

微生物利用による生体機能調節物質の生産に関する研究

渡辺泰成*¹ 横堀正敏*¹ 増田こずえ*² 奥沢洋平*¹ 館博***

Production of the Living Body Function Control Compounds by Microorganisms

WATANABE Yasunari*¹, YOKOBORI Masatoshi*¹, MASUDA Kozue*², OKUZAWA Youhei*¹,
TACHI Hiroshi***

抄録

塩蔵ニンニク漬液を電気透析した結果、脱塩と共にアルギニンが2倍に濃縮された。清酒山廃酵母から50株の乳酸菌を取得し、おからの処理を行い、高抗酸化能の2菌株、高ラジカル消去能の3菌株を得た。大豆蒸煮液にピフィズス菌増殖促進作用があり、培養基材として利用できることが分った。

キーワード：微生物，生体機能調節物質，おから，塩蔵ニンニク漬液，大豆蒸煮液

1. はじめに

消費者の健康志向が高まる中で、血圧降下作用や抗酸化能を有した特定保健用食品への需要が増大している。また、畜産業においても代用乳等の飼料での高機能化が求められている。一方、食品製造残渣にも有用成分が含まれており、その有効利用が求められている。食品残渣を主要原料として用い、微生物利用により新規機能性食品素材や飼料を開発することを目的として本研究を実施した。本研究では豆腐残渣、塩蔵ニンニク漬液、大豆蒸煮液の利用について基礎的検討を行った。

2. 実験方法

2.1 塩蔵ニンニク漬液の発酵による機能性物質の生産

2.1.1 供試材料

中国から輸入された塩蔵ニンニクの漬液を使用

した。本漬液は県内の漬物会社から提供を受けた。

2.1.2 電気透析

ニンニク漬液のpH(5.5)を、アルギニン(Arg)の水溶液中での等電点(10.76)付近へ調整後、電気透析を行った。透析条件は既報¹⁾と同様である。

2.1.3 分析方法

2.1.3.1 一般成分の分析

食塩濃度は電位差滴定法、エキス分含量は糖度計で求めた。また、表1(後述)に記したArg濃度は、坂口反応を利用した吸光光度法で測定した。

2.1.3.2 遊離アミノ酸の分析

試料にエタノールを75%となるよう加えて、遊離アミノ酸を抽出した。減圧下40℃で濃縮乾固し、試料希釈液に溶解し、*o*-フタルアルデヒドを使用したポストカラムHPLC法で測定した。

2.1.3.3 ポリアミンの分析

試料にアセトニトリルを30%となるよう加えよく混合し、ろ過(PTFE 0.2 μm)したものを試料溶液とした。*o*-フタルアルデヒドとN-アセチ

*¹ 北部研究所 生物工学部

*² 北部研究所 技術交流支援室

*** 東京農業大学

ル-L-システインにより蛍光標識したオンカラム法 H P L C で測定した²⁾。Shodex Asahipak ODP-40(4.6 mm ID × 150 mm)を使用した。

2.2 乳酸菌処理おからの抗酸化性

2.2.1 乳酸菌の取得³⁾

県内酒造会社の山廃酵母を酵母添加前に採取し、0.5 %炭酸カルシウム含有 M R S 寒天培地で周辺に透明部分の生じたコロニーを釣り上げた。

2.2.2 おからの乳酸菌処理

乾燥オカラ 3 g と水 30 ml に前培養した乳酸菌を接種し、28 3 日間培養後のろ液を以下の試験に供した。

2.2.3 抗酸化能の測定⁴⁾

津志田らの方法⁴⁾に準じてカロチン退色法により測定した。この値が小さいほどリノール酸の酸化による退色を抑え、抗酸化性が強いことになる。

2.2.4 D P P H ラジカル消去能の測定⁵⁾

須田の方法⁵⁾に準じ、一定量の試料添加時の吸光度を測定して残存率とし、D P P H ラジカル消去能とした。この値が小さいほどよくラジカルを消去し、抗酸化性が強いことになる。

2.3 大豆蒸煮液利用試験

2.3.1 使用微生物

Bifidobacterium breve JCM1192、*Bifidobacterium pseudolongum* JCM1205、*Bifidobacterium longum* JCM1217、*Bifidobacterium infantis* JCM1222

