

## 効果的な柿酢の製造法の検討と薬理活性についての基礎的研究

三島 隆\*・卯川 裕一\*\*・渡部 愛都子\*・赤塚 智恵子\*・服部 健\*

\* 三重大学生物資源学部附属農場  
\*\* 三重大学生物資源学部食品化学研究室

### Study of Persimmon Vinegar from Fermentation and Its Pharmacological activity

Takashi MIshima\*, Yuichi Ukawa\*\*, Atsuko Watabe\*,  
Chieko Akatsuka\*, and Takeshi Hattori\*

\* Experimental Farm, Faculty of Bioresources, Mie University  
\*\* Department of Food Chemistry, faculty of Bioresources, Mie University

### Abstract

It is known that Juice of persimmon fruit (*Diospyros kaki*) exhibits an antitumor activity. The active ingredients are kaki tannins including catechin, epicatechin, epicatechingallate, epigallocatechin gallate. Since persimmon juice is too astringent, we processed juice to vinegar by means of fermentation to extinguish the astringency. The persimmon vinegar tasted soft with little astringency, probably due to the masking of astringent elements by gluconic acid, a fermentation product. Pharmacological tests revealed that persimmon vinegar has antitumor activity against Sarcoma 180.

### 緒言

人間が生きていくために欠くことのできないものとして衣・食・住を挙げることができる。その中でも食はエネルギーを摂取するのはもとより、健康をも左右することが近年になって改めて知られるようになった。人間の健康に生活をしたという願いは、マスメディアにおいても取り上げられ、近年まれにみる健康食品ブームが巻き起こっている。食物の成分が示す機能の一つとして抗酸化性、あるいは活性酸素消去能により悪性新生物（ガン）を抑制する事が知られている。その中でも渋柿ジュース（カキタンニン）がマウス皮膚発癌実験において強い発癌抑制効果があると知られている<sup>1)</sup>。柿中のタンニンは、果肉中のタンニン細胞と呼ばれる細胞の液胞中に存在する。このタンニン細胞の大きさや果肉中での分布密度が品種によって異なり、渋みの程度に差異が生じる。渋柿を食べるとタンニン細胞がつぶれてタンニンが出るために渋味を感じるためになかなかそのまま摂取できるものではない。

酢は酵母、細菌などの微生物が糖類などの有機化合物に作用してこれを分解し、アルコールなどから転じて得られ、酢酸を3~5%含む調味料である。これは多くの菌を3分以内に死滅させる強い殺菌力をもつ。酢はアルカリ性食品の代表である。胃液の分泌を高め消化を良くするため、食欲を増進させる働きをする。そして柿の実は漢方薬をはじめ成人病、高血圧、腹痛、腸出血、やけど、捻挫、

しもやけ、二日酔いなどに効果があるなど、健康面からその効果が指摘されている。

渋柿はそのままでは食用に適さないので、食用にする場合には脱渋処理が必要である。しかし渋柿を酢酸菌により発酵させて果実酢にすることにより、酢酸による渋味のマスキングが期待される。また農産物として見た場合の柿は、非常に痛みやすく、商品価値のないものが多くできる。そこで、このように農産物として商品価値を持たない渋柿を発酵させ、健康食品にふさわしい機能を有する商品価値を付加させることを目的とする。

## 材料と方法

### 菌株及び培養条件

実験には酢酸菌 *Acetobacter aceti* IFO3284 (発酵研究所、大阪) を使用した。表 1 に示す組成の液体培地に1%寒天を加えた培地を調整し、試験管内でスラントを形成させて3カ月おきに継代培養して以下の実験に供した。なお、各紙薬は和光純薬 (大阪) より購入した。

表 1 酢酸菌培養培地の組成

Polypeptone	0.5g
Yeast extract	2 g
Glucose	5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1g
Total	100ml
pH	6.6-7.0
Agar (if needed)	1 g

### 酢酸発酵条件

渋柿は三重大学生物資源学部にて平成11年11月中旬に収穫されたものを使用した。渋柿をHC-VC型ハンマークラッシャー (橋本缶詰、東京) にて破碎して渋柿ジュースとした直後に-20℃にて冷凍保存し、実験に用いるときは適宜解凍して用いた。

