

米麴を添加した芋焼酎粕飲料の機能性に関する研究

著者	池田 浩二
ファイル(説明)	博士論文要旨 本文
学位授与番号	17701甲連研第748号
URL	http://hdl.handle.net/10232/15117

米麴を添加した芋焼酎粕飲料の機能性に関する研究

池 田 浩 二

2 0 1 2

略語

AA : α -Amylase

AC : Koji acidity

AG : α -Glucosidase

BG : β -Glucosidase

CAP : Activity of caffeic acid production

DPPH : 1,1Diphenyl-2-picrylhydrazyl

ELISA : Enzyme-linked immunoSorbent assay

GA : Glucoamylase

GABA : 4-Aminobutanoic acid

LDH : Lactate dehydrogenase

MTT : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NK cell : Natural killer cell

PBS : Phosphate buffered saline

RSD : Raw starch digestion

SDR : Sweetpotato *shochu*-distilled residue

TPA : 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate

目次

略語	1
目次	2
緒論	6
第1章 芋焼酎粕に米麴を添加する新飲料の製造方法の確立	9
第1節 序章	9
第2節 実験方法	10
第1項 試薬・試料の調製	10
第2項 酵素反応の条件	10
第3項 分離速度確認試験	12
第4項 固形分可溶化試験	12
第5項 HPLCによる糖分析	12
第6項 呈味性試験	13
第7項 実スケールにおける固液分離試験	13
第8項 飲料の成分分析	14
第3節 結果と考察	14
第1項 セルラーゼ系酵素の選択試験（一次スクリーニング）	14
第2項 セルラーゼ系酵素の選択試験（二次スクリーニング）	16
第3項 呈味性試験（三次スクリーニング）	20
第4項 実スケールにおける固液分離試験	21
第5項 芋焼酎粕飲料の成分	25
第4節 小括	29

第2章	新飲料の脂質代謝・血糖値に及ぼす効果	30
第1節	序章	30
第2節	実験方法	30
第1項	新飲料の製造方法	30
第2項	ポリフェノール含有量	31
第3項	DPPHラジカル消去活性	31
第4項	脂質代謝評価試験における実験動物と飼料の調製と飼育条件	32
第5項	飼育期間における測定項目	32
第6項	血清成分の測定方法	32
第7項	高血糖に対する評価試験	33
第3節	実験結果と考察	34
第1項	新飲料のポリフェノール含有量とラジカル消去活性	34
第2項	脂質代謝評価試験中の飼育時の摂食量及び各種重量	36
第3項	血清中性脂質濃度の変化	39
第4項	血清コレステロール濃度の変化	41
第5項	高血糖抑制効果	44
第4節	小括	46
第3章	新飲料の免疫亢進効果	47
第1節	序章	47
第2節	実験方法	48

第 1 項	新飲料の製造方法	4 8
第 2 項	マウスへのガン投与および飼育条件	4 8
第 3 項	腫瘍重量の測定と NK 細胞と YAC-1 細胞の調製	4 9
第 4 項	NK 活性の測定方法	5 0
第 3 節	実験結果と考察	5 2
第 1 項	飼料摂食量と増体量	5 2
第 2 項	脾臓重量の変動	5 2
第 3 項	サルコーマ脾臓組織重量の変化	5 2
第 4 項	担ガンマウス脾臓中の NK 活性の変化	5 6
第 4 節	小括	5 9
第 4 章	新飲料のガン培養細胞への影響	6 0
第 1 節	序章	6 0
第 2 節	実験方法	6 0
第 1 項	新飲料の製造方法	6 0
第 2 項	ヒアルロン酸の分解抑制による抗酸化活性	6 1
第 3 項	MTT アッセイ	6 2
第 4 項	細胞ガン化培養方法	6 3
第 3 節	結果と考察	6 5
第 1 項	抗酸化活性	6 5
第 2 項	ガン細胞増殖抑制作用	6 7
第 3 項	細胞ガン化抑制作用	7 0
第 4 節	小括	7 2

第 5 章	各種麴菌の米麴によるカフェ酸生成活性	7 3
第 1 節	序章	7 3
第 2 節	実験方法	7 5
第 1 項	試験菌株	7 5
第 2 項	培養培地および製麴条件	7 5
第 3 項	原料米とその前処理	7 6
第 4 項	製麴方法	7 6
第 5 項	分析方法	7 8
第 3 節	結果と考察	8 1
第 1 項	製麴の再現性試験	8 1
第 2 項	<i>Aspergillus</i> 属の標準菌株による米麴の CAP と酵素活性	8 3
第 3 項	市販種麴による米麴の CAP と酵素活性	8 6
第 4 項	酵素活性等の偏差で示したレーダーチャート	8 8
第 5 項	CAP と酵素活性等との相関行列	9 1
第 6 項	製麴期間中の CAP と酵素活性のモニタリング	9 3
第 4 節	小括	9 4
総括		9 5
謝辞		1 0 0
参考文献		1 0 1

緒論

サツマイモや米麴を原料にアルコール発酵を終えた芋焼酎もろみは蒸留工程によりエチルアルコールやその他の香気成分等の揮発性成分は芋焼酎として製造され，副産物として芋焼酎粕が得られる。常圧蒸留の場合，焼酎粕の量は芋焼酎の約 1.9 倍になる。芋焼酎粕には，原料のサツマイモ及び米に由来する繊維類，非発酵性糖類，タンパク質，脂肪，無機塩類その他の原料成分の一部と，麴菌，酵母などの菌体，有機酸，ビタミン類及びポリフェノール等発酵生産物の中，蒸留で除去されなかった成分が含まれている^{1,2)}。平成 14 年度から始まったとされる焼酎ブーム³⁾による焼酎製造数量の増加に伴い，熊本国税局しゅうちゅう調査書によると平成 18 酒造年度の焼酎粕排出量は 787,065kL と平成 14 酒造年度の 1.7 倍量まで急激に増加している。その処理方法と比率はメタン発酵 32.2%，加熱乾燥 15.5%，海洋投入 13.0%，焼却 10.2% となっており，陸上処理が約 87%になっている⁴⁾。焼酎粕の成分や機能性に注目した有効利用法として泡盛蒸留廃液や黒糖焼酎粕のもろみ酢について抗酸化作用などの報告^{5,6)}があり，また，米元ら⁷⁾は芋焼酎粕と乳成分を利用した乳酸菌飲料についてアレルギー抑制効果や腸内細菌叢の改善を報告している。また，森村ら^{8~10)}は各種焼酎粕から醸造酢を製造し抗腫瘍活性効果や ACE 阻害活性などを報告している。また，麦焼酎粕の肝障害抑制¹¹⁾や脂肪肝抑制¹²⁾，泡盛についても脂質代謝抑制作用の報告¹³⁾がある。一方，麴菌は日本国の国菌とされ，我が国の食生活に密着している。代表的な食品として日本酒や味噌，納豆，醬

油，食酢などがあり，抗酸化作用や抗アレルギー作用，血圧降下作用，脂質代謝改善効果などの機能性が数多く報告¹⁴⁾されている。

一方，厚生労働省が発表¹⁵⁾した我が国の平均寿命は男性 79.64 歳，女性 86.39 歳（平成 22 年）とそれぞれ世界で 4 位と 1 位である。また，65 歳以上の高齢者人口比は 23%を占めるほどになっている。そのため，現在の医療保険制度の維持が難しくなりつつある。日本人の 3 大死因は悪性新生物（ガン），心疾患，脳血管疾患であるとされ，厚生労働省によると平成 22 年度の日本人の死因の割合はそれぞれ 29.5%，15.8%，10.3%と発表¹⁶⁾している。このうち，脳血管疾患や心疾患はいずれも生活習慣病と密接に関係していることから，食事による予防が可能になることが考えられ，これまでの研究で「食品による予防効果」が明らかになりつつある。

先にも述べた通り，芋焼酎粕の中には原料や麹菌，酵母が生成したクエン酸などの有機酸や必須アミノ酸及びビタミン E，ポリフェノール，食物繊維，酵母菌体などの食品成分が多量に含まれている。これらの成分は現代社会の様々な生活習慣病の原因とされる中性脂肪やコレステロール，活性酸素の低下などの効果が期待される。有用な成分を含む芋焼酎粕は健康維持や増進機能を有する飲料として活用することで，付加価値の高い原料と成り得ることが考えられる。

しかし，芋焼酎粕は固形分が多く粘性も高いことが知られており¹⁾，そのままの状態では飲料にすることは難しい。また，固液分離も困難であるために，食品へ利用されていない。そこで，芋焼酎粕を飲料として利用するための固液分離性を向上させる技術の開発が必要である。

また、芋焼酎粕には異臭（発酵臭）があり、味も酸味はあるものの甘味はなく酸っぱいだけである。飲みやすく、かつ、大量に飲用できる香味改善が必要である。

そこで、このような芋焼酎粕を有効利用しやすくするために研究を開始した。すなわち、芋焼酎粕にクエン酸を生成する麹菌による米麹と繊維分解酵素を添加することにより固液分離性の向上や米麹に含まれるデンプンを糖化することによる天然の甘味と麹菌が生成したクエン酸の付与による香味改善を試みた。この研究の先行する成果として、芋焼酎粕に米麹を添加する工程によりポリフェノールが増えること、抗酸化作用が増すことやポリフェノールからカフェ酸が生成されることを見出し、既に報告している^{17, 18)}。

本研究論文では、産業廃棄物として排出されている芋焼酎粕から製造した飲料が健康増進飲料と成り得るのか研究した内容について、第1章では芋焼酎粕に米麹を添加する飲料の製造方法の確立について、第2章では芋焼酎粕に米麹を添加してできた飲料の脂質代謝・血糖値に及ぼす作用に関する研究について、第3章では新飲料のマウスの免疫亢進効果に及ぼす影響に関する研究について、第4章では新飲料のガン培養細胞への影響に関する研究について、第5章では芋焼酎粕に麹菌を作用させるとカフェ酸が生成されることを先に見出したことから、各種麹菌のクロロゲン酸からのカフェ酸生成活性について研究を行った。

以下に本論に得られたこれらの次第を論述する。

第 1 章 芋焼酎粕に米麴を添加する新飲料の製造方法の確立

第 1 節 序章

本格芋焼酎は米とサツマイモを原料に用い、それを発酵、蒸留して焼酎ができる。蒸留と同時に副産物の芋焼酎粕が排出され、その量は年間約 470,000 t（平成 18 年度）にのぼり、その約 17%が海洋投入処分されている⁴⁾。

芋焼酎粕の中には、麴菌や酵母が生成したクエン酸などの有機酸や必須アミノ酸及びビタミン E，ポリフェノール，食物繊維，酵母菌体などの健康増進能を持つ食品成分が多量に含まれている¹⁾。これらの成分は現代社会の様々な生活習慣病の原因とされる中性脂肪やコレステロール，活性酸素の低下や便秘などに効果が期待されている。このように有用な成分を含んでいる芋焼酎粕は健康維持や増進機能を有する飲料として活用することで、高い付加価値のある原料と成り得る。しかし、芋焼酎粕は固形分が多く粘性も高いため、そのままの状態では飲料にすることは難しい。また、固液分離も困難であるため食品への利用も遅れている。そこで、芋焼酎粕を飲料として利用するための固液分離性を向上させる技術開発が必要である。また、焼酎粕は発酵臭があり酸味が際立つためそのままでは飲料に適さない。そこで、発酵臭を抑え、飲みやすくすることを目的に、芋焼酎粕に米麴を加えて再発酵することでクエン酸濃度増加による酸味と、米麴デンプンを糖化させることによる天然の甘味を付与し、香味改善の検討を行った。このようにして得られた飲料には芋焼酎粕に由来する抗酸化性物質や米麴か

らのクエン酸などを含む飲料となることが期待される。

本章では芋焼酎粕の固液分離性，酵素反応液のろ過性，固形分の減量化に注目した各種セルラーゼ系酵素剤の選抜することならびに米麴添加により，芋焼酎粕から新飲料を製造する技術の開発を目的とした。

第2節 実験方法

第1項 試薬・試料の調製

麴歩合 20%，汲み水歩合 65%のもろみを常圧蒸留して得られた芋焼酎粕を各試験に用いた。酵素選抜試験に使用する芋焼酎粕は，予め標準ふるい（6.5mesh）で粗大固形分を除去した。

セルラーゼ系酵素は HBI，天野エンザイム，キッコーマン，協和エンザイム，新日本化学工業，大和化成，ナガセケムテックス，ノボザイムズ，ヤクルト薬品工業の 9 社より 34 種類を提供いただいた（Table 1 - 1）。

第2項 酵素反応の条件

芋焼酎粕 200 mL を 300 mL 容三角フラスコに分注後，各種酵素剤を芋焼酎粕の 0.1%（W/V）添加し，50℃，24 時間酵素反応させた。酵素反応は，インキュベーター（ASONE 製 ICV-750）内でロータリーシェーカー（TAITEC 製 RT-50）に反応液を入れた三角フラスコをセットし，回転速度 45 rpm で行った。

Table 1 - 1 List of cellulolytic enzymes obtained commercially

No.	Enzyme	Enzyme Type	Origin	Company
1	Cellulosin AC40	cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	
2	Cellulosin AL	cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	
3	Ccellulosin T2	cellulase	<i>Trichoderma viride</i>	
4	Cellulosin HC100	xylanase	<i>Aspergillus niger</i>	HBI Enzymes Inc.
5	Cellulosin HC	xylanase	<i>Aspergillus niger</i>	
6	Cellulosin TPL	xylanase	<i>Trichoderma viride</i>	
7	Cellulosin GM5	mannanase	<i>Aspergillus niger</i>	
8	Cellulosin PE60	pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	
9	Cellulase A 「Amano」 3	cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	
10	Cellulase T 「Amano」 4	cellulase	<i>Trichoderma viride</i>	
11	Pectolyase G 「Amano」	pectinase	<i>Aspergillus pulverulentus</i>	
12	Pectolyase	pectinase	<i>Aspergillus japonicus</i>	KIKKOMAN CORPORATION
13	Cellulase AC20	cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	
14	Multifect B	cellulase	<i>Trichoderma reesei</i>	Kyowa-Enzymes Co.,Ltd
15	Driselase KSM	cellulase	<i>Irpex lacteus</i>	
16	Sumizyme AC	cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	SHIN NIHON CHEMICAL CO., LTD.
17	Sumizyme C	cellulase	<i>Trichoderma sp.</i>	
18	Sumizyme AP-2	cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	
19	Sumizyme SPC	pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	
20	Sumizyme PMAC	pectinase	<i>Aspergillus sp.</i>	
21	Cellulase DAIWA	cellulase	<i>Trichoderma sp.</i>	Daiwa Fine Chemicals Co., Ltd.
22	Cellulase Nagase	cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	Nagase Chemtex Corporation
23	Cellulase XL-531	cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	
24	Cellulase XP-425	cellulase	<i>Trichoderma viride</i>	
25	Pectolyase Nagase	pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	
26	Pectolyase XP-534	pectinase	<i>Bacillus subtilis</i>	
27	Celluclast	cellulase	<i>Trichoderma reesei</i>	
28	VISCIZYME	cellulase	<i>Aspergillus aculeatus</i>	
29	CELLULASE"ONOZUKA"3S	cellulase	<i>Trichoderma viride</i>	
30	Cellulase Y-NC	cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	
31	Macerozyme A	Collapse enzyme of the plant tissue	<i>Rhizopus sp.</i>	YAKULT PHARMACEUTICAL INDUSTRY CO.,LTD
32	Pectolyase SS	pectinase	<i>Aspergillus niger</i>	
33	Pectolyase 3S	pectinase	<i>Aspergillus sp.</i>	
34	Pectolyase HL	pectinase	<i>Aspergillus sp.</i>	

第3項 分離速度確認試験

分離速度確認試験は永浜らの方法を参考にした²⁰⁾。すなわち，酵素反応後の焼酎粕を 100 mL 採取し，ろ紙 No.5A による 60 分間のろ液量を測定し，濁度は分光光度計（日立製作所製，U2000）で 660 nm の吸光度を測定した。

第4項 固形分可溶化試験

固形分の可溶化は酵素反応終了後，室温まで冷却した反応液 50 mL を遠心分離（4500 rpm，10 分間）して得られた上清量を測定した。また，上清の濁度は第3項の方法で測定した。反応液中の固形分含有量は，反応液 5 mL を採取し，ADVANTEC 製ガラス繊維ろ紙 GA-100(1 μm) でろ過し，110℃乾燥法で測定した。

第5項 HPLC による糖分析

第3項の分離速度確認試験で得られたろ液を純水で 20～50 倍希釈し，Waters 社製 Sep-Pak Plus C18 カラムを用いて疎水性化合物を除去し，メンブランフィルター 0.45 μm で前処理したサンプル 50 μL を HPLC に供した。

糖分析は島津製作所製高速液体クロマトグラフ LC-VP 還元糖分析システムを用いた。カラムは Shim-Pak ISA-07/S2504(250 mmL×4.0 mm I.D.) を使用し，移動相は A 液 [0.1M ほう酸カリウム緩衝液 (pH8)] と B 液 [0.4M ほう酸カリウム緩衝液 (pH9)] を用いて，A/B=100/0→0/100 へと切替える直線グラジエントで行った。移動相流量は 0.6 mL/min，

カラム温度は 65℃とした。また，検出条件は反応液として 1% L-アルギニンを含む 3%ホウ酸水溶液を使用し，反応液流量は 0.5 mL/min とした。検出器は分光蛍光検出器 RF-10A_{XL}を使用し，励起波長 320 nm，測定波長 430 nm で行った。

第 6 項 呈味性試験

芋焼酎粕 1500 mL に選抜した酵素 0.1% (W/V) 添加して糖化 (50℃, 15 時間) した液部の pH, 酸度, Brix の測定と官能検査を行った。pH は堀場製作所社製 F-12 を用いた。酸度は国税庁所定分析法注解の方法²¹⁾に従い, 焼酎粕液 10mL に B.T.B, N.R.混合指示薬を 2~3 滴加え 1/10N NaOH で淡緑色になるまで中和滴定した。

また，芋焼酎粕だけでは発酵臭や酸味が目立つため，香味改善を目的に米麴の添加量を変えて常法通りの酵素反応を行った。なお，米麴には黒麴を使用し，その添加量は 5, 10, 15, 20, 25, 30%の 6 区分で行った。

第 7 項 実スケールにおける固液分離試験

試験室スケールで選抜した酵素を用いて 50 L 規模の圧搾試験を行った。すなわち，芋焼酎粕 40 L に米麴 8 kg と酵素 0.1%添加し，55℃, 15 時間反応させた。反応中は攪拌機を用いて均一になるように攪拌した。反応終了液を酒袋に入れ，手動式圧搾機（東洋商会製：C 型 480L）にて一昼夜圧搾ろ過を行い，ろ液の分離量（搾汁率），懸濁物質濃度（SS），透明度，圧搾粕量を測定した。

透明度は第 3 項の濁度，懸濁物質濃度は第 4 項と同じ方法で行った。

第 8 項 飲料の成分分析

新飲料の分析を外部分析機関である（財）日本食品分析センターに依頼した。測定項目は，栄養成分（水分，カロリー，タンパク質，脂質，灰分，炭水化物，食物繊維）のほか，ミネラル，有機酸，アミノ酸， γ -アミノ酪酸（GABA）とした。

第 3 節 結果と考察

第 1 項 セルラーゼ系酵素の選択試験（一次スクリーニング）

芋焼酎粕に酵素剤 0.1%を添加した反応液 100 mL を用いて分離速度確認試験を行った。ろ過を開始して 60 分後のろ液量は酵素処理により芋焼酎粕そのものをろ過するより最大で 1.6 倍に増加した。ろ液の濁度は芋焼酎粕のろ液より低いものや 2~3 倍と高い値などが散見されたが，酵素剤の起源により差は見られなかった。酵素の起源別では *Tricoderma* 属起源の酵素剤が *Aspergillus* 属起源のものよりもろ液量が多くなる傾向がみられた。

これらの結果から，酵素剤 34 種類のうち最終ろ液の量が Blank である芋焼酎粕ろ液量よりも 1.4 倍（60 mL）以上であり，ろ液濁度が Blank とほぼ同じ値か低い値である酵素剤 13 種類を選抜した（Table 1 - 2）。

Table 1 - 2 Effect of various cellulolytic enzymes on filtration performance of SDR.

No.	Enzyme	Origin	Amount of filtrate per 60 min(mL)	Turbidity
0	Blank	—	44.0	0.49
1	Cellulosin AC40	<i>Aspergillus niger</i>	64.5	0.37
2	Cellulosin T2	<i>Trichoderma viride</i>	69.5	0.10
3	Cellulosin GM5	<i>Aspergillus niger</i>	67.0	0.23
4	Cellulase AC20	<i>Aspergillus niger</i>	60.5	0.58
5	Multifect B	<i>Trichoderma reesei</i>	66.0	0.41
6	Sumizyme AC	<i>Aspergillus niger</i>	61.5	0.55
7	Sumizyme C	<i>Trichoderma sp.</i>	63.0	0.22
8	Sumizyme PMAC	<i>Aspergillus sp.</i>	63.0	0.32
9	Cellulase DAIWA	<i>Trichoderma sp.</i>	65.0	0.18
10	Cellulase XP-425	<i>Trichoderma viride</i>	63.5	0.32
11	Celluclast	<i>Trichoderma reesei</i>	64.0	0.34
12	CELLULASE”ONOZUKA“3S	<i>Trichoderma viride</i>	61.0	0.58
13	Cellulase Y-NC	<i>Aspergillus niger</i>	63.5	0.46

第 2 項 セルラーゼ系酵素の選択試験（二次スクリーニング）

第 1 項で選抜した酵素剤を用いた酵素反応液を固形分可溶化試験に供し、二次スクリーニングを行った。

液部割合は *Tricoderma* 属起源の方が *Aspergillus* 属起源の酵素剤より多くなり、第 1 項と同様の傾向が見られた。液部の濁度は *Tricoderma* 属起源の酵素剤が高く、*Aspergillus* 属起源の酵素剤は Blank とほぼ変わらなかった。これは *Tricoderma* 属起源の酵素剤が遠心分離では沈降しない大きさに繊維が細かく分断されることが考えられる (Table 1 - 3)。

酵素処理後の固形分の減少度割合は、セルロシン T2 が最も大きく、次いで Multifect B、セルラーゼダイワ、セルラーゼ XP-425、セルクラストの 4 種類であった。これらはいずれも *Tricoderma* 属起源の酵素剤であった (Fig. 1 - 1)。

分離液を HPLC で糖分析したところ、酵素剤の種類により生成される糖の組成が異なっていた。*Tricoderma* 属起源の酵素剤はセロビオース、マルトース、キシロースが増える傾向にあり、*Aspergillus* 属起源の酵素剤は、ガラクトースが増える傾向が見られた (Table 1 - 4)。グルコースの生成量が最も多かったのはセルロシン T2、セロビオースが最も多いのは Multifect B であった。

以上の結果から、液分離量が多く固形分の減量化と糖分析試験で特徴的であると認められた酵素剤 2 種類（セルロシン T2、Multifect B）を選抜した。

Table 1 - 3 Effect of various cellulolytic enzymes on centrifugation performance of SDR.

