

新規耐酸性乳酸菌の探索と食品応用

山口 仁孝・片山 理恵・門脇明日香・田中 優佳
森下 亜美・竹田 江里・岩成 遥

美作大学・美作大学短期大学部紀要（通巻第59号抜刷）

新規耐酸性乳酸菌の探索と食品応用

A search for novel acid-resistant *Lactobacillus* species and their application to foods

山口 仁孝・片山 理恵*・門脇明日香*・田中 優佳*
森下 亜美*・竹田 江里*・岩成 遥*

キーワード：植物性耐酸性乳酸菌

はじめに

乳酸菌とは、糖を分解して乳酸を生産することによってエネルギーをつくる細菌の総称で、多くの種類が存在する。乳酸菌は古来より食品発酵の分野でヨーグルト、チーズ、バター、乳酸菌飲料の他に、漬物や味噌などの食品の乳酸発酵に関与し、私たちの生活の多方面において有効に利用され、とくに近年、健康志向の高まりとともに乳酸菌のプロバイオティクス効果が注目されている。

プロバイオティクスとは、「適正量を摂取した際に宿主に有用な作用を示す生菌体」として定義され^{1) 2)}、乳酸菌には整腸作用や感染防御作用、免疫賦活作用、発ガン抑制作用など、人間にとって有益な効果があることが知られている^{3) ~ 5)}。しかしながら、経口摂取された乳酸菌は、そのすべてが腸に到達できるわけではなく、腸に達する前に強酸性下の胃を通過しなければならぬ。胃では、消化液として胃液が分泌されているが、胃液はpH 2.0程度の強酸性であり、酸に弱い乳酸菌のほとんどが胃液によって死滅してしまう。

一方、日本では、古くから漬物や醤油、味噌などの野菜や穀類などの発酵食品が食べられ、それらの製造過程においても乳酸菌が関与し³⁾、とくに漬物や醤油、味噌などの植物由来の乳酸菌には、塩分、酸やアルカリに強いものが存在し、より過酷な環境でも生息

できると言われており、生きたまま胃を通過して腸に定着する有用な菌であると考えられている⁶⁾。

そこで本研究では、漬物を中心とした植物性の発酵食品に着目し、(1) 乳酸菌を効率よく分離するための選択培養法の開発、(2) 漬物からの新規耐酸性乳酸菌の分離、(3) 加工食品への応用(ヨーグルト、サバの乳酸菌つけ)を試みた。

材料と方法

(1) 乳酸菌選択培養法の開発

以下の項目について、標準菌株 (*Lactobacillus bulgaricus* NBRC No.1395, *Lactococcus lactis* NBRC No.100933) を用いて行った。

- ① 酸素要求性試験：市販培地 (MRS寒天培地：Oxoid、M-17寒天培地：Oxoid、BCP加プレートカウント寒天培地：栄研化学) を用い、37°C好気ならびに微好気、嫌気培養 (ガスパック法：アネロパック：三菱化学) を行い、発育経過 (コロニー形成) を比較検討した。
- ② 塩分試験：MRS液体培地 (Oxoid) の塩分濃度を 3、5、7% に調節後、分光光度計による吸光度測定を行った。測定されたOD値を検量線に当てはめ、菌数を推定し、比較した。
- ③ pH試験：MRS液体培地のpHを5.0、5.5、6.0、6.5に調節後、分光光度計による吸光度測定を行った。

* 美作大学食物学科学学生

測定されたOD値を検量線に当てはめ、菌数を推定し、比較した。

④耐酸性試験：食物はヒトの胃内に約1時間滞留することから⁷⁾、pH 2.0またはpH 3.0に調節したTBS (Tris-buffered saline) 溶液に菌液を入れて静置した。標準株 (*L. bulgaricus*)、大腸菌、漬物からの分離した乳酸菌3株 (A、B、C) を対象に、菌液500 μ l (1.0×10^8 個) をpH 2.0またはpH 3.0に調節したTBS溶液または生理食塩水 (陰性コントロール) 4.5mlに混和し、35°C 1時間酸処理を行い、10段階希釈してMRS寒天培地で35°C 48時間培養し、菌数を確認した。

(2)新規耐酸性乳酸菌の分離

①検体及び原材料：市販漬物 (塩漬け、浅漬け、みそ漬け、ぬか漬け等) 53検体 (商品名等の詳細は記載しない)

②スクリーニング試験：

培地及び培養方法：液体培地 (MRS broth : Oxoid) と寒天培地 (MRS agar : Oxoid) の2種類を用いた。

培養方法：漬物を外の袋からよく揉みほぐし、漬液を約1ml無菌的に採取し、MRS液体培地に入れ35°C 48時間前培養し、酸処理 (後述) を行った後にMRS寒天培地で35°C 48時間培養して単離コロニーを得たのち、純培養後性状試験を行い、乳酸菌であることを確認した。

酸処理：MRS brothで前培養した菌液0.5mlをTBS (pH2.0) 4.5mlに入れ35°C 1時間酸処理を行った。

性状試験：常法に従いグラム染色し、顕微鏡にてグラム染色性および形態を確認後、カタラーゼ試験を行った。

③同定試験：

API試験：API50CH、API50CHL (sysmex-biomerieux) を用いて炭水化物分解性試験を行い、菌を同定した。

PCR試験：16SrRNAをターゲットとした、*L. plantarum*

特異プライマー、DNA gyrase Bをターゲットとした*L. lactobacillus*属、*L. plantarum* および*L. brevis*に対する特異プライマーを設計し、常法に従いPCR法による遺伝子検査を行った。

(3)加工食品への応用

(2)において分離した漬物由来耐酸性乳酸菌株を用いて、ヨーグルトおよびサバの乳酸菌つけの作成を試みた。

①ヨーグルト

○予備試験：市販ヨーグルト4種をスターターとして使い、必要に応じ酸度測定 (ポケット酸度計PAL-AC1、ATAGO®)、塩分測定 (デジタル塩分計ES-421、ATAGO®)、pH測定 (デジタルpHメーター、HORIBA) をを行い、間接的に乳酸発酵能のモニタリングを行った。また、原乳種、菌数、温度、時間について、Lg直行配列法による条件の割り付けを行い、9通りの組み合わせを検討した。

