

平成23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・精製法を利用した微生物制御剤等の開発」

研究開発成果等報告書

平成24年 3月

委託者 九州経済産業局

委託先 財団法人福岡県産業・科学技術振興財団

## 目次

### 第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	2
1-2 研究体制	4
1-3 成果概要	7
1-4 当該研究開発の連絡窓口	8

### 第2章 本論

① 新規二段階乳酸菌発酵・精製法（新規製法）の確立	9
② ナイシン A 抽出液に関する検討	11
③ 機能性発酵調味液の開発	17
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	20

最終章 全体総括	23
----------	----

## 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

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（ナイシン）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「ナイシン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より、天然の抗菌物質として注目されている。国内では、数社が「ナイシンまたはナイシン製剤」として販売しているが、すべて海外輸入製品である。その相場価格は、4万円/kg以上と高く、広く普及させるための障害となっている。また、既存ナイシン製剤の製法技術においても、大量の食塩を使用する塩析手法を用いているため、ナイシン以外の他物質も混在した、低純度ナイシン（高塩濃度）と、高塩濃度の発酵残渣が同時に発生する。ともに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イシンの応用が食品分野のみに限定されてしまっている。

食品業界では、生鮮食品や過度の殺菌処理を行えない非加熱食品の保存性という大きな問題がある。特に耐熱芽胞菌は、ほとんどの薬剤が効きにくいだけでなく、消毒剤で代表的なアルコール製剤でも全く効かない有害微生物で、製造ラインや製品中で生き残り、品質・風味劣化を引き起こし、その結果、品質事故（例：レトルト食品等の膨張、生めん等の表面のヌメリなど）という多大なる被害を及ぼす。この耐熱芽胞菌の制御剤として、次亜塩素酸ナトリウムが頻繁に使用されているが、次亜塩素酸ナトリウムは、食品素材の鮮度、風味を劣化するだけでなく、生産設備の金属腐食をも引き起こしてしまう欠点を持っており、素材に優しい代替品の開発が強く望まれている。

化粧品業界では、以前より製品の保存性を高める防腐剤として、万能のパラベンを使用している。しかし、パラベンには、発がん性、皮膚刺激、毒性の疑いがあり、安全性の面で一般的に嫌悪されている。そのため、様々なパラベン代替品の研究開発が行われているが、未だパラベン以上の性能を有するものはない状況である。その中で注目されている物質として、合成により作られるアルカンジオールが存在するが、天然志向の製品、消費者には不向きであるという欠点がある。このような理由により、天然素材の防腐剤の開発が強く望まれている。

このような背景の中、一昨年度より、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、有用な微生物ライブ

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（ナイシン）の製法（発酵・分離技術および廃棄物削減）の研究を行った。その結果、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」を開発し、高純度のナイシン A と発酵調味液を、廃棄物を出さずに生産することを小スケールにて確認した。本事業では、新規製法のスケールアップを行い、最終的に 1 t 以上の実生産スケールの生産体制を確立する。

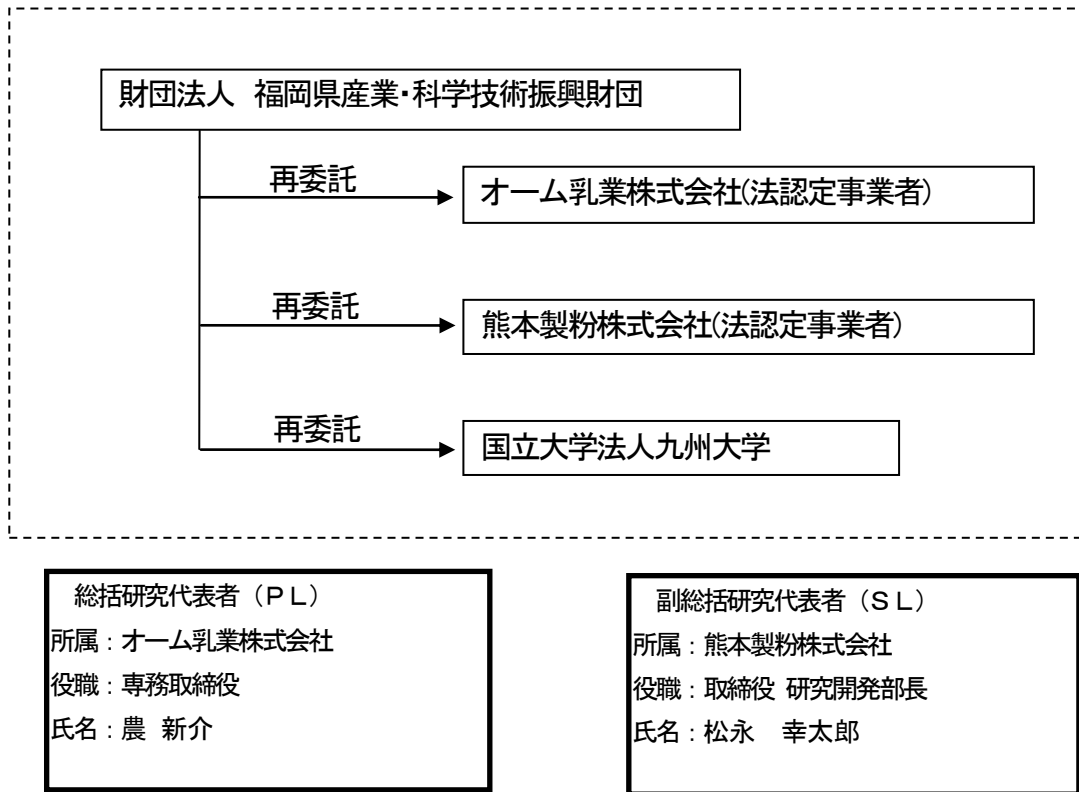
一方、新規製法で生産される発酵調味液に関しては、様々な遊離アミノ酸、ペプチド等の存在が確認されており、マスキング効果、呈味、肉質改良効果などの機能性を示した。市販の製品は、1 製品 1 機能というものが多い中、我々の発酵調味液は、多様な機能性を兼ね備えている。

本研究では、“ものづくり（発酵産物）”と“廃棄物削減”を両立した、ユニークな環境調和型生産プロセス技術を実現させ、“低コスト”かつ、多様な商品を提供することができる。特に、安全・安心な抗菌物質である「ナイシン」を利用した天然抗菌剤や微生物制御剤等を開発することで、ヒト、食品、製品に対して優しく、危害、品質劣化を引き起こす、有害な微生物（芽胞菌等）のコントロールが可能となる。さらに、使用する主原料は、九州産の焼酎粕原料と明確なものであり、それから作られた食品保存料や機能性発酵調味液など、消費者に対して、安全・安心な素材として提供することができる。

## 1-2 研究体制

### (1) 研究組織及び管理体制

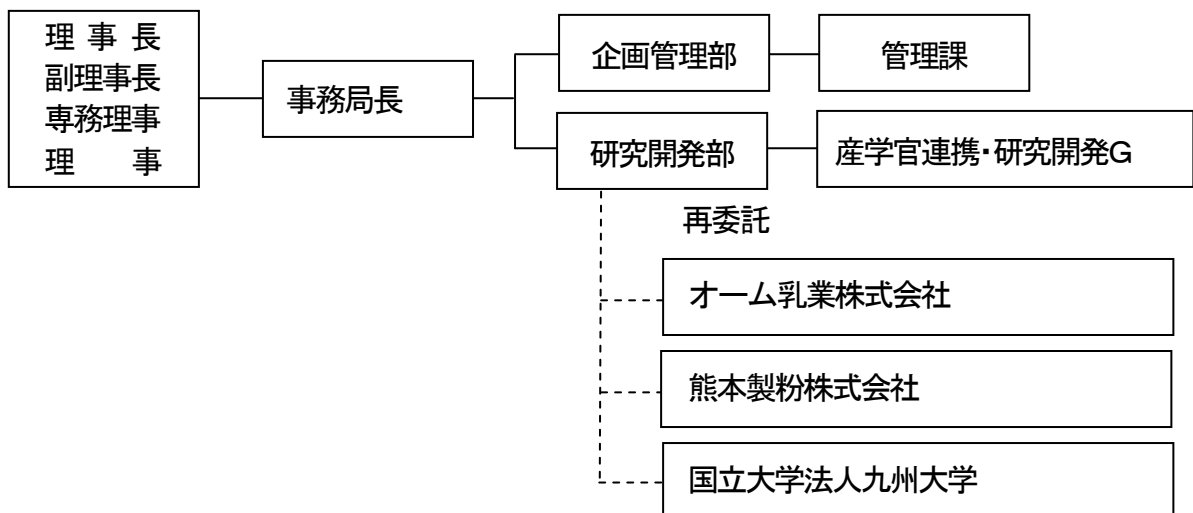
#### 1) 研究組織(全体)



