



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

## 阿波晩茶に生息する乳酸菌に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2022-06-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 西岡, 浩貴 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/88143">http://hdl.handle.net/20.500.12099/88143</a>

阿波晩茶に生息する乳酸菌に関する研究

2021年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物資源科学

(岐阜大学)

西岡 浩貴

# 阿波晩茶に生息する乳酸菌に関する研究

西岡 浩貴

## 目次

第1章 序論 .....	4
1. 1. 自然界に生息する乳酸菌 .....	4
1. 2. 後発酵茶について .....	4
1. 3. 阿波晩茶の乳酸菌と風味について .....	5
1. 4. 乳酸菌の地域資源としての利用 .....	5
1. 5. 研究の目的 .....	6
第2章 阿波晩茶の嫌気発酵に関与する乳酸菌 .....	7
2. 1. 緒言 .....	7
2. 2. 実験方法 .....	7
2. 2. 1. 供試茶葉 .....	7
2. 2. 2. 各製造工程の生菌数 .....	7
2. 2. 3. 茶葉からの乳酸菌の分離と同定 .....	8
2. 2. 4. 乳酸菌の系統解析 .....	9
2. 2. 5. 嫌気発酵後茶葉の菌叢解析 .....	9
2. 2. 6. 茶葉の成分分析 .....	11
2. 2. 7. 培養細胞による茶葉の脱顆粒抑制評価 .....	12
2. 2. 8. 原料茶葉から分離した乳酸菌の茶葉抽出液中での生育性 .....	13
2. 2. 9. 統計解析 .....	13
2. 3. 結果 .....	14
2. 3. 1. 嫌気発酵による乳酸菌と茶葉成分の変遷 .....	14
2. 3. 1. 1. 各製造工程の生菌数 .....	14
2. 3. 1. 2. 各製造工程の細菌 .....	14
2. 3. 1. 3. 嫌気発酵による茶葉成分の変化 .....	15

2. 3. 1. 4. 嫌気発酵による茶葉の生理活性への影響.....	15
2. 3. 1. 5. 原料茶葉から分離した乳酸菌の茶葉抽出液中での生育性 .....	15
2. 3. 2. 乳酸菌の地域性 .....	15
2. 3. 2. 1. 各製造地域の乳酸菌 .....	15
2. 3. 2. 2. 各生産者から分離した <i>L. plantarum</i> グループの系統樹.....	16
2. 3. 2. 3. 各生産者の嫌気発酵後茶葉の菌叢解析.....	16
2. 3. 2. 4. 各生産者の嫌気発酵後茶葉の成分分析.....	16
2. 4. 考察.....	17
<b>第3章 阿波晩茶から分離した乳酸菌の特性 .....</b>	<b>22</b>
3. 1. 緒言.....	22
3. 2. 実験方法.....	22
3. 2. 1. 乳酸菌の糖資化性 .....	22
3. 2. 2. 乳酸菌の人工消化液耐性 .....	22
3. 2. 3. 乳酸菌の腸管上皮細胞に対する付着性と傷害性 .....	23
3. 2. 4. 乳酸菌の GABA 産生性.....	24
3. 2. 5. 乳酸菌の茶葉抽出液に対する生育性 .....	24
3. 2. 6. 統計解析 .....	25
3. 3. 結果.....	25
3. 3. 1. 阿波晩茶から分離した乳酸菌の培養特性と糖資化性.....	25
3. 3. 2. 乳酸菌の人工消化液耐性 .....	25
3. 3. 3. 乳酸菌の腸管上皮細胞に対する付着性と傷害性 .....	26
3. 3. 4. 乳酸菌の GABA 産生性.....	27
3. 3. 5. 乳酸菌の茶葉抽出液に対する生育性 .....	27
3. 4. 考察.....	27

第 4 章 結言 .....	31
謝辞 .....	32
参考文献 .....	33
表 .....	42
図 .....	51

## 第 1 章 序論

### 1. 1. 自然界に生息する乳酸菌

乳酸菌は、自然界の様々な環境に生息している(岡田, 2010). 乳酸菌が生育するためには糖成分, アミノ酸類, 生育因子のビタミン類やミネラル類が必須で, 一部の乳酸菌では脂肪酸が生育に必要な場合がある. また, 乳酸菌は通性嫌気性で酸素により死滅することはないが, 酸素が無い環境を好む. 自然界での乳酸菌の生育場所について, 特に動物や植物が関連している環境は乳酸菌の生育にも適していることが多い. 乳酸菌はそれぞれの環境に適応して生育していることから, 生育環境ごとに異なる特性を持つことが想像される.

乳酸菌の生息源の一つに, 後発酵茶である阿波晩茶がある. 阿波晩茶に生息する乳酸菌は, 他の生息源の乳酸菌とは特性が異なることが推察される. また, 同じ阿波晩茶でも, 製造地域により乳酸菌の特性が異なる可能性も考えられる.

### 1. 2. 後発酵茶について

茶は製法により不発酵茶, 発酵茶, 半発酵茶, 後発酵茶に分類することができる(大森, 2017). 不発酵茶は緑茶が該当し, 茶葉を収穫後, 加熱して茶葉の酵素を失活させてつくられる. 発酵茶は紅茶, 半発酵茶はウーロン茶が該当し, これらは茶葉の酵素により茶葉成分を変化させてつくられる. 発酵茶と半発酵茶は製造に微生物は関与していないが, 茶の業界では習慣的に「発酵」が使用されている. 後発酵茶は微生物の発酵によりつくられ, さらに製造方法によって好気発酵タイプ, 嫌気発酵タイプ, 好気・嫌気 2 段発酵タイプに分けられる. 後発酵茶の製造地域は世界でも限られており, 東南アジアと日本でのみつくられる. 東南アジアでは, 中国雲南省で好気発酵タイプのプーアル茶(郭ら, 2004), タイでは嫌気発酵タイプのミャン(堀江ら, 2020), ミャンマーでは嫌気発酵タイプのラペソー(福司山ら, 2009)がつくられる. 日本では 4 種類の後発酵茶が伝統的につくられており, 富山県では好気発酵タイプのバタバタ茶がつくられ(中川, 1979; 堀江ら, 2019), 残りの 3 種類は四国にある(Fig. 1). 愛媛県には 2 段発酵タイプの石鎚黒茶(加藤ら, 1995; Horie *et al.* , 2019b),

高知県には同じく2段発酵タイプの碁石茶(加藤ら, 1994)がある。

本研究の対象である阿波晩茶は嫌気発酵タイプである。阿波晩茶は国内に類似の製法で作られる茶はなく、タイのミャンが近いものの詳細は異なる(堀江ら, 2020)。阿波晩茶の起源は分かっていないが、1800年代後半に取引した記録が残っており、19世紀にはすでに製造されていたと考えられる(徳野, 2020)。阿波晩茶は徳島県的那賀町と上勝町で主に製造される他、近年は西部の三好市でも製造されている。阿波晩茶の製造は、主に夏期(7~9月頃)に行われる。製造工程は、茶葉を摘んで、釜で茶葉が茶色に変わるまで数分間茹でた後、揉捻機で揉み、空気が入らないように桶に詰め、重石を乗せて2~4週間程度発酵が行われる(Fig. 2)。発酵後、茶葉は桶から取り出され、1~3日程度天日で乾燥して製品となる。

### 1. 3. 阿波晩茶の乳酸菌と風味について

阿波晩茶の発酵は乳酸菌等の微生物が関与しており、嫌気発酵により茶葉の成分が変化し(加藤ら, 1993; 宮崎ら, 2007)、酸味のある独特の風味を形成する。発酵に乳酸菌スターターは用いられず、製造環境に生息する乳酸菌により発酵が行われる。嫌気発酵は阿波晩茶の風味を形成する重要な工程であるが、発酵に関する乳酸菌についての詳細は分かっていない。また、阿波晩茶の風味は生産者により差異があることが知られているが、この要因の一つとして阿波晩茶の発酵に関与する乳酸菌の特性がそれぞれで異なる可能性が考えられる。阿波晩茶の発酵に関与する乳酸菌について優占種等の詳細が明らかになれば、品質安定化に貢献できると考える。

### 1. 4. 乳酸菌の地域資源としての利用

阿波晩茶に生息する乳酸菌の中には、ヒトの健康に有益な効果を有する菌株が存在する可能性がある。一般的な乳酸菌の機能性としては、プロバイオティクスとして整腸作用や免疫賦活効果、病原細菌の生育阻害効果が知られている(Fuller, 1989; 辨野, 2011)。このほ



か、個別の株では様々な生理活性が認められ、血圧低下効果やストレス低減効果がある  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) を産生する乳酸菌も報告されている (上野ら, 2007; Yokoyama *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2016). 大手食品企業からは機能性乳酸菌を利用した製品がこれまでに多く発売されている. 一例を挙げると、腸内細菌叢を制御し整腸作用やアレルギー抑制効果が報告されている *Lacticaseibacillus casei* YIT9029 (志田, 2010) やプラズマサイトイド樹状細胞を活性化することにより免疫を活性化させる *Lactococcus lactis* Plasma (Jounai *et al.*, 2012) 等を利用した製品が開発されている. 一方、地方の企業においては、特定の地域から分離した乳酸菌の活用が行われている. 例としてこれまでに、すんきから分離した *Pediococcus pentosaceus* Sn26 (増田ら, 2010) や、雪室保存の漬物から分離した *Lactilactobacillus sakei* UONUMA (西脇ら, 2014)、岐阜県郡上市の自然素材から分離した *Streptococcus thermophilus* SC-6 (中川ら, 2014)、北海道の漬物から分離した *Lactiplantibacillus plantarum* HOKKAIDO (中川, 2018) が、ヨーグルト等様々な食品に利用されている. また、地域から分離した乳酸菌に健康に寄与する機能性があれば、地域独自の機能性製品を開発することができる. 阿波晩茶から分離された乳酸菌の機能性としては、これまでに *Lactiplantibacillus pentosus* OLL203984 で調製した茶発酵物が腸内細菌叢を変化させることによる消化管通過時間の改善 (横尾ら, 2020) や、*L. plantarum* FG4-4 の加熱死菌体によるアレルギー抑制作用 (吉田ら, 2010) が報告されているが、他の機能性を持つ菌株も存在していると考えられる. 阿波晩茶から分離した乳酸菌に付加価値として様々な機能性があれば、徳島県の地域色を活かした商品開発への利用が期待できる.

## 1. 5. 研究の目的

本研究では、阿波晩茶に生息する乳酸菌について優占種や地域性を検討するとともに、様々な特性を評価した. 第 2 章では嫌気発酵による乳酸菌と成分の変遷と、乳酸菌の地域性について検討した. 第 3 章では、阿波晩茶の乳酸菌についてプロバイオティクスとしての有用性や、機能性成分の産生性等を評価した.

## 第2章 阿波晩茶の嫌気発酵に関与する乳酸菌

### 2.1. 緒言

緒論で述べたとおり、阿波晩茶の嫌気発酵は風味を形成する重要な工程で、乳酸菌が大きく影響を与えていることが考えられる。阿波晩茶の発酵に関与する乳酸菌として、これまでに *L. pentosus* や *L. plantarum* (岡田ら, 1996; Horie *et al.*, 2019a) が報告されているものの、優占種や起源等の詳細については不明である。また、阿波晩茶の風味は生産者により異なるが、要因の一つとして生産者ごとに生息する固有の菌株が影響を与えていることが考えられる。

本章では、阿波晩茶の発酵に関与する乳酸菌について、嫌気発酵による阿波晩茶の乳酸菌の変遷と、乳酸菌の地域性について検討した。また、茶葉の風味関連成分を分析し、乳酸菌と風味との関連について検討した。

### 2.2. 実験方法

#### 2.2.1. 供試茶葉

阿波晩茶は那賀町、上勝町、三好市の生産者から発酵後の桶から取り出した茶葉の提供を受けた (Table 1)。生菌数の測定及び乳酸菌の分離に使用した茶葉は実験に使用するまで 4°C で保管した。成分分析に使用した茶葉は、凍結乾燥した後にミルサー (IFM-700G, 岩谷産業) で粉末にした。

#### 2.2.2. 各製造工程の生菌数

各製造工程 (原料茶葉, 殺青後, 殺青後数時間放置, 嫌気発酵後) の茶葉 1 g (湿重量) に対して滅菌したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を 10 mL 加え, 1 分間攪拌した。懸濁液を滅菌 PBS で希釈し, 標準寒天平板 (DAIGO, 日本製薬), de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Becton, Dickinson and Company) 寒天平板, Yeast malt (YM) 寒天平板に塗抹した。標準寒天平板は 35°C で 2 日間, MRS 寒天平板はアネロパック・ケンキ (三菱ガス化学) を用いて

35°Cで2日間, YM 寒天平板は28°Cで5日間培養し, 生じたコロニーを計測した.

### 2. 2. 3. 茶葉からの乳酸菌の分離と同定

生産者から提供された阿波晩茶の嫌気発酵後茶葉1gをPBS10 mLと混合し, 1分間攪拌した後, 上清を希釈してMRS寒天平板に塗抹した. MRS寒天平板はアネロパック・ケンキを用いて35°Cで2日間培養した後, 生じたコロニーを単離し, MRS液体培地に植えた. 乳酸菌の同定は, *recA* 遺伝子を標的としたマルチプレックスPCR (Trriani *et al.* , 2001)により *L. plantarum* グループ (*L. plantarum*, *L. pentosus*, *Lactiplantibacillus paraplanarum*) (平山ら, 2016)を同定した後, 16S rRNA の相同性によりその他の菌種を同定した. PCR に用いる鋳型 DNA は, DNA 抽出キット NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel) により調製した. MRS 液体培地で24時間培養した乳酸菌培養液1 mLを1,940 gで10分遠心し, 培地を除いて集菌した. 菌体のペレットにLysis Buffer T1を180 µL加えて懸濁した後, 超音波破碎装置 (Bioruptor, ソニック・バイオ) を用いて5分 (10秒 run, 5秒 stop サイクル) 超音波破碎を行った. 破碎後の乳酸菌懸濁液を用いて, マニュアルに従い菌体DNAを回収し, PCRの鋳型DNAとして使用した. 遺伝子解析は, 初めに *recA* 遺伝子を標的としたマルチプレックスPCRを行った. プライマーは paraF (5' -GTCACAGGCATTACGAAAAC-3'), pentF (5' -CAGTGGCGCGGTTGATATC-3'), planF (5' -CCGTTTATGCGGAACACCTA-3'), pREV (5' -TCGGGATTACCAAACATCAC-3'), PCR 酵素は TaKaRa *Ex Taq* (タカラバイオ) を用いた. PCR 反応液は総量 50 µL とし, 以下に示す組成とした: 1 µL 鋳型 DNA, 5 µL 10×*Ex Taq* Buffer (Mg<sup>2+</sup> free), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 µM paraF, 0.25 µM pentF, 0.25 µM pREV, 0.12 µM planF, 0.2 mM dNTP mixture, 1.25 U *Ex Taq* polymerase. PCR の反応条件は, 94°C3分で熱変性し, 94°C30秒, 56°C10秒, 72°C30秒を30サイクル繰り返した後, 72°C5分で最終伸長反応を行い, 4°Cで保持した. PCR 増幅産物を2%アガロースゲルにより増幅を確認した. 増幅がなかった菌体 DNA については, 乳酸桿菌用プライマー (Lane, 1991) により 16S rRNA 遺伝子を増幅した. 使用したプライマーは 27F (5' -

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')である。PCR 反応液は総量 50  $\mu$ L とし、以下に示す組成とした: 1  $\mu$ L 鋳型 DNA, 5  $\mu$ L 10 $\times$  *Ex Taq* Buffer (Mg<sup>2+</sup>plus), 1  $\mu$ M 27F, 1  $\mu$ M 1492R, 0.2 mM dNTP mixture, 1.25 U of *Ex Taq* polymerase. PCR の反応条件は、95°C3 分で熱変性し、95°C30 秒, 55°C55 秒, 72°C1 分を 40 サイクル繰り返した後、72°C10 分間で最終伸長反応を行い、4°Cで保持した。PCR 増幅産物について、マクロジェン・ジャパンにより精製とサンガー法によるシーケンスを実施した。シーケンス用プライマーは LAB-SeqF (5'-TCCTGGCTCAGGACGAACGCT-3')を使用した決定した塩基配列について BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) による相同性検索を行い、菌種を同定した。

#### 2. 2. 4. 乳酸菌の系統解析

乳酸菌から抽出した DNA を鋳型として、*dnaK* 遺伝子を増幅した。プライマーには Lpdnak-500F3 (5-CCGTTCTTRTCRATRTCRAA-3), Lpdnak-1710R5 (5-GAAAYYCAAGTYGGHGAAGT-3) (Huang *et al.*, 2010)を用いた。PCR 反応液は総量 50 $\mu$ L で、内容は以下の通り: 1  $\mu$ L 鋳型 DNA, 5  $\mu$ L 10 $\times$  *Ex Taq* Buffer (Mg<sup>2+</sup>plus), 1  $\mu$ M Lpdnak-500F3, 1  $\mu$ M Lpdnak-1710R5, 0.2 mM dNTP mixture, and 1.25 U *Ex Taq* polymerase. PCR の反応条件は 94°C5 分で熱変性し、94°C1 分, 58°C1 分, 72°C1 分を 35 サイクル繰り返した後、72°C7 分で最終伸長反応を行い、4°Cで保持した。PCR 増幅産物はマクロジェン・ジャパンにより精製とサンガー法によるシーケンスを実施した。シーケンス用プライマーは Lpdnak-500F3 を使用した。決定された塩基配列は、ClustalW (<https://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) によりアライメントを行った後、NJplot (<http://doua.prabi.fr/software/njplot>)により系統樹を作成した。Reference strain の配列は GenBank から引用した。

#### 2. 2. 5. 嫌気発酵後茶葉の菌叢解析

試料中の全 DNA を、嫌気発酵後の未乾燥茶葉 0.3g から、Extrap Soil DNA Kit Plus ver. 2(日鉄環境)を用いて、マニュアルに従い、RNasefree 水 100 $\mu$ L 中に抽出した。DNA 抽出プロトコルはキットのマニュアルに従った。抽出 DNA 溶液中 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅には、16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を標的とする 341F/805R (Klindworth *et al.*, 2013) の 5'末端側に illumina アダプター配列が付加されたプライマーを使用した。フォワードプライマーについては、illumina アダプター配列と標的領域特異的配列の間にサンプル識別用の 6 塩基の Index 配列を付加した。標的領域特異的部分の配列は、341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')および 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')を用いた。PCR 反応液は総量 25 $\mu$ L とし、以下に示す組成とした: 鋳型 DNA 2. 5 $\mu$ L, 0. 3 $\mu$ M 341F, 0. 3 $\mu$ M 805R, KAPA HiFi HS ReadyMix (KAPA Biosystems) 12. 5 $\mu$ L。PCR の反応条件は、95°C 5 分で熱変性し、98°C 20 秒, 60°C 15 秒, 72°C, 15 秒を 26 サイクル繰り返し、72°C 5 分で最終伸長を行った。PCR 増幅産物は岐阜大学 NGS サービスを利用し、MiSeq システム (Illumina) により網羅的塩基配列を決定した。MiSeq から出力されたリードファイル (Fastq ファイル) は、Index 配列に基づいて各サンプルに分離された。この際、index 部に Q スコア 30 未満の塩基を持つリードは除去された。サンプル分離後のリードに対し、fastp (Chen *et al.*, 2018) によるフィルタリングが行われた。この過程では、フォワードリードは 5'末端 23 塩基、リバーズリードは 5'末端 21 塩基が切り捨てられ、プライマー及び Index 部分が除去された。また、両リードについて、3'末端 1 塩基の切り捨て、平均 Q スコア 30 未満のリードの除去、3'末端側低品質塩基のスライディングウィンドウ法による切り捨て (ウィンドウサイズ 4, 平均 Q スコア 30 未満) が行われた。フィルタリング後のリードに対し、QIIME 2 2021. 4 (Bolyen *et al.*, 2019) による解析を行った。まず、DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) (q2-dada2 経由) を用いてリバーズリードとフォワードリードの結合及びリードのノイズ除去を行い、Amplicon sequence variants (ASV) を作成した。各 ASV への細菌分類割り当てには、q2-feature-classifier (Bokulich *et al.*, 2018) プラグインの classify-sklearn naive Bayes taxonomy classifier を使用した。この過程で使用された分類器は、REScriPt (Robeson *et*

al. , 2020)によるキュレーション実行後の Silva release 138. 1 SSU 99% (<https://www.arb-silva.de/>) (Quast *et al.* , 2013; Yilmaz *et al.* , 2014) データベースを基に, 増幅プライマー配列に基づく V3-V4 領域の抽出及び qiime feature-classifier fit-classifier-naive-bayes による訓練を経て作成された. RESCRIPt によるキュレーションでは, 低品質配列(5 個以上の曖昧塩基または 8 塩基長以上のホモポリマーを含む配列)の除去, 塩基長フィルタリング(以下の基準を満たしていない配列を除去: 古細菌  $\geq 900\text{bp}$ , 細菌  $\geq 1200\text{bp}$ , 真核生物  $\geq 1400\text{bp}$ )及び重複配列の削除が行われた. 分類割り当ての結果から葉緑体およびミトコンドリア由来であると推定された ASV は, ASV 集計表から除去された.