○本試験：予備試験結果より、最適と思われる条件で、(2)で得られた乳酸菌を用いた加工を試みた。

○評価：それぞれのサンプルについて官能検査を行い評価した。評価項目は外観、香り、食感、味および総合評価について4段階評点法 (悪い0~良い+3) で行った。

②サバの乳酸菌つけ

○予備試験：乳酸菌によって魚の生臭さを軽減させることを念頭に、水産物の中から『生さば』を選択し、乳酸菌による発酵過程を加えることにより、風味や食感への影響について検討した。発酵過程は、ヨーグルトと同様にモニタリングし、前処理の有無、添加菌量、発酵温度、時間について、Lg直行配列法による条件の割り付けを行い、9通りの組み合わせを検討した。

○本試験：①予備試験結果より、最適と思われる条件で、(2)で得られた乳酸菌を用いた加工を試みた。

○評価：それぞれのサンプルについて官能検査を行い評価した。評価項目は外観、香り、食感、味および総合評価について4段階評点法 (悪い0~良い+3) で行った。

結果および考察

(1) 乳酸菌選択培養法の開発

① 酸素要求性試験

嫌気培養では、コロニー形成数が最も多く発育が良好であった。一方、好気および微好気培養では、嫌気培養の70%程度のコロニーが見られた。市販分離培地では、供試2株ともMRS寒天培地での発育が最も良好であったことから、今後の実験の基礎培地としてMRS培地を用いることとした。

② 塩分試験

塩分を調整していない培地ではOD値が0.940、検量線による菌数の測定では約 1.3×10^8 個/mlとなった。3%調整培地では0.253 (約 3.3×10^7 個/ml)、5%調整培地では0.200 (約 2.5×10^7 個/ml)、7%調整培地では0.179 (約 2.2×10^7 個/ml)となった。*L. bulgaricus*は、塩分濃度が低いもので発育が良好で、濃度が高いものでは発育が抑制される傾向があると推察された。しかし、OD値が0.2付近と低く、実際の菌数においては大きな差は見られないものと考えられた。

③ pH試験

pHを調節していない培地ではOD=0.940 (約 1.3×10^8 個/ml)、pH6.5調整培地ではOD=0.255 (約 3.3×10^7 個/ml)、pH6.0調整培地ではOD=0.238 (約 3.1×10^7 個/ml)、pH5.5調整培地ではOD=0.150 (約 1.8×10^7 個/ml)、pH5.0 (約 2.0×10^7 個/ml)となった。

*L. bulgaricus*は、MRS培地のpHが6.2付近での発育が最も良好であるが、pHを6.2以下に下げた培地での培養では大きな差は見られなかった。OD値では、菌量に大きな差が見られなかったため、菌量の確認は、10倍段階希釈によるコロニーカウント法を用いることとした。

④ 耐酸性試験

陰性コントロールである生理食塩水処理では、菌数は1/10程度に減少したのち、処理前と同数に回復した(図1)。同様にpH3.0TBS溶液処理においても、全ての乳酸菌種について、菌の回復が見られた(図2)。このことから、乳酸菌はpH3.0で1時間処理では、生育に影響をあまり受けず、増殖することが分かった。

