

水産資源からの乳酸菌の分離

水産科 2 年 中荒井李華

1. はじめに

乳酸菌とは自身が利用した糖の 50%以上を乳酸へと変換する細菌の総称で、現在までに 26 属種の発見が報告されている。また、発酵様式は 2 パターンあり、最終生成物が乳酸のみのホモ乳酸発酵、最終生成物が乳酸に加えて、アルコールなどの他の物質を含むヘテロ乳酸発酵である。これらの性質を利用することでヨーグルトやチーズ、醤油などの発酵食品の製造ができる。

乳酸菌は様々な乳製品から分離されているが、この他にもイネやオリーブなどの植物表面から多く分離されている。加えて、水圏環境からはニジマスなど魚類のほかチョウセンハマグリを含む数種の二枚貝類から分離が成功している。これらの二枚貝類はケイソウを含む植物プランクトンを摂餌するフィルターフィーダーである。以上のことから「水中の植物は陸上環境の植物に相当しており、二枚貝類はそれらを摂餌するため乳酸菌が分離できたのではないのか」と考えた。そこで、淡水の植物である底生性の付着藻類からの乳酸菌の分離を試み、また、一連の食物連鎖によって、付着藻類を餌とするアユならびにそれを捕食するスズキからも同様に乳酸菌の分離が可能か調べた。

2. 試料と分離方法

(1) 試料

本研究の試料には、那珂川水系である武茂川に遡上したアユおよびアユの摂餌跡あるコケを用いた。また、涸沼川でスズキを採捕した。アユは孵化後、海で微生物や水生昆虫などを食べて生活する。成長すると河川へ遡上し、櫛状歯という歯が発達してコケを食べる。スズキは遡上および遡下をする間は魚食性が強いため、アユなどを捕食して生活をしている可能性がある。採捕したアユとスズキは滅菌環境下で解剖、腸内容物を搾出した。加えて、アユの摂餌跡のある石を採取し、石からコケおよびデトリタスをこすり取り、0.01g を滅菌超純水に 10ml 希釈後、試料とした。

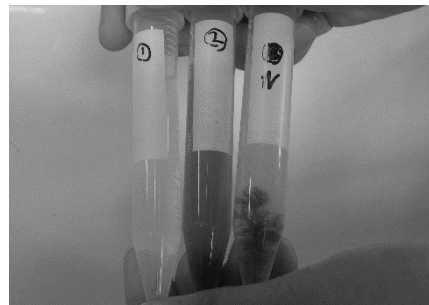


写真 1. 採取したデトリタス 3 種

(2) 分離方法

1) 直接培養法

試料を 10~10,000 倍に系列希釈後、乳酸菌の選択培地である MRS 寒天培地に接種した。その後、好機条件下で 25°C で 3 日間培養した。

2) 増菌培養法

試料を 10~100,000,000 倍に系列希釈後、MRS 液体培地に接種して 25°C で 3 日間培養した (写真 1, 2)。増菌培養を確認後、直接培養法と同様の培養法を行った。

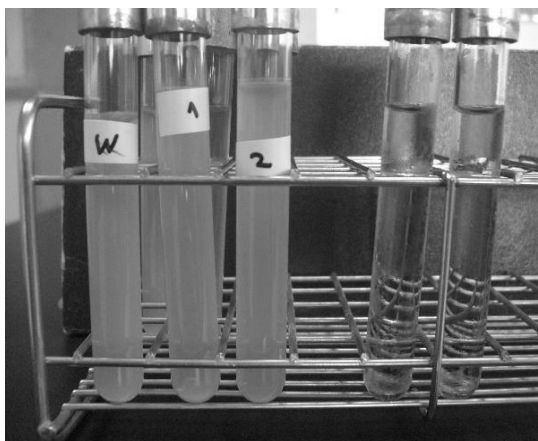


写真 2. 増菌が確認された MRS 液体培地

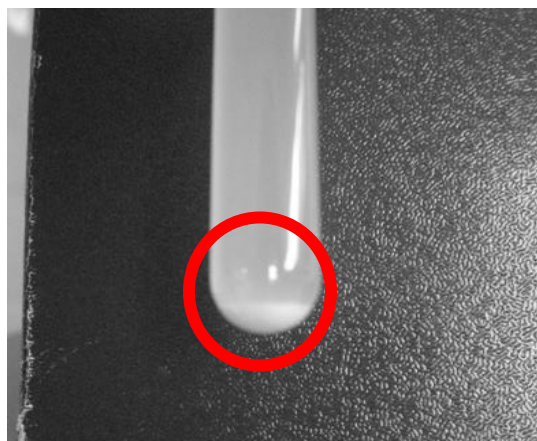


写真 3. 底に溜まった菌

3) 乳酸菌様株の選別

検出されたコロニーを乳酸菌様株選別のため 1%の CaCO_3 を含有した MRS 寒天培地に接種し、クリアゾーン形成の有無を調べた。写真の左が通常の寒天培地、右が炭酸カルシウムを含有した二層培地となっている (写真 4)。 CaCO_3 は酸に溶ける性質を持っており、酸を生成する乳酸菌がこの培地で増殖するとコロニーの周囲にクリアゾーンができるため、クリアゾーンができた株を乳酸菌様株とした (写真 5)。

