



耐酸性を有する乳酸菌の検索

磯部由香, 松井宏樹*, 安見真帆, 成田美代

(三重大学教育学部, *三重大学生物資源学部)

原稿受付平成 18 年 9 月 25 日; 原稿受理平成 19 年 4 月 7 日

Screening of Acid-Tolerant Lactic Acid Bacteria

Yuka ISOBE, Hiroki MATSUI,* Maho YASUMI and Miyo NARITA

Faculty of Education, Mie University, Tsu 517-8507

*Faculty of Bioresource, Mie University, Tsu 517-8507

Lactic acid bacteria were isolated from fermented squid (Ika-kimuchi) with the aim of finding new probiotic bacteria. The isolated bacteria were exposed to a GYP medium at pH 2.0, 2.5, and 3.0 for four hours. All the bacterial strains survived at pH 3.0, and three of them, strains D-1, D-2 and D-3 retained their ability to grow at pH 2.0. These three acid-tolerant strains were grown in a medium with pepsin and bile, their growth not being affected. An analysis of the 16S rRNA sequences led to the identification of these three strains as *Lactobacillus plantarum*.

(Received September 25, 2006; Accepted in revised form April 7, 2007)

Keywords: acid tolerance 耐酸性, lactic acid bacteria 乳酸菌, *Lactobacillus plantarum*.

1. 緒 言

乳酸菌とは糖類をエネルギー源として発酵し, 多量の乳酸を生成する一方, たんぱく質を分解しても腐敗産物を産出しないなど, ヒトにとって有用な細菌の一群¹⁾であり, 多くの発酵食品に存在しており, 我が国でも, 味噌, 醤油, 日本酒, 漬物などの発酵熟成に深く関わっている. この乳酸菌は, 近年, 健康志向により「発酵過程において有用であるもの」という視点から, 「栄養生理機能の中心に生きた乳酸菌が存在し, この機能性を積極的に利用しようとするもの」という視点に変化してきている. これはプロバイオティクス (probiotics) と呼ばれ, 「適正量を摂取した際に宿主に有用な作用を示す生菌体」と定義される²⁾. プロバイオティクスの機能は様々あるが, 腸内感染防御, 免疫応答の調節, アレルギーおよび自己免疫疾患の改善, 炎症性腸疾患の改善, 過敏性腸症候群ならびにストレス応答の緩和, 血圧降下作用, 皮膚の健康維持などに注目が集まっている³⁾. 発酵食品中の乳酸菌がプロバイオティクスとして機能するにはいくつかの条件があるが, 特に重要なことは, 胃酸や胆汁を含む消化液に

対して耐性を有し, 生きたまま腸管に達することである²⁾. そこで, 本研究においては, 水産発酵食品中から乳酸菌を分離し, プロバイオティクスとして活用することを最終目的として, *in vitro* における酸耐性について検討を行った.

2. 実験材料および方法

(1) 使用菌株

市販の発酵食品であるイカキムチ (新潟県産) を滅菌生理食塩水でホモジナイズ後, 希釈液を 0.001% アジ化ナトリウムおよび 0.001% シクロヘキシミドを添加した GYP 寒天平板培地 (グルコース 1.0%, 酵母エキス 1.0%, ペプトン 0.5%, 肉エキス 0.2%, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, NaCl 0.01%, ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート 1%) に塗布し, BBL ガスパック (BECTON DICKINSON Microbiology Systemes 製) を用いて 25℃ で約 1 週間, 嫌氣的に培養を行った. 培養後, 色・形等の肉眼的観察および顕微鏡観察を行い, 見た目の異な

るコロニーを釣菌し、同培地にて25℃で3~7日嫌氣的に純粋分離培養し、分離した細菌をGYP高層培地に釣菌後、1週間培養し保存菌株とした。

(2) 酸耐性試験

1) 酸耐性試験

分離乳酸菌を液体GYP培地に接種し、25℃で16時間培養したものを前培養液とした。この培養液の10倍希釈液を、pH 2, 2.5, 3に調製した液体GYP培地に、1%ずつ接種し、37℃で3時間培養した。培養後、滅菌0.1Mリン酸バッファー (pH 6.8) で中和後、滅菌生理食塩水にて適宜希釈し、同培地で25℃で1~2日間、BBLガスパックを用いて嫌氣的に培養を行い、生菌数を測定した。また、対照として、前培養液の生菌数を測定した。なお1菌株に対し、2連で2回ずつ実験を行い、pH 2まで耐性が見られた菌株については確認のため、再度、確認実験を行った。

