

カゼイン分解物添加還元脱脂粉乳培地での生育特性を指標として 生乳から分離した乳酸菌の同定

栃原 孝志・阪野 猛文・中本 健太
近藤 美雪・蝦名 飛勇・富田 絢美
高木 洋旗・竹田 保之

Identification of lactic acid bacteria isolated from raw milk based
on growth properties in reconstituted skim milk supplemented with casein hydrolysates.

Takashi TOCHIHARA, Takefumi BANNO, Kenta NAKAMOTO, Miyuki KONDO, Hiyuu EBINA,
Ayami TOMITA, Hiroki TAKAGI and Yasuyuki TAKEDA
(Accepted 10 July 2019)

緒 言

乳酸菌のタンパク質分解作用はチーズの熟成過程における風味発現と組織形成、発酵乳製品における機能性ペプチドの生成さらに乳タンパク質のアレルゲン性の低減など乳製品製造において極めて重要な特性の一つである^{1~3)}。熟成型チーズではスターター乳酸菌と非スターター乳酸菌の協働的な作用で風味形成が起きていることから⁴⁾、生乳やチーズを分離源として、強いタンパク質分解力や芳香成分生成能を有する非スターター乳酸菌の単離が試みられており、チーズ製造への利用が検討されている^{5,6)}。チーズ製造への利用が検討されている非スターター乳酸菌の多くは *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* などの *Lactobacillus* 属乳酸菌が多い⁷⁾。また、タンパク質分解作用が強いとされている *Lb. helveticus* を通常はスターターとして使用しないゴーダチーズに加えることでタンパク質分解を促進し、熟成期間の短縮を目指す試みもなされている⁸⁾。このように、タンパク質分解性を有する乳酸菌はチーズ熟成において有用なものと考えられている。

乳から特徴的なタンパク質分解作用を有する乳酸菌を分離する試みは以前より行われている。Tulimi らはウシ乳、スイギュウ乳およびヤギ乳ならびにチーズよりミルク成分を含む寒天培地を用いてタンパク質分解力の強い乳酸菌のスクリーニングを行っている⁹⁾。また、Graham らは同様にミルク成分含

有寒天培地を使いタンパク質分解性の強い *Enterococcus* 属乳酸菌の分離を試みている¹⁰⁾。

乳酸菌のタンパク質分解作用はチーズならびに乳を主体とする培地での生育において重要な代謝系である。ある種の乳酸菌はミルク成分のみの培地では生育できないことが知られている。これらの乳酸菌はカゼインの酵素分解物やアミノ酸を添加することで生育が改善されることから、タンパク質分解系に何らかの問題があるものと考えられる。このことはタンパク質分解性が強い乳酸菌はカゼインの分解物の添加が無くてもミルク培地で良好に生育できることを意味している。そこで本実験では、乳製品製造に利用可能な特徴ある乳酸菌株の取得を目指し、まず、いくつかの市販乳酸菌株を用いてカゼイン分解物を添加した脱脂粉乳培地と無添加の脱脂粉乳培地での生育を比較することで乳酸菌のタンパク質分解性を推定できるかどうか確認した後、生乳を分離源としたタンパク質分解作用が強いと思われる乳酸菌株のスクリーニングを試みた。

材料および方法

1. 実験に用いた市販乳酸菌株

当研究室において -80℃ で保存してある市販乳酸菌株より、表 1 に示した 12 株を使用した。

2. 生乳からの乳酸菌の分離

本学農場由来の生乳をプラスチックシャーレ（直径 90 mm）にて作製した MRS 寒天培地及び

表 1 実験に用いた市販乳酸菌株

<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132 ^T
<i>Lactobacillus casei</i> JCM1134 ^T
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> JCM1002 ^T
<i>Lactobacillus gasseri</i> JCM1131 ^T
<i>Lactobacillus helveticus</i> JCM1120 ^T
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM8130 ^T
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM1136 ^T
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> JCM5805 ^T
<i>Leuconostoc lactis</i> JCM6123 ^T
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> JCM9700 ^T
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM6124 ^T
<i>Streptococcus thermophilus</i> IFO13957

