

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7199063号
(P7199063)

(45)発行日 令和5年1月5日(2023.1.5)

(24)登録日 令和4年12月22日(2022.12.22)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20	A
C 1 2 P	1/04 (2006.01)	C 1 2 P	1/04	Z
A 2 3 L	5/00 (2016.01)	A 2 3 L	5/00	J
A 2 3 L	2/38 (2021.01)	A 2 3 L	2/38	1 0 2
A 2 3 L	7/10 (2016.01)	A 2 3 L	7/10	A

請求項の数 3 (全9頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-129598(P2020-129598)
 (22)出願日 令和2年7月30日(2020.7.30)
 (65)公開番号 特開2022-26233(P2022-26233A)
 (43)公開日 令和4年2月10日(2022.2.10)
 審査請求日 令和4年1月19日(2022.1.19)
 微生物の受託番号 NPMD NITE P-03243

(73)特許権者 592102940
新潟県
新潟県新潟市中央区新光町4番地1
 (74)代理人 110003063
弁理士法人牛木国際特許事務所
 (72)発明者 奥原 宏明
新潟県加茂市新栄町2番25号 新潟県
農業総合研究所 食品研究センター内
 (72)発明者 西脇 俊和
新潟県加茂市新栄町2番25号 新潟県
農業総合研究所 食品研究センター内
 審査官 幸田 俊希

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規乳酸菌およびこの乳酸菌を利用した粘性発酵物の製造法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ラクトバチルス パラプランタラム YAMAKOSHI (Lactobacillus paraplantarum YAMAKOSHI: 受託番号NITE P-03243) である乳酸菌。

【請求項2】

請求項1に記載の乳酸菌を用いて、発酵させるステップを含むことを特徴とする粘性発酵物の製造法。

【請求項3】

請求項2に記載の製造法により得られることを特徴とする粘性発酵物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、曳糸性成分を産生する乳酸菌およびこの乳酸菌を利用した粘性発酵物の製造法に関する。

【背景技術】

【0002】

最近、二酸化炭素排出などの環境負荷の軽減、サステナブル社会の実現、食のバリアフリー化などの観点からグルテンフリー食品のほか、植物性原材料だけで作られた食品であるプラントベース食品の需要が高まっている。そして、国内有数の米の産地である新潟

県では、米だけを原料とするパン、麺、味噌、醤油などの食品開発が推進されてきた。しかし、米だけでは様々な食感や物性をもつ食品素材の製造には限界があり、新たな物性変換技術が必要とされている。

【0003】

一方、発酵微生物の中には、麹菌、納豆菌、乳酸菌など、植物性成分を分解あるいは新たな成分を産生して、液状化、粘質化など食品素材の物性変換に寄与するものが存在する。そのため、植物性の原材料を発酵することにより物性変換を行う技術が有用であると考えられる。

【0004】

また、発酵食品を製造する際、地域の特産食品やその土地に由来する乳酸菌を分離し、それをスターターとして用いて発酵食品を製造することが試みられている。例えば、新潟県魚沼地域の野沢菜漬けから分離された乳酸菌を用いた発酵食品の製造方法（特許文献1）、白神山地の腐葉土から分離された乳酸菌を用いた発酵食品の製造方法（特許文献2）、発酵キムチから分離される乳酸菌ラクトバチルス・サケHS1を用いた漬物の製造方法（特許文献3）などが知られている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】特開2013-236604号公報

特開2007-236344号公報

特開2001-120173号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明は、米だけを原料とした場合においても、様々な食感や物性をもつ食品素材の製造を可能とする新規の乳酸菌を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題を達成するため鋭意検討した結果、曳糸性成分を産生する新規の乳酸菌とこの乳酸菌を利用した粘性発酵物の製造法を見出した。具体的には、新潟県山古志地区に古くから伝わる保存食「いぜこみ菜」から食品素材に粘性、曳糸性（糸引き性）を付与し物性変換に寄与する新規乳酸菌を見出し、菌種の同定及び諸性質の解析を行った。さらに、本菌株を用いて玄米や豆乳など植物性タンパク質を含む素材を発酵することにより、ヨーグルトやチーズ様の物性をもつ食品素材が得られることがわかり、本発明に至った。

