

新・「郡上高校ヨーグルト」の開発を目指して

岐阜県立郡上高等学校 食品流通科3年 食品化学専攻



go good!

はじめに

日本人のヨーグルトの消費量は1年間で平均6.5 kgであり、多い人では1年間で10 kg以上ヨーグルトを食べる人もいます。ヨーグルトに対する日本人の好みは多様化しており、これまでに多種多様なヨーグルト製品が、国内で販売されている。

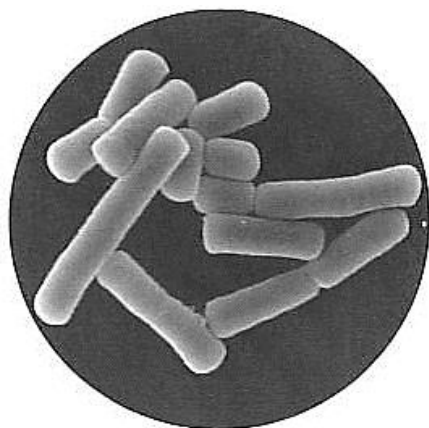
ヨーグルトは発酵食品であるため、乳成分の僅かな変化でも組織が微妙に変化してくる。本校で生産されている「郡上高校ヨーグルト」の原材料は、生乳と上白糖のみを使用している。牛乳成分の調整を行っていないため、牛の個体差や飼育環境、季節などによって、食味が微妙に変動する性質を持っている。一般的には冬は乳固形分（乳脂肪分と無脂乳固形分）が高いので粘性が高くなり、夏場は乳固形分が低くなるためサラサラとした状態になる傾向がある。このような季節の変化による違いを楽しめるのも、本校のヨーグルトの特徴の1つである。しかし近年、年間を通して軟らかくカードテンションが低い状態、しっかりと固さに仕上がった新しいヨーグルトにリニューアルしたいと考えている。そこで、一昨年度よりカード形成能力の高い乳酸菌を自然界から選抜し、郡上産の乳酸菌をPRした新・「郡上高校ヨーグルト」を製造することを目的に本研究に着手している。

昨年度は、本校より植物試料を無作為に採取して菌の同定を試みたが、得られた菌株はブドウ球菌属であり、乳酸菌ではなかった。今年度は、本校・本校周辺より植物試料を採取し、花・茎葉・樹木の3つの組織にターゲットを絞り、乳酸菌の単離を試みた。

ヨーグルト開発に向けた地域乳酸菌とは

乳酸菌とは、糖類を発酵して消費糖に対して50%以上の乳酸を生成する通性嫌気性の桿菌または球菌の総称である。

それぞれの土地には、その土地の自然環境に適合した特徴的な微生物が生息している。自然界の中には、まだ知られていない有用な特徴を備えた微生物が存在しており、私たちの住んでいる郡上市にも、この地域に特徴的な微生物資源が沢山生存していることが予想される。そこで、郡上産の乳酸菌で新・「郡上高校ヨーグルト」を開発し、イメージが良く、付加価値のあるヨーグルトを製造したいと考えている。私たちはまず、自然界から天然の乳酸菌を単離し、以下に示す5つの条件をクリアした食用として利用できる乳酸菌を選抜することにした。



【ラクトバチルス属（微生物利用【実況出版】より）】

ヨーグルト製造に使用する乳酸菌の条件

1. カード形成能を持つこと。
2. 発酵香が良いこと。
3. 乳酸菌であること。
4. 病原微生物でないこと。
5. 食経験がある種であること。

試料の採取・集積培養

①以下の3つの点に注意し、植物試料をピンセットで採取する。採取する際は、グローブを着用し、皮膚常在菌がコンタミしないように注意する。

注意）雨天時には試料の採取をしない

- ・印象の良い場所で、採取する
- ・印象の良い植物を、採取する



【サンプリングの様子】

採取した植物試料（計112サンプル）

コニシキソウ（茎葉） 紅葉（枝・樹皮・樹液） タンポポ（花）
ヤブツルアズキ（花） キツネノマゴ（花） 等

②液体培地 [10% スキムミルク, 2% グルコース] の中に、植物試料を入れ、培養 (39°C・12時間) する。

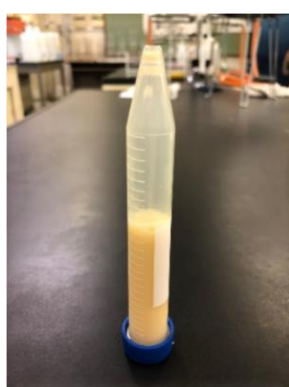
③カード形成が見られ、香りが良好なサンプルを選抜する。



【固まった状態】



【少し固まった状態】



【固まっていない状態】

④新しい液体培地に③の固まったサンプルを1 ml 移植後、培養 (39°C・12時間) する。

⑤カード形成が見られ、香りが良好なサンプルを選抜する。

⑥④～⑤の過程を5回繰り返す。

平板培養による新規乳酸菌のスクリーニング

- ①5回集積培養に成功したサンプルを、クリーンベンチ内でMRS培地に塗抹する。
- ②①のシャーレを、倒置培養 (39°C・24~72時間) する。
- ③乳酸菌の分離培養に成功した植物試料の一部を以下に示す。