#### 2) 管理体制

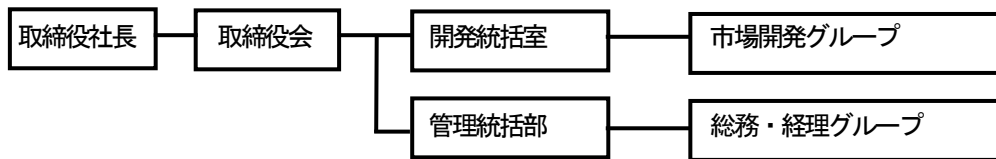
##### ① 事業管理者

財団法人福岡県産業・科学技術振興財団

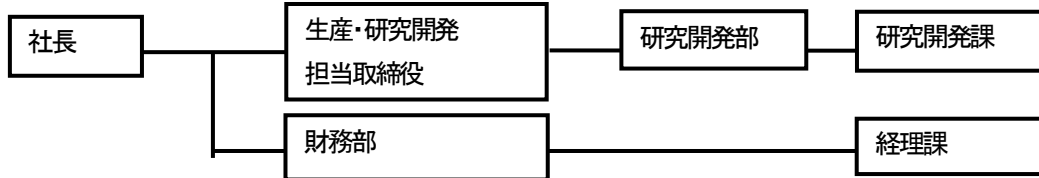


②(再委託先)

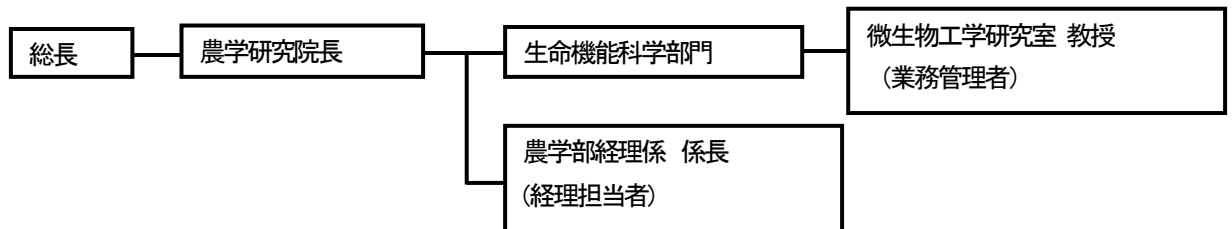
オーム乳業株式会社



熊本製粉株式会社



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
中村 裕章	研究開発部 部長
中村 憲和	研究開発部 主幹
河口 千弘	研究開発部 主幹
堂ノ脇 靖巳	研究開発部 副主幹
内野 正和	研究開発部 専門研究員
石川 正洋	研究開発部 主任主事
江田 智子	研究開発部 サブマネージャー
松尾 朱三江	研究開発部 サブマネージャー
小村 和彦	企画管理部 管理課長
平田 学	企画管理部 事務主査
舩添 史和	企画管理部 主任主事

【再委託先】※研究員のみ

オーム乳業株式会社

氏名	所属・役職
農 新介	専務取締役
永利 浩平	開発統括室
古賀 祥子	開発統括室

熊本製粉株式会社

氏名	所属・役職
松永 幸太郎	取締役 研究開発部 部長
林 いずみ	研究開発部
神山 清人	研究開発部
石崎 清加	研究開発部

国立大学法人九州大学

氏名	所属・役職
園元 謙二	農学研究院 生命機能科学部門 教授
善藤 威史	農学研究院 生命機能科学部門 助教

(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 小村 和彦  
 (業務管理者) 研究開発部 部長 中村 裕章

(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) 取締役 研究開発部 部長 松永 幸太郎

国立大学法人 九州大学

(経理担当者) 農学部経理係 係長 志谷 直樹  
 (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
古田 吉史	三和酒類株式会社 環境技術部 拝田グリーンバイオ事業所 フロンティア研究室 室長	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 開発統括室	
古賀 祥子	オーム乳業株式会社 開発統括室	
松永 幸太郎	熊本製粉株式会社 取締役 研究開発部 部長	SL
林 いずみ	熊本製粉株式会社 研究開発部	
神山 清人	熊本製粉株式会社 研究開発部	
石崎 清加	熊本製粉株式会社 研究開発部	
園元 謙二	国立大学法人九州大学 農学研究院 生命機能科学部門 教授	
善藤 威史	国立大学法人九州大学 農学研究院 生命機能科学部門 助教	
中村 裕章	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 新規二段階乳酸菌発酵・精製法（新規製法）の確立

【発酵】一次発酵液からナイシン A を取り除いた残りの一次発酵液 NO の配合量と二次発酵に必要な窒素源（焼酎粕）の補充量を最適化することにより、ナイシン A 生産性が高まった。この発酵条件の実生産スケール（1～2t）における検討を行った。発酵タンク内の温度バラツキを少なく徹底管理することにより、生産性は安定化した。最終的には目標値 2,400 U/ml を十分に達成することができた。

【分離精製】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、2種類の分離方法の検討を行った。一つは、溶剤を必要とする従来分離法で、もう一つは、無機膜（分画分子量の異なる 2 種類）を用いた分離法である。各方法において、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 69%以上の目標値を達成することができた。



## ② ナイシンA抽出液に関する検討

【性能評価】実生産スケールで試作した抽出液 NA の性能評価（精製度、安定性、抗菌性、溶解性）を行った。結果は、すべての項目で競合品以上の性能を示すことができた。最終的に本年度目標値に対しても達成し、実生産スケールでの抽出液 NA の生産は、特に問題はないと思われる。

【安全性評価】実生産スケールで試作した抽出液 NA について、化粧品原料ガイドラインに準じた安全性試験を外部評価機関にて行った。口腔粘膜等の刺激試験では抽出液 NA は全く無刺激であることが証明され、抽出液 NA の安全性を確認した。

以上の結果をもとに、優れた機能性を示した抽出液 NA を利用した微生物制御剤の開発を行った。開発した製剤は、本来ナイシン単独では効果のないグラム陰性菌の大腸菌に対しても優れた抗菌活性を示した。最終的には、幅広い分野で使用できる製剤として2種類開発した。

## ③ 機能性発酵調味液の開発

ナイシンA抽出後の発酵液を機能性発酵調味料として活用するために、評価を行った。二次加工試験にて畜肉や魚肉に添加することで甘味の向上、マスキング効果、肉質軟化の効果があることが確認された。特に魚肉に対するマスキング効果が高かった。GC-MS を用いてトリメチルアミンに対する効果を確かめたところ、トリメチルアミンが65%減少した。また、HPLCによりグルタミン酸（旨味成分）とプロリン（甘味成分）が多く含まれていた。これより、魚肉のマスキング剤というコンセプトを確立した。既存品と比べても保存性に優れていることや、アレルギー表示が不要といった優位性も確認できた。

生産規模が大きくなることで、品質の差異が現れることが危惧されたが、スケールアップの試作においても品質の変化は認められなかった。

## 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

乳酸菌の効率的なスクリーニング法、および抗菌活性試験法（Direct 法、Spot-on-lawn 法、比濁法）を構築した。Direct 法や Spot-on-lawn 法により、新たに得られた分離株および研究室保有株から、6 株の抗細菌活性株（バクテリオシン様抗菌物質生産株）を見いだした。うち4株はLC/MS分析により、ナイシンZを生産することが明らかとなった。一方、残りの2株が生産する抗菌ペプチドは、LC/MS や抗菌スペクトルの解析結果から新規性が高いと考えられた。そのうちの1株の培養液上清より、硫安沈殿、陽イオン交換クロマトグラフィー、逆相 HPLC によって複数のバクテリオシンを精製した。質量分析などにより、4種の構造を決定し、新規性が高いバクテリオシンも複数見いだされた。また、Direct 法、比濁法を用いてスクリーニングを行い、14 株の抗真菌活性株を得た。そのうちの2株は、抗細菌物質であるバクテリオシンとともに、何らかの抗真菌活性物質を菌体外に生産していた。

### 1-4 当該研究開発の連絡窓口

財団法人 福岡県産業・科学技術振興財団 研究開発部  
tel 092-725-2781 fax 092-725-2786 E-mail; ken@ist.or.jp

## 第2章 本論

### ① 新規二段階乳酸菌発酵・精製法（新規製法）の確立

#### ①-1 一次発酵の検討

焼酎粕由来培地での一次発酵性試験を行った。テーブルでの発酵性試験にて培地組成を決定した後、工場（1 t）スケールでの試作を行った。その結果を図1に示した。図1より、1回目の試作では、ナイシン A 生産性は、2,218 U/ml となりテーブルで行った時よりも低いナイシン A 生産性であった。この原因について検討を行った結果、スターターとして用いる乳酸菌の継代培養を繰り返すとナイシン A の生産性が低くなる傾向が認められた。そこで、発酵に用いる乳酸菌スターターの活性が一定になるよう前培養条件（温度、時間、攪拌など）を検討し、最適化した結果、ナイシン A の生産性が向上することがテーブル試作にて確認された。その後、工場スケール試作を 3 回行い、安定してナイシン A 生産性 3,000 U/ml 以上を製造できるようになった（目標値達成）。