## 2. 2. 6. 茶葉の成分分析

有機酸の分析は有機酸分析装置 (EXTREMA, 日本分光) を使用した. 分析試料は, 茶粉末 1 g に精製水を加えて 10 mL に定容した後, 室温で 1 時間振盪し, 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過して調製した. カラムには RSpak KC-811 (8 mm  $\times$  300 mm; 昭和電工) を 60°C で使用した. 移動相は 3 mM 過塩素酸を流量 1.0 mL/min, 反応相は 0.2 mM ブロモチモールブルーを含む 15 mM リン酸水素二ナトリウム溶液を流量 1.5 mL/min で用いた. 有機酸は 445 nm の波長で検出した.

遊離アミノ酸は全自動アミノ酸分析計 (JLC-500V/2, 日本電子) で分析した. 分析試料は, 茶粉末 1 g に 10% スルホサリチル酸を加えて 10 mL に定容し, 室温で 2 時間振盪した. 上清をクエン酸リチウム緩衝液 (P-21, 日本電子) と 1:1 の割合で混合し, 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過して調製した.

カテキン類とカフェインの分析には, 高速液体クロマトグラフィー (Waters Corporation) を用いた. 分析試料は, 茶粉末 500 mg に精製水とアセトニトリル等量混合溶液を加えて 100 mL に定容し, 室温で 40 分間振盪した後, 上清を 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過して使用した. カラムは CAPCELL PAK C18 UG120 (S3) (4.6 mm  $\times$  100 mm; 資生堂) を 40°C で使用した. 移動相は, 0.5% (v/v) リン酸/メタノール = 82/18 で, 流量は 0.8 mL/min だった. カフェインと

カテキン類は、280 nm の波長で検出した。

香気成分の分析は、茶粉末 1 g に対し沸騰させた精製水を 100 mL 加え、5 分間静置した後、8,000g, 4°C, 10 分間遠心して上清を分析試料とした。香気成分分析には 2 次元ガスクロマトグラフ飛行時間型質量分析計 (Pegasus 4D GC×GC-TOFMS, LECO) を用いた。オートサンプラーには L-PAL3 (Agilent Technologies) を用いた。分析試料 2 mL をバイアルに入れ、固相マイクロ抽出法 (Solid phase micro extraction; SPME) により濃縮した。SPME ファイバーには DVB/CAR/PDMS (膜厚 50/30µm, メルク) を用い、60°C で 30 分間吸着してスプリットレス注入で導入した。1 次元カラムには DB-WAX (0.25 mm × 60 m × 0.25 µm; Agilent Technologies) を、2 次元カラムには InertCap 5MS/NP (0.18 mm × 20 m × 0.18 µm; ジーエルサイエンス) を用いた。分析条件を Table 2 に示す。分析して得られたデータのデコンボリューションとアライメントには ChromaTOF ソフトウェア Ver. 4.72 (LECO) を使用した。香気成分の同定には NIST ver. 14 と Wiley ver. 10 を用いた。測定データをアライメントして、有意差の指標である Fisher Ratio 値 (FR 値) (Pierce *et al.*, 2006) を算出し、FR 値 5 以上の香気成分について JMP15 (SAS) を使用して主成分分析を行った。

### 2. 2. 7. 培養細胞による茶葉の脱顆粒抑制評価

茶葉の脱顆粒抑制は RBL-2H3 細胞を用いて評価した (Watanabe *et al.*, 2005)。滅菌精製水に原料茶葉または嫌気発酵後茶葉の茶粉末 250 mg に滅菌精製水を 5 mL 加え、4°C で 24 時間静置した後、0.22 µm フィルターで滅菌ろ過し、試験用の試料とした。抽出液は使用まで -80°C で保存した。RBL-2H3 細胞は JCRB 細胞バンク (医薬基盤・健康・栄養研究所) より入手した。細胞培養の培地には非働化した 10% ウシ胎児血清 (FBS, GE Healthcare) と 250 ng/mL 抗生物質-抗菌剤混合溶液 (Amphotericin B, ナカライテスク) を含む Minimum essential medium (MEM, サーマフィッシャーサイエンティフィック) を使用した。細胞を 24 ウェルプレートに  $2.5 \times 10^5$  cells/well の濃度で植え、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で 1 晩培養した。培地を 50 ng/mL の抗モノクローナルマウス IgE 抗体 (ヤマサ醤油) と 10% FBS を含む MEM に置換

し, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で 2 時間インキュベートした. 細胞を Modified Tyrode's buffer (MT バッファ: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.6 mM グルコース, 20 mM HEPES, 0.1% (w/v) bovine serum albumin (BSA, ナカライ), pH 7.4) で洗浄し, MT バッファで 50 倍に希釈した茶葉抽出液を加えて 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で 10 分間インキュベートした. 次に終濃度 50 ng/mL になるように 2, 4-dinitrophenylated BSA (DNP-BSA, コスモバイオ) を添加して, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で 30 分間インキュベートした. 上清を回収した後, 0.1% Triton X-100 を含む MT バッファで細胞を溶解し, 上清 50 μL または細胞溶解液 100 μL を 3.3 mM p-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (富士フィルム和光純薬) を含む 0.1 M クエン酸バッファ (pH 4.5) と 96 ウェルプレート中で混合して, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下で 25 分間インキュベートした. 100 μL の 2M グリシンバッファ (pH 10.4) で反応を停止し, 405 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Tecan Group) により測定した. 放出率は, 上清の吸光度 / (上清の吸光度 + 細胞溶解液の吸光度) × 100 として算出し, 茶葉抽出液を含まない細胞の放出率を 100% としたときの相対値とした.

#### 2. 2. 8. 原料茶葉から分離した乳酸菌の茶葉抽出液中での生育性

市販の緑茶茶葉 (西森園) をミルサーで粉末化した茶粉末 0.3 g とグルコース 1 g, 沸騰させた精製水 100 mL を混合して, スターラーで 30 分間攪拌した後, 上清を 0.2 μm フィルターで滅菌濾過し, 10 mL をねじ口試験管に加えた. 原料茶葉から分離した乳酸菌を MRS 液体培地で 35°C, 24 時間培養し, 乳酸菌培養液 100 μL をねじ口試験管に添加して, 35°C で 48 時間培養した. 培養液について, 分光光度計 (UV-1200, 島津製作所) で濁度 (OD<sub>600</sub>) を測定した.

#### 2. 2. 9. 統計解析

各製造工程の生菌数, 脱顆粒抑制評価, 茶葉抽出液中での生育性では, 値を平均地 ± 標準偏差で示した. 脱顆粒抑制評価では, 一元配置分散分析 (ANOVA) と Tukey 法にて多



重比較を行った。

## 2. 3. 結果

### 2. 3. 1. 嫌気発酵による乳酸菌と茶葉成分の変遷

#### 2. 3. 1. 1. 各製造工程の生菌数

阿波晩茶の各製造工程について、標準寒天平板と YM 寒天平板, MRS 寒天平板を用いて生菌数を測定した (Fig. 3). 原料茶葉は、それぞれの培地で約  $10^4 \sim 10^6$  cfu/g の生菌が確認されたが、殺青工程では生菌は確認されなかった。しかし、製造現場に数時間放置された茶葉からは、それぞれの培地で約  $10^2 \sim 10^4$  cfu/g の生菌が確認された。嫌気発酵後の茶葉からは、それぞれの培地で約  $10^8$  cfu/g の生菌が確認され、菌数は大きく増加した。

#### 2. 3. 1. 2. 各製造工程の細菌

2018 年に那賀町と上勝町で製造された阿波晩茶 (生産者 A のロット 1, 2, 3, 生産者 B のロット 1, 生産者 C のロット 1, 生産者 D のロット 1, 生産者 E のロット 1, 生産者 F のロット 1, 生産者 G のロット 1) について、MRS 寒天平板を用いて各製造工程の茶葉の細菌を分離し、*recA* 遺伝子に対するマルチプレックス PCR または 16S rRNA の相同性により菌種を同定した。各製造工程の細菌の割合を Fig. 4 に、生産者ごとの分離された細菌数を Table 3 に示す。原料茶葉からは 25 株、殺青後数時間放置された茶葉からは 20 株、嫌気発酵後茶葉からは 74 株の全 119 株を分離した。原料茶葉からは、*L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *Weissella parameseneroides*, *Weissella cibaria*, *Enterococcus gallinarum* 等が分離された。また、殺青後数時間放置された茶葉からは *L. pentosus*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis* 等が分離された。嫌気発酵後茶葉からは *L. pentosus* が最も多く分離され、次いで *L. plantarum* が分離された。*L. pentosus* と *L. plantarum* で、嫌気発酵後茶葉から分離された細菌数の 92% を占めた。

### 2. 3. 1. 3. 嫌気発酵による茶葉成分の変化

原料茶葉と嫌気発酵後茶葉の成分を測定した (Table 4). 有機酸については, どの生産者も嫌気発酵により総量が増加した. 特に乳酸の増加が顕著であった. また, 酢酸やコハク酸も増加傾向だった. pH はおおよその生産者で嫌気発酵により低下した. カテキン類の嫌気発酵による変化は, 生産者により差異はあったものの, 総量は減少傾向であった. カフェインも同様に, 嫌気発酵により減少傾向だった.

### 2. 3. 1. 4. 嫌気発酵による茶葉の生理活性への影響

原料茶葉と嫌気発酵後茶葉について, RBL-2H3 細胞を用いて脱顆粒の抑制を評価した (Fig. 5). 生産者により差異があるものの, 嫌気発酵後茶葉は原料茶葉よりも脱顆粒を抑制する傾向にあった.

### 2. 3. 1. 5. 原料茶葉から分離した乳酸菌の茶葉抽出液中での生育性

原料茶葉から分離した乳酸菌について, 1%グルコースを含む茶葉抽出液中での生育性を検討した (Fig. 6). *L. pentosus* 及び *L. plantarum* は, 他の細菌よりも OD<sub>600</sub> が高かった.

## 2. 3. 2. 乳酸菌の地域性

### 2. 3. 2. 1. 各製造地域の乳酸菌

2019 年と 2020 年に那賀町, 上勝町, 三好市で製造された阿波晩茶 (生産者 A のロット 4, 5, 6, 生産者 B のロット 2, 生産者 D のロット 2, 3, 生産者 E のロット 2, 生産者 H のロット 1, 2, 3, 生産者 I のロット 1, 2) の嫌気発酵後茶葉から MRS 寒天平板を用いて乳酸菌を分離した. 生産地ごとの乳酸菌の割合を Fig. 7 に, 生産者ごとに分離された乳酸菌を Table 5 に示す. また, 比較のため, 石鎚黒茶の嫌気発酵後茶葉からも同様に乳酸菌を分離した. 分離株数は, 那賀町は 46 株, 上勝町からは 39 株, 三好市からは 61 株, 石鎚黒茶からは 12 株を分離した. 那賀町の生産者からは *L. pentosus* が最も多く分離され, 他には

*Secundilactobacillus collinoides*, *L. plantarum*, *Lactocaseibacillus pantheris* 等が分離された。また、上勝町の生産者からは *L. pentosus* のみが分離された。一方、三好市の生産者から最も多く分離されたのは *L. plantarum* で、*L. pentosus* は分離されなかった。他には *Loigolactobacillus coryniformis* や *Levilactobacillus brevis*, *L. paraplantarum* が分離された。また、石鎚黒茶からは *L. plantarum* が最も分離され、次いで *L. brevis* が分離された。

#### 2. 3. 2. 2. 各生産者から分離した *L. plantarum* グループの系統樹

阿波晩茶と石鎚黒茶から分離した *L. plantarum* グループ (*L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. paraplantarum*) について *dnaK* 遺伝子を解析し、系統樹を作成した (Fig. 8)。系統解析に使用した乳酸菌を Table 6 に示す。阿波晩茶から分離した乳酸菌は、おおよそ生産者ごとにクラスターを形成した。特に、同じ生産者から分離された *L. pentosus* は分離された年が異なっても同じクラスターを形成する傾向にあった。

#### 2. 3. 2. 3. 各生産者の嫌気発酵後茶葉の菌叢解析

各生産者から阿波晩茶の嫌気発酵後茶葉について、属レベルでの菌叢解析を行った (Fig. 9)。ほとんどの生産者で、*Lactiplantibacillus* 属が優占していた。*Lactiplantibacillus* 属の次に検出された細菌は生産者により異なり、*Paucilactobacillus* 属、*Secundilactobacillus* 属、*Klebsiella* 属が検出された。また、生産者 H は他の生産者とは異なり、*Leuconostoc* 属または *Lactococcus* 属が優占し、次に *Lactiplantibacillus* 属が検出された。

#### 2. 3. 2. 4. 各生産者の嫌気発酵後茶葉の成分分析

各生産者の嫌気発酵後茶葉の成分分析を行った (Table 7)。有機酸について、ほとんどの生産者で乳酸が最も多く検出され、次に酢酸やシュウ酸が検出された。一方、生産者 A のロット 5 や生産者 H のロット 3 では、酢酸が最も多く検出された。有機酸総量は生産者により異なった。例えば、生産者 H は約 900~1, 600 mg/100g と少なく、生産者 I は 5, 400~5,

900 mg/100g と多かった。カテキン類の分析では、EGC がほとんどの生産者で最も多く検出され、次に EGCg が検出された。カテキン類の総量は、生産者 A は約 1,500~3,900 mg/100g と少なく、生産者 I は約 11,700~12,600 mg/100g と多かった。遊離アミノ酸の分析では、ほとんどの生産者でテアニンが最も多く検出され、次いでグルタミン酸が検出された。また、生産者 A のロット 5 や、生産者 H のロット 2, 3 は GABA が多く検出された。

香気成分は、FR 値 5 以上の香気成分 818 種について主成分分析を行った。スコアプロット (Fig. 10A) によると、生産者 A のロット 5 及びロット 6 は左上に、生産者 H のロット 1 及びロット 2 は右側にプロットされた。その他の生産者は B, D, E は、中央付近にプロットされた。また、ローディングプロット (Fig. 10B) によると、第一主成分が小さいほど p-クレゾール等が、大きいほどアジピン酸イソブチル (Hexanedioic acid, bis (2-methylpropyl) ester) 等がプロットされた。また、第二主成分が小さいほど 2, 4-ヘプタジエナール, (E, E) 等が、大きいほど酪酸エチル (Butanoic acid, ethyl ester) 等がプロットされた。

## 2. 4. 考察

本研究では阿波晩茶の発酵に関与する乳酸菌について、製造工程による変遷と、地域性を検討した。阿波晩茶の各製造工程の乳酸菌について、原料茶葉から分離した MRS 寒天平板を使用して分離すると、約  $10^4$  cfu/g の生菌が確認された。原料茶葉の乳酸菌を同定すると、*L. pentosus* や *L. lactis*, *W. paramesenderoides* 等、多様な細菌が検出された。殺青工程で微生物は殺菌され生菌は検出されなくなるが、製造現場に数時間置かれた茶葉からは再び約  $10^2$  cfu/g の生菌が確認され、*L. pentosus* や *S. haemolyticus* 等が検出された。この理由として、作業道具等から微生物がコンタミネーションした可能性が考えられる。嫌気発酵後、茶葉の生菌数は約  $10^8$  cfu/g と大きく増加し、分離された乳酸菌は *L. pentosus* と *L. plantarum* が主であった。このように、阿波晩茶の乳酸菌は、嫌気発酵により菌叢が変化することが示された。嫌気発酵中、微生物はカテキン類等の抗菌成分が多い環境におかれるので、茶葉成分が乳酸菌の菌種を選抜している可能性を考え、茶葉抽出液での生育性を

検討したところ, *L. pentosus* 及び *L. plantarum* は他の乳酸菌よりも高い生育性を示すことが示唆された. 内野らは, 嫌気発酵中, 茶葉のポリフェノールが微生物の制御因子となることを報告している(内野ら, 2020). また, *L. pentosus* 及び *L. plantarum* の細胞壁ペプチドグリカンは *meso*-DAP 型で, カテキン類に対して耐性が高いとされる(平山ら, 2016; 岡田, 2002). このように, 茶葉成分が選択圧となり, 耐性の高い *L. pentosus* や *L. plantarum* が選抜されることが示唆された. また, 嫌気発酵後茶葉からは, 標準寒天平板, YM 寒天平板でも約  $10^8$  cfu/mL の生菌数が確認され, 乳酸菌以外の細菌や, 酵母も阿波晩茶の嫌気発酵に関与している可能性が示唆された. 茶葉成分についても, 嫌気発酵により変化が確認された. 有機酸については, 全ての生産者で総量が増加した. 特に乳酸が大きく増加し, 他には酢酸やコハク酸が増加傾向にあった. 乳酸は乳酸菌により産生されると考えられる. また, 酢酸は酢酸菌, コハク酸は酵母により産生された可能性がある(Conway *et al.* , 1950). 総カテキン量は, 生産者により差異はあったものの, 嫌気発酵により減少傾向であった. また, EGCg は減少し, EGC は増加傾向であった. *L. plantarum* や *L. pentosus* はタンナーゼ活性を有することが報告されており(Osawa *et al.* , 2000), タンナーゼにより EGCg が EGC に加水分解されたことが考えられる. また, EGC は EGCg よりも苦味や渋味といった忌避味が低く(Narukawa *et al.* , 2010), また腸管での吸収効率が良いことが報告されている(Henning *et al.* , 2005). さらに, 嫌気発酵後茶葉は原料茶葉よりも RBL-2H3 細胞の脱顆粒を抑制したことから, 何らかの生理活性成分が嫌気発酵により生じた可能性がある. このように, 阿波晩茶の乳酸菌は嫌気発酵により *L. pentosus* や *L. plantarum* に選抜され, 有機酸やカテキン類等の茶葉成分の変化を引き起こし, 阿波晩茶の風味を形成することが示唆された.

