

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 24 日現在

機関番号：43601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750033

研究課題名(和文) 発芽玄米酒粕の呈味増強効果と生理活性

研究課題名(英文) Increasing the taste and bioactivities of pre-germinated brown rice sake-lees

研究代表者

小木曾 加奈 (Kogiso, Kana)

長野県短期大学・その他部局等・准教授

研究者番号：30435284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：発芽玄米酒粕は発芽玄米を原料とする清酒の残さである。これを製パン時に添加すると「塩味」が増強する傾向にあることがわかった。各種試験の結果、発芽玄米酒粕中の有機酸の一部が小麦粉中で焼成されると塩味発現に関与することが示唆された。減塩についての検討を行った結果、強力粉の1割を発芽玄米酒粕に代替することで24.2%までの減塩が可能になった。活性酸素消去活性試験と血圧降下に関連するACE阻害活性試験を行った。活性酸素消去能は混合物ベース換算で、IC50値で33.5 mg/mlであった。ACE阻害活性はIC50値で0.15mg/mlであった。これらの活性成分の簡易検索方法を確立できた。

研究成果の概要(英文)：Pre-germinated brown rice sake-lees is the strained lees from the sake which made the pre-germinated brown rice ferment. This sake-lees was added to the bread dough and tended to increase the "saltiness" of the bread. As a result of various studies, it was suggested that a part of the organic acid in the sake-lees was involved in the saltiness expression when baked in wheat flour. As a result of having substituted the sake-lees for 10% of the flour, only 24% of the salt was necessary for adequate taste. We conducted an active oxygen scavenging activity study and an ACE inhibitory activity study about the sake-lees. The active oxygen scavenging ability was 33.5 mg/ml with an IC50 level by mixture base conversion. The ACE inhibitory activity was 0.15 mg/ml with an IC50 level. We were able to establish a simple search method of these active ingredients.

研究分野：食品科学

キーワード：減塩 塩味発現 機能性 ACE阻害活性 ポリフェノール 抗酸化活性 簡易検索法 発芽玄米酒粕

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 清酒醸造の一般的な方法では、酒玄米を70-50%精米するという過程が最初に行われる。これは米粒の外側に雑味の原因となるタンパク質や脂肪が多く存在するためであり、この部分を削り落とすことで清酒の洗練された味を引き出すことができる。一方、削り落とされた精米部分やぬか、発酵残さである酒粕などは一部、食品として回収されるが、基本的に産業廃棄物のうちの動植物性残さとして排出されることになる。廃棄物削減にはこのぬかや発酵残さを検討する必要がある。ぬかを削り落とさない玄米を約1~2日程度、摂氏32度前後の状態に水分を含ませ、1mmほどの芽が出た状態にしたものが発芽玄米である<sup>1)</sup>。発芽玄米にはビタミンやミネラルが豊富というだけでなく、血圧上昇を抑制する働きを持つ $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)やフェルラ酸、コウジ酸などのフェノール類も多く含んでいる。発芽玄米を発酵させることは、すなわち、精米過程で削り取られてしまう糠・胚芽を残したまま発酵させることによって、清酒や酒粕の中に元来削り取られて無くなっていた玄米部分の成分がそのまま残ることになり、食品の機能性に富むことが予想される。この機能性成分を取り込みつつ、産業廃棄物を減らす試みとして発芽玄米を発酵させお酒を造る試みを行ってきた。

(2) 我々がこの発芽玄米酒粕を添加したパンを作成したところ、塩味とコク味が増強する傾向があった<sup>2-4)</sup>。また香気成分が増強するほか、普通の酒粕と比較し、パンの着色や膨らみが増すことがわかった<sup>5)</sup>。

## 2. 研究の目的

発芽玄米を添加したパンの塩味増強の原因を探ると同時に、発芽玄米酒粕の機能性について検討することとした。

### (1) 発芽玄米酒粕製パンにおける塩味増強発現の検討

発芽玄米酒粕を添加したパンの塩味増強の原因を探るため、酒粕中の呈味成分を検討した。その成分を素のパンに添加することでどのように呈味が変化したかを検討した。また発芽玄米酒粕を加えることでどの程度まで減塩が可能かを検討した。

