

長崎乳酸菌ライブラリーを活用した加工食品の開発

食品・環境科	主任研究員	松本 周三
食品・環境科	科 長	河村 俊哉
食品・環境科	専門研究員	晦日 房和
食品・環境科	主任研究員	玉屋 圭
食品・環境科	主任研究員	田畑 士希

食品製造企業

戦略プロジェクト研究「長崎県産物由来の乳酸菌及び酵母を活用した加工食品の開発」(平成21～23年度)において、長崎県産の発酵食品や農産物から乳酸菌623株を分離した。得られた菌の食品に寄与する機能、例えば健康機能性、保存性、呈味性を調べることで有用微生物を獲得した。しかし、乳酸菌をより幅広い製品に対して使用したいという要望があるため、様々な原料及び複数菌での発酵条件検討等を行い、乳酸菌の高度利用、有効活用を行えるよう研究開発を進展させる必要がある。本研究では、MRS培地で乳酸菌を培養したときの乳酸等の有機酸及び遊離アミノ酸の産生量、またはDPPHラジカル消去活性測定法を用いて調べた抗酸化能試験の結果から、20菌株を乳酸菌ライブラリーから選抜した。また、そのうちの10菌株の糖の資化性及び消化液耐性を調べると共に、実際に食材加工の指標となるように多種類の農産物に乳酸菌を添加し、24時間後のpHについて調べた。さらに、得られた結果を参考に、長崎県内で生産が盛んな農産物を中心に乳酸発酵食品の試作を行った。

1. 緒言

近年、メタボリックシンドローム等により医療費が増加する中、毎日の食事を通じて健康を維持していくことが重要とされる。県内食品業界においても健康機能に重点が置かれ、また、安心安全の観点から古来より利用される微生物による機能性の付加が望まれている。さらに、地域資源、未利用資源の利用に乳酸菌を含めた微生物の活用は有効であり、付加価値向上のための手段として研究開発が求められている。このことを受けて、平成21～23年度戦略プロジェクト研究「長崎県産物由来の乳酸菌及び酵母を活用した加工食品の開発」を行い、県内で生産される発酵食品等から乳酸菌623株を獲得した。これらの菌株の有機酸やアミノ酸産生能を調べ、有用と思われる菌をライブラリーとしてまとめた。しかし、乳酸菌をより幅広い製品に対して使用したいという要望があるため、菌株の特徴をより詳細に調べ、ライブラリーの充実を図ると共に、様々な原料及び複数菌での発酵条件検討等を行い、乳酸菌の高度利用、有効活用を行えるよう研究開発を進展させる必要がある。

そこで、得られた乳酸菌のMRS培地中の有機酸、遊離アミノ酸分析の結果及び1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル(DPPH)ラジカル消去活性測定法を用いた抗酸化能試験の結果から、特徴を有した10菌株を選抜した。それらの乳酸菌について人工消化液耐性試験

を行い、また、発酵可能な食材の指標となるように、糖の資化性試験を行った。さらに、情報をわかりやすく提供するため、実際の食材、今回は多種類の農産物に乳酸菌を添加し、pHの値から発酵の状態について調べた。

2. 実験方法

2.1 有機酸分析及び遊離アミノ酸分析

成分分析及び抗酸化能試験用のサンプルには、MRS培地に各乳酸菌を植菌後、37℃、48時間嫌気条件下で培養した培養液を遠心分離し、その上清を用いた。有機酸分析はHPLC Waters 660(ウォーターズ社製)、Waters 431電気伝導度検出器を用い、pH緩衝化法¹⁾で行った。カラムはOrganic Acid(7.8mm×300mm×2)(日本ウォーターズ社製)、カラム温度は40℃、移動相には5mMp-トルエンスルホン酸水溶液、緩衝液には100μM EDTA・2Na及び20mM Bis-Trisを加えた5mMp-トルエンスルホン酸水溶液を用いて、流速は移動相、緩衝液共に0.8ml/minとした。サンプルは10倍希釈した後、0.45μmのフィルターでろ過したものを用いた。遊離アミノ酸分析には0.22μmのフィルターでろ過したサンプルをアミノ酸分析装置JLC-500(日本電子社製)に供した。

