

乳酸菌・酵母により発酵熟成させた「植物発酵エキス」の有効性に関する研究

中島伸佳* 桑木信輔** 石原浩二*** 田中英彦****

要旨 植物性食品を中心とした食生活は、生活習慣病の予防や治療に効果があるとされている。乳酸菌や酵母により発酵熟成させた植物発酵エキスは、多種多様な植物性原料を用いて、発酵と糖蔵という伝統的な食品保存技術を応用した発酵食品である。本研究では、植物発酵エキスの有効性（栄養的特性や保健機能）に関する研究を行った。植物発酵エキスには、58.5%の炭水化物、3.7%のタンパク質、1.3%の脂質をはじめ、18種類のタンパク質構成アミノ酸や種々のビタミン類、食物繊維、ファイトケミカル（ポリフェノール、テルペノイド等）が含まれていた。さらに、植物発酵エキスは抗酸化作用、血圧上昇抑制作用、抗菌作用、抗アレルギー作用、抗炎症作用、チロシナーゼ阻害作用を有していることを「in vitro 試験」により明らかにした。

キーワード：植物発酵エキス、発酵、機能性食品、乳酸菌、酵母

1. はじめに

元来、日本人は農耕による植物性食品を中心とした食生活であったが、近年の食生活の欧風化に伴い、肥満・高血圧症・糖尿病・脂質代謝異常などの生活習慣病や悪性新生物の増殖などが急増している¹⁻⁴⁾。野菜や果物の摂取による心臓病や循環器系疾患を予防する効果が示唆され⁵⁻⁷⁾、植物性食品を中心とした食生活が見直されている。

植物発酵エキスは、シヨ糖の浸透圧を利用して果物や野菜からエキス分を抽出し、乳酸菌や酵母により発酵・熟成させる発酵と糖蔵の食品保存技術を組み合わせた植物性の発酵食品である。植物発酵エキスは、多種多様な植物を一度に摂取できることと、微生物発酵により各植物由来成分が栄養素として消化・吸収されやすくなっている⁸⁾ことが利点と考えられるものの、植物発酵エキスの栄養的特性や保健機能については未だ未解明な部分も多い。

そこで、本研究では植物発酵エキスの有効性を明らかにすることを主目的とし、発酵・熟成過程での微生物の経時変化や栄養成分の分析、及び、*in vitro*における保健機能について検討した。

2. 材料と方法

1) 植物発酵エキスの調製

植物発酵エキスには、糖類を含む75種類の多種多様な植物性原料を使用した。具体的には、糖類（黒砂糖、オリゴ糖）、果物類（ブルーベリー、梅、柚子、苺、林檎、伊予柑、葡萄、無花果、柿、キウイ、蜜柑、檸檬、金柑、アケビ、山葡萄、山桃、冬苺、ブルーベリー、ブラックベリー、木苺、花梨、桃、梨、グミ）、野菜類・野草類（南瓜、人参、蓬、キャベツ、ケール、ホウレン草、大根、茄子、紫蘇、トマト、ピーマン、胡瓜、苦瓜、小松菜、ウコン、アカメガシワ、オオバコ、大麦若葉、熊笹、牛蒡、スギナ、ビワ葉、ブロッコリー、モロヘイヤ、日本山人参、パセリ、セリ、セロリ、蓮根、ミツバ、ミョウガ、アスパラガス、生姜、チンゲン菜、ビタミン菜）、キノコ類（椎茸、レイシ、キクラゲ、舞茸）、海藻類（昆布、若布、ヒバマタ、根昆布、ヒジキ）、豆類・穀類（大豆、ココア、スイートコーン、米糠、玄米）を使用した。乳酸菌は15種類の乳酸菌（*Lactobacillus acidophilus*, *L. acetotolerans*, *L. amylovorus*, *L. brevis*, *L. buchneri*,

*岡山県立大学保健福祉学部栄養学科 〒719-1197 岡山県総社市窪木111 : E-mail nkmt-nakajima@fhw.oka-pu.ac.jp
 **ReLife Lab(株) 〒701-1221 岡山県岡山市北区芳賀5303 (ORIC内) : E-mail relifelab@yahoo.co.jp
 ***岡山理科大学理学部臨床生命科学科 〒700-0005 岡山県岡山市北区理大町1-1
 ****岡山大学農学部 〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中1-1-1

L. casei, *L. fermentum*, *L. kefirifaciens*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *P. damnosus*, *P. pentosaceus*, *P. urinaequi*) を発酵スターターとして添加した。植物発酵エキスは、果物類・野菜類については、新鮮な旬の原料を洗浄後個別の樽に入れ黒砂糖漬けにし、細胞を破壊することなく浸透圧抽出により得られたエキスを、熱水抽出した野草類や、キノコ類、海藻類、豆類、穀類の粉末とともにペースト状に仕上げられ、スターター乳酸菌や原料由来の天然酵母で発酵・熟成させることにより調製した。

