

麹菌による発酵に着目した「神麴」の品質評価法の確立

申請代表者 奥津 果優

鹿児島大学農学部

特任助教

所内共同研究者 小松 かつ子

資源開発研究部門生薬資源科学分野

教授

■背景・目的

神麴は、古来消化不良や食欲不振などの胃腸器疾患に利用されてきた漢方用薬であり、『公定規格に記載されていない生薬の規格及び試験方法』¹⁾において、「麴に赤小豆、杏仁、青蒿、蒼茸、野蓼を混合したものを圧縮して成型し、数日間発酵させた後乾燥したものである」と記載されている。この麹菌による発酵過程が神麴の最大の特徴であるといえ、麹菌の生成する酵素や代謝物が有用性に寄与していると考えられる。

神麴は半夏白朮天麻湯や加味平胃散に配合されることからその需要が高まりつつあり、現在日本薬局方への収載が検討されている。しかしながら、有用成分や発酵に寄与する微生物が不明である上、市場品によって外観や品質が全く異なっていることから、品質管理のための標準化が難航している。そこで本研究では、神麴の成分的もしくは微生物学的な特徴を明らかにすることにより、神麴を品質管理するための指標を見出すことを目的とした。

■結果・考察

日本の生薬企業 3 社より、神麴市場品を 13 サンプル蒐集し (表 1)、以下の分析に用いた。

1. 神麴に含まれる成分の分析

【消化酵素】

市販される多くの胃腸薬には、有効成分の一つとして消化酵素が配合されている。そこで神麴についても、消化酵素活性を調べることにした。サンプルより酵素抽出を行い、 α -amylase 測定キット (Kikkoman), Lipase activity assay kit (Cayman) により活性を測定した。

その結果、全ての市場品に酵素活性が見られ (表 1)、アミラーゼについては A 社より入手した韓国産神麴 (サンプル H~J) が高い傾向であった。リパーゼについては、韓国産神麴 (サンプル H~M) の活性が共通して高く、中国産 (サンプル A~G) の 30 倍以上になることが分かった。

【フェルラ酸】

麴の原料である穀類中には、抗炎症作用が報告されている²⁾ フェルラ酸が含まれる。そこで、神麴市場品中のフェルラ酸の含量を HPLC により定量した。その結果、全てのサンプルにフェルラ酸が含まれることが確認されたが、含量は 25-554 nmol/g とばらつきが大きいことが分かった (表 1)。韓国産神麴は 25.8-91.4 nmol/g、中国産は 99.9-554.6 nmol/g と中国産神麴の含量が高い傾向であった。これまでの研究においても中国産神麴のフ

表 1. 実験に用いた神麴市場品とその分析結果

サンプル名	産地	入手年	入手先	Amylase (U/g)	Lipase (U/g)	Ferulic acid (nmol/g)	糸状菌	一般細菌	耐熱性菌
A		2016	B社	0.48	2.6	99.9	1.0×10^2	1.3×10^8	1.8×10^8
B		2015	A社	0.47	0.1	321.0	$<10^2$	1.2×10^8	2.0×10^8
C		2013	A社	0.38	11.4	87.8	$<10^2$	1.1×10^8	1.3×10^8
D	中国	2013	B社	1.59	1.9	554.6	$<10^2$	7.8×10^8	1.1×10^9
E		2012	A社	0.46	25.8	140.7	$<10^2$	1.0×10^8	1.7×10^8
F		2009	A社	0.47	5.5	109.8	$<10^2$	1.1×10^8	1.6×10^8
G		2008	A社	0.36	11.9	176.5	$<10^2$	1.0×10^8	1.1×10^8
H		2000	A社	2.25	1673.8	60.7	$<10^2$	2.5×10^3	4.0×10^3
I		1998	A社	1.61	696.7	42.3	$<10^2$	7.0×10^2	2.5×10^2
J	韓国	1993	A社	2.16	2656.5	91.4	$<10^2$	3.1×10^3	2.1×10^3
K		2013	C社	0.89	5805.5	75.4	-	-	-
L		2015	C社	0.53	4025.0	59.9	-	-	-
M		2017	C社	0.95	2639.7	25.8	-	-	-

