

I－1. 沖縄における乳酸菌の収集と特性評価

畜産試験場
加工部微生物利用研究室

木元 広実

I－1. Collection and Characterization of Lactic Acid Bacteria in Okinawa

Hiromi KIMOTO

Department of Animal Products, National Institute of Animal Industry,
Tsukuba Norin-danchi, P.O.Box 5, Ibaraki 305-0901, Japan

1. 目的

乳酸菌により醸成される発酵乳を始めとする乳製品の生理的効用（整腸作用，血清コレステロール低下作用など）については，近年の消費者の健康志向を反映して世界的に関心が高まってきている。このような効用については，近年「プロバイオティクス」（腸内微生物のバランスを改善することによって宿主動物に有益に働く微生物添加物）という概念が導入されており，世界中でプロバイオティック機能を有する乳酸菌の探索が行われている。

沖縄地方は我が国で唯一亜熱帯地域に属し，気候的にも歴史的にも独特の文化を有している。沖縄地方独特の風土が育んだ食品のなかには様々な性質の乳酸菌が存在する可能性がある。従って本事業では，発酵食品，サイレージなどから乳酸菌を分離し，乳酸菌が腸内でプロバイオティクスとしての機能を発揮するために必須な条件である腸内生残性（胆汁酸耐性，低 pH 耐性）の評価を行った。

2. 収集の概要

沖縄島，石垣島，宮古島にてサイレージ，牧草，漬け物の収集を行った（表 1，図 1）。サイレージ，牧草については，採取後ただちに無菌袋に入れ，低温（約 5℃）で保冷し，研究室に搬送した。漬け物については，市場で袋詰めのまま購入したものはそのまま保冷し，家庭で漬けた漬け物（国際農林水産業研究センター沖縄支所内，沖縄県庁内）は入手後，無菌袋に入れ，保冷し，研究室に搬送した。

3. 収集成果

1) 方法

(1) 乳酸菌の分離

サンプル 1 g を 9 ml の 0.85 % NaCl にけん濁し、適当な濃度に希釈後、0.8%の炭酸カルシウムを添加した MRS (Difco, USA) 寒天培地に塗末し、嫌気培養 (30℃, 24 時間) 後、クリアゾーンをつくるコロニーを釣菌した。分離した菌株は同定試験、特性評価試験まで 15%グリセロール添加 MRS 液体培地にて - 80℃ で保存した。

(2) 同定試験

分離した菌株の同定は小崎¹⁾らの方法にて行った。即ちグラム染色にて陽性の菌株について、形態観察、カタラーゼテスト、生育温度試験 (10℃ 及び 45℃)、食塩耐性試験 (6.5%濃度)、生育 pH 試験 (pH9.6)、ガス産生試験、生成乳酸の旋光性判別試験 (DL- 乳酸キット, Boehringer Mannheim, Germany) を行い、属名を決定した。さらに BBL のキット (Boehringer Mannheim) 及び API20 (bioMérieux, France) を用いて、糖の発酵性試験、生化学性状試験を行い、種名を決定した。

(3) 胆汁酸耐性試験²⁾

まず M17 (Difco) 液体培地及び GM17 (M17 に 0.5%のグルコースを添加) 液体培地 5ml に滅菌済みの Bactooxgall (脱水胆汁, Difco) を 0.3% (v/v) になるように添加した培地を準備した。各液体培地に 30℃で 18 時間培養した乳酸菌体を接種し、腸管内の温度に合わせ 37℃で培養した。24 時間後、菌の増殖を Spectronic 20 spectrophotometer (Bausch & Lomb, Rochester, NY) で測定した。脱水胆汁無添加の培地での増殖をコントロールとした。

