

博士学位論文

麹菌を利用した
新たな穀類加工食品開発のための
基礎研究

Basic Research of the Development of New Cereal Processed
Foods by Using Koji Mold

2020

韓 宝祥

新潟大学大学院自然科学研究科博士後期課程

生命・食料科学専攻

目次

第1章 緒論	1
第2章 塩麴の特性の解明	8
緒言	
第1節 市販の塩麴の分析	10
1. 実験材料	
2. 方法	
3. 結果および考察	
第2節 自家製麴の微生物の分析	52
1. 実験材料	
2. 方法	
3. 結果および考察	
第3節 自家製塩麴の分析	57
1. 実験材料	
2. 方法	
3. 結果および考察	
要約	69
第3章 3種の麴菌を利用して糠層や外皮を含む 穀類で調製した麴と塩麴の抗酸化活性	71

緒言

第1節 3種の麴菌を利用して玄米で調製した麴と塩麴の抗酸化活性	72
1. 実験材料	
2. 実験方法	
3. 結果および考察	

第2節 3種の麹菌を利用して小麦と大麦 で調製した麹と塩麹の抗酸化活性	106
1. 実験材料	
2. 実験方法	
3. 結果および考察	
要約	117
総括	120
参考文献	124
謝辞	127

第1章 緒論

日本は世界でも平均寿命が長い。厚生労働省の最新の統計である「平成 30 年度簡易生命表の概況」によると、日本人の平均寿命は、男性 81.25 歳、女性 87.32 歳で、WHO（世界保健機関）の最新の統計である 2016 年の世界人口の平均寿命である 72.0 歳（Global Health Observatory data, 2016）を遥かに上回っている。また、日本人は平均寿命が長いだけではなく、WHO の 2018 年 4 月に更新した最新の統計のよると、2016 年現在、「健康上の問題で日常生活が制限されることなく生活できる期間」と定められている（厚生労働省「健康日本 21」）「健康寿命」も 74.8 歳で、隣の中国人 68.7 歳と韓国人 73.0 歳に比べると長く、世界平均の 63.3 歳を上回って世界でも 1 位になっている（Healthy life expectancy Data by country, 2018）。そのため長寿の国として多くの研究者から注目を集めている。

一方、私が生まれ育った中国は、1970 年代末から経済の「対内改革・対外開放」といういわゆる世界にも注目された「改革開放」路線に踏み切り、市場経済化や外資の導入スタート、そして 2001 年に WTO（世界貿易機関）に加盟するなどのおかげで、30 年以上にわたって 10%近い GDP（国内総生産）成長を遂げた。経済の急速発展に伴い、人々の生活が豊かになった一方、標準を超えた農薬を使用した農産物や肥育促進剤入の飼料で養った家畜肉など様々な食品が市販されるようになり、問題になっている。これらのことから、人々はお腹いっぱい食べる食生活から健康食品を食べる食生活へ移りつつあり、健康で長く生きることを望むようになった。そこで、近年中国では日本の長寿に関心を持つ研究者が多くなっている。

寿命には心理状態や遺伝子など様々なファクターが影響を与えることが知られている。その中で、環境要因として重要な 3 つの柱は、食事、運動、生きがいであることが、長寿者の調査研究から明らかになっている（白澤ら、2011）。この中でも特に海外の研究者が注目しているのが、日本特有の食材と食文化である。農林水産省のホームページによると「和食；日本人の伝統的な食文化」は日本人の大自然を尊重する気質に基づいた「食」に関する「習わし」であるとして 2013 年 12 月にユネスコ無形文化遺産に登録された。和食には以下の 4 つの特徴がある。一、和食は多様で新鮮な食材を持ち、その持ち味を尊重する。太平洋西岸に日本海を隔てて大陸を望む場所に位置する日本の国土は、南の台湾から北のロシアまで南北に長く、湖や川、山や森林、そして農地や里など豊かな自然が広がっているため、多種多様な食材を用いることができる。また、各々の地域の生産物や習慣によって、食材そのものの味わいを活かした調理技術や調理道具も発達している。二、和食は健康的な食生活を支える栄養バラン

スを保っている。和食の基本構造は主食と副食であり、主食はご飯、副食は一汁三菜である。一汁は味噌汁で、三菜に主菜一品と副菜二品を含む。主食のご飯は炭水化合物でエネルギーを補う。一汁の味噌汁は主に水分を補う。主菜は魚や卵、大豆製品で、主にタンパク質を補う。副菜は漬物やサラダなどの純野菜で、主にビタミン、ミネラル、食物繊維を補う。このように和食は栄養のバランスを保っている上で、昆布などを使って旨味を上手に使うため動物由来の飽和性油脂の少ない食生活を実現しており、昔から日本人の長寿や肥満防止に役立っている。三、和食は自然の美しさや季節の移ろいを表現できる。日本独特の文学文化にある世界一短い詩とも言われる俳句にだけ季節が見られるのではなく、日本独特の食文化にも季節が見られる。日本人の食卓には季節の花や葉などで飾り付けた料理や季節に合った容器などがよく現れる。そこで食事している人々は季節感を楽しめる。四、和食は日本のお正月などの年中行事と密接に関わっている。大自然の恵みである「食べ物」を親族や友人などと分け合い、食事の時間を共に過ごすことで家族や地域の絆を深めている。和食にはこれらの特徴があるので、栄養学的な観点から、食に肉や乳製品の割合が多い欧米では日本食はヘルシー食と考えられている。和食の中でも、味噌、日本酒、泡盛、みりん、食酢などは日本特有の発酵食品であり、欧米人が好んで食べているチーズやヨーグルトなどの発酵食品と栄養性・機能性成分が異なっている。特に、これらの和食の大きな共通的な特徴は全て「麹菌」を用いて調製した「麹」を使用している。

麹菌とは、日本では、日本醸造学会により (1) 和名を黄麹菌と称する *Aspergillus oryzae* (オリゼ)、(2) 黄麹菌 (オリゼ一群) に分類される *Aspergillus sojae* (ソーヤ) と黄麹菌の白色変異株、(3) 黒麹菌に分類される *Aspergillus luchuensis* (*Aspergillus luchuensis* var. *awamori*) (リュチュエンシス) 及び黒麹菌の白色変異株である白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* (*Aspergillus kawachii*) を指すと定義されている。野生から家畜化された麹菌は昔から今日に至るまで日本の醸造をはじめ、様々な伝統食品の製造に欠かせることが出来ない存在であり、日本独自の豊かな食文化の形成および発展を通して日本人の考え方や日本社会に大きな貢献してきた。例えば、オリゼは醤油・味噌・日本酒、ソーヤは醤油・味噌、リュチュエンシスは泡盛に使用されている。そのため、東北大学名誉教授の一島英治博士の「麹菌はわが国を代表する微生物であり国菌と呼ぶに相応しい」とした提唱をきっかけに、2006年に日本醸造学会は「われわれの先達が長い間大切に育み、使ってきた貴重な財産」であるとして麹菌を国菌と認定した(北本勝ひこ、『和食とうま味のミステリー』、河出書房新社、2016)。

麹は、日本では蒸して殺菌した米・麦・大豆などの穀類に「コウジカビ」で

ある麹菌を繁殖させて発酵・熟成させたものである。日本で麹を利用した醸造食品に関する最古の記録である奈良時代初期の西暦 713 年に編集された『播磨国風土記』に「カビが生えた米飯でお酒を作り神様に捧げた」という内容の文章が残っている。一方、中国でも麹が使用されているが、日本と中国の麹では違いがある。中国で麹を利用した醸造食品に関する最古の記録は遊牧騎馬民族である鮮卑族によって建設された北魏時代（西暦 386-534）に書かれた『斉民要術』に残っている。また、中国では「根霉（ゲンメイ）」と呼ばれるクモノスカビ (*Rhizopus*) が主体で、原料は伝統的にソラマメを使うのが一般的である。また、作り方および発酵時間も違う。中国では原料を蒸さずに使う。穀類を粉末にして練って固めて置いておくと、収穫の際に付着していたクモノスカビが繁殖する。伝統的なソラマメの場合、発酵時間が半年から一年かかるのが一般的で、時間が長ければ長いほど高級品になると言われている。この麹を使った中国の代表的調味料として豆板醤が挙げられる。このように、両国では同じ麹を使う文化でありながら、異なる原料を異なる菌を用いて、異なる方法で発酵・熟成させるため、麹を用いて調製した食品の色と味も異なっている。

塩麹（しおこうじ）は、麹と塩、水を混ぜて発酵・熟成させた日本の伝統的な調味料であり、麹の原料である米由来の栄養素を持つ食品の一つである。また、塩麹は江戸時代に書かれた料理百科事典である『本朝食鑑』にも記述がある伝統食品の一つである。古くから野菜や魚の漬物床として利用されてきたが、近年様々な料理への利用法や健康効果がマスコミなどで取り上げられ、2012 年をピークに人気を博すようになった。料理の効果としては、食材に含まれるデンプンやタンパク質を分解し、甘味や旨味を引き出して美味しくする。また、肉を漬けると柔らかくなり、焼いたり炒めたりするとききれいな焼き色を付けることができ、照りや艶も加わって食欲をそそる料理に仕上げるのに非常に優れた効果的な調味料であるとして「万能調味料」とも言われている。

近年人気を集めている塩麹の健康効果については、アトピーの改善、花粉症の軽減、便秘の解消などが一般書籍などに書かれているが、あくまでも利用者の感想がほとんどであり、根拠となる論文に乏しい。塩麹の効果の一因として乳酸菌の存在が挙げられているが、麹に蔵付きの乳酸菌が存在することは知られているが、それを用いて製造した塩麹中の乳酸菌の分析例は見当たらない。前述の通り、日本の伝統発酵調味料である塩麹と塩麹関連商品が近年、スーパーなどの小売店やインターネットなどで様々なメーカーから販売されている。しかし、市販の塩麹でも粥状やペースト状のものから液状あるいは粉末状のものまで様々であり、原料に麹と塩以外を使用したものなど多様化している。また、少なくとも私の住んでいる中国の東北地域には米の粒が残っている調味料がないため、日本の塩麹に強い好奇心があった。そこで本研究の第 2 章では塩

麴を科学的に正しく理解し、商品の現状を把握することを目的に研究を行った。最初に、異なる 9 種類の市販の塩麴を分析し、特性の違いの解明を試みた。次に、塩麴の微生物学的分析がほとんどなされていないことから、塩麴の微生物源となる麴の一般細菌および乳酸菌を分析した。最後に、味噌・醤油用の米麴と麦麴および清酒用の米麴を原料として塩麴を調製し、発酵過程における成分変化を調べた。

UN (国際連合) の経済社会局 (Department of Economic and Social Affairs) の報道によると、世界人口は 2050 年に 98 億人、2100 年に 112 億人に達すると予測されている。人口の増加に伴い、世界的穀物の年間需要量は 2010 年の 20 億トンから 2050 年の 30 億トン超えに達すると予測されている (Food Agriculture Organization of the United Nations (FAO), “World Agriculture towards 2030/2050”)。そのため農地の改良や袁隆平農学者によるハイブリッド稲の研究開発のように農地面積当たりの生産量を増やす必要があるが、地震や台風そして近年の地球温暖化によって多発している気候の変動などの自然災害により面積当たりの生産量を増やすことに制限があることが知られている。一方、食品ロス防止や自然の恵みである穀物を効率よく食品にするのも一つの有効な方法である。そこで私は、第 2 章の研究を通じて得た塩麴の特性に関する知識及び麴菌のパワーを活かし、自分でも麴菌と穀類を用いた新たな穀類加工食品の開発を試みて、自然の恵みである穀物を効率よく食品にすることに自分なりの小さな貢献をしたいと考えた。そこで世界三大穀物と呼ばれている米、小麦、トウモロコシの中で、その大半が家畜飼料に使用されているトウモロコシを除いた米、小麦に加え低温や乾燥した地方でも良く栽培される大麦の 3 種類の穀物を、麴菌を用いて発酵させた麴の研究を行った。その研究内容を第 3 章にまとめた。

まずは、糠層を含む玄米と 3 種の麴菌を用いて研究を行った。世界人口の約半分がエネルギー源として主食で摂取している米を、加工利用する際には製造副産物として大量の米糠が排出される。米糠は食物繊維、ビタミン、ミネラル等の栄養成分や γ -オリザノール、フェルラ酸、植物ステロール、ワックス、グルコシルセラミド、フィチン、イノシトール等の機能性成分を豊富に含む有用資源であり、米油の抽出原料や家畜の配合飼料、きのこ栽培の培地、漬物の糠床等として利用されているが、産業用の利用は約半分に留まる (谷口ら、2012)。資源の有効利用の観点からその利用率の向上が求められる一方、有用成分を豊富に含む米糠を排出せず米玄米のまま利用することも米糠の有効利用の一つである。

玄米に含まれる代表的なポリフェノールとしてフェルラ酸、 γ -オリザノールなどが挙げられる。また、黒米にはアントシアニン、赤米にはプロアントシア

ニンが含まれている。その中でフェルラ酸は、活性酸素消去活性やラジカル消去活性を持ち、その優れた抗酸化活性から酸化防止剤として食品に利用されている (Marinova ら、1992)、(Terao ら、1993)。また、フェルラ酸やその誘導体は、抗酸化活性以外に抗ガン作用、心血管疾患や糖尿病の予防作用、皮膚の紫外線防御作用など様々な生理機能を持つことが報告されている (Mancuso ら、2014)。さらに、超高齢社会を迎える日本でも近年患者数が大きく増加しているアルツハイマー型認知症の予防・改善効果があることも報告されている (Yan ら、2001)、(Cho ら、2005)、(Jung ら、2016)。

フェルラ酸は植物の細胞壁を構成するフェノール酸のひとつであり、代表的な穀類である米・小麦・トウモロコシなどのイネ科植物の細胞壁に含まれる主要なフェノール酸である (西澤ら、1998)、(Shibuya ら、1984)。リグニン合成の中間体としての役割の他、ヘミセルロースを構成するアラビノキシランにエステル結合した結合型として存在し、フェルラ酸同士が結合してジフェルラ酸を形成することで細胞骨格をより強固なものにしている。樋口らは小麦ふすまに含まれるフェルラ酸の 96.4%が結合型であると報告しており、植物に存在するフェルラ酸の大部分は細胞壁成分に結合して存在する (樋口ら、2008)。ヒトは細胞壁に結合したフェルラ酸を遊離する消化酵素を持っていないことから、結合型フェルラ酸を含む食材を摂取してもフェルラ酸は体内に吸収されず、その生理機能を享受することができない。したがって、フェルラ酸の生理機能を十分に活用するには、結合型フェルラ酸を遊離型に変えなければならない。

これまでに植物バイオマスの有効利用を目的に、細胞壁を分解する各種酵素に関する研究が行われ、その中で細胞壁にエステル結合したフェルラ酸を加水分解により遊離するフェルロイルエステラーゼ (FAE) を産生する様々な微生物が見いだされている。前述のように、オリゼ、ソーマ、リュチエンシスなどの麹菌は、デンプンやタンパク質などを分解する様々な酵素を産生する能力が高く、古くから清酒・味噌・醤油・焼酎などの製造に利用されてきた。その高い酵素産生能からそれらの FAE 活性が調べられ、小麦ふすまを炭素源とした *A. oryzae* VTT-D-85248 と *A. awamori* IFO4033 の培養物では活性があることが示されている (Topakas ら、2007)。また、これら 2 つの種の麹菌を使用した清酒、麦味噌および麦麹、黒米糠麹では実際に遊離型フェルラ酸が原料に比べて多く含まれることが報告されている (Ohta ら、1992)、(松田ら、2000)、(Shin ら、2019)。

玄米には白米に比べて多くの結合型フェルラ酸が含まれる (西澤ら、1998)。したがって、精米せずに玄米を麹菌で発酵させることにより遊離型フェルラ酸を豊富に含む麹を製造できると考えられる。そこで 3 種の麹菌を用いて玄米麹を調製し、その抗酸化活性とポリフェノール含量およびフェルラ酸含量を調べた。

また、麴に含まれる酵素を利用した発酵調味料として塩麴がある。麴に FAE が含まれる場合、塩麴の製造過程において遊離型フェルラ酸の増加が期待される。そこでこれらの玄米麴を用いて調製した玄米塩麴の抗酸化活性とポリフェノール含量およびフェルラ酸含量も合わせて測定した。

次に、外皮を含む小麦と大麦および 3 種の麴菌を用いて研究を行った。小麦と大麦を日本語や中国語などの漢字文化圏の言語には麦と総称することができるが、英語やモンゴル語などのインド・ヨーロッパ語族やミクロ・アルタイ語族の言語には総称する言葉がない。英語で小麦は **wheat**、大麦は **barley** になっていて、モンゴル語では小麦は **ᠪᠣᠭᠠᠳᠠᠢ bogudai**、大麦は **ᠠᠷᠪᠠᠢ arbai** になっている。遊牧生産方式で生活をするモンゴル人の言語にも農業由来の言葉があるのかと思うヒトがいるかも知れない。実は、モンゴル族とは一昔同じモンゴル高原の異なる地域に生活していた色々な異なる部族からなりたった民族である。その部族の中に契丹という部族があり、彼らは私の出身地域でもある今の中国内モンゴル自治区の東部に農牧両営（「半農半牧」として文献でよく現れるが、不適切として近年そういう表現を回避しつつある。）生産方式で生活をしてきた。彼らの農業や農産物に関する言葉が後にモンゴル族全体に使えるようになったのではないかと思える。私の子供時代は年寄りの祖父の色々な面白い昔話に育てられた。祖父の話によると、昔は種を蒔く時、今のように機械で開拓するのではなく、沼地に種を蒔いて上に牛の群れを通らせる、すると蒔いた種が牛の蹄に押さられて風に飛ばずによく生えるという。牛の群れではなく、馬や羊の群れを通らせては行かないという。その原因は馬の蹄が硬いので蒔いた種が砕かれる。羊の群れだと、身体が牛より小さいので種を押すには体重が足りない、また羊は蹄を引いて歩く動物なので、効果的ではないという。話に戻ると、同じ麦と総称されている小麦と大麦はその構成成分が異なっている。例えば、小麦にはグルテンというタンパク質が多く含まれるため粘りと弾力性を持ち、パンやうどんなどの麺類によく使用される。一方、大麦は味噌やビール、麦茶の原料であり、近年麦ご飯としても使うようになっている。小麦粒は 3 部分から構造されている。それぞれは加工過程を経て小麦粉になる胚乳と生命の源になる胚芽、それにこれらを包む 6 層の外皮である。外皮は小麦粒の 2~3% を占める（長尾精一、「小麦とその加工」、P. 79）。大麦の場合は、粒には「麦のふんどし」と呼ばれる相撲のまわしような構造がある。それにより麦粒は厚い外皮で包まれた構造をしている。これらの小麦や大麦の外皮にはポリフェノール類が植物繊維の構造体としてアラビノキシランとエステル結合して多く存在していることが知られている（松田ら、2000）、（樋口、2009）。麴菌が産生する酵素でこれら小麦や大麦の細胞壁に結合しているポリフェノール類を遊離することが可能と考えられる。そこで、3 種の麴菌を用いて小麦と大麦で調製した麴と塩麴

の抗酸化活性とポリフェノール含量およびフェルラ酸含量を測定した。

第2章 塩麴の特性の解明

緒言

私の出身地である中国の内モンゴル自治区のモンゴル食には米の粒が残った調味料はない。また、内モンゴル自治区の通遼市に近隣している中国の東北地域にも米の粒が残った調味料を見たことがない。そのため日本の塩麴に強い好奇心があった。日本では塩麴と塩麴に関連する様々な調味料が多数の食品メーカーから販売されている。

そこで、本章の第1節では、性状や原料、メーカーなどが異なる9種類の市販塩麴の成分を分析し、その成分にどのような違いがあるのかを調べた。分析項目は、水分含量、塩分濃度、pH値、アルコール濃度、糖分の定量、L-グルタミン酸の定量、酵素活性測定（ α -アミラーゼ活性、糖化力、プロテアーゼ活性）、菌数（一般細菌、乳酸菌）測定の計11項目である。

人は食事をして、消化活動を行うことで栄養を吸収している。しかし、発酵食品は微生物が産生する酵素により人が食べる前に食品成分を分解し、消化、吸収しやすい状態に変化させてくれる。この点から発酵食品は即効性のある栄養補給が可能な優れた食品と言える。また、発酵に使用される微生物が乳酸菌やビフィズス菌といったいわゆる善玉菌であれば、それらの菌が産生する乳酸を始めとする代謝産物による健康効果も期待できる。

塩麴は米麴に食塩と水を加え、開放的な環境で発酵させ製造されるため、麴由来の微生物や環境中の微生物を多数含むと考えられる。また、一般的な原料の配合割合では10数%の濃度になるよう食塩を加えるため耐塩性の高い微生物しか含んでいないとも推測される。しかし、塩麴中の微生物の分析に関する報告は少なく詳細に不明点が多い。

そこで本章の第2節では、実際に塩麴を研究室で調製し、その成分や微生物を分析するのに先立ち、塩麴の原料であるとともに微生物源となる麴の細菌を分析した。分析試料としては塩川酒造株式会社より分与された日本酒用の麴を使用し、その一般細菌数、好気性乳酸菌数、好気性耐塩性乳酸菌数、嫌気性乳酸菌数、嫌気性耐塩性乳酸菌数を測定した。

身近な発酵食品の代表ともいえるべき味噌や醤油、漬物は、数十年前まではごく普通に一般家庭でも手作りされ、生きた麴の力、発酵食の恵みを、特に意識することなく毎日の食事から享受していた。しかし、加工食品の普及に伴い、今やほとんどの家庭では食品メーカーにより製造された既製品を買い求めている。手作りした製品と市販品では場合によっては大きな違いがある。例えば、醤油に関して言えば、手作りの製品が生であるのに対し、市販品では加熱処理

がなされている。つまり、出荷されて店頭に並び、消費者の手に届くまでの間に、発酵が進んで品質が変わらないよう「火入れ」をしている。これにより搾ったままの「生揚げ醤油」に含まれていたせっかくの微生物が殺菌されてしまう。大量に生産した製品を広く安価に流通させるためには仕方ないことだが、善玉菌や栄養成分などの損失を招くことにもなる。

近年、人気を集めている塩麴は、麴に塩と水を加え、夏場は約 1 週間、冬場は 2 週間ほど常温に置き、発酵・熟成させて作る。完成した塩麴は、甘味とうま味が豊富なおかゆのような状態になる。塩に代わる調味料としての利用だけでなく、野菜や肉類などを漬けておくだけで、麴の酵素の働きにより軟らかく、美味しさと深みのある味わいを楽しむことができる。

塩麴の作り方は、麴、塩、水の配合割合、発酵温度、発酵期間、使用する麴の種類などの点で様々異なる。作り方が違えばその成分も違うと考えられる。しかし、塩麴の発酵過程で細菌や乳酸菌、呈味成分やその生成に関与する酵素がどのように変化しているのか、麴に塩と水を加えて発酵させる意義や成分変化の全体像は明らかにされていない。

そこで本章の第 3 節では、味噌・醤油用の米麴と麦麴および日本酒用の米麴の 3 つを原料として塩麴を調製し、発酵過程における pH 値、糖分の定量、L-グルタミン酸の定量、 α -アミラーゼ活性、プロテアーゼ活性の計 5 項目の変化を調べた。

第 1 節 市販の塩麴の分析

1. 実験材料

1-1. 試料：市販塩麴 9 種

2015 年に新潟市のスーパーマーケット（アピタ、イオン、原信、ウオロク、清水フード）で市販されていた塩麴（A、C～I）及び、インターネットで購入した塩麴（B）の計 9 点を測定試料として用いた。塩麴製品は入手した直後 4℃ の冷蔵庫に保管して、11 項目の分析に用いた。

また、商品を購入する時、出来るだけ新しい出荷した商品を店員にお願いして購入した。同じ商品でも含有成分にばらつきがあるのかを確かめるために出荷時期別の各商品を 3 つずつ購入し、それぞれ成分分析及び酵素活性測定を行った。本研究で用いた市販塩麴の詳細を表 2-1 及び図 2-1 に示した。

表 2-1-1. 市販の塩麴の製造会社および本研究での試料番号

市販の塩麴	製造者	試料番号
にいがた塩麴	株式会社 竹林味噌醸造所	A
塩こうじ	麴屋本舗 法野麴店	B
塩麴	マルタ食品 株式会社	C
やさかの有機塩こうじ	有限会社 やさか共同農場	D
液体塩こうじ	ハナマルキ 株式会社	E
塩麴	石山味噌醤油 株式会社	F
塩糀	イチビキ 株式会社	G
米こうじの塩だれ	山崎醸造 株式会社	H
醤油麴	石山味噌醤油 株式会社	I

表 2-1-2. 市販の塩麴の食品表示と形状

試料	商品名	原料	内容量	保存方法	形状
A	塩こうじ	米こうじ(国産)、食塩	300 g	冷暗所に保存 開封後は冷蔵庫	ペースト状
B	塩こうじ	麴(富山県産米)、塩	200 g	要冷蔵	粥状
C	塩こうじ	米、食塩、米こうじ	250 g	直射日光を避け 常温保存	ペースト状
D	有機米こうじ 調味料	有機米(国内産)、食塩、糀菌	200 g	直射日光を避け 冷所で保管	粥状
E	液体塩こうじ	米こうじ、食塩、酒精	500 mL	直射日光・高温 を避け常温保存	液状 (固形分無)
F	米麴調味料	米麴(米(新潟県産))、食塩、酒 精	140 g	直射日光を 避けて保存	ペースト状
G	塩糀	米、米糀、食塩、酒精	300 g	直射日光を避け 常温で保存	ペースト状
H	液状塩麴	米、米こうじ、食塩、昆布エキス、 醸造酢、アルコール、増粘剤(加 エデンプン、キサンタン)、調味料 (アミノ酸等)、(原材料の一部に 大豆を含む)	300 mL	直射日光を避け 常温で保存	粥状
I	米麴調味料	米麴(米(新潟県産))、しょうゆも ろみ、しょうゆ、食塩、酒精、(原 材料の一部に小麦、大豆を含む)	140 g	直射日光を避け て常温で保存	ペースト状



A



B



C



D



E



F



G



H



I

図 2-1. 市販塩麴の外観写真

1-2. 試薬

・アルコール濃度の測定

F-キット エタノール

J. K. International Inc.

・糖の定量

エタノール（糖の抽出用）

和光純薬株式会社

アセトニトリル（HPLC 用）

Merck KGaA Corp.

グルコース（特級）

和光純薬株式会社

マルトース（特級）

和光純薬株式会社

・L-グルタミン酸含量の測定

ヤマサ L-グルタミン酸測定キット II

ヤマサ醤油株式会社

・糖化力測定

塩化ナトリウム

和光純薬株式会社

酢酸ナトリウム（無水）

和光純薬株式会社

酢酸（特級）

ナカライテスク株式会社

糖化力測定キット

Kikkoman Corp.

・ α -アミラーゼ活性の測定

塩化ナトリウム

和光純薬株式会社

酢酸（特級）

ナカライテスク株式会社

α -アミラーゼ活性測定キット

Kikkoman Corp.

・プロテアーゼ活性測定

リン酸二水素カリウム

和光純薬株式会社

リン酸水素二ナトリウム・12 水和物

和光純薬株式会社

水酸化ナトリウム（粒状）

和光純薬株式会社

りん酸

和光純薬株式会社

カゼイン（ハマルステン氏法）

和光純薬株式会社

トリクロロ酢酸

ナカライテスク株式会社

炭酸ナトリウム（無水）

和光純薬株式会社

フェノール試薬

関東化学株式会社

・菌数測定

塩化ナトリウム	和光純薬株式会社
カビサイジン	和光純薬株式会社
エタノール（特級）	和光純薬株式会社
普通ブイヨン	栄研化学株式会社
M.R.S. ブイヨン	関東化学株式会社
寒天	和光純薬株式会社
ブロモクレゾールパープル	ナカライテスク株式会社

2. 実験方法

2-1. 水分測定

塩麴の水分含量は「105℃乾燥法」により測定した。あらかじめ恒量を求めたアルミニウム箔容器（ W_0 ）に試料を秤量（ W_1 ）し、105℃に設定した恒温乾熱器で完全に乾燥させた。乾燥後、正確に 30 分間デシケーター中で放冷し、秤量（ W_2 ）した。恒量となるまで、同様の操作を繰り返した。水分含量は以下の式に従い、計算した。

$$\text{含水率(\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100$$

2-2. 塩分濃度測定

塩麴の塩分濃度は、ポケット塩分計「APAL-ES1」（ATAGO co., ltd.）を用いて測定した。本器は測定範囲が食塩濃度 0.00～3.00% であるため、各試料を水にて重量比で 10 倍に希釈し、その希釈液を測定した。10 倍希釈液の測定値に 10 を乗じた値を試料の食塩濃度%（g/100 g）とした。

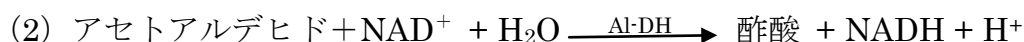
2-3. pH 測定

塩麴の pH は、「twin pH B-212」（HORIBA, Ltd.）を用いて測定した。試料は希釈せずに直接センサーの上に滴下し、測定した。

2-4. アルコール濃度の測定

塩麴のアルコール濃度は、「F-キット エタノール」(J. K. International Inc.)を用いて測定した。

2-4-1. 実験原理



エタノールはアルコール脱水素酵素 (ADH) の存在下で、ニコチンアミドアデニンジヌクレオシド (NAD) によりアセトアルデヒドに酸化される (1)。この平衡反応はエタノールと NAD 側にあるので、アルカリ条件下で生成したアセトアルデヒドをトラップすることで完全に右側に移行させることができる。アセトアルデヒドはアルデヒド脱水素酵素 (Al-DH) の存在下で定量的に酢酸に酸化される (2)。NADH は、334, 340 又は 365 nm の吸収で定量される。

2-4-2. 実験操作

○試薬の調製

NAD 約 4 mg 及びアルデヒド脱水素酵素 (Al-DH) 約 0.8 U を含む錠剤 1 錠当たり、ピロリン酸カリウムバッファー (pH 約 9.0) 3 mL 加え、泡立っていないように穏やかに溶解した (※測定回数分 [ブランク+試料] 調製した)。その後、約 15 分間放置し、試薬を安定させた。これを「溶液 I」とする。

○試料の調製

塩麴 5 g を 50 mL のメスシリンダーにとり、4℃の脱塩水を加え 50 mL に合わせた。パラフィルム (PARAFILM “M”, BEMIS) でメスシリンダーを密封し、2～3 回穏やかに倒置攪拌した。攪拌後、遠心管に移し、遠心機 (マイクロ冷却遠心機 3700、久保田商事株式会社) で 3,000×g、4℃、5 分間遠心して、上清を測定試料として用いた。

○測定方法

以下に示すように、溶液をプラスチック製セルへ分注し、試料の測定を行った。

	ブランク	試料
溶液 I	1.00 mL	1.00 mL
脱塩水	0.050 mL	—
試料	—	0.050 mL

パラフィルムで各セルを密封し、2～3 回穏やかに倒置攪拌した。混和後、3 分間放置し、340 nm における吸光度を分光光度計 (U2000, HITACHI) を用いて測定した (A_1)。

次に、この溶液にアルコール脱水素酵素 約 7000 U を含む懸濁液を 0.017 mL 添加し、攪拌した。混和後、10 分間室温で放置し、再び 340 nm の吸光度を測定した (A_2)。

※ A_1 : 反応前の試料及びブランクの測定

A_2 : 反応後のエタノールから生成した NADH の測定

○濃度算出法

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{\text{試料}} - (A_2 - A_1)_{\text{ブランク}} \quad \dots \textcircled{1}$$

$$c \text{ (濃度 g/L)} = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta A \quad \dots \textcircled{2}$$

V : 反応液量 [mL] v : 試料量 [mL] MW : 測定対象の分子量 [g/mol]

d : 光路長 [cm] ε : NADH の吸光係数 [$\text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