様式 1-5

種目 (一般研究 I)

エルラ酸含量が高いことが報告されており³⁾, 中国と韓国では原料もしくは製造工程が異なることが示唆された。

【GC-MS 検出成分】

神麴の原料とされるセイコウ, ソウジ, タデは精油を含んでおり, 精油成分に含まれるセスキテルペン類は唾液や胃液の分泌を促進することで健胃作用を示すことが知られている⁴⁾. そこで, 神麴に含まれる精油成分を GC-MS を用いて調べた. その結果, 神麴市場品には 23 種類の共通成分があることが分かった (表 2). その中には linalool や terpinen-4-ol, dihydroactinolide などの植物由来の精油成分に加え, phenylethyl alcohol や γ -nonalactone などの発酵食品に特徴的な香気成分も含まれていた。

検出された全成分の主成分分析を行なったところ, 市場品が大きく 3 グループに分類された (図 1A). 中国産神麴は全て同じグループに分類され, 韓国産神麴は入手先によって 2 グループに分けられた. 各成分の主成分負荷量を調べたところ, 中国産には 4-vinylguaiaicol や pyradine 類が多い傾向があり, 韓国産の H, I, J には linalool や menthol など植物由来の精油成分, 韓国産の K, L, M には短鎖の脂肪酸や脂肪族アルデヒドが多く含まれる傾向があった (図 1B). 4-vinylguaiaicol や pyrazine 類は加熱により生成する成分であることが報告されており^{5,6)}, 中国産神麴は製造過程で加熱乾燥されていることが予想された。

表 2 神麴市場品に共通する成分

Group	Name
Acids	Dodecanoic acid
	Palmitic acid
	Octanoic Acid
Alcohols	Linalool
	Terpinen-4-ol
	Benzyl Alcohol
	Phenylethyl Alcohol
Aldehydes	2-(E)-Heptenal
	Benzaldehyde
	Hexanal
	Nonanal
	Decanal
Esters	Methyl salicylate
	2-Phenylethyl acetate
Ketones	Pulegone
	Piperitone
	2-Octanone
Lactones	γ -Nonalactone
	Geranylacetone
Others	Dihydroactinolide
	Paeonol
	Naphthalene
	Methyleugenol

