

## 植物性素材を原料とした「乳酸菌・酵母発酵エキス (PELY)」に関する研究

桑木 信輔<sup>1)</sup>, 中島 伸佳<sup>2)</sup>, 石原 浩二<sup>3)</sup>, 双 全<sup>4)</sup>, 田中英彦<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>機能性食品開発研究所\*, <sup>2)</sup>岡山県立大学保健福祉学部栄養学科\*\*,

<sup>3)</sup>岡山理科大学理学部臨床生命科学科\*\*\*, <sup>4)</sup>内蒙古農業大学食品科学工程学院\*\*\*\*)

### Studies on the Plant-based Extract Fermented by Lactic Acid Bacteria and Yeast

Shinsuke KUWAKI<sup>1)</sup>, Nobuyoshi NAKAJIMA<sup>2)</sup>, Kohji ISHIHARA<sup>3)</sup>, Shuangquan<sup>4)</sup> and Hidehiko TANAKA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Functional Food Creation Research Institute Co., Ltd, Okayama 701-1145, Japan,

<sup>2)</sup>Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science,  
Okayama Prefectural University, Okayama 719-1197, Japan,

<sup>3)</sup>Department of Life Science, Okayama University of Science, Okayama 700-0005, Japan,

<sup>4)</sup>College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University,  
Inner Mongolia 01008, P.R. China

#### Summary

A plant-based diet is thought to be better for the prevention and treatment of lifestyle-related diseases. A plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast (PELY) was made from various plant materials and was fermented product applying to traditional food-preservation technique, that is, fermentation and sugaring. In this study, the characterization and physiological function of PELY were examined.

PELY contained 58.8 % carbohydrate, 3.7 % protein, and 1.3 % lipid. It contained 18 kinds of amino acids and vitamin A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, E, K, niacin, pantothenic acid, and folic acid. It also did a lot of dietary fiber and phytochemicals (polyphenol, terpenoid, *i.e.*).

Moreover, it was determined that PELY had several physiological functions such as antioxidant, antihypertensive, antibacterial, prompt digestive and anti-tyrosinase activities. As the results, PELY possessed antioxidant, antihypertensive, antibacterial, and anti-tyrosinase activities *in vitro*.

日本人の食文化は、農耕による植物性食品を中心とした文化であったが、近年、食生活の欧風化に伴い、肥満・高血圧症・糖尿病・高脂血症などの生活習慣病が急増している<sup>1-4)</sup>。また、生活習慣病予防のための食品摂取の重要性が高まるとともに、野菜や果物の摂取が心臓病や循環器系の疾患を予防する効果が示唆され<sup>5-7)</sup>、植物性食品を中心とした食生活が見直されつつある。

最近では食品加工技術等の進歩により、季節を問わず野菜や果物が手に入るようになったものの、多くの野菜や果物にはいわゆる「旬」があり、ある決まった時期にしか手に入らないものである<sup>8)</sup>。そのため、それらを加工し保存性を高める工夫も古くから行われており、発酵や糖蔵は、塩蔵・乾燥・燻製と並んで伝統的な食品保存技術であると言える<sup>8)</sup>。

乳酸菌・酵母発酵エキス (PELY) は、発酵と糖蔵技術をうまく組み合わせ、シヨ糖の浸透圧を利用して旬の果物や野菜からエキス分を抽出し、それらエキス成分をブレンドし、かつ乳酸菌や酵母により発酵・熟成させた植物性の発酵食品である。したがって、多種多様な植物を摂取することができる利点もある。また、牡蠣 (*Crassostrea gigas*) は栄養豊富な食品として知られており、健康食品としても一般に広く利用されている<sup>9)</sup>が、PELYをはじめとした植物発酵食品も同様に、日本の健康食品の草分け的存在<sup>10)</sup>として知られている。しかし、牡蠣の場合とは異なり、原材料の種類が多く、微生物発酵で各植物成分が消化・吸収されやすくなって栄養素として有利である<sup>11)</sup>と考えられているもののその作用機序はいまだ未解明な部分も多い。また、PELY においては発酵制御を伝統的な加工経験に頼る部分

\*所在地：岡山県岡山市北区横井上 49-1 (〒701-1145)

\*\*所在地：岡山県総社市窪木 111 (〒719-1197)

\*\*\*所在地：岡山県岡山市北区理大町 1-1 (〒700-0005)

\*\*\*\*所在地：No. 306, Zhaowuda Road, Saihanqu, Hohhot, Inner Mongolia, P. R. China (〒010018)

が多く、発酵・熟成過程の科学的調査の必要がある。さらに、PELYの栄養的特性や保健（生理）機能についても、生活習慣病予防などに役立つ新たな知見や情報を得る上で重要であると考えられる。

そこで、本研究ではPELYのさらなる有効性を解明するために、発酵・熟成過程での微生物の菌数の推移や栄養成分の分析および *in vitro* における保健（生理）機能について検討することとした。

## 実験方法

### 1. 乳酸菌・酵母発酵エキス (PELY) の調製

PELYの調製に用いた原材料はTable 1に示したとおり

である。75種類の多種多様な植物性原料を使用した。乳酸菌はTable 2に示した15種類の植物性乳酸菌を発酵スターターとして添加した。また、Fig. 1にPELYの製造プロセスの概略を示した。黒砂糖と新鮮な旬の原料を個別の樽に入れ、細胞を破壊することなく内容成分を抽出し、それらを粉末や熱水抽出した原料とともにブレンドし、乳酸菌・酵母により発酵・熟成させたものを試料とした。

