

平成 22 年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「新規製麺技術及びそれを用いた機能性食品素材製造技術の開発」

研究開発成果等報告書

平成 23 年 3 月

委託者 四国経済産業局

委託先 ヤマキ株式会社

印刷物基準実績について：本印刷物はリサイクル適正を満たします。

目次

項 目	頁
第1章 研究開発の概要	3
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	3
1-2 研究体制	4
1-3 成果概要	8
1-4 当該プロジェクト連絡窓口	10
第2章 本論	11
① 乳酸菌，耐酸性麹菌を用いる新規製麹技術の開発	11
② 新規麹の試験製造，スケールアップ，各種低利用水産資源の新規麹での分解試験，スケールアップ	12
1 研究開発成果	12
2 事業化の検討	12
③ 水産資源の麹分解物からの機能性物質の検索	13
④ 専門語句説明	15
第3章 全体総括	16

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

(高度化目標，技術的目標)

1) 発酵・精製工程の効率化・高精度化に係る技術の高度化

製麴工程に抗菌物質であるバクテリオシン生産乳酸菌と耐酸性黒麴菌を使用することで一般汚染細菌の非常に少ない麴生産技術を開発する。乳酸菌，及び黒麴菌の生産する乳酸，クエン酸等の有機酸の多い爽快感のある食品を開発する。

2) 最新の社会的ニーズ等に対応した発酵・精製技術システムの開発

発酵製品の高品質化のためには，一般汚染細菌の少ない麴を作る必要がある。厳密な無菌状態での製麴を行うためには設備，環境の清浄化のために多大の投資を必要とする。当該研究では，抗菌物質バクテリオシン生産乳酸菌を用いて培地に混入する雑菌を抑制する。

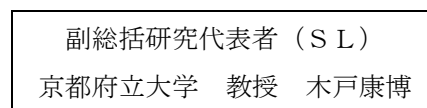
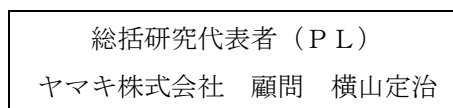
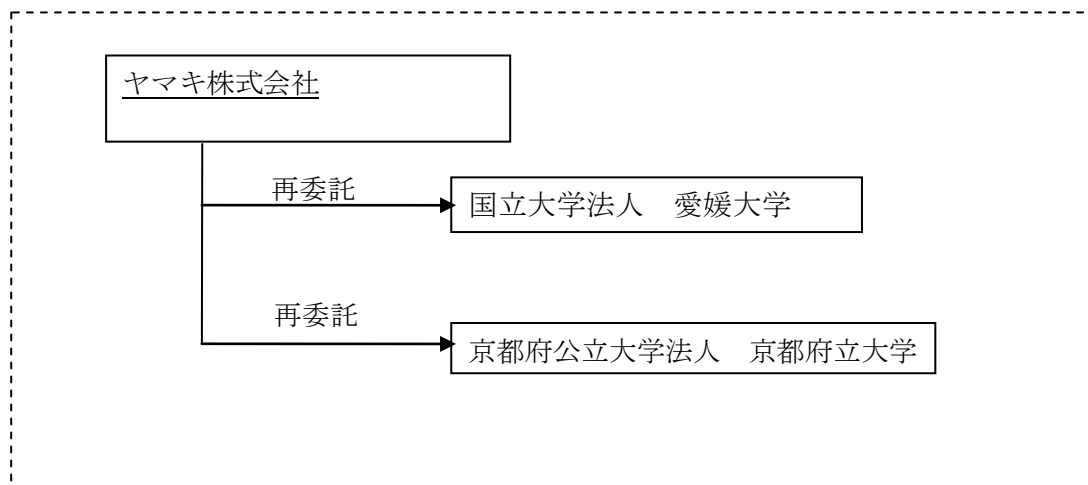
尚，高プロテアーゼ生産麴菌の製麴に於いては，酵素生産と共に生産されたプロテアーゼにより，乳酸菌抗菌物質のバクテリオシンが分解されて抗菌活性を消滅し，一般汚染細菌が増殖する傾向がある。また，酸性に傾いた培地にはこれまでの麴菌，例えば醤油麴菌は生育が遅くなり，汚染菌が優勢に増殖して良い麴を得ることが困難であった。当該研究では酸性培地に於いて良好に生育する黒麴菌中のプロテアーゼ高生産麴を用いることにより，一般汚染細菌の混入が非常に少なく高品質である麴の製造技術を開発する。

