

抗菌効果と保健効果を有した機能性発酵液卵の開発および評価

岡山大学大学院環境生命科学研究科・助教 荒川 健佑

■ 緒 言

卵は、乳や肉とともに、豊富な栄養素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活かした様々な調理形態があることから、加工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なかったためと考えられる。卵の保存性は、卵殻による物理的な一次バリアと、卵白中に含まれるオボトランスフェリンやリゾチーム、アビジンといった抗菌タンパク質の化学的な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や、卵白中に含まれるオボムコイド、オボインヒビター、オボマクログロブリンおよびシスタチンといったプロテアーゼ阻害タンパク質が窒素源となるアミノ酸やペプチドの切り出しを困難にしていることも、卵の高い保存性の一因と考えられる。しかし、加工卵においては、比較的耐熱性の高い *Bacillus*、*Enterococcus*、*Micrococcus* および *Staphylococcus* といったグラム陽性菌が低温殺菌で生残する場合があります、それらを抑制することが課題となっている¹⁾。液卵の発酵は、これら汚染微生物を制御する上で有効な手段の1つと期待される。

ところで、現代の乳酸菌による食品発酵は、保存性の向上というより、むしろ風味や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。乳酸菌およびその発酵産物の保健機能には、腸内環境改善作用・脂質(コレステロール)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・抗菌作用等が挙げられる。最近では、これらの機能を期待した液卵の発酵が試みられている^{2,3)}。しかし、前述の通り、卵には保存性(微生物抑制能)が備わっていることから、乳酸菌の良好な生育(発酵)には、糖質や酵母エキス(ペプチド混合物)等の栄養源を液卵に添加して、様々な因子による増殖抑制を乗り越えるだけの生育環境を整えてあげなければならない。特に、抗菌タンパク質が存在する卵白では必須とされている酵母エキス等の添加は、風味に悪影響を及ぼし、消費者に敬遠される傾向にあることから、避けられることが望ましい。

そこで本研究では、まず、発酵液卵の保存性向上を目指し、乳酸菌の抗菌物質として知られるバクテリオシンの汚染細菌に対する抑制効果を調べることにした。次いで、酵母エキスに頼らない機能性発酵卵白の開発を目指し、その前段階として、加糖卵白発酵乳酸菌の選抜、および選抜乳酸菌の発酵可能要因の一端を明らかにすることとした。

■ 方 法

1) バクテリオシン産生乳酸菌による液卵汚染細菌の抑制試験

代表的な乳酸菌バクテリオシンであるナイシンを産生する *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* D4(当研究室にて単離)を MRS 液体培地にて 30°C で 24 時間培養し、供試菌として用いた。培養後の遠心上清(1,600g, 20min)は pH7.0 に調整し(未調整は pH4.2)、フィルター滅菌(孔径 0.20- μ m)後、バクテリオシン活性測定に用いた。バクテリオシン活性は常法に従い、被検菌には加工卵の汚染菌となり得る 10 菌種 15 菌株(表 1)を用い¹⁾、標準寒天培地もしくは MRS 寒天培地にて試験した。結果は被検菌に対する阻止円直径の大きさで評価した。

2) 加糖卵白発酵乳酸菌の選抜

一般的に菌体外プロテアーゼ(CEP)活性が高いとされる乳酸菌 11 菌種 45 菌株(表 2)を MRS 液体培地にて培養し、供試菌として用いた。加糖卵白は、卵白に 5% (w/v) グルコースもしくは 5% (w/v) スクロースを添加し、pH7.0 に調整後、攪拌しながら 60°C で 30 分間殺菌処理することで作製した。殺菌の有効性は、加糖卵白を標準寒天培地および trypticase soy agar を用いて 25, 30, 37 および 42°C で 1 週間培養後、コロニー形成がないことにより確認した。供試菌の加糖卵白中での生育性は培養液 pH を測定することで評価し、72 時間培養後に培養液 pH が 5.2 未満となった菌株を加糖卵白中で

