

# 醤油麹分解液およびハーブの機能性のスクリーニング (in vitro による評価)

— 醤油麹分解液を用いた心臓疾患予防効果を有する機能性飲料の開発 —

山本展久・佐野一成・江藤 勲  
材料科学部

## In Vitro Screening for Functionality of Soybean Hydrolysate and Herbs

Nobuhisa YAMAMOTO・Kazunari SANO・Susumu ETO  
Materials Science and Technology Div.

### 要 旨

大分県産食品素材を利用して保健機能食品の開発スキームを構築する目的で研究を行った。特に本研究では醤油麹抽出液および大分県産ハーブを例に機能性の検索を行った。醤油麹分解液について ACE 阻害活性を測定したところ、非常に高い阻害活性を確認した。しかし、分解が進むにつれて活性は低下した。醤油麹の ACE 阻害活性も非常に高いものであったが、麹菌の繁殖に伴って、活性は低下した。醤油麹分解液で ACE 阻害活性の高活性化を図ったが、原料が最も高い活性であった。マイクロソーム画分に対して 15 種類のハーブが非常に高い抗酸化性を示した。これは生体内でもハーブの抗酸化性が有効に働く可能性を示唆するものであった。ADP 凝固惹起による血小板凝集に対して 23 種類のハーブが非常に高い凝集抑制活性を示した。その中で 7 種類については極めて高い活性を有していることが明らかとなった。

### 1. 緒 言

日本は世界で最も速く高齢化が進んでいる国である。高齢者の多くは加齢により肉体的機能が低下し、糖尿病、高血圧、高脂血症、心臓病、ガンなどの生活習慣病の発症率が増加すると言われている。これらの疾患は加齢だけではなく、食生活の欧米化、ストレスの増加、運動不足などによっても誘発されるため、中高年、若年層にも生活習慣病が増加しつつある。日本人の 3 大死因であるガン、心臓病、脳血管疾患は、生活習慣病もしくはそれが悪化した高度疾患として捉えられている<sup>(1)</sup>。

これら生活習慣病は食事、運動、休養の 3 つが関連因子と考えられており、その中でも特に食事の影響は大きく、食生活の改善で生活習慣病の進行を抑制したり、予防したりすることが可能と考えられている。これらのことから健康を維持し、生活習慣病を予防または進行を抑制する効果を持つ食品が多くの人から求められている。さらに医療費や介護費、特に若年層での生活習慣病の治療費が急激に増加しており、社会経済圧迫の一因となっている。このような背景から生活習慣病を予防する効果を科学的に実証する研究開発が求められている。

食品の発揮する機能は 3 つの面から捕らえることができる。つまり栄養面で見た 1 次機能、嗜好面で見た 2 次機能、健康面で見た 3 次機能である。とりわけ、食品の

“第三の機能”として提唱され、免疫系・分泌系・神経系・循環系・消化系といった生体の生理制御系を調節す

ることによって病気を予防する 3 次機能は、学術的に新鮮な研究対象であるのみならず、その研究が“機能性食品”という具体的な応用成果を生み出す基盤になることから大きな関心を呼んでいる。<sup>(2),(3)</sup>

こうした風潮の中、平成 13 年度より厚生労働省の認可により、保健機能食品制度が創設された。「保健機能食品」とは、特定の保健機能を有する成分を摂取することを目的とした食品であり、従来の「特定保健用食品」と新設された「栄養機能食品」とを合わせたものである。これにより健康食品は、認可基準の違いにより Fig.1 に

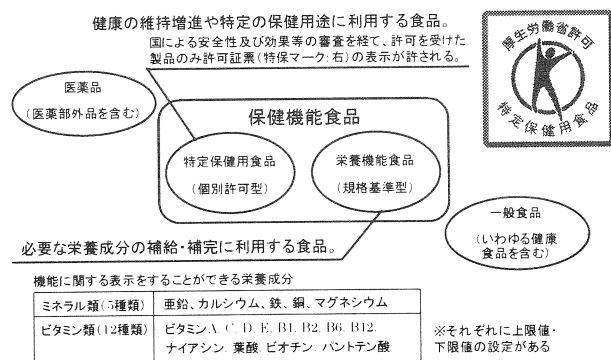


Fig.1 保健機能食品制度の概略

示すようになった。

保健機能食品制度によると「栄養機能食品」とは規格基準型の食品群であり、厚生労働省からの認可は必要としない。現在 Fig.1 下表に示すように 5 種のミネラルと 12 種のビタミン類についてそれぞれに規定された数値規格の中に含有値が納まっていれば販売して良く、数種のミネラルおよびビタミン補強食品が栄養機能食品として販売されている。

