

アユの乳酸菌はどこから来るの？

～起源的研究と産業利用～

水産科 3 年 中荒井 李華

1. はじめに

乳酸菌とは自身が利用した糖の 50%以上を乳酸へと変換する細菌群の総称で、現在までに 26 属 213 種が報告されている。また、発酵様式はホモ乳酸発酵およびヘテロ乳酸発酵の 2 パターンがあり、種により異なる。これらの性質を利用してヨーグルトやチーズ、醤油などの発酵食品が製造されている。

乳酸菌は様々な乳製品の他、イネやオリーブなどの植物表面から多く分離されている。加えて、水圏環境からはアユを含む魚類のほか、チョウセンハマグリを含む数種の二枚貝類から分離が報告されている。これらの種はケイ藻およびラン藻を含む植物プランクトンを摂餌している。特に二枚貝類はフィルターフィーダーであり、環境水中の藻類を集積している。これらの植食者から乳酸菌が多く分離されていることから「水中の植物は陸上環境の植物に相当し、乳酸菌の分離源として適しているのではないか」と考えた。そこで、本研究では藻類を摂餌するアユの腸管から乳酸菌を再分離するとともに、淡水の植物である底生性の付着藻類や有機懸濁物質からの乳酸菌の分離を試みた。

2. 乳酸菌の分離

(1) 試料

本研究の試料には平成 29 年 7 月 21 日那珂川水系の河川である箒川と武茂川に遡上するアユ 3 尾およびアユの食み跡のある石を 2 つ採取した。加えて、採捕したアユは滅菌環境下で解剖し、腸内容物および粘膜を採集して試料とした。アユの食み跡のある石からは付着藻類をこすり取り、試料とした。また、石を運ぶ際に使用していたバケツに溜まった水も試料とした。

(2) 分離方法

1) 直接培養法

試料は滅菌超純水を用いて $10^0 \sim 10^{-4}$ 倍に系列希釈後、乳酸菌の選択培地である MRS 寒天培地に接種した。その後、好機条件下 25°C で 3 日間培養した。

2) 増菌培養法

試料を MRS 液体培地に接種し、好気条件下 25°C で 3 日間培養した。菌懸濁液を $10^0 \sim 10^{-9}$

倍に系列希釈した後、MRS 寒天培地に接種した。25 °C で培養後、コロニーを確認した。

3) 乳酸菌様株の選別

検出されたコロニーを乳酸菌様株選別のため、1%濃度の CaCO_3 を含有した MRS 寒天培地に接種し、クリアゾーン形成の有無を調べた。クリアゾーン形成株は釣菌後、通常の MRS 寒天培地に接種し、純粋培養を行った。

(3) 各種解析

アユから乳酸菌様株が分離できるということは、アユの食性あるいは生活環境由来であることが予想される。そこで、本研究ではアユの腸内容物および付着藻類を次世代シーケンス解析に供し、試料中の細菌相および植物相を明らかにした。また、解析と結果が一致することで今回行った寒天培養法の正確性が明らかになる。加えて、試料となる付着藻類の植物相がわかることで、アユの食性および食んだ石に付着した藻類の種が明らかになる。

(4) 結果

アユの腸内容物および粘膜を各培養法に供し、得られた分離株をクリアゾーン形成試験に供した結果、箒川由来のアユ 2 個体から 60 株および武茂川由来のアユ 3 個体から 30 株の乳酸菌様株を確認することができた (表 1)。

表 1. アユの腸内要物および粘膜から得られた乳酸菌様株

分離源	乳酸菌様株	培養法
アユ 1 (箒川)	30 株	増菌培養法
アユ 2 (箒川)	30 株	増菌培養法
アユ 3 (武茂川)	10 株	増菌培養法
アユ 4 (武茂川)	10 株	増菌培養法
アユ 5 (武茂川)	10 株	増菌培養法

付着藻類を両培養法に供した結果、1 回目の分離実験では 2 つの石の増菌培養法から 50 株、バケツの水は直接培養法から 47 株および増菌培養法から 25 株の乳酸菌様株が得られた。これらは、半永久的に保存ができるグリセロールストックに供した。バケツに溜まった水から多く乳酸菌様株が分離されたが、これはデトリタスあるいは河川水のどちらから分離されたかわからない。そこで、食んだ跡のある石と滅菌水を容器に入れて攪拌し、得られた水 (バケツ水) および河川水を試料として再分離を行った。