2) 人工胃液耐性試験

人工胃液に対する耐性試験は東らの方法⁴⁾に従った。上記試験で酸耐性が見られた菌株を液体GYP培地に接種し、25℃で18時間前後培養したものを前培養液とした。pHを2, 2.5, 3に調製し、0.04%ペプシンを添加した液体GYP培地 (人工胃液) に、各菌株の前培養液を1%ずつ接種し、37℃で3時間培養後、酸耐性試験と同様に生菌数を測定した。また、対照としてペプシン無添加のpH 6.8の液体GYP培地についても同様の操作を行った。

3) 人工胆汁液耐性試験

胆汁に対する耐性試験は東らの方法⁴⁾に従った。酸耐性が見られた菌株を、液体GYP培地に接種し、25℃で18時間前後培養したものを前培養液とした。胆汁末を0.1, 0.2または0.3%添加した液体GYP培地 (人工胆汁液) および対照として用いた胆汁末無添加培地に、前培養液を1%ずつ接種し、37℃で18時間培養した。培養後、培養液を蒸留水にて適宜に希釈し、660 nmにおける吸光度を測定した。なお、1菌株に対し4回ずつ試験を行った。

(3) 人工消化液耐性菌株の推定

人工消化液耐性を有する乳酸菌の推定は分子生物学的手法を用いて行った。すなわち、耐酸性菌のDNAをGodonらの方法⁵⁾により抽出し、精製後、16SリボソームRNA遺伝子 (16S rDNA) のほぼ全長をPCRにより増幅させた。プライマーおよび反応条件はTajimaらの報告⁶⁾に従った。得られた増幅断片はPresequencing kit (usb corporation, Cleveland, OH)

で精製した。このDNA断片をテンプレートとして用い、DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) によりシーケンス反応を行った。プライマーには530f (5'-GTGC CAGCMGCCGCGG-3') あるいは1392r (5'-ACGGGC GGTGTGTRC-3') を用いた⁷⁾。塩基配列の解読はABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) で解読した。このようにして得られた746-815塩基対の16S rDNAの部分配列はNCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) により相同性検索を行い、属種のレベルまで推定した。得られた塩基配列は日本DNAデータベース (DDBJ) に登録した (アクセッション番号 AB295638-AB295640)。

3. 実験結果

(1) 酸耐性試験

イカキムチからGYP培地を用いて、平板分離培養法により分離した18株について、酸耐性試験を行った。その結果、表1に示すとおり、対照として用いた*Lactobacillus casei* subsp. *casei* はpH 3でも生育しなかったが、今回分離したすべての菌株において、pH 3における耐性が確認された。また、pH 2.5まで生育した株が12株、pH 2まで生育した株がD-1, D-2およびD-3の3株であった。

(2) 人工胃液耐性試験

次に、pH 2までの酸耐性が確認された菌株を用いて、ペプシン耐性試験を行った。表2に示すとおり、D-1, D-2およびD-3株における人工胃液耐性は、酸耐性試験の結果と比較して、同程度の生菌が残存していた。このことから、D-1, D-2およびD-3株は、ペプシンによる影響を受けないと考えられた。

(3) 人工胆汁液耐性試験

次に、pH 2までの酸耐性が確認された菌株を用いて、胆汁液耐性試験を行った。表3に示すとおり、D-1, D-2およびD-3株における人工胆汁液耐性は、無添加の際の濁度と比較して、0.1%は96%, 0.2%は94%, 0.3%は89%と、非常に高い耐性であった。また、各菌株間における人工胆汁液耐性に有意差は認められず、同程度であった。

