

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

食用海藻製品の抗糖化性と乳酸発酵の影響に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-05-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 江田, 美佳 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1415

修士学位論文

食用海藻製品の抗糖化性と
乳酸発酵の影響に関する研究

平成 28 年度

(2017 年 3 月)

東京海洋大学大学院

海洋科学技術研究科

食機能保全科学専攻

江田 美佳

目次

緒言	・・・・・・・・・1
第1章 海藻乾燥製品の抗酸化性および抗糖化性	
第1節 能登海藻乾燥製品の抗酸化性と抗糖化性	・・・・・・・・・5
第2節 三浦海藻乾燥製品の抗酸化性と抗糖化性	・・・・・・・・・18
第2章 海藻乾燥製品の抗糖化性に及ぼす沿岸環境由来乳酸菌による発酵の影響	
第1節 海藻乾燥製品の抗糖化性に及ぼす発酵の影響	・・・・・・・・・25
第2節 限外ろ過画分における海藻発酵液の抗糖化性	・・・・・・・・・37
第3章 高脂肪食マウスの血中および腸内糖化産物量に及ぼす三浦産アカモク 発酵液の影響	・・・・・・・・・44
総括	・・・・・・・・・55
引用文献	・・・・・・・・・58
謝辞	・・・・・・・・・70

緒言

里海は環境省により、「人間の手で陸域と沿岸域が一体的・総合的に管理されることにより、物質循環機能が適切に維持され、高い生産性と生物多様性の保全が図られるとともに、人々の暮らしや伝統文化と深く関わり、人と自然が共生する沿岸地域」と定義されている (環境省, 2008). 里山と同様、人と自然とが共生するエリアで、伝統的な漁業、社会組織、食文化などが伝承されている. 例えば、様々な海藻を食することは、里海地域の伝統的な食習慣のひとつである.

食用海藻はその機能性の研究が進んでおり、特に褐藻類は、フロロタンニンといった海藻ポリフェノールや、水溶性多糖類のラミナランやアルギン酸、フコイダンを多く含み、抗酸化性 (Ibañez *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2011)、抗菌性 (Eom *et al.*, 2011; Kuda *et al.*, 2015a)、抗炎症作用 (park *et al.*, 2017)、抗肥満作用 (Shang *et al.*, 2017) などの機能性を有することが報告されている. また、紅藻類に含まれる水溶性多糖類のポルフィランは、抗酸化性や抗炎症作用 (Isaka *et al.*, 2015)、免疫賦活作用 (Bhatia *et al.*, 2013) を持つことが報告されている.

近年、食品のもつ機能性として、抗糖化性が注目されている. 糖化とは、加熱された食品、あるいは生体内で引き起こされるアミノ酸や蛋白質と還元糖の非酵素的な反応のことであり、メイラード反応もその1つである. Fig. 1のように、アミノ酸や蛋白質と還元糖が反応することにより、グリオキサール (GO)、メチルグリオキサール (MGO)、3-デオキシグリコソン (3-DG) などの中間体を経て、カルボキシルメチルリジン (CML)、カルボキシルエチルリジン (CEL)、ペントシジン、ピロピリジンなどの糖化最終生成物 (Advanced glycation endproducts, AGEs) が生成する (Singh *et al.*, 2001; Vistoli *et al.*, 2013). AGEs は、老化や糖尿病の合併症である網膜症、白内障、動脈硬化、腎障害をひき起こすことが報告されている (Kandarakis *et al.*, 2014; Roca *et al.*, 2014). AGEs の生成を抑制する方法として、血中の糖分をコン

トロールすることが挙げられる (Younus *et al.*, 2016). また、この糖化反応はいくつかの酸化反応を介するため、食品中の抗酸化物質による糖化抑制が注目されている (Nagai *et al.*, 2010). そのため、果実、茶、微細藻類など様々な抗酸化性をもつ食品において、抗糖化性に関する報告があるが (Ho *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2010, 2014; Wang *et al.*, 2011), 食用海藻に関する報告はほとんどない.

乳酸菌にはプロバイオティクスとして利用されている菌株が多く存在する (Foligné *et al.*, 2013). FAO/WHO は、プロバイオティクスを「十分量を摂取したときに宿主に有益な効果をもたらす生菌」と定義している (FAO/WHO, 2002). しかし近年の報告では、生菌だけではなく乳酸菌の産生成分も有益な効果を示すことが確認されている (Stanton *et al.*, 2005). 前述のように、食用海藻は抗酸化性を示すものがあることが報告されている (Ibañez *et al.*, 2013) が、さらに乳酸菌の発酵により、いくつかの食用海藻のスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) 消去能が上昇することが確認されている (Kuda *et al.*, 2015b, Nemoto *et al.*, 2016). このことから、乳酸菌により発酵させた食用海藻において、さらなる抗糖化性の向上も期待される.

環境や発酵食品から、プロバイオティクス候補株として乳酸菌を分離した報告は多い. このうち、高塩分環境や低 pH 環境など、通常よりも厳しい条件で生息する乳酸菌には、高いプロバイオティクス効果が期待される. 例えば、魚類の腸管から分離された *Lactococcus lactis* がチーズから分離された *Lc. lactis* と比較して、塩分耐性だけでなく抗菌性などの機能性も示され、水産分野だけでなく機能性食品への応用も考えられる (Itoi *et al.*, 2009). また、能登のアジのなれずしから分離した *Lactobacillus plantarum* AN6 でコレステロール低減能が確認されているほか (Kuda *et al.*, 2013), 福井のサバのなれずしから分離した *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 は、抗酸化性やマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 における抗炎症作用、ヒト腸管細胞 Caco-2 への病原菌の侵入抑制効果を有することが報告されている (Kanno *et al.*, 2012; Kuda *et al.*, 2014a; Nakamura *et al.*, 2012).

本研究では、食用海藻の抗糖化性とその抗糖化性に及ぼす乳酸発酵の影響について検討し、食用海藻の新たな機能性を解明することを目的とした。第 1 章では、伝統的に様々な海藻が食されてきた能登半島および三浦半島の海藻乾燥製品の抗糖化性について、*in vitro* のウシ血清アルブミン (BSA) -Fructose (Fru) モデルと BSA-Methylglyoxal (MGO) モデルを用いて検討した。第 2 章では、各沿岸環境から分離された乳酸菌による海藻発酵能を確認し、抗糖化性に及ぼす発酵の影響を検討した。第 3 章では、三浦産アカモク発酵液を用いて、高脂肪食マウスの血中および腸内糖化産物量に及ぼす影響を検討した。

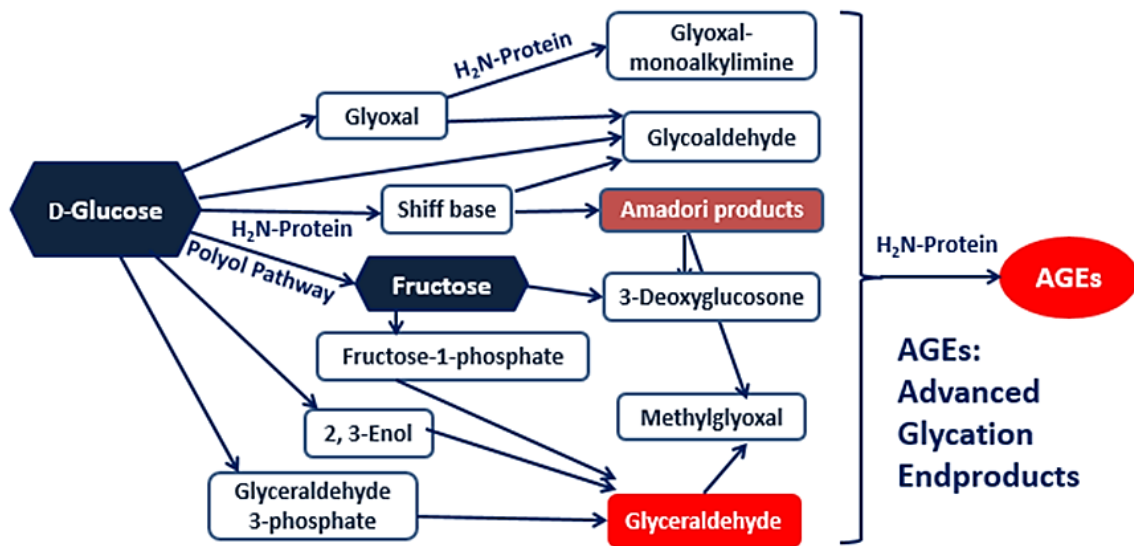


Fig. 1 Reaction path way of glycation.

第 1 章 海藻乾燥製品の抗酸化性および抗糖化性

前述のように、食品のもつ機能性として、抗糖化性が注目されている。生体内での糖化により、Fig. 1 のように生成される糖化最終生成物 (Advanced glycation endproducts, AGEs) は、老化や糖尿病の合併症である網膜症、白内障、動脈硬化、腎障害をひき起こすことが報告されている (Kandarakis *et al.*, 2014; Roca *et al.*, 2014). AGEs の生成を抑制する方法として、血中の糖分をコントロールすることが挙げられる (Younus *et al.*, 2016). また、この糖化反応はいくつかの酸化反応を介するため、食品中の抗酸化物質による糖化抑制が注目されている (Nagai *et al.*, 2010). そのため近年では、抗糖化性を有する機能性素材として、抗酸化性を持つ食品が注目されている。

食用海藻は抗酸化性を持つものがあり、その成分としては褐藻類のフロロタンニン類などが知られている (Li *et al.*, 2010). しかし、食用海藻の抗糖化性に関する報告はほとんどない。そこで本章では、能登半島および三浦半島特産の海藻乾燥製品の抗糖化性について、BSA-Fru モデルと BSA-MGO モデルを用いて検討した。

第 1 節 能登海藻乾燥製品の抗酸化性と抗糖化性

北陸地方の中央付近に位置する石川県能登半島は、三方を海に囲まれ、山地や丘陵地が多いことから、漁業・観光業が栄えている地域である。日本海側の他の地域と同様に海藻の種類が豊富であるが、特にこの地域では約 40 種類もの海藻が食用として利用されている (Ikemori *et al.*, 2002). 主にワカメやカジメ類 (ツルアラメ、クロメ) をはじめ、岩ノリ、テングサといった海藻が能登の特産品として親しまれている。

カジメ類は、国内外で食用とされているほか、アルギン酸の原藻としても利用されている (大野ら, 2004). とくに日本では、湯通しして醤油をかけ、健康食品として食する習慣がある. カジメ類はフロログルシノールやエコール, ダイエコールなどの多種のフロロタンニン類を含み、抗酸化性を有することが報告されている (Li *et al.*, 2009).

本節では、能登特産の海藻乾燥製品の抗糖化性について検討した.

実験方法

実験材料

実験に用いた試料を Table 1 に示した. 海藻乾物 11 製品 (ツルアラメ *Ecklonia stromifera* (E1), クロメ *Ecklonia kurome* (E2), ワカメ *Undaria pinnatifida* 2 製品 (Up1, Up2), メカブ (ワカメの胞子葉部) 2 製品 (Up'1, Up'2), ツルモ *Chorda filum* (Cf), テングサ *Gelidiaceae* sp. 2 製品 (G1, G2), エゴ *Campylaephora hypnaeoides* (Ch), 岩ノリ *Pyropia* sp. (P)) を石川県の能登地域で購入し、実験に供した.

サンプル調製

各試料をブレンダー (Oster 16 Speed Blender, 大阪ケミカル) で粉砕し、1 mm メッシュの篩を用いて海藻粉末を調製した. このとき、ブレンダーで粉砕できなかったサンプルについては、ハサミで 5 mm 程度の大きさになるように切断し、調製を行った. 海藻粉末に 40 倍量の蒸留水を加え、105°C で 15 分間加熱し、遠心分離 (3000 g, 10 min, 4°C) を行った上清を熱水抽出液 (AES) とした.

ポリフェノール含量の測定

フォリンチオカルト法 (Kuda *et al.*, 2009) を用いて、以下のように行った. 蒸留水を用いて希釈した試料を 96 well plate (アズワン, 1-6776-03) に 0.03 mL ずつ分注

した ($n = 3$). そこへ 10 % (w/v) Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma) 0.06 mL を添加し, 室温で 3 分間放置した. その後, 10 % (w/v) 炭酸ナトリウム 0.12 mL を添加し, 室温で 60 分間放置し, マルチプルマイクロプレートリーダー (SH9000, コロナ電気) を用いて 750 nm における吸光度を測定した. 測定した値から, フロログルシノール等量 [$\mu\text{mol PG Eq/mL}$] でポリフェノール含量を算出した.

DPPH ラジカル消去活性

2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH \cdot) は安定なフリーラジカルであり, ラジカルを消去すると退色するため, その吸光度を測定することで, 簡単に抗酸化能を測定することが出来る (Dejian *et al.*, 2005). そのため, DPPH \cdot 消去能は, 食品の抗酸化能の試験に広く用いられている.

本実験では Kuda *et al.* (2010) の方法に沿って実験を行った. 蒸留水を用いて 1/2 段階希釈したサンプルを 96 well plate に 0.1 mL ずつ入れた ($n = 3$). エタノール 0.1 mL を加え, マイクロプレートリーダーで吸光度 OD 517 nm を測定した (Abs1). 次に, 1 mmol/L の DPPH \cdot (Sigma) /エタノール溶液 0.025 mL を加え, 光に触れないようにアルミホイルで覆い, 37°C で 30 分間放置し, 同様に吸光度を測定した (Abs2). DPPH \cdot 消去能は次式を用いて計算した.

$$\text{DPPH}\cdot \text{ 消去能 (\%)} = \{1 - \text{Sample (Abs2 - Abs1) / Blank (Abs2 - Abs1)}\} \times 100$$

鉄還元能

Kuda *et al.* (2009) を改良し, 以下のように行った. 上記と同様に試料をマイクロプレートに 0.05 mL ずつ入れた ($n = 3$). 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.2) 0.025 mL, 1% (w/v) フェリシアン化カリウム (Sigma) 0.025 mL を加え, 光に触れないようにアルミホイルで覆い, 37°C, 60 分間放置した. 10% トリクロロ酢酸 0.025 mL, 蒸留水 0.1 mL を加え, 吸光度 OD 700 nm を測定した (Abs1). 次に 0.1% Fe $_2$ Cl $_3$ 0.025 mL を加え, 同様に吸光度を測定した (Abs2). 鉄還元能は次式を用いて計算した.

$$\text{鉄還元能} = \text{Sample (Abs 2 - Abs 1)} - \text{Blank (Abs 2 - Abs 1)}$$

スーパーオキシドアニオンラジカル ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 消去能

$\text{O}_2^{\cdot-}$ は体内で自然発生するラジカルで、最初に産出されるため、その消去能は最も重要な抗酸化能とされる (Dejian *et al.*, 2005).

Kuda *et al* (2009) の方法を改良し、以下のように行った。蒸留水を用いて1/2段階希釈したサンプルをマイクロプレートに0.1 mLずつ入れた ($n = 3$). 0.25 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.2) 0.05 mL, 2 mmol/L β -nicotinamide adenine dinucleotide reduced from (NADH, Sigma) 0.025 mL, 0.5 mmol/L nitro blue tetrazolium (NBT, Sigma) 0.025 mL をそれぞれ加え、吸光度 OD 560 nm を測定した (Abs1). 次に 0.03 mmol/L phezazine methosulfate (PMS, Sigma) 0.025 mL を加え、光に触れないようにアルミホイルで覆い、室温で5分間放置し、同様に吸光度を測定した (Abs2). $\text{O}_2^{\cdot-}$ 消去能は次式を用いて計算した。

$$\text{O}_2^{\cdot-} \text{ 消去能 (\%)} = \{1 - \text{Sample (Abs2 - Abs1)} / \text{Blank (Abs2 - Abs1)}\} \times 100$$

メイラード反応抑制能

Kuda *et al.* (2014c) を改良し、以下のように行った。2.0 mol/L グルコース (和光純薬) 0.5 mL に 2.0 mol/L L-リジン (和光純薬) 0.5 mL, 熱水抽出液 0.5 mL, 0.25 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液 0.5 mL を添加し、50°C で3時間水浴した。3時間後、96 well plate に反応液 0.2 mL をとり、マイクロプレートリーダーで吸光度 OD 465 nm を測定した。なお、ブランクは蒸留水とした。測定した吸光度を用いて、以下の式により、メイラード反応抑制能 (%) を計算した。

$$\begin{aligned} & \text{メイラード反応抑制能 (\%)} \\ & = \{1 - \text{sample (Abs 3h - Abs 0h)} / \text{blank (Abs 3h - Abs 0h)}\} \times 100 \end{aligned}$$

BSA-Fru モデルにおける熱水抽出液の抗糖化性

Wang *et al.* (2011) を改良し, Fig. 3 のように行った. 1.5 mol/L D-フルクトース (Fru, 和光純薬) 0.5 mL に熱水抽出液 0.5 mL, 50 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4, 0.02 %アジ化ナトリウム) 0.5 mL を添加し, 37°C で 2 時間放置した ($n = 3$). その後, 30 mg/mL ウシ血清アルブミン (BSA, 和光純薬) 0.5 mL を添加し, 37°C で 5 日間反応させた. 5 日後, 96 well plate (住友ベークライト, MS-8496K) に反応液 0.2 mL をとり, マイクロプレートリーダーを用いて, 340-420 nm における AGEs の蛍光強度を測定した. なお, ブランクは蒸留水とした. 測定した AGEs の蛍光強度を用いて, 以下の式により, 抗糖化性 (%) を計算した.

$$\begin{aligned} & \text{抗糖化性 (\%)} \\ & = \{ 1 - \text{sample (Fl 5day - Fl 0day)} / \text{blank (Fl 5day - Fl 0day)} \} \times 100 \end{aligned}$$

BSA-MGO モデルにおける熱水抽出液の抗糖化性

Wang *et al.* (2011) を改良し, Fig. 3 のように行った. 60 mmol/L メチルグリオキサール (MGO, Sigma) 0.5 mL に熱水抽出液 0.5 mL, 50 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4, 0.02 %アジ化ナトリウム) 0.5 mL を添加し, 37°C で 2 時間放置した ($n = 3$). その後, 30 mg/mL BSA 0.5 mL を添加し, 37°C で 5 日間反応させた. 5 日後, 96 well plate に反応液 0.2 mL をとり, マイクロプレートリーダーを用いて, 340-380 nm における AGEs の蛍光強度を測定した. 測定した AGEs の蛍光強度を用いて, 上記と同様の式により, 抗糖化性 (%) を計算した.

