

米糠を用いた機能性発酵素材の開発

2019 年

大友 理宣

目次

第1章 緒言	1
第2章 米糠を用いた乳酸菌による米糠発酵素材の生産法	9
第1節 米糠を用いた乳酸菌による γ -アミノ酪酸組成物の生産法	9
1. 実験方法	10
2. 実験結果と考察	14
第2節 無洗米粕を用いた乳酸菌による γ -アミノ酪酸組成物の生産法	27
1. 実験方法	27
2. 実験結果と考察	30
第3節 米糠を用いた乳酸菌による γ -アミノ酪酸高濃度組成物の生産法.....	37
1. 実験方法	37
2. 実験結果と考察	39
第4節 加工食品への米糠発酵素材の利用適性	46
1. 実験方法	46
2. 実験結果と考察	48
第3章 米糠発酵素材の食品・ペットフード用に向けた機能性の評価	53
第1節 高脂肪食負荷ラットに対する脂質異常症改善作用	53
1. 実験方法	53
2. 実験結果と考察	56
第2節 肝臓細胞に対する脂質異常症改善作用および成分の解明	59
1. 実験方法	59
2. 実験結果と考察	63

第3節 米糠発酵素材のヒトモデル腸管に対する脂質吸収抑制作用	71
1. 実験方法	72
2. 実験結果と考察	74
第4節 米糠発酵素材配合サプリメントを用いた家庭犬モニター調査	80
1. 実験方法	80
2. 実験結果と考察	85
第4章 総括	93
Summary	98
参考文献	103
本研究に関する発表論文	109

本研究に使用されている略号

ALT	alanine aminotransferase
apoA - 1	apolipoprotein A
apoB-100	apolipoprotein B
AST	aspartate aminotransferase
BG	bran Grind
BMI	body mass index
BSA	bovine serum albumin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CFU	colony forming unit
CM	chylomicron
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
FAS	fatty acid synthase
FCS	fetal calf serum
FDFT	farnesyl diphosphate farnesyltransferase
GABA	gamma-aminobutyric acid
GAD	glutamic acid decarboxylase
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GUS	β -glucuronidase
HDL	high density lipoprotein
HMGCS-1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase-1
HPLC	high performance liquid chromatography
IFO	institute for fermentation osaka
LAP	lipid accumulation product

LDL	low density lipoprotein
MSG	monosodium glutamate
MTTP	microsomal triglyceride transfer protein
NWRL	no-wash rice lees
PBS	phosphate buffered salts
RB	rice bran
SCD	stearoyl coa desaturase-1
SD	sprague dawley
SP	species
SREBP-1c	sterol regulatory element binding protein-1c
SREBP-2	sterol regulatory element binding protein-2
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
VLDL	very low density lipoprotein

第1章 緒言

1. 精米副産物の状況

農林水産省は、平成 28 年度の日本国内における米生産量は 749.8 万トンとの報告をしている¹⁾。また、国税庁の「平成 28 酒造年度における清酒の製造状況等について」では、日本国内の酒蔵で使用した玄米量は 24.1 万トンと報告されている²⁾。単純計算ではあるが、全国酒蔵での米使用割合は日本国内の米生産量の約 3.2%程度である。さらに、消費者の生活スタイルの変化の影響によって米および清酒の消費量は減少傾向を推移し、その影響による米・清酒の生産量も減っている。しかしながら、米は、国内農業生産物の中でも上位に位置した重要な生産物である。また、清酒製造業は「國酒」の伝統産業であり、全国各蔵が各地域で連携して生産している地場産業である。秋田県においては「米どころ・酒どころ」として全国的に有名な地域でもある。また、米(玄米)は、精米機で外層側を削って精白米としている。その場合、食用米(白米)は、玄米の外層側 10%が米糠として、清酒原料米においては、最低でも外層側から 25%以上は米糠として除去される。また、大吟醸酒などの高品質の清酒は、外層側 60%以上を精米した白米で醸造している。このような現状から、精米過程で排出される米糠(精米かす)を概算すると、平成 28 年度年間で約 75 万トンの米糠が大量発生している。さらに、酒蔵においては、外側 25%精米した場合、年間で約 6 万トン以上(概算)の米糠が発生する。また、生活様式の利便性を考慮した無洗米が消費者に急速に拡大し、年間 40 万トン以上も生産利用されている。無洗米の製造法は各社で異なるが市場シェア 73%を占める東洋ライス株式会社の BG 無洗米(Bran Grind)は、玄米を精米した精白米に、水、糠、タピオカ澱粉などを用いて白米表面に付着した肌糠(米糠の一部)を除去して製品化している。その際、精白米に付着

した肌糠が 1.5%ほど無洗米粕として産生される。しかしながら、大量発生する米糠や無洗米粕^{3)~6)}の殆どが、家畜飼料、堆肥、米糠油脂等に産業廃棄物を避けるために安価で利用されている。しかし、精米副産物の米糠や無洗米粕には良質な油脂、タンパク質、炭水化物、ビタミン、食物繊維の他、 γ -オリザノール、フェルラ酸、ステロール、 γ -アミノ酪酸(γ -aminobutyric acid ; 以下 GABA)、グルコシルセラミド⁷⁾、トコトリエノール、フィチン酸やイノシトールといった機能性成分⁷⁾も豊富に含まれている。谷口らは⁷⁾、日本国内の米糠の利用状況について 37.5%が米油原料、きのこ栽培用に 9.5%、配合飼料に 7.0%、残り 46.0%の詳細は不明で、産業用利用の米糠の割合は約半分であると報告していることから、現状では十分な活用はされていないと考えられる。

2. 清酒業界の状況

清酒出荷数量は平成 10 年から減少傾向を推移し、20 年間で半分以下の出荷数量となっている。戦後の最大ピーク時と比べると 1/6 程度まで出荷数量が激減している。これは、日本国内における生活様式の変化が影響している。特に、欧米の食生活や文化を取り入れたことで生活スタイルの洋風化による和食文化に適合した清酒の消費者離れが加速化し、リキュール、ワインなどの洋酒の需要が増加した。平成 30 年国税庁調査における各酒類の販売(消費)数量の構成比率では、平成 28 年の清酒は全体の 6.4%、平成 10 年に比べて約 5 割まで減っている(Table 1-1)。さらに、成人 1 人当りの酒類消費数量は、平成 28 年度で 80.9L とピーク時の 8 割に減少し、ビール(31.3%)、リキュール(24.4%)、発泡酒(8.7%)といった低アルコール酒が増加している(Table 1-2)。

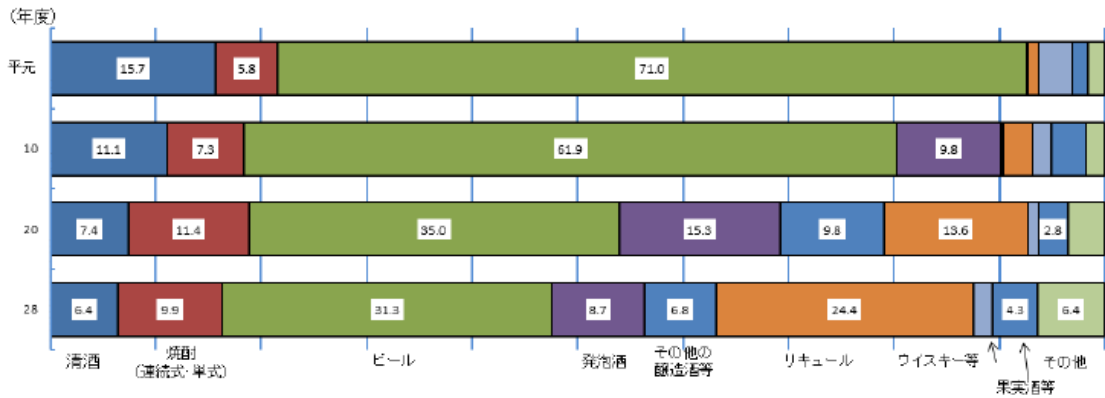


Table 1-1 各酒類の販売(消費)数量構成比率の推移

(出典 酒のしおり(平成30年3月国税庁課税部酒税課))

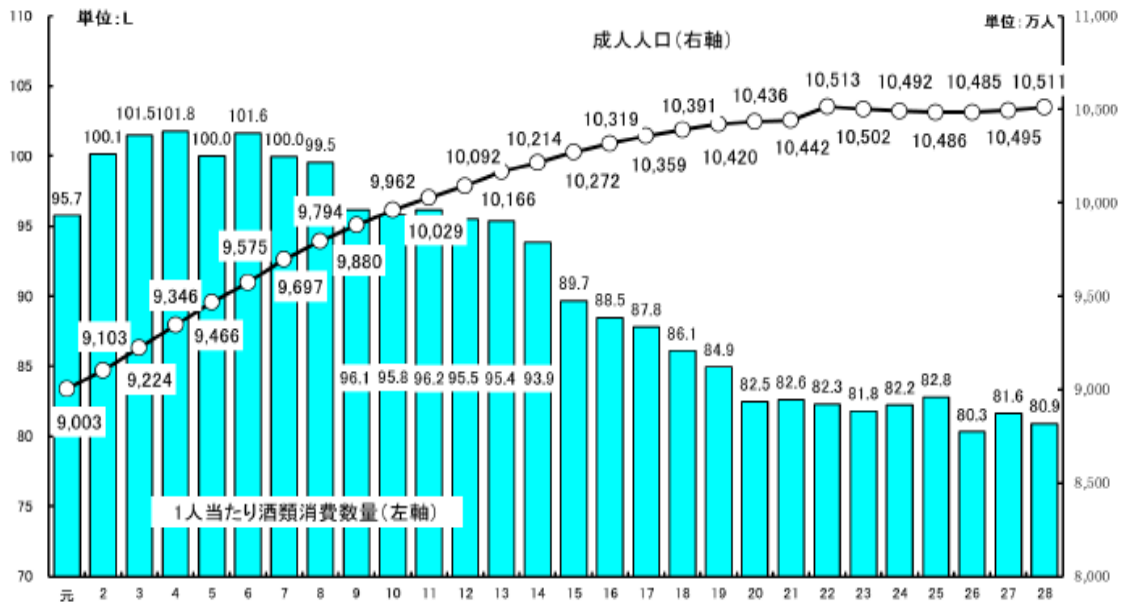


Table 1-2 成人1人当りの酒類消費数量

(出典 酒のしおり(平成30年3月国税庁課税部酒税課))

しかしながら、清酒の種類区分の中で、特定名称酒といった付加価値の高い商品群だけは一定の出荷数量を維持している (Fig. 1-1). これは、消費者の生活様式の変化、飲酒年代層の違いも影響し、飲酒形式も量から質の時代に変換しつつある. さらに、海外の日本食ブームに伴う高品質もしくはブラン

ド日本酒の需要拡大の影響，安定購入できる商品より入手困難なマニアック製品に対する消費者需要が高くなっていることも影響している．そこで，昨今の各蔵元においては，大衆向けの安価な経済酒の製造販売を終売し，市場ニーズおよび営業利益が高い特定名称酒の商品種類を増やし，小ロットでの数量販売に特化することで売上金額を維持している．しかしながら，特定名称酒の生産量増加による清酒全体の激減数量の回復までは期待できない．

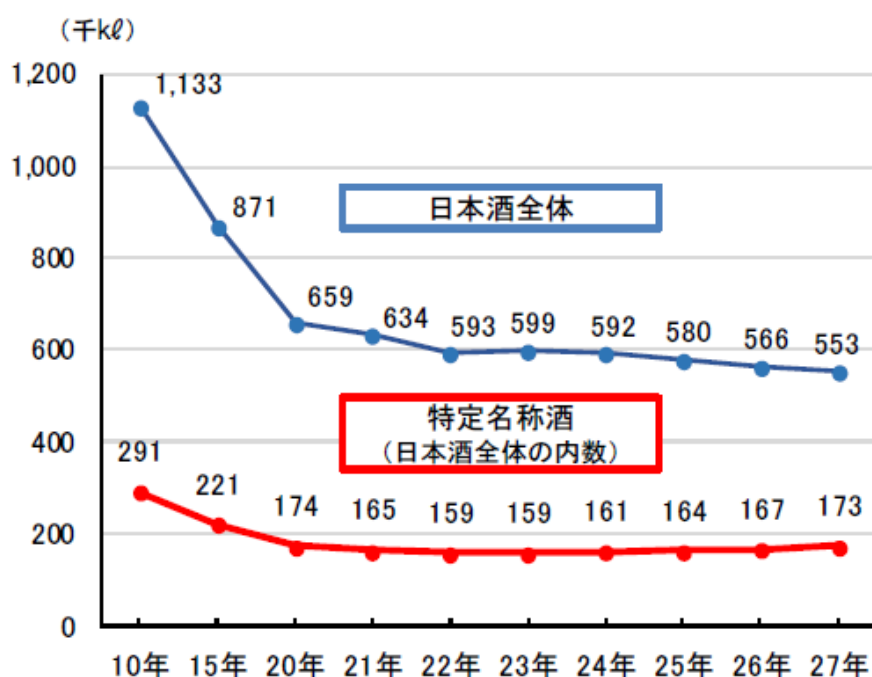


Fig. 1-1 国内清酒出荷量の推移

(出典 日本酒をめぐる状況(平成28年農林水産省政策統括官))

今後，更なる清酒出荷数量の減少傾向を考慮すると，工場の稼働率は，生産量の減少と並行して醸造設備の稼働率も低下し，休眠期間の長期化は免れない状況が考えられる．さらに，製造生産の従業員数も少数での対応が可能となるため，新規雇用の期待はできない．さらに，清酒原料米の使用量も減

少することから、米の利用増加は見込めない。しかし、酒蔵従業員は、清酒製造に関する発酵・管理技術および発酵設備を保有していることから、その技術や設備を多目的用途への利用が期待できる。

3. 国民の健康志向による健康市場の状況

現在、食生活の欧米化や高齢化社会による生活習慣病の増加は、大きな社会問題になっている。厚生労働省では、平成 25 年に「21 世紀における国民健康づくり運動(健康日本 21(第 2 次))」策定し、各目標項目の設定による 10 年間での国民健康の推進を図るための計画を実施している。中でも、目標項目の「主要な生活習慣病の発病予防と重症化予防の徹底に関する目標」では、脳血管疾患・虚血性心疾患の減少、高血圧改善、脂質異常症の減少、糖尿病改善などの目標値が掲げられ、改善のための「栄養・食生活、身体活動・運動、休養、飲酒、禁煙及び歯・口腔の健康に関する生活習慣および社会環境の改善に関する目標」が設定されている。さらに、厚生労働省の平成 29 年国民健康・栄養調査⁸⁾では「糖尿病が強く疑われる者」の割合は、男性 18.1%、女性 10.5%であり、血圧については収縮期血圧 140mmHg 以上の割合男性 37.0%、女性 27.8%、血清総コレステロール値 240mg/dL 以上の割合は男性 12.4%、女性 19.8%であると報告されている。また、生活習慣病予備軍を含めると多くの国民が生活習慣病に関与していることが考えられる。その様な影響もあり、国民の健康の維持の手段として、運動や生活習慣の改善およびサプリメント等で必要成分を補給するスタイルが認知され、近年では日常生活においても一般食品からも機能性素材が配合された食品を摂取している。事実、平成 29 年の国内健康食品市場における生物由来有効成分・素材 50 品目の売上額は 2,236 億円で、平成 34 年予想額は 2,572 億円と推定され、今後も市場拡大が見込まれる⁹⁾。

4. 飼育ペットおよびペットフードの状況

一方、家庭で飼養されている犬猫の平成 29 年度全国飼育頭数は、犬 892 万頭、猫 952 万 6,000 頭¹⁰⁾で、日本国民の人口で換算すると約 15%となる。この飼育されている犬猫においても人間社会同様に、高齢化および生活習慣病の問題が重要視され、家庭で飼育されている成犬の 35%~45%が、過体重もしくは肥満であるとの報告もされている¹¹⁾。また、肥満は個体の生活の質 (Quality of Life : QOL) の低下だけでなく、それに起因する疾患の治療など飼い主の負担も大きくなる。肥満の予防・改善には、人間と一緒に、適度な運動による蓄積脂肪の代謝や給餌制限により摂取カロリーの軽減などの手段はある。しかし、飼い主の人間ですら厚生労働省が掲げた国民健康維持政策による健康促進を図っているときに、伴侶動物の肥満予防を日常生活で実行することは困難とも考えられる。実際、健康食品やサプリメントといったヒトに対する市場が拡大しているのと一緒に、ペット業界においても肥満軽減や栄養補強を付与したプレミアムペットフード、おやつなどを展開している。

5. 精米副産物を用いた米糠発酵素材の可能性

そこで本論文では、精米副産物の米糠や無洗米粕を原料に、醸造設備を活用した米糠発酵素材の開発に向けた研究調査を実施した。その中で、戸枝らは¹²⁾、GABAを高含有した米糠の製造法について報告し、上野らは、乳酸菌 *Lactobacillus brevis* IFO12005株からグルタミン酸デカルボキシラーゼ (glutamic acid decarboxylase ; 以下GAD) の生成¹³⁾に関して報告している。GABA (Fig. 1-2) は、アミノ酸のひとつで、主に抑制性の神経伝達物質として機能している物質である。動植物界¹⁴⁾に広く分布し、血圧降下作用¹⁵⁾や精神安定作用¹⁶⁾が知られている。植物では米胚芽、米糠、米や茶葉などの内在GADを利用してGABAを富化した食品素材やその生理機能につい

て報告^{17)~21)}されている。

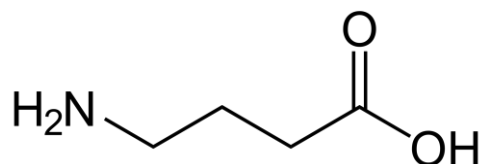


Fig. 1-2 GABA (gamma-aminobutyric acid)

モル質量：103.12 g/mol

最近では，GABA の血圧降下作用を目的とした消費者庁許可食品である「特定保健用食品」として数社から上市されている。さらに，平成 27 年には特定保健用食品のように消費者庁長官からの許可までは必要のない，事業者の責任による科学的根拠に基づいた機能性を表示した消費者庁長官へ届出で良い機能性表示食品の制度が策定された。2018 年には，消費者庁に対して，GABA 配合商品として機能性表示食品の届出件数は 163 件であり，届出の機能性成分では GABA は上位であった。

以上の背景から，豊富な栄養素を含んだ低利用の副産物である米糠や無洗米粕を発酵原料に用いて，乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 株による乳酸発酵による GABA 生産および実用化に関する報告は少ない。

本論文 2 章では，現有の醸造設備を活用した米糠および無洗米粕を発酵原料に用いた乳酸菌発酵における効率的な GABA 生産による米糠発酵素材の新規生産法の確立および実用化を図った^{22)~24)}。さらに，実用化した GABA 含有米糠発酵素材の色々な加工食品利用を考慮し，各加工食品への配合による加工利用適性についての検証をした。

また、第3章では、実用化した GABA 含有米糠発酵素材による生活習慣病予防などを目的に、細胞や小動物による脂質異常症改善作用などの機能性評価試験および遺伝子メカニズムの解明²⁵⁾を検証した。さらに、ヒト以外に対する GABA 含有米糠発酵素材の波及を図るため、犬を対象としたモニター調査による機能性評価²⁶⁾について検証した。

第2章 米糠を用いた乳酸菌による米糠発酵素材の生産法

精米副産物として大量発生する米糠または無洗米粕の有効利用は重要な課題である。この精米副産物である米糠や無洗米粕には、良質な油脂、タンパク質、炭水化物、ビタミンなどの栄養成分や食物繊維等の機能性成分が豊富に含まれ、発酵原料として有望であると考えられるが、現状は有効利用されていない。また、米糠または無洗米粕を発酵培地に用いた乳酸菌による GABA 含有機能性発酵素材などの開発は報告されていない。

本章では、米糠または無洗米粕を発酵原料とした乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 株による GABA 含有発酵素材の生産法を検討した。さらに、現有の醸造設備および発酵技術を活用した米糠発酵素材生産法の検討による実用化を図った。

第1節 米糠を用いた乳酸菌による γ -アミノ酪酸組成物の開発

本節では、米糠を唯一の栄養素とした米糠培地における乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 を用いた乳酸発酵による GABA 含有組成物の生産を目的とした。初めに、乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 株を用いた発酵によるグルタミン酸モノナトリウム・一水和 (monosodium glutamate ; 以下 MSG) から GABA 変換に適した培地および培養条件を検討した。さらに、最適培地における GABA 変換可能な MSG 添加限界濃度を培地配合割合や培養条件も含めて検討した。また、実用化に向けた 30L ジャー培養装置による GABA 含有米糠発酵素材の生産法の検証ならびに素材の固液分離法を検討した。さらに、現有醸造設備を活用した GABA 含有米糠発酵素材の生産法の検討による実用化を図った。

実験方法

1. 実験試料

秋田銘醸株式会社にて酒造工程の精米時に排出される秋田県産米あきたこまち(一般米), めんこいな(一般米), 秋田酒こまち(酒米)の3品種の米糠(玄米から15%精米部分)を用いた。MSGは, 富士フィルム和光純薬製を用いて米糠重量に対して8~16%(w/w)添加した。

2. 使用菌株と培養法

乳酸菌は *L. brevis* IFO12005株を公益財団法人発酵研究所(IFO: Institute for Fermentation.Osaka)から購入して用いた。現在, 当該株は, 独立行政法人製品評価技術基盤機構で *Lactobacillus brevis* NBRC12005株として入手可能である。保存培地はMRS培地(Difco製)を用いた。前培養培地は, GY液体培地(グルコース2%, 酵母エキス1%(醇味, 武田キリン食品製), MSG1%を用い, 培養条件は30℃で2日間静置培養を行った。前培養液を米糠培地に対して4%(v/w)添加した。

3. アミノ酸分析

試料1.0gに40%トリクロロ酢酸0.25mLを添加後, 遠心分離(2900rpm, 10分)により除タンパクし, 得られた上澄液のアミノ酸を分析した。アミノ酸分析は, アミノ酸自動分析機JLC-300(日本電子社製; 全自動アミノ酸分析装置)で, アミノ酸分析用カラム(強酸性陽イオン交換樹脂)を用い, ニンヒドリンを反応試薬として440nm, 570nm, 690nmで測定(測定時間80分)した。

4. GABA 変換率

GABA 変換率(%)は生成した GABA モル濃度を添加 MSG モル濃度で除して算出した。

5. 糖分析

米糠酵素処理によって可溶化される単糖および少糖の分析は、DX-500(ダイオネクス社製)高性能陰イオン交換クロマトグラフィー(HPAEC-PAD)を用いて分析を行った。カラムを DIONEX CarboPacPA1 を用い、3種類の溶媒すなわち A;超純水, B; 100mM NaOH, C; 100mM NaOH/0.5M NaOAc の混合比をプログラムにより分析を行った。なお、溶媒プログラムは渡邊らと同様に行った²⁷⁾。

6. 菌数の測定

試料原液を予想菌数に応じて減菌水を用いて希釈し、乳酸菌数測定用培地(BCP 加プレートカウントアガール; 日水製薬製)を用いて 35°Cで 3 日間培養し、菌数を測定した。

7. 米糠培地および培養方法の検討

7. 1 米糠混合液による GABA 生産

米糠 20 g, 水 75mL の混合液を 90%乳酸(発酵乳酸;大塚食品製)で pH4.5 に調整し、加圧滅菌(121°C, 15 分)した米糠混合液に、別途にて加熱殺菌した MSG 溶液(MSG1.6 g/5mL)を加え、前培養液を接種し、30°C, 4~6 日間の攪拌培養(50rpm)をした。経時的に GABA, グルタミン酸濃度および乳酸菌数を測定した。

7. 2 米糠の酵素処理による培地の検討

米糠 20g, 水 80mL の混合液 (pH4.5) を, 市販酵素剤の液化アミラーゼ酵素剤 YA (天野エンザイム製), 蛋白分解酵素剤デナプシン 10P (ナガセケムテック製), 繊維分解酵素剤ペクチナーゼナガセ (ナガセケムテック製), 脂肪分解酵素剤リリパーゼ A-10FG (ナガセケムテック製) を米糠重量に対して, それぞれ 0.1% (w/w) を加え, 攪拌しながら Fig. 2-1 に示した昇温プログラムで酵素処理をした. なお, 酵素処理した米糠混合液を GABA 生産用米糠培地 (RB 培地 : Rice Bran Medium) として用いた.

