

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-193820

(P2011-193820A)

(43) 公開日 平成23年10月6日(2011.10.6)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N	1/20	Z N A A	4 B 0 1 8	
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04		4 B 0 2 4	
C 1 2 Q	1/40	(2006.01)	C 1 2 Q	1/40		4 B 0 6 3	
A 2 3 L	1/30	(2006.01)	A 2 3 L	1/30	Z	4 B 0 6 5	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A		

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2010-65304 (P2010-65304)
 (22) 出願日 平成22年3月20日 (2010. 3. 20)

(71) 出願人 504155293
 国立大学法人島根大学
 島根県松江市西川津町1060
 (74) 代理人 100116861
 弁理士 田邊 義博
 (72) 発明者 麻生 祐司
 島根県松江市西川津町1060 国立大学
 法人島根大学内
 Fターム(参考) 4B018 MD86 MD91 ME03 MF13
 4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09
 CA10 CA11 GA19 HA08 HA09
 HA12 HA14
 4B063 QA01 QA18 QQ06 QR15 QR43
 QR50 QR69 QR75 QS24 QS28
 QS36 QX01

最終頁に続く

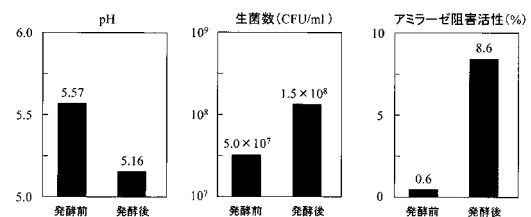
(54) 【発明の名称】 乳酸菌、乳酸菌選抜方法、および、発酵食品

(57) 【要約】

【課題】 新規な乳酸菌であって、簡便に培養でき、経口により腸内に達し糖尿病予防が期待できる技術を得ること。

【解決手段】 動物臓由来のアミラーゼに対して阻害活性を有し、かつ、耐熱性のある物質を産生する乳酸菌である。マイクロプレートの各ウェルに、動物臓由来の至適濃度の アミラーゼと至適濃度のデンプンとを調製した溶液を添加し、あわせて、カブ由来の複数の乳酸菌株の培養液上清それぞれを各ウェルに一株ずつ添加して、至適反応時間後に、ヨウ素デンプン反応の発色に基づいて、この乳酸菌を選抜することが可能である。

【選択図】 図 4



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物臓由来のアミラーゼに対して阻害活性を有しかつ耐熱性のある物質を産生する乳酸菌。

【請求項 2】

胃酸耐性および/または胆汁酸耐性を有することを特徴とする請求項 1 に記載の乳酸菌。

【請求項 3】

乳酸菌がワイセラ属乳酸菌であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の乳酸菌。

【請求項 4】

マイクロプレートの各ウェルに、動物臓由来の至適濃度の アミラーゼと至適濃度のデンプンとを調製した溶液を添加し、あわせて、カブ由来の複数の乳酸菌株の培養液上清それぞれを各ウェルに一株ずつ添加して、至適反応時間後に、ヨウ素デンプン反応の発色に基づいて、請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の乳酸菌を選抜することを特徴とする乳酸菌選抜方法。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の乳酸菌を用いた発酵食品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、乳酸菌、乳酸菌選抜方法、および、発酵食品に関し、特に、経口により腸内に達し糖尿病予防の期待できる乳酸菌を得る技術ないし得た乳酸菌、および、その利用技術に関する。

【背景技術】

【0002】

糖尿病は 1 型と 2 型にわかれ、近年では、生活習慣等に起因した 2 型糖尿病の発症件数を減らすもしくは予防することが社会的にも重要視されている。

【0003】

糖尿病は、血糖値の調整に係るインシュリンの分泌機能不全や血糖値上昇の感知機能不全などにより生じる。特に食事後には、デンプンの分解による血液中のグルコース（ブドウ糖）濃度すなわち血糖値が高くなるため、糖尿病患者は、インシュリン投与等が必要となる。

【0004】

近年では、インシュリン投与とは別のアプローチとして、グルコースの前駆物質であるマルトースの生成量を低減ないし緩和するために、消化酵素であるアミラーゼの活性を阻害するアミラーゼインヒビターが着目されつつある。

【0005】

また、近年では人体に良い影響を与える微生物またはそれらを含む製品や食品、いわゆるプロバイオティクスが着目されている。たとえば乳酸菌の中には、胃ガンの発生原因の一つであるピロリ菌活動を抑制する効果のある乳酸菌の添加されたヨーグルトなども知られている。

【0006】

しかしながら、従来知られているアミラーゼインヒビターを産生する微生物のほとんどは放線菌に属している。ここで、放線菌は、抗生物質を産生する場合が多く、取扱いや薬学的な検証に時間がかかるという問題点があった。したがって、放線菌は一般的には食品の利用に向かないという問題点があった。また、放線菌の培養には特殊な装置を必要とし、簡便には培養できないという問題点があった。

【0007】

また、プロバイオティクスの観点からは、細菌が腸内まで失活しないで到達、定着する

10

20

30

40

50

ことが求められるが、この場合には、胃酸や胆汁酸などに耐性があることが求められるところ、放線菌にこれらの特性があるかは必ずしも明らかとなっていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開昭54-163511号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