生育可能な乳酸菌として一次選抜した。次いで、一次選抜菌のうち生育の早かった菌株を二次選抜し、スクロース添加卵白中での経時的な生菌数測定に供した。最終的に生育性の優れていた菌株を加糖卵白発酵乳酸菌として選抜した。

3) 選抜乳酸菌の卵白抗菌タンパク質に対する耐性試験

加糖卵白発酵選抜乳酸菌の卵白抗菌タンパク質に対する耐性を調べるために、選抜乳酸菌 4 菌株および非選抜乳酸菌 3 菌株を 1.25% (w/v) オボトランスフェリン、0.35% (w/v) リゾチームもしくは 0.006% (w/v) アビジンを添加した MRS 液体培地にて 24 時間培養し、経時的に培養液 pH、濁度 (OD₆₂₀) および生菌数を測定した。卵白抗菌タンパク質に対する耐性は、それぞれの値を MRS 液体培地での値と比較することにより評価した。さらに、同様の方法 (濁度のみ) で全供試菌 45 菌株のリゾチーム耐性を評価した。

■ 結果および考察

1) バクテリオシン産生乳酸菌による液卵汚染細菌の抑制試験

汚染細菌に対する *Lc. lactis* subsp. *lactis* D4 の培養上清 (pH4.2 および pH7.0) の抗菌活性測定の結果を表 1 に示した。Staphylococci に対しては、pH 調整の有無に関わらず、十分な抗菌効果を示した。Bacilli、micrococci および enterococci に対しては菌株特異的な抗菌効果を示し、その効果は pH 未調整 (pH4.2) の方が pH7.0 に調整したものより高かった。本結果は、ナイシンが酸性域でより高い抗菌活性を示すことと、ナイシンと乳酸による相乗効果によるものと考えられた。これらの結果から、発酵液卵中でナイシン産生株は汚染細菌の抑制に有効と思われたが、後述の通り、*Lc. lactis* subsp. *lactis* は卵白中での生育が良好でない (リゾチーム耐性が低い) ことから、発酵液卵中でナイシンを十分に産生することは困難と想定された。しかし、ナイシンは食品添加物として認可されているため、ナイシン製剤を発酵液卵に添加する効果はあると考えられた。一方、未発酵液卵では、pH7.0 で汚染源として最も対策が必要な *B. cereus* を中心に抗菌活性が低かったことから、ナイシンの添加効果は比較的低いものと想定された。しかし、細胞壁分解作用を有するリゾチームと孔形成による殺菌作用を有するナイシンとの併用効果は既に報告がある⁴⁾ことから、液卵中では想定以上のナイシン添加効果が認められる可能性がある。今後、ナイシンの液卵への添加効果を試験するとともに、液卵中で生育可能なバクテリオシン産生乳酸菌の探索を行う予定である。