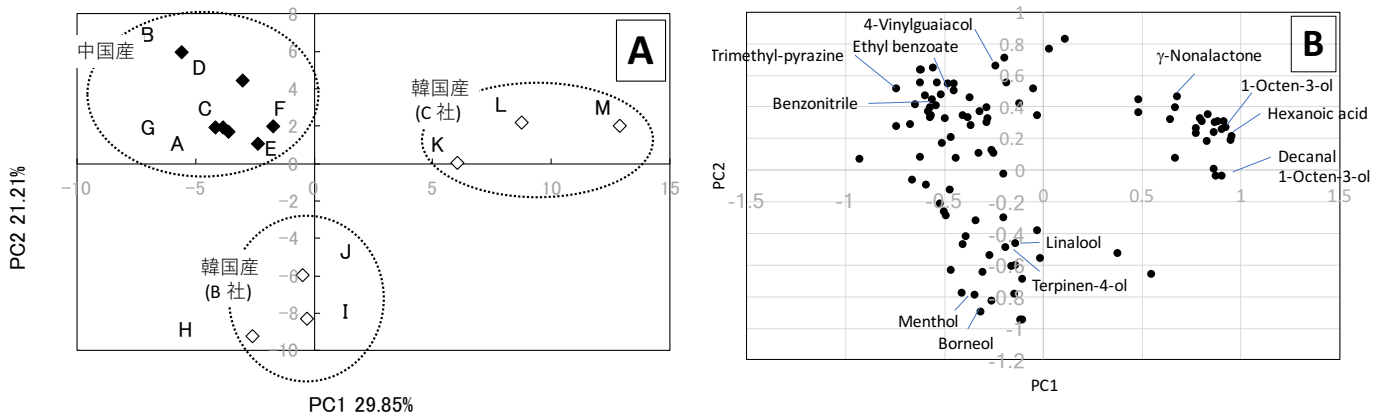


図 1 GC-MS で検出される成分の主成分分析結果 A: スコアプロット, B: ローディングプロット

2. 神麴に存在する微生物の分析

【生菌数の測定】

神麴を滅菌水に懸濁した液を適宜希釈後, 平板培地に塗抹, 培養した後, 出現したコロニー数を測定した (表 1). その結果, 麹菌を含む糸状菌様のコロニーはほとんど検出できず, 生菌として麹菌を検出することが困難であった. 一方, 中国産神麴には一般細菌, 特に耐熱性の細菌が 10^8 以上存在しており, 麹菌以外の細菌類が多く存在することが示唆された。

【菌叢解析】

生菌数の結果より, 麹菌以外の細菌が多量に存在することが示唆されたため, 次世代シーケンサーによるアンプリコンシーケンス解析により微生物の群集構造を調べた. 神麴から DNA 抽出を行い (ZR Fecal DNA MiniPrep), プライマーセット V3V4f-V3V4r を用いて細菌 16S rDNA V3/V4 領域を, また ITS1F_KYO1-ITS2_KYO2 を用いて真菌 ITS 1 領域を対象とした PCR 増幅を行った. 各試料について, 得られたアンプリコンを次世代シーケンス装置 MiSeq (Illumina) に供して 2x300 bp の条件でシーケンシングを行なった. 得られたリードは, クオリティフィルタリングを行なった後, Qiime を用いて細菌及び真菌の帰属分類群の推定を行なった. 結果を図 2 に示す. 細菌の群集構造において, 中国産神麴では *Bacillus* sp. が 50%以上を占めていた. *Bacillus* 属細菌は一般に耐熱性の芽胞を形成する. よって生菌として多く検出された耐熱性の細菌は *Bacillus* 属細菌と推察した。

様式 1-5
種目 (一般研究 I)

