

乳酸菌の酸生成に及ぼすアオノリ, アオサの促進効果

中 嶋 昭 正

(福岡女子短期大学)

平成 8 年 5 月 30 日受理

Stimulating Effects of Green Laver and Sea Lettuce on Acid Production by Lactic Acid Bacteria

Akimasa NAKASHIMA

Fukuoka Women's Junior College, Dazaifu 818-01

An aqueous extract of green laver (*Enteromorpha* sp.) added to skim milk stimulated the acid produced by *Lactobacillus casei* YIT-9018 to as high a level as that of chlorella.

The active component in the extract for stimulating this acid production was studied. The factor stimulating acid production was fractionated by gel filtration with G-50 and G-15, and by chromatography with Dowex 50 and Dowex 1. The fraction containing stimulating activity was separated from the sugar, amino acid and peptide fractions, as well as most of the nucleic acid derivatives.

Since most of the stimulating activity still remained after ashing, and the level of activity was proportional to the amount of Mn in the ashed fraction, it was concluded that Mn was the component responsible for the stimulating effect on acid production of green laver. An organic substance, not Mn, seemed to be involved in the stimulating activity with *L. casei* subsp. *casei* S-1.

The effect of the extract from sea lettuce (*Ulva* sp.) was to stimulate acid production even more than that by green laver, the Mn content of sea lettuce also being greater than that of green laver.

Aqueous extracts from the two algae considerably stimulated the acid produced by *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B-5b, *L. acidophilus* L-54, *L. casei* subsp. *casei* L-14, *L. paracasei* subsp. *paracasei* IFO-3533, and *L. paracasei* subsp. *paracasei* S-2, but significantly inhibited it with *L. helveticus* B-1 and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO-13953.

However, neither extract had much effect on the acid production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 527, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H-61, or *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 510.

(Received May 30, 1996)

Keywords: green laver アオノリ, sea lettuce アオサ, fermented milk 発酵乳, lactic acid bacteria 乳酸菌, *Lactobacillus* ラクトバチラス, stimulation 促進.

1. 緒 言

単細胞藻類クロレラが乳酸菌発育促進物質を含有することが永松ら¹⁾によって見出され、乳酸菌飲料の製造に利用されてきた。しかし、他の藻類についての詳しい報告は見当たらない。それゆえ、アオノリ、アマノリ、コンブの乳酸菌の酸生成に及ぼす効果をクロレラと比較したところ、アオノリがクロレラと同程度の酸生成促進効果をもつことを見出した。そこで、その本体について追究し、若干の知見を得たので、これらの結果について報告する。

なお、市販されている“青ノリ粉”はアオノリとアオサが用いられているので、アオサについても検討した。

2. 実験材料および方法

(1) 試 料

アオノリ (*Enteromorpha* sp.), アオサ (*Ulva* sp.) は市販されている製造元の異なる数種の“青ノリ粉”を用いた。そのほか、市販のアマノリ、コンブと、クロレラ (日本クロレラ (株) から分譲されたもの) も用

いた。

マンガン(Mn)の添加には特級試薬 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (片山化学工業(株)製)を用いた。

(2) 供試菌株

Lactobacillus casei YIT-9018 (代田株) (ヤクルト本社研究所より分譲されたもの), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* S-1 (九州大学農学部水産化学第二教室より分譲されたもの)を主として用いた。

そのほか, 日本乳業技術協会分譲菌の *Lactobacillus helveticus* B-1, *Lactobacillus acidophilus* L-54, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B-5b, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* L-14, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 527, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H-61, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 510, 発酵研究所分譲菌の *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* IFO-3533, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO-13953, および *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* S-2 (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。これらの乳酸菌を前報²⁾にしたがって保存し, 前培養した。

(3) 使用培地

2倍濃度の脱脂乳は100 mlの水に16 gの脱脂粉乳(雪印, スキムミルク)と4 gのブドウ糖を溶かした。また, 16 gの脱脂粉乳と4 gのブドウ糖を水に溶かして100 mlにしたものも用いた(3-(3)以後)。いずれもpHを6.8に調整した。

(4) 培養法

試験脱脂乳は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, 試料溶液10 mlを加えて調製した。殺菌は115~119℃, 20分間で行い, これに接種液の0.2 mlを加え培養した。

接種菌液は前培養液そのままか, 前報²⁾にしたがって調製したものを用いた。また, Sephadex ゲル濾過などによる分画液の培養は, 綿栓試験管に2倍濃度の脱脂乳2 mlと試料溶液2 mlを加えて行った。

(5) 試料水抽出液の調製

試料に海砂および水を加えて乳鉢にて磨碎し, 遠心分離後上澄液を採取し, 残渣の洗浄液と上澄液を合して定量とした。これを濾紙にて濾過し, 抽出前の乾燥試料の量として2%試料水抽出液を作製した。

(6) アオノリ水抽出液の Sephadex G-50, G-15 ゲル濾過

2%アオノリ水抽出液20 mlをSephadex G-50, あるいはG-15 カラム (2.6×28 cm) に注入し, 蒸留水

で溶出し, 10 ml ずつ分画した。

(7) アオノリ水抽出液のイオン交換樹脂による分画

2%アオノリ水抽出液50 mlをDowex 50-X 8 (Na^+) カラム (1.8×20 cm) に通し, さらにDowex 1-X 8 (Cl^-) カラム (1.8×20 cm) に通し, 流出液を得た。Dowex 50-X 8 およびDowex 1-X 8 吸着物は, それぞれ100 mlの2M塩化ナトリウムで溶出し, 樹脂を水で洗浄し, 水を加えて200 mlとした。さらに4M塩化ナトリウム50 mlで溶出し, 水で洗浄後同じく200 mlとした。