(4) 低 pH 耐性試験³⁾

30℃で 18 時間培養した乳酸菌体を遠心分離 (4℃, 1840 × g, 10 分間) にて集菌し、1N の塩酸にて pH2.5 及び pH6.5 に調製した 0.85% 食塩水にけん濁後、37℃ のウォーターバス中で 30 分間保温した。生存している菌数は、プレートコロニーカウント法にて測定した。即ちこの乳酸菌けん濁液を MRS 寒天培地に段階希釈して塗末し、培養後、出現したコロニー数を測定した。pH 6.5 の食塩水にけん濁した場合の生残率をコントロールとした。

2) 成果

(1) 乳酸菌の分離

沖縄島において、漬け物 23 点から 156 株、サイレージ 4 点から 40 株、牧草 4 点から 41 株を分離した。石垣島及び宮古島では、漬け物 18 点から 31 株、サイレージ 5 点から 28 株を分離した (計 296 株)。

(2) 同定

グラム染色後の形態観察により、桿菌は 187 株、球菌は 109 株であった。

プロバイオティクスとして世界的に研究が進んでいるのは、*Lactobacillus* 属の乳酸桿菌であり、*Lactococcus*, *Leuconostoc* などの乳酸球菌については、これまでプロバイオティクスとしての評価はほとんど行われてこなかった。しかし、特に *Lactococcus* 属乳酸菌は、乳酸菌 12 属のなかでも安全性が高く、また、乳製品製造において重要な役割を果たしており、プロバイオティクスとしての性質が見出されれば、新しいプロバイオティック食品の開発が期待できる。従って今回は特に *Lactococcus* 属乳酸菌の取得を中心に行い、プロバイオティクスとしての特性評価を行った。

球菌 109 株について生育温度等の試験を行い、27 株の *Lactococcus* 属乳酸菌を取得した (表 2)。

分離源の内訳は、漬け物から 15 株、牧草から 12 株であった。

(3) *Lactococcus* 属乳酸菌の胆汁酸耐性及び低 pH 耐性

M17 及び GM17 の 2 種類の培地における *Lactococcus* 属乳酸菌の胆汁酸耐性を表 3 に示した。GM17 培地において、供試株すべてで胆汁酸耐性が認められたが、M17 培地では胆汁酸耐性は認められず、*Lactococcus* 属の胆汁酸耐性は増殖培地により異なっていた。

胆汁酸耐性に優れた *Lactococcus* 属乳酸菌のうち、2 株について低 pH 耐性試験を行った（表 4）。酸が細菌の殺菌効果を示すのは、pH2.5 以下であるとされている⁴⁾が、G46, G47 株は両株とも pH2.5 において、適度の生残率を示した（5.3-6.0 log cfu/ml）。

(4) 漬け物から分離した乳酸菌の胆汁酸耐性

Lactococcus 属乳酸菌以外の分離乳酸菌についても胆汁酸耐性試験を行ったところ、36 株中 24 株が胆汁酸耐性を有しており（表 5）、漬け物の発酵に関係する乳酸菌には、胆汁酸耐性に優れた乳酸菌株が多数存在することが示された。

4. 所感

乳酸菌は自然界に幅広く存在しており、生乳や発酵乳製品中に存在するもの（ミルク系の乳酸菌）、動物・昆虫の消化管に生息するもの（腸管系乳酸菌）、植物の発酵や傷ついた果実などに関係するもの（植物系の乳酸菌）の 3 つに分類される⁵⁾。今回収集した乳酸菌は、漬け物、サイレージ発酵などに関わる植物系の乳酸菌であった。植物系の乳酸菌の分離に際しては、発酵食品中に共存する酵母、カビ、好気性の細菌が分離の妨げになる場合があるが、今回の分離作業においては特にこれらの微生物が妨げになることはなかった。しかし、今回の収集では漬け物 41 点のうち 25 点からはまったく乳酸菌が分離できなかった。これらの多くは土産物として販売されているパパイヤやゴーヤの漬け物であった。

