◇◇◇◇ 原著論文 ◇◇◇◇

フルクタン資化性乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* S506 株の 分離とニンニク発酵食品への応用

草野崇一^{1,†}, 田村弘司¹, 岡崎勝一郎²

¹ 富士産業株式会社 研究開発センター, ² 香川大学農学部 応用生物科学科

Isolation of the Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus plantarum* S506 Strain with Fructan Utilizing Ability and Application of it to Foods Containing Fermented Garlic

Shuichi KUSANO^{1,†}, Hiroshi TAMURA¹, Katsuichiro OKAZAKI²

¹ Research and Development, Fuji Sangyo Co., Ltd., 1301 Tamura, Marugame-shi, Kagawa 763-0071, Japan,

² Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2393 Miki, Kagawa 761-0795, Japan

Lactic acid bacteria primarily perform lactic acid fermentation by utilizing monosaccharides such as glucose. However, the polysaccharide fructan, which is the main component of garlic, generally cannot be fermented. We recently investigated fructan-utilizing bacteria to create lactic acid bacteria-fermented garlic food and isolated the *Lactobacillus plantarum* S506 strain from pickled shallots. We were able to efficiently perform lactic acid fermentation with the S506 strain using garlic fructan as the only source of carbohydrate. The fermented garlic extract obtained with the isolated S506 strain as a starter markedly increased interleukin-12 (IL-12) production, an indicator of innate immune enhancement, in experiment using J774.1 macrophage-like cells derived from BALB/c mice. The main active ingredient in this IL-12 production-promoting action was suggested to be a component newly generated through fermentation. This lactic acid bacteria-fermented garlic food with a newly added immunological function is expected to be useful for maintaining health.

Keywords: garlic, fermentation, fructan, *Lactobacillus plantarum*, interleukin-12

1. 緒 言

ニンニクは古来より滋養強壮作用があるといわれ、また、食欲をそそる香味を与えることから様々な料理に用いられている。また、ニンニクにはがん予防効果 [1] や心疾患改善作用 [2]、血圧降下作用 [3]、血中脂質改善作用 [4]、抗菌作用 [5] など様々な生理機能も報告され、健康維持に役立つ素材として知られている。

ニンニクの成分としてはビタミン、ミネラルの他に含硫黄化合物を豊富に含んでいるが、主成分は炭水化物であり、僅かな単糖の他はフルクトースが重合した難消化性多糖類のフルクタンがほとんどである。一方、乳酸菌はグルコースなどの単糖類やマルトース、トレハロースなどのオリゴ糖は資化するが難消化性多糖類のフルクタンは一般的に資化できない [6]。したがって、ニンニクの乳酸菌発酵食品はほとんど出回っていない。

そこで我々は新しい生理機能の付与されたニンニク発酵食品を作ることを目的とした。まず、ニンニクフルクタンを資化することのできる果実や食用植物から乳酸菌の探索を行った。良好な資化性を示した植物素材からフルクタン資化性菌の分離・同定を行い、実際に分離した乳酸菌をスターターとしてニンニクの乳酸菌発酵食品を調製した。さらに、得られた発酵ニンニクについて健康維持のために役立つ生理機能について検討した。

2. 実 験 方 法

2.1 フルクタン資化性乳酸菌の分離プレートの調製

生ニンニク 1 kg に水 5 L を加えて 80℃ で 1 時間加熱した。煮汁を捨て、ニンニクに新たに約 700 mL の水を加えて、ホモジナイズした。得られたホモジネートから 7,730×g、30 分の遠心分離により不純物を取り除き、ニンニクエキスをした後、凍結乾燥粉末を得た。この粉末 100 g を水 200 mL に再溶解し、800 mL のエチルアルコールを添加、攪拌し 1 夜放置した。7,730×g、30 分の遠心分離により上清を除き 100% エチルアルコール

(受付 2014 年 12 月 25 日, 受理 2015 年 4 月 1 日)

