

食糧研報 (Rept. Natl. Food Res. Inst.) No. 38, 115-120 (1981) [原著]

Aspergillus flavus group の aflatoxin および kojic acid の産生について

真鍋 勝・後藤哲久・田中健治・松浦慎治

The Capabilities of the *Aspergillus flavus* Group to Produce Aflatoxins and Kojic Acid

Masaru MANABE, Tetsuhisa GOTO, Kenji TANAKA and Shinji MATSUURA

Recently, kojic acid was found to be mutagenic by the Ames test with metabolic activation using liver homogenate fractions (S-9 mix). In our laboratory, the DNA-attacking abilities of 13 mycotoxins including kojic acid were determined by the rec-assay, using *Bacillus subtilis* M45 (rec-) and the parent strain H17(rec+) and S-9 mix. According to the results, 7 mycotoxins including kojic acid and aflatoxins possessed DNA-attacking abilities. Kojic acid is produced by various *Aspergillus* and *penicillium* spp., and also by certain bacteria. It is also generally known that koji-molds used in Japanese fermented food industries can produce kojic acid. Most strains of koji-molds are classified into the *Aspergillus flavus* group, specifically *Asp. oryzae*.

Then, kojic acid and aflatoxin producing abilities were examined on 149 strains of *Asp. oryzae* used in Japanese fermented food industries and 46 strains of *Asp. flavus* and 9 strains of *Asp. lamarii* stocked in our laboratory.

Aflatoxin production was observed in 24 out of 46 strains of *Asp. flavus*, but it was not observed in the other strains, including *Asp. oryzae* and *Asp. lamarii*. ~~Sakaguchi's culture medium was used for the examination of kojic acid producing ability.~~ The medium inoculated with the each strain was cultivated for 14 days at 30°C, and kojic acid in the cultivated medium was measured by the colorimetric determination using $Fe_2(SO_4)_3$. As a result, all strains of *Asp. flavus* and *Asp. lamarii* produced kojic acid, and the maximum value of kojic acid produced in this experiment was over 40 mg per ml of the culture medium. One hundred five out of 149 strains of *Asp. oryzae* produced kojic acid, but the other 44 strains (about 30%) did not produced any.

わが国のみそ、しょう油、清酒などの製造に用いられる麹菌の大部分は、*Aspergillus flavus* group に属しており、なかでも *Asp. oryzae* に属するものが多い。1960年にかび毒の一種 aflatoxin (A F) が発見され、その産生菌が *Asp. flavus* であることが明らかにされると、その近縁種である麹菌に畏惑の目がむけられた。しかし、わが国の研究者の情力的な研究の結果、発酵工業で使用している麹菌は A F を産生しないことが証明された¹⁾。一方、麹菌は二次代謝産物として kojic acid (K A) を産生することが、1907年斎藤により初めて麹から分離・証明され²⁾、1924年飯田により麹菌が決定さ

れた³⁾。K A は、マウスに対する LD₅₀ 値が 250mg/kg (腹腔内) で、けいれんを起こしたり、中枢神経系や腎臓に影響を与えるといわれているが、毒性は弱く余り問題視されなかった。近年、突然変異性の検出方法が進歩し、弱いながらも K A が突然変異原性を有することが明らかになった⁴⁾。

そこで、現在わが国の発酵工業で使用されている麹菌の中より *Asp. oryzae* に属する菌株と、実験室に保存している *Asp. flavus*, *Asp. lamarii* について K A と A F の産生能について検討した。

実験方法

1. Rec-assay

突然変異原性の試験方法には、バクテリアを使用する簡易な Ames 試験法や Rec-assay がある。AF については、既に強い発ガン性を有することが確認され、変異原性も有することが証明されている。KA については、弱い毒性のためこれらの試験はほとんどなかったが、近年試験方法の進歩と共に注目された。WEHNER らは、*Salmonella typhimurium* を使用する Ames 法により 17 種のマイコトキシンの変異原性を検索し、その中で KA が変異原性を有することを報告している。上野らは枯草菌を用いる Rec-assay (S-9 を不使用) によって 30 種のマイコトキシンの DNA 作用を検討しているが、KA については実施していない。著者らは、WEHNER の結果を他の方法で再確認する目的で、賀田らが新しく開発した S-9 を使用する Rec-assay に準じて、KA、AF らのマイコトキシンについて DNA 作用を検討した。

2. KA、AF 産生能試験菌株

全国植協協会の協力により集めた菌株と当研究室が集めた菌株の合計 204 株について、KA と AF の産生能を検討した。この菌株の内訳は、*Asp. oryzae* 149 株、*Asp. flavus* 46 株、*Asp. tamarii* 9 株である。

3. AF の産生能試験

試験に使用した培地は、AF の産生に適している米を使用した。300 ml 容三角フラスコに 5% 濃精米 30 g と水

15 ml を加え、米が充分水を吸収したのち高圧滅菌する。冷却後、1 週間培養した供試菌を接種、28°C、1 週間培養を行ない、培養後 100 ml のメタノールを加えて殺菌し、AF の産生の有無を検査した。AF の分析は、A. O. A. C. 分析法の第 3 法¹⁰⁾ に準じて行なった。

4. KA の産生能試験

KA 産生用培地としては種々のものが報告されているが、比較的万能でかつ簡単なのは麹汁である。しかし、KA の生成機構等を今後検討する場合、培地作成毎に組成が変わる可能性の大きい培地は不適當である。そこで KA 用の合成または準合成培地である坂口培地¹¹⁾、MAY-HERRICK 培地¹²⁾、片桐・北原培地¹³⁾ とかびの分類によく使用される CZAPECK 培地¹⁴⁾ の 4 種について、KA 産生の良否を検討し、良好な培地を KA 産生能試験に使用することにした。上記 4 種の培地組成を Table 1 に示す。