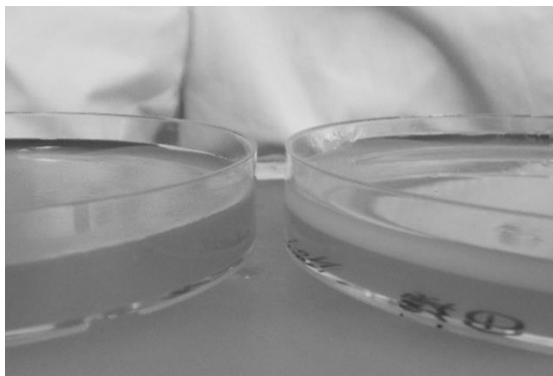


写真 4. MRS 寒天培地と CaCO_3 含有培地

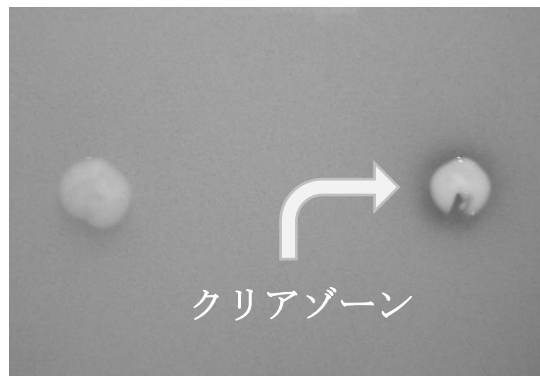


写真 5. クリアゾーン形成

4) DNA 解析 (共同研究)

得られた乳酸菌様株は平成 28 年 7 月 30 日に日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科糸井史朗教授のご協力を頂き、DNA 解析を行った。

BL buffer を用いた DNA 抽出を行った後、これを鋳型として PCR 法にて増幅を行った。以降、日本大学の 4 年生である山本早矢花氏が塩基配列の解析および種判別を行った。

5) 性状試験

乳酸菌は同種であっても分離源により、耐塩性や温度耐性を含む表現形質が異なるため種判別された株に耐塩性試験、胆汁酸耐酸性試験および温度耐性試験を行い、分離株の性状を明らかにした。

3. 結果

(1) アユからの分離実験

DNA 解析の結果、アユは 4 個体中 2 個体から *Lactobacillus plantarum* が 51 株、*Lactococcus garvieae* が 1 株分離された (表 1)。*Lb. plantarum* に各性状試験を行った結果、耐塩性試験では、4%の NaCl まで耐えることができた (表 2)。一方、胆汁酸に対しては一切の耐性が認められなかった。温度耐性試験では、他の株と同様、4~40℃まで耐えることができた。

表 1. アユ由来 *Lb. plantarum* をの表現形質

分離源	塩分 (%)				胆汁酸 (%)			温度 (°C)				
	0	1	2	3	4	3	6	9	4	2	3	4
<i>Lb. plantarum</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+

(2) スズキからの分離実験

スズキ腸管を前腸、中腸、後腸に分け、内容物および粘膜を各培養法に供した。得られた分離株をクリアゾーン形成試験に供した結果、乳酸菌様株を 5 株選別することができた。

(3) コケからの分離実験

アユの摂餌跡のある石を 2 つ採取し、コケをこすり取ったものを懸濁した液を 1 および 2 とした。また、1 の石に付着したアユが摂餌していないと思われる比較的大きな藻類を 3 として各培養法に供した。培養後は得られた分離株をクリアゾーン形成試験に供して乳酸菌様株を選別した。これらは日本大学へ行き、DNA 解析を行ったが失敗した。また、乳酸菌様株を継代培養の失敗により死滅させてしまったため、実験終了となった。

4. 考察

アユ由来株を性状試験に供した結果、高い塩分耐性および温度耐性を有していたことから、アユ由来乳酸菌は発酵食品の製造など、産業利用できる可能性が考えられる。また、本研究ではアユから乳酸菌である *Lb. plantarum* の分離に成功した。アユ由来乳酸菌分離の報告は今までに無く、研究結果より新たな乳酸菌の分離源として適している可能性が示唆された。

スズキから乳酸菌用株の選別ができたことも新たな乳酸菌の分離源として適している可能性が示唆される。

加えて、コケ由来乳酸菌様株は塩基配列を明らかにし、アユ由来株と比較することで分離源の同一性を明らかにできる可能性がある。

5. 今後の予定

今後は、得られたアユ由来乳酸菌を用いた発酵食品の製造を行う予定である。アユ由来 *Lb. plantarum* および *Lc. garvieae* の両株を用いてヨーグルトの製造を行い、比較することで産業利用の可能性を広げていきたい。また、チーズも作製する予定であり、レンネットおよび乳酸を用いることで、製造時の違いを見ていきたい。

アユ由来 *Lc. garvieae* の表現形質も明らかにしていくことに加えて、再度コケからの乳酸菌株の分離を試み、コケ由来乳酸菌様株と同時にスズキ由来乳酸菌様株の DNA 解析および各種性状試験に供する予定である。

謝辞

本研究の遂行にて様々なご指導を賜った増殖環境学研究室の杉田治男教授ならびに糸井史朗准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は東和食品研究振興会の学術奨励金による助成を賜っています。