また, 阿波晩茶の発酵に関与する乳酸菌は, 製造地域及び生産者ごとに地域性があることが分かった. MRS 寒天平板を用いて嫌気発酵後茶葉から乳酸菌を分離して同定したところ, 那賀町と上勝町の生産者 A, B, D, E は *L. pentosus* が最も多く分離されたのに対し, 三好市の生産者 H, I からは *L. plantarum* が最も多く分離された. この傾向は, 阿波晩茶の製造年が異なっても同じであった. *L. pentosus* と *L. plantarum* は植物等からよく分離され(岡

田, 2002; Parente *et al.*, 2010), 遺伝子は非常に近く, 16S rRNA の相同性は 99%以上である(Torriani *et al.*, 2001; Bringel *et al.*, 2005). このように, *L. pentosus* と *L. plantarum* は非常に近い種であるにもかかわらず, 那賀町と上勝町で製造される阿波晩茶からは *L. pentosus* が *L. plantarum* よりも頻繁に分離される. 一方で, 三好市で製造される阿波晩茶からは *L. plantarum* が頻繁に分離されるのに対し, *L. pentosus* は本研究では分離されていない. また, 愛媛県西条市で製造される石鎚黒茶からは *L. plantarum* が多く分離され, 三好市の阿波晩茶と同様の傾向であった. このように, 阿波晩茶の発酵に関与する乳酸菌は, 製造地域により異なることが示唆された. これは何らかの環境要因によるものや, 地域により生息する乳酸菌が異なることなどが推察されるが, 現在のところ理由は不明であり, 今後の解明が期待される. *dnaK* 遺伝子に基づく系統樹では, 株レベルで生産者ごとに固有の乳酸菌が生息していることが示唆された. *L. pentosus* と *L. plantarum* のゲノムサイズは 3Mb 以上(Niwa *et al.*, 2020; Ito *et al.*, 2021)と乳酸菌の中では大きいので, 株レベルで特性の差異が大きいことが予想される. 今後, 各生産者の乳酸菌の代謝特性等を検討することで, 乳酸菌が阿波晩茶の風味に与える影響の詳細を明らかにできるだろう. また, 菌叢解析の結果も生産者により異なっていた. ほとんどの生産者で *Lactiplantibacillus* 属が優占していたが, 生産者 H は *Leuconostoc* 属や *Lactococcus* 属が優占していた. 生産者 H によると, 嫌気発酵の終了後, 桶の茶葉を混ぜているとのことであった. 推測ではあるが, 桶の上部はカテキン等を多く含む発酵液に浸かっていないため, *Lactiplantibacillus* 属が優占しなかった可能性がある. また, 生産者 A のロット 5 および 6 は他の生産者よりも *Acetobacter* 属が多く検出された. 生産者 D は他の生産者よりも *Klebsiella* 属が多く検出された. 岡田らは, 阿波晩茶の発酵には *Klebsiella pneumoniae* が関与し, エタノールや 2,3-ブタンジオールを生成し, 風味に影響を与えていると報告している(岡田ら, 1996). 本研究でも生産者 D の香気成分には (R,R)-ブタン-2,3-ジオールが寄与していることが示唆されたので, 生産者 D の風味形成には *K. pneumoniae* が影響を与えている可能性がある. 生産者ごとの嫌気発酵後茶葉の分析においても, 生産者ごとの差異が確認された. ほとんどの生産者で乳酸が多く検出さ

れたが、生産者 A のロット 5 は酢酸が多く検出された。これは生産者 A の菌叢解析で、*Acetobacter* 属が多く検出されていることが関与していると考えられる。*Acetobacter* 属は好気性であるので、発酵中に空気が存在していたことが原因かもしれない。カテキン類についても、生産者 I はロット 1, 2 とともに総カテキン量が多かったが、生産者 A はロット 4, 5, 6 とともに少なく、生産者ごとに差異が確認された。遊離アミノ酸の分析は、ほとんどの生産者でテアニンが最も多く検出され、次いでグルタミン酸が検出された。テアニンは旨味を増強する他 (Narukawa *et al.* , 2008), リラックス効果があることが報告されている (小林ら, 1998; 小関ら, 2004)。グルタミン酸は旨味成分としてよく知られている。また、生産者 A のロット 5 や、生産者 H のロット 2, 3 からは、他の生産者よりも GABA が多く検出された。GABA は、*L. brevis* が高産生することが報告されており、生産者 H の嫌気発酵後茶葉に GABA が多く含有されるのは、同じ茶葉から *L. brevis* が分離されたことと関係している可能性がある (Yokoyama *et al.* , 2002; 森ら, 2007)。また、香気成分について、スコアプロットで生産者 A のロット 5, 6 と、生産者 H のロット 1, 2 はそれぞれ近くにプロットされたことから、生産者ごとに香気成分の特徴があることが示唆された。

このように、阿波晩茶の発酵に関与する乳酸菌の地域性が、阿波晩茶の風味の生産者ごとの差異に関与している可能性が考えられるものの、乳酸菌だけでは十分に説明することはできない。例えば、生産者 A のロット 5, 6 は GABA が多く検出されたが、*L. brevis* は分離されず、また菌叢解析においても、*Levilactobacillus* 属は 1% 以下であった。また、生産者 B は他の生産者よりも菌叢における *Lactiplantibacillus* 属が占める割合は高かったが、有機酸総量は多くない。阿波晩茶の風味を形成する微生物は、*L. pentosus* や *L. plantarum* が中心ではあるものの、他にも *Klebsiella* 属や *Acetobacter* 属等の関与が考えられる。また、嫌気発酵後茶葉の菌数より、酵母も乳酸菌と同等数生息しており、風味に影響を与えていることが推察される。阿波晩茶の発酵に関与する酵母は明らかになっていないが、基石茶では *Pichia manshurica* が香気特性に影響していると報告されている (小山ら, 2019)。また、微生物の他にも、原料茶葉の栄養成分や、製造条件も影響することが考えられ、阿波晩茶の風味はこ

これらの要因が複雑に合わさって形成されている。



## 第3章 阿波晩茶から分離した乳酸菌の特性

### 3.1. 緒言

本章では、第2章で阿波晩茶の嫌気発酵後茶葉から分離した乳酸菌について、人工消化液耐性、腸管上皮細胞付着性及び GABA 産生性を評価した。人工消化液耐性及び腸管上皮細胞付着性が高ければ、乳酸菌が生菌のまま腸まで届いて定着することで、プロバイオティクスとしての利用が期待できる (Moal *et al.*, 2002; Mukai *et al.*, 2002)。また、GABA を高産生する乳酸菌を得られれば、GABA を含有する発酵食品の開発に利用できる。さらに、阿波晩茶の乳酸菌は、カテキンやタンニンなどの茶葉由来の抗菌成分が多く存在する環境で発酵を行っていることから、茶葉抽出液に対する生育性を検討した。

### 3.2. 実験方法

#### 3.2.1. 乳酸菌の糖資化性

乳酸菌の49種の炭素源に対する資化性は、アピ<sup>®</sup> 50CH (BioMérieux)を用いて評価した。MRS 液体培地で24時間培養した乳酸菌培養液を1,940 gで10分間遠心して集菌し、上清を除いてPBSに懸濁した。再び遠心した後に上清を除き、PBSで再懸濁した。マニュアルに従い、乳酸菌懸濁液をアピ<sup>®</sup> 50CHL培地と混合し、プレートに接種して35°Cで48時間培養した。培養後の培地の色について、黄色を陽性、緑色を弱陽性、紫色を陰性と判定した。エスクリンについては、紫色から黒色へ変化した場合を陽性とした。阿波晩茶から分離した乳酸菌と比較するため、基準株として *L. pentosus* NBRC106467<sup>T</sup>, *L. brevis* NBRC107147<sup>T</sup> を製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターより購入した。

#### 3.2.2. 乳酸菌の人工消化液耐性

乳酸菌の人工消化液耐性は、瀧口らの報告を基に評価した (瀧口ら, 2000)。塩酸で pH2.0 または 3.0 に調整した MRS 液体培地 9 mL に 4% ペプシン (富士フィルム和光純薬) を 100  $\mu$ L 加えた人工胃液に、MRS 液体培地で 24 時間培養した乳酸菌培養液 1 mL を混

合して、35°Cで 3 時間処理した。人工胃液処理後、MRS 寒天平板に塗抹して、アネロパック・ケンキを用いて 35°Cで 48 時間培養し、コロニー数を測定した。また、乳酸菌培養液と人工胃液を混合した後直ちに MRS 寒天平板に塗抹し、培養して生菌数を測定したものを処理時間 0 とした。次に、人工胃液処理液 100  $\mu$ L を、MRS 液体培地 10 mL に 20%胆汁末(富士フィルム和光純薬)100  $\mu$ L, 1%トリプシン(富士フィルム和光純薬)100  $\mu$ L, 1%パンクレアチン(富士フィルム和光純薬)100  $\mu$ L を混合した人工腸液に加え、35°Cで 24 時間処理した。人工腸液処理液を MRS 寒天平板に塗抹し、培養して生菌数を測定した。また、処理時間 0 は、人工胃液処理液を人工腸液と混合した後、直ちに MRS 寒天平板に塗抹し、培養して生菌数を測定した。

### 3. 2. 3. 乳酸菌の腸管上皮細胞に対する付着性と傷害性

阿波晩茶から分離した乳酸菌を、MRS 液体培地を用いて 35°Cで 24 時間培養後、1,940 g で 10 分間遠心し、培地を PBS に置換して懸濁した。再度遠心して上清を除き、PBS で再懸濁して乳酸菌を洗浄した。バクテリアカウンター(サンリード硝子)を用いて乳酸菌懸濁液の菌数を測定し、懸濁液を  $1 \times 10^7$  cells/mL になるよう 20%FBS (Biological Industries)と非必須アミノ酸溶液(NEAA, Thermo Fisher Scientific)を含む MEM に加えた。ヒト結腸癌由来の細胞株 Caco-2 は American Type Culture Collection より購入した。細胞は 20%FBS と NEAA を含む MEM 培地中で、CO<sub>2</sub> インキュベーターを用いて 5%CO<sub>2</sub>, 37°Cで培養した。6 ウェルマルチプレートに細胞を 1 ウェルあたり  $2 \times 10^5$  cells の濃度で植え、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 48 時間培養して接着させるとともに、90%のコンフルエント状態であることを確認した。培地を  $1 \times 10^7$  cells/mL の乳酸菌を含む懸濁培地と置換し 35°Cで 2 時間静置した。乳酸菌懸濁培地を除き、PBS を 2 mL 加えてマイルドミキサーで 5 分間穏やかに振盪して洗浄した。PBS での洗浄は 3 回行った後、滅菌精製水 2 mL を注いで細胞を壊し、細胞に付着した乳酸菌を回収して MRS 寒天平板に塗抹し、アネロパック・ケンキを用いて 35°Cで 48 時間培養してコロニー数を測定した。

乳酸菌の培養細胞への傷害性を脱水素酵素(LDH)の漏出を指標に評価した。20%FBSとNEAAを含むMEM培地で培養したCaco-2細胞を、6ウェルマルチプレートに1ウェルあたり $2 \times 10^5$  cellsの濃度で植え、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で48時間培養して接着させた。培地を $1 \times 10^7$  cells/mLの乳酸菌を含む懸濁培地と置換し、35°Cで2時間静置した後、培養上清を回収した。上清を除いた6ウェルマルチプレートに、0.1%ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(富士フィルム和光純薬)を含む滅菌精製水を2 mL加え、35°Cで30分間静置して細胞溶解液を回収した。LDHは細胞毒性検出キット(LDH)(Roche)を用いて、マニュアルに従い評価した。

#### 3. 2. 4. 乳酸菌のGABA産生性

ねじ口試験管中で500 g/Lグルタミン酸ナトリウム溶液1 mLと必要量の90%の水で調製したMRS液体培地9 mLを混合し、乳酸菌培養液100  $\mu$ Lを添加して35°Cで48時間培養した。培養液を7,740 gで5分間遠心して上清を回収した後、上清と10%スルホサリチル酸を1:9の比率で混合して攪拌し、除タンパク処理を行った。処理後の溶液をクエン酸リチウム緩衝液P-21(日本電子)で希釈し、全自動アミノ酸分析計JLC-500/V2(日本電子)を用いてGABAを測定した。また、グルタミン酸ナトリウムを含むMRS液体培地で培養した後の乳酸菌培養液をMRS寒天平板に塗抹し、アネロパック・ケンキを用いて35°Cで48時間培養してコロニー数を測定した。

#### 3. 2. 5. 乳酸菌の茶葉抽出液に対する生育性

市販の緑茶茶葉(ホームサイズ緑茶, 伊藤園)4 gとグルコース2 gに沸騰させた精製水200 mLを加え、1分間静置した後0.2  $\mu$ mフィルターにより滅菌し、1%グルコースを含む茶葉抽出液を調製した。この茶葉抽出液10 mLにMRS液体培地で24時間培養した乳酸菌培養液100  $\mu$ Lを添加し、35°Cで24時間培養した。培養液をMRS寒天平板に塗抹し、アネロパック・ケンキを用いて35°Cで48時間培養してコロニー数を測定した。生育率は、茶葉

抽出液で培養した生菌数/MRS 液体培地で培養した生菌数×100 として算出し、各菌株を MRS 液体培地で 24 時間培養した生菌数を 100%としたときの相対値とした。

### 3. 2. 6. 統計解析

人工消化液に対する耐性、腸管上皮細胞に対する付着性、GABA 産生性、茶葉抽出液に対する生育性の値は、平均値±標準偏差で示した。基準株に対する比較は ANOVA と Dunnett 法にて多重比較を行い解析した。

## 3. 3. 結果

### 3. 3. 1. 阿波晩茶から分離した乳酸菌の培養特性と糖資化性

阿波晩茶の嫌気発酵後茶葉から分離した *L. pentosus* のうち、MRS 液体培地で培養した際、振盪すると菌体が凝集する *L. pentosus* AWA1922 (Fig. 11A)と、粘性物質を産生する *L. pentosus* AWA1955 (Fig. 11B) が得られ、これらは他の *L. pentosus* とは異なる特性を示した。乳酸菌の機能性評価にはこれらのユニークな特性を有する *L. pentosus* に加え、GABA を高産生することで知られる *L. brevis* を使用した。供試乳酸菌の詳細を Table 8 に示す。

供試乳酸菌の糖の資化性を評価したところ、それぞれの菌株で資化性パターンは異なった (Table 9)。 *L. pentosus* については、D-ラフィノースが *L. pentosus* NBRC106467<sup>T</sup> は陰性であったのに対し、 *L. pentosus* AWA1922, *L. pentosus* AWA1952, *L. pentosus* AWA1955 は陽性を示した。 *L. brevis* については、 *L. brevis* AWA1984 と *L. brevis* AWA1985 は同じ資化性パターンを示した。

### 3. 3. 2. 乳酸菌の人工消化液耐性

乳酸菌の pH3.0 または 2.0 の人工胃液及び人工腸液に対する耐性を評価した。乳酸菌培養液を pH3.0 に調整した人工胃液で処理した結果、全ての菌株で生菌数への影響は確認されなかった (Fig. 12A)。人工胃液処理後の乳酸菌液を人工腸液で処理すると、*L.*

*pentosus* については全ての菌株で生菌数は増加した。*L. brevis* については、*L. brevis* NBRC107147<sup>T</sup>は人工腸液処理により生菌数は減少したが、阿波晩茶から分離した*L. brevis* AWA1978, *L. brevis* AWA1984, *L. brevis* AWA1985 は生菌数が増加した。

pH2.0 に調整した人工胃液に乳酸菌培養液を混合すると、*L. pentosus* では全ての菌株で生菌数は減少し、*L. pentosus* AWA1955 においては生菌が検出されなかった。*L. pentosus* NBRC106467<sup>T</sup>, *L. pentosus* AWA1952 は 10<sup>1</sup> cfu/mL 程度の生菌数であったのに対し、*L. pentosus* AWA1922 は 10<sup>5</sup> cfu/mL 程度生存しており、他の菌株と比べ高い人工胃液耐性を示した (Fig. 12B)。また、*L. pentosus* AWA1952 については試験によって pH2.0 の人工胃液処理後に生菌が検出される場合とされない場合があり、バラツキが大きかった。人工胃液処理後に生菌が検出された場合は人工腸液に接種すると生菌数は増加したが、人工胃液処理後に生菌が検出されなかった場合は人工腸液に接種しても生菌は検出されなかった。*L. brevis* については、どの菌株も生菌数は減少したが、10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> cfu/mL 程度生存しており、*L. pentosus* と比較して人工胃液に対する耐性は高かった。人工胃液処理後の乳酸菌液を人工腸液で処理したところ、*L. pentosus* では *L. pentosus* AWA1922 のみ生菌が検出された。*L. brevis* では、*L. brevis* NBRC107147<sup>T</sup>は生菌数が減少したのに対し、*L. brevis* AWA1978, *L. brevis* AWA1984, *L. brevis* AWA1985 は増加しており、乳酸菌培養液を pH3.0 の人工胃液と人工腸液で処理した結果と同様の傾向が確認された。

