

長崎乳酸菌ライブラリーを活用した加工食品の開発

食品・環境科	主任研究員	松本 周三
食品・環境科	科 長	河村 俊哉
食品・環境科	専門研究員	晦日 房和
食品・環境科	主任研究員	芋川 あゆみ
食品・環境科	主任研究員	玉屋 圭

食品製造企業

戦略プロジェクト研究「長崎県産物由来の植物性乳酸菌及び酵母を活用した加工食品の開発」（平成21～23年度）において、長崎県産の発酵食品や農産物から乳酸菌623株を分離した。得られた菌の食品に寄与する機能、例えば健康機能性、保存性、呈味性を調べることで有用微生物を獲得した。しかし、乳酸菌をより幅広い製品に対して使用したいという要望があるため、様々な原料及び複数菌での発酵条件検討等を行い、乳酸菌の高度利用、有効活用を行えるよう研究開発を進展させる必要がある。本研究では、まず乳酸菌の性質として重要とされる消化液に対する耐性を、人工の胃液、腸液を用いて調べ、生体内での生存率及び有用性が期待される菌株の選抜を行った。

1. 緒言

近年、メタボリックシンドローム等により医療費が増加する中、毎日の食事を通じて健康を維持していくことが重要とされる。県内食品業界においても健康機能に重点が置かれ、また、安心安全の観点から古来より利用される微生物による機能性の付加が望まれている。さらに、地域資源、未利用資源の利用に乳酸菌を含めた微生物の活用は有効であり、付加価値向上のための手段として研究開発が求められている。このことを受けて、平成21～23年度戦略プロジェクト研究「長崎県産物由来の植物性乳酸菌及び酵母を活用した加工食品の開発」を行い、県内で生産される発酵食品等から乳酸菌623株を獲得した。これら菌株の有機酸やアミノ酸産生能を調べ、有用と思われる菌をライブラリーとしてまとめた。しかし、乳酸菌をより幅広い製品に対して使用したいという要望があるため、菌株の特徴をより詳細に調べ、ライブラリーの充実を図るとともに、様々な原料及び複数菌での発酵条件検討等を行い、乳酸菌の高度利用、有効活用を行えるよう研究開発を進展させる必要がある。

そこで得られた乳酸菌の中から、分離源の異なる株や有機酸、アミノ酸の産生に特徴がある株を選抜し、人工胃液、腸液への耐性を調べた。乳酸菌の消化液に対する耐性は、生菌としての腸内での健康機能を期待する際に求められる特徴の一つと言える。

また、人工消化液耐性試験に供した菌株の遺伝子解析を行い、菌種の同定を行った。

2. 実験方法

2.1 乳酸菌の人工消化液耐性試験

熊谷ら^[1]及び中川ら^[2]の報告を参考に人工胃液(胃酸)耐性試験及び人工腸液(胆汁酸)耐性試験を10菌株について行った。

2.1.1 胃液耐性試験

MRS液体培地5 mlに各乳酸菌を植菌し、37℃、嫌気条件下で24時間培養した。ペプシンを加えたMRS液体培地4.5 mlに、24時間培養後の乳酸菌懸濁液を0.5 ml加えた。MRS液体培地は懸濁液添加時、6 M 塩酸を加えpH 2.5及び3.0、ペプシン終濃度0.32%になるよう調製した。懸濁液添加後37℃でインキュベートし、0、1、2、3、6時間後の生菌数を測定した。生菌数の測定にはMRS寒天培地を用いた。

2.1.2 腸液耐性試験

0.2 μmのフィルターで滅菌ろ過した胆汁末溶液を、終濃度0、0.2、0.4%になるよう加えたMRS液体培地4.9 mlに、25%パンクレアチン液0.05 ml、上記、胃酸耐性試験により人工胃液処理(pH 3.0、37℃、3時間)した乳酸菌懸濁液0.05 mlを加えた。37℃でインキュベートし、48時間後までの600 nmのODを測定し、増殖の様子を調べた。

2.2 乳酸菌の同定

乳酸菌をMRS培地 1 mlで37℃、48時間嫌気培養し、

5,000×g で遠心し菌体を回収した。TEN(TE beffer -0.1 M NaCl)で2回洗浄し、bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (GEヘルスケア社製)を用いてTotal DNAを調製した。

16S rRNA をコードする1500 bpの遺伝子は、各0.5 μM の27f primer (forward)、1525r primer (Reverse)を用いて^[3] Takara EX Taq 酵素で反応した。反応条件は、ABJ社のサーマルサイクラーモデル9700を用いて96℃、5分、96℃、30秒、58℃、20秒、72℃、90秒を30サイクル、72℃、4分を行い、4℃で冷却した。

