

甘藷糖化液発酵適性の高い乳酸菌の選抜

高山 清子*¹・工藤 哲三*¹・小玉 誠*²

Selection of Suitable Lactic Acid Bacterium for fermentation of saccharized of Sweet Potato

Kiyoko TAKAYAMA, Tetsuzo KUDO and Makoto KODAMA

当県特産の甘藷を利用した乳酸発酵食品の開発を目指して、植物性乳酸菌の分離を行った。分離菌について各種選抜試験を行った結果、18株のホモ型乳酸発酵菌を選抜した。甘藷糖化液の発酵適性試験を行った結果、NBRCより入手した株では *Lactobacillus plantarum* (*Lb. plantarum*) と *Streptococcus thermophilus* が適していた。分離菌のうち甘藷糖化液乳酸発酵適性の高い4株について16S rDNA塩基配列解析により乳酸菌の同定を行った。その結果、*Lb. plantarum* 3株、*Lb. pentosus* 1株と同定された。また、乳酸発酵の進行に伴いACE阻害活性物質、 γ -アミノ酪酸 (GABA) が生成しており、その有用性を確認した。

キーワード：植物性乳酸菌、ホモ型乳酸発酵菌、甘藷糖化液、ACE阻害活性、 γ -アミノ酪酸 (GABA)

1 はじめに

乳酸菌は、乳製品や日本酒、ワイン、味噌醤油、食酢、漬物などの発酵食品の製造に利用される微生物であり、近年その有用性から大きな注目を集めており、特に、植物性乳酸菌は動物性乳酸菌よりも栄養条件の厳しい条件下で生育することができる何らかの環境適応能力を持っているのではないかと、盛んに研究されている。

本研究では植物性乳酸菌に注目し、当県特産の甘藷を利用した乳酸発酵食品の開発を目指して、甘藷糖化液乳酸発酵適性の高い乳酸菌の分離、選抜、同定を行った。また、乳酸発酵した甘藷糖化液のアンジオテンシンI変換酵素 (ACE) 阻害能の測定、アミノ酸分析をおこない、その有用性の評価を行った。

2 実験方法

2-1 乳酸菌の分離

分離源の植物や漬物を滅菌した0.05%トリトンX液で抽出し、抽出液をMRS平板培地に塗抹し、嫌気ジャーを用いて30℃で2、3日培養を行った。

2-2 乳酸菌の選抜・保存¹⁾

簡便法を用いてグラム反応試験、カタラーゼ試験を行った。グラム反応試験は3%水酸化カリウム水溶液1滴に新鮮な菌苔1白金耳量取ってよくかき混ぜた。持ち上げたとき粘性をもって糸を引くものをグラム陰性、サラサラと溶解して糸を引かないものをグラム陽性と判定した。カタラーゼ試験は菌体を白金耳でかき取り、3%過酸化水素水を滴下した。このとき、菌体から気泡を発生するものを陽性、発生しないものを陰性とした。その他、有機酸分析による乳酸の定量、顕微鏡による形態観察、培養液のアルコール測定を行い、ホモ型乳酸発酵菌を選抜した。選抜した乳酸菌はMRS高層培地に穿刺培養し冷蔵保存したもの、グリセリンに溶かして-80℃で保存したものの2種類で保存した。冷蔵保存のものは、2~3ヶ月保存可能であるが生酸力の強いものは1~2ヶ月で接種しなおす必要がある。

2-3 甘藷糖化液の発酵試験

Lactobacillus plantarum (*Lb. plantarum*) (NBRC NO.15891), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (NBRC NO.3427), *Streptococcus thermophilus* (NBRC NO.13957), *Lactobacillus acidophilus* (NBRC NO.13951), *Lactobacillus*

*1 応用微生物

*2 食品開発部

casei subsp. *casei* (NBRC NO.15883), *Leuconostoc lactis* (NBRC NO.12455) と分離した乳酸菌 5 株を用いて、甘藷糖化液の発酵試験を行った。調製した甘藷糖化液に乳酸菌を添加して、30℃16時間発酵させた後、pH、酸度、有機酸分析を行った。

2-4 甘藷糖化液乳酸発酵の経時変化測定

Lb. plantarum (NBRC NO.15891) を用いて 5、9、15、20、25、30、40 時間後の pH の測定及び有機酸分析を行った。

2-5 乳酸菌の同定

分離した乳酸菌の同定を行うために DNA を抽出し、PCR 法により 16S rDNA 遺伝子配列を増幅した後、Cycle Sequence を行い、ABI Prism310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems 社) により塩基配列を解析した。同定は、既知微生物の標準塩基配列データベースと比較検討し、乳酸菌の同定を行った。