### (2) 発芽玄米酒粕の機能性と機能性成分の簡易検索法

発芽玄米酒粕の機能性について検討すると同時に、*in silico*における簡易検索方法を検討した。

### (3) 塩味増強を見出す実験系の確立

パンにおける塩味増強は有機酸のドウ中における焼成時に発現する。しかし、ドウ中では小麦粉原料中の様々な成分が反応することによって数多くの呈味成分が発現し

ていると考えられる。今回のような有機酸が焼成によってメイラード反応を起こし、呈味成分を生成するかを検討するため、粉体系焼成発現系の確立を行い、呈味発現物質を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 発芽玄米酒粕製パンにおける塩味増強発現の検討

#### 製パン方法

製パンは1斤タイプ自動ホームベーカリー(製品番号SD-BH103-Pパナソニック社製東京)を用いて2時間コースにて製パンを行った。材料は一般的な市販品である強力粉、食塩、グラニュー糖、バター、スキムミルク、ドライイーストを用いた。小麦粉の一部代替材料として発芽玄米酒粕、または吟醸粕を用いた。なお、発芽玄米酒粕と吟醸粕の違いは清酒製造の際、発芽玄米酒粕は焙煎発芽玄米(美山錦)を使用し、吟醸粕は精白米(美山錦59%精米)を使用したかである。比較用の無添加食パン生地として強力粉280g、バター10g、砂糖17g、スキムミルク6g、塩5g、水200ml、ドライイースト4.2gを用意した。これらの酒粕配合量については製パン性が最も良くなる状態であり、水分量、調整をして製パンを行った。

各有機酸の添加量は酒粕28g中に含まれる有機酸量を基準として量を検討した。有機酸は全て食品添加物グレードのものを使用した。

減塩については発芽玄米酒粕を添加したもののうち、減塩しないもの、0.6g減塩(12%減塩)、1.0g減塩(20%減塩)、1.3g減塩(26%減塩)、1.6g減塩(32%減塩)、1.9g減塩(38%減塩)した6種類のパンを作成した。比較対照用には、発芽玄米酒粕を添加せず、かつ減塩しない食パン(以後、無添加食パンと略記)を用い、~のパンとそれぞれ2点比較を行った。

#### 官能試験方法

被験者にはあらかじめ官能試験を実施し、健康で味覚に問題のない大学生及び教員を13名選抜した。

呈味成分として各種有機酸(クエン酸、リンゴ酸、酢酸、乳酸)を用いた。アンケート項目「甘さ」、「おいしさ」、「コク味」、「塩味」について実際に食べて感じられる5段階(強い5、やや強い4、変わらない3、やや弱い2、弱い1)で評価した。比較用の無添加食パン(A)と発芽玄米酒粕入り製パン(B)とで2点比較を行い、その後、比較用の無添加食パン(A)と有機酸入り製パン(C)について2点比較を行った。無添加食パンを全て平均値3と考えて発芽玄米酒粕製パン(B)と有機酸入り製パン(C)を比較した。

減塩についての項目は「塩味」、「コク味(味わいの深さ)」、「おいしさ」について5段階

(強い5、やや強い4、変わらない3、やや弱い2、弱い1)で評価した。さらに減塩による加工特性に対し、変化の有無を検討するため、パンの性状である「焼き色」、「香ばしさ」についても同様に評価した。比較の際には無添加食パンを全て平均値3として採点した。

### 3. 統計解析

製パン中に有機酸を加え呈味を検討した統計解析は以下の通りである。JMP9.0.2を用い、Tukey-KramerのHSD検定を使ったすべてのペアの比較を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

また減塩に関する官能政権で行った統計解析は以下の通りである。統計ソフトJMP11.0.0を使用し、相関係数を算出し、その有意水準を算出した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

相関が得られたものについては回帰式を算出し、どの程度まで減塩が可能かを検討した。

### (2) 発芽玄米酒粕の機能性と機能性成分の簡易検索法

#### 活性酸素消去活性

活性酸素消去能は素のままの発芽玄米酒粕を水で希釈し、WST-1でのSOD活性測定法を用いて *in vitro* における活性酸素消去活性測定を行った。

#### ACE 阻害活性

ACE 阻害活性を検討するサンプルは、発芽玄米酒粕のほか、発芽胚芽米酒、同様の製法を行っている清酒についてそれぞれ測定を行った。それぞれの酒は蒸留水で希釈し使用した。発芽玄米酒粕は遠心分離後の上澄み液を使用した。ACE 阻害活性は Dojindo 社製 ACE Kit - WST を用いて *in vitro* における阻害能を測定した。