Rogosa 寒天培地に 0.5 ml 塗抹し表面を乾燥させた後、アネロパックケンキ（三菱ガス化学株式会社）とともにアネロパック角型ジャー内にて、15℃の場合は 7 日間、30℃および 45℃の場合は 2 日間、嫌気条件下で静置培養を行なった。培養終了後、各プレートに生じたコロニーより無作為に最大 20 コロニーを滅菌爪楊枝で釣菌し、クライオチューブ（IWAKI, 2782-002）に分注した 1 ml の MRS 液体培地に懸濁した。懸濁後、15℃と 30℃で分離したコロニーは 30℃で、45℃で分離したコロニーは 45℃で 24~48 時間静置培養後、10%量のグリセリンを添加し -80℃で凍結保存し、分離保存菌株とした。

3. 乳酸菌の培養

凍結保存菌体溶液を融解した後、MRS 液体培地にてそれぞれの乳酸菌の生育至適温度にて静置培養した。生育が確認できたらその 0.1 ml を 10%還元脱脂粉乳（RSM）培地（10 ml）に接種し、さらに 1 日静置培養し前培養とした。前培養において乳酸菌の生育が確認できたら、RSM 培地、RSM 培地に 2%のハイポリペプトン（日本製薬株式会社）を添加した P-RSM 培地ならびに RSM 培地に 2%のカザミノ酸（Bacto Casamino Acids, BD 社）を添加した C-RSM 培地に前培養液を 0.1%量添加して 24 時間静置培養し、これを本培養とした。本培養期間中経時的に培養液の pH を pH メータで測定し、生育の指標とした。

4. 16S rRNA 遺伝子配列解析による乳酸菌の同定

(1) DNA 抽出と精製

凍結保存していた分離菌体液を融解後、その 0.5 ml より遠心分離（KUBOTA3700, 8,000 rpm (5,870 × g), 4℃, 10 分間）にて菌体を回収した。回収した菌体に 1.2% TritonX-100 及び 20 mg/ml のリゾ

チーム（和光純薬工業株式会社）を含む TE buffer（10 mM トリス塩基, 1 mM EDTA, pH8.0）を 180 µl 加え、ボルテックスにてよく混濁した後、37℃のウォータースバスで 30 分間静置した。このリゾチーム処理菌体液を QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN 社）を用いて DNA 抽出を行った。

この DNA 抽出液に等量のフェノールとクロロホルムを加え、ボルテックスにて攪拌した後、遠心分離（KUBOTA3700, 15,000 rpm (10,000 × g), 4℃, 5 分間）にて上層を回収した。回収した上層液に等量のクロロホルムを加え、ボルテックスにて攪拌した後、同様に上層を回収した。この回収液に 0.5 ml のジエチルエーテルを加え、同様に遠心分離を行い上層を取り除いた。この操作を 2 回行い、ドラフト内でチューブのふたを開けたまま室温で 10 分間静置し、残存するジエチルエーテルを蒸発させた。

静置後、残存液の 1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム（pH5.2）を加え、さらに 2.5 倍量の 99.5%エタノールを加え、ボルテックスにてよく攪拌した後、-80℃で 15 分間静置した。その後遠心分離（KUBOTA3700, 15,000 rpm (10,000 × g), 4℃, 5 分間）を行い、上清を除去したマイクロチューブの水分を除去した後、70%エタノールを加え、同様に遠心分離を行い上清を除去し、遠心エバポレーター（CVE-3100, 東京理化器械株式会社）を用いて完全に上清液を取り除いた。最終的にマイクロチューブに TE buffer を 22 µl 加え、精製鋳型 DNA 抽出液とした。

(2) PCR を用いた 16S rRNA 遺伝子領域の増幅と生成産物の精製

BIOTAQ DNA Polymerase（BIOLINE 社）を用い、Taq Polymerase (5 U/ml), プライマー DNA (100 pM), 鋳型 DNA (37.5 ng) を含む 50 µl の反応液に

表 2 PCR に使用したプライマー

名称	タイプ* ¹	16S rRNA 遺伝子中の位置* ² (5' → 3')	塩基配列 (5' → 3')	参考 文献
27f	f	8~27	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	(11)* ³
1492r	r	1492~1510	GGC TAC CTT GTT ACG ACT T	(11)
V3f	f	341~357	CCT ACG GGA GGC AGC AG	(12)
U968-f	f	968~984	AAC GCG AAG AAC CTT AC	(13)
L-1401-r	r	1401~1417	GCG TGT GTA CAA GAC CG	(13)

