

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05786

研究課題名(和文) 海洋性乳酸菌による薬草粉末及び海藻粉末の発酵と有効物質の構造解析

研究課題名(英文) Fermentation of herb and seaweed powders and determination of chemical structure of effective substance by lactic acid bacterium from marine environment

研究代表者

今田 千秋(imada, chiaki)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：90183011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：沖縄県久米島の海藻表面から分離した海洋植物由来乳酸菌を市販の豆乳に各種植物粉末および海藻粉末を添加した培地で静置培養し、培養物について α -グルコシダーゼ阻害活性を測定した。その結果、粉末無添加では見られない阻害活性がスギノリ粉末を添加することにより新たに出現した。高速液体クロマトグラフィーを用いて本物質を分析したところ、すでに阻害活性が報告されているアグリコン型イソフラボンであるゲニステインとダイゼインが検出されたことから、本菌はスギノリ粉末を添加することにより、豆乳に含まれるグリコシド型のイソフラボンをアグリコン型に変換することにより、阻害活性が出現することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳酸等の腸内細菌による植物成分の代謝変換については報告がある。大豆イソフラボンは腸内細菌の代謝を受けるとエクオールという物質に変換され、イソフラボンよりも強力な女性ホルモン様活性を有する。このエクオールに限らず、様々な植物成分が乳酸菌などの代謝変換を受けることにより生体に作用する機能性物質に変換されることを示唆する。植物成分の機能性評価は細菌代謝産物として評価しなければ、真の機能性を評価できない。本研究は乳酸菌を試験管で培養することにより、腸内での物質の代謝変換反応を再現するという独自性の高い発酵方法で、今後の応用の可能性が高く、機能性物質の生産を視野に入れた基礎研究で新規性と独自性を有する。

研究成果の概要(英文)：Lactic acid bacterium was isolated from seagrass (a marine plant) collected from Kume-Jima Island in Okinawa Prefecture, Japan. The strain was incubated in commercial product of soymilk, and multiple kinds of plant or seaweed powders were added one by one. The inhibitory activity of α -glucosidase in the culture was determined. No activity was detected in the absence of these powders whereas activity was detected in the presence of seaweed powder "Suginori". Aglycone type isoflavones such as daidzein and genistein were detected by HPLC. These isoflavones are reported to α -glucosidase inhibitors. Glycoside type isoflavones such as genistin and daidzin were converted by the fermentation of the soymilk and the inhibitory activity was detected.

研究分野：海洋微生物学

キーワード：乳酸菌 植物粉末 海藻粉末 豆乳 α -グルコシダーゼ阻害活性 グリコシド型イソフラボン アグリコン型イソフラボン スギノリ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで約 30 年間、様々の海洋微生物から各種酵素阻害物質や抗菌物質など有用生理活性物質を単離・精製し、化学構造を明らかにするとともに諸産業への応用研究を展開してきた。微生物は培養温度や生産培地等の条件を若干変更するだけで、生産物の量が大きく変動したり、予想もできないような代謝産物を生産することから、微生物の代謝潜在能力に大変興味がかかれた。

例えば、「ヒアルロマイシン」は報告者らが 2015 年に発見した海洋由来放線菌のヒアルロニダーゼ阻害剤であるが、その化学構造は「ルブロマイシン群」という既知の抗生物質の基本構造の側鎖に C5N が結合した新規物質であった。興味深いことに、ヒアルロマイシンにはヒアルロニダーゼ阻害活性が見られるが、ルブロマイシン群では全く活性が見られない。この様に微生物は有機合成困難な物質を常温下で、劇薬などを用いずに、いとも簡単に生合成できることから、低コストで環境にやさしい生産方法といえる。今回、乳酸菌を有用物質生産に用いる理由はカビや細菌に比べ、一般消費者に受け入れられ易いからである。報告者はこれまで海洋細菌の生産するプロテアーゼ阻害剤が、魚肉練り製品の食感向上に有効であること、また海洋由来カビの生産するチロシナーゼ阻害剤が生鮮食材の褐変防止に著効があることを明らかにしたが、細菌やカビはイメージが悪い為、無害であったにも関わらず産業への応用には至らなかった。一方、乳酸菌は長年の食経験や Generally Recognized As Safe(米国 FDA)により、一般消費者にも受け入れられやすく、産業への応用が容易であることから本研究を企画した。

