

甘藷を利用した乳酸発酵食品の開発

小玉 誠^{*1}・高山 清子^{*2}・工藤 哲三^{*2}・小村 美穂^{*3}
水野 貴之^{*4}・榊原 洋一^{*4}・水光 正仁^{*4}

Development of the Lactic Fermented Food using the Sweet Potato

Makoto KODAMA, Kiyoko TAKAYAMA, Tetsuzo KUDO, Miho KOMURA
Takayuki MIZUNO, Yoichi SAKAKIBARA, Masahito SUIKO

甘藷を利用した機能性オリゴ糖の調製及びそれを原料とした乳酸発酵物の製造について検討した。オリゴ糖については、甘藷をペースト状にしたものに糖化酵素とトランスグルコシダーゼを添加することによりイソマルトオリゴ糖を調製することができ、ペースト中に約15%と高濃度のオリゴ糖を調製できる条件を確立した。また、甘藷に適性の高い乳酸菌を選抜することで甘藷乳酸発酵物の調製が可能となった。調製物の抗変異原性及びガン細胞増殖抑制について検討したところ、乳酸発酵物において高い活性を示した。

キーワード：甘藷、オリゴ糖、乳酸発酵、抗変異原性、ガン細胞増殖抑制

1 はじめに

宮崎県内で広く生産されている甘藷については、多くのデンプンを含むことから、加工品原料、アルコール原料及びデンプン原料として利用されているが、更なる高付加価値化や高度利用が望まれていた。

そこで、甘藷の生理活性的な付加価値を更に向上させるために、甘藷を原料としたオリゴ糖製造及び乳酸発酵について検討した。

製造するオリゴ糖は、デンプンを基質として生成することのできる「イソマルトオリゴ糖」を選んだ。イソマルトオリゴ糖は、ビフィズス菌増殖因子があることや、抗う蝕性で虫歯を抑制することも明らかにされている機能性オリゴ糖である。

また、乳酸発酵についても、近年、植物を原料として乳酸発酵を行うことのできる「植物性乳酸菌」の研究が進んでおり、さらにその乳酸発酵物の機能性についても検討されている。

本報告では宮崎県の主要農作物である甘藷の生

理活性的な付加価値を更に向上させるために、甘藷を利用したオリゴ糖調製及びそれを原料として乳酸発酵物の調製を行い、それらについて抗変異原性試験及びガン細胞増殖抑制効果について検討したので報告する。

2 実験方法

2-1 甘藷ペーストの調製

原料甘藷は宮崎産ミヤザキベニを用いた。

まず、蒸し器で50分間蒸煮し、甘藷中のデンプンを α 化した。皮剥後、適量の水を添加し、コロイドミルにより攪拌することでペースト化し、裏ごしすることにより甘藷ペーストとした。

2-2 糖・オリゴ糖の分析

ペーストを適宜希釈し、 $0.20\mu\text{m}$ フィルターろ過することにより分析用試料とした。分析用試料は、イオンクロマトグラフ（DX-500 日本ダイオネクス製）に供することにより分析した。分析条件は表1のとおりに行った。

グルコース、シュークロース、フラクトース、マルトース、マルトトリオース、イソマルトース、イソマルトトリオース及びパノースを標準物質とし、各成分の定量を行った。

* 現 宮崎県産業支援財団 結集型研究推進室
* 1 食品開発部
* 2 応用微生物部
* 3 宮崎大学農学部応用生物科学科

表1 イオンクロマトグラフィーの条件

分離カラム	CarboPac PA-100
ガードカラム	CarboPac PA-100 GUARD
溶離液	15mM NaOH
流量	1.0ml/min
検出器	パルスドアンペロメトリー検出器

2-3 甘藷デンプンの糖化

甘藷濃度20%のペーストにBiozyme A、M、L、F10SD（以上4種 α -amylase）Biozyme M5、ML（以上2種 β -amylase）gluczyme AF6、NL4.2（以上2種glucoamylase）計8種の糖化酵素（天野エンザイム製）をそれぞれ甘藷に対して0.1%の濃度で添加し、50℃恒温水中で30分から3時間処理することにより糖化を行った。遊離糖をHPLCにより定量することにより評価した。

