

クズの根からの乳酸菌の分離とその特性

都築 正男^{*1)}, 藤野 布久代^{*2)}, 西尾 実紗^{*2)}, 北田 善三^{*3)}

Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Kudzu-root

TSUDUKI Masao^{*1)}, FUJINO Fukuyo^{*2)}, NISHIO Misa^{*2)}, KITADA Yoshimi^{*3)}

近年、乳酸菌及びそれらを利用した食品の健康機能性が注目されている。なかでも特にヨーグルトや発酵乳などの発酵食品はプレバイオティクスとして利用され、その摂取効果に期待が寄せられている。乳酸菌の健康機能性は整腸、生活習慣病の改善、免疫賦活などが知られているが、本研究では奈良県の伝統食品である吉野葛の原料であるクズの根から乳酸菌を分離し、その乳酸菌が *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* であることを明らかにした。また抗菌性や免疫賦活活性などの特性を調べ、豆乳ヨーグルト用のスターターとして商品化を行った。

1. 緒言

近年の健康志向の高まりに伴い、食品の様々な健康機能性について注目が集まっている。特に乳酸菌は、ヒトの腸内に生息する細菌の中でもビフィズス菌同様、有害菌の増殖を抑制するなど有用細菌としてヒトの健康維持増進に重要な役割を果たしている。また、乳酸菌は乳酸発酵を行うグラム陽性細菌の総称であるが、形態的には球菌と桿菌があり、発酵形式では糖類から乳酸のみを生成するホモ乳酸菌と乳酸以外の物質（炭酸ガスやアルコール、酢酸等）を生成するヘテロ乳酸菌に分けられている。これらの乳酸菌は様々な発酵食品で利用されており、日本の伝統的な食品として漬物、醤油、味噌、なれずし、阿波番茶、清酒（生酛、菩提酛）などがある。また現代ではヨーグルトや発酵乳に様々な種類の乳酸菌が盛んに利用され、プロバイオティクスとしてこれらの摂取効果が注目されている。乳酸菌の健康機能性としては、整腸作用¹⁾⁴⁾、免疫賦活作用⁵⁾⁷⁾、高血圧や高脂血症などの生活習慣病に対する効果⁸⁾⁹⁾などが報告されている。

本研究では、乳酸菌の分離源として吉野葛の原料となるクズを用いた。吉野葛は奈良県の伝統的な食材であり、秋の七草でもあるクズの根を繊維状に粉碎、水で洗浄し、しぼり汁からデンプンを沈殿させ、灰汁抜きと沈殿を繰り返して純度の高いデンプンを取り出して陰干しして得たものである。吉野葛は葛餅やくずきり、葛湯などの和菓子が有名であるが、料理のとろみ付けや洋菓子の生地などにも用いられる食材である。本研究では、クズに関連した食品開発の一環として乳酸菌の分離を行い、その乳酸菌の特性調査ならびに商品の開発を行った。

2. 実験方法

2.1 乳酸菌の分離

2.1.1 使用培地

集積培地は麴汁培地 (Brix 10, pH 3.5) を使用した。選抜培地は BCP 加プレートカウントアガール「ニッスイ」(以下 BCP 培地, 日水製薬(株)製) を使用した。乳酸菌の増殖には GYP for LAB 培地 (グルコース 1%, 酵母エキス 1%, ペプトン 1%, 酢酸ナトリウム 0.2%, 硫酸マグネシウム 7 水和物 400 ppm, 硫酸マンガン 4 水和物 20 ppm, 硫酸鉄・7 水和物 20 ppm, 塩化ナトリウム 20 ppm, Tween80 500 ppm, シクロヘキシミド 10 ppm, アジ化ナトリウム 10 ppm, pH 6.5) を用いた。

2.1.2 分離源

2016年9月1日から9月4日にかけて、株式会社井上天極堂の本社(御所市)および樞原工場(樞原市)を含む奈良県内の12カ所(天理市、御所市、樞原市、高取町、明日香村、斑鳩町、香芝市、大和郡山市)で、クズの花、つる、根の採取を行い、これらを乳酸菌の分離源とした。

2.1.3 選抜

採取した試料を無菌的に 50 mL のチューブに各々入れ、集積培地を加え、30°C で培養した。白濁した集積培養液のうち pH が 4.0 を下回る培養液 100 µL を選抜培地に塗抹し、30°C, 48 時間培養した。生じたコロニーの周囲に黄色いハローが見られたものを釣菌し、新たな BCP 培地に塗抹して再度ハローが形成されるのを確認した。得られたコロニーを用いてグラム染色を行った。グラム陽性であるものは、カタラーゼ試験(3%過酸化水素水を滴下し、ガスの発生の有無を確認)を行い、ガスの発生が見られない菌株を乳酸菌の候補菌株とした。

