

研究論文

黒麹菌を用いた固体発酵によるサトウキビエキスの開発

広瀬直人・照屋亮・三枝隆裕¹⁾・和田浩二²⁾

(沖縄県農業研究センター, ¹⁾ 沖縄工業高等専門学校, ²⁾ 琉球大学農学部)

Naoto HIROSE, Ryo TERUYA, Takahiro MITSUE, Koji WADA:

Development of sugar cane extract by solid-state fermentation method using *Aspergillus luchuensis*.

要約

サトウキビ粉碎物に黒麹菌を接種して固体発酵を行った後に搾汁し、サトウキビエキスを得た。サトウキビエキスはアンジオテンシンI変換酵素阻害活性及び抗変異原性を有していた。黒麹菌によるさとうきび粉碎物の固体発酵は、泡盛蒸留廃棄物を添加することで促進された。

キーワード：サトウキビ, 黒麹菌, *Aspergillus luchuensis*, 固体発酵, クエン酸, 泡盛蒸留粕

緒言

沖縄県の基幹作物として広く栽培されているサトウキビ (*Saccharum spp. hybrid*) は血圧上昇抑制効果が認められているγ-アミノ酪酸 (GABA) (Hayakawa ら, 2004) をはじめミネラルやビタミンなど多様な有用成分を豊富に含んでいる (氏原ら, 2004)。また、サトウキビの搾汁液を濃縮して製造される黒糖 (含みつ糖) はサボニン等のフラボン配糖体 (荻・前田, 2008) やフェノール性抗酸化成分 (Takara ら, 2002, 2003), ポリコサノール (Irmak ら, 2006) などを含む。ポリフェノールに由来する動脈硬化抑制作用 (Inafuku ら, 2007), LDL酸化抑制作用や糖類分解酵素阻害作用 (前田・荻, 2008) など、多種の機能が報告されてい

る。このようなサトウキビの持つ生理機能性を生かした加工技術として、筆者らは乳酸発酵によって GABA を増強したサトウキビ乳酸発酵飲料を開発した (広瀬ら, 2008)。また、サトウキビ酢は飲用酢市場の成長に伴い注目を集めており、ラジカル消去能, 抗変異原性, がん細胞の増殖抑制, ナチュラルキラー細胞の作用活性化などの豊富な機能が報告されている (吉元ら, 2001)。

一方、沖縄県では黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) を利用した独特の蒸留酒である泡盛の製造が盛んである。黒麹菌が生産するクエン酸は蒸留廃棄物中に残存し、蒸留廃棄物より固形分を除去した液部は「もろみ酢」として利用され、人気を博している。また、焼酎麹菌は植物細胞壁溶解酵素群を著量に生産し、焼酎醪の機能性に寄与している (伊藤, 2005) ほか、抗酸化能の増大 (石川ら, 2005) や、ポリコサノールの遊離 (Musa ら, 2004) などが報告されており、固体発酵による植物体の分解産物には、多様な生理活性の付与が期待される。蒸留廃棄物のうち固形分は可消化養分やタンパク質を含有している (玉城ら, 2013) が、一部が飼料として利用されているのみであり、高付加価値素材への転換 (古田ら, 2010) など有効利用技術の開発が望まれている。

本報では、クエン酸を含有し、かつ、高い機能性を有した発酵飲料の開発を目的として、サトウキビ粉砕物を発酵基質とした黒麹菌による固体発酵を試みた。

材料及び方法

1. 供試試料

黒麹菌は市販の種麹（焼酎用黒麹種菌，ピオック）を卓上ミル（IFM-800，岩谷産業）で粉砕して用いた。サトウキビは春植の Ni15（粟国島産，3月中旬収穫）を用い，サトウキビ用シュレッダー（CSS-NS-01，日特機械工業）で破碎して用いた。シュレッダー破碎物（以下サトウキビ破碎物と称する）は使用時まで -20°C で保存した。泡盛蒸留廃棄物は久米仙酒造（沖縄県那覇市）より入手した。泡盛蒸留廃棄物より10,000 rpm \times 20分間の遠心分離で固液分離し，泡盛蒸留粕（固部）および泡盛蒸留廃液（液部）とした。なお，蒸留粕は凍結乾燥して供試した。