2-4 オリゴ糖の調製

(a) 酵素剤の検討

20%甘藷ペーストに3種の糖化酵素を甘藷に対して0.05%と共にtransglucosidase L（天野エンザイム製）を0.5%添加することによりイソマルトオリゴ糖の調製を検討した。

(b) 酵素剤濃度の検討

20%甘藷ペーストに甘藷に対して0.05%のbiozyme F10SDと共にtransglucosidase Lを0.05～1%添加し、イソマルトオリゴ糖の生成量を検討した。

(c) 処理時間の検討

20%甘藷ペーストに甘藷に対してのbiozyme L 0.05%、transglucosidase L 0.2%を添加し、添加直後から30分後までのイソマルトオリゴ糖生成量を測定した。

(d) 基質中甘藷濃度の検討

甘藷濃度が20、30、40%となるように水を添加し、各甘藷濃度のペーストを調製した。これに甘藷に対して0.05%のbiozyme Lと0.2%のtransglucosidase Lを添加し、50℃で3時間処理を行った。

2-5 乳酸発酵物の調製

乳酸発酵物は次のとおり調製した。甘藷ペーストを調製した後、甘藷に対して β -アミラーゼ0.05%、トランスグルコシダーゼ0.2%（共に天野エ

ンザイム製）を添加し、50℃で2時間処理後、煮沸水浴中で20分加熱失活することにより甘藷オリゴ糖液を調製した。これを30℃まで冷却後、供試乳酸菌を接種し、30℃で18時間培養したものを甘藷乳酸発酵物とした。

甘藷ペースト、甘藷オリゴ糖液及び乳酸発酵物は7500rpmで20分間遠心分離し、上澄液を5Cろ紙でろ過したものを真空凍結乾燥することにより水溶性成分を乾燥粉末化し、分析用試料とした。分析時はこれを適量の水に溶解し、滅菌フィルターを通し用いた。

2-6 供試乳酸菌

供試乳酸菌は漬物、キムチ等から分離した*Lactobacillus plantarum* 19, 25, 30の3株及び*L. pentosus* 24の1株の合計4株を用いた。

対象として、(独)製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門(NBRC)から購入した、*Lactobacillus plantarum* NBRC 15891を用いた。

2-7 乳酸菌の培養及び試料の調製

乳酸菌の培養は、MRS培地(Difco)を用いた。30℃、48時間培養した後、3000rpmで10分間の遠心分離を行い、沈殿物を乳酸菌体とした。

2-8 抗変異原性試験

抗変異原性試験はエームス法に準じて行った。指標菌は*Salmonella typhimurium* TA98(NBRC 14193)を用いた。変異原物質は3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b)indole(Trp-P-1)(和光純薬製)を用い、DMSOに溶解して試験に用いた。指標菌液0.1mlにS-9mix0.1ml、変異原物質DMSO溶液3 μ l及び試料溶液0.05mlを添加し、37℃で20分間振とう後、軟寒天2mlを加え攪拌後、SEM平面培地に均一に重層し、37℃で48時間培養した。試料の代わりに、水を用いたものを陽性対照、試料と変異原物質を添加しないものを自然復帰コロニー数とした。

復帰率は以下の式によって求めた。

$$\text{復帰率 (\%)} = \left(1 - \frac{A-B}{C-D}\right)$$

A: 試料と抗変異原物質添加時のコロニー数

B: 試料のみ添加時のコロニー数

C: 陽性対照コロニー数

D: 自然復帰コロニー数

2-9 増殖抑制効果の測定

HL60白血病細胞 (RCB0041) は (独) 理化学研究所バイオリソースセンターより分譲された。HL60細胞は10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地で、37°C、5%CO₂存在下、相対湿度100%の条件下で培養した。HL60細胞を96穴プレートに1×10⁵ cells/mlになるように播種し、各試料を培養液中に添加して、24時間培養した後、トリパンプルー色素排除能を示す精細胞数を、血球計算盤を用いて測定することにより検討した。

