

乳酸菌ライブラリーの構築に関する研究

バイオ系チーム 和田 潤, 泊 直宏, 高阪 千尋,
清野 珠美, 廣岡 青央, 山本 佳宏

要 旨

微生物は菌株それぞれが唯一無二であり、昨今、有用な微生物そのものが生物資源として価値が再認識されている。本研究では乳酸菌を研究対象とする。乳酸菌は長年にわたりヨーグルトや漬物などの発酵食品に広く用いられ、人にとって非常に身近で安心なものである。さらに、近年、多くの乳酸菌がプロバイオティクス（ヒトの健康に好影響を与える生細菌）として注目を集めている。

京都では微生物の力を借りてつくられた多くの発酵食品（飲料含む）が市場に出回っている。しかしながら、商品（発酵食品）の品質を大きく左右する微生物の保管・管理は、大手企業を除けば多くの事業所で十分には行われていない。そこで、将来的に発酵食品製造において新製品の開発や品質管理に寄与すべく、研究所オリジナルの乳酸菌コレクション、即ち、乳酸菌ライブラリー構築を目指して乳酸菌の単離を発酵食品等から行った。その結果、300株以上の菌株のストックを構築した。

1. はじめに

我々は古くから多くの発酵食品を製造し、食してきた。それゆえにヨーグルトや漬物など、多くの発酵食品に用いられる乳酸菌も我々にとって非常に馴染みがあり、安心なものである。乳酸菌は、ブドウ糖（グルコース）などの糖質を分解利用（代謝）して乳酸を生成する細菌類の総称である。乳酸菌の糖質の代謝は2種類の代謝経路に分類され、消費された糖質の全てを乳酸に変換するホモ乳酸発酵と乳酸の他にエタノールと二酸化炭素などを生成するヘテロ乳酸発酵がある¹⁾（図1）。

乳酸菌が多くの発酵食品に用いられる所以は、乳酸菌が代謝産物として酸を生産し、食品保存や製品の旨味を引き出す効能を有しているからである。

さらに、近年、乳酸菌はプロバイオティクス（ヒトの健康に好影響を与える生細菌）としても注目を集めており²⁾、その効能も免疫賦活、整腸作用、抗腫瘍性、抗炎症性、抗アレルギー効果、血清コレステロール低下作用など実に幅広いものである³⁾⁻⁶⁾。実際、乳酸菌関連商品が多く含まれる健康食品市場は2013年に2兆円以上が見込まれる規模に到達しており、6000億円以上のトクホ（特定保健用食品）市場においても乳酸菌関連が3500億円以上を占める。即ち、乳酸菌は先述の食経験に基づいた“身近”や“安全”というイメージとともに“健康”というイメージも有している。

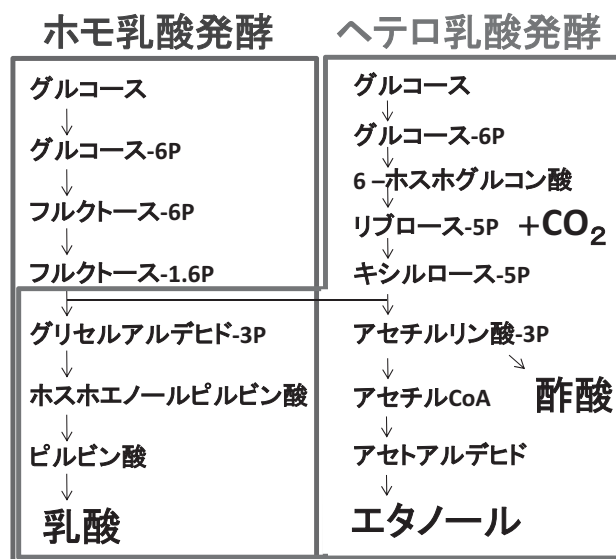


図1 乳酸菌の糖代謝経路
乳酸菌による糖質の代謝経路は生成物が乳酸のみか乳酸以外も生成するかどうかによってホモ乳酸発酵とヘテロ乳酸発酵に分類される。

古くから京都では微生物の力を借りてつくられた多くの発酵食品（飲料含む）が市場に出回っている。発酵食品（飲料含む）の製造における主役は発酵過程を担う微生物であり、商品の出来や品質を大きく左右する。しかしながら、大手企業を除けば菌株レベルで発酵の基となる微生物（乳酸菌）を管理している事業所は少ない。従って、新製品開発や品質の安定化を検討

