# 甘酒中のレジスタントプロテインの機能性解析について


| | |
|---|---|
| 誌名 | 日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan |
| ISSN | 09147314 |
| 著者名 | 尾関,健二 |
| 発行元 | 日本醸造協会 |
| 巻/号 | 117巻9号 |
| 掲載ページ | p. 627-634 |
| 発行年月 | 2022年9月 |



農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

AgriKnowledge

# 甘酒中のレジスタントプロテインの機能性解析について

**甘酒は，美容や健康への効果で注目を集めている発酵食品である。甘酒中の機能性成分については様々な研究があるが，著者は，米由来の難消化性タンパク質であるレジスタントプロテインが甘酒中に存在しており，有効成分として機能している可能性を見出した。甘酒のレジスタントプロテイン量を高める方法や，甘酒で確認された新たな機能性についても解説した。**

尾関健二

## 1. はじめに

甘酒は麹由来のものと酒粕由来のものに大別され，俳句では夏の季語にもなっているように長い飲用の歴史があるが，その割には研究報告が少ない。成分分析では麹甘酒にはイソマルトースなどの分岐鎖オリゴ糖が多く[1]，麹由来のグルコシルセラミドも含有されている[2]。機能性研究としては動物実験で肥満抑制，血圧上昇抑制などの生活習慣病の予防効果がある報告があり[3]，ヒトでは脂質代謝の改善効果や便通改善効果が報告された[4,5]。また健常者の食後血糖上昇を抑制する効果[6]や長期摂取による安全性検証試験[7]など，甘酒の認知度が増すにしたがって新たな機能性が広がってきた。

難消化性タンパク質であるレジスタントプロテイン（RP）は1998年に日本食物繊維学会で，ヒトの消化酵素で消化・吸収され難く，消化管を介して健康維持に役立つ生理機能を持つタンパク質と定義された。最初の報告は蕎麦タンパク質からであり[8,9]，その後絹タンパク質[10]，大豆タンパク質[11]や酒粕特に液化仕込みの酒粕[12,13]に多く含有しているとの報告があった。米タンパク質は消化されるタンパク質であるグルテリン（米ではオリゼニン）が80％程度あり，残りの10-15％が消化されにくいプロラミンとしてプロテインボディーⅠに存在している[14]。酒粕では日本酒発酵中に米麹のプロテアーゼによりオリゼニンはかなり分解され，最終的に米由来のプロラミンが濃縮された形で酒粕中に残存する。RPの機能性として動物実験により脂質代謝の改善効果や肥満抑制効果などがあり，ヒトにおいては便通改善効果，LDL-コレステロール低減効果や肥満抑制効果があることが証明された[15]。