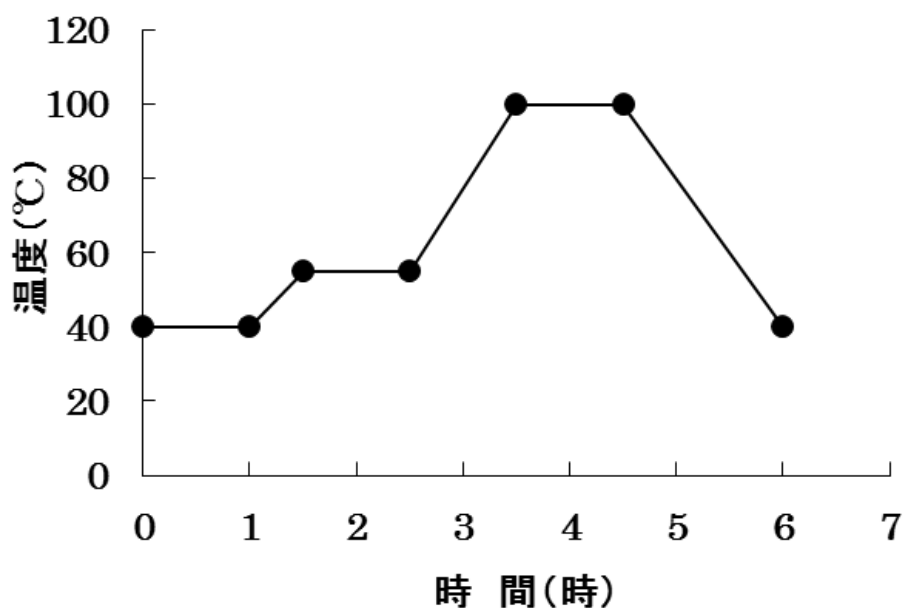


Fig. 2-1 酵素処理温度プログラム

7. 3 RB 培地による GABA 生産

7.2 と同じ方法で調製した RB 培地 (米糠 20g, 水 80mL, pH4.5) に対して, MSG を 1.6 g (米糠重量に対して 8% 濃度) を加え, 前培養液を接種し, 30°C, 6 日間の攪拌培養 (50rpm) を行った. 経時的に GABA, グルタミン酸濃度を

測定した。さらに、醸造設備を活用した実用化を図るため、30L ジャー培養装置 MSJ-N₂型(丸菱バイオエンジニア製)を用いたベンチスケールでの発酵試験を行った。あきたこまち米糠 4kg, 水 16L の RB 培地(pH4.4)を酵素処理(処理方法 7.2)した後、MSG を 8%添加(米糠重量に対して)し、前培養液を加え、30℃で 7 日間の攪拌(50rpm)培養を行った。培養終了後には、RB 培地の固液分離について検討した。経時的に GABA, グルタミン酸濃度および乳酸菌数を測定した。

7. 4 米糠配合比の異なる RB 培地における GABA 生産の影響

RB 培地の配合割合(米糠 : 水 = 1 : 4, 7.2 製法)の加水割合を 1 : 4 から 1 : 6 に変化させた培地に、8%MSG と前培養液を加え、30℃で 4 日間の攪拌培養(50rpm)をした。経時的に GABA, グルタミン酸濃度および乳酸菌数を測定した。

7. 5 RB 培地への MSG 添加量の影響

RB 培地(配合割合/米糠 : 水 = 1 : 6)に対して、MSG を各濃度別に 8%,12%,16% (米糠重量に対して)を加え、前培養液を接種して 30℃, 3 日間の攪拌培養(50rpm)をした。経時的に GABA, グルタミン酸濃度および乳酸菌数を測定した。

7. 6 RB 培地初発 pH の GABA 生産に対する影響

RB 培地(配合割合/米糠 : 水 = 1 : 6)に対して、MSG を 16% (米糠重量に対して)加え、1N 塩酸溶液にて pH4.0, 4.7, 5.3 に調整後、前培養液を接種して 30℃, 3 日間の攪拌培養(50rpm)をした。経時的に GABA, グルタミン酸濃度および乳酸菌数を測定した。

実験結果と考察

1. 米糠混合液による GABA 生産

GABA の生成に関与する *L. brevis* IFO12005 の GAD の至適 pH は 4.2 と報告¹³⁾されているが，本研究では，現場醸造も考慮し，米糠混合液 100g(米糠：水=1：4)を pH4.5 以下に調整し，常圧加熱による滅菌および GAD 活性の至適 pH による GABA 生産の最適化を目的とした．滅菌した米糠混合液 (pH4.5)に，米糠重量に対して 8%MSG および前培養液 *L. brevis* IFO12005 を加えた乳酸菌培養による GABA 生産の経時変化を Fig. 2-2 に示した．

培養初発のグルタミン酸濃度 15.45mg/mL(105mM) における GABA 生産量は，培養 2 日目で 1.02mg/mL，4 日目で 8.63mg/mL(83.7mM)が確認され，MSG から GABA への変換率は，培養 4 日目で 79.7%に達した．以上の結果から，米糠(あきたこまち)を唯一の栄養源とし，*L. brevis* IFO12005 培養による GABA 生産が可能であることが判明した．

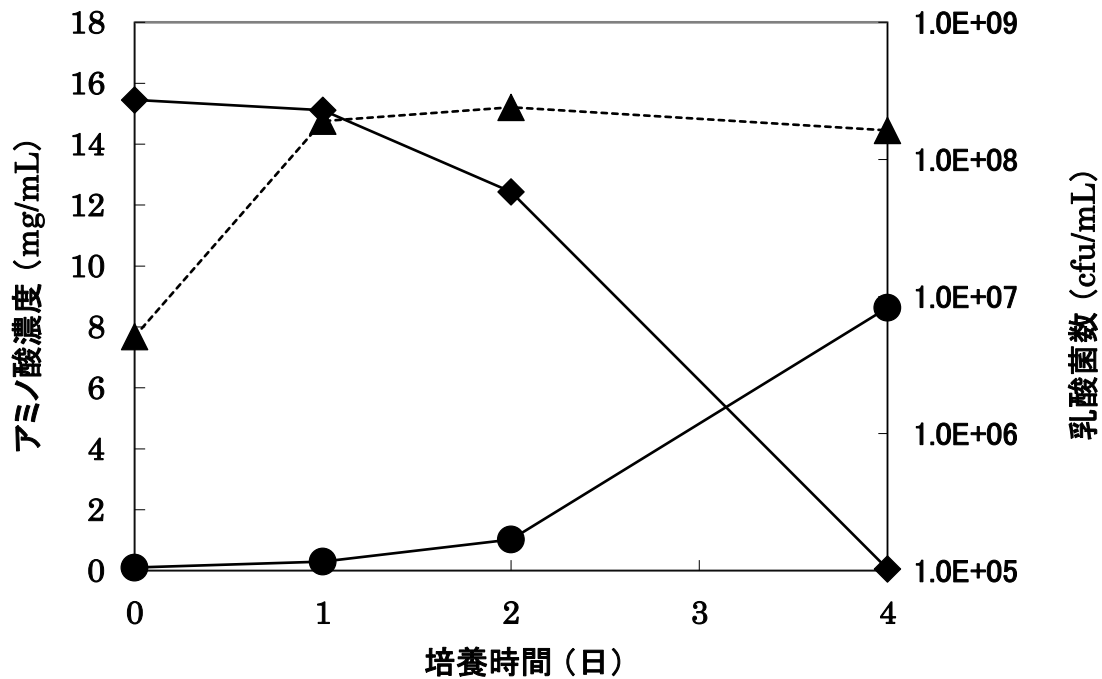


Fig. 2-2 米糠混合液における *L. brevis* IFO12005 培養による

MSG からの GABA 生産

● : GABA, ◆ : グルタミン酸, ▲ : 乳酸菌数

培養条件 ; 30°C/4 日間 ; 米糠混合液配合比 (米糠:水 = 1:4)

さらに、異なる品種「あきたこまち」、「めんこいな」、「秋田酒こまち」の米糠混合液における *L. brevis* IFO12005 培養による GABA 生産、変換率について Table 2-1 に示した。各米糠の最大 GABA 生産量および変換率は、あきたこまち 8.96mg/mL, 90.8%(培養 6 日目), めんこいな 9.02mg/mL, 100%(培養 4 日目), 秋田酒こまち 8.81mg/mL, 95.8%(培養 4 日目)となり、品種の異なる米糠混合液による GABA の生産に顕著な差は認められなかった。このことから、米糠の品種の違いは GABA 生産性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

Table 2-1 異なる品種の米糠混合液による GABA 生産への影響

培養時間 (日)	あきたこまち		めんこいな		秋田酒こまち	
	GABA 濃度 (mg/mL)	GABA 変換率 (moL%)	GABA 濃度 (mg/mL)	GABA 変換率 (moL%)	GABA 濃度 (mg/mL)	GABA 変換率 (moL%)
0	0.09	0.9	0.15	1.7	0.22	2.4
4	8.29	83.5	9.02	100.0	8.81	95.8
6	8.96	90.8	9.00	95.9	8.74	95.1

培養条件 ; 30°C/6 日間

2. 米糠の酵素処理

米糠混合液の更なる栄養源の増加を目的に、あきたこまち、秋田酒こまちな米糠に対して酵素処理の検討を行った。酵素処理後の米糠混合液中のアミノ酸および糖組成について Table 2-2 に示した。

米糠混合液の遊離アミノ酸総量は、酵素未処理の米糠混合液に比べ 2 倍以上に増加し、糖組成についても酵素処理によって、本菌が利用可能なグルコース、フラクトース、マルトースなどの炭素源が増加した。

Table 2-2 酵素処理米糠混合液のアミノ酸及び糖組成

米糠種類	酵素処理 有無	総アミノ酸 (mg/g)	糖濃度(mg/g)			
			グルコース	フラクトース	スクロース	マルトース
あきたこまち	—	0.93	3.55	3.59	3.29	1.93
	+	2.55	9.63	5.18	0.23	2.04
秋田酒こまち	—	0.81	3.77	3.47	3.40	0.09
	+	1.80	10.85	5.08	2.71	1.03

※米糠混合液の酵素処理は Fig.1 酵素処理プログラムを使用

3. RB 培地による GABA 生産

RB 培地(米糠 20g, 水 80 mL, pH4.5)に対して, MSG を 1.6 g(米糠重量に対して 8%濃度)を加え, 前培養液を接種し, 30°C, 6 日間の攪拌培養(50rpm)における GABA, グルタミン酸濃度を Fig. 2-3 に示した.

RB 培地における GABA 生産は, 培養 3 日目で 8.44mg/mL, 培養 6 日目では 8.35mg/mL で 3 日目と同等であった. また, GABA 変換率も 6 日目で 92.3%と高い変換率であった. このことから, RB 培地を用いた乳酸菌培養による GABA 生産は, 米糠混合液よりも効率的に GABA 生産が可能であることが判明した.

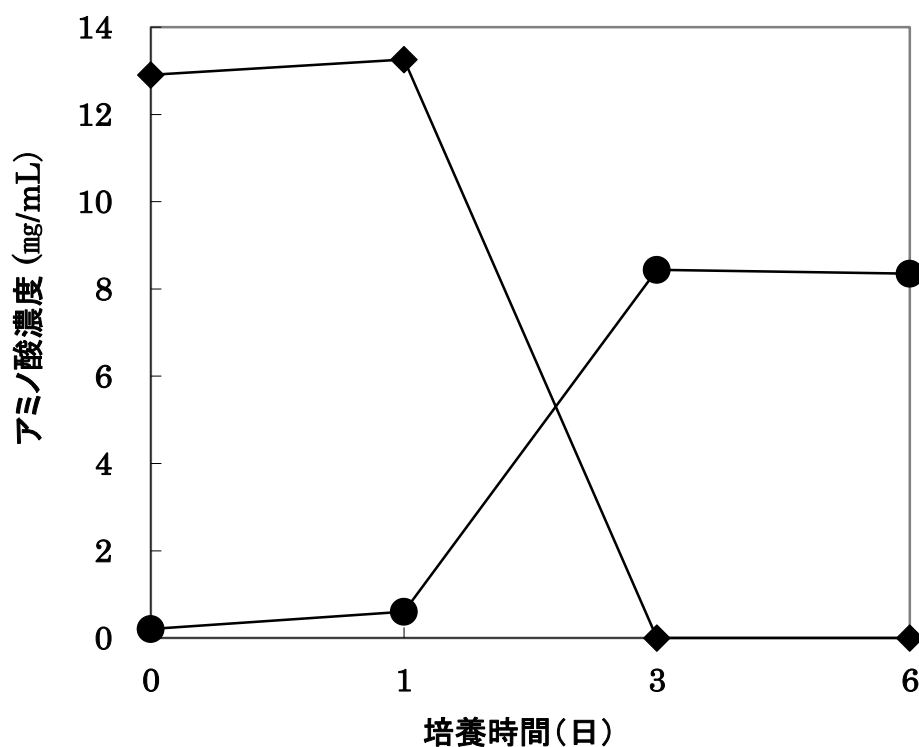


Fig. 2-3 RB 培地による GABA 生産

● : GABA, ◆ : グルタミン酸, 培養条件 ; 30°C/6 日間, 攪拌培養 (50rpm)

4. RB 培地による GABA 生産および GABA 含有組成物の生産試験

醸造設備を活用した GABA 生産および実用化を図るため、30L ジャー培養装置を使用し、米糠 4 kg スケールの RB 培地による GABA 生産 (35°C, 7 日間) を Fig. 2-4 に示した。RB 培地における GABA 変換率および菌体増殖は、培養 3 日目以内で最大 (GABA 変換率 95%, 乳酸菌数 4.6×10^8 cfu/mL) に達し、GABA 生産も 14.10 mg/mL と最大値を確認した。次に、GABA 含有組成物を調製するため、培養終了 7 日目の RB 培養液による固液分離の最適化を圧搾機 MO-4 型 (藪田産業製) で検討した。RB 培養液をポンプで圧搾機に自動通液すると圧搾機内の内圧が上昇し、液体の連続採取が不可能であった。原因として、圧搾機濾布に米糠由来のデキストリン等が吸着して目詰まりを起こし、圧搾機内の内圧が上昇したと考えられる。そこで RB 培養液に市販の糖化酵素剤バイオザイム A (天野製薬製) を米糠重量に対して 0.1% (w/w) 添加し、55°C で 1 時間の糖化处理をした後、同様に圧搾機での固液分離を行った。糖化处理による酵素分解によって流動性が高まり、目詰まりが解消されたことで液体の連続採取が可能となった。液体収率は 65.6% (w/w) で、これは、遠心分離法 (3000rpm, 50 分) の液体収率 65.2% (w/w) と同等であった。得られた液体および固形分を含む濾過残渣の GABA 濃度は、液体 1.3% (w/v) および濾過残渣 1.2% (w/w) であった。以上の結果、本製法を用いることで GABA 含有組成物の液体および濾過残渣の乾燥により固体生産が現行醸造設備でも可能と判断された。さらに、生産工程において、原料である精米副産物の米糠を廃棄物として発生させずに GABA 生産が可能な新規製法を確立した。

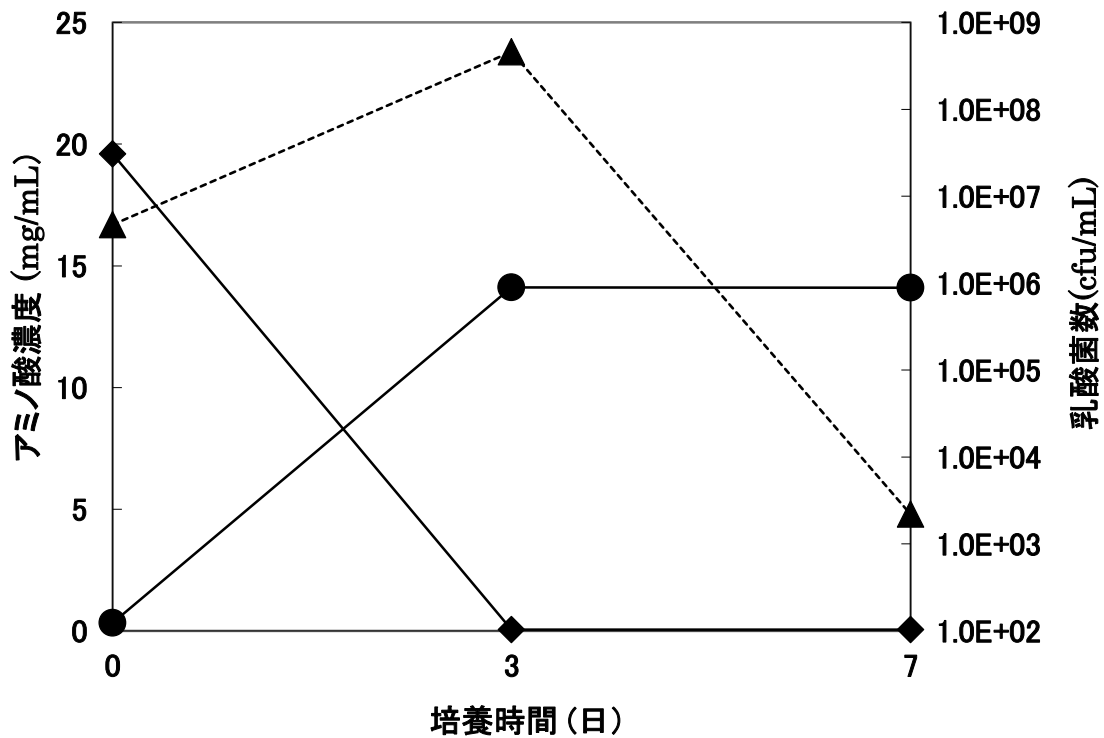


Fig. 2-4 30L ジャー培養装置による GABA 生産

● : GABA, ◆ : グルタミン酸, ▲ : 乳酸菌数, 培養条件 ; 30°C, 攪拌培養 (50rpm)

5. 米糠配合比の異なる RB 培地における GABA 生産の影響

RB 培地(米糠 : 水 = 1 : 4)の加水割合を 1 : 4 から 1 : 6 に変化した培地 (RB 培地 1 : 4 区 ~ 1 : 6 区) に対して 8%MSG と前培養液を加え, 30°C で 4 日間の攪拌培養 (50rpm) による GABA 変換率および乳酸菌数について Fig. 2-5 に示した. 各 RB 培地の GABA 変換率は, RB 培地 1:6 区で 83.4%, RB 培地 1 : 5 区で 86.0% と培養 2 日目で最大値に達し, RB 培地 1 : 4 区では, 培養 4 日目で 85.2% の最大値に達した. このことから, RB 培地の加水比率を米糠に対して 5 倍以上に増加させることによって, GABA 変換速度に顕著な改善が認められた. さらに, 乳酸菌増殖については, 各培地とも培養 1 日目で菌体数が最大に達したが, RB 培地 1 : 4 区で 2.8×10^8 cfu/mL に対

し、RB 培地 1 : 5 区で 4.4×10^8 cfu/mL, RB 培地 1 : 6 区で 4.3×10^8 cfu/mL と菌体数が 1.5 倍であることが確認された。これは、RB 培地における加水比率の増加による培地粘性の低下の影響が考えられる。その結果、GABA 変換速度や菌体増殖が促進されたと推測される。

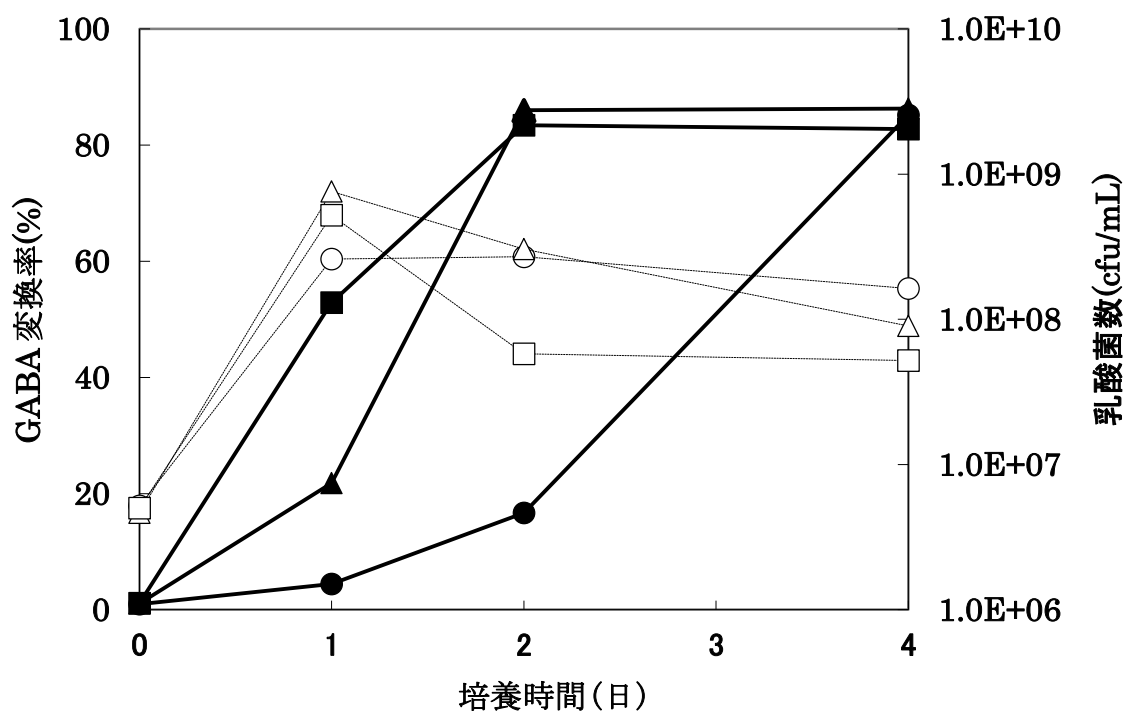


Fig. 2-5 RB 培地における米糠配合比の GABA 生産への影響

GABA 変換率[米糠 : 水=1 : 4(—●—), 米糠 : 水=1 : 5(—▲—), 米糠 : 水=1 : 6 (—■—)],
 乳酸菌数[米糠 : 水=1 : 4(---○---), 米糠 : 水=1 : 5(---△---), 米糠 : 水=1 : 6(---□---)],
 培養条件 ; 30°C/4 日間攪拌培養

6. RB 培地への MSG 添加量の影響

RB 培地(米糠:水=1:6)に 8%,12%,16%MSG および *L. brevis* IFO12005 前培養液を加え, 30℃で 3 日間の攪拌培養による GABA 生産の経時変化を Fig. 2-6 に示した. 培養 1 日目における GABA 生産は, 12%MSG 区で 8.75 mg/mL, 16%MSG 区で 11.92 mg/mL が確認され, 両区ともに 95%以上の GABA 変換率であった. さらに, 培養中における培地 pH の経時変化は, 12%MSG 区で pH4.8~5.3, 16%MSG 区では 5.0~5.6 と培養 3 日目間で急激な増加傾向であった. 一方, 8%MSG 区では, 培養 1~2 日目で 2.83~6.40 mg/mL の GABA 生産が得られ, GABA 変換率も培養 2 日目で 95%以上であった. RB 培地の pH も, 培養 3 日目間で pH4.7~4.8 と緩やかな増加傾向を示した. RB 培地の MSG 濃度増加によって, 培地の pH が増加したため, *L. brevis* IFO12005 の生育が旺盛になり, その結果 MSG から GABA の変換率が向上したものと考えられる.

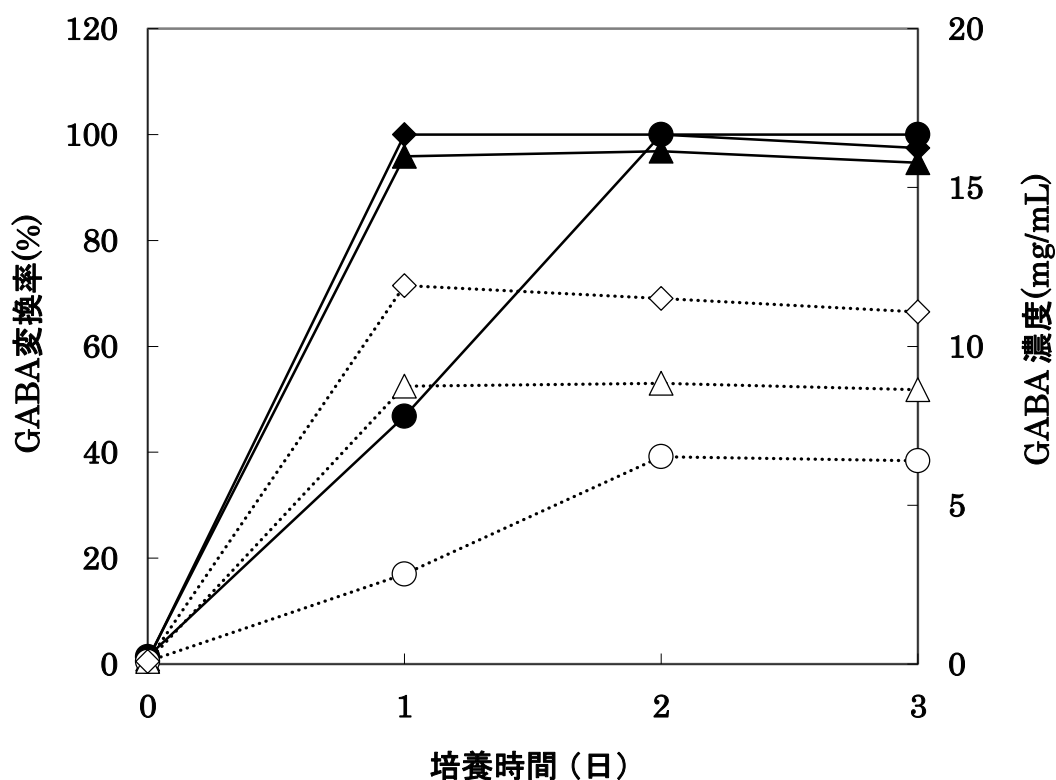


Fig. 2-6 MSG 添加量の違いによる GABA 生産の影響

GABA 変換率 ; 8%MSG (●), 12%MSG (▲), 16%MSG (◆),

GABA 濃度 ; 8%MSG (○), 12%MSG (△), 16%MSG (◇).

7. RB 培地初発 pH の GABA 生産に対する影響

RB 培地(米糠 : 水 = 1 : 6)の初発 pH の影響による GABA 生産について Fig. 2-7 に示した. 培養 3 日目の GABA 生産は, pH4.7 区で 3.02 mg/mL, pH5.3 区で 13.37 mg/mL を得られたが, pH4.0 区では GABA が未生産であった. さらに pH4.0, 4.7 区の pH の経時変化は, 培養 3 日目までに pH3.95 ~ 4.00 (pH4.0 区), pH4.58 ~ 4.70 (pH4.7 区) と殆ど変化はなく, pH5.3 区のみ pH5.30 ~ 7.08 に急激に増加した.

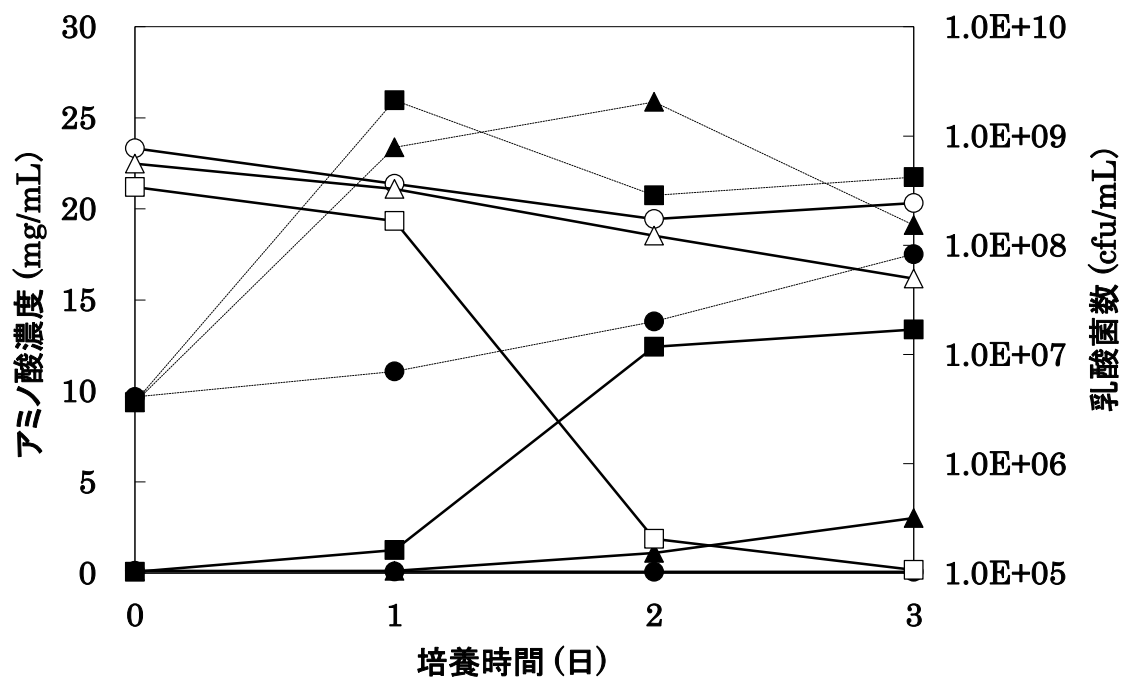


Fig. 2-7 初発pHの GABA 生産の影響

GABA 濃度 (pH4.0 (—●—), pH4.7 (—▲—), pH5.3 (—■—)),
 グルタミン酸濃度 (pH4.0 (—○—), pH4.7 (—△—), pH5.3 (—□—)),
 乳酸菌数 (pH4.0 (---●---), pH4.7 (---▲---), pH5.3 (---■---))

また、pH の異なる RB 培地における菌体増殖は、pH4.0 区で最大菌数 8.3×10^7 cfu/mL に達し、pH4.7 区および 5.3 区と比較した場合 1/100 少ないことから、菌体増殖の減少により GABA が生産されなかったものと考えられる。一方、pH4.7 区では 10^8 cfu/mL オーダーに達していたが GABA 生産は pH5.3 区の 1/4 以下であった。

以上の結果から、RB 培地において、*L. brevis* IFO12005 接種前の初発 pH が 4.7 以上なければ、菌体増殖による菌体定常期に移行しても GABA の生産は抑制されることが推測される。

8. 醸造設備による GABA 含有米糠発酵素材

本節で開発した新規製法を用いた 4,000L 醸造発酵タンクおよび醸造設備による現場スケール製造試験では、1.0% (w/w) の GABA 含有組成物の生産に成功した。さらに、現場スケール生産した液体の GABA 含有組成物を「爛漫ギャバ液(米糠発酵液)」として商品化した (Fig. 2-8)。



単位 (g/100g)

	水分	たんぱく質	脂質	炭水化物	灰分	GABA
爛漫ギャバ液	92.5	1.7	0.1	4.4	1.3	1.0

Fig. 2-8 爛漫ギャバ液製品

要 約

L. brevis IFO12005 および米糠を用いて γ -アミノ酪酸(GABA)の効率的な生産法を検討した。

大量発生する食品副産物の米糠(あきたこまち, めんこいな, 秋田酒こまち)を唯一の栄養源とした米糠混合液(酵素未処理)を用いた *L. brevis* IFO12005 の乳酸発酵培養では, 米糠重量に対して 8%(w/w)の添加 MSG から 90%以上の変換率で GABA を生産することを確認した。また, 米糠混合液を複合酵素剤で酵素処理することで, 培地中の栄養源であるアミノ酸や糖分が 2 倍以上に増加し, 乳酸菌発酵に適した新規米糠培地(RB 培地)の開発および製法を確立した。なお, 本製法は, 現行醸造設備による培地製造および加熱殺菌処理が可能な新製法でもある。次に, RB 培地を用いた乳酸菌発酵では, 米糠混合液より早い培養時間で 8.44mg/mL の GABA 生産を確認した。さらに, 醸造設備を活用した実用化を目的に, 30L ジャー培養装置による RB 培地 20kg スケールでの培養試験において, GABA が 1.4%(w/w)生産された。また, 培養液の固液分離によって 1.0%(w/w)以上の GABA 含有米糠発酵素材の液体および固体の新規生産法を確立した。