1) - 1 菌数測定

発酵初期段階 (0 ~ 200 日) における発酵関与菌の菌数の経時変化及び pH の変化を調べた。乳酸菌数はブロムクレゾールパープル加プレートカウント寒天培地 (以下 BCP) を用いて 37℃ で 72 時間培養した。酵母数は、ポテトデキストロース寒天培地 (以下 PDA と表記) を用いて 30℃ で 6 日間培養した。それぞれの培地上に出現したコロニーを計数し、各菌数を CFU/g として表した。pH は植物発酵エキスがペースト状のため、精製水で 10 倍 (w/w) 希釈したものを pH メーターで測定した。

1) - 2 乳酸菌及び酵母の同定

発酵初期の植物発酵エキスに含まれる乳酸菌の同定は、BCP 上に出現したコロニーを単離し、グラム染色によるグラム反応陽性、3% 過酸化水素によるカタラーゼ試験陰性、顕微鏡観察による形態観察で芽胞非形成の菌を乳酸菌とし、乳酸菌同定キットである API50CHL を用いて菌の同定を行った。また、発酵・熟成を経た植物発酵エキスに含まれる乳酸菌の同定は、(株)テクノスルガ・ラボに依頼した。GC-341f,534r⁹⁾ のプライマーを用いて PCR-DGGE 解析で得られたバンドに対する塩基配列の解析結果に基づいて同定した。発酵初期の植物発酵エキスに含まれる酵母の同定は、PDA 上に出現したコロニーを単離し、同定は(株)ベックスに依頼した。1% (v/v) Triton X-100 を含む菌体処理液に取り、99℃ 10 分間処理した DNA と ITS1F primer : GTAACAAGGT(T/C)TCCGT 及び ITS1R primer: CGTTCTTCATCGATG を用いて 28S rRNA 遺伝子の一部を PCR により増幅し、その塩基配列に基づいて同定した。当該遺伝子の PCR 増幅は、94℃、3 分間の前処理後、94℃、30 秒間、55℃、1 分間、72℃、1 分間のサイクルを 30 回繰り返し、最後に

72℃、7 分間保持した。同遺伝子の塩基配列は、ITS1F primer と BigDye Terminator FS ver.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて決定した。得られた塩基配列を BLAST 検索し、一致率の最も高い菌種を同定菌種とした。また、発酵・熟成を経た植物発酵エキスに含まれる乳酸菌の同定は、(株)テクノスルガ・ラボに依頼した。GC-1427f,1616r¹⁰⁾ のプライマーを用いて PCR-DGGE 解析で得られたバンドに対する塩基配列の解析結果に基づいて同定した。

2) 栄養成分分析

一般成分や無機質、ビタミン類の分析方法は、五訂日本食品標準成分表¹¹⁾ に従った。食物繊維 (NDF) は、NaOH で中和後、AACC 法¹²⁾ にしたがって定量した。アミノ酸については、トリプトファンは植物発酵エキスを水酸化バリウム (チオジエチレングリコール含有) で 110℃、12 時間加水分解後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定し、シスチンとメチオニンは、植物発酵エキスを過ギ酸酸化後、6N 塩酸 (0.04% β -メルカプトエタノール含有) で 150℃、20 時間加水分解後、その他のアミノ酸 (アルギニン、リジン、ヒスチジン、フェニルアラニン、チロシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、アラニン、グリシン、プロリン、グルタミン酸、セリン、スレオニン、アスパラギン酸) は、植物発酵エキスを 6N 塩酸 (0.04% β -メルカプトエタノール含有) で 100℃、24 時間加水分解後、カラムクロマトグラフィー法 (アミノ酸自動分析計使用) で測定した。ポリフェノールはフォリンデニス法¹³⁾ にしたがって、植物発酵エキスを 80% アセトンで抽出・希釈し、カフェー酸をスタンダードとして、760nm の吸光度を測定した。

3) 保健 (生理) 機能

3) - 1 抗酸化作用

Myagmar と Aniya の方法¹⁴⁾ にしたがって、植物発酵エキスを純水で 1 : 1 (w/w) 抽出し、50% エタノールに溶解し、ESR 測定装置 (JEOL、JES-FR 30 ES) を用いて、HPX-XOD (ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ [EC 1.1.3.22]) 系によって発生するスーパーオキシドの 5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド (DMPO) 付加体の ESR スペクトルを測定した。対照 (H₂O) と比較し、その減少

からラジカル消去活性を算出した。さらに試料として、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) による検量線を作成し、SOD 様活性として表した。

