

# 機能性乳酸菌の探索と高付加価値食品への応用

京都府中小企業特別技術指導員の麻生祐司氏(京都工芸繊維大学大学院准教授)に上記テーマで寄稿いただきました。

## 1. 機能性乳酸菌とは

乳酸菌は、糖を発酵して大量の乳酸を産生する細菌の総称です。厳密には、消費したブドウ糖に対して50%以上の乳酸を産生する、グラム陽性である、カタラーゼ陰性である、内生孢子形成能がない、稀に運動性を示すなどの学術上の定義があり、それらの条件を全て満たす細菌のことを指します。現在までに乳酸菌は*Lactococcus*属、*Lactobacillus*属、*Enterococcus*属、*Leuconostoc*属など約20属に分類され、種としては200種以上あるなどバラエティに富んでいます。乳酸菌は乳酸などの有機酸を産生することから、環境中のpHを有意に低下させて他の微生物の増殖を抑制するとともに、豊かな風味をもたらすことから、古くよりチーズ、ヨーグルト、漬物、味噌、ワイン、パンなど様々な発酵食品に利用されてきました。

ところで、乳酸を産生する機能とは別に、特殊な生理機能を持った乳酸菌、すなわち「機能性乳酸菌」を食品に利用する動きが盛んになっています(図1)。例えば、乳酸以外

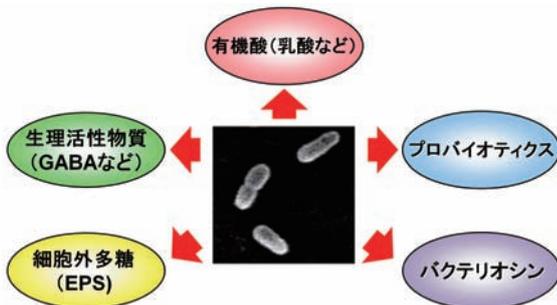


図1 機能性乳酸菌

の有用物質を産生する乳酸菌の例として、血圧降下、中性脂肪抑制、神経鎮静などの効果が期待されるGABA(γ-アミノ酪酸)を産生する乳酸菌が知られており、これまでに多くの食品に利用されています。また、食品への利用ではありませんが、デキストランやケフィランなどのEPS(細胞外多糖)を産生する乳酸菌は工業的に利用されています。他の有用物質として、乳酸菌の産生する抗菌性ペプチド(バクテリオシン)が知られています。バクテリオシンは、安全性が高い、無味無臭、耐熱性・耐酸性に優れる(食品製造プロセスに耐える)、腸内で容易に分解されるなど、食品保存料としての優れた性質を備えています。乳酸菌*Lactococcus lactis*の産生するバクテリオシンの1つであるナイシンA(図2)は、バクテリオシンの中で唯一、

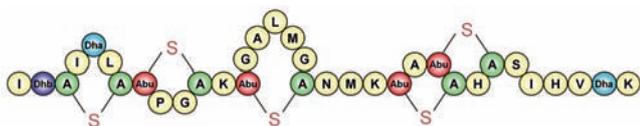


図2 ナイシンA

FDA(米国食品医薬品局)によりGRAS(Generally Recognized As Safe)として認可されるなど、世界50カ国以上で缶詰、マヨネーズ、チーズなどの保存料として既に実用化されています。日本でも2009年3月に認

可されており、新しいタイプの食品保存料としての利用が期待されていますが、使用基準に準拠する必要があるため、現在のところ全ての食品には利用できないなどの欠点もあります。

有用物質を産生する機能の他に、プロバイオティクスに関連する効果を持つ新しい機能性乳酸菌が次々と見出されてきています。プロバイオティクスとは、「適量を摂取した際に宿主に有用な作用をもたらす生きた微生物」と定義されています。プロバイオティクスを摂取することで、腸内における乳酸菌などの有用菌の割合を増加させることができます。その結果、有用菌によって産生される乳酸などの有機酸の働きで腸内のpHが酸性に傾くことで、腐敗物質を産生する有害菌が減少するとともに、有機酸の刺激によって腸の蠕動運動が促進されます。これらの相互作用によって、便秘や下痢を予防・改善することができます。また、プロバイオティクスは腸管免疫系に対して免疫応答を誘起させ、腸管の感染防御機能の向上、アレルギー症状の改善などももたらします。さらに、プロバイオティクスの中には、発ガン抑制、血圧降下、コレステロール低減など多様な生理効果を示すものもいることがわかってきました。予防医学の観点から、プロバイオティクスを積極的に摂取することはとても重要であるといえます。