2) 加糖卵白発酵乳酸菌の選抜

グルコースもしくはスクロースを添加した卵白中での供試乳酸菌 45 菌株の生育性を培養液 pH にて評価した結果、いずれかの培地で 72 時間培養時に pH<5.2 となった 11 菌株を加糖卵白中で生育可能な乳酸菌として一次選抜した (表 2)。内訳は、*Lb. casei* が 6 菌株、*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* が 2 菌株、*Lb. paracasei* subsp. *paracasei* が 1 菌株、および *Streptococcus thermophilus* が 2 菌株であった。次いで、培養液 pH の経時測定の結果から、生育の早かった *Lb. casei* 6 菌株および *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 1 菌株を二次選抜した (24 時間培養時の培養液 pH を表 2 に示した)。さらに、スクロース添加卵白での生菌数変化から、生育性の優れていた 4 菌株 (JCM 11302, KCTC 3260, MAFF 401102 および NIAI L-54) を加糖卵白発酵乳酸菌として最終選抜した (図 1)。最終選抜菌はいずれも *Lb. casei* であり、二次選抜菌を含めても *Lb. casei* と近縁の *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* のみであった。本結果は、*Lb. casei* およびその近縁種が加糖卵白発酵を可能にする何らかの要因を特異的に持つことを示唆する。これまで全卵を乳酸菌にて発酵した事例はあったが^{5,6)}、栄養源が相対的に乏しく、抗菌タンパク質およびプロテアーゼ阻害タンパク質が豊富な卵白で、酵母エキス等の生育促進成分を添加せずに乳酸発酵を実現した報告はなかった。よって、本成果は加糖のみで乳酸菌による卵白発酵を実現した初めての事例となった。酵母エキス等の添加なしに卵白発酵した本事例は、卵以外の成分に由来する雑味を排除できるだけでなく、様々な生理機能が知られる卵ペプチド⁷⁾の生成を促すという利点もある。なぜなら、一般的に乳酸菌の CEP はペプチドが豊富な環境下では発現が極端に低い一方で、ペプチドが少ない環境下では発現が上昇するためである⁸⁾。ゆえに、酵母エキス等のペプチド成分を添加しない本発酵方法は、乳酸菌 CEP による卵タンパク質からの機能性ペプチドの遊離を引き起こす可能性を十分に有する。今後、本発酵方法で生じる卵白ペプチドの分離および機能解析を行うことにより、機能性発酵液卵の開発に繋げていきたいと考えている。

3) 選抜乳酸菌の卵白抗菌タンパク質に対する耐性試験

選抜した乳酸菌の加糖卵白における生育要因の一端を解明するために、卵白タンパク質に対する耐性試験を行った。用いた非選抜菌3菌株・選抜菌4菌株はともにオボトランスフェリンおよびアビジンに対して耐性を有していたが、非選抜菌はいずれもリゾチームに対して感受性を示した(図2)。一方で、選抜菌はいずれもリゾチーム耐性を有していた。次に、供試45菌株のリゾチーム耐性試験を行ったところ、二次選抜菌7菌株全てにおいて比較的高い耐性が認められた(図3)。これらの結果は、選抜乳酸菌の加糖卵白中での良好な生育性の一因がリゾチーム耐性にあることを示唆する。しかし、リゾチーム耐性を示した非選抜菌も存在したことから、リゾチーム耐性以外の生育要因もあると思われる。一般的に乳酸菌は複雑な栄養要求性を示すことから、脂質、ビタミンおよびミネラル(特に亜鉛やマンガン)といった卵白中に比較的少ない栄養成分の不足がリゾチーム耐性非選抜乳酸菌の生育を抑制した可能性がある。また、プロテアーゼ阻害タンパク質の影響等で、非選抜菌の CEP が卵白タンパク質から窒素源となるアミノ酸やペプチドをうまく切り出せていないことも考えられる。一方で、*Lb. casei* に特徴的に見られる加糖卵白中での良好な生育性は、そのリゾチーム耐性だけでなく、加糖卵白による十分な栄養供給があったためと見なせる。*Lb. casei* 等のリゾチーム耐性のメカニズムは不明であるが、単純なペプチドグリカンの厚さの差異の他に、菌種特異的な CEP 等によるリゾチーム活性阻害があるのかもしれない。

■ 要 約

ナイシン産生乳酸菌 *Lc. lactis* subsp. *lactis* D4 の培養上清を用いて液卵汚染細菌に対する抗菌活性測定を行った。その結果、pH 未調整(pH4.2)および調整(pH7.0)の培養上清はそれぞれ15菌株中12および7菌株に対して抗菌効果を示した。*Lc. lactis* subsp. *lactis* が加糖卵白中で十分に生育しなかったことから、発酵液卵中でのナイシン産生は困難と考えられたが、ナイシン製剤の添加による液卵汚染防除の可能性は期待された。

