

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12)特許公報 ( B 2 )

(11)特許番号

特許第3538641号

( P 3 5 3 8 6 4 1 )

(45)発行日 平成16年6月14日(2004.6.14)

(24)登録日 平成16年4月2日(2004.4.2)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	
A23L 1/337		A23L 1/337	B
			W
1/30		1/30	B

請求項の数 8 (全12頁)

(21)出願番号	特願2001 - 191784( P 2001 - 191784)	(73)特許権者	501168814 独立行政法人水産総合研究センター 神奈川県横浜市金沢区福浦2丁目12番4号
(22)出願日	平成13年6月25日(2001.6.25)	(72)発明者	内田 基晴 神奈川県横浜市中区小港町2 - 83 小港 住宅1 - 308
(65)公開番号	特開2003 - 201( P 2003 - 201 A )	(72)発明者	村田 昌一 神奈川県横浜市中区小港町2 - 83 小港 住宅1 - 303
(43)公開日	平成15年1月7日(2003.1.7)	(74)代理人	100090941 弁理士 藤野 清也 (外2名)
審査請求日	平成13年6月25日(2001.6.25)	審査官	鈴木 恵理子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】海藻発酵食品およびその製造方法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 海藻類を、セルラーゼを含む糖質分解酵素により分解して単細胞の粒子に変換するとともに乳酸菌及び/又は酵母により発酵させて得られる、単細胞の粒子よりなり発酵されている海藻発酵食品。

【請求項2】 健康機能性を有する請求項1記載の海藻発酵食品。

【請求項3】 健康機能性が血中中性脂質(トリグリセライド)低減作用および肝臓脂質(トリグリセライド及びコレステロール)低減作用である請求項2記載の海藻発酵食品。

【請求項4】 海藻類をセルラーゼを含む糖質分解酵素により分解して単細胞性の粒子に変換するとともに乳酸菌及び/または酵母により発酵させることを特徴とする請求項1記載の海藻発酵食品の製造方法。

2

【請求項5】 海藻類がワカメである請求項4記載の海藻発酵食品の製造方法。

【請求項6】 乳酸菌が Lactobacillus 属、酵母が Debaryomyces 属、Candida 属および Saccharomyces 属からなる群から選択される1種またはそれ以上である請求項4記載の海藻発酵食品の製造方法。

【請求項7】 乳酸菌が Lactobacillus brevis NRIFS B5201株(FERM BP-7301)、酵母が Debaryomyces hansenii NRIFS Y5201株(FERM BP-7302) および Candida zeylanoides NRIFS Y5206 株(FERM BP-7303)である請求項6記載の海藻発酵食品の製造方法。

【請求項8】 海藻発酵食品が健康機能性を有するものである請求項4~7のいずれかに記載の海藻発酵食品の製造法。

【発明の詳細な説明】

10

## 【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】本発明は、海藻発酵食品およびその製造方法に関する。本発明の海藻発酵食品は、食用に供され、食品素材あるいはそのまま飲食品（以下、これらを食品ということがある）として使用することができる。例えば本発明の海藻発酵食品は、そのままで飲食したりあるいはご飯や野菜サラダにかけるなどして利用することができ、また魚類塩干品等を製造するための漬けだれとして、また乾燥処理することによりパスタ、お好み焼き等のトッピング素材としてなど様々な様式で食品として利用することができる。しかもこれらの食品は、血中中性脂質低減作用、肝臓脂質低減作用等さまざまな健康機能性を有する。

## 【 0 0 0 2 】

【従来の技術】発酵食品は、長い人類の歴史のなかで、乳や糖質素材を放置した場合に、偶然それが発酵したことを観察したことが端緒となって作られるようになったといわれており、まさに発明による食品といえる。このような発酵食品は、今日の我々の台所にいろいろな食材を提供しており、豊かな食生活を送るうえで多大な貢献をしている。さらに最近では、発酵食品を食する習慣が長寿を育む原因であることを示唆する疫学調査や、発酵食品に含まれる乳酸菌が腸内細菌相に影響を与え健康維持の目的に好影響を及ぼすことを示唆する研究結果の蓄積がおこなわれ、健康な食生活を送るための食品素材として注目されている。特に現代社会においては、高脂血症、脂肪肝、糖尿病などの生活習慣病と呼ばれる症例が増加する傾向にあり、これらを予防する機能を有する食品は今後、益々重要な価値を有するものと考えられる。

【 0 0 0 3 】発酵食品は、チーズ、ヨーグルト等のように動物性素材を基質として発酵させたものとみそ、大豆醤油、納豆等のように植物性素材を発酵させたものとに大きく分けられる。食品素材を収穫する場所を陸系と水系（或いは海洋系）に分けて考えた場合、これまで陸系素材を原料とした発酵食品が、市場で大きな地位を占めているのに対し、水系素材を原料とした発酵食品は、魚醤油、塩から、くさや、鰹節等、数えるほどしかなく、市場に占める地位も限られている。しかも、これらはすべて魚介類という動物性素材を基質にした発酵食品ということができ、水系においては植物性素材を原料とした発酵食品はこれまでほとんどみられなかった。