### 3. 3. 3. 乳酸菌の腸管上皮細胞に対する付着性と傷害性

腸管上皮細胞 Caco-2 に対する乳酸菌の付着性を評価した。*L. pentosus* NBRC106467<sup>T</sup>, *L. pentosus* AWA1952, *L. brevis* NBRC107147<sup>T</sup>, *L. brevis* AWA1984 及び *L. brevis* AWA1985 は、おおよそ単位面積当たり 1, 000~3, 000 個程度であった (Fig. 13)。一方、*L. pentosus* AWA1922 は約 160, 000 個、*L. pentosus* AWA1955 は約 46, 000 個と、他の菌株に比べ強い付着性を示した。また、乳酸菌の Caco-2 細胞への傷害性評価では、全ての菌株で LDH の漏出は確認されなかった (データ未掲載)。

### 3. 3. 4. 乳酸菌の GABA 産生性

GABA の前駆体としてグルタミン酸ナトリウムを添加した MRS 液体培地で乳酸菌を培養したときの、培地中の GABA 濃度と生菌数を測定した。GABA 濃度について、*L. brevis* NBRC107147<sup>T</sup> の GABA 濃度は約 4.6 g/L であったのに対し、阿波晩茶から分離した *L. brevis* AWA1978, *L. brevis* AWA1984, *L. brevis* AWA1985 は約 16~18 g/L と高かった (Fig. 14A)。一方、*L. brevis* AWA19101 は *L. brevis* NBRC107147<sup>T</sup> よりも GABA 濃度が低かった。また、*L. pentosus* については、全ての菌株で GABA は検出されなかった。培養後の生菌数については、*L. brevis* NBRC107147<sup>T</sup> は約  $0.5 \times 10^9$  cfu/mL で、*L. brevis* AWA1978, *L. brevis* AWA1984, *L. brevis* AWA1985 は約  $1.1 \sim 1.2 \times 10^9$  cfu/mL, *L. brevis* AWA19101 は約  $0.9 \times 10^9$  cfu/mL であったことから、阿波晩茶から分離した乳酸菌の生菌数は基準株よりも多かった (Fig. 14B)。

### 3. 3. 5. 乳酸菌の茶葉抽出液に対する生育性

1%グルコースを含む茶葉抽出液で乳酸菌を培養し、生育率を測定した (Fig. 15)。*L. brevis* について、阿波晩茶から分離した *L. brevis* AWA1978, *L. brevis* AWA1984, *L. brevis* AWA1985, *L. brevis* AWA19101 は *L. brevis* NBRC 107147<sup>T</sup> よりも茶葉抽出液に対して高い生育性を示した。

## 3. 4. 考察

本研究では、阿波晩茶から分離した乳酸菌について特性の評価を行った。分離された *L. pentosus* の中でユニークな培養特性を示す菌株が確認されたが、乳酸菌には多糖を産生する株が存在し、*L. pentosus* AWA1922 は細胞膜外膜やペプチドグリカン層に共有結合した莢膜多糖を、*L. pentosus* AWA1955 は菌体から遊離したスライム多糖を産生していると推察される (福田, 2015)。糖の資化性評価では、*L. brevis* AWA1984, *L. brevis* AWA1985 は同じ

資化性パターンを示したことから、特性が似ている可能性が考えられる。その他の菌株はそれぞれで資化性パターンが異なったことから、特性も異なることが示唆された。

人工消化液耐性の評価では、pH3.0 または 2.0 に調整した人工胃液と、人工腸液を用いた。胃液の pH は、空腹時は 2.0 未満で、胃に食物が入ると上昇する(武藤, 2002)。本研究では、阿波晩茶から分離した菌株全てで pH3.0 の人工胃液に耐性があり、かつ人工腸液に耐性を有することから、乳酸菌を食事とともに経口摂取した場合、生菌として腸まで届く可能性が示唆された。一方、pH2.0 の人工胃液で乳酸菌を処理した場合は全ての菌株で生菌数は減少したが、種レベルでは *L. brevis* は *L. pentosus* よりも生存した。原因として、*L. brevis* はグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) によるグルタミン酸の脱炭酸反応で産生される GABA が、培地 pH の上昇に寄与していることが考えられるが、*L. pentosus* は GABA の産生が認められず、GAD 活性が無いと考えられるため、酸耐性は *L. brevis* よりも低くなると推察される。また、*L. pentosus* の中では、*L. pentosus* AWA1922 が *L. pentosus* NBRC106467<sup>T</sup> 及び *L. pentosus* AWA1952 よりも生存し、高い耐性を示した。*L. pentosus* AWA1922 は *L. pentosus* の中では人工胃液に対する耐性が高く、莢膜型の菌体外多糖により保護されている可能性がある(Darilmaz, 2013)。一方で、スライム型の菌体外多糖を産生する *L. pentosus* AWA1955 は pH2.0 の人工胃液処理で生菌は検出されず、菌体外多糖が遊離しているためか菌体保護効果は確認されなかった。また、*L. pentosus* AWA1952 については試験による結果のバラツキが大きく、pH2.0 の人工胃液に対する耐性は高くないと考える。乳酸菌の人工胃液耐性を評価した先行研究においても、人工胃液の pH が 3.0 未満になるとおよそその菌株で生菌数は減少しているが(瀧口ら, 2000;熊谷ら, 2001;磯部ら, 2007;中川ら, 2018)、中には pH2.0 に調整した人工胃液で 3 時間処理した後でも約  $10^5$  cfu/mL 生存する *Lactobacillus gasseri* strain Yukijirushi(瀧口ら, 2000)や、*L. plantarum*(磯部ら, 2007)が報告されている。本研究とは試験条件が異なる部分はあるものの、*L. pentosus* AWA1922, *L. brevis* AWA1978, *L. brevis* AWA1984, *L. brevis* AWA1985 も同程度の人工胃液耐性を有すると考えられる。

人工腸液で処理すると, *L. pentosus* は全ての菌株で耐性があったが, *L. brevis* では *L. brevis* AWA1978, *L. brevis* AWA1984, *L. brevis* AWA1985 は *L. brevis* NBRC 107147<sup>T</sup>よりも耐性が高いことが示された. 人工腸液に含まれる胆汁酸は界面活性作用があり, 微生物の細胞膜を損傷して生育阻害殺菌活性を示す (Begley *et al.* , 2005; 横田, 2010). 細菌の胆汁酸に対する防御機構としては, バイオフィーム形成 (Lebeer *et al.* , 2007) や細胞膜の脂肪酸組成を変化させる (Ruiz *et al.* , 2007) ことにより細胞膜への損傷を軽減させることが報告されている. 本研究で人工腸液に耐性のあった菌株についても, 原因は分かっていないが, 何らかの機構により細胞膜が胆汁酸に対して耐性を示したことが考えられる.

腸管上皮細胞に対する付着性では, *L. pentosus* AWA1922 は高い付着性を示し, 次いで *L. pentosus* AWA1955 が高かった. これらは産生する菌体外多糖が腸管上皮細胞と相互作用し, 付着性向上に寄与している可能性がある (Alp *et al.* , 2010). また, これら以外の菌株の付着性が低かったのは, 菌体外多糖産生能が低い, もしくは無いためであると考えられる. 阿波晩茶から分離された乳酸菌の中では, 特に *L. pentosus* AWA1922, *L. pentosus* AWA1955 がプロバイオティクスとして有用である可能性が示唆された. 今後は, 腸内細菌叢に与える影響を検討する必要がある. また, 傷害性の評価について, LDH の漏出が確認されなかったことと, *L. pentosus* 及び *L. brevis* は製品への応用実績があることから, 有害性は低いと考えられる.

グルタミン酸ナトリウムを含む MRS 液体培地で乳酸菌を培養したとき, *L. brevis* AWA1978, *L. brevis* AWA1984, *L. brevis* AWA1985 は *L. brevis* NBRC 107147<sup>T</sup>よりも高い GABA 濃度を示したが, これは生菌数の多さが関与している可能性がある. 一方で, *L. brevis* AWA19101 は *L. brevis* NBRC 107147<sup>T</sup>よりも GABA 濃度が低かったのにも関わらず生菌数は多かったため, *L. brevis* が産生する GABA 濃度は生菌数と GAD 活性に影響を受けることが考えられる (早川ら, 1997). また, *L. pentosus* については全ての株で GABA 産生が確認されず, GAD 活性が無いことが示唆された. GABA 産生量は培養条件に影響されるので (Villegas *et al.* , 2016), 今後 GABA 産生の最適条件を検討していく.



また, 阿波晩茶から分離した *L. brevis* は茶葉抽出液中での生育性が高かった. 乳酸菌の茶葉抽出液に対する生育性については, 2 章の考察でも述べたとおり, *L. pentosus* の細胞壁ペプチドグリカンが *meso*-DAP 型で, カテキン類等に対して耐性が高いことされている. 一方, *L. brevis* の細胞壁ペプチドグリカンは *Lys-Asp* 型で, 種としてカテキン類等に対する耐性は高くないが, 茶葉抽出物中で生育し, GABA を高産生する株は報告されている(森ら, 2007; 渡辺ら, 2009). 詳細はわかっていないが, 阿波晩茶から分離した *L. brevis* も茶葉成分が多い環境に生息していたため, これらの成分に対して基準株よりも高い耐性を持つことが推察される.

## 第 4 章 結言

本研究では、阿波晩茶に生息する乳酸菌について、第 2 章で発酵に関与する乳酸菌を解析するとともに、第 3 章では阿波晩茶から分離した乳酸菌の地域資源としての利用を検討するため特性の評価を行った。

第 2 章では、阿波晩茶の乳酸菌は嫌気発酵中、茶葉成分により *L. pentosus* または *L. plantarum* に選抜されることが示唆された。茶葉成分については、嫌気発酵により乳酸などの有機酸が増加し、カテキン類が減少する傾向にあった。阿波晩茶の安定した製造のためには、*L. pentosus* や *L. plantarum* の生育に適した環境を整えることが重要であると考えられる。例えば、嫌気発酵時に空気が入らないようにする、殺青工程で生じた茹で汁を加える等が有効だろう。また、阿波晩茶の嫌気発酵後茶葉からは、上勝町と那賀町では *L. pentosus* が最も頻繁に分離されたのに対し、三好市で製造される阿波晩茶は *L. plantarum* が最も多く分離され、製造地域により乳酸菌の優占種が異なることが示唆された。阿波晩茶から分離した乳酸菌を使用して *dnaK* 遺伝子に基づく系統樹を作成したところ、生産者ごとに異なっていた。また、嫌気発酵後茶葉の成分も、生産者により差異があった。阿波晩茶の乳酸菌の地域性が、風味の差異を形成していることが示唆された。

第 3 章では、阿波晩茶から分離された乳酸菌について、様々な特性を評価した。*L. pentosus* AWA1922, 及び *L. pentosus* AWA1955 は pH3.0 に調整した人工胃液及び人工腸液に対しても耐性があり、腸管上皮細胞への付着性が高かったことから、プロバイオティクスとして有用であることが示唆された。今後、これらの菌株が腸内細菌叢に与える影響等を検討していく必要がある。また、GABA を高産生する *L. brevis* AWA1978, *L. brevis* AWA1984, *L. brevis* AWA1985 が得られた。これらの菌株を使用することで、GABA を高含有する発酵食品を開発できる可能性がある。さらに、阿波晩茶から分離した *L. brevis* は茶葉抽出液中で基準株より良好な生育性を示したことから、後発酵茶へのスターターとしての利用が考えられる。本研究で得られた阿波晩茶由来乳酸菌は、機能性食品やサプリメント等に活用できる可能性を秘めているだろう。

## 謝辞

まず、本研究を遂行し、多くのご指導ご鞭撻を賜りました、産業技術総合研究所 健康医工学部門 ぐらし工学研究グループの堀江祐範研究グループ長に心より深謝申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり多大なるなご助言を賜るとともに、論文執筆のご指導を頂きました岐阜大学 応用生物科学部 応用微生物学研究室の岩橋均教授と食品栄養学研究室の中川智行教授に深く感謝申し上げます。

菌叢解析をご協力頂いた岐阜大学大学院 連合農学研究科 生物資源科学専攻の大野智生様に深く感謝申し上げます。

研究材料として、阿波晩茶の茶葉をご提供頂いた生産者の皆様に深く感謝申し上げます。

学位取得の機会を与えて下さり、また本研究について多大なるご助言を賜りました、徳島県立工業技術センターの山川誠所長、武知博憲副所長、山本澄人次長、正木孝二研究部長、企画総務担当の吉本亮子課長に深く感謝申し上げます。

日々の業務についてご協力を賜り、学位の取得のご支援を頂いた徳島県立工業技術センター 食品・応用生物担当の新居佳孝課長、市川亮一上席研究員、岡久修己研究係長、池田絵梨主任、矢野景子主任、横山直人研究員に深く感謝申し上げます。

学位取得を応援し、私生活のご支援を頂いた父 佳宏、母 郁子に深く感謝申し上げます。最後に、終始心の支えとなって頂いた妻 節子、長女 千陽に深い感謝の意を表して謝辞と致します。

## 参考文献

- Alp, G. , Aslim, B. , Suludere, Z. , and Akca, G. (2010) The role of hemagglutination and effect of exopolysaccharide production on bifidobacteria adhesion to Caco-2 cells *in vitro*. *Microbiol. Immunol.* , 54, 658-665.
- Begley, M. , Gahan, C. G. M. and Hill, C. (2005) The interaction between bacteria and bile, *FEMS Microbiol.Rev.*, 29(4), 625-651.
- 辨野義己 (2011) プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能. *モダンメディア*, 57(10), 277-287.
- Bokulich, N. A. , Kaehler, B. D. , Rideout, J. R. , Dillon, M. , Bolyen, E. , Knight, R. , Huttley, G. A. , and Caporaso, J. , G. (2018) Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin . *Microbiome*, 6, 90.
- Bolyen, E. , Rideout, J. R. , Dillon, M. R. , Bokulich, N. A. , Abnet C. C. , Al-Ghalith, G. A. , Alexander, H. , Alm, E. J. , Arumugam, M. , Asnicar, F. , Bai, Y. , Bisanz, J. E. , Bittinger, K. , Brejnrod, A. , Brislawn, C. J. , Brown, T. , Callahan, J. Caraballo-Rodríguez, A. M. , Chase, J. , Cope, E. K. , Silva, R. D. , Diener, C. , Dorrestein, P. C. , Douglas, G. M. , Durall, D. M. , Duvallet, C. , Edwardson, C. F. , Ernst, M. , Estaki, M. , Fouquier, J. , Gauglitz, J. M. , Gibbons, S. M. , Gibson, D. L. , Gonzalez, A. , Gorlick, K. , Guo, J. , Hillmann, B. , Holmes, S. , Holste, H. , Huttenhower, C. , Huttley, G. A. , Janssen, S. , Jarmusch, A. K. , Jiang, L. , Kaehler, B. D. , Kang, K. B. , Keefe, C. R. , Keim, P. , Kelley, S. T. , Knights, D. , Koester, I. , Kosciulek, T. , Kreps, J. , Langille, M. G. I. , Lee, J. , Ley, R. , Liu, Y. , Loftfield, E. , Lozupone, C. , Maher, M. , Marotz, C. , Martin, B. D. , McDonald, D. , McIver, L. J. , Melnik, A. V. , Metcalf, J. L. , Morgan, S. C. , Morton, J. T. , Naimey, A. T. , Navas-Molina, J. A. , Nothias, L. F. ,

- Orchanian, S. B. , Pearson, T. , Peoples, S. L. , Petras, D. , Preuss, M. L. , Pruesse, E. , Rasmussen, L. B. , Buur, L. , Rivers, A. , Robeson II, M. S. , Rosenthal, P. , Segata, N. , Shaffer, M. , Shiffer, A. , Sinha, R. , Song, S. J. , Spear, J. R. , Swafford, A. D. , Thompson, L. R. , Torres, P. J. , Trinh, P. , Tripathi, A. , Turnbaugh, P. J. , Ul-Hasan, S. , Hooft, J. J. J. , Vargas, F. , Vázquez-Baeza, Y. , Hippel, M. , Walters, W. , Wan, Y. , Wang, M. , Warren, J. , Weber, K. C. , Williamson. C. H. D. , Willis, A. D. , Xu. Z. Z. , Zaneveld, J. R. , Zhang, Y. , Zhu, Q. , Knight R. , and Caporaso, G. (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*, 37, 852-857.
- Bringel, F. , Castioni, A. , Olukoya, D. K. , Felis, G. E. , Torriani, S. , and Dellaglio, F. (2005) *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov. , isolated from vegetable matrices. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* , 55(Pt4), 1629-1634.
- Callahan, B. J. , McMurdie, P. J. , Rosen, M. J. , Han, A. W. , Johnson, A. J. , and Holmes , S. P. (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13, 581-583.
- Chen, S. , Zhou, Y. , Chen, Y. , and Gu, J. (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884-i890.
- Conway, E. , Downey, M. (1950) An outer metabolic region of the yeast cell. *Biochem. J.* , 47(3), 347–355.
- Darilmaz, D. (2013) Relationship between gastrointestinal tolerance and exopolysaccharide production of propionibacteria strains under different pH and bile conditions. *Int. J. Dairy Technol.* , 66(2), 194-201.
- 福田健二(2015)乳酸菌の細胞外多糖. *日本応用糖質科学会誌*, 5(1), 31-37.
- 福司山エツ子, 太院億(2009)ラペソー調査研究. *鹿児島女子短期大学紀要*, 44, 31-41.
- Fuller, R(1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* , 66(5), 365-378.

