

乾燥米麴粉末作成における最適条件検討およびメタボロミクス解析

人間科学研究科 博士前期課程2年 前澤 志織

1. はじめに

「麴」は米や麦、豆などの穀物やそれらの副産物に麴菌を付着させて発酵させたものの総称であり（村上 1986）、清酒や味噌、醤油などの発酵食品の製造に利用されている（渡邊ら 2015）。近年は、麴菌を利用した食品や麴菌そのものの薬理作用が盛んに研究されており、多くの機能性が見出されている（今村 2015）。

蔵元や麴師らによって受け継がれてきた製造条件については全身の触覚や勘、経験に頼る部分が多くあり（合資会社小泉麴屋）、製造条件の科学的根拠を示した報告は多くないため（柳内ら 1993, 岩野ら 2004）、機器を用いた正確な温度管理下で製麴し、米麴の特性に対する製麴温度条件の影響について解明することを目的とした。また近年、発酵食品を利用した新たな調味料として米麴粉末調味料の商品化がなされているが、その機能性や特性を科学的に検討した研究は多くないため、調理に活用可能な乾燥米麴の効率的な作製を目指し、新たな調味料と注目されている乾燥米麴粉末の作製方法の検討および乾燥米麴粉末の特性の評価を目的とした。

2. 乾燥米麴粉末の特性の比較と調理特性の検討

2.1 材料および方法

・米麴サンプルの作製方法

製麴過程において、異なる保温温度条件、保温時間条件で米麴の作製を試みた。材料は米（五百万石/山形県2020年産）、麴菌（改良長白菌/菱六製）、水（奥大山の天然水/サントリー）を用いた。製麴時の保温温度を3条件（30、35、40℃/48時間）、保温時間を3条件（24、48、72時間/35℃）とし、その他の条件は統一して

米麴を作製した。保温は発酵器（発酵器mini PF110D/日本ニーダ株式会社）を使用した。

・乾燥米麴サンプルの作製方法

乾燥方法は温風乾燥と凍結乾燥とし、温風乾燥は40℃、60℃、80℃の3温度帯で行った。

本項目では35℃/48時間保温で作製した米麴サンプルを使用した。

2.2 統計処理

統計処理はExcel統計（ver4.03/株式会社社会情報サービス）の多重比較検定（Tukey-kramer）を行った。有意水準は1%（ $P<0.01$ ）および5%（ $P<0.05$ ）とした。

2.3.1 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた乾燥米麴粉末の遊離アミノ酸測定

・材料および方法

サンプル（温風乾燥40、60、80℃、凍結乾燥）2gをファルコンチューブに秤量し2% スルホサリチル酸溶液を8mL加え、転倒混和後、冷蔵庫で1時間冷却した。その後、遠心処理を行い（2500rpm, 15分）、上清を再び遠心処理を行った（10000rpm, 10分）。さらに上清をフィルタ付チューブ（ポアサイズ0.22 μ m）でろ過し、ろ液をHPLC分析の試料液とした。

遊離アミノ酸測定には、高速液体クロマトグラフィーアミノ酸分析システム（株式会社日立ハイテクサイエンス製）を使用した。ポストオルトフタルアルデヒド蛍光法にて19種類の遊離アミノ酸と2種類のペプチドを測定した。標準物質（富士フイルム和光純薬株式会社製）を0.02mol/Lの塩酸で50 μ mol/mLに調整したスタンダードおよびサンプルは、20 μ Lを、シリンジを用いてカラムにアプライして溶出し、ピークが検出されるまでの保持時間を確認した。得られた保持時間とピーク面積から遊離アミノ酸を同定し、定量した。