また, 更なる GABA 生産性を高めるため, RB 培地中の栄養源の増加を図った。すなわち, 培地の配合割合(米糠:水)を 1:4 から 1:6 に変更し, RB 培地による発酵比較試験の結果, 加水割合が高い RB 培地ほど GABA 変換速度が早いことが確認された。さらに, MSG 添加量も米糠重量に対して 16%まで増量が可能となり, 95%以上の高い変換率と高収量な GABA を 24 時間で生産した。以上から, 精米副産物の米糠を原料とした RB 培地における乳酸菌による効率的な GABA 生産配合量は, RB 培地の培地比率 1:6(米糠:水)または培地米糠配合量 14%(w/w)程度が最適で, 且つ MSG 添加限界量は 16%(米糠重量に対して)であった。

本節製法を用いた 4,000L 醸造発酵タンクおよび醸造設備を活用した現場スケールにおける GABA 含有米糠発酵素材の生産に成功し、液体は「爛漫ギャバ液（米糠発酵液）」として実用化した。

第2節 無洗米粕を用いた乳酸菌による γ -アミノ酪酸組成物の生産法

本節では、無洗米粕を唯一の栄養素とした培地を調製し、乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 を用いた乳酸発酵による GABA 含有組成物の生産を目的とした。最初に、乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 を用いた発酵による MSG から GABA 変換に適した無洗米粕培地の開発および培養条件を検討した。さらに、最適培地における GABA 変換可能な MSG 添加限界濃度を培地配合割合や培養条件も含めた検討によるグルタミン酸から GABA への高い変換効率を保持した GABA 含有組成物の生産法を開発した。

実験方法

1. 実験試料および使用菌株

秋田県大潟村カントリーエレベータ公社が所有する BG (Bran Grind) 無洗米装置 (東洋ライス製) で製造工程中に発生する無洗米粕 (no-wash rice lees ; NWRL, Table 2-3)⁵⁾ を原料に用いた。前節 (第2章1節) で GABA の生産性に優れた *L. brevis* IFO12005 株を実験に供した。なお、前培養法は、前節と同様の方法で行った。

Table 2-3 NWRL の成分

	単位 (g/100g)					
	水分	たんぱく質	脂質	炭水化物	灰分	食物繊維 (総量)
NWRL	10.0	15.9	14.1	51.2	8.8	8.5

2. 分析および菌数測定

アミノ酸分析，菌数測定および GABA 変換率算出は，前節(2章1節)と同様方法で行った。

3. NWRL 培養液による GABA 生産

NWRL 培養液は NWRL 5g，水 15mL の混合液を 90%乳酸(発酵乳酸；大塚食品製)で pH4.5 に調整後，加圧滅菌(121℃，15 分)して調製した。滅菌した培養液に対して，別途滅菌した MSG 溶液(NWRL 配合重量に対して)および前培養液を培地に対し 4%(v/w)接種後，30℃で所定時間回転振とう培養(200rpm)した。経時的に GABA，グルタミン酸濃度を測定した。

4. 酵素処理 NWRL 培地の調整

NWRL 250g，水 750mL [加水割合 3 倍(NWRL に対して)] の混合液を 90%乳酸にて pH4.5 に調整し，市販酵素剤の液化アミラーゼ酵素剤 YA(天野エンザイム製)，蛋白分解酵素剤デナプシン 10P(ナガセケムテック製)，繊維分解酵素剤ペクチナーゼナガセ(ナガセケムテック製)を NWRL 重量に対してそれぞれを 1/1,000 加え，攪拌しながら酵素処理した。酵素処理は，40℃(60 min)→40-55℃(30 min)→55℃(60 min)→55-100℃(60 min)→100℃(10 min)→100-40℃(50 min)の条件で実施した。本法により得られた酵素処理液を酵素処理 NWRL 培地とした。

5. 酵素処理 NWRL 培地による GABA の調製

5. 1 NWRL 培地および酵素処理 NWRL 培地による GABA 生産

NWRL5g，水 15mL の混合液および酵素処理 NWRL(NWRL5g 相当量)20g を加圧滅菌(121℃，15 分)した。それぞれの混合溶液に別途滅菌した MSG

を加え、グルタミン酸の終濃度は 1.59% (w/w) とした。前培養液を 1 mL 接種した。培養は 30°C で 4 日間回転振とう培養 (100 rpm) した。経時的に GABA, グルタミン酸濃度を測定した。

5. 2 酵素処理 NWRL 培地中の NWRL 配合比の違いによる GABA 生産への影響

酵素処理 NWRL 培地の最適配合比を検討するため、NWRL と水の配合比を 1 : 4, 1 : 6, 1 : 8 に設定した。酵素処理 NWRL 培地 60g (培地の配合比 ; NWRL : 水 = 15g : 45mL = 1 : 3) に水を 15mL (1 : 4), 45mL (1 : 6) および 75mL (1 : 8) 加えた。さらに、別途滅菌した MSG を配合比の異なる 1 : 4 区, 1 : 6 区, 1 : 8 区に加え、各試験区のグルタミン酸の終濃度を 1.6% (w/w), 1.1% (w/w) および 0.7% (w/w) とした。次に、前培養した *L. brevis* IFO12005 を接種し、30°C で 3 日間の攪拌培養 (200 rpm) を行った。経時的に GABA, グルタミン酸濃度を測定した。

5. 3 酵素処理 NWRL 培地による GABA 高生産条件の検討

酵素処理 NWRL 培地 8g (NWRL 2g 含有) を水 8mL で加水 (NWRL : 水 = 1 : 7) したものに、MSG を NWRL 重量に対して 8, 16, 24, 32, 40% (w/w) に相当する量を添加した。各試験区のグルタミン酸終濃度は、それぞれ 0.7, 1.4, 2.1, 2.8, 3.5% (w/w) とした。さらに、前培養液 *L. brevis* IFO12005 を接種し、30°C で 5 日間の攪拌 (200rpm) 培養を行った。経時的に GABA, グルタミン酸濃度を測定した。

6. GABA 含有組成物の 30 L ジャー生産試験

30L ジャー培養装置 MSJ-N2 型(丸菱バイオエンジ製)で pH4.5 に調整した酵素処理 NWRL 培地(NWRL として 2.5kg)を加熱滅菌(121°C, 15 分)した。別途滅菌した MSG を加え, グルタミン酸終濃度は 2.4% (w/w)とした。なお, NWRL と水の配合比は 1 : 7 とした。さらに, 前培養液 *L. brevis* IFO12005 を加え, 30°C で 40 時間の攪拌培養(200 rpm)をした。経時的に生菌数, GABA, グルタミン酸濃度および乳酸菌数の測定をした。

実験結果と考察

1. NWRL 培地および酵素処理 NWRL 培地による GABA 生産

NWRL 培地および酵素処理 NWRL 培地を用い, *L. brevis* IFO12005 による培養 4 日後の GABA の生成量を Table 2-4 に示した。NWRL 培地では GABA 生成濃度(変換率)は 2.8mg/mL(25.7%)であり, 未変換 14.8mg/mL のグルタミン酸があったが, 酵素処理 NWRL 培地を用いた場合, 10.8mg/mL(98.7%)の GABA が培養 4 日目で生産された。このことから, NWRL 培地における GABA 生産性の低い原因は, 培地中の栄養源不足が考えられる。そこで, Table 2-5 に酵素処理 NWRL 培地中の糖組成および培養 4 日後の培養液中の糖組成を示した。

Table 2-4 NWRL 培地と酵素処理 NWRL 培地の GABA 生産性

酵素処理の有無	mg/mL	
	Glu	GABA
-	14.8	2.8
+	0.2	10.8

Table 2-5 培養による糖組成の変化

NWRL培地	糖組成 (mg/g)			
	グルコース	イソマルトース	マルトース	マルトトリオース
酵素処理後	2.3	10.5	12.6	13.6
培養終了後	0	8.2	1.6	11.8

NWRL 培地には、糖としてイソマルトースのみが 8.7mg/g 含まれていたが、NWRL 培地の酵素処理によってグルコース、イソマルトース、マルトースおよびマルトトリオースが 2.3 mg/g から 13.6 mg/g に増加した。これは NWRL 中の澱粉が酵素処理により生成したものと考えられる。前節(2章1節)の米糠の酵素処理においてもグルコース、マルトースの増加が認められているが、酵素処理 NWRL 培地でも同様に認められた。培養 4 日後にはグルコースが完全に消費され、マルトースも著しく消費された。以上のことから酵素処理により生成したグルコース、マルトースが乳酸菌の栄養源となった結果、菌体増殖が起こり、GABA が高生産されたものと考えられる。前節(2章1節)では、米糠に対するプロテアーゼ酵素剤処理によって遊離アミノ酸量が 2 倍に増加していることを確認している。本節では、酵素処理 NWRL 培地中のアミノ酸は測定していないが、使用した酵素剤にはプロテアーゼ酵素剤も含まれていることからアミノ酸も増加し、栄養源になったものと考えられる。しかしながら、酵素処理 NWRL 培地中のグルタミン酸濃度は 0.01mg/g 以下であり、MSG 添加量に比べ、無視できる濃度と考えられる。

2. GABA 生産における酵素処理 NWRL 培地の加水割合の影響

培養に伴う MSG から GABA への変換率を Fig. 2-9 に示した.

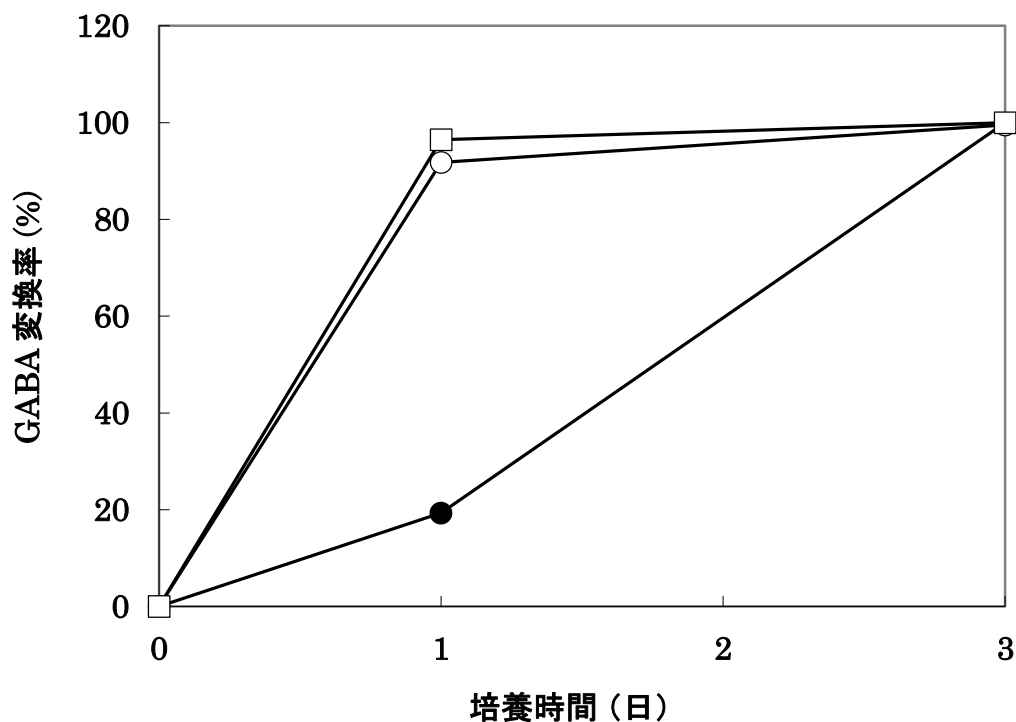


Fig. 2-9 培地配合割合の違いによる GABA 生産の影響

GABA 変換率 ; 試験区 1 : 4 (●), 試験区 1 : 6 (○), 試験区 1 : 8 (□).

試験区 1 : 4 (NWRL : 水) の培養 1 日目では GABA が 1.7mg/g 生成し, 変換率 19.3% (w/w) と低い値となったが, 試験区 1 : 6 および 1 : 8 では, GABA がそれぞれ 5.7mg/g, 4.7mg/g 生成し, 95% 以上の高い変換率であった. また, 試験区 1 : 4 において GABA 生産性が低い原因は乳酸菌の生育不良が示唆された. 前節 (第 2 章 1 節) において乳酸菌の GABA 高生産には 10^8 cfu/g 以上の菌体量が必要であったことを確認している. 本節試験では生菌数を測定していないが, 低い加水割合の場合, 高い糖濃度となることによるグルコースのカタボライト制御による菌生育の遅れが原因として考えられる.

3. 酵素処理 NWRB 培地による GABA 高生産条件の検討

NWRL 重量に対し 8~40% (w/w) の MSG を添加した試験区の培養 5 日後の GABA 生成結果を Fig. 2-10 に示した.

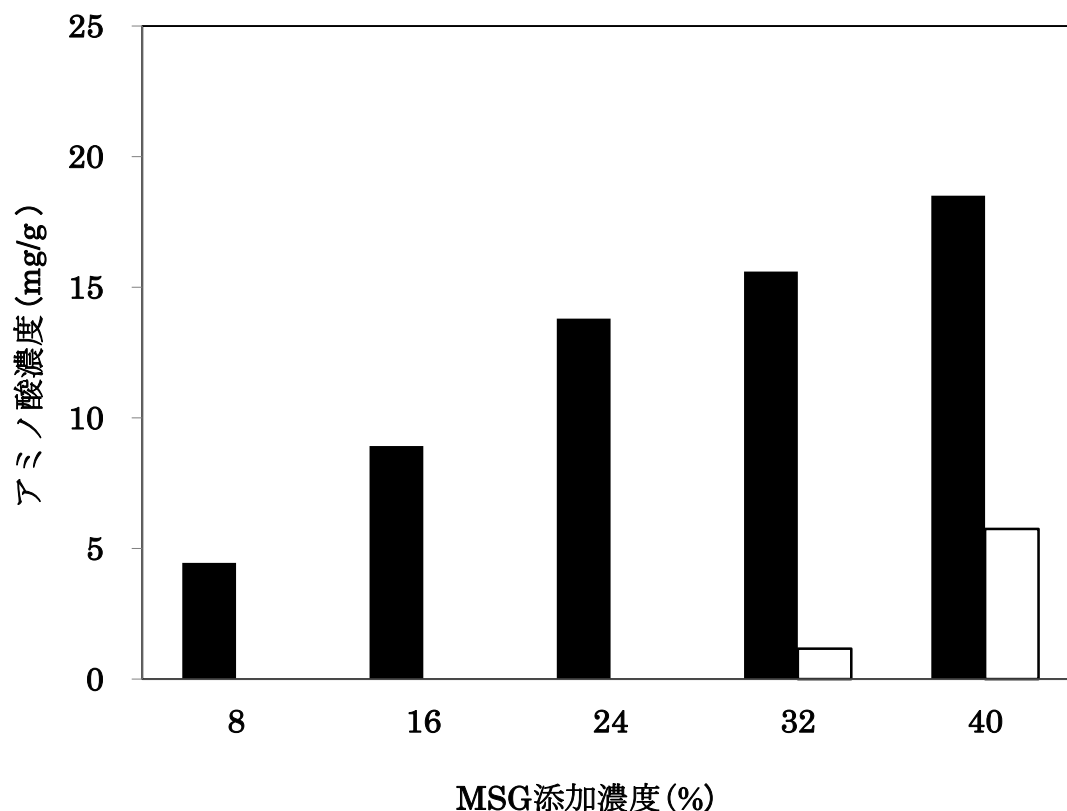


Fig. 2-10 MSG 添加濃度の GABA 生産への影響

GABA (■), グルタミン酸 (□)

各試験区 8%, 16%, 24%における GABA 濃度と変換率は, それぞれ 4.4mg/g(変換率:100%), 8.9mg/g(97.3%), 13.8mg/g(100%)で, MSG 添加濃度に伴い GABA 濃度も増加した. しかし, 32%区, 40%区の GABA 濃度(変換率)は, それぞれ 15.6mg/g(84.2%), 18.5mg/g(80.7%)と GABA 濃度は高くなったが, 未変換の MSG も増加した. 24%区では添加 MSG の全

てが変換され、13.8mg/g の GABA を生成した。早川ら²⁸⁾は *L. brevis* IFO12005 を用いた GYP 培地による 1%MSG から 5.2mg/g の GABA 生成を確認している。また、前節(第 2 章 2 節)では、*L. brevis* IFO12005 を用いた酵素処理米糠培地において 14.1mg/g の GABA 生成を報告した。以上のことから、GABA 生産において酵素処理 NWRL 培地は、合成 GYP 培地より優れており、酵素処理米糠培地と同等以上の GABA 生産性があることが確認された。

4. GABA 含有組成物の 30 L ジャー生産試験

30L ジャー培養装置による NWRL 2.5kg スケールの GABA 生産(30℃ , 40 時間)について Fig. 2-11 に示した。MSG から GABA の変換率は、培養 20 時間で 51.4%に達し、GABA の濃度も 8.5mg/g となり、培養 40 時間には添加 MSG の全てが GABA に変換され、生産濃度も 16.1mg/g に達した。*L. brevis* IFO12005 の菌体増殖は、培養 24 時間まで急激に増殖し、40 時間後には最大菌体数 2×10^9 cfu/ml に達した。以上から、ジャー培養においては RB 培地を超える GABA 生産性であることが判明した。上野ら²⁴⁾は、*Lactobatillus* sp. L13 を用いた GYP 培地による pH5.0 制御培養におけるグルタミン酸から 6.7%GABA 生産について報告している。本節では、pH 制御を行っていないため、pH 制御を含むジャー培養の条件を最適化することにより GABA 高生産性の期待ができる。また、得られた液体および固形分を含む濾過残渣の GABA 含有濃度と重量は、それぞれ液体で 16.3mg/g, 18.3kg および濾過残渣 20.6mg/g, 2.7kg(湿重量)あった。

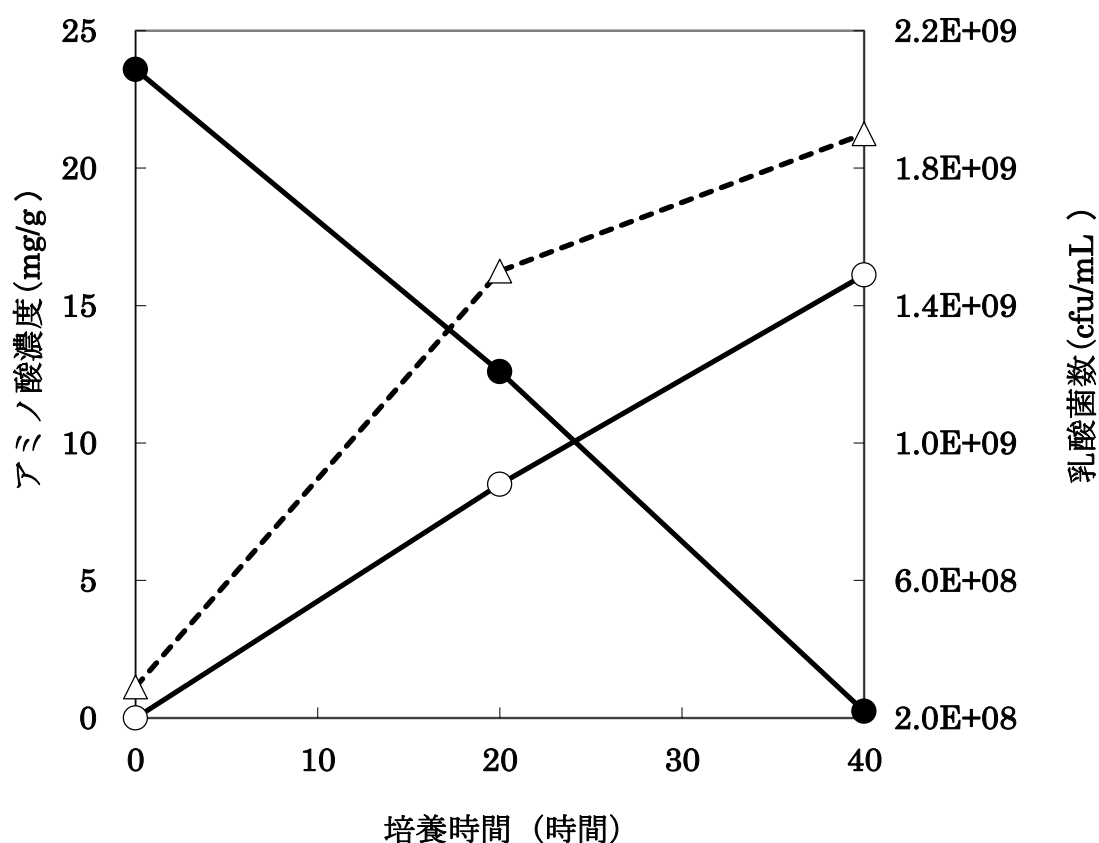


Fig. 2-11 30LスケールにおけるNWRL培地によるGABA生産

GABA(○), グルタミン酸(●), *L. brevis* IFO12005 菌数(△).

培養条件：30℃, 200rpm 攪拌培養

以上の結果から、本法を用いることにより GABA 含有組成物として液体および濾過残渣(固体)の生産が可能と判断され、精米副産物の NWRL を用いて廃棄物を出すことなく GABA 生産を可能とした。また、GABA を含有した酵素処理米糠の培養液では、固液分離せずに、そのまま乾燥することで家畜やペットフード用原料に利用可能であることから、酵素処理 NWRL の培養液も同様に飼料原料としての利用が期待できる。今回の実験試料である BG 無洗米製造時の NWRL は、平均粒径は 29 μm と非常に細かいことから固形分を含む醪および濾過残渣を微粉碎することなく食品に利用可能であ

る。また、株式会社サタケ製の無洗米製造装置スーパージフライス方式³⁾およびネオテイスティホワイトプロセス方式⁴⁾で発生する無洗米粕も NWRL と成分組成が似ていることから、本製法による GABA 生産も可能と考えられる。

要 約

L. brevis IFO12005 による無洗米粕 (NWRL) を原料に用いた GABA の効率的な生産法を検討した。NWRL を唯一の炭素源として *L. brevis* IFO12005 を用いた乳酸発酵による MSG からの GABA 生成量 (変換率) は 2.8mg/g (25.7%) と低かった。そこで、NWRL [加水割合 3 倍 (NWRL に対して)] を酵素処理することで *L. brevis* IFO12005 の発酵に必要な栄養素 (少糖, アミノ酸) を増量した酵素処理 NWRL 培地を開発した。酵素処理 NWRL 培地を用いた *L. brevis* IFO12005 による GABA 生成量 (変換率) は 10.8mg/g (98.7%) と著しく改善されたが、培養は 4 日間を要した。酵素処理 NWRL 培地の加水割合を NWRL 重量の 4 倍から 6 倍, 8 倍に増加させることで、GABA 変換率 91% 以上で培養期間が 1 日に短縮された。さらに、7 倍加水した酵素処理 NWRL 培地による更なる GABA 高生産性を検討した。結果、NWRL 重量に対し MSG (w/w) を 8~24% 添加区では、GABA 変換率は 97% 以上であり、24% 区では GABA が 13.8mg/g 生産された。30L ジャー培養装置による酵素処理 NWRL 培地 20kg スケールの培養により、97.5% の GABA 変換率で 16.1mg/g の GABA 含有組成物の新規製造法を確立した。

第3節 米糠を用いた乳酸菌による γ -アミノ酪酸高濃度組成物の生産法

前節まで、米糠および無洗米副産物を唯一の栄養源とした米糠または無洗米粕に対する酵素処理培地の開発、および開発培地を用いた乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 による MSG から GABA 濃度 1.0~1.6% (w/w) 生産について報告した。

本節では、前節までに開発した米糠を唯一の栄養源とした RB 培地を基本培地とした *L. brevis* IFO12005 に適した培地配合比率および MSG 添加量の検討による高濃度 GABA 生産法の開発をした。さらに、現有醸造設備を活用した生産法による GABA 含有米糠発酵素材の実用化を図った。

実験方法

1. 実験試料および使用菌株

秋田銘醸株式会社にて酒造工程で副生するあきたこまちの米糠 (rice bran:RB) を用いた。前節(第2章1節)で、GABA の生産性に優れた *L. brevis* IFO12005 株を実験に供した。なお、前培養法は、前節と同様に行った。

2. 分析および菌数測定

アミノ酸分析、菌数測定および GABA 変換率算出は、前節(2章1節)と同様に行った。

3. RB 基本培地の調製

米糠と水(米糠重量に対して 4~5 倍)を加えた混合液に 90%乳酸(発酵乳酸;大塚食品製)で pH 4.5 に調整し、市販酵素剤の液化アミラーゼ酵素剤 YA(天野エンザイム製)、蛋白分解酵素剤デナプシン 10P(ナガセケムテック

製), 繊維分解酵素剤ペクチナーゼナガセ(ナガセケムテック製)を 0.1% (w/w) (米糠重量に対して)を加え, 攪拌しながら酵素処理を行った培養液を RB 基本培地とした.

4. RB 培地を用いたジャー培養による GABA 高生産条件の検討

4. 1 RB 培地を用いた最適 pH の検討

2L ジャー培養装置 MDL200(丸菱バイオエンジニア製)に, 米糠 125g と水 652g を酵素処理した RB 基本培地 777g を採り, 加圧滅菌(121°C, 15 分)した. なお, RB 基本培地の米糠と水の配合比は 1 : 5 であった. その後, 別途滅菌した MSG 溶液 245g(MSG72g/蒸留水 173g)を RB 基本培地に加え, 所定の RB 培地とした. 最終 RB 培地の米糠と水の配合比は 1 : 7 であった. さらに, 前培養した *L. brevis* IFO12005 を 50mL 加え, 90%乳酸にて pH4.5, 5.0, 5.5, 6.0 に pH 制御し, 30°C, 3 日間の攪拌培養(200rpm)を行った. なお, 初発 MSG 濃度は 6.7%であった.

4. 2 RB 培地の最適配合比(米糠 : 水)の検討

GABA 高生産を目的とした RB 培地中の米糠と水の最適配合比を検討した. なお, 各試験区を 8%区, 9%区, 12%区(各区%は最終 RB 培地全量に対する米糠重量%とした)と示し, 2L ジャー培養装置 MDL200 に RB 基本培地(8%区 ; 450g, 9%区 ; 500g, 12%区 ; 655g)を採り, 加圧滅菌(121°C, 15 分)をした. なお, RB 基本培地の米糠と水の配合比は 1 : 4 であった. 次に, 別途滅菌した各 MSG 溶液(8%区;MSG110g/蒸留水 500g, 9%区;MSG110g/蒸留水 450g, 12%区;MSG110g/蒸留水 295g)を各試験区に加え, 所定の RB 培地を調製した. さらに, 前培養した *L. brevis* IFO12005 を 50ml 加え, 90%乳酸で pH 5.0 に制御して 30°C, 3 日間の攪拌培養(200rpm)を行った.