3 結果及び考察

3-1 甘藷デンプンの糖化

8種の糖化酵素を用いて処理後の甘藷ペースト中の遊離糖の量は、 α -amylaseでは、Biozyme Aが6.7g、Biozyme Mが7.2g、Biozyme Lが7.9g、Biozyme F10SDが8.2gであった。 β -amylaseでは、Biozyme M5が4.7g、Biozyme MLが5.9gであった。Glucoamylaseでは、Gluczyme AF6が8.2g、Gluczyme AF6が8.0gであった。すべてにおいて、Glucose、Sucrose、Fructose、Maltoseの4種の遊離糖のみが検出され、イソマルトオリゴ糖は検出されなかった。以上の結果より、 α -amylaseではBiozyme F10SDを、 β -amylaseではBiozyme MLを、GlucoamylaseではGluczyme AF6を甘藷糖化酵素とした。酵素濃度を検討したところ、それぞれの酵素とも、甘藷に対して0.05%の添加で十分な糖化能力を示した。

3-2 オリゴ糖の調製

(a) 酵素剤の検討

TransglucosidaseはMaltoseを基質としてイソマルトオリゴ糖を調製する酵素として知られており、一般的には糖化酵素と共に添加することによ

り多くのオリゴ糖を生成するとして、主に β -amylaseと共に用いることで工業的な生産が行われている。工業生産においては精製澱粉を原料として用いているが、今回は甘藷そのものを原料として利用するため、最適な糖化酵素との組み合わせを検討することとした。Transglucosidase Lに先に選抜した3種の甘藷糖化酵素をそれぞれ添加し、イソマルトオリゴ糖生成量を測定することにより図1に示した。Gluczyme AF6では、全遊離糖量は最も多くなものの、イソマルトオリゴ糖生成量は低い結果となった。Biozyme MLでは、Gluczyme AF6に比べて多くのイソマルトオリゴ糖を生成していたが、最も多く生成しているのはBiozyme F10SDを用いた時であった。20%甘藷ペースト(デンプン濃度約6%)100ml中に2.1gのイソマルトオリゴ糖を生成していた。そのうち約70%はイソマルトースであった。

(b) 酵素剤濃度の検討

Biozyme F10SD 0.05%と共にTransglucosidase Lを0.05~1%添加し、イソマルトオリ

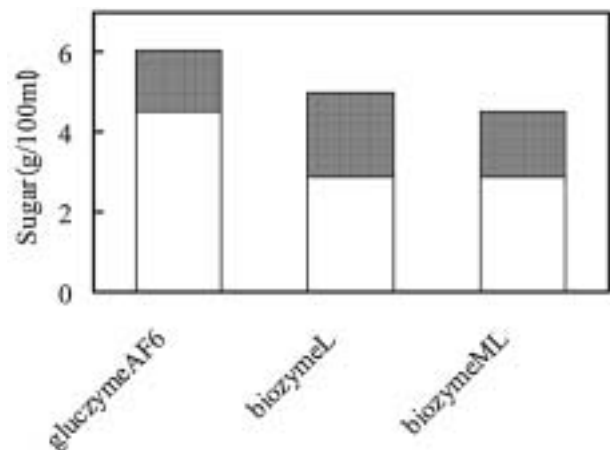


図1 トランスグルコシダーゼと共に添加した糖化酵素に対するオリゴ糖の生成量

表2 酵素剤濃度に対する糖およびオリゴ糖の生成量

Enzyme concentration	Sucrose	Glucose	Fluctose	Maltose	Maltotriose	Total	Isomaltoorigosuccharides			
							Isomaltose	Isomaltotriose	Panose	Total
0.05	231	841	218	1274	228	2792	495	28	966	1489
0.10	180	1127	241	764	117	2429	817	110	861	1788
0.20	104	1894	267	450	37	2751	1255	447	477	2180
0.50	64	2447	300	146	0	2956	1251	533	108	1892
1.00	24	3162	345	81	0	3613	1097	358	70	1525