2.3.2 使用培地

BIFIDOBACTERIUM 培地(完全培地)を使用した。最小培地は完全培地からカゼインペプトン、酵母エキス、肉エキスを除いたものを使用した。その他の培地は最小培地に各試験物を添加した。大豆蒸煮液は限外ろ過(分画分子量 20000)し、固形分として 0.5 % となるよう加えた。

大豆蒸煮液培地は大豆蒸煮液(固形分 5.6 %)を pH6.8 としこの液 8 に対しアスコルビン酸、システイン塩酸塩を 2 の割合で加えたものである。

2.3.3 培養方法

試験管に培地を 10 ml 加え、完全培地に前培養した各菌液 25μ l を接種し、37 24時間三菱ガス化学製アネロパックを用いて嫌気培養した。

2.3.4 乾燥菌体量測定方法

乾燥菌体量は 10 倍希釈培養液の 562nm の吸光度を測定し、予め作成した検量線から算出した。

3. 結果及び考察

3.1 塩蔵ニンニク漬液の発酵による機能性物質の生産

ニンニクを塩蔵すると細胞壁が破壊されて、ニンニク中のエキス分が漬液中に移行する。ニンニクには、遊離 Arg が多く含まれているので、漬液中でも高濃度に存在することが予想される。本研究では、この Arg に着目し、ニンニク漬液の発酵による機能性物質の生産を目指している。

ニンニク漬液は塩濃度が 20 % 以上あるため、そのままでは発酵が困難であり、漬液中の有用成分(Arg)を残しながら脱塩する必要がある。本研究では、電気透析による脱塩を試みた。

3.1.1 電気透析による脱塩結果

ニンニク漬液の電気透析経過を図 1 に、透析前後の成分等の変化を表 1 に示す。10 V 定電圧、流速 150 L/h という条件で、ほぼ完全に脱塩するのに約 4 時間を要した。脱塩後、Arg は約 2 倍に濃縮され、透析前後の回収率は 87 % であった。

3.1.2 漬液の遊離アミノ酸含量

電気透析で脱塩されたニンニク漬液について、遊離アミノ酸の分析を行った。ニンニク鱗茎の遊離アミノ酸含量(文献値⁵⁾)とともに、その結果

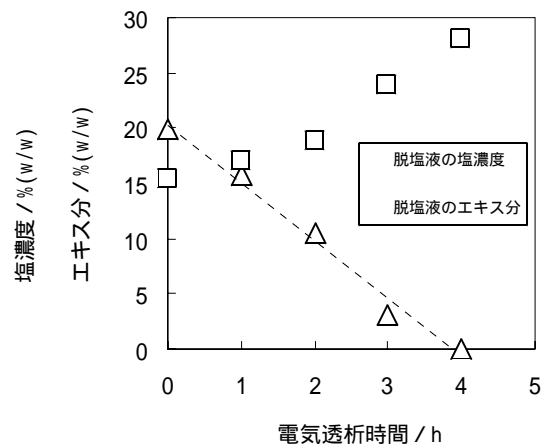


図 1 ニンニク漬液の脱塩実験

試料液槽 漬液 2 L
濃縮液槽 5 %NaCl 水溶液 2 L

表1 ニンニク漬液電気透析結果*

	pH調整後の漬液	脱塩液	食塩濃縮液
pH	10.99	10.68	10.43
食塩 (w/w %)	19.9	0.06	15.3
アルギニン (w/w %)	0.28	0.61	0.00033
エキス分 (w/w %)	15.3	28.0	-
液量 (L)	2.0	0.88	3.2
密度 (g cm ⁻³)	1.22	1.11	1.12

* アルギニン等電点へ pH 調整後電気透析

表2 脱塩したニンニク漬液の遊離アミノ酸含量 (g/kg)

