631, *Rhizopus oryzae* NBRC 4706, *Saccharomycopsis fibuligera* NBRC 1665)を植菌し、恒温機内で 37℃, 1 週間静置培養した。発酵物を 50 ml 遠沈管に移し、凍結乾燥を行った後、粉碎したものを発酵物試料とした。また、米培地を 50 ml 遠沈管に移し、凍結乾燥を行った後、粉碎したものを未発酵物試料とした。

(2) 製造した米発酵物の成分分析

1) 還元糖量の測定

試験管に R.O 水 245 μ l と試料を 5 μ l 添加し、ソモギー試薬 250 μ l を添加した。試験管を沸騰水に入れ 20 分間煮沸した。煮沸終了後、直ちに氷冷水中で冷却し、ネルソン試薬を 250 μ l 添加し、15 分間放置した。混合後、96 穴マイクロプレートに 100 μ l を移し、マイクロプレートリーダーで 540 nm の吸光度を測定した。各試料の測定値は各試料 1 g

当たりの還元糖含量 (mg/ml) をグルコース当量として算出した。

2) アミノ酸含量の測定

試験管に 10 mg/ml の測定試料 50 μ l と R.O 水 450 μ l を入れ、ニンヒドリン溶液を 500 μ l 添加した。試験管は 15 分間煮沸後、氷冷水中で冷却した。試験管に 50%エタノール 750 μ l 添加後 10 分間放置した。そのうちの 100 μ 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で 540 nm の吸光度を測定した。各試料の測定は各試料 1 g 当たりの総アミノ酸含量をアラニン当量で算出した。

3) ポリフェノール含量の測定

96 穴マイクロプレートに蒸留水 57.5 μ l と 100 mg/ml の試料を各ウェルへ 5 μ l 添加した。Folin-Ciocalteu 用フェノール試薬を 12.5 μ l 添加し、3 分間室温に放置後、10% NaCO₃ 25 μ l を添加した。さらに 30 分間放置した後、マイクロプレートリーダーを用いて 690 nm の吸光度を測定した。各サンプルの測定値各試料 1 g 当たりの総ポリフェノール含量 (mg/g) をコーヒー酸当量として算出した。

(3) アミン化合物の分析方法

1) アミン化合物のダンシルクロリドによる誘導体化

各アミン化合物溶液に 2M NaOH 50 μ l、飽和 NaHCO₃ 75 μ l、1%ダンシルクロリド溶液 (ダンシルクロリド 0.1 g/アセトン 10 ml) を加え攪拌後、恒温機 40 で 2 時間放置した。その後、水酸化アンモニウム 25 μ l を加え 30 分室温で放置後、分析まで -20 で保存した。

2) HPLC 条件とサンプルの前処理

全サンプルはそれぞれ遠心分離 (10,000

rpm, 5 分) し、上清のみをフィルターろ過した。HPLC 分析は、フォトダイオードアレイ (PDA) 検出器を付属した Waters 社製 ACQUITY UPLC を使用し、カラムはナカライテクス社の HPLC 用カラム COSMOSIL5C₁₈-MS-II (4.6 I.D. \times 250 mm) を用いた。カラム温度は常温、流速 0.6 ml/min、検出波長 254 nm で分析を行い、以下の条件で分析を行った。

(0 分) A:100% (10 分) A: 90% B: 10% (60 分) A: 90% B: 10% (110 分) A: 0% B: 100% (115 分) A: 100% B: 0% (120 分) A: 100% B: 0%

(4) 抗酸化活性の測定

DPPH ラジカル消去活性は Shimada らの方法を一部改変し、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。調製した DPPH 溶液は、マイクロプレートリーダーで 595 nm の吸光度が 0.9~1.0 の範囲であることを確認し、実験まで室温で遮光保存した。調製した試料を 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 mg/ml になるように希釈して 96 穴マイクロプレートに添加後、MES バッファー 10 μ l、0.5 mg/ml DPPH 溶液 50 μ l を添加した。暗所に 30 分間放置後、マイクロプレートリーダーを用いて 595 nm の吸光度を測定した。なお、サンプルの着色を考慮し、サンプル、蒸留水および MES バッファーを入れた状態の吸光度をブランクとして測定した。サンプル濃度 0 mg/ml の際の吸光度を 100%とし、サンプル濃度の上昇による吸光度の減少を記録し、その近似線から 50%阻害濃度 (IC₅₀) を求めた。