## 2. 機能性乳酸菌探索のストラテジー

一般に乳酸菌の栄養要求性は複雑であり、環境中では発酵食品、植物の花・果実や表面組織、動物の口腔・消化管内などから富栄養培地を用いて分離されます。一方、土壌や陸水・海水など貧栄養環境と考えられる場所からも分離が行われる例もあり、自然界には幅広く乳酸菌が存在しているといえます。とりわけ、乳酸菌を食品へ利用する場合、安全性が認められていなければならず、健全者(乳児)や食経験の長い発酵食品などは有用な分離源であるといえます。最近、植物性乳酸菌という言葉が耳にする機会が増えましたが、これは主に植物あるいは植物原料の食品から分離された乳酸菌のことで、これまでに腸内での生残性やプロバイオティクス効果が高いものも多く見つかっています。幅広い分離源から乳酸菌の分離を試みることでバラエティに富んだ乳酸菌を得ることができます。乳酸菌を分離する際、沈降性の炭酸カルシウムを混和した寒天培地に分離源を塗布することで、形成されたコロニーの周囲の炭酸カルシウム由来の白濁が乳酸によって溶かされクリアゾーンを形成しているコロニーを乳酸菌コロニーとして特定することができます(図3)。また、真核生物の生育阻害剤であるシクロヘキシミドと、好気性生物の生育阻害剤であるアジ化ナトリウムの両方を添加した培地を用いて乳酸菌を集積培養した後にコロニーを形成させることで効率的に分離することができます。分離



図3 クリアゾーンを形成した乳酸菌コロニー

した乳酸菌はグリセロール溶液にストックし、乳酸菌ライブラリーとして冷凍保存します。その後、16S rDNA配列解析や糖の資化性パターンなどに基づいた同定を行い、分離した乳酸菌の属種を決定します。

機能性乳酸菌を分離する場合は、その機能性を評価するための評価系を確立する必要があります。例えば、GABA産生乳酸菌を分離する場合は、グルタミン酸を培地に添加しておき、グルタミン酸からGABAへの変換活性をTLCまたはHPLC分析などで調べることで、GABA生産能を評価します。バクテリオシン産生乳酸菌を分離する場合は、乳酸菌コロニーを形成させた寒天培地上に、検定菌(バクテリオシン感受性菌)を接種した軟寒天培地を溶解した状態で重層します。培養後、乳酸菌コロニーの周囲にクリアゾーンが観察されるコロニーをバクテリオシン産生乳酸菌として分離することができます。また、プロバイオティクスとして乳酸菌を利用する場合は、*in vitro*での細胞試験の他に、動物試験やヒトを対象とした臨床試験を行い、安全性・機能性を評価します。安全性評価試験としては、薬剤耐性、代謝阻害、毒素産生、溶血性、急性毒性などを調べます。また、機能性評価試験としては、消化液耐性、腸管付着性などを調べます。食品に用いる場合、機能性だけでなくスターター(発酵の開始のために加える微生物)としての機能を有していることも重要です。分離した機能性乳酸菌を用いてプロトタイプ食を作製し、スターター機能(風味・テクスチャ、発酵安定性など)を総合的に評価し、食品への利用に耐えうるか調べる必要があります。

### 3. アミラーゼ阻害活性を有する乳酸菌の発見

糖尿病は罹患率の高い生活習慣病です。糖尿病の治療では、食後の急激な血糖値上昇を防ぐことを目的として、食事の際に摂取する糖質の量をコントロールする治療(食餌療法)が求められます。また、アミラーゼなど血糖の生成に関与する酵素の活性を阻害する特殊な薬剤を使用した治療(薬物療法)が行われることもあります。これら食餌療法や薬物療法は、食事量の制限や薬物による副作用などを引き起こすため、生活の質(QOL)を大きく低下させます。そのため、毎日の食事で摂取する食品を利用したマイルドな方法による新しい糖尿病治療および予防法の開発が望まれています。しかし、これまでに開発されている糖尿病関連食品の形態は限定的であり、現代の食のニーズにマッチしたバラエティ豊かな糖尿病関連食品の開発が急務となっています。我が国の糖尿病人口は1800万人を越える(患者数:約212万人、予備軍:約1620万人[2002年調査])といわれており、糖尿病関連食品の開発は今後盛んになると予想されています。

