平成２８年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「複合乳酸菌発酵法を利用した大豆を原料とする抗ストレス食品素材の開発」

研究開発成果等報告書

平成２９年　３月

担当局　関東経済産業局
補助事業者　公益財団法人　埼玉県産業振興公社

目　次

第１章　研究開発の概要

１－１　研究開発の背景・研究目的及び目標

１－１－１　研究開発の背景

１－１－２　研究目的及び目標

１－２　研究体制

１－３　成果概要

１－４　当該研究開発の連絡窓口

第２章　本論

２－１　蛍光標識した基質を用いた乳酸菌ステリルグルコシド合成酵素の簡便な活性測定法の確立と乳酸菌の選択

２－１－１　ステリルグルコシド産生能のある乳酸菌の選択

２－１－２　複合乳酸菌発酵グループの形成

２－２　高効率生産の発酵方法・発酵環境の実現

２－２－１　乳酸菌発酵装置の開発

２－２－２　発酵条件の選定

２－２－３　プラントスケールでの検討

２－２－４　規格決定

２－３　ステリルグルコシドの効果効能の実証

２－３－１　発酵試作品中のステリルグルコシドの構造解析

２－３－２　ステリルグルコシドの定量

２－３－３　生体試験

２－３－４　安全性試験

２－３－５　ヒトボランティア試験

第３章（最終章）　全体総括

３－１　研究開発成果

３－２　研究開発後の課題・事業化展開

第１章　研究開発の概要

１－１　研究開発の背景・研究目的及び目標

１－１－１　研究開発の背景

株式会社光英科学研究所は創業昭和 44 年より植物系素材に対して発酵性の優れた乳酸菌混合スターターを用いて、大豆を原料として発酵させた「乳酸菌生産物質」の製造と商品化を行ってきた。さらに、乳酸菌発酵による有用成分の生産について研究開発を進めるために、多種の乳酸菌株を独自で保有している。その複合乳酸菌を用いて発酵させた大豆成分について分析を行ったところ、糖脂質の一種である「ステリルグルコシド（SG）」類（図 1）が含まれていることが確認された。

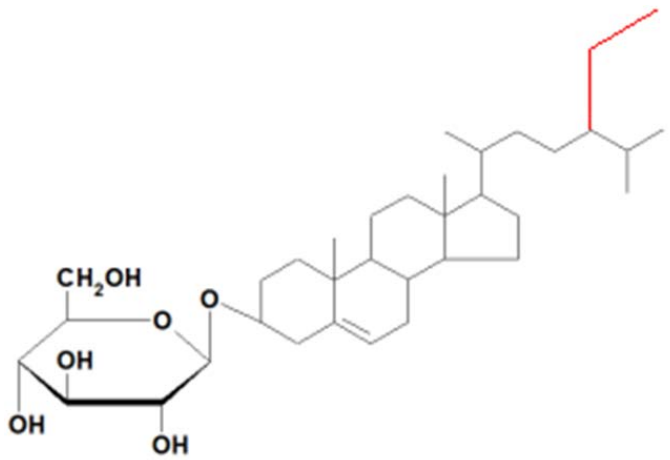


図 1：ステリルグルコシド（SG）の構造
赤いラインを含める場合はシトステリルグルコシドを示し、
赤いラインを除いた場合コレステリルグルコシドを示す。

SG は、国立大学法人お茶の水女子大学　室伏きみ子名誉教授により抗ストレス機能を持つことが見出だされた物質で、これまでに以下の作用があることが明らかにされてきた。

① 細胞が熱ストレスを受けると、速やかに SG が生成され、ストレス応答反応の初期情報分子として働いて、細胞をストレスによる損傷から修復する役割を担う熱ショックタンパク質（HSP）の合成を誘導する（図 2）。

② 寒冷拘束ストレスによってラット胃壁での SG 産生量が増加する。

③ SG 投与はラットの寒冷拘束ストレス誘導性胃潰瘍を顕著に抑制する（図 3）。

室伏きみ子名誉教授はこれら SG について深い知見や特許「熱ショック蛋白質誘導剤」（P4322329）を有している。お茶の水女子大学と当社が共同で、SG を含有する抗ストレス効果を持つ健康食品に関して研究・開発することは極めて有益であると考えられた。

そこで本事業では、当社の発酵技術とお茶の水女子大学の研究を結集し、複合乳酸菌発酵大豆に含まれる抗ストレス機能性成分について SG 類の分子種を特定すると共に、成分を効率よく発酵生産する技術を開発し、広く普及できる食品素材とすることを目的とした。