【シングルコロニーアイソレーション】

採取した植物

コニシキソウ
紅葉（樹皮）
紅葉（樹液）

採取した場所

【本校裏の草むら】
【生徒指導室の前】
【生徒指導室の前】 等

MRS培地に含まれている炭酸カルシウム (CaCO₃) を中和し、クリアゾーンを形成しているコロニーを選抜した。その結果、112種類の植物から3株の乳酸菌と推測されるコロニーのスクリーニングに成功した。

スクリーニングした乳酸菌の同定

岐阜大学応用生物科学部 食品栄養学研究室 中川智行教授に依頼し、単離した乳酸菌株の同定を16S rRNA遺伝子の増幅により行う。

- ①コロニーPCR法によって、各乳酸菌株からの16S rRNA遺伝子の増幅を行う。
- ②PCR産物の塩基配列決定は、PRISM DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) を用いたダイデオキシ法に従い、DNA sequencer, Model 3130 kit (Applied Biosystems) にて行う。
- ③得られた塩基配列は、BLAST Search (URL: <http://blast.genome.jp/>) を用いて相同性の高い他菌株由来16S rRNAの塩基配列を検索し、ClustalW (URL: <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を用いて系統解析を行う。

紅葉（樹皮） : *Enterococcus casseliflavus* or *E. gallinarum* (相同性99%以上)

```
TCCCAATACATGCAAAAGTCGAACGCTTTTTCCTTCCACCGAGCTTGCTCCACCGAAGAAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTTGGGTAACCTGTC  
CCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACACTATTTTCCGCATGGAAGAAAGTTGAAAGGCGCTTTTTCGCTCACTGATGGAT  
GGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTGGTGGAGTAACCGCTCACAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAATCGGCCACACTGGGACTGAGACAC  
GGCCAGACTCCTACGGGAGGAGCAGTGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCGCGGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAA  
AACTCTGTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAGAAGCTTCATCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTAAAGCCCGCGCTCAACCGGGGAGGG  
TCATTGGAAGTGGGAGACTTGAAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGAACACCACTGGCGAAGGCGG  
CTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGAGTGCTAAGTGTG  
GGA
```

紅葉（樹液） : *Oenococcus oeni* (相同性100%)

```
ACTAATACATGCAAGTCGTACGCTAGCCGCTGAATTGATCCTTCGGGTGAAGTGGGCAATGACTAGAGTGGCGAACTGGTGAACACGTAAGAAACCT  
GCCCTTAGTGGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCTAACAAACAAATCACACATGTGATCTGTTTGAAGGTCCTTTGGATCGCTAGAGG  
ATGGTCTTGGCGGTATTAGCTGTTGGTGGGTAGGAGGCTACCAAGGCAATGATGCGTAGCCGAGTTGAGAGACTGGCCGGCCACATTGGGACTGAGAC  
ACTGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGACGATGGGAATTTCCGCAATGCAGAAAGTGTGACGGAGCGACCGCGGTGTGTGATGAAGGCTTTGGGTCGT  
AAAGCACTGTTGAAGGGAAGAATAACTGAATTCAGAGAAAGTTTTCAGCTTGACGGTACCTTACCAGAAAGGATGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGTATGTCGCGAGCTTATCCGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTATTAAGTCTGATGTAAATCCCGAGGCCAACCTCGGAA  
CTGCATTGAAACTGATTACTTGTAGTGGATAGAGGCAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGAAAGAACCACCACTGGCGAAG  
CGGCTTGTAGATCGTAACCTGACGTTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAACCGGATTAGATACCCCGGTAGTCCATACCGTAAACGATGGGTGCTAGTTG  
TTAAGAGGTTTCCGCTCCTAGTGACGTAGCAAA
```

同定した結果、2種類の属名の乳酸菌を単離することができた。2種類のうちの1つが、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属である。しかしこの菌株は、カード形成能が高くなく、ヨーグルト製造には難しい種であった。もう1つの菌株が、ワインの製造過程でマロラクティック発酵を行うオエノコッカス (*Oenococcus*) 属である。オエノコッカス (*Oenococcus*) 属は、ヘテロ型乳酸菌であるため、この菌株も、ヨーグルト製造には適していない種であった。

まとめ

私たちは、カードテンションが高く、郡上産であることをPRした新しい「郡上高校ヨーグルト」を作るために、自然界からカード形成能力の高い乳酸菌の選抜を試みた。今回単離できた菌株は乳酸菌であったが、全ての条件を満たしておらず、今年度もヨーグルト製造に利用することはできないという結果になった。

自然界から有用な乳酸菌を単離することは、容易なことではないが、まだ私たちには知られていない有用な特徴を備えた微生物資源が沢山存在していることが期待できる。今後も地域の象徴や地域特産品から地域乳酸菌を単離し、新・「郡上高校ヨーグルト」を開発していきたい。郡上産の乳酸菌で地域の創出に挑戦し続けたいと考えている。

本研究を進めるにあたり、岐阜大学の中川教授より研究のご指導、ご助言を頂きました。この場を借りてお礼申し上げます。