【 0 0 0 4 】水系における植物性素材としては、海藻と微細藻類とがあるが、海藻については、長い歴史をもって食品素材として親しまれてきた。特に日本人は、海藻を好んで食する習慣があり、海藻が健康に良いという認識が広く浸透している。従って、これに発酵という要素を付け加えた、全く新しい種類の食材が発明された場合、それが食材として受け入れられるための素地があがっているものと期待される。さらに、もしその食材に健康機能が認められれば、日本型食生活に良くなり

む画期的な食品素材といえる。

【 0 0 0 5 】海藻を発酵させる技術に関しては、これまでにいくつかの特許が出願されている。例えば、海藻酒および海藻酢の製造方法がみられる。前者は特公昭55-71475の「海藻抽出液による酒類製造法」であり、後者は特公平 10-304866の「海藻酢の製造方法」である。しかしこれら2つの発明は、いずれも加糖をして発酵をおこなっており、海藻は風味、色合い等を加える目的で副原料として使用されているに過ぎず、真の意味で海藻を主原料として発酵させて得られた食品とはいえない。

【 0 0 0 6 】本発明では、発酵のための加糖をいっさいせず、海藻のみで発酵させている点が従来の技術と大きく異なる。また本発明では、海藻にセルラーゼを作用させ、海藻中の硬い成分であるセルロースを分解するとともに、海藻全体を直径約10 $\mu$ mの単細胞性の粒子に変換している点も大きな特徴である。この海藻を単細胞化する技術については、本発明者が特許第 2772772号「海藻デトリタスの製造法」および特願2000-300399号「海藻デトライタス発酵飼料の製造法」において独自に発明し、完成させた技術であるが、これら2件の発明では、利用の目的を水産初期飼料としての利用に限定した発明であった。本発明では、この発酵産物が微細粒子であることにより滑らかなヨーグルトに似た物性を有する点、あるいは条件により炭酸ガスを含有することによりムースのような物性を有する点、フルーティーな芳香臭を有する点、あるいは条件によりチーズのような特徴ある臭気を有する点、保存性に優れる点、健康性機能が知られている乳酸菌を含有する点などに着目し、新たな食品としての可能性を追求するため鋭意努力をおこなった結果、健康機能性を有する海藻発酵食品というまったく新しい食品素材あるいは食品を発明するに至った。

## 【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】すなわち本発明は、本発明者が水産飼料の開発を目的に世界で始めて開発した、海洋系の植物性素材である海藻を発酵させる技術を利用し、全く異なる視点から工夫と改良を重ねることにより、海藻を原料として健康機能性を有する新しい食品あるいは食品素材を提供することを課題とする。

## 【 0 0 0 8 】

【課題を解決するための手段】本発明は、このような課題を解決するためになされたものであって、海藻類をセルラーゼを含む糖質分解酵素により分解して単細胞の粒子に変換するとともに乳酸菌及びノ又は酵母により発酵させて得られる、単細胞の粒子よりなり健康機能性を有する海藻発酵食品に関する。また、本発明は、海藻類をセルラーゼを含む糖質分解酵素により分解して単細胞性の粒子に変換するとともに乳酸菌及びノ又は酵母により発酵させることよりなる前記海藻発酵食品の製造法に関する。

【 0 0 0 9 】さらに本発明は、このような海藻発酵食品

を素材として得られた健康機能性を有する食品に関する。本発明における乳酸菌としては、Lactobacillus 属、Streptococcus 属、Leuconostoc 属、Pediococcus 属、Tetragenococcus 属、Bifidobacterium 属などに属する乳酸菌が、また酵母としては、Debaryomyces 属、Saccharomyces 属、Candida 属などに属する酵母を用いることができる。特に乳酸菌として Lactobacillus brevis NRIFS B5201 株 (FERM BP-7301)、酵母として Debaryomyces hansenii NRIFS Y5201 株 (FERM BP-7302)、Candida zeylanoides NRIFS Y5206 株 (FERM BP-7303) を用いることが好ましく、これらの 3 種類を併用した微生物コンソーシアムを用いることが特に好ましい。

【0010】なお、微生物コンソーシアムとは、複数の微生物種の組み合わせという意味であり、微生物群あるいは複合系微生物とも呼ばれる。単独でなく複数の微生物を組み合わせることで、その場で安定な微生物相を形成したり、多様な機能を同時に発揮させることが可能になるので、生ごみの堆肥化や石油の分解処理などの際にも、微生物をコンソーシアムとして投入することが注目されつつある。

#### 【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明で使用する原料の海藻類としては、例えばワカメ、マコンブ、ヒジキなどの褐藻類、アマノリなどの紅藻類、アオサなどの緑藻類、アマモなどの顕花植物が挙げられ、これから選択される 1 種以上を適宜使用する。これらの海藻類は生あるいは乾燥粉末の形態で用いることができる。上記海藻類の中でも、SCD 粒子 (単細胞化された海藻粒子のことをいう。Single cell detritus の略) の生成効率、原料の大量調達の容易さの面、経験的に優れた食品であることが知られている点などの観点から特にワカメ類、コンブ類、ヒジキ、アマノリ、アオサ類を用いるのが好ましい。それらの中でも、血中トリグリセライド濃度、肝臓脂質含量を低減させるなどの健康機能性について顕著な効果がみられるワカメがとりわけ好ましい。

