

抗菌性物質を産生する有用乳酸菌を用いた バイオプリザベーションに関する研究*

—味噌醸造に存在する抗菌性物質産生乳酸菌の諸性状解析とその利用—

恩田 匠・樋川 芳仁・辻 政雄・柳田 藤寿*・篠原 隆*
横塚 弘毅*・中澤 等**・岩下 勝也**・香山 聰**

The Development of Bio-preservation of Foods by Using Useful Lactic Acid Bacteria Producing Antibacterial Substance

—Characterization and Application of Bacteriocin-Producing Lactic acid bacteria existed in *Miso*-paste—

Takumi ONDA, Yoshihito HIKAWA, Masao TSUJI, Fujitoshi YANAGIDA*, Takashi SHINOHARA*,
Koki Yokotsuka*, Hitoshi NAKAZAWA**, Katsuya IWASHITA** and Satoshi KAYAMA**

要 約

味噌醸造における発酵過程の細菌叢の変遷解析を実施した。好塩性乳酸菌と（非好塩性）乳酸菌の複雑な変遷パターンを明らかにすることができた。同定された数菌種の細菌は、味噌からは分離例のないものであった。健全な発酵が達成できた醸造過程にも、味噌醸造に好ましくない影響を与えると考えられる一般細菌が比較的高頻度で推移することが分かった。バクテリオシン産生 *E. faecium*- 菌種グループの菌株は、味噌醸造の細菌フローラの好適化に重要な役割を果たす可能性が示唆された。以上のことから、今後のバクテリオシン産生乳酸菌の応用試験のための基礎的な知見が得ることができ、生育抑制を促すべきターゲットとなる雑菌類の生菌数変化を明らかにできた。

Abstract

Time series changes of bacterial flora during *Miso*-paste manufacturing process was performed. Halophilic lactic acid bacteria and nonhalophilic lactic acid bacteria were classified and identified. Tetragenococci and enterococci were dominant in *Miso*-paste manufacturing process. General aerobic bacteria, which were seemed to be contaminant, were ca. 10^5 CFU/g. Strains of bacteriocin-producing *E. faecium*-species group were important on maintain the bacterial flora in *Miso*-paste manufacturing process.

1. 緒 言

近年、食品に対する消費者の健康・安全志向はますます高まる傾向にあるが、その一方で大規模な細菌性の食中毒が頻発する問題も発生している。今後、食品にはより高度な衛生管理はもとより、高品質化・健康機能性の付与などが強く求められていくことが予想される。したがって、安全で高品質な食品の製造方法の開発や食品保蔵方法の確立が重要な課題となっている。以上のことを背景として、最近食品分野において「バイオプリザベーション (Bio-

preservation)」¹⁾ という新しい考え方が注目されている。「バイオプリザベーション」とは、生物のもつ自然な抗菌力を用いることにより、有害な細菌の増殖を抑制し、自然かつ安全な食品を製造（加工）または保蔵することを目的としている。このバイオプリザベーションで最も可能性が高いものとして、乳酸菌とその乳酸菌が産生する抗菌性物質²⁾が注目されている。

味噌は日本の伝統的な発酵食品であるが、現在でも微生物学的な問題が残されている。味噌醸造に好ましくない影響を与える細菌として最も代表的な汚染菌は、好気性芽胞細菌である *Bacillus subtilis*³⁾ を代表とする *Bacillus* 属細菌である。この *Bacillus* 属細菌は、芽胞を形成して味噌製品にも生残するため、主に味噌を原材料とした二次加工品など

†本研究は、平成12年度産学官共同研究推進事業として実施された共同研究である。

*山梨大学ワイン化学研究センター、**宮坂醸造(株)甲府工場

で変敗の原因となっている。最近、味噌の健康保健機能に関する情報⁴⁾から、味噌の二次加工品が多く流通・販売されるようになってきており、その原料味噌に対して厳しい細菌規格が要求されるようになりつつある。

