

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名

池田浩二

題 目

米麴を添加した芋焼酎粕飲料の機能性に関する研究  
(Study on physiological activity of a rice-*koji* beverage made from distilled residue of sweet potato *shochu*)

近年、植物性食品に含まれるポリフェノール類は抗酸化作用を持ち、活性酸素を消去することで動脈硬化やがんなど各種疾病の抑制効果などがあるとされ注目されている。芋焼酎粕にもポリフェノール類が含まれ、それらは原料のサツマイモに由来している。申請者らは芋焼酎粕を出発原料に、それにある種の繊維分解酵素と米麴を添加する独自の製造方法により、焼酎粕特有の臭気が軽減された芋焼酎粕飲料(新飲料)を製造する技術を開発した。新飲料には、ポリフェノール類や各種アミノ酸、GABAなどが豊富に含まれ、様々な成分による機能性の相乗効果が期待されることが分かった。

そこで、以下の動物実験により新飲料の生理作用を明らかにした。まず新飲料のラットへの食餌試験で、血中の中性脂質や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るなど、脂質代謝改善効果が確認された。また、高血糖抑制効果についても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。これらは、食物繊維やポリフェノールなどの相互作用が考えられた。

次に、サルコーマ 180 を接種したマウスに新飲料を摂取させたところ、腫瘍重量の増加が抑制され、ガン細胞増殖抑制効果が認められた。このとき脾臓の NK 活性が上昇するのが同時に観察され、これらのことから新飲料の摂取で生体防御能が高く維持され、ポリフェノールの抗酸化作用とともに腫瘍の増殖が抑制されたと考えられた。

さらに、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)に対し、新飲料を添加した *in vitro* における試験では、ガン細胞 HL60 の細胞増殖を強く抑制したが、正常細胞 JB6 には殆ど影響を与えなかった。さらに、発ガンプロモーターTPA を用いた JB6 の細胞ガン化誘導試験において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。以上、新飲料に含まれる成分にはガン細胞増殖抑制効果や正常細胞のガン化誘導に対する強い抑制効果があることが示唆された。

一方、新飲料の製造過程で、カフェ酸は米麴添加により芋焼酎粕中のポリフェノール類から生成する知見が得られている。カフェ酸は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成分である。そこで、各種麹菌(標準菌株 17 株、市販種麹 34 種類)を用いて米麴を製麹し、その抽出液についてクロロゲン酸を基質としてカフェ酸生成(CAP)活性を比較した。その結果、黄麹タイプよりクエン酸を生成する黒麹タイプの方が CAP 活性は高いこと、その中でも河内白麹が最も高いことが分かった。また、CAP 活性は製麹初期に活性発現する糖化酵素より、製麹後期に発現する  $\beta$ -グルコシダーゼ活性と最も相関性が高かった。

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。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名

Koji IKEDA

題 目

Study on physiological activity of a rice-*koji* beverage made from distilled residue of sweet potato *shochu*  
(米麴を添加した芋焼酎粕飲料の機能性に関する研究)

Recently, natural compounds of polyphenols found in various plant foodstuffs were of particular interests, since they exhibit anti-oxidant activity and many suppressant effects on various disorders such as arteriosclerosis and cancer cell growth. Polyphenols was found also in distilled residue of sweetpotato *shochu*. In the authors' previous study, the author has developed a method of new beverage; it was made by adding rice-*koji* to the distilled residue of sweetpotato *shochu*. This was done so that its taste and flavor could be improved. Chemical analysis revealed that the new beverage contained rich bioactive components, such as polyphenols, etc., which may be expected to show some synergistic effect of a various bioactive components.

Therefore, we examined physiological activities of the new beverage by the following experiments. First, Animal tests with rats demonstrated a strong suppressant effect of the beverage on neutral lipid and the total cholesterol concentrations in serum. Furthermore, the ingestion of the beverage powder was observed to maintain its HDL ratio but reduce its LDL significantly. The experimental rats showed that the beverage also exerted an inhibitory effect on hyperglycemia.

Next, we examined the effect of the new beverage on the biological defense ability, using mice. Mouse tumor inoculated with sarcoma-180 has been suppressed significantly in size by ingestion of the beverage. The beverage showed a growth suppressive activity against cancer cells. At the same time the activity of natural killer cells in the mouse spleen was observed to rise. Therefore, its ingestion showed an effect to suppress the growth of mouse tumor through anti-oxidative and/or biological defense abilities of bioactive compounds in the beverage, such as polyphenols.

Futhermore, the beverage is observed to strongly suppress the growth of human acute promyelocytic leukemia cells (HL60) *in vitro* test, whereas the beverage not to affect that of mouse normal skin cells (JB6). In addition, the carcinogenesis promotion test of JB6 cells revealed that new beverage, even at low concentrations as a food substance, had substantially suppressed canceration rate.