- 郭雲飛, 呂毅, 駱少君, 坂田完三 (2004) 黒茶-微生物発酵を取り入れた茶. 日本食品科学工学会誌, 51(7), 323-331.
- 早川潔, 上野義栄, 河村貞也, 谷口良三, 小田耕平 (1997) 乳酸菌による  $\gamma$ -アミノ酪酸の生産. 生物工学会誌, 75(4), 239-244.
- Henning, S. M. , Niu, Y. , Liu, Y. , Lee, N. H. , Hara, Y. , Thames, G. D. , Minutti, R. R. , Carpenter, C. L. , Wang, H. , and Heber, D. (2005) Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals. J. Nutr. Biochem. , 16(10), 610-616.
- 平山洋佑, 遠藤明仁 (2016) 乳酸菌分類の現在とビフィズス菌・乳酸菌分類小委員会が提言した新規乳酸菌種提唱のための最少基準. 腸内細菌学雑誌, 30(1), 17-28.
- 堀江祐範, 西岡浩貴, 多田敦美, 杉野紗貴子, 水野智文, 豊留孝仁, 岩橋均 (2019) バタバタ茶の発酵に関与する微生物. 美味技術学会誌, 18(2), 62-70.
- Horie, M. , Sato, H. , Tada, A. , Nakamura, S. , Sugino, S. , Tabei, Y. , Katoh, M. , and Toyotome, T. (2019a) Regional characteristics of *Lactobacillus plantarum* group strains isolated from two kinds of Japanese post-fermented teas, Ishizuchi-kurocha and Awa-bancha. Biosci Microbiota Food Health, 38(1), 11-12.
- Horie, M. , Tada, A. , Kanamoto, N. , Tamai, T. , Fukuda, N. , Sugino, S. , Toyotome, T. , and Tabei, Y. (2019b) Evaluation of lactic acid bacteria and component change during fermentation of Ishizuchi-kurocha. J. Food Process. Preserv. , 43(11), e14186.
- 堀江祐範, Ruengsomwong, S. , Wannissorn, B. (2020) タイ王国の後発酵茶「ミヤン」の製法調査. 日本食品工学会誌, 21(3), 125-137.
- Huang, C. H. , Lee, F. L. , and Liou, J. S. (2010) Rapid discrimination and classification of the *Lactobacillus plantarum* group based on a partial *dnaK* sequence and DNA fingerprinting techniques. Antonie van Leeuwenhoek, 97(3), 289-296.
- 磯部由香, 松井宏樹, 安見真帆, 成田美代 (2007) 耐酸性を有する乳酸菌の検索. 日本家

政学会誌, 58(6), 337-341.

Ito, F. , Niwa, R. , Syaputri, Y. , Ikagawa, Y. , Mizuno, T. , Horie, M. , and Iwahashi, H. (2021) Draft Genome Sequence of *Lactiplantibacillus pentosus* AWA1501, Isolated from Awa-bancha. ASM, 10(30), e00518-21.

Jounai, K. , Ikado, K. , Sugimura, T. , Ano, Y. , Braun, J. , and Fujiwara, D. (2012) Spherical Lactic Acid Bacteria Activate Plasmacytoid Dendritic Cells Immunomodulatory Function via TLR9-Dependent Crosstalk with Myeloid Dendritic Cells. PLoS One, 7(4), e32588.

加藤みゆき, 田村朝子, 水落由美子, 大森正司, 難波敦子, 宮川金二郎(1993)阿波番茶製造工程における風味成分の変化とその特徴. 日本家政学会誌, 44(7), 561-565.

加藤みゆき, 田村朝子, 大森正司, 難波敦子, 宮川金二郎, 西村修, 亀田弥(1994)碁石茶製造工程における風味成分の変化とその特徴. 日本家政学会誌, 45(6), 527-532.

加藤みゆき, 田村朝子, 斎藤ひろみ, 大森正司, 難波敦子, 宮川金二郎(1995)石鎚黒茶製造工程における風味成分の変化とその特徴. 日本家政学会誌, 46(6), 525-530.

Klindworth, A. , Pruesse, E. , Schweer, T. , Peplies, J. , Quast, C. , Horn, M. , and Glöckner, F. M. (2013) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res, 41(1), e1.

小林加奈理, 長戸有希子, 青井暢之, ジュネジャ, L. R. , 金武祚, 山本武彦, 杉本助男(1998)L-テアニンのヒトの脳波に及ぼす影響. 日本農芸化学会誌, 72(2), 153-157.

小山翔大, 小泉香菜, 妙田貴生, 内野昌孝, 藤森嶺, 高野克己(2019)後発酵茶・碁石茶の特徴香気成分とその生成に関与する微生物の解析. 日本食品保蔵科学会誌, 45(3), 119-127.

熊谷武久, 瀬野公子, 川村博幸, 渡辺紀之, 岡田早苗(2001)植物性乳酸菌の食品発酵性と食餌モデル培地における生育. 日本食品科学光学会誌, 48(9), 667-683.

- Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing, In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-175. John Wiley & Sons, New York.
- Lebeer, S. , Verhoeven, T. L. A. , Vélez, M. P. , Vanderleyden, J. , and De Keersmaecker, S. C. J. (2007) Impact of Environmental and Genetic Factors on Biofilm Formation by the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* , 73(21), 6768-6775.
- 増田健幸, 中田雅也, 岡田早苗, 保井久子(2010) *Pediococcus pentosaceus* Sn26 株のアレルギー性下痢症抑制作用及びその作用機序解析. *日本乳酸菌学会誌*, 21(1), 42-49.
- 宮崎絵梨, 中西謙二(2007) 春期阿波番茶製造工程における各種成分分析. *徳島県立工業技術センター研究報告*, 16, 37-40.
- Moal, V. L. , Amsellem, R. , Servin, A. L. , and Coconnier, M. (2002) *Lactobacillus acidophilus* (strain LB) from the resident adult human gastrointestinal microflora exerts activity against brush border damage promoted by a diarrhoeagenic *Escherichia coli* in human enterocyte-like cells. *Gut*, 50(6), 803-811.
- 森久子, 渡部恭子, 磯野義員(2007) 茶葉抽出物中で  $\gamma$ -アミノ酪酸を生成する乳酸菌 *Lactobacillus brevis* mh4219 の分離とそれを用いた発酵茶飲料のストレス軽減効果. *生化学工学会誌*, 85(12), 521-526.
- Mukai, T. , Asasaka, T. , Sato, E. , Mori, K. , Matsumoto, M. , and Ohori, H. (2002) Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Immunol. Med. Microbiol.* , 32(2), 105-110.
- 武藤泰敏(2002) 消化・吸収, 改訂新版, pp. 196-197, 第一出版, 東京.
- 中川眸(1979) 富山県蛭谷における飲茶風習(バタバタ茶)について. *調理科学*, 12(4), 246-251.
- 中川良二(2018) 乳酸菌 HOKKAIDO 株を用いた機能性を有する食品等の開発と技術普及. *日本食品科学工学会誌*, 65(6), 283-289.



- 中川智行, 久保田太樹, 西津貴久, 妙田貴生, 久保田和花, 田島彩奈, 若山敬嗣, 日比野歩美, 佐藤優太, 福岳寛隆, 早川享志 (2014) 岐阜県郡上市の地域乳酸菌のスクリーニングとヨーグルト発酵菌としての評価. 美味技術学会誌, 13 (2), 5-11.
- Narukawa, M. , Morita, K. , and Hayashi, Y, (2008) L-Theanine elicits an umami taste with inosine 5'-monophosphate. Biosci. Biotechnol. Biochem. , 72 (11), 3015-3017.
- Narukawa, M. , Kimata, H. , Noga, C. , and Watanabe, T. (2010) Taste characterisation of green tea catechins. J. Food Process. Preserv. , 45 (8), 1579-1585.
- 西脇俊和, 下僚明 (2014/7/18) 新規乳酸菌およびこの乳酸菌を利用した発酵食品の製造方法. 日本国特許庁, 特許第 5577559 号.
- Niwa, R. , Syaputri, Y. , Horie, M. , and Iwahashi, H. (2020) Draft genome sequence of *Lactobacillus plantarum* IYO1511 , isolated from Ishizuchi-kurocha . Microbiology Resource Announcements, 9 (18), e00143-20.
- 大森正司 (2017) お茶の科学 「色・香り・味」を生み出す茶葉のひみつ, 初版, pp. 25-28. 講談社, 東京.
- 岡田早苗, 高橋尚人, 小原直弘, 内村泰, 小崎道雄 (1996) 阿波晩茶の発酵に関与する微生物, 日本食品科学工学会誌, 43 (1), 12-20.
- 岡田早苗 (2002) 植物性乳酸菌世界とその秘める可能性. 日本乳酸菌学会誌, 13 (1), 23-26.
- 岡田早苗 (2010) 乳酸菌の自然界での分布, 日本乳酸菌学会, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 初版, pp. 10-15. 京都大学学術出版会, 京都.
- Osawa, R. , Kuroiso, K. , Goto, S. , and Shimizu, A. (2000) Isolation of tannin-degrading Lactobacilli from humans and fermented foods. Appl. Environ. Microbiol. , 66 (7), 3093-3097.
- 小関誠, Juneja, L. R. , 白川修一郎 (2004) アクチグラフを用いた L-テアニンの睡眠改善効果の検討. 日本生理人類学会誌, 9 (4), 143-150.

- Parente, E. , Ciocia, F. , Ricciardi, A. , Zotta, T. , Felis, G. E. , and Torriani, S. (2010) Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *Int. J. Food. Microbiol.* , 144(2), 270-279.
- Pierce, K. M. , Hoggard, J. C. , Hope, J. L. , Rainey, P. M. , Hoofnagle, A. N. , Jack, R. M. , Wright, B. W. , and Synovec, R. E. (2006) Fisher Ratio Method Applied to Third-Order Separation Data To Identify Significant Chemical Components of Metabolite Extracts. *Anal. Chem.* , 78(14), 5068-5075.
- Quast, C. , Pruesse, E. , Yilmaz, P. , Gerken, J. , Schweer, T. , Yarza, P. , Peplies, J. , and Glöckner, F. O. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 41, D590–D596.
- Robeson, M. S. , O'Rourke, D. R. , Kaehler, B. D. , Ziemski, M, Dillon, M. R. , Foster, J. T, and Bokulich, N. A. (2020) RESCRIPt: Reproducible sequence taxonomy reference database management for the masses . *bioRxiv* , doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.05.326504>.
- Ruiz, L. , Sánchez, B. , Ruas-Madiedo, P. , De Los Reyes-Gavilán, C. G. , and Margolles, A. (2007) Cell envelope changes in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* as a response to bile. *FEMS Microbiol. Lett.* , 274(2) 316-322, 2007.
- 志田寛(2010)*Lactobacillus casei* YIT 9029(乳酸菌シロタ株)のアレルギー抑制効果:作用機序と臨床応用への可能性. *日本乳酸菌学会誌*, 21(2), 107-111.
- 瀧口隆一, 鈴木豊(2000)乳酸菌の消化液中での生残性. *腸内細菌学雑誌*, 14(1), 11-18.
- 徳野隆(2020)第四章歴史・流通・食文化 第一節近世・近代前期における阿波の茶生産, 徳島県県民環境部スポーツ・文化局文化資源活用課, 国選択記録作成等の措置を講ずべき無形の民俗文化財 四国山地の発酵茶の製造技術「阿波晩茶製造技術」調査報告書, pp. 43-51. 徳島県, 徳島.

Torriani, S. Felis, G. E. , and Dellaglio, F. (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.* , 67 (8), 3450-3454.

内野昌孝, 小山翔大, 高野克己 (2020) 徳島県産後発酵茶「阿波番茶」の微生物とポリフェノールについて. *日本食品保蔵科学会誌*, 46(2), 63-69.

上野義栄, 平賀和三, 森義治, 小田耕平 (2007) 漬物から  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 高生産性乳酸菌の分離とその応用. *生物工学会誌*, 85(3), 109-114.

Villegas, J. M. , Brown, L. , Giori, G. S. , Hebert, E. M. (2016) Optimization of batch culture conditions for GABA production by *Lactobacillus brevis* CRL 1942, isolated from quinoa sourdough. *J. Food Sci. Technol.* , 67(16), 22-26.

Watanabe, J. , Shinmoto, H. , and Tsushida, T. (2005) Coumarin and flavone derivatives from estragon and thyme as inhibitors of chemical mediator release from RBL-2H3 Cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* , 69(1), 1-6.

渡辺祐子, 早川潔, 植野洋志 (2009) 乳酸菌による茶葉中での  $\gamma$ -アミノ酪酸の生産, 茶業研究報告, 107, 61-69.

Yilmaz, P. , Parfrey, L. W. , Yarza, P. , Gerken, J. , Pruesse, E. , Quast, C. , Schweer, T. , Peplies, J. , Ludwig, W. , and Glöckner, F. O. (2014) The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res*, 42, D643–D648.

横尾岳大, 竹田麻理子, 石田達也, 小泉明子, 木村勝紀, 浅見幸夫, 幡野雅彦 (2020) *Lactobacillus pentosus* OLL203984 で調製した茶発酵物が *Ncx/Hox11L. 1* 遺伝子ノックアウトマウスの消化管通過時間および腸内細菌叢に与える影響. *日本乳酸菌学会誌*, 31(2), 99-104.

横田篤 (2010) 乳酸菌・ビフィズス菌における胆汁酸ストレス応答. *日本乳酸菌学会誌*, 21

(2), 87-94.

Yokoyama, S. , Hiramatsu, J. , and Hayakawa, K. (2002) Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005. J. Biosci. Bioeng. , 93(1), 95-97.

吉田茂利, 大畑映利子, 増田健幸, 岡田早苗, 宮崎洋二, 山下哲郎, 保井久子(2010)アトピー性皮膚炎モデルマウスにおける *Lactobacillus plantarum* FG4-4 のアレルギー抑制作用, 日本乳酸菌学会誌, 21(3), 214-220.

Table 1. Sample tea leaves.

Producer	Lot	Region produced	Year of production
A	1	Naka	2018
	2	Naka	2018
	3	Naka	2018
	4	Naka	2019
	5	Naka	2019
	6	Naka	2020
B	1	Naka	2018
	2	Naka	2019
C	1	Naka	2018
D	1	Kamikatsu	2018
	2	Kamikatsu	2019
	3	Kamikatsu	2020
E	1	Kamikatsu	2018
	2	Kamikatsu	2019
F	1	Kamikatsu	2018
G	1	Kamikatsu	2018
H	1	Miyoshi	2019
	2	Miyoshi	2019
	3	Miyoshi	2020
I	1	Miyoshi	2020
	2	Miyoshi	2020

Table 2. Analysis conditions for GC × GC–TOFMS.

Inlet Temperature	250°C
Carrier gas	Helium, 1.0 mL/min
1st Oven temperature	40°C (1 min) → 10°C/min → 250°C (10 min hold)
2nd Oven temperature	+5°C offset from 1st Oven
Modulator	+15°C offset from 2nd Oven
Modulation period	5 s(Hot : 1.5s, Cold : 1.0 s)
Transfer temperature	250°C
Ionization method	Electron ionization
Ion source temperature	230°C
Detector	LECO Pegasus 4D Time-of-Flight Mass Spectrometer
Acquisition rate	200 spectra/sec
Stored mass range	33 to 600 u

Table 3. Number of bacteria isolated by MRS agar plates in each production process.

Producer	A	A	A	B	C	D	E	F	G
Lot	1	2	3	1	1	1	1	1	1
Year of production	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018	2018
Region produced	Naka	Naka	Naka	Naka	Naka	Kamikatsu	Kamikatsu	Kamikatsu	Kamikatsu
Raw tea leaves	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	6		1	-	-	-	-	
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	-		-	-	-	-	2	
	<i>Lactococcus lactis</i>	-		-	3	-	1	2	
	<i>Weissella paramesenteroides</i>	2		-	-	-	-	-	
	<i>Weissella oryzae</i>	-	NT	-	-	1	-	-	NT
	<i>Weissella cibaria</i>	-		-	-	-	2	-	NT
	<i>Enterococcus gallinarum</i>	-		-	-	-	2	-	
	<i>Enterococcus gilvus</i>	-		-	-	-	-	1	
	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	-		-	-	-	-	1	
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-		-	-	-	-	1	
A few hours after boiling	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	4			-	3	-		
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	1			-	-	-		
	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	-			1	-	-		
	<i>Enterococcus faecium</i>	-			2	-	-		
	<i>Lactococcus lactis</i>	-	NT	NT	1	-	-	NT	NT
	<i>Weissella paramesenteroides</i>	1			-	-	-		
	<i>Sphingomonas leidyi</i>	1			-	-	-		
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-			-	-	3		
	<i>Staphylococcus hominis</i>	-			-	-	1		
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-			-	-	2		
After anaerobic fermentation	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	18	3	3	7	6	6	3	5
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	-	-	-	3	3	-	5	-
	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	-	-	2	-	-	-	-	-
	<i>Paucilactobacillus suebicus</i>	-	1	-	-	-	-	-	-
	<i>Secundilactobacillus collinoides</i>	-	1	-	-	-	-	-	-
	<i>Lacticaseibacillus pantheris</i>	-	-	1	-	-	-	-	-
	<i>Levilactobacillus brevis</i>	-	-	1	-	-	-	-	-

NT : Not tested, - : Not isolated.

Table 4. Anaerobic fermentation changes the components of Awa-bancha.

Producer		A	A	B	C	D	F						
Lot		1	3	1	1	1	1						
Year of production		2018	2018	2018	2018	2018	2018						
Region produced		Naka	Naka	Naka	Naka	Kamkikatsu	Kamkikatsu						
Sample		Raw tea leaves	After anaerobic fermentation	Raw tea leaves	After anaerobic fermentation	Raw tea leaves	After anaerobic fermentation	Raw tea leaves	After anaerobic fermentation	Raw tea leaves	After anaerobic fermentation	Raw tea leaves	After anaerobic fermentation
pH		5.3	5.4	5.3	4.5	5.1	4.8	5.0	4.3	5.2	4.1	5.3	4.5
Oxalic acid	mg/100g	1238.7	1113.4	624.1	615.0	417.2	299.8	1525.7	-	1149.7	1032.1	667.4	723.1
Citric acid	mg/100g	-	-	463.9	-	-	-	-	-	-	-	939.8	508.0
Malic acid	mg/100g	227.5	-	405.0	-	350.2	-	423.7	-	330.0	-	269.1	-
Succinic acid	mg/100g	224.7	-	66.8	592.1	73.5	471.0	110.5	657.3	139.0	623.9	90.8	799.5
Lactic acid	mg/100g	-	646.1	-	2451.8	-	675.0	-	2421.9	-	5201.9	-	2577.6
Acetic acid	mg/100g	54.1	153.7	66.8	1557.7	-	795.6	-	1167.5	-	856.3	43.2	751.9
Total organic acids	mg/100g	1745.0	1913.2	1626.6	5216.6	840.9	2241.4	2059.9	4246.7	1618.8	7714.3	2010.3	5360.1
EGC	mg/100g	1205.5	772.4	1211.4	1427.7	1481.5	775.3	1345.5	388.3	1628.1	4734.6	519.4	2420.0
C	mg/100g	619.9	267.7	589.4	226.1	221.1	58.8	215.7	-	228.3	120.9	91.8	25.6
EGCg	mg/100g	811.6	539.6	202.5	283.7	1177.0	1103.0	1291.7	2116.9	1682.2	1621.2	575.3	1210.8
EC	mg/100g	188.0	164.6	482.0	-	512.5	-	331.4	178.9	680.6	1312.6	148.4	-
ECg	mg/100g	144.2	94.4	196.2	-	543.7	226.7	415.4	370.2	664.6	454.7	499.0	458.4
Total catechins	mg/100g	2969.2	1838.6	2681.5	1937.5	3935.8	2163.8	3599.7	3054.3	4883.8	8243.9	1833.8	4114.8
Caffeine	mg/100g	1465.3	1587.5	2009.4	1533.7	1189.4	1111.8	1400.5	915.0	1489.6	1334.9	1902.5	1860.9

- : Overlapped with other peaks or below detectable level.