3) - 2 血圧上昇抑制作用

Okamoto らの方法¹⁵⁾により、植物発酵エキスを PBS で 1 : 1 抽出し、凍結乾燥して得られた粉末を試料とし、Hippury-Histidyl-Leucine (HHL) を基質としてアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の阻害活性を調べた。酵素標準物としてウサギ肺由来アンジオテンシン変換酵素を用いた。

3) - 3 抗菌作用

抗菌試験に使用した菌名と培養条件は以下のとおりである。*Lactobacillus acidophilus* NBRC13951 (37℃、36hr、嫌気)、*L. brevis* NBRC3960 (37℃、36hr、嫌気)、*L. fermentum* NBRC3071 (37℃、36hr、嫌気)、*L. plantarum* THT030701 (37℃、36hr、嫌気)、*Lactococcus lactis* NBRC12007 (37℃、36hr、嫌気)、*Enterococcus faecalis* NBRC3971 (37℃、36hr、嫌気)、*Streptococcus mutans* NBRC13955 (37℃、48hr、嫌気) は MRS 寒天培地 (OXIOD 社製) を使用した。*Helicobacter pylori* JCM12036 (37℃、96hr、微好気) と *Porphyromonas gingivalis* JCM12257 (37℃、96hr、嫌気) は血液寒天培地を使用した。*Vibrio parahaemolyticus* NBRC12711 (35℃、24hr、好気) は LB 寒天培地 (ポリペプトン 1.0% (w/v)、酵母エキス 0.5%、NaCl 1.0%、寒天 1.3%、pH = 7.0) を使用した。*Escherichia coli* NBRC3301 (37℃、18hr、好気)、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC3080 (37℃、18hr、好気)、*Salmonella typhimurium* NBRC12529 (37℃、18hr、好気)、*Staphylococcus aureus* NBRC3060 (37℃、18hr、好気)、*Staphylococcus aureus* IID1677 (37℃、48hr、好気)、*Providencia rettgeri* NBRC13501 (30℃、18hr、好気) は普通寒天培地を基本培地として用いた。また、各培地に植物発酵エキスを 5% (w/v) 加え、NaOH で pH 調整したものを試験培地とした。それぞれをシャーレに分注し、菌体を滅菌水で段階希釈し、各プレートに 50 μ l ずつコンラージ棒で塗布した。それらを上記に示したとおり培養し、基本培地に形成されたコロニーが約 100 ~ 1000CFU/プレートと同希釈倍率の試験培地に形成されたコロニーを数え、抗菌性の指標とした。

3) - 4 抗アレルギー作用

リポキシゲナーゼ 15 (15-LOX) の阻害活性を

Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit を用いて調べた。植物発酵エキスは純水で 1 : 1 抽出・濾過し、その抽出液を適宜希釈し、試料とした。96穴プレートに、Blank、Positive Control、100% Initial Activity 区、Inhibitor 添加区を設定し、液量が 100 μ l となるように添加した。さらに基質 (アラキドン酸) を 10 μ l 添加し、5分間振とうし、発色液 (Chromogen) を 100 μ l 加え、さらに5分間振とうした。プレートリーダーで 500nm の吸光度を測定した。

3) - 5 抗炎症作用

慢性関節リウマチのような炎症性疾患の治療における非ステロイド性抗炎症薬開発の標的酵素とされているシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) の阻害活性を Colorimetric COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit を用いて調べた。植物発酵エキスは純水で 1 : 1 抽出・濾過し、その抽出液を適宜希釈し、試料とした。96穴プレートに Blank I、Blank II、100% Initial Activity 区、Inhibitor 添加区を設定し、液量が 170 μ l となるように添加した。プレートを数秒間振とう後、25℃で5分間インキュベートし、発色液 20 μ l と、基質 (アラキドン酸) 20 μ l を加えた。プレートを数秒間振とう後、25℃で5分間インキュベートし、プレートリーダーで 590nm の吸光度を測定した。

3) - 6 チロシナーゼ阻害活性

Nihei らの方法¹⁶⁾にしたがって、酵素は mushroom 由来チロシナーゼを、基質は L-DOPA を用いて測定を行った。植物発酵エキスを純水で 1 : 1 抽出した水抽出画分を NaOH で中和したものを試料として、チロシナーゼの阻害活性を調べた。