3) 発酵醸造食品廃棄物，水産未利用資源等から有用物質（高付加価値物質）を生産する技術の開発

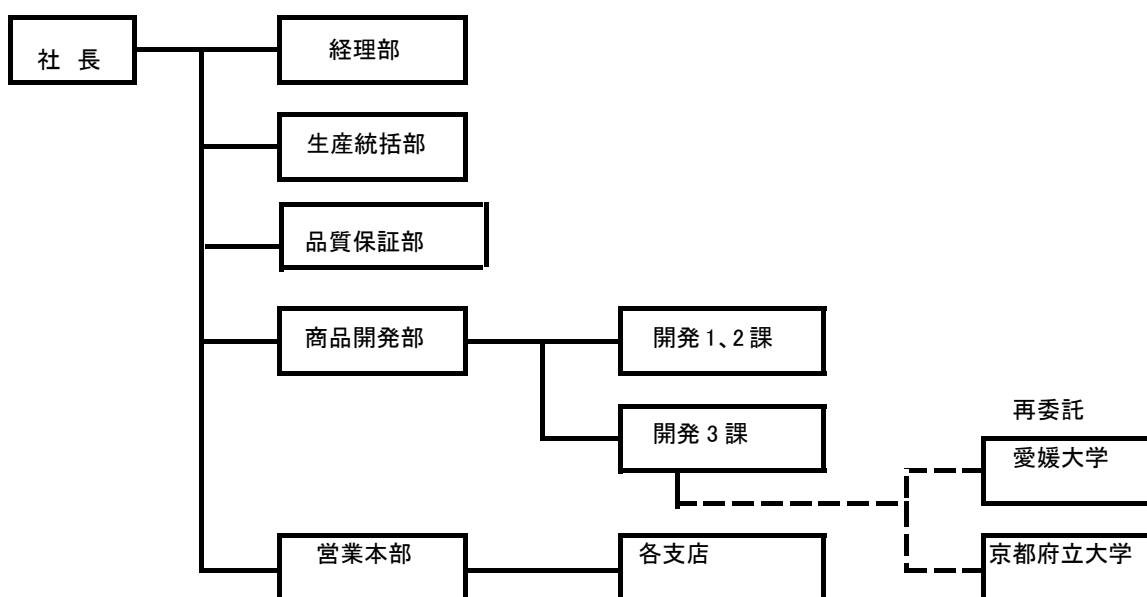
該技術で製造された麴を用いて，種々の未利用水産資源を分解することにより，生理機能性を有する高付加価値発酵食品の製造技術を開発する。魚介類には多くの機能性が有ることはこれまでに良く知られているが，魚介類を麴で分解処理して得られる物質についての研究はこれまでは見られない。我々はこれまでの研究で水産資源の麴分解物が抗肥満活性の指標である中性脂肪吸収抑制作用を示すことを動物試験で確認してきた。この方法を用いて，水産未利用物の麴分解物から機能性を有する高付加価値物質生産する技術を開発する。

1-2 研究体制

1) 研究組織（全体）

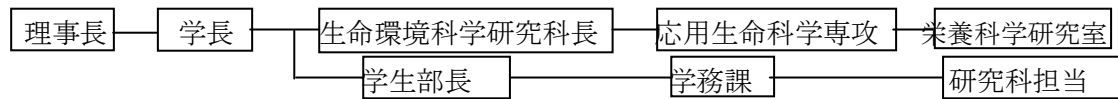


2) 事業管理者「ヤマキ株式会社」

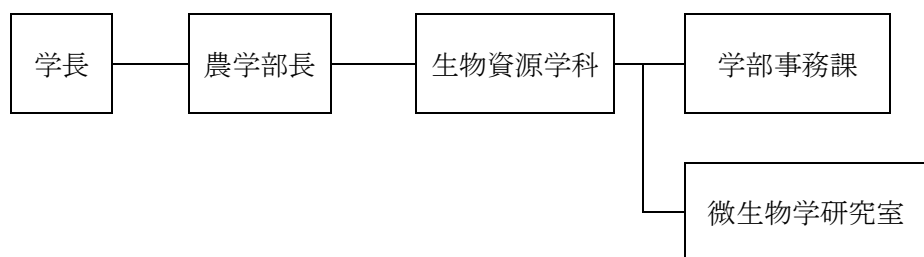


②（再委託先）

京都府公立大学法人 京都府立大学



国立大学法人 愛媛大学



（２） 管理員及び研究員

【事業管理者】 ヤマキ株式会社

① 管理員

氏 名	所属・役職
横山 定治	商品開発部・開発 3 課 顧問

② 研究員

氏 名	所属・役職
横山 定治(再)	商品開発部・開発 3 課 顧問
栗田 光作	かつお節・だし研究所 係長
宇多村 優	品質保証部 主任
来島 壮	商品開発部・開発 3 課 研究員
富士田 浩二	商品開発部・開発 3 課 顧問

国立大学法人 愛媛大学

氏 名	所属・役職
木場 洋次郎	農学部・教授
丸山 雅史	農学部・講師

京都府公立大学法人 京都府立大学

氏名	所属・役職
木戸 康博	大学院生命環境科学研究科・教授
桑波田 雅士	大学院生命環境科学研究科・准教授

(3) 経理担当者及び業務管理者の所属, 氏名

(事業管理者)

ヤマキ株式会社

(経理担当者) 経理部 次長 坂本 保

(業務管理者) 商品開発部・開発3課 顧問 横山 定治

(再委託先)

国立大学法人 愛媛大学

(経理担当者) 農学部事務課 会計チーム 児玉 直子

(業務管理者) 農学部長 林 和男

京都府公立大学法人 京都府立大学

(経理担当者) 学務課 生命環境科学研究科担当 能勢 高士

(業務管理者) 大学院生命環境科学研究科 研究科長 久保 康之

1-3 成果概要

○乳酸菌，耐酸性麹菌を用いる新規製麹技術の開発

新規バクテリオシン生産性乳酸菌の分離に成功し、その抗菌物質の性質を検討すると共にこの乳酸菌と耐酸性麹菌（白麹菌、黒麹菌）を用いる新規製麹技術を開発した。その成果は学会等で発表すると共に日本醸造学会誌に投稿した。次いで製麹操作の簡易化及び麹の品質向上に向けて、酸添加による抗菌作用を検討した。有機酸のような酸の抗菌作用は、非解離型分子のみが微生物の細胞膜を透過し、細胞内に移行してはじめて発現される。種々の有機酸により、解離の程度が異なるためそれぞれの pH における非解離型分子の割合も異なる。そこで、鰹出汁粕培地に糖を添加することによって、黒麹の特徴でもあるクエン酸等の有機酸を積極的に生産させた。また、直接添加する酸の種類により酵素活性，抗菌作用に差異が出るかについて検討した。

