

地域資源より分離した乳酸菌の機能性評価

1. 目的

近年、乳酸菌の保健効果が注目され、乳酸菌を用いた製品の市場は年々拡大を続けている。県内企業においても乳酸菌を応用した製品開発のニーズは高まっているが、有用な乳酸菌を保有していないこと等が課題となり、新製品の開発は進んでいない。

本研究では、県内企業の乳酸菌応用製品の開発を支援するため、地域資源から乳酸菌を分離し、機能性について検討した。今年度は、地域資源として阿波晩茶から乳酸菌を分離し、遺伝子解析による菌種の同定を行った。

2. 方法

乳酸菌は阿波晩茶から分離した。嫌気発酵後の茶葉をリン酸緩衝生理食塩水で懸濁し、MRS 寒天培地に塗抹して、アネロパック・ケンキ（三菱ガス化学）を用い、嫌気ジャー中で 35°C、2 晩培養した。発生したコロニーを釣菌し、ねじ口試験管に分注した MRS 液体培地で 35°C、1 晩培養した後、培養液をグリセロール（30%）と混合し、-80°C で保存した。

乳酸菌は、*recA* 遺伝子に対するマルチプレックス PCR 及び 16S rRNA 遺伝子の配列比較により同定した。MRS 液体培地で前培養した乳酸菌をバイオラプター（コスモ・バイオ）で超音波処理した後、NucleoSpin Tissue（タカラバイオ）を用いて菌体 DNA を抽出した。初めに、*Lactobacillus plantarum* グループを同定するため、Torriani らの方法¹⁾に従い *recA* 遺伝子に対するマルチプレックス PCR を行った。PCR 産物について 2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、バンドを確認した。次に、バンドが出現しなかった菌株について、16S rRNA の配列比較による同定を行った。PCR は、Lane により報告された乳酸桿菌用プライマー²⁾である 27F/1492R を用いて行った。PCR 産物についてサンガーシーケンス法により配列を決定し、菌種を同定した。

3. 結果および考察

乳酸菌は MRS 寒天培地により 101 株が分離された。分離された乳酸菌の菌体 DNA について *recA* 遺伝子に対するマルチプレックス PCR を行った結果、101 株中 60 株が 200 bp 付近、24 株が 300 bp 付近にバンドが確認された（図 1）。この方法における PCR 産物は、*Lactobacillus pentosus* が 218 bp、*L.plantarum* が 318 bp であるため、200 bp 付近に出現したバンドは *L.pentosus*、300 bp 付近は *L.plantarum* とそれぞれ

同定した。一方、17 株はバンドが出現しなかった。これらの菌株に対して 16S rRNA 遺伝子の配列比較を行った結果、*Lactobacillus collinoides* 等が同定された。阿波晩茶から分離した乳酸菌の同定結果を表 1 に示した。*L.pentosus* が最も多く分離され、次いで *L.plantarum* が分離された。

次年度は分離された乳酸菌の人工消化液耐性や腸管上皮細胞付着性等を確認し、機能性を評価する予定である。



図 1. *recA* 遺伝子に対するマルチプレックス PCR による乳酸菌の同定

表 1. 分離した乳酸菌の菌種と数

菌種	分離数
<i>Lactobacillus pentosus</i>	60
<i>Lactobacillus plantarum</i>	24
<i>Lactobacillus collinoides</i>	6
その他*	11
合計	101

*: 分離数が5以下の菌種。

参考文献

- 1) Torriani S.; Felis GE.; Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. Appl Environ Microbiol. 2001, vol. 67, no. 8, p. 3450-3454.
- 2) Lane D. 16S/23S rRNA sequencing: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. 1st ed., J Wiley and Sons, 1991, p. 115-175.