



株式会社 明治 土橋 英恵

生乳由来乳酸菌に関する研究

はじめに

乳酸菌とは、グラム陽性、桿菌あるいは球菌、カタラーゼ陰性で、糖を消費して著量の乳酸を作る菌の総称であり、分類学的には *Lactobacillales* 目5科66属<sup>1)</sup> に分類される種が該当する。その数は500種以上であり、植物(花, 果実), 動物(腸管), 食品(発酵食品, 生乳) など我々の身近に広く生息している。古くから様々な発酵食品の製造において重要な役割を果たしており、特に欧州の伝統的なチーズに代表される非殺菌乳を用いた伝統的発酵乳製品では、生乳由来の乳酸菌が風味醸成に大きな影響を与えるため、生乳由来乳酸菌に関する研究が多数報告されている。一方、日本には様々な伝統的発酵食品は存在するが、乳を用いたものは我々が知る限り存在せず、日本国内の生乳由来乳酸菌に関する知見およびそれを用いた発酵乳製品はない。筆者は2010年より国産生乳由来乳酸菌を対象とした研究に着手し、これまでにいくつかの生乳由来株を自社発酵乳製品に応用してきた。本稿では、生乳由来乳酸菌およびそれを用いた発酵乳のメタボローム解析結果に加え、最近の商品開発への応用事例について紹介する。なお、2020年4月に *Lactobacillus* 属が新規23属を含む25属に分割再編されたが<sup>2)</sup>、本稿では検討を行った当時の旧分類名で表記する。

1. 生乳から高頻度で分離される乳酸菌の種類

当社は独自のスターター開発を目的として、植物や動物、発酵食品といった様々なサンプルから乳酸菌を分離・収集しており、現在5000株を超える乳酸菌をライブラリーとして保有している。特に2009年以降は生乳由来の乳酸菌に注目し、2015年までに北海道産生乳から6科19属に属する計1475株の乳酸菌を分離し(現在も継続中)、生乳には多種多様な菌種が生息していることが示唆された。

2. 生乳由来乳酸菌の代謝産物によるプロファイリング

2-1. 香り成分によるプロファイリング<sup>3)</sup>

乳中で乳酸菌が産生する香り成分プロファイルを明らかにすることを目的とし、生乳から高頻度で分離される菌種を中心に *Lactobacillus* 属, *Lactococcus* 属, *Leuconostoc* 属, *Pediococcus* 属, *Streptococcus* 属から成る17種143株について、発酵乳中の香り成分および有機酸を分析した。検出された香り成分44種、有機酸10種について主成分分析を行った結果、絶対ヘテロ乳酸発酵型の乳酸菌(以下、絶対ヘテロと略)と *Lactococcus lactis*, その他菌種で大きく3つのクラスターにわかれた(図1(a))。絶対ヘテロと *Lc. lactis* の特徴が際立っていたため、それ以外の菌種についてはその特徴を読み取ることができなかった。そこで *Lactobacillus* 属11種98株を対象に主成分分析したところ、発酵型(絶対ホモ, 通性ヘテロ, 絶対ヘテロ)に

よって3つに大別された(図1(b))。さらに、発酵型別に解析すると菌種別に分かれたことから、菌種別に特徴的な香り成分プロファイルの存在が示唆された(図1(c), (d), (e))。

2-2. 水溶性成分によるプロファイリング<sup>4)</sup>

特徴的な香りプロファイルを示した5種47株の乳酸菌(*L. delbrueckii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lc. lactis*)を対象を限定し、香り成分分析および有機酸分析に加えてCE-TOFMS分析による水溶性成分分析を実施した。機器分析により有機酸8種、香り成分44種、水溶性成分234種(ペプチド不含)検出された。5菌種の香り成分について主成分分析した結果、絶対ヘテロの *L. fermentum*, *Lc. lactis* および *L. paracasei*, その他菌種の3つに分かれ、前項の結果(図1(a))と同様の結果が得られた(図2(a))。水溶性成分について解析した結果、供試した5菌種すべてが分かれ(図2(b))、水溶性成分の方が香り成分よりも菌種毎の特徴を明確に反映する結果となった。これは香り成分に比

