麦麴の製麴における β -グルカンと β -グルカナーゼ活性の変化†

松田 茂樹*・工藤 康文**

Changes of β -glucan contents and β -glucanase activity in *Mugi koji*
(Barley-*koji*) making
(Studies on the Quality of *Mugi Miso* Part II)

MATSUDA Shigeki* and KUDOH Yasufumi**

* Kumamoto Industrial Research Institute

3-11-38 Higashi-machi, kumamoto-shi, Kumamoto 862-0901

** Kumamoto Food Processing Research Institute

3-11-38 Higashi-machi, kumamoto-shi, Kumamoto 862-0901

We performed analysis and measurement of β -glucan contents in barley *miso-koji* made by different *koji* molds and changes in β -glucanase activities during *koji* cultivation and those of *koji* made by various materials. β -glucan in barley were decomposed after *koji* making by every *tane-koji* (*koji*-mold) tested. Especially, the β -glucan content of *koji* made by brown yellow type *tane-koji* (BR) was decreased from 3.4% to 1.3%, however, β -glucan content was slightly decreased in light yellow type *tane-koji* (DW). It was found that changes in the β -glucan of barley was closely related to the β -glucanase activity during *koji* making. Barely *koji* made by BR showed more higher β -glucanase activity (300U/kg-*koji*) than that of *koji* made by DW (40U/kg-*koji*). Also, influence of *koji* materials such as composition ratio of barley and rice was observed. The β -glucanase activity of *koji* made by barley was significantly higher than that of *koji* made by rice. This indicated that β -glucanase activity was induced by barley substrate of *koji* materials.

(Received Jun. 2, 2000; Accepted Jul. 17, 2000)

前報¹⁾において、味噌に含まれるフェルラ酸を分析し、麦味噌および米味噌を比較したところ、フェルラ酸は麦味噌に多く含まれることが明らかとなった。これは原料である大麦にフェルラ酸が多く含まれることに起因すると考えられた。さらに、麦麴には米麴に比べて総フェルラ酸含量、遊離フェルラ酸含量ともに多く見い出され、大麦には米と比べて大いに異なる成分的特徴があることが認められた。一方、穀類の中でえん麦や大麦には β -

グルカンが多く含まれることが知られており、特に大麦では (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-グルカンと (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-グルカンが混在した鎖状構造になっている²⁾。

近年、担子菌類に含まれる β -グルカンの抗腫瘍活性が注目されるようになってきているが、その有効成分は蛋白結合 (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-グルカンであり、免疫細胞を活性化することにより腫瘍部位に対して障害作用を示すとされている³⁾。その他にも (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-グルカン多糖類が

† 麦味噌の品質に関する研究 (第2報)

* 熊本県工業技術センター (〒862-0901 熊本県熊本市東町3-11-38)

** 熊本県食品加工研究所 (〒862-0901 熊本県熊本市東町3-11-38)

免疫細胞の活性を高める効果が報告されている⁴⁾。また、YOKOYAMAらはえん麦に含まれる β -グルカンが血清中のコレステロールや中性脂肪を低下させることを報告している⁵⁾。また、麦飯を摂食することでもこれと同様の効果がみられるといわれている。このように大麦に含まれる β -グルカンについては多くの機能性や構造が明らかにされつつあるが⁶⁾、麦麴や麦味噌の発酵過程での挙動については不明な点が多い。そこで、本研究では大麦の特徴的成分である β -グルカンに着目し、麦麴、米麴および麦・米両者の「あわせ麴」の製麴工程における β -グルカナーゼなどの酵素活性を測定し、 β -グルカンの消長との関連を調べたので、その結果を報告する。

実験方法

1. 供試味噌および味噌原料

麴原料の大麦と米は前報と同様のものを用いた。

2. 麦および米味噌麴の製麴

大麦は水道水で洗浄して1時間浸漬した後、40分間水切りした。その60gを300mlの三角フラスコに入れ、120℃で10分間蒸煮した。米は一晩浸漬し、1時間水切りした後、麦と同様に処理した。米と大麦の「あわせ麴」は米：麦の混合割合を60：40および40：60として製麴を行った。種麴は前報と同様のものを用い、33～38℃で培養した。淡色(Wタイプ：*Aspergillus oryzae*)および赤色麦味噌用の麴菌(Rタイプ：*Aspergillus soya*)はそれぞれ種麴メーカー5社(A～D)から入手した9種類を用いた。麴は40時間培養した後、凍結乾燥して粉碎したものを β -グルカン分析用の試料とした。