私の研究室では島根県特有の発酵食品である「津田かぶ漬け」を分離源として、新たに開発した効率的な分離手法により、アミラーゼに対して比較的強い阻害活性を示す乳酸菌 *Weissella* sp. KY5-4 を分離することに成功しました。本菌は胃酸・胆汁酸耐性が比較的高く、プロバイオティクスとしても有用であることがわかりました。また、アミラーゼ阻害活性は耐熱性・保存性にも優れることがわかりました。さらに、本菌を用いて津田かぶ漬けを試作したところ、風味豊かな漬物ができ、発酵終了における漬け汁のアミラーゼ阻害活性が有意に増加したことから、発酵食品への利用が可能であることがわかりました(図4)。機能性

乳酸菌KY5-4は食品由来であることから、食品への適用も容易であるなどの利点を有しており、糖尿病関連食品などの高付加価値食品への応用を期待しています。

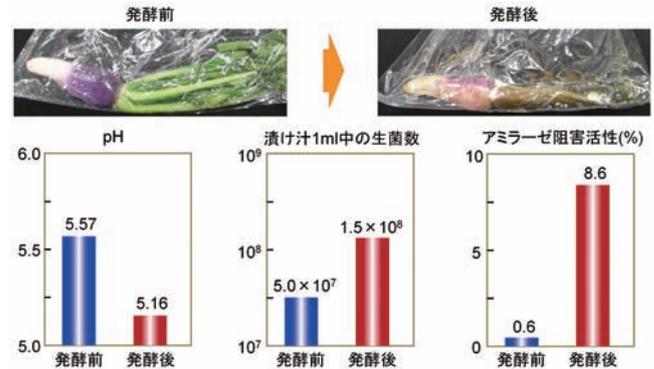


図4 機能性乳酸菌KY5-4を利用した漬物の試作

### 4. 機能性乳酸菌の拓く未来

従来の「乳酸を産生する細菌＝乳酸菌」という限定的なイメージは今や大きく変わりつつあります。新たな機能を持った乳酸菌を探索し食品に利用することで、食品開発の可能性を大きく広げることができます。私の研究室ではアミラーゼ阻害活性を有する乳酸菌の他にも、ビタミンの一種である葉酸を高生産する乳酸菌の分離とそれを利用したプロトタイプ食の開発にも成功しています。例えば、このような乳酸菌を利用することで、サプリメント機能を有した新しい食品を開発することも可能でしょう。我々の望む生理機能を持った乳酸菌は全て、既にこの世に存在しているといっても過言ではありません。まさに、機能性乳酸菌の可能性は無限であるといえます。

### 謝辞

機能性乳酸菌の研究に際して、島根大学教育学部の高橋哲也教授にお世話になりました。アミラーゼ阻害活性を有する乳酸菌に関する研究は、科学研究費補助金(日本学術振興会)と、しまね産学官協働推進事業可能性試験研究費(しまね産業振興財団)による補助を受けて行われました。

### あそ 祐司 氏 プロフィール



所属 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 バイオベースマテリアル学部門 准教授  
 略歴 1999年 九州大学農学部食糧化学工学科卒  
 2004年 九州大学大学院生物資源環境科学府 博士課程修了、同大ベンチャービジネスラボラトリー講師(中核的研究機関研究員)  
 2005年 京都大学大学院農学研究科産学連携研究員  
 2006年 島根大学教育学部講師  
 2008年 同准教授  
 2010年より現職  
 専門 応用微生物学(生物工学)  
 著書 遺伝子から見た応用微生物学(朝倉書店) 分担執筆

【お問い合わせ先】

京都府中小企業技術センター  
 応用技術課 食品・バイオ担当

TEL:075-315-8634 FAX:075-315-9497  
 E-mail:ouyou@mtc.pref.kyoto.lg.jp