

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17902

研究課題名(和文) 乳酸菌を用いた加糖卵白発酵と卵白タンパク質由来機能性ペプチドに関する研究

研究課題名(英文) Research on sweetened egg white fermentation and albumen-derived functional peptides using lactic acid bacteria

研究代表者

荒川 健佑 (Arakawa, Kensuke)

岡山大学・環境生命科学研究所・准教授

研究者番号：50609930

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)：卵は保存性に富むことから乳酸菌による発酵が難しく、特に酵母エキス等の補助栄養成分の添加に頼らない卵白発酵はこれまで実現していない。本研究では、加糖のみで卵白発酵可能な乳酸菌を探索し、その発酵メカニズムの解明を試みた。その結果、*Lactobacillus casei*グループ乳酸菌(現 *Lactocaseibacillus*)のみが加糖卵白発酵可能であり、その要因として、卵白に含まれる抗菌タンパク質(リゾチーム)とプロテアーゼ阻害タンパク質に対する耐性を同乳酸菌が特異的に持つためであることを見出した。現在、発酵加糖卵白中に遊離してくるペプチドの機能性について、引き続き調べている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵は保存性に富み、発酵が困難であると考えられてきたことから、これまで液卵発酵に関する研究はほとんどなされてこなかった。本研究では、世界に先駆けて、酵母エキス等の補助栄養成分の添加に頼らない、加糖のみでの乳酸菌による卵白発酵を実現した。このことは、発酵液卵という新たな食品の誕生の礎になることが十分に想定され、社会的意義は極めて高いと考えている。また、それだけでなく、卵白発酵のメカニズムを解明する過程で、いままで十分に明らかにされてこなかった乳酸菌のタンパク質代謝に関する新たな知見を見出したことは、学術的意義も十分にあったと考えている。

研究成果の概要(英文)：Egg fermentation with lactic acid bacteria (LAB) is generally recognized to be difficult due to its high preservability. In particular, for fermentation of egg white, any nutritional supplement such as yeast extract had been needed to grow LAB well. In this study, egg white fermentation was achieved specifically using *Lactobacillus casei*-group LAB without any supplements except sugar. Then, it was found that *Lb. casei*-group LAB were tolerant to lysozyme and protease inhibitor proteins included in egg white. That is thought as the reasons why they can specifically ferment sweetened egg white. We are continuously researching about the mechanism of egg white fermentation in detail, and also about the functional peptides derived from egg white proteins during the fermentation.

研究分野：畜産物利用学、畜産食品学、乳卵科学、食品加工保蔵学、食品微生物学、発酵学、生物活性ペプチド

キーワード：乳酸菌 卵白 発酵 *Lactobacillus casei* *Lactocaseibacillus* リゾチーム 菌体外プロテアーゼ
プロテアーゼ阻害

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

卵は、乳や肉とともに、豊富な栄養源をバランス良く含む畜産食品として古くから食されてきた。また、凝固性・ゲル化性・起泡性・乳化性といった有用な性質を生かした様々な調理・加工形態があることから、食品製造において最も重要な原材料の1つとして用いられている。しかし、殻付卵や加工卵としての販売は行われているものの、乳や肉と異なり、発酵原料としての利用はほとんどなされてこなかった。これは、卵自体が保存性に優れており、他の生鮮食品のように保存目的での発酵が重要視されてこなかったためと考えられる。卵の保存性は、卵殻部による物理的な一次バリアと卵白部に含まれる抗菌性タンパク質(オボトランスフェリン、リゾチーム、アビジン等)による二次バリアによるところが大きい。また、汚染微生物のエネルギー源となる糖質が少ないこと、同様にエネルギー源となる脂質が膜に覆われた卵黄部に偏在していること、卵白中に含まれるプロテアーゼ阻害タンパク質が微生物の増殖に必要な窒素源となるペプチドやアミノ酸の切り出しを困難にしていることなども、卵の保存性の高さの一因と考えられる。しかし、裏を返せば、保存性の高さは発酵の難しさを表しており、これらの要因は液卵発酵を達成するためのハードルと見なすこともできる。

