

# 富有柿幼果黒麹菌発酵物における発酵温度の検討

折居 千賀

## Investigation of Fermentation Temperature in Fermented Product of Immature 'Fuyu' Persimmon using *Aspergillus luchuensis*.

Chika Orii

Previously, we found that fermentation using *Aspergillus luchuensis* enhanced the functionality of the fruit of immature 'Fuyu' persimmon. However, the range of fermentation temperatures suitable for functional enhancement was unknown. Therefore, we investigated the effect of temperature on the enhancement of  $\beta$ -lipase inhibitory activity and the production of flavor and functional components in the range of 25 °C to 40 °C. The growth of the fungus was delayed at 25 °C, and no spores were formed at 40 °C. In  $\beta$ -lipase inhibitory activity, similar enhancement was observed at all temperatures. A component with  $\beta$ -lipase inhibitory activity was found and designated as Compound A. Compound A showed the highest production amount at 40 °C. In flavor, there were differences in sourness and bitterness. From these, it was found that the difference in fermentation temperature affected the functional enhancement, the production of functional components, and the flavor.

**Key Words:** persimmon, fermentation temperatures, *Aspergillus luchuensis*,  $\beta$ -lipase inhibitory activity, flavor

### 1. 背景および目的

これまで富有柿幼果を原料とし、固体および振とう発酵法の確立や機能性の増強、発酵物の加熱殺菌処理、生体に対する投与の影響について検討した。富有柿幼果を発酵させて得られた発酵物は固体、振とうともに *In vitro* では  $\beta$ -リパーゼ阻害活性や ACE 阻害活性, DPPH ラジカル消去活性が増加し<sup>1)</sup>, *In vivo* では健常 SD ラットに対する発酵物抽出液の投与により、抗肥満に関する影響がみられたことを報告した<sup>2)</sup>。また、 $\beta$ -リパーゼ阻害活性等の機能性が加熱で損なわれないことを明らかにした<sup>3)</sup>。

現在、黒麹菌の発酵に適した温度は 35 °C ~ 38 °C とされている。しかし、製麹の際はクエン酸などの有機酸生成に適した温度帯、糖化を行う酵素類の最適温度との兼ね合いも含め、細かい温度管理がなされており、発酵温度は常に一定ではない<sup>4)</sup>。九州南部の焼酎や沖縄の泡盛製造において、クエン酸の生成は雑菌抑制に重要な要素で、清酒醸造における乳酸菌の役割を担うものとされる。このため、黒麹菌および白麹菌を用いた酒造には生酸のための温度管理が作業工程に組み込まれるのが一般的である。それに対し、これまでの検討では開始より終了まで 35 °C という一定の温度条件で行っている。これは、可能な限り簡易な方法による発酵条件の確立を目的としたからである。これらのことを踏まえ、本報告では黒麹菌による幼果の発酵に適した発酵温度の範囲とそれとともなう  $\beta$ -リパーゼ阻害活

性の増強および風味への影響について検討した。具体的には異なる温度条件で発酵を行い、 $\beta$ -リパーゼ阻害活性や成分、風味への影響を検討し、富有柿幼果の発酵に適した温度条件について考察した。

### 2. 方法

#### 2.1. 発酵および抽出法

発酵菌には黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis* NBRC 111188, 旧 *Aspergillus awamori* NBRC4033) を用いた。原料は 7 月上旬に奈良県農業研究開発センターにて摘果した富有柿幼果を用いた。固体発酵については従来の方法で以下の通りに行った<sup>1)</sup>。富有柿幼果約 40 g を 100 °C の熱水で 10 秒間煮沸処理し、滅菌済みビーカーに移した。滅菌済みステンレス鉢にて細断した試料を滅菌済み 200 ml バッフルフラスコに移し、通気性があるシリコ栓で密封した。種菌は黒麹菌をポテトデキストロース寒天斜面培地 (Difco Laboratories) で 35 °C, 3 日間培養したものを用いた。滅菌水 10 ml で懸濁後、孢子懸濁液 3.0 ml を添加し、それぞれの設定温度 (25 °C, 30 °C, 35 °C, 37 °C, 40 °C) にて好気発酵を行った。このとき、温度によりグループ A (25 °C, 30 °C, 35 °C), グループ B (35 °C, 37 °C, 40 °C) にわけて比較を行うことにした。また、機能性の経時変化を調べるにあたり、発酵中の均質