するにあたって特徴ある有用菌の保有は重要である。現在、乳酸菌としては亜種も含めれば、既に400種以上にもものぼる属種が同定かつ分類されているが、同属種の菌株同士でも株が異なれば、当然のことながら異なった性質を有している。即ち、未だに、多くの単離・同定されていない未知の有用菌の存在が考えられる。

そこで、良い発酵食品等を作るために必要な良い微生物を提供する目的で、多くの発酵食品（飲料含む）が市場に出回る京都において、乳酸菌の単離及び収集を行った。微生物は菌株それぞれが唯一無二であり、今日、有用な微生物そのものが生物資源として価値が再認識されている。研究所オリジナルの多様で特徴ある乳酸菌のコレクション、即ち、乳酸菌ライブラリーの構築を目指して菌株の単離方法や保管方法を検討し、生育性について調べたので報告する。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

本研究において単離した乳酸菌及び比較として属種の同定された独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター（NBRC）の乳酸菌を用いた。

2.2 乳酸菌の培養方法

乳酸菌はMRS培地（DIFCO）、ロゴサ寒天培地（Oxoid）、そしてBCP 加プレートカウントアガール（ニッスイ）の3種類を用いて30℃で静置培養を行った（表1）。ロゴサ寒天培地とBCP加プレートカウントアガールは常に固体培地として用いた。MRS培地は液体培地もしくは固体培地として用い、固体培地として用いる時には液体培地の組成（表1）に終濃度で1.5%と

なるように寒天を添加した。培養時間は菌体の増殖から判断し、数日培養を行った。嫌気培養を行う時は脱酸素、炭酸ガス発生剤としてアネロパック（三菱ガス化学）を用いた。

2.3 乳酸菌の保管方法（グリセロールストック）

MRS液体培地を用いて培養した培養液と滅菌 50%グリセロールを7:3の比率で混合したものを凍結チューブに分注し（グリセロール濃度15%）、-80℃で凍結保管した。

2.4 乳酸菌の単離

漬物、キムチ、チーズなどの乳酸菌が存在する可能性の高い品をおよそ1g量りとり、滅菌生理食塩水を5～10ml添加して均一になるように混合したものをサンプルとした。クリーンベンチの中で無菌的に操作し、2.2項の培地を用いて培養を行った。

2.5 乳酸菌の生育性試験

生育性試験はMRS 液体培地を用いて培養を行った。培養後、培養液を96穴マイクロプレートに分注し、xMark マイクロプレートリーダー（Bio-Rad）を用いて濁度（吸光度600nm）を測定し、菌の生育の指標とした。

