

学位論文題名

Development of a Novel Fermented Food using Alkali-Tolerant *Lactobacillus* Strains and Physiological Studies of *Lactobacilli* under Alkaline Conditions

(アルカリ耐性 *Lactobacillus* 属細菌の新規発酵食品への利用およびアルカリ条件における *Lactobacillus* 属細菌の生理解析に関する研究)

学位論文内容の要旨

Lactobacillus 属細菌はヨーグルト、発酵ソーセージ、サワーブレッドそしてピクルス等の発酵食品製造用スターターとして幅広く用いられている。*Lactobacillus* 属細菌で発酵した食品で、栄養価の改善、酸味・風味の形成による嗜好性の向上、保存の長期化、そしてヒトの健康増進が確認されている。したがって、*Lactobacillus* 属細菌を利用して新たな発酵食品を開発することは重要と思われる。そこで本研究では、新規性があり高い価値が付与された小麦粉食品の創出を目指し、*Lactobacillus* 属細菌の乳酸発酵を利用した新しいタイプの即席中華麺の開発を行うことにした。

即席中華麺の基本原料は強力粉、かんすい (K_2CO_3 と Na_2CO_3 の混合溶液)、食塩、そして水である。かんすいはアルカリ水であるため、これら原料から作製した麺帯 (麺原料を混合・圧延し帯状にしたもの) の pH は 8.5 のアルカリ性である。したがって、麺帯を発酵するためにはアルカリ耐性を示す *Lactobacillus* 属細菌が必要である。しかしながら、*Lactobacillus* 属細菌のアルカリストレスに対する耐性や感受性に関する研究はほとんど見られない。麺帯を *Lactobacillus* 属細菌の生育地培地として考えた場合、主要発酵炭素源はマルトースであり、生育に必要な遊離アミノ酸は少ないと考えられる。したがって、マルトースを発酵し、要求するアミノ酸が少ない *Lactobacillus* 属細菌が、麺帯発酵スターターとして適していると予想される。

上述の背景を踏まえて本研究では、選抜された *Lactobacillus* 属細菌を利用して発酵即席中華麺を開発した。つづいて、新規発酵即席中華麺の産業化のために、スターター調製用の安全で安価な食品グレード培地を開発した。最後に基盤解析として、*Lactobacillus* 属細菌のアルカリストレスに対する生育、生理、そして代謝について調べた。

1) *Lactobacillus plantarum* を利用した発酵即席中華麺の開発

12 種 (亜種を含む) 46 株の *Lactobacillus* 属細菌を用いて、アルカリ麺帯の発酵に適した株のスクリーニング試験を行ったところ、興味深いことに *Lb. plantarum* と *Lb. pentosus* に属する植物性発酵食品分離株のみが麺帯を発酵した。これら発酵株の中で、ピクルスから分離された *Lb. plantarum* NRIC 0380 が最も速く麺帯を発酵し、麺に好ましい食感と風味を与えた。そこで本株を麺帯発酵の最適スターター株として用い、発酵試験および官能試験を行った。麺帯を 24 時間発酵すると、スターター株の乳酸発酵によって麺帯 pH は初期の 7.9 から 3.9 まで低下した。官能試験の結果、pH 7.5 (1.5 時間発酵) まで発酵した麺帯から調製した即席中華麺に、好ましい硬さと弾力性の増加および軽い酸味が付与されていることがわかった。さらに、発酵を続けると麺は柔らか

くなり、酸味が増加した。したがって、麺帯の最適発酵時間を 1.5 時間と定めた。以上の結果より、*Lb. plantarum* NRIC 0380 の乳酸発酵を利用した発酵即席中華麺の開発に成功した。