#### *in silico* における簡易検索方法

#### 1) 活性酸素消去活性を有すると考えられる各種ポリフェノールの検索

できるだけ簡便な方法で機能性成分を探索するため、酒粕中に存在すると考えられるフェノール類(フェルラ酸、 $\gamma$ -オリザノール、イノシトール、イノシトール6リン酸)について簡易検索方法を確立する方法を検討した。発芽玄米酒粕の LC-MS データを ACD/MS Workbook Suite の IntelliTarget 機能により、各種文献から酒粕中に存在すると考えられるフェノール類に該当する分子イオンピークを持つピークを判別した。

#### 2) ACE 阻害活性を有するジペプチドの検索

できるだけ簡便な方法で機能性成分を探索するため、ACE 阻害活性を有するジペプチドをコンピュータソフト ACD/MS Workbook

Suite の IntelliTarget 機能で検索することとした。発芽玄米酒粕を5倍容に懸濁し、LC-MSで分析した。LC-MS データを ACD/MS Workbook Suite の IntelliTarget 機能により、分子イオンピークが確認されるピークを判別後、ジペプチドに該当する質量数を持つピークを判別した。IntelliTarget 機能により、ジペプチドに相当する質量数を持つ 57 ピークが判別された。

#### (3) パン焼成時における塩味の特定に対する、メイラード反応粉体系の確立

代替ドウ系メイラード反応システムの検討方法として以下のように行った。まず、水系と異なり、100 以上の加熱など、製パンと同様のことができるよう、ドウ中の小麦粉代替物として  $\alpha$ -シクロデキストリンを使用した。 $\alpha$ -シクロデキストリンと水を加え懸濁したものをブランクとし、そこにグルコース(0.17 g)とグリシン(0.16 g)を加えた系をコントロールとした。発芽玄米酒粕ならびに同様の製法を行っている清酒吟醸粕から検出された有機酸(リンゴ酸 0.059 mg、酢酸 0.29 mg)について、それぞれコントロールに加え、加熱したものの検討を行った。

- シクロデキストリンを用いた各種粉体焼成後の物質を 0.01 g/ml になるよう水に溶解した。その後、その 10 g を採取し、80、20 分間加熱したヘッドスペースガス 1 ml を用いて GC-MS の分析を行い、成分を分析したほか、その官能性を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 発芽玄米酒粕製パンにおける塩味増強発現の検討

酸度測定の結果、発芽玄米酒粕には酢酸換算による酸度で 770 ppm の有機酸が含まれていることがわかった。個々の有機酸分析では酢酸が最も多く、次にコハク酸が多く検出された。ピルピン酸は検出されなかった。清酒に一般的に含まれるリンゴ酸やクエン酸、乳酸も検出された。

発芽玄米酒粕製パンには 28 g を酒粕として加えており、酢酸換算で 0.23 g の有機酸がパンに添加されていることがわかった。これらの条件から酢酸換算で 0.23 g を基準として量を検討した。有機酸添加量としてクエン酸 0.05 g (N=13)、クエン酸 0.1 g (N=13)、クエン酸 0.2 g (N=11)、クエン酸 0.4 g (N=12)、コハク酸 0.4 g (N=13)、コハク酸 2 ナトリウム 0.4 g (N=13)、リンゴ酸 0.2 g (N=11)、リンゴ酸 0.4 g (N=12)、酒粕疑似有機酸パン(N=6)、酒粕入り(N=12)、酢酸 0.4 g (N=7)、酢酸 0.4 g とリンゴ酸 0.1 g (N=8)、酢酸 30 mg とリンゴ酸 5.6 mg + アミノ酸 (N=9)、乳酸カルシウム 0.4 g (N=13)、乳酸ナトリウム 0.4 g (N=13)をパンに添加して有機酸入りパンとした。なお酒粕疑似有機酸パンは検出された全ての有機酸を酒粕中の有機酸と同量添加したものである。

