

乳酸菌発酵による食品の感覚応答の増強・減弱

食品科 堀池隼雄
静岡県立大学 内田邦敏
鳥居食品株式会社 鳥居大資

Control of food sensory responses by lactic acid bacteria fermentation

HORIIKE Hayao, UCHIDA Kunitoshi and TORII Daishi

We have been working on the development of fermented foods using microorganisms^{1,2,3}, and in doing so, we discovered that by fermenting habanero, a type of chili pepper, using lactic acid bacteria from Suruga Bay, which is in Shizuoka, Japan, can make it less spicy and mellow. In this research, we also aimed to develop technology to control sensations such as spiciness and hotness through fermentation by elucidating the fermentation conditions and the mechanism by which habaneros become less spicy and mellow. As a result, by fermenting habanero paste for one week at 15°C with the addition of 3% NaCl using lactic acid bacteria Is332 from Suruga Bay, the response of the pungency receptor (TRPV1) was attenuated by more than half. The emulsification state of habanero paste changed due to fermentation, suggesting that the fat-soluble pungent components and their state of existence may have been denatured and the influx of capsaicin into cells may have been inhibited, resulting in a decrease in spiciness.

Keywords:Lactic acid bacteria, Habanero pepper, fermentation, pungency receptor

これまで微生物を用いた発酵食品の開発に取り組んできた^{1,2,3}が、その中で、唐辛子の一種であるハバネロを乳酸菌を用いて発酵することで、辛味がまろやかに感じられることがわかった。本研究では、さらに、発酵条件やハバネロの辛味がまろやかになるメカニズムを解明することで、発酵により辛味・温度などの感覚を制御する技術の開発を目指した。その結果、駿河湾由来の乳酸菌 Is332 を用いて、3% NaCl 添加、15°C の条件でハバネロのペーストを1週間発酵することで、辛味受容体 (TRPV1) の応答が1/2以下に減弱することが明らかとなった。また、発酵によりハバネロペーストの乳化状態が変化していたことから、メカニズムとして、脂溶性である辛味成分やその存在状態が変性し、細胞内へのカプサイシン流入が阻害されたことで辛味が減弱した可能性が示唆された。

キーワード：乳酸菌、ハバネロ、発酵、辛味受容体

1 はじめに

本県ではこれまでに、県内の海洋資源から収集した微生物を用いて様々な発酵食品を開発してきた。その中で、唐辛子の一種であるハバネロを駿河湾由来の乳酸菌を用いて発酵することで、辛味がまろやかに感じられることがわかった。近年、食品を食べたときに感じる感覚に関連する市場のニーズは大きく、例えば子供用の甘口カレーにかけただけで大人向け辛口カレーになるスパイスソースが販売されている。一方で、辛い食べ物が苦手な人でもかけただけで食べられるような

調味料の開発への需要もあり、食べたときの感覚を制御する技術の開発が望まれている。本研究では、ハバネロの辛味がまろやかになる発酵条件を決定し、そのメカニズムを解明することで、発酵により辛味・温度などの感覚を制御する技術の開発を目指した。

2 方法

2.1 受容体応答が減弱する発酵条件の最適化

(1) 乳酸菌を用いた発酵条件の検討

ハバネロの果実 (図1) をフードプロセッサー

MK-K61 (パナソニック (株) 製) を用いてハバネロ:水=2:1の重量比でペースト化し、重量比3%のNaClを添加した。これに、以下に示す4株の乳酸菌いずれかの乾燥粉末を、重量比0.1%となるよう添加して15°Cで1週間発酵を行い、pHの変化を測定した。なお、これらの乳酸菌は、令和2年度から4年度に実施された新成長戦略研究「マリンバイオ産業を振興するための海洋由来微生物を活用した新たな食品開発」において、県が収集した海産物や海洋深層水を分離源として同定されたものであり、良好なpH低下能を示した乳酸菌株 (*Lactiplantibacillus plantarum*) である。

- ・ Is117 (駿河湾海藻 (タンバノリ) 由来)
- ・ Is315 (田子 (西伊豆) 海水由来)
- ・ Is332 (田子 (西伊豆) 海水由来)
- ・ Is363 (田子 (西伊豆) 海水由来)