【0008】

すなわち、本発明の乳酸菌は、ラクトバチルス パラプランタラム YAMAKOSHI (*Lactobacillus paraplantarum* YAMAKOSHI: 受託番号NITE P-03243)である。

【0009】

また、本発明の粘性発酵物の製造法は、本発明の乳酸菌を用いて、発酵させるステップを含むことを特徴とする。

【0010】

さらに、本発明の粘性発酵物は、本発明の製造法により得られることを特徴とする。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、米などの植物性タンパク質を含む食品素材に粘性、曳糸性を付与し、ヨーグルトやチーズ様の物性をもつ食品素材を製造することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】recA塩基配列に基づく分子系統樹である。

10

20

30

40

50

【図2】培養温度が本発明の乳酸菌の増殖に及ぼす影響を示すグラフである。

【図3】培地pHが本発明の乳酸菌の増殖に及ぼす影響を示すグラフである。

【図4】各種タンパク質添加による粘度への影響を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明の乳酸菌ラクトバチルス パラプラントラム YAMAKOSHI (*Lactobacillus paraplantarum* YAMAKOSHI)は、新潟県長岡市山古志地区の伝統的保存食「いぜこみ菜」(大根菜の無塩漬物)から分離されたラクトバチルス パラプラントラム (*Lactobacillus paraplantarum*)に属する新規の菌であり、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センター(千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8)に、2020年7月7日付けで、受託番号NITEP-03243として寄託されている。以下、本発明の乳酸菌をYAMAKOSHI株と称する。

10

【0014】

本発明のYAMAKOSHI株は、玄米や豆乳など植物性タンパク質を含む基質から粘性成分を産生する。また、タンパク質濃度が高い基質ほど、本発明のYAMAKOSHI株の発酵により粘度が上昇し、特に、大豆や米糠に対しては、強い曳糸性を発現する。したがって、玄米や豆乳を本発明のYAMAKOSHI株を用いて発酵させると、粘性、曳糸性をもつヨーグルトやチーズ様食品の製造が可能となる。

【0015】

また、強い粘性、曳糸性成分を生成する乳酸菌は希少であり、本発明のYAMAKOSHI株を用いることによって、新たな物性をもつグルテンフリー、プラントベース食品の創出が可能となる。例えば、米や大豆等の植物原料だけを用いて粘性調整が可能となり、新たな加工食品開発への道が開ける。

20

【0016】

以下、実施例に基づき、本発明についてより詳細に説明する。なお、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、本発明の思想を逸脱しない範囲で種々の変形実施が可能である。

【実施例1】

【0017】

本発明の新規乳酸菌の分離および同定について説明する。

30

【0018】

新潟県長岡市山古志地区の伝統的保存食「いぜこみ菜」(大根菜の無塩漬物、漬け込み後25日)に滅菌生理食塩水を加えてストマッカーで均質にした。その一部を乳酸菌分離用のMRS白亜寒天培地で培養し、培地に添加した炭酸カルシウムを溶解してクリアゾーン(透明帯)を形成した乳酸菌40株を採取した。

【0019】

このうち、培地上で非常に強い曳糸性(糸引き性)を示した菌株の16SリボソームDNAの部分塩基配列のBLAST相同性解析を行った。その結果、ラクトバチルス プラントラム、ラクトバチルス ペントーサス、ラクトバチルス パラプラントラムのいずれかが判明した。

40

【0020】

次にこの菌株を同定するために、株式会社テクノスルガ・ラボに委託し、*recA* (*recombinase A protein*)塩基配列解析を行った。国際塩基配列データベースに対するBLAST相同性検索の結果、本菌株の*recA*遺伝子部分塩基配列は、ラクトバチルス プラントラム (*Lactobacillus plantarum*)グループのL.パラプラントラム (*L. paraplantarum*)の*recA*遺伝子塩基配列に対し高い相同性を示した。L.プラントラム (*L. plantarum*)グループに含まれる菌群の*recA*遺伝子塩基配列(表1)を取得して実施した分子系統解析の結果、本菌株はL.パラプラントラム (*L. paraplantarum*)が形成するクラ