KA の分析方法として種々の報告^{15), 16)} がなされているが、試料中の分析妨害物質を除去する目的で酸性にしてエーテル抽出し、紫外部吸収により定量する方法、抽出後 $Fe_2(SO_4)_3$ で発色し比色定量する方法、試料を直接発色定量する方法について検討した。

第 1 法：試料溶液を硫酸酸性にしてエーテル抽出を約 2 日間行なう。抽出エーテル部分を分取し、エーテルを蒸去後残渣を水に溶解し、硫酸第 2 鉄溶液を加えて発色して 500 nm で比色定量する。

第 2 法：第 1 法同様にエーテル抽出し水に溶解後、麹の紫外部吸収 217 nm あるいは 265 nm の吸収強度を測

Table 1. Culture media

Sakaguchi's culture medium		May & Herrick's culture medium	
Glucose	10.0%	Glucose	15.0%
Peptone	1.2	NH_4NO_3	0.1
KH_2PO_4	0.01	KCl	0.01
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05
$CaCl_2$	0.01	H_3PO_4	0.005
$FeCl_3$	0.05	pH: 2.8-3.0 (H_3PO_4)	
pH: 2.8-3.0 (H_3PO_4)			
Katagiri & Kitahara's culture medium		Czapek's culture medium	
Glucose	5.0%	Sucrose	3.0%
$(NH_4)_2SO_4$	0.05	$NaNO_3$	0.3
KH_2PO_4	0.1	K_2HPO_4	0.1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05
$CaCl_2$	0.01	KCl	0.05
pH: 3.0 (HCl)		$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001
		pH: 7.0	

Table 2. Rec-assay of mycotoxins at pH 7

Group	Mycotoxins	Amount ($\mu\text{g}/\text{disk}$)	Inhibition zone(mm)		rec- effect*
			M45	H17	
I.	Penicillium toxins				
	Citrinin	100	0	0	-
		10	0	0	-
	Patulin	100	10.25	7	+
		10	7.25	5.5	-
	Penicillic acid	100	6	5.5	-
		10	0	0	-
	Rubratoxin B	100	0	0	-
		20	0	0	-
II.	Aspergillus toxins				
	Aflatoxin B ₁	5	9	2.75	++
		0.15	5.1	0	++
	Aflatoxin B ₂	100	9.1	2	++
		10	5.25	0	++
	Aflatoxin G ₁	100	10	0	++
		10	7.1	0	++
	Aflatoxin G ₂	100	5.1	0	++
		10	1.25	0	-
	Ochratoxin A	100	0	0	-
		20	0	0	-
	Sterigmatocystin	100	7	0	++
		10	8.25	3	++
III.	Fusarium toxins				
	Fusarenon-X	100	0	0	-
		10	0	0	-
	Zearalenone	100	0	0	-
	10	0	0	-	
IV.	Other toxins				
	Kojic acid	1000	5.0	0	++
		100	0	0	-

* Difference in diameter between the inhibition zone with the H17 and M45 strains:
++ \geq 5mm; + \geq 2mm; - $<$ 2mm.

定して定量する。

第3法：試料を適当濃度に希釈し、検体1mlに5%硫酸第二鉄溶液0.8ml、10%硫酸2.4ml、水5.8mlを加えて発色後500nmで比色定量する。

供試菌株のKA産生能試験は、培地を分譲フェルンバツハコルペンに100mlずつ分注・高圧液通し、冷却後供試菌株（棉栓試験管の斜面培地に30°C、1週間培養したもの）を1白金耳接種して、30°C、14日間静置培養し、KAの産生量を測定した。

結果および考察

1. Rec-assay

Rec-assay に使用したバクテリアは、*Bacillus subtilis* の H17(Rec+) および M45(Rec-) である。マイコキシン13種について Rec-assay によりDNA作用を検討した結果は、Table 2 に示すごとく7種の化合物が陽性であった。この Rec-assay 結果と今までに報告されている Ames test の結果(17-19) が異なっていたのは Patulin であり、Rec-assay で陽性でAmes

test で陰性であり、*in vivo* で発ガン性が証明されている。KAについては、Ames test 同様に Rec-assay でも陽性であったが、余り強くなかった。マイコトキシンの中で発ガン性、変異原性の最も強いと考えられる AF-B₁ と KA を供試量と阻止帯の長さ (Rec-effect) から単純に比較検討すると、KA の DNA 作用は AF-B₁ の 6000~7000 分の 1 位と思われる。また、KA は発ガン性の証明はされておらず、食品衛生上の問題点の有無また重要性については未だ不明の点が多いが、わが国の発酵工業で使用している麹菌が産生能を有する可能性が多いことから、それを明らかにしておくことは必要と考えた。

2. AF 産生能試験

供試菌 204 株についての AF 産生能試験の結果、*Asp. flavus* 46 株中 24 株に AF の産生を認め、*Asp. oryzae*, *Asp. lamarii* のいずれの菌株からも AF を検出することができなかった。この結果は、先に報告した結果^{20, 21} と同様の結果であり、わが国の発酵工業で使用中の麹菌が AF を産生しないことが再確認された。AF 産生菌の中でも産生量が多い菌株は、原料米当り 650ppm の AF-B₁ を産生した。

3. KA 産生能試験

KA 産生能試験に使用する培地を選択する目的で、4 種類の培地に *Asp. oryzae* 3 株 (MS-1, SH-3, S-1) をそれぞれ接種し、経時的に培養液を分取し、硫酸第二鉄溶液で発色して KA の産生状況を測定した結果を Table 3 に示す。供試 3 菌株について KA 産生量

