

森林資源を活用した新たな食品開発

—植物由来乳酸菌の探索と食品への利用検討—

原田雅典*¹ 和田健太朗*² 松本美樹*² 秋山稔*¹ 山川翔平*³

New Food Development Utilizing Forest Resources by Plant-derived Lactic Acid Bacteria

HARADA Masanori*¹, WADA Kentaro*², MATSUMOTO Miki*²,
AKIYAMA Minoru*¹, YAMAKAWA Shohei*³

抄録

新規食品開発を目的として、植物由来の乳酸菌を探索した。埼玉県秩父地域の森林資源（花、葉、苔など）から乳酸菌を分離したところ、凝乳特性のあるホモ型乳酸菌を単離した。これらは16S rRNA塩基配列解析などから、*Lactococcus lactis*と*Lactiplantibacillus plantarum*と同定された。食経験がある属種のため、食品利用が可能であると考えられた。

キーワード：乳酸菌，植物由来，食品，乳製品，秩父

1 はじめに

埼玉県の森林は、全県面積の約32%を占め、県土保全・水源のかん養・保健休養など貴重な役割を担っている。また森は、広葉樹や針葉樹、動物、昆虫、微生物など、様々な動植物によって構成され、貴重な地域資源である。特に、埼玉県西部に位置する秩父地域は、面積の約8割に森林が広がっており、豊かな森林資源を活用して地域経済を活性化させる製品開発が期待されている。

近年、消費者の健康志向により、発酵食品に関心が高まっている。総務省統計局の家計調査(令和2年)によれば、1世帯当たりの牛乳やチーズの消費量は埼玉が全国上位であり、乳製品の需要が高い地域であると言える。

そこで本研究では、秩父地域の森林資源として、乳製品開発に必要な不可欠である乳酸菌に着眼した。

植物由来の乳酸菌を探索して食品への利用を検討することとし、単離した乳酸菌から新たな乳製品を開発することを最終目標とした^{1)~7)}。

2 実験方法

2.1 乳酸菌の分離

秩父地域の森林資源である、花、葉、樹皮、実、種、苔を、乳酸菌の分離源とした。採取した試験片は、常温保存牛乳(市販)、またはシクロヘキシミドとアジ化ナトリウムを各々10 ppm添加したMRS培地(Difco社製)で、30°Cで約5日間集積培養した。常温保存牛乳では、継代培養(30°C・約2日間)を3回実施後、pH低下能(pH < 5.0)及び凝乳性(目視)を指標にスクリーニングした。シクロヘキシミドとアジ化ナトリウムを添加したMRS培地では、白濁の有無(目視)を指標にスクリーニングした。

スクリーニングした培養液を滅菌りん酸緩衝生理食塩水で段階希釈した後、0.5%炭酸カルシウムを添加したMRS寒天平板培地に塗抹し、30°Cで約2日間培養した。コロニー形成後、MRS培地に

*¹ 現 材料技術担当*² 食品・バイオ技術担当*³ 総務・事業化・製品開発支援担当

接種し、30℃で約2日間培養した。最後に、20%グリセロール添加 MRS 培地にて-80℃で保存し、これらを乳酸菌の候補株とした。

2.2 乳酸菌の選抜

乳酸菌の候補株に対し、グラム染色を行った。グラム染色は、フェイバーG「ニッスイ」(日水製薬(株)製)を使用し、青色に染色されたものをグラム陽性とした。グラム陽性であるものは、カタラーゼ試験(バイオメリュー・ジャパン(株)製 ID カラーカタラーゼを使用)を行い、ガスの発生が観察されないものをカタラーゼ陰性とした。発酵形式は、ガストラップチップ入り MRS 培地で純粋培養(30℃・約2日間)し、ガスの生産性を目視で確認して、ホモ発酵型かヘテロ発酵型かを判定した。

形態観察は、光学顕微鏡((株)ニコン製 ECLIPSE 80i)と走査型電子顕微鏡(日本電子(株)製 JSM-IT300LA)により行った。走査型電子顕微鏡用の試料作製は、2%グルタルアルデヒド溶液で固定し、50~100%エタノール溶液で順次脱水後、t-ブチルアルコール凍結乾燥を行った。

