

平成 2 1 年度 戦略的基盤技術高度化支援事業

「新規二段階乳酸菌発酵・精製法の開発」

研究開発成果等報告書

平成 2 2 年 7 月

委託者：九州経済産業局

委託先：(財)福岡県産業・科学技術振興財団

目 次

第1章 研究開発の概要	1
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1-1-1 研究開発の背景	1
1-1-2 研究目的及び目標	2
1-2 研究体制	3
1-3 成果概要	8
1-3-1 研究項目「①新規二段階乳酸菌発酵・精製法(新規製法)の確立」	8
1-3-2 研究項目「②ナイシンA抽出液に関する検討」	8
1-3-3 研究項目「③機能性発酵調味液の開発」	8
1-3-4 研究項目「④高生産株および新規抗菌ペプチド生産株のスクリーニング」	8
1-4 当該プロジェクト連絡窓口	8
第2章 新規二段階乳酸菌発酵・精製法(新規製法)の確立	9
2-1 一次発酵の検討	9
2-1-1 焼酎粕由来培地の開発	9
2-1-1-1 開発目標	9
2-1-1-2 研究成果	9
2-1-1-3 今後の課題	13
2-1-2 焼酎粕由来培地による有用物質(ナイシンA)の分離精製の検討	13
2-1-2-1 開発目標	14
2-1-2-2 研究成果	14
2-1-2-3 今後の課題	16
2-2 二次発酵の検討	17
2-2-1 分離発酵液(一次発酵)の成分分析	17
2-2-1-1 開発目標	17
2-2-1-2 研究成果	17
2-2-1-3 今後の課題	17
2-2-2 分離発酵液(一次発酵)の再発酵(二次発酵)の検討	18
2-2-2-1 開発目標	18
2-2-2-2 研究成果	18
2-2-2-3 今後の課題	19
2-2-3 二次発酵における有用物質(ナイシンA)の分離精製の検討	20
2-2-3-1 開発目標	20
2-2-3-2 研究成果	20
2-2-3-3 今後の課題	20
第3章 ナイシンA抽出液に関する検討	21
3-1 ナイシンA抽出液の性能評価	21
3-1-1 精製度評価	21
3-1-1-1 開発目標	21

3-1-1-2	研究成果	21
3-1-1-3	今後の課題	22
3-1-2	保存安定性試験	23
3-1-2-1	開発目標	23
3-1-2-2	研究成果	23
3-1-2-3	今後の課題	24
3-1-3	抗菌活性試験	24
3-1-3-1	開発目標	24
3-1-3-2	研究成果	25
3-1-3-3	今後の課題	25
3-1-4	溶解性（沈殿物）に関する検討	26
3-1-4-1	開発目標	26
3-1-4-2	研究成果	26
3-1-4-3	今後の課題	26
3-2	ナイシンA抽出液の安全性評価	27
3-2-1	ラットにおける単回経口投与毒性試験	27
3-2-1-1	開発目標	27
3-2-1-2	研究成果	27
3-2-1-3	今後の課題	29
3-2-2	ウサギにおける皮膚一次刺激試験	30
3-2-2-1	開発目標	30
3-2-2-2	研究成果	30
3-2-2-3	今後の課題	31
第4章	機能性発酵調味液の開発	32
4-1	分離発酵液の成分分析	32
4-1-1	開発目標	32
4-1-2	研究成果	32
4-1-3	今後の課題	33
4-2	分離発酵液の機能性評価	33
4-2-1	開発目標	34
4-2-2	研究成果	34
4-2-3	今後の課題	37
4-3	分離発酵液の製剤化・濃縮等による機能性の向上	38
4-3-1	開発目標	38
4-3-2	研究成果	38
4-3-3	今後の課題	41
4-4	保存安定性試験	42
4-4-1	開発目標	42
4-4-2	研究成果	42
4-4-3	今後の課題	43
第5章	高生産株および新規抗菌ペプチド生産株のスクリーニング	44
5-1	保有ナイシン生産株の選定	44

5-1-1	開発目標	44
5-1-2	研究成果	44
5-1-3	今後の課題	47
5-2	ナイシン高生産株のスクリーニング	47
5-2-1	開発目標	47
5-2-2	研究成果	47
5-2-3	今後の課題	48
5-3	新規抗菌ペプチド生産株のスクリーニング	49
5-3-1	開発目標	49
5-3-2	研究成果	49
5-3-3	今後の課題	52
第6章	全体総括	53
6-1	全体総括	53
6-2	今後の予定	54
6-3	目標に対する成果	54

第1章

研究開発の概要

第 1 章 研究開発の概要

オーム乳業株式会社 専務取締役 農 新介
熊本製粉株式会社生産開発担取締役 大熊 浩

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

近年の焼酎市場の拡大に伴い、焼酎製造時の蒸留工程後に副産物として排出される“焼酎蒸留粕（焼酎粕）”の量も急激に増大した。通常、本格焼酎を製造する場合、原料 1 t 当り 1.5 ～ 2.5 t の焼酎粕が発生し、2008 年度の九州全体の年間焼酎粕発生量は約 90 万 t に達している。

焼酎粕は水分が 90 % 前後を占め、BOD 値で数万 ppm と高濃度の有機物を含むため、その処理は極めて困難であるとされてきた。従来から行われてきた海洋投入による処分については、ロンドン条約（廃棄物その他の物の投棄による海洋汚染の防止に関する条約）に代表される国際的な地球環境保全の高まりを受けて日本でもやがて全面禁止になると予想される。さらに、焼酎粕を産業廃棄物として処分する場合（1 万円 / t の処分費）、九州全体で年間約 90 億円の経費が発生し、焼酎粕処理を取り巻く環境は一層厳しさを増している。しかし、焼酎粕には微生物の生育に必要な有機物（栄養源）が豊富に含まれており、微生物用の生育培地として大いに期待される。

一方、乳酸菌が生産する抗菌ペプチド（ナisin）は、世界 50 ヶ国以上で食品保存料として利用されている安全性の高いペプチドで、国内でも 2009 年の 3 月 2 日に「ナisin A」が食品添加物として認可されている。この乳酸菌抗菌ペプチドは産業界に過大な被害を及ぼす有害微生物に有効で、かつ抗生物質とは異なり耐性菌を誘導しにくい特徴を合わせ持つことにより、天然の抗菌物質として注目されている。しかし、既存のナisin 製剤は国産のものではなく、海外輸入製品であり、しかも国内では認められていない「ナisin Z」がほとんどいう現状である。

既存のナisin 製剤の課題としては、価格および製法（技術）があげられる。価格については、既存海外ナisin 製剤の相場価格が、約 20,000 円 / kg と高く、広く普及させるための障害となっている。また、製法（ナisin 発酵・分離技術）については、ナisin を発酵生産した後、大量の食塩添加による塩析手法を用いているが、目的物質であるナisin 以外の他物質も同時に沈殿してしまい、目的の物質を分離する技術としては、精製度が低く、塩分が多いため応用範囲は非常に狭い。そのため、安全な抗菌物質であるナisin の応用が食品分野のみに限定されてしまっている。それに加えて、ナisin 分離工程で発生する廃棄物の問題があり、このような課題を解決することが社会的に強く望まれている。

このような背景の中、我々は課題解決のためのプロジェクトを構成することとなった。乳酸菌抗菌ペプチドに関して永年に渡り研究を行い、新規抗菌ペプチドの迅速的な検出技術や抗菌ペプチド生産菌ライブラリーを多く有している九州大学（園元教授ら）の「微生物資源」と有機物（栄養源）リッチな食品廃棄物（焼酎粕）の「培地資源」を利用し、有用物質の発酵生産を目的とした。予備的試験の結果、製法（発酵・分離技術）および廃棄物発生の課題に関

しては、一回分の仕込み原料（培地）で連続二回の発酵・精製を行う「新規二段階乳酸菌発酵・精製法」を確立することにより解決する可能性が大いにあることが確認された。すなわち、新規発酵製法は連続二回の有用物質（ナイシンA、機能性ペプチド等）の生産による低コスト化と残りの発酵液（分離発酵液）の有効活用による廃棄物ゼロを両立することが可能となる。また、分離精度の課題は、新たに樹脂を使用した分離技術を採用することにより、従来より精製度を高めることが示唆された。培地組成の変化に応じ、樹脂の種類や洗浄・溶出条件などの条件検討が必要となるが、条件の最適化を実現することにより、ナイシンの高精製度分離と食塩フリーを同時に行い、医療やサニタリー分野まで応用範囲を広げられる可能性が大いに期待される。

また、新規分離技術で発生する分離発酵液中には様々な有用物質（GABA等遊離アミノ酸）の存在が確認されており、1回目の発酵より、2回目の発酵の方が、有用物質が濃縮されることにより、機能性発酵物として有望である。特に、分離発酵液中の遊離アミノ酸組成バランスは、一般的な漁醤の組成と似ている。肉やスープ等の加工食品に利用する漁醤の様な発酵調味料としての利用が期待できる。また、食材に対する発酵産物によるマスキング効果に関する知見も有していることより、分離発酵液による食品の不快な臭いを低減させるマスキング効果も期待できる。また、分離発酵を肉質改良剤としてハンバーグ等の肉加工食品の食感や歩留まりの向上に利用できる可能性が大きい。

本研究をさらに進めることにより、食品廃棄物（焼酎粕）の削減、高付加価値化をもたらし、また一方では、安全な抗菌物質であるナイシンを利用した天然抗菌剤を開発することで、抗生物質やその他薬剤が効きにくく院内感染を引き起こす抗生物質耐性菌のコントロールが可能となる。さらに機能性発酵調味料を開発することにより、安全・安心な食材を消費者へ提供し、健康への貢献が可能となる。尚、国内外の研究に未だに似たものはなく、新規性、オリジナル性が高い内容を含んでいる。

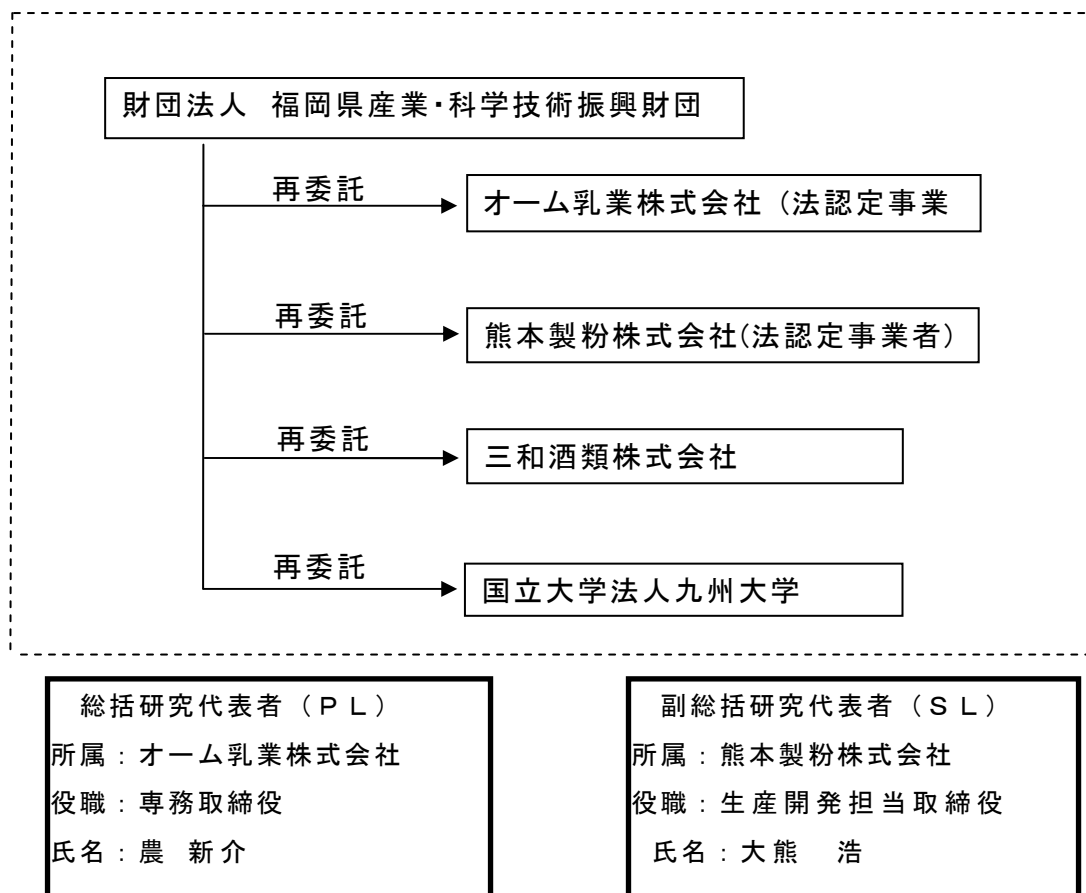
1-1-2 研究目的及び目標

本研究では、従来の乳酸菌発酵・精製法（ナイシン等）の問題点である、①低純度、高食塩濃度なため応用範囲が限られる、②水溶液で不安定、③可食原料から作られるためコストが高い、④食塩濃度の高い発酵残渣が廃棄され環境汚染となる、等の4課題を解決するため、樹脂を利用した新規の二段階乳酸菌発酵・精製法を開発し、発酵残渣を出さずに、低価格かつ高純度のナイシンと機能性発酵調味料の同時開発を目的とする。また、今回の研究委託期間は、3年間の計画全体の1/3（初年度分のみ）が対象であることより、1 t 以下のスケールで新規二段階乳酸菌発酵・精製法の基礎技術の確立および今後のスケールアップのための課題抽出を目標とする。

1-2. 研究体制

(1) 研究組織及び管理体制

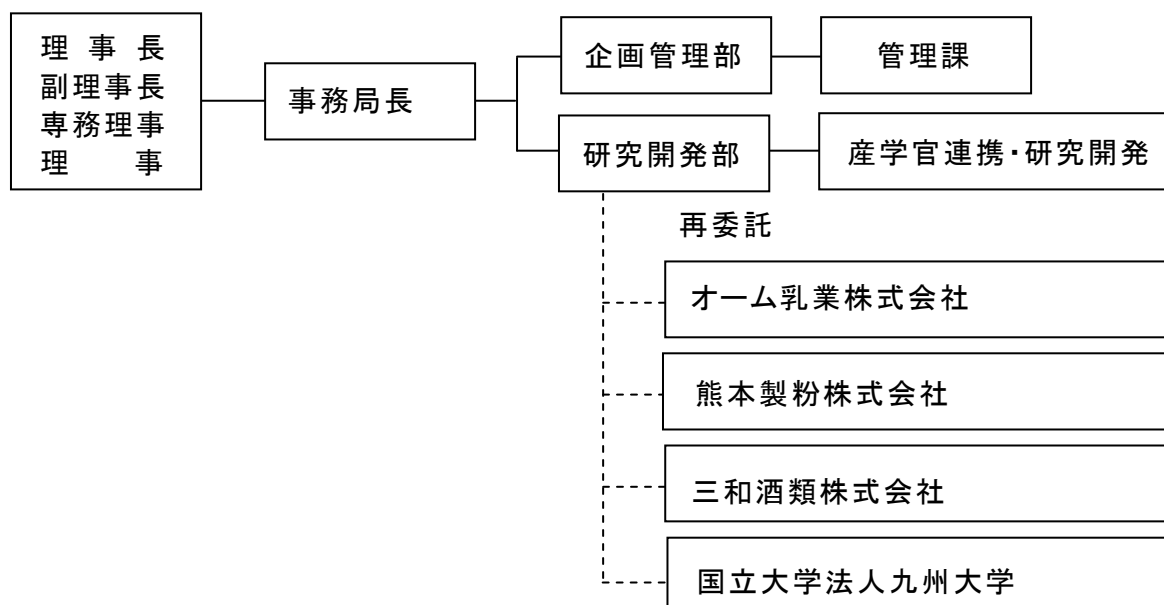
1) 研究組織(全体)



2) 管理体制

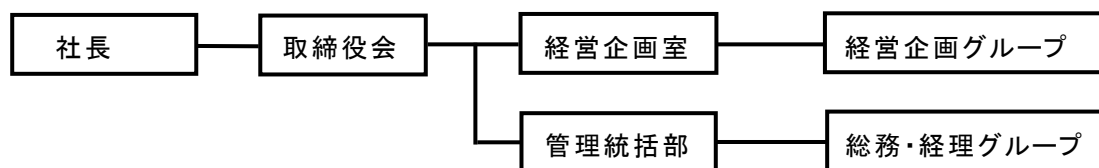
①事業管理者

財団法人福岡県産業・科学技術振興財団

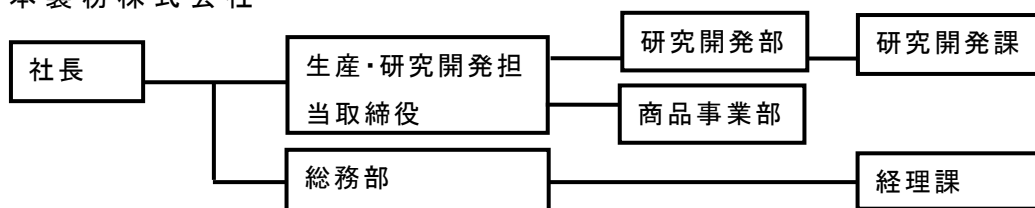


②(再委託先)

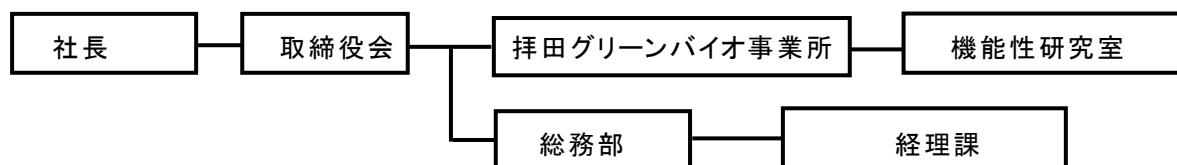
オーム乳業株式会社



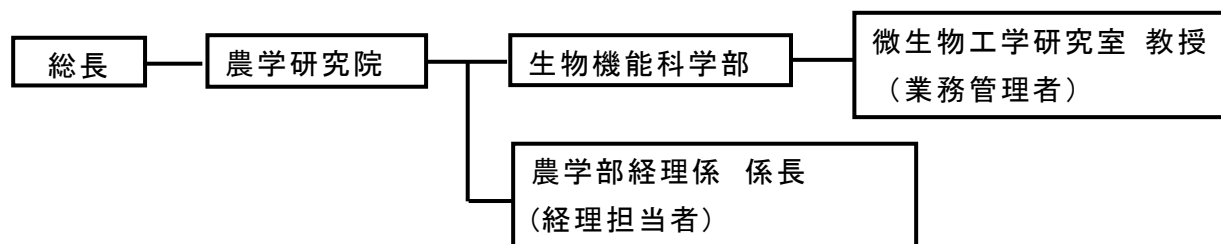
熊本製粉株式会社



三和酒類株式会社



国立大学法人九州大学



(2) 管理員及び研究員

【事業管理者】

財団法人福岡県産業・科学技術振興財団

①管理員

氏 名	所属・役職	実施内容(番号)
武藤 行弘	研究開発部 部長	⑤
吉海 和正	研究開発部 主幹	⑤

吉村 賢二	研究開発部 副主幹	⑤
今林 正則	研究開発部 事務主査	⑤
松尾 朱三江	研究開発部 サブマネージャー	⑤
森部 広道	企画管理部 管理課長	⑤
井上 雅之	企画管理部 主任主事	⑤
石川 正洋	企画管理部 主任主事	⑤