* 1 f, forward : r, reverse。

* 2 大腸菌における位置。

* 3 文献中では 8FE の名称で記載されている。

表 3 市販乳酸菌株の還元脱脂粉乳およびカゼイン分解物添加還元脱脂粉乳培地における pH 低下度のまとめ

菌株名* ¹	pH 低下度* ²					
	培養 10 時間目			培養 24 時間目		
	RSM	P-RSM	C-RSM	RSM	P-RSM	C-RSM
<i>Lb. acidophilus</i> JCM1132 ^T	0.93	1.15	0.80	2.35	2.53	2.10
<i>Lb. casei</i> JCM1134 ^T	2.46	2.58	2.58	3.25	3.08	3.18
<i>Lb. bulgaricus</i> JCM1002 ^T	1.30	0.98	0.86	3.07	2.78	2.95
<i>Lb. gasseri</i> JCM1131 ^T	2.60	2.68	2.64	3.23	3.13	3.18
<i>Lb. helveticus</i> JCM1120 ^T	2.64	2.59	2.71	3.31	3.04	3.21
<i>Lb. paracasei</i> JCM8130 ^T	0.88	1.52	0.96	3.03	2.97	3.10
<i>Lb. rhamnosus</i> JCM1136 ^T	1.41	1.38	1.41	3.04	2.89	3.06
<i>Lc. lactis</i> JCM5805 ^T	0.44	1.19	0.83	1.21	2.47	2.03
<i>Leu. lactis</i> JCM6123 ^T	0.82	1.17	1.34	3.12	3.36	3.19
<i>Leu. mesenteroides</i> JCM9700 ^T	0.47	1.28	1.03	1.59	2.52	2.21
<i>Leu. mesenteroides</i> JCM6124 ^T	0.66	1.54	1.26	1.29	2.43	2.18
<i>St. thermophilus</i> IFO13957	3.26	3.25	3.16	3.86	3.75	3.76

* 1, 一部菌株名を省略した。詳細は表 1 を参照のこと。

* 2, 培養開始時の培地の pH より培養 10 時間目および 24 時間目における pH を引いた値。RSM は還元脱脂粉乳培地, P-RSM は 2%ペプトン添加 RSM 培地, C-RSM は 2%カザミノ酸添加 RSM 培地。

て PCR を行った。用いたプライマーは表 2 に示した。遺伝子配列解析のための PCR 産物の調製には 27f および 1492r をプライマーペアとして用いた。反応条件はまず始めに予備加熱 (97℃, 2 分) 後, 変性 (97℃, 30 秒), アニール (61℃, 30 秒), 伸長 (72℃, 30 秒) とし, この変性から伸長までを 30 サイクル繰り返した。最後に 72℃ で 10 分処理した後, 冷却 (4℃) した。得られた PCR 産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社) にて精製した。

(3) 16S rRNA 遺伝子配列の解析

得られた PCR 産物の DNA 配列の解析には表 2 に示した 5 つのプライマーを使用した。配列解析は株式会社ファスマックシーケンスサービスに依頼し, その結果を NCBI (National Center for Biotechnology Information) の検索機能 Nucleotide BLAST を用いて菌種の同定を試みた。

結 果

1. 市販乳酸菌株の RSM 培地およびカゼイン分解物添加 RSM 培地における生育特性

表 1 に示した市販乳酸菌 12 株を RSM, P-RSM および C-RSM 培地にて 24 時間静置培養を行なった。培養 10 時間目および 24 時間目における pH を測定し, 培養開始時からの pH より引いた pH 低下度を表 3 に示した。

Lactococcus 属および *Leuconostoc* 属乳酸菌計 4 株は培養 10 時間目において, RSM 培地における pH 低下度よりも P-RSM および C-RSM 培地における pH 低下度が顕著に大きかった。これらの菌株のうち *Leu. lactis* JCM6123^T の培養 24 時間目における pH 低下度は 3 種類の培地において差が見られなくなったものの, 他の 3 株においては培養 10 時間目と同様の差が見られた。

Lb. paracasei JCM8130^T と *Lb. acidophilus* JCM1132^T の P-RSM における培養 10 時間目の pH

表4 生乳から MRS 寒天培地および Rogosa 寒天培地を用いて分離した菌株数

分離培地	分離保存菌株数			
	15℃	30℃	45℃	計
MRS 寒天培地	145	200	118	463
Rogosa 寒天培地	8	117	71	196
計	153	317	189	659

