

大豆加工食品への利用を目的とした乳酸菌に関する検討

製品化・人材育成支援グループ 和田 潤、田中 秀典、清野 珠美

要旨

大豆加工食品製造において、日々大量の副産物が発生している。これらの副産物は栄養価も十分にありながら、日持ちがしないことから活用が難しい状態にある。そこで、現在は廃棄されている未利用資源を京都市産業技術研究所が保有する乳酸菌ライブラリーを用いて有用食品へ昇華させることを目指して、本ライブラリーの中から大豆加工食品製造の副産物に利用可能な乳酸菌を探索することとした。大豆加工食品中やその副産物に含まれる糖質の分解に関わる α -ガラクトシダーゼ活性や、豆乳や大豆ホエーに乳酸菌を添加して乳酸菌の増殖を調べたところ、全ての試験において良好な活性を示す乳酸菌を見出すことができた。本乳酸菌により、大豆加工食品由来の副産物の保存性向上が期待できるとともに、有用食品原料として展開できる可能性が示唆された。

キーワード：乳酸菌、乳酸発酵、乳酸菌ライブラリー、発酵微生物、大豆加工食品

1. はじめに

現代の日本では高齢化率は上昇しながら総人口は減少の一途をたどっている。一方、世界の人口は、爆発的な増加を続け、地球温暖化など世界規模での環境悪化とともにエネルギーや食料資源の需給がひっ迫することが懸念されている。世界では今も8億人以上が十分な食べ物を得られず飢餓に苦しんでいるが、日本は食品ロス大国で食品ロスは年間約500万トン以上である¹⁾。食品ロスの放置により大量の食べ物が無駄になるだけでなく、環境悪化や将来的な世界的人口増加に伴い、海外からの食糧輸入に依存している日本においては、食料危機が危惧されている。2030年に向けて、すべての人々が豊かで平和に暮らし続けられる社会を目指し「持続可能な開発目標（SDGs）」を掲げる今日において、食品ロスの削減は、先進国にとっても途上国にとっても、大きな課題となっている。個人個人が使用量や食べ残しなどを減らす努力をするとともに、食品製造者にはつくる責任のもとに食料廃棄量の削減努力が求められており、そのための技術や方法の開発が必要とされている。

京都で食品の製造業を営む企業においても、昨今のSDGsの意識の高まりとともに自社の製造の過程で生産され廃棄される副産物を見直し、利用の検討を行っている企業が増えてきた。対象となる食品は少なくないが、なかでも大豆加工食品は、製造過程において日々大量の副産物が発生している。京都において、豆腐、湯葉、お揚げなど大豆加工食品は多様な形態で京都名産として製

造や販売が行われている。しかし、これらの製造により副産物として生産されるオカラや大豆ホエーは、大量に生産される一方で日持ちがせず、栄養価も十分にありながら活用が難しい状態にある。

一方で、これまでに、京都市産業技術研究所では独自性を有する高付加価値発酵食品製造に用いる乳酸菌の獲得を目指し、研究所オリジナルの乳酸菌ライブラリーを構築してきた^{2、3)}。発酵食品の品質は発酵過程を担う微生物によって大きく左右され、古来よりヨーグルトや漬物など多くの発酵食品に用いられてきた乳酸菌は⁴⁾、酵母や麹菌とならんで我々にとって非常に馴染みがある発酵微生物である。近年、乳酸菌はヒトの健康に好影響を与えるプロバイオティクスとしても注目を集めており⁵⁾、その効能も多岐にわたる⁶⁻⁹⁾。優れた機能を有する乳酸菌の活用は、高付加価値食品製造への可能性を有している。

そこで、本研究では大豆加工食品製造が抱える課題に対して、京都市産業技術研究所の微生物資源である乳酸菌ライブラリーを活用した発酵による解決方法の可能性を探るべく、大豆加工食品の副産物の活用を妨げる保存性の悪さを乳酸発酵により改善し、さらには有用食品へと展開できる礎となることを目指して、大豆加工食品の発酵に適した乳酸菌を探索することとした。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