を培地別に検討すると、坂口培地が他の 3 培地に比較して多量に産生していることから、この培地を今後の KA 産生試験に使用することにした。

KA の分析方法を 3 種類検討したが、まずエーテル抽出による KA の回収率を検討した。抽出検討試料として KA 標品 100mg を水 100ml に溶解したものと、KA 標品の同量を坂口培地 100ml に溶解したものを作り、それぞれ 50ml をソックスレー抽出器に取り、硫酸酸性にして約 2 日間抽出し、KA の抽出量を比色定量した。この結果は両試料とも抽出しによる回収率は約 50% であり、抽出が不十分であった。一方、第 3 法を坂口培地に KA 標品を加えた試料について検討したが、培地の色はブランクで除くことにより正確な値が得られることから、KA の定量には第 3 法を使用することにした。硫酸第二鉄による呈色は、KA のみの特異的なものではなく、フェノール性水酸基を有する化合物は呈色することから、薄層、マトによる定性も合わせて実施した。その結果、菌の培養液中には硫酸第二鉄により発色する物質の存在が認められるものもあったが、KA の発色の強さに比べて一般にかなり弱いことから、本報では 500nm の測定値をすべて KA として換算し、KA の産生量とした。

供試菌 204 株の KA 産生試験結果を Fig. 1 と 2 に示す。KA 産生能は菌株により大きな開きがあるが、*Asp. flavus* と *Asp. lamarii* の全菌株に KA の産生が認められた。*Asp. flavus* については、AF 産生能と KA 産生能の関係について検討したが、両者の間に相関は認められなかった。*Asp. oryzae* も菌株による KA 産生能に大

Table 3. Effect on kojic acid production by using various kinds of culture media

Culture media	Strain (<i>Asp. oryzae</i>)	Cultivated period(days)			
		0	4	8	12
Sakaguchi's	MS-1	-(3.0)**	-(2.4)	3.0(2.3)	3.0(2.0)
	SH-3	-(3.0)	-(2.3)	3.5(2.1)	3.5(2.0)
	S-1	-(3.0)	-(2.3)	4.0(2.0)	4.5(2.0)
May & Herrick's	MS-1	-(3.0)	-(2.2)	0.3(2.1)	0.5(1.7)
	SH-3	-(3.0)	-(2.3)	0.2(2.0)	0.5(1.8)
	S-1	-(3.0)	-(2.1)	0.0(1.9)	0.3(1.8)
Katagiri & Kitahara's	MS-1	-(2.9)	-(2.1)	0.0(2.1)	0.0(2.1)
	SH-3	-(2.9)	-(2.4)	1.0(2.1)	1.0(2.1)
	S-1	-(2.9)	-(2.3)	2.5(2.1)	2.5(2.0)
Czapeck's	MS-1	-(7.0)	-(6.4)	0.0(6.4)	0.0(7.0)
	SH-3	-(7.0)	-(6.4)	0.0(6.4)	0.5(6.4)
	S-1	-(7.0)	-(6.2)	0.0(5.8)	0.4(5.7)

