

日本近海の海藻から分離した海洋植物由来乳酸菌の性状

Characteristics of marine plant-derived lactic acid bacteria isolated from nearshore seaweed in Japan

今田千秋^{*1,2}

Chiaki IMADA ^{*1,2}

^{*1}Tokyo University of Marine Science and Technology 4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan

^{*2}Institute of Ocean Energy University of Saga 1-Honjo machi, Saga-shi, Saga, 840-8502, Japan.

Abstract

Samples of surface seawater, seaweed, and marine sediment were collected from coastal areas across Japan, and marine lactic acid bacteria were isolated from these samples. As a result, lactic acid bacteria were isolated from the seaweed Matsumo inhabiting Otsuchi Town, Iwate Prefecture. This strain was named S-1 strain. Species identification based on the 16S rDNA base sequence revealed a 99.9% similarity to both *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactiplantibacillus pentosus*, making it impossible to determine which species was the closest relative. Therefore, a carbohydrate fermentation test using the API 50 CH kit was conducted. The S-1 strain and *L. plantarum* JCM11125^T strain were negative for glycerol and D-xylose fermentation, while *L. pentosus* 106467^T was positive. Furthermore, the fermentation of methyl- α -D-mannopyranoside, D-raffinose, and D-turanose was positive for both the S-1 strain and JCM11125^T, but negative for the 106467^T strain. Based on these results, although the S-1 strain showed some differences in sugar fermentation from JCM11125^T, it had fewer differences compared to the fermentation pattern of 106467^T, suggesting it as a close relative of *L. plantarum*. Therefore, this strain was named *Lactiplantibacillus plantarum* S-1. Tests for resistance to artificial gastric juice and artificial intestinal juice were conducted on the S-1 strain, and it showed high resistance in both cases.

Key words : lactic acid bacteria, *Lactiplantibacillus plantarum*, artificial gastric juice, artificial intestinal juice

1. 緒言

乳酸菌は古来より食品の加工や調味、貯蔵など様々な分野で利用されてきた代表的な有用微生物である(1)。近年ではプロバイオティクス素材としても用いられている(2, 3)。これまで乳酸菌は様々な環境から分離されているが、海洋環境からの分離例は少ないのが現状である(4-8)。海洋環境からの微生物探索が遅れていること、また圧力、塩分、温度、光などの環境条件が陸上と異なっていることなどから、海洋環境から陸上由来微生物と性質の異なる微生物が新たに分離されることに期待が寄せられている(9)。そこで、本研究では陸上由来株と異なる性質を有していることに期待し、日本沿岸の各海域から乳酸菌の分離を試み、得られた株について分類学的性状(生育温度、耐塩性、及び糖の資化性)をそれらの近縁の標準株と比較するとともに本菌を実際に経口摂取することを想定し、*in vitro*における人工消化液耐性(胃液耐性および胆汁酸耐性)を検証した。

2.1. 海洋植物由来乳酸菌の分離

原稿受付 2023年11月6日

^{*1} 東京海洋大学学術研究院(〒108-8477 東京都港区港南4-5-7)

^{*2} 佐賀大学海洋エネルギー研究所(〒840-8502 佐賀市本庄町1)

E-mail of corresponding author: sz0146@cc.saga-u.ac.jp

日本各地の沿岸海域から表面海水や海藻および海底堆積物などを採集した。これらのサンプルを滅菌海水に懸濁したのち、同海水で適宜希釈を行い、その希釈液 0.1ml を、1%炭酸カルシウムを添加した市販の MRS 寒天培地に塗抹した。これを 37°C で 3 日間静置培養を行い、生じたコロニーの周囲に透明のハローが形成された株を選抜し、さらにカタラーゼ試験（3%過酸化水素水を滴下）を実施し、しばらく放置しても酸素の気泡の発生が観察されない株を乳酸菌株として分離した。