Enzyme	Origin	Percentage of supernatant (%)	Turbidity
Blank	—	66	0.06
Cellulosin T2	<i>Trichoderma viride</i>	83	0.87
Multifect B	<i>Trichoderma reesei</i>	83	0.75
Sumizyme C	<i>Trichoderma sp.</i>	80	0.73
Cellulase DAIWA	<i>Trichoderma sp.</i>	82	0.77
Cellulase XP-425	<i>Trichoderma viride</i>	80	0.56
Celluclast	<i>Trichoderma reesei</i>	83	0.86
CELLULASE"ONOZUKA"3S	<i>Aspergillus niger</i>	75	0.56
Cellulosin AC40	<i>Trichoderma viride</i>	78	0.06
Cellulosin GM5	<i>Aspergillus niger</i>	80	0.06
Cellulase AC20	<i>Aspergillus niger</i>	76	0.10
Sumizyme AC	<i>Aspergillus niger</i>	76	0.15
Sumizyme PMAC	<i>Aspergillus sp.</i>	75	0.03
Cellulase Y-NC	<i>Aspergillus niger</i>	73	0.10

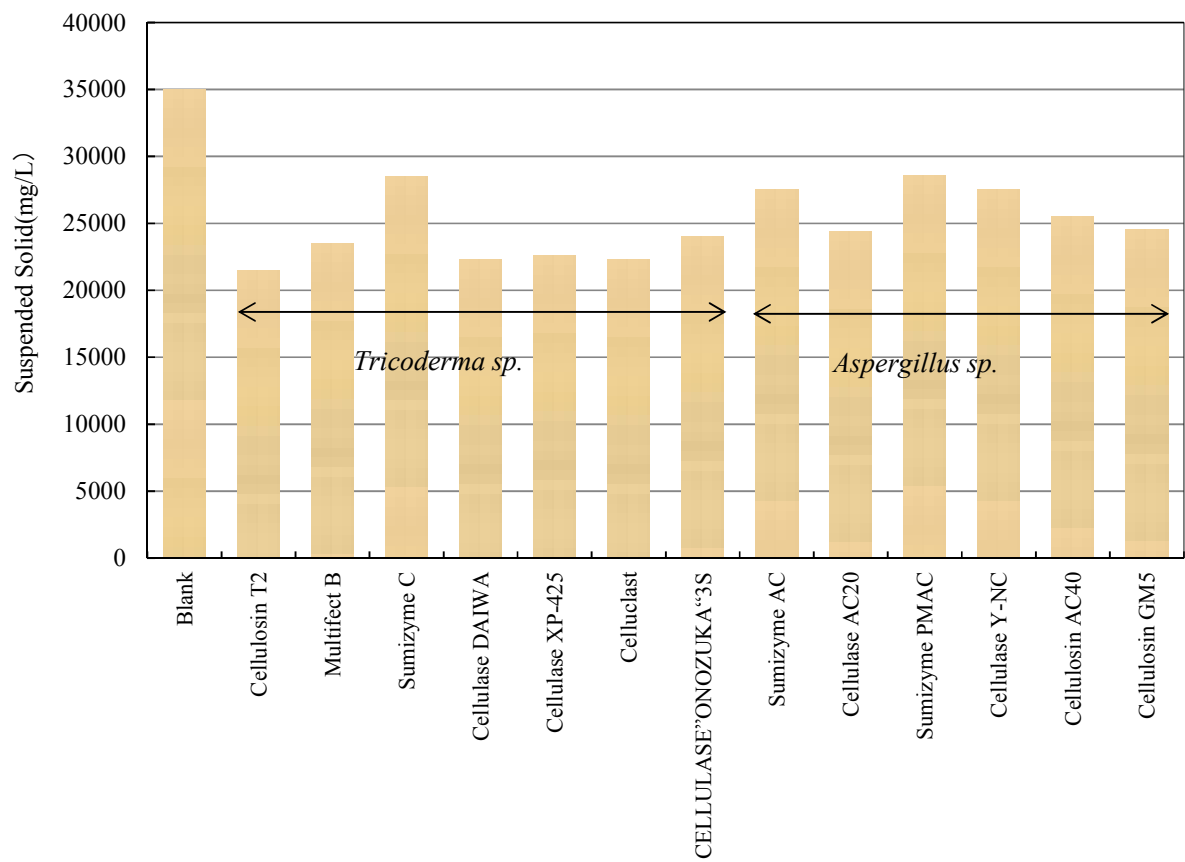


Figure 1 - 1 Suspended solid in the supernatants after treatment of SDR by various cellulolytic enzymes.

Table 1 - 4 Sugars in the supernatant from the enzyme-treated SDR.

Enzyme	Origin	Product				
		Cellobiose	Maltose	Galactose	Xylose	Glucose
Blank	—	0.0	0.0	0.7	0.0	0.4
Cellulosin T2	<i>Trichoderma viride</i>	0.1	0.2	0.9	0.1	5.8
Multifect B	<i>Trichoderma reesei</i>	2.2	0.2	0.8	0.1	2.9
Sumizyme C	<i>Trichoderma sp.</i>	0.3	0.4	0.9	0.1	4.9
Cellulase DAIWA	<i>Trichoderma sp.</i>	1.1	0.2	0.8	0.1	3.6
Cellulase XP-425	<i>Trichoderma viride</i>	0.4	0.4	0.9	0.0	4.5
Celluclast	<i>Trichoderma viride</i>	1.9	0.2	0.7	0.1	2.9
CELLULASE”ONOZUKA“3S	<i>Trichoderma reesei</i>	0.7	0.4	0.7	0.1	3.0
Sumizyme AC	<i>Aspergillus niger</i>	0.0	0.0	1.0	0.0	5.6
Cellulase AC20	<i>Aspergillus niger</i>	0.0	0.0	1.2	0.0	5.0
Sumizyme PMAC	<i>Aspergillus sp.</i>	0.1	0.0	1.6	0.0	4.4
Cellulase Y-NC	<i>Aspergillus niger</i>	0.0	0.0	0.9	0.1	5.6
Cellulosin AC40	<i>Aspergillus niger</i>	0.0	0.0	1.4	0.0	4.9
Cellulosin GM5	<i>Aspergillus niger</i>	0.0	0.0	1.6	0.0	5.3

第3項 呈味性試験（三次スクリーニング）

芋焼酎粕 1500 mL に第2項で選抜した酵素を 0.1% 添加し，第2項と同様の反応条件で得られた糖化液の分析と官能検査を行った。その結果，酸度，pH，Brix に大差は認められなかった。官能検査では Multifect B にややエグミが，セルロシン T2 にはスッキリ感が感じられた。飲みやすい飲料にするために清涼感が感じられたセルロシン T2 を使用することにした（Table 1 - 5）。

芋焼酎粕は原料中のデンプン質がアルコール発酵により殆ど残っていない。そのため，甘味がなく，クエン酸とアミノ酸に由来する酸味と旨味だけが目立つ飲料である。そこで，まず，黒麹菌で製麹した米麹の添加量を変えて水に添加し，糖化により酸味と甘味の付与の確認を行った。黒麹菌による米麹のクエン酸の影響から，添加量の増加とともに酸度は上昇し，酸味も強くなった。麹添加量が 25% 以上では甘味と酸味が強くなりすぎたことから，米麹は 20% 添加が適量と判断した（Table 1 - 6）。

Table 1 - 5 Some properties of the enzyme-treated SDR.

	Enzyme	
	Cellulosin T2	Multifect B
Acidity(10ml)	6.05	6.25
pH	3.2	3.2
Brix	3.2	3.2
Turbidity	0.107	0.081
Taste	Clear	Bitter

Table 1 - 6 Effect of the treatment modified by rice-*koji*.

	Amount of rice- <i>koji</i> (%)					
	5	10	15	20	25	30
Acidity	2.4	4.4	6.3	8.2	9.7	11.0
pH	3.38	3.36	3.33	3.29	3.29	3.28
Brix	2.8	6.0	9.0	12.0	14.0	16.6
Sensory test	Weak sour Thin taste	Weak sour	Weak sour	Good balance of sweetness and sour	A little strong sweet and sour	Strong sour

第 4 項 実スケールにおける固液分離試験

芋焼酎粕を酒袋に入れて圧搾機に並べた後に均一に重みが伝わるように重石をのせた。圧搾開始後、間もなく濁った液（荒走り）が出てきた。その後 30 分前後で透明な液が得られるようになり、加圧（0.5MPa）を開始し、芋焼酎粕自体の荒走りを含む圧搾液の回収率は 77.5%、圧搾固形分の水分含有量は 80.9%であった（Table 1 - 7）。

試験室スケールで選抜した酵素剤を用いて 50 L 規模の圧搾試験を行った。米麴無添加では回収率が 82.8%、圧搾液の懸濁物質 [suspended solid (SS)] は 2390 mg/L と非常に高く、とても圧搾できたとは言えない結果であった。次に、酵素反応後に米麴を添加して糖化反応させて圧搾を試みたところ、分離液の回収率は 72%、圧搾固形分の水分が 67%と芋焼酎粕そのものを圧搾するよりも回収率は低いが、分離液の SS が 627 mg/L と透明な液が得られた。米麴を添加することで、圧搾で

きなかった酵素反応液の圧搾性を向上させることが出来た。

そこで、酵素剤と米麴による酵素反応と麴の糖化を同時に行った。その結果、分離液の SS は酵素反応後に米麴を添加した方法とほぼ同程度の圧搾液が得られた。分離液の回収率は約 84% と高く、圧搾により分離した固形部分の水分は 73% まで低下し、各試験区の中で最も良い結果が得られた。

これらの結果は、米麴の添加によりセルラーゼ処理された芋焼酎粕の固液分離を容易にすることが出来ることを実証した。芋焼酎粕だけを固液分離する場合、芋焼酎粕中の繊維はろ過助剤の役目を果たすが、酵素剤を添加することで繊維が分断し、微細化して酒袋から漏れたと考えられた。この反応液に米麴を加えることで、米麴由来の固形部がろ過助剤の役目を果たし、圧搾が可能になったと推察している。

圧搾液のうち、米麴を 10%、20%、30% 添加した区分の遊離糖類を分析した (Table 1 - 8)。米麴添加により、グルコース濃度が最も増加し、次いでキシロースであった。アラビノース、ガラクトースもキシロースほどではないものの増加していた。

次に、芋焼酎粕に米麴とセルロシン T2 を加え反応させた溶液を糖分析した結果、最も多いグルコース量は酵素添加による差異は認められなかった。細胞壁に由来するセロビオースやアラビノースなどが増えている理由として、セルラーゼ系酵素の効果によるものと考えられた。

Table 1 - 7 Test plant of making the new beverage from SDR.

Treatment of SDR	sample	Liquid		Solid		
		SS (mg/l)	Turbidity	Recovery rate (%)	Moisture content (%)	
None	Arabasiri (liquid without compression)	1713	2.07	77.5	80.9	
	Compressed liquid	560	0.10			
Enzyme	Arabasiri (liquid without compression)	5170	2.72	82.8	87.0	
	Compressed liquid	2390	2.18			
Enzyme +rice-koji	Addition of rice- <i>koji</i> after enzyme treatment of SDR	Arabasiri (liquid without compression)	254	0.93	72.0	67.0
		Compressed liquid	627	1.13		
	Simultaneous addition of enzyme and rice- <i>koji</i>	Arabasiri (liquid without compression)	2000	2.18	83.8	73.1
		Compressed liquid	654	0.35		

※ SDR : Seetpotato *Shochu*-Distilled Residue

Table 1 - 8 Sugar composition in new beverage.

		(g/L)					
Enzyme	Added amount of <i>koji</i> (%)	Cellobiose	Maltose	Arabinose	Galactose	Xylose	Glucose
Without enzyme	10	0	0.0	0.4	0.3	2.4	61.4
	20	0	0.1	0.8	0.6	4.6	93.7
	30	0.1	0.2	1.0	0.9	6.9	123.2
Cellulosin T2	10	0.2	0.0	1.2	0.9	1.7	60.4
	20	0.2	0.2	1.3	1.2	4.9	96.8
	30	0.3	0.1	1.8	1.4	4.9	119.8

第5項 芋焼酎粕飲料の成分

芋焼酎粕に米麴を添加して得られた压榨液〔芋焼酎粕飲料（新飲料）〕の栄養成分は、100 mL当たりのカロリーが63 kcal、糖質が15.2 g、食物繊維は0.3 gであり、脂質は0.1 g以下であった（Table 1-9）。総有機酸量は1080 mgと豊富でその約85%はクエン酸であり920 mg含まれていた。その他はコハク酸、リンゴ酸、酢酸、乳酸、ピログルタミン酸であった。遊離アミノ酸は18種類が確認され、100mLあたりに総量として1111 mg含まれていた。このうち、必須アミノ酸は406 mgであった。ミネラルではカリウムが、ビタミン類ではパントテン酸、ナイアシン、ビオチン、ビタミンB₂、葉酸などが比較的多く含まれており、この他にもポリフェノールやGABAが含まれていた。

新飲料に含まれるクエン酸は、用いた麴菌に由来し、その量は920 mg/100 mLであり、この数値は、通常、芋焼酎製造時に産生する焼酎粕中の含有量488 mg/100 mL¹⁾に比べて約2倍の高い値を示した。新飲料の製造方法では、米麴を再度添加し再発酵させているため、他の有機酸を含めてクエン酸量が増強されたものと考えられる。クエン酸には疲労回復効果などが知られており²²⁾、この点で、今回開発した再発酵法を用いることで、新飲料のクエン酸含有量が高くなり、健康維持機能も高いと言える。

また、アミノ酸についても興味ある知見が得られた。新飲料100 mL当たり、必須アミノ酸の含有量は406 mgであった。運動時のエネルギー源となる分岐鎖アミノ酸（Val,Leu,Ile）²³⁾は180 mg含まれていた。通常の食生活では概ね必要なタンパク質は食事で摂取できるとされて

いるが、食欲低下など食事摂取量が少ない場合には摂取したタンパク質がエネルギーに利用され、タンパク質必要量は多くなる²⁴⁾。新飲料は約1%のアミノ酸を含むため、不足するアミノ酸を容易に補完することに役立つものと考えられる。

ミネラルの中で特異的に多かったカリウムは新飲料に185 mg/100 mL含まれていたが、サツマイモにカリウムは470 mg/100 g含まれている²⁵⁾ことから、原料のサツマイモに由来するものといえる。カリウムは体内のナトリウム排出作用などが知られている。なお、ナトリウムは4.8 mg/100 mLと殆ど含まれていなかった。

ビタミン類はパントテン酸が新飲料100 kcal当たり0.86 mg含まれており、健康増進法第31条第1項に基づく栄養表示基準制度の豊富に含む旨の表示が可能になる基準値(0.55 mg)を超える含有量であった。また、ナイアシン、ビオチンおよびビタミンB₂および葉酸に関しても、強化された旨の表示が可能な基準値以上含まれていた。厚生労働省所管の栄養機能食品の規格基準では、パントテン酸、ナイアシン、ビオチン、ビタミンB₂は皮膚や粘膜の健康維持を助ける栄養素、葉酸は赤血球の形成を助ける栄養素であるとされている。以上のことから、新飲料には各種ビタミン類が含まれ、健康維持機能に役立つものと考えられる。

血圧降下作用などが報告²⁷⁾されているGABAは13 mg/100 mL含まれていた。一日の目安摂取量は20 mg²⁷⁾とされているが、新飲料を一日に100 mL/日摂取することで一日必要量の半分を満たすと考えられる。

原料の芋焼酎粕と米麴のロットによる差異があると新飲料の品質に

影響することが考えられる。したがって、安定した品質の新飲料を得るための条件として、同一品種のサツマイモと精白度を一定にした原料米を用いて、製麴条件や製造工程を同一とし、酸度などの規格値を設けた焼酎麴やもろみ管理を実施することが考えられる。また、仕込配合（原料や水の配合割合）や蒸留条件も一定にする必要がある。これらを遵守することで蒸留粕、米麴ならびに新飲料の品質が安定することになる。

なお、製造に用いる焼酎麴の規格としてクエン酸量と酵素力価が考えられる。クエン酸量は新飲料中の含有量に直接影響することから出麴酸度の規格が必要になるが、酵素力価は麴酸度が十分であれば糖化系酵素量を特に管理する必要はない。

以上のことに留意して 6 回製造した新飲料はカリウム、クエン酸、アミノ酸などの栄養成分の含有量のバラツキが $\pm 10\%$ 以下であることを確認した(未発表)。

Table 1 - 9 Some chemical analysis of New beverage.

(Japan Food Research Laboratories Report : NO.403010059 - 004)

Nutritional value	Content/100ml	Organic acids	Content/100ml	Amino acids	Content/100ml
Moisture	89.1g	Citric acid	0.92g	Arg	82mg
Calorie	67kcal	Succinic acid	0.06g	Lys*	62mg
Protein	1.6g	Acetic acid	0.02g	His*	31mg
Lipid	< 0.1g	Lactic acid	0.02g	Phe*	47mg
Ash	0.4g	Pyroglutamic acid	0.02g	Tyr	50mg
Carbohydrate	15.2g	Malic acid	0.04g	Leu*	71mg
Dietary fiber	0.3g			Ile*	47mg
				Met*	19mg
				Val*	62mg
				Ala	70mg
Mineral	Content/100ml	Vitamins	Content/100ml		
Fe	0.27mg	B ₁	0.03mg	Gly	70mg
Na	4.8mg	B ₂	0.05mg	Pro	66mg
Ca	8.7mg	Inositol	22mg	Glu	161mg
K	185mg	Niacin	0.61mg	Ser	58mg
Mg	10.7mg	Pantothenic acid	0.58mg	Thy*	53mg
		Biotin	3.0μg	Asp	122mg
		Folic acid	10μg	Trp*	14mg
				Cys	26mg

* Essential amino acid

GABA 13mg(Japan Food Research Laboratories Report : NO.404020081 - 008)

第4節 小括

芋焼酎粕の有用成分に着目して、食品への利用を目的に固液分離性改善のためにセルラーゼ系酵素と米麴を添加した独自の方法により検討した結果、次のことが明らかになった。

(1) セルラーゼ系酵素剤 34 種類の中から、ろ過速度や固形分の減量化、官能検査、糖分析結果などを検討して実用試験に用いる酵素剤を選抜した。酵素剤の種類により、ろ過速度や最終ろ液量などに差異が見られた。ろ液を糖分析した結果からは、酵素剤により遊離してくる糖に違いのあることがわかった。

(2) 実用スケールで芋焼酎粕を圧搾したところ、酵素剤だけの添加では圧搾液の SS は非常に高いが、反応液に米麴を添加して圧搾することで清澄な液が得られるようになった。また、セルラーゼ系酵素剤と米麴を同時に添加すると、圧搾液の量が増えて圧搾粕の水分含有量も少なくなるなど圧搾性が向上した。

(3) 新飲料にはクエン酸、アミノ酸がそれぞれ約 1%、ミネラルではカリウムが多く、ビタミン類ではナイアシン、パントテン酸、ビオチン、ビタミン B₂、葉酸などが比較的多く含まれていた。ポリフェノールは約 0.1%、食物繊維は 0.3%、GABA も含まれており、様々な成分による相乗効果が期待される栄養豊富な飲料であることが考えられた。

第 2 章 新飲料の脂質代謝・血糖値に及ぼす効果

第 1 節 序章

芋焼酎粕に米麴とセルラーゼ系酵素剤を添加して、一定時間再発酵させた後、固液分離して得られた芋焼酎粕飲料（新飲料）には、前章でも述べた通り、原料に由来する食物繊維、ポリフェノール、ビタミン E、麴菌や酵母が生成したクエン酸などの有機酸やアミノ酸及び酵母菌体などの健康増進能を持つ食品成分が多量に含まれている。これらの成分は現代社会で問題となっている生活習慣病の 1 つである脂質異常症、すなわち、中性脂肪や総コレステロール値の低減や活性酸素の除去、便秘の改善作用などに様々な生理作用を示すことが知られている^{1, 2, 28, 29)}。

今回はその新飲料の脂質代謝改善効果、血糖値上昇抑制効果などの生理機能について検討した。

第 2 節 実験方法

第 1 項 新飲料の製造方法

試験に用いた飲料の製造方法は前章と同様の方法で行った。すなわち、河内菌白麴を散布して米麴を造った。それを芋焼酎粕の 20%相当量芋焼酎粕に加え、また、*Trichoderma viride* 由来のセルラーゼ [商品名セルロシン T2 (HBI 社製)] を芋焼酎粕の 0.1%量(w/v)添加し、その後、55℃で 15 時間再発酵させ、芋焼酎粕と米麴を可溶化した。なお、芋焼酎粕ならびに芋焼酎粕に添加した米麴は田苑酒造(株)で製造したも

のを使用した。

芋焼酎粕の可溶化液は清酒用酒袋に入れ、圧搾ろ過機（東洋商会製：C型480L）で圧搾ろ過により固液分離した。分離液はSFフィルターM×1型（0.3 μm，株山中技研製）で清澄ろ過し，加熱殺菌を行った。

第2項 ポリフェノール含有量

新飲料のポリフェノール含有量はフォーリン・チオカルト法により測定した。すなわち，サンプル 25μL に 10 倍希釈したフェノール試薬 125μL 添加し，3 分間攪拌した後に 10%炭酸ナトリウムを 125μL 加え，25℃，15 分静置後，マイクロプレートリーダーで 660nm の吸光度を測定し，飲料 100mL あたりのクロロゲン酸相当量として算出した。

第3項 DPPH ラジカル消去活性

ラジカル消去活性は安定ラジカルであるDPPHを用いて測定した³⁰⁾。96 ウェルマイクロプレートにサンプル75 μLを採取し，50%EtOHを含む0.1M MES溶液（pH6.0）150 μL，0.4mM DPPH溶液（50%EtOH含有）75 μLを添加してよく振盪し，室温で2分間保持後，520 nmでの吸光度を測定した。その活性はIC₅₀（DPPHの吸光度を50%に減少させるに必要な試料の量）でトロロックス換算により示した。

