

有用乳酸菌を用いた高付加価値食品の開発[†]

— 各種発酵食品からの抗菌性乳酸菌の分離・検索 —

恩田 匠・柳田 藤寿*・辻 政雄・荻野 敏・篠原 隆*

The Development of Valuable Fermented Food by Using Beneficial Lactic Acid Bacteria

—Identification of Lactic Acid Bacteria Having Antibacterial Activity from Miso-paste—

Takumi ONDA, Fujitoshi YANAGIDA, Masao TSUJI, Satoshi OGINO and Takashi SHINOHARA

要 約

生味噌から分離した抗菌性物質を生産する乳酸菌GM005株の同定を行ったところ、*Enterococcus faecalis* に近縁の乳酸菌であることが分かった。GM005株の生産する抗菌性物質は、タンパク質性のバクテリオシンであり、高い耐熱性と広い抗菌作用域をもっていた。このGM005株のバクテリオシンに対し鋭敏な感受性を示した*Lactobacillus sake* JCM1157^T を指示菌として再度バクテリオシン生産乳酸菌の検索を行った結果、新たに17株の抗菌性乳酸菌を得た。

Abstract

Identification of antibacterial substance producing-lactic acid bacterial strain GM005 which isolated from Miso-paste and characterization of its antibacterial substance were investigated. As a result of identification tests, the strain GM005 was *Enterococcus* sp.. Antibacterial substance produced by the strain GM005 was bacteriocin and showed broad antibacterial spectra. *Lactobacillus sake* JCM1157^T was highly sensitive for bacteriocin. And, 17 strains producing antibacterial substance were newly isolated by screening method using *Lactobacillus sake* JCM1157^T as the indicator strain.

1 緒 言

近年、一部の乳酸菌が産生するタンパク質性の抗菌性物質であるバクテリオシンが、食品を保蔵する上で注目されており、精力的に研究が進展している。既に*Lactococcus lactis* が産生するバクテリオシン¹⁾であるnisinなどは、その分子生物学的性状が明らかにされており、欧米では食品添加物として利用されている。

著者ら²⁾は、味噌の安定な製造工程の確立や製品の保存技術の開発のため、生味噌からの抗菌性物質を生産する乳酸菌の検索を行い、その結果、食品の代表的な汚染菌の一種である*Bacillus subtilis* と *Staphylococcus aureus* に対して抗菌活性を示す*Enterococcus* 属の乳酸菌1株 (GM005株) を得た。

そこで、この乳酸菌が産生する抗菌性物質の有用性を確認するため、本菌株の詳細な同定とその抗菌性物質の本体や諸性質を明らかにすることを目的に研究を行った。また、その研究中、*Lactobacillus sake* に属する乳酸菌菌株が、分離乳酸菌の抗菌性物質に対して鋭敏な感受性を示すことが分

かり、この菌株を抗菌活性検出の指示菌として、より多くの抗菌物質産生乳酸菌の再検索を行った。

2. 実験材料および方法

2-1 供試菌株および培養

供試菌株として、味噌試料から分離した乳酸菌と菌株保存機関や関連企業から得た乳酸菌を用いた (Table 1)。以上の乳酸菌のうち、食塩存在下で生育が良好な菌株の培養には、食塩を5%添加し、pHを8.0に調整した*Lactobacilli* MRS broth (以下、食塩添加MRS培地という) を用いた。その他の乳酸菌の培養には、食塩を添加しないMRS培地を用いた。

バクテリオシンの比較実験のため、nisin産生菌として報告のある*Lactococcus lactis* IFO12007³⁾ を用いた。

抗菌性物質検出のための指示菌には、既報²⁾の*Bacillus subtilis* JCM1465¹⁾と後述する乳酸桿菌*Lactobacillus sake* JCM1157^Tを用いた。*Bacillus subtilis* JCM1465¹⁾の培養には、Neutrient培地 (BactoPeptone [Difco] 1.0%, Beef Extract [Difco] 0.5%, 塩化ナトリウム0.5%) を用いて、37℃18時間振盪培養 (150strokes/min) した。

