

## 黒麹菌および乳酸菌を用いた発酵による 富有柿幼果の機能性向上

折居 千賀<sup>\*1</sup>

(2015年4月23日受付; 2015年6月19日受理)

**要旨:** 廃棄物である富有柿幼果を黒麹菌および乳酸菌にて発酵させ機能性の増強を試みた。これらは発酵によりβ-リパーゼ阻害活性を増強した。β-リパーゼ阻害活性は黒麹菌発酵物 (IC<sub>50</sub> = 16 μg/mL) および乳酸菌発酵物 (IC<sub>50</sub> = 29 μg/mL) とともに水画分で高い阻害活性を示した。黒麹菌および乳酸菌発酵物ではアンジオテンシン変換酵素阻害活性の増強もみられた。幼果由来成分および発酵生成物解析の結果、幼果よりスクロースおよびシトルリンを同定し、これらは7日目に消失することがわかった。黒麹菌と乳酸菌では7日目以降の発酵生成物に相違がみられた。黒麹菌発酵物より血圧上昇抑制効果を有するマンニトールを同定した。乳酸菌発酵物ではマンニトールの生成がみられなかったため、両化合物では各種阻害活性に関与する化合物が異なることが示唆された。以上のことより、黒麹菌および乳酸菌を用いた発酵は富有柿幼果の機能性を増強することを明らかにし、機能性素材として活用できる可能性が示唆された。

**キーワード:** 富有柿, 幼果, 発酵, 黒麹菌, 乳酸菌

柿 (*Diospyros kaki*) は中国を原産とし、古来より食用や薬、あるいは染料や塗料として用いられてきたなじみ深い果物である。それらは完全甘柿、不完全甘柿、不完全渋柿、渋柿に分類され、日本では富有柿や次郎柿、市田柿など様々な品種が存在する。しかし、食用としての柿は加熱処理に不向きであり、消費形態は他の果物に比べて多様ではない<sup>1)</sup>。さらに摘果や規格外果実は廃棄コストがかかるといった環境負荷の問題も有している。そのため、柿の産地を有する自治体では柿を有効活用するための様々な試みがなされている<sup>2)</sup>。柿の発酵物は、渋柿を自然発酵させた柿渋が古来より塗料や染料として用いられてきた。そのほか柿を発酵させたワインや柿酢が流通している。柿の発酵では、柿より分離された酵母 *Saccharomyces bayanus*, *Kloeckera javanica* による異臭のない柿渋製造<sup>3)</sup>が報告されている。同様に柿由来の酢酸菌 *Acetobacter* sp. を用いた三社柿の柿酢発酵<sup>4)</sup>に関する報告がある。また、乳酸菌を用いた成熟果の発酵による抗酸化活性の増加<sup>5)</sup>や養豚の疾病予防効果を持つ発酵飼料への応用<sup>6)</sup>に関する報告がある。柿ワインでは工業用酵母として *Saccharomyces cerevisiae* が用いられており、これらの試みは主に成熟果が対象である。規格外果実と同様、摘果後の幼果もまた環境負荷問題を有している。渋柿あるいはその幼果の果汁を酵母で発酵させた発酵物<sup>7)</sup>に関し、β-リパーゼ阻害およびα-アミラーゼ阻害

活性が報告されている。しかし、幼果の発酵については報告が少なく、菌の選定や品種を含めて緒に就いたばかりといえる。新たな発酵菌および発酵系の検討は、機能性の付与や増強だけではなく、微生物発酵茶より同定された teadenol A<sup>8)</sup> のような新規機能性化合物の生産が期待される。これらの試みは、廃棄幼果だけではなく成熟果も含めた柿の活用法を広げることが考えられる。

本報告では発酵による富有柿幼果の機能性の増強を試みた。発酵菌として、タンニン耐性<sup>9)</sup>が報告されている *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (乳酸菌) および後発酵茶<sup>10)</sup>に用いられる *Aspergillus awamori* (黒麹菌) を選択し、試験管およびバツフルフラスコを用いた発酵系の確立について検討した。また、発酵による富有柿幼果のβ-リパーゼ阻害活性、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性の増強について調べ、発酵生成物の解析を行った。

### 実験方法

#### 1. 試料および供試菌

当研究所農場にて2012年および2013年7月下旬に摘果した富有柿幼果を用いた。いずれも収穫後すぐに果皮、へた、種子を取り除き、果実を適当な大きさにスライスした。試料は-80°Cで保存した。発酵菌は *Aspergillus awamori* NBRC 4033, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007 を用いた。これらはNBRC (Biological Re-

\* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: chika\_orii@shokuken.or.jp)