*1) バイオ・食品グループ *2) 株式会社井上天極堂 *3) 畿央大学

2.2 分離乳酸菌の種の同定

2.2.1 同定キットによる種の同定

乳酸菌同定キット API50CHL (ビオメリュー・ジャパン(株)製)を用いて同定を行った。菌体をサスペンションメディアウム 2 mL に懸濁し, この懸濁液を API 50CHL 培地にマクファーランド濁度 2 になる量の 2 倍量を添加した。菌液を API50CH プレートに接種し, ミネラルオイルを重層した後 30°C, 48 時間培養後プレート上の 49 種類の炭素源の資化性パターンから apiweb™ (<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>) により種を推定した。

2.2.2 遺伝子解析による種の同定¹⁰⁾

細菌の種の同定に用いられる 16S rDNA の塩基配列を用いた。PCR の鋳型は, 培養液を蒸留水で 100 倍希釈したものを用いた。プライマーは 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3') および 1406R (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3')⁴⁾ を用い, PCR を行った。PCR の反応液は, KOD Plus (東洋紡(株)製) を 0.4 µL, 10×KOD buffer を 2 µL, dNTP Mixture (2.5 mM each) を 2 µL, 2.5 mM 塩化マグネシウムを 0.8 µL, プライマー (20 µM) を 0.6 µL, 鋳型 DNA を 2 µL 加え, 滅菌水で 20 µL に調製した。Veriti Thermal Cycler (ライフテクノロジーズ・ジャパン(株)製)を用いて, 94°C, 3 分間で DNA の変性を行った後, 94°C で 15 秒 (変性), 45°C で 30 秒 (アニーリング), 68°C で 2 分 (伸長) を 35 サイクル行った。ExoSAP-IT (アフィメトリックス・ジャパン(株)製) で 1 本鎖 DNA の消化と余剰な dNTPs を不活性化した後, これを鋳型に BigDye Terminator v.3.1 (ライフテクノロジーズ・ジャパン(株)製)を用いてシークエンス用試料を調製し, ABI3130/3130xl Genetic Analyzer (ライフテクノロジーズ・ジャパン(株)製)で塩基配列を解析した。得られた塩基配列は Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) により相同性検索を行い, 種の同定を行った。

2.2.3 Rep-PCR 法による菌株の識別¹¹⁾

乳酸菌の培養液から菌体を遠心分離で集菌し, 100 µL のアクロモペプチダーゼ (250 U/mL TE) を加え 40°C, 15 分間処理し, 等量の 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液を添加後 100°C で 10 分間加熱処理を行い, フェノール抽出, エタノール沈殿で染色体 DNA を調製して TE 緩衝液 30 µl を加えて溶解した。これを鋳型として Rep-PCR を行った。条件は, 94°C で 3 分, 94°C で 30 秒, 52°C で 1 分, 68°C で 2 分を 30 サイクル行った。PCR 反応液は KOD Plus を 0.5 µL, 10×KOD buffer を 2.5 µL, dNTP Mixture (2.5 µM each) を 2 µL, 2.5 mM 塩化マグネシウムを 2 µL, プライマーを各 5 µL (1 µM) に鋳型 DNA を 1 µL 加え, 滅菌水で 25 µL に調製した。用いたプライマーは LcREP-A (5'-CTGACAAGTC TGTCAGTAAA-3'), LcREP-C (5'-CTGACAAGTCTGTCA GTAAC-3'), LcREP-T (5'-CTGACAAGTCTGTCAAGTAAAT-

3') である。PCR 産物は 1%アガロースゲル電気泳動を行い, その泳動パターンを既存の菌株と比較した。対照として用いた乳酸菌は NRIC1147 (NBRC100933) 株, 正暦寺乳酸菌 (ともに *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) である。

2.3 分離乳酸菌の特性

2.3.1 糖資化性

乳酸菌同定キット API50CHL に接種した菌体が資化する 49 種類の炭素源 (グリセリン, エリスリトール, D-アラビノース, L-アラビノース, D-リボース, D-キシロース, L-キシロース, D-アドニトール, メチル-β-D-キシロピラノシド, D-ガラクトース, D-グルコース, D-フルクトース, D-マンノース, L-ソルボース, L-ラムノース, ガラクチトール, イノシトール, D-マンニトール, D-ソルビトール, メチル-α-D-マンノピラノシド, メチル-α-D-グルコピラノシド, 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, D-セロビオース, D-マルトース, D-ラクトース, D-メリビオース, D-スクロース, D-トレハロース, イヌリン, D-メレジトース, D-ラフィノース, デンプン, グリコーゲン, キシリトール, ゲンチオビオース, D-ツラノース, D-リキソース, D-タガロース, D-フコース, L-フコース, D-アラビトール, L-アラビトール, グルコン酸, 2-ケトグルコン酸, 5-ケトグルコン酸) について調べた。