2.2. 分離株の 16S rDNA による種の同定

得られた乳酸菌株を MRS 寒天培地 (Lactobacilli MRS Agar: Difco Laboratories 製) にて 3 日間培養後、遠心分離 (20,000×g, 4°C, 20 分間) し、集菌した菌体から、Soil DNA Isolation Kit (フナコシ) を用いて、常法により細菌 DNA を抽出・精製した。得られた DNA をシーケンス PCR にかけ、16S rRNA 遺伝子解析を行った。なお、遺伝子解析は (株) テクノスルガラボに分析を委託した。また、遺伝子解析の結果、本菌の近縁種と考えられる 2 つの基準株、*Lactiplantibacillus plantarum* JCM11125^T (理化学研究所) および *Lactiplantibacillus pentosus* NBRC106467^T (製品評価技術基盤機構) をそれぞれの保存機関から入手し、分離株との並行実験に供した。

2.3. 分離株の生育温度

分離株とその基準株を各々 MRS 寒天培地にて前培養 (37°C, 1 日) した。前培養後、これらの株を MRS 寒天培地に画線植菌し、各温度 (4°C, 15°C, 27°C, 37°C 及び 55°C) で本培養を行った。培養 7 日後及び 14 日後に肉眼でこれらの菌株の生育状況をそれぞれ観察し、生育したものを陽性、また生育しなかったものを陰性と判定した。

2.4. 分離株の NaCl 耐性試験

分離株とその基準株を各々前培養 (37°C, 1 日) した後、各濃度の NaCl を添加した MRS 寒天培地 (0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% 及び 8%) に画線植菌したのち、37°C で培養した。培養 7 日後にそれぞれの生育状況を肉眼的に観察し、生育が見られたものを陽性、また生育しなかったものを陰性と判定した。

2.5. 分離株の炭水化物資化性試験

API50CH (アピ 50CH) キット (バイオメリュー・ジャパン株式会社) を使用し、分離株とその標準株の炭水化物資化性試験を行った。これらの株を各々 MRS 寒天培地上に画線植菌したのち、前培養 (37°C, 1 日) した。前培養により得られた供試菌株コロニーをイオン交換水に懸濁し、付属説明書に従いマクファーランド濁度 2.0 に調整後、それを 50CHL medium 10 ml に懸濁し、それぞれ静置培養 (37°C, 48 時間) を行い、各基質に対する反応を陽性 (+)、または陰性 (-) と判定した。

2.6. 分離株の人工胃液耐性試験(10)

分離株を MRS 液体培地 (Lactobacilli MRS Broth: Difco Laboratories) 50ml 中で 37°C にて 4 日間静置培養したのち、1ml に培養液を分取して適宜希釈後、培養サンプル中の生菌数を計数した。残りの培養液に滅菌済みの新たな同液体培地 40ml を添加したのち、①pH 未調整、②6N HCl で pH3 に調整したもの、③6N HCl 塩酸で pH3 に調整したのち、4%ペプシン溶液 (Porcine Stomach Mucosa, Fujifilm, 161-24482) を添加したものを、それぞれ 37°C で 4 時間静置培養した。培養後、①、②、③からそれぞれ 1ml の培養液を分取して、滅菌水で適宜希釈したのち、その 0.1ml を MRS および BCP (Merck, KGaA, 64271 Dmstadt) 寒天培地に塗抹後、37°C で 5 日間培養を行い、それぞれの生菌数を計数した。

2.7. 分離株の人工胆汁酸耐性試験(10)

滅菌済みの MRS 液体培地 94ml に 4%胆汁酸溶液 (豚胆汁末, Powdered Swine, Fujifilm 168-24311) 5ml を添加し、上記の人工胃液反応物①、②、③ 1ml をそれぞれ接種後、37°C で 7 時間培養し、培養サンプルの生菌数を比較した。培養後、①、②、③よりそれぞれ 1ml の培養液を分取して、滅菌水で適宜希釈したのち、その 0.1ml を MRS および BCP 寒天培地に塗抹後、37°C で 5 日間培養を行い、それらの生菌数を計数した。