各試験区の初発 MSG 濃度は 9.9% (w/w ; 529mM) であった。また、各試験区の最終 RB 培地の米糠と水の配合比は、8%区で米糠 : 水 = 1 : 10, 9%区で米糠 : 水 = 1 : 9, 12%区で米糠 : 水 = 1 : 7 であった。

4. 3 RB 培地を用いた MSG 添加量の検討

2L ジャー培養装置 MDL200 (丸菱バイオエンジ製) に RB 基本培地 (米糠 : 水 = 1 : 4) 555g を取り、加圧滅菌 (121°C, 15 分) した。なお、試験区は 7% MSG 区, 12%MSG 区, 14%MSG 区で示した。また、別途滅菌した MSG 溶液 (7%MSG 区 ; 72g/蒸留水 395g, 12%MSG 区 ; 110g/395g, 14%MSG 区 ; 150g/395g) を加え、所定の RB 培地を調製した。さらに、前培養した *L.brevis* IFO12005 を 50ml 加え、90%乳酸で pH 5.0 に制御して 30°C, 4 日間の攪拌培養 (200rpm) を行った。なお、各区の MSG 終濃度は 380mM (7%MSG 区), 560mM (12%MSG 区), 730mM (14%MSG 区) であった。最終 RB 培地の米糠と水の配合比は、各区とも 1 : 7 であった。

実験結果と考察

1. RB 培地を用いた最適 pH の検討

培養中の乳酸菌数は、培養 1 日目で各区とも 10^8 から 10^9 cfu/g オーダーに増加し、増加率は 3~12 倍であった。pH5.0 区 (乳酸菌数 3.5×10^9 cfu/g) および pH5.5 区 (乳酸菌数 2.6×10^9 cfu/g) では、培養 1 日目で最大乳酸菌数に達した。また、pH4.5 区 (1.2×10^9 cfu/g) および pH6.0 区 (2.5×10^9 cfu/g) は、培養 2 日目に最大乳酸菌数に達している。しかしながら、pH4.5 区における乳酸菌の増殖は緩慢であった (Fig. 2-12)。

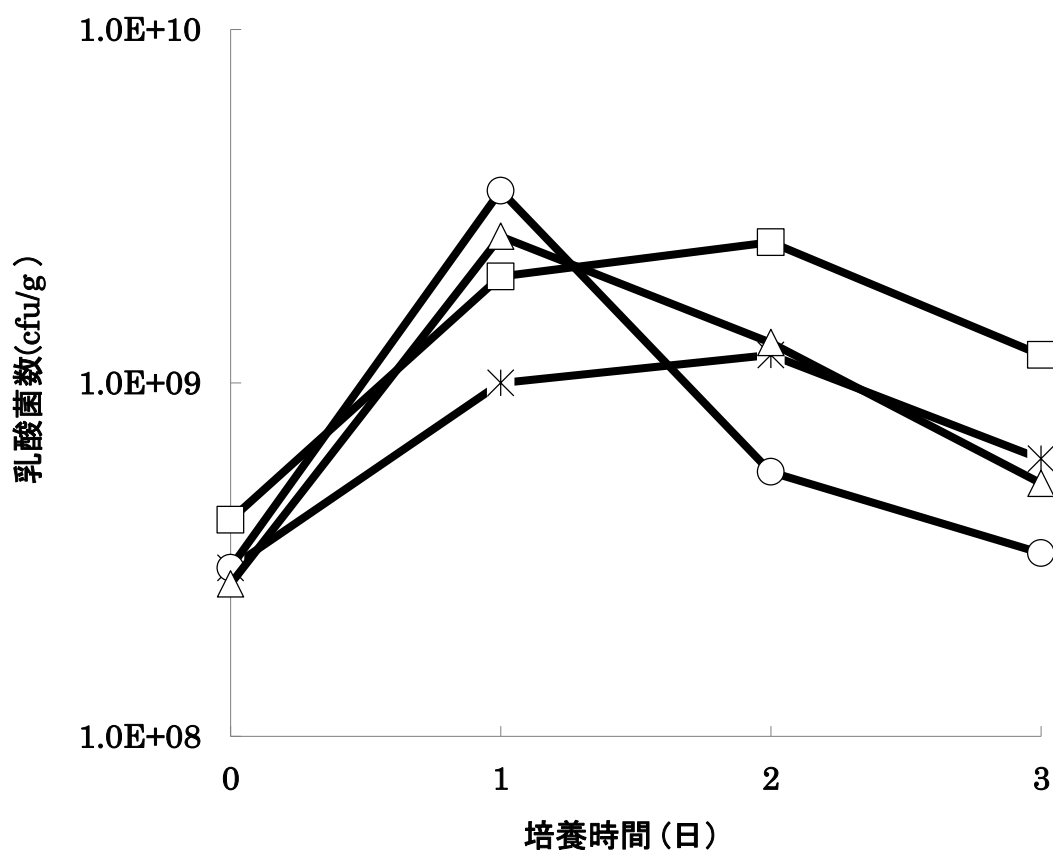


Fig. 2-12 pH 制御による乳酸菌増殖への影響

pH 4.5 (*), pH 5.0 (O), pH 5.5 (Δ), pH 6.0 (□). 30℃, 3 日間攪拌培養

pH5.0 区から 6.0 区では、培養 2 回目から 3 日目で添加した 6.7%MSG が 90%以上 GABA に変換し、各区とも 37mg/g(363mM)程度の GABA を生成した。一方、pH4.5 では培養 3 日目でも GABA 変換率 41.9%、GABA16.3mg/g(159mM)と生成が抑えられた(Fig. 2-13)。以上から、pH5.0 区および pH5.5 区は、培養 1 日目で最大生菌数に達し、培養 2 日目には RB 培地内のグルタミン酸が残存していないことから、RB 培地における GABA 高生産の最適 pH は 5.0~5.5 と考えられる。さらに、第 2 章 1 節で RB 培地における初発 pH4.7 以上において GABA 生成が有効的である報告からも、本節 pH4.5 区の GABA 生成が少ないことと符合した。

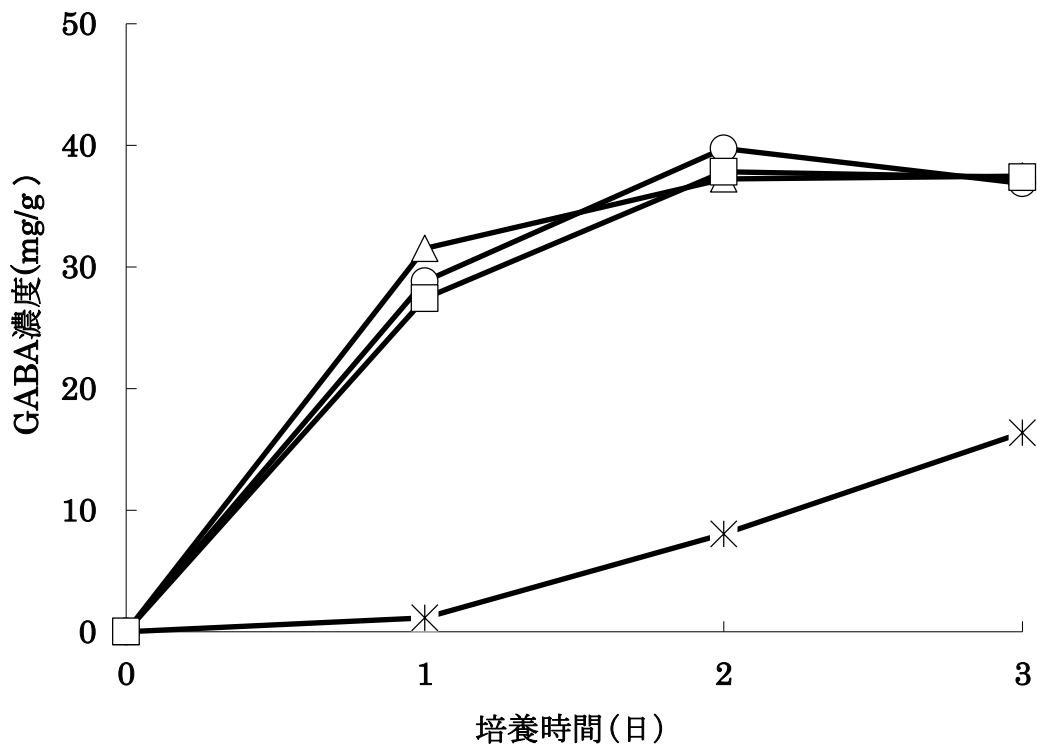


Fig. 2-13 pH 制御による GABA 生産性

pH 4.5 (*), pH 5.0 (O), pH 5.5 (Δ), pH 6.0 (□)

30°C, 3 日間攪拌培養 (200rpm)

2. RB 培地中の最適米糠添加量の検討

各 RB 培地における乳酸菌培養による GABA 生成を Fig. 2-14 に示した。全ての試験区に於いて MSG から GABA に変換された。しかし、RB 培地の米糠配合量が多い順 (RB 培地 12% 区 > 9% 区 > 8% 区) に GABA 生成速度も同じであった。RB 培地 12% 区では、培養 2 日で、全ての MSG が GABA に変換され、54.9mg/g (533mM) の GABA 生成を確認した。また、培養 1 日目の生菌数は、RB 培地 8% 区で 1.4×10^9 cfu/g, 9% 区で 2.1×10^9 cfu/g, 12% 区で 3.8×10^9 cfu/g と RB 培地米糠配合量に菌体量も依存した。このことか

ら、RB 培地 12%区における菌体の生育速度が高かったため、GABA 生成速度も上昇したと考えられる。以上の結果から、RB 培地中の米糠配合量は 12% (培地配合比/米糠：水=1：7)が好ましいことが分かった。

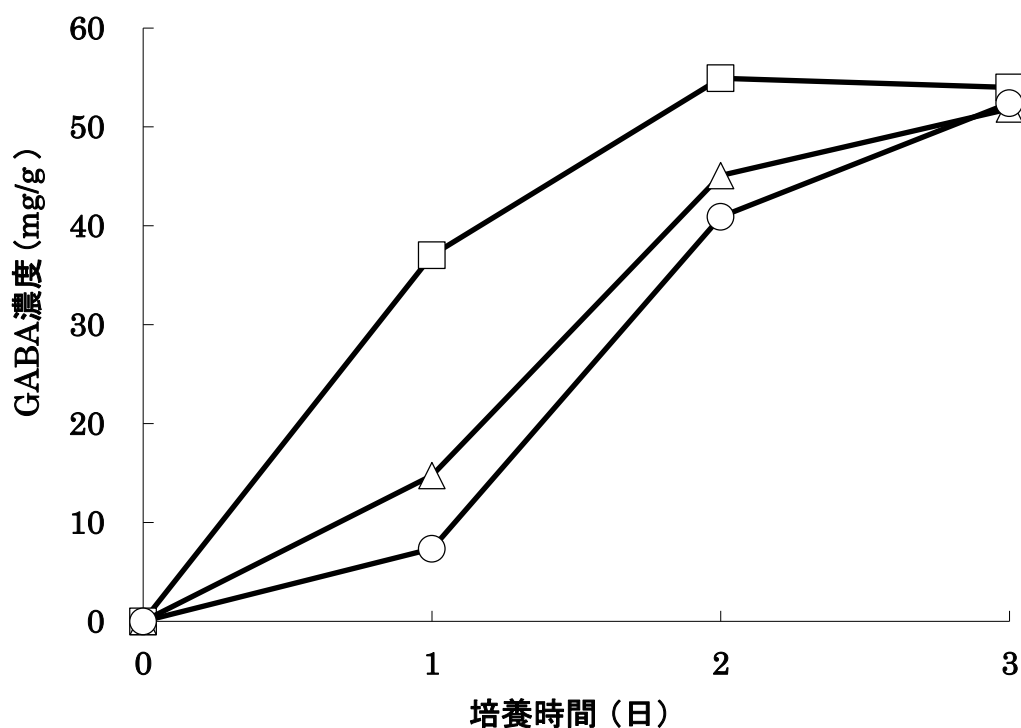


Fig. 2-14 GABA 生産量への RB 濃度の影響

RB 12% (□), RB 9% (△), RB 8% (○)

30°C/3 日間攪拌培養

3. RB 培地を用いた MSG 添加量の検討

MSG 添加量が異なる RB 培地 (7%MSG 区, 12%MSG 区, 14%MSG 区) における乳酸菌の増殖は、12%MSG 区で培養 1 日目に 4.3×10^9 cfu/g, 7%MSG 区では培養 2 日目に 2.0×10^9 cfu/g の最大菌数に達し、以後は両区とも減少をした。また、14%MSG 区では乳酸菌の増殖は認められなかった。な

お、7%および12%MSG区では培養1日目に乳酸菌数が 10^9 cfu/g オーダーとなった。さらに、各区におけるMSGからGABAへの変換は、7%MSG区で培養2日目に全てのMSGがGABAに変換され、41.8mg/gのGABA生成をした(Fig. 2-15)。

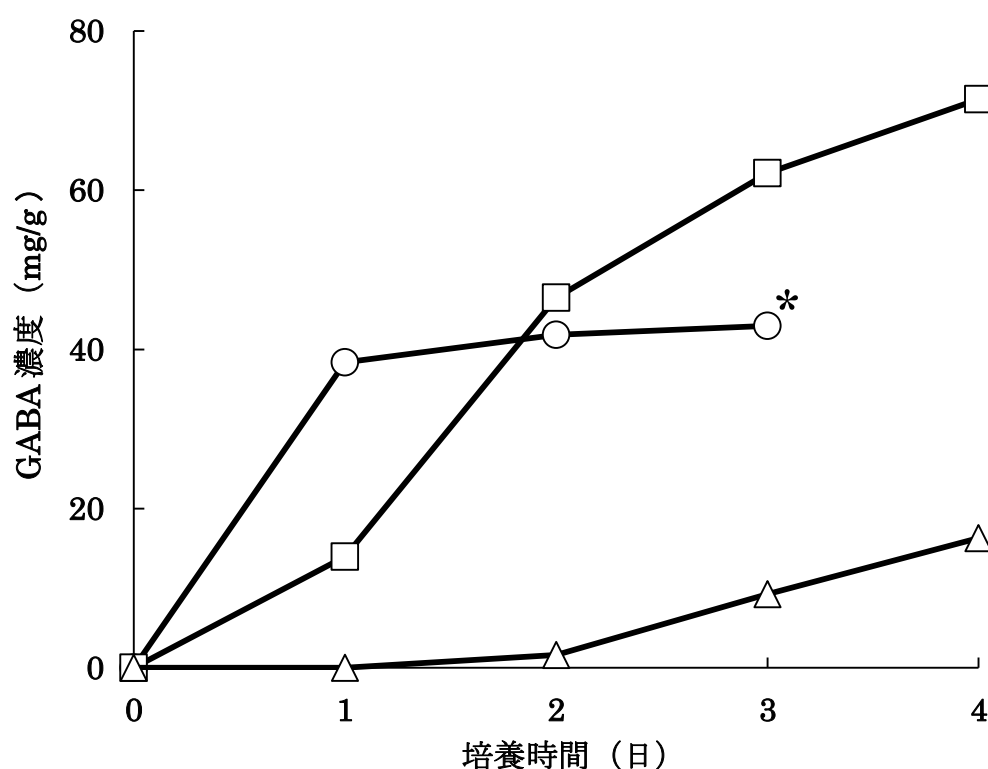


Fig. 2-15 MSG 添加濃度の GABA 生産への影響

7%MSG (○), 12%MSG (□), 14%MSG (△)

30℃, 4日間攪拌培養(200rpm)

*: 培養3日目でGABA濃度が添加MSGモル当量に達した

一方、12%MSG区ではGABAへの変換は緩慢であったが、培養4日には全てのMSGがGABAに変換され71.4 mg/g(693mM)のGABA生成であった。14%MSG区では、培養4日目までに16.3mg/g(158mM)のGABA生成

に留まり、MSG からの GABA 変化率も 19.8%であった。これは、*L. brevis* IFO12005 を用いた RB 培地における GABA 生成に関する効率的な生菌数は 10^8 cfu/g 以上との報告(第 2 章 1 節)と本試験も同結果であることが判明した。また、本節試験 12%MSG 区での GABA 生成量は、上野ら²⁹⁾が漬物から分離した GABA 生産菌 *Lactobacillus* sp. L13 を用いた MSG からの GABA 生成量(650mM)を超えている。*Lactobacillus* sp.L13 は、MSG を 800mM 添加による GABA650mM の生産、添加 MSG は全て培養中に消費している。しかしながら、GABA 変換率が 81%であったことから *Lactobacillus* sp. L13 が GABA を資化している可能性があるが言及されていない。なお、*L. brevis* IFO12005 は GABA を資化しないことを確認している。この高い変換率は *L. brevis* IFO12005 が GABA を資化しないことも一因と考えられる。さらに、*Lactobacillus* sp. L13 の GABA 生産試験において *L. brevis* IFO12005 を比較対象菌株として用いた結果、340mM 添加 MSG から *Lactobacillus* sp. L13 は 290mM、*L. brevis* IFO12005 は 100mM の GABA 生産の報告であった。以上から、*L. brevis* IFO12005 を用いた GABA 生産において、RB 培地は優れた GABA 生産培地であることを確認した。また、本節製法による 4,000L 醸造発酵タンクおよび醸造設備を活用した現場スケールによる GABA 含有組成物の生産では、培養 8 日目で 7.1%(w/w)の GABA 生産を確認した。さらに、本製法を活用し、現場スケールで培養した醪に賦形剤(米糠)を配合し、醪ごと乾燥粉末化する製法も確立した。なお、粉末の GABA 含有米糠発酵素材については「爛漫ギャバ粉末(米糠発酵粉末)」として商品化をした(Fig. 2-16)。



単位 (g/100g)

	水分	たんぱく質	脂質	炭水化物	灰分	GABA
爛漫ギャバ粉末	6.5	16.8	8.7	62.2	5.8	4.0

Fig. 2-16 爛漫ギャバ粉末(米糠発酵素材(粉末))

要 約

L. brevis IFO12005 を用いた RB 培地における GABA の効率的な生産法を検討した。RB 培地(培地配合比/米糠 : 水 = 1 : 7)を用いた乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 発酵では、pH5.0~5.5 に制御することで MSG から GABA を高変換することをジャー培養で確認した。また、RB 培地中の最適な米糠配合量を検討した結果、RB 培地中の米糠配合量 12% (w/w) が良好であり、培養 2 日目で添加 MSG を全て GABA に変換した。さらに、米糠配合量 12% の RB 培地での pH5.0 制御による乳酸菌培養では、培養 4 日目で MSG (690mM) から GABA を 7.1% (w/w) 高生産する製法を確立した。なお、本製法は、乳酸菌発酵による GABA 生産において高生産する新規製法である。

第4節 加工食品への米糠発酵素材の利用適性

前章まで、精米副産物の米糠または無洗米粕を唯一の原料とした開発培地を用いた乳酸菌 *L. brevis* IFO12005 発酵による GABA 含有の新規米糠発酵素材を開発した。本素材は種々の加工食品に添加することにより、食品に機能性を付与することが期待される。しかしながら、各加工食品に使用する場合、各製造工程における米糠発酵素材含有の GABA 残存量および安定性が求められる。また、本素材は乳酸発酵によって生産された発酵液であり、素材の pH が酸性であることから、各食品加工における酸臭や酸分解等による製造工程中の各加工食品の変化や風味の影響も懸念される。そこで、本節では、米糠発酵素材を配合した各加工食品の試作試験を行い、本素材の利用適応を検証することを目的とした。

実験方法

1. 実験試料

第2章1節で実生産した米糠発酵素材(液体)を各加工品に供した。

2. アミノ酸分析

アミノ酸分析は、前節(2章1節)と同様の方法で行った。

3. 各加工食品の試作方法

各加工食品の試作方法については以下に通りに行った。

3.1 炊飯試験

炊飯試験の配合量を Table 2-6 に示した。炊飯器は、市販の家庭炊飯器

(タイガー社製)を使用し、通常モードで炊飯した。また、炊飯後の炊飯米の官能評価および GABA 濃度測定を行った。なお、試作使用した米糠発酵素材(液体)の GABA 濃度は 8.6mg/g であった。

Table 2-6 炊飯米配合表

		対照区	試験区 1	試験区 2
白米	(g)	135	135	135
水	(mL)	145	136	118
米糠発酵素材(液体)	(mL)	0	9	27

3. 2 パン製造試験

パン製造試験の配合量を Table 2-7 に示した。加工には市販のホームベーカリー器(サンヨー社製)を使用して 1 斤サイズの容量で試作した。焼成後の試作品を官能評価および GABA 濃度を測定した。また、米糠発酵素材(液体)の GABA 濃度は 10mg/g であった。

Table 2-7 パン配合表

	対照区 (g)	試験区 (g)
小麦粉 (カメリア強力粉)	280.0	280.0
砂糖	16.8	16.8
食塩	5.6	5.6
スキムミルク	5.0	5.0
マーガリン	20.0	20.0
水	190.0	173.4
米糠発酵素材(液体)	0	16.6
白神こだま酵母	8.4	8.4

3. 3 製麺試験

製麺配合量を Table 2-8 に示した。製麺器は、市販家庭用(サンヨー社製)を使用し、試作した製麺(生麺)、茹で麺、茹で汁の GABA 濃度を測定した。また、試作した製麺 50g を各区とも一定量の水および茹で時間(12 分)で処理した後、湯切りをして茹で麺、茹で汁の重量測定をした。なお、試作使用した米糠発酵素材(液体)の GABA 濃度は 8.6mg/g であった。

Table 2-8 製麺配合表

	対照区 (g)	試験区 (g)
中力粉	400.0	400.0
水	180.0	156.0
食塩	16.0	16.0
米糠発酵素材(液体)	0.0	24.0

実験結果と考察

1. 炊飯試験

炊飯結果を Table 2-9 に示した。結果、試験区 1 および試験区 2 ともに炊飯における米糠発酵素材(液体)含有の GABA は残存することが確認できた。また、味覚試験においても酸味等の問題は確認されなかった。さらに、GABA 残存率も炊飯米配合の米糠発酵素材(液体)の GABA 濃度から換算した理論値を 100%とした場合、残存率 87.8%以上と高い値であったことから、ある程度的高温および長時間加工でも問題ないと考えられた。

Table 2-9 炊飯工程における米糠発酵素材(液体)の影響

	対照区	試験区1	試験区2
GABA濃度 (mg/1合)	3.5	73.0	203.8
炊飯米理論値 (mg/1合)	0	77.4	232.2
残存率 (%)	—	94.3	87.8

2. パン製造試験

パン製造試験の結果を Table 2-10 に示した。結果、米糠発酵素材(液体)配合の影響による発酵、焼成工程に問題は生じなかった (Fig. 2-17)。また、焼き上がり後のパン 1 斤における GABA 濃度も 167.0mg/斤と理論値と同値であった (GABA 残存率 100%)。以上から、米糠発酵素材(液体)含有の GABA は、パン製造の焼成工程など高温条件下でも添加濃度と同等が製品残存することを確認し、味覚的にも問題は無かった。

Table 2-10 パン製造における米糠発酵素材(液体)の影響

	対照区	試験区
GABA濃度 (mg/1斤)	3.0	167.0
パン理論値 (mg/1斤)	0.0	166.0
残存率 (%)	—	100.0



Fig. 2-17 焼成後のパン試作製造品

3. 製麺試験

製麺の各工程における重量を Table 2-11 に示した. 両区とも製麺 50g に対して, 茹で麺重量が対照区 95g, 試験区 88g と多少の差が生じた. これは, 麺の湯切りが原因と考えられ, 米糠発酵素材(液体)の影響はないと判断した. また, 各工程別の全体量(Table 2-11 重量)に対する GABA 測定結果を Table 2-12 に示した. その結果, 製麺工程で GABA 減少は無かった(生麺理論値 17.0mg に対して製造試験品 19mg). しかしながら, 生麺を茹でることで茹で汁に GABA が 50% (w/w)ほど流出することで, 茹で麺には添加量の 50% (w/w)の残存という結果となった.

Table 2-11 製麺の各工程重量

	対照区 (g)	試験区 (g)
生麺	50.0	50.0
茹で麺	95.0	88.0
茹で汁	284.0	301.0

Table 2-12 製麺工程別の GABA 濃度

			対照区	試験区
生麺	GABA濃度	(mg/全量)	1.8	19.0
生麺	GABA濃度理論値	(mg/全量)	0.0	17.0
	残存率	(%)	—	100.0
茹で麺	GABA濃度	(mg/全量)	1.0	10.5
茹で汁	GABA濃度	(mg/全量)	0.8	8.2

要 約

本節では、米糠発酵素材(液体)を配合した各加工食品の試作試験による本素材の適性を検証した。炊飯米の製造試験では、米糠発酵素材(液体)含有の GABA が残存することが確認できた。GABA 残存率も試作開始時に添加した米糠発酵素材(液体)の GABA 濃度から換算した理論値を 100%とした場合、87.8%以上が残存した。また、官能評価においても味覚に関する問題は確認されなかった。パン製造試験では、米糠発酵素材(液体)配合による発酵・焼成工程における影響は無かった。また、焼成後のパン 1 斤当たりの GABA 濃度は 167.0mg と配合時の理論値と同じ(残存率 100%)で、官能評価においても問題は確認されなかった。製麺試験では、製麺工程における米糠発酵素材(液体)の影響は生じず、生麺の GABA 残存率は 100% (w/w)であった。しか

しながら、生麺を茹でることで、茹で汁内に 50% (w/w) の GABA が流出することが確認された。さらに、スープ、おかゆ等のレトルト食品(殺菌条件 120°C, 30 分)における米糠発酵素材(液体)配合の試作結果においても GABA 残存率は 90% (w/w) 以上であった。以上から、米糠発酵素材(液体)は、各種の加工食品製造工程では GABA 減少率が少ないことから、各種加工食品に対して利用適性に優れた素材であることが確認された。

第3章 米糠発酵素材の食品・ペットフード用に向けた機能性の評価

精米副産物の米糠または無洗米粕の未利用原料を用いて、米糠発酵素材である米糠発酵液および米糠発酵粉末の新規生産法を確立し、加工食品への利用適性でも問題がないことを確認し、実用化にも成功した。しかし、米糠発酵素材の実用化による波及を考えた場合、本研究の各発酵素材における機能性効果エビデンスは必須と考える。以上から、本章では、米糠発酵素材(培養液、液体、粉末)における脂質異常改善作用、遺伝子メカニズムの解明および犬に対する家庭犬モニター調査について検証した。

第1節 高脂肪食負荷ラットに対する脂質異常症改善作用

本研究の主原料である米糠には、幾つかの含有成分に関する脂質代謝改善効果などの報告⁷⁾がある。本節では、雄性 Sprague-Dawley ラット(以下；SD ラット)に対して米糠発酵素材配合の高脂肪食給与における血中脂質濃度や各種臓器重量測定による脂質異常症改善作用について検証した。

実験方法

1. 実験試料

飼料原料には、第2章1節で報告した米糠発酵素材の培養液(固液分離前の醪)を NaOH で pH7.0 調整し、凍結乾燥を行った試料(以下；米糠発酵素材(培養液))を用いた。Table 3-1 に米糠発酵素材の成分組成を示した。なお、米糠発酵素材(培養液)の GABA 濃度は 9.12 g/100g である。

Table 3-1 米糠発酵素材(培養液)の成分組成

項 目	栄養成分 (g/100g)
水分	3.4
炭水化物	67.5
たんぱく質	14.6
脂質	2.0
灰分	14.5

2. 実験動物および飼育条件

本研究における動物実験は、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」(環境省)および「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議)を遵守したうえで行った。

6週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット 12匹は日本エスエルシーより購入した。飼育温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間明暗サイクル(明暗 7:00~19:00)の環境下で、ラットを個別ゲージで飼育した。高脂肪食 High Fat Diet 32(日本クレア(株)製)および飲料水を2週間自由摂取させて予備飼育をし、体重が同一になるように2群($n=6/\text{群}$)に分け、各飼料を投与した。対照区には高脂肪食のみ、試験区(以下;高脂肪食+米糠発酵素材(培養液))には高脂肪食に米糠発酵素材(培養液)を2.0%(w/w)混合した飼料を3週間ラットに投与した。各飼料組成について Table 3-2 に示した。試験期間中は、実験動物に対して飼料および飲料を自由摂取させた。