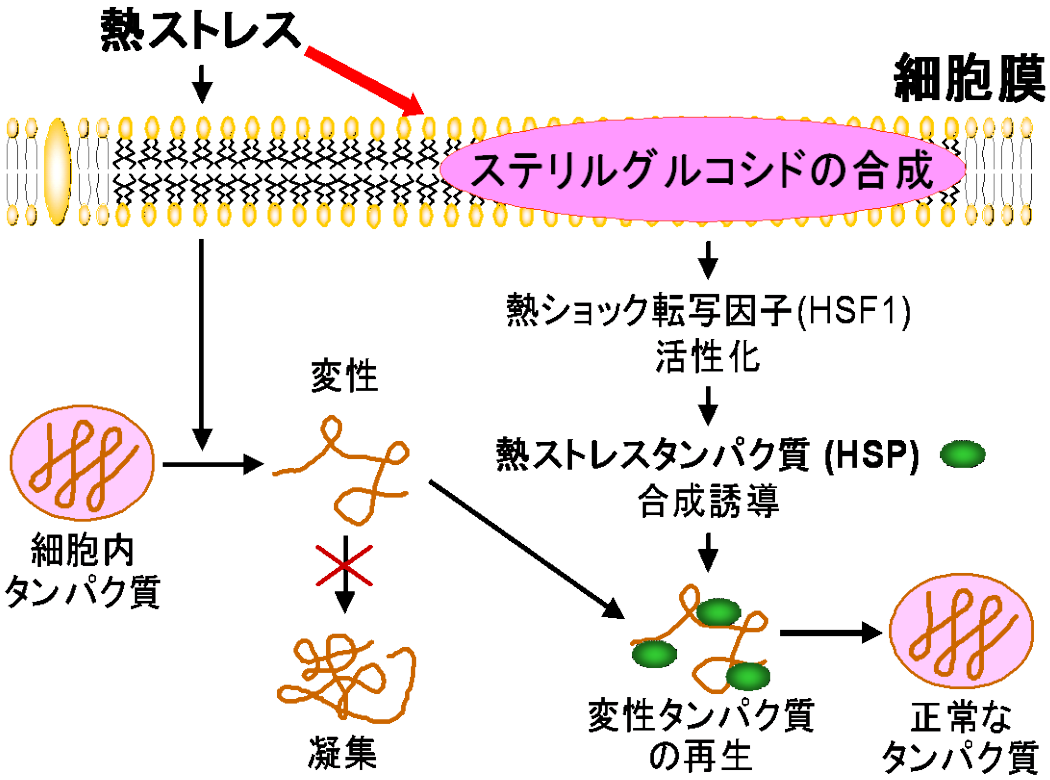


図 2: SG を介した細胞の熱ストレス応答機構（仮説）

図 3: SG 投与による胃潰瘍形成抑制作用

青い矢印が潰瘍部分を示す。

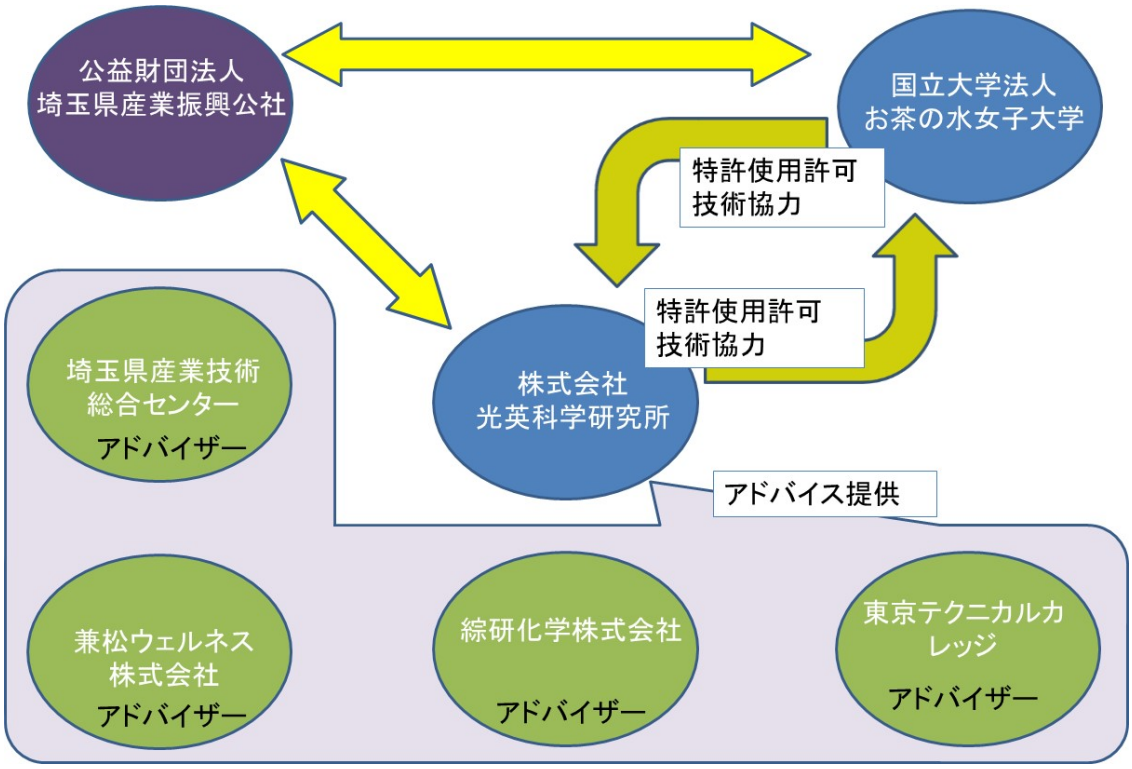
１－１－２　研究目的及び目標

抗ストレス機能を持ち、抗ストレス食品素材として期待されるSGは、現在では主に、有機溶媒を利用した化学合成による生産法が採用されている。このため、まだ食品素材としての普及に至っていない。本事業では、大豆等の植物成分を乳酸菌発酵させることによって化学合成を使用しない新たな生産法を確立し、SGを食品素材として大量生産することを目標とした。

１－２　研究体制

（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者）

所属	氏名	役職	備考
公益財団法人 埼玉県産業振興公社	小笠原均郎	先端産業コーディネーター	
	大松洋一	主任	
株式会社 光英科学研究所	小野寺洋子	専務取締役	PL
	錦織浩治	特別顧問	
	中西弘一	研究顧問	
	松田正一	技術顧問	
	東　正博	顧問	
	天野貴市	顧問	
	曽我信之	顧問	
	玉根強志	製造開発部　係長	
	片岡良太郎	製造開発部　主任	
	関　沙織	製造開発部　主任	
国立大学法人 お茶の水女子大学	室伏きみ子	学長	SL
	後藤真里	ヒューマンウェルフェアサイエンス研究教育寄附研究部門准教授	
	中島進吾	ヒューマンウェルフェアサイエンス研究教育寄附研究部門講師	
	深澤桂子	ヒューマンウェルフェアサイエンス研究教育寄附研究部門 リサーチフェロー	
兼松ウェルネス 株式会社	工藤　誠	代表取締役社長	アドバイザー
綜研化学株式会社	橋爪　隆	研究開発センタープロセス開発室 室長	アドバイザー
学校法人小山学園 専門学校東京テクニカルカレッジ	大江宏明	バイオテクノロジー科長	アドバイザー
埼玉県産業技術 総合センター北部研究所	富永達矢	食品・バイオ技術担当	アドバイザー



＜アドバイザーの支援＞

●埼玉県産業技術総合センター

SG 産生能のある乳酸菌の選択

●兼松ウェルネス株式会社

