

脱脂乳へのアミノ酸添加が乳酸菌の酸生成に及ぼす効果

中 嶋 昭 正

(福岡女子短期大学)

平成7年10月5日受理

Effects of Amino Acids on the Acid Production of Lactic Acid Bacteria Added to Skim Milk

Akimasa NAKASHIMA

Fukuoka Women's Junior College, Dazaifu 818-01

The effects of various amino acids on the acid production of lactic acid bacteria were studied for nine strains of *Lactobacillus*, two strains of *Lactococcus*, and one strain of *Streptococcus*. The amino acids were added in 50-mg amounts to 100 ml of skim milk.

The type of inhibiting, stimulating or non-effective amino acid for acid production was different for each strain of lactic acid bacteria.

L-Cysteine and L-cystine stimulated 8 of the 9 strains of *Lactobacillus*, while inhibiting the *Streptococcus* strain used in this study.

Glycine stimulated to a small extent four strains of *Lactobacillus*, but inhibited one strain of this genus.

L-Aspartic acid, L-methionine, L-isoleucine, and L-leucine generally inhibited acid production.

The *Lactobacillus* and *Streptococcus* strains were stimulated by one or more of the amino acids used in the study, while 7 strains of *Lactobacillus*, and the *Lactococcus* and *Streptococcus* strains tested were inhibited by one or more of the added amino acids.

(Received October 5, 1995)

Keywords: amino acid アミノ酸, growth-stimulation 成長促進, growth-inhibition 成長阻害, lactic acid bacteria 乳酸菌, *Lactobacillus* ラクトバチルス, fermented milk 発酵乳.

1. 緒 言

著者は、脱脂乳に加えられた種々の動植物性材料による乳酸菌発育促進効果を明らかにするため、主として *Lactobacillus casei* subsp. *casei* S-1 (旧分類名 *Lact. acidophilus* S-1) と *Lact. casei* YIT-9018 を用い、一連の研究を行ってきた。その結果、アオノリ、アオサ¹⁾ や米胚芽^{2,3)} が著しい発育促進効果を示すことを見出し、これらに含まれる発育促進物質の一つが Mn であることを明らかにした。また、その際、Mn 以外にも何らかの有機物に発育促進効果があるのではないかと示唆した。

脱脂乳へのアミノ酸添加の上記2菌株の酸生成に及ぼす効果についてはすでに検討し、L-システイン、L-

シスチンが若干酸生成を促進することを明らかにした⁴⁾。さらに、他の乳酸菌に対するアミノ酸の酸生成に及ぼす効果について明らかにしたいと考え、既報⁴⁾で Mn の発育促進効果について調べた日本乳業技術協会の分譲菌7株および発酵研究所の2株と他の1株をとりあげ検討し、若干の知見を得たので報告する。

2. 実験材料および方法

(1) 試 料

L-アラニン、L-アルギニン塩酸塩、L-アスパラギン酸、グリシン、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン塩酸塩一水和物、L-ヒドロキシプロリン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン塩酸塩、L-メチオニン、L-フェ

ニルアラニン, L-プロリン, L-セリン, L-スレオニン, L-トリプトファン, L-チロシン, L-バリン, L-シスチン (以上特級相当品, 味の素(株)製), L-システイン (特級, 片山化学工業(株)製) を用いた。

(2) 供試菌株

日本乳業技術協会分譲菌の *Lact. helveticus* B-1, *Lact. acidophilus* L-54, *Lact. casei* subsp. *casei* L-14, *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B-5b, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 510, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 527, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H-61, および発酵研究所の *Lact. paracasei* subsp. *paracasei* IFO-3533, *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO-13953 を用いた。また, *Lact. casei* YIT-9018 (ヤクルト本社研究所より分譲されたもの), *Lact. casei* subsp. *casei* S-1 および *Lact. paracasei* subsp. *paracasei* S-2 (旧分類名 *Lact. bulgaricus* S-2) (以上2株: 九州大学農学部水産化学第二教室より分譲されたもの) も用いた。