一方、従来からある「特定保健用食品」は個別許可型の食品群であり、食することによってある効果を発揮するものとされ、認可には科学的な実証や安全性の確認などが必要とされる。平成 16 年 12 月 16 日現在では 475 品目の認可<sup>(4)</sup>がある。この食品数は今後も増加すると予想され、栄養機能食品と合わせて保健機能食品全般の有用性が期待されている。

このような研究開発は国内・国外共に盛んに行われており、特に「医食同源」の考えから国内においては活発に研究されている。例えばイワシペプチドの血圧降下作用（九州大学）、緑茶の抗酸化性（伊藤園）、みその機能性香気成分（熊本県工業技術センター）など、その種類・数は非常に多い。それらの成果が様々な特定保健用食品群として結実し現在市場に出回っている。

本研究では大分県産食品素材を利用して保健機能食品の開発スキームを構築する目的で取り組んだ。県内には機能性に富んだ食品素材が数多くあり、機能性食品への応用が期待されている。当センター保有の分析技術と大分大学教育福祉科学部（望月研究室）の持つ動物実験および医学部での臨床試験などの評価技術を融合させ、機能性食品の開発プロセスを構築しようとした。

本報では都市エリア産学官連携促進事業（大分県央エリア）の一環として醤油麹分解液およびハーブを用いた機能性食品の開発を例に取り、我々の取り組みを報告する。醤油麹分解液は本県基幹産業の一つである醤油産業から派生する機能性食品素材と考えられ、血圧降下作用について検討した。また、これまでの我々の研究からハーブは高い抗酸化機能を有していることが明らかとなっており、そのデータを更に詳細なものにすることと新たな機能を見出すことを目的として検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 サンプルの調製

#### 2.1.1 醤油麹分解液

醤油麹分解液は醤油製造の定法を一部改訂して行った。すなわち、蒸煮脱脂大豆および焙煎小麦を混合し、醤油製造用麹菌を繁殖させて醤油麹を製造した。この醤油麹を分解し、醤油麹分解液を得た。

醤油麹抽出液は醤油麹に水を加え、ろ過を行って抽出液を得た。また、原料の抽出は麹菌を繁殖させる前のものに水を加え、同様な操作を行って抽出液を得た。

#### 2.1.2 ハーブ抽出液

県内で7月から11月に収穫されたフレッシュ・ハーブ類について、主に利用する部位5gをエタノールとともにホモゲナイザー（日本精密工業㈱製、ヒストコロン）で磨砕し、濾過した後、残渣をエタノールで洗浄し、洗液と合わせて50mlとした。同一ハーブでも様々な部位を利用する場合はそれぞれについて調製した。

### 2.2 ACE 阻害活性<sup>(5)</sup>

生体内で血圧のコントロールするアンジオテンシン変換酵素（ACE）に対する阻害活性を測定し、血圧制御系のモデルとした。すなわちブタ膵臓由来の ACE 水溶液 100 $\mu$ l、アンジオテンシン変換合成酵素基質 Hippuryl-His-Leu 溶液（600mM NaCl を含む 400mM リン酸カリウム緩衝液）100 $\mu$ l、醤油麹分解液を被験液として 50  $\mu$ l 試験管に混合し、37 $^{\circ}$ C で酵素反応させた。正確に 30 分間後、0.3M NaOH 1.5ml を加えて反応を停止させた。これに *o*-フタルアルデヒド（OPA）の 2%メタノール溶液を加え、正確に 10 分後、3M HCl 0.2ml で反応を停止させた。水で希釈し、励起波長 340nm、蛍光波長 455nm で蛍光を測定した。

### 2.3 ラット肝ミクロソームを用いた抗酸化試験<sup>(6)</sup>

ウィスター系雄ラットの肝臓より得られたミクロソーム懸濁液<sup>(7)</sup>を使用に際して 1.5mg/ml のタンパク質濃度になるように 0.1M トリス塩酸緩衝液（pH7.4）:0.15M 塩化カリウム溶液=1:2 で希釈して用いた。ミクロソーム懸濁液 250 $\mu$ l にハーブ抽出液を被験液として 25 $\mu$ l、2mM ADP、0.1mM-0.2mM EDTA-FeCl<sub>3</sub>、0.5mM NADPH をそれぞれ 250 $\mu$ l 添加し、37 $^{\circ}$ C の湯浴中で緩やかに振とうしながら 30 分間インキュベートし反応後直ちに氷冷して反応を停止させ、2.4 に従って脂質の過酸化度を測定した。