したがって、抗菌性物質を産生する有用な乳酸菌を味噌醸造に用いて、好ましくない細菌類の増殖を抑制することができれば、安全な製造工程が確立でき、高品質な製品が開発できると考えられた。そこで、味噌醸造環境から、抗菌性物質を産生する乳酸菌を検索し、得られた乳酸菌およびその抗菌性物質の諸性状を解明し、さらに抗菌性物質産生乳酸菌を味噌醸造に用いることを目的に本研究を開始した。

本年度は、味噌醸造における細菌学的な背景の解明を目的として、味噌醸造過程における細菌叢の時系列的な解析を実施することを目的とした。

2. 実験方法

2-1 供試味噌試料とその発酵

供試味噌試料には、宮坂醸造(株)甲府工場で製造されている米味噌(発酵型のいわゆる信州味噌タイプのもの、食塩約12.5%)を供試した。工場で仕込み作業が終了した直後の味噌試料を採取し、工業技術センター内の恒温室(25℃)中で発酵させた。なお、本味噌試料は、乳酸菌スターターが添加されていないものである。

2-2 味噌醸造過程における細菌類の生菌数計測と乳酸菌の純粋分離

仕込直後から15週間にわたり分析用試料を採取した。

各分析試料は直ちに、一般生菌数、好塩性乳酸菌数および(非好塩性)乳酸菌数、pHの計測を行った。一般生菌数の計測は、標準寒天培地(ニッスイ社製)を用いて混釈平板したものを37℃で培養した。好塩性乳酸菌数および(非好塩性)乳酸菌数の計測は、次の2種の培地を用いた。

一つは、10%食塩を添加したMRS寒天培地⁵⁾(*Lactobacilli* MRS-broth, Difco社製)(pH8.0に調整)であり、好塩性(高度耐塩性)乳酸菌の計測・分離用として使用した。もう一つは、食塩を含まないMRS寒天培地(pH7.0)であり、非耐塩性~中程度の耐塩性を示す乳酸菌の計測・分離用として使用した。味噌試料10gを、10倍ずつ生理的食塩水で希釈したサンプルを作製し、それぞれ1ml量をシャーレに分取した。次に上述した培地を溶解させて50℃前後に調整したものをシャーレに流し入れ、よく混釈し、固化させた。このとき、各培地には炭酸カルシウム⁶⁾(終濃度1.0%)とアジ化ナトリウム⁶⁾(10 μ g/ml)、シクロヘキシミド⁶⁾(10 μ g/ml)を無菌的に添加した。炭酸カルシウムは酸生成コ

ロニーの検出用の懸濁指示薬として、アジ化ナトリウムとシクロヘキシミドは好気性微生物の生育抑制を目的として添加した。作製した混釈培地は、ガスパックシステム(三菱ガス化学社製)を用いた嫌気雰囲気の中で、30℃3日~6日間培養した。培養後、炭酸カルシウムの白濁を溶かして透明化させたコロニーを乳酸菌として計測した。酸生成コロニーは、無作為に選択し、白金線を用いて釣菌したものを、寒天培地の上でストリークカルチャーすることにより、純粋分離を行った。3回の純化操作後、得られた単一コロニーを分離株として凍結保存した。

2-3 供試菌株の培養法

供試した全ての菌株は、超低温フリーザー(-80℃)でグリセロールストックとして凍結保存した。短期的な保存には、穿刺培養菌体を作製し、4℃保管した。分離した乳酸菌は、MRS液体培地あるいは10%食塩添加MRS寒天培地を用い、30℃18時間静置培養した。実験に際しては、継代培養を少なくとも3回以上繰り返し、菌体の活性を高めてから分析に供した。各種分析の対照菌株として使用した乳酸菌の標準菌株も同様に培養した。

Bacillus subtilis JCM1465⁷⁾は、ニュートリエント培地(pH7.0)を用い、37℃で18時間振盪培養した。

2-4 抗菌活性の検出

乳酸菌株の抗菌活性の検出は、アガーウェル拡散法により実施した。すなわち、乳酸菌培養液を遠心分離し、得られた上清を少量の1N水酸化ナトリウムで中和した後、メンブランフィルター除菌(0.45 μ m, アドバンテック社製)したものを試験液とした。次に、アガーウェル指示菌を接種したソフト寒天を寒天培地に重層した。ソフト寒天が固化した後、コルクボーラー(5mm ϕ)で穴をあけ、ウェルを作製した。このウェルに試験液を注入し、培養を行った後に形成される生育阻止円を確認した。