2. 研究の目的

乳酸菌は「グラム陽性・無芽胞・カタラーゼ陰性・消費糖に対してモル比に換算して、50%以上の乳酸を産生」する細菌の慣用名である。古来より乳酸菌は食品の加工や調味、貯蔵など様々な分野で利用されてきた代表的な有用微生物である。近年ではプロバイオティクス素材としても用いられている。これまで乳酸菌は様々な環境から分離されているが、海洋由来のものはサンプルの取得が困難であることなどの理由から、あまり研究が進められていないのが現状である。本研究では我々がこれまで様々の海洋環境から分離した乳酸菌の中から、沖縄県久米島町で採集した海草表面（アマモ）から分離した *Lactobacillus derbrueckii* KM-2 株を選択し、近年健康食品として注目されている豆乳を本菌の発酵素材に選んだ。豆乳はオリゴ糖などの優れた栄養素やイソフラボン、ポリアミンなどの抗酸化物質を含有する優れた食材である。豆乳を乳酸菌で発酵した豆乳発酵物は豆乳の栄養素や乳酸菌の持つ機能性を付与できる上、身体に摂取しやすくなるなどの長所がある。本研究では、各種植物粉末や海藻粉末を添加した豆乳発酵液を調製し、得られた発酵液について、 α -グルコシダーゼ阻害活性の測定を行うとともに有効物質を特定することを目的とした。 α -グルコシダーゼは糖の α -1,4-グルコシド結合を加水分解する反応を触媒する酵素の総称であり、殆ど全ての生物がこの酵素を保有している。ヒトでは小腸上皮細胞に膜酵素として発現しており、その活性を阻害する事で食後の血糖値上昇を緩やかにする事が可能である。この特性から α -グルコシダーゼ阻害剤は、糖尿病患者の食後血糖値急上昇を抑制する薬剤として使用されている。

本研究では、あまり研究がされていない海洋由来乳酸菌を用いて市販の豆乳に植物や海藻粉末を添加して発酵を行い、発酵物の α -グルコシダーゼ阻害活性を測定するとともに代謝産物の諸性状を調べることにした。

3. 研究の方法

3-1. 供試乳酸菌

沖縄県久米島町の海草(アマモ)から分離した乳酸菌 KM-2 株 (2010 年 10 月採集) を供試乳酸菌として用いた。本菌について 16S rDNA の塩基配列から種の同定を行った結果、*Lactobacillus derbrueckii* と判明した。本菌の塩基配列を DDBJ (DNA Data Bank of Japan) のデータベースに登録番号 LC685966 で登録した。

3-2. 乳酸菌の培養方法

市販の成分無調整豆乳 (Marusan) 20ml を 50ml 容ファルコンチューブに分注し、オートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分間) を行った。滅菌後、MRS 液体培地で前培養 (1 日, 27°C) した KM-2 株菌液 200 μ l をそれぞれ接種した後、37°C で 3 日間静置培養を行った。また豆乳 (菌無接種) に試薬の乳酸を滴下し、pH4.1 \pm 0.1 に調整した「人工豆乳発酵物」を調製し、本実験のネガティブコントロールに用いた。

3-3. 植物及び海藻粉末添加発酵物の調製

豆乳に添加する植物粉末として、 α -グルコシダーゼ阻害活性や糖尿病への予防が確認されている植物粉末として、グアバ、冬虫夏草、ギムネマシルベスター、マイタケおよび柿の葉の各粉末を、また血圧上昇を抑制するものとして、ノニおよび長命草粉末、また β -グルコシダーゼ活性がみられるシイタケおよび月経少女の緩和などが報告されているビテックス粉

