

## 熟成糠床から人工胃液・腸液耐性を有する乳酸菌の分離

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria  
with Gastrointestinal Transit Tolerance  
from Aged Nukadoko

古田 吉史

Yoshifumi FURUTA

## 〈要旨〉

米糠を自然発酵させて調製する糠床に、種々の野菜を漬け込んで造る糠漬けは日本の伝統的発酵食品の一つである。糠床中には数多くの微生物が生息し、浸漬した野菜にそれら微生物が付着すると考えられる。付着した微生物の中にヒトの胃液・腸液に耐性の高い乳酸菌が多く含まれれば、糠漬け野菜のプロバイオティクスとしての機能がさらに高まることが期待される。そこで本研究では、85年以上経過した熟成糠床3種から、ヒトの胃液(人工胃液)および腸液(人工腸液)に耐性のある乳酸菌の分離を試みた。各糠床の懸濁液に3時間の人工胃液処理(pH2.5, 0.04%ペプシン含有 MRS 培地)を行った後に得られた乳酸菌コロニーを89株釣菌し、再度人工胃液処理を行って人工胃液に対する耐性能の高い19株を選抜した。さらに、24時間の人工腸液処理(0.3%胆汁末、0.25%パンクレアチン含有 MRS 培地)を行い、19株の中から人工腸液に対する耐性能の高い9株を選抜した。選抜した9株の16S rDNAの全塩基配列を解析したところ、8株は *Lactobacillus alimentarius* (相同率99.9%)に、1株は *Lactobacillus parafarraginis* (相同率100.0%)に高い相同性を示した。選抜した株については今後、食品グレードの培地素材等を用いて高濃度に培養後、新鮮な米糠から新たな糠床を調製する際の初期段階に投入することで、それら乳酸菌を優占種とする熟成糠床を作製できないか検討を行う予定である。

## I. 諸言

米糠を自然発酵させて調製した「糠床」に種々の

野菜を漬け込むことで作製する「糠漬け」は、乳酸菌を利用した我が国特有の伝統的発酵食品の一つである。諸外国の研究者からはしばしば「日本にはヨーグルトにも勝る乳酸菌の宝庫、糠床・糠漬けが存在する」と評されることもある。また、熟成を繰り返せば繰り返すほどに風味に深みが加わっていくため、福岡県を中心とする九州北部には、数十年、さらには小倉城主小笠原忠真公の時代から引き継がれる糠床に代表されるような数百年という長い熟成期間を経た究極とも呼べる糠床も多く存在する。

糠床中に生息する微生物(乳酸菌、酵母など)に関する研究は多く報告されているが<sup>1-7)</sup>、糠床に浸漬された野菜に付着する微生物に着目した研究はほとんど行われていない。通常、糠床に浸漬した野菜を食するには、糠床の風味があまり落ちない程度に軽く水洗いをした後に食するが、その際糠床中で付着した多くの微生物が浸漬野菜の表面に残存すると考えられる<sup>8)</sup>。野菜に残存する菌数、特に有用菌として一般的である乳酸菌数が多ければ、糠漬け野菜のプロバイオティクスとしての機能が高まることが期待される。一方、ヒトの胃酸や胆汁酸に耐性があり、生きて腸まで届く可能性のある乳酸菌(所謂プロバイオティクス機能の高い乳酸菌)については、これまでに漬物等をはじめとする種々の食品素材<sup>9-13)</sup>、乳児の糞便中<sup>14)</sup>あるいは魚類の腸管<sup>15)</sup>等から分離されているが、熟成糠床から分離された報告例はほとんどない。そこで本研究では、数十年以上経過した長い食経験を有する熟成糠床から、ヒトの胃液および腸液に耐性のある乳酸菌の分離を試みた。

## II. 方法

### 1. 使用糠床

熟成糠床として、少なくとも 85 年以上経過しているとされる北九州市内の 3 種の糠床「Y糠床」「H糠床」「K糠床」を貰い受け、本研究の乳酸菌分離源として使用した。