第4項 脂質代謝評価試験における実験動物と飼料の調製と飼育条件

Wistar ラット [雄 5 週齢, 1 群 6 匹 (計 2 群)] を日本 SLC(株)より購入し, 個別ケージで約 1 週間予備飼育した。その間の飼料は Table 2 - 1 に示す AIN93G に準じて調製し, これを水で練って成形後凍結乾燥した標準飼料をすべての群に与えた。

予備飼育後, 実験飼料による飼育を 30 日間行った。実験飼料は水 (コントロール区) あるいは新飲料 (試験区) 3.5 mL を上記標準飼料粉末 7 g に加え, 良く混練した後, 凍結保存した。これを日々解凍し, 1 個/日/匹を午前中に投与した。なお, 投与した実験飼料は直ちに完全に摂食することを確認した。標準飼料は自由摂取とし, 飲水も自由とした。

飼育条件は $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 時間明暗条件 (明, 7:00~19:00) 下で行った。

第5項 飼育期間における測定項目

飼育期間中は 1 週間~10 日毎に体重測定し飼料の摂食量は 3 日毎に測定した。飼育実験終了時に各ラットの体重を測定し, エーテル麻酔下で心臓採血し, 血清を得た。各臓器(肝臓, 脾臓, 盲腸, 腎臓, 腎周辺脂肪組織および副睾丸周辺脂肪組織)を得て, 重量を測定した。

第6項 血清成分の測定方法

血清は測定時まで凍結保存し, 総コレステロール, HDL コレステロ

ール，中性脂質（トリグリセライド）は，それぞれの試験項目用のカイノスキット（株カイノス，東京）を用いて測定した。

第7項 高血糖に対する評価試験

高血糖に対する影響を調べるため，ヒトインスリン非依存性Ⅱ型糖尿病モデルマウスである KK-A^y の5週齢，雄1群9匹（計2群18匹）を日本クレア（株）（愛知）から購入した。標準飼料5gに芋焼酎粕飲料10%添加し，飼育条件は脂質代謝に関する飼育試験と同様の方法で2ヶ月間行った。血糖値は1週間毎にマウスの尾静脈より採血し，簡易血糖測定器（ACCU-CHEK Compact：Roche社製）の酵素電極法で測定した。実験終了時にエーテル麻酔下で心臓採血し，全血を採り，糖化ヘモグロビン（Hb-A1c）濃度（%）を測定した。その定量は鹿児島市医師会臨床検査センターに委託した。

Table 2 - 1 Standard feed (AIN93G)

Ingredients	Composition
Corn starch	47%
Casein	25%
Cellose	7%
Sucrose	10%
Corn oil	6%
Vitamin mixture*	1%
Mineral mixture**	3.5%
Choline chloride	0.2%
DL-Methionine	0.3%
TOTAL	100%

* The vitamin contents were according to the AIN-93 formula and supplied from Nihon Nosan Co.,LTD

** The mineral contents were according to the AIN-93 formula and supplied from Nihon Nosan Co.,LTD

第3節 実験結果と考察

第1項 新飲料のポリフェノール含有量とラジカル消去活性

新飲料のポリフェノール含有量の結果を Table 2 - 2 に示した。米麴を添加する前の芋焼酎粕のポリフェノール含有量は 77 mg/100 mL であり、新飲料には 134 mg/100 mL と高い含有量で存在していた。これらは原料の米とサツマイモに由来するが、米麴添加によりポリフェノールが増えていた。一方、芋焼酎粕及び新飲料のラジカル消去活性 (IC₅₀) はそれぞれ 3.9, 4.3 であり、ポリフェノール含有量の増加ほどではないものの新飲料の方が高い値を示した (Fig. 2 - 1)。また、機能性が高いとされている市販醸造酢と比較しても遜色ないことが確認された。

Table 2 - 2 Polyphenol content of commercially vinegar, sweetpotato *shochu* distilled residue and new beverage.

Vinegar type	Polyphenol content
Sweetpotato distilled residue	77
New beverage	134
Rice vinegar	141
Unpolished rice vinegar	265
Barley vinegar	269

(mg/100mL-vinegar)

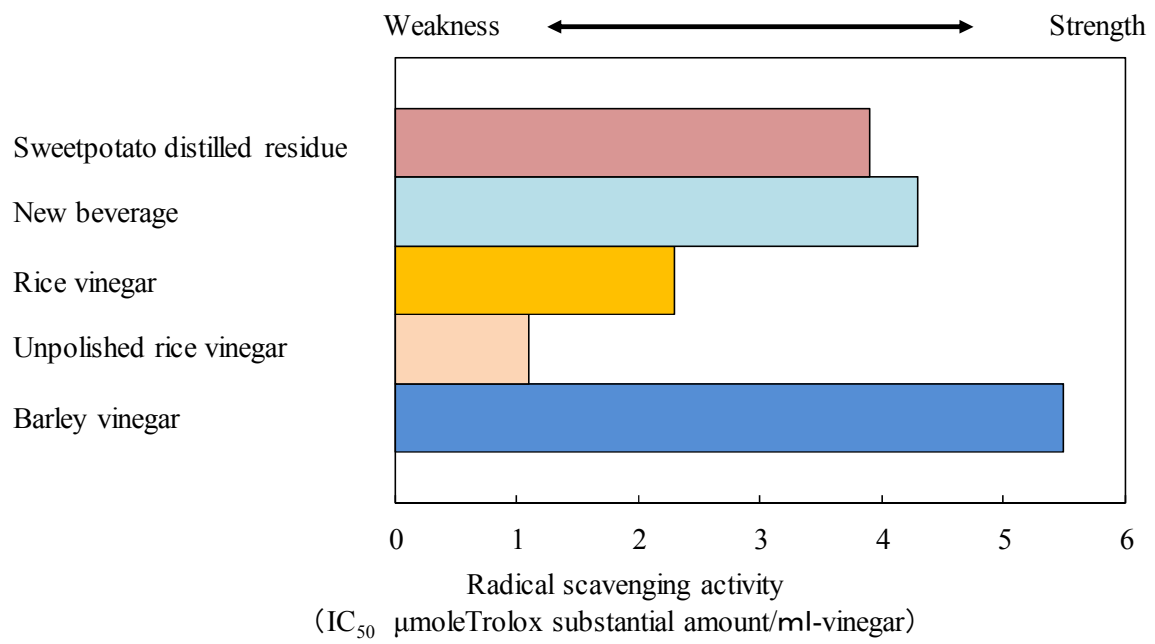


Figure 2 - 1 Radical scavenging activity of commercially vinegar, sweetpotato *shochu* distilled residue and new beverage.

第2項 脂質代謝評価試験中の飼育時の摂食量及び各種重量

飼育実験の期間中 3 日間隔で摂食量を計測したところ、新飲料区が全期間を通じて高い値を示した。従って、総摂食量も対照区で 738.5 g であったのに対し、新飲料区では 789.9 g と対照区と比べて 51.4 g（約 7%）多くなった。

飼料の投与法は新飲料の一定量を標準飼料に添加し混練した形で投与し、それ以外は標準飼料を自由摂取している。実験区で標準飼料を多く摂食しているのは、新飲料投与によってラットの体調が改善され、食欲増進したためと考えられる。

また、コントロール区および新飲料区の体重は双方とも順調に増加したが、実験の後半において新飲料区の体重は少し多めに推移する傾向が認められた（Fig. 2 - 2）。その理由として、上述したように、新飲料区では飼料の摂食量が増えたために、体重の増加傾向になったと考えられる。

飼育実験終了時のラットの各種臓器重量を Fig. 2 - 3 に示した。肝臓重量は新飲料区の方が少し重い傾向を示し、これは摂食量の増加により、肝臓脂肪含有量の増加のためと考えられる。副睾丸脂肪組織でも新飲料区が重い傾向があった。腎周辺脂肪組織では新飲料区が少し軽い傾向が見られたが、これらのデータから、新飲料区では脂肪組織重量の低下傾向は認められなかった。新飲料摂食により摂食量が増え、その結果、体重が増加し、脂肪組織重量も増えたことを示唆していると考えられた。

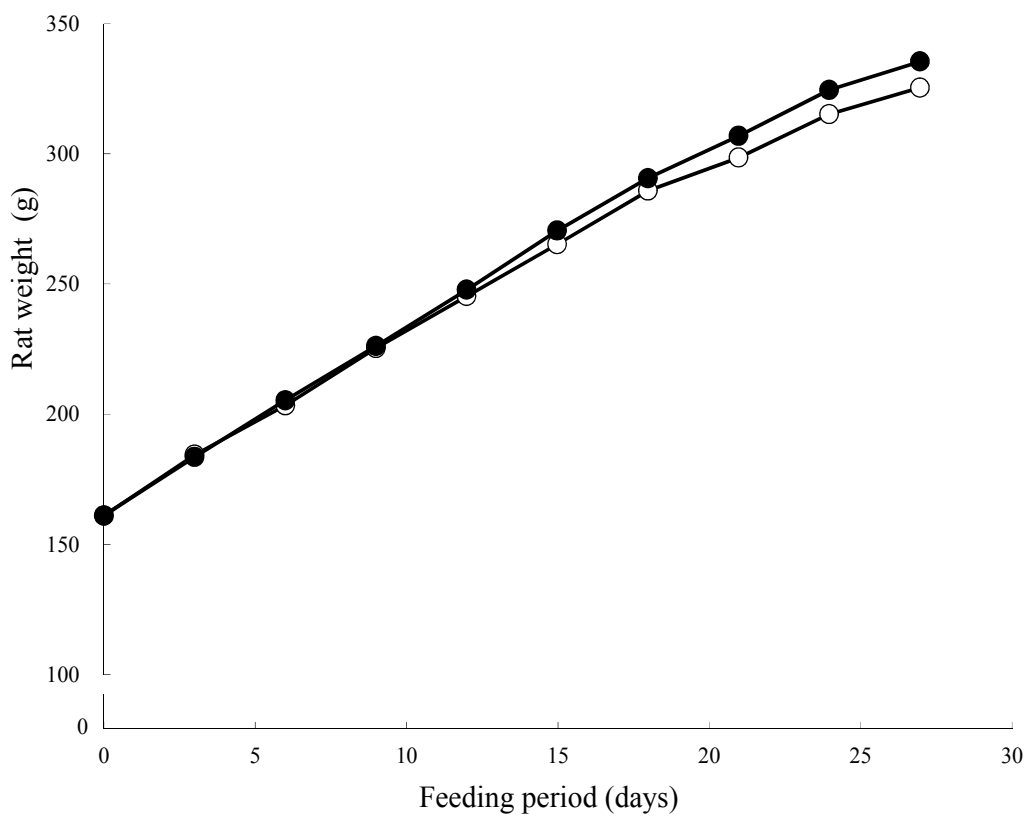


Figure 2 - 2 Body weight gain of rat during ingestion of new beverage.
Symbols: ○, Control feed: ●, New beverage

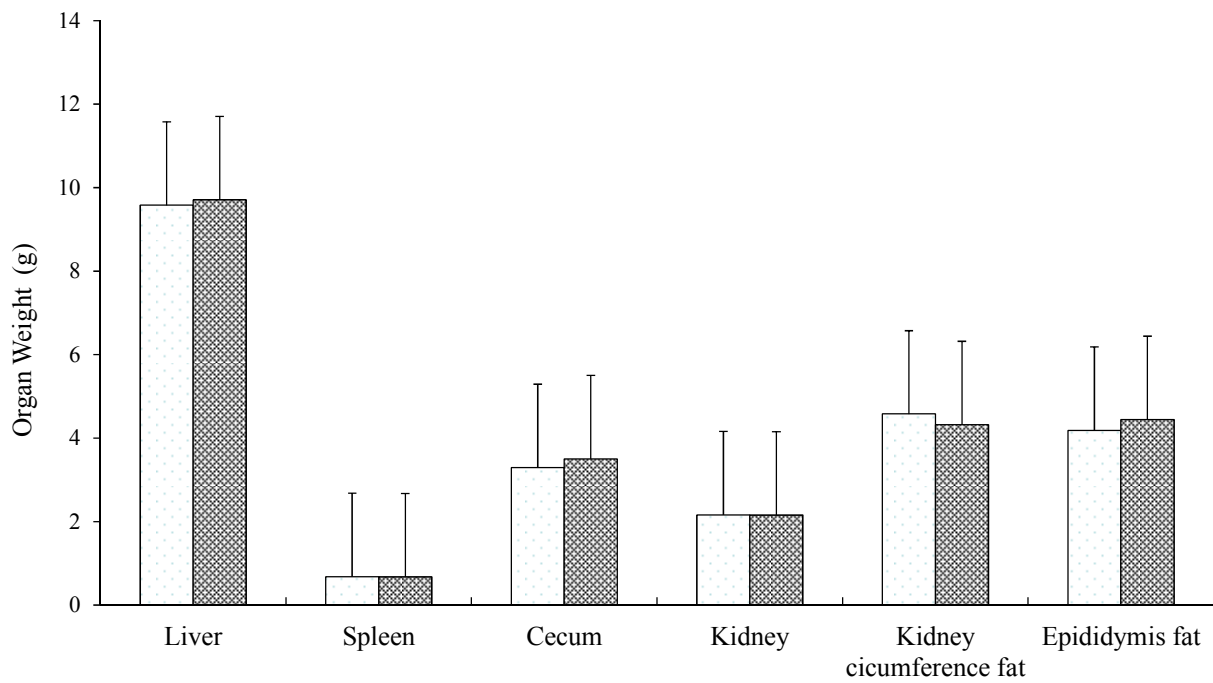


Figure 2 - 3 Various organs' weights of rats fed with new beverage.
 Symbols: ,Control: , New beverage

第3項 血清中性脂質濃度の変化

実験終了時の血清について、中性脂質を測定した結果を Fig. 2 - 4 に示した。血清中性脂質濃度はコントロール区で 59.7 mg/100 mL であったが、新飲料区で 34.0 mg/100 mL と約 57% に大幅に低下し、この差は 1% 水準で有意であり、強い中性脂質抑制効果が認められた。

血清中性脂質は肝臓で合成される中性脂質が脂肪組織に運ばれているものであり、これが低下すると当然脂肪組織量も減少するはずである。しかし、上述のとおり、腎周辺脂肪組織重量は新飲料区が少し軽い値を示すものの、副睾丸脂肪組織重量は新飲料投与区で増加傾向があり、血清中性脂質濃度と矛盾する。この理由として考えられるのが、新飲料投与区で飼料摂取量の増加があったため、これが体重増加、即ち、脂肪重量の増加となったと考えられる。

即ち、新飲料には本来ダイエット効果があるが、体調改善効果が強く現れたため、摂食過多であっても顕著な体重増がないことから、ダイエット効果があると考えられる。この推測を実証するには、今後、ペアフィーディング法を用いて摂食量を同一にして試験を行う必要があらう。

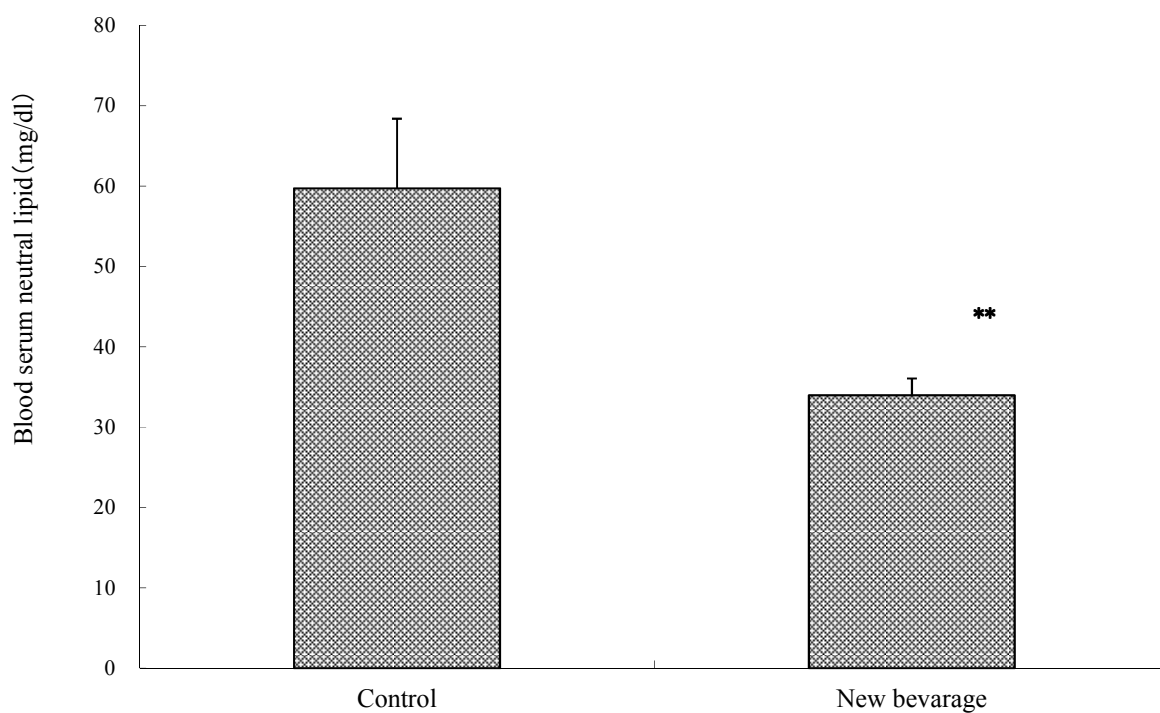


Figure 2 - 4 Neutral lipid content in serum of rats fed with new beverage (n=6).

** Significantly different by new beverage ingestion. ($p < 0.01$)

第4項 血清コレステロール濃度の変化

Fig. 2 - 5 に示すように，総コレステロール含有量はコントロール区で 115.2 mg/100 mL であったが，新飲料区で 77.8 mg/100 mL と約 67.6% に大幅に低下し，有意差 1% と強い総コレステロール抑制効果が認められた。また，総コレステロールの組成を検討すると，LDL コレステロールはコントロール区の 50.8 mg/100 mL と比べ，新飲料区では 17.0 mg/100 mL と約 33.4% に低下し，有意差 1% を示した。一方，HDL コレステロールはコントロール区が 59.0 mg/100 mL であったが，新飲料区では 60.9 mg/100 mL とほとんど変わらない値を示した (Fig. 2 - 6)。

以上のように，新飲料摂取により血中の総コレステロール含有量は大幅に抑制され，さらに健康にとって悪玉といわれる LDL コレステロール濃度のみが大幅に低下し，善玉である HDL コレステロール濃度は変化しないことが明らかとなり，新飲料の健康維持効果が強く認められた。

コレステロール低下作用が認められた例として，酒粕^{31,32)}や食物繊維³³⁾，ウーロン茶³⁴⁾などのポリフェノールなどの報告がある。新飲料は芋焼酎粕の固形分が除かれているため，食物繊維は可溶性であり，その含有量は 0.3 g/100 mL と低かった (Table 1 - 9)。したがって，新飲料の脂質代謝改善効果は食物繊維だけに起因するとは考えにくい。ビタミン類，アミノ酸など各種成分の相互作用によることが考えられる。

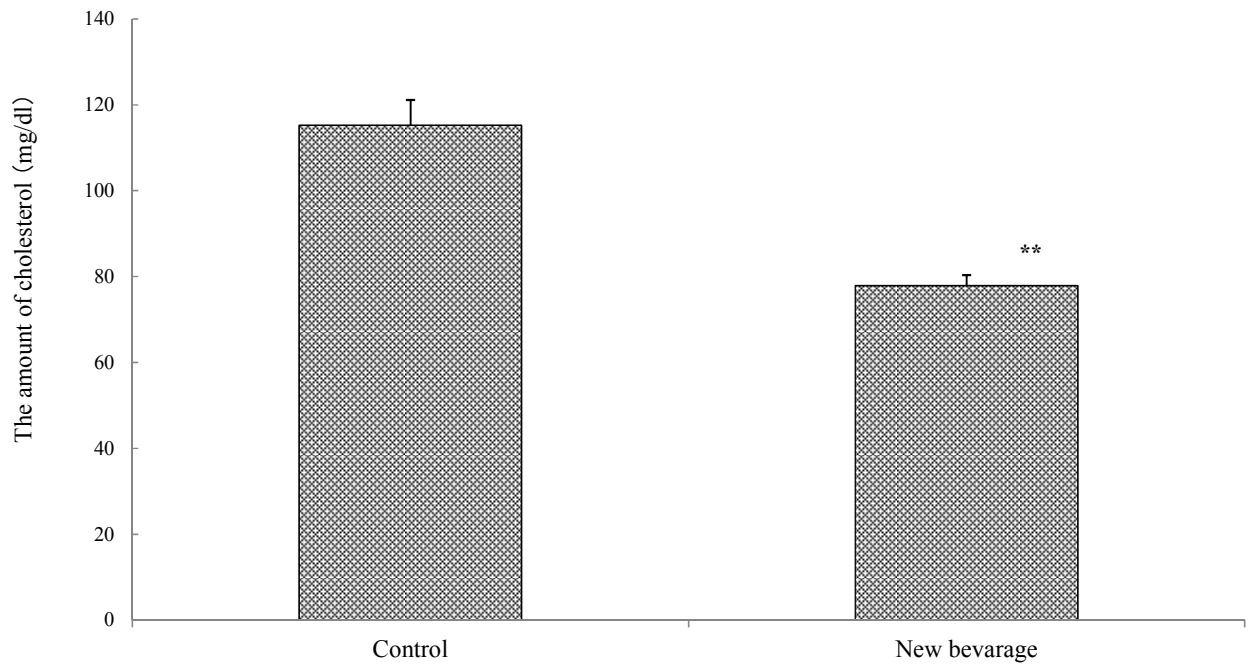


Figure 2 - 5 Total cholesterol content in serum of rats fed with new beverage (n=6).

