

乳酸菌等を利用した食品加工技術開発

乳酸菌利用研究チーム

田畑 恵* 橋本 俊郎*

1. はじめに

発酵食品にはさまざまな微生物が用いられており、独特の風味付けや品質の向上に寄与している。酵母は酒やパン製造の主役となって、アルコールや発酵ガスの利用が行われる。乳酸菌はヨーグルト等の乳製品や味噌、醤油等の発酵大豆食品及び漬物で重要な役割を果たしている。

乳酸菌はその生育環境の違いから、動物性乳酸菌(肉、ミルク)と植物性乳酸菌に大別され、各々生理的性質の異なることが知られている。

当センターでは、植物性乳酸菌、特に漬物に生育する乳酸菌に着目し、これまでに*Lactobacillus.sakei* HS-1という乳酸菌を分離し、漬物製造用スターター株として実用化した。HS-1を漬物に使用した場合、食味の向上、大腸菌群の増殖抑制等の効果が認められている¹⁾。一方、乳酸菌はプロバイオティクス(=宿主の腸内細菌のバランスを改善することにより、宿主に有益な作用をもたらす微生物)として注目されており、整腸作用や免疫賦活などの効果が期待されている。そこで今回、*L.sakei* HS-1のプロバイオティクスとしての可能性について検討を行った。

また、機能性(=抗菌物質生産性やプロバイオティクスとしての作用)を持った新たな有用乳酸菌の開発を目的として、伝統的な発酵食品から乳酸菌の分離を行ったので、それについても併せて報告する。

2. 実験方法

2.1 人工胃液耐性試験

MRS培地に0.32%ペプシンを添加し、塩酸で所定のpHに調製したものを人工胃液とし、HS-1を 2×10^6 CFU/mlとなるように接種して、37℃の好気条件下で振とう培養した。1時間ごとに、0.5%炭酸カルシウムを添加したMRS寒天培地で、生菌数を測定した。

2.2 人工腸液耐性試験

MRS培地に胆汁末(oxgall)を添加したものを人工腸液とし、HS-1を 2×10^6 CFU/mlとなるように接種して、37℃の好気条件下で振とう培養した。16時間培養後の濁度(Abs.650nm)を測定し、相対増殖度を算出した。

2.3 摂取回収試験

低温殺菌した野菜ジュースと牛乳の混合物にHS-1を

接種し、25℃で2日間発酵させた。この発酵物100mlを被験者に5日間毎食後摂取させ、糞便中のHS-1の有無を調査した。HS-1摂取前と摂取後の糞便から、0.5%炭酸カルシウム添加MRS培地およびHS-1用選択培地(GYP寒天培地1Lあたりにアジ化ナトリウムおよびシクロヘキシミドをそれぞれ10mg、0.5%炭酸カルシウム、5%食塩を添加したものを)を用いて、乳酸菌を分離培養した。顕微鏡で形態を観察し、乳酸桿菌について、以下の方法により分類同定を行った。

(1) 生理的性質による同定試験

分離された乳酸菌の生育温度および糖類発酵性について、乳酸菌実験マニュアル²⁾に従って調べた。

(2) 16S rDNAの塩基配列による同定試験

糞便から回収された乳酸桿菌およびHS-1について、16S rDNAの塩基配列の解析を行い、相同性を検討した。

培養菌体をLysozymeおよびAcromopeptidaseで処理後、フェノール/クロロホルムでゲノムDNAを抽出した。PCRおよびシーケンスに使用したプライマーの配列を表1に示した。抽出したゲノムDNAを鋳型として、プライマー10Fと1540Rを用いて、16S rDNAを増幅した。PCR反応条件は、96℃で5分、ついで95℃で45秒、54℃で45秒、72℃で90秒を30サイクル、さらに72℃で5分とした。PCR産物(約1.5kb)は、1.2%アガロースゲル電気泳動で確認後、精製を行い、直接DNAシーケンスに供した。

