米及び米加工品より分離した植物性 乳酸菌の抗変異原性

熊谷武久*・瀬野公子*・渡辺紀之*・岡田早苗**

Antimutagenicity of Plant Origin Lactic Acid Bacteria Isolated from Rice and Processed Rice Products

Takehisa KUMAGAI*, Kimiko SENO*,
Toshiyuki WATANABE* and Sanae OKADA**

*Kameda Seika Co. LTD., 1-3-5 Motomachi, Kameda-
machi, Nakakanbara-gun, Niigata 950-0192

**NRIC Culture Collection Center, Tokyo University of
Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku,
Tokyo 156-8502

Eighty strains of lactic acid bacteria were isolated from rice and processed rice products to examine antimutagenic effect. Antimutagenic activity on living and killed cells of lactic acid bacteria and the fermented milk against 4-nitroquinoline-oxide (4-NQO) were determined according to the Ames test using *Escherichia coli* WP2uvrA. Ten strains having high activity of antimutagen were selected and were identified as *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*. Living cells of 10 strains selected showed higher antimutagenic activity than killed cells of them. Milk added glucose and rice flour that digested with α -amylase was used to as materials of fermented milk products. The fermented milk products indicated high activity of antimutagen, but the activity was lowered by heating (Received Jan. 11, 2000 ; Accepted Apr. 10, 2000)

乳酸菌は自然界で幅広く棲息し、その種、株によって適した環境を選択している。また、その棲息場所によって大きく以下の3つに分類される¹⁾。第一にヨーグルトやチーズ等の酪農加工品に使用される動物性乳酸菌、第二にヒトや動物の腸内に棲息する腸内乳酸菌、第三に植物やその加工品に棲息する植物性乳酸菌である。

植物性乳酸菌を利用した食品は、味噌、醤油、日本酒、ワイン、漬け物、お茶、パン等と数多い。穀物、豆類、果実、野菜等の原料の多様さや加工法の違いを考慮すると、植物性乳酸菌の生息場所は、動物性乳酸菌よりかなり広いと考えられる。

Lactobacillus plantarum, *L. casei*, *L. brevis*, *L. sake*, *L. sanfrancisco*, *Pediococcus halophilus* 等の乳酸菌が植物性加工品より分離されているが、分類学上は同じ種であっても、生息場所の広さより、栄養、生理、生態が多岐にわたっていると予想される²⁾。

乳酸菌の機能性については発酵乳やその乳酸菌に代表されるように多くの研究がされている。抗変異原性についても、発酵乳^{3,4)}、ミルクペプチド⁵⁾、乳酸菌菌体⁶⁾、細胞壁⁷⁾等に有することが報告されている。しかしながら、植物性乳酸菌の機能性についての研究例は少ないのが現状である。

動物性乳酸菌を利用した食品は発酵乳、チーズ等に代表されるように、発酵の主役が乳酸菌であり、スターターを製造し、同一菌株で発酵する。一方、植物性乳酸菌を利用した食品の場合は、味噌、醤油や酒のように、発酵の主役が麴や酵母であることや、漬け物のように乳酸菌が発酵の主役でも、スターターを製造せず食品に付着している乳酸菌を利用するといった製造方法の違いが挙げられ、このような背景より植物性乳酸菌の機能性の研究が遅れていると推察する。

本報告では日本人の主食である米及び米加工品に棲息する乳酸菌を分離し、4-ニトロキノリン1-オキシドに対する抗変異原性を調べ植物性乳酸菌の有効性を検討した。

1. 実験方法

(1) 供試乳酸菌

供試乳酸菌は *Lactobacillus* 属 60 株 (*L. casei* 7 株, *L. plantarum* 7 株, *L. fermentum* 1 株, *L. sake* 1 株, *Lactobacillus* spp. 44 株), *Streptococcus* 属 18 株, *Leuconostoc mesenteroides* 1 株, *Pediococcus acidilactici* 1 株, の計 80 株であった。これらの菌株は米及び米加工品である粳米と糯米の玄米、白米、米糠及び米麴、糠床、酒粕より当研究室で分離し、乳酸菌実験マニュアル⁸⁾によって同定した。

対照として、(財)日本乳業技術協会より購入した、*L. casei* subsp. *casei* L-14 を用いた。

(2) 乳酸菌の培養及び試料の調製

* 亀田製菓株式会社研究室 (〒950-0192 新潟県中蒲原郡亀田町元町 1-3-5)