** Significantly different by new beverage ingestion. ($p < 0.01$)

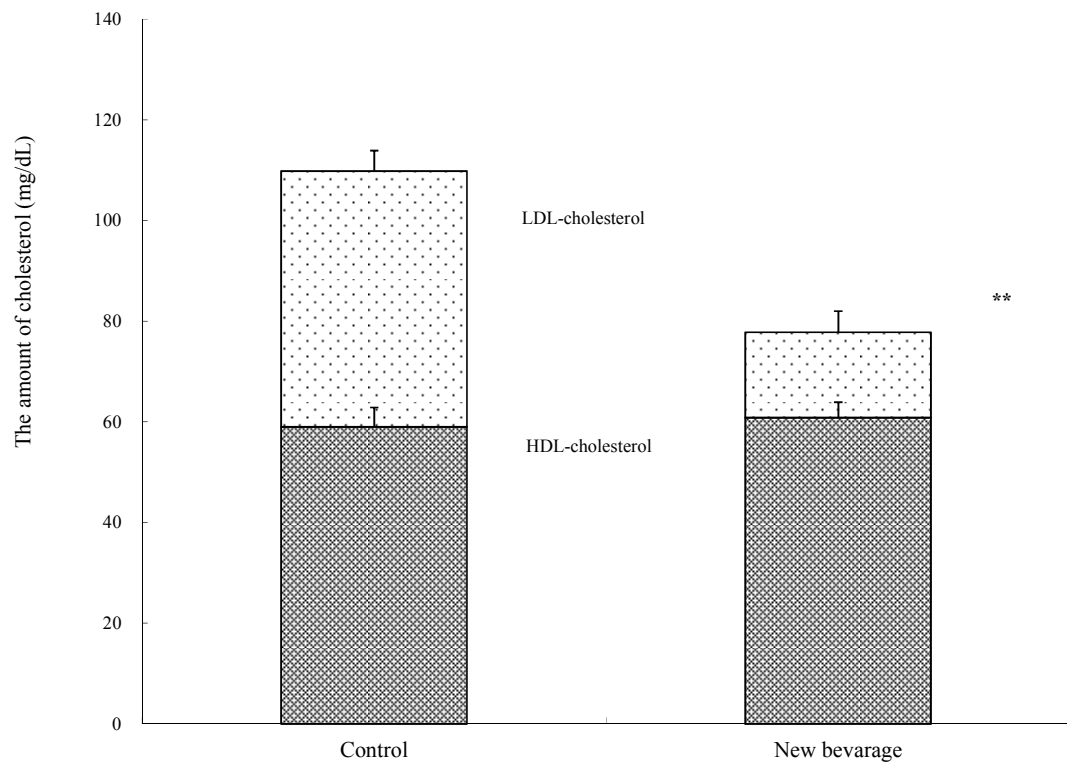


Figure 2 - 6 HDL- and LDL-cholesterol contents in serum of rats fed with new beverage (n=6).

** Significantly different by new beverage ingestion. ($p < 0.01$)

第 5 項 高血糖抑制効果

高血糖抑制効果について、Fig. 2 - 7 に結果を示した。飼育に伴ってコントロール区、新飲料区ともに血中グルコース濃度がほぼ同様に上昇したが、これは KK-A^y マウス固有の性質であり、一般的に認められるものである。飼育実験開始 4 週目以降、コントロール区は血糖値が 500 mg/100 mL 以上の値を維持したのに対し、新飲料投与区ではそれよりも 100 mg/100 mL ほど低い血糖値で推移し、7 週目では有意差を示した ($p < 0.05$)。実験終了時の血中の HbA1c 濃度はコントロール区が 7.5% であるのに対し、新飲料区で 7.2% と低い値を示した。新飲料区で長期間に亘って血糖値が低めに推移したことを示している。

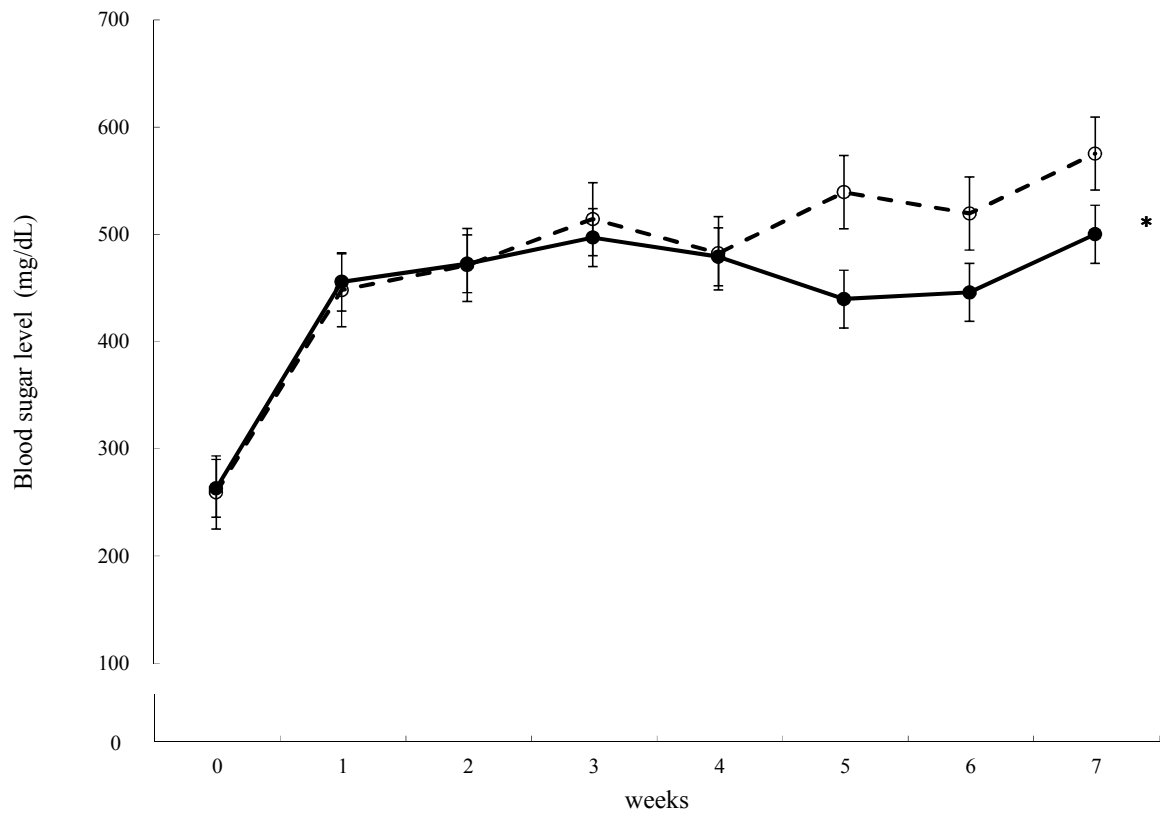


Figure 2 - 7 Blood sugar level in serum of KK-A^y mice fed with new beverage.

Symbols: (----), Control: (——), New beverage

*Significantly different by new beverage ingestion. ($p < 0.05$)

第4節 小括

芋焼酎粕の有用成分に着目し，米麴を添加した独自の香味改善と機能性の増強を目的とした製造方法で得られた芋焼酎粕飲料（新飲料）の生理作用について検討した。その結果，次のことが明らかになった。

（1）動物試験において，新飲料はその嗜好性から飼料摂食量が増えたが，体重増に有意差が見られず新飲料摂食により代謝が高まることが考えられた。なお，臓器重量には有意差はみられなかった。

（2）新飲料摂食試験の結果，強い血清中性脂質抑制効果，総コレステロール抑制効果，特に悪玉である LDL コレステロールを大幅に有意に減少させ，善玉である HDL コレステロールは減少させない結果が得られ，さらに，血糖値を抑制する効果が明らかになった。

以上のように，芋焼酎粕を原料とした新飲料の脂質代謝改善作用，高血糖抑制効果などの生理作用や食品機能を明らかにできたことから，生活習慣病やメタボリックシンドロームなどの予防や改善効果をもたらす優れた飲料であると考えられる。

第3章 新飲料の免疫亢進効果

第1節 序章

芋焼酎粕には、焼酎製造に関与する微生物（麹菌，酵母など）により生成されたクエン酸，タンパク質，アミノ酸や原料に由来するサツマイモポリフェノール，繊維分，ミネラルなど不揮発の栄養素を含み¹⁾、様々な機能性^{28, 29, 35)}が報告されている。麦焼酎粕の機能性に関しては、大森ら^{11, 36)}は繊維分に脂肪肝抑制効果，肝機能改善効果について、望月ら¹²⁾は上清画分に肝障害抑制物質の存在を報告している。また、廣瀬ら³⁷⁾は麦，米，芋焼酎粕の水溶性画分が種々の培養ガン細胞に対する *in vitro* での細胞増殖抑制効果と正常ラットに対して毒性がなく安全であることを報告している。

前章において、芋焼酎粕を原料とし、焼酎用麹菌で製麹した米麹を芋焼酎粕に添加して得られた芋焼酎粕飲料（以下、「新飲料」）の抗酸化能や脂質代謝改善効果，血糖値上昇抑制作用に関する報告を行った。

食品の免疫調節作用に関する報告はいくつかなされており，茶ポリフェノール³⁸⁾や，フコイダン³⁹⁾，シソエキス⁴⁰⁾などの抗アレルギー効果やNK活性亢進作用などがある。

また，発酵物中に抗腫瘍能があることは既に奥田⁴¹⁾の酒粕や上野⁴²⁾らの黒酢に関する報告があるが，それに用いるのは黄麹菌であり，芋焼酎製造に用いられているクエン酸生成能のある黒麹菌または白麹菌ではない。本章では，クエン酸生成能を持つ麹菌を用いた新飲料の免疫亢進効果について検討した。

第2節 実験方法

第1項 新飲料の製造方法

麴歩合 20%，汲み水歩合 65%のもろみを常圧蒸留して得られた芋焼酎粕に，河内菌白麴菌を用いて製麴した米麴とセルラーゼ〔セルロシン T2（HBI 社製）〕を芋焼酎粕のそれぞれ 20%(w/v)相当量および 1/1000(w/v)相当量添加し，55℃で 15 時間糖化して，圧搾ろ過した液部を使用した。

第2項 マウスへのガン投与および飼育条件

マウスの腹水ガン細胞（サルコーマ 180）は東北大学医学部附属細胞研究所より入手し，リン酸緩衝液生理食塩水(PBS)で洗浄後，マウス（Balb/c，雄，5 週齢，日本 SLC 株，静岡県）の腹腔に注入し，約 2 週間増殖させた。なお，動物実験は鹿児島大学動物実験指針に従って行った。

増殖したサルコーマ 180 を腹水ごと抜き取って集め，低張緩衝液中で赤血球を除去し，サルコーマ 180 の細胞数を計測した。マウス（Balb/c，雄，5 週齢，n=5）を室温 23℃±2℃，12 時間毎に明暗サイクル（明,7:00～19:00）の飼育環境で 1 週間予備飼育した後に，上記のように得たサルコーマ 180（ 5×10^6 個/0.5 mL 生理食塩水/マウス）を腰部に皮下投与した。当日より凍結乾燥した新飲料を標準飼料（Table 3 - 1）に 5%含むように調製した実験飼料で約 20 日間飼育した。飼料と水は自由摂取させた。

第3項 腫瘍重量の測定とNK細胞とYAC-1細胞の調製

飼育終了時、頸椎脱臼させたマウスより、皮下投与したサルコーマ180によって形成された腫瘍組織と脾臓を採取し、重量を測定した。脾臓をハンクス液で洗浄し、RPMI1640培地（ニッスイ製薬）を加えてナイロンメッシュを2重に通して組織片を除き、脾臓浮遊細胞を得た。その後、遠心分離（ $150\times g$ 、5分間）して脾臓浮遊細胞を集め、 $0.144M$ NH_4Cl 、 $0.0017M$ Tris-HCl buffer（pH7.2）2 mL中で赤血球を溶血除去し、 1500 rpm 、2分間遠心分離して、白血球を得た。この白血球をRPMI1640培地（10 mL）に加えて洗浄し、細胞数を測定した。

得られた白血球をRPMI1640培地で 5×10^6 個/mLとし、6 cm ディッシュに4 mLずつ分注し、 $37^\circ C$ 、5%炭酸ガスで3時間培養により接着性のマクロファージを除去した。得られた浮遊細胞を、NK細胞を含む非接着性脾浮遊細胞（NK細胞）とした。以後の操作では、NK細胞をエフェクター細胞として使用した。

なお、NK細胞の調製にはRPMI1640培地を使用した。すなわち、L-グルタミン 0.3 mg/mL 、ペニシリン 100 U/mL 、ストレプトマイシン $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ を加え、10% $NaHCO_3$ でpH7.4に調製した。

また、NK細胞のターゲットとなるYAC-1細胞（リンパ腫細胞）は東北大学医学部附属細胞研究所より入手し、10%子牛血清添加RPMI1640培地で培養した。YAC-1細胞をRPMI1640培地で培養し、細胞数を 1×10^5 /mLに調製し培養3日後の細胞をNK細胞のターゲット細胞として以下の試験に使用した。

第4項 NK活性の測定方法

NK活性の測定はターゲットである YAC-1 細胞に対する細胞毒性によって、障害を受けた細胞の放出する Lactate Dehydrogenase (LDH) をマーカーとする細胞障害性アッセイシステム (CytoTo x 96® , Promega 社) により、Promega 社のテキスト⁴³⁾に従って行った。なお、以上の操作は全て無菌的に行った。すなわち、96 穴プレート (岩城硝子) にエフェクター細胞 (E) として NK 細胞 100 μ L を分注し、これに、5% 子牛血清を含む RPMI1640 培地に浮遊させたターゲット細胞 (T) である YAC-1 (リンパ腫細胞) 1×10^5 /mL を 100 μ L ずつ分注し、5% 炭酸ガスインキュベーター (37°C) で 4 時間培養した。この際にあらかじめマイクロプレート用の遠心機で遠心分離 (250 \times g, 4 分間) し、細胞を互いに密着させ、細胞障害反応を生じさせやすくした。4 時間の反応後、再び遠心分離 (250 \times g, 4 分間) し、細胞を沈殿させ、各上清 50 μ L を別の 96 穴プレートに取り、基質混合液を 50 μ L ずつ添加し、遮光して室温で静置した (E:T ratio= 10:1)。30 分後、反応停止液 50 μ L を加え、直ちに 96 マイクロプレートリーダー (アマシャムバイオサイエンス株) で 492 nm の吸光度を測定し、LDH 放出量を算出した。なお、LDH は子牛血清中にも含まれるので、それによるコンタミを抑えるために添加する子牛血清濃度を低濃度とした。

NK 活性はターゲット細胞に対するエフェクター細胞の障害作用として測定した。すなわち、ターゲット細胞から放出される最大の LDH 活性を 100% とし、エフェクター細胞添加により得られた LDH 活性を最大 LDH 活性に対する割合で表した。なお、それぞれの LDH 活性は培地

の LDH 活性（バックグラウンド）を差引いて算出した。

$$\text{NK 活性 (\%)} = \frac{\text{実験 LDH 放出量} - \text{E} - \text{T}}{\text{最大放出量} - \text{T}} \times 100$$

E：エフェクター細胞から自然放出される LDH 量

T：ターゲット細胞から自然放出される LDH 量

最大放出量：ターゲット細胞中に存在する全 LDH 量

Table 3 - 1 Standard feed(AIN93G)

Ingredients	Composition
Corn starch	47%
Casein	25%
Cellose	7%
Sucrose	10%
Corn oil	6%
Vitamin mixture*	1%
Mineral mixture**	3.5%
Choline chloride	0.2%
DL-Methionine	0.3%
TOTAL	100%

* The vitamin contents were according to the AIN-93 formura and supplied from Nihon Nosan Co.,LTD

** The mineral contents were according to the AIN-93 formura and supplied from Nihon Nosan Co.,LTD

第3節 実験結果と考察

第1項 飼料摂食量と増体量

飼育実験の期間中 7 日間隔で摂食量を計測したところ、新飲料区が全期間を通じて高い値を示し、総摂食量はコントロール区が $41.8 \text{ g} \pm 0.5 \text{ g}$ （平均値 \pm 標準誤差）、新飲料区が $44.3 \text{ g} \pm 2.4 \text{ g}$ と新飲料区がコントロール区に比べて平均値で 2.5 g （約 6%）多く摂取した。第2章のラットを用いた脂質代謝改善効果試験において、新飲料区がコントロール区に比べて約 7%多く摂取していた。新飲料投与によってマウスの体調が改善され、食欲増進したために実験区で標準飼料を多く摂食したと考えられる。

また、増体量は新飲料区が $1.7 \text{ g} \pm 0.6 \text{ g}$ とコントロール区 ($1.3 \text{ g} \pm 0.7 \text{ g}$) に比べて多かった。飼料摂食量の多かった影響が考えられたが、有意差は認められなかった (Table 3 - 2)。

第2項 脾臓重量の変動

飼育実験終了時のマウスの脾臓重量を Fig. 3 - 1 に示す。脾臓重量は新飲料区 0.097 g に対し、コントロール区は 0.10 g と差がなく、新飲料投与による脾臓の重量変化には影響ないことを確認した。

第3項 サルコーマ脾臓組織重量の変化

マウス腰部皮下にマウスのガン細胞サルコーマ 180 を接種し、同時に実験飼料を投与して 20 日間飼育した。その後、と殺して腫瘍組織重量の差を増殖抑制効果で検討した。その結果、形成された腫瘍重量の

平均値はコントロール区で 0.18 g であった。新飲料区では 0.11 g と腫瘍重量は約 30%小さく、この両者間では 5%水準で有意な差が認められた。即ち、新飲料の投与により腫瘍の重量増加を抑制しており、新飲料には移植ガン細胞増殖抑制効果が認められた (Fig. 3 - 2)。

Table 3 - 2 Food intake and body weight gain of mice fed with new beverage.

	Food intake (g/14day)	Body weight gain (g/14day)
Control	41.8±0.5	1.3±0.7
New beverage	44.3±2.4	1.7±0.6

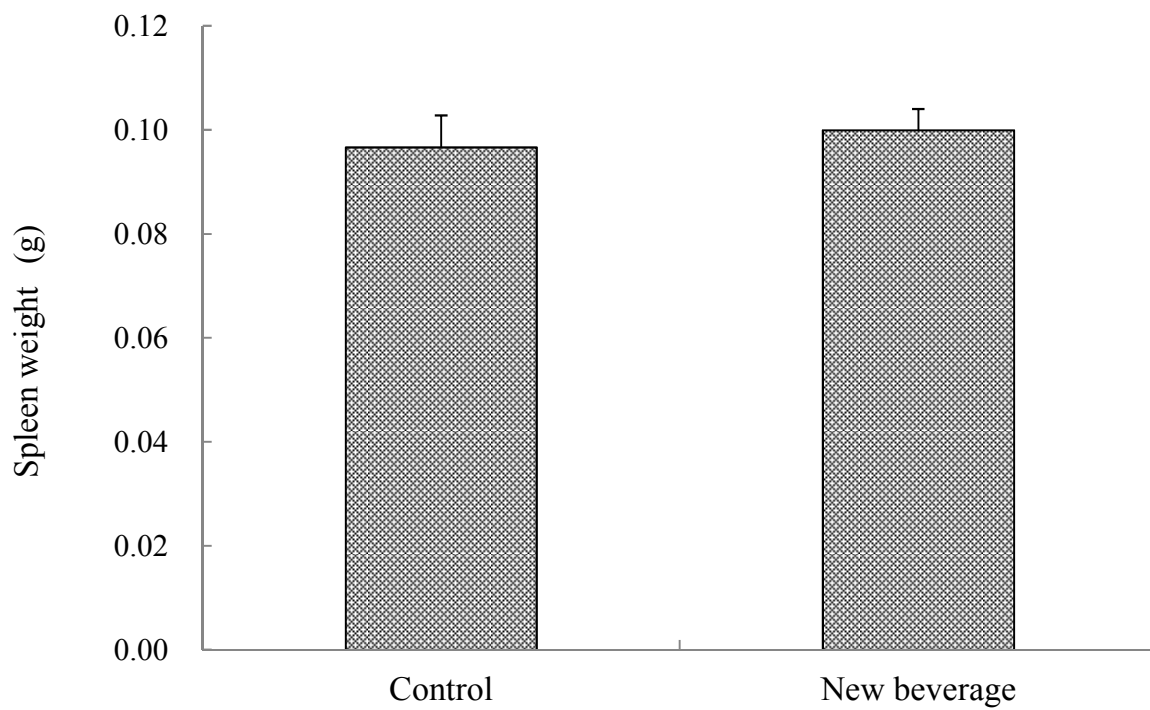


Figure 3 - 1 Changes in spleen weight of mice by ingestion of new beverage.

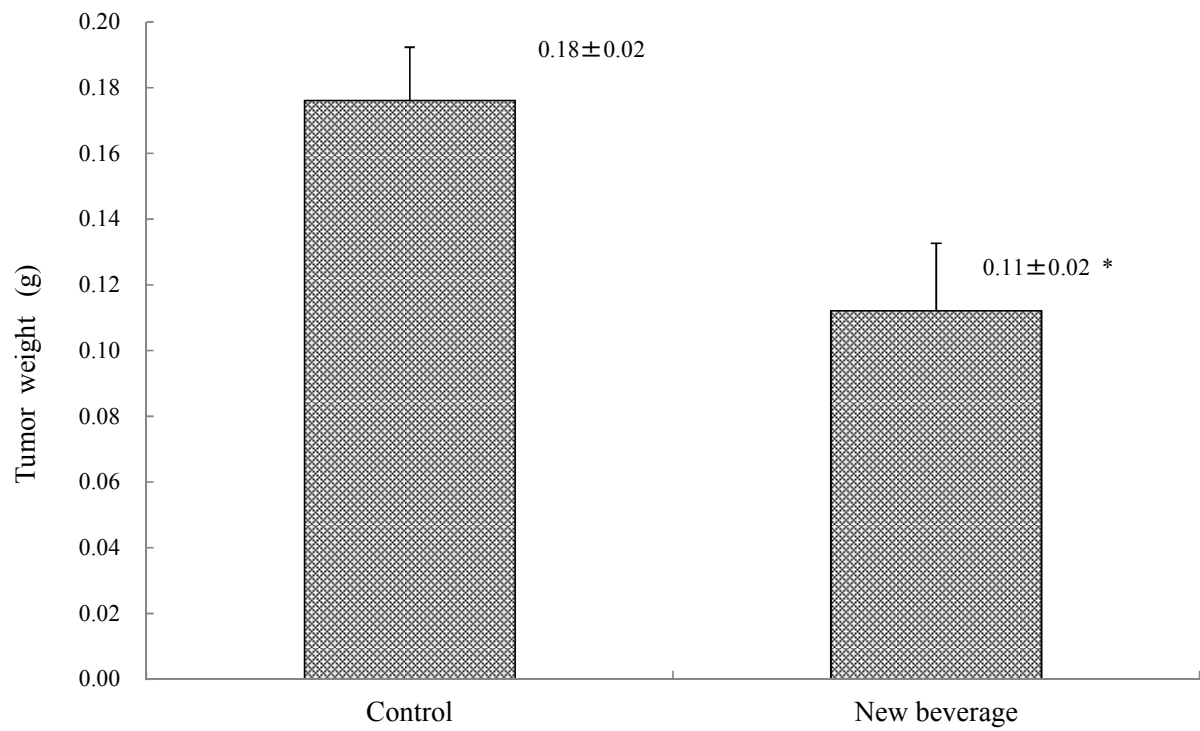


Figure 3 - 2 The anti-tumor action of the ascites tumor cells of mice by ingestion of new beverage.