3. 酵素液の抽出

国税局所定法に準じて抽出した⁷⁾。すなわち、麴10gに0.5% NaClを含む10mM酢酸緩衝液(pH5.5)を50mlを加え、ときどき攪拌しながら室温で3時間抽出し、ろ過したものを酵素活性測定用の酵素液とした。

4. 大麦および麴中の β -グルカン含量の測定法

β -グルカンの分析はMACCLEARYらの方法⁹⁾により測定し、 β -グルカン分析キット(Megazyme社：アイルランド)を用いた。すなわち、粉碎試料0.5gにリン酸塩緩衝液(20mM, pH6.5)5mlを加え沸騰水で5分間加熱し、冷却後リケナーゼ(10U)を加えて40℃で1時間反応させた。水を加えて冷却し30mlにして反応を停止した。ろ液0.1mlに酢酸緩衝液(50mM, pH4.0)を加えた後、 β -グルコシダーゼ(0.2U)を加え40℃で15分間反応させた。冷却後、グルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ試薬3mlを加え40℃で20分間加温し

した後、610nmの吸光度を測定し、グルコースから β -グルカン量を換算した。

5. β -グルカナーゼ活性の測定

麴中の β -グルカナーゼ活性は大麦の β -グルカナーゼ活性を測定するためのアゾ大麦グルカン基質(Azo-barley glucan)を用いるMACCLEARYらの方法⁹⁾に準じて測定し、 β -グルカナーゼ分析キット(Megazyme社：アイルランド)を用いた。アゾ大麦グルカン基質0.5mlに酵素抽出液0.5mlを加え30℃で10分間反応させ、沈殿液(酢酸亜鉛緩衝液, pH5.0)3mlを加え攪拌後、1,000Gで10分間遠心分離を行った。この上澄液の590nmの吸光度を測定し、アゾ大麦グルカン基質の検量線から大麦麦芽の活性に相当する β -グルカナーゼ活性(U/kg)を算出した。

6. 麴の α -アミラーゼ活性および糖化力測定

国税局所定法に準じて抽出した麴の抽出液をについて、 α -アミラーゼ活性、糖化力および α -グルコシダーゼ活性を測定した。測定には醸造用酵素分析キット(キッコーマン社製)を用いた。この糖化力と α -グルコシダーゼ活性からグルコアミラーゼ活性を分別算出した¹⁰⁾。

実験結果および考察

1. 味噌原料および麴中の β -グルカン含量

大麦、米およびそれぞれの麴に含まれる β -グルカン含量をFig.1に示す。麴菌を接種しなかった大麦原料には3.4%の β -グルカンが含まれるが味噌用の麴菌を用いて製麴した麦麴では β -グルカン量は減少し、その量は麴菌の種類によって異なる結果が認められた。淡色

AW, BW, CW, DW and EW are tested using *tane-koji* (*koji*-mold) for light yellow type *mugi* miso making. AR, BR, CR and DR are tested using *tane-koji* for brown yellow type *mugi* miso making. The values are means of two experiments.

Fig. 1 Comparison of β -glucan contents between *mugi koji* (barley-*koji*) and *kome koji* (rice-*koji*)

Table 1 Analysis contents of β -glucan and glucose in *mugi koji* made by different types of *tane-koji* (*koji*-molds) and barley

Items	β -glucan (%)	glucose (%)
<i>Mugi koji</i> ^{a)} (<i>Barley-koji</i>)	$2.6 \pm 0.1^{(b)}$	$20.0 \pm 2.6^{(b)}$
<i>Mugi koji</i> ^{c)} (<i>Barley-koji</i>)	$1.7 \pm 0.4^{(b)}$	$25.8 \pm 5.0^{(b)}$
Barley	3.4	2.0

a) *Tane-koji* for light yellow type *miso*b) Means $\pm$ S. D. (n = 4)c) *Tane-koji* for brown yellow type *miso*

麦味噌の麴 (W タイプ) の β -グルカン量は2.4~2.7 %で、わずかに減少しているのに対して赤色麦味噌の麴 (R タイプ) では1.3~2.2%と原料大麦の約半分の β -グルカン量であった。なお、米および米麴には β -グルカンはほとんど存在しなかった。Table 1に種々の麦麴の β -グルカンとグルコース含量を示した。