すなわち、解決しようとする点は、簡便に培養でき、経口により腸内に達し糖尿病予防を期待できる乳酸菌を得る点である。

【課題を解決するための手段】

【0010】

請求項1に記載の発明は、動物臓由来のアミラーゼに対して阻害活性を有しかつ耐熱性のある物質を産生する乳酸菌である。

【0011】

請求項2に記載の発明は、胃酸耐性および/または胆汁酸耐性を有することを特徴とする請求項1に記載の乳酸菌である。

【0012】

請求項3に記載の発明は、乳酸菌がワイセラ属乳酸菌であることを特徴とする請求項1または2に記載の乳酸菌である。たとえば、カブに付着している乳酸菌から選抜可能である。

【0013】

請求項4に記載の発明は、マイクロプレートの各ウェルに、動物臓由来の至適濃度のアミラーゼと至適濃度のデンプンとを調製した溶液を添加し、あわせて、カブ由来の複数の乳酸菌株の培養液上清それぞれを各ウェルに一株ずつ添加して、至適反応時間後に、ヨウ素デンプン反応の発色に基づいて、請求項1～3のいずれか一つに記載の乳酸菌を選抜することを特徴とする乳酸菌選抜方法である。

【0014】

請求項6に記載の発明は、請求項1～3のいずれか一つに記載の乳酸菌を用いた発酵食品である。

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、新規な乳酸菌であって、簡便に培養でき、経口により腸内に達し糖尿病予防が期待できる技術を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】選抜した菌のSEM写真である。

【図2】KY5-4株の濁度と阻害活性を測定した結果を表した図である。

【図3】KY5-23株の濁度と阻害活性を測定した結果を表した図である。

【図4】選抜された乳酸菌KY5-4株を用いたカブ漬けについての生菌数やアミラーゼ阻害活性を測定した結果を示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、本発明の実施の形態を図面を参照しながら詳細に説明する。

本発明は、本願発明者が鋭意検討の結果、従来全く知見のなかった、乳酸菌にアミラーゼ阻害活性物質を産生するものがあることを発見したに基づいて成された発明である。

【0018】

<至適条件の検討>

10

20

30

40

50

まず、津田カブ漬け（島根県特産の蕪の一種である津田カブの漬け物であって、乳酸発酵したものである。）から乳酸菌を単離したあと、B L A（*Bacillus licheniformis*のアミラーゼ）に対するアミラーゼ阻害活性を示す乳酸菌96株を事前選抜した。選抜方法は培養シャーレを用いてコロニーを採取するなど、定法を用いた。

【0019】

<至適条件の検討：至適アミラーゼ濃度の決定手法>

次に、本選抜をおこなう前に、至適胨臓アミラーゼ濃度を検討した。ここでは、ブタ由来の胨臓アミラーゼ（シグマアルドリッチ株式会社製：A 6 2 5 5 - 1 0 M G）を用いた。

【0020】

添加する希釈胨臓アミラーゼの濃度を以下の3種類とした。

- 1) 0.5 μ l / 50 μ l (100倍希釈)
- 2) 0.1 μ l / 50 μ l (500倍希釈)
- 3) 0.05 μ l / 50 μ l (1,000倍希釈)

マイクロプレートのウェルに50 μ lのMRS液体培地（関東化学株式会社製：7 1 1 3 5 9 - 5）、50 μ lの希釈胨臓アミラーゼ、50 μ lの1.5%可溶性でんぷん（ナカライテスク株式会社製：3 2 1 2 2 - 7 5）を入れて、37 で10分間、30分間、1時間、1.5時間、2時間、5時間、20時間反応させた。

反応後、1M HClを100 μ l入れて反応を停止させ、ヨウ素溶液（0.12% I₂ + 0.4% KI）50 μ lを加えて染色し、6倍希釈したものを波長595 nmの光を照射し吸光度を測定した。

【0021】

その結果、胨臓アミラーゼを100倍希釈したものの染色度（吸光度）は低く、1,000倍希釈したものの染色度は高かった。希釈の程度が小さい場合は、当然ながらデンプンの分解が速く進むことが吸光度の値からも分かったため、至適胨臓アミラーゼ濃度を1,000倍希釈と仮決めした。

【0022】

また、反応時間が1時間と1.5時間とでは、染色度に大きな差がみられなかったため、反応時間を1時間に仮決めした。

【0023】

<至適条件の検討：至適デンプン濃度と至適反応時間の決定手法>

次に、至適デンプン濃度を検討した。添加する希釈胨臓アミラーゼの濃度は、上記予備試験よりさらに希釈して0.005 μ l / 50 μ l (10,000倍希釈)としたものを用い、可溶性デンプンの濃度は1.5%、0.15%とした2種類を検討することとした。

具体的には、マイクロプレートのウェルに50 μ lのMRS液体培地、50 μ lの希釈胨臓アミラーゼ、50 μ lの可溶性デンプンを入れて、37 で1時間、1.5時間、2時間、6時間、20.5時間、24時間反応させた。

反応後、1M HClを100 μ l入れて反応を停止させ、ヨウ素溶液（0.12% I₂ + 0.4% KI）50 μ lを加えて染色し、6倍希釈したものを波長595 nmの光を照射して吸光度を測定した。

【0024】

結果は、反応時間1.5時間と2時間とで染色度に大きな差がみられなかったため、反応時間を2時間と仮決めした。デンプン濃度については、0.15%では全体的に染色度が低く、これは濃度が低すぎたと考えられたため、1.5%を至適デンプン濃度と仮決めした。