抗ストレス素材のマーケティング

●綜研化学株式会社

乳酸菌生産物質の量産プラント技術支援

●東京テクニカルカレッジ

ヒトボランティア（専門学校生）による抗ストレス試験系の確立

１－３　成果概要

今回の開発により、発酵物に含まれるSGの量を発酵前の３倍以上（1 mg/g スプレードライサンプル）に増加させることに成功し、抗ストレス食品素材として実用化への道筋が立てられた。表１に従来法と比較した本研究開発の成果を示す。

表１：従来法と比較した本研究開発の成果

区分	従来法		本法（開発成果）
方法	化学合成法	酵母抽出	複合乳酸菌発酵法
食経験	× 食経験なし 有機溶媒の使用が不可欠	◎ 酵母は食経験がある	◎ 原料の大豆、酵母及び乳酸菌は食経験は豊か
作業面の安全性	× 高温・高圧 有機溶媒の使用が不可欠	◎ 常温で反応	◎ 常温で反応 有機溶媒が不要
生産性 ・コスト ・環境	× ・製造プロセスが複雑 ・抽出工程で排出される廃液の処理コストが高い。	× ・製造プロセスが複雑 ・培養時間が長い ・抽出工程で排出される廃液の処理コストが高い。	◎ ・製造プロセスがシンプル ・乳酸菌と酵母の二段階発酵の採用で生産効率性を高めることができた。 ・発酵液をそのままスプレードライで乾燥粉末化できる技術を確立した。
結果			実用化への道筋

１－４　当該研究開発の連絡窓口

公益財団法人　埼玉県産業振興公社

先端産業振興グループ　大松　洋一

TEL　048-711-6870

omatsu.youichi@saitama-j.or.jp

第２章　本論

２－１　蛍光標識した基質を用いた乳酸菌ステリルグルコシド合成酵素の簡便な活性測定法の確立と乳酸菌の選択

２－１－１　ステリルグルコシド産生能のある乳酸菌の選択

[乳酸菌について]

混合スターターによる豆乳培地を用いた培養で、培養前の豆乳培地と比べ 1.3 ～1.4 倍に SG 含有量が増加した。さらに効率の良い SG 生産を行うため、保有する混合スター22 サンプルから乳酸菌を単離し、SG 産生能の高い乳酸菌を選定した。当初は 16 種 35 株を予定していたが、その後の精査によって性状や形状の違いにより 74 株を単離した（表 2)。

