

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 米元俊一

題 目 サツマイモ焼酎粕の生理機能とその向上に関する研究  
(Functions of sweet-potato *shochu* distillery by-products and their reinforcement)

近年、焼酎の需要増に伴ってその副産物・焼酎粕は増大し、その有効な利用方法の開発が重要である。我々はサツマイモ焼酎粕(SDB)の液部(SDB-S)を生理機能性に富む食品・飲料の原料として利用開発するための基礎的研究を行った。

その結果、焼酎粕液部(SDB-S)に抗酸化能、抗腫瘍能、ビフィズス菌増殖能、アレルギー抑制効果、抗肥満効果、サイトカイン誘導効果等を確認した。先ず SDB-S を HP20 カラムに通し、素通画分(H-1)と吸着画分(H-2)を得た。次に、H-1画分を Sephadex G-25 ゲルろ過し、多糖類画分(S-1)とオリゴ糖画分(S-2)を得た。次に、S-2 を BioGel P-2 ゲルカラムに供し、オリゴ糖を含む B-1 と B-2、および糖を含まぬ B-3 を得た。

抗酸化能はポリフェノールを含む H-2 に認められた。抗腫瘍効果は S-1 に認められ、グルコースやウロン酸を多く含む高分子多糖であり、セルラーゼで低分子化される  $\beta$ -1,4 グルコシド結合を含むグルカンと考えられ、分子量は約 20 万以上と 9600 であった。アレルギー抑制活性はオリゴ糖画分(B-1)に強く、また B-2 に弱く認められた。他方、糖を含まぬ B-3 にも認められた。ビフィズス菌増殖活性もオリゴ糖 B-1 に強く、また B-2 に弱く認められ、糖を含まぬ B-3 にも認められるなど、アレルギー抑制能とビフィズス菌増殖能の成分は同一であると考えられる。

SDB を水熱反応処理し、機能性の増加を検討した。飲料や食材利用のための反応条件は 160℃~170℃処理が適当であった。水熱処理で可溶性タンパク質やポリフェノール含量は増加し、オリゴ糖が約 3 倍増加し、構成糖では Xylose が増加し、多糖類は低分子化した。水熱処理により生じた着色成分、臭い成分は吸着樹脂によりほぼ除去でき、機能性では、ビフィズス菌増殖能が 2.5 倍、抗酸化能が 2 倍増加した。マウスに対する抗肥満効果を確認し、サイトカイン解析により抗炎症能等の生理的機能向上が示唆された。次に、SDB-S を乳酸菌発酵すると、焼酎原料のサツマイモによって、特徴ある乳酸菌飲料を開発した。SDB-S は発酵時の添加水の約 50~75%まで代替可能であった。これら乳酸菌飲料の官能評価を行い、味、香りにおいて良い評価を得、高い市場性が示唆された。これら乳酸菌飲料には強いアレルギー抑制効果が認められた。ヒト介在試験において腸内菌叢の改善(乳酸菌、ビフィズス菌の増殖と有害腸内細菌類の減少)、便秘症の改善が確認され、プレバイオティクスとして利用可であると認められた。

以上のように、サツマイモ焼酎粕(SDB-S)には抗酸化能、抗腫瘍能、ビフィズス菌増殖能、アレルギー抑制効果、抗肥満効果、サイトカイン誘導効果等を示すことを明らかにした。また SDB-S を 160℃~170℃処理した水熱反応により、健康維持機能の亢進が認められ、水熱処理の有用性を明らかにした。また、SDB-S を乳酸菌発酵飲料調製に添加し、焼酎粕の食材としての有用性を検討し、高付加価値的利用の可能性を明らかにした。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Toshikazu Yonemoto
題 目	Functions of sweet-potato <i>shochu</i> distillery by-products and their reinforcement. (サツマイモ焼酎粕の生理機能とその向上に関する研究)

Along with the recent increase in the demand for *shochu* and the amount of its by-products generated, development of the effective use of *shochu* by-products is needed. We conducted basic research for application/development of the liquid component (supernatant) of sweet-potato *shochu* distillery by-products (SDB-S) as ingredients for foods/beverages with abundant physiological functions.

As a result, antioxidant potential, antitumor ability, bifidobacteria-proliferating ability, allergy-suppressing effect, antiobesity effect, cytokine-inducing effect, and other effects were detected in SDB-S. We first passed SDB-S through an HP20 column and obtained the flow-through fraction (H-1) and the absorbed fraction (H-2). We then performed Sephadex G-25 gel filtration for the H-1 fraction to obtain the polysaccharide fraction (S-1) and the oligosaccharide fraction (S-2). The S-2 fraction was then passed through a BioGel P-2 gel column, resulting in oligosaccharide-containing fractions of B-1 and B-2, and B-3 with no sugar content.