低下度は RSM 培地と比べてやや大きかった。また, *Lb. bulgaricus* JCM1002^T の RSM 培地での低下度は他の 2 つの培地よりも大きかったが, これら以外の *Lactobacillus* 属 4 株と *St. thermophilus* の計 5 株においては, 3 種の培地における pH 低下度に大きな差は認められなかった。また, これら 8 株は培養 24 時間目ではいずれの培地においても pH 低下度に差は見られなかった。従って, これら 8 株の乳酸菌はカゼイン分解物の添加に拘らず RSM 培地で良好に生育するものと思われた。

2. 生乳から得られた乳酸菌分離株の RSM 培地およびカゼイン分解物添加 RSM 培地における生育特性

先に述べた市販乳酸菌株の結果より RSM 培地とカゼイン分解物を添加した RSM 培地での生育性を調べることで, カゼイン添加物の添加に拘らず RSM 培地で良好な生育を示す *Lactobacillus* 属乳酸菌の選択的な分離が可能ではないかと考え, まず生乳から得られた乳酸菌分離株を用いて RSM 培地と C-RSM 培地における生育性を調べた。

表 4 に示した通り, 乳酸菌の生育選択性が強いと言われている MRS 寒天培地および Rogosa 寒天培地を用いて生乳より分離後保存した菌株数はそれぞれ 463 株および 196 株であった。分離培地と分離温度の組み合わせごとに最大 20 コロニーを目途に分離したが, MRS 寒天培地に比べて Rogosa 寒天培地に出現するコロニーは顕著に少なかった。特に, 中温性乳酸菌の生育温度の下限に近い 15℃ での分離では搾乳日の異なる 9 回分の生乳を用いても 8 株しか得られず, 同温度における MRS 寒天培地での分離株数 (145 株) と大きな差が見られた。

これらの分離株を用い, RSM 培地における生育性を培養 10 時間目の pH を培養開始時の pH から引いた pH 低下度を RSM-pH 低下度₁₀ とし 4 段階に分けて判断した。さらに, C-RSM 培地における培養 10 時間目の pH 低下度 (C-RSM-pH 低下度₁₀) から RSM 培地における RSM-pH 低下度₁₀ を引いた値を ΔpH 低下度₁₀ とし, カゼイン添加物であるカザミノ酸添加による RSM 培地での生育性の変化を 4

段階に分けて判断した。表 5 および表 6 はその結果をまとめたものである。

今回, 表 2 で示したように培養 24 時間目で RSM 培地と C-RSM 培地で大差なく生育が見られた菌株の中で, 培養 10 時間目での RSM 培地での pH 低下度が最も小さかった *Lb. paracasei* で 0.88 であったことから, RSM 培地における pH 低下度の選抜基準値を 0.80 以上と設定した。また, 培養時間は pH 低下度が識別できる値として得られる培養 10 時間目とした。RSM 培地における pH 低下度が 0.8 以上あったものは MRS 寒天培地分離株で 463 株中 227 株あった。このうち 1.2 以上の pH 低下度を示したものは 123 株あった。一方, Rogosa 寒天培地分離株では pH 低下度が 0.8 以上示したものは 196 株中 37 株, そのうち 1.2 以上の低下度を示したものは 5 株あった。これらの菌株のうち, C-RSM 培地での生育性が RSM 培地と変わらないもの, すなわち ΔpH 低下度₁₀ に差が無かったもの (0.1 > ΔpH 低下度₁₀ > -0.1) は MRS 寒天培地分離株では 227 株中 43 株, Rogosa 寒天培地分離株では 37 株中 3 株がそれに該当した。

3. 分離乳酸菌株の同定

前述の RSM 培地での生育性が良好でかつ, C-RSM 培地での生育性と差が見られなかった 46 株について 16S rRNA 遺伝子配列による菌種同定を試みた。表 7 はその結果をまとめたものである。

46 株の内訳は *Lactobacillus* 属と推定されたものが 29 株, *Enterococcus* 属と推定されたものが 6 株, *Lactococcus* 属と推定されたものが 2 株, *Streptococcus* 属と推定されたものが 1 株, 同定できなかったものが 8 株であった。今回, 推定菌種が得られた 39 株のうち, 15℃ で分離した 9 株中 7 株, 30℃ で分離した 13 株中 7 株, 45℃ で分離した 17 株中 16 株は *Lactobacillus* 属乳酸菌であった。

Lactobacillus 属が推定菌種として得られた 29 株のうち *Lb. casei*, *Lb. paracasei* または *Lb. rhamnosus* とされたものが 25 株, *Lb. helveticus* または *Lb. gallinarum* とされたものが 4 株あった。