なサンプリングは困難であると考えた。そのため、それぞれの設定温度に対してフラスコを3つ用意し、発酵期間を1日、3日、7日に設定し、指定の期間で発酵を終了させることでサンプリングの代わりとした。発酵終了後、水による抽出を4℃で3日間行ったのち、ろ紙による残渣の除去および滅菌フィルターによる孢子や菌体の除去を行い、減圧乾固した。得られた抽出液を10% (w/v) となるように水に溶解し、試料溶液とし、 $\beta$ -リパーゼ阻害活性について調べた。

## 2.2. $\beta$ -リパーゼ阻害活性の測定

$\beta$ -リパーゼの測定は既報のものを一部改変して行った<sup>5)</sup>。基質に4-メチルウンベリフェロンのオレイン酸エステル (4-MUO, Tronto Research Chemicals Inc.)、酵素は豚膵臓由来 $\beta$ -リパーゼ (和光純薬工業 (株)) を用い、生成した4-メチルウンベリフェロン (4-MU) の蛍光 (励起波長 355 nm, 蛍光波長 460 nm) を測定し、50% 阻害濃度 ( $IC_{50}$ ,  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を算出した。なお、 $IC_{50}$  の値が小さければ小さいほど高い阻害活性であることを示す。

## 2.3. 発酵物抽出液の LCMS 分析および活性成分 A の定量

発酵物抽出液について LCMS 分析を行った。試料の前処理にフィルターを用いたろ過を行い、ネガティブイオンモードにて測定した。LCMS 装置は Agilent 6430 triple Quad LCMS (アジレントテクノロジー (株))、カラムは逆相カラムの Synergi hydro-RP100A (150 mm  $\times$  2 mm-i.d., 粒径 3 $\mu\text{m}$ , Imtakt (株))、移動相として A 液は 2% 酢酸水溶液、B 液は 0.5% 酢酸水溶液とアセトニトリルを 1:1 (v/v) で混合したものをを用いた。流速は 0.3 ml/min、カラム温度は 45℃ に設定した。B 液 2% で 2

分間保持したのち、B 液を 15 分かけて 0% から 45% に上げ、10 分かけて B 液を 100% まで上げるグラジエントプログラムとした。注入量は 3 $\mu\text{l}$  とした。イオン化は ESI (Electrospray Ionization) 法で、走査範囲は  $m/z$  125-1000、フラグメンター電圧を 100 V、乾燥窒素ガス (350℃) を毎分 10 L、ネブライザー圧を 55 psi、キャピラリー電圧はポジティブおよびネガティブともに 4000 V とした。活性成分 A の定量についてはカテキンを用いた検量線を作成し、mg-カテキン相当量 / 1.0 g で算出した。

## 2.4. 味認識装置による風味解析

各発酵物について味認識装置 SA402B (インテリジェントセンサーテクノロジー) を用いた風味解析を行った。試料は発酵物抽出液を用いた。このとき、相対評価の基準には未発酵の効果抽出液を設定した。測定時、試料液を解凍して味認識装置に設置後、装置全体をアクリルケースに入れて内部を窒素ガスで置換した。5 回測定したのち、2 回目以降の値をもとに解析を行った。測定項目は旨味、塩味、酸味、苦味雑味、渋味刺激、旨味コク、苦味および渋味とした。

## 3. 結果

### 3.1. 発酵温度の違いによる発酵物の外見的变化

グループ A (25℃, 30℃, 35℃), グループ B (35℃, 37℃, 40℃) について、7 日間発酵後の外見的变化を **図 1** に示した。グループ A において 25℃ 条件下では 30℃, 35℃ と比較して黒麹菌の生育が遅い傾向がみられた。また、グループ B では 35℃, 37℃ とともに順調な生育を示したが、40℃ では孢子の形成がみられなかった。