検討の結果から、製麹時に有機酸または無機酸を添加することによって、抗菌作用が得られることがわかった。いずれの酸でも濃度を上げると、はじめの pH が下がるため雑菌の抑制には効果的であった。しかし、2 日目以降 pH が上昇するに伴い、菌数も増加した。また、酵素活性値も減少する傾向があった。また、スクロースを添加すると、添加量に応じて培地 pH は低下するが、抗菌作用に有意な差はなかった。スクロース無添加の 0.05N 酢酸と比較すると 2 オーダー、蒸留水との比較では 3 オーダーの雑菌抑制効果があった。酵素活性では 6 割以上は保持出来ていた。クエン酸生成量やスクロース残存濃度からもわかるように、添加したスクロースは出麹の 5 日目には検出されないが、クエン酸への使用効率はかなり低かった。これは黒麹がスクロースをエネルギーとして優先的に利用した結果であり、プロテアーゼ等の活性値が減少する裏付けとも考えられる。よって、出汁粕培地のような動物性資源を有効に消費するためには、プロテアーゼ活性を優先し、スクロースは極力少ない添加量で抑える方が良い。1%のスクロースと 0.05N 酢酸を併用すれば、十分に抗菌作用は期待できると言える結果となった。

○新規麹の試験製造，スケールアップ，各種低利用水産資源の新規麹での分解試験，スケールアップ

・研究開発成果

分解中諸味を酸性 pH に保持することで良好な TN、FN 値の調味料が得られた。30℃でも 1.5 ヶ月分解でも従来（45℃）に近い分解率が得られた。常温分解での実生産が見込める。糖質原料未使用により色の薄い調味料となった。保存中も着色は少ない。原料鰹節出汁粕の溶解率（利用率）は TN 計算で 80%以上となり、目標の 60%を達成することが出来た。これまで処理に困っていた工場副生物（鰹節出汁粕）を 60%程度溶解することで、出汁粕の処理と共に製造コスト面でもメリットは大きいと考えている。殆ど鰹節（出汁粕）のみを原料とする発酵調味料であり商品差別化に有効であると予想出来る。また諸味中の雑菌

(cfu/g) が殆どゼロ (0-100) であり開放系タンクで経済的かつ衛生的に生産可能であることも当該技術の優位点である。

・事業化検討

社内検討会に於いて当該調味料の研究状況を報告すると共に、試作調味料の試飲を実施して経営者他から意見を収集した (2 回)。実験室規模の実験データを基に、中型製麹装置、1 t 分解タンク、固液分離装置等を使用して試験製造を実施した。また、事業化に関する資料作成、事業化計画の作成を行った。

○水産資源の麹分解物からの機能性物質の検索

メタボリックシンドロームは開発国で増えている。肥満は、メタボリックシンドロームの根本的なリスクファクターであり、摂取エネルギーが消費エネルギーをうわまわる時に生じる。特に、高脂肪食は膵臓の過負荷あるいは機能不全を伴う高インスリン血症や高血糖を誘導し、結果として、インスリン抵抗性の悪循環が憎悪される。

まず、発酵原料の種類がラットのエネルギー代謝に及ぼす影響について検討した。その結果、ナマズ麹調味料を投与したN群の酸素消費量は、蒸留水を投与したC群と比較して高い値を示した。一方、カツオ麹調味料を投与したK群の酸素消費量は、C群に比較して低下し、N群と比較すると有意に低値であった。カツオ麹調味料を投与したK群の呼吸商は、投与後最初の 30 分間ではC群およびN群に比較して有意に低下した。呼吸商が 0.7 に近づくほど、エネルギー源として脂肪を利用し、1.0 に近づくほど、エネルギー源として糖質を利用していると考えられることから、発酵原料の種類を換えると生体内で利用するエネルギー源も変化することが明らかとなった。一方、自発運動量は、K群において 60-120 分間の自発運動量がC群と比較して有意に高値であった。他の時間は、3 群間に有意な差を見られなかった。一般に、運動量とエネルギー消費量とは正の相関関係が認められる。しかし本研究では、麹調味料投与により自発運動が亢進しエネルギー消費量を増加させたとする明らかな結果は得られなかった。また一般に、酸素消費量はエネルギー消費量に比例することから、麹調味料投与後のエネルギー消費量は、発酵原料の種類を換えるとエネルギー消費量が増加することが明らかとなった。このことは、黄麹菌による発酵の過程で生じたアミノ酸やペプチドが発酵原料の違いによって異なり、エネルギー代謝に影響したものと考えられた。

そこで次に、黄麹菌ではエネルギー代謝に影響を及ぼさなかったカツオ出汁粕を原料にして、麹菌の種類を白麹菌あるいは黒麹菌に換えて麹調味料を作成し、ラットのエネルギー代謝に及ぼす影響について検討した。その結果、カツオ出汁粕を発酵原料として黄麹菌で作成した黄麹調味料を投与した Y 群の酸素消費量は、C群に比較して低下し、第 2 章の結果と同様であった。また、白麹菌を用いて作成した白麹調味料を投与したW群でも酸素消費量を増加させることはなかった。しかし、黒麹菌を用いて作成した黒麹調味料を投与したB群では、C群に比較して酸素消費量が増加した。特に、投与物質投与後最初の 2 時

間は、W群に比較してB群の酸素消費量が有意に増加した。また、投与後最初の30分にC群の呼吸商は、他の3群に比較して、高かった。投与後30分から120分までの呼吸商では、B群が他の3群に比較して高い傾向を示した。このことは、カツオを発酵原料として黒麹菌で作成した黒麹調味料では、エネルギー消費量が増加し、そのエネルギー源として糖質が利用されていることが示唆された。