(8) アオノリ水抽出液のDowex 50-X 8 イオン交換クロマトグラフィ

2%アオノリ水抽出液100 mlのDowex 50-X 8 カラム (1.1×21 cm) 吸着物を1M塩化ナトリウム100 mlで溶出し, 10 ml ずつ分画した。さらに, 100 mlの2M塩化ナトリウムで10 ml ずつ分画した。

(9) アオノリ, アオサ水抽出液の灰化

2%アオノリ, アオサ水抽出液の50 mlをそれぞれ沸騰水浴上と100℃の乾燥器で乾燥し, 500~550℃で灰化した。a) 灰化物に濃硝酸0.5 ml, 2N塩酸3 mlを加えて湯浴上で溶解し, 3N NaOHでpH 6.6~6.8に調整し, 水を加えて50 mlの定量とした。不溶物も懸濁して培地に加えた。b) 灰化物に少量の濃塩酸を加え, 蒸発乾固し, 湯浴上で3N塩酸3 mlに溶解後濾過した。濾紙上の残渣を3N塩酸2 mlで洗浄し, 濾液に水を加えて25 mlの定量にし, Mnの分析試料とした。

(10) 酸生成量の定量

培養後の脱脂乳の0.1N NaOH 滴定値から, 培養前の脱脂乳の0.1N NaOH 滴定値を差し引き, 得られた値を乳酸量に換算³⁾して酸生成量 (g/100 ml) を求めた。

(11) 分析法

糖の発色反応であるアンスロン反応は, 加熱時間を100℃, 5分に改変してTrevelyanらの方法⁴⁾で行った。アミノ酸の発色反応であるニンヒドリン反応は, 60%エタノール添加量を3 mlに改変してYemmらの方法⁵⁾で行った。260 nmにおける吸収の測定は日立分光光度計 (139 型) で, Mnの定量は過ヨウ素酸比色法⁶⁾によった。また, 塩化ナトリウムの濃度はNaイオン濃度計によって測定したNaイオン濃度から換算した。

乳酸菌の酸生成に及ぼすアオノリ、アオサの促進効果

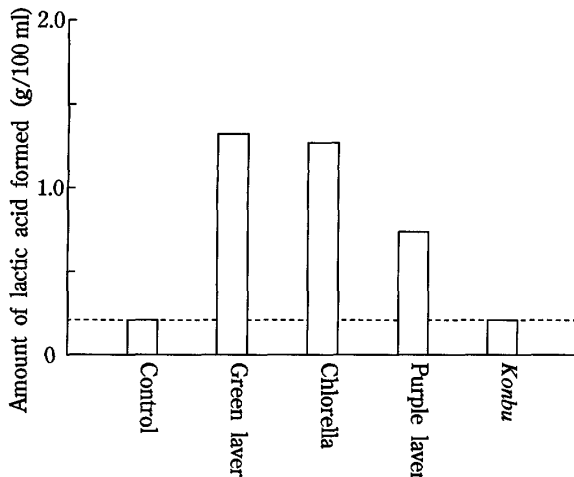


Fig. 1. Stimulating effects of aqueous extracts of various algae on the acid produced by *Lactobacillus casei* YIT-9018 in skim milk

To 10 ml of an aqueous extract of each alga equivalent to 2 % raw material, 10 ml of skim milk* was added and thoroughly mixed. This medium was autoclaved for 20 min at 120 °C, and 0.2 ml of a preculture of *Lactobacillus casei* YIT-9018 was then inoculated. After incubating for 72 h at 30 °C, the amount of the acid thus formed was evaluated by titrating with 0.1 N NaOH, and is expressed as the amount (g/100 ml) converted to a lactic acid equivalent. * Skim milk: 16 g of dried skim milk and 4 g of glucose were dissolved in 100 ml of distilled water (pH 6.8).

3. 実験結果

(1) アオノリの乳酸菌酸生成促進効果

緑藻としてアオノリ、紅藻としてアマノリ、褐藻としてコンブを選び、それらの水抽出液とクロレラ水抽出液を乾燥粉末として1 % 濃度で脱脂乳に加え、*L. casei* YIT-9018 を接種し、30 °C、72 時間後に酸生成量を定量した。その結果を Fig. 1 に示した。

アオノリ、クロレラでは、対照の6倍以上の酸生成量を示し、著しい酸生成促進効果が認められた。アオノリの方がクロレラよりもわずかに酸生成量が多かった。アマノリでは対照のほぼ3倍量の酸生成量を示し、コンブでは対照とほとんど変わらなかった。

次に、アオノリの濃度と酸生成促進効果との関係をアオノリ水抽出液を用いて検討し、その結果を Fig. 2 に示した。0.125 % の濃度でも1 % の場合の約70 % の酸生成量を示し、添加量が1/8でも酸生成量は約2/3に減少するにとどまった。また、Fig. 2 中に挿入した図に示すように、アオノリ濃度の対数と酸生成量との間に比例関係が認められた。

