

# 胃酸・胆汁酸耐性を有し米発酵に適した植物性乳酸菌の選抜とその特性

駒野小百合<sup>1</sup>・角谷智子<sup>2</sup>・小林恭一<sup>1</sup>・谷政八<sup>3</sup>

## Screening and Properties of the Plant Origin Lactic Acid Bacteria with Gastrointestinal Transit Tolerance and Appropriate for Fermentation of Rice

Sayuri KOMANO<sup>1</sup>, Tomoko KADOYA<sup>2</sup>, Kyoichi KOBAYASHI<sup>1</sup>, Masahachi TANI<sup>3</sup>

発酵食品および発酵食品製造工程の試料から分離した乳酸菌 120 株をもとに、胃酸耐性および胆汁酸耐性を指標として選抜を行い、両者の耐性を併せ持つ 10 株を選抜した。さらに、米を原料とした乳酸発酵への適性を評価し、発酵特性に優れる 1 株 (No.125) を選抜し FPL1 と命名した。FPL1 はラッキョウ甘酢漬け製造工程から分離した株であり、16S リボソーム RNA 配列の相同性検索や糖類発酵性試験から *Lactobacillus pentosus* に類縁の菌株と推測される。

米の麹糖化物を原料に FPL1 を使用して乳酸発酵することで、ヨーグルトに類似した米乳酸発酵食品を製造することができる。この発酵物は米を原料としているため脂肪分を殆ど含まず、また冷蔵庫で一カ月保存後も  $10^8$  cfu/ml 以上の生菌が含まれていた。

キーワード：乳酸菌，米，プロバイオティクス

## ．緒 言

米は日本人にとって古くから主食として欠かせない食品である。しかし、米の国民 1 人あたりの 1 年間についての供給純食糧（消費量）は減少傾向にあるため、米粉加工など米の新しい利用方法が検討され、米パンや米麺などが開発されている。

一方、近年、消費者の健康志向を反映して、乳酸菌の持つ機能性が注目されてきている。乳酸菌は「プロバイオティクス」として知られているように、整腸作用・免疫増強作用・発ガン抑制効果など人間にとって有益な働きをすることが知られている<sup>1)2)</sup>。市場ではこれらの保健機能を付加したヨーグルトや乳酸菌飲料など、様々な商品が見受けられる。これらの製品は、乳を原料とする発酵乳で、米などの穀類、果実、野菜を利用した製品はあ

まり例がない。しかし、乳酸菌は発酵乳だけでなく、漬物や味噌、醤油などの穀類や野菜の発酵にも多く関与しており、生育環境のちがいにより、植物性乳酸菌とよばれている<sup>3)</sup>。

そこで、米の需要拡大を図るために、米と保健機能を持つ乳酸菌を組み合わせた健康志向の新たな乳酸発酵食品を開発することを目的に、米発酵に適し、かつ、発酵物の特性（乳酸菌株の生存、風味、嗜好性）の良好な乳酸菌株の選抜を行い、さらに選抜種を使用し米乳酸発酵食品の開発について検討した。

## ．試験方法

### 1. 乳酸菌の選抜

#### 1) 供試菌株

保有している乳酸菌 120 株 (*Lactobacillus* 属 48 株, *Leuconostoc* 属 7 株, *Pediococcus* 属 6 株, *Enterococcus* 属 1 株, *Streptococcus* 属 1 株, 未同定 57 株, 合計 120 株) を GYP 高層培地から GYP 液体培地<sup>4)</sup>に移し、30 で 24 時間前培養したものをを用いた。

<sup>1</sup> 福井県食品加工研究所

<sup>2</sup> 現嶋田病院 (前仁愛女子短期大学)

<sup>3</sup> 現仁愛大学 (前仁愛女子短期大学)