図1 ハバネロ

左: ハバネロの実 右: ハバネロペースト

(2) 受容体応答の評価

ア. サンプルの調製

2.1 (1) で調製した発酵ハバネロペーストを試食し、特に辛味がまろやかになったと感じたIs332発酵ハバネロペーストを試験対象とした。遠心分離機H-19 α 、ローターRF-109K (株)コクサン製) を用いて3,000rpmで3分間遠心分離した後、上清25 μ Lを25mLの還流溶液(140mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, 10mM HEPES, 10mM グルコース: pH7.4に調整)に加えた後ボルテックスミキサーで十分に攪拌し、1,000倍希釈溶液とした。これをさらに10倍ずつ段階希釈し、10,000倍希釈液及び100,000倍希釈液を調製した。

イ. カルシウムイメージングに用いる細胞の維持

ヒト胚性腎臓由来のHEK293細胞を、10%FBS

(Cell Culture Technologies CC3008-502)、50units/mL ペニシリン (Gibco)、50mg/mL ストレプトマイシン (Gibco) 及び2mM GlutaMAX (Gibco) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、Sigma) にて37°C、5% CO₂ 中で維持した。

ウ. カルシウムイメージング

OPTI-MEM 培地 (Invitrogen 社製) にて human TRPV1 チャネルの cDNA をトランスフェクション (導入) した HEK293 細胞を、3.3 μ M の Fluo-4 (カルシウム蛍光指示薬、同仁化学研究所製) を含む培地中で37°C、30分間インキュベート (定温静置) した。この細胞が接着したカバーガラスを2.1 (2) アと同組成の還流溶液で洗浄し、蛍光を還流溶液中で測定した。カバーガラスを重力流システムに接続されたチャンバーに取り付け、2.1 (2) アで調製した各希釈倍率の発酵ハバネロペースト上清を流した。ここで、TRPV1とは、トウガラシの辛味成分(カプサイシン)や42°C以上の熱、酸などの刺激に応答して開口するチャネル分子である。細胞内に存在する結合部位にカプサイシンが結合することで開口し、細胞内にカルシウムイオンなどが流入することで辛味や痛みの信号として脳にシグナルを送ることが知られている。カルシウムイメージングでは、カルシウムと結合して蛍光を発するFluo-4が細胞内に導入されており、細胞の蛍光強度を蛍光顕微鏡などで測定することで受容体の応答を評価することができる。

2.2 感覚応答を減弱するメカニズムの解明

発酵による辛味の減弱のメカニズムについて、以下の3つの仮説が考えられた。

仮説1: 辛味成分であるカプサイシン等の分解

仮説2: TRPV1の結合部位へのカプサイシン結合の阻害

仮説3: 細胞内へのカプサイシン流入の阻害

これらの仮説1~3について検討するため、以下の(1)~(3)に示した方法で検討を行った。

(1) 仮説1: カプサイシンが分解された可能性の検討

2.1 (1) で調製した4種の発酵ハバネロペースト100mgにメタノール50mlを加え、高速振盪機CM-1000 (東京理化器械(株)製)を用いて15min振盪した。その後、0.45 μ mのフィルターでろ過し、UPLCを用いてカプサイシン含量を測定した。UPLCの条件を表1に示す。

表1 カプサイシン分析条件

区分	内容
装置	Waters ACQUITY UPLC System (ACQ-SM, ACQ-BSM, ACQ-PDA)
カラム	ACQUITY BEH C18 1.7 μ m 2.1 \times 100mm Column
溶離液	A: 0.1% H ₃ PO ₄ in water B: Acetonitrile
流速	0.6 mL/min
グラジエント	時間 (min) %A %B
	0.00 60 40
	8.00 60 40
	9.00 0 100
	11.00 0 100
	11.20 60 40
	13.00 60 40
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
検出波長	280nm
試料注入量	2 μ L

(2) 仮説2：結合部位へのカプサイシン結合阻害の検討

これまでに、乳酸の存在下で TRPV1 の応答が減弱するケースが報告されている⁴⁾。Is332 の発酵により産生される乳酸濃度においてハバネロの辛味が減弱するか、以下の方法で検討を行った。

