

# 発芽玄米浸漬水中から分離された乳酸菌を用いた 豆乳ヨーグルトの作成

藤原 秀彦<sup>1)</sup> 牧井 忠<sup>2)</sup> 米元 俊一<sup>1)</sup>

## 【要 旨】

豆乳ヨーグルトは乳酸菌の乳酸発酵により生じた乳酸が豆乳中のタンパク質を変性させ固化したものである。本研究では福岡県宗像市の発芽玄米浸漬水中から乳酸菌を分離し安全性を評価し、より風味のよい豆乳ヨーグルトを作成し、市販することを目的とした。発芽玄米浸漬水中から3株の乳酸菌様微生物を分離し、同定を行った結果、病原性・毒性がない微生物であることが示唆された。これら2菌株を用い豆乳ヨーグルトを作成した。

## 【キーワード】

豆乳ヨーグルト、乳酸菌、DNA シーケンス

## 【はじめに】

乳酸菌とは、一般的に酸素分圧の低い条件下でグルコースのような単糖をホモ乳酸発酵で乳酸を、ヘテロ乳酸発酵により乳酸およびアルコール、二酸化炭素を生成しエネルギーを獲得する微生物群の総称である。<sup>1)</sup>本菌はグラム陽性細菌で細胞形態が球状の *Lactococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Leuconostoc* 属、*Pediococcus* 属細菌などが存在し、一方で細胞形態が桿状の *Lactobacillus* 属、*Bifidobacterium* 属細菌などが存在する。また、生息域によって植物性乳酸菌と動物性乳酸菌に分類される。植物性乳酸菌は植物の表面などに生息し、主に日本のぬか漬けや韓国のキムチ、中国のザーサイ、ドイツのザワークラウトなどの植物を原料とした発酵食品製造に用いられる。一方、動物性乳酸菌は動物の腸管内などに生息し、ヨーグルトなどの動物性の乳等を原料とした発酵食品製造に用いられる。これら乳酸菌群は、前述のように発酵食品製造に用いられ、プロバイオティクスへの関心の高まりから一般に好まれる微生物群であるが、*Streptococcus* 属細菌の中には *S. pyogenes* や、*S. pneumoniae* はヒトに対し病原性を示すものも存在するので注意が必要である。<sup>1)</sup>

ヨーグルトとは、動物（主に牛）の乳を、動物性乳酸菌を用いて発酵させたものである。乳酸菌は乳中の乳糖を分解しグルコースへと変換する。グルコースは解糖もしくはペントースリン酸

<sup>1)</sup> 別府大学食物栄養科学部発酵食品学科

<sup>2)</sup> 南マキイ

経路によりピルビン酸へと酸化される。さらにピルビン酸は還元され、乳酸を生成する。この乳酸により乳中のタンパク質が変性し、凝固したものがヨーグルトである。

一方、豆乳中には大豆タンパク質が豊富に含まれる。この大豆タンパク質をにがりに含まれる  $Mg^{2+}$  を用いて凝固させたものが豆腐である。この大豆タンパク質は pH を酸性にすると凝固する性質を持っている。この性質を利用し、乳酸を用いて豆乳を凝固させたものが豆乳ヨーグルトである。

本研究では福岡県福岡市にて販売されている豆乳ヨーグルト製造に用いられる発芽玄米浸漬水中から植物性乳酸菌を分離し、その同定を行った。同定を行った乳酸菌を用い、より風味のよい豆乳ヨーグルトの作成を行った。

## 【材料と方法】

### 1. 豆乳ヨーグルト

豆乳ヨーグルトは福岡県福岡市のスーパーマーケットマキイで市販されている物を用いた。本豆乳ヨーグルトは、福岡県宗像市の自然農タッキーベジガーデンにて、平成25年に1ヶ月間天日干したヒノヒカリ玄米を浸漬した水を乳酸菌種とし、福岡県糸島市のフクユタカの豆乳に添加し室温で一晩培養したものである。

### 2. 菌株の分離

1の乳酸菌種を適宜希釈し、MRS+0.1%CaCO<sub>3</sub>寒天培地に塗布した。MRS+0.1%寒天培地組成は表1に示す。塗布した寒天培地は、アネロパック嫌気を用いて37℃で2日間嫌気培養した。出現したコロニーのうち、CaCO<sub>3</sub>が溶解したクリアゾーンを形成したものを酸生成菌とし、コロニーの色、形が異なるものを選択した。

表1 MRS 寒天培地組成 (g/L, pH6.2)

Peptone	10	Yeast Extract	4	Glucose	20	Tween80	1mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	Sodium Acetate	5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> -citrate	2	MgSO <sub>4</sub>	0.2
MnSO <sub>4</sub>	0.5	Meat Extract	10	CaCO <sub>3</sub>	1		

### 3. DNA 抽出

DNA 抽出は Sambrook の手法を参考にした。<sup>2)</sup>MRS 寒天培地で一晩培養した菌体を滅菌水とコンラージ棒を用いて集菌し、0.1M Tris-HCl (pH7.0) で菌体を洗浄した。Proteinase K (20 mg/mL) にて一晩反応後、フェノール/クロロフォルム抽出で菌体破碎およびタンパク質の除去を行った。さらに、RNase 処理後、再度フェノール/クロロフォルム抽出を行い、RNase の除去を行った。0.6倍量のイソプロパノールを加え、-80℃で2時間インキュベート後、15,000rpmで20分間遠心分離しDNAを沈殿させた。上澄みを除去し、70%エタノールで沈殿を洗浄し、真空乾燥を行った。沈殿に適量のTEバッファーを加え、4℃で十分に時間をかけてDNAを溶解させた。溶解したDNAは電気泳動で存在を確認し、NanoDropでDNA濃度を1μg/mLに調整した。