### 2. 人工胃液・腸液耐性乳酸菌の分離と選抜

Y糠床、H糠床およびK糠床をそれぞれ 9 倍量の滅菌水に添加し攪拌後、その懸濁液 0.5ml を、塩酸により pH を 2.5 に調整した 5ml の 0.04% ペプシン含有 MRS (BD 社製) 培地に添加し、37°C で 3 時間保持した (⇒人工胃液処理)。その処理液を無菌水で  $10^1 \sim 10^3$  に希釈した希釈液  $100 \mu\text{l}$  を、1% 炭酸カルシウム、0.005% シクロヘキシミドおよび 0.001% アジ化ナトリウムを添加した MRS 寒天培地 (乳酸菌用培地プレート) に塗布し、30°C で約 72 時間培養を行って乳酸菌コロニーを形成させた。コロニー数をカウントし、人工胃液処理前の懸濁液を無菌水で  $10^1 \sim 10^3$  に希釈した希釈液  $100 \mu\text{l}$  を乳酸菌用培地プレートに塗布した場合のコロニー数と比較することで、人工胃液処理後の乳酸菌の生存率を調べた。

次に、クリアゾーンを形成したコロニー (菌株) を釣菌し、MRS 培地にて 24 時間培養後、培養液の  $\text{Abs}_{560\text{nm}}$  値を測定することでそれぞれの菌株の増殖能を評価した。さらに、それぞれの菌培養液に再度上記と同条件の人工胃液処理を行い、3 時間の人工胃

液処理後と処理前の  $\text{Abs}_{560\text{nm}}$  の比 (人工胃液処理 3 時間後の  $\text{Abs}_{560\text{nm}}$  値を人工胃液処理 0 時間目の  $\text{Abs}_{560\text{nm}}$  値で割った値) を求めることで、それぞれの菌株の人工胃液に対する耐性能を評価し、菌株の選抜を行った。

次に、人工胃液に対する耐性能を基に選抜した菌株を MRS 培地にて培養後、その培養液 0.09ml を 6ml の 0.3% 胆汁末 (Oxgall, BD 社製) および 0.25% パンクレアチン含有の MRS 培地に懸濁し、37°C で 24 時間保持した (⇒人工腸液処理)。24 時間の人工腸液処理後と処理前の  $\text{Abs}_{560\text{nm}}$  の比 (人工腸液処理 24 時間後の  $\text{Abs}_{560\text{nm}}$  値を人工腸液処理 0 時間目の  $\text{Abs}_{560\text{nm}}$  値で割った値) を求めることで、それぞれの菌株の人工腸液に対する耐性能を評価し、菌株の選抜を行った

### 3. 選抜株の遺伝子解析

選抜した株を MRS 寒天培地プレートに増殖させた後、株式会社テクノスルガ・ラボ (静岡県静岡市) に依頼して、16S rDNA の全塩基配列を解析した。

## III. 結果

### 1. 人工胃液処理による各糠床中の乳酸菌数の変化

各糠床の懸濁液を 0.04% ペプシン含有 MRS 培地 (塩酸により pH2.5 に調整) に添加して人工胃液処理 (37°C, 3 時間) を施した処理液を、乳酸菌用培地プレートに塗布した際のプレート写真を図 1 に示した。