【再委託先】※研究員のみ

オーム乳業株式会社

氏 名	所属・役職	実施内容(番号)
農 新介	専務取締役	①、②
永利 浩平	経営企画室 グループリーダー	①、②
古賀 祥子	経営企画室	①、②

熊本製粉株式会社

氏 名	所属・役職	実施内容(番号)
大熊 浩	生産開発担当取締役	③
林 いずみ	研究開発部 グループリーダー	③
山田 徹	研究開発部 グループリーダー	③
前田 幸子	研究開発部	③
矢田 志頼	商品事業部	③
藤川 三紗	研究開発部	③

三和酒類株式会社

氏 名	所属・役職	実施内容(番号)
竹嶋 直樹	拝田グリーンバイオ事業所 副所長	①
上原 絵理子	拝田グリーンバイオ事業所 機能性研究室	①

国立大学法人九州大学

氏 名	所属・役職	実施内容(番号)
園元 謙二	農学研究院 生物機能科学部門 教授	④
善藤 威史	農学研究院 生物機能科学部門 助教	④

(3) 経理担当者及び業務管理者の所属、氏名

(事業管理者)

財団法人福岡県産業・科学技術振興財団

(経理担当者)企画管理部 管理課長 森部 広道

(業務管理者)研究開発部 部長 武藤 行弘

(再委託先)

オーム乳業株式会社

(経理担当者) 管理統括部 総務・経理グループリーダー 馬場 政代

(業務管理者) 専務取締役 農 新介

熊本製粉株式会社

(経理担当者) 総務部 経理課 長 陽一郎

(業務管理者) 生産開発担当取締役 大熊 浩

三和酒類株式会社

(経理担当者) 総務部 経理課 課長 米田智之

(業務管理者) 常務取締役 下田雅彦

国立大学法人 九州大学

(経理担当者) 農学部経理係 係長 山本 泰庸

(業務管理者) 農学研究院 教授 園元 謙二

(4)他からの指導・協力者名及び指導・協力事項

推進委員会委員

(外部推進委員)

氏 名	所属・役職	備考
竹花 稔彦	株式会社 ADEKA 先端材料開発研究所 研究員	アドバイザー
齋藤 忠夫	国立大学法人東北大学大学院農学研究科 教授	アドバイザー

(内部推進委員)

氏名	所属・役職	備考
農 新介	オーム乳業株式会社 専務取締役	PL
永利 浩平	オーム乳業株式会社 経営企画室 グループリーダー	委
古賀 祥子	オーム乳業株式会社 経営企画室	委
大熊 浩	熊本製粉株式会社 生産開発担当取締役	SL
山田 徹	熊本製粉株式会社 研究開発部 グループリーダー	委
前田 幸子	熊本製粉株式会社 研究開発部	委
矢田 志頼	熊本製粉株式会社 商品事業部	委
竹嶋 直樹	三和酒類株式会社 拝田グリーンバイオ事業所 副所長	
上原 絵理子	三和酒類株式会社 拝田グリーンバイオ事業所 機能性研究室	
園元 謙二	国立大学法人九州大学 農学研究院 生物機能科学部門 教授	
善藤 威史	国立大学法人九州大学 農学研究院 生物機能科学部門 助教	
武藤 行弘	財団法人福岡県産業・科学技術振興財団 研究開発部 部長	
池田 敬史	財団法人福岡県産業・科学技術振興財団 産学コーディネータ	

1-3 成果概要

1-3-1 研究項目「①新規二段階乳酸菌発酵・精製法（新規製法）の確立」

保有オリジナルナイシンA生産菌を用いた発酵試験において、ナイシンA活性が2,000IU/mL以上で、かつ発酵液の着色も低減した焼酎粕由来培地の開発に成功した。さらに本培地は、一次発酵用培地としてのみならず、連続発酵の二次発酵用培地としても優れていた。

本培地によるナイシンA発酵液（発酵液NA）から、樹脂を用いた分離精製法を利用し、高純度ナイシンAと機能性発酵液の同時生産を可能にしたことにより、廃棄残渣を出さない新規二段階乳酸菌発酵・精製法が確立できた。

1-3-2 研究項目「②ナイシンA抽出液に関する検討」

新規製法により得られたナイシンA抽出液（抽出液NA）は、市販のナイシンA製剤（食品添加物）より精製度（純度）が高く、試薬ナイシンと同等であった。また、抽出液NAの保存安定性と抗菌活性は、45℃で30日間でも優れた性能を維持していた。さらに、外観の清浄度も高く、溶解性にも優れていた。抽出液NAの安全性についても評価を行い、ラットの単回経口投与毒性試験、ウサギの皮膚一次刺激試験の結果、“無毒”、“無刺激”が実証されたことより、安全・安心な天然抗菌素材として大いに期待される。

1-3-3 研究項目「③機能性発酵調味液の開発」

ナイシンA抽出後の発酵液を原料とし、マスキング、呈味や肉質改良効果のある機能性発酵調味液を開発した。二段階発酵液を用いる事でより効果が高い機能性発酵調味液を開発する事が出来た。粉末化による濃縮を行いハンドリングや機能性効果を向上させた。今回開発した機能性発酵調味料は、煮込み料理、練り製品、スープ類など幅広い分野での効果が確認された。

1-3-4 研究項目「④高生産株および新規抗菌ペプチド生産株のスクリーニング」

九州大学保有の乳酸菌ライブラリーより、焼酎粕由来培地での生産性に優れた *Lactococcus lactis* R3株をナイシンA生産株として選定した。選定したR3株に紫外線照射を施すことで、ナイシン高生産候補株を複数取得することに成功した。また、種々の分離源からスクリーニングを行い、2株のバクテリオシン様抗菌物質生産株を分離した。この2株の生産する抗菌物質は、ナイシンを含む既報のバクテリオシンとは異なる抗菌スペクトルを示したことから、きわめて新規性が高いことが予想された。

1-4 当該プロジェクト連絡窓口

財団法人 福岡県産業・科学技術振興財団 研究開発部 吉海 和正

tel 092-725-2781 fax 092-725-2786

E-mail; ken@ist.or.jp

第2章

新規二段階乳酸菌発酵・精製法 （新規製法）の確立

第2章 新規二段階乳酸菌発酵・精製法（新規製法）の確立

三和酒類株式会社 拝田グリーンバイオ事業所 副所長 竹嶋 直樹
三和酒類株式会社 拝田グリーンバイオ事業所 機能性研究室 上原 絵理子
オーム乳業株式会社 専務取締役 農 新介
オーム乳業株式会社 経営企画室 グループリーダー 永利 浩平
オーム乳業株式会社 経営企画室 経営企画グループ 古賀 祥子

2-1 一次発酵の検討

2-1-1 焼酎粕由来培地の開発

2-1-1-1 開発目標

三和酒類(株)で発生する焼酎粕を出発点とし、ろ過・濃縮などにより抽出液を調整し、焼酎粕由来培地を作製する。目標としては、実験室レベルで保有のオリジナルナisin A 生産菌を用いた発酵試験を行い、ナisin A 活性が 2,000IU/mL 以上の発酵液が得られるよう、焼酎粕由来培地を作製する。

2-1-1-2 研究成果

今回の研究で使用する培地の原料である「焼酎粕」について説明する。図1に示したように、今回使用する焼酎粕は、大麦を原料とし、白麹菌及び酵母により約3週間発酵させた後に蒸留を行い、アルコール分を除去したものである。焼酎粕は水分が90%以上の「みそ汁」に似た性状のものである。

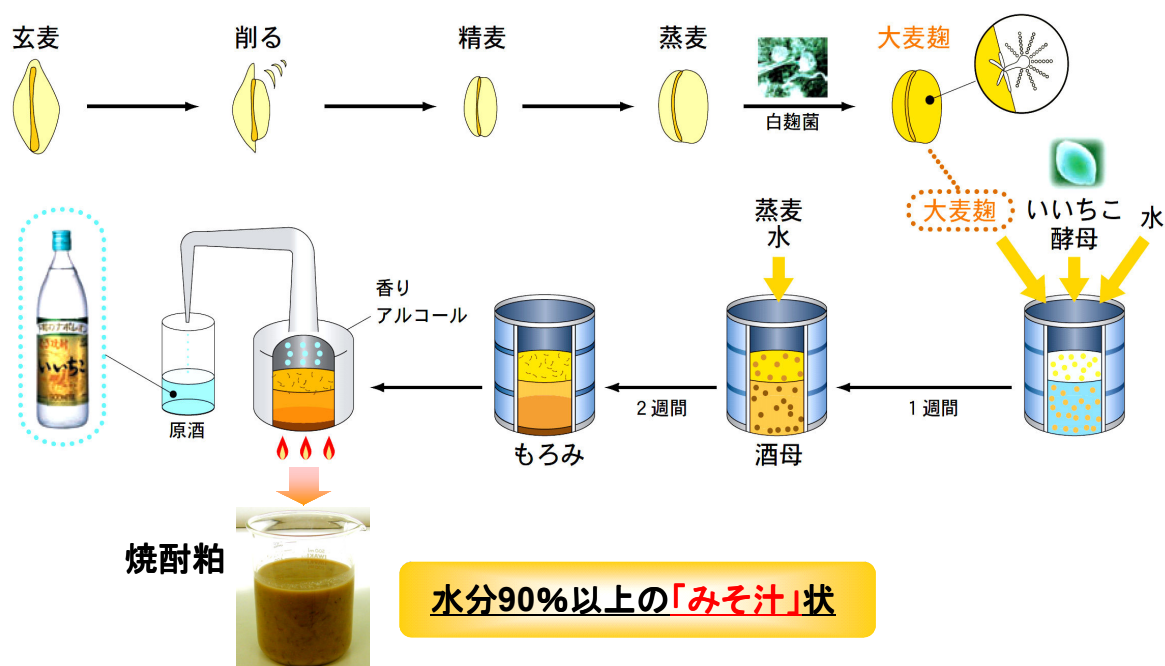


図1. 焼酎粕の製造フロー

今回、上記性状の焼酎粕を培地として利用するにあたり、第一段階として清澄化の検討を行った。図2に示したように、前処理工程を①孔径1×1mmのふるいろ過、②遠心分離、の2通りにて検討した。それぞれのろ液及び上清部を孔径0.22μmのMF膜に通液した。その結果、①ふるい処理のろ液では固形物が多く、ろ過が困難であり透過液を得ることが出来なかった。一方、②遠心分離処理の上清では順調に透過液が得られ、みそ汁様から麦茶様となった透過液を「素材A」とし、素材Aの保存性、流通性を向上させるために減圧濃縮を行ったものを「素材A-conc.」とした。焼酎粕1,500mlから、素材Aが900ml、また素材A-conc.が90ml得られ、両素材にて一次発酵の検討を行った。

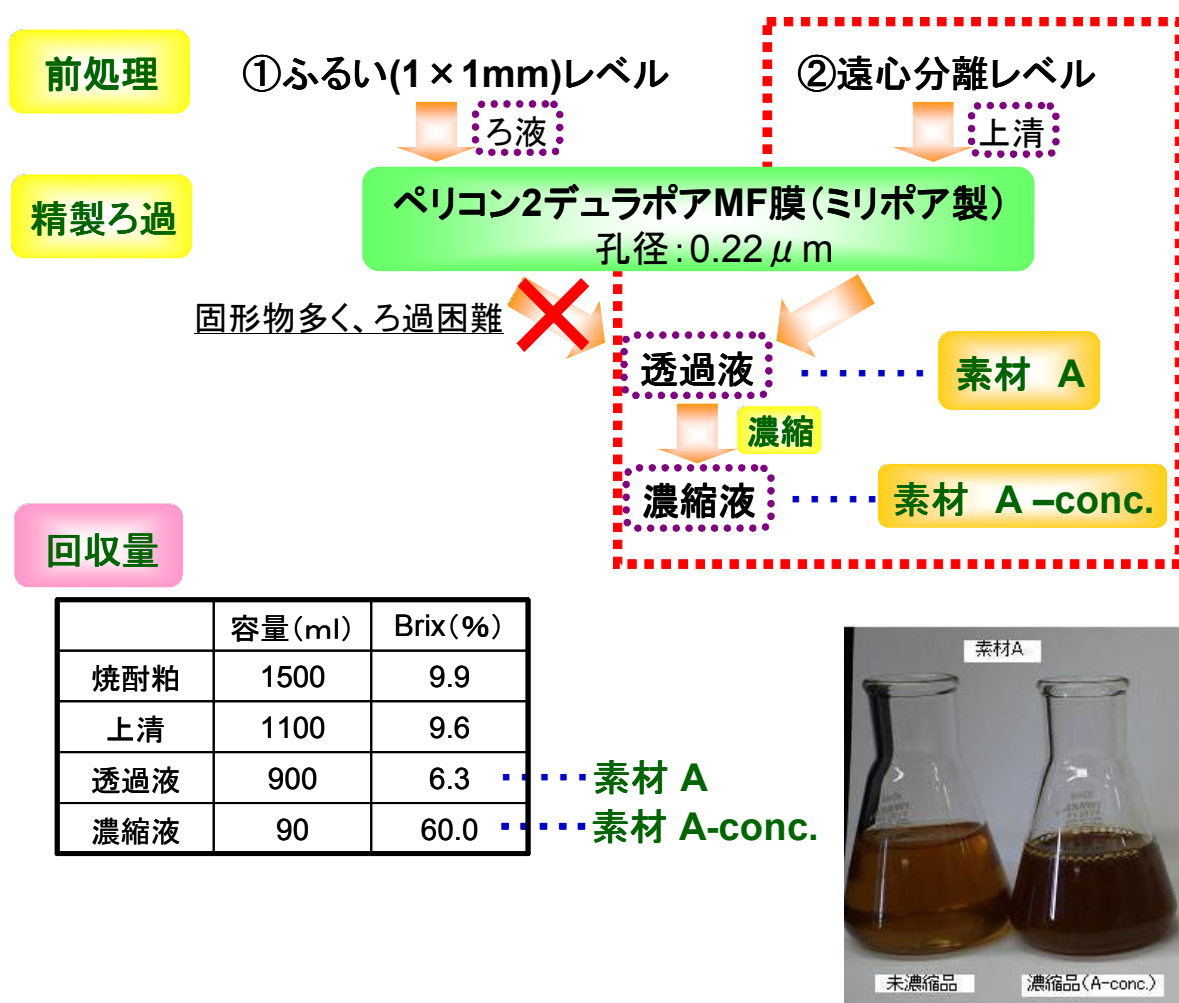


図2. 焼酎粕由来培地の開発（素材A、素材A-conc.）

2種類の焼酎粕由来素材（素材A、素材A-conc.）を用いてナイシンAの発酵生産試験を行った（糖源として、グルコース5%、培地の緩衝剤として炭酸カルシウム2%を配合した）。まず、素材Aを培地に対して10%～30%となるように配合し、発酵性試験を行った。

その結果を図 3 に示した。図 3 より、20%配合培地で、目標値の 2,000 IU/ml、30%配合培地で、2,800 IU/ml のナイシン A 生産性を示した。また、素材 A-conc. を 4% 添加した試験区（素材 A を 30% 配合した場合の Brix 値に合わせた培地）でも、同等のナイシン A 生産性が認められ、試験目標であるナイシン A 活性 2,000 IU/ml 以上を有する発酵液を得ることができた。

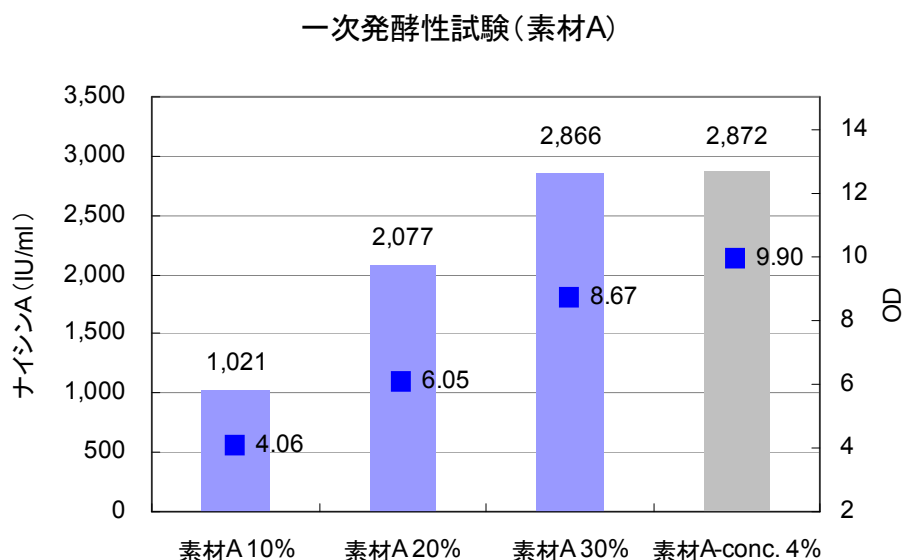
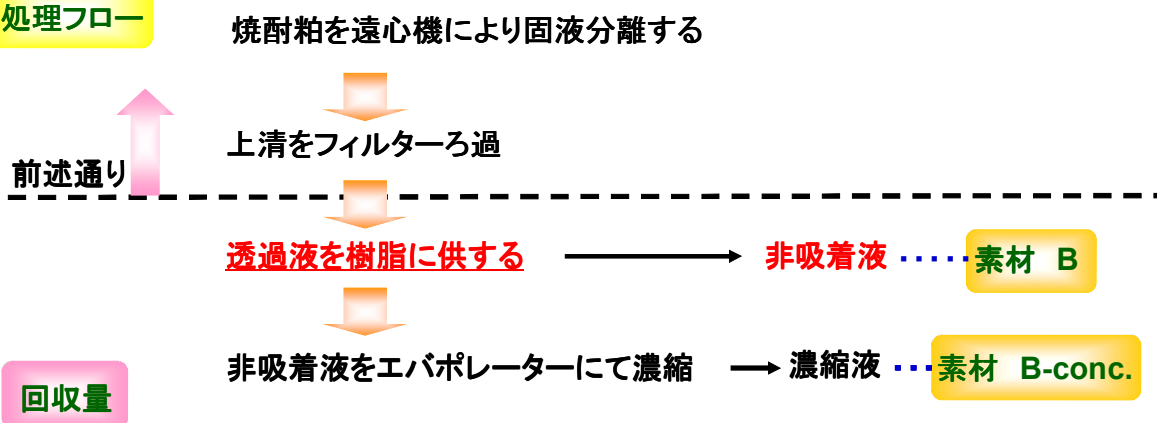


図 3．素材 A を用いたナイシン A の発酵生産性試験

素材 A、および素材 A-conc. を用いたナイシンの発酵性試験は非常に良好であったものの、当該素材は着色がかなり強く、この発酵液からナイシン A を分離・精製する際に、ナイシン A の抽出液もかなり着色してしまう傾向にあった。そこで、この着色は培地素材に起因すると考えられたため、脱色を目的とした改良を実施することとした。

素材 A の改良として図 4 に示したように、素材 A を得るところまでは前述の通りの手法で行い、その後樹脂に通液することにより脱色処理を行った。得られた液を「素材 B」とし、濃縮を行ったものを「素材 B-conc.」とした。焼酎粕 1,500ml から、素材 B が 1,100ml、また素材 B-conc. が 96ml 得られ、両素材にて一次発酵の検討を行った。

処理フロー



回収量

	容量 (ml)	Brix (%)
焼酎粕	1500	10.0
上清	1100	9.7
透過液	900	6.3
非吸着液	1100	4.9
濃縮液	96	50.0

..... 素材 B

..... 素材 B-conc.