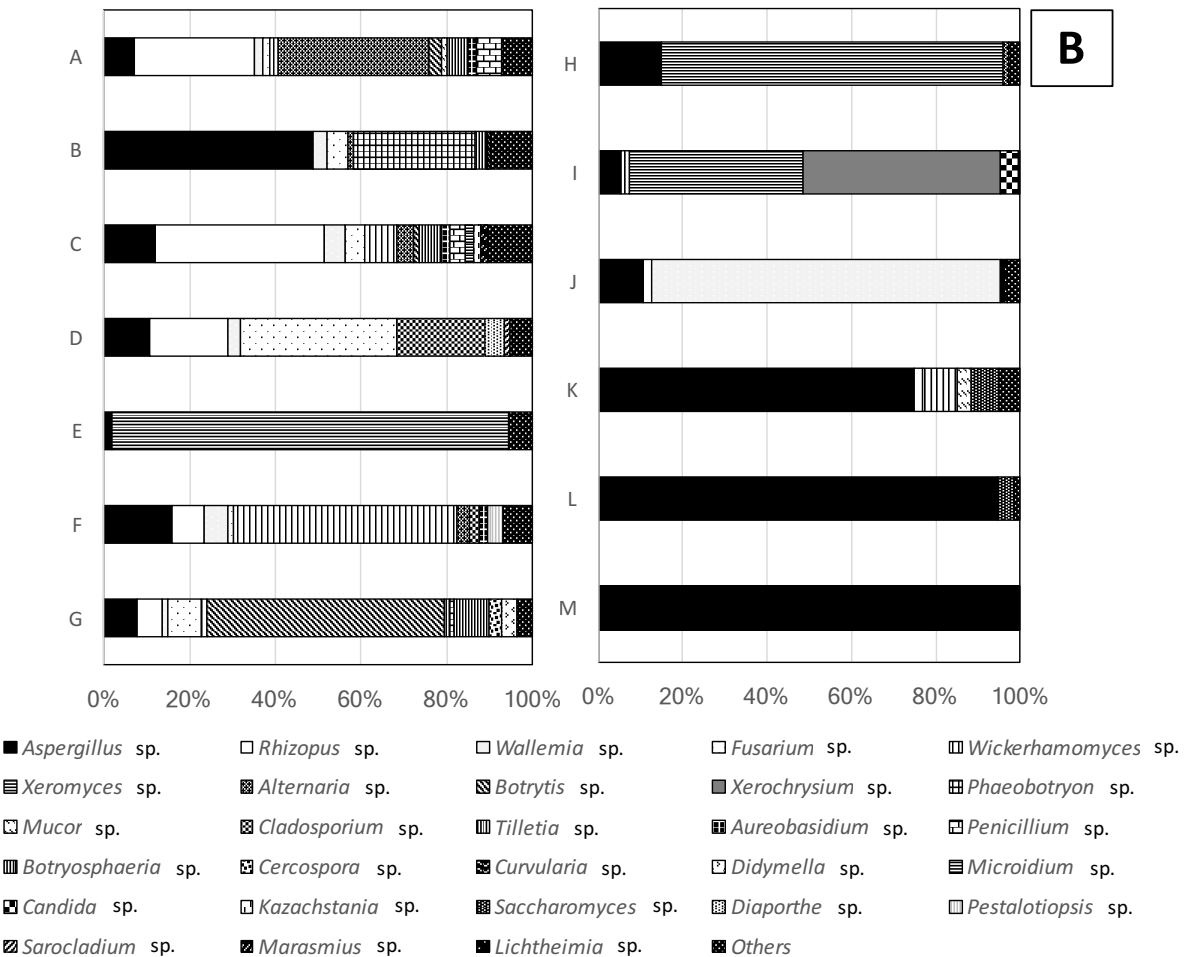
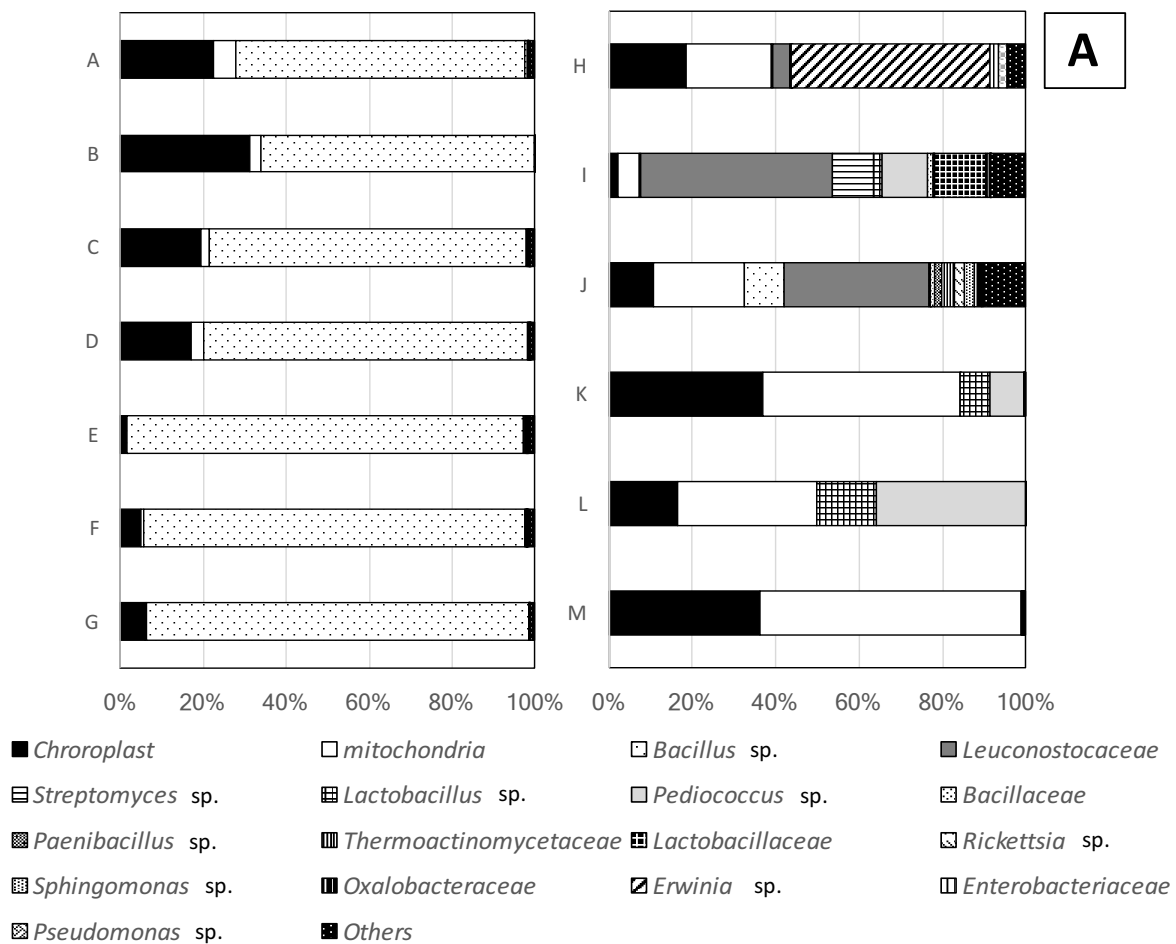