現代の乳酸菌等の微生物による食品発酵は、保存性の向上というより、むしろ風味・テクスチャーの変化および保健機能の付与という目的で行われることが多い。最近では、それらを期待した液卵発酵が試みられるようになってきているが、前述の通り、卵には保存性、すなわち微生物増殖抑制能が備わっていることから、発酵微生物の良好な増殖(液卵発酵)には糖質や酵母エキス(ペプチド混合物)等の栄養源を補助的に液卵に添加する必要がある。特に、微生物増殖抑制要因の多い卵白ではこれらの添加は必須と考えられてきたが、酵母エキス等の添加は液卵本来の風味に少なからず影響を及ぼすことから、当然避けられることが好ましい。また、酵母エキス等の栄養成分の添加は、狭義的にはその添加栄養成分を発酵しているに過ぎず、液卵自体の成分の化学変化に乏しいと考えられることから、液卵を発酵しているとは言い難い。このことは、補助的な栄養成分を添加して作られた発酵液卵において、その保健機能が卵に起因しているわけではない可能性を意味する。

発酵食品の保健機能は近年盛んに調べられており、腸内環境改善作用・脂質代謝改善作用・血圧上昇抑制作用・抗肥満作用・免疫調節作用・抗菌作用等が知られている。それらの機能は、発酵微生物の細胞成分自体、発酵微生物が産生する代謝産物、および微生物の作用により発酵素材から遊離もしくは素材成分が変化してきた産物のいずれか、ないし複合的な作用によるものである。とは発酵素材による影響は少ないと考えられ、発酵液卵に特徴的な機能性成分があるとすればということになる。の代表的な成分には食品タンパク質由来の機能性ペプチドが挙げられ、卵黄・卵白タンパク質由来の機能性ペプチドに関する報告もいくつかなされている。しかし、それら多くはペプシンやトリプシンといった消化酵素等の食品利用可能なプロテアーゼの作用によって遊離してくるペプチドであり、発酵微生物のプロテアーゼ作用によって生じる卵タンパク質由来の機能性ペプチドに関する報告は極めて少ない。これは、そもそも液卵発酵が難しいため、試みられてさえこなかったためと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、これまで世界的にほとんど前例のない「乳酸菌を用いた液卵発酵」を実現するために、中でも最も難易度が高いと思われる「卵白発酵」に挑戦し、その発酵メカニズムの一端を解明することとした。手順としては、酵母エキス等の補助栄養成分の添加に頼らない、加糖のみで卵白発酵可能な乳酸菌を選抜し、選抜菌株が卵白発酵可能な要因(=非選抜菌株が卵白発酵できない要因)を探ることとした。また、加糖発酵卵白中に遊離するペプチドの機能性を探索するために、機能の1つとして想定される抗菌活性について評価することとした。

3. 研究の方法

(1) 加糖卵白発酵乳酸菌の選抜

加糖卵白発酵が期待される乳業用乳酸菌45菌株を供試菌とし、加糖卵白発酵中での最適温度での生育性を培養液 pH および生菌数の経時測定により評価した。72 時間培養後の培養 pH が 5.2 未満となった菌株を一次選抜し、次いで、24 時間培養時の pH が 6.2 未満となった菌株を二次選抜した。さらに、生菌数上昇が顕著だった菌株のうち、菌種・亜種が異なる菌株を三次選抜した。

(2) 抗菌性卵白タンパク質が加糖卵白発酵に及ぼす影響の評価

抗菌性卵白タンパク質であるオボトランスフェリン、リゾチームおよびアビジンを卵白中と同濃度となるように MRS 液体培地に添加し、三次選抜菌株を接種・培養した。24 時間培養中の培養液 pH、濁度および生菌数を経時測定し、MRS 液体培地での培養時と比較することにより、抗菌性卵白タンパク質の影響を評価した。対照には、加糖卵白非発酵性の乳業用乳酸菌を用いた。

(3) 加糖卵白発酵乳酸菌のリゾチーム耐性の評価

供試 45 菌株について、MRS 液体培地およびリゾチームを卵白中と同濃度となるように添加した MRS 液体培地中に接種し、24 時間培養した。培養後の培養液濁度を比較することで、供試全菌株のリゾチーム耐性を評価した。

