

《様式B》

研究テーマ	「海洋乳酸菌を用いた豆乳ヨーグルトの機能性増強と風味改善を両立する発酵技術の開発」		
研究責任者	所属機関名	静岡県農林技術研究所 茶業研究センター	
	官職又は役職	上席研究員	
	氏名	豊泉友康	
	メールアドレス	tomoyasu1_toyoizumi@pref.shizuoka.lg.jp	
共同研究者	所属機関名		
	官職又は役職		
	氏名		

(令和3年度募集) 第34回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1,000字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

骨粗しょう症は、加齢による骨密度低下により骨折頻度が高くなる疾患で、国内患者数だけでも1300万人に達し、予防が喫緊の課題となっている。本研究は、豆乳を用いた骨粗しょう症予防食品の開発に有用となる発酵技術の開発を目指し、予防に有効な機能性の増強および豆臭由来の不快臭を低減する海洋由来の乳酸菌 (海洋乳酸菌) 株の選抜を目的とし、以下2つの実験を行った。

実験1: 保有株のイソフラボン類のアグリコン・エクオール生成能力の解明

実験2: 保有株の不快臭の低減力の解明

実験1では、保有する低温増殖能を有す16種 (S1から16) の海洋乳酸菌株で市販の豆乳を15℃・3日間発酵させた試料 (豆乳ヨーグルト、発酵区) を用いて、イソフラボン類のアグリコン・エクオール生成能力や抗酸化能等をHPLC (高速液体クロマトグラフ) 法・ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 法等で分析化学的に評価した。結果、供した16菌株は、いずれもアグリコン生成能を有すものの、エクオール生成能はなかった。また、*Lactobacillus fermentum*、*Lactococcus lactice*、*Lactiplantibacillus plantarum* および *Lactobacillus paracasei* のS1から12株は、発酵後に抗酸化能 (H-ORAC値) も高めた。

実験2では、実験1と同様の豆乳ヨーグルトを用いて、豆臭・香りおよび関連する揮発性成分を官能検査・GC (ガスクロマトグラフ) 法で評価した。結果、供した内の9株 (S1から4、S7および8、S12から14) は、官能レベルで豆臭低減効果を示した。

また、豆臭の主要成分である Hexanal および Heptanal を含め、アルデヒド類の揮発成分のピーク面積値は、発酵後に検出限界以下まで低下した。更に、この 9 株の内、8 株 (S1 から 4、S7 および 8、S13 および S14) では、発酵後に好ましい香りも高まった。

以上から S1 から S4、S7 および 8、S13 の 7 株の海洋乳酸菌は、高い機能性・香り増強効果に加え、豆臭低減効果を有することが明らかとなった。今後は本株を用いる発酵技術を豆乳ヨーグルトの製造過程に活かすことで、骨粗しょう症予防効果を更に高め、かつ風味も改善した食品開発が期待できる。

本株の一部を用いた発酵技術は、静岡県内の企業において豆乳の機能性増強および風味改善で活用され、抹茶入りやプレーン等の 3 種類の豆乳ヨーグルトの商品化に貢献した。また、研究成果は、学会で 1 件および新聞で 3 件情報発信した。なお、研究に関わる特許出願の予定はない。

2. 実施内容および成果の説明

【背景・目的】骨粗しょう症は、加齢による骨密度低下により骨折頻度が高くなる疾患で、国内患者数だけでも 1300 万人に達し、予防が喫緊の課題となっている。これに対し食分野では、骨の形成促進と破壊抑制の効果を有すイソフラボンを多く含む機能性食品が注目されている。中でも豆乳ヨーグルトは、臨床効果が発現する摂取量 55 mg を日常的かつ容易に摂取でき、更にカルシウム等予防に関わる栄養成分も多いため有用である。

イソフラボンの内のアグリコンであるゲニステイン・ダイゼインが高い予防効果を有すが、豆乳中では効果の低い糖が結合した状態（非アグリコン）で存在している。従って、通常の豆乳ヨーグルトよりアグリコン量を高めるために、陸上由来の乳酸菌が持つ糖結合の切断力を活かした発酵技術が開発され、活用されつつある。