3. 結果及び考察

各海域の海水や海藻などから乳酸菌の分離を行った結果、岩手県大槌町の沿岸海域に生息する海藻マツモ（2009年6月採集）から、乳酸菌株が分離された。本菌（S-1株と命名）について、16S rDNAの塩基配列による種を同定した結果、*Lactiplantibacillus plantarum* (11)と99.9%（1,491塩基のうち1,489塩基の配列が一致）、また*Lactiplantibacillus pentosus*と99.9%（1,492塩基のうち1,490の配列が一致）の相同率が見られ、いずれの種が最近縁種かを判別することができなかった。そこで、次に*Lactiplantibacillus plantarum* および*L. pentosus*の基準株をそれぞれ入手して、S-1株と並行実験を実施した。その結果、生育温度は3株とも4°C-55°Cであり、これらの基準株との間に差異は見られなかった。また、NaCl耐性も3株とも7%まで生育可能であり、海洋環境から分離された本菌が特に高いNaCl耐性を持っていなかった（データ未発表）。次に炭水化物の資化性試験を行った結果、Table 1に示すように、S-1株とJCM11125^T株はいずれもglycerolとD-xyloseの資化性が陰性であったのに対し、106467^Tは陽性であった。また、methyl- α -D-mannopyranoside、D-raffinoseおよびD-turanoseの資化性は、S-1株とJCM11125^Tがいずれも陽性であったのに対し、106467^T株は陰性であった。また、L-sorboseとL-rhamnoseの資化性はJCM11125^Tのみ陽性で、他の2株は陰性であった。

以上の結果、S-1株はJCM11125^Tの資化性と一部異なるが、106467^Tの資化性よりも相違点が少なかったため、*L. plantarum*の最近縁種と考えられた。そこで、本菌を*Lactiplantibacillus plantarum* S-1株と命名した。文献によると(12)、*L. pentosus*はグリセロール及びキシロースの資化性が陽性であり、*L. plantarum*は陰性である事が報告されており、本結果と一致した。

S-1株の人工胃液における生残性をFig. 1に示した。①のpH未調整サンプルおよび③pH3.0に調整したのち人工胃液を添加したサンプルの方が、元のサンプルよりも生菌数が多かった。従って、本菌はpH3の人工胃液中でも耐性が高いことが判明した。この結果から、もし本菌を経口摂取した場合も胃内での生残率が高いことが予想された。しかし、②pH3に調整したのみのサンプルは生菌数が減少した。この理由については現在のところ不明である。

S-1株の人工胆汁液における生残性をFig. 2に示した。なお、耐胆汁液試験は実際の腸管内の滞留時間を考慮して、反応時間は7時間、胆汁濃度は最高値で2%（胆汁末濃度で0.2%に相当）であるためにその濃度を4%とした。その結果、Fig. 2に示すように、人工胆汁液を添加したサンプルはいずれも顕著に生菌数が増加した。中でも①のpH未調整のサンプルは最も生菌数が多かった。また、③のpH3の人工胃液サンプルや②pH3のみのサンプルも生菌数が増加したことから、本菌は胆汁酸に対する耐性が高いことが判明した。

空腹時のヒト胃内は、胃酸によってpH1-2に保たれ、殺菌作用が強い状態にあることが知られている(13)。しかし、空腹時に肉や野菜のような通常の食物を摂取すると、pHは4-5まで上昇するとされている(14)。このような理由から、本研究では通常の人の胃内のpHよりも少し高いpH3を基本として人工胃液耐性試験を行った。また、通常胃内消化物が完全に十二指腸に移送されるのに約2時間かかることから(13)、胆汁液耐性試験の処理時間は7時間とした。その結果、S-1株は、①、②、③の生菌数の減少はいずれもみられず、高い胆汁耐性を示した。

乳酸菌を食品に利用するためには、その乳酸菌がそれを発酵できるか否か、すなわち、速やかに生菌数が増加して、pHが低下することが重要である。特に乳酸菌飲料を含む発酵乳を製造した場合、プロバイオティクス効果を発現するのに十分な菌数が発酵乳製品中で存在することや摂取後、胃内の酸性条件や腸管内の胆汁存在下で生残すること(15)、到達した腸管内で増殖すること、などが重要と考えられているが(16)、本菌はこのような条件を十分満たした乳酸菌と考えられた。そこで、本菌を用いた野菜果汁乳酸菌飲料の開発のためのモニタリング試験を実施した。その結果、本菌は野菜果汁乳酸菌飲料の連続的な摂取は1週間当たりの排便回数が3-5回の便秘傾向のある健康女性の便通、腸内細菌叢および肌状態の改善が期待されることが判明した(17)。本研究結果をもとに野菜果汁乳酸菌飲料が商品された。[\(https://okagesamanet.com/umika/\)](https://okagesamanet.com/umika/)。

