

## 微生物ライブラリーを用いたハマナスの乳酸菌発酵エキス

食品科 袴田雅俊 松野正幸 浅沼俊倫\* 石橋佳奈 山下里恵

*Rosa rugosa* extract fermented by lactic acid bacteria on the microbial libraryHAKAMATA Masatoshi, MATSUNO Masayuki, ASANUMA Toshimichi,  
ISHIBASHI Kana and YAMASHITA Rie

Skin care is important for maintaining our health. We have been collecting agricultural products from Shizuoka Prefecture and using them as skin care materials. On the other hand, in order to develop the prefecture's characteristic fermented foods, useful microorganisms from the natural world of the prefecture have been collected and a library has been prepared. This time, we focused on *Rosa rugosa* petal extract. It inhibits collagenase, which decomposes collagen that contributes to skin elasticity, and tyrosinase, a melanin synthase that contributes to skin blackening. We examined whether the functionality could be enhanced. Six of the lactic acid bacteria used grew in *Rosa rugosa* extract, and the pH of the fermented extract decreased. Compared with the extract to which lactic acid bacteria were not added, the tyrosinase inhibitory activity was stronger in the extract in which the pH was lowered. Since the amount of polyphenols was also increased in the fermented extract, it was considered that the metabolism and conversion of polyphenols by lactic acid bacteria and the stabilization of polyphenols by lowering the pH had an effect on the tyrosinase inhibitory activity. Furthermore, in the extract containing lactic acid bacteria having  $\beta$ -glucosidase activity, there was an increase in phenylethyl alcohol and geraniol, which are the aroma components of roses, and the material had a strong fragrance.

Keywords : *Rosa rugosa*, Lactic acid bacteria, skin-care and tyrosinase

スキンケアは健康維持のために重要である。我々はこれまでに静岡県内から農林水産物を集めてスキンケア素材への利用を検討してきた。一方で、静岡県ではこれまでに、特徴ある発酵食品を開発するため、県内の自然界から有用微生物を集めてライブラリーを整備した。今回は、皮膚の弾力に寄与しているコラーゲンを分解するコラゲナーゼや肌の黒色化に寄与するメラニンの合成酵素チロシナーゼを阻害するハマナス花卉エキスに注目し、ハマナスエキスを乳酸菌で発酵することで素材の機能性を強化できるか検討した。用いた乳酸菌のうち6株はハマナスエキス中で増殖し、発酵エキスのpHの低下が見られた。乳酸菌を添加していないエキスと比べ、pHの低下が見られたエキスではチロシナーゼ阻害活性が強くなった。発酵エキスではポリフェノール量の増加も見られたことから、乳酸菌によるポリフェノールの代謝や変換、pH低下によるポリフェノールの安定化などがチロシナーゼ阻害活性に影響を与えていると考えられた。さらに、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性を持つ乳酸菌を入れたエキスでは、バラの香気成分であるフェニルエチルアルコールとゲラニオールが増加し、香りの強い素材となっていた。

キーワード：ハマナス、乳酸菌、スキンケア、チロシナーゼ

## 1 はじめに

皮膚は細菌や紫外線等から体を守り、体内の水分を保つ役割を果たしている。我々はスキンケア素材を探索しており、これまでにコラーゲンの分解酵素であ

るコラゲナーゼ等の阻害活性を示す植物抽出エキスを探索してきた<sup>1)</sup>。今回はその中からハマナス花卉の抽出エキスに着目した。ハマナスは北海道等の海岸線に自生している植物であるが、静岡県内では島田

\* 現 企画調整部

市の山間部の農園で栽培されている。

乳酸菌は消費したグルコースの50%以上を乳酸に変換するグラム陽性、カタラーゼ陰性の無芽胞菌で、ヨーグルトやチーズ等の製造に利用されており、整腸作用などを示すことが広く知られている。また、化粧品素材にも利用され、これまでに脱脂粉乳の乳酸菌発酵物が皮膚角層の水分を保持することが報告されており<sup>2)</sup>、ヒト線維芽細胞に作用させるとコラーゲン産生を促進する乳酸菌が市販されているなど、スキンケア素材としても有効である。近年、静岡県では、しずおか有用微生物ライブラリーを整備し、県内の自然界から収集した微生物のうち、発酵食品に利用できる菌株の情報を一部公開し、分譲にも対応している。

そこで、酵素阻害活性で結果の良かったハマナスエキスを乳酸菌で発酵することで、さらなるハマナスエキスの機能向上を期待してハマナス乳酸菌発酵エキスを作製し、分析を行うこととした。