Table 3-2 飼料組成および栄養成分値

		対照区 (高脂肪食)	試験区 (高脂肪食+米糠発酵素材)
飼料組成 (%)	ミルクカゼイン	24.4	24.0
	アルブミン粉末	5.0	4.9
	システイン	0.4	0.4
	牛脂	15.9	15.5
	ベニバナ油	20.0	19.6
	セルロース粉末	5.5	5.4
	マルトデキストリン	8.3	8.1
	乳糖	6.9	6.8
	スクロース	6.8	6.7
	AIN-93ビタミン混合物	1.4	1.3
	AIN-93 Gミネラル混合物	5.0	4.9
	コリン酒石酸塩	0.4	0.4
	米糠発酵素材 (培養液)	—	2.0
	栄養成分 (g/100g)	エネルギー	524.7
水分		6.1	3.9
たんぱく質		25.4	25.7
脂質		32.7	32.8
炭水化物		32.2	33.5
灰分		3.6	3.7
繊維		5.5	5.6

3. 血清成分の測定

採血は、試験開始日および試験開始 21 日目とし、採血日前日から 12 時間絶食後の午前 10 時に行った。試験開始日は、尾静脈よりヘパリン処理した毛細管で約 160 μ l を採血した。試験開始後 21 日目は、体重測定後にマウスをケタミンで麻酔、解剖し、心臓採血、肝臓重量、を測定した。血液は遠心分離 (3,000rpm, 4°C, 15 分) 後、血清を採取し、分析時まで -80°C で凍結保存した。血清中の中性脂肪値、コレステロール値、糖濃度、アスパラギン酸アミノ基転移酵素値 (Aspartate aminotransferase, AST)、アラニンアミノ

基転移酵素 (Alanine aminotransferase, ALT), アルブミン値について, ドライケムシステム (富士フィルム和光純薬製) を用いて測定した。

4. 統計処理

すべての測定値は, 平均値±標準偏差で示した。有意差検定には, 市販のソフトウェア Graph Pad Prism5.0-J (Graph Pad Software社) を用いて, *t*-検定を行い, 有意水準を5%以下とした。

実験結果と考察

高脂肪食負荷ラットに対する影響

対照区 (高脂肪食) および試験区 (高脂肪食+米糠発酵素材 (培養液)) における高脂肪食負荷ラットの各種臓器重量, 血液成分値に対する影響を Table 3-3 にまとめた。

Table 3-3 SD ラットの各種臓器重量および血液成分値に対する影響

		対照区 (高脂肪食)	試験区 (高脂肪食+米糠発酵素材)	
餌摂取量	(g/日)	18.3 ± 1.9	17.0 ± 1.6	
体重	(g)	313.4 ± 16.1	311.2 ± 14.6	
体重増加量	(g/日)	7.1 ± 1.3	7.0 ± 1.0	
肝臓重量	(g)	17.0 ± 2.5	13.9 ± 0.9	*
脂肪組織				
腸間膜周囲脂肪	(g)	7.6 ± 2.7	4.9 ± 0.7	*
精巣周囲脂肪	(g)	11.3 ± 2.8	7.8 ± 0.9	*
血清中性脂肪	(mg/dL)	121.2 ± 34.6	71.2 ± 19.9	*
血清コレステロール	(mg/dL)	87.2 ± 8.1	62.6 ± 16.2	*
血清グルコース	(mg/dL)	173.2 ± 57.5	165.0 ± 47.6	
AST	(U/L)	99.0 ± 17.2	81.2 ± 19.0	
ALT	(U/L)	25.8 ± 8.1	23.0 ± 4.3	
血清アルブミン	(g/L)	3.7 ± 0.3	3.8 ± 0.2	

数値は平均値±標準偏差 (n=6, * *p*<0.05)

対照区および試験区米糠発酵素材(培養液)2.0%添加の1日当たりの餌摂取量に変化はなかった。SDラットに対して3週間の高脂肪食ならびに高脂肪食+2.0%米糠発酵素材(培養液)を給与した結果、1日当たりの体重増加が7.0g/個体ならびに7.1g/個体であり、有意な差は認められなかった。しかしながら、試験区は、対照区と比べて肝臓重量、腸管膜周囲脂肪重量ならびに精巣周囲脂肪重量の増加を有意に抑制した($p<0.05$)。さらに、血液成分値の測定結果、試験区ラットは、対照区に比べ、血中中性脂肪値ならびにコレステロール値に有意な正常化作用が認められた(いずれも $p<0.05$)。しかしながら、血糖値には影響を与えなかった。また、肝機能マーカーであるAST、ALTあるいはアルブミン値には有意な差がなかった。これらの結果から米糠発酵素材(培養液)には、高脂肪食負荷ラットにおける肝臓や脂肪組織における脂肪蓄積を低減する作用ならびに、血中脂質値(中性脂肪およびコレステロール値)を正常化する作用があることが判明した。本試験試料は、精米副産物である米糠を原料に乳酸菌発酵によってGABAを生産した米糠発酵素材(培養液)である。この米糠には、ビタミンE群^{30)~31)}、フィチン酸³²⁾などが含有し、これらの成分には血中コレステロールや中性脂肪の低下作用に関する報告⁷⁾がされている。また、GABAにも脂質異常症改善作用の報告がある³³⁾。このことから、米糠発酵素材(培養液)は、米糠および発酵由来の何らかの含有成分によって、高脂肪食負荷ラットに対する肝臓や脂肪組織の脂肪蓄積低減作用、血中中性脂肪およびコレステロールの正常化作用があったと推察される。

要 約

雄性 SD ラットに対する米糠発酵素材(培養液)配合の高脂肪食 HFD の 3 週間給与による脂質異常症改善作用について検証した。結果, 高脂肪食区に比べ, 高脂肪食+米糠発酵素材(培養液)区は, 血中成分値において血中中性脂肪値およびコレステロール値に有意な正常化作用が確認された(いずれも $p < 0.05$)。さらに, 解剖における肝臓重量, 腸管膜周囲脂肪重量ならびに精巣周囲脂肪重量の増加を顕著に抑制した($p < 0.05$)。以上から米糠発酵素材(培養液)には, 高脂肪食負荷ラットにおける肝臓や脂肪組織に対する脂肪蓄積低減作用および, 血中脂質値(中性脂肪およびコレステロール値)の正常化作用があることが判明した。

第2節 肝臓細胞に対する脂質異常症改善作用および成分の解明

本節では、前節の同様に米糠発酵素材(培養液)における高脂肪食負荷ラットに対する臓器脂肪蓄積抑制作用および血中中性脂肪値正常化作用に関する遺伝子メカニズム解明するため、米糠発酵素材(液体)のヒト肝臓由来細胞株HepG2細胞における脂質代謝に対する影響について検証した。さらに、米糠発酵素材(液体)のHepG2細胞における脂質異常症改善作用成分の解明を目的に研究を行った。

実験方法

1. 実験試料

試料は、第2章1節の米糠発酵素材(液体)をNaOHでpH7.0調整し、凍結乾燥品を試験試料として供した。

2. HepG2細胞培養によるリポタンパク質の回収

1×10^5 個/mLのHepG2ヒト肝臓細胞(理研細胞バンク)を10%牛胎児血清(fetal calf serum ; 以下FCS)を含むダルベッコ改変イーグル培地(以下DMEM)に1.0mL懸濁し、24穴マイクロプレートに播種し、2日間の前培養(37°C)を行った。次に、PBSで2回洗浄した細胞に対して、各濃度の被検試料(米糠発酵素材(液体)添加濃度 ; 0.1~10 mg/mL)および750 μ Mオレイン酸ナトリウムを含む1.0% (w/v)牛血清アルブミン(bovine serum albumin ; 以下BSA)を含むDMEM(0.3mL)に交換し、4日間培養(37°C)した。培養終了後、細胞培養液を遠心分離(15,000 rpm, 5分間)し、上清をリポタンパク質解析に供した。なお、陽性対象として500 μ Mフェノフィブラート(シグマアルドリッチ社製)を用いた。

3. リポタンパク質解析

培養上清中に含まれるリポタンパク質解析には、株式会社スカイライト・バイオテック社のLipoSEARCH[®]^{34)~35)}法を用いた (Fig. 3-1). 細胞培養上清 (80 μ L) に含まれるリポタンパク質をゲル濾過HPLCにより粒子サイズに従って分離した3種主要リポタンパク質の超低密度リポタンパク質 (very low density lipoprotein ; 以下VLDL), 低密度リポタンパク質 (low density lipoprotein ; 以下LDL) および高密度リポタンパク質 (high density lipoprotein ; 以下HDL) に関して, オンライン酵素反応による画分に含まれる中性脂肪およびコレステロール濃度を定量³⁶⁾し, スカイライト・バイオテック社独自のコンピュータープログラムを用いて解析した. 尚, 酵素反応について, 中性脂肪はDiacolor Liquid TG-S (東洋紡績製), コレステロールはCholescolor Liquid Kit for cholesterol (東洋紡績製) を用い, 3種主要クラスリポタンパク質中の中性脂肪およびコレステロール濃度の標準血清は, 協和発酵キリン株式会社を使用した.

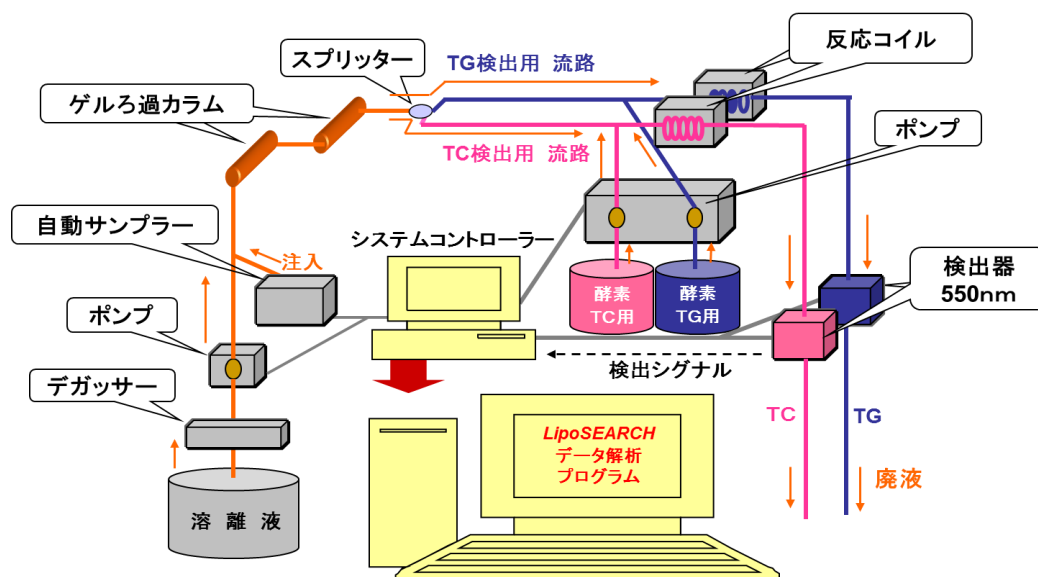


Fig. 3-1 LipoSEARCH[®]システム

(出典 株式会社スカイライト・バイオテックHP (LipoSEARCH[®]システム))

4. 発現遺伝子解析

4. 1 細胞培養によるRNA抽出およびcDNA合成

2.5×10^5 個/mLのHepG2細胞(理研化学研究所)を10%FCS含有のDMEMに懸濁し、12穴マイクロプレートに播種して2日間前培養(37°C)した。次に、被検資料の米糠発酵素材(液体、終濃度1.0mg/mL)、750 μ Mオレイン酸および1.0% BSA添加のDMEMに交換して2日間の培養をした。培養終了後、細胞をPBSで洗浄した後、全RNAはTotal Quick Gene RNA cultured cell kit S(富士フィルム和光純薬製)を用いてRNAの抽出・単離をした。5 μ gの全RNAをPrimeScript RT reagent Kit(タカラバイオ製)を用いてcDNA合成した。

4. 2 リアルタイムRT-PCR

リアルタイムRT-PCR反応は、SYBR Premix Ex Taq II(タカラバイオ製)を用いて行った。反応液は12.5 μ LのSYBR Premix Ex Taq II、各プライマー1 μ L(終濃度0.4 μ M)、cDNA2.0 μ Lおよび滅菌蒸留水8.5 μ Lから構成され、サーマルサイクラーで95°Cの30秒、次に95°Cで5秒、60°Cで30秒のサイクル40回を繰り返した。本研究で用いたHepG2細胞における脂質合成に参与するプライマー配列をTable 3-4に示した。目的遺伝子の発現量は、 β -アクチンmRNA(センス鎖; 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC-3', アンチセンス鎖; 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3')に対する相対発現量で表し未処理の区を100とした。

Table 3-4 脂質合成に関与する遺伝子プライマー

遺伝子	センス鎖	アンチセンス鎖
GUS	5'-CATTATTCAGAGCGAGTATGGAGCA-3'	5'-TCTTCAGTGAACATCAGAGGTGGA-3'
SREBP-1c	5'-CTATGGAGCAGCCTCAACGTCA-3'	5'-CAGCCAGTGGATCACCACA-3'
SREBP-2	5'-CAGCAGTTCACGGACATGGAG-3'	5'-CCGTAGCGACAGTAGCAGGTCA-3'
FAS	5'-GTATGCCCTGGTAGTTGCAGGAG-3'	5'-CGGCACGCAGCTTGTAGTAGA-3'
SCD	5'-TGAACAGTGCTGCCACCTC-3'	5'-CGGCCATGCAATCAATGAAG-3'
HMGCS-1	5'-TGTGTACGTGGATGTGCTCAAAGA-3'	5'-TGTTGCATATGTGTCCCACGAA-3'
ApoA-1	5'-TGTGTACGTGGATGTGCTCAAAGA-3'	5'-GTCACGCTGTCCCAGTTGTCA-3'
ApoB-100	5'-TCGCCTGCCAAACTGCTTC-3'	5'-CATTGGTGCCTGTGTTCCATTCC-3'
MTTP	5'-TCTCTACTCGGGTTCTGGCATTCTA-3'	5'-GCTGCGATTAAGGCTTCCAGTC-3'

5. 脂質代謝改善成分の解明

5. 1 米糠発酵素材(液体)含まれる脂質代謝改善成分の単離

試料は米糠発酵素材(液体)を供した。米糠発酵素材(液体) 10 LをHP-20カラムに通過させ、水溶性物質(非吸着画分)と脂溶性物質(吸着画分)に分離した。吸着画分は、メタノールで溶出し、シリカゲル, Sephadex LH-20, ODS (OctaDecyl Silyl)カラムクロマトグラフィーを順次に行い、活性物質を単離した。

5. 2 細胞から分泌されるリポタンパク質中の中性脂肪量測定

単離した被検体を 1×10^5 個/mLのHepG2ヒト肝癌細胞を10% FCSが含むDMEMに1.0mL懸濁し、24穴マイクロプレートに播種して2日間の培養(37°C)を行った。2日間培養したHepG2細胞培養上清(150 μ L)を凍結乾燥した後、37.5mLのコレテストTG①溶液(積水メディカル製)に溶解させ40°Cで30分間反応させた。反応液に対して、コレテストTG②溶液(積水メディカル製)を添加し、5分間保温した。反応液を550nm波長で測定して中性脂肪濃度を定量した。

6. 統計処理

すべての測定値は、平均値±標準偏差(SD)で示した。有意差検定には、市販のソフトウェア Graph Pad Prism5.0-J(Graph Pad Software製)を用いて、Tukey法の多重比較検定を行い、有意水準を5%以下とした。

実験結果と考察

1. 脂質代謝に対する影響

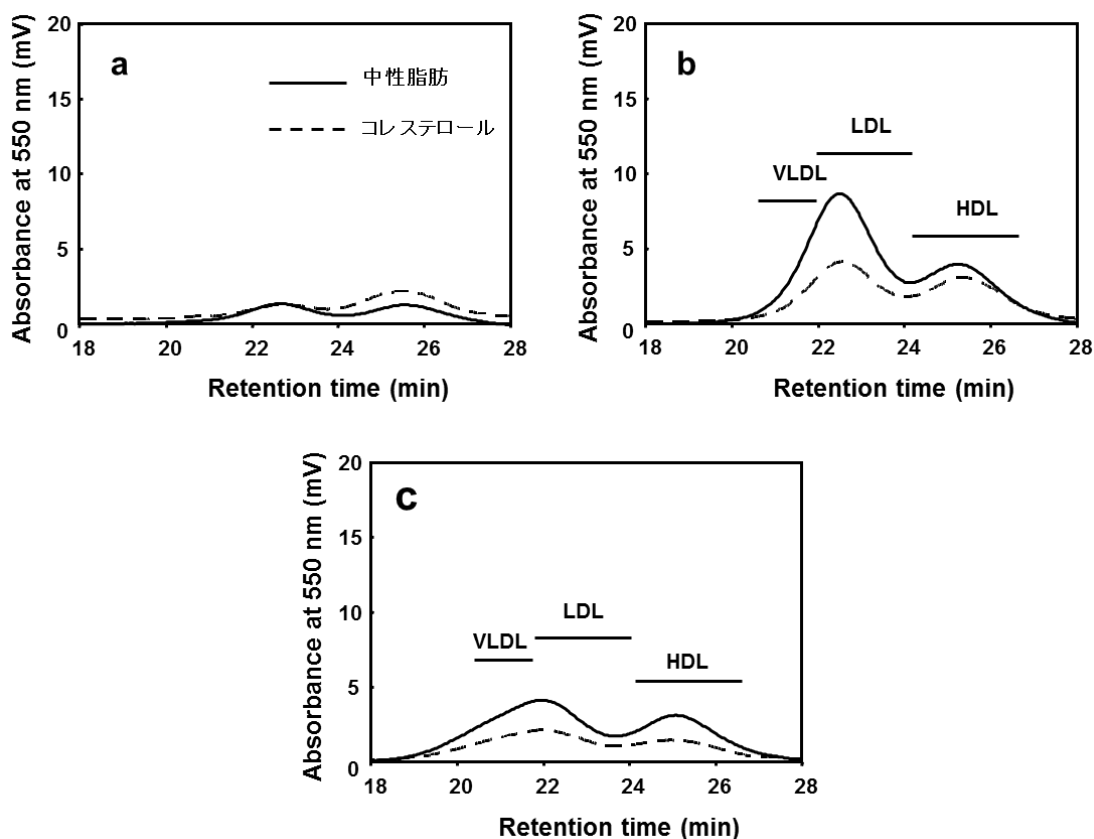
HepG2細胞に対して、750 μ Mオレイン酸ナトリウム、異なる添加濃度の米糠発酵素材(液体)もしくは陽性対象フェノフィブラートを添加し、培養液中に分泌される主要リポタンパク質中の中性脂肪ならびにコレステロール値に対する影響についてTable 3-5に示した。HepG2細胞は、0.75mMのオレイン酸ナトリウム添加により培養液中に分泌される総中性脂肪値が約5.6倍、総コレステロール値が約1.3倍と増加した。陽性対象として使用したフェノフィブラート区は、オレイン酸添加による中性脂肪およびコレステロールの分泌量促進を抑制した($p < 0.01$)。これに対し、米糠発酵素材(液体)0.1mg/mL区では、HepG2細胞からの中性脂肪およびコレステロール分泌量にほとんど影響を与えなかったが、米糠発酵素材(液体)を1.0 mg/mL以上の添加濃度区では、中性脂肪およびコレステロール分泌促進を濃度依存的に有意に抑制した(両区とも $p < 0.01$)。

Table 3-5 HepG2細胞から分泌されるリポタンパク質に対する米糠発酵素材(液体)の影響

			米糠発酵素材(液体)			フェノフィブラート
	0	0.75	0.1 mg/mL 0.75	1.0 mg/mL 0.75	10.0 mg/mL 0.75	500 μM 0.75
オレイン酸ナトリウム(mM)						
細胞数($\times 10^5$)	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.3	2.6 ± 0.2	2.9 ± 0.2	2.8 ± 0.2	2.6 ± 0.3
中性脂肪($\mu\text{g}/10^6$ cells)						
総量	2.3 ± 0.4	12.8 ± 0.3	13.8 ± 0.3	7.6 ± 0.3 **	1.3 ± 0.4 **	5.1 ± 0.2 **
VLDL	0.2 ± 0.1	2.0 ± 0.2	2.1 ± 0.4	1.5 ± 0.3 *	0.2 ± 0.1 **	1.0 ± 0 **
LDL	1.5 ± 0.1	7.4 ± 0.8	8.0 ± 0.7	3.5 ± 0.1 **	1.0 ± 0.2 **	2.1 ± 0.3 **
HDL	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.3	3.7 ± 0.1	2.6 ± 0.3	0.1 ± 0.1 **	2.0 ± 0.1 **
コレステロール($\mu\text{g}/10^6$ cells)						
総量	3.2 ± 0.4	4.1 ± 0.4	4.0 ± 0.4	2.7 ± 0.1 **	0.4 ± 0 **	1.9 ± 0.4 **
VLDL	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0 ± 0 **	0.6 ± 0.1
LDL	0.6 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.2	0.7 ± 0 **	0 ± 0 **	0.5 ± 0.1 **
HDL	2.1 ± 0.5	2.1 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.3 ± 0.1 **	0.4 ± 0 **	0.8 ± 0.2 **

平均±標準偏差(n = 4, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

また、米糠発酵素材(液体) 1.0 mg/mL区におけるHepG2細胞から分泌される培養液中の中性脂肪ならびにコレステロールプロファイル変化をFig. 3-2 に示した。HepG2 細胞はオレイン酸負荷によりVLDLおよびLDL画分に含まれる中性脂肪濃度が上昇したが (Fig. 3-2, b), 1.0 mg/mLの米糠発酵素材(液体)添加によりVLDLおよびLDL画分の中性脂肪値の上昇は抑制された (Fig. 3-2, c)。



**Fig. 3-2 HepG2細胞のリポタンパク質プロファイルに対する
米糠発酵素材(液体)の効果**

(a) 0.75mMオレイン酸ナトリウム及び被検体を含まない細胞, (b) 0.75mMオレイン酸ナトリウムのみ添加細胞, (c) 0.75mMオレイン酸ナトリウム+米糠発酵素材(1.0mg/mL添加細胞). 培養条件: 37°C, 4日間培養後に培地上清液のTG, コレステロールを測定. 平均±標準偏差(n = 4)

2. リポ蛋白合成に関与するmRNA発現に及ぼす米糠発酵素材(液体)の影響

米糠発酵素材(液体)を1.0 mg/mL添加したHepG2細胞における脂質合成に関与する遺伝子発現量の変化をリアルタイムPCRで解析した結果をFig.3-3に示した.

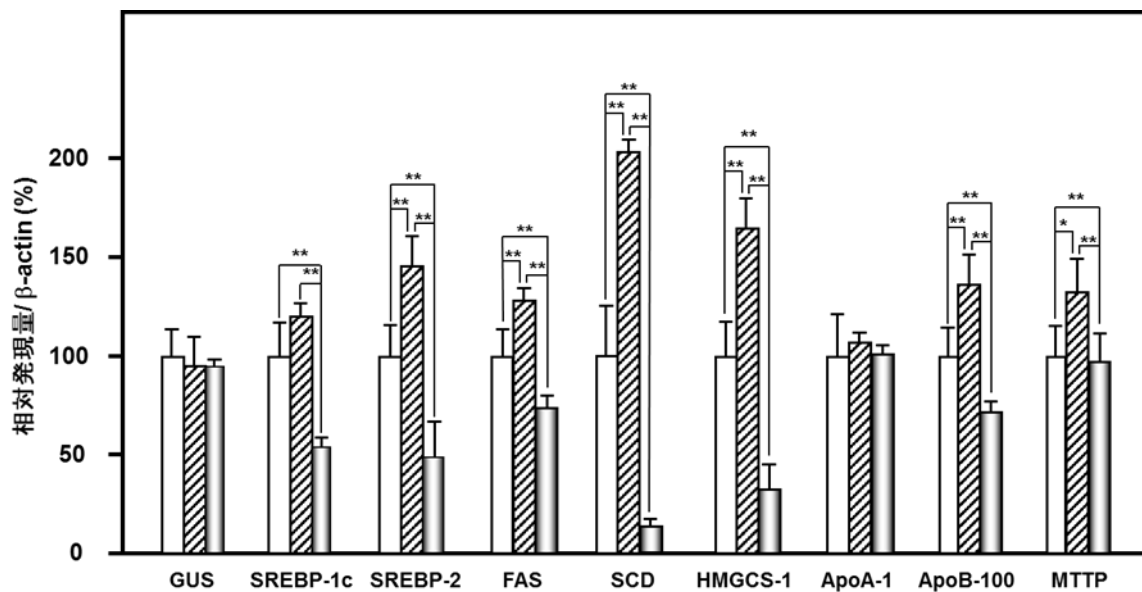


Fig. 3-3 リポタンパク質合成に関与するmRNA発現に及ぼす

米糠発酵素材(液体)の影響

(□)無添加区, (▨)0.75mMオレイン酸ナトリウム添加区, (■)0.75mMオレイン酸ナトリウム+1.0mg/mL 米糠発酵素材添加区.

平均±標準偏差(n = 4, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

housekeeping遺伝子である β -glucuronidase遺伝子(GUS)発現量は、オレイン酸処理あるいは米糠発酵素材(液体)添加に関わらず一定であった。脂肪酸合成系の転写因子であるsterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)ならびに中性脂肪合成酵素fatty acid synthase (FAS)およびstearoyl-CoA desaturase-1 (SCD)遺伝子の発現は、コントロール区と比較してオレイン酸負荷区では、SREBP-1cで1.2倍、FASで1.2倍ならびにSCDで2.1倍に増加した。しかしながら、同時に1.0mg/mLの米糠発酵素材(液体)添加区では、オレイン酸負荷区と比較してSREBP-1cで44.7%、FASで57.4%およびSCDで6.0%に抑制された(コントロール区と比較した場合、SREBP-1c 53.7%、FAS 73.7%、SCD 12.5%の抑制)。さらに、コレステ

ロール合成系の転写因子であるsterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2) およびコレステロール合成系の酵素である3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase-1 (HMGCS-1) 遺伝子の発現は、オレイン酸負荷により約1.5倍, 1.6倍にそれぞれ上昇したが, 米糠発酵素材(液体)とオレイン酸添加区では, オレイン酸負荷区と比較して, SREBP-2が33.1%, HMGCS-1が19.8%まで抑制された(コントロール区と比較ではSREBP-2が48.2%, HMGCS-1が32.6%). VLDLおよびLDL の構造タンパク質であるアポリポタンパク質(apolipoprotein B ; 以下apoB-100)の発現量はコントロールと比較して72.0%, オレイン酸負荷区と比較して52.8%まで抑制された. さらに, リポタンパク質に中性脂肪を転移させるミクロソーム中性脂肪転移タンパク質(microsomal triglyceride transfer protein ; MTP)のmRNAレベルはオレイン酸負荷により1.4倍まで増加する. しかしながら, 同時に米糠発酵素材(液体)を添加した区では, 発現量がコントロール区と同等であった. 一方, HDLの構成タンパク質であるApoA-1の発現には, オレイン酸負荷の影響は認められず, 米糠発酵素材(液体)の抑制効果も認められなかった.