ア. 発酵ハバネロペースト中の乳酸量

2.1 (1) で調製した4種の発酵ハバネロペーストを4,000 \times g で10min 遠心分離して上清を分取した。この上清を Milli-Q 水で10倍に希釈し、0.20 μ m フィルターでろ過した後、UPLC 測定に供した。UPLC の条件を表2に示す。

表2 乳酸分析条件

区分	内容
装置	Waters ACQUITY UPLC System (ACQ-SM, ACQ-BSM, ACQ-PDA)
カラム	ACQUITY HSS T3 1.8 μ m 2.1 \times 100mm Column
溶離液	A: 20mM NaH ₂ PO ₄ in water (pH2.5に調整) B: 60% Acetonitrile in water
流速	0.4 mL/min
グラジエント	時間 (min) %A %B
	0.00 100 0
	3.00 100 0
	3.50 0 100
	4.50 0 100
	5.00 100 0
	6.00 100 0
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
検出波長	210nm
試料注入量	2 μ L

イ. 乳酸がハバネロの TRPV1 応答に及ぼす影響

2.1 (1) と同様の方法で NaCl 添加ハバネロペーストを調製し、乳酸菌を添加せず15 $^{\circ}$ Cで1週間静置したペーストから上清を14 μ L 分取し、5.79mg/mL の乳酸14 μ L を加えて、2.1 (2) アと同組成の還流溶液で14mL にメスアップし、1,000倍希釈溶液とした。これをさらに10倍ずつ段階希釈し、10,000倍希釈液及び100,000倍希釈液を調製した。カルシウムイメージングに用いる細胞の維持及びカルシウムイメージングは、2.1 (2) イ及び2.1 (2) ウと同様に行った。

(3) 仮説3：細胞内へのカプサイシン流入阻害の検討

カプサイシンは脂溶性の物質であり、疎水性の上皮細胞を通り抜けて感覚神経に発現する TRPV1 に作用する。一方、*Bacillus* 属によるカプサイシンの生分解などにより生成するカプシエイトはカプサイシンの類似化合物であるが、カプサイシンよりも疎水性が大きいため細胞膜の脂質二重層にトラップされ、辛味を感じづらいことが報告されている⁵⁾。一方で、ハバネロの色素は、辛味成分カプサイシンと同じく脂溶性である。そのため、ハバネロペースト上清の色、カプサイシン含量及び粒度分布を調べることで、カプサイシンの脂溶性の変化が明らかになると考え、以下の方法で検討を行った。

ア. ハバネロペースト上清のカプサイシン含量

2.1 (1) で調製した4種の発酵ハバネロペーストを4,000 \times g で10min 遠心分離した後、上清200 μ L を2mL チューブにとり、1.8mL のメタノールを加え、高速振盪機 CM-1000 (東京理化工業(株)製)を用いて15min 振盪した。その後、12,000 \times g で10min 遠心分離した上清を UPLC 測定に供した。UPLC の条件は表1と同様である。

イ. ハバネロペースト上清の色調

分光測色計 CM-5 (コニカミノルタ(株)製)を用いて測定を行った。2.1 (1) で調製した Is332 発酵ハバネロペーストを4,000 \times g で10min 遠心分離した上清200 μ L を微小シャーレに入れ測定した。

ウ. 粒度分布

2.1 (1) で調製した Is332 発酵ハバネロペーストを4,000 \times g, 10min 遠心分離して上清を分取した。分取した上清を蒸留水にて10倍希釈し、

粒度分布測定装置 Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical 社製) を用いて動的光散乱法にて粒度分布を計測した。粒子径は、体積基準で評価した。

エ. pHの調整によるハバネロペースト上清の色調変化

2.1 (1)と同様の方法でペースト化し、NaCl及び乳酸菌の添加や、発酵を行っていないハバネロペーストを、8,000 × gで10min遠心分離し、上清を分取した。リン酸でpHを1.66に調整して目視で色調を確認した。その後、15°Cで1週間静置し、目視で色調を確認した。