【0012】本発明に使用する糖質分解酵素としては、多糖分解後に発酵の基質として利用される糖質が生成されている必要があるということからセルラーゼを必ず使用しなければならない。さらに単細胞化の効率を上げるためあるいはオリゴ糖等の健康機能性成分の生成を期待して、アルギン酸分解酵素、アガラーゼ、キシラナーゼ、フコイダン分解酵素、微生物由来各種ヘミセルラーゼ、ペクチナーゼ、アワビアセトンパウダー、プロテアーゼ、リパーゼなど海藻に含まれる成分を分解する種々の酵素と併用して使用することができる。

【0013】海藻を単細胞化する過程で使用する酵素の濃度は高い程、効率が良いが、コストの面から 3.0% (なお%は全て重量%を示す) 以下の濃度で用いるのが現実的である。セルラーゼを単独使用する場合、ワカメ

の場合 SCD 粒子の生成数を指標に判断すると 1% 以上の濃度で使用すれば、海藻の単細胞化と発酵をスターター微生物を添加しなくてもおこさせることが可能であるが、スターターを使用した場合には 0.1~0.5% 程度の低濃度での添加で海藻の単細胞化を効率的におこない、かつ発酵を充分におこさせることができるので経済的に有利である。

【0014】海藻を単細胞化する過程での反応温度は、5~50 の範囲で単細胞化の効率に大差なく実施できる。従ってコストの面から、調温設備を必要としない室温付近で実施するのが好ましい。ただし、製造コストよりも製品の品質を重視する場合や、腐敗の危険を低減させる目的がある場合には、5 程度の低温下で長期間の培養と保存をおこなうことも考えられる。

【0015】海藻を単細胞化する過程での海藻基質の濃度は、乾燥重量で 1~12% の範囲で目的とする食品の種類によって選択することができる。高い海藻濃度で調製しておいて、後で希釈して食品として利用するのは簡単であるので、高い濃度で調製するのが製造コストの面からいうと有利である。乾燥粉末を原料として使用する場合、最大で 10~12% 乾燥重量濃度までなら懸濁させて発酵させることができる。このとき試料は、ペースト状の強い粘性を有するため、取り扱いに不便を感じる場合は、5~10% 濃度で調製するのが最も好ましい。

【0016】海藻を単細胞化する過程において塩分濃度は、食品の種類により 0~30% の範囲で使用することができる。塩分濃度が 2.5% 以上の場合には、陸性の腐敗細菌の生育が抑制され、海洋性の腐敗細菌もセルラーゼの作用により産生されるグルコースおよびその代謝物により生育が阻害されるので、常温で長期保存可能な発酵産物が得られる。塩分濃度が 2.5% を切る場合には、陸性の細菌による腐敗が懸念されるが、スターターの量を多めに使用するか、あるいは試料の pH 値が充分下がり腐敗がおこりにくくなるまで、5 前後の低温で数日前培養するなど工夫をすることにより、塩分濃度が低い海藻発酵物を製造することも可能である。

【0017】塩分濃度が比較的低い条件、例えば食塩濃度 0% でワカメを発酵させた場合には、乳酸菌の増殖が活発になり、即ち菌数レベルが高くなるとともに、乳酸発酵がさかんにおこる。この場合、発酵の形式が、ヘテロ型の乳酸発酵をおこす乳酸菌を使用した場合には、乳酸の生成とともにエタノールと炭酸ガスが産生される。海藻に多量に含まれるアルギン酸等の多糖は粘性が高いため、発酵により発生した炭酸ガスは容易に試料の外部に出られない。その結果、培養 4 日目から 10 日目くらいにかけて、海藻試料が大量の炭酸ガスを抱き込むこととなり、ムース状の物性をした食品素材を得ることが出来る。またこの場合にはチーズに似た乳酸発酵独特の臭気を有するため、例えば乾燥してパスタやお好み焼きの上に振りかけたりするなど各種食品のトッピング材として

利用することができる。一方、塩分濃度が比較的高い条件、例えば食塩濃度 3.5% でワカメを発酵させた場合には得られる発酵産物は、ヨーグルトに似た物性を有していることから、本発明者はこれをマリンヨーグルトと呼んでおり、例えばご飯にのせて朝食として食べるなどすることができる。またこの場合は、フルーティなワインに似た芳香臭を有するのが特徴である。

【0018】本発明で使用する微生物は、栄養源として海藻だけが存在する系でも成育できる微生物であるという前提条件のほか、グルコースを基質として乳酸発酵もしくはエタノール発酵を起こすということが必要となる。また目的とする食品の種類により、好ましい臭気を付与するという目的にあった微生物を組み合わせる使用。即ち、チーズのような乳酸発酵食品に独特の臭気を求められる場合は、乳酸菌単独あるいは乳酸菌が主体として機能しうるような組み合わせの微生物を選んで使用する。一方、ワインのようなフルーティな香りが好ましい食品の場合には、酵母を主体として使用することによりエステルに起因する芳香臭を付与することができる。また原材料に含まれる雑菌の成育を抑制し、腐敗しにくい安定な微生物相を形成させるには乳酸菌と酵母を同時に使用することが好ましいが、この場合には、食塩濃度、培養温度等の培養条件を変化させることにより、臭気の異なる海藻発酵試料を調製することが可能である。