(4) 各種栄養成分の添加が加糖卵白発酵に及ぼす影響の評価

加糖卵白発酵に及ぼす栄養成分の不足の有無を調べるために、リゾチーム耐性乳酸菌 15 菌株を供試菌として、各種栄養成分 (Tween 80、水溶性ビタミン 8 種、ミネラル 2 種、核酸塩基 6 種) を添加した加糖卵白中での生育性を培養液 pH の経時測定により評価した。評価は、栄養成分無添加の加糖卵白との比較により行った。

(5) ペプチド添加が加糖卵白発酵に及ぼす影響の評価

加糖卵白発酵に及ぼすペプチドの不足の有無を調べるために、ペプシン分解したオボアルブミン (ペプチド) を加糖卵白に添加し、同培地中での供試 15 菌株の生育性を培養液 pH の経時測定により評価した。対照培地には、ペプシン分解していないオボアルブミン (タンパク質) を添加した加糖卵白と、無添加の加糖卵白を用いた。

(6) 加糖卵白発酵乳酸菌の菌体外プロテアーゼ遺伝子保有パターンの調査

NCBI データベース上からコンプリートゲノムが公開されている *Lb. casei* グループ乳酸菌 50 菌株の菌体外プロテイナーゼ (CEP) 様遺伝子 (S8 ファミリーペプチダーゼ遺伝子) を抽出し、配列に基づく系統樹を作成した。次いで、同遺伝子配列アライメントから CEP 様遺伝子検出用プライマーを作製し、研究室保有の *Lb. casei* グループ乳酸菌 11 菌株に対して PCR を行った。これにより、加糖卵白発酵乳酸菌 (*Lb. casei* グループ乳酸菌) の CEP 様遺伝子保有状況を調べた。

(7) 卵白成分による乳酸菌菌体外プロテイナーゼ活性阻害効果の評価

CEP 様遺伝子の保有パターンの異なる *Lb. casei* グループ乳酸菌 2 菌株を加糖卵白およびリゾチーム添加還元脱脂乳にて 14 日間培養し、生育性 (培養液 pH、生菌数) および遊離ペプチド量を経時測定した。また、同 2 菌株作製した発酵加糖卵白における経時的なタンパク質分解を SDS-PAGE にて観察することによって、卵白成分による CEP 活性阻害効果を評価した。

(8) 乳酸菌菌体外プロテイナーゼを阻害する卵白成分の探索

乳酸菌の CEP 活性を阻害する卵白成分の同定を行うために、卵白の分画を行い、得られた各画分に対して乳酸菌集菌洗浄菌体を用いて CEP 活性測定 (遊離ペプチド定量) を行った。卵白の分画は、蒸留水に対する透析と弱陰イオン交換クロマトグラフィー (0-0.5 M NaCl によるステップワイズ溶出) によって行い、各画分に含まれている卵白タンパク質の確認は SDS-PAGE にて行った。CEP 活性測定の供試乳酸菌には、(5) でペプチド添加により大幅に生育性の向上が見られた (CEP 活性阻害を受けやすい) 2 菌株を用いた。

(9) 発酵加糖卵白の抗菌活性測定

発酵加糖卵白中で遊離するペプチドに期待される機能特性の 1 つとして抗菌活性が挙げられる。そこで、*Lb. casei* グループ乳酸菌 7 菌株を用いて発酵加糖卵白 (7 日間培養) を作製し、遠心培養上清を pH 4.0、7.0、10.0 に調整後、食中毒細菌・食品汚染細菌 10 種 10 菌株 (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Ent. faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica*) に対して寒天拡散法にて抗菌活性測定を行った。

4. 研究成果

(1) 加糖卵白発酵乳酸菌の選抜

供試 45 菌株を加糖卵白に接種・培養したところ、72 時間培養後の培養液 pH が 5.2 未満となった一次選抜株は 11 菌株であった。そのうち、24 時間培養後の培養液 pH が 6.2 未満となった二次選抜株は 7 菌株であった。7 菌株はいずれも *Lactobacillus casei* グループ (現 *Lacticaseibacillus*) 乳酸菌であった。そして、経時的な生菌数変化を観察したところ、二次選抜株いずれでも十分な増殖が確認されたが、中でも増殖が顕著だった 4 菌株のうち、菌種・亜種の異なる 3 菌株を三次選抜した。3 菌株の菌種は、*Lb. paracasei* subsp. *paracasei*、*Lb. rhamnosus*、*Lb. zeae* であった。