図2 神麴市場品の菌叢解析 A: 細菌 (16S rDNA V3/V4 領域), B: 真菌 (ITS1 領域)

一方、韓国産神麴では植物由来の葉緑体 DNA やミトコンドリア由来の DNA の占める割合が多くなっており、細菌の存在割合が低いことが予想された。また韓国産には、*Pediococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp. などの乳酸菌が検出された。

真菌の群集構造を調べた結果、全てのサンプルに共通して *Aspergillus* sp. 及び *Rhizopus* sp. といった麴菌が検出された (図 2B)。一方、*Mucor* sp. は一部のサンプルにしか検出されず、存在比も全体の数パーセントであった。E, H, I については *Xeromyces* sp. が、J については *Wallemia* sp. が大部分を占めていたが、これらの真菌は食品の汚染菌として知られており、耐乾性であることが報告されている。さらに、D にはカビ毒を生産する可能性がある *Fusarium* sp. が検出され、市場品の中には微生物汚染されているサンプルがあることが示唆された。産地別に比較すると、中国産神麴では多様な真菌が検出され、群集構造に多様性が見られた一方、韓国産神麴においては群集構造が単純で、*Rhizopus* sp. に比べ *Aspergillus* sp. の存在比が高いことが分かった。特に韓国産の K, L, M については *Aspergillus* sp. の存在比が全体の 80%以上を占めており、他の微生物がほとんど検出されなかった。K, L, M については前述の成分組成においても同一のグループを形成していたことから、このような微生物の違いが香気成分に影響していることが示唆された。

【麴菌の定量】

次世代シーケンスによって *Aspergillus* sp. 及び *Rhizopus* sp. といった麴菌が検出されたことから、これら麴菌の定量を試みた。表 3 に示したプライマー及び SYBR premix Ex Taq II (TliRNase H plus) を用いてリアルタイム PCR を行なった。リアルタイム PCR の結果、図 3 に示すように *Rhizopus* sp. のコピー数は $10^4 \sim 10^7$ となり、産地による傾向は見られなかったが、*Aspergillus* sp. のコピー数は $10^1 \sim 10^{12}$ とサンプルによって差が大きく、韓国産神麴のコピー数が多い傾向が見られた (図 3)。また上記の次世代シーケンスの結果から汚染菌の割合が高かった E, H, I, J についても絶対量としては麴菌が 10^4 以上存在することが分かった。

表 3 リアルタイム PCR に使用したプライマー

<i>Rhizopus</i> 検出用プライマー (28S ribosomal RNA)	
Zygo-F1	TTCAAAGAGTCAGGTTGTTTGG
Zygo-R1	CAGTCTGGCTCCAACGGTCC
<i>Aspergillus</i> 検出用プライマー (18S ribosomal RNA)	
Asp2	ACCCCCCTGAGCCAGTCCC
AspG	GCCAGCGAGTACATCACCTTGG