2.3.2 抗菌性

10⁸ cfu/mL に調整した供試菌 (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* NBRC12732, *Cultibacterium acnes* NBRC107605, *Escherichia coli* NBRC3972) の培養液 1 mL をシャーレに加え, SCDLP 寒天培地「ダイゴ」(日本製薬(株)製)にて混釈して固めた。これに 10⁷~10⁸ cfu/mL の乳酸菌培養液 80 µL を滅菌ディスク(アドバンテック(株)製)に染み込ませ, 室温で 2 時間乾燥させたものを中央に置き, 35°C で 24 時間静置培養し, 滅菌ディスクの周りのハローの観察および測定を行った。対照として滅菌水を滅菌ディスクに染み込ませたものを用いた。

2.3.3 インターロイキン (IL) -12 産生能

IL-12 産生誘導活性の測定は, NPO 法人日本サプリメント臨床研究会研究所に委託し, 以下の方法で行った。BALB/c マウスより脾臓細胞を調製し, 2.5×10⁶/mL の濃度の細胞溶液に, 被検乳酸菌が 1 µg/mL, および 10 µg/mL になるように乳酸菌を加え, 96 穴培養プレートに 200 µL/well 分注し, 5%CO₂, 37°C 下で 2 日間培養後, IL-12 について特異抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により培養液中の IL-12 の濃度を測定した。なお, 使用した BALB/c マウスの週齢は 10 週齢で, 脾臓細胞培養液は 10%FBS (牛胎児血清) -RPMI1640+100 µg/mL ストレプトマイシン+100 U/mL ペニシリン+50 µM 2-メルカプトエタノールである。1 サンプル 1 濃度につき 6Well を使用し, 統計解析は一元配置の分散解析を行った。陽性対照との比較は Dunnett の

検定, 被検乳酸菌 (1 μ g/mL, 10 μ g/mL) 間の比較は Welch の t 検定により有意差の有無を検定した. 被検乳酸菌は静置培養し, 集菌・洗浄後加熱殺菌したものを用いた. 陽性対照として免疫療法剤であるピシバニール (OK-432) を使用した. また抗体は 1 次, 2 次抗体ともにラット抗マウスモノクローナル抗体 (BioLegend Inc.) を用いた.

2.3.4 細胞外多糖 (EPS) の産生能¹²⁾

2.3.4.1 EPS 試料の調製

MRS 液体培地で培養した培養液を遠心分離 (11,000 rpm, 4°C, 20 分) 後, 上清を回収し, 菌体は PBS で 2 回洗浄して遠心分離後, 上清を回収した. 回収した上清を中和後凍結乾燥により 1/10 量に乾燥・濃縮し, 上清と等量の冷却エタノールを加え, 4°C に静置し, 多糖類, タンパク質, 核酸などを沈殿させた. 上清を除去し, 水に溶解させた後, 再度同様にエタノール沈殿させ, 上清を除去し沈殿を水に溶解した. 1 mM MgCl₂ を含む 5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中で Proteinase K (7 μ g/mL, 富士フイルム和光純薬(株)製) を加え, 37°C で 8 時間処理した. 100°C, 10 分間加熱して酵素を失活させ, エタノール沈殿を 2 回繰り返した. 沈殿を水で溶解し, 不溶物を遠心分離により除去した. 得られた上清を, 蒸留水で 48 時間透析を行い, 凍結乾燥させた.

2.3.4.2 陰イオンクロマトグラフィー

凍結乾燥した試料を 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に溶解し, 陰イオン交換樹脂 HiTrap DEAE-FF (GE ヘルスケア・ジャパン(株)製) に供し, 非吸着多糖を回収した後, 0.2 M NaCl/ Tris-HCl および 0.5 M NaCl/Tris-HCl の順にステップワイズ法で酸性 EPS (APS) を溶出させ回収した. 分画は流速 1.2 mL/min. で, 室温で分画し, 各フラクションは 5 mL ずつ分画した. 糖の定量はフェノール硫酸法により行い, グルコースをスタンダードとして算出した.

2.3.4.3 陽イオンクロマトグラフィー

陰イオン交換で非吸着であった画分を透析, 凍結乾燥後, 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に溶解させ, 陽イオン交換樹脂 HiTrap CM-FF (GE ヘルスケア・ジャパン(株)製) に供し, 中性 EPS (NPS) を回収した後, 0.5 M NaCl/ 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) により塩基性 EPS を回収した. 分画は, 流速 1.2 mL/min. で, 室温で行い, 各フラクションは 5 mL ずつ分画した. 糖の定量はフェノール硫酸法により行った.

