

氏名 (本国籍)	Yolani Syaputri	(インドネシア共和国)
学位の種類	博士 (農学)	
学位記番号	農博甲第746号	
学位授与年月日	令和2年9月18日	
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻	
研究指導を受けた大学	岐阜大学	
学位論文題目	Role of Plantaricin Produced by <i>Lactobacillus plantarum</i> on Fermentation of Ishizuchi-kurocha and its Application in Post-fermented of Coarse Tea (Bancha) using the Artificially Fermented Method (石鎚黒茶の発酵における <i>Lactobacillus plantarum</i> 生産プラントリシンの役割と人工発酵法を用いた番茶の後発酵への応用について)	
審査委員会	主査 岐阜大学 教授	中川 智行
	副査 岐阜大学 教授	岩橋 均
	副査 静岡大学 准教授	徳山 真治
	副査 岐阜大学 准教授	稲垣 瑞穂

論文の内容の要旨

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* は、植物、肉、魚介類、乳製品などの栄養豊富な環境に生息する乳酸菌です。乳酸菌 *L. plantarum* は、有機酸、脂肪酸、アンモニア、過酸化水素、ジアセチル、バクテリオシンなどの物質を産生し、生き延びている。*L. plantarum* によって産生されるバクテリオシンはプラントリシンとして知られており、一般的にはクラス II のバクテリオシンとして報告されており、様々な殺菌/静菌機構を持つ。

本研究では、土壌、バージンココナッツオイル (VCO)、石鎚黒茶の発酵後のお茶など多くの試料から *L. plantarum* の分離を試みた。その結果、健康な土壌から分離された *L. plantarum* 6 株のうち 3 株と、ブラッサ科植物の黒腐病が発生した土壌から分離された *L. plantarum* 4 株のうち 1 株が *plnA* の存在を示すことがわかった。VCO から分離された *L. plantarum* COY 2906 は、プラントリシンを産生することで指標菌 (大腸菌等) を抑制する優れた能力を示した。塩ストレスとアルカリ条件の下で、*L. plantarum* COY 2906 は、大腸菌 K12 JM10、枯草菌および *S. aureus* JCM 20624 を阻害することが観察された。

石鎚黒茶を発酵後に分離した、*L. plantarum* IY01501 株および IY01511 株のプラスミドからプラントリシン遺伝子 *plnA* および *plnEF* が検出され、*L. plantarum* IY01511 株の染色体から *plnNJK* が検出された。抗菌活性については、*plnA*, *plnEF*, *plnNJK* の発現産物が指標菌に対して殺菌作用および静菌作用を示した。

上記の研究により、プランタリシンが発酵に重要な役割を果たしていることが明らかになった。このことを確認するために、モデル系として、人工的な後発酵茶の製造を試み、プランタリシンの役割を考察した。岐阜県揖斐川町から番茶を入手し *Aspergillus luchuensis* mut. *Kawachii* を接種、*L. plantarum* IY01511 を添加乳酸菌として使用した。これらのモデル発酵法の pH を市販の後発酵茶と同等にすることに成功し、乳酸コロニー数と乳酸産生量を増加させ、生菌・真菌のコロニー数を減少させることに成功した。これらの人為的に発酵させたモデル発酵法では、指標菌の抑制効果が認められた。また、茶葉の抽出液中にプランタリシン活性を測定することができた。以上のことから、人工発酵法を用いた後発酵茶の製造に成功すると共に、プランタリシンが雑菌を抑制し、発酵中に重要な役割を果たしていることを示した。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者、Yolani Syaputri は、土壌、バージンココナッツオイル (VCO)、石鎚黒茶の発酵後のお茶の試料から *Lactobacillus plantarum* を分離し、*L. plantarum* が、環境中で生育していく上で、プランタリシンが重要性であることを示した。まず、健康な土壌から分離された *L. plantarum* 6 株のうち 3 株がプランタリシン遺伝子を持つことを確認し、VCO から分離された *L. plantarum* COY 2906 は、プランタリシンを産生することで指標菌を抑制する優れた能力を示した。石鎚黒茶を発酵後に分離した、*L. plantarum* IY01501 株および IY01511 株のプラスミドからもプランタリシン遺伝子 *pInA* および *pInEF* が検出され、*L. plantarum* IY01511 株の染色体から *pInNJK* が検出された。抗菌活性については、*pInA*, *pInEF*, *pInNJK* の発現産物が指標菌に対して殺菌作用および静菌作用を示した。さらに、プランタリシンの抗菌活性を利用した、人工発酵法を用いた黒茶の生産法を開発し、乳酸菌が優占種となりプランタリシンの抗菌活性を測定することができた。

審査委員会は、上記の内容が学術的に充分であることを確認した。

基礎となる学術論文

1) Yolani Syaputri, Parwi and Hitoshi Iwahashi

Plantaricin A of *Lactobacillus plantarum* IYP1718 Plays a Role in Controlling Undesirable Organisms in Soil

Research Journal of Biotechnology, 印刷中

2) Yolani Syaputri and Hitoshi Iwahashi

Characteristics of heterologous plantaricin from *Lactobacillus plantarum* and its future in food preservation

Review in Agricultural Science, 印刷中

3) Yolani Syaputri, Ryo Niwa and Hitoshi Iwahashi

Effect of pH and Salinity on Lactic Acid Production and Multiplication of Plantaricin Plasmid Genes of *Lactobacillus plantarum* COY 2906 Isolated from Virgin Coconut Oil

Research Journal of Biotechnology, 印刷中

既発表論文

1) Syumariati Syukur, Syafrizayanti, Horas Rajagukguk, Yolani Syaputri, and Hitoshi Iwahashi

Probiotic research in several products of virgin coconut oil from Padang, Indonesia

Journal of Physics: Conference Series, 1116, 4, 1-6, 2018

2) Thanapa Atikij , Yolani Syaputri, Hitoshi Iwahashi, Thanit Praneenararat, Sophon Sirisattha, Hakuto Kageyama, and Rungaroon Waditee-Sirisattha

Enhanced lipid production and molecular dynamics under salinity stress in green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* (137C)

Marine Drugs, 17, 484, 1-15, 2019