On the other hand, caffeic acid is known to be a bioactive compound, and the author previously found that the compound could be increased by the addition of rice-*koji* to *shochu* distilled residue during manufacturing a new beverage. Thus, we prepared a variety of rice-*koji*s, using 17 standard strains of *Aspergillus* molds and 35 commercial *koji*-seeds, and investigated their caffeic acid-producing activities (CAP) from chlorogenic acid. As for types of *koji*, acid-producing types showed lower in  $\alpha$ -amylase but higher in CAP than non-acid-producing, yellow types. Among acid-producing types, white types showed the highest CAP. Statistical analysis of correlations between CAP and other enzymatic properties suggested that CAP of *koji* seemed most closely associated with  $\beta$ -glucosidase activity which began to increase at later stages of *koji* culture.

As a result, the findings of animal test have revealed that the new beverage exhibits the physiological activities against hyperglycemia and cancer cell growth, since it contains rich in bioactive compounds such as anti-oxidant substance of polyphenols. Furthermore, the physiological activity of the beverage would be enhanced more by the addition of *shochu-koji* to the distilled residue of sweetpotato *shochu*.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	池田 浩二
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副査 鹿児島大学 准教授 高峯 和則
	副査 琉球 大学 教授 外山 博英
	副査 佐賀 大学 教授 光富 勝
	副査 鹿児島大学 准教授 北原 兼文
審査協力者	
題 目	米麴を添加した芋焼酎粕飲料の機能性に関する研究 (Study on physiological activity of a rice-koji beverage made from distilled residue of sweetpotato <i>shochu</i> )
<p>近年、植物性食品に含まれるポリフェノール類は抗酸化作用を持ち、活性酸素を消去することで動脈硬化やがんなど各種疾病の抑制効果などがあるとされ注目されている。芋焼酎粕にもポリフェノール類が含まれ、それらは原料のサツマイモに由来している。申請者らは芋焼酎粕を出発原料に、それにある種の繊維分解酵素と米麴を添加する独自の製造方法により、焼酎粕特有の臭気が軽減された芋焼酎粕飲料(新飲料)を製造する技術を開発した。新飲料には、ポリフェノール類や各種アミノ酸、GABA などが豊富に含まれ、様々な成分による機能性の相乗効果が期待されることが分かった。</p> <p>そこで、以下の動物実験により新飲料の生理作用を明らかにした。まず新飲料のラットへの食餌試験で、血中の中性脂質や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るなど、脂質代謝改善効果が確認された。また、高血糖抑制効果についても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。これらは、食物繊維やポリフェノールなどの相互作用が考えられた。</p>	

次に、サルコーマ 180 を接種したマウスに新飲料を摂取させたところ、腫瘍重量の増加が抑制され、ガン細胞増殖抑制効果が認められた。このとき脾臓の NK 活性が上昇するのが同時に観察され、これらのことから新飲料の摂取で生体防御能が高く維持され、ポリフェノールの抗酸化作用とともに腫瘍の増殖が抑制されたと考えられた。

さらに、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) に対し、新飲料を添加した *in vitro* における試験では、ガン細胞 HL60 の細胞増殖を強く抑制したが、正常細胞 JB6 には殆ど影響を与えなかった。さらに、発ガンプロモーター TPA を用いた JB6 の細胞ガン化誘導試験において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。以上、新飲料に含まれる成分にはガン細胞増殖抑制効果や正常細胞のガン化誘導に対する強い抑制効果があることが示唆された。

一方、新飲料の製造過程で、カフェ酸は米麴添加により芋焼酎粕中のポリフェノール類から生成する知見が得られている。カフェ酸は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成分である。そこで、各種麴菌(標準菌株 17 株, 市販種麴 34 種類)を用いて米麴を製麴し、その抽出液についてクロロゲン酸を基質としてカフェ酸生成 (CAP) 活性を比較した。その結果、黄麴タイプよりクエン酸を生成する黒麴タイプの方が CAP 活性は高いこと、その中でも河内白麴が最も高いことが分かった。また、CAP 活性は製麴初期に活性発現する糖化酵素より、製麴後期に発現する  $\beta$ -グルコシダーゼ活性と最も相関性が高かった。

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、焼酎粕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。これらの成果は、芋焼酎粕から機能性食品に変換するという新しい食品加工法を提示すると同時に、健康保健飲料の市場を新たに開拓するものであり、よって本論文は、学位論文として十分な価値あるものと判定した。

## 最終試験結果の要旨

学位申請者 氏 名	池田 浩二
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副査 鹿児島大学 准教授 高峯 和則
	副査 琉球 大学 教授 外山 博英
	副査 佐賀 大学 教授 光富 勝
	副査 鹿児島大学 准教授 北原 兼文
審査協力者	
実施年月日	平成 24 年 8 月 9 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>主査および副査4名は、平成24年8月9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もとめ、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十分の学力並びに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者	
氏 名	池田 浩二