寒天培地として用いるときには、上記の培地に寒天1.5%を添加して調製した。また、軟寒天として用いるときには、0.5%の寒天を添加した。全ての培地の殺菌は、オートクレーブを用いて121℃15分処理した。

[†] 本研究は、山梨県地域共同開発研究センターのご助力により、山梨大学ワイン研究センターとの共同研究として行われた。

*山梨大学ワイン研究センター (旧・発酵化学研究施設)

Table 1 Lactic acid bacterial strains used in this study

25 strains of <i>Tetragenococcus halophilus</i> :				
JCM5888 ^T	IAM1673,	IAM1674,	IAM1675,	IAM1676,
IAM1678,	IAM1681,	IAM1682,	IAM1683,	IAM1685,
IAM1686,	IAM1688,	IAM1689,	IAM1692,	IAM1693,
IAM1698,	IAM1702,	NRIC1519,	NRIC1630,	NRIC1631,
NRIC1643,	NRIC1689,	NRIC1690,	NRIC1991,	NRIC1992
20 strains of un-identified strains obtained from company SA :				
T001,	T002,	T003,	T004,	T005,
T006,	T007,	T008,	T009,	T010,
T011,	T012,	T013,	T014,	T015,
T016,	T017,	T018,	T019,	T020
92 strains of isolates from Miso -paste from company MG				
82 strains of isolates from Miso -paste from company MM				
50 strains of isolates from Miso -paste from company MF				
50 strains of isolates from Miso -paste from company MMY				
10 strains of isolates from Miso -paste from company MMK				
50 strains of isolates from Miso -paste from company MI				

Abbreviations : T; type strain,
JCM ; Japan Collection of Microorganisms, The
Institute of Physical and Chemical Research, IAM ;
Institute of Applied Microbiology, Tokyo University,
NRIC ; NODAI Research Institute Culture Collection
Center, Tokyo University of Agriculture.

供試菌株の保存は、穿刺培養 (*Bacillus subtilis* は斜面培養) した培地を4℃の冷蔵庫に放置することにより行った。また、一部の菌株は-80℃の超低温フリーザーを用いて凍結保存した。いずれの場合も、実験に使用する前に少なくとも3回継代培養を繰り返し、菌株の活性を高めて使用した。

2-2 抗菌活性の検出

抗菌活性の検出には、既報²⁾の改変 agar well diffusion 法を用いた。指示菌には、後述するように *Bacillus subtilis* JCM1465^Tと *Lactobacillus sake* JCM1157^Tを比較検討した結果、*Lactobacillus sake* JCM1157^Tの方が抗菌物質に対する感受性が高かったため、本実験では *Lactobacillus sake* JCM1157^Tを指示菌として採用した。

2-3 乳酸菌の同定

乳酸菌の同定は、乳酸菌実験マニュアル⁴⁾をもとにして、グラム染色、光学顕微鏡による形態観察、乳酸発酵形式、糖類発酵性パターンなどの生理・生化学的性状を検討した。

2-4 抗菌性物質の諸性状の検討

既報²⁾で分離した抗菌活性を有するGM005株の産生する抗菌性物質の諸性状を明らかにするため、GM005株の一晩培養液の遠心上清に対して、Table 3に示した各種酵素を処理させて、その後の残存する抗菌活性を調べた。

また、抗菌性物質の抗菌作用域を調べるために、各種乳酸菌類を用いて、それらの菌株を指示菌とした改変 agar well diffusion 法により各菌株の感受性を調べた。

2-5 味噌試料からの乳酸菌の再分離

乳酸菌分離のための味噌試料は、既報²⁾と同様に、山梨県内の味噌製造会社および麹製造会社の7社から得た。これらの味噌製品は、天然醸造、すなわち酵母や乳酸菌のスターターを添加しないで製造されたもので、火入れやアルコール添加を施していない、いわゆる「生味噌」を用いた。

味噌由来の耐塩性 (好塩性) の乳酸菌の分離用培地として、*Lactobacilli* MRS broth (Difco, Co., Ltd., USA) に塩化ナトリウム7.5%および寒天1.5%を添加して、pHを8.0に調整した寒天培地を用いた。本培地を用い、既報²⁾と同様に混釈培養法により、乳酸菌菌株の分離を行った。

