

## 2020年度 新産業創出研究会「研究成果報告書」

### 「日本ワインぶどう果皮成分の麹菌固体培養による食品・化粧品機能性素材への高機能化」

研究代表者	[岡山大学・教授]	[神崎 浩]
共同研究者	[岡山大学・教授]	[仁戸田 照彦]
	[岡山県工業技術センター・専門研究員]	[三宅 剛史]
	[岡山県工業技術センター・専門研究員]	[伊藤 一成]
	[岡山県工業技術センター・研究員]	[谷野 有佳]
	[(株)樋口松之助商店・取締役]	[山下 秀行]
	[(株)樋口松之助商店・研究室リーダー]	[中川 拓郎]
	[(株)果実工房・代表取締役]	[平野 幸司]
共同提案者	[岡山大学・産学官連携コーディネーター]	[栢菅 一久]

#### 1. はじめに

我々はユニークな構造を有している微生物や植物の二次代謝産物の一部の構造のみを微生物細胞や酵素を利用して変換すると、活性や物性に大きな変化をもたらすことを報告し、化粧品素材や食品素材等への商品開発が可能な化合物に変換が可能であることを明らかにしてきた。さらに、押し麦固体培養で糸状菌によって新規生理活性アルカロイド Pochonicine が生産されること、その物質は液体培養では生産されず固体培養でのみ生産されること、植物(麦)が生産する二次代謝産物からの微生物変換で生産される可能性が高いことを報告し、植物を培養基材とする固体培養でその成分の高機能化が達成できる事を明らかにしてきた。

穀物類に少量の水を加え糸状菌を生育させる固体培養技術は、醸造における麹造りで古くから利用されてきた。糸状菌の中でも麹菌は固体培養により特異的に発現する遺伝子を持ち、様々な酵素を生産することが知られており、発酵食品の製造では米や豆などの穀物を基材として麹菌を固体培養した麹が用いられ、固体培養における麹菌の有用性が知られている。しかしこれまでに穀物以外を麹にした例や、二次代謝産物の微生物変換に麹を用いた例はほとんどない。

近年の日本ワイン生産増加により副産物として増加しつつある日本ワインぶどう搾り粕(以下 日本ワインパミスと呼ぶ)にはアントシアニン、レスベラトロール、カテキン等のポリフェノール類が著量含まれており、その有効利用を目指して機能性研究がなされているが、微生物変換で新素材を作成する研究はなされていない。そこで、本研究では、日本ワインパミスへの麹菌の固体培養での生育(日本ワインパミス麹の創生)を試みた。

醤油、味噌、清酒、焼酎など日本の伝統的醸造における固体培養手法としては、杜氏の職人芸により湿温度管理を行う「蓋麹(こうじぶた)法」が使用されているが、今回の研究においては、図1-1に示す、シャーレ培養(トレイ培養)法と岡山県工業技術センターで開発した無通風箱培養法の2種を採用した。



図 1-1 2種の固体培養(シャーレ培養と無通風箱培養)手法

## 2.概要

地域植物資源には様々な機能性成分が含まれる素材が豊富に存在する。これらの植物代謝成分はその複雑でユニークな構造から機能性を発揮しているが、その機能性の活用はもちろんのこと、微生物変換によるさらなる高機能化により、新規素材を創生することが可能と考えられる。麹菌は、伝統的発酵食品の製造に用いられ、固体培養において特異的に発現する遺伝子を持つことが知られている。しかし、これまでは、穀物のデンプンやタンパク質の分解による発酵やそれら分解酵素の効率的生産に焦点が当てられてきており、植物二次代謝産物の変換に焦点を当てた例は少ない。そこで、麹菌固体培養技術を駆使し、ワイン醸造副産物でありポリフェノール類等を豊富に含む日本ワインパミスの成分を構造変化させ、より有用な機能性を示す化合物を含む素材の創生を目指した。麹菌固体培養として、シャーレ培養法と無通風箱培養法を用いたところ、どちらの培養法でも日本ワインパミス上で麹菌の生育が認められた。興味深いことに、麹菌が生育した日本ワインパミス抽出物の、総ポリフェノール量や抗酸化活性に変化が確認され、液体クロマトグラフィー分析で、麹菌の固体培養により増加する化合物が複数確認できたことから、麹菌の固体培養により日本ワインパミス成分が高機能化された可能性が示唆された。