1-4 当該プロジェクト連絡窓口

ヤマキ株式会社〈担当：商品開発部・開発3課 横山 定治〉

連絡先 TEL:089-983-6200

FAX:089-983-1540

第2章 本論

○乳酸菌，耐酸性麹菌を用いる新規製麹技術の開発

製麹時に汚染菌増殖抑制を目的として添加するバクテリオシン生産乳酸菌を選定する。山梨大から供与された乳酸菌 10 株のうち 4 菌株にバチルス、ミクロコッカス、乳酸菌に対して高い抗菌活性を認めた。この 4 菌株は他の乳酸菌よりも乳酸生成量が多いことが分かったが、バクテリオシンの生産は確認できなかった。②漬物等の発酵食品よりバクテリオシン生産乳酸菌をスクリーニングし、分離された 170 菌株のうち 4 菌株に抗菌活性が見られた。

酒類総合研究所から譲渡された黒麹菌のタイプカルチャー8 菌株と ATCC のタイプカルチャー1 菌株の計 9 菌株で麹を調製し、プロテアーゼ活性およびクエン酸生産量を検討した結果、*Aspergillus phoenicis* および *A. saitoi* (*A. phoenicis* ATCC 14332) の 2 菌株が酸性カルボキシペプチダーゼ活性、酸性プロテアーゼ活性、クエン酸生成量のいずれをとっても他の菌株よりも優良であることがわかった。また、両菌株で調製した麹は pH が 3.6~3.9 まで低下し、雑菌汚染の抑制にも効果的であると思われる。

これまでのスクリーニングで得られたバクテリオシン生産乳酸菌 2 株 (KK-12 株 (*Pediococcus* sp.), SU-19 株 (*Lactococcus lactis*)) とヤマキ (株) で分離された 3-17 株 (*Lactobacillus plantarum*) の 3 菌株による製麹試験 (白麹菌を種菌として、大麦と鰹節出汁粕に鰹エキスを添加した麹培地による) を行った。その結果、SU-19 株と 3-17 株でナイシン生産菌と同等以上の *Bacillus cereus* および *B. subtilis* に対する増殖抑制効果が見られたことより、製麹へのバクテリオシン生産乳酸菌の添加は、汚染細菌に対する増殖抑制効果を高めることが示唆された。また、この雑菌増殖抑制効果は製麹中に生産される酸 (乳酸およびクエン酸) とバクテリオシンの両方の効果によるものと推測された。

次いで、雑菌増殖抑制に対する酸の有効性が示唆されたので、製麹作業の簡略化を目的とした酸添加試験を行い、酸性領域でも生育可能な黒麹の利用について検討する。

黒麹菌 (*Aspergillus phoenicis*) による鰹出汁粕を原料とした製麹試験において、有機酸 (乳酸、クエン酸、酢酸) または無機酸 (塩酸) の添加は汚染菌の増殖を抑制することがわかった。②有機酸では、いずれも 0.2N では抗菌効果が弱いものの、2 日目まで菌数は減少した。中でも酢酸 (0.05N) は 5 日目にはコントロールと比較して 1 オーダーの菌数減少が見られた。③1%のスクロースと 0.05N 酢酸の併用により、スクロース無添加の 0.05N 酢酸と比較すると 2 オーダー、蒸留水との比較では 3 オーダーの雑菌抑制効果が認められた。以上の結果より、黒麹菌による製麹時に 1%のスクロースと 0.05N 酢酸を併用すれば、十分な抗菌効果が期待できることがわかった。

○新規麴の試験製造、スケールアップ、各種低利用水産資源の新規麴での分解試験、スケールアップ

・研究開発成果

黒麴菌、白麴菌を用いて AP 活性、ACP 活性共に高い麴を得ることが出来た。製麴操作をプラスチックレベルから製麴を小型製麴機レベルにスケールアップして高い AP 活性、ACP 活性を有する麴の製造法が確立できた。殆ど鰹節（出汁粕）のみで培養可能である。生出汁粕を大部分培地に使用することで原料コストを低減出来た。

分解中諸味を pH3.5-4.5 に保持することで良好な TN、FN 値をゆする調味料が得られた。30℃でも 1.5 ヶ月分解で従来（45℃）の 8-9 割の分解が得られ、常温分解での実生産が見込める。糖質原料未使用により色の薄い調味料となった。保存中も着色は少ない。原料鰹節出汁粕の溶解率（利用率）は TN 計算で 80%以上となり、目標の 60%を達成した。工場副生物（鰹節出汁粕）を 60%程度溶解することで、出汁粕の処理と共に製造コスト面でもメリットは大きい。殆ど鰹節（出汁粕）のみを原料とする発酵調味料であり商品差別化に有効である。諸味中の雑菌（cfu/g）が殆どゼロ（0-100）であり開放系タンクで経済的かつ衛生的に生産可能である。鰹節出汁粕の分解試験で得られた該技術は以下のような特徴を有する。即ち、①黒（白）麴の酸性プロテアーゼ、及び酸性カルボキシペプチダーゼ相互作用での呈味性調味料。②酸性 pH 領域での分解による雑菌汚染が抑制された諸味を実現。③酸性 pH 領域諸味による低食塩濃度での分解熟成の実現④黒（白）麴での分解による高い原料溶解率の達成。⑤諸味への雑菌汚染が少ないためにヒスタミン、TMA等の有害物質の副生が微量である。⑥開放系タンクで生産出来安価な製造設備で対応できる。⑦薄い色の調味料が生産出来、製品の用途を拡げることが可能である。これらの特長を利用して種々の食品原料の分解を検討中である。先ず、鰹残渣（頭、内臓等）利用の“鰹調味料”の製造方法を検討した。東南アジアの伝統的魚醬と同等の呈味性があり色度も同等の薄い調味料が得られている。有害物質であるヒスタミンの含有は殆ど見られなかった。魚介類原料の溶解率は良く骨だけが残存した。更に、真鯛あら、小魚（キビナゴ）、貝（ホタテ）、畜肉（手羽元）等の該技術を利用した処理を検討して良好な結果が得られている。