3. 実験結果および考察

3-1 抗菌活性を有する乳酸菌GM005株の同定

既報²⁾において、GM005株の簡易同定の結果、連鎖状乳酸球菌である *Streptococcus* 属系統の乳酸菌であるとしたが、より詳細な同定試験を行い、生理・生化学的性状を調べた (Table 2)。GM005株は、グラム陽性の通性嫌気性球菌であり、双球状または連鎖状の細胞配列を示し、ホモ型乳酸発酵によりL (+)型乳酸を生成した。また、15℃および45℃において生育が良好で、pH9.6あるいは6.5%食塩に調整した培地においても良好に生育したことから、*Enterococcus* 属の乳酸菌であることが分かった。さらにアルギニンの分解性や糖類の発酵パターンは、*Enterococcus faecalis* または *Enterococcus faecium* と近似した。しかしながら、糖類の発酵パターンが必ずしも両菌種の *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*⁵⁾ の記載と一致せず、表現形質のみからGM005株をどちらかの菌種に決定するのは困難であった。今後、詳細な、特にDNAなどの遺伝情報高分子レベルの化学分類学的手法の導入が不可欠であると考えた。菌種レベルの同定が困難なことから、GM005株は、*Enterococcus* sp. GM005と記載することにした。

Table 2 Results of identification test of strain GM005

	GM005	<i>Ec. faecalis</i>	<i>Ec. faecium</i>
Cell morphology	cocci, chain	cocci, chain	cocci, chain
Fermentation type	homo	homo	homo
Optical form of lactic acid	L(+)	L(+)	L(+)
Growth at 45	+	+	+
Growth at 15	+	+	+
Growth at pH9.6	+	+	+
Growth at 6.5% NaCl	+	+	+
NH ₃ from arginine	+	+	+
Fermentation of :			
L-arabinose	-	-	+
melezitose	-	+	-
melibiose	-	+	-
sorbitol	+	+	-
sorbose	-	-	-

(2) 抗菌性物質生産菌株の検出および抗菌性物質の力価測定の方法の確立

著者らは、既報²⁾において、TAGGとMcGIVEN⁶⁾が開発した agar well diffusion 法を改変した抗菌活性の検出法を確立した。本法では指示菌として、*Bacillus subtilis* JCM1465^Tを用いていたが、活性の検出において再現性が良好でなく、抗菌性物質により感受性の高い菌株の選択が必要であった。後述するようにGM005株の抗菌性物質の抗菌作用域を調べた結果、*Lactobacillus sake* JCM1157^TがGM005株の抗菌性物質

に対して最も感受性が高いと考えられた。そこで、*Lactobacillus sake* JCM1157^Tを指示菌として用いたagar well diffusion法と*Bacillus subtilis* JCM1465^Tを用いた従来法の比較検討を行った。すなわち、GM005株の一晚培養液を随時2倍希釈した被験液を作製し、その被験液中の抗菌活性の検出を、それぞれの菌株を指示菌とした改変agar well diffusion法による抗菌活性の検出を行った。その結果、*Lactobacillus sake* JCM1157^Tの方が*Bacillus subtilis* JCM1465^Tよりも4倍から8倍高い感受性を示すことが分かった。

したがって、全ての抗菌活性の力価測定は、標準物質を必要としないCritical dilution法の考え方により、*Lactobacillus sake* JCM1157^Tを指示菌とした改変agar well diffusion法を用いて行った。すなわち、力価測定の被験液を2倍ずつ希釈した試験液を作製し、それぞれの試験液を改変agar well diffusion法により、活性の残る希釈段階をもって抗菌活性力価 (Activity Unit, 以下A.U.と略記) で示した。

nisin産生株の*Lactococcus lactis* IFO12007を用いて、一晚培養後の培養液の抗菌活性の力価を比較したところ、*Lactococcus lactis* IFO12007の力価は2560 (A.U./ml)であり、同条件でのGM005株の力価は5120 (A.U./ml)であった。