2.2 抗酸化能試験

抗酸化能試験には、須田らの方法を一部改変したDPPHラジカル消去活性測定法²⁴⁾を用いた。サンプルは12.5倍希釈し、ブランクには純水、コントロールには乳酸菌培養液と同じ処理を行ったMRS培地を用いた。400 μ M DPPH エタノール溶液、0.2 M MES 緩衝液 (pH 6.0) 及びエタノールを同量混合し、96穴プレートに150 μ L分注、サンプル 50 μ Lを加え攪拌し、室温で20分間反応した。その後、マイクロプレートリーダーで520 nmの吸光度を測定した。ブランクに対するDPPHラジカルの消去能を相対比として算出した。

2.3 人工消化液耐性試験

胃液耐性試験は、まず、MRS液体培地5 mLに各乳酸菌を植菌し、37°C、嫌気条件下で24時間培養した。ペプシンを加えたMRS液体培地4.5 mLに、24時間培養後の乳酸菌懸濁液を0.5 mL加えた。MRS液体培地は懸濁液添加時、6 M 塩酸を加え、pH 2.5、ペプシン終濃度0.32%になるよう調製した。懸濁液添加後37°Cでインキュベートし、0、1、2、3、6時間後の生菌数を測定した。生菌数の測定はMRS寒天培地を用いた。

腸液耐性試験には0.2 μ mのフィルターで滅菌ろ過した胆汁末溶液を、終濃度0.4%になるよう加えたMRS液体培地4.9 mLに、25%パンクレアチン懸濁液0.05 mL、pH 3.0の人工胃液処理 (37°C、3時間) した乳酸菌懸濁液0.05 mLを加えた。37°Cでインキュベートし、48時間後までの600 nmのODを測定し、増殖曲線を作成した。

2.4 糖の資化性試験

乳酸菌ライブラリーから選抜した菌株について、糖の資化性を調べた。資化性試験はシスメックス・ビオメリュー社製 api 50CHL培地及びapi 50CHを用いて行い、48時間後の結果を採用した。

2.5 農産物発酵試験

農産物はミキサーで粉碎後、約10 mLずつ分け、オートクレーブで110°C、10分間の殺菌を行った。植菌用の乳酸菌は1 mLのMRS培地で嫌気条件下、37°C、24時間培養した。培養液を遠心分離し、上清を除去した。菌体を生理食塩水で洗浄後、最少容量の生理食塩水で懸濁し、植菌した。24時間後のpHを測定し、その値から発酵力を評価した。

2.6 乳酸発酵トマトジュース試作試験

トマトをミキサーで破碎後、80°C、30分間加熱した。1/100量のMRS培地に各乳酸菌を培養し、集菌、生理食塩水で2回洗浄後、最少容量の生理食塩水に懸濁して添加した。37°C、48時間後のpHを確認後、固相マイクロ抽出 (SPME) GC/MSで香気成分分析を行った。測定は240-GC/MS (バリアン社製)、カラムはDB-WAXetr (アジレント社製)、長さ60 m、内径0.25 mm、膜厚0.25 μ mを用いた。カラムオープン温度は40°Cで1分間保持、190°Cまで3°C/minで昇温、240°Cまで10°C/minで昇温後、9分間保持した。キャリアガスはHe、流量1.2 mL/min、SPMEはDVB/CAR/PDMS (シグマアルドリッチ社製)を用い、スプリット比は1:1、注入口220°C、検出器240°C、m/z 35-350で分析を行った。