表3 酵素処理時間に対する糖およびオリゴ糖の生成量

Time	Sucrose	Glucose	Fructose	Maltose	Maltotriose	Total	Isomaltoorigosuccharides			
							Isomaltose	Isomaltotriose	Panose	Total
15	88	298	103	628	43	1160	141	2	223	365
30	149	1008	175	500	84	1915	563	79	618	1260
60	129	1558	236	30	40	1994	995	378	366	1739
180	64	2447	300	146	0	2956	1251	533	108	1892
300	50	2665	320	156	0	3191	1321	632	51	2004

ゴ糖の生成量を検討した。結果を表2に示した。酵素濃度の増加に伴い全遊離糖量が増加していることが分かった。イソマルトオリゴ糖については、0.20%添加時までは、酵素剤増加に伴い生成量の増加を示していたが、0.50%以上の添加時においては生成量が減少する傾向が見られた。このことから、糖化酵素とトランスグルコシダーゼの添加量にはバランスが必要であることが示唆された。最も多くのイソマルトオリゴ糖を生成したtransglucosidase L 0.20%添加時において、イソマルトオリゴ糖生成量は、全遊離糖中の約44%を占めていた。

(c) 処理時間の検討

結果を表3に示した。酵素処理時間の経過と共に、イソマルトオリゴ糖、その他の遊離糖共に増加する傾向があった。180分から300分まで増加量はそれほど大きいものではないため、処理時間は180分とすることにした。また、原料とした20%甘藷ペースト中に含まれるデンプン量は約6gと推測され、遊離糖の分析結果からそのほとんどは糖化されていることが推測されたため、甘藷に対する酵素添加量及び処理時間は、甘藷の糖化及びイソマルトオリゴ糖調製に対して、最適な条件であったと考えた。

(d) 基質中甘藷濃度の検討

甘藷ペースト中に甘藷濃度を変化させることにより、イソマルトオリゴ糖の生成量の変化を検討した。甘藷濃度を増加させることでペースト中のデンプン濃度を変化させることになる。結果を表4に示した。甘藷濃度の増加に伴い、全遊離糖量が増加し、イソマルトオリゴ糖量も増加していた。また、全遊離糖中に占めるイソマルトオリゴ糖の生成率も増加し、甘藷濃度40%の甘藷ペーストを基質として用いた場合で約49%を示した。

表4 基質中甘藷濃度に対する糖およびオリゴ糖生成率

Sweet potato concentration (%)	Sugar (mg/100g)	Isomaltoorigo succharides (mg/100g)	(%)
20	3567	761	21
30	5909	1921	33
40	6778	2700	40

3-3 抗変異原性試験

各試料100gから回収された乾燥試料重量は、甘藷ペーストが13.46g、甘藷オリゴ糖液が15.05g、*L. plantarum*19乳酸発酵物が16.73g、*L. plantarum*25乳酸発酵物が16.38g、*L. plantarum*30乳酸発酵物が16.84g、*L. pentosus*24乳酸発酵物が16.55g及び*Lactobacillus plantarum* NBRC 15891乳酸発酵物が16.77gであった。これら計7種の分析用試料について抗変異原性試験を行った。結果を図2に示した。そのときのTrp-P-1濃度及び陽性対照コロニー数は0.005 μ g/plate、300 \pm 50cfu/plate (平均値 \pm 標準偏差)であった。

甘藷ペースト水溶性成分1, 3, 30mg/ml添加時にそれぞれ、14, 41, 54%の抗変異原性率を示した。オリゴ糖液では37, 55, 66%と甘藷ペーストに比べ高い抗変異原性率を示した。乳酸発酵物水溶性成分について検討した結果、*L. plantarum* 19, 25, 30を用いた乳酸発酵物では、1mg/ml添加時にそれぞれ約58, 52, 51%と抗変異原性率の増加を示し、添加濃度に対する依存性も見られ、30mg/ml添加では約70%の抗変異原性率があった。*L. pentosus* 24を用いた乳酸発酵物の場合、先に示した3株の乳酸発酵物と比べ低い値となり、1mg/ml添加で約40%の抗変異原性率であった。対照乳酸