EGC : Epigallocatechin, C : Catechin, EGCg : Epigallocatechin gallate, EC : Epicatechin, ECg : Epicatechin gallate.

Pyroglutamic acid was not detected.



Table 5. Number of lactic acid bacteria isolated from Awa-bancha and Ishizuchi-kurocha using MRS agar plate for each producer.

Types of post-fermented tea	Awa-bancha	Awa-bancha	Awa-bancha	Awa-bancha	Awa-bancha	Awa-bancha	Awa-bancha	Awa-bancha	Awa-bancha	Awa-bancha	Awa-bancha	Awa-bancha	Ishizuchi-kurocha
Region produced	Naka	Naka	Naka	Naka	Kamikatsu	Kamikatsu	Kamikatsu	Miyoshi	Miyoshi	Miyoshi	Miyoshi	Miyoshi	Sajo
Year of produce	2019	2019	2020	2019	2019	2020	2019	2019	2019	2020	2020	2020	2020
Producer	A	A	A	B	D	D	E	H	H	H	I	I	
Lot	4	5	6	2	2	3	2	1	2	3	1	2	
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	8	8	11	6	12	12	15	-	-	-	-	-	-
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	-	-	1	2	-	-	-	16	6	7	7	9	10
<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-
<i>Secundilactobacillus collinoides</i>	3	3	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Lacticaseibacillus pantheris</i>	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	3	-	2	-
<i>Levilactobacillus brevis</i>	-	-	-	-	-	-	-	3	1	-	-	-	2
<i>Lactiplantibacillus mudanjiangensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
Total isolates	11	15	12	8	12	12	15	21	8	11	10	11	12

- : Not isolated

Table 6. Lactic acid bacteria used for phylogenetic analysis of *dnaK* gene.

Strain	Species	Isolation				
		Source	Region	Year	Producer	Lot
NBRC106467 <sup>T</sup>	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Corn silage				
NBRC12011	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>					
NBRC15891 <sup>T</sup>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Pickled cabbage				
NBRC107151 <sup>T</sup>	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	Beer spoilage agent				
A1915	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha	Naka	2019	A	4
A1922	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha	Naka	2019	A	5
A2009	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha	Naka	2020	A	6
A2011	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha	Naka	2020	A	6
B1901	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha	Naka	2019	B	2
B1907	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Awa-bancha	Naka	2019	B	2
B1910	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Awa-bancha	Naka	2019	B	2
B1911	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha	Naka	2019	B	2
D1915	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha	Kamikatsu	2019	D	2
D1925	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha	Kamikatsu	2019	D	2
D2001	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha	Kamikatsu	2020	D	3
D2010	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha	Kamikatsu	2020	D	3
E1902	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha	Kamikatsu	2019	E	2
E1915	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha	Kamikatsu	2019	E	2
H1901	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Awa-bancha	Miyoshi	2019	H	1
H1922	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Awa-bancha	Miyoshi	2019	H	2
H2001	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Awa-bancha	Miyoshi	2020	H	3
H2011	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Awa-bancha	Miyoshi	2020	H	3
I2001	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	Awa-bancha	Miyoshi	2020	I	1
I2002	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Awa-bancha	Miyoshi	2020	I	1
I2006	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	Awa-bancha	Miyoshi	2020	I	1
I2015	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Awa-bancha	Miyoshi	2020	I	2
IZ2001	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Ishizuchi-kurocha	Saijo	2020		
IZ2010	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	Ishizuchi-kurocha	Saijo	2020		

Table 7. Component of tea leaves after anaerobic fermentation for each producer.

		mg/100g											
Producer	A	A	A	B	D	D	E	H	H	H	I	I	
Lot	4	5	6	2	2	3	2	1	2	3	1	2	
Region produced	Naka	Naka	Naka	Naka	Kamikatsu	Kamikatsu	Kamikatsu	Miyoshi	Miyoshi	Miyoshi	Miyoshi	Miyoshi	
Year of production	2019	2019	2020	2019	2019	2020	2019	2019	2019	2020	2020	2020	
Organic acids	Oxalic acid	126.1	233.2	732.4	183.2	372.7	709.8	669.9	130.9	112.2	358.8	2260.7	1506.4
	Citric acid	13.9	-	80.7	76.4	114.3	235.1	367.1	-	-	17.4	59.1	69.1
	Malic acid	-	-	36.7	-	-	-	16.2	-	-	24.3	26.9	29.0
	Succinic acid	280.5	126.0	226.0	206.1	195.1	286.0	287.5	90.3	113.5	236.8	519.9	427.9
	Lactic acid	3505.5	688.8	2399.3	2297.6	829.4	1618.6	1237.1	561.1	958.3	83.4	2751.2	3036.5
	Acetic acid	623.7	1773.1	817.5	382.6	385.5	489.4	849.3	133.4	352.7	891.6	267.0	342.6
	Total organic acids	4549.7	2821.1	4292.6	3145.9	1897.1	3338.9	3427.0	915.8	1536.7	1612.3	5884.8	5411.3
Catechins	EGC	1123.0	1081.4	1893.4	2013.3	5528.9	6145.4	2531.5	2315.6	2942.8	5441.4	6685.7	6656.2
	C	371.0	312.5	403.3	57.9	161.1	203.7	37.4	149.1	164.7	-	289.6	249.9
	EGCg	1001.3	105.4	1231.2	3084.5	1625.0	2192.8	960.6	3484.4	1921.2	803.6	3738.3	3032.8
	EC	111.6	-	-	91.8	1402.6	1401.8	-	101.6	-	-	1265.9	1159.7
	ECg	247.0	-	340.2	644.3	477.9	772.7	322.9	601.8	353.1	156.6	603.1	553.7
	Total catechins	2853.8	1499.3	3868.2	5891.8	9195.5	10716.3	3852.4	6652.5	5381.8	6401.6	12582.6	11652.3
Free amino acids	Caffeine	591.2	1744.2	1453.4	497.5	1392.5	729.6	1004.0	1652.1	1368.6	1485.4	1541.3	466.8
	O-Phosphoserine	12.9	22.9	16.6	13.0	12.1	13.2	17.4	7.2	9.3	10.5	11.5	6.7
	Taurine	5.5	24.7	8.7	7.1	3.2	3.1	-	4.1	6.2	4.2	3.4	2.2
	O-Phosphoethanolamine	2.4	4.4	2.1	3.3	2.7	3.2	2.5	1.8	1.5	1.3	3.0	-
	Threonine	0.5	0.8	-	-	0.7	-	0.5	-	-	-	-	-
	Serine	1.4	2.1	0.8	1.2	1.6	0.8	2.1	1.8	0.7	3.1	2.0	1.3
	Asparagine	-	8.0	-	12.5	-	-	-	11.9	16.9	-	-	-
	Glutamic acid	90.2	44.8	27.8	112.0	80.0	118.4	115.0	67.5	14.7	19.7	97.3	44.6
	Glutamine	-	-	3.1	-	1.1	-	-	-	-	-	-	2.5
	Theanine	187.9	99.6	145.8	338.2	122.2	18.7	187.2	298.8	468.5	404.2	148.6	83.1
	Glycine	2.1	12.1	3.3	3.5	1.3	2.0	0.4	11.5	2.6	0.8	4.0	1.8
	Alanine	11.8	96.1	22.3	33.7	15.5	18.7	19.8	0.0	16.2	8.3	21.8	16.7
	Citrulline	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	α-Aminobutyric acid	1.1	2.6	2.8	1.1	2.1	2.1	19.8	-	1.1	3.5	3.9	2.0
	Valine	4.1	4.7	3.5	11.0	3.1	2.0	8.4	8.5	6.6	7.1	4.6	2.5
	Cystine	-	-	-	-	1.4	-	-	-	-	-	-	-
	Cystathionine	-	2.0	-	0.2	-	-	0.2	-	-	-	-	-
	Isoleucine	-	5.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Leucine	-	19.1	0.4	1.1	-	-	0.3	-	0.3	-	0.3	-
	Tyrosine	-	8.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Phenylalanine	-	11.0	-	2.4	0.7	-	-	-	-	-	-	-
	γ-Aminobutyric acid	25.7	80.5	11.4	10.7	15.0	7.2	2.2	22.1	65.6	38.3	4.5	2.3
	Ammonium chloride	5.9	30.9	7.6	13.0	11.1	8.6	11.9	13.0	17.2	17.3	25.5	16.6
	Ornithine	31.3	2.1	19.9	1.7	-	-	9.8	3.7	1.4	2.6	-	-
	1-Methyl-L-histidine	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-
	Histidine	-	-	-	2.0	1.2	-	-	-	0.4	-	-	-
	Lysine	1.2	1.2	5.1	2.4	0.3	-	-	0.6	1.6	-	3.2	2.8
Tryptophan	-	7.2	-	6.9	8.8	-	-	-	-	-	-	-	
Arginine	-	-	-	4.2	7.0	-	-	-	-	-	-	-	
Hydroxyproline	26.8	6.0	8.5	21.1	8.2	7.4	10.4	22.3	37.4	14.3	7.8	4.0	
Proline	3.9	2.4	4.8	-	3.0	1.6	3.0	-	-	1.6	3.3	1.7	
Total free amino acids	417.4	499.2	294.4	602.2	302.8	207.0	411.0	474.9	668.3	536.9	344.7	190.9	

- : Overlapped with other peaks or below detectable level.

EGC : Epigallocatechin, C : Catechin, EGCg : Epigallocatechin gallate, EC : Epicatechin, ECg : Epicatechin gallate.

The following components were not detected : Pyroglutamic acid, Urea, Aspartic acid, 2-Amino adipic acid, Methionine, β-Alanine, β-Aminoisobutyric acid, Anserine, Carnosine, 3-Methyl-L-histidine, 5-Hydroxylysine, 2-Aminoethanol.

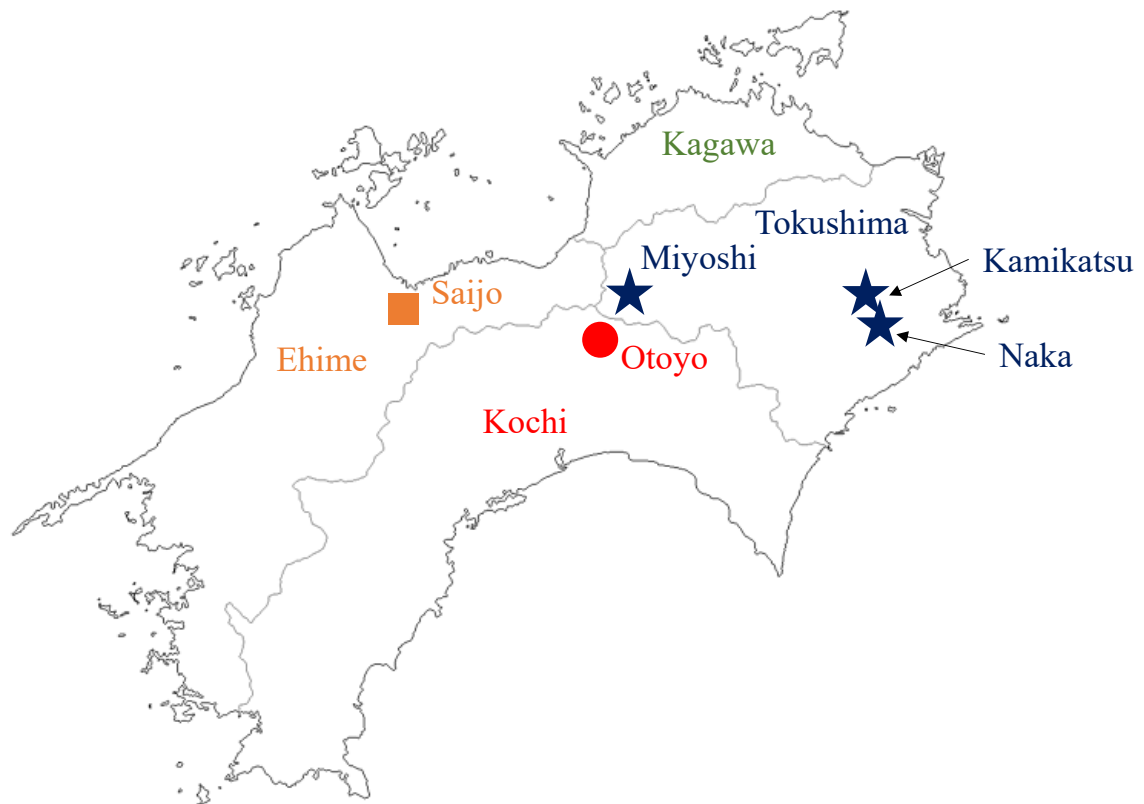
Table 8. Tested lactic acid bacteria strain.

Strain	Species	Source
NBRC106467 <sup>T</sup>	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Corn silage
NBRC107147 <sup>T</sup>	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Human feces
AWA1922	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha
AWA1952	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha
AWA1955	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Awa-bancha
AWA1978	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Awa-bancha
AWA1984	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Awa-bancha
AWA1985	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Awa-bancha
AWA19101	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Awa-bancha

Table 9. Sugar utilization of lactic acid bacteria.

Strain	NBRC106467 <sup>T</sup>	AWA1922	AWA1952	AWA1955	NBRC107147 <sup>T</sup>	AWA1978	AWA1984	AWA1985	AWA19101
Glycerol	+	-	±	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	-	+	-	+	-	-	-	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-βD-Xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D-Galactose	+	+	+	+	+	±	±	±	±
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	±	±	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	-	+	+	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	±	+	+	+	-	-	-	-	-
Methyl-αD-Mannopyranoside	-	+	-	±	-	-	-	-	-
Methyl-αD-Glucopyranoside	-	+	+	±	-	±	-	-	-
N-Acetyl Glucosamine	+	+	+	+	±	±	±	±	±
Amygdalin	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Areutin	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Esculin ferric citrate	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D-Cellobiose	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose	+	+	-	+	-	-	-	-	-
D-Melibiose	+	+	+	+	±	+	+	+	±
D-Sucrose	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D-Trehalose	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Insulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melezitose	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	-	+	±	+	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentibiose	+	+	+	+	-	-	-	-	-
D-Turanose	-	-	+	-	-	-	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	+	-	±	-	±	±	±	±	±
2-Keto Gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Keto Gluconate	-	-	-	-	±	±	±	±	±

+ : positive, ± : weak positive, - : negative



Fgi. 1. Production area of post-fermented tea in Shikoku Island.

★ : Awa-bancha, ■ : Ishizuchi-kurocha, ● : Goishi-cha



Fig. 2. Production process of Awa-bancha.

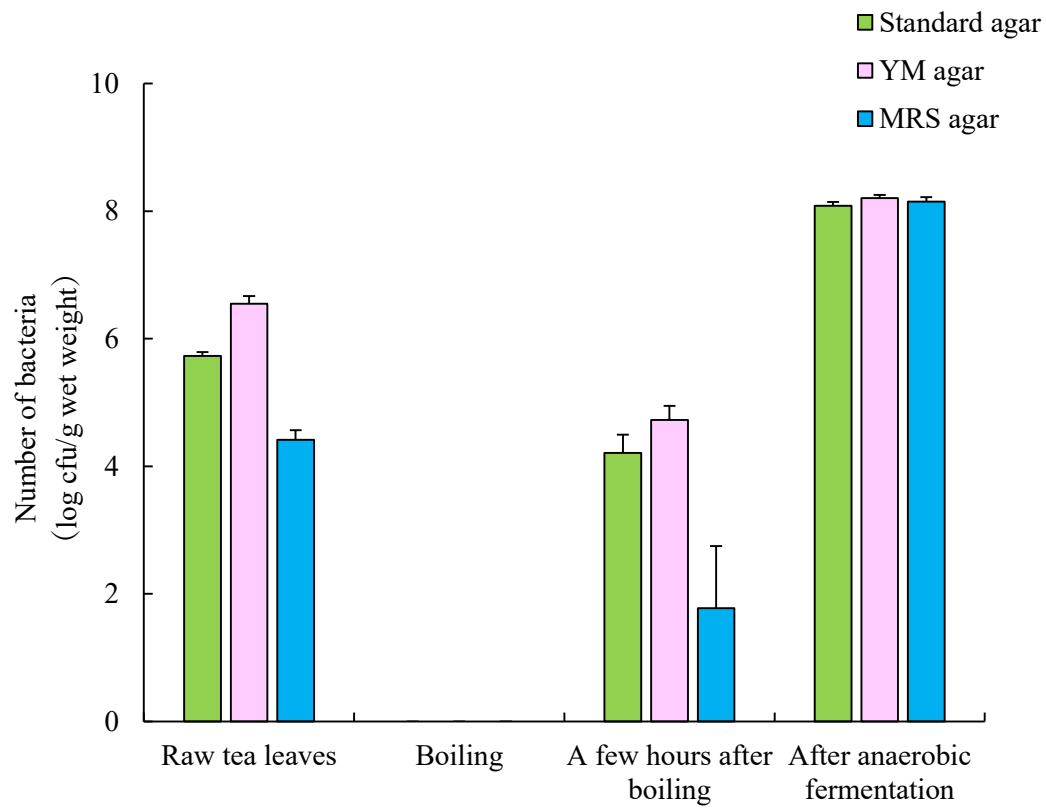


Fig. 3. Number of viable bacteria in each production process.

Results are expressed as the mean of nine tests, and error bars mean standard deviation.