3. 結果と考察

3.1 乳酸菌の単離

本研究で単離する乳酸菌は将来的には食品等に用いるので、単離源としても食経験などがあり、安全性が高いものを選択した。主に京都市で製造、販売されて

表1 培地

MRS培地 (1L 55 g 中)		ロゴサ寒天培地(1L 82 g中)		BCP加プレートカウントアガール (1L 24.7 g中)	
プロテアーゼペプトン	10.0 g	トリプトン	10.0 g	酵母エキス	2.5 g
肉エキス	10.0 g	酵母エキス	5.0 g	ペプトン	5.0 g
酵母エキス	5.0 g	ブドウ糖	20.0 g	ブドウ糖	1.0 g
ブドウ糖	20.0 g	Tween 80	1.0 g	Tween 80	1.0 g
Tween 80	1.0 g	リン酸二水素カリウム	6.0 g	レーシステイン	0.1 g
クエン酸アンモニウム	2.0 g	クエン酸アンモニウム	2.0 g	ブロムクレゾールパープル	0.06 g
酢酸ナトリウム	5.0 g	酢酸ナトリウム(無水)	17.0 g	寒天	15.0 g
硫酸マグネシウム	0.1 g	硫酸マグネシウム	0.575 g		
硫酸マンガン	0.05 g	硫酸マンガン	0.12 g		
リン酸二カリウム	2.0 g	硫酸第一鉄	0.034 g		
		寒天	20.0 g		

おり、製造過程に乳酸発酵を含み、乳酸菌が存在する可能性の高い食品等を収集し、乳酸菌の単離を試みた(表2)。

表2 単離を試みた分離源

分離源	原材料
塩漬け	ハクサイ、スグキ菜、赤カブラ
塩漬け	スグキ
塩漬け	キャベツ
塩漬け	ゴボウ
しば漬け	ナス、シソ
しば漬け	ナス、ミョウガ、キュウリ、シソ、ウリ
しょうゆ漬け	キュウリ、ウリ、ダイコン、シソ
しょうゆ漬け	スグキ菜
ぬか漬け	水ナス
ぬか漬け	キュウリ
ぬか漬け	スグキ
ぬか漬け	黒ミヅナ、生姜
ぬか漬け	ダイコン
キムチ	ハクサイ
キムチ	キュウリ、ダイコン
キムチ	ダイコン、ニンジン
奈良漬	ウリ
碁石茶	後発酵茶
清酒醪	米
清酒酒母	米
カマンベールチーズ	生乳
ケフィア	生乳
桜	花びら

他の菌の混入を防ぎ、乳酸菌だけを単離して、かつ、多様な乳酸菌を取得するために培養および単離には実験方法の項に先述した3種の培地を順番に用いることとした(図2)。予備実験から、すべての培養条件を30℃、静置で嫌氣的に行った。ロゴサ寒天培地で1回とMRS寒天培地で2回シングルコロニーを釣菌し、菌の単一化をはかった。単一化した菌はグリセロールストックを作製し、-80℃で凍結保管した。

単離源によっては、乳酸菌が単離できなかったものもあったが、多種類のサンプルから多数の乳酸菌を取得できた。30℃で静置培養後、多くの乳酸菌が白色の少し光沢のあるコロニーを形成した。ロゴサ寒天培地への植菌は100μl一定としたが、サンプルによっては数十しかコロニーを形成しないものも有れば、数百コロニー形成するものもあった。中には、乳酸菌がコロニー形成せずにプレート一面に生育したものもあり、その場合は全体的に生育した菌をかきとってMRS寒天培地に何度か画線してシングルコロニーを形成させた。この様に分離源とした発酵食品の種類や発酵の度合いによって乳酸菌の数に違いが出ていることが示唆され