・結果および考察

今回は検出された21成分のうち、旨味成分

(アスパラギン酸、グルタミン酸)、甘味成分(セリン、グリシン、アラニン)、苦味成分(バリン、イソロイシン、ロイシン)に関連するアミノ酸を抽出した。また血圧上昇抑制効果など機能性を有する γ -アミノ酪酸(GABA)について着目した。旨味成分においては凍結乾燥サンプルで多く、甘味成分は温風乾燥60℃サンプルで多く、苦味成分は温風乾燥80℃サンプルと60℃サンプルで多かった。GABAは4群間で有意な差は見られなかった。

食品を乾燥させる本来の目的は食品の貯蔵性を高めることである。凍結乾燥は凍結した試料から氷を昇華させて水分を取り除くため材料の熱変性や化学変性の影響が少ないが、従来の温風乾燥や熱風乾燥と比べるとコストがかかることが問題とされている。従来の温風乾燥や熱風乾燥は熱変性しやすく、表面硬化などの品質の変化が生じる(上西ら 2004)。温風乾燥60℃サンプルと温風乾燥80℃サンプルの中には、乾燥終了時に茶色く色づいていることが観察されたサンプルがあり、メイラード反応によるものであると考えられた(臼井 2015)。温風乾燥60℃サンプルと温風乾燥80℃サンプルはメイラード反応により独特な香りと風味が付加された可能性が考えられる。

2.3.2 乾燥米麴の乾燥方法によるプロテアーゼ活性の比較

・材料および方法

チロシン標準液、米麴(温風乾燥40、60、80℃、凍結乾燥)抽出液、ブランクをそれぞれ準備し、0.4M炭酸ナトリウム溶液と希釈フェノールを加えて攪拌し、38℃に温めたウォーターバスで30分保温、その後分光光度計にて660nmで吸光度を測定した。検量線作成用チロシンの結果をもとに検量線を作成し、計算式を用いてpH6.0における酵素活性を算出した。

・結果および考察

凍結乾燥サンプル(4427 U/g)、温風乾燥80℃(3533 U/g)、温風乾燥60℃(3336 U/g)、温風乾燥40℃(3157 U/g)の順となり、凍結乾燥サンプルのプロテアーゼ活性は他の3サンプル全てと比較して有意に高く、温風乾燥80℃サンプルのプロテアーゼ活性は温風乾燥40℃サンプルと比較して有意に高かった。本実験においても凍結乾燥サンプルでは熱変性や化学変性の酵素活性への影響は少なく、他の3群は乾燥工程で酵素の低下や変性が起こったと考えられ、プロテアーゼ活性が凍結乾燥サンプルよりも低くなったと考えられる。

2.3.3 乾燥米麴粉末添加による鶏ミンチ肉の軟化に及ぼす効果の検討

・材料および方法

鶏ムネミンチ肉(当日購入/国内産)を等分し、米麴粉末(温風乾燥60℃、凍結乾燥)を1%添加、3%添加および無添加の試料を作製した。添加した乾燥米麴粉末は20メッシュ(1.27mm/m目)を使用した。ミンチ肉をスプーンで30回こね、15gずつ取りセルクルで成型後ラップをかけ、上から板を軽く乗せて高さを均一にした。電子レンジ(ヘルシオ/SHARP製)500Wで1分、電子レンジのウォーターオープンモードの予熱あり210℃で10分加熱調理し、測定用サンプルとした。加熱後の試料の内部温度が、大腸菌が死滅する75℃以上であることを確認した。加熱後30分室温で常温に戻した後供試した。

食感を数値化することができるテクスチャアナライザー(TA.XT plusC/英弘精機社製)を用いて、2回押しモード、歪み(Strain40%)で測定を行い、硬さと凝集性について検討した(A. S. Szezesniak et al. 1963)。

・結果および考察

硬さにおいては、温風乾燥60℃サンプル3%添加したミンチ肉は、添加なし、温風乾燥60℃サ

ンプル1%添加、凍結乾燥サンプル1%添加した鶏ミンチ肉と比較して有意に柔らかかった。

凝集性においては、添加なし、温風乾燥60℃サンプル1%添加、凍結乾燥サンプル1%添加は、温風乾燥60℃サンプル3%添加、凍結乾燥サンプル3%添加と比較して有意に高かった。乾燥米麴粉末添加により柔らかく、凝集性は高くなり、物性が変化することが認められた。乾燥米麴粉末が鶏ミンチ肉のタンパク質を分解することで柔らかくなったことが示唆された。