また、アオノリ水抽出液の酸生成促進効果を12日

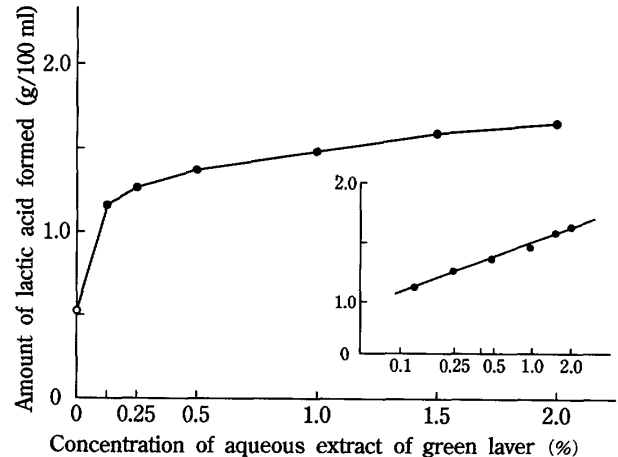


Fig. 2. Effect of concentration of the green laver aqueous extract on the acid produced by *L. casei* YIT-9018

The main experimental procedures were the same as those described in Fig. 1, excepting incubation at 37 °C. The inset graph shows the logarithmic relationship between the concentration of the aqueous extract of green laver and the amount of lactic acid formed by *L. casei* YIT-9018 in skim milk.

間の酸生成量で追跡した結果を Fig. 3 中に示した。培養日数の少ない期間が特に対照に対する酸生成量の比が高かった。培養日数を長くしても、対照の酸生成量はアオノリ水抽出液の酸生成量の約2/3で、アオノリ水抽出液は酸の生成を促進するだけでなく、酸生成量を多くする効果をもつものと考えられる。

次に、アオノリ水抽出液の *L. casei* subsp. *casei* S-1 および *L. paracasei* subsp. *paracasei* S-2 の酸生成に及ぼす効果について検討し、その結果を Fig. 3 中に示した。アオノリ水抽出液はこの2菌株に対しても著しい酸生成促進効果を示した。

(2) アオノリの乳酸菌酸生成促進物質の分別

1) アオノリ水抽出液のゲル濾過

Sephadex G-50, および G-15 で、アオノリ水抽出液のゲル濾過を行い、得られた画分の *L. casei* YIT-9018 に対する酸生成促進効果について検討した。また、分画液のアンスロン反応による発色で糖の、ニンヒドリン反応による発色でアミノ酸、ペプチドの、260 nm での吸収で核酸関連物質の、それぞれの溶出について検討した。それらの結果を Fig. 4 に示した。

Sephadex G-50 ゲル濾過では、まず糖の大部分と核酸関連物質の一部が溶出し、その後、酸生成促進物質が、アミノ酸、ペプチドおよび大部分の核酸関連物質、一部の糖と重なって溶出した。Sephadex G-15 ゲル濾過でも、まず糖の大部分と核酸関連物質の一部が溶出

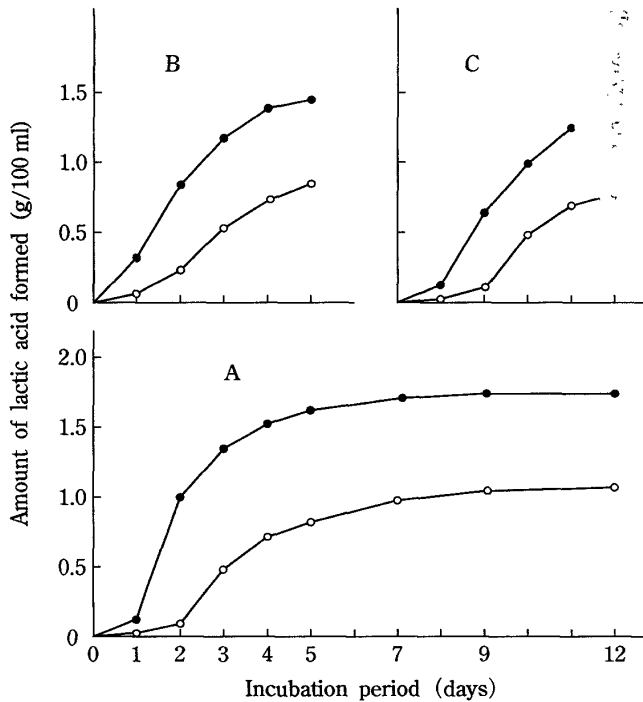


Fig. 3. Effect of incubation period with the green laver aqueous extract on the acid produced by *L. casei* YIT-9018 and two other lactic acid bacteria

The main experimental procedures were the same as those described in Fig. 1. A: *L. casei* YIT-9018 at 37°C. B: *L. casei* subsp. *casei* S-1 at 37°C. C: *L. paracasei* subsp. *paracasei* S-2 at 37°C. ○, control (no addition); ●, addition of the aqueous extract of green laver.