反応物を1.5%低融点アガロース(プロメガ社製、タイプLMP)に供し、電気泳動後1500 bpに相当するDNAバンドを切り出した。アガロースからのDNAの溶出はMiniElute Gel Extraction Kit (キアゲン社製)を用いて行った。

得られたDNAの sequence は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (ABJ社製)を用いて、primerはforward側5'より27f、fE1L、f2L、f2L'、f3L、f4Lの6種類、一方Reverse側は5'より1525r、r4L、r3L、r2L'、r1L、rE1Lの6種類を使用した。反応条件は、96℃、2分、96℃、10秒、50℃、5秒、60℃、4分を25サイクル、4℃で冷却した。

反応物をエタノール沈殿、Hi-Di Formamide 溶解、熱処理を行い、サンプルをGenetic Analyzer 310 (ABJ社製)に供した。ForwardおよびReverseからの配列を各々繋ぎ、GenetexソフトウェアによりReverse配列をcomplementary配列に置き換えてForward配列と一致するのを確認した。

最終的に決定したDNA配列を基にDNA Data Bank of Japan (DDBJ) のBlastを用いてホモロジー検索することにより菌株の同定を行った。

3. 結果及び考察

pH 3.0の人工胃液処理においては、処理後3時間までに乳酸菌生菌数の急激な減少は見られなかった。図1にpH 2.5の人工胃液処理時間と乳酸菌生菌数の一例を示した。消化物が胃を通過するまでに、比較的早いもので2-3時間程度と言われているが、3時間後における生菌数が初発菌数の70%以上を示した菌株が10菌株中2菌株見られた。

図2に胆汁末濃度ごとの培養液のOD、つまり乳酸菌の増殖曲線の一例を示した。胆汁末濃度が0.4%のとき、24時間後までにODが0.8程度まで上昇し、良好な増殖を示した菌は6菌株で、半数以上が胆汁酸に耐性を有することが明らかとなった。

上記、胃液に強い耐性が見られた2菌株も併せて胆汁酸耐性を有しており、生菌として腸まで到達し、腸内で増殖する可能性を有していることが示唆された。また、それらの菌が*Lactobacillus plantarum*等の植物由来乳酸菌であることが明らかとなった。

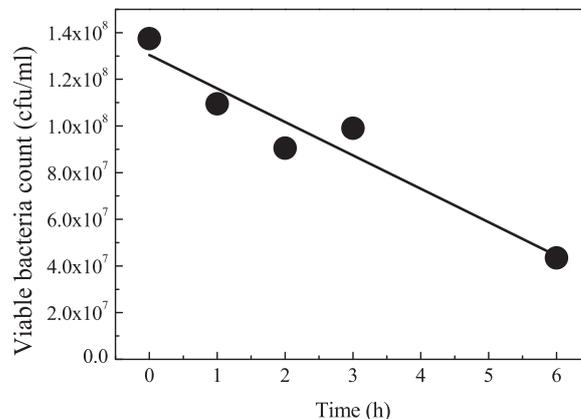


図1 人工胃液処理時間と乳酸菌生菌数

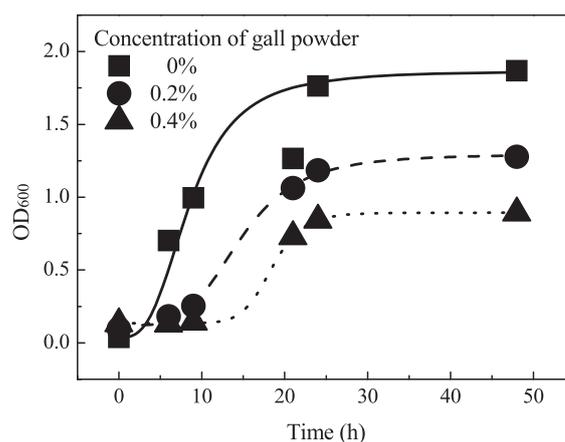


図2 人工腸液処理時間と乳酸菌培養液のOD

4. 結言

人工消化液耐性試験を行った10菌株のうち2菌株が胃液、胆汁酸両方に対して耐性が見られた。これらの菌は健康機能性が期待され、食品加工への展開が期待される。今後は農水産物への加工特性に関する試験を行い、加工食品への応用が可能か検討を行う。

参考文献

- [1]熊谷武久, 他, 日本食品科学工学会誌, Vol. 48, No. 9, pp. 677-683 (2001)
- [2]中川良二, 他, 日本食品科学工学会誌, Vol. 52, No. 3, pp. 140-143 (2005)
- [3]篠田吉史, 他, 島津評論, Vol. 57, No. 1-2, pp. 121-132 (2000)