表 5 RSM 培地ならびにカザミノ酸添加 RSM 培地における pH 低下度を指標とした生乳由来分離菌株 (MRS 寒天培地分離株) の分類

分離 温度	ΔpH 低下度 ₁₀ ^{*2} (B)	含まれる菌株数				小計	計
		RSM-pH 低下度 ₁₀ ^{*1} (A)					
		A<0.4	0.4≤A<0.8	0.8≤A<1.2	1.2≤A		
15℃	B ≥ 0.3	0	5	3	1	9	143
	0.3>B≥0.1	2	6	3	1	12	
	0.1>B≥-0.1	9	28	6	3	46	
	-0.1>B	1	18	21	36	76	
	小計	12	57	33	41		
30℃	B ≥ 0.3	5	11	4	1	21	200
	0.3>B≥0.1	7	11	9	4	31	
	0.1>B≥-0.1	31	15	7	8	61	
	-0.1>B	0	24	37	26	87	
	小計	43	61	57	39		
45℃	B ≥ 0.3	0	12	2	2	16	118
	0.3>B≥0.1	0	4	1	5	10	
	0.1>B≥-0.1	0	14	5	14	33	
	-0.1>B	0	33	6	19	59	
	小計	0	63	14	43		

* 1, RSM 培地における培養 10 時間目の pH 低下度 (培養 10 時間目の pH を培養開始時の pH から引いた値)。

* 2, C-RSM 培地における培養 10 時間目の pH 低下度から RSM 培地における培養 10 時間目の pH 低下度を引いた値。

表 6 RSM 培地ならびにカザミノ酸添加 RSM 培地における pH 低下度を指標とした生乳由来分離菌株 (Rogosa 寒天培地分離株) の分類

分離 温度	ΔpH 低下度 ₁₀ ^{*2} (B)	含まれる菌株数				小計	計
		RSM-pH 低下度 ₁₀ ^{*1} (A)					
		A<0.4	0.4≤A<0.8	0.8≤A<1.2	1.2≤A		
15℃	B≥0.3	0	1	0	0	1	8
	0.3>B≥0.1	0	0	0	0	0	
	0.1>B≥-0.1	3	1	0	0	4	
	-0.1>B	0	2	0	1	3	
	小計	3	4	0	1		
30℃	B≥0.3	1	1	1	0	3	117
	0.3>B≥0.1	1	0	0	0	1	
	0.1>B≥-0.1	57	15	2	0	74	
	-0.1>B	5	19	11	4	39	
	小計	64	35	14	4		
45℃	B≥0.3	0	0	0	0	0	71
	0.3>B≥0.1	0	0	0	0	0	
	0.1>B≥-0.1	1	27	1	0	29	
	-0.1>B	0	25	17	0	42	
	小計	1	52	18	0		

* 1, * 2, 表 5 と同じ。

考 察

多くの乳酸菌はアミノ酸をはじめとしてビタミン類, 金属イオンなどの複雑な栄養要求性を示すことが知られている。従って, 乳酸菌用の合成培地には酵母エキスやタンパク質分解物であるペプトン類などが使用されている。一方, 乳酸菌の培養には牛乳成分を主体とする天然培地も古くから使われている

が, 合成培地ではよく生育するものもミルク培地では生育できない乳酸菌が存在することも知られている¹⁴⁻¹⁶⁾。このような生育的特性をもつ乳酸菌の培養ではタンパク質分解物を加えることでミルク培地でも良好に生育することから, ミルク培地での生育にはその乳酸菌がもつタンパク質分解酵素システムが強く関係していることも報告されている¹⁷⁾。