## 2 方法

### 2.1 ハマナス花卉の乳酸菌発酵処理

乳酸菌はMRS培地にて培養し、添加直前に生理食塩水にて洗浄を行った。

ハマナス花卉を凍結乾燥し、マルチビーズショッカー（安井器械株式会社）にて粉碎した。粉碎したハマナス花卉粉末1 gを90 mLの水に入れ、100℃で10分間加熱した。冷却後、洗浄した乳酸菌懸濁液を添加し、30℃で10日間培養した。培養液のpHを測定することで、乳酸菌発酵の状態を観察した。

乳酸菌は平成27年から29年にかけて取り組んだしずおか有用微生物ライブラリー構築時に収集した株を用いた。

### 2.2 チロシナーゼ阻害試験

マッシュルーム由来チロシナーゼを40 U/mLになるように67 mMのリン酸緩衝液（pH6.8）に溶解した。また、L-DOPAを2.5 mMとなるようにリン酸緩衝液に溶解した。96穴プレートにリン酸緩衝液90  $\mu$ L、酵素溶液40  $\mu$ L、サンプル20  $\mu$ Lを入れ、23℃で3分間静置した。そこに基質溶液50  $\mu$ Lを入れ490 nmの吸光度を測定した後、23℃で10分間反応後、再び490 nmの吸光度を測定した。

### 2.3 総ポリフェノール量の測定

フェノール試薬（富士フィルム和光純薬）をイオン

交換水で2倍希釈した。試料溶液500  $\mu$ Lとイオン交換水500  $\mu$ L、希釈したフェノール試薬1 mLを試験管にとり、攪拌した。室温で3分間静置後、10%炭酸ナトリウム水溶液1 mLを加え攪拌し、室温で60分間静置後、750 nmの吸光度を測定した。没食子酸溶液で検量線を作成し、ポリフェノール量を算出した。

## 2.4 香気成分分析

ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）にて分析した。20 mLガラスバイアルに各試料 1 mLを入れ、動的ヘッドスペース（DHS）法でTDUチューブに香気成分を捕集し、加熱脱着ユニットにて250℃で加熱することでGC-MSへ捕集した香気成分を導入した。測定条件を表1に示す。

表1 GC/MSの測定条件

区分	内容
本体	(GC) 7890A-(MS) 5975C (アジレント・テクノロジー製)
カラム	DB-WAX UI (長さ 60 m、内径 0.2 mm、膜厚 0.2 $\mu$ m)
カラムオープン昇温条件	40℃(2分)→8℃/minで昇温→250℃(2分) 合計 30分

## 2.5 乳酸菌の酵素活性評価

アピザイム（シスメックスバイオメリュー社）を用いて添付のマニュアルに従って乳酸菌の酵素活性を評価した。具体的には、乳酸菌をMRS斜面培地にて培養した後、サスペンションメディウム（シスメックスバイオメリュー社）にマクファーランド濁度5程度になるように懸濁した。次にトレイにイオン交換水を5mL入れ、試験のためのプレートにトレイに設置した。プレートの各カップに、乳酸菌懸濁液を適量入れ、トレイのふたを閉め、30℃で4時間培養した。培養後、ZYM A試薬とZYM B試薬を1滴ずつ入れ、5分間静置後、各カップの色を判定した。

## 3 結果および考察

### 3.1 ハマナス抽出物のpH変化

乳酸菌には表2の菌株を使用した。ハマナス抽出物に乳酸菌を添加したところ、*Pediococcus pentosaceus*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactiacaseibacillus casei*、*Lactiplantibacillus plantarum*、*Lactiplantibasillus pentosus*、*Enterococcus faecalis*の6株で明らかなpHの低下が見られた。この6種類の株では、ハマナスエキス中の糖を代謝して乳酸を生成したと考えられた。

表2 乳酸菌の種類とハマナスエキス発酵後のpH

菌種	ハマナスエキス pH
0 -	6.20
1 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	3.70
2 <i>Levilactobacillus brevis</i>	5.80
3 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4.17
4 <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	5.90
5 <i>Lacticaseibacillus casei</i>	3.90
6 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3.40
7 <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	3.47
8 <i>Enterococcus faecalis</i>	3.33
9 <i>Lactococcus lactis</i>	6.20