乳酸菌11菌種45菌株を供試菌として用い、加糖卵白中での生育性を培養液 pH および生菌数から評価した。その結果、良好な生育性を示した4菌株を加糖卵白発酵乳酸菌として最終選抜した。4菌株はいずれも *Lb. casei* であり、高いリゾチーム耐性を有していた。本選抜菌による発酵方法は、酵母エキス等を添加する必要がないことから、卵以外の雑味を排除した発酵液卵の開発に有用と考えられた。また、酵母エキス等のペプチド成分を添加しないことは、乳酸菌 CEP による卵タンパク質の分解を促進し、機能性卵ペプチドを含む発酵液卵の開発に繋がると期待された。

■ 文 献

1. 今井忠平, 中丸悦子(1990)卵と耐熱菌. *New Food Industry* 32:77-83.
2. Li, S., Offengenden, M., Fentabil, M., Ganzle, M. G., Wu, J.(2013)Effect of egg white fermentation with lactobacilli on IgE binding ability of egg white proteins. *Food Res. Int.* 52:359-366.
3. 有満和人, 児嶋高志, 松岡亮輔, 成田琴美, 出井明子(2015)卵白を乳酸発酵した新素材「ラクティエッグ」が広げる世界. *日本食品工学会誌* 16:79-82.
4. Chung, W., Hancock, R. E. W.(2000)Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 60:25-32.
5. 片峯伸一郎, 関本邦敏, 持田芳照, 志済吉信, 古川徳, 山中良忠(1977)全卵液の滅菌方法の検討及び乳酸菌による滅菌全卵液の発酵について. *日本食品工業学会誌* 24:30-36.
6. 片峯伸一郎, 間宮米二, 関本邦敏, 古川徳, 山中良忠(1978)全卵液の滅菌及び乳酸発酵における卵蛋白質及び遊離アミノ酸の変化. *日本食品工業学会誌* 25:311-317.
7. Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Chen, F., Liu, J.(2014)Application and bioactive properties of proteins and peptides derived from hen eggs:opportunities and challenges. *J. Sci. Food Agric.* 94:2839-2845.
8. Sadat-Mekmene, L., Genay, M., Atlan, D., Lortal, S., Gagnaire, V.(2011)Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review. *Int. J. Food Microbiol.* 146:1-13.

表1. 汚染細菌に対する*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* D4の培養上清の抗菌活性

Species	Strain	Culture Temp. (°C)	Diameter of clear zone (mm±S.D.)	
			pH 4.2	pH 7.0
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	JCM 20624 ^T	37	11.00 ± 0.00	10.00 ± 0.00
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	IAM 1011	37	15.00 ± 0.00	13.33 ± 0.58
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	JCM 2414 ^T	37	14.00 ± 1.73	14.00 ± 0.00
<i>Bacillus cereus</i>	JCM 2152 ^T	30	16.00 ± 1.00	11.00 ± 0.00
<i>Bacillus cereus</i>	JCM 17690	37	7.67 ± 0.58	—
<i>Bacillus cereus</i>	JCM 20037	30	—	—
<i>Bacillus cereus</i>	JCM 20054	30	17.67 ± 1.15	—
<i>Bacillus cereus</i>	JCM 20240	30	12.33 ± 0.58	—
<i>Bacillus megaterium</i>	JCM 2506 ^T	30	17.33 ± 0.58	14.33 ± 0.58
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	JCM 1465 ^T	30	—	—
<i>Bacillus circulans</i>	JCM 2504 ^T	30	17.67 ± 1.15	14.67 ± 0.58
<i>Micrococcus flavus</i>	JCM 14000 ^T	30	—	—
<i>Micrococcus luteus</i>	JCM 1464 ^T	30	15.67 ± 1.53	14.33 ± 0.58
<i>Enterococcus faecalis</i>	JCM 5803 ^T	37	8.33 ± 1.15	—
<i>Enterococcus faecium</i>	JCM 5804 ^T	37	9.33 ± 0.58	10.00 ± 1.73