(2) 抗菌性卵白タンパク質が加糖卵白発酵に及ぼす影響の評価

三次選抜 3 菌株と加糖卵白非発酵性の対照 3 菌株 (*Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) について、MRS 液体培地および各種抗菌性卵白タンパク質を添加した MRS 液体培地中で培養したところ、対照菌株・選抜菌株問わず、オボトランスフェリンないしアピジン添加した培地中では良好な生育が見られた。しかし、対照 3 菌株いずれもがリゾチーム添加培地中で顕著に菌数減少したのに対し、三次選抜株 3 菌株はいずれも同培地中で十分に生育した。このことにより、加糖卵白発酵可能な乳酸菌はリゾチーム耐性を有している、すなわち発酵乳酸菌のリゾチーム耐性が加糖卵白発酵を可能にする 1 つの要因であることが示唆された。

(3) 加糖卵白発酵乳酸菌のリゾチーム耐性の評価

発酵乳酸菌のリゾチーム耐性が加糖卵白発酵の要因の 1 つであることを確かめるために、供試 45 菌株のリゾチーム耐性を試験した。その結果、二次選抜株はいずれも高いリゾチーム耐性を有していることが明らかとなった。しかし、加糖卵白非発酵乳酸菌の中にも高リゾチーム耐性の乳酸菌がいたことから、卵白発酵要因はリゾチーム耐性だけではないことが示された。

(4) 各種栄養成分の添加が加糖卵白発酵に及ぼす影響の評価

各種栄養成分を添加した加糖卵白中での供試 15 菌株の生育性を培養液 pH の経時測定により評価したところ、うち 13 菌株は栄養成分無添加区と同等の生育性を示し、添加栄養成分の不足はないと判断された。一方、*Lb. plantarum* グループ (現 *Lactiplantibacillus*) の 2 菌株は栄養成分の添加により、生育性の向上が見られた (添加栄養成分は、特定の 1 成分ではなく、複合的に *Lb. plantarum* グループ乳酸菌の生育性向上に寄与していた)。

(5) ペプチド添加が加糖卵白発酵に及ぼす影響の評価

ペプチド (ペプシン分解オボアルブミン) を添加した加糖卵白発酵中での供試 15 菌株の生育性を評価したところ、供試菌株全てでペプチド添加による大幅な生育性促進効果が認められた。タンパク質 (オボアルブミン) 添加による生育促進が見られた菌株も一部存在していたが、ペプチド添加による生育促進効果はいずれもタンパク質添加よりも顕著であった。このことは、ペプチドの不足が乳酸菌による加糖卵白発酵の制限要因になっていることを示していた。乳業用乳酸菌は、CEP によって培地中のタンパク質を分解し、トランスポーターを介してペプチドの吸収、後に菌体内で代謝利用している。このことから、リゾチーム耐性乳酸菌による加糖卵白発酵の制限要因は、(ペプチドを除く) 栄養成分の不足ではなく、何らかの卵白成分による卵白タンパク質の分解阻害 (乳酸菌 CEP 活性阻害) である可能性が強く示唆された。すなわち、加糖卵白発酵可能な乳酸菌は、リゾチーム耐性だけでなく、卵白成分による CEP 活性阻害の影響を受けづらいことが示唆された。

(6) 加糖卵白発酵乳酸菌の菌体外プロテアーゼ遺伝子保有パターンの調査

Lb. casei グループに偏在する加糖卵白発酵乳酸菌は、卵白成分による CEP 活性阻害を受けづらいことが想定されたため、同グループ乳酸菌の CEP 様遺伝子保有パターンを調べることとした。まず、コンプリートゲノムが公開されている同グループ 50 菌株の CEP 様遺伝子の系統樹を作成したところ、既知の *prtP* と *prtR* を含む 4 種類の CEP 様遺伝子が存在することが明らかとなった。次に、4 種類の CEP 様遺伝子を検出するためのプライマーを作製し、研究室保有の同グループ 11 菌株に対して PCR を行った。その結果、CEP 様遺伝子を持たない菌株、*prtP* のみを持つ菌株、*prtP* と *prtR* を持つ菌株、そして、*prtP* と未知の 2 種類の CEP を持つ菌株の 4 パターンに大別された。うち、CEP 様遺伝子を持たない菌株は加糖卵白発酵能を有していなかった。