Antioxidant potential was detected in H-2, which contained polyphenol. Antitumor effect was found in S-1, which was a high-molecular polysaccharide fraction containing a large amount of glucose and uronic acids. Glucans including  $\beta$ -1,4 glucoside bonds obtained by degradation of cellulase represented a large proportion, with molecular weight of approx. 200,000 and 9600 polysaccharide elements. Allergy-suppressing activity was strongly detected in the oligosaccharide fraction (B-1) and weakly in B-2. This activity was also found in B-3 containing no sugar. Bifidobacteria-proliferating activity was also detected strongly in the oligosaccharide B-1 and weakly in B-2, and also found in non-sugar-containing B-3. This indicated that the factors of allergy-suppressing ability and bifidobacteria-proliferating ability were the same.

We conducted hydrothermal synthesis reaction treatment for SDB to examine how the functions could be reinforced. The most appropriate temperature condition for the reaction treatment for use as beverages and foods was found to be between 160 and 170 °C. Hydrothermal treatment raised the content of soluble proteins and polyphenols, and tripled the amount of oligosaccharides. Xylose increased and polysaccharides were molecularly degraded. The browned component and the odor component generated in the hydrothermal treatment could be almost completely removed by resin absorption. In terms of functions, bifidobacteria-proliferating ability increased by 2.5 times, while antioxidant potential was doubled. A mouse-feeding test demonstrated antiobesity effect, and a cytokine analysis indicated improvement in physiological functions such as anti-inflammatory activity. We then lactobacillus-fermented SDB-S to develop unique lactic acid beverages that varied depending on the type of sweet potato used as an ingredient. Up to 50 to 75% of the additive water for fermentation was found to be replaceable with SDB-S. In a sensory evaluation conducted on these lactic acid beverages, their taste and smell received favorable evaluation, indicating their high market potential. These lactic acid beverages showed strong allergy-suppressing effect. A human test reported improved intestinal flora (increase in lactic acid bacteria and bifidobacteria and decrease in harmful intestinal bacteria) and relief from constipation, indicating high potential as prebiotics.

Thus, our study has revealed that sweet-potato *shochu* distillery by-products (SDB-S) have antioxidant potential, antitumor ability, bifidobacteria-proliferating ability, allergy-suppressing effect, antiobesity effect, cytokine-inducing effect and other effects. It was also discovered that hydrothermal treatment of SDB-S at a temperature between 160 and 170 °C would enhance its health-maintenance functions, proving effectiveness of hydrothermal treatment. We have also demonstrated the possibility of using SDB-S as a high value-adding ingredient, by adding it to lactobacillus-fermented beverages.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	米元 俊一
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 藤井 信
	副査 鹿児島大学 准教授 侯 徳興
	副査 佐賀大学 教授 神田康三
	副査 佐賀大学 教授 渡邊啓一
	副査 琉球大学 教授 和田浩二
審査協力者	
題 目	サツマイモ焼酎粕の生理機能とその向上に関する研究 (Functions of sweet-potato <i>Shochu</i> distillery by-products and their reinforcement.)
<p>学位申請者は焼酎会社の研究所の責任者であり、焼酎生産に伴って生じる副産物、焼酎粕の利用の観点から、先ず、焼酎粕が持つ生理機能の解明を行い、それらの機能をさらに向上させる水熱処理法を考案した。さらに得られた高機能焼酎粕の利用法を検討し、ヒトへの介入実験まで行って、ヒトの健康改善に資する商品の開発までを展望した研究成果である。</p> <p>同申請者は、サツマイモ焼酎粕が持つ生理機能としてDPPH法により抗酸化能を測定し、これがサツマイモ原料由来のポリフェノール画分に依ることを明らかにした。次いで、焼酎粕をゲルろ過カラムで分画し、分子量の大きな多糖類画分を経口投与するとマウス移植ガン細胞の増殖抑制が認められ、そしてこの活性画分を与えることで、ガン細胞移植後3日目においてマウス脾臓細胞のインターロイキン-12, インターフェロン-<math>\gamma</math>、TNF-<math>\alpha</math> などの産生能が刺激され、その結果、免疫能の亢進が推定され、そのため</p>	