(3) 使用培地

日本乳業技術協会分譲菌の *Lactobacillus* の4株は乾燥菌体を10%脱脂乳培地で培養し, 既報⁶⁾までと同じ保存培地で保存後, 前培養液で培養し, *Lactococcus* および *Streptococcus* の3株は10%脱脂乳培地で培養後前培養した。発酵研究所の2株は指定の培地(復水液: IFO 培地 No. 702, 復元培養液: IFO-3533, No. 804; IFO-13953, No. 803; 保存継体用培地 No. 205)⁷⁾ で培養後, 前培養した。

前培養培地は前報⁶⁾までと同じく, ペプトン-酵母エキス-ブドウ糖培地である。すなわち, 0.5 g のペプトン, 0.5 g の酵母エキス, 1.5 g のブドウ糖を水100 ml に溶解し, pH を6.8に調製した。ペプトンは片山化学工業(株)製, 酵母エキスは大五栄養化学(株)製である。

脱脂乳は前報⁶⁾までと同様に調製した。すなわち, 8 g の脱脂粉乳(雪印“スキムミルク”)と2 g のブドウ糖を水に溶解して100 ml とした。2倍濃度の脱脂乳は16 g の脱脂粉乳と4 g のブドウ糖を水に溶解して100 ml とした。いずれも pH 6.8 に調整した。

(4) 培養法

培養は前報⁶⁾までの方法に準じて行った。すなわち, 2倍濃度の脱脂乳10 ml を50 ml 容量の綿栓三角フラスコに入れ, これに10 mg のアミノ酸を含む水溶液10 ml を加え調製した。殺菌は卓上高速滅菌器“トーヨーシビマス SVS-20”(東洋製作所製)を用いて,

116~119℃, 20 分間行った。なお, 溶解度の小さい L-シスチン, L-チロシンについては, 50 ml の三角フラスコに10 mg 量を秤量して10 ml の水を加え, これに2倍濃度の脱脂乳10 ml を加え攪拌して用いた。

接種菌は前培養液を遠心分離後, 沈澱菌体を前培養液と同量の滅菌生理食塩水で懸濁して調製し, その0.2 ml を試験脱脂乳20 ml に加え, 各菌株ごとに所定の温度, 時間で培養した。

(5) 酸生成量の定量

培養後の脱脂乳の0.1 N NaOH 滴定値から, 培養前の脱脂乳の0.1 N NaOH 滴定値を差し引き, 得られた値を乳酸量に換算⁸⁾して酸生成量(g/100 ml)を求めた。なお, 同一条件での2個の試験脱脂乳の酸生成量の平均値をとった。

3. 実験結果および考察

種々のアミノ酸の各種乳酸菌の酸生成に及ぼす効果について検討した。すなわち, 20 種のアミノ酸をそれぞれ脱脂乳100 ml あたり50 mg の濃度で添加し, *Lactobacillus* 7 菌株, *Lactococcus* 2 菌株をそれぞれ接種した。各菌株ごとに所定の温度, 時間で培養後, 酸生成量を定量した。これらの結果を Fig. 1~3 に示す。なお, 図中の数字は対照(アミノ酸無添加)の酸生成量を100としたときのアミノ酸添加脱脂乳の酸生成量の割合である。

図に示すように, アミノ酸は各種乳酸菌の酸生成に対して, 促進的に働くもの, 阻害的に働くもの, 影響を与えないものがあった。

Fig. 1 の *Lact. helveticus* B-1 に対しては, L-システインと L-シスチンが約30%, L-アスパラギン酸, L-グルタミン酸, グリシンが約15%多く促進し, L-ヒスチジン, L-チロシンが12%少なく阻害した。平林ら⁹⁾は, この菌に対する酵母エキス中に含まれる酸生成促進物質としてセリンを同定し, L-セリンは低濃度(0.05 mg/ml)で促進したと報告している。それゆえ, 脱脂乳に0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/ml の濃度で L-セリンを添加して酸生成について検討したが, Fig. 4 に示すように促進効果は認められなかった。平林ら⁹⁾はブドウ糖を加えない10% (w/v) 脱脂乳を82~83℃, 30 分間殺菌して用い, 前培養液として脱脂乳培地を用いていることなどが本報告の実験条件と異なっている。