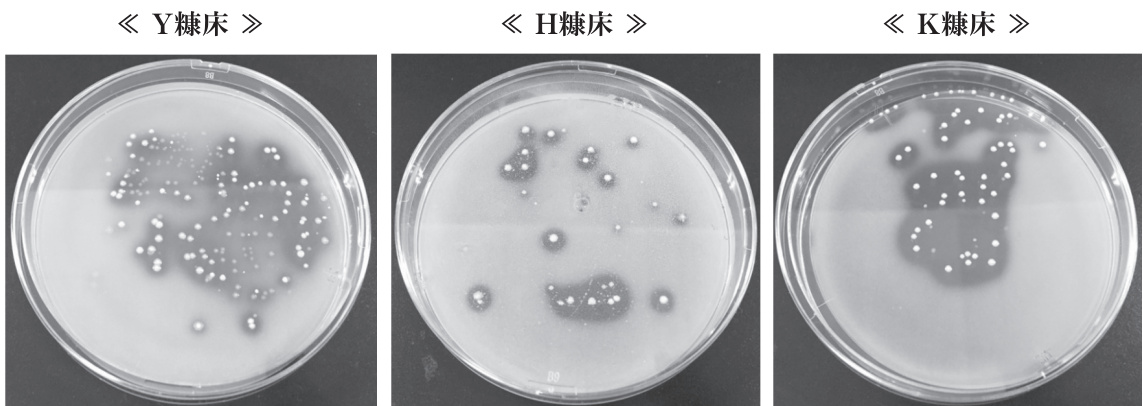


Fig. 1. Plate picture.  $10^3$  dilution of each nukadoko suspension after 3.0 hours of treatment with artificial gastric juice was spotted and spread on the plate.

※ 乳酸菌測定用培地には炭酸カルシウムが含まれているため、乳酸菌が生育すると生成された酸により炭酸カルシウムが溶けてコロニーの周囲にクリアゾーンが形成される

Table 1. Comparison of the number of surviving cell and surviving ratio after 3.0 hours of treatment with artificial gastric juice.

	乳酸菌数* (cfu** /ml)		人工胃液処理後 生存率(%)
	処理前	処理後	
Y糠床	3.7×10 <sup>6</sup>	2.3×10 <sup>4</sup>	0.62
H糠床	2.2×10 <sup>6</sup>	1.0×10 <sup>4</sup>	0.45
K糠床	4.9×10 <sup>6</sup>	1.0×10 <sup>4</sup>	0.20

\*各乳酸菌数は3回の実験の平均値      \*\*colony forming unit

図のように、乳酸菌の生育に伴って生成された酸によりコロニー周囲の炭酸カルシウムが溶け、クリアゾーンが形成された。クリアゾーンを形成したコロニー数(乳酸菌数)をカウントし、その結果を人工胃液処理前の懸濁液中の乳酸菌数を同様の方法に従ってカウントした結果と比較して表1に示した。人工胃液処理前のY糠床懸濁液中の乳酸菌数は 3.7×10<sup>6</sup> cfu (colony forming unit) /ml であったのに対し、人工胃液処理後の懸濁液中の乳酸菌数は 2.3×10<sup>4</sup> cfu /ml で、本実験の人工胃液処理の条件下で生き残った乳酸菌の生存率は 0.62% であった。同様に、H糠床およびK糠床については、人工胃液処理前の懸濁液中の乳酸菌数はそれぞれ 2.2×10<sup>6</sup> cfu/ml、4.9×10<sup>6</sup> cfu/ml であったのに対し、人工胃液処理後の乳酸菌数はどちらも 1.0×10<sup>4</sup> cfu /ml で、乳酸菌の生存率はそれぞれ 0.45%、0.20% であった。

## 2. 人工胃液耐性能および

### 人工腸液耐性能による菌の選抜

図1中のクリアゾーンを形成したコロニーの中から、Y糠床、H糠床、K糠床由来のものを計 89 菌株釣菌した。次に、それぞれの菌株をMRS培地にて培養後、再度同条件の人工胃液処理を行い、3時間の人工胃液処理後と処理前の Abs<sub>560nm</sub> の比を求めることで、それぞれの菌株の人工胃液に対する耐性能を評価し、人工胃液耐性能の高い19株を選抜した。さらに、この19株それぞれをMRS培地にて培養後、人工腸液処理を行い、24時間の人工腸液処理後と処理前の Abs<sub>560nm</sub> の比を求めることで、それぞれの菌株の人工腸液に対する耐性能を評価し、人工胃液への耐性能が高く且つ人工腸液への耐性能も高い9株を選抜した。この9菌株の人工胃液および人工腸液に対する耐性能を表2にまとめて示した。