3 結果および考察

3.1 受容体応答が減弱する発酵条件の最適化

(1) 乳酸菌を用いた発酵条件の検討

1週間発酵後に測定したpHを以下の表3に示す。発酵開始前のハバネロペーストのpHは4.77であったが、いずれの菌株も、発酵によりpHが低下した。試食をしたところ、乳酸菌なしに比べ、いずれの株も辛味が減弱しており、特にIs332で顕著であった。

表3 1週間発酵後のハバネロペーストのpH

菌株	なし	Is117	Is315	Is332	Is363
pH	4.66	3.83	3.53	3.51	3.49

(2) 受容体応答の評価

Is332を用いて発酵したハバネロペーストのTRPV1応答を評価したところ、どの希釈倍率でも、乳酸菌なしのハバネロペースト上清と比べ、応答の減弱が確認された(図2)。特に10,000倍希釈で比較すると、応答強度に2倍以上の差が見られた。このことから、3% NaCl及び0.1% Is332を添加して15°Cで1週間発酵を行うことで、ハバネロペーストのTRPV1応答が1/2以下に減弱することがわかった。

3.2 感覚応答を減弱するメカニズムの解明

(1) カプサイシンが分解された可能性の検討

これまでの報告で、*Bacillus*属の細菌や、麹菌の発酵により、カプサイシンが分解され、辛味が減弱するケースが報告されている^{6,7)}。乳酸菌による発酵でハバネロペースト中のカプサイシン

が分解されているか検討するため、カプサイシン含量の測定を行った結果、ハバネロペースト中のカプサイシン量は、発酵による変化が見られなかった(図3)。このことから、カプサイシンの分解により発酵ハバネロペーストの辛味が減弱した可能性は小さいことがわかった。

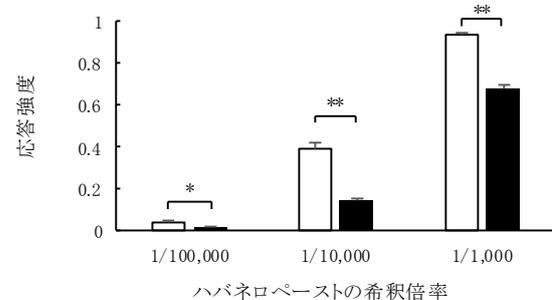


図2 乳酸菌 Is332 を用いた発酵によるカプサイシン

□ 乳酸菌無し ■ Is332

応答強度は 1 μ M カプサイシンに対する相対強度
Mean+SEM, N=142-457

*p < 0.05, **p < 0.01 (t-test)

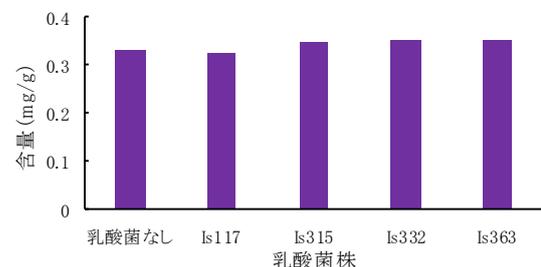


図3 発酵ハバネロペースト中のカプサイシン含量

(2) 結合部位へのカプサイシン結合阻害の検討

ア. 発酵ハバネロペースト中の乳酸量

これまでに、乳酸の存在下でTRPV1の応答が減弱するケースが報告されている⁴⁾。Is332の発酵により産生される乳酸濃度においてハバネロの辛味が減弱するか検討するため、まず発酵ペースト上清中の乳酸量を測定した結果を図4に示す。Is332の発酵により、ペースト上清中に5.79mg/mLの乳酸の生成が見られた。

イ. 乳酸がハバネロのTRPV1応答に及ぼす影響

Is332を用いて発酵したハバネロペースト中の乳酸含有量(5.79mg/mL)と同じ濃度となるよう未発酵のハバネロペーストに乳酸を加え、TRPV1応答を評価したところ、応答の減弱は見られなかつ

た(図5)。このことから、発酵に伴い生成した乳酸が、TRPV1へのカプサイシンの結合を阻害するなどして発酵ハバネロペーストの辛味が減弱した可能性は小さい。これまでに乳酸の存在下でTRPV1の応答が減弱したケースでは、50%阻害がみられる乳酸濃度が $20 \pm 12\mu\text{M}$ と報告⁴⁾されており、そのときのカプサイシン濃度は50nMであった。本測定時の乳酸濃度は、1,000倍希釈で $64.3\mu\text{M}$ であったが、カプサイシン濃度が300nM程度であり、この2成分以外にもペースト中の様々な成分が存在していたため、一概に比較はできない。