2. 固体発酵方法とサトウキビエキスの調製方法

50 gのサトウキビ破碎物を500 ml容の三角フラスコに取り， 121°C で15分間オートクレーブ殺菌した後に1.0 gの種麹を接種し， 30°C で静置して発酵を行った。泡盛蒸留廃棄物の添加では，蒸留粕の凍結乾燥品を1.5 g（湿重量で5.0 gに相当）または蒸留廃液5.0 gをサトウキビ破碎物に添加した後に良く混合し，オートクレーブ殺菌を行った。発酵中は毎日1回，攪拌操作を行った。発酵後のサトウキビ破碎物に120 mlの蒸留水を加えて卓上ミルで粉砕し，油圧プレス（P-1D，理研機器）を用いて24.5 MPaで5分間加圧して搾汁した（搾汁率 \approx 60%）。搾汁液を10,000 rpm \times 10分間の遠心分離，次いでNo.2ろ紙でろ過して固形分を除去した後に150 mlに定容し，サトウキビエキス

を得た。

3. 液体発酵方法

油圧プレスを用いてサトウキビ破碎物を搾汁し（搾汁率 \approx 67%），50 μm メッシュパスした後に 121°C で15分間オートクレーブ滅菌して用いた。500 mlのサトウキビ搾汁液に種麹を1.0 g接種し，ジャーフェーマンター（LTI-700，東京理化工機）を用いて発酵を行った。発酵温度は 30°C とし，通気量は0.5 ml/minとした。発酵液は10,000 rpm \times 10分間の遠心分離，次いでNo.2ろ紙でろ過した後に分析に供した。

4. 分析方法

アミノ酸の分析にはアミノ酸分析システム（LC-VPアミノ酸分析システム，島津製作所）を使用した。カラムはShim-pack Amino-Na（島津GLC）を用い，*o*-フタルアルデヒドを反応試薬として蛍光強度（ $\text{Ex}=348\text{ nm}$ ， $\text{Em}=450\text{ nm}$ ）を蛍光検出器（RF-10AXL，島津製作所）で測定した。有機酸の分析には有機酸分析システム（LC-10A，島津製作所）を用いた。カラムはShim-pack SPR-H（ $7.8\times 250\text{ mm}$ ，2本直列，島津GLC）を用い，移動相は5mM *p*-トルエンスルホン酸，緩衝液には5mM *p*-トルエンスルホン酸と100 μM EDTAを含む20 mM Bis-Trisを用いた。流速を0.7 ml/minとし，カラム温度は 40°C とした。検出器には電気伝導度検出器（CDD-6A，島津製作所）を用いた。糖組成は液体クロマトグラフ（LC-20A，島津製作所）で分析した。カラムはAsahipak-NH2P-50（ $4.6\times 250\text{ mm}$ ，Shodex）を用い，移動相は75%アセトニトリル，流速を1.0 ml/minとし，カラム温度は 40°C とした。検出器には蒸発光散乱検出器（ELSD-LT，島津製作所）を用いた。アンジオテンシン I 変換酵素

(ACE) 阻害活性は道畠らの方法 (2003) を参考に, Hip-His-Leu (和光純業工業) を基質に用いた ACE (ウサギ肺由来, シグマ・アルドリッチ) の阻害活性を HPLC 法で測定した. 抗変異原性は, 変異原に Trp-P-2 (和光純業工業), 供試株にサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA-98 株を用いたエームス法 (新本, 2000) により測定した. 試料は滅菌水で希釈し, メンブレンフィルター (0.45 μ m) でろ過して供試した.

結果および考察

1. 黒麹菌によるサトウキビの固体発酵と液体発酵の比較

麹菌は固体発酵において種々の酵素を菌体外に生産することが知られている (岩下, 2005) ことや, 液体発酵ではアミラーゼやセルラーゼなどの酵素生産が固体発酵よりも低くなること (Iwashita ら, 1998) など, 固体発酵と液体発

酵では大きく挙動が異なる. 一方で, 液体発酵では無菌培養が容易であることや, 培養のパラメーターを管理しやすいことなど利点も多く, 液体麹開発も進められている (小路ら, 2013). そこで, サトウキビ破碎物の固体発酵と, サトウキビ搾汁液を用いた液体発酵について, それぞれ 30 $^{\circ}$ C で発酵して, クエン酸の生成量を指標として発酵程度を比較した. その結果, 固体発酵では発酵 3 日目までに pH が大きく低下し, クエン酸の生産量が約 1.6% に達した. 総遊離アミノ酸は発酵 1 日目で急激に減少し, 3 日目には 9 割程度を消費していた. グルタミン酸は発酵初期に増加するが, その後は減少し, GABA の蓄積は見られなかった. ショ糖は発酵初期に速やかに分解されてブドウ糖及び果糖が生成するが, その後の減少は見られなかった (図 1A). 一方, 液体発酵では pH の低下は緩やかであり, クエン酸生成量は発酵 5 日目でも 0.05% 程度であった. 総遊離アミノ酸は微増