<sup>1</sup> 公益財団法人東洋食品研究所 (666-0026 兵庫県川西市南花屋敷4-23-2)

source Center, NITE) より購入した。

## 2. 試料の殺菌

幼果の殺菌には煮沸処理を用いた。富有柿幼果を100°Cの熱水で10秒間煮沸処理し、滅菌済みピーカーに移した。その後、滅菌済みステンレス鉢にて細断した試料を滅菌済み試験管あるいは300 mLバッフルフラスコに移し、通気性があるシリコ栓で密封した。試験管発酵系では1.0 g、バッフルフラスコ発酵系では40.0 gの幼果を用いた。また、煮沸処理後の試料をサンプリングし、発酵0日目試料とした。

## 3. 発酵法

黒麹菌はポテトデキストロース寒天斜面培地 (Difco Laboratories) で35°C、3日間培養したものを種菌とした。滅菌水10 mLで懸濁後、孢子懸濁液1.0 mLを幼果に添加し、好気条件下、35°Cで14日間発酵を行った。また、試料に菌糸をまん延させるため、サンプリング時に攪拌を行った。

乳酸菌は5.0 mL MRS ブイヨン液体培地 (Merck Millipore 社) を用い、30°Cで2日間静置培養したものを種菌とした。嫌気状態を保つため、幼果が入ったフラスコに100 mLの滅菌水を添加して浸漬状態とし、菌懸濁液を1.0 mL添加した。アネロパック・ケンキ (三菱ガス化学(株)) を用いた密封嫌気条件下で、30°Cで14日間発酵を行った。乳酸菌を用いた発酵では、柿幼果のほか浸漬水についても30 mLずつサンプリングを行った。

## 4. 抽出法

試験管発酵系では抽出にエタノールを用い、4°Cで4日間抽出を行った。減圧乾固後の抽出物は10% (w/v) となるようにエタノールに溶解したのち、残留したエタノール不溶成分を等量の水で溶解した。これらをそれぞれエタノール画分および水画分とした。

バッフルフラスコ発酵系では、エタノールを用い、4°Cで4日間抽出を行った。さらに、エタノール抽出液を回収した後の試料に対し、30 mLの水を用いて4°Cで4日間抽出した。エタノール抽出液は減圧乾固したのち、10% (w/v) となるようにエタノールで溶解し、エタノール画分とした。残留したエタノール不溶成分は水抽出液と統合した。同水抽出液を減圧乾固し、10% (w/v) となるように水に再溶したものを水画分とした。また、乳酸菌発酵物において、サンプリングした浸漬水はエタノール不溶成分とともに水抽出液として統合した。

## 5. $\beta$ -リパーゼ阻害活性試験

測定は既報<sup>11)</sup>のものを一部改変して行った。基質に4-メチルウンベリフェロンのオレイン酸エステル (4-MUO, Tronto Research Chemicals Inc.) を用い、生成した4-メチルウンベリフェロン (4-MU) の蛍光を測定した。基質溶液および酵素液の調製には150 mM 塩化ナトリウムと1.36 mM 塩化カルシウムを含む13.0 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0, 緩衝液 A) を用いた。活性測定は次の通りに実施した。希釈した試料25  $\mu$ Lを96穴マイク

ロプレートに添加後、基質 (0.1 mM 4-MUO ジメチルシルホキシド溶液を緩衝液 A にて10,000 倍に希釈したもの) を50  $\mu$ L添加、37°Cで5分間プレインキュベートした。酵素は豚膵臓由来  $\beta$ -リパーゼ (和光純薬工業(株)) を用い、酵素液 (2.0 mg/mL) を25  $\mu$ L添加後、37°Cで30分酵素反応を行った。反応終了後、0.1 M クエン酸ナトリウム (pH 4.2) 緩衝液を50  $\mu$ L添加し、反応を停止させた。遊離した4-MUの蛍光 (励起波長355 nm, 蛍光波長460 nm) を蛍光プレートリーダー (FLUOstar Optima, BMG LABTECH) で測定し、50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>,  $\mu$ g/mL) を算出した。

## 6. ACE 阻害活性試験

血圧上昇に関与するアンジオテンシン変換酵素 (ACE) に対する阻害活性は、ACE kit-WST (同仁化学研究所) を用いて調べた。付属のマニュアルに従い各抽出物の ACE 阻害活性を測定し、50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を算出した。同キットは有機溶媒に対して大きく影響をうけるため、水画分のみ測定を行った。