3. 結果及び考察

便宜上、各乳酸菌は番号で記してある。

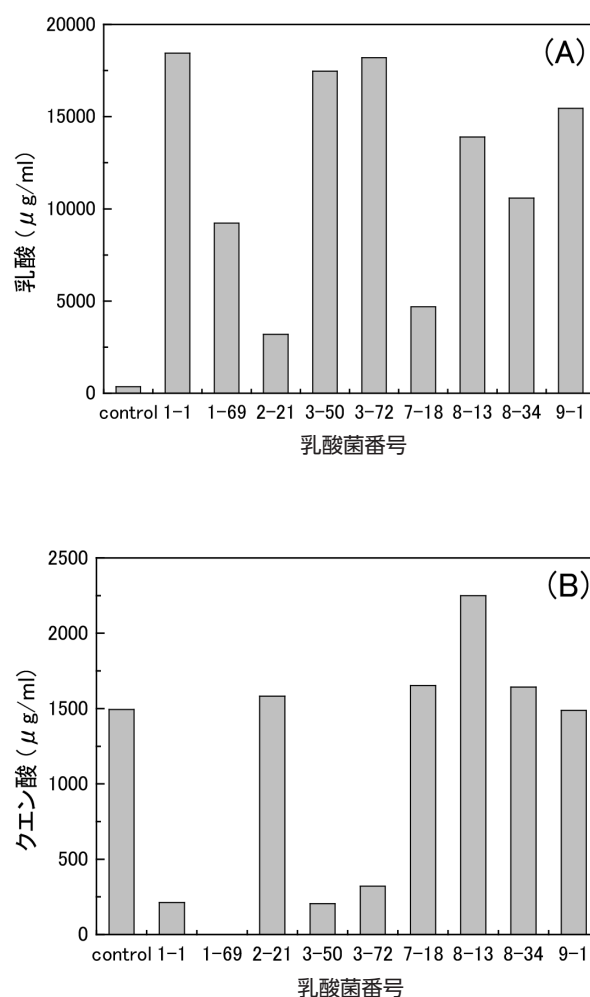


図1 乳酸菌培養液の有機酸含有量
(A)乳酸、(B)クエン酸

食品加工に利用するため、図1 (A)に示すように乳酸の産生が比較的多い菌を選抜した。(10-16は都合により除いている。)ただし、図1 (B)に示すように乳酸の産生に伴ってクエン酸を消費する菌と消費しない菌があることから、酸味の質や持続時間を変化させるこ

とが期待される。また、クエン酸の減少はジアセチル等の香気成分の生成に影響していることが考えられるため、味だけではなく風味の改善も期待される。

アミノ酸について図2に示す。アスパラギン酸とグルタミン酸の旨味系アミノ酸(A)、グリシン、アラニン、トレオニン、セリン、グルタミンの甘味系アミノ酸(B)、 γ -アミノ酪酸(GABA)の機能性アミノ酸(C)に分けて示した。3-47、3-50、3-72は旨味系、甘味系アミノ酸共に大幅な増加は見られず、逆に消費しているアミノ酸が見られた。一方で8-13、8-34、9-1は多くのアミノ酸が増加しており、味に厚みを持たせる効果が期待された。また、GABAの増強が期待できる乳酸菌も選抜しており、グルタミン酸を多く含む原料については機能性を付加した製品の開発が期待される。

DPPHラジカル消去活性測定試験において、コントロールに対して5%以上の消去率が見られた株を図3に示した。乳酸発酵による抗酸化能の上昇は、乳酸菌の代謝によって産生される複数の物質が要因と考えられているが、未だ明らかになっていない。このことについては、より詳細な成分分析や他の方法での抗酸化能測定も必要と考えられ、今後も検討の継続を要する。

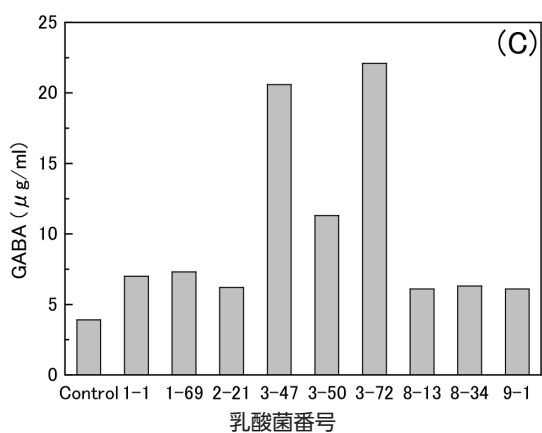
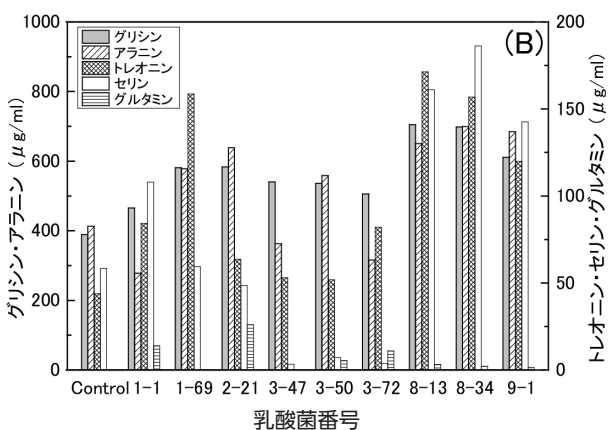
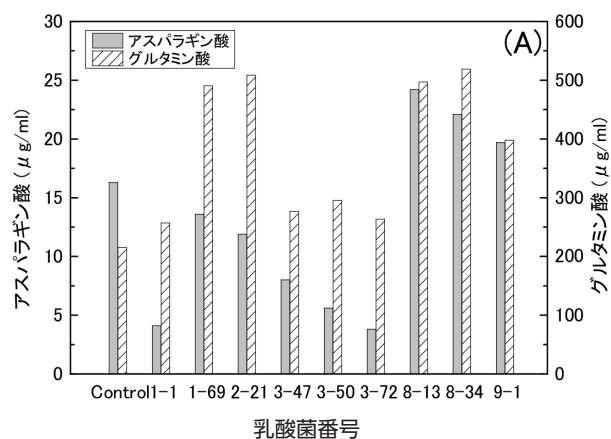