50

スター内に含まれた(図1)。よってこれらの結果から、本菌株はL.パラプランタラム(L. paraplantarum)と同定し、YAMAKOSHI株と命名した。

【0021】

【表1】

分子系列解析に用いた配列

種名	株名	(アクセッション番号)
	SIID31486	
<i>Lactobacillus fabifermentans</i>	DSM 21115 ^T	(AB983471)
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	LMG 16673 ^T	(AJ621662)
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	LMG 18402	(AJ271963)
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	NIRD-P2	(AJ271964)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	LMG 10755 ^T	(AJ621666)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	LMG 18401	(AJ292254)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	MP-10	(FR871814)
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>	A7	(AJ640080)
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>	DKO 22 ^T	(AJ640079)
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	ATCC 14917 ^T	(AJ286119)
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	B41	(AJ271962)
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	WCFS1	(AL935263)
<i>Lactobacillus xiangfangensis</i>	NBRC 108914 ^T	(AB983477)
<i>Lactobacillus collinoides</i>	LMG 9194 ^T	(AJ621631)

注1) 株名の末尾のTはその種の基準株 (Type strain) であることを示します。

【0022】

次に、YAMAKOSHI株の増殖特性を検討した。MRS培地(pH6.8)における培養温度が増殖に及ぼす影響を図2に示す。生育至適温度は28前後であって、低温での増殖性がある一方、40以上では増殖しないことが示された。また、MRS培地、30における培地pHが増殖に及ぼす影響を図3に示す。低pH(pH3.5以上)での増殖性があることが示された。

【0023】

次に、YAMAKOSHI株の糖類資化性を検討した。YAMAKOSHI株は、L-アラビノース、D-リボース、D-ソルビトール、メチル-D-グルコピラノシド、D-ツラノースに資化性を示し、エスカリンには資化性を示さなかった。YAMAKOSHI株は、同種乳酸菌基準株(L. paraplantarum NBRC107151)と資化性が異なり、さらに曳系性成分を産生することから、新規の菌株であると認められた。

【0024】

【表2】

YAMAKOSHI株と同種乳酸菌基準株の糖類資化性

	NBRC 107151	YAMAKOSHI		NBRC 107151	YAMAKOSHI		NBRC 107151	YAMAKOSHI
グリセロール	-	-	D-マンニトール	+	+	D-ラフィノース	+	+
エリスリトール	-	-	D-ソルビトール	-	+	デンプン	-	-
D-アラビノース	-	-	メチル-α-D-マンノピラノシド	-	-	グリコーゲン	-	-
L-アラビノース	-	+	メチル-α-D-グルコピラノシド	-	+	キシリトール	-	-
D-リボース	-	+	N-アセチルグルコサミン	+	+	ゲンチオビオース	+	+
D-キシロース	-	-	アミグダリン	+	+	D-ツラノース	-	+
L-キシロース	-	-	アルブチン	+	+	D-リキソース	-	-
D-アドニトール	-	-	エスカリン	+	-	D-タガトース	-	-
メチル-β-D-キシロピラノシド	-	-	サリシン	+	+	D-フコース	-	-
D-ガラクトース	+	+	D-セロビオース	+	+	L-フコース	-	-
D-グルコース	+	+	D-マルトース	+	+	D-アラビトール	-	-
D-フルクトース	+	+	D-ラクトース	+	+	L-アラビトール	-	-
D-マンノース	+	+	D-メリビオース	+	+	グルコネート	+	+
L-ソルボース	-	-	D-サッカロース	+	+	2ケトグルコネート	-	-
L-ラムノース	-	-	D-トレハロース	+	+	5ケトグルコネート	-	-
ズルシトール	-	-	イヌリン	-	-			
イノシトール	-	-	D-メレイトース	+	+			

※ + ; 資化性あり、- ; 資化性なし

※ 微生物バンク(JCM及びNite)に保存されているYAMAKOSHI株と同種の菌株は唯一 *Lactobacillus paraplantarum* NBRC107151^T(=JCM12533^T)

