

# ケフィアグレイン菌株を用いたグレインの生成とケフィアの比較

誌名	日本食品保蔵科学会誌
ISSN	13441213
著者名	長谷川,真由美 綿貫,仁美 林,一也 馬場,修 小原,直弘
発行元	日本食品保蔵科学会
巻/号	37巻5号
掲載ページ	p. 241-244
発行年月	2011年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## ケフィアグレイン菌株を用いた グレインの生成とケフィアの比較

長谷川真由美<sup>\*1§</sup>・綿貫仁美<sup>\*1</sup>・林 一也<sup>\*1</sup>  
馬場 修<sup>\*1</sup>・小原直弘<sup>\*2</sup>

\* 1 東京家政学院大学現代生活学部

\* 2 東京農業大学応用生物科学部

### Comparison of the Kefir Uses Strain of Kefir Grains

HASEGAWA Mayumi<sup>\*1§</sup>, WATANUKI Hitomi<sup>\*1</sup>, HAYASHI Kazuya<sup>\*1</sup>,  
BABA Osamu<sup>\*1</sup> and OHARA Naohiro<sup>\*2</sup>

\* 1 Tokyo Kasei-Gakuin University,  
22, Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075

\* 2 Tokyo University of Agriculture,  
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

The microflora of kefir grains is highly varied. Seven varieties of microflora with varying properties were compared in this study. A previous report suggested that *Candida kefir*, one of the main yeast species in kefir, causes opportunistic infections. Different combinations of the strains, except *Candida kefir*, present in kefir grains were examined. ① The weight of kefir grains increased at all combinations. The kefir grain weight, except those of the genus *Candida*, showed an increase. ② Although it was thought that yeast played a role in imparting rigidity to the kefir grains, *Lactobacillus kefir* GKL-2 and *L. kefiranofaciens* GKL-28 were found to play the main role in imparting rigidity.

(Received Oct. 13, 2010 ; Accepted Jul. 11, 2011)

**Key words** : kefir, kefir grains, *Candida*, rigidity, culture

ケフィア, ケフィアグレイン, キャンディダ, 粘性, 培養

ケフィア (英: Kefir露: Кефир) とは, ケフィアグレインという種菌を用いて発酵させた乳飲料である。ケフィアグレインとは, ケフィランという多糖類の粘性物質に, 多くの乳酸菌や酵母が共生してできたポップコーンのような形をした菌塊である<sup>1)</sup>。

起源はコーカサス地方で, 山羊の乳を運んでいる最中, 乳酸菌や酵母が入り込み, 自然発酵してできたとされている。ケフィアの最大のポイントは, 酵母と乳酸菌が“共生”発酵していることにある。酵母と乳酸菌の共生発酵は, 単にエタノールが入ったヨーグルトというだけではなく, 酵母に豊富に含まれるビタミンや酵母などが分解する糖やタンパク質を利用して, 難生育性の乳酸菌が生育していることにあるとされている<sup>2)~4)</sup>。

ケフィアには何種類もの微生物が複雑に共生しており, それら微生物は共生発酵して働いている。自然発酵では,

ケフィアグレインの基本的な菌は乳酸菌・酵母をはじめ, 連鎖状球菌・酢酸菌・芳香微生物も含まれ構成されるといわれている<sup>5)</sup>。

このケフィア中の微生物については, グルジア由来のケフィアグレイン中に3種の酵母と4種の乳酸菌が主要菌として生育していることが明らかになっている<sup>3), 6)</sup>。特に, ケフィア特有の粘性物質の生成には *Lactobacillus kefir* や *Lactobacillus kefiranofaciens* が関与していることが明らかになっている<sup>2), 7), 8)</sup>。

今回, ケフィアグレイン中の菌を殺菌し, 新たに菌種(3種類の酵母と4種類の乳酸菌)の組み合わせを変えて植菌し, ケフィアグレインの増加や, ケフィアの性状にどのような影響があるかを検討した。また, 近年ケフィアの主要酵母である *Candida kefir* が日和見感染菌とするような報告<sup>9), 10)</sup>がなされたため, この菌を除いた菌相