### 3.2 チロシナーゼ阻害活性

ハマナス乳酸菌発酵エキスについて、チロシナーゼ阻害活性を測定した。その結果、乳酸菌未添加のハマナスエキスでは阻害率が20%であったのに対して、乳酸菌で処理することによりチロシナーゼ阻害活性が強まった（図1）。各試料について、総ポリフェノール量を測定したところ阻害活性が高まった試料でポリフェノール量が多い傾向が見られた（図2）。チロシナーゼはフェノールを酸化する酵素であることから、ポリフェノール含有量が多い方が、酵素であるチロシナーゼと基質であるL-DOPAの反応を阻害する確率が高くなることが考えられ、ポリフェノール含有量がチロシナーゼ活性阻害の一因となっていると考えられた。

### 3.3 ハマナス乳酸菌発酵エキスの香気成分の増加

ハマナス乳酸菌発酵エキスについて、香りを比較したところ、一部の発酵エキスで花の香りが強くなっていた。そこで香気成分を測定したところ、バラ様の香りとされるフェニルエチルアルコールとゲラニオールが、*Levilactobacillus brevis*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lacticaseibacillus casei*、*Lactiplantibacillus plantarum*、*Lactiplantibacillus pentosus*、*Enterococcus faecalis*株で発酵したエキスで増加していることが明らかとなった（図3、図4）。

植物の一部の香気成分は配糖体として植物中に保持されており、植物中の酵素により糖が離れることで、香気成分が放出されることが報告されている<sup>3)</sup>。乳酸菌発酵によって増加することを確認したフェニルエチルアルコールとゲラニオールも配糖体として蓄えられており、各成分の水酸基にβ-グルコシド結合により糖鎖が結合していると考えられることから、乳酸菌が持つβ-グルコシダーゼ活性を調べることにした。