### 増殖曲線の測定

液体培地に酢酸菌を1白金耳植え、25℃、振とう培養にて培養した。経時的に菌体を含む培地をサンプリングし、適当に蒸留水で希釈して600nmにおける吸光度をUVDEC-320S (Jasco、東京) にて測定した。

### 酢酸発酵法の検討

酢酸発酵に供す酢酸菌は、次のように前培養を行った。100ml容の三角フラスコに培地を25ml入れ、25℃、振とう培養にて4日間培養した。発酵基質に加える前に菌体を蒸留水にて希釈し、7,000rpm 5分間遠心して菌体を集め、再度留水にて希釈し、7,000rpm 5分間遠心して菌体を集めて培地を取り除いてから以下の実験に供した。

エタノール発酵法として、渋柿ジュース500gに対して10%に当たる50mlを加えたものに、あらかじめ

め前培養した酢酸菌を加えた。連続発酵法として、あらかじめ発酵させた渋柿酢200gを500gの新しい渋柿ジュースに加え、前培養した酢酸菌を加えた。

柿酢中の酢酸量を測定するため、2つの柿酢をそれぞれ適当に蒸留水で希釈し、0.1Nの水酸化ナトリウムをビュレットを用いて加え、pH meter F-8<sub>L</sub> (HORIBA、東京)がpH 7.0を示すまで滴下して、酸の量を定量した。

### 抗腫瘍活性効果試験

ICR/SIc系マウス（5週齢、雌性）にSarcoma 180細胞を $2 \times 10^6$ 個移植し、移植後24時間後よりカキ酢の10倍希釈液を固形餌と共に自由摂餌させ、その後の生存日数に差異があるか調べた。また移植後24時間後から連続10日間腹腔内に0.2ml直接投与した場合についても検討した。

## 結果と考察

前培養時の増殖曲線を図1に示した。培養してから1日目までが誘導期、1から2日目が対数増殖期、3日目が定常期であった。よって酢酸菌の前培養は3日以降で最大菌数となることがわかった。よって以降の実験では4日前培養したものをを用いることとした。

図2は、連続発酵及びエタノール発酵における酸の量の経時変化を示す。連続発酵では、ほぼ一定の割合にて酢酸が生成したが、エタノール発酵では7から8日目にかけて若干の減少が見られた。初期の発酵段階では、前培養された酢酸菌がエタノールを資化して酢酸を作り出すが、7から8日目にかけてエタノールが一時的に不足したために酢酸の生成が抑えられたのかもしれない。