ガン細胞の増殖が抑制されたと考えられた。マウスに焼酎粕を投与すると、IgE 産生能が抑制されることから、アレルギー抑制能を有することが明らかとなり、この活性はSephadex G-25 およびBioGel P-2 カラムによる解析の結果、分子量が数百のオリゴ糖に由来することが認められた。このアレルギー抑制効果はマウスおよび細胞実験で確認された。さらに焼酎粕中にビフィズス菌を増殖させる機能も確認した。このビフィズス菌増殖因子はゲルろ過法によって分子量が数百のオリゴ糖であることが明らかとなり、アレルギー抑制画分とビフィズス菌増殖因子は同一のオリゴ糖であると結論された。次に焼酎粕への水熱処理を行い、生理機能の変化について検討した。その結果、抗酸化能が水溶画分中で増加し、オリゴ糖も増加し、ビフィズス菌増殖能が著しく増加することが認められた。これは水熱反応で、不溶性繊維などからのオリゴ糖の遊離に起因し、それがビフィズス菌の増殖に資したと考えられた。また焼酎粕をマウスに投与するとコレステロール低下作用も明らかとなった。次に焼酎粕の利用法について検討した。コガネセンガンと紫イモを原料とし、水熱処理した焼酎粕を用いて、乳酸菌発酵飲料とビフィズス菌添加発酵飲料の試作を行った。焼酎粕には特有の発酵臭があり、そのマスキングが必要と考えられるが、発酵飲料とするとその臭いもかなり弱くなり、特に紫イモ焼酎粕を使用するとき綺麗な色とアントシアニンに由来する強い抗酸化能も注目され、特に若い女性の嗜好性が高く、市場性も高いと認められた。焼酎粕を加えた乳酸飲料は多量のポリフェノール、食物繊維の給源としても望ましいと考えられる。またヒトへの介入実験でこの乳酸飲料の摂食で、便秘性の改善効果と排便が滑らかになり、排便後のスッキリ感を感じる例が多かった。また腸内細菌叢の改善、即ち乳酸菌とビフィズス菌の増殖と有害腸内細菌数の減少効果が見られ、またマウスを用いたアレルギー抑制実験でIgE 産生抑制効果は焼酎粕のみの投与に比べより高い低減化効果を示すなど、焼酎粕にプレバイオティクスとしての機能が見られ、これは焼酎粕中のビフィズス菌増殖因子（オリゴ糖）に関連しているものと推測され、以上より焼酎粕を加えて調製する発酵乳製品に高い市場性が期待できる。

これらの成果はサツマイモ焼酎粕が持つ多くの生理機能を明らかにし、これに水熱処理を行うことで抗酸化能、ビフィズス菌増殖能を高め、市場性が強く期待できる発酵乳製品の展開へと焼酎粕の新しい利用法の提案として、極めて価値が高い研究成果と認められる。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	米元俊一
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 藤井 信
	副査 鹿児島大学 准教授 侯 徳興
	副査 佐賀大学 教授 神田康三
	副査 佐賀大学 教授 渡邊啓一
	副査 琉球大学 教授 和田浩二
審査協力者	
実施年月日	平成22年12月28日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。） <span style="float: right;">(口答)・筆答</span>	
<p>主査及び副査は平成22年12月28日の公開審査会において、学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な充分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	米元俊一
<p>[質問1] 焼酎粕の機能性と乳酸菌の機能性はどのように考えられるか。</p> <p>[回答1] 焼酎粕の成分の機能と焼酎粕乳酸菌飲料の機能性効果は明確に区分し難いが、焼酎粕乳酸菌飲料投与時に見られるヒト大腸内でのビフィズス菌の増加効果は焼酎粕が持つ効果と考えられる。マウスでのアレルギー抑制実験で、焼酎粕単独よりも焼酎粕乳酸菌飲料にした方がより強い抑制効果がみられるのは、摂取した乳酸発酵菌により生体のアレルギー抑制能が高まると共に、投与した焼酎粕中のビフィズス菌増殖因子による大腸内でのビフィズス菌増殖能の効果と相まって生体のアレルギー抑制能が高まっていると考えられる。</p> <p>[質問2] サイトカインはF Iしか実験していない。F I～FIVのサイトカインの変化はどうか。F I画分に抗腫瘍能が見られた。その後、サイトカインをみているが、他の画分(F II～FIV)ではサイトカイン誘発を見ていない。F II～FIVも見る必要があるのでは？他の画分を見ていない以上、サイトカイン抑制による抗腫瘍能とはいえない。あまり狭く云わない方がよいのでは。</p> <p>[回答2] NK活性を計測した結果、F Iに抗腫瘍効果の活性が高く、F II～FIVの活性は高くなかった。従って、F II～FIVについてはそれ以上の検討をしなかった。F Iのサイトカインの誘導能をみた結果、腫瘍細胞摂取後の1日～12日目で実験したところ、3日目の誘導能(IFN-<math>\gamma</math>、TNF-<math>\alpha</math>及びIL-1<math>\beta</math>、IL-12)が顕著に増加すること、即ちNK活性を中心とした初期免疫の活性化が示唆された。</p> <p>以上のように、F I画分がNK細胞活性亢進能を有していることが明らかとなり、NK細胞の亢進の結果、腫瘍細胞の増殖が抑制されていることが示唆された。またこれは、腫瘍細胞移植後、3日目という初期に免疫応答初期にNK細胞が腫瘍細胞を攻撃し腫瘍の増殖を抑制すると考えられた。</p> <p>[質問3] Fig6-24のSDB-SとSDB-HR-Sのフラクションの比較は処理が違うのに同じものと考えてよいのか。</p> <p>[回答3] 今回の試験は焼酎粕に水熱処理して不溶性成分から水溶性成分へと多糖成分を低分子化させ、それらの機能を比較したものである。各フラクションが水熱処理によってどうなるかではなく、もともと水不溶性の成分を水溶性のオリゴ糖として増加させる意味合いで行い、その中でF1～F3の糖組成がどうなっているか検討したものである。</p> <p>[質問4] 最初セファデックスG-25で実験した後、あとHP20に切り替えた理由は？</p> <p>[回答4] 一連の実験で時間的な経過がある。初期はHP20でポリフェノール画分などの疎水画分を除去する発想がなかった。その後経験を積み、最初にポリフェノール画分を除去したほうが分画が綺麗に出来るということがわかったので、実験後半では始めにHP20で処理する方法を採用した。その後、セファデックスG25、BioGel P-2で分画を行った。</p> <p>[質問5] コントロールが一番抑制率が高い理由は</p> <p>[回答5] 抑制率で書いているため。</p> <p>[質問6] 抗酸化能のコントロールはなにか</p> <p>[回答6] フラクションに分ける前のサンプル(SDB-S)を使用した。</p>	

