

ブドウ滓サイレージからの乳酸菌の分離とその性質

乙黒 美彩¹・小西 啓太¹・長沼 孝多²・佐藤 憲亮²・木村 英生²・長坂 克彦³・古屋 元宏⁴・柳田 藤寿¹
(¹山梨大学ワイン科学研究センター・²工業技術センター・³総合農業技術センター・⁴畜産試験場)

Isolation and Characterization of Lactic acid bacteria from wine by-products

Misa OTOGURO¹, Keita KONISHI¹, Kota NAGANUMA², Kensuke SATO², Hideo KIMURA², Katsuhiko NAGASAKA³,
Motohiro FURUYA⁴, Fujitoshi YANAGIDA¹

(¹The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi, ²Yamanashi Industrial Technology Center,
³Yamanashi Prefectural Agritechology Center, ⁴Yamanashi Prefectural Livestock Experiment Station)

要約：悪臭の低減効果が期待される乳酸菌を取得する目的でブドウ滓サイレージから乳酸菌の分離を試みた。カタラーゼ活性試験，グラム染色試験，乳酸生成試験を行い，総計で164株の乳酸菌を分離した。16S rDNAの塩基配列解析を行い，101株の同定を行ったところ，*Lactobacillus*属77株，*Leuconostoc*属6株，*Pediococcus*属1株，*Weissella*属10株，未同定7株が認められた。分離株164株の抗菌活性試験では13株に活性が認められ，このうち2株がバクテリオシン様の抗菌物質を生産することが示唆された。

Abstract : Total 164 lactic acid bacterial strains were isolated from wine by-products collected at silo in the Kobayashi farm in Kai-shi. Based on 16S rRNA gene sequences analysis, the genera *Lactobacillus*, *Weissella* and *Leuconostoc* were identified as main genera in marc silage. Thirteen strains among isolates were showed antibacterial activity. Strains 6S35M314 and 6S35B315 probably produced bacteriocin-like agents.

1. 緒言

乳酸菌は糖を発酵して多量の乳酸を生産する細菌の総称で，乳酸発酵による飲料のみならず，保存性の良い乳製品や食品の香味や芳香にも乳酸菌が関与している。長年に渡り人間の生活と密接にかかわってきた乳酸菌であるが，近年では食品分野だけでなく，医療分野においても注目を集めている。また家畜飼料(サイレージ)の貯蔵などにも寄与し，幅広い利用性のある有用微生物である。

サイレージは牧草などの飼料作物をサイロに詰め，乳酸発酵させた家畜の貯蔵飼料であり，発酵によって乳酸，酢酸といった物質が発生し，腐敗菌やタンパク分解菌の活動を抑えるため，飼料の長期にわたる貯蔵が可能になる。また，発酵で生じた有機酸は，家畜にとって重要な栄養源であり，食欲をそそる香りをたてるため，家畜の食欲を増進させる。この発酵品質には多くの微生物が関与するが，その一番の担い手が乳酸菌である。

本研究では，豚のふん尿等から発生する悪臭を低減する機能を有する乳酸菌を含有する低タンパク質飼料を開発するために，ブドウ滓サイレージより乳酸菌を分離し，

サイレージ中の乳酸菌の多様性を解明すること，悪臭低減効果を有する乳酸菌を特定し，その特徴を明らかにすることを目的としている。

2. 実験方法

2-1 ブドウ滓サイレージからの乳酸菌の分離

乳酸菌の分離源として山梨県甲斐市の小林牧場内のバンガーサイロで発酵させたサイレージ飼料を用いた。サンプリングは2013年6月および9月の2回行い，サイロの上層，中層，下層からそれぞれ飼料を採取した。分離方法は希釈平板法および集積培養法を用い，分離培地として，一般的な乳酸菌の培養に用いられるMRS培地(Difco製)，BCP加プレート寒天培地(ニッスイ製)およびGYP培地の3種類を使用した。培養温度は採取時のサイレージの温度から30℃，35℃，40℃に設定し，18通りの組み合わせにより乳酸菌候補株を分離した。なお，希釈平板法は3日間，集積培養法は2-5日間嫌気培養を行った。



図1 サイレージ飼料のサンプリング

2-2 乳酸菌分離株の同定

2-2 乳酸菌分離株の同定

分離株のカタラーゼ活性試験, グラム染色試験および乳酸生成能を調査し, 乳酸菌分離株を取得した. また, 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析を行い, BLAST 検索により分離株の菌種同定を行った.