## 2) 乳酸発酵の確認

以下の方法で乳酸発酵の確認・乳酸菌生菌数の測定を行った。

(1)pH pH MATER F52 (堀場製作所製) を使用し、試料に直接電極を入れて測定した。

(2) 滴定酸度 試料 2 ml にニュートラルレッドとプロムチモールブルーの混合指示薬 5 滴を加え、0.1 M 水酸化ナトリウムで滴定した。

(3) 乳酸菌数 GYP 白垂寒天培地<sup>4)</sup>を用い、混釈平板培養により 30 , 48 時間後にクリアゾーンを有するコロニーをカウントした。

(4) 乳酸菌生育の確認 分光光度計 U-2001 (日立製作所) を用いて、630 nm における濁度を指標とした。

## 3) 胃酸耐性・胆汁耐性を有した乳酸菌の選抜

### (1) 胃酸耐性

ワッセルマン試験管に無菌的に分注した人工胃液(100 mM HCl, 100 mM KCl, 0.04 % Pepsin) 4.5 ml に供試菌株プロスを 0.5 ml 加え、37 で 0, 1 および 2 時間処理した。各時間の処理液 10  $\mu$ l を取り GYP 液体培地 4.0 ml に接種し、30 , 20 時間培養後 OD 630 nm を測定した。また、この試験で濁度の上昇がみられた菌株について、さらに東ら<sup>6)</sup>および熊谷ら<sup>7)</sup>の試験方法で胃酸耐性を確認した。

### (2) 胆汁液耐性試験

無菌的に調製した 0, 0.1, 0.2, 0.3 および 0.4 % 胆汁未含有 GYP 液体培地 4.0 ml に供試菌株プロスを 4  $\mu$ l 接種し、一部 300  $\mu$ l ずつ 96 穴マイクロプレートに移しマイクロプレートリーダー IWAKI MICRO PLATE READER EZS-ABS (旭テクノクラス株式会社) に移し 30 , OD 630 nm を経時的に測定した。また残りを 30 22 時間で培養後 OD 630 nm と滴定酸度を測定した。

### 4) 米発酵に適した乳酸菌の選抜

うるち米粉(自家調製品) 0.2 g, グルコース 0.2 g, 脱イオン水 20 ml を 50 ml 容メジウム瓶に入れ、オートクレーブ滅菌後、前培養した供試菌株の乳酸菌 GYP プロスを 0.2 % 量添加し、30 で 2 日間発酵させ pH と官能評価(におい, 食味) で乳酸菌を選抜した。

さらに米麹糖化物での発酵適性を調査した。白米 150 g に水 370 ml を加えて炊飯後に約 60 の温湯 600 ml を加え、さらに市販米麹(株式会社米五製) 150 g を加え 55 14 時間保温した後に加熱殺菌を行い米糖化物

(甘酒) とした。これに前述と同様に乳酸菌プロスを添加して 2 日間発酵させ、滴定酸度, 乳酸菌生菌数, 官能評価(におい, 食味) を調査し 1 株に選抜した。

## 2. 選抜株の形質, 同定

乳酸菌実験マニュアル<sup>4)</sup>に従って、形質について検討した。なお 16S rDNA の全塩基配列は(株)テクノスルガ・ラボ(静岡県)に依頼した。

## 3. 米乳酸発酵試験

### 1) 温度別発酵試験

前述の米糖化物 2 1 に前培養した FPL1 の GYP プロスを 2 ml 加え、50 ml 容ファルコチューブに 30 ml ずつ無菌的に分注し、20 , 30 , 40 の各温度にて 0~36 時間保温し pH, 滴定酸度, 乳酸菌数の増加を調べた。

### 2) 初期添加量試験

24 時間前培養した FPL1 の GYP プロス 40 ml を生理食塩水で 2 回洗浄(2,000 rpm, 10 min)したあと、同量の生理食塩水で懸濁しスターターとして用いた。前述の米糖化物をメジウム瓶に 200 ml ずつ分注して殺菌し、それぞれスターターを 0.02 ml(0.01 %), 0.2 ml(0.1 %), 2 ml(1 %) 添加し、30 インキュベータ内で培養し、36 時間後まで乳酸菌数の増加を調査した。

### 3) 米乳酸発酵物の一般成分

栄養表示のための成分分析のポイント<sup>5)</sup> および日本食品標準成分表分析マニュアル<sup>6)</sup> に従い、以下の方法で一般成分の分析を行った。