【実施例2】

【0025】

YAMAKOSHI株は、曳系性成分を産生する。そこで、YAMAKOSHI株によ

る糖液の粘性付与条件について検討を行った。

【0026】

市販の麹甘酒150gに各種タンパク質（米胚乳タンパク質：オリザプロテイン P-70（オリザ油化製）；グルテン：VITAL WHEAT GLUTEN AG-850（AMD製）；大豆タンパク質：たん白粉末（大豆由来、富士フィルム和光純薬製））を1%、3%、5%（w/w）になるように添加し、YAMAKOSHI株の懸濁液（OD660nm=1.0）を1%（v/w）加え、25、24時間発酵させた後、B型粘度計（BM型、東機産業製、ローターNo.3、30rpm）により粘度を測定した。その結果、図4に示すように、タンパク質種によって粘度が異なったが、いずれも濃度依存的に粘度が上昇した。このうち、大豆タンパク質の添加が最も粘度が高く、さらに曳系性も示した。

10

【0027】

次に、麹甘酒に米胚乳タンパク質（オリザ油化製）、米油（築野食品工業製）を表3のように添加し、YAMAKOSHI株の懸濁液（OD660nm=1.0）を1%（v/w）加え、25、24時間発酵させた後、B型粘度計（ローターNo.3、30rpm）により粘度を評価した。また、ザーンカップNo.7を使用したときの液切れ時間を測定することによって、曳系性を測定した。米糖液の粘質化に及ぼす要因を解明するために、米糖液に米胚乳タンパク質、米油を添加して発酵させたが、表4に示すように、粘度及び曳系性に影響はなかった。

【0028】

20

【表3】

供試糖液の組成

	①	②	③	④	⑤
麹甘酒	230.0g	230.0g	237.5g	242.5g	250.0g
5%米タンパク質	12.5g	12.5g	12.5g	-	-
3%米油	7.5g	7.5g	-	7.5g	-

【0029】

【表4】

米タンパク質及び米油の添加による粘性への影響

30

処理区	粘度 (mPa·s)	曳系性 (秒) [※]
①+米タンパク質, 米油 (非発酵)	149.2	1.9
②+米タンパク質, 米油	233.2	2.1
③+米タンパク質	223.6	2.0
④+米油	130.4	1.9
⑤無添加	148.8	1.9

※ ザーンカップ No.7 の使用による液切れ時間

【0030】

次に、米糠懸濁液3L（米糠または脱脂米糠750g（25%（w/v））、グルコース60g（2%（w/v））、クエン酸30g（1%（w/v））にヘミセルラーゼ3g（0.1%（w/v））を添加し、50、24時間反応させた。この懸濁液にOD660nm=1.0に調整した乳酸菌懸濁液を1%（v/v）添加し、25、24時間発酵させた。経時的に試料を採取し、粘度及び曳系性を評価した。表5に示すように、ヘミセルラーゼを用いて液化化した脱脂米糠または米糠を基質としてYAMAKOSHI株で発酵させた結果、脱脂米糠では曳系性は示さず、米糠では曳系性が認められた。このことから、米糠に含まれる成分のうち、複数の成分が乳酸発酵による曳系性の付与に関与していることが推察された。

40

【0031】

50

【表 5】

基質及び乳酸菌種の違いによる粘性への影響

	菌種	粘度 (mPa·s)	曳糸性 (秒) [※]
脱脂米糠	非接種	197	1.5
	JCM1149	115	1.9
	YAMAKOSHI	138	1.5
米糠	非接種	73	1.8
	JCM1149	44	1.6
	YAMAKOSHI	372	6.9

※ ザーンカップ No.7 の使用による液切れ時間

10

【実施例 3】

【0032】

YAMAKOSHI 株を用いて、米だけを原料としたヨーグルト様食品を製造した。

【0033】

炊飯した玄米または白米 900g に 360mg (0.04% (w/w)) の アミラーゼを添加し、YAMAKOSHI 株の懸濁液 (OD660 = 1.0) を 9ml (1% (v/w)) 加えて初発乳酸菌数が 10^6 cfu/g になるように調製し、30 もしくは 25 で 24 時間発酵させて米発酵物を得た。米発酵物は 30 メッシュ (595 μm) で裏漉しの後、B 型粘度計による粘度測定、ザーンカップによる曳糸性の評価及び官能評価を行った。