表1 プライマーの塩基配列

	塩基配列(5' 3')
10F	AGTTTGATCCTGGCTC
350F	TACGGGAGGCAGCAG
350R	CTGCTGCCTCCCGTAG
520F	ACCGCGGCTGCTGGC
800F	ATTAGATACCCTGGTA
800R	CTACCAGGGTATCTAAT
1100F	GCAACGAGCGCAACCC
1100R	AGGGTTGCGCTCGTTG
1540R	AAGGAGGTGATCCAGCC

2.4 有用乳酸菌の分離

茨城県鹿島灘沿岸の伝統的な発酵食品であるごさい漬をはじめ、長野県木曽地方のすんき漬、中国の包菜を分

*食品バイオ部門

離源として用い、0.5%炭酸カルシウムを添加した MRS 培地で乳酸菌の分離培養を行った。分離した乳酸菌は、2.3(1)に示した生理的性質による同定試験および 2.3(2)に示した 16S rDNA の塩基配列による同定試験を行った。

2.5 抗菌物質生産性の検定試験

滅菌した MRS 寒天培地を 45℃まで冷却し、これに指示菌の一晚培養液を 0.25% (v/v) 接種し混合後、シャーレに分注して、指示菌プレートを作製した。固化後、指示菌プレートは 4℃に保存し、2週間以内に使用した。

各供試菌株の一晚培養液を遠心分離し、培養上清を指示菌プレートに 10 µl ずつ滴下した。抗菌物質生産性の判定は、30℃で 24 時間培養後、試料滴下部位における生育阻止円の有無により行った。

3. 結果と考察

3.1 人工胃液耐性試験

人工胃液における乳酸菌 HS-1 の生菌数の変化を表 2 に示した。pH3 では、1 時間後の生菌数が 10⁶CFU/ml から 10²CFU/ml 以下に減少したが、pH3.5 以上では、4 時間後でも高い生残性を示した。食後の胃の pH は 4 ~ 5 に上昇すること、また摂取した食物が胃から腸に移送されるまでの時間がおよそ 2 時間であることから、食品として摂取した HS-1 は、生存したまま胃を通過し、腸管へ移送される可能性が高いと考えられる。

表 2 人工胃液における乳酸菌 HS-1 の生菌数の変化

培養時間 (h)	生菌数 (log CFU/ml)		
	pH3	pH3.5	pH4
0	6.4	6.4	6.4
1	<2	6.5	6.5
2	<2	6.4	6.5
3	<2	6.4	6.5
4	<2	6.5	6.6

3.2 人工腸液耐性試験

人工腸液における乳酸菌 HS-1 の相対増殖度を表 3 に示した。腸管内の胆汁濃度は胆汁末 0.2% に相当するが、この濃度でも胆汁末無添加時 (100%) に比べ、91% という高い増殖を示した。また生菌数を測定したところ、培養開始から 16 時間後には、2 × 10⁶CFU/ml から 3 × 10⁸CFU/ml に増殖していた。胆汁耐性が高いことから、HS-1 の腸管生残性はきわめて高いと考えられる。

表 3 人工腸液における乳酸菌 HS-1 の相対増殖度

胆汁末濃度 (%)	相対増殖度 (%)
0	100
0.1	96
0.2	91
0.3	87
0.5	83
1.0	76

3.3 摂取回収試験

乳酸菌 HS-1 の発酵物摂取前の糞便からは、主に乳酸球菌が検出され、*L.sakei* は検出されなかった。一方、HS-1 発酵物摂取後の糞便からは、乳酸桿菌が生酸性コロニーの 20 ~ 50% の割合で検出された。ヒトの糞便から高率 (30% 以上) で検出される *Lactobacillus* 属の菌種³⁾ は、いずれも 15℃での生育を示さないが、今回の HS-1 摂取期間に検出された乳酸桿菌は、いずれも 15℃で生育を示し、糖類に対する発酵性も、*L.sakei* の性質と完全に一致した。また、回収された乳酸菌および HS-1 の 16S rDNA の塩基配列を比較したところ、100% の相同性を示した。回収された乳酸菌は *L.sakei* に帰属され、16S rDNA の塩基配列が HS-1 と 100% の相同性を示すことから、回収された乳酸菌は *L.sakei* HS-1 であると判断した。