2-6 アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害能の測定

甘藷糖化液であらかじめ *Lb. plantarum* (NBRC NO.15891) を前培養し、その一定量を本培養液に移して、6、24、32、48 時間後の pH と ACE 阻害活性の測定を行った。また、分離した乳酸菌を用いて、乳酸発酵後甘藷糖化液の ACE 阻害活性の測定を行った。すべての ACE 阻害活性の測定は、0.45 μm フィルターろ過したものを試料とし、堀江ら²⁾の方法に準じて行った。

2-7 乳酸発酵に伴う甘藷糖化液中のアミノ酸変化

乳酸菌は多くのアミノ酸を生合成により得ることができないため、窒素源としての蛋白質を効率的に利用するための蛋白質分解系を備えてるといわれている。試料は 2-6 と同じ処理をし、アミノ酸分析計 (HITACHI L-8800) を用いて、遊離アミノ酸を測定した。

2-8 乳酸菌及び乳酸発酵後甘藷糖化液の凍結乾燥

MRS 液体培地 100ml にそれぞれ LA-19、LA-24 の前培養液入れ 30℃ で 2 日間培養した。遠心分離 (3000rpm, 20分) で集菌後、0.05% トリトン X で洗浄した。集菌後、0.05% トリトン X を 1 ml 加え、

液体窒素中に 1 滴ずつ滴下したものをペレット状凍結品とした。これを凍結乾燥し、乳酸菌の凍結乾燥品を得た。同様に LA-19、LA-24 を用いて乳酸発酵した甘藷糖化液に 20% のサイクロデキストリンを加えペレット状凍結品を作り、その後凍結乾燥したものを乳酸発酵後甘藷糖化液の凍結乾燥品とした。また、それぞれの凍結乾燥品について、乾燥前 1 ml 当りの乳酸菌数及び乾燥後 1 g 当りの乳酸菌数を求めた。

3 結果及び考察

3-1 乳酸菌の分離

植物の花や実、焼酎もろみ、味噌、漬物を分離源として乳酸菌の分離を試みた結果、MRS 培地にみられた白色や黄色の小さなコロニーを 33 個分離した。

3-2 ホモ型乳酸菌の選抜

乳酸菌選抜試験において、グラム陽性かつカタラーゼ陰性のものを純化し、18 個の乳酸菌を選抜した。また、その他の試験をおこないホモ型乳酸発酵菌を選抜した。今回は安全性の面から、韓国の伝統食品であるキムチ、京都で古くから作られ乳酸発酵によって保存性を保っているすぎき漬、我々が比較的良好に口にする糠漬けから分離した 5 つの分離菌を用いて甘藷糖化液の発酵試験を行った。

表 1 今回利用した乳酸菌

仮名	グラム	カタラーゼ	形態	分離源
LA-19	+	-	桿菌	糠漬け
LA-24	+	-	桿菌	キムチ
LA-25	+	-	桿菌	キムチ
LA-30	+	-	桿菌	すぎき
LA-27 (耐塩性)	+	±	桿菌	糠漬け

3-3 乳酸菌による甘藷糖化液発酵適性試験

Lb. plantarum (NBRC NO.15891), *Streptococcus thermophilus* (NBRC NO.13957) は発酵後の pH、酸度の値から甘藷糖化液の発酵に適していた。耐塩性培地で生育した乳酸菌を除いて、漬物から分離した乳酸菌 4 株も、甘藷糖化液

の発酵に適していることが分かった (表2、図1)。

3-4 甘藷糖化液乳酸発酵の経時変化

表2 甘藷糖化液の発酵試験

菌株 (NBRC NO.)	pH	酸度
糖化液	5.53	0.61
<i>Lb.plantarum</i> (15891)	3.82	3.56
<i>Lc.lactis subsp.cremoris</i> (3427)	4.09	2.05
<i>Stc.thermophilus</i> (13957)	3.98	3.16
<i>Lb.acidophilus</i> (13951)	5.89	0.76
<i>Lb.reuteri</i> (15892)	5.40	0.80
<i>Lb.casei subsp.casei</i> (15883)	4.18	2.46
<i>Leuc.lactis</i> (12455)	4.14	2.53
LA-19	3.83	3.54
LA-24	3.78	3.83
LA-25	3.76	3.92
LA-30	3.78	3.76
LA-27 (耐塩性)	5.19	1.03