\* 1 〒102-0075 東京都千代田区三番町22

§ Corresponding author. E-mail: hasegawa@san.kasei-gakuin.ac.jp

\* 2 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

のケフィアグレインでのケフィア生成を試みたので報告する。

## 実験方法

### 1. 使用培地

使用した培地の組成を表1に示した。乳酸菌の前培養培地にはカビの生育を防ぐためにアジ化ナトリウム100ppmと、共生していると思われる酵母の生育を防ぐためにシクロヘキシミド100ppmを添加した。

また、酵母の前培養培地にはYM培地を用いた。さらに、サンプル中に混在している乳酸菌などの細菌の生育を防ぐためにクロラムフェニコール100ppmを添加した<sup>6)</sup>。

### 2. 菌株および培養方法

(1) 乳酸菌および前培養方法 ケフィアグレインから分離した乳酸菌 *Lactobacillus kefir* GKL-2, *Lactobacillus kefiranofaciens* GKL-28, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* Gme-17の前培養方法は既報<sup>6)</sup>に従った。

(2) 酵母および前培養方法 ケフィアグレインから分離した酵母 *Saccharomyces unisporus* GKY-75, *Candida holmii* GKY-57, *Candida kefir* GKY-40の前培養方法は既報<sup>6)</sup>に従った。

表1 培地組成

		GYP	WYAP	YM
glucose	(g)	1.0		1
yeast extract	(g)	1.0		0.3
malt extract	(g)			0.3
peptone	(g)	0.5	0.5	0.5
Na-acetate · 3H <sub>2</sub> O	(g)	0.2		
salts solution <sup>*1</sup>	(mℓ)	0.5		
Tween80solution	(mℓ)	1.0		
water	(mℓ)	100		100
whey	(mℓ)		80	
Yeast autolysate	(mℓ)		20	
pH		6.8	5.5	5.5
CaCO <sub>3</sub>	(g)	0.5		
Agar	(g)	1.2	1.2 <sup>*2</sup>	1.5

\*1 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 40mg · MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 2mg · FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2mg · NaCl 2mgが含まれる。

\*2 継代培養の際にはCaCO<sub>3</sub> 0.5%を加えたものを使用した。

### 3. 乳酸菌と酵母の組み合わせ

7種類の菌体の組み合わせをつくるために、まず、乳酸菌を組み合わせた2種類 (A) *L. kefir* GKL-2, *L. kefiranofaciens* GKL-28, (B) *L. lactis* と *Leuc. mesenteroides* Gme-17, 酵母を組み合わせた (C) *Sacch. unisporus* GKY-75と *C. holmii* GKY-57を作製した。

その後、7種類の菌体の組み合わせを作製した。7種類の菌体の組み合わせを表2に示した。No.1は既報<sup>6)</sup>によってケフィアグレインから分離した乳酸菌および酵母の全ての菌株を組み合わせ、No.7は無接種とした。

### 4. 培養方法

No.1からNo.6までの菌体の組み合わせをつくり、WYAP培地50mℓに接種し、30℃で24時間培養した。培養後に遠心分離をし、集菌した。集菌した菌体を再び、WYAP培地100mℓで30℃、24時間培養した。遠心分離で集菌したものを、70%エタノールに1週間浸けて殺菌後、生理食塩水で3回洗浄したケフィアグレイン10gに接種し、牛乳100mℓ添加後、22℃で2日培養した。No.1からNo.7の組み合わせの菌のグレインは2日ごとに新しい牛乳を入れ替え22℃で培養した。植え替えはグレイン重量測定を検討する為に36回行い、HPLC測定、粘度測定は15回植え替え後に行った。

### 5. 分析方法

(1) グレイン重量測定 0, 15, 36回植え替え後のグレイン重量を測定した。

(2) HPLC測定 乳糖, エタノール, 乳酸の測定は、15回植え替え後のケフィアを対象に、HPLC (Waters Millennium 2010 Chromatography Manager (Waters)) を使用し、検出器は示差屈折計 (RI) を用いて行った。乳糖, エタノールの分析にはShim-pack SCR-101N (7.9mmI.D. × 300mm, 島津製作所) カラムを用い、カラム温度は60℃, 移動層は超純水, 流速は0.8mℓ/minで行った。乳酸の分析にはTSKgel OApak-P+TSKgel OApak-A (6.0mmI.D. × 40mm + 7.8mmI.D. × 300mm, 東ソー) カラムを用い、カラム温度は40℃, 移動相は0.75mM硫酸, 流速は0.8mℓ/minで行い、もとの牛乳中に含まれる乳酸を差し引いた後、3回測定平均値を求めた。