	ニンニク漬液	ニンニク鱗茎 (文献値 ³⁾)
Asp	2.47	9.27
Thr	0.36	6.22 ^{a)}
Ser	0.10	2.33
Glu	1.07	8.04
Pro	不検出	1.61
Gly	- ^{b)}	0.03
Ala	0.74 ^{b)}	0.54
Cys	不検出	2.48
Val	不検出	1.39
Met	不検出	0.11
Ile	不検出	0.43
Leu	不検出	0.35
Tyr	不検出	0.80
Phe	不検出	1.07
Lys	0.72	3.94
His	不検出	0.75
Arg	6.48	58.5

a) Thr の文献値には Thr と同じファクターで計算された Gln を含む。
 b) Ala の実験値には Ala と同じファクターで計算された Gly を含む。
 を表2に示す。ニンニク漬液の遊離アミノ酸組成は、鱗茎とほぼ同じ傾向を示した。漬液中には、Arg に続き、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、リジン (Lys) も多く含まれていた。なお、本測定で求められた Arg 含量は、0.65 w/w% となり、吸光光度法による結果 (0.61 w/w%) とほぼ一致した。

3.1.3 ニンニク漬液のポリアミン含量

表3 ニンニク漬液のポリアミン含量 (μg/g)

	ニンニク漬液			ニンニク鱗茎	
	原液	脱塩液	食塩濃縮液	文献 a ⁴⁾	文献 b ⁵⁾
ブトレッシン	17	不検出	8.5	4.4	2.5
スペルミジン	4.4	不検出	0.77	54	31
カダベリン	1.9	不検出	0.74	未測定	不検出
スペルミン	痕跡あり	不検出	不検出	8.0	9.0

ニンニク鱗茎中には、スペルミジンを主体としたポリアミンが含まれている^{7), 8)}。ニンニク漬液中にポリアミンがどの程度移行しているか調査したところ、各種のポリアミンが検出された(表3)。脱塩液からは、表3に示す4種のポリアミンが検出されなかった。これは、電気透析した結果、漬液中のポリアミンが、Na⁺、Cl⁻とともに透析膜を通過したためと考えられる。

3.2 乳酸菌処理おからの抗酸化性

豆腐製造時には栄養豊富なおからが副生し、食用にもなるが、腐敗しやすく利用が限られてきた。本研究では、植物性の環境であり、古くから使われてきたので安全性も確認されている、清酒の生酛から得た乳酸菌によっておからを処理し、有用な物質を生産させることを試みた。

山廃酒母からは50株の乳酸菌が得られた。図2

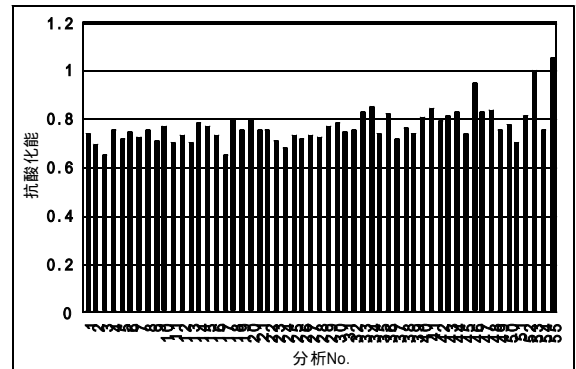


図2 抗酸化能

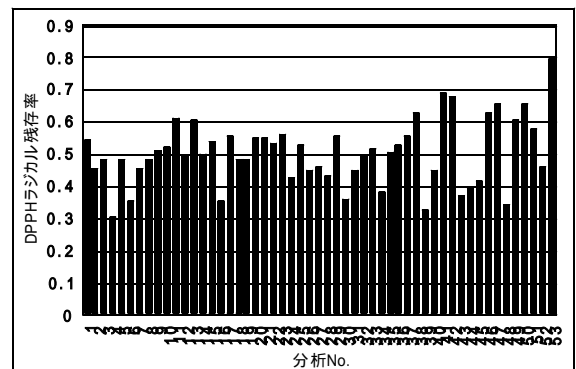


図3 DPPHラジカル消去能

に抗酸化能、図3にDPHラジカル消去能を示す。分析 No.1 ~ 50 はおから+乳酸菌、51 はおから+培地のみ、52 はおからのみ、53 はBHA 10ppm。

どちらも値が小さいほど能力が高いことになる。これらより、No.3,17等の抗酸化能の高い菌株や、No.4,39,48等のラジカル消去能の大きいものを選択し、今後詳細な試験を行う予定である。