表2中の YF1,2,15 および 28 株はY糠床から、HF13と18株はH糠床から、KF1,11および13株はK糠床からそれぞれ分離された菌株である。何れの菌株についても、人工胃液という高いストレス環境下にも拘らず、初発菌濃度(人工胃液処理0時間目の Abs<sub>560nm</sub> 値)は減少せず、3時間の人工胃液処理後に 1.08 ~ 1.33 倍に増大した。また、人工腸液処理についても同様に、何れの菌株についても初発菌濃度から減少することなく、24時間の人工腸液処理後に 33 ~ 87 倍に増大した。

Table 2. Comparison of tolerance for artificial gastric and intestinal juice of nine isolated lactic acid bacteria.

選抜株	人工胃液処理前後の Abs <sub>560</sub> の比*	人工腸液処理前後の Abs <sub>560</sub> の比**
YF1	1.17	33
YF2	1.13	50
YF15	1.20	33
YF28	1.33	36
HF13	1.11	35
HF18	1.11	87
KF1	1.08	43
KF11	1.08	35
KF13	1.09	35

\*比 = 人工胃液処理3時間後のAbs<sub>560nm</sub>値 / 人工胃液処理0時間目のAbs<sub>560nm</sub>値  
\*\*比 = 人工腸液処理24時間後のAbs<sub>560nm</sub>値 / 人工腸液処理0時間目のAbs<sub>560nm</sub>値

## 3. 選抜株の遺伝子解析結果

選抜した9菌株それぞれの16S rDNAの全塩基配列を解析したところ、YF28株を除く8菌株は *Lactobacillus alimentarius* (相同率 99.9%) に、YF28株は *Lactobacillus parafarraginis* (相同率 100.0%) に非常に高い相同性を示した。

## IV. 考察

本研究において、Y糠床、H糠床およびK糠床の3種の異なる熟成糠床から、人工胃液および人工腸液に対する耐性能を基に選抜した9菌株のうち、8菌株は *Lactobacillus alimentarius* に、1株は *Lactobacillus parafarraginis* に高い相同性を示し、

選抜株の乳酸菌種はこの 2 種に限定された。しかしながら、過去の報告<sup>6,7)</sup>では、熟成糠床からは数多くの種類の乳酸菌が検出されている。表 1 に示したように、本研究において最初の段階で行った各糠床懸濁液への人工胃液処理による乳酸菌の生存率は 0.20 ~ 0.62% と、何れの場合も 100 分の 1 を下回っている。つまり、この初期段階の高いストレス（選択圧）が、最終的に選抜された株の菌種の限定に大きく寄与しているのではないかと推察された。

次に、本研究で得られた選抜株が高い相同性を示した *Lactobacillus alimentarius* と *Lactobacillus parafarraginis* に関しては、どちらも中山・園元らを中心とする九州大学のグループにより、次世代型シーケンサーを用いた熟成糠床中に生息する乳酸菌種の網羅的な遺伝子解析<sup>6,7)</sup>において検出された実績のある菌種である。加えて、*Lactobacillus alimentarius* についてはサワードウ<sup>16)</sup> やあじなれずし<sup>17)</sup>、ブドウ滓サイレージ<sup>18)</sup> 等から、*Lactobacillus parafarraginis* については焼酎蒸留粕のコンポスト<sup>19)</sup> 等から分離されたことが過去に報告されている。しかしながら、どちらの菌種についても、ヒトの胃液や腸液に高い耐性を有するという特性については、筆者の知る限りではこれまでのところ報告されておらず、はじめての知見であると考えられる。

