

石川県の伝統発酵食品および麴甘酒の機能性探索

辻篤史* 道嶋俊英* 小柳喬**

石川県では、飯寿し（かぶら寿し、大根寿し）、なれ寿し、魚介の糠漬け等の多種多様な伝統発酵食品が製造されている。また近年では、発酵食品メーカーによる麴甘酒の製造が盛んになっている。本研究では、これら発酵食品の新たな機能性を見出すことを目的に、ORAC法による抗酸化性、抗変異原性、ビフィズス菌増殖促進作用、D-アミノ酸量について評価を行った。その結果、魚介糠漬け、なれ寿しは高い抗酸化性を有していた。また、飯寿し、甘酒にはビフィズス菌増殖促進作用が認められた。さらに、なれ寿しにはD-アミノ酸が豊富に含まれていることが明らかとなった。得られた知見は今後、伝統発酵食品のブランディングや新規機能性発酵食品の開発への利用が期待される。

キーワード：発酵食品、甘酒、抗酸化性、抗変異原性、ビフィズス菌増殖促進、D-アミノ酸

Investigation for Food Functionality of Traditional Fermented Food and Amazake

Atsushi TSUJI, Toshihide MICHIHATA and Takashi KOYANAGI

A wide variety of traditional fermented foods such as *izushi* (*kaburazushi* and *daikonzushi*), *narezushi*, seafood *nukazuke*, etc. are manufactured in Ishikawa Prefecture. Also, in recent years, the production of *amazake* (a sweet drink made from fermented rice) has become popular among fermented food manufactures. In this research, in order to find new functionalities of these fermented foods, evaluation was performed for antioxidant activity (using the ORAC method), antimutagenicity, the growth-promoting effect on bifidobacteria and D-amino acid amount. Our results showed that seafood *nukazuke* and *narezushi* have high antioxidant activities. In addition, growth-promoting effects on bifidobacterium were observed in *izushi* and *amazake*. Furthermore, it was revealed that some D-amino acids were abundantly contained in *narezushi*. These findings are expected to be used in the branding of traditional fermented foods and the development of new functional fermented foods.

Keywords : fermented food, *amazake*, antioxidant activity, antimutagenicity, bifidobacteria growth-promoting effect, D-amino acid

1. 緒 言

石川県は、日本海の多様な海産資源に恵まれるとともに、日本有数の米どころでもあり、歴史的にこれらの豊富な食資源を使用した発酵食文化が発展してきた。特に、能登地方で製造される魚醤油いしる、なれ寿し、主に加賀地方で製造される飯寿しの一種かぶら寿し・大根寿し、魚介の糠漬けなど伝統的な水産発酵食品の多様さは特筆すべきである。また、県内各地に日本酒、醤油、味噌の製造業者が存在し、個性的な発酵食品を製造している。近年、これらの製造業者は伝統発酵食品の製造に加え、甘酒や塩麴、それらを応用したドレッシングなどの新製品開発を活発化させている。

一方で、消費者の食品の機能性に対する関心は年々

高まっており、発酵食品製造者の中でも機能性による伝統食品のブランディングや機能性食品の開発に対する期待が高まっている。石川県の伝統発酵食品についてはこれまでに、いしる、かぶら寿し・大根寿し、魚介糠漬けにおいて、DPPHラジカル消去活性（抗酸化性）とACE阻害活性（血圧上昇抑制作用）が確認されている^{1,2)}が、その他の機能性は報告されていない。また、近年生産量が飛躍的に伸びている米の糖化により作られる麴甘酒の機能性については、抗肥満効果、血圧抑制効果など一部の機能性が報告されている³⁾のみで、さらなる研究の進展が期待されている。

そこで本研究では、石川県の伝統発酵食品（飯寿し、なれ寿し、魚介糠漬け）と麴甘酒を中心とした甘酒類について、これまでに報告のなかったORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)法による抗酸化性、抗変

*化学食品部 **石川県立大学 生物資源環境学部

異原性、ビフィズス菌増殖促進作用、D-アミノ酸量の評価を行った。

2. 実験方法

2.1 分析試料

石川県内で市販されていた飯寿し10点(かぶら寿しA-F, 大根寿しG-J), なれ寿し7点(アジA-F, ウグイG), 魚介の糠漬け8点(イワシA-C, フグ卵巣D-H), 甘酒類12点(酒粕甘酒A, 麴甘酒B-K, 乳酸発酵甘酒L)を分析試料とした。飯寿しとなれ寿しは少量の米麴または米が付着した状態(市販の状態), 魚介糠漬けは糠をへらにて軽く除去した状態で使用した。各試料は、2-3個体を採取し、ミキサーにて粉碎・均一化した後、各分析評価に応じた前処理に供した。