乳酸菌のプロバイオティクスとしての機能についての研究は、腸管系の乳酸菌を用いた研究が主流であり、植物系乳酸菌に関する研究は少ない⁵⁾。今回分離した植物由来の *Lactococcus* 属乳酸菌の胆汁酸耐性については、増殖培地により違いは見られたものの、分離株すべてが胆汁酸耐性を示し、プロバイオティクスとして重要な性質を有していた。またこれらは植物由来であるが、牛乳中でも生育することが出来、乳製品製造に利用できる可能性がある。引き続きプロバイオティクスとして有効な他の性質についても検討していく予定である。

5. 謝辞

今回の収集にあたり、ご多忙にもかかわらず筆者の探索収集活動を支援して頂きました方々に心よりの謝意を表します。特に、沖縄島におきましては、(株)トロピカルテクノセンターの伊良部忠男研究開発部長、石垣島では、国際農林水産業研究センター沖縄支所作物保護研究室の河野勝行主任研究官、宮古島では、沖縄県宮古農業改良普及センターの親里真理子技師に大変お世話になりました。ここに記して改めて深く感謝いたします。ありがとうございました。

6. 参考文献

- 1) 小崎道雄 (1992) 乳酸菌実験マニュアル. 朝倉書店, 東京. P32.
- 2) Kimoto, H., Ohmomo, S., Nomura, M., Kobayashi, M. and Okamoto, T. (2000) Milchwissenschaft 55: 245-249.
- 3) Mayra-Makinen, A., Manninen, M. and Gyllenberg, H. (1983) Journal of Applied Bacteriology 55: 241-245.
- 4) Maffei, H. V. L. and Nobrega, F. J. (1975) Gut 16: 719-726.
- 5) 熊谷武久・瀬野公子・渡辺紀之・岡田早苗 (2000) 日本食品化学工学会誌 47: 551-554.

Summary

In the late summer of 1999, exploration and collection of lactic acid bacteria were conducted in Okinawa. A total of 296 lactic acid bacteria were isolated from fermented vegetables, silage and grass. Out of the strains, 27 strains were identified as *Lactococcus* strains. Among them, 14 strains were identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on the basis of phenotypic tests. *Lactococcus* strains were examined their probiotic properties, such as tolerance to low pH and bile. All strains tested could tolerate bile. Two strains tested, G46 and G47, had a moderate survival rate for 30 min at pH2.5. Results of this investigation reveal that bile and acid tolerant strains naturally occur and survive on fermented foods. It is of great interest and importance to further examine their beneficial effects on human and animal health.