米糠の脂質異常症改善作用に関する幾つかの報告では, 高コレステロール症患者に米糠を配合した食事を給与した結果, 血中 LDL コレステロールならびに apoB-100 レベルの低下が観察された結果³⁷⁾や米糠油配合食餌による2型糖尿病誘発モデルラットにおける血中のHDL コレステロールの増加および肝臓総コレステロール値の低減など脂質異常正常化作用が認められている³⁸⁾. また, ビタミンE の一種であるトコトリエノールは3T3-L1脂肪前駆細胞におけるインスリン誘発分化抑制による脂肪蓄積を制御する作用機構の一部が解明されている³⁹⁾. このことから, 米糠発酵素材(液体)は肝細胞における脂質生成酵素およびコレステロール酵素の発現の減衰による肝細胞に

における脂質合成および分泌を抑えることで高脂肪食負荷ラットにおける血中中性脂肪値の正常化をしたと考えられる。

3. 脂質代謝改善成分の解明

米糠発酵素材(液体)から単離した脂質代謝改善成分は、フィチン酸およびフェルラ酸であった。Fig. 3-4に米糠発酵素材由来の2種の脂質代謝改善成分の構造式を示した。

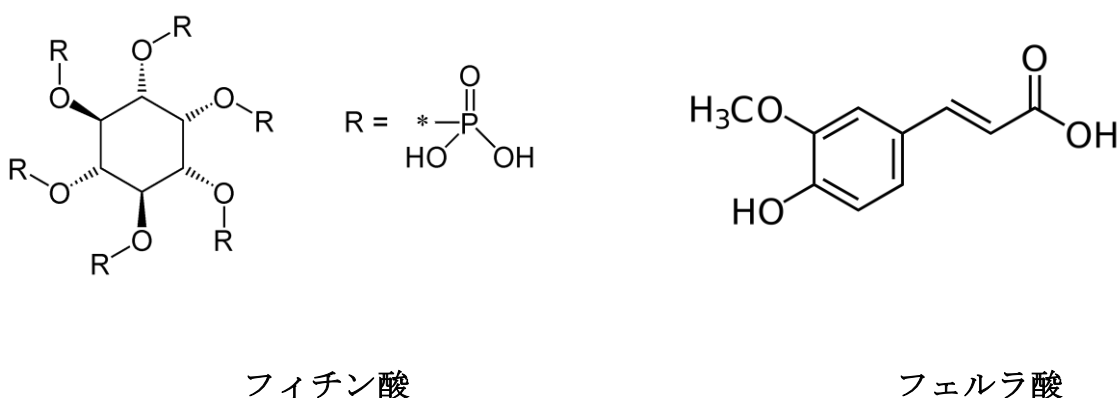


Fig. 3-4 米糠発酵素材由来の脂質代謝改善成分

HepG2細胞から分泌されるリポタンパク質中の中性脂肪量測定の結果，単離した脂質代謝成分であるフィチン酸は，0.1 mMの濃度で90.3%までヒト肝細胞からの中性脂肪の分泌を抑制した．一方，フェルラ酸は1.0 mMの濃度で40.5%まで阻害した(Fig. 3-5)．通常，フィチン酸は，米糠に多量に含まれているが，Caなどと結合しているために遊離しないことが知られている．しかしながら，米糠発酵素材(液体)は，RB培地を生産する際，米糠に対してプロテアーゼ酵素剤の処理をした後，乳酸菌による発酵を行う．最終的にはpH が4.0 付近まで低下する．そのpH 領域は，フィチン酸が溶解することから米

糠発酵素材(液体)には多量のフィチン酸が含まれ、それが主に、本素材の脂質代謝改善作用に寄与すると考えられる。また、脂溶性物質のフェルラ酸は若干であるが米糠発酵素材(液体)に含まれる。これらの相加、相乗効果も考えられる。

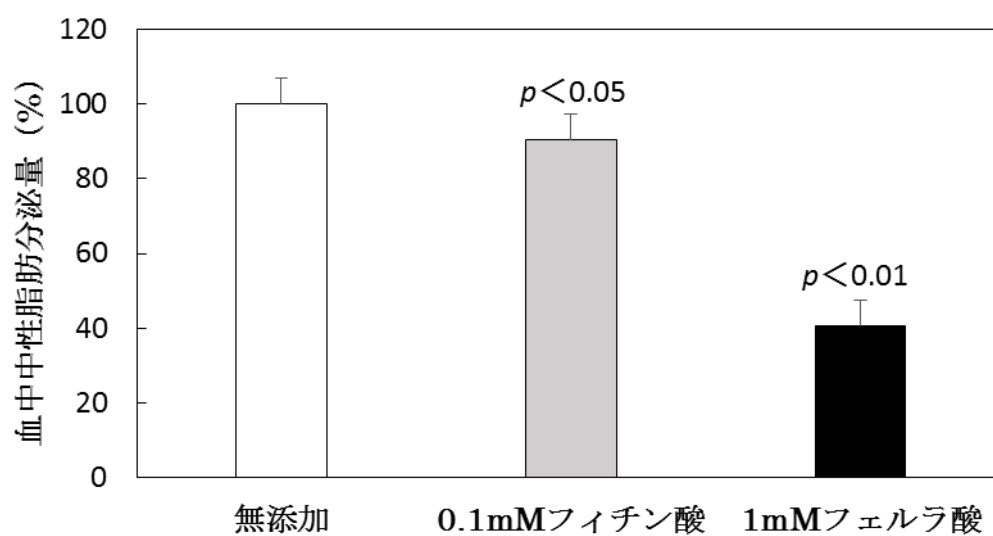


Fig. 3-5 HepG2細胞からの中性脂肪分泌に対する単離成分フィチン酸およびフェルラ酸の影響

要 約

本節では、HepG2 細胞を用いた米糠発酵素材(液体)における培養液中の主要リポタンパク質の中性脂肪およびコレステロールに関する影響を検証した。結果、HepG2 細胞に対して米糠発酵素材(液体)を 1.0 mg/mL 以上の添加した濃度区では、中性脂肪およびコレステロールの分泌促進を濃度依存的に有意に抑制した(両区とも $p < 0.01$)。また、培養液中の中性脂肪およびコレステロールのプロファイル変化について、HepG2 細胞におけるオレイン酸負荷区では、VLDL および LDL 画分に含まれる中性脂肪濃度が上昇したのに対し、米糠発酵素材(液体)を 1.0 mg/mL 添加区では VLDL および LDL 画分の中性脂肪値の上昇抑制をした。さらに、米糠発酵素材(液体)は、細胞中の脂質生成酵素およびコレステロール酵素の発現の減衰によって、HepG2 ヒト肝癌細胞からの脂質合成および分泌を減少した。また、米糠発酵素材(液体)に含まれる脂質代謝改善成分の解明の結果、フィチン酸およびフェルラ酸であることが確認された。

第3節 米糠発酵素材のヒトモデル腸管に対する脂質吸収抑制作用

前節まで、米糠発酵素材(培養液および液体)における高脂肪食負荷ラットに対する臓器脂肪蓄積抑制作用や血中中性脂肪値正常化作用を見出し、その遺伝子メカニズムについて、肝細胞における脂質(中性脂肪およびコレステロール)生合成遺伝子群の発現制御であることを確認した。

本節では、米糠発酵素材(液体)における新たなメカニズム解析の探索を目的とした。中でも、腸は、食品成分が直接かつ高濃度で作用し得る体内器官であり、腸管吸収の調節によって疾病予防の可能性があると考えた。ヒト結腸癌由来のCaco2細胞は、酪酸ナトリウム等の化学物質処理により多孔性メンブレンフィルター上での培養中に小腸の円柱上皮細胞様に分化し、微絨毛やタイトジャンクション構造といった小腸特有の形態学的特徴を有する単層膜を形成することが知られている。分化したCaco2細胞では、酵素や輸送体の発現が確認できることから、物質吸収や輸送のモデル系細胞として広く利用されている^{40)~41)}。畠らは、酪酸ナトリウムによる分化誘導により、アルカリホスファターゼ等の小腸特有の遺伝子およびタイトジャンクションに関わる分子の発現を確認し、さらにはヒトモデル腸管から分泌されるリポタンパク質測定システム(Fig. 3-6)を構築している⁴²⁾。

本実験では、上述のリポタンパク質測定システムを活用した米糠発酵素材(液体)における脂質吸収抑制作用を検証した。

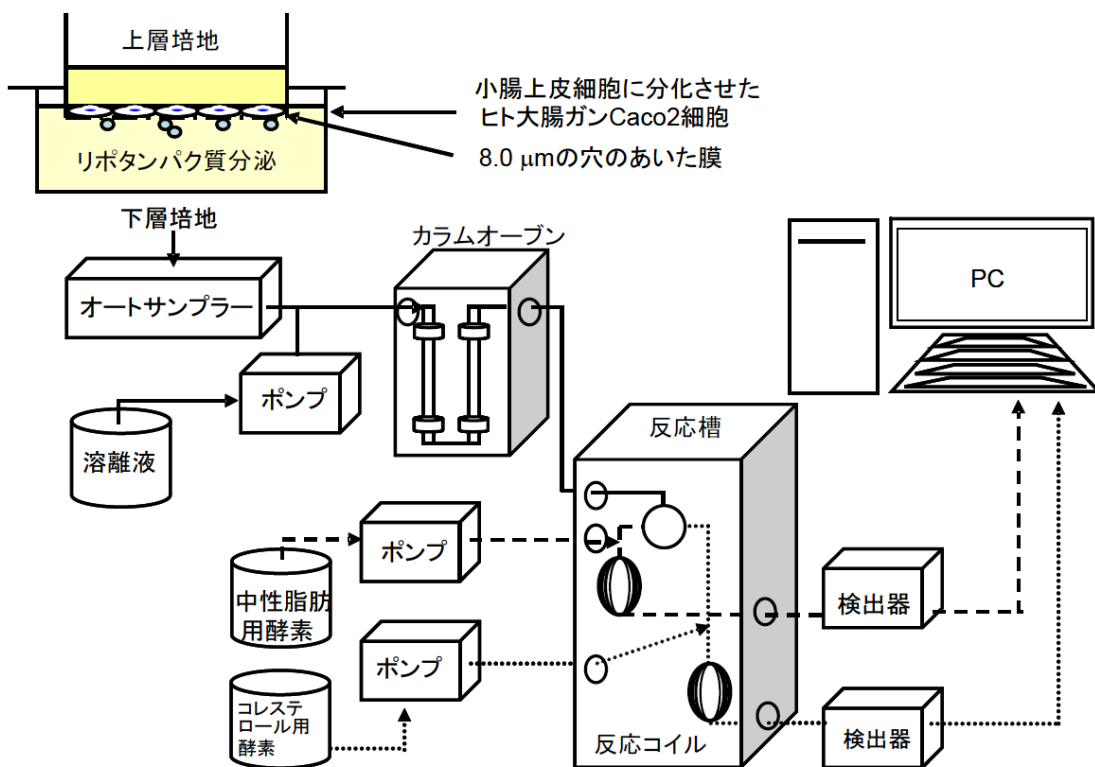


Fig. 3-6 ヒトモデル腸管から分泌されるリポタンパク質測定システム

実験方法

1. 実験試料

試料は、米糠発酵素材(液体)を前節同様に調製して試験試料に供した。

2. Caco2 細胞培養によるリポタンパク質の回収

2.5×10^5 個/mL の Caco2 ヒト大腸癌細胞(理研細胞バンク製)を 10%牛胎児血清(FCS)が含む DMEM に懸濁し、12 穴 Thin Cert (グライナー・ジャパン製: 孔径 8.0 μ m)に播種した後、3 日間培養(37 $^{\circ}$ C)を行った。さらに、5mM 酪酸ナトリウムを添加した DMEM に交換して 37 $^{\circ}$ C で 4 日間培養をし、

小腸上皮細胞に分化させた。次に、PBS で細胞を 2 度洗浄した後、各濃度米糠発酵素材(終濃度 ; 0.1mg/mL 区, 1.0mg/mL 区, 10 mg/mL 区), 1.0% BSA, 750 μ M オレイン酸および 0.2mg/mL リゾホスファチジルコリン(富士フィルム和光純薬製)を含む DMEM 培地で 2 日間培養(37 $^{\circ}$ C)した。培養終了後、リポタンパク質が分泌される 12 穴 Thin Cert 下層の細胞培養液を遠心分離(15,000 rpm, 5 分間)し、上清をリポタンパク質解析に供した。

3. リポタンパク質解析

Caco2 細胞培養上清中の 4 種主要クラスリポタンパク質であるカイロミクロン(chylomicron ; 以下 CM), VLDL, LDL, HDL の解析は、前節同様に LipoSEARCH[®]法を用いて同様の方法で測定した。

4. 発現遺伝子解析

4. 1 細胞培養による RNA 抽出および cDNA 合成

2.5 \times 10⁵ 個/mL の Caco2 ヒト大腸癌細胞を 10%FCS を含む DMEM に懸濁し、12 穴 Thin Cert に播種して 3 日間の前培養(37 $^{\circ}$ C)をした。さらに、5mM 酪酸ナトリウムを添加した DMEM に交換して 4 日間培養(37 $^{\circ}$ C)した。次に、細胞を PBS で 2 度洗浄した後、米糠発酵素材(液体, 1.0mg/mL), 1.0% BSA, 750 μ M オレイン酸および 200 μ g/mL リゾホスファチジルコリンを含む DMEM で 2 日間(37 $^{\circ}$ C)培養した。培養終了後、細胞を PSB で洗浄した後、全 RNA は、Total Quick Gene RNA cultured cell kit S(富士フィルム和光純薬製)を用いて単離した。鋳型 cDNA 合成は、PrimeScript RT reagent Kit(タカラバイオ製)を用いて合成した。

4. 2 リアルタイムRT-PCR

リアルタイム RT-PCR 反応は、第 3 章 3 節同様に行った。HepG2 細胞における脂質合成に関与する遺伝子群を Table 3-6 に示した。目的遺伝子の発現量は、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA (センス鎖 ; 5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3', アンチセンス鎖 ; 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3') に対する相対発現量で表し、未処理の区を 100 とした。

Table 3-6 脂質合成に関与する遺伝子プライマー

遺伝子	センス鎖	アンチセンス鎖
SREBP-1c	5'-CTATGGAGCAGCCTCAACGTCA-3'	5'-CAGCCAGTGGATCACCACA-3'
SREBP-2	5'-CAGCAGTTCACGGACATGGAG-3'	5'-CCGTAGCGACAGTAGCAGGTCA-3'
FAS	5'-GTATGCCCTGGTAGTTGCAGGAG-3'	5'-CGGCACGCAGCTTGTAGTAGA-3'
SCD	5'-TGAACAGTGCTGCCACCTC-3'	5'-CGGCCATGCAATCAATGAAG-3'
HMGCS-1	5'-TGTGTACGTGGATGTGCTCAAAGA-3'	5'-TGTTGCATATGTGTCCCACGAA-3'
FDFT	5'-CGTGCAGTGCCTGAATGAACTTA-3'	5'-GGCAGCCAAAGTGGCAATG-3'
ApoB-100	5'-TCGCTGCCAAACTGCTTC-3'	5'-CATTGGTGCCTGTGTCCATTC-3'

5. 統計処理

すべての測定値は、平均値±標準偏差(SD)で示した。有意差検定には、市販のソフトウェア Graph Pad Prism5.0-J(Graph Pad Software社)を用いて、Tukey法の多重比較検定を行い、有意水準を5%以下とした。

実験結果と考察

1. 小腸上皮細胞における脂質代謝に対する影響

本試験では、12 穴 Thin Cert 内で Caco2 細胞を小腸上皮細胞に分化させ、上層に各濃度の被検試料である米糠発酵素材(液体)を添加し、下層に分泌される培養液中のリポタンパク質量を定量した。5mM 酪酸ナトリウム処理に

より小腸上皮細胞に分化させた Caco2 細胞に，中性脂肪の素となるオレイン酸やリポタンパク質誘導物質であるリゾホスファチジルコリンを添加することで，中性脂肪やコレステロールが分泌促進される．しかしながら，被検試料米糠発酵素材(液体)を 1.0 mg/mL 以上添加した各区では，中性脂肪およびコレステロールの分泌が抑制された (Table 3-7)．

Table 3-7 モデル腸管から分泌されるリポタンパク質に対する米糠発酵素材(液体)の影響

	対照区	米糠発酵素材(液体)		
		0.1 mg/mL	1.0 mg/mL	10.0 mg/mL
細胞数($\times 10^5$)	2.7 \pm 0.2	2.7 \pm 0.1	2.8 \pm 0.3	2.7 \pm 0.2
中性脂肪($\mu\text{g}/10^6$ cells)				
総量	7.4 \pm 1.1	7.1 \pm 0.7	4.2 \pm 0.3 **	0.4 \pm 0.2 **
CM	0.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0	0.0 \pm 0
VLDL	5.4 \pm 0.4	5.1 \pm 0.6	3.3 \pm 0.3 **	0.3 \pm 0.2 **
LDL	1.7 \pm 0.6	1.7 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1 **	0.0 \pm 0 **
HDL	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0	0.2 \pm 0	0.1 \pm 0.1
コレステロール($\mu\text{g}/10^6$ cells)				
総量	2.2 \pm 0.1	1.7 \pm 0	1.9 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2 **
CM	0.4 \pm 0	0.2 \pm 0	0.2 \pm 0 *	0.2 \pm 0 *
VLDL	1.0 \pm 0.1	0.9 \pm 0	0.9 \pm 0	0.5 \pm 0.1 **
LDL	0.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1
HDL	2.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0	0.3 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1

平均 \pm 標準偏差(n = 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

また、この際の代表的なりポタンパク質プロファイル結果を Fig. 3-7 に示す．1.0mg/mL の米糠発酵素材(液体)による Caco2 細胞より分泌される培養液中の中性脂肪ならびにコレステロールのプロファイル変化については，CM，VLDL，LDL 画分に含まれる両者の濃度上昇を抑制した．

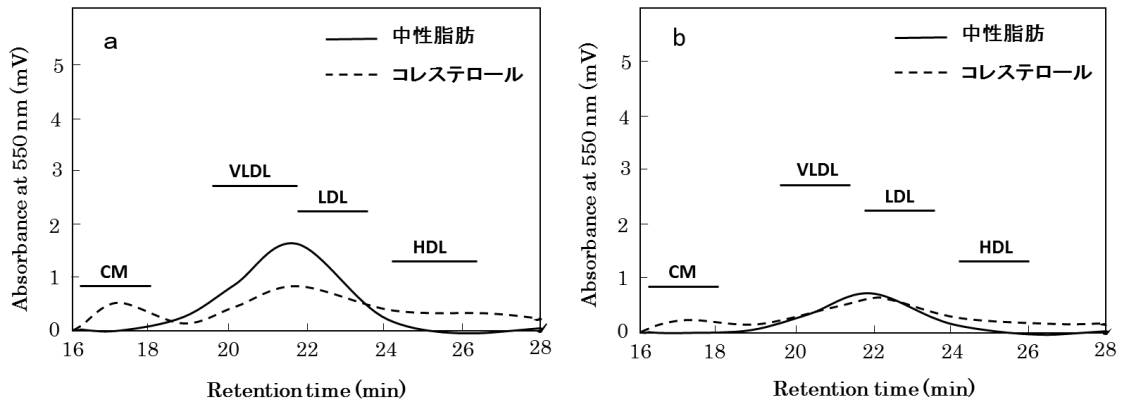


Fig. 3-7 ヒトモデル腸管から分泌されるリポタンパク質プロファイル

a ; 対照区, b ; 米糠発酵素材添加区

2. 小腸上皮細胞における脂質合成関連遺伝子発現量の影響

米糠発酵素材(液体)を 1.0mg/mL 添加区における小腸上皮細胞に分化誘導した Caco2 細胞における脂質合成に関与する遺伝子群の発現量の変化を Fig. 3-8 に示した. 脂肪酸合成系の転写因子である SREBP-1c, ならびに中性脂肪合成酵素である FAS 遺伝子の発現は, コントロール区と比較して, オレイン酸負荷区では両遺伝子とも約 1.2 倍に増加した. しかしながら, 1.0mg/mL の米糠発酵素材(液体)添加区では, オレイン酸負荷区と比較して SREBP-1c が 50.1%, FAS が 55.8%まで抑制された(コントロール区と比較した場合, SREBP-1c が 61.0%, FAS が 70.0%の抑制). さらに, コレステロール合成系の転写因子である SREBP-2 およびコレステロール合成系の酵素である HMGCS-1 遺伝子の発現は, オレイン酸負荷 により SREBP-2 が約 1.4 倍, HMGCS-1 が 1.6 倍に上昇したが, 米糠発酵素材(液体)をオレイン酸と同時に添加した区では, オレイン酸負荷区と比較して, それぞれ SREBP-2 が 69.3%, HMGCS-1 が 54.9%まで抑制された(コントロール区と比較した場合, SREBP-2 が 99.1%, HMGCS-1 が 92.4%). VLDL および

LDLの構造タンパク質ApoBの発現量は、コントロール区と比較して105.8%、オレイン酸負荷区と比較して49.1%まで抑制された。一方、中性脂肪合成酵素であるSCDおよびコレステロール合成酵素 farnesyl-diphosphate farnesyltransferase (FDFT)の発現にはオレイン酸負荷の影響が認められず、米糠発酵素材(液体)添加による抑制効果も認められなかった。

前節まで米糠発酵素材(液体)における肝細胞における脂質異常症改善作用および有効成分単離について報告した。本節では、米糠発酵素材(液体)における新たなメカニズム解析の探索を目的としたCaco2ヒト大腸癌細胞を用いた脂質吸収抑制作用では、前節の肝細胞と同様に小腸細胞においても米糠発酵素材(液体)が中性脂肪値のVLDLおよびLDL画分の上昇抑制、ならびに脂質生成酵素およびコレステロール酵素の発現による脂質合成および分泌の上昇抑制をした。これは、前節同様に米糠発酵素材(液体)の原料米糠含有フィチン酸やフェルラ酸による作用効果と考えられる。

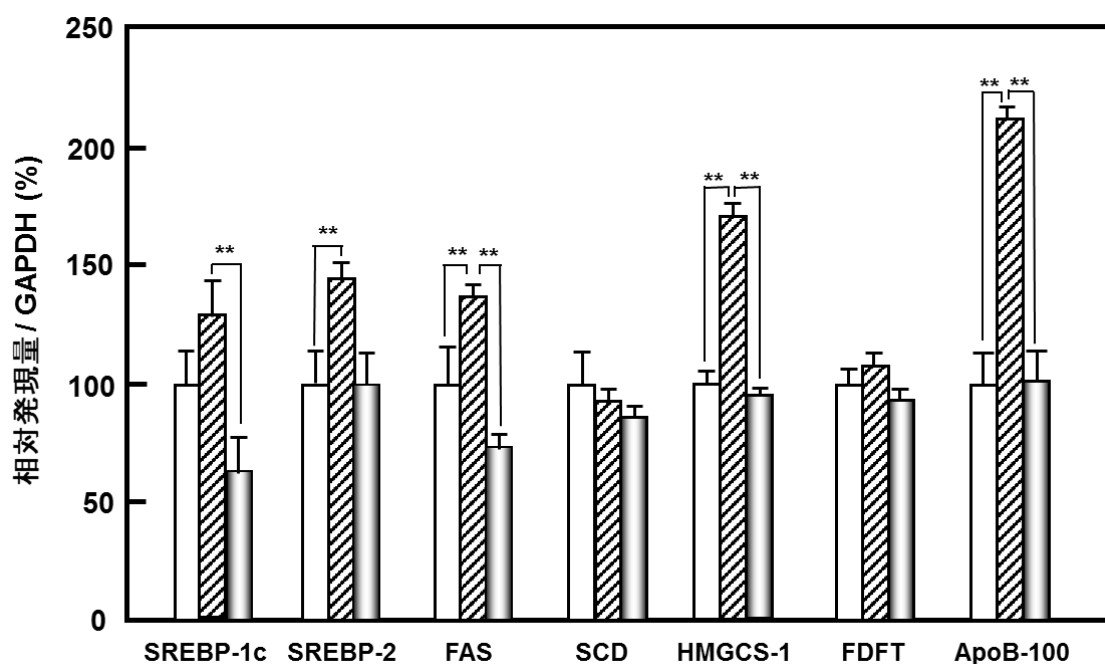


Fig. 3-8 小腸上皮細胞における脂質合成遺伝子の発現パターン

(□)無添加区, (▨)0.75mMオレイン酸ナトリウム添加区, (■)0.75mMオレイン酸ナトリウム+1.0mg/mL 米糠発酵素材(液体)添加区.

平均±標準偏差(n = 4, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

要 約

本節では、Caco2 ヒト大腸癌細胞を用いた米糠発酵素材(液体)における培養液中の主要リポタンパク質の中性脂肪およびコレステロールに対する影響について検証した。Caco2 細胞に対して米糠発酵素材(液体)を 1.0 mg/mL 添加濃度区では、総中性脂肪、VLDL および LDL 中性脂肪ならびにコレステロールの CM の分泌促進を有意に抑制した(両区とも $p < 0.01$)。また、培養液中の中性脂肪およびコレステロールのプロファイル変化では、Caco2 細胞におけるオレイン酸負荷区では、中性脂肪画分の VLDL および LDL が上昇したのに対し、米糠発酵素材(液体)を 1.0 mg/mL 添加区では中性脂肪値

の VLDL および LDL 画分の上昇抑制を確認した。さらに、米糠発酵素材(液体)は、Caco2 ヒト大腸癌細胞中の脂質生成酵素およびコレステロール酵素の発現によって、脂質合成および分泌の上昇抑制をした。

第4節 米糠発酵素材配合サプリメントを用いた家庭犬モニター調査

本節では、一般家庭で飼育されている家庭犬をモニター募集し、米糠発酵粉末を配合したサプリメントを年齢、性別、体重の異なる家庭犬に対して8週間の継続摂取させた。飼い主には、試験開始前、投与2週目、4週目、6週目および8週目における腹囲と体重の計測、行動学的変化、生理学的変化およびサプリメントの印象に関するアンケート設問の回答による集計、解析をした。

実験方法

1. 対象動物

一般家庭で飼養されている犬54頭(雄23頭、雌31頭)を対象とした。なお、年齢は平均5.5歳、体重は平均6.7kgで、主な犬種は、チワワ(n=15)、ミニチュアダックスフント(n=13)であった。

2. 犬用サプリメントおよび給与方法

犬用のサプリメントには、第2章3節で実用化した米糠発酵素材(粉末)(商品名；爛漫ギャバ粉末、GABA濃度40mg/g)を試験に供した。また、粉末状サプリメントは、ペットフードメーカー(株式会社ポチみや)に依頼して生産した。サプリメント配合量および栄養成分をTable 3-8、Table 3-9に示した。なお、標準給与量は、犬体重1kg当りサプリメント1.2g(米糠発酵素材(粉末)1.0g/kg・イヌ体重)に設定し、モニター品の単独、あるいは主食にふりかけて与えることとした。対象動物の主食および間食等、サプリメント以外の食餌内容に関しては、それぞれの個体が普段摂取している内容と同等のものを摂取することとした。

Table 3-8 粉末サプリメント配合量

品名	配合量(%)
米糠発酵素材(粉末)	80.0
煮干粉末	10.0
ビール酵母	6.0
黒擦りゴマ	1.8
卵殻	1.2
無塩チーズ	1.0

Table 3-9 栄養成分表(100g 当り)

項目	成分量
エネルギー	347 Kcal
水分	7.7 %
粗タンパク質	26.8 %
粗脂肪	7.7 %
炭水化物	50.4 %
灰分	7.4 %
GABA	3.2 %

3. 家庭犬モニター調査によるアンケート調査方法

株式会社ポチみや HP にて、犬用サプリメントの 8 週間投与およびアンケート回答が可能な飼い主を募集して登録した。登録希望者で、モニター調査内容に同意したモニターに対してサプリメントおよび専用計量カップを送付した。なお、アンケートは、モニター用調査サイトで回答を回収した。回答は、開始直前、投与 2 週目、4 週目、6 週目および 8 週目の計 5 回とした (Table 3-10)。また、飼い主に依頼した内容の詳細は以下の通りとした。

- ・1 日の摂取量は、体重 kg に対して約 1.25g を必ず与えること。
- ・専用計量カップで体重に合った量を計算すること。
- ・サプリメントを「そのまま」、もしくは「主食等にふりかけて」、毎日適量

を与えること.

- サプリメントを与える前に腹囲, 体重を測定すること.
- サプリメント開始から 2, 4, 6, 8 週目の腹囲, 体重を測定すること.
- 腹囲は, サプリメントを与える前にあらかじめ飼い主が決めた箇所を毎回測定すること.
- モニター開始から 2, 4, 6, 8 週目にアンケートに回答すること.

