

石川県立大学 生物資源環境学部 食品科学科

研究代表者：松本健司

共同研究者：小柳喬

研究題目：石川県発酵食品から単離した乳酸菌が産生する菌体外多糖(EPS)の機能解析

近年、乳酸菌の産生する菌体外多糖 (EPS) が免疫調節や抗菌作用などの生理作用を有しているほか (Carbohydr Res, 2013; Carbohydr Polym, 2013)、EPS 産生乳酸菌の食品加工分野での利用が盛んに行われるようになり (Torino et al., Front Microbiol, 2015)、生理活性と食品加工分野への応用について乳酸菌が産生する EPS が注目を集めている。我々は石川県の発酵食品を中心に乳酸菌を単離し、現在 500 株程度の乳酸菌ライブラリーを保持している。本研究において、これらの乳酸菌から EPS 産生株を選抜し、その化学構造の分析と機能解析を試みた。

### 1. EPS 産生菌の単離

EPS 産生菌はスクロース存在下で粘性の高いコロニーを形成することから、MRS 寒天培地に 5%スクロースを添加し、30°Cで嫌気的な条件で培養し、各乳酸菌株の EPS 産生の有無を調べた。その結果、92 株の EPS 産生菌を単離することができ、そのほとんどが EPS 産生菌として多数報告のある *Leuconostoc* 属であったが、1 株のみ報告のなかった *Pediococcus ethanolidurans* であり、新規の EPS 産生菌を単離することが出来た。

### 2. EPS 産生菌の胃酸・胆汁酸耐性

免疫調節や脂質代謝に対する健康増進効果を期待して EPS を利用する際、EPS の収量の観点から菌体そのものをプロバイオティクスとして利用の方が効率的な場合がある。プロバイオティクスとして利用可能な有用菌の特徴の一つに胃酸・胆汁酸耐性があることから、単離した EPS 産生菌において、EPS が胃酸・胆汁酸耐性に関与しているかどうかを検討した。その結果、スクロース培地で調製した EPS 産生菌体、および通常の MRS 培地で培養した EPS をほとんど産生していない菌体の双方で、大きな耐性の違いは無く、耐性が高い菌株は、EPS 産生の有無にかかわらず高い耐性を持っており、耐性のない株が EPS を産生することによって耐性を獲得することはなかった。このことから、胃酸・胆汁酸からの菌体の保護には EPS は関与しないと考えられる。

### 3. <sup>1</sup>H-NMR による EPS のグリコシド結合様式の解析

これまでの研究で、*Leuconostoc* 属の産生する EPS は、group I~IV の 4 種に分かれる

ことが報告されている(図1. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 10889-10897)。本研究で EPS の機能解析を行うにあたり、EPS の構造を明らかにし、構造と機能性の活性相関を明らかにしたいと考え、得られた EPS の  $^1\text{H-NMR}$  による EPS のグリコシド結合様式の解析を行った。

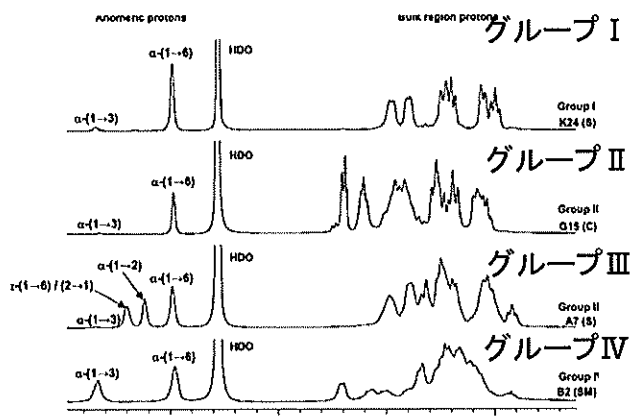


図1.  $^1\text{H-NMR}$  解析による EPS のグリコシドの結合様式 (*J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 10889-10897 より引用)

構造解析に十分な量の EPS が得られた 22 株について解析した結果を表 1 に示す。

表 1.  $^1\text{H-NMR}$  による EPS の分類

分離源	菌種名	株数	グループ	グリコシド結合様式の割合 (%)		
				$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)	$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)	$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)
自家製きゅうりの漬物	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	6	グループ I	80~90	-	10~20
		1	グループ II	-	-	-
	<i>Leuconostoc</i> sp.	1	グループ I	-	-	-
自家製漬物	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2	グループ I	88	-	12
		1	グループ II	-	-	-
きゅうりの糠漬け	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	グループ I	-	-	-
		3	グループ II	89	-	11
	<i>Leuconostoc citreum</i>	1	グループ II	90	-	10
	<i>Leuconostoc</i> sp.	1	グループ I	92	-	8
かつお大根	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2	不明	-	-	-
	<i>Leuconostoc</i> sp.	1	グループ III	67	21	12
さくらべつたら	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	1	グループ I	77	-	23
山菜	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1	グループ II	-	-	-
デキストラン(市販品)	-	-	グループ I	87	-	13

グループIVに該当する EPS は得られなかったが、グループ I~IIIまでの EPS といずれのグループにも属さない EPS (かつお大根由来 *Leuconostoc mesenteroides*) が確認できた。

#### 4. 各 EPS の免疫系、生活習慣病予防効果に対する影響

$^1\text{H-NMR}$  による解析で明らかになったグループの異なる EPS について検討を行う予定

であったが、動物実験に十分な量の EPS が平成 28 年度には間に合わなかったため、現在、大量培養により EPS を作成している。今後、マウスを用いた実験により、各 EPS の生体への機能を明らかにするとともに化学構造との活性相関について解明する。