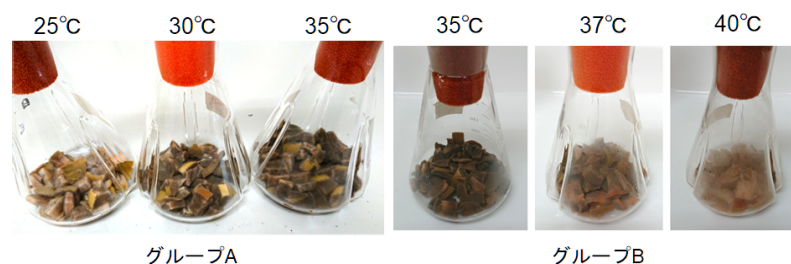


図 1 発酵温度が異なる条件下での発酵 7 日目の外見的变化

### 3.2. 発酵温度が異なる発酵物の $\beta$ -リパーゼ阻害活性比較

グループ A (25℃, 30℃, 35℃), グループ B (35℃, 37℃, 40℃) における  $\beta$ -リパーゼ阻害活性を比較した。グループ A (25℃, 30℃, 35℃) において、 $\beta$ -リパーゼ阻害活性 (表 1) では 25℃, 30℃, 35℃ とともに活性の増加がみられ、35℃・7 日目において最も高い阻害活

性 ( $IC_{50}=0.15\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を示した。25℃ と 30℃ では最終的な活性の増加は同程度であったが、25℃ において活性増強の速度は 30℃ および 35℃ よりも遅い傾向にあった。グループ B (35℃, 37℃, 40℃) では、 $\beta$ -リパーゼ阻害活性が 7 日目まで増加し、37℃ において最も高い阻害活性 ( $IC_{50}=0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を示した (表 2)。

表1 グループ A (25 °C, 30 °C, 35 °C) におけるβ-リパーゼ阻害活性

発酵期間	β-リパーゼ阻害活性 (IC <sub>50</sub> = μg/ml)		
	25°C	30°C	35°C
0 日目	12.5	12.5	12.5
1 日目	10.2	7.7	8.1
3 日目	9.2	1.3	1.9
7 日目	0.99	0.76	0.15

表2 グループ B (35 °C, 37 °C, 40 °C) におけるβ-リパーゼ阻害活性

発酵期間	β-リパーゼ阻害活性 (IC <sub>50</sub> = μg/ml)		
	35°C	37°C	40°C
0 日目	14.8	14.8	14.8
1 日目	3.7	2.5	3.4
3 日目	2.0	1.9	1.4
7 日目	0.98	0.25	1.1

### 3.3. 各発酵物の LCMS 分析および活性成分 A の定量

各発酵物(7日目)の LCMS 分析を行った(図 2)。グループ A (図 2A) とグループ B (図 2B) のクロマトグラムを比較すると、25 °C ~ 35 °C, 37 °C および 40 °C でクロマトグラムのパターンおよび検出された生成物のピークに相違がみられた。その中でも 18 分付近に顕著な増減を示すピークがみられた。同成分について粗精製を行ったところ、β-リパーゼ阻害活性を示したことからこれを活性成

分 A とした (data not shown)。そこで、活性成分 A の生成量をカテキン相当量で定量した。25 °C ではクロマトグラムでのピークは検出されたが検出下限値を下回った。活性成分 A は 35 °C 以上の発酵温度条件下で顕著な生成がみられた (表 3, 表 4)。最も高い値を示したのは 40 °C で、35 °C よりも高い生成量を示した (表 4, 21.5 mg-カテキン相当量 /g)。