図2 乳酸菌培養液のアミノ酸含量
(A)旨味系アミノ酸、(B)甘味系アミノ酸、
(C)機能性アミノ酸(GABA)

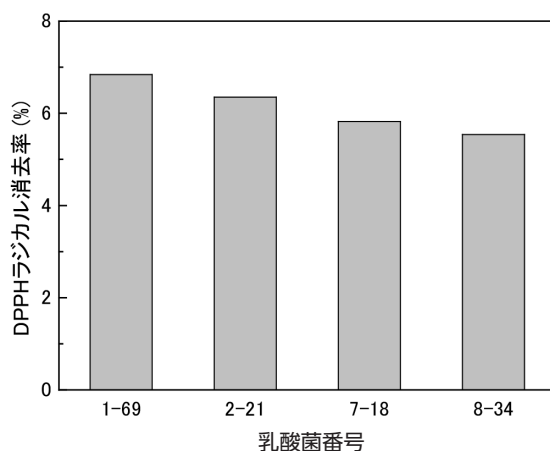


図3 DPPHラジカル消去活性

人工消化液耐性試験のうち胃液耐性試験において、処理後3時間で50%以上の生菌率を示した4株を図4に示した。人工腸液耐性試験では処理後24時間までに顕著に増殖した5株について、その増殖曲線を図5に示した。1-1、3-72、8-34株については、胃液、腸液の両方に耐性が見られ、消化管内での生存及び増殖が可能であり、プロバイオティクス製品開発への利用が考えられる。

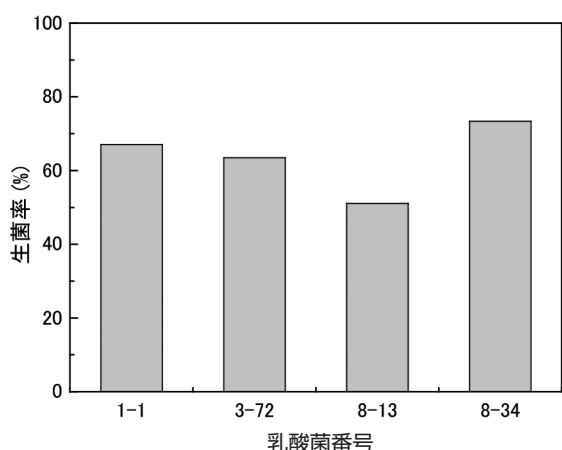


図4 人工胃液処理3時間後の乳酸菌の生存率

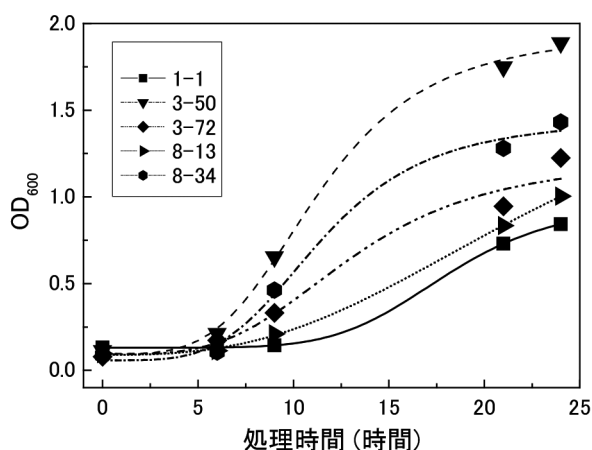


図5 人工腸液処理中のOD600の変化

乳酸菌の糖の資化性について表1に示す。1-1、3-72、10-16は資化できる糖の種類が豊富である。また、これらの菌株は有機酸の生成量が多く、人工消化液に対する耐性も比較的高いことから、発酵力に優れていることがうかがえる。特に、乳酸菌は自らが産生した乳酸によって死滅してしまうため、食品加工時におけるpHの迅速な低下には、糖の資化性と酸に対する耐性は非常に重要と考えられる。表2に示すように実際の食材でも、上記3株の発酵物は発酵開始後24時間以内で食品保存のための一つの目安とされるpH 4.0より低くなっている。