2.2 ORAC法による抗酸化性評価

水溶性ORAC(H-ORAC)および脂溶性ORAC(L-ORAC)の測定は、WATANABEらの方法^{4),5)}に従った。前処理はWATANABEらの方法^{4),5)}を一部改変し、水溶性画分の抽出には粉碎試料を、脂溶性画分の抽出には凍結乾燥試料を使用した。評価はn=3で実施し、平均値と標準偏差を示した。

2.3 抗変異原性の評価

山口らの方法⁶⁾に従い、*Salmonella typhimurium* TA98株を用いたAmes試験により評価した。凍結乾燥試料2.0gに20.0mLの蒸留水を添加し、10分間の超音波抽出を2回繰り返した後、遠心上清を孔径0.2 μ mフィルターにてろ過した水抽出液をAmes試験に用いた。比較試料として市販の米味噌を使用した。評価はn=2で実施し、平均値を示した。

2.4 ビフィズス菌増殖促進作用の評価

2.3節で使用した水抽出液を評価試料として使用した。ビフィズス菌として、*Bifidobacterium bifidum* JCM7004株および*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* JCM7052株を用いた。本評価の前に、変法GAMブイヨン(日水製薬(株))にて37°Cで24時間培養したビフィズス菌培養液に30%(v/v)グリセロール水溶液を同容量混合し、液体窒素で凍結したストック溶液を作製した。

本評価は、古田ら⁷⁾、細山ら⁸⁾の方法を参照し、菌体量の増加を指標として行った。変法GAMブイヨンに1%(v/v)の試料抽出液を添加した後、解凍したビフィ

ズス菌ストック溶液を0.1%(v/v)接種した。これを37°Cで24時間、アネロバック・ケンキ(三菱ガス化学(株))を用いて嫌気培養した後、600nmの吸光度を測定した。滅菌蒸留水添加時に対する試料抽出液添加時の吸光度の増加率を菌体増加率とし、増殖促進作用を評価した。

2.5 イソマルトオリゴ糖の定量

甘酒類5.0gを蒸留水約30mLに懸濁し、10分間の超音波抽出を2回繰り返した後、遠心上清をろ紙ろ過して50mLにメスアップを行った。これを孔径0.45 μ mフィルターでろ過した後、適宜希釈してHPLCに供した。

イソマルトース、コージビオース含有量はClass-VP HPLCシステム((株)島津製作所)を用いて分析した。アミノカラムAsahipak NH2P-50E (4.6 \times 250mm)(昭和電工(株))上でアセトニトリル/水=75/25混合物で分離し、蒸気散乱光にて検出を行った。分析はn=3で実施し、平均値と標準偏差を示した。

2.6 D-アミノ酸の定量

前処理として、陽イオン交換固相カラムを用いたアミノ酸濃縮と夾雑物除去を行った。粉碎試料(甘酒類)1.0mLまたは凍結乾燥試料(飯寿し, なれ寿し)1.0gに0.05N HCl 1.0mLとアセトニトリル8.0mLを添加・混合した後、遠心上清をろ紙にてろ過した。ろ液を平衡化したInertSep SCX (GLサイエンス(株), カラムサイズ500mg/6mL)に負荷した後、アセトニトリル/0.01N HCl水溶液=8/2 混合液5mLで洗浄後、1%(v/v)アンモニア-メタノール溶液5.0mLにてアミノ酸を溶出した。窒素雰囲気下でメタノールを揮発させた後、0.02N HCl水溶液1.0mLに溶解した。これを孔径0.2 μ mフィルターでろ過した後、適宜希釈してHPLCに供した。

L, D体アミノ酸比率は、BRÜCKNERらの方法⁹⁾の誘導体化試薬濃度と使用カラムを変更し、Class-VP HPLCシステム((株)島津製作所)を用いて測定した。誘導体化試薬は、130mM N-isobutyryl-L-cysteine, 170mM o-phthalaldehyde 溶液(ホウ酸緩衝液(pH 10.4))を、カラムはODS-STRII (4.6 \times 250mm)((株)島津ジーエルシー)を使用した。ピーク位置は、市販L, D-アミノ酸試薬により確認した。L, D体比率は、得られたL, D体ピークの面積値から算出した。定量値は、アミノ酸分析計((株)日立製作所L-8900)にて測定した遊離アミノ酸量(L, D体の総量)にL, D体比率の平均値(n=3)を乗じて数値化した。