発酵食品から単離、構築した研究所保有乳酸菌ライブラリーの中から先行研究による機能解析を基に、代表的な80株を選んで用いた(表1)。

2.2 乳酸菌の培養及び調製

乳酸菌の培養はMRS培地(DIFCO)もしくはロゴサ寒天培地(関東化学)を用いて30℃、2から3日、静置で行った。MRS培地は液体培地もしくは固体培地として用い、固体培地として用いる時には液体培地の組成に1.5%となるように寒天を添加した。また、ロゴサ寒天培地は必要に応じて10 ppmとなるようにシクロヘキシミドを添加した。

2.3 α -ガラクトシダーゼ活性測定

試験する乳酸菌をMRS培地で30℃、2日、静置で培養した培養液1 mLを集菌し、PBS(0.1 M リン酸ナトリウム、0.15 M 塩化ナトリウム、pH 7.2) 45 μ Lで懸濁した。10 mM *p*-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシド 5 μ Lを添加した後、30℃、1時間、静置した。1 M 炭酸ナトリウム 20 μ Lを添加し、12000 rpmで5分間遠心して得られた上清 50 μ Lを96穴マイクロプレートに移した後、マイクロプレートリーダーを用いて400 nmで吸光度を測定し、 α -ガラクトシダーゼ活性を評価した。

濁した。10 mM *p*-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシド 5 μ Lを添加した後、30℃、1時間、静置した。1 M 炭酸ナトリウム 20 μ Lを添加し、12000 rpmで5分間遠心して得られた上清 50 μ Lを96穴マイクロプレートに移した後、マイクロプレートリーダーを用いて400 nmで吸光度を測定し、 α -ガラクトシダーゼ活性を評価した。

2.4 豆乳凝固試験

試験する乳酸菌をMRS培地で30℃、3日、静置で前培養した培養液を市販の成分無調整豆乳に1%植菌後、30℃で一晩静置後に状態を観察した。

2.5 大豆ホエーを用いた培養試験

市内の大豆加工食品製造企業より提供を受けた大豆ホエーを60℃で1時間保温後、8000 rpmで10分間遠心して得られた上清を培養試験用の大豆ホエーとした。試験する乳酸菌をMRS培地で30℃、3日、静置で前培養した培養液を1%の割合で培養試験用の大豆ホエーに植

表 1. 使用菌株

菌株番号	単離源	菌株番号	単離源	菌株番号	単離源
F106	すぐき(塩漬け)	F908	きゅうり(ぬか漬け)	F1610	ダイコン(ぬか漬け)
F107	すぐき(塩漬け)	F909	きゅうり(ぬか漬け)	F1711	ダイコン(キムチ)
F108	すぐき(塩漬け)	F910	きゅうり(ぬか漬け)	F1712	ダイコン(キムチ)
F109	すぐき(塩漬け)	F1206	すぐき(塩漬け)	F1713	ダイコン(キムチ)
F110	すぐき(塩漬け)	F1207	すぐき(塩漬け)	F1714	ダイコン(キムチ)
F201	ケフィア	F1208	すぐき(塩漬け)	F1715	ダイコン(キムチ)
F202	ケフィア	F1209	すぐき(塩漬け)	F1801	きゅうり(ぬか漬け)
F203	ケフィア	F1210	すぐき(塩漬け)	F1802	きゅうり(ぬか漬け)
F204	ケフィア	F1311	きゅうり(キムチ)	F1803	きゅうり(ぬか漬け)
F205	ケフィア	F1312	きゅうり(キムチ)	F1804	きゅうり(ぬか漬け)
F301	キャベツ(塩漬け)	F1313	きゅうり(キムチ)	F1805	きゅうり(ぬか漬け)
F302	キャベツ(塩漬け)	F1314	きゅうり(キムチ)	F2101	すぐき(塩漬け)
F303	キャベツ(塩漬け)	F1315	きゅうり(キムチ)	F2102	すぐき(塩漬け)
F304	キャベツ(塩漬け)	F1413	清酒酒母	F2103	すぐき(塩漬け)
F305	キャベツ(塩漬け)	F1414	清酒酒母	F2104	すぐき(塩漬け)
F401	白菜(キムチ)	F1415	清酒酒母	F2105	すぐき(塩漬け)
F402	白菜(キムチ)	F1416	清酒酒母	F2801	なす(しば漬け)
F403	白菜(キムチ)	F1417	清酒酒母	F2802	なす(しば漬け)
F404	白菜(キムチ)	F1418	清酒酒母	F2803	なす(しば漬け)
F405	白菜(キムチ)	F1419	清酒酒母	F2804	なす(しば漬け)
F511	水ナス(ぬか漬け)	F1420	清酒酒母	F2805	なす(しば漬け)
F512	水ナス(ぬか漬け)	F1421	清酒酒母	F3001	すぐき(塩漬け)
F513	水ナス(ぬか漬け)	F1422	清酒酒母	F3002	すぐき(塩漬け)
F514	水ナス(ぬか漬け)	F1606	ダイコン(ぬか漬け)	F3003	すぐき(塩漬け)
F515	水ナス(ぬか漬け)	F1607	ダイコン(ぬか漬け)	F3004	すぐき(塩漬け)
F906	きゅうり(ぬか漬け)	F1608	ダイコン(ぬか漬け)	F3005	すぐき(塩漬け)
F907	きゅうり(ぬか漬け)	F1609	ダイコン(ぬか漬け)		