Table 3-10 8週目アンケート設問および選択肢（回答選択率（%））

基本情報			
	【1】	飼い主様の名前	
	【2】	モニター犬の犬種、性別、年齢	
	【3】	8週間後の胴回りをcm(小数点以下1桁まで)でお答えください。	
	【4】	8週間後の体重をkg(小数点以下1桁まで)でお答えください。	
犬の変化について	行動学的変化		選択肢の中から一つ選んでください。
	【5-a】	一日の活動量	1. 増えた(4.7), 2. やや増えた(34.9), 3. 変化しない(44.2), 4. やや減った(11.6), 5. 減った(4.7)
	【5-b】	元気、活発になった	1. 当てはまる(41.0), 2. 変化しない(56.8), 3. 当てはまらない(2.2)
	【5-c】	ゆっくり寝ている時間が増えた	1. 当てはまる(32.6), 2. 変化しない(67.4), 3. 当てはまらない(0)
	【5-d】	主食に対する食欲	1. 増えた(22.7), 2. やや増えた(20.5), 3. 変化しない(54.5), 4. やや減った(2.3), 5. 減った(0)
	【5-e】	無駄吠えする	1. 増えた(0), 2. やや増えた(11.6), 3. 変化しない(79.1), 4. やや減った(9.3), 5. 減った(0)
	【5-f】	散歩中に会おう犬や人に対して怖がる回数	1. 増えた(0), 2. やや増えた(4.7), 3. 変化しない(83.7), 4. やや減った(11.6), 5. 減った(0)
	【5-g】	家族の帰宅時や起床時などの様子	1. 落ち着くのが早くなった(4.7), 2. やや落ち着いてきた(18.6), 3. 変化しない(74.4), 4. やや興奮しやすくなった(2.3), 5. 興奮しやすくなった(0)
	【5-h】	散歩でほかの犬に出会うと興奮する回数	1. 増えた(2.3), 2. やや増えた(4.7), 3. 変化しない(88.4), 4. やや減った(4.7), 5. 減った(0)
	【5-i】	慣れない状況や音を怖がる回数	1. 増えた(0), 2. やや増えた(9.3), 3. 変化しない(83.7), 4. やや減った(7.0), 5. 減った(0)
	【5-j】	留守番させたときの様子の変化	1. 落ち着いて待てるようになった(2.3), 2. やや落ち着いた(11.6), 3. 変化しない(81.4), 4. やや興奮しやすくなった(4.7), 5. 興奮しやすくなった(0)
	【5-k】	飼い主の号令にすぐに従うようになった	1. 当てはまる(14.0), 2. 変化しない(86.0), 3. 当てはまらない(0)
	生理学的変化		選択肢の中から一つ選んでください。
	【5-l】	皮膚の状態(かゆみ、赤み、フケ)が変化しましたか？	1. 良くなった(4.7), 2. やや良くなった(11.6), 3. 変化しない(83.7), 4. やや悪くなった(0), 5. 悪くなった(0)
	【5-l-a】	変化が見られた場合、どこがどういう風に変化しましたか？	場所 具体的な変化を記入してください
	【5-m】	毛づやは変化しましたか？	1. 良くなった(2.3), 2. やや良くなった(27.9), 3. 変化しない(69.8), 4. やや悪くなった(0), 5. 悪くなった(0)
	【5-m-a】	変化が見られた場合、それはどういったところが変化しましたか？	
	【5-n】	その他外見上の変化は見られましたか？	1. 良くなった(88.4), 2. 悪くなった(11.6)
	【5-n-a】	変化が見られた場合、それはどういったところが変化しましたか？	
	【5-o】	飲む水の量は変化しましたか？	1. 増えた(2.3), 2. やや増えた(37.2), 3. 変化しない(58.1), 4. やや減った(2.3), 5. 減った(0)
	【5-p】	嘔吐はありましたか？	1. はい(7.0), 2. いいえ(93.0)
	【5-p-a】	嘔吐が見られた場合、これまでに何回嘔吐しましたか？	
	【5-p-b】	はじめて嘔吐があったのは、開始してから何日後でしたか？	
	【5-p-c】	嘔吐がみられた場合、嘔吐があったのはいつですか？	
【5-p-d】	サプリメントを与えておよそ何時間後でしたか？		
【5-q】	その他、与えた後に変わったという印象がある行動についてお答えください。		

	与える前と後の排泄物の変化について	選択肢の中から一つ選んでください。	
	【6-a】 1日にする便の回数が増えましたか？	1. 増えた(2.3), 2. やや増えた(27.9), 3. 変化しない(65.1), 4. やや減った(4.7), 5. 減った(0)	
	【6-b】 1回の便の量は変化しましたか？	1. 増えた(2.3), 2. やや増えた(16.3), 3. 変化しない(74.4), 4. やや減った(7.0), 5. 減った(0)	
	【6-c】 便の色は変化しましたか？	1. 薄くなった(20.9), 2. 変化しない(69.8), 3. 濃くなった(9.3)	
	【6-d】 便のニオイは変化しましたか？	1. 強くなった(7.0), 2. 変化しない(79.1), 3. 弱くなった(14.0)	
	【6-e】 便の硬さは変化しましたか？	1. 硬くなった(0), 2. やや硬くなった(20.9), 3. 変化しない(65.1), 4. 柔らかくなった(14.0), 5. 柔らかすぎるようになった(0)	
	【6-f】 1日にする尿の回数が増えましたか？	1. 増えた(2.3) 2. やや増えた(23.3) 3. 変化しない(69.8) 4. やや減った(4.7) 5. 減った(0)	
	【6-g】 その他、与えた後に変化したところについてお答えください。		
	【7-a】 嗜好性について	1. ほかのおやつやフードより好んで口にした(9.3) 2. ほかのおやつやフードと同じくらいの嗜好性だった(76.7) 3. 最初は食べたが飽きたようだ(4.7) 4. 最初は食べなかったが徐々に食べるようになってきた 5. 何か別のものと混ぜると食べた(7.0)	
	【7-a-a】 【7-a】で3とお答えの方、その理由はなんにあると思いますか？		
	【7-a-b】 【7-a】で5とお答えの方、混ぜたものをお答えください。		
	【7-b】 サプリメントは毎日与えることができましたか？	1. はい(90.7), 2. いいえ(9.3)	
	【7-b-a】 【7-b】で1とお答えの方、与えたタイミングについてご記入ください。	1. 食事と一緒に(97.6), 2. 他のおやつと一緒に(0) 3. 単独で(2.4), 4. 日によって違う(0)	
	【7-b-a-a】 【7-b-a】で2, 3, 4とお答えの方、主食となるフードを与えてからおよそ何時間後に与えましたか？		
	【7-b-b】 【7-b】で2, いいえとお答えの方、毎日与えられなかった理由についてご記入ください。		
その他	【8】 今後も今回のサプリメントを与えたいと思いますか？	1. はい(79.1), 2. いいえ(20.9)	
	【8-a】 その理由をご記入ください。		
	【9】 フードやトリーツを選ぶ際に気をつけているポイントについて次の中からこだわっている順に3つお選びください。	第一選択肢回答比率	
		安全性(62.8), 国産(4.7), 嗜好性(7.0), 効能(2.3), 保存性(0), ブランド(0), アレルギー(4.7), 無添加(0), オーガニック(16.3), 値段(2.3)	
		第二選択肢回答比率	
安全性(14.0), 国産(7.0), 嗜好性(11.6), 効能(7.0), 保存性(0), ブランド(2.3), アレルギー(7.0), 無添加(34.9), オーガニック(4.7), 値段(11.6)			
第三選択肢回答比率			
安全性(9.3), 国産(16.3), 嗜好性(7.0), 効能(11.6), 保存性(7.0), ブランド(7.0), アレルギー(4.7), 無添加(9.3), オーガニック(4.7), 値段(23.3)			

4. サプリメント有効性の検証

回収した計 5 回（開始のアンケート回答を集計した．回答の中から，投与前後に変化の見られたパラメーターについて Wilcoxon の符号付順位和検定を用いて統計的解析を行った．

実験結果と考察

モニターからのアンケート回答に関する集計結果を Table 3-11 に示した．

Table 3-11 アンケート集計結果

アンケート時期	頭数	オス (n)	メス (n)
開始前アンケート	54	23	31
第1回(2週目)	47	20	27
第2回(4週目)	44	19	25
第3回(6週目)	44	19	25
第4回(8週目)	44	19	25

試験開始時のモニター数は 54 頭に対し，試験終了時の 8 週目は 44 頭，アンケート回数率は 81.5%であった．アンケート回答の中止理由は，9 頭が「餌を食べなくなった」，1 頭が「嘔吐による獣医師からの中止」の回答であった．嘔吐に関する直接的な原因は不明であるが，本試験サプリメント摂取時期と嘔吐の発生時期が同時期であることから試験中止となったと推察される．

次に，試験期間 8 週目まで，計 5 回のアンケート回答をした 44 頭のモニター（雄 19 頭，雌 25 頭，平均年齢 5.5 歳を対象に，各設問回答で変化があった設問項目のみを報告する．「元気・活発になった（設問 5-b）」と回答した個体は，2 週間目 25.6%，8 週間目 41.0%に増加した．「主食に対する食欲

(設問 5-d)」では、「増えた」および「やや増えた」と回答した個体は、2 週間目で 53.9%に対し、8 週間目では 43.2%に減少した。「飲水量の変化(設問 5-o)」に関して、増加した個体は 2 週間目 41.1%に対し、8 週間目 39.5%と減少した。また、「サプリメントの嗜好性(設問 7-a)」について、「他のおやつやフードより好んで口にした」と回答したモニターは、2 週間目 12.8%に対し、8 週間目では 9.3%と減少し、「他のおやつやフードと同等の嗜好性」と回答したモニターは 2 週間目 76.9%に対し、8 週間目 76.7%と同等であった。このことから、嗜好性においては「他のおやつやフードと同等以上」と評価した個体が、8 週間試験継続(n=44)では 86%、中止個体も含めた全体(n=54)では 70.4%と高評価であることが確認された。以上から米糠発酵素材(粉末)を配合した本サプリメントは補助食でありながら、嗜好性においては犬のおやつやフードとして許容される高さがあると考えられる。以上から、米糠発酵素材(粉末)を配合した本サプリメントは補助栄養食でありながら、嗜好性においては犬のおやつやフードとして許容される高さがあると考えられる。

また、個体の腹囲および体重の変化に関して、開始前の値を 100 とし、投与後の変動率を算出して変化を検討した。腹囲の変化率を Fig. 3-9 に示した。開始前に比べ 4 週目、6 週目および 8 週目において、腹囲に有意な減少($p < 0.05$)を確認した。一方、体重には有意な差を確認できなかった。医学分野では、脂質代謝障害マーカーとして、従来の体重と身長を用いた Body Mass Index(BMI)値ではなく、腹囲と血中中性脂肪値から算出される Lipid Accumulation product(LAP)値が有用視され始めている⁴³⁾。臨床獣医学的にもイヌの腹囲は肥満度の診断の一基準として重要視^{44)~45)}され、犬腹囲の増減が脂質代謝の変化に反映している可能性が高いと考えられる。本サプリメントの主原料である米糠発酵素材は、前節までに高脂肪食負荷ラットの血中

脂肪値の正常化，肝臓細胞および小腸上皮細胞における脂質合成遺伝子の発現抑制を報告しているが，犬に対する腹囲減少効果に関しても前節までの成果が影響したと示唆される．また，米糠には脂質代謝改善作用が認められているビタミン群^{46)~47)}やフィチン酸^{48)~49)}などが含まれていることから，こうした成分が犬に対して同様の作用をもたらしたことで腹囲減少が見られたとも考えられる．

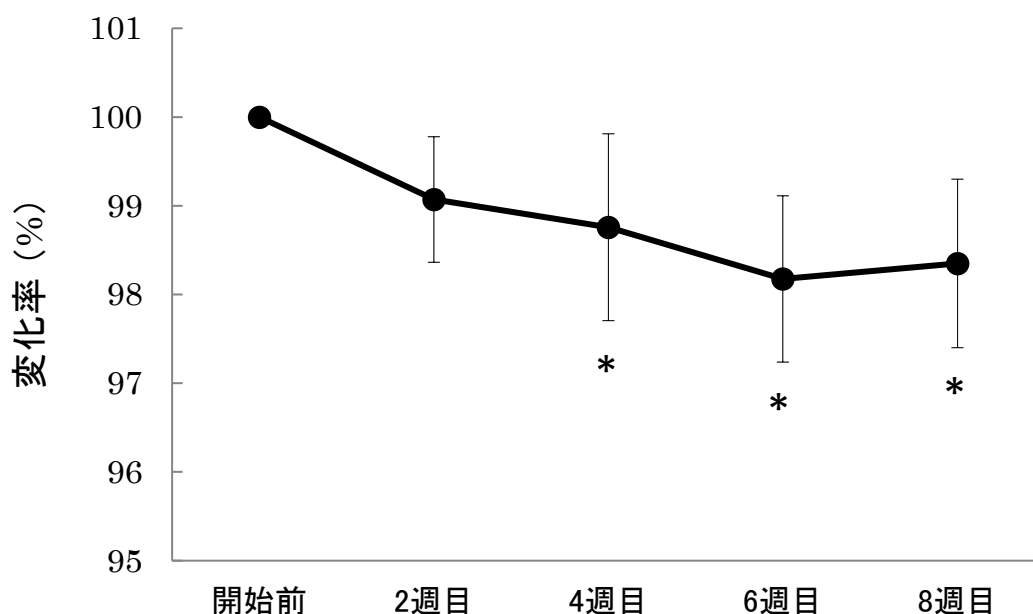


Fig. 3-9 腹囲の変化率 (全頭数)

平均値±標準誤差 (n = 44, * $p < 0.05$)

また，犬のライフステージは7歳以上から高齢犬と報告されている⁵⁰⁾．そこで，固体年齢の境界線を7歳とし，腹囲の減少効果を Fig. 3-10 に示した．7歳未満の個体は，7歳以上の高齢犬に比べて2週目から6週目まで腹囲減少における有意な差 ($p < 0.05$) が確認された．個体犬種による差異はあるものの，7歳齢以上の個体では脂質代謝機能が劣りがちとされている⁵¹⁾．このことから，脂質代謝機能が高い固体において，サプリメント効果が顕著と

なると考えられる。

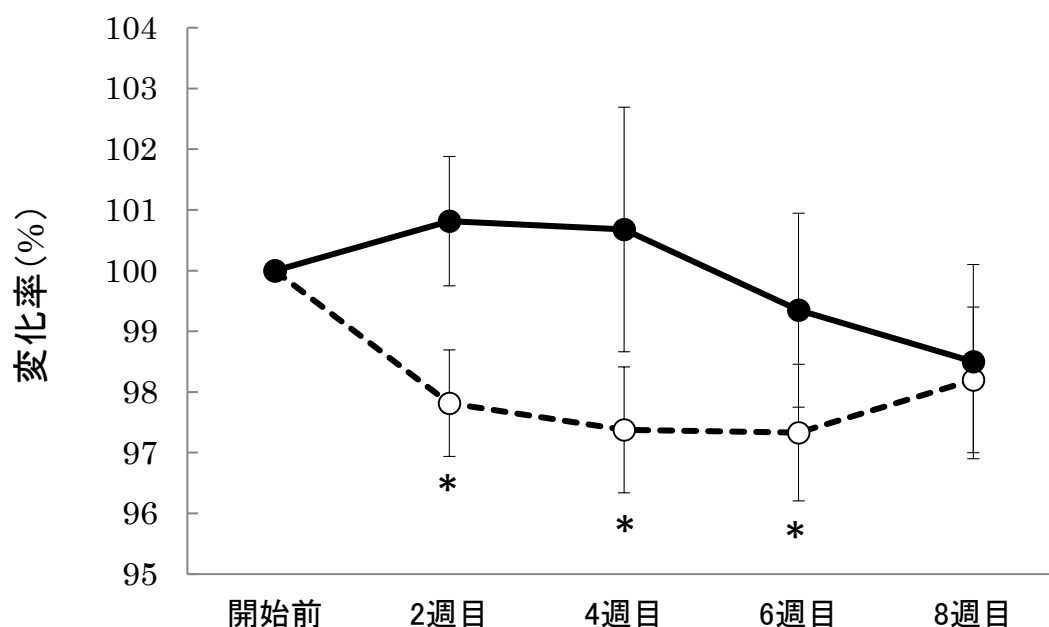


Fig. 3-10 腹囲の変化率 (年齢別)

● ; 7歳以上(n=18), ○ ; 7歳未満(n=26)

平均値±標準誤差(* $p < 0.05$)

次に、アンケート回答からの行動学的変化について検証した。設問 5-b「元気、活発になった」で、「当てはまる」と回答したモニターは 2 週目で 25.6%、8 週目で 41.0%と増加した。また、8 週目の回答で「変化しない」が 56.8%、「当てはまらない」が 2.2%で、個体数(8 週目結果)では、「当てはまる」が 18 頭、「変化しない」が 25 頭、「当てはまらない」が 1 頭であった。そこで、8 週目に「当てはまる」と回答した 18 頭の個体を活性化群、「変化しない」と回答した 25 頭の個体を無変化群とし、各群における腹囲の変化について Fig. 3-11 に示した。結果、活性化群(n=18)が無変化群(n=25)に対して、4 週目、6 週目および 8 週目に有意な減少($p < 0.05$)を確認した。これは、元

気・活発になった個体の方が、より摂取カロリーを多く消費し、蓄積された体内脂肪をより多く代謝したため、腹囲が減少したと考えられる。

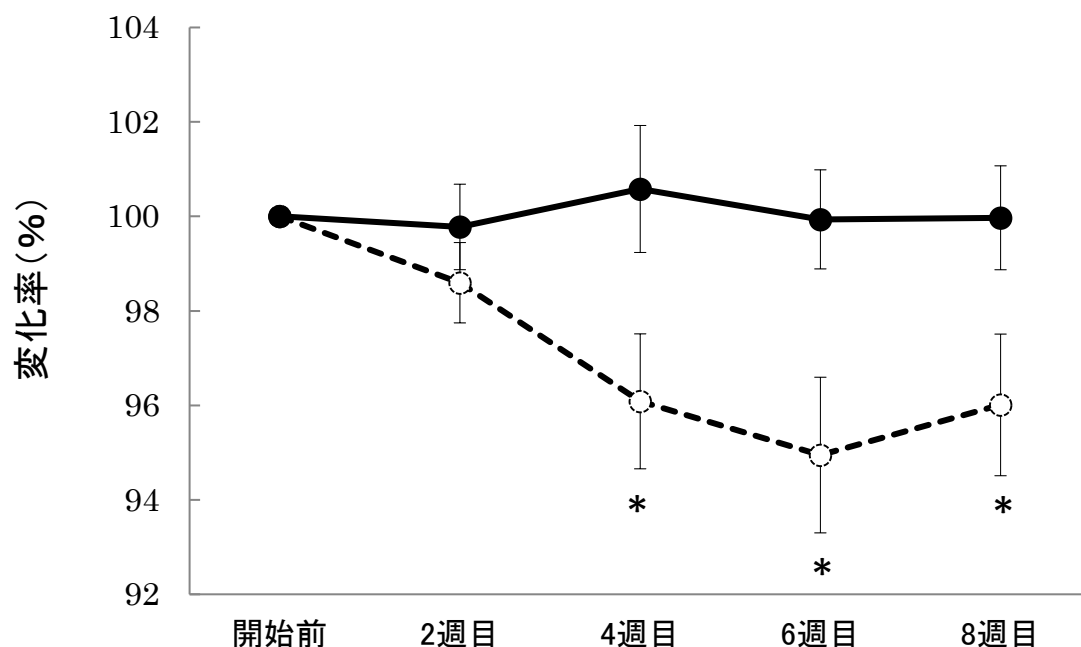


Fig. 3-11 腹囲の変化率 (活性化別)

● ; 無変化 (n=25), ○ ; 活性化 (n=18)

平均値±標準誤差 (* $p < 0.05$)

また、設問 5-d「主食に対する食欲」という設問で、食欲が増加したと回答したモニターは 2 週目で 53.9%から 8 週目で 22.7%と減少していた。犬には目新しい匂いや食味を好む傾向があり、経時的にその魅力は減少してしまう。本試験サプリメントにおいても開始時から一定期間では、食欲の一時的な増加は続いたが、その後は個体のサプリメントに対する飽きがあったことが推察される。その中で、8 週目の回答で、主食に対する食欲が増進したと回答した個体 19 頭を増加群、変化しないと回答した個体 24 頭を無変化群として腹囲の変化を検証した。腹囲の変化率について Fig. 3-12 に示したが、

増加群は，無変化群に比べ，4週間後，6週間後および8週間後に有意な減少($p < 0.05$)が認められた．つまり，サプリメント添加によって食欲が増進した個体において，その腹囲が減少したが，食欲が変化しなかった個体では腹囲の増減は認められなかった．

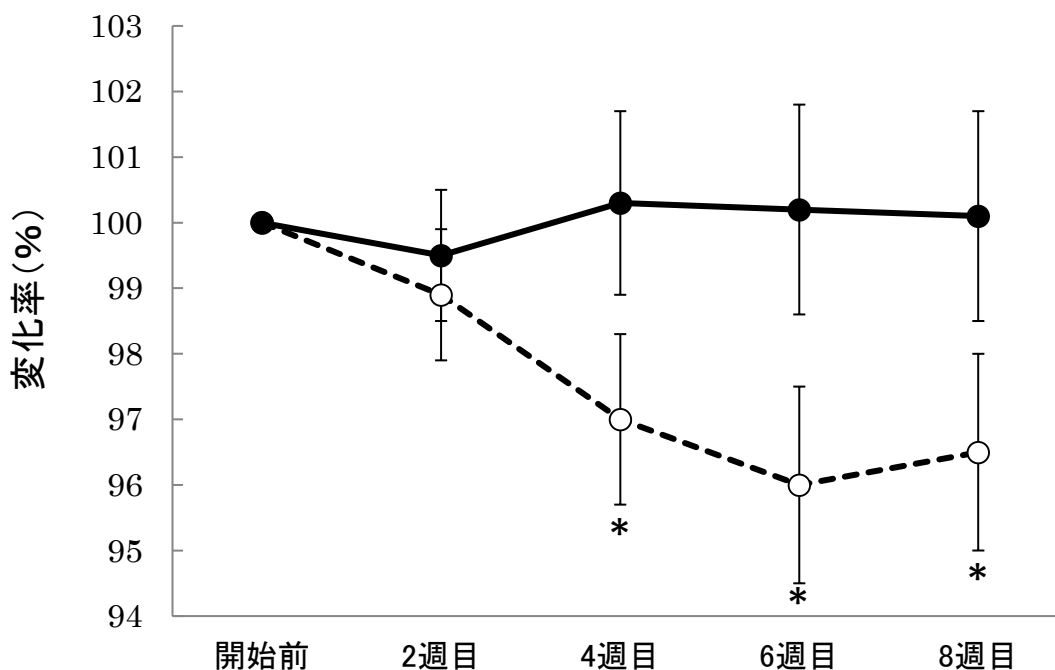


Fig. 3-12 腹囲の変化率（食欲意欲別）

● ; 無変化群 (n=24), ○ ; 増加群 (n=19)

平均値±標準誤差 (* $p < 0.05$)

本調査では，ふりかけという形態で提供することによって，家庭犬それぞれの本来の主食やライフスタイルを著しく変えることなく，実生活に即した状況でのモニター品の効果を検証することが目的であった．実際，肥満の原因は，個体の環境や生活スタイルで異なることから，個体に合わせた対応が必要である．しかしながら，あえて多様な環境で実施した今回のモニター調査結果を踏まえると，本サプリメントの継続摂取に加え，散歩や運動量，さ

らには食餌内容の見直しをすることで、肥満改善の効果が顕著にみられることが予測できる。また、慣れた主食や食習慣にサプリメントを添加するだけの操作は、犬および飼い主の両者の食餌ストレスが少なかったと示唆される。その結果、サプリメントの継続投与が可能となり、8週間のアンケート回収もできたと考えられる。また、本調査では、個々の主食が同一の栄養成分ではなかった可能性が高く、調査期間中に摂取した食餌の総合的な栄養面での個体間のばらつきがあったと考えられる。このことは、腹囲および体重の増減のばらつきがみられた一因と考えられる。設問9「フードやトリーツを選ぶ際に気をつけているポイント（自由選択）」の集計結果から、飼い主は第一に安全性、次いで無添加、値段というポイントにこだわっていることが明らかとなった。本素材は、国産の米糠を原料とした発酵素材であり、残留農薬や重金属など安全性は問題が無いことから、ペットフード素材として機能性も含め期待が持てる素材であることが確認された。

要 約

本節では、一般家庭で飼育されている年齢、性別、体重の異なる犬種を対象に、それぞれの体重に従った量の米糠発酵素材(粉末)配合サプリメントを8週間継続摂取させ、その変化に関してアンケート形式で調査、解析をした。

試験開始時のモニター個体数54頭、8週目の試験終了時の個体数は44頭と10頭減少し、アンケート回数率は81.5%であった。さらに、アンケート設問「サプリメントの嗜好性」において、「他のおやつやフードと同等以上」と回答した個体は、8週間の試験継続個体(n=44)では86.0%、中止個体も含めた全体(n=54)では70.4%と高評価であることが確認した。さらに、8週間のサプリメント摂取による腹囲の変化について、給与試験開始前に比べて、

4週目、6週目および8週目で腹囲に有意な減少($p < 0.05$)を確認した。しかし、体重では有意な差を確認できなかった。また、個体の年齢層区分7歳(7歳以上は高齢犬)とした腹囲変化は、7歳未満の個体は、7歳以上の高齢犬に比べて2週目から6週目まで腹囲の減少に有意な差($p < 0.05$)を確認した。また、行動学的変化では、アンケート「元気、活発になった」の設問に対する8週目の回答で、「当てはまる」の回答個体を活性化群、「変化しない」の回答個体を無変化群としての腹囲変化率は、活性化群($n=18$)が無変化群($n=25$)に比べて4週目、6週目および8週目に有意な減少($p < 0.05$)を確認した。これは、元気・活発になった個体が、より摂取カロリーを多く消費し、蓄積された体内脂肪をより多く代謝したため、腹囲が減少したと考えられた。アンケート「主食に対する食欲」設問(8週目回答)で、食欲が増進したと回答した個体を増加群、変化しないと回答した個体を無変化群とし、腹囲の変化率を検証した結果、増加群は、無変化群に比べ、4週間後、6週間後および8週間後に有意な減少($p < 0.05$)が認められた。サプリメント添加によって食欲が増進した個体のみ腹囲が減少した。

第4章 総括

近年、食生活の欧米化による消費者の食に対する変化や高齢化社会による健康に関する意識が高まっている。この背景は清酒業界にも影響し、生産量が最大期の20%程度まで激減し、消費者の飲酒スタイルが量から質に変化している。これは、日本の伝統産業である国酒の清酒製造業にとって深刻な問題である。しかし、清酒製造業は、既存の醸造設備や発酵技術を保有していることから、今後、新たな発酵製品などの開発は可能と考えられる。また、国民の主食である米の消費者量および生産量も減少傾向を推移している。しかしながら、国内米生産量は約750万トン(平成28年度)もあり、その米を使用する場合には必ず米糠が発生する。また、生活スタイルの変化や利便性による無洗米も急速に増えているが、無洗米粕が発生している。これらの大量発生する未資源の精米副産物は、豊富な栄養素などを含んでいるが産業的に有効利用されていない。

本論文では、低利用の精米副産物である米糠や無洗米粕を原料に用いた乳酸菌発酵によるGABA生成に関する報告がないことから、日本国内で大量に発生している精米副産物の米糠または無洗米粕の有効利用を目的とし、かつ酒蔵の醸造設備や発酵技術を活用した乳酸菌による効率的なGABA含有発酵素材の開発および機能性評価の解明による実用化に関してまとめたものである。

第2章では、精米副産物の米糠または無洗米粕を発酵原料に用いた現有醸造設備による効率的なGABA生産法の確立および実用化について研究をした。米糠(あきたこまち, めんこいな, 秋田酒こまち)を唯一の栄養源とした米糠混合液(酵素未処理)を用いた *L. brevis* IFO12005 乳酸菌の発酵培養では、米糠重量に対して8%(w/w)の添加MSGから90%以上の変換率でGABA