## 7. 柿幼果および発酵物抽出物の成分解析

黒麹菌および乳酸菌発酵物抽出液を LC/MS 分析に供した。フィルターろ過試料をポジティブイオンおよびネガティブイオンモードで測定した。LC/MS 装置は Agilent Technologies 6430 triple Quad LC/MS (アジレントテクノロジー社)、カラムは逆相カラムの Scherzo SS-C18 (150 mm  $\times$  2 mm-i.d., 粒径3  $\mu$ m, Imtakt 社)、移動相として A 液は酢酸とギ酸をそれぞれ0.2%となるように添加した水溶液、B 液は200 mM 酢酸アンモニウム水溶液とメタノールを1:1 (v/v) で混合したものをを用いた。流速は0.3 mL/min、カラム温度は45°Cに設定した。B 液2%で3分間保持したのち、B 液を11分かけて2%から45%に上げ、10分かけてB 液を100%まで上げるグラジエントプログラムとした。注入量は3  $\mu$ Lとした。イオン化は ESI (Electrospray Ionization) 法で、走査範囲は m/z 100-1,000、フラグメンター電圧を100 V、乾燥窒素ガス (350°C) を毎分10 L、ネブライザー圧を55 psi、キャピラリー電圧はポジティブおよびネガティブともに4,000 Vとした。精密質量の測定には LC-Q-TOF/MS 装置 (LC 装置: UFLCXR, 島津製作所(株); TOF/MS 装置: microTOF-QII, BRUKER Daltonics) を用いた。イオン化は ESI (Electrospray Ionization) 法で、走査範囲は m/z 50-1,000、乾燥窒素ガス (200°C) を毎分8.0 L、ネブライザー圧を1.6 Bar、キャピラリー電圧はポジティブイオンモード4,500 V、ネガティブイオンモード3,500 Vとした。カラム、移動相、グラジエント条件は LC/MS と同様のものをを用いた。精密質量より組成式を推定し、推定組成式より得られた化合物について標品を用いて同様に分析を行い、保持時間およびスペクトルの一致をもって同定した。

マンニトールの同定には GC-MS 分析を用いた。減圧乾固した試料に100  $\mu$ Lの無水ピリジンを添加し、再溶

## 富有柿効果の発酵

227

した。同溶液に 200  $\mu$ L の N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (MSTFA, Thermo Fisher Scientific, Inc.) を添加し、室温で 4 時間反応させトリメチルシリル誘導体化したのち、GC-MS 分析に供した。GC-MS 分析条件を以下に示す。GC 装置：アジレントテクノロジー製 Agilent 6890N；検出器：アジレントテクノロジー製 Agilent 5972；カラム：アジレントテクノロジー製 J&W DB-5 (30 m $\times$ 0.25 mm-i.d., 膜厚 0.25  $\mu$ m)；キャリアーガス：ヘリウム (1.0 mL/min)；注入口温度：260 $^{\circ}$ C；オープン：80 $^{\circ}$ C で 2.0 min 保持後、10 $^{\circ}$ C/min で 320 $^{\circ}$ C まで昇温、4.0 min 保持；溶媒待機時間：4.0 min；イオン化：EI (イオン化電圧 70 eV)。標品としてマンニトール (和光純薬工業(株)) およびマンニトールの構造異性体であるソルビトール (和光純薬工業(株))、イジトール (東京化成工業(株))、ガラクトール (東京化成工業(株)) 標品を同様に誘導体化し、比較を行った。

## 結 果

## 1. 発酵過程における富有柿効果の変化および発酵物の特徴

煮沸処理の際、水に淡い茶の着色が認められたが果肉のペースト化および著しい変色はみられなかった。発酵時の外見的变化を観察したところ、黒麹菌での発酵では 7 日目で菌糸が試料全体にまん延し、胞子形成がみられるなど良好な生育を示した。このとき、発酵物は橙色を呈し、果肉の軟化がみられた。乳酸菌もまた、単独での生育を示したが麹菌のような外見的变化および果肉の軟

化はみられなかった。これらの特徴は試験管およびバツフルフラスコ発酵系ともに同様の傾向を示した。また、発酵物には腐敗臭や刺激臭は認められなかった。

2. 試験管発酵系における各発酵物の  $\beta$ -リパーゼ阻害活性

それぞれの発酵物抽出液について、脂肪の吸収阻害、抗肥満に關与する  $\beta$ -リパーゼ阻害活性について調べた (表 1)。黒麹菌発酵物では発酵にともなう活性の増加がみられ、エタノール画分では 14 日目に  $IC_{50}=248 \mu$ g/mL、水画分では 7 日目に  $IC_{50}=580 \mu$ g/mL と最も高い値を示した。乳酸菌発酵物は水画分で 7 日目に一時的な活性の減少がみられたのち増加し、14 日目には  $IC_{50}=85 \mu$ g/mL を示した。エタノール画分では黒麹菌と比較して弱い阻害活性を示した。これらの結果より、黒麹菌および乳酸菌による発酵は富有柿効果の  $\beta$ -リパーゼ阻害活性を増加することが示唆された。