表 2: 保有混合スターターより単離された乳酸菌株数

乳酸菌スターターNr	単離菌株数	乳酸菌スターターNr	単離菌株数
1	3	14	3
2	3	15	4
3	6	17	3
4	3	18	6
5	4	19	5
6	5	21	3
7	3	22	1
8	3	23	1
10	1	24	1
12	5	30	4
13	3	33	4
		計22本	計74株

[SG 合成活性測定法について]

蛍光標識基質を用いた酵素活性測定法（図 4）と　② 薄層クロマトグラフィー（Thin Layer Chromatography; TLC）法を用いて、豆乳培地中で乳酸菌が合成する SG 量を測定することで、SG 合成能の高い乳酸菌の選定を行った。測定方法を次頁に記す。

① 蛍光標識基質を用いた酵素活性測定法

反応液 100 μL 中： 乳酸菌懸濁液 80 μL

8 μM 25-NBD-コレステロール （図 4）±360 μM UDP-グルコース

0.5 % CHAPS, 1 % エタノール

↓

37℃、72 時間インキュベート

↓

脂質抽出・・・Folch 法［クロロホルム/メタノール/水（8：4：3)］

↓

脂質成分分析・・・ TLC

［クロロホルム/メタノール（85:15）で展開］

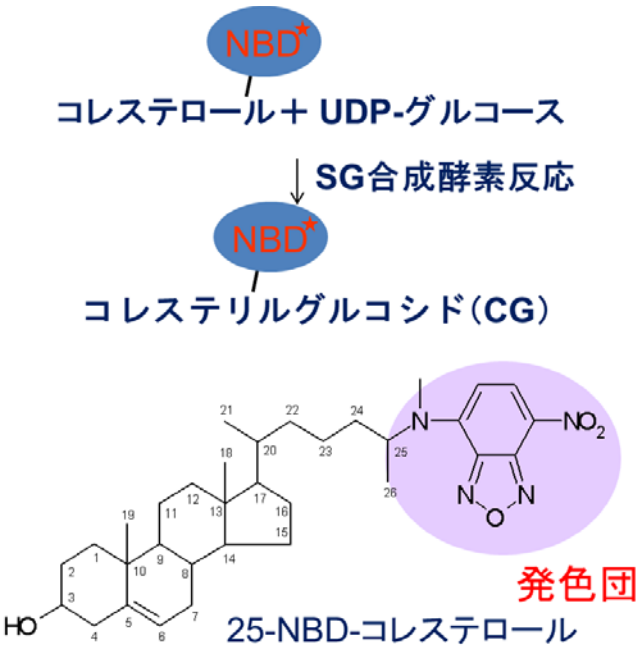


図４: 蛍光標識基質を用いた酵素活性測定法

② TLC による豆乳培地中で乳酸菌が合成する SG 量の測定

凍結乾燥処理 乳酸菌発酵液　0.3ｇ

↓

脂質抽出・・・Folch 法［クロロホルム/メタノール/水（8：4：3)］　40ml

↓

下層 3ml を濃縮

↓

脂質成分分析・・・　TLC

［クロロホルム/メタノール（85:15）で展開］

↓

酢酸銅発色による定量（発酵前との比較）

［結果］

表 3: 各乳酸菌株による SG 生産量と SG 合成活性

		豆乳培地でのSG生産量（発酵後/発酵前　比）TLC測定	SG合成酵素活性測定
1	a	1.03	ND
	b		ND
	c		ND
2	a	1.11	ND
	b		ND
	c		ND
3	a	0.97	ND
	b	1.00	ND
	c	1.04	ND
	d	1.02	ND
	e		ND
	f		ND
4	a	1.07	ND
	b		ND
	c		ND
5	a	0.99	ND
	b	0.81	ND
	c		ND
	d		ND
6	a	0.95	ND
	b		ND
	c		ND
	d	1.06	ND
	e	1.12	ND

		豆乳培地でのSG生産量（発酵後/発酵前　比）TLC測定	SG合成酵素活性測定
7	a	1.19	ND
	b		ND
	c		ND
8	a	1.02	ND
	b	0.99	ND
	c	0.99	ND
10	a	0.79	ND
12	a		ND
	b		ND
	c	0.83	±
	d		±
	e		ND
	MIX	0.95	
13	a	1.14	ND
	b	1.08	ND
	c		±
14	a		±
	b	1.10	±
	c		ND
15	a		ND
	b		ND
	c		ND
	d		ND
17	a	0.98	ND
	b		ND
	c		ND