20

【0034】

曳糸性の評価はザーンカップ (No.7、離合社製) を用いて行った。すなわち、200ml 容ビーカーに 25 で保温した試料 200ml を入れ、試料液面から 10cm の高さに設置したザーンカップをビーカー内の試料に沈め、素早く一定の動作でビーカーを引き離した。カップ底面が液面を離れる瞬間からザーンカップ底部のオリフィス (穴) から流出する試料の流れが途切れるまでの時間を計測し、その定常流の持続する時間を曳糸性の評価とした。

【0035】

白米の発酵物では曳糸性を確認できなかったが、玄米の発酵物では曳糸性が認められ、ヨーグルト様の粘性をもつ食品製造が可能となった。

30

【0036】

【表 6】

基質の違いによる粘性への影響

	粘度 (mPa·s)	曳糸性 (秒) [※]
精白米	1434	4.1
玄米	2834	13.2

※ ザーンカップ No.7 の使用による液切れ時間

【実施例 4】

【0037】

豆乳を用いたヨーグルト様食品を製造した。

40

【0038】

1L 容の遠沈管に市販の豆乳 (固形分 10%、タンパク質 5%、pH 6.5) 900ml を入れ、乳酸菌の懸濁液 (OD660 = 1.0) を 9ml (1% (v/v)) 加えて初発乳酸菌数が 10^6 cfu/g になるように調製し、25 で 24 時間発酵させて豆乳発酵物を得た。

【0039】

50

【表 7】

乳酸菌種の違いによる粘性への影響

	菌種	粘度 (mPa·s)	曳糸性 (秒) [※]
豆乳	非接種	200.8	1.5
	NBRC107151	2526.8	3.8
	YAMAKOSHI	3347.2	33.0

【実施例 5】

【0040】

チーズ様食品を製造した。

【0041】

1 L 容の遠沈管に市販の豆乳（固形分 10%、タンパク質 5%、pH 6.5）900 ml を入れ、乳酸菌の懸濁液（OD 660 = 1.0）を 9 ml（1%（v/v））加えて初発乳酸菌数が 10^6 cfu/g になるように調製し、25℃ で 24 時間発酵させて豆乳発酵物を得た。豆乳発酵物を遠心分離（2000 rpm、20 min）して上清を除去した。沈殿物を 250 ml 容の遠沈管に移し、再度遠心分離（10000 rpm、15 min）して上清を除去し、チーズ様の固形分（チーズ様食品）を得た。

【0042】

チーズ様食品は、23 名のパネルによって、食感（かたさ、滑らかさ、ねばり）、香味（酸味、旨み、香り）及び総合評価（好み）を評価項目として官能評価を実施した。

【0043】

YAMAKOSHI 株を利用したチーズ様食品は、他株を利用したものと比較して、滑らかさ及びねばりの評価が高く、酸味が強いと評され、総合評価も高かった。

【0044】

【表 8】

チーズ様食品の官能評価

使用菌株	食感			香味			総合評価
	かたさ	滑らかさ	ねばり	酸味	うまみ	香り	好み
JCM1149	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
NBRC107151 ^T	3.4	3.1	3.2	3.8	3.0	2.6	2.8
YAMAKOSHI	2.1	4.4	4.2	4.1	3.3	3.1	3.5

【実施例 6】

【0045】

発酵液状糠床を製造した。

【0046】

米糠 750 g（25%（w/w））、グルコース 60 g（2%（w/w））、クエン酸 30 g（1%（w/w））に水 2160 g を加え、よく混合し、加圧滅菌（121℃、15 分）した。冷却後、ヘミセルラーゼ（ヘミセルラーゼ「アマノ」90、天野エンザイム（株）製）3 g（0.1%（w/w））を添加して 50℃ で 24 時間反応させた後、pH を 6.5 に調整した。本発明の YAMAKOSHI 株の懸濁液（OD 660 = 1.0）を 30 ml（1%（v/w））加えて初発乳酸菌数が 10^6 cfu/g になるように調製し、25℃ で 24 時間発酵させて発酵液状米糠を得た。