末など、さらに海藻粉末として、メカブ、スギノリ、ヒジキおよびコンブ各粉末の合計 13 種類をそれぞれ豆乳に添加して培養実験に供した。これらの植物および海藻粉末を豆乳 20ml に対して各々 1.0% 添加 (0.20g) 添加し、オートクレーブ (121°C, 15 分間) で殺菌を行った。殺菌後、これらの培地に KM-2 株をそれぞれ植菌した後、37°C で 3 日間培養を行い、豆乳発酵物を調製した。

3-4. 阻害活性サンプルの調製

上記で得られた豆乳発酵物 (ネガティブコントロール含む) 1ml を 1.5ml 容のマイクロチューブに分注し、遠心分離 (20,630 × g, 10 分間, 4°C) を行い、この上清 0.5ml を分取し、ヒートブロック (太陽科学工業株式会社) を用いてドライアップ (50°C, 12 時間-16 時間) を行い、得られた乾固物に等量 (500 μl) の 99.5% メタノール (Fujifilm 131-01826 特級) を添加した。これを試験管ミキサーでよく攪拌した後、10 分間静置を行い、再度遠心分離した上清をサンプルとして回収し、α-グルコシダーゼ阻害活性測定に供した。

3-5. α-グルコシダーゼ阻害活性の測定

96well タイタープレート (Costar®) に 0.11U/ml (0.0015mg/ml) の α-グルコシダーゼ (Oriental Yeast Co., Ltd 46510003) 溶液 20 μl および豆乳発酵物サンプル 100 μl (リン酸緩衝液にて適宜希釈) をそれぞれ分注した後、プレインキュベーション (37°C, 10 分間) を行った。その後、基質として、0.087mg/ml の *p*-Nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (Fujifilm 355-17471) 100 μl を添加した後、インキュベーション (37°C, 30 分間) を行った。インキュベーション後、3 N NaOH 30 μl を加えて酵素反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー (日本バイオラッドラボラトリーズ (株), Model 550) を用いて 415nm の吸光度を測定した。

得られた吸光度をもとに、次式を用いて各サンプルの阻害活性評価を行った。30 分間のインキュベーションによって生じた吸光度の増加量に対し、人工豆乳発酵物の吸光度増加量の割合をもとに阻害活性 (IU/ml) を算出した。なお、阻害率 50% を 1 Unit (U) と定義し、希釈率に応じて阻害活性を算出した。

$$IU = \left(\frac{\text{乳酸菌由来豆乳発酵液の吸光度増加量}}{\text{人工豆乳発酵物の吸光度増加量}} \times 100 \times \frac{1}{50} \right) \times \text{希釈率}$$

4. 研究成果

4-1. 植物粉末添加実験結果

図 1 の結果より、乳酸菌無接種の人工豆乳発酵液でも高い阻害活性がみられたサンプルは、もともと粉末そのものに阻害活性が見られることから、乳酸菌発酵物の阻害活性を測定することが困難であるため、本研究では実験から除外した (ノニおよびシイタケ)。

これに対し、グアバおよびスギノリ粉末そのものでは、活性が見られないが、グアバおよびスギノリ添加発酵物は無添加では見られない活性が新たに出現した。このうち、スギノリ添加の活性が顕著に高かったため、本研究における候補植物粉末として選択した。