1 〒763-0071 香川県丸亀市田村町 1301

2 〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393

† Fax: 0877-25-0567, E-mail: s_kusano@fuji-sangyo.co.jp

で洗浄して、再度同様に遠心分離を行い、得られた沈殿物をニンニクフルクタン高含有粉末（ニンニクフルクタン）とした。フルクタン資化性菌分離に用いるニンニクフルクタンプレートはニンニクフルクタン 5%、寒天 1% にブロムクレゾールパープル 0.006%, CaCO_3 0.5% を加えて調製した。

2.2 ニンニクフルクタン発酵能を有する乳酸菌の選抜

約 40 種の果実および食用の植物類についてフルクタン資化性乳酸菌のスクリーニングを試みた。発酵に用いる菌の多くは耐酸性、耐塩性であることが多いため、終濃度が 5% ニンニクフルクタンを含む 0.5% 乳酸または 5% NaCl 濃度となる溶液にスクリーニング素材を浸漬し、30℃ で経日的に 1 週間後まで観察を行い、溶液の白濁がみられるかどうかにより発酵性を評価した。発酵性を示した培養液はニンニクフルクタンプレートに塗布し、単コロニーを得て、コロニーの生育速度や性状から釣菌し、純粋培養により分離株を得た。

2.3 フルクタン資化性能の確認

分離株をニンニクフルクタン粉末 20 g に水 150 mL を加えた溶液中で 30℃、2 日間培養した。その後、さらに 2 日間（計 4 日間）培養を行うか、もしくは、約 1 g のカキガラ粉末（日本粉末薬品株式会社製）を添加した後さらに 2 日間（計 4 日間）培養を行った。これらの試料を薄層クロマトグラフィ（TLC）にて分離して、フルクタン分解の程度を確認した。TLC の展開溶媒は酢酸エチル、酢酸、メタノール、水（12:3:3:2）からなる組成を用いた。展開後、薄層を乾燥させ、アニス試薬（アニスアルデヒド：硫酸：エタノール=1:1:18）により呈色させ、各スポットを確認した。

2.4 分離株の形質、同定

分離株を乳酸菌に良好な培地である MRS 寒天培地に植菌し、30℃ で 48 時間嫌気培養した後、生育した菌体の細胞形態、運動性、発酵形式、グラム染色、生育温度を検討した。また、16S rDNA の塩基配列約 1,500bp を決定し、配列データを国際塩基配列データベースに登録した（Accession number LC03213）。その配列を用いて塩基配列データベースに対して相溶性検索を行った。相溶性検索の結果から推定される近縁菌群の基準株由来の 16S rDNA 配列を取得して検体の 16S rDNA 配列を含めた分子系統解析を行い、検体の帰属分類群を決定した。追加試験として糖資化性試験を実施した。なお、DNA 塩基配列・分子系統解析および各種糖の資化性試験は株式会社テクノスルガ・ラボ（静岡）依頼した。

2.5 分離株を用いたニンニクエキスの発酵

菌体の調製は保存分離株を TYG 培地のグルコースを

フルクトースに変更した少量の TYF 培地（酵母エキス 0.5%, トリプトン 1%, フルクトース 1%, NaCl 0.5%）に植菌し 30℃ にて一晚培養した。拡大培養を行うため、この培養液を新たな TYF 培地に再度植菌し 30℃ にて 8 時間培養した。得られた培養液から沈殿物を菌体として回収して生理食塩水で洗浄し、ニンニクの発酵スターターとした。

発酵スターターを生ニンニクジュースの 40,000×g、30 分間遠心分離の後、0.2 μm フィルタでろ過した溶液（生ニンニク搾り汁）および 80℃ で 1 時間加熱処理した上記ニンニクエキスを植菌して各々の発酵エキスを調製した。培養は 30℃ でおこなった。経日的に pH を測定し、カキガラ粉末を添加して pH を 5 付近に保った。両エキスの発酵ともフルクタンがほぼ消滅した 14 日後まで培養を行った。