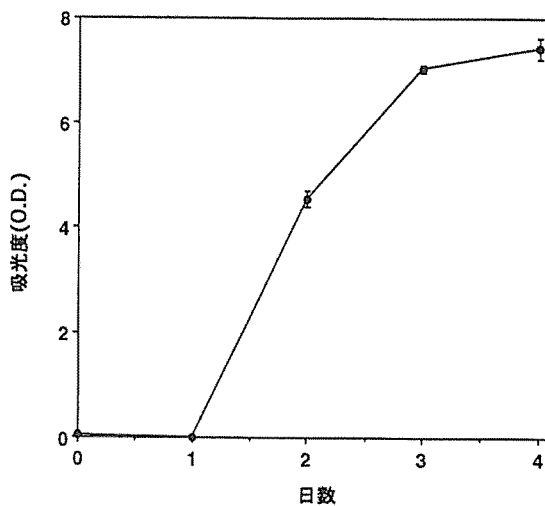


図1 前培養時の酢酸菌の増殖曲線

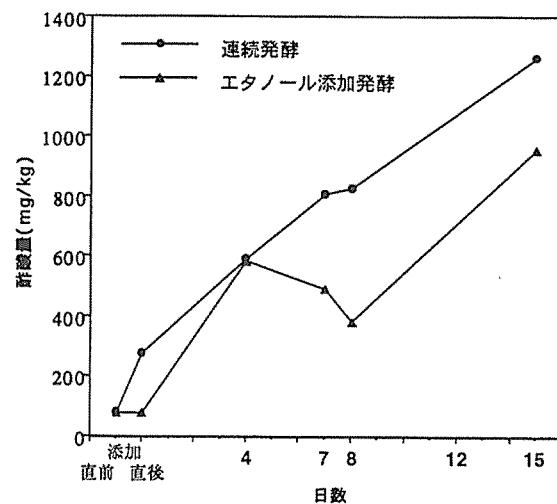


図2 発酵方法の異なる系による酢酸量の変化

工業レベルでの酢酸発酵の中でもっとも発酵効率が高いのは深部培養法である。発酵タンクの中央部にある回転翼を回転させてそこに無菌空気の泡をつくらせ、これにアルコールを含んだ発酵液をよくよく混合して酢酸菌の酸化発酵を促進させる方法である<sup>2)</sup>。次いで発酵塔による速醸法が有名である。現在の酢酸工業はこのように、エタノールを使った発酵方法が中心となっている。しかし本実験において酢酸の量はアルコールの発酵方法よりも連続発酵の方が生成酢酸量が多かった。この原因

は、500gという小規模における発酵には連続発酵法が適していることを示していると思われる。

腹水ガン(Sarcoma 180)に対する柿酢の治癒効果の実験にて、投与方法として経口投与と腹腔内投与を試した。経口投与群では投与開始後約14日の平均余命であった。無投与群でも平均余命に差異はなかった。腹水型のSarcoma 180に対しては、抗癌剤の効果は、経口・腹腔投与のいずれの場合も効果が見られにくい。本実験においても同様の傾向であったと思われる。この原因は経口投与のために消化管内にて有効成分である渋柿タンニンが胃酸等の消化液により変化したために効果が見られなかったか、消化器官において何らかの理由で吸収されなかったために起こったと推察される。

他方、皮膚に移植した固形ガン(Sarcoma 180)において、投与後4週間の生存率は未投与群の生存率が約14%だったのと比較して60%と高い生存率を示した(表2)。また腫瘍を抑制することも確かめられ、制ガン剤としての利用の可能性を示した。

表2 カキ酢の腫瘍抑制効果

	未投与	カキ酢投与
3週間後腫瘍サイズ(±S.D.)	23.30(±2.24)	12.72(±5.05)
腫瘍抑制率	0	45.41
4週間後生存率(%)	14	60

未投与群:n=7、投与群:n=5

7, 12-Dimethylbenzanthracene (DMBA)によるイニシエーションと12-O-Tetra decanoyl phorbol 13-acetate (TPA)プロモーターを用いた皮膚ガン発症系に対して渋柿抽出物が抑制効果を示すことをAchiwaらが報告している<sup>1)</sup>。TPAによる皮膚ガン発症系には、プロテインキナーゼがTPAと結合して活性酸素を発生させかつポリアミン合成における律速酵素であるornithine decarboxylase(ODC)活性が高まると考えられている<sup>3)</sup>(図3)。カキタンニンはODC活性の阻害、TPAのプロテインキナーゼへの結合及び活性酸素消去能等の要因が複合的に関与していると推察されている。同様の効果が移植ガンSarcoma 180に対しても見られたということは、免疫機能賦活化にも貢献していることが推察され、新たな治療薬としての可能性を示すものである。