		豆乳培地でのSG生産量（発酵後/発酵前　比）TLC測定	SG合成酵素活性測定
18	a	1.04	ND
	b	1.17	ND
	c	1.04	ND
	d		ND
	e	0.97	ND
	f	1.17	ND
19	a		ND
	b	1.21	ND
	c		ND
	d		ND
	e	1.19	ND
21	a		ND
	b		ND
	c		ND
22	a	1.19	ND
23	a		ND
24	a		
30	a	1.22	ND
	b		ND
	c	1.23	ND
	d		ND
33	a		ND
	b	1.16	ND
	c		ND
	d		ND

計 74 株

ND : Not detected

± : コレステロール基質に対する酵素活性は検出されたが
ステリルグルコシドが合成されたかどうかは未確認

結果として、表３に示すように混合スターター培養液が示した豆乳培地の 1.3～1.4 倍の濃度以上の SG を生産する乳酸菌株を見出す事が出来なかった。そこで、これまでに酵母と複合で培養することで、乳酸菌がよりよく増殖することが経験的に分かっていたため（培養状態を嫌気性に保つためと考えている）、乳酸菌と酵母を組合せて培養することに決定した。

２－１－２　複合乳酸菌発酵グループの形成

酵母と複合で培養するほうが、培養状態を嫌気性に保つために、乳酸菌がよりよく増殖すると推測しているが、酵母の中には SG の分解酵素を有する株が多いことが知られているため、より高収率な SG 生産を目指すために、SG 分解活性が低い酵母の選定を行った。

文献などを参考に SG 分解活性が低いと考えられる酵母株数種について SG 分解活性の検討を行った。その結果、*Kluyveromyces* 属の酵母を混合する候補株が低い SG 分解活性を示すことが分かったので、乳酸菌との複合培養に利用する株として選定した。

最終的に、増殖がよく、他と比較して SG 生産能が高い乳酸菌株・*Lcatobacillus rhamnosus*　株を選定し、上記の酵母選定株とともに、複合乳酸菌発酵グループを形成した。

これにより試験管レベルでは発酵前の培地と比較して３倍以上の SG 生産が達成された（図５）。

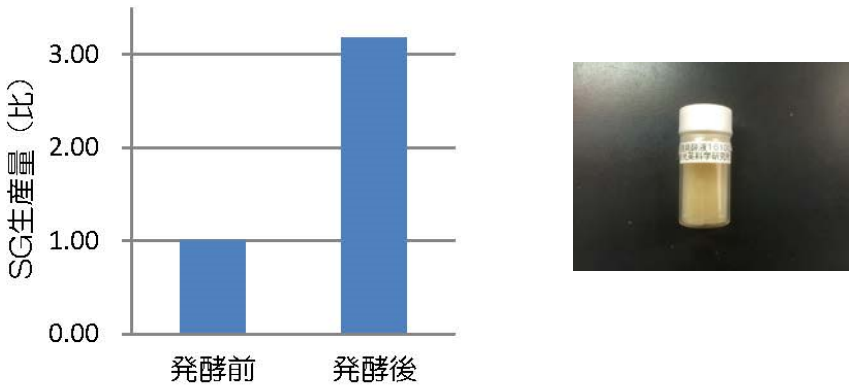


図５: 複合乳酸菌発酵による SG 含有量の増加率と発酵液

２－２　高効率生産の発酵方法・発酵環境の実現

２－２－１　乳酸菌発酵装置の開発

SG 生産のための乳酸菌発酵を促すために、均一撹拌が可能な撹拌子の選定（綜研テクニックス・Ｈｉ－Ｆミキサー）を行って 100Ｌ発酵装置に導入し、発酵システムを開発した（図６）。