#### 1) 菌数測定

発酵初期段階（0～200日）における発酵関与菌の菌数の経時変化およびpHの変化を調べるために、以下のような方法を用いた。

乳酸菌数はプロムクレゾールパープル加プレートカウント寒天培地（以下BCPと表記）を用いて、37℃で72時間培

**Table 1** Food materials of PELY\*

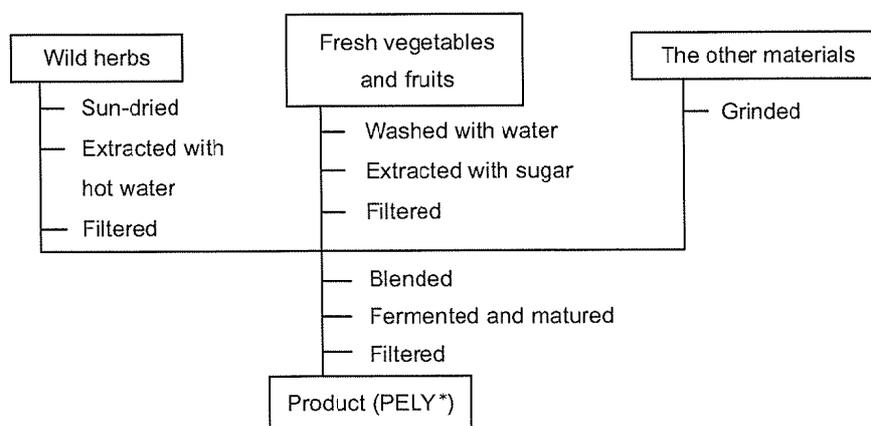
	Plant name
Sugar	Brown sugar, Oligosaccharide
Fruits	Prune, Ume, Citron, Strawberry, Apple, Iyo-orange, Grape, Fig, Persimmon, Kiwi, Mandarin, Lemon, Kumquat, Akebi, Wild vine Artubus, Winter strawberry, Blueberry, Blackberry, Raspberry, Burmese rosewood, Peach, Pear, Goumi
Vegetables and Wild herbs	Pumpkin, Carrot, Mugwort, Cabbage, Kale, Spinach, Japanese radish, Eggplant, Perilla, Tomato, Pimento, Cucumber, Bitter gourd, Komatsuna, Turmeric, Japanese mallotus, Plantain, Young leaf of barley, Striped bamboo, Burdock, Field horsetail, Loquat leaf, Broccoli, Jew's mallow, Japanese mountain ginseng, Parsley, Japanese parsley, Celery, Lotus root, Mitsuba, Japanese ginger, Asparagus, Ginger, Qing geng cai, Vitamin-na
Mushrooms	Shiitake mushroom, Lucid ganoderma, Jew's-ear, Maitake mushroom
Seaweed	Kombu, Wakame, Fucus, Kombu root, Hijiki
Pulse and Cereals	Soybean, Cocoa, Sweet corn, Rice bran, Unpolished rice

\* Plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast.

**Table 2** Lactic acid bacteria added as a starter in PELY\*

Rods	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>
	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus buchmeri</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus kefiranoferiens</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Cocci	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	<i>Pediococcus damnosus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Pediococcus urinae-equi</i>

\* Plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast.



**Fig. 1** Manufacturing process of PELY\*.

\* Plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast.

養した。真菌数は、ポテトデキストロース寒天培地(以下 PDA と表記)を用いて 30℃ で 6 日間培養した。それぞれの培地上に出現したコロニーを計数し、各菌数を CFU/g として表した。pH は PELY がペースト状のため、純水で 10 倍 (w/w) 希釈したものを pH メーターで測定した。

## 2) 酵母の同定

PDA 上に出現したコロニーを釣菌し、1% (v/v) Triton X-100 を含む菌体処理液に取り、99℃、10分処理した DNA と ITS1F primer: GTAACAAGGT (T/C) TCCGT および ITS1R primer: CGTTCTTCATCGATG を用いて 28S rRNA 遺伝子の一部を PCR により増幅し、その塩基配列に基づいて同定した。当該遺伝子の PCR 増幅は、94℃、3分の前処理後、94℃、30秒、55℃、1分、72℃、1分のサイクルを 30 回繰り返し、最後に 72℃、7分保持することで行った。同遺伝子の塩基配列は、ITS1F primer と BigDye Terminator FS ver. 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて決定した。得られた塩基配列を BLAST 検索し、一致率のもっとも高い菌種を同定菌種とした。

## 2. 栄養成分分析

### 1) 一般分析

一般成分や無機質の分析方法は、五訂日本食品標準成分表<sup>12)</sup>に従った。水分は減圧加熱乾燥による減量法により測定した。タンパク質は改良ケルダール法によって定量した窒素量から算出した。脂質はジエチルエーテルによるソックスレー抽出法により定量した。灰分は直接灰化法 (550℃) により定量した。ナトリウム、カリウム、マグネシウム、亜鉛、マンガンは原子吸光法により定量した。カルシウムは ICP 発光分析法により定量した。リンはバナドモリブデン酸吸光光度法により定量した。鉄は *o*-フェナントロリン吸光光度法により定量した。セレンは蛍光光度法により定量した。食物繊維 (NDF) は、PELY を NaOH で中和後、AACC 法<sup>13)</sup>に従って定量した。