(1) 水分 70 24 時間常圧加熱乾燥法を用いた。

(2) 灰分 250 で予備灰化後、550 で直接灰化法を用いた。

(3) タンパク質 窒素定量換算法(たんぱく質換算係数 5.95)を用いた。

(4) 粗脂肪 銅溶液を混合後、水酸化ナトリウムで水酸化銅とタンパク質および脂質を共沈させ、沈殿物をろ過乾燥後エーテル抽出法(ソックスレー抽出)により求めた。

(5) 炭水化物 差引き法により算出した。

## ．実験結果および考察

### 1. 乳酸菌の選抜

発酵食品中の乳酸菌がヒトに対して有益な「プロバイオティクス」として機能するために特に重要なのは、胃酸や胆汁を含む消化液に対して耐性があり、生菌状態で腸管に達することである<sup>9)</sup>。このため最初に胃酸耐性および胆汁耐性を指標としたスクリーニングを行った。

#### 1) 胃酸耐性・胆汁耐性菌株の選抜

通常、胃内消化物が完全に十二指腸に移送されるのに約2時間かかる<sup>10)</sup>ことから、胃酸処理時間は2時間とした。胃酸耐性の評価については、東らおよび熊谷らの方法(以下東・熊谷試験とする)が一般的であるが、同法は胃酸処理後の生存率を生菌数で評価しているため操作が煩雑で多検体をスクリーニングするのに困難である。本試験では生菌数測定の代わりに濁度を指標にして簡便化した。本法により胃酸耐性を有する株として120株中、29株を選抜した。

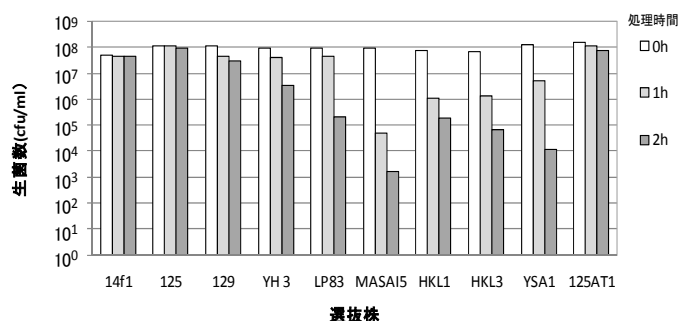
また、胆汁耐性については、Davenportが腸管内の胆汁濃度は最高値で2%と報告していることから<sup>11)</sup>、胆汁濃度2%に相当する胆汁未濃度である0.2%を中心に0%、0.1%、0.2%、0.3%および0.4%とした。試験の結果、保存株120株中胆汁耐性を有していると判断できる株は30株であった。

以上の結果から、胃酸耐性と胆汁耐性の両方を有している10株を選抜した。この10株の胃酸耐性について、東・熊谷試験の結果を第1図に示した。なお、この10株の中には、高濃度の胆汁下で多少生育が抑制される株もあるが、実用上問題になる程度ではないと判断している(第2図)

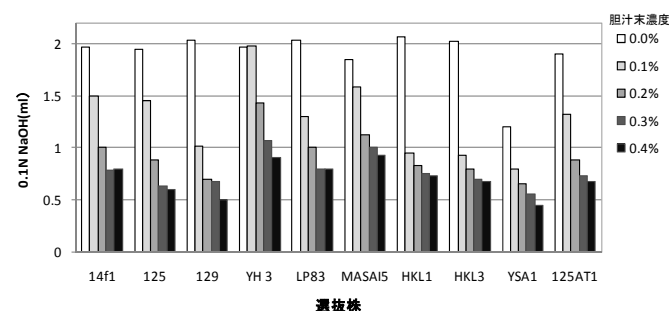
#### 2) 米の発酵に適した乳酸菌の選抜

米の発酵食品の開発に際しては、米を基質とした場合の発酵特性が重要となるため、耐胃酸性と耐胆汁性を有する選抜株10株中から、さらに米の発酵に適した乳酸菌の選抜を行った。

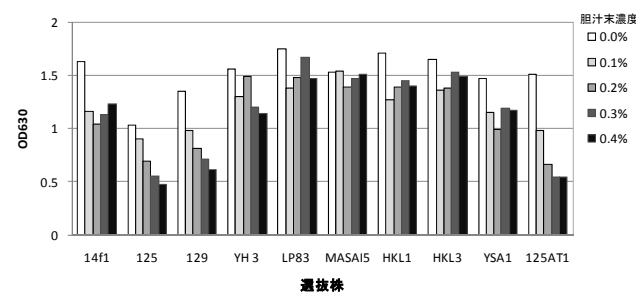
まず、米粉にグルコースを混合した液を使用し、供試菌株の発酵性を調査した。選抜はpHと官能評価を指標にした。なおについてはダイアセチル臭等乳酸菌の発