一方、申請者は、食分野での応用例が少ない海洋由来の株を多く保有し、これらの内、発酵食品の製造過程で食中毒菌の繁殖抑制に有効な 15℃低温で高い増殖能を有す菌株を選抜してきた。また、海洋株は、陸上より栄養源の糖が少ない環境で生育可能なため、糖結合の高い切断力・資化能が期待できる。即ち、この切断力を豆乳の低温発酵時に活かすことで、高いアグリコン生成能を示し、機能性増強も期待できるが知見はない。更にダイゼインは、摂取後に腸内の特定の乳酸菌により機能がより高いエクオールに変換されるが、その菌の定着率の個人差が大きく、生成量の差も大きい。従って、機能面の更なる向上のため、低温発酵時にエクオールまで代謝変換できれば有益となるが、海洋株の適応性は不明である。併せて、豆乳を原料とする食品の場合には、豆由来の脂肪酸関連の青臭い不快成分が残存し、風味低下を引き起こす欠点もあり、解決が必要である。

そこで、本研究は、上述の課題を解決し豆乳の機能性増強・風味改善を両立する有望株を選抜するため、保有株のアグリコン・エクオール生成能力（実験 1）、保有株の不快臭の低減力（実験 2）および機能性増強・風味改善の両立株の解明を目的とした。

表 1 供した海洋乳酸菌株の分離源・属種

実験番号	菌株番号	分離源	属種
S1	SUG-0215	鯉腸管(御前崎)	<i>Lactobacillus fermentum</i>
S2	ML58	サクラエビ(駿河湾)	<i>Lactococcus lactis</i>
S3	1-7	ナマコ腸管(生・御前崎)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
S4	20-3	サクラエビ(生・大井川)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
S5	23-2	シラス(生・春・用宗)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
S6	26-1	ヒトエグサ(生・春・浜名湖)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
S7	24-4	シラス(生・春・用宗)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
S8	L1	塩汁(沼津)	<i>Lactobacillus paracasei</i>
S9	Y414	サザエ(由比)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
S10	Y415	サザエ(由比)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
S11	Y422	サザエ(由比)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
S12	Y424	サザエ(由比)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
S13	NON113	シラス(福田)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
S14	NON128	マクサ(堂ヶ島)	<i>Lactobacillus brevis</i>
S15	NON140	オゴノリ(浜名湖)	<i>Lactobacillus paracasei</i>
S16	NON142	アワビ(由比)	<i>Lactobacillus brevis</i>

【方法】低温増殖能を有し、かつ解凍後の生存率が高かった 16 株の海洋乳酸菌の菌液（表 1）について、市販の豆乳に無菌下で接種し、15°C・3 日間発酵させた（発酵区、図 1）。凝固した豆乳（豆乳ヨーグルト）は、以下の実験 1 および 2 の評価で供した。

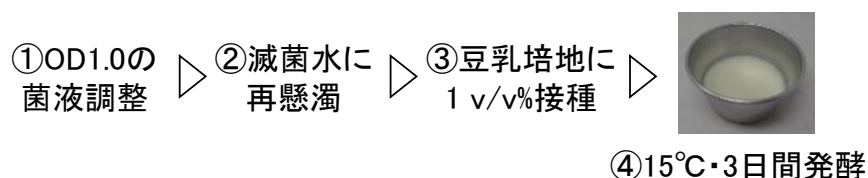


図 1 豆乳ヨーグルトの調製法の概略

実験 1（イソフラボン類のアグリコン・エクオール生成能力の解明）

各菌株の機能性増強効果を評価するため、発酵区のイソフラボン類・その代謝産物 8 種（ゲニステイン・ダイゼイン・グリシテイン・これら 3 種の非アグリコン（ゲニスチン、ダイジンおよびグリシチン）・ジヒドロダイゼイン・エクオール）含量、総ポリフェノール（TP）含量および抗酸化能（DPPH 値：2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl・H-ORAC 値：Hydrophilic Oxygen Radical Absorbance Capacity）を、高速液体クロマトグラフおよびマイクロプレートリーダーで測定した。