赤色麦味噌麴では淡色麦味噌麴に比べて β -グルカン含量が少なく、グルコース含量が多い傾向が認められた。従来から、(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-グルカンに対して end 的に作用するグルカナーゼを生産する微生物は知られているが¹¹⁾、味噌用の麴菌の酵素が大麦の β -グルカンにどのように作用するのか、その詳細は明らかでない。醸造食品に用いられる麴菌では菌叢が濃緑色のものや分生子柄の短いものはヘミセルラーゼ活性が強いといわれており¹²⁾、今回使用した味噌用の麴菌で β -グルカンをよく分解したものは全て緑色を呈する赤色麦味噌の麴菌 (R タイプ) であることから、これらの麴に含まれるグルコース含量が多いことは大麦に含まれる混合鎖の (1 $\rightarrow$ 3); (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-グルカンに作用する β -グルカナーゼとヘミセルラーゼなどの酵素の複合的な作用によるものと考えられた。

2. 麴中の β -グルカン含量および β -グルカナーゼ活性の変化

β -グルカンをほとんど分解しなかった淡色麦味噌用麴菌 (DW) とよく分解した赤色用麴菌 (BR) を使用した麦麴の製麴過程における β -グルカンおよび β -グルカナーゼ活性の消長を Fig. 2 に示す。赤麴菌 (BR) では麴中の β -グルカナーゼ活性は製麴時間の経過とともに増加し、24時間以降出麴まで100 U/kg以上の高い活性を維持した。これに対応して β -グルカンは製麴後半に直線的に減少し、初期の3.4%から1.4%となり約50%の残存量となった。一方、麴菌 (DW) の β -グルカナーゼ活性は24時間頃まで70 U/kgの活性に達したが、以後徐々に減少し、40時間製麴後には麴菌 (BR)

Symbols: ■; β -glucan content of *koji* made by BR, □; β -glucanase activity of *koji* made by BR, ●; β -glucan content of *koji* made by DW, ○; β -glucanase activity of *koji* made by DW. BR and DW are described in Fig.1. The values are means of two experiments.

Fig. 2 Changes in β -glucan contents and β -glucanase activities during *mugi koji* (barley-koji) making

に比べて約13%の活性であった。この間、麴中の β -グルカンはほとんど分解作用を受けずに原料の初期含量に対してわずかに減少したのみであった。以上のことから、大麦中の β -グルカンは製麴の過程で麴菌の生産する β -グルカナーゼにより分解されることが明らかとなった。また、大麦の細胞構造は大、小の球状澱粉粒が厚い細胞壁に包まれ、その細胞間隙にペクチン質やヘミセルロースが存在するとされるが¹³⁾、 β -グルカナーゼ活性が高い麴ではこれらの組織構造支持に酵素的な分解作用が働いているものと思われる。

3. 原料配合比率が麴の β -グルカナーゼおよびその他の酵素活性に及ぼす影響

麴原料の配合割合による β -グルカナーゼ活性の違いを Fig. 3 に示す。麴菌 (BR) および麴菌 (DW) とともに米の場合に比べて麦のみを原料とした場合に約2.5倍

Each *koji* are cultivated for 40hrs at 34~38°C. White bars and black bars indicate *mugi koji* made by DW and BR, respectively. BR and DW are described in Fig.1. The values are means of two experiments.

Fig. 3 Effects on β -glucanase activities of *mugi koji* (barley-*koji*) made by various ratio of rice and barley

の高い活性を示し、米：麦比率が40：60、60：40と麦の配合割合が低くなるに従い活性も低下した。また、麹菌（DW）は麹菌（BR）に比べていずれの原料配合比率においても約10分の1の活性であった。これらのことから、麹菌の β -グルカナナーゼは麹菌の種類により異なることに加え、基質により誘導的に生産されることが示唆された。さらに原料比率が α -アミラーゼその他の酵素活性に及ぼす影響をFig. 4に示す。

Fig. 4 A に示したように麹菌（DW）の α -アミラーゼ活性は麹菌（BR）に比べてやや高く、かつ米の割合が多くなるほど高くなる傾向を示した。Fig. 4 B に示したように麹菌（BR）の α -グルコシダーゼ活性は麦100%の場合に麹菌（DW）より高いが、米の混合比率が高くなるほど上昇し、米100%の場合には活性が逆転した。Fig. 4 C に示したように麹菌（BR）と麹菌（DW）のグルコアミラーゼ活性は糖化力と同様な傾向を示し、米の配合比率が高くなるにつれて上昇したが麹菌（DW）の活性はいずれの配合比率においても麹菌（BR）の活

(A) : α -amylase, (B): α -glucosidase, (C): glucoamylase, (D): glucose-forming activities. Each *koji* are cultivated for 40hrs at 33~38°C. White bars and black bars indicate *mugi koji* made by DW and BR, respectively. BR and DW are described in Fig.1. The values are means of two experiments.

