乳酸菌 HOKKAIDO 株を用いた機能性を有する食品等の開発と技術普及

中 川 良 二*

北海道立総合研究機構

Development and Technology Transfer of Functional Foods Using *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO

Ryoji Nakagawa*

Food Processing Research Center, Hokkaido Research Organization,
589-4, Bunkyo-dai-midorimachi, Ebetsu, Hokkaido 069-0836

We have isolated a new strain of *Lactobacillus plantarum* from Japanese pickles produced by a farmer in Hokkaido, and have named the strain HOKKAIDO. Our investigation of HOKKAIDO strain revealed several characteristics. The strain exhibits digestive juice tolerance and can survive in the intestine. The strain strongly adheres to human enterocyte-like Caco-2 cells, and cells of HOKKAIDO strain competed with *E. coli* O-157 cells for adhesion to Caco-2 cells. From several examinations with human dendritic cells, this strain may act to improve immune function. It was found that HOKKAIDO strain is superior in the fermentation of vegetables, fruits, and cereals. These characteristics were exploited to produce foods such as fermented soybean milk, alcoholic beverages using sake lees, and fermented carrot drink. In addition, HOKKAIDO strain as a probiotic was contained in commercial products such as yogurt and a milk substitute for calves. (Accepted Feb. 16, 2018)

Keywords : lactic acid bacteria, HOKKAIDO strain, fermentation, functionality, food development

キーワード : 乳酸菌, HOKKAIDO 株, 発酵, 機能性, 食品開発

1. はじめに

北海道における食品工業の付加価値率は26.7%と全国(32.8%, 平成25年)に比べ低く、北海道は豊富な農水産物を有しているがその素材を上手く活かしてない現状にある。そこで、北海道の漬物からオリジナルの乳酸菌株を取得し、これを用いた機能性を有する食品等の開発を行った。

乳酸菌は糖を発酵し、主として乳酸を産生する細菌の総称で、グラム陽性の桿菌または球菌が含まれ、カタラーゼ陰性という特徴をもつ。また、ヨーグルト、チーズ、漬物など様々な発酵食品の製造に使用され、人間の生活に深く関係している細菌でもある。古くから日本人は旬の野菜を漬けこんだ漬物を香の物として毎日のように食してきた。このような漬物は乳酸菌発酵食品であり、その乳酸菌数はヨーグルトに匹敵する。漬物などの野菜や果物などで生育、発酵する乳酸菌は俗に植物性乳酸菌とも呼ばれ、我々

日本人の腸内環境の健全化など健康維持に寄与してきたと考えられる。

2. 乳酸菌 HOKKAIDO 株について

漬物(古漬)は乳酸菌発酵によりつくられる発酵食品であり、良く発酵した漬物では *Lactobacillus* 属乳酸菌が優勢菌になることが知られている。我々は長年、漬物をつくっている道内農業生産者からしっかりと漬かった漬物の提供を受け、ここから新規な乳酸菌株を分離し、生理生化学試験および遺伝子解析から菌種を明らかにし、北海道ブランドの乳酸菌にしたいという思いをこめて、*Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO (略して、HOKKAIDO 株)と名づけた¹⁾。

(1) 消化液耐性²⁾

プロバイオティクスは、1989年に英国の微生物学者 Fuller により「宿主の腸内菌叢のバランスを改善することにより、宿主に有益な作用をもたらすような、経口摂取す

〒069-0836 北海道江別市文京台緑町 589-4

*連絡先 (Corresponding author), nakagawa-ryoji@hro.or.jp

図 1 HOKKAIDO 株の人工胃液耐性 (A) および人工腸液耐性 (B)

(A), pH2.5 (○), pH3.0 (●)
(B), 人口腸液処理 (▲), 対照 (□)

る生きた微生物およびそれを含む食品」と定義され、広く受け入れられている。したがって、プロバイオティクスとなりえる微生物は、生きて胃を通過し、腸管に到達して増殖することが望ましいと考えられ、強い殺菌効果を有する胃酸や胆汁を含む消化液に耐性を持つことが必要である。そこで、HOKKAIDO 株が生きて腸まで到達できるかどうかを明らかにするため、人工消化液耐性を調べた。