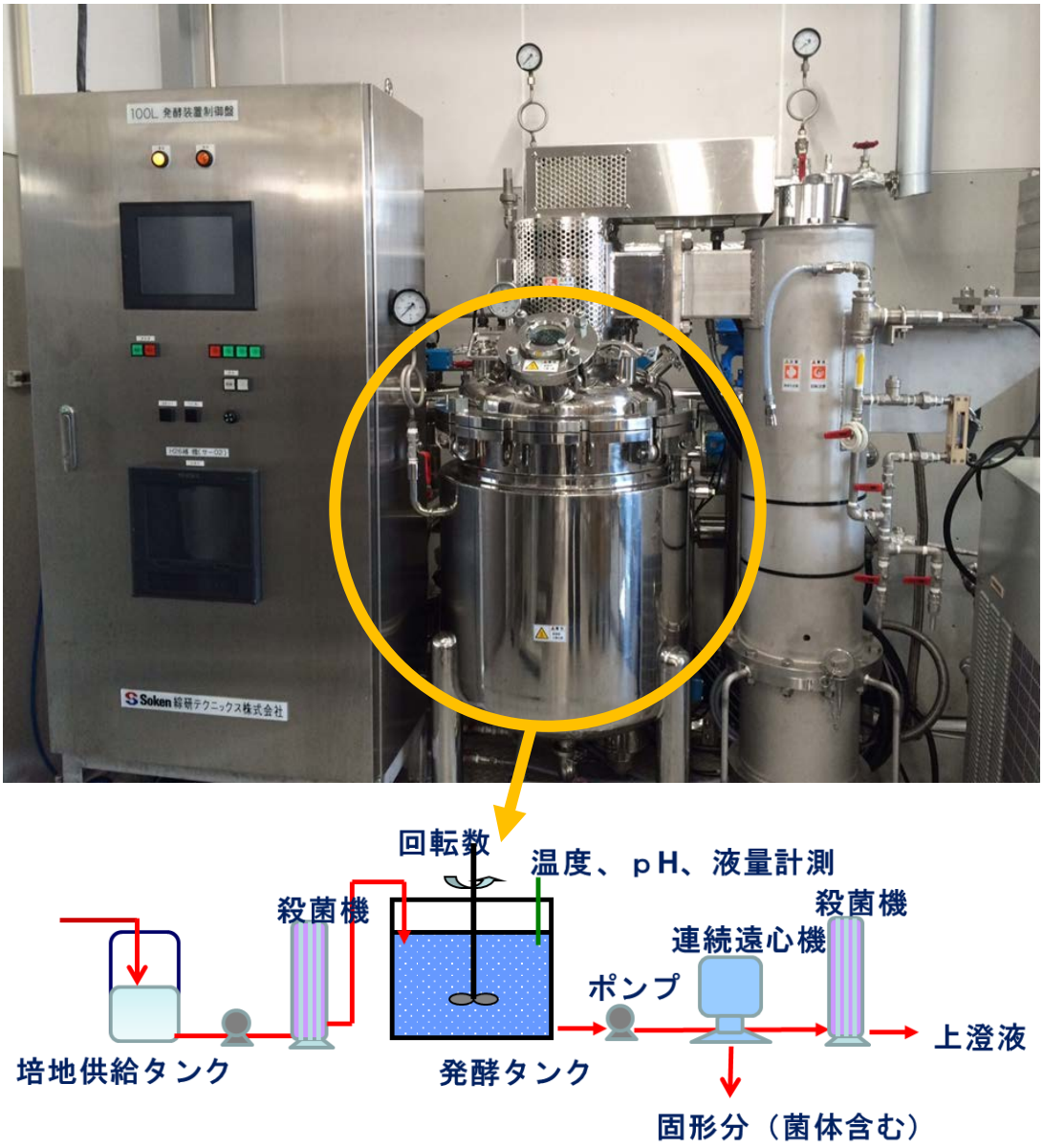


図６：１００Ｌ発酵装置

ただし、このシステムでは培地供給タンクに充分な容量がないため、SG の原料となる豆乳成分が不均一になるという課題が残った。また培地粘度が高いため、殺菌機を通る間に成分が不均一になる可能性もあることから、培地供給タンクの容量を大きくして、培地成分を均一化しながら滅菌ができるように、培地供給タンクに殺菌機能をもたせた「培地滅菌ユニット」を導入してシステムの改良を行った（図 7）。

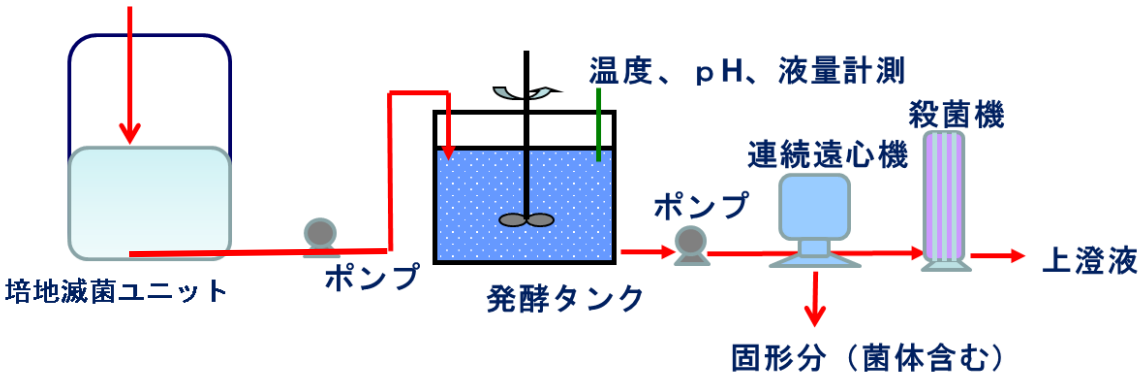


図 7：培地滅菌ユニットの導入

この改良によりシステムがシンプル化され、培地殺菌機（UHT 殺菌機）の設置が不要となり、未滅菌状態の培地がラインに滞留することがなくなるため、微生物汚染のリスクの低減も期待できるようになった。