し、その後、酸生成促進物質がアミノ酸、ペプチド、一部の核酸関連物質と重なって溶出したが、その後、核酸関連物質の他の一部が溶出した。

Sephadex G-50 では、酸生成量の溶出パターンはアミノ酸、ペプチド、一部の糖の溶出パターンとはほぼ一致するが、Sephadex G-15 では異なった。また、G-50、G-15 とともに、核酸関連物質の溶出パターンとは若干異なった。

これらの結果からでは、アオノリの酸生成促進効果と糖、アミノ酸、ペプチド、核酸関連物質との関連性が密接とは考えにくい、これらの一部が酸生成促進物質である可能性は否定できない。

2) アオノリ水抽出液のイオン交換樹脂による分画

アオノリ水抽出液の Dowex 50-X 8 (Na⁺) 吸着画分を塩基性画分、Dowex 1-X 8 (Cl⁻) 吸着画分を酸性画分、両樹脂に吸着されなかった画分を中性画分とし、アオノリ粉末として 0.25% の濃度で、各画分の *L.*

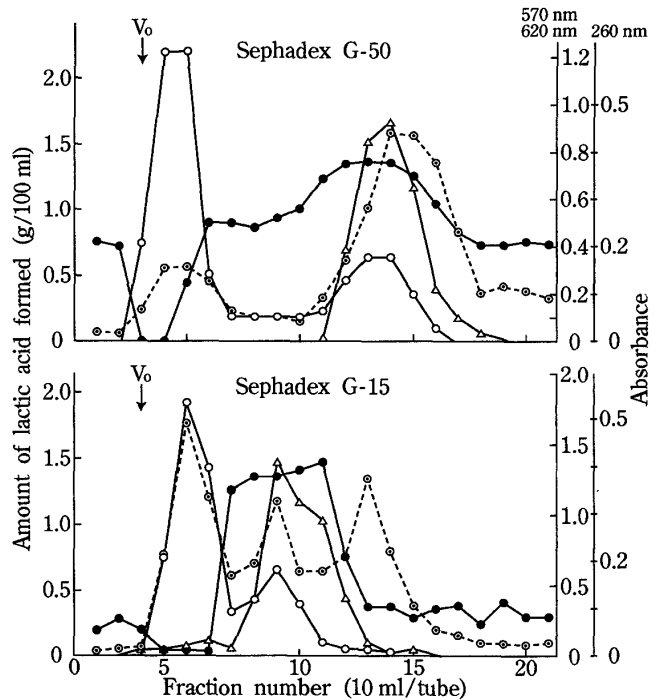


Fig. 4. Gel filtration profiles of the aqueous extract of green laver through Sephadex G-50 and G-15

Twenty milliliters of a 2% aqueous extract of green laver was applied to a column (2.6 × 28 cm) of Sephadex G-50 or G-15. Elution was carried out with distilled water. Sugar in the effluent was determined by the modified anthrone method, amino acid and peptide by the ninhydrin method, and nucleic acid derivatives by their absorbance at 260 nm. Two milliliters of each fraction was mixed with 2 ml of skim milk and then autoclaved. A preculture²⁾ of *L. casei* YIT-9018 was inoculated into the autoclaved sample, and the culture incubated for 72 h at 37°C. ●, amount of lactic acid formed; ○, absorbance at 620 nm (sugar); △, absorbance at 570 nm (amino acid and peptide); ◎, absorbance at 260 nm (nucleic acid derivatives). V₀: void volume peak.

casei YIT-9018 への酸生成促進効果を検討し、その結果を Table 1 に示した。

酸生成量から明らかのように、酸生成促進物質の大部分は塩基性画分に存在した。酸性画分は対照とほとんど変わらなかったが、中性画分は対照よりも若干酸生成量が多かった。

また、各画分のアンスロン反応による発色で糖の存在を、ニンヒドリン反応による発色でアミノ酸、ペプチドの存在を、260 nm での吸収で核酸関連物質の存在を、それぞれ検討し、Table 1 に示した。

糖はほとんど中性画分にのみ存在し、塩基性画分に

乳酸菌の酸生成に及ぼすアオノリ、アオサの促進効果

Table 1. Effects of Dowex 50 (Na⁺) and Dowex 1 (Cl⁻) treatments of the aqueous extract of green laver on the acid produced by *L. casei* YIT-9018, and on the adsorption of sugar, amino acid and peptide, and nucleic acid derivatives

	Lactic acid formed (g/100 ml)	Sugar	Amino acid and peptide	Nucleic acid derivatives
Control	0.41			
Aqueous extract of green laver	0.81	++++	++++	++++
Basic fraction eluted with 2 M NaCl	0.87	—	+	±
Basic fraction eluted with 4 M NaCl	0.78	—	±	±
Acidic fraction eluted with 2 M NaCl	0.40	— to ±	+	++
Acidic fraction eluted with 4 M NaCl	0.41	—	±	±
Neutral fraction	0.48	++++	+++	++

One hundred milliliters of a 2% aqueous extract of green laver was passed through columns (1.8×20 cm) of Dowex 50-X8 (Na⁺) and Dowex 1-X8 (Cl⁻). The effluent eluted from each resin was the neutral fraction. The basic fraction adsorbed to Dowex 50-X8 (Na⁺) was eluted with 2 M NaCl and 4 M NaCl, and the acidic fraction adsorbed to Dowex 1-X8 (Cl⁻) was eluted with 2 M NaCl and 4 M NaCl. The concentration of NaCl in the incubated skim milk was adjusted to 0.5 M. The amount of the green laver extract or each fraction added to the skim milk was equivalent to 0.25% raw material. The sugar, amino acid and peptide, and nucleic acid derivatives were determined as shown in the legend to Fig. 4. The intensity of absorbance at 620 (sugar), 570 (amino acid and peptide) and 260 nm (nucleic acid derivatives) is rated in decreasing order as +, ± and —.