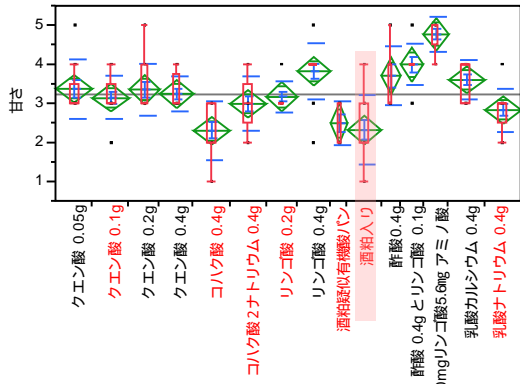


Fig.1. 甘さに関する官能検査結果

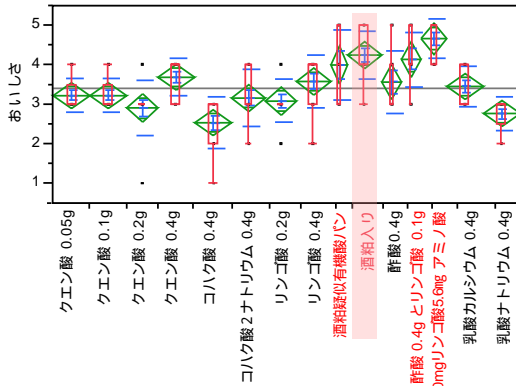


Fig.2. おいしさに関する官能検査結果

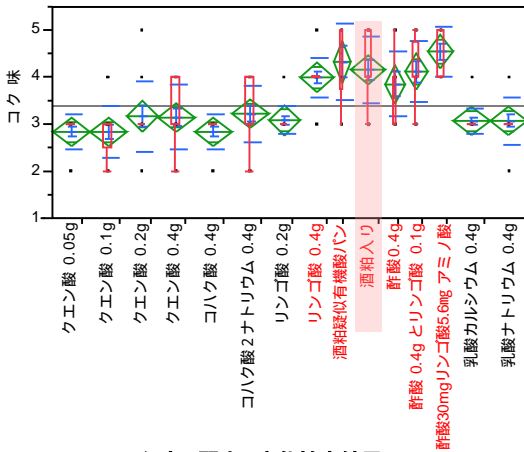


Fig.3. コク味に関する官能検査結果

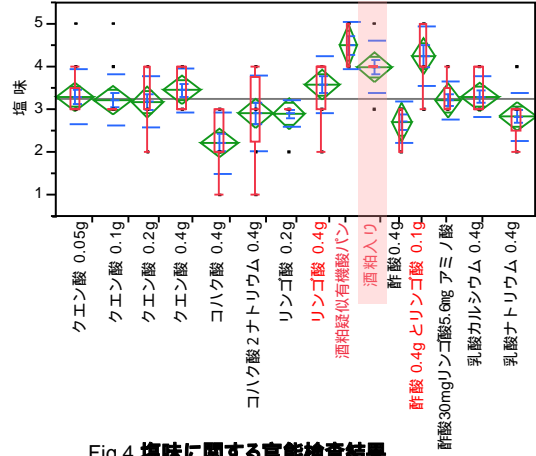


Fig.4. 塩味に関する官能検査結果

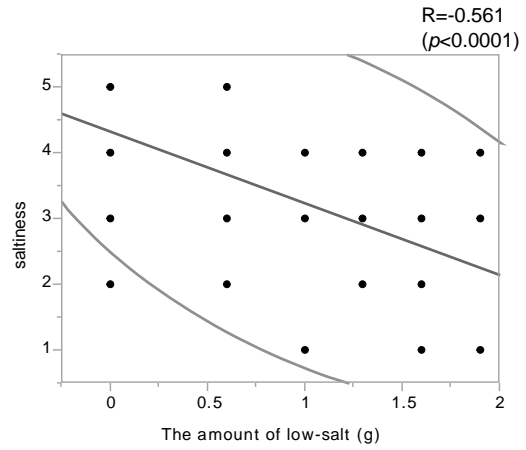


Fig.5 発芽玄米酒粕製パンにおける減塩量と塩味

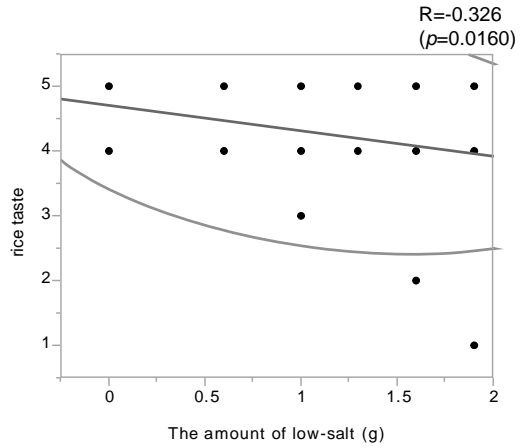


Fig.6 発芽玄米酒粕製パンにおける減塩量とコク味

また、アミノ酸は検出されたうち一般的な酒粕よりも多く含まれるものを酒粕と同量添加したものである。

甘味について Fig.1 に示す。発芽玄米酒粕を添加したパンは甘くないが、コハク酸添加では甘味が出ず、一方でアミノ酸を添加するとより甘くなることがわかった。

おいしさについて Fig.2 に示す。発芽玄米酒粕を添加したパンは何も添加していないパンよりも美味しくなるが、同程度美味しくなるためには酢酸とリンゴ酸の添加が必要であることが示唆された。