* : Value of optical density at 500nm

** : pH value

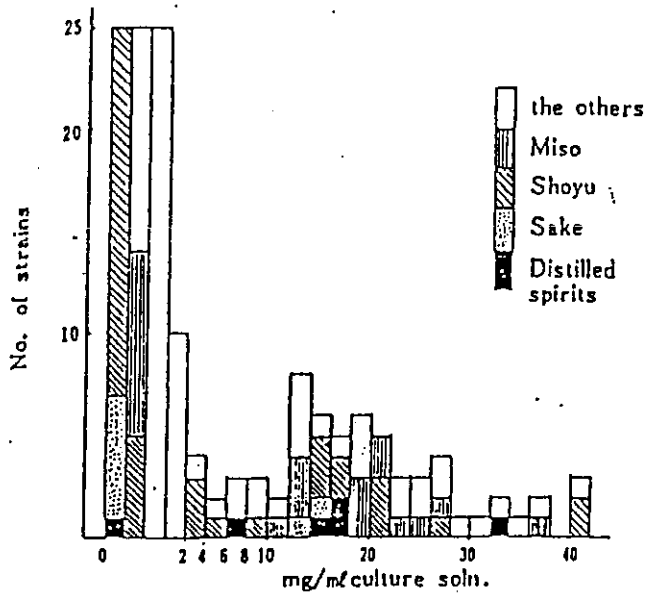


Fig. 1. Producing ability of kojic acid by *Asp. oryzae*

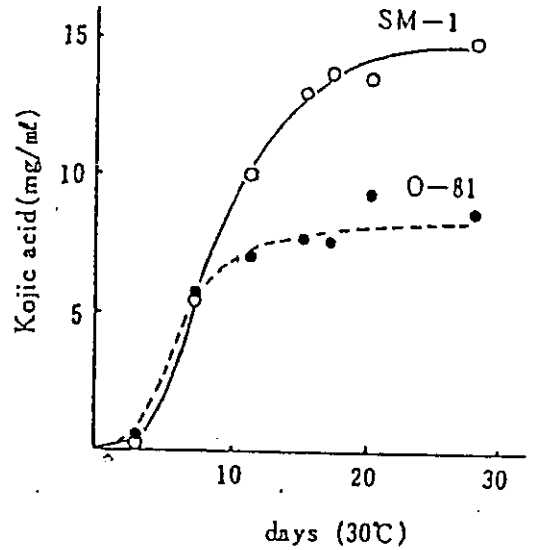


Fig. 3. Producing ability of kojic acid by *Asp. oryzae* MS-1 and O-81

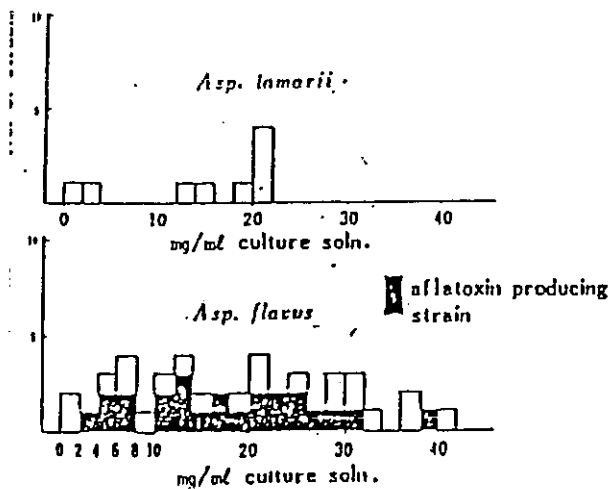


Fig. 2. Producing ability of kojic acid by *Asp. lamarii* and *Asp. flavus*

きな開きがあるが、培養液 1 ml 中に 0~2 mg の低産生量の菌が 149 株中 85 株あり、この中でもほとんど K A の産生を検出できない 0.05 mg/ml 以下の菌株が 44 株存在した。この結果から、現在わが国の発酵工業で使用されている *Asp. oryzae* の約 30% は、K A 産生能をほとんど有していないことが明らかとなった。また、*Asp. oryzae* の菌株を使用目的別にみると、みそ、しょう油、焼酎用用と比べて清酒用菌株に K A の産生能が低いか、または認められないものが多かった。これは、清酒中に K A が存在すると濁色の原因ともなり、濁色を成す清酒では K A 産生能の低い菌株が好まれたものと考えられる。

以上の K A 産生能試験では、K A が産生されやすい培地および培養条件で実施したものであり、実際にみそ、しょう油、清酒等を製造する場合の製麹条件、特に期間が大きく異なることから、K A 産生能の高い 2 菌株 (*Asp. oryzae* MS-1 と O-81) を使って経時的な K A の産生量を測定した。その結果 (Fig. 3)、K A の産生は接種後 3 日目頃より始まり、10 日目頃まで急激に増加していることがわかる。みそ、しょう油、清酒の製造に使用する麹は、一般に 2 日 (48 時間) 以内であり、K A 産生能の高い菌株を使用しても、麹中に産生される K A の量はかなり低いものと推察される。しかし、みそ、しょう油等製品の違いにより麹原料が米や小麦等と異なることや、各製造工場での製麹条件も異なることから、すべての製品が K A の汚染を受けていないとは断定できない。そこで、今後続けて市販されている製品は勿論、各工場で製造される麹について K A を調べる必要があると考える。

また、今回使用した K A の硫酸第二鉄呈色による比色定量は、フェノール性水酸基を有する化合物で発色することや分析感度が低いことから、感度および精度の高い新しい分析方法の開発が必要である。

以上の実験結果から、*Asp. oryzae* の中には K A 産生能をほとんど持たない菌株が存在することが明らかになったことから、K A の毒性が弱く、みそ、しょう油等の製品に K A が麹から移行する可能性が少なくとも、K A 産生能の認められない菌株を選択し、発酵工業に使用することが望ましいと考える。

要 約

わが国で発見されたKAは、マイコトキシンという菌葉が使われだした10数年前からこの種ちゅうに入っているが、実験動物に対する毒性が弱く、これによる事故が報告されていないことから余り問題にされていなかった。近年突然変異原性を有することがAmes testで明らかにされたことより、現在わが国の発酵工業で使用されている麹菌の中より *Asp. oryzae* (149株)、実験室保存の *Asp. flavus* (46株)、*Asp. tamarisii* (9株) について、KAとAFの産生能を検討した。

1. Rec-assay法を使用してKA、AFを含む13種のマイコトキシンのDNA作用を検討し、KAとAF-B₁を含む7種が陽性であることを明らかにした。

2. 供試菌204株についてAF産生能を試験した結果、*Asp. oryzae*と*Asp. tamarisii*の全供試菌株には産生が認められず、*Asp. flavus* 46株中24に産生が認められた。

3. KA産生能試験は、坂口培地を使用し、30°C、14日間培養し、培養液を硫酸第二鉄で呈色し比色定量した。*Asp. flavus*と*Asp. tamarisii*の全供試菌は、KAを産生し、最高産量は40mg/ml培養液以上であった。*Asp. oryzae* 149菌株中105株にKAの産生が認められ、残りの44株(約30%)に産生が認められなかった。

文 献

- 1) 粟飯原崇昭・宮木高明：食品衛生研究，16，(10)，69 (1966)。
- 2) 横塚 保・佐々木正典・菊池忠昭・後尾保夫・延原昭男：農化，41，(1)，32 (1967)。
- 3) 真鍋 勝・松浦慎治・中野政弘：日食工誌，15，(8)，341 (1968)。
- 4) 斎藤賢道：植物学雑誌，21，7 (1907)。

- 5) 藤田貞治郎：東京化学会誌，37，1185，1234 (1916)。
- 6) YABUTA, T.: *J. Chem. Soc.* 125, 575 (1924)。
- 7) WEHNER, F. C., THIEL, P. G., RENSBERG, S. J. V. and DEMASIUS, I. P. C.: *Mutation Research*, 58, 193 (1978)。
- 8) UENO, Y. and KUBOTA, K.: *Cancer Res.*, 36, 445 (1976)。
- 9) KADA, T., and HIRANO, L.: *Chemical Mutagens* 6, 1 (1978)。
- 10) Methods of A. O. C., 11th Ed., p.426 (1970)。
- 11) 坂口謙一郎：農化，8，205 (1933)。
- 12) MAY, O. E., MOYER, A. J., WELLS, P. A., and ERRICK, H. T.: *J. Am. Chem. Soc.*, 53, 774 (1931)。
- 13) KATAGIRI, H. and KITAHARA, K.: *Mem. Coll. Agr. Kyoto Imp. Univ.*, No.26, 1 (1933)。
- 14) RAPER, K. B., and FENNEL, D. I.: *The Genus Aspergillus*, (The Williams and Wilkins Company) p.36 (1965)。
- 15) 辰己忠治・鮎山 爽：農化，28，274 (1956)。
- 16) 坂口謙一郎：農化，6，400 (1930)。
- 17) UENO, Y., KUBOTA, K., ITO, T., and NAKAMURA, Y.: *Cancer Res.*, 38, 536 (1978)。
- 18) 長尾美奈子・本田雅子・浜崎 敏・名取信策・上野芳夫・山崎幹夫・清野祐子・矢作多貴子・杉村 隆：マイコトキシン，3/4，41 (1976)。
- 19) STARK, A. A., LOBBE, B., MARSUO, K., BUCHI, G., WOGAN, G. and DEMAIN, A. L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 412 (1978)。
- 20) 真鍋 勝・松浦慎治・中野政弘：日食工誌，15，8，341 (1968)。
- 21) 真鍋 勝・鶴田 理・杉本貞三・南沢正敏・松浦慎治：食衛誌，12，(5)，364 (1971)。
- 22) 鶴田 理・杉本貞三・南沢正敏・真鍋 勝：日食工誌，15，(3)，258 (1974)。
- 23) 真鍋 勝・鶴田 理・田中健治・松浦慎治：日食工誌，17，(3/4)，436 (1977)。