Lact. acidophilus L-54 では, グリシンが15%, L-システイン, L-シスチンが約10%とわずかに促進し,

脱脂乳へのアミノ酸添加が乳酸菌の酸生成に及ぼす効果

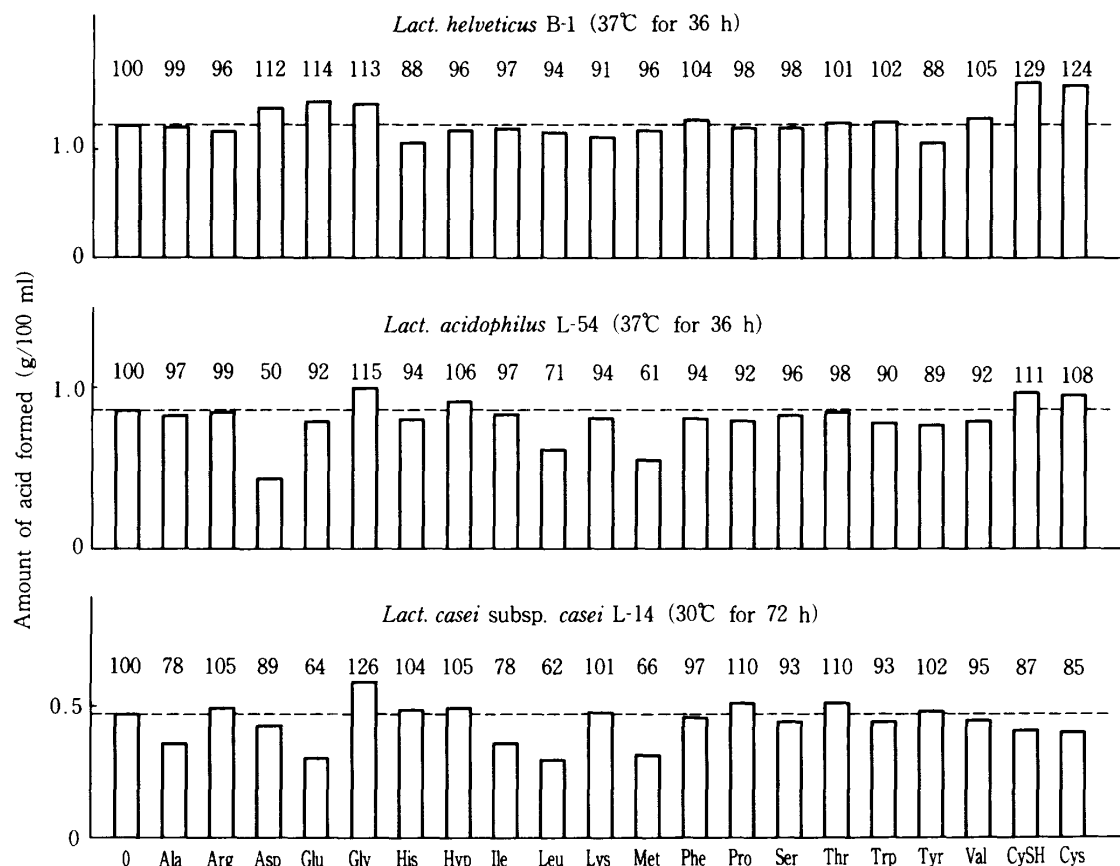


Fig. 1. Effects of various amino acids on the acid production of lactic acid bacteria in skim milk (1)

To an aqueous solution containing 10 mg of each amino acid, 10 ml of skim milk * was added and mixed thoroughly. This mixture was autoclaved for 20 min at 116–119°C, before 0.2 ml of a precultured bacterial strain, which had been precipitated by centrifugation and suspended in a 0.9% NaCl solution, was inoculated. After incubating, the amount of acid formed was evaluated by titrating with 0.1 N NaOH and is expressed as the amount (g/100 ml) converted to lactic acid. The figures above each bar represents the ratio (%) of the amount of acid produced in skim milk with an added amino acid to that in straight skim milk. * The skim milk solution contained 16 g of dried skim milk and 4 g of glucose in 100 ml (pH 6.8).