※ 340 nm = 6.3 [$\text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

②式に今回の条件を代入すると、以下の計算式になる。

$$\begin{aligned} c \text{ (エタノール g/L)} &= \frac{1.067 \times 46.07}{6.3 \times 1.00 \times 0.050 \times 2 \times 1000} \times \Delta A \\ &= 0.0780 \times \Delta A \end{aligned}$$

2-5. 糖の定量

塩麴の糖含量は、和田（2004）の方法に準じて定量した。

2-5-1. 実験操作

○試薬の調製

- ・ 80%エタノール

エタノール 80 mL に超純水 20 mL 加えた。

- ・ アセトニトリル/水 75 : 25 （v/v）溶液（展開溶媒）

アセトニトリル 750 mL にと超純水 250 mL 加え、混和した。

- ・ 標準グルコース溶液

グルコース 20 mg を 80%エタノール 10 mL に溶解した。

- ・ 標準マルトース溶液

マルトース 50 mg を 80%エタノール 10 mL に溶解した。

○試料の調製

凍結乾燥した塩麴 2 g を粉砕し、80%エタノール 10 mL で 2 回、5 mL で 1 回抽出した。3 回分の抽出液を集め、25 mL 容メスフラスコで定容した。定容後、遠心管に移し、遠心機（マイクロ冷却遠心機 3700、久保田商事株式会社）で 3,000×g、4℃、5 分間遠心して、上清を測定試料として用いた。

○測定方法

試料を孔径 0.45 μm Cellulose Acetate フィルター (DISMIC®-25cs, ADVANTEC) で濾過し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。

HPLC は DGV-14A PV DEGASSER (島津製作所)、LC-10AT VP LIQUID CHROMATOGRAPH (島津製作所)、CTO-10A VP Column oven (島津製作所)、RID-10A REFRACTIVE INDEX DETECTOR (島津製作所)、D-2500 Chromato-Integrator (日立製作所) を用い、分離カラムは YMC-Pack Polyamine II (4.6 mm i.d. \times 250 mm, YMC 社製) を使用した。カラム温度は 30°C、試料の注入量は 20 μL 、流速は 1.0 mL/分 で分析した。

○糖含量の算出法

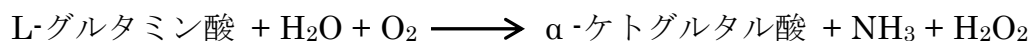
標準液と試料液のピーク面積の比較により、抽出溶液中の各糖の濃度を求めた。

2-6. L-グルタミン酸の定量

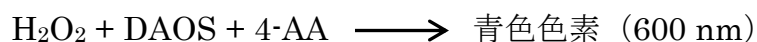
塩麴の L - グルタミン酸含量は、「ヤマサ L - グルタミン酸測定キット II」(ヤマサ醤油株式会社) を用いて定量した。

2-6-1. 実験原理

- (1) L - グルタミン酸オキシダーゼの酸化反応



- (2) パーオキシダーゼによる青色色素形成



※ DAOS : N-エチル-N- (2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル) -3,5-ジメトキシアニリンナトリウム塩

L - グルタミン酸オキシダーゼの酸化反応で L - グルタミン酸より産生された過酸化水素と、4 - アミノアンチピリン (4 - AA) 及び DAOS にパーオキシダーゼを反応させることにより青色色素を生成させる。次いで、この色素量を

比色定量することにより、L - グルタミン酸量を求める。

2-6-2. 実験操作

○発色試薬の調製

酵素試薬（凍結乾燥品）を緩衝液で溶解した。約 1 mL の緩衝液を酵素試薬バイアルに入れて凍結乾燥品をよく溶かし、これを元の緩衝液バイアルに戻して混和した。調製した発色試薬溶液は 2～8℃で遮光して保存した。

○試料の調製

L - グルタミン酸が 100 mg/L 程度の濃度になるように塩麴を脱塩水で希釈した。本実験では、塩麴 2.5 g を 25 mL 容メスフラスコで定容後、定性濾紙（No.2 φ125 , ADVANTEC）を用いて濾過した。この濾液を遠心機(KN-70, KUBOTA) で、2,800 ×g、10 分間遠心を行い、この上清を検体試料とした。

○測定方法

以下に示すように、溶液を各試験管に分注し、よく攪拌して反応を開始させた。混和後、25℃で 20 分間放置後、脱塩水を対照にして 600 nm の吸光度を測定した（n = 3）。

	検体試料	標準液	発色試薬盲検	検体盲検
発色試薬	450 μL	450 μL	450 μL	—
検体試料	30 μL	—	—	30 μL
標準液	—	30 μL	—	—
脱塩水	—	—	30 μL	450 μL
吸光度	A	S	R	B

○濃度算出法

試料中の L - グルタミン酸の濃度は下記の計算式により求めた。

・ **10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0)**

500 mL 容ビーカーに酢酸ナトリウム 0.41 g を秤量し、脱塩水を約 400 mL 加えて溶解した (A)。次いで、200 mL 容ビーカーに酢酸を少量入れ、脱塩水を約 100 mL 加えて希釈した (B)。A 液に B 液を少しずつ加えて混和し、pH 5.0 に調整した。その後、この溶液を 500 mL 容メスフラスコで定容した。

・ **0.5% NaCl を含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0)**

プラスチック容器に塩化ナトリウム 2.5 g を秤量し、10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 500 mL を加え、溶解した。

○ **試料の調製**

塩麴 5 g に 0.5% NaCl を含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を 25 mL 加え、振とう培養機 (BR-43FL・MR, TAITEC) で、135 r/min、18℃、3 時間振とう、抽出した後、濾紙で濾過した (抽出率 5 倍)。この濾液を、0.5% NaCl を含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で 2 倍に希釈したものを測定試料とした。

○ **測定方法**

試験管に基質溶液 0.25 mL と酵素溶液 0.25 mL を分注し、37℃で 5 分間予備加温した。これに測定試料を 0.05 mL 加え、良く混合して反応を開始した。37℃で正確に 10 分反応させた後、反応停止液を 1.0 mL 加え良く混合して、反応を停止させた。反応終了後、これをブラックセルに入れ、400 nm の波長で吸光度を測定した (測定試料の吸光度は計算方法の Es 値)。なお、吸光度測定時の対照には脱塩水を用いた (n = 3)。

ブランクの測定は、上記反応液を 37℃で 15 分間加温後、反応停止液を 1.0 mL 加えて良く混合し、さらに測定試料を 0.1 mL 加えて再び混合した。この液の吸光度を上記と同様にして測定した (ブランクの吸光度は計算方法の Eb 値)。

○ **活性算出法**

糖化力の 1 U は、ここで記した測定条件において、1 分間に 1 μ mol の PNP を遊離する力価と定義する。なお、ここでの糖化力とは、G2- β -PNP 分解活性を

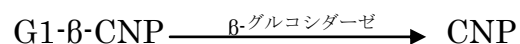
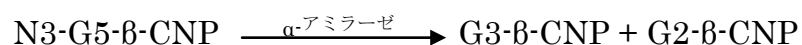
示している。

$$\begin{aligned}\text{糖化力 (U/g)} &= (E_s - E_b) \times 0.171 \times \text{希釈倍率} \times \text{抽出率} \\ &= (E_s - E_b) \times 0.171 \times 2 \times 5 \\ &= (E_s - E_b) \times 1.71\end{aligned}$$

2-8 α -アミラーゼ活性の測定

塩麴の α -アミラーゼ活性の測定は、「 α -アミラーゼ活性の測定キット」(Kikkoman Corp.) を用いて測定した。

2-8-1 実験原理



基質の N3-G5- β -CNP^{*1}は、 α -アミラーゼによって分解され、G3- β -CNP と G2- β -CNP を生じる。これらは共役酵素として添加したグルコアミラーゼと β -グルコシダーゼによってさらに分解され、CNP^{*2} が生じる。反応は、炭酸ナトリウムを加えることにより停止するが、同時に反応液の pH がアルカリ側となり、CNP の発色が最大になる。この CNP を 400 nm で定量することにより α -アミラーゼ活性を測定する。

※1 N3-G5- β -CNP : 2-クロロ-4-ニトロフェニル 6⁵-アジド-6⁵-デオキシ- β -マルトペンタオシド

※2 CNP: 2-クロロ-4-ニトロフェノール

2-8-2 実験操作

○試薬の調製

・ 0.5% NaCl を含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0)

プラスチック容器に塩化ナトリウム 2.5 g を秤量し、10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 500 mL を加え、溶解した。

○試料の調製

塩麴 5 g に 0.5% NaCl を含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を 25 mL 加え、振とう培養機 (BR-43FL・MR, TAITEC) で、135 r/min、18℃、3 時間振とう、抽出した後、濾紙で濾過した (抽出率 5 倍)。この濾液を、0.5% NaCl を含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で 2 倍に希釈したものを測定試料とした。

○測定方法

試験管に基質溶液 0.25 mL と酵素溶液 0.25 mL を分注し、37℃で 5 分間予備加温した。これに測定試料を 0.05 mL 加え、良く混合して反応を開始した。37℃で正確に 10 分反応させた後、反応停止液を 1.0 mL 加え良く混合して、反応を停止させた。反応終了後、これを吸光度測定用ブラックセルに入れ、400 nm の波長で吸光度を測定した (測定試料の吸光度は計算方法の Es 値)。なお、吸光度測定時の対照には脱塩水を用いた (n = 3)。

ブランクの測定は、上記反応液を 37℃で 15 分間加温後、反応停止液を 1.0 mL 加えて良く混合し、さらに測定試料を 0.1 mL 加えて再び混合した。この液の吸光度を上記と同様にして測定した (ブランクの吸光度は計算方法の Eb 値)。

○活性算出法

α-アミラーゼの 1 U は、ここで記した測定条件において、1 分間に N3-G5-β-CNP から 1 μmol の CNP を遊離する力価と定義している。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-アミラーゼ活性 (U/g 麴)} &= (E_s - E_b) \times 0.179 \times \text{希釈倍率} \times \text{抽出率} \\ &= (E_s - E_b) \times 0.179 \times 2 \times 5 \\ &= (E_s - E_b) \times 1.790\end{aligned}$$

2-9. プロテアーゼ活性の測定

塩麴のプロテアーゼ活性は、全国味噌技術会の「基準みそ分析法」（1995）に準じ、以下のように測定した。

2-9-1. 実験原理

麹菌が生産するプロテアーゼは、タンパク質のペプチド結合を比較的ランダムに分解して種々のペプチドを生成するプロテイナーゼと、タンパク質およびペプチドの末端からアミノ酸単位で分解するペプチダーゼに代別される。

麹菌の生産するプロテアーゼは、作用の最適 pH によって酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ、アルカリ性プロテアーゼの 3 種が知られている。味噌用の米麴においては pH 6.0 付近で測定するプロテアーゼの活性が味噌の色調、タンパク質溶解率、同分解率および官能評価と高い相関を有する。また、塩麴の pH が中性付近であることから、ここでは pH 6.0 における中性プロテアーゼ活性を測定した。

2-9-2. 実験操作

○試薬の調製

・ pH 6.0 リン酸緩衝液

0.2 M リン酸水素二ナトリウム（リン酸水素二ナトリウム 14.32 g を水に溶解し 200 mL に定容）を、0.2 M リン酸二水素カリウム（リン酸二水素カリウム 27.22 g を水に溶解し 1 L に定容）に少しずつ加え、正確に pH 6.0 になるように調整した。

・ 0.2 M 水酸化ナトリウム溶液

水酸化ナトリウム 0.24 g を水 30 mL に溶解した。

・ 0.2 M リン酸溶液

リン酸 2.36 mL を水に加え、100 mL に定容した。

・ 1.5% ミルクカゼイン溶液

カゼイン 1.5 g に 0.2 M 水酸化ナトリウム溶液 30 mL を加えて溶解した。

溶解後、攪拌しながら 0.2 M リン酸溶液を徐々に加え pH 6.0 に調整した。
pH 調整後、リン酸緩衝液 (pH 6.0) を加えて 100 mL に定容した。

・ 0.4 M トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液

トリクロロ酢酸 13.08 g を水に溶解し、200 mL に定容した。

・ 0.4 M 炭酸ナトリウム溶液

無水炭酸ナトリウム 21.2 g を水に溶解し、500 mL に定容した。

・ 1 N フェノール試薬

フェノール試薬 (2 N) を 2 倍希釈して使用した。

○酵素液の調製

塩麹 5 g とリン酸緩衝液 (pH 6.0) 50 mL を 200 mL の三角フラスコに入れ、振とう培養機で 135 r/min、25°C、1 時間振とうして抽出した。抽出後、濾紙で濾過し、これを酵素液とした。

○測定方法

1.5% ミルクカゼイン溶液 1 mL を試験管に採り、30°C で 5 分間予備加温後、酵素液 0.5 mL を加えて攪拌し、正確に 30°C で 10 分間反応させた。反応後、0.4 M TCA 溶液 1.5 mL を加えて反応を停止し、30°C で 30 分間放置した。遠心機 (マイクロ冷却遠心機 3700、(久保田商事株式会社)) で 2800×g、10 分間遠心を行い、この上清を反応液とした。試験管に反応液 1 mL を採り、0.4 M 炭酸ナトリウム溶液 2.5 mL 及び 1 N フェノール試薬 0.5 mL を加え、30°C で 30 分間インキュベートした後、660 nm の吸光度を測定した (対照セルには脱塩水を用いた)。

ブランクとして、1.5% ミルクカゼイン溶液 1 mL に 0.4 M TCA 溶液 3 mL 加え、攪拌した後、酵素液 0.5 mL を加え、30°C で 30 分間反応をさせ、以下同様の作業を行った。

試料の吸光度 (A) からブランクの吸光度 (B) を差し引き、検量線からチロシン量 ($\mu\text{g} / \text{mL}$) (T) を求めた。

$$\text{検量線： } T = 59.519 \times (A-B) - 0.137$$

○活性算出法

ここでのプロテアーゼ活性は、酵素液 1 mL が 30℃で 1 分間に 1 μg のチロシンを生成する酵素力を 1 U と定義する。塩麴 1 g 当たりの酵素活性は次式により算出した。

$$\begin{aligned} \text{プロテアーゼ活性 (U/g)} &= T \times \frac{3^{1)}}{1} \times \frac{1^{2)}}{10} \times \frac{50^{3)}}{5} \\ &= 3T \end{aligned}$$

T：検量線から求めたチロシン量

1)：反応液量 2)：反応時間 3)：酵素抽出倍率

2-10. 菌数の測定（一般細菌・乳酸菌）

2-10-1. 実験操作

○試薬の調製

・生理食塩水（希釈用）

塩化ナトリウム 8.5 g を脱塩水 1 L に溶解し、オートクレーブに 121℃で 15 分間滅菌した。

・10 mg 力価 /mL カビサイジン溶液

100 mg 力価のカビサイジンをエタノール 10 mL に溶解した。

・普通ブイヨン寒天培地（一般細菌用）

普通ブイヨン 1.8 g にカビサイジン溶液 1 mL と脱塩水 100 mL を加えて溶解後、寒天 1.2 g と混和しオートクレーブで 121℃、15 分間滅菌した。固化した寒天培地は加熱して溶解し、50～60℃に冷まして使用した。

・MRS 寒天培地（乳酸菌用）

MRS ブイヨン 5.2 g とプロモクレゾールパープル (BCP) 4 mg を分取し、これにカビサイジン溶液 1 mL と脱塩水 100 mL を加えて溶解した。溶解後、寒天 1.2 g と混和し、オートクレーブで 121℃、15 分間滅菌した。固化した寒天培地は加熱して溶解し、50～60℃に冷まして使用した。

○菌液の調製

塩麴 5 g を分取し、100 mL 容メスシリンダーに入れ、生理食塩水を加えて 100 mL に定容した。これをワーリングブレンダー (12 Speed, Oster) に入れ、30 秒間、3 回粉碎し、試料原液とした。試料原液 1 mL と生理食塩水 9 mL を混和し、これを 10^{-1} 液とした。この希釈を順次繰り返し、希釈菌液を調製した。

○測定方法

・一般細菌の測定

菌液 1 mL を滅菌シャーレに添加し、50～60℃に冷ました普通ブイヨン寒天培地 15～20 mL を加え十分に混和した。培地が固化した後、シャーレを倒置し、35℃で 48 時間培養した。培養後、目視できるコロニー数を計測し、希釈倍率を考慮して塩麴中の一般細菌数 (cfu/g : colony forming unit/g) を算出した。

・乳酸菌の測定

菌液 1 mL を滅菌シャーレに入れ、50～60℃に冷ました MRS 寒天培地 15～20 mL を加え十分に混和した。培地が固化した後、シャーレを倒置し、35℃で 48 時間培養した。乳酸菌が産生する酸によりコロニー周辺の培地が紫色から黄色に変化しているコロニーを乳酸菌と判断し、そのコロニー数を計測し、希釈倍率を考慮して塩麴中の乳酸菌数 (cfu/g) を算出した。

3. 実験結果および考察

3-1. 購入した市販の塩麴について

市販の塩麴の特性の違いを解明するため、インターネットやスーパーなどの小売店でメーカーや原料が異なる 9 種類の市販塩麴を購入し、測定試料 (A~I) として用いた。購入した 9 種類の市販塩麴の詳細情報をすでに表 2-1、図 2-1 に示してある。また、同じ商品でも品質のばらつきを求めるため、生産期日が異なる各商品を 3 つずつ購入し、それぞれ成分分析および酵素活性測定の計 11 項目を調べた。

包装形態には 4 つの形態があり、瓶詰が 4 商品 (試料 D、F、H、I)、PET ボトル詰めが 1 商品 (試料 E)、目立型パウチ詰めが 3 商品 (試料 A、C、G)、プラスチックシール容器詰めが 1 商品 (試料 B) あった。また瓶詰商品に関しては瓶の形状により 2 つに分けることができ、広口瓶が 3 商品 (試料 D、F、I)、細口瓶が 1 商品 (試料 H) あった。

内容物の状態も商品により異なり、粒を残した粥状のものが 3 商品 (試料 B、D、H)、粒のないペースト状のものが 5 商品 (試料 A、C、F、G、I)、固形分を全く含まない液状のものが 1 商品 (試料 E) あり、ペースト状の商品が多かった。粥状の 1 商品 (試料 H) は細口瓶に入れられていたが、内容物が出しにくいなどの問題はなかった。

商品の保存方法は、生塩麴の 2 商品 (試料 A、B) では他の商品に書かれていない「冷蔵保存」と記載されていたに対して、他の 7 商品は「冷所保存」や「常温保存」と記載され、9 商品の賞味期限は 3 カ月から 6 カ月前後となっていた。また、1 商品 (試料 E) の商品ラベルに「非加熱」と記載しているのに対して、1 商品 (試料 D) の製造会社ホームページに「加熱殺菌」と記載していた。「非加熱」により商品の新鮮さを維持しているのに対して「加熱殺菌」で商品の保存期間を延ばしていると考えられる。この 2 商品以外のものには、加熱殺菌がなされているかどうか具体的な情報が得られなかった。

原料には基本的な塩麴の原料である米麴と食塩は全ての商品で使用されているが、米麴と食塩以外に使用している原料は商品により若干異なり、米や酒精 (アルコール) などを使用している商品が多かった。また、保存性を向上させるためにアルコールを加えている商品が 9 種類の市販塩麴の中 5 商品と多数を占めていた。加えていない商品は、賞味期限が加えたものに比べて若干短い傾向がある。なお、アルコールの役割としては、風味の向上も考えられるため、塩麴へのアルコールの添加にはそのような意味合いも含まれているのかもしれない。また、9 商品中 1 商品 (試料 H) だけであるが昆布エキス、調味料 (アミノ酸)、醸造酢、増粘剤 (加工デンプン、キサンタン) を加えているものがあった。これらは調味料としての風味を向上させるために添加されていると考えられ、添加により発酵期間を短縮させた商品ではないかと考えられた。さらに、近年は塩麴に加え醤油麴や味噌麴なども市販されており、今回購入した 1 商品

(試料 I) では、醤油や醤油もろみが使用されていた。

3-2. 水分

水分はほとんどの食品の主な成分の一つであり、肉 65-75%、ミルク 87%、果物と野菜 70-90%、パン 35%、穀粉 12-14%とそれぞれ水分を含んでいる。(H. D. Belitz ら、2009) 食品の中には水分は「自由水」と「結合水」という二つの状態で存在している。自由水は食品の中で自由に動くことができ、様々な反応の溶媒になると共に自分自身も化水分解反応に参加する。自由水の含量を表わす指標として水分活性 (A_w) がある。この水分活性は食品の貯蔵に重要な指標でもあり、食品を腐敗させる微生物の繁殖には栄養素と適切な温度があっても水分活性が一定程度より低い場合、微生物の繁殖が阻害される。また、結合水とは食品中の水分は食品の糖分などと結合して自由に動くことが出来ず、その分子の一部になっている状態だ。例えば、塩蔵だと食品から水分を除去することにより貯蔵している。糖蔵の場合は食品の水分を結合させることにより貯蔵している。水分はこれ以外にも、塩分、多糖、脂質、タンパク質などと物理的な相互作用を起こし、食品の味に影響をしている。

市販塩麴 9 商品の水分含量を測定し、その結果を図 2-2、表 2-2 に示した。最も多いもので 63.4%、最も少ないもので 38.1%と約 2 倍の違いがあった。平均水分は 50.5%であった。しかし、最も水分含量が多かった商品は試料 H であり、この商品の原料に加えられている昆布エキス、醸造酢、アルコール、調味料などはいずれも液体原料であるため、水分含量が多くなったと推測される。一般家庭での塩麴の作り方が書かれている書籍では、材料として加える米麴、食塩、水の量を 200 : 60 : 200 (おの、2010) や 200 : 70 : 250~270 (白澤ら、2011)、200 : 14 : 400~450 (伏木ら、2011) などとしており、米麴自体に含まれる水分も考えるとそれらの作り方で作った塩麴の水分含量は 57%、60%、76%となる。これらと比較すると市販の塩麴の水分含量は大体同じかやや少ない。今回、自由水を示す指標である水分活性を測定しなかったが、市販塩麴では変敗防止のために水分を少なめに調製しているのかもしれない。

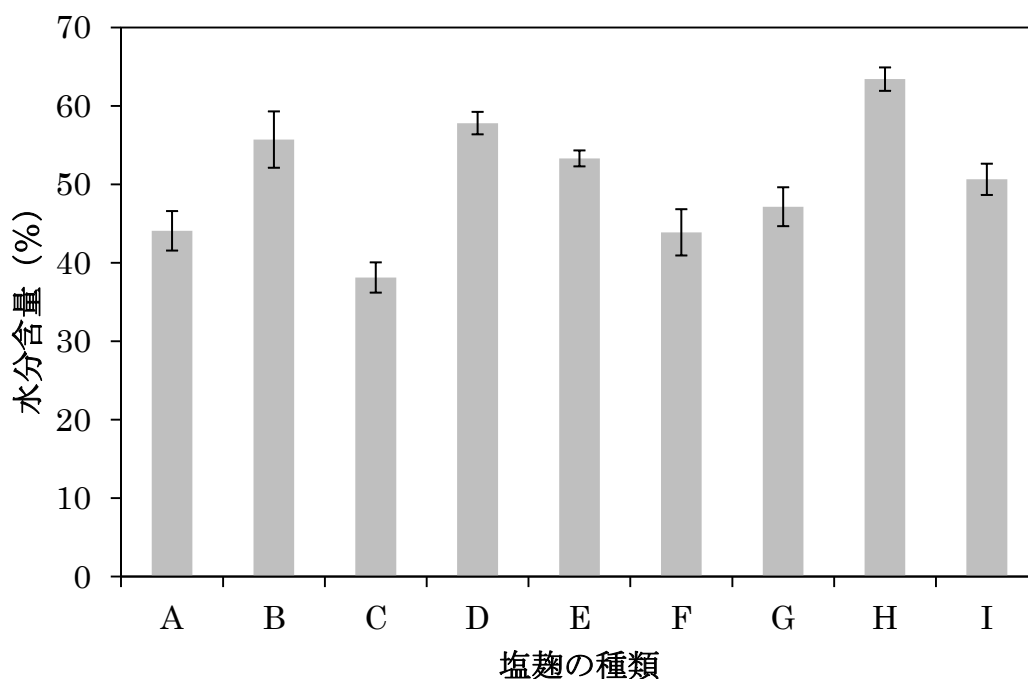


図 2-2. 市販塩麴 9 種の水分含量 (%)

市販塩麴 9 種 (A~I) を各 3 個ずつ購入し、水分含量 (%) を測定した (n = 3)。棒グラフはその平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 2-2. 試料の概要と水分含量

試料	市販の塩麴	製造会社	水分含量 (%)
A	にいがた塩麴	(株) 竹林味噌醸造所	44.1 ± 2.5
B	塩こうじ	麴屋本舗 法野麴店	55.7 ± 3.6
C	塩麴	マルタ食品 (株)	38.1 ± 1.9
D	やさかの有機塩こうじ	(有) やさか共同農場	57.8 ± 1.4
E	液体塩こうじ	ハナマルキ (株)	53.3 ± 1.0
F	塩麴	石山味噌醤油 (株)	43.9 ± 3.0
G	塩糀	イチビキ (株)	47.1 ± 2.5
H	米こうじの塩だれ	山崎醸造 (株)	63.4 ± 1.5
I	醤油麴	石山味噌醤油 (株)	50.6 ± 2.0

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

3-3. 塩分濃度

塩蔵は人類が経験的に発見した最初の食品貯蔵方法とも言われている。塩分を加えることにより食品の水分活性が低くなり、微生物の繁殖を抑制する目的に達する。塩分は食品の保存に影響を与えるだけではなく、食品の呈味や酵素による穀物の分解作用にも影響を与える（中村、2012）。

市販塩麴 9 商品の塩分濃度をポケット塩分計「APAL-ES1」を用いて測定し、その結果を図 2-3、表 2-3 に示した。最も高いのは C 商品 12.9%で、最も低いのは G 商品 8.4%で、平均 10.5%であった。植田（1998）氏は米味噌の塩分は 4.5%～12.5%と報告しており、今回の結果は米味噌の塩分濃度より若干高かった。

塩分濃度は 10%より低い全ての商品（試料 F、G、H、I）の原料には酒精（アルコール）が加えている。そのため、これらの商品は塩分だけではなく、エタノールの殺菌効果により食品の保存効果を高め、賞味期限を伸ばしていると考えられる。一方、酒精を加えていない生麴の商品 A、B に塩分濃度は 10%以上であることが測定され、これらの商品は塩分により微生物の繁殖を抑え、保存期限を伸ばしていると考えられた。

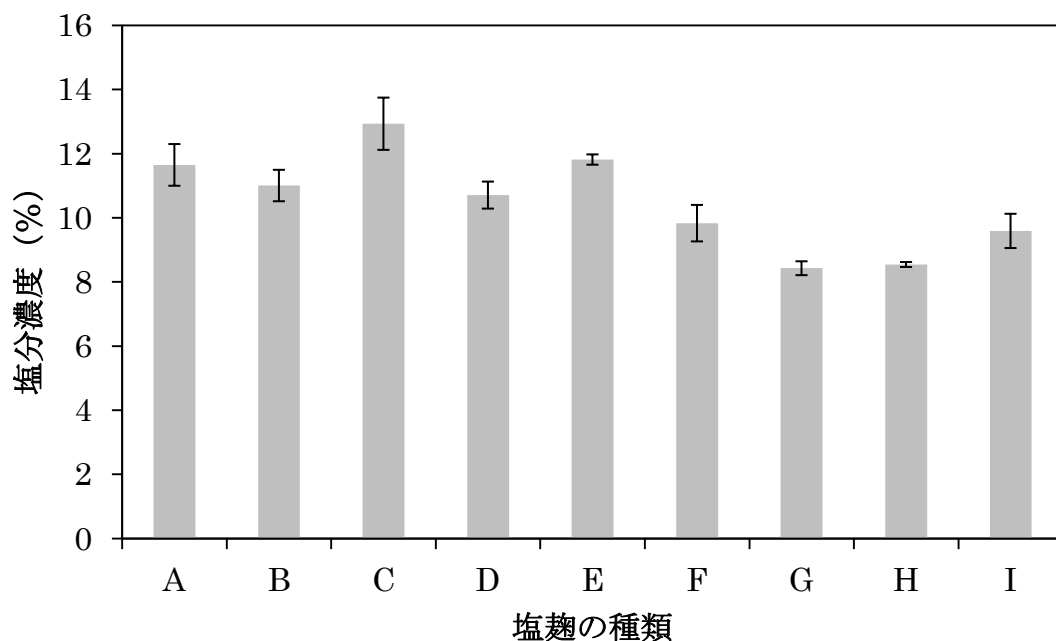


図 2-3. 市販塩麴 9 種の塩分濃度

市販塩麴 9 種 (A~I) を各 3 個ずつ購入し、それぞれ塩分濃度 (%) を測定した (n = 3)。棒グラフはその平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 2-3. 試料の概要と塩分濃度

試料	市販の塩麴	製造会社	塩分濃度 (%)
A	にいがた塩麴	(株) 竹林味噌醸造所	11.7 ± 0.7
B	塩こうじ	麴屋本舗 法野麴店	11.0 ± 0.5
C	塩麴	マルタ食品 (株)	12.9 ± .08
D	やさかの有機塩こうじ	(有) やさか共同農場	10.7 ± 0.4
E	液体塩こうじ	ハナマルキ (株)	11.8 ± 0.2
F	塩麴	石山味噌醤油 (株)	9.8 ± 0.6
G	塩糀	イチビキ (株)	8.4 ± 0.2
H	米こうじの塩だれ	山崎醸造 (株)	8.5 ± 0.1
I	醤油麴	石山味噌醤油 (株)	9.6 ± 0.5

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

3-4. pH 測定

pH 値は麴の調製過程における麴菌を含む微生物の働きに大きな影響を与えることが数多く報告されている（佐々木ら、1986）。

市販塩麴 9 商品の pH 値を pH メーター「twin pH B-212」を用いて測定し、その結果を図 2-4、表 2-4 に示した。また、商品の約 1 カ月保存中における pH 値の経時変化を図 2-5、表 2-5 に示した。

塩麴の pH 値は 4.7～5.3 であり、いずれの商品も弱酸性であった。また、pH が低いものと高いものの間では 0.6 の違いしかなかった。塩麴 H には原料として醸造酢が使われているが、その pH は 5.2 であり特に低くはなかった。塩麴の原料である麴には麴菌以外にも様々な細菌が存在することが知られている。その中には乳酸菌が含まれており、日本酒の製造（特に古来より行われている生酛造り）では乳酸菌の産生する乳酸が雑菌の繁殖を抑えるために重要な働きをしている。本研究では塩麴に含まれる酸の分析は行わなかったが、塩麴が弱酸性であることから麴に含まれる乳酸菌が産生する乳酸により pH が低下していると推測される。

微生物の増殖におよぼす pH の影響は微生物の種類により異なり、一般的にカビや酵母は酸性側の pH 4.0～6.0 で良く増殖するが、細菌や放線菌は中性から弱アルカリ性の pH 6.5～8.0 で増殖し、pH 4.5～5.0 以下では増殖できなくなる（一色、2005）。このことを考えると市販の塩麴の pH は一般的な細菌の増殖を抑え、腐敗を防止するに有効な pH と考えられる。

B 商品を除き、市販塩麴の約 1 カ月保存中における pH 値に経時的有意な変化が検出されなかった。B 商品の pH 値が経時的徐々に低下した。経時的に気泡が徐々に多くなっている状態を目視でも観察できた。B 商品は生麴であるため、耐塩性乳酸菌の働きにより pH 値が低下したと考えられた。