2-3 乳酸菌分離株の抗菌活性試験と抗菌物質の性状解析

分離株の抗菌活性試験は指示菌に *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T を用いアガーウェル拡散法にて試験した. すなわち, 40℃~50℃にしたMRS軟寒天培地 (Agar, 0.5 % w/v) に前培養した *L. sakei* JCM1157^T を接種し, MRS寒天培地に重層した. 培地表面にコルクボーラー ($\phi=5.5$ mm) で穴をあけ, ここに分離株の培養液を遠心分離し, 1M NaOHでpH7に調整後, ろ過滅菌 (0.2 μ m) したろ液を 50 μ l ずつ注入後, 30℃一晚培養しウェルの周りに形成される阻止円を観察した. 活性を示した菌株を選抜し, 培養液を用いた抗菌性物質の酵素・熱処理を行った. 酵素処理はProteinase K (和光純薬製) を0, 0.22, 2.2, 220 unit/mlになるように中和滅菌後の培養液に加え, 37℃ 5時間反応させた. また, 熱処理は中和滅菌後の培養液を90℃ 30分間, 100℃ 30分間, 110℃ 15分間, 121℃ 15分間それぞれ熱処理を行った. 各処理液をアガーウェル拡散法にて阻止円の消失の有無を確認した.

3. 結果

3-1 乳酸菌の分離

2度のサンプリングで総計164株の乳酸菌候補株を分離した. 分離温度別にみると, 35℃の分離温度でもっとも多い109株の分離株を取得した. また40℃においても20株が分離された.

サンプル別では, 上層サンプルから22株, 中層から68株, 下層から75株の分離株を取得したが, いずれのサンプルにおいても桿菌が優勢に分離された.

表1 ブドウサイレージからの乳酸菌分離株数

分離温度	分離培地	上層		中層		下層	
		桿菌	球菌	桿菌	球菌	桿菌	球菌
30℃	MRS	0	0	3	0	10	0
	BCP	0	0	1	1	7	0
	GYP	0	0	7	0	6	0
35℃	MRS	8	0	14	3	11	5
	BCP	5	3	11	3	10	0
	GYP	5	1	12	4	13	1
40℃	MRS	0	0	2	0	3	0
	BCP	0	0	2	0	2	0
	GYP	0	0	4	0	7	0
合計	164	18	4	56	11	69	6

3-2 分離株の同定

ブドウサイレージから得られた分離株164株のうち, 16S rDNA 配列解析によって同定を行った101株の結果を表2に示した. BLAST 検索によって既知の基準種との相同性が99%以上を示したものを同種と判断した.

Lactobacillus 属77株, *Leuconostoc* 属6株, *Pediococcus* 属1株, *Weissella* 属10株, 未同定7株が認められ, ブドウサイレージ中の乳酸菌の多様性が高いことが明らかとなった.

表2 分離株の同定

Identification	No.of strains
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	5
<i>Lactobacillus buchneri</i>	14
<i>Lactobacillus collinoides</i>	1
<i>Lactobacillus farciminis</i>	1
<i>Lactobacillus farraginis</i>	1
<i>Lactobacillus harbinensis</i>	1
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	8
<i>Lactobacillus mali</i>	1
<i>Lactobacillus namurensis</i>	1
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	19
<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	7
<i>Lactobacillus pentosus</i>	2
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	13
<i>Lactobacillus sicerae</i>	1
<i>Lactobacillus tuceti</i>	1
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	6
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1
<i>Weissella paramesenteroides</i>	10
New species	5
New species (<i>Clostridium</i>)	2

3-3 分離株の抗菌活性試験 (バクテリオシン生産性)

Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM 1157^Tを被試験菌としてアガーウェル拡散法により抗菌活性を示した分離株は13株であった。比較対象としてナイシン生産菌の*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007, 悪臭低減効果を持つ市販の乳酸菌製材から分離したNS-9株とNS-X株, 分離株13株の計16株から得られた培養液の酵素処理試験および熱処理試験の結果を表3, 表4にそれぞれ示した。

抗菌活性を示した分離株13株はいずれもバンガーサイロの下層から分離されたものであった。NBRC 12007, NS-9, NS-X, 分離株6S35M314, 分離株6S35B315が生産する抗菌性物質は酵素処理によって抗菌活性は失活するが, 熱処理では安定であったことから, バクテリオシンである可能性が示唆された。