(4) 人工消化液耐性が確認された乳酸菌の推定

上記の結果より、人工消化液耐性が確認されたD-1, D-2およびD-3株について、形態観察および性状試験を行った。その結果、3株とも、桿菌であり、グラム

耐酸性を有する乳酸菌の検索

表 1. 分離乳酸菌の耐酸性

株	生菌数 (Log cfu/ml)			
	pH 6.8	pH 3	pH 2.5	pH 2
A-1	8.04±0.16	6.38±0.23	0	0
A-2	7.96±0.37	6.67±0.07	5.58±0.32	0
A-3	8.73±0.04	6.91±0.10	5.23±0.21	0
B-1	8.48±0.04	6.79±0.02	6.76±0.01	0
B-2	8.24±0.08	6.62±0.03	6.61±0.02	0
B-3	8.19±0.09	6.44±0.07	6.42±0.06	0
C-1	7.88±0.06	6.40±0.04	6.11±0.08	0
C-2	7.28±0.06	5.58±0.05	5.46±0.06	0
C-3	6.71±0.49	5.36±0.06	5.29±0.03	0
D-1	8.89±0.41	6.91±0.02	6.83±0.04	5.48±0.32
D-2	8.81±0.16	7.04±0.23	6.99±0.17	4.31±0.11
D-3	8.81±0.03	6.75±0.01	5.67±0.03	4.17±0.05
E-1	5.26±0.43	4.05±0.06	0	0
E-2	7.29±0.02	5.46±0.03	0	0
E-3	7.81±0.06	5.88±0.03	5.86±0.03	0
F-1	8.60±0.05	6.55±0.03	6.43±0.02	0
F-2	8.81±0.03	6.85±0.02	6.85±0.02	0
F-3	8.44±0.06	6.54±0.06	6.48±0.07	0

表 2. 分離乳酸菌の人工胃液耐性

株	生菌数 (Log cfu/ml)			
	pH 6.8	pH 3	pH 2.5	pH 2
D-1	8.77±0.04	6.91±0.02	6.83±0.02	4.82±0.02
D-2	8.89±0.01	7.15±0.10	6.98±0.01	5.36±0.04
D-3	8.95±0.02	7.14±0.07	7.04±0.04	5.48±0.03

表 3. 分離乳酸菌の耐胆汁酸性

株	吸光度 (OD 660)			
	胆汁末濃度 (%)			
	0	0.1	0.2	0.3
D-1	0.90±0.03	0.86±0.02	0.83±0.02	0.81±0.02
D-2	0.89±0.03	0.84±0.04	0.84±0.04	0.78±0.04
D-3	0.90±0.01	0.88±0.02	0.86±0.01	0.81±0.02

染色陽性, カタラーゼ試験陰性, 糖から乳酸を生成し, その発酵形式はホモ型であった。

また, 3 株の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を解析し, 「BLAST」により相同性検索を行った結果, D-1, D-2 および D-3 株は, いずれも *Lactobacillus plantarum* であると推定され, 相同性は 99% であった。

4. 考 察

通常, 空腹時のヒトの胃内の pH は 1~2 であるが, 食物摂取時には pH 5~6 まで上昇するとされている⁸⁾. そのため, 今回は Hyronimus ら⁹⁾ が行った実験にもとづいて, pH を 2, 2.5, 3 に設定した. 今回, 試験を行った菌株はいずれも pH 3 までの耐性を示し, そ

のうちのほとんどが pH 2.5 までの耐性を示した。このときの菌数は、対照の 10 分の 1 から 100 分の 1 の減少であったことから、他の食品といっしょに摂取し、胃内の pH を上昇させることにより腸まで到達させることも可能であると考えられる。また、D-1、D-2 および D-3 の 3 株は pH 2 まで生残し、菌数の減少は 1 万分の 1 程度であった。よって、この 3 株については、単独で 10^5 個以上の菌数を摂取することにより、生きたまま小腸まで到達させることができることから、プロバイオティクスとしての利用の可能性が示唆される。また、これまでの報告から見て、*L. plantarum* の酸耐性の程度は様々であるが^{8)~14)}、この中で今回分離された D-1、D-2、D-3 株は比較的耐性の高い方であった。

ヒトの胃内は、胃酸の働きによって、pH が低いだけでなく、消化酵素であるペプシンが働いているため、殺菌力が非常に高い状態にある⁸⁾。そのため、強酸性下における耐性が確認された乳酸菌であっても、同時にペプシンにおける耐性がない場合、生きて腸管に到達する可能性を検証することができないと考えられる。よって、酸耐性試験において、耐性が確認された D-1、D-2、D-3 株について人工胃液耐性試験を行ったところ、ペプシンの影響は見られなかった。