3. 結果および考察

3.1 ORAC法による抗酸化性

体内で不必要に生じる活性酸素種(フリーラジカル)について、循環器疾患、がん、糖尿病などの疾患との関連が報告されている¹⁰⁾。食品には、多種類の活性酸素種の除去物質(抗酸化物質)が含まれており、食事を通じて抗酸化物質を摂取することで健康な身体の維持・増強に繋がることが期待される。そこで、石川県産発酵食品の抗酸化性をORAC法にて評価した。

市販製品のH-ORACとL-ORACはそれぞれ、飯寿しで930-1520と200-1150、なれ寿しで4420-7060と2050-5610、魚介糠漬けで4480-12400と1420-6770、甘酒で240-2270と未検出-510 $\mu\text{mol Trolox}$ 相当量/100gの範囲であった(図1)。同じ部類の食品の中で、原料の違いによるORACの高低の傾向は特段認められなかった。既報²⁾において、飯寿しよりも糠漬けでDPPHラジカル消去法による抗酸化活性が高いことが明らかとされているが、ORAC法でも同様の傾向が認められた。

TAKEBAYASHIら¹¹⁾は、抗酸化性の高い食品として知られる野菜と果実のH-ORACを本研究と同手法にて評価しており、野菜と果実の平均値をそれぞれ、695と1223 $\mu\text{mol Trolox}$ 相当量/100gであると報告している。このことから、魚介糠漬けやなれ寿しは、重量あたりの抗酸化性が非常に高い部類の食品であると考えられる。イワシ糠漬けでは、熟成中にタンパク質の酵素消化で生じるある種のペプチドが抗酸化性を高めることが示唆されている¹²⁾。また、ペプチドに加えて一部の遊離アミノ酸はラジカル吸収能を有する¹³⁾。野菜を含む飯寿しとは異なり、糠漬けとなれ寿しは魚介が重量の大部分を占めるため、そのH-ORACにペプチドやアミノ酸が強く関与していると推察される。また、糠漬けに使用される米糠には、トコフェロール、トコトリエノール、フェルラ酸等の脂溶性抗酸化物質やフィチン酸等の水溶性抗酸化物質が含有されている¹⁴⁾。従って、発酵食品の抗酸化性には、原料由来成分や発酵過程で生じる成分が複合的に関与していると推測される。各抗酸化成分の寄与の程度を明らかにするためには、今後さらに詳細について検討する必要がある。

3.2 抗変異原性

これまでに、ワイン、味噌、醤油などの発酵食品について、発癌抑制作用がある可能性が報告されている¹⁵⁾。そこで、石川県産発酵食品について、発癌の予測

モデルとして用いられるAmes試験により抗変異原性の評価を行った(図2)。

魚介糠漬けや飯寿しの一部製品は、比較試料の米味噌と同等レベルの抗変異原性を有していた。魚介糠漬けの中では、フグの卵巣(63.2-77.6%)がイワシ(51.5-53.9%)よりも抗変異原性がやや高い傾向が認められた。その他の部類の発酵食品で、原料の違いによる抗変異原性の高低の傾向は認められなかった。また、味噌よりも全体的に高い抗変異原性を示す部類の発酵食品を見出すことはできなかった。唯一、原料に紫黒米を含む麴甘酒Fが90%以上の高い抗変異原性を示した。紫黒米にはタンニン、アントシアニン等のポリフェノールが含まれており¹⁶⁾、強い抗変異原性を有することが報告されている¹⁷⁾。このような原料由来の特異的な成分が抗変異原性の高さに寄与したものと推定される。

3.3 ビフィズス菌増殖促進作用

善玉菌として知られるビフィズス菌は、ヒト腸内に存在し、腸内環境の改善に寄与することが報告されている¹⁸⁾。また、腸内のビフィズス菌増殖を選択的に促進する物質として、難消化性オリゴ糖(ガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖など)が特に有効であることが示されている¹⁸⁾。