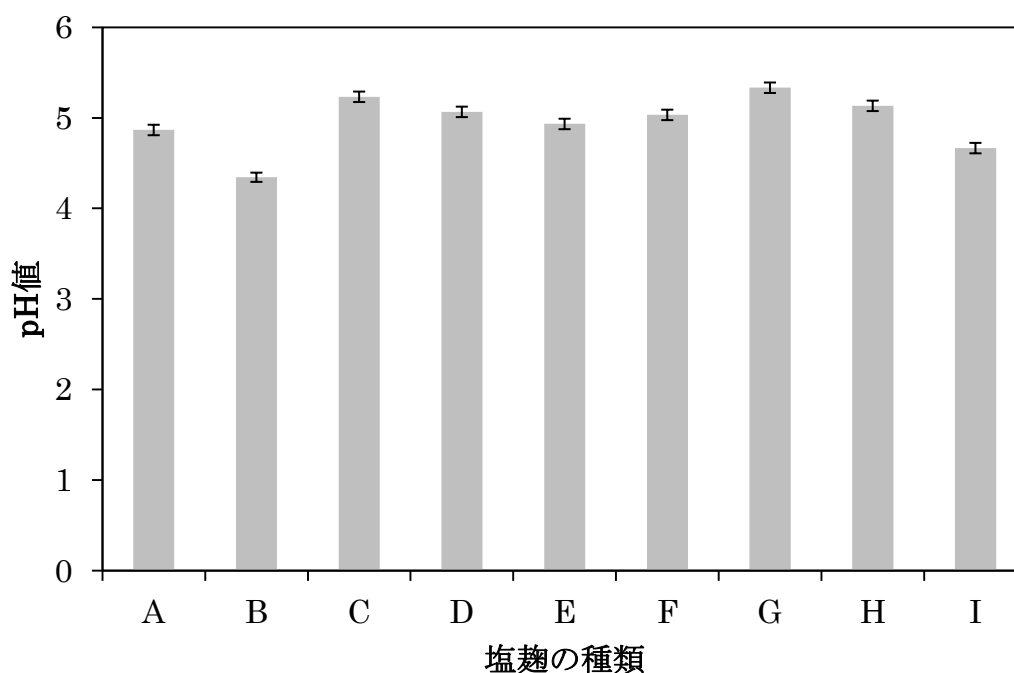


図 2-4. 市販塩麴 9 種の pH

市販塩麴 9 種 (A~I) を各 3 個ずつ購入し、それぞれ測定した (n = 3)。棒グラフはその平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 2-4. 試料の概要と pH 値

試料	市販の塩麴	製造会社	pH 値
A	にいがた塩麴	(株) 竹林味噌醸造所	4.8 ± 0.1
B	塩こうじ	麴屋本舗 法野麴店	4.7 ± 0.1
C	塩麴	マルタ食品 (株)	5.2 ± 0.1
D	やさかの有機塩こうじ	(有) やさか共同農場	5.0 ± 0.1
E	液体塩こうじ	ハナマルキ (株)	5.0 ± 0.1
F	塩麴	石山味噌醤油 (株)	5.1 ± 0.1
G	塩糀	イチビキ (株)	5.3 ± 0.1
H	米こうじの塩だれ	山崎醸造 (株)	5.2 ± 0.1
I	醤油麴	石山味噌醤油 (株)	4.7 ± 0.1

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

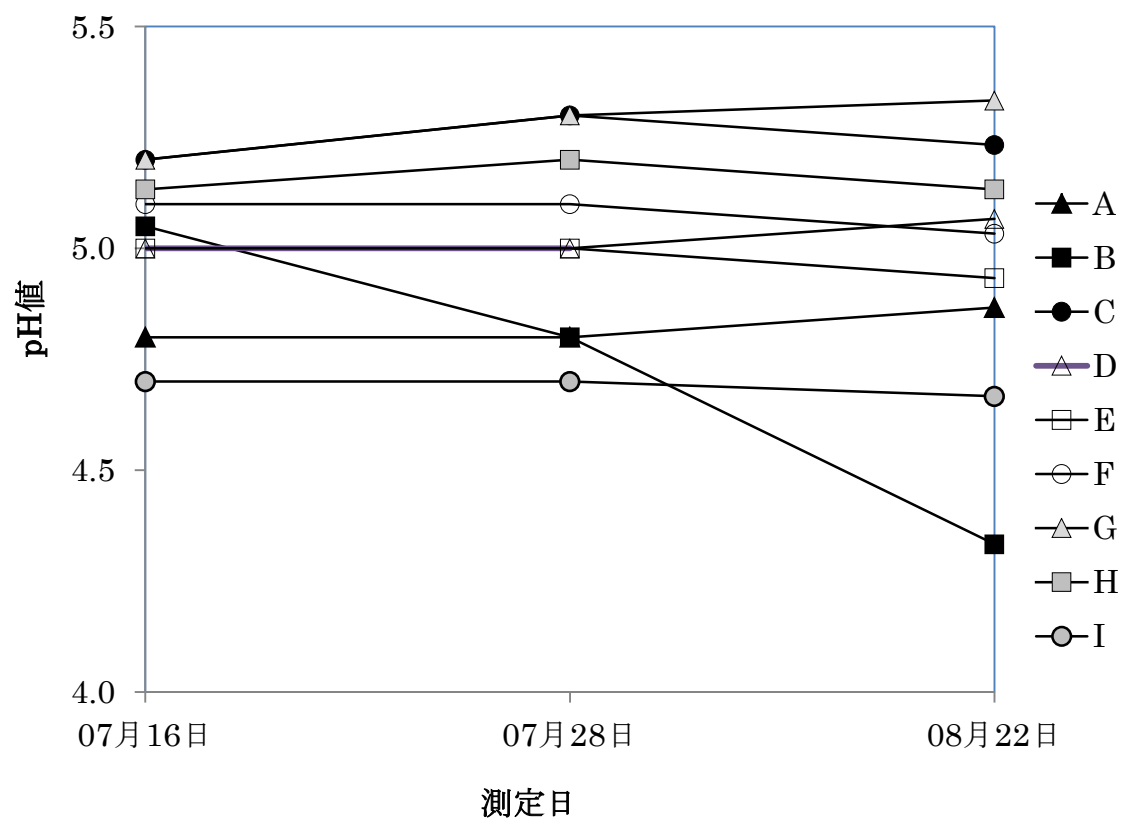


図 2-5. 市販塩麴 9 種の pH の経時的変化

市販塩麴 9 種 (A~I) の pH について、測定結果の平均値 ($n = 3$) を測定日別に示した。

表 2-5. 試料の概要と経時 pH 値

試料	市販の塩麴	7 月 16 日	7 月 28 日	8 月 22 日
A	にいがた塩麴	4.8	4.8	4.9
B	塩こうじ	5.1	4.8	4.3
C	塩麴	5.2	5.3	5.2
D	やさかの有機塩こうじ	5.0	5.0	5.1
E	液体塩こうじ	5.0	5.0	4.9
F	塩麴	5.1	5.1	5.0
G	塩糀	5.2	5.3	5.3
H	米こうじの塩だれ	5.1	5.2	5.1
I	醤油麴	4.7	4.7	4.7

数値は平均値 ($n = 3$) を示している。

3-5. アルコール濃度の測定

お酒の主な成分であるエタノールは、安全性が高い、少量（4～8%）のエタノールは食品の呈味に影響をしない、微生物の繁殖に抑制力がある等のことから近年食品添加物として幅広く使用されている（宇田川、1987）。

市販塩麴 9 商品のアルコール濃度を「F-キット エタノール」を用いて測定し、その結果を図 2-6、表 2-6 に示した。商品 A、B、C、D にはアルコールが検出されなかったに対して、商品 E、F、G、H、I の 5 つの塩麴にアルコールが検出された。アルコールは検出された商品の中で、濃度は最も高い E 商品 2.80% で、最も低い F 商品 2.48% であり、平均 2.65% であった。原料に商品 A、B、C、D ではアルコール（酒精）の添加が記載されていないのに対して、商品 E、F、G、H、I にアルコールが添加されていると記載されている。今回の結果はそれらの記載と一致した。また、市販塩麴に添加されているアルコールについて、阿部ら（2013）は 2.2～5.9%、前橋ら（2005）は 1.50～3.25% と報告している。これらのことから、市販の塩麴のアルコール濃度は 3% 前後であることが推測される。

山本ら（1984）の報告によると、エタノールの抗菌作用は 8～11% の濃度範囲である。しかし、市販塩麴に含むアルコール濃度が 3% 前後であるため、塩分濃度や pH 値と組み合わせて微生物の繁殖を抑制効果を発揮していると考えられる。

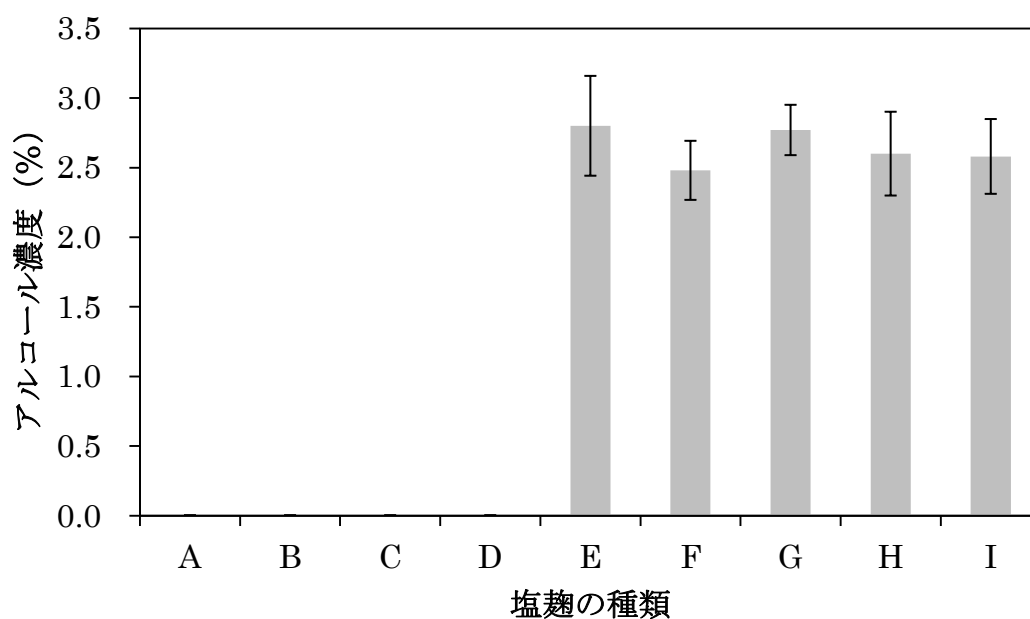


図 2-6、市販塩麴 9 種のアルコール濃度

市販塩麴 9 種 (A~I) を各 3 個ずつ購入し、それぞれアルコール濃度 (%) を測定した (n = 3)。棒グラフはその平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 2-6. 試料の概要とアルコール濃度

試料	市販の塩麴	製造会社	アルコール濃度 (%)
A	にいがた塩麴	(株) 竹林味噌醸造所	0 ± 0
B	塩こうじ	麴屋本舗 法野麴店	0 ± 0
C	塩麴	マルタ食品 (株)	0 ± 0
D	やさかの有機塩こうじ	(有) やさか共同農場	0 ± 0
E	液体塩こうじ	ハナマルキ (株)	2.80 ± 0.4
F	塩麴	石山味噌醤油 (株)	2.48 ± 0.2
G	塩糀	イチビキ (株)	2.77 ± 0.2
H	米こうじの塩だれ	山崎醸造 (株)	2.60 ± 0.3
I	醤油麴	石山味噌醤油 (株)	2.58 ± 0.3

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

3-6. 糖の定量

糖は食品の三大栄養素の一つである炭水化物であり、食品の味や色などに大きな影響を与える物質でもある。そのため糖分含量は食品にとって、最も重要な指標の一つである。

市販塩麴 9 商品の少糖類を、アミノカラムを付けた HPLC を用いて測定し、その結果を図 2-7、表 2-7 と図 2-8、表 2-8 に示した。その結果、いずれの塩麴でも含まれる少糖の大部分はグルコースであり、グルコースの存在が塩麴に強い甘味を与えていると考えられた。それ以外では少量のマルトースが含まれることがわかった。なお、今回分析に用いたカラムではマルトースとイソマルトースを分離することができず、それらは同じ位置に溶出する。したがって、検出された糖がマルトースであるのか、イソマルトースであるのか、それらの混合物であるのかは不明である。そこで本研究では便宜的にマルトースと表記することとした。

グルコースは、商品 A、E に一番多く 5.23 mg/g 含まれており、塩麴の重量の約 0.5 割を占めていた。逆に、少ない H 商品では 2.77 mg/g であり、その含量は A、E 商品に比べ約 2 倍の差が見られた。一方、マルトースは多い F 商品で 1.13 mg/g、少ない H 商品で 0.04 mg/g しか含まれていなかった。各塩麴におけるグルコース含量とマルトース含量の間に若干ずれがあったが、全体的に相関が見られた。グルコースを多く含む A、E、F、G 商品に、マルトースも他の 5 つの商品より多く含まれていた。また、グルコースが一番少ない H 商品にマルトースも一番少なかった。塩麴の原料である米麴には麴菌が産生した糖質分解酵素が豊富に含まれている。米デンプンのグルコースやマルトースへの分解には、主に α -アミラーゼより行われる。そのため、麴菌の分泌した α -アミラーゼ活性により米デンプンからマルトースが分解され、マルトースはさらに α -アミラーゼ活性により分解されグルコースが生成されたと推察された。また、塩麴の製法には約 60℃に加熱して酵素糖化を短時間で終わらせる短期熟成法があり（山元、2012）、グルコースとマルトース含量の若干ずれはこの製法によるものかもしれない。

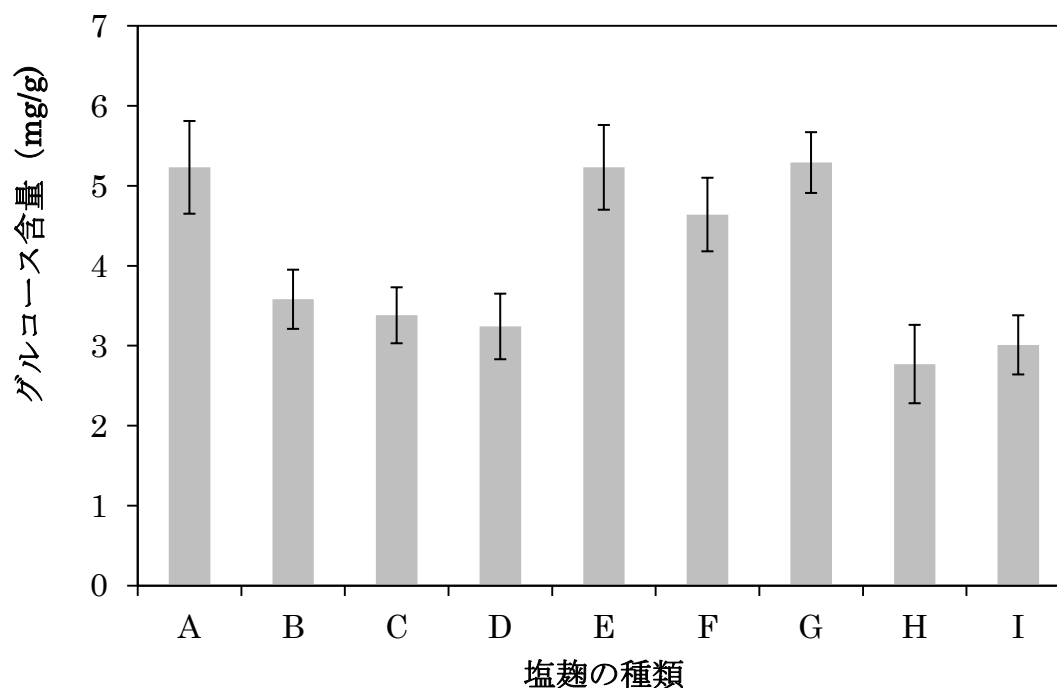


図 2-7. 市販塩麴 9 種のグルコース量

市販塩麴 9 種 (A~I) を各 3 個ずつ購入し、それぞれグルコース含量 (mg/g) を測定した (n = 3)。棒グラフはその平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 2-7. 試料の概要とグルコース含量

試料	市販の塩麴	製造会社	グルコース含量 (mg/g)
A	にいがた塩麴	(株) 竹林味噌醸造所	5.2 ± 0.6
B	塩こうじ	麴屋本舗 法野麴店	3.6 ± 0.4
C	塩麴	マルタ食品 (株)	3.4 ± 0.4
D	やさかの有機塩こうじ	(有) やさか共同農場	3.2 ± 0.4
E	液体塩こうじ	ハナマルキ (株)	5.2 ± 0.5
F	塩麴	石山味噌醤油 (株)	4.6 ± 0.5
G	塩糀	イチビキ (株)	5.3 ± 0.4
H	米こうじの塩だれ	山崎醸造 (株)	2.8 ± 0.5
I	醤油麴	石山味噌醤油 (株)	3.0 ± 0.4

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

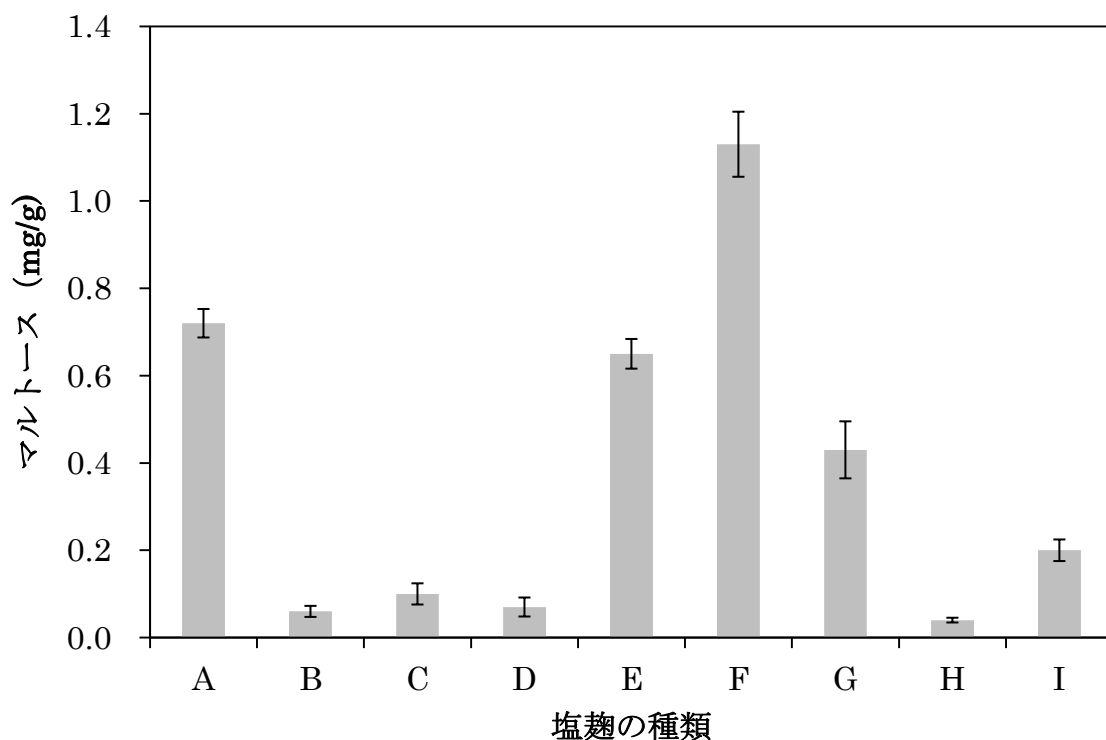


図 2-8. 市販塩麴 9 種のマルトース量

市販塩麴 9 種 (A~I) を各 3 個ずつ購入し、それぞれマルトース含量 (mg/g) を測定した (n = 3)。棒グラフはその平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 2-8. 試料の概要とマルトース量

試料	市販の塩麴	製造会社	マルトース含量 (mg/g)
A	にいがた塩麴	(株) 竹林味噌醸造所	0.72 ± 0.03
B	塩こうじ	麴屋本舗 法野麴店	0.06 ± 0.01
C	塩麴	マルタ食品 (株)	0.10 ± 0.02
D	やさかの有機塩こうじ	(有) やさか共同農場	0.07 ± 0.02
E	液体塩こうじ	ハナマルキ (株)	0.65 ± 0.03
F	塩麴	石山味噌醤油 (株)	1.13 ± 0.07
G	塩糀	イチビキ (株)	0.43 ± 0.06
H	米こうじの塩だれ	山崎醸造 (株)	0.04 ± 0.01
I	醤油麴	石山味噌醤油 (株)	0.20 ± 0.02

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

3-7. L-グルタミン酸の測定

食品における代表的うま味成分である L-グルタミン酸が市販塩麴 9 商品にどの程度含まれているのかを調べるため、「ヤマサ L-グルタミン酸測定キット II」を用いて測定し、その結果を図 2-9、表 2-9 に示した。L-グルタミン酸含量が最も多かったのが I 商品で 2.11 mg/g 含まれていた。一方、最も少なかったのが G 商品で 0.10 mg/g しか含まれておらず、両者の間には約 20 倍の開きがあった。L-グルタミン酸含量が多い 3 商品（試料 A、H、I）のうち H は、調味料として昆布エキスを原料として使用している。L-グルタミン酸は昆布のうま味成分として最初に発見された物質であり、昆布には当然豊富に含まれている。そのため昆布エキスを使用した塩麴にも L-グルタミン酸が多いと推察された。また、I 商品には原料として醤油や醤油もろみを使用している。醤油には大豆が分解されて生じた L-グルタミン酸が豊富に含まれているため、これを加えた醤油麴にも L-グルタミン酸が多く含まれていたと推察される。A 商品の原料に添加物が使用されていないにもかかわらず L-グルタミン酸含量が高かった。

これら 3 つの商品を除くと L-グルタミン酸含量の違いはやや小さくなるが、それでも多い E 商品と少ない C 商品の間に約 0.6 mg/g の差があった。L-グルタミン酸は原料中のタンパク質が麴に含まれるタンパク質分解酵素により分解されて生じる。塩麴におけるタンパク質の供給源は米であり、米のタンパク質含量は精米歩合により異なる（木崎ら、1991）。そこで、塩麴製造に使用された米麴や米の精米歩合の違いが塩麴の L-グルタミン酸含量の違いに影響している可能性が推察された。また、米麴のタンパク質分解酵素活性に違いがあることも当然考えられるため、次に塩麴の酵素活性を測定した。

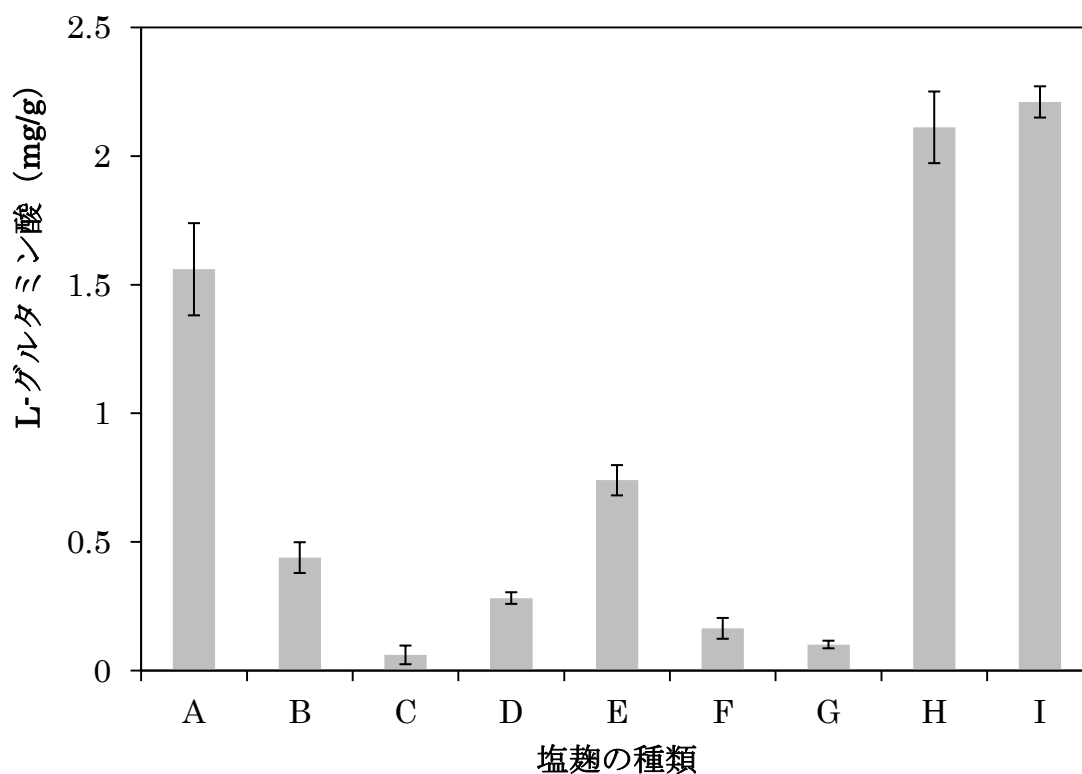


図 2-9. 市販塩麴 9 種の L-グルタミン酸量

市販塩麴 9 種 (A~I) を各 3 個ずつ購入し、それぞれ L-グルタミン酸量 (mg/g) を測定した (n = 3)。棒グラフはその平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 2-9. 試料の概要と L-グルタミン酸量

試料	市販の塩麴	製造会社	L-グルタミン酸 (mg/g)
A	にいがた塩麴	(株) 竹林味噌醸造所	1.56 ± 0.18
B	塩こうじ	麴屋本舗 法野麴店	0.44 ± 0.06
C	塩麴	マルタ食品 (株)	0.06 ± 0.04
D	やさかの有機塩こうじ	(有) やさか共同農場	0.28 ± 0.02
E	液体塩こうじ	ハナマルキ (株)	0.74 ± 0.06
F	塩麴	石山味噌醤油 (株)	0.16 ± 0.04
G	塩糀	イチビキ (株)	0.10 ± 0.01
H	米こうじの塩だれ	山崎醸造 (株)	2.11 ± 0.14
I	醤油麴	石山味噌醤油 (株)	2.21 ± 0.06

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

3-8. 糖化力測定

麴に含まれる麴菌の働きにより米デンプンを分解してグルコース生成させ、お酒や味噌、醤油などを調製しているため、糖化力は麴の最も重要な機能の一つである。麴菌の分泌するデンプン分解酵素の一つである α -グルコシダーゼの遺伝子もクローニングされ、誘導発現機構が近年報告されている(今井ら、1997)。塩麴は原料の麴を用いて調製しているため、高い糖化力が期待される。

市販塩麴 9 商品の糖化力を、「糖化力測定キット」を用いて測定し、その結果を図 2-10、表 2-10 に示した。9 商品の内 A、B、E 商品のみ活性が検出され、残りの 6 商品に活性が見られなかった。3 商品の内 B 商品が一番高く 1.03 U/g で、E 商品が一番低く 0.46 U/g であった。

同じ麴でも使用されている種麴の菌種により酵素活性が異なることを報告されている(松本ら、1989)。また、同一の菌種でも、維持される温度により分泌する酵素量が異なる(江崎ら、2010)。また、奈良(1994)氏は原料に含まれる栄養素が麴菌の分泌する酵素量を左右することを報告している。これらのことから、市販塩麴は一定の規制で作られていないため、メーカー毎に異なっていると推察される。

麴の最も重要な指標の一つである糖化力が塩麴にも活性が高いことを期待したが、今回の購入した商品にその活性が失活した商品が多く見られ、保存期間を延ばすため、加熱殺菌をしていると考えられた。また、市販塩麴に一定の規制を作り、その製造工程や殺菌方法を見直すことで、塩麴中の酵素の失活を防ぎ、より高い酵素活性の含む商品の製造販売が期待される。

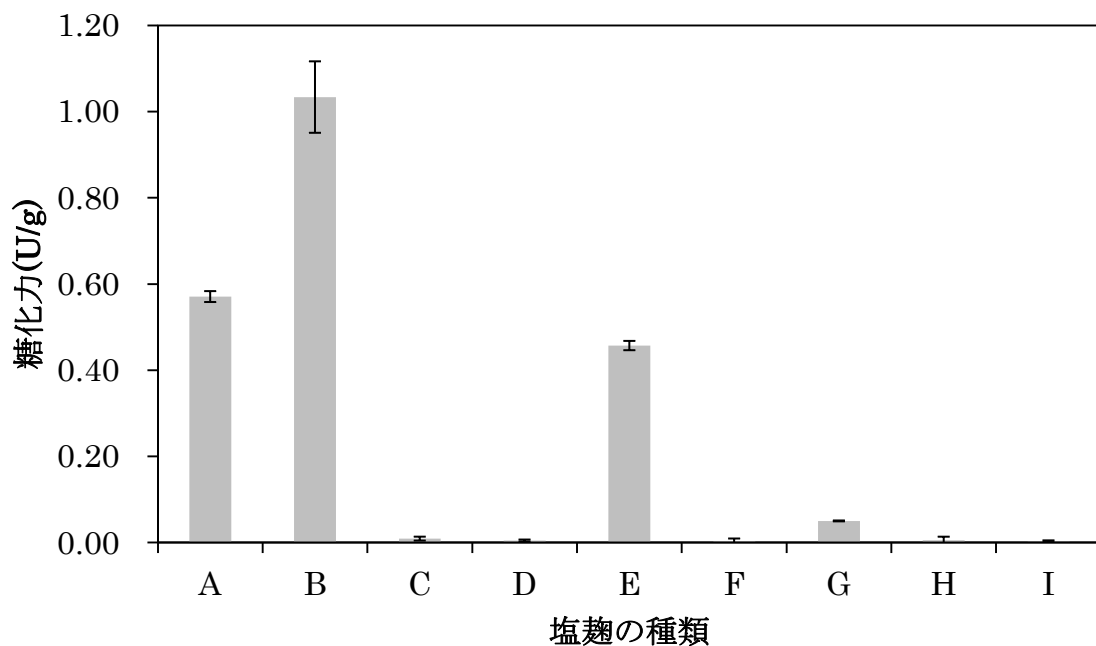


図 2-10. 市販塩麴 9 種の糖化力

市販塩麴 9 種 (A~I) を各 3 個ずつ購入し、それぞれ糖化力 (U/g) を測定した ($n = 3$)。なお、糖化力は塩麴 1 g あたりの活性値として表す。棒グラフはその平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 2-10. 試料の概要と糖化力

試料	市販の塩麴	製造会社	糖化力 (U/g)
A	にいがた塩麴	(株) 竹林味噌醸造所	0.57 ± 0.01
B	塩こうじ	麴屋本舗 法野麴店	1.03 ± 0.08
C	塩麴	マルタ食品 (株)	0.01 ± 0.01
D	やさかの有機塩こうじ	(有) やさか共同農場	0.00 ± 0.00
E	液体塩こうじ	ハナマルキ (株)	0.46 ± 0.01
F	塩麴	石山味噌醤油 (株)	0.00 ± 0.01
G	塩糀	イチビキ (株)	0.05 ± 0.00
H	米こうじの塩だれ	山崎醸造 (株)	0.01 ± 0.01
I	醤油麴	石山味噌醤油 (株)	0.00 ± 0.00

数値は平均値 ($n = 3$) と標準偏差を示している。

3-9. α -アミラーゼ活性の測定

糖の分析の結果、塩麴にはグルコースが豊富に含まれることがわかった。このグルコースは、塩麴の原料である米麴に含まれる α -アミラーゼとグルコアミラーゼが米デンプンを分解することにより生じる。そこでグルコースの生成に関わる酵素のうち α -アミラーゼについて、市販塩麴 9 商品における活性を「 α -アミラーゼ測定キット」で測定し、比較した。その結果を図 2-11 と表 2-11 で示した。