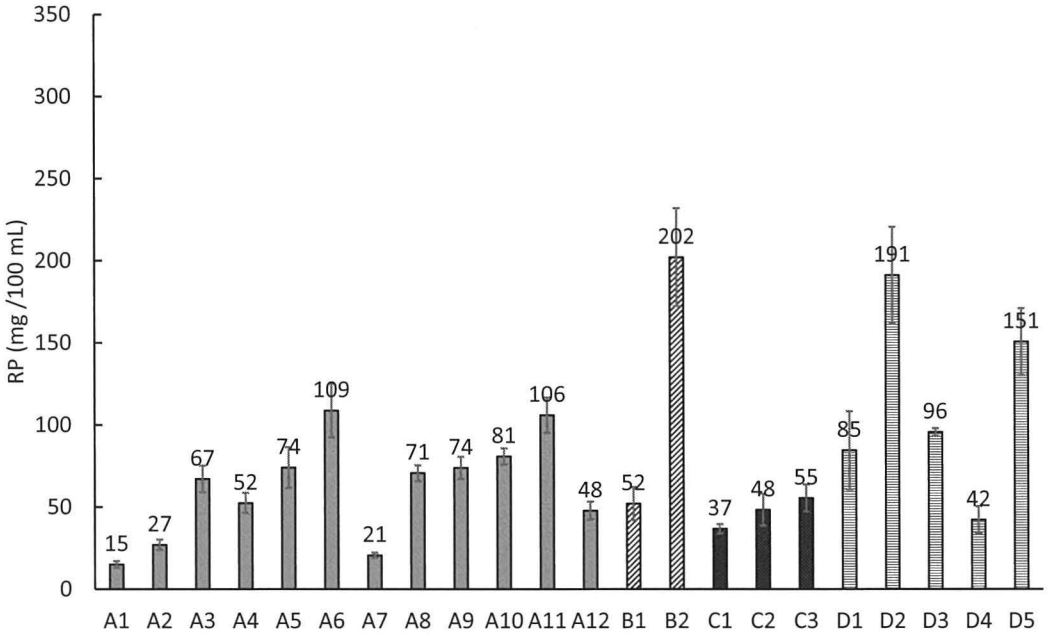
そこで甘酒とRPのこれまで報告されている機能性と重複する部分もあるが，RPの定量法を確立後に市販甘酒中のRP量を測定した[16]。その結果，全ての市販甘酒にRPが存在しており，コップ1杯の150mLで有効量を超える甘酒が何点もあることが分かった。

これまでに麹由来の甘酒では55-60℃での一晩糖化中に，米と麹のRPが麹のプロテアーゼによりどの程度分解されるかの報告はない。そこで原料米や麹の種類を変えた場合の甘酒製造中のRPの残存量の違いを検討し，RPの残存率を高める製法を検討した。またヒトでの機能性研究としてRP高含有の甘酒を飲用後の角質水分量と腸内細菌叢に与える影響について試験を行った。

## 2. RP定量法の確立と市販甘酒の分析

酒粕由来の市販サプリメントであるプロファイバープラス（大関株式会社）の有効量は6粒（1.464 g）であり，6粒中の酒粕発酵物は750 mgである。酒粕発酵物に含まれるRPはおよそ15%であると報告[4]されているので，RPの有効量は113 mgと算出でき，市販サプリメント1 gに含まれるRP量は77 mgであ

Functional Analysis of Resistant Protein in Amazake
Kenji Ozeki (*Genome Biotechnology Laboratory Kanazawa Institute of Technology*)

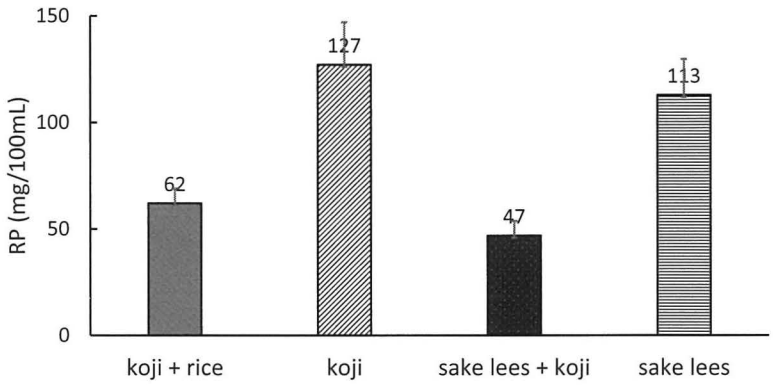



**第1図**　甘酒 100 ml 中の RP 量

る。酒粕発酵物には米由来の RP であるプロラミン（13kDa）が濃縮されていることが報告されている[14,15]ので，酒粕発酵物を含むサプリメントを用いて，RP の検量線を作成した。サプリメントの粉砕試料を 1 g，2% SDS-8 M 尿素 50 mM リン酸バッファー（pH 6.8）25 mL に入れ，ハイパワーホモジナイザーで分散・可溶化させた。常法に従ってポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った後，染色・脱色したゲルを Image J（画像処理アプリ）で解析し RP を定量した。