バクテリオシン産生株の検索と抗菌活性測定には、先に分離したGM005⁸⁾株のバクテリオシンに高感受性を示した*Lactobacillus sakei* JCM1157⁹⁾を指示菌として用いた。

2-5 乳酸菌株の表現形質レベルでの同定試験

純粋分離した乳酸菌の表現形質レベルでの同定は、「乳酸菌実験マニュアル」¹⁰⁾を参考に試験を実施した。基本的な性状として、グラム染色・細胞の形態・細胞の配列様式・カタラーゼ(シュードカタラーゼ)反応・胞子形成の有無・pHと温度に対する生育挙動および8種の糖類の発酵(資化性)を調べ、属レベルの同定を行った。属レベルの同定試験の結果から、分離株のグルーピングを行い、そ

それぞれのグループの代表株についてさらに詳しい生理・生化学的性状を調べ、菌種の判定を行った。

分離株の病原性の有無については、薬剤耐性および溶血活性を調べた。

3. 実験結果および考察

3-1 味噌醸造過程における細菌類の生菌数変化

味噌醸造へのバクテリオシン産生乳酸菌の応用試験の前に、通常の味噌醸造における細菌叢とその変遷を解析・把握しておく必要が考えられた。今回の供試した味噌試料は、健全な発酵を経て12~15週間目で通常製品とほぼ同等の状態になった。発酵過程における一般細菌、好塩性乳酸菌、(非好塩性)乳酸菌およびpHの変化を図1に示した。今回の結果から、健全な発酵過程を経た味噌醸造過程にも、雑菌であると考えられる一般細菌(好気性細菌)類が比較的高い濃度で推移することが分かった。好塩性の乳酸菌は、仕込み直後の生菌数は少ないが、発酵過程後半で緩慢に生菌数を増加させた。一方で、(非好塩性の)乳酸菌類は、2週間目まで生菌数が増加したが、4週間目までに急激に減少し、その後8週間目まで再度増加した後、緩やかに減少するといった複雑な変遷パターンを示した。この非好塩性乳酸菌の複雑な変遷から、複数の菌種の存在とその複雑な変遷が予想された。

純粋分離した菌株は、基本的な性状(前述した内容と同様)の調査結果から、グルーピングを行い、それぞれのグループの代表株についてさらに詳しい生理・生化学的性状を調べ、菌種の判定を行った。

(i) 味噌醸造における乳酸菌類の菌叢の変遷解析

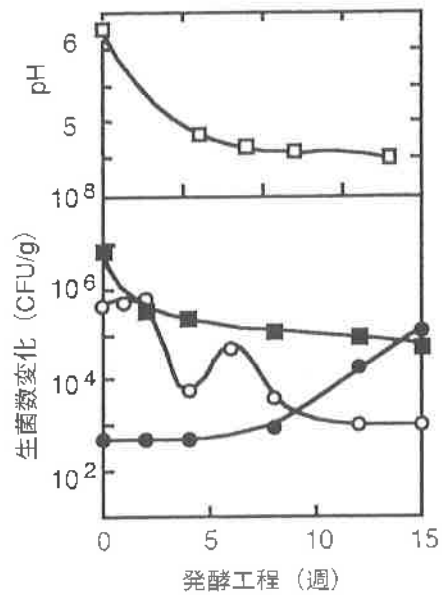


図1 味噌醸造過程における細菌類の生菌数とpHの変化

本醸造過程では、12~15週間目に、製品とほぼ同等な状態に達した。

記号: □; pH, ●; 好塩性乳酸菌, ○; (非好塩性の)乳酸菌, ■; 一般細菌(好気性菌)

乳酸菌類の菌叢の変遷を調べた。好塩性乳酸菌では、*Tetragenococcus halophila*のみが出現した。

非耐塩性の乳酸菌類では、9菌種の乳酸菌が存在(図2)し、醸造過程で複雑な消長があることがわかった。中でも *Enterococcus* 属菌種は主要な菌叢(全分離株の80%以上)を占め、それらには *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. faecalis* および *E. solitarius* が含まれていた。 *Enterococcus* 属の乳酸菌はバクテリオシン産生能を示す菌株が多く、味噌醸造に