２－２－２　発酵条件の選定

小スケールバイオファーメンタを用いて（図 8）、培地成分・発酵温度・時間など多様な条件下で発酵試験を実施し、初期検討時に比べ約２倍の量産効率を達成した。

図８：小スケールバイオファーメンタ

２－２－３　プラントスケールでの検討

小スケール発酵の再現性を確認し、二段階発酵で SG を生産する培養方法を確立して特許出願を行った。それに並行して発泡性の高い培地で培養できる通気攪拌方式および発酵液をそのままスプレードライ加工する方法も確立した（図９、１０）。

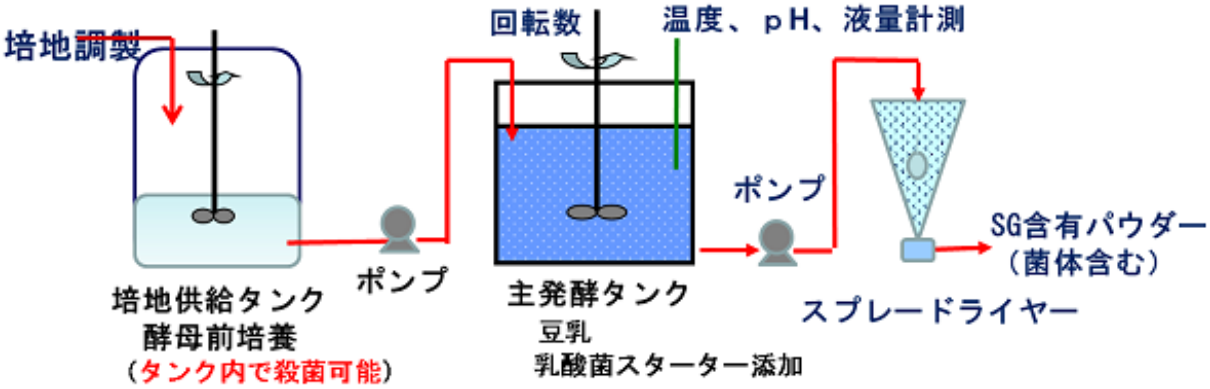


図９：二段階発酵による SG 生産とスプレードライ加工

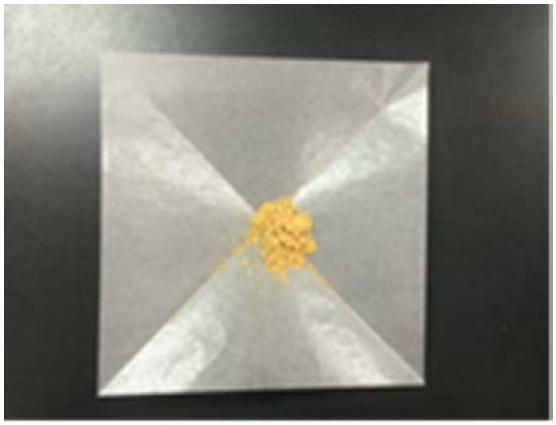


図１０：SG 含有乳酸菌発酵物粉末

（スプレードライ加工後）

２－２－４　規格決定

TLC を用いた迅速な SG 定量法を確立し、生産工程管理における規格値（全菌数・酸度・pH 値）と粉体加工後の SG 含有量の規格値を決定した。

２－３　ステリルグルコシドの効果効能の実証

２－３－１　発酵試作品中のステリルグルコシドの構造解析

以下のチャートに示す液体クロマトグラフィータンデム型質量分析法（Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry; LC/MS/MS）による解析の結果から、乳酸菌による豆乳培地を用いた乳酸菌発酵産物には『シトステリルグルコシド』が含まれていることが明らかになった。

乳酸菌発酵後の豆乳培地

↓

凍結乾燥処理サンプル　0.3ｇ

↓

脂質抽出・・・Folch 法［クロロホルム/メタノール/水（８：４：３）］　40ml

↓

LC/MS/MS による SG 類の測定

２－３－２　ステリルグルコシド定量法の確立

豆乳培地を用いた乳酸菌による発酵産物中の SG の定量方法として、TLC および、LC/MS/MS を用いた定量法を確立した。図１１に測定系における検量線の直線性を示す。

乳酸菌発酵後の豆乳培地

↓

凍結乾燥処理サンプル　0.3ｇ

↓

脂質抽出・・・Folch 法［クロロホルム/メタノール/水（８：４：３）］　40ml

↓

濃縮

↓

TLC または

LC/MS/MS による SG 類の定量

図１１：TLC による SG の定量と検量線の作成

２－３－３　生体試験

ストレス性胃潰瘍の発症に及ぼす SG の効果を調べた。

① スンクスの胃を用いた Organ bath 試験

雌性スンクスの全胃及び前庭部を用いて Organ bath（38℃、95% O_2、5% CO_2）実験を行い、SG（10^{-5} M）を投与して全胃と前庭部の収縮運動を記録した。