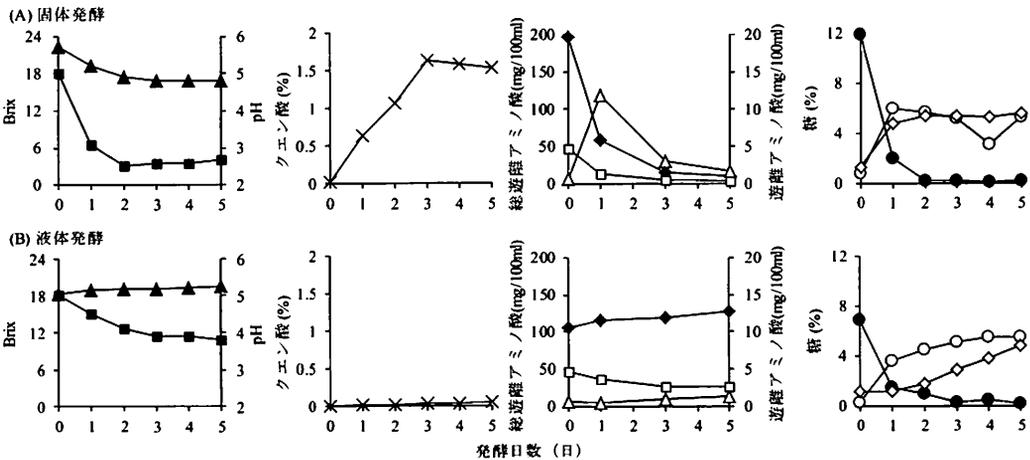


図 1. 黒麹菌によるサトウキビの固体発酵と液体発酵の比較. 30 $^{\circ}$ C で発酵を行った.

■ ; pH, ▲ ; Brix, × ; クエン酸, ◆ ; 総遊離アミノ酸, △ ; グルタミン酸, □ ; GABA, ● ; ショ糖, ○ ; ブドウ糖, ◇ ; 果糖.

向であったが、グルタミン酸やGABAの増減は小さかった。また、ショ糖の分解は固体発酵に比べて遅く、単糖の生成もゆるやかであった(図1B)ことから、液体発酵では黒麹菌の生育が不良であることが推察された。以上の結果より、黒麹菌によるさとうきびの発酵は、生育が良好でクエン酸を多く生産する固体発酵が適することが明らかとなった。小路ら(2013)は、液体麹の製造において穀皮が存在する玄麦の利用で酵素の生産性が高まることを報告している。本研究ではサトウキビ搾汁液を液体発酵の培地として使用したが、搾汁残渣の配合等によって酵素の生産性が変化する可能性がある。今後、菌体の生育やクエン酸生成に関与する発酵条件を特定し、検討を進めていく必要がある。

2. 固体発酵の発酵温度

黒麹菌の最適生育温度は37℃前後である(比嘉, 2007)が、黒麹菌のクエン酸生産は32℃で最大となる(谷口ら, 2001)など、麹菌で

は生育に適する温度と物質生産に適する温度が異なる場合が多い(岩野ら, 1987)。そこで、サトウキビ破碎物の固体発酵を30℃および37℃で行い、クエン酸の生成量を指標として発酵程度を比較した。その結果、BrixやpHの低下には大きな差異は見られなかったものの、37℃ではクエン酸の生成量が減少し、発酵1日目に見られるグルタミン酸の蓄積も小さくなったことから、発酵温度は30℃が適していると考えられた(図2)。

3. 泡盛蒸留廃棄物の添加が固体発酵に及ぼす影響

黒麹によるサトウキビ破碎物の固体発酵では、発酵中に遊離アミノ酸が少なくなり、単糖が消費されずに残存した(図1, 2)ことから、サトウキビ原料だけでは窒素源の枯渇によって発酵が制限されていることが示唆された。そこで、粗タンパク質を4割程度含む未利用資源である泡盛蒸留廃棄物(野原ら, 2002)の添加につい