(3) 粘度測定 粘度測定は、15回植え替え後のNo.1からNo.7のグレインを22℃で0.24.36.48時間培養したケフィアをステンレスふるいでろ過後、ろ液の粘度

表2 接種菌体組み合わせ

菌体No.	接種菌体
1	(A) + (B) + (C) + <i>Candida kefir</i> GKY-40
2	(A) + <i>Lactococcus lactis</i> + <i>Saccharomyces unisporus</i> GKY-75
3	(A) + <i>Lactococcus lactis</i> + <i>Candida holmii</i> GKY-57
4	(A) + <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Gme-17 + <i>Sacch.unisporus</i> GKY-75
5	(A) + <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Gme-17 + <i>Candida holmii</i> GKY-57
6	(A) + (B) + (C)
7	無菌

を測定した。粘度の測定にはViscometer LV DV-IP (Brookfield) を用いた。

(4) 官能検査 官能検査は15回植え替え後のケフィアNo.1~No.6を用いて行った。パネルは女子大学生15名、官能評価の内容は甘さ・香り・舌触り・酸味・粘り・炭酸味・食味・総合評価とし、-3 (弱い・悪い) から+3 (強い・良い) の段階で評価した。評価項目ごとに平均値を求めた。ただし、No.7は無菌のものとして官能検査を行わなかった。

実験結果および考察

1. グレイン重量測定

グレイン増加量を図1に示した。グレインの重量測定から、ブランクと比較してすべての組み合わせでグレインの増加が認められた。このことから、*C. kefir*がなくともグレインの増加が行われることが明らかとなった。また、ブランクであるNo.7のグレインは36回植え換え時には、形状を保てずに崩れた状態であった。

2. HPLC測定

液体クロマトグラフィーを用いて測定したエタノール、乳糖、乳酸量の100ml中に含まれる量 (g) を図2に示した。

各サンプルのエタノール・乳糖・乳酸量をみてみると、乳糖の減少とエタノールの増加は、ほぼ比例していた。これは、乳糖が分解されエタノールが生成されていることを示していると考えられた。無菌接種のNo.7は、十分消毒したグレインを使い、クリーンベンチの無菌状態の中で植え替えを行ったが、乳糖の低下と乳酸値の上昇がみられた。このため、植え替えに使用した牛乳からの乳酸菌の持ち込みがあったのではないかと考察した。しかし、エタノールが検出されず、顕微鏡観察でも酵母が認められなかったことから、ブランクとして成立していると考えられた。

3. 粘度測定

粘度測定の結果を図3に示した。ケフィアの粘性物質生産には、(A) の*L. kefir* GKL-2と*L. kefiranofaciens*

GKL-28が不可欠であることを既報によって明らかにしている<sup>3)</sup>が、今回の結果、No.1と比較すると、No.3およびNo.5の36時間後の粘度に大きな変化がみられた。

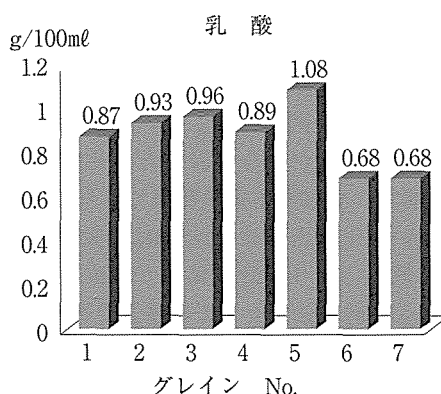
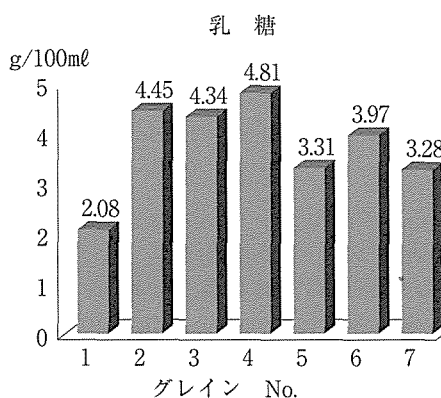
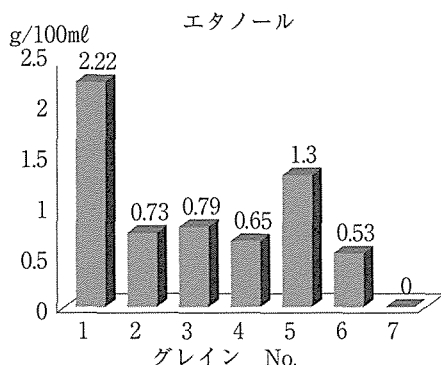