L-アスパラギン酸が50%, L-ロイシン, L-メチオニンが30~40%とかなり阻害した。 *Lact. casei* subsp. *casei* L-14では, グリシンが26%促進し, L-アラニン, L-イソロイシンが22%, L-グルタミン酸, L-ロイシン, L-メチオニンが約35%阻害した。また, L-システイン, L-シスチンが約15%とわずかに阻害した。

Fig. 2に示す *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B-5 bでは, グリシン, L-システイン, L-シスチンが10~15%とわずかに促進し, L-アスパラギン酸, L-ロイシン, L-メチオニンが21~25%阻害した。 *Lact. paracasei* subsp. *paracasei* IFO-3533では, L-システイン, L-シスチンが約50%とかなり促進し, L-ロイシン, L-メチオニンが約40%, L-アスパラギン酸, L-イソロイシンが約20%と明らかに阻害した。 *Lact. delbruec-*

kii subsp. *bulgaricus* IFO-13953では, L-システイン, L-シスチン, L-リジンが約30%促進し, グリシンが63%と著しく阻害した。

また, Fig. 3に示す *Lact. paracasei* subsp. *paracasei* S-2では, L-システイン, L-シスチンが約30%促進し, L-アスパラギン酸, L-イソロイシン, L-ロイシン, L-メチオニンが20~30%阻害した。 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 527, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H-61では, どのアミノ酸にも促進されず, L-イソロイシンでそれぞれ15, 10%とわずかに阻害された。

脱脂乳培地でのアミノ酸の発育促進効果については上述の平林ら⁹⁾の報告のほか, 次のような報告がある。Zurawら¹⁰⁾はコーンスチープリカーの *Lact. casei* に対する発育促進物質の一つがフェニルアラニンであると