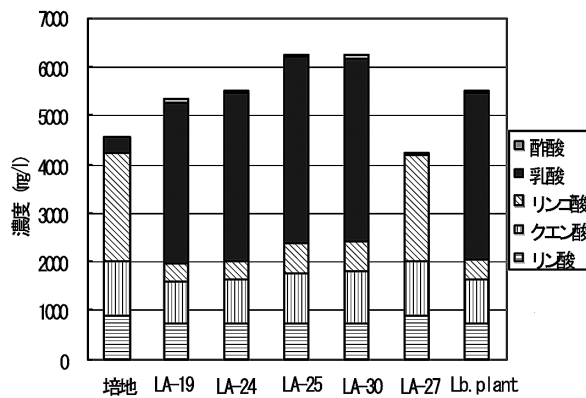


図1 甘藷糖化液乳酸発酵後の有機酸分析

5、9、15、20、25、30、40時間後のpHの測定及び有機酸分析を行ったところ、5～9時間でpHの低下、乳酸濃度の急上昇がみられた。また、40～50時間においても乳酸濃度の急上昇が確認された。5～9時間でリンゴ酸だけが減少したが、25～30時間ではリンゴ酸、クエン酸、リン酸が大きく減少した。わずかながら徐々に酢酸が生成され20～25時間以降大きな上昇がみられた (図2、図3、図4)。一般に *Lb.plantarum* はクエン酸代謝経路を有しているといわれており、クエン酸をクエン酸リアーゼによりオキサロ酢酸と酢酸に分解する。クエン酸の減少、酢酸の増加の時期が

ほぼ一致することから、約20～25時間以降クエン酸代謝経路が働いていると考えられる。³⁾

3-5 乳酸菌の同定

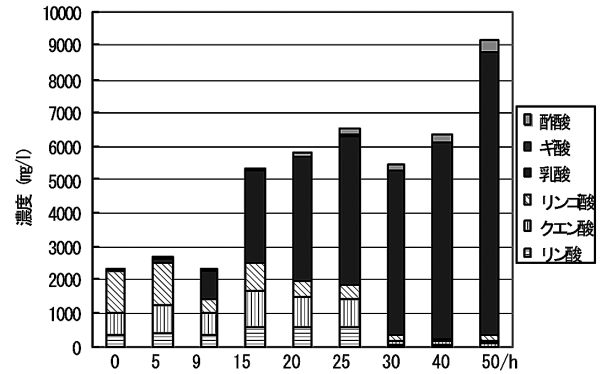


図2 乳酸発酵に伴う有機酸の経時変化

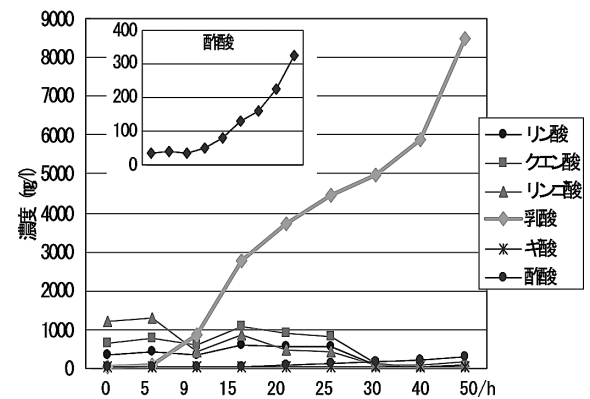


図3 乳酸発酵に伴う有機酸の経時変化

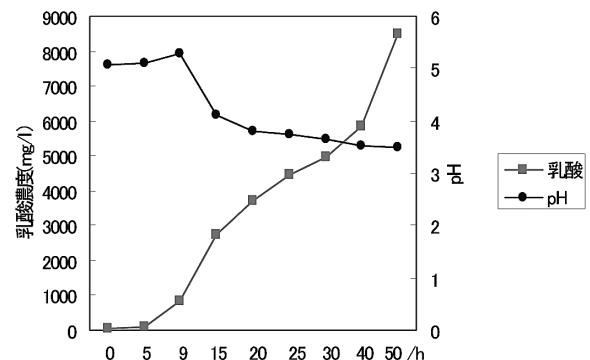


図4 乳酸濃度とpHの変化

分離した乳酸菌の16S rDNA塩基配列を解析し、検索を行った結果、糠漬け、キムチ、すぐき漬けから分離した乳酸菌は、*Lb.plantarum*と99%以上の相同性があった。また、キムチから分離した乳酸菌のうち1株は*Lb. pentosus*と99%以上の相同性があった(表3)。