菌し、30℃、3日、静置で本培養を行った。培養液を100 μ Lずつ96穴マイクロプレートに移した後、マイクロプレートリーダーを用いて濁度（600 nmの吸光度）を測定し、生育を評価した。

2.6 乳酸菌の糖質資化試験及び簡易同定

乳酸菌の資化試験にはAPI50CHL（ビオメリュー）を用いた。糖質が資化されることにより酸が生成されてpHが低下することに伴い、培地中に含まれるpH指示薬の色調が紫色から緑色を経て黄色に変わるため、黄色に変化したものを陽性とした。また、その中の炭素源の1つであるエスクリンに対する試験だけは黒色に変化したものを陽性とした。陽性の場合には+、陰性の場合には-、緑色の場合には±として判別した。得られた資化プロファイルを基に菌名検索用アプリケーションのアピウェブ（<https://apiweb.biomerieux.com>）から乳酸菌の属種の推定を行った。また、属種の同定には指紋領域である16S rRNA遺伝子の高度可変領域の一部の配列を決定し、データベースと照合することによっても推定した。目的とする指紋領域の増幅はPCR法を用いた。ポリメラーゼはKOD FX neo（TOYOBO）、プライマーは7Fプライマー（5'-agagtttgat (c/t) (a/c) tggctcag-3'）と1510Rプライマー（5'-acgg (c/t) taccttggttacgactt-3'）を用いてPCR条件は付属の説明書に従った。PCR産物のシーケンス解析は株式会社FASMACに委託した。シーケンスには10Fプライマー（5'-gtttgacactggctca-3'）を用いた。得られた配列をNCBIのBLAST（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome）を用いて照合し、相同性の高い菌株を調べた。

2.7 オカラを用いた培養試験

市内の大豆加工食品製造企業より提供を受けたオカラを65℃で30分保温後、室温まで冷却した。MRS培地で30℃、2日、静置で前培養した乳酸菌を生理食塩水で調製して、オカラ1 gあたり 1×10^4 cell以下になるように植菌後、30℃、3日、静置で培養した。乳酸菌を植菌した培養後のオカラを生理食塩水で懸濁、 1×10^5 倍希釈してシクロヘキシミド含有のロゴサ寒天培地2枚にそれぞれ100 μ Lずつ塗布して30℃、3日、静置で培養し、現れたコロニーを観察した。なお、比較対象のオカラのみは、オカラに生理食塩水を添加し、30℃、3日、静置で培養後、生理食塩水で10倍希釈し、同培地、同量、