は存在しなかった。したがって、アオノリの酸生成促進物質は糖ではないことは明らかである。核酸関連物質は酸性画分、中性画分に大部分が存在し、塩基性画分にはわずかであった。この結果と前項の結果から、アオノリの酸生成促進物質が核酸関連物質である可能性は少ないといえよう。

アミノ酸、ペプチドは量的には多少はあるが、塩基性、酸性、中性画分に存在した。したがって、前項の結果と同じく、アオノリの酸生成促進物質の一つがアミノ酸、ペプチドである可能性は否定できない。

3) アオノリ水抽出液の Dowex 50 イオン交換クロマトグラフィによる分画

酸生成促進物質とアミノ酸、ペプチドとの関連性を明らかにするため、Dowex 50 イオン交換クロマトグラフィでアオノリ水抽出液の吸着物の分画を行った。得られた各画分の *L. casei* YIT-9018 への酸生成促進効果とアミノ酸、ペプチドの溶出を検討し、その結果を Fig. 5 に示した。

Fig. 5 に示すように、酸生成促進効果をもつ画分とアミノ酸、ペプチドをほぼ完全に分離することができた。この結果から、アオノリの酸生成促進物質がアミノ酸、ペプチドではないことは明らかであると考えられる。

(3) アオノリ、アオサ水抽出液灰化物の乳酸菌酸生成促進効果とその本体

1) アオノリ、アオサ水抽出液灰化物の乳酸菌酸生成促進効果

前項の Dowex 50 イオン交換クロマトグラフィで得た酸生成促進物質の画分の Sephadex G-15 ゲル濾過を行ったところ、アオノリ水抽出液のそれより低分子のところに溶出した。また、アオノリ水抽出液をセロファンチューブで透析すると、その酸生成促進物質はかなり透析されにくいですが、Dowex 50 吸着物中の酸生成促進物質は大部分が容易に透析される実験結果も得ている。

これは、Dowex 50 への吸着操作によって、酸生成促進物質の水抽出液中の存在形態に変化がおこったための挙動ではないかと考えられる。Dowex 50 に吸着され、透析しやすくなることから、酸生成促進物質は無機カチオンである可能性が考えられる。そこで、まず水抽出液の灰化物の酸生成促進効果について検討した。

試料の項で述べたように、市販青ノリ粉にはアオノリとアオサがある。そこで、アオノリ、アオサ水抽出液の灰化物を調製し、試料として 1% の濃度で添加した脱脂乳に、*L. casei* YIT-9018, *L. casei* subsp. *casei*

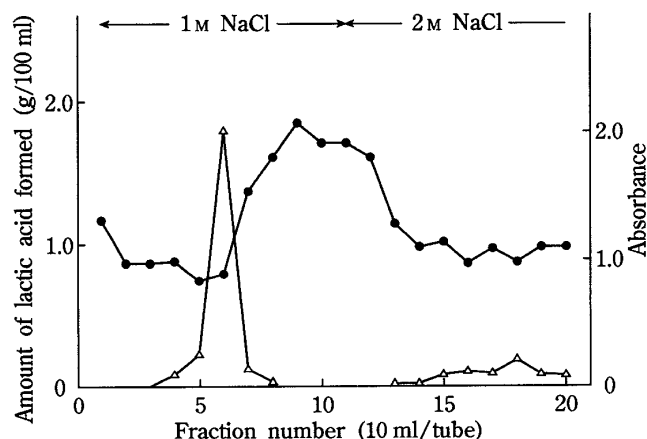


Fig. 5. Ion-exchange chromatography of the aqueous extract of green laver on Dowex 50-X 8 (Na^+)

One hundred milliliters of a 2% aqueous extract of green laver was passed through a Dowex 50-X 8 (Na^+) column (1.1×21 cm). Elution was carried out with 1 or 2 M NaCl. The effluent was analyzed for amino acid and peptide. The effluent was incubated with *L. casei* YIT-9018 by the procedure described in Fig. 4. ●, amount of lactic acid formed; △, absorbance at 570 nm (amino acid and peptide).

S-1 を接種し, 37℃, 48 時間培養後の酸生成量を Fig. 6 に示した。

Fig. 6 に示したように, 灰化しても酸生成促進効果は残存していた。とくに, *L. casei* YIT-9018 に対しては, アオノリ, アオサ水抽出液による酸生成量とその灰化物による酸生成量とは大差なく, 無機質がアオノリ, アオサに含まれる酸生成促進物質の主体であるように思える。一方, *L. casei* subsp. *casei* S-1 に対しては, 水抽出液とその灰化物による酸生成量はかなり差があり, 無機質がアオノリ, アオサに含まれる酸生成促進物質の主要な一つではあるが, 他に有機質の酸生成促進物質の存在が示唆される。

なお, アオノリよりもアオサの方が酸生成促進効果は大きかった。

2) アオノリ, アオサ水抽出液灰化物の Mn 含量と Mn 添加の乳酸菌酸生成促進効果

著者ら⁷⁾は種々の無機塩の中で Mn 塩が乳酸菌の酸生成に著しい促進効果をもつことを明らかにしている。それゆえ, アオノリ, アオサ水抽出液の酸生成促進効果はその Mn 含量に関係があるのではないかと考え, 灰化物の Mn 含量を定量した。アオノリは 0.0036%, アオサは 0.014% の Mn を含んでおり, アオサの方が約 4 倍多かった。