3-6 各乳酸菌のACE阻害活性及び経時変化

表3 乳酸菌の同定結果

仮名	種	分離源
LA-19	<i>Lb.plantarum</i>	糠漬け
LA-24	<i>Lb. pentosus</i>	キムチ
LA-25	<i>Lb.plantarum</i>	キムチ
LA-30	<i>Lb.plantarum</i>	すぐき漬け

Lb. plantarum (NBRC NO.15891) と今回分離した乳酸菌で発酵させた甘藷糖化液のACE阻害活性の測定を行った。その結果、発酵前の糖化液ではACE阻害活性が50%前後であったのに対し、発酵後のACE阻害活性はいずれも80%前後と高い阻害活性を示した。また、*Lb. plantarum* (NBRC NO.15891) を用いてACE阻害活性の経時変化を測定したところ、ACE阻害活性の増加がみられた。発酵の進行に伴いACE阻害活性の増加が認められたことより、発酵によってACE阻害物質が生成されていることが推察された(図5)。乳酸発酵後に加熱処理をしたものについてもACE阻害活性に変化がなかったことから、プロテアーゼ等の影響でACE阻害活性が高くなったわけではないことが証明された。

3-7 乳酸発酵に伴う甘藷糖化液中のアミノ酸

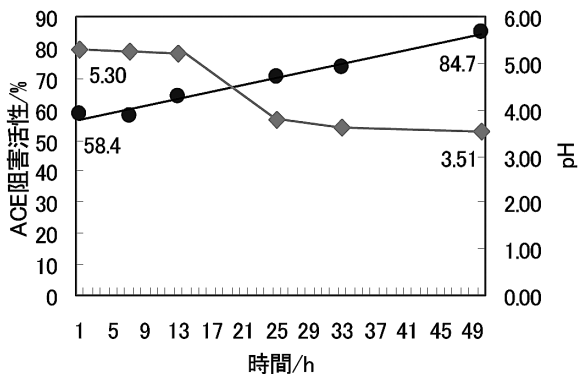


図5 ACE阻害活性及びpHの変化

変化

Lb. plantarum (NBRC NO.15891) で発酵させた甘藷糖化液のアミノ酸の経時変化の測定を行った。

その結果、9~20時間で多くのアミノ酸の減少がみられた。(Asp, Glu, Phe, Thr, Ser, Ala, Val, Ile, Leu, Tyr, Met, His, Arg)。シスチンとγ-アミノ酪酸(GABA)は発酵に伴う増加が確認された。(図6) また、分離乳酸菌について発酵後のアミノ酸分析を行った。その結果、同じ*Lb. plantarum*でありながらアミノ酸の増加、減少