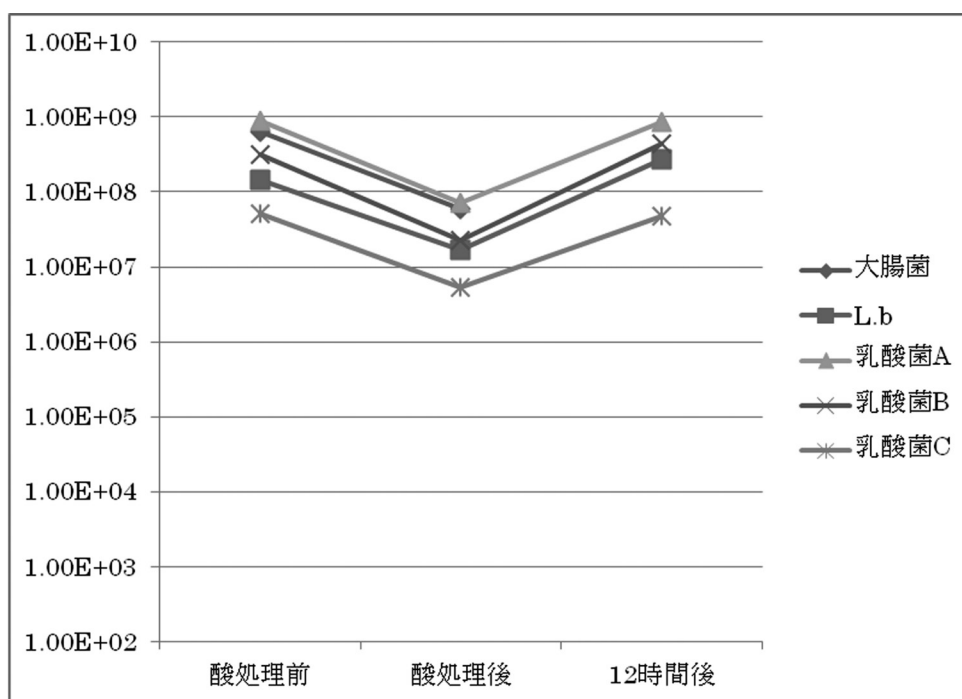


図1 生理食塩水処理

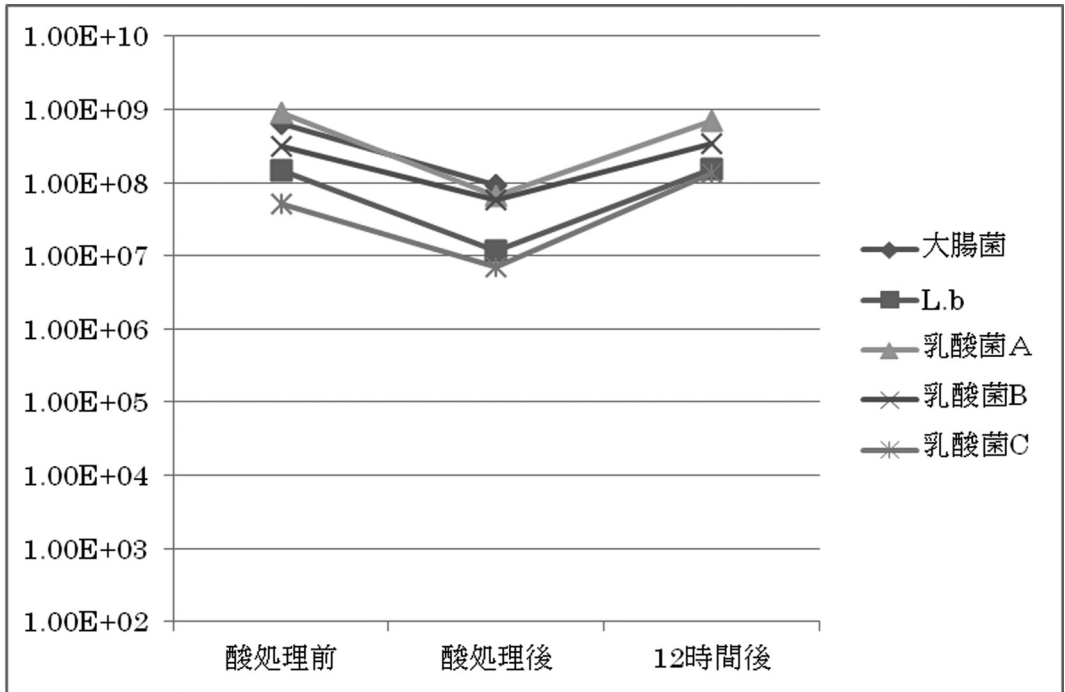


図 2 pH3.0処理

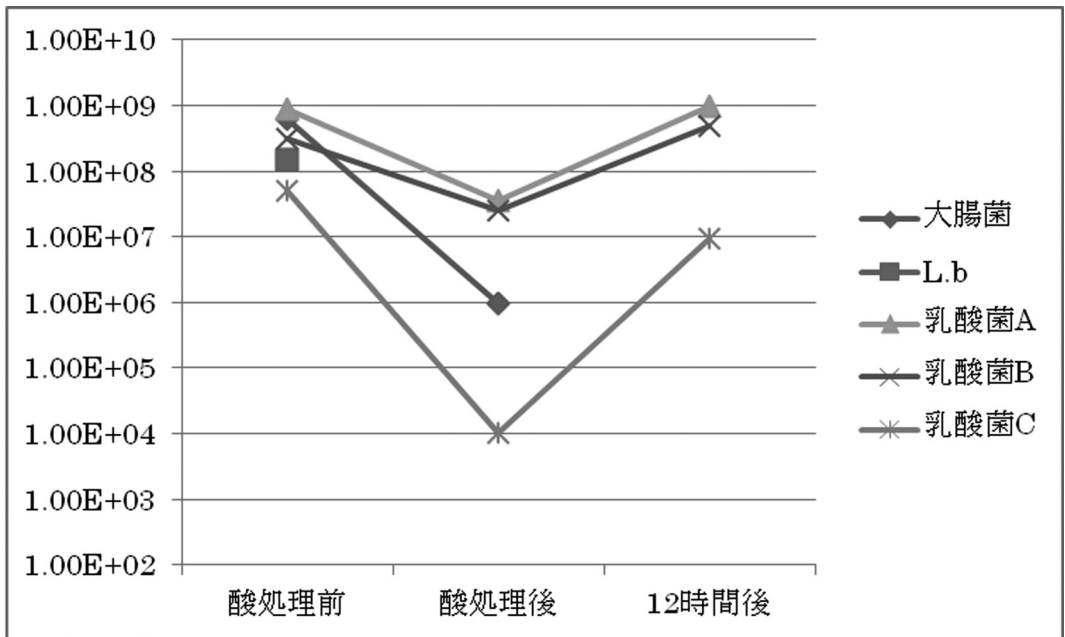


図 3 pH2.0処理

pH2.0TBS溶液で処理すると(図3)、大腸菌は1mlあたり 10^8 個から 10^5 個へ3オーダー(1/1000)まで菌数が減少した。一方、漬物から分離した乳酸菌では、 10^9 個から 10^8 個に1オーダー(1/10)までの減少しか認められなかった。これらのことから、このpH2.0TBS溶液で処理する方法は、耐酸性乳酸菌のスクリーニング法として有用であると考えられた。

また、*L. bulgaricus*標準株は、生理食塩水、pH3.0TBS溶液では約 1.0×10^8 個の菌数を確認することができたが(図2)、pH2.0処理後では菌の生育は見られず、耐酸性が弱いと考えられた。同様に、耐酸性の弱い菌(C)では、大腸菌同様の3オーダー(1/1000)以上の菌数の減少が見られた。市販の乳酸菌選択培地としては、MRS培地で最も発育がよく、酸素要求性では、嫌気培養で発育が良好であった。また、耐酸性乳酸菌の効率的なスクリーニング方法として、pH2.0TBS溶液で35℃1時間処理する方法が有効であることが確認された。

(2)新規耐酸性乳酸菌の分離

①スクリーニング試験結果

漬物53検体中、14サンプルから乳酸菌様のコロニーの発育を確認し、その中から29のコロニーについて純培養後同定作業を行った(表1)。さらに、乳酸菌様の菌株であると判断するための項目として、①寒天平板培養で表面が滑らかな球状の乳白色のコロニーを形成し、②グラム染色陽性、③形態が桿菌または球菌であるか等を確認し判断した結果、耐酸性があり、比較的菌の生育が良かった1、5、9、22番、対照として耐酸性がなかった13、14番の計6種類を選択し、カタラーゼ試験陰性を確認後、APIおよびPCR法による同定試験を行った。