結果と考察

1) - 1 菌数、pH の変化

植物発酵エキスの乳酸菌数、酵母数の発酵期間中の推移を図 1 に示した。乳酸菌及び酵母の各菌数は 3 日目に最大になり、それぞれ 5.8 log (CFU/g)、7.4 log (CFU/g) で、16 日目まで穏やかに減少した。30 日目には、3.3 log (CFU/g)、3.9 log (CFU/g) となり、その後も乳酸菌と酵母の菌数はほぼ同じように推移し、小さな増減を 2 ~ 4 log (CFU/g) で繰り返すことが明らかとなった。

pH は 0 日目では、pH5.4 であったが、発酵により低下し続け 90 日目には 4.3 まで低下した。

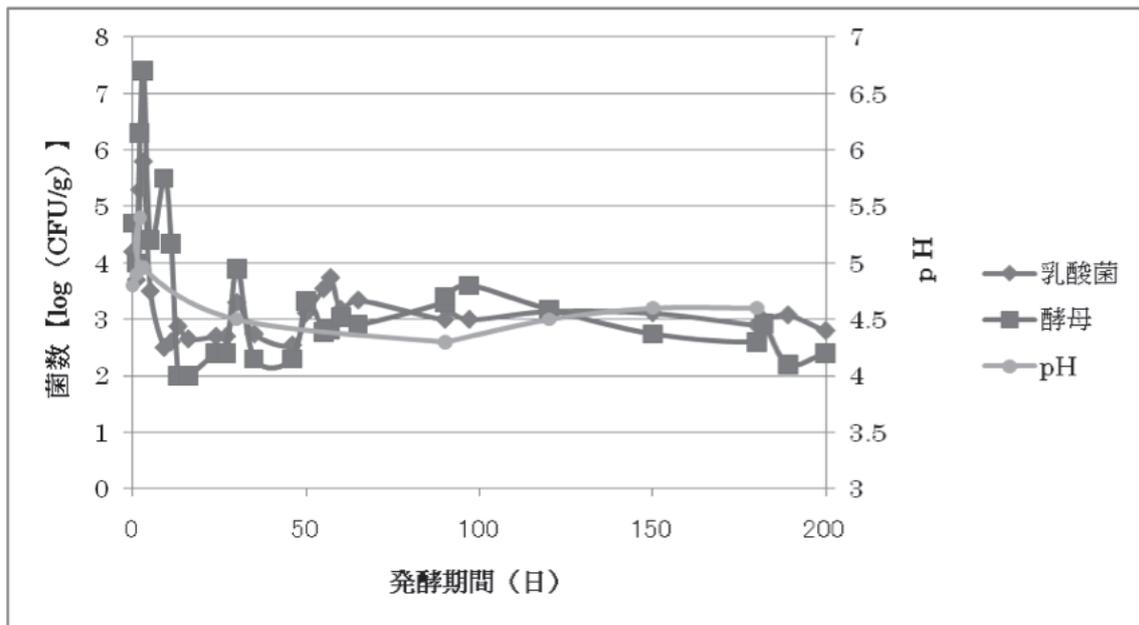


図1 植物発酵エキスの乳酸菌数、酵母数、pHの経時変化

1) - 2 乳酸菌及び酵母の同定

発酵初期の植物発酵エキスから分離された菌は、API50CHLキットによる糖の資化性の結果から *Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus fermentum* と同定された。また、発酵・熟成を経た植物発酵エキスからは、解析の結果 *Streptococcus* 属の乳酸菌も検出された。

一方、植物発酵エキスに発酵スターターとして人為的に添加はしていないが、初期発酵における酵母の関与を明らかにするために、菌数検査においてPDA上に出現したコロニーを釣菌し、真菌28S rRNA遺伝子増幅用プライマーを用いてPCRを行った。しかし、PDA上に出現したコロニーの中には、PCRで増幅産物が得られない場合があったことから、細菌のコロニーも生育していたと考えられた。また、PCR解析が可能であったコロニーの分析解析結果から、*Saccharomyces* 属と *Candida* 属の酵母が主として検出され、優勢な属と考えられた。さらに、分離・同定した酵母 *S. cerevisiae* と *C. apicola* をPDAに培養し、官能試験により、それぞれアルコール臭やフルーティーな香り（エステル臭）がしたことから、植物発酵エキス中においては、*S. cerevisiae* はアルコール発酵に関与し、*C. apicola* は芳香成分の産生に関与していると推定された。また、*Hanseniaspora osmophila* という糖度の高い糖蜜やワイン等で生育することが知られている¹⁷⁾ 酵母が検出された。さらに、発酵・熟成を経た植

物発酵エキスからは、解析の結果塩分の高い醤油等で生育することが知られている *Zygosaccharomyces* 属の酵母が検出された。*Saccharomyces* に属する一倍体の種類 (*S. rouxii* 等) や、*H. osmophila* や *Zygosaccharomyces* 属の酵母は、好稠性酵母（高濃度の糖、すなわち高い浸透圧のもとでよく生育する酵母）であり、*H. osmophila* はエステル、アルデヒド、その他揮発性の代謝産物によるわずかな発酵臭を発生する¹⁷⁾ ことが知られていることから、これらの酵母も植物発酵エキスの発酵・熟成に関与している可能性が示唆された。