2.3.5 アルブチン分解能

乳酸菌を GYP for LAB 培地のグルコースをアルブチンに置き換えた培地, ナシの果皮抽出液に置き換えた培地で 30°C, 48 時間培養し, 培養前後の培養上清を高速液体クロマトグラフ LCMS-2010EV (株)島津製作所製) で分析した. 分析条件は以下の通りである. カラム: YMC-Pack Pro C18 4.6×150 mm ID, 検出器: UV 280 nm, 溶離液: 5/95 メタノール/10 mM リン酸, 流速: 1.0 mL/min., カラム温度: 30°C.

2.4 発酵試験

抗生物質を除いた GYP for LAB 培地で培養した乳酸菌を遠心分離 (3,000 rpm, 5 分) で集菌した. 10 または 50 mL の牛乳または豆乳に, 乳酸菌を 1 白金耳または乳酸菌培養液を 1 mL 摂取し, 30°C, 24 時間静置してタンパク質の凝固の確認と pH 測定, 有機酸の定量および官能評価を行った.

有機酸は 100 倍希釈し, フィルターろ過したものを試料として用いた. キャピラリー電気泳動装置 G1602A (アジレントテクノロジー(株)製) を使用して分析した. 泳動条件は以下の通りである. カラム: アジレントテクノロジー(株)製 fused-silica (75 μ m ID, 75 cm), 泳動バッファー: アジレントテクノロジー(株)製 Organic Acid Buffer for CE pH 5.6, 印加電圧: -25 kv, 温度: 20°C, 波長: 350 nm, ref 200 nm, 注入量: 2 sec./50 mmBar, キャピラリー温度: 20°C.

3. 結果および考察

3.1 乳酸菌の分離と同定

採取した 142 の試料から集積培養で pH 4.0 以下に低下した試料は, 20 検体であった. この 20 検体から BCP 培地に塗抹し, 形成されたコロニーから大きさや形状等の外見が異なるものを 2 株ずつ新たな BCP 培地に塗抹し, ここで形成したコロニーを用いてグラム染色およびカタラーゼ試験を行い, グラム陽性かつカタラーゼ反応陰性であった 29 菌株を選抜した.

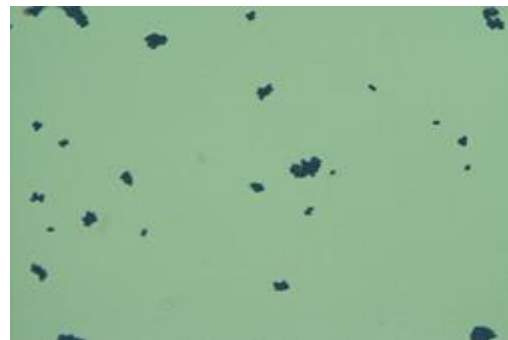


図 1 *L. lactis* subsp. *lactis* No. 5 株のグラム染色

29 菌株のうち, 13 菌株について API50CHL を用いて種の同定を試みたところ, *Lactobacillus plantarum* が 10 菌株, *Lactobacillus pentosaceus* が 2 菌株, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* が 1 菌株であることが推定された. *L. plantarum* と推定された 6 菌株と *L. lactis* subsp. *lactis* 1 菌株について 16S rDNA の塩基配列を用いて公開されている既知の配列との相同性を比較したところ, *L. plantarum* が 5 菌株 (No.74-2, No.86-1, No.86-2, No.101-1, No.101-2), *Leuconostoc mesenteroides* が 1 菌株 (No.つる-5), *L. lactis* subsp. *lactis* が 1 菌株 (No.5, 図 1) であった.

3.2 ヨーグルト製造に適した乳酸菌の選定

分離した 29 株の乳酸菌を用いて豆乳および牛乳の乳酸発酵試験を行った。乳酸発酵の結果、豆乳はすべての乳酸菌において凝固したため、固形のヨーグルトができるのではないかと推察した。一方、牛乳では *L. mesenteroides* No. つる-5 株のみが凝固した。発酵後の豆乳および牛乳の pH を測定したところ、豆乳ではすべてにおいて 4.0~5.0 酸性を示したのに対し、牛乳ではほぼ 6.0~6.7 と中性付近に留まっており、ほとんど乳酸発酵していないと考えられた。*L. plantarum* など植物から分離された乳酸菌は牛乳に含まれる主要な糖であるラクトースを資化できない乳酸菌が多く、今回分離した乳酸菌もラクトースの資化性が弱い、持たないために牛乳で乳酸発酵しなかったと考えられる。

乳酸発酵させた豆乳の官能評価を行ったところ、乳酸菌株によって大きく風味が異なっており、臭いがきつく食用に適さないものもあったが、*L. lactis* subsp. *lactis* No.5 株で乳酸発酵させた豆乳の風味はヨーグルトに近く感じられたことから、以下の実験ではこの乳酸菌株を使用して各種性質を調査した。