(5) 3T3-L1 細胞を用いた脂肪分解試験

1) 脂肪細胞への分化

24 穴ウェルプレートに 3T3-L1 細胞 (1 \times 10⁵ cells/ml) 500 μ l 添加し、37 , 5%CO₂

条件下で2日間培養した後、培地を交換し、Adipolysis Assay Kitに付属の分化誘導剤(デキサメタゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチンおよびインスリン; ×1000濃度)を各0.5 μl/well添加し、分化を誘導した。その後、37℃, 5%CO₂条件下で2日間培養し、培地を交換した後、37℃, 5%CO₂条件下で培養を6日間続けた細胞を脂肪分解活性試験に用いた。

2) 脂肪分解活性測定

脂肪細胞に分化させた細胞に発酵物および未発酵物試料を終濃度1 mg/mlになるようにウェルに添加し、37℃, 5%CO₂条件下で3日間培養した。なお、ポジティブコントロールとして、アドレナリンレセプターのアゴニストである10 mM イソプロテレノール(IPR)を終濃度10 μMで用いた。各ウェルから培養液12 μlを採取し96穴マイクロプレートへ入れ、そこにグリセロールアッセイ試薬50 μlを添加し、よく混合後、暗所で1時間反応させた。反応後、マイクロプレートリーダーを用いて540 nmの吸光度を測定した。

4. 研究成果

(1) 成分分析

製造した発酵物および未発酵物中の成分分析結果(還元糖量, アミノ酸量, およびポリフェノール含量)を図1に示す。各微生物を用いた発酵物全ての還元糖含量において未発酵物と比較して増加しており、その中でも、*R. oryzae*と*R. oligosporus*で著しい増加が見られ、*As. oryzae*発酵物中の還元糖量と比較して約2倍の還元糖量であった。全ての発酵物の還元糖含量が増加した要因として、微生物が分泌するアミラーゼによって米のデンプンが分解され、単糖やオリゴ糖となり還元末端が増加したためと考えられた。総ポリフェ

ノール含量は、用いた微生物による全ての発酵物において未発酵物と比較して増加しており、その中でも、*R. oryzae*と*R. oligosporus*で著しく高い値を示した。発酵によるポリフェノール成分含量の増加は先行研究において、微生物が発酵過程に分泌する酵素(β-グルコシダーゼ, セルラーゼ, キシラナーゼ)が細胞組織を分解し、組織内のポリフェノール成分やアミノ酸成分を細胞外に漏出させることや、物質変換酵素によって機能が付与されたことに起因するものと推察されており¹⁾、本研究における機能性成分の増加も同様の要因によるものと推察された。総アミノ酸含量は、各微生物の発酵物でいずれも未発酵物と比較して高く、その中でも、*R. oligosporus*と*R. oryzae*で著しく高い値が示された。総アミノ酸含量が増加した要因として、微生物発酵により産生されたプロテアーゼ等の酵素により、玄米中のタンパク質が分解されペプチドおよびアミノ酸がメタノール抽出物として検出されたこと、また、玄米細胞組織の分解により、各種タンパク質やその分解物であるアミノ酸が細胞外へ漏出した可能性が考えられた。

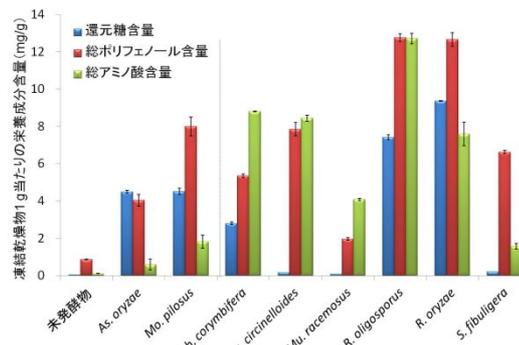


図1 成分分析

(2) 抗酸化活性

発酵処理によるポリフェノール含量の増加に伴う機能性向上の1つとして抗酸化活性の

上昇が期待された。よって発酵物および未発酵物のDPPHラジカル消去活性を測定し、発酵物および未発酵物を比較した。本試験では各試料の酢酸エチル抽出物のDPPHラジカル消去活性を求めた。その結果、全ての発酵物の酢酸エチル抽出物において未発酵物と比較し、DPPHラジカル消去活性は上昇しており、中でも *Mo. pilosus* , *Ab. corymbifera* および *Mu. circinelloides* を用いた発酵物で活性の上昇が顕著であった(表1)。