2.6 分離株を用いたニンニク発酵エキスのマクロファージ活性化能の測定

BALB/c マウス由来マクロファージ様細胞株 J774.1（理研バイオリソースセンターより分譲）を用い、インターロイキン-12（IL-12）産生を指標としたマクロファージ活性化能の測定を行った。J774.1 細胞は 37℃ の 5% CO_2 インキュベーター内で 10% FBS 添加 RPMI-1640 培地を用い継代培養した。継代培養した J774.1 細胞を 1.2×10^4 cells/well となるように細胞懸濁液 100 μL ずつ 96 穴平底プレートに撒いた。細胞がウェルの底に接着して伸展した 3 時間後、被検物を添加した。被検物として加熱処理ニンニクエキス末およびその発酵エキス末を用いた。両エキスとも細胞に添加する前に沸騰浴中で 5 分加熱殺菌処理した。被検物は終濃度が 100 $\mu\text{g/mL}$ なるように添加したものを最高用量とし、さらに、濃度を下げた 50 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ の用量について試験した。陽性対照物としてリボ多糖（LPS、和光純薬社製）を終濃度 100 ng/mL の濃度で用いた。24 時間培養後、各ウェルから培養上清 25 μL あるいは 50 μL を用いて IL-12 の測定を行った。IL-12 測定は Mouse total IL-12 ELISA kit（Thermo Scientific 社製）を用いて酵素免疫法で測定した。

3. 実験結果

3.1 ニンニクフルクタン資化性菌の選抜と分離

フルクタン資化性乳酸菌のスクリーニングを試みた結果、ニンニクと同属であるラッキョウの塩漬けによりニンニクフルクタン培養液を白濁させるとともに pH を低下させ、最もよく発酵することを認めたため、その乳酸菌の分離を試みた。乳酸菌の分離はニンニクフルクタンプレートにより行った。分離した株のなかからさらに選抜を行うため、生のニンニク搾り汁溶液のみを栄養源と

した培養液を用いて最も発酵性の良いものを選択し、ニンニクフルクタン発酵に適した乳酸菌を選抜した。

その結果、ひとつの乳酸菌がニンニク搾り汁溶液のみを栄養源とした培地で、栄養豊富な培地に引けをとらない、良好な生育を示した。さらにクローニングを行って安定形質分離株 (S506 株) を手に入れた。分離株 S506 株についてニンニクフルクタン培地での資化性を検討した結果を Fig. 1 に示す。2 日後および 4 日後、大きな変化は示されなかったが、2 日経過後にカキガラ粉末を添

Fig. 1 Fructan utilization by the isolated S506 strain.

The isolated S506 bacterial cells were added to a culture medium containing 20 g of garlic fructan powder diluted in 150 mL of water and cultured at 30°C. After 2 days, the cells were cultured for another 2 days (a total of 4 days) without any change or after adding approximately 1 g of oyster shell powder. These samples were subjected to thin-layer chromatography (TLC) with a solvent system comprising ethyl acetate, acetic acid, methanol, and water (12:3:3:2), and each spot was colored by anise reagent (anisaldehyde:sulfuric acid:ethanol=1:1:18). Lane 1, fructose; lane 2, fructan; lane 3 to 6, S506 cells were cultured for 0 hr (lane 3), 2 days (lane 4), 4 days (lane 5) and 4 days in addition of oyster shell powder (lane 6).