3.3 *L. lactis* subsp. *lactis* No. 5 株の生理学的性質

3.3.1 既知の *L. lactis* subsp. *lactis* との相違

No.5 株が既知の乳酸菌 *L. lactis* subsp. *lactis* とは異なることを調べるために Rep-PCR 法により他の菌株 (正暦寺乳酸菌, NBRC100933 株) と比較した。その結果, No.5 株, 正暦寺乳酸菌, NBRC100933 株はすべて繰り返し配列の大きさが異なっており, それぞれ独立した菌株であることが分かった (図 2)。

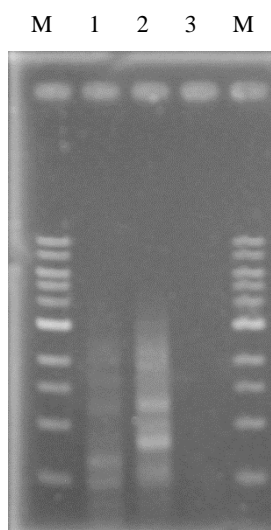


図 2 Rep-PCR 産物の電気泳動

LaneM ; 1kb Ladder Maker, Lane1 ; No. 5 株, Lane2 ; 正暦寺乳酸菌, Lane3 ; NBRC100933 株.

3.3.2 糖資化性

No.5 株が資化する糖は, L-アラビノース, D-リボース, D-キシロース, D-ガラクトース, D-グルコース, D-フルクトース, D-マンノース, D-マンニトール, 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, D-セロビオース, D-マルトース, D-ラクトース, D-スクロース, D-トレハロース, デンプン, ゲンチオピオースであった。*L. lactis* subsp. *lactis* の 50%が L-アラビノース, D-キシロース, D-マンニトール, D-スクロース, デンプンの 5 種類の糖を資化するといわれていることから, 本菌株の特徴と言える。

一方で, *L. lactis* subsp. *lactis* の 20~30%が資化することができるメチル- α -D-グルコピラノシド, グルコン酸については No.5 株は資化できないことが分かった。

3.3.3 抗菌性

L. lactis は, バクテリオシンの一種であるナイシンを生じる菌種として知られている。ナイシンは他の多くのバクテリオシンと異なり, 広い範囲のグラム陽性菌に抗菌性を示すことが知られており¹³⁾, 今回分離した No.5 株について抗菌性の有無を確認した。本試験で 3 菌種 (*S. aureus* subsp. *aureus* NBRC12732, *C. acnes* NBRC107605 および *E. coli* NBRC3972) についての抗菌性を調べたが, グラム陽性菌である *S. aureus* subsp. *aureus* NBRC12732 および *C. acnes* NBRC107605 に対して, ハローが形成されたため (図 3), No.5 株は *S. aureus* や *C. acnes* に対して抗菌性を示すものと考えられた。一方, グラム陰性菌である *E. coli* NBRC3972 に対しては対照と同様にハローが形成されず, *E. coli* に対して抗菌作用がないと考えられた (データ未掲載)。グラム陽性菌のみに抗菌性を示したことから No.5 株の抗菌性は, No.5 株が生成するナイシンによるものと推測された。

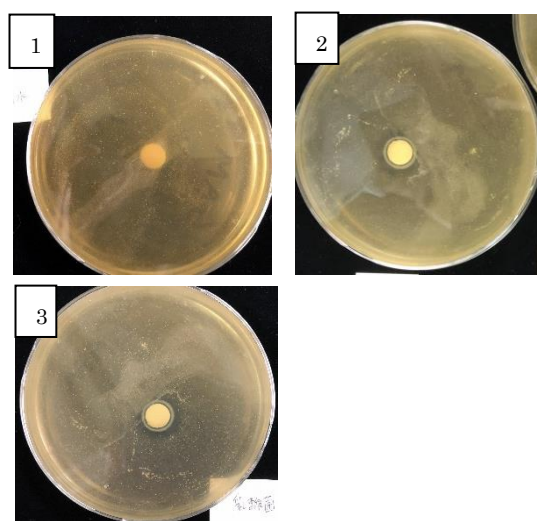


図 3 No.5 株のグラム陽性菌に対する抗菌性試験
1: 対照, 2: *S. aureus* subsp. *aureus* NBRC12732, 3: *C. acnes* NBRC107605

3.3.4 IL-12 産生能

乳酸菌には免疫賦活作用があるとされているが、分離した No.5 株のサイトカインの産生能について調査した。今回検討したものは NK 細胞を刺激して Th1 細胞への分化を促進するインターロイキンである IL-12 の産生能の検討を行った。