本実験では RSM 培地にカゼイン分解物を添加し

表7 RSM 培地と C-RSM 培地での生育程度に差が無い生乳由来菌株の 16SrRNA 遺伝子配列による同定

菌株番号	分離 培地	分離 温度	推定菌種* ¹	アクセッション 番号
M15-005	MRS	15℃	<i>Enterococcus</i> sp.	LC463226
M15-033	MRS	15℃	<i>Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus</i>	LC463227
M15-035	MRS	15℃	<i>Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus</i>	LC463228
M15-068	MRS	15℃	<i>Enterococcus faecalis</i>	LC463229
M15-070	MRS	15℃	<i>Lactobacillus paracasei/casei/rhamnosus</i>	LC463230
M15-073	MRS	15℃	<i>Lactobacillus rhamnosus/paracasei/casei</i>	LC463231
M15-082	MRS	15℃	<i>Lactobacillus rhamnosus/casei/paracasei</i>	LC463232
M15-104	MRS	15℃	<i>Lactobacillus paracasei/rhamnosus/casei</i>	LC463233
M15-137	MRS	15℃	<i>Lactobacillus paracasei/casei/rhamnosus</i>	LC463234
M30-001	MRS	30℃	<i>Lactobacillus rhamnosus/casei/paracasei</i>	
M30-012	MRS	30℃	<i>Lactobacillus rhamnosus/casei/paracasei</i>	LC463254
M30-013	MRS	30℃	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	
M30-077	MRS	30℃	<i>Lactobacillus rhamnosus/casei/paracasei</i>	LC463235
M30-084	MRS	30℃	<i>Lactococcus lactis</i>	
M30-094	MRS	30℃	<i>Lactobacillus rhamnosus/casei/paracasei</i>	LC463236
M30-118	MRS	30℃	<i>Lactobacillus rhamnosus/casei/paracasei</i>	
M30-139	MRS	30℃	<i>Enterococcus faecalis</i>	
M30-145	MRS	30℃	<i>Lactococcus lactis</i>	LC465154
M30-175	MRS	30℃	<i>Enterococcus faecalis</i>	
M30-179	MRS	30℃	<i>Enterococcus faecalis</i>	
R30-105	Rogosa	30℃	<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	
M45-001	MRS	45℃	<i>Lactobacillus helveticus/gallinarium</i>	LC463237
M45-004	MRS	45℃	<i>Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus</i>	LC463238
M45-009	MRS	45℃	<i>Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus</i>	LC463239
M45-021	MRS	45℃	<i>Lactobacillus rhamnosus/casei/paracasei</i>	LC463240
M45-024	MRS	45℃	<i>Lactobacillus helveticus/gallinarium</i>	LC463241
M45-025	MRS	45℃	<i>Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus</i>	LC463242
M45-032	MRS	45℃	<i>Enterococcus faecalis</i>	LC463243
M45-050	MRS	45℃	<i>Lactobacillus rhamnosus/casei/paracasei</i>	LC463244
M45-059	MRS	45℃	<i>Lactobacillus rhamnosus/casei/paracasei</i>	LC463245
M45-062	MRS	45℃	<i>Lactobacillus rhamnosus/casei/paracasei</i>	LC463246
M45-067	MRS	45℃	<i>Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus</i>	LC463247
M45-070	MRS	45℃	<i>Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus</i>	LC463248
M45-073	MRS	45℃	<i>Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus</i>	LC463249
M45-075	MRS	45℃	<i>Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus</i>	LC463250
M45-088	MRS	45℃	<i>Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus</i>	LC463251
M45-107	MRS	45℃	<i>Lactobacillus helveticus/gallinarium</i>	LC463252
M45-121	MRS	45℃	<i>Lactobacillus helveticus/gallinarium</i>	LC463253

* 1. 相同値 99%以上を示した菌種を推定菌種とした。複数の菌種が記載されている場合はスコア値が高く出たものから順に示した。

でも同程度の生育が見られる乳酸菌にはチーズ製造に利用可能な強いタンパク質分解作用をもつものがあるのではないかと考え、生乳を分離源としてそのような乳酸菌の分離を試みた。まず、乳製品製造によく使われる乳酸菌種の市販乳酸菌株を用いて RSM 培地およびカゼイン分解物であるポリペプトンまたはカザミノ酸を添加した RSM 培地での生育を見てみたところ、調べたすべての *Lactobacillus* 属乳酸菌種と *St. thermophilus* は培養 10 時間目において RSM 培地とカザミノ酸添加 RSM (C-RSM)

培地の生育に差が無かった (表 5)。このことはこれらの乳酸菌がカザミノ酸添加により生育が促進された *Lactococcus* ならびに *Leuconostoc* 属乳酸菌に比べてより強いタンパク質分解系を有すること、ならびにこれらの培地の生育性を比べることは *Lactobacillus* 属乳酸菌の有効な選抜手段になることが示唆された。

RSM 培地とカゼイン分解物を添加した *Lactobacillus* 属乳酸菌のなかでは *Lb. acidophilus* と *Lb. paracasei* の 2 株は RSM 培地での培養 10 時