分析した市販甘酒には原料別に分けて 4 区分あり，麹＋米（koji + rice）；12 種類：A1-12，麹（koji）；2 種類：B1-2，酒粕＋麹（sake lees + koji）；3 種類：C1-3，酒粕（sake lees）；5 種類：D1-5 の計 22 種類の RP 量を測定した。甘酒 40 mL を遠心分離（8000 rpm，15 min）し，40 mL 中の固形分量を量った後，均一にするため固形分を混ぜ，1 g 量り取って，固形分 1 g 中の RP 量を測定した。

甘酒 22 種類の RP 量（mg/100 mL）を第 1 図に示




**第2図**　甘酒 100 ml 中の RP 量

した。RPとして測定した13 kDaのタンパク質はプロラミンであり[13,14]，各甘酒のプロラミン量の測定を行ったことになる。RPにはLDL-コレステロースを低減する効果や便通改善効果があり[8]，甘酒にも同様な効果の報告があった[9]。このような甘酒の機能性をRPで説明できると考え，市販甘酒のRP含量を分析したわけだが，その結果コップ1杯に相当する150 mLで有効量である113 mgを超えるRP量を含む甘酒は，22種類中で8種類あった。従ってこれまで報告されている甘酒の機能性としてコレステロール改善や便通改善効果の主体はRPで説明できることが分かった。

製法別でRP量を分類して平均値と標準偏差で示すと第2図のようになる。麹甘酒はAとB合わせて14種類あったが，その中で有効量である113 mgを超えるRPを含む甘酒は4種類あり，その内麹のみ（B）では1種類，麹＋米（A）では3種類であった。酒粕甘酒（CとD）では8種類中で4種類が有効量を超えていたが，その内酒粕のみ（D）で4種類あり，酒粕＋麹（C）では認められなかった。各社各様の製法のため，麹の使用量や糖化温度，時間などが明確ではないが，傾向としては酒粕の甘酒にRPの有効量を超える割合が高かった。酒粕にはRPが多く濃縮されているという報告[7]があり，原材料に酒粕と表記されている甘酒にRPの含量が多く認められる結果と一致していた。

## 3. RP量を高める原料米と製法の検討

どぶろく醸造で低グルテリン米[17]であるユメカナエの品種を使うとRP量をコシヒカリに比べ6倍程度高めることが可能であったので，原料米を変更することで甘酒のRP量を高める効果がどの程度あるかを試験した（第1表）。また甘酒仕込みで麹の種類として第1表の4種類の麹を用い，昇温時間を各種検討し，原料由来のRP量が甘酒に残存する割合（残存率）を算出し，原料米，麹の種類，糖化製法でRP量に影響する検討を加えた。この時の甘酒の小仕込み配合を第2表に示した。

コシヒカリの甘酒のRP量を第3図にまた各甘酒のRP残存率を第3表に示した。

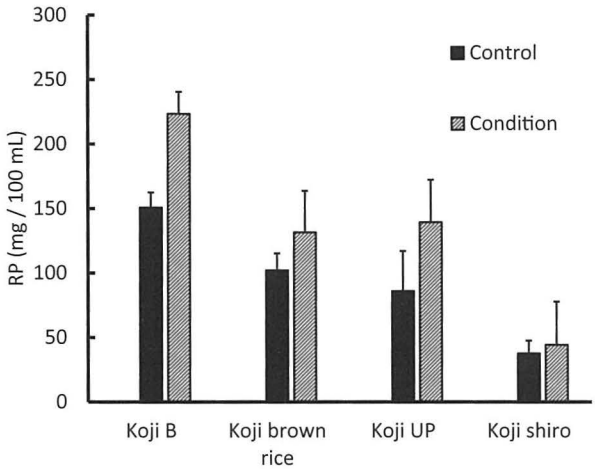
コシヒカリの甘酒における麹の種類によるRPの残存率では，Koji Bの甘酒が100 mL当りの113 mgの