結果および考察

熱水抽出液のポリフェノール含量と抗酸化性

熱水抽出液のポリフェノール含量を、Fig. 4A に示した。ポリフェノール含量をフロログルシノール当量にすると、特にツルアラメ (E1) で約 8 PG Eq/mL と高く、クロメ (E2) は約 4 PG Eq/mL、メカブ (Up'1) は約 3 PG Eq/mL と高い値を示した。また、岩ノリ (P) はおよそ 1.6 PG Eq/mL のポリフェノール含量であった。ツルアラメ、クロメを含めカジメ類が高いポリフェノール含量をもつことは、すでに報告されている (Kuda *et al.*, 2007)。今回検討を行った 2 種類のメカブは、それぞれポリフェノール含量が大きく異なっていた。海藻は多糖類やポリフェノールを含む成分が季節により大きく変動することが報告されており (Hodt *et al.*, 2011)、今回の結果も採取時期の違いに起因することが考えられる。

熱水抽出液の 8 倍希釈の濃度における DPPH \cdot 消去能の結果を Fig. 4B に示した。11 サンプルのうち、クロメ (E2)、ツルアラメ (E1)、メカブ (Up'1)、ツルモ (Cf) で高い消去能が認められた。Kuda *et al.* (2010) の実験は、褐藻類の DPPH \cdot 消去能はポリフェノール含量と強い相関性があることを報告している。本実験で用いた褐藻類のカジメ類についても、ポリフェノール含量と DPPH \cdot 消去能と相関していると考えられる。

熱水抽出液の 32 倍希釈の濃度における鉄還元能の結果を Fig. 4D に示した。クロメ (E2) に続き、ツルアラメ (E1) で高い還元能が認められ、ポリフェノール含量および DPPH \cdot 消去能と相関していると考えられる。

海藻に含まれるポリフェノールとしてはフロログルシノールが知られており、海藻の葉状体の外側皮質層に多く含まれ活性酸素からのストレスを消去する可能性があると報告されている (Shibata *et al.*, 2004)。

熱水抽出液の8倍希釈の濃度における $O_2^{\cdot-}$ 消去能の結果をFig. 4Cに示した。ポリフェノール含量およびDPPH \cdot 消去能で高い値を示したクロメ (E2), ツルアラメ (E1), メカブ (Up'1) で同様に, 高い $O_2^{\cdot-}$ 消去能が認められた。一方で, ポリフェノール含量の低かったメカブ (Up'2), テングサ (G1) でも, 高い $O_2^{\cdot-}$ 消去能が認められた。Kuda *et al.* (2006) は, 褐藻類中の水溶性多糖類の $O_2^{\cdot-}$ 消去能を示している。今回のメカブやテングサの $O_2^{\cdot-}$ 消去能も, ポリフェノール以外の成分が関与していると考えられる。

熱水抽出液の抗糖化性

各熱水抽出液のメイラード反応抑制能 (%) の結果を Fig. 5A に示した。テングサ (G1 および G2) で, それぞれ約 43, 33% の抑制能が認められた。また, エゴ (Ch), ツルモ (Cf) でも, 約 24% の抑制能が認められた。一方で, 高いポリフェノール含量およびDPPH \cdot 消去能を示したクロメ (E2), メカブ (Up'1) はメイラード反応を促進していた。メイラード反応は, ポリフェノールや Mg^{2+} および Cl^- などのミネラルにより促進することが報告されている (Kuda *et al.*, 2014; Noor-Soffalina *et al.*, 2009)。また, カジメ類はポリフェノールやミネラルを豊富に含むことも報告されている (Kuda *et al.*, 2007) ことから, 海藻に含まれるこれらの成分がメイラード反応を促進したと考えられる。

各熱水抽出液の抗糖化性 (%) をFig. 5B, Cに示した。BSA-Fru モデルにおいては, カジメ類 (E1, E2) で72~98%, 岩ノリ (P) で78%, メカブ (Up'1, Up'2) で64~71%と高い抗糖化性が示された。

また, BSA-MGO モデルにおいては, カジメ類 (E1, E2) で65~96%, 岩ノリ (P) で76%, メカブ (Up'1) で55%と高い抗糖化性が示されたが, メカブ (Up'2) では抗糖化性が低くなった。テングサ (G2), エゴ (Ch) はどちらのモデルでも抗糖化性が低かった。

熱水抽出液におけるポリフェノール含量と、BSA-Fru モデルおよび BSA-MGO モデルのポリフェノール含量との相関を Fig. 5D に示した。ポリフェノール類は、抗酸化性ととも AGEs の生成を阻害するという報告がある (Yeh *et al.*, 2017)。BSA-MGO モデルでは $r^2 = 0.78$ であったが、褐藻類のみでは $r^2 = 0.98$ と高い値を示した。一方、BSA-Fru モデルは $r^2 = 0.54$ で、褐藻類のみでも $r^2 = 0.68$ とあまり高くなかった。今回の結果から、BSA-MGO モデルではポリフェノールの効果が強く、BSA-Fru モデルではポリフェノール以外の成分が効果を示すものと考えられる。

本節で、高い抗糖化性を示したカジメ類、岩ノリ、メカブは、体内における糖化を抑制する機能性素材として、ドレッシングなどの食品やサプリメントとしての利用が期待できる。

Table 1 Dried algal samples of Noto Peninsula used in this study.

Scientific name	Market name (Japanese)	Harvest place (city)	Abbreviation
Pahaephyta			
<i>Ecklonia stronifera</i>	<i>Kajime*</i>	Wajima	E1
<i>E. kurome</i>	<i>Kajime**</i>	Suzu	E2
<i>Undaria pinnatifida</i> (Fronde part)	<i>Wakame</i>	Wajima	Up1
<i>U. pinnatifida</i> (Fronde part)	<i>Wakame</i>	Suzu	Up2
<i>U. pinnatifida</i> (sporophyll part)	<i>Mekabu</i>	Wajima	Up'1
<i>U. pinnatifida</i> (sporophyll part)	<i>Mekabu</i>	Suzu	Up'2
<i>Chorda filum</i>	<i>Tsurumo</i>	Wajima	Cf
Rhodophyta			
<i>Gelidiaceae</i> sp.	<i>Tengusa</i>	Wajima	G1
<i>Gelidiaceae</i> sp.	<i>Tengusa</i>	Suzu	G2
<i>Campylaephora hypnaeoides</i>	<i>Ego</i>	Wajima	Ch
<i>Pyropia</i> sp.	<i>Iwanori</i>	Suzu	P

Standard Japanese name; **Turuarame*, ***Kurome*

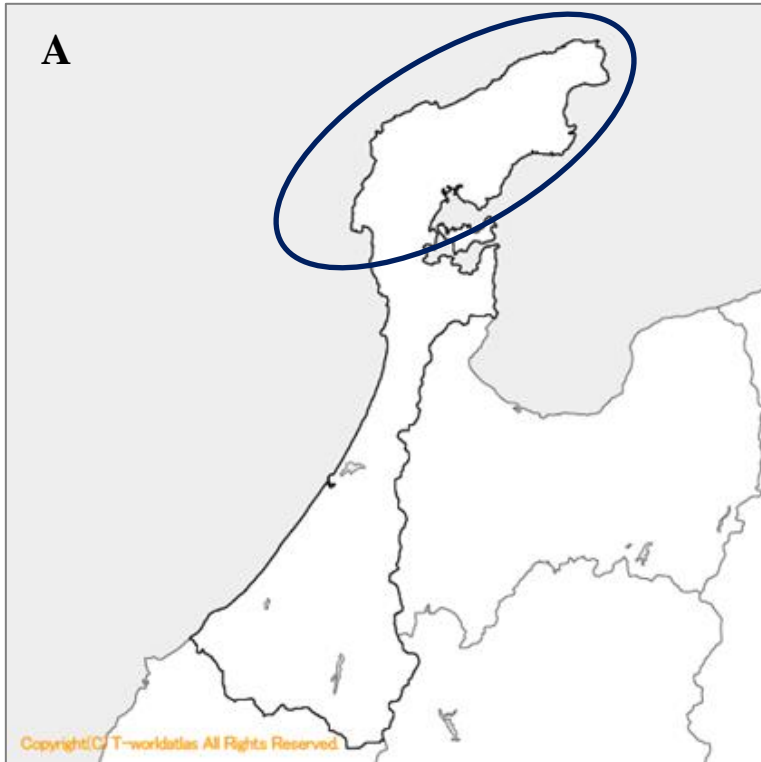


Fig. 2 Noto Peninsula, Japan (A), the coast of Noto Peninsula, Senmuida (B)

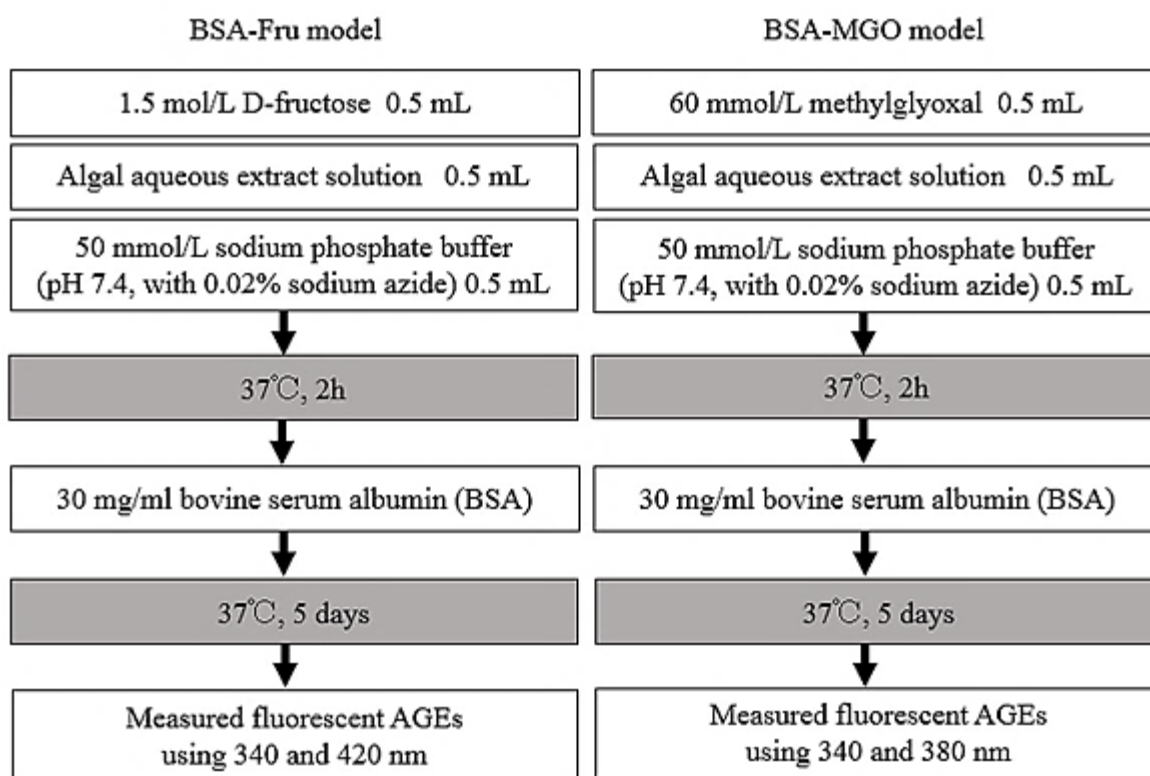


Fig. 3 The measurement method of anti-glycation capacity.

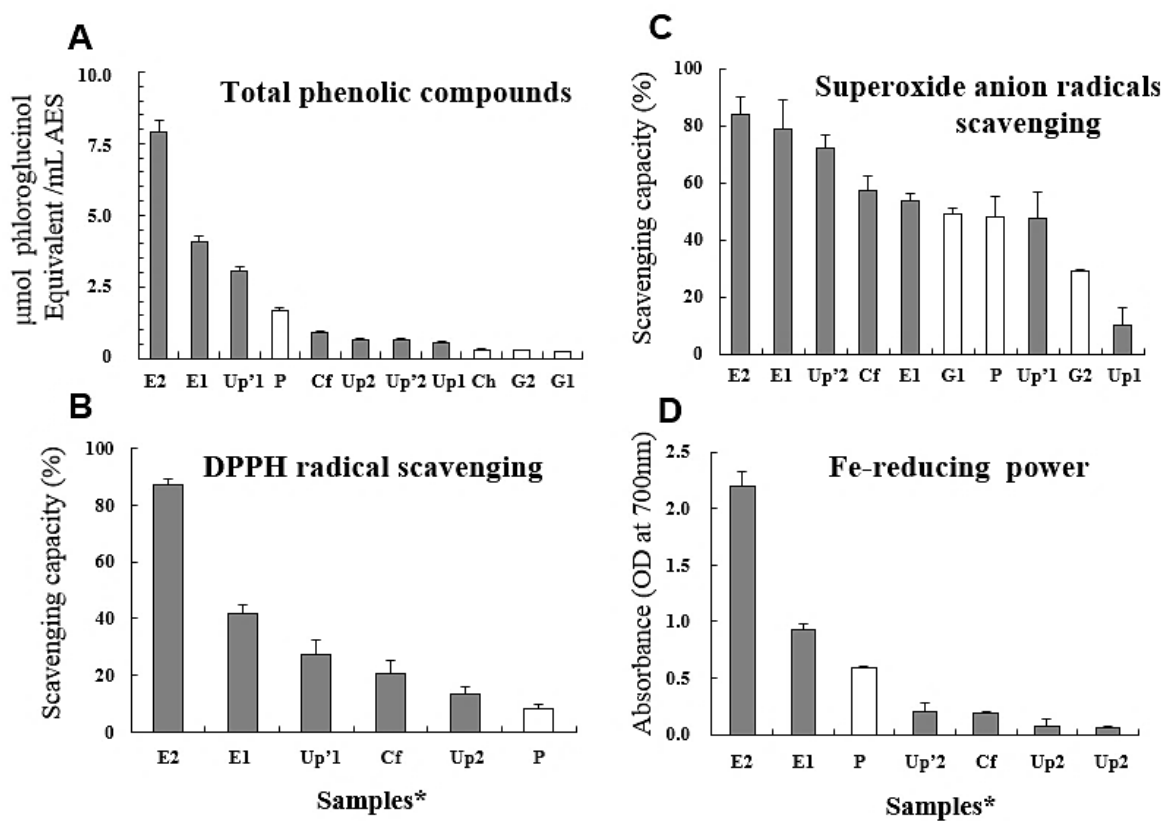


Fig. 4 Total phenolic compound content (A), DPPH and superoxide anion radical scavenging capacity (B and C), and Fe-reducing power (D) of aqueous solution of dried algal products. * See Table 1. Sample contents in B, C, and D were 0.8, 0.8 and 3 mg, respectively dried sample equivalent/ml. Values are mean and SEM ($n = 3$).