実験 2（不快臭の低減力の解明）

各菌株の不快臭の低減効果を評価するため、発酵区の官能（豆臭および香り）・関連する揮発性成分を、専門検査員による官能検査・質量分析計を接続したガスクロマトグラフ（GC/MS）で検査した。

【結果】

実験 1

供した 16 株の発酵区において、3 種の非アグリコン型イソフラボン含量は、発酵前区（5°C・3 日間保管）と比較して有意に減少した（省略）。一方、3 種のアグリコン型イソフラボン含量は、発酵前区と比較して有意に増加した（図 2、ゲニステイン・グリシテイン含量は省略）。また、この内の 14 株由来の発酵区（S1 から 13、S15）のイソフラボン類含量は、マクサ・アワビ由来の *Lactobacillus brevis* 2 株のもの（S14 および 16）と比較して有意に多かった。

エクオール・その前駆体であるジヒドロダイゼインは、いずれの発酵区においても検出されなかった（省略）。TP 含量は、*Lactiplantibacillus plantarum* の S3 株の発酵区においてのみ、発酵前区と比較して有意に増加した（省略）。

SET (Single Electron Transfer) 法に基づく抗酸化能の指標である DPPH 値は、いずれの発酵区でも変化はなかった (省略)。一方、HAT (Hydrogen Atom Transfer) 法に基づく指標である H-ORAC 値は、*Lactobacillus fermentum*、*Lactococcus lactice*、*L. plantarum* および *Lactobacillus paracasei* の S1 から S12 株由来の区において、発酵前区より有意な増加が認められた (図 3)。