** 東京農業大学菌株保存室 (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)

洗浄菌体は、次のように調製した。乳酸菌の培養は、*Lactobacilli* MRS 培地 (Difco) を用い、37℃、24 時間培養した後、4℃ 冷却下で生理食塩水を用い遠心洗浄 (3000rpm, 10 分) を 4 回繰り返した。

発酵物は、牛乳 (市販の全乳)、1% グルコース添加牛乳、及び米粉グルコース添加牛乳 (グルコース 10g と米粉 100g を牛乳 1l に懸濁し、100℃ に加熱した後、 α -アミラーゼ (天野製薬製) 10mg を添加し、70℃、10 分間液化した) を沸騰湯浴中で 5 分加熱殺菌した後、供試乳酸菌を接種し、37℃ で培養した。

(3) 抗変異原性試験

抗変異原性試験に用いた試料は、次の通りである。① 洗浄菌体、② pH 4.2 になるまで培養した乳酸菌発酵物をストマフィルター (オルガノ社製) で濾過した液、③ ① と ② を沸騰湯浴中で 5 分加熱した熱失活物。対照として乳酸 (和光純薬製) で pH 4.2 に調整した疑似発酵乳を、同様な濾過処理をしたものを用いた。

抗変異原性試験はエームステストに準じ、ブレインキュベーション法⁹⁾にて行った。指標菌は *Escherichia coli* WP2uvrA (IFO 14196) を、変異原物質は 4-ニトロキノリン 1-オキシド (4-NQO) を用いた。1/15 M リン酸緩衝液 0.5 ml (pH 7.0) に、4-NQO ジメチルスルホキシド溶液 0.05 ml と試料溶液 0.05 ml を添加し、攪拌後、37℃ で 1 時間、振とう下で接触させた。この反応液に、指標菌液 0.1 ml を添加し、37℃ で 20 分間接触後、軟寒天液 2 ml を加え攪拌後、SEM 平板培地に均一に重層し、37℃ で培養した。3 日後の復帰変異コロニー数を計算し、さらに 5 日後にコロニー数の増加がないことの確認を行った。試料の代わりに、生理食塩水を用いたものを陽性対照とし、変異原物質を添加しないジメチルスルホキシド溶液を用いたものを陰性対照とした。

抗変異原性率は、以下の式によって求めた。
(陽性対照コロニー数 - 4-NQO と試料を添加した時の復帰変異コロニー数) / (陽性対照コロニー数 - 陰性対照コロニー数) × 100

2. 実験結果及び考察

(1) 洗浄菌体の抗変異原性

反応液中の 4-NQO 濃度が 0.43 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の時の陽性対照コロニー数は 2892 個 $\pm$ 476/plate (平均値 $\pm$ 標準偏差) であり、0.71 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の時は 4162 個 $\pm$ 330/plate (平均値 $\pm$ 標準偏差) であった。また、これら洗浄菌体には指標菌に対して抗菌作用がないことを確認した。

分離した植物性乳酸菌 80 株については、洗浄菌体を用い、反応液の 4-NQO 濃度 0.43 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で抗変異原性率を

測定し選抜した。そのうち、高い抗変異原性率を示した 10 株を選出し、4-NQO 濃度を 0.71 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで上げて抗変異原性率を測定した。これら乳酸菌の種名と抗変異原性率を表 1 に示した。これら 10 株は、すべてが *Lactobacillus* 属であり、*L. casei* subsp. *casei* が 6 株、*L. plantarum* が 3 株、*L. fermentum* が 1 株であった。

乳酸菌細胞数が 10⁹ cfu/ml で、反応液の 4-NQO 濃度が 0.43 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合、9 菌株が 90% 以上の抗変異原性率を示した。0.71 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に濃度を上げると、抗変異原性率は全体的に低下する傾向が見られたが、90% 以上の抗変異原性率を示した株は 7 株存在した。

乳酸菌細胞数を 10⁸ cfu/ml まで下げても抗変異原性は維持され、同じ種間の差がより明確になった。特に *L. casei* subsp. *casei* とされた 327 株は、90% 以上の活性を維持しており、抗変異原性が高い菌種であることを示している。

(2) 加熱洗浄菌体の抗変異原性

先の実験で選抜した 10 株の抗変異原性が加熱によっても維持されるかを調べるために、加熱洗浄菌体を調製し、抗変異原性を測定した。乳酸菌細胞数は 10⁹ cfu/ml を用い、乳酸菌が加熱処理で死滅していることを確認した。