**第1表**　原料の種類

| 米 | コシヒカリ | ユメカナエ（低グルテリン米） | | |
|---|---|---|---|---|
| 麹 | Koji B | Koji brown rice | Koji UP | Koji shiro |
| 糖化 | 55℃，22h(Control) | 35℃，2h→45℃，2h→55℃，18h Condition) | | |

**第2表**　甘酒小仕込み

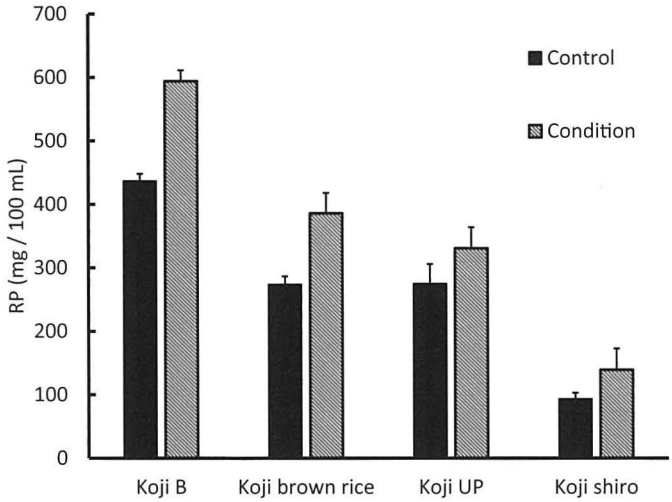
| | |
|---|---|
| 米(g) | 18.5 |
| 麹(g) | 8.5 |
| 水(mL) | 23 |




**第3図**　コシヒカリの甘酒のRP量

**第3表**　コシヒカリの甘酒のRP残存率

| 条件 | Koji B(%) | Koji brown rice(%) | Koji UP(%) | Koji shiro(%) |
|---|---|---|---|---|
| 55℃，22h | 55 | 51 | 33 | 16 |
| 昇温 | 81 | 65 | 53 | 19 |




**第4図**　ユメカナエの甘酒のRP量

**第4表**　ユメカナエの甘酒のRP残存率

| 条件 | Koji B(%) | Koji brown rice(%) | Koji UP(%) | Koji shiro(%) |
|---|---|---|---|---|
| 55℃，22h | 42 | 38 | 27 | 9 |
| 昇温 | 57 | 40 | 32 | 14 |

有効量を超えるが，Koji brown rice，Koji UP，Koji shiroの順でRP含量が減少した。このことから甘酒の糖化過程で麹のプロテアーゼによるRPの分解が起きることが分かった。しかし糖化温度をゆっくり昇温すると，どの麹区分でもプロテアーゼによる分解が抑制される効果が認められ，Koji BではRP残存率を55%から81%まで高めることが可能であった（第3表）。

低グルテリン米であるユメカナエの甘酒のRP量を第4図にまた各甘酒のRP残存率を第4表に示した。

ユメカナエの甘酒では，コシヒカリの甘酒と同様にKoji Bの麹を使用した場合のRP含量が一番高くなった。通常の糖化条件で比べると，コシヒカリより約3倍RP量を増やす原料米であることが分かった。またゆっくり昇温する糖化条件の効果もどの麹区分でも認められた。Koji Bではコシヒカリの通常の糖化条件の甘酒のRP量に比べ，ゆっくり昇温する区分ではRP量が約4倍高くなることが判明した。昇温をゆっくり行うことで，アミラーゼによるデンプン質の分解とプロテアーゼによるタンパク質の分解がともに抑制された可能性が示唆される。