【質問】焼酎粕から新飲料を製造するのに麴を再使用した意義は？

【回答】固液分離が難しい芋焼酎粕にセルラーゼ系酵素を添加し圧搾しても、固形分は十分に分離されない。芋焼酎粕に米麴を添加することで、米麴の固形分がろ過助剤の役目を果たし、酵素反応液を圧搾することができるようになった。また、米麴を添加することにより、香味改善される意義も大きいと感じている。

【質問】麴を再使用（添加）することで風味改善が行われるのはどうしてか？

【回答】この芋焼酎粕に米麴を添加することで、米麴の糖質に由来する甘味と麴菌が生成したクエン酸が付与されて酸味と甘味のバランスが整い、風味改善されて飲みやすい飲料にすることができる。また、芋焼酎粕には特有の発酵臭があるが、米麴を添加した工程により特有の臭いも軽減される。米麴の固形分に吸着される形で除去されるものと推察している。

【質問】固液分離性の向上に市販酵素剤を種々用いた試験を行っているが、市販酵素のどのような活性が有効と考えておこなったのか？結果として実用的価値は認められたのか？

【回答】市販植物組織崩壊酵素34種類を用いてまず実験室規模で試験した。ろ液量が多く、固形分の減量効果が大きいもので選択すると、セルラーゼが11種類、マンナーゼとペクチナーゼが1種類得られたことから、セルラーゼ活性が最も有効であったと考えている。最終的にはセルラーゼを選抜し、実用規模においても、液部回収量は芋焼酎粕相当量まで増加し、逆に圧搾固形分は添加した米麴の約1/2に減少して、固液分離性の向上が十分認められた。

【質問】新飲料のポリフェノール含量が、原料の焼酎粕の1.7倍も増加しているがこの原因は？

【回答】米麴を添加した効果が考えられる。芋焼酎粕のほか、麦焼酎粕と米焼酎粕に添加した試験においても、ポリフェノール含量は焼酎粕の原料に関係なく、麴菌で処理することにより増加することを確認している。従って、米麴に由来するチロシンなどアミノ酸やペプチドのモノフェノールが反応したと推察している。

【質問】新飲料は種々の生理効果を示すが、新飲料に含まれるどのような成分が実際に効果を発揮していると考えているか？

【回答】ポリフェノールなどの抗酸化成分の影響がまず考えられる。また、多糖類や

ペプチドの作用の可能性もあるのではないかと考えている。

【質問】クロロゲン酸基質からのカフェ酸生成活性として本酵素を追跡しているが、本活性の正体が本当にクロロゲン酸からカフェ酸生成するのが主体なのか？本酵素の基質特異性などをきちんと調べているのか？

【回答】芋焼酎粕に含まれる複数のポリフェノールに麴酵素抽出液を作用させることでカフェ酸を生成できることを確認している。カフェ酸誘導体であれば、酵素活性の評価は可能であると考え、カフェ酸誘導体の中でカフェ論とキナ酸がエステル結合した化合物であるクロロゲン酸を基質として使用した。ただ、様々なポリフェノール化合物に対して本酵素の基質特異性を調査したわけではない。

【質問】HDLの方は減少せずにLDLのみ低下しているのは興味深いですが、このような現象（効果）が起きるメカニズムとしてどのようなことが考えられるか。

【回答】肝臓においてコレステロールが合成されLDLの出発物質となるが、例えばコレステロール合成系が阻害されることによって、血中へのコレステロール供給が減少する一方で、血中のLDLコレステロールが肝臓に運ばれて胆汁酸へと分解していくことで、血中のLDLコレステロールが低下することが考えられる。

【質問】これらの機能性は、焼酎粕自体にもあると思われるが、麴添加による新飲料製造でどのように強化されたのか？

【回答】麴を添加する製造方法により、新飲料の成分はクエン酸が約2倍に、アミノ酸は約10倍になっている。また、ポリフェノール含量も約1.7倍になり、抗酸化能も高くなっていることが確認された。その他にも、GABAやビタミン類も高い含有量含まれているが、これらはいずれも米麴を添加することで強化されたと考えられる。

【質問】新飲料を摂取させた方が、体重増加がありしかも中性脂肪の減少など脂質代謝改善効果が認められたのは興味深いですが、今後胃から分泌される食欲ホルモンを指標として食欲増進効果を調べるのも今後興味深い試験となるのでは。

【回答】いずれの動物試験においても摂食量の増加や体重増加が認められているので、今後食欲がなく食事をとれない人に新飲料を投与することで食欲増進を促す可能性を確かめるため、食欲ホルモンを指標とする試験を行うことについては私自身も興味深く感じる。