3. バツフルフラスコ発酵系における各発酵物の  $\beta$ -リパーゼ阻害活性および ACE 阻害活性

発酵系のスケールアップとして 300 mL バツフルフラスコを選択した。バツフルフラスコ発酵系で得られた発酵物抽出液について  $\beta$ -リパーゼ阻害活性を調べた (表 2)。黒麹菌発酵物ではエタノール画分で 14 日目まで活性の増加がみられ ( $IC_{50}=2,324 \mu$ g/mL)、水画分では 7 日目に最も高い阻害活性 ( $IC_{50}=16 \mu$ g/mL) を示したのち減少した。乳酸菌発酵物ではエタノール画分および水画分において 14 日目まで活性の増加がみられ、エタノール画分では  $IC_{50}=11,305 \mu$ g/mL、水画分では  $IC_{50}=29 \mu$ g/mL であった。

表 1 試験管発酵系における富有柿効果発酵物の  $\beta$ -リパーゼ阻害活性

発酵菌	発酵期間 (days)	$\beta$ -リパーゼ阻害活性 ( $IC_{50}=\mu$ g/mL)	
		エタノール画分	水画分
黒麹菌	0	—	2,043
	7	—	580
	14	248	2,282
乳酸菌	0	—	76
	7	25,160	134
	14	20,431	85

表 2 バツフルフラスコ発酵系における富有柿効果発酵物の  $\beta$ -リパーゼ阻害活性

発酵菌	発酵期間 (days)	$\beta$ -リパーゼ阻害活性 ( $IC_{50}=\mu$ g/mL)	
		エタノール画分	水画分
黒麹菌	0	—	2,591
	7	7,144	16
	14	2,324	77
乳酸菌	0	—	2,591
	7	13,028	114
	14	11,305	29



表3 黒麹菌および乳酸菌発酵物水画分の ACE 阻害活性

発酵期間 (days)	ACE 阻害活性 ( $IC_{50} = \mu\text{g/mL}$ )	
	黒麹菌	乳酸菌
0	683	683
7	183	166
14	487	58

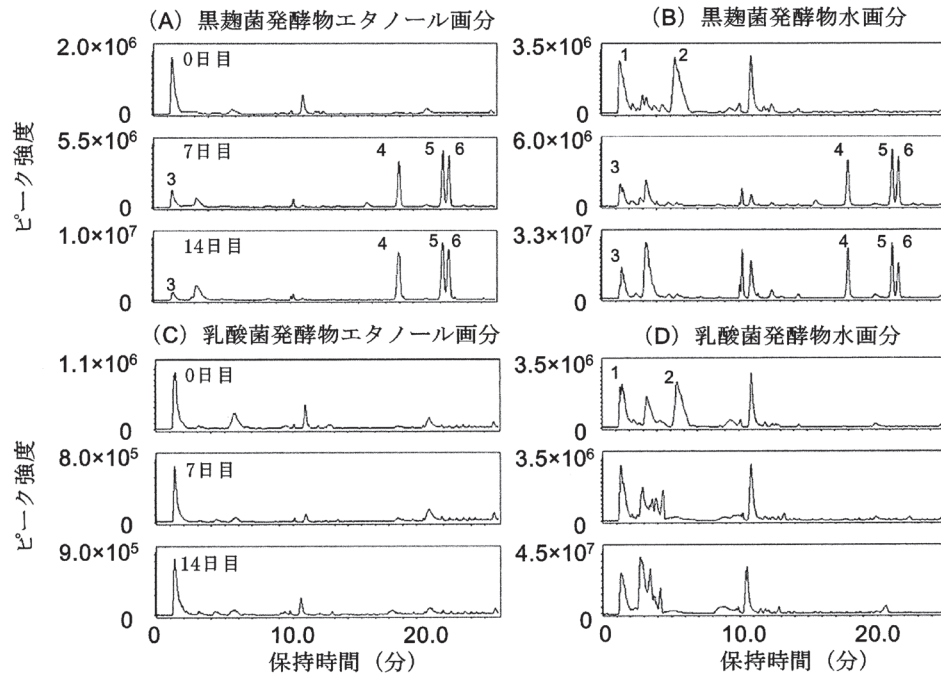


図1 黒麹菌発酵物および乳酸菌発酵物由来成分の LC/MS 解析  
 カラム: Scherzo SS-C18 (150 mm×2 mm-i.d., 粒径 3  $\mu\text{m}$ ); 測定機器: Agilent Technologies 6430 triple Quad LC/MS; イオンモード: ポジティブ。A: 黒麹菌発酵物エタノール画分; B: 黒麹菌発酵物水画分; C: 乳酸菌発酵物エタノール画分; D: 乳酸菌発酵物水画分。

ACE 阻害活性では黒麹菌発酵物は7日目に最も高い阻害活性を示し,  $IC_{50} = 183 \mu\text{g/mL}$ であった(表3)。乳酸菌発酵物は14日目まで阻害活性の増加がみられ, 黒麹菌発酵物よりも高い阻害活性,  $IC_{50} = 58 \mu\text{g/mL}$ を示した。これらのことより, 黒麹菌および乳酸菌において発酵による $\beta$ -リパーゼ阻害活性増強の再現性が得られたほか, これらの菌は発酵により ACE 阻害活性も増強することが示唆された。

