

# コウジ菌によるコウジ酸生産

岡村 澄夫, 伊藤 俊彦<sup>\*1</sup>, 石井 綾<sup>\*2</sup>, 沼山 康紀<sup>\*3</sup>

## Production of Kojic Acid by *Asp. oryzae*

Sumio OKAMURA, Toshihiko ITO<sup>\*1</sup>, Aya ISHII<sup>\*2</sup> and Yasunori NUMAYAMA<sup>\*3</sup>

(2003年11月21日受理)

A certain kind of *Aspergillus oryzae* can generate kojic acid. Although it continues generating kojic acid by the culture medium till the 2nd week, it decreases after that. When glucose is lost in a culture medium, kojic acid which produced at once will be taken and be consumed by *Aspergillus oryzae*. So, it is thought that kojic acid is not contained in the soy sauce or the bean paste which are traditional Japanese food.

### 1. 緒言

コウジ酸は1907年に日本で米こうじ中に存在することが発見され、1924年にその化学構造が決定された。その後コウジ酸については金属とのキレート形成能や抗菌作用は知られていたが、工業的に有望な用途が見出されなかったため基礎的研究のみに留まっていた。近年、コウジ酸に抗酸化能、美白作用などの機能があることが見出され、工業的な生産、利用が行われている。本研究では種々のコウジ菌からコウジ酸生産量の多い菌株見つけ、コウジ酸を分離・精製・確認しいくつかの性質について検討した。

### 2. 実験

コウジ酸は下式に示したようにコウジ酸発酵能をもった *Aspergillus* 属のコウジ菌がグルコースをコウジ酸に変換して生産する。実験では最初に

*Aspergillus* 属コウジ菌の選択を行い、このコウジ菌を培養してコウジ酸生産能を調べた。

#### 2.1 コウジ菌の培養

##### (1) *Aspergillus* 属コウジ菌の選択

コウジ酸生産菌を得るには最初にこうじから胞子を採取し、マルツエキス寒天培地<sup>a)</sup>で培養し、生えてきた菌を Slide culture 法<sup>b)</sup>により顕微鏡で観察してコウジ酸発酵を行うとされている *Aspergillus* 属であることが判明したコウジ菌を選択した。実験には一般の商店で購入できるもの1種類と専門業者の秋田今野商店から購入した9種類<sup>c)</sup>を使用した。

a) マルツエキス寒天培地

マルツエキス：2%

酵母エキス：0.2%

pH：7.2

b) Slide culture 法

スライドガラスにのせた大きいホッチキスの針の



<sup>\*1</sup> 平成15年3月退官

<sup>\*2</sup> 秋田高専卒業生 (現：塩野義製薬)

<sup>\*3</sup> 秋田高専卒業生 (現：秋田高専専攻科)

内側にマルツエキス寒天培地をピペットで流し込み、カバーガラスをかぶせ培地に孢子を植菌して数日後に生えた菌を顕微鏡で観察した。この方法によって緑色中毛菌が *Aspergillus* 属のコウジ菌であることが判明した。

c) 焼酎用白コウジ菌, 焼酎用黄コウジ菌, 焼酎用黒コウジ菌, 豆コウジ菌 (豆味噌用), 醤油コウジ菌 (醤油1号), 醤油コウジ菌 (醤油2号), 白コウジ菌 (1号), 白コウジ菌 (すずらん), 紅コウジ菌

## (2) コウジ酸発酵

選択したコウジ菌を100mlのコウジ酸生産培地<sup>a)</sup>を入れた坂口フラスコ10本に植菌して3週間培養した。この間, 毎日培養液をサンプリングして塩化鉄反応<sup>b)</sup>を行い, コウジ酸の生成を定性的に調べた。さらにコウジ酸の生成が確認できたフラスコについて7, 11, 13, 15, 17および21日目に1本ずつ培養を止め, コウジ酸の分離・精製・定量分析を行った。

### a) コウジ酸生産培地

グルコース: 10%

ペプトン: 0.5%

MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O: 0.5%

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.02%

pH2~3.5

b) コウジ酸は1%塩化鉄水溶液によって赤紫色に着色するので, 培養液に塩化鉄溶液を加えコウジ酸の生成を定性的に調べた。

## 2.2 培養液からコウジ酸の抽出

所定の日数培養し塩化鉄溶液によってコウジ酸の生成が確認できた培養液を吸引ろ過し, 菌体とろ液に分け菌体は減圧下に加熱乾燥した。ろ液は1/3程度まで減圧濃縮してから酢酸エチル20mlで4回抽出した。抽出液を無水塩化カルシウムで乾燥し減圧濃縮した後, デシケータ中で減圧乾燥した。乾燥した抽出物中に含まれるコウジ酸について, 薄層クロマトグラフによる確認および分離精製, 高速液体クロマトグラフで定量分析を行った。