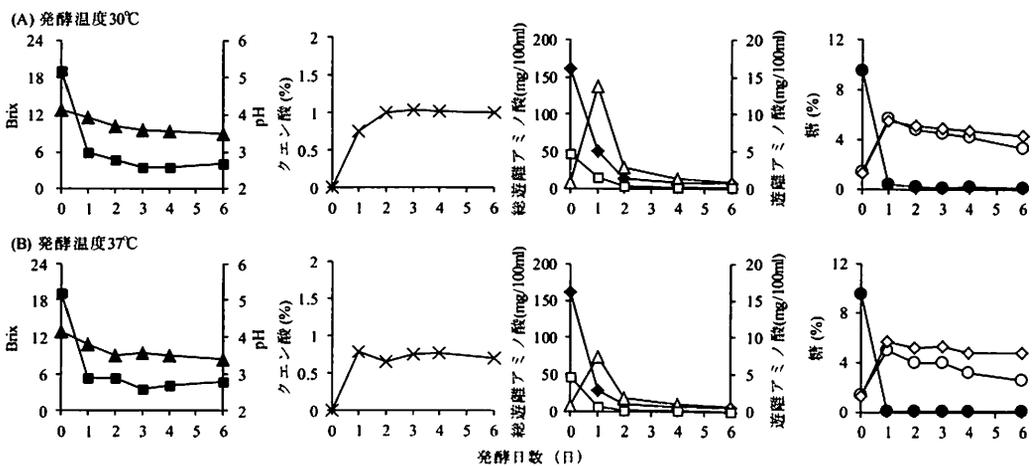


図2. 黒麹菌によるサトウキビの固体発酵における発酵温度の影響。

■; pH, ▲; Brix, ×; クエン酸, ◆; 総遊離アミノ酸, △; グルタミン酸, □; GABA, ●; ショ糖, ○; ブドウ糖, ◇; 果糖。

て検討した結果を図3に示す。培地のpHは無添加の5.2から泡盛蒸留廃棄物の添加によって4.2~4.3に低下したが、発酵1日目には添加の有無による差異は見られなくなった。Brixの低下は泡盛蒸留粕添加区が最も大きく、次いで泡盛蒸留廃液添加区となった。クエン酸の生成は発酵3日目ではほぼ頂点に達したが、生成量は泡盛蒸留粕および泡盛蒸留廃液添加区で無添加区の1.5倍程度に高くなった。発酵前の培地中における総遊離アミノ酸量は、無添加の171 mg/100mlに対して泡盛蒸留粕添加区は220 mg/100ml、泡盛蒸留廃液添加区では236 mg/100mlと増加したが、発酵6日目には、それぞれ17、22および15 mg/100mlまで減少し、

減少率は90.3、90.1、93.5%であった。また、発酵2日目のグルタミン酸の蓄積が泡盛蒸留粕添加区で高くなった。ショ糖の動向は各試験区において大きな差異は無く、発酵2日目ではほとんどが分解された。一方、単糖は泡盛蒸留廃棄物添加区で、発酵3日目以降に減少した。糖類総量(ショ糖、ブドウ糖および果糖の総和)では、無添加の10.3%に対して泡盛蒸留粕添加区は11.4%、泡盛蒸留廃液添加区では14.3%と増加した。発酵6日目には、それぞれ8.0、4.0および6.0%まで減少し、減少率は無添加の22.6%に対して、泡盛蒸留粕添加区は65.0%、泡盛蒸留廃液添加区では58.1%と、大きく増加した。これらの結果より、泡盛蒸留廃棄物の添加によ