2種類のビフィズス菌について、各発酵食品の水抽出液を添加した時の菌体増加率を評価した(図3)。その結果、飯寿しで6.8-134%、甘酒類で5.9-138%の菌体増加率となり、全体的に高いビフィズス菌増殖作用が認められた。また、飯寿し・甘酒類よりはやや低いものの、魚介糠漬けも3.0-34%の菌体増加率を示した。飯寿し、なれ寿し、糠漬けにおいて、原料の違いによる菌体増加率の高低の傾向は認められなかった。

飯寿しの原料としても使用される麴甘酒には、ビフィズス菌の増殖促進因子であるイソマルトオリゴ糖が含まれることが報告されている¹⁹⁾。そこで、甘酒類のイソマルトオリゴ糖(コージビオース、イソマルトース)含有量を測定した(表1)。尚、今回の分析では、ニゲロースはピーク分離が不十分で定量できなかった。また、全ての甘酒で三糖以上のイソマルトオリゴ糖は検出されなかった。酒粕甘酒にはイソマルトオリゴ糖が検出されなかった一方で、麴甘酒には2種類の合計量で0.5-2.3 g/100gのイソマルトオリゴ糖が存在した。これらのイソマルトオリゴ糖は、ビフィズス菌の増殖促進に寄与したものと推察される。しかし、ビフィズ

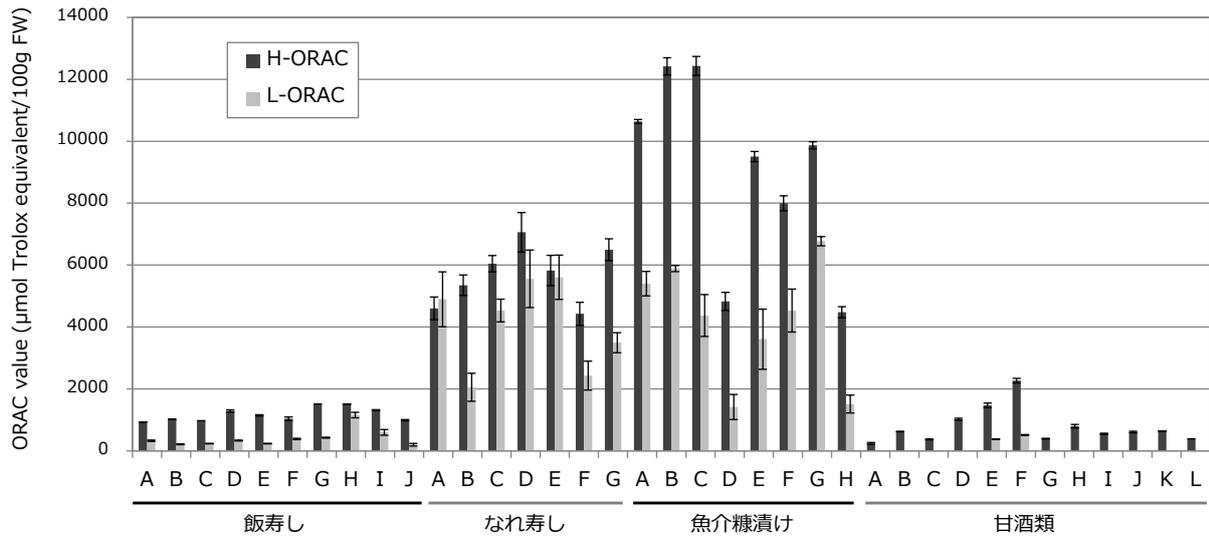


図1 石川県産発酵食品の抗酸化性(ORAC)