【0019】具体的には、乳酸菌としては *Lactobacillus* 属、*Streptococcus* 属、*Leuconostoc* 属、*Pediococcus* 属、*Tetragenococcus* 属から選択される 1 種類以上の菌株を使用することができる。また、広い意味で乳酸菌とみなされる *Bifidobacterium* 属の菌株も選択することができる。また酵母としては、*Debaryomyces* 属、*Candida* 属および *Saccharomyces* 属から選択される 1 種類以上の菌株を選択して使用することができる。とりわけ原材料中にあらかじめ存在する雑菌を良く抑制することが実験的に確かめられている、本発明者らがアオサの発酵試料より分離した微生物コンソーシアム、すなわち *Lactobacillus brevis* NRIFS B5201 株、*Debaryomyces hansenii* NRIFS Y5201 株および *Candida zeylanoides* NRIFS Y5206 株の 3 種類を同時に添加することが有効である。この微生物コンソーシアムを分離した方法及び各微生物の分類学的性状の詳細については、特願 2000-300399 号明細書に記載したが、次のとおりである。

【0020】本発明者らは、本発明者らの研究室においてセルラーゼ処理して SCD 化したアオサをペットボトルで密封した条件下で 1 年 5 ヶ月間、2 に放置した試料が、発酵臭を発する発酵状態になったことを見出し

乳酸菌の NRIFS B 5201 株の性状

た。この発酵したアオサ試料を新しいアオサ試料にセルラーゼとともに、1% 程度の量として植え継ぐと、新たにアオサ試料を発酵状態に誘導できることが観察された。その後さらに約 1 年間にわたり詳細に、解析をすすめ、塩濃度 5%、セルラーゼ濃度 1% という条件下において発酵試料を 1% 接種し、20 で 1 週間培養すれば、数ヶ月ごとの植え継ぎでも、海藻を発酵させるスターターとしての能力を保持したままで試料が維持できることがわかった。そこで、この発酵状態にあるアオサ試料より、アオサを発酵させる能力を有する微生物群を得ることとした。継体されたアオサ試料中の微生物相を直接計数法、寒天平板法により詳細に解析し、蛍光顕微鏡による直接計数法からの結果とも照らし合わせた結果、この試料中には、1 種類の乳酸菌、2 種類の酵母、3 種類の糸状菌が優占しており、植え継ぎ前後で安定的に菌相が維持されていることが判明した。

【0021】これらのうち、糸状菌は一般に糖質分解酵素の活性が強く、発酵の基質となる糖の生成段階で有用であるが、本発明の場合には、市販の糖質分解酵素を利用しているため、特に糸状菌を使用する必要はないと判断し、乳酸菌 1 種類（すなわち、NRIFS B5201 株）と酵母 2 種類（すなわち、NRIFS Y5201 株及び NRIFS Y5206 株）の合計 3 種類を分離して発酵スターターとして利用した。これら 3 種類の微生物の混合体を、新たな海藻試料に対してセルラーゼとともに少量接種したところ、アオサのみならずワカメ、マコンブ等幅広い種類の海藻を発酵状態に誘導するためのスターターとして利用できることが判明した。なお、ここでいう発酵状態とは、海藻試料を、水溶液に懸濁した状態で、20 下に 1 週間以上放置しても、腐敗臭が発生しないばかりでなく、フルーティなエステル様の臭気が発生した状態に誘導されることを意味する。またこのとき試料の上清画分中に、乳酸もしくはエチルアルコールが生成されているという特徴を有する。

【0022】ここで得られた微生物を Burgey's Manual of Systematic Bacteriology (N.R. Krieg and J.G. Holt, Williams & Wilkins 1984) 及び The Yeast 4th edition (Kurtzman, C.P. and Fell, J.W., Elsevier Science B.V., 1998) に従い同定した結果、乳酸菌 NRIFS B 5201 株は表 1 のとおり *Lactobacillus brevis* であると、酵母 NRIFS Y5201 株及び酵母 NRIFS Y5206 株は、表 2 及び表 3 のとおり、*Debaryomyces hansenii* 及び *Candida zeylanoides* であることが判明した。

【0023】

【表 1】

9	
グラム染色	+
形態	桿菌
	1.0× 1.5~2.0 μm
胞子	-
運動性	-
O/F 試験	F
カタラーゼ	-
オキシダーゼ	-
集落の色調	クリーム色
グルコースからの乳酸産生 (効率)	+(50%)
グルコースからのエタノール産生	+
グルコースからのガス産生	+
乳酸発酵形式	ヘテロ型
生育温度	
5	-
15	+
30	+
45	-
炭水化物からの酸産生	
グルコース	+
フラクトース	+
ガラクトース	+
D-キシロース	+
L-キシロース	-
マンノース	-
グリセロール	-
エリスリトール	-
D-アラビノース	-
L-アラビノース	+
リボース	+
アドニトール	-
- メチル-D- キシロース	-
ソルボース	-
ラムノース	-
ズルシトール	-
イノシトール	-
マンニトール	-
ソルビトール	-
- メチル-D- マンノース	-
- メチル-D- グルコース	±
N-アセチルグルコサミン	±
アミグダリン	-
アルブチン	-
エスクリン	+
サリシン	-
セロビオース	-
マルトース	+
ラクトース	-
メリビオース	-
シュークロース	-