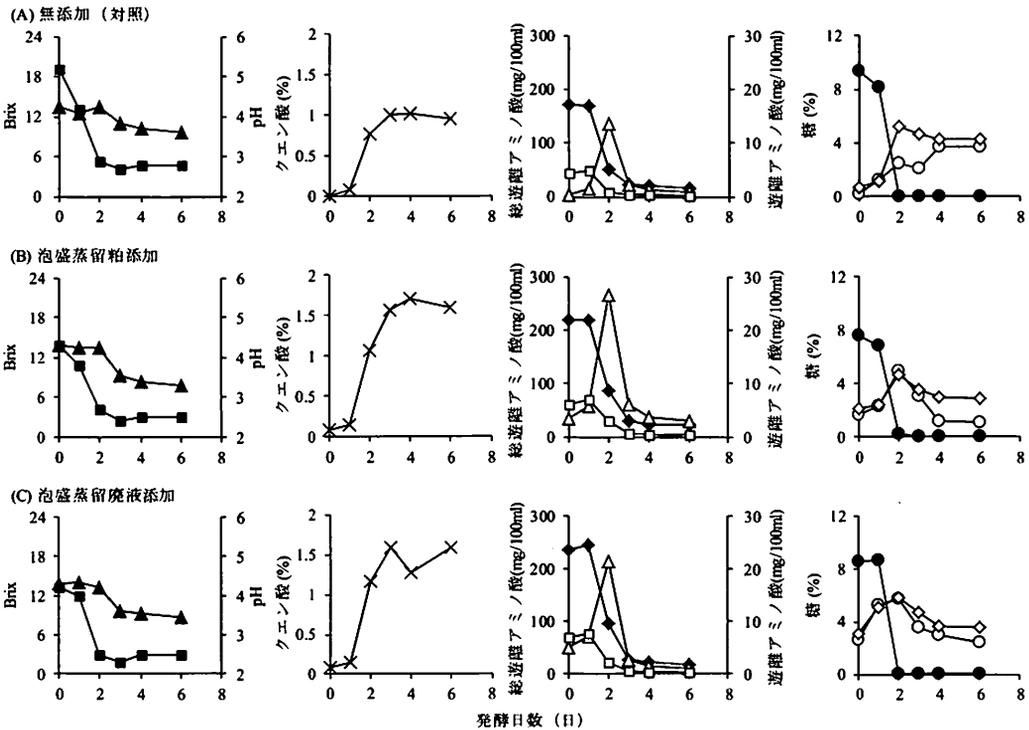


図3. 黒麹菌によるサトウキビの固体発酵における泡盛蒸留残渣添加の影響。

■; pH, ▲; Brix, ×; クエン酸, ◆; 総遊離アミノ酸, △; グルタミン酸, □; GABA, ●; ショ糖, ○; ブドウ糖, ◇; 果糖。

て、糖分の消費が進み、サトウキビ破砕物の固体発酵が促進されることが明らかとなった。発酵後の総遊離アミノ酸残存量が同程度であったことから、泡盛蒸留廃棄物添加の添加量を増やすことで、更に糖分の消費を進めることが可能と考えられるが、泡盛蒸留廃棄物由来の風味や、残存する糖分がさとうきびエキスの食味に及ぼす影響も含めて、更なる検討が必要である。

4. サトウキビエキスの機能性

サトウキビ破砕物を黒麹菌で固体発酵させ、搾汁して得られたエキスについて機能性を評価した。その結果、ACE 阻害活性は泡盛蒸留廃棄物の添加によって高くなり、いずれの場合でも発酵 2 日目に最大値を示した (図 4)。泡盛をはじめとする各種焼酎の蒸留廃棄物中にはアミノ酸やミネラル等の多くの有用成分を含み (瀬戸ら, 2003)、麹菌が生産するクエン酸を生かした「もろみ酢」として利用されている。また、泡盛蒸留廃棄物の液体部分を原料とした「もろみ酢」には血圧上昇抑制作用の指標となる ACE 阻害活性が見出されている (比嘉ら,

2003, 2004)。また、斉藤ら (1992) は酒粕より ACE 阻害活性を見出し、寄与物質が麹菌のプロテイナーゼにより生成した 2~5 残基のペプチドであると推測している。サトウキビエキス中の ACE 阻害活性も短鎖ペプチドが関与していることが推測され、発酵と共に更に分解されて活性を失ったものと思われた。一方、抗変異原性は発酵の進行と共に高くなり、泡盛蒸留粕添加区で高いようであった (図 4)。食品中に含有される成分には、ポリフェノール類をはじめとして抗変異原性を有する物質が多く見出されている (大江, 1991)。また、後藤 (2003) は清酒の醸造中に抗変異原性が蓄積することを報告しており、渡辺ら (2004) はリパーゼ活性が高い麹菌を利用したみそは脂肪酸含有量が高く、抗変異原性が向上したみそになることを報告している。サトウキビエキスにおいても、発酵の進行と共に抗変異原性を有する物質が蓄積しているものと考えられた。