また、胨臓アミラーゼ濃度については、先の1000倍希釈の場合と10000倍希釈の場合とで染色度に大きな差がみられなかった。

【0025】

以上の二つの予備実験から、以降では、胨臓アミラーゼ濃度を10000倍希釈、反応

10

20

30

40

50

時間 2 時間、デンプン濃度を 1.5 % として、実験をおこなうこととした。

【 0 0 2 6 】

< アミラーゼ阻害活性を有する株の選抜 >

以上の予備実験から、これまで全く知見のなかったところである、乳酸菌におけるアミラーゼ阻害活性物質の産生能の可能性がみられたので、これを詳しく調べることにした。また、以上の予備実験では、ほ乳類（ブタ）由来の膵臓アミラーゼを用いているので、人体への好影響も期待できる。

【 0 0 2 7 】

選抜は次の方法によった。

マイクロプレートの各ウェルに 250 μ l の MRS 液体培地を入れ、事前選抜した 96 株の乳酸菌を接種して 18 時間培養したあと、その上清を新しいマイクロプレートのウェルにそれぞれ 50 μ l ずつ移した。

また、コントロール用に、同じマイクロプレートの別のウェルに、培養液に代えて pH 5.5 の MRS 液体培地のみを 50 μ l 入れたものを 2 つ作製した。

さらに、残ったマイクロプレートの各ウェルに、蒸留水を 150 μ l 入れ、培養液：蒸留水 = 1 : 1 となるように調製し、波長 595 nm の光をあて濁度を測定した（この値を I_D と表記することとする）。

【 0 0 2 8 】

次に、培養液上清を移した新しいウェルに、

・ 121、20 分間オートクレーブした 50 mM Tris - HCl buffer (pH 6.9) で混合した 1.5 % 可溶性デンプン溶液 50 μ l

・ 希釈膵臓アミラーゼ溶液 50 μ l

を添加した。

【 0 0 2 9 】

また、上述のコントロール用のウェルの一方には、

(A) 阻害率 0 % のポジティブコントロールとして、

・ 121、20 分間オートクレーブした 50 mM Tris - HCl buffer (pH 6.9) で混合した 1.5 % 可溶性デンプン溶液 50 μ l

・ 希釈膵臓アミラーゼ溶液 50 μ l

を入れ、他方には、

(B) 阻害率 100 % のネガティブコントロールとして、

・ 121、20 分間オートクレーブした 50 mM Tris - HCl buffer (pH 6.9) で混合した 1.5 % 可溶性デンプン溶液 50 μ l

・ 50 mM Tris - HCl buffer (pH 6.9) 50 μ l

を入れたものを作製した。

【 0 0 3 0 】

次に、このマイクロプレートを 37 で 2 時間インキュベーションし、その後、各ウェルに 1 M

HCl (蒸留水：濃塩酸 = 10 : 1) を 100 μ l 入れて攪拌し反応を停止させ、ヨウ素溶液 (0.12 % I_2 + 0.4 % KI) 50 μ l を加えて染色し、6 倍希釈したものを波長 595 nm の光を照射して吸光度を測定した（この値を I_{abs} と表記することとする）。

【 0 0 3 1 】

なお、染色度と濁度の算出式は、次の通りとした。

$$\text{染色度} = I_{abs} \times 6$$

$$\text{濁度} = I_D \times 6$$

また、阻害活性 % の算出は、阻害率 0 % のポジティブコントロールの染色度と、阻害率 100 % のネガティブコントロールの染色度との値から、染色度 vs 阻害活性の検量線を作成し（このとき得られた検量線の式は $y = 17.526x - 41.126$ (x : 阻害活性、y : 染色度) であった。)、この式を用いて、各ウェルの染色度から阻害活性 % を算