・事業化の検討

現在、工業化ステージでの検討を実施中であるが、解決すべき課題は多い。また、ヤマキとしても3年間に渡る研究化の中で、3,500万円以上の人件費、などの投資を続けてきているために、これ以上の研究期間と投資を考えると、事業としての採算性に大きく影響を与えてくる。そのために、早急な工業化、事業化の実施が望まれる。これらのことを考えていくと、工業化におけるプラントテストでの概算製造フローの実施により、事業化に向けてのいくつかのパターンでのシミュレーションを早期に行い、工業化ステージの終了を待つまでも無く事業化の可否判断をする必要がある。そのためのシミュレーションは、

以下のように考えている。

- ①概算製造フローからの年間製造量（製造金額）の製造シミュレーション
- ②それに伴う設備投資額のシミュレーション
- ③上記を基にした最終製造原価のシミュレーション
- ④上記を基にした最終販売価格のシミュレーション
- ⑤上記各シミュレーションを基にした最終損益あるいは収支

上記の事業化に向けた案件を、工業化のプラントテストの実施と平行して算出していく予定。現時点での事業化シミュレーションでは、損益分岐点がまだまだ高いために、工業化条件の確立と安定化を進めると同時に、予想される設備投資額から目標コストに向けての生産の効率化が必須の課題となっている。特に、目標コスト達成（製造コスト低減）のためには、

- ・かつお節残渣分解率の向上による窒素量当りの旨味力価のアップ
- ・発酵期間の短縮による投資生産設備の低減と生産人件費の低減
- ・固液分離の精度向上による歩留り向上、生産人件費の低減
- ・大量生産によるスケールメリットの創出

などが考えられている。また、これらの課題を解決していくためには、

- ・今後の工業化のプラントテストを繰り返しのために、約1年の工業化テスト期間と、約2000万円の人件費、約1400万円の原材料費、設備運営費の投資が発生する。
- ・ただし、半年間で最終事業化の判断の目処は、事業化シミュレーションで確定させられる可能性はあり。

○水産資源の麴分解物からの機能性物質の検索

本研究では、大麦麴および魚麴調味料の機能性の1つとして消化管における中性脂肪吸収抑制効果を検討した。その結果、大麦麴および魚麴調味料には、消化管からの中性脂肪の吸収抑制効果が認められた。その抑制効果は、どの試作調味料でも原液濃度より高い濃度でより大きくなった。また、アマエビとアミエビの調味料には、中性脂肪の吸収速度を抑制する効果があると確認された。しかし、中性脂肪吸収抑制機序としてリパーゼ阻害作用は確認できず、中性脂肪吸収抑制機序についてはさらなる検討が必要である。以上の結果から、大麦麴および魚麴調味料の摂取は、肥満、それに続くメタボリックシンドロームの予防に有効であることが示唆された。今後、大麦麴および魚麴調味料の機能性に関する研究として、中性脂肪吸収抑制以外の作用も興味深い課題である。また、肥満のリスク軽減に関する実験系として、先行研究でエネルギー代謝亢進作用が確認されているカプサイシンをポジティブコントロールとしてエネルギー代謝研究法が確立できた。

次いで、未利用水産資源の麴分解物の機能性の1つとして消化管における中性脂肪吸収抑制効果ならびにエネルギー代謝促進効果を検討した。未利用水産資源の麴分解物としては、ナマズを材料に作成した白麴調味料および黄麴調味料を用いた。対照にはナマズを材料に作成した大麦麴調味料を用いた。その結果、白麴調味料および黄麴調味料には、消化

管からの中性脂肪の吸収抑制効果が認められた。しかし、大麦麴調味料では、蒸留水を投与したコントロールとほぼ同等であった。調味料に使われる麴の種類によって中性脂肪吸収速度に違いが認められ、このことは調味料の生成過程で生じるペプチドやアミノ酸成分が関係していることが推察された。また、肥満のリスク軽減を目的にエネルギー代謝亢進作用について検討した。その結果、白麴調味料および黄麴調味料投与後 60 分から 300 分のエネルギー消費量が増加した。このエネルギー消費量の増加は、自発運動量の増加によるものではなく、エネルギー代謝の亢進によると推察された。白麴調味料および黄麴調味料投与後のエネルギー基質は、呼吸商の経時的な変化から、いずれも脂肪が利用されていることが推察された。これらの結果から、本研究で新たに製造した未利用水産資源の麴分解物は、メタボリックシンドローム予防に有用であると推察された。

最終年度（平成 22 年度）は、肥満のリスク軽減に注目して、麴調味料のエネルギー代謝亢進作用について検討した。

実験 1: 麴調味料の原料がラットのエネルギー代謝に及ぼす影響 黄麴菌を製麴し、発酵原料としてナマズまたはカツオの出し殻に加えて麴調味料を製造した。SD 系雄性ラット（7~9 週齢）を 24 時間以上絶食させ、麴調味料（0.2 g/40%グルコース溶液 5 mL/kg 体重）および脂肪乳剤（2 g/脂肪/10 mL/kg 体重）を胃内投与した。投与前、投与後 1、2、3、4、および 6 時間後に採血し、血漿グルコース濃度を測定した。また、投与前および投与後 6 時間の酸素消費量、呼吸商および自発運動量を測定した。その結果、酸素消費量は、コントロール群に比較して、カツオ黄麴調味料を投与すると低下し、ナマズ黄麴調味料を投与すると上昇したことから、麴調味料の原料が異なるとラットのエネルギー代謝に及ぼす影響も異なり、ナマズ黄麴調味料がカツオ黄麴調味料よりもエネルギー代謝亢進効果が大きいことが示唆された。