### 2.4 過酸化脂質の測定法

過酸化脂質の測定は内藤らの方法<sup>(8)</sup>に従って行った。すなわち、フタ付きネジ口試験管に試料を 150 $\mu$ l 入れ、1.5ml 0.05N 塩酸、0.5ml 0.67%チオバルビツール酸を加えて 95 $^{\circ}$ C湯浴中に 30 分保ったのち、氷冷し、2ml 15%メタノール含有 *n*-ブタノール溶液を加えて激しく振とうしたのち、3000rpm 20 分間遠心分離して、上層のブタノール層の 535nm での吸光度を測定した。

### 2.5 血小板凝集抑制能の測定

ヒト血を用い血小板凝集抑制能を測定した。クエン酸採血したヒト血 200 $\mu$ l 4 本にハーブ抽出液を被験液としてそれぞれ 20  $\mu$ l ずつ添加し、3 分間 37 $^{\circ}$ C で攪拌した。

凝固惹起物質として ADP を 4 濃度（例えば終濃度で 1,2,4,8 $\mu$ M, 血液の状態によって違う）添加し, 2 分後に血液をマイクロメッシュフィルターで吸引し, 吸引圧を測定した. 測定には全血対応吸引式血小板凝集能測定装置 (WBA アナライザー: エム・シー・メディカル株式会社) を用いた. 血液凝固の判定は Fig.2 の凝固曲線と横軸とで囲まれた面積値で行った.

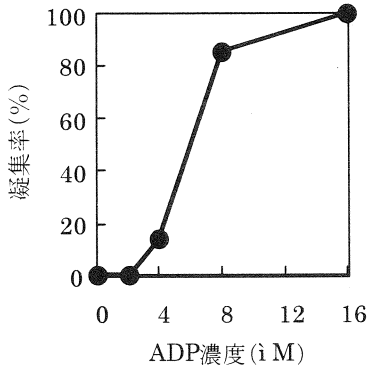


Fig.2 ADP 刺激による血液凝集曲線

個人差を排除する意味で, 採血者ごとに被験液としてアスピリンを用いた阻害程度を測定し, その値を 100 とした相対阻害率で各サンプルの阻害程度を算出した.

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 醤油麹分解液のACE阻害活性

醤油麹分解液のACE阻害活性の経時変化を Fig.3 に示す. ACE阻害, つまり生体内では血圧降下作用はタンパク質が分解されて生成したペプチドによるとされており, 今回の醤油麹分解液も醤油麹由来のタンパク質分解酵素

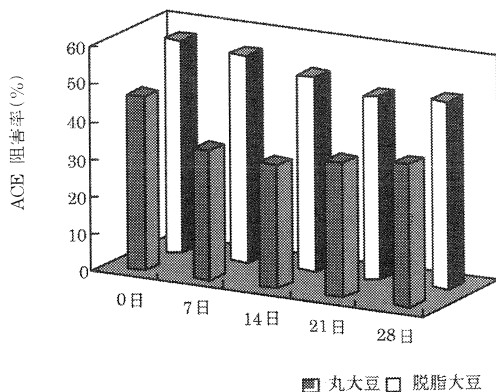


Fig.3 醤油麹分解液のACE阻害活性

によって大豆タンパク質が分解され, ペプチドが蓄積し, 血圧降下作用を示すと考えた. しかしながら, 醤油麹分解液では丸大豆, 脱脂大豆ともにタンパク質の加水分解が進むにつれてACE阻害活性は低下することが明らかとなった. ただし, この測定には分解液を300倍希釈して用いており, 阻害活性としては極めて高い値であると言える. また, 脱脂大豆でACE阻害活性が高かった. 丸大豆には脂質を多量に含有しており, 相対的にタンパク質量が少ないことが考えられた. 丸大豆の脂溶性成分としてはフラボノイド類やサポニンなどがあげられ, これらも他の機能性を有していると考えられる. 丸大豆, 脱脂大豆ともに十分なACE阻害活性をもっていることから, 丸大豆を使用する方が他の機能性との組み合わせという点では非常に興味深いものである.

経時的に活性が低下する理由として, もともと醤油製造では最終的に旨味成分であるアミノ酸を大量に生成する麹菌を選択していることが考えられた. つまり, 醤油麹の段階 (加水分解前) で目的とするペプチド類は生成されていると考察した. そこで醤油麹についてACE阻害活性を経時的に測定した.