発酵食品中の蛍光成分に関する研究 (第7報)

添加した麴酸のしょう油醸造中の分解

進士栄一郎*, 真鍋 勝**, 後藤哲久**, 三沢幸子**, 田中健治**, 松浦慎治**

((財)日本醬油研究所* 農林水産省食品総合研究所**)

(昭和59年8月6日受理)

Studies on the Fluorescent Compound in Fermented Foods (Part 7)
The Degradation of Added Kojic Acid during Soy Sauce FermentationElichirō SHINSHI*, Masaru MANABE**, Tetsuhisa GOTŌ**,
Yukiko MISAWA**, Kenji TANAKA** and Shinji MATSUURA**

(*Japan Soysauce Research Institute

**National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)

麴菌の麴酸産生能を調べた結果, *Asp. oryzae* 47株中19株, *Asp. sojae* 3株中3株に産生能を認めた。また, 麴酸のしょう油醸造中の挙動について検討した結果, 添加後150日目までほとんど分解していた。

緒 言

自然界には無数の種類のかびが存在しており, この中にはわが国伝統食品であるしょう油, みそ, 清酒, みりん等の製造に用いられている *Aspergillus* 属のかびもある。この *Aspergillus* 属のある種のかびの中には, マイコトキシンの一種である麴酸を産生するものもある。

麴酸は1907年に斎藤¹⁾により初めて麴から分離・証明され, 1924年に 荻田²⁾により構造が決定された。この物質は抗菌作用をもつ毒性を持っており, その強さは生後12日目のひよこに対する LD₅₀ が 16mg/100g, 17gのマウスに対する LD₅₀ が 30mgと, マイコトキシンの中では比較的弱い毒性³⁾であまり問題視されなかった。しかし近年, 種々の物質の突然変異原性が注目を浴び, その試験方法も進歩した結果, 麴酸も弱いながら突然変異原性を有することが判明⁴⁾した。

本報では, 基礎的実験として, 各種麴菌の麴酸産生能の有無, 麴酸の分解に対する水素イオン濃度の影響を調べ, 続けて麴酸が仕込時に存在した場合の諸味醸造中の挙動について検討した。また, 市販しょう油中の麴酸についても検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 麴菌の麴酸産生能試験

しょう油, みそ, 清酒, しろうじ製造に使用している麴菌の原株について, 麴酸の産生能の有無を調べた。各種麴菌の原株を坂口培地 10ml の入った試験管に接種し, 30°Cで14日間培養後, 高速液体クロマトに直接注入して調べた。

また麴酸産生能の高かった麴菌については, 実際に麴を調整し麴酸量を測定した。しょう油用麴については, 脱脂大豆と割砕小麦の混合物を蒸煮冷却後, 菌を接種し 30°Cで19時間30分続けて25°Cで26時間30分, 計46時間培養(3日麴)した後, 麴酸量を測定した。清酒用麴については, 73%歩留り精白米を洗米, 蒸煮, 冷却後, 菌を接種し, 30°Cで41時間20分培養(2日麴)した後, 麴酸量を測定した。みそ用麴については, 85.5%歩留り精白米を洗米, 蒸煮, 冷却後, 菌を接種し, 30°Cで41時間20分培養(2日麴)した後, 麴酸量を測定した。しろうじ用麴については, みそ用麴と同様に行ない麴酸量を測定した。麴酸の測定方法については, 前報⁵⁾に準じて行なった。

2. 水素イオン濃度に対する影響

水素イオン濃度に対する麴酸の安定性について検討した。pH 2~11の緩衝液2種類を調整し、各々の緩衝液中の添加麴酸の分解状態を経時的に測定した。

緩衝液は Britton-Robinson Buffer と Volatile Buffer を用いた。Britton-Robinson Buffer はリン酸、酢酸、ホウ酸と水酸化ナトリウムで調整⁷⁾し、各緩衝液に麴酸を1 mg/mlの割合にそれぞれ加え、40°Cの恒温器に入れ、麴酸量の変化を経時的に測定した。Volatile Buffer は pH 2を酢酸-ギ酸、pH 5をピリジン-酢酸、pH 7・9・11をアンモニア-酢酸で調整⁸⁾し、各緩衝液に麴酸を10 mg/mlの割合にそれぞれ加え、40°Cの恒温器に入れ、麴酸量の変化を経時的に測定した。

次に、水素イオン濃度と温度による影響を調べてみた。先の Britton-Robinson Buffer の pH 5, pH 9に麴酸を1 mg/mlの割合にそれぞれ加え、40°C, 60°C, 90°C, 110°Cと温度を違えて経時的に測定した。麴酸の分析は、前処理を行わず高速液体クロマトに直接注入して行なった。