図 4. 焼酎粕由来培地の開発（素材 B、素材 B-conc.）

この素材 B およびこれを濃縮した素材 B-conc. を用いて、発酵性試験を実施した。素材 A を用いた発酵性試験での結果より、Brix 値が 2.4% となるように素材 B、素材 B-conc. を配合し、発酵性試験を実施した（糖源として、グルコース 5%、培地の緩衝剤として炭酸カルシウム 2% を配合した）。ナイシン A 生産性の比較対象として、市販の乳酸菌用培地である MRS 培地（OXOID 社製）の培養液を用いた。その結果を図 5 に示した。図 5 より、素材 B を配合した培地でも、素材 A を配合した場合と同等のナイシン A の生産性を示す培地を開発することができ、目標値の 2,000 IU/ml を達成することができた。さらに 30% 発酵液自体の着色も改善できた。また、本培地は、市販の培地である MRS 培地よりも、ナイシン A の発酵生産に適していることが示唆された。以上の結果より、今後の試験については発酵液の着色が最も少なく、かつ発酵が良好であった「素材 B」を用いて研究を進めることとした。

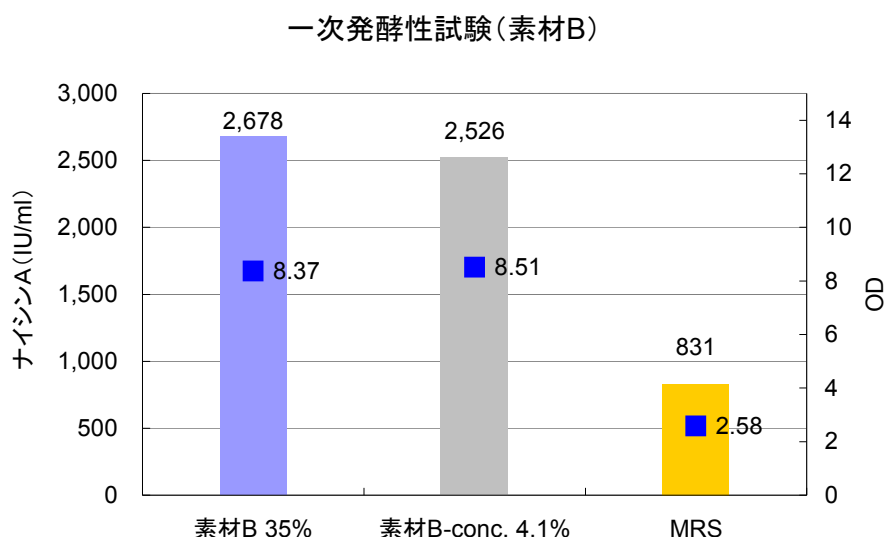
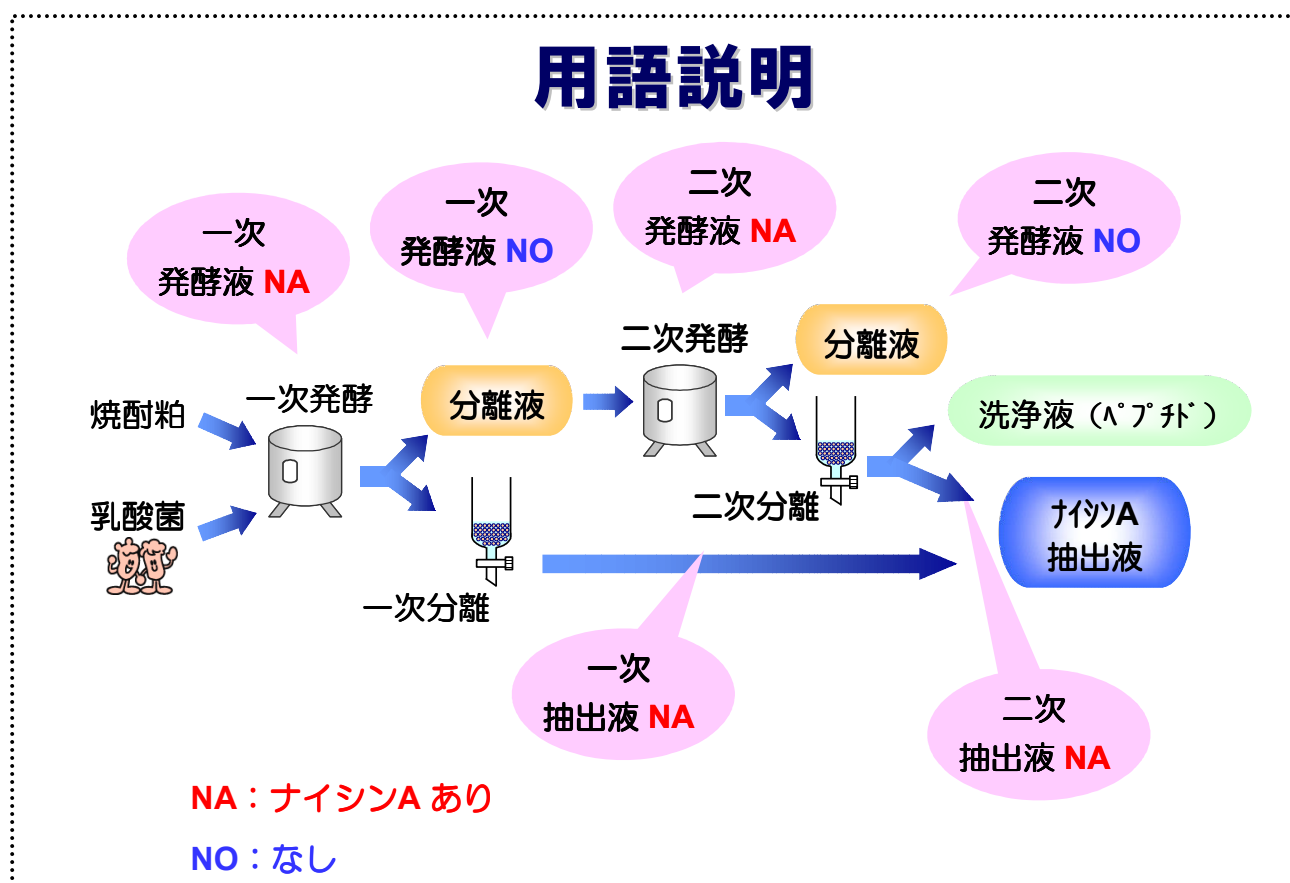


図 5. 素材 B を用いたナイシン A の発酵生産性試験

2-1-1-3 今後の課題

開発目標とした、焼酎粕由来培地を用いてナイシン A 活性 2,000IU/ml 以上の発酵液を得ることができた。今後は、焼酎粕由来培地のロット間差の確認、焼酎粕由来培地の保存性（使用期限）確認などを行う必要がある。

2-1-2 焼酎粕由来培地による有用物質（ナイシン A）の分離精製の検討



2-1-2-1 開発目標

焼酎粕由来培地を発酵させたナイシンA含有発酵液からナイシンAを効率良く分離するため、樹脂を用いた新規分離精製法の検討を行う。ナイシンAの分離・精製の最適条件を見出すことにより、ナイシンAの回収率 60%以上を目標とした。

2-1-2-2 研究成果

焼酎粕由来培地を発酵させたナイシンA含有発酵液（一次発酵液NA）と樹脂を用いた分離精製の検討を行った。まずは、樹脂のナイシンA吸着能について確認するため、発酵液の 1/100 容量の樹脂を用い、3 時間におけるナイシンA吸着量を、HPLCにより測定した結果を図6に示した。図6より、ナイシンAの吸着率は、1時間で72%、2時間で85%、3時間で100%を示した。

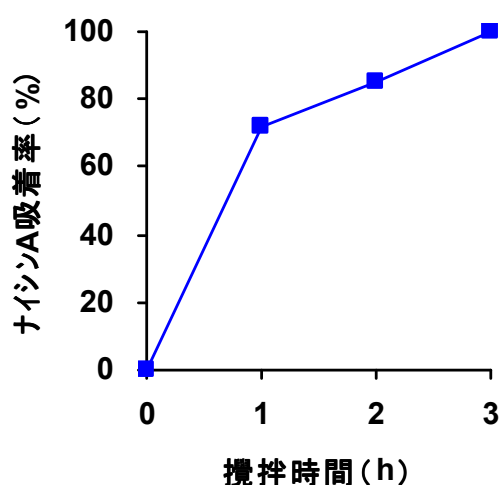


図6．一次発酵液NA中のナイシンA吸着試験結果

ナイシンAを吸着させた樹脂には、ナイシンA以外の夾雑物が存在するため、夾雑物のみを除去する条件の検討を行った。今回は、発酵液中に含まれるカルシウムを洗浄するため、10 mM のクエン酸を用いた結果（図7）、洗浄画分中に 25%のナイシンAが検出され、大きなロスが発生し、最終的な抽出画分のナイシンA回収率は、56%と低くなった。そこで、クエン酸を使用せず、精製水により行った結果（図7）、洗浄画分のロスは 10%に減少し、抽出画分のナイシンA回収率は、69%と向上した。目標値であるナイシンA回収率 60%を達成することができた。

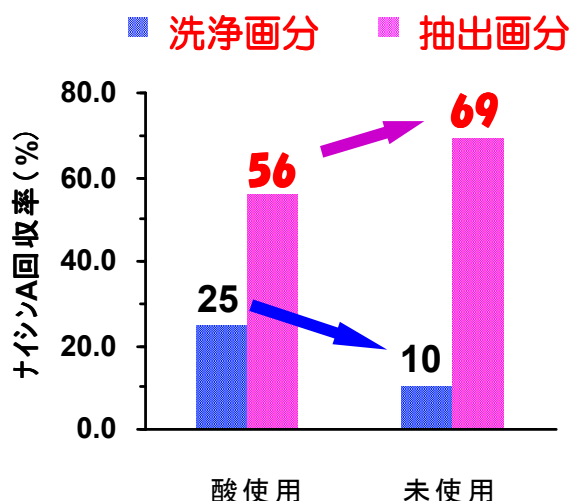


図 7. ナイシン A の抽出結果（クエン酸の影響）

また、本研究で購入したセラミックフィルター除菌装置、およびイオン交換樹脂処理カラムに関する検討も行った。セラミックフィルター除菌装置の検討結果を図 8 に示した。図 8 より、最もナイシン A の回収率が高かったのは、 $0.1\mu\text{m}$ で 95% であった。さらに除菌性能という観点からも、 $0.1\mu\text{m}$ が優れており、以後 $0.1\mu\text{m}$ で研究を行うことに決定した。

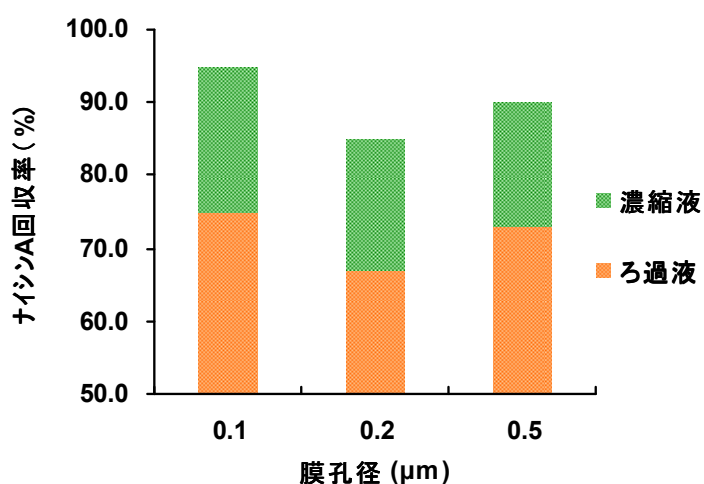
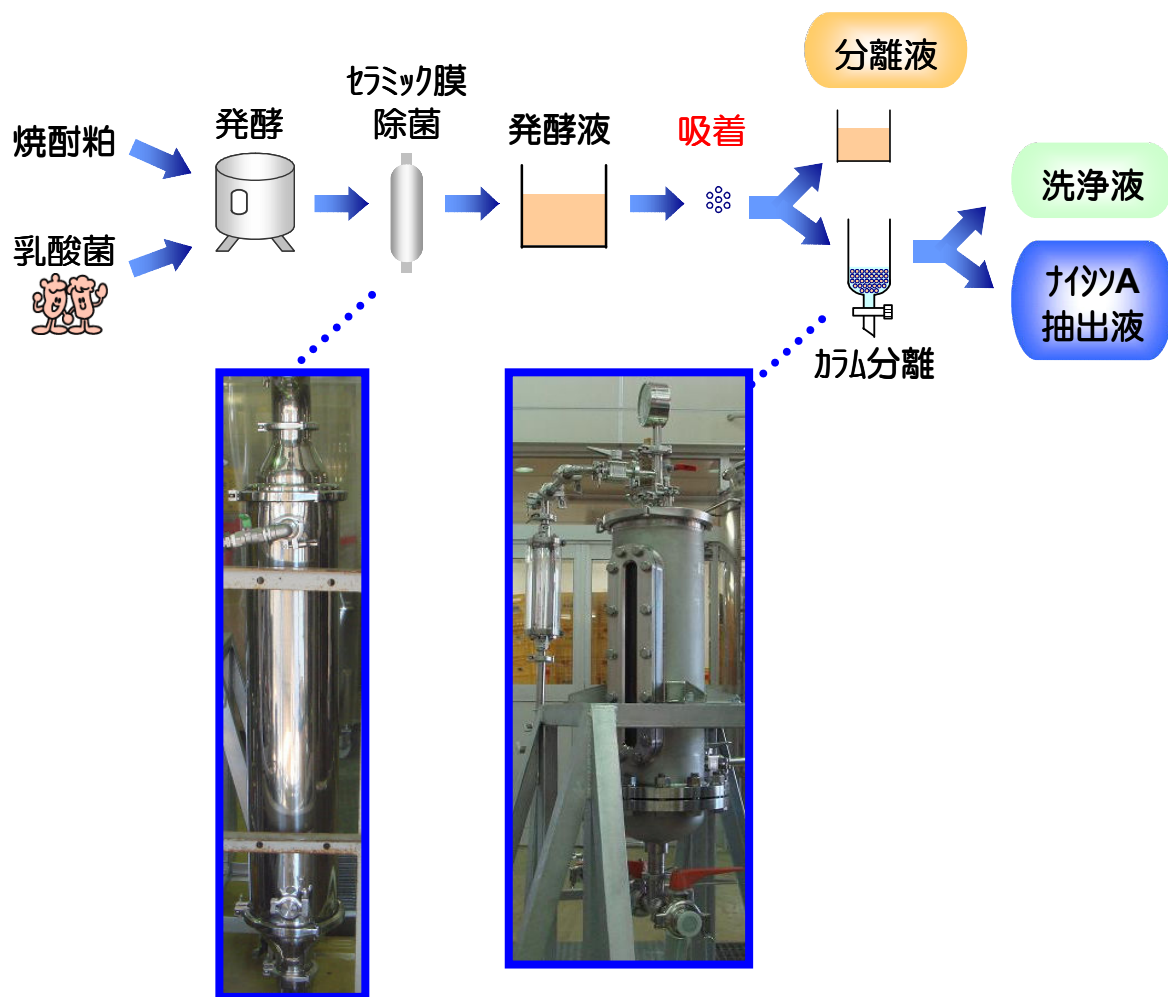


図 8. セラミック膜孔径のナイシン A 回収率に対する影響

次に、新規製法の工場試作（セラミックフィルター除菌装置、およびイオン交換樹脂処理カラム）に関する検討を行った。その結果を図 9 に示した。図 9 より、ナイシン A の生産性は、 $1,000\text{ IU/mL}$ と低くなったが、ナイシン A 回収率は、65% とラボレベルと同等となり、目標値のナイシン A 回収率 60% を達成した。



発酵スケール : 800 kg
 ナイシンA生産量 : 1,000 IU/mL
 ナイシンA回収率 : 65%

図9．新規製法の工場試作（一次発酵）

2-1-2-3 今後の課題

工場スケールアップでは、焼酎粕由来培地を発酵させたナイシンA含有発酵液の生産性に課題を残した。これは、スケールアップに伴う様々な外部環境の違いによるものと思われる。今回は、初回ということもあり、ラボスケールの条件をそのまま採用した結果である。今後、条件の最適化を行うことにより、目標達成は可能である。

2-2 二次発酵の検討

2-2-1 分離発酵液（一次発酵）の成分分析

2-2-1-1 開発目標

一次発酵のナイシンA分離工程で排出される分離発酵液中に含まれる全窒素量やアミノ酸等の窒素源及び糖類、有機酸等の炭素源の定量分析を実施し、含有成分の明確化を行う。

2-2-1-2 研究成果

一次発酵後のナイシンA分離工程で排出される分離発酵液（「一次発酵液 NO」）に含まれる各種成分を定量分析し、二次発酵での培地利用について検討を行った。その結果、表 1 に示した通り、一次発酵を行うことにより窒素及びグルコースが消費され二次発酵に必要な量としては不足していると考えられた。また、一次発酵を行うことにより乳酸含量が大きく増加しており、二次発酵時に阻害を及ぼすことが考えられた。以上のことから、一次発酵液 NO は、乳酸含量に注意しながら素材 B 及びグルコースを添加することにより二次発酵培地として利用できると考えられた。

表 1. 一次発酵液の成分分析結果

			一次発酵液		培地
			NA	NO	発酵前
その他分析項目	OD 430 nm	-	0.076	0.165	-
	pH		5.99	4.95	5.98
	Brix		6.60	6.40	5.90
	全窒素		0.11	0.11	0.18
	ポリフェノール	%	0.04	0.04	0.03
糖分析	マルトース		0.07	0.03	0.04
	グルコース		0.96	0.43	2.85
	キシロース		0.00	0.00	0.03
	アラビノース		0.00	0.00	0.06
	グリセロール		0.28	0.20	0.29
	糖合計		1.31	0.66	3.27
	クエン酸		0.07	0.07	0.10
有機酸分析	リンゴ酸		0.01	0.01	0.00
	乳酸		1.93	2.38	0.14
	コハク酸		0.16	0.16	0.18
	酢酸		0.02	0.02	0.02
	有機酸合計		2.19	2.65	0.45

2-2-1-3 今後の課題

一次発酵分離液を二次発酵用培地として用いる場合、一次発酵の状態によりグルコースや乳酸含量が変化する。そのため一次発酵分離液のロット間分析を行い、窒素源、炭素源など含有成分の範囲を明確化し、二次発酵時に阻害を受けず、かつ栄養不足が発生しないようなレシピ組みを構築する必要がある。

2-2-2 分離発酵液（一次発酵）の再発酵（二次発酵）の検討

2-2-2-1 開発目標

分離発酵液（一次発酵）の分析結果より、二次発酵に必要な窒素源（焼酎粕由来素材等）や炭素源（糖類等）を補充した培地を調製し、二次発酵試験を行う。また、二次発酵後のナイシンA抽出液へ影響も考慮し、発酵液の着色・臭いの低減も可能な最適発酵条件を見出す。ナイシンAの生産量は、HPLC分析によりモニタリングし、ナイシンAの生産量（活性）2,000 IU/mL以上を目標とした。

2-2-2-2 研究成果

一次発酵液からナイシンAを取り除いた後の分離液（一次発酵液NO）に、一次発酵により消費された栄養分（炭素源、窒素源など）を配合し、ナイシンAの二次発酵生産が可能な検討を行った。表1の成分分析結果より、一次分離発酵液にはグルコースが0.43%残存していることが明らかとなったため、一次発酵を行う場合よりも、グルコース配合量を低くした培地（素材B 35% or 素材B-conc. 4.1% + グルコース 3%、炭酸カルシウム 2%）にて発酵性試験を行った。比較としては、発酵液NOの代わりに水で調製した培地での発酵液を用いた。その結果を図10に示した。図10より、培地調整用の水を全て発酵液NOに置換した場合、発酵液NOに含まれる乳酸の影響により、ナイシンA生産菌の増殖が阻害され、目標値の2,000 IU/mlをクリアすることができなかった。