間目における pH 低下度が他の *Lactobacillus* 属乳酸菌に比べて小さくさらにペプトンの添加により pH 低下度は増加している (表 5)。Masuda らは *Lb. acidophilus* のある株はミルク培地での生育性が悪いこと、カゼイン分解物の添加で生育が促進されることを報告している¹⁶⁾。今回用いたこの 2 株もミルク培地での生育性は他の *Lactobacillus* 属乳酸菌に比べて高くない菌株だったと考えられる。また、この 2 株において培養 10 時間目に生育促進効果がカザミノ酸添加では見られず、ポリペプトンでのみ見られたことは興味深い点である。菌種は異なるが、Arakawa らは *Lb. gasseri* のある株のミルク培地における生育にはタンパク質やアミノ酸ではなく、ペプチドが必要であることを報告している¹⁸⁾。今回用いたポリペプトンもカザミノ酸もカゼインの水解物であるが、前者は酵素分解物、後者は酸加水分解物であり、後者の方がより低分子分解物を多く含むものと考えられることから、今回用いた *Lb. acidophilus* と *Lb. paracasei* の 2 株はミルク培地においてカゼイン由来のペプチドにより生育が促進されるタイプなのかもしれない。

今回、RSM 培地で良好な生育を示し、かつ C-RSM 培地での生育と差が無い菌株として選抜した 46 株で推定菌種が得られた 39 株中、29 株、約 74% が *Lactobacillus* 属乳酸菌であった。このうち *Lb. casei*, *Lb. paracasei* または *Lb. rhamnosus* とされたものが 25 株、*Lb. helveticus* または *Lb. gallinarum* とされたものが 4 株あった。これらはそれぞれにおいて近縁種であるため、16S rRNA 遺伝子配列の相同性だけでは単一の菌種には同定されなかった。今後、候補となった菌種の標準菌株と糖資化性などの培養特性を比較しながら、同定を進める必要がある。また、C-RSM 培地での生育よりも RSM 培地での生育がより良好であったもの (表 5, 6 における B 値が -0.1 より小さいもの) がかなりの数で存在していた。これらの分離株はカゼイン分解物の添加が生育を抑制しているとも考えられるが、現時点では詳細は不明であり、興味を持たれる点である。

推定菌種の候補となった *Lb. helveticus* と *Lb. casei/paracasei* はチーズ製造に深く関係している菌種であり、前者は風味形成促進効果をもつタンパク質分解性の強い乳酸菌種として¹⁹⁾、後者は熟成型チーズの非スターター性乳酸菌として熟成後期に出現し、チーズの風味形成に関与する菌種として⁷⁾ それぞれ知られている。Tullini らは生乳およびチーズからのタンパク質高分解性乳酸菌のスクリーニングにおいて脱脂粉乳培地での生育と SDS-PAGE に

よるカゼインの分解程度を指標として、我々と同様に *Ec. faecalis* ならびに *Lb. paracasei* を分離したことを報告している⁹⁾。今後、選抜された乳酸菌株のタンパク質分解作用についてさらなる検討を進めることで、チーズ製造への利用性についてさらなる知見が得られるものと思われる。

以上の結果より、カゼイン分解物の添加に拘らず RSM 培地で良好に生育する乳酸菌の選抜はチーズ製造に関与するタンパク質分解性の強い *Lactobacillus* 属乳酸菌のスクリーニングにおいて有用なものと考えられた。

参考文献

- 1) 井越敬司. 2004. 乳発酵食品におけるタンパク質分解. ミルクサイエンス 53: 1-8.
- 2) 三浦孝之, 阿久澤良造. 2011. 乳酸菌がチーズの製造と品質に及ぼす影響. 日本乳酸菌学会誌 22: 93-98.
- 3) Biscoia V., Y. Choiset, H. Rabesona, J. M. Chobert, T. Haertlé and B. D. G. M. Franco. 2018. Brazilian artisanal ripened cheeses as sources of proteolytic lactic acid bacteria capable of reducing cow milk allergy. J. Appl. Microbiol. 125: 564-574.
- 4) Blava J., Z. Barzideh and G. Le Pointe. 2017. Symposium Review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. J. dairy Sci. 101: 3611-3629.
- 5) Crow V. L., T. Coolbear, P. K. Gopal, F. G. Martley, L. L. McKay and H. Riepe. 1995. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. Int. Dairy J. 5: 855-875.
- 6) Bozoudi D., C. Kotzamanidis, M. Hatzikamari, N. Tzanetaxis, G. Menexes, E. Litopoulou-Tzanetaki. 2015. A comparison for acid production, proteolysis, autolysis and inhibitory properties of lactic acid bacteria from fresh and mature Feta PDO Greek cheese, made at three different mountainous area. Int. J. Food Microbiol. 200: 87-96.
- 7) Jordan K. N. and T. M. Cogan. 1993. Identification and growth of non-starter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. Ir. J. Agr. Food res. 32: 47-55.
- 8) 木村 彰. 2008. *Lactobacillus helveticus* を用いたゴーダチーズの開発. ミルクサイエンス,