ヒトの胃内は空腹時では pH1~2 になるが、食事を摂取すると pH が 3~5 に上昇し、また、胃内の消化物が十二指腸に移送されるのに約 2 時間かかることとされている。そこで、HOKKAIDO 株について pH2.5 と 3.0 で 4 時間までの人工胃液耐性試験を行った。その結果、pH2.5 では生菌数が減少したが、pH3 では生菌数の減少は見られなかった (図 1A)。この人工胃液耐性度は消化液耐性が確認されている乳酸菌株に匹敵し、HOKKAIDO 株が胃液に対して高い耐性を有することが示唆された。一方、胃を通過した消化物は腸内に 24 時間ほど留まるとされている。そこで、本研究では 27 時間までの人工腸液耐性試験を行った。その結果、HOKKAIDO 株は対照区と同様に、死滅することなく、むしろ増殖し、7 時間目までにその菌数は約 100 倍となったことから、腸液に対して非常に高い耐性を有することが示唆された (図 1B)。以上から、食事とともに摂取された HOKKAIDO 株は殆どが生きて腸まで達し、腸管内で増殖できると考えられる。

(2) 大腸菌 O-157 のヒト腸管由来培養細胞株 Caco-2 への付着抑制³⁾

HOKKAIDO 株は Caco-2 への付着性を示し、顕微鏡観察等から細胞当たり数十から数百個が付着していると推定された。一方、約 1×10^6 の Caco-2 に対して、 1×10^7 の大腸菌 O-157 と 1×10^{10} の乳酸菌 HOKKAIDO 株を添加したとき、大腸菌 O-157 の細胞付着が顕著に抑制された。特に、予め乳酸菌を加えておくと、付着抑制効果がさらに高まった (図 2)。添加した乳酸菌数が少ない場合は、大腸菌

図 2 HOKKAIDO 株による大腸菌 O-157 の Caco-2 細胞付着抑制

Caco-2 細胞: 1×10^6 個/ウェル, 大腸菌 O-157 の添加数: 1×10^7 cfu/ウェル
乳酸菌と大腸菌を同時に添加 (○), 大腸菌添加の 30 分前に乳酸菌を添加 (●)

O-157 の付着抑制は殆ど起こらなかったことから、大腸菌 O-157 の Caco-2 細胞への付着抑制は乳酸菌により細胞表層の受容体が飽和されることで起こると推察された。一般的に、ヒトの腸内は飽和状態の細菌が存在するので、そこでは乳酸菌やビフィズス菌などの有益な細菌 (善玉菌) と有害な細菌 (悪玉菌) による付着の競合が起こっていると推定される。したがって、健康的な腸内環境を維持するには、善玉菌を恒常的に定住させておくことが重要であり、そのために、乳酸発酵させた漬物などを食べ、細胞付着性を有する乳酸菌を常に補うことが有効であろうと考えられる。

(3) 免疫機能性⁴⁾

HOKKAIDO 株と正常ヒト未成熟樹状細胞 (Cryo NHDC) を共培養し、各種サイトカイン等の発現量を網羅的に解析

図 3 HOKKAIDO 株添加によるヒト未成熟樹状細胞 Cryo NHDC の IL-6, TNF- α , IL-10 および IL-12 産生量の変化

した。その結果、未成熟樹状細胞は成熟化し、IL-1 α , IL-1 β , IL-6 および TNF- α 遺伝子の発現が有意に増大した。また、IL-10 および IL-12 の発現が認められた。これらのサイトカイン等の産生量について ELISA 法により測定した結果、IL-6, TNF α , IL-10 および IL-12 を産生し、特に IL-10 および IL-12 は 1 日間よりも 2 日間培養で産生量が有意に増加した (図 3)。しかし、IL-1 α および IL-1 β の産生は認められなかった。これらのことから、HOKKAIDO 株はヒトの免疫バランス等の免疫機能改善に効果のある可能性が推察された。