2) 栄養成分分析

植物発酵エキスは、有害微生物の増殖を抑えるため、水分活性を糖質（黒砂糖）により高く維持した発酵食品である。糖質が主たる成分であるため、粘度が高くペースト状の低たんぱく質、低脂肪であった（表1）。植物発酵エキスの発酵熟成時のpHの経時変化でも示したが、乳酸菌の関与する発酵であるため、最終製品のpHは4.1と酸性であった。また、植物性素材を原料としているためカリウムが多く含まれており、微量元素である亜鉛、鉄、マンガンも補給できることが明らかとなった。さらに、食物繊維もイチジク、アスパラガス、コマツナ等の食物繊維量に相当する1.9 g/100 g含まれていた。植物発酵エキスのアミノ酸組成を調べたところ、必須アミノ酸だけでなく、分析対象とした18種類のアミノ

表1 植物発酵エキスの栄養成分 (100g当たり)

水分	34 g
タンパク質	3.7 g
脂質	1.3 g
炭水化物	58.8 g
灰分	2.2 g
ナトリウム	137 mg
カリウム	619 mg
カルシウム	131 mg
マグネシウム	68 mg
リン	97 mg
亜鉛	11 mg
鉄	3 mg
マンガン	1 mg
セレン	未検出
食物繊維 (NDF*)	1.9 g
アルギニン	0.09g
リジン	0.11g
ヒスチジン	0.04g
フェニルアラニン	0.14g
チロシン	0.07g
ロイシン	0.23g
イソロイシン	0.13g
メチオニン	0.04g
バリン	0.15g
アラニン	0.15g
グリシン	0.15g
プロリン	0.20g
グルタミン酸	0.53g
セリン	0.14g
トレオニン	0.12g
アスパラギン酸	0.45g
シスチン	0.04g
トリプトファン	0.04g
γ -アミノ酪酸 (GABA)	17 mg
ビタミン A (レチノール当量)	20 μ g
α -カロテン	25 μ g
β -カロテン	192 μ g
クリプトキサンチン	77 μ g
ビタミン B1	0.05 mg
ビタミン B2	0.07 mg
ビタミン B6	0.27 mg
ビタミン B12	0.03 μ g
ナイアシン (ニコチン酸当量)	1.69 mg
ビタミン C	未検出
ビタミン D	未検出
ビタミン E (α -トコフェロール)	0.4 mg
ビタミン E (β -トコフェロール)	未検出
ビタミン E (γ -トコフェロール)	0.2 mg
ビタミン E (δ -トコフェロール)	0.1 mg
ビタミン K	30 μ g
パントテン酸	0.19mg
葉酸	1 μ g

*Neutral Dietary Fiber

酸はすべて含まれており、旨味成分として知られるグルタミン酸・アスパラギン酸の含有量が多いことがわかった (表1)。また、動植物や自然界に広く分布していることが知られているアミノ酸の1種である γ -アミノ酪酸 (GABA) も含まれていた (表1)。

植物発酵エキスに含まれるビタミン類で特徴的なことはナイアシン量が多いことであった (表1)。

ビタミンCは検出されなかった。ビタミンCは酸化されやすい性質であることから、発酵過程で酸化され、アミノ酸が共存することから、アミノカルボニル反応により褐変した¹⁸⁾と考えられた。ナイアシン量は、原料の配合割合と日本食品標準成分表¹²⁾から算出される値は約0.7mg/100gであることから、発酵に関与する乳酸菌・酵母が生産していると考えられた。植物発酵エキスのポリフェノール含有量は、発酵初期は100g当たり212mg、1年発酵後は236mg、3年発酵後は246mgと発酵年数に応じて増加する傾向を示した。赤ワインやココアのポリフェノール含有量と比較した結果、植物発酵エキス (3年発酵) は、赤ワインの1.7倍、ココア (飲料) の5.7倍であった。

このように、植物発酵エキスには基本的な栄養素であるタンパク質、脂質、炭水化物をはじめ、微量栄養素である種々のビタミン、ミネラルやアミノ酸が含まれており、それ以外にも健康に密接に関係するファイトケミカル (抗酸化物質) など従来の栄養学では取り扱われていない¹⁹⁾機能性成分も多く存在することが明らかになった。植物性 (ポリ) フェノール化合物は、抗菌作用、抗酸化作用やラジカル消去能などを有し、さらには免疫力の向上効果、抗ウイルス作用や制癌作用などの様々な有用生理機能を示すことから、最近では、化粧品、食品添加物、医薬品などとしても注目されている。ただし、植物発酵エキスは多種類の植物性原料を用いているので、植物性 (ポリ) フェノール化合物は単一ではないと考えられる。

3) - 1 抗酸化作用

植物発酵エキスにおける抗酸化作用 (SOD様活性) の経時的変化を以下に示した (図2)。発酵年数が長くなるにつれて、抗酸化作用は上昇することが明らかになった。また、ポリフェノール含有量と抗酸化作用との相関を調べたところ、ポリフェノール含有量と抗酸化作用には正の相関が得られた。抗酸化作用は、発酵の進行に伴ってポリフェノール類が増加していた。さらに、フラボノイド類はXODを阻害することが報告されている²⁰⁾ことから、本実験系における抗酸化作用の上昇は、実際のSOD様活性の増加とポリフェノール (フラボノイド等) によるXODの阻害作用の「両者の要因」によるものと考えられた。