### 2) アミノ酸組成

アミノ酸分析は以下のように行った。シスチンとメチオニン、PELY を過ギ酸酸化後 6 N 塩酸 (0.04% β-メルカプトエタノール含有) で 150℃、20 時間加水分解後、カラムクロマトグラフィー法 (アミノ酸自動分析計使用) で測定した。トリプトファンは PELY を水酸化バリウム (チオジエチレングリコール含有) で 110℃、12 時間加水分解後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。その他のアミノ酸 (アルギニン、リジン、ヒスチジン、フェニルアラニン、チロシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、グリシン、プロリン、グルタミン酸、セリン、スレオニン、アスパラギン酸) は、PELY を 6 N 塩酸 (0.04% β-メルカプトエタノール含有) で 100℃、24 時間加水分解後、カラムクロマトグラフィー法 (アミノ酸自動分析計使用) で測定した。

### 3) ビタミン含有量

ビタミン類の分析は、五訂日本食品標準成分表<sup>12)</sup>の方法に従った。ビタミン A (レチノール) は、ODS 系カラムと水-メタノール混液による紫外吸収検出-HPLC 法で定量した。α-カロテン、β-カロテン、クリプトキサンチンは、ODS 系カラムとクロロホルム-メタノール溶液による可視部吸収検出-HPLC 法により定量した。ビタミン B<sub>1</sub> (チアミン) は、ODS 系カラムとメタノール-0.01 mol/L リン酸二水素ナトリウム-0.15 mol/L 過塩素酸ナトリウム混液による分離とポストカラムでのフェリシアン化カリウムとの反応による蛍光検出-HPLC 法により定量した。ビタミン B<sub>2</sub> (リボフラビン) は、ODS 系カラムとメタノール-酢酸緩衝液による蛍光検出-HPLC 法により定量した。ビタミン B<sub>6</sub> は、*Saccharomyces cerevisiae* ATCC9080 による微生物学的定量法により定量した。ビタミン B<sub>12</sub> は、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC7830 による微生物学的定量法により定量した。ナイアシンは、*Lactobacillus plantarum* ATCC8014 による微生物学的定量法により定量した。ビタミン C は、順相型カラムと酢酸/*n*-ヘキサン/酢酸エチル混液による可視部吸光検出-HPLC 法により定量した。ビタミン D は、逆相型カラムとアセトニトリル/メタノール混液による分取高速液体クロマトグラフ法のあと、順相型カラムと 2-プロパノール/*n*-ヘキサン混液による紫外吸収検出-高速液体クロマトグラフ法により定量した。ビタミン E は、順相型カラムと酢酸/2-プロパノール/*n*-ヘキサン混液による蛍光検出-HPLC 法により定量した。ビタミン K は、還元カラム-ODS 系カラムとエタノール/メタノール混液による蛍光検出-HPLC 法により定量した。パントテン酸は、*Lactobacillus plantarum* ATCC8014 による微生物学的定量法により定量した。葉酸は、*Lactobacillus rhamnosus* ATCC8014 による微生物学的定量法により定量した。

### 4) ポリフェノール含有量

ポリフェノール含有量はフォリンデニス法<sup>14)</sup>にしたがって、PELY を 80% アセトンで抽出・希釈し、カフェー酸をスタンダードとして、760 nm の吸光度を分光光度計 (DU-64, BECKMAN) で測定した。

## 3. 保健 (生理) 機能

### 1) 抗酸化作用

Myagmar と Aniya の方法<sup>15)</sup> (ESR-スピントラップ法) に従って、PELY を純水で 1 : 1 抽出し、50% エタノールに溶解し、ESR 測定装置 (JEOL, JES-FR 30 ES) を用いて、HPX-XOD (ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ [EC 1.1.3.22]) 系によって発生するスーパーオキシドの 5,5-ジメチル-1-ピロリン-*N*-オキシド (DMPO) 付加体の ESR スペクトルを測定した。対照 (H<sub>2</sub>O) と比較し、その減少からラジカル消去活性を算出した。さらに試料として、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) による検量線を作成し、SOD 様活性として表した。

## 2) 血圧上昇抑制作用

Okamotoらの方法<sup>6)</sup>により、PELYをPBSで1:1抽出し、凍結乾燥して得られた粉末を試料とし、Hippury-Histidyl-Leucine (HHL)を基質としてアンジオテンシン転換酵素(ACE)の阻害活性を調べた。酵素標準物としてウサギ肺由来アンジオテンシン転換酵素を用いた。

## 3) 抗菌作用

抗菌試験に使用した菌名と培養条件は以下のとおりである(Table 3)。

乳酸菌(*Lactobacillus acidophilus* NBRC13951, *L. brevis* NBRC3960, *L. fermentum* NBRC3071, *L. plantarum* THT 030701, *Lactococcus lactis* NBRC12007, *Enterococcus faecalis* NBRC3971)と*Streptococcus mutans* NBRC13955はMRS寒天培地(OXIOD社製), *Helicobacter pylori* JCM12036と*Porphyromonas gingivalis* JCM12257は血液寒天培地, *Vibrio parahaemolyticus* NBRC12711はLB寒天培地(ポリペプトン1.0% (w/v), 酵母エキス0.5%, NaCl 1.0%, 寒天1.3%, pH 7.0), その他の細菌は普通寒天培地を基本培地として用いた。また, 各培地にPELYを5% (w/v) 加え, NaOHでpH調整したものを試験培地とした。それぞれをシャーレに移し, プレートを作成し, 菌体を滅菌水で段階希釈し, 各プレートに50 µLずつコンラージ棒で塗布した。それらを上記に示したとおり培養し, 基本培地に形成されたコロニーが約100~1000 CFU/プレートと同希釈倍率の試験培地に形成されたコロニーを数え, 抗菌性の指標とした。