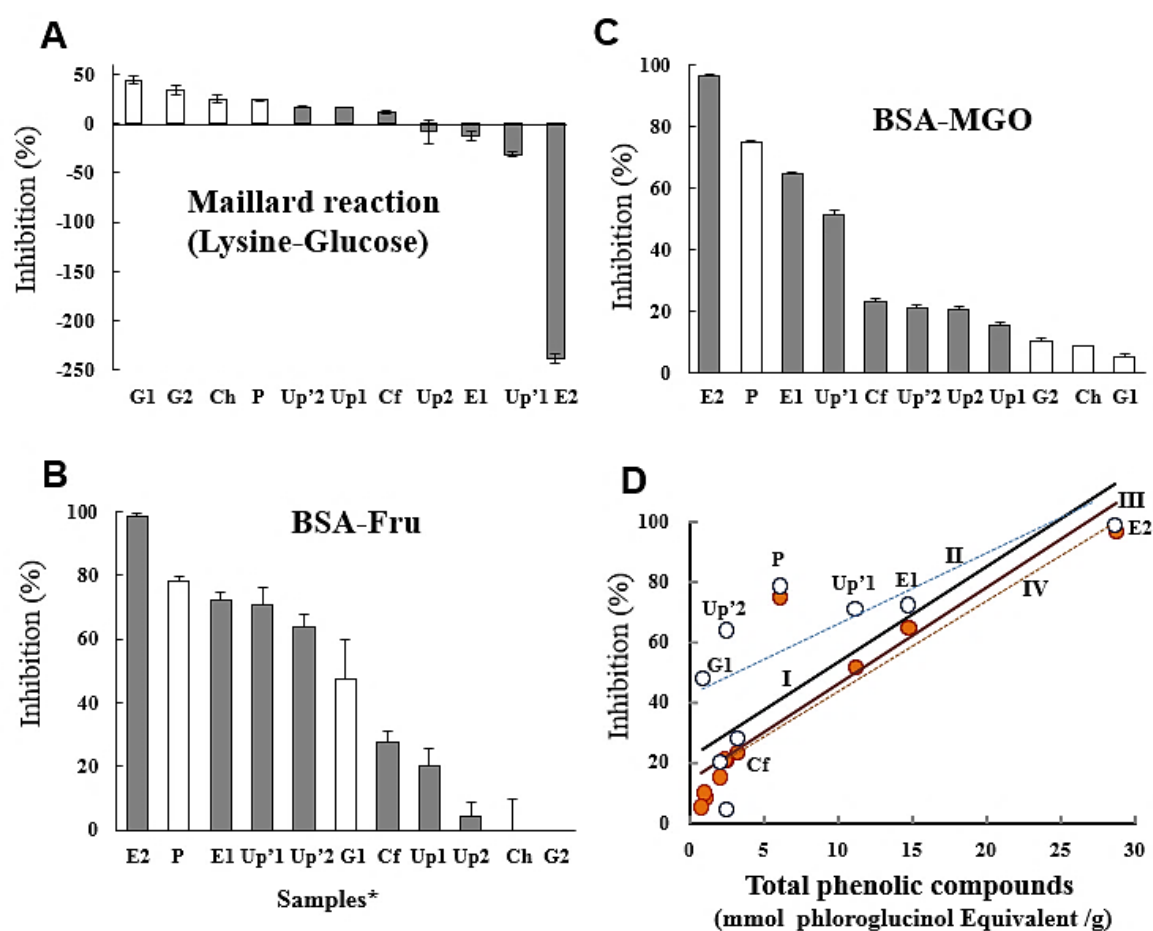


Fig. 5 Effects of aqueous solutions of dried algal products on Maillard reaction (A), glycation of BSA with fructose (Fru, B) and methylglyoxal (MGO, C). * See Table 1. Values are mean and SEM ($n = 3$). Figure D shows correlations between total phenolic compounds and inhibition activities in BSA-Fru (open circles and I: $r^2 = 0.536$) and BSA-MGO (closed circles and III: $r^2 = 0.782$) models. Lines II and IV show the correlation without Rhodophyta ($r^2 = 0.679$ in BSA-Fru, and 0.983 in BSA-MGO).

第 2 節 三浦海藻乾燥製品の抗酸化性と抗糖化性

三浦半島は、神奈川県南東部に位置し、その海岸は日本の首都圏における産業を支える重要な役割を果たしている東京湾の西側に面している。この海域は、東京湾水と黒潮系沿岸流の影響を受けて、多彩な環境と生物相を呈している（新崎ら、1983）。そのため、三浦半島は特に海藻の種類が豊富で、約 380 種類が分布している（高橋ら、2009）。この地域では、日本で広く親しまれているワカメ、ヒジキ、ノリ、テングサといった海藻のほか、アカモク、カヤモノリ、ハバノリなど、能登半島と同様に、多様な海藻が食用として利用されている。

本節では、三浦特産の海藻乾燥製品の抗糖化性について検討した。

実験方法

実験材料

実験に用いた試料を Table 2 に示した。海藻乾物 8 製品（干しワカメ (Up), 干しメカブ (Up'), 煮干しヒジキ *Sargassum fusiforme* (Sf1), 煮干し長ヒジキ *Sargassum fusiforme* (Sf2), 乾燥アカモク *Sargassum horneri* (Sh), 焼きノリ (P), テングサ 2 製品 (G1, G2)）を神奈川県の三浦半島で購入し、実験に供した。

熱水抽出液の抗酸化性および抗糖化性

前節と同様に、熱水抽出液を調製し、そのポリフェノール含量および抗酸化性 (DPPH・消去能, 鉄還元能, O_2^- ・消去能), 抗糖化性を測定した。

結果および考察

熱水抽出液のポリフェノール含量および抗酸化性

熱水抽出液のポリフェノール含量, DPPH \cdot 消去能および鉄還元能の測定結果を Fig. 7A, B および D に示した. ポリフェノール含量は, 今回のサンプルの中では, ノリ (P) で約 4 PG Eq/mL と高く, アカモク (Sh), 長ヒジキ (Sf2) はおよそ 1.2 PG Eq/mL であった. DPPH \cdot 消去能, 鉄還元能でも同様にノリが最も高い値を示したことから, 前節の能登半島のサンプルと同様に, ポリフェノールがこれらの活性に関わると考えられた.

熱水抽出液の 8 倍希釈の濃度における O₂ \cdot^- 消去能の結果を Fig. 7C に示した. ポリフェノール含量, DPPH \cdot 消去能および鉄還元能で高い値を示したノリ (P) は, 約 22% と O₂ \cdot^- 消去能は低く, ノリと比較して低いポリフェノール含量であったメカブ (Up'), アカモク (Sh), 長ヒジキ (Sf2) では, それぞれ約 77, 57, 51% の高い O₂ \cdot^- 消去能が認められた. 今回の結果からも, O₂ \cdot^- 消去能は, ポリフェノール含量以外の水溶性多糖類などで効果があるものと考えられる.

熱水抽出液の抗糖化性

各熱水抽出液のメイラード反応抑制能 (%) の結果を Fig. 8A に示した. 前節と同様に, テングサ (G1 および G2) で, それぞれ約 29, 23% の抑制能が認められた. 一方で, 他の 6 サンプルでは 10% 以下の低い抑制能であった.

各熱水抽出液の抗糖化性 (%) を Fig. 8B, C に示した. BSA-MGO モデルにおいては, ポリフェノール含量の高いノリ (P) で 93% と最も高い抗糖化性が認められた. 他の 7 サンプルは 22% 以下の低い抗糖化性であった.

一方, BSA-Fru モデルにおいては, 高い DPPH \cdot 消去能を示したノリ (P) と長ヒジキ (Sf2) で約 53, 51% と同等で, 次にアカモク (Sh) で 23% と高かった.

熱水抽出液におけるポリフェノール含量と、BSA-Fru モデルおよび BSA-MGO モデルのポリフェノール含量との相関を Fig. 8D に示した。 r^2 乗値を比較すると、BSA-Fru モデルは 0.59、BSA-MGO モデルは 0.89 を示しており、今回の結果からも、BSA-Fru モデルと比較して BSA-MGO モデルでは、ポリフェノール含量と抗糖化性との間により強い相関があることが明らかになった。

前節でのカジメ類、岩ノリ、メカブと同様に、高い抗糖化性を示したノリ、長ヒジキも、体内における糖化を抑制する機能性素材としての利用が期待できる。

Table 2 Dried algal samples of Miura Peninsula used in this study.

Scientific name	Market name (Japanese)	Harvest place	Abbreviation
Phaeophyta			
<i>Undaria pinnatifida</i> (Frond part)	<i>Wakame</i>	Sagamiwan	Up
<i>U. pinnatifida</i> (sporophyll part)	<i>Mekabu</i>	Sagamiwan	Up'
<i>Sargassum fusiforme</i>	<i>Hijiki</i>	Arasaki	Sf1
<i>S. fusiforme</i>	<i>Nagahijiki</i>	Miura	Sf2
<i>Sargassum horneri</i>	<i>Akamoku</i>	Sagamiwan	Sh
Rhodophyta			
<i>Pyropia sp.</i>	<i>Nori</i>	Hashirimizu	P
<i>Gelidiaceae sp.</i>	<i>Tengusa</i>	Sagamiwan	G1
<i>Gelidiaceae sp.</i>	<i>Tengusa</i>	Jyogashima	G2



Fig. 6 Miura Peninsula, Japan (A), the coast of Miura Peninsula, Mabari (B)

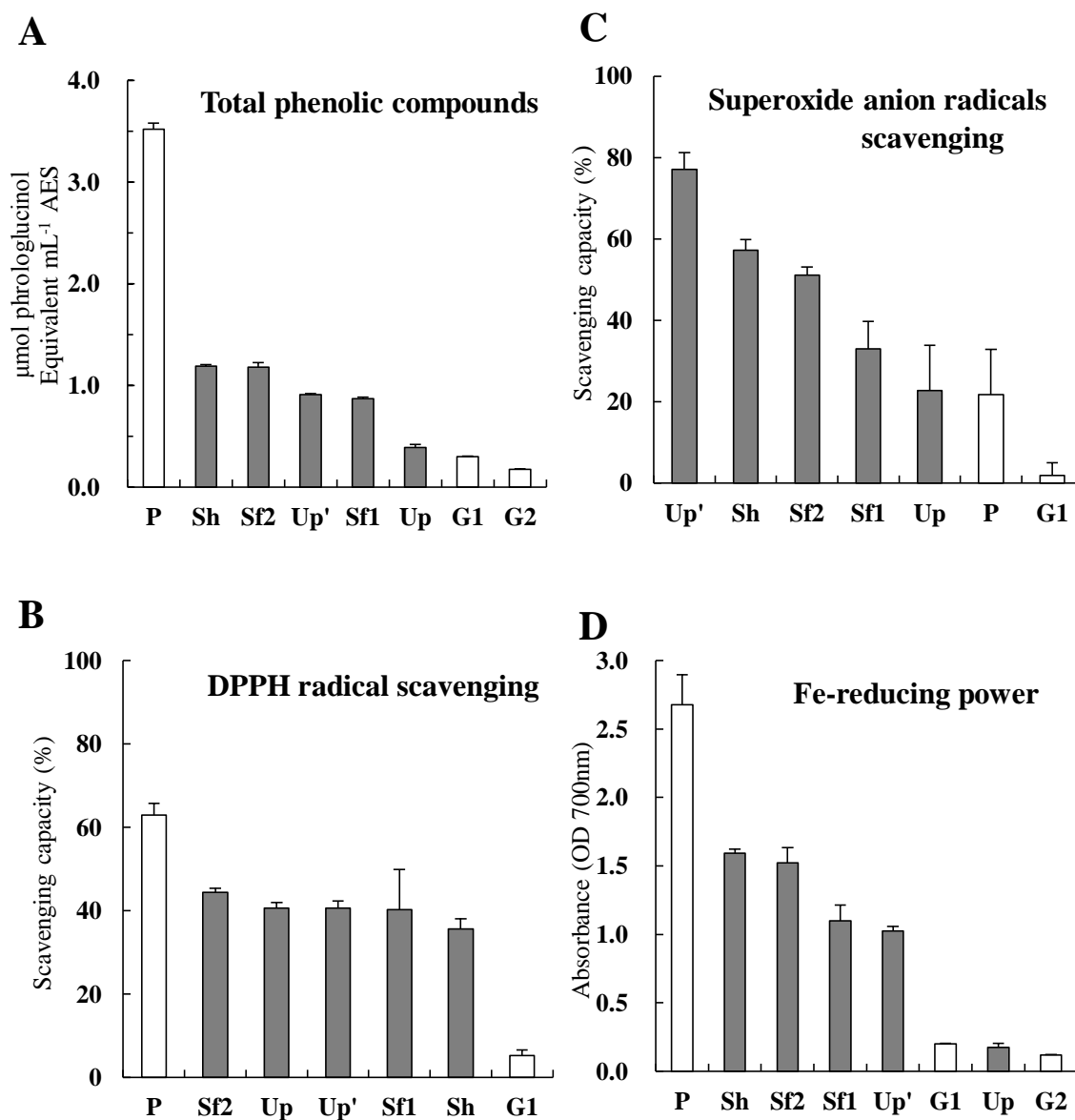


Fig. 7 Total phenolic compound content (A), DPPH and superoxide anion radical scavenging capacity (B and C), and Fe-reducing power (D) of aqueous solution of dried algal products. Sample contents in B, C and D were 25, 1.6 and 25 mg respectively dried sample equivalent/ml. Values are mean and SEM ($n = 3$).

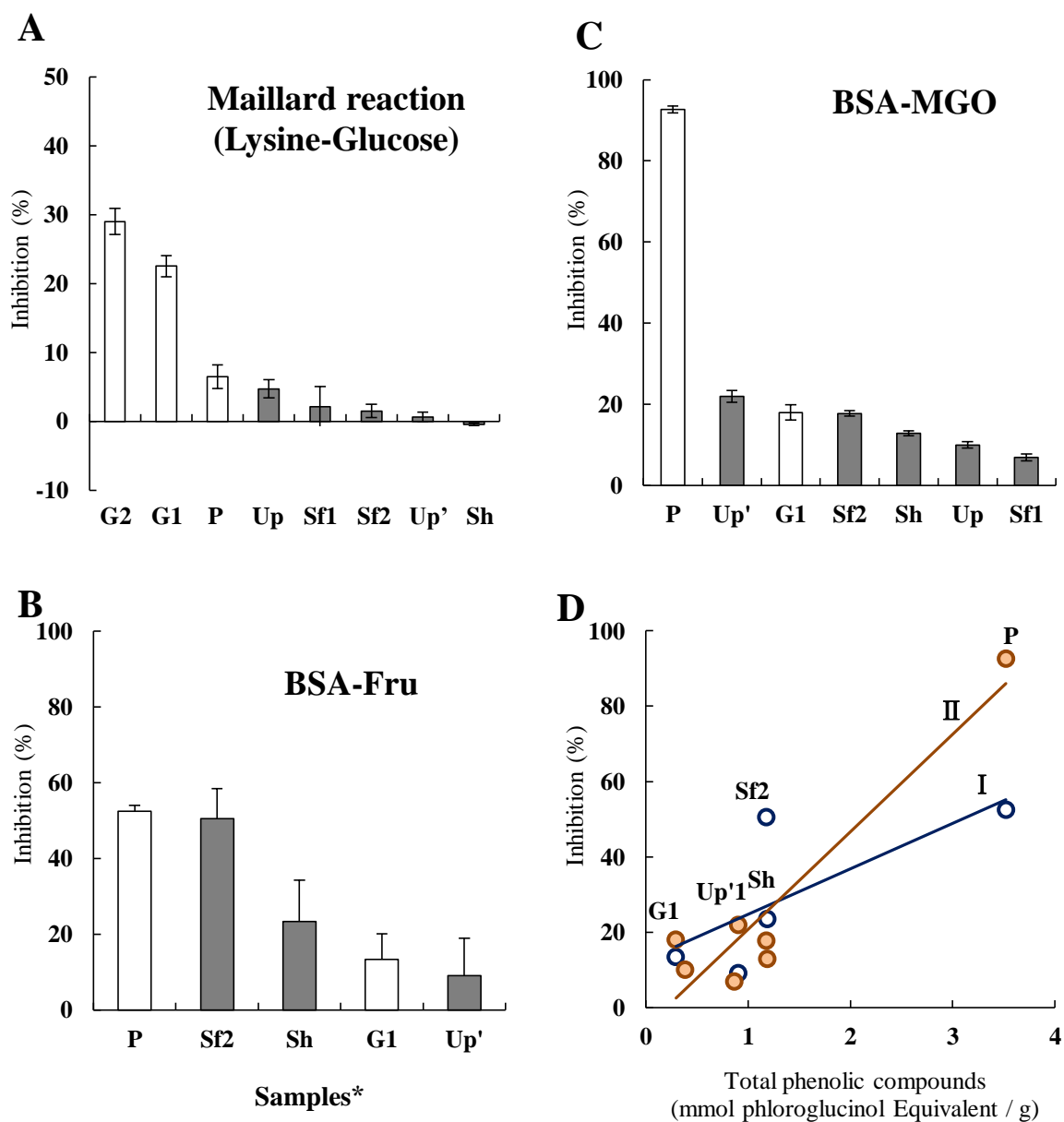


Fig. 8 Effects of aqueous solutions of dried algae products on Maillard reaction (A) , glycation of bovine serum albumin (BSA) with fructose (Fru; B) and methylglyoxal (MGO; C). Figure D shows the correlations between total phenolic compounds and inhibition activities in BSA-Fru (open circles and I: $r^2 = 0.526$) and BSA-MGO (closed circles and II: $r^2 = 0.879$) models.

第 2 章 海藻乾燥製品の抗糖化性に及ぼす沿岸環境由来乳酸菌による

発酵の影響

FAO/WHO は、プロバイオティクスを「十分量を摂取したときに宿主に有益な効果をもたらす生菌」と定義している (FAO/WHO, 2002). プロバイオティクスの条件にはまず、胃酸環境を通過し、腸まで届くために低 pH で生存可能であることが挙げられ、腸管粘膜や腸管粘液への接着性、整腸作用、免疫賦活作用、ミネラルや栄養の吸収力改善、病原菌との競合性など宿主に有益な影響をもたらすこと、さらに病原性・毒性がなく安全であること等が挙げられる (FAO/WHO, 2002).