1 µg/mL の投与量では、OK-432 は IL-12 が誘導され、502 pg/mL 産生したが、No.5 株では誘導されなかった。一方、10 µg/mL の投与量では、OK-432 は 110 pg/mL の IL-12 が誘導されたのに対し、No.5 株は 441 pg/mL の IL-12 産生が誘導されることが確認され、No.5 株は免疫賦活作用があるものと考えられた (図 4)。

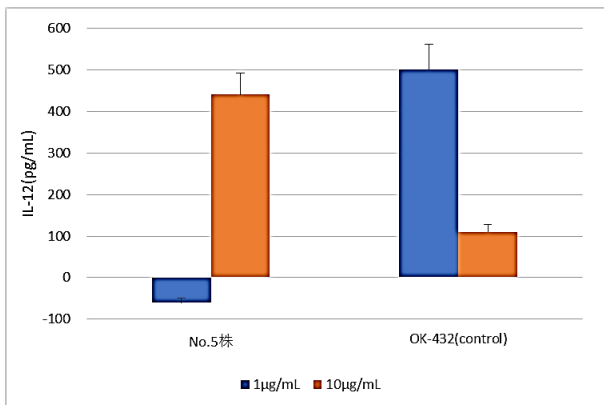


図 4 No.5 株の IL-12 の産生誘導活性

3.3.5 細胞外多糖 (EPS) の産生

EPS は微生物の分泌酵素により細胞外で合成される多糖であり、乳酸菌は複数種の単糖で構成されるヘテロ型の EPS を主に生産することが知られている¹⁴⁾。乳酸菌における EPS の生理的役割は、EPS の粘性により主に乾燥、ファージの攻撃、毒物など外的要因に対する防御が主な役割と考えられている¹⁵⁾。また健康機能性についてもプレバイオティクス作用¹⁶⁾や血圧降下¹⁷⁾、抗菌¹⁸⁾、抗腫瘍^{19),20)}、免疫賦活作用²¹⁾⁻²³⁾が報告されている。また EPS を生産する乳酸菌も多様で、本研究で分離した No.5 株が属する *L. lactis* subsp. *lactis* も EPS を生産する²⁴⁾ため、No.5 株が生産する EPS の分離と精製を試みた。

No.5 株の培養液から EPS を調製したところ、30 mL の培地から約 113 mg の EPS を得ることができた。イオン交換クロマトグラフィーで EPS の精製を行い、陰イオン交換クロマトグラフィーにより、APS を分離したところ、弱酸性 APS (W-APS) と強酸性 APS (S-APS) が得られた。また、陰イオン交換クロマトグラフィーに吸着しない非吸着 EPS も得られた (図 5)。ここで得られた非吸着 EPS は NPS と塩基性 EPS が混在している可能性があったため非吸着の EPS について陽イオン交換クロマトグラフィーを行ったが、陽イオン交換樹脂には吸着せず、NPS のみが含まれている事がわかった (データ未掲載)。全 EPS 量におけるそれぞ

れの割合 (重量%) は、NPS が 43.9%、W-APS が 40.6%、S-APS が 15.5% であった。

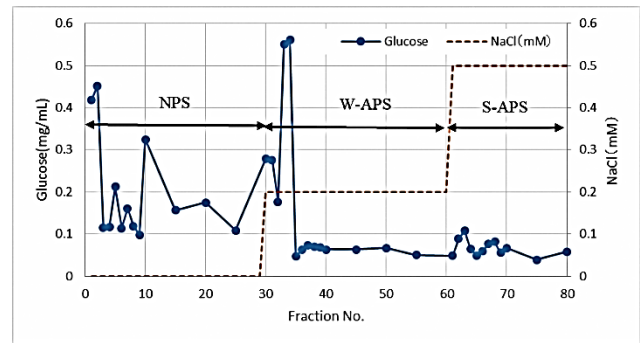


図 5 No.5 株が生産する EPS の陰イオンクロマトグラフィーでの分画

3.3.6 アルブチン分解能

アルブチンは、ナシやコケモモなどの植物に含まれるフェノール配糖体である。加水分解されてヒドロキノンとグルコースが生じる。アルブチンはチロシナーゼに作用してメラニン合成を妨げるために化粧品などに美白効果があるものとして使用されている。また、ヒドロキロンは還元力が強く、写真の現像などで還元剤として使用される他、その漂白作用により医薬部外品で美白剤として処方されている。No.5 株がアルブチンを資化することから、No.5 株の培養によってアルブチンが加水分解されてヒドロキロンを生産するか確認した。

アルブチンを唯一の炭素源として No.5 株を培養すると培養液中のアルブチンは全て乳酸菌により資化され、加水分解産物であるヒドロキノンのみが検出された。このことから、No.5 株によりアルブチンをヒドロキノンに変換することが可能であることが示唆された (図 6)。