## 4) 消化促進作用

α-アミラーゼ活性は, α-アミラーゼ活性分析キット(キッコマン(株))を用いてデンプンを基質として測定した。40℃, pH 5.0において30分間に1%デンプン溶液1 mLをヨウ素呈色度が波長670 nm, 光路長10 mmで66%の透過率を与えるまで分解する活性を1 Uとした。プロテアーゼ活性は, 基準味噌分析法<sup>7)</sup>に準じて測定し, チロシン量として算出した。カゼイン(乳製)を基質として, 酸性プロテアーゼは38℃, pH 3.0, 中性プロテアーゼは38℃, pH 6.0, アルカリ性プロテアーゼは38℃, pH 9.0におけ

る反応初期の1分間に1 µgのL-チロシンに相当する非タンパク性のフェノール試薬呈色物質の増加をもたらす活性を1 Uとした。トリプシン活性は, Hiranoらの方法<sup>8)</sup>に従って, 合成基質*N*-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BANA)を用いて測定した。リパーゼ活性は, リパーゼキットS(大日本製薬株式会社)を用いて三酪酸ジメルカプロール(BALB)を基質として測定した。

## 5) チロシナーゼ阻害活性

Niheiらの方法<sup>9)</sup>に従って, 酵素はmushroom由来チロシナーゼを, 基質はL-DOPAを用いて測定を行った。PELYを純水で1:1抽出した水抽出画分をNaOHで中和したものを試料として, チロシナーゼの阻害活性を調べた。

## 結果

### 1. PELYの発酵熟成時における菌数, pHの変化

Fig. 2にPELYの乳酸菌数, 真菌数の発酵期間中の推移を示した。乳酸菌および真菌の各菌数は3日目に最大になり, それぞれ約5.8 log (CFU/g), 約7.4 log (CFU/g)で, 16日目まで穏やかに減少した。30日目には, 約3.3 log (CFU/g), 約3.9 log (CFU/g)となり, その後も乳酸菌と酵母の菌数はほぼ同じように推移し, 小さな増減を2~4 log (CFU/g)で繰り返すことが明らかとなった。

pHは0日目では, pH 5.4であったが, 発酵により低下し続け90日目には4.3まで低下した。

また, PELYの発酵スターターとして人為的に添加はしていないが, 発酵期間中の酵母の関与を明らかにするために, 各サンプリング日におけるPELY中の菌数検査においてPDA上に出現したコロニーを釣菌し, 真菌28S rRNA遺伝子増幅用プライマーを用いてPCRを行った。PDA上に出現したコロニーの中には, PCRで増幅産物が得られない場合があり, 細菌のコロニーも生育していたと考えられた。このため, 解析可能であったコロニー数は十分とは言えないが, *Saccharomyces* 属, *Candida* 属の酵母が主として検出され, 優勢と考えられた。中でも分離・同定した *Saccharomyces cerevisiae* と *Candida apicola* をPDAに培養

Table 3 Microorganisms used for antibacterial effects

Strain	Temperature	Incubation time	Condition
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NBRC13951	37℃	36 h	Anaerobic
<i>Lactobacillus brevis</i> NBRC3960	37℃	36 h	Anaerobic
<i>Lactobacillus fermentum</i> NBRC3071	37℃	36 h	Anaerobic
<i>Lactobacillus plantarum</i> THT030701	37℃	36 h	Anaerobic
<i>Lactococcus lactis</i> NBRC12007	37℃	36 h	Anaerobic
<i>Enterococcus faecalis</i> NBRC3971	37℃	36 h	Anaerobic
<i>Escherichia coli</i> NBRC3301	37℃	18 h	Aerobic
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NBRC3080	37℃	18 h	Aerobic
<i>Salmonella typhimurium</i> NBRC12529	37℃	18 h	Aerobic
<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC3060	37℃	18 h	Aerobic
<i>Staphylococcus aureus</i> IID1677	37℃	48 h	Aerobic
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> NBRC12711	35℃	24 h	Aerobic
<i>Providencia rettgeri</i> NBRC13501	30℃	18 h	Aerobic
<i>Streptococcus mutans</i> NBRC13955	37℃	48 h	Aerobic
<i>Helicobacter pylori</i> JCM12036	37℃	96 h	Microaerophile
<i>Porphyromonas gingivalis</i> JCM12257	37℃	96 h	Anaerobic

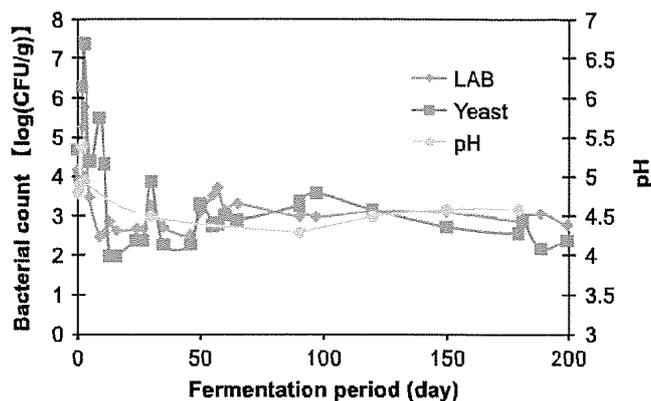


Fig. 2 Time course of LAB\*, Yeast, and pH in PELY\*\*.

\* LAB : Lactic Acid Bacteria.

\*\* Plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast.