加して pH 3.9 から 5 付近にまで上げたものでは、3 日経過後に生菌数は 10^9 cells/mL レベルにまで増殖し、4 日経過後にはニンニクフルクタンの分解が進んだ。

これらのことから、S506 株がニンニクフルクタンを資化することが確認された。そして、とくに、酸性に傾かない条件にて、ニンニクフルクタンを資化することが示された。

3.2 分離株 S506 株の形態、同定

得られた安定形質分離株 S506 株の細胞形態は桿菌 ($0.7\sim0.8\times1.5\sim2.0\ \mu\text{m}$) であり、グラム染色では陽性を示した。コロニー色調は乳白色であった。また、本菌株は、通性嫌気性の有機酸産生菌で無芽胞、直径 1~2 mm の淵のはっきりしたコロニーを形成し、運動性はなかった。

16S rDNA 塩基配列はテクノスルガ・ラボ細菌基準株データベースに対する相同性検索で *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. paraplantarum* に 99% 以上の高い相同性を示した。国際塩基配列データベースに対する相同性検索においても、S506 株の 16S rDNA 塩基配列は *L. pentosus*, *L. plantarum* に対して高い相同性を示した。これらのことから S506 株は *L. pentosus*, *L. plantarum* などに非常に近縁であると考えられた。そこで上記の種を中心に、*Lactobacillus* 基準株由来の 16S rDNA 配列を取得し、分子系統樹を作成した (Fig. 2)。分子系統解析の結果、*L. plantarum*, *L. pentosus*, もしくは *L. paraplantarum* と同一の系統枝を形成し、さらにこれら 3 種で系統解析を行った結果、S506 株は *L. plantarum* あるいは *L. pentosus* と推定された。

各種糖類資化性試験を細菌検査同定用キット AP150CHL (bioMeriux 社製) を用い、培地として MRS 寒天培地を用い、培養温度は 30°C、培養期間は

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the isolated S506 strain using 16S rDNA sequences.

The numbers near branch nodes are bootstrap values, and the bottom left line is the scale bar. The T at the end of the strain name indicates that it is the type strain of the species. The S506 strain is expressed as SIID4172-01.

24 時間, 嫌気培養の条件で行った. その結果, S506 株は, 26 種類の糖 (L-アラビノース, リボース, ガラクトース, グルコース, フラクトース, マンノース, ソルボース, マンニトール, ソルビトール, N-アセチルグルコサミン, アミグダリン, アルブチン, エスクリン, サリシン, セロビオース, マルトース, ラクトース, メリビオース, サッカロース, トレハロース, イヌリン, メレチトース, ラフィノース, ゲンチオビオース, D-ツラノース, グルコネート) を資化したが, 23 種類の糖 (グリセロール, エリスリトール, D-アラビノース, D-キシロース, L-キシロース, アドニトール, β -メチル-D-キシロシド, ラムノース, ズルシトール, イノシトール, α -メチル-D-マンノシド, α -メチル-D-グルコシド, デンブリン, グリコーゲン, キシリトール, D-リキソース, D-タガトース, D-フコース, L-フコース, D-アラビトール, L-アラビトール, 2-ケトグルコネート, 5-ケトグルコネート) を資化しなかった. また, S506 株は 15°C での生育性を示した. これらの性質は *L. pentosus*, *L. plantarum* の内, *L. plantarum* の性状と一致するものであった. また, グリセロール, D-キシロースおよびズルシトールを資化しない点において, *L. pentosus* と異なった. よって, 上記 16S rDNA の塩基配列を用いた系統解析結果と各種糖の資化性試験の結果から, S506 株は, *Lactobacillus plantarum* に属する新規の乳酸菌株であると同定された.

本菌株は, フルクトタンを資化する点で特徴的な乳酸菌であり, フルクトタン含有原料の発酵菌として非常に有用である. 本研究で分離された乳酸菌株である *Lactobacillus plantarum* S506 株は, 平成 20 年 9 月 2 日付で, 「受託番号 NITE BP-643」として, 独立行政法人製品評価技術基盤機構に寄託されている.