最後に、水素イオン濃度の違いによる麴酸分解物の変異原性を調べた。先の Volatile Buffer の pH 5, pH 6.9, pH 9, pH 11に麴酸を10 mg/mlの割合にそれぞれ加え、40°Cで21日間静置後、各緩衝液0.1 mlについて変異原性試験を行なった。変異原性試験方法は、賀田⁹⁾、真鍋¹⁰⁾が用いた Rec-assay で行なった。

3. 添加した麴酸のしょう油醸造中の挙動

実際にしょう油を仕込み、その醸造中の添加麴酸の挙動について調べた。しょう油は脱脂大豆を蒸し、小麦を炒り砕き混合したところに種麴を接種し麴を作り、そこに塩水を加えて諸味となり、その後、発酵、压榨、火入を行ないしょう油となる。そこで、添加した麴酸の醸造中の挙動を調べる際、少量で麴を作って仕込むと、その後の発酵が一般的には正常に行なわれず、反対に多量に麴を作って仕込むと、試験後の試料処理が大変なので、今回は予め製麴されている日清製粉(株)「ハイコージ1000」を用いて、少量のしょう油諸味を作った。「ハイコージ1000」800gに麴酸1g添加した試料と麴酸無添加の試料を別々に3 lのガロンビンに汲水13水で仕込み、180日間発酵させ、麴酸量の変化を経時的に測定した。

麴酸の分析は図1に従って実施した。

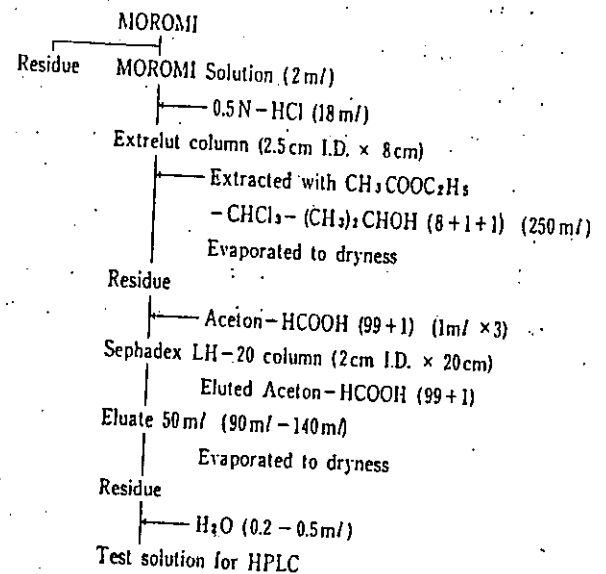


図1 Analytical Method of Kojic acid in MOROMI

また、麴酸添加試料が正常に発酵しているかの指標として、全窒素分(T.N)、食塩分(NaCl)、アルコール分(Alco.)、pHを測定して無添加試料と比較した。T.N, NaCl, Alco., pHは、しょう油基準分析法¹¹⁾に従って行なった。

4. 市販しょう油の麴酸分析

現在、市販されているこいくち6本、うすくち、たまり、さいしこみ、しろしょう油各3本、計18本のしょう油の麴酸を測定した。麴酸の分析は前報⁶⁾に準じて行なった。

実験結果および考察

1. 麴菌の麴酸産生能試験

しょう油、清酒、みそ、しろこうじ製造に使用している麴菌の原株について、麴酸産生能の有無を調べた結果、麴菌 *Aspergillus oryzae* については、47株中19株が麴酸を産生した。用途別にみると、しょう油用が12株中1株、清酒用が13株中3株、みそ用が17株中12株、しろこうじ用が5株中3株それぞれ麴酸を産生した。しょう油用 *Asp. oryzae* については、12株中1株と他に比べ産生能を有する株が少なかった。一方、しょう油用 *Asp. sojae* については、3株中全株に麴酸産生が認められた。

そこで、麴酸産生の認められた各種麴菌 *Asp. oryzae*

について、実際に製麹した場合の麹酸産生量を測定した。その結果、しょう油用麹で調整した麹酸量が 175ppm, 99ppmであり、清酒用は1.6ppm, 1.8ppm, みそ用は< 0.1ppm, しろこうじ用は 3ppmと、しょう油用麹菌の産生量が多かった。この原因は図2に示す通り一般に麹酸の産生は3日目から10日目頃まで急激に増加している。このことより、先のしょう油麹が3日麹で製麹されているのに対し、清酒・みそ麹が2日麹で製麹されており、この製麹時間の差がしょう油用麹菌の麹酸産生量を増加させたと思われる。

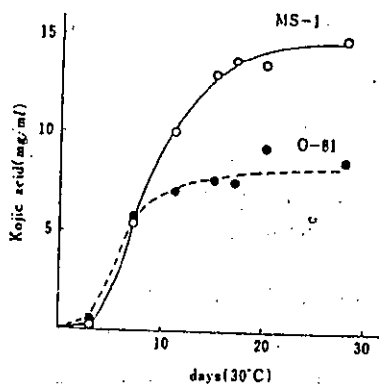


図2 Producing Ability of Kojic acid by *Asp.oryzae* MS-1 and O-81

2. 水素イオン濃度に対する影響

麹酸の水素イオン濃度に対する安定性を、pH を違えた緩衝液を用いて行なった。緩衝液 Britton - Robinson Buffer の pH の違いによる麹酸量の変化を経時的に測定した。その結果、表1に示すように pH 2~5 の酸性側では日数が経過してもあまり分解が認められず、pH 6, 7, 8 の中性側でわずかに分解が認められ、pH 9, 10 のアルカリ側では最も強く分解が認められた。しかし、それよりも強アルカリ pH 11ではやや分解が低下した。他の緩衝液 Volatile Buffer を用いて同様に実施した結果、表2に示すように前の緩衝液と同様な結果であった。