3.3 大豆蒸煮液の利用

大豆蒸煮液は味噌、醤油、納豆等の製造において大豆を蒸煮する際に副生し、オリゴ糖をはじめとする栄養成分を豊富に含んでいる。このため、酵母、乳酸菌等の培養液として検討されてきた経過がある⁹⁾。今回、ビフィズス菌の培養基材としての検討を行った。

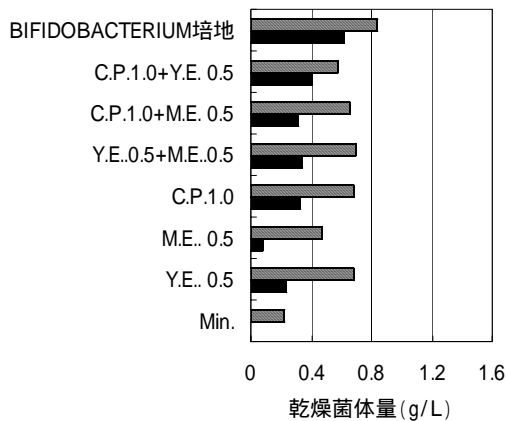


図4 *B.infantis*生育へ大豆蒸煮液の影響

斜線：大豆蒸煮液添加 C.P.:カゼインペプトン Y.E.:酵母エキス M.E.:肉エキス (図4~7)

ビフィズス菌は整腸作用を有する有用微生物としてサプリメント、整腸剤として販売されている。ビフィズス菌は完全合成培地では生育できず、乳カゼイン消化物、乳漿、酵母エキス、天然ゴム漿等¹⁰⁾の生物由来物質を必要とする。完全培地および最小培地にカゼインペプトン、酵母エキス、肉エキスを組み合わせて添加した培地7種類とこれらに大豆蒸煮液を固形分として0.5%添加した培地、合計16種類の培地にビフィズス菌4菌株を接種、培養した(図4, 5, 6, 7)。どの菌株においても、大豆蒸煮液を添加した培地では添加していない培地より増殖量が大きくなった。また、肉エキス単独、最小培地を除く他の培地では、大豆蒸煮液を添加した場合、完全培地におけるよりも菌体量が増加していた。これらの結果から大豆蒸煮液にはビフィズス菌の生育促進物質が含まれると考えられた。