3.3 分離した *L. plantarum* S506 株によるニンニクエキスの発酵

Lactobacillus plantarum S506 株のニンニクフルクトタン資化性については Fig. 1 において資化性が確認されているが, 生ニンニク搾り汁および加熱処理ニンニク発酵エキスにおいてそのフルクトタン資化性を TLC 分析により確認した. 両エキスともにカキガラ粉末を添加して pH を 5 付近に調整することによりフルクトタンはほぼ消失した. Fig. 3 に生ニンニクの発酵後の TLC 分析結果を示す. 発酵後には, 原点のフルクトタンがほぼ消失し, 代わりにフルクトースの生成が示された. さらに, F キット (J.K.International 社製) を用いてフルクトースを定量した. その結果, Fig. 3 におけるカキガラ添加の発酵生ニンニクの培養液中においてのフルクトース含量は, 発酵前の 1.1mg/mL から 20.9mg/mL へと増大し, フルクトースの生成が確認された.

Fig. 3 TLC analysis of compositions of raw garlic by lactic acid fermentation with the S506 strain.

The S506 strain cultured in TYF medium consisting of 0.5% yeast extract, 1% tryptone, 1% fructose, and 0.5% NaCl was added as the starter to raw garlic juice and then cultured for 14 days at 30°C. Lane 1, fructose; lane 2, raw garlic; lane 3, fermented raw garlic.

3.4 発酵ニンニクの J774.1 マクロファージ IL-12 産生促進作用

得られた発酵ニンニクの生理機能について検討した. Fig. 4 に発酵ニンニク, 未発酵ニンニクおよび LPS の各濃度における, マクロファージからの IL-12 産生能を調べた結果を示す. 発酵ニンニクは濃度依存的に IL-12 産生が増強し, 未発酵ニンニクはいずれの濃度においても IL-12 産生は認められなかった.

Fig. 4 Effect of fermented and non-fermented garlic on the IL-12 production-promoting action of J774.1 macrophages.

J774.1 cells were seeded in each well of a 96-well, flat-bottomed plate at 1.2×10^4 cells/0.1 mL/well, allowed to adhere to the bottom of the wells, spread for 3 h, and then fermented, non-fermented garlic or LPS (100ng/mL) was added. After culturing for 24 h, IL-12 in the culture supernatant from each well was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay. Data are shown as means $\pm$ standard deviation ($n=3$).

次に、この免疫賦活作用について、増殖した S506 株によるものなのか、あるいは S506 株以外の発酵により新たに生成した成分によるものなのかを検討するため、Fig. 5 に示すように S506 株単独と S506 株を同数に調製した発酵ニンニクにおいて IL-12 産生能を比較した。S506 株は上記 TYF 培養液から得られた S506 株を用いた。血球計算版を用い、培養液中に S506 株あるいは発酵ニンニク中の S506 株が 6×10^4 , 3×10^5 , 1.5×10^6 cells/well となるように各々の被験物を添加した。24 時間後に培養液中の IL-12 含量を測定した。結果を Fig. 5 に示す。図に示されるように S506 株単独においても IL-12 産生能が示されたが、同じ菌数濃度の発酵ニンニクは濃度依存的に顕著な IL-12 産生能を示した。

さらに、得られた発酵ニンニクについて、免疫賦活作用が可溶性成分であるのかあるいは不溶性成分であるのかを検討するため、遠心分離後の上清と沈殿物について活性比較を行った。発酵ニンニク最終濃度 100 $\mu\text{g/mL}$ と同条件で遠心分離された上清と沈殿物の被検物を上記同様に J774.1 細胞培養液に添加して 24 時間後の培養液中の IL-12 含量を測定した。Fig. 6 に示すように、IL-12 産生能は沈殿物においてのみに示された。

4. 考 察

乳酸菌はヨーグルト、ぬか漬、醤油、味噌などの発酵食品にたくさん含まれ、発酵過程に深く関与して

Fig. 5 Effect of fermented garlic using J77.1 macrophages and the S506 strain on the IL-12 production-promoting action of J774.1 macrophages.

J774.1 cells were seeded in each well of a 96-well, flat-bottomed plate at 1.2×10^4 cells/0.1 mL/well, allowed to adhere to the bottom of the wells, and spread for 3 h. The S506 strain alone or the S506 strain in fermented garlic was added to the culture at 6×10^4 , 3×10^5 , and 1.5×10^6 cells/well. After culturing for 24 h, IL-12 in the culture supernatant from each well was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay. Data are shown as means $\pm$ standard deviation ($n=3$).