孔径 = 6 mm; —, 阻止円なし

表2. 加糖卵白における供試乳酸菌45菌株の培養液pH（72および24時間培養）

Species	Strain	Incubation temp. (°C)	pH ± S.D. (72 h)		pH ± S.D. (24 h)		
			+Glc	+Suc	+Glc	+Suc	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	JCM 1132 ^T	37	7.97 ± 0.08	8.59 ± 0.13	N.D.	N.D.	
<i>Lactobacillus casei</i>	JCM 11302	37	3.92 ± 0.03	4.19 ± 0.03	5.54 ± 0.04	5.94 ± 0.10	
	KCTC 3260	37	5.04 ± 0.02	5.04 ± 0.10	5.78 ± 0.04	5.59 ± 0.15	
	MAFF 401102	37	4.23 ± 0.09	4.80 ± 0.10	5.13 ± 0.22	5.84 ± 0.10	
	MAFF 401201	37	4.97 ± 0.05	5.16 ± 0.03	5.73 ± 0.05	5.99 ± 0.04	
	NBRC 15883 ^T	37	6.48 ± 0.28	5.31 ± 0.02	N.D.	N.D.	
	NIAI L-14	37	4.18 ± 0.15	4.10 ± 0.01	5.53 ± 0.03	5.26 ± 0.13	
	NIAI L-54	37	4.74 ± 0.17	5.15 ± 0.23	6.13 ± 0.16	6.14 ± 0.12	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	JCM 1001	37	6.33 ± 0.64	5.00 ± 0.06	7.08 ± 0.12	7.06 ± 0.10	
	JCM 1002 ^T	37	6.16 ± 1.56	5.25 ± 0.07	N.D.	N.D.	
	JCM 11037	37	6.80 ± 0.88	5.14 ± 0.19	7.49 ± 0.05	6.98 ± 0.12	
	JCM 11038	37	6.58 ± 1.51	8.00 ± 0.06	N.D.	N.D.	
	JCM 20398	37	6.62 ± 1.42	8.17 ± 0.11	N.D.	N.D.	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	ATCC 9649 ^T	37	6.63 ± 1.21	7.55 ± 0.42	N.D.	N.D.	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	JCM 1248 ^T	37	6.54 ± 1.39	8.51 ± 0.09	N.D.	N.D.	
<i>Lactobacillus helveticus</i>	JCM 1003	37	7.80 ± 0.09	5.99 ± 0.16	N.D.	N.D.	
	JCM 1004	37	7.23 ± 0.93	8.55 ± 0.07	N.D.	N.D.	
	JCM 1005	37	7.19 ± 0.88	8.44 ± 0.11	N.D.	N.D.	
	JCM 1006	37	6.19 ± 1.90	7.94 ± 0.35	N.D.	N.D.	
	JCM 1007	37	7.48 ± 0.92	8.76 ± 0.04	N.D.	N.D.	
	JCM 1008	37	6.60 ± 1.72	7.62 ± 1.44	N.D.	N.D.	
	JCM 1062	37	6.89 ± 1.43	8.56 ± 0.06	N.D.	N.D.	
	JCM 1103	37	5.86 ± 1.00	8.43 ± 0.09	N.D.	N.D.	
	JCM 1120 ^T	37	5.31 ± 0.86	8.14 ± 0.59	N.D.	N.D.	
	JCM 1554	37	6.50 ± 0.78	8.35 ± 0.03	N.D.	N.D.	
	JCM 1555	37	6.98 ± 1.27	7.87 ± 0.41	N.D.	N.D.	
	JCM 20023	37	5.76 ± 1.65	8.37 ± 0.35	N.D.	N.D.	
	MAFF 401103	37	6.76 ± 1.40	8.37 ± 0.07	N.D.	N.D.	
	MAFF 401104	37	5.66 ± 1.76	8.29 ± 0.28	N.D.	N.D.	
	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	ATCC 25598	30	3.96 ± 0.01	5.15 ± 0.16	5.15 ± 0.16	6.13 ± 0.05
		NBRC 15889 ^T	30	5.42 ± 0.09	5.22 ± 0.01	N.D.	N.D.
	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	NBRC 15906 ^T	30	7.32 ± 0.30	8.68 ± 0.09	N.D.	N.D.
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	JCM 12533 ^T	30	6.39 ± 0.09	8.16 ± 0.54	N.D.	N.D.	
<i>Lactobacillus pentosus</i>	JCM 1558 ^T	30	6.45 ± 0.11	7.96 ± 1.04	N.D.	N.D.	
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	JCM 1149 ^T	30	6.21 ± 0.46	6.40 ± 0.93	N.D.	N.D.	
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i>	JCM 16169 ^T	30	6.25 ± 1.04	8.31 ± 0.18	N.D.	N.D.	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	JCM 1136 ^T	37	5.32 ± 0.37	5.98 ± 0.05	N.D.	N.D.	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	NBRC 100676 ^T	30	7.85 ± 0.40	7.26 ± 0.72	N.D.	N.D.	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	IFO 12007	30	7.56 ± 0.02	8.59 ± 0.26	N.D.	N.D.	
	NBRC 100933 ^T	30	7.09 ± 0.63	8.57 ± 0.24	N.D.	N.D.	
	NIAI 527	30	7.59 ± 0.06	8.67 ± 0.21	N.D.	N.D.	
	NIAI N-7	30	5.58 ± 0.29	8.49 ± 0.10	N.D.	N.D.	
	JCM 7638	37	6.74 ± 1.68	7.50 ± 0.64	N.D.	N.D.	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	JCM 17834 ^T	37	6.53 ± 1.08	5.03 ± 0.21	7.40 ± 0.02	6.92 ± 0.28	
	JCM 20026	37	7.48 ± 0.58	4.99 ± 0.19	7.29 ± 0.27	6.87 ± 0.42	
Control		37	8.17 ± 0.11	8.49 ± 0.45	7.60 ± 0.05	7.71 ± 0.13	