今回分離された乳酸菌はその基準株と炭水化物の資化性が若干異なる以外に性状に大きな相違は見られなかった。しかし、今後様々な性質例えば、耐圧性やアミノ酸の利用性などを調べていくことにより海洋由来の乳酸菌の特徴が明確になることが予想されるため、今後も本菌について多方面の機能性検索を継続していきたいと考えている。

Table 1 Carbohydrate utilization of strain S-1 and its type strains

Carbohydrate	<i>L. plantarum</i> strain JCM11125 ^T	<i>L. pentosus</i> strain NBRC106467 ^T	<i>L. plantarum</i> strain S-1
None added	-	-	-
Glycerol	-	+	-
Erythritol	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+
D-Ribose	+	+	+
D-Xylose	-	+	-
L-Xylose	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-
Methyl-βD-xylopyranoside	-	-	-
D-Galactose	+	+	+
D-Glucose	+	+	+
D-Fructose	+	+	+
D-Mannose	+	+	+
L-Sorbose	+	-	-
L-Rhamnose	+	-	-
Dulcitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+
D-Sorbitol	+	+	+
Methyl-α-D-mannopyranosid	+	-	+
Methyl-α-D-glucofuranoside	-	-	-
N-Acetyl-glucosamine	+	+	+
Amygdalin	+	+	+
Arbutin	+	+	+
Esculin ferric citrate	+	+	+
Salicin	+	+	+
D-Celiobiose	+	+	+
D-Maltose	+	+	+
D-Lactose	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+
D-Sucrose	+	+	+
D-Treharose	+	+	+
Inulin	-	-	-
D-Melezitose	+	-	+
D-Raffinose	+	-	+
Starch	-	-	-
Glycogen	-	-	-
Xylitol	-	-	-
Gentibiose	+	+	+
D-Turanose	+	-	+
D-Lyxose	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-
D-Fucose	-	-	-
L-Fucose	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-
Gluconate	+	+	+
2-Keto-gluconate	-	-	-
5-Keto-gluconate	-	-	-