様々な発酵食品からプロバイオティクス候補となる乳酸菌の分離を検討した報告があるが、近年、水産発酵食品や魚類の腸管からの乳酸菌の分離も試みられている。例えば、能登のアジのなれずしから分離した *Lb. plantarum* AN6 でコレステロール低減能が確認されている (Kuda *et al.*, 2013). また、福井のサバのなれずしから分離した *Ln. mesenteroides* 1RM3 は、抗酸化性やマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 における抗炎症作用、ヒト腸管細胞 Caco-2 への病原菌の侵入抑制効果を有することが報告されている (Kanno *et al.*, 2012; Kuda *et al.*, 2014a; Nakamura *et al.*, 2012). 魚類腸管からの分離例は、スズキ腸管から *p*-nitrophenol 分解能を持つ *Lc. lactis* を、サケ腸管から抗酸化性などを持つ *Ln. mesenteroides* および *Lc. lactis* を分離した報告 (Kuda *et al.*, 2011, 2014b) がある。

これらの沿岸環境から分離した菌の特徴として、分離源が塩分を含み、海岸では日光の紫外線にさらされることもあることから、塩分や乾燥、紫外線に対する耐性を持つ可能性がある。また、水産発酵食品も高塩分で乳酸などにより低 pH であることが多いため、分離された菌はある程度の耐酸性、耐塩性を持つと考えられる (Kuda *et al.*, 2013).

これまでに、牛乳や豆乳、ダイコンジュースにおける O_2^- 消去能が乳酸発酵によって上昇することが確認されているほか (Kawahara *et al.*, 2015; Kuda *et al.*, 2010), フノリやメカブなどの食用海藻においても O_2^- 消去能の向上が確認されている (Kuda *et al.*, 2015b, Nemoto *et al.*, 2016). このことから、乳酸菌により発酵させることにより、海藻製品の抗糖化性も上昇する可能性がある.

そこで本章ではまず、能登半島および三浦半島沿岸環境から分離された乳酸菌による海藻発酵能を確認した. また、発酵の認められたサンプルについて、抗糖化性に及ぼす発酵の影響を検討した.

第 1 節 海藻乾燥製品の抗糖化性に及ぼす発酵の影響

実験方法

能登半島および三浦半島分離乳酸菌による海藻発酵能

本実験では、石川県の能登 (千枚田) の海藻から分離された *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Noto-SU1 (accession No. LC213627, Kuda *et al.*, 2016), アジのなれずしから分離した *Lactobacillus plantarum* AN6 (accession No. LC213626, Kuda *et al.*, 2013) の 2 株と神奈川県三浦半島 (馬堀海岸) の海藻から分離した *Lb plantarum* Miura-SU1 (accession No. LC125266, Kuda *et al.*, 2016), *Lc. lactis* Miura-SU2 (accession No. LC125267, Kuda *et al.*, 2016) の 2 株を用いた. それぞれの菌株を、de Man, Rogosa, Sharpe broth (MRS broth, OXOID) を用いて 30°C で 2 日間前培養した. 前章と同様に調製した熱水抽出液 3 mL に前培養菌液 0.03 mL を接種した. 30°C で 2 日間培養後、濁りの有無を観察し、濁りの認められたサンプルについて、pH メーター (COMPACT pH METER B-211, HORIBA) を用いて pH を測定した.

海藻発酵液の抗糖化性

前章と同様に、BSA-Fru と BSA-MGO モデルを用いて抗糖化性を測定した。なお、岩ノリの海藻発酵液については4倍希釈にして実験に供した。

海藻発酵液のポリフェノール含量および抗酸化性

発酵による抗糖化性が認められたサンプルのうち3サンプルを選抜し、前章と同様に、そのポリフェノール含量および抗酸化性 (DPPH・消去能, 鉄還元能, O_2^- ・消去能) を測定した。

統計処理

実験データは平均値 \pm 標準誤差 ($n = 3$) で表した。統計処理は EXCEL 統計 6.0 (エスミ, 東京) を用い、スチューデントの t 検定により発酵前後の平均値を比較した。有意水準は* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ とした。

結果および考察

能登分離乳酸菌の海藻発酵能

能登分離乳酸菌 2 株の海藻発酵能を確認した結果を Table 3 に示した。テングサ (G1), ワカメ (Up1), エゴ (Ch), ツルモ (Cf), メカブ (Up'2), 岩ノリ (P) の 6 サンプルでは、2 株とも濁りおよび pH の低下を示したが、*Lb. plantarum* AN6 が pH を 3.5 まで低下させ、より強い発酵能を示した。カジメ類 (E1, E2) は、今回用いた乳酸菌による発酵は確認されなかった。前章において、カジメ類 (E1, E2) は最も高いポリフェノール含量および抗酸化性、抗糖化性を示したが、そのポリフェノールについては、グラム陽性菌に対する抗菌性が報告されている (Kuda *et al.*, 2007)。

能登半島産海藻製品の抗糖化性に及ぼす乳酸発酵の影響

Lc. lactis N-SU1 による 6 サンプルの海藻発酵液について、発酵前と比較して抗糖化性の上昇は認められなかった (データ示さず).

Lb. plantarum AN6 による海藻発酵液の BSA-Fru モデルにおける抗糖化性 (%) を Fig. 9 に示した. テングサ(G1), エゴ (Ch), ツルモ (Cf) の 3 サンプルでは、発酵による影響は認められなかった (データ示さず). 岩ノリ (P) では、熱水抽出液の抗糖化性が 59%であったのに対し、*Lb. plantarum* AN6 による海藻発酵液では 81%と上昇が認められた. また、ワカメ (Up1) では、熱水抽出液の抗糖化性 49%に対し、73%と有意に高い値が認められた. さらにメカブ (Up'2) でも、熱水抽出液の抗糖化性 34%に対し、72%と有意に高く、ワカメ、メカブでも抗糖化性の上昇が確認できた.

BSA-MGO モデルにおいては、発酵による抗糖化性の上昇は認められなかった (データ示さず).

三浦分離乳酸菌の海藻発酵能

三浦分離乳酸菌の海藻発酵能を確認した結果を Table 4 に示した. 海藻乾物製品では、テングサ (G1) 以外のすべてのサンプルで濁りおよび明確な pH の低下が認められた. また、*Lb. plantarum* Miura-SU1 による発酵では、7 サンプル全てで、*Lc. lactis* Miura-SU2 による発酵と比較して pH の低下が大きかった.

三浦半島産海藻製品の抗糖化性に及ぼす乳酸発酵の影響

Lb. plantarum Miura-SU1 による海藻発酵液の BSA-Fru モデルにおける抗糖化性を Fig. 10 に示した. ノリ (P), ヒジキ (Sf1) の 2 サンプルでは、発酵による影響は認められなかった (データ示さず). メカブ (Up') では、熱水抽出液の抗糖化性が 37%であったのに対し、*Lb. plantarum* Miura-SU1 による海藻発酵液では 70%と有意

に高く、抗糖化性の上昇が認められた。また、長ヒジキ (Sf2) では、熱水抽出液の抗糖化性 60%に対し、72%と有意に高い値が認められた。さらにアカモク (Sh) でも、熱水抽出液の抗糖化性 58%に対し、84%と有意に高く、長ヒジキ、アカモクでも抗糖化性の上昇が確認できた。

BSA-MGO モデルにおいては、能登半島産海藻製品の場合と同じく、発酵による抗糖化性の上昇は認められなかった (データ示さず)。

ポリフェノール含量および抗酸化性に及ぼす発酵の影響

今回の実験において、発酵による明確な抗糖化性の上昇が認められた能登半島のワカメ (Up1) およびメカブ (Up'2)、三浦半島のアカモク (Sh) について、ポリフェノール含量および抗酸化性を調べた。

Fig. 12A に発酵前後のポリフェノール含量を示した。いずれのサンプルも発酵によるポリフェノール含量の上昇が認められたものの、その上昇は 10%程度であった。

熱水抽出液の 4 倍希釈の濃度における DPPH・消去能の結果を Fig. 12B に示した。ワカメでは、発酵後前後で変化が認められず、メカブおよびアカモクでは、有意に上昇したがいずれも低い値であった。

熱水抽出液の 4 倍希釈の濃度における鉄還元能の結果を Fig. 12D に示した。いずれも有意な上昇が認められ、特にアカモクでは明確で、発酵前の 0.41 から 0.57 まで上昇した。

植物由来の食品において、細胞壁が微生物による加水分解を受けることで、ポリフェノール含量が増加することが報告されている (Hur *et al.*, 2013)。またいくつかの褐藻類においても、微生物の発酵により、ポリフェノール含量が増加することがすでに確認されている (Eom *et al.*, 2011; Shobharani *et al.*, 2013)。

ワカメおよびメカブの熱水抽出液の4倍希釈液およびアカモクの64倍希釈液の O_2^- 消去能の結果を Fig. 12C に示した。いずれのサンプルも発酵後の上昇が認められたが、発酵前後ともアカモクの O_2^- 消去能が高かった。

今回発酵が認められたサンプルのうち、ワカメ、メカブのポリフェノール含量および DPPH \cdot 消去能、鉄還元能、 O_2^- 消去能はもともと低く、発酵により上昇してもあまり高くはなかった。一方、アカモクは、発酵前からポリフェノール含量、抗酸化性、抗糖化性とも高く、さらに発酵により活性が上昇するため、発酵アカモクは有望な機能性素材と考えられる。

Table 3 Values of pH in the aqueous solution of algae fermented by lactic acid bacteria (LABs) isolated from Noto.

Algae	Abbreviation	Control without LABs	<i>Lactococcus lactis</i> N-SU1	<i>Lactobacillus plantarum</i> AN-6
Phaeophyta				
<i>Undaria pinnatifida</i> (Frond part)	Up1	6.4 ± 0.1	5.3 ± 0.1	3.5 ± 0.1
<i>U. pinnatifida</i> (sporophyll part)	Up'2	6.5 ± 0.1	4.9 ± 0.3	3.5 ± 0.1
<i>Chorda filum</i>	Cf	4.5 ± 0.1	4.4 ± 0.1	3.5 ± 0.1
Rhodophyta				
<i>Pyropia</i> sp.	P	6.6 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.5 ± 0.1
<i>Gelidiaceae</i> sp.	G1	7.3 ± 0.1	6.0 ± 0.1	4.6 ± 0.1
<i>Campylaephora hypnaeoides</i>	Ch	7.4 ± 0.1	5.1 ± 0.1	4.6 ± 0.1

The aqueous solutions inoculated LABs were incubated at 30°C for 48h. Value are mean and SD ($n = 3$).

E. stronifera (E1), *E. kurome* (E2), *U. pinnatifida* (Up2, Up'1) and *Gelidiaceae* sp. (G2) were could not be fermented.

Table 4 Values of pH in the aqueous solution of algae fermented by lactic acid bacteria (LABs) isolated from Miura.

Algae	Abbreviation	Control without LABs	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> Miura-SU1	<i>Lactococcus</i> <i>lactis</i> Miura-SU2
<i>Phaeophyta</i>				
<i>Undaria pinnatifida</i>	Up	6.1 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.8 ± 0.1
<i>U. pinnatifida</i>	Up'	6.1 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.9 ± 0.1
<i>Sargassum fusiforme</i>	Sf1	5.7 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.9 ± 0.1
<i>S. fusiforme</i>	Sf2	5.7 ± 0.1	4.4 ± 0.1	5.0 ± 0.1
<i>Sargassum horneri</i>	Sh	6.0 ± 0.1	4.2 ± 0.1	4.7 ± 0.1
<i>Rhodophyta</i>				
<i>Pyropia</i> sp.	P	6.3 ± 0.1	4.8 ± 0.1	5.3 ± 0.1
<i>Gelidiaceae</i> sp.	G2	5.9 ± 0.2	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.1

The aqueous solution inoculated LABs were incubated at 30°C for 48h. Values are mean and SD ($n = 3$). *Gelidiaceae* sp. (G1) was could not be fermented.

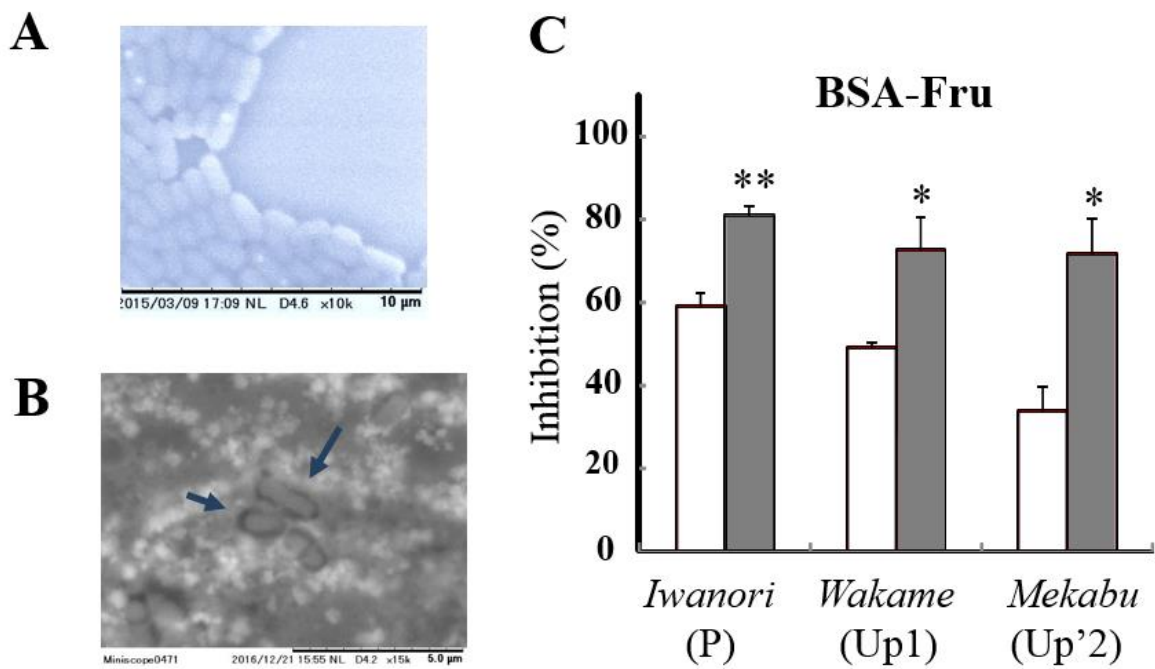


Fig. 9 Image of *Lactobacillus plantarum* AN6 (A) and *Lb. plantarum* AN6 in fermented *Mekabu* (B), increasing of anti-glycation capacity of edible algae by AN6 fermentation (C). The cells shape was observed under a table top SEM (TM3030, Hitachi) without any treatment and staining. The anti-glycation capacity of Iwanori was measured after dilution with 3 volumes water. Values are mean and SE ($n = 3$). * and **: $p < 0.05$ and 0.01 , respectively, when the fermented aqueous extract solutions (AESs) (closed columns) were compared to the intact AESs (open columns).

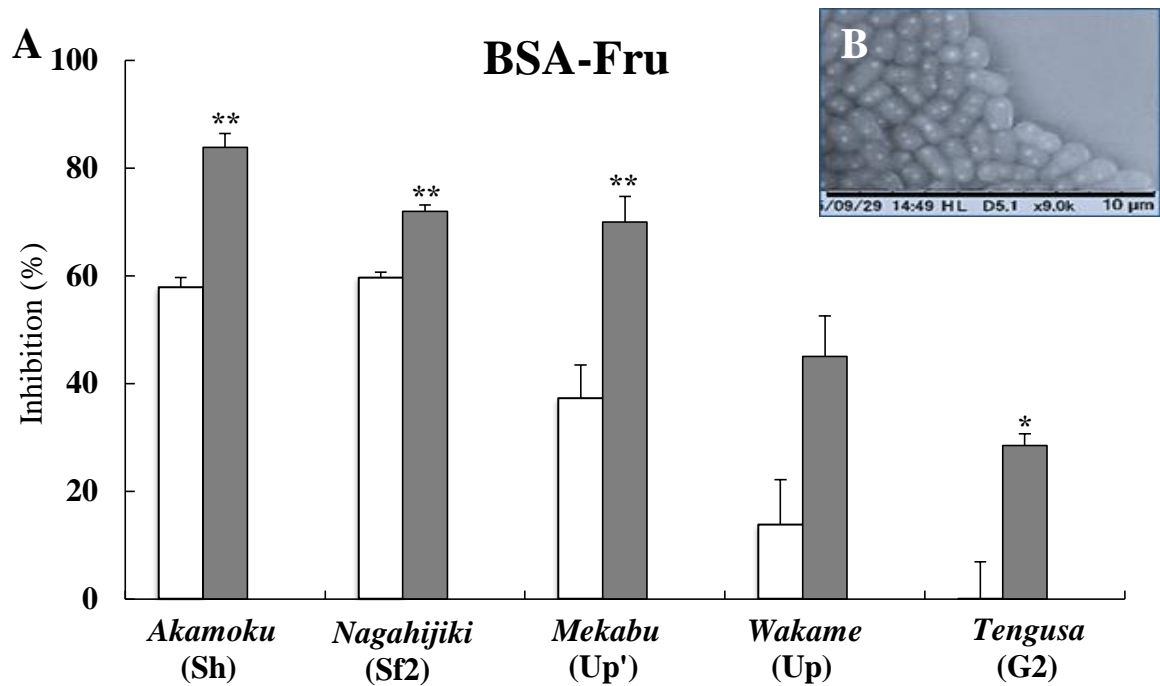


Fig. 10 Increasing of anti-glycation capacity of edible algae by Miura-SU1 fermentation (A) and image of *Lactobacillus plantarum* Miura-SU1 (B). The cell shape as shown in (b) was observed under a table-top scanning electron microscope (TM3030; Hitachi, Tokyo, Japan) without any treatment or staining. Values in (A) are mean and SE ($n = 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, when the fermented aqueous extract solutions (AESs, solid columns) were compared to the intact AESs (open columns).