実験 2: 麴菌の種類がラットのエネルギーに及ぼす影響 黄麴菌、白麴菌または黒麴菌を製麴し、発酵原料としてカツオの出し殻に加えて麴調味料を製造した。SD 系雄性ラット（7~9 週齢）を 24 時間以上絶食させ、実験 1 と同様にエネルギー代謝を測定した。その結果、麴調味料投与後 200 分までの酸素消費量は、コントロール群に比較して、カツオ黒麴調味料を投与すると上昇し、カツオ黄麴調味料およびカツオ白麴調味料を投与すると低下したことから、同じ原料を用いても麴菌の種類が異なるとラットのエネルギー代謝に及ぼす影響も異なり、カツオ黒麴調味料がカツオ黄麴調味料よりもエネルギー代謝亢進効果が大きいことが示唆された。

実験 3: 黒麴調味料がヒトのエネルギー代謝に及ぼす影響 健康な成人延べ 18 名を被験者とした。本研究は、京都府立大学倫理委員会の承認を得て実施した。黒麴調味料（0.2 g/mL/kg BW）、食用オリーブオイル（0.2 g/mL/kg BW）およびトレラン G 液（100 g グルコース含有）を摂取させ、その後のエネルギー代謝量、炭水化物代謝量、脂肪代謝量および呼吸商を測定した。その結果、カツオ黒麴調味料摂取後 120 分間は、エネルギー代謝量、炭水化物代謝量、脂肪代謝量がいずれもコントロールに比較して高値を示した。

以上の結果から、未利用水産資源であるカツオの出し殻を原料としたカツオ黒麹調味料は、ヒトにおいても緩やかなエネルギー代謝亢進効果が期待された。

③ 専門語句説明

1：バクテリオシン

乳酸菌の生産する抗菌物質である。安全性が高く、食品の防腐作用に有用と考えられている。

2：プロテアーゼ

蛋白質を分解してペプチド、アミノ酸を遊離する生体触媒である。その作用 pH 領域からアルカリプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、酸性プロテアーゼと大別されている。

3：ウェル拡散法

乳酸菌により培地中に生産された抗菌物質の定量方法であり、シャーレ中の培地上面に穴を開けそこに試験液を添加して阻止円の大きさで抗菌活性を測定する。

4：ヘマトクリット値

全血液に占める赤血球の容積量の割合をパーセントであらわしたもの。

5：血漿総タンパク濃度

血漿中に存在して、全身を循環しているタンパク質。多数のものがある。総タンパク質の大半はアルブミンである。その他に、各種免疫グロブリン、リポタンパク質、フィブリノーゲン、トランスフェリンなどがある。

6：血漿グルコース濃度

血漿中に存在するグルコース濃度。健常者の静脈血中の基準値は空腹時4～6mmol/L(70～110 mg/dL)、食後でも16 mg/dL未満とほぼ一定の範囲に保たれている。

7：血漿中性脂肪濃度

血液中に存在する中性脂肪(トリアシルグリセロール)濃度。疎水性が強いのでアポタンパク質とともにリポタンパク質という球形の形態をとって血液中を運搬される。

8:APase(Acid protease)

酸性 pH 領域で蛋白質を良く分解する。基質蛋白質の内部でペプチド結合を分解して種々の大きさのペプチドを生成する。

9:ACPase(Acid carboxypeptidase)

酸性 pH 領域で蛋白質及びペプチドに良く作用する。基質のカルボキシル末端のペプチドを分解して末端から順番にアミノ酸を遊離する。

第3章全体総括

○乳酸菌、耐酸性麹菌を用いる新規製麹技術の開発

鰹節出汁粕の麹分解諸味から新規バクテリオシン生産性乳酸菌を分離し、その抗菌物質の性質を検討すると共にこの乳酸菌と耐酸性麹菌（白麹菌、黒麹菌）を用いる新規製麹技術を開発した。次いで製麹操作の簡易化及び麹の品質向上に向けて、酸添加による抗菌作用を検討した。製麹時に有機酸または無機酸を添加することによって、抗菌作用が得られることがわかった。いずれの酸でも濃度を上げると、はじめの pH が下がるため雑菌の抑制には効果的であった。しかし、2 日目以降 pH が上昇するに伴い、菌数も増加した。また、酵素活性値も減少する傾向があった。スクロースを添加すると、添加量に応じて培地 pH は低下するが、抗菌作用に有意な差はなかった。スクロース無添加の 0.05N 酢酸と比較すると 2 オーダー、蒸留水との比較では 3 オーダーの雑菌抑制効果があった。酵素活性では 6 割以上は保持出来ていた。クエン酸生成量やスクロース残存濃度からもわかるように、添加したスクロースは出麹の 5 日目には検出されないが、クエン酸への使用効率はかなり低かった。これは黒麹がスクロースをエネルギーとして優先的に利用した結果であり、プロテアーゼ等の活性値が減少する裏付けとも考えられる。出汁粕培地のような動物性資源を有効に消費するためには、プロテアーゼ活性を優先し、スクロースは極力少ない添加量で抑える方が良い。1%のスクロースと 0.05N 酢酸を併用すれば、十分に抗菌作用は期待できると言える結果となった。

○新規麹の試験製造、スケールアップ、各種低利用水産資源の新規麹での分解試験、スケールアップ

・研究開発成果

新規製麹方法で得られた麹を使用し、諸味 pH を酸性 pH に保持することで良好な TN、FN 値の調味料製造方法が確立出来た。常温での 1.5 ヶ月分解でも従来（45℃）に近い分解率が得られた。糖質原料未使用により色の薄い調味料となった。保存中も着色は少ない。原料鰹節出汁粕の溶解率（利用率）は TN 計算で 80%以上となり、目標の 60%が達成出来た。工場副生物（鰹節出汁粕）を効率良く分解出来、出汁粕の処理面でもメリットは大きいと考えている。また商品差別化に有効である。諸味中の雑菌（cfu/g）が殆ど見られず、開放系タンクで経済的かつ衛生的に生産可能で。