同条件とした。

3. 結果と考察

3.1 α -ガラクトシダーゼ活性を有した乳酸菌の探索

大豆加工食品中にはスタキオースやラフィノースといった非還元末端にガラクトースが α 結合した構造を有するオリゴ糖が多く含まれる¹⁰⁾。これら大豆オリゴ糖を資化できる乳酸菌は効率良く大豆由来成分を利用できるのでと考え、研究所保有乳酸菌ライブラリーの中から代表的な80株に対して、2.3の手法により α -ガラクトシダーゼ活性を有した乳酸菌を探索した。活性が検出されたものを+と評価し、より活性の高かったものを++と評価し、ほとんど活性の検出されなかったものを-と評価した（表2）。本研究で用いた乳酸菌の中で多数の菌株が α -ガラクトシダーゼ活性を有していることが示唆された。

3.2 豆乳凝固能を有する乳酸菌の探索

豆乳に乳酸菌を接種して、豆乳中の成分が乳酸菌によって代謝されて十分な乳酸が生産されると豆乳が凝固した。研究所保有乳酸菌ライブラリーの中から代表的な80株を用いて、豆乳中の成分を代謝できる乳酸菌を見出すために、乳酸菌を接種して一晚静置後に豆乳が凝固するかどうか調べた。1.5 mLのチューブを試験に使い、凝固したものはチューブを逆さにしても液が滴下しなかった（図1）。一晚静置後に豆乳が凝固したものを+と評価し、凝固しなかったものを-と評価した（表2）。本研究で用いた乳酸菌の中で多数の菌株が乳酸を生成して豆乳を凝固できることが分かった。

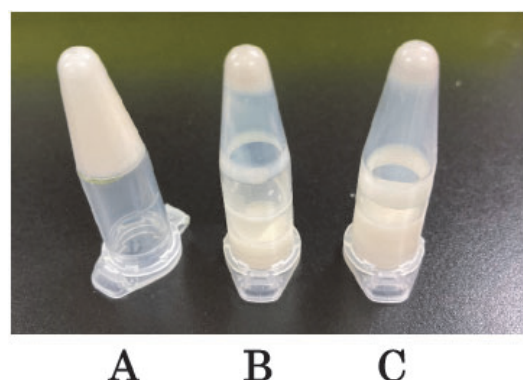


図1. 豆乳凝固試験

A：豆乳に乳酸菌を添加して凝固したもの、
B：豆乳に乳酸菌を添加して凝固しなかったもの、
C：豆乳に乳酸菌を添加していないもの。

表 2. 活性評価

菌株番号	ガラクトシ ダーゼ	豆乳 凝固	ホエー 生育	菌株番号	ガラクトシ ダーゼ	豆乳 凝固	ホエー 生育	菌株番号	ガラクトシ ダーゼ	豆乳 凝固	ホエー 生育
F106	—	+	++	F908	+	—	++	F1610	—	+	—
F107	—	+	++	F909	++	—	++	F1711	+	—	+
F108	—	+	++	F910	—	—	++	F1712	—	—	+
F109	—	+	++	F1206	++	+	++	F1713	—	—	+
F110	—	+	++	F1207	++	+	++	F1714	—	+	++
F201	+	+	++	F1208	—	+	++	F1715	—	+	++
F202	+	+	++	F1209	+	+	++	F1801	—	+	++
F203	+	+	++	F1210	++	+	++	F1802	—	+	++
F204	+	+	++	F1311	+	+	++	F1803	—	+	++
F205	+	—	++	F1312	+	+	++	F1804	—	+	++
F301	++	+	++	F1313	—	—	—	F1805	—	+	++
F302	—	—	—	F1314	—	—	—	F2101	++	+	++
F303	—	—	—	F1315	—	—	++	F2102	+	—	+
F304	—	—	++	F1413	—	—	—	F2103	++	—	—
F305	—	—	++	F1414	—	+	+	F2104	+	—	+
F401	—	—	++	F1415	—	—	—	F2105	+	—	+
F402	—	—	—	F1416	—	+	++	F2801	—	—	+
F403	—	—	—	F1417	—	—	—	F2802	++	—	—
F404	—	—	++	F1418	—	+	+	F2803	—	+	++
F405	—	—	++	F1419	—	—	—	F2804	—	+	++
F511	+	+	++	F1420	—	—	—	F2805	—	+	++
F512	+	+	++	F1421	—	+	++	F3001	++	+	++
F513	—	+	++	F1422	—	—	—	F3002	++	+	++
F514	+	+	++	F1606	—	+	—	F3003	++	+	++
F515	—	—	—	F1607	—	+	++	F3004	++	+	++
F906	—	+	++	F1608	—	+	—	F3005	—	—	—
F907	—	+	++	F1609	—	+	—				