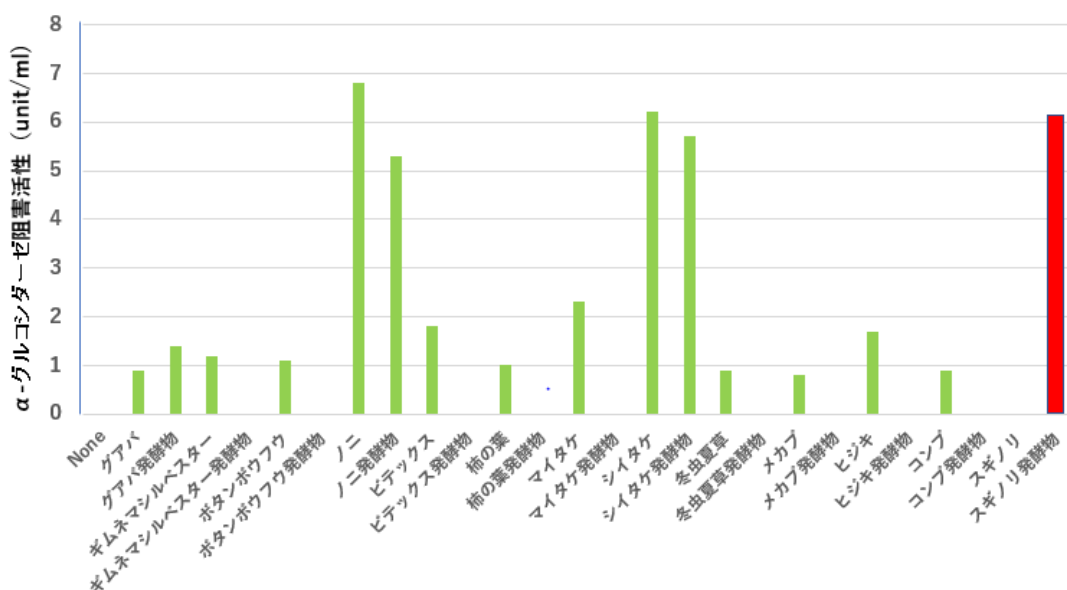


図1. 各種植物及び海藻粉末およびこれらの豆乳発酵物の α-グルコシダーゼ阻害活性

4-2. スギノリ粉末添加豆乳発酵物の高速液体クロマトグラフィー分析

4-1. での結果を踏まえ、スギノリ粉末添加および無添加豆乳発酵物の分析を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて行った。(カラム: COSMOSIL 3C18-AR-II (4.6 x 100mm), 溶媒: 0.1%ギ酸/アセトニトリル, アセトニトリル濃度: 0-3分(15%)—25分(85%)—29分(85%)—32分(15%), 流速: 1.2 mL, 検出UV波長: 256 nm). その結果, 図2に見られるように, スギノリ無添加ではグリコシド型イソフラボンであるダイジンおよびゲニスチンが検出されたが, アグリコン型イソフラボンであるダイゼインおよびゲニステインは検出されなかった. これに対し, スギノリ添加ではダイジンとゲニスチンが検出されず, ダイゼインおよびゲニステインが検出された. このことから, 本株はスギノリ粉末を豆乳に添加することにより, 豆乳中に含まれるグリコシド型イソフラボンを分解し, アグリコン型イソフラボンを生成したものと推定される. ダイゼインやゲニステインには α -グルコシダーゼ阻害活性が報告されている. また, 同じスギノリ目のフノリを添加した際にも同様の阻害活性がみられたと述べられている.