#### 3.2 醤油麹抽出液のACE阻害活性

蒸煮大豆として脱脂大豆を用いて調製した醤油麹から得た抽出液のACE阻害活性を Fig.4 に示す. 原料とは麹菌の繁殖がない蒸煮脱脂大豆と焙煎小麦を用いたサンプルである.

麹菌の繁殖時にペプチドのようなACE阻害物質が生成するのではないかと考えたが, 結果として原料のACE

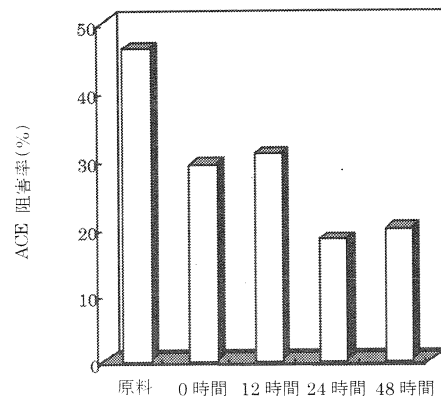


Fig.4脱脂大豆を原料としたサンプルのACE阻害率

阻害活性が最も高く, 麹菌が繁殖することで阻害活性は低下することがわかった. これらのサンプルはどれも希釈液を用いており, 阻害活性は非常に高いものである.

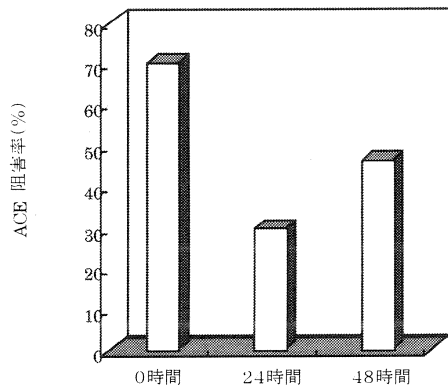


Fig.5 丸大豆を原料としたサンプルのACE 阻害率

Fig.5に丸大豆を原料とした場合の結果を示す。丸大豆では原料については測定していないが、こちらでも麹の繁殖が進むにつれてACE阻害活性が低下することがわかった。丸大豆では24時間から48時間で阻害活性が上昇しているが、原因は不明である。いずれにしても、麹菌の繁殖により本来大豆もしくは小麦のもっているACE阻害物質の喪失が起こったことが判明した。Fig.4,5の縦軸の数値が違うが、希釈率の違いである。

以上のことから今回の製麹条件および分解条件では目的の血圧降下物質の上昇は見られなかった。しかし、醤油麹抽出液でも分解液でもACE阻害活性は有意に高いことから、動物実験へ進むこととした。

安田らは沖縄の伝統的大豆発酵食品とうふようから2つのACE阻害物質を単離同定<sup>9)</sup>しており、大豆タンパク質分解物にはACE阻害活性があることが明らかとした。我々の研究においても大豆タンパク質を材料としていることから同様なペプチド性のACE阻害物質が得られる可能性がある。

また、大澤・川岸らはそばの実を材料に8種類の麹菌による発酵物について、その機能性を検討し、菌種によって機能性の差があることを明らかとした<sup>10)</sup>。麹菌の種類によって生産されるタンパク質分解酵素は異なるため、大豆タンパク質にあった菌種および分解条件のスクリーニングも重要課題であると思われる。

### 3.3 ハーブの抗酸化性について

大分県内で栽培されたハーブ75種類についてラット肝臓マイクロソームを用いた抗酸化性を検討した。この系ではラット肝臓マイクロソーム画分に含まれる酵素系によりNADPHを電子供与体として鉄を還元し、生じた2価鉄が

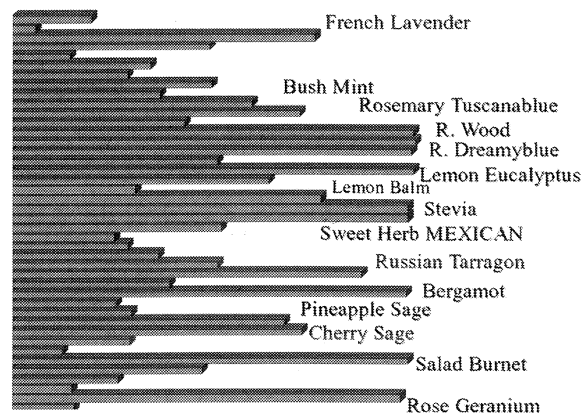


Fig.6 ミクロソーム画分を用いたハーブの抗酸化性

脂質の過酸化を引き起こす<sup>11)</sup>ことを応用している。

42種類のハーブ類が一次スクリーニングで選抜され、それらの5倍希釈液について二次スクリーニングを実施した。その結果、Fig.6に示すように15種類のハーブが肝臓マイクロソームに対して非常に高い抗酸化性を有することが明らかとなった。