[質問 7] 抗酸化能のサンプルの量は何を基準にしたのか

[回答 7] 分画した後の量を基準にして乾固量を示したが、割合はポリフェノールに着目し280nmで表わした量で統一した。

[質問 8] 熱水処理と同時に分解酵素も併用したのか

[回答 8] 水熱処理の前後に酵素処理して機能性を向上させることを検討したが、糖の抽出及び機能性の向上がさほど認められなかったので、発表内容から省略した。

[質問 9] HP-20とSP-207との違いはどこにあるのか

[回答 9] HP-20 は実験室用で、工業的には SP-207 を使用する。SP-207 は比重が重いため再生時に処理しやすい。性質は殆ど同じである。

[質問 10] 餌への添加量の表 (%) の意味は?

[回答 10] 乾燥重量 (%) とした。

[質問 11] 芋焼酎粕と米、麦焼酎との差はどこにあるのか

[回答 11] 範囲がひろすぎるため、イモ焼酎粕に限定した。コメ、麦は残糖が多い。これら焼酎粕に共通に含まれる機能性成分のほかにサツマイモ焼酎粕には、特有の成分としてペクチンを多く含み、これらの分解により生じるウロン酸を含むオリゴ糖による機能性があると考えている。

[質問 12] アレルギー抑制効果について、ポリフェノールの部分は抑制しないのか。

[回答 12] 抗アレルギー物質としてポリフェノール、ペプチド、オリゴ糖などが知られているが、このうちオリゴ糖は大腸内でのビフィズス菌の増加作用により、ヘルパーT 細胞を活性化することによるとされている。今回の実験ではオリゴ糖が大腸内に達して腸内フローラを改善し、腸内細菌や代謝産物の働きかけにより免疫的なバランスを改善し、抗アレルギー効果に繋がっているものと考えている。

[質問 13] 水、EtOH で分画してるが、MeOH などもっと疎水的なものも行うべきでは? 吸着樹脂の吸着成分の溶出でメタノールは使用しなかったのか

[回答 13] 食品としての活用を目的としているためエタノールにした。ただ、再生の時には水酸化ナトリウム溶液を使用している。

[質問 14] 花粉症をアレルギー全体として考えてよいのか?

[回答 14] アレルギー反応には I 型~IV 型まで知られており、I 型の典型的な症状として花粉症がある。今回の実験系では I 型アレルギー反応での検討を行った。文中に I 型アレルギー反応の実験であることを明記した。

[質問 15] 同時に得られるポリフェノールの利用方法は?

[回答 15] 現在、主に糖成分の機能性を検討している。この中で、糖成分を SP207 で分離する中で、あるいはセファデックス G-25 で分画する中で後半部にポリフェノール画分が溶出する。現在のところは抗酸化作用があることを確認している。このポリフェノール成分の機能性については興味のあるところなので、今後改めて研究する予定である。

[質問 16] 乳酸菌への応用はどうか

[回答 16] 乳酸飲料の応用については現在、焼酎粕+乳酸菌の相乗効果でアレルギー抑制効果が増すことを確認しており、乳業メーカーとで商品化を進めている。また同時に乳酸菌飲料のスターターの増殖を促進することがわかってきており、これも現在テスト中である。