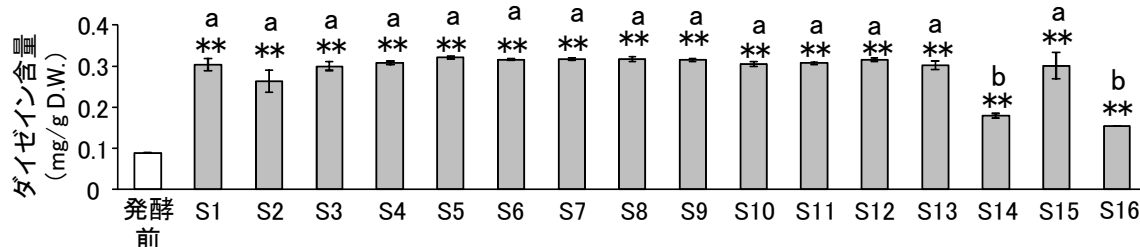


図 2 16 種の海洋乳酸菌株で試作した豆乳ヨーグルトのダイゼイン含量の特性

各区は、4 反復の平均値±標準偏差を示す。* * : 発酵前区と比較して、1%水準で有意な差が認められた (Dunnet 検定、両側)。

異符号間に 5%水準で有意な差が認められた (Tukey' s HSD 検定、両側)。

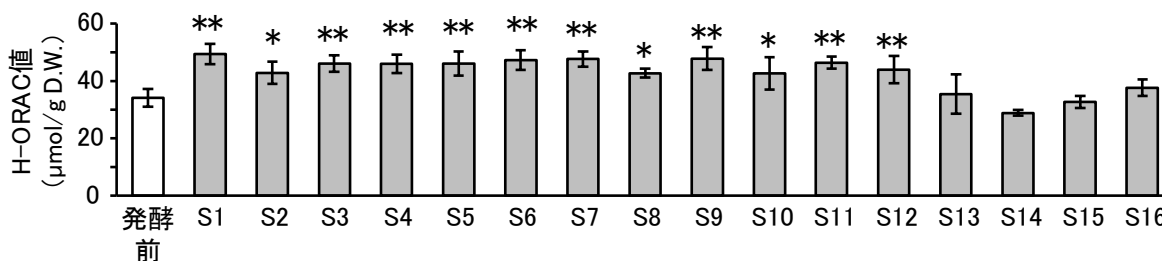


図 3 16 種の海洋乳酸菌株で試作した豆乳ヨーグルトの抗酸化能の特性

各区は、4 反復の平均値±標準偏差を示す。* または * * : 発酵前区と比較して、5 または 1%水準で有意な差が認められた

(Dunnet 検定、両側)。

実験 2

供した内の 9 株の発酵区 (S1 から 4、S7 および 8、S12 から 14) の豆臭は、発酵前

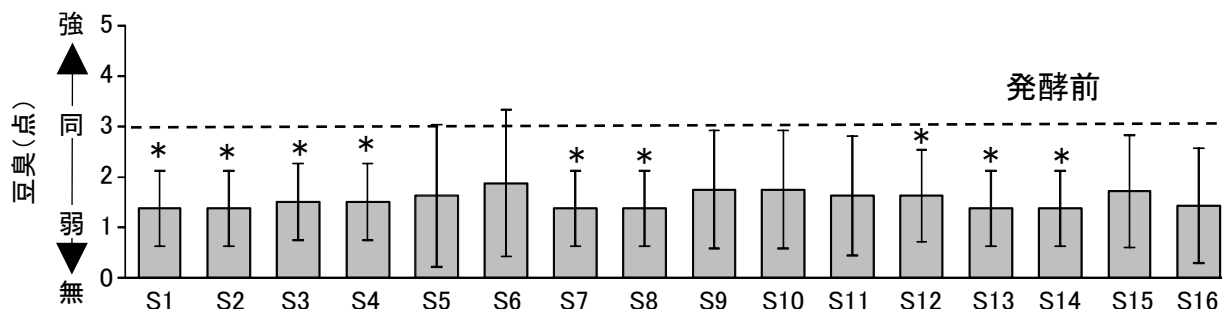


図 4 16 種の海洋乳酸菌株で試作した豆乳ヨーグルトの豆臭 (官能) の特性

各区は、8 名の検査員の平均値±標準偏差を示す。豆臭は、0 点 : ない、1 点 : 弱い、2 点 : やや弱い、3 点 : 同じ、4 点 : やや強い、5 点 : 強い、の基準で、5°C で 3 日間保管した豆乳 (発酵前区) と比較評価した。* : 発酵前区と比較して、5%水準で有意な差が認められた (Steel 検定、両側)。

区と比較して、有意に低下した（図 4）。また、豆臭に関わるアルデヒド類の Hexanal および Heptanal のピーク面積値は、発酵後に検出限界以下となった（図 5、データ一部のみ）。更に、その他のアルデヒド類である Benzaldehyde、3-Methylbutanal、2-Methylbutanal、Nonanal および Octanal も発酵後に検出限界以下となった（省略）。