α -ガラクトシダーゼ活性は吸光度 400 nm の値が0.2未満を—、0.2以上を+、0.5以上を++とした。
大豆ホエーに対する生育能は吸光度 600 nm の値が0.3未満を—、0.3以上を+、1.5以上を++とした。

3.3 大豆ホエーに生育できる乳酸菌の探索

調製した大豆ホエーに含まれる成分によって生育することができる乳酸菌を見出すために研究所保有乳酸菌ライブラリーの中から代表的な 80 株を用いて、乳酸菌を接種して一定時間後に乳酸菌の生育による濁度 (600 nm の吸光度) をマイクロプレートリーダーで測定した。濁度の増加が検出されたものを+と評価し、より濁度の増加の高かったものを++と評価し、ほとんど濁度が増加しなかったものを—と評価した (表 2)。本研究で用いた乳酸菌の中で多数の菌株が大豆ホエーに対して生育できることが示された。また、 α -ガラクトシダーゼ活性、豆乳凝固能、大豆ホエーに対する生育能の全てについて、F301 株、F1206 株、F1207 株、F1210 株、F2101 株、F3001 株、F3002 株、F3003 株、F3004 株など高い活性を示した菌株も複数見出すことができた。

3.4 乳酸菌の糖質資化試験及び簡易同定

種々の活性試験において高い活性を有し、特に大豆ホ

エーに対して良好に生育して濁度の高かった F3002 株について API50CHL を用いて資化試験を行った (表 3)。得られた結果を基にアピウエブにて検索を行ったところ、*Lactiplantibacillus pentosus* に属することが示唆された。また、16S rRNA 遺伝子の高度可変領域を対象にして本遺伝子を PCR 法にて増幅して、前半部分の配列 500 塩基を決定した。BLAST を用いて相同性検索を行ったところ、F3002 株は既に登録されている *Lactiplantibacillus pentosus* や *Lactiplantibacillus plantarum* に属する乳酸菌らの 16S rRNA 遺伝子の塩基配列と高い相同性を示した。両試験の結果から *Lactiplantibacillus pentosus* に属することが示唆された。

また、糖質資化試験で、F3002 株がスクロースにガラクトースが α 結合したラフィノースを資化できることが明らかになったが、 α -ガラクトシダーゼ活性の有無を調べる試験において F3002 株が α -ガラクトシダーゼ活性を有したものと整合する結果となった。

表 3. 糖質資化試験 (F3002 株)

糖質	評価	糖質	評価
グリセロール	+	サリシン	+
エリスリトール	—	D-セロビオース	+
D-アラビノース	—	D-マルトース	+
L-アラビノース	+	D-ラクトース	+
D-リボース	+	D-メリビオース	+
D-キシロース	—	D-スクロース	+
L-キシロース	—	D-トレハロース	+
D-アドニトール	—	イヌリン	—
メチルβ-D-キシロピラノシド	—	D-メレジトース	—
D-ガラクトース	+	D-ラフィノース	+
D-グルコース	+	デンプン	—
D-フルクトース	+	グリコーゲン	—
D-マンノース	+	キシリトール	—
L-ソルボース	—	ゲンチオビオース	+
L-ラムノース	±	D-ツラノース	—
ダルシトール	—	D-リキソース	—
イノシトール	—	D-タガトース	—
D-マンニトール	+	D-フコース	—
D-ソルビトール	+	L-フコース	—
メチルα-D-マンノピラノシド	—	D-アラビトール	—
メチルα-D-グルコピラノシド	—	L-アラビトール	—
N-アセチルグルコサミン	+	グルコン酸(塩)	—
アミグダリン	+	2-ケトグルコン酸(塩)	—
アルブチン	+	5-ケトグルコン酸(塩)	—
エスクリン	+		