し、匂いを嗅ぐとそれぞれアルコール臭、フルーティーな香り（エステル臭）がしたことから、PELY 中においても *S. cerevisiae* はアルコール発酵に関与し、*C. apicola* は芳香成分産生に関与していると考えられた。また、*Hanseniaspora osmophila* という糖度の高い糖蜜やワイン等で生育することが知られている<sup>20</sup>珍しい酵母も検出された。*Saccharomyces* に属する一倍体の種類（*S. rouxii*, *S. bisporus* var. *mellis*, *S. baillii* var. *osmophilus*）や、*Hanseniaspora osmophila* は、好稠性酵母（高濃度の糖、すなわち高い浸透圧のもとでよく生育する酵母）として認められており、エステル、アルデヒド、その他揮発性の代謝産物によるわずかな発酵臭を発生する<sup>20</sup>ことが知られていることから、これらの酵母が PELY の発酵・熟成に関与しているかもしれない。

## 2. 栄養成分分析

### 1) 一般分析

PELY は、有害微生物の増殖を抑えるため、水分活性を糖質（黒砂糖）により高く維持した発酵食品である。糖質が主たる成分であるため、粘度が高くペースト状の低タンパク質、低脂肪であった（Table 4）。PELY の発酵熟成時の pH の経時変化でも示したが、乳酸菌の関与する発酵であるため、最終製品の pH は 4.1 と酸性であった。また、

Table 4 Nutritional compounds in PELY\* (per 100 g)

Water content	34 g
Protein	3.7 g
Lipid	1.3 g
Carbohydrate	58.8 g
Ash	2.2 g
Sodium	137 mg
Potassium	619 mg
Calcium	131 mg
Magnesium	68 mg
Phosphorus	97 mg
Zinc	11 mg
Iron	3 mg
Manganese	1 mg
Selenium	None
Dietary fiber (NDF**)	1.9 g

\* Plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast.

\*\* Neutral Dietary Fiber.

植物性素材を原料としているためカリウムが多く含まれており、微量元素である亜鉛、鉄、マンガンも補給できることが明らかとなった。さらに、食物繊維もイチジク、アスパラガス、コマツナ等の食物繊維量に相当する 1.9 g/100 g 含まれていた。

### 2) アミノ酸組成

PELY のアミノ酸組成を調べたところ、必須アミノ酸だけでなく、分析対象とした 18 種類のアミノ酸はすべて含まれており、旨味成分として知られるグルタミン酸・アスパラギン酸の含有量が多いことがわかった（Table 5）。

### 3) ビタミン含有量

PELY に含まれるビタミン類で特徴的なことはナイアシン量が多いことであった（Table 6）。ビタミン C は検出されなかった。ビタミン C は酸化されやすい性質であることから、発酵過程で酸化され、アミノ酸が共存することから、アミノカルボニル反応を起こし、褐変した<sup>21</sup>と考えられた。ナイアシン量は、原料の配合割合と日本食品標準成分表<sup>12</sup>から算出される値は約 0.7 mg/100 g であることから、発酵に関与する乳酸菌・酵母が生産していると考えられた。

### 4) ポリフェノール含有量

PELY は発酵年数に応じて、ポリフェノール含有量が増

Table 5 Amino acid content of PELY\* (per 100 g)

Arginine	0.09 g
Lysine	0.11 g
Histidine	0.04 g
Phenylalanine	0.14 g
Tyrosine	0.07 g
Leucine	0.23 g
Isoleucine	0.13 g
Methionine	0.04 g
Valine	0.15 g
Alanine	0.15 g
Glycine	0.15 g
Proline	0.20 g
Glutamic acid	0.53 g
Serine	0.14 g
Threonine	0.12 g
Aspartic acid	0.45 g
Cystine	0.04 g
Tryptophan	0.04 g

\* Plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast.

**Table 6** Vitamin content of PELY\* (per 100 g)

Vitamin A (retinol equivalent)	20 µg
α-carotene	25 µg
β-carotene	192 µg
Cryptoxanthin	77 µg
Vitamin B1 (thiamin)	0.05 mg
B2 (riboflavin)	0.07 mg
B6	0.27 mg
B12	0.03 µg
Niacin (nicotinic acid equivalent)	1.69 mg
Vitamin C	None
Vitamin D	None
Vitamin E (α-tocopherol)	0.4 mg
(β-tocopherol)	None
(γ-tocopherol)	0.2 mg
(δ-tocopherol)	0.1 mg
Vitamin K	30 µg
Pantothenic acid	0.19 mg
Folic acid	1 µg

\* Plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast.

加する傾向を示した (Table 7)。PELY (3年発酵) 中のポリフェノール含有量は、246 mg/100 gであった。赤ワインやココアのポリフェノール含有量と比較した結果、PELY (3年発酵) は、赤ワインの1.7倍、ココアの0.17倍であった。

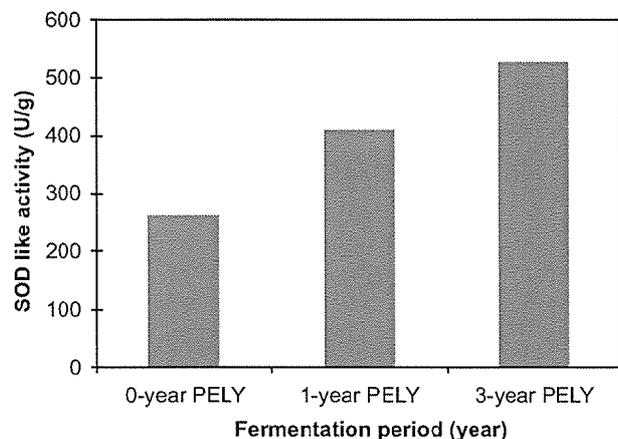
### 3. 保健 (生理) 機能

#### 1) 抗酸化作用

PELYにおける抗酸化作用 (SOD様活性) の経時的変化を以下に示した (Fig. 3)。発酵年数が長くなるにつれて、抗酸化作用は上昇することが明らかになった。また、ポリフェノール含有量と抗酸化作用との相関 (Fig. 4) を調べたところ、ポリフェノール含有量と抗酸化作用には正の相関が得られた。

#### 2) 血圧上昇抑制作用

PELYの水抽出成分中に血圧上昇作用を有する「レニン-アンジオテンシン変換系」に関与する酵素 (ACE) を阻害する成分が含まれているかどうかを調べた。Table 8に示したように、PELYは基質から生成物の産生が、コント

**Fig. 3** Time course of antioxidant activity in PELY\*.

\* Plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast.