(3) GM005株の産生する抗菌性物質の性質

GM005株の産生する抗菌性物質の性質を調べるために、GM005株の培養上清に対し、各種酵素を作用させた後の残存活性を調べた (Table 3)。その結果、GM005株の抗菌活性は、アミラーゼやセルラーゼ、カタラーゼにより影響を受けなかった。特にカタラーゼにより活性が消失しないことから、本抗菌性物質が過酸化水素ではないことが判明した。一方で、本抗菌活性は、5種のペプチダーゼにより、その活

Table3 Residual activity of antibacterial produced by *Enterococcus* sp. er various enzymatic treatment

treatment	activity (A.U.)
Proteinase K	0
Pronase	0
Dispase	0
Tripsin	2
α -Chymotrypsin	0
α -Amylase	64
Cellulase	64
Catalase	64
Control	64

(reaction at pH 7.0)

性が消失または失活したことから、その本体がタンパク質性のペプチドであることが分かった。特に、一部の芳香族アミノ酸と他のアミノ酸のペプチド結合を特異的に切断する α -キモトリプシンにより活性消失したことから、本抗菌活性の発現には、上述したアミノ酸の配列が必須であることが推察された。いずれにしても、本抗菌性物質は、タンパク質性のペプチドであり、抗菌的作用も有することから、バクテリオシンであることが判明した。

(4) GM005株の産生する抗菌性物質の抗菌作用域

各種乳酸菌を用いて、GM005株のバクテリオシンの抗菌作用域を調べた (Table 4)。その結果、本バクテリオシンは、

Table4 Antibacterial spectra of bacteriocin produced by *Enterococcus* sp. GM005

Sensitive strains		No sensitive strains	
<i>Ec. faecalis</i>	RIFY5058 ^T	<i>Ec. faecalis</i>	IAM10067
<i>Ec. faecalis</i>	IAM1119	<i>Ec. faecalis</i>	IAM10071
<i>Ec. faecalis</i>	IAM10065	<i>Ec. hirae</i>	JCM8729
<i>Ec. faecalis</i>	IFO12964	<i>Lb. confusus</i>	RIFY5119 ^T
<i>Ec. faecium</i>	JCM5804 ^T	<i>Lb. gasseri</i>	RIFY5130 ^T
<i>Lc. lactis</i>	IFO12007	<i>Lb. jensenii</i>	RIFY5134 ^T
<i>Lc. sarivarius</i>	RIFY5053	<i>Lb. maltaromicus</i>	RIFY5138 ^T
<i>Leuc. mesenteroides</i>	RIFY5004 ^T	<i>Lb. minor</i>	RIFY5139 ^T
<i>mesenteroides</i>	IAM1069	<i>Lb. viridescens</i>	RIFY5149 ^T
<i>mesenteroides</i>	IAM10060	<i>Lb. crispatus</i>	RIFY5121 ^T
<i>Lb. delbrueckii</i>	RIFY5123 ^T	<i>Lb. salivarius</i>	RIFY5144 ^T
<i>Lb. brevis</i>	RIFY5111 ^T	<i>Lb. murinus</i>	RIFY5140 ^T
<i>Lb. bifermantans</i>	RIFY5110 ^T	<i>Lb. sanfrancisco</i>	RIFY5145 ^T
<i>Lb. alientarius</i>	RIFY5104 ^T	<i>Lb. kandleri</i>	RIFY5135 ^T
<i>Lb. farciminis</i>	RIFY5126 ^T	<i>Lb. curvatus</i>	RIFY5122 ^T
<i>Lb. reuteri</i>	RIFY5141 ^T	<i>Lb. fructosus</i>	RIFY5129 ^T
<i>Lb. halotolerans</i>	RIFY5131 ^T		
<i>Lb. collinooides</i>	RIFY5118 ^T		
<i>Lb. amylophilus</i>	RIFY5105 ^T		
<i>Lb. bavarius</i>	RIFY5109 ^T		
<i>Lb. acidophilus</i>	RIFY5102 ^T		
<i>Lb. casei</i>	RIFY5115 ^T		
<i>Lb. cellobiosus</i>	RIFY5117 ^T		
<i>Lb. vitulinus</i>	RIFY5148 ^T		
<i>Lb. coryniformis</i>	RIFY5120 ^T		
<i>Lb. brevis</i>	JCM1170 ^T		
<i>Lb. casei</i>	RIFY5116 ^T		
<i>Lb. agilis</i>	RIFY5103 ^T		
<i>Lb. delbrueckii</i>	RIFY5125 ^T		
<i>Lb. animalis</i>	RIFY5107 ^T		
<i>Lb. buchneri</i>	RIFY5112 ^T		
<i>Lb. hilgardii</i>	RIFY5153 ^T		
<i>Lb. viridescens</i>	RIFY5147 ^T		
<i>Lb. vaccinostercus</i>	RIFY5147 ^T		
<i>Lb. yamanashiensis</i>	RIFY5150 ^T		
<i>Lb. plantarum</i>	RIFY5152 ^T		
<i>Lb. fermentum</i>	RIFY5127 ^T		
<i>Lb. sharpeae</i>	RIFY5146 ^T		
<i>Lb. sake</i>	RIFY5143 ^T		