商品 B では 77.3 U/g と非常に高い活性が検出され、商品 A と E でも 15~16 U/g とより高い活性が検出された。商品 D、G にそれぞれ 4.0 U/g および 3.30 U/g とある程度活性が見られたが、これら以外の商品の α -アミラーゼ活性は極めて低かった。商品 C、F、H、I にはわずかな活性しか検出されなかったが、グルコースは多量に含まれていたため（図 2-7）、塩麴の発酵後に酵素が活性を失ったものと推測される。酵素失活の要因としてアルコールの添加や加熱処理が考えられる。アルコールを添加していない商品 B の α -アミラーゼ活性が非常に高いのに対し、アルコールを添加した、F、G、H、I の活性がいずれも低かった。アルコール測定結果（図 2-6）でアルコール濃度が 3%前後で、麴菌の生育を抑制するには大きな影響を与えることが出来ないため、これらの商品ではアルコールの添加とともに加熱殺菌しているのが酵素活性低下の要因であると推察される。商品 E には少量のアルコールが添加されているが、加熱殺菌がなされていないため、ある程度の活性があったと考えられる。また、商品 C と D はアルコール無添加にも関わらず活性が低かった。これらの商品には活性に影響をおよぼすような原料が使用されていないことから、品質保持のために加熱処理がなされた可能性が考えられた。

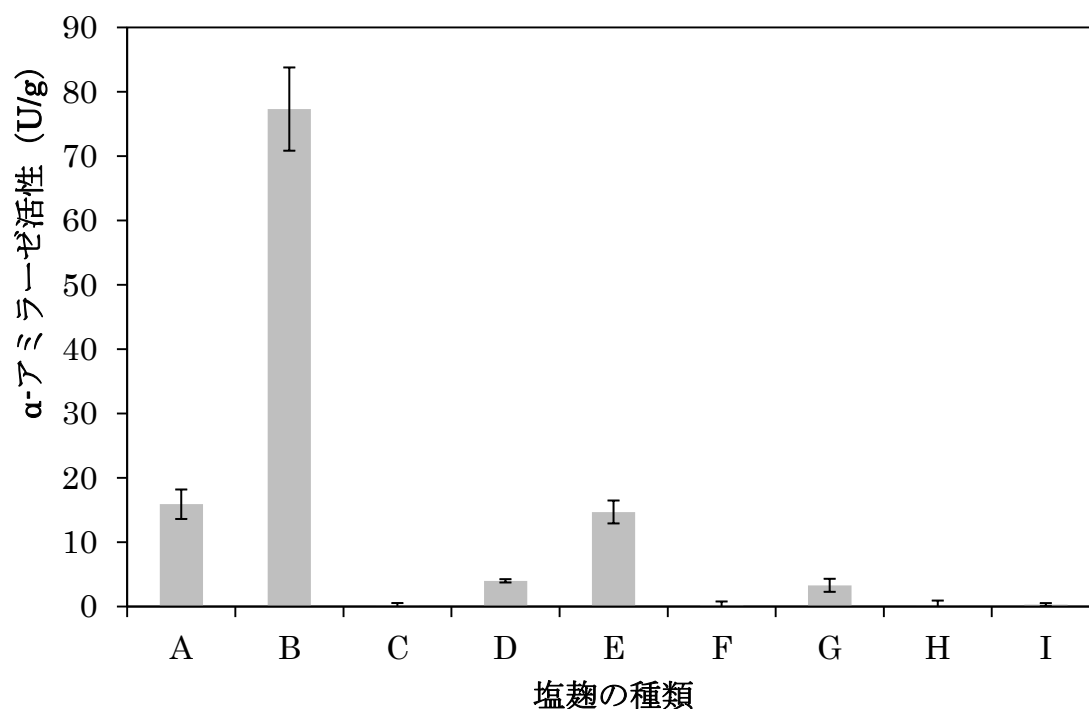


図 2-11. 市販塩麴 9 種の α-アミラーゼ活性

市販塩麴 9 種 (A~I) を各 3 個ずつ購入し、それぞれ α-アミラーゼ活性 (U/g) を測定した (n = 3)。棒グラフはその平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 2-11. 試料の概要と α-アミラーゼ活性

試料	市販の塩麴	製造会社	α-アミラーゼ活性 (U/g)
A	にいがた塩麴	(株) 竹林味噌醸造所	15.9 ± 2.3
B	塩こうじ	麴屋本舗 法野麴店	77.3 ± 6.5
C	塩麴	マルタ食品 (株)	0.1 ± 0.5
D	やさかの有機塩こうじ	(有) やさか共同農場	4.0 ± 0.3
E	液体塩こうじ	ハナマルキ (株)	14.7 ± 1.8
F	塩麴	石山味噌醤油 (株)	0.2 ± 0.6
G	塩糀	イチビキ (株)	3.3 ± 1.0
H	米こうじの塩だれ	山崎醸造 (株)	0.1 ± 0.8
I	醤油麴	石山味噌醤油 (株)	0.3 ± 0.2

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

3-10. プロテアーゼ活性の測定

麴の原料である米タンパク質を分解する酵素として麴菌の分泌するプロテアーゼは主な働きをしている。

市販塩麴 9 商品のプロテアーゼ活性を測定し、その結果を図 2-12、表 2-12 に示した。麴菌が産生するプロテアーゼには、pH 3.0 付近に至適 pH を持つ酸性プロテアーゼ、pH 6.0 付近に至適 pH を持つ中性プロテアーゼ、pH 7.5 付近に至適 pH を持つアルカリ性プロテアーゼがあることが報告されているが(みそ技術ハンドブック、1995)、本研究では塩麴の pH が 5 付近であったことから中性プロテアーゼを測定した。

測定の結果、商品 A、B、E では 6~22 U/g と高いプロテアーゼ活性が検出されたが、商品 H のように 0.1 U/g とほとんど活性がないものもあった。調味料や醤油を加えた H、I を除くと、L-グルタミン酸含量とプロテアーゼ活性の間には比較的高い相関が見られた。しかし、商品 B ではプロテアーゼ活性が非常に高いにも関わらず、L-グルタミン酸含量が活性に見合うほど多くなかった。プロテアーゼにはタンパク質の内部の結合を切断してペプチドを生成するエンド型のプロテイナーゼと、ペプチドの末端のアミノ酸を切断するエキソ型のペプチダーゼがある。L-グルタミン酸の生成に直接関与する酵素は后者であるが、本活性測定法では両者を区別して測定することができない。このことから活性と L-グルタミン酸含量が一致しなかったのかもしれない。また、L-グルタミン酸含量のところでも述べたが、L-グルタミン酸の供給源となるタンパク質の含量は米の精米歩合により異なる。したがって、商品 B の米麴に使用された原料米が強く精米され、タンパク質含量が少なかった可能性もある。

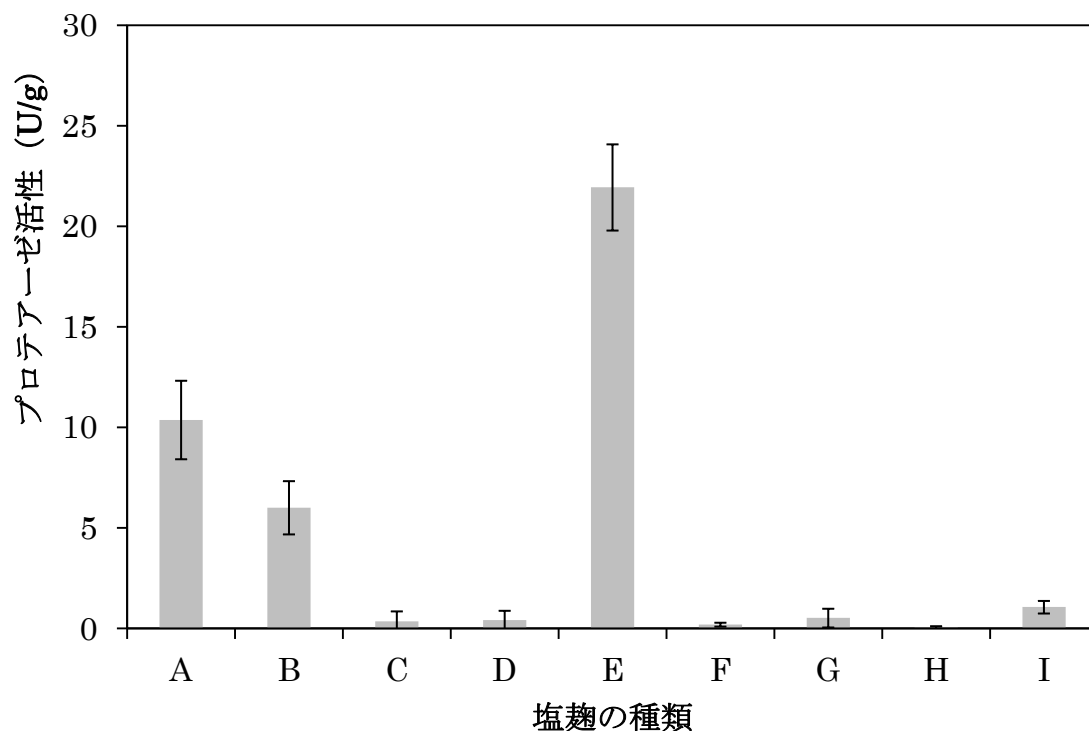


図 2-12. 市販塩麴 9 種のプロテアーゼ活性

市販塩麴 9 種 (A~I) を各 3 個ずつ購入し、それぞれプロテアーゼ活性 (U/g) を測定した ($n = 3$)。なお、プロテアーゼ活性は塩麴 1 g あたりの活性値として表す。棒グラフはその平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 2-12. 試料の概要とプロテアーゼ活性

試料	市販の塩麴	製造会社	プロテアーゼ活性 (U/g)
A	にいがた塩麴	(株) 竹林味噌醸造所	10.4 ± 2.0
B	塩こうじ	麴屋本舗 法野麴店	6.0 ± 1.3
C	塩麴	マルタ食品 (株)	0.4 ± 0.5
D	やさかの有機塩こうじ	(有) やさか共同農場	0.4 ± 0.5
E	液体塩こうじ	ハナマルキ (株)	21.9 ± 2.1
F	塩麴	石山味噌醤油 (株)	0.2 ± 0.1
G	塩糀	イチビキ (株)	0.5 ± 0.5
H	米こうじの塩だれ	山崎醸造 (株)	0.1 ± 0.1
I	醤油麴	石山味噌醤油 (株)	1.1 ± 0.3

数値は平均値 ($n = 3$) と標準偏差を示している。

3-11. 菌数の測定（一般細菌・乳酸菌）

塩麴の原料である米麴には麴菌だけでなく、製麴室に存在する多くの細菌が含まれていることが知られている。このうち乳酸菌の存在は塩麴の健康効果のひとつの要因であると謳われている（白澤ら、2011）。しかし、市販の塩麴の微生物の分析に関する報告はこれまでにない。そこで、市販の塩麴の一般細菌と、塩麴に生残していると考えられる乳酸菌を分析し、その結果を表 2-13 と表 2-14 に示した。分析に際しては、麴菌の生育を抑えるため真菌用抗菌剤であるカビサイジンを添加した培地を用いた。

一般細菌数を分析した結果、商品 A と B ではそれぞれ 2.3×10^7 (cfu/g) と 1.5×10^6 (cfu/g) の細菌が検出されたが、それ以外の商品では細菌は検出されなかった（表 2-13）。商品 B でも細菌が検出されたが、1000 倍試料希釈液のシャーレ 3 枚にコロニーが合計 1 個生えただけであった。

また、乳酸菌を測定した結果、商品 A と B ではそれぞれ 1.6×10^7 (cfu/g) と 1.5×10^6 (cfu/g) の乳酸菌が検出されたが、それ以外の商品では乳酸菌は検出されなかった。また、乳酸菌が検出された B でも、1000 倍試料希釈液のシャーレ 3 枚にコロニーが合計 2 個生えただけであった。

先の塩分の分析の結果、市販の塩麴の塩分は 10% と細菌の増殖を抑えるほど高くはなかった。検出された商品 A、B がアルコール無添加とともに「生塩麴」の商品であることから、少数の細菌が生きていると考えられる。アルコールを添加した塩麴では加えたアルコールと食塩の組み合わせた効果により細菌が死滅したと推測された。また、商品 C と D はアルコールを添加していないにも関わらず、細菌が検出されなかった。これら 2 つの商品は、酵素活性の測定において α -アミラーゼ活性、プロテアーゼ活性ともに低く、加熱処理の可能性が考えられた。なお、多数の一般細菌が検出された商品 A でも耐塩性乳酸菌は少なかった。乳酸菌の中には高い耐塩性を示す *Pediococcus* 属のような乳酸菌もいるが、比較的耐塩性の低い *Leuconostoc* 属のようなものもいる（児玉ら、2008）。麴には高い確率で乳酸菌が存在すると考えられることから、この塩麴の製造に用いた麴には培地に加えた 10% の塩濃度に耐えて増殖する乳酸菌が比較的少なかったと考えられる。

表 2-13. 試料の概要と一般細菌数の平均値 (n = 3)

試料	市販の塩麴	製造会社	一般細菌数 (cfu/g)
A	にいがた塩麴	(株) 竹林味噌醸造所	2.3×10^7
B	塩こうじ	麴屋本舗 法野麴店	1.5×10^6
C	塩麴	マルタ食品 (株)	—
D	やさかの有機塩こうじ	(有) やさか共同農場	—
E	液体塩こうじ	ハナマルキ (株)	—
F	塩麴	石山味噌醤油 (株)	—
G	塩糀	イチビキ (株)	—
H	米こうじの塩だれ	山崎醸造 (株)	—
I	醤油麴	石山味噌醤油 (株)	—

— : 検出されず

表 2-14. 試料の概要と乳酸菌数の平均値 (n = 3)

試料	市販の塩麴	製造会社	乳酸菌数 (cfu/g)
A	にいがた塩麴	(株) 竹林味噌醸造所	1.6×10^7
B	塩こうじ	麴屋本舗 法野麴店	6.7×10^3
C	塩麴	マルタ食品 (株)	—
D	やさかの有機塩こうじ	(有) やさか共同農場	—
E	液体塩こうじ	ハナマルキ (株)	—
F	塩麴	石山味噌醤油 (株)	—
G	塩糀	イチビキ (株)	—
H	米こうじの塩だれ	山崎醸造 (株)	—
I	醤油麴	石山味噌醤油 (株)	—

— : 検出されず

第2節 麴の微生物の分析

1. 実験材料

1-1. 試料

塩川酒造株式会社より分与された精米歩合 65%の酒造好適米「亀の尾」を用いて調製された麴を使用した。

1-2. 試薬

塩化ナトリウム	和光純薬株式会社
カビサイジン	和光純薬株式会社
エタノール（特級）	和光純薬株式会社
普通ブイヨン	栄研化学株式会社
M.R.S. ブイヨン	関東化学株式会社
寒天	和光純薬株式会社
ブロモクレゾールパープル	ナカライテスク株式会社

2. 実験方法

○試薬の調製

・生理食塩水（希釈用）

塩化ナトリウム 8.5 g を脱塩水 1 L に溶解し、オートクレーブに 121℃で 15 分間滅菌した。

・10 mg 力価/mL カビサイジン溶液

100 mg 力価のカビサイジンをエタノール 10 mL に溶解した。

・普通ブイヨン寒天培地（一般細菌用）

普通ブイヨン 1.8 g にカビサイジン溶液 1 mL と脱塩水 100 mL を加えて溶解後、寒天 1.2 g と混和しオートクレーブで 121℃、15 分間滅菌した。固化した寒天培地は加熱して溶解し、50～60℃に冷まして使用した。

・ **MRS 寒天培地**（好気性乳酸菌と嫌気性乳酸菌の分析用）

MRS ブイヨン 5.2 g とプロモクレゾールパープル (BCP) 4 mg を分取し、これにカビサイジン溶液 1 mL と脱塩水 100 mL を加えて溶解した。溶解後、寒天 1.2 g と混和し、オートクレーブで 121℃、15 分間滅菌した。固化した寒天培地は加熱して溶解し、50～60℃に冷まして使用した。

・ **食塩添加 MRS 寒天培地**（好気性耐塩性乳酸菌と嫌気性耐塩性乳酸菌の分析用）

MRS ブイヨン 5.2 g とプロモクレゾールパープル (BCP) 4 mg、食塩 10 g を分取し、これにカビサイジン溶液 1 mL と脱塩水 100 mL を加えて溶解した。溶解後、寒天 1.2 g と混和し、オートクレーブで 121℃、15 分間滅菌した。固化した寒天培地は加熱して溶解し、50～60℃に冷まして使用した。

○菌液の調製

塩麴 5 g を分取し、100 mL 容メスシリンダーに入れ、生理食塩水を加えて 100 mL に定容した。これをワーリングブレンダー (12 Speed, Oster) に入れ、30 秒間、3 回粉碎し、試料原液とした。試料原液 1 mL と生理食塩水 9 mL を混和し、これを 10^{-1} 液とした。この希釈を順次繰り返し、希釈菌液を調製した。

2-1. 一般細菌数の測定

菌液 1 mL を滅菌シャーレに添加し、50～60℃に冷ました普通ブイヨン寒天培地 15～20 mL を加え十分に混和した。培地が固化した後、シャーレを倒置し、35℃で 48 時間培養した。培養後、目視で数十から数百個のコロニーが生えている希釈倍率のシャーレについてコロニー数を計測し、希釈倍率を考慮して麴中の一般細菌数 (cfu/g : colony forming unit/g) を算出した。

2-2. 好気性乳酸菌の測定

菌液 1 mL を滅菌シャーレに入れ、50～60℃に冷ました MRS 寒天培地 15～20 mL を加え十分に混和した。培地が固化した後、シャーレを倒置し、35℃で 48 時間培養した。培養後、乳酸菌が産生する酸によりコロニー周辺の培地が紫色から黄色に変化しているコロニーを乳酸菌と判断し、そのコロニー数を計

測し、希釈倍率を考慮して麴中の好気性乳酸菌数 (cfu/g) を算出した。

2-3. 好気性耐塩性乳酸菌の測定

菌液 1 mL を滅菌シャーレに入れ、50～60℃に冷ました食塩添加 MRS 寒天培地 15～20 mL を加え十分に混和した。培地が固化した後、シャーレを倒置し、35℃で 48 時間培養した。培養後、乳酸菌が産生する酸によりコロニー周辺の培地が紫色から黄色に変化しているコロニーを乳酸菌と判断し、そのコロニー数を計測し、希釈倍率を考慮して麴中の好気性乳酸菌数 (cfu/g) を算出した。

2-4. 嫌気性乳酸菌の測定

菌液 1 mL を滅菌シャーレに入れ、50～60℃に冷ました MRS 寒天培地 15～20 mL を加え十分に混和した。培地が固化した後、シャーレを倒置し、アネロパック嫌気（三菱ガス化学）とともに密閉型角形ジャーに入れ、35℃で 48 時間培養した。培養後、乳酸菌が産生する酸によりコロニー周辺の培地が紫色から黄色に変化しているコロニーを乳酸菌と判断し、そのコロニー数を計測し、希釈倍率を考慮して麴中の嫌気性乳酸菌数 (cfu/g) を算出した。

2-5. 嫌気性耐塩性乳酸菌の測定

菌液 1 mL を滅菌シャーレに入れ、50～60℃に冷ました食塩添加 MRS 寒天培地 15～20 mL を加え十分に混和した。培地が固化した後、シャーレを倒置し、アネロパック嫌気（三菱ガス化学）とともに密閉型角形ジャーに入れ、35℃で 48 時間培養した。培養後、乳酸菌が産生する酸によりコロニー周辺の培地が紫色から黄色に変化しているコロニーを乳酸菌と判断し、そのコロニー数を計測し、希釈倍率を考慮して麴中の嫌気性乳酸菌数 (cfu/g) を算出した。

3. 実験結果および考察

日本酒用の麴の細菌数と乳酸菌数を測定した。なお、使用した麴は調製翌日に分与され、速やかに細菌の分析に使用した。表 2-15 に示す通り、使用した麴には 6.4×10^7 cfu/g の細菌が検出された。また、好氣的条件で増殖する乳酸菌を測定したところ 1.6×10^5 cfu/g の乳酸菌が検出された。しかし、10%の食塩を添加した培地では乳酸菌の増殖は見られず、また嫌氣的条件下で増殖する乳酸菌も見いだすことはできなかった。

使用した麴では好気性乳酸菌しか検出されなかった。乳酸菌には好氣的な環境で良く増殖する好気性乳酸菌と嫌氣的な環境で良く増殖する嫌気性乳酸菌がある。前者としては植物由来の乳酸菌が多く、後者は動物由来の乳酸菌が多い（上野ら、2011）。麴は好氣的な環境で製造され、日本酒の原料である米は植物性の食材である。麴を製造する室（むろ）では長年米を原料に麴が作られてきており、米を栄養源として生育しやすい好気性乳酸菌が蔵付きの微生物として多数存在すると考えられる。最近では手間と時間がかかるため乳酸を添加した酒造りが一般的であり、蔵付きの乳酸菌を活かした生酏作りはほとんど行われなくなったが、生酏作りでは乳酸球菌 *Leuconostoc mesenteroides* や乳酸桿菌 *Lactobacillus sakei* が増殖して乳酸を産生し、野生酵母を含めた雑菌が淘汰されると考えられている（児玉ら、2008）。これらの乳酸菌の食塩耐性は比較的 low、食塩濃度が 3%以上になると生育が著しく抑制される。今回の実験では乳酸菌の同定は行わなかったが、検出された乳酸菌が好気性かつ低耐塩性であり、これらの乳酸菌と性質が似ているため、類似するグループの乳酸菌であるかもしれない。乳酸菌の同定は rDNA の塩基配列を調べることで可能であるため（森、1997）、今後の研究を期待したい。

表 2-15 日本酒用米麴の細菌の分析

		菌数 (cfu/g)
一般細菌		6.4×10^7
乳酸菌	好気性乳酸菌	1.6×10^5
	好気性耐塩性乳酸菌	—
	嫌気性乳酸菌	—
	嫌気性耐塩性乳酸菌	—

—：検出されず

第3節 自家製塩麴の分析

1. 実験材料

1-1. 試料

味噌・醤油用の米麴は、山崎醸造株式会社より分与された生麴を用いた。

味噌・醤油用の麦麴は、株式会社ますやみそより販売されている乾燥麴を用いた。

日本酒用の米麴は第2章と同じ塩川酒造株式会社から分与されたものを用いた。

1-2. 試薬

・塩麴の調製

塩化ナトリウム

財団法人塩事業センター

・糖の定量

エタノール（糖の抽出用）

和光純薬株式会社

アセトニトリル（HPLC 用）

Merck Millipore

グルコース（特級）

和光純薬株式会社

マルトース（特級）

和光純薬株式会社

・L-グルタミン酸含量の測定

ヤマサ L-グルタミン酸測定キット II

ヤマサ醤油株式会社

・α-アミラーゼ活性の測定

酢酸（特級）

ナカライテスク株式会社

塩化ナトリウム

和光純薬株式会社

α-アミラーゼ活性測定キット

Kikkoman Corp.

・プロテアーゼ活性測定

リン酸二水素カリウム

和光純薬株式会社

リン酸水素二ナトリウム・12水和物

和光純薬株式会社

水酸化ナトリウム（粒状）

和光純薬株式会社

りん酸	和光純薬株式会社
カゼイン（ハマルステン氏法）	和光純薬株式会社
トリクロロ酢酸	ナカライテスク株式会社
炭酸ナトリウム（無水）	和光純薬株式会社
フェノール試薬	関東化学株式会社

2. 実験方法

2-1. 塩麴の調製

○調製方法

塩麴を作る時の原料の配合割合は本により異なる。本実験では「麴のレシピ」（おの、2010）を参考に塩麴と食塩と純水を 100:30:135（w/w/w）の割合で使用し、塩麴を調製した。麦塩麴には乾燥麦麴を使用したため、麦麴の水分含量を調べ、加える麦麴と水の量を調節した。

○調製操作

麴 10 g を手袋した手でこすりパラパラの状態にした後、ボウルにパラパラになった麴と塩 3 g を入れ、よく混ぜ合わせた。また、純水 13.5 mL を加え、さらに良く混ぜ合わせた。混合物を 1 L 容のネジロカラス瓶に入れ軽くフタをした。これを湿度 70%、温度 25℃の恒温器（ヤマト科学）に入れ、9 日間、毎日 1 回かき混ぜながら発酵させた。

2-2. 測定方法

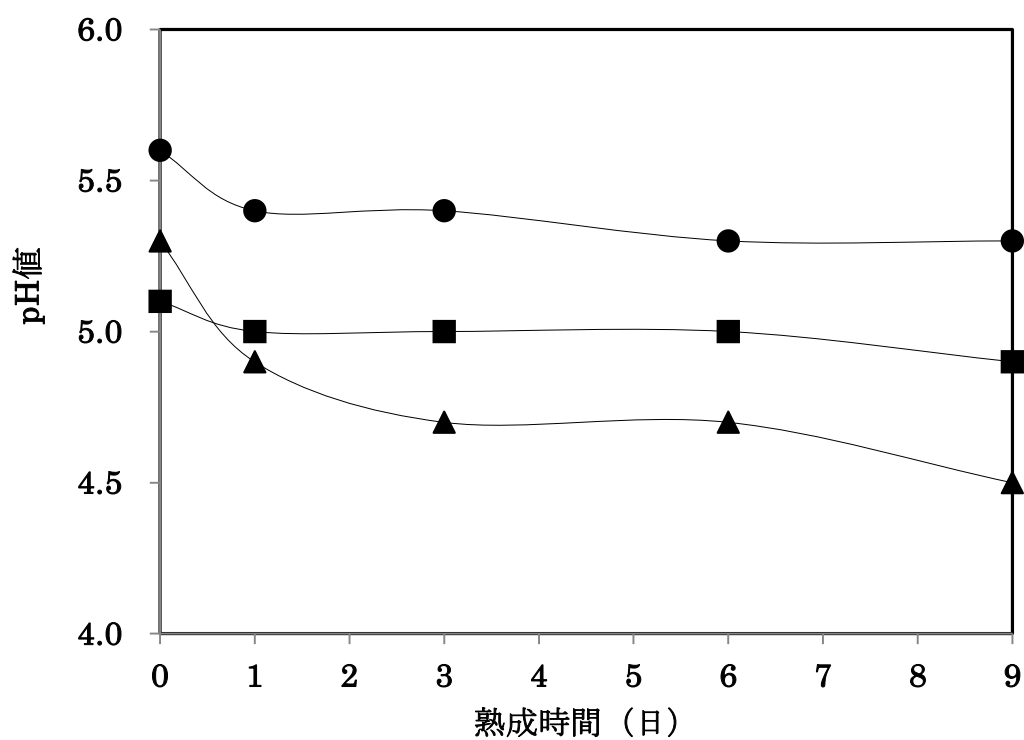
pH、糖の含量、L-グルタミン酸含量、 α -アミラーゼ活性、プロテアーゼ活性の測定は第 2 章の第 1 節を参照した。

3. 結果および考察

3-1. 塩麴の発酵過程における pH の変化

培養開始前の pH は味噌・醤油用米麴 5.6、麦麴 5.1、日本酒用米麴 5.3 であり、すでに弱酸性を呈していた（図 2-13）。培養初期に pH の低下が大きく、その後の低下は緩やかであった。最終的に日本酒用米麴の pH の低下が最も大きく、9 日目で 4.5 まで低下した。

発酵過程での pH の低下は麴に含まれる乳酸菌が乳酸を生成することによるものと考えられる。しかし、第 2 節の分析結果で示された通り、麴には耐塩性乳酸菌が含まれておらず、培養時間の経過に伴い、食塩の微生物の繁殖抑制と乳酸菌が分泌した乳酸の濃度が上がることで乳酸菌自体が死滅していくため、pH の低下が緩やかになると推測される。また、日本酒用の米麴は他に比べ新鮮なものを用いたため乳酸菌の生育が良く、培養初期の pH の低下が大きかったと考えられる。



●, 味噌・醤油用米麴; ■, 味噌・醤油用麦麴; ▲, 日本酒用米麴

図 2-13. 調製した塩麴の発酵過程における pH の変化

表 2-16. 調製した塩麴の発酵過程における pH の変化

熟成時間 (日)	0	1	3	6	9
味噌・醤油用米塩麴	5.6	5.4	5.4	5.3	5.3
味噌・醤油用麦塩麴	5.1	5.0	5.0	5.0	4.9
日本酒用米麴	5.3	4.9	4.7	4.7	4.5

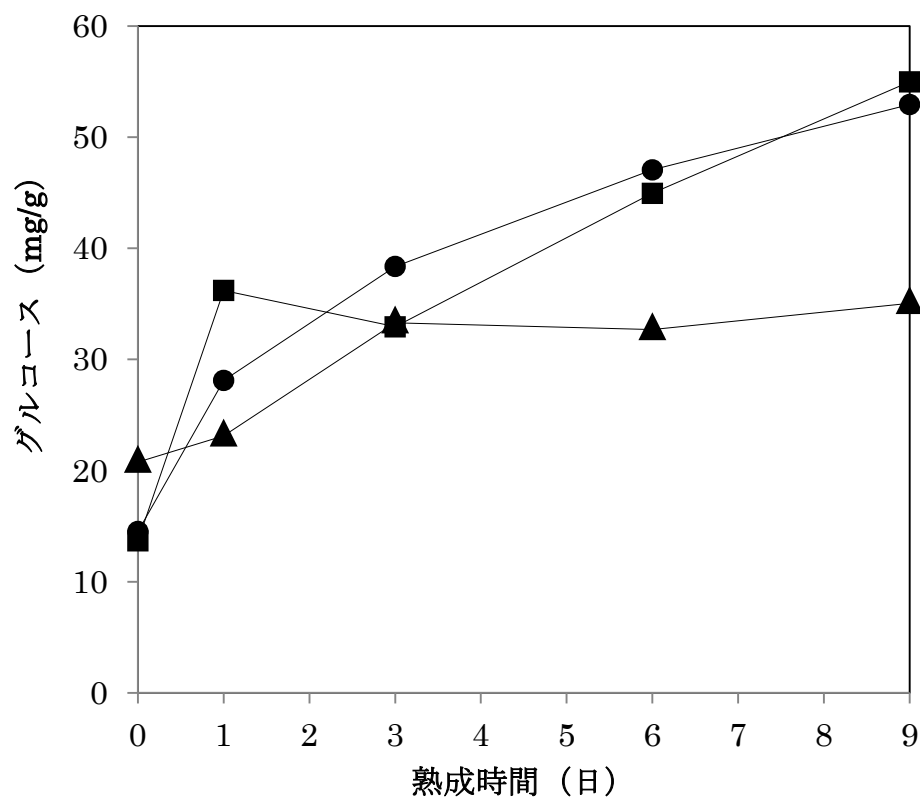
数値は平均値 (n = 3) を示している。

3-2. 塩麴の発酵過程における糖含量の変化

塩麴中のグルコースおよびマルトース含量の発酵過程における変化を調べた。グルコース含量は発酵に伴い培養 9 日目まで次第に増加した (図 2-14)。増加したグルコース量は味噌・醤油用米麴と麦麴はほぼ同じであったが、日本酒用米麴では少なく、他の半分以下であった。