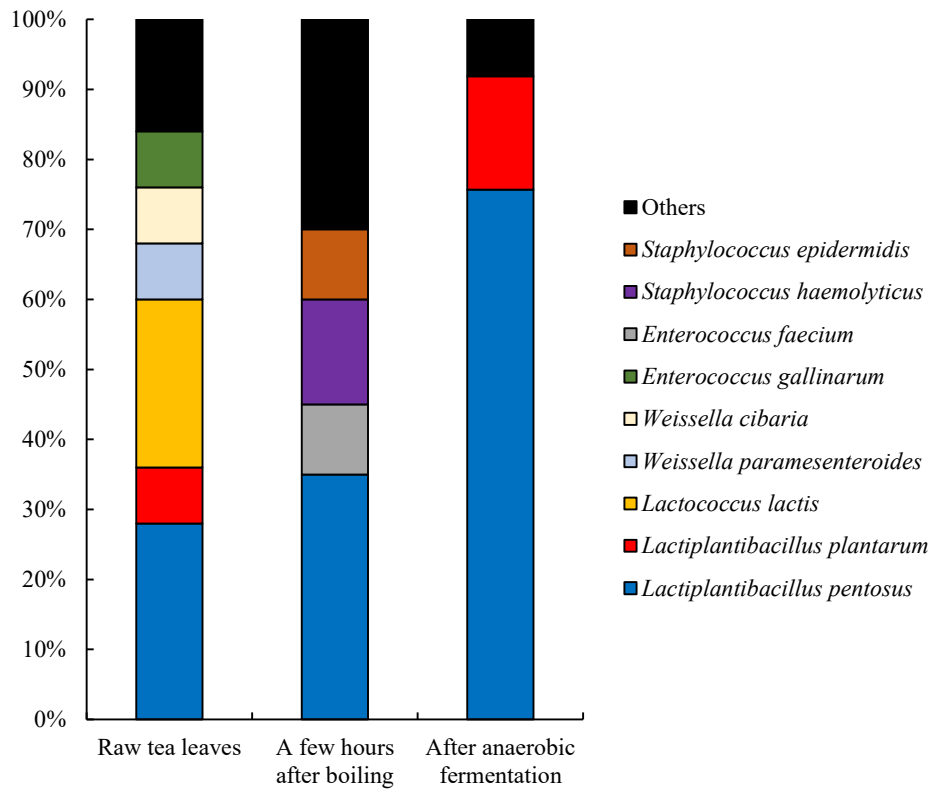


Fig. 4. Bacteria isolated from tea leaves in each production process.

Less than 10% is classified as Others.

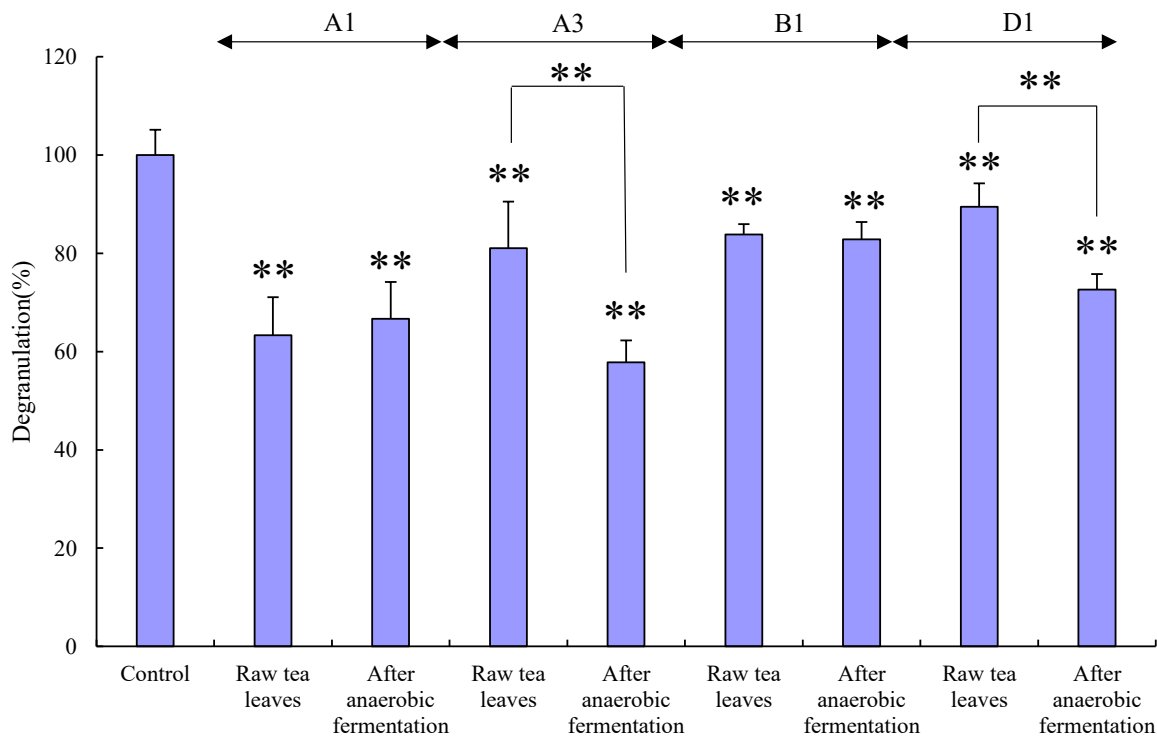


Fig. 5. Evaluation of degranulation by the tea extract for RBL-2H3 cells.

The alphabet indicates the producer and the number indicates the lot. Results are expressed as the mean of six tests, and error bars mean standard deviation. \*\*p<0.01 (vs Control, ANOVA, Tukey's test).

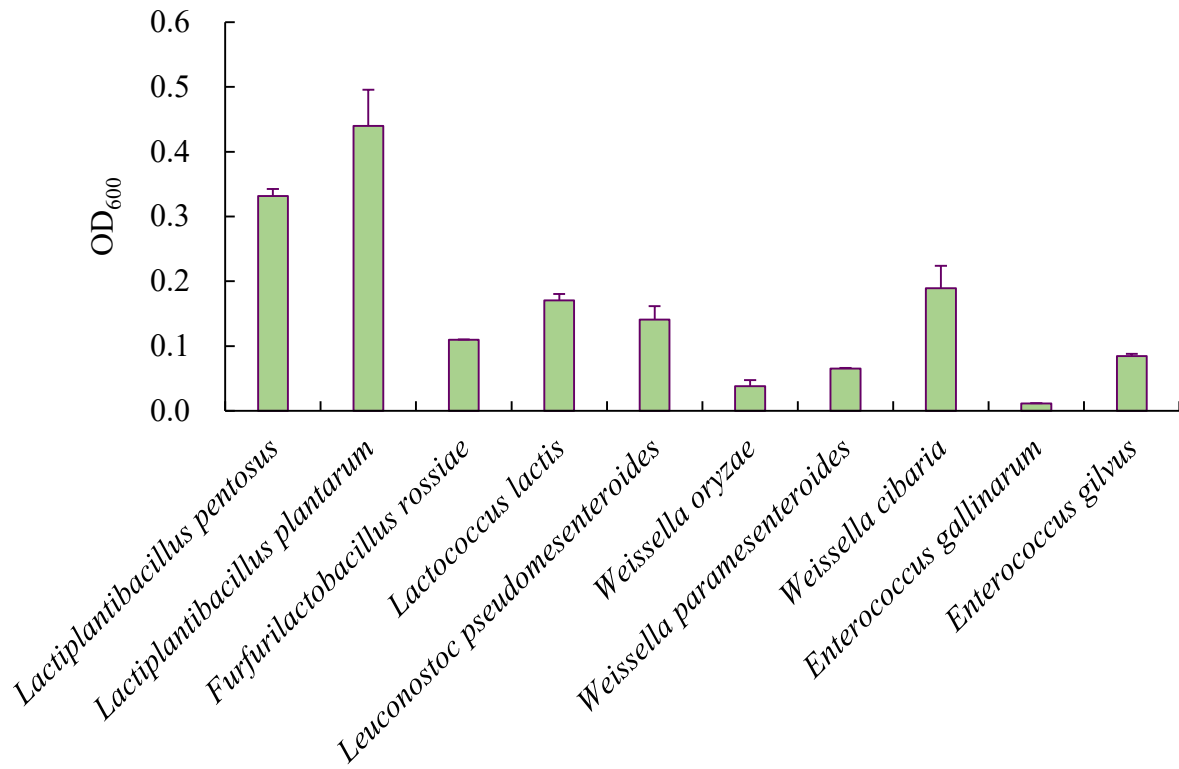


Fig. 6. Growth of lactic acid bacteria isolated from raw tea leaves in tea leaf extracts.

Results are expressed as the mean of three tests.

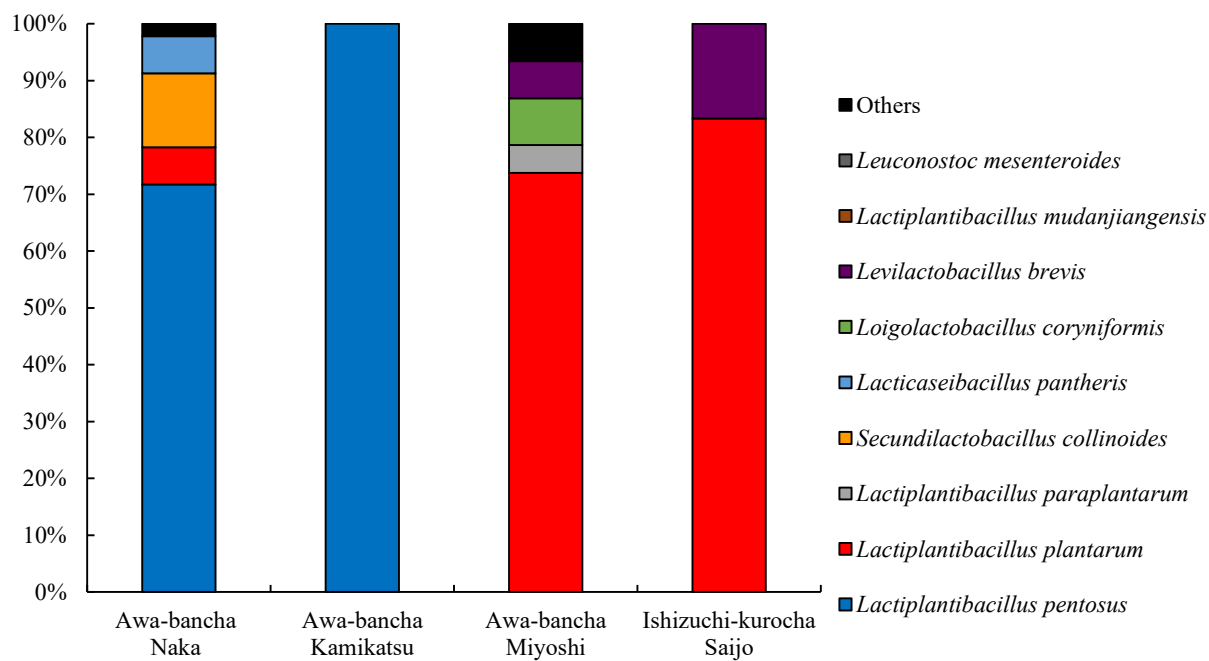


Fig. 7. Lactic acid bacteria isolated from each production area.

Those below 5% were classified as Others.

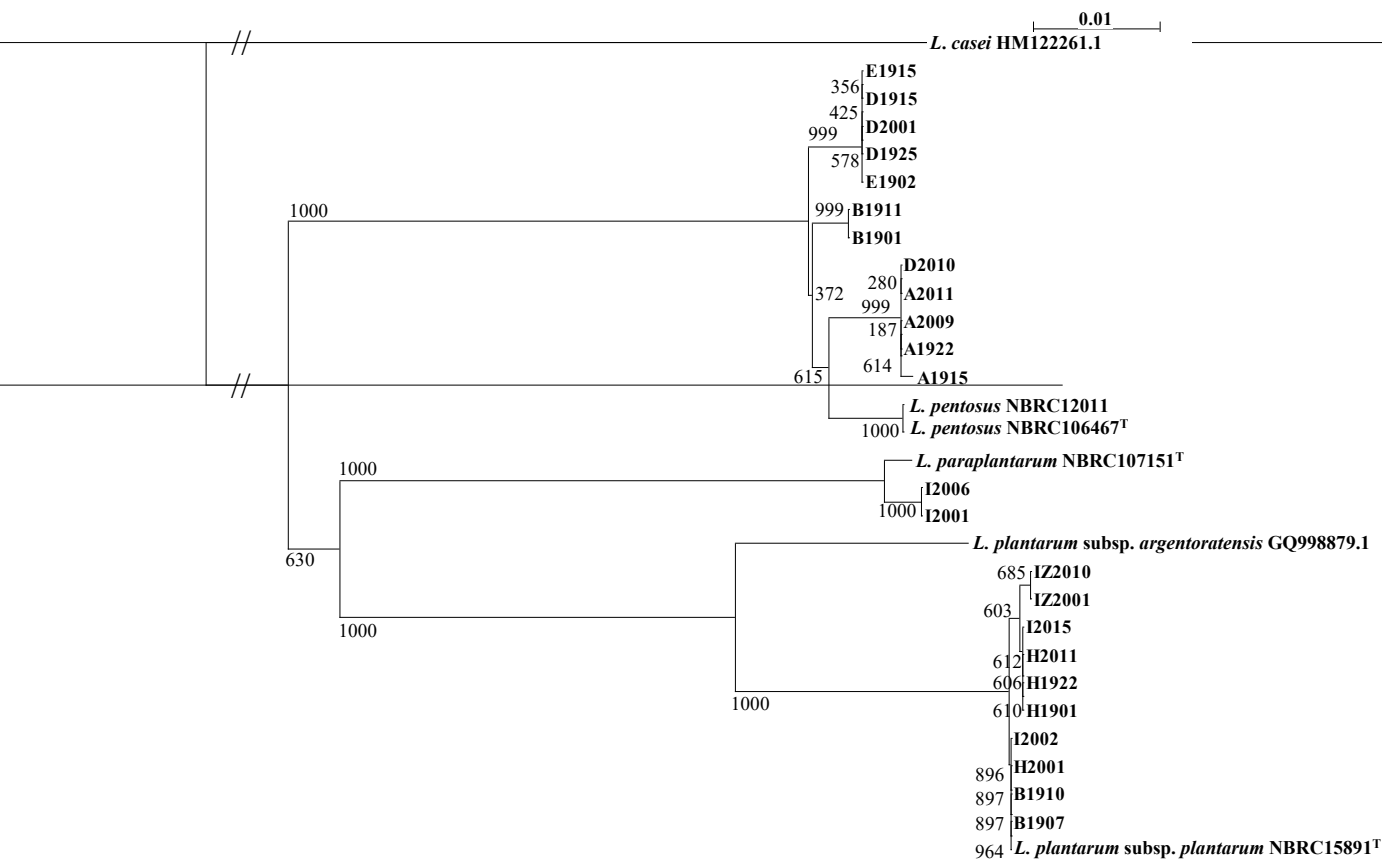


Fig. 8. Phylogenetic tree based on the *dnaK* gene of lactic acid bacteria.

Numbers indicate bootstrap values calculated 1,000 times, and bars show differences in the base sequence of 1%. The sequences of *Lacticaseibacillus casei* and *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* were obtained from GenBank. Accession numbers are shown in the figure. *L. casei* was used as the outgroup.

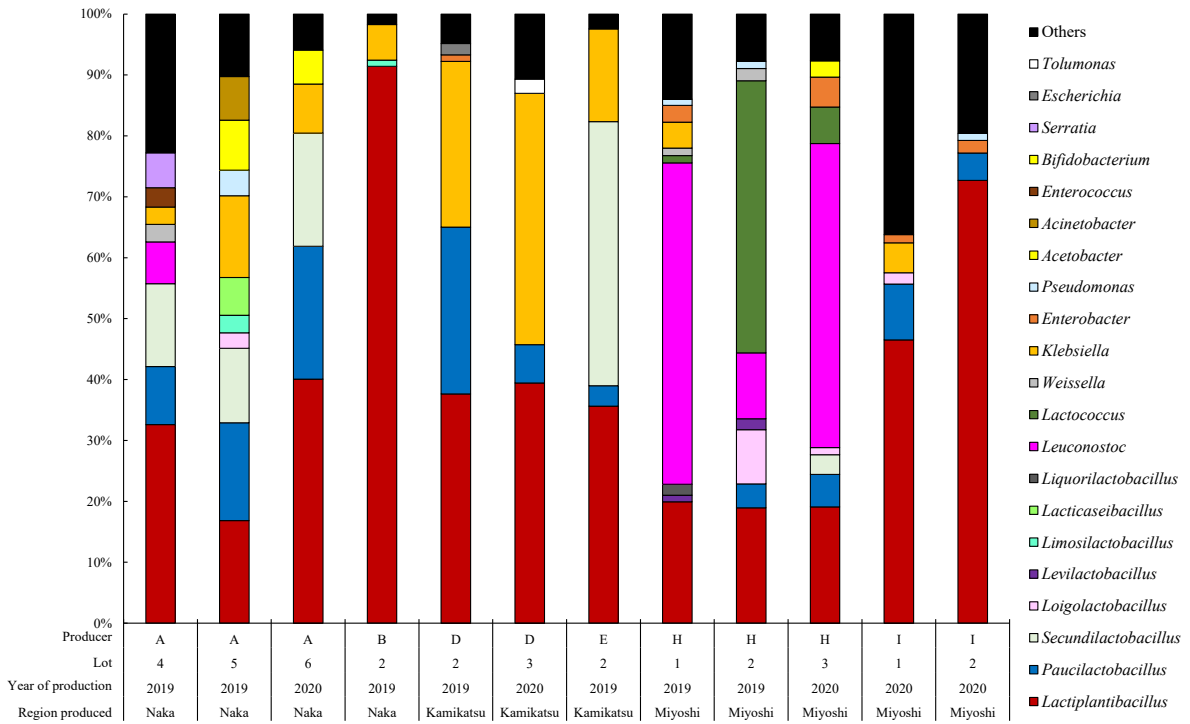


Fig. 9. Genus-level bacterial flora of Awa-bancha after anaerobic fermentation for each producer.

Those below 1% were classified as Others.