いる [7]. また、乳酸菌は腸内に住み着いて整腸作用 [8-10] や免疫賦活作用 [11-13] を有し、健康に対して有用な作用をもっている。

一般的に乳酸菌は単糖類や一部のオリゴ糖を好んで資化するが多糖類のフルクタンに対しては資化できない [6]. したがって、フルクタンが主成分であるニンニクについてはこれまで乳酸発酵食品はほとんど出回っていない。A. de Castro ら [14] は、生ニンニクを 90°C 15 分のブランチング処理したニンニクを用いて 7 日後に pH が 3.8 に低下し乳酸発酵したことを認めている一方で、ブランチング処理なしの生ニンニクについて発酵が進まなかったことを報告している。これはブランチングによるフルクタン分解物の一部が発酵したものと考えられる。我々はフルクタンそのものを効率よく資化する菌を見出してニンニク乳酸菌発酵食品を作ることを目指した。

スクリーニングの結果、ラッキョウ塩漬けから分離された乳酸菌 S506 株が最もニンニクフルクタンをよく資化した。フルクタンの構造についてはイヌリン型 ($\beta 2 \rightarrow 1$ 結合) とレバン型 ($\beta 2 \rightarrow 6$ 結合) が知られている。ラッキョウの主な糖質はフルクタンであるが、その構造は主にレバン型の $\beta 2 \rightarrow 6$ 結合をもつと考えられている [15]. 一方、ニンニクフルクタンは直鎖状のイヌリン型という報告がなされている [16]. ラッキョウ塩漬

Fig. 6 Effect of centrifuged supernatant and precipitate from fermented garlic on the IL-12 production-promoting action of J774.1 macrophages.

J774.1 cells were seeded in each well of a 96-well, flat-bottomed plate at 1.2×10^4 cells/0.1 mL/well, allowed to adhere to the bottom of the wells, and spread for 3 h. As test materials, 100 $\mu\text{g/mL}$ (final concentration) fermented garlic and centrifuged supernatant and precipitate at a concentration equivalent to 100 $\mu\text{g/mL}$ (final concentration) fermented garlic were added to the culture. After culturing for 24 h, IL-12 in the culture supernatant from each well was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay. Data are shown as means $\pm$ standard deviation ($n=3$).

け後は塩漬け前に比べフルクタン含量が低下することが知られ [15], ラッキョウにはラッキョウフルクタンを分解する乳酸菌の存在が示唆される。今回, 高いニンニクフルクタン発酵性が認められたラッキョウ塩漬け液からニンニクフルクタン資化性菌の分離・同定を行った。分離された S506 株は 16S rDNA の塩基配列を用いた系統解析および各種糖の資化性試験より, *Lactobacillus plantarum* に属する新規の乳酸菌株であると同定された。本菌は, フルクタンを資化する点で特徴的な乳酸菌である。本菌を用いて生ニンニクについて発酵を行うと, フルクタンがほとんど分解されフルクトースに変わることも確認された。したがって, 当初の目的のニンニク乳酸菌発酵食品を作ることに成功した。

次にこの乳酸菌発酵ニンニクについて, 生理機能を検討するため, 自然免疫の指標とされる IL-12 活性を指標に免疫賦活作用を検討した。BALB/c マウス由来 J774.1 マクロファージを用いて IL-12 産生能を測定した結果, 発酵前の未発酵ニンニクについては IL-12 産生能が示されなかったのに対して, 発酵後のニンニクについては濃度依存的に顕著な IL-12 産生促進作用を有することが示された。Sashihara ら [17] や Kato ら [18] は乳酸菌の免疫賦活作用について IL-12 促進作用を報告している。そこで, S506 株単独と発酵ニンニク中の S506 株の乳酸菌数を同数に調製し IL-12 産生能を検討した。その結果, S506 株単独において濃度が増大するにつれ IL-12 産生促進作用はやや増大したのに対し, 同条件での発酵ニンニクでは顕著な IL-12 産生促進作用が観察された。したがって, 発酵により生じた未知の成分が IL-12 産生促進作用に大きく関与していると考えられた。