2) *Lactobacillus plantarum* スターター調製用の食品グレード培地の開発

発酵即席中華麺の産業化のために、*Lb. plantarum* NRIC 0380 スターター調製用の安全で安価な食品グレード (FG) 培地を、*Lactobacillus* 属細菌の研究用培地である MRS 培地を参考にして開発した。考案した FG 培地組成は単純であり、スクロース、イーストペプトンスタンダードタイプ F (酵母エキス)、サンソフト Q-17S (乳化剤)、そして硫酸マンガンのみを含む。pH を 6.5 に制御した 2 L の小型ジャーで 1 L の FG 培地を用いて *Lb. plantarum* NRIC 0380 の培養試験を行ったところ、生育、糖消費、そして乳酸生成速度が MRS 培地を用いた場合とほとんど同じであった。また、1,200 L FG 培地を用いて 2,000 L の産業用ジャーで *Lb. plantarum* NRIC 0380 を培養しても、2 L ジャーで培養時した時と同様の生育・発酵結果が得られた。以上の結果より、*Lb. plantarum* NRIC 0380 スターター調製に最適な FG 培地の開発に成功した。さらに、FG 培地は様々な *Lactobacillus* 属細菌の培養も可能であることがわかった。したがって、考案した FG 培地は *Lb. plantarum* NRIC 0380 のみならず、多くの *Lactobacillus* 属細菌の培養に使用できることがわかった。本 FG 培地が食品業界において標準的なスターター調製培地として利用されることが期待される。

3) *Lactobacillus* 属細菌のアルカリ耐性の多様性と耐性機構の解明

酸性環境における乳酸菌のストレス応答に関する研究は数多く報告されているが、アルカリストレス応答に関しては限られた種でしか行われていない。特に *Lactobacillus* 属細菌に関しては研究報告は見られない。そこで、様々な *Lactobacillus* 属細菌のアルカリ条件における生育、生理、代謝について調べた。

Lactobacillus 属細菌 34 株の MRS 培地における生育限界アルカリ pH (pH_{max}) を決定した。植物質分離の *Lb. casei*、*Lb. paracasei* subsp. *tolerans*、*Lb. paracasei* subsp. *paracasei*、*Lb. curvatus*、*Lb. pentosus*、そして *Lb. plantarum* は高いアルカリ耐性を示し、pH_{max} は 8.5-8.9 だった。これらの中で、*Lb. casei* NRIC 1917 と *Lb. paracasei* subsp. *tolerans* NRIC 1940 は pH 8.9 まで生育を示し、最も高い pH_{max} を示した。消化管分離の *Lb. gasseri*、*Lb. johnsonii*、*Lb. reuteri*、*Lb. salivarius* subsp. *salicinius*、そして *Lb. salivarius* subsp. *salivarius* は中程度のアルカリ耐性を示し、pH_{max} は 8.1-8.5 だった。一方、乳製品分離の *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*、*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*、そして *Lb. helveticus* はアルカリ耐性が低く、pH_{max} は 6.7-7.1 だった。したがって、*Lactobacillus* 属細菌のアルカリ耐性の多様性を見出した。

アルカリ耐性の多様性決定要因を明らかにするために、代表的な *Lactobacillus* 属細菌株の細胞内 pH の測定を行った。アルカリ外部 pH 条件で細胞内 pH を中性付近に制御するような積極的なシステムは見られなかった。しかしながら、わずかに細胞内 pH が外部 pH よりも低くなる現象 (逆転 Δ pH) が供試株のアルカリ耐性に関わらず見られた。したがって、アルカリ外部 pH 条件で生じる逆転 Δ pH はアルカリ耐性の多様性決定要因では無いと考えられた。しかしながら、ナイジェライシン (細胞内外の pH を同値にする薬剤) で逆転 Δ pH を消去すると、ほとんどの供試株の pH_{max} が低下したため、逆転 Δ pH はアルカリ耐性に寄与していることがわかった。