コク味について Fig.3 に示す。パンにコク味が出るためには酢酸やリンゴ酸が必要であることが示唆された。リンゴ酸単体だとコク味を出すのに高濃度が必要だが、酢酸と一緒に添加すると酢酸、リンゴ酸共に少量でコク味が出ることを示された。

塩味について Fig.4 に示す。パンに塩味が出るためにはリンゴ酸が必要で酢酸と一緒に添加すると共に少量でコク味が出ることを示された。またアミノ酸を添加すると塩味が緩和することがわかった。発芽玄米酒粕中に含まれる有機酸はパンのおいしさを引き立たせるのにベストな割合で入っているため、コク味や塩味が出やすいパンが作成できるのではないかと考えられる。

発芽玄米酒粕を添加し、どの程度の減塩が可能か検討を行った。減塩しないもの、0.6 g 減塩、1.0 g 減塩、1.3 g 減塩、1.6 g 減塩、1.9 g 減塩した6種類のパンと無添加食パンをそれぞれ2点比較した。

塩味については Fig.5 のような結果になった。この結果から、塩味についての相関係数は  $R = -0.561$  ( $p < 0.0001$ ) で負の相関があり、その回帰式は  $y = -1.091x + 4.33$  であった。酒粕を添加しても減塩すれば徐々に塩味は低下した。

コク味については Fig.6 のような結果になった。この結果からコク味についての相関係数  $R = -0.326$  ( $p = 0.0160$ ) で同じく負の相関があり、その回帰式は  $y = -0.0393x + 4.72$  であった。塩味ほどではないが酒粕を添加しても減塩すれば徐々に味に深みがなくなった。

おいしさに対する結果、パンの焼き色、パンの香ばしさの結果、相関がなかった。

以上のことから発芽玄米酒粕を添加し、かつ、塩分を減じて製パンしたところ、食パン1斤辺りおよそ1.2 g (6枚切り食パン1枚で0.2 g) 程度まで「減塩」が可能であり、また「コク味」も「おいしさ」もその程度の減塩で損なわれることはなかった。また1.9 g までの減塩によってパンの性状である焼き色や香ばしさにも変化がないことがわかった。

## (2) 発芽玄米酒粕の機能性と機能性成分の簡易検索法

活性酸素消去活性

発芽玄米酒粕の活性酸素消去能は混合物

ベースの換算では IC50 値で 33.5 mg/ml であった。

### ACE 阻害活性

発芽玄米酒粕、発芽胚芽米酒、清酒の ACE 阻害活性は IC50 値でそれぞれ 0.15mg/ml、1.15 mg/ml、1.55 mg/ml であった。清酒より発芽胚芽米酒が ACE 阻害活性は高かったことから、発芽に由来する成分が ACE 阻害活性を示すことがわかった。また酒粕の方がより阻害活性が高かったことから、絞った残さの方が、血圧降下作用がより高いことがわかった。

### *in silico* における簡易検索方法

1) 活性酸素消去活性を有すると考えられる各種ポリフェノールの検索

発芽玄米酒粕の LCMS データを ACD/MS Workbook Suite の IntelliTarget 機能により、各種文献から酒粕中に存在すると考えられるフェノール類(フェルラ酸、 $\gamma$ -オリザノール、イノシトール、イノシトール6リン酸)に該当する分子イオンピークを持つピークを判別した。MS Workbook は構造式のクロマトグラムピークへの帰属機能を持っており、その分析の結果、発芽玄米酒粕にはフィチン酸、オリザノール、myo-イノシトールは確認できなかった。一方、フェルラ酸は存在が確認できた。フェルラ酸標品からの LC スペクトルにおける Area 値から、発芽玄米酒粕5倍容の量(酒粕容量1mlあたりフェルラ酸0.756 mg)が計算できた。今回は内部標準や検量線を引いていないが、目安程度の凡その量が示唆された。

2) ACE 阻害活性を有するジペプチドの検索

IntelliTarget 機能により、ジペプチドに相当する質量数を持つ57ピークが判別された。各種文献から ACE 阻害のあるジペプチドのうち標品のスペクトルとの比較から、最終的に発芽玄米酒粕中で阻害活性のあるジペプチドの1つは Val-Pro と推定された。