Fig. 11 Images of *U. pinnatifida* (sporophyll part) (A) and *Sargassum horneri* (B).

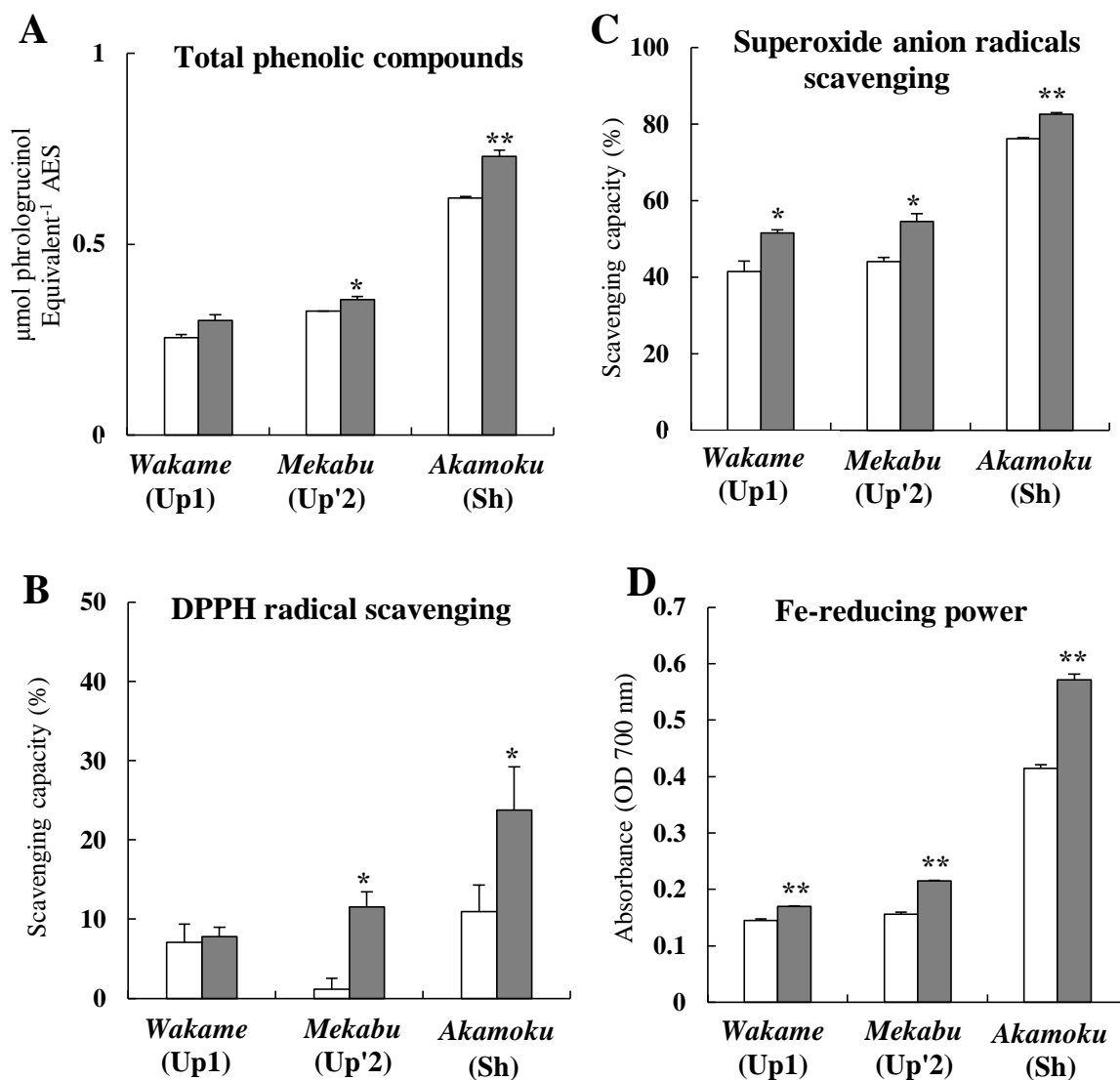


Fig. 12 Increasing of total phenolic compound content (A), DPPH and superoxide anion radicals scavenging capacity (B and C), and Fe-reducing power (D) of edible algae by fermentation. Values are mean and SE ($n = 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, when the fermented aqueous extract solutions (AESs, solid columns) were compared to the intact AESs (open columns).

第 2 節 限外ろ過画分における海藻発酵液の抗糖化性

前節の実験で、能登特産のワカメやメカブ、三浦特産のアカモクは、発酵により BSA-Fru モデルにおける抗糖化性の上昇が認められた。

本節では、海藻発酵液の抗糖化性がポリフェノールなどの低分子によるものか、多糖類を含む高分子によるものかを検討するために、それぞれの発酵前後の熱水抽出液について分子量ふるい (限外ろ過) を用いて分画し、大まかな分子量ごとの抗糖化性を調べた。さらに、各画分についてタンパク質濃度やポリフェノール含量の測定を行い、活性との相関を検討した。

実験方法

海藻発酵液の分画と抗糖化試験

前節で示した通り調製した *Lb. plantarum* AN6 によるワカメおよびメカブの発酵液と *Lb. plantarum* Miura-SU1 によるアカモクの発酵液を、Vivaspin (日本ジェネティクス株式会社) を用い、添付説明書に沿って Fig. 13 のように遠心分離を行い、3 kDa 未満, 3~10 kDa, 10~30 kDa, 30~100 kDa, 100~300 kDa, 300 kDa 以上の 7 画分を得た。具体的には、サンプルを遠心分離した後、残渣にサンプルと等量の蒸留水を加えさらに遠心分離し、得られた残渣をサンプルと等量の蒸留水でメスアップしたものを 300 kDa 以上の画分とした。また、ろ液に、同様の操作を行ったものを 100~300 kDa の画分とし、繰り返し同様の操作を行った。分画前の原液および得られた各画分について、上記と同様に、BSA-Fru モデルを用いて抗糖化性を測定した。

各画分のタンパク質濃度およびポリフェノール含量

各画分のタンパク質濃度は Protein Assay Rapid Kit (Wako) を用いて測定した。また、前章と同様に、そのポリフェノール含量を測定した。

統計処理

実験データは平均値 \pm 標準誤差 ($n = 3$) で表した。統計処理は EXCEL 統計 6.0 (エスミ, 東京) を用い、スチューデントの t 検定により各群の平均値を比較した。有意水準は* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ とした。

結果および考察

海藻発酵液の各画分の抗糖化性

Fig. 14 に、各画分の BSA-Fru モデルにおける抗糖化性を示した。発酵前のワカメの抗糖化性はすべての画分で認められ、特に 3 kDa 未満および 300 kDa 以上の画分で高かった (Fig. 14A)。 *Lb. plantarum* AN6 による発酵により、全ての画分で上昇の傾向が確認されたが、特に 300 kDa 以上の画分で活性が高い傾向で、10~30 kDa および 100~300 kDa の画分でも有意な上昇が認められた。

発酵前のメカブの抗糖化性は、3 kDa 未満の画分のみでしか認められなかったため (Fig. 14B)、メカブの抗糖化性は多糖類ではなく、ポリフェノール類や他の低分子化合物によるものと考えられる。しかし、 *Lb. plantarum* AN6 による発酵により、3 kDa 未満および 300 kDa 以上の画分で抗糖化性の上昇が確認された。

発酵前のアカモクの抗糖化性は、3 kDa 未満の低分子側で高く、3~10 kDa および 300 kDa 以上の高分子画分でも確認された (Fig. 14C)。 *Lb. plantarum* Miura-SU1 によるアカモクの発酵により、3 kDa 未満の画分で活性が低下したが、10 kDa 以上の高分子画分で抗糖化性の上昇が確認された。メカブの場合とは異なり、発酵により低分

子の活性成分はある程度消失してしまうものの、高分子の活性成分が産生されたと考えられる。高分子側の抗糖化性については、菌そのものが産生する高分子化合物が考えられる。

各画分のタンパク質濃度およびポリフェノール含量

タンパク質濃度は、いずれの熱水抽出液でもほとんど検出されず、発酵による上昇も認められなかった (データ示さず)。

各画分のポリフェノール含量を Fig. 15 に示した。発酵前のワカメおよびメカブでは、3 kDa 未満および 300 kDa 以上の画分において高く、発酵による変動はあまり大きくなかった (Fig. 15A, B)。また、発酵前のアカモクでは、10 kDa 未満および 300 kDa 以上の画分において高く、3 kDa 未満の低分子および 300 kDa 以上の高分子画分でポリフェノール含量が上昇していたが、3~10 kDa の画分では減少していた (Fig. 15C)。乳酸菌の有する加水分解酵素により、タンニンなどのポリフェノール重合体が分解され、没食子酸やピロガロールなどの低分子ポリフェノールが生成することが確認されている (Rodríguez *et al.*, 2009)。

Fig. 14 に示したように、発酵により高分子側で抗糖化性が上昇していたが、本実験でタンパク質の上昇が認められなかったことから、多糖類が影響していると考えられる。食用海藻中のタンパク質量はもともと少なく (大石, 1993)、また抽出時に加熱変性した後、遠心を行ったため抽出されなかったものと考えられる。アカモクにおいて、発酵により 3 kDa 未満の画分でポリフェノール含量が増加しているが、抗糖化性は低下していた。このことから、アカモクの発酵による抗糖化性の上昇は多糖類によるものと考えられる。

本章の結果より、能登特産のワカメやメカブ、三浦特産のアカモクは、発酵により抗糖化性の上昇が認められ、糖尿病の合併症および老化に関与する糖化反応の

抑制に有望であることが示唆された。その抗糖化性の上昇は、抗酸化性を伴い、300 kDa 以上の画分で高いことが認められた。これらのことから、海藻発酵液の抗糖化性は、抗酸化性をもつ物質を含む高分子の物質が関与すると考えられる。

プロバイオティクスの菌体外多糖 (Exopolysaccharide: EPS) の生理活性については、多くの報告がされている。例えば、抗酸化性やコレステロール低減能、免疫賦活作用、抗菌作用などの機能性を持つとされる (Dilna *et al.*, 2015; Shao *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2010)。本実験における海藻の発酵による抗糖化性の上昇も、EPS が関与していることも考えられる。これら発酵により変動する EPS およびポリフェノールについて、今後、詳細な検討が必要である。

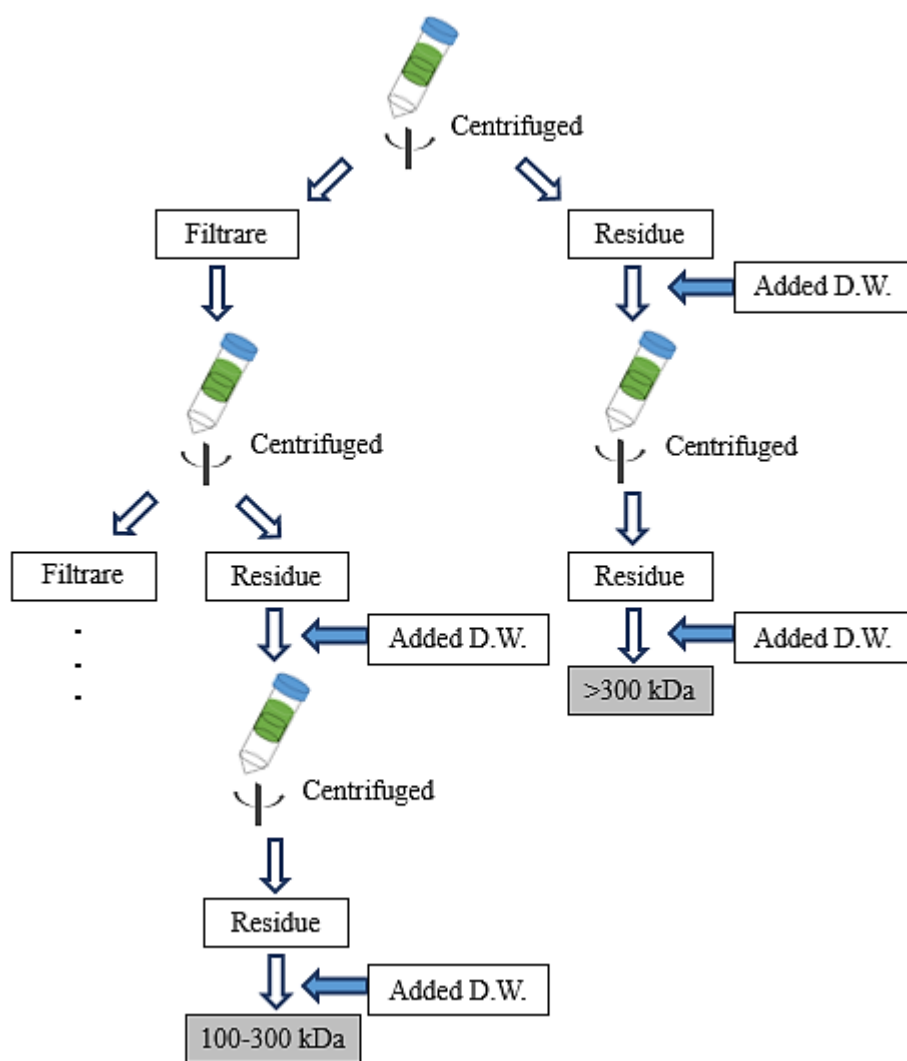


Fig. 13 Method of ultrafiltration.

D.W. : Distilled water

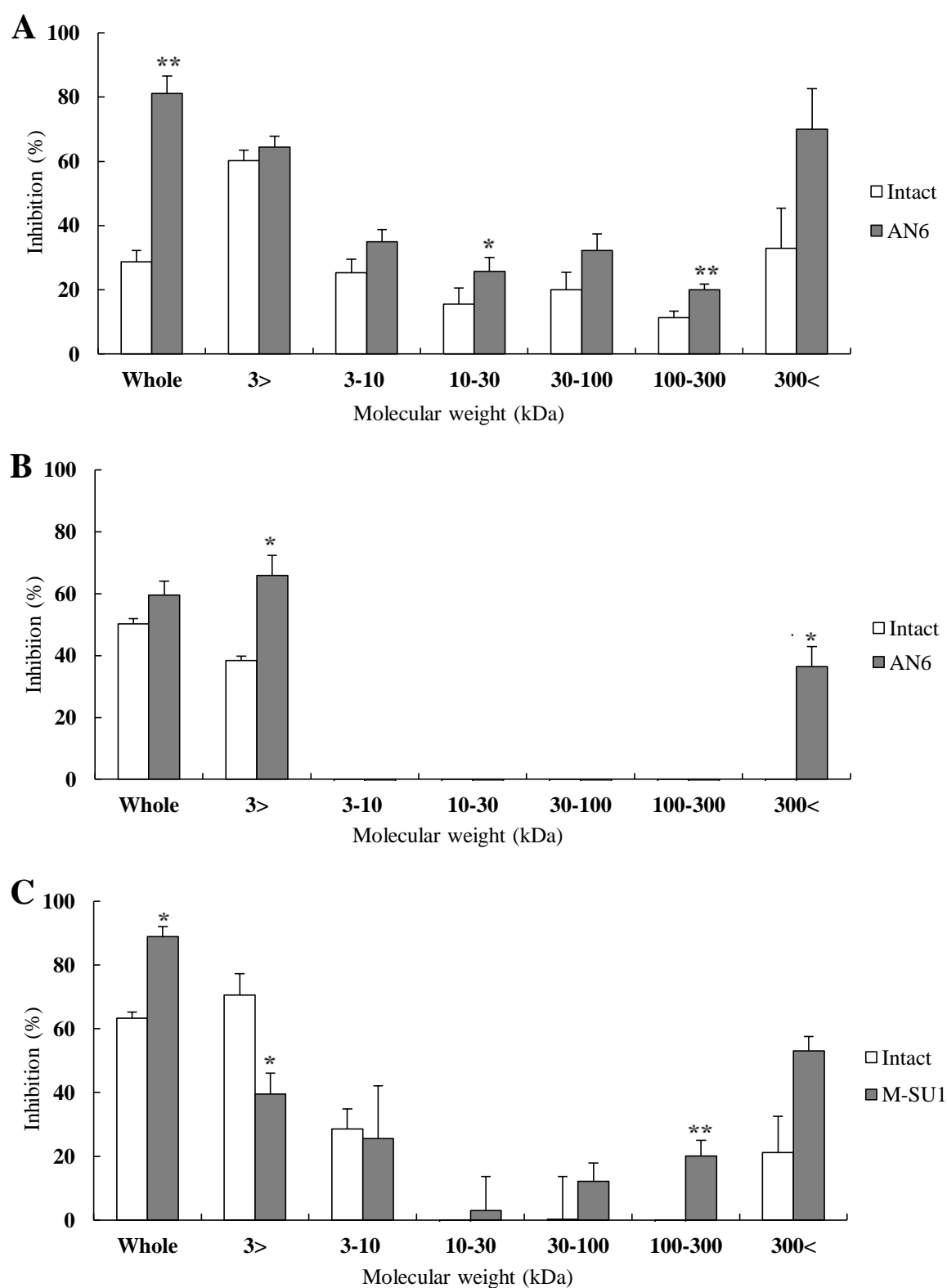


Fig. 14 Effect of ultrafiltrated sample solution on anti-glycation capacity. *Undaria pinnatifida* (Frond part) (A), *U. pinnatifida* (sporophyll part) (B) and *Sargassum horneri* (C). Values are expressed as mean and SE ($n = 3$).