これらの結果からいくつかの菌株を用いて乳酸発酵トマトの試作を行った。48時間後のpHは、そのほとんどが4.0以下となっており、十分に発酵しており、味、

香りにもそれぞれの菌株の特徴が見られた。一例として発酵前のトマトと3-50で乳酸発酵させたトマトとの香り成分を比較すると、図6のようにトマトの青臭みであるヘキサナール及びシス-3-ヘキサナールの減少が見られた。これらの成分はトマトの香り成分の中でも全体の香りに対する寄与率が高いことが知られており、トマトの青臭みが苦手な人にも飲みやすいジュースになっていると言えることができる。ただし、48時間で発酵では酸味が強くなることもあり、今後さらなる改善が必要である。

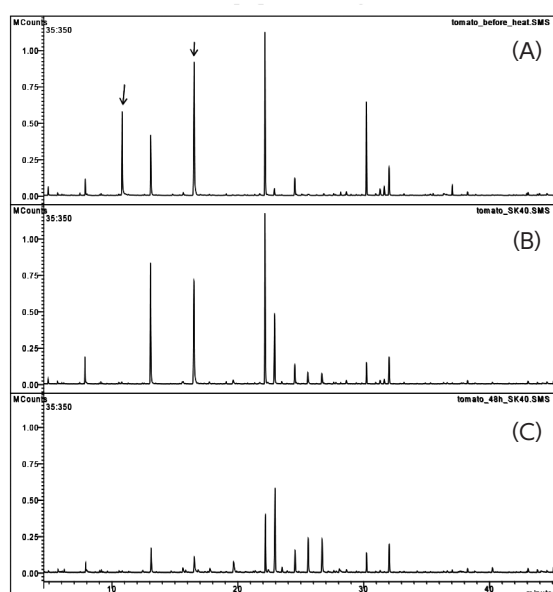


図6 乳酸発酵前後のガスクロマトグラム
(A) 発酵前、(B) 24時間後、(C) 48時間後

4. 結言

本研究で選抜を行った菌について、その情報を増やし、また、それらを整理することにより、多様な商品開発をおこなうための足掛かりとなった。現在、複数の県内食品企業と商品開発を進めており、長崎乳酸菌ライブラリーを使用した研究開発及び商品開発は広がりを見せている。

今後も長崎乳酸菌ライブラリーを利用した商品開発を提案すると共に、本研究で得た知見を企業へと提供していく。

参考文献

- [1] 林 守正. 島津評論. 1992, 49 (1-2), p. 59-64.
- [2] 須田郁夫. “抗酸化機能 ①分光学的抗酸化機能評価”. 食品機能研究法. 光琳, 2000, p. 218-223.

表1 乳酸菌の糖の資化性

Box No.	1-1	1-69	2-21	3-47	3-50	3-72	8-13	8-34	9-1	10-16
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±
D-Mannitol	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
D-Sorbitol	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
N-Acetyl glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdalin	+	-	-	+	+	+	+	+	±	+
Arbutin	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	-	±	+	+	+	+	-	+
D-Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	±	-	-	-	-	-	-	-	-	±
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

"+, positive; ±, weak positive; -, negative"

表2 食品素材の発酵試験

Box No.	1-1	1-69	2-21	3-47	3-50	3-72	8-13	8-34	9-1	10-16
ショウガ	◎	×	◎	◎	◎	◎	◎	○	○	◎
イチジク	◎	○	○	◎	◎	◎	◎	○	◎	◎
ナシ	◎	×	○	◎	◎	◎	○	×	○	◎
スイカ	◎	○	◎	◎	◎	◎	◎	○	◎	◎
カボチャ	◎	○	○	◎	◎	◎	○	○	○	◎
ダイコン	◎	○	◎	◎	◎	◎	◎	○	◎	◎
キャベツ	◎	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
ナス	◎	○	◎	◎	◎	◎	◎	○	◎	◎
ブロッコリー	◎	○	○	◎	◎	◎	◎	○	◎	◎

◎; <pH 4, ○ ; >pH 4, ×; 変化なし