

# 乳酸発酵並びに酵素利用技術を用いた機能性食品の開発

食品・環境科 主任研究員 玉屋 圭  
応用技術部 部長 河村 俊哉  
有限会社伊東精麦所 代表取締役 伊東 清一郎

当センターでは、これまでに長崎県特産物から乳酸菌約 600 株を分離してきた。さらに、これら菌株の有する特徴（有用成分生産能、抗菌性など）をもとにしてライブラリー化し、各種の加工食品を開発してきた。一方、当センターでは酵素利用技術を用いて、本県産の農水産物を原料とした調味料及び菓子素材の開発を行った。本研究では、食による疾病予防へのニーズに対応するために、これら両技術を活用し地域資源から機能性成分を産生あるいは抽出することにより、成分を高度に含有する機能性食品の開発を行った。今回は大麦糠を乳酸発酵及び酵素処理に供して得られたエキスについて報告する。

## 1. 緒言

近年、食生活の欧米化とともに、がん、循環器系疾患、肥満、アレルギー性疾患などの生活習慣病が若年から老年層にわたって増大している。この状況から、食による疾病予防に対するニーズは依然として高く、機能性食品の市場は 6,493 億円（特定保健用食品；2019 年度）と大きな規模を保っている。2015 年 4 月から機能性表示食品制度も開始され、今後の高齢化の進展や医療費の増大を考慮すると、疾病リスクを軽減する機能性食品の開発は新事業の創出及び育成に繋がると考えられる。また、機能性食品素材には健康機能だけでなく安全性の担保も強く求められる。この観点から、原料産地の明確化は重要であり、県産の地域資源を用いた機能性食品開発はニーズが高いものと考えられる。当センターでは、これまでに長崎県特産物から乳酸菌約 600 株を分離<sup>[1]</sup>してきた。さらに、これら菌株の有する特徴（有用成分生産能、抗菌性、抗酸化性など）をもとにしてライブラリー化し、各種の加工食品を開発してきた。一方、酵素利用技術を用いて、本県産の農水産物を原料とした調味料<sup>[2]</sup>及び菓子素材<sup>[3]</sup>の開発を行って来た。

本研究では、食による疾病予防へのニーズに対応するために、これら両技術を活用し地域資源から機能性成分を産生あるいは抽出することにより、成分を高度に含有する機能性食品の開発を行った。今回は大麦糠を乳酸発酵及び酵素処理に供して得られたエキスについて報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 試供材料

大麦品種は、サチホゴールド（佐賀県産）を用いた。大麦糠の調製は、(有)伊東精麦所に設置されている横型大麦搗精機を用いて行った。

原麦を 1～10 号機まで直列に設置された搗精機に投入し、各機から排出される糠を採取した。

昨年度の検討<sup>[4]</sup>により、高いポリフェノール含量（1,100 mg/100g）を示すことが判明した 3 号機から得られる糠（歩留率 93%）を試料とした。

### 2.2 大麦糠の乳酸発酵物の調製

大麦糠粉末 3 g に、精製水 30 mL を添加した後、オートクレーブ処理（121℃、15 分間）したものに、表 1 で示した各種乳酸菌（No.1～5）の培養液 0.5 mL をそれぞれ添加し、攪拌後 37℃で 48 時間発酵を行った。その後、遠心分離（5,000 rpm、10 分間）して得られた上清を測定試料とした。なお、表 1 の乳酸菌株は県産の加工食品、農産物から取得したものであり、当センターの乳酸菌ライブラリーに保存されている。

表 1 今回の検討に使用した乳酸菌

No.	分離源
1	漬物
2	漬物
3	果物
4	米麴
5	酒粕

### 2.3 大麦糠の酵素処理物の調製

5gの大麦糠に対して、表2に示した市販されている各種酵素を試料の0.3%分添加した。2倍量の水を添加し、攪拌した後に、55℃で3時間反応させた。本酵素反応液を100℃の沸騰水に20分間浸漬し、反応を停止した。さらに遠心分離(5,000rpm、10分間)を行って獲得した上清を測定試料とした。

表2 今回の検討に使用した市販酵素

酵素名	至適pH	起源
プロテアーゼ①	7.0	<i>Aspergillus sp.</i>
プロテアーゼ②	4.5	<i>Aspergillus sp.</i>
プロテアーゼ③	7.0	<i>Aspergillus sp.</i>
プロテアーゼ④	10.0	<i>Bacillus licheniformis</i>
プロテアーゼ⑤	7.0	<i>Aspergillus sp.</i>
グルコアミラーゼ	4.5	<i>Rhizopus sp.</i>
アミラーゼ	6.0	<i>Bacillus sp.</i>
ペクチナーゼ	4.0	<i>Aspergillus sp.</i>
セルラーゼ①	4.0	<i>Trichoderma sp.</i>
セルラーゼ②	4.0	<i>Aspergillus sp.</i>