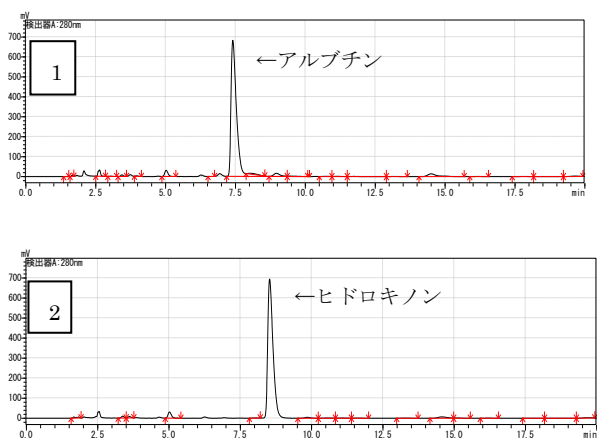


図 6 アルブチン含有培地での No.5 株培養液のアルブチンおよびヒドロキノン
1:培養前, 2:培養後

一方、ナシの果皮抽出液を用いて No.5 株を培養すると、培養前のアルブチンは資化されることなく、培養後もその

まま残存し, ヒドロキノンの生成が見られなかった. ナシの果皮抽出液にはグルコースやフルクトースなどの他の糖類が多く存在するため, これらを資化し, アルブチンは利用しなかったと考えられる.

3.4 牛乳および豆乳の乳酸発酵

No.5 株が豆乳を乳酸発酵し, 豆乳ヨーグルトができることを選抜段階で確認したが, No.5 株をヨーグルトスターターとして利用することを目指して, 表 1 に示した配合で発酵試験を行った.

No.5 株は牛乳を乳酸発酵させても pH の低下はみられるものの十分に凝固しなかった. しかしグルコースやフルクトースを 2% 添加することで牛乳および加工牛乳が凝固し, ヨーグルトができることが確認でき, pH はいずれも 4.3~4.4 であった. 豆乳については豆乳のみでも凝固したが, 糖類やスキムミルクを添加した場合も同程度に凝固し, ヨーグルト様になった. 発酵後の pH は牛乳より若干中性よりで 4.6~4.7 であった.

表 1 牛乳および豆乳を用いた乳酸発酵試験

	牛乳	加工牛乳	豆乳1	豆乳2	豆乳3	豆乳4
仕込量(mL)	50	50	50	50	50	50
乳酸菌培養液(mL)	1	1	1	1	1	1
グルコース(%)	2	2	1	1	0.05	0.05
フルクトース(%)	—	—	1	1	0.05	0.05
スキムミルク(%)	—	—	2	—	2	—
発酵時間(hr)	24	24	24	24	24	24
発酵後pH	4.33	4.38	4.61	4.68	4.64	4.60

No.5 株で発酵した豆乳と既に販売されている他社品の有機酸を比較した(表 2). No.5 株では, A 社や B 社のもので生成したリンゴ酸やコハク酸が検出されなかった. 一方, 酒石酸は No.5 株のみで検出された. また, 酢酸は他社品より少なく, リン酸は多く検出され, 乳酸は 3 サンプルの中では中間的な生成量であった.

表 2 豆乳ヨーグルトの有機酸 (ppm)

	No.5株	A社	B社
酒石酸	359.2	N.D.	N.D.
リンゴ酸	N.D.	81.5	N.D.
クエン酸	1552.3	1466.7	1633.3
コハク酸	N.D.	73.6	186.0
ピルビン酸	N.D.	N.D.	N.D.
酢酸	174.4	207.0	628.8
乳酸	3862.1	2189.9	4674.0
リン酸	105.8	41.2	49.8
ピログルタミン酸	N.D.	N.D.	N.D.
グルコン酸	N.D.	N.D.	N.D.

4. 結言

本研究でクズの植物体から乳酸菌の分離を行い, この乳酸菌の抗菌性, 免疫賦活作用, EPS の産生能, アルブチン

の分解能を調べるとともに, ヨーグルトスターターの利用を目指し, 乳酸発酵試験を行った. 主な結果は次の通りである.