## 4. 甘酒のヒト飲用試験

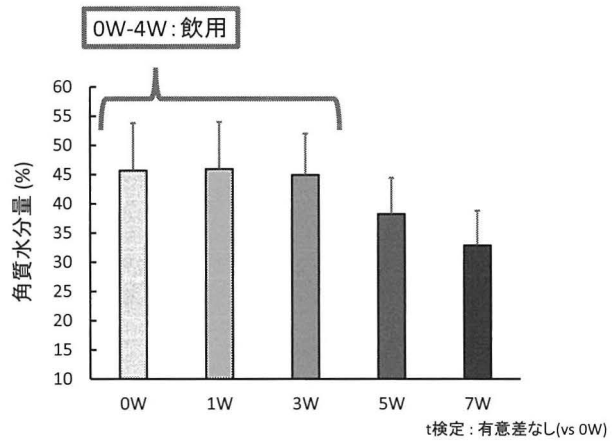
### 4.1 角質水分量への影響

金沢工業大学の倫理委員会の同意を得て後，学生パネラーを対象として各甘酒の4週間の飲用試験（15時頃に接収し，食事制限はなし）を実施した。低グルテリン米である春陽を用いて厚生産業株式会社で作製した甘酒を飲用した。今回の使用甘酒のRP量と試験期間とパネラー人数を第5表に示した。

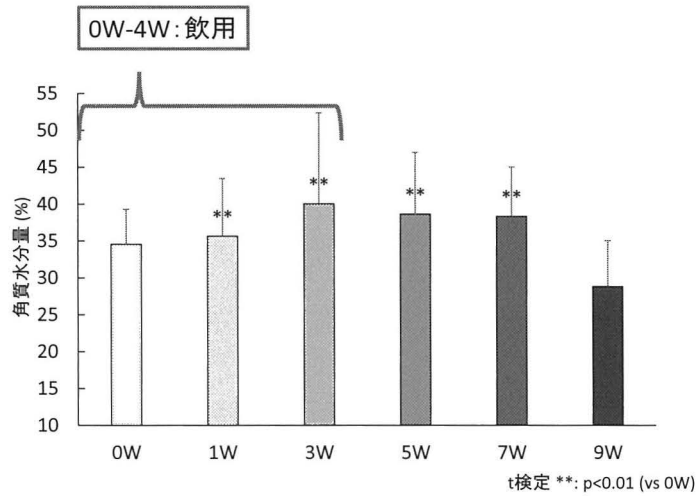
通常の甘酒（106mgRP）を4週間飲用しても，飲用前と飲用中および飲用終了3週までに飲用前の0週と比較して角質水分量に有意差は出なかった(第5図)。565mgのRPを含有する甘酒を4週間飲用する試験では，飲用前の0週と比べて飲用開始1週目から角質水

**第5表**　甘酒の飲用試験

| RP量(mg/125 mL) | 試験年月間 | 学生パネラー(人) | 結果 |
|---|---|---|---|
| 106 | 2018. 9-10 | 6 | 第5図 |
| 565 | 2018. 11-12 | 6 | 第6図 |
| 247 | 2019. 10-12 | 6 | 第7図 |