太字 = pH < 5.2（72時間培養）, pH < 6.2（24時間培養）

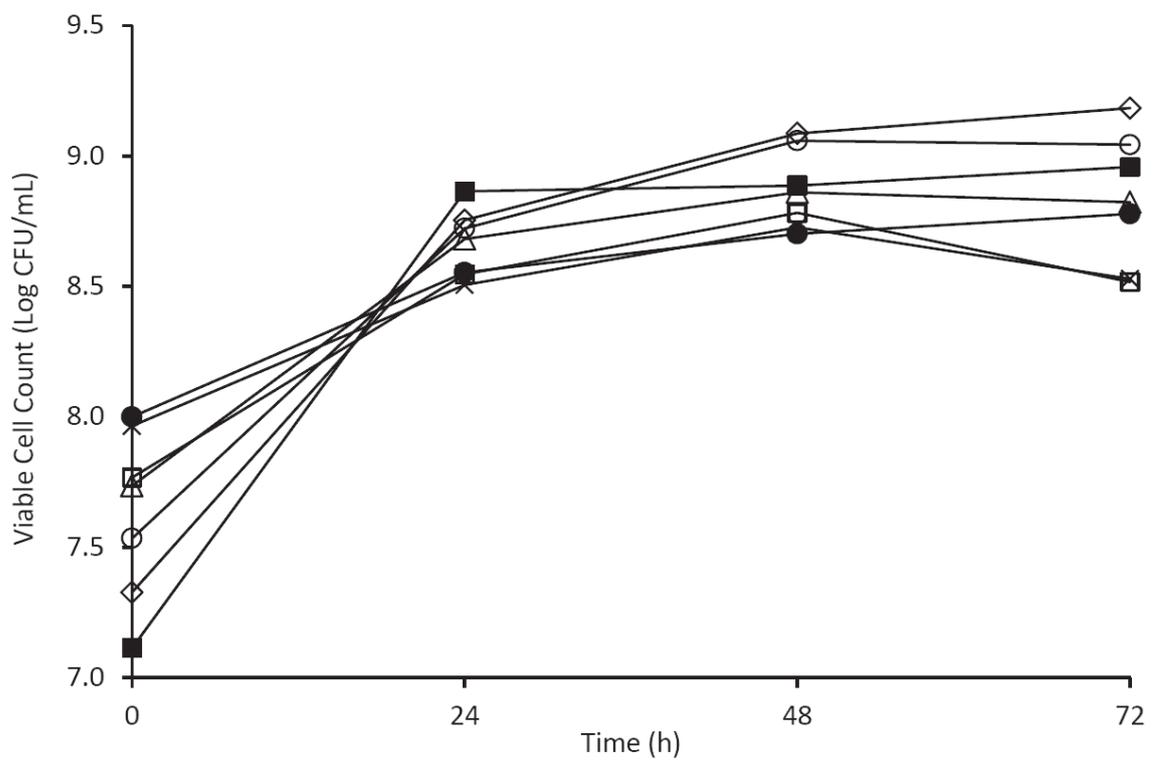


図1. スクロース添加卵白における二次選抜乳酸菌の生育性

◇, *Lb. casei* JCM 11302; ■, *Lb. casei* KCTC3260; △, *Lb. casei* MAFF 401102; ●, *Lb. casei* MAFF 401201;
 □, *Lb. casei* NIAI L-14; ○, *Lb. casei* NIAI L-54; ×, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 25598