2.3.4 乾燥米麴粉末添加鶏ミンチ肉の味の強度に関する官能検査

・材料および方法

試料調整は2.3.3と同様に行った。官能検査では6名の研究協力者に味の強度の違いについて検査した。評価項目は、添加なしサンプルと比較した味の強弱について、香り、塩味、甘味、酸味、旨味、コク味、後味の7項目に回答してもらった。回答から、添加なしを基準とし、と同じ強さの場合を0点とし、弱いを-1点、とても弱いを-2点、強いを1点、とても強いを2点として得点化した。

・結果および考察

本実験は神戸女学院大学の倫理委員会にて承認されたのち実施した（承認No.22-17）。各群間で有意な差は見られず、官能検査で味の強度の違いを明らかにすることができなかった。しかしながら、温風乾燥60℃サンプルでは1%添加における味の強度が高い傾向が見られ、凍結乾燥サンプルでは3%添加における味の強度が高い傾向が見られ、米麴添加によりタンパク質が分解し、呈味が変化する可能性が示唆された。

3. キャピラリー電気泳動を用いた乾燥米麴粉末のメタボロミクス解析

・試料作製

2.1で作製した米麴サンプル保温温度（30、35、40℃ /48時間）、保温時間（24、48、72時間/35℃）に加え、麴菌を付着させない蒸米サンプルを作製した。米麴サンプルおよび蒸米サンプルを50 mgずつ秤量し、実際に秤量したサンプルの重さ×8/50 μL の内部標準①（・D-カンファー-10-スルホン酸、DL-Methionine Sulfone）を加えた。

十分に攪拌した後、秤量したサンプルの重さ×20 μL のメタノールを加え、よく攪拌し、遠心処理を行った（5000 rpm, 20分, 4℃）。上清500 μL をチューブにとり、クロロホルム500 μL を加えてよく攪拌した後、超純水300 μL を加え、再度よく攪拌し、遠心処理を行った（5000 rpm, 10分, 4℃）。面の上層清を新しい別のチューブにとり、遠心濃縮機（CVE-2100/東京理化工械（株）製EYELA）で処理し（60℃, 2時間エバポレーションしてメタノールを揮発）、試料を濃縮した。

濃縮後、超純水300 μL を加え、凍結乾燥機（東京理科器械（株）製）で一昼夜凍結乾燥処理を行った。凍結乾燥後、内部標準②（Trimellitic Acid、PIPES）を20 μL ずつ加えたものをサンプルとした。

・材料および方法

蒸米サンプルと米麴サンプル保温温度条件（30、35、40℃ /48時間）、保温時間条件（24、48、72時間/35℃）を使用した。キャピラリー電気泳動質量分析装置（CE-MS装置/アジレント・テクノロジー（株）製）を用いて、陽イオン性代謝物質（Cation）および陰イオン性代謝物質（Anion）を測定した。以後、陽イオン性代謝物分析条件で測定した結果はCation、陰イオン性代謝物質で測定した結果はAnionと記載する。測定は1サンプルにつき3本、1本につ

き3回測定し、n=9とした。測定データの解析にはMass Hunter Profinder（アジレント・テクノロジー（株）製）および、Mass Profiler Professional（アジレント・テクノロジー（株）製）を使用した（笹 2012）。

内部標準物質を補正物質として用い、試料毎の操作誤差、装置誤差を補正し、サンプル中の各成分について抽出イオンカレントクロマトグラムのピーク面積値を算出した。検出された成分についてはデータベースリスト（108成分）と照合し、本実験の解析に用いた。統計処理は解析ソフトウェア上ではずれ値検定後、有意差のあるものを結果に示した（KEGG Metabolic pathway）。