結果、本実験条件下では SG は胃の収縮運動には影響を与えないことが示された。

② マウスを用いた SG の脳への影響について

SG による脳内の活性を調べるため、雌性マウス（*Mus musculus*）　を用いて SG 腹腔内投与による脳内 c-fos 発現の検討を行った。

結果、外側手綱核（LHb），視床下部背内側核（DM）の二か所の神経核において c-fos 発現が上昇することが確認できた（図１２）。

以上の結果により、末梢での SG 投与が中枢神経系の特定の領域を活性化することが示唆された。

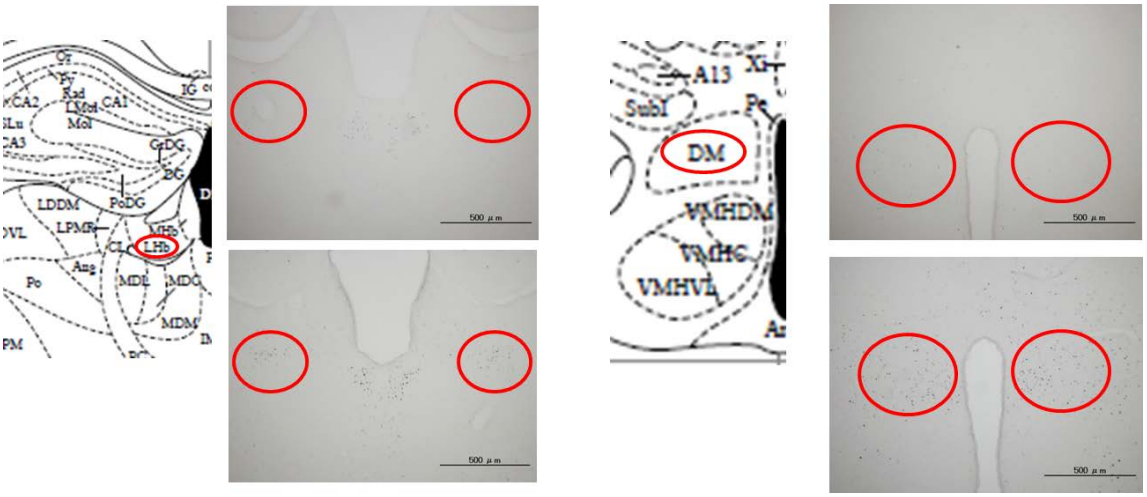


図１２: SG 投与によるマウス脳内 c-fos 発現の変化

２－３－４　安全性試験

ラットを用いた 90 日間反復投与毒性試験を実施、食品としての安全性を確認した。

実施機関：薬物安全性試験センター

東京都新宿区高田馬場１－３１－８

２－３－５　ヒトボランティア試験

ヒトボランティア試験の試験系確立を目的に、クレペリン検査によるストレス負荷試験を実施し（n = 18）、ストレス負荷によってヒトの唾液アミラーゼ量が実際に増加する傾向を確認した。この結果を基に今後ヒトボランティア試験を実施する予定である。

第３章（最終章）　全体総括

３－１　研究開発成果

今回の開発により、発酵物に含まれるSG含有量を発酵前の３倍以上（1mg/g）に増加させることに成功した。なお、開発した二段階発酵システムについては特許出願を行った。そして発酵装置にスプレードライヤーを導入し、安価にSG含有乳酸菌発酵物の粉末サンプルを製造できるシステムを確立した。

従来のSGは化学合成や酵母抽出で生産され、製造方法が複雑でコストも高く、食品として一般に普及するのは難しいものであった。しかし今回、複合乳酸菌発酵法を用いた発酵により、従来のSG生産法と比べ生産プロセスがシンプルで安全性が高く、低コストで生産可能な優れた生産方法の開発に成功した。

これにより、抗ストレス食品素材としてのSGの普及に道筋ができた。

３－２　研究開発後の課題・事業化展開

今後は、SG含有乳酸菌発酵物粉末を用いて本格的なボランティア試験を実施し、抗ストレス素材として具体的な商品化へ移行する予定である。

なお現状では健康美容市場において「抗ストレス」という明確な分野は確立されておらず、近い分野は「リラックス」となるが、市場全体で占める割合は少ない。SG含有抗ストレス食品は未だ上市されていない新規製品であり、認知度アップと商品の普及をどのように図っていくかが課題である。

事業化展開としては、既に消費者と接点を持つ企業を販売活動の主体としながら、全国調剤薬局を軸に消費者との対面の場を多く設けて、初期拡販活動を実施する。そこで必要となる科学的データに基づく販促ツールや新製品の作成・開発協力を行うほか、乳酸菌発酵によるSGの効果効能を普及するための啓発活動を行っていく。この活動を通し、企業が機能性食品素材として拡販し易い市場を形成したいと考えている。