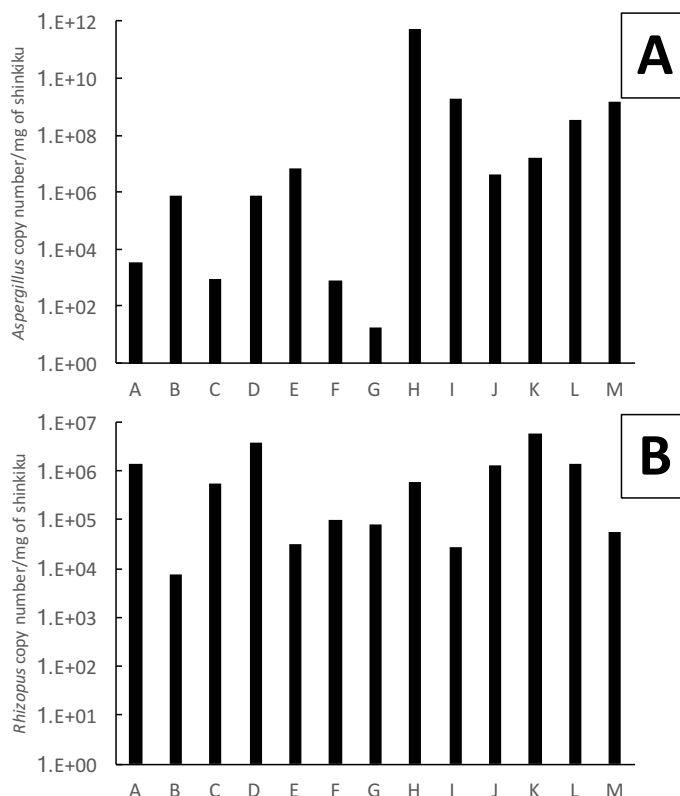


図 3 リアルタイム PCR による麴菌の定量

A: *Aspergillus* sp., B: *Rhizopus* sp.

■結論

市場品の神麴に共通する成分として、既に報告されている消化酵素 (アミラーゼ, リパーゼ), フェルラ酸の存在を確認し、新たに原料植物由来のテルペン類 (linalool, terpinen-4-ol) など 23 成分が見出された。酵素活性は消化促進作用に関与し、フェルラ酸には抗炎症作用、精油成分には健胃作用がそれぞれ期待でき、これらが神麴の消化薬としての有用性に寄与していると考えられた。さらに微生物としては、*Aspergillus* sp. や *Rhizopus* sp. といった麴菌が共通して存在することが明らかになった。

一方、共通性はあったものの、神麴は産地や入手先によって特徴が異なることも明らかになった。特に GC-MS で検出される成分の主成分分析において、同一のグループに分類された韓国産 C 社のサンプルは、他のサンプルと微生物叢が大きく異なり、*Aspergillus* 属糸状菌が優先的に増殖していることが分かった。よって微生物叢の違いが含有成分の種類や組成に影響していると考えられた。以上、神麴市場品の共通性と多様性が明らかになるとともに、神麴の品質を評価する上で微生物管理の重要性が示唆された。

【参考文献】

- 1) 日本漢方生薬製剤協会, 日本生薬連合会, 『公定規格に記載されていない生薬の規格及び試験法』, 2012.
- 2) Ou S., Kwok K. C., Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1261-1269, 2004.
- 3) 奥津果優, 門岡千尋, 小城章裕, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 高峯和則, 中国及び韓国の市場品「神麴」における菌叢と含有成分の実態調査, *生薬学雑誌*, 71 (1), 41-48, 2017.
- 4) 渡辺和夫, 柴田昌裕, 矢野真吾, 蔡陽, 渋谷博孝, 北川勲, 屋久島産ガジュツ抽出物及び単離成分の抗潰瘍作用, *薬学雑誌*, 106 (12), 1137-1142, 1986.
- 5) 小林章夫, 久保田紀久枝, 調理と加熱香気, *調理科学*, 22 (3), 156-163, 1989.
- 6) 金桶光起, 清酒中の4-ビニルグアイアコール生成要因, *日本醸造協会誌*, 109 (5), 320-326, 2014.