3. 乳酸菌 HOKKAIDO 株を用いた食品等の開発

HOKKAIDO 株は北海道発のプロバイオティクス乳酸菌として機能性を有する付加価値製品の開発が期待できること、また、幾つかの食品素材に対する発酵試験の結果、野菜、果物、穀類などの植物性素材に対して優れた発酵力を示すことが明らかとなり、これらの特徴を活かした食品等の開発を行った。

(1) 発酵豆乳¹²⁾

大豆は世界的に重要な作物であり、栄養価に優れた食品素材である。日本においても、古くから豆腐、納豆、味噌、醤油などの原料に利用され、貴重なタンパク源となってきた。

さらに、近年では栄養面だけでなく、機能性の面からも注目され、大豆タンパク質、大豆オリゴ糖、イソフラボン、亜鉛などの生活習慣病に対する予防効果が期待される機能性成分を多く含有している。そこで、植物性素材に対して優れた発酵力を有する HOKKAIDO 株の特徴を生かすべく、ヨーグルト様の発酵豆乳を開発した。

滅菌した容器に、市販の調製豆乳と乳酸菌 HOKKAIDO 株を加え、30℃で 14 日間の発酵を行ったところ、1 日の発酵でヨーグルト状になり、十分に発酵した。pH は、発酵 1 日で 7.0 から 5.0 に下がり、その後は緩やかに低下し、14 日後には 4.0 になった (図 4A)。乳酸菌数は添加数の 10^6 cfu/mL から発酵 1 日で 10^9 cfu/mL になり、その後は緩やかに低下し、14 日後には 5×10^7 cfu/mL まで減少した (図 4B)。乳酸は D-および L-乳酸ともにほぼ同量生成され、それぞれ発酵 1 日目では 1.5mg/mL および 2.0mg/mL に、その後は緩やかに増加し、14 日後には 5.2mg/mL および 6.0mg/mL になった (図 4C)。ブドウ糖含量は当初 22mM であったが、発酵 1 日で 8mM になり、2 日後には 3mM にまで減少したが、その後は 5mM 前後で推移した。ショ糖含量は 14 日の発酵期間中 30 から 40mM の範囲で推移した。大豆オリゴ糖含量は当初 15mM であり、14 日の発酵期間中もほとんど変化しなかった (図 4D)。これら

図4 豆乳の発酵過程における pH (A), 乳酸菌数 (B), 乳酸量 (C) および糖含有量 (D) の変化
(C), D-乳酸 (●), L-乳酸 (○)
(D), ブドウ糖 (□), ショ糖 (○), 大豆オリゴ糖 (●)

の結果から, HOKKAIDO 株は豆乳ヨーグルト用乳酸菌として優れており, この食品中で十分量の乳酸菌数を維持できることが示された. プレバイオティクスは, 「大腸にそのまま到着してビフィズス菌などの有用菌のエサとなり, 増殖させる働きのあるもの」と定義されている. つまり, 当該乳酸発酵豆乳はビフィズス菌を増殖させうる大豆オリゴ糖含有食品であることから, プレバイオティクスとプロバイオティクスを併せ持つシンバイオティクスとして期待される.

(2) 乳酸菌発酵酒粕を用いたアルコール飲料⁵⁾

清酒の製造数量は 1973 年の 1421 千 kL をピークに減少し, 2015 年には 434 千 kL となり, ピーク時の約 31% まで縮小している. このような清酒を中心とした酒類離れが続く市場にあって, 最近の消費者志向は健康的で飲みやすい低アルコール化に向いている.

一方, 清酒の醸造副産物である酒粕は栄養価の高い食素材であり, 甘酒, 粕汁, 漬物などに利用されてきた. また, 近年は生活習慣病に関わる様々な生理活性が報告され, その機能性が注目されている.

そこで, 本研究では酒粕を HOKKAIDO 株で発酵させ, 生きた乳酸菌を含む低アルコール飲料を開発した.