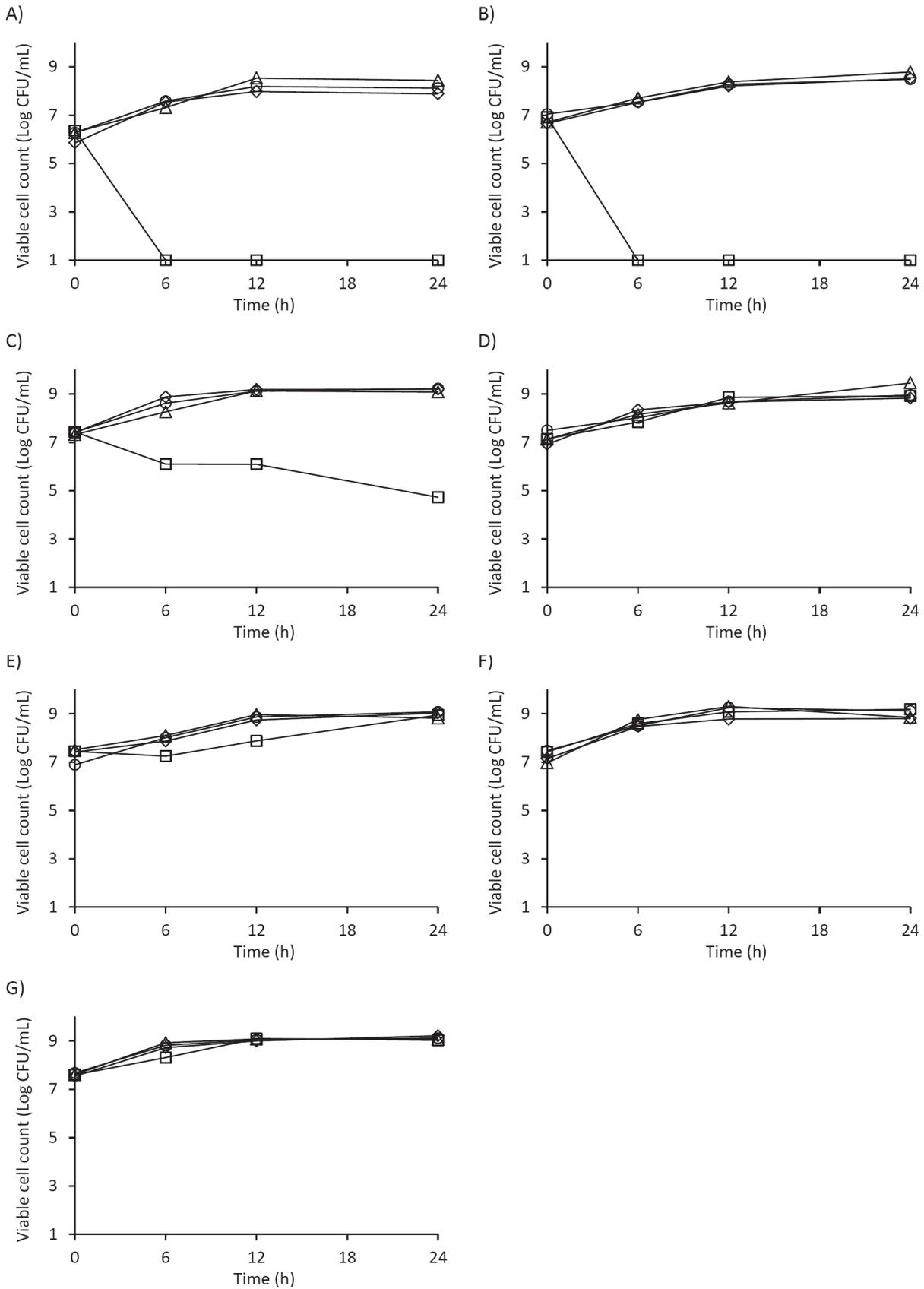


図2 乳酸菌の卵白抗菌タンパク質に対する耐性試験

A) *Lb. acidophilus* JCM 1132^T; B) *Lb. helveticus* JCM 1120^T; C) *Lc. lactis* subsp. *lactis* NBRC 100933^T;

D) *Lb. casei* JCM 11302; E) *Lb. casei* KCTC 