第1図 選抜株の胃酸耐性



2-1 胆汁濃度と乳酸生成



2-2 胆汁濃度と生育

第2図 選抜株の胆汁耐性

酵特有の異臭が少ないもの、食味はさわやかな酸味を有しえぐみ等を感じられないものを良いとした。第1表に示すように、乳酸発酵はYSA1株を除くすべての株で良好であり、官能検査を基準に14f1、No.125、YH3、HKL1、HKL3の5株を選抜した。

第1表 米発酵に適した乳酸菌の選抜

菌株 No.	pH	におい	食味	総合評価
14f1	3.26			
125	3.33			
129	3.15	×		×
YH3	3.28			
LP83	3.20		×	
MASA15	3.30			
HKL1	3.22			
HKL3	3.20			
YSA1	4.02	×	×	×
125AT1	3.26			

次に、選抜した5株について、麹で糖化させた米(甘酒)での発酵性を基準に選抜を行った。麹による米糖化物は乳酸菌の生育に非常に適し、どの乳酸菌も生育が良好で差が見られなかったが(第2表,第3表),麹由来の香りと乳酸菌の発酵臭が比較的強くなる傾向があり,官能検査で香りにくせの少ないNo.125を選抜した(第4表)。

第2表 pH, 酸度の変化

菌株 No.	pH		酸度(乳酸換算 mg/100g)	
	24時間後	48時間後	24時間後	48時間後
14f1	3.49	3.41	800	1100
125	3.53	3.31	710	1010
YH3	3.43	3.24	840	1190
HKL1	3.46	3.23	760	1150
HKL3	3.43	3.30	840	1150

第3表 米糖化物中の乳酸菌数の変化

菌株 No.	スタート時	24時間後	48時間後
14f1	$5.7 \times 10^5$	$7.9 \times 10^8$	$7.4 \times 10^8$
125	$1.1 \times 10^6$	$1.6 \times 10^9$	$1.2 \times 10^9$
YH3	$9.1 \times 10^5$	$5.6 \times 10^8$	$7.2 \times 10^8$
HKL1	$9.0 \times 10^5$	$2.1 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
HKL3	$5.2 \times 10^5$	$1.1 \times 10^9$	$1.3 \times 10^9$

(個/g)

第4表 乳酸発酵物の官能評価

	におい		食味	
	24時間後	48時間後	24時間後	48時間後
14f1	△	△	○	○
125	○	○	◎	◎
YH3	○	○	○	○
HKL1	○	△	○	○
HKL3	△	△	○	△

とても良い 良い 普通

## 2. 選抜株 No.125 の諸性質

選抜株 No.125 の形態的性状,生理学的性状,糖類発酵性については第5表のとおりであった。No.125 は中温性のホモ発酵乳酸桿菌で,生成乳酸はラセミ乳酸であった。

また,糖類発酵性についてはアラビノース,リボース,マンノース,マンニトール,ソルビトール,グリセロールの発酵が可能であった。また耐塩性を有していた。

第 5 表 No.125 の形質的性状，生理学的形状，糖類発酵性

分離源		ラッキョウ下漬け		
形質的 形状	細胞形態 運動性	桿菌 なし	胞子の有無 グラム染色性	なし 陽性
生理学的 形状	カタラーゼ	-	乳酸旋光性	DL + D
	ガス生産	-	細胞壁タイプ	meso-DAP
	発酵形式	homo		
	生育温度	15 + 20 + 30 +	40 45	+ W
糖類 発酵性	glucose	+	Na-gluconate	-
	L-arabinose	+	galactose	+
	D-ribose	+	rhamnose	-
	D-xylose	-	cellobiose	+
	fructose	+	maltose	+
	mannose	+	melibiose	+
	lactose	+	salicin	+
	sucrose	+	trehalose	+
	raffinose	+	merititors	-
	mannitol	+	Starch	-
sorbitol	+	inulin	-	
glycerol	+			
耐塩性	0%	+	7.5%	+
	3%	+	10%	-
	4%	+	12.5%	-
	6.5%	+		