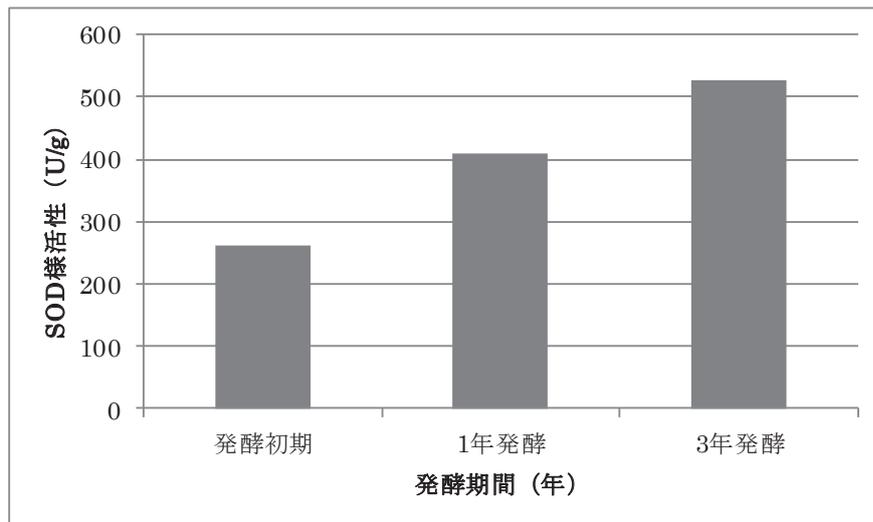


図2 植物発酵エキスの抗酸化作用

3) - 2 血圧上昇抑制作用

植物発酵エキスの水抽出成分中に血圧上昇作用を有する「レニン・アンジオテンシン変換系」に関与するアンジオテンシン変換酵素 (ACE) を阻害する成分が含まれているかどうかを調べた。植物発酵エキスは基質から生成物の産生が、コントロールと比較して61.4%阻害された。また、植物発酵エキスをに用いている原料の1部を用いてACE阻害活性を同様に測定し、比較したところ、植物発酵エキスはウコンと同程度のACE阻害活性を示すことが示唆された。

3) - 3 抗菌作用

植物発酵エキスは清酒、ワイン、味噌、醤油など多くの発酵食品と同様に、開放系で行われるため多くの種類の微生物が混入・増殖する可能性があるが、伝統的な加工経験による微生物制御や、植物発酵エキス中で優勢であると考えられる乳酸菌や酵母が生産した抗菌物質により、腐敗細菌の増殖が抑制されていると考えられた。そこで、植物発酵エキスの抗菌作用を調べたところ、乳酸菌 (*L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *E. faecalis*) や大腸菌 (*E. coli*) に対しては抗菌性を示さなかったが、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA, *S. aureus* IID1677)、緑膿菌 (*P. aeruginosa*)、プロビデンシア菌 (*P. rettgeri*) に対しては強い抗菌性を示した (表2)。さらにピロリ菌 (*H. pylori*) や歯周病菌 (*P. gingivalis*)、腸炎ビブリオ (*V. parahaemolyticus*) に対しても抗菌性を示すことが明らかとなった。また、ネズミチフス

菌 (*S. typhimurium*) と黄色ブドウ球菌 (*S. aureus* NBRC3060) においては、増殖を抑える程度の弱い抗菌性が認められた。

以上の結果より、植物発酵エキスはグラム陽性・陰性の両方の細菌で抗菌作用が見られた。特に、有害微生物 (病原菌) に対して強い抗菌作用を示すことが明らかとなった。植物発酵エキスに含まれる抗菌性物質については、乳酸、酢酸、プロピオン酸等の有機酸類やバクテリオシンと呼ばれる細菌によって生産される殺菌作用を中心とした抗菌作用を持つペプチドあるいはタンパク質が考えられた。植物発酵エキスに含まれる抗菌物質は、中和しても抗菌性が残存し、オートクレーブ (121℃、15分) 処理しても抗菌性が低下しない耐熱性を有する、主に分子量1,000以下の低分子成分であると考えられた。

3) - 4 抗アレルギー作用

植物発酵エキスの水抽出液を添加することにより、15-LOXの活性が阻害されることより、植物発酵エキスには15-LOXの阻害物質が含まれることが明らかとなった。植物発酵エキスのIC50を算出すると、21.3 mg/mlであった (図3)。