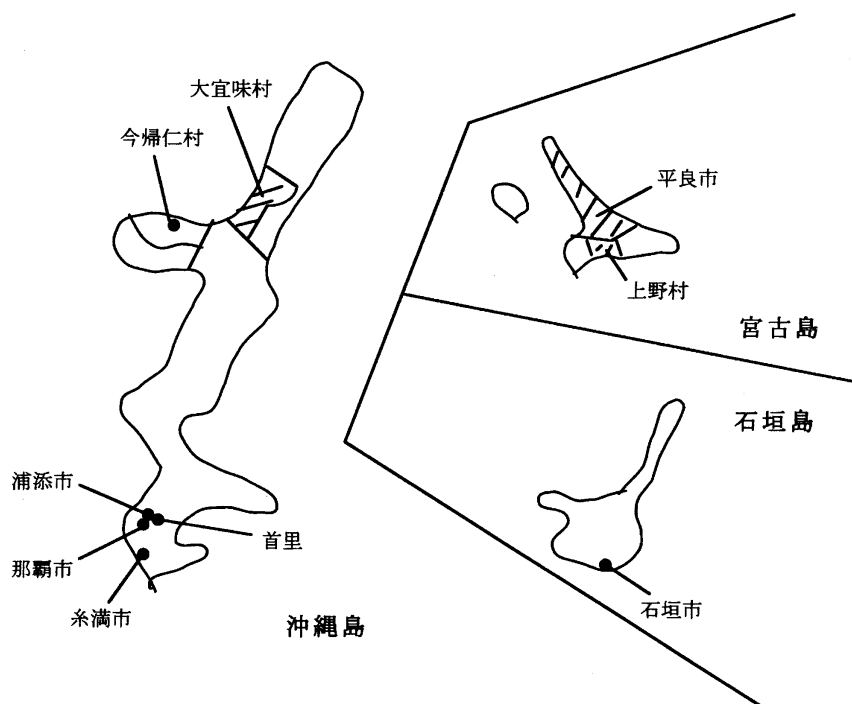


図1 沖縄における探索・収集場所

表1 沖縄地方における乳酸菌収集の日程表

年月日	行 程	行 動 内 容
H11.8.25	つくば～宮古島	移動
H11.8.26	宮古島内	沖縄県宮古農業改良普及センター訪問，センター内にて漬け物採取，上野村にてサイレージを採取
H11.8.27	宮古島～石垣島 石垣市内	宮古空港にて試料採取 国際農林水産業研究センター沖縄支所訪問，支所内及び市内にて漬け物採取
H11.8.29	石垣島～沖縄島	移動，那覇市内にて漬け物採取
H11.8.30	那覇市内 浦添市，糸満市，首里	沖縄県庁訪問，県庁内にて漬け物採取， (株)トロピカルテクノセンター訪問，各市町村にて漬け物，サイレージ採取
H11.8.31	今帰仁村，大宜味村	沖縄県畜産試験場訪問，場内にて牧草，サイレージを採取，大宜味村にてサイレージ採取
H11.9.1	沖縄～つくば	移動

表2 収集した *Lactococcus* 属乳酸菌の内訳

菌株整理番号	菌 名	採集場所	分離源
G46	<i>Lactococcus</i> sp.	今帰仁村	ネピアグラス
G47	<i>Lactococcus</i> sp.	今帰仁村	ネピアグラス
G48	<i>Lactococcus</i> sp.	今帰仁村	ネピアグラス
G50	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	今帰仁村	ネピアグラス
G51	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	今帰仁村	ネピアグラス
G53	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	今帰仁村	ネピアグラス
G55	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	今帰仁村	ネピアグラス
G56	<i>Lactococcus</i> sp.	今帰仁村	ネピアグラス
G60	<i>Lactococcus</i> sp.	今帰仁村	ネピアグラス
G61	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	今帰仁村	ネピアグラス
G62	<i>Lactococcus</i> sp.	今帰仁村	ネピアグラス
G65	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	今帰仁村	ネピアグラス
H45	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	宮古島	キムチナマコ
H46	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	宮古島	キムチナマコ
H47	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	宮古島	キムチナマコ
H48	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	宮古島	キムチナマコ
H49	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	宮古島	キムチナマコ
H50	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	宮古島	キムチナマコ
H51	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	宮古島	キムチナマコ
H52	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	宮古島	キムチナマコ
H53	<i>Lactococcus</i> sp.	宮古島	キムチナマコ
H54	<i>Lactococcus</i> sp.	宮古島	キムチナマコ
H55	<i>Lactococcus</i> sp.	宮古島	キムチナマコ
H56	<i>Lactococcus</i> sp.	宮古島	キムチナマコ
H57	<i>Lactococcus</i> sp.	宮古島	キムチナマコ
H58	<i>Lactococcus</i> sp.	宮古島	キムチナマコ
H60	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	宮古島	キムチナマコ

表3 収集した *Lactococcus* 属乳酸菌の胆汁酸耐性

菌株整理番号	M17 培地		GM17 培地	
	無添加	脱水胆汁添加	無添加	脱水胆汁添加
G46	1.98	—	2.10	1.90
G47	2.15	—	2.09	1.89
G50	1.91	—	1.41	1.94
G51	1.91	—	1.30	1.90
G53	1.98	—	0.88	1.90
G55	1.89	—	1.18	1.86
H45	1.65	—	0.90	1.70
H46	1.70	—	0.90	1.75
H47	1.90	—	0.82	1.84
H48	1.66	—	0.80	1.75
H49	2.00	—	1.00	1.75
H50	2.31	—	0.98	1.75
H51	1.91	—	1.08	1.80
H52	1.96	—	0.92	1.80
H60	1.90	—	0.80	1.78