+ : positive, - : negative, W : weak

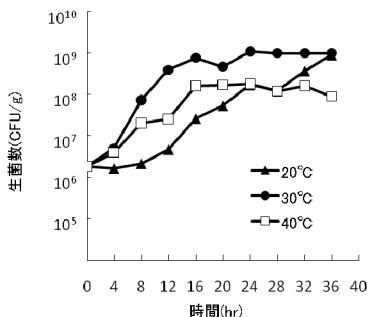
### 3. 遺伝学的特性

No.125 の 16S rDNA の塩基配列は *Lactobacillus pentosus* 及び *Lactobacillus plantarum* の 16S rDNA に対し、相同率 99.0 % 以上の高い相同性を示した。福井県はこの株を FPL1 (NITE P-691) として(独)特許微生物寄託センターに寄託した(以下 No.125 を FPL1 とする)。

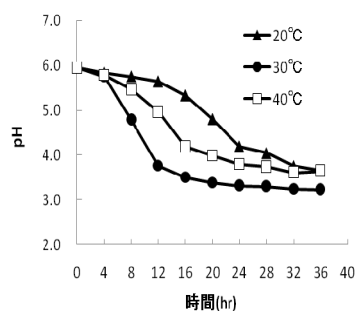
### 4. FPL1 の米糖化物発酵試験

FPL1 で効率よく米乳酸発酵を行うために、発酵温度および初期添加量について検討を行った。

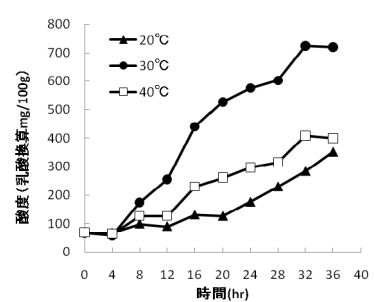
本菌株の至適温度である 30 で最も菌数の増加、pH 低下、酸度上昇がみられたが、20 および 40 でも 24 時間後には  $10^8$  CFU/g 以上と十分な菌数増加が確認できた(第 3 図、第 4 図、第 5 図)。



第 3 図 発酵温度別生菌数の増加

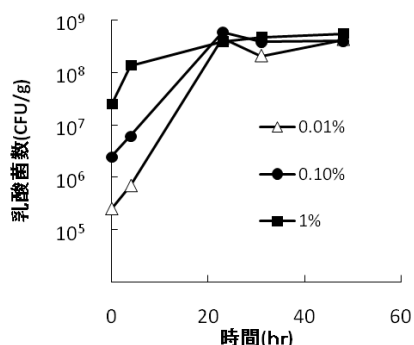


第 4 図 発酵温度別 pH の変化



第 5 図 発酵温度別乳酸生成量の変化

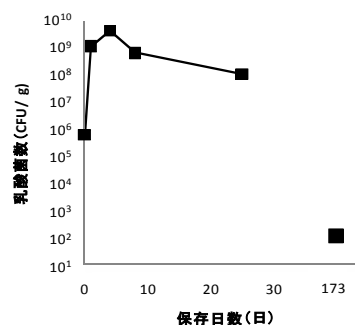
次に、FPL1 の初期接種量の違いによる菌数の増加の違いを調査したところ、初期添加量に関しては、液量で 0.01 % ( $2.0 \times 10^7$  CFU) と少量でも 22 時間後には 0.1 %、1 % 添加と変わらずに菌数が増加した(第 6 図)。これらの結果から、初期添加量は 0.01 % 以上で 30 加温が最も乳酸発酵が速やかに起こり、かつ、効率が良いと判断



第 6 図 初期接種量が乳酸菌数の増加に及ぼす影響

した。また、発酵時間を 16 時間以上とし pH 3.5 以下にしたものが味も優れていた。

なお、30 で 24 時間発酵させた米乳酸発酵物を冷蔵庫で保存し、生存率を調査したところ、30 日後でも  $10^8$  CFU/g が生存し、約半年(173 日)後も生存していた(第 7 図)。



第 7 図 保存中の乳酸菌数の変化

## 5. 米乳酸発酵物の一般成分

米 150 g、麴 110 g、最終容量 1 l の米麴糖化物を用い、FPL1 の GYP プロス 1/1000 量を添加して 17 時間乳酸発

酵を行い米乳酸発酵物の一般成分を調査した。第 6 表に示すとおり、発酵物は米を原料としているため粗脂肪はほぼ検出されず、ほとんどが炭水化物であった。

第 6 表 米乳酸発酵物の一般成分

水分 g/100g	灰分 g/100g	タンパク質 g/100g	粗脂肪 g/100g	炭水化物 g/100g	熱量 kcal/100g
78.3	0.1	1.5	0	20.1	86.5