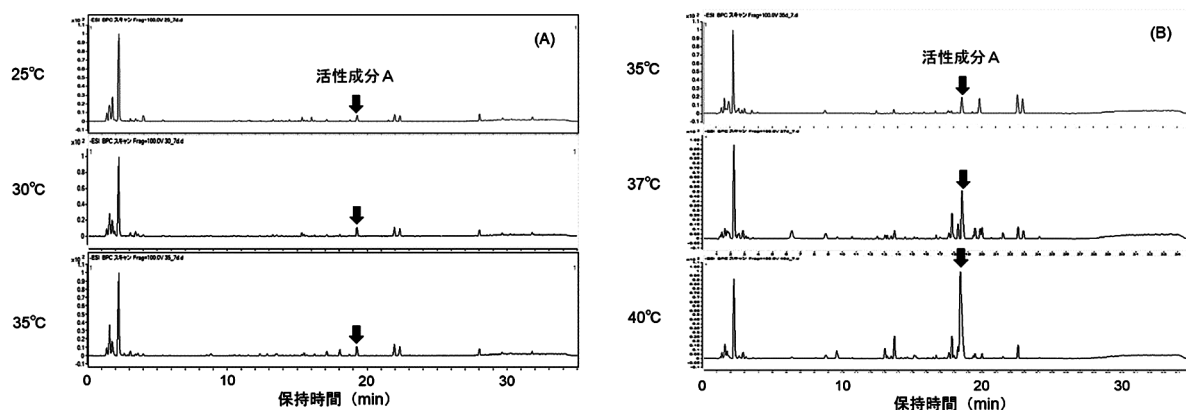


図2 各発酵物抽出液 (7 日目) の LC-MS 分析

表3 活性成分 A の定量 (グループ A)

発酵温度	活性成分 A (mg-カテキン相当量/g)	
	3 日目	7 日目
25℃	—	—
30℃	—	0.2
35℃	0.4	2.3

表4 活性成分 A の定量 (グループ B)

発酵温度	活性成分 A (mg-カテキン相当量/g)	
	3 日目	7 日目
35℃	0.2	2.5
37℃	1.0	0.3
40℃	1.8	21.5

### 3.4. 味認識装置を用いた発酵物の風味解析

25℃, 35℃, 37℃, 40℃の発酵で得られた発酵物抽出液の風味解析を行った(図3)。コントロールは未発酵の幼果抽出液とした。25℃では酸味の増加と旨味の減

少が特徴的で、35℃, 37℃, 40℃では苦味雑味の増加が特徴的であった。35℃, 37℃は類似した傾向を示し、40℃では苦味雑味のほか、酸味が減少する傾向がみられた。

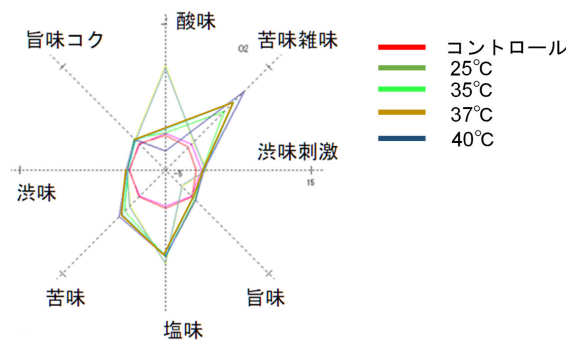


図3 各発酵物の風味解析

## 4. 考察

富有柿幼果の発酵において機能性の増強や機能性成分の増加に適した発酵温度の範囲を調べた。発酵物の外見的特徴では30℃, 35℃, 37℃では黒麹菌の生育に顕著な差は見られなかったが、25℃では生育が遅れが生じ、40℃では生育は順調であったが胞子の形成はみられなかった(図1)。泡盛における製麹温度の標準は35℃~40℃の範囲で調整されている<sup>4)</sup>。このことは25℃が黒麹菌の生育に適した温度ではないことを示し、その結果として生育が遅れたと推測した。一方、40℃は製麹における切り返し作業の目安となる温度である<sup>4)</sup>。このため40℃で一定の温度を保ちつづける発酵法では、水分の減少等麹菌の生育を阻害する要因が生じやすく、その結果として胞子の不形成に至った可能性が考えられた。β-リパー

ゼ阻害活性についてはそれぞれの温度で機能性の増強がみられ(表1, 2)、発酵温度にともなう顕著な差は見られなかった。25℃は生育の遅れがみられ、機能性増強の速度にも遅れが生じた。これらのことより、黒麹菌を用いた富有柿幼果の発酵では25℃~40℃の範囲でβ-リパーゼ阻害活性の増強が可能であることが示唆された。一方、β-リパーゼ阻害活性を有する成分のひとつである活性成分Aは、25℃と35℃~40℃では生成量に顕著な差がみられた(表3, 表4)。最も高い生成量を示したのは40℃であった。このことは25℃において活性成分Aを生成する代謝系が何らかの理由で阻害されている可能性を示唆した。35℃, 37℃と40℃の違いは胞子形成の有無が大きな特徴である。37℃では活性成分Aの量が3日目まで増加したのち減少に転じた(表4)。40℃では何らかの理由で胞子形成が阻害されていることから、活性成分Aが