37℃ で 24 時間培養後の吸光度 620nm の値を示した。

—, 増殖せず

表4 収集した *Lactococcus* 属乳酸菌の低 pH 耐性

菌株整理番号	生菌数 (log cfu/ml) *	
	pH6.5	pH2.5
G46	9.17	5.95
G47	9.22	5.30

* pH6.5 または pH2.5 に調製した食塩水に菌体をけん濁し, 37℃ で 30 分間保温後の生菌数

表5 分離した植物系乳酸菌の GM17 培地における胆汁酸耐性

菌株整理番号	胆汁酸耐性	分離源	採集地	菌株整理番号	胆汁酸耐性	分離源	採集地
D75	++	セロリ漬け物	浦添市	F12	—	きゅうりぬか漬け	那覇市
D76	—	セロリ漬け物	浦添市	F14	—	きゅうりぬか漬け	那覇市
D78	++	セロリ漬け物	浦添市	F17	—	きゅうりぬか漬け	那覇市
E1	+	セロリ漬け物	浦添市	F18	—	きゅうりぬか漬け	那覇市
E2	—	セロリ漬け物	浦添市	F19	++	きゅうりぬか漬け	那覇市
E13	—	白菜漬け物	浦添市	F29	++	からしな漬け	那覇市
E14	++	大根しば漬け	浦添市	F30	+++	キムチらっきょう	那覇市
E15	+++	大根しば漬け	浦添市	F32	+++	キムチらっきょう	那覇市
E16	—	大根しば漬け	浦添市	F33	++	キムチらっきょう	那覇市
E17	++	大根しば漬け	浦添市	F36	+++	キムチらっきょう	那覇市
E19	+++	大根しば漬け	浦添市	F39	+	キムチらっきょう	那覇市
E53	—	きゅうりぬか漬け	浦添市	F41	+	きゅうり塩漬け	那覇市
E58	++	きゅうりぬか漬け	浦添市	F42	++	きゅうり塩漬け	那覇市
E59	—	きゅうりぬか漬け	浦添市	F43	++	きゅうり塩漬け	那覇市
E62	++	きゅうり古ぬか漬け	浦添市	F45	++	きゅうり塩漬け	那覇市
E63	++	きゅうり古ぬか漬け	浦添市	F47	++	きゅうり塩漬け	那覇市
E64	+++	きゅうり古ぬか漬け	浦添市	F48	++	きゅうり塩漬け	那覇市
F10	—	きゅうりぬか漬け	那覇市	F49	—	きゅうり塩漬け	那覇市

—, 胆汁酸耐性なし +, 胆汁酸耐性あり (弱), ++ (中), +++ (強)

微生物の探索収集プロフィール



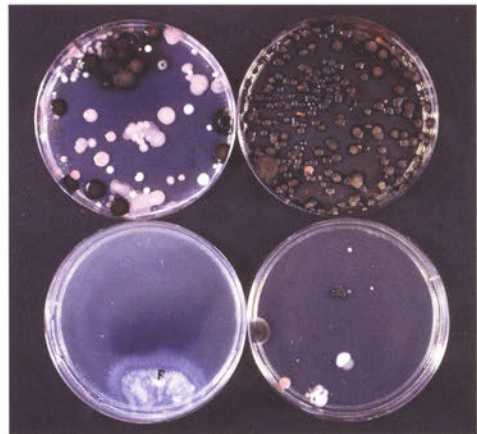
那覇市牧志市場・漬け物店（木元）



宮古島サイレージ採取（木元）



宮城県亶理郡亶理町の調査圃場（小板橋）



イチゴ葉からの葉面微生物の分離状況（小板橋）



サハリン Sokol 支所実験棟（写真中央）（吉田）



線虫の分離（机上のアイスクリームカップの中に土壌サンプルとハチノスツヅリガ幼虫が入っている。サハリン Sokol 支所にて）（吉田）