マルトース含量も発酵時間とともに増加する傾向にあったが、麦麴を除けばその増加は顕著なものではなかった (図 2-15)。

グルコースとマルトースの増加の傾向が異なったが、これはそれらの生成に関わる酵素 (グルコアミラーゼと β -アミラーゼ) が違うことに起因すると推測された。



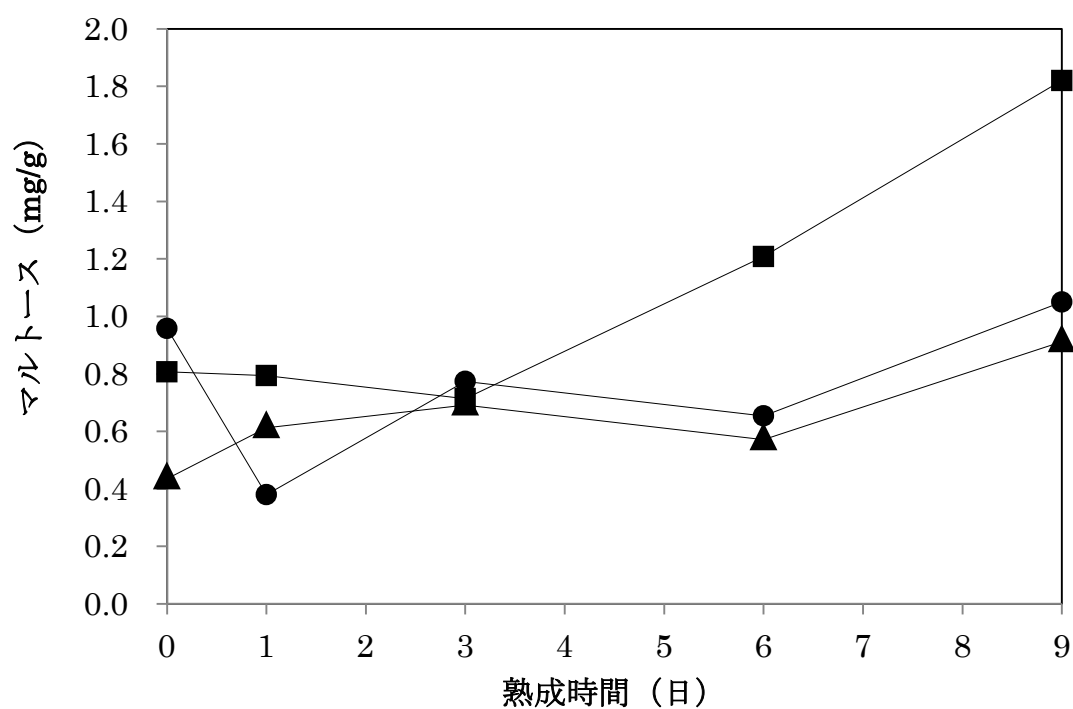
●, 味噌・醤油用米麴；■, 味噌・醤油用麦麴；▲, 日本酒用米麴

図 2-14. 調製した塩麴の発酵過程におけるグルコース量の変化

表 2-17. 調製した塩麴の発酵過程におけるグルコース量の変化

熟成時間（日）	0	1	3	6	9
味噌・醤油用米塩麴	14.5	28.1	38.4	47.1	52.9
味噌・醤油用麦塩麴	13.7	36.2	32.9	44.9	55.0
日本酒用塩米麴	20.8	23.1	33.3	32.7	35.0

数値は平均値（n = 3）を示している。



●，味噌・醤油用米麴；■，味噌・醤油用麦麴；▲，日本酒用米麴

図 2-15. 調製した塩麴の発酵過程におけるマルトース量の変化

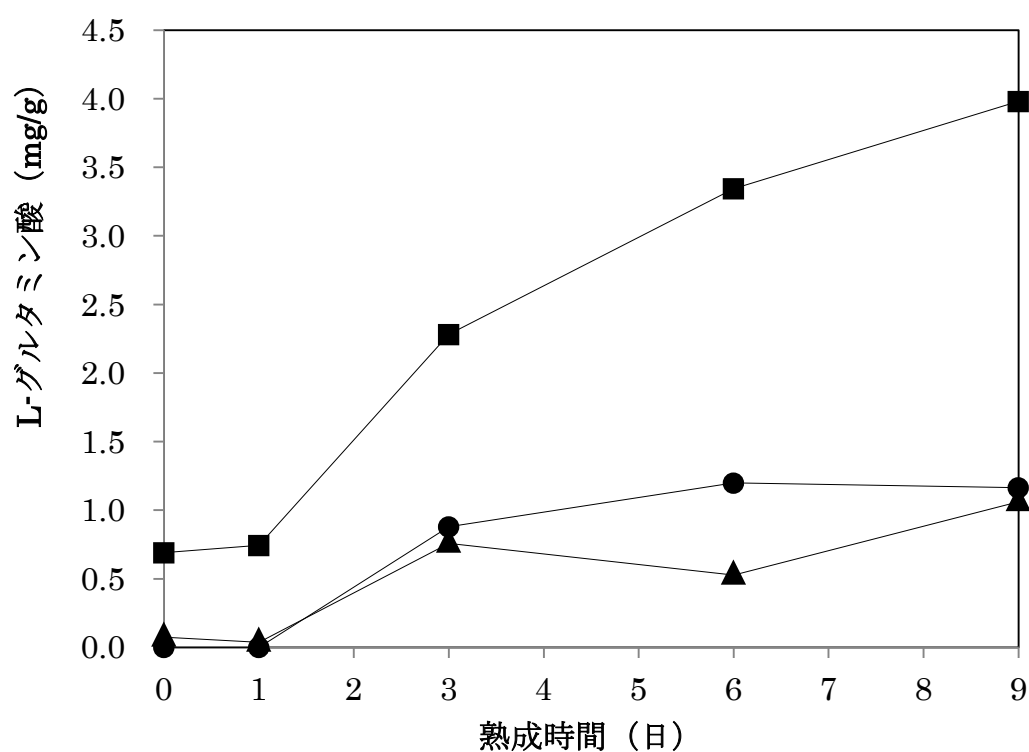
表 2-18. 調製した塩麴の発酵過程におけるマルトース量の変化

熟成時間 (日)	0	1	3	6	9
味噌・醤油用米塩麴	1.1	0.4	0.8	0.7	1.1
味噌・醤油用麦塩麴	0.8	0.8	0.	1.2	1.8
日本酒用塩米麴	0.4	0.6	0.7	0.6	0.9

数値は平均値 (n = 3) を示している。

3-3. 塩麴の発酵過程における L-グルタミン酸含量の変化

発酵過程における L-グルタミン酸含量の変化を図 2-16 に示した。L-グルタミン酸は 3 つの麴のいずれにおいても発酵に伴い増加した。しかし、増加の程度は発酵後半になるに従い緩やかになった。3 つの麴の増加量を比較すると、麦麴における増加が著しく多く、培養 9 日目では他の 4 倍近い量に増加した。



●, 味噌・醤油用米麴; ■, 味噌・醤油用麦麴; ▲, 日本酒用米麴

図 2-16. 調製した塩麴の発酵過程における L-グルタミン酸量の変化

表 2-19. 調製した塩麴の発酵過程における L-グルタミン酸量の変化

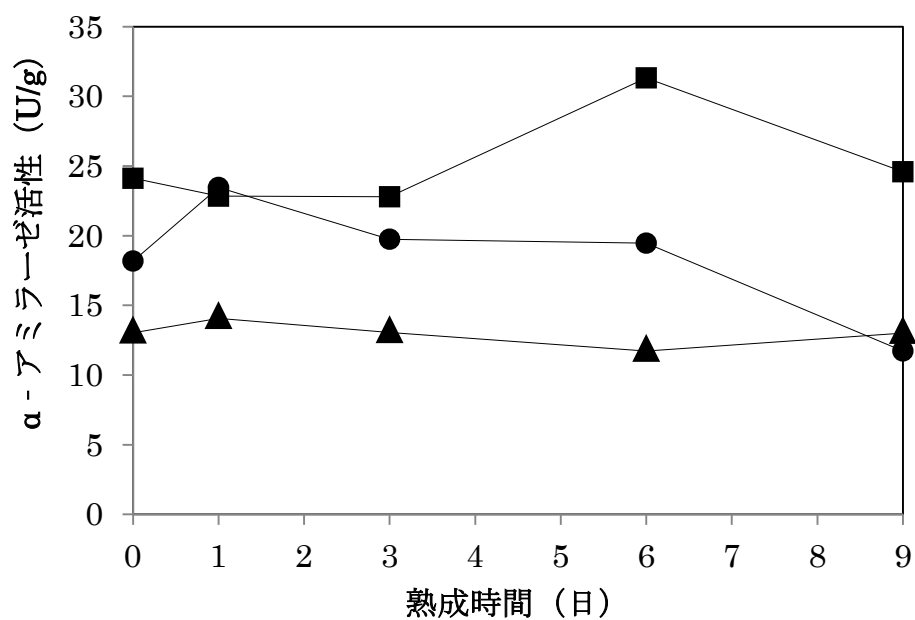
熟成時間 (日)	0	1	3	6	9
味噌・醤油用米塩麴	0.0	0.0	0.9	1.2	1.2
味噌・醤油用麦塩麴	0.7	0.7	2.3	3.3	4.0
日本酒用米塩麴	0.1	0.0	0.8	0.5	1.1

数値は平均値 (n = 3) を示している。

3-4 塩麴の発酵過程における α -アミラーゼ活性の変化

α -アミラーゼ活性とプロテアーゼ活性の変化を図 2-17 と図 2-18 に示した。培養日数により若干の増減はあるものの、3 つの麴を用いて調製した塩麴の α -アミラーゼ活性とプロテアーゼ活性はともに、培養期間を通じ大きな変化はなく、その活性は比較的安定していた。和久（1993）は 50 日の味噌の仕込み期間中の各種酵素活性を測定し、糖質分解酵素群、タンパク質分解酵素群の活性がほとんど変化しないと報告している。この実験で使われた味噌の塩分濃度 12.5% は、本実験の塩麴の塩分濃度とほぼ同じであることから、この程度の濃度の食塩は麴菌が産生する糖質分解酵素やタンパク質分解酵素の活性に影響をおよぼさないことが示された。

また、3 つの麴の α -アミラーゼ活性は、味噌・醤油用麦麴が一番高く、日本酒用米麴が最も低かった。このアミラーゼ活性の大小は、生成するグルコース量と正の相関を示した。また、プロテアーゼ活性についても、3 つの麴のうち味噌・醤油用麦麴の活性が一番高く、それに相応して L-グルタミン酸の増加量も最も多かった。



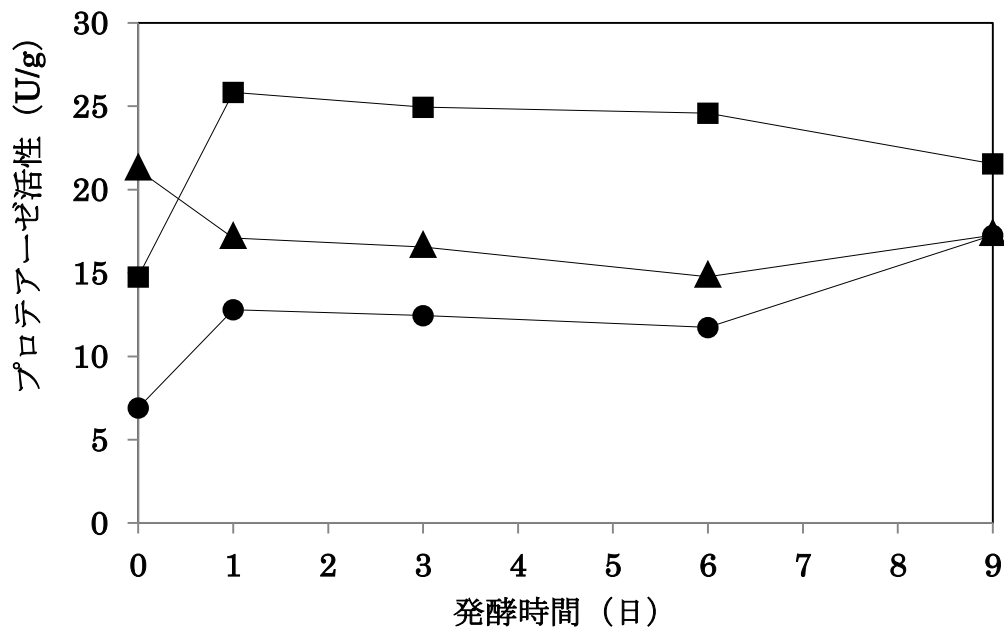
●, 味噌・醤油用米麴 ; ■, 味噌・醤油用麦麴 ; ▲, 日本酒用米麴

図 2-17. 調製した塩麴の発酵過程における α-アミラーゼ活性の変化

表 2-20. 調製した塩麴の発酵過程における α-アミラーゼ活性の変化

熟成時間 (日)	0	1	3	6	9
味噌・醤油用米塩麴	18.2	23.5	19.8	19.5	11.7
味噌・醤油用麦塩麴	24.1	22.8	22.8	31.3	24.6
日本酒用米塩麴	13.0	14.1	13.1	11.7	13.0

数値は平均値 (n = 3) を示している。



●, 味噌・醤油用米麴 ; ■, 味噌・醤油用麦麴 ; ▲, 日本酒用米麴

図 2-18. 調製した塩麴の発酵過程におけるプロテアーゼ活性の変化

表 2-21. 調製した塩麴の発酵過程におけるプロテアーゼ活性の変化

熟成時間 (日)	0	1	3	6	9
味噌・醤油用米塩麴	6.9	12.8	12.4	11.7	17.3
味噌・醤油用麦塩麴	14.8	25.8	24.9	24.6	21.6
日本酒用米塩麴	21.2	17.1	16.6	14.8	17.3

数値は平均値 (n = 3) を示している。

要約

日本は世界でも平均寿命が長く、長寿の国として知られている。そして長寿を支える要因のひとつとして日本食がある。日本食の中でも納豆、味噌、醤油等の植物性発酵食品は欧米の発酵食品にはない成分を含むと考えられ、様々な研究が行われている。米、麦、大豆等の穀類に麹菌を繁殖させた「麹」は日本の伝統的な発酵食材のひとつであり、この麹を利用した「塩麹」が近年注目を集めている。塩麹は、麹に塩と水を混ぜて発酵・熟成させたものであり、古来より漬物床として用いられてきたが、麹特有のうま味や風味を持つ調味料としての利用が紹介されて以来、人気を集めている。塩麹には、麹に含まれる麹菌や乳酸菌、その他微生物の菌体成分や様々な代謝物が含まれると考えられ、その健康増進効果も塩麹が注目される理由のひとつである。

日本では、様々な塩麹が多くのメーカーから製造・販売されている。形状も粥状、ペースト状のものから液体状、粉末状のものまで様々であり、原料も麹と塩以外のものを使用した商品等、多様化している。そこで、本章では塩麹を科学的に正しく理解し、現状を把握することを目的に研究を行った。最初に、9種類の市販の塩麹関連商品の成分を分析した。次に、塩麹の微生物学的分析がほとんどなされていないことから、塩麹の微生物源となる麹の一般細菌および乳酸菌を分析した。最後に、味噌・醤油用の米麹と麦麹および清酒用米麹を原料として実際に塩麹を調製し、発酵過程における成分変化を調べた。

スーパー等の小売店で9種類の塩麹関連商品を購入した。その包装形態には、瓶詰め、PET ボトル詰め、自立型パウチ詰めのものがあり、内容物も麹の粒を残した粥状3品、粒のないペースト状5品、固形分を含まない液状1品と商品により異なっていた。原料も麹と塩以外に、米や昆布エキス、調味料、酢、増粘剤、アルコールを使用したものがあり、さらに醤油麹では、醤油、醤油諸味、みりんが使用されていた。商品の水分含量は38.1～63.4%と幅が広く、液状の塩麹の水分は意外にも53.3%と少なかったが、ペースト状のものでも40～58%と様々であった。塩分濃度は8.4～12.9%と若干差があるが、平均値として約10%程度であった。また、pHは4.7～5.3と著しい違いはなかった。アルコール濃度は商品のラベルにアルコール(酒精)添加を示した商品のみ検出され、平均して約3%であった。微生物の生育を抑制する十分な濃度ではないため、塩分濃度やpH値などの組み合わせにより微生物の繁殖を抑制する効果をしていると考えられる。塩麹の呈味成分として糖とグルタミン酸を定量した。HPLCにより塩麹中の糖を分析した結果、いずれの塩麹でも含まれる少糖の大部分はグルコースであり、グルコースの存在が塩麹に強い甘味を与えていると考えられた。それ以外では少量のマルトースが含まれることがわかった。グルコース

は 2.77~5.23 mg/g、マルトースは 0.04~1.13 mg/g と幅があった。また、これらの少糖含量と糖質分解酵素である糖化力活性や α -アミラーゼ活性相関が見られた。したがって、麹菌の分泌する酵素によって原料の米デンプンが分解され少糖が生成したと推測される。グルタミン酸含量は 0.11~2.2 mg/g と商品により差があった。グルタミン酸が多い商品 H、I には昆布エキス、醸造酢や醤油、醤油諸味などグルタミン酸を豊富に含む添加物が加えられていることに影響されたと考えられる。

次に塩麴の原料となる麴中の細菌を調べた。日本酒用米麴の一般細菌数を測定した結果、 6.4×10^7 cfu/g の菌が検出され、麹菌以外にも多数の細菌が含まれることがわかった。また、 1.6×10^5 cfu/g の乳酸菌が検出されたが、それらは全て好気性であるが耐塩性を持たず、塩麴中では増殖できないことが示唆された。

味噌醤油用米麴と麦麴、日本酒用米麴を原料に、麴／塩／水を 100 : 30 : 135 の割合で配合し、25℃で 9 日間発酵させ塩麴を調製した。発酵過程における呈味成分を分析したところ、グルコースとグルタミン酸ともに発酵期間とともに増加した。麴の種類によるグルコース増加量の違いは見られなかったが、グルタミン酸は麦麴において顕著に増加し、これは原料である麦のタンパク質含量が多いことおよび麦麴が米麴に比べてプロテアーゼ活性が高いことによると考えられた。また、発酵期間中の α -アミラーゼと中性プロテアーゼ活性に大きな変動はなかった。

以上、市販の塩麴と研究室で調製した塩麴の成分を分析し、その特性を明らかにした。商品により呈味成分の量や酵素活性は大きく異なっていた。塩麴の利用法として肉を浸け置くと軟らかくなることがあるが、プロテアーゼ活性の極めて低い商品にはそのような効果は期待できない。市販塩麴に一定の規格を定める等の対応が必要であろう。

第 3 章 3 種の麹菌を利用して糠層や外皮を含む穀類で調製した麴と塩麴の抗酸化活性

緒言

穀類の加工工程で廃棄されるヌカやフスマなどの外皮には、フェルラ酸やフィチン酸塩、アラビノキシラン、 β -グルカンなどの機能性成分が豊富に含まれている。しかし、その多くは不溶性であり、その機能の活用には可溶化による利用効率の向上が不可欠である。

一方、古くから発酵食品の製造に使用されている麹菌は、高い酵素生産性や物質代謝能力を持つ微生物である。その物質代謝能力を利用し、穀類の外皮に含まれる不溶性の機能性成分を可溶化できれば、穀類の機能を十分活用した新たな穀類加工食品の開発が可能になる。

そこで本章では、糠層を含む米と外皮を含む小麦および大麦の粒状穀類を 3 種の麹菌で発酵させることで調製した麴と塩麴の抗酸化能を評価し、代表的な抗酸化成分であるポリフェノール含量を測定した。また、穀類に含まれる代表的なポリフェノールの一種であるフェルラ酸の含量も合わせて測定した。

第 1 節 3 種の麹菌を利用して玄米で調製した玄米麹と玄米塩麹の抗酸化活性

1. 実験材料

1-1. 試料

玄米は市販の新潟県産コシヒカリを使用し、白米は購入した玄米を精米機 (MR-E520W、ツインバード工業) で精米歩合 90% に精米して用いた (図 3-1)。

麹菌は *Aspergillus oryzae* (AO、オリゼ)、*Aspergillus sojae* (AS、ソーヤ)、*Aspergillus luchuensis* (AL、リュチュエンシス) の 3 種を使用し、オリゼは株式会社菱六の長白菌の種麹、ソーヤは日本醸造工業株式会社のソーヤ菌の種麹、リュチュエンシスは株式会社樋口松之助商店の黒麹菌の種麹を入手して用いた (図 3-1、表 3-1)。



玄米



長白菌(オリゼ)



ソーヤ菌(ソーヤ)



黒麹菌(リュチュエンシス)

図 3-1. 玄米および麹菌商品の写真

表 3-1. 麹菌の詳細情報

商品名	製造会社名	学名	日本語読み	略称
長白菌	(株)菱六	<i>Aspergillus oryzae</i>	オリゼ	AO
ソーヤ菌	日本醸造工業(株)	<i>Aspergillus sojae</i>	ソーヤ	AS
黒麹菌	(株)樋口松之助商店	<i>Aspergillus luchuensis</i>	リュチュエンシス	AL

1-2. 試薬

・塩麴の調製

塩化ナトリウム

和光純薬株式会社

・糖化力測定

酢酸ナトリウム（無水）

和光純薬株式会社

酢酸（特級）

ナカライテスク株式会社

塩化ナトリウム

和光純薬株式会社

糖化力測定キット

Kikkoman Corp.

・抗酸化活性の測定

アセトン（特級）

関東化学株式会社

1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル（DPPH）

和光純薬株式会社

メタノール（鹿一級）

関東化学株式会社

・ポリフェノール含量の測定

アセトン（特級）

関東化学株式会社

メタノール（鹿一級）

関東化学株式会社

フェノール試薬

関東化学株式会社

・フェルラ酸含量の測定

アセトン（特級）

和光純薬株式会社

塩酸（特級）

和光純薬株式会社

ヘキサン（特級）

ナカライテスク株式会社

ジエチルエーテル（鹿一級）

関東化学株式会社

酢酸エチン（特級）

和光純薬株式会社

酢酸（特級）

関東化学株式会社

水酸化ナトリウム

和光純薬株式会社

アセトニトリル（HPLC 用）

メルク株式会社

フェルラ酸

LKT Laboratories, Inc.

・FEA 活性の測定

アセトン

和光純薬株式会社

エタノール（特級）

和光純薬株式会社

シュウ酸（特級）

和光純薬株式会社

水酸化ナトリウム	和光純薬株式会社
メタノール (特級)	和光純薬株式会社
ギ酸エチル (一級)	和光純薬株式会社
ギ酸 (特級)	和光純薬株式会社
フェルラ酸	LKT Laboratories 株式会社
硫酸 (特級)	和光純薬株式会社
重クロム酸カリウム	Strem Chemicals, Inc.
4-モルホリンメタンスルホン酸 (Mes)	和光純薬株式会社
N, N'-ジメチルホルムアミド (特級)	和光純薬株式会社
CBB Dye Reagent Concentrate	BIO-RAD

・食塩の FEA に対する影響

アセトン	和光純薬株式会社
エタノール (特級)	和光純薬株式会社
シュウ酸 (特級)	和光純薬株式会社
水酸化ナトリウム	和光純薬株式会社
メタノール (特級)	和光純薬株式会社
ギ酸エチル (一級)	和光純薬株式会社
ギ酸 (特級)	和光純薬株式会社
フェルラ酸	LKT Laboratories, Inc.
硫酸 (特級)	和光純薬株式会社
重クロム酸カリウム	Strem Chemicals, Inc.
4-モルホリンメタンスルホン酸 (Mes)	和光純薬株式会社
N, N'-ジメチルホルムアミド (特級)	和光純薬株式会社
塩化ナトリウム	和光純薬株式会社

2. 実験方法

2-1. 麴と塩麴の調製

○麴の調製

麴は次の通り調製した。玄米または白米 10 g を洗淨後、3 時間室温で水に浸漬した。浸漬した米は電気蒸し器（ウルトラコンパクト II、グループセブジャパン）で 60 分間蒸煮後、放冷し、100 mL ビーカーに移した。これに 30 mg の種麴を 3 回に分けて振り混ぜ、恒温器 IG420（ヤマト科学）中で 37℃、湿度 70% で 7 日間発酵させた。

○塩麴の調製

塩麴は麴、食塩、水を 100 : 30 : 135（w/w/w）の割合で混合し、毎日 1 回混ぜながら上記の恒温器中で 25℃、湿度 70% で 7 日間発酵させた。

2-2. 糖化力測定

第 2 章の“糖化力測定”を参照した。

2-3. 抗酸化活性の測定

麴および塩麴は DPPH ラジカル消去活性によりその抗酸化活性を評価した。DPPH ラジカル消去活性は増田らの方法（増田ら、2002）に準じ、以下のよう
に測定した。

2-3-1. 実験操作

○試薬の調製

- 80%アセトン

400 mL100%アセトンに超純水を加えながら 500 mL に定容した。

- 1mM DPPH 溶液

DPPH 19.716 mg を 50 mL メタノールに溶かした。DPPH は自然に分解しやすいので、50 mL の遠心管に入れ、アルミホイルで巻いて−80℃で保存して用いた。

○試料の調製

凍結乾燥試料 100 mg を 10 mL 容ガラス製遠心管に取り、80%アセトン 7 mL を加え、10 分間室温で振とうした。その後 1,700×g、5 分間遠心分離し、上清を回収した。残渣に再び 80%アセトン 7 mL を加えて同様の抽出操作を 2 回繰り返した。3 回分の抽出液を集め、メスフラスコを使用し 80%アセトンで 25 mL に定容した。

○測定方法

80%アセトン抽出試料 (s) 200 μL を試験管にとり、メタノール 1,600 μL、メタノールに溶かした 1 mM DPPH 200 μL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、暗所、室温で 30 分間放置した。その後溶液の 517 nm における吸光度 (E) を U-2900 Spectrophotometer (日立製作所) で測定した。試料ブランク (b) として 1 mM DPPH の代わりにメタノールを加えたものを、コントロール (c) として試料の代わりに 80%アセトンを加えたものを調製し、同様に測定した。

○活性の算出法

各試料の DPPH ラジカル消去活性は標準物質に水溶液トコフェロールの同族体である Trolox を用いて作成した検量線を利用し、Trolox 相当量として示した。

$$\text{計算式：ラジカル消去活性} = E_c - E_s + E_b \quad \dots \textcircled{1}$$

検量線の式： $Y=2.4837X+0.0024$ …②

Ec: コントロールの吸光度 Es: サンプルの吸光度 Eb: ブランクの吸光度
X: Trolox 換算試料濃度 (mM) Y: ラジカル消去活性

上記式①で算出したラジカル消去活性を式②に代入して Trolox 換算濃度を求めた後、1000/4 を乗じた乾燥重量当たりの Trolox 換算ラジカル消去活性 ($\mu\text{mol Trolox eq./g d.w.}$) は次式により算出した。

$$\text{DPPH ラジカル消去活性 } (\mu\text{mol Trolox eq./g d.w.}) = \frac{(\text{Ec}-\text{Es}+\text{Eb}-0.0024) \times 1000}{9.9348}$$

2-4. ポリフェノール含量の測定

麴および塩麴のポリフェノール含量はフォリン・シオカルト法 (Folin et al., 1927) を津志田の方法 (2000) に適用して、以下のように測定した。

2-4-1. 実験操作

○試薬の調製

・80%アセトン

400 mL 100%アセトンに超純水を加えながら 500 mL に定容した。

・1 N フェノール溶液

市販の 2 N フェノールを 2 倍希釈した。

・1 M 炭酸ナトリウム溶液

5.300 g 炭酸ナトリウムを 50 mL 超純水に溶かした。

○試料の調製

試料液は抗酸化活性測定用試料液の調製を参照した。

○測定方法

80%アセトン抽出試料液 (s) 200 μ L を 1.5 mL 容プラスチック製遠心チューブにとり、1 M フェノール試薬 200 μ L を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し 3 分間放置した。その後 1 M 炭酸ナトリウム 200 μ L を加えて攪拌し、暗所、室温で 1 時間放置した。1 時間後、遠心機で 1,700 \times g、5 分間遠心分離し、上清の 760 nm における吸光度 (E) を U-2900 Spectrophotometer (日立製作所) を用いて測定した。試料ブランク (b) としてフェノール試薬の代わりに脱塩水を加えたものを、コントロール (c) として試料の代わりに 80%アセトンを加えたものを調製し、同様に測定した。

○活性の算出法

また、ポリフェノール濃度は標準物質に没食子酸を用いて作成した検量線を利用し、没食子酸相当量として示した。

$$\text{計算式：試料補正值} = E_s - E_b - E_c \quad \dots \textcircled{1}$$

$$\text{検量線の式：} Y = 8.0062X \quad \dots \textcircled{2}$$

E_c : コントロールの吸光度 E_s : サンプルの吸光度 E_b : ブランクの吸光度
 X : 没食子酸換算濃度 (mM) Y : 試料補正值

上記式①で算出した試料補正值を式②に代入し、ポリフェノール濃度を求めた後、1000/4 を乗じて乾燥重量当たりのポリフェノール含量 (μ mol Gallic acid eq./g d.w.) を算出した。

$$\text{ポリフェノール含量 (}\mu\text{mol Gallic acid eq./g d.w.)} = \frac{(E_s - E_b - E_c) \times 1000}{32.0248}$$

2-5. フェルラ酸含量の測定

玄米、白米、それらを原料に調製した麴および塩麴に含まれる遊離型フェルラ酸は樋口らの方法 (樋口ら、2008) を準じ、一部改変して次のように定量し

た。

2-5-1. 実験操作

○試薬の調製

・ 80%アセトン

400 mL 100%アセトンに超純水を加えながら 500 mL に定容した。

・ 2 N 水酸化ナトリウム

80.0 g 水酸化ナトリウムを超純水に溶解し、1 L に定容する。

・ 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0)

① 50 mM 酢酸溶液： 4 ml 市販酢酸に超純水を加え、500 ml に定容した。

② 50 mM 酢酸ナトリウム溶液： 2.051 g 酢酸ナトリウムを超純水に溶解して、500 ml に定容した。

③ ①に②を加えながら pH 4.0 に調整した。

・ 6.0 N 塩酸

市販の 12 N 濃塩酸を超純水 1 : 1 で希釈した。

・ ヘキサン

市販のヘキサンをそのまま用いた。

・ ジエチルエーテル/酢酸エチル 1 : 1 (v/v) 溶液

ジエチルエーテル 500 mL に酢酸エチル 500 mL 加え、混和した。

・ 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) /アセトニトリル (1:1,v/v) 溶液

50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 100 mL にアセトニトリル 100 mL 加え、混和した。

・ 標準フェルラ酸 (0.5 µg/µL)

5 mg フェルラ酸を 10 mL 8%アセトンに溶かした。

○試料の調製

凍結乾燥した試料 200 mg に 80%アセトン 15 mL を加え、往復振とう機 PERSONAL-11 (タイテック) により 100 rpm で 1 時間振とうすることで遊離型フェルラ酸を抽出した。この抽出液を 6.0 N 塩酸溶液により酸性 (pH 2.0) とした後、等量のヘキサンを加えて激しく振とうし、1,500×g で 5 分間遠心分離して上層を除くことで洗浄した。この洗浄操作を 5 回繰り返した後、ジエチルエーテルと酢酸エチルの混合液 (1:1, v/v) 10 mL を加えて振とうし、1,500×g で 5 分間遠心分離して上層の有機溶媒層を分取した。この抽出操作を 3 回繰り返して集めた有機溶媒層をロータリーエバポレーターで減圧乾固し、残渣を 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) とアセトニトリルの混合液 (1:1, v/v) 3 mL に溶解した。これを孔径 0.45 μm の親水性 PTFE フィルター (アドバンテック東洋) でろ過し、高速液体クロマトグラフ L-2130 (日立製作所) (HPLC) の試料とした。

○測定方法

HPLC 分析では Inertsil ODS-3 カラム (5 μm 、4.6×250 mm; ジーエルサイエンス) を接続した高速液体クロマトグラフ L-2130 (日立製作所) を用い、カラム温度 40°C で分析した。溶離液は流速 1.0 mL/分で流し、A 液として 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0)、B 液としてアセトニトリルを用い、B 液の濃度を 30 分間で 5% から 50% まで直線的に上昇させた。また、フェルラ酸は UV-VIS 検出器 L-4250 (日立製作所) により 320 nm で検出した。

○フェルラ酸含量の算出法

標準フェルラ酸の面積と試料液の面積から試料液に含むフェルラ酸含量を算出し、さらに、麴や塩麴中のフェルラ酸含量を算出した。

2-6. FEA 活性の測定

フェルロイルエステラーゼ (FEA) の基質であるフェルロイルアラビノフラノース (FAra) の調製および活性測定は McCallum らの方法 (1991) に準じて、次のように測定した。