また、*Lactobacillus alimentarius* については、本研究で分離された YF1 株、YF2 株、YF15 株、HF13 株、HF18 株、KF1 株、KF11 株および KF13 株の計 8 株がこれに高い相同性を示したが、表 2 に示したように、これらの 8 株間には人工胃液や人工腸液に対する耐性能に差が見られた。且つ、今回結果として示していないが、人工胃液や人工腸液を全く含まない通常の MRS 培地における 24 時間培養後の菌の増殖にも差が見られた（24 時間後の Abs<sub>560nm</sub> 値：最小 2.57、最大 5.81）。これらの結果から、8 株は遺伝子解析によって同種の菌に高い相同性を示すものの、その特性には大きな差（個体差）があると考えられる。今後、これら 8 株の人工胃液や人工腸液に対する耐性能、増殖能をさらに詳細に検討し、より優れた菌株の選抜を行いたいと考えている。

選抜した株については今後、食品グレードの培地素材<sup>20)</sup> 等を用いて高濃度に培養後、新鮮な米糠から新たな糠床を調製する際の初期段階に投入するこ

とで（※一旦熟成されて、所謂“堅牢な微生物叢”が形成された後では、特定の乳酸菌を投入してもそれが優占種になることは困難であると予想されるため）、①それら乳酸菌を優占種とする熟成糠床を作製できるのか、②それら乳酸菌が接着した糠漬け野菜を造ることができるのか、並びに③熟成糠床の風味への影響等について検討を行う予定である。併せて、発酵乳やパンなど他の加工食品への応用についても検討していきたいと考えている。

## V. 結言

85 年以上経過した熟成糠床 3 種から、人工胃液および人工腸液に対する耐性能を基に、*Lactobacillus alimentarius* に高い相同性を有する 8 株 (YF1、YF2、YF15、HF13、HF18、KF1、KF11、KF13 株) と、*Lactobacillus parafarraginis* に高い相同性を有する 1 株 (YF28 株) を分離した。今後、人工胃液・腸液に対する耐性能や増殖能等を詳細に調べることによって菌株のさらなる選抜を行い、新たな糠床を調製する際の初期段階に投入することで、それら乳酸菌を優占種とする熟成糠床を作製できないか検討を行いたいと考えている。

## VI. 謝辞

本研究は、JSPS 科研費 JP19K05905 の助成を受けて実施したものである。

## 文献

- 1) 今井正武、平野進、饗場美恵子：糠床の熟成に関する研究 - 熟成中の菌叢および糠床成分の変化 -。日本農芸化学会誌。57 : 1105-1112, 1983
- 2) 今井正武、平野進、饗場美恵子：糠床の熟成に関する研究 - 熟成中のフレーバー成分の変化 -。日本農芸化学会誌。57 : 1113-1120, 1983
- 3) 今井正武：糠みそ床の香气成分の生成に関する微生物と温度の影響。日本食品低温保蔵学会誌。21 : 161-178, 1995
- 4) 今井正武、後藤昭二、平野進：糠床熟成中の酵母フローラの消長と分離菌株の同定。日本農芸化学会誌。58 : 545-551, 1984
- 5) Nakayama J, Hoshiko H, Fukuda M, Tanaka H, Sakamoto N, Tanaka S, Ohue K, Sakai K