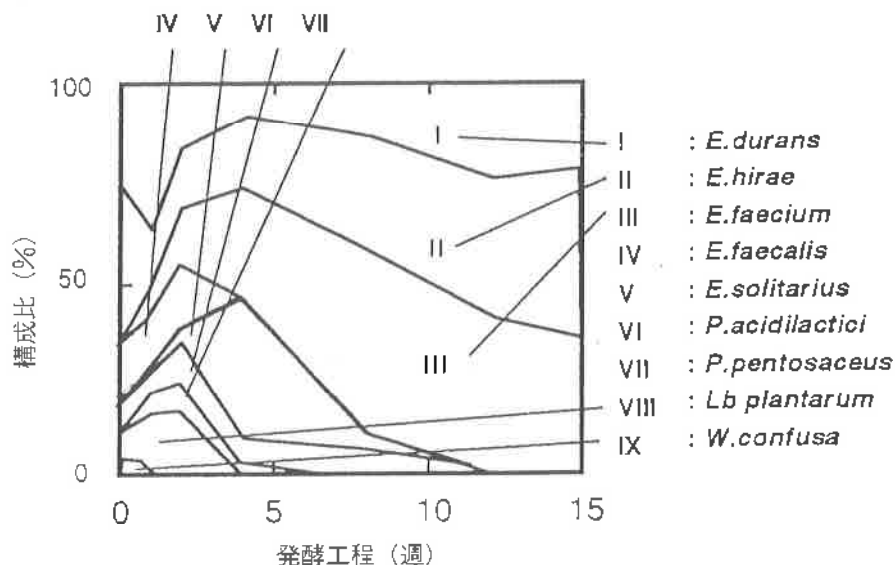


図2 味噌醸造過程における(非好塩性)乳酸菌の菌叢変化

において菌叢の好適化に重要な役割を果たすことが推察された。

その他の乳酸菌として、*Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici*, *Lactobacillus plantarum*, *Weissella confusa* なども出現することが分かった。*P. acidilactici*^{3, 7)} および *L. plantarum*⁸⁾ は異常な発酵や変敗を引き起こす可能性のある乳酸菌として古くから認識されている菌種であり、今回の健全な発酵が達成された醸造過程にも当該菌種が含まれることが明らかになった。なお、*P. pentosaceus* および *W. confusa* については、味噌からの初めての分離例となった。

なお、全ての分離乳酸菌は、溶血活性や薬剤耐性などの病原性に関わる因子は保持しなかった。

4. 結 言

味噌醸造過程の細菌叢の変遷パターンが明らかになったことから、バクテリオシン産生乳酸菌の応用試験のための基礎的知見を得ることができ、今後は新規な味噌醸造システム、特に加工味噌のための醸造システムの開発が可能なものと思われた。

今後は、バクテリオシンの食品利用上の特性や構造解析などを行い、その安全性についても評価を実施中である（平成13年度を予定）。また、味噌醸造へのバクテリオシン産生乳酸菌の応用試験を実施予定である（平成14年度を予定）。

参考文献

- 1) 松田敏樹, 松田敏生: バイオプリザベーション; 乳酸菌による食品微生物制御 (幸書房, 東京) (1999)
- 2) Hoover, D. G. and Steenson, L. R.: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria (Academic Press, London) (1993)
- 3) 全国味噌技術会: みそ技術ハンドブック (明和印刷, 東京) (1996)
- 4) 海老根英雄: 日醸協誌, 85, 70-75 (1990)
- 5) Onda, T., Yanagida, F., Tsuji, M., Ogino, S. and Shinohara, T.: Food Sci. Technol. Res., 5, 247-250 (1999)
- 6) 小崎道雄: 乳酸菌実験マニュアル; 分離から同定まで (朝倉書店, 東京) (1992)
- 7) 好井久雄, 金子安之, 山口和夫: 食品微生物学ハンドブック (技報堂, 東京), p.210-212 (1995)
- 8) 加藤丈雄: 食品工業, 42, 33-42 (1999)