MRS 液体培地 (Difco) を用いて HOKKAIDO 株の 5, 10, 15, 20% アルコール存在下での増殖を調べた. 図 5 に示すように, 5% アルコール添加区では発酵 1 日後に最大生菌数 (1.8×10^9 cfu/mL) となり, 無添加区 (4.1×10^9 cfu/mL) と同様に 1 mL 当たり 10^9 以上まで増殖した. その後, 生菌数は徐々に減少し, 発酵 7 日後には 1.3×10^7 cfu/mL になった. 10% および 15% アルコール添加区では発酵 2 日後に最大生菌数になったが, それぞれ 8.5×10^5 cfu/mL および 4.8×10^5 cfu/mL にとどまった. 20% アルコール添加区では発酵 1 日後に検出限界以下となり, 増殖が確認できなかった. 発酵 7 日後の pH を測定すると, 無添加区および 5% アルコール添加区でそれぞれ pH 3.98 および pH 4.05 まで下がっていたのに対して, 10% 以上のアルコール添加区では pH 5.55 以上 (発酵前: pH 5.85) であり, 十分に乳酸発酵したとはいえない値であった.

以上の結果から, HOKKAIDO 株は 5% アルコール存在下まで十分に増殖することが示され, アルコール含有の酒粕を原料に乳酸発酵が可能であろうと考えられた. しかし, 日本食品標準成分表によると, 酒粕にはアルコール分が約 8% 程度含まれていると記されていることから, 原料によっては加熱処理等でアルコール濃度を下げるなどの対

図 5 HOKKAIDO 株の増殖に及ぼすエタノールの影響
エタノール濃度, 0% (●), 5% (○), 10% (■), 15% (□), 20% (▲)

図 6 HOKKAIDO 株による発酵酒粕の糖質分析
グルコース (●), イソマルトース (○), イソマルトトリオース (■)

表 1 HOKKAIDO 株による発酵酒粕の有機酸分析

	発酵日数 (日)				
	0	1	2	3	4
クエン酸	83	0	0	0	0
リンゴ酸	84	0	0	0	0
コハク酸	111	124	107	125	127
乳酸	41	7030	8459	9862	9980
酢酸	17	109	148	186	206

単位: mg/L

策が必要である。また、迅速かつ効率的に乳酸菌を増やすには、加熱処理等でアルコールを完全に除いた酒粕を用い、後からアルコールを添加し調整する方が適当であろうと思われる。

酒粕を原料に HOKKAIDO 株が増殖し、十分な乳酸発酵が可能かを明らかにするため、酒粕を水で 10 倍希釈後、加熱殺菌した酒粕溶液による発酵試験を行い、生菌数、pH、有機酸および少糖類の経時変化を調べた。発酵前は生菌数 2.1×10^7 cfu/mL、pH 5.18 であったが、発酵 1 日後には生菌数 1.8×10^8 cfu/mL、pH 3.19 になった。その後、発酵経過と共に生菌数が緩やかに減少し、発酵 4 日後には 6.3×10^7 cfu/mL、pH 3.06 になった。表 1 に示すように、発酵前の酒粕溶液からはクエン酸 (83mg/L)、リンゴ酸 (84mg/L)、コハク酸 (111mg/L)、乳酸 (41mg/L)、酢酸 (17mg/L) が検出された。発酵 1 日後、クエン酸およびリンゴ酸が検出限界以下となったが、コハク酸は発酵 4 日後まではほぼ一定であった。一方、乳酸は発酵 1 日後に約 170 倍の 7030 mg/L まで増加し、発酵 4 日後には約 240 倍の 9980 mg/L に達した。酢酸は発酵 1 日後に約 6 倍の 109mg/L になり、発酵 4 日後には約 12 倍の 206mg/L まで増加した。

表 2 HOKKAIDO 株による発酵酒粕のタウリン、オルニチン、シトルリン量の変化

	発酵日数 (日)				
	0	1	2	3	4
タウリン	0	4	3.8	5	4.3
シトルリン	0	0.8	0.8	1.1	1
オルニチン	14.3	19.1	20.3	27.3	22.5