・結果および考察

麹菌添加による代謝物の差異を調べるために、蒸米サンプルと米麹サンプル（35℃ /48h）の検出成分数の比較を行った。蒸米サンプルではCationで13成分、Anionで3成分が検出されたのに対し、米麹サンプルではCationで42成分、Anionで23成分検出された。蒸米サンプルよりも米麹サンプル（35℃ /48h）で検出される成分が多く、発酵により代謝産物が増加することが示唆された。

米麹サンプル保温温度条件（30、35、40℃ /48時間）、保温時間条件（24、48、72時間 /35℃）の米麹サンプルのメタボロミクス解析を行った。その結果、保温温度条件（以下Temp）で56成分、保温時間条件（以下Time）で53成分が共通して検出された。Tempにおいては35℃サンプルで検出量が多く、続いて40℃、30℃の順であった。Timeでは48時間サンプルで検出量が最も多く、続いて72時間、24時間の順であった。クエン酸回路における検出した代謝物は35℃と48時間サンプルが最も多いことが示唆された。Tempのアミノ酸においては40℃保温サンプルで検出量が多い傾向を示し、クエン酸回路で示した有機酸とは異なる結

果が認められた。また、GABAは35℃で検出量が多いことが示唆された。

Tempにおいては、代謝産物は30℃から35℃で増加し、35℃から40℃で減少するパターンが多くを占めていた。温度が高くなるにつれ、発酵が活発になり代謝産物も増加するという仮説を立てていたが、35℃から40℃で減少する代謝産物が多かった。

一方、Timeについては、発酵時間が短い24時間では有機酸、アミノ酸と共に検出量が少なく、48時間で増加したが、72時間では有機酸、アミノ酸ともに減少する傾向があることが明らかになった。今回、時間経過によって増加して減少する要因については明らかにすることはできなかったが、24時間では発酵時間が短いため、48時間と比較して代謝が活発ではない可能性が示唆された。

4. 参考文献

- 今村和彦（2015）麹菌の新たな機能性 生化工学会誌 Vol.93 No.8 p.491
- H. H. Freidman・J. E. Whitney & A. S. Szezesniak（1963）J. Food Sci., Vol. 28, pp. 385-389
- 岩野君夫・伊藤俊彦・長谷川恵美子・高橋和弘・高橋仁・中沢伸重（2004）製麹における原料米の品種と精米歩合の影響 日本醸造協会誌 Vol. 99 No. 1 pp. 55-63
- 京都大学 KEGG Metabolic pathway, <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>（2023年1月24日）
- 合資会社小泉麹屋 米麹ができるまで（前半）
<https://www.koujiya.com/kouji/how-to-make-kouji-1/>（2022年12月30日閲覧）
- 村上英也（編者）（1986）：麹学 日本醸造協会
- 笹一志（2012）キャピラリー電気泳動装置の原理と分析事例 表面技術 小特集:めっきにおける分析技術(Ⅰ) Vol. 63 No. 8 pp. 482-485

- 上西浩史（2004）相良泰行：食品凍結乾燥の
基礎知識と実用技術への展開(1)食品分野
における凍結乾燥技術の歴史と利用の動
向 日本冷凍空調学会 冷凍=Refrigeration,
Vol. 79 No. 922 pp26-32
- 臼井照幸（2015）食品におけるメイラード反応
日本食生活学会誌 Vol. 26 No. 1 pp. 7-10
- 渡邊誠衛, 大友理宣（2015）新規麹菌“CK-33”を
用いた乾燥麹及び粉末麹の開発 秋田県総
合食品研究センター Vol. 17 pp. 1-7
- 柳内敏靖, 福田潔, 長野知子, 中村智美, 宮
崎紀子, 水間智哉, 清川良文, 若井芳則
（1993）“原料米の製麴適性“ 日本醸造協会
誌 Vol. 88 No. 12 pp. 977-983