## 2.3 薄層クロマトグラフによるコウジ酸の確認

市販のコウジ酸を用いて蛍光剤入りで0.25mm厚のシリカゲル薄層板でコウジ酸分離に適切な展開溶媒を探索したところ, クロロホルム/メタノール=4/1でRf値が約0.7のところに丸いスポットを形成することがわかった。スポットの確認には254nmの紫外線ランプを使用した。

## 2.4 薄層クロマトグラフによるコウジ酸の分離精製

2.2項でデシケータ中で乾燥した抽出物をメタノールに溶解して2mm厚の蛍光剤入りシリカゲル薄層板に塗布し, クロロホルムとメタノール(4:1)の混合溶媒で展開した後, コウジ酸部分をかき取り, 酢酸エチルで抽出した。

## 2.5 高速液体クロマトグラフによるコウジ酸定量法

市販のコウジ酸を標準物質として絶対検量線法で定量分析した。装置, 分析条件および分析操作は次の通りである。

### (1) 装置および分析条件

ポンプ: 日立 L-6000型

検出器: 254nmでの紫外吸収

データ処理: 日立 D-2500型インテグレーター

カラム: Inertsil SIL (GLサイエンス社), 4.6X150mm

注入口: レオダイン, 5μlのループ付き

溶媒: クロロホルム/メタノール=24/1, 1.5ml/min

### (2) 分析操作

市販のコウジ酸10, 20, 30, 40mgを100mlの共栓付きフラスコに精秤し, 酢酸エチル50mlをホールピペットで正確に加えて溶解した。この25μlを5μlのループを付けた注入口から注入して検量線を作製した。培養液から抽出して乾燥したサンプルについても同じように酢酸エチル溶液を作製して分析した。得られたデータから検量線によって培養液中に含まれるコウジ酸量を求めた。

## 2.6 コウジ酸ターンオーバーの測定

### (1) グルコースの定量

コウジ酸はコウジ菌によってグルコースから生産される。培養液中のグルコースをグルコースオキシダーゼ法<sup>a)</sup>で定量して, 培養日数によるグルコース残存量を定量し, これまでに得られた菌体重量, コウジ酸生産量との関係を調べた。

a) 培養液に発色試薬を作用させると, 培養液中にグルコースが存在すれば, 発色試薬中のグルコースオキシダーゼの作用で酸化され, グルコン酸に変化すると同時に過酸化水素を生成する。生成した過酸化水素は発色試薬中のペルオキシダーゼの作用により, 同じく発色試薬中の4-アミノアンチピリンとフェノールを定量的に縮合させて赤色の色素を生成する。この赤色物質の吸光度を測定することによ

て培養液中のグルコースを定量した。

## (2) コウジ酸生産培組成とコウジ菌の培養

コウジ酸生産機構を解明するためコウジ酸生産培地あるいはグルコースの代わりにコウジ酸を加えた培地で培養を行った。

## 2.7 コウジ酸の性質

### (1) 抗菌作用

検定菌として酵母, コウジカビ, 大腸菌および黄色ブドウ球菌を用いた。酵母およびコウジカビはマルツエキス培地で, 大腸菌および黄色ブドウ球菌はブイヨン培地で前培養した。つぎに4種の菌の培養液をそれぞれの寒天培地に0.2mlずつ加え, コンラージ棒でむらがないように広げた。その上に62.5, 125, 250あるいは500 $\mu$ g/mlのコウジ酸溶液に浸したペーパーディスクをのせて抗菌作用を調べた。

### (2) 抗酸化作用

小さく切ったりんご片を5つ用意して, 1つはそのまま空气中に放置, 残りの4つは0.1%食塩水, 1%食塩水, 0.1%コウジ酸水溶液, 1%コウジ酸水溶液に浸したあと空气中に放置して, りんごの色の変化によるチロシナーゼ阻害効果を見た。

## 2.8 醤油およびみそに含まれるコウジ酸

醤油100mlを酢酸エチル50mlで塩析を行いながら3回抽出した。一方, みそは100gに酢酸エチル100mlを加えてかきまぜ機で30分かき混ぜた。それぞれの抽出液を無水塩化カルシウムで乾燥後, 減圧濃縮し薄層クロマトグラフおよび高速液体クロマトグラフで分析した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 コウジ酸生産菌の選択

10種類のコウジ菌それぞれからSlide culture法でAspergillus属と判明した緑色中毛菌を分離して培養し, 塩化鉄水溶液によってコウジ酸の生産を確認できたのはつぎの2つであった。

- (1) 焼耐用黄コウジ菌
- (2) 醤油コウジ菌 (醤油2号)

この結果からAspergillus属であっても必ずしもコウジ酸を生産するとは限らないことがわかった。

### 3.2 培養液からコウジ酸の抽出, 分離精製および定量分析

焼耐用黄コウジ菌と醤油コウジ菌 (醤油2号) について, コウジ酸生産培地で培養を行い, 所定日数

ごとに培養ろ液100mlから酢酸エチルでコウジ酸を抽出して乾燥試料を作製した。つぎにこの試料に含まれるコウジ酸を薄層クロマトグラフで分離精製して高速液体クロマトグラフで定量分析した。