②同定試験結果

○API試験

API50CHのキットを用い、49種類の炭水化物発酵能を検査したところ、発酵陽性の炭水化物wellでは、48時間後には紫色の培地が黄色へと変化した。

陽性率表で確認した結果、候補として5、9、22番があり、5、22番の2つの菌は発酵性が非常に似ており、*Lactobacillus plantarum*、9番は*Lactobacillus brevis*である可能性が高いことがわかった。一方、1、13、14番は発酵能が低いこともあり、分類表の乳酸菌には該当しなかった(表2)。

○PCR試験結果

同定試験結果を踏まえ、乳酸菌だと思われる5、9、22番について、16SrRNAをターゲットとした*Lactobacillus plantarum*に対する特異プライマーを用いて遺伝子検査を行った。その結果、5番、22番は増幅遺伝子のバンドが確認されたが、9番はバンドが確認されなかった。

さらに、DNAジャイレースをターゲットとした各菌種ごとの特異プライマーを設計し、APIの結果から非耐酸性の乳酸菌だと思われる18番の大根高菜漬を加えてPCR試験を行った。まず、*Lactobacillus*属の共通配列に対する特異プライマーでは、乳酸菌と考えられるすべての菌でDNAの増幅が確認できた。また、*Lactobacillus plantarum*の特異プライマーでは、22番および非耐酸性の大根高菜漬(18番)で増幅バンドを確認し、*Lactobacillus brevis*の特異プライマーでは、9番にDNAの増幅が確認できた(図4)。これらのPCRの結果とAPIの結果から、キムチ(5番)およびかぼちゃの浅漬(22番)は*Lactobacillus plantarum*、大根塩漬(9番)は*Lactobacillus brevis*と推定した。

今回分離したこれらの植物性耐酸性乳酸菌について、新たな発酵食品の開発について検討した。

(3)加工食品への応用

①ヨーグルト

○市販ヨーグルトをスターターに用いての予備実験

4種類の市販ヨーグルトをスターターに用いて予備実験を行い、発酵条件の検討を行った結果、時間の経過に伴い菌数の増加が確認され、24時間を過ぎると増加率が減少する傾向が認められた。特に40℃発酵の2種類については、7時間後から菌数が大き

表1 分離株の性状試験結果

No.	名前	グラム染色	MRS白濁	酸処理2日培養後 コロニー有無	コロニー色・形状	純培養2日後 コロニー有無
1	大根塩漬No.1	球菌 (+)	++	+	乳白色・丸	+
2	大根塩漬No.2	球菌 (+)	++	+	乳白色・丸	+
3	柚子白菜塩漬No.1	短桿菌 (+)	+	+	白色・丸	-
4	柚子白菜塩漬No.2	短桿菌 (+)	+	+	白色・丸	+
5	白菜キムチ (王道キムチ) No.1	桿菌 (+)	++	+	乳白色・丸	+
6	白菜キムチ (王道キムチ) No.2	桿菌 (+)	++	+	乳白色・丸	+
7	高菜漬No.1	短桿菌 (+)	±	+	乳白色 (透)・丸	+
8	高菜漬No.2	短桿菌 (+)	++	+	乳白色 (透)・丸	-
9	大根塩漬No.1	短桿菌 (+)	++	+	乳白色 (透)・丸	+
10	大根塩漬No.2	短桿菌 (+)	++	+	乳白色 (透)・丸	+
11	福神漬No.1	短桿菌 (+)	++	+	乳白色・丸	-
12	福神漬No.2	短桿菌 (+)	++	+	乳白色・丸	+
13	らっきょう酢漬	短桿菌 (+)	++	+	白色・丸	-
14	なすからし漬No.1	桿菌 (+)	+	+	乳白色 (透)・丸	-
15	なすからし漬No.2	桿菌 (+)	±	-	-	-
16	浅漬け (なす・きゅうり) No.1	桿菌 (+)	+	+	乳白色 (透)・丸	-
17	浅漬け (なす・きゅうり) No.2	桿菌 (+)	+	+	乳白色 (透)・丸	+
18	大根高菜塩漬No.1	短桿菌 (+)	+	+	乳白色・丸	-
19	大根高菜塩漬No.2	短桿菌 (+)	±	+	乳白色・丸	-
20	青しそ大根しょうゆ漬No.1	短桿菌 (+)	++	+	乳白色・丸	-
21	青しそ大根しょうゆ漬No.2	短桿菌 (+)	+	+	乳白色・丸	+
22	かぼちゃ浅漬No.1	短桿菌 (+)	+	+	乳白色・丸	+
23	かぼちゃ浅漬No.2	短桿菌 (+)	+	+	乳白色・丸	+
24	白菜キムチ (手造りキムチ) No.1	短桿菌 (+)	+	+	乳白色・丸	+
25	白菜キムチ (手造りキムチ) No.2	短桿菌 (+)	+	+	乳白色・丸	+
26	白菜キムチ (手造りキムチ) No.3	短桿菌 (+)	+	+	乳白色・丸	+
27	白菜キムチ (赤い恋人) No.1	球菌 (+)	+	+	乳白色・丸	+
28	白菜キムチ (赤い恋人) No.2	球菌 (+)	±	+	乳白色・丸	+
29	白菜キムチ (赤い恋人) No.3	球菌 (+)	±	+	乳白色・丸	+

く増加した。また、培養前の市販ヨーグルトには約 1.0×10^7 個/g程度の乳酸菌が存在していることがわかったことから、この菌数を参考に、菌液を用いたヨーグルト作成を行うこととした。

酸度変化の確認では、発酵開始後約7時間までは4種類の市販乳酸菌サンプルともほぼ同程度の酸度の上昇が見られたが、その後は40℃発酵の1種類では酸度の上昇が早く、48時間後で1.8%程度まで上

昇し続けた。一方、もう1種類の40℃発酵株と35℃発酵の2種類の株では、酸度の上昇変化が類似し、24時間後くらいから酸度の上昇率が緩く変化し、48時間後で1.3%前後であった (図5)。ヨーグルト製品の適度な酸度は0.8~1.0%といわれており、はじめに想定していた発酵時間 (7~10時間) 前後の時点では、4種類とも酸度が0.5前後と低かったため、発酵時間をもう少し延長させたら良い酸味を得るこ

表2 APIによる同定結果

5番：白菜キムチ

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49					
24h	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
48h	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
72h	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG						