二次発酵性試験①

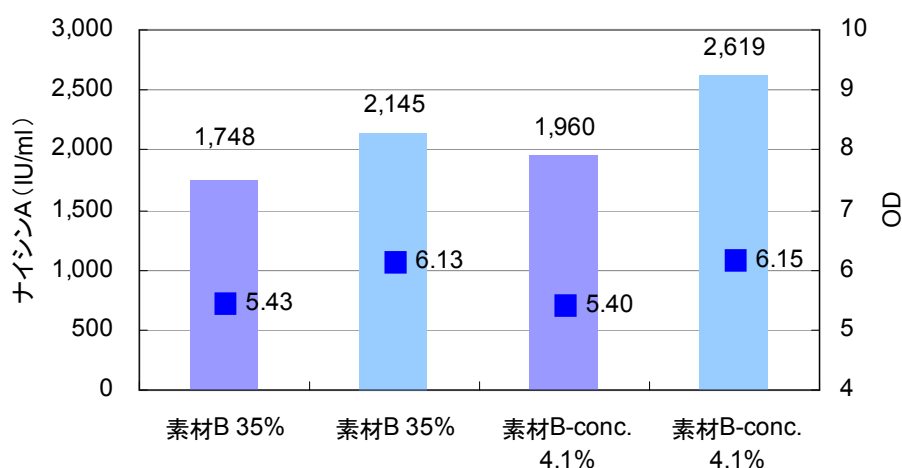


図10. 二次発酵性試験①

（■；発酵液NOを使用、■；発酵液NOの代わりに水を使用）

そこで、発酵液NOの配合量を減らすことにより、培地に含まれる乳酸濃度をコントロールした培地（表2）を作製し、再度発酵性試験を実施した。その結果を図11に示した。

図 1 1 より、発酵前の培地中の乳酸濃度が低くなることによって、ナイシン A 生産菌の増殖が高くなり、それに合わせてナイシン A の生産性も高くなった。本結果より、初期乳酸濃度を 8.4 mg/ml 以下に調整することにより、目標値である 2,000 IU/ml 以上のナイシン A を発酵生産可能な二次発酵の条件を確立することができた。

表 2．二次発酵培地組成

[培地組成]	A	B	C
グルコース	2%	2%	2%
炭酸カルシウム	1%	1%	1%
素材 B	30%	30%	30%
一次発酵液 NO	67%	44%	22%
水	—	23%	45%
発酵前乳酸濃度 (mg/ml)	12.8	8.4	4.2

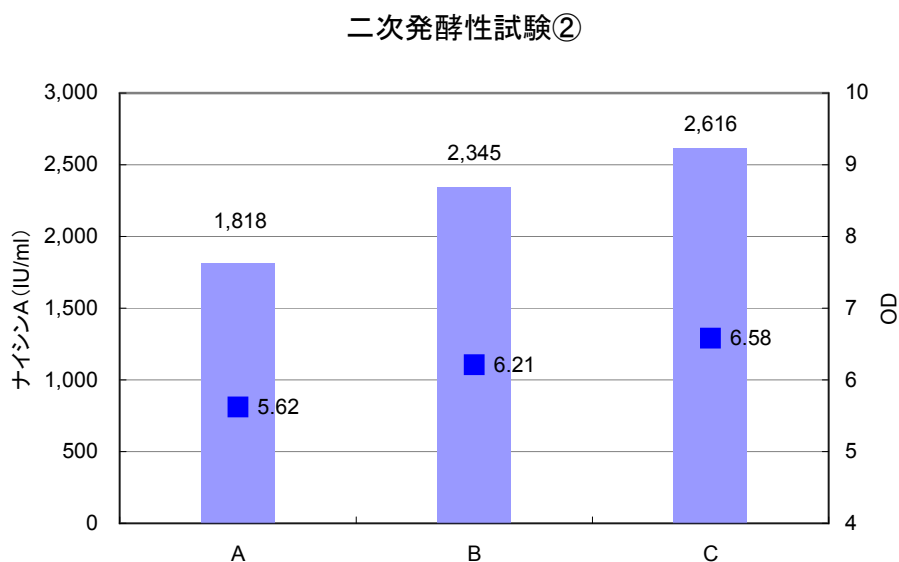


図 1 1．二次発酵性試験②（初発乳酸濃度調整）

2-2-2-3 今後の課題

二次発酵では、培地中に含まれる乳酸濃度により、乳酸菌の発育阻害やナイシン A 生産性に大きく影響することが確認された。そのため、発酵阻害となりうる乳酸や他の有機酸等の把握、または窒素源、炭素源など発酵促進物質の検討も同時に行い、さらなる最適化検討が必要である。

2-2-3 二次発酵における有用物質（ナイシンA）の分離精製の検討

2-2-3-1 開発目標

ナイシンA含有二次発酵液からナイシンAを効率良く分離するため、一次発酵時と同様、樹脂を用いた新規分離精製法の検討を行う。ナイシンAの分離・精製の最適条件を見出すことにより、ナイシンAの回収率 60%以上を目標とした。

2-2-3-2 研究成果

ナイシンA含有二次発酵液（二次発酵液NA）と樹脂を用いた分離精製の検討を行った。2-1-2-2の一次発酵液と同条件でナイシンA吸着試験を行った結果を図12に示した。図12より、ナイシンAの吸着率は、1時間で63%、2時間で75%、3時間で89%を示した。

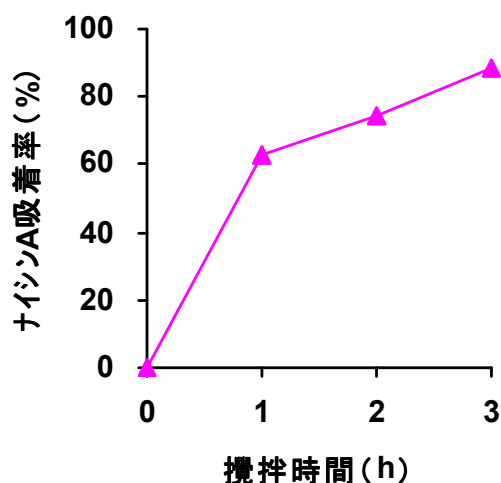


図12. 二次発酵液NA中のナイシンA吸着試験結果

ナイシンAを吸着させた樹脂からナイシンAを抽出する条件は、一次抽出条件と同条件で行った結果、ナイシンAの回収率は、47%とやや低かった。

2-2-3-3 今後の課題

二次発酵液からのナイシンAの抽出（回収）を、一次抽出条件により試みたが、一次時のような高回収は得られなかった。これは、もとの発酵液に含まれる有機物の量の違いが関係していると考えられ、二次抽出に最適な条件を見出すことにより、さらなるナイシンA回収率の向上は可能である。

第3章

ナイシン A 抽出液に関する検討

第 3 章 ナイシン A 抽出液に関する検討

オーム乳業株式会社	専務取締役		農	新介
オーム乳業株式会社	経営企画室	グループリーダー	永利	浩平
オーム乳業株式会社	経営企画室	経営企画グループ	古賀	祥子

3-1 ナイシン A 抽出液の性能評価

3-1-1 精製度評価

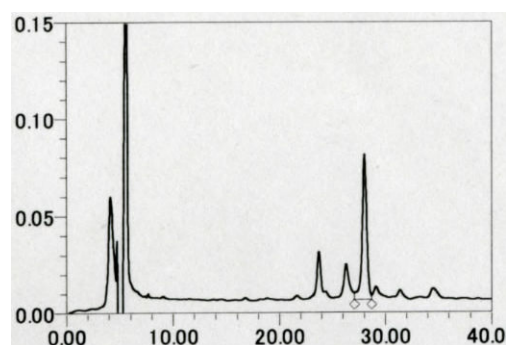
3-1-1-1 開発目標

ナイシン A 抽出液の精製度（純度）を確認するため、H P L C 分析およびゲルろ過分析を行い、ナイシン A 以外の物質の存在を確認する。海外既存品の純度 2.5%、より夾雑物の検出量を低減し、固形分中の純度 90%以上を目標とした。

3-1-1-2 研究成果

焼酎粕由来培地を用い、新規二段階乳酸菌発酵・精製法により得られたナイシン A 抽出液を H P L C（Asahipak ODP-50 6E）により分析した結果を図 1 に示した。精製度の評価は、H P L C のピーク面積（%）により算出した（ただし、保持時間 5 分前後のピークは溶離液の濃度変化によるものであるため、対象外とした）。図 1 より、一次抽出液 N A 中に含まれるナイシン A（酸化物も含む）の精製度は、90%であった。一方、二次抽出液 N A 中に含まれるナイシン A（酸化物も含む）の精製度は、71%であった。これは、ベースのナイシン A 発酵液中に含まれる焼酎粕由来有機物の量の影響で、一次に比べ、二次発酵液の方が、有機物が豊富であるため、分離精製度に対して不利に働き、その差が現れたものと考えられる。

一次抽出液 N A Lot.No. 20100128



二次抽出液 N A Lot.No. 20100205

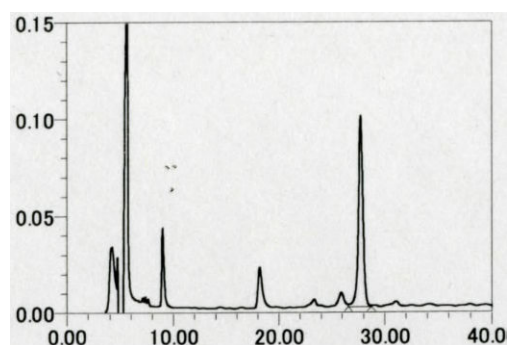
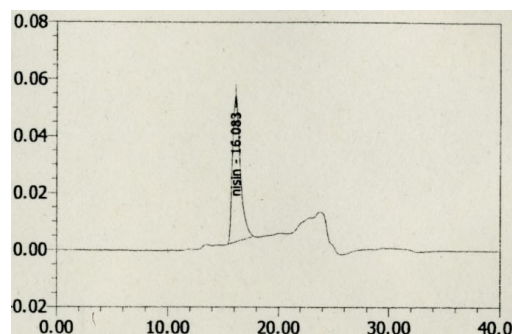


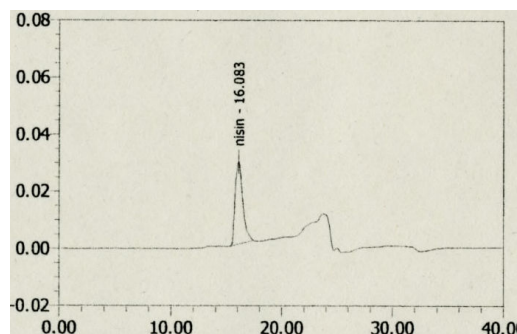
図 1. ナイシン A 抽出液の H P L C 分析結果

さらに、上記ナisin A抽出液と競合品（食品添加物ナisin、試薬ナisin）をゲルろ過（TSK-GEL G2000SW XL）により分析した結果を図2に示した。図2より、食品添加物ナisinは、ナisin A以外の物質（矢印部分）が多く検出され、精製度が低いことが確認された。一方、一次および二次抽出液N Aは、他の物質も少なく、高額な試薬ナisinと同レベルの精製度を示した。

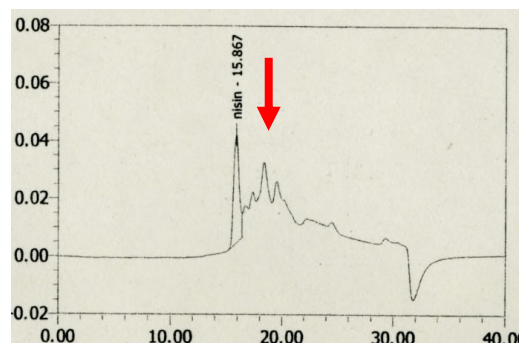
一次抽出液N A Lot.No. 20100128



二次抽出液N A Lot.No. 20100205



食品添加物ナisin



試薬ナisin

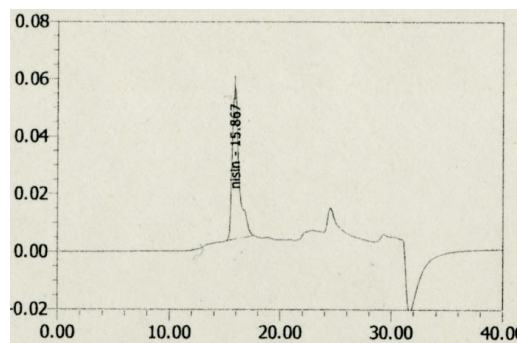


図2．ナisin A抽出液と競合品のゲルろ過分析結果

以上より、新規製法のナisin A抽出液の精製度は、一次では目標値の90%を達成した。二次では、有機物リッチな発酵液がベースとなっているため、精製度がやや劣るが、ゲルろ過の結果では、食品品添加物ナisinより優れていた。分離精製に関しては、二次発酵液は有機物リッチということで相性は良くはないが、発酵調味料としては非常に魅力的な素材であると思われる。

3-1-1-3 今後の課題

ナisin A抽出液、特に二次抽出液N Aの精製度（純度）は、目標未達成であった。これは、一次抽出液N Aの条件をそのまま採用しているためで、さらに二次抽出液N Aに最適な条件を見出すことにより、さらなる精製度の向上が可能である。

3-1-2 保存安定性試験

3-1-2-1 開発目標

ナイシンA抽出液の保存安定性（ナイシンA単体の安定性）を確認するため、HPLC分析にて、ナイシンAの残存をモニタリングする。海外既存品の45℃、30日間の残存活性 50%より安定化させ、45℃、30日間の残存活性 70%以上を目標とした。

3-1-2-2 研究成果

60%エタノールを含んだナイシンA抽出液（一次抽出液NA Lot.No. 20091208）と減圧濃縮によりエタノールを除去したナイシンA抽出液を滅菌精製水で2倍希釈し、最終活性が 16,000 IU/mL になるように調製したサンプル（10 mL）を、65℃で15分間の熱処理（残存プロテアーゼ失活のため）を行った後、滅菌した微量遠心チューブに入れたものを保存サンプルとした（500 μ L $\times$ 6）。保存サンプルは、45℃保存区で試験を開始し、任意日数に1サンプルを取り出し（使い捨て）、HPLC分析によるナイシンAの分析を行い、ナイシンA単体の残存率%を算出した。今回は加熱処理において、エタノールを含む抽出液NAのみ、酸化が進行してしましたが、その状態から試験を開始した。45℃保存試験開始（D0）から試験終了（D28）のナイシンA単体の活性をモニタリングした結果を図3に、D0とD28のHPLC分析を図4に示した。図3より、45℃でD28の抽出液NAのナイシンA単体の残存活性は、エタノール“なし”で82%、エタノール“あり”で72%となり、ともに目標値の残存活性 70%を達成した。しかし、エタノールの存在により、約10%の差（影響）が確認された。さらに、図4より、ナイシンAの酸化のし易さも確認され、安定性という点からも、エタノールは除去した方が好ましい。

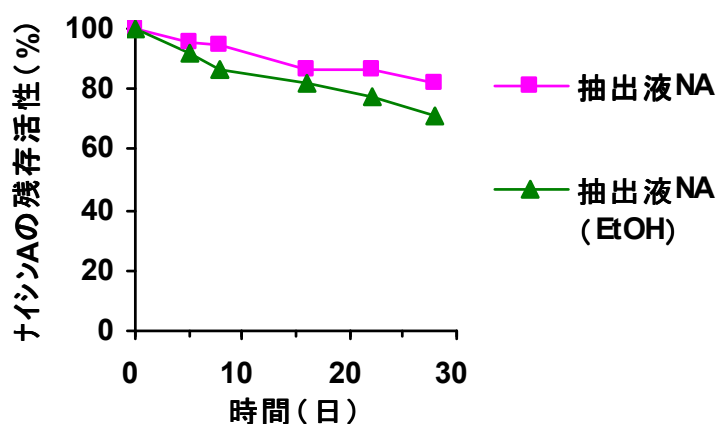


図3. ナイシンA抽出液の45℃保存安定性（エタノールの影響）

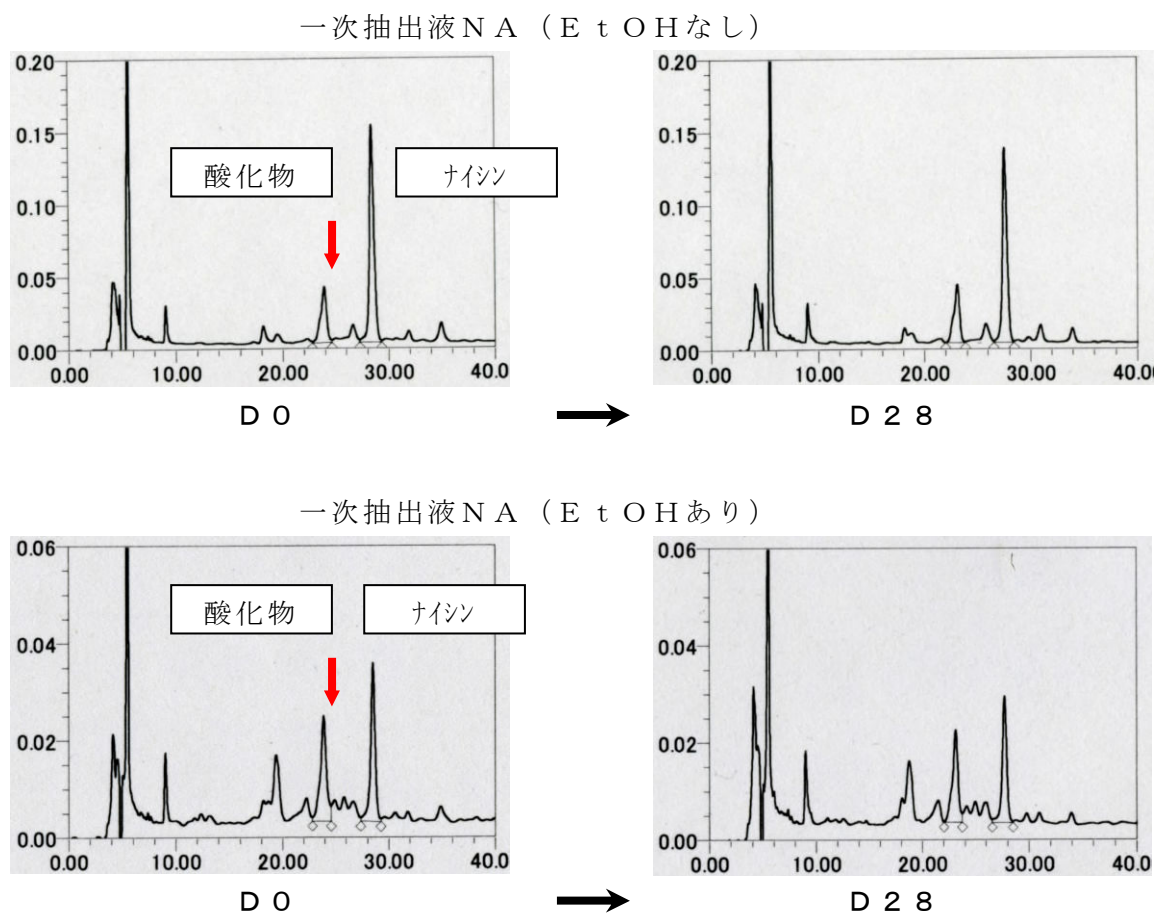


図4．45℃保存ナisinA抽出液（エタノール有無）のHPLC分析結果

3-1-2-3 今後の課題

ナisinA抽出液中のナisinA単体の安定性はエタノールの存在により、影響され、酸化が進行する傾向が見られる。従って、今後の抽出液の応用範囲を広げるために、エタノール中での安定性に関する検討を行う必要がある。