Abbreviations : *Ec.* ; *Enterococcus*, *Lc.* ; *Lactococcus*, *Leuc* ; *Leuconostoc*, *Lb.* ; *Lactobacillus*.

乳酸菌類において広い作用域をもつことが分かった。特に、*Lactobacillus sake* JCM1157^Tは、検討した乳酸菌類の中で、最も大きく透明度の高い阻止円を形成し、本バクテリオシンに対して鋭敏な感受性を示した。また、この*Lactobacillus sake* JCM1157^Tは、*Lactococcus lactis* IFO12007のnisinにも同様に鋭敏な感受性を示した。このことから、*Lactobacillus sake* JCM1157^Tは、バクテリオシン活性検出において有用な菌株であることが考えられた。

(5) 抗菌性を有する乳酸菌の再分離

バクテリオシンに鋭敏な感受性を示した*Lactobacillus sake* JCM1157^Tを用いて、新規にバクテリオシン産生乳酸菌の検索を行った。その結果、味噌から分離した乳酸菌の中から、

新たに17株の抗菌性物質生産菌が得られた。これらの菌株は、全てグラム陽性の球菌で、双球状または連鎖状の細胞配列をもつことから、最初に分離されているGM005株に近縁な *Enterococcus* 属の乳酸菌と考えられた。

以上のことから、味噌醸造において、抗菌活性をもつ乳酸菌が広く分布することが明らかになった。これらの抗菌性株は、味噌醸造における雑菌の増殖抑制に有用な役割を果たしていることが推察された。

4. 結 言

生味噌から分離した抗菌活性を有する乳酸球菌GM005株の同定と産生する抗菌性物質の諸性状の検討を行った。

- (1) 乳酸球菌GM005株は、 *Enterococcus* sp. であることが分かった。
- (2) GM005株の産生する抗菌性物質は、バクテリオシンであり、広い抗菌作用域を示した。
- (3) バクテリオシンに対し鋭敏な感受性を示す *Lactobacillus sake* JCM1157^T を指示菌とした検索の結果、新たに17株の抗菌性物質産生乳酸菌を得た。

今後は、得られた抗菌性物質のタンパク化学的諸性質とDNAレベルでの遺伝学的諸性質を調べ、同時に味噌醸造への応用試験を行う。

参考文献

- 1) De VUYST, L. and VANDAMME E. J. : *Bacteriocins of lactic acid bacteria*, Blackie Academic and Professional, London (1994)
- 2) 恩田 匠・柳田藤寿：有用乳酸菌を用いた食品保存技術の開発，山梨大学地域共同開発研究センター研究成果報告書,4,74 (1996)
- 3) HIRSH, A. : Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*, *J.Gen.Microbiol.*, 5,208 (1951)
- 4) 小崎道雄監修：乳酸菌実験マニュアル（朝倉書店，東京）(1992)
- 5) GARVIE, E., KANDLER, O. and WEISS, N. : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2 The Willams and Willkins Co. Baltimore (1986)
- 6) TAGG, J. R. and McGIVEN, A. R. : Assay System of Bacteriocins, *Journal of Applied Microbiology*,21, 943 (1976)