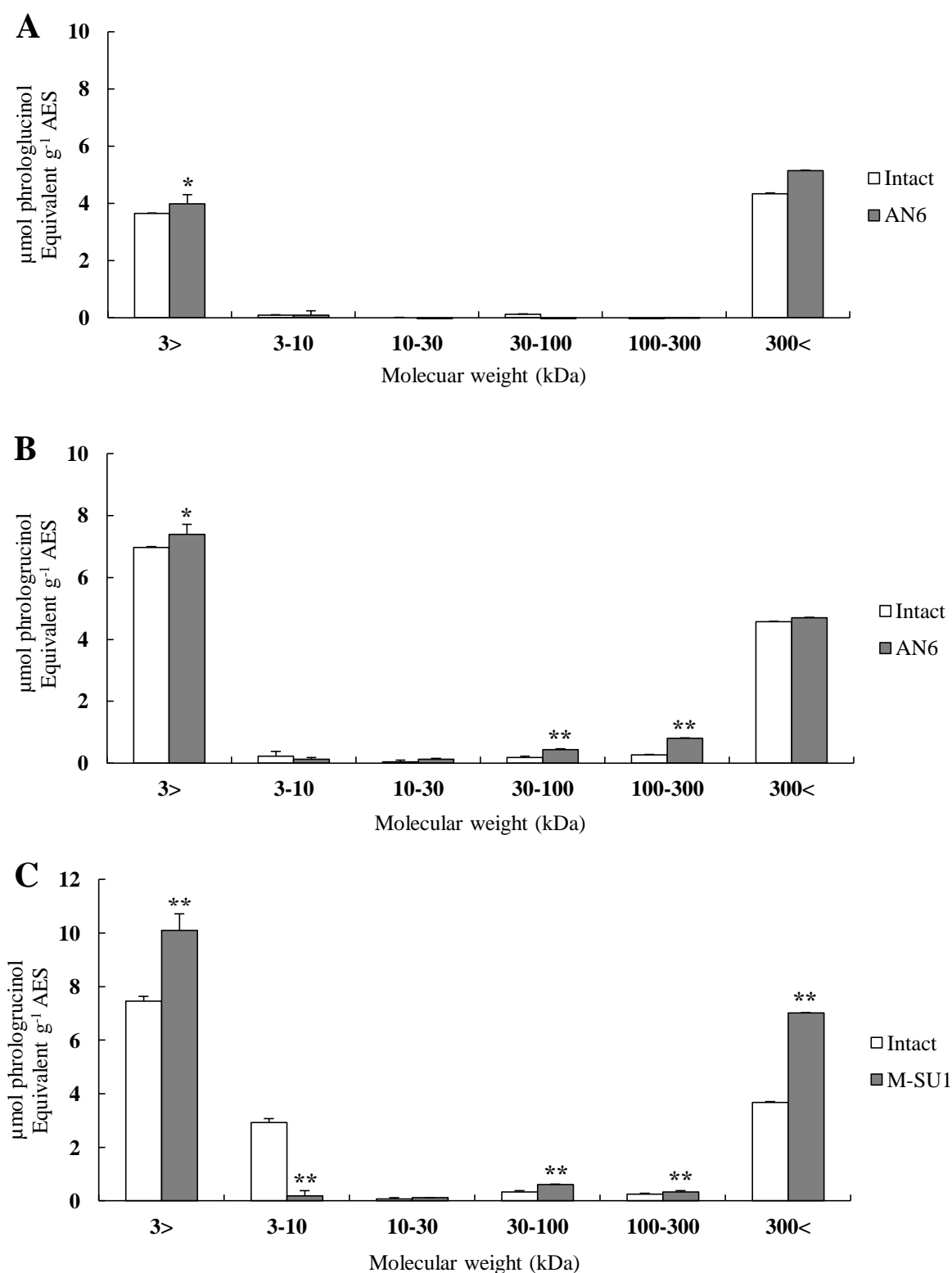


Fig. 15 Total phenolic compounds of ultrafiltrated sample solution. *Undaria pinnatifida* (Frond part) (A), *U. pinnatifida* (sporophyll part) (B) and *Sargassum horneri* (C). Values are expressed as mean and SE ($n = 3$).

第3章 高脂肪食マウスの血中および腸内糖化産物量に及ぼす三浦産

アカモク発酵液の影響

過剰な糖分や脂質を摂取した際に、糖化により体内で糖化最終生成物 (Advanced glycation endproducts, AGEs) が増加することが知られている (Ahmed *et al.*, 2005). Fig. 1 で示したように、アミノ酸や蛋白質と還元糖が反応し、グリオキサール (GO), メチルグリオキサール (MGO), 3-デオキシグリコソン (3-DG) などの中間体を経て、カルボキシルメチルリジン (CML), カルボキシルエチルリジン (CEL), ペントシジン, ピロピリジンなどの AGEs が生成する (Singh *et al.*, 2001; Vistoli *et al.*, 2013).

MGO はグルコースの 20000 倍という高い反応性を有し (Thornalley *et al.*, 2005), 強力な細胞毒性を持つ中間体である (Thornalley *et al.*, 2008). シュワン細胞やメサンギウム細胞を用いた実験では, MGO によりアポトーシスが誘導されることが報告されている (Fukunaga *et al.*, 2004; Liu *et al.* 2003). また, ヒト皮膚由来線維芽細胞 TIG-108 は, 老化の研究に用いられている正常二倍体線維芽細胞である. 近年では, TIG-108 細胞を用いた抗糖化性に関する研究の報告がある (Shimada *et al.*, 2011).

血糖コントロール状態の指標として使用されているグリコヘモグロビン (HbA1c) やグリコアルブミン (GA) も, 中間体の 1 種である. HbA1c は赤血球ヘモグロビンが糖化を受けたもので, 2~3 か月前の血糖値の状態を反映して変動する (Anguizola *et al.*, 2013). 一方 GA は, 血清アルブミンが糖化を受けたもので, 半減期が約 17 日程度である (Day *et al.*, 1980) ため, 直近の 2 週間前ほどの血糖値を反映して変動する. また, カルボキシルメチルリジン (CML) は, 体内だけではなく食品中にも生成される AGEs である (Poulsen *et al.*, 2013).

ホンダワラ科は、海水中で気胞により浮力を持つことが特徴の褐藻類で、炭水化物、ミネラル、タンパク質、必須アミノ酸、 β カロテンとビタミンを豊富に含んでいる (Kumar *et al.*, 2015). そのホンダワラ科の中でも、アカモクは、軽く湯通しすることで、風味の良い食材として日本の北陸や秋田、山形、韓国の一部地域で食されてきた。一方、太平洋側の宮城県や三浦半島では、アカモクは食用海藻として利用されず、さらには網に絡みつくことから、水産業においては邪魔な海藻とされていた。しかし、近年では、多糖類を豊富に含み、抗酸化性 (Wen *et al.*, 2014) や抗炎症性 (Wen *et al.*, 2016) といった機能性を有することが明らかになったため、機能性素材として注目を集めている。

前章までに、三浦半島のアカモクは、発酵前からポリフェノール含量、抗酸化性、抗糖化性とも高く、さらに発酵により活性の上昇が認められた。本章では、アカモクの発酵液を用い、糖化産物による細胞毒性に対する保護作用と、高脂肪食マウスにおける血中 GA と腸内 CML 量に及ぼす影響を検討した。

実験方法

アカモク発酵液の調製

Lb. plantarum Miura-SU1 を MRS broth を用いて 30°C で 2 日間培養した。菌体を PBS で洗浄後、660 nm の吸光度が 2.0 になるように PBS で調整したものを菌液とした。アカモクの熱水抽出液 100 mL に対し、菌液 1 mL を接種した。30°C で 2 日間培養したアカモク発酵液に 100°C、20 分の加熱処理を行い、以後の細胞実験に用いた。

ヒト皮膚由来線維芽細胞 (TIG-108) の培養

糖化産物に対する感受性が報告されている (Shimoda *et al.*, 2011) TIG-108 細胞 (JCRB0537) を, 10% (v/v) 非働化ウシ胎児血清 (FBS, フナコシ), 1% (v/v) 100× Penicillin-Streptomycin (和光純薬工業) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 和光純薬工業) で, 37°C, 5% CO₂ 条件下で継代培養を行った.

96 ウェル細胞培養プレート (Becton Dickinson, 1-8425-05) に 0.1 mL (5000 cells/well) になるよう播種し, 24 時間培養して接着させ, 実験に用いた.

アカモク発酵液の細胞毒性に対する保護作用

Jiménez-Aspee *et al.* (2016) を改良し, 以下のように行った. TIG-108 の培地を除去し, DMEM 0.1 mL とアカモク発酵液 0.01 mL を加えた ($n = 3$). 37°C, 5% CO₂ で 24 時間培養を行った後, 培地を除去し, 新たに DMEM 0.1 mL と MGO 0.01 mL (終濃度 3 mmol/L) あるいは Fru (終濃度 0.375 mol/L) を添加した. 再び 24 時間培養後, 生存率を計算するため培地を除去し, PBS を用いて 3 回洗浄を行い, DMEM 0.1 mL と WST-8 (Cell Counting Kit-8, 同仁科学) 0.01 mL を添加した. 37°C, 2 時間放置後, OD 450 nm の吸光度を測定した.

生存性(%)

$$= (\text{Sample Abs} - \text{Blank Abs}) / (\text{Control Abs} - \text{Blank Abs}) \times 100$$

飲料水の調製

前章と同様に調製したアカモクの熱水抽出液およびその発酵液を 3 倍量の蒸留水で希釈し, 以下の実験に用いた.

マウスの飼育条件

本研究で行った動物実験は、東京海洋大学動物実験委員会による承認を受け、動物実験等取扱規則に従って行った。

5 週齢, Kwl: ddY マウス (雄) 24 匹を東京実験動物より購入し、普通食 (CE-2, 日本クレア) および飲料水として蒸留水を自由摂取させ 4 日間予備飼育した。飼育は室温 22~25°C, 湿度 50~70% で行った。

予備飼育後, Fig. 17 に示すように無作為に 4 群に分け ($n = 8$)、Control 群には CE-2 および蒸留水, High fat 群には高脂肪食 (Quick fat, 日本クレア) および蒸留水, Sh 群には高脂肪食および飲料水として 25% アカモク抽出液, FSh 群には高脂肪食および 25% アカモク発酵液をそれぞれ 21 日間与えた。飼育終了後に, 30% イソフルラン/プロピレングリコールで吸気麻酔後, 全採血し, 血液および各臓器 (脾臓、肝臓、腎臓、盲腸) を摘出し秤量した。盲腸内容物は CML 測定前まで -30°C で凍結保存した。

血漿成分

血液は予めヘパリンを加えておいたマイクロチューブに回収した後, 遠心分離し, 血漿を得た。オリエンタル酵母工業株式会社に依頼し, 血漿中の総コレステロール (T-CHO), トリグリセリド (TG), グリコアルブミン (GA) を測定した。

盲腸内容物のカルボキシルメチルリジン (CML) 量

盲腸内容物を蒸留水で 1000 倍希釈し, OxiSelect™ Nε - (Carboxymethyl) Lysine (CML) Competitive ELISA kit (コスモバイオ) を用いて, CML 量の定量を行った。

統計処理

実験データは平均値 ± 標準誤差で表した. EXCEL 統計 6.0 (エスミ) を用い, 分散分析 (ANOVA), テューキー多重比較法により各群の平均値を対照群の平均値と比較した. 有意水準は* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ とした.

結果と考察

アカモク発酵液の細胞毒性に対する保護効果

3 mmol/L MGO に暴露した後の TIG-108 細胞の生残率を Fig. 16A に示した. MGO の暴露により生残率は約 46% に減少し, アカモク発酵液による生残率の上昇は認められなかった. また, Fru の添加によって生残率は約 77% に減少し, 同様に効果は認められなかった (Fig. 16B). 前章においてアカモク発酵液の抗糖化性が確認されたが, 本実験では糖化産物による細胞毒性からの保護効果はみられず, それらの結果と一致しなかった.

糖化産物による細胞のアポトーシスは, MAP 経路の活性化により誘導される (Fukunaga *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2013). MAP キナーゼは, 酸化ストレスやサイトカインなどの外界からの刺激に応答し, MAP 経路を仲介する酵素である (Wada *et al.*, 2004). LR-90, タンシノン IIA, ピオグリタゾンなどの添加により, 糖化産物による細胞毒性に対する保護効果が確認されているが (Figarola *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2015), これらは MAP キナーゼの働きを阻害することで効果を示す. このことから, アカモク発酵液は, MAP キナーゼに対する阻害作用を示さないものと考えられ, 別の実験系を検討する必要がある.

体重および臓器重量, 血中脂質

体重変化と各臓器の重量を Table 5 に示した. 盲腸以外の臓器では Control 群との有意差が認められなかった. 盲腸重量は, Control 群と比較して High fat 群と Sh 群において有意な減少が認められたが, FSh 群では減少量が小さかった. 腸内発酵が促進された結果として, 盲腸が肥大することが報告されている (Campbell *et al.*, 1997; Nakata *et al.*, 2016) ため, アカモク発酵液は腸内フローラやその代謝産物に影響を与えていると考えられる.

血中脂質を測定した結果, Control 群と比較して High fat 群で T-CHO の値が有意に高く, Sh 群と FSh 群では減少は認められなかった (Table 5). また, TG は High fat 群で高い傾向が認められ, High fat 群と比較して FSh 群では TG が減少する傾向があった.

乳酸菌の投与により, 腸内フローラが変動し, 血中 TG が減少することが多く報告されている (Ahn *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2013). 海藻成分による血中脂質低減作用に関する報告は多く存在するが, 長期間にわたり投与を行ったものが多く (川崎ら, 2007; Jeon *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2012), アカモクについてもより長期的な飼育が必要であると考えられる.

血漿 GA および盲腸内容物 CML 量

血漿中の GA を測定した結果を Fig. 18A に示した. 有意差はないものの, Control 群と比較して High fat 群で 2 倍ほどの量に増加していた. 一方, FSh 群では Control 群と同程度であり, アカモク発酵液による糖化抑制の傾向が認められた. この傾向は Sh 群では認められなかった. 血中タンパク質の糖化抑制については, ザクロの投与により GA の生成が抑制された報告のほか (Kumagai *et al.*, 2015), クワの葉やハーブ, L-カルニチンなどの投与により, HbA_{1c} の生成の抑制が認められた報告があるが (Naowaboot *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2012; Rajasekar *et al.*, 2006), これらは

抗酸化作用や高血糖状態の改善により効果を示す。水溶性多糖類は糖分の吸収を抑制することが報告されている (Ulmius *et al.*, 2009) ことから、アカモク発酵液においては、酸化および糖分の吸収が抑制されることにより、血漿中の GA が減少したと考えられる。

盲腸内容物中の CML 量を測定した結果を Fig. 18B に示した。Control 群は 2 ng/ml であったのに対し、High fat 群では 25 ng/ml と高く、CML 量の増加が確認された。また、Sh および FSh 群では、さらに高い傾向であった。

前章までの結果から、盲腸内での CML の生成は抑制されるものと予想されたが、盲腸内容物中の CML 量は相反する結果となった。CML は、糖化反応以外にも脂質の過酸化により生成することが報告されており、脂質を多く含む食品ほど、CML 量が高くなることが確認されている (Buetler *et al.*, 2008)。本実験に用いた高脂肪食により体内で生成した CML に加え、高脂肪食中にも CML が含有されているものと考えられる。食事由来の CML は腸管から吸収され、疾患の発症に影響することが報告されている (Li *et al.*, 2015)。これまでに盲腸内や糞便中の CML を測定した報告はほとんどないが、アカモク発酵液中の水溶性多糖類が糖分だけではなく CML の体内への吸収を抑制し、盲腸に残存する CML が増加した可能性がある。

高脂肪食では腸内フローラが変動することが知られている (Daniel *et al.*, 2014)。今後、腸内の糖化産物と腸内フローラの相関も含め、詳細に検討する必要がある。

Table 5 Body and organ weight and constituent of blood plasma in mice.

	Group			
	Control	High fat	Sh	FSh
Body weight				
Initial body weight (g)	27.7 ± 1.0	27.9 ± 0.6	27.7 ± 0.7	27.8 ± 0.6
Final body weight (g)	35.1 ± 1.7	37.5 ± 1.7	37.6 ± 2.1	37.4 ± 2.6
Organ weight				
Kidney (g)	0.49 ± 0.05	0.53 ± 0.04	0.52 ± 0.04	0.55 ± 0.04
Spleen (g)	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.02
Cecum (g)	0.57 ± 0.04 ^a	0.39 ± 0.05 ^b	0.44 ± 0.06 ^b	0.47 ± 0.05 ^{ab}
Liver (g)	1.79 ± 0.12	1.90 ± 0.11	1.89 ± 0.19	1.96 ± 0.17
Constituent of blood plasma				
TG (mg/dL)	108.3 ± 14.8	133.2 ± 16.5	133.7 ± 34.3	116.5 ± 12.0
T-CHO (mg/dL)	130.0 ± 9.8 ^a	182.2 ± 16.1 ^b	168.5 ± 7.3 ^{ab}	179.5 ± 11.3 ^b

Values are mean and SEM ($n = 8$ for body and organ weight, $n = 6$ for constituent of blood plasma). Different letters indicates significantly differences between groups.