・事業化検討

実験室規模の実験データを基に、中型製麹装置、1 t 分解タンク、固液分離装置等を使用して試験製造を実施した。また、事業化に関する資料作成、事業化計画の作成を行った。

○水産資源の麹分解物からの機能性物質の検索

メタボリックシンドロームは開発国で増えている^{8) 9)}。肥満は、メタボリックシンドロームの根本的なリスクファクターであり、摂取エネルギーが消費エネルギーをうまわる時に

生じる^{10) 11)}。特に、高脂肪食は膵臓の過負荷あるいは機能不全を伴う高インスリン血症や高血糖を誘導し、結果として、インスリン抵抗性の悪循環が憎悪される。

世界各地では、様々な麴調味料(穀物、豆類、魚介類などの原料を塩漬け、発酵させたもの)が使われている。日本を含むアジアでは、味噌や醤油のような穀醬や、ナンプラーのような魚醬が古くから愛用されてきた。特に魚醬は、麴菌の産生するプロテアーゼの作用により生じたアミノ酸と魚肉に含まれる核酸を豊富に含むので、料理に濃厚なうま味を加えるはたらきがある。また、血圧降下作用³⁾、血清脂質改善作用⁴⁾などの生理作用も報告されており、麴調味料は使用する材料と麴菌の種類によって様々な効果が期待できる。本研究では、カツオの出汁粕などの未利用水産資源を原料として、麴菌の種類を変えて麴調味料を試作した。試作した調味料は、魚の動物性タンパク質が分解されたペプチドやアミノ酸を豊富に含むため、様々な生理作用が期待された。そこで本研究では、肥満やメタボリックシンドロームのリスク軽減に注目して、麴調味料のエネルギー代謝亢進作用について検討した。

本研究で用いた発酵原料は、ナマズの骨や頭部の残渣、カツオの出汁粕などの未利用水産資源とした。ベトナムでは、欧米諸国にナマズをフィレとして大量に輸出している。しかし、その残渣である骨や頭部、内臓部は未利用水産資源であり、大部分は廃棄されている。日本においても、カツオを鰹節として処理した残渣である骨や頭部、内臓部は未利用水産資源であり、大部分は廃棄されている。また、鰹節から鰹だしをとった残渣も未利用水産資源であり、家畜の飼料等に利用されている。そこで本研究では、未利用水産資源であるナマズやカツオの廃棄部分を用いて麴調味料を作成し、未利用水産資源の有効利用の可能性を探るとともに肥満やメタボリックシンドロームなどの生活習慣病対策に寄与することを目的とした。

麴調味料は、使用する麴菌の違いによって、生成されるアミノ酸やペプチドが異なることが推察される。醤油麴菌である黄麴菌は中性条件で発育し、雑菌が繁殖しやすいのに対し、黒麴菌は酸性条件でも発育し、雑菌が増殖しない。また、黒麴菌は培地に糖質がないと発育しない。そこで、適当量の酸と糖を加えて製麴することを考えた。本研究で用いた麴菌は、黄麴菌、白麴菌または黒麴菌である。これらの麴菌を大麦またはカツオの出汁粕で製麴し、発酵原料のナマズまたはカツオの出汁粕に加えて麴調味料を製造した。これらの麴調味料を脱塩し、凍結乾燥したものを試料として用いた。

まず、発酵原料の種類がラットのエネルギー代謝に及ぼす影響について検討した。その結果、ナマズ麴調味料を投与したN群の酸素消費量は、蒸留水を投与したC群と比較して高い値を示した。一方、カツオ麴調味料を投与したK群の酸素消費量は、C群に比較して低下し、N群と比較すると有意に低値であった。カツオ麴調味料を投与したK群の呼吸商は、投与後最初の30分間ではC群およびN群に比較して有意に低下した。呼吸商が0.7に近づくほど、エネルギー源として脂肪を利用し、1.0に近づくほど、エネルギー源として糖質を利用していると考えられることから、発酵原料の種類を換えると生体内で利用するエ

エネルギー源も変化することが明らかとなった。一方、自発運動量は、K群において 60-120 分間の自発運動量がC群と比較して有意に高値であった。他の時間は、3 群間に有意な差を見られなかった。一般に、運動量とエネルギー消費量とは正の相関関係が認められる。しかし本研究では、麹調味料投与により自発運動が亢進しエネルギー消費量を増加させたとする明らかな結果は得られなかった。また一般に、酸素消費量はエネルギー消費量に比例することから、麹調味料投与後のエネルギー消費量は、発酵原料の種類を換えるとエネルギー消費量が増加することが明らかとなった。このことは、黄麹菌による発酵の過程で生じたアミノ酸やペプチドが発酵原料の違いによって異なり、エネルギー代謝に影響したものと考えられた。

そこで次に、黄麹菌ではエネルギー代謝に影響を及ぼさなかったカツオ出汁粕を原料にして、麹菌の種類を白麹菌あるいは黒麹菌に換えて麹調味料を作成し、ラットのエネルギー代謝に及ぼす影響について検討した。その結果、カツオ出汁粕を発酵原料として黄麹菌で作成した黄麹調味料を投与した Y 群の酸素消費量は、C群に比較して低下し、第 2 章の結果と同様であった。また、白麹菌を用いて作成した白麹調味料を投与したW群でも酸素消費量を増加させることはなかった。しかし、黒麹菌を用いて作成した黒麹調味料を投与したB群では、C群に比較して酸素消費量が増加した。特に、投与物質投与後最初の 2 時間は、W群に比較してB群の酸素消費量が有意に増加した。また、投与後最初の 30 分にC群の呼吸商は、他の 3 群に比較して、高かった。投与後 30 分から 120 分までの呼吸商では、B群が他の 3 群に比較して高い傾向を示した。このことは、カツオを発酵原料として黒麹菌で作成した黒麹調味料では、エネルギー消費量が増加し、そのエネルギー源として糖質が利用されていることが示唆された。