10

20

30

40

50

出した。

【 0 0 3 2 】

結果を、表 1 に示す。

【 表 1 】

株	染色度 (OD595)	濁度 (OD595)	阻害活性 (%)	阻害活性 /濁度	株	染色度 (OD595)	濁度 (OD595)	阻害活性 (%)	阻害活性 /濁度
KY4-9	3.600	0.924	21.97	23.77	KY5-66	2.133	1.176	-3.75	-3.19
KY4-19	4.371	1.608	35.48	22.07	KY5-68	2.241	1.150	-1.86	-1.61
KY4-42	3.288	0.975	16.50	16.92	KY5-67	2.307	1.196	-0.70	-0.58
KY4-43	4.554	1.599	38.69	24.20	KY5-70	2.832	1.361	8.50	6.25
KY4-52	4.395	1.410	35.90	25.46	KY5-71	2.463	1.097	2.04	1.86
KY4-71	4.491	1.272	37.59	29.55	KY5-72	1.950	1.211	-6.96	-5.74
KY4-79	4.419	1.371	36.33	26.50	KY5-74	2.193	1.390	-2.70	-1.94
KY4-82	4.752	1.113	42.16	37.88	KY5-77	2.058	1.228	-5.06	-4.12
KY4-83	4.575	1.446	39.06	27.01	KY5-79	2.685	1.222	5.93	4.85
KY4-95	2.217	0.552	-2.28	-4.12	KY5-82	2.085	1.031	-4.59	-4.45
KY4-110	4.503	1.359	37.80	27.81	KY5-83	2.013	1.011	-5.85	-5.79
KY4-113	2.511	0.705	2.88	4.08	KY5-85	1.917	1.139	-7.53	-6.62
KY4-117	3.372	1.017	17.97	17.67	KY5-86	1.710	1.018	-11.16	-10.97
KY4-120	4.143	1.362	31.49	23.12	KY5-87	1.809	1.327	-9.43	-7.10
KY4-121	4.410	1.362	36.17	26.55	KY5-88	2.052	1.534	-5.17	-3.37
KY4-127	4.446	1.194	36.80	30.82	KY5-91	1.998	1.319	-6.12	-4.64
KY4-135	4.416	1.578	36.27	22.99	KY5-92	3.240	1.040	15.66	15.06
KY4-143	4.482	1.425	37.43	26.27	KY5-94	3.198	1.031	14.92	14.47
KY4-155	4.512	1.248	37.96	30.41	KY5-96	2.940	1.026	10.40	10.13
KY4-159	4.710	1.221	41.43	33.93	KY5-98	2.442	0.964	1.67	1.73
KY4-160	2.700	0.648	6.19	9.55	KY5-122	2.583	1.051	4.14	3.94
KY4-162	4.824	1.308	43.42	33.20	KY5-143	2.442	1.096	1.67	1.52
KY5-4	6.093	0.783	65.67	83.87	KY5-146	2.358	0.403	0.20	0.49
KY5-18	3.195	0.759	14.87	19.59	KY5-149	3.336	1.061	17.34	16.34
KY5-19	3.957	1.296	28.23	21.78	KY5-163	2.304	1.341	-0.75	-0.56
KY5-20	3.429	1.419	18.97	13.37	KY5-179	2.160	1.236	-3.28	-2.65
KY5-22	3.921	1.650	27.60	16.72	YA68-103	1.467	0.342	-15.42	-45.10
KY5-23	5.163	1.698	49.37	29.07	YA69-32	1.981	1.556	-6.41	-4.12
KY5-29	3.534	1.308	20.81	15.91	YA69-54	1.653	0.613	-12.16	-19.84
KY5-33	3.468	1.320	19.65	14.89	YA69-63	1.941	1.565	-7.11	-4.55
KY5-34	3.516	0.735	20.50	27.89	YA69-64	2.040	1.580	-5.38	-3.40
KY5-35	2.955	0.735	10.66	14.50	YA69-65	2.040	1.568	-5.38	-3.43
KY5-36	3.393	0.852	18.34	21.52	YA69-66	2.391	1.570	0.77	0.49
KY5-38	2.859	0.675	8.98	13.30	YA69-67	2.145	1.267	-3.54	-2.79
KY5-39	3.519	0.630	20.55	32.62	YA69-68	2.118	1.491	-4.01	-2.69
KY5-42	3.213	0.783	15.18	19.39	YA69-70	2.034	1.529	-5.48	-3.59
KY5-44	3.402	1.422	18.50	13.01	YA69-71	1.545	0.954	-14.06	-14.73
KY5-46	3.066	0.534	12.61	23.61	YA69-72	1.587	1.214	-13.32	-10.97
KY5-47	2.958	0.654	10.71	16.38	YA69-73	1.455	0.974	-15.63	-16.05
KY5-49	3.354	0.519	17.66	34.02	YA69-74	1.692	1.253	-11.48	-9.16
KY5-52	2.865	1.092	9.08	8.32	YA69-75	1.995	1.153	-6.17	-5.35
KY5-53	2.925	1.209	10.14	8.38	YA69-166	2.094	1.016	-4.43	-4.36
KY5-54	2.808	1.284	8.08	6.30	YA69-174	1.827	0.511	-9.11	-17.83
KY5-55	3.033	1.221	12.03	9.85	YA70-18	2.850	2.085	8.82	4.23
KY5-56	3.003	0.840	11.50	13.69	YA70-87	1.851	0.981	-8.69	-8.86
KY5-60	2.847	1.080	8.77	8.12	YA71-84	1.623	0.769	-12.69	-16.50
KY5-63	2.976	0.978	11.03	11.28	YA71-122	1.779	1.097	-9.95	-9.07
KY5-65	3.246	0.795	15.76	19.83	YA71-167	2.181	1.095	-2.91	3.56

10

20

30

40

【 0 0 3 3 】

表から明らかなように、96株の中で、KY4-82、KY4-159、KY4-162、KY5-4、KY5-23の5株に高いアミラーゼ阻害活性がみられた。

【 0 0 3 4 】

また、代表的な動物性乳酸菌株 (*L. lactis* NBRC100933^T) と、代表的な植物生乳酸菌株 (*L. plantarum* NBRC15891^T) について、上記と同様の実験をおこなった結果をそれぞれ表2および表3に示す。

【 0 0 3 5 】

50

【表 2】

	濁度 (OD595)	染色度 (OD595)
1 回目	1.182	2.658
2 回目	0.840	2.502
3 回目	1.044	2.580
4 回目	1.098	3.270
5 回目	1.242	2.742
6 回目	0.804	2.424
7 回目	1.218	2.862
8 回目	0.906	2.586
平均値	1.042	2.703
阻害活性 (%)	6.2	
阻害活性 / 濁度	5.9	

10

【表 3】

	濁度 (OD595)	染色度 (OD595)
1 回目	0.438	2.250
2 回目	0.630	2.058
3 回目	0.498	2.094
4 回目	0.864	2.268
5 回目	0.588	2.178
6 回目	0.636	2.094
7 回目	0.726	2.076
8 回目	0.570	2.154
平均値	0.619	2.147
阻害活性	-3.5	
阻害活性 / 濁度	-5.6	

20

30

【0036】

40

以上の結果から、カブに付着している乳酸菌の中には、驚くべきことに、代表的な乳酸菌にはほとんどみられない、動物由来のアミラーゼに対して阻害活性を有する物質を産生するものがあることが確認できた。

【0037】

<プロバイオティクスの検討：胆汁酸耐性>

乳酸菌は腸内定着が期待できるため、経口摂取が可能か検討することにした。すなわち、胆汁酸耐性や胃酸耐性の有無を検討した。測定においては、アミラーゼ阻害活性物質の産生能が比較的高い5株（KY4-82、159、162、KY5-4、23）を含めて96株を検討した。