3) - 5 抗炎症作用

植物発酵エキスの水抽出液を添加することにより、COX-2の活性が阻害されることから、植物発酵エキスにはCOX-2の阻害物質が含まれることが明らかとなった。15-LOXと同様に、植物発酵エキスのIC50を算出すると、14.2 mg/mlであった。

3) - 6 チロシナーゼ阻害活性

植物発酵エキスの水抽出液を添加することにより、チロシナーゼの活性が阻害されることから、植

表2 植物発酵エキスの抗菌作用

	植物発酵エキス添加量	コロニー数(CFU/plate)	抗菌活性
<i>L. acidophilus</i> NBRC13951	0%	908	
	5%	1097	-
<i>L. brevis</i> NBRC3960	0%	517	
	5%	577	-
<i>L. fermentum</i> NBRC3071	0%	140	
	5%	132	-
<i>L. plantarum</i> THT030701	0%	148	
	5%	125	-
<i>L. lactis</i> NBRC12007	0%	139	
	5%	138	-
<i>E. faecalis</i> NBRC3971	0%	546	
	5%	408	-
<i>E. coli</i> NBRC3301	0%	112	
	5%	110	-
<i>P. aeruginosa</i> NBRC3080	0%	290	
	5%	0	++
<i>S. typhimurium</i> NBRC12529	0%	40	
	5%	20	+
<i>S. aureus</i> NBRC3060	0%	289	
	5%	191	+
<i>S. aureus</i> IID1677	0%	201	
	5%	0	++
<i>V. parahaemolyticus</i> NBRC12711	0%	162	
	5%	0	++
<i>P. rettgeri</i> NBRC13501	0%	294	
	5%	0	++
<i>S. mutans</i> NBRC13955	0%	235	
	5%	0	++
<i>H. pylori</i> JCM12036	0%	191	
	5%	0	++
<i>P. gingivalis</i> JCM12257	0%	716	
	5%	0	++

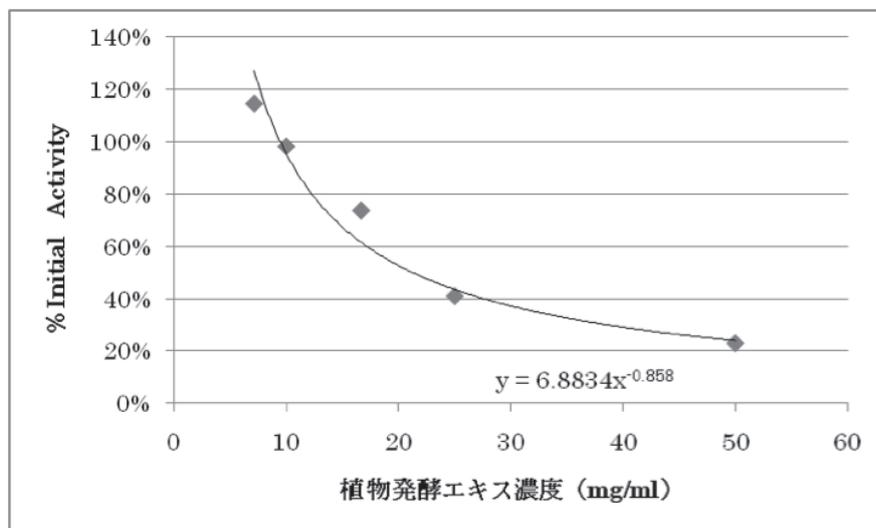


図3 植物発酵エキスにおける15-LOX阻害活性

物発酵エキスにはチロシナーゼの阻害物質が含まれることが明らかとなった。15-LOXと同様にIC₅₀を算出すると、58.5mg/mlであった。

以上の結果より、植物発酵エキスは多種多様な植物性原料由来のエキスを乳酸菌や酵母により発酵することで、長期保存が可能で、さまざまな微量栄養素を補給できる可能性を秘めた食品素材であることが示唆された。また機能性評価の結果、植物発酵エキスは抗酸化作用、血圧上昇抑制作用、抗菌作用、抗アレルギー作用、抗炎症作用、チロシナーゼ阻害作用を有することが示された。植物発酵エキスは微量栄養素の補給のみならず、生活習慣病予防を目的とした機能性食品素材として有効な発酵食品であると考えられた。