米乳酸発酵に適した乳酸菌として選抜した FPL1 は 16S rDNA の同定結果でも *Lactobacillus pentosus* または *Lactobacillus plantarum* のいずれにも決定できなかったが、グリセロールを資化することから *Lactobacillus pentosus* の可能性が高いと推測<sup>12)</sup>している。

米麴糖化物内での生育は良好で、至適温度は 30 だが 20 ~ 40 でも十分生育した。ただし、乳酸菌添加前の米糖化物の殺菌が不十分だと雑菌汚染により異臭がつく場合があり、乳酸発酵は 30 以下にした方が乳酸の生成も速やかで、雑菌の繁殖も抑える可能性が高いと思われた。米乳酸発酵物は酸で凝固する成分を含まないため、発酵が進んでも液状である。色はやや黄色がかかった白で甘酒に似た外観だが、加熱時間が長くなりすぎ

ると褐変がすすんだ。しかし、乳酸発酵が進むと白さが増した。今回、プロバイオティクスとして有用な乳酸菌を選抜しているが、飲料として商品化するためには法規上殺菌過程が不可欠である。このため生きたままの乳酸菌を提供するためには、寒天等で固めた菓子としての提供が理想である。麴の香りを官能的に悪いと感じる人もいたが、フレーバー等の添加で改善が可能である。また、低温での保存により香りが変化し、保存が進むにつれて香り・味ともに良くなっていった。

なお、*Lactobacillus* sp. FPL1 (NITE P-691) と米乳酸発酵飲食品およびその製造方法に関しては、福井県から特許出願中である。

## 引用文献

- 1)引用文献乳酸菌研究集談会(1996).乳酸菌の科学と技術. 学会出版センター. p.311-333
- 2)細野明義(2002). 発酵乳の科学 - 乳酸菌の機能と保健効果 -. アイ・ケイコーポレーション
- 3)岡田早苗(2002). 植物性乳酸菌世界とその秘めたる可能性.日本乳酸菌学会誌 13. 23~35
- 4)小崎道雄(1992). 乳酸菌実験マニュアル - 分離から同定まで -. 朝倉書店.
- 5) (財)日本食品分析センター編(2007). 栄養表示のための成分分析のポイント.中央法規
- 6)安本教傳・竹内昌昭・安井明美・渡邊智子編集(2006). 五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル.建帛社
- 7)東幸雅・伊藤和徳・佐藤学(2001). *Lactobacillus gasseri* NY0509 および *Lactobacillus casei* NY1301 の人工消化液耐性並びに腸内有害菌抑制効果. 日本食科工誌 48. 656~663
- 8) 熊谷武久・瀬野公子・川村博幸・渡辺紀之・岡田早苗(2001).植物性乳酸菌の食品発酵性と食餌モデル培地における生育.日本食科工誌 48. 677~683
- 9) 磯部由香・松井宏樹・安見真帆・成田美代(2007).耐酸性を有する乳酸菌の検索.日本家政学会誌 58. 337~341
- 10) 武藤泰敏(2002). 消化・吸収-基礎と臨床-.第一出版. p.63
- 11) 武藤泰敏(1998). 新版 消化・吸収. 第一出版. p.131
- 12) Kandler, O., and Weiss, N., in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, "Vol.2, ed. by Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1229(1986)

## Screening and Properties of the Plant Origin Lactic Acid Bacteria with Gastrointestinal Transit Tolerance and Appropriate for Fermentation of Rice

Sayuri KOMANO , Tomoko KADOYA , Kyoichi KOBAYASHI , Masahachi TANI

### Summary

One hundred and twenty strains of lactic acid bacteria which were isolated from fermented food and process of making food , were tested for the survival of an artificial digestive juice. Ten strains which can live in both simulated gastric juice and medium containing bile were tested for the fermentation of rice. As the result, the plant origin lactobacilli "FPL1" was selected by the fermentation test and was useful as probiotics.

Moreover the making process of fermented rice by FPL1 were examined, the rice saccharified with Koji can be fermented food of well by FPL1, and became good taste.

This fermented food of rice is taste like yogurt, no fat, and beneficial for person of milk allergy.