【0038】

50

胆汁酸耐性においては、マイクロプレートの各ウェルに、 $250\ \mu\text{l}$ のMRS液体培地を入れてそれぞれ乳酸菌を接種し18時間培養した。この培養液 $50\ \mu\text{l}$ を別のマイクロプレートに移し、蒸留水を $250\ \mu\text{l}$ 入れ、培養液：蒸留水 = 1：5となるようにし、波長 $595\ \text{nm}$ で濁度を測定した。

また、培養液を $\text{OD}_{595} = 0.01$ となるように、MRS液体培地（ $\text{pH}6.5$ ）と0.3%オックスゲル添加MRS液体培地にそれぞれ接種し、 30°C で24時間培養し、波長 $595\ \text{nm}$ の光を照射し吸光度を測定した。培養液の濁度（吸光度）比により増殖性（耐性）がわかる。

【0039】

結果を表4に示す。

なお、胆汁酸の耐性率 = $(0.3\% \text{オックスゲル添加MRS培地のOD}) / (\text{MRS液体培地}(\text{pH}6.5)\text{のOD}) \times 100$ として表した。

【表 4】

順位		耐性率(%)	順位		耐性率(%)
1	YA70-18	62.7	49	KY5-82	26.7
2	KY5-88	41.1	50	KY5-18	26.1
3	KY5-91	40.8	51	YA70-87	19.7
4	KY4-42	40.3	52	KY5-4	19.6
5	KY5-34	38.8	53	KY5-44	11.8
6	KY5-149	37.9	54	KY5-22	10.6
7	KY4-9	37.9	55	KY4-117	8.6
8	KY5-92	37.8	56	YA69-63	8.4
9	KY5-85	37.6	57	YA69-70	7.4
10	KY5-47	37.5	58	YA69-68	6.6
11	KY5-98	37.5	59	YA69-32	6.5
12	KY5-96	37.4	60	YA69-174	6.1
13	KY5-122	37.0	61	KY4-83	5.8
14	KY5-163	36.7	62	YA71-122	5.0
15	KY5-83	36.5	63	YA69-71	4.5
16	KY5-60	36.5	64	YA69-64	3.2
17	KY5-77	36.4	65	YA69-166	3.1
18	KY5-33	36.3	66	YA69-73	3.1
19	KY5-42	36.1	67	YA69-72	2.7
20	KY5-53	35.7	68	YA69-75	2.5
21	KY5-49	35.5	69	YA69-66	2.3
22	KY5-56	35.5	70	KY4-113	1.9
23	KY5-86	35.4	71	YA69-65	1.8
24	KY5-46	35.1	72	KY4-143	1.2
25	KY5-38	34.8	73	YA69-54	1.0
26	KY5-87	34.8	74	KY4-43	0.2
27	KY5-179	34.0	75	YA71-167	0.2
28	KY5-72	33.7	76	KY4-162	0.1
29	KY5-70	33.1	77	KY5-146	0.0
30	KY5-65	33.0	78	KY4-159	0.0
31	KY5-52	33.0	79	KY4-160	0.0
32	KY5-36	32.9	80	KY4-95	0.0
33	KY5-23	32.0	81	KY4-71	-0.3
34	KY5-39	31.8	82	KY5-71	-0.4
35	KY5-55	31.8	83	YA69-67	-0.9
36	KY5-35	31.0	84	KY4-52	-1.0
37	KY5-54	30.9	85	KY4-121	-1.1
38	KY5-63	30.5	86	YA71-84	-1.2
39	KY5-19	30.1	87	KY4-120	-1.7
40	KY5-68	29.7	88	KY4-135	-2.1
41	KY5-74	29.7	89	YA69-74	-2.2
42	KY5-79	28.9	90	KY4-155	-2.3
43	KY5-66	28.7	91	YA68-103	-2.8
44	KY5-29	28.1	92	KY4-19	-2.8
45	KY5-20	27.9	93	KY4-110	-3.0
46	KY5-67	27.9	94	KY4-82	-3.1
47	KY5-143	27.6	95	KY4-79	-3.1
48	KY5-94	27.2	96	KY4-127	-3.1

【 0 0 4 0 】

表から明らかなように、KY5シリーズの株は比較的胆汁酸耐性が高く、KY4シリーズの株は比較的胆汁酸耐性が低い乳酸菌であることが分かった。また、アミラーゼ阻害活

10

20

30

40

50

性の測定結果と胆汁酸耐性の測定結果には、相関性がみられなかった。このことから、アミラーゼ阻害活性物質の産生能が高い株であっても直ちにプロバイオティクスに適しているとはいえないことが確認できた。

【0041】

<プロバイオティクスの検討：胃酸耐性>

胃酸耐性については、アミラーゼ阻害活性物質産生能が比較的高い乳酸菌5株（KY4-82、159、162、KY5-4、23）の耐性率を測定することとした。マイクロプレートの各ウェルに250 μ lのMRS液体培地を入れて乳酸菌を接種し18時間培養した。培養液50 μ lを別のマイクロプレートに移し、蒸留水を250 μ l入れ培養液：蒸留水=1：5となるようにし、波長595nmの光を照射し濁度を測定した。

また、培養液をOD₅₉₅=0.01となるように、MRS液体培地（pH6.5）とMRS液体培地（pH3.0）にそれぞれ接種し、30℃で4時間インキュベーションした。培養液を滅菌水で10,000倍希釈し、MRS寒天培地にプレーティングし、30℃で18時間インキュベーションすることで、乳酸菌コロニーを形成させ、コロニー数から胃酸耐性率を算出した。