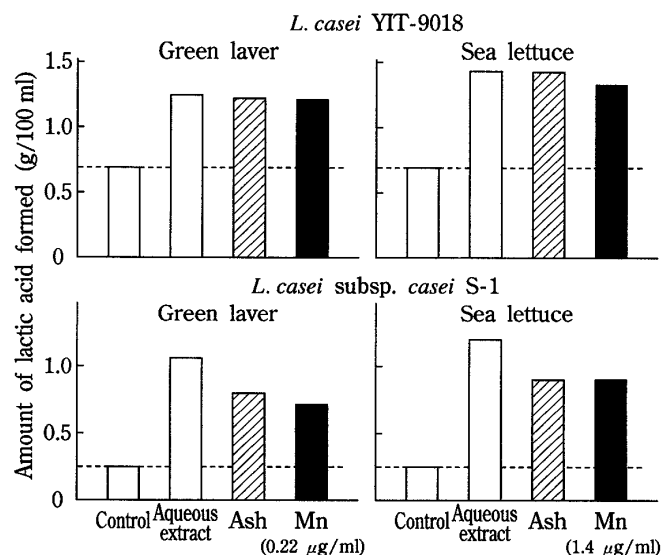


Fig. 6. Effects of aqueous extracts of green laver and sea lettuce, their ash, and Mn corresponding to the Mn content in the ash on the acid produced by *L. casei* YIT-9018 and *L. casei* subsp. *casei* S-1

An amount of the aqueous extract equivalent to 1% raw material, its ash and Mn corresponding to the Mn content in the ash was added to skim milk. Each test medium was incubated for 48 h at 37℃. Mn was added as MnCl_2 .

次に, アオノリ, アオサ水抽出液の灰化物含有相当量の Mn の酸生成促進効果を検討した。すなわち, アオノリ, アオサとして 1% 量に相当する灰化物, あるいは灰化物含有相当量の Mn を脱脂乳に添加し, *L. casei* YIT-9018, *L. casei* subsp. *casei* S-1 を接種し, 37℃, 48 時間培養後の酸生成量を定量し, その結果を Fig. 6 中に示した。

灰化物含有相当量の Mn を脱脂乳に加えると, 両菌に対して著しい酸生成促進効果が認められ, 灰化物の酸生成量にはほぼ匹敵した。この結果から, Mn がアオノリ, アオサ水抽出液灰化物中の酸生成促進物質の主体であることは明らかである。

3) アオノリ, アオサの乳酸菌酸生成促進効果の標品差について

アオノリ, アオサの酸生成促進効果についての標品差を検討した。市販の青ノリ粉 8 標品について, 1% 水抽出液, あるいはその灰化物を脱脂乳に加え, *L. casei* YIT-9018, *L. casei* subsp. *casei* S-1 を接種し, 37℃, 48 時間培養後の酸生成量を定量した。また, これらの標品の Mn 含量を定量し, Mn 含量の多い順に, 酸生成量を Fig. 7 に示した。なお, 供試した青ノ

乳酸菌の酸生成に及ぼすアオノリ、アオサの促進効果

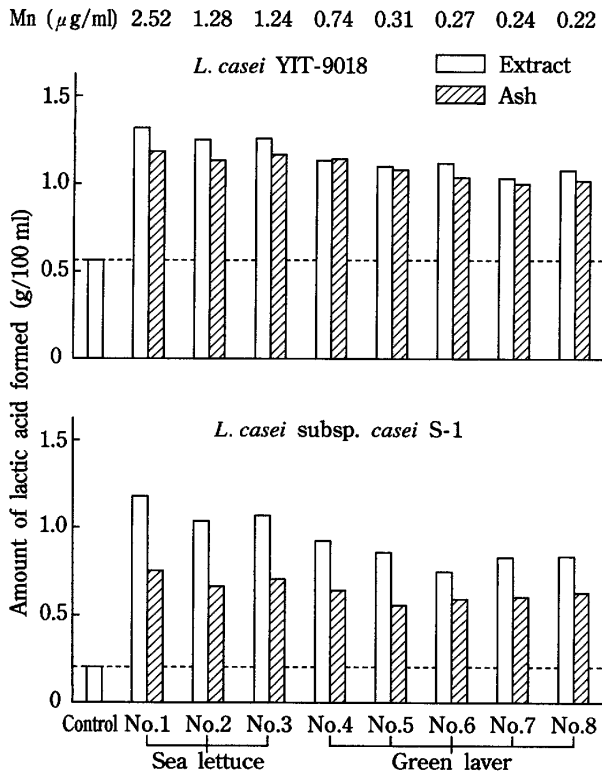


Fig. 7. Effect of the aqueous extracts of green laver and sea lettuce and their ash on the acid produced by lactic acid bacteria

Mn was supplemented to the medium by adding the ash of extracts from 8 samples.

り粉のうち、アオノリは5標品、アオサは3標品であり、それぞれの添加により脱脂乳に加えられるMn量を図中に示した。

青ノリ粉8標品の水抽出液では、脱脂乳100mlあたりの酸生成量は、*L. casei* YIT-9018で1.02~1.32g, *L. casei* subsp. *casei* S-1で0.81~1.23gであり、かなりの標品差があった。一方、アオノリ5標品水抽出液のMn含量は原試料1gとして22~74 μgで、アオサ3標品は124~252 μgであり、アオサの方がMn含量は多く、したがって酸生成促進効果も大きかった。

次に、X軸をMn量(μg/ml)の対数値、Y軸を酸生成量(g/100ml)とし、Fig. 7の水抽出液、その灰化物による酸生成量をプロットし、その結果をFig. 8に示した。アオノリ、アオサは別種であるが、Mnが灰化物中の酸生成促進物質の主体であることから、アオノリ、アオサを併せて検討した。