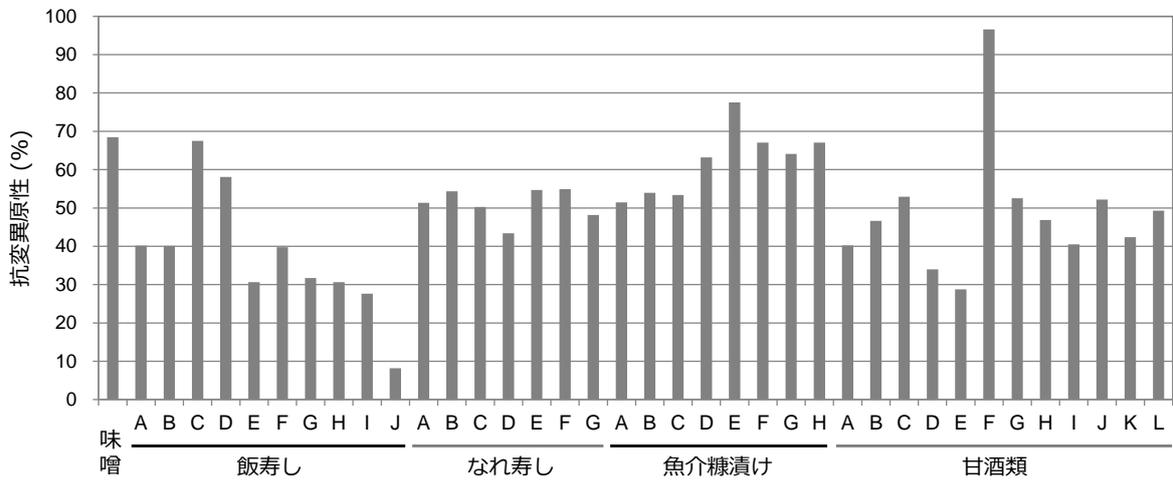


図2 石川県産発酵食品の抗変異原性

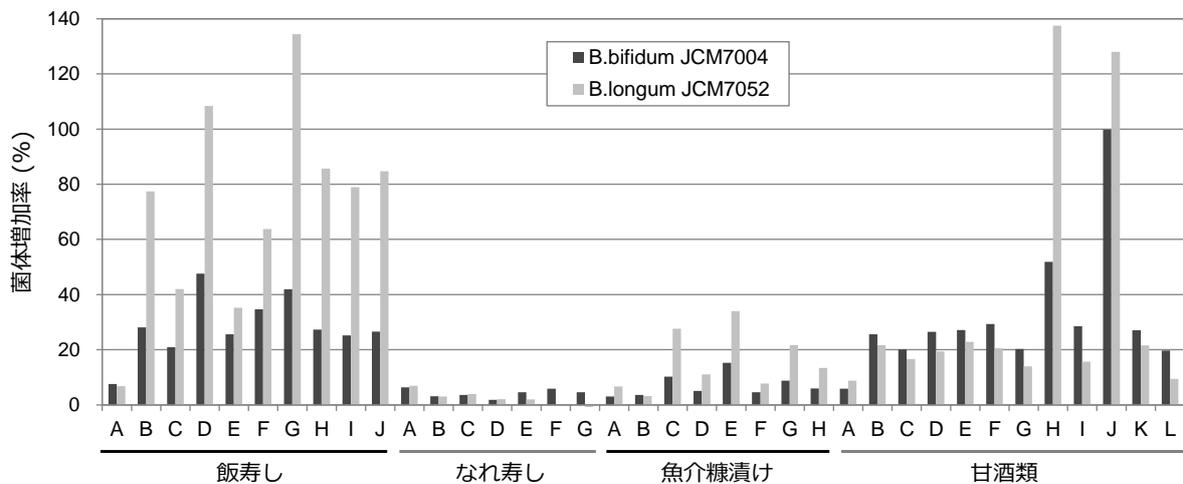


図3 石川県産発酵食品のビフィズス菌増殖促進作用

ス菌体増加率とイソマルトオリゴ糖量の間に関連は認められなかったことから、その他成分の増殖促進への寄与の方がより大きいものと考えられた。米糠、焼酎粕などにおいては、オリゴ糖以外のビフィズス菌増殖促進物質としてペプチドの関与が示唆されている^{7),8)}。今回の評価だけでは、増殖促進効果がビフィズス菌選択的であるかを明らかにすることができない。今後、他の腸内細菌種を用いた増殖試験や動物投与試験での腸内菌叢解析などを検討する必要がある。

表1 甘酒類のイソマルトオリゴ糖含有量 (mg/100g)

	コージビオース	イソマルトース
甘酒 A	nd	nd
甘酒 B	140 ± 28	1137 ± 38
甘酒 C	97 ± 13	411 ± 30
甘酒 D	352 ± 19	820 ± 48
甘酒 E	468 ± 18	1762 ± 35
甘酒 F	465 ± 31	1851 ± 48
甘酒 G	198 ± 15	675 ± 11
甘酒 H	242 ± 36	1158 ± 161
甘酒 I	151 ± 17	742 ± 18
甘酒 J	256 ± 7	1130 ± 28
甘酒 K	218 ± 20	885 ± 32
甘酒 L	191 ± 39	474 ± 21