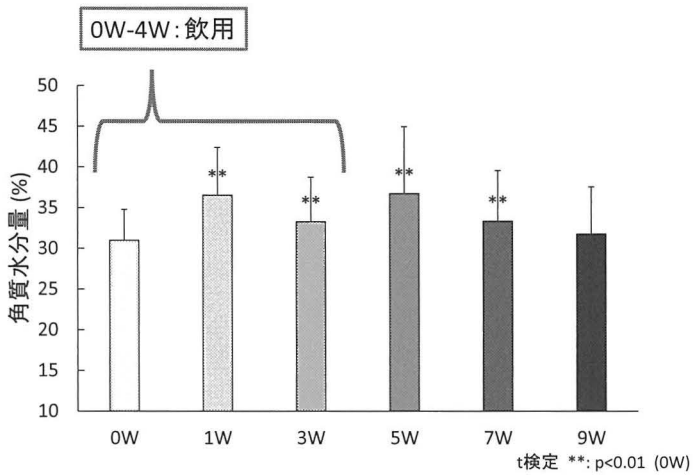

**第5図**　甘酒(RP；106 mg/125 mL)飲用による角質水分量



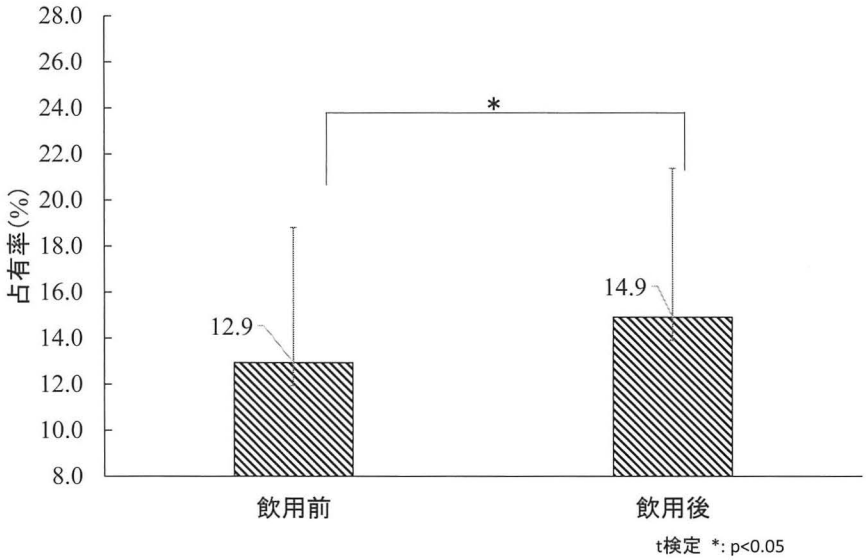

**第6図**　甘酒(RP；565 mg/125 mL)飲用による角質水分量

分量が高くなる有意差が認められ，飲用終了後3週まで有意差があった（第6図)。247mgRP甘酒では飲用1週目から角質水分量が高まり，飲用終了後3週目まで角質水分量が高い状態が継続することが分かった(第7図)。

RP量が106mgと247mgの甘酒のグルコシルセラミド量は0.87mg/125 mLと0.63mg/125 mLとほとんど変わりはないので，この影響で角質水分量が高まったのではなく，RP量が247mgを超えると角質水分量が高められるという新規の機能性が確認できた。この結果は450mgのRPを含有する酒粕甘酒を1週間飲用する飲用試験で，女性パネラーの飲用後1週目で平均3%，飲用を止めた後1週目で更に8%まで角質水分量が上昇する結果と一致した[18]。




**第7図**　甘酒(RP；247 mg/125 mL)飲用による角質水分量

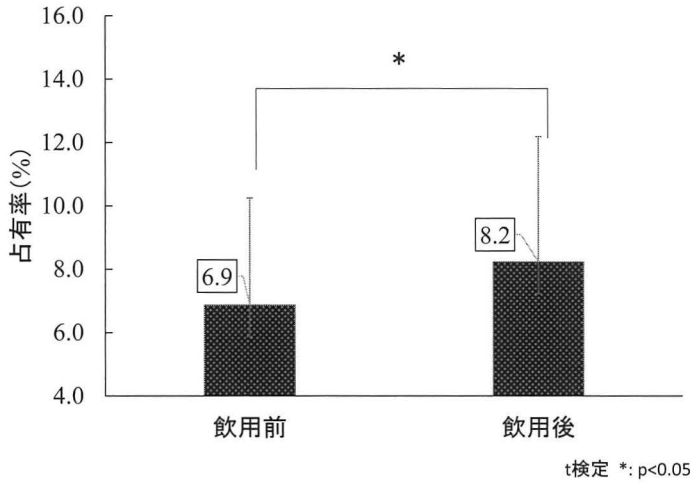



**第8図**　甘酒(RP；247 mg/125 mL)飲用前後の酪酸生産菌

### 4.2　腸内細菌叢への影響

学生パネラーの飲用試験に用いた247mg RP/125 mL甘酒を厚生産業株式会社の20-50代パネラー25名で30日間飲用し，前後の腸内細菌叢への影響のデータを取得した。その結果を第8，9図に示した。