#### 4. 富有柿幼果および発酵物由来成分の解析

黒麹菌および乳酸菌発酵物抽出液の LC/MS 解析を行い, 成分の経時変化を調べた(図1)。0日目水画分において, 富有柿幼果由来成分としてピーク1(保持時間1.3分,  $[M+H]^+ 343.1$ ,  $[M-H]^- 341.1$ )およびピーク2(保持時間5.3分,  $[M+H]^+ 176.1$ ,  $[M-H]^- 174.1$ )を検出した(図1B)。LC/MSおよびLC-Q-TOF/MSの結果より, ピーク1をスクロース, ピーク2をシトルリンと同定した。スクロースとシトルリンは黒麹菌および乳酸菌ともに7日目には発酵にともなう減少あるいは消失がみ

られた。

黒麹菌発酵物では, 7日目に発酵生成物とみられるピークが検出された(図1A, B)。ピーク3(保持時間1.3分,  $[M+H]^+ 183.1$ ,  $[M-H]^- 181.1$ )は標品との比較によりマンニトール, もしくはソルビトールと推定した(図2)。しかし, 両化合物は同じ保持時間およびフラグメントパターンを示したため, 同測定条件下では判別ができなかった。そこで GC-MS 分析を行ったところ, 保持時間15.9分にマンニトールと同様の保持時間および分子イオンピーク ( $m/z$  319.2), フラグメントパターンを示すピークが検出された(図3)。異性体のソルビトール, ガラクチトール, イジトールとは保持時間に相違がみられたため, 同化合物をマンニトールと同定した。

ピーク4(保持時間18.0分,  $[M+H]^+ 240.1$ ), ピーク5(保持時間21.2分,  $[M+H]^+ 254.1$ ), ピーク6(保持時間21.6分,  $[M+H]^+ 254.1$ )について, ピーク5および6は分子イオンピークおよびスペクトルパターンが類似していたことから構造異性体である可能性が示唆され

富有柿幼果の発酵

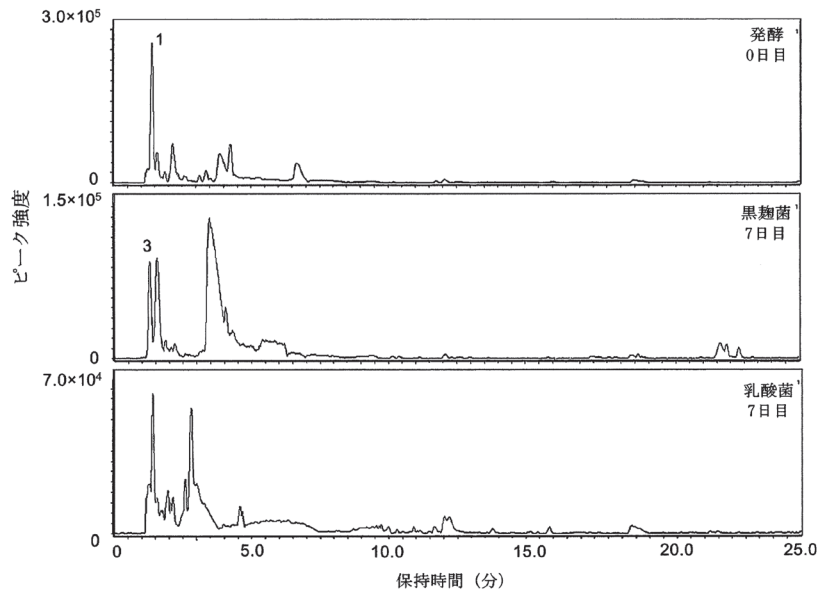


図2 黒麹菌発酵物および乳酸菌発酵物7日目水画分の発酵生成物比較  
 カラム：Scherzo SS-C18 (150 mm×2 mm-i.d., 粒径 3 μm)；測定機器 Agilent Technologies 6430 triple Quad LC/MS；イオンモード：ネガティブ；発酵0日目：煮沸処理後の富有柿幼果水画分；黒麹菌7日目：発酵7日目黒麹菌発酵物抽出液（水画分）；乳酸菌7日目：発酵7日目乳酸菌発酵物抽出液（水画分）。

