

清涼飲料水中に添加した殺菌乳酸菌体の菌株判別手法の開発

青山 冬樹
アサヒ飲料株式会社

1. 目的

現在機能性表示食品制度を利用した食品において、機能性成分として特定の菌株を利用した場合、当該の菌株の定性、定量試験方法を開示する必要があり、またその定性、定量試験を第三者機関で実施可能である必要がある。乳酸菌を用いた発酵乳やヨーグルト等の場合、生きた乳酸菌の特異的検出培地と菌種や菌株に特異的な PCR などにより比較的容易に定性・定量が可能であることが多いが、乳酸菌が添加されて殺菌された清涼飲料水の場合は、添加した乳酸菌を単離培養することができない。また清涼飲料水の pH などの条件や殺菌などの加熱処理工程で菌体の核酸も損傷が進んでいくために、既存の菌株判別手法で定性分析を行うことは極めて難しい。そこで清涼飲料水中に添加した乳酸菌死菌体の菌株判別手法の開発を行った。

2. 方法

L. amylovorus CP1563 株, *L. gasseri* CP2305 株, *L. acidophilus* L-92 株の培養菌体および殺菌原料菌末、清涼飲料水中に添加した死菌体を集菌して核酸を抽出し、16S rDNA や主にタイピング用に使用されている 6 つのハウスキーピング遺伝子等の解析を行い、タイピングの可否やタイピングに必要な遺伝子の選抜を行った。また清涼飲料水中に添加した乳酸菌体の核酸を抽出し分解状況を確認した。それぞれの菌種ごとに菌株特異的な一塩基を解析できるように 100-400nt 程度の領域を増幅する複数のプライマーを設計しタイピング解析を実施した。

3. 結果

培養菌体および殺菌菌末においては、DNA を用いて既知の Primer にて 600bp 程度の遺伝子を解析することにより、タイピングを実施することが可能であったが、清涼飲料製品中に添加した乳酸菌体では DNA を対象としたタイピングを実施することができなかった。しかし RNA を対象として 400nt 程度の長さを増幅するプライマーを用いて解析を実施することでそれぞれの菌株を判別可能であることが分かった。また常温 1 年間の賞味期限相当の保存を行うと、保存中徐々に核酸が分解し、PCR による増幅・解析を実施することが出来なかった。核酸の分解状況を確認したところ 200nt 以下程度に分解されている事が分かった。そこで 100-200nt 程度の配列を増幅・解析するプライマーを設計し、各菌種とも 2-4 個の遺伝子の解析配列の系統樹解析を行った結果、既存の *L. amylovorus*, *L. gasseri*, *L. acidophilus* の各菌株を判別することが可能となった。また特定の *L. amylovorus* CP1563 株, *L. gasseri* CP2305 株, *L. acidophilus* L-92 株の菌株であれば、それぞれ 1-2 個の遺伝子を解析することにより、当該菌株だけを判別することが可能であることが分かった。以上の結果、本方法により清涼飲料水中に添加した乳酸菌体の菌株を判別することが可能となった。