**Table 7** Polyphenol content of PELY\*

Polyphenol content (per 100 g) Caffeic acid equivalent	
PELY* (0-year fermentation)	212 mg
PELY* (1-year fermentation)	236 mg
PELY* (3-year fermentation)	246 mg
Red wine	145 mg
Cocoa	1,440 mg

\* Plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast.

**Table 8** ACE inhibitory activity of PELY\*

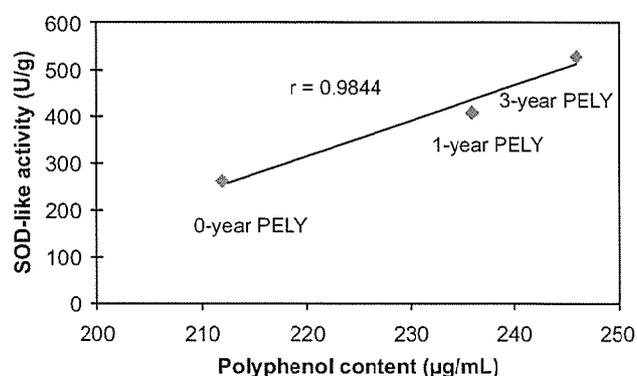
ACE inhibitory activity (%)	
PELY*	61.4
Bitter melon	99.0
Jew's mallow	68.6
Turmeric	63.0
Parsley	40.7

\* Plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast.

ロールと比較して61.4%阻害された。また、PELYに用いている原料の一部を用いてACE阻害活性を同様に測定し、比較したところ、PELYはウコンと同程度のACE阻害活性を示すことが示唆された。

#### 3) 抗菌作用

PELYは清酒、ワイン、味噌、醤油など多くの発酵食品と同様に、開放系で行われるため多くの種類の微生物が混入・増殖する可能性があるが、伝統的な加工経験による微生物制御や、PELY中で優勢であると考えられる乳酸菌や酵母が生産した抗菌物質により、腐敗細菌の増殖が抑制されていると考えられた。そこで、PELYの抗菌作用を調べたところ、乳酸菌 (*L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *E. faecalis*) や大腸菌 (*E. coli*) に対しては抗菌性を示さなかったが、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA, *S. aureus* IID1677)、緑膿菌 (*P. aeruginosa*)、プロビデンシア菌 (*P. rettgeri*) に対しては強い抗菌性を示した (Table 9)。さらにピロリ菌 (*H. pylori*) や歯周病菌 (*P. gingivalis*)、腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) に対しても抗菌性を示すことが明らかとなった。また、ネズ

**Fig. 4** Correlation between polyphenol content and antioxidant activity in PELY\*.

R is Pearson product-moment correlation coefficient.

\* Plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast.

**Table 9** Antibacterial activity of PELY\*

	Additive amount of PELY*	Colony account (CFU/plate)	Antibacterial activity
<i>L. acidophilus</i> NBRC13951	0 %	908	-
	5 %	1097	
<i>L. brevis</i> NBRC3960	0 %	517	-
	5 %	577	
<i>L. fermentum</i> NBRC3071	0 %	140	-
	5 %	132	
<i>L. plantarum</i> THT030701	0 %	148	-
	5 %	125	
<i>L. lactis</i> NBRC12007	0 %	139	-
	5 %	138	
<i>E. faecalis</i> NBRC3971	0 %	546	-
	5 %	408	
<i>E. coli</i> NBRC3301	0 %	112	-
	5 %	110	
<i>P. aeruginosa</i> NBRC3080	0 %	290	+
	5 %	0	
<i>S. typhimurium</i> NBRC12529	0 %	40	Growth-inhibition
	5 %	20	
<i>S. aureus</i> NBRC3060	0 %	289	Growth-inhibition
	5 %	191	
<i>S. aureus</i> IID1677	0 %	201	+
	5 %	0	
<i>V. parahaemolyticus</i> NBRC12711	0 %	162	+
	5 %	0	
<i>P. rettgeri</i> NBRC13501	0 %	294	+
	5 %	0	
<i>S. mutans</i> NBRC13955	0 %	235	+
	5 %	0	
<i>H. pylori</i> JCM12036	0 %	191	+
	5 %	0	
<i>P. gingivalis</i> JCM12257	0 %	716	+
	5 %	0	

\* Plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast.

ミチフス菌 (*S. typhimurium*) と黄色ブドウ球菌 (*S. aureus* NBRC3060) においては、コロニー数が激減しないことから抗菌性は認められなかったが、形成されたコロニーの大きさがPELYを添加していない培地で培養した場合と比べて小さかったことから、増殖抑制作用はあると考えられた。これらの結果から、PELYの抗菌作用のスペクトルはグラム陽性・陰性の両方の細菌で見られた。とくに、有害微生物(病原菌)に対して強い抗菌作用を示すことが明らかとなった。PELYに含まれる抗菌性物質については、乳酸、酢酸、プロピオン酸等の有機酸類やバクテリオシンと呼ばれる細菌によって生産される殺菌作用を中心とした抗菌作用を持つペプチドあるいはタンパク質が考えられる。これまでに、PELYに含まれる抗菌物質の性質としては、中和しても抗菌性が残存し、オートクレーブ(121℃, 15分)処理しても抗菌性が低下しない耐熱性を有し、主に分子量1,000以下の低分子成分であることまでわかっており、現在同定中である。