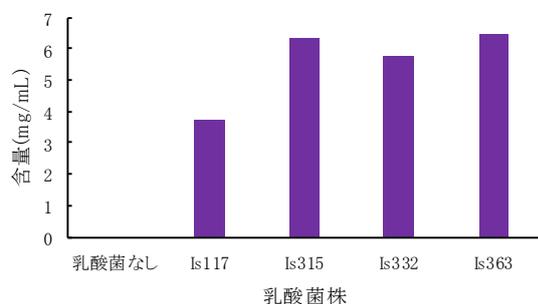


図4 発酵ハバネロペースト上清中の乳酸含量
L-, D-乳酸含む

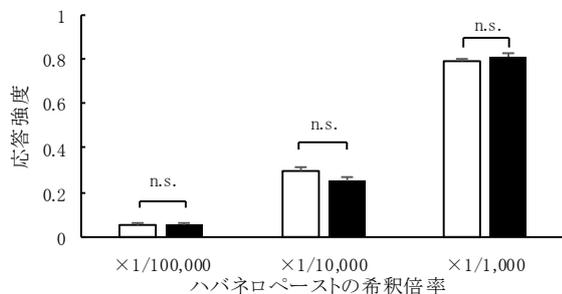


図5 未発酵ハバネロペーストに乳酸を添加したときのカプサイシン受容体TRPV1応答の変化

□乳酸菌無しハバネロペースト ■乳酸菌無しハバネロペーストに乳酸を5.79mg/mL添加
Mean +SEM, N=152-238, t-test

(3) 細胞内へのカプサイシン流入阻害の検討

ア. ハバネロペースト上清のカプサイシン含量

ハバネロペースト上清中のカプサイシン量を測定したところ、発酵によりその量が減少した(図6)。一方、3.2(1)の結果では、ハバネロペースト全体におけるカプサイシン量は発酵により変化しなかった。これらのことから、ペースト中のカプサイシンは、発酵により上清中に存在

しづらい状態に変化したと考えられる。

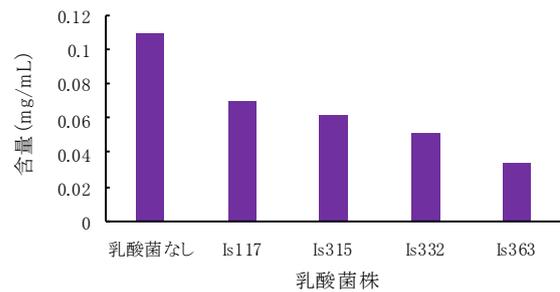


図6 発酵ハバネロペースト上清中のカプサイシン含量

イ. ハバネロペースト上清の色調

乳酸菌無添加のハバネロペーストにおいては、 $L^*a^*b^*$ 色空間における測定値が $L^*:16.44$, $a^*:10.31$, $b^*:22.87$ に対し、Is332を用いて発酵したハバネロペースト上清では $L^*:12.92$, $a^*:3.29$, $b^*:13.08$ であった。 L^* は明度、 $+a^*$ は赤方向、 $+b^*$ は黄方向の色を表しており、Is332で発酵したペースト上清の方が、赤みや黄色みが弱いことを示す結果であった。図7に示すとおり、目視でも発酵により上清の色が薄くなっているように見られた。

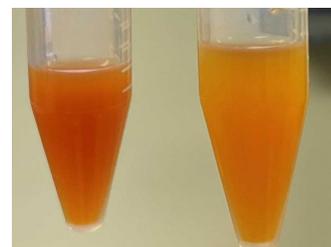


図7 ハバネロペースト上清の色の差異

左：乳酸菌なし、右：Is332添加

ウ. 粒度分布

ハバネロペースト上清の粒度分布を測定した結果を図8に示す。乳酸菌なしでは平均径が3,473nmであったが、Is332発酵では2,638nmに変化し、粒子が微細化した。