9番：大根塩漬

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49						
24h	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
48h	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
72h	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG							

22番：かぼちゃの浅漬

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49							
24h	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48h	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
72h	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG								

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
試料	CTRL	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG
検出率	0	0	0	0	71	71	56	0	0	0	99	99	99	99	0	0	0	28	14	14	0	14	99	99	99	83	99	99	85	71	57	81	71	28	14	42	0	0	0	99	14	0	14	0	0	28	14	85	20	14
検出率	0	1	0	0	74	92	2	0	0	0	92	100	100	100	2	33	0	0	99	78	55	33	100	99	99	99	99	99	100	99	94	88	96	0	92	74	7	7	0	98	62	0	7	0	0	36	0	62	0	0

とができると考えられた。また、24時間、48時間発酵後のヨーグルトを一部試食したが、酸度が1%を超え、酸味が強くなり、おいしさを感じなかった。

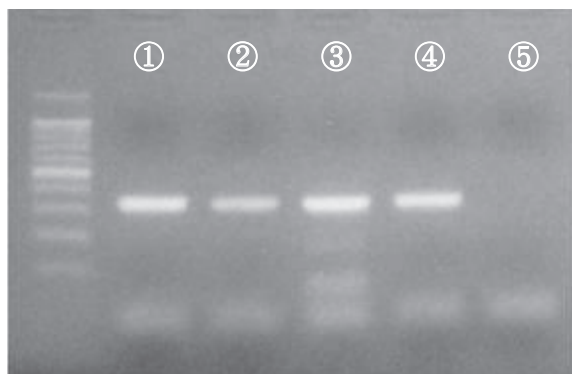
○市販ヨーグルトから乳酸菌の分離・同定

市販ヨーグルト3種類から乳酸菌の分離を行った。グラム染色陽性、桿菌または球菌、カタラーゼ試験陰性のコロニーについて、API50 CHLを用いて同定試験を行った結果、ヨーグルトBから、*Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* 1株を同定した。この菌について、菌液を調整し再び菌液からのヨーグルトの作成を試みた。

○ヨーグルト乳酸菌液を用いてのヨーグルト作成

発酵が良好に見られたのは⑤⑦⑨であり、その他は固まらなかった(発酵条件 表3)。凝固が認められなかった理由として、原料乳のタンパク質が多い方がカードを形成されやすいため、今回使用した低脂肪乳では他の牛乳に比べてタンパク質量が低く凝固しなかったものと考えられた。また、25℃での発酵では、乳酸菌の乳酸生成量が少ないため、カード形成が十分にできなかったことが考えられた。完成したヨーグルトの一部を試食した結果、24時間発酵した⑤⑨は市販品よりも少し酸味が強く、48時間発酵である⑦は酸味が強すぎて、おいしさを感じるこ

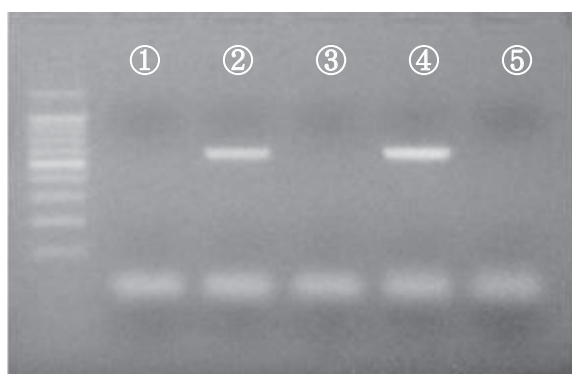
【Primer target : DNA gyrase】



- ① 5番 白菜キムチ
- ② 22番 かぼちゃの浅漬
- ③ 9番 大根塩漬
- ④ 18番 大根高菜漬
- ⑤ 陰性コントロール

Lactobacillus spp.

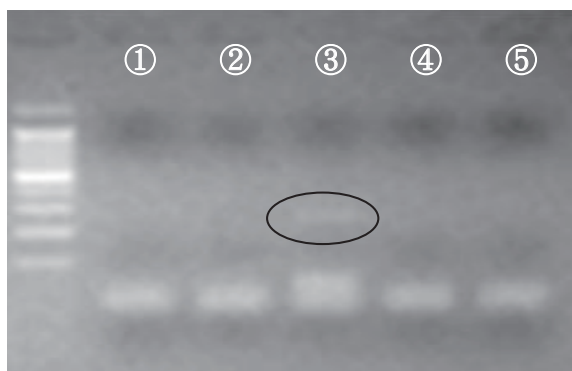
Amplicon : 356bp



- ① 5番 白菜キムチ
- ② 22番 かぼちゃの浅漬
- ③ 9番 大根塩漬
- ④ 18番 大根高菜漬
- ⑤ 陰性コントロール

Lactobacillus plantarum

Amplicon : 616bp



- ① 5番 白菜キムチ
- ② 22番 かぼちゃの浅漬
- ③ 9番 大根塩漬
- ④ 18番 大根高菜漬
- ⑤ 陰性コントロール

Lactobacillus brevis

Amplicon : 264bp

図4 漬物分離株PCR結果

とができなかった。要因効果図(図6)より、4要因3水準の中から評価が高かった水準は、原料:ジャーザー乳、スターター菌数: 7.1×10^9 個/100ml乳、発酵温度: 40℃、発酵時間: 24時間であった。

○新規植物性乳酸菌を用いてのヨーグルト作成
漬物から新規に分離した、耐酸性乳酸菌3株(か

ぼちゃの浅漬、白菜キムチ、大根塩漬)をスターターに用いて、ヨーグルトの作成を試みた結果、いずれの株でも24時間発酵したが凝固が認められず、48時間発酵で親指等大の凝固部分は観察できたものの、全体として通常のヨーグルトの固さは得られなかった。