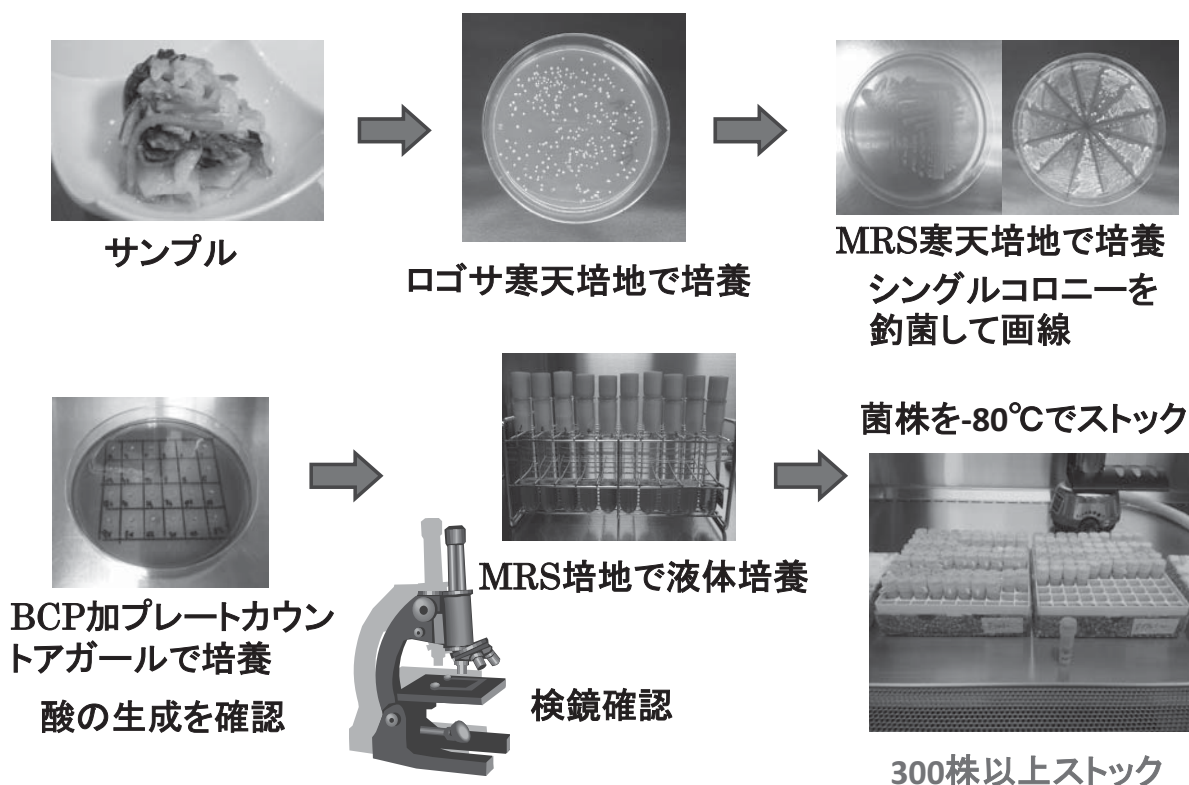


図2 菌株ストックまでの工程
数種類の培地を用いて、複数回培養を行うことによって単一菌株を取得し、-80℃で菌株を保存した。

た。また、特徴的な菌株ライブラリーを構築するために、シングルコロニーを釣菌する時にはコロニーの大きさなどが違うものなどを優先的に選択した。

BCP加プレートカウントアガールは酸(乳酸)の生成を確認するために用いた。静置培養後、全ての菌の周辺が黄色に変色し、酸の生成が確認された。コロニーの観察時にコロニーの形態や大きさが乳酸菌と異なるものがいくつか出現した。培養後、顕微鏡で観察した

結果、乳酸菌と同様に発酵食品に多く用いられる酵母であることが示唆され、誤って単離された酵母については除外した。乳酸菌を選択的に拾い一つも多様な菌株ライブラリー構築を目的としているので、乳酸球菌の単離も試みた。ロゴサ寒天培地のpHを本来よりは高めに設定した結果、顕微鏡観察において本ライブラリー中に球菌も観察された。本研究において300株以上の菌株のストックを構築した(図2)。