11		12
トレハロース	-	
イヌリン	-	
メレチトース	-	
ラフィノース	-	
スターチ	-	
グリコーゲン	-	
キシリトール	-	
ゲンチオピオース	-	
D-ツラノース	-	
D-リキソース	-	
D-タガトース	-	
D-フコース	-	
L-フコース	-	
D-アラビトール	-	
L-アラビトール	-	
グルコネート	+	
2-ケトグルコン酸	-	
5-ケトグルコン酸	±	
GC含量(mol%)	45	
16S rRNA遺伝子 (大腸菌の第41番 - 第1507番位) の比較		
<u>Lavtobacillus brevis</u> (Accession No.dbj D37785) との相同性	99.9%	

【 0 0 2 4 】

【表 2】

酵母 NRIFS Y5201株の性状

試験項目	試験結果 (Y 5201株)
栄養細胞の形態	球形～卵形
増殖形式	多極出芽
偽菌糸	形成しない
子嚢胞子	形成する (麦芽培地、15、3週間) 球形、表面が滑らかでない
成育試験	
35	-
0.01%シクロヘキシミド存在下	-
酢酸の生成	-
ビタミン欠培地	-
糖類発酵性試験	
D-グルコース	弱い
D-ガラクトース	-
シュークロース	弱い
マルトース	-
ラクトース	-
ラフィノース	-
炭素化合物資化性試験	
D-グルコース	+
D-ガラクトース	+
L-ソルボース	+

13

14

D-グルコサミン	+
D-リボース	-
D-キシロース	+
L-アラビノース	+
L-ラムノース	+
シュークロース	+
マルトース	+
、 - トレハロース	+
メチル -D- グルコシド	+
セロビオース	+
メリビオース	-
ラクトース	-
ラフィノース	+
メレチトース	+
グリセロール	+
meso- エリスリトール	+
D-ソルビトール	+
D-マンニトール	+
myo-イノシトール	-
2-ケト-D- グルコン酸	+
D-グルコン酸	+
D-グルクロン酸	+
DL- 乳酸	+
窒素化合物資化性試験	
硝酸塩	-
エチルアミン	+
L-リジン	+
ガダベリン	+
D-グルコサミン	-
18S rRNA遺伝子	
( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の	
第22番 - 第1771番位) の塩基	
配列の比較	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	
(Accession No.dbj AB013555)と	99.9%
の相同性	

【 0 0 2 5 】

【表 3】

酵母 NRIFS Y5206株の性状

試験項目	試験結果
栄養細胞の形態	卵形～長楕円形
増殖形式	出芽
偽菌糸	形成する
子嚢胞子	形成せず (麦芽および酢酸培地)
成育試験	
35	-
0.01%シクロヘキシミド存在下	+
酢酸の生成	-

15		
糖類発酵性試験		
D-グルコース	-	
D-ガラクトース	-	
シュークロース	-	
マルトース	-	
ラクトース	-	
ラフィノース	-	
炭素化合物資化性試験		
D-グルコース	+	
D-ガラクトース	-	
L-ソルボース	+	
D-グルコサミン	弱い	
D-リボース	-	
D-キシロース	-	
L-アラビノース	-	
L-ラムノース	-	
シュークロース	-	
マルトース	-	
、 - トレハロース	+	
メチル -D- グルコシド	-	
セロビオース	-	
メリビオース	-	
ラクトース	-	
ラフィノース	-	
メレテトース	-	
グリセロール	+	
meso- エリスリトール	-	
D-ソルビトール	+	
D-マンニトール	+	
myo-イノシトール	-	
2-ケト-D- グルコン酸	+	
D-グルコン酸	-	
D-グルクロン酸	-	
DL- 乳酸	-	
窒素化合物資化性試験		
硝酸塩	-	
エチルアミン	+	
L-リジン	+	
カダベリン	+	
D-グルコサミン	-	
18S rRNA遺伝子		
( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の		
第22番 - 第1771番位) の塩基		
配列の比較		
<i>Candida zeylanoides</i>		
(Accession No.dbj AB013509)と	99.5%	
の相同性		



【 0 0 2 7 】本発明で使用するこれらの微生物の接種量としては、各菌体の培養菌体を濁度 $OD_{(660nm)} = 1$ の濃度に調整した細胞懸濁液を海藻懸濁液に対して 1~0.1%程度の重量割合で接種すればよいが、海藻発酵物の一部を 1~10%相当の量として直接移植し、スターター(種)として利用することも可能である。海藻発酵微生物を添加する時期は、海藻をSCD化した後でもよいが、糖質分解酵素を加える第一段階で同時に添加した方が、時間の節約になり望ましい。

【 0 0 2 8 】このようにして製造した海藻発酵物は、硬いセルロース成分が分解されるとともに単細胞化されているため滑らかな食感を有し、ペースト状であるため食パンの上に塗ることも容易である。あるいは消化され易いことが期待されるなど食材としての利用する上で様々な優位性を有している。また、そのまま、例えばご飯の上に乗せて食したり、野菜サラダの上にかけてドレッシングとして利用したり、あるいは、くさや汁のように魚のひらきの表面に塗布することにより、乳酸菌発酵物が有する抗菌性を利用した食品として利用できる。保存性についても、20℃で18ヶ月放置した場合にも腐敗がおこらず良好な保存性を有している。