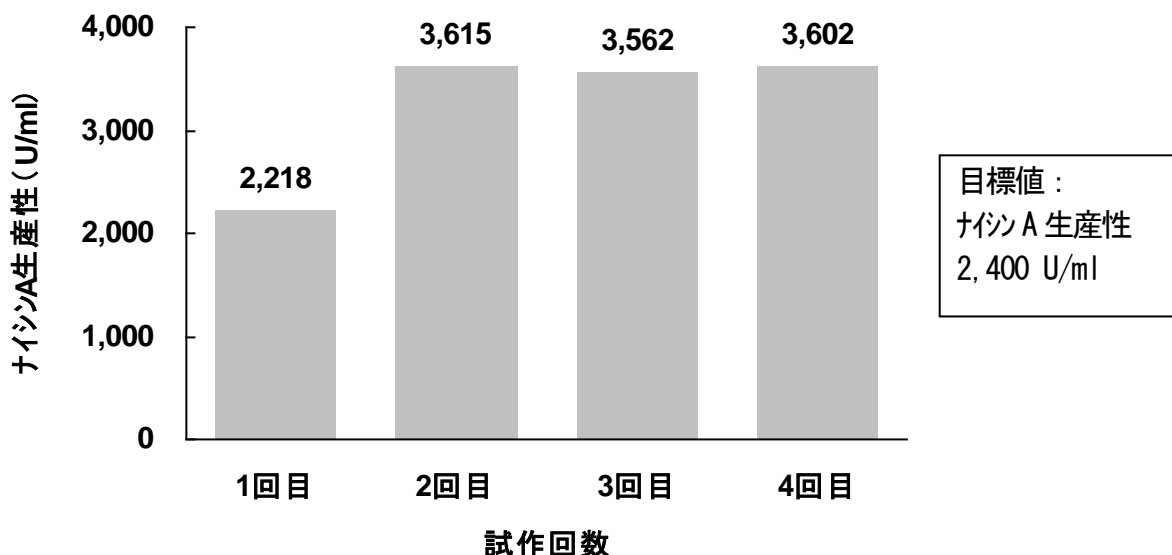


図1. 工場スケールにおけるナイシン A の一次発酵性試験

#### ①-2 二次発酵の検討

一次発酵液からナイシン A を取り除いた後の残りの一次発酵液 NO を、二次発酵では利用する。そこで、一次発酵液 NO の配合量（0～80%）を変えた二次発酵用培地の発酵試験を行った。その結果を図2に示した。図2より、一次発酵液 NO の配合量が多いほど、ナイシン A 生産性が低くなった。これは、一次発酵液 NO 中に含まれる乳酸によるものである。64%以上配合した場合、培地中に含まれる乳酸濃度が高くなり、ナイシン A 生産菌の生育が阻害され、その結果、ナイシン A 生産性も低下した。最終目標値 2,400 U/ml を達成するための一次発酵液 NO の配合量としては、50%であった（目標値達成）。

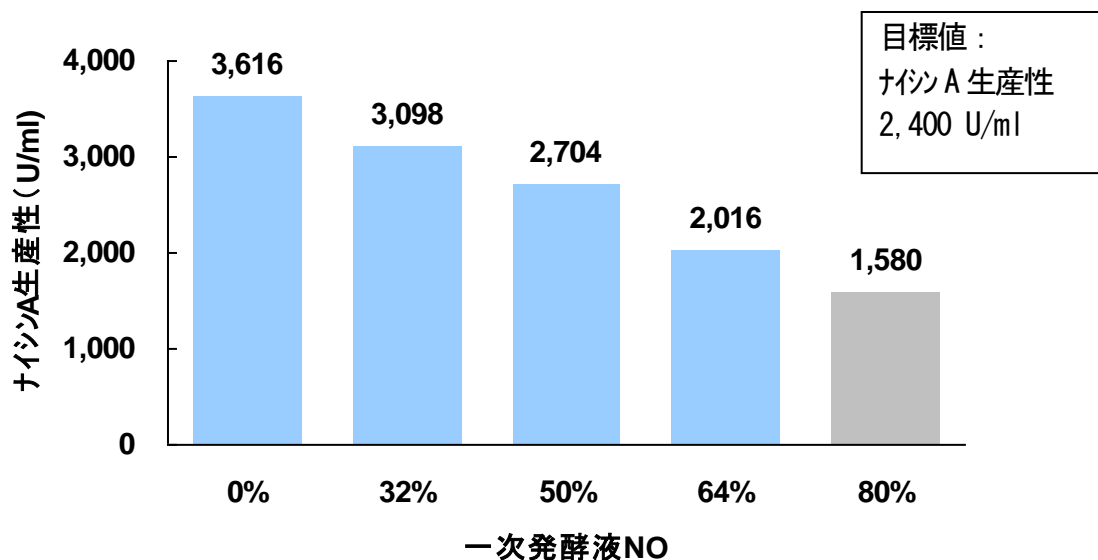


図2. 二次発酵における一次発酵液NOの配合量の検討

### ①-3 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

ナイシンA含有発酵液と溶剤を必要とする樹脂を用いた分離精製の検討を工場スケールで行った。本年度は、工場試作を5回行い、その結果を図3に示した。図3より、1回目の工場試作では、回収率は75%と高かったものの分離が悪く、精製度（純度）が低くなってしまった。その原因は、樹脂中に一緒に吸着したナイシンA以外の夾雑物の洗浄（除去）が不足していたためと考えられる。2回目の工場試作では、洗浄処理で不備があり、大きなロスが発生し、ナイシンA回収率は、32%と低くなった。この2回の試作の失敗により、さらなる分離条件の最適化を行った。その結果、洗浄ロスは低減し、精製度の高いナイシンA抽出液を80%以上回収することができた（目標値達成）。

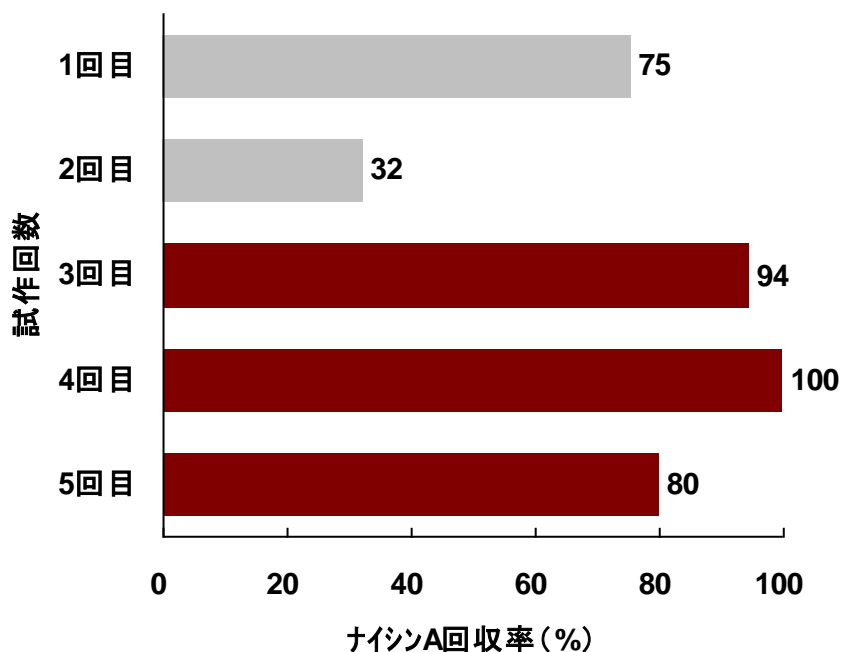


図3. 工場スケールにおけるナイシンAの分離精製の検討

次に、ナイシン A の無機膜分離試験を行った。本試験では、最初にナイシン A 含有発酵液を分画分子量 20,000 の 20nm の膜を透過させ、高分子物質の除去を行った。得られた透過液を、分画分子量 1,000 の 5nm の膜で処理し、濃縮液に蓄積するナイシン A を回収した。その結果を図 4 に示した。図 4 より、20nm の膜では、99%が膜を透過した。得られた透過液は、さらに、5nm の膜で処理した結果、透過液に 14%ロスが見られたものの、濃縮液で 78%のナイシン A を回収することができた（目標値達成）。

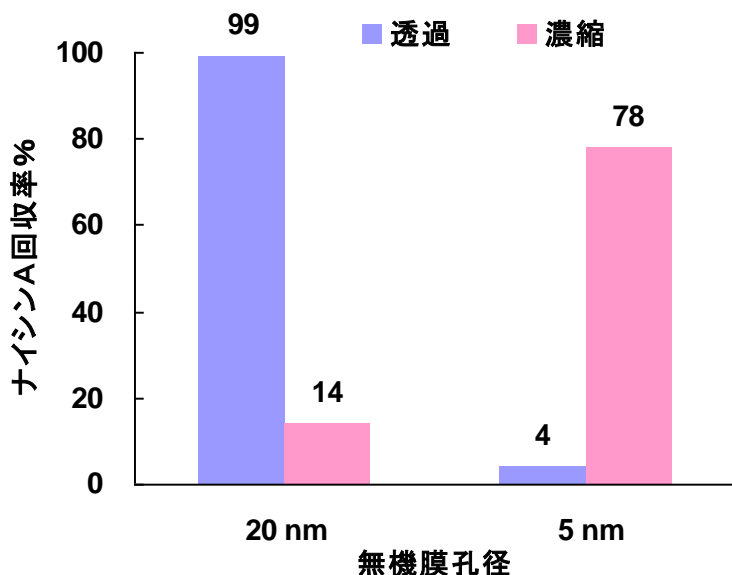


図 4. 無機膜試験 (20nm → 5nm 膜) のナイシン A 回収率測定結果

## ② ナイシン A 抽出液に関する検討

### ②-1 ナイシン A 抽出液の性能評価

#### ②-1-1 精製度評価

工場試作品の抽出液 NA (Lot. No.110809) と競合品 (食品添加物ナイシン製剤) の精製度 (純度) の比較を行った。本試験は、HPLC におけるナイシン A のピーク面積 (%) により純度を算出した。その結果を図 5 に示した。図 5 より、抽出液 NA の純度は 88%と、競合品の 24%と比べて非常に高いことが確認できた。さらに競合品は、HPLC 分析前に遠心分離 (10,000×g, 10 分間) により、沈殿物を除去するという前処理を行っており、実際の純度は、さらに低いと思われる (目標値達成)。