2.3 乳酸菌の凝乳性

1 mL の MRS 培地で、乳酸菌の候補株を 30℃・約2日間前培養した。5 mL の常温保存牛乳(市販)に、前培養液を 100 μL 添加し、30℃及び40℃で24時間発酵させた。発酵後、目視観察と pH 測定により凝乳性を評価した。

2.4 乳酸菌の同定

2.4.1 同定キットによる菌種推定

乳酸菌同定キット(バイオメリュー・ジャパン(株)製 API50CHL)を使用して行った。培養後、プレート上の49種類の炭素源の資化性パターンから菌種を推定した。

2.4.2 遺伝子解析による菌種同定

細菌の種の同定に用いられる 16S rRNA の塩基配列を解析した。(株)マクロジェン・ジャパンへの委託試験により行った。

3 結果及び考察

3.1 乳酸菌の分離・選抜

本研究では、秩父地域の花、葉、樹皮、実、種、苔から合計500検体サンプリングを行い、乳酸菌の分離を試みた。その結果、乳酸菌の候補株として56菌株を得ることができた。

乳酸菌の候補株に対し、グラム染色、カタラーゼ試験、ガス発酵試験を行ったところ、グラム陽性・カタラーゼ陰性・ホモ発酵型に該当したものは56菌株中44菌株であった。さらに、光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡を使用して、球菌や桿菌の形態を確認した(図1,2)。