nd: Not detected

3. 4 D-アミノ酸含有量

近年、微生物や植物、哺乳動物に存在するD-アミノ酸の生体内での機能が注目されている。中でも、D-アスパラギン酸(D-Asp)は肌の状態を改善する効果が報告されている²⁰⁾。また、D-Asp、D-グルタミン酸(D-Glu)、D-アラニン(D-Ala)等は、哺乳類の腸内における免疫力維持への貢献が示唆されている²¹⁾。発酵食品は比較的多くのD-アミノ酸を含む食品であること²²⁾、D-アミノ酸生成には乳酸菌の関与が報告されている²³⁾ことから、石川県産の乳酸発酵食品(かぶら寿し、なれ寿し)、甘酒・乳酸発酵甘酒についてD-Asp、D-Glu、D-Ala量を測定した(表2)。

その結果、半数以上のかぶら寿し製品にD-Glu、D-Alaが、多数のなれ寿し製品にD-Asp、D-Glu、D-Alaが、麴甘酒(甘酒G)にD-Ala、乳酸発酵甘酒(甘酒L)にD-Glu、D-Alaが検出された。また、乳酸菌数が多い飯寿しと

なれ寿しにおいて、これらのD-アミノ酸含有量が高い傾向が認められた(data not shown)。発酵食品のD-アミノ酸量については、黒酢でD-Asp 0.47-2.63、D-Glu 0.41-4.02、D-Ala 0.24-30.1 mg/100mL²⁴⁾、日本酒でD-Asp 0.09-0.89、D-Glu 0.13-1.94、D-Ala 0.07-3.27 mg/100mL²⁵⁾と報告されている。これらの値と比較して、なれ寿しにはD-アミノ酸が高い濃度で含まれていることが明らかとなった。郷上ら²³⁾は日本酒の製造工程において、ある種の乳酸菌の生産するアミノ酸ラセマーゼがL-アミノ酸を異性化している可能性を示した。なれ寿しの製造過程では、タンパク質の自己消化による多量の遊離アミノ酸生成と乳酸発酵が同時に行われるために、D-アミノ酸濃度が顕著に高くなるものと考えられる。

表2 石川県産発酵食品のL、D-アミノ酸含有量 (mg/100g)

	L-Asp	D-Asp	L-Glu	D-Glu	L-Ala	D-Ala
かぶら寿し A	11.0	nd	9.0	0.4	17.6	1.4
かぶら寿し B	35.9	nd	40.7	nd	44.8	nd
かぶら寿し C	24.3	nd	21.3	3.0	22.5	nd
かぶら寿し D	8.2	nd	69.5	nd	61.6	nd
かぶら寿し E	46.7	nd	54.2	4.1	64.9	3.9
かぶら寿し F	50.0	nd	61.6	2.3	88.4	5.0
なれ寿し A	124.1	nd	317.6	nd	134.6	nd
なれ寿し B	319.2	12.3	23.0	12.6	332.6	56.0
なれ寿し C	189.0	3.8	209.6	6.2	177.7	22.8
なれ寿し D	269.8	10.7	76.1	5.5	389.5	46.9
なれ寿し E	95.1	nd	71.1	3.8	95.1	5.7
なれ寿し F	69.6	4.5	50.1	6.9	218.6	32.0
なれ寿し G	462.6	8.7	493.7	10.2	348.7	28.9
甘酒 A	6.5	nd	5.5	nd	11.2	nd
甘酒 B	21.2	nd	24.1	nd	26.5	nd
甘酒 C	14.4	nd	14.4	nd	13.4	nd
甘酒 E	28.1	nd	35.2	nd	41.5	nd
甘酒 G	20.1	nd	19.5	nd	17.3	1.7
甘酒 L	10.2	nd	14.2	0.6	7.5	2.9

nd: Not detected

4. 結 言

石川県産の伝統発酵食品と甘酒について、抗酸化性、抗変異原性、ビフィズス菌増殖促進効果、D-アミノ酸量を評価した結果、以下の知見が得られた。

- 1) 魚介糠漬け、なれ寿しは、ORAC法による抗酸化性が高い部類の食品であった。

2) 飯寿し, 甘酒には, ビフィズス菌増殖促進効果が認められた。また, 麴甘酒は, ビフィズス菌の選択的増殖促進物質であるイソマルトオリゴ糖を0.5-2.3g/100g 含有していた。