次に、水素イオン濃度と温度による影響をみた。先の Britton - Robinson Buffer pH 5, pH 9 の2種類の緩衝液に、麹酸を加え温度を違えてその分解状態を調べた。その結果を表3に示した。pH 5では 110°C 60分温度を加えても分解が認められなかったのに対し、pH 9では 110°C 30分温度を加えただけで約15%分解され、さらに

110°C 60分温度を加えると約30%分解した。

表1 Decomposition of Kojic acid (Effects of pH)

Sample Days	Rate of Decomposition of Kojic acid (%)									
	pH2	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10	pH11
3days	0	0	0	0	0	2	11	33	36	26
6days	0	0	0	1	5	14	28	59	54	33
10days	0	0	0	0	5	22	45	71	62	31
17days	0	0	0	3	13	44	67	83	76	38
21days	0	0	3	13	17	55	75	88	81	49

Incubated in BRITTON-ROBINSON buffer at 40°C
Kojic acid : 1mg/ml

表2 Decomposition of Kojic acid (Effects of pH)

Sample Days	Rate of Decomposition of Kojic acid (%)				
	pH2	pH5	pH6.9	pH9	pH11
6 days	1	0	13	24	23
10 days	3	0	29	43	31
17 days	3	0	29	58	44
21 days	3	0	35	75	50

Incubated in volatile buffer at 40°C
Kojic acid ; 10mg/ml

表3 Decomposition of Kojic acid (Effects of Temp.)

pH and Time	Temp			
	40°	60°	90°	110°
pH5	30 min	0	0	0
	60 min	0	0	0
pH9	30 min	0	1	15
	60 min	0	5	31

Kojic acid ; 1mg/ml

最後に、水素イオン濃度の違いによる麹酸分解物の変異原性を調べた。その結果、阻止円の幅がpH 5では7.0mm, pH 6.9では5.0mm, pH 9では3.0mm, pH 11では5.5mmとアルカリ側に進むにつれて、変異原性が弱まり、酸性側では変異原性が残った。このように、分解度合と変異原性とは相関があった。

3. 添加した麹酸のしょう油醸造中の挙動

しょう油醸造中の添加麹酸の挙動試験を行なった。この試験で、しょう油発酵が正常に行なわれたかを T. N,

NaCl, Alco., pH を指標として経時的に測定し, 無添加試料と比較した。その結果, 図 3, 4, 5, 6 に示した通り, 添加試料は無添加試料と同様な傾向を示し, 麴酸を大量に添加しても醸造中に働く微生物に大きな影響を与えず, 正常な発酵が行なわれた。

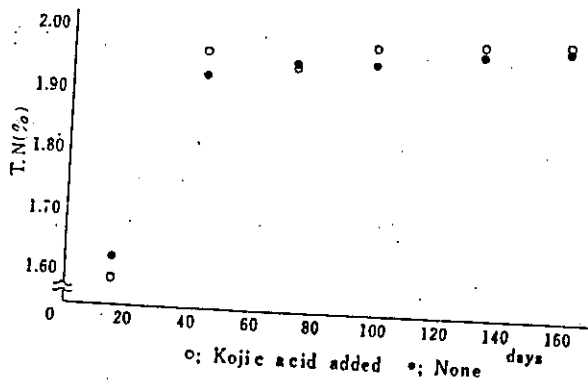


図 3 Change of T.N During Shoyu Fermentation

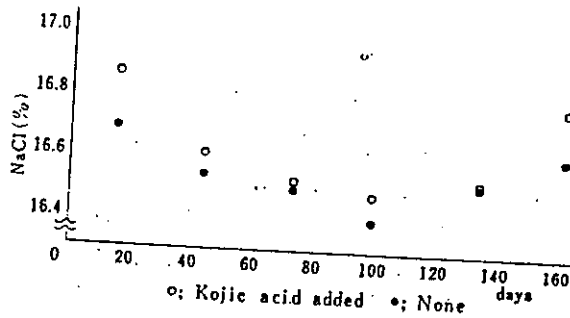


図 4 Change of NaCl During Shoyu Fermentation

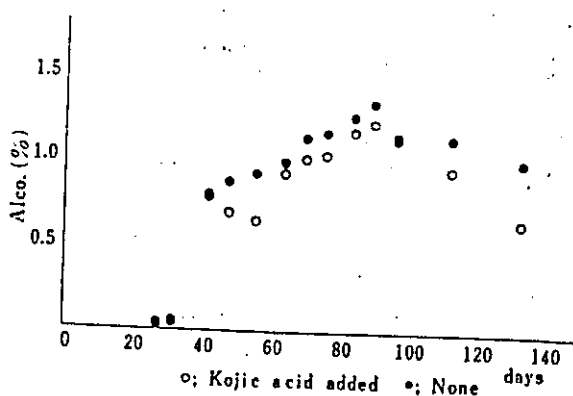


図 5 Change of Alco. During Shoyu Fermentation

次に, 麴酸添加しょう油の醸造中の挙動についての結果を図 7 に示した。これより麴酸添加後 10 日目までに, 添加麴酸の約 30% が急激に分解し, 醸造開始より 20 日目頃に約 50%, 70 日目頃に約 70% と分解が進み, 添加後 150 日目頃に約 100% 分解した。現在, 通常の諸味発酵期間

