

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月1日現在

機関番号：14303  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2011  
 課題番号：22780066  
 研究課題名（和文） アミラーゼインヒビター生産乳酸菌の生理機能解析と機能性食品デザインへの応用  
 研究課題名（英文） Characterization and Application of lactic acid bacterium producing amylase inhibitor to design of functional foods  
 研究代表者  
 麻生 祐司（ASO YUJI）  
 京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授  
 研究者番号：70380590

研究成果の概要（和文）：分離したアミラーゼインヒビター生産乳酸菌を *Weissella* sp. KY5-4 株と同定した。KY5-4 株は、温度 37℃、培養 14 時間目において最大インヒビター活性（22.5%）を示した。また、KY5-4 株はプロバイオティクスとしても有用であること、生産するアミラーゼインヒビターは耐熱性・保存性に優れていることがわかった。さらに、KY5-4 株を用いて蕪漬けを試作したところ、発酵後のインヒビター活性値が上昇した。

研究成果の概要（英文）：Lactic acid bacterium KY5-4 producing amylase inhibitor was identified as *Weissella* sp. The KY5-4 strain showed the highest inhibitory activity (22.5%) after 14 h cultivation at 37 °C. The strain was found to be an useful bacterium for probiotics, and its inhibitor displayed heat- and acid-tolerance. Furthermore, the inhibitory activity was increased after Turnip pickle was fermented by using KY5-4 strain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：応用微生物

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：乳酸菌、機能性食品、アミラーゼ、糖尿病、阻害剤

1. 研究開始当初の背景

(1) 乳酸菌は古来より我々の健康に深く関与してきた微生物である。従来、発酵食品における乳酸菌の機能としてはスターターとしての役割が主であったが、近年ではプロバイオティクス機能が注目されるように、乳酸菌に対してスターター機能以外の新しい健康機能を求める動きが活発である。最近では、アンチエイジング・アレルギー抑制・発ガン抑制などプロバイオティクスに関連する乳

酸菌の特殊な生理機能が次々と見出されてきており、生理機能の詳細な解析と新しい機能性食品の開発は国内外でとりわけ盛んとなっている。このような背景の中、これまでに見出されたものと全く異なる新しい生理機能を有した乳酸菌を世界に先駆けて取得・機能解析し機能性食品へ利用することは、世界における機能性食品の研究開発分野を日本が優位にリードするとともに、新しい長寿社会の創成を実現可能とするために極め

て重要であるといえる。

(2) 糖尿病は罹患率の高い生活習慣病である。糖尿病の治療では、食後の急激な血糖値上昇を防ぐことを目的として、食事の際に摂取する糖質の量をコントロールする治療（食餌療法）が求められる。また、唾液・膵液アミラーゼなど血糖の生成に関与する酵素の活性を阻害する特殊な薬剤を使用した治療（薬物療法）が行われることもある。これら食事療法や薬物療法は、食事量の制限や薬物による副作用などを引き起こすため、生活の質（QOL）を大きく低下させる。そのため、毎日の食事で摂取する食品を利用したマイルドな方法による新しい糖尿病治療法の開発が望まれている。しかし、これまでに開発されている糖尿病食の形態は限定的であり、現代の食のニーズにマッチしたバラエティ豊かな糖尿病食の開発が急務となっている。我が国の糖尿病人口は1800万人を越える（患者数：約212万人、予備軍：約1620万人〔2002年調査〕）といわれており、糖尿病食の開発は今後盛んになると予想される。

(3) 新たな糖尿病予防食の開発を目的として、申請者は世界で初めて、糖尿病予防に大きく貢献する可能性を持つ『アミラーゼインヒビター』を生産する新規乳酸菌を島根県特産の発酵食品（蕪漬け）からマイクロプレートを用いたハイスループットスクリーニング法により分離することに成功した（図1）。現在までに発見されている微生物起源のアミラーゼインヒビターのほとんどが放線菌 *Streptomyces* 由来であり、低分子性の基質アナログ的阻害剤もしくは高分子性の動物アミラーゼ特異的阻害剤として機能する。これまでに、乳酸菌の生産するアミラーゼインヒビターに関する報告はなく、申請者が新たに発見したアミラーゼインヒビターは極めて新規性の高い物質であると示唆される。