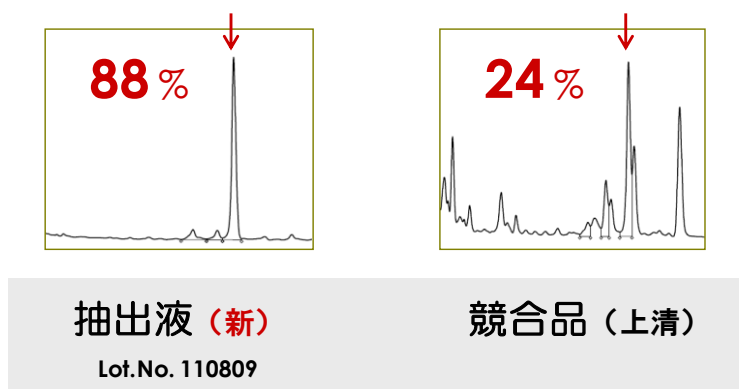


図 5. 抽出液 NA と競合品の純度比較

### ②-1-2 保存安定性試験

工場試作の抽出液 NA (Lot.No. 110809) と競合品 (食品添加物ナイシン製剤) の活性を 20,000 U/ml に調製し、40℃保存安定性試験を行った。保存サンプルは、任意日数に 1 サンプルを取り出し (使い捨て)、HPLC 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 (ナイシン A のピーク面積より算出)。40℃保存試験開始 (D+0) から試験終了 (D+90) のナイシン A 単体の活性を HPLC モニタリングした結果を図 6 に示した。図 6 より、D+90 の抽出液 NA のナイシン A の残存活性は、67%であった。一方、競合品は著しい活性の低下が見られ、D+90 には、ナイシン A の残存活性は 23%まで低下しており、抽出液の方が安定性は高かった (目標値達成)。

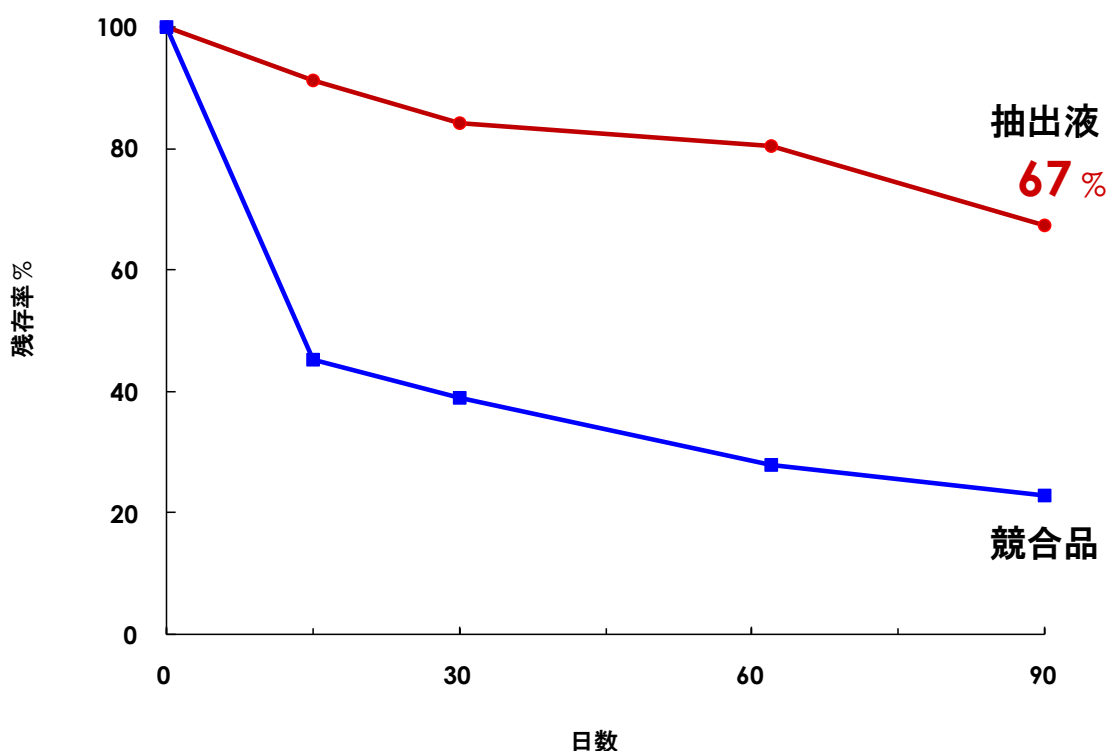


図 6. 抽出液 NA と競合品の 40℃保存安定性比較

### ②-1-3 抗菌活性試験

検定菌には、ナイシンに感受性の高い、*Micrococcus luteus* NBRC 13867 を用い、抽出液 NA (Lot.No. 110809) の抗菌活性試験を行った。検定菌を接種した SCD (Soybean-casein digest) 液体培地 (100  $\mu$ l) を添加し、30℃で 18 時間培養後に目視による菌の増殖 (濁度) を観察し、濁度の有無により、サンプルの抗菌力を算出した。その結果を図 7 に示した。図 7 より、抽出液 NA の MIC 値を比較したところ、D+0 (3.9 U/ml) と D+90 (3.9 U/ml) とで全く変化が見られず、40℃で 3 ヶ月間 (90 日間) 保存した後もナイシン A の残存活性が 100% あることを示した (目標値達成)。

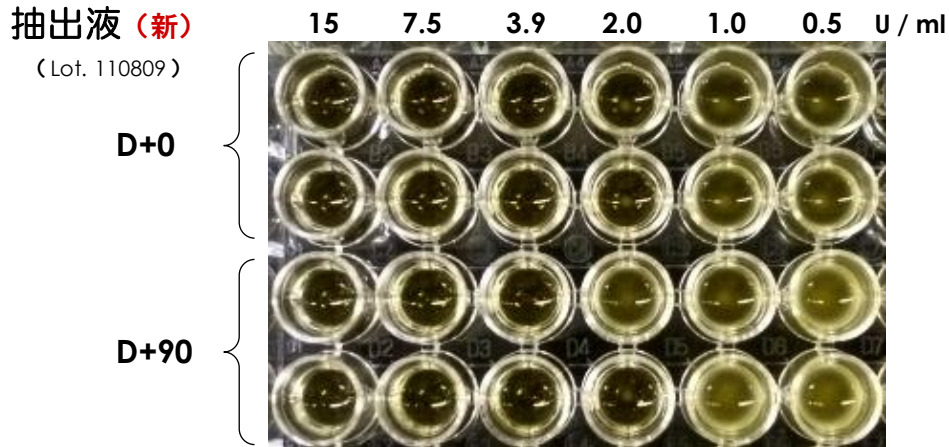


図7. 比濁法（マイクロプレート法）による抗菌活性試験結果

②-1-4 溶解性（沈殿物）に関する検討

工場試作の抽出液 NA (Lot.No.110809) と競合品（食品添加物ナイシン）の活性を 20,000 U/ml に調製した。サンプルは原液のまま直接セルに入れ、分光光度計（JASCO V-630）にセットし、OD 600nm で測定を行った。その結果を図 8 に示した。図 8 より、抽出液 NA は透明で清浄度が高いのに対して、競合品は、濁りが強く、沈殿が発生していた。濁度の差としては、2 オーダーも高い値であった（目標達成）。

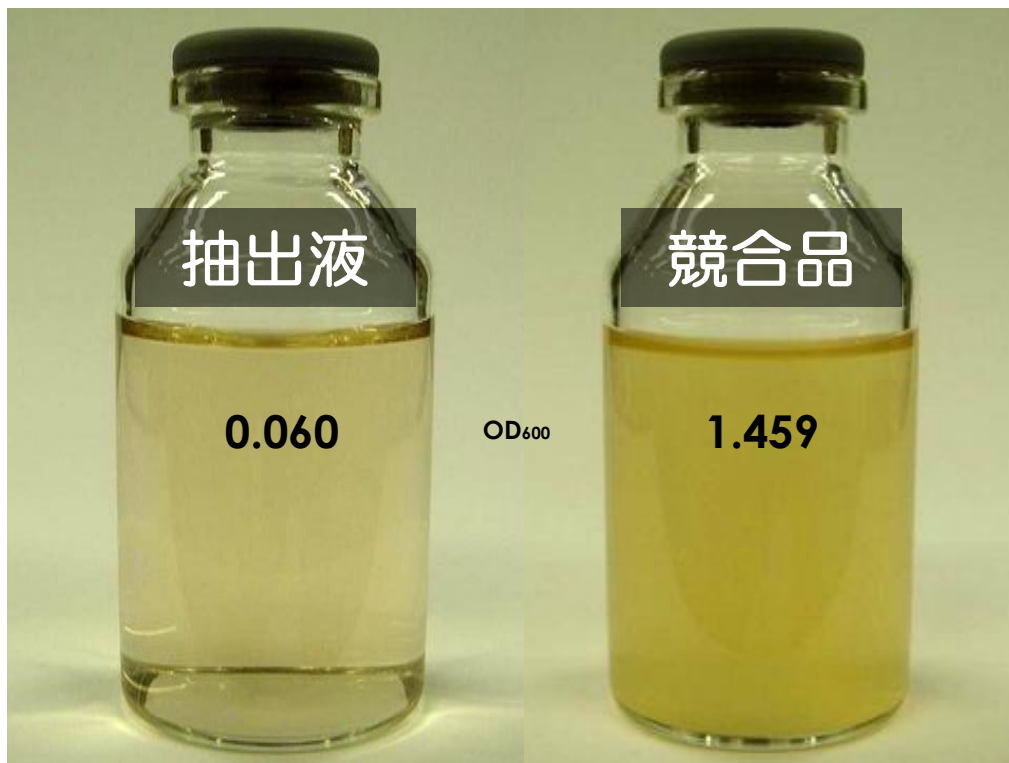


図8. 抽出液 NA と競合品の外観（濁度）比較

以上の結果をもとに、優れた機能性を示した抽出液 NA を利用した微生物制御剤の開発を行った。

本研究では、抽出液 NA の弱点であるグラム陰性菌に対する抗菌効果を補うため、抗菌作用の強いアルコールとの組み合わせを行った。通常アルコールは、抗菌目的に使用される場合、70～80%濃度のものがほとんどであるが、我々は、ナイシン A とアルコールの相乗効果についての知見を得ていたため、低濃度タイプの製剤での検討を重ねた。その結果、28%濃度のアルコール製剤を開発した。開発品は、通常の高濃度アルコール製剤との差別化を図っており、3つの特徴を示した。