引用文献

- 1) Egusa G, Murakami F, Ito C, Matsumoto Y, Kado S, Okamura M, Mori H, Yamane K, Hara H, Yamakido M (1993) Westernized food habits and concentration of serum lipids in the Japanese. *Atherosclerosis*, 100: 249-255.
- 2) 大久保雅通, 蓼原太, 渡辺浩, 藤川るみ, 江草玄士, 今津道教, 山木戸道郎 (1999) 耐糖能障害とレムナント代謝-ライフスタイルの欧米化はいかに影響するか. *動脈硬化* 26: 295-300.
- 3) Imazu M, Yamamoto H, Toyohuku M, Watanabe T, Okubo M, Egusa G, Yamakido M, Kohno N (2001) Association of apolipoprotein E phenotype with hypertension in Japanese-americans: data from the Hawaii-Los Angeles-Hiroshima Study. *Hypertens. Res.* 24: 523-529.
- 4) Egusa G, Watanabe H, Ohshita K, Fujiwara R, Yamane K, Okubo M, Kohno N (2002) Influence of the extent of Westernization of lifestyle on the progression of preclinical atherosclerosis in Japanese Subjects. *J Atheroscler Thromb* 9: 299-304.
- 5) McCullough ML, Fesknanich D, Stanmpfer MJ, Rosner BA, Hu FB, Hunter DJ, Variyam JN, Colditz GA, Willet WC (2000) Adherence to the dietary guidelines for Americans and risk of major chronic diseases in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 1214-1222.
- 6) Liu S, Manson JE, Lee IM, Cole SR, Hennekens CH, Willett WC, Buring JE (2000) Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular diseases: the Women's Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 72: 922-928.
- 7) Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria CM, Vupputuri S, Myers L, Whelton PK (2002) Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 93-99.
- 8) 板倉弘重, 小笠原信之, 平田明隆 (2003) 最新サプリメント・ガイド「植物発酵食品」. からだの科学 [増刊]. 日本評論社, 東京: pp.88.
- 9) Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S r RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
- 10) Sugano A, Tsuchimoto H, Tun C, Asakawa S, Kimura M (2007) Succession and phylogenetic profile of eukaryotic communities in rice straw incorporated into a rice field: Estimation by PCR-DGGE and sequence analyses. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 53: 585-594.
- 11) 科学技術庁資源調査会 (2000) 五訂 日本食品標準成分表. 大蔵省印刷局, 東京.
- 12) Insoluble Dietary fiber. *AACC Method* 32-20.
- 13) AOAC OFFICIAL METHOD 952.03, 955.25 (1965)
- 14) Myagmar, BE and Aniya, Y (2000) Free radical scavenging action of medicinal herbs from Mongolia. *Phytomedicine* 7: 221-229.
- 15) Okamoto A, Hanagata H, Matsumoto E, Kawamura Y, Koizumi Y and Yanagiba F (1995) A angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Activities of Various Fermented foods. *Bioscience. Biotechnol. Biochemistry* 59: 1147-1149.
- 16) Nihei K, Yamagiwa Y, Kamikawa T and Kubo I (2004) 2-Hydroxy-4-isopropylbenzaldehyde, a potent partial tyrosinase inhibitor. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 14: 681-683.
- 17) Phaff HJ, Miller MW and Mark PM 永井 進

- (訳) (1982) 高濃度の糖を含む製品に出する酵母.
酵母菌の生活. 学会出版センター, 東京: pp.156-159.
- 18) 並木満夫, 中村良, 川岸舜朗, 渡邊乾二 (1985)
アスコルビン酸とレダクトンの化学. 現代の食品
化学. 三共出版, 東京: pp.95-98.
- 19) 渡邊 昌 (2008) Phytochemical の健康影響:
機能栄養学の提唱. 微量栄養素研究 25: 23-31.
- 20) Rohnert U, Schneider W and Elstner EF (1998)
Superoxide-dependent and -independent nitrite
formation from hydroxylamine: inhibition by
plant extracts. Z. Naturforsch. C. 53: 241-249.

Studies on the plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast

NOBUYOSHI NAKAJIMA*, SHINSUKE KUWAKI**, KOHJI ISHIHARA***, HIDEHIKO TANAKA****

**Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science, Okayama Prefectural University, 111 Kuboki, Soja, Okayama 719-1197, Japan*

***ReLife Lab Co. Ltd., 5303, haga, kita-ku, Okayama 701-1221, Japan*

****Department of Life Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

*****Faculty of Agriculture, Okayama University, 1-1-1, Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan*

Abstract

A plant-based diet is thought to be better for the prevention and treatment of lifestyle-related diseases. A plant-based extract fermented by lactic acid bacteria and yeast (PELY) was made from various plant materials and was fermented product applying to traditional food-preservation technique, that is, fermentation and sugaring. In this study, the characterization and physiological function of PELY were examined.

PELY contained 58.8% carbohydrate, 3.7% protein, and 1.3% lipid. It contained 18 kinds of amino acids and vitamin A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, E, K, niacin, pantothenic acid, and folic acid. It also did a lot of dietary fiber and phytochemicals (polyphenol, terpenoid, i.e.) .

Moreover, PELY had several physiological functions such as antioxidant, antihypertensive, antibacterial, anti-allergy, anti-inflammatory and anti-tyrosinase activities in vitro.

Keywords : fermented plant extract, fermentation, functional food, lactic acid bacteria, yeast