また、この 9 株の内、8 株（S1 から 4、S7 および 8、S13 および 14）は、発酵後に好ましい香りも高めた（図 6）。

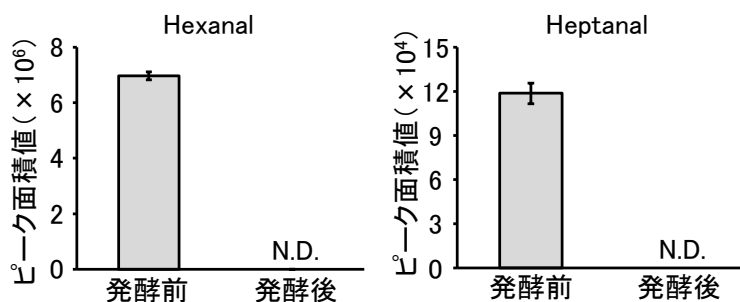


図 5 海洋乳酸菌株で試作した豆乳ヨーグルトの豆臭関連の揮発成分の特性

各区は、4 反復の平均値±標準偏差を示す。

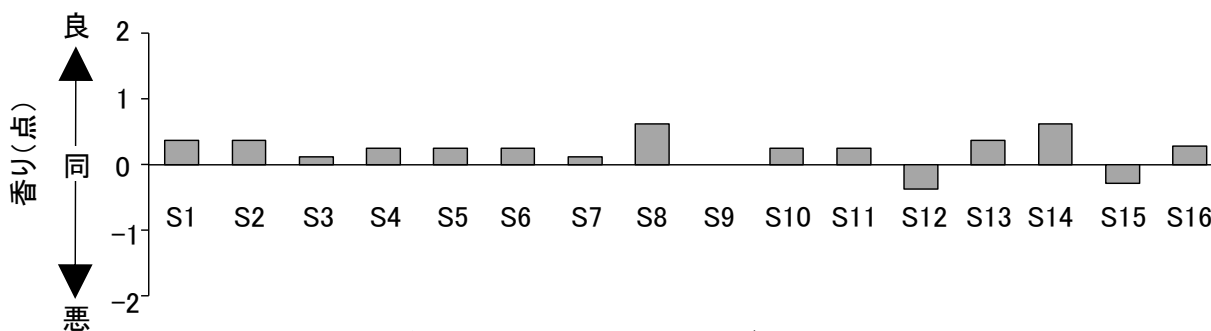


図 6 海洋乳酸菌株で試作した豆乳ヨーグルトの香り（官能）の特性

各区は、8 名の検査員の平均値±標準偏差を示す。香りは、-2 点：悪い、-1 点：やや悪い、0 点：同じ、1 点：やや良い、2 点：良い、の基準で、5℃で 3 日間保管した豆乳（発酵前区）と比較評価した。

【考察】 供した 16 株の海洋乳酸菌は、いずれもアグリコン生成能を有すものの、エクオール生成能はなかった。また、*L. fermentum*、*L. lactice*、*L. plantarum* および *L. paracasei* の S1 から 12 の株は、発酵後の豆乳の抗酸化能も高めた。これは、イソフラボン類のアグリコン化に加え、その他の抗酸化成分のアグリコン化が影響したと考えている。従って、S1 から 12 の菌株の利用は、豆乳ヨーグルトの機能性増強において有用である。

供した内の 9 株（S1 から 4、S7 および 8、S12 から 14）による発酵は、官能レベルにおいて豆乳由来の豆臭を低減させた。これは、豆臭の関与成分である Hexanal およ

び Heptanal、その他のアルデヒド類 5 種の揮発成分が減少したことから、菌株が有すアルデヒドデヒドロゲナーゼによる代謝影響と推測した。また、この 9 株の内、8 株 (S1 から 4、S7 および 8、S13 および S14) は、発酵後に好ましい香りも高めた。これらの関与成分については、現在、評価・解析中である。従って、S1 から 4、S7 および 8、S13 および 14 の菌株の利用は、豆乳ヨーグルトの風味改善面において有用である。

以上から、S1 から S4、S7 および 8、S13 の 7 株の海洋乳酸菌は、高い機能性・香り増強効果に加え、豆臭低減効果を有することが明らかとなった。今後は本株を用いる発酵技術を豆乳ヨーグルトの製造過程に活かすことで、骨粗しょう症予防効果を更に高め、風味も改善した食品開発が期待できる。

【研究成果】

- ① 豊泉友康、村上 覚、藤井 拓、鈴木夏織、山崎資之、川井理仁、小杉 徹、齋藤禎一、大場聖司、単離・選抜した海洋乳酸菌株で発酵させた豆乳食品の大豆イソフラボン類・官能特性の評価、公益社団法人日本食品科学工学会 令和 5 年度 関東支部大会、2023 年 3 月 11 日
- ② 豊泉友康、村上 覚、藤井 拓、大場聖司、小杉 徹、16 株の海洋乳酸菌のアグリコン型イソフラボン類の生成・官能特性の評価、静岡県農林技術研究所試験研究成果の概要集、2023 年 3 月
- ③ 浜名湖の海藻乳酸菌で商品、読売新聞、2023 年 3 月 9 日
- ④ 浜名湖乳酸菌を商品化 「大豆グルト」発売、静岡新聞、2022 年 9 月 22 日
- ⑤ 乳酸菌 浜名湖の名物に 初の商品化「大豆グルト」、中日新聞、2022 年 9 月 22 日

【謝辞】

本研究は、一般財団法人 東海産業技術振興財団 第 34 回助成研究の支援を受けて行いました。また、分析用の豆乳ヨーグルトの調製実験では、静岡県農林技術研究所 村上 覚 博士にご支援いただきました。更に、機能性成分の抽出実験および GC/MS のデータ解析では、静岡県農林技術研究所 茶業研究センター 藤井 拓 氏にご支援いただきました。以上について、ここに記して感謝いたします。