- (1) クズの植物体 142 検体から 29 菌株の乳酸菌を分離し, そのうちの 1 菌株が *L. lactis* subsp. *lactis* (No.5 株) であり, ヨーグルトスターターとして用いることができる乳酸菌であった.
- (2) *L. lactis* subsp. *lactis* (No.5 株) は黄色ブドウ球菌, アクネ菌に対する抗菌性を示し, IL-12 の産生を上昇させた. また, 酸性および中性 EPS を産生し, アルブチンを加水分解し, ヒドロキノンを菌体外に生成することがわかった.
- (3) *L. lactis* subsp. *lactis* (No.5 株) は加糖した牛乳ならびに豆乳を乳酸発酵し, ヨーグルトを作成することができた. 本乳酸菌は当センターと株式会社井上天極堂と共同で特許出願を行うとともに, 「葛乳酸菌」と命名し, 平成 31 年 1 月に豆乳ヨーグルト用の種菌セットとして株式会社井上天極堂より商品化を行った. 乳酸菌の健康機能性は様々知られているが, 本乳酸菌についてどのような機能があるのか今後検討を行う予定である. また, 豆乳ヨーグルト以外の利用・商品化も並行して実施予定である.

参考文献

- 1) Gilliland, S. E., Speak, M. L., Nauyok, G. F. Jr, and Giesbrecht, F. G.; J. Dairy Sci., (61), 1-10, 1978
- 2) 高野俊明; 乳酸菌研究集談会編; 乳酸菌の科学と技術, 316-317, 学会出版センター, 1996
- 3) 瀧口隆一, 宮本真理, 望月栄輔, 鈴木豊, 景山良治, 飯野久保; 腸内細菌学雑誌, (11), 117-122, 1998
- 4) Yaeshima, T., Takahashi, S., Matsumoto, N., Ishibashi, N., Hayasawa, H., and Iino, H.; Biosci. Microflora, (16), 73-77, 1997
- 5) Gill, H. S., Rutherford, K. J., Prasad, J., and Gopal, P. K.; Br. J. Nutr., (83), 167-176, 2000
- 6) Matsuzaki, T., and Chin, J.; Immunol. Cell Biol., (78), 67-73, 2000
- 7) Perdigon, G., de Macias, M. E., Alvarez, S., Oliver, G., and de Ruiz Holgado, A. P.; Immunology, (63), 17, 1998
- 8) Hata, Y., Yamamoto, M., Ohni, M., Nakajima, K., Nakamura, Y., and Takano, T.; Am. J. Clin. Nutr., (64), 767-771, 1996
- 9) Kiessling, G., Schneider, J., and Jahreis, G.; Eur. J. Clin. Nutr., (56), 843-849, 2002
- 10) 鈴木チセ; 平成 20 年度農林水産省補助事業 (食料産業クラスター展開事業) 食品機能性評価マニュアル集 III 集, 41-48, (社) 日本食品科学工学会 2009
- 11) Odamaki, T., Yonezawa, S., Sugahara, H., Xiao, J., Yaeshima,

- T., and Iwashima, T. ; *Syst. Appl. Microbiol.*, (34), 429-434, 2011
- 12) 橋口健司, 長田裕子, 吉田睦子, 室伏陽, 北澤春樹 ; 日本乳酸菌学会誌, (22), 100-105, 2011
- 13) 益田時光, 善藤威史, 園元謙二 ; *Milk Science*, (59), 59-65, 2010
- 14) 福田健二, 浦島匡 ; 乳業技術, (60), 66-92, 2010
- 15) de Vuyst, L., and de Vin, F. ; Kamerling, H. ed. ; *Bacterial / Animal / Yeast Polysaccharides* ; 477-519, Elsevier Ltd. Oxford, 2007
- 16) Tsuda, H., and Miyamoto, T. ; *Food. Sci. Technol. Res.*, (16), 87-92, 2010
- 17) Maeda, H., Zhu, X., Suzuki, S., Suzuki, K., and Kitamura, S. ; *J. Agric. Food Chem.*, (52), 5533-5538, 2004
- 18) Song, J. O., Kim, T. J., and Kim, Y. H. ; *Kor. J. Food Sci. Anim. Res.*, (27), 538-542, 2007
- 19) Kim, Y., Oh, S., Yun, H. S., Oh, S., and Kim, S. H. ; *Lett. Appl. Microbiol.*, (51), 123-130, 2010
- 20) Kim, J. U., Kim, Y., Han, K. S., Oh, S., Whang, K., Y., Kim, J., N., and Kim, S. H. ; *J. Microbiol. Biotechnol.*, (16), 939-945, 2006
- 21) Kitazawa, H., Yamaguchi, T., and Itoh, T. ; *J. Dairy Sci.*, (75), 2946-2951, 1992
- 22) Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Kumano, N., Adachi, S., and Yamaguchi, T. ; *Anim. Sci. Technol.*, (62), 277-283, 1991
- 23) Chobot, S., Yu, H. L., de Leseleuc, L., Cloutier, D., von Calsteren, M. R., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M., and Oth, D. ; *Lait*, (81), 683-697, 2001
- 24) Suzuki, C., Kobayashi, M., and Kimoto-Nira, H. ; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (77), 2013-2018, 2013