Fig. 4 Effects on enzymatic activities of *mugi koji* (barley-*koji*) made by various ratio of rice and barley

性よりも低い傾向を示した。Fig. 4D に示したように麴菌 (BR) の糖化力は米：麦の原料比率によらずほぼ一定であったのに対し、麴菌 (DW) は麦100%の場合、麴菌 (BR) の2分の1以下であったのが、米の割合が高くなるほど活性が上昇し、米100%の場合にはほぼ同程度の活性となった。麴菌の生産する種々の酵素の活性は原料の組成によって影響を受けることが報告されており¹⁴⁾、今回の結果からも麦と米の配合比率によって β -グルカナーゼその他の酵素活性が異なることを確認できた。

要 約

麴に含まれる β -グルカンの含量を分析し、麦麴および米麴を比較したところ、 β -グルカンは麦麴に多く含まれ、米麴にはほとんど存在しないことがわかった。さらに、麦麴中の β -グルカン量は麴菌の種類によって異なり、*Aspergillus soja* 系の麴菌で製麴した麴の β -グルカン残存量は*Aspergillus oryzae* 系の麴菌に比べて少なく、逆にグルコース含量は多かった。このことは、麴菌の生産する β -グルカナーゼ活性の差によるものと考えられた。麴原料の米と麦の比率が麴中の β -グルカナーゼ活性に及ぼす影響を調べたところ、同じ麴菌では米100%の場合に比べて、麦100%を原料とした場合には約3倍の高い活性を示し、米：麦比率が40：60、60：40と麦の配合割合が低くなるに従って活性も低下した。また、麴菌 (DW) は麴菌 (BR) に比べていずれの原料配合比率においても約10分の1の活性であった。これらのことから、麴菌の β -グルカナーゼは麴菌の種類により異なることに加え、基質により誘導的に生産されることが示唆された。

文 献

- 1) 松田茂樹・工藤康文：日食保蔵誌, **26** (4), 199 (2000)
 - 2) AMAN, P. and GRAHAM, H.: *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 704 (1987)
 - 3) 藤宮芳章・小堀英和・大志万浩一・曾田 良・海老名卓三郎：日食科工誌, **45** (4), 246 (1998)
 - 4) MIZUNO, M., YAMAKAWA, A., MINATO, K., TATSUOKA, S., TERA, H. and TSUCHIDA, H.: *Food Sic. Technol. Res.*, **5**, 398 (1999)
 - 5) YOKOYAMA, W. H., KNUCKLES, B. E., STAFFORD, A. and INGLET, G.: *J. Food Sci.*, **63** (4), 713 (1998)
 - 6) LEE, C. J., HORSLEY, R. D., MANTHEY, F. A. and SCHWARZ, P.B.: *Cereal Chemistry*, **74** (5), 571 (1997)
 - 7) 西谷尚道編：第四回改正国税庁所定分析法注解 (日本醸造協会, 東京), p.214 (1993)
 - 8) MCCLEARY, B. V. and CCDD, R.: *J. Sic. Food Agric.*, **55**, 303 (1991)
 - 9) MCCLEARY, B. V. and SHAMEER, I.: *J. Inst. Brew.*, **593**, 87 (1987)
 - 10) 今井泰彦・徳武昌一・山次信幸・鈴木 勝：醸協, **91** (1), 51 (1996)
 - 11) AKIBA, S., YAMAMOTO, K. and KUMAGAI, H.: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **87** (5), 576 (1999)
 - 12) 海老根英雄：味噌麴, 麴学 (村上英也編：日本醸造協会, 東京), p.327 (1986)
 - 13) 久米 堯・伊藤明德：醸協, **94** (3), 187 (1999)
 - 14) 中台忠信・水沼武二：製麴, 醤油の科学と技術 (柄倉辰六郎編：日本醸造協会, 東京), p.90 (1988)
- (平成12年6月2日受付, 平成12年7月17日受理)