*Significant differences by ingestion of new beverage. ($p < 0.05$)

第4項 担ガンマウス脾臓中のNK活性の変化

サルコーマ 180 を接種し，20 日間実験飼料で飼育してマウスの脾臓より得た NK 細胞活性の測定を行った。その結果，Fig. 3 - 3 に示すように，マウスの NK 細胞活性はコントロール区 5.9% に対し，新飲料区は 9.8% と約 2 倍であり，この両者間では 0.1% 水準で有意な差が認められ，非常に強い NK 細胞活性を示した。

以上より，新飲料投与区においてサルコーマ 180 の増殖抑制が明らかであり，また，生体の側でもガン化細胞の増殖を抑制する NK 活性の活性亢進が認められた。すなわち，新飲料は NK 活性を高めて生体防御能を高く維持し，その結果，移植腫瘍の増殖を抑制したと考えられ，生体防御能の亢進と腫瘍組織の増殖抑制との関連が認められた。

上野ら⁴²⁾は酢酸除去した黒酢をマウスに投与した試験により，腫瘍の増大が有意に抑制され，脾臓より調製した NK 細胞の活性が有意に増加したことを報告している。その中でゲルろ過により得られた黒酢の高分子画分を構成する糖類（マンノース，グルコース，ウロン酸，ガラクトース，アラビノース，ラムノース，キシロース）の影響を示唆している。NK 細胞の活性を高める成分として，海藻類由来多糖類^{44, 45)}や乳酸菌由来リン酸化多糖類⁴⁶⁾，オリゴグルコサミン⁴⁷⁾，キチン誘導体⁴⁸⁾，マイタケ抽出多糖類⁴⁹⁾，ニゲロオリゴ糖⁵⁰⁾，カシス由来多糖類⁵¹⁾などの報告があり，腫瘍細胞の増殖抑制や腫瘍消失などが確認されているが，これらはいずれも多糖類によるものである。田代ら⁵²⁾は芋焼酎粕による *in vivo* による抗腫瘍活性試験により，Test 群のマウスは Control 群に比べて腫瘍形成が抑制されたことを報告している。その

際に、芋焼酎粕を 4 画分に分画し、芋焼酎粕原液給餌区と比較したところ、腫瘍重量の最も小さかった画分が最も高い NK 細胞の活性亢進能が見られたと報告している。また、NK 細胞の活性亢進は認められなかったもののポリフェノール含有量、抗酸化能が高かった 2 つの画分においても腫瘍形成が抑制されていたことから、ポリフェノールによる抗酸化能がサルコーマ 180 への直接作用したと推察している。森村ら⁸⁾は芋焼酎粕および醸造酢による同様の試験において、ともに添加飼料投与群では延命効果が見られ、特に 0.5%添加飼料群が対照群と比較して顕著な延命効果だけでなく腫瘍増殖抑制効果が認められたと報告している。

以上のように、今回の試験に用いた新飲料は原料にサツマイモを用いているが黒酢と同様の微生物（麹菌、酵母）が関与しており、他の発酵物と同様に多糖類の影響により NK 活性亢進能が強くなることでガン組織重量の減少が考えられる。また、新飲料は芋焼酎粕に米麴を添加する処理により、ポリフェノール含有量が 134 mg/100 mL と米麴添加前に比べて約 1.7 倍増加すること (Table 2 - 2) やラジカル消去能 (IC₅₀) も高い値 (Fig. 2 - 1) を示したことから、ポリフェノールの抗酸化作用によっても腫瘍の増殖が抑制されたと考えられた。

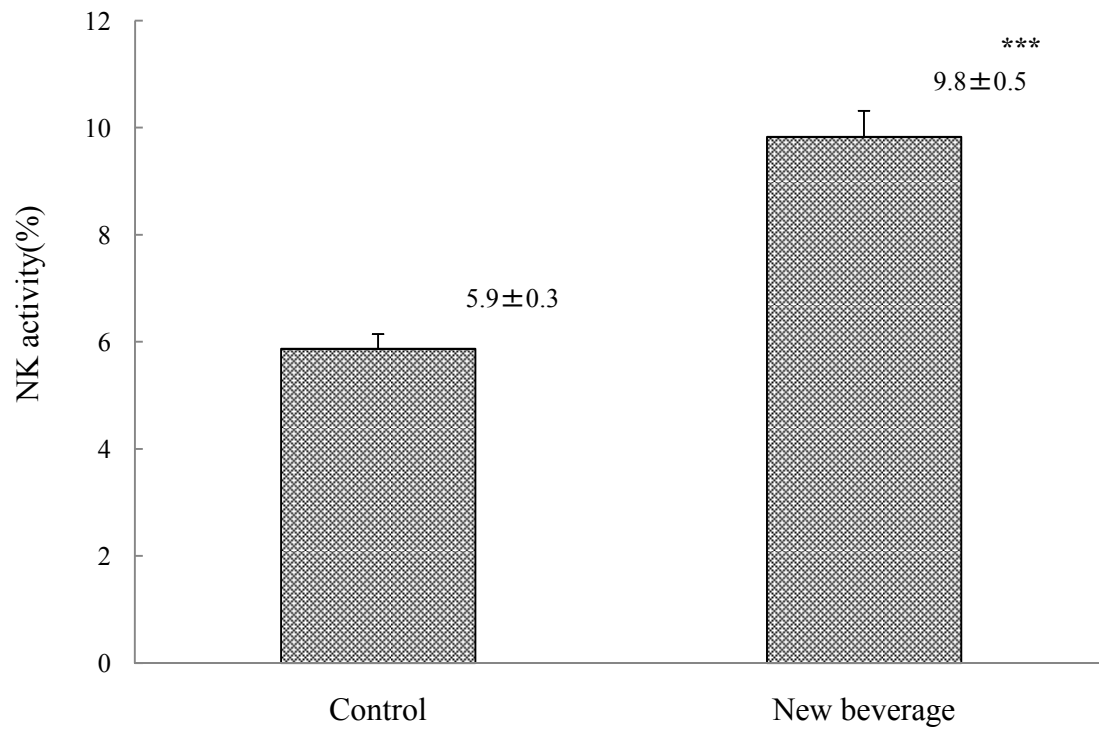


Figure 3 - 3 NK activity in the spleen of mice by ingestion of new beverage. (NK:YAC-1=10:1).

***Significant differences by ingestion of new beverage. ($p < 0.001$)

第4節 小括

芋焼酎粕飲料（新飲料）の生体防御能亢進効果に関する試験を行った。サルコーマを接種したマウスの新飲料を摂取することによって腫瘍の重量増加に5%水準の有意差が認められ、新飲料には移植ガン細胞増殖抑制効果が認められた。このときの脾臓のNK活性はコントロール区に比べて高い値を示し、この両者間では0.1%水準で有意な差が認められ、非常に強いNK細胞活性を示した。新飲料の摂取によって生体防御能が高く維持され、また、新飲料に含まれるポリフェノールの抗酸化作用により腫瘍の増殖が抑制されたと考えられた。5%水準で有意な差が認められた。

ヒトは60兆の細胞からなっており、日々更新されている。この時に遺伝子の修復のエラー、環境因子、ウイルス感染などによって遺伝子に異常を持つ細胞が数千個/日も生じると言われている。これらの異常細胞が生き残るとガン化する確率が高い。生体内でこの異常細胞を早期に見つけて処理しているのがNK細胞と言われるものであり、この細胞活性が高く維持されていると、異常細胞の消去が早期に行われ、ガン化が未然に防止されることになる。

本章で論述したように、摂取する食品成分によって活性が高く維持できるので、生体の免疫系を高く維持しうる機能を持つ食品を開発・提供するのとは重要であると考えられる。

第4章 新飲料のガン培養細胞への影響

第1節 序章

焼酎蒸留粕には，焼酎製造に関与する微生物（麹菌，酵母など）により生成されたクエン酸，アミノ酸や原料に由来するタンパク質や揮発性の各種栄養素^{1,2)}が含まれている。焼酎粕の機能性に関しては，抗酸化作用⁵⁾，抗ラジカル活性^{8, 9, 17)}，脂肪肝抑制効果¹¹⁾，肝障害抑制¹²⁾，抗腫瘍活性^{9, 10, 52)}，脂質代謝改善効果^{6, 13, 36)}，血圧上昇抑制^{12, 53)}，アレルギー⁷⁾などが報告されている。また，廣瀬ら³⁷⁾は種々の培養ガン細胞に対する *in vitro* での細胞増殖抑制効果と正常ラットへの安全性について報告している。

一方，発酵物の抗腫瘍作用として大腸ガンの予防効果などがあるとされる発酵乳⁵⁴⁾などの報告がある。

本章では，クエン酸生成能を持つ麹菌を用いた芋焼酎粕飲料(新飲料)のガン培養細胞増殖抑制能，ガン化抑制能に関する生理機能について述べる。

第2節 実験方法

第1項 新飲料の製造方法

これまで同様に，麴歩合 20%，汲み水歩合 65%のもろみを常圧蒸留して得られた芋焼酎粕に，河内菌白麴を用いて製麴した米麴を芋焼酎粕の 20%(w/v)相当量，セルラーゼ [セルロシン T2 (HBI 社製)] を芋焼酎粕の 1/1000 相当量(w/v)添加し，55℃で 15 時間糖化して，圧搾ろ

過した液部（以後、「新飲料」）を使用した。

第2項 ヒアルロン酸の分解抑制による抗酸化活性

抗酸化能の測定はヒアルロン酸の低分子化抑制を粘度法で検討した。ヒアルロン酸の調製は生化学工業(株)の特許の方法⁵⁵⁾に従った。すなわち、トサカ 500 g を 55℃ の水 1 L に加え 2 時間保温し溶解した。細かく細断後、水 1.5 L を加え、pH7.5 に調製した。プロナーゼ 25000 単位を加え 37℃、3.5 時間反応させ、タンパク質を消化し、ろ過した。ろ液 2 L に 5%塩化セチルピリジニウム 130 mL を加えて攪拌し、多糖類を沈殿させてろ過し集めた。それを、0.5M NaCl を含む 30%エタノールに溶かし、さらに同量のエタノール(95%~99%)を加えて生じた沈殿物をろ過し、乾燥してヒアルロン酸標品とした。

過酸化水素/鉄(II) (Fenton 試薬) またはアスコルビン酸/過酸化水素/鉄(III)により生成するヒドロキシルラジカルが高分子ヒアルロン酸を分解すると溶液の粘度が低下する。しかし、この系にラジカル消去活性や鉄キレート活性をもった化合物を添加すると粘度の低下が抑制される⁵⁶⁾。そこで、以下の方法により試験を行った。すなわち、過酸化水素/鉄(II)系の反応液組成は最終濃度をヒアルロン酸 2.5 mg/mL, リン酸緩衝液 (pH7.4) 50mM, 過酸化水素 1mM, 硫酸鉄(II) 0.05mM とし、この反応液に芋焼酎粕飲料の凍結乾燥粉末を 0, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL 添加し、混合した後、37℃で 30 分間インキュベートし粘度を測定した。反応液量は 5 mL とし、粘度計は小倉硝子製キャノンフェンスケ粘度計 (No.300)を使用した。粘度低下に対する抑制効果は次式により芋焼酎粕

飲料のヒアルロン酸分解抑制率として算出した。

$$\text{抑制率(\%)} = (C - B) / (A - B) \times 100$$

A:未処理のヒアルロン酸の粘度

B:アスコルビン酸/過酸化水素で処理したヒアルロン酸の粘度

C:Bに試験化合物を添加した場合の粘度

第3項 MTTアッセイ

新飲料によるガン細胞の増殖抑制効果はヒト急性前骨髄性白血病ガン細胞(HL60)を用いて MTTアッセイ⁵⁷⁾で行った。また、対照細胞群としてマウス正常皮膚由来株細胞(JB6)を用いた。

HL60細胞は東北大学加齢医学研究所癌細胞保存施設から、JB6細胞は National Cancer Institute (USA) から入手した。また、リン酸緩衝生理食塩水 [PBS(-)] は 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄ になるように調製後、オートクレーブで滅菌した。

MTT液(5 mg/mL)は 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 500 mg を滅菌した PBS(-)100 mL に溶解した。

0.04N 塩酸-イソプロパノールは 96 ウェル 1 枚当たり、濃塩酸 34μL とイソプロパノール 10 mL を混合し、作製した。

MTTアッセイは、まず、細胞培養用 96 ウェルプレート(平底)に細胞を 1~2.0×10⁴ 個/100 μL/ウェルに調製し、37℃, 5%CO₂ で 24 時間培養した。その後、新飲料を各種濃度(0.25, 0.50, 0.75 および 1.00 mg/mL) 添加し、新飲料無添加の細胞をコントロールとして、さらに 48 時間培

養した。また、新飲料のバックグラウンドを除去するため、培地のみ入れた 96 ウェルプレートに同量の新飲料を添加した。培養終了後、細胞密度をそれぞれ測定した。

細胞増殖の測定は Carmichael らの方法⁵⁸⁾に従って行った。すなわち、培養終了後、MTT 液を 10 μ L ずつ各ウェルに分注した。さらに、4 時間培養後、0.04N 塩酸 - イソプロパノール 100 μ L ずつウェルに分注し、結晶を溶解した。室温で 5 分間静置後、バイオラッド社製マイクロプレートリーダーで 595 nm の吸光度を測定した。細胞生存率は実験用の吸光度からサンプルの吸光度の差をコントロールの吸光度に対する百分率 (%) で求めた。また、コントロールに対する割合が 50% の時の試料濃度を IC₅₀ として増殖抑制活性を示した。

第 4 項 細胞ガン化培養方法

(1) 試薬の調製

細胞のガン化抑制能の解析はガン細胞などの寒天内でもコロニーを形成することができる性質を利用したコロニーアッセイ法²³⁾により行った。すなわち、培地には EMEM (イーグル最少必須培地, 1×EMEM) と 2×EMEM (1×EMEM の 2 倍濃度), 1.5% BACTO Agar を使用し, それぞれ超純水で混合後, オートクレーブして使用した。PBS(-)は前述した方法と同様とし, Trypsin-EDTA 溶液は 0.53mM EDTA-4Na を含む 0.05% トリプシン溶液を使用した。また, 発ガンプロモーターである 12-*O*-tetra-decanoylphorbol-13-acetate (TPA)は Sigma 社から入手した。1×INT 染色液は *p*-idonitrotetrazolium violet 0.25g/mL を超純水で溶解後, オートク

レーブ滅菌して使用した。

(2) 基層培地の調製

細胞の維持培養の基層培地には，6cm 培養ディッシュ 1 枚あたりに 1×EMEM と 2×EMEM，1.5%寒天をそれぞれ 1 mL ずつ加え，これに TPA 20 ng/mL と新飲料の凍結乾燥粉末を 0.1～2 mg/mL 加え，よく混合した後に，クリーンベンチで固化させた。

(3) 細胞の調製

培養ディッシュの JB6 細胞を移し，PBS(-)7 mL 加え，ディッシュをリンス後回収した。Trypsin-EDTA 液を 1mL 加え，37℃，5%CO₂ インキュベーターで細胞の剥離処理を行った。PBS 入り培地を 9 mL 加え，15 mL の遠心管に回収した。800 rpm で 8 分間遠心分離し，上清を除去後，沈殿した細胞の濃度が 1×10⁵ 個細胞/mL になるよう培地に加えた。細胞をよく拡散させた後，細胞懸濁液を 37℃，5%CO₂ インキュベーターで保温した。

(4) 上層培地の調製

6 cm 培養ディッシュ 1 枚あたりに 1×EMEM 1.0 mL，2×EMEM と 1.5% 寒天はそれぞれ 0.5 mL，調製した細胞総数が 1.0×10⁴ 個になるように添加後，よく混合した。

(5) 実験方法

基層培地に上層培地を注ぎ，均一に広げ，クリーンベンチ内で約 1 時間固化した。その後，37℃，5%CO₂ インキュベーターに移し，2 週間培養し，1×INT 液 0.8mL を注ぎ，染色した。さらに同インキュベーター内で 24 時間置いた後，4℃で 1～2 日間冷却した。増殖し染色したコロニー数を計測し，コントロールと比較してガン化抑制能を検討した。

第 3 節 結果と考察

第 1 項 抗酸化活性

新飲料の凍結乾燥粉末添加によるヒアルロン酸の粘度低下抑制率の測定結果を Fig. 4 - 1 に示した。ヒアルロン酸に対する添加量 0.25 mg/mL の粘度低下抑制率が 23%であるのに対し，0.5 mg/mL 添加では 95%とかなり高く粘度低下を抑制することから，非常に強い抗酸化能を示すことがわかった。1.0 mg/mL でも 90%以上と同程度であり，強い抗酸化能を示し，新飲料にはかなり高い抗酸化活性が認められた。

西山⁵⁹⁾は各種ポリフェノールを用いて，ラジカル消去活性とヒアルロン酸の分解に対する抑制活性を指標とした抗酸化活性を比較している。ポリフェノールの一部（ピロガロール，エピガロカテキンガレート）を除いてラジカル消去活性と抗酸化活性の間には相関が認められたが，ラジカル消去活性が強い化合物が必ずしも抗酸化的に作用しないことを示唆している。また，サツマイモに含まれるカフェ酸誘導体（カフェ酸，クロロゲン酸）も測定しているが，いずれもラジカル消去活性，抗酸化活性を示している。

今回の試験において、新飲料に抗酸化活性が認められているが (Fig. 4 - 1), 新飲料の高いラジカル消去能 (IC₅₀) や原料のサツマイモに由来するカフェ酸誘導体の作用ならびに芋焼酎粕に米麴を添加する処理により、ポリフェノール含有量が増加したことによる影響 (Fig. 2 - 1) が考えられる。

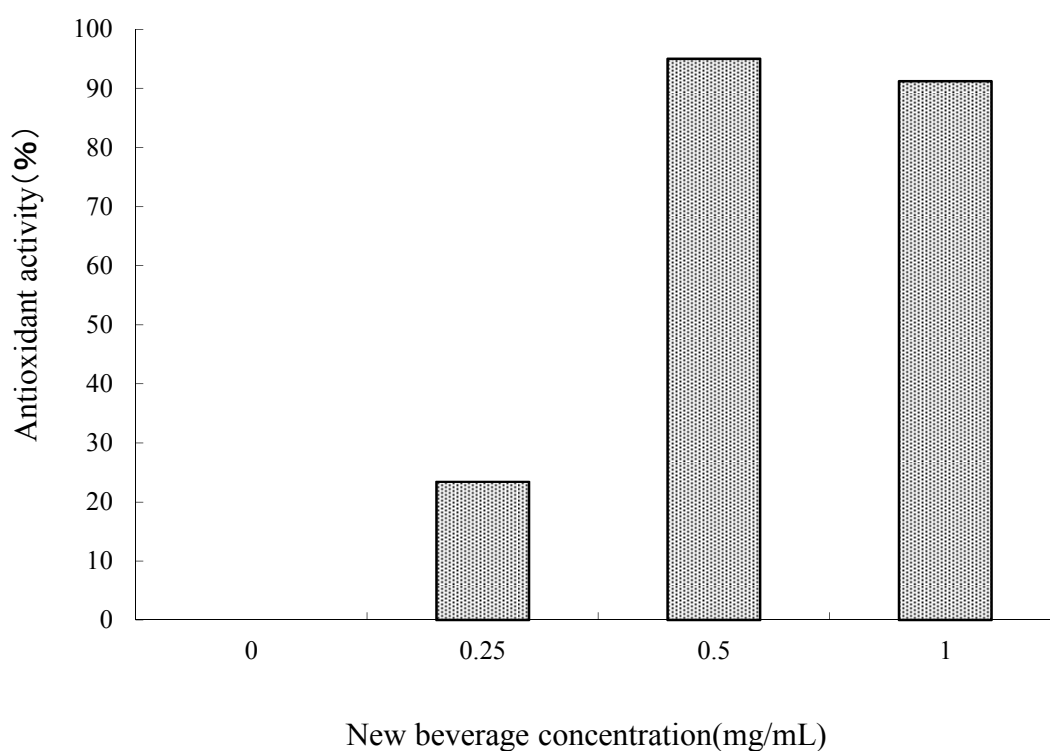


Figure 4 - 1 Antioxidant activity of new beverage measured by the hyaluronic acid-decomposition method.