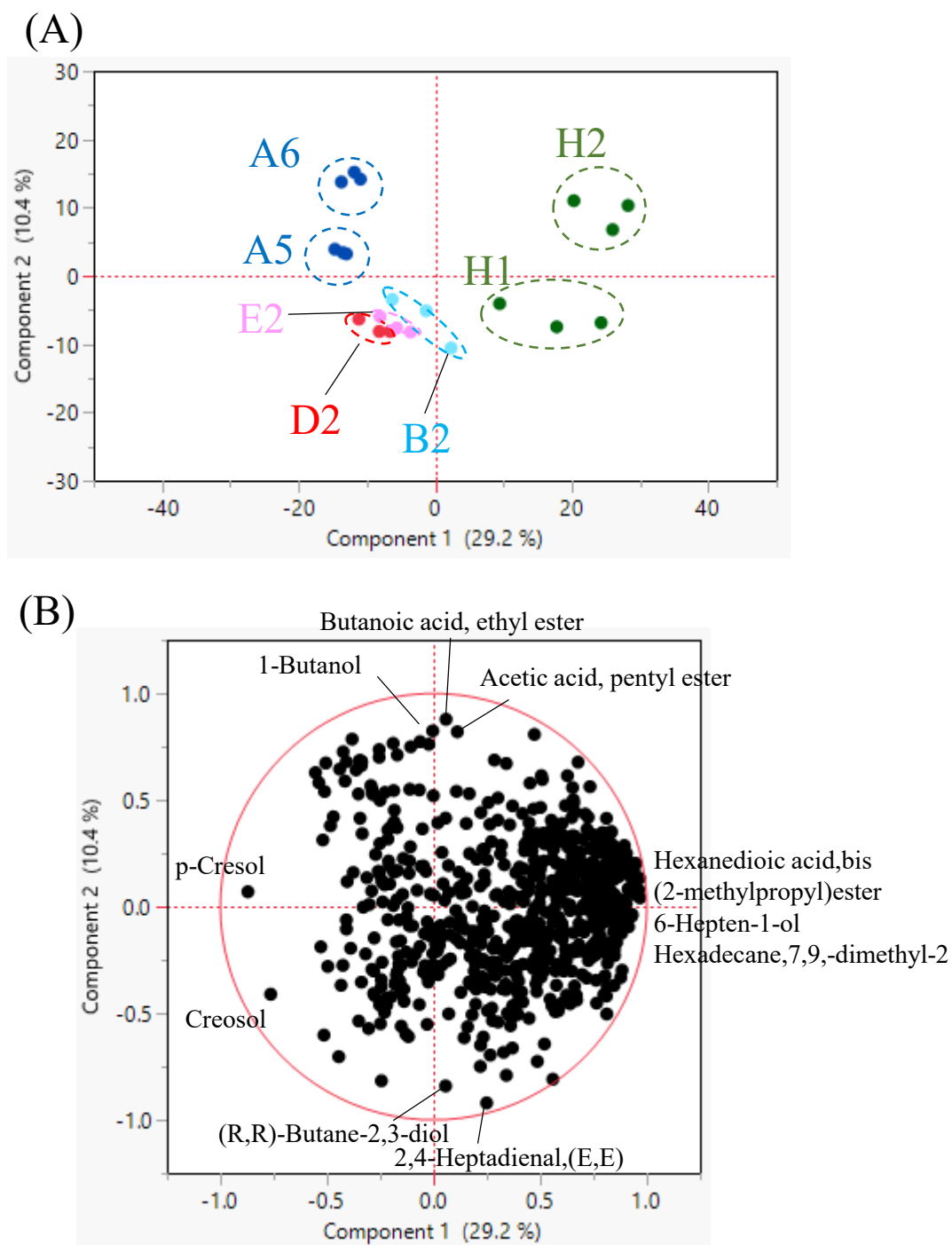


Fig. 10. Principal component analysis based on aroma components for each producer.

(A) Score plot, (B) Loading plot. The alphabet indicates the producer and the number indicates the lot.

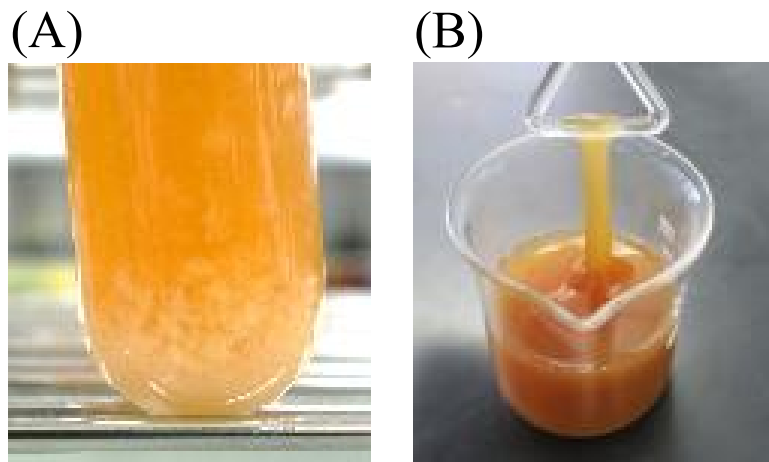


Fig. 11. *L. pentosus* cultured in MRS broth.

(A) *L. pentosus* AWA1922, (B) *L. pentosus* AWA1955.



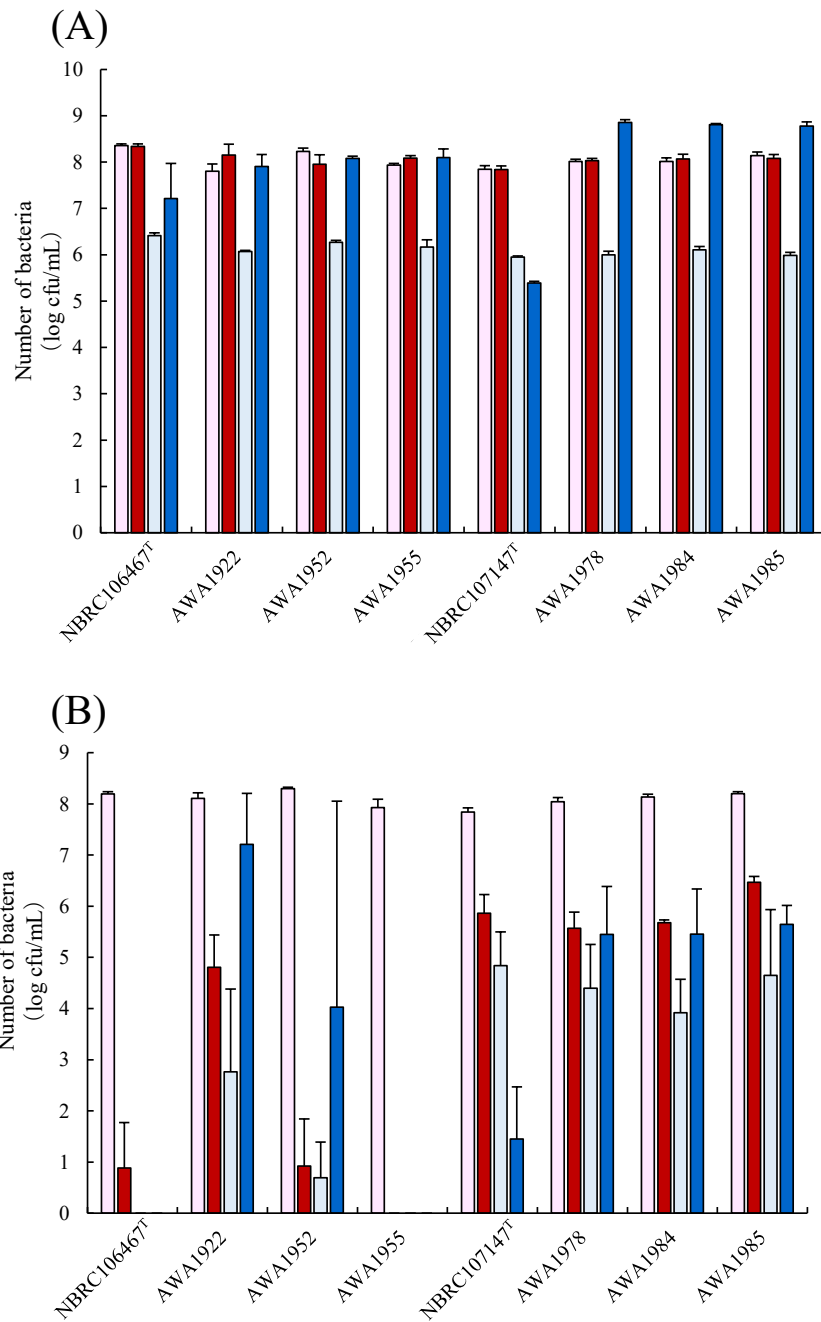


Fig. 12. Resistance to artificial digestive juices of lactic acid bacteria.

(A) Artificial gastric juice pH3.0, (B) Artificial gastric juice pH2.0, : Artificial gastric juice processing time 0, : Artificial gastric juice processing time 3 h, : Artificial intestinal juice processing time 0, : Artificial intestinal juice processing time 24 h. Results are expressed as the mean of four tests, and error bars mean standard deviation.

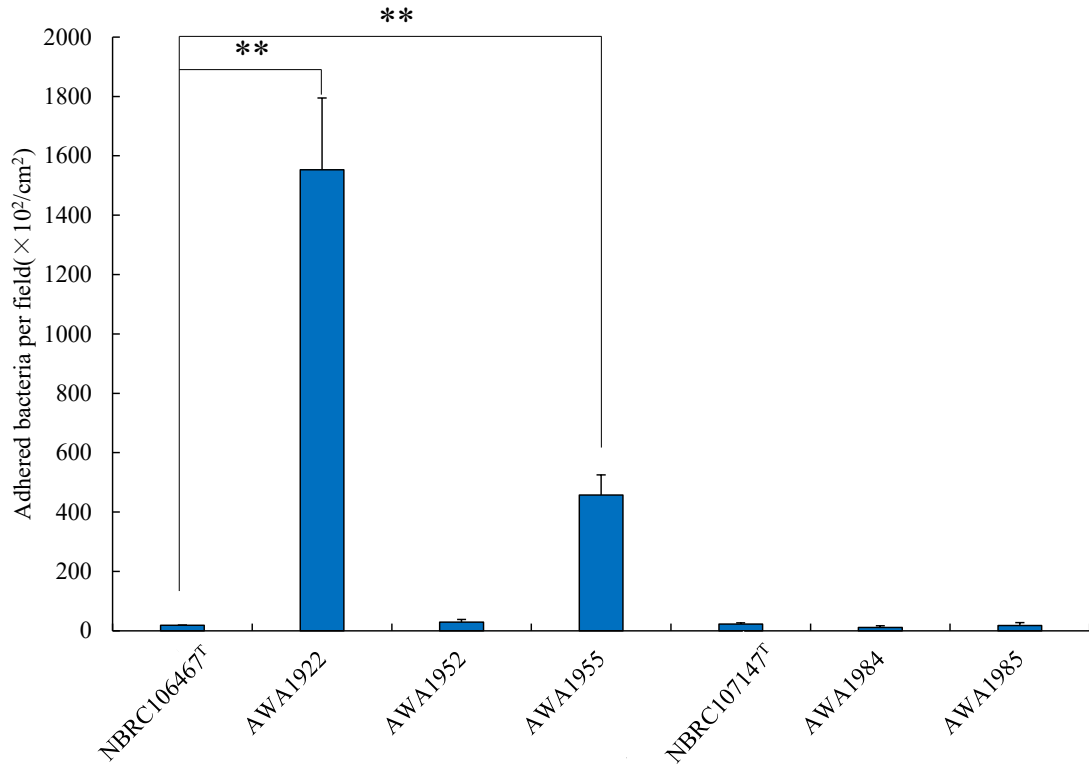


Fig. 13. Adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells.

Results are expressed as the mean of four tests, and error bars mean standard deviation.

\*\* $p < 0.01$  (vs type strain, ANOVA, Dunnett's test).

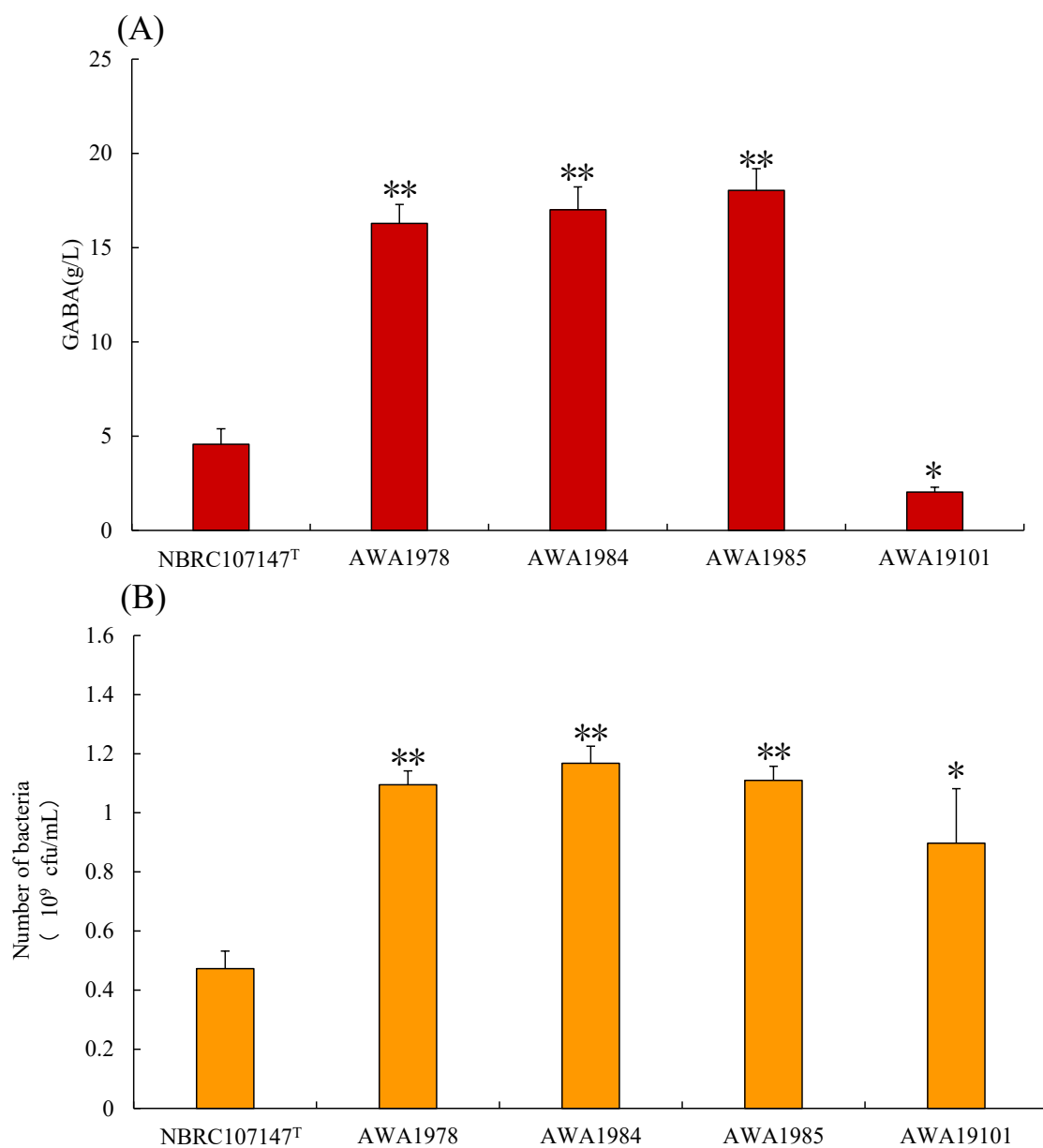


Fig. 14. GABA-producing properties of *L. brevis*.

(A) GABA concentration, (B) Viable bacterial count, Results are expressed as the mean of four tests, and error bars mean standard deviation. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  (vs type strain, ANOVA, Dunnett's test).

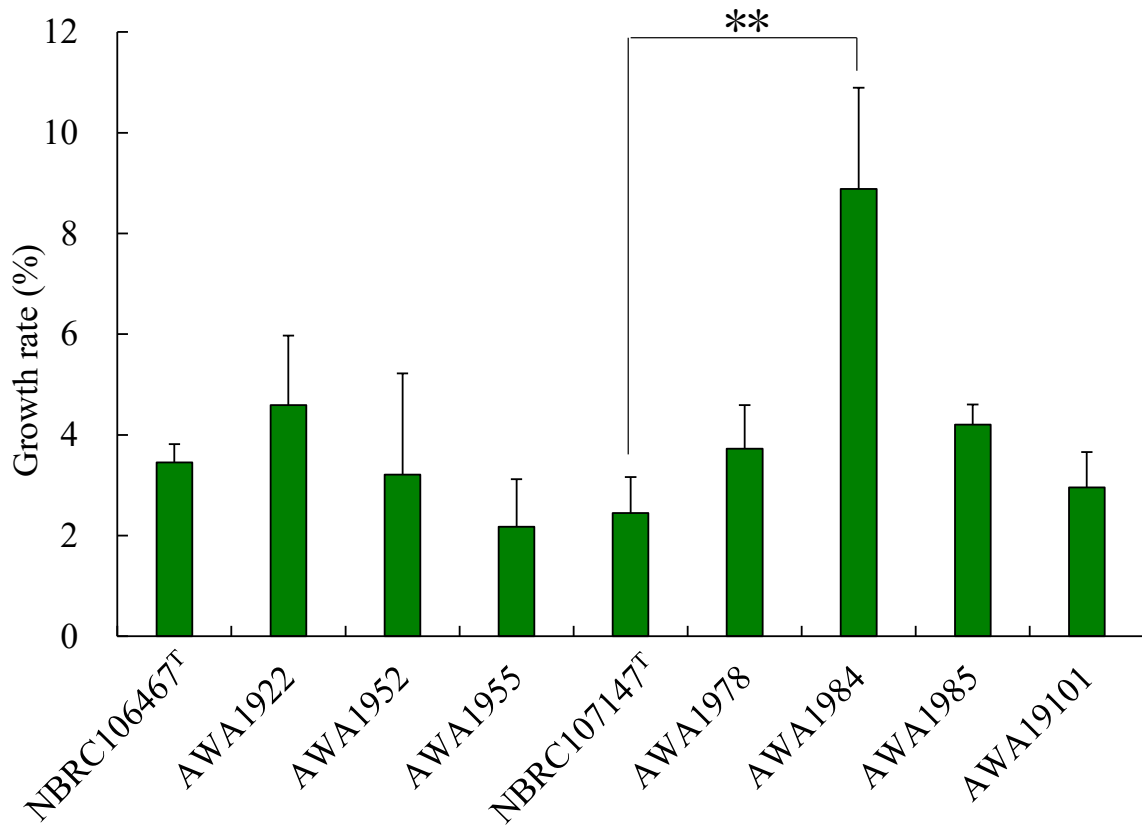


Fig. 15. Growth of lactic acid bacteria on tea leaf extracts.

Results are expressed as the mean of four tests, and error bars mean standard deviation.

\*\*p<0.01 (vs type strain, ANOVA, Dunnett's test).