※ +: positive, -: negative

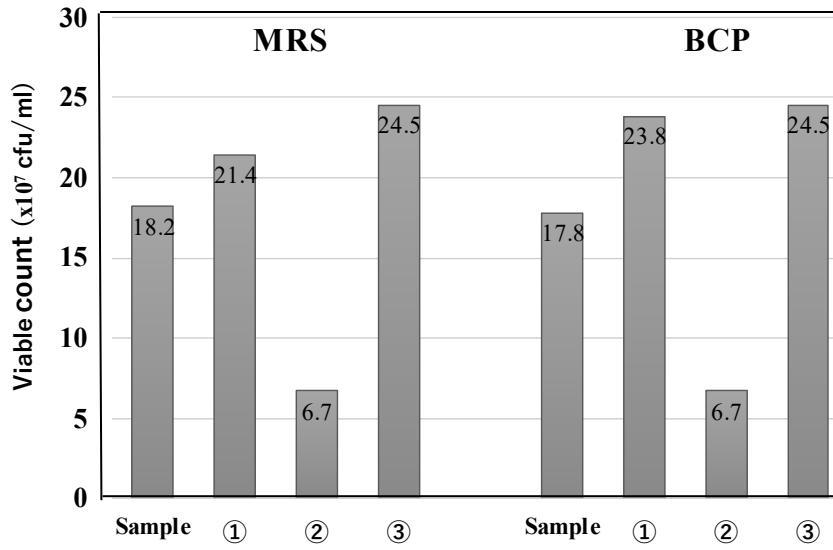


Fig. 1. S-1 strain artificial gastric fluid (pepsin) resistance test

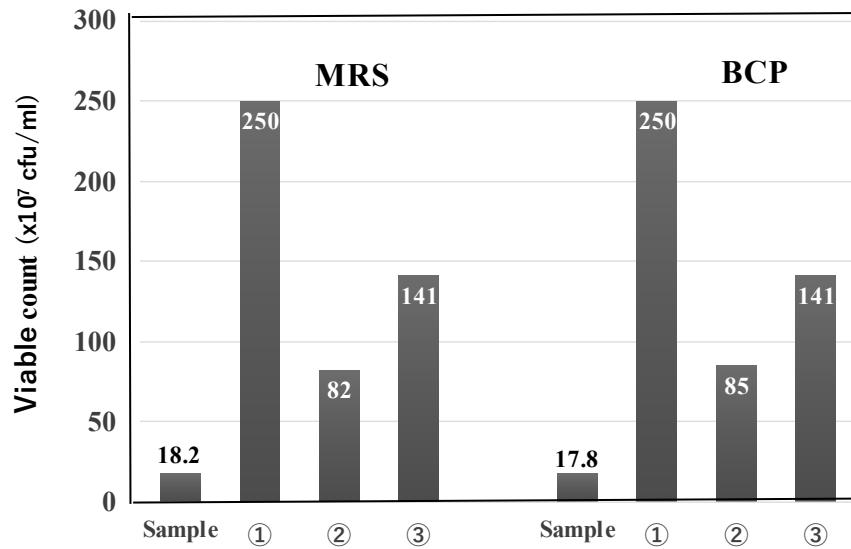


Fig 2. S-1 strain artificial intestinal fluid (bile acid) resistance test

4. 謝辞

本研究の一部は佐賀大学海洋エネルギーセンター共同利用研究(採択番号; 22A01)および科学研究費助成事業課題番号(学術研究助成基金助成金)基盤研究(C)19K05786により実施されたことを記して謝意を表します。

参考文献

- 1). 森地敏樹. 食品保存における乳酸菌の利用. 日本食品科学工学会誌, 49, 207-219 (2002).
- 2). 光岡知足. プロバイオティクスの歴史と進化. 日本乳酸菌学会誌, 22, 26-37 (2011).
- 3). 辨野義己. プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能. モダンメディア, 57, 277-287 (2011).
- 4). 田中尚人. 乳酸菌を分離するための基本. 日本乳酸菌学会誌, 30, 3-7 (2019).
- 5). 久田孝. 沿岸(里海)環境からの乳酸菌および酵母の分離と応用. 日本乳酸菌学会誌, 2, 51-57 (2017).
- 6). 糸井史郎. 魚類のプロバイオティクス(乳酸菌飼料). 日本水産学会誌, 78, 784 (2012).
- 7). Ishikawa, M., Nakajima, K., Yanagi, M., Yamamoto, Y., and Yamasato, K., *Marinilactobacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 711-720 (2003).
- 8). Ishikawa, M., Nakajima, K., Itamiya, S., Furukawa, Y., Yamamoto, Y., and K. Yamasato. *Halolactibacillus halophilus* gen. nov. sp. nov. and *Halolactibacillus miurensis* sp. nov., halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria constituting a phylogenetic lineage in *Bacillus* rRNA group1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 2427-2439, (2005).
- 9). 左子芳彦. ゲノム情報を用いた海洋微生物の生理生態学的研究. 日本水産学会誌, 85, 281-290 (2019).
- 10). 東幸雅, 伊藤和徳, 佐藤学. *Lactobacillus gasser* NY0509および*Lactobacillus casei* NY1301の人工消化液耐性並びに腸内有害菌抑制効果. 日本食品科学工学会, 48, 656-666 (2001).
- 11). Zheng, J., S. Wittouck, E. Salvetti, CMAP Franz, HMB Harris, P. Mattarelli, PW O' Toole, B. Pot, P. Vandamme, J. Walter, K. Watanabe, S. Wuyts, GE Felis, M. G Gänzle, and S. Lebeer. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 2782-2858 (2020).
- 12). 草野崇一, 田村弘, 司岡崎勝一郎. フルクトン資化性乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* S506 株の分離とニンニク発酵食品への応用. 日本食品工学会誌, 16, 125-131 (2015).
- 13). 武藤泰敏, 新版 消化吸収(第一出版, 東京), p.137 (1988).
- 14). 武藤泰敏, 新版 消化吸収(第一出版, 東京), p.129 (1988).
- 15). Fuller, R., Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365-378 (1989).
- 16). Link-Amster, H., Rochart, F., Saudan, K. Y., Mignot, O., and Aeschlimann, J. M. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 10, 55-63 (1994).
- 17). 吉積一真, 相澤萌, 山本有人, 泉田仁, 高木良将. 海藻由来の植物性乳酸菌(*Lactobacillus plantarum* S-1株)と水溶性食物繊維にオリゴ糖を配合した野菜果汁飲料の摂取成績. *応用薬理*, 161, 19-24 (2021).