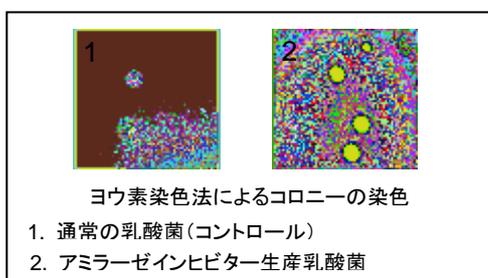


図1 アミラーゼインヒビター生産乳酸菌

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、世界で初めて分離したアミ

ラーゼインヒビター生産乳酸菌について、生産する新規アミラーゼインヒビターの構造解析・物理化学的安定性の解析・発酵生産性の解析を行うことでアミラーゼインヒビターの機能を解明するとともに、アミラーゼインヒビター生産乳酸菌を用いた発酵食品ベースの新しい糖尿病予防食を開発することを目的とする。現在までに糖尿病予防の視点から乳酸菌の生理機能を解析した研究は皆無であり、これまでに発酵食品を糖尿病予防食へ変換するための技術も確立されていない。すなわち本研究は、乳酸菌の生活習慣病に対する生理機能を明らかにするとともに、長寿社会に向けた新しい機能性食品を世界に先駆けてデザインする極めて斬新な研究である。

## 3. 研究の方法

(1) マイクロプレートを用いてMRS培地で乳酸菌を30℃で18時間培養後、培養液上清50  $\mu$ lを遠心により分取し、これに1.5%可溶性デンプン溶液50  $\mu$ lと1,000倍希釈したブタ膵臓由来 $\alpha$ -アミラーゼ(A6255-10MG、シグマアルドリッチ)50  $\mu$ lを添加して、37℃で1時間反応させた。その後、マイクロプレートに1M塩酸を入れて反応を停止させた。これにヨウ素溶液(0.12%I<sub>2</sub>+0.4%KI)を加えて混合することで染色し、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度(595nm)を測定することで培養液中のアミラーゼ阻害活性を算出した。

(2) アミラーゼ阻害活性を比較的強く示した5株を対象に、SEMによる形態観察および16S rDNA配列に基づいた属種の同定を行った。

(3) マイクロプレートで乳酸菌を培養後、培養液をOD<sub>595</sub>=0.01となるように、MRS液体培地(pH6.5)と0.3%オックスゲル添加MRS液体培地にそれぞれ接種し、30℃で24時間培養した。その後、培養液濁度を測定し、胆汁酸耐性率(%)を算出した。また、乳酸菌をマイクロプレートで培養後、培養液をOD<sub>595</sub>=0.01となるように、MRS液体培地(pH6.5)とMRS液体培地(pH3.0)にそれぞれ接種し、30℃で4時間インキュベーションした。その後、培養液をMRS寒天培地にプレーティングし、30℃で18時間インキュベーションすることで、乳酸菌コロニーを形成させ、コロニー数から胃酸耐性率(%)を算出した。

(4) アミラーゼ阻害活性を比較的高く示し、胆汁酸耐性・胃酸耐性を比較的示した乳酸菌

KY5-4 株を対象に、アミラーゼ阻害活性の生産時期の解析、生産性向上のための培養条件検討をした。MRS 培地に KY5-4 株を接種し、18 時間、30 °C で前培養した。これを MRS 培地に接種し、30 あるいは 37°C で本培養を行った。培養開始から、2、4、6、8、10、12、14、16、18、34 時間目に培養液を分取し、濁度 OD<sub>600</sub> を測定した。また、培養液上清 50 μl を遠心により分取し、(1)の方法によりアミラーゼ阻害活性を測定した。

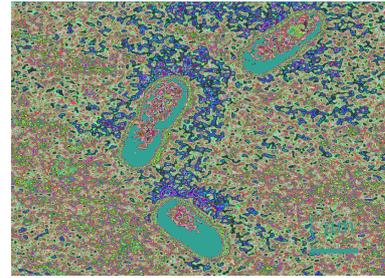


図2 KY5-4株のSEM観察像

(5) MRS 培地に KY5-4 株を接種し、30 °C、18 時間で培養した後、遠心により培養液上清を得た。培養液上清を 105 °C、5 分間、あるいは、121 °C、20 分間オートクレーブ後、アミラーゼ阻害活性を求めることで、熱安定性試験をした。このとき、オートクレーブしていない培養液上清のアミラーゼ阻害活性値を 100% として、熱安定性を求めた。一方、培養液上清を 37、20、4、-20、-80 °C で保存した後、1、6 週間後にサンプリングし、アミラーゼ阻害活性を求めることで、保存性試験をした。

(6) MRS 培地に KY5-4 株を接種し、30 °C、18 時間で培養した。培養液上清を限外分子量 3,000 の限外ろ過ユニットに入れ、20 °C、8,000×g、4 時間遠心した。ユニット上部とユニット下部のサンプルの量を測定し、MRS 液体培地を用いて、それぞれ等量となるように fill-up した。それぞれの培養液上清を用いて、アミラーゼ阻害活性を求め、アミラーゼ阻害物質の分子量を推定した。