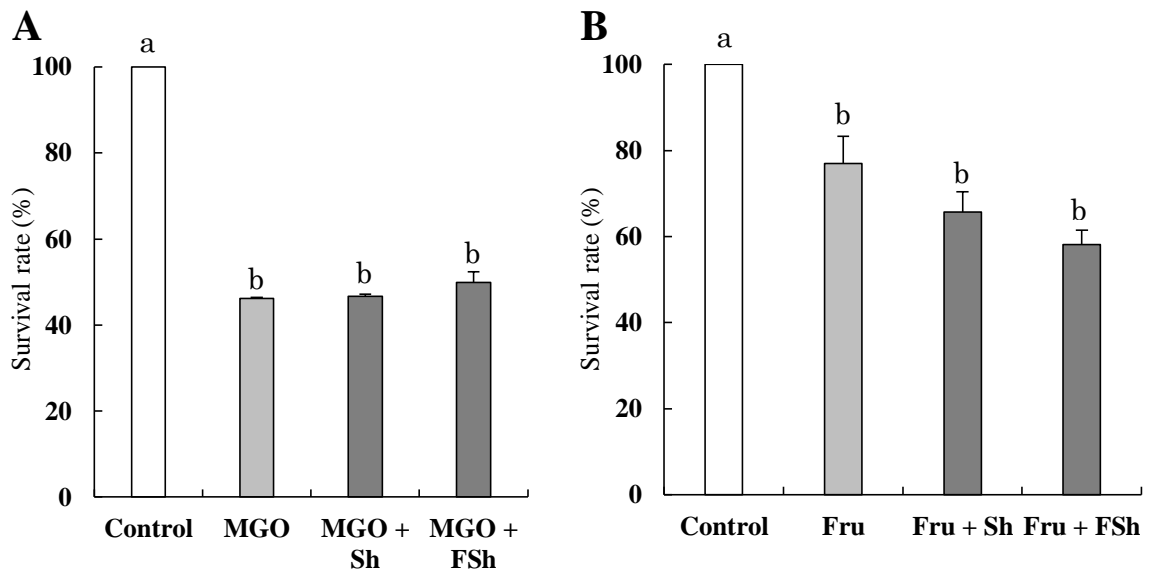


Fig. 16 Effect on the viability of TIG-108 cells pre-treated with Sh or FSh and subsequently challenged with MGO (A) or Fru (B). Values are mean and SEM ($n = 3$). Different letters indicates significantly differences between groups.

Sh : *Akamoku*

FSh : Fermented *Akamoku*

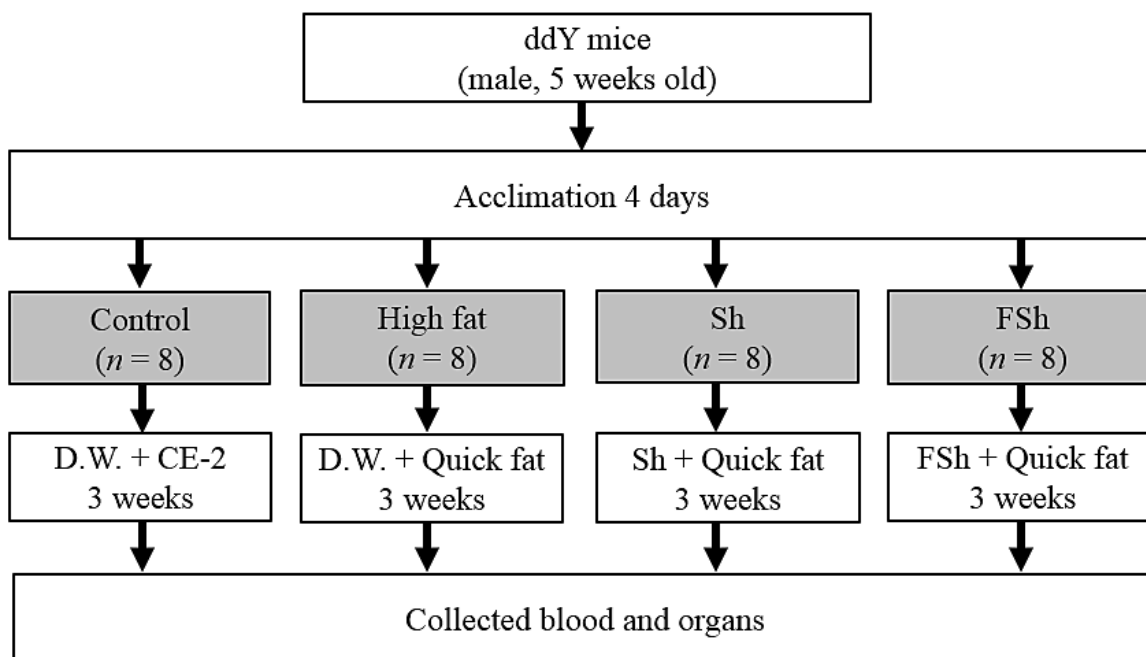


Fig. 17 Schedule of drinking water in animal experiment.

D.W. : Distilled water

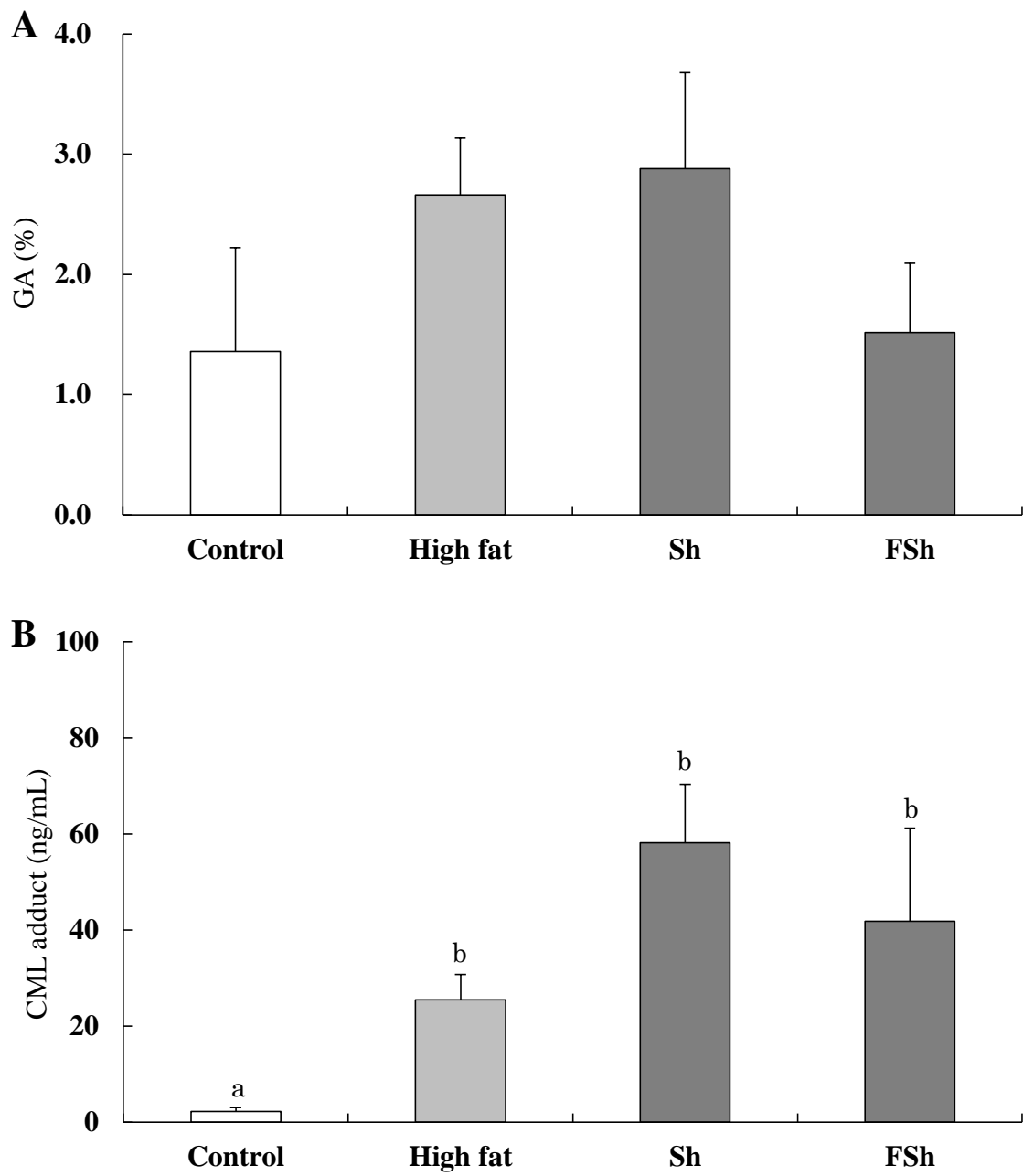


Fig. 18 GA of blood plasma (A) and CML protein adduct of cecal samples (B) in mice.

Values are mean and SEM ($n = 6$). Different letters indicates significantly differences between groups.

GA (%); glycolisine / total lysine $\times 100$

総括

本研究では、食用海藻の新たな機能性を解明することを目的とし、能登および三浦特産の海藻乾物の熱水抽出液の抗糖化性、各沿岸環境から分離した乳酸菌による海藻発酵液の抗糖化性を調べた。また、アカモク発酵液の高脂肪食マウスの血中および腸内糖化産物量に及ぼす影響を検討した。

第1章では、能登海藻乾物製品 11 製品 (カジメ類 (E1, E2), ワカメ 2 (Up1, Up2), メカブ 2 (Up'1, Up'2), ツルモ (Cf), テングサ 2 (G1, G2), エゴ (Ch), 岩ノリ (P)) および三浦海藻乾物製品 8 製品 (干しワカメ (Up), 干しメカブ (Up'), 煮干しヒジキ (Sf1), 煮干し長ヒジキ (Sf2), 乾燥アカモク (Sh), 焼きノリ (P), テングサ 2 (G1, G2)) の熱水抽出液の抗糖化性を検討した。能登海藻乾燥製品において、糖化中期以後を想定した BSA-MGO モデルでは、カジメ (E1, E2), 岩ノリ (P), メカブ (Up'1) で高い抗糖化性が示された。糖化反応全体を想定した BSA-Fru モデルでも、同様の結果が示されたが、メカブのサンプルの 1 つでは抗糖化性が高くなった。また、三浦海藻乾燥製品において、BSA-MGO モデルでは、ノリ (P) が最も高い抗糖化性を示した。BSA-Fru モデルでは、ノリ (P), 長ヒジキ (Sf2), アカモク (Sh) で高い抗糖化性が示された。BSA-MGO モデルでの抗糖化性は、ポリフェノール含量, DPPH・消去能, 鉄還元能と相関していた。一方、BSA-Fru モデルでは、ポリフェノール以外の活性成分の存在が示された。

第2章では、沿岸環境由来の乳酸菌株による海藻発酵能を確認し、発酵の認められたサンプルについて、抗糖化性に及ぼす発酵の影響を検討した。能登分離乳酸菌である *Lc. lactis* Noto-SU1, *Lb. plantarum* AN6 を接種した熱水抽出液において、テングサ (G1), ワカメ (Up1), エゴ (Ch), ツルモ (Cf), メカブ (Up'2), 岩ノリ (P) の 6 サンプルでは、濁りおよび pH の低下が認められた。また、三浦分離乳酸菌である *Lb. plantarum* Miura-SU1, *Lc. Miura-SU2* により、テングサ (G1) 以外の 7 サンプル

で発酵が認められた。これらの海藻発酵液の抗糖化性を検討したところ、糖化中期以後を想定した BSA-MGO モデルにおいては、抗糖化性に対する影響は認められなかった。しかし、糖化全体を想定した BSA-Fru モデルにおいて、*Lb. plantarum* AN6 による岩ノリ、ワカメ、メカブの発酵液と *Lb. plantarum* Miura-SU1 による干しメカブ、煮干し長ヒジキ、乾燥アカモク、テングサの発酵液で、抗糖化性の上昇が認められた。

発酵による明確な抗糖化性の上昇が認められた能登半島のワカメ (Up1) およびメカブ (Up'2)、三浦半島のアカモク (Sh) について、ポリフェノール含量および酸化性を調べたところ、特にアカモクで発酵により活性が上昇した。

海藻発酵液中の抗糖化性を持つ成分について検討するために、前述の3サンプルについて分子量ふるいを用いて分画した。大まかな分子量ごとの抗糖化性を調べた結果、高分子画分で発酵による抗糖化性の上昇が認められた。この抗糖化性の上昇と画分中のタンパク質量およびポリフェノール含量との相関性は認められなかったことから、多糖類が影響していると考えられる。

第3章では、アカモク発酵液を用いて、高脂肪食マウスの血中および腸内糖化産物量に及ぼす影響を検討した。飲料水としてアカモク発酵液を与えたマウスでは、盲腸内容物中の CML の増加の抑制は認められなかったものの、血漿中の糖化アルブミンについては、増加の抑制傾向が示された。

以上の結果より、伝統的な食用海藻のカジメ類やノリ、また、各沿岸環境から分離した乳酸菌により発酵されたワカメやメカブ、アカモクは抗糖化性を有する、有用な機能性食材として期待できる。なかでも、アカモク発酵液の抗糖化性が高く、その経口摂取は、高脂肪食マウスにおいて、血中糖化産物の増加の抑制傾向を示した。これらの結果は海藻および発酵の新たな機能性を示唆するものであると考え

ている。今後、本研究で認められた結果について、抗糖化性の上昇に關与する高分子画分の成分や乳酸菌そのものについてのより詳細な検討が望まれる。

なお本研究で得られた成果の一部は、以下の通り発表済みである。

ポスター発表：

日本水産学会 (2015年9月, 東北大学川内北キャンパス). 能登海藻乾物製品の抗糖化性と乳酸発酵の影響. 江田美佳, 根本真希, 久田孝, 高橋肇, 木村凡

口頭発表：

日本水産学会 (2016年9月, 近畿大学農学部). 三浦産海藻乾物製品の抗糖化性と乳酸発酵の影響. 江田美佳, 根本真希, 久田孝, 高橋肇, 木村凡.

投稿論文:

Kuda T., Eda M., Kataoka M., Nemoto M., Kawahara M., Oshio S., Takahashi H., Kimura B., 2016. Anti-glycation properties of the aqueous extract solutions of dried algae products and effect of lactic acid fermentation on the properties. *Food Chemistry*, 192, 1109–1115.

Eda M., Kuda T., Kataoka M., Takahashi H., Kimura B., 2016. Anti-glycation properties of the aqueous extract solutions of dried algae products harvested and made in the Miura Peninsula, Japan, and effect of lactic acid fermentation on the properties. *Journal of Applied Phycology*, 28, 3617–3624

引用文献

- Anguizola J., Matsuda R., Barnaby OS., Hoy KS., Wa C., DeBolt E., Koke M., Hage DS., 2013. Review: Glycation of human serum albumin. *Clinica Chimica Acta*, 21, 64-76.
- Ahn HY., Kim M., Ahn YT., Sim JH., Choi ID., Lee SH., Lee JH., 2015. The triglyceride-lowering effect of supplementation with dual probiotic strains, *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032: Reduction of fasting plasma lysophosphatidylcholines in nondiabetic and hypertriglyceridemic subjects. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 25, 724-733.
- Ahmed N., 2005. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 67, 3-21.
- Bhatia S., Rathee P., Sharma K., Chaugule BB., Kar N., Bera T., 2013. Immuno-modulation effect of sulphated polysaccharide (porphyran) from *Porphyra vietnamensis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 50-56.
- Buetler TM., Leclerc E., Baumeyer A., Latado H., Newell J., Adolfsson O., Parisod V., Richoz J., Maurer S., Foata F., Piguet D., Junod S., Heizmann CW., Delatour T., 2008. N ϵ -carboxymethyllysine-modified proteins are unable to bind to RAGE and activate an inflammatory response. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 370 - 378.
- Campbell JM., Fahey GC Jr., Wolf BW., 1997. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *Journal of Nutrition*, 127, 130-136.

- Daniel H., Gholami AM., Berry D., Desmarchelier C., Hahne H., Loh G., Mondot S., Lepage P., Rothballer M., Walker A., Böhm C., Wenning M., Wagner M., Blaut M., Schmitt-Kopplin P., Kuster B., Haller D., Clavel T, 2014. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *The ISME Journal*, 8, 295–308.
- Day JF., Ingebretsen CG., Ingebretsen WR Jr., Baynes JW., Thorpe SR., 1980. Nonenzymatic glycosylation of serum proteins and hemoglobin: response to changes in blood glucose levels in diabetic rats. *Diabetes.*, 29, 524-527.
- Dejian H., Boxin O., Ronald L P., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Dilna SV., Surya H., Aswathy RG., Varsha KK., Sakthikumar DN., Pandey N., Nampoothiri KM., 2015. Characterization of an exopolysaccharide with potential health benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF₄. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 1179-1186.
- Eom SH., Kang YM., Park JH., Yu DU., Jeong ET., Lee MS., Kim YM., 2011. Enhancement of polyphenol content and antioxidant activity of brown alga *Eisenia bicyclis* extract by microbial fermentation. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 14, 192-197.
- Eom SH., Kim YM., Kim SK., 2011. Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 3251–3255.
- FAO/WHO, 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
- Foligné B., Daniel C., Pot B., 2013. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Current Opinion of Microbiology*, 16, 284-92.
- Figarola JL., Singhal J., Rahbar S., Awasthi S., Singhal SS., 2014. LR-90 prevents methylglyoxal-induced oxidative stress and apoptosis in human endothelial cells. *Apoptosis*, 19, 776-788.