を生産することを確認した。しかし、米糠混合液中の栄養源不足が原因で MSG 濃度 8%以上では GABA の変換効率が低下した。そこで、米糠混合液に対して複合酵素剤による酵素処理によって、米糠混合液中の栄養源であるアミノ酸や糖分が 2 倍以上に増加し、乳酸菌発酵に適した米糠培地 (RB 培地) の新規製法を確立した。また、RB 培地中の配合割合 (米糠 : 水) の変更によって、水の配合量が多いと GABA 変換速度も早いことが確認された。さらに、MSG 添加量も 16%まで増量が可能となり、95%以上の変換率で且つ高収量で GABA 生産をした。30L ジャー培養装置による RB 培地 20kg スケールの培養により GABA が 1.4% (w/w) 生産された。培養液の固液分離によって 1.0% (w/w) 以上の GABA 含有米糠発酵素材の液体、固体の生産法を確立し、実用化をした。また、無洗米粕 (NWRL) では、米糠同様に NWRL 配合液の酵素処理によって GABA 生産性に優れた NWRL 培地を開発し、乳酸菌培養による 1.6% (w/w) の GABA 生産法を確立した。さらに、米糠または無洗米粕を原料に用いて開発した乳酸発酵培地は、合成培地よりも菌体増殖に優れた培地であることから GABA の高生産法を検討した。RB 培地の米糠配合量 12.0% とし、pH5.0 で乳酸発酵を制御することで 7.1% (w/w) の GABA 生成を確認し、実用化をした。本製法は、発酵 GABA 生産では、最も高濃度に GABA を生産する新製法である。実用化した GABA 含有米糠発酵素材の色々な加工食品利用を考慮し、各加工食品への GABA 含有米糠発酵素材を配合した各加工試験 (米飯, パン, うどん) による加工適性を検証した。結果、炊飯およびパン焼成工程等の加工中の高温工程においても GABA の減少は少なく、官能評価による風味にも影響が少ないことが判明した。

第 3 章では、開発した GABA 含有米糠発酵素材の生活習慣病予防などを目的に、米糠発酵素材を用いて、細胞や小動物による脂質異常症改善作用などの機能性評価試験および遺伝子メカニズムの解明をまとめた。雄性 SD ラ

ットに対する米糠発酵素材を 2% (w/w) 配合した高脂肪食 HFD 給与による脂質異常症改善作用の効果は，血中中性脂肪値およびコレステロール値に有意な正常化作用 (いずれも $p < 0.05$)，および肝臓重量，腸管膜周囲脂肪重量ならびに精巣周囲脂肪重量の顕著な増加抑制 ($p < 0.05$) を確認した．以上から，米糠発酵素材には，高脂肪食負荷ラットにおける肝臓および脂肪組織に対する脂肪蓄積低減作用，血中脂質値 (中性脂肪およびコレステロール値) の正常化作用を見出した．さらに，米糠発酵素材の高脂肪食負荷ラットに対する臓器脂肪蓄積抑制作用および血中中性脂肪値正常化作用に関する遺伝子メカニズムの解明のため，ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞による脂質異常症改善作用の影響について検証した．結果，HepG2 細胞に対して米糠発酵素材を添加 1.0mg/mL 以上で，中性脂肪およびコレステロールの分泌促進を濃度依存的に有意に抑制 ($p < 0.01$) することが判明した．また，HepG2 細胞にオレイン酸を負荷することで VLDL および LDL 中性脂肪が濃度上昇するのに対し，米糠発酵素材添加区では VLDL および LDL の上昇抑制をリポタンパク質プロファイルで確認した．さらに，米糠発酵素材は，細胞中の脂質生成酵素およびコレステロール酵素の発現抑制をすることで HepG2 ヒト肝癌細胞からの脂質合成および分泌の減衰を見出した．次に，米糠発酵素材の新たなメカニズム解析の探索を目的とした．中でも，小腸は，食品成分が直接かつ高濃度で作用し得る体内器官であり，腸管吸収の調節によって疾病予防の可能性があると考えた．そこで，小腸上皮細胞を分化させたヒト結腸癌由来 Caco2 細胞による米糠発酵素材における脂質吸収抑制作用の解明を検証した．結果，Caco2 細胞に対して米糠発酵素材添加 1.0mg/mL 以上で，中性脂肪およびコレステロールの分泌促進を濃度依存的に有意に抑制 ($p < 0.01$) することを確認した．また，Caco2 細胞にオレイン酸を負荷することで CM, VLDL および LDL 中性脂肪濃度が上昇するのに対し，米糠発酵素材添加区では

CM, VLDL および LDL の上昇抑制をリポタンパク質プロファイルで確認した。さらに、米糠発酵素材は、Caco2 ヒト大腸癌細胞中の脂質生成酵素およびコレステロール酵素の発現によって、脂質合成および分泌の上昇抑制をした。また、ヒト以外に対する GABA 含有素材の波及を図るため、ペットフード産業に利用可能な研究を試みた。そこで、一般家庭の飼育犬(n=54)を対象とした米糠発酵素材配合サプリメントによるモニター調査、解析をした。犬の腹囲は、開始前に比べ 4 週~8 週間後に有意な減少($p<0.05$)を確認したが、体重は有意差を確認できなかった。また、腹囲の減少効果は、7 歳未満の年齢が若い個体において明瞭であることが判明した。以上の結果から、米糠発酵素材はヒト以外にも機能性素材として多目的用途に利用可能であることが判明した。

本研究の結果より、精米副産物である米糠または無洗米粕を原料に用いた発酵培地の開発、および乳酸菌発酵による効率的な GABA 生産法を確立した。これは、精米副産物の有効利用および醸造設備・発酵技術の有効活用にも考慮した機能性発酵素材の開発としての新規性があること考え、特許出願、権利化^{52)~53)}をしている。また、米糠発酵素材の各機能性検証による脂質異常症改善作用および遺伝子メカニズム解明などの知見を得られたことは、実用化製品の販売において重要な役割を担う。さらに、犬に関する知見を得たことで、ペットフード産業での利用も期待できる。本研究素材は、食品、健康食品およびペットフード産業において、各用途に適応した多目的な利用が可能な素材である。さらに、各商品に、本素材を微量配合することで機能性効果が付与され、商品の付加価値化に貢献できる。

本研究によって、中小企業の酒蔵から醸造設備や発酵技術を活用した新規発酵素材の開発が、低迷した業界の一助となれば幸いである。本素材は、豊富な栄養素を含んだ精米副産物を原料とした発酵素材のため、未解明な機能

性効果や有効成分が含有している可能性が高いことから、今後も研究継続をするつもりである。さらに、醸造設備を活用した発酵に関する研究を行っていきたい。

Summary

Development of functional fermented material using rice bran

Masanobu Ohtomo

Consumers' dietary habits have recently been westernized and health consciousness has increased with the aging of society. This has affected the sake industry, with sake production being markedly reduced to approximately 20% of the maximum and the drinking style of consumers changing from quantity to quality. This is a serious issue for the traditional Japanese sake industry. However, as the sake industry possesses brewing equipment and fermentation technology, new fermented products should be developed in the future. In addition, the consumption and production of rice, the Japanese staple food, has been decreasing. However, the domestic rice production remains high, at 7.5 million tons in 2016, with rice bran generated in large quantities during rice usage. In addition, no-wash rice production has rapidly increased along with lifestyle changes and the pursuit of convenience, resulting in the generation of no-wash rice lees. Such rice milling by-products, produced in large amounts, contain abundant nutrients, but are not effectively utilized for industrial purposes.

There are few reports on gamma-aminobutyric acid (GABA) production by lactic acid bacteria fermentation using rice bran or no-wash rice lees, rice milling by-products not effectively utilized as raw materials. Therefore, the present article summarizes the development of beneficial GABA-containing rice bran-fermented materials with lactic acid bacteria using brewing equipment and fermentation

technology, and their practical applications through elucidation of their functions in order to effectively use the food byproducts, rice bran and no-wash rice lees.

Chapter 2 describes the establishment and practical applications of the efficient GABA production method for the rice milling by-products, rice bran, and no-wash rice lees as raw materials for fermentation using the brewing equipment. During the lactic acid bacteria fermentation with *Lactobacillus brevis* IFO12005 using rice bran mixtures (*Akitakomachi*, *Menkoina*, and *Akitasakekomachi*) as the sole source of nutrition, GABA production was demonstrated with the supplementation of 8% (w/w) monosodium glutamate (MSG; relative to rice bran weight) and a conversion rate of >90%. In addition, the amount of nutrient sources (amino acids and glucose) in the rice bran mixtures more than doubled after treatment with a complex enzyme agent. Thus, a method for manufacturing rice bran (RB) media suitable for lactic acid bacteria fermentation was established. Furthermore, the GABA conversion rate increased at a higher water content in the RB medium. The amount of MSG supplementation was able to be increased up to 16%, enabling GABA production with a high yield and a conversion rate of >95%. GABA was produced at 1.4% (w/w) by culturing an RB medium (20 kg) in a 30-L jar culture device. Using solid-liquid separation of the medium, a method for producing liquid and solid >1.0% (w/w) GABA-containing rice bran-fermented material was established and put into practical use. In addition, medium from no-wash rice lees (NWRL) with high GABA productivity was produced by enzymatic treatment of a mixture of no-wash rice lees (NWRL) and water, enabling 1.6% (w/w) GABA production by lactic acid bacteria culture. Furthermore, as the lactic acid fermentation media developed with rice bran or no-wash rice lees as the raw material exhibited more efficient bacterial growth than synthetic media, a method for large-

scale GABA production was examined. GABA was produced at 7.1% (w/w) by supplementing rice bran at 11% in the RB medium and controlling the fermentation at pH 5.0, thereby establishing practical applications. This new method allows for the highest GABA production among the fermentation methods for GABA production. For the practical application of GABA-containing rice bran-fermented materials to processed foods, processing tests (rice, bread, and udon) were conducted with blended materials. As a result, GABA was reduced only by a small amount even during high-temperature processes, such as rice cooking and bread baking, with flavors not compromised, as confirmed by sensory evaluation.

Chapter 3 summarizes functional evaluation tests on the inhibitory effects on lipid abnormality in cells and small animals, and the elucidation of their genetic mechanisms using rice bran-fermented material prepared from rice bran-fermented materials (liquids) containing the GABA-containing rice bran-fermented materials intended to prevent lifestyle-related diseases. A high-fat diet containing 2% (w/w) rice bran-fermented material improved lipid metabolism in male Sprague-Dawley rats, i.e., significantly normalizing blood triglyceride and cholesterol levels, and markedly suppressing increases in liver and fat weights surrounding the intestinal membrane and testes. Thus, rice bran-fermented material reduced fat accumulation in the liver and adipose tissues, and normalized blood lipid levels (triglyceride and cholesterol levels) in rats fed a high fat diet. In addition, the effects of rice bran-fermented material on lipid metabolism in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells were investigated to elucidate the genetic mechanisms of rice bran-fermented material regarding the inhibitory effects on organ fat accumulation and the normalizing effects on blood triglycerides in rats fed a high fat diet. As a result, rice bran-fermented material supplementation (>1.0 mg/mL) to HepG2 cells significantly

suppressed the promotion of triglyceride and cholesterol secretion in a concentration-dependent manner. In addition, very low density lipoprotein (VLDL) and low density lipoprotein (LDL) triglycerides were increased by the addition of oleic acid to HepG2 cells, and the suppression of increases in VLDL and LDL was demonstrated in the rice bran-fermented material supplemented group using a lipoprotein profile. Furthermore, rice bran-fermented material reduced lipid synthesis and secretion in HepG2 human hepatoma cells by suppressing the expression of lipid-forming and cholesterol enzymes in the cells. Subsequently, new mechanisms were analyzed using rice bran-fermented materials. In particular, food ingredients can act directly at high concentrations in the small intestine, thereby enabling disease prevention through intestinal absorption control. As such, the inhibitory effects of rice bran-fermented materials on lipid absorption by human colon carcinoma Caco2 cells were evaluated. As a result, the promotion of triglyceride and cholesterol secretion was significantly suppressed in a concentration-dependent manner by rice bran-fermented material supplementation (>1.0 mg/mL) to Caco2 cells. In addition, chylomicron (CM), VLDL, and LDL (triglycerides) levels were increased by the addition of oleic acid to Caco2 cells, and the suppression of increases in CM, VLDL, and LDL levels was demonstrated in the rice bran-fermented material supplemented group using a lipoprotein profile. Furthermore, rice bran-fermented material suppressed the increases in lipid synthesis and secretion by inducing the expression of lipid-forming and cholesterol enzymes in the Caco2 cells. To promote the veterinary application of GABA-containing materials, a survey was conducted in the pet food industry. In the survey, supplements containing rice bran-fermented materials were monitored and analyzed in pet dogs. Their abdominal circumference had significantly decreased at 4-8 weeks, relative to 0 weeks, although no significant difference was noted in the

body weight. In addition, the reduction in abdominal circumference was significant in dogs aged <7 years. Thus, the rice bran-fermented materials can be used as functional materials for numerous purposes in animals other than humans.

As described above, fermentation media were developed using rice milling by-products, rice bran, or no-wash rice lees as raw materials, and an efficient GABA production method was established using lactic acid bacteria fermentation. Considering its novelty in the development of functional fermented materials, and the effective utilization of rice milling by-products, brewing equipment, and fermentation technology, an application was filed for patenting and authorization. In addition, the findings from the functional confirmation of rice bran-fermented materials, including the normalization of lipid abnormality and the elucidation of the genetic mechanisms, will facilitate practical applications. Furthermore, the findings in dogs are applicable to the pet food industry. The materials used in the present study can be applied for several purposes in the food, health food, and pet food industries. By supplementing a trace amount of the materials, functional effects can be obtained, adding value to the products.

The new fermented materials developed using the brewing equipment and fermentation technology of small and medium sake breweries may revive the stagnant sake industry. The fermented materials made from nutritious rice milling by-products as raw materials are likely to have unknown functional effects and contain active ingredients. This research will be continued in the future, and fermentation technology will be further developed by utilizing brewing equipment.

参考文献

- 1) 28 年産米の生産量と 29 年産米の都道府県別の生産数量目標等, 農林水産省政策統括官付穀物課水田農業対策室(参考 1), http://www.maff.go.jp/lj/press/seisaku_tokatu/s_taisaku/161128.html.
- 2) 平成 28 酒造年度における清酒の製造状況等について, 国税庁鑑定企画室, 2018 年 2 月.
- 3) 柴田恒彦, 河野征弘; 我が社の無洗米設備その開発と普及スーパージフライス設備, ジャパンフードサイエンス, **37**, 39-43, 1998.
- 4) 金本繁晴, 柴田恒彦; 無洗米—新しい無洗米化処理装置(NTWP)の開発—, 日本食生活学会誌, **13**, 2-9, 2002.
- 5) 雑賀慶二; 米のとぎ汁公害と BG 無洗米の開発, ジャパンフードサイエンス, **37**, 33-38, 1998.
- 6) 永西修, 川島知之; 無洗米製造副産物の第一胃内消化特性と栄養価, *Grassl.Sci.*, **49**, 471-476, 2003.
- 7) 谷口久次, 橋本博之, 細田朝夫, 米谷俊, 築野卓夫, 安達修二; 米糠含有成分の機能性とその向上, 日本食品科学工学会, **59**, 301-318, 2012.
- 8) 厚生労働省統計資料; 平成 29 年国民健康・栄養調査結果の概要.
- 9) 株式会社富士経済; 健康食品、医薬品などの成分・素材の国内市場を調査, 富士経済グループプレスリリース第 17125 号, 2017 年 12 月 25 日.
- 10) 一般社団法人ペットフード協会; 平成 29 年全国犬猫飼育実態調結果, 2017 年 12 月 22 日.
- 11) McGreevy.P.D., P.C.Thomson., C.Pride., A.Fawcett., T.Grassi., B. Jones.; Prevalence of obesity in dogs examined by Australian veterinary practices and the risk factors involved, *Vet.Rec.*, **156**, 695-702,

- 2005.
- 12) 戸枝一喜, 青木淳子, 熊谷亮, 伊藤汎; γ -アミノ酪酸高含有米糠の製造法, *秋田県総合食品研究所報告*, **4**, 25-29, 2002.
 - 13) Y.Ueno., K.Hayakawa., S.Takahashi., K.Oda.; Purification and Characterization of Glutamate Decarboxylase from *Lactocillus brevis* IFO-12005, *Biosci. Biotech. Biochem*, **6**, 1168-1171, 1997.
 - 14) 浜田尚樹, 村北宏之; *島津評論*, **45**, 183-187, 1988.
 - 15) Stanton.H.C.; Mode of action of γ -aminobutyric acid on the cardiovascular system, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **143**, 195-204, 1963.
 - 16) 岡田忠司, 杉下朋子, 村上太郎, 村井弘道, 三枝貴代, 堀野俊郎, 小野田明彦, 梶本修身, 高橋励, 高橋丈夫; γ -アミノ酪酸蓄積脱脂コメ胚芽の経口投与における更年期障害及び初老期精神障害に対する効果, *食工誌*, **47**, 596-603, 2000.
 - 17) T.Saikusa., T.Horino., Y.Mori.; Distribution of Free Amino Acids in the Rice Kernel and Kernel Fractions and the Effect of Water Soaking on the Distribution, *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1122-1125, 1994.
 - 18) 大森正司, 矢野とし子, 岡本順子, 津志田藤二郎, 村井敏信, 樋口満; 嫌気処理緑茶(ギャバロン茶)による高血圧自然発症ラットの血圧上昇抑制作用, *農化*, **61**, 1449-1451, 1987.
 - 19) 岡田忠司; *食品と開発*, **36**, 7-9, 2001.
 - 20) 杉下朋子; *食品と開発*, **36**, 10-11, 2001.
 - 21) 津志田藤二郎, 村井敏信, 大森正司, 岡本順子; γ -アミノ酪酸を蓄積させた茶の製造とその特徴, *農化*, **61**, 817-822, 1987.
 - 22) 大友理宣, 木村貴一, 渡辺誠衛, 戸枝一喜; 米糠を用いた *Lactobacillus brevis* IFO12005 による γ -アミノ酪酸含有組成物の生産, *生物工学*,

- 84, 479-483, 2006.
- 23) 大友理宣, 保刈美佳, 押部明德, 畠恵司, 戸枝一喜; 無洗米副産物を用いた *Lactobacillus brevis* IFO12005 による γ -アミノ酪酸含有組成物の生産, *日本食品保蔵科学会誌*, **38**, 19-23, 2012.
- 24) M.Ohotomo., S.Nojima., A.Ito., M.Hokari., K.Hata., K.Toeda; Enhancement of GABA Production Utilizing Enzyme-treated Rice Bran by Lactic Fermentation with pH Control, *Food Preservation Science*, **44**, 309-313, 2018.
- 25) 大友理宣, 高嶋亜希子, 菊池継夫, 高橋純一郎, 戸枝一喜, 畠恵司; 米糠乳酸発酵抽出物の高脂肪食負荷ラットにおける脂質異常改善作用, *生薬学会誌*, **65**, 33-38, 2011.
- 26) 橋爪千恵, 大友理宣, 高倉はるか, 高嶋亜希子, 畠恵司; 米糠発酵粉末を含む犬用補助栄養食の有用性と満足度に関するアンケート調査, *ペット栄養学会誌*, **15**, 72-79, 2012.
- 27) 渡辺隆幸, 保刈美佳, 戸枝一喜, 伊藤英晃; 秋田味噌のイソマルトース含有について, *味噌の科学と技術*, **56**, 291-294, 2008.
- 28) 早川潔, 上野義栄, 河村眞也, 谷口良三, 小田耕平; 乳酸菌による γ -アミノ酪酸の生産, *生物工学*, **75**, 239-244, 1997.
- 29) 上野義栄, 平賀和三, 森義治, 小田耕平; 漬物から γ -アミノ酪酸(GABA) 高生産性乳酸菌の分離と応用, *生物工学*, **85**, 109-114, 2007.
- 30) Jack.Yang.N., Y.Desai.I.D.; Effect of high levels of dietary vitamin E on liver and plasma lipids and fat soluble vitamins in rats, *J. Nutr.*, **107**, 1418-1426, 1997.
- 31) Qureshi.A.A., Bradlow.B.A., Brace.L., Manganello.J., Peterson.D.M., Pearce.B.C., Wright.J.J., Gapor.A., Elson.C.E.; Response of hyper-

- cholesterolemic subjects to administration of tocotrienols; *Lipids*, **30**, 1171-1177, 1995.
- 32) S.Onomi., Y.Okazaki., T.Katayama.; Effect of dietary level of phytic acid on hepatic and serum lipid status in rats fed a high-sucrose diet, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1379-1381, 2004.
- 33) K.Horie., N.Higashiguchi., H.Yokogoshi., *FOOD Style***21**, **8**, 64-68, 2009.
- 34) M.Okazaki., S.Usui., M.Ishigami., N.Sakai., T.Nakamura., Y.Matsuzawa., S.Yamashita.; Identification of Unique Lipoprotein Subclasses for Visceral Obesity by Component Analysis of Cholesterol Profile in High-Performance Liquid Chromatography, *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.*, **25**, 578-584, 2005.
- 35) S.Usui., Y.Hara., S.Hosaki., M.Okazaki.; A new on-line dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC, *J. Lipid. Res.*, **43**, 805-814, 2002.
- 36) M.Itoh., Y.Abe., Y.Iwama., F.Kimura., M.Shoji., J.Takahashi., G.Toshima., H.Sasaki., K.Hata.; HPLC analysis of lipoproteins in culture medium of hepatoma cells:an in vitro system for screening antihyperlipidemic drug, *Biotech. Lett.*, **31**, 953-957, 2009.
- 37) A.L.Gerhardt., N.B.Gallo.; Full-Fat Rice Bran and Oat Bran Similarly Reduce Hypercholesterolemia in Humans, *J. Nutr.*, **128**, 865-869, 1998.
- 38) T.W.Chou, C.Y.Ma., H.H.Cheng., Y.Y.Chen., Lai.M.H.; A Rice Bran OilDiet Improves Lipid Abnormalities and Suppress Hyperinsulinemic Responses in Rats with Streptozotocin/Nicotinamide-Induced Type 2

- Diabetes, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **45**, 29-36, 2009.
- 39) H.Uto.Kondo., R.Ohmori., C.Kiyose., Y.Kishimoto., H.Saito., O.Igarashi., K.Kondo.; Tocotrienol Suppresses Adipocyte Differentiation and Akt Phosphorylation in 3T3-L1 Preadipocytes¹⁻³, *Nutr.*, **139**, 51-57, 2009.
- 40) Faria.A., Monteiro.R., Pestana.D., Freitas.V., Mateus.N., Azevedo.I., Calhau.C.; Intestinal oxidative state can alter nutrient and drug bioavailability, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2**, 322-327, 2009.
- 41) T.Nakano., I.Inoue., S.Katayama., M.Seo., S.Takahashi, S.Hokari., R.Shinozaki., K.Hatayama., T.Komoda.; Lysophosphatidylcholine for efficient intestinal lipid absorption and lipoprotein secretion in Caco-2 cells, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **45**, 227-234, 2009.
- 42) J.Takahashi., K.Ogihara., Y.Naya., F.Kimura., M.Itoh., Y.Iwama., Y.Matsumoto., G.Toshima., K.Hata.; An in vitro assay system for antihyperlipidemic agents by evaluating lipoprotein profiles from human intestinal epithelium-like cells, *3 Biotech.*, **3**, 213-218, 2013.
- 43) Kahn.H.S.; The "lipid accumulation product" performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: a population-based comparison, *BMC Cardiovasc.Disord.*, **5**, 26-36, 2005.
- 44) AAHA Nutritional Assessment Guidelines for Dogs and Cats, *J. A. A. H. A.*, **46**, 285-296, 2010.
- 45) Tvarijonaviciute.A., Tecles.F., Ceron.J.J.; Relationship between serum butyrylcholinesterase and obesity in dogs: a preliminary report, *Vet. J.* **186**, 197-200, 2010.
- 46) Chou.T.W., Ma.C.Y., Cheng.H.H., Chen.Y.Y., Lai.M.H.; A rice bran oil

- diet improves lipid abnormalities and suppresses hyperinsulinemic responses in rats with streptozotocin/nicotinamide-induced type 2 diabetes, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **45**, 29-36, 2009.
- 47) Sen.C.K., Khanna.S., Roy.S.; Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family, *Mol. Aspects. Med.*, **28**, 692-728, 2007.
- 48) Liu.N., Ru.Y., Wang.J., Xu.T.; Effect of dietary sodium phytate and microbial phytase on the lipase activity and lipid metabolism of broiler chickens, *The British journal of nutrition*, **103**, 862-868, 2010.
- 49) S.Onomi., Y.Okazaki., T.Katayama.; Effect of dietary level of phytic acid on hepatic and serum lipid status in rats fed a high-sucrose diet, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1379-1381, 2004.
- 50) 専門家監修犬情報サイトワンペディア; <https://wanpedia.com/>.
- 51) Fahey.G.C.Jr., Barry.K.A., Swanson.K.S.; Age-related changes in nutrient utilization by companion animals, *Annu. Rev. Nutr.*, **28**, 425-445, 2008.
- 52) 戸枝一喜, 渡辺誠衛, 木村貴一, 大友理宣; γ -アミノ酪酸含有組成物並びにその製造方法, 特開 2005-65691.
- 53) 押部明德, 戸枝一喜, 大友理宣; γ -アミノ酪酸含有組成物を含む飼料とその製造方法, 特許第 5196094 号.

本論文に関する発表論文

第2章の研究に関する発表論文

- 1) 大友理宣, 木村貴一, 渡辺誠衛, 戸枝一喜; 米糠を用いた *Lactobacillus brevis* IFO12005 による γ -アミノ酪酸含有組成物の生産, *生物工学会誌*, **84**, 479-483, 2006.
- 2) 大友理宣, 保刈美佳, 押部明德, 畠恵司, 戸枝一喜; 無洗米副産物を用いた *Lactobacillus brevis* IFO12005 による γ -アミノ酪酸含有組成物の生産, *日本食品保蔵科学会誌*, **38**, 19-23, 2012.
- 3) Ohotomo Masanobu, Nojima Satoshi, Ito Aya, Hokari Mika, Hata Keishi and Toeda Kazuki; Enhancement of GABA Production Utilizing Enzyme-treated Rice Bran by Lactic Fermentation with pH Control, *Food Preservation Science*, **44**, 309-313, 2018.

第3章の研究に関する発表論文

- 1) 大友理宣, 高嶋亜希子, 菊池継夫, 高橋純一郎, 戸枝一喜, 畠恵司; 米糠乳酸発酵抽出物の高脂肪食負荷ラットにおける脂質異常改善作用, *生薬学会誌*, **65**, 33-38, 2011.
- 2) 橋爪千恵, 大友理宣, 高倉はるか, 高嶋亜希子, 畠恵司; 米糠発酵粉末を含む犬用補助栄養食の有用性と満足度に関するアンケート調査, *ペット栄養学会誌*, **15**, 72-79, 2012.

謝 辞

本論文の研究および作成にあたり、常に御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東京農業大学 生物産業学部食香粧化学科 戸枝 一喜教授に心より深謝の意を表します。

本研究および論文作成にあたり、有益な御助言、御指導を賜りました秋田県総合食品研究センター 畠 恵司博士に深く感謝の意を表します。

本論文の執筆にあたり、適切な御助言を賜りました東京農業大学 応用生物科学部醸造科学科 門倉 利守准教授、東京農業大学 生物産業学部食香粧化学科 妙田 貴生教授に深く感謝を申し上げます。

本研究にあたり、常に御理解、激励を賜りました秋田銘醸株式会社 京野 勉代表取締役社長に心より感謝を申し上げます。また、本研究の遂行にあたり御協力を戴きました秋田銘醸株式会社製造課および研究室の皆様に御礼を申し上げます。

本研究にあたり、共同研究等で御協力を戴きました秋田県総合食品研究センターの職員の皆様に感謝を申し上げます。

本研究の基礎となる「発酵」の素晴らしさを学生時代から御教授を戴きました^敬竹田 正久先生（元東京農業大学農学部醸造学科教授）に心から謝意を表します。

最後に、常日頃から支えてくれた仲間、家族に感謝をいたします。