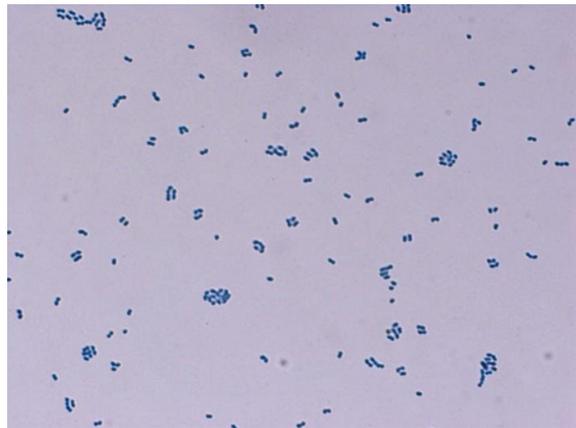


図1 グラム染色後の光学顕微鏡観察結果

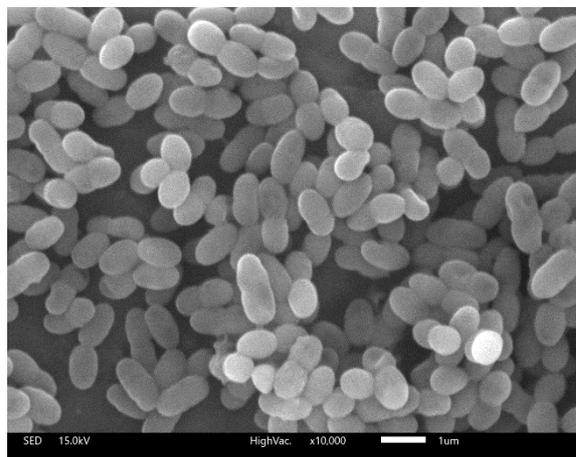


図2 走査型電子顕微鏡による観察結果

3.2 乳酸菌の凝乳性

30℃及び40℃で24時間の発酵試験後、目視観察により凝乳が確認され、pHが5.0未満に低下したものは44菌株中11菌株であった(図3)。

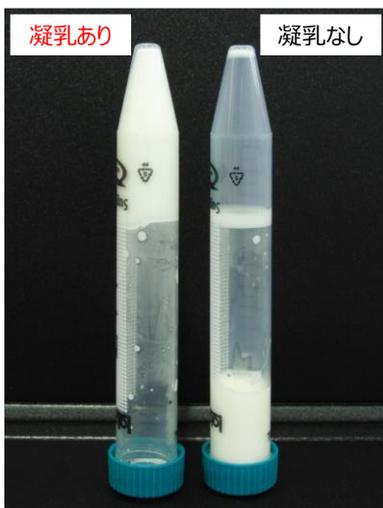


図3 凝乳性の評価

3.3 乳酸菌の同定

凝乳性が目視で確認され、pHが5.0未満に低下した11菌株に対し、乳酸菌同定キットを用いた菌種推定と16S rRNAの塩基配列解析を行った結果、*Lactococcus lactis*が4菌株、*Lactiplantibacillus plantarum*が2菌株であった(表1)。分離培地として常温保存牛乳を用いた場合 *Lactococcus lactis* が、シクロヘキシミドとアジ化ナトリウムを各々10 ppm 添加した MRS 培地を用いた場合 *Lactiplantibacillus plantarum* が同定され、乳酸菌の属種がスクリーニングの条件に影響を受ける結果

となった。同定された乳酸菌は、食経験がある属種のため、食品利用が可能であると考えられた。

4 まとめ

植物由来乳酸菌を利用した新たな乳製品開発を目的として、埼玉県秩父地域の花、葉、樹皮、実、種、苔から、乳酸菌を分離した。

500 検体サンプリングのうち、グラム陽性・カタラーゼ陰性・ホモ発酵型・凝乳性が確認されたものは11菌株で、乳酸菌の属種が特定されたものは6菌株であった。これらは、*Lactococcus lactis* または *Lactiplantibacillus plantarum* と同定され、食経験がある属種のため、食品利用が可能であると考えられた。

謝辞

本研究を進めるにあたり、森林資源からのサンプリングに御協力いただいた特定非営利活動法人秩父百年の森の坂本裕三様、島崎武重郎様、斎藤隆様に感謝いたします。

また、客員研究員として御指導いただきました、高崎健康福祉大学の辻聡助教に感謝の意を表します。

表1 単離した乳酸菌の同定結果

サンプリングNo	19	82	161	184	287	298
分離源	葉	苔	苔	苔	花	花
グラム染色	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
カタラーゼ反応	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
発酵形式	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ	ホモ
細胞形態	球菌	球菌	球菌	球菌	桿菌	桿菌
凝乳性	あり (30°C)	あり (30°C)	あり (30°C)	あり (30°C)	あり (30°C・40°C)	あり (30°C・40°C)
推定属種	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
相同率	99%	99%	100%	99%	99%	99%

参考文献

- 1) 内村泰, 岡田早苗, ” 乳酸菌実験マニュアル - 分離から同定まで - ”, 朝倉書店, 6-124 (1992)
- 2) 中川智行, 久保田太樹, 西津貴久, 妙田貴生, 久保田和花, 田島彩奈, 若山敬嗣, 日比野歩美, 佐藤優太, 福岳寛隆, 早川享志: 岐阜県郡上市の地域乳酸菌のスクリーニングとヨーグルト発酵菌としての評価, 美味技術学会誌, **13**, 2, 5-11 (2014)
- 3) 大澤克己, 松井淳一, 丸田正治, 森田祐子, 斉藤信博: すんきから分離した植物由来乳酸菌によるヨーグルトの開発, 日本食品科学工学会誌, **62**, 12, 585-590 (2015)
- 4) 玉川 英幸, 伊藤 良仁: きゅうり古漬けから単離された乳酸菌の同定と諸性質, 岩手県工業技術センター研究報告, **19**, 62-68 (2017)
- 5) 西垣ひろ美, 西尾昭: 鳥取県内の生乳から分離した乳酸菌を使用したカマンベールチーズの製造, 鳥取県産業技術センター研究報告, **21**, 23-28 (2018)
- 6) 都築正男, 藤野布久代, 西尾実紗, 北田善三: クズの根からの乳酸菌の分離とその特性, 奈良県産業振興総合センター研究報告, **45**, 13-19 (2019)
- 7) 袴田雅俊, 浅沼俊倫, 松野正幸, 堀池隼雄, 久保田かおり, 松下正明: 海洋由来乳酸菌を用いた静岡チーズの開発, 静岡県工業技術研究所研究報告, **16**, 24-28 (2023)