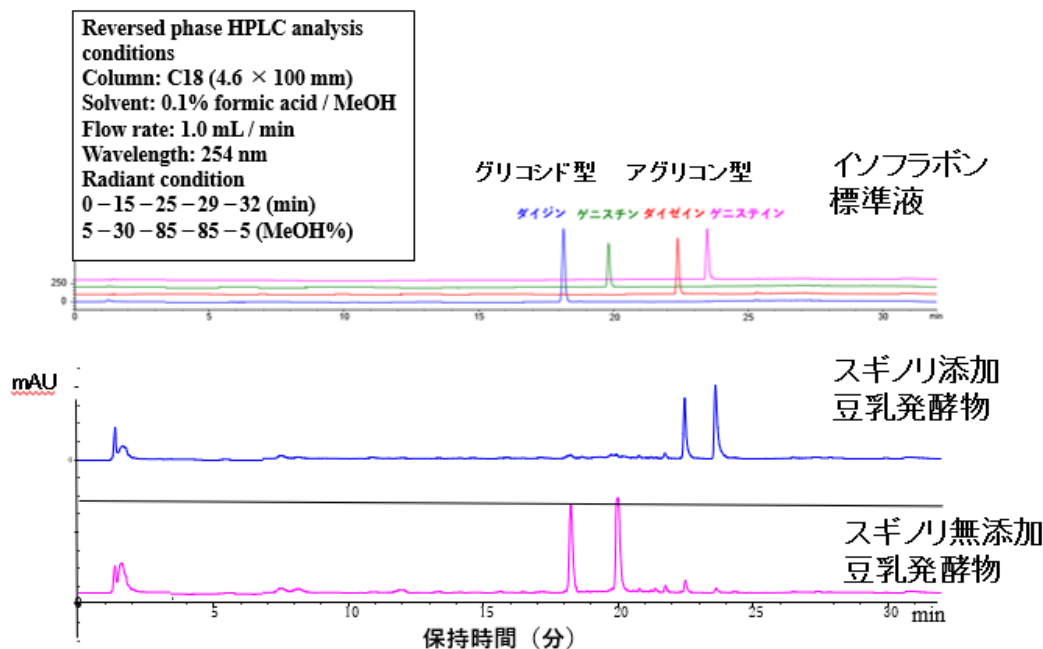


図2. スギノリ粉末添加及び無添加豆乳発酵物のHPLC分析結果

4-3. スギノリ粉末添加豆乳発酵物の HPLC によるフラクション分取

次にスギノリ粉末添加豆乳発酵物約 10ml を 100 μ l に濃縮したのち, 同一条件で HPLC に展開し, 図3に示すように 11 フラクションを分取した. 各フラクションについて, HPLC に用いた溶媒 (0.1%ギ酸/メタノール) を除去したのち, 凍結乾燥した. これらのサンプルをリン酸緩衝液に溶解させたのち, α -グルコシダーゼ阻害活性を測定した. その結果, ダイゼインおよびゲニステインが溶出したフラクション⑦および⑨に強い α -グルコシダーゼ阻害活性が見られた. このことから, スギノリ添加豆乳発酵物の阻害成分はダイゼインおよびゲニステインと考えられた. なお, その他のフラクションにも若干阻害活性が見られたが, ⑦および⑨よりも低かったため, HPLC 分析に用いた溶媒が酵素活性に影響を与え, 阻害活性があるように見えたのではないかと考えられた.

今後, その他の植物粉末や海藻粉末を添加して本菌の培養を行い, 新たな物質の生産性を調べたいと考えている.

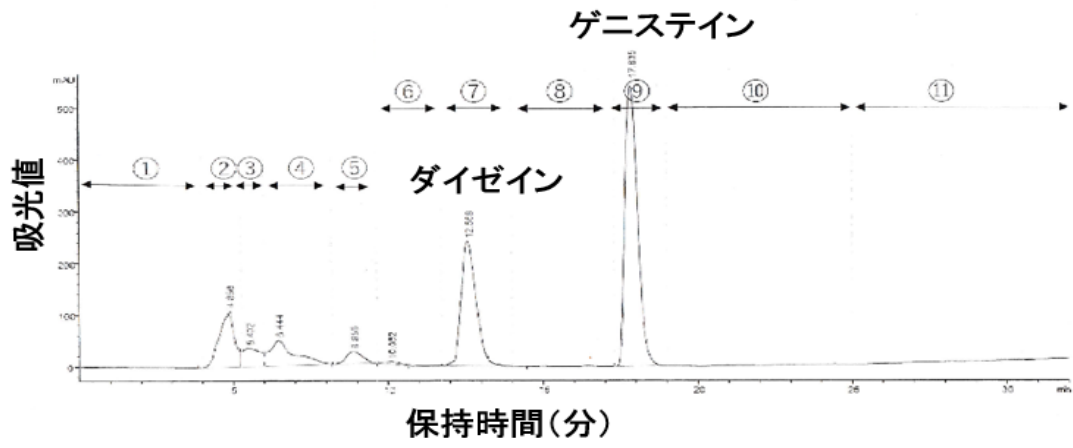


図3. スギノリ粉末添加豆乳発酵物のHPLCによるフラクション分取

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今田千秋 若杉準 春成円十郎 五十嵐康弘
2. 発表標題 海洋植物由来乳酸菌による植物および海藻粉末の豆乳醗酵物の諸性状
3. 学会等名 海洋深層水利用学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	五十嵐 康弘 (Igarashi Yasuhiro) (20285159)	富山県立大学・工学部・教授 (23201)	
研究分担者	春成 円十郎 (Harunari Enjuro) (00750449)	富山県立大学・工学部・助教 (23201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------