- 1) アルコールの効かない芽胞に対する抗菌効果
- 2) アルコールでは困難な抗菌持続性
- 3) アルコール濃度を低減化することのメリット（コストダウン、手荒れ防止、危険物の回避など）

1) の芽胞に対する抗菌効活性試験とその結果を図 9 に、2) の抗菌持続性試験とその結果を図 10 に示した。図 9 より、開発したアルコール製剤（28%）は、阻止円を形成し芽胞菌に対する発育阻止効果を示した。一方、抽出液 NA の入っていない低アルコール（28%）や市販品（77%濃度アルコール製剤）はともに、阻止円の形成は見られず、全く抗菌効果を示さなかった。

図 10 より、開発品（28%）は芽胞と接触後、芽胞菌の発芽を抑制し、その効果は 6 日間認められた。一方、抽出液 NA の入っていない低アルコール（28%）や市販品（77%濃度アルコール製剤）はともに、接触 1 日後には、菌が増殖し、全く抗菌持続性を示さなかった。

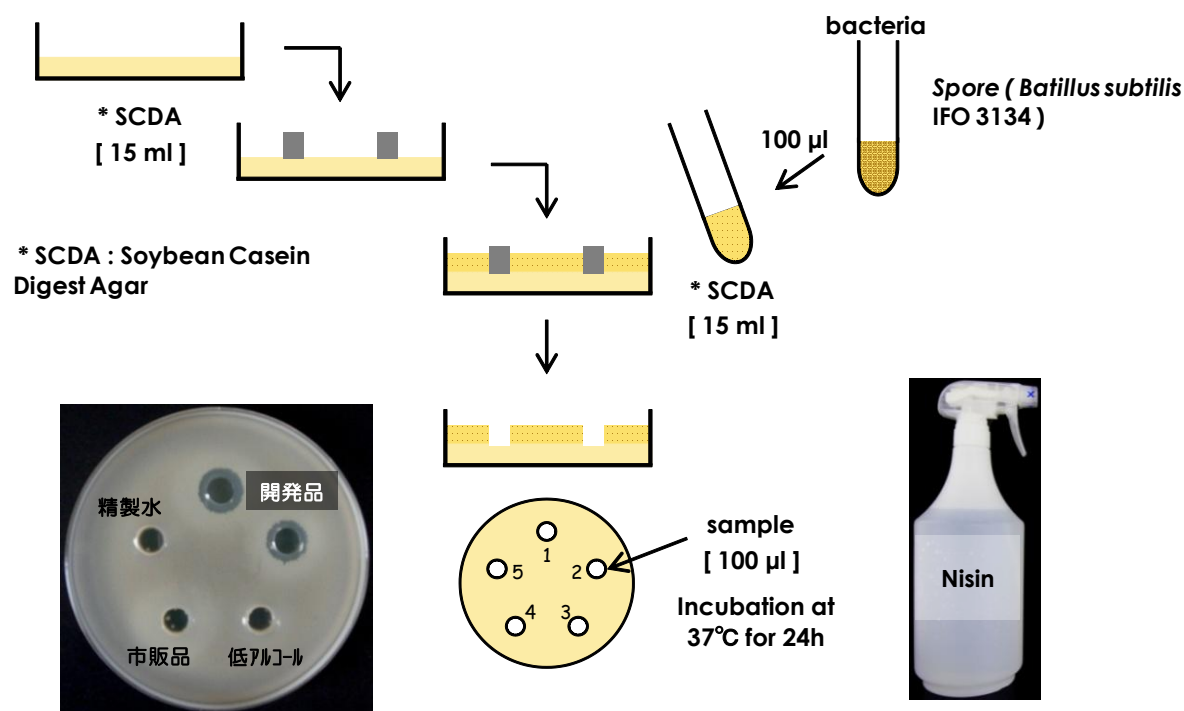


図 9. 開発品（抽出液 NA 微生物制御剤）の芽胞菌に対する抗菌効果



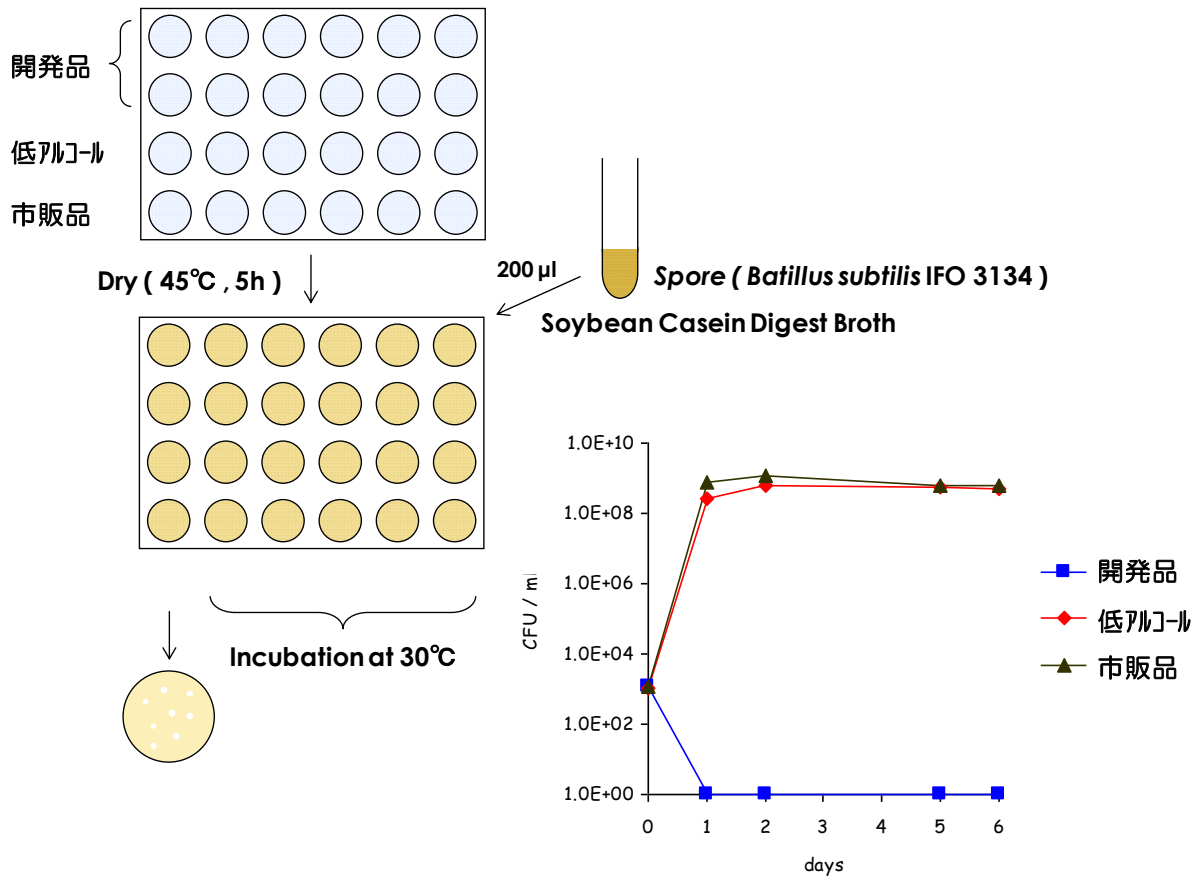


図 10. 開発品（抽出液 NA 微生物制御剤）の芽胞菌に対する抗菌持続効果

さらに、開発品はグラム陰性菌の大腸菌に対しても優れた抗菌活性を示すことも確認しており、幅広い分野で使用できる製剤である。その他、アルコールを使用しない、植物由来の抗菌素材との組み合わせの検討も現在行っており、抽出液 NA の製剤としては、2 種類開発を行った。