表3 使用菌株

番号(試料)	番号(菌株)	菌株(属種)	分離源
1	NBRC107147	<i>Lactobacillus brevis</i>	Human feces
2	NBRC15883	<i>Lactobacillus casei</i>	Cheese
3	NBRC106101	<i>Lactobacillus concavus</i>	Walls of a distilled spirit fermenting cellar
4	NBRC107129	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Pickled Chinese cabbage
5	NBRC13953	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Bulgarian yogurt
6	NBRC15885	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Fermented beets
7	NBRC107160	<i>Lactobacillus nodensis</i>	Japanese pickles
8	NBRC107152	<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	Sourdough
9	NBRC101973	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Mash of manju-dough for Japanese traditional cake
10	NBRC101974	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Mash of manju-dough for Japanese traditional cake
11	NBRC101975	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sunki-zuke, non-salted fermented vegetable (green leaves)
12	NBRC109604	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
13	NBRC15891	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Wine
14	NBRC109618	<i>Lactobacillus rapi</i>	Pickled cabbage
15	NBRC15892	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Sunki, traditional Japanese pickles
16	NBRC3425	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Intestine of adult
17	NBRC3541	<i>Lactobacillus sakei</i>	
18	NBRC107130	<i>Lactobacillus sakei</i>	Pickled Chinese cabbage
19	NBRC15893	<i>Lactobacillus sakei</i>	"Moto" starter of sake
20	NBRC103853	<i>Lactobacillus senmaizukei</i>	Pickles

番号(試料)	番号(菌株)	分離源	番号(試料)	番号(菌株)	分離源
21	F101	漬物(スグキ)	55	F1001	漬物(スグキ)
22	F102	漬物(スグキ)	56	F1002	漬物(スグキ)
23	F103	漬物(スグキ)	57	F1003	漬物(スグキ)
24	F104	漬物(スグキ)	58	F1004	漬物(スグキ)
25	F201	ケフィア	59	F1101	清酒醪
26	F202	ケフィア	60	F1102	清酒醪
27	F203	ケフィア	61	F1103	清酒醪
28	F204	ケフィア	62	F1104	清酒醪
29	F301	漬物(キャベツ)	63	F1201	漬物(スグキ)
30	F302	漬物(キャベツ)	64	F1202	漬物(スグキ)
31	F303	漬物(キャベツ)	65	F1203	漬物(スグキ)
32	F304	漬物(キャベツ)	66	F1204	漬物(スグキ)
33	F401	キムチ(ハウサイ)	67	F1301	キムチ(キュウリ)
34	F402	キムチ(ハウサイ)	68	F1302	キムチ(キュウリ)
35	F403	キムチ(ハウサイ)	69	F1303	キムチ(キュウリ)
36	F404	キムチ(ハウサイ)	70	F1304	キムチ(キュウリ)
37	F501	漬物(ナス)	71	F1401	清酒醪
38	F502	漬物(ナス)	72	F1402	清酒醪
39	F503	漬物(ナス)	73	F1403	清酒醪
40	F504	漬物(ナス)	74	F1404	清酒醪
41	F601	チーズ	75	F1501	桜
42	F602	チーズ	76	F1601	漬物(ダイコン)
43	F603	チーズ	77	F1602	漬物(ダイコン)
44	F604	チーズ	78	F1603	漬物(ダイコン)
45	F701	漬物(ミズナス)	79	F1604	漬物(ダイコン)
46	F703	漬物(ミズナス)	80	F1701	キムチ(ダイコン)
47	F705	漬物(ミズナス)	81	F1702	キムチ(ダイコン)
48	F706	漬物(ミズナス)	82	F1703	キムチ(ダイコン)
49	F801	漬物(ミズナス)	83	F1704	キムチ(ダイコン)
50	F802	漬物(ミズナス)	84	F1801	漬物(キュウリ)
51	F901	漬物(キュウリ)	85	F1802	漬物(キュウリ)
52	F902	漬物(キュウリ)	86	F1803	漬物(キュウリ)
53	F903	漬物(キュウリ)	87	F1804	漬物(キュウリ)
54	F904	漬物(キュウリ)	88	F1901	漬物(ウリ)

3.2 乳酸菌の生育性試験

属種が判明している乳酸菌と本研究において単離された乳酸菌の中から代表的な菌株を用いて生育性試験を行った(表3)。 -80°C で凍結保管されたグリセロールストックからMRS液体培地に植菌し、 30°C で3日間、静置培養を行った。培養液 $100\mu\text{l}$ を96穴マイクロプレートにそれぞれ分注し、菌の生育の指標として濁度を測定した(図3)。MRS液体培地は栄養分が豊富で乳酸菌の培養において広く用いられる培地のため、試験に用いた全ての乳酸菌が増殖したが、増殖の度合いについては菌株によって違いが観察された。