10

20

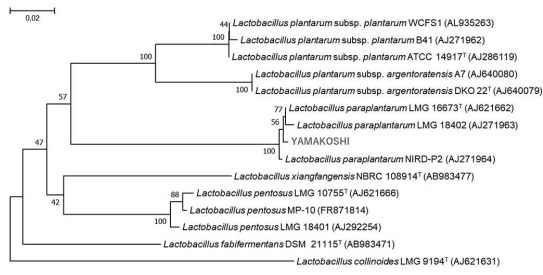
30

40

50

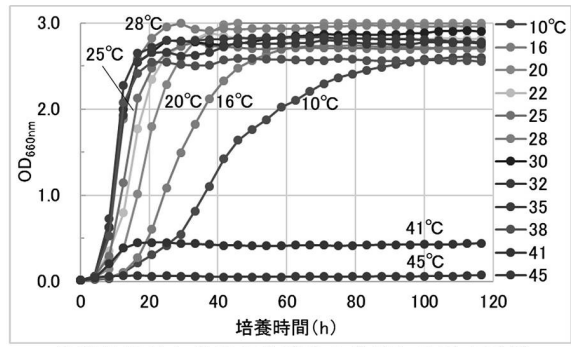
【図面】

【図 1】



recA 塩基配列に基づく分子系統樹

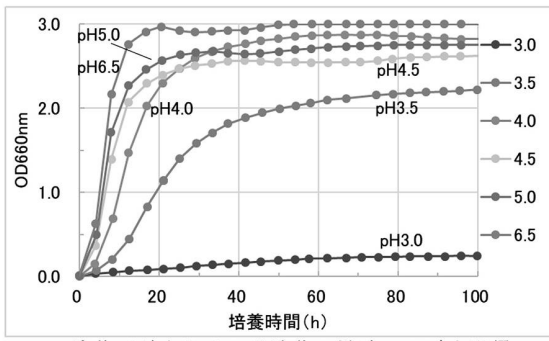
【図 2】



培養温度が本発明の乳酸菌の増殖に及ぼす影響
MRS培地 (pH6.8)

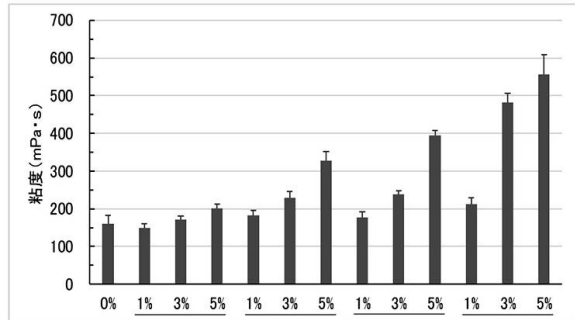
10

【図 3】



培養pHが本発明の乳酸菌の増殖に及ぼす影響
MRS培地、30°C

【図 4】



各種タンパク質添加による粘度への影響

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I	
A 2 3 L	11/65 (2021.01)	A 2 3 L	11/65
C 1 2 R	1/225(2006.01)	C 1 2 R	1:225

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 6 / 1 2 5 8 6 1 (W O , A 1)

特開 2 0 1 3 - 1 9 3 9 9 6 (J P , A)

特開 2 0 1 0 - 1 4 2 2 1 4 (J P , A)

特開 2 0 0 8 - 2 8 3 9 2 2 (J P , A)

特表 2 0 1 8 - 5 3 7 1 1 4 (J P , A)

Akihito Endo et al. , In vitro and in silico characterisation of Lactobacillus paraplantarum D 2-1, a starter culture for soymilk fermentation. , Int. J. Food Sci. Nutr. , 2018年01月10日 , Vol.69, No.7 , p.857-869 , doi: 10.1080/09637486.2007.1422701

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 / 2 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)