飲用前の酪酸生産菌の占有率が12.9%から飲用後には14.9%となり実に2ポイント高まることが分かった(第8図)。フィーカリバクテリウム属細菌では飲用前6.9%から飲用後8.2%と1.3ポイント有意的に高まった（第9図)。酪酸生産菌やフィーカリバクテリウム属細菌は腸内菌叢の善玉菌として知られている菌である。このようにRPが高い甘酒の飲用により腸内菌叢の善玉菌を大いに活性化できることは，麹甘酒には分岐鎖のオリゴ糖が豊富に含まれており[1]，これが腸内細菌の炭素源となることが原因と考えられていた。さらに今回のRP高含有の甘酒には炭素源のオリゴ糖と窒素源となるRPの両者が豊富に含まれていることにより，腸内菌叢改善効果が大いに高められたと考えられる。




**第9図**　甘酒(RP；247 mg/125 mL)飲用前後のフィーカリバクテリウム属

## 5. おわりに

市販サプリメントのRP量を標準として市販甘酒のRPを定量する方法を開発した。市販甘酒22点のRP量を定量すると，全ての甘酒にRPが存在することが分かった。試料には麹＋米の区分の甘酒の種類が多かったが，各社各様の製造法があるが酒粕を含有する甘酒にRP量が多い傾向であった。これは酒粕にはRPが濃縮されている報告[15]と合致した。

原料米では低グルテリン米を使用することにより，甘酒のRP含量を3倍程度高められることが分かったが，どぶろく醸造では6倍（RPの残存率90％以上で15℃発酵ではプロテアーゼ分解はほとんどない）高められるので，甘酒製造過程で50％程度のRPが麹のプロテアーゼで分解されてしまうことも判明した。この現象を少しでも抑えるためには糖化工程で，ゆっくり昇温させるとプロテアーゼによる分解が抑えられた。これはRPの分解とデンプンの分解が協調していることも考えられ，メカニズムを詳細に解明していく必要がある。

RP量113mgでコレステロール低減，便通改善，肥満抑制効果が報告されているが[4]，247mgの摂取で更に腸内菌叢を大いに改善でき，角質水分量までも高められることが確かめられた。

腸内菌叢を改善することにより，例えば悪玉菌が産生するフェノールやp-クレゾールなどの腐敗物質の吸収を阻害する腸管バリア機能を高め，結果的に荒れ肌物質の吸収を抑え，角質水分量を高める効果があった[19]とも考えられるが，詳しいメカニズムの解明も必要と考えている。

これまで麹甘酒にはアミロペクチン由来の$\alpha$-1,6結合のオリゴ糖が3％程度含有する報告[1]があり，腸内細菌の炭素源としてのプレバオティクスと考えられていた。今回RPは窒素源としての新たな結果を取得し，両栄養源が合わさることによりプレバイオティクスとして大いに効果を発揮すると考えられる。従って甘酒は現在のコロナ禍では腸内菌叢を改善することで免疫力を高める最善な飲料であると推測している。

## 6. 謝　辞

市販甘酒，原料米，麹の提供および腸内菌叢試験にご協力いただいた厚生産業株式会社に感謝いたします。

〈金沢工業大学　ゲノム生物工学研究所〉

## 参考文献

1) Yshifumi Oguro, Ayana Nakamura, Atsushi Kurahashi: *J. Biosci. Bioeng.*, **5**, 570-574 (2019)
2) Hiroshi Hamajima, Masaru Tanaka, Miyuki Miyagawa, Mayuko Sakamoto, Tsuyoshi Nakamura, Teruyoshi Yanagita, Megumi Nishimukai, Susumu Mitsutake, Jiro Nakayama,Koji Nagao：*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **83**,