腸管内の胆汁は、摂取した食物の種類により分泌量が異なること、消化管の部位によりその濃度に差があることなどから、腸管内の胆汁濃度を一定値として求めることは困難と考えられる⁴⁾が、Davenport は、腸管内の胆汁濃度は最高値で 2% と報告している⁷⁾。胆汁濃度 2% は、胆汁末濃度 0.2% に相当することが知られており、0.1、0.2 および 0.3% に設定して実験を行った。D-1、D-2、D-3 株と同じ *L. plantarum* については耐胆汁酸性を有する菌株についての報告がいくつかある^{10)~12)15)~19)}が、実験条件が異なるため、比較は難しい。同条件で実験を行った同じ *Lactobacillus* 属の *L. gasseri* NY 0509 や *L. casei* NY 1301⁴⁾と比較すると、本実験で分離された 3 株の耐胆汁酸性は非常に高いことが明らかとなった。

今回、分離された *L. plantarum* は、サイレージ、しば漬け、キムチ、すんき、ザワークラウト²⁰⁾などの植物性発酵食品や、マサイミルク²¹⁾、サラミソーセージ²⁰⁾などの動物性食品からも検出されており、日本人にとって、これまでに食経験が深い乳酸菌の 1 つである。この菌を用いて調製した発酵乳の摂取による糞便細菌叢のバランス改善効果²²⁾も報告されている。このことから、D-1、D-2、D-3 株もプロバイオティクスと

して応用の可能性が期待できる。しかし、耐酸性および人工消化液耐性を有することと生きて腸管に達することは同義ではないことから、経口投与した菌株の糞便中での検出など、今後は *in vivo* における効果についての検討を行う必要がある。

5. 要 約

新規プロバイオティクス乳酸菌の検索を目的に、市販の発酵食品から乳酸菌の分離を行い、分離された菌株について *in vitro* における酸耐性の検討を行った。

1) GYP 白亜寒天培地を用いて、イカキムチから分離した乳酸菌 18 株について酸耐性試験を行ったところ、D-1、D-2 および D-3 の 3 株については pH 2 までの耐性が認められた。また、この 3 株はいずれもペプシンおよび胆汁末の影響をほとんど受けなかった。

2) 耐酸性を有する 3 株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析し、「NCBI BLAST」を用いて相同性検索をした結果、D-1、D-2 および D-3 株は、いずれも *Lactobacillus plantarum* であると推定された。

本研究は、山村乳業(有)との共同申請により採択された平成 15 年度三重県医療・健康・福祉産業学官共同研究補助事業補助金により行った。また、塩基配列の解読は三重大学生命科学研究支援センター遺伝子実験施設で行った。

引 用 文 献

- 1) 中澤勇二, 細野明義 (編):『発酵乳類の機能—健康科学の検索—』, 食品資材研究会, 東京, 21 (1988)
- 2) Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1 (2002)
- 3) 伊藤喜久治, 五十君静信, 佐々木隆, 高井俊明, 服部正平, 森田秀利 (編):『プロバイオティクスとバイオジェニクス 科学的根拠と今後の開発展望』, エヌティーエス, 東京, 26-33 (2005)
- 4) 東 幸雄, 伊藤和徳, 佐藤 学: *Lactobacillus gasseri* NY 0509 および *Lactobacillus casei* NY 1301 の人工消化液耐性並びに腸内有害菌抑制効果, 日食科工誌, **48**, 656-663 (2001)
- 5) Godon, J. J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F., and Moletta, R.: Molecular Microbial Diversity of an Anaerobic Digester as Determined by Small-Subunit rDNA Sequence Analysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2802-2813 (1997)
- 6) Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H., and Benno, Y.: Rumens