第 2 項 ガン細胞増殖抑制作用

MTT は帯黄色の化合物で，ミトコンドリアの呼吸鎖に作用し，存在する酵素によってテトラゾリウム環が開裂し，青色の MTT フォルマザンを生成する。この生成量は細胞数とほぼ比例関係にあり，フォルマザンは酸性イソプロパノールにより分解し，呈色するため，その比色値を測定し，比較することにより細胞増殖の指標とすることができる。

新飲料無添加のコントロール（100%）に対するヒト急性骨髄性白血病ガン細胞(HL-60)の生存率は，添加量 0.25 mg/mL において 96.0%であったものの，0.50 mg/mL で 69.5%と低下し，0.75 mg/mL および 1.00 mg/mL の添加ではそれぞれ 30.6%および 19.6%を示すなど，新飲料にはガン細胞増殖を抑制する成分が存在することが考えられた(Fig. 4 - 2)。俣ら⁶⁰⁾は焙煎したサツマイモを用いた試験により，ポリフェノール濃度が高く，DPPH ラジカル消去能の強いほど，ガン細胞(HL60)の増殖を抑制したと報告しているが，今回の試験における HL60 細胞の増殖抑制作用もポリフェノールによるラジカル消去活性の強さと関係があるものと考えられる。

対象細胞群としてマウス正常皮膚由来細胞を用いて，同様の方法で新飲料を添加し，48 時間培養後，細胞密度を測定した結果を Fig. 4 - 2 に示した。0.25, 0.50, 0.75 および 1.00 mg/mL の添加では JB6 細胞の生存率は無添加のコントロール（100%）に対して，それぞれ 97.7%, 87.4%, 85.1%および 72.2%であり，新飲料は正常細胞の増殖にはあまり影響を与えないことがわかった。

以上の結果から，新飲料はマウス正常皮膚由来細胞 JB6 の増殖には

影響が少ないものの、ヒト急性前骨髄性白血病ガン細胞 HL-60 の増殖を著しく抑制し、ガン細胞増殖抑制能が認められた。

芋焼酎粕を用いたガン細胞の増殖抑制効果として、廣瀬ら³⁷⁾はマウス由来悪性黒色腫細胞とヒト細胞（胃ガン，肝臓ガン，肺腺ガン）に対する効果を報告している。

先に述べた通り，新飲料には原料のサツマイモに由来するポリフェノールが 134 mg/100 mL 含まれ，製造工程で芋焼酎粕に米麴を添加処理することにより，米麴添加前に比べて約 1.7 倍増加していた。また，ラジカル消去能 (IC₅₀) もこの製造工程を経ることで増加し，各種焼酎粕（芋，麦，米）よりも高い値を示していた¹⁷⁾。食品によるガン細胞への作用に関する報告として，緑黄色野菜や緑茶，大豆⁶¹⁾，黒米⁶²⁾，サツマイモ⁶³⁾などがあり，これらはいずれもその含有成分であるカテキン類，フィチン，アントシアニンなどの抗酸化物質の作用に起因することが考えられる。今回の試験結果についても新飲料の添加量が増えるに従って，抗酸化作用が強くなることから，ガン細胞増殖抑制能が認められたのは抗酸化作用が高まることに起因することが考えられる。

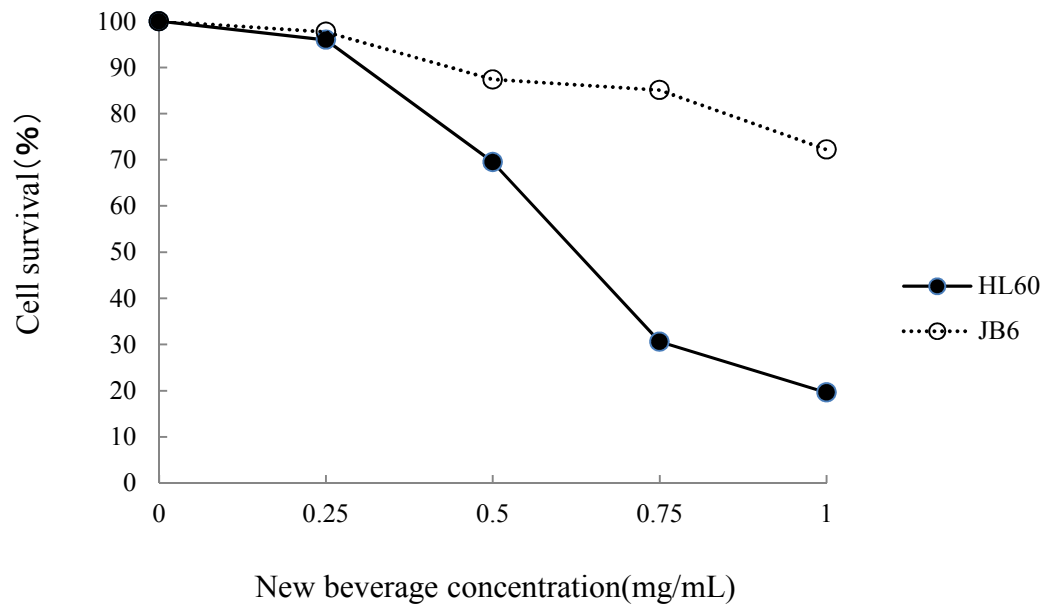


Figure 4 - 2 Suppression effect of new beverage on growth of human acute promyelocytic leukemia cells (HL60).

第3項 細胞ガン化抑制作用

マウス皮膚細胞(JB6)を用い、ガン化誘導剤として発ガンプロモーターTPAを添加すると細胞がガン化し、軟寒天培地中でも増殖し、コロニーを形成できるようになる。これをマーカーとして同時に新飲料を0.1~2 mg/mL培地となるように添加してTPAによるガン化誘導に対する抑制効果を見る方法を用いてガン化誘導抑制率を計測した。

この方法は微生物を用いる変異原試験に比べ、正常動物細胞を用いるため、ヒトへの発ガン誘導抑制能を推定する上で極めて有効で、価値の高い情報が得られることが考えられる。結果をFig. 4-3示しているが、0.5 mg/mL濃度では約85%と非常に強い抑制率を示した。

抗ガン能の1つであるガン細胞を自殺に追い込むアポトーシス誘導能について、新飲料の乾燥物の添加濃度(0.25~8 mg/mL)を変えて試験した。その結果は示していないが、いずれの濃度においてもアポトーシスの分子エビデンスであるDNAのラダー(断片化)化はみられず、ガン細胞を自殺に追い込む作用は観察されなかった。ガン細胞への作用として、ガン細胞の増殖を直接抑制するいわゆる抗ガン剤と同様の作用とガン細胞の増殖自体には影響を及ぼさないがアポトーシス誘導することで自殺に追い込みガン細胞を減らす作用が考えられる。今回の結果は、ガン細胞の増殖は抑制しているがアポトーシス誘導は見られなかったことから、前者によるものと考えられる。

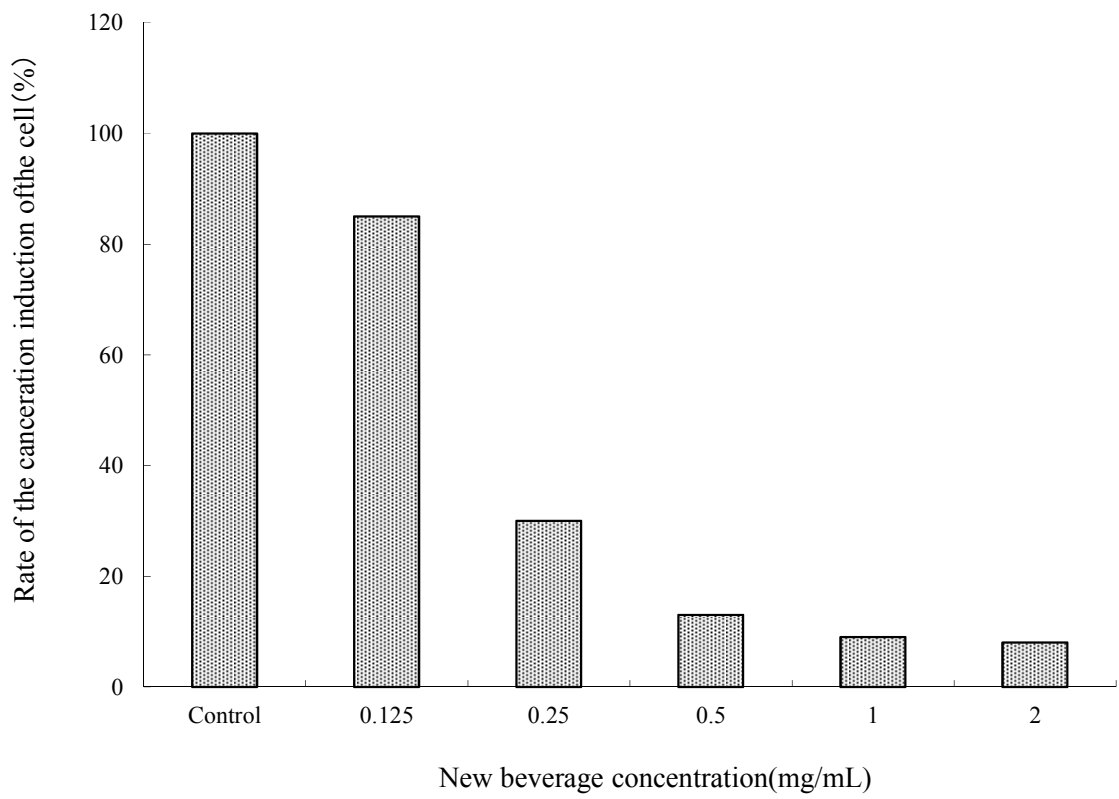


Figure 4 - 3 Suppression effect of new beverage on carcinogenesis promotion of JB6 cells.

第4節 小括

芋焼酎粕飲料（新飲料）のガン細胞増殖抑制能に関する生理機能に関する試験を行った。

ヒト急性骨髄性白血病ガン細胞(HL60)とマウス正常皮膚由来細胞(JB6)に新飲料を添加して培養したところ、HL60細胞の増殖を強く抑制するが、正常細胞の増殖にはあまり影響を与えないことがわかった。これはガン細胞の増殖を特異的に抑制することを示すもので、新飲料が健康食品として非常に期待されると考えられた。

また、マウス正常細胞を用いた細胞ガン化抑制試験において、新飲料はガン化誘導に対するかなり強い抑制が認められた。

前章までの芋焼酎粕に米麴を添加した飲料に含まれる成分や飲料の脂質代謝改善作用、高血糖上昇抑制作用、移植ガン細胞の腫瘍組織の増殖抑制、免疫亢進作用に加えて、芋焼酎粕飲料にはガン細胞に対する直接的な増殖抑制とガン化誘導抑制作用がある知見が得られた。以上の結果から、芋焼酎粕飲料は健康食品として非常に期待されることを示すことができた。

第5章 各種麹菌の米麹によるカフェ酸生成活性

第1節 序章

新飲料の製造方法により，ポリフェノールからカフェ酸が発酵産物として検知された^{18,26)}。カフェ酸は桂皮酸に水酸基が結合したポリフェノール化合物であり，コーヒー豆やサツマイモの塊根^{19,63)}のような様々な植物に遊離またはエステル誘導体として存在している。代表的なエステル誘導体はクロロゲン酸の天然化合物がよく知られている。カフェ酸は，最近，抗酸化作用および抗腫瘍活性などのような生理活性を有することが見出され，また高血圧^{64,65,66)}を改善または予防するための薬剤として期待されている。カフェ酸およびその誘導体の天然化合物はサツマイモの塊根^{28,67,68)}にも発見され，その化合物の機能に基づいていくつもの新製品が開発^{7,69,70)}された。

クロロゲン酸（5-カフェオイルキナ酸）は，Fig. 5-1に示すようにカフェ酸がエステル結合によりキナ酸の水酸基と結合した複雑な構造を有しており，クロロゲン酸エステラーゼによって分解され，カフェ酸⁷¹⁾を生成する。これまでの研究により，芋焼酎粕に米麹を添加することによりカフェ酸の増加が観察された^{18,26)}ことから，焼酎麹抽出液のカフェ酸生成活性(CAP)に着目した。

CAPについては，Okamura *et al.*⁷²⁾は *A.japonicas* がクロロゲン酸エステラーゼを生成できること，Adachi *et al.*⁷³⁾は *A.sojae* による麹の酵素活性がコーヒー粕を含む培地を使用することでカフェ酸誘導体により誘導されたことを言及している。また，Asther *et al.*⁷⁴⁾は *A.niger*,

A.oryzae, *A.tamarii* を用いた液体培養試験において *A.niger* の培養液だけからクロロゲン酸エステル加水分解酵素の活性を発見した。

しかし、清酒，焼酎，味噌等の一般的に醸造食品に使用されている米麴のクロロゲン酸加水分解酵素に関する報告されていない。

そこで，本研究では各種麴菌により原料米を用いて製麴し，得られた米麴から抽出した酵素作用について検討した。本研究では，クロロゲン酸からカフェ酸を生成する麴抽出液中の CAP を調べるために，市販種麴 35 種類と同様の *Aspergillus* 属の標準菌株 17 種類を用いて小スケールの米麴 52 種類を調製した。

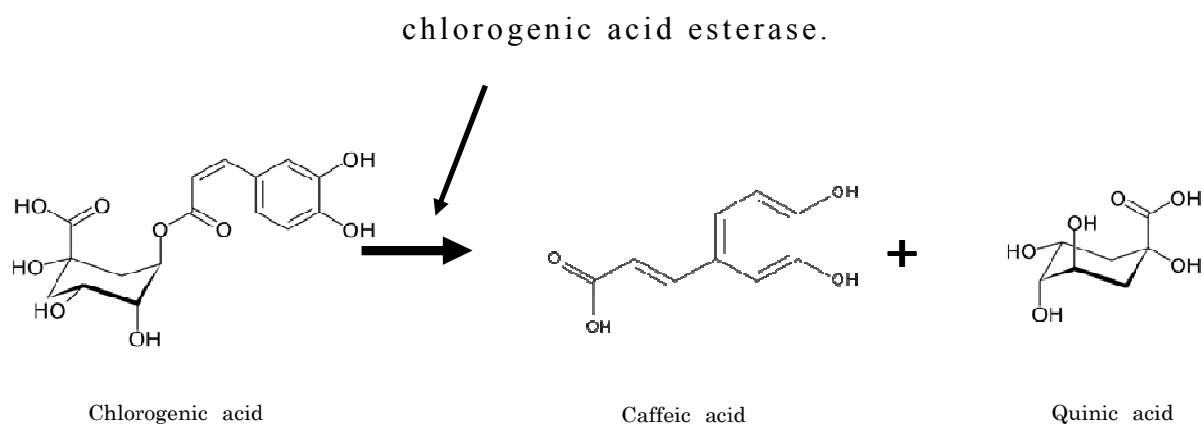


Figure 5 - 1 A scheme for caffeic acid production from chlorogenic acid by chlorogenic acid esterase.

第2節 実験方法

第1項 試験菌株

麴菌の標準菌株は(独)酒類総合研究所から *A.oryzae* (RIB40, RIB128, RIB143 および RIB430) , *A.sojae* (RIB910 および RIB6001), *A.tamarii* (RIB3005), *A.usamii* (RIB2004 および RIB2005), *A.usamii mut. shirousamii* (RIB2501 および RIB2506), *A.kawachii* (RIB SC60), *A.awamori* (RIB2051, RIB2601 および RIB2604), *A.niger* (RIB2002) を, また, (独) 製品評価技術基盤機構から *A.kawachii* (NBRC4308) の計 17 株が供与された。また, 市販種麴は白麴菌 7 株, 黒麴菌 8 株および黄麴菌 13 株が(株)ビオック (B), (株)秋田今野商店 (A), (株)樋口松之助商店 (H) より供与され, 白麴菌 4 株および黒麴菌 3 株は河内源一郎商店 (K) より購入した。種麴のリストは Table 5 - 1 の通りである。

第2項 培養培地および製麴条件

(1) *Aspergillus* 属の標準菌株培養

標準菌株のプレート培養には 0.5%酵母エキス, 2%寒天を含む Brix10° に調製した麴汁培地を 121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌し, 冷却後, シャーレ (φ90mm×15mm) に撒いて麴菌生育用培地とした。

(2) 麴菌の培養

Aspergillus 属の分生子は白金耳で上記の培養培地に接種し, 4 日間 35°C で培養した。

第3項 原料米とその前処理

麴原料にはタイ米 A1 スーパーを使用した。原料米は洗米後 30 分間浸漬し，30 分間水切後，50 分間蒸煮した。室温まで放冷後原料米重量の 5%相当量の水を 3 回に分けて散水し，再度 50 分間蒸煮した。

第4項 製麴方法

ガラスシャーレ（φ90mm×20mm）の内壁並びに底面に JK ワイパーを折り込み，不要部分を切除後，ろ紙（φ90mm）とキムワイプを入れ，オートクレーブで 121℃，30 分間滅菌し，培養容器とした。

Aspergillus 属の標準菌株は，麴菌生育用培地に生育してできた分生子は 1% NaCl 溶液で表面を洗浄した分生子懸濁液（ 2.5×10^5 孢子/mL）を蒸米約 50 g（原料米として約 40 g）に種付けした。市販種麴は，原料米の 1/500 量を散布した。培養条件は培養容器を 35℃で 43 時間製麴し，湿度 85%で管理した。なお，製麴開始後 26 時間で麴をよくほぐした。

Table 5 - 1 List of 17 standard strains of *Aspergillus* molds and 35 commercial seed *koji*'s.

Koji Type		<i>Aspergillus</i> name or Company name	number	Use
Yellow	Type	<i>Aspergillus oryzae</i> var. <i>brunneus</i> Murakami	RIB40	
Yellow	Type	<i>Aspergillus oryzae</i> var. <i>oryzae</i> Murakami	RIB128	
Yellow	Type	<i>Aspergillus oryzae</i> var. <i>oryzae</i> Murakami	RIB143	
Yellow	Type	<i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlburg) Cohn	RIB430	
Yellow	Type	<i>Aspergillus sojae</i> Sakaguchi et Yamada	RIB910	
Yellow	Type	<i>Aspergillus sojae</i>	RIB6001	
Yellow	Type	<i>Aspergillus tamarii</i> Kita	RIB3005	
Yellow	Type	B Co. Ltd.	1	SAKE
Yellow	Type	H Co. Ltd.	2	SAKE
Yellow	Type	H Co. Ltd.	3	SAKE
Yellow	Type	H Co. Ltd.	4	SAKE
Yellow	Type	B Co. Ltd.	5	Soy-sauce
Yellow	Type	B Co. Ltd.	6	Soy-sauce
Yellow	Type	B Co. Ltd.	7	Soy-sauce
Yellow	Type	B Co. Ltd.	8	Miso
Yellow	Type	B Co. Ltd.	9	Miso
Yellow	Type	H Co. Ltd.	10	Miso
Yellow	Type	B Co. Ltd.	11	Shochu
Yellow	Type	A Co. Ltd.	12	Shochu
Yellow	Type	H Co. Ltd.	13	Shochu
Black	Type	<i>Aspergillus usamii</i>	RIB2004	Shochu
Black	Type	<i>Aspergillus usamii</i>	RIB2005	Shochu
Black	Type	<i>Aspergillus awamori</i> Nakazawa	RIB2051	Awamori
Black	Type	<i>Aspergillus awamori</i>	RIB2601	Awamori
Black	Type	<i>Aspergillus awamori</i> (<i>Aspergillus luchuensis</i>)	RIB2604	Awamori
Black	mold	<i>Aspergillus niger</i>	RIB2002	
Black	Type	H Co. Ltd.	1	Shochu
Black	Type	K Co. Ltd.	2	Shochu
Black	Type	K Co. Ltd.	3	Shochu
Black	Type	K Co. Ltd.	4	Awamori
Black	Type	B Co. Ltd.	5	Awamori
Black	Type	A Co. Ltd.	6	Awamori
Black	Type	A Co. Ltd.	7	Awamori
Black	Type	A Co. Ltd.	8	Awamori
Black	Type	A Co. Ltd.	9	Awamori
Black	Type	A Co. Ltd.	10	Shochu
Black	Type	A Co. Ltd.	11	Awamori
White	Type	<i>Aspergillus usamii</i> mut. <i>shirousamii</i>	RIB2501	Shochu
White	Type	<i>Aspergillus usamii</i> mut. <i>shirousamii</i>	RIB2506	Shochu
White	Type	<i>Aspergillus kawachii</i>	RIB SC60	Shochu
White	Type	<i>Aspergillus kawachii</i>	NBRC4308	Shochu
White	Type	H Co. Ltd.	1	Shochu
White	Type	H Co. Ltd.	2	Shochu
White	Type	K Co. Ltd.	3	Shochu
White	Type	K Co. Ltd.	4	Shochu
White	Type	K Co. Ltd.	5	Shochu
White	Type	K Co. Ltd.	6	Shochu
White	Type	A Co. Ltd.	7	Shochu
White	Type	A Co. Ltd.	8	Shochu
White	Type	A Co. Ltd.	9	Shochu
White	Type	A Co. Ltd.	10	Shochu
White	Type	K Co. Ltd.	11	Shochu

第 5 項 分析方法

(1) 麴酸度および麴酵素の抽出

酵素力価測定用の酵素抽出液は国税庁所定分析法⁷⁵⁾に従って調製した。黄麴菌は米麴に 5 倍量の 0.5% NaCl を含む 0.01M (黒麴菌, 白麴菌による米麴は 0.1M) 酢酸緩衝液 (pH5.0) を加え, 低温室で一夜浸出した後ろ紙 No.5C でろ過を行い, 酵素溶液とした。

麴酸度 (AC) は米麴に 5 倍量の水を加え室温にて 3 時間浸出し, そのろ液 10mL を 0.1N NaOH で pH7.2 になるまでの滴定量とした。

(2) アミラーゼ系酵素の分析方法

グルコアミラーゼ (GA) および α -アミラーゼ (AA) は最終濃度が 0.5% になるように 50mM 酢酸緩衝液 (pH4.5) を用いて調製した可溶性デンプン [アミラーゼ定量用 (ナカライテスク株式会社製)] 溶液 450 μ L を予め 37°C, 5 分間保温後, 酵素溶液 50 μ L を加え 37°C で 10 分間反応させ, 10 分間熱煮沸により反応を停止した。この反応液から 200 μ L 取りソモギー・ネルソン法 (S-N 法)⁷⁶⁾を, 100 μ L 取りグルコースオキシダーゼ法 (G-O 法)⁷⁷⁾を行った。G-O 法の値をグルコアミラーゼ活性とし, S-N 法の値から G-O 法の値を差し引いた値を α -アミラーゼ活性とし, 1 分間に 1 μ mole のグルコースを生成する酵素量を 1 ユニット (U) と定義した。

なお, 同法によるグルコアミラーゼ活性を約 10 倍した数値が国税庁所定分析法注解⁷⁵⁾による活性とほぼ同値である。

(3) α -及び β -グルコシダーゼ活性の分析方法⁷⁸⁾

α -グルコシダーゼ (AG) 及び β -グルコシダーゼ (BG) 活性はそれぞれ *p*-ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシド (ナカライテスク株式会社製), *p*-ニトロフェニル- β -D-グルコピラノシド (ナカライテスク株式会社製) を最終濃度 1mM に調製した基質 (50mM 酢酸緩衝液) 450 μ L に, 酵素溶液 50 μ L を加え 37°C で 60 分間反応させ, 0.2M 四ホウ酸ナトリウムを 3 mL 加えて反応を停止させた。この反応液を吸光度 405 nm で測定し, 1 分間に 1 μ mole の *p*-ニトロフェノールを生成する酵素量を 1 ユニット (U) と定義した。

(4) 生デンプン分解力の分析方法

生デンプン分解率 (RSD) はサツマイモ (実験室調製) から調製した生デンプン (水分 12.5%) 200 mg に酵素溶液 500 μ L と酢酸緩衝液を 3.5 mL 加え, 37°C に保った恒温室内のロータリーシェーカー (TAITEC ROTATOR R-50) を用いて約 30 rpm の速度で回転させながら反応させた。この反応液を 0, 2, 4 および 6 時間毎に 500 μ L ずつサンプリングし, これを遠心分離 (11,400 g, 5 分間) した上澄み液 200 μ L を, S-N 法で測定した。生デンプン分解率の算出方法は以下に示す。

$$\text{生デンプン分解率 (\%)} = \frac{\text{Glc (\mu g)} \times \text{希釈} \times 162/180 \times 4 \text{ (mL)}}{1000 \times 0.2 \text{ (mL)} \times 200 \text{ (mg)}}$$