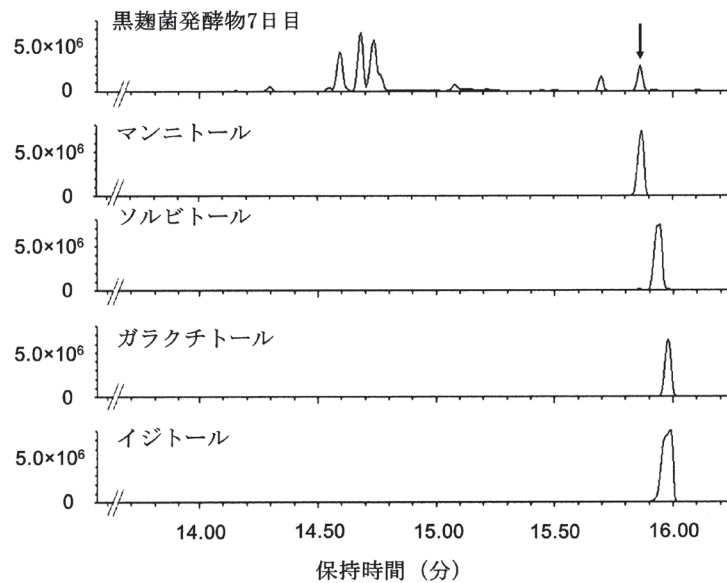


図3 GC-MS分析による黒麹菌発酵物, マンニトールおよびマンニトール異性体の比較 (部分)  
 GG装置：アジレントテクノロジー製 Agilent 6890N；検出器：アジレントテクノロジー製 Agilent 5972；カラム：アジレントテクノロジー製 J&W DB-5 (30 m×0.25 mm-i.d., 膜厚 0.25 μm)；イオン化：EI (イオン化電圧 70 eV)；トリメチルシリル誘導体化。

たが、ピーク4を含めて同定には至らなかった。また、マンニトールを含むこれらのピークは14日目まで著しい減少および消失はみられなかった。

乳酸菌発酵物はスクロースおよびシトルリンの消失は黒麹菌発酵物と同様の傾向を示したが、黒麹菌発酵物で検出されたピーク4, 5, 6の成分は認められなかった(図1C, D)。また、LC/MS分析(図2)およびGC-MS分析ともにマンニトールおよびマンニトール異性体は検出されなかった。乳酸菌発酵物では2.0分から5.0分において発酵生成物とみられるいくつかのピークが検出された。黒麹菌と乳酸菌では発酵生成物に相違がみられたことから、各種阻害活性に関与する化合物もまたそれぞれ異なる可能性が示唆された。

## 考 察

柿効果は可溶性タンニンを含むため、発酵菌のタンニン耐性は重要である。乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* はタンナーゼ生産<sup>9)</sup>に関する報告があり、黒麹菌 *Aspergillus awamori* は茶 (*Camellia sinensis*) を発酵させて作る後発酵茶<sup>10)</sup>の報告より、タンニン耐性を有することが推測された。結果、いずれも単独で生育を示したため、これらは柿由来タンニン存在下でも発酵が可能であることがわかった。また、安定した発酵のため、素材の殺菌法として煮沸処理を検討した。同処理法は成分の流出が若干認められたが、果肉の著しい変質はなかった。また、菌の生育が良好であったため発酵には著しい影響を与えないと判断した。また、 $\beta$ -リパーゼ阻害活性の増加に関して再現性が得られたため、煮沸処理は目的外の菌の繁殖を抑制し、安定した発酵に寄与したと推測した。*A. awamori* はクエン酸<sup>12)</sup>、*L. lactis* は抗菌ペプチドであるナイシン<sup>13)</sup>の生成が報告されており、菌の性質を利用することでより安定な発酵が可能になると考えられた。

黒麹菌発酵物でみられた軟化は、碁石茶<sup>14)</sup>と同様、栄養源獲得を目的としたセルラーゼによる細胞破壊と推定した。一方、乳酸菌発酵物では軟化は認められなかったため、乳酸菌は試料表面あるいは浸漬水に浸出した成分を利用した生育、発酵を行うと推測した。また、いずれの発酵物も刺激臭は認められなかったことから、同発酵系では無臭柿渋の製造<sup>3)</sup>で報告されたプロピオン酸のような悪臭あるいは刺激臭をともなう有機酸生成がないことが示唆された。

抽出法としてエタノール抽出および水抽出を併用した結果、発酵生成物はエタノール画分および水画分に分離した。そのため、各種阻害活性の増減は、発酵生成物の総合的な活性の推移を示すものではない。しかし、原料の富有柿効果も同様の方法で抽出を行い比較したため、各画分について発酵による活性の増強が確認できたと判断した。

柿の効果には脂質代謝改善および血糖値低下効果が確認されている<sup>15)16)</sup>。実験に用いた効果はほぼ同時期に摘

果したものであるが、原料そのものが有する $\beta$ -リパーゼ阻害活性に相違がみられた。これは効果の大きさや成分および成分量に個体差があることを示唆している。しかし、各発酵系に用いたどの効果においても各種阻害活性の増強はみられた。これらのことより、成分の個体差があっても発酵による一定の機能性増強効果は得られることを明らかにした。また、同発酵系では黒麹菌および乳酸菌ともに発酵7日目以降に活性が増強するという傾向が得られた。同発酵法が有する課題として菌の生育状況や代謝の違いによる発酵や機能性成分生成のばらつきが考えられたが、これらは発酵条件の検討により改善できると考えられた。