図2 植え替え15回後に含まれるエタノール・乳糖・乳酸量

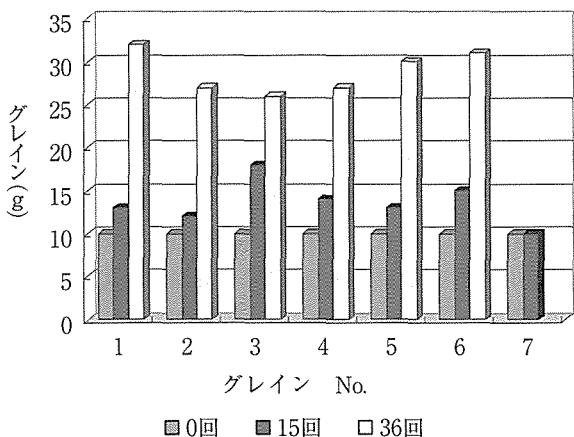


図1 ケフィアグレインの植え替えによる重量変化

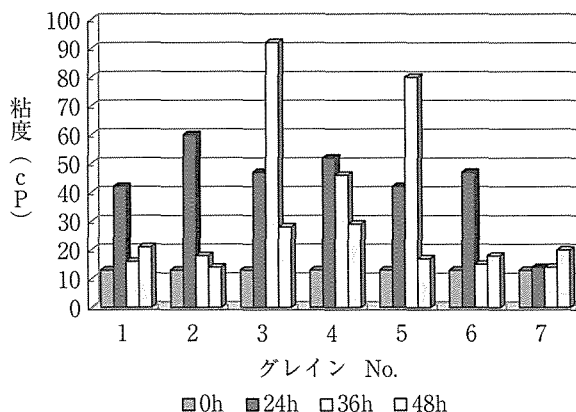


図3 植え換え15回後の各種ケフィアの粘度変化

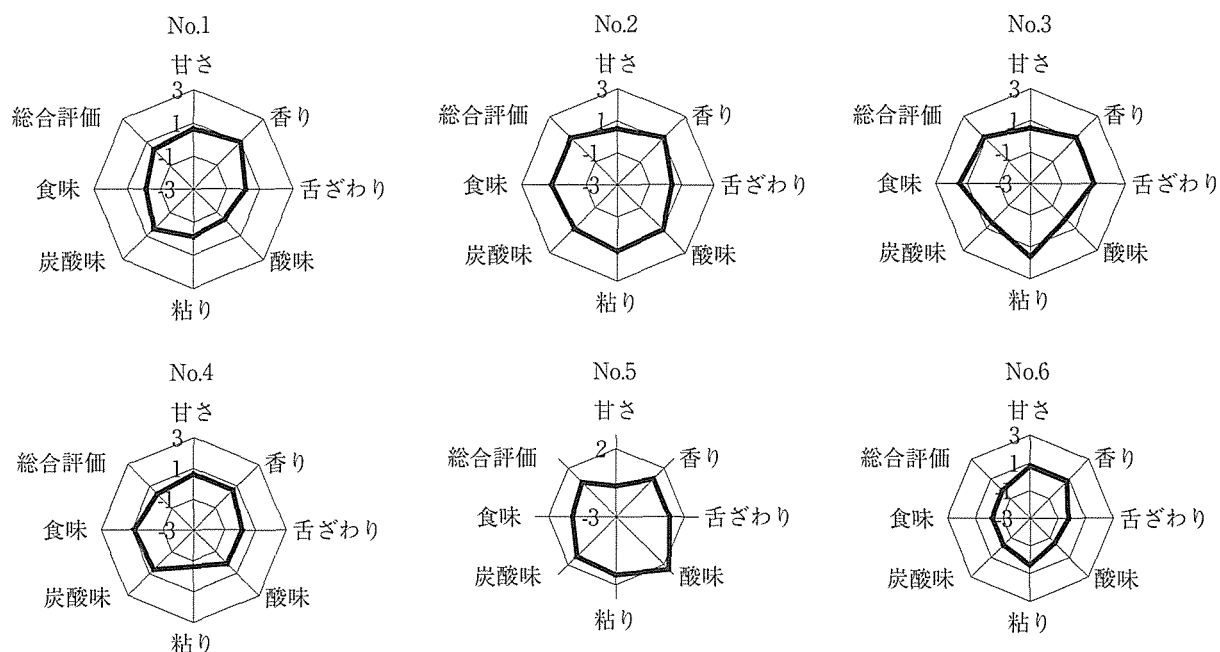


図4 各種ケフィアの官能検査

No.3およびNo.5には、酵母菌の*C.holmii* GKY-57が入っており、粘り生成には*C.holmii* GKY-57も深く関わっていると考えられた。また、培養が進むとすべてにおいて粘度が低下したが、pHの上昇によって粘性物質が沈澱し、その為に粘度が低下したと思われた。本件に関しては今後の検討課題と考える。

#### 4. 官能検査

官能検査の結果を図4に示した。No.1は、香りがやや高く、粘りが少ない評価だった。No.2は、甘さの評価が低く、舌触りも低い結果であったが、総合評価が一番良い結果であった。No.3は、炭酸、甘さと酸味が非常に低く、粘りの評価結果が高かった。また、No.2と同じく総合評価が一番良い結果であった。

No.4は甘さ、炭酸、酸味のバランスがとれており、食味の評価が高い結果であった。No.5は、甘みの評価が低く他の評価も0~1前後と低く、酸味のみが非常に高い結果であった。

No.6は、甘さ、香り、粘りが高く、食味、炭酸味、酸味、舌触りが非常に低い結果であった。また、No.2およびNo.3の評価が高かったが、総体的な味の差はあまりみられなかった。No.2およびNo.4は*Candida*属を用いておらず、*Candida*属なしでもケフィアの特徴ともいえる粘りが形成できることを明らかにした。さらに、粘性物質の生成には、乳酸菌だけではなく、酵母も深く関与していると推察できた<sup>1),7)</sup>。