生成したのち消費されずに蓄積した状態であると推測した。これらのことから活性成分 A は菌の生育の過程で生成し、胞子の形成にともない消費される中間代謝産物であると推測した。ただし、37℃では活性成分 A の生成量は少ないが、 $\beta$ -リパーゼ阻害活性は 40℃よりも高いことから、活性成分 A のほかにも  $\beta$ -リパーゼ阻害に関与する成分が複数存在することが改めて示唆された。発酵物の風味解析では、25℃と 35℃～40℃で酸味、苦味雑味を中心に顕著な違いがみられた (図 3)。特に、25℃では酸味が強く、35℃～40℃では苦味雑味が強くなる傾向がみられた。一般的に、麹菌が酸を生成する際に適した温度は増殖の適温よりも低い<sup>4)</sup>とされているため、25℃での発酵は生酸に適した温度である可能性が高く、クエン酸などの有機酸が多く生成し、酸味が著しく強くなったと考えられた。一方、40℃においては酸味が減少傾向にあり、あらかじめ高い温度で発酵を行っているため生成した酸の量が 25℃よりも少ない可能性が考えられた。また、発酵生成物の LCMS 分析結果 (図 2A, B) のクロマトグラムが 25℃と 35℃, 37℃, と 40℃では相違がみられたため、発酵生成物の違いもまた風味に影響していることが考えられた。

これらをふまえ、各温度帯の特徴と富有柿幼果の発酵に適した温度条件を以下のように考察した。 $\beta$ -リパーゼ阻害活性ではいずれの温度も顕著な差がみられなかったが、25℃における発酵の遅れ、40℃での胞子不形成という生育への影響がみられた。このことより、25℃および 40℃は機能性増強を目的とした発酵が可能な下限および上限温度であり、25℃～40℃の間で機能性増強を目的とした発酵が可能であるとした。今回検討した範囲では 35℃および 37℃が最も  $\beta$ -リパーゼ阻害活性増強に適した発酵温度であることを示し、再現性も得られた。しかし、37℃においては再現性試験の検討中、発酵が進みすぎてかえって機能性が減少したものも見られた。このことは、菌の最適増殖温度下では発酵速度および発酵期間の検討も必要になることを示唆している。これらをまとめると、安定的に発酵を行いたい場合は 35℃、より機能性を高めたいのであれば発酵期間の検討を行った上で 37℃が適しているといえる。25℃においても機能性は増強するが、酸味が著しく強いことが予想されるため、食品素材としての用途が限られる可能性が考えられた。また、35℃～40℃についても、食品素材として使用する際に、全体的な味にどのような影響を与えるかについては別途検討が必要である。

今回の検討により、異なる発酵温度が黒麹菌に影響を与え、結果として味、機能性増強、機能性成分の生産において相違がみらることを明らかにした。このことは、富有柿幼果の発酵において機能性を維持した目的別の発酵が可能になることを示した。

## 5. 参考文献

- 1) 折居千賀, 黒麹菌および乳酸菌を用いた発酵による富有柿幼果の機能性向上. 日本栄養・食糧学会誌, **68**, 225-232 (2017), DOI: <https://doi.org/10.4327/jsnfs.68.225>
- 2) 折居千賀, 東洋食品研究所 研究報告書, **33**, 39-43 (2020)
- 3) 折居千賀, 富有柿幼果黒麹菌発酵物の機能性に対する熱処理の影響. 日本防菌防黴学会誌, **45**, 251-257 (2015)
- 4) 蟹江松雄, 黒麹菌に関して, 日本醸造協会, **58**, 681-685 (1963), DOI:<https://doi.org/10.6013/jbrewsocjapan1915.58.681>
- 5) 小島芳弘, 村中隆, カワラケツメイに含まれる新規タンニンおよびそのリパーゼ阻害活性, 日本食品科学工学会誌, **59**, 279-283 (2012), DOI: <https://doi.org/10.3136/nskkk.59.279>