所定培養日数ごとの培養ろ液100mlについて定量分析まで行った結果を表1に示した。

表1 抽出・精製物の結果

培養 (日)	黄コウジ菌		醤油コウジ菌	
	菌体 (g)	コウジ酸 (mg)	菌体 (g)	コウジ酸 (mg)
0	0	0	0	0
7	1.45	7.36	1.14	5.94
11	1.40	13.60	1.15	4.18
13	1.31	18.18	1.21	35.68
15	1.32	218.4	1.22	214.4
17	1.27	4.90	0.75	5.60
21	2.19	0	0.49	2.40

2つのコウジ菌にはばらつきがあるが, おおよそ培養1週間で菌体重量が増加し, その後は大きな変化はないが, 3週間目には再び増加した。これに対してコウジ酸の生産は2週間目くらいまでに大きく増加し, その後減少している。1度生産されたコウジ酸が減少するとともに菌体重量が増えているのは, コウジ菌はグルコースが無くなるとコウジ酸を栄養源として同化しているためではないかと考えている。

### 3.3 コウジ酸のターンオーバー

#### (1) グルコースの定量

グルコースオキシダーゼ法で培養0日と15日目の培養液中のグルコースを定量した。その結果, 培養液100mlに含まれるグルコースの量は0日目は10gで培地に加えた量が定量できたが, 15日目には0gで全く残っていないことがわかった。3.2項の結果と合わせて考えると, グルコースが無くなった15日以降に菌体重量が増え, コウジ酸が減っているはコウジ菌が栄養源としてコウジ酸を同化していることが推定される。

#### (2) コウジ酸生産培地組成とコウジ菌の培養

コウジ酸生産培地あるいはグルコースの代わりにコウジ酸を加えた培地でコウジ菌の培養を行った。

その結果, 培地中にグルコースがないとコウジ菌は増殖できないが, グルコースが無くても代わりにコウジ酸があれば増殖できることがわかった。

3.2項および3.3項を総合して考えると, コウジ菌は増殖に必要なグルコースが無くなると, 自ら生産したコウジ酸を栄養源として同化する能力を持つ

菌であることが証明できた。

### 3.4 コウジ酸の性質

#### (1) 抗菌作用

酵母，こうじかび，大腸菌および黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用を試験したが，全ての試験で阻止円は見られなかった。検定菌の濃度を薄めた実験およびコウジ酸の濃度を濃くした実験をすることが考えられたが，本研究では実施しなかった。

#### (2) 抗酸化作用

りんご片を空气中に放置してチロシナーゼ阻害作用による変色度合いを観察し，コウジ酸の抗酸化作用を試験し結果を表2に示した。

表2 コウジ酸の抗酸化作用

条 件	変色度合
空气中に放置	5+
0.1%食塩水	2+
1%食塩水	1+
0.1%コウジ酸溶液	1+
1%コウジ酸溶液	0

定性的な試験であるが，コウジ酸には抗酸化作用があることがわかった。さらに詳細に試験する必要があると思われる。

### 3.5 醤油およびみそに含まれるコウジ酸

最近コウジ酸の発ガン性という問題が生じ，化粧品への使用も禁止されるようになった。日本人が古来から食べてきた醤油およびみそにコウジ酸が含まれていれば大きな問題になるということで，これらの食品にコウジ酸が含まれているかどうか調べることにした。

醤油およびみそから酢酸エチルで抽出して濃縮し

た溶液を使用して，クロロホルムとメタノールの混合溶媒（4：1）で薄層クロマトグラフを行ったところ，市販のコウジ酸とほぼ同じ位置にスポットがあったので，高速液体クロマトグラフで分析を試みたが定量できなかった。このスポットはニンヒドリン試薬で呈色したのでアミノ酸の一種と思われる。

すべての醤油およびみそを調べたわけではないが，3.3項の実験で明らかにされたように，コウジ菌は一度生産したコウジ酸を再び同化して体内に取り込むことから推定すると，これらの食品にはコウジ酸が残存している可能性はないと考えられる。

## 4. 結果のまとめ

本研究の結果をまとめると次の通りである。

- (1) *Aspergillus* 属のコウジ菌であってもコウジ酸を生産する菌としない菌がある。
- (2) 焼酎用黄コウジ菌と醤油用コウジ菌（醤油2号）のコウジ酸生産を確認した。
- (3) コウジ菌はグルコースを栄養源としてコウジ酸を生産するが，グルコースが無くなると，自ら生産したコウジ酸を栄養源として同化することがわかった。
- (4) コウジ酸の抗酸化作用を確認した。

## 5. 参考資料

- 1) 日本生物工学会編，生物学実験書（培風館）
- 2) 浅原正三他編，溶剤ハンドブック（講談社）
- 3) 化学大事典（共立出版）
- 4) 日本微生物学協会編，微生物学辞典（技報堂出版）