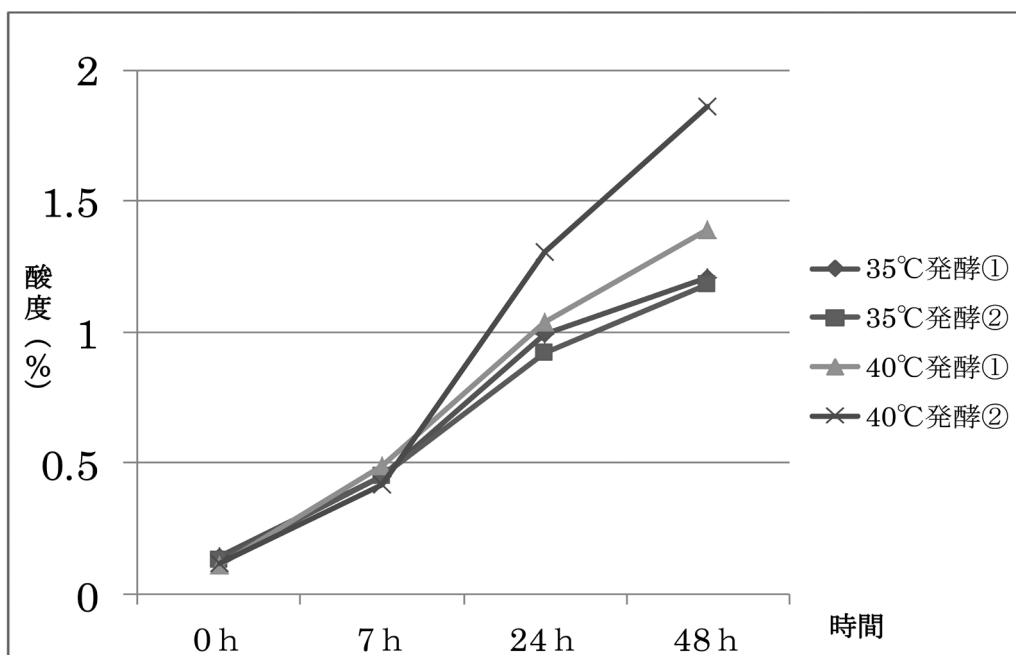
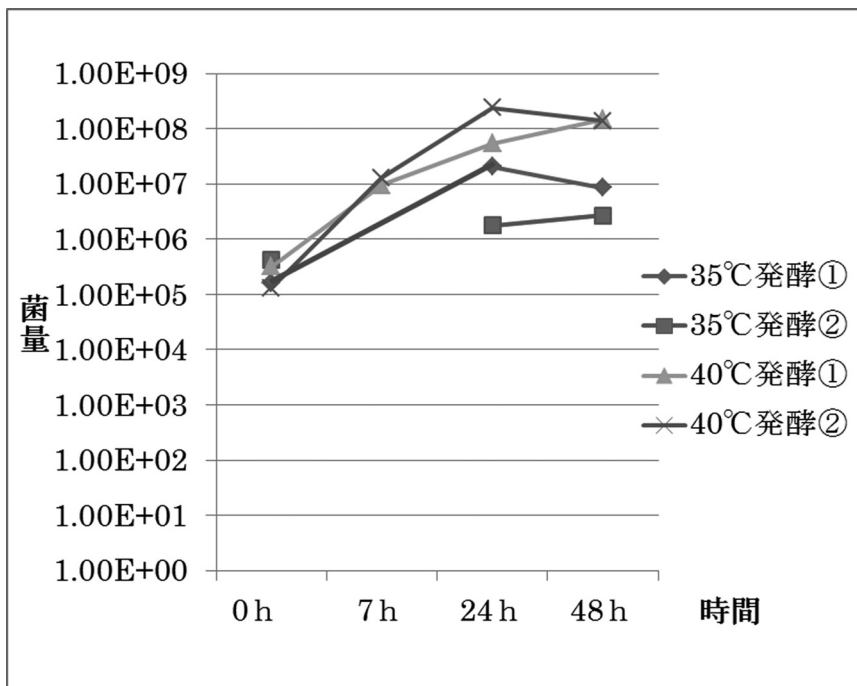


図5 ヨーグルト予備試験結果

表3 直行配列法による発酵条件の割り付け

	A	B	C	D
	牛乳	菌量	温度	時間
①	低脂肪乳	2.3×10^9	25°C	24 h
②	低脂肪乳	7.1×10^9	35°C	48 h
③	低脂肪乳	2.2×10^{10}	40°C	72 h
④	普通牛乳	2.3×10^9	35°C	72 h
⑤	普通牛乳	7.1×10^9	40°C	24 h
⑥	普通牛乳	2.2×10^{10}	25°C	48 h
⑦	ジャージー	2.3×10^9	40°C	48 h
⑧	ジャージー	7.1×10^9	25°C	72 h
⑨	ジャージー	2.2×10^{10}	35°C	24 h