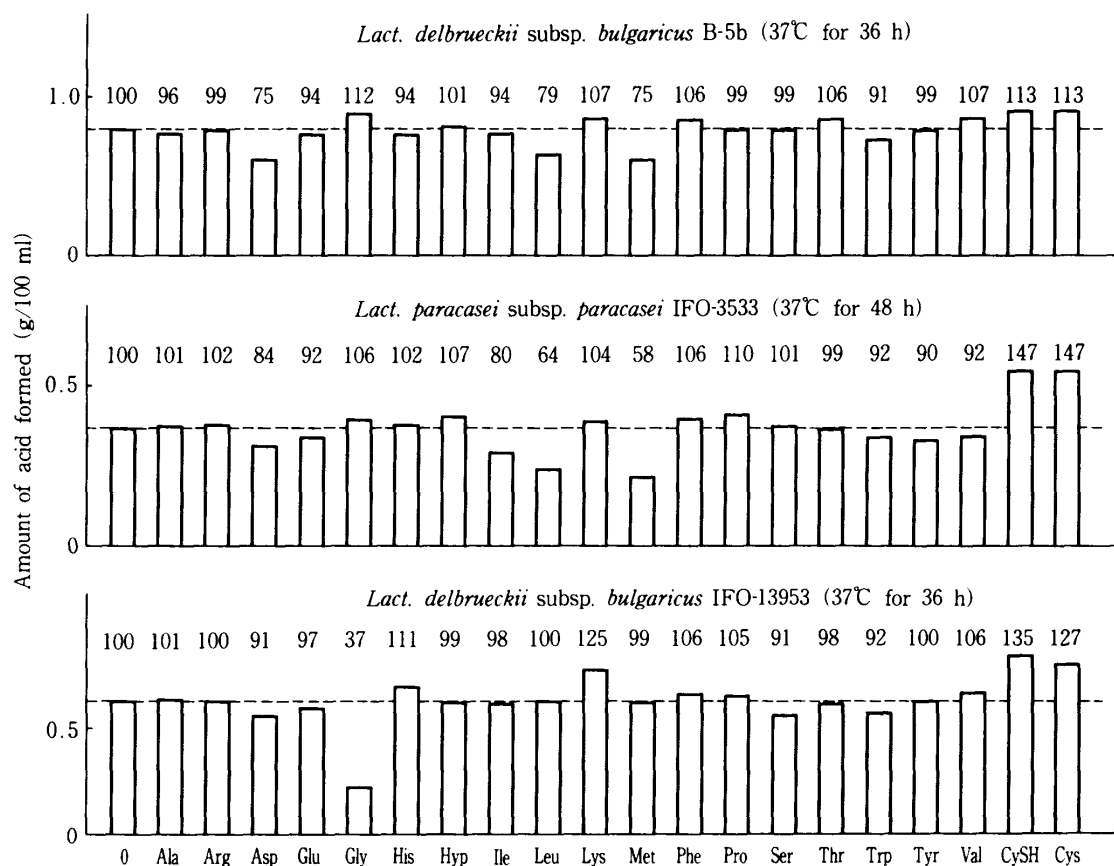


Fig. 2. Effects of various amino acids on the acid production of lactic acid bacteria in skim milk (2)
The experimental procedures were the same as those shown in Fig. 1.

同定し、Nakagaki ら¹¹は大豆抽出液から、L-アルギニン、L-トリプトファンなどを分離し、L-トリプトファンが *Lact. acidophilus* に発育促進効果をもつものの一つであることも明らかにした。

東尾ら¹²は、*Streptococcus thermophilus* と *Lact. bulgaricus* の共生において、*Lact. bulgaricus* の産生するヒスチジン、バリン、メチオニン、グルタミン酸、ロイシンの5種のアミノ酸混合物が *Str. thermophilus* の生育を促進するとし、Bautista ら¹³も *Str. thermophilus* と *Lact. bulgaricus* との共生において、*Lact. bulgaricus* 産生するヒスチジンとグリシンが *Str. thermophilus* の酸生成を促進することを見出した。

また、Marshall ら¹⁴はヒト由来の *Lact. acidophilus* がシステインにより生育が促進されるが、他の含硫アミノ酸であるメチオニン、シスチンには促進効果は認められないこと、それは遊離SH基による酸化還元電位の低下によるものと思われると報告している。

このように、菌株によって促進するアミノ酸も種々である。しかし、阻害についての報告はあまり

見当たらないが、グリシンの細菌類への抗菌作用についてはよく知られている。

つぎに、各菌株の酸生成の促進、阻害の比較をわかりやすくするため、Fig. 1~3の各菌株の各種アミノ酸添加による酸生成量の増加、または減少量と無添加の対照との割合(%)を酸生成の促進率、阻害率として計算し、Fig. 5を作成した。L-システインとL-シスチンはほぼ同じ傾向を示すので、L-システインのみ示した。なお、すでに報告している *Lact. casei* subsp. *casei* S-1、*Lact. casei* YIT-9018¹¹、および *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 510¹⁵ も加えて図示した。

Fig. 5に示すように、L-システインは *Lactobacillus* 9菌株中8菌株の酸生成を促進した。しかし、*Streptococcus* の1菌株は約50%とかなり阻害された。また、グリシンは *Lactobacillus* の4菌株の酸生成を促進した。しかし、1菌株はグリシンにより著しく阻害されたが、L-リジンで促進された。そのほか、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-ヒスチジン、L-プロリン、L-スレオニンもわずかに促進し、供試した12