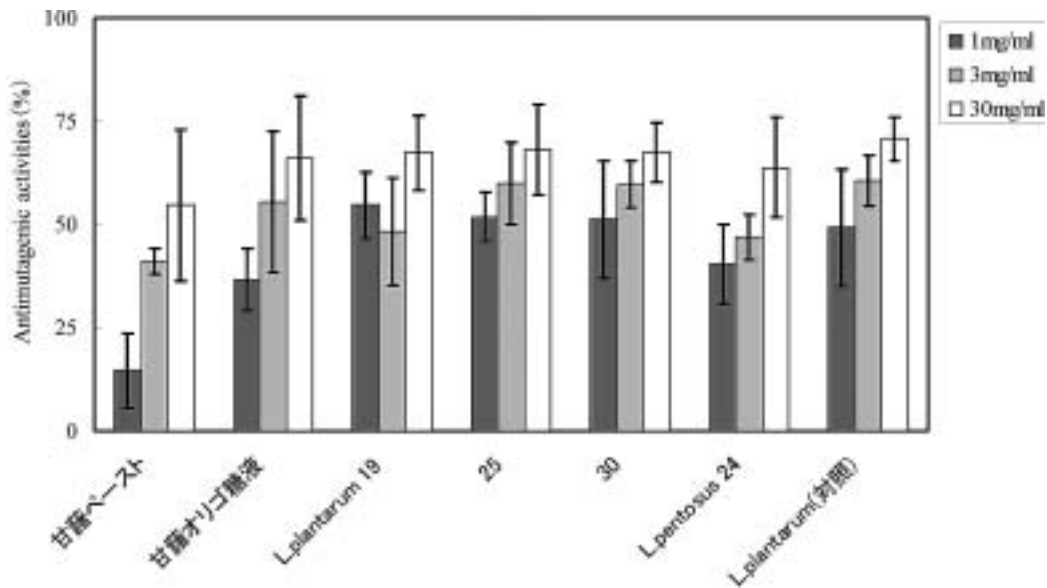


図2 オリゴ糖液および乳酸発酵物の抗変異原活性

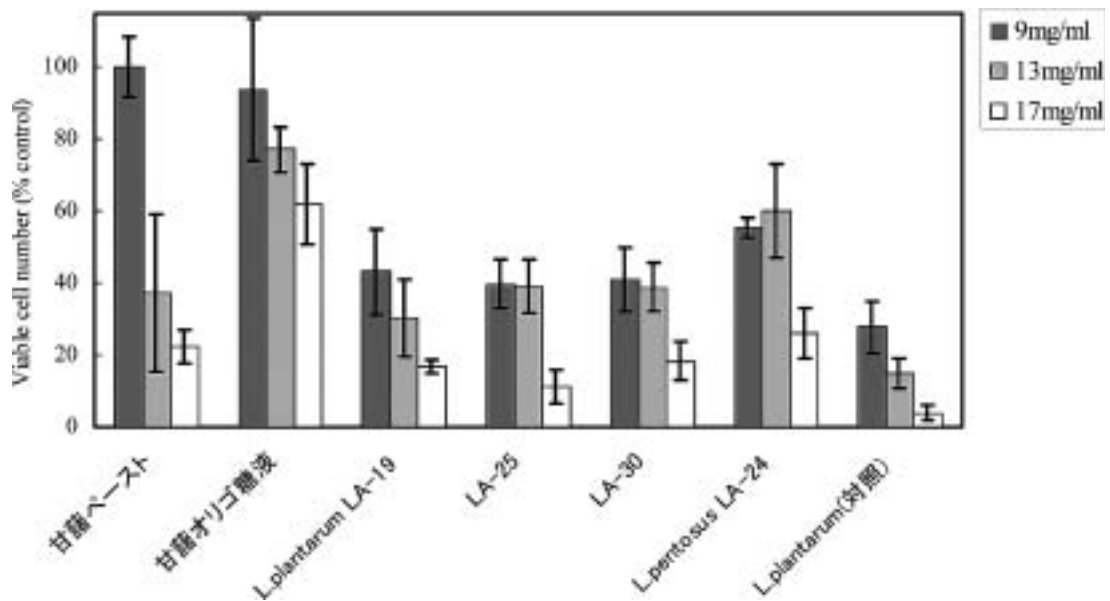


図3 オリゴ糖液および乳酸発酵物のガン細胞増殖抑制活性

菌株である*L. plantarum* NBRC 15891を用いた乳酸発酵物では、分離菌である*L. plantarum* 19, 25, 30と同等の抗変異原性率であった。

