

氏名	MD. HARUN-UR-RASHID
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博甲第3274号
学位授与の日付	平成18年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科生命分子科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Study on identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk 'Dahi' in Bangladesh (バングラデシュの伝統的発酵乳ダヒから分離した乳酸菌の同定と特性に関する研究)
論文審査委員	教授 宮本 拓 教授 泉本勝利 教授 坂口 英

### 学位論文内容の要旨

Two hundred-sixty-six strains of lactic acid bacteria were isolated from 28 traditional fermented milk 'Dahi' samples in Bangladesh that were comprised of six genera of *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* and *Pediococcus*, and twelve species of *Streptococcus bovis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus* species, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus raffinolactis* and *Pediococcus pentosaceus*. Among them, *S. bovis* (47.0%), *Lb. fermentum* (12.4%), *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (10.5%), and *Ec. faecium* (9.4%) were represented as the dominant species.

Twelve selected LAB strains were evaluated for their probiotic properties on basis of their fermentation patterns, acid and bile acid tolerance, and ACE inhibitory and antimicrobial activities. Highest ACE inhibitory activity (72.09±1.07%) was found in skim milk fermented with *S. bovis* J2 40-2. This strain also showed strong antilisterial activity in particularly, against *Listeria monocytogenes*, however, exhibited lower bile acid tolerance. Both of higher ACE inhibitory activity and bile acid tolerance were expressed by *Lb. fermentum* B5 40-2 and *Ec. faecium* D3 25-1. Though, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* M3 40-3 exhibited more tolerance at acidic medium.

Bacteriocin from *S. bovis* J2 40-2 exhibited narrow inhibitory spectra, was active at wide ranges of pH and was heat stable. It was sensitive to several proteolytic enzymes. Optimum bacteriocin production was obtained in MRS medium at 37°C for 24 h cultivation. Eliminating and/or substituting the components of MRS medium showed the variable effects on bacteriocin production, but no bacteriocin production was observed in the absence of Tween 80. The active fraction of bacteriocin was obtained by using (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> precipitation (80% saturation), dialysis (3,500 MW Cut-off dialyzer), Sephadex G-25 gel filtration and SDS-PAGE.

In conclusions, results obtained from this study suggest that bacteriocin-producing strain *S. bovis* J2 40-2 should be used as food biopreservations or as protective starter culture in dairy fermentations. Another strains of *Lb. fermentum* B5 40-2 and *Ec. faecium* D3 25-1 might be used as probiotic starter in food industries.

## 論文審査結果の要旨

本研究ではバングラデシュの伝統的発酵乳ダヒに含まれる乳酸菌の同定と特性を明らかにし、ダヒの品質や製造技術の開発に資することを目的とした。まず、バングラデシュの4地域から自家製ダヒの28試料を収集し、成分的ならびに衛生的品質を評価した。次に、ダヒの主要な構成乳酸菌を調べるために、凍結乾燥したダヒ試料をリトマスミルクに接種し、20℃と40℃で増菌培養後、中温性あるいは高温性乳酸菌をBCP加プレートカウント寒天培地の混釈平板から分離した。266株の分離乳酸菌について、それらの生理・生化学的性状や16SrDNAの塩基配列の解析等によって同定をしたところ、*Streptococcus bovis*, *Str. thermophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb.delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lb.species*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *Leuc. mensenteroides* ssp. *dextranicum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lc.raffinolactis* and *Pediococcus pentosaceus* などの乳酸菌が優勢な菌種であった。

選択した代表的乳酸菌種12株の酸および胆汁酸耐性、ACE阻害活性ならびに抗菌活性などの性状に基づき、プロバイオティクスとしての特性を評価した。その結果、酸および胆汁酸耐性に優れた菌株がある一方で、胆汁酸耐性能は比較的低いものの、脱脂乳の培養ろ液で高いACE阻害活性を持つ *Streptococcus bovis* J2 40-2 があった。この菌株は *Listeria monocytogenes* VTU206 に対して強い抗菌活性を示した。*Streptococcus bovis* J2 40-2 の生産する抗リステリア性バクテリオシンは抗菌スペクトルが狭かったが、熱に対して安定で、広い範囲の pH で抗菌活性を示した。バクテリオシンの生産性は培地の成分によって影響され、MRS 培地を使用した時に高まった。特に、ツイン 80 を含まない MRS 培地では抗菌活性が見られなかった。硫酸分画、透析、ゲルろ過および SDS-PAGE によって、バクテリオシンの活性画分を得た。

以上のように、バングラデシュの伝統的発酵乳ダヒの乳酸菌フローラを調べると共に、抗菌性乳酸菌あるいはプロバイオティック乳酸菌の特性を明らかにした。これらの研究成果は、今後、バングラデシュの発酵乳製品の開発における加工技術の発展に資するところが大きいと考えられる。したがって、学位審査委員会は、本論文が博士(学術)の学位に値するものであると判断した