発酵ニンニクを遠心分離して上清と沈殿物に分けて IL-12 産生能を測定した結果, 沈殿物にのみ IL-12 産生促進作用が示された。したがって, 有効性成分は水不溶性の成分と推定された。Dong ら [19] は, ニンニクから精製したレクチンタンパクについて, 本研究で示されたような IL-12 産生促進作用や INF- γ 産生促進作用をもつことを報告している。今回我々の試験においては未発酵ニンニクでの IL-12 産生は示されなかった。Dong らによると精製レクチンの IL-12 や INF- γ の産生促進作用は 0.25 mg/mL 以上の濃度で検討しており今回の試験では有効性を示す濃度に達していなかったことが考えられる。本研究においても, 沈殿物に分子量 3,200 程度のレクチンペプチドが含まれていることが示されており (データ未記載) 活性との関係を現在検討中である。さらに有効成分についても今後明らかにしていく必要がある。

以上のことから S506 株を用いた発酵ニンニクは新たに免疫賦活能が付与されており, 免疫賦活能を有する

食品素材としての利用が期待される。

5. 結 論

ニンニクの主成分は難消化性多糖類のフルクタンである。一般的にフルクタンに対して乳酸菌は資化することができないため, ニンニク発酵食品はほとんど出回っていない。我々はニンニクフルクタンを資化する乳酸菌の探索を行い, ラッキョウの塩漬けの中からニンニクフルクタン資化性乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* S506 株を分離・同定した。S506 株はニンニクフルクタンのみを糖質源として効率よく乳酸発酵することができた。S506 株を用いた発酵ニンニクエキ스는, マクロファージ様細胞株 J774.1 細胞に対して自然免疫強化の指標である IL-12 産生量を顕著に増大することを見出した。この IL-12 産生促進作用の主な有効成分は発酵により新たに生成した成分であることが推察された。本研究において分離・同定した *Lactobacillus plantarum* S506 株の性質が明らかにされ, またそのニンニク発酵食品の有用性が示された。

引 用 文 献

- 1) H. X. Cao, K. X. Zhu, J. G. Fan, L. Qiao; Garlic-derived allyl sulfides in cancer therapy. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **14**, 793-799 (2014).
- 2) E. Ginter, V. Simko; Garlic (*Allium sativum* L.) and cardiovascular diseases. *Bratisl. Lek. Listy*, **111**, 452-456 (2010).
- 3) Y. Nakasone, Y. Nakamura, T. Yamamoto, H. Yamaguchi; Effect of a traditional Japanese garlic preparation on blood pressure in prehypertensive and mildly hypertensive adults. *Exp. Ther. Med.*, **5**, 399-405 (2013).
- 4) I. A. Sobenin, I. V. Andrianova, O. N. Demidova, T. Gorchakova, A. N. Orekhov; Lipid-lowering effects of time-released garlic powder tablets in double-blinded placebo-controlled randomized study. *J. Atheroscler. Thromb.*, **15**, 334-338 (2008).
- 5) G. Goncagul, E. Ayaz; Antimicrobial effect of garlic (*Allium sativum*). *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, **5**: 91-3 (2010).
- 6) E. Sasaki, T. Shimada, R. Osawa, Y. Nishitani, S. Spring, E. Lang; Isolation of tannin-degrading bacteria isolated from feces of the Japanese large wood mouse, *Apodemus speciosus*, feeding on tannin-rich acorns. *Syst. Appl. Microbiol.*, **28**, 358-265 (2005).
- 7) T. Arima; Big incident in small world (Chiisana sekaino ookina dekgoto), *Seibutsu-kogaku*, **89**, 344 (2011).
- 8) C. M. Carey, M. Kozrzynska; Lactic acid bacteria and bifidobacteria attenuate the proinflammatory response in intes-