脱脂乳へのアミノ酸添加が乳酸菌の酸生成に及ぼす効果

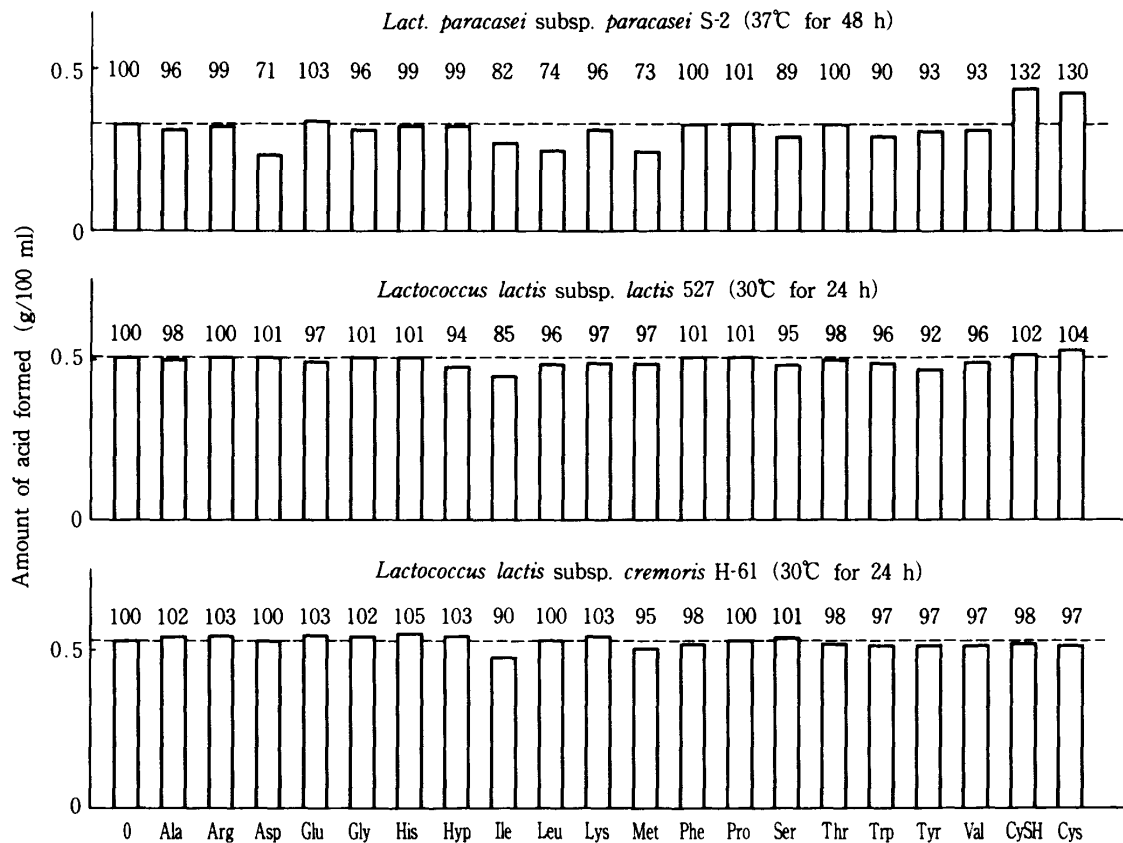


Fig. 3. Effects of various amino acids on the acid production of lactic acid bacteria in skim milk (3)

The experimental procedures were the same as those shown in Fig. 1.

菌株中 10 菌株は 20 種のアミノ酸の 1 種あるいは数種類で促進された。しかし、*Lactococcus* の 2 菌株はどのアミノ酸によっても促進されなかった。

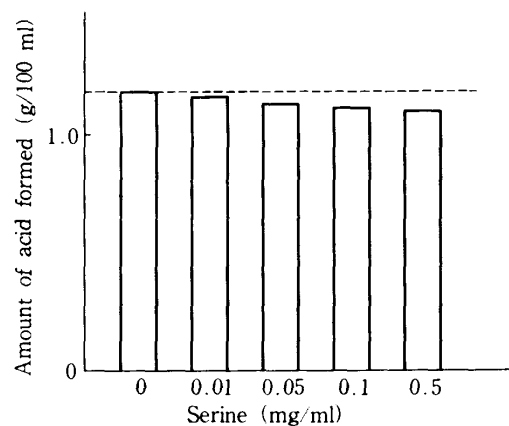
酸生成を全体的に阻害する傾向があるアミノ酸は、L-アスパラギン酸、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-メチオニンであった。また、L-アラニン、L-グルタミン酸、L-プロリン、L-セリン、L-トリプトファン、L-チロシンなどのアミノ酸も菌株によっては阻害し、*Lactobacillus* の 2 菌株を除く 10 菌株はそれぞれ 1 種あるいは数種類のアミノ酸で阻害された。

Str. salivarius subsp. *thermophilus* 510 は L-アスパラギン酸で著しく阻害され、L-システイン、L-シスチン、L-セリン、L-プロリンなど多くのアミノ酸で阻害されることは、供試した他の菌に比べて特異的である。

なお、Fig. 5 のような図は、既報¹²⁾でも用いたが、各菌株の酸生成の促進、阻害を比較するのに価値のある方法と思われる。

4. 要 約

脱脂乳に添加した各種アミノ酸の乳酸菌の酸生成に

Fig. 4. Effect of L-serine on the acid production of *Lactobacillus helveticus* B-1 in skim milk

The experimental procedures were the same as those shown in Fig. 1.

