

[ 研究区分 : 学際的・先端的研究 (A) ]

研究テーマ : 広島牛の乳汁における乳酸菌の分布およびその機能性に関する研究	
研究代表者 : 生命環境学部 生命科学科 准教授・津田治敏	連絡先 : tsudah@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者 :	
<b>【研究概要】</b> 和牛の乳汁から乳酸菌を分離・同定し、人工消化液耐性を調べた。今回分離・同定した <i>Lb. reuteri</i> PUHM1004 および <i>E. hirae</i> PUHM1011 は 0.3%Oxgall 含有 MRS 液体培地において 50%以上の生育度を示した。また、pH 2.0 に調整した人口胃液中で 3 時間後まで高い菌数を維持し、人工腸液中において菌数の増加が見られた。これらの菌株を経口摂取した際、胃および上部消化管内を生きのまま通過する可能性が高く、プロバイオティック食品および飼料への応用が期待できる。	

### 【研究内容・成果】

#### 【目的】

広島県北部は 1800 年代中期から、資質が極めて優良な岩倉蔓（あづまつる）と呼ばれる品種が飼育されていた土地である。ここでいう資質とは、農耕作業への使役に適し、乳汁の分泌量多く、多産であることを指す。現在では特に広島牛と呼ばれる神石牛や比婆牛をもとに作られた肉用和牛が肥育されている。広島牛の肉質の特徴としては筋繊維が細かく、脂肪が少ないことが挙げられるが、このような特徴には遺伝的な要因、飼料の種類および肥育環境などが影響することが知られている。しかしながら、乳汁中の細菌分布が和牛の肉質におよぼす影響に関する研究報告は無い。本研究では、和牛の肉質改善を目的として、飼料用機能性生菌添加剤に資する乳酸菌を広島牛の乳汁中から分離することを目的とした。

#### 【材料と方法】

##### 1. 和牛の乳汁

広島県内で飼育されている和牛の乳汁試料を 6 つ得た。いずれも分娩後 1 週間以上が経過した広島牛から搾乳した。乳汁は滅菌ボトルに入れ、冷蔵状態で実験室に運び入れ冷凍庫に保存した。

##### 2. 乳酸菌の計数

乳汁を無菌的に段階希釈し、希釈液 0.1 ml をそれぞれ BCP 加プレートカウントアガールに塗抹した。平板を 30℃で 72 時間培養し、周辺が黄変した集落を乳酸菌として計数した。

##### 3. 乳酸菌の釣菌

黄変集落を任意に釣菌し、液体培地および寒天培地を用いて純化した。得られた菌株をグラム染色およびカタラーゼ試験に供し、グラム陽性でカタラーゼ陰性の細菌を乳酸菌とした。得られた菌株は生理学および生化学的試験に供し菌種の同定を行った。

##### 4. 乳酸菌の同定

同定試験として、形態観察、温度生育性、耐塩性、アルギニンの分解能、乳酸旋光性、発酵形式および糖類発酵性などの生理学および生化学的試験を行い同定した。また、16S rDNA の塩基配列を解析し、菌種の同定を行った。

##### 5. 胆汁酸耐性試験

ウシ胆汁末である oxgall を 0.3%含む MRS 培地での生育性を、通常の MRS 培地での生育性と比較することで胆汁酸耐性を評価した。

## 6. 人工胃液耐性試験

ペプシンを含む人工胃液を調製した。pH は 4.0, 3.0 および 2.0 に調整した。これらの人工胃液に乳酸菌を接種し, 3 時間後までの菌数変化を経時的に測定し, 人工胃液への耐性を評価した。

## 7. 人工腸液耐性試験

人工胃液で処理した乳酸菌をトリプシンを含む人工腸液に接種し, 嫌気条件下で培養した。嫌気条件はアネロパックを用いて達成した。培養 18 時間後の菌数を測定し, 人工腸液への耐性を評価した。

## 【結果と考察】

### 1. 乳酸菌数

乳汁における乳酸菌数は平均  $5.2 \times 10^1$  CFU/ml であった。最も多い試料で  $1.1 \times 10^2$  CFU/ml であり, 乳酸菌が検出されない試料が複数存在した。乳酸菌が検出されなかった試料については増菌培養を行い, 乳酸菌の分離を行った。

これまでの報告によれば, 牛乳中の乳酸菌数は  $1.0 \times 10^1$  から  $8.0 \times 10^3$  CFU/ml 程度であることから, 本実験で得られた乳酸菌数は平均的な値であると考えられた。

### 2. 乳酸菌の分離・同定

合計で 21 株の乳酸菌を分離した。得られた乳酸菌は生理学および生化学的諸性状ならびに 16S rDNA の解析結果から, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus garviae*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Weissella thailandensis* および *Pediococcus pentosaceus* と同定した。

上記の菌種のほとんどはウシの乳汁から分離された報告がこれまでにあるものの, *Lb. reuteri* および *W. thailandensis* が分離されたという報告はほとんど無い。この 2 菌種はそれぞれ一つの乳汁から検出されたものである。そのため, これらの菌が広島和牛に特有のものか, 飼育方法によるものかは今のところ不明である。

### 3. 人工消化液耐性試験

*Lb. reuteri* PUHM1004 および *E. hirae* PUHM1011 は 0.3%Oxgall 含有 MRS 液体培地において 50%以上の生育度を示した。

胆汁酸耐性は生きたまま消化管を通過するために必要な性質である。胆汁酸は界面活性効果を有し膜脂質を分解することで殺菌作用を示す。今回使用した 0.3%Oxgall 濃度はヒトの胆汁中の胆汁酸濃度 3.0%に相当する。一般にヒトの胆汁酸濃度は 1.5 ~ 2.0%程度とされているため, 本試験で 50%以上の生育度を示したこの 2 株をヒトが摂取した場合, 胆汁酸に耐性を示し下部消化管に到達する可能性が高い。

*Lb. reuteri* PUHM1004 および *E. hirae* PUHM1011 は pH 2.0 に調整した人工胃液中で 3 時間後まで高い菌数を維持し, 人工腸液中において菌数の増加が見られた。

空腹時の胃内の pH は約 1~2 程度とされ, 摂取した食物はおおよそ 2~4 時間かけて胃を通過する。そのため, pH2.0 の人工胃液において 3 時間後まで高い菌数を示したこの 2 株は空腹時摂取した場合でも生きて胃を通過する可能性が高い。

以上のことから, これらの菌株を経口摂取した際, 胃および上部消化管内を生きたまま通過する可能性が高く, プロバイオティック食品および飼料への応用が期待できる。