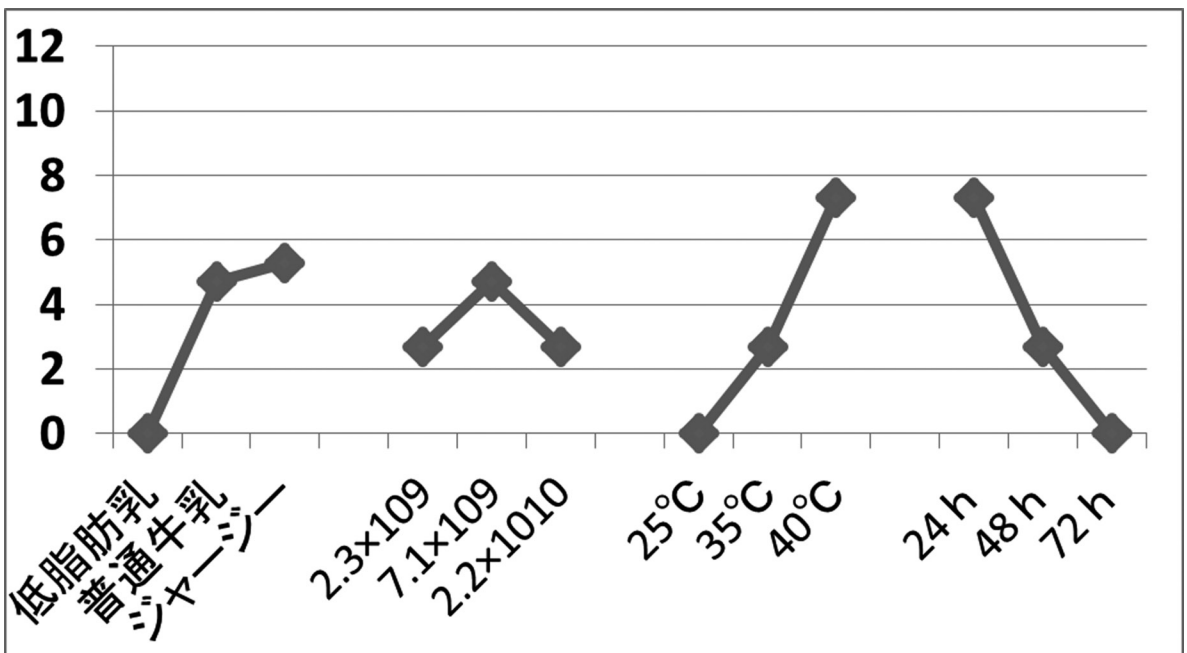


図6 要因効果図

一方、ヨーグルトは乳酸発酵 ($C_6H_{12}O_6 + 2ADP + 2Pi \rightarrow 2C_3H_6O_3 + 2ATP + 2H_2O$) で1分子のグルコースから2分子の乳酸が生成されることによりできるため、牛乳にグルコースを加えて乳酸発酵を試みた。その結果、24時間後には、市販ヨーグルトよりは柔らかいが *Lactobacillus plantarum* 2株で作成したヨーグルトは固まりを形成した(図7)。しかしながら、一部を試食した結果、ヨーグルトの酸味はあ

まり感じられず、牛乳の風味が強く感じられた。

②サバの乳酸菌つけ

○市販ヨーグルトを用いた予備実験

5人のテスターに、おいしさを4ランク評価で採点してもらった。今回は、3種類の調理方法(焼く、蒸す、電子レンジ)によって調理を行った。評価結果は、要因効果を確認するために、合計点を計算し、グラフにプロットした(図8)。これにより、A~

24時間発酵



浅漬けかぼちゃ

白菜キムチ

大根塩漬け

24時間発酵(グルコース添加)



浅漬けかぼちゃ

白菜キムチ

大根塩漬け

図7 新規植物性乳酸菌を用いてのヨーグルト作成

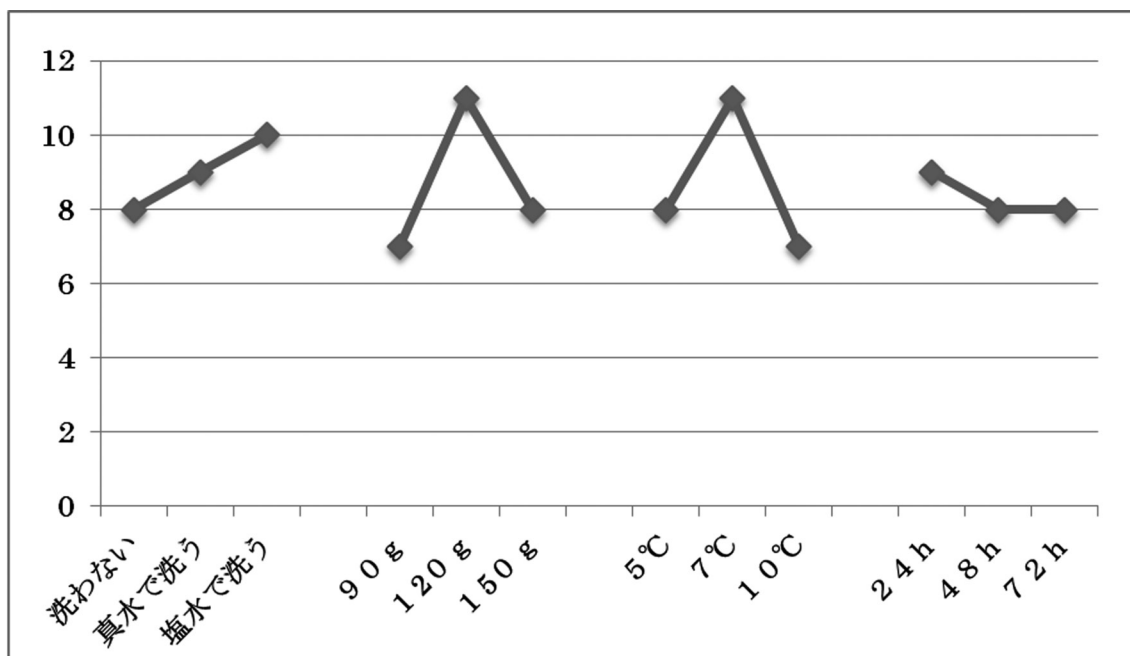


図8 サバの乳酸菌つけ評価

Dの因子（A：さばの前処理、B：ヨーグルト添加量（菌量）、C：発酵温度、D：発酵時間）において、評価が高いものを確認した。その結果、塩水で前処理を行い、120gのヨーグルト量（ 2×10^7 個/さば1g）で7°C24時間発酵をさせることが、一番評価が高い条件とわかった。

テスターの評価では、乳酸菌無添加のものに比べ、乳酸菌を添加した方が、魚の生臭みが減少している、身が軟らかいという意見が多く聞かれた。要因効果図では、120gのヨーグルトを添加したもので評価が高かったことから、単純にヨーグルトの添加量（乳酸菌量）が多い方がよいとは限らないことがわかった。また、24時間発酵させることがよい条

件であるという結果は、予備実験より菌数が24時間付近で最も上昇するという結果と同じ結果となり、乳酸菌が最も増殖し、発酵が継続している時間帯が、嗜好に良い影響を与えたと考えられた。一方、発酵温度については、7°Cで最も評価が高く、家庭における冷蔵庫の野菜室の温度（約5～7°C）にあたるということがわかった。

○新規耐酸性乳酸菌を用いたサバの乳酸菌処理

本試験では、4種の新規耐酸性乳酸菌を用いて行った。発酵条件の設定は、予備実験で得られた結果をもととし、60gのさばを塩水で前処理後、さば1gに対し 2×10^7 個の乳酸菌を添加し、7°Cで24時間発酵させることとした。調理方法は、予備実験