表3 選抜菌株の酵素処理試験

Strains	Inhibition zone (mm)			
	Control	0.025 units/ml	2.5 units/ml	250 units/ml
NBRC12007	22.1	16.5	14.6	-
NS-9	19.2	18.1	7.9	-
NS-X	17.5	12.1	-	-
6K35M311	6.2	-	-	-
6K35M314	13.3	10.9	-	-
6K35M324	-	-	-	-
6K35B312	10.3	-	-	-
6K35G312	-	-	-	-
6S35M311	-	-	-	-
6S35M312	12.1	8.1	-	-
6S35M314	17.9	14.1	-	-
6S35B311	8.1	-	-	-
6S35B315	19.1	17.8	8.8	-
6S35B411	-	-	-	-
9S35G312	-	-	-	-
9K30M354	-	-	-	-

表4 抗菌性物質の熱処理試験

Strains	Inhibition zone (mm)			
	90°C 30 min	100°C 30 min	110°C 15 min	121°C 15 min
NBRC12007	19.9	18.8	16.9	12.5
NS-9	19.8	17.9	11.1	7.9
NS-X	18.1	13.1	12.1	6.9
6K35M311	6.3	-	-	-
6K35M314	14.1	10.9	-	-
6K35M324	6.1	-	-	-
6K35B312	9.8	-	-	-
6K35G312	-	-	-	-

6S35M311	-	-	-	-
6S35M312	12.1	8.8	-	-
6S35M314	18.1	14.1	12.3	8.8-
6S35B311	-	-	-	-
6S35B315	19.4	16.9	14.1	11.1
6S35B411	-	-	-	-
9S35G312	6.4	-	-	-
9K30M354	-	-	-	-

4. 考察

バンガーサイロの深さはおよそ2m程度であり, 上層, 中層, 下層からそれぞれサンプリングを行い, 乳酸菌の分離を行った。上層から分離された乳酸菌は22株と最も少なく, これは上層部では中層や下層とは異なり, 酸素と接触することで, 好気性菌が優勢になるためと考えられる。一方, 中層や下層では嫌気状態となり通性嫌気性菌である乳酸菌が比較的多く分離できたと考えられる。

分離株の同定結果を見ると, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* が19株, *Lactobacillus buchneri* が14株主要属種として分離された。*L. paracasei* subsp. *tolerans* は耐熱性を示す菌群であり, 源記載では70°C 40秒のヒートショックを与えても生育すると報告されている。また *L. buchneri* はサイレージの好気的変敗を抑制するスターターとして広く利用されている。小林牧場ではスターターを添加しているのか不明であるが, 本実験で優先種として分離されたのは非常に興味深い。また *L. hirgardii* や *Leuconostoc mesenteroides* などはワイン中からの分離報告例が数多くあることからブドウ滓由来の乳酸菌である可能性が高い。

乳酸菌の生産する抗菌性物質バクテリオシンは低分子量のペプチド・タンパク質であるため, 熱に安定で100°C 15分程度の熱処理では分解されない。さらに一般的なタンパク質分解酵素により容易に分解され, その抗菌活性は失われる。抗菌スペクトルにおいては主に近縁の乳酸菌に活性を有し, その作用は静菌的なものもあるが, 殺菌的なものが多数である。これらの特徴をふまえ, バクテリオシンはクラスIからクラスIVまでに分類されている。今回の試験結果からだけではクラス分けはできないが, 乳酸菌分離株6S35M314および6S35B315が生産する抗菌物質は, ナイシン生産菌である*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007や悪臭低減が報告されているNS-9株, N-10株と同様に高い熱安定性を示したことから, この分離株2株も悪臭低減効果を持つことが期待できる。今後, 小規模脱臭試験を行い, その可能性を調査する予定である。

5. 結 言

ブドウ滓サイレージより164株の乳酸菌を分離した。16S rDNAの塩基配列解析による同定では主要属として *Lactobacillus* 属, *Weissella* 属, *Leuconostoc* 属などが認められた。

・ 164株中13株に抗菌活性が認められた。このうち分離株6S35M314, 6S35B315の2株が生産する抗菌物質はバクテリオシン様の物質であると考えられた。

参考文献

- 1) 日本乳酸菌学会編：乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, P411-416, (2010)

成果発表状況

学会発表

- 1) 小西 啓太・乙黒 美彩・岸本 宗和, 古屋 元宏, 柳田 藤寿：ブドウ滓サイレージからの乳酸菌の分離とその性質, 日本農芸化学会2015年度大会, 岡山, (2015)