3-1-3 抗菌活性試験

3-1-3-1 開発目標

ナisinA抽出液の抗菌活性（抽出液の総活性）および保存時の抗菌活性の持続を確認するため、ナisinAに感受性の高い、*Lactobacillus sakei*を用いた抗菌活性試験：Spot-on-lawn法（図5…九州大学の方法に準じる）にて抗菌活性の有無を評価する。海外既存品の45℃、30日間の抗菌活性50%より優れた、70%以上を目標とした。

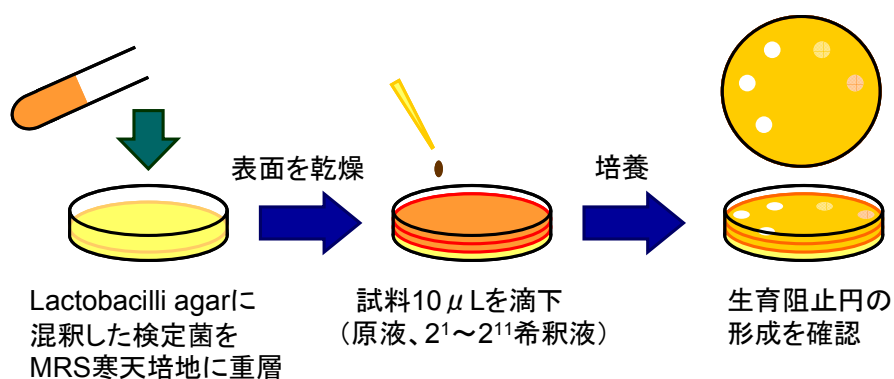


図5．Spot-on-lawn 法による抗菌活性試験

3-1-3-2 研究成果

3-1-2の保存安定性試験で用いたナisin A抽出液サンプルを用い、抗菌活性（抽出液の総活性）の試験を行った。試験に使用した保存サンプルは、図3，4に示したエタノール有無のナisin A抽出液、45℃、D0とD28の合計4種類である。検定菌（*Lactobacillus sakei*）を用いた抗菌活性試験結果を図6に示した。図6より、全てのサンプルにおいて、抗菌活性（阻止円）の差は見られず、抗菌活性は保持していた。目標値である70%の残存活性を達成することができた。

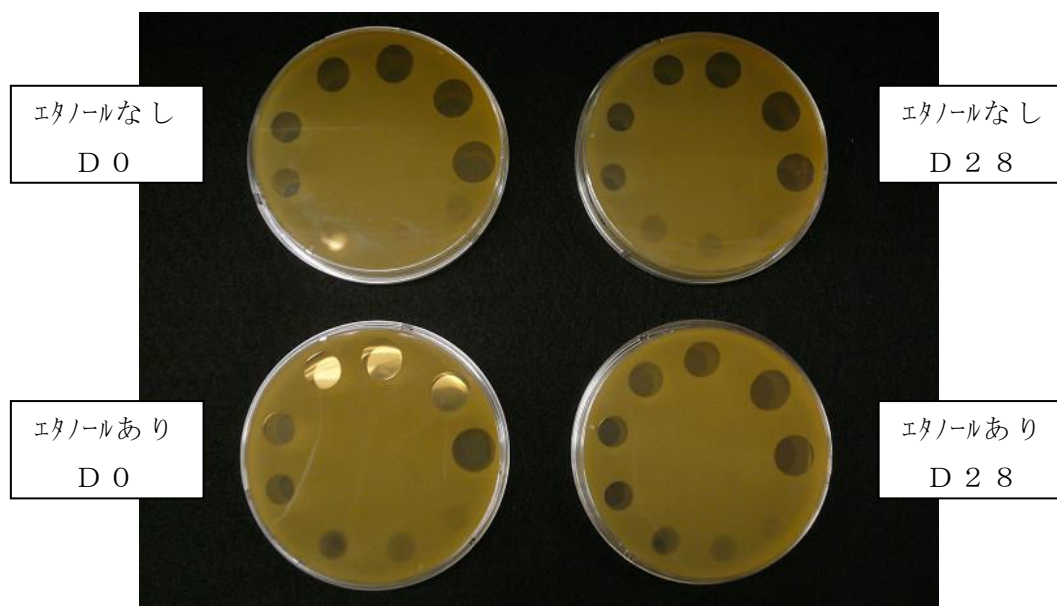


図6．45℃保存ナisin A抽出液（エタノール有無）の抗菌活性試験結果

3-1-3-3 今後の課題

3-1-2の保存安定性試験と同様、ナisin A抽出液の抗菌活性（抽出液の総活性）および保存時の抗菌活性の持続についてもエタノールの影響が確認された。従って、今後の抽出液の応用範囲を広げるために、エタノール中での安定性に関する検討を行う必要がある。

3-1-4 溶解性（沈殿物）に関する検討

3-1-4-1 開発目標

ナイシンA抽出液の溶解性（沈殿物発生量）を確認するため、分光光度計を用い濁度の評価を行う。吸光度（OD 600 nm）で0.05以下を目標とした。

3-1-4-2 研究成果

60%エタノールを含んだナイシンA抽出液：一次抽出液NA Lot.No. 20091208と二次抽出液NA Lot.No. 20100205の原液をセルに入れ、分光光度計（JASCO V-630）にセットし、OD 600 nmで測定を行った。その結果を表1に示した。表1より、一次抽出液NAの方が二次抽出液NAより清浄度が高いことが確認された。これは、3-1-1の精製度と同様、二次抽出液NAのものの二次発酵液は、一次発酵液よりも有機物がリッチであるため、分離精製度にややマイナスに働き、その差が現れたものと考えられる。しかし、二次抽出液NAの吸光度値は、目標値である0.05以下であり、十分に目標を達成することができている。

表1. ナイシンA抽出液の濁度（OD 600 nm）の測定結果

Sample	Lot. No.	OD ₆₀₀
一次抽出液NA	20091208	0.030
二次抽出液NA	20100205	0.045

3-1-4-3 今後の課題

ナイシンA抽出液の濁度において、二次抽出液NAは、一次抽出液より清浄度にやや劣っていた。これは、3-1-1の精製度（純度）が大きく影響しており、精製度の改善を行うことにより、その他夾雑物も低減され、その結果、さらなる精製度の向上、すなわち濁度の向上が可能となる。

3-2 ナイシンA抽出液の安全性評価

3-2-1 ラットにおける単回経口投与毒性試験

試験実施期間：2010年2月3日～2月17日
薬物安全性試験センターにて実施

3-2-1-1 開発目標

ナイシンA抽出液の応用範囲は広く、食品から医薬、化粧品原料として使用できる可能性を確認するため、医薬品原料ガイドラインまたは化粧品原料規格に準じた安全性試験（単回投与毒性試験）を実施し、安全性の実証を行う。ラットにおける単回経口投与毒性試験にて、最大投与量：2,000 mg/kg体重で無毒（陰性）、であることを目標とした。

3-2-1-2 研究成果

二次抽出液NA Lot.No. 20100118（エタノール除去）の単回経口毒性についてラットを用いて検討した。試験動物としてWistar系ラットの雌雄、各5匹、合計10匹を用いた。被験物質は液体であり、未希釈物をそのまま投与試料として、金属製胃ゾンデを用いて強制経口的に単回投与した。

試験は限度試験として2000 mg/kgを投与した。生死および一般状態の観察を投与後14日間行い、その間に体重を測定した。観察期間終了後に剖検し、諸臓器の肉眼的観察を行った。その結果、死亡発生状況を表2に示した。表2より、雌雄ともに死亡例はみられず、概略の致死量は2000 mg/kgを超える値であった。

表2. 死亡発生状況

性	投与量 (mg/kg)	供 試 動 物 数	経 日 死 亡 数														死亡率	
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	(%)
雄	2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
雌	2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

次に一般状態の結果を表3に示した。表3より、観察期間を通じて外観および行動に異常はみられなかった。

体重の結果を表4に示した。表4より、雌雄ともに投与1日後より順調な増加推移を示し、14日間の増加量は雄で78～94 g、雌で45～57 gとなり正常と考えられた。

表 3. 一般状態

性	投与量 (mg/kg)	動物番号	観 察 時 間													
			時 間						日							
			0	-	1	2	3	6	1	2	3	4	5	6	7	8 - 14
雄	2000	1001	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1002	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1003	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1004	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1005	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
雌	2000	2001	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2002	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2003	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2004	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2005	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : 異常なし

表 4. 体重変化

性	投与量 (mg/kg)	動物番号	観 察 時 間							増加量
			0	1	2	3	4	7	14	
雄	2000	1001	98	110	116	122	132	152	192	94
		1002	96	108	112	119	127	144	185	89
		1003	95	105	109	115	123	138	173	78
		1004	97	106	112	118	125	143	186	89
		1005	96	106	111	118	125	142	184	88
		平 均	96.4	107.0	112.0	118.4	126.4	143.8	184.0	87.6
		標準偏差	1.14	2.00	2.55	2.51	3.44	5.12	6.89	5.86
雌	2000	2001	88	99	103	108	113	124	145	57
		2002	88	92	99	104	109	119	135	47
		2003	85	95	98	102	108	117	134	49
		2004	84	90	93	98	104	111	129	45
		2005	85	94	97	100	107	114	130	45
		平 均	86.0	94.0	98.0	102.4	108.2	117.0	134.6	48.6
		標準偏差	1.87	3.39	3.61	3.85	3.27	4.95	6.35	4.98

(単位: g)

剖検所見の結果を表5に示した。表5より、外観に異常はみられず、頭蓋腔、胸腔および腹腔内の各臓器ならびにリンパ節の肉眼的観察において異常は認められなかった。

表5．解剖所見

性	投与量 (mg/kg)	動物番号	生 死	観 察 部 位				
				外 観	頭蓋腔内	胸 腔 内	腹 腔 内	リンパ節
雄	2000	1001	生存	—	—	—	—	—
		1002	生存	—	—	—	—	—
		1003	生存	—	—	—	—	—
		1004	生存	—	—	—	—	—
		1005	生存	—	—	—	—	—
雌	2000	2001	生存	—	—	—	—	—
		2002	生存	—	—	—	—	—
		2003	生存	—	—	—	—	—
		2004	生存	—	—	—	—	—
		2005	生存	—	—	—	—	—

—：異常なし

以上の結果より、二次抽出液N Aの 2000 mg/kg 用量で死亡例はみられず、毒性影響も示さなかったことから、概略の致死量は雌雄ともに 2000 mg/kg を超える値であると結論された。本試験でのナイシンA濃度は、0.53 mg/kg に相当し、ナイシンAのADI : 0.13 mg/kg の約4倍に相当したが、本試験結果より、安全性を実証することができた。

また、ナイシンAを含まない二次発酵液N Oも同様の単回経口毒性試験を行った結果、二次抽出液N Aと同様、全く問題はなく、安全性を実証した。

3-2-1-3 今後の課題

二次抽出液N Aおよび二次発酵液N Oは、ともに安全性が高く、天然の抗菌素材として、または天然の調味料として大いに期待される。今後は、本素材を基にした商品の開発が必要である。

3-2-2 ウサギにおける皮膚一次刺激試験

試験実施期間：2010年2月1日～2月4日
薬物安全性試験センターにて実施

3-2-2-1 開発目標

ナイシンA抽出液の応用範囲は広く、食品から医薬、化粧品原料として使用できる可能性を確認するため、医薬品原料ガイドラインまたは化粧品原料規格に準じた安全性試験（皮膚一次刺激性試験等）を実施し、安全性の実証を行う。ウサギにおける皮膚一次刺激試験にて、投与量：100%（原液）、50%、10%濃度で無刺激（陰性）であることを目標とした。

3-2-2-2 研究成果

二次抽出液NA Lot.No. 20100118（エタノール有無の2種類）の皮膚一次刺激性について検討した。試験動物として日本白色種ウサギの雌3匹を用い、除毛した背部に健常皮膚部および損傷皮膚部を設け、投与部位とした。

被験物質は液体であり、未希釈物（原液100%）と50および10w/v%溶液（媒体：注射用水）に調製したものを投与試料として試験に使用した。投与試料0.5mLを2.5×2.5cm大のリント布に含浸させて投与部位に直接貼付し、無浸透性絆創膏、粘着性スポンジ絆創膏および粘着性伸縮包帯を用いて24時間の閉塞貼付を行った。皮膚反応の観察は貼付除去3、24および48時間後に実施した。

未希釈物（原液）の皮膚反応の結果である一次刺激性インデックス（P.I.I.）を表6、個別評点を表7に示した。

表6．未希釈物（原液）の一次刺激性インデックス（P.I.I.）

動物 番 号	健常皮膚部				損傷皮膚部			
	紅斑・痂皮		浮 腫		紅斑・痂皮		浮 腫	
	3hr.*	48hr.	3hr.	48hr.	3hr.	48hr.	3hr.	48hr.
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
平 均	0		0		0		0	
強 度	0				0			
P.I.I.	0							

*：貼付除去後の時間

表 7. 未希釈物（原液）の皮膚反応評点（個別）

動物番号	判定 項目	健常皮膚部			損傷皮膚部		
		3hr.*	24hr.	48hr.	3hr.	24hr.	48hr.
1	紅斑・痂皮	0	0	0	0	0	0
	浮腫	0	0	0	0	0	0
2	紅斑・痂皮	0	0	0	0	0	0
	浮腫	0	0	0	0	0	0
3	紅斑・痂皮	0	0	0	0	0	0
	浮腫	0	0	0	0	0	0

*：貼付除去後の時間

表 6，7 より、健常皮膚部および損傷皮膚部ともにいずれの観察時においても皮膚反応はみられず、P. I. I. は 0 であった。50 および 10w/v% 溶液においても同様の結果となった。

表 8. 体重および一般状態

動物番号	体重 (kg)		一般状態			
	投与時	終了時	投与日	投与1日後	投与2日後	投与3日後
1	2.43	2.46	－	－	－	－
2	2.56	2.62	－	－	－	－
3	2.30	2.36	－	－	－	－

－：異常なし

一般状態および体重変化の結果を表 8 に示した。表 8 より、試験期間中の一般状態に異常はみられず、体重においても順調な増加がみられた。

以上の結果より、本被験物質に皮膚刺激性は認められず、評価区分はいずれの試料濃度においても“無刺激物”であると結論された。

3－2－2－3 今後の課題

二次抽出液 N A は、未希釈物の原液そのままでも皮膚刺激性は認められず、“無刺激物”であると結論された非常に安全性の高い天然の抗菌素材である。今後は、食品から医薬、化粧品原料として幅広く応用した商品開発が必要である。

第4章

機能性発酵調味液の開発

第 4 章 機能性発酵調味液の開発

熊本製粉株式会社	生産開発担当取締役	大熊 浩
熊本製粉株式会社	研究開発部 グループリーダー	林いずみ
熊本製粉株式会社	研究開発部 グループリーダー	山田 徹
熊本製粉株式会社	研究開発部	前田幸子
熊本製粉株式会社	商品開発部	矢田志頼
熊本製粉株式会社	研究開発部	藤川三紗

4-1 分離発酵液の成分分析

4-1-1 開発目標

ナイシン A 抽出後の発酵液の成分特性を把握する。固形分、pH 及び遊離アミノ酸の定量を目的とした。

4-1-2 研究成果

機能性発酵液の原料となる分離発酵液の成分特性を把握する為、ナイシン A 抽出後の発酵液（一次発酵液 NO、二次発酵液 NO）及び発酵前の培地の固形分（図 1）と pH（図 2）を測定した。

また、ナイシン A 抽出に使用した樹脂を洗浄した液にも機能性効果成分を含む可能性がある為 pH と固形分を測定した。

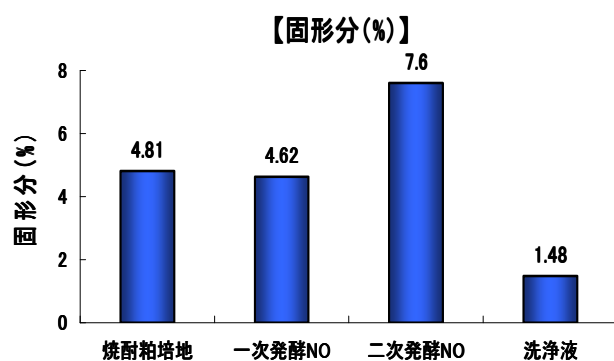


図 1 . 固形分比較

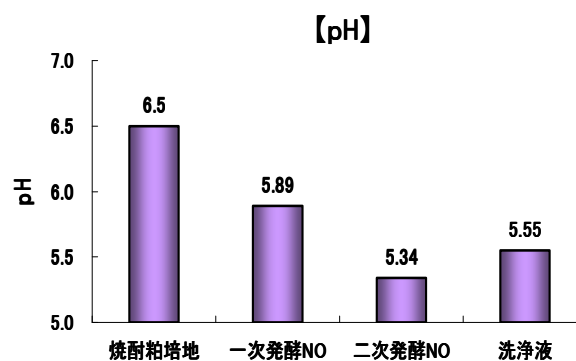


図 2 . pH 比較

二次発酵液 NO の固形分が最も高かった。また、pH は発酵を重ねる度に低下し二次発酵液 NO が最も低かった。

発酵前の培地、一次発酵液 NO、二次発酵液 NO の遊離アミノ酸含量を測定した（図 3）。

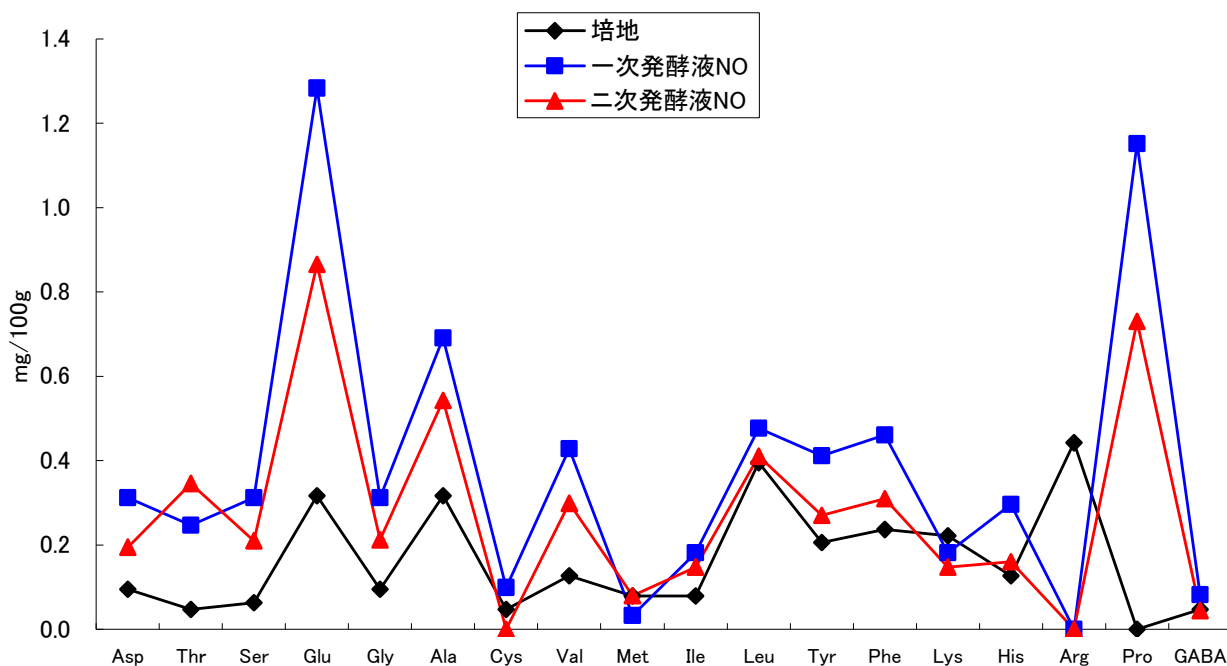


図 3．遊離アミノ酸含量の比較

乳酸菌発酵後の一次及び二次発酵液 NO の遊離アミノ酸含量は発酵前培地と比べ増加することが分かった。

4-1-3 今後の課題

遊離アミノ酸は乳酸菌発酵により増加する事が確認された。また、pH の低下から発酵による有機酸の増加が考えられた。二次発酵後の固形分が最も高く、機能性効果がある成分がより多く含まれていると思われた。今後の課題としては、遊離アミノ酸以外の成分の分析を行い機能性効果のある成分を特定する。