【0042】

結果を表5に示す。

胃酸の耐性率 = (MRS液体培地（pH3.0）のコロニー数) / (MRS液体培地（pH6.5）のコロニー数) × 100として表した。

【表5】

	pH3.0 (cells/ml)	pH6.5 (cells/ml)	耐性率 (%)
KY4-82	2.40×10⁶	3.21×10⁸	0.75
KY4-159	3.05×10⁶	1.88×10⁸	1.62
KY4-162	6.40×10⁶	3.57×10⁸	1.79
KY5-4	5.50×10⁵	4.94×10⁸	1.11
KY5-23	3.15×10⁶	3.79×10⁸	0.83

【0043】

表から5株総てが胃酸耐性を備えていることが分かった（耐性率は～数%であるが、これは、ヨーグルト等に用いられる乳酸菌と同レベルであって腸内に失活せずに到達する耐性率である。一般的に胃酸の方が胆汁酸より酸性度が高いが、KY4系は、胃酸耐性であっても意外にも胆汁酸耐性がほとんどみられない。しかしながらKY5-4とKY5-23については、胆汁酸耐性も胃酸耐性も有しており、この点で良好な耐酸性バランスを有しているといえる。

【0044】

以上から、アミラーゼ阻害活性、胆汁酸耐性、胃酸耐性を考慮し、KY5-4、KY5-23株が有用株の候補と考えられ、この株を中心として適宜他の3株も含めてさらに検討をすることとした。

【0045】

<乳酸菌の同定>

これまで、カブ漬け由来であり乳酸菌特有の香りがすることから乳酸菌と想定して各種の検討をおこなったが、候補が絞り込まれたことから、乳酸菌の同定作業をおこなった。

【0046】

まず、選抜した5株につき、走査型電子顕微鏡（SEM）による形態観察をおこなった。図1にSEM写真を示す。図示したように、5株総てが乳酸菌の特徴である桿菌である

ことが確認できた。

【0047】

次に、16S rRNA遺伝子解析をおこなって、分子遺伝学的同定をおこなうこととした。PCRにより遺伝子増幅後、アガロース電気泳動により16S rDNA断片の増幅を確認した。増幅DNA断片を鋳型として16S rDNAのシーケンシングを行ったところ、KY4-82は223bp（配列番号1）、KY4-159は224bp（配列番号2）、KY4-162は224bp（配列番号3）、KY5-4は225bp（配列番号4）、KY5-23は224bp（配列番号5）の配列を解読することに成功した。各遺伝子断片の相同性解析を行った結果、KY4-82、159、162は*Leuconostoc citreum*、*Leuconostoc carnosum*、または*Leuconostoc kimchii*と99%、KY5-4、23は*Weissella cibaria*、*Weissella confusa*、または*Weissella kimchii*と99%相同性を示した。これからも、選抜された菌は乳酸菌であることが確認できた。

10

【0048】

<アミラーゼ阻害活性物質の生産時期・培養条件の検討>

次に、KY5-4、KY5-23に対し、アミラーゼ阻害活性物質の産生時期の解析、生産性向上のための培養条件検討をした。

エッペンに1mlのMRS液体培地を入れて上記乳酸菌を接種し、18時間、30℃で培養した培養液を、100μl分取して蒸留水を900μl入れ、培養液：蒸留水=1：9となるようにし、波長595nmで濁度を測定した。別のファルコンチューブにMRS液体培地20ml入れて、OD₅₉₅=0.01となるように培養液から分取し、30℃と37℃で培養した。

20

培養開始から、2時間、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、14時間、16時間、18時間、34時間後に培養液を1ml分取して10倍希釈し、波長595nmで濁度を測定した。また、別のエッペンに培養液を1ml分取し、15,000rpm、3分間で集菌し、培養液上清を新しいエッペンに入れ、アミラーゼ阻害活性を測定した。

【0049】

KY5-4とKY5-23の濁度と阻害活性の結果を、それぞれ図2、図3に示す。なお、濁度は、吸光度計による培養液の吸光度であって、実験では適宜、培養液を2つに分け、1つはヨウ素反応による阻害率を、もう1つはそのまま吸光度を調べて濁度を求める用にしている。図から明らかなように、KY5-4については、培養18時間後にアミラーゼ阻害活性物質を多く生産するようになることが確認できた。また、培養34時間程度経過すると、アミラーゼ阻害活性が急増している。一方で、KY5-23は培養してから34時間経ってアミラーゼ阻害活性物質が多く生産されていることが確認できた。KY5-4とKY5-23で比較すると、KY5-4の方がアミラーゼ阻害活性物質を生産しており、KY5-4、23ともに、30℃の方がアミラーゼ阻害活性物質を多く生産していることが分かった。

30

【0050】

<アミラーゼ阻害活性物質の熱的安定性>

プロバイオティクスの観点を含めて以上を総合的に判断すると、KY5-4株がもっとも好適な株であるといえる。したがって、次に、KY5-4の産生するアミラーゼ阻害活性物質の熱的安定性を調べることにした。KY5-4株をMRS液体培地にて30℃、14時間培養し、この培養液を15,000rpm、3分間で集菌し、培養液上清をエッペンに500μl分取し、105℃×5分間、121℃×20分間、それぞれの条件でオートクレーブ後、マイクロプレートでアミラーゼ阻害活性を測定した。オートクレーブしていない培養液上清のアミラーゼ阻害活性値を100%として、残存阻害活性を求めた。