4-NQO 濃度が 0.43 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の時の抗変異原性率を表 2 に示した。9 株で抗変異原性が認められたが、加熱処理を行うことで、すべての株において活性が低下し、3 株が 30% 程度の抗変異原性率を示した。さらに、4-NQO 濃度を 0.71 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に上げるとすべての菌株に活性が全く見られなかった。

細野ら^{7,10)}は *Enterococcus faecalis* の洗浄菌体及び細胞壁画分に 4-NQO に対する抗変異原性を確認している。Lankaputhra & Shah⁶⁾ は *L. acidophilus* 6 株の抗変異原性を 4-NQO を含む 8 種類の変異原物質を用いて測定して、生菌体の方が死菌体より抗変異原性が高いこと、また変異原物質と乳酸菌と接触させたものの遠心沈澱部を DMSO で抽出したところ、変異原物質の回収率が死菌体では高いが、生菌体で極端に低下することを報告し、生菌体と死菌体の抗変異作用の違いの可能性を示唆している。著者らが用いた乳酸菌株は、加熱によって活性がほとんど失われるため、生菌体における効果が高く、死菌体及び細胞壁に抗変異原性活性物質が存在する可能性は低いと考えられた。

(3) 米粉グルコース添加牛乳発酵物の抗変異原性

牛乳及びグルコースを添加した牛乳では十分な発酵をした株はほとんど見られなかったため、供試乳酸菌株の

表 1 洗浄菌体の乳酸細胞数及び 4-NQO 濃度の違いによる抗変異原性

菌種 菌株 No.	乳酸菌細胞数 10^9 オーダー			乳酸菌細胞数 10^8 オーダー	
	乳酸菌細胞数	抗変異原性率/%		乳酸菌細胞数	抗変異原性率/%
	$\times 10^9$ cfu/ml	0.43 μ g	0.71 μ g	$\times 10^8$ cfu/ml	0.43 μ g
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>					
327	1.0	100	99	1.8	95
379	2.2	83	42	5.5	27
409	2.8	100	95	7.0	40
508	1.6	100	98	4.0	31
511	3.4	100	90	1.0	48
924	2.8	90	59	8.7	61
<i>L. plantarum</i>					
79	4.7	97	77	9.0	22
139	1.5	100	97	3.8	25
204	2.5	99	94	6.0	34
<i>L. fermentum</i>					
1016	2.5	100	100	6.0	46
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>					
L-14	1.2	100	92	1.2	14

表 2 加熱洗浄菌体の 4-NQO に対する抗変異原性

菌種 菌株 No.	抗変異原性率/%
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>	
327	23
379	0
409	32
508	31
511	33
924	18
<i>L. plantarum</i>	
79	17
139	15
204	16
<i>L. fermentum</i>	
1016	22

乳酸菌は表 1 の乳酸菌細胞数 10^9 オーダーを使用
4-NQO 濃度 0.43 μ g/ml

分離源が米及び米加工品であったことより、米粉グルコース添加牛乳を原料としたものを用い抗変異原性を測定した。その菌数と抗変異原性率を表 3 に示した。発酵物中の菌数は *L. casei* ssp. *casei* 511 を除く 9 株が 10^9 cfu/ml を上回っていた。なお、*L. plantarum* 139 及び

L. plantarum 204 を用いた試験区は、自然復帰コロニーが多く出現したため、測定が不可能であったので除外した。また、熱処理発酵物の乳酸菌は加熱により死滅していることを確認した。

発酵物の抗変異原性率は、すべての発酵物で 90% 以上の高い値を示した。この発酵物を加熱したときの抗変異原性率は、40% 程度であった。

生菌体及びそれらの発酵物の抗変異原性率 (表 1, 3) は、高い値を示すのに対し、これらの熱処理物 (表 2, 3) は、著しい低下を示したことより、タンパク質あるいはそれらによる酵素的な効果が高いと推察された。

対照である牛乳、米粉グルコース添加牛乳を乳酸で pH を 4.2 に調整した疑似発酵乳の抗変異原性率は 25% 程度であった。Matar *et al.*⁵⁾ は *L. helveticus* の発酵乳をアセトン抽出を行い、その抽出画分に 4-NQO に対する乳タンパク質由来の抗変異原性乳ペプチドの存在を確認している。著者らが用いた、対照物である疑似発酵乳や疑似米粉グルコース添加発酵牛乳の抗変異原性率がほぼ同じであることや、加熱発酵物の抗変異原性率が、対照物の値より高いことより、乳酸菌による牛乳分解物等の発酵生成物もしくは乳酸菌の代謝物質による効果が示唆された。