## ②-2 ナイシンA抽出液の安全性評価

実生産スケールで試作した抽出液 NA について、化粧品原料ガイドラインに準じた安全性試験を外部評価機関にて行った。

口腔粘膜等の刺激試験では、モルモットは Hartley 系（4 週齢、雌）を用い、群構成および動物数は、被験物質投与群 5 匹とし、試験に供した。被験物質は、そのまま投与試料として試験に供した。投与方法は、1 日 4 回（2 時間間隔）を 4 日間連続とし、投与試料 0.1 ml を下顎口腔前庭部に投与し、絵筆を用いて 30 秒間塗布を行った。刺激性の判定（表 1）は、1 ～ 3 日目の初回投与前および最終投与日の 1 日後（4 日目）、3 日後（6 日目）に行った。口腔粘膜の刺激性評点を表 1 に示した。表 1 より、前歯部歯肉および下唇部粘膜ともに、いずれの観察時にも異常はみられなかった（刺激スコアは 0）。また、美白試験と保湿試験の評価も行ったが、刺激等の副作用は全く見られず、高い安全性を示した。

以上の結果より、実生産スケールで試作した抽出液 NA は、無刺激（陰性）であることが分かった（目標達成）。

表 1. 抽出液 NA の刺激性評価

動物番号	判定項目	観察日				
		1日目	2日目	3日目	4日目	6日目
1	前歯部歯肉	0	0	0	0	0
	下唇部粘膜	0	0	0	0	0
2	前歯部歯肉	0	0	0	0	0
	下唇部粘膜	0	0	0	0	0
3	前歯部歯肉	0	0	0	0	0
	下唇部粘膜	0	0	0	0	0
4	前歯部歯肉	0	0	0	0	0
	下唇部粘膜	0	0	0	0	0
5	前歯部歯肉	0	0	0	0	0
	下唇部粘膜	0	0	0	0	0

### ③ 機能性発酵調味液の開発

#### ③-1 分離発酵液の成分分析

ナイシン A 抽出後の発酵液 (以下発酵液 NO) を機能性発酵調味料として活用するために、成分分析を行った。分析項目は固形分、pH とした。また、発酵液 NO にナイシン A が残存している可能性があるため、HPLC とバイオアッセイにてナイシンの残存を確かめたが、ナイシン A は発酵液 NO には残存していなかった。

図 11 に発酵液 NO を示した。発酵液 NO は生産規模が大きくなることで品質が変わることが危惧されたが、生産規模がスケールアップし、なおかつナイシン A を吸着する樹脂が変更された設備で生産された発酵液 NO (以下発酵液 NO (新規樹脂)) でも固形分、pH は安定しており、スケールアップ前に比べ分析値が変わることはなかった。



図 11. 発酵液 NO (新規樹脂)

#### ③-2 分離発酵液の機能性評価

発酵液 NO を様々な食品に添加する二次加工試験を行い、発酵液 NO、発酵液 NO (新規樹脂) の機能性を確かめた。

無添加をコントロールとする官能評価の結果を図 12 に示した。図 12 より発酵液 NO は甘味の向上効果、マスキング効果、肉質軟化の効果をもっていることがわかった。発酵液 NO は添加量 0.5% から効果があり、添加量が増えるにつれて効果も向上した。しかし、発酵液 NO を 2% 以上添加しても、2% 添加した時とあまり差を感じなくなり、発酵液 NO の添加量は 2% が適切な使用量であることがわかった。

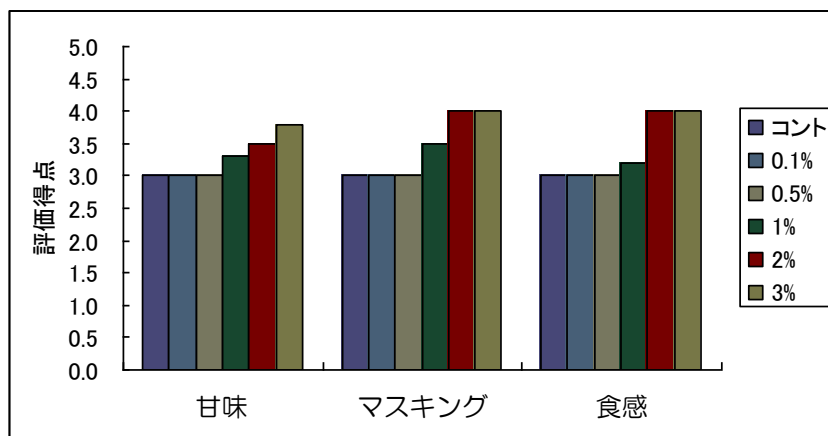


図 12. 発酵液 NO の添加量の違いによる官能評価

次に、発酵液 NO、発酵液 NO（新規樹脂）のスケールアップした工場試作品の評価を行った。図 13 にアジフライの官能評価の結果を示した。比較対象として、当社既存マスキング素材「デリーモア」を用いた。無添加をコントロールとする官能評価の結果、スケールアップ前と同様に発酵液 NO および発酵液 NO（新規樹脂）は甘味の向上効果、マスキング効果、肉質軟化の効果を有していることがわかった。なかでもマスキング効果はデリーモアと同等に優れており、特に魚肉に対して有効であった。

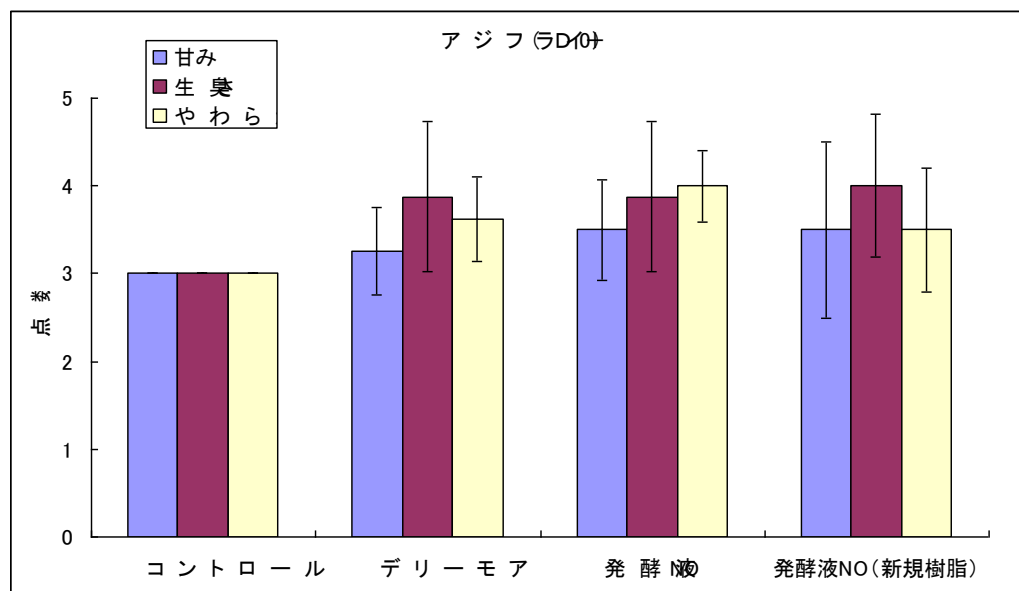


図 13. アジフライの官能評価  
デリーモア、発酵液 NO、発酵液 NO（新規樹脂）添加量 2%

これまでの官能評価で、マスキング効果のある機能性調味液として有望な発酵液 NO（新規樹脂）のマスキング効果をガスクロマトグラフィー質量分析計（以下 GC-MS）を用いて確かめた結果を図 14 に示した。指標物質は魚の生臭さの原因といわれているトリメチルアミンの 500ppm 溶液を用いた。発酵液 NO の添加量は 5% とした。

発酵液 NO（新規樹脂）を添加したものは無添加に比べ、トリメチルアミンが 65% も低減された。すでにマスキング剤として市販されている市場品やデリーモアには消臭効果としては及ばなかったものの、目標としていた消臭効率 50% 以上を達成することができた。

発酵液 NO（新規樹脂）は官能評価、機器分析の両方でマスキング効果があることが確認できた。

トリメチルアミン消臭効率(%)

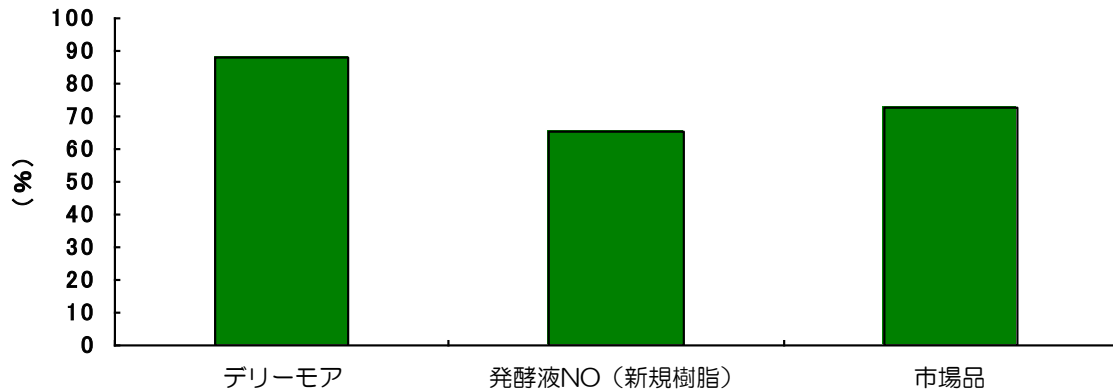


図 14. トリメチルアミンの消臭効率

トリメチルアミン消臭効率 (%)

$$= \{ 1 - (\text{サンプルの積分面積}) / (\text{無添加の積分面積}) \} \times 100$$

### ③-3 分離発酵液の製剤化・濃縮等による機能性の向上

発酵液 NO を濃縮や、他の資材と組み合わせることで機能性を向上させることを試みた。発酵液 NO を 3 倍濃縮し、二次加工評価を行ったが、濃縮前に比べ甘味の向上、マスキング効果、肉質軟化効果に大きな変化は見られなかった。一方、濃縮することでコスト上昇したため、濃縮することは優位ではなく、濃縮せず商品化することとした。