#### 4) 消化促進作用

発酵期間中はPELYに含まれる糖やタンパク質を盛んに分解している様子が観察されたことから、発酵・熟成を経たPELYにも活性の高いそれらの酵素が多く含まれ、PELYを食品として摂取した場合、他の食品の消化・吸収

**Table 10** Activities of digestive enzymes in PELY\*

	Total Activity	Lower limit
α-amylase	n.d.	50 U/g
Acid-Protease	n.d.	20 U/g
Neutral-Protease	n.d.	20 U/g
Alkaline-Protease	n.d.	20 U/g
Trypsin	n.d.	1 U/g
Lipase	n.d.	50 BALB Unit

n.d.: not detected.

\* Plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast.

を助ける作用を期待してPELYにおける各種消化酵素活性を調べてみた。しかし、発酵・熟成を経たPELYの最終産物には、アミラーゼ、プロテアーゼ(トリプシンを含む)、リパーゼのいずれの消化酵素活性も認められなかった(Table 10)。また、トリプシンとリパーゼに活性化および阻害のいずれかの作用を有する成分が含まれるかを調べたが、酵素活性に変化がなかったため、そのような成分も含まれていないと考えられた。

#### 5) チロシナーゼ阻害活性

チロシナーゼ活性の測定結果をTable 11に示した。PELYにおけるチロシナーゼ阻害活性のIC50を算出すると、58.5 mg/mLであった。PELYのポリフェノール含有量は0.25 mg/mLであったので、ポリフェノール含有量が

**Table 11** Anti-tyrosinase activity in PELY\*

	IC 50 (mg/mL)
PELY* (water soluble ingredients)	58.5
PELY* (polyphenol content equivalent)	0.086
Scopoletin	0.24
Anisic acid	0.091
Benzoic acid	0.078
Umbelliferone	0.068
L-Ascorbic acid	0.058
Anisaldehyde	0.054
Arbutin	0.011

\* Plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast.

ら IC 50 を算出すると 0.086 mg/mL であった。これは安息香酸、アニス酸、ウンベリフェロン、L-アスコルビン酸のそれと同程度であり、PELY 中の植物性（ポリ）フェノール化合物がチロシナーゼ活性を阻害している可能性があることが示唆された。

## 考 察

以上の結果より、PELY は多種多様な植物性原料由来のエキスを乳酸菌や酵母により発酵することで、長期保存が可能で、さまざまな微量栄養素を補給できる可能性を秘めた食品素材であることが示唆された。PELY には基本栄養素であるタンパク質、脂質、炭水化物をはじめ、微量栄養素である種々のビタミン、ミネラルやアミノ酸が含まれており、それ以外にも健康に密接に関係するファイトケミカルや抗酸化物質など従来の栄養学では取り扱われていない<sup>22)</sup>機能性成分（ポリフェノール、食物繊維等）も PELY 中には多く存在することが明らかになった。植物性（ポリ）フェノール化合物は、抗菌作用、抗酸化作用やラジカル消去能などを有し、さらには免疫力の向上効果、抗ウイルス作用や制癌作用などの様々な有用生理機能を示すことから、最近では、化粧品、食品添加物、医薬品などとしても注目されている<sup>23)</sup>。PELY は多種類の植物性原料を用いているので、植物性（ポリ）フェノール化合物も単一ではないと考えられるが、今後は主たる成分の特定を進めていくべきである。また、PELY に含まれる機能性成分については、他の一般的な発酵食品にも多く含まれておりアミノ酸の 1 種であるアルギニンから細胞内で合成されるスベルミン、スベルミジン、プトレスシンのようなポリアミンや、動植物や自然界に広く分布していることが知られているアミノ酸の 1 種であるγアミノ酪酸（GABA）が含まれる可能性も考えられる。

さらに、従来は生体内に存在する希少アミノ酸と考えられてきた D-アミノ酸が、近年の分析技術の発達に伴い、果物や野菜中にもその存在が確認されており、ヒトなどの哺乳動物ではその由来や生理的機能が注目され<sup>24)</sup>、現在研究が進められている。これらの機能性成分が PELY にも含まれている可能性があると考えられるため、これらの機能性成分についても分析を進めることも今後の課題である。

機能性評価の結果、PELY には今回検討した消化酵素の

活性は残存しておらず、消化促進作用に繋がる知見は得られなかった。また、これらの消化酵素を阻害する作用も認められなかった。他の酵素活性についても引き続き調べる必要がある。例えば、PELY において酵素活性が認められる可能性のある酵素としては、インペルターゼが挙げられる。インペルターゼは、微生物、植物、動物等広く自然界に分布しており、熟成後のワインでも活性が残存することが報告されている<sup>25)</sup>。

今回、PELY は抗酸化作用、血圧上昇抑制作用、抗菌作用、チロシナーゼ阻害作用を有することが示された。抗酸化作用においては、発酵の進行に伴ってポリフェノールが増加しており、ポリフェノール、とくにフラボノイドは XOD を阻害することが報告されている<sup>26)</sup>ことから、本実験系における抗酸化作用の上昇は、実際の SOD 様活性の増加とポリフェノール（フラボノイド等）による XOD の阻害の 2 つの要因によるものと考えられた。

さらに、PELY は抗炎症作用の標的酵素である COX（シクロオキシゲナーゼ）や、抗アレルギー作用の標的酵素である LOX（リポキシゲナーゼ）に対する阻害作用を持つことが予備的な結果ではあるが示唆されており、抗アレルギー作用や抗炎症作用に繋がる生理機能を有している可能性もあり、現在これらの有効性についても検討中である。