(7) KY5-4 株を MRS 培地で培養後、集菌・洗菌し、滅菌水に懸濁した。その後、1.5%食塩水 20 ml を添加してよく揉んだ津田蕪 98 g に、KY5-4 株の懸濁液を 5.0 x 10<sup>7</sup> cells となるように接種してよく混合し、25°C で静置にて 4 日間発酵した。発酵前と発酵後の pH、生菌数、アミラーゼ阻害活性を測定し、比較した。

#### 4. 研究成果

(1) 確立したハイスループットスクリーニング法を用いて、津田蕪漬けから分離した約 1000 株の乳酸菌ライブラリーより、ブタ腭臓由来 α-アミラーゼに阻害活性を示す新規乳酸菌 5 株を分離し、SEM による形態観察を行ったところ、いずれも桿菌の形態を示した (図 2)。また、16S rDNA 配列解析の結果、得られた 5 株は *Leuconostoc* sp. および *Weissella* sp. と高い相同性を示した。

(2) KY5-4 株の胃酸耐性率・胆汁酸耐性率を調べたところ、それぞれ 1.11%、19.6%であったことから、プロバイオティクスとしても有用である可能性が示された。

(3) KY5-4 株の培養液上清におけるアミラーゼ阻害活性を経時的に解析したところ、37°C よりも 30°C で培養した方が、菌の生育度は高かった。一方、アミラーゼ阻害活性は 37°C で培養した方が培養 10 時間目以降高い値が確認された。特に、37°C、培養 14 時間目において最大阻害活性値 22.5%を示した (図 3)。

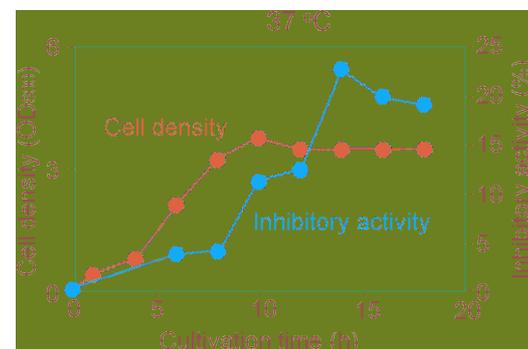
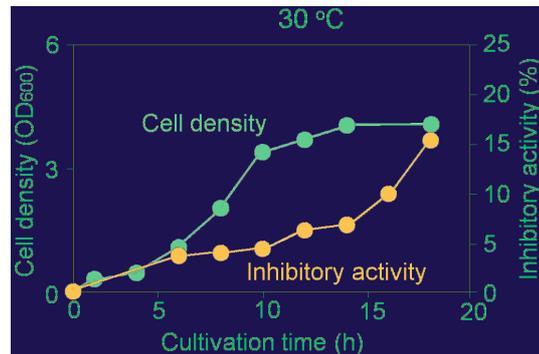


図3 アミラーゼインヒビター生産解析 (上: 培養温度 30°C、下: 培養温度 37°C)

(4) KY5-4 株の売条駅上清を 121°C、20 分間

の熱処理に供した結果、アミラーゼインヒビター残存活性値は73.5%であった。一方、37℃～-80℃、4週間の保存処理では残存活性値22.6～37.1%を示したことから、KY5-4株の生産するアミラーゼインヒビターは比較的耐熱性・保存性にも優れることがわかった。

(5) KY5-4株を用いて津田蕪漬けを試作してみたところ風味豊かな漬物ができた(図4)。発酵終了(発酵開始4日目)における漬け汁のpHは5.16となり、発酵前(pH5.57)と比べて若干低下した。また、発酵終了における漬け汁中の生菌数は $1.5 \times 10^8$  cellsとなり、発酵前( $5.0 \times 10^7$  cells)と比べて増加した。さらに、発酵終了における漬け汁中のアミラーゼ阻害活性値は8.6%となり、発酵前(0.6%)と比べて増加した。

発酵前



発酵後



図4 KY5-4株を用いた蕪漬けの試作

(6) 以上のことから、KY5-4株を生菌として、もしくは、培養液上清を食品に用いることでバラエティ豊かな糖尿病予防食を開発できると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

① 麻生祐司、アミラーゼ阻害活性を有する乳酸菌の分離と機能解析、日本生物工学会、2010年10月29日(ワールドコンベンションセンターサミット・宮崎県宮崎市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

麻生 祐司 (ASO YUJI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：70380590

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：