肝臓と脂肪組織は脂質とグルコースの恒常性を維持するために重要な役割を演じている。Jenkins et al.¹²⁾ によって提案されたグリセミックインデックス (GI) は、血糖上昇に対する炭水化物食のランキングを示すものである。低 GI 食が血糖コントロールだけでなく血清脂質も改善することが報告されている^{13) 14)}。したがって、Pawlak et al.¹⁵⁾ は、低 GI 食は膵臓 β 細胞の機能不全を防御すると主張している。本研究において、2 g/kg BW のグルコースを胃内投与した結果、血漿グルコース濃度には明らかな変化を認めなかった。しかし、黒麹調味料では、エネルギー消費量が増加し、そのエネルギー源として糖質が利用されていることが示唆された。

そこで実験 2 では、ヒトで黒麹調味料のエネルギー代謝に及ぼす影響を検討した。カツオ黒麹調味料 (0.2 g/Kg BW)、オリーブオイル (0.2 g/Kg BW) およびトレラン G 液 (100 g グルコース含有) 摂取後 2 時間は、蒸留水を摂取したコントロールに比較して、エネルギー代謝量は緩やかに増加した。この時の呼吸商の変化は、カツオ黒麹調味料摂取後 90 分間は、コントロールに比べて緩やかに上昇した。これを炭水化物代謝量と脂肪代謝量に分けて解析すると、カツオ黒麹調味料摂取後 90 分間は、コントロールに比較して炭水化物代謝量が増加する傾向を示し、摂取後 60 分から 150 分の間は、脂肪代謝量がコントロールよりも緩

やかに増加した。これらのことから、カツオ黒麹調味料は、糖質代謝だけでなく脂肪代謝も亢進させ、肥満やメタボリックシンドロームの予防に寄与できることが推察された。

本研究の限界は、今回作成したカツオ黒麹調味料の効果の本体がアミノ酸、ペプチドであることを直接証明できていないことである。また、ナマズ黒麹調味料についても検討できていない。これらの課題については、さらなる研究が必要である。

以上の結果から、麹調味料の機能性は、調味料の原料や利用する麹菌によって大きく異なることが明らかとなった。また、カツオ黒麹調味料はラットだけでなくヒトにおいてもエネルギー代謝を緩やかに亢進する効果を認め、肥満やメタボリックシンドロームの予防に寄与できると考えられた。

当該委託事業に関連した特許出願及び外部発表は以下のようである。

○特許出願及び外部発表

・特許出願

1：{発明の名称} 酸性プロテアーゼ活性及び酸性カルボキシペプチダーゼ活性の高い麹及びその製造方法、並びにその麹を用いた魚調味料、{出願日} 平成21年8月17日、{出願番号} 特願2009-188267、{出願人} ヤマキ株式会社

・学会等での講演

1：{演題} 魚介類を培地とする新しい製麹方法とそれを用いた調味料製造技術の開発 {講演者} 横山定治、富士田浩二、木場洋次郎 {講演日} 平成21年9月17日 {学会} 日本醸造学会大会

2：{演題} バクテリオシン生産乳酸菌による製麹試験、{講演者} 池原国彦、楠原 剛、仙頭将之、丸山雅史、富士田浩二、横山定治、木場洋次郎 {講演日} 平成22年1月23日 {学会} 日本農芸化学会中四国支部第26回講演会

3：{演題} 新規鯉節だし風調味料の特性と調理特性 {講演者} 亀岡恵子、峰 弘子、横山定治 {講演日} 平成21年10月11日 {学会} 日本家政学会中国・四国支部研究発表会

4：{演題} *Lactobacillus plantarum* 3-17 が生産するバクテリオシン {講演者} 富士田浩二、横山定治 {講演日} 平成22年1月23日 {学会} 日本農芸化学会中四国支部第26回講演会

5：{演題} メコン鯰を原料とする麹分解調味料の試作とその健康機能性 {講演者} 横山定治、ハ・タン・トアン、グエン・バン・タン、楊 存厚、木戸康博 {講演日} 平成22年9月15日 {学会} 日本醸造学会大会

6：{演題} 魚介類麹分解調味料とその機能性 {講演者} 横山定治 {講演日} 平成22年11月19日 {学会} 機能性食品用ペプチド研究会

・展示

1：{展示会名} 産業交流展2009 {場所} 東京ビッグサイト {展示日} 平成21年11月4/6日

2：{展示会名} 中国四国地域アグリビジネス創出フェア {場所} 広島市中小企業会館 {展示日} 平成21年12月8日

3：{展示会名} さんわかポスター展示（農芸化学会大会併設）{場所} 京都女子大 {展示日} 平成23年3月26日

・印刷化

1：{題} 新規鰹節だし風調味料の調理特性 {著者} 亀岡恵子、峰 弘子、横山定治 {掲載誌名他} 松山東雲短期大学研究論集40巻、37－43頁、2010年

2：{題} 鰹節出汁粕を焼酎用白麹菌で分解して得られる調味料 {著者} 横山定治、木場洋次郎、亀岡恵子、峰 弘子 {掲載誌名他} 日本醸造学会誌、受理されて印刷中

3：{題} 新しい鰹節分解調味料の嗜好適性 {著者} 亀岡恵子、峰 弘子、横山定治 {掲載誌名他} 松山東雲短期大学研究論集、印刷中

4：{題} 魚肉含有培地での製麴におけるバクテリオシン生産性乳酸菌の雑菌汚染防止効果 {著者} 横山定治、富士田浩二、木場洋次郎 {掲載誌名他} 日本醸造学会誌、受理されて印刷中