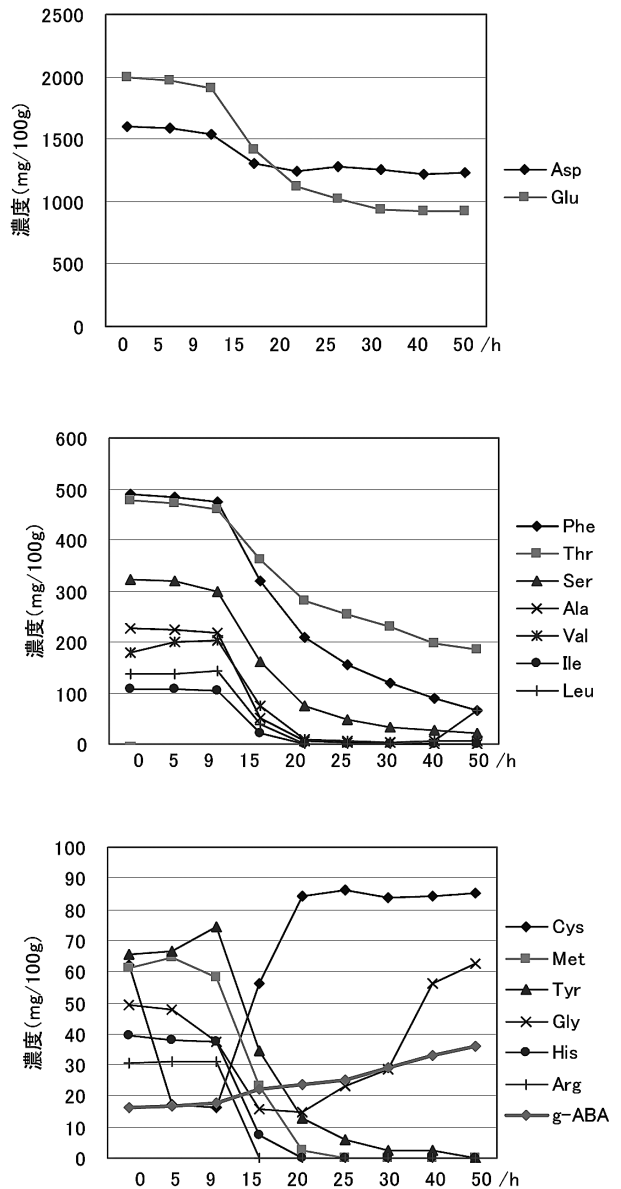


図6 乳酸発酵に伴うアミノ酸変化

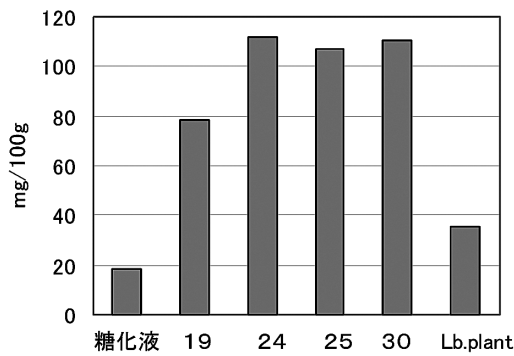


図7 各乳酸菌の乳酸発酵後のGABA濃度

の程度が異なっていた。今回分離した乳酸菌は、*Lb. plantarum* (NBRC NO.15891) の約3倍GABAを成した(図7)。

3-8 乳酸菌及び乳酸発酵後甘藷糖化液の凍結乾燥前後の乳酸菌数

乳酸菌の凍結乾燥品について乾燥前後の乳酸菌数を表4、乳酸発酵後甘藷糖化液の凍結乾燥品について乾燥前後の乳酸菌数を表5に示す。

表4 乳酸菌の凍結乾燥前後の乳酸菌数

	乾燥前 (個/1 ml)	乾燥後 (個/1 g)
LA-19	1×10^{12}	2×10^9
LA-24	2×10^{12}	1×10^{11}

表5 乳酸発酵後甘藷糖化液凍結乾燥前後の乳酸菌数

	乾燥前 (個/1 ml)	乾燥後 (個/1 g)
LA-19	6×10^9	8×10^6
LA-24	8×10^9	2×10^7

4 まとめ

- 1) 甘藷糖化液の乳酸発酵には、植物由来の乳酸菌が適しており、漬物、キムチから分離した乳酸菌は、甘藷糖化液の乳酸発酵に適していた。
- 2) 分離した乳酸菌は、16S rDNA塩基配列解析の結果、*Lb. plantarum* 3株、*Lb. pentosus* 1株と同定された。
- 3) ACE阻害活性の測定では、*Lb. plantarum* (NBRC NO.15891) 及び分離した乳酸菌とも80%前後の高い値を示した。また、発酵の進行に伴いACE阻害活性の増加が認められたことより、発酵によってACE阻害物質が生成されていることが推察された。
- 4) アミノ酸分析では、GABAが発酵の進行とともに増加していた。同じ*Lb. plantarum*でありながら分離した乳酸菌は*Lb. plantarum* (NBRC NO.15891) の約3倍のGABAの生成が確認された。
- 5) 分離乳酸菌及び乳酸発酵後の甘藷糖化液の凍結乾燥を試みた。乳酸菌保護物質を添加しなかったが、高い生存率の乾燥菌体を得られた。

5 参考文献

- 1) 小崎道雄、内村泰、岡田早苗 朝倉書店 乳酸菌実験マニュアル -分離から同定まで-
- 2) 食品の機能性マニュアル集(農林水産省農林水産技術会議事務局 1999) p117~121
- 3) 乳酸菌研究集談会編 学会出版センター 乳酸菌の科学と技術