その結果、バケツ水の直接培養法から 26 株および河川水の直接培養法から 1 株の乳酸菌様株が得られた (表 2)。このことにより付着藻類由来の可能性が高いが、環境水中にもわずかに乳酸菌は存在することが示唆された。

表 2. 付着藻類から得られた乳酸菌様株

分離源	乳酸菌様株	培養法
石 1	25 株	増菌培養法
石 2	25 株	増菌培養法
バケツの水	47 株	直接培養法
バケツの水	25 株	増菌培養法
バケツ水 + 滅菌水	26 株	直接培養法
河川水	1 株	直接培養法

4. チーズ官能試験

(1) 作製方法

昨年度分離したアユ由来の株を用いて食品製造を行った。乳酸菌を加えないチーズ（コントロール）、*Lactobacillus plantarum* および *Lactococcus garvieae* を用いたチーズを作製した。それぞれの株は低温殺菌乳に増菌培養を行った菌液を添加した。加熱後、沸騰直前にレンネットを加えて、凝固させた。乳清（ホエー）を可能な限り取り除いた後、形を整えて半日ほどプレスを行った。これらのチーズは 1 ヶ月ほど熟成させ、それぞれの味や風味の変化などの比較を行った。また、製造過程で pH の変化を調べた。

チーズ作製の後は本校生徒および職員に協力してもらいアンケート調査を行った。味、臭いおよび風味の項目を 3 段階で評価するアンケート用紙を作成した。

(2) 結果

熟成期間を合わせ、合計 1 ヶ月ほどでチーズを作製することができた。本来、チーズの作製は数ヶ月熟成することによりチーズ特有の風味が出てくる。しかし、今回作製を行った結果、*Lb. plantarum* および *Lc. garvieae* を用いたチーズは 1 ヶ月でも十分に風味が出た。

低温殺菌乳の pH はどのチーズも 7.0、ホエー排出後の pH は 6.1～7.0 であった。作製したチーズは生徒 15 人、先生方 14 人および一般の方 3 人を対象にアンケートを実施した。意見としては *Lb. plantarum* では「苦い」という意見が最も多く、*Lc. garvieae* は「食べやすい」、「ワインに合いそう」と好評だった（表 3）。一方、乳酸菌を添加しなかったコントロールに関しては「味がしない」、「ポソポソする」という意見が得られた。

表 3. チーズ官能試験のアンケート集計結果

	味		臭 い		風 味	
コントロール	○	11 人	○	16 人	○	7 人
	△	13 人	△	10 人	△	18 人
	×	4 人	×	2 人	×	3 人
<i>Lc. garvieae</i>	○	12 人	○	11 人	○	11 人
	△	11 人	△	10 人	△	12 人
	×	4 人	×	6 人	×	4 人
<i>Lb. plantarum</i>	○	10 人	○	6 人	○	8 人
	△	12 人	△	12 人	△	12 人
	×	6 人	×	10 人	×	8 人

(○:良い, △:普通, ×:悪い)

5. 本研究の考察

(1) 分離実験

昨年度の研究でもアユの腸内容物から乳酸菌の再分離ができたことから、乳酸菌の分離源として適している可能性が高いことが考えられる。また、付着藻類および河川水の直接培養法から乳酸菌が分離できたことから、少ない量ながら乳酸菌が存在することが示唆された。

(2) 各種解析

本研究では分離された乳酸菌様株の DNA 解析および次世代シーケンス解析の結果を出すに至らなかった。そのため、残りの時間でこれらを行い、分離株の多様性を調べて分離源としての適性を評価する。

(3) チーズ官能試験

3つのチーズを製造、比較することで「種の異なる乳酸菌を添加することにより、発酵スピードや味、食感、風味に大きな変化がある」ということが明らかになった。また、同時に「乳酸菌の種による変化が見られたことから、今後多様な製品が生み出せる」ということを改めて感じた。今後、プロバイオティクス効果などを調べることで、有益な効果を呈するチーズをつくることが期待できる可能性がある。

謝辞

実験に際してご協力いただいた日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科の糸井史郎准教授、ゆりがねのやなの大金様ならびに株式会社生物技研の中野様に深くお礼申し上げます。また、本研究の一部は東和食品研究振興会の学術奨励金による援助を賜っています。