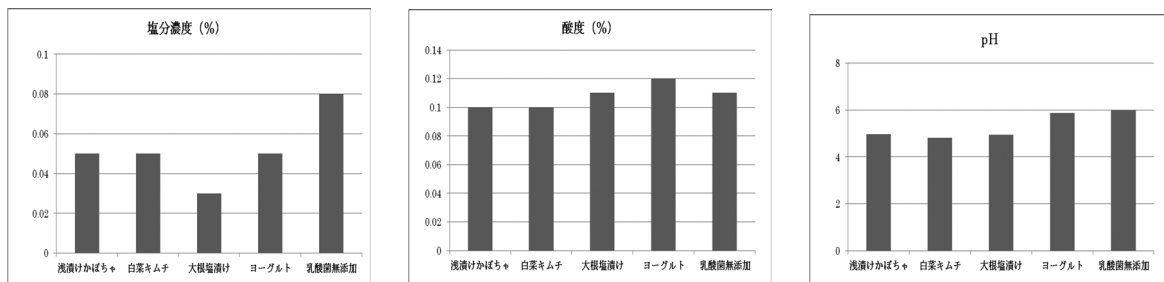


図9 サバの乳酸菌処理による変化

でのテスターの意見において、最も評価が高かった蒸し調理とし、実験を行うこととした。

生さばに乳酸菌を添加し、発酵させた直後の調理前の段階では、発酵させていないものに比べ感触が軟らかく、箸を使って身は簡単にほぐれた。蒸し調理後は、さらに乳酸菌を添加したものは軟らかく変化し、味がまろやかに感じられた。特に白菜キムチから分離された乳酸菌 (*L. plantarum*) を用いたものは、食感が軟らかくなっていった。しかしながら、乳酸菌種の違いによる味の変化や、外観に差は見られなかった。菌数の測定結果より、添加した乳酸菌数は、コントロールとして使用したヨーグルトの菌数とほぼ同じ菌量とわかった。

塩分濃度測定では、乳酸菌無添加のものに比べ、乳酸菌を添加したものは低い値に変化した。乳酸発酵によって塩分が低下することで、食品をよりまろやかに変化させていることが確認された。また、酸度、pHの低下が見られた(図9)。

今回分離した新規植物性耐酸性乳酸菌を用いたヨーグルト作成では、十分な凝固が得られなかった。固まりが弱かった理由として、菌量不足、ヨーグルト作成における工程の検討(温度・時間)が不十分だったことが考えられる。植物性乳酸菌株の性状や発酵条件の詳細な検討が必要と考えられた。

牛乳には乳糖が多く含まれており、今回供試した植物性乳酸菌株は、乳糖をグルコースとガラクトースに分解するラクターゼの活性が低かった可能性も考えられた。また、乳酸菌にはホモ型($C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_3H_6O_3$)とヘテロ型($C_6H_{12}O_6 \rightarrow C_3H_6O_3 + C_2H_5OH$

+CO₂)がある。ホモ型は乳酸のみを生成し、ヘテロ型は乳酸のほかに二酸化炭素や酢酸を産生し、風味不良などの問題を起こす。今回使用した*L. plantarum*は通性ヘテロ型発酵、*L. brevis*はヘテロ型発酵であったため、発酵がうまくいかなかったことも考えられ、植物性乳酸菌株の性状や発酵条件の詳細な検討が必要と考えられた。

乳酸菌には、多くの種類が存在し、それぞれの菌種によって発酵能力や副産物が異なり、発酵食品の味や風味への影響もさまざまである。そのため、今回加工食品に使用した4種類の乳酸菌においても、完成した発酵食品については、味や風味が異なり嗜好性に何らかの違いがあると予想された。しかしながら、乳酸菌無添加のものとは違いがあったものの、乳酸菌種間の違いは見られなかった。このことは逆に、菌量、発酵温度や時間をより細かく検討する必要があるのかもしれない。一方、サバの乳酸菌つけの発酵温度については、7℃で最もよい評価であったことから、家庭用冷蔵庫でも設定可能な温度であり、家庭においても今回使用した新規耐酸性乳酸菌を用いた、新たな発酵食品を作ることが十分可能であると思われた。

まとめ

耐酸性乳酸菌分離に適した培養方法の検討を行い、市販漬物53検体から植物性耐酸性乳酸菌の分離を試みた結果、3検体から*L. plantarum*(2株)、*L. brevis*(1株)を分離同定した。新規に同定した耐酸性乳酸菌を用いた加工食品として、ヨーグルトおよびサバの乳酸菌つけを試作した結果、ヨーグルトについてはい

ずれの菌株でも凝固能が低かった。また、サバの乳酸菌つけでは、まろやかな風味を示したものの、菌株による差異は認められず、加工食品への応用については発酵過程の詳細な検討が必要と思われた。

参考文献

- 1) Mary E Sanders, Probiotics : Definition, Sources, Selection, and Uses : Clin Infect Dis, Volume 46, Issue Supplement 2, pS58-S61 (2008)
- 2) 磯部由香、松井宏樹、安見真帆、成田美代：『耐酸性を有する乳酸菌の検索』：日本家政学会誌 Vol.58, No.6, p337-341 (2007)
- 3) 乳酸菌研究集談会（編）：『乳酸菌の科学と技術』：学会出版センター, p311-333 (1996)
- 4) 食品機能性の科学編集委員会（編）：『食品機能性の科学』：(株)産業技術サービスセンター, p424-475, p823-846 (2008)
- 5) 駒野小百合、角谷智子、小林恭一、谷政八、百木華奈子：『食品加工に関する試験成績』：平成18年度福井県農業試験場食品加工研究所 p7-8 (2006)、平成19年度石川県農業試験場食品加工研究所 p5-11 (2007)
- 6) 日本乳酸菌学会（編）：『乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス』：京都大学学術出版会, p12-14 (2010)
- 7) 武藤泰敏（編著）：『消化・吸収－基礎と臨床－』第一出版, p63 (2002)