4-2 分離発酵液の機能性評価

4-2-1 開発目標

機能性発酵調味液の原料となる分離発酵液の機能性効果を確認する。分離発酵液の味の特性の把握、GC-MS によるマスキング効果（トリメチルアミン減少率 50%）、食材試験での呈味及び肉質改良剤効果（官能評価 4 点以上）を目標とした。

4-2-2 研究成果

一次発酵液 NO、二次発酵液 NO 及び樹脂洗浄液の味を把握する為、味覚センサーを用いて各サンプルの味の特性を測定した（図 4）。

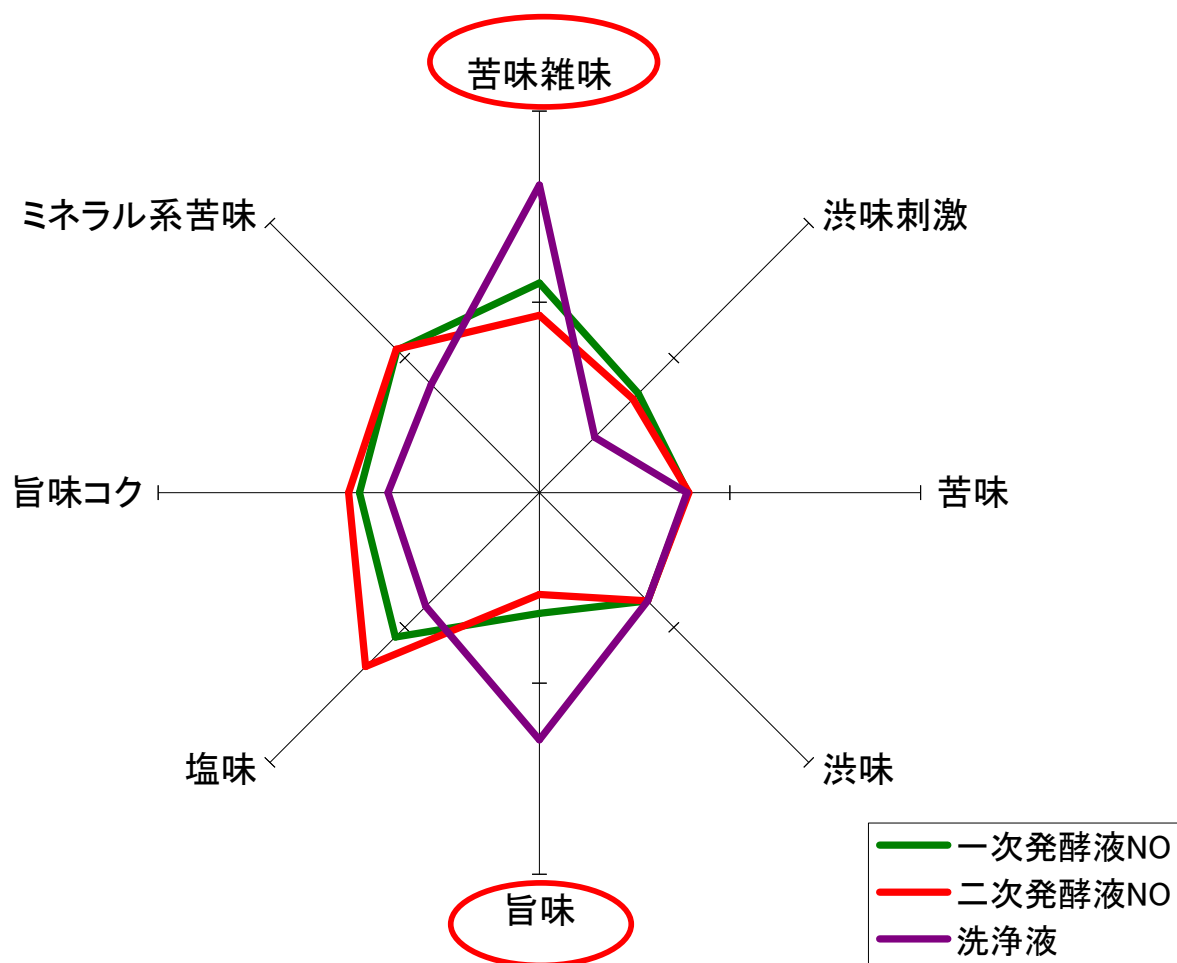


図 4．味覚センサー測定結果

人間の舌をモデルとした人工膜センサーを用いてサンプルの味の特性を客観的に評価した。

二次発酵液 NO が若干一次発酵液 NO より塩味が強い結果だった。発酵を繰り返す事で味が強くなったと考えられる。

樹脂洗浄液は苦味雑味と旨味が強く、一次と二次発酵液 NO とは異なる味の特性を示した。

魚の生臭さの原因であるトリメチルアミンに対するマス킹効果をガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-MS）にて確認した（図5）。

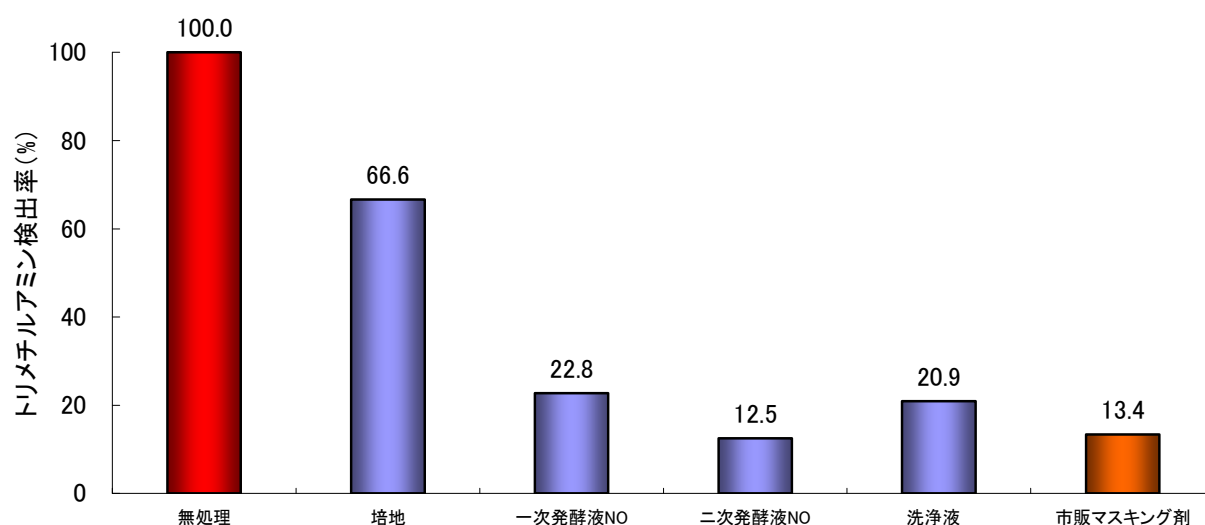


図5．トリメチルアミンに対するマス킹効果

一定濃度のトリメチルアミン溶液に対し各サンプル添加した。検出されたトリメチルアミンのピークエリアを無処理のピークエリアと比較し、検出率として示した。

二次発酵液 NO のトリメチルアミン検出率が最も低く、市販のマス킹剤と同等又は以上の高いマス킹効果が確認された。

一次より二次発酵液 NO のトリメチルアミン検出率が低く、繰り返し乳酸菌発酵を行う事でマス킹効果が向上する事が分かった。

また、樹脂洗浄液にもマス킹効果が認められた。

次に食材試験での機能性効果を確認した。

【ハンバーグ】

添加量 0～1%（図 6）

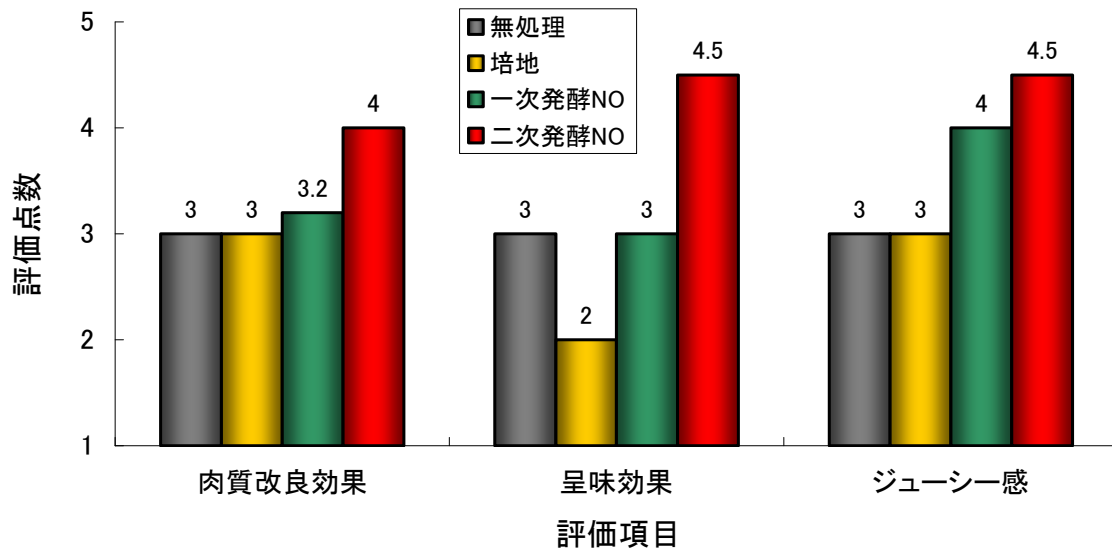


図 6．ハンバーグの官能評価結果

ハンバーグでは二次発酵液 NO が最も高い呈味及び肉質改良効果を示した。（図 6）
発酵を繰り返す事で肉練製品への機能性効果は向上した。

【鶏レバー】

生の鶏レバーを 0～6%のサンプル溶液に浸漬後、蒸して官能評価を行った（図 7）。

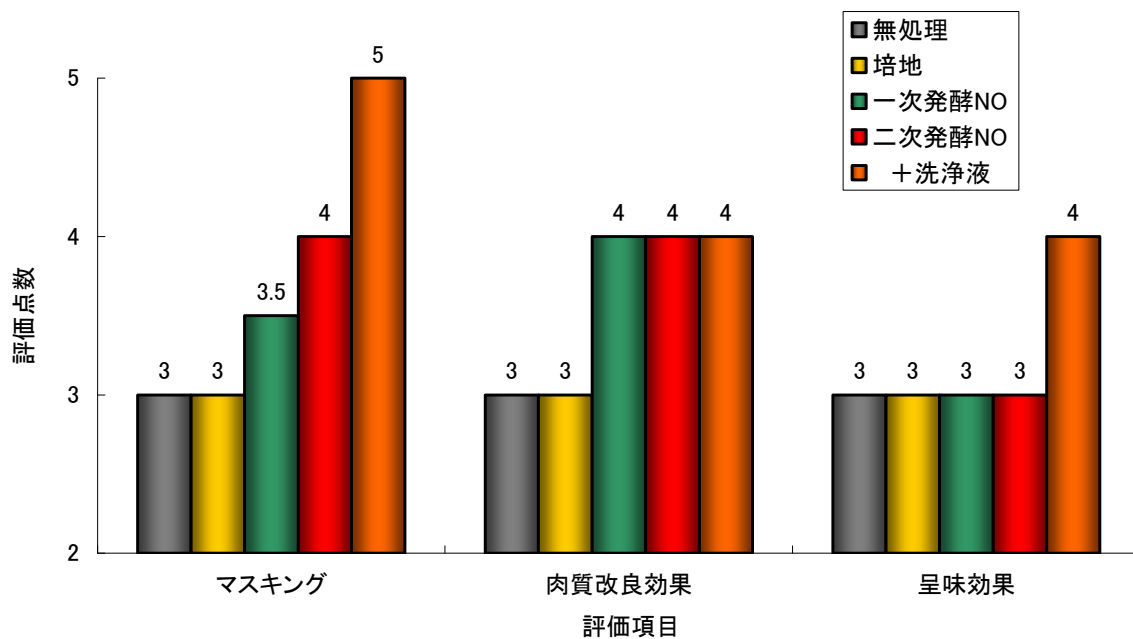


図 7．蒸し鶏レバーの官能評価結果

二次発酵液 N0 に樹脂洗浄液を添加したサンプルが最もマスキング、肉質改良及び呈味効果が高かった。(図 7)

マスキング効果は一次発酵液 N0 より二次発酵液 N0 の方が高く、発酵工程を繰り返す事で向上する事が分かった。

肉質改良効果は、一次発酵液 N0 と二次発酵液 N0 に差は無かった。

呈味効果では、二次発酵液 N0 単独では効果が認められなかったが樹脂洗浄液と組み合わせる事で効果が得られた。

【炊き込みご飯】

添加量 0～1% (図 8)

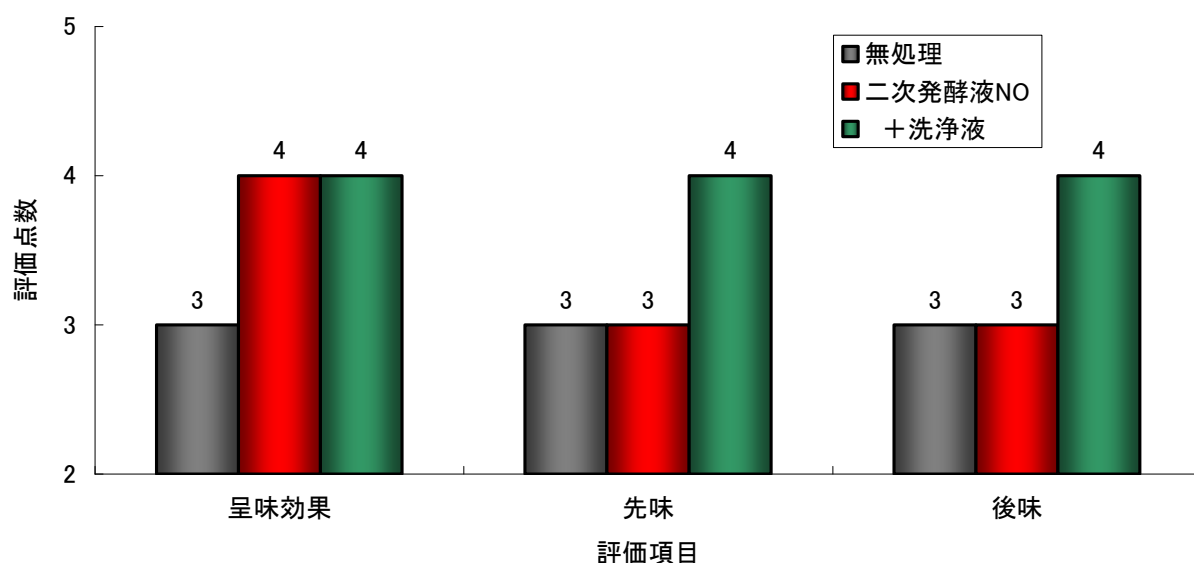


図 8. 炊き込みご飯の官能評価結果

炊き込みご飯では二次発酵液 N0 に洗浄液を添加する事で先味と後味が強化された。(図 8)

4-2-3 今後の課題

味覚センサーにて各サンプルの味特性を把握した。GC-MS でのマスキング試験では二次発酵液 N0 に 80%以上のマスキング効果が確認された。食材試験では呈味、肉質改良、マスキング効果が官能評価点数 4 点以上で確認された。今後の課題は使用方法の確立等による効果の向上を目指す。

4-3 分離発酵液の製剤化・濃縮等による機能性の向上

4-3-1 開発目標

原料の組み合わせによる機能性の相乗効果を目的とした。また、濃縮による機能性効果の向上を目標とした。

4-3-2 研究成果

機能性発酵調味液の効果を向上させる為、原料の組み合わせを行った。

まず始めに主原料となる液を選択した。章4-2-2の結果から二次発酵後の分離液（二次発酵液 N0）が機能性発酵調味料の原料として最も適していることが判明した（表1）。