40

【0051】

測定結果を表6に示す。

【表 6】

	残存阻害活性 (%)
105°C	70.9
121°C	73.5

10

【0052】

表から明らかなように、高温に曝された場合であっても、アミラーゼ阻害活性の大幅な低下はみられず、KY5-4が生産するアミラーゼ阻害活性物質は、熱で変性しにくい特性を有する、すなわち、耐熱性があることが確認できた。したがって、食品に添加しても加熱調理が可能であるといえる。

【0053】

<アミラーゼ阻害活性物質の保存試験>

次に、アミラーゼ阻害活性物質の保存性を検討した。まずKY5-4株をMRS液体培地に30、18時間培養した。培養液を15,000rpm、3分間で集菌し、培養液上清をエッペンに500μlずつ分注し、37、20、4、-20、-80で保存した。1週間後と6週間後にそれぞれ50μlずつサンプリングして、アミラーゼ阻害活性(培養液上清のアミラーゼ阻害活性値を100%とした残存阻害活性)を求めた。

20

【0054】

測定結果を表7に示す。

【表 7】

	残存阻害活性 (%)	
	1週間	6週間
37°C	39.9	31.4
20°C	34.0	24.5
4°C	40.9	22.6
-20°C	34.7	33.9
-80°C	39.5	37.1

30

阻害活性は、いずれも1週間で大幅に下がったが、1週間と6週間ではわずかに減少しただけであった。アミラーゼ阻害活性物質は、初めの1週間で大きく低下するものの、低下した以降はむしろ安定的に活性が残存しているといえる。

40

【0055】

<プロバイオティクスの検討>

KY5-4株はもともとカブ漬けから採取した乳酸菌であるが、実際にこの株を用いてカブを漬け、乳酸菌数とアミラーゼ阻害活性の有無を調べた。

50

KY5-4株をMRS培地にて培養し、培養液を遠心分離して集菌した。カブは津田カブを用い、水洗い後、カブ重量の1.5%の塩、20%の水を加えた。これに、 10^7 CFU/ml程度となるように集菌したKY5-4カブを接種した。

25で4日間発酵させ、pH、生菌数、アミラーゼ阻害活性を測定した。

【0056】

結果を図4に示す。カブにはもともと乳酸菌が付着しているため、発酵前にもわずかながら阻害活性が認められるが、発酵後には顕著なアミラーゼ阻害活性が確認できる。したがって、KY5-4株は、実際に発酵食品への応用が可能であることが確認できた。

【0057】

以上説明したように、カブから選抜される乳酸菌の中には、高いアミラーゼ阻害活性物質産生能を有するものがあることが確認でき、その物質は熱的安定性、保存安定性も有し、また、乳酸菌自体も、胃酸耐性および胆汁酸耐性を備えることが分かった。したがって、この乳酸菌は腸内定着も期待でき、定着後は、アミラーゼ阻害活性物質を産生し続けるため、飲食により糖尿病予防が期待できる。また、アミラーゼ阻害活性物質自体を単離して食品添加、調理の用途開発の可能性も期待できる。

【0058】

なお、以上はカブに付着していた乳酸菌を選抜した結果であったが、乳酸菌は、広く野菜表面等に付着しているものであるため、カブのみならず根菜類その他の野菜に同種の乳酸菌が付着していることは大いに予見できるところである。したがって、マイクロプレートを用いたハイスループットスクリーニングにより、適宜選抜・入手可能であるといえる。

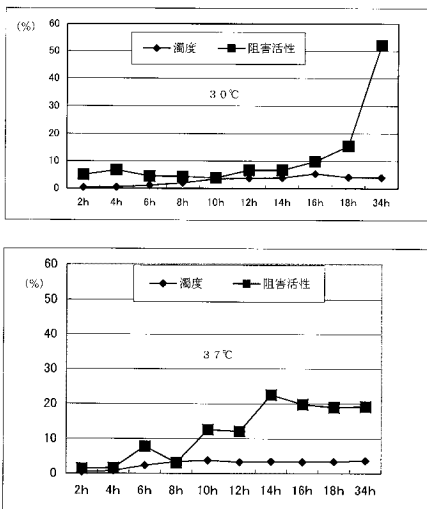
【産業上の利用可能性】

【0059】

本発明によれば、プロバイオティクスへの応用が可能であって、経口により腸内に達し糖尿病予防を期待できる。

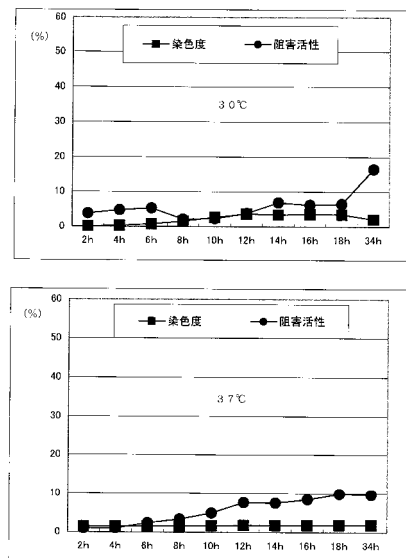
【図2】

KY5-4	染色度(OD595)		濁度(OD595)		阻害活性(%)		阻害活性/濁度	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
2h	2.361	2.145	0.350	0.430	5.0	1.4	14.2	3.3
4h	2.469	2.157	0.460	0.770	6.8	1.6	14.7	2.1
6h	2.328	2.532	1.100	2.340	4.4	7.8	4.0	3.3
8h	2.322	2.247	2.020	3.430	4.3	3.1	2.1	0.9
10h	2.292	2.829	3.440	3.800	3.8	12.7	1.1	3.3
12h	2.466	2.799	3.720	3.260	6.7	12.2	1.8	3.7
14h	2.466	3.432	3.890	3.480	6.7	22.5	1.7	6.5
16h	2.658	3.267	5.340	3.380	9.9	19.8	1.8	5.9
18h	3.000	3.216	4.070	3.430	15.5	19.0	3.8	5.5
34h	5.232	3.231	3.920	3.670	52.1	19.2	13.3	5.2