#### 4. PCR とクローニング、DNA シーケンス

菌株の同定を行うために、16S rRNA 遺伝子を PCR で増幅した。用いたプライマーの配列を表 2 に示す。PCR 反応は Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) を用いて製造者の推奨する方法で行った。PCR 反応後電気泳動にて増幅を確認し、MagExtractor<sup>™</sup>-PCR & Gel Clean up-(TOYOBO) を用いて DNA を精製した。生成した DNA 断片を北海道システム・サイエンス株式会社 (<http://www.hssnet.co.jp>) に依頼し塩基配列を決定した。

表 2 用いたプライマー

名前	配列	Tm 値 (°C)
27F	5'-AGAGTTTGATCACTGGCTCAG-3'	56.5
907R	5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'	50.2

#### 5. BLAST 検索

決定された塩基配列は、BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて相同性検索を行った。この際相同性検索を行った塩基配列は、フォワードとリバースプライマーで解析された配列のうち、保存された領域を用いた。

### 【結果と考察】

#### 1. 乳酸菌の分離と DNA 増幅

乳酸菌種から 3 株の乳酸菌を分離し M1 株、M2 株、M3 株とした。これら 3 株の DNA を抽出し、PCR 法で 16S rRNA 遺伝子を増幅したところ、M3 株の増幅が認められなかった (図 1)。M3 株において真正細菌に保存されている 16S rRNA 遺伝子が増幅しなかったことから、本菌株が真正細菌ではないことが示唆された。本研究では豆乳ヨーグルトの作成を目的としているため、真正細菌以外の可能性がある M3 株を今後の研究に用いないこととした。

#### 2. 乳酸菌の同定

M1 株、M2 株の 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析を行った。得られた塩基配列を BLAST を用いて相同性検索した。その結果 M1 株が *Lactobacillus casei* と、M2 株が *Lb. plantarum* とそれぞれ 99% の相同性を示したことから、M1 株は *Lb. casei*、M2 株は *Lb. plantarum* であることが明らかとなった。なお、両種ともにこれまでに毒性・病原性の報告がないため M1 株、M2 株も同様に毒性・病原性がないものと判断した。

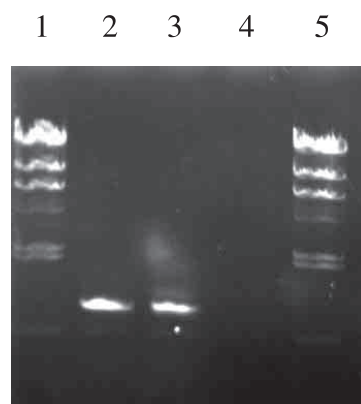


図 1 16S rRNA 遺伝子の増幅  
Lane 1, 5 :  $\lambda$ /HindIII マーカー、  
Lane 2 : M1 株、Lane 3 : M2 株、  
Lane 4 : M3 株のゲノム DNA を増幅したもの

### 3. 豆乳ヨーグルト作成

スーパーマーケットマキイでは玄米浸漬水を乳酸菌種とし、豆乳ヨーグルトを製造していたが、本研究で分離したM1株、M2株を用いて改めて豆乳ヨーグルトの作成を行った。クリーンベンチ中で滅菌した100mL容広口瓶に豆乳を適量入れ、MRS寒天培地に生育させたM1株、M2株を、コンラージ棒を用いて掻き取り、それぞれ別の豆乳に植菌した。37℃で一晩静置培養した。固化した豆乳ヨーグルトをスターターとして、滅菌した1.5L容広口瓶にM1株、M2株で作成した豆乳ヨーグルトをそれぞれ、5mL、5mL添加し、37℃で一晩静置培養した。その結果、M1株、M2株のみから作成した豆乳ヨーグルトと比較して、酸味が抑えられたまろやかな豆乳ヨーグルトが得られたため、これを市販品として販売することとした。

#### 【終わりに】

今回、発芽玄米浸漬水中から3株の乳酸生成菌を分離し、2株の同定に成功した。その結果この2菌株は*Lb. casei*、*Lb. plantarum*であることが明らかとなり、ともにこれまでに毒性・病原性が報告されておらず、本2菌株が食品製造に適した乳酸菌であることが示唆された。この2菌株を用いた豆乳ヨーグルトを作成したところ、M1株、M2株の種ヨーグルトを1:1の割合で混合すると酸味が抑えられたまろやかな豆乳ヨーグルトを作成することができた。現在図2に示すように、福岡市中央区のスーパーマーケットマキイにて市販されている。今後、より有用な乳酸菌を分離し、本豆乳ヨーグルト製造に用いることで機能性のある食品の開発が望まれる。



図2 市販されている豆乳ヨーグルト

#### 【参考文献】

- 1) 清水昌、堀之内末治編 応用微生物学第2版、文永堂出版
- 2) Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.