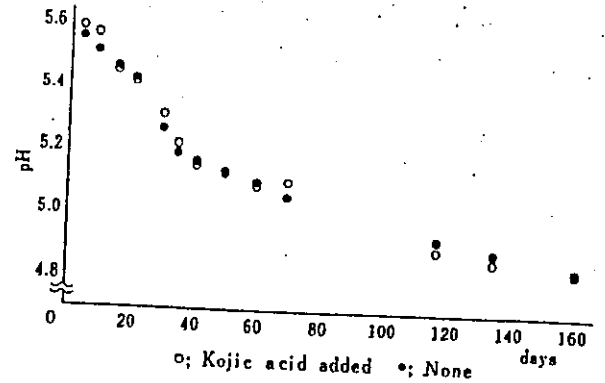


図 6 Change of pH During Shoyu Fermentation

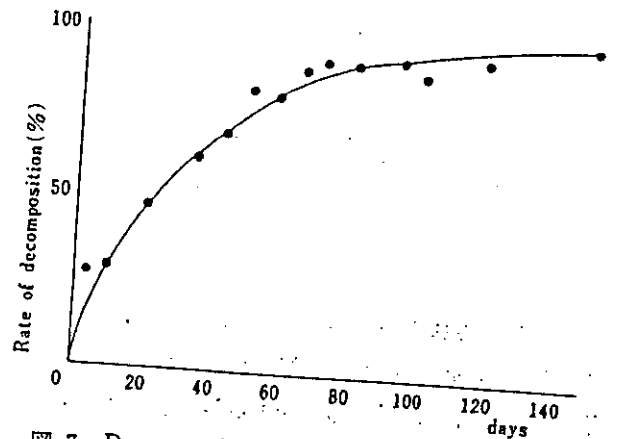


図 7 Decomposition of Kojic acid During Shoyu Fermentation

は約 180 日間であり, もしも製麴時に麴酸が産生したとしても諸味醸造中に分解し, 最終製品にまで残存する可能性は少ないと思われる。

この麴酸の分解因子としては, 光, 水素イオン濃度, 温度, 酵素, 微生物などが考えられる¹²⁾。光については醸造中うす暗い所に置かれること等から影響はなく, 水素イオン濃度については, 醸造中の諸味 pH が 4.8~5.6 の酸性側領域であり, ほとんど影響はなく, 温度については, 諸味温度が 15~30°C であり, 大きな影響はないと考える。すなわち, しょう油醸造中に働く微生物, 酵素により麴酸が分解されたと思われる。

4. 市販しょう油の麴酸分析

上記の結果から, 製麴時に麴酸が産生したとしても, 諸味醸造中に分解され最終製品にまで残存する可能性が少ないことが明らかにされたが, 現在全国で市販されているしょう油について検討するため, ランダムにこいくち, うすくち, たまり, さいしこみ, しろしょう油を 18

点集めて麹酸を測定した。その結果、表4に示す通りいずれの試料からも麹酸は検出されなかった。

表4 Analysis of Kojic acid in Commercial of Shoyu

Sample of Shoyu	Kojic acid	Sample of Shoyu	Kojic acid
KOIKUCHI	A ND	TAMARI	A ND
	B ND		B ND
	C ND		C ND
	D ND	SAISHIKOMI	A ND
	E ND		B ND
	F ND		C ND
USUKUCHI	A ND	SHIRO	A ND
	B ND		B ND
	C ND		C ND

ND= None Detection

要 約

現在市販されているしょう油用、清酒用、みそ用、しろこうじ用麹菌の麹酸産生能、麹酸の水素イオン濃度の違いによる分解、添加した麹酸のしょう油諸味醸造中の挙動、市販しょう油中の麹酸有無について検討した。

1. 各種麹菌の麹酸産生能について、*Asp. oryzae* は47株中19株麹酸を産生した。用途別にみると、しょう油用が12株中1株、清酒用が13株中3株、みそ用が17株中12株、しろこうじ用が5株中3株、それぞれ麹酸を産生した。*Asp. sojae* は3株中3株とも麹酸を産生した。実際に、麹酸産生能の高い麹菌を使って、しょう油用、みそ用、清酒用麹を製造した場合の麹酸の産生量を調べた結果、わずかながら麹酸の産生が認められた。

2. 麹酸の水素イオン濃度の違いによる分解については、酸性側ではほとんど分解がなく、中性では少し分解があり、アルカリ側では強く分解し、強アルカリ側(pH 11)ではやや分解が減少した。水素イオン濃度と温度に

よる影響についても、pH 5ではほとんど分解がなかったのに対し、pH 9では110°C 60分温度を加えると約30%分解した。水素イオン濃度による麹酸分解物の変異原性についても、中性側からアルカリ側に進むにつれて変異原性が減少していった。

3. 添加した麹酸のしょう油醸造中の挙動については、添加後10日目で30%、20日目で50%、70日目で90%と分解が進み、添加後150日目で麹酸は検出されなかった。現在、通常の諸味発酵期間は約180日間なので、もしも製麹時に麹酸を産生したとしても、諸味醸造中に分解され最終製品に残存する可能性は少ないと考えられる。

4. 市販しょう油中の麹酸については、現在市販されている18点のしょう油について分析したが、いずれのしょう油からも麹酸が検出されなかった。

文 献

- 1) 斎藤賢道：植物学雑誌，21，7（1907）
- 2) 藪田貞治郎：東京化学会誌，37，1185，1234（1916）
- 3) T. YABUTA：J. Chem. Soc.，125，575（1924）
- 4) Toxigenic Fungi，7，（Kodansha）p.4（1984）
- 5) F. C. WEHNER，P. G. THIEL，S. I. V. RENSBERG and I. P. C. DEMASIUS：Mutation Research，58，193（1978）
- 6) 真鍋 勝，進士栄一郎，後藤哲久，三沢幸子，田中健治，松浦慎治：本誌，10，146（1984）
- 7) 微生物及び酵素実験法化学実験学（第2部）第12巻第1版（河出書房）P.151（1943）
- 8) 基礎生化学実験法，第6巻（丸善）P.285（1976）
- 9) T. KADA and L. HIRANO：Chemical Mutagens，6，1（1978）
- 10) 真鍋 勝，後藤哲久，田中健治，松浦慎治：食総研報，38，115（1981）
- 11) 基準しょう油分析法，日本醤油技術会（1966）
- 12) 真鍋 勝，松浦慎治：食工誌，19（6），275（1972）