(3) パン焼成時における塩味の特定に対する、メイラード反応粉体系の確立

メイラード反応を行うのに適していたのは  $\alpha$ -シクロデキストリンであった。 $\alpha$ -シクロデキストリンを使用した代替ドウ系メイラード反応システムは100以上での焼成が可能であった。コントロールとして  $\alpha$ -シクロデキストリンのみを200近い温度帯で加熱を行っても焼成時に着色することがなく、焼成後、これら粉末・固形物として評価が可能になった。

また、各種有機酸を加えた際の粉体系ではそれぞれによる風味の変化が認められた。発芽玄米酒粕中に存在するリンゴ酸や酢酸を加えることでメイラード生成物の内容が変化した。例えばリンゴ酸0.059 mgをこの粉体系に加えると風味にシャープな苦味が増強

されるのが感じられ、また酢酸 0.29 mg を添加すると酸味が増強されるのが感じられた。GC-MS 分析の結果、リンゴ酸や酢酸を添加したサンプルには、同定はできなかったものの、特徴的なピークが出現した。これらのピークが匂いの差や味の差に繋がっている可能性があると示唆された。

今後、パンの中でどのように有機酸が味や風味に変化を出しているのか、この粉体系を利用して検討したいと考えている。

#### <参考文献>

- 1) FANCL: Pre-germinated brown rice. Patent 2005. OpenURL No. 3738025
- 2) 発芽玄米酒粕の食品利用方法についての検討、牛越静子、小木曾加奈、長野県短期大学紀要 第 65 号、(2010)、P.13-P.18
- 3) 発芽玄米酒粕製パンの呈味性、小木曾加奈、中澤弥子、吉岡由美、佐藤晶子、岡崎光雄、日本味と匂学会誌 18(3)、(2011)、P.387-P.390
- 4) 発芽玄米酒粕中の有機酸がパンの呈味に及ぼす影響、小木曾加奈、中澤弥子、吉岡由美、佐藤晶子、岡崎光雄、日本味と匂学会誌 20(3)、(2013)、P.313-P.316
- 5) 発芽玄米酒粕添加がパンの色調と嗜好に及ぼす影響、小木曾加奈、中澤弥子、吉岡由美、佐藤晶子、岡崎光雄、日本調理学会大会講演要旨集、(2013)、セッション ID: 2P-47

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

[雑誌論文]

小木曾加奈、中澤弥子、岡崎光雄、発芽玄米酒粕の嗜好特性、日本家政学会誌、査読有り、66(3)、2015、P113-119

小木曾加奈、岡崎光雄、発芽玄米酒粕の加工特性と減塩効果、日本味と匂学会誌、査読有り、21(3)、2015、P339-342

[学会発表](計 7 件)

小麦粉代替ドウによるメイラード反応の検討とその評価、小木曾加奈、寺尾 啓二、古根 隆広、岡崎 光雄、(2017 年 3 月)、日本農芸化学会 2017 年度大会 (於京都女子大学)

発芽玄米酒粕中のポリフェノール簡易探索方法の検討、小木曾加奈、古田一匡、(2016 年 9 月)、日本農芸化学会中部支部大会第 177 回 例会 (於名古屋大学農学部講義棟および野依記念学術交流館)

LC MS による ACE 阻害活性ペプチドの簡易探索法の検証、古田一匡、小木曾加奈、(2016 年 3 月)、日本農芸化学会 2016 年度大会 (於札幌コンベンションセンター)

発芽玄米酒粕の ACE 阻害活性、小木曾加奈、岡崎光雄、(2016 年 3 月)、日本農芸化学会 2016 年度大会 (於札幌コンベンションセンター)

発芽玄米酒粕の呈味増強効果と活性酸素消去能、小木曾加奈、岡崎光雄、(2015 年 3 月)、日本農芸化学会大会(於岡山大学津島キャンパス)

発芽玄米酒粕の加工特性と減塩効果、小木曾加奈、岡崎光雄、(2014 年 10 月)、第 48 回日本味と匂学会 (於静岡市清水文化会館マリナート)

発芽玄米酒粕の食品加工特性と減塩効果 小木曾加奈、岡崎光雄、(2014 年 6 月)第 8 回健康長寿長野研究会(於松本大学)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

小木曾 加奈 (KOGISO, Kana)  
長野県短期大学・生活科学科・准教授  
研究者番号：30435284

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

岡崎 光雄 (OKAZAKI, Mitsuo)  
信州大学・繊維学部・名誉教授  
古田 一匡 (FURUTA, Kazumasa)