### 2.4 総ポリフェノール量の測定

総ポリフェノール量の測定はフォリン・デニス法<sup>[5]</sup>により測定した。脱イオン水1.6mLを添加した試験管に、2.2及び2.3で得られた試験液100μLを加え、次いでフォリン・デニス試薬100μL、飽和炭酸ナトリウム溶液200μLを添加して30分間反応を行った。その後、760nmでの吸光度を測定し、乾燥重量100gあたりのクロロゲン酸相当量として算出した。

## 3. 結果

### 3.1 大麦糠の乳酸発酵物

大麦糠に含まれる機能性成分を増加させることを目的として、センターの乳酸菌ライブラリーの菌株を用いて発酵物を調製した。

まず、大麦糠発酵物のpHを表3に示す。比較対象の非発酵物はpHが6.0であったのに対して、どの乳酸発酵物についても低下が確認され、No.1、2、3による発酵物ではpHが3.7まで低下していた。さらに、発酵物の香りを研究担当で確認したところ、No.4による発酵物が最も強い発酵臭を有していた。この発酵物の香りは分離減の米麴に似たようなものであり、

香りが分離減に由来するものと予想された。その一方、大きなpH変化を見せたNo.1、2、3の発酵物は強い香りを示さなかったことから、pH変化と発酵臭との間に関連は認められなかった。

表3 大麦の乳酸発酵物のpH変化と香りの強さ

No.	pH	強さ (3段階評価)
比較対象 (非発酵物)	6.0	-
1	3.7	2
2	3.7	2
3	3.7	1
4	5.2	3
5	4.8	2

次に、発酵物中の総ポリフェノール量を表4に示す。比較対象のポリフェノール量は19mg/100mLであったのに対して、各乳酸菌株による発酵物中の含量はどれも高まっており、No.5は非発酵物のほぼ2倍まで増加していた。

表4 大麦乳酸発酵物の総ポリフェノール量

No.	総ポリフェノール量 (mg/100mL)
比較対象 (非発酵物)	19
1	27
2	24
3	31
4	26
5	36

さらに、発酵物中のγ-アミノ酪酸(GABA)量をWaters AccQ-Tag法を用いて測定した結果を表5に示した。非発酵物のGABA量は0.3mg/100mLであったのに対して、各乳酸菌株による発酵物中の含量は3倍以上増加していた。特に、No.5で最も高い含量(1.5mg/100mL)を有し、非発酵物の5倍まで達していた。上述の総ポリフェノール量の結果を合わせて考えると、No.5の菌株は大麦中の有用成分を効果的に増加させる可能性を示していた。

### 3.2 大麦糠の酵素処理物

次いで、大麦糠からのエキス抽出を目的として、酵

表5 大麦乳酸発酵物のγ-アミノ酪酸量

No.	γ-アミノ酪酸量 (mg/100mL)
比較対象 (非発酵物)	0.3
1	1.1
2	1.1
3	1.1
4	1.1
5	1.5

素処理技術の適用を検討した。酵素処理により得られた上清を大麦糠の抽出エキスと考え、エキスの生成率を算出(表6)した。

生成率は、以下の式により算出した。

$$\text{エキス生成率(\%)} = \frac{\text{エキス乾燥重量}}{\text{大麦糠重量}} \times 100$$

比較対象であるエタノール抽出液は15%の生成率を示したのに対して、酵素処理物はいずれも高い生成率を有していた。特に、プロテアーゼ①、④、グルコアミラーゼ、セルラーゼ①、②が23%以上の高い生成率を示した。

表6 各種酵素で得られる大麦糠からのエキス獲得

酵素名	エキス生成率(%)
比較対象 (60%エタノール抽出)	15
プロテアーゼ①	23
プロテアーゼ②	20
プロテアーゼ③	20
プロテアーゼ④	25
プロテアーゼ⑤	20
グルコアミラーゼ	23
アミラーゼ	20
ペクチナーゼ	20
セルラーゼ①	25
セルラーゼ②	23

さらに、酵素抽出エキスに含まれる総ポリフェノール量の測定を行った。その結果、コントロールである60%エタノール抽出液が960 mg/100gと最も高い数値を有していた。それに対して、酵素抽出によるエキスの含有量(270 mg/100g ~ 730 mg/100g)はエタノール抽出よりも低いものであった。

その中でも、プロテアーゼ⑤により得られたエキスが730 mg/100gと優れた値を示していた。

60%エタノール抽出液は、ポリフェノール成分が主に抽出されたものであることから、エキス生成率は低いのに対してポリフェノール含量は高い数値として得られたと考えられた。その一方で、酵素処理物についてはポリフェノール以外の他成分も同時に抽出されたことにより、エキスの生成率は高いにもかかわらず、ポリフェノール含量は低い数値にとどまったと考察された。

一般的に、ポリフェノールを抽出するためにエタノール、メタノール、アセトン、DMSOなどの有機溶媒が使用される。これら溶媒を含水の状態で用いるとポリフェノールを対象食品から効率的に抽出<sup>[6]</sup>することができる。しかしながら、食品などの製造現場において、有機溶媒を用いることはコスト面、防爆などの安全対策設備などで大きな負担を要する。本研究では、有機溶媒に代わる方法として酵素処理法を検討し、大麦糠からのエキス獲得を試みた。エキス生成率及びポリフェノール量を測定した結果、大麦糠からポリフェノールを抽出するには、市販酵素ではプロテアーゼ⑤が最適であると考えられた。