ナイジェライシンを含む培地で培養試験を行ったところ、アルカリ耐性の多様性要因が細胞内代謝、特に糖代謝のアルカリ耐性に依存していると予想される結果を得た。そこで、代表的な *Lactobacillus* 属細菌株の糖代謝のアルカリ耐性をナイジェライシン存在下で調べたところ、興味深いことに供試株の中で最もアルカリ耐性が高い *Lb. paracasei* subsp. *tolerans* NRIC 1940 の糖代謝活性曲線はアルカリ側にシフトしており、他の株で活性が失われる pH 8.0 でも十分な活性を示した。したがって、糖代謝のアルカリ耐性は *Lactobacillus* 属細菌で見られたアルカリ耐性の多様性の一要因であると考えられた。

以上の結果より、乳酸菌の酸耐性要因が数多く発見されている一方で、積極的なアルカリ耐性要因が

Lactobacillus 属細菌で見られなかったことから、本属細菌がアルカリ環境で生育するのに必要な耐性要因は進化の過程で十分に形成されなかったのではないかとと思われる。本研究はアルカリ条件における *Lactobacillus* 属細菌の生理変化を調べた最初の報告である

以上、本研究ではアルカリ耐性 *Lactobacillus* 属細菌を利用した発酵即席中華麺の開発および *Lactobacillus* 属細菌スターター調製用の FG 培地の開発に成功した。アルカリ条件における *Lactobacillus* 属細菌の生理変化を調べ、アルカリ耐性の多様性とその一要因を明らかにした。以上の成果は、*Lactobacillus* 属細菌を利用した食品開発および *Lactobacillus* 属細菌の基礎研究に大きく寄与するものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	横田	篤
副査	教授	浅野	行蔵
副査	教授	松井	博和
副査	助教授	湯本	勲
副査	助教授	和田	大

学位論文題名

Development of a Novel Fermented Food using Alkali-Tolerant *Lactobacillus* Strains and Physiological Studies of *Lactobacilli* under Alkaline Conditions

(アルカリ耐性 *Lactobacillus* 属細菌の新規発酵食品への利用およびアルカリ条件における *Lactobacillus* 属細菌の生理解析に関する研究)

本論文は英文 98 頁、図 10、表 10、5 章からなり、参考論文 3 編が付されている。

Lactobacillus 属細菌は発酵食品の製造用スターターとして幅広く用いられ、発酵による多くの機能付加が確認されている。したがって、*Lactobacillus* 属細菌を利用して新たな発酵食品を開発することは重要である。そこで本研究では、新規の高付加価値小麦粉食品の創出を目指し、*Lactobacillus* 属細菌の乳酸発酵を利用した新しい即席中華麺の開発を行うことにした。即席中華麺はかんすい (K_2CO_3 と Na_2CO_3 の混合溶液) を含むため、pH は 8.5 のアルカリ性である。したがって、麺帯を発酵するためにはアルカリ耐性の *Lactobacillus* 属細菌が必要である。しかし、*Lactobacillus* 属細菌のアルカリストレスに対する研究はほとんど見られない。そこで本研究では、選抜された *Lactobacillus* 属細菌を用いて発酵即席中華麺を開発した。つづいて、発酵即席中華麺の産業化のために、スターター調製用の食品グレード培地を開発した。最後に基盤解析として、*Lactobacillus* 属細菌のアルカリストレスに対する生理変化について調べた。

1) *Lactobacillus plantarum* を利用した発酵即席中華麺の開発

46 株の *Lactobacillus* 属細菌を用いて、アルカリ麺帯発酵好適株のスクリーニング試験を行ったところ、*Lb. plantarum* と *Lb. pentosus* に属する植物質分離株のみが麺帯を発酵した。これらの中で、ピクルス分離の *Lb. plantarum* NRIC 0380 が最も速