黒麹菌発酵物は $\beta$ -リパーゼ阻害活性で14日目に活性の減少がみられたが消失はなく、スケールアップ後も安定した阻害活性を示した。乳酸菌も同様に $\beta$ -リパーゼ阻害活性の増加を示した。乳酸菌は菌そのものが機能性を示すプロバイオティクス細菌として注目されている。しかし、*L. lactis* の場合、菌体は $\beta$ -リパーゼに対する阻害を示さなかった<sup>17)</sup>ことが報告されているため、同菌の発酵による $\beta$ -リパーゼ阻害活性の増加は発酵生成物に起因することが考えられた。そのほか、黒麹菌および乳酸菌発酵物ではACE阻害活性の増強もみられた。このことは、発酵により富有柿効果が有する複数の機能性を増強できることを示した。既報の柿果汁の酵母発酵物<sup>7)</sup>では高い $\beta$ -リパーゼ阻害活性が報告されているが、素材および測定法が異なるため比較が困難であった。カワラケツメイ由来成分(IC<sub>50</sub>=2.0  $\mu$ g/mL)や緑茶抽出成分(IC<sub>50</sub>=3.0  $\mu$ g/mL)は高い $\beta$ -リパーゼ阻害活性を示し、機能性成分として緑茶のカテキン類、カワラケツメイでは縮合型タンニン<sup>11)</sup>が同定されている。しかし今回のLC/MS解析ではこれらの化合物は検出されなかった。このため、富有柿効果発酵物ではタンニンやカテキンとは異なる成分が機能性に関与する可能性が示唆された。また、発酵法においても、抽出や発酵条件の検討を行うことで発酵の安定とさらなる機能性向上も可能であると考えた。

発酵生成物の解析に関して、原料である柿効果にはスクロース、シトルリンが含まれることを確認した。富有柿効果にはシトルリンやパリンをはじめとした遊離アミノ酸が含まれており、シトルリンは柿効果においてアミノ酸総量の40%を占めると報告されている<sup>18)</sup>。これらの化合物は7日目までに消失したため、菌の生育に際し炭素源および窒素源として消費されたと推定した。発酵の結果とあわせ、富有柿効果は*A. awamori* および*L. lactis* の生育に必要な最低限の栄養を備えた素材であるといえる。黒麹菌と乳酸菌発酵物ではクロマトグラム上では発酵生成物に大きな相違がみられたため(図1, 2)、機能性に関与する化合物が異なる可能性が示唆された。黒麹菌発酵物で確認されたピークの多くは14日目まで消失せず、生成後に分解あるいはさらなる代謝を受けにくい化合物であることがわかった。また、黒麹菌発酵生成



物として同定したマンニトール (図3) は ACE 変換酵素阻害活性<sup>19)</sup>が報告されている。そのため、マンニトールの生成が発酵7日目の ACE 阻害活性増加に関与する可能性が考えられた。乳酸菌発酵物ではマンニトールの生成がみられなかったため、ACE 阻害活性の増加にはマンニトール以外の化合物が関与することがわかった。

以上の結果から、黒麹菌および乳酸菌を用いた発酵により、富有柿効果の機能性の増強が可能であることが明らかになった。富有柿効果は発酵菌の炭素源、窒素源となる成分を有しており、機能性成分生産あるいは発酵食品として活用できる可能性が示唆された。