表1．一次発酵液 N0 と二次発酵液 N0 の機能性効果比較

	マスキング	肉質改良効果	呈味効果
一次発酵液 N0	○	○	○
二次発酵液 N0	◎	◎	◎

◎：非常に効果が高い、○：効果が高い、△：やや効果がある、×：効果が全く無い

また、二次発酵液 N0 と樹脂洗浄液を複合配合する事により、マスキングや呈味等の機能性発酵調味液の効果が向上した（表2）。

表2．洗浄液の機能性効果

	マスキング	呈味効果	味の強度（先・後味）
二次発酵液 N0	○	○	○
二次発酵液 N0 + 洗浄液	◎	◎	◎

◎：非常に効果が高い、○：効果が高い、△：やや効果がある、×：効果が全く無い

よって、二次発酵液 N0 と樹脂洗浄液を混合したものを機能性発酵調味液として開発した（図9）。

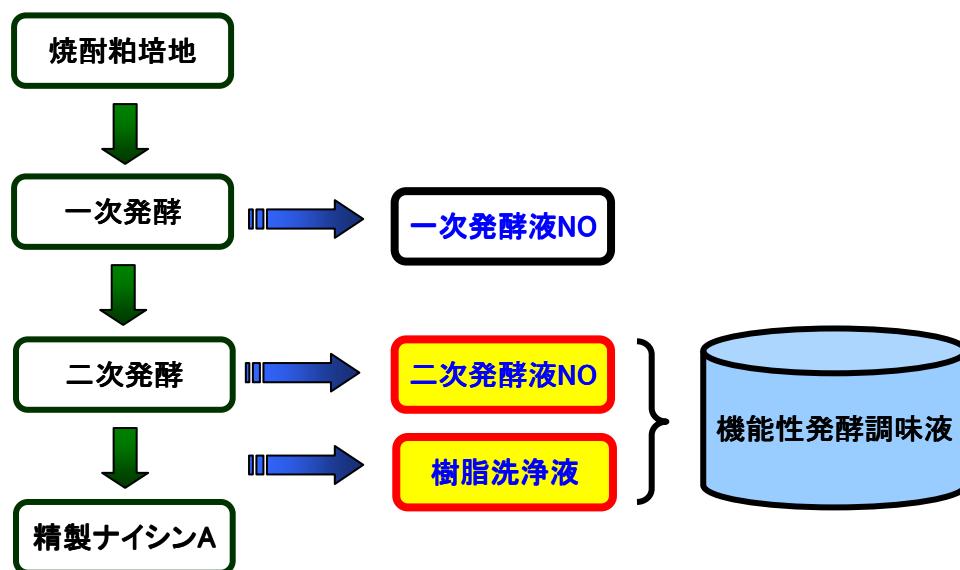


図 9．機能性発酵調味液の配合

ハンドリングや流通、及び機能性の向上を目的とし、粉末化による濃縮を行った（図 10）。

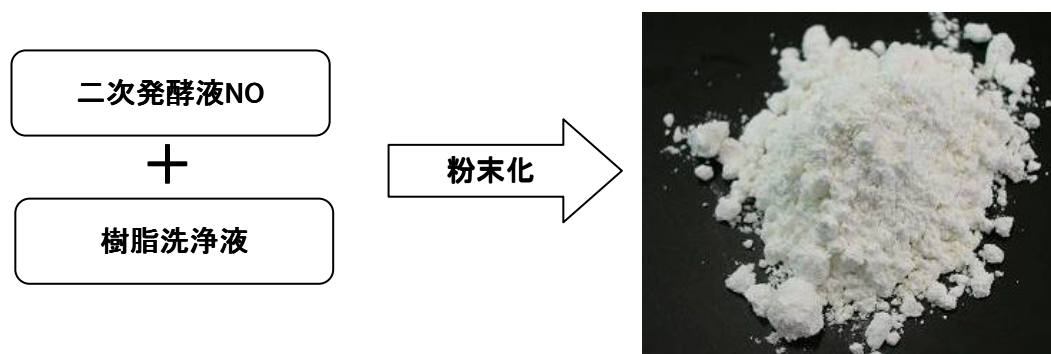


図 10．機能性発酵調味料の粉末化工程

粉末化による機能性向上効果を二次加工試験にて確認した。
炊き込みご飯にて粉末前の原液と粉末品を比較した。

表 3．粉末機能性発酵調味料の効果

サンプル	添加量（％）	呈味効果	味強化
二次発酵液 NO+ 洗浄液	1	◎	◎
粉末品	0.1～0.2	◎	◎

◎：非常に効果が高い、○：効果が高い、△：やや効果がある、×：効果が全く無い

粉末品では原液の 1/5～1/10 の添加量で同等の呈味や味強化の効果が認められた（表 3）。
よって粉末化により機能性効果成分を濃縮する事に成功した。

濃縮した粉末機能性発酵調味料の機能性効果を食材試験にて確認した。

【クリームシチュー】添加量 0～1%（図 1 1）

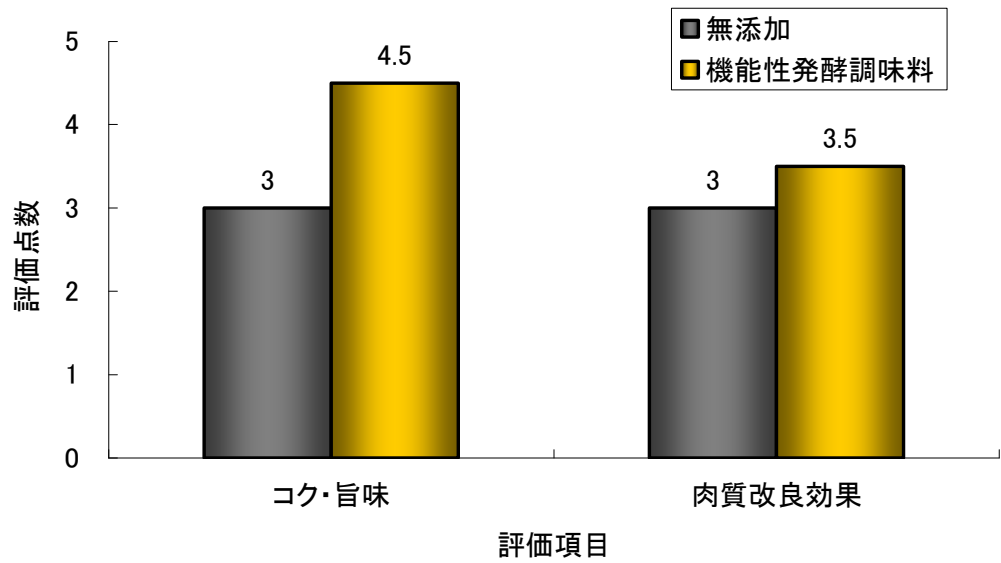


図 1 1 . クリームシチューの官能評価結果

鶏のササミを使ったクリームシチューでは、スープのコクと旨味が向上した。ササミ肉では若干肉質改良効果が認められた。

【結着肉】浸漬液 0～1%（図 1 2）

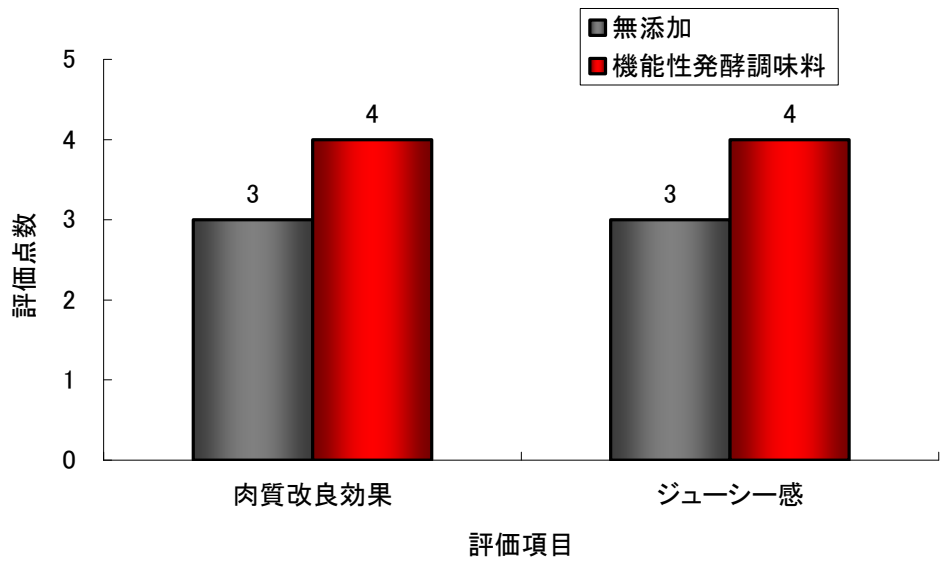


図 1 2 . サイコロステーキの官能評価結果

浸漬後、焼成した結着肉サイコロステーキでは柔らかさとジューシー感が向上した。

【ラーメンスープ】添加量 0～1%（図 13）

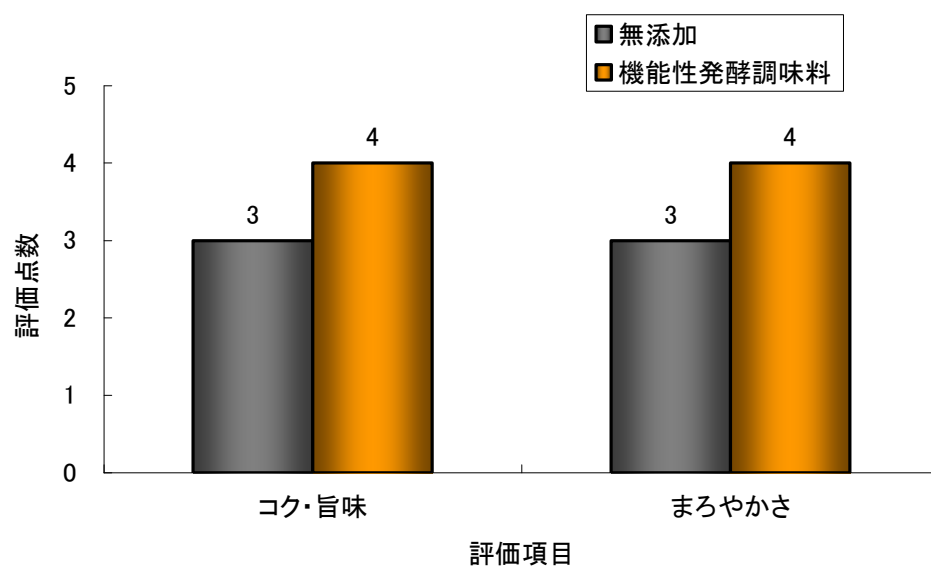


図 13. ラーメンスープの官能評価結果

ラーメンスープではコクと旨味を付与し、また全体をまろやかにする効果が認められた。

4-3-3 今後の課題

二次発酵液 N0 と洗浄液の複合配合により機能性効果が向上した。また、粉末化による濃縮にて機能性効果とハンドリングが向上した。今後の課題としては更なる最適配合の検討を行う。

4-4 保存安定性試験

4-4-1 開発目標

開発した機能性発酵調味料の保存安定性を確認する。液体と粉末品にて保存安定性試験を行った。液体で冷蔵保存（10℃以下）にて6ヶ月を目標とした。

4-4-2 研究成果

二次発酵液 N0 と樹脂洗浄液の混合液を 5、常温、25、36℃で保存し pH を測定した（図 14）。

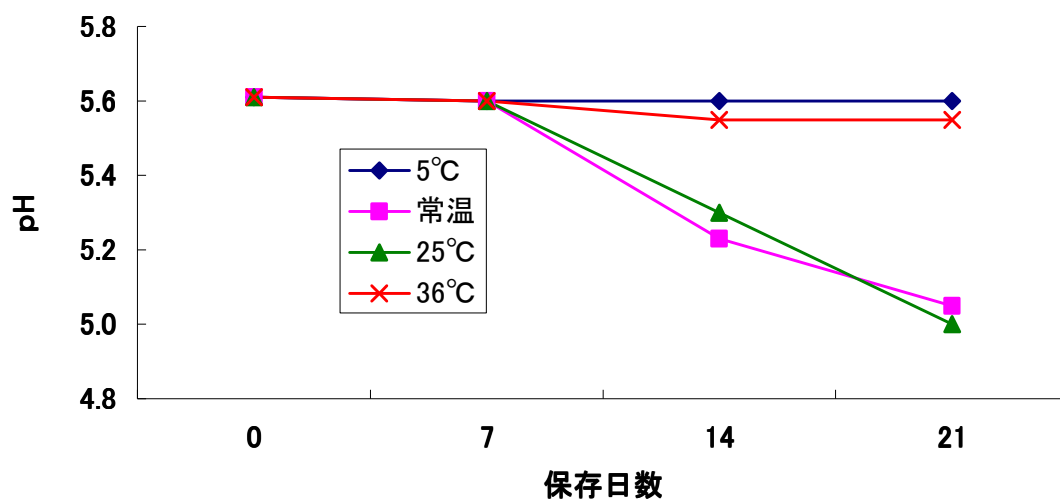


図 14．液体サンプルの pH 経時的変化

21 日間保存では、5℃（冷蔵）と 36℃では変化がなかったが常温と 25℃では pH が低下した。

表 4． 保存 3 週目（D+21）液体サンプル目視検査の結果

検査項目	5℃	常温（15～20℃）	25℃	36℃
目視 （色、にごり、匂い）	問題なし	色問題なし 濁りあり	やや黄色が強い 濁りあり	黄色が強い 濁りなし

二次発酵液 N0 と洗浄液の混合液は、15～25℃では pH の低下に伴い濁りが生じ保存性が悪いことが分かった（表 4）。

表 5. 保存 3 週目 (D+21) 粉末品サンプルの保存試験結果

検査項目	5℃	常温 (15～ 20℃)	25℃	36℃
目視 (色、匂い)	問題なし	問題なし	問題なし	問題なし
食材試験 (マス킹、呈味、肉質 改良)	問題なし	問題なし	問題なし	問題なし

3 週間保存後の粉末品では全ての保存温度において変化は確認されなかった (表 5)。

液体では温度により保存安定性が悪い為、今後は粉末品での保存試験を継続する事とした。

4 - 4 - 3 今後の課題

25℃と 36℃の液体機能性発酵調味料では pH 低下や濁りが確認され安定性が低い事が分かった。濃縮を行った粉末品では 3 週間保存後の段階では全ての温度帯に置いて品質に問題はなかった。今後の課題として 5℃、36℃及び粉末品の保存安定性試験を引き続き行う。

第5章

高生産株および新規抗菌ペプチド生産株 のスクリーニング

第5章 高生産株および新規抗菌ペプチド生産株のスクリーニング

国立大学法人九州大学農学研究院生物機能科学部門 教授 園元 謙二
国立大学法人九州大学農学研究院生物機能科学部門 助教 善藤 威史

5-1 保有ナイシン生産株の選定

5-1-1 開発目標

九州大学で保有する乳酸菌ライブラリーの中から、焼酎粕由来培地でのナイシンA生産に適したナイシンA生産株の選定を行う。1株のナイシンA生産株の選定を目標とした。

5-1-2 研究成果

九州大学大学院農学研究院・微生物工学研究室では、表1に示す3株のナイシンA生産乳酸菌分離株を保有している。また、菌株保存機関からの分譲株として1株を保有している。これらの4株について、焼酎粕由来培地におけるナイシンAの生産性を比較した。

表1. 九州大学大学院農学研究院・微生物工学研究室が保有するナイシンA生産乳酸菌

菌種	菌株	生育至適温度 (°C)
<i>Lactococcus lactis</i>	R1 (九州大学分離株)	30
<i>Lactococcus lactis</i>	R2 (九州大学分離株)	30
<i>Lactococcus lactis</i>	R3 (九州大学分離株)	30
<i>Lactococcus lactis</i>	NCD0 497 (=NBRC 12007)	30

焼酎粕由来培地の組成は、焼酎蒸留粕エキスを(素材B)30%(v/v)、グルコース3%(w/v)、炭酸カルシウム1.3%(w/v)とした。各成分は、オーム乳業(株)よりご恵与いただいた。この焼酎粕由来培地をねじ口試験管に10mLずつ分注し、121°C15分間のオートクレーブ滅菌の後、使用した。対照として、MRS培地をねじ口試験管に5mLずつ分注したものを使用した。

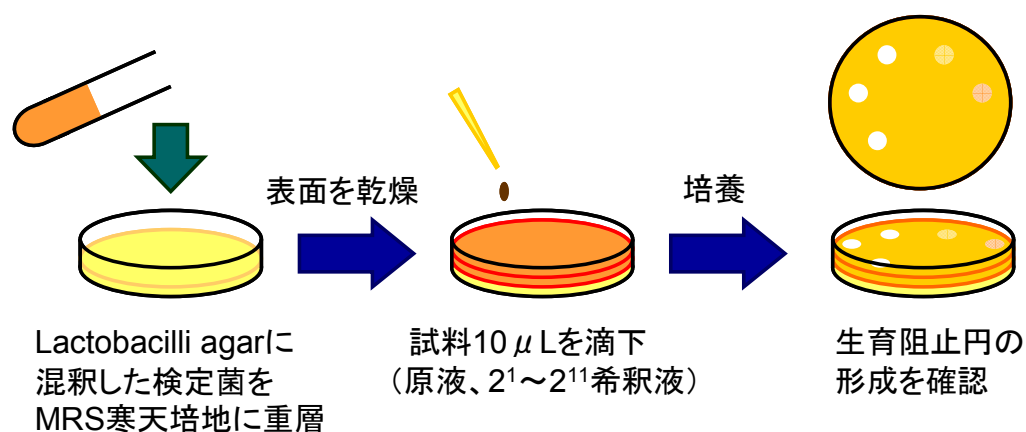


図 1. Spot-on-lawn 法による抗菌活性試験

滅菌水を用いて培養液上清の 2 倍希釈列を調製し、各希釈液を検定菌を接種した寒天平板に滴下し、検定菌の至適培地にて一晚培養した。生育阻止円を形成した最大の希釈倍率を求め、抗菌活性とした。

MRS 培地で培養した各ナisin A 生産株の前培養液を接種量が 1% (v/v) となるように、焼酎粕由来培地と MRS 培地に接種した。30℃にて 100 strokes/min の振とう培養を行い、24 時間後と 48 時間後に培養液をサンプリングした。サンプリングした培養液を遠心分離および滅菌フィルターにて菌体を除去したものを培養液上清試料とした。培養液上清中のナisin A の量を Spot-on-lawn 法（図 1）による抗菌活性として求めた。Spot-on-lawn 法による抗菌活性試験には、表 2 に示す 3 株のナisin 高感受性検定菌を用いた。

表 2. 抗菌活性試験に使用した検定菌

菌種	菌株	略記	生育至適温度 (℃)
<i>Bacillus coagulans</i>	JCM 2257 ^T	<i>B. coa.</i>	30
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	JCM 1157 ^T	<i>Lb. sakei</i>	30
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	JCM 5885	<i>P. pen.</i>	30

まず、対照とした MRS 培地におけるナisin A 生産量の結果を表 3 に示す。ここでは、生育阻止円を形成した最大の希釈倍率を抗菌活性として表しているの、数値が大きいほど抗菌活性が高い、すなわちナisin A の生産量が多いことを示している。MRS 培地においては、48 時間後は、24 時間後に比べて抗菌活性が低下する傾向にあり、ナisin A の分解や生産菌体への吸着が起こっていると推察された。また、分離菌株のナisin A 生産量は NCD0 497 株とほぼ同等で、3 つの分離株の中では R2 株と R3 株の生産量がやや多いことが示唆された。

表 3. MRS 培地におけるナイシン生産量の比較

菌株	培養時間 (時間)	抗菌活性		
		<i>B. coa.</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>P. pen.</i>
R1	24	$>2^{11}$	$>2^{11}$	2^3
	48	2^9	2^{10}	2^2
R2	24	$>2^{11}$	$>2^{11}$	2^4
	48	2^9	$>2^{11}$	2^3
R3	24	$>2^{11}$	$>2^{11}$	2^4
	48	$>2^{11}$	$>2^{11}$	2^3
NCDO 497	24	$>2^{11}$	$>2^{11}$	2^3
	48	2^{10}	$>2^{11}$	2^3

次に、焼酎粕由来培地におけるナイシン A 生産量の結果を表 4 に示す。MRS 培地の場合と異なり、焼酎粕由来培地の場合は 48 時間経過後も抗菌活性が上昇する傾向が認められた。したがって、培養条件や培地組成の改良により、ナイシン A の生産量の改善が期待される。例えば、今回はねじ口試験管を用いたため、通気はできなかったが、通気を行うとナイシン A 生産量が向上する例がある。

試験した 4 つの菌株の中では、焼酎粕由来培地におけるナイシン生産量は R3 株が最大であった。そこで、次の「ナイシン高生産株のスクリーニングにおける変異処理」には、R3 株を用いることとした。また、本研究全体においても、ナイシン A 生産株として R3 株を使用することとした。

表 4. 焼酎粕由来培地におけるナイシン生産量の比較

菌株	培養時間 (時間)	抗菌活性		
		<i>B. coa.</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>P. pen.</i>
R1	24	2^8	2^9	2^1
	48	2^8	2^8	2^1
R2	24	2^8	2^9	2^2
	48	2^9	2^{10}	2^3
R3	24	2^9	2^9	2^2
	48	2^{10}	2^{11}	2^2
NCDO 497	24	2^9	2^9	2^0
	48	2^8	2^8	2^0

5-1-3 今後の課題

焼酎粕由来培地に適したナイシン A 生産株として、九州大学大学院農学研究院・微生物工学研究室において分離された分離株の中から、*Lactococcus lactis* R3 を選定した。今後、自然界からのスクリーニングや育種により、さらに高いナイシン A 生産能をもつ菌株の取得が期待される。

5-2 ナイシン高生産株のスクリーニング

5-2-1 開発目標

種々の分離源からナイシン高生産株のスクリーニングを行う。また、既存のナイシン分離株に種々の選択圧を加えて育種し、ナイシンの高生産化株を取得する。1 株以上のナイシン高生産株の取得を目標とした。

5-2-2 研究成果

種々の分離源から、新たにナイシン A 高生産株の分離を試みたが、ナイシン A 生産株は得られなかった。この方法の詳細については、次の「新規抗菌ペプチド生産株のスクリーニング」で述べる。