【 0 0 2 9 】このように、海藻を単細胞化しかつ発酵させたものは、味、臭気、物性の各面にわたりこれまでにないユニークな性状を有し、それ自体新規な食品として利用されることが期待できるが、それ以外に活きた乳酸菌を含むという特徴を有することから、様々な健康機能が期待できる。これまでに乳酸菌あるいは乳酸発酵食品が有する健康機能性としては、蛋白の予備消化作用、ミネラル吸収促進作用、整腸作用、血中コレステロール低減作用、血中トリグリセライド低減作用、血圧降下作用、制癌作用、免疫賦活作用等(乳酸菌の科学と技術、乳酸菌研究集団編、学会出版センター)とが知られており、本発明により得られる海藻発酵食品も、使用する

乳酸菌の種類を選ぶことにより、同様の効果が期待できる。例えばワカメは、それ自体、血中及び肝臓中の中性脂質(トリグリセライド)を低減させる効果があることが既に報告されているが、*L. brevis* NRIFS B5201 株、*D.hansenii* NRIFS Y5201 株、*Candida zeylanoides* NRIFS Y5206 株からなる微生物コンソーシアムにより発酵させたワカメは、無処理のワカメより、その低減効果が著しいことが動物試験により、認められている。また肝臓中のコレステロール含量を低減させる効果もワカメそのものよりも、これを発酵処理したものの方が効果が著しい。

【 0 0 3 0 】  
【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定して解釈されるものではない。

【実施例 1】紅藻類、褐藻類、緑藻類および顕花植物に属する各種の海藻の乾燥粉末(粒径1mm以下)0.5gを、0.1gのセルラーゼオノズカR-10、((Toyamaの方法で測定した)ろ紙破壊力として力価10,000u/g)9ml のオートクレーブ処理して滅菌された 3.5% NaCl 水溶液とともにフタつきの試験管にいれ、さらにスターターとして3菌株(*Lactobacillus brevis* NRIFS B5201 株、*Debaryomyces hansenii* NRIFS Y5201株および*Candida zeylanoides* NRIFS Y5206 株)からなる海藻発酵型の微生物コンソーシアムを接種した。接種の方法は、各菌株の培養菌体を $OD_{(660nm)} = 1$ の濃度として生理的食塩水に懸濁したものを、それぞれ0.05mlづつ接種した。培養は、密栓した状態で、20℃下で、ゆっくり(5rpm)試験管を回転させながら、7日間おこない、培養後、微生物発酵により産生される乳酸およびエタノールの量を測定し、表4にまとめた。

【 0 0 3 1 】

【表 4】

各種海藻において微生物コンソーシアムを添加することにより乳酸及びエタノールが発酵生産されるかどうか調べた結果

海藻	分類	乳酸生成量 (g/100ml)	エタノール生成量 (g/100ml)
スギノリ		+ (0.25)	+ (0.18)
オゴノリ		+ (0.31)	+ (0.23)
イバラノリ		+ (0.22)	+ (0.16)
シキンノリ		+ (0.16)	+ (0.18)
オバクサ	紅藻類	+ (0.12)	+ (0.08)
キントキ		+ (0.25)	+ (0.17)
ヒトツマツ		+ (0.25)	+ (0.41)
オオブサ		+ (0.18)	+ (0.12)
ミゾオゴノリ		+ (0.25)	+ (0.12)
ウミウチワ		- (<0.01)	+ (0.08)

19		20		
オオバモク	± (0.01)	+	(0.04)	
ヒジキ	± (0.01)	+	(0.24)	
イシゲ	± (0.01)	+	(0.10)	
フクリンアミジ 褐藻類	± (0.02)	+	(0.04)	
アラメ	± (0.02)	+	(0.03)	
ワカメ	+	(0.23)	+	(0.38)
茎ワカメ	+	(0.25)	+	(0.12)
マコンブ	+	(0.16)	+	(0.15)
アオサ試料 1 緑藻類	+	(0.76)	+	(0.16)
アオサ試料 2 "	+	(0.45)	+	(0.41)
アマモ 顕花植物	+	(1.14)	+	(0.26)

【 0 0 3 2 】表 4 より一部の褐藻類では乳酸生成量が少ないものの、全ての海藻において乳酸もしくはエタノールの産生がみられた。なお、試料は、エステル様のフルーティーな臭気を有していた。この結果より、本発明者が開発した上記の海藻発酵型の微生物コンソ - シアムをセルラーゼとともに添加することにより、全ての種類の海藻を乳酸発酵もしくはエタノール発酵させて食品素材とすることが可能であることがわかる。