今回、分離した乳酸菌及びその発酵物の抗変異原性と

表 3 発酵物の 4-NQO に対する抗変異原性

菌種	菌株 No.	乳酸菌細胞数	抗変異原性率 / %	
		×10 ⁹ cfu/ml	発 酵 物	加熱発酵物
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>				
	327	2.1	100	40
	379	3.8	100	38
	409	5.1	97	31
	508	4.3	100	40
	511	0.6	100	41
	924	6.0	92	36
<i>L. plantarum</i>				
	79	1.6	99	38
<i>L. fermentum</i>				
	1016	7.0	96	38
対照 1 ^{a)}		—	—	25
対照 2 ^{b)}		—	—	24

a) ; 牛乳を乳酸で pH 4.2 に調整後濾過

b) ; グルコース米粉添加牛乳を乳酸で pH 4.2 に調整後濾過

して、生菌体における効果が最も高く、次に発酵による生成物であり、加熱死菌体における効果は最も少ない結果であった。以上のことより、植物性乳酸菌にも動物性乳酸菌と同様に抗変異原性が認められ、その有効性が示唆された。

3. 要 約

米及び米加工品から乳酸菌を分離、同定し、4-NQO に対する抗変異原性を検討した。

(1) 米及び米加工品より分離した植物性乳酸菌 80 株の内訳は、*Lactobacillus* 属 60 株、*Streptococcus* 属 18 株、*Leuconostoc* 属 1 株、*Pediococcus* 属 1 株であった。

(2) 分離菌の洗浄菌体を調製し 4-NQO に対する抗変異原性率を測定し、活性の高い 10 株を選択した、それらはすべて *Lactobacillus* 属であった。

(3) 選択した 10 株の加熱洗浄菌体の抗変異原性はすべての株で著しく低下、もしくは活性が消失した。

(4) 分離した乳酸菌の牛乳に対する発酵性は低く、グルコースと液化米粉を牛乳に添加することで良好な発酵物が得られた。

(5) 発酵物の抗変異原性は洗浄菌体と同様、高い値を示したが、加熱により活性の低下又は消失が見られた。

(6) 加熱発酵物の抗変異原性率が疑似酸乳より高いこと、及び加熱菌体にはほとんど活性が見られないことより、乳酸菌による牛乳分解物等の発酵生成物もしくは乳酸菌の代謝物質による効果が示唆された。

この研究の一部は食糧庁「米成分の高度加工・利用技術開発事業」の補助を得て行ったものである。また、ご助言を頂きました、農林水産省食品総合研究所、企画連絡室、企画科長、津志田藤二郎博士に深謝いたします。

文 献

- 1) 小崎道雄：乳酸発酵の文化譜，(中央法規出版，東京)，p. 324 (1996)。
- 2) 岡田早苗：微生物，**4**，55，(1988)。
- 3) HOSODA, M., HASHIMOTO, H. and HOSONO A.: *J. Dairy Sci.*, **75**, 976 (1992)。
- 4) NADATHUR, S.R., GOULD, S.J. and BARAKALINSKY, A.T.: *J. Dairy Sci.*, **77**, 3287 (1994)。
- 5) MATAR, C., NADATHUR, S.S., BARAKALINSKY, A.T. and GOULET, J.: *J. Dairy Sci.*, **80**, 1965 (1997)。
- 6) LANKAPUTHRA, W.E. and SHAH, N.P.: *Mutat. Res.*, **397**, 169 (1998)。
- 7) HOSONO, A., YOSHIMURA, A. and OTANI, H.: *Neth. Milk Dairy J.*, **41**, 239 (1987)。
- 8) 小崎道雄：乳酸菌実験マニュアル，(朝倉書店，東京)，p. 32 (1992)。
- 9) 川岸舜朗：食品中の生体機能調節物質研究法，(学会出版センター，東京)，p. 21 (1996)。
- 10) HOSONO, A., YOSHIMURA, A. and OTANI, H.: *Milchwissenschaft*, **43**, 168 (1988)。

(平成 12 年 1 月 11 日受付，平成 12 年 4 月 10 日受理)