耐酸性を有する乳酸菌の検索

- Bacterial Diversity as Determined by Sequence Analysis of 16S rDNA Libraries, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **29**, 159-169 (1999)
- 7) Koike, S., Yoshitani, S., Kobayashi, Y., and Tanaka, K.: Phylogenetic Analysis of Fiber-Associated Rumen Bacterial Community and PCR Detection of Uncultured Bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.*, **229**, 23-30 (2003)
 - 8) 武藤泰敏 (編著): 『消化・吸収—基礎と臨床—』, 第一出版, 東京, 63 (2002)
 - 9) Hyronimus, B., Le Marrec, C., Sassi, A. H., and Deschamps, A.: Acid and Bile Tolerance of Spore-Forming Lactic Acid Bacteria, *Int. J. Food Microbiol.*, **61**, 193-197 (2000)
 - 10) Haller, D., Colbus, H., Ganzle, M. G., Scherenbacher, P., Bode, C., and Hammes, W. P.: Metabolic and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria in the Gastro-Intestinal Ecosystem: A Comparative *In Vitro* Study between Bacteria of Intestinal and Fermented Food Origin, *Syst. Appl. Microbiol.*, **24**, 218-226 (2001)
 - 11) Sanni, A. I., Morlon-Guyot, J., and Guyot, J. P.: New Efficient Amylase-Producing Strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* Isolated from Different Nigerian Traditional Fermented Foods, *Int. J. Food Microbiol.*, **72**, 53-62 (2002)
 - 12) Charalampopoulos, D., Pandiella, S. S., and Webb, C.: Evaluation of the Effect of Malt, Wheat and Barley Extracts on the Viability of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria under Acidic Conditions, *Int. J. Food Microbiol.*, **82**, 133-141 (2003)
 - 13) G-Alegria, E., Lopez, I., Ruiz, J. I., Saenz, J., Fernandez, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., and Ruiz-Larrea, F.: High Tolerance of Wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* Strains to Lyophilisation and Stress Environmental Conditions of Acid pH and Ethanol, *FEMS Microbiol. Lett.*, **230**, 53-61 (2004)
 - 14) 中川良二, 藪内裕子, 八十川大輔, 長島浩二: *Lactobacillus plantarum* HOKKAIDO を用いた豆乳ヨーグルトの製造およびその機能性, 日食科工誌, **52**, 140-143 (2005)
 - 15) Brink, M., Todorov, S. D., Martin, J. H., Senekal, M., and Dicks, L. M.: The Effect of Prebiotics on Production of Antimicrobial Compounds, Resistance to Growth at Low pH and in the Presence of Bile, and Adhesion of Probiotic Cells to Intestinal Mucus, *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 813-820 (2006)
 - 16) Bron, P. A., Marco, M., Hoffer, S. M., Van Mullekom, E., de Vos, W. M., and Kleerebezem, M.: Genetic Characterization of the Bile Salt Response in *Lactobacillus plantarum* and Analysis of Responsive Promoters *In Vitro* and *In Situ* in the Gastrointestinal Tract, *J. Bacteriol.*, **186**, 7829-7835 (2004)
 - 17) Xanthopoulos, V., Hatzikamari, M., Adamidis, T., Tsakalidou, E., Tzanetakis, N., and Litopoulou-Tzanetaki, E.: Heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* Isolates from Feta Cheese throughout Ripening, *J. Appl. Microbiol.*, **88**, 1056-1064 (2000)
 - 18) Park, Y. S., Lee, J. Y., Kim, Y. S., and Shin, D. H.: Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Feces of Newborn Baby and from Dongchimi, *J. Agri. Food Chem.*, **50**, 2531-2536 (2002)
 - 19) Coeuret, V., Gueguen, M., and Vernoux, J. P.: *In Vitro* Screening of Potential Probiotic Activities of Selected Lactobacilli Isolated from Unpasteurized Milk Products for Incorporation into Soft Cheese, *J. Dairy Res.*, **71**, 451-460 (2004)
 - 20) 岡田早苗: 注目の機能性食品素材「乳酸菌」乳酸菌の分類, 月刊フードケミカル, **5**, 29-38 (1989)
 - 21) Isono, Y., Shingu, I., and Shimizu, S.: Identification and Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Masai Fermented Milk in Northern Tanzania, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 660-664 (1994)
 - 22) 久米村恵, 戸羽正道, 曾川芳郎, 清水精一, 川口信三: *Lactobacillus plantarum* を用いて調製した発酵乳の生理機能 I. *Lactobacillus plantarum* の大腸到達性および健康成人の糞便細菌叢に及ぼす影響, 腸内細菌学雑誌, **15**, 15-20 (2001)