【 0 0 3 3 】

【実施例 2】ワカメ乾燥粉末（粒子直径74 μm以下）800gを8gのセルラーゼ（R-10、ヤクルト本社製）、滅菌蒸留水8 Lとともにスクリュウキャップ付き10L 容のポリプロピレン製容器に収容し、よく混合した。*Lactobacillus brevis* NRIFS B5201株の培養菌体を滅菌水で濁度OD<sub>(660)</sub> =1の懸濁液として80ml（即ち6.3x10<sup>10</sup> 細胞相当）、*Debaryomyces hansenii* NRIFS Y5201株の培養菌体を同様に濁度OD<sub>(660)</sub> =1の懸濁液として80ml（即ち4.4x10<sup>9</sup> 細胞相当）、*Candida zeylanoides* NRIFS Y5206株の培養菌体を同様に濁度OD<sub>(660)</sub> =1の懸濁液として80 ml（即ち6.8x10<sup>8</sup> 細胞相当）添加し、キャップを閉めた嫌気・静置条件下で、5 で3日間1次培養し、さらに20 で9日間2次培養して発酵させた。

【 0 0 3 4 】培養 4 日目から 9 日目の培養終了時まで、顕著な発泡が観察され、pHが初期値6.4 から5.2 に下がるなど、ヘテロ型の乳酸発酵が活発に起こっていると推察された。タンクの破裂を防ぐため、1日1回程度キャップをゆるめて圧抜きをしなければならぬほど発酵は

強力であった。アルギン酸多糖を含有するワカメ試料は粘性に富むため、発酵により産生された炭酸ガスは容易にワカメ試料の外部に放出されず内部に残るため、このようにして得られた海藻発酵産物は、ヨーグルトかあるいはムースのような物性を有し、そのまま食したりあるいはご飯にかけて食するなどにより食品としての利用が可能であった。培養終了時の菌相は、雑菌の成育が抑制され、乳酸菌が優占していた。BCP 添加カウントアガール平板で計数した乳酸菌の数は1.0x10<sup>8</sup> CFU/ml、サブロー培地で計数した酵母の数は 2.2 × 10<sup>5</sup> CFU/mlであった。顕微鏡観察するとワカメが、直径5-10 μm単細胞性の粒子になっており、これをヒトが食した場合、消化しやすいことが容易に推察された。

【 0 0 3 5 】また、この発酵試料を凍結乾燥すると乳酸発酵独特のチーズに似た臭気を有し、微粒子粉末状であるため、粉チーズの代わりに例えばスパゲティーにふりかけて食するなどによりトッピング材としての利用が可能であった。表5 に原料ワカメとこれを発酵させた試料の成分組成の一部（粗タンパク含量及び炭水化物含量）を示す。発酵処理により炭酸ガスやエタノールが産生され、その結果ワカメに多く含まれる炭水化物の割合が減少するとともに、粗タンパク含量の割合が増加する傾向がみられ、食品として栄養バランスがよくなっていることがわかる。

【 0 0 3 6 】

【表 5】

ワカメ試料および発酵ワカメ試料の成分組成の比

	粗タンパク	炭水化物
ワカメ粉末	25.4	52.0
発酵ワカメ粉末	39.5	38.0

乾物重量割合 (%)

粗タンパク：ケルダール法

炭水化物：粗タンパク、粗脂肪、灰分より算出

50 【 0 0 3 7 】

【実施例 3】実施例 2 で得られたワカメ発酵産物の凍結乾燥物を配合した飼料（発酵ワカメ区）をラットに摂食させ、血中および肝臓中の中性脂肪（トリグリセライド）濃度およびコレステロール濃度を低減させる効果があるかどうか調べた。比較のため、ワカメを含有しない飼料（対照区）および発酵処理していないワカメを等量含有する飼料（ワカメ区）を調製し摂食させた。各試験各試験区の飼料組成

区の飼料組成は表 6 に示す。投与試験は、各区ともラット（6 週令、オス、体重 205-239g、n=7）を対象に 3 週間投餌し、投餌後の肝臓中のトリグリセライド濃度及びコレステロール濃度を測定して比較した。

【 0 0 3 8 】

【表 6】

	対照区	ワカメ区	発酵ワカメ区
DL- メチオニン	3.0	3.0	3.0
AIN-76 ビタミン混合	10.0	10.0	10.0
AIN-76 ミネラル混合	35.0	35.0	35.0
セルロースパウダー	50.0	46.6	46.6
ワカメ粉末		100.0	
発酵ワカメ粉末			100.0
コーンスターチ	150.0	150.0	150.0
カゼイン	200.0	174.6	173.6
コーン油	50.0	45.5	45.5
シュークロース	502.0	435.3	436.3

\*飼料 1kgあたり(g)

【 0 0 3 9 】ラットに、対照区、ワカメ区、発酵ワカメ区とも、与えられた飼料をほぼ同じ量として 3 週間摂取させ、嗜好性の点では、いずれも良い結果が得られた。飼育後、ラットの血液および肝臓を採取し、トリグリセライド濃度を測定した。この結果を図に示す。図 1 のように、対照区と比較して、有意（ダンカンの検定、5 % 水準）にラットの血中（図1A）および肝臓中（図1B）のトリグリセライド濃度を低減させる効果が認められた。トリグリセライドの低減作用はワカメ区についても認められたが、それよりも発酵処理したワカメを配合した飼料のほうが効果が顕著であった。またワカメ区の場合は、図 2 に示すように血中コレステロール(図2A) が増加する傾向があるというマイナスの要因があったが、発酵処理したワカメでは、このような血中コレステロール(図2A) の増加も認められず、肝臓中コレステロール濃度においては、対照区(図2B) に比べ有意にこれを低減させる効果が認められた。