以上の結果より、黒麹菌によるサトウキビの固体発酵によってクエン酸を含有するサトウキビエキスの製造が可能であり、泡盛蒸留廃棄物

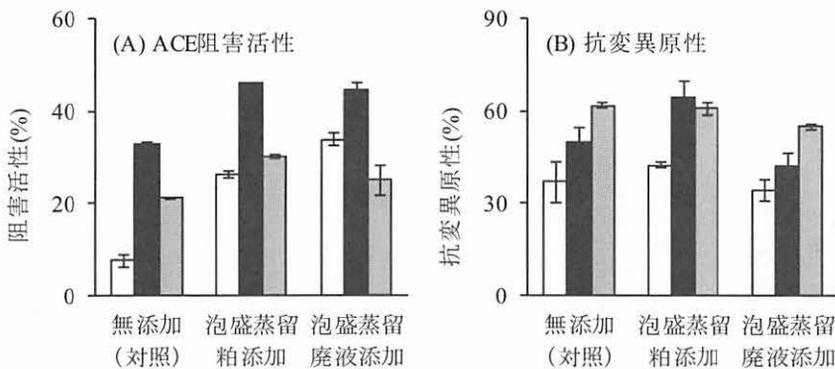


図 4. 黒麹菌による固体発酵で得られたサトウキビエキスの機能性。

30℃で固体発酵を行った。mean±標準誤差 (n=3)。

□; 発酵前, ■; 発酵 2 日目, ■; 発酵 4 日目。

の添加によって固体発酵が促進されることが明らかとなった。泡盛蒸留廃棄物のうち蒸留廃液(液部)は「もろみ酢」としての利用が確立されているが、蒸留粕(固部)の用途開発に寄与するものと思われる。今後はサトウキビ由来や黒麹菌が産生する酵素による分解産物がもたらす機能性に併せて、泡盛蒸留粕由来の機能性付与も視野に入れた機能性評価を進め、より高付加価値を有する発酵飲料の開発に向けて研究を進めていくことが必要である。

謝辞

サトウキビ原料を提供頂いたJAおきなわ粟国支店の皆様、泡盛蒸留廃棄物を提供頂いた久米仙酒造の皆様に感謝致します。

Abstract

Sugar cane extract was developed by solid-state fermenting crushed sugar cane with *Aspergillus luchuensis*, and squeezing after fermentation. The extract had angiotensin I converting enzyme inhibitory activity and antimutagenicity. The solid-state fermentation of the crushed sugar cane by *Aspergillus luchuensis* was promoted by adding Awamori distillation waste.

引用文献

後藤邦康 2003. 清酒中の抗変異原性. 醸協 98 : 44-45.
 Hayakawa, K., M. Kimura, K. Kasaha, K. Matsumoto, H. Sansawa and Y. Yamori 2004. Effect of a gamma-aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. Br J Nutr. 92 : 411-417.
 比嘉賢一・入福濱寿・照屋亮・照屋隆司 2003.

もろみ酢の微生物制御に及ぼす酢酸添加の影響および市販製品の品質分布に関する研究. 沖縄工技報 5 : 77-84.

比嘉賢一・照屋亮・池亀孝 2004. 保険機能因子強化飲料及びその原材料の品質評価研究. 沖縄工技報 6 : 1-9.

比嘉賢一 2007. 沖縄黒麹もろみ酢の製造方法に関する研究 (I) 製麹条件の検討. 沖縄工技報 9 : 39-44.

広瀬直人・氏原邦博・照屋亮・前田剛希・吉武均・和田浩二・吉元誠 2008. γ -アミノ酪酸 (GABA) を増強したサトウキビ乳酸発酵飲料の開発. 食科工 55 : 209-214.

古田吉史・丸岡生行・中村彰宏・大森俊郎・園元謙二 2010. 乳酸菌を利用した焼酎蒸留粕の高付加価値素材への転換プロセスの構築. 生物工学 88 : 114-120.

Irmak, S., N. T. Dunford and J. Milligan 2006. Policosanol contents of beeswax, sugar cane and wheat extracts. Food Chem. 95 : 312-318.
 Inafuku, M., T. Toda, T. Okabe, K. Wada, K. Takara, H. Iwasaki and H. Oku 2007. Effect of *Kokuto*, a non-centrifugal cane sugar, on the development of experimental atherosclerosis in Japanese quail and apolipoprotein E deficient mice. Food Sci. Technol. Res. 13 : 61-66.