表7 各種酵素で得られる大麦糠からのエキスに含まれるポリフェノール量

酵素名	総ポリフェノール量 (mg/100g)
比較対象 (60%エタノール抽出)	960
プロテアーゼ①	380
プロテアーゼ②	330
プロテアーゼ③	390
プロテアーゼ④	400
プロテアーゼ⑤	730
グルコアミラーゼ	380
アミラーゼ	350
ペクチナーゼ	270
セルラーゼ①	460
セルラーゼ②	400

ここでは省略するが、選抜したプロテアーゼ⑤の反応条件(酵素濃度、反応時間など)を検討し、最適なものを決定した。さらに本条件を用いて、有限会社伊東精麦所と連携し、酵素分解エキスのスケールアッ

ブ製造試験を実施した。

本試験により得られたエキス粉末に含まれる機能性成分を測定した結果が以下の表 8 である。

表 8 プロテアーゼ⑤を用いて得られたエキス粉末に含まれる成分

	濃度 (mg/100g)
総ポリフェノール量	1,200
全フェルラ酸	30
フラバノール	140

反応条件を最適なものにより、エキス粉末中のポリフェノール量は、表 7 で示した 60 % エタノール抽出液の数値 (960 mg/100g) よりも上回っていた。また、抗酸化作用などを有するフェルラ酸、機能性成分であるカテキンやプロアントシアニジンを含むフラバノールも多く含んでいることも確認することができた。

以上の検討結果を活用し、伊東精麦所から商品名「大麦ポリフェノール」で製品化がなされた (図 1)。



図 1 大麦糠酵素分解エキス粉末の製品化

#### 4. 結 言

本研究では、まず大麦糠に含まれる機能性成分を増加させることを目的として、センターの乳酸菌ライブラリーの菌株を用いて発酵物を調製した。比較対象の非発酵物は pH が 6.0 であったのに対して、どの乳酸

発酵物についても低下が確認され、pH が 4.0 以下まで低下したのも見受けられた。さらに、発酵物の香りを確認したが、pH 変化と発酵臭との間に関連は認められなかった。

次に、発酵物中の総ポリフェノール量を測定した。非発酵物のポリフェノール量は 19 mg/100mL であったのに対して、各乳酸菌株による発酵物中の含量はどれも高まっており、特に No.5 の発酵物は非発酵物のほぼ 2 倍まで増加していた。

さらに、発酵物中の GABA 量を測定した。非発酵物の GABA 量は 0.3 mg/100mL であったのに対して、各乳酸菌株による発酵物中の含量は 3 倍以上に増加していた。特に、No.5 で最も高い含量 (1.5 mg/100mL) を有し、非発酵物の 5 倍まで達していた。本検討により、No.5 の菌株は大麦中の有用成分を効果的に増加させることを示唆していた。今後、機能性成分をより効果的に増加させる発酵条件を検討する予定である。

次いで、大麦糠からのエキス抽出を目的として、酵素処理技術の適用を検討した。酵素処理物は、比較対照であるエタノール抽出液より高い生成率を示した。中でもプロテアーゼ系、セルラーゼ系の分解酵素が 23% 以上の高い生成率を示した。さらに、酵素抽出エキスに含まれる総ポリフェノール量の測定を行ったところ、酵素処理エキスの含有量 (270 mg/100g ~ 730 mg/100g) は比較対照のエタノール抽出 (960 mg/100g) よりも低いものであった。その中でも、プロテアーゼ⑤により得られたエキスが 730 mg/100mL と優れた値を示していた。

次に、プロテアーゼ⑤の反応条件 (酵素濃度、反応時間など) を検討し、最適なものを決定した。この条件を用いて、有限会社伊東精麦所と共同で、酵素分解エキスの製造試験を実施した。反応条件を最適なものにより、エキス粉末中のポリフェノール量は 1,200 mg/100g となり、選抜試験での数値 (730 mg/100g) よりも大幅に改善し、さらにエタノール抽出液の数値 (960 mg/100g) より高い数値となった。また、抗酸化作用などを有するフェルラ酸、カテキン、プロアントシアニジンなどの成分も多く含んでいることも確認した。以上の検討結果を活用し、伊東精麦所から商品名「大麦ポリフェノール」で製品化がなされた。

#### 参考文献

[1] 河村俊哉、晦日房和、玉屋 圭、松本周三:長崎

県工業技術センター報告、41、1-5 (2011).

- [2] 玉屋 圭：長崎県工業技術センター報告、43、50-52 (2013).
- [3] 小笠原耕太郎、玉屋 圭：長崎県工業技術センター報告、46、16-22 (2016).
- [4] 玉屋 圭、河村俊哉、伊東清一郎：長崎県工業技術センター報告、48、41-45 (2018).
- [5] 津志田藤二郎：食品機能研究法、318-322、光琳 (2002).
- [6] 鈴木 誠、渡辺敏郎、三浦麻子、原島恵子、中川靖枝、辻啓介：日本食品科学工学会、49、507-511 (2002).