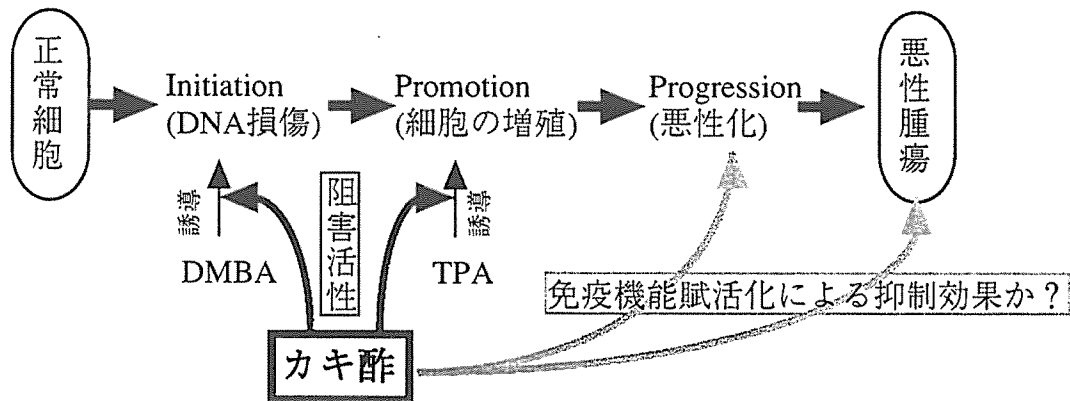


図3 ガン化のメカニズムとカキ酢による阻害・抑制効果

天然醸造酢には、酢の本質的主成分である酢酸以外の有機酸の量と種類の多いことにあると推定される。今回使用した渋柿酢は非常に風味が良く、渋みをほとんど感じないまろやかな口当たりの酢であった。このまろやかさは、柿の汁液中のブドウ糖の直接酸化によって生じたグルコン酸によるものと考えられる<sup>9)</sup>。これら有機酸による渋みという味のマスクングも、人間が実際摂取する場合に有効に機能すると考えられる。この特性を生かし、腹腔以外に存在するガンに対する経口投与による抗ガン作用が期待でき、健康食品として日常的に摂取することにより健康な生活を続けることが期待できる。今回は経口投与による効果が見られなかったが、能動的に蛍光摂取することにより効果が現れることは十分期待できる。

これまでに人間の健康維持を目的として、食べ物に含まれる抗酸化性あるいは、活性酸素消去能を持つ多くの物質の発癌、炎症や老眼等を抑制する作用についての研究が盛んに行われてきた。そして幾つかの天然物が抗腫瘍作用を持ち、かつその作用機序がアポトーシス誘導に関与しているものと考えられている。例えば、お茶中に含まれるカテキンがやはり皮膚ガンの発症抑制に働くことも知られている<sup>9)</sup>。渋柿ジュース（カキタンニン）の抗腫瘍作用について、ヒト白血病細胞の増殖作用を調べると、細胞増殖抑制効果が認められたことが知られている<sup>10)</sup>。また今回の実験より、いままで知られているカキタンニンによる皮膚ガン発症プロセスの阻害効果だけでなく免疫活性上昇にも有効である可能性が示唆された。これらの結果は、いままで商品価値のないクズガキとして処分されていたものに対して高い商品価値を付加し、新たな産業の創出に貢献できるであろう。

## 要約

渋柿 (*Diospyros kaki*) から抽出したジュースを *Acetobacter aceti* IFO3284 を用いて渋柿酢を製造する方法についての手順を検討し、ネズミへ移植した腫瘍細胞の Sarcoma 180 に対する抗ガン効果について検討したところ、以下の結果を得た。

- 1) 小規模での渋柿ジュースの酢酸発酵には連続発酵法が適していた。
- 2) 渋柿酢にすることにより渋柿独特の渋味がマスクングされた。
- 3) ネズミの皮膚下に移植された Sarcoma 180 に対して渋柿酢を腹腔内投与することにより、抗腫瘍性効果を示すことが明らかとなった。

## 参考文献

- 1) ACHIWA, Y., H. HIBASAMI, H., KATSUZAKI, and T. KOMIYA. Inhibitory effect of persimon extract on skin tumor promotion. *Food Sci. Technol., Int.*, 2(4), 183-186 (1996).
- 2) 山田正一. 細菌利用工業—微生物工学講座 6. 共立出版株式会社, p10-12 (1955)
- 3) YOSHIZAWA, S., T. Horiuchi, H. Fujiki, Y. Yoshida, and T. Sugimura. Antitumor promoting activity of (-)-Epigallocatechin Gallate, the main constituent of "Tannin" in Green Tea. *Phytotherapy Res.*, 1, 44-47 (1987)
- 4) 柳沢文正・穂積忠彦. 酢料理で健康. 農産漁村文化協会, p75-79 (1981)

- 5) Agarwal, R. S.K. Katiyar, S.I. Zaidi, and H. Mukhtar. Inhibition of skin tumor promoter-caused induction of epidermal ornithine decarboxylase in SENCAR mice by polyphenolic fraction isolated from green tea and its individual epicatechin derivatives. *Cancer Research*. 52(13) 3582-8 (1992).