及ぼす効果について検討した。

Lactobacillus 9 菌株、*Lactococcus* 2 菌株、*Streptococcus* 1 菌株について、アミノ酸を脱脂乳 100 ml に 50 mg 添加して、次の結果を得た。

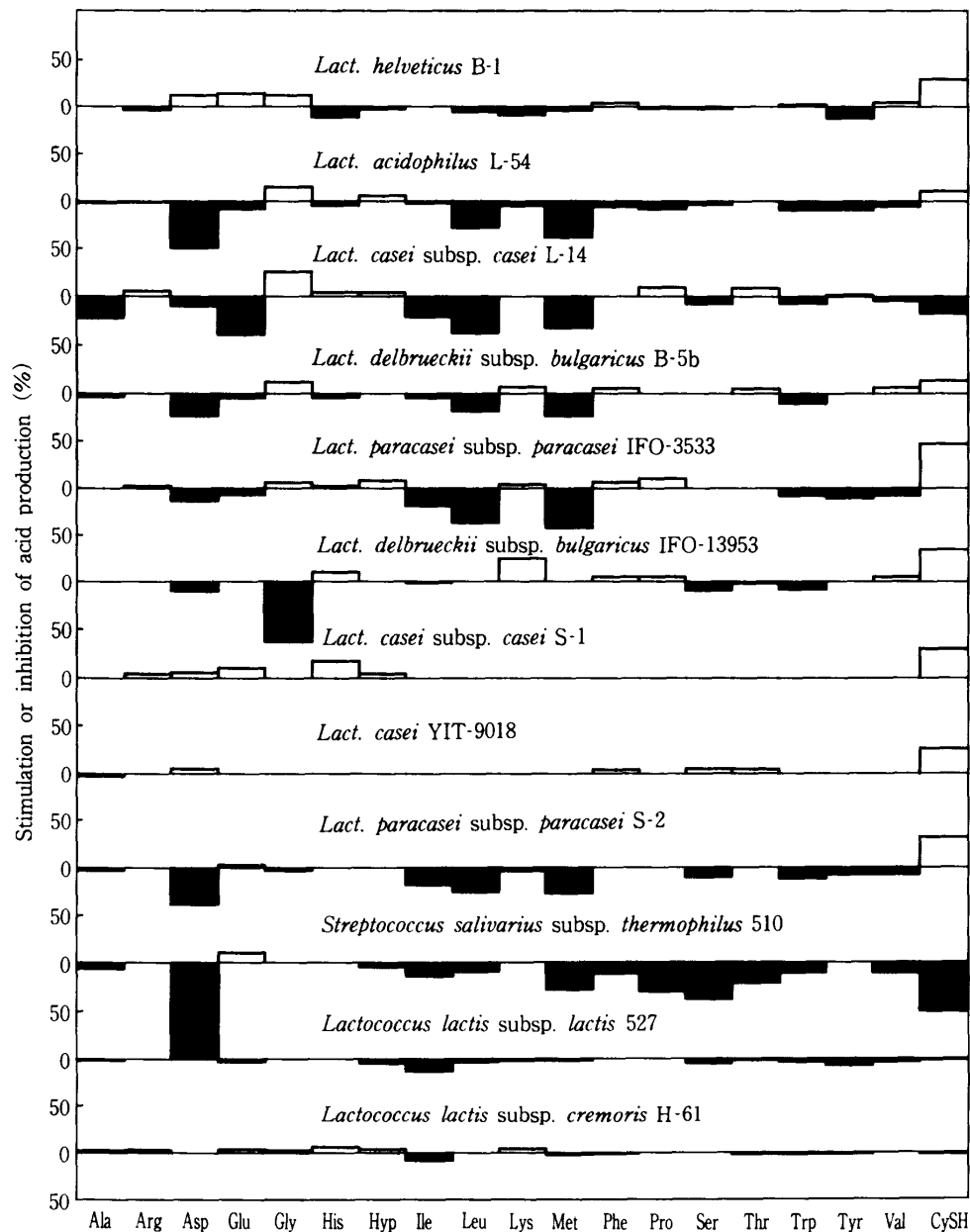


Fig. 5. Rate of stimulation or inhibition by amino acids of acid production of lactic acid bacteria