2-6-1. 実験原理

麹菌が産生する FEA 酵素の作用下、フェルラ酸は FAra とのエステル結合が切断され、遊離される (図 3-2)。

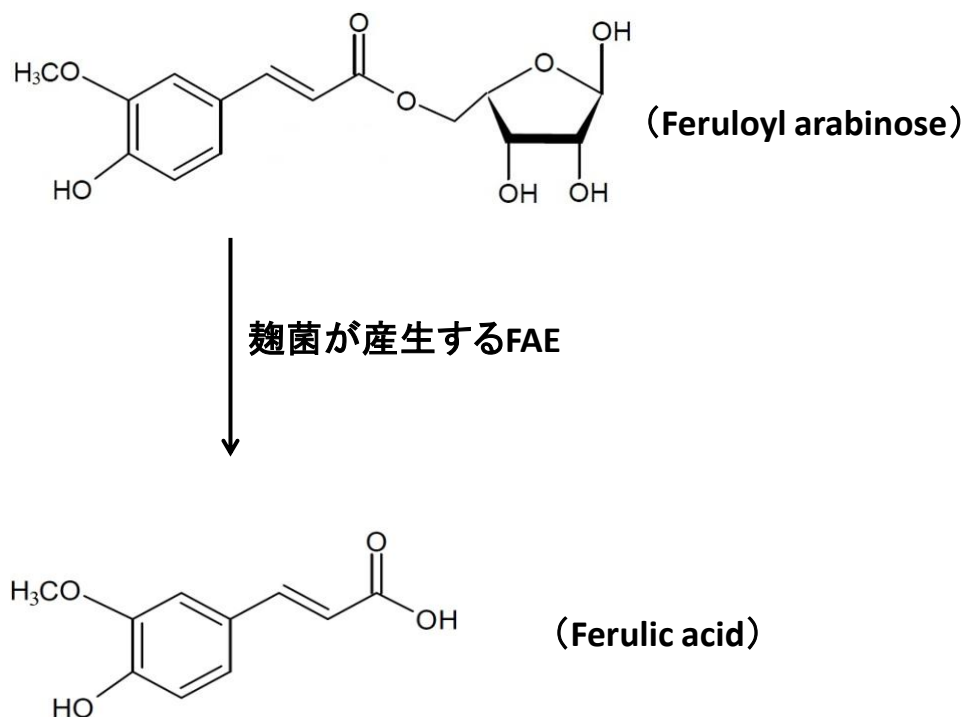


図 3-2. フェルラ酸の溶離

2-6-2. 実験操作

○試薬の調製

- **95%エタノール**

エタノール 95 mL に超純水 5 mL 加え、混和した。

- **アセトン**

市販のアセトンをそのまま用いた。

- **32 mM シュウ酸**

シュウ酸 325.28 mg を 80 mL 超純水に溶かした。

- **水酸化ナトリウム**

5 mg 水酸化ナトリウムを 20 mL 脱塩水に溶解した。

- **50%メタノール**

メタノール 1 L に超純水 1 L 加えて混和した。

- **標準フェルラ酸溶液**

フェルラ酸 1 mg をエタノール 1 mL に溶かした。

- **ギ酸エチル/ギ酸 9/1 (v/v)**

ギ酸エチル 9 mL にギ酸 1 mL 加え、混和した。

- **40%硫酸と 1%重クロム酸カリウム溶液**

硫酸 40 mL に重クロム酸カリウム 1 mL 加えた後、超純水を加えて 100 mL 定容した。

- **50 mM 4-モルホリンメタンスルホン酸 (MES) バッファー (pH 5.5)**

106.63 mg Mes を 3 mL 脱塩水に溶かして、薄い NaOH を加え pH 5.5 に調整し、また超純水を加えながら 10 mL に定量する。

- **30% N, N'-ジメチルホルムアミド**

N, N'-ジメチルホルムアミド 3 mL を超純水 7 mL に溶かした。

○試料の調製

- **酵素液の調製法**

麴 1 g に 50 mM 4-モルホリンメタンスルホン酸 (MES) バッファー (pH 5.5) 6 mL を加えて氷水中で 2 時間振とうし、3,000×g, 5 分間遠心後、上清をガラス繊維濾紙で濾過して得られた濾液を酵素液として使用した。

- **基質液の調製法**

細胞壁成分からのフェルラ酸の遊離に直接関与している酵素は FAE である。そこで 3 種の種麴を用いて調製した玄米麴の FAE 活性を測定した。FAE 活性の測定には酵素の基質となるフェルロイルアラビノフラノース (FAra) が必要で

ある。しかし、FAraは市販されていない。そこで、小麦ふすまを原料に McCallum ら（1991）の方法に従って調製した。フェルラ酸は植物細胞壁のアラビノキシランのアラビノースに結合した形で存在する。最初に、小麦ふすまを 85～90℃の水で 15 分間攪拌した後、大量の水でデカントした。この操作で繰り返し、濁りがなくなるまで洗浄してから、ワットマン No.1 濾紙で濾過した。濾過で得た残留ふすまを残留重さの 10 倍量の 95%エタノールで攪拌し抽出した。次に残量重さの 10 倍量のアセトンで攪拌して抽出した後、風乾した。風乾した小麦ふすまをシュウ酸で 2 時間加熱しながら加水分解し、FAra を含む分解産物を調製した。これを Sephadex LH-20（カラム（GE ヘルスケアライフサイエンス）：φ2.6 cm × 75 cm、遊離液：50%メタノール、流速：30 mL/h）によるゲル濾過で分画し、分画液の 320 nm での吸光度を吸光度測定機（日立 U-2900）で測定した

・TLC 測定法

ゲル濾過で得た濾液を薄層クロマトグラフィー（Thin-Layer Chromatography、TLC Silica gel 60 F₂₅₄）で確認する実験を行った。標準フェルラ酸と試料溶液をそれぞれ 20 μL を TLC に滴下しギ酸エチル/ギ酸（v/v）展開溶媒を用いて展開した。展開した後、室温で待ちながら乾かせ、40%硫酸および 1%重クロム酸カリウム水溶液を噴霧した。噴霧した TLC プレーートを 110℃で加熱乾燥し、可視化した。

・酵素液タンパク質の測定法

酵素液のタンパク質濃度を、プロテインアッセイキット（バイオ・ラッド）を用いて測定し、麹菌が産生する FAE はタンパク質当りの活性として示した。

調製した酵素液試料 40 μL を超純水 360 μL で 10 倍希釈したものに CBB Dye Reagent Concentrate を 100 μL 加えて混和し、室温暗所で 15 分間以上放置後、595 nm における吸光度を測定した。ブランクには、超純水 400 μL に CBB Dye Reagent Concentrate を 100 μL 加えて混和したものをを用いた。標準物質にウシ血清アルブミンを用いて作成した検量線から導いた以下の式より、サンプル中のタンパク質濃度を算出した。

$$\begin{aligned}\text{タンパク質濃度 } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) &= \text{Abs} \times 19.431 + 0.004834 \quad (0 \leq \text{O.D.} \leq 0.4) \\ &= \text{Abs} \times 27.0 + 2.3770 \quad (0.4 < \text{O.D.} \leq 0.8)\end{aligned}$$

○測定方法

酵素活性は 15 mM FAra 20 μ L、50 mM MES バッファー (pH 5.5) 500 μ L に酵素液 100 μ L を加え、37°C で 10 分間、340 nm における吸光度の減少をタイムスキャンすることで測定した。

○活性算出法

FAra とフェルラ酸の 340 nm におけるモル吸光係数の差 ($8981 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) を用いて反応により分解された FAra の量を算出し、1 分間に 1 μ mol の基質を分解する酵素量を 1 U と定義して酵素液の FAE 活性を求めた。

2-7. 食塩の FEA 活性に対する影響

塩麴調製条件下における FEA 活性を検討するため、酵素活性におよぼす食塩の影響を調べた。麴 1 g に様々な食塩濃度の 50 mM MES バッファー (pH 5.5) 6 mL を加えて氷水中で 2 時間振とうし、3,000 \times g、5 分間遠心分離後、上清をガラス繊維濾紙で濾過して得られた濾液を食塩濃度別酵素液として使用した。

活性の測定方法は 2-6 と同じ操作で行った。

3. 実験結果および考察

3-1. 調製した玄米麴と玄米塩麴

3 種の種麴を用いて調製した玄米麴と玄米塩麴の写真を図 3-2 に示した。白米の場合、通常数日で麴の調製が完了するが、玄米では菌の生育が遅く、約 2 倍の時間を要した。また、本研究では麴菌が産生する酵素による結合型フェルラ酸の遊離型への分解を進めるため、胞子が形成する 7 日目まで時間をかけて培養した。

次にこれら玄米麴を使用し、玄米塩麴を調製した。図 3-2 に示す通り、オリゼ玄米塩麴は市販されている塩麴と同様の灰白色様の色調であったが、ソーヤとリュチュエンシスの玄米塩麴は黒緑色および暗褐色をしていた。泡盛の種麴として有名な黒麴菌であるリュチュエンシスは遊離アミノ酸を良く生産するペプチダーゼを分泌し（一島、2002）、またソーヤは澱粉分解酵素だけでなくタンパク質分解酵素産生能が高いことが知られている。したがって、玄米塩麴の発酵過程で酵素分解により生成した糖とアミノ酸によりアミノカルボニル反応が生じ、胞子の色と合わさり、塩麴が黒緑色や暗褐色になったと考えられる。

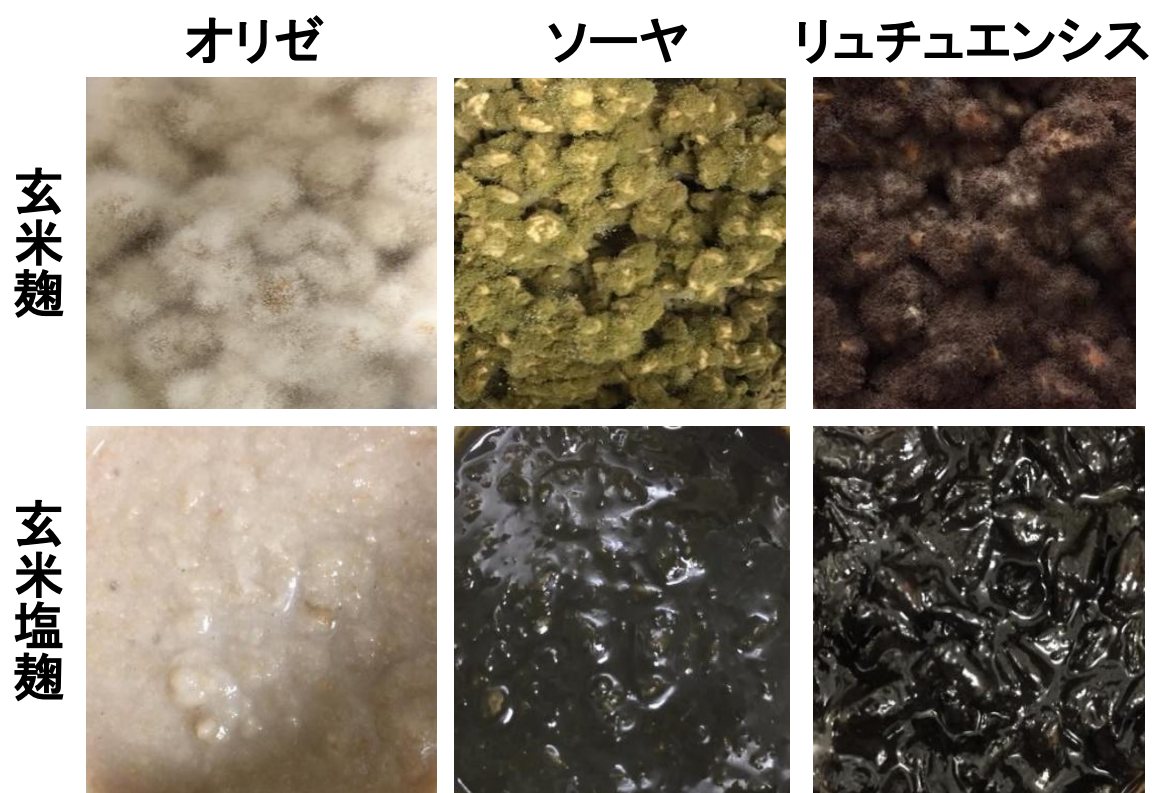


図 3-2. 調製し玄米麴と玄米塩麴の写真

3-2. 玄米麴の糖化力

調製した玄米麴の良否を判定するため、麴の良否の指標の一つである糖質分解酵素活性を測定した。その結果、オリゼ玄米麴で 0.6 U/g、ソーヤ玄米麴で 0.8 U/g、リュチュエンシス玄米麴で 2.9 U/g であった（図 3-3、表 3-1）。市販されている 2 種類の米麴の市販品 A（商品名：生糍、製造会社：有限会社 村山健次商店）と市販品 B（商品名：生こうじ、製造会社：柳醸造株式会社）を購入し同様に測定した結果、市販品 A は 0.9 U/g、市販品 B は 2.2 U/g であり、また、尾関らは 12 種類の麴菌を用いて精米歩合 70% の白米で調製した麴の糖化力を測定したところ、0.1～2.4 U/g であったと報告している（尾関ら、2008）。したがって、今回調製した玄米麴は白米麴と同程度の糖化力を持つ、実用に堪え得る麴であることが示された。

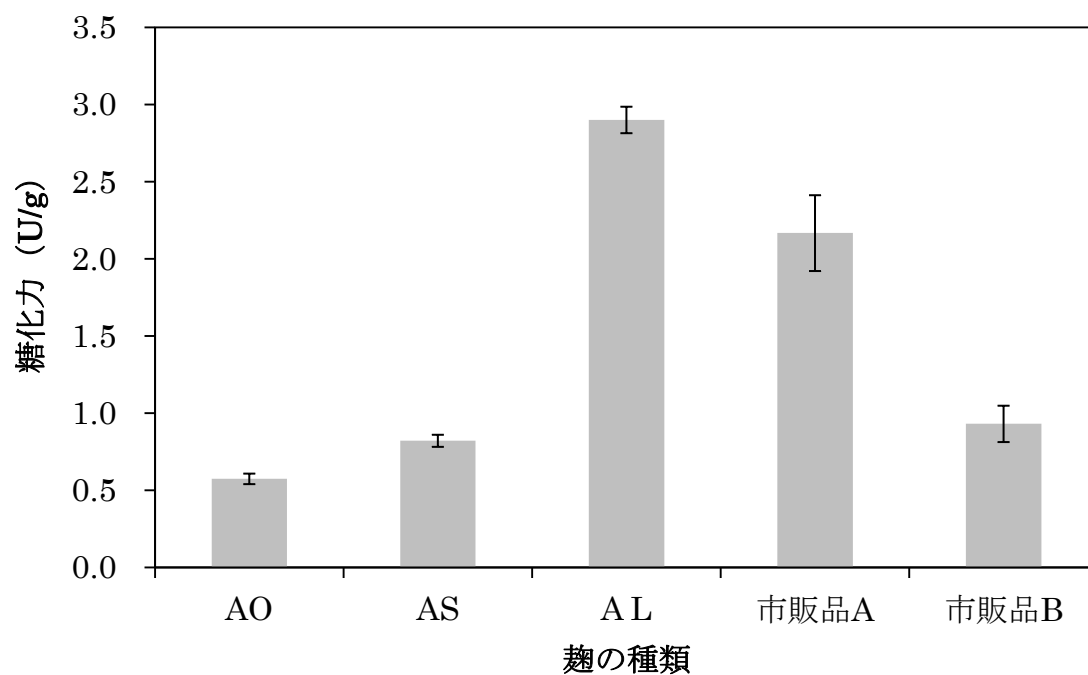


図 3-3. 自家製玄米麴と市販米麴の糖化力活性

自家製玄米麴と市販米麴を各 3 個ずつ調製および購入し、それぞれ糖化力を測定した (n = 3)。棒グラフは平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 3-1. 自家製玄米麴と市販米麴の糖化力活性

麴	糖化力活性(U/g)
AO	0.6 ± 0
AS	0.8 ± 0
AL	2.9 ± 0.1
市販品 A	2.2 ± 0.2
市販品 B	0.9 ± 0.1

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

3-3. 玄米麴と玄米塩麴の抗酸化活性

3 種類の種麴を用いて調製した玄米麴と玄米塩麴の抗酸化活性を DPPH ラジカル消去活性で評価した。玄米を麴にすることで抗酸化活性は増加し、各々の活性は玄米に比べオリゼ玄米麴で 4.7 倍、ソーヤ玄米麴で 3.1 倍、リュチュエンシス玄米麴で 17.2 倍と 3 種類の麴菌の中でもリュチュエンシスを用いた時の活性の上昇が著しく大きかった（図 3-4、表 3-2）。玄米麴における抗酸化活性を調べた報告はこれまでにないが、オリゼを用いた清酒（太田ら、1992）、オリゼと *A. awamori* を用いた黒米糠麴（Shin ら、2019）、オリゼ、ソーヤ、*A. awamori* を用いた白米麴（尾関ら、2008）など麴菌による発酵物が高い抗酸化活性を示すことは既に報告されており、今回の結果はそれらと一致した。

一方、3 種類の玄米塩麴の抗酸化活性は玄米よりも高いものの玄米麴よりいずれも低くなった。松田と工藤（2000）は麦麴の製麴過程で一旦増加した抗酸化物質であるフェルラ酸がその後減少することを見出し、麴菌による代謝作用によるものと推察している。このことから、玄米麴中に存在していた抗酸化物質は塩麴の調製過程で麴菌が産生した酵素の働きにより分解されたと考えられる。

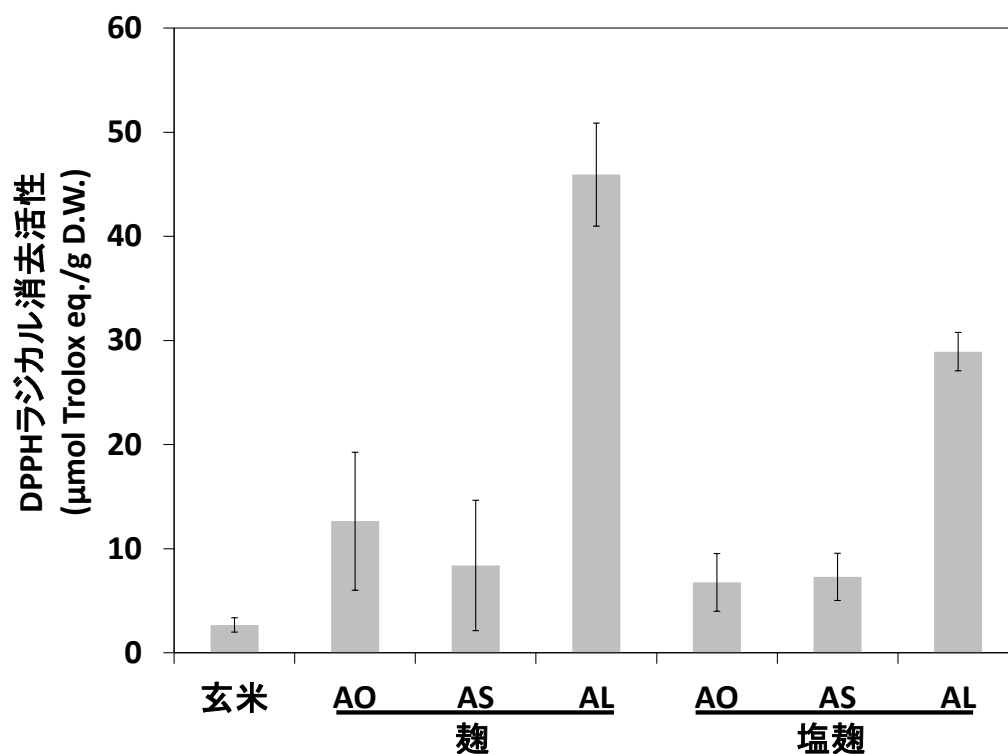


図 3-4. 調製した玄米麴と玄米塩麴の抗酸化活性

玄米麴と玄米塩麴を各 3 回調製し、その抗酸化活性を 3 連で測定した (n = 3)。棒グラフは平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 3-2. 3 種の麴菌を用いて玄米で調製した麴と塩麴の抗酸化活性

麴と塩麴	DPPH ラジカル消去活性 (μmol Trolox eq./g D.W.)
玄米	2.7 ± 0.7
玄米 AO	12.6 ± 6.6
玄米 AS	8.4 ± 6.3
玄米 AL	45.9 ± 5.0
玄米塩 AO	6.8 ± 2.8
玄米塩 AS	7.3 ± 2.3
玄米塩 AL	28.9 ± 1.9

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

3-4 玄米麴と玄米塩麴のポリフェノール含量

玄米と比較すると、3種の種麴を用いて調製した玄米麴と玄米塩麴に高い抗酸化活性が見られたため、玄米麴と玄米塩麴のポリフェノール含量を測定し、抗酸化活性との相関を検討した（図 3-5、表 3-3）。玄米を麴にすることでポリフェノール含量は増加し、各々の含量は玄米に比べオリゼ玄米麴で 7 倍、ソーヤ玄米麴で 5 倍、リュチュエンシス玄米麴で 23 倍と 3 種の麴菌の中でもリュチュエンシスを用いた時の含量の上昇が著しく大きかった。太田ら（1992）はオリゼを用いた清酒でフェノール化合物が抗酸化活性の増加に寄与することを報告している。今回の結果はそれらと一致した。

一方、3種類の玄米塩麴のポリフェノール含量は玄米よりも高いものの玄米麴よりいずれも低くなった。この結果は玄米麴と玄米塩麴の抗酸化活性の結果と似ていた。そこで、抗酸化活性とポリフェノール含量をの相関を計算してみた（図 3-6）。そこで、 $R^2=0.990$ と非常に高い相関が見られた。これらの結果から玄米麴と玄米塩麴の抗酸化物質はポリフェノールであることが示唆された。

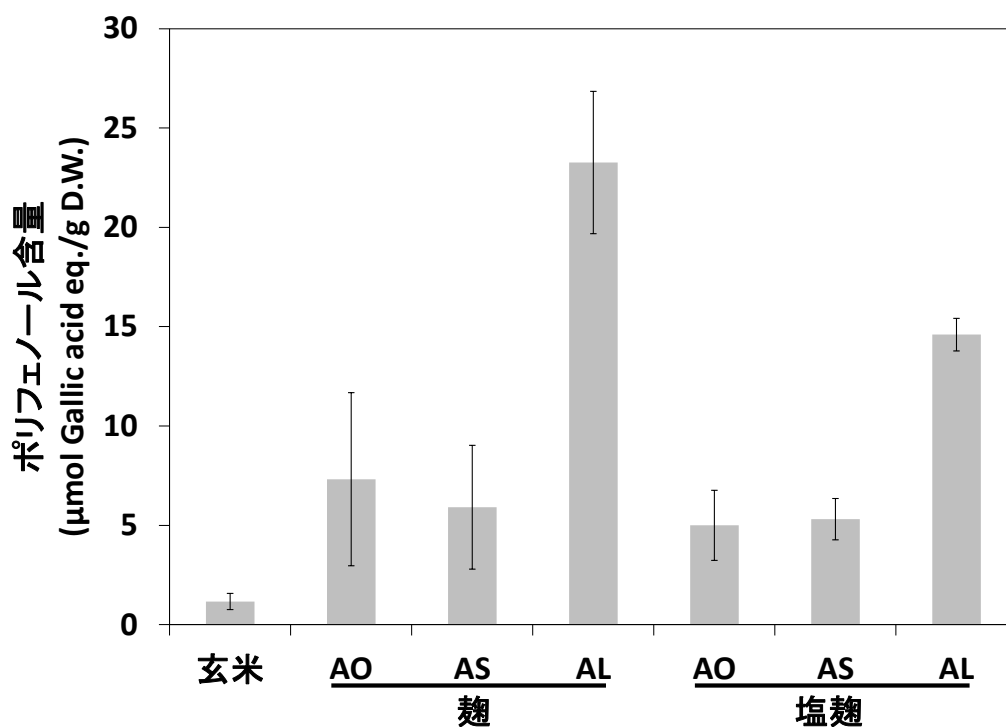


図 3-5. 調製した玄米麹と玄米塩麹のポリフェノール含量

玄米麹と玄米塩麹を各 3 回調製し、そのポリフェノール含量を測定した (n = 3)。棒グラフは平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 3-3. 3 種の麹菌を用いて玄米で調製した麹と塩麹のポリフェノール含量

麹と塩麹	ポリフェノール含量
	(μmol Gallic acid eq./g D.W.)
玄米	1.2 ± 0.4
玄米 AO	7.3 ± 4.4
玄米 AS	5.9 ± 3.1
玄米 AL	23.3 ± 3.6
玄米塩 AO	5.3 ± 1.0
玄米塩 AS	5.0 ± 1.8
玄米塩 AL	14.6 ± 0.8

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

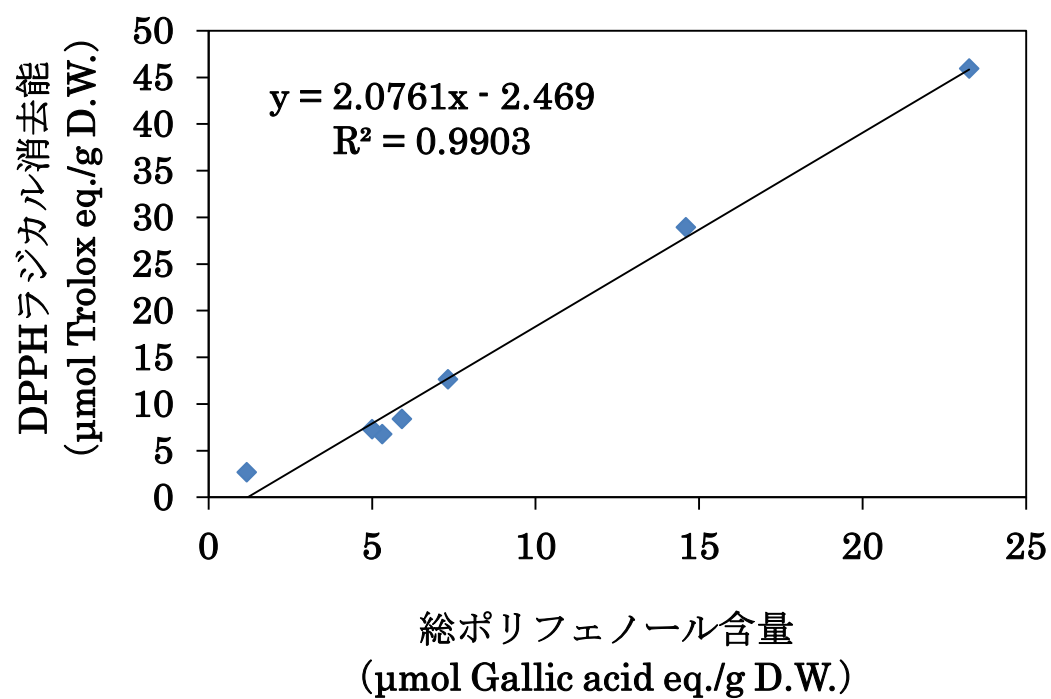


図 3-6. 抗酸化活性とポリフェノール含量の相関関係

玄米麴と玄米塩麴を各 3 回調製し、その抗酸化活性とポリフェノール含量を測定した後、両方の相関関係を算出した ($n = 3$)。

3-5. 玄米麴と玄米塩麴のフェルラ酸含量

麴菌による発酵物における代表的抗酸化物質として発酵過程で細胞壁成分から遊離して生じるフェルラ酸がある。そこで次に玄米麴と玄米塩麴に含まれる遊離型フェルラ酸を定量した。玄米に含まれるフェルラ酸は $1.7 \mu\text{g/g D.W.}$ と非常に少なかった (図 3-7)。オリゼ玄米麴とソーヤ玄米麴には玄米の約 2 倍のフェルラ酸が含まれ、リュチュエンシス玄米麴では約 250 倍多い $419 \mu\text{g/g D.W.}$ のフェルラ酸が含まれていた。このように麴菌で穀類を発酵させると遊離型フェルラ酸含量が増加し、この結果は清酒 (太田ら、1992) (Hashizume ら、2013)、麦味噌および麦麴 (松田ら、2000)、黒米糠麴 (Shin ら、2019) の報告と一致した。それらの報告の数値と比較すると、リュチュエンシス玄米麴の含量は麦味噌の $1.5 \sim 12.7 \mu\text{g/g}$ (松田、2000) より多く、米糠そのものを *A. oryzae* ATCC22787 および *A. awamori* ATCC38854 で発酵させた黒米糠麴の約 $400 \sim 500 \mu\text{g/g}$ (Shin ら、2019) と同等の含量であった。但し、これらの数値の引用元論文では抽出・分析手法が異なる。

また、玄米塩麴のフェルラ酸含量は玄米麴より少なく、リュチュエンシス玄米塩麴の含量はリュチュエンシス玄米麴の $1/3$ に減少していた。玄米麴を塩麴にすると抗酸化成分であるフェルラ酸が減少したという結果は、抗酸化活性の低下と一致しており、フェルラ酸等の抗酸化成分が塩麴の調製過程で分解されることで抗酸化活性が低下することが示唆された。

玄米には白米より多くの細胞壁結合型フェルラ酸が含まれると報告されている (西澤ら、1998)。そこで 3 種類の種麴で白米麴および白米塩麴を調製し、遊離型フェルラ酸含量を調べた。白米のフェルラ酸含量は $1.0 \mu\text{g/g D.W.}$ と玄米より少なく、調製した白米麴のフェルラ酸含量はオリゼ白米麴で $1.3 \mu\text{g/g D.W.}$ 、ソーヤ白米麴で $2.2 \mu\text{g/g D.W.}$ 、リュチュエンシス白米麴で $323 \mu\text{g/g D.W.}$ と玄米麴同様に発酵過程で増加し、特にリュチュエンシス白米麴では著しく増加した。また、白米塩麴の含量は白米麴より少なかった。玄米麴のフェルラ酸含量は白米麴より多く、これは細胞壁結合型フェルラ酸の量が糠層に多いことに起因すると推測された (西澤ら、1998)。しかし、予想していたより両者の差は少なく、その理由として玄米麴では表層の果種皮により菌糸の米粒内部への侵入が阻害され、その結果胚乳部分での結合型フェルラ酸の分解が不十分であったことが考えられる。

本研究において、3 種類の種麴を用いて調製した玄米麴の抗酸化活性は原料の玄米より高く、その一因は抗酸化物質であるフェルラ酸が増加することにあることを明らかにした。そこで、試薬として販売されているフェルラ酸の抗酸化活性を測定してフェルラ酸の Trolox 相当量を求め、リュチュエンシス玄米麴中

のフェルラ酸含量からフェルラ酸に由来する抗酸化活性を算出し、リュチエンシス玄米麴の抗酸化活性において含有されるフェルラ酸がどの程度寄与しているのかを計算した（図 3-8）。その結果、1 mol のフェルラ酸は 0.598 mol の Trolox に相当し、この値よりリュチエンシス玄米麴の抗酸化活性の 60% はフェルラ酸によるものと推定され、遊離型フェルラ酸は、玄米麴の抗酸化活性に大きな影響を与えることが示された。なお、リュチエンシス玄米麴の抗酸化活性の 40% はフェルラ酸以外の化合物に起因すると推定される。また、フェルラ酸は少量しか含まないオリゼやソーヤの玄米麴や玄米塩麴にも相応の抗酸化活性が検出されている。米の発酵物に含まれる抗酸化物質としてはフェルラ酸以外にプロトカテキ酸、バニリン酸、p-クマル酸、チロソールなどのフェノール性化合物が報告されており、これら玄米麴や玄米塩麴にはそれらの化合物が含まれているのかも知れない（Shin ら、2019）、（松田ら、2000）。