く麵帯を発酵した。そこで本株を麵帯発酵の最適スターター株として用い、発酵試験および官能試験を行った。麵帯を 24 時間発酵すると、スターター株の乳酸発酵により麵帯の pH は初期の pH 7.9 から 3.9 まで低下した。官能試験の結果、pH 7.5 (1.5 時間発酵) まで発酵した麵は、好ましい硬さと弾力性の増加および軽い酸味が付与された。さらに、発酵を続けると麵は柔らかくなり、酸味が増加した。したがって、最適発酵時間を 1.5 時間と定めた。以上の結果より、*Lb. plantarum* NRIC 0380 の乳酸発酵を利用した発酵即席中華麵の開発に成功した。

2) *Lactobacillus plantarum* スターター調製用の食品グレード培地の開発

Lb. plantarum NRIC 0380 スターター調製用の安全で安価な食品グレード (FG) 培地を、実験用標準培地である MRS 培地を参考にして開発した。考案した FG 培地組成は単純であり、スクロース、イーストペプトンスタンダードタイプ F (酵母エキス)、サンソフト Q-17S (乳化剤)、そして硫酸マンガンである。pH を 6.5 に制御した 2 L の小型ジャーフェーマンターで 1 L の FG 培地を用いて *Lb. plantarum* NRIC 0380 の培養試験を行ったところ、生育、糖消費、および乳酸生成速度が MRS 培地を用いた場合とほぼ同様であった。また、1,200 L の FG 培地を用いて 2,000 L の産業用ジャーフェーマンターで *Lb. plantarum* NRIC 0380 を培養しても、2 L ジャーフェーマンターで培養時した時と同様の生育・発酵結果が得られた。以上の結果より、*Lb. plantarum* NRIC 0380 スターター調製に最適な FG 培地の開発に成功した。さらに、FG 培地は様々な *Lactobacillus* 属細菌の培養も可能であることがわかった。したがって、この培地は *Lb. plantarum* NRIC 0380 のみならず、多くの *Lactobacillus* 属細菌の培養に適用できることがわかった。

3) *Lactobacillus* 属細菌のアルカリ耐性の多様性と耐性機構の解明

これまで *Lactobacillus* 属細菌のアルカリ条件における生育・生理・代謝に関する研究は報告されていない。そこで、*Lactobacillus* 属細菌 34 株の MRS 培地における生育限界アルカリ pH (pH_{max}) を調べたところ、pH_{max} は種・株・分離源によって異なっており 6.7-8.9 の範囲に認められ、アルカリ耐性の多様性を発見した。多様性要因解明のため供試株の細胞内 pH を測定したところ、アルカリ外部 pH で、多様性に関与する程度の積極的な細胞内 pH の中性制御は見られなかった。しかしながら、アルカリ耐性に寄与するわずかな細胞内 pH の酸性化が、供試株のアルカリ耐性度に関わらず見られた。ナイジェライシン添加培養試験を行ったところ、アルカリ耐性の多様性要因が細胞内代謝に依存していると予想される結果を得た。そこでナイジェライシン存在下で糖代謝のアルカリ耐性を調べたところ、pH_{max} の高い株は低い株よりも糖代謝のアルカリ耐性が高いことがわかった。したがって、糖代謝のアルカリ耐性は *Lactobacillus* 属細菌で見られたアルカリ耐性の多様性の一要因であることが示された。

以上、申請者はアルカリ耐性 *Lactobacillus* 属細菌の乳酸発酵を利用した発酵即席

中華麺の開発に成功し、また、食品加工に用いる *Lactobacillus* 属細菌スターター調製培地として安全で安価な FG 培地を開発した。これらの知見は乳酸菌を用いる食品産業分野での利用が大いに期待される。さらに、未解明であった *Lactobacillus* 属細菌のアルカリストレスに対する耐性/感受性について、生育・生理・代謝の面から調べ、*Lactobacillus* 属細菌のアルカリ耐性の多様性とその多様性の一要因を明らかにした。本知見は乳酸菌の生理の理解に大きく寄与するものである。

よって審査員一同は、澤渡 優喜が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。