【 0 0 4 0 】

【実施例 4】凍結生ワカメを解凍後、クリアランス幅 0.5mm に調製したマスコロイダーに 1 回通すことにより、ワカメペーストを調製した。このワカメペースト 400g を 4g のセルラーゼオノズカ R-10、3.5g の NaCl とともにスクリュウキャップ式ポリカーボネートボトル（ナルゲン社製、500ml 容）に収容し混合した。スターターとして、減菌生理的食塩水で OD660nm = 1.0 の濃度で調製した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* IAM 12477 株の細胞懸濁液を 4 ml、同濃度の酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

IAM 4512 株の懸濁液を 4 ml 添加し、20 ℃ で静置培養した。培養 5 日目で海藻の単細胞化がコールターカウンターにより確認されるとともにエステル様の芳香臭が発生し、十分に乳酸発酵が達成された大豆味噌に似た物性を有する産物が得られた。これは、そのままあるいはご飯に載せてなど食することができ大変美味であった。また魚の開き等に塗布することにより、カス漬けに類似する食品として利用するなど様々な用途が期待できる食品素材と考えられた。

【 0 0 4 1 】

【実施例 5】実施例 2 で得られた発酵産物 500g を厚さ約 20mm の板状に成型し、-40 ℃ で凍結後、棚温度 30 ℃ で凍結乾燥し、これを家庭用ミキサーにより粉碎後、メッシュ No.200 を通し、微粒子粉末とした。これは乳酸発酵独特のチーズ様臭気を呈し、海藻からできた粉チーズと呼ぶのがふさわしい産物が得られた。これをパスタにふりかえて食すると、従来の粉チーズと異なり、緑色をしており、色彩的にも鮮やかなだけでなく、海藻の風味が多少感じられ、健康感ある食材と考えられた。

【図面の簡単な説明】

【図 1】実施例 3 の 3 週間後のラットの血中および肝臓中のトリグリセライド濃度の比較。

【図 2】実施例 3 の 3 週間後のラットの血中および肝臓中のコレステロール濃度の比較。

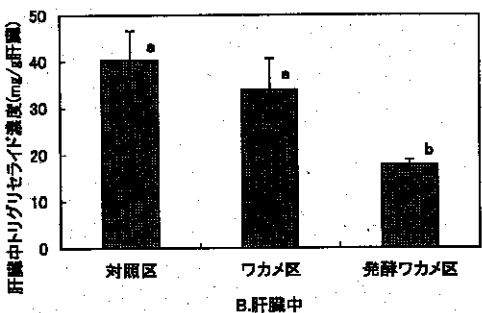
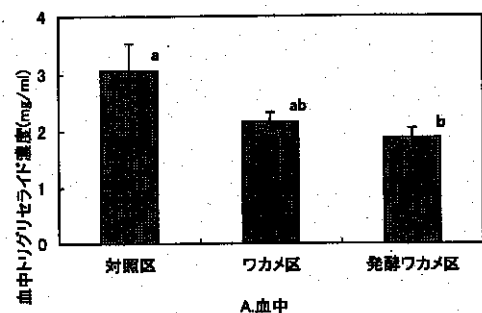
【符号の説明】

対照区 a ワカメ区 ab 発酵ワカメ区 b と記載している場合、対照区とワカメ区との間には Duncan の検定により 5

%水準で有意差はなく、ワカメ区と発酵ワカメ区との間にも有意差はないが、対照区と発酵ワカメ区との間には有意差があることを意味する。また、対照区a ワカメ区 a 発酵ワカメ区b と記載している場合、対照区とワカメ区との間にはDuncanの検定により 5 %水準で有意差はな

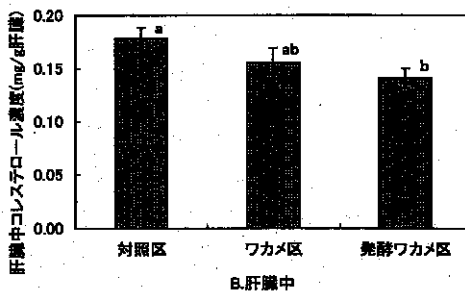
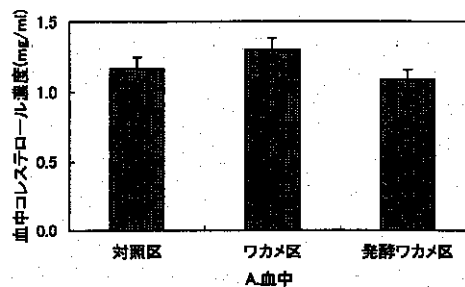
いが、ワカメ区と発酵ワカメ区との間に有意差があり、対照区と発酵ワカメ区との間にも有意差があることを意味する。さらに、a,b がない場合は、どの試験区どうしの間にも有意差がないことを示す。

【 図 1 】



ワカメ配合飼料を与えたラットの血中および肝臓中におけるトリグリセライド量の変化

【 図 2 】



ワカメ配合飼料を与えたラットの血中および肝臓中のコレステロール値の変化

フロントページの続き

(56)参考文献 特開 平 6 - 105661 ( J P , A )  
 特開 平 4 - 258273 ( J P , A )  
 特開 平 3 - 172147 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, D B 名)  
 A23L 1/337  
 A23L 1/28 - 1/30