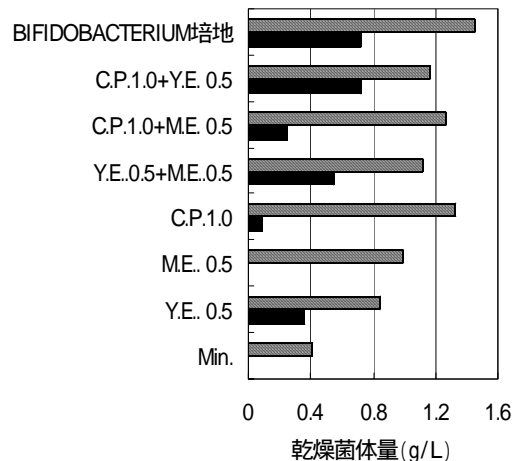


図6 *B.breve*生育へ大豆蒸煮液添加の影響

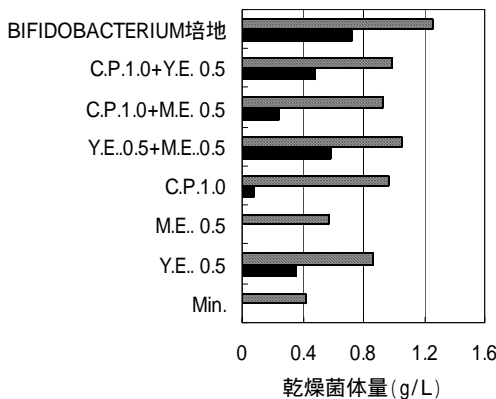


図5 *B.longum*生育へ大豆蒸煮液添加の影響

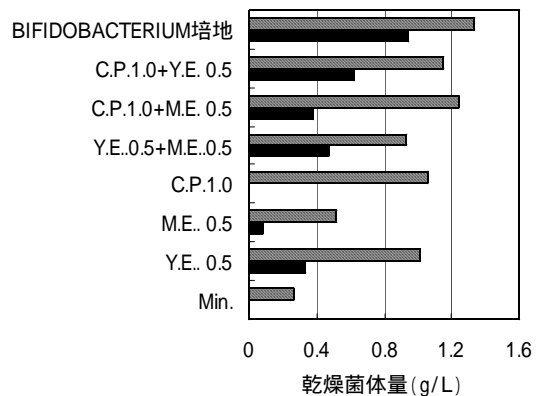


図7 *B.pseudolongum*生育へ大豆蒸煮液添加の影響

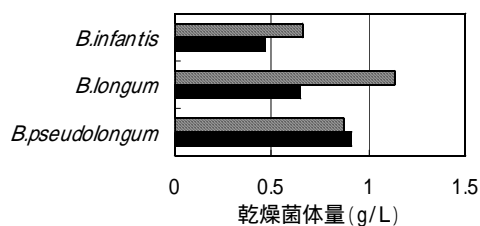


図8 大豆蒸煮液培地でのビフィズス菌の生育

■ 大豆蒸煮液(固形分4.5%)
■ BIFIDOBACTERIUM培地

次に大豆蒸煮液単独のビフィズス菌増殖性を検討するため、大豆蒸煮液培地での培養試験を実施した結果、大豆蒸煮液培地では完全培地と同等あるいはそれ以上の生育量が見られた(図8)。

これらの結果から、大豆蒸煮液はビフィズス菌培養基材として有効であると考えられた。

4. まとめ

(1) 塩蔵ニンニク漬液を発酵させるため、脱塩したところ、電気透析によりアルギニン濃度が約2倍に濃縮された脱塩液(約0.6%)が得られた。脱塩した漬液の遊離アミノ酸組成は、ニンニク鱗茎とほぼ同じ傾向を示した。ニンニク漬液中にブトレッシン等のポリアミンは存在したが、脱塩液からは検出されなかった。

(2) 清酒山麩酒母から取得した乳酸菌50株でおからを処理し、カロチン退色法による抗酸化能の高い菌株2株、DPPHラジカル消去能の高い菌株3株を得た。

(3) 大豆蒸煮液にビフィズス菌増殖促進作用があり、培養基材としての利用の可能性が示された。

謝辞

山麩酒母及び乾燥オカラ、ニンニク漬液、大豆蒸煮液の提供を戴いた県内各企業に感謝いたします。

参考文献

- 1) 北村英三, 松本なぎさ, 加藤司郎: 漬物工場における脱塩技術の改善に関する研究(第5報), 埼玉県工業技術センター研究報告, 2, (2000)233
- 2) K.Saito, M.Horie, N.Nose, K.Nakagomi, H.Nakazawa: Determination of Polyamines in Foods by Liquid Chromatography with On-Column Fluorescence Derivatization, Anal.Sci., 8, (1992)675

- 3) 本庄隆成, 北村英三, 奥沢洋平: 食品産業における未利用資源の有効利用による環境負荷低減に関する研究 生オカラを用いた唐辛子風味発酵調味料の開発, 埼玉県工業技術センター研究報告, 2, (2000) 238
- 4) 津志田藤二郎, 鈴木雅博, 黒木柁吉: 各種野菜類の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定, 日本食品工業学会誌, 41, 9 (1994) 611
- 5) 須田郁夫: 分光光度計によるDPPHラジカル消去能の測定, 食品の機能性評価マニュアル集, (1999) 16
- 6) Y.Ueda, H.Kawajili, N.Miyamura, R.Miyajima: Content of Some Sulfur-Containing Components and Free Amino Acids in Various Strains of Garlic, 日本食品工業学会誌, 38, 5 (1991)429
- 7) 和田政裕, 渡辺昌, 鶴高重三: ポリアミンの食品中の含量と発ガンに対するその抑制効果と関連性, 食に関する助成研究調査報告書, 12, (1999) 115
- 8) 望月恵美子, 山本敬男, 小宮山美弘, 堀江正一, 斉藤貢一, 中澤裕之: にんにく製品の判別法に関する検討, 山梨衛公研年報, 38, (1994)12
- 9) 岡秀樹: 純植物性乳酸菌飲料について, 食品工業, 31, 15 (1988)72
- 10) Ayaaki Ishizaki: Natural Rubber Serum that Contains a Special Growth Promoter for *Bifidobacterium*, Biosci. Biotech. Biochem., 59, 6 (1995)1151