3.5 オカラを用いた乳酸菌の培養

種々の活性試験において高い活性を示した F3002 株を生理食塩水に懸濁して濃度を調製後、オカラに添加し生育できるかを乳酸菌の選択培地であるロゴサ寒天培地を用いて調べたところ、生理食塩水のみを添加した対照サンプルには乳酸菌のコロニーは検出されなかったが、F3002 株を添加したサンプルには 1 g あたり 1×10^8 cell 以上の乳酸菌が検出された (図 2)。F3002 株がオカラにも生育できたことから、種々の活性試験において高い活性を示した菌株はオカラをはじめとした大豆加工食品や副産物に対する発酵適性が高いことが示唆された。

4. まとめ

大豆加工食品業界が抱える課題解決のために、京都市産業技術研究所の乳酸菌ライブラリーの中から大豆加工食品の発酵に適した乳酸菌を探索したところ、大豆加工食品中に多く含まれる糖質の分解に関わる α-ガラクトシダーゼ活性を有し、豆乳や大豆ホエーに対して十分に生育する乳酸菌を見出すことができた。また、選抜した乳酸菌はオカラに対しても増殖できることが示唆され

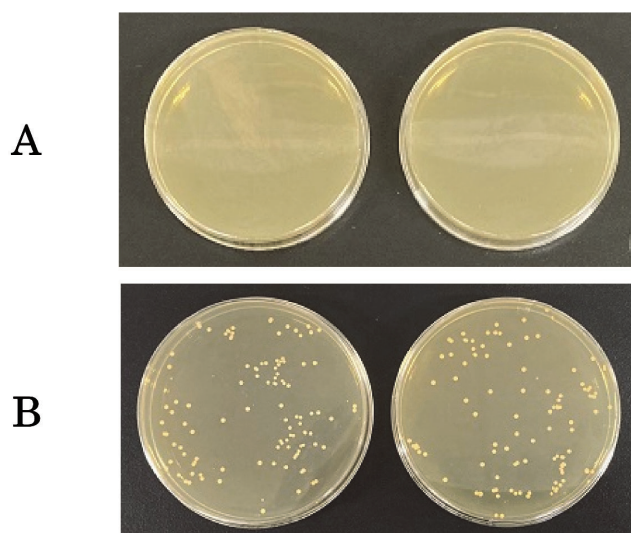


図 2. オカラを用いた培養試験
A: 無添加 B: F3002 株添加

た。これらの乳酸菌は日々大量に生産される一方で日持ちがせず、栄養価も十分にありながら活用が難しい大豆加工食品の副産物に対して乳酸発酵によって機能性（保存性）を向上させ得る可能性を有している。今後も継続

した研究が要されるが、大豆加工食品は、豆腐、湯葉、お揚げなど京都府下において京都名産として多様な形態で製造や販売が行われており、未利用資源の活用のみならず、有用食品への展開につながれば、京都の産業においてに寄与できることとなる。

参考文献

- 1) 消費者庁 消費者教育推進課 食品ロス削減推進室 編, "食品ロス削減ガイドブック", p. 6, 消費者庁 (令和4年度版).
- 2) 和田潤 他: 京都市産業技術研究所研究報告, No.5, p.87 (2015).
- 3) 和田潤 他: 酒研会報, No.55, p.9 (2016).
- 4) 乳酸菌研究集談会 編, "乳酸菌の科学と技術", p. 229, 学会出版センター (1996).
- 5) G. Reid 他: Clinical Microbiology Reviews, **16**, 658 (2003).
- 6) Y. Kikuchi 他: PLoS ONE, **9**, e86416 (2014).
- 7) K. Shida 他: Int. Arch. Allergy Immunol., **115**, 278 (1998).
- 8) J. E. Kim 他: J. Microbiol. Biotechnol., **17**, 1227 (2007).
- 9) N. Yamamoto 他: Biosci. Biotech. Biochem., **58**, 776 (1994).
- 10) 関村照吉 他: 岩手県工業技術センター研究報告, No.4, p.187 (1997).