また、発酵液 NO をスプレードライヤーで粉末化し、ハンドリングの向上、機能性の向上を試みた。作業性の向上、効果の向上はあったものの、コスト上昇率が高かったため粉末化も適さないことがわかった。

### ③-4 保存安定性試験

発酵液 NO (新規樹脂) の保存安定性の確認を行った。冷蔵条件 (5°C以下) で 6 ヶ月の安定性を目標とした。結果、冷蔵条件で 6 ヶ月保管後も成分分析値ならびに官能評価の得点に問題はなかった。スケールアップ試験でも同様の結果が得られた。6 ヶ月の保存安定性を確認できたことで、既存品を上回る賞味期限を設定することができ、市場品との優位性を確認することができた。

### ③-5 機能性発酵調味料の使用法の確立

成分分析、二次加工試験から発酵液 NO は魚肉に対するマスキング効果が高いこと明らかになった。これより発酵液 NO を魚肉のマスキング剤というコンセプトで商品化できることを確認することができた。また、既存のマスキング剤よりも賞味期限を長く設定できる。さらにアレルギーの表示が不要ということから市場での優位性はあると考えられる。

#### 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

##### ④-3 新規抗菌ペプチド生産株のスクリーニング

ナイシンは非常に優れた抗菌ペプチド（バクテリオシン）であるが、中性～アルカリ性領域での低い安定性やグラム陽性菌に限定された抗菌スペクトルなどの欠点もある。このような欠点をカバーし、ナイシン単独では制御できない微生物群、とくに真菌類の制御に有効な抗菌ペプチドや乳酸菌が求められる。

新規抗菌ペプチド生産株、新規抗真菌活性乳酸菌をスクリーニングするにあたり、乳酸菌の分離方法と抗菌活性試験法を構築した。乳酸菌の分離は、最も一般的な乳酸菌用培地である MRS 培地による集積培養を経る方法で主に行った。得られた乳酸菌様分離株の抗菌活性は、まず Direct 法で評価した。バクテリオシン高感受性株として設定した数種の細菌、あるいは標準的な真菌類を検定菌として、抗細菌活性（バクテリオシン活性）および抗真菌活性を評価した。新規分離株とともに研究室保有株についても同様に Direct 法で抗菌活性試験を行った。Direct 法で抗細菌活性が確認された分離株については、次に Spot-on-lawn 法で培養液上清の抗細菌活性を調べた。また、Direct 法で抗真菌活性が確認された分離株については、比濁法で培養液上清の抗真菌活性を調べた。抗細菌活性を示した分離株の培養液上清は、さらに LC/MS で解析し、抗菌スペクトルの解析結果と併せて、抗菌ペプチドの新規性を判断した。新規性の認められたものについては、抗菌ペプチドの精製と構造解析を試みた。本スクリーニングの概略を図 15 に示した。

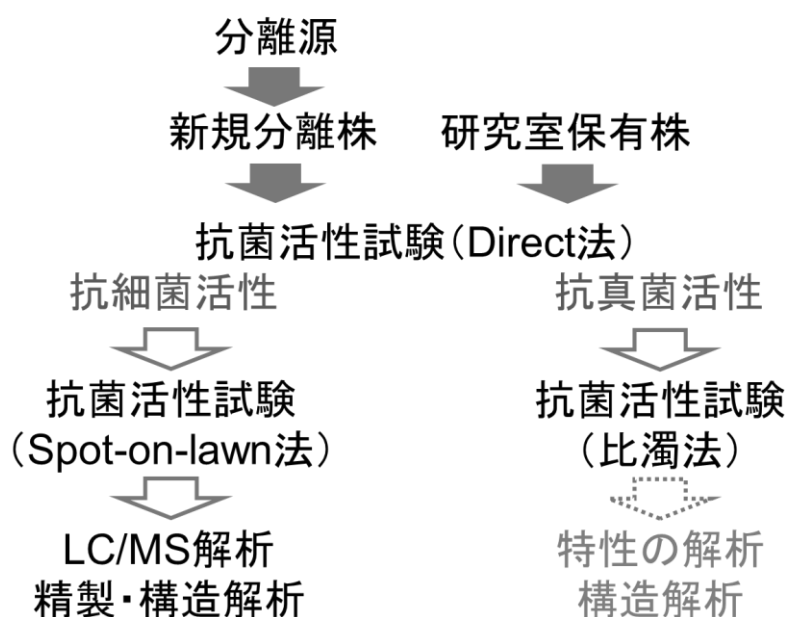


図 15. 新規抗菌ペプチド生産株および抗真菌活性株のスクリーニング

抗細菌試験の結果、6 株のバクテリオシン様活性を示す分離株が得られた。それらを LC/MS にて分析したところ、そのうちの 4 株がナイシン Z を生産していることが明らかとなった。残りの 2 株、A 株と B 株はナイシンとは異なる抗菌スペクトルを示し、LC/MS でナイシンのシグナルが確認されなかったことから、新規性の高いバクテリオシンを生産していると考えられた。しかし、B 株は抗菌活性が微弱で、抗菌ペプチドの精製・構造解析を行う

には至らなかった。

A 株については、生産する抗菌ペプチドの精製・構造解析を試みた。活性回収率を指標に様々な精製方法を検討した結果、培養液上清中のタンパク質画分の硫酸沈殿、陽イオン交換クロマトグラフィー、逆相 HPLC によって、抗菌活性を有する精製ペプチドを得ることができた。計 8 つの活性画分を得ることができ、そのうちの 7 つについては ESI-MS によって分子量を決定することができた。分子量を決定できた 7 つのペプチドのうち、4 つは既知のバクテリオシンと同じ分子量であった。さらに、そのうちの 1 つについては、N 末端アミノ酸配列解析の結果からも、既知の抗菌ペプチドと同一の配列を持つことが確認された。しかし、残りの 3 つのペプチドについては同じ分子量を持つ抗菌ペプチドの報告例がなく、これらは新規の抗菌ペプチドと考えられた（目標達成）。

Direct 法による抗真菌活性試験の結果、計 14 株に抗真菌活性が認められた。その一例を図 16 に示した。これらの菌株は *Aspergillus niger* と *Penicillium chrysogenum* の両方もしくは一方に抗真菌活性を示した。また、一部の菌株は *Fusarium oxysporum* にも微弱な抗真菌活性を示した。Direct 法で抗真菌活性が認められた菌株の一部については、さらに比濁法によって、培養液上清の抗菌活性を調べた。その一例を図 17 に示した。培養液上清の原液から 4 倍希釈程度までが *A. niger* と *P. chrysogenum* に対して抗真菌活性を示し、これらの抗真菌活性菌株は何らかの抗真菌活性成分を菌体外に分泌していると考えられた（目標達成）。