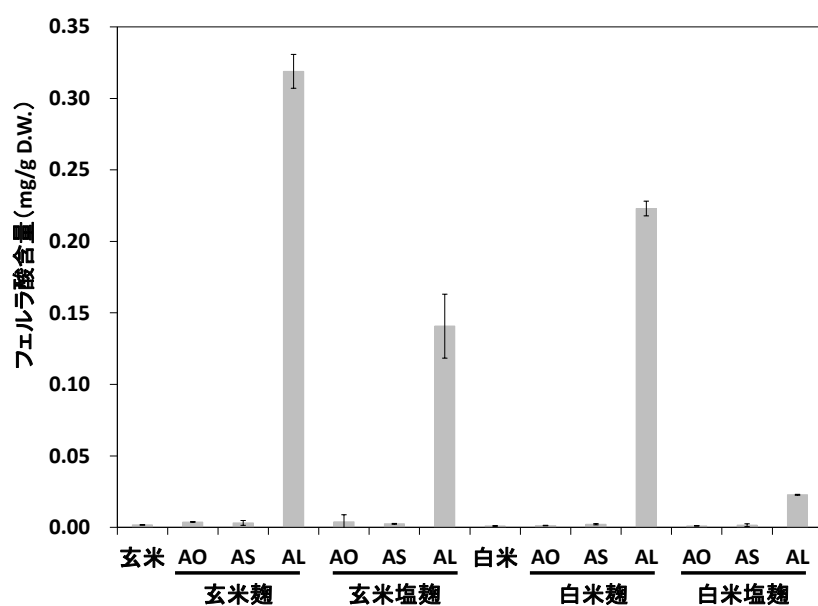


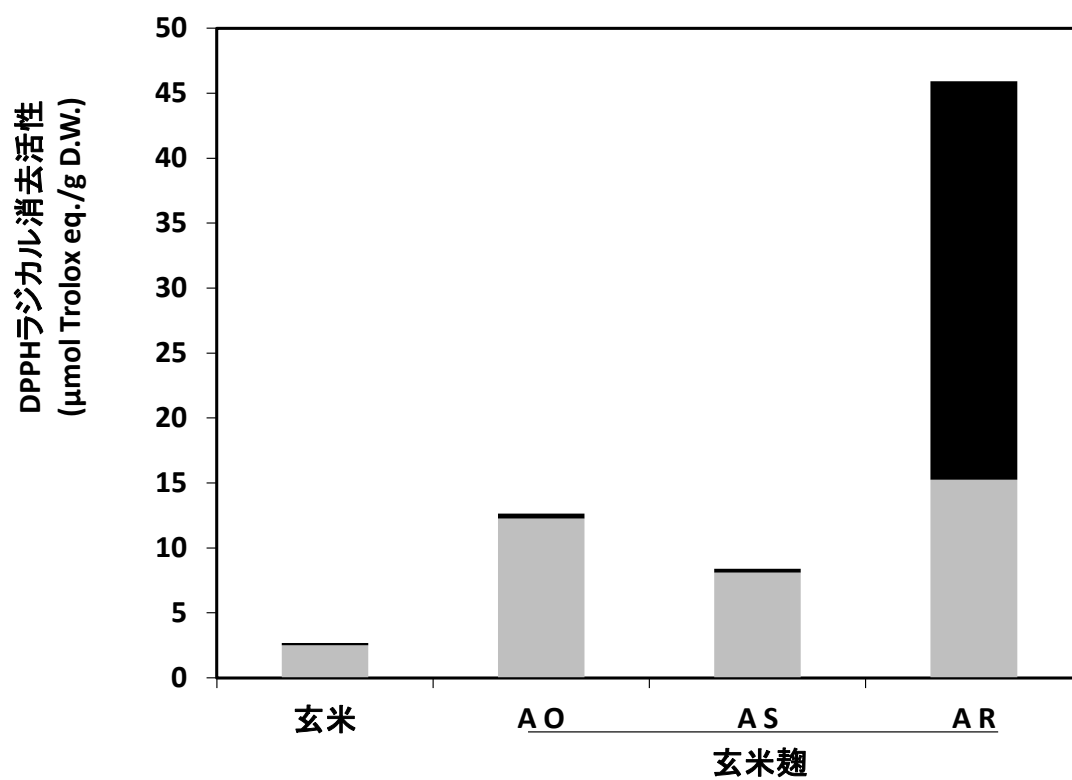
図 3-7. 麹と塩麹の遊離型フェルラ酸含量

麹と塩麹は玄米と白米を用いて調製した。各麹と塩麹を 3 回調製し、フェルラ酸含量を測定した (n = 3)。棒グラフは平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 3-4. 3 種の麹菌を用いて玄米と白米で調製した麹と塩麹の遊離型フェルラ酸含量

遊離型フェルラ酸含量 (μg/g D.W.)	
玄米	1.7 ± 0.1
麹 AO	3.8 ± 0.2
麹 AS	3.1 ± 1.7
麹 AL	319.0 ± 11.8
塩麹 AO	3.9 ± 4.9
塩麹 AS	2.5 ± 0.3
塩麹 AL	140.7 ± 22.4
白米	1.0 ± 0.1
麹 AO	1.3 ± 0.2
麹 AS	2.2 ± 0.4
麹 AL	223.0 ± 5.2
塩麹 AO	1.0 ± 0.1
塩麹 AS	1.5 ± 1.0
塩麹 AL	22.8 ± 0.3

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。



- : フェルラ酸の Trolox 換算抗酸化活性 (μmol Trolox eq./g d.w.)
○ : フェルラ酸以外の物質の抗酸化活性 (μmol Trolox eq./g d.w.)

図 3-8. 玄米と玄米麴の抗酸化活性におけるフェルラ酸の寄与

3-6. 玄米麴のフェルロイルエステラーゼ (FAE) 活性

フェルロイルエステラーゼ (FAE) の基質であるフェルロイルアラビノフラノース (FAra) は市販されていないため、小麦ふすまのシュウ酸加水分解物を Sephadex LH-20 の 2.5×100 cm カラム (GE ヘルスケアライフサイエンス) によるゲル濾過および TLC により確認した。

ゲル濾過の結果を図 3-9 に示した。ゲル濾過では A、B、C の 3 つのピークが検出された。

ゲル濾過で得た画分液 A、B、C および標準フェルラ酸溶液 (D) を薄層クロマトグラフィー (Thin-Layer Chromatography, TLC Silica gel 60 F₂₅₄) で展開し、FAra を確認した。その結果を図 3-10 に示した。A、B、C 3 つの画分溶液の中、C 液の R_f 値は 0.56 と参考論文の R_f 値と一致した。そこで、C 画分液は FAra 溶液であることが確認された。

また、麴菌が分泌する酵素のタンパク質重量当たり活性を計算するため、3 種の麴菌で調製した玄米麴のタンパク質含量をプロテインアッセイキット (バイオ・ラッド) で測定し、その結果を図 3-11 に示した。3 種の玄米麴に含むタンパク質含量には 92.5~124.5 µg/g の幅が見られ、ソーヤ<リュチュエンシス<オリゼの順であった。

次に、調製した基質を用いて 3 種の麴菌の FAE 活性の測定を行った。その結果、図 3-12 に示した通りリュチュエンシス玄米麴のみが非常に高い活性を示し、フェルラ酸の量と一致していた。細胞壁成分からのフェルラ酸の効率の良い遊離にはキシラナーゼ等の細胞壁分解酵素も関係することが知られており

(Topakas ら、2007)、焼酎麴菌であるリュチュエンシスにはそれら酵素を多量に産生するという特徴がある (伊藤ら、2005)。したがって、リュチュエンシスは単に FAE の作用だけでなく他の細胞壁分解酵素との相乗作用により、より多くのフェルラ酸を産生する能力を発揮しているのかもしれない。また、今回使用したオリゼおよびソーヤの FAE 活性は低く、リュチュエンシスの活性だけが高かった。Tenkanen らはオリゼ VTT-D-85248 を小麦ふすま培地で培養すると高い FAE 活性を示すと報告している (Tenkanen ら、1991)。また、Smith らは複数の *A. awamori* の菌株の FAE 活性を調べ、*A. awamori* IMI211394 や IMI59613 では明瞭な活性が検出されたが、IMI63763 や IMI59605 では全く活性がないと報告している (Smith ら、1991)。これらのことから、麴菌の遊離型フェルラ酸産生能には菌の属種に加え、菌株の特性も重要と考えられる。

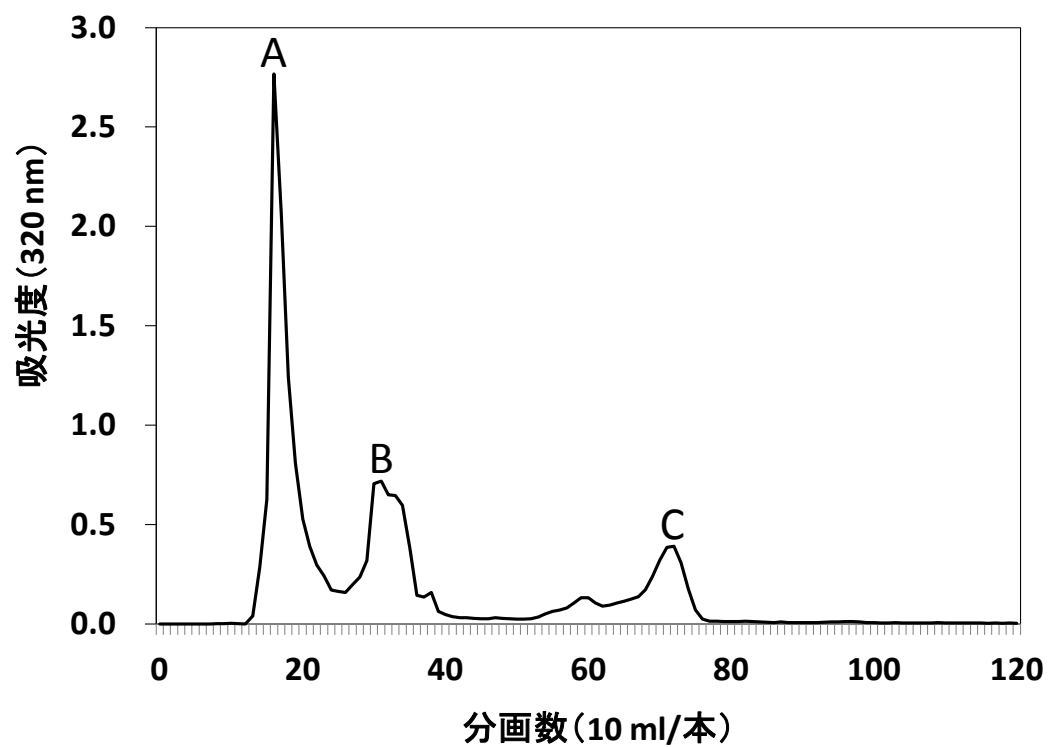


図 3-9. 小麦ふすまのシュウ酸加水分解物のゲル濾過

小麦ふすま加水分解液を、Sephadex LH-20 カラム（GE ヘルスケアライフサイエンス、 $\phi 2.6 \text{ cm} \times 75 \text{ cm}$ ）に、50%メタノースの溶離液を 30 mL/h の流速で流した。A、B、C はゲル濾過で得られた分画液を示している。



図 3-10. 小麦ふすま加水分解物のゲル濾過画分の TLC 分析

TLC Silica gel 60 F₂₅₄ を用いてゲル濾過で得た A、B、C 3 つの画分溶液および標準フェルラ酸溶液 D をそれぞれ 20 μ L を TLC に滴下しギ酸エチル/ギ酸 (v/v) 展開溶媒を用いて展開した。展開した後、40%硫酸および 1%重クロム酸カリウム水溶液を噴霧し、TLC プレートに 110°C で加熱乾燥して可視化した。

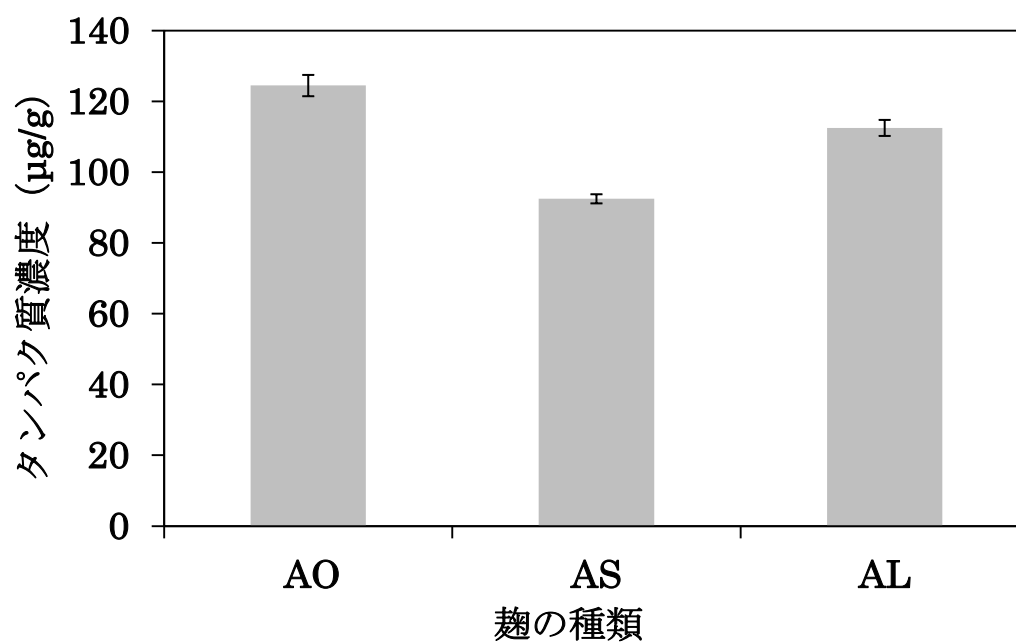


図 3-11. 3 種の麹菌で調製した玄米麹のタンパク質濃度

3 種の麹菌を用いて玄米麹を調製した。各麹を 3 回調製し、タンパク質濃度を測定した (n = 3)。棒グラフは平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 3-5. 3 種の麹菌を利用して玄米で調製した麹のタンパク質濃度

玄米麹	タンパク質濃度 (μg/g)
AO	124.5 ± 3.0
AS	92.5 ± 1.3
AL	112.5 ± 2.3

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

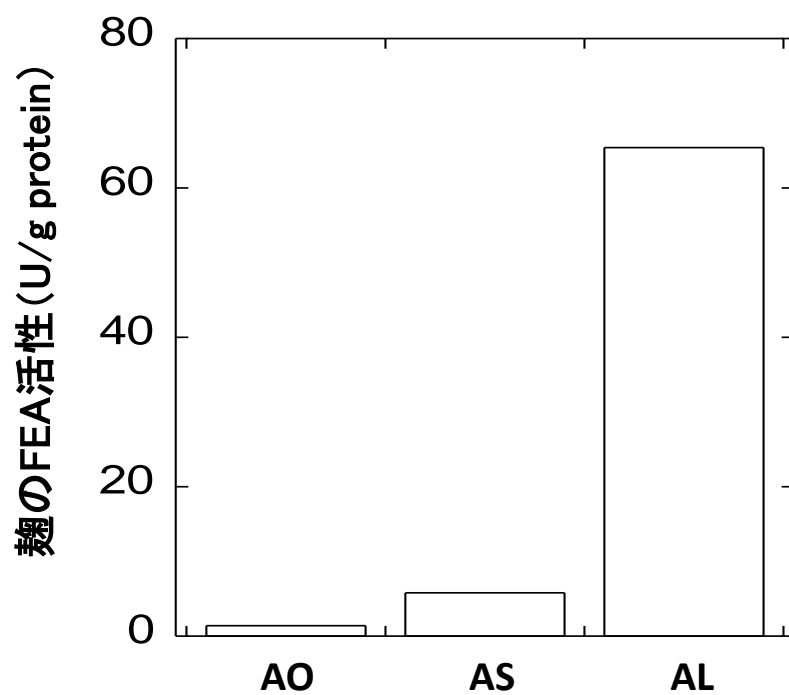


図 3-12. 3 種類の玄米麴の FEA 活性

玄米麴から調製した酵素液の FEA 活性とタンパク質を測定し、酵素活性はタンパク質当たりの活性として示した。麴を 3 回調製し、FEA 活性を測定した ($n = 3$)。棒グラフは平均値を示している。

3-7. 食塩の FEA に対する影響

塩麴調製条件下における FAE 活性を検討するため、酵素活性に及ぼす食塩の影響を調べた。様々な濃度の食塩存在下で FAE 活性を測定したところ、無添加の活性に比べ 10%食塩で 16%、15%食塩で 4%とその活性は食塩により大きく低下した (図 12)。玄米塩麴は約 11%の食塩存在下で 7 日間かけて調製しており、玄米麴に含まれていた FAE は食塩により活性が大きく阻害されと考えられた。リュチュエンシス玄米塩麴中のフェルラ酸含量は原料であるリュチュエンシス玄米麴より少なかった (図 3-7)。麴菌にはフェルラ酸の代謝作用があると推察されていることから (松田ら、2000)、本研究で使用したリュチュエンシスにはフェルラ酸を代謝する酵素が存在し、その働きにより玄米塩麴中のフェルラ酸が減少すると共に、食塩による FAE 活性の阻害により、玄米からの新たなフェルラ酸の遊離が阻害されたためと推測されえる。

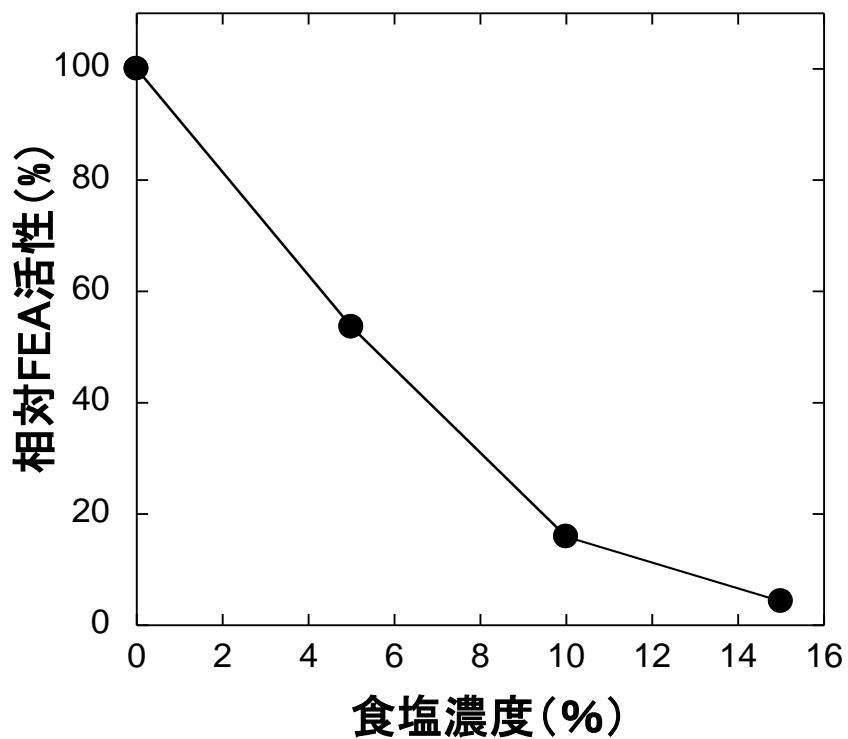


図 3-13. 麹菌 AL が産生する FAE 活性に及ぼす食塩の影響

玄米麹から調製した酵素液を用い、食塩の存在下で酵素活性を測定した。数値は食塩無添加の活性を 100 とした時の相対活性で示した。

第2節 3種の麴を利用して小麦と大麦で調製した麴と塩麴の抗酸化活性

1. 実験材料

1-1. 試料

小麦は農林 61 号、大麦はシュンライを用いた。3 種の麴菌は第 3 章第 1 節で用いた麴菌を用いた。(図 3-14)



小麦



大麦



オリゼ



ソーヤ



リュチュエンシス

図 3-14. 3 種の麴菌および小麦と大麦の外観写真

1-2. 試薬

第 3 章第 1 節の“試薬 2-1”を参照した。

2. 実験方法

2-1. 麴と塩麴の調製

麴は次の通り調製した。小麦または大麦 10 g を洗浄後、3 時間、室温で水に浸漬した。浸漬した麦は電気蒸し器（ウルトラコンパクト II、グループセブジヤパン）で 60 分間蒸煮後、放冷し、100 mL ビーカーに移した。これに 30 mg の種麴を 3 回に分けて振り混ぜ、恒温器 IG420（ヤマト科学）中で 37℃、湿度 70% で 7 日間発酵させた。

塩麴は麴、食塩、水を 100 : 30 : 135 (w/w/w) の割合で混合し、毎日 1 回混ぜながら上記の恒温器中で 25℃、湿度 70% で 7 日間発酵させた。

2-2. 抗酸化活性の測定

抗酸化活性の測定方法は、第 3 章第 1 節の“2-3. 抗酸化活性の測定”を参照した。

2-3. ポリフェノール含量の測定

ポリフェノール含量の測定方法は、第 3 章第 1 節の“2-4. ポリフェノール含量の測定”を参照した。

2-4. フェルラ酸含量の測定

フェルラ酸含量の測定方法は、第 3 章第 1 節“2-4 フェルラ酸含量の測定”を参照した。

3. 実験結果および考察

3-1. 麴と塩麴の調製

3種の麴菌を利用して小麦と大麦で調製した麴と塩麴の写真を図 3-13 に示した。小麦と大麦は玄米と比較するとより硬い外皮を含んでいる。麴調製法は玄米と全く同じであるため、ガーゼで蓋したビーカーの表面は若干乾燥したが、意外にも麴菌が良く繁殖し、小麦と大麦でも玄米のように麴を調製することが出来た。硬い外皮を含むにもかかわらず麴菌が良く生えたのは、小麦と大麦を浸漬して蒸すと、一部の麦粒が割れ、中のデンプンが溶出してくる。麴菌がこの溶出したデンプンを利用して良く生えたと考えられる。

また、これらの麴を用いて美味しい香りがする塩麴の調製もできた。オリゼの麴と塩麴には市販の麴と塩麴と同じく胞子の色をしているが、ソーヤとリュチュエンシスの塩麴は玄米塩麴と同じく黒緑色および暗褐色をしていた。したがって、小麦と大麦の塩麴にも発酵過程で酵素分解により生成した糖とアミノ酸によりアミノカルボニル反応が生じ、胞子の色と合わさり、塩麴が黒緑色や暗褐色になったと考えられる。

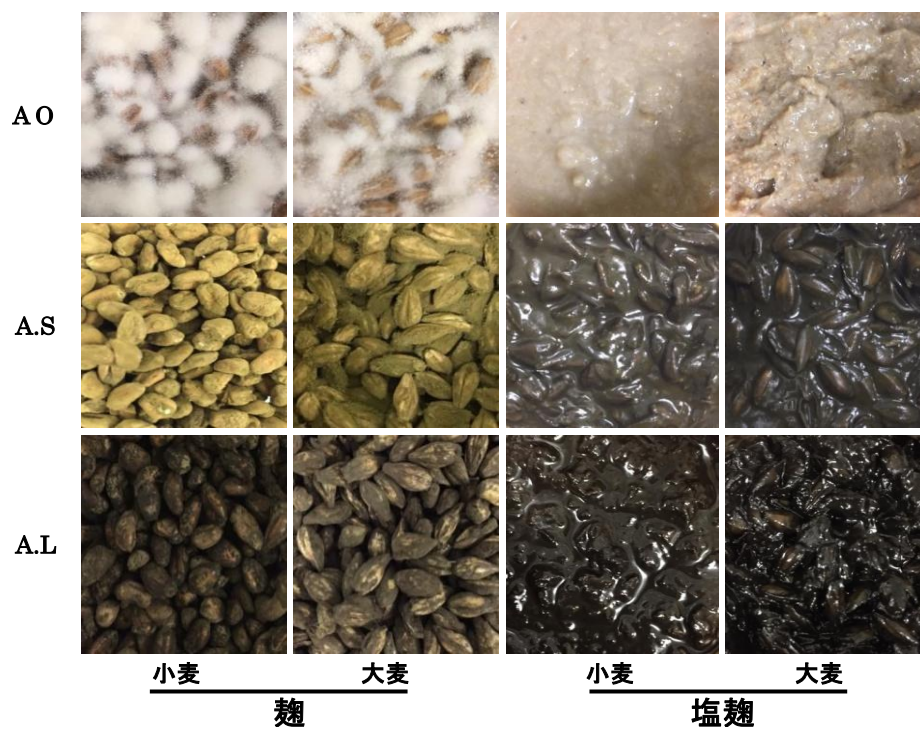


図 3-15. 3 種の麴菌を利用し小麦と大麦で調製した麴と塩麴の写真

3-2. 抗酸化活性

3種の麹菌を利用して小麦と大麦で調製した麹と塩麹の抗酸化活性を DPPH ラジカル消去活性で評価し、その結果を図 3-16、表 3-6 に示した。

小麦で 3 種の麹菌を利用して麹を調製すると抗酸化活性は 3 種の麹菌の全てで増加した。その中、リュチュエンシス小麦麹で増加が著しく大きく、原料の小麦の約 15 倍であった。小麦麹で小麦塩麹を調製すると、オリゼ小麦塩麹の抗酸化活性は若干減少したのに対して、ソーヤ小麦塩麹には若干増加する傾向が見られた。リュチュエンシス小麦塩麹では原料の小麦麹に比較して約半分減少した。一部異なる点もあったが全体的には玄米麹と玄米塩麹の抗酸化活性の変化と近い変化が見られた。

一方、3 種の麹菌を用いて大麦で麹を調製すると、その抗酸化活性はオリゼ大麦麹で減少し、ソーヤ大麦麹で若干増加したのに対して、リュチュエンシス大麦麹では 2 倍以上増加した。これら大麦麹で大麦塩麹調製したところ、抗酸化活性はオリゼ大麦塩麹で若干増加したが、その値は大麦の約 1/2 しかなかった。ソーヤ大麦塩麹では麹より変化が見られなかった。リュチュエンシス大麦塩麹では原料のリュチュエンシス大麦麹と比較すると半分に減少した。大麦を原料に調製した麹と塩麹の抗酸化活性には玄米や小麦の麹と塩麹のように一定の変化が見られなかった。元々大麦には高い抗酸化活性が含まれていた。その活性は玄米の約 5 倍、小麦の約 7 倍であった。

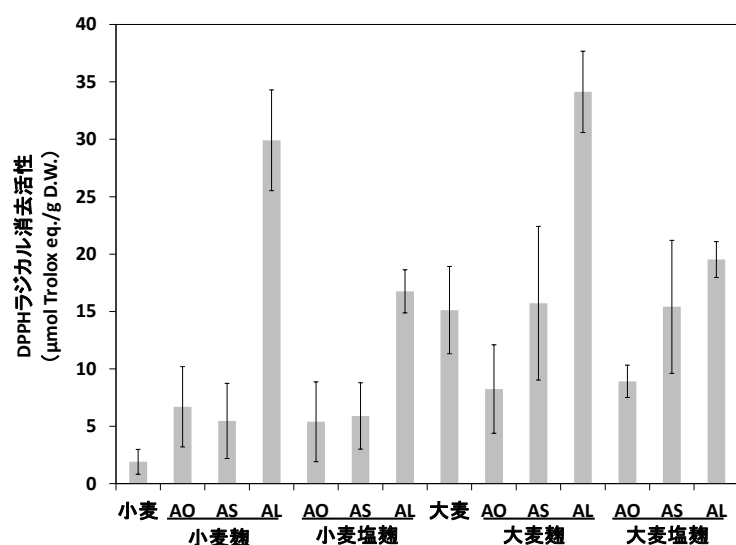


図 3-16. 麹と塩麹の抗酸化活性

3 種の麹菌を利用して小麦と大麦で麹と塩麹を調製した。各麹と塩麹を 3 回調製し、抗酸化活性を測定した (n = 3)。棒グラフは平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 3-6. 3 種の麹菌を利用して小麦と大麦で調製した麹と塩麹の抗酸化活性の平均値 (n = 3)

試料	DPPH ラジカル消去活性 (μmol Trolox eq./g D.W.)
小麦	1.9 ± 1.1
小麦 AO	6.7 ± 3.5
小麦 AS	5.5 ± 3.3
小麦 AL	29.9 ± 4.4
小麦塩 AO	5.4 ± 3.5
小麦塩 AS	5.9 ± 2.9
小麦塩 AL	16.8 ± 1.9
大麦	15.1 ± 3.8
大麦 AO	8.3 ± 3.9
大麦 AS	15.7 ± 6.7
大麦 AL	34.1 ± 3.5
大麦塩 AS	15.4 ± 5.8
大麦塩 AO	8.92 ± 1.4
大麦塩 AL	19.5 ± 1.6

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

3-3. ポリフェノール含量の測定

3種の麹菌を利用して小麦と大麦で調製した麹と塩麹のポリフェノール含量の測定結果を図 3-17 表 3-7 に示した。

小麦で麹を調製すると、3種の小麦麹においてポリフェノールは全て増加した。その中リュチュエンシス小麦麹での増加が大きく、小麦の約 16 倍だった。これらの麹で塩麹を調製するとリュチュエンシス小麦塩麹のポリフェノール含量のみが減少し、他の 2 つの小麦塩麹には増加した。その中で、ソーヤ小麦塩麹には原料の麹に比べると約 2 倍増加した。

大麦で麹を調製すると、ポリフェノール含量はオリゼ大麦麹では減少し、他の 2 つの大麦麹では増加した。リュチュエンシス大麦麹には原料の大麦と比較して約 2.5 倍増加した。これらの大麦麹で大麦塩麹を調製すると、リュチュエンシス大麦塩麹では原料の大麦麹に比較して減少し、他の 2 つの菌種の大麦塩麹では増加が見られた。

また、抗酸化活性とポリフェノール含量の相関を計算すると（図 3-18）、 $R^2 = 0.865$ と玄米麹と玄米塩麹ほどではないが、高い相関が見られた。大麦には元々ポリフェノールは多く含まれていた。その含量は玄米と小麦の約 6 倍であった。

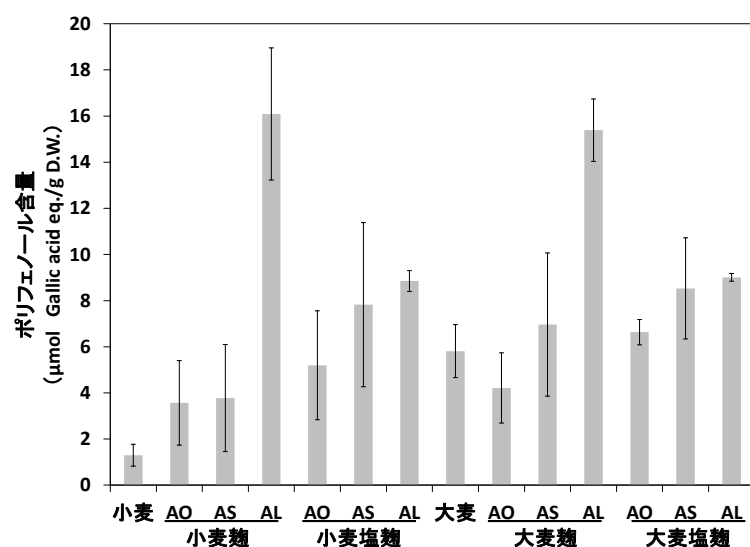


図 3-17. 麴と塩麴のポリフェノール含量

3 種の麴菌を利用して小麦と大麦で麴と塩麴を調製した。各麴と塩麴を 3 回調製し、ポリフェノール含量を測定した (n = 3)。棒グラフは平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 3-7. 3 種の麴菌を利用して小麦と大麦で調製した麴と塩麴のポリフェノール含量の平均値 (n = 3)

試料	ポリフェノール含量
	(μmol Gallic acid eq./g D.W.)
小麦	1.3 ± 0.5
小麦 AO	3.6 ± 1.8
小麦 AS	3.8 ± 2.3
小麦 AL	16.1 ± 2.9
小麦塩 AO	5.2 ± 2.4
小麦塩 AS	7.8 ± 3.6
小麦塩 AL	8.9 ± 0.5
大麦	5.8 ± 1.1
大麦 AO	4.2 ± 1.5
大麦 AS	7.0 ± 3.1
大麦 AL	15.4 ± 1.4
大麦塩 AO	6.6 ± 0.6
大麦塩 AS	8.5 ± 2.2
大麦塩 AL	9.0 ± 0.2