3-4 ガン細胞増殖抑制試験

甘藷乳酸発酵物等の水溶性成分におけるHL60ヒト白血病細胞の増殖に及ぼす影響について検討した。結果を図3に示した。

甘藷ペースト水溶性成分9 mg/ml添加24時間後のHL60細胞の生細胞数は無添加のコントロールとほぼ変化がなかったが、添加濃度を13, 17

mg/mlと増加させることにより、生細胞数をそれぞれ約37及び22%に減少させた。オリゴ糖液では17mg/mlの高濃度添加時においても、生細胞数は約62%に留まり、甘藷ペーストに比べ低いHL60細胞増殖抑制効果が認められた。酵素処理により生成した糖やイソマルトオリゴ糖が細胞増殖の方向に作用した結果と考えられる。乳酸発酵物水溶性成分について検討した結果、*L. plantarum* 19, 25, 30を用いた乳酸発酵物では、9 mg/mlの低濃度添加時でもそれぞれ約40%、

17mg/ml添加時ではそれぞれ約17, 11, 18%と高い増殖抑制効果を示すことが明らかになった。

L. pentosus 24を用いた乳酸発酵物の場合、先に示した3株の乳酸発酵物と比べ低い増殖抑制効果を示した。*L. plantarum* NBRC 15891を用いた乳酸発酵物が最も高い増殖抑制効果を示し、9, 13, 17mg/mlの添加濃度でそれぞれ約28, 15, 4%の生細胞数であった。これらの結果から、分離した4株の乳酸菌及び標準菌株を用いて甘藷を乳酸発酵させることにより、何らかの細胞増殖を抑制する成分が生成されているものと推測することができた。また、各乳酸菌株によってその増殖抑制効果が異なることから、乳酸菌株によってその生成量や生成成分が異なることも推測された。

4 まとめ

甘藷を原料としたイソマルトオリゴ糖の生成条件及びそれを原料とした乳酸発酵物の抗変異原性とガン細胞増殖抑制機能について検討した結果は以下のとおりであった。

- 1) Transglucosidase Lと共に添加する糖化酵素として、Gluczyme AF6を用いた。
- 2) 甘藷ペーストを処理する際には、甘藷に対してGluczyme AF6を0.05%、Transglucosidase Lを0.20%添加し、50℃で180分処理することで、最も多くのイソマルトオリゴ糖を生成することができた。

3) 甘藷ペースト中の甘藷濃度、つまりデンプン濃度を増加させることにより、イソマルトオリゴ糖の生成率が高まった。

4) オリゴ糖液及び乳酸発酵物共に抗変異原活性が確認されたが、乳酸発酵物に高い活性があった。特に、*L. pentosus* 24を用いた乳酸発酵物について最も高い結果が得られた。

5) 甘藷乳酸発酵物に高いガン細胞増殖抑制機能があることが明らかとなった。

5 参考文献

- 1) 菅野智栄. イソマルトオリゴ糖の機能特性とその応用, 澱粉科学, p87-97 (1990)
- 2) 中久喜輝夫. 澱粉関連オリゴ糖の製造と利用, 澱粉, p92-98 (1992)
- 3) 辻政雄, 木村英生ら. モモ果実を用いた乳酸菌飲料の開発. 山梨県工業技術センター研究報告, p79-85 (2000)
- 4) 熊谷武久, 瀬野公子, 渡辺紀之, 岡田早苗. 食科工, 48, 693 (2001)
- 5) 熊谷武久・瀬野公子・渡辺紀之・岡田早苗: 食科工, 47, 551 (2000)
- 6) 江藤公美・岩下恵子・竹井利之・八巻幸二・篠原和毅・小堀真珠子: 食科工, 49, 44 (2002)