## 3.研究成果および今後の課題

固体培養には、乾燥調製した日本ワインパミス(ピノワールとツヴァイゲルトルーベの混合)と、それを食品の裏ごし機で処理して粉碎した試料の2種を用いて実施した。

固体培養手法として、①シャーレ培養(トレイ培養)法と②無通風箱培養法を採用し、各手法で日本ワインパミスを基材とした麹菌の生育の有無の確認、麹菌の生育による日本ワインパミスに含まれる成分及び機能性変化の確認を行った。これら2種の方法はともに固体培養手法であるが、①では容器の下からの通気がないのに対し、②では容器の下部がメッシュになっているため下からの通気があること、上下の透湿多孔膜を通して培養物から発生する水蒸気の箱外への移動が可能となっていることの点で異なっており、固体培養で重要とされる温湿度管理の違いがあるため、その発酵で植物基材の成分変化にも違いが出ることを期待してこの2種の手法を採用した。

麹及びそのコントロールの植物基材の成分変化及び機能性変化については、試料の抽出物を用いて検討を行った。成分変化については、フォーリン・チオカルト(Folin-Ciocalteu)法で求める総ポリフェノール量と液体クロマトグラフィーによる分離定量による成分変化の2種で判定し、機能性変化は、ラジカル2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)補足活性(DPPH法)で判定する抗酸化活性を用いた。

### 3-1 日本ワインパミスと麹菌を用いたシャーレ固体培養

日本の古来からの発酵食品に利用される麹菌には様々な種類が存在し、その種類ごとに用いる基材に適した酵素活性が発現するように育種されてきている。すなわち、菌株ごとに異なる酵素活性を発現することが知られており、その結果として日本ワインパミスの成分の変化も菌株による差が期待される。そこでシャーレ培養法においては、4種の麹菌を用いて製麹実験を行った。

30°Cで74時間培養した時の麹菌の生育状況は図3-1に示した通りで、全ての菌株が日本ワインパミス基材に生育し、この時点で孢子着生の認められる菌株も存在した。

これら4種の麹菌の麹と植物基材の抽出物について成分分析を行なったところ、菌株ごとにその傾向が異なるという興味深い結果が得られた。総ポリフェノール量においては、基材に比較して増加している株と減少している株が存在し、この傾向はDPPH法で判定した抗酸化活性の傾向と類似していた。さらに液体クロマトグラフィーにおいて、基材にはほとんど存在しない化合物が特定の麹菌が生育した麹で大きく増加していること、さらに複数の化合物が麹菌の生育で増加すること、その変化は菌株ごとに大きく変わることが判明した。

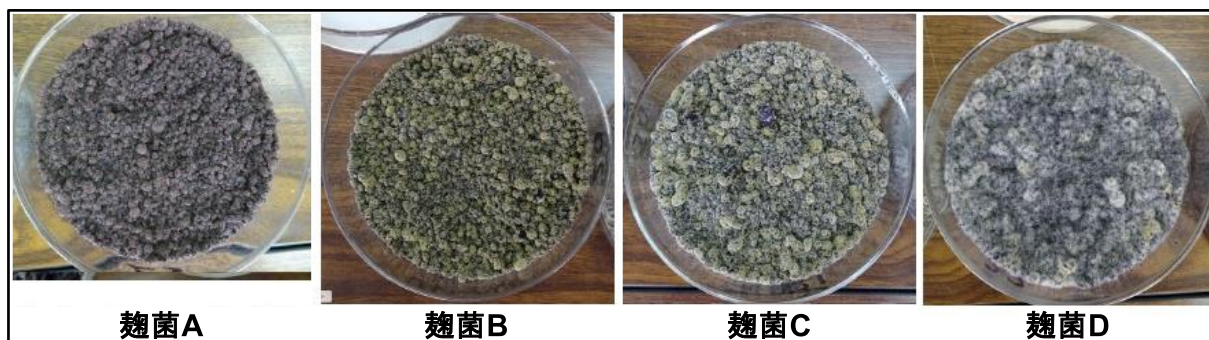


図 3-1 日本ワインパミスの麹菌固体培養(シャーレ培養)の生育状況  
(使用した日本ワインパミス: 粉碎した物, 30℃で 74 時間培養後の麹試料)

### 3-2 日本ワインパミスと麹菌を用いた無通風箱培養

基材重量(未粉碎:100g, 粉碎:200g)に対し 60%の蒸留水を加えなじませた後, 箱当たり約  $10^9$  の麹菌の胞子の胞子を加え, 30℃, 95%RH で無通風箱培養を行った。

その生育状況の継時変化の写真を図3—2に示す。基材として未粉碎・粉碎の2種を用いたが、いずれの基材においても 72 時間後には麹菌の生育が目視で確認できた。一般の麹における麹菌の生育の指標として用いられる, 酵素活性を測定したところ, 時間の経過に伴い増加していることが確認された。

この箱培養によって得られた麹と植物基材の抽出物について成分分析を行なったところ, 総ポリフェノール量が基材に比べて継時的に変化し, その変化と DPPH 法で判定した抗酸化活性の変化の傾向が似ていた。さらに液体クロマトグラフィーで分析した化合物変化についてはシャーレ培養での変化とは似ていたが, 箱培養特徴的な変化も認められた。