- 57 卷, 109–112.
- 9) Tulini F. L., N. Hymery, T. Haertle, G. Le Blay and E. C. P. De Martinis. 2016. Screening for antimicrobial and proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from cow, buffalo and goat milk and cheeses marketed in the southeast region of Brazil. *A. Dairy Res.* 83: 115–124.
 - 10) Graham K., R. Rea, P. Simpson and H. Stack. 2017. Development of a rapid, one-step screening method for the isolation of presumptive proteolytic enterococci. *J. Microbiol. Methods* 132: 99–105.
 - 11) Salzman, N. H., H. de Joung, Y. Paterson, H. J. M. Harmsen, G. W. Welling and N. A. Bos. 2002. Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology* 148: 3651–3660.
 - 12) Muyzer, G., E. C. De Wall and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695–700.
 - 13) Zoetendal, E. G., A. D. L. Akkermans and W. M. De Vos. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3854–3859.
 - 14) Elli, M., R. Zink, R. Reniero, and L. Morelli. 1999. Growth requirements of *Lactobacillus johnsonii* in skim and UHT milk. *Int. Dairy J.* 9: 507–513.
 - 15) Avonts, L., E. Van Uytven, and L. De Vuyst. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *Int. Dairy J.* 14: 947–955.
 - 16) Masuda, T., R. Taguchi, T. Kabuki, H. Nakajima, and T. Itoh. 2003a. Improvement of the growth of *Lactobacillus acidophilus* in milk by addition of enzymatically digested casein. *Milchwissenschaft* 58: 124–127.
 - 17) Masuda, T., R. Taguchi, T. Kabuki, H. Nakajima, and T. Itoh. 2003b. Growth profile of *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria in milk relating to their proteolytic activity. *Milchwissenschaft* 58: 366–370.
 - 18) Arakawa K., K. Matsunaga, S. Takihiro, A. Moritoki, S. Ryuto, Y. Kawai, T. Masuda and T. Miyamoto. 2015. *Lactobacillus gasseri* requires peptides, not proteins or free amino acids, for growth in milk. *J. Dairy Sci.* 98: 1593–1603.
 - 19) Slattey L., J. O'Callaghan, G. Fitzgerald, T. Beresford and R. Ross. 2010. Invited review: *Lactobacillus helveticus* — a thermophilic dairy starter related to gut bacteria. *J. Dairy Sci.* 93: 4435–4454.

Abstract

In the present study, we aimed to identify lactic acid bacteria with the proteolytic activity useful for manufacturing dairy products. To achieve this goal, we investigated whether the addition of casein degradation products, such as casamino acids and peptone, affects the growth of various lactic acid bacteria in reconstituted skim milk (RSM) medium and then attempted to identify lactic acid bacteria growing equally well in RSM medium regardless of the presence or absence of casein degradation products, using lactic acid bacteria strains isolated from raw milk. We tested a total of 12 commercially available lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus* (n = 7), the genus *Leuconostoc* (n = 3), the genus *Lactococcus* (n = 1), and *Streptococcus* (n = 1), and found 8 *Lactobacillus* and *Streptococcus* species showed no differences in growth in 10 h of culture in RSM medium with casein degradation products versus without casein degradation products. Meanwhile, the other four bacterial species grew faster in RSM medium supplemented with casein degradation products than RSM medium. Because all strains of genus *Lactobacillus* used in this study showed no differences between the growth rate in RSM medium and that in RSM medium supplemented with casein degradation products, we investigated the growth characteristics of bacterial isolates in these culture media to identify lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus* with potent proteolytic activity. We compared growth rates of lactic acid bacteria isolates (n = 659) in RSM medium and casamino acid-supplemented RSM medium. Forty-six strains with no difference between the growth rates in the two media were selected and subjected to 16S rRNA gene sequencing for species identification.

Consequently, 29 *Lactobacillus* strains, 6 *Enterococcus* strains, 2 *Lactococcus* strains and one *Streptococcus* strain were identified. These results suggest that lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus* can be efficiently isolated from raw milk using RSM medium supplemented with casein degradation products.