The ratio (%) of the amount of acid formed in skim milk with an added amino acid to the amount of acid formed without an added amino acid was calculated. The amounts of acid produced by each lactic acid bacterium are shown in Figs. 1-3. For *Lact. casei* subsp. *casei* S-1 and *Lact. casei* YIT-9018, the data from Fig. 2 of the previous paper⁴⁾ were used, and for *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* 510, the data shown in Nakashima⁶⁾ were used. □, stimulation; ■, inhibition.

(1) 酸生成を促進するアミノ酸, 阻害するアミノ酸, 影響を与えないアミノ酸は各菌株によって, それぞれ異なった。また, 同じアミノ酸が菌株が異なると促進することも阻害することもあった。

(2) L-システイン, L-シスチンは *Lactobacillus* 9 菌株の酸生成を促進したが, 1 菌株は阻害した。グリシンは *Lactobacillus* の 4 菌株を促進したが, 1 菌株は著しく阻害した。

脱脂乳へのアミノ酸添加が乳酸菌の酸生成に及ぼす効果

(3) そのほか, L-リジン, L-ヒスチジンなど数種類のアミノ酸が菌株によっては促進効果を示した。

(4) 酸生成を全体的に阻害する傾向があるアミノ酸は, L-アスパラギン酸, L-イソロイシン, L-ロイシン, L-メチオニンであった。また, L-アラニン, L-グルタミン酸, L-セリンほか数種類のアミノ酸が菌株によっては阻害効果を示した。

(5) 結局, 供試した 12 菌株中 *Lactococcus* の 2 菌株以外の 10 菌株の酸生成は, それぞれ 1 種あるいは数種類のアミノ酸で促進された。また, *Lactobacillus* の 2 菌株以外の 10 菌株は 1 種あるいは数種類のアミノ酸で阻害された。

本報告の概要は平成元年度第 41 回日本家政学会大会 (東京) で発表した。

引用文献

- 1) 中嶋昭正：福岡女短大紀要, **28**, 1~12 (1984)
- 2) 中嶋昭正：福岡女短大紀要, **31**, 1~9 (1986)
- 3) 中嶋昭正：福岡女短大紀要, **45**, 1~11 (1993)
- 4) 中嶋昭正：福岡女短大紀要, **30**, 1~10 (1985)
- 5) 中嶋昭正：福岡女短大紀要, **48**, 59~67 (1994)
- 6) 中嶋昭正：家政誌, **47**, 663~670 (1996)
- 7) 発酵研究所：Institute for Fermentation Osaka, List of Cultures, 8th ed., Vol. 1, 発酵研究所, 東京 (1988)
- 8) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之 (編)：食品分析ハンドブック, 建帛社, 東京, 482 (1973)
- 9) 平林照美, 佐藤一精, 佐々木卓治：栄食誌, **41**, 324~327 (1988)
- 10) Zuraw, E.A., Speck, M.L., Aurand, L.W. and Tove, S.B.: *J. Bacteriol.*, **80**, 457~463 (1958)
- 11) Nakagaki, T. and Hirano, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **34**, 1580~1583 (1970)
- 12) 東尾侃二, 吉岡八州男, 菊池俊彦：農化, **51**, 203~208 (1977)
- 13) Bautista, E.S., Dahiya, R.S. and Speck, M.L.: *J. Dairy Res.*, **33**, 299~307 (1966)
- 14) Marshall, V.M., Cole, W.M. and Vega, J.R.: *J. Dairy Res.*, **49**, 665~670 (1982)
- 15) 中嶋昭正：福岡女短大紀要, **39**, 1~9 (1990)