単位: mg/L

酒粕に含まれる主な少糖類はグルコース、イソマルトース、イソマルトトリオースである。図 6 に示すように、発酵前の酒粕溶液からはグルコース、イソマルトース、イソマルトトリオースがそれぞれ 560mg/L、180mg/L、160mg/L 検出された。発酵 1 日後、グルコースおよびイソマルトースはそれぞれ 210mg/L (当初量の 1/2 以下) および 50mg/L (当初量の 1/4 以下) となり、発酵 2 日後にはほぼ全量が分解された。一方、イソマルトトリオースは発酵 4 日後まで一定であり、当初量を維持した。

以上の結果から、酒粕は HOKKAIDO 株の増殖に適した原料であった。また、乳酸菌種の中には乳酸のほかに幾種類かの有機酸を生成するヘテロ型乳酸菌が存在するが、これらの菌種で発酵させたものは香りや味が良くないなどの欠点が見られる。ホモ型乳酸菌である *L. plantarum* に属する HOKKAIDO 株は、発酵により主な少糖類であるグルコースとイソマルトースを分解し、マイルドな酸味の乳酸を主として産生した。このことから、発酵酒粕からは酸味をもった爽やかさのある酒類ができると考えられる。

機能性成分として知られるタウリン、シトルリンおよびオルニチン量の発酵過程における経時変化を調べた。表 2 に示すように、タウリンおよびシトルリンは発酵前の酒粕

からは検出されないが、発酵1日後にはそれぞれ4.0mg/Lおよび0.8mg/Lとなり、その後ほぼ一定量を維持した。オルニチンは発酵前には14.3mg/L含まれていたが、発酵1日後には19.1mg/Lに増加し、発酵3日後には当初量の約2倍の27.3mg/Lに達した。タウリンは含硫アミノ酸様化合物で、コレステロール低下作用や肝機能の改善作用が示唆されている。また、シトルリンおよびオルニチンはアミノ酸の一種で、シトルリンには血管内皮機能や疲労回復など、オルニチンには成長ホルモンの分泌促進やアンモニア代謝の向上などの機能が示唆されている。これら成分の1日の薬理効果を期待した摂取目安量は、既知文献の試験データや市販の健康飲食品の推奨量から3成分ともに数百mg程度と推定される。したがって、当該発酵酒粕のみの飲食で薬理効果を期待することは難しいが、他の飲食物と組合せて有効レベルに到達するためのアイテムとしての活用が考えられる。タウリンおよびシトルリンは発酵前の酒粕からは検出されず乳酸菌発酵により生成した。これら成分の当該発酵酒粕中の含有量はそれ程多くはないが、酒粕を乳酸菌発酵することで得られる新たな機能成分として今後の研究進展が期待される。

(3) 野菜発酵飲料

昨今、健康志向を反映してニンジンを使った野菜飲料がつくられているが、最近の野菜ジュースに対する消費者嗜好は、甘さよりも酸味を求める傾向にあることから、有機酸やレモン果汁等を加えるなどの工夫がされている。そこで、本研究では地域農産物の新たな加工利用を目的として、北海道浦臼町産の有機栽培ニンジンを用いて発酵させた特長ある植物性乳酸飲料の開発を行った。

原料ニンジンは、皮をむき、柔らかくなるまでボイル(約30分)した。これをミキサーでジュースにした後、85℃、30分間の加熱殺菌処理を行った。これにHOKKAIDO株の菌液を接種し、一定温度で発酵させた後、加熱殺菌(85℃、30分間)を行い、発酵の進行を止めた。

ニンジンジュースを発酵させる至適温度と時間を明らかにするため、20℃から40℃の範囲で、1日から3日間の発酵処理し、pH変化を調べた。発酵前のpHは4.62であったが、発酵開始1日後には各温度条件でpH低下が認められ、特に発酵温度30から35℃で最も低くなった(pH3.8~3.7)。2日および3日間の発酵処理では、更にpHが低下したが、2日間の発酵物でも酸味が強く、飲料として適当ではなかった。したがって、当該ニンジンジュースの発酵には、30から35℃で1日間が適当であろうと考えられた。

乳酸菌数は図7に示したように、初発菌数が 6×10^6 cfu/mLであり、発酵開始1日後には 1.1×10^9 cfu/mLにまで増加し、3日後まではほぼ同数で推移した。ニンジンジュースは発酵処理によって糖が消費され、有機酸を産生することでpHが低下し酸味が出ると推定される。そこ