次に、ナイシン A 生産株として選定された *L. lactis* R3 株に変異処理を加えて、ナイシン A 高生産株の取得を試みた。R3 株の菌体懸濁液に、無菌箱中の紫外灯を用いて紫外線を照射した。適当な時間が経過した後に懸濁液をサンプリングし、MRS 寒天平板に塗布した。2 日間培養後、生じたコロニー（変異株）の抗菌活性を Direct 法にて調べた。まず、生じた変異株コロニーを釣菌し、新しい MRS 寒天平板に穿刺した。一晚培養後、Spot-on-lawn 法と同様にして、溶解した Lactobacilli Agar AOAC に検定菌 *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885 を接種し、変異株を穿刺培養した MRS 寒天平板に重層した。検定菌の至適温度で一晚培養した後、変異株による阻止円形成の有無を確認し、その直径を計測した。同時に、対照として、紫外線処理をしていない R3 株（親株）についても同様に抗菌活性を調べた。また、必要に応じて、変異株を MRS 培地にて培養した培養液上清の抗菌活性を Spot-on-lawn 法にて調べた。

結果の一例を図 2 に示す。試験した 107 株のうち、18 株がもとの R3 株（親株）よりも大きな阻止円を形成した。これらをナイシン A 高生産候補株とした。

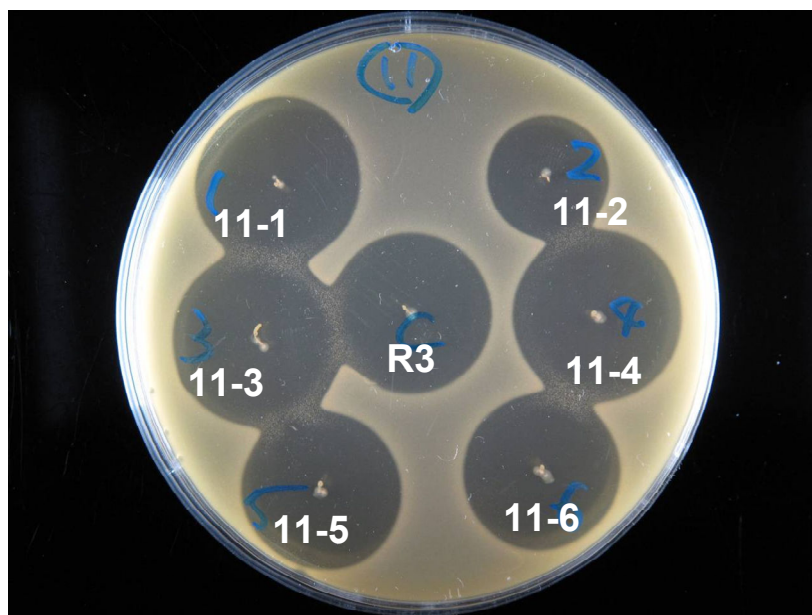


図 2. Direct 法による変異株の抗菌活性試験の一例

変異株コロニーを MRS 寒天平板で穿刺培養し、検定菌 *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885 を重層した。中心に穿刺したもとの R3 株（親株）が形成した阻止円の直径と、周りに穿刺した変異株の阻止円の直径を比較した。ここでは、11-1 株、11-3 株、11-4 株は、R3 株よりも顕著に大きな阻止円を形成した。

5-2-3 今後の課題

L. lactis R3 株に紫外線処理を施すことによって、18 株のナイシン A 高生産候補株を得ることができた。今後、Spot-on-lawn 法や HPLC など、ナイシン A 生産量をさらに詳細に検討するとともに、焼酎粕由来培地でのナイシン A 生産の検証が必要である。また、再度の紫外線処理やナイシン耐性能の強化によって、さらにナイシン A 生産能の向上を図ることも必要であろう。

5-3 新規抗菌ペプチド生産株のスクリーニング

5-3-1 開発目標

種々の分離源から新規抗菌ペプチド生産株のスクリーニングを行う。抗菌スペクトル等によって簡易的に判定し、新規抗菌ペプチド生産候補株を取得する。新規性が高いと判断されるものについては、精製・構造解析を試みる。1 種以上の新規抗菌ペプチド生産株の取得を目標とした。

5-3-2 研究成果

我々はこれまでに、多種多様な乳酸菌バクテリオシンの獲得を目的として、未開拓の分離源から新規バクテリオシン生産乳酸菌の探索を行ってきた。乳酸菌というと、まず乳製品が連想されるが、実際には乳酸菌は環境中に広く生息しており、動植物を問わず有機物の存在するところには何らかの乳酸菌が生息している可能性がある。未開拓の分離源からは新たな乳酸菌の分離、さらには新規抗菌ペプチド生産乳酸菌の分離が期待される。そこで、身近に入手できる様々な分離源から、新規抗菌ペプチド生産株のスクリーニングを試みた。

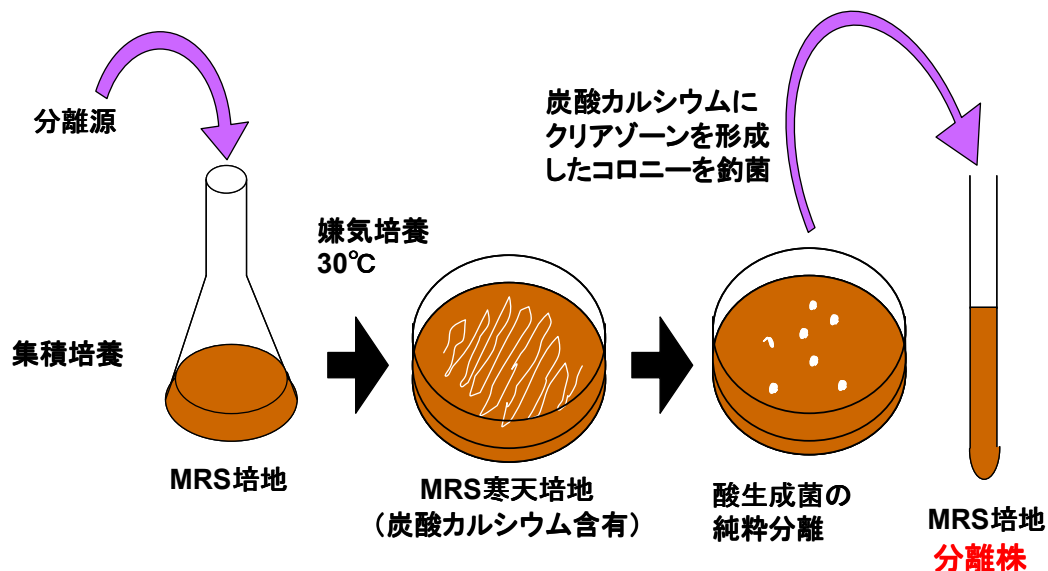
今回用いた分離源を表 5 に、分離方法を図 3 に示した。ぬか床やキムチなどの発酵食品、花や果実などの植物体をはじめとする種々の分離源から乳酸菌の分離を行った。乳酸菌用の MRS 培地で集積培養を行い、嫌気条件下で生育した有機酸生成菌株を純粋分離し、分離株を得た。分離株のうち、カタラーゼ活性陰性のものを乳酸菌と見なした。

表 5. 新規抗菌ペプチド生産株のスクリーニングに用いた分離源

発酵食品	植物体	その他
ぬか床 1~4	クリ（実とイガ）	ダンゴ虫
みそ 1~3	木の花	池の泥
粕漬	腐った落ち葉 1・2	池の水
へしこ	草の実	
デンジャン	腐りかけの木	
ゴチュジャン	落ち葉	
キムチ（5 種）	腐りかけのまつぼっくり	
高菜漬	ミカン	
	リンゴ	
	ラフランス	

図 3. 乳酸菌の分離方法

MRS 培地で集積培養を行い、炭酸カルシウム含有 MRS 寒天培地に嫌気条件下で生育した有機酸生成菌株を純粋分離し、分離株とした。得られた分離株について、Direct 法と Spot-on-lawn 法による抗菌活性試験を行い、バクテリオシン活性を調べた。また、分離株のうち、カタラーゼ活性陰性のものを乳酸菌と見なした。



分離株について、Direct 法および Spot-on-lawn 法によって抗菌活性試験を行い、バクテリオシン活性を調べた。バクテリオシン生産が確認された分離株については、さらに培養液上清試料の 2 倍希釈列の抗菌活性を調べることで、各検定菌に対する抗菌活性の強度を調べた。得られた結果を既報の代表的なバクテリオシンの抗菌スペクトルと比較することで、分離株が生産するバクテリオシンの新規性を評価した。今回は、上記で用いた 3 株の検定菌にさらに 3 株を加えた、計 6 株の検定菌に対する抗菌スペクトルを調べた。なお、これまでの研究により、これら 6 株に対する抗菌スペクトルを調べることで、バクテリオシンの大まかな分類および新規性の判定が可能であることがわかっている。また、培養液上清を液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) で分析し、バクテリオシンの分子量の決定を試み、分子量によって新規性を評価した。さらに、新規抗菌ペプチド生産株について、16S rDNA の配列解析等による菌種の同定を試みた。必要に応じて、新規抗菌ペプチド生産株の DNA 配列解析による既報バクテリオシンの検出を試みた。

種々の分離源から乳酸菌の分離を行った結果、計 37 種の分離源から、108 株の分離株が得られた。108 株の分離株について、Direct 法および Spot-on-lawn 法による抗菌活性試験を行った結果、腐りかけの木から分離された No.9 株と高菜漬けから分離された MB1-4 株の計 2 株がバクテリオシン様の抗菌活性を示した。この 2 株の分離株について、培養液上清試料の 2 倍希釈列の抗菌活性を調べた結果を表 6 に示す。対照として、ナイ

シンの抗菌スペクトルと、ナイシンに次いで代表的なバクテリオシンであるクラス IIa バクテリオシンの抗菌スペクトルも併せて表 6 に示した。

表 6. Spot-on-lawn 法による分離株 (No. 9 と MB1-4) の抗菌スペクトル

検定菌	抗菌活性			
	No. 9	MB1-4	ナイシン	クラス IIa
<i>Micrococcus luteus</i> IFO 12708	–	–	2 ⁵	–
<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 ^T	2 ⁵	2 ²	2 ⁸	–
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	2 ⁵	–	2 ¹¹	2 ¹¹
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	–	–	2 ⁴	2 ⁹
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885	2 ¹	+	2 ⁵	2 ⁴
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435 ^T	2 ²	–	2 ⁴	–

–, 活性なし; +, Direct 法では微弱な活性あり

No. 9 株および MB1-4 株は、ナイシンやクラス IIa バクテリオシンとは異なる抗菌スペクトルを示したことから、新規性が高いと考えられた。No. 9 株の培養液上清は、検定菌 6 株のうち、*M. luteus* と *E. faecalis* には抗菌活性がなく、他の 4 つの検定菌に対しては抗菌活性を示した。このような抗菌スペクトルのパターンはこれまでに例が少なく、非常に新規性が高いと考えられた。一方、MB1-4 株の培養液上清は、*B. coagulans* にのみ顕著な抗菌活性を示し、*P. pentosaceus* に対しては微弱な抗菌活性を示した。このような抗菌スペクトルのパターンも珍しく、新規性が高いと考えられた。両株の培養液上清を LC/MS にて分析したが、両株が生産する抗菌物質の同定や分子量の決定には至らなかった。No. 9 株と MB1-4 株は、16S rDNA 配列解析等により、それぞれ、乳酸菌 *Lactococcus* 属および *Weissella* 属に分類されることが予想された。また、No. 9 株および MB1-4 株の DNA 配列解析では現在までのところ、既報のバクテリオシンは検出されず、この結果からも両株の生産するバクテリオシンは新規性が高いことが予想された。

No. 9 株は、九州大学構内の腐りかけの木（切り株）から分離された。乳酸菌が直接木を分解しているとは考えられないため、他の真菌類が木を分解し（腐らせ）、乳酸菌が資化できる糖源を供給していたと予想される。一方、MB1-4 株は高菜漬けから分離された。高菜漬けは、多量の塩分を添加して作られるが、乳酸菌による乳酸発酵も同時に進行し、高菜漬けの保存性を高め、酸味を付与している。高菜漬けの保存効果は、添加される多量の塩分によるところが大きいですが、多量の塩分の摂取は我々の健康を害する恐れがある。しかし、塩分を低減すると、雑菌汚染のリスクが高まることになる。そこで、高菜漬けにもともと存在する乳酸菌から、MB1-4 株のようにバクテリオシン生産能をもつ菌株を選抜し、抗菌性スターターとして用いれば、高菜漬けの低塩化と保存効果の維持が同時に達成できる可能性がある。

5-3-3 今後の課題

分離した 108 株から、No. 9 株および MB1-4 株の計 2 株のバクテリオシン様抗菌物質生産株を取得した。両株の培養液上清が示す抗菌スペクトルは、ナイシンやクラス IIa のものとは類似しておらず、新規性が高いバクテリオシンによるものと考えられた。両株が高い抗菌活性を示した検定菌 *B. coagulans* や *Lb. sakei* は、一般にバクテリオシンに対する感受性が高いことから、培養条件等の最適化によるバクテリオシン生産量の増加に伴い、今回は活性がなかった検定菌に対しても、抗菌活性を示す可能性がある。MB1-4 株については、抗菌活性があまり強くなく、バクテリオシン生産量が精製・構造解析には十分ではないと考えられることから、培養条件の検討が必須である。

今後は、今回見出された両株のバクテリオシンの精製を行い、質量分析やアミノ酸配列解析によって、それらの構造決定を試みる。また、生産菌である No. 9 株および MB1-4 株の菌種の同定を行う。生産されるバクテリオシンの種類は、生産菌の菌種によってかなり限定されており、生産菌の菌種はバクテリオシンの新規性を判断する上で重要である。また、上記で用いた 6 株以外の検定菌を用いた抗菌スペクトルや、バクテリオシンの安定性など、今後の応用に向けて重要な特性についても検討を行う。また、焼酎粕由来培地でのバクテリオシン生産を検討し、ナイシン A 生産と同様のプロセスを適用できるかどうかを検討する必要もあろう。

今回は 2 株の新規バクテリオシン様抗菌物質生産株を取得することができたが、ナイシン A 生産株を自然界から新たに分離することは出来なかった。これまでの経験上、日本には、ナイシン A 生産株はあまり存在しておらず、水環境から稀に分離されるナイシン Q 生産株を除いては、ナイシン Z 生産株が多く生息していると考えられる。分離源や分離の際の選択圧をうまく選定することで、ナイシン A 高生産菌の分離が期待される。

第 6 章

全 体 総 括

第6章 全体総括

総括研究代表者 農 新介

副総括研究代表者 大熊 浩

6-1 全体総括

本研究開発により、次のような成果を得ることができた。

1. 乳酸菌について

- 1) 焼酎粕由来培地での生産性に優れたナイシンA生産菌を選定
- 2) 選定したナイシンA生産菌をさらに紫外線照射を施すことで、ナイシンA高生産候補株を複数取得することに成功
- 3) 種々の分離源から新規性の高いバクテリオシン様抗菌物質生産株を2株分離

2. 焼酎粕由来培地について

- 1) 連続二段階発酵において、ナイシンA生産性が2,000IU/mL以上可能な焼酎粕由来培地を開発
- 2) 焼酎粕由来の着色成分を極めて抑えた着色の少ない焼酎粕由来培地を開発

3. ナイシンA抽出液（抽出液NA）について

- 1) ナイシンA含有発酵液（発酵液NA）から、樹脂を用いた分離精製法を利用し、ナイシンAの抽出と機能性発酵液の同時生産に成功
- 2) 抽出液NAは、市販のナイシンA製剤（食品添加物）より精製度（純度）に優れ、試薬ナイシンと同等であった
- 3) 抽出液NAは、高温安定性と抗菌活性の持続性、溶解性においても優れていた
- 4) 抽出液NAは、急性毒性はなく“無毒”で、かつ皮膚に対しても“無刺激”

4. 発酵分離液（発酵液NO）について

- 1) 発酵液NOは、マスキング、呈味や肉質改良効果を示した
- 2) 発酵液NOに樹脂洗浄液（有機物リッチ成分）を組み合わせた機能性発酵調味液を開発（相加効果あり）
- 3) 機能性発酵調味液の粉末化による濃縮を行うことで、さらなるハンドリングや機能性効果を向上させた

以上の研究成果より、優れた乳酸菌利用による有用物質（ナイシンA）の高生産化と食品廃棄物（焼酎粕）利用による培地コスト削減を成功させることができた。さらに、これらの資源を活用し、連続発酵と樹脂分離を組み合わせた、新規二段階乳酸菌発酵・精製法の開発にも成功した。この新規製法では、高純度ナイシンAと機能性発酵調味液を同時生産することができ、発酵残渣がほとんど出ない環境調和型の生産プロセスを可能とした。

6-2 今後の予定

今回は、新規二段階乳酸菌発酵・精製法を開発し、高純度ナイシンAと機能性発酵調味液を同時生産することに成功した。しかし、研究委託期間内では、小スケールの基礎技術の確立までしか検討できていないため、まずはスケールアップを行い、プロセスの基礎技術の検証、および生産物（高純度ナイシンAと機能性発酵調味液）の品質精度を向上させる。さらに、生産物（高純度ナイシンA：抽出液NA）は、高い安全性、優れた抗菌活性、製剤化に必要な液状安定性を有するため、その特徴を活かせる市場（サニタリー分野、ヘルスケア分野）向けの商品（アルコール製剤、マウスウォッシュ等）開発を行っていく。一方、生産物（機能性発酵調味液：発酵液NO）は、優れたマスキング、呈味、肉質改良効果を同時に示すことのできるユニークな素材であるため、その特徴を活かせる食品市場向けの商品（魚醤、発酵調味料、肉質改良剤等）開発を行っていく。

6-3 目標に対する成果

本研究では、従来の乳酸菌発酵・精製法（ナイシン等）の4つの課題に対する目標を設定しており、以下に目標と成果を述べる。

★可食原料から作られるためコストが高い

2つのコスト低減の成果が得られた。1つは、有用物質（ナイシンA）の生産性の高い乳酸菌を選定し、生産効率を高めたこと。もう1つは、食品廃棄物（焼酎粕）を乳酸菌の生育培地として利用し、培地コストを低減したことである。

★低純度、高食塩濃度なため応用範囲が限られる

★水溶液で不安定

★食塩濃度の高い発酵残渣が廃棄され環境汚染となる

これらの課題に対して、新規二段階乳酸菌発酵・精製法を開発したことにより成果が得られた。まずは、ナイシンAの精製において、食塩を全く使用せずに、樹脂を利用した分離精製技術を取り入れたため、ナイシンAの高純度化と食塩フリーの両立を可能とした。高純度ナイシンAは、夾雑物が少ないため、ナイシンAの保存安定性を高め、さらに安全性も高いことが実証された。もう一方の分離残渣として発生する機能性発酵液も食塩は少なく、マスキング、呈味、肉質改良効果を有するユニークな素材であることが確認された。

以上の結果より、新規製法により生産される素材は、性能・品質に優れ、応用範囲を広げることができる。さらに、新規製法は、生産プロセス中に発生する廃棄残渣をほとんど出さないことから環境汚染の心配もなくなり、地球環境への貢献は、今後ますます増えていくと思われる。

平成 2 1 年度 戦略的基盤技術高度化支援事業
新規二段階乳酸菌発酵・精製法の開発

研究開発成果等報告書

平成 2 2 年 7 月

委託者 九州経済産業局
〒812-8546 福岡市博多区博多駅東2-11-1

委託先 財団法人 福岡県産業・科学技術振興財団
〒810-0001 福岡市中央区天神1-1-1アクロス福岡西オフィス9F
TEL 092-725-2781 FAX 092-725-2786