- Fukunaga M., Miyata S., Liu BF., Miyazaki H., Hirota Y., Higo S., Hamada Y., Ueyama S., Kasuga M., 2004. Methylglyoxal induces apoptosis through activation of p38 MAPK in rat Schwann cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20, 689-695.
- Ho S., Wu S., Lin S., Tang Y., 2010. Comparison of anti-glycation capacities of several herbal infusions with that of green tea. *Food Chemistry*, 122, 768-774.
- Hur SJ., Lee SY., Kim YC., Choi I., Kim GB., 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*, 160, 346–356.
- Ibañez E., Cifuentes A., 2013. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 703-709.
- Ikemori T., Tajima M., 2002. List of marine plants from the coast of Ishikawa prefecture. *Bulletin of Ishikawa Prefecture Fisheries Research Center*, 3, 1-11.
- Isaka S., Cho K., Nakazono S., Abu R., Ueno M., Kim D., Oda T., 2015. Antioxidant and anti-inflammatory activities of porphyran isolated from discolored nori (*Porphyra yezoensis*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 68–75.
- Itoi S., Yuasa K., Washio S., Abe T., Ikuno E. and Sugita H., 2009. Phenotypic variation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates derived from intestinal tracts of marine and freshwater fish. *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology*, 107, 867-874.
- Jeon SM., Kim HJ., Woo MN., Lee MK., Shin YC., Park YB., Choi MS., 2010. Fucoxanthin-rich seaweed extract suppresses body weight gain and improves lipid metabolism in high-fat-fed C57BL/6J mice. *Biotechnology Journal*, 5, 961-965.

- Jiménez-Aspee F., Theoduloz C., Ávila F., Thomas-Valdés S., Mardones C., von Baer D., Schmeda-Hirschmann G., 2016. The Chilean wild raspberry (*Rubus geoides* Sm.) increases intracellular GSH content and protects against H₂O₂ and methylglyoxal-induced damage in AGS cells. *Food Chemistry*, 194, 908-919.
- Kandarakis SA, Piperi C, Topouzis F, Papavassiliou AG, 2014. Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases. *Progress Retinal and Eye Research*, 42, 85-102.
- Kang MC., Kang N., Kim SY., Lima IS., Ko SC., Kim YT., Kim YB., Jeung HD., Choi KS., Jeon YJ., 2016. Popular edible seaweed, *Gelidium amansii* prevents against diet-induced obesity. *Food and Chemical Toxicology*, 90, 181-187.
- Kanno T., Kuda T., Choa A., Takahashi H. and Kimura B., 2012. Radical scavenging capacities of *saba-narezushi*, Japanese fermented chub mackerel, and its lactic acid bacteria. *Food Science and Technology*, 25-30.
- Kawahara M., Nemoto M., Nakata T., Kondo S., Takahashi H., Kimura B., Kuda T., 2015. Anti-inflammatory properties of fermented soy milk with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S-SU2 in murine macrophage RAW264.7 cells and DSS-induced IBD model mice. *International Immunopharmacology*, 26, 295–303.
- Kim MJ., Jeon J., Lee JS., 2014. Fucoidan prevents high-fat diet-induced obesity in animals by suppression of fat accumulation. *Phytotherapy Research*, 28, 137-143.
- Kuda T., Ikemori T., 2009. Minerals, polysaccharides and antioxidant properties of aqueous solutions obtained from macroalgal beach-casts in the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan. *Food Chemistry*, 112, 575-581.
- Kuda T., Kaneko N., Yano T., Mori M., 2010. Induction of superoxide anion radical scavenging capacity in Japanese white radish juice and milk by *Lactobacillus*

plantarum isolated from *aji-narezushi* and *kaburazushi*. Food Chemistry, 120, 517–522.

Kuda T., Kanno T., Kawahara M., Takahashi H., Kimura B., 2014a. Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from narezushi on lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 mouse macrophage cells and dextran sodium sulphate-induced inflammatory bowel disease in mice. Journal of Functional Foods, 6, 631-636.

Kuda T., Kataoka M., Nemoto M., Kawahara M., Oshio S., Takahashi H., Kimura B., 2016. Isolation of lactic acid bacteria from plants of the coastal *Satoumi* regions for use as starter cultures in fermented milk and soymilk production. Food Science and Technology, 68, 202-207.

Kuda T., Kosaka M., Hirano S., Kawahara M., Sato M., Kaneshima T., Nishizawa M., Takahashi H., Kimura B., 2015a. Effect of sodium-alginate and laminaran on *Salmonella* Typhimurium infection in human enterocyte-like HT-29-Luc cells and BALB/c mice. Carbohydrate Polymers, 125, 113–119.

Kuda T., Kunii T., Goto H., Suzuki T., Yano T., 2007. Varieties of antioxidant and antibacterial properties of *Ecklonia stolonifera* and *Ecklonia kurome* products harvested and processed in the Noto peninsula, Japan. Food Chemistry, 103, 900–905.

Kuda T., Kyoji D., Takahashi H., Obama K., Kimura B., 2011. Detection and isolation of *p*-nitrophenol-lowering bacteria from intestine of marine fishes caught in Japanese waters. Marine Pollution Bulletin, 62, 1622-1627.

Kuda T., Nemoto M., Kawahara M., Oshio S., Takahashi H., Kimura B., 2015b. Induction of the superoxide anion radical scavenging capacity of dried ‘*funori*’ *Gloiopeltis*

- furcata* by *Lactobacillus plantarum* S-SU1 fermentation. Food & Function, 6, 2535-2541.
- Kuda T., Noguchi Y., Ono M., Takahashi H., Kimura B., Kamita R., Eto T., Kato M., and Kawahara M., 2014b. *In vitro* evaluation of the fermentative, antioxidant, and anti-inflammation properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BF3 and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* BF7 isolated from *Oncorhynchus keta* intestines in Rausu, Japan. Journal of Functional Foods, 11, 269-277.
- Kuda T., Yano T., 2014c. Mineral composition of seawater bittern nigari products and their effects on changing of browning and antioxidant activity in the glucose/lysine Maillard reaction. Applied Biochemistry and Biotechnology, 172, 2989–2997.
- Kuda T., Yazaki T., Ono M., Takahashi H., and Kimura B., 2013. *In vitro* cholesterol-lowering properties of *Lactobacillus plantarum* AN6 isolated from *aji-narezushi*. Letters in Applied Microbiology. 57, 187-192.
- Kumagai Y., Nakatani S., Onodera H., Nagatomo A., Nishida N., Matsuura Y., Kobata K., Wada M., 2015. Anti-Glycation effects of Pomegranate (*Punica granatum L.*) fruit extract and its components in vivo and in vitro. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63, 7760–7764.
- Kumar S., Sahoo D., Levine I., 2015. Assessment of nutritional value in a brown seaweed *Sargassum wightii* and their seasonal variations. Algal Research, 9, 117–125.
- Lee SH., Min KH., Han JS., Lee DH., Park DB., Jung WK., Park PJ., Jeon BT., Kim SK., Jeon YJ., 2012. Effects of brown alga, *Ecklonia cava* on glucose and lipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice, a model of type 2 diabetes mellitus. Food and Chemical Toxicology, 50, 575–582.

- Li M., Zeng M., He Z., Zheng Z., Qin F., Tao G., Zhang S., Chen J., 2015. Effects of long-term exposure to free N ϵ -(Carboxymethyl)lysine on rats fed a high-fat diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 10995–11001.
- Li Y., Qian ZJ., Ryu B., Lee SH., Kim MM., Kim SK., 2009. Chemical components and its antioxidant properties in vitro: An edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 1963–1973.
- Li YX., Wijesekara I., Li Y., Kim SK., 2011. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*, 46, 2219–2224.
- Liu BF., Miyata S., Hirota Y., Higo S., Miyazaki H., Fukunaga M., Hamada Y., Ueyama S., Muramoto O., Uriuhara A., Kasuga M., 2003. Methylglyoxal induces apoptosis through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in rat mesangial cells. *Kidney International*, 63, 947–957.
- Nagai R., Mori T., Yamamoto Y., Kaji Y., Yonei Y., 2010. Significance of advanced glycation end products in aging-related disease. *ANTI AGING MEDICINE*, 7, 112-119.
- Nakamura S., Kuda T., An C., Kanno T., Takahashi H., and Kimura B., 2012. Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from *narezushi*, a fermented fish with rice, on *Listeria monocytogenes* infection to Caco-2 cells and A/J mice. *Anaerobe*, 18, 19-24.
- Nakata T., Kyoui D., Takahashi H., Kimura B., Kuda T., 2016. Inhibitory effects of laminaran and alginate on production of putrefactive compounds from soy protein by intestinal microbiota *in vitro* and in rats. *Carbohydrate Polymers*, 143, 61–69.
- Naowaboot J., Pannangpetch P., Kukongviriyapan V., Kongyingyoes B., Kukongviriyapan U., 2009. Antihyperglycemic, antioxidant and antiglycation activities of

- mulberry leaf extract in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, 116–121.
- Nemoto M., Kuda T, Eda M, Yamakawa H, Takahashi H, Kimura B., 2016. Protective effects of mekabu aqueous solution fermented by *Lactobacillus plantarum* Sanriku-SU7 on human enterocyte-like HT-29-luc cells and DSS-Induced murine IBD model. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.
- Noor-Soffalina SS., Jinap S., Nazamid S., Nazimah S. A. H., 2009. Effect of polyphenol and pH on cocoa Maillard-related flavour precursors in a lipidic model system. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 168-180.
- Park DY., Ahn YT., Huh CS., McGregor RA., Choi MS., 2013. Dual probiotic strains suppress high fructose-induced metabolic syndrome. *World Journal of Gastroenterology*, 19, 274-283.
- Park J., Cha JD., Choi KM., Lee KY., Han KM., Jang YS., 2017. Fucoidan inhibits LPS-induced inflammation *in vitro* and during the acute response *in vivo*. *International Immunopharmacology*, 43, 91–98.
- Perez GRM., Flores CLB., Gonzalez AM., 2012. Evaluation of the antioxidant and anti-glycation effects of the hexane extract from *Piper auritum* leaves *in vitro* and beneficial activity on oxidative stress and advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats. *Molecules*, 17, 11897-11919.
- Poulsen MW., Hedegaard RV., Andersen JM., de Courten B., Bügel S., Nielsen J., Skibsted LH., Dragsted LO., 2013. Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 10–37.

- Rajasekar P., Anuradha CV., 2007. L-Carnitine inhibits protein glycation *in vitro* and *in vivo*: evidence for a role in diabetic management. *Acta Diabetol*, 44, 83-90.
- Roca F., Grossin N., Chassagne P., Puisieux F., Boulanger E., 2014. Glycation: the angiogenic paradox in aging and age-related disorders and diseases. *Ageing Research Reviews*, 15, 146–160.
- Rodríguez H., Curiel JA., Landete JM., Rivas B., Felipe FL., Gómez-Cordovés C., Mancheño JM., Muñoz R., 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 79–90.
- Shang Q., Song G., Zhang M., Shi J., Xu C., Hao J., Li G., Yu G., 2017. Dietary fucoidan improves metabolic syndrome in association with increased *Akkermansia* population in the gut microbiota of high-fat diet-fed mice. *Journal of Functional Foods*, 28, 138–146.
- Shao L., Wu Z., Zhang H., Chen W., Ai L., Guo B., 2014. Partial characterization and immunostimulatory activity of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* KF5. *Carbohydrate Polymers*, 107, 51–56.
- Shibata T., Kawaguchi S., Hama Y., Inagaki M., Yamaguchi K., Nakamura T., 2004. Local and chemical distribution of phlorotannins in brown algae. *Journal of Applied Phycology*, 16, 291-296.
- Shi L., Yu X., Yang H., Wu X., 2013. Advanced glycation end products induce human corneal epithelial cells apoptosis through generation of reactive oxygen species and activation of JNK and p38 MAPK pathways. *PLoS One*, 8.
- Shimoda H., Nakamura S., Morioka M., Tanaka J., Matsuda H., Yoshikawa M., 2011. Effect of cinnamoyl and flavonol glucosides derived from cherry blossom flowers on the production of advanced glycation end products (AGEs) and AGE-induced fibroblast apoptosis. *Phytotherapy Research*, 25, 1328-35.

- Shobharani P., Halami PM., Sachindra NM., 2013. Potential of marine lactic acid bacteria to ferment *Sargassum* sp. for enhanced anticoagulant and antioxidant properties. *Journal of Applied Microbiology*, 114, 96-107.
- Singh R., Berden A., Mori T., Beilin T., 2001. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia.*, 44, 29-46.
- Stanton C., Ross R P., Fitzgerald G F., Sinderen D V., 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 198-203.
- Sun Z., Liu J., Zeng X., Huangfu J., Jiang Y., Wang M., Chen F., 2011. Astaxanthin is responsible for antiglycoxidative properties of microalga *Chlorella zofingiensis*. *Food Chemistry*, 126, 1629-1635.
- Sun Z., Peng X., Liu .J, Fan K., Wang M., Chen F., 2010. Inhibitory effect of microalgal extracts on the formation of advanced glycation endproducts (AGEs). *Food Chemistry*, 120, 261-267.
- Thornalley PJ., 2005. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043, 111-117.
- Thornalley PJ., 2008. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug metabolism and drug interactions*, 23, 125-150.
- Thomas NV., Kim SK., 2011. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *environmental toxicology and pharmacology*, 32, 325–335.
- Ulmius M., Johansson A., Onning G., 2009. The influence of dietary fibre source and gender on the postprandial glucose and lipid response in healthy subjects. *European Journal of Nutrition*, 48, 395-402.

- Vistoli G., DeMaddis D., Zarkovic N., Cipak A., Carini M., Aldini G., 2013. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Research*, 47, 3–27.
- Wada T., Penninger JM., 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*, 2004, 23, 2838-2849.
- Wang W., Yagiz Y., Buran T J., Nunes C d N., Gu L., 2011. Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end - products by scavenging reactive carbonyls. *Food Reseach International*, 44, 2666-2673.
- Wen ZS., Xiang XW., Jin HX., Guo XY., Liu LJ., Huang YN., OuYang XK., Qu YL, 2016. Composition and anti-inflammatory effect of polysaccharides from *Sargassum horneri* in RAW264.7 macrophages. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 403–413.
- Wen ZS., Liu LJ., OuYang XK., Qu YL.,Chen Y., Ding GF., 2014. Protective effect of polysaccharides from *Sargassum horneri* againstoxidative stress in RAW264.7 cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68, 98–106.
- Wu MH., Pan TM., Wu YJ., Chang SJ., Chang MS., Hu CY., 2010. Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial properties. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 104–110.
- Yeh WJ., Hsia SM., Lee WH., Wu CH., 2017. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. *Journal of Food and Drug Analysis*. 25, 84-92.
- Younus H., Anwar S., 2016. Prevention of non-enzymatic glycosylation (glycation): Implication in the treatment of diabetic complication. *International Journal of Health Sciences*, 10, 261–277.

- Zhang HB., Zhang Y., Chen C., Li YQ., Ma C., Wang ZJ., 2016. Pioglitazone inhibits advanced glycation end product-induced matrix metalloproteinases and apoptosis by suppressing the activation of MAPK and NF- κ B. *Apoptosis*, 21, 1082–1093.
- Zhou WJ., Gui QF., Wu Y., Yang YM., 2015. Tanshinone IIA protects against methylglyoxal-induced injury in human brain microvascular endothelial cells. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8, 1985-1992.
- 環境省, 2008, 里海創生支援事業とは～里海再生に向けて～
- 新崎盛敏, 東禎三. 三浦半島の海藻. 株式会社教育放送, 1983, 1-90.
- 大石圭一. 海藻の科学. 株式会社朝倉書店, 1993, 19.
- 大野正夫. 有用海藻誌 海藻の資源開発と利用に向けて. 株式会社老鶴園, 2004, 144-155.
- 川崎雅志, 石山香, 下川原雅弥香, 高橋 優智, 畠山美幸. ラットの血漿および肝臓脂質レベルに対する食餌アカモクの作用. 岩手県立大学盛岡短期大学部研究論集, 2007, 9, 55-61.
- 高橋昭善, 大森雄治. 三浦半島海藻図鑑 - 海藻は海からの手紙 -. 横須賀市自然・人文博物館, 2009, 1-208.

謝 辞

本研究の遂行および論文作成にあたり、終始多大なご指導、ご鞭撻を賜りました東京海洋大学 食品微生物学研究室 木村凡教授、久田孝准教授、高橋肇助教に心より感謝し、厚く御礼申し上げます。

また、論文のご校閲を賜りました食品栄養化学研究室 小山智之准教授に心より御礼申し上げます。

さらに、本研究の実施および研究室生活において、公私共に多大なるご助言、ご協力を頂いた東京海洋大学 食品微生物学研究室の皆さまに心より感謝の意を表します。また、数々のご助力を頂いた根本真希氏、横田泰史氏、平野詩乃氏に深く感謝いたします。

本研究のために尊い命を頂きました、マウス達に感謝いたします。

最後に、現在まで学ぶ機会を与えてくれ、多大なる理解と温かいご支援を頂いた江田邦臣・美雪氏に心より感謝いたします。