3.4 有用乳酸菌の分離

漬物から分離した乳酸菌の性質を表 4 に示した。生育温度、発酵形式等の生理的性質および 16S rDNA の塩基配列の相同性検索により、各菌株は *L.plantarum*、*L.fermentum*、*L.plantarum*、*L.brevis* に帰属された。

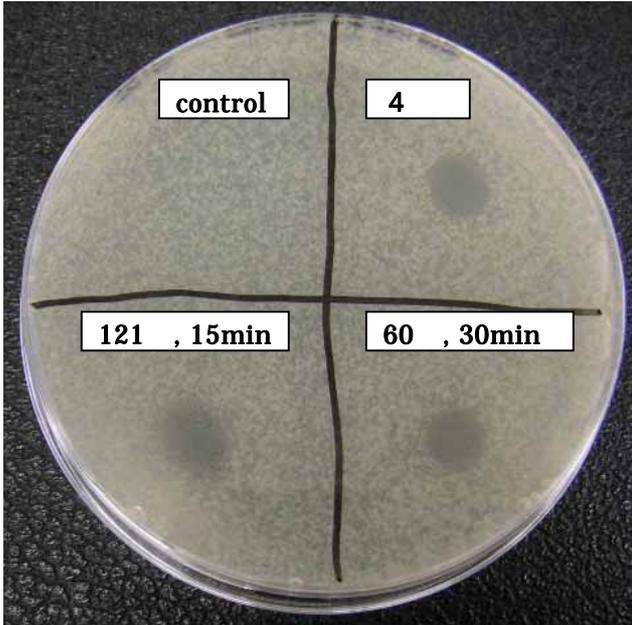
3.5 抗菌物質生産性の検定試験

指示菌として、セレウス菌 (*Bacillus cereus*) を用いたときの指示菌プレートを図 1 に示した。ごさい漬から分離した乳酸菌の培養上清を滴下した部分に、セレウス菌の増殖阻止円が認められ、抗菌物質生産性が確認された。また培養上清を 60℃で 30 分加熱した場合および 121℃で 15 分オートクレーブした場合でも、抗菌活性は失われないことが明らかとなった。

表4 漬物から分離した乳酸菌の性質

	ごさい漬	すんき漬	包菜1	包菜2
形態	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌
15 での生育	+	-	+	+
45 での生育	-	+	-	-
6.5%食塩存在下での生育	+	+	+	+
発酵形式	ホモ	ヘテロ	ホモ	ヘテロ
糖類発酵性				
アラビノース	+	+	-	+
キシロース	-	-	-	+
フラクトース	+	+	+	+
シュクロース	+	+	+	+
トレハロース	+	+	+	-
ソルビトール	+	-	+	-
マルトース	+	+	+	+
ガラクトース	+	+	+	+
16S rDNA による帰属	<i>L.plantarum</i>	<i>L.fermentum</i>	<i>L.plantarum</i>	<i>L.brevis</i>

図1 セレウス菌を用いたときの指示菌プレート



4. まとめ

人工消化液耐性試験と摂取回収試験の結果から、*L.sakei* HS-1 は生きてそのまま腸管に達し、排泄されたと結論づけられた。HS-1 は漬物を安全に、そしておいしくするスターターとして開発されたが、腸内での生存が確

認されたことにより、プロバイオティクスとしての可能性が示唆された。

また、新たな機能性乳酸菌の探索を目的として、漬物から乳酸菌の分離を試みた結果、4株の乳酸菌を得ることができた。各菌株は、16S rDNA の塩基配列の結果から、*Lactobacillus* 属に帰属された。さらにごさい漬から分離した1株については、抗菌物質生産性が確認された。今後は各菌株の性質について明らかにするとともに、抗菌物質についても、その種類、抗菌スペクトル、さらに利用法について検討していく予定である。

5 参考文献

- 1) 橋本俊郎：漬物用乳酸菌スターターの開発，茨城県工業技術センター研究報告，30，34-38（2002）
- 2) 小崎道雄監修，内村泰，岡田早苗著：「乳酸菌実験マニュアル」，初版（朝倉書店，東京），pp36-59（1992）
- 3) 辨野義己：ヒトにおける常在乳酸菌のエコロジー，「乳酸菌の科学と技術」，第3版（学会出版センター，東京），pp287-298（2000）