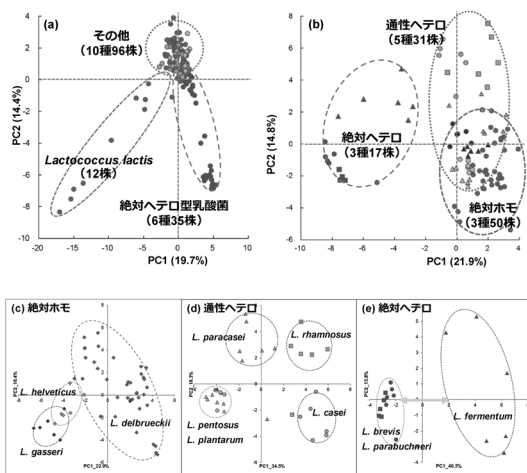


図1. 香り成分の主成分得点散布図, (a) 17種143株, (b) *Lactobacillus* 属11種98株, (c) 絶対ホモ3種50株, (d) 通性ヘテロ5種31株, (e) 絶対ホモ3種17株

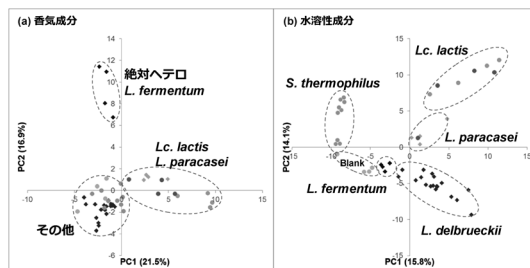


図2. 5種47株を対象とした(a) 香り成分および(b) 水溶性成分の主成分得点散布図

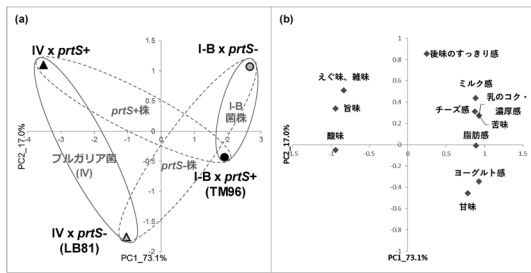


図3. 発酵乳4種を対象とした官能評価値の (a) 主成分得点散布図, (b) 主成分負荷量散布図

べ水溶性成分の成分数が多いことに起因する。以上の結果から、菌種毎に特徴的な水溶性成分プロファイルが存在することが示唆された。

### 3. 生乳由来乳酸菌の特徴解析

食品の国際規格 (Codex 規格)<sup>5)</sup>において、ヨーグルトとは *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ブルガリア菌) と *S. thermophilus* の共発酵品と定義されているため、一般的にヨーグルトスターターと言えば、これら2菌種を指す。そこで北海道産生乳から分離した *L. delbrueckii* と *S. thermophilus* に着目し、それぞれの特性を調べた。

#### 3-1. 生乳由来 *Lactobacillus delbrueckii*<sup>6)</sup>

*L. delbrueckii* は6つの亜種に細分され、ブルガリア菌は *L. delbrueckii* の6亜種のうちの1亜種である。生乳由来 *L. delbrueckii* の亜種の分布を推定することを目的として、北海道産生乳由来226株について *groEL* (*hsp60*) 遺伝子配列に基づいた系統解析を行った。その結果、226株の *groEL* (*hsp60*) 遺伝子は新規8種を含む14種のアレル型に分類され、全体の半数以上の株が単一のアレルを有することが明らかになった。次に代表的なアレル型を持ついくつかの株を対象に亜種を同定した結果、生乳由来 *L. delbrueckii* 226株にブルガリア菌 (クラスター IV) は存在しなかったが、これまでに報告のないサブクラスター (I-B と呼称) に属する菌群 (I-B 菌群) が7割近くを占め、この I-B 菌群は生乳由来 *L. delbrueckii* の最優勢菌群である可能性が示唆された。

#### 3-2. 生乳由来 *Streptococcus thermophilus*

細胞壁結合型プロテアーゼをコードする *prtS* 遺伝子を有する *S. thermophilus* は、乳での発酵性がよいことが古くから報告されている<sup>7)</sup>。しかし、*prtS* 遺伝子保有株 (*prtS*+ 株) は少なく、フランス INRA のコレクション135株のうち、*prtS*+ 株は21株 (15.6%) との報告<sup>8)</sup>がある。山本らは、当社国産生乳由来 *S. thermophilus* 172株について調べ、59株 (34.3%) に *prtS* 遺伝子が存在することを明らかにした<sup>9)</sup>。