(5) カフェ酸生成活性 (CAP) の分析方法

カフェ酸生成活性 (CAP, またはクロロゲン酸エステラーゼ) の測定は Adachi et al. の方法⁷³⁾を一部改変して行った。すなわち, 酵素抽出液 500 μ L に, 2.5 mM クロロゲン酸 [0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0)] 1 mL を添加し, 30°C で 5 時間インキュベートした。ブランクには酵素溶液の代わりに緩衝液を使用した。反応混合物を氷中に保存し, 以下に示す HPLC 分析を行った。1 分間に 1nmole のカフェ酸を生成する酵素量を 1 ユニット (U) と定義した。

(6) クロロゲン酸およびカフェ酸の HPLC 分析

クロロゲン酸およびカフェ酸の HPLC 分析は試料をマイクロフィルター (0.45 μ m, ADVANTEC) でろ過後, Yoshimoto et al.¹⁷⁾の方法に準じ, 島津製作所製インジェクター付 HPLC システム [ポンプ LC-6A, オートインジェクター SIL-6B, 検出器 SPD-6AV (326 nm)], カラムは YMC-Pack ODS-AM AM-302 column (4.6mm ID x150mm, 5 μ m) を使用した。

分析条件はカラム温度 40°C, 流速 1 mL/min とし, 溶媒には 0.2% (v/v) 蟻酸 (A) とメタノール (B) を使用し, 2% B (0-15 min), 2%-45%B グラジエント (15-50 min), 45% B (50-65 min) とするグラジエント分析を行った。

第3節 結果と考察

第1項 製麴の再現性試験

シャーレスケールの製麴試験について再現性を確認するために河内菌白麴を用いて5回製麴試験を繰り返し、麴酸度及び酵素力価を測定した(データ省略)。標準偏差を平均値で除した変動係数は1.4%と非常にバラつきが小さかった。GA, AG および BG の変動係数はそれぞれ1.8%, 4.3%および10.2%とばらつきは小さかった。一方, AA は49.2%の大きな値が得られた。これはAA活性の値が小さいためにばらつきが大きくなったと考えている。

以上のことから小スケールでの製麴の再現性はかなり良好であると判断した。

米麴を長期間培養した時の酸度およびCAPを含む酵素活性の増加を確認するために、市販の白麴菌を使用して76時間までモニターした。その結果, GA, AA, AG および RSD のようなデンプン分解活性は24時間の初期段階までに増加し始めた。一方, AC, BG, CAP は28時間から32時間までの後期に増加した。標準培養段階の43時間以内にすべての活性の増加が観察されたことから、標準的な培養期間である43時間して、製麴時間を設定した(Table 5-2)。

Table 5 - 2 Monitoring for production of CAP and the other enzymatic activities during *koji*-making

	GA (U)	AA (U)	AG (U)	BG (U)	RSD (%)	AC (mL)	CAP (U)
16h	0.85	1.75	0.55	0.10	0.41	0.12	0.0
24h	4.05	1.15	1.55	0.20	1.46	1.03	0.0
28h	8.45	2.45	2.50	0.30	2.03	2.25	0.3
32h	14.30	4.80	4.25	0.85	2.02	3.65	1.4
36h	20.35	3.25	5.15	2.00	2.32	5.28	4.4
40h	24.50	3.25	6.35	2.75	2.39	5.53	3.6
44h	20.55	3.55	6.90	3.60	2.25	6.05	5.0
52h	30.20	5.60	9.10	9.70	2.63	6.8	7.8
64h	31.50	3.55	9.95	7.45	2.62	6.75	5.6
76h	34.85	6.25	11.10	12.55	2.78	6.95	10.8

AC: *koji* acidity, GA: Glucoamylase, AA: α -Amylase, AG: α -Glucosidase, BG: β -Glucosidase, RSD: Raw starch digestion, CAP: Activity of caffeic acid production

第2項 *Aspergillus* 属の標準菌株による米麴の CAP と酵素活性

Aspergillus 属の標準菌株 17 種類を用いて、米麴の CAP とその他酵素活性分析のために小スケールで製麴した。Fig. 5 - 2 に示す HPLC 分析するために 43 時間培養した麴の一部を採取した。生成されたカフェ酸量に応じて、麴抽出物の酵素力価 (Table 5 - 3) を算出した。AC の高い麴である *A.kawachii*, *A.niger*, および *A.awamori* の CAP 活性はそれぞれ 37.3 U/g, 26.7 U/g および 19.9 U/g と高かったのに対し、低い AC の麴である *A.oryzae*, *A.sojae* および *A.tamarisii* の CAP 活性はそれぞれ 1.5 U/g で、2.1 U/g と 3.9 U/g と低い値であった。

その他の酵素活性では、*A.oryzae* の 4 株の麴は GA (42 U/g), AA (89 U/g) と AG (12 U/g) において最も高い活性が観察されたが、RSD と BG の活性は低かった。*A.sojae* の 2 株の麴の GA (3.3 U/g), AA (4.7 U/g), AG (2.5 U/g) は低い活性を示した。一方、酸を生成する麴菌の *A.niger*, *A.usamii*, *A.usamii mut. shirousamii*, *A.awamori* および *A.kawachii* は酸を生成しない麴菌の *A.oryzae* と比較し、GA は 15-31 U/g と低く、AA は 2-14 U/g と非常に低かった。

酸を生成する麴菌の中で *A.niger* は AC が最も高く、CAP は 2 番目に高い活性を示したが、AG, BG および RSD の他の酵素活性はそれほど高くなかった。Asther は *A.niger* の液体培地中でクロロゲン酸エステラーゼ活性 (0.46 nkat/ml) を発見し、その酵素の生産および性質⁷⁴⁾について報告している。今回の製麴実験 (固体培養) において、我々は *A.kawachii* の CAP が *A.niger* よりもさらに強いことを発見した。

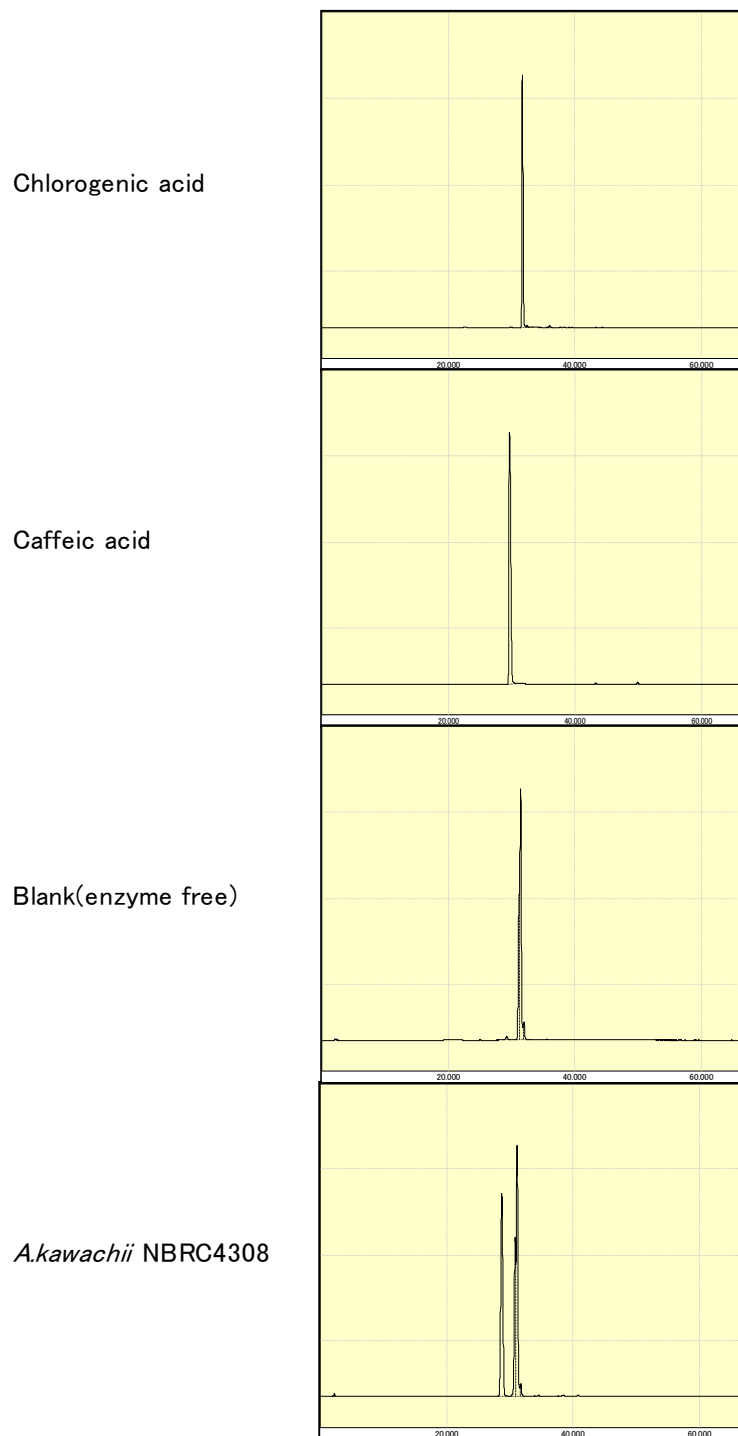


Figure 5 - 2 HPLC assay for caffeic acid production from chlorogenic acid by *A. kawachii* NBRC4308.

Table 5 - 3 Some enzymatic activities including CAP and acidity of rice-*koji*'s made by 17 standard strains of *Aspergillus* molds.

Strain	n	GA (U)	AA (U)	AG (U)	BG (U)	RSD (%)	AC (mL)	CAP (U)
<i>Aspergillus oryzae</i>	4	42.0	89.3	12.1	1.7	0.5	0.2	1.5
<i>Aspergillus sojae</i>	2	3.3	4.7	2.5	2.1	0.11	0.3	2.1
<i>Aspergillus tamarii</i>	1	13.3	21.0	7.0	1.2	0.66	0.5	3.9
<i>Aspergillus usamii</i>	2	22.3	7.1	6.5	2.5	2.36	4.2	5.2
<i>Aspergillus awamori</i>	3	28.2	7.9	5.7	9.6	2.61	3.4	19.9
<i>Aspergillus niger</i>	1	31.4	14.3	3.6	4.0	1.07	8.5	26.7
<i>Aspergillus usamii mut. shirousamii</i>	2	17.4	2.1	5.5	4.5	2.59	4.0	17.2
<i>Aspergillus kawachii</i>	2	15.5	6.1	2.9	15.5	2.07	4.0	37.3

AC : koji acidity, GA: Glucoamylase, AA: α -Amylase, AG: α -Glucosidase, BG: β -Glucosidase, RSD: Raw starch digestion, CAP: Activity of caffeic acid production

第3項 市販種麴による米麴のCAPと酵素活性

Table 5 - 4 に示すように、市販種麴 35 種類を使用してその CAP と他の酵素活性の分析のために小さなスケールで米麴を調製した。白麴菌および黒麴菌が 14.8-32.5 U/g と同程度に高かったのに対し、黄麴菌の CAP 活性は 1.2-3.2 U/g と同様に低値であった。*Aspergillus* 属の標準菌株と同じように、酸生成する種麴は酸生成しない種麴よりも高い CAP 活性を有することが観察された。白麴菌と標準菌株の *A.kawachii* の CAP 活性は Adachi et al.⁷³⁾ によって報告されたような特定の誘導培地なしにそれぞれ 32.5 U/g, 37.3 U/g とかなり高い活性を示した。

他の酵素活性について、黄麴菌（日本酒，醤油，味噌，焼酎）のすべてのグループは白麴菌や黒麴菌よりも GA, AA と AG の活性が高く，BG と RSD の活性は低かった。これらの傾向は *A.sojae* の株を除いて，標準菌株と市販種麴の間に本質的に同じである。市販の醤油麴が他の黄麴と同じような高いアミラーゼ活性を示したのに対し，一般的に醤油を作るために使用される *A.sojae* による麴は低アミラーゼ活性を示した。この不一致は市販の醤油麴には *A.sojae* や *A.oryzae* の混合物であることに起因する⁷⁹⁾ことが考えられる。岩野らは南九州における焼酎製造工場から得られた米麴の様々なタイプの α -アミラーゼ活性を研究し，焼酎麴の α -アミラーゼの活性は清酒麴⁷⁵⁾のそれらよりもはるかに低かったことを報告した。今回においても同様の結果を得た。

BG 活性は発酵時の焼酎もろみの香気生産に関与する⁸⁰⁾ことが知られている。白麴菌（12.6 U/g）と焼酎用黒麴菌（12.3 U/g）の BG 活性は泡盛用黒麴菌を含む他のものよりはるかに高い値を示した。

Table 5 - 4 Some enzymatic activities including CAP and acidity of rice-*koji*'s made by 35 commercial seed *koji*'s.

	n	GA (U)	AA (U)	AG (U)	BG (U)	RSD (%)	AC (mL)	CAP (U)
Sake	4	25.6	75.3	6.9	1.6	0.35	0.1	1.2
Soy-sauce	3	40.1	55.2	12.8	6.0	0.44	0.2	3.2
Yellow type miso	3	52.0	117.0	17.4	2.8	0.48	0.1	2.0
<i>Shochu</i>	3	45.2	91.7	12.5	3.0	0.49	0.1	1.4
AVE.	13	39.5	84.1	12.0	3.2	0.43	0.1	1.9
Awamori	7	14.8	14.6	3.1	4.8	1.82	4.9	14.8
Black type <i>Shochu</i>	4	21.5	7.8	5.6	12.3	2.36	7.4	26.2
AVE.	11	17.2	12.1	4.0	7.5	2.02	5.8	19.0
White type	11	23.7	7.7	5.8	12.6	2.61	7.8	32.5
AVE.	35	27.6	37.5	7.5	7.5	1.61	4.3	16.9

AC: koji acidity, GA: Glucoamylase, AA: α -Amylase, AG: α -Glucosidase, BG: β -Glucosidase, RSD: Raw starch digestion, CAP: Activity of caffeic acid production

第4項 酵素活性等の偏差で示したレーダーチャート

標準菌株 17 種類と市販種麹 35 種類の合計 52 種類を 4 タイプ [黄麹菌 (20), 黒麹菌 (16), 白麹菌 (15) と *A.niger* の黒カビ (1)] に分類した。黒麹菌はさらに焼耐用 (6) と泡盛用 (10) の 2 つのグループに分けた。

麹菌の各タイプを特徴づけるために、酵素特性はレーダーチャートを作成した。各特性の数値は偏差値 (T-スコア) で示した。ある特性が平均値の場合、その T-スコアは 50 となり、T-スコアが 60 を示すときには数値は標準偏差で平均よりも大きいことを意味する。Fig. 5-3 に見られるように、低 AC である黄麹菌は高い AC の他の麹菌とは大きく異なり、黄麹菌のレーダーチャートは他の麹菌とは明確に区別された。黄麹菌の酵素特性は他の麹菌と逆の関係を持ち、酸を生成する白麹菌や黒麹菌よりも AA (T-スコア 60), GA (T-スコア 56), AG (T-スコア 57) は高い活性を示し、BG (T-スコア 43), RSD (T-スコア 39) と CAP (T-スコア 41) は低い活性を示した。白麹菌の酵素特性は酸を生成する麹菌の中で最大の円で描かれ、白麹菌の CAP は最も高い T-スコア 61 であった。黒麹菌の中で焼耐用麹菌は AA を除いたほとんどの活性や酸度が泡盛用麹菌よりも大きいことを示したことが注目される。焼耐用麹菌が酵素の供給源として主に使用されたのに対し、泡盛用麹菌はデンプン分解酵素のほかに、米からの糖質の供給源として使用されていることから、活性の違いは妥当である。その酵素は一次もろみが蒸されて粉碎された大量のサツマイモにより、希薄化後の二次発酵もろみでサツマイモデンプンに作用する。バニリンは泡盛を特徴付け

る特定の香りであり，フェルラ酸エステラーゼによって生じる 4-ビニルグアイヤコールから生成され，低 pH 条件⁸¹⁾では不活性化されることが知られている。それで，泡盛の製造には，弱い酸度を持つ麹菌が選択されていると考えられる。

図に見られるように，黒カビの *A.niger* は最も高い AC（8.5ml，T-スコア 63）で RSD（T-スコア 45）と BG（T-スコア 45）が低い活性特徴づけられ，歪んだレーダーチャートを示した。2つの活性は他の酸生成する麹菌と大幅に異なっている。矢野らは，*A.niger* の配列は *A.awamori* のものでは大幅に異なっていることを DNA 配列分析で明らかにしたが，酸生成や酵素活性のような *A.niger* と *A.awamori* との間の特性の違いは配列の違いに直接関連することができなかった。

すべての酵素特性の偏差値（T-スコア）に比べ，CAP 活性や酸生成能，生デンプン分解活性（RSD）および β -グルコシダーゼ活性（BG）のような他の酵素特性の間にいくつかの関係が示唆されている。

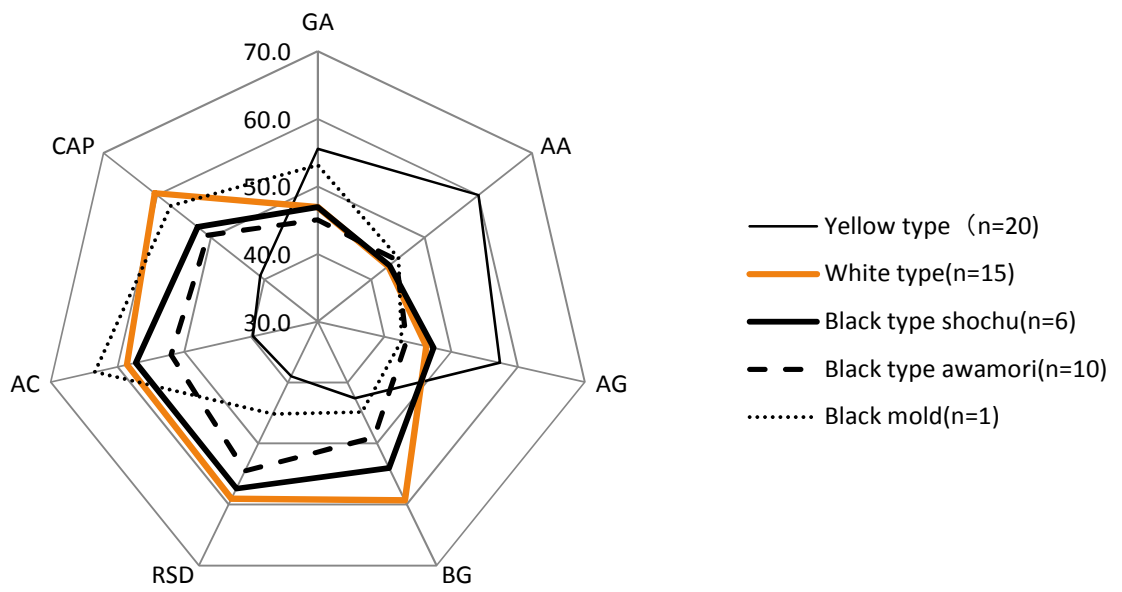


Figure 5 - 3 Rader charts of 5 classes of *koji*'s.