- and Sonomoto K : Molecular monitoring of bacterial community structure in long-aged nukadoko : Pickling bed of fermented rice bran dominated by slow-growing *Lactobacilli*. *J Biosci Bioen.* 104 : 481-489, 2007
- 6) Sakamoto N, Tanaka S, Sonomoto K and Nakayama J : 16S rRNA pyrosequencing-based investigation of the bacterial community in nukadoko, a pickling bed of fermented rice bran. *Int J Food Microbiol.* 144 : 352-359, 2011
- 7) 坂本直茂、中山二郎：糠床のマイクロフローラと乳酸菌の共生。生物工学会誌。8 : 482-485, 2011
- 8) 古田吉史、田中貴絵、甲斐達男：糠床への浸漬による野菜に付着する微生物叢の変化。西南女学院大学紀要。21 : 145-151, 2017
- 9) 麻生祐司：機能的乳酸菌の探索と高付加価値食品への応用。食品加工技術。34 : 171-177, 2014
- 10) 中川良二：乳酸菌 HOKKAIDO 株を用いた機能的性を有する食品等の開発と技術普及。日本食品科学工学会誌。65 : 283-289, 2018
- 11) 駒野小百合、角谷智子、小林恭一、谷政八：胃酸・胆汁酸耐性を有し米発酵に適した植物性乳酸菌の選抜とその特性。福井県農業試験場研究報告。47 : 31-37, 2010
- 12) 熊谷武久、瀬野公子、川村博幸、渡辺紀之、岡田早苗：植物性乳酸菌の食品発酵性と食餌モデル培地における生育。日本食品科学工学会誌。48 : 677-683, 2001
- 13) 松本周三、河村俊哉、晦村房和、芋川あゆみ、玉屋圭：長崎乳酸菌ライブラリーを活用した加工食品の開発。長崎県工業技術センター研究報告。44 : 52-56, 2015
- 14) 鈴木チセ：乳児糞便からの乳酸菌の分離・同定と特性解析。微生物遺伝資源探索収集調査報告書。24 : 43-49, 2011
- 15) Takanashi S, Miura A, Abe K, Uchida J and Sugita H : Variations in bile tolerance among *Lactococcus lactis* strains derived from different sources. *Folia Microbiologica.* 59 : 289-293, 2014
- 16) 平山洋佑、遠藤明仁：乳酸菌分類の現在とビフィズス菌・乳酸菌分類小委員会が提言した新規乳酸菌種提唱のための最少基準。腸内細菌学雑誌。30 : 17-28, 2016
- 17) 太田富久、高野文英、熊谷英彦、小柳喬。免疫抑制乳酸菌組成物及び免疫抑制乳酸発酵食品。特開 2013-188198
- 18) 乙黒美彩、小西啓太、長沼孝多、佐藤憲亮、木村英夫、長坂克彦、古屋元宏、柳田藤寿。ブドウ滓サイレージからの乳酸菌の分離とその性質。山梨県総合理工学研究機構研究報告書。10 : 121-124, 2015
- 19) Endo A and Okada S : *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis* sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57 : 708-712, 2007
- 20) 古田吉史、丸岡生行、中村彰宏、大森俊郎、園元謙二：乳酸菌を利用した焼酎蒸留粕の高付加価値素材への転換プロセスの構築。生物工学会誌。88 : 114-120, 2010

<Abstract>

‘Nukazuke’, pickling vegetables in ‘nukadoko’, is one of Japanese traditional fermented foods. Nukadoko is prepared by natural fermentation of rice bran and contains various kinds of microorganisms, such as lactic acid bacteria (LAB) and yeast, certain amount of which would adhere to pickling vegetables. As the number of LAB with gastrointestinal transit tolerance increases in nukadoko, probiotic function of pickling vegetables might elevate. In this study, we isolated nine of LAB which have high tolerance for artificial gastric juice (pH2.5 adjusted with HCl, containing pepsin) and intestinal juice (containing bile and pancreatin), from eighty-nine of LAB candidates derived from three different long-aged nukadoko (more than 85 years). Analysis of their 16S rRNA (rDNA) gene sequences revealed that eight of them (YF1, YF2, YF15, HF13, HF18, KF1, KF11 and KF13) had high similarity (99.9%) to *Lactobacillus alimentarius* and one of them (YF28) had high similarity (100.0%) to *Lactobacillus*

*parafarraginis*. Their LAB strains would be added to the initial stage of preparing nukadoko newly from rice bran in order to make them predominant in microbiota of nukadoko.