### 4. 発酵乳の代謝産物プロファイル研究<sup>10)</sup>

生乳由来 *L. delbrueckii* あるいは *S. thermophilus* には従来のヨーグルトスターターとは異なる特性を有する菌株が存在することが示唆され、十勝産生乳由来乳酸菌から選抜した *L. delbrueckii* OLL204989 (I-B 菌群) と *S. thermophilus* OLS4496 (*prtS*+ 株) から成るスターター「十勝ミルク乳酸菌 TM96」を開発した。さらにこの TM96 を用いた「明治北海道十勝濃厚マイルドヨーグルト」を2019年3月に上市した。

TM96 を用いた発酵乳と、*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ブルガリア菌) と *S. thermophilus* から成る既存ヨーグルトスターター LB81 を用いた発酵乳との違いを明らかにするため、TM96 (I-B, *prtS*+) あるいは LB81 (IV, *prtS*-) の *L. delbrueckii* と *S. thermophilus* を組み合わせた発酵乳のメタボローム解析を行った。その結果、*prtS* 遺伝子の有無と *L. delbrueckii* 亜種の違いにより、4つに分かれ (図3 (a)), LB81 (IV, *prtS*-) で調製した発酵乳は酸味とヨーグルト感があるのに対し、TM96 で調製した発酵乳 (I-B, *prtS*+) は、酸味が弱く、ミルクの風味とヨーグルト感の両方を合わせもった風味であることが明らかになった (図3 (b))。

### おわりに

今回は乳酸菌を用いた食品の二次機能 (嗜好性) に関する研究を中心に紹介したが、近年乳酸菌の健康機能性についても知見が蓄積している。そして生乳以外にも多種多様な乳酸菌が生息し、我々が知らない可能性がまだ眠っていると信じている。これからも乳酸菌の可能性を探求することにより、おいしく健康的な食品の開発に少しでも貢献できればと考えている。

### (引用文献)

- 1) List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, <https://www.bacterio.net/>
- 2) J. Zheng et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **70**(4), 2782, 2020
- 3) 土橋英恵, 斎藤瑞恵, 市川愛弓, 植野敦子, 神山智敬, 木村勝紀, 生乳由来 *Lactobacillus* 属乳酸菌の香気プロファイル研究, 日本乳酸菌学会2018年度大会講演要旨集, p. 14, (2018)
- 4) 土橋英恵, 斎藤瑞恵, 戸松創, 市川愛弓, 植野敦子, 神山智敬, 木村勝紀, 生乳由来乳酸菌発酵物のメタボローム解析, 日本酪農科学シンポジウム2018要旨, p. 20, (2018)
- 5) CODEX STANDARD FOR FERMENTED MILKS, CODEX STAN 243-2003
- 6) 土橋英恵, 市川愛弓, 小泉明子, 竹田麻理子, 溝口智奈弥, 石田達也, 木村勝紀, 国内産生乳から分離された *Lactobacillus delbrueckii* の遺伝的多様性の解析, 日本農芸化学会2019年度大会プログラム集, (2019)
- 7) S. Shahbal et al., *Lait*, **71**, 351, 1991
- 8) C. Delorme et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**(2), 451, 2010
- 9) E. Yamamoto et al., *Biosci. Microbiota Food Health*, **39**(3), 169, 2020
- 10) 土橋英恵, 市川愛弓, 武安紗英, 河合良尚, 植野敦子, 斎藤瑞恵, 戸松創, 木村勝紀, 国産生乳から分離した *Lactobacillus delbrueckii* と *Streptococcus thermophilus* を用いた発酵乳のメタボローム解析, 日本乳酸菌学会2019年度大会講演要旨集, p. 30, (2019)

謝辞 本研究は株式会社 明治にて多数の研究員の方々と共同して取り組んだものです。共同研究者の皆様ならびに日々の研究を支えてくださったラボのメンバーに深く感謝いたします。特に本研究は生乳から分離された乳酸菌なくしては成り立ちませんでした。長年にわたり乳酸菌の分離・収集に携わった研究員の方々の地道な取り組みに敬意を表します。2-2および4についてはヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社との共同研究です。ご支援くださりました HMT 社関係各位に厚く御礼申し上げます。最後に本研究に理解を示し、ご支援ならびにご指導賜りました株式会社 明治の皆様にも深く感謝いたします。