表1 抗酸化活性

Organism	EC ₅₀ of ethyl acetate extract (mg/ml)	Inhibition ratio (%)
Unfermented	17.4 ± 1.1	27.1 ± 1.7
<i>A. oryzae</i>	17.8 ± 0.92	16.3 ± 1.4
<i>M. pilosus</i>	7.0 ± 0.55**	47.8 ± 1.1**
<i>A. corymbifera</i>	9.7 ± 0.69**	52.0 ± 2.9**
<i>M. circinelloides</i>	9.2 ± 0.71**	59.4 ± 2.2**
<i>M. racemosus</i>	18.8 ± 1.1	27.1 ± 1.0
<i>R. oligosporus</i>	13.3 ± 0.58*	21.7 ± 1.9
<i>R. oryzae</i>	15.5 ± 0.38*	30.9 ± 2.0
<i>S. fibuligera</i>	20.5 ± 1.3	18.5 ± 1.4

(3) 脂肪分解活性

製造した発酵物および未発酵物の酢酸エチル抽出物の脂質分解活性の結果を図2に示す。本活性試験は、培地中への試料添加により脂肪細胞に蓄えられたトリグリセロールが分解され、その分解物であるグリセロールの培地中への放出度をポジティブコントロール(IPR)に対する相対値で表すものである。各酢酸エチル抽出物試料を終濃度が1 mg/mlになるように培地中に添加した際の結果を示した。その結果、未発酵物と比較して *Ab. corymbifera* , *Mu. circinelloides* , および *Mu. racemosus* を用いた発酵物の酢酸エチル抽出物において顕著な活性の上昇が見られた。脂肪分解のメカニズムとして、アドレナリンやIPRなどのカテコールアミン類がβ3-アドレナリンレセプターに作用し、脂肪分解を促進することが知られている。よって、顕著な脂

肪分解活性を示した *Ab. corymbifera* , *Mu. circinelloides* , および *Mu. racemosus* を用いた発酵物中にはβ3-アドレナリンレセプターに作用するカテコールアミン様の化合物が存在している可能性が示唆された。

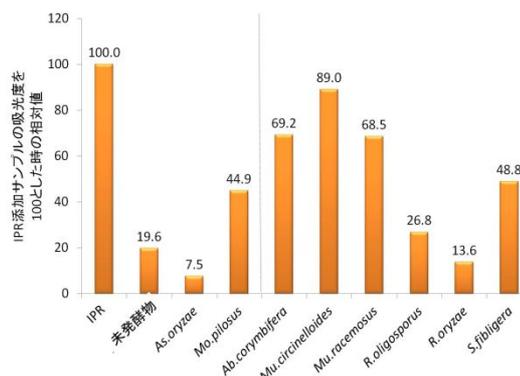


図2 脂肪分解活性

<引用文献>

1) Tapati et al., Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. *Bioresource Technology*, 100, 2861-2866, 2009

5. 主な発表論文

Shyuichiro Inagaki, Takahiro Kato, Kuniyoshi Ichige, Cytotoxicity and apoptosis-inducing effect of soybean broth cultured with microorganisms used in the production of fermented soybean foods on U937 cells., *Food Sci. Technol. Res.*, 20, 499-504.

Takeshi Kawahara, Daichi Nakayama, Shyuichiro Inagaki, Kathumi Tanaka, Hisako Yasui, Suppressive effect of wild *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains on IgE production of mouse spleen cells., *Food*

Sci. Technol. Res., 19, 1019-1027.

Shyuichiro Inagaki, Takahiro Kato,
Shizuka Mori, Composition and
antioxidant activity of rice fermented
with saccharifying organisms from Asian
countries., *Food Sci. Technol. Res.*, 19,
893-899.

6 . 研究組織

研究代表者

稲垣 秀一郎 (INAGAKI, Shuuichiro)

羽衣国際大学・人間生活学部・専任講師

研究者番号：20575774