マイクロソームは小胞体の細分化によって生じた小胞が主成分であり、この系はその小胞中に存在する薬物代謝系酵素によって引き起こされる酵素的な脂質過酸化を測定する系である<sup>11)</sup>。実際の生体内での脂質過酸化に即した系として生体内抗酸化性を評価できると考えられている。これまで我々はハーブの抗酸化性のメカニズムとしてラジカル消去能を呈示している<sup>11)</sup>。このマイクロソームを用いた系でもラジカルが関与する反応を経由することからハーブのラジカル消去能によってマイクロソーム抗酸化性が支配されていると考えられた。

今回、細胞成分を用いてハーブの抗酸化性を実証した。これは生体内でもハーブの抗酸化性が有効に働く可能性を示唆するものである。

### 3.4 ハーブの血小板凝集抑制能について

生体内における血小板の凝集はいくつかの経路が存在し、非常に複雑な反応系を構成している。その中で今回はADPを凝固惹起物質としてハーブの血小板凝集抑制能をスクリーニングした。一次スクリーニングの結果、75種類のハーブ中、23種について高い凝集抑制能を確認した。次に二次スクリーニングとして抽出液の2倍希釈液について同様な測定を行った。その結果、7種については極めて高い活性を有していることが明らかとなった。今後はこれらの有望ハーブを大量栽培し、有効成分の分離

同定およびメカニズムの解析を行う予定である。

#### 4. まとめ

大分県産食品素材を利用して保健機能食品の開発スキームを構築する目的で研究を行った。特に本研究では醤油麹抽出液および大分県産ハーブを例に機能性の検索を行ったところ以下のような知見が得られた。

- (1) 醤油麹分解液について ACE 阻害活性を測定したところ、非常に高い阻害活性を確認した。しかし、分解が進むにつれて活性は低下した。
- (2) 醤油麹の ACE 阻害活性も非常に高いものであったが、麹菌の繁殖に伴って、活性は低下した。
- (3) 醤油麹分解液で ACE 阻害活性の高活性化を図ったが、残念ながら原料が最も高い活性であった。しかし、麹菌の検索や分解条件の再検討によって高活性化は可能と考える。
- (4) ミクロソーム画分に対して 15 種類のハーブが非常に高い抗酸化性を示した。これは生体内でもハーブの抗酸化性が有効に働く可能性を示唆するものであった。
- (5) ADP 凝固惹起による血小板凝集に対して 23 種類のハーブが非常に高い凝集抑制活性を示した。その中で 7 種類については極めて高い活性を有していることが明らかとなった。

本研究は、文部科学省の補助事業である都市エリア産学官連携促進事業として行ったものである。

#### 参考文献

- 1) 清水俊雄：『保健機能食品』市場導入プログラム，(2001)，健康産業新聞社
- 2) 篠原和毅，鈴木建夫，上野川修一：「食品機能研究法」，(2000)，光琳
- 3) 荒井綜一：「機能性食品の研究」，(1995)，学会出版センター
- 4) <http://www.jhnfa.org/>
- 5) 「食品の機能性評価マニュアル集」，(1999)，p117-121，食品総合研究所
- 6) 人見英里，田村聡美，鶴木祐子，津田孝範，中野昌俊：日本食品科学工学会誌，46(12)，(1999)，p779-785
- 7) 川岸舜朗：「生物化学実験法38 食品中の生体機能調節物質研究法」，(1996)，p18-
- 8) 内藤周幸，山中 健：日本老年医学会雑誌，15(3)，(1978)，187-191
- 9) 日本農芸化学会2003年度（平成15年度）大会講演要旨3A19a11
- 10) 日本農芸化学会2003年度（平成15年度）大会講演要旨2B01p07
- 11) 中村 良，川岸舜朗，渡邊乾二，大澤俊彦：食品機能化学，(1991)，p89-，三共出版
- 12) N.Yamamoto, S.Mizue, S.Eto, N.Takano, E.Hitomi and S.Mochizuki, *ITE Letter*, 4, 685-690 (2003)