【図3】

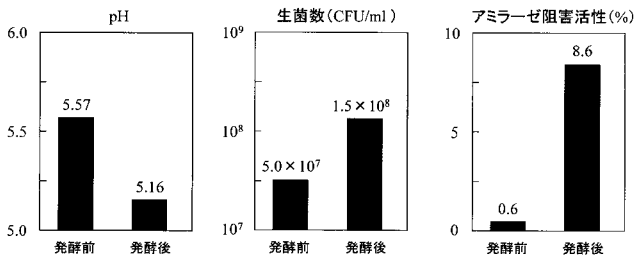
KY5-23	染色度(OD595)		濁度(OD595)		阻害活性(%)		阻害活性/濁度	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
2h	1.617	1.491	0.041	0.391	3.8	1.0	92.3	2.5
4h	1.662	1.494	0.253	0.920	4.8	1.1	18.9	1.1
6h	1.686	1.554	0.743	2.350	5.3	2.4	7.1	1.0
8h	1.542	1.599	1.573	3.090	2.1	3.4	1.3	1.1
10h	1.551	1.671	2.683	3.160	2.3	5.0	0.9	1.6
12h	1.620	1.794	3.663	3.440	3.8	7.7	1.1	2.2
14h	1.758	1.788	3.423	3.700	6.9	7.6	2.0	2.0
16h	1.728	1.830	3.613	3.640	6.2	8.5	1.7	2.3
18h	1.740	1.893	3.543	3.720	6.5	9.9	1.8	2.7
34h	2.193	1.884	2.163	1.490	16.5	9.7	7.6	6.5



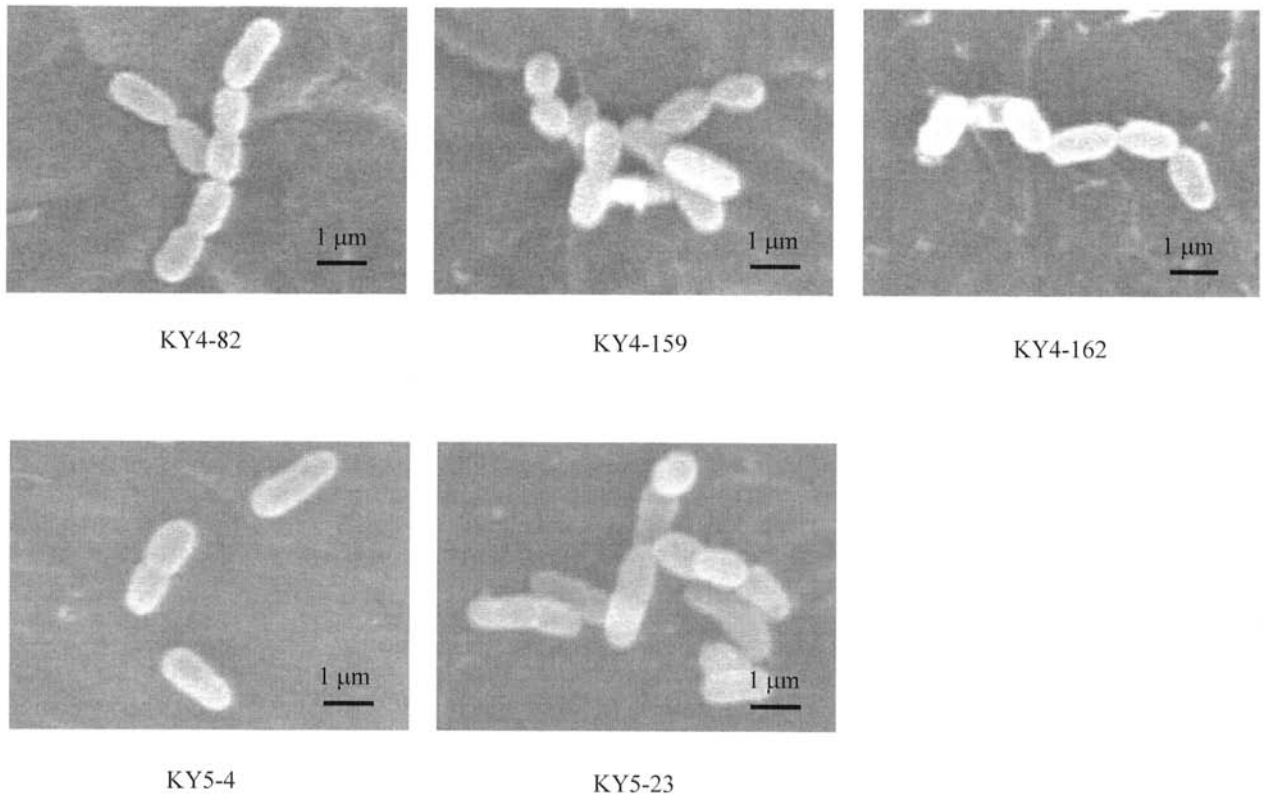
10

20

【 図 4 】



【 図 1 】



【 配列表 】

[2011193820000001.app](#)

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B065 AA01X AC05 AC14 AC20 BA23 BB02 BB18 BB21 CA42