属種の判明しているNBRC株を培養した結果、*Lactobacillus casei* (NBRC15883)、*Lactobacillus paralimentarius* (NBRC107152)、*Lactobacillus rhamnosus* (NBRC3425)、そして、*Lactobacillus plantarum* の5種(NBRC101973, NBRC101974, NBRC101975, NBRC109604, NBRC15891)が高い生育能を示した。一方、*Lactobacillus senmaizukei* (NBRC103853)の生育能は低いことが示唆された。本研究で単離した菌株については、F101株, F104株, F1201株, F1202株, F1203

株などスグキ由来の菌株が高い生育能を示した。その他の菌株についても異なった濁度をそれぞれ示したことから、本研究の単離工程で多様な菌種が取得できたことが示唆された。

4. まとめ

我々の生活のまわりには多くの発酵食品が存在し、京都市においても多くの事業所が清酒などの飲料も含んだ発酵食品の製造に携わっている。これら発酵食品は微生物の生命活動の結果として作りあげられる生産物であり、当然のことながら製品の品質を微生物が大きく左右する。良い発酵食品もしくは商品化のコンセプトに合致した製品製造を可能にするためには、適した性能を有した微生物を用いる必要がある。本研究における菌株ライブラリーの構築はこのような現状を踏まえて、本菌株ライブラリーから優れた菌株を提供することにより、京都市内外の食品製造などの事業所での新製品開発や品質管理に寄与しようとするものである。そのためには、選りすぐりの優秀な菌株を提供できるように豊富で多様な菌株ライブラリーを構築す