灰化物の場合、*L. casei* YIT-9018では、Mn含量の対数値と酸生成量の間に $\gamma = 0.95$, *L. casei* subsp. *casei* S-1では $\gamma = 0.92$ の、それぞれ強い相関があっ

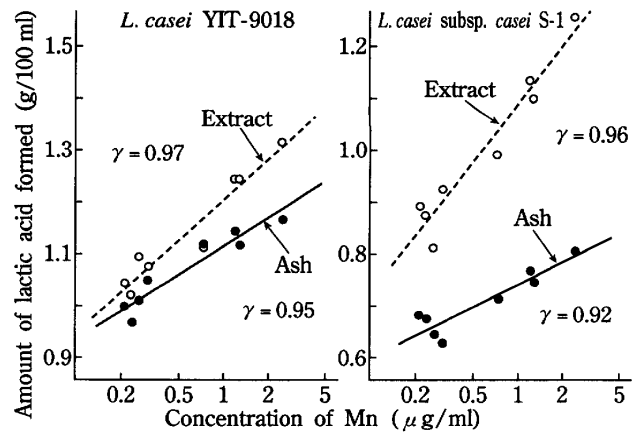


Fig. 8. Relationship between the Mn content in the aqueous extract of green laver and sea lettuce or their ash and the amount of lactic acid formed by lactic acid bacteria

Values for Mn concentration in the skim milk by adding the ash from extracts of 8 samples and the amounts of lactic acid formed follow the data shown in Fig. 7.

た。灰化物で、Mn含量と酸生成量との相関が強いことは予想されるが、水抽出液の場合も $\gamma = 0.97$, 0.96 とそれぞれの相関は強かった。特に、*L. casei* subsp. *casei* S-1の場合、Mnは水抽出液中の酸生成促進物質の一つであり、他の促進物質の影響、アオノリ、アオサの違いなど他の要因も考えられるが、結果として強い相関があった。

(4) 他の乳酸菌の酸生成に及ぼすアオノリ、アオサの効果

ここまで、*L. casei* YIT-9018, *L. casei* subsp. *casei* S-1に対してアオノリ、アオサが著しい酸生成促進効果をもつことを見出し、その本体を追究してきた。しかし、アオノリ、アオサが他の乳酸菌の酸生成に促進効果があるかどうか分からない。

そこで、日本乳業技術協会分譲菌7株と発酵研究所分譲菌(IFO菌)2株に及ぼすアオノリ、アオサの影響について検討した。すなわち、アオノリ、アオサ水抽出液を乾燥粉末として0.5%濃度になる量で脱脂乳に添加し、各種乳酸菌を接種後培養し、所定の時間後酸生成量を定量した。対照(無添加)を100としたときの値をTable 2に示した。なお、*L. casei* YIT-9018, *L. casei* subsp. *casei* S-1についても示した。

アオノリ、アオサは*Lactobacillus*の6菌株に著しい酸生成促進効果を示したが、2菌株に対してはかなり酸生成を阻害した。また、*Lactococcus*の2菌株、*Streptococcus*の1菌株には大きい影響を与えなかった。

Table 2. Effects of aqueous extracts of green laver and sea lettuce on the acid produced by lactic acid bacteria in skim milk

Strain	Culture conditions	Stimulation rate for acid production	
		Green laver	Sea lettuce
Control		100	100
<i>Lactobacillus casei</i> YIT-9018	37°C, 48 h	197	227
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> S-1	37°C, 48 h	414	514
<i>Lactobacillus helveticus</i> B-1	37°C, 36 h	22	25
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> B-5b	37°C, 36 h	174	201
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> IFO-13953	37°C, 36 h	57	29
<i>Lactobacillus acidophilus</i> L-54	37°C, 36 h	152	184
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> L-14	30°C, 72 h	423	525
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> IFO-3533	37°C, 48 h	231	294
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 527	30°C, 24 h	95	93
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> H-61	30°C, 24 h	85	97
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> 510	37°C, 24 h	98	112

The main experimental procedures were the same as those described in Fig. 1, apart from the addition of a 0.5% aqueous extract of each alga. The stimulation rate for acid production is quoted as lactic acid equivalent compared with that for the control.

なお、前述したように、*L. paracasei* subsp. *paracasei* S-2 もアオノリで著しく酸生成を促進されている。

4. 考 察

代田ら⁸⁾は、牛乳培地でクロレラが *L. acidophilus* 代田株（現菌名 *L. casei* YIT-9018）に対して示す著しい発育促進作用の有効因子として無機塩類、プリンヌクレオチド、ペプタイドを見出したと総括している。それより前、代田ら⁹⁾、その後、武智¹⁰⁾は、クロレラに含まれる乳酸菌発育促進物質の一つが Mn であることは田宮ら（未発表）により見出されたと引用し、彼らも Mn の添加効果を認めている。

しかし、実際にクロレラや他の材料中の Mn 含量を求めて発育促進効果を検討した例は、Zielke ら¹¹⁾の報告中での簡単な記載のほかは見あたらない。Zielke らはセネデスムスの水抽出液の乳酸菌発育促進効果を検討した際、水抽出液中の Mn を定量している。

Mn が著しい酸生成促進効果を示すことは、脱脂乳中の Mn 含量が乳酸菌の十分な生育には不十分であることを示している。工藤ら¹²⁾は、乳酸菌の増殖と酸生成に及ぼす粉乳間の差異を Mn の変動のみで説明できることを見出している。