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

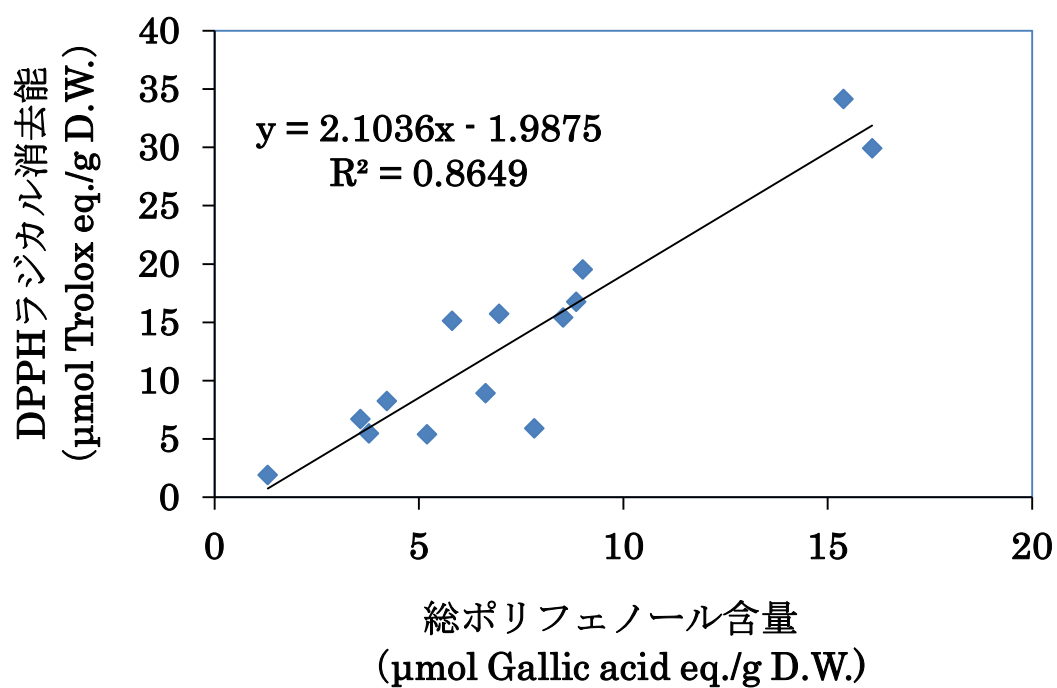


図 3-18. 抗酸化能とポリフェノール含量の相関関係

3 種の麹菌を利用して小麦および大麦の麴と塩麴を各 3 回調製し、その抗酸化活性とポリフェノール含量を測定した後、抗酸化活性とポリフェノールの相関関係を算出した ($n = 3$)。

3-4. フェルラ酸含量の測定

3種の麹菌を利用して小麦と大麦で調製した麹と塩麹のフェルラ酸含量の測定結果を図 3-19、表 3-8 に示した。

小麦で調製した麹では、3種の麹菌の麹全てでフェルラ酸が増加した。その中でもリュチュエンシス小麦麹での増加が原料の小麦に比較して約 73 倍として非常に大きかった。これらの小麦麹で小麦塩麹を調製し、そのフェルラ酸含量を測定した結果、ソーヤ小麦塩麹では原料のソーヤ小麦麹と比較して大きな変化が見られず、他の 2 つの小麦塩麹では原料の小麦麹と比較して減少した。リュチュエンシス小麦塩麹では 1/6 減少した。

一方、大麦で調製した麹では、フェルラ酸含量は全ての菌株で増加したが、リュチュエンシス大麦麹での増加は他の 2 つより大きかった。しかし、リュチュエンシス小麦麹ほど大きな増加が見られなかった。これらの大麦麹を原料に大麦塩麹を調製し、それらのフェルラ酸含量を測定した結果、オリゼ大麦塩麹で著しい増加が見られ、ソーヤ大麦塩麹に大きな変化が見られなかった。リュチュエンシス大麦塩麹のフェルラ酸は大きく減少した。

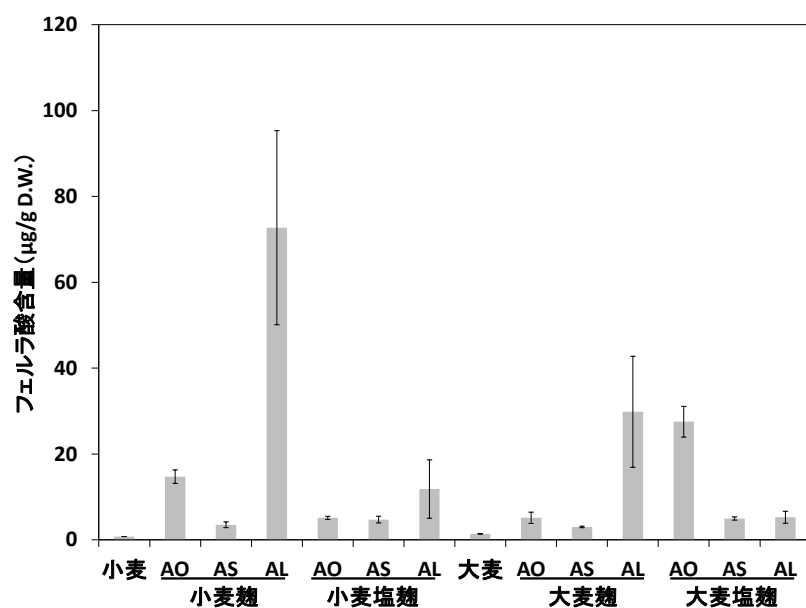


図 3-19. 麴と塩麴のフェルラ酸含量

3 種の麴菌を利用して小麦と大麦で麴と塩麴を調製した。各麴と塩麴を 3 回調製し、フェルラ酸含量を測定した (n = 3)。棒グラフは平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示している。

表 3-8. 3 種の麴菌を利用して小麦と大麦で調製した麴と塩麴のフェルラ酸含量の平均値 (n = 3)

試料	フェルラ酸含量 (μg/g D.W.)
小麦	0.8 ± 0.0
小麦 AO	14.7 ± 1.6
小麦 AS	3.5 ± 0.7
小麦 AL	72.7 ± 22.6
小麦塩 AO	5.12 ± 0.4
小麦塩 AS	4.7 ± 0.8
小麦塩 AL	11.8 ± 6.8
大麦	1.4 ± 0.1
大麦 AO	5.1 ± 1.3
大麦 AS	3.0 ± 0.2
大麦 AL	29.8 ± 13.0
大麦塩 AO	27.5 ± 3.6
大麦塩 AS	5.0 ± 0.4
大麦塩 AL	5.25 ± 1.4

数値は平均値 (n = 3) と標準偏差を示している。

要約

米糠や麦外皮を有効に活用して米・麦の機能性を向上させるために、玄米、小麦、大麦を原料に3種の麹菌 *Aspergillus oryzae* (オリゼ)、*Aspergillus soyae* (ソーヤ)、*Aspergillus luchuensis* (リュチュエンシス) の種麹を用いて麹と塩麹を調製した。本研究では食品の抗酸化活性に着目し、DPPH ラジカル消去活性で麹と塩麹の抗酸化活性を評価した。穀類の代表的な抗酸化物質としてポリフェノールが知られている。そこで、ポリフェノール含量を測定し、抗酸化活性とポリフェノール含量の麹と塩麹における相関をみた。また、フェルラ酸は穀類に含まれる代表的なポリフェノールの一種である。調製した麹と塩麹の抗酸化活性とポリフェノール含量の相関は非常に高いことから、フェルラ酸含量を合わせて測定した。

最初に、3種の麹菌を利用して玄米で麹と塩麹を調製し、分析を行った。玄米の糠層が麹菌の繁殖を妨げると考えられたが、7日を要するものの十分に菌が繁殖した麹が得られ、塩麹も調製できた。玄米、玄米麹と玄米塩麹の抗酸化能を測定した結果、3種の麹菌で調製した玄米麹に全て原料の玄米より抗酸化活性増加した。その中、リュチュエンシス玄米麹の抗酸化活性は著しく高く、玄米の約15倍もあった。一方、3種の麹菌で調製した玄米塩麹の抗酸化活性は玄米より高かったが、原料の玄米麹より活性は減少した。また、代表的な抗酸化物質であるポリフェノール含量を測定した。その結果、抗酸化活性と似たような結果が得られた。そこで各試料の抗酸化能とポリフェノール含量の相関を調べたところ、3種の麹菌を利用して玄米で調製した麹と塩麹には $R^2=0.990$ と非常に高い相関があることが明らかとなり、玄米麹と玄米塩麹に含まれる抗酸化成分はポリフェノール化合物であることが示唆された。フェルラ酸は穀類に含む代表的なポリフェノールの一種であり、様々な効果が近年報告されている。そこで、3種の麹菌で調製した玄米麹と玄米塩麹の遊離型フェルラ酸含量を測定した。その結果、玄米麹の遊離型フェルラ酸は原料の玄米より増加し、特にリュチュエンシス玄米麹に含まれるフェルラ酸の含量は原料の玄米の約250倍も増加した。玄米塩麹では玄米と比較すると、フェルラ酸は増加したが、原料の玄米麹と比較すると減少した。この結果は抗酸化活性とポリフェノール含量の結果と一致した。そこで、試薬として販売されているフェルラ酸の抗酸化活性を測定してフェルラ酸の Trolox 相当量を求め、リュチュエンシス玄米麹中のフェルラ酸含量からフェルラ酸に由来する抗酸化活性を算出し、リュチュエンシス玄米麹の抗酸化活性において含有されるフェルラ酸がどの程度寄与しているのかを計算した。その結果、1 mol のフェルラ酸は 0.598 mol の Trolox に相当し、この値よりリュチュエンシス玄米麹の抗酸化活性の 60% はフェルラ酸によるもの

と推定された。フェルラ酸は穀物の細胞壁にヘミセルロースを構成するアラビノキシランにエステル結合した結合型として存在し、フェルラ酸同士が結合してジフェルラ酸を形成することで細胞骨格をより強固なものにしている。この結合しているフェルラ酸を遊離するフェルロイルエステラーゼ (FAE) 酵素を持つ様々な微生物が報告されており、麹菌はその一つである。そこで 3 種の麹菌の FAE 活性を測定した。その結果、リュチュエンシスのみが非常に高い活性を示し、フェルラ酸含量と一致していた。細胞壁成分からフェルラ酸の効率の良い遊離にはキシラナーゼ等の細胞壁分解酵素も関係することが知られており、焼酎麹菌であるリュチュエンシスにはそれら酵素を多量に産生するという特徴がある。したがって、フェルラ酸の生理機能を十分に活用するには、結合型フェルラ酸を遊離型に変えなければならない。

塩麹調製条件下における FAE 活性を検討するため、酵素活性におよぼす食塩の影響を調べた。様々な濃度の食塩存在下で FAE 活性を測定したところ、無添加での活性に比べ 10%食塩で 16%、15%食塩で 4%とその活性は食塩により大きく低下した。玄米塩麹は約 11%の食塩存在下で 7 日間かけて調製しており、玄米麹に含まれていた FAE は食塩により活性を大きく阻害されると考えられた。リュチュエンシス玄米塩麹中のフェルラ酸含量は原料であるリュチュエンシス玄米麹より少なかった。麹菌にはフェルラ酸の代謝作用があると推察されていることから、本研究で使用したリュチュエンシスにはフェルラ酸を代謝する酵素が存在し、その働きにより玄米塩麹中のフェルラ酸が減少するとともに、食塩による FAE 活性の阻害により、玄米からの新たなフェルラ酸の遊離が阻害されたためと推測される。

次に、3 種の麹菌を利用して小麦と大麦で麹と塩麹を調製し、玄米と同じく抗酸化活性に着目し分析を行った。小麦麹の抗酸化活性は原料の小麦と比較すると 3 種の麹菌で調製した全ての麹で増加し、小麦塩麹では小麦と比較すると増加したが、原料の小麦麹と比較すると減少した。これは玄米麹と玄米塩麹の結果と似たような結果であった。一方、大麦で大麦麹と大麦塩麹を調製するとその抗酸化活性は原料の大麦と比較してオリゼ大麦麹では減少し、ソーヤ大麦麹では若干増加した傾向であり、リュチュエンシス大麦麹では約 2 倍増加した。大麦塩麹の抗酸化活性は菌種によって違っていた。オリゼ大麦塩麹の抗酸化活性は原料のオリゼ大麦麹と比較して若干増加したが、ソーヤ大麦塩麹の抗酸化活性は原料のソーヤ大麦麹と比較すると若干減少した。リュチュエンシス大麦塩麹の抗酸化活性は原料のリュチュエンシス大麦麹と比較して約半分に減少した。3 種の麹菌を利用して小麦と大麦で調製した麹と塩麹のポリフェノール含量と遊離型フェルラ酸含量の結果でも、小麦麹と小麦塩麹には玄米麹と玄米塩麹と似たような傾向であったが、大麦麹と大麦塩麹には一定のばらつきが見られ

なかった。原料である大麦には元々高い抗酸化活性が検出されていた。その活性は玄米の約 5 倍、小麦の約 7 倍であった。麹菌の酵素生産能について、麹菌はその環境に適応して生存するため、原料の栄養成分に応じて最適な酵素を産生することが報告されている。また、麹菌にはフェルラ酸など抗酸化物質の代謝作用があると推察されている。大麦には元々玄米や小麦より抗酸化物質が多く含まれていたことで、麹菌の抗酸化物質分解酵素の酵素産生能が活発し、その結果大麦で調製した麹と塩麹には玄米と小麦で調製した麹と塩麹のような相関が見られなかったと推測される。

フェルラ酸は活性酸素消去活性やラジカル消去活性を持ち、その優れた抗酸化活性から酸化防止剤として食品に利用されている。また、フェルラ酸やその誘導体は、抗酸化活性以外に抗ガン作用、心血管疾患や糖尿病の予防作用、皮膚の紫外線防御作用など様々な生理機能を持つことが報告されている。さらに、超高齢社会を迎え日本でも近年患者数が大きく増加しているアルツハイマー型認知症の予防・改善効果があることも報告されている。また、玄米には白米より多くの細胞壁結合型フェルラ酸が含まれている。これらのことから、本研究で用いたリュチュエンシスの菌株よりさらに **FAE** 産生能が高い菌株を探索して玄米を発酵させることで、フェルラ酸を豊富に含む玄米麹が調製可能であると考えられる。

総括

日本国民の平均寿命および健康寿命は世界トップクラスにある。そのため長寿の国として多くの研究者から注目を集めている。一方、私が生まれ育った中国は、1970年代末から経済の「対内改革・対外開放」といういわゆる世界にも注目された「改革開放」路線に踏み切り、市場経済化や外資の導入スタート、そして2001年にWTO（世界貿易機関）に加盟するなどのおかげで、30年以上にわたって10%近いGDP（国内総生産）成長を遂げた。経済の急速発展に伴い、人々の生活が豊かになり、食品のバランスに気を配るようになってきた。そこで、隣国日本の長寿に関心を持つ人が多くなってきている。

寿命には心理状態や遺伝子など様々なファクターが影響を与えることが知られている。その中で、環境要因として重要な3つの柱は、食事、運動、生きがいであることが、長寿者の調査研究から明らかになっている（白澤ら、2011）。この中でも特に海外の研究者が注目しているのが、日本特有の食材と食文化である。「和食；日本人の伝統的な食文化」は2013年12月にユネスコ無形文化遺産に登録された。和食の中でも、味噌、日本酒、泡盛、みりん、食酢などは日本特有の発酵食品であり、欧米人が好んで食べているチーズやヨーグルトなどの発酵食品と栄養性・機能性成分が異なっている。特に、これらの和食の大きな共通的な特徴は全て「麹菌」を用いて調製した「麹」を使用している。

麹菌とは、日本醸造学会により（1）和名を黄麹菌と称する *Aspergillus oryzae*（オリゼ）、（2）黄麹菌（オリゼ一群）に分類される *Aspergillus sojae*（ソイヤ）と黄麹菌の白色変異株、（3）黒麹菌に分類される *Aspergillus luchuensis*（*Aspergillus luchuensis* var. *awamori*）（リュウチュウエンシス）及び黒麹菌の白色変異株である白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*（*Aspergillus kawachii*）を指すと定義されている。麹は、蒸して殺菌した米・麦・大豆などの穀類に「コウジカビ」である麹菌を繁殖させて発酵・熟成させたものである。塩麹（しおこうじ）は、麹と塩、水を混ぜて発酵・熟成させた日本の伝統的な調味料であり、古くから野菜や魚の漬物床として利用されてきたが、近年様々な料理への利用法や健康効果がマスコミなどで取り上げられ、人気を集めている。

近年、スーパーなどの小売店やインターネットなどで様々なメーカーから販売されている。しかし、市販の塩麹でも粥状やペースト状のものから液状あるいは粉末状のものまで様々であり、原料に麹と塩以外を使用したものなど多様化している。また、少なくとも私の住んでいる中国の東北地域には米の粒が残っている調味料がないため、日本の塩麹に強い好奇心があった。そこで本研究では塩麹を科学的に正しく理解し、商品の現状を把握することを目的に研究を

行った。最初に、異なる 9 種類の市販の塩麴を分析し、特性の違いの解明を試みた。次に、塩麴の微生物学的分析がほとんどなされていないことから、塩麴の微生物源となる麴の一般細菌および乳酸菌を分析した。最後に、味噌・醤油用の米麴と麦麴および清酒用の米麴を原料として塩麴を調製し、発酵過程における成分変化を調べた。

調べた結果、商品により呈味成分の量や酵素活性は大きく異なっていた。塩麴の利用法として肉を浸け置くと軟らかくなることがあるが、プロテアーゼ活性の極めて低い商品にはそのような効果は期待できない。市販の塩麴と研究室で調製した塩麴の成分を分析し、その特性を明らかにした。市販塩麴に一定の規格を定める等の対応が必要であると考えられた。

自然の恵みである穀類を大事にいただくのは一つのマナーでもある。身近なことから考えると、食品ロス防止や自然の恵みである穀物を効率よく食品にするのも一つの有効な方法である。そこで私は、塩麴の特性に関する知識及び麴菌のパワーを活かし、自分でも麴菌と穀類を用いた新たな穀類加工食品の開発を試みて、自然の恵みである穀物を効率よく食品にすることに自分なりの小さな貢献をしたいと考えた。そこで世界三大穀物と呼ばれている米、小麦、トウモロコシの中で、その大半が家畜飼料に使用されているトウモロコシを除いた米、小麦に加え、低温や乾燥した地方でもよく栽培される大麦の 3 種類の穀物を、麴菌を用いて発酵させた麴の研究を行った。

最初に、3 種の麴菌を利用して玄米で麴と塩麴を調製し、分析を行った。玄米の糠層が麴菌の繁殖を妨げると考えられたが、7 日を要するものの十分に菌が繁殖した麴が得られ、塩麴も調製できた。玄米、玄米麴と玄米塩麴の抗酸化能を測定した結果、3 種の麴菌で調製した玄米麴に全て原料の玄米より抗酸化活性増加した。その中、リュチュエンシス玄米麴の抗酸化活性は著しく高く、玄米の約 15 倍もあった。一方、3 種の麴菌で調製した玄米塩麴の抗酸化活性は玄米より増加したが、原料の玄米麴より活性は減少した。また、代表的な抗酸化物質であるポリフェノール含量を測定した。その結果、抗酸化活性と似たような結果が得られた。そこで各試料の抗酸化能とポリフェノール含量の相関を調べたところ、3 種の麴菌を利用して玄米で調製した麴と塩麴には $R^2=0.990$ と非常に高い相関があることが明らかとなり、玄米麴と玄米塩麴に含まれる抗酸化成分はポリフェノール化合物であることが示唆された。フェルラ酸は穀類に含む代表的なポリフェノールの一種であり、様々な効果が近年報告されている。そこで、3 種の麴菌で調製した玄米麴と玄米塩麴の遊離型フェルラ酸含量を測定した。その結果、玄米麴の遊離型フェルラ酸は原料の玄米より増加し、特にリュチュエンシス玄米麴に含むフェルラ酸の含量は原料の玄米の約 250 倍も増加した。玄米塩麴には玄米と比較すると、フェルラ酸は増加したが、原料の玄米麴と比

較すると減少した。この結果は抗酸化活性とポリフェノール含量の結果と一致した。そこで、試薬として販売されているフェルラ酸の抗酸化活性を測定してフェルラ酸の Trolox 相当量を求め、リュチュエンシス玄米麴中のフェルラ酸含量からフェルラ酸に由来する抗酸化活性を算出し、リュチュエンシス玄米麴の抗酸化活性において含有されるフェルラ酸がどの程度寄与しているのかを計算した。その結果、1 mol のフェルラ酸は 0.598 mol の Trolox に相当し、この値よりリュチュエンシス玄米麴の抗酸化活性の 60% はフェルラ酸によるものと推定された。フェルラ酸は穀物の細胞壁にヘミセルロースを構成するアラビノキシランにエステル結合した結合型として存在し、フェルラ酸同士が結合してジフェルラ酸を形成することで細胞骨格をより強固なものにしている。この結合しているフェルラ酸を遊離するフェルロイルエステラーゼ (FAE) 酵素を持つ様々な微生物が報告されており、麴菌はその一つである (Topakas ら、2007)。そこで 3 種の麴菌の FAE 活性を測定した。その結果、リュチュエンシスのみが非常に高い活性を示し、フェルラ酸含量と一致していた。細胞壁成分からフェルラ酸の効率の良い遊離にはキシラナーゼ等の細胞壁分解酵素も関係することが知られており、焼酎麴菌であるリュチュエンシスにはそれら酵素を多量に産生するという特徴がある (伊藤ら、2005)。したがって、フェルラ酸の生理機能を十分に活用するには、結合型フェルラ酸を遊離型に変えなければならない。

塩麴調製条件下における FAE 活性を検討するため、酵素活性におよぼす食塩の影響を調べた。様々な濃度の食塩存在下で FAE 活性を測定したところ、無添加での活性に比べ 10% 食塩で 16%、15% 食塩で 4% とその活性は食塩により大きく低下した。玄米塩麴は約 11% の食塩存在下で 7 日間かけて調製しており、玄米麴に含まれていた FAE は食塩により活性を大きく阻害されたと考えられた。リュチュエンシス玄米塩麴中のフェルラ酸含量は原料であるリュチュエンシス玄米麴より少なかった。麴菌にはフェルラ酸の代謝作用があると推察されていることから (松田ら、2000)、本研究で使用したリュチュエンシスにはフェルラ酸を代謝する酵素が存在し、その働きにより玄米塩麴中のフェルラ酸が減少するとともに、食塩による FAE 活性の阻害により、玄米からの新たなフェルラ酸の遊離が阻害されたためと推測される。

次に、3 種の麴菌を利用して小麦と大麦で麴と塩麴を調製し、分析を行った。小麦を原料に 3 種の麴菌で調製した麴と塩麴の抗酸化活性、ポリフェノール含量および遊離型フェルラ酸含量は玄米麴と玄米塩麴の分析結果と似た傾向であった。3 種の麴菌で調製した大麦麴と大麦塩麴には以上の測定 3 項目はばらつきが見られなかった。原料である大麦には元々高い抗酸化活性が検出されていた。その活性は玄米の約 5 倍、小麦の約 7 倍であった。奈良原 (1994) は、麴菌の酵素生産能について、麴菌はその環境に適応して生存するため、原料の栄養成

分に応じて最適な酵素を産生することが報告されている。また、麴菌にはフェルラ酸など抗酸化物質の代謝作用があると推察されている（松田ら、2000）。大麦には元々玄米や小麦より抗酸化物質が多く含まれていたことで、麴菌の抗酸化物質分解酵素の酵素産生能が活発し、その結果、大麦で調製した麴と塩麴には玄米と小麦で調製した麴と塩麴のような相関が見られなかったと推測される。

フェルラ酸は活性酸素消去活性やラジカル消去活性を持ち(Marinova、1992)、(Terao ら、1993)、その優れた抗酸化活性から酸化防止剤として食品に利用されている。また、フェルラ酸やその誘導体は、抗酸化活性以外に抗ガン作用、心血管疾患や糖尿病の予防作用、皮膚の紫外線防御作用など様々な生理機能を持つことが報告されている (Mancuso ら、2014)。さらに、超高齢社会を迎え日本でも近年患者数が大きく増加しているアルツハイマー型認知症の予防・改善効果があることも報告されている (Yan ら、2001)。また、玄米には白米より多くの細胞壁結合型フェルラ酸が含まれている。これらのことから、本研究で用いたリュチュエンシスの菌株よりさらに FAE 産生能が高い菌株を探索して玄米を発酵させることで、フェルラ酸を豊富に含む玄米麴が調製可能であると考えられた。

参考文献

- Belitz H.-D., W. Grosch, and P. Schieberle. (2009). Food Chemistry 4th revised and extended ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. P. 1
- Cho, J.Y., Kim, H.S., Kim, D.H., Yan, J.J., Suh H.W., and Song, D.K. Inhibitory effects of long-term administration of ferulic acid on astrocyte activation induced by intracerebroventricular injection of h-amyloid peptide (1–42) in mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 29, 901-907 (2005)
- Hashizume, K., Ito, T., Ishizuka, T., and Takeda, N. Formation of ethyl ferulata by rice koji enzyme in sake and mirin mash conditions. *J. Biosci. Bioeng.*, 116, 209-213 (2013)
- Jung, J.S., Yan, J.J., Li, H.M., Sultan, M. T., Yu, J., Lee, H.S., Shin, K.J., and Song, D.K. Protective effects of a dimeric derivative of ferulic acid in animal models of Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.*, 728, 30-34 (2016)
- Mancuso, C., and Santangelo, R. Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. *Food Chem. Toxicol.*, 65, 185-195 (2014)
- Marinova, E.M., and Yanishlieva, N.V. Effect of temperature on the antioxidant action of inhibitors in lipid autoxidation. *J. Sci. Food Agric.*, 6, 313-318 (1992)
- McCallum, J.A., Taylor, I.E.P., and Towers, G.H.N. Spectrophotometric assay and electrophoretic detection of *trans*-feruloyl esterase activity. *Anal. Biochem.*, 196, 360-366 (1991)
- Shibuya, N. Phenolic acids and their carbohydrate esters in rice endosperm cell walls. *Phytochemistry*, 23, 2233-2237 (1984)
- Shin, H.Y., Kim, S.M., Lee, J.H., and Lim, S.T. Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts. *Food Chem.*, 272, 235-241 (2019)
- Smith, D.C., Bhat, K.M., and Wood, T.M. Xylan-hydrolysing enzymes from thermophilic and mesophilic fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 475-484 (1991)
- Tenkanen, M., Schuseil, J., Puls, J., and Poutanen, K. Production, purification and characterization of an esterase liberating phenolic acids from lignocellulosic. *J. Biotechnol.*, 18, 69-84 (1991)

- Terao, J., Karasawa, H., Arai, H., Nagano, A., Suzuki, T., and Takama, K. Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acid and its related phenolic compounds in solution. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 1204-1205 (1993)
- Topakas, E., Vafiadi, C., and Christakopoulos, P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochem.*, 42, 497-509 (2007)
- Yan, J.J., Cho, J.Y., Kim HS, Kim, K.L., Jung, J.S., Huh, S.O., Suh, H.W., Kim, Y.H., and Song, D.K. Protection against α -amyloid peptide toxicity *in vivo* with long-term administration of ferulic acid. *Br. J. Pharmacol.*, 133, 89-96 (2001)
- 一島英治. 麹菌のタンパク質分解酵素. 日本醸造協会誌, 97, 7-16 (2002)
- 一色賢司. 食品衛生学. スタンダード栄養・食物シリーズ8. 東京化学同人(2005)
- 伊藤清. 焼酎麹菌の酵素生産の特徴. 日本醸造協会誌, 100, 838-848 (2005)
- 上野八重子、水谷理絵、工藤卓伸、原崇、城斗志夫. 植物性食品素材から分離した乳酸菌の大豆イソフラボンのアグリコンへの変換能. 日本食品科学工学会誌, 58, 173-177 (2011)
- 江崎秀男. 味噌を科学する. 生活の科学, 32, 1-9 (2010)
- 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)
- 尾関健二, 桐藤万裕, 筒井健司, 若泉賢功, 尾関清子. 米麹の糖化および発酵による抗酸化能の付与. 食品・臨床栄養, 4, 19-26 (2008)
- おのみさ. 麹のレシピーからだに「いいこと」たくさん. 池田書店 (2010)
- 賈思勰 (田中静一、小島麗逸、太田泰弘 編訳). 齊民要術 (新装版). 雄山閣 (2017)
- 木崎康造、井上康裕、岡崎直人、小林信也. 酒造原料米中のプロテインボディーの分離・定量. 日本醸造学会誌, 86, 293-298 (1991)
- 北本勝ひこ. 和食とうま味のミステリー. 河出書房 (2016)
- 児玉徹、川本伸一. 食品と微生物. 光琳選書9. 光琳 (2008)
- 桜井芳人、藤巻正生、加藤博通. 食品の加工と貯蔵. 光生館 (1987)
- 白澤卓二、舘野真知子. 塩麹と発酵食のレシピーおいしくてからだによく効く. アスペクト出版 (2011)
- 全国味噌技術会. みそ技術ハンドブック付属基準みそ分析法. (1995)
- 谷口久次, 橋本博之, 細田朝夫, 米谷俊, 築野卓夫, 安達修二. 米糠含有成分の

- 機能性とその向上. 日本食品科学工学会誌, 59, 301-318 (2012)
- 奈良原英樹. 麴菌と麴 (その 2) 製麴における麴菌の扱い. 日本醸造協会誌, 89, 954-964 (1994)
- 西澤千恵子, 太田剛雄, 江頭祐嘉合, 真田宏夫, 穀類のフェルラ酸含量. 日本食品科学工学会誌, 45, 499-503 (1998)
- 樋口誠一, 高橋学, 山路明俊. 小麦由来機能性成分の新規利用技術の開発 (2). 埼玉県産業技術総合センター研究報告, 6, 69-73 (2008)
- 伏木暢顕, 小石原はるか. 麴の「生きた力」を引き出す本. 青春出版社 (2011)
- 増田俊哉, 小山保夫, 稲葉譲, 新田智裕, 武田美雄, 仲本勝男, 國永秀樹, 西里さおり, 野中亮. 沖縄産食薬用植物エタノール抽出物の抗酸化関連活性. 日本食品科学工学会誌, 49, 652-661 (2002)
- 松田茂樹, 工藤康文, 麦味噌および大麦麴に含まれるフェルラ酸と抗酸化活性. 日本食品保蔵科学会誌, 26, 199-203 (2000)
- 森勝美. 16S リボゾーム RNA 遺伝子情報を利用した乳酸菌の同定システム. 日本醸造協会誌, 92, 188-194 (1997)
- 山本晋平, 松郷誠一. 塩麴～温故知新の調味料～. New Food Industry, 54, 69-83 (2012)
- 山元正博. 麴のちから. 風雲舎 (2012)
- 和田美保. 卒業論文「豆類およびニンジン、トマトの発芽過程における呈味成分、機能性成分の量的変化」(2004)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始多大なるご指導とご高配を賜りました主指導教員城斗志夫教授に対して深謝の意を表します。

また、終始適切なるご指導を賜りました指導教員原崇准教授および指導教員藤村忍教授並びに同専攻先生西海理之教授に深謝の意を表します。

本研究の第 2 章第 1 節の研究にご協力してくださった白石桃子氏に感謝の意を表します。

最後に、上野八重子氏と工藤卓伸氏を始め食品化学研究室の先輩の方々、同輩の方々、後輩の方々および生命・食料科学専攻の諸先生方に感謝の意を表します。