3260; F) *Lb. casei* MAFF 401102; G) *Lb. casei* NIAI L-54

◇, MRS培地; △, オボトランスフェリン添加MRS培地; □, リゾチーム添加MRS培地; ○, アビジン添加MRS培地

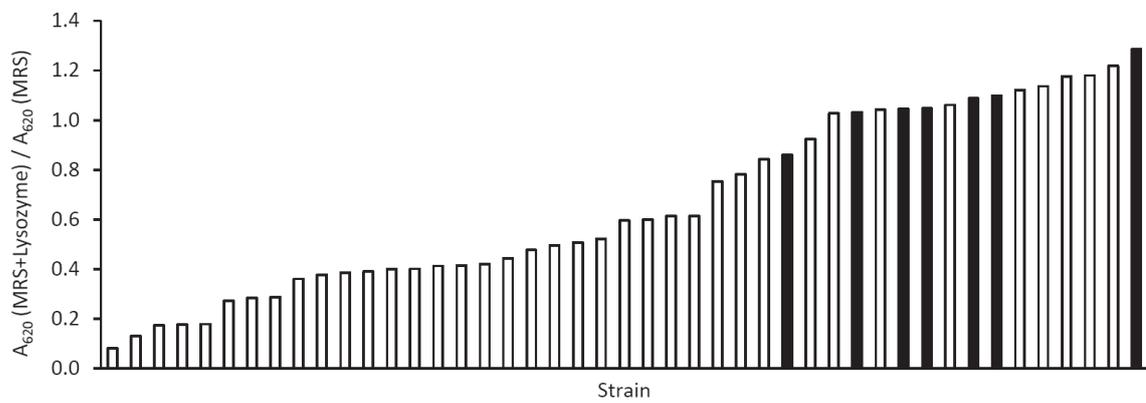


図3. 供試乳酸菌45菌株のリゾチーム耐性試験
 黒, 加糖卵白発酵選抜菌株; 白, 非選抜菌株