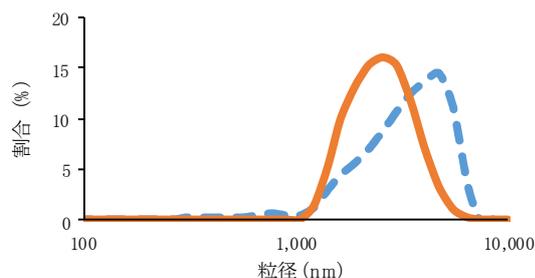


図8 発酵ハバネロペースト上清の粒度分布

--- : 乳酸菌なし、— : Is332、ハバネロペーストを10倍に希釈して測定

エ. pHの調整によるハバネロペースト上清の色調変化

pH 5.14の未発酵ハバネロペースト上清を、リン酸を用いてpH 1.66に調整した結果、直後に色の変化は見られなかった(図9)。トウガラシ色素は、アントシアニン系の色素とは異なり、pHの影響を受けづらいことが知られている。一方、同上清を1週間15℃で静置したところ、pH調整したペースト上清で、液中での沈殿がより明確に認められた(図10、右側)。液部もより澄んでいるように見られたことから、pHの低下により、脂溶性の色素を含む乳化状態が破壊され、油分と水分の分離が進んだ可能性がある。



図9 ハバネロペースト上清
pH調整直後(左:pH5.14、右:pH1.59)



図10 ハバネロペースト上清
pH調整後1週間15℃にて静置
(左:pH5.14、右:pH1.59)

以上ア～エの結果をまとめると、発酵により、ハバネロペーストの乳化状態が変化したと考えられる。このことから、脂溶性である辛味成分やその存在状態が変性し、辛味を減弱させた可能性が示唆された

4 まとめ

【受容体応答を減弱する発酵条件の最適化】

TRPV1受容体の応答の変化が大きい発酵条件として、Is332を用いて、3% NaCl添加、15℃で1週間発酵を行うことで、ハバネロペーストのTRPV1応答が1/2以下に減弱することが明らかとなった。

【感覚応答を減弱するメカニズムの解明】

- (1) ハバネロペースト中の主な辛味成分であるカプサイシンについて、発酵による含有量の減少は見られなかったことから、辛味減弱のメカニズムは、カプサイシンの分解によるものではないと考えられた。
- (2) 乳酸菌を添加していないハバネロペーストに、Is332を用いて発酵したハバネロペーストと同濃度の乳酸を添加しても、TRPV1応答に変化がなかった。このことから、乳酸が、結合部位へのカプサイシン結合を阻害して辛味を減弱させた可能性は小さい。
- (3) Is332を用いた発酵により、ハバネロペーストの乳化状態が変化したことで、脂溶性である辛味成分やその存在状態が変化し、細胞内へのカプサイシン流入が阻害され辛味が減弱した可能性が示唆された。より詳細なメカニズム解明のために、今後さらなる検討が必要である。

謝辞

研究にご協力いただきました静岡県立大学薬学部薬剤学分野の尾上誠良教授及び佐藤秀行准教授に御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 堀池隼雄 他: 海洋由来乳酸菌を用いた発酵ハバネロソースの開発, 静岡県工業技術研究所研究報告, 16, 54-55 (2023).
- 2) 袴田雅俊 他: 海洋由来乳酸菌を用いた静岡チーズの開発, 静岡県工業技術研究所研究報告, 16, 24-28 (2023).
- 3) 袴田雅俊 他: 海洋由来乳酸菌を用いた発酵甘酒の開発, 静岡県工業技術研究所研究報告, 16, 29-35 (2023)
- 4) de la Roche J. et al. : Lactate is a

- potent inhibitor of the capsaicin receptor TRPV1. *Scientific Reports*, 6, 36740 (2016).
- 5) 川端二功：スパイスの化学受容と機能性, 日本調理科学会誌, 46 (1), 1-7 (2013).
- 6) Cho S. et al. : Biodegradation of capsaicin by *Bacillus licheniformis* SK1230. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 57, 335-339 (2014) .
- 7) Lee M. et al, : Bioconversion of Capsaicin by *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(26), 6102-6108 (2015).