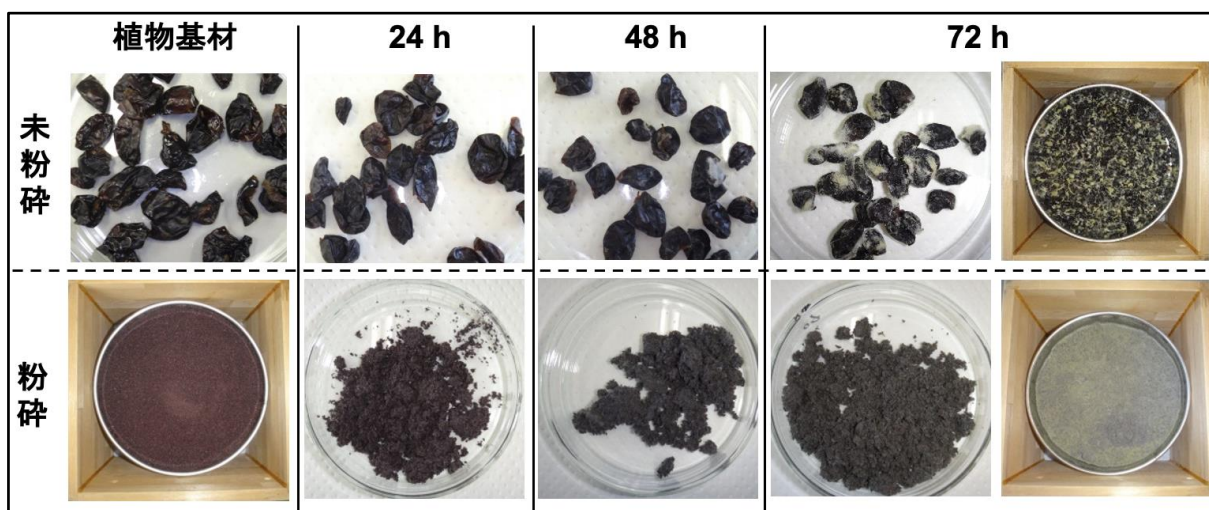


図 3-2 日本ワインパミスの麹菌固体培養(箱培養)の生育状況  
(使用した日本ワインパミス: 上;未粉碎, 下;粉碎, 30℃で培養した麹の培養継時変化)

#### 4. おわりに

本研究により、日本ワインパミスへの麹菌の生育が2種の固体培養法(シャーレ培養と箱培養)の両方で可能であることが証明できた。興味深いことに、麹菌の生育に伴い、成分変化が生じ、抗酸化活性で評価した機能性が大きく変化することも明らかとなった。今後これらの成分変化の精査を行うとともに、固体培養条件の検討を行うことで、高機能化日本ワインパミス麹の創生が達成され、その素材を用いた食品あるいは化粧品などの新商品開発が期待される。

#### 5. 本研究の今後の計画

今回の固体培養での成分変化を精査し、特に増加した成分の同定・構造解析を行う。さらに DPPH 法で判定する抗酸化活性の精査に加えて、それ以外の機能性の変化を検討し、麹菌を生育させることによる変化を科学的に正確に判定し、それらの科学的裏付けに基づいた素材開発を実施する予定である。

#### 6. その他

##### (1) 出願特許(タイトル・出願番号・発明者・特許権者など)

なし

##### (2) 投稿論文(タイトル・学会名等)

学会発表:

麹菌固体培養による日本ワインパミス成分の高機能化

日本農芸化学会 2021 年度大会(仙台・オンライン)2021.3.20(講演番号: 3C06-06)

奥川日菜乃<sup>1)</sup>, 橋本敦子<sup>1)</sup>, 三宅剛史<sup>2)</sup>, 伊藤一成<sup>2)</sup>, 谷野有佳<sup>2)</sup>, 山下秀行<sup>3)</sup>, 中川拓郎<sup>3)</sup>, 平野幸司<sup>4)</sup>, 仁戸田照彦<sup>1)</sup>, 神崎浩<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 岡山大学大学院環境生命科学研究科, <sup>2)</sup> 岡山県工業技術センター, <sup>3)</sup> (株)樋口松之助商店,

<sup>4)</sup> (株)果実工房

##### (3) 本研究会の参加企業・団体名

(株)果実工房: 日本ワインぶどう搾り粕(日本ワインパミス)の乾燥試料の作成

岡山県工業技術センター: 日本ワインぶどう搾り粕(日本ワインパミス)の麹菌固体培養(無通風箱培養)

(株)樋口松之助商店: 日本ワインぶどう搾り粕(日本ワインパミス)の麹菌固体培養(シャーレ培養)



競輪の補助事業

この報告書は、競輪の補助により作成しました。

<https://jka-cycle.jp>