3) なれ寿し, かぶら寿しなどの乳酸発酵食品にD-アミノ酸が含まれており, 特になれ寿しは比較的高濃度のD-アミノ酸を含む食品であった。

今後, 機能性の原因成分についての研究を進め, 発酵食品のブランディングや機能性成分を高含有する新たな発酵食品の開発に取り組みたい。

参考文献

- 1) 寺沢なお子, et al. イシルのラジカル消去活性および活性成分の分離. 日本家政学会誌, 2010, 61.8: 493-499.
- 2) 武春美, et al. 石川県の伝統発酵食品の成分と機能性に関する研究. 石川県工業試験場研究報告. 2007, 57, 47-52.
- 3) 大浦新, et al. マウス試験による甘酒の機能性評価. 日本醸造協会誌, 2007, 102.10: 781-788.
- 4) WATANABE, Jun, et al. Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts. *Analytical Sciences*, 2012, 28.2: 159-159.
- 5) WATANABE, Jun, et al. Improvement of the lipophilic-oxygen radical absorbance capacity (L-ORAC) method and single-laboratory validation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2013, 77.4: 857-859.
- 6) 山口美奈子, et al. 食品機能性評価マニュアル集 第1集 (改訂2版), (社)日本食品科学工学会, 2009, 81-88.
- 7) 古田吉史, et al. 大麦焼酎蒸留粕に含まれる乳酸菌・ビフィズス菌増殖促進因子の探索. 生物工学会誌, 2007, 85.4: 161-166.
- 8) 細山浩, et al. 米糠麴中のビフィズス菌増殖促進物質. 日本食品工業学会誌, 1991, 38.10: 940-944.
- 9) BRÜCKNER, H., et al. Liquid chromatographic determination of d-and l-amino acids by derivatization with o-phthalaldehyde and chiral thiols: Applications with reference to biosciences. *Journal of Chromatography A*, 1994, 666.1-2: 259-273.
- 10) GÖRLACH, Agnes, et al. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: problems solved?. *Redox biology*, 2015, 6: 372-385.
- 11) TAKEBAYASHI, Jun, et al. Hydrophilic antioxidant capacities of vegetables and fruits commonly consumed in Japan and estimated average daily intake of hydrophilic antioxidants from these foods. *Journal of food composition and analysis*, 2013, 29.1: 25-31.
- 12) YATSUNAMI, et al. Antioxidative constituents from fermented sardine with rice-bran. *Food Science and Technology Research*, 1999, 5.4: 343-346.
- 13) HERNÁNDEZ-LEDESMA, Blanca, et al. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53.3: 588-593.
- 14) 谷口久次, et al. 米糠含有成分の機能性とその向上. 日本食品科学工学会誌, 2012, 59.7: 301-318.
- 15) 北本勝ひこ編, 増補 醸造物の機能性, (公財)日本醸造協会, 2013
- 16) 猪谷富雄, et al. 有色米の抗酸化活性とポリフェノール成分の品種間差異. 日本食品科学工学会誌, 2002, 49.8: 540-543.
- 17) KONG, Jin-Ming, et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 2003, 64.5: 923-933.
- 18) 日本乳酸菌学会編. 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 京都大学学術出版会, 2010.
- 19) 麻生清, et al. 甘酒の糖組成について. 醸酵工學雑誌, 1960, 38.10: 464-469.
- 20) “飲むと、肌まで届く。D-アミノ酸”, (株)資生堂HP, https://www.shiseidogroup.jp/rd/report_f/damino.html, (2018.8.17)
- 21) SASABE, Jumpei, et al. Interplay between microbial d-amino acids and host d-amino acid oxidase modifies murine mucosal defence and gut microbiota. *Nature microbiology*, 2016, 1.10: 16125.
- 22) 井上裕, et al. 発酵食品および熟成食品の味質に及ぼすD-アミノ酸の影響についての考察. 微量栄養素研究, 2014, 31: 59-65.
- 23) 郷上佳孝, et al. 生酏, 乳酸菌添加生酏, 速醸酏造りの日本酒醸造工程中のD-アミノ酸の定量的解析. *Trace Nutrients Research*, 2012, 29: 1-6.
- 24) 岡田かおり, et al. 黒酢及び米酢中のD-及びL-アミノ酸の定量的解析. 微量栄養素研究, 2012, 29: 62-66.
- 25) 岡田かおり; 郷上佳孝; 老川典夫. 日本酒中のD-アミノ酸の定量と生成機構の解析. 微量栄養素研究, 2011, 28: 65-69.