図7 発酵温度35℃におけるpHおよび乳酸菌数の経時変化

で、発酵ニンジンジュースの有機酸分析を行った。原料ジュースに含まれる有機酸の殆どがリンゴ酸(約2.38mg/mL)であり、他の有機酸は僅かであった。発酵1日後にはリンゴ酸が分解消失し、代わって乳酸が殆どを占めた(約5.72mg/mL)。

赤ワインや一部の白ワインでは、アルコール発酵終了直後のワインに多く含まれる酸味の強いリンゴ酸がある種の細菌の働きで、マイルドな酸味をもつ乳酸に変換されるマロラクティック発酵(MLF)という二次発酵が知られている。このMLFにより、ワインはまろやかで香味豊かになる。今回のニンジンジュースにおいて、HOKKAIDO株による発酵処理によりMLFに類似した効果が期待された。

4. おわりに

これらの研究の成果に基づいて、ヨーグルト様の発酵豆乳、発酵酒粕を用いた酒類、ニンジンやトマトを原料とした発酵飲料などが製品化された。また、HOKKAIDO株の生菌を含有するサプリメント、発酵乳なども開発された。生乳を使ったヨーグルトについてはヒト摂取試験を実施し、HOKKAIDO株入りヨーグルトが免疫機能を改善し、ストレスマーカーを低下させることが示唆⁶⁾され、北海道食品機能性表示制度(ヘルシーDo)¹⁾の認定商品となった。食品以外として、仔牛用代用乳等の飼料に利用され⁷⁾、幾つかの製品が開発された。今後も引き続き、乳酸菌HOKKAIDO株の特長を活かした高付加価値製品の開発および普及を推進する予定である。

文 献

- 1) 中川良二, 八十川大輔, 長島浩二 (2004), 新規な乳酸菌とそれを用いて得られる発酵豆乳およびその製造方法, 特許第3925502号, 3月9日。
- 2) Nakagawa, R., Yabuuchi, H., Yasokawa, D., and Nagashima, K. (2005). Fermentation of soybean milk with *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO and its health function. *Journal of*

- the Japanese Society for Food Science and Technology (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi)*, **52**, 140–143 (中川良二, 藪内裕子, 八十川大輔, 長島浩二. *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO を用いた豆乳ヨーグルトの製造およびその機能性, 日本食品科学工学会誌).
- 3) 中川良二 (2003). 漬物由来乳酸菌の保健機能. 食品と技術, **385**, 14–16.
 - 4) 中川良二, 内田健治, 片野直哉 (2012). *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO に対するヒト樹状細胞の免疫応答. 京都. 2012 年度日本農芸化学会大会要旨集, 2J11p07.
 - 5) Nakagawa, R. and Hamaoka, N. (2012). Probiotic alcoholic beverage made from fermented sake cake with lactic acid bacteria. *Journal of the Brewing Society of Japan (Nippon Jozokyoikaishi)*, **107**, 605–610 (中川良二, 濱岡直裕. 乳酸菌発酵酒粕を用いた生菌含有アルコール飲料, 日本醸造協会誌).
 - 6) Nishimura, M., Ohkawara, T., Tetsuka, K., Kawasaki, Y., Nakagawa, R., Satoh, H., Sato, Y., and Nishihira, J. (2016). Effects of yogurt containing *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO on immune function and stress markers. *J. Tradit. Complement. Med.*, **6**, 275–280.
 - 7) 中川良二, 長島浩二, 北村 亨, 上西寛司, 本間 満, 副島洋, 阿部健太郎, 古川 修 (2008). ラクトバチルス・プラントラムを含有する動物用飼料組成物, 該組成物を含有する動物用配合飼料及び前記ラクトバチルス・プラントラムを動物腸管内で維持又は増殖させる方法, 特許第 5499231 号, 3 月 20 日.
- 引用 URL**
- i) http://www.h-food.or.jp/functional_display-2/ (2017.10.17)
(平成 30 年 2 月 16 日受理)