- tinal epithelial cells induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Can. J. Microbiol.*, **59**, 9–17 (2013).
- 9) N. Pirarat, T. Kobayashi, T. Katagiri, M. Maita, M. Endo; Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **15**, 113, 339–347 (2006).
 - 10) S. Michail, F. Abernathy; *Lactobacillus plantarum* inhibits the intestinal epithelial migration of neutrophils induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **36**, 385–91 (2003).
 - 11) E. Kmonickova, M. Kverka, H. Tlaskalová-Hogenová, P. Kostecka, Z. Zidek; Stimulation of nitric oxide, cytokine and prostaglandin production by low-molecular weight fractions of probiotic *Lactobacillus casei* lysate. *Neuro Endocrinol. Lett.*, **33**, 166–172 (2012).
 - 12) L. Shao, Z. Wu, H. Zhang, W. Chen, L. Ai, B. Guo; Partial characterization and immunostimulatory activity of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* KF5. *Carbohydr. Polym.*, **107**, 51–56 (2014).
 - 13) G. Paturi, M. Phillips, K. Kailasapathy; Effect of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 and *Lactobacillus paracasei* LAFTI L26 on systemic immune functions and bacterial translocation in mice. *J. Food. Prot.*, **71**, 796–801 (2008).
 - 14) A. de Castro, A. Montañó, A. H. Sánchez, L. Rejano; Lactic acid fermentation and storage of blanched garlic. *Int. J. Food Microbiol.*, **39**, 205–211 (1998).
 - 15) K. Kobayashi, T. Saitou, K. Nishikawa, S. Inagi, S. Okada; “Characterization of the Rakkyo Fructans fermented by *Lactobacillus plantarum*” (in Japanese). *Jpn. J. Lactic Acid Bact.*, **11**, 4 (2000).
 - 16) N. D. Narendra, D. Amalendu; Structure of the D-fructan isolated from garlic (*Allium sativum*) bulbs. *Carbohydrate Res.*, **64**, 155–167 (1978).
 - 17) T. Sashihara, N. Sueki, K. Furuichi, S. Ikegami; Effect of growth conditions of *Lactobacillus gasseri* OLL2809 on the immunostimulatory activity for production of interleukin-12 (p70) by murine splenocytes. *Int. J. Food Microbiol.*, **120**, 274–281 (2007).
 - 18) I. Kato, K. Tanaka, T. Yokokura; Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon- γ by mouse splenocytes. *Int. J. Immunopharmacol.*, **21**, 121–31 (1999).
 - 19) Q. Dong, T. Sugiura, Y. Toyohira, Y. Yoshida, N. Yanagihara, Y. Karasaki; Stimulation of IFN- γ production by garlic lectin in mouse spleen cells: involvement of IL-12 via activation of p38 MAPK and ERK in macrophages. *Phytomedicine*, **18**, 309–316 (2011).

要 旨

乳酸菌は主にグルコースなどの単糖類を資化して乳酸発酵を行うが、ニンニクの主成分である多糖類のフルクタンは一般的に発酵できない。我々はニンニク乳酸菌発酵食品を作る目的で新たにフルクタン資化性菌を探索し、ラッキョウ塩漬けから *Lactobacillus plantarum* S506 株を分離した。S506 株はニンニクフルクタンのみを糖質源として効率よく乳酸発酵することができた。分離した S506 株をスターターとして得られた発酵ニンニクエキ스는、BALB/c マウス由来マクロファージ様細胞株の J774.1 細胞を使った試験において自然免疫強化の指標となるインターロイキン-12 (IL-12) 産生量を顕著に増大した。この IL-12 産生促進作用の主な有効成分は発酵により新たに生成した成分であることが推察された。このような新たな免疫機能が付与されたニンニク乳酸菌発酵食品は健康維持に役立つ食品として期待される。