著者¹³⁾は、脱脂粉乳 6 標品中の Mn 含量は 0.22～

0.30 ppm であることを報告しているが、8% 脱脂乳培地にすると、0.018～0.024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となる。一方、本実験では、アオノリ水抽出液で 0.22～0.74 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、アオサ水抽出液では 1.24～2.52 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Mn の添加となり、Mn の酸生成促進効果が現れるものと考えられる。

L. casei YIT-9018 については、アオノリ、アオサの酸生成促進物質の主体は Mn と考えられるが、*L. casei* subsp. *casei* S-1 の酸生成促進物質は Mn 以外に他の有機質が考えられる。核酸関連物質¹⁴⁾などの関与についても今後の検討課題である。

アオノリ、アオサは供試した *Lactobacillus* の 9 菌株中 7 菌株の酸生成を促進したが、2 菌株の酸生成を阻害した。*Lactococcus*、*Streptococcus* の 3 菌株には影響しなかった。このように、菌株によっては促進したり、阻害したりするので、各菌株ごとに確認することが必要である。

また、アオノリ、アオサにより酸生成を促進された菌株は Mn により促進されるが、阻害された *L. helveticus* B-1、*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO-13953 の両菌は Mn により促進されない¹⁵⁾。アオノリ、アオサによって促進される菌株と促進されない菌株との違いは、Mn への挙動の違いとの関連があることが示唆

乳酸菌の酸生成に及ぼすアオノリ, アオサの促進効果

される。なお、阻害物質についての検討は今後の課題である。

5. 要 約

(1) 脱脂乳に添加したアオノリ, アマノリ, コンブ, クロレラ水抽出液が, *Lactobacillus casei* YIT-9018 の酸生成に及ぼす効果について検討したところ, アオノリにクロレラと同程度の酸生成促進効果が認められた。

(2) アオノリ水抽出液中の *L. casei* YIT-9018 に対する酸生成促進物質は, Sephadex G-50, G-15 ゲル濾過で, 糖および核酸関連物質の一部と, アミノ酸, ペプチドが溶出する画分に溶出した。

また, アオノリ水抽出液の酸生成促進物質の大部分は Dowex 50-X 8 に吸着された。この樹脂に糖は吸着されず, 核酸関連物質は一部しか吸着されなかった。この樹脂でのイオン交換クロマトグラフィによって, 酸生成促進物質とアミノ酸, ペプチドとは分離された。

(3) アオノリ, アオサ水抽出液の灰化物に, *L. casei* YIT-9018, *L. casei* subsp. *casei* S-1 に対する酸生成促進物質がかなり残存した。灰化物の Mn 含量からみて, Mn がアオノリ, アオサの酸生成促進物質の一つであることが明らかになった。

また, アオノリ, アオサ 8 標品の酸生成量と Mn 含量の対数値の間に直線関係があり, その相関は強かった。アオサの方が Mn 含量が多く, 酸生成促進効果が大きかった。

(4) *L. casei* subsp. *casei* S-1 では, アオノリ, アオサ水抽出液の灰化物の酸生成促進効果が水抽出液よりもかなり少なかった。したがって, この菌株に対しては Mn のほかに, 有機質の酸生成促進物質の存在が示唆される。

(5) そのほか, アオノリ, アオサ水抽出液は, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B-5b, *L. acidophilus* L-54,

L. casei subsp. *casei* L-14, *L. paracasei* subsp. *paracasei* IFO-3533, *L. paracasei* subsp. *paracasei* S-2 の酸生成を著しく促進したが, *L. helveticus* B-1, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IFO-13953 の酸生成をかなり阻害した。

Lactococcus lactis subsp. *lactis* 527, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H-61, *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* 510 には影響が少なかった。

引 用 文 献

- 1) 永松 昇, 代田 稔, 武智芳郎: 特許公告, 昭和 35-175 (1960)
- 2) 中嶋昭正: 家政誌, **47**, 1085~1091 (1996)
- 3) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之: 食品分析ハンドブック, 建帛社, 東京, 482 (1973)
- 4) Trevelyan, W. E. and Harrison, J. S.: *Biochem. J.*, **50**, 298~303 (1952)
- 5) 日本化学会 (編): 実験化学講座第 23 巻 生物化学 I, 丸善, 東京, 126~130 (1957)
- 6) 日本化学会 (編): 実験化学講座第 15 巻 分析化学 (下), 丸善, 東京, 306~307 (1958)
- 7) 中嶋昭正, 吉開富士子: 福岡女短大紀要, **22**, 11~19 (1981)
- 8) 代田 稔, 遠藤 寛, 小沢一水: *New Food Ind.*, **7**, 33~38 (1965)
- 9) 代田 稔, 武智芳郎: 乳酸菌飲料文献集 I, ヤクルト本社, 東京, 127~132 (1963)
- 10) 武智芳郎: クロレラーその基礎と応用一, 学習研究社, 東京, 115~131 (1973)
- 11) Zielke, H., Kneifel, H., Webb, L. E. and Soeder, C. J.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 79~86 (1978)
- 12) 工藤 聡, 馬田三夫: 乳業技術協会資料, **33**, 10~19 (1983)
- 13) 中嶋昭正: 福岡女短大紀要, **33**, 1~12 (1987)
- 14) 中嶋昭正: 家政誌, **48**, 11~18 (1997)
- 15) 中嶋昭正: 福岡女短大紀要, **48**, 59~67 (1994)