## 文 献

- 鶴永陽子, 高橋哲也, 山下稚香子, 鈴木秀規, 牧慎也, 松本敏一, 松崎 一, 近重克幸, 生田千枝子 (2012) 可溶性カキタンニンの化学反応性を利用したカキ洋菓子の製造, 日本家政学会誌 **63**, 185-92.
- 菅原哲也, 五十嵐喜治 (2014) 庄内柿の機能性を活かした食品加工技術開発と商品開発, 日本食品科学工学会誌 **61**, 339-45.
- 吉田 清, 稲橋正明, 野呂二三, 村上英也 (1985) 渋柿から分離した酵母の特性と異臭のない柿渋製造試験, 日本醸造協会雑誌 **7**, 471-5.
- 中嶋 実, 中川秀幸, 本江 薫, 山下市二, 青木章平 (1987) 三社柿から分離した酢酸菌による柿酢発酵過程の成分変化, 日本食品工業学会誌 **34**, 818-25.
- 九州大学, 福岡県醤油醸造協同組合, 株式会社レオロジー機能食品研究所, 柿の抗酸化活性機能増強法および健康食品素材, 特開 2010-252726, 2010-11-11.
- 亀岡俊則, 中野長久, 庄條愛子, 細谷圭助, 藤田永治 (2012) 養豚の疾病予防効果の高い柿高密度乳酸発酵飼料の開発, 畜産の研究 **66**, 707-10.
- ゼリア新薬工業株式会社, 抗肥満剤, 特許第 3404235 号, 2003-02-28.
- Wulandari RA, Haraguchi N, Nakano S, Furukawa Y, Tanaka T, Kouno I, Kitagaki H, Ishimaru K (2011) Teadenols biotransformed from tea catechins. 日本食品化学学会誌 (*Jpn J Food Chem Saf*) **18**, 137-42.
- Varsha, Mukherjee A, Bhanwar S, Ganguli A (2014) Characterization of tannase production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and its potential in enhancing nutritional value of a composite sourdough. *International Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **5**: 77-84.
- 株式会社レオロジー機能食品研究所, 福岡県醤油醸造協同組合, 国立大学法人九州大学, 一番食品株式会社, 発酵茶および薬効性組成物, 特開 2010-220489, 2010-10-07.
- 小島芳弘, 村中 隆 (2012) カワラケツメイに含まれる新規タンニンおよびそのリパーゼ阻害活性, 日本食品科学工学会誌 **59**, 279-83.
- 谷口亜樹子, 鈴木昌治, 小泉武夫 (2001) 稲麹粒から分離した多酸性麹菌 *Aspergillus oryzae* のクエン酸生産能, 日本食品保蔵科学会誌 **27**, 339-42.
- Ennahar S, 善藤威史, 園元謙二, 石崎文彬 (1999) 北部九州地方の熟成したぬか床から分離した乳酸菌が生産するバクテリオシン, 日本乳酸菌学会誌 **10**, 29-37.
- 岡田早苗, 高橋尚人, 小原直弘, 内村 泰, 小崎道雄 (1996) 碁石茶の発酵に関する微生物, 日本食品科学工学会誌 **43**, 1019-27.
- 八尋産業株式会社, 未成熟柿果実粉末組成物とその製造方法, 特開 2008-63332, 2008-03-21.
- 石川県公立大学法人, 中野 BC 株式会社, 血糖値低下効果を有する柿果実粉末組成物, 特開 2013-35803, 2013-02-21.
- 松村 敦 (2010) プロバイオティクス細菌によるリパーゼ阻害作用, 腸内細菌学雑誌 **24**, 287-92.
- 松下アヤコ (1964) 母および柿の成育過程における遊離アミノ酸含有量の変化に関する研究, 栄養と食糧 **17**, 99-101.
- Kiyoto M, Suzuki H, Hara T, Yagi Y, Cho N, Aoyama M (2005) Moderate angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from the fruit body of *Sarcodon aspratus*. *Mushroom Science and Biotechnology* **13**: 189-94.

*J Jpn Soc Nutr Food Sci* 68: 225-232 (2015)

### Research Note

## Fermentation of Immature Fruit of *Diospyros kaki* 'Fuyu' Using *Aspergillus awamori* and *Lactococcus lactis* to Increase Its Functionality

Chika Orii<sup>\*,1</sup>

(Received April 23, 2015; Accepted June 19, 2015)

**Summary:** Young unripe persimmon fruit is a waste material and environmental burden. We studied whether fermentation using *Aspergillus awamori* and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* would be effective for utilization of immature *Diospyros kaki* 'Fuyu' fruit. These microorganisms caused an increase of inhibitory activity against  $\beta$ -lipase. An aqueous fraction of material fermented with *A. awamori* showed the highest activity against  $\beta$ -lipase ( $IC_{50} = 16 \mu\text{g/mL}$ ) at day 7, whereas an aqueous fraction of material fermented with *L. lactis* showed the highest anti- $\beta$ -lipase activity ( $IC_{50} = 29 \mu\text{g/mL}$ ) at day 14. Additionally, material fermented with both *A. awamori* and *L. lactis* showed increased activity against angiotensin converting enzyme. The fruit of 'Fuyu' contains sucrose and citrulline, and these compounds disappeared by day 7 of fermentation. The fermentation products of *A. awamori* differed from those of *L. lactis*; mannitol was identified from the former, but not from the latter. These results indicate that *A. awamori* and *L. lactis* produce different compounds that are involved in inhibitory activities. Therefore, fermentation of immature fruit of the persimmon variety 'Fuyu' using *A. awamori* and *L. lactis* increases its functionality, suggesting that such immature persimmon could be utilized as a new material for functional foods.

**Key Words :** *Diospyros kaki* 'Fuyu', immature persimmon, fermentation, *Aspergillus awamori*, *Lactococcus lactis*

\* Corresponding author (E-mail: chika\_orii@shokuken.or.jp)

<sup>1</sup> Toyo Institute of Food Technology, 4-23-2, Minami-Hanayashiki, Kawanishi, Hyogo, 666-0026, Japan