1514-1522 (2019)
3) 大浦新，鈴木佐知子，秦洋二，川戸章嗣，安部康久：醸協，**102**，781-788（2007）
4) 渡辺敏郎：醸協，107，282-291（2012）
5) 森貞夫，守田稔，松生恒夫：薬理と治療，**48**，1187-1193（2020）
6) 倉島敦，中村彩奈，小黒芳史，渡辺賢一，尾崎信紘，後藤博，平山匡男：醸協，**115**，43-53（2020）
7) 倉島敦，中村彩奈，小黒芳史，米井嘉一：醸協，**115**，159-172（2020）
8) 加藤範久，栢下淳，佐々木真宏：日本栄養・食糧学会誌，**53**，71-75（2000）
9) Norihisa Kato, Kmikazu Iwami：*J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 48, 1-5（2002）
10) Masahiro Sasaki, Hideyuki Yamada, Norihisa Kato：*Food Sci. Technol. Res*, **6**, 280-283（2000）
11) Naoyuki Azuma, Keiko Machida, Tohru Saeki, Ryuhei Kanamoto, Kimikazu Iwai：*J. Nutri. Sci. Vitaminol.*, **46**, 23-29（2000）
12) 芦田優子，斉藤義幸，川戸章嗣，杉並孝二，今安聡：農化，**71**，137-143（1997）
13) 渡辺敏郎，峰時俊貴，友竹浩之，加藤範久：*Food Style 21*，**11**，51-54（2007）
14) 木崎康造，井上康裕，岡崎直人，小林信也：醸協，**86**，293-298（1991）
15) 湯川雅之，伊藤大輔，峰時俊貴，渡辺敏郎，広常正人：醸協，**104**，963-968（2009）
16) 高橋雅弥，尾関健二：醸協，**116**，719-723（2021）
17) 高橋雅弥，尾関健二：醸協，**116**，769-772（2021）
18) 尾関健二：米の機能性食品化と新規利用技術・高度加工技術の開発，テクノシステム，405-420（2022）
19) 宮澤賢司，原田岳，依田一豊：*Cosmetic Stage*，**14**，6-11（2020）

**執筆者紹介**（順不同・敬称略）

**尾関健二**＜ Kenji Ozeki ＞
1955年生まれ＜勤務先と所在地＞金沢工業大学ゲノム生物工学研究所　〒924-0838石川県白山市八束穂3-1＜略歴＞1978年岐阜大学農学部農芸化学科卒，1980年同大学農学研究科修了，同年大関株式会社総合研究所，1988～1990年株式会社醸造資源研究所・国税庁醸造試験所出向，同年大関株式会社，2004年築野食品工業株式会社企画開発室，2005年金沢工業大学バイオ・化学部応用バイオ学科教授，現在に至る＜抱負＞麹および麹発酵物の認知活動として，簡単な発酵物の甘酒と複雑な発酵物の日本酒の新たな機能性なども含めて一般消費者まで浸透したい。＜趣味＞単身赴任が長いので，実家に戻った際は家族でお出かけや旅行を楽しんでます。

**米倉裕一**＜ Yuichi Yonekura ＞
1964年生まれ＜勤務先と所在地＞地方独立行政法人岩手県工業技術センター　〒020-0857盛岡市北飯岡2丁目4-25＜略歴＞1987年岩手大学農学部農芸化学科卒，同年小岩井乳業株式会社入社，1990年岩手県醸造食品試験場（現：岩手県工業技術センター）入庁醗酵食品部，2000年岩手県工業技術センター醸造技術部，2014年地方独立行政法人岩手県工業技術センター醸造技術部長，2022年地方独立行政法人岩手県工業技術センター理事兼地域産業技術統括部長，現在に至る＜抱負＞今後も酒造業界のお役に立てれば＜趣味＞テニス（下手ですが歴だけは長いです），飲食