今後は、ケフィア中の菌の組み合わせを変えたときの、機能性やより高い多糖の生成条件、好まれる味を作る為の培養条件などを明らかにしていく必要があると考える。

#### 文 献

- 1) 戸羽隆宏：ケフィール・ヨーグルトの乳酸菌，乳酸菌研究集談会誌，2，68~73 (1992)
  - 2) 小原直弘：ケフィールの機能と今後の課題，食品と開発，29 (8)，8~10 (1994)
  - 3) 小崎道夫：乳酸菌—健康を守る発酵食品の秘密 (八坂書店，東京)，pp.65~66 (2002)
  - 4) 足立 達・伊藤敏敏・戸羽隆宏・有原圭三・向井孝夫：乳酸菌の生態—*Lactobacillus kefirianofaciens*によるケフィール粒の形成を例として—，微生物，6，15~27 (1990)
  - 5) 乳酸菌研究集談会：乳酸菌の科学と技術，pp.270~274 (2000)
  - 6) 小原直弘・内村 泰・駒形和男：凍結乾燥，水浸漬および継代培養ケフィアグレイン (グルジア) の酵母菌相の比較，日食誌，26，69~74 (2000)
  - 7) 小原直弘・鈴木正人・岡田早苗・内村 泰・小崎道雄・駒形和男：凍結乾燥ケフィアグレイン (グルジア) より分離した乳酸菌の同定，日食微誌，13，165~171 (1997)
  - 8) 戸羽隆宏，足立 達：ケフィール粒の微生物学，バイオサイエンスとインダストリー，47，383~386 (1989)
  - 9) 西川朱實：カンジダの菌学，真菌誌，43，126~128 (2007)
  - 10) KURTZMAN, C. P.: The Yeasts, A Taxonomic Study Fourth edition (Elsevier Science and Technology, Amsterdam), pp.9~12 (1998)
- (平成22年10月13日受付，平成23年7月11日受理)