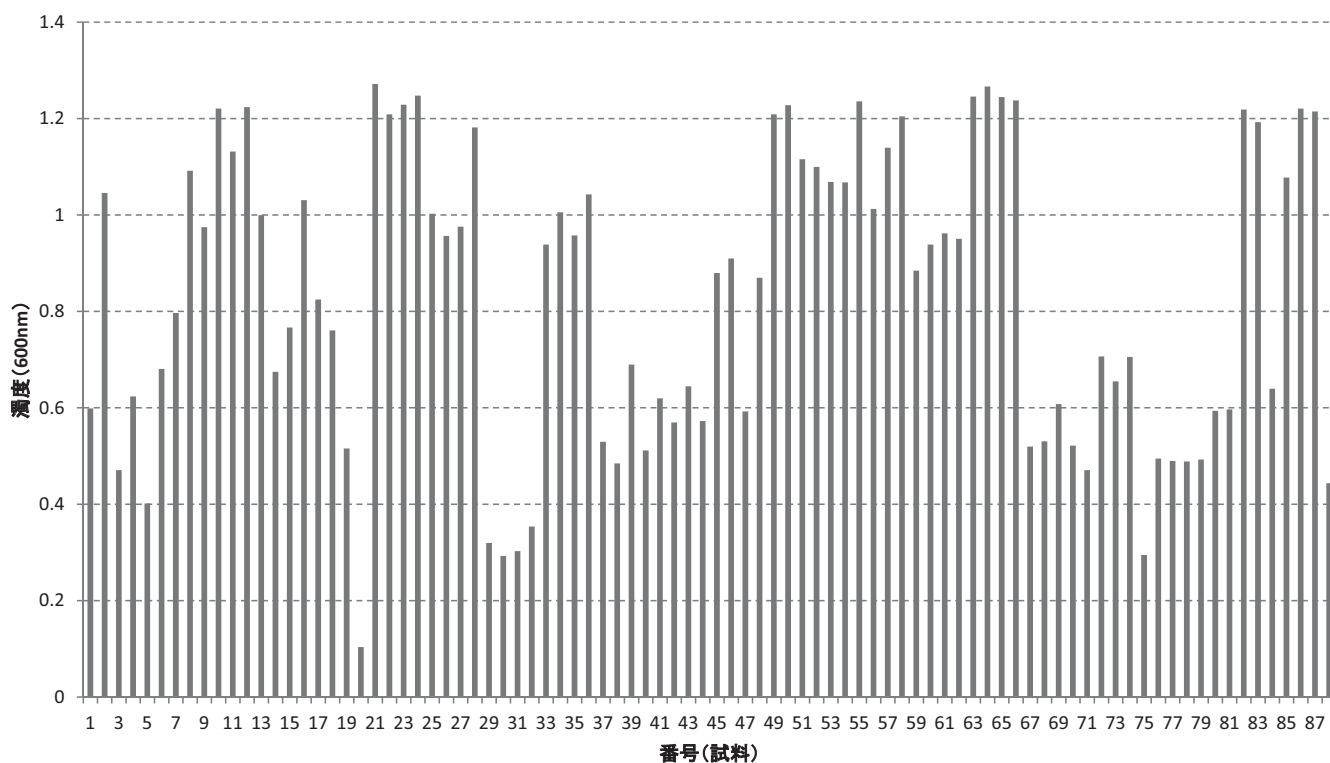


図3 乳酸菌の生育性試験
MRS培地を用いてNBRCから購入した菌株と本研究で単離した菌株を培養した。濁度を測定して菌株の生育能を評価した。番号(試料)は表3の菌株をそれぞれ示す。

る必要がある。

そこで、本研究では多くの発酵食品に乳酸菌が関与していることから、乳酸菌に限定し、京都市で製造・販売されている発酵食品などから300株以上の乳酸菌を単離し、グリセロールストックとして-80℃に保管した。今後、本菌株ライブラリーの更なる拡大、そして充実化を図るのは当然として、使用目的に応じた菌の選抜を行っていく。その一環として栄養成分や温度などの様々な条件での生育性試験のみならず、耐塩性、耐酸性、アルコール耐性そして代謝産物などの生化学的諸性質をそれぞれの菌株で調べて、特質を把握してカタログ化することによって、製品ごとの様々な要望に的確に応えられるようにする。更には、それらの分析の結果から菌株の特質を抑えることにより、発酵工程に関して品質管理を容易にすることができる。

また、本研究で取り扱った乳酸菌はプロバイオティクスとしても大変注目されている。本菌株ライブラリーから免疫学的にも優秀な菌株や、腸管接着能などの乳酸菌の効能を効率良く働かせるための特別な機能を有している菌株⁷⁾を取得できるかもしれない。更に、今日、DNAシーケンサーの発達もあり、多くの乳酸菌の遺伝子情報が公開されている⁸⁾。結果、特徴的な表現型の候補因子の選抜や、実際に特定のタンパク質の機能性を調べるのが容易になってきており、想像もできないような有用な因子を発見する可能性もある。本菌株ライブラリーは将来的に多くの効用が期待できるとともに、独創的な製品開発を支援する重要なツールとしての展開が期待できる。

8) Oksana Lukjancenکو et al.: *Microb. Ecol.*, **63**, 651 (2012)

参考文献

- 1) 乳酸菌研究集談会 編, "乳酸菌の科学と技術", p. 89, 学会出版センター (1996)
- 2) Gregor Reid et al.: *Clinical Microbiology Reviews*, **16**, 658 (2003)
- 3) Yosuke Kikuchi et al.: *PLoS ONE*, **9**, e86416 (2014)
- 4) Kan Shida, Koji Nomoto: *Indian J. Med. Res.*, **138**, 808 (2013)
- 5) H. Dong et al.: *Clinical and Experimental Immunology*, **161**, 378 (2010)
- 6) Roberto Berni Canani et al.: *Pharmaceuticals*, **5**, 655 (2012)
- 7) 山本憲二, 和田潤: *生化学*, **73**, 382(2001)