同様に、各培養液上清とナイシン（終濃度 1500 IU/mL）との相乗作用を調べたが、ナイシンの添加による抗真菌活性の向上は認められなかった。

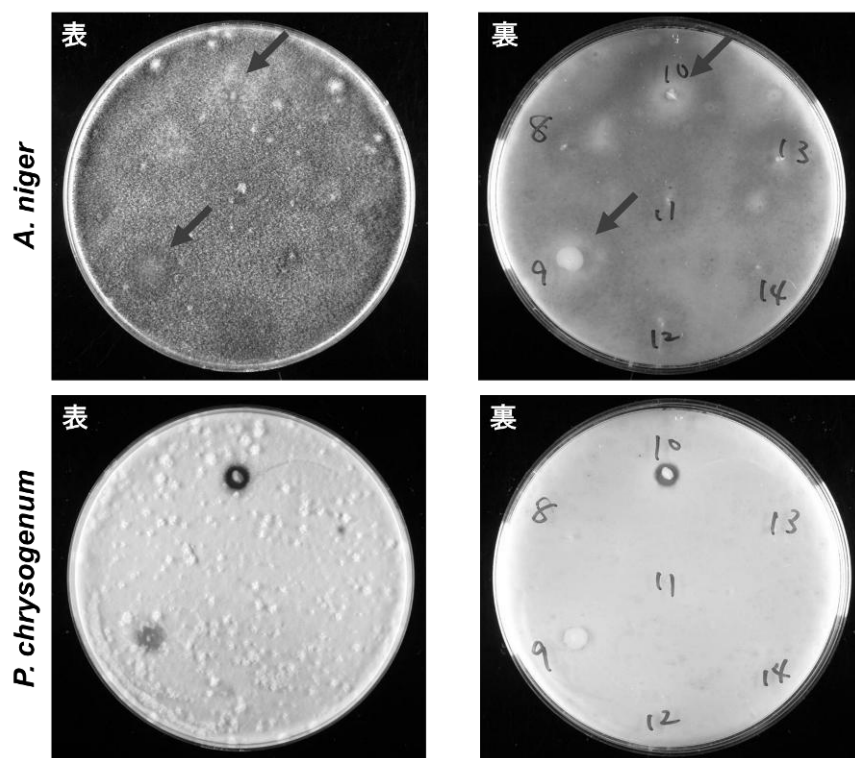


図 16. Direct 法による抗真菌活性試験結果の例

9 (A 株) と 10 (B 株) は、両検定菌に対して生育阻止円を形成し、抗菌活性を示した。

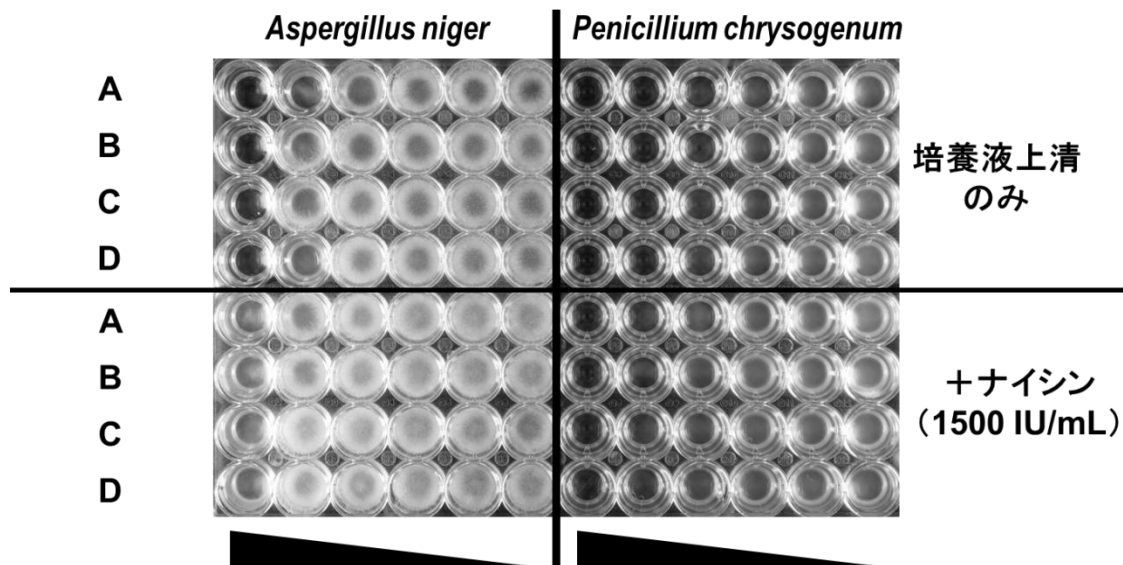


図 17. 比濁法による分離株培養液上清の抗真菌活性試験の例

A~D 株の培養液上清は左側のウェルから 2 倍希釈列として添加された。各検定菌は孢子懸濁液として接種され、写真は培養開始後 3 日目で、白濁した部分に各検定菌が生育している。試験した 4 株の培養液上清はいずれも *A. niger* と *P. chrysogenum* の両検定菌に対して抗真菌活性を示した。しかし、ナイシン (1500 IU/mL) とは相乗作用を示さなかった。

図 16 および図 17 に示したように、抗細菌活性 (バクテリオシン活性) が確認された A 株と B 株からは、抗真菌活性も確認された。精製された抗菌ペプチドによる抗真菌活性は確認されていないが、両株の培養液上清には抗細菌活性物質であるバクテリオシンとともに、何らかの抗真菌活性物質が含まれていると考えられた。

培養液上清の場合と同様に比濁法を用いて、ナイシンと相乗的に抗真菌活性を示す物質の探索を試みた。種々の抗真菌活性候補物質とナイシン (1500 IU/mL) の相乗的抗真菌活性を調べた。その結果、多数の物質に抗真菌活性が認められたものの、ナイシン添加による相乗的な抗真菌活性の向上は確認できなかった。乳酸菌の主要な生産物である乳酸には顕著な抗真菌活性は認められなかったことから、得られた抗真菌活性株は、乳酸以外の何らかの抗真菌活性物質を生産していると考えられた。

現状では、細菌の制御にはナイシンを使用し、真菌の制御には他の抗菌物質を用いて、抗菌スペクトルを相乗的に拡大することが効果的な微生物制御を実現するために取り得る最善の手段と考えられた。また、A 株と B 株からは、抗細菌活性 (バクテリオシン活性) と抗真菌活性の両方が確認された。このような乳酸菌自身もしくはその培養液上清を用いることで、細菌から真菌に至るまで幅広い範囲の微生物の制御が一度に達成できる可能性がある。両株の培養液上清は、細菌から真菌までの広い抗菌スペクトルを持つ抗菌剤、食品保存料としての利用が期待される。

## 最終章 全体総括

本事業（H22 ～ H23 年度）の2年間の研究成果を以下にまとめた。

### ① 新規二段階乳酸菌発酵・精製法（新規製法）の確立

#### 【発酵】

テーブル試作により、一次および二次発酵の培養条件の検討を行った結果、スターター調整、発酵温度、発酵時間、培地組成の最適化を見出し、最終目標である 2,400 U/ml のナイシン A 生産性を安定して生産できる条件を確立した。さらに、工場試作へのスケールアップの検討では、実生産設備に最適な培養条件を見出し、実生産レベルでもナイシン A 生産性が 2,400 U/ml 安定して生産できる条件を確立した（目標達成）。

#### 【分離・精製】

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、2 種類の分離方法の検討を行った。一つは、溶剤を必要とする従来分離法で、もう一つは、無機膜（分画分子量の異なる 2 種類）を用いた分離法である。検討の結果、品質を落とさず、溶剤を 1/3 低減化することができ、コストダウンを図った。改良した抽出液は、実生産スケールの工場試作を 2 回行い分析した結果、従来品と同等の回収率、精製度であることが確認され、本年度の目標値であるナイシン A 回収率 69%を十分に達成することができた。

### ② ナイシン A 抽出液に関する検討

#### 【性能評価】

実生産スケールで試作した抽出液の性能評価（精製度、安定性、抗菌性、溶解性）を行った。結果は、すべての項目で競合品以上の性能を示すことができた（目標値達成）。

#### 【安全性評価】

実生産スケールで試作した抽出液について、化粧品原料ガイドラインに準じた安全性試験を外部評価機関にて行った。口腔粘膜等の刺激試験では抽出液は全く無刺激であることが証明され、抽出液 NA の安全性を確認した。

#### 【微生物制御剤の開発】

性能評価、安全性評価の結果をもとに抽出液 NA を利用した微生物制御剤の開発を行った。開発した製剤は、本来ナイシン単独では効果のないグラム陰性菌の大腸菌に対しても優れた抗菌活性を示した。最終的には、幅広い分野で使用できる製剤として 2 種類開発した。

### ③ 機能性発酵調味液の開発

ナイシン A 抽出後の発酵液を機能性発行調味料として活用する方法を確立した。発酵液 NO の評価を行い、呈味の向上、マスキング効果、肉質軟化の効果があることがわかった。GC-MS にて特に魚肉に対するマスキング効果が高いことが明らかになり、魚肉のマスキング剤としての商品化できることがわかった。保存試験においては冷蔵条件で 6 ヶ月品質が安定していることを確認できた。既存のマスキング剤と比べても保存安定性も高く、また、アレルギー表示も不要であるため市場での優位性はあると考えられる。



#### 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

乳酸菌の効率的なスクリーニング法、および抗菌活性試験法（Direct 法、Spot-on-lawn 法、比濁法）を構築した。Direct 法や Spot-on-lawn 法による抗細菌活性試験の結果、新たに得られた分離株および研究室保有株から、6 株の抗細菌活性株（バクテリオシン様抗菌物質生産株）を見いだした。うち 4 株は培養液上清の LC/MS 分析により、ナイシン Z を生産することが明らかとなった。一方、残りの 2 株が生産する抗菌ペプチドは、LC/MS や抗菌スペクトルの解析結果から新規性が高いと考えられた。そのうちの 1 株の培養液上清より、硫安沈殿、陽イオン交換クロマトグラフィー、逆相 HPLC によって複数のバクテリオシンを精製した。質量分析などにより、4 種の構造が既知のバクテリオシンと同じであることが明らかとなった。一方、一致する分子量の報告例がない、新規性が高いバクテリオシンも複数見いだされた。また、Direct 法、比濁法を用いた抗真菌活性試験の結果、14 株の抗真菌活性株を得た。そのうちの 2 株は、上記の新規抗菌ペプチド生産株であった。この 2 株は、抗細菌物質であるバクテリオシンとともに、何らかの抗真菌活性物質を菌体外に生産しており、細菌から真菌に至る広範囲の微生物の制御に有効と考えられた。

以上の研究成果より、工場スケールにおける、連続発酵と 2 種類の分離法を組み合わせた、新規二段階乳酸菌発酵・精製法の技術の確立を行った。この新規製法では、高純度のナイシン A 抽出液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。

新規製法で得られる高純度のナイシン A 抽出液は、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）向けの微生物制御剤（アルコール製剤、天然抗菌製剤等）として、2 種類開発することができた。これら微生物制御剤は、外部の工場を利用し、生産委託するが、現在試作前の段階まできている。まずは、100 ～ 200 個規模の微生物制御剤の試作の実施および試作品サンプルの確保を行う。次に、本プロジェクトメンバー内の既存ユーザーから本開発品に興味のあるユーザーを選出し、試作サンプルの評価を実施し、ユーザーの要望や試作品の改良を通して、最終的には販売につなげる予定である。

一方、機能性発酵調味液は、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。