したがって、PELY は微量栄養素の補給だけでなく、生活習慣病予防を目的とした機能性食品素材として有効である可能性を持った発酵食品であると考えられる。

## 参考文献

- 1) Egusa G, Murakami F, Ito C, Matsumoto Y, Kado S, Okamura M, Mori H, Yamane K, Hara H, Yamakido M (1993) Westernized food habits and concentration of serum lipids in the Japanese. *Atherosclerosis* 100: 249-255.
- 2) 大久保雅通, 蓼原太, 渡辺 浩, 藤川るみ, 江草玄士, 今津道教, 山本戸道郎 (1999) 耐糖能障害とレムナント代謝-ライフスタイルの欧米化はいかに影響するか. *動脈硬化* 26: 295-300.
- 3) Imazu M, Yamamoto H, Toyohuku M, Watanabe T, Okubo M, Egusa G, Yamakido M, Kohno N (2001) Association of apolipoprotein E phenotype with hypertension in Japanese-americans: data from the Hawaii-Los Angeles-Hiroshima Study. *Hypertens Res* 24: 523-529.
- 4) Egusa G, Watanabe H, Ohshita K, Fujiwara R, Yamane K, Okubo M, Kohno N (2002) Influence of the extent of Westernization of lifestyle on the progression of preclinical atherosclerosis in Japanese Subjects. *J Atheroscler Thromb* 9: 299-304.
- 5) McCullough ML, Feskianich D, Stanmpfer MJ, Rosner BA, Hu FB, Hunter DJ, Variyam JN, Colditz GA, Willet

- WC (2000) Adherence to the dietary guidelines for Americans and risk of major chronic diseases in women. *Am J Clin Nutr* 72: 1214-1222.
- 6) Liu S, Manson JE, Lee IM, Cole SR, Hennekens CH, Willett WC, Buring JE (2000) Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular diseases: the Women's Health Study. *Am J Clin Nutr* 72: 922-928.
- 7) Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria CM, Vupputuri S, Myers L, Whelton PK (2002) Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *Am J Clin Nutr* 76: 93-99.
- 8) 黒川守浩 (1991) 食品加工学. 中央法規出版, 東京: pp. 2-4.
- 9) 安部麻美子, 松田芳和, 小邨奈未, 吉田宗弘 (2006) 牡蠣 (*Crassostrea gigas*) 肉エキス製造過程廃棄物からの有効成分の回収とその有効性の評価. *微量栄養素研究* 23: 89-92.
- 10) 特集 酵素・酵母 (2008) *健康産業新聞* 1239号: 24.
- 11) 板倉弘重, 小笠原信之, 平田明隆 (2003) 最新サプリメント・ガイド「植物発酵食品」. *からだの科学* [増刊]. 日本評論社, 東京: pp.88.
- 12) 科学技術庁資源調査会 (2000) 五訂 日本食品標準成分表. 大蔵省印刷局, 東京.
- 13) Insoluble Dietary fiber. *AACC Method*: 32-20.
- 14) AOAC OFFICIAL METHOD 952.03, 955.25 (1965).
- 15) Myagmar BE, Aniya Y (2000) Free radical scavenging action of medicinal herbs from Mongolia. *Phytomedicine* 7: 221-229.
- 16) Okamoto A, Hanagata H, Matsumoto E, Kawamura Y, Koizumi Y, Yanagiba F (1995) A angiotensin converting enzyme inhibitory activities of various fermented foods. *Bioscience Biotechnol Biochemistry* 59: 1147-1149.
- 17) 全国味噌技術会 (1995) 基準味噌分析法. *みそ技術ハンドブック*. 明和印刷, 東京.
- 18) Hirano M, Miura M, Gomyo T (1994) Melanoidin as a novel trypsin inhibitor. *Bioscience Biotechnol Biochemistry* 58: 940-941.
- 19) Nihei K, Yamagiwa Y, Kamikawa T, Kubo I (2004) 2-Hydroxy-4-isopropylbenzaldehyde, a potent partial tyrosinase inhibitor. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 14: 681-683.
- 20) Phaff HJ, Miller MW, Mark PM 永井 進 (訳) (1982) 高濃度の糖を含む製品に出現する酵母. *酵母菌の生活*. 学会出版センター, 東京: pp.156-159.
- 21) 並木満夫, 中村 良, 川岸舜朗, 渡邊乾二 (1985) アスコルビン酸とレダクトンの化学. *現代の食品化学*. 三共出版, 東京: pp.95-98.
- 22) 渡邊 昌 (2008) Phytochemical の健康影響: 機能栄養学の提唱. *微量栄養素研究* 25: 23-31.
- 23) 中島伸佳 (2004) 新規な化粧品素材としてのコウジ酸,  $\beta$ -ターヤプリシン, *p*-アミノ安息香酸, 及び, アルブチンのさらなる高機能化を目的とした酵素的分子設計. *コスメトロジー研究報告* 12.
- 24) 郷上佳孝, 伊藤克佳, 老川典夫 (2006) 野菜および果物中の D-アミノ酸の定量分析と植物における D-アミノ酸の生合成機構. *微量栄養素研究* 23: 1-4.
- 25) 中西載慶, 横塚弘毅 (1990) ワイン中のインベルターゼ活性とその性質. *J Inst Enol Vitic Yamanashi Univ* 25: 5-14.
- 26) Rohnert U, Schneider W, Elstner EF (1998) Superoxide-dependent and -independent nitrite formation from hydroxylamine: inhibition by plant extracts. *Z Naturforsch C* 53: 241-249.