第5項 CAP と酵素活性等との相関行列

統計学的に CAP と他の酵素特性の間の統計的ないくつかの関係を確認するために、相関行列を Table 5 - 5 に示した。相関行列は標準菌株 17 種類と市販種麴 35 種類の合計 52 種類の米麴を使用して、その特性から算出した。7 つの特性 (CAP, GA, AA, AG, BG, RSD と AC) 間の相関行列は CAP と RSD ($r=0.76$), CAP と AC ($r=0.83$), CAP と BG ($r = 0.86$) の間に高い正の相関を示したが、CAP と AA ($r=-0.64$) の間には負の相関が見られた。CAP との関係以外で、最も高い相関係数は GA と AG ($r=0.91$) の関係が観察された。

GA はデンプン結合ドメイン⁸²⁾に由来する生デンプン分解活性を有することが知られている。しかし、RSD と GA の関係は負の相関を示し、正の相関を示していない。RSD の活性が GA だけではなく AG あるいは AA のような他の酵素も起因したという意外な結果が示唆される。最近、AG も清酒製造の間に生デンプン消化のいくつかの役割を果たすことが判明した^{83,84)}。AA については酸生成しない黄麴菌が耐酸性のないタイプだけを生成するのに対し、酸を生成する白麴菌や黒麴菌は耐酸性 AA と耐酸性のない AA の 2 つのタイプを生産することができる⁸⁵⁾。耐酸性 AA は GA のようなデンプン結合ドメインを有し、RSD 活性を示す。焼酎もろみや泡盛もろみにおいて、pH を 4.0 以下というもろみの酸性条件下で耐酸性のない AA が不活性化する一方、耐酸性 AA は安定であることが知られており⁸⁶⁾、酸に不安定な AA よりもサツマイモや米のデンプン分解により多く作用する。

Table 5 - 5 Correlation matrix between CAP and the other enzymatic properties of rice-*koji*'s made by 17 standard strains of *Aspergillus* molds and 35 commercial seed *koji*'s

	GA	AA	AG	BG	RSD	Acid	CA
GA	1.00						

AA	0.70	1.00					
	***	***					
AG	0.91	0.73	1.00				

BG	-0.12	-0.54	-0.15	1.00			
	*	***	**	***			
RSD	-0.29	-0.59	-0.44	0.60	1.00		
		***	**	***	***		
Acid	-0.25	-0.67	-0.39	0.70	0.72	1.00	
		***	**	***	***	***	
CA	-0.22	-0.64	-0.34	0.86	0.68	0.83	1.00

AC: *koji* acidity, GA: Glucoamylase, AA: α -Amylase, AG: α -Glucosidase, BG: β -Glucosidase, RSD: Raw starch digestion, CAP: Activity of caffeic acid production

- * Significantly different by enzymatic properties. ($p < 0.05$)
- ** Significantly different by enzymatic properties. ($p < 0.01$)
- *** Significantly different by enzymatic properties. ($p < 0.001$)

第 6 項 製麴期間中の CAP と酵素活性のモニタリング

相関マトリックスを通しての統計分析が CAP と BG ($r=0.85$) の間で最も高い相関係数, それから CAP と AC の間の係数を明らかにした。そこで, CAP と他の酵素特性の関係を調査するために, Table 5 - 2 に示されるように, 長期間 (72 時間) の製麴過程で酵素活性を再度チェックした。酸生成は 16-24 時間の培養後期で見いだされたのに対して, CAP と BG 活性は 28 - 32 時間とやや後の段階でほぼ同時に増加し始め, 両活性はいくつかの第二の代謝として引き起こされたことが示唆された。

第 4 節 小括

米麴のカフェ酸生成活性 (CAP) と他の酵素の性質を調べるために, *Aspergillus* 属の標準菌株 17 種類と市販種麴 35 種類を用いて, 蒸し米から 52 種類の麴を調製した。結論は次のように得られた。

(1) 米麴抽出物のうち, 標準菌株や市販種麴の黄麴菌の CAP は低活性を示したのに対し, 白麴菌と黒麴菌の CAP は黄麴菌のものよりはるかに高かった。したがって, *A.kawachii* と市販の白麴菌により製麴された酸生成するタイプは特定の誘導培養することなく CAP の高活性を有していた。

(2) 麴のタイプの特徴として, 52 種類の麴は 5 グループ [黄麴菌 (20), 泡盛用黒麴菌 (10), 焼酎用黒麴菌 (6), 白麴菌 (15), *A.niger* の黒カビ (1)] に分けられ, それぞれの酵素特性は偏差値 (T-スコア) を基にレーダーチャートを示した。酸生成するタイプの中で白麴菌の特性は最も大きいチャートの円で表現でき, 黄麴菌と反対であった。これは白麴菌が他の酸生成するタイプの麴菌よりも CAP, BG と RSD の活性が高く黄麴菌と逆の特性を示すことを意味する。黒麴菌の中で焼酎用麴菌の殆どの酵素特性と酸度は泡盛用麴菌よりも高い値を示した。

(3) 52 種類の米麴抽出液の 7 つの酵素特性 (CAP, GA, AA, AG, BG, RSD と AC9) について統計的分析を行った。CAP について, CAP と BG の間に高い正の相関 ($r=0.86$) が相関行列により得られた。CAP と BG 活性はいずれも 28 から 32 時間の培養後期にほぼ同時に増加することが明らかとなった。

総括

ポリフェノール類は各種植物に含まれ、抗酸化作用や各種疾病の抑制効果があることが発表されるなど、近年注目されている。芋焼酎粕にも原料のサツマイモに由来するポリフェノールが含まれているが、固液分離が難しいために飲食品への利活用が遅れている。固液分離の問題を解決するために、芋焼酎粕に繊維分解酵素と米麴を添加して再発酵する独自の製造方法により、新規芋焼酎粕飲料（新飲料）を製造する技術を開発した。芋焼酎粕はアルコール発酵を終えているため糖分を含まない。また、特有の発酵臭があるため、そのままでは飲みにくい。得られた飲料はクエン酸を生成する性質を持つ麴菌で製麴した米麴を添加しているため、酸味と甘味が適度に含まれる飲料であり、芋焼酎粕特有の発酵臭が軽減されている。

この製法で得られた新飲料には、有機酸、アミノ酸がそれぞれ約 1% 含まれていた。ビタミン類ではパントテン酸は新飲料 100 kcal 当たり 0.86 mg 含まれており、健康増進法第 31 条第 1 項に基づく栄養表示基準制度の豊富に含む旨の表示が可能になる基準値（0.55 mg）を超える含有量であった。また、ナイアシン、ビオチンおよびビタミン B₂ および葉酸に関しても、強化された旨の表示が可能な基準値以上含まれていた。厚生労働省所管の栄養機能食品の規格基準では、パントテン酸、ナイアシン、ビオチン、ビタミン B₂ は皮膚や粘膜の健康維持を助ける栄養素、葉酸は赤血球の形成を助ける栄養素であるとされている。以上のことから、新飲料には各種ビタミン類が含まれ、健康維持機能に

役立つものと考えられる。

新飲料にはポリフェノール化合物が芋焼酎の原料であるサツマイモと同程度（約 0.1%）含まれていた。また、この新飲料のポリフェノールからの発酵産物として抗酸化能やがん細胞の抗増殖作用、高血圧予防・改善効果などの作用が報告されている成分であるカフェ酸も検知された。その他では、血圧降下作用などが報告されている GABA は 13 mg/100 mL 含まれていた。一日の目安摂取量は 20 mg とされているが、新飲料を 100 mL/日摂取することで一日必要量の半分を満たすと考えられた。食物繊維は 0.3% 含まれ、様々な成分による相乗効果が期待される栄養豊富な飲料であることが示された。

動物試験において、新飲料はその嗜好性から飼料摂食量が増えたが、体重増や臓器重量に差は見られず、代謝が高まることが考えられた。また、血中の中性脂質と総コレステロール濃度に対して強い低減効果が顕著に認められ、特に、悪玉である LDL コレステロール濃度は低下させ、善玉の HDL コレステロール濃度には影響を与えないなど脂質代謝を改善することが確認された。

新飲料は食物繊維を少量しか含まないにもかかわらず、血清脂質改善作用などの生理的機能を顕著に示し、また、高血糖抑制効果などの生理作用や食品機能を明らかにできたことから、生活習慣病やメタボリックシンドロームなどの予防や改善効果をもたらす優れた飲料であると考えられた。コレステロール低下作用が認められた例として、食物繊維やポリフェノールなどがあり、新飲料においても各種成分との相互作用が考えられた。

また、新飲料の生体防御能亢進効果を検討した。新飲料を摂取することにより、サルコーマを接種したマウスの腫瘍重量増加は抑制されており、ガン細胞増殖抑制効果が認められた。このときの脾臓のNK活性はコントロールに比べ非常に強く、新飲料摂取により生体防御能が高く維持されていた。NK細胞の活性を高める成分として、硫酸化多糖類や乳酸菌由来リン酸化多糖類、オリゴグルコサミン、キチン誘導体、マイタケ抽出多糖類、ニゲロオリゴ糖、カシス由来多糖類などの報告があり、腫瘍細胞の増殖抑制や腫瘍消失などが確認されているが、これらはいずれも多糖類によるものである。したがって、他の発酵物と同様に新飲料においても多糖類の影響によりNK活性亢進能が強くなることでガン組織重量の減少が考えられる。また、芋焼酎粕の分画物を用いた報告に腫瘍重量の最も小さかった画分が最も高いNK細胞の活性亢進能が見られ、ポリフェノール含有量、抗酸化能が高かった2つの画分においてはNK細胞の活性亢進は認められなかったものの腫瘍形成が抑制されていたことから、ポリフェノールによる抗酸化能がサルコーマ180への直接作用したと推察されている。新飲料においても芋焼酎粕に米麴を添加する処理により、ポリフェノール含有量が134 mg/100 mLと米麴添加前に比べて約1.7倍増加することやラジカル消去能(IC₅₀)も高い値を示しており、ポリフェノールの抗酸化作用によっても腫瘍の増殖が抑制されたと考えられた。

一方、本研究では *in vitro* にて新飲料のガン細胞増殖抑制能の試験を行った。ヒト急性骨髄性白血病ガン細胞(HL60)とマウス正常皮膚由来株細胞(JB6)に新飲料を添加して培養したところ、HL60細胞の増殖を強

く抑制したが、正常細胞の増殖にはあまり影響しないことがわかった。食品によるガン細胞への作用に関する報告として、緑黄色野菜や緑茶、大豆、黒米、サツマイモなどがあり、これらはいずれもその含有成分であるカテキン類、フィチン、アントシアニンなどの抗酸化物質の作用に起因することが考えられた。今回の試験においても新飲料の添加量が増えるに従い、抗酸化作用が強くなり、ガン細胞増殖抑制能が認められたのは抗酸化作用が高まることに起因することが考えられる。また、マウス正常皮膚由来細胞(JB6)による細胞ガン化抑制試験により、新飲料はガン化誘導をかなり強く抑制することが認められた。HL60細胞の増殖抑制作用はポリフェノールによるラジカル消去活性の強さとの関係が考えられた。

これまでの研究において、芋焼酎粕への米麴の添加処理はポリフェノール量やラジカル消去能(IC₅₀)の増加することや芋焼酎粕中のポリフェノール類からカフェ酸が生成する知見を得ている。抗酸化能やガン細胞の抗増殖およびアポトーシス効果が認められ、高血圧予防・改善等の効果など様々な機能性素材として活用が期待されるカフェ酸に注目し、各種麴菌（標準菌株 17 株，市販種麴 35 種類）により製麴した米麴の酵素抽出液によりクロロゲン酸を基質としたカフェ酸生成活性を比較した。その結果、白麴菌、黒麴菌はカフェ酸生成活性が強いこと、その特性である麴酸度および β-グルコシダーゼ活性、生デンプン分解率と相関性が高く、β-グルコシダーゼ活性と最も相関性が高いことを確認した。

以上の結果から、新飲料には抗酸化物質ポリフェノール類など機能

性成分が豊富に含まれ、実際に脂質代謝改善効果や抗腫瘍活性など様々な生理作用を示すことを動物試験で明らかにすることができた。また、新飲料の機能性は、焼酎麴の添加を行う製造法により強化が図られていることも示唆された。

謝辞

本稿を終えるにあたり，終始懇篤なご指導，ご意見，ご高閲を賜りました鹿児島大学農学部生物資源化学科 菅沼俊彦教授，藤井信名誉教授，侯徳興教授，同学部附属焼酎・発酵学教育研究センター高峯和則准教授，鹿児島純心女子大学 中野隆之教授，鹿児島女子短期大学 吉元誠教授，九州沖縄農業研究センター 倉田理恵主任研究員に深甚なる謝意を表します。

本研究に対し，深いご理解とご支援を賜りました(株)MCA ホールディングス代表取締役社長 本坊清和様，(株)VinEx コーポレーション代表取締役社長 本坊正文様，同社元代表取締役専務 故米玉利隆様，田苑酒造(株)元特別顧問 塚田定清様に謹んでお礼申し上げます。

また，本研究を遂行するにあたり，ご協力いただいた鹿児島大学農学部 神山恵理氏，元田苑酒造(株)吉留朋尚氏，大迫美穂氏に心より感謝いたします。

最後に，(株)VinEx コーポレーションならびに田苑酒造(株)の関係者の皆様に心よりお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 鹿児島県：鹿児島県工業技術センター編，食品工業生産，リサイクル高度化システム地域技術開発研究成果報告書（昭和60年度～平成元年度），108 - 111(1991)
- 2) 財団法人日本醸造協会：醸造物の成分， p.139 - 141(1999)
- 3) 日本銀行鹿児島支店：焼酎ブームのその先にあるものは!？，(2008)
- 4) 熊本国税局：しょうちゅう調査書（平成18酒造年度）， p.24 - 29
- 5) 石川信夫：日本醸造協会誌，**95**, (7), 520 - 525(2000)
- 6) 石橋源次, 渡悦美：日本家政学会誌，**56**, (2), 87 - 94(2005)
- 7) 米元俊一，中野智木，竹迫寿一，侯徳興，藤井信：日本醸造協会誌，**105**, (12), 793 - 803(2010)
- 8) 森村茂，河野邦晃，韓蓮淑，関孝弘，重松亨，木田建次：生物工学会誌，**82**, (12), 573 - 578(2004)
- 9) Ye X.J., Morimura S., Han S.L., and Shigematsu T., and Kida K. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, (3), 551 - 556(2004)
- 10) 関孝弘，森村茂，重松亨，前田浩，木田建次：日本醸造協会誌，**98**, (12), 869 - 874(2003)
- 11) 望月聡，宮本安紀子，萩原美和子，竹島直樹，大森俊郎：日本醸造協会誌，**96**, (8), 559 - 563(2001)
- 12) 望月聡，宮本安紀子，大神彩子，甲斐千晴，大島孝平，田中寿一，外圍英樹，竹島直樹，大森俊郎：日本醸造協会誌，**100**, (2), 135 - 140(2005)

- 13) 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 : 琉球大学農学部学術報告, **49**, 190 - 197(2002)
- 14) 北本勝ひこ編 : 醸造物の機能性 (財団法人日本醸造協会, 東京) ,
p.1 - 92(2007)
- 15) 厚生労働省 HP : 平成 22 年簡易生命表の概況
- 16) 厚生労働省 HP : 平成 22 年(2010)人口動態統計の年間推計
- 17) Yoshimoto M., Kurata-Azuma R., Fujii M., Hou D.X., Ikeda K.,
Yoshidome T., and Osako M. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, (12),
2477 - 2483(2004)
- 18) Yoshimoto M., Kurata-Azuma R., Fujii M., Hou D.X., Ikeda K.,
Yoshidome T., and Osako M. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, (9),
1777 - 1781(2005)
- 19) 吉元 誠 : 食品と技術, **8**, 10 - 18(2008)
- 20) 鹿児島県 : 鹿児島県工業技術センター編, 食品工業生産, リサイ
クル高度化システム技術開発研究成果報告書 (昭和 60 年度~平成
元年度) , p.92 - 107(1991)
- 21) 注解編集委員会編 : 第四回改正国税庁所定分析法注解 (財団法人
日本醸造学会, 東京) , 211 - 228
- 22) Sugino T., Aoyagi S., SHIRAI T., Kajimoto Y., and Kajimoto O. :
J. Clin. Biochem. Nutr., **41**, (11), 224 - 230(2007)
- 23) 宮村充彦, 森山洋憲, 邑田修三, 横田淳子, 吉岡三郎, 宅間大祐,
濱田篤秀, 西岡 豊 : *The Pharmaceutical Society of Japan*, **128**, (7),
1037 - 1044(2008)

- 24) 厚生労働省：「日本人の食事摂取基準」(2010年版)
- 25) 文部科学省：五訂増補日本食品標準成分表
- 26) 塚田定清，池田浩二，吉元 誠，倉田理恵，侯 徳興，藤井 信：
特許第 4336746 号
- 27) 梶本修身，平田 洋，中川聡史，梶本佳孝，早川和仁，木村雅行：
日本食品科学工学会誌，**51**, (2), 79 - 86(2004)
- 28) 奥野成倫，田原秀隆，浮田和貴，森山和之，平井伸博，吉元 誠：
日本食品科学工学会誌，**53**, (4), 207-213(2006)
- 29) 藤井信，侯 徳興，米元俊一，中野隆之：特開 2011 - 93815(2011)
- 30) 章 超，倉田理恵，奥野博紀，高瀬良和，吉元 誠：日本食品
科学工学会誌，**55**, (6), 287 - 292(2008)
- 31) 芦田優子，家藤義幸，川戸章嗣，杉並孝二，今安 聰：日本農芸
化学会誌，**71**, (2), 19 - 25(1997)
- 32) 持田和美，栗林 喬，斉藤憲司，菅原正義：日本食品科学工学会
誌，**47**, (2), 78 - 84(2000)
- 33) 海老原清：日本栄養・食糧学会誌，**61**, (1), 3 - 9(2008)
- 34) 宮村充彦，森山洋憲，邑田修三，横田淳子，吉岡三郎，宅間大祐，
濱田篤秀，西岡 豊：*The Pharmaceutical Society of Japan*, **128**, (7),
1037 - 1044(2008)
- 35) 米元俊一，森山正宗，竹迫寿一，安藤浩毅，侯 徳興，藤井 信：
日本醸造協会誌，**105**, (7), 477 - 487(2010)
- 36) 大森俊郎：日本醸造協会誌，**99**, (6), 39 - 403(2004)
- 37) 廣瀬 茂，田上 修，家藤治幸，松本陽子，上岡龍一：化学工学

- 論文集, **28**, (5), 621 - 625(2002)
- 38) 山本(前田)万里: 日本食品科学工学会誌, **49**, (10), 631 - 638(2002)
- 39) 朴 今花, 池原ゆかり, 佐々木努, 宮城 健, 東みゆき: 日本栄養・食糧学会誌, **58**, (5), 273 - 280(2005)
- 40) 小島弘幸, 青柳光敏, 姉帯正樹, 矢野昭起: 北海道立衛生研究所報告, **46**, 1 - 7(1996)
- 41) 奥田拓道: 日本醸造協会誌, **98**, (11), 750-755(2003)
- 42) 上野知子, 藤井 暁, 長野正信, 侯 徳興, 藤井 信: 日本食品科学工学会誌, **57**, (10), 408 - 413(2010)
- 43) プロメガ株式会社テクニカルサービス部 CytoTox96®
Non-Radioactive Cytotoxicity
- 44) 池見 明, 藤井 信: 特許 3984402 号
- 45) 名雲照一, 藤原三知雄, 飯島紀子: 特公昭 59 - 19561
- 46) 牧野聖也, 池上秀二, 指原紀宏: 特開 2005 - 194259
- 47) 梶本修身, 坂本廣司, 三輪 端, 又平芳春: 特開 2001 - 3157
- 48) Nishimura K., Nishimura K., Nishi N., Nurata F., Tone Y., Tokura S., and Azuma I. : *Vaccine*, **3**, (5), 379 - 384(1985)
- 49) Kodama N., Komuta K., Sakai N., and Nanma H. : *Biol Pharm Bull*, **25**, (12), 1647 - 1650(2002)
- 50) Murosaki S., Muroyama K., Yamamoto Y., Liu T., and Yoshikai Y. : *Int Immunopharmacol*, **2**, (1), 151 - 159(2002)
- 51) Tanaka R., Yamamoto R., Yanai T., Konno T., and Okubo T. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, (11), 2042 - 2050(2005)

- 52) 田代まゆみ, 中野隆之, 藤井 信 : 鹿児島純心女子大学看護栄養学部紀要, **10**, 1 - 12(2006)
- 53) 土谷紀美, 松田豊和, 西村賢了, 岩原正宜 : 日本醸造協会誌, **98**, (2), 132 - 138(2003)
- 54) 高野俊明 : 日本醸造協会誌, **85**, (7), 438 - 444(1990)
- 55) 宮崎 剛, 田中重則, 高橋昭治, 奥山 隆 : 特公昭 61 - 8083
- 56) 西山和夫, 亀田諭, 濱松浩己 : 日本農芸化学会誌, **70**, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 9(1996)
- 57) 植物色素研究会編 : 植物色素研究法, (大阪公立大学共同出版会, 大阪府), 247 - 251(2004)
- 58) Carmichael J., Degraff W.G., Grazdar A.F., Minna J.D., and Mitchell J. B. : *Cancer Research*, **47**, 936-942(1987)
- 59) 西山和夫 : 宮崎大学学術情報リポジトリ, 研究成果報告書, 93 - 97 (2003)
- 60) Rabah O.I., Hou D.X., Komine S., and Fujii M. : *J. Agric. Food Chem.*, **52**, (23), 7152 - 7157(2004)
- 61) 津金昌一郎 : 環境変異原研究, **26**, 233 - 239(2004)
- 62) Miyazawa M., Oshima T., Tokura M. and Hisama M. : *J. Oleo. Scie.*, **52**, 471 - 481(2003)
- 63) 西川研次郎監修 食品機能性の科学編集委員会 : 食品機能性の科学(産業技術サービスセンター, 東京), p.340 - 341(2008)
- 64) Yen, W.J., Wang, B.S., Chang, L.W., and Duh, P.D. : *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2658 - 2663(2005)

- 65) Kampa, M., Alexaki, V.I., Notas, G., Nifli, A.P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A., and Castanas, E. : *Brest Cancer Res.*, **6**, R63 - R74 (2004).
- 66) 鈴木 淳, 落合龍史, 時光一郎 : 特許第 4119629(2010)
- 67) 河野邦晃, 森村 茂, 上田華奈子, 黒木達哉, 太田広人, 木田建次 : 日本醸造協会誌, **105**, 421 - 425(2010)
- 68) 鶴木隆文, 瀬戸口眞治, 亀澤浩幸, 下野かおり, 前野一朗, 西場洋一, 須田邦夫 : 鹿児島県工業技術センター 研究報告, NO.19, 15 - 20(2005)
- 69) 米元俊一, 中野智木, 竹迫寿一, 中冶十成, 高峯和則, 青木孝良, 藤井 信 : 日本醸造協会誌, **104**, (12), 969 - 977(2009).
- 70) 河野邦晃, 森村 茂, 藤原誉司, 奥野博紀, 高瀬良和, 木田建次 : 日本醸造協会誌, **103**, 301 - 307(2008)
- 71) 岡村成通, 渡辺正澄 : 日本農芸化学会誌, **55**, (11), 1099 - 1107(1981)
- 72) Okamura, S., and Watanabe, M. : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1839 - 1848 (1982).
- 73) Adachi, O., Ano, Y., Akabe, Y., Shinagawa, E., and Matsushita, K. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 145 - 151(2008).
- 74) Asther, M., Alvarado, M. I. E., Haon, M., Navarro, D., Asther, M., Lesage-Meessen, L., and Record E. : *J. Biotechnol.*, **115**, 47 - 56 (2005)
- 75) 注解編集員会編 : 第四回改正国税庁所定分析法注解(財団法人日本

- 醸造協会, 東京), 211 - 228(1993)
- 76) Nelson, N. : *J.Biol.Chem.*, **153**, 375 - 380(1944)
- 77) 井川幸雄, 小原 侃 : 臨床病理, **13**, 197 - 201(1965)
- 78) 奈良原英樹, 真野史義, 岩田全且, 木村延二郎 : 日本醤油研究所
雑誌, **13**, (2), 49 - 53(1987)
- 79) 太田剛雄, 下條寛和, 橋本憲治, 近藤洋大, 佐無田隆, 大場俊輝 :
日本醸造協会誌, **86**, (7), 536 - 539(1991)
- 80) Koseki, T., Furuse, S., Iwano, K., and Matsuzawa, H. : *Biosci.*
Biotechnol. Biochem., **62**, 2032 - 2034(1998).
- 81) 秦 洋二, 川戸章嗣, 今安 聰, 田村學造, 五味勝也, 北本勝ひ
こ, 熊谷知栄子 : 日本生物工学会大会講演要旨集平成4年度, 111
(1992)
- 82) Iwata, H., Suzuki, T., Takahashi, K., and Aramaki, I. : *J. Biosci.*
Bioeng., **93**, 296 - 02(2002) .
- 83) Nakai, H., Ito, T., Tanizawa, S., Matsubara, K., Yamamoto, T.,
Okuyama, M., Mori, H., Chiba, S., Sano, Y., and Kimura, A. : *Journal*
of Applied Glycoscience, **53**, 137 - 142(2006) .
- 84) Suganuma, T., Fujita, K., and Kitahara, K. : *J. Biosci. Bioeng.*, **104**,
353 - 362(2007)
- 85) 菅沼俊彦, 西山重幸, 北原兼文, 永浜伴紀 : 鹿大農学術報告, **45**,
29 - 35(1995)