石川絹子・森下真希・小泉幸道・福田靖子 2005. セサムフラワの微生物処理が抗酸化機能性に及ぼす影響. 名古屋女子大紀 51 : 27-32.

伊藤清 2005. 焼酎麹菌の酵素生産の特徴. 醸協 100 : 838-848.

岩野君夫・三上重明・福田清治・能勢晶・椎木? 1987. 焼酎白麹の各種酵素生産に及ぼす製麹条件の検討. 醸協 82 : 200-2004.

Iwashita, K., K. Todoroki, H. Kimura, H. Shimoi and K. Ito K. 1998. Purification and

- characterization of extracellular and cell wall bound beta-glucosidases from *Aspergillus kawachii*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 : 1938-1946.
- 岩下和裕 2005. 固体培養における麹菌の酵素生産と菌体外可溶性多糖に関する研究. 生物学 83 : 69-78.
- 前田剛希・荻貴之 2008. 沖縄産純黒糖の抗酸化能と糖類分解酵素阻害活性. 沖縄県工技報 10 : 1-5.
- 道島俊英・林未央・勝山陽子・附木貴行・日比野剛・川嶋正男・矢野敏博・榎本俊樹 2003. 食品製造副生物の高度利用化技術に関する研究. 石川工試報 53 : 1-6.
- Musa, R., K. Yunoki, M. Kinoshita, Y. Oda and M. Ohnishi 2004. Increased levels of policosanol and very long-chain fatty acids in potato pulp fermented with *Rhizopus oryzae*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68 : 2401-2404.
- 野原敏次・上地俊徳・小倉剛・川島由次・仲田正・田幸正邦・本郷富士彌 2002. 高コレステロール負荷ラットの血清および肝臓中の脂質濃度に及ぼす泡盛粕給与の影響. 琉大農報 49 : 189-197.
- 大江武 1991. 食品中抗変異原の細胞遺伝学的研究. 食物 46 : 1-12.
- 荻貴之・前田剛希 2008. 沖縄産黒糖に含まれるフラボン配糖体. 沖縄県工技報 10 : 7-11.
- 斉藤義幸・中村圭子・川戸章嗣・今安聡 1992. 清酒, および副産物中のアンジオテンシン変換酵素阻害物質. 農化 66 : 1081-1087.
- 瀬戸口眞治・鶴木隆文・下野かおり・前野一朗 2003. 市販もろみ酢の栄養成分分析. 鹿児島工技報 17 : 5-8.
- 新本洋士 2000. サルモネラ菌 TA98 を用いた抗変異原性試験法. 食品機能研究法. 光琳, 東京. pp. 252-255
- 小路博志・杉本利和・舛田晋・上野貴生 2013. 新規液体麹の開発と発酵飲食品への展開. 生化学工学 91 : 73-79.
- Takara, K., D. Matsui, K. Wada, T. Ichiba, and Y. Nakasone 2002. New antioxidative phenolic glycosides isolated from *Kokuto* non-centrifuged cane sugar. Biosci. Biotech. Biochem. 66 : 29-35.
- Takara, K., D. Matsui, K. Wada, T. Ichiba, I. Chinen and Y. Nakasone 2003. New phenolic compounds from *Kokuto*, non-centrifuged cane sugar. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67 : 376-379.
- 玉城政信・中山貴智・清水法明・波平知之・仲村一郎・赤嶺光・Md. Amzad Hossain 2013. 泡盛もろみ酢粕の黒毛和種子牛飼料としての利用. 暖地畜産報 56 : 29-33.
- 谷口亜樹子・鈴木昌治・小泉武夫 2001. 稲麹粒から分離した多酸性麹菌 *Aspergillus oryzae* のクエン酸生産能. 日食保蔵 27 : 339-342.
- 氏原邦博・増田亮一・杉浦誠・永田茂穂・杉本明・寺島義文・福原誠司 2004. サトウキビジュースにおける有用成分の生育時期別推移と加工時の消長. 日作九支報 70 : 75-77.
- 渡辺隆幸・尾張かおる・堀一之・高橋光一 2004. 遊離脂肪酸含量および抗変異原性に基づく味噌用麹菌の選抜. 食科工 51 : 698-702.
- 吉元誠・奥野成倫・諏訪一勇・杉本明・和田浩二 2001. サトウキビ酢の抗変異原性など機能性. 九州農業研究 63 : 40.