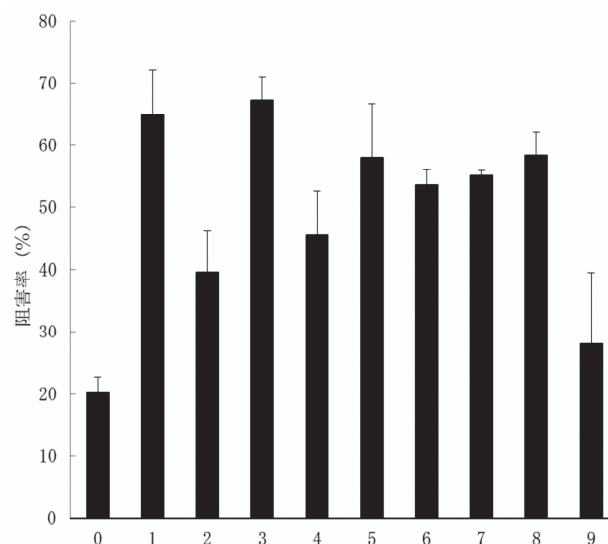


図1 チロシナーゼ阻害活性

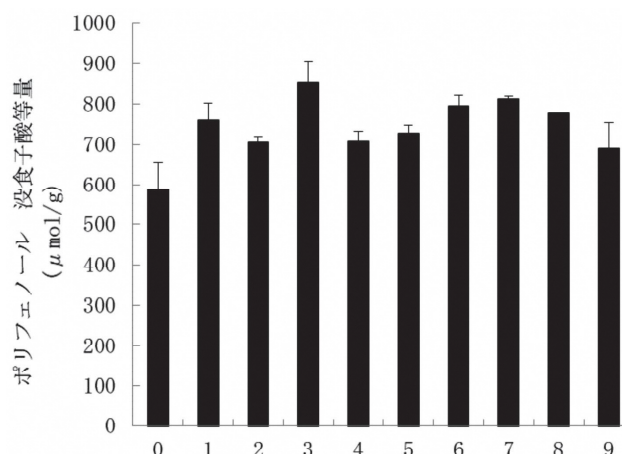


図2 ハマナス発酵エキスの固形分あたりのポリフェノール量

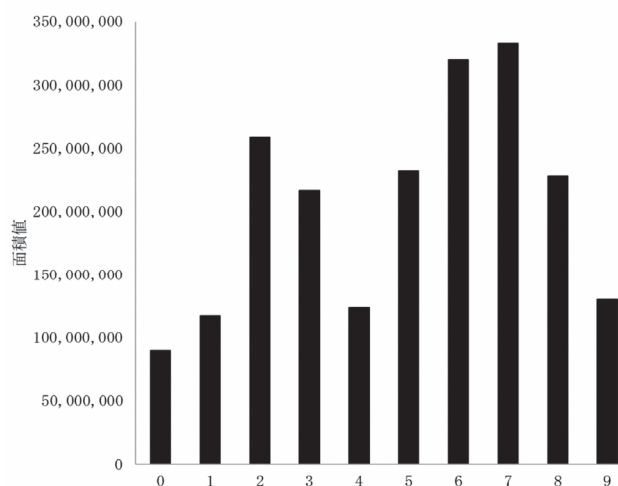


図3 フェニルエチルアルコールの面積値

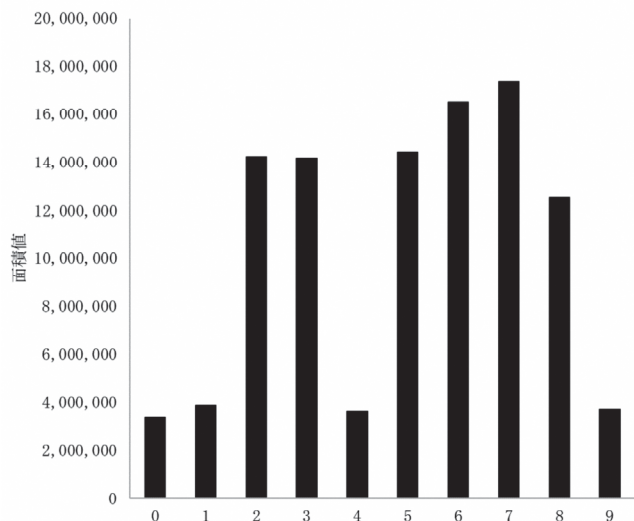











図4 ゲラニオールの面積値

### 3.4 乳酸菌の酵素活性評価

乳酸菌の酵素活性について結果を表3に示す。乳酸菌株によって酵素活性に違いが見られた。香氣成分の増加に寄与していると考えられるβ-グルコシダーゼに注目したところ、*Levilactobacillus brevis*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lacticaseibacillus casei*、*Lactiplantibacillus plantarum*、*Lactiplantibacillus pentosus*、*Enterococcus faecalis*株でβ-グルコシダ

表3 乳酸菌のβ-グルコシダーゼ活性

菌種	β-グルコシダーゼ活性
0 -	
1 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	 17 -
2 <i>Levilactobacillus brevis</i>	 17 +
3 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	 17 +
4 <i>Limosilactobacillus fermentum</i>	 17 -
5 <i>Lacticaseibacillus casei</i>	 17 +
6 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	 17 +
7 <i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	 17 +
8 <i>Enterococcus faecalis</i>	 17 +
9 <i>Lactococcus lactis</i>	 17 -

ーゼの酵素活性を保持していることが明らかとなった。これはフェニルエチルアルコールとゲラニオールが増加したエキスで作用した乳酸菌と一致していた。従って、β-グルコシダーゼを持つ乳酸菌が作用することで、ハマナスエキス中の配糖体がアグリコンと糖に分解され、フェニルエチルアルコールとゲラニオールが増加し、実際にヒトが鼻でも捉えられる程度の香氣成分の増加が見られたと考えられた。

### 4 まとめ

ハマナス花卉エキスに乳酸菌を添加したところ、*Pediococcus pentosaceus*、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lacticaseibacillus casei*、*Lactiplantibacillus plantarum*、*Lactiplantibacillus pentosus*、*Enterococcus faecalis*の6株でpH低下が見られた。乳酸菌処理した発酵エキスではチロシナーゼ阻害活性が増強しており、ポリフェノール量も増加していたことからポリフェノールがチロシナーゼ阻害活性に関わっていることが示唆された。さらにβ-グルコシダーゼ活性を持つ乳酸菌で処理したエキスではハマナスの香りが強くなっていた。これは配糖体として蓄えられていたフェニルエチルアルコールやゲラニオールの糖が切れることで、香氣成分であるアグリコンが増加したためと考えられた。

本研究の一部は、地方創生推進交付金により実施した。

### 参考文献

- 1) 袴田雅俊 他：皮膚老化を防ぐ静岡県産農産物の探索. 静岡県工業技術研究所研究報告, 13, 36-37, (2020)
- 2) 高橋康之：保湿化粧品とその作用. 日本化粧品学会誌, 42(4), 280-287, (2018)
- 3) 渡辺修治 他：花はなぜ香るのか?. 化学と生物, 32(3), 203-208, (1994)