(7) 卵白成分による乳酸菌菌体外プロテイナーゼ活性阻害効果の評価

CEP 様遺伝子保有パターンの異なる *Lb. casei* グループ乳酸菌 2 菌株を加糖卵白およびリゾチーム添加還元脱脂乳にて培養したところ、2 菌株とも両培地において培養 3 日目まで菌数の上昇が確認され、以降は減少した。また、2 菌株とも両培地において培養 7 日目までペプチドの遊離率が上昇したが、リゾチーム添加還元脱脂乳の方が加糖卵白よりも有意に高いペプチド遊離率を示した。このことから、*Lb. casei* グループ乳酸菌 2 菌株の CEP 活性は卵白成分によって阻害されていることが強く示唆された。加えて、SDS-PAGE によって発酵加糖卵白におけるタンパク質分解を確認したところ、多くの卵白タンパク質は培養 14 日後も分解されずに残存しており、卵白タンパク質の分解は極めて遅い、すなわち供試 2 菌株の CEP 活性は何らかの卵白成分により阻害されていると推定された。

(8) 乳酸菌菌体外プロテイナーゼを阻害する卵白成分の探索

乳酸菌の CEP 活性を阻害する卵白成分を同定するために、卵白を透析および陰イオンクロマトグラフィーで分画し、各画分に対する CEP 活性測定を行ったところ、透析内液上清と 0.1 M NaCl 溶出画分前半で比較的低い遊離ペプチド量を検出した。すなわち、これらの画分において CEP 活性阻害が推定された。両画分には特徴的な卵白タンパク質が含まれており、他の画分には含まれていなかったことから、同タンパク質が乳酸菌 CEP の阻害因子であることが示唆された。現在、より精密な卵白成分の分画を行っており、CEP 阻害因子の特定を試みている。

(9) 発酵加糖卵白の抗菌活性測定

発酵加糖卵白の遠心上清は、一部の食中毒細菌・食品汚染菌（主に *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica*）に対して、特に pH 4.0 に調整した際に高い抗菌活性を示した。しかし、本抗菌活性は乳酸菌未接種の遠心上清でも概ね同等に確認されたことから、発酵加糖卵白に特異的な活性ではないと推察された。すなわち、発酵加糖卵白で遊離するペプチドに起因する効果ではないと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 荒川健佑
2. 発表標題 乳酸菌の多様性と有効活用に向けた新たな取り組み
3. 学会等名 岡山県食品新技術応用研究会 令和元年度食品技術ミニシンポジウム「アイデアと技術で広がる発酵食品の世界」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kensuke Arakawa
2. 発表標題 Processing and quality control of animal food products using lactic acid bacteria
3. 学会等名 The 6th Summer Course “Bio-tech applications in Animal Science and Sustainable Livestock”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本恵輔, 劔物亜友実, 大田茜, 江原優作, 浦上莉緒, 高橋美歩, 森田英利, 荒川健佑
2. 発表標題 加糖卵白発酵乳酸菌の選抜とその発酵要因の検討
3. 学会等名 平成30年度岡山大学農学部・岡山県農林水産総合センター畜産研究所研究成果検討会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kensuke Arakawa
2. 発表標題 Sweetened egg white can be fermented with Lactobacillus casei-group lactic acid bacteria
3. 学会等名 Bioactive Okayama 2018 (BA02018)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒川健佑, 劔物垂友実, 大田茜, 江原優作, 森田英利
2. 発表標題 乳酸菌を用いた加糖卵白発酵とその発酵要因の検討
3. 学会等名 2018年度日本乳酸菌学会泊まり込みセミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒川健佑
2. 発表標題 乳酸菌を用いた新たな乳卵発酵への試み
3. 学会等名 岡山大学と岡山県による共同研究に向けた情報交換会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒川健佑, 劔物垂友実, 大田茜, 江原優作, 森田英利
2. 発表標題 加糖卵白発酵乳酸菌の選抜と発酵要因の解析
3. 学会等名 日本食品科学工学会第64回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>岡山大学大学院環境生命科学研究科動物応用微生物学分野HP http://www.gels.okayama-u.ac.jp/profile/kouza/areas07_animal.html 岡山大学農学部動物応用微生物学ユニットHP http://www.okayama-u.ac.jp/user/agr/profile/nougaku03_7.html</p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------