

有用乳酸菌を用いた食品保存技術の開発

— 味噌からの抗菌性物質を生産する乳酸菌の検索 —

恩田 匠・柳田 藤寿*

The Technical Development of Food Preservation by Using Useful Lactic Acid Bacteria

— Screening of Lactic Acid Bacteria Having Antibacterial Activity from *miso*-paste Product —

Takumi ONDA and Fujitoshi YANAGIDA*

要 約

味噌関連試料から乳酸菌の分離を行い、約1,000株の菌株を得た。それらの乳酸菌菌株を用いて、アガーウェル拡散法により抗菌性物質生産菌の検索を行った。その結果、1株の乳酸菌が *Bacillus subtilis* と *Staphylococcus aureus* に対して生育阻害活性を示した。その乳酸菌は *Streptococcus* 属の菌株であると同定した。

Summary

A total of approximately 1,000 strains of lactic acid bacteria were isolated and purified from *miso*-paste products. And, these strains were screened for antibacterial activity by modified agar diffusion assay. As a results, one of these strains exhibited inhibitory activity against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. It was suggested that this strain belongs to genus *Streptococcus* or closely related genus.

1. 緒 言

各種の発酵食品においては、有害微生物の汚染が問題となることがあり、発酵工程管理の安定化および製品の保存技術の確立がきわめて重要である。発酵食品の発酵過程において、乳酸菌は、酵母とともに多様な役割を果たしているが、その機能の一つに有害微生物を含む雑菌の生育を抑制する能力がある。この乳酸菌の雑菌抑制能力¹⁾は、基本的には乳酸生成に起因する環境のpHの低下によるものであるが、乳酸菌が生産する抗菌性物質の関与²⁾も示唆されている。その中でも近年、一部の乳酸菌が生産するタンパク質性の抗菌物質であるbacteriocin^{3,4)}が注目されており、これらの研究が精力的に進展している。特に *Enterococcus faecalis* が生産するbacteriocinであるnicin^{4,5)}などは、その分子遺伝学的な性状が明らかにされており、既に欧米では食品添加物として利用されている。

以上のことから、抗菌性物質生産能を有する乳酸菌およびそれらが生産する抗菌性物質の積極的な利用は、発酵食品などの製造および保存において非常に有効であることが考えられた。そこで、発酵食品、今回は特に味噌関連試料

からの乳酸菌の分離を行い、その中から抗菌性物質を生産する乳酸菌の検索を行った。

2. 実験材料および方法

2-1 味噌試料からの乳酸菌の分離

乳酸菌分離のための味噌試料は、山梨県内の味噌製造会社(A社、B社、C社)および麴製造会社(D社、E社)の5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7.5に調整した寒天培地を用いた。上記の培地の他に、Table Iに示す培地に塩化ナトリウム7.5%と寒天1.5%を添加したもの(以下、食塩添加GYP寒天培地⁶⁾と略記)も併せて用いた。

味噌試料5gを生理的食塩水に10倍ずつ数段階希釈し、各段階の希釈液1mlを、融解させて50℃に調整した上記の寒天培地を用いてシャーレに混釈培養した。このとき、培地中に生酸性のコロニーの検出のため炭酸カルシウムを1%添加し、好気性菌の増殖を抑制するためアジ化ナトリウムおよびシクロヘキシミドをそれぞれ1.0mg/mlになるよう

本共同研究は、山梨大学地域共同開発研究センターのご助力を得て行われた。

*山梨大学発酵化学研究施設(甲府市北新1-13-1)

Table 1 Composition of GYP medium

Glucose	1.0% (w/v)
Yeast extract [Difco]	1.0% (w/v)
Bacto Peptone [Difco]	1.0% (w/v)
Sodium Acetate	1.0% (w/v)
Tween 80	0.05% (v/v)
Salt B solution	0.05% (v/v)
* Salt B solution contained:	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	40mg/ml
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2mg/ml
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2mg/ml
NaCl	2mg/ml
conc HCl	0.5ml/200ml

Medium was adjusted at pH7.0±0.1

に添加した。30℃で3日間から7日間培養後、プレートを観察して、コロニーの周囲に炭酸カルシウムが溶解した clear zone[†]を形成する通性嫌気性の生酸細菌を乳酸菌として分離した。分離した菌株は、寒天培地に画線培養して、単コロニー分離を行った。この純粋分離操作は、少なくとも3回繰り返した。

2-2 供試菌株および培養

供試菌株として、前項の方法で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。Pediococcus halophilus[†]を主とした乳酸菌を理化学研究所微生物系統保存施設(JCM)、東京大学分子細胞生物学研究所内の細胞・機能高分子総合センター(IAM)および東京農業大学菌株保存室(NRIC)から得た(Table 2)。また、醤油および味噌から分離した未同定の乳酸菌を関連企業(F社, G社)2社から分与を受けた(Table 2)。以上の乳酸菌

Table 2 Lactic acid bacterial strains obtained from some culture collections

Pediococcus halophilus	JCM5888T,IAM1673,IAM1674,IAM1675,IAM1676,IAM1678,IAM1681,IAM1682,IAM1683,IAM1685,IAM1686,IAM1688,IAM1689,IAM1692,IAM1693,IAM1698,IAM1702, NRIC1519,NRIC1630,NRIC1631, NRIC1632,NRIC1634,NRIC1643, NRIC1689,NRIC1990,NRIC1991
Unidentified lactic acid bacteria	T001,T002,T003,T004,T005,T006, T007,T008,T009,T010,T011,T012, T013,T014,T015,T016,T017,T018, T019,T020, M001,M002,M003,M004,M005,M006, M007,M008,M009,M010,M011,M012, M013,M014,M015,M016,M017,M018, M019,M020,M021,M022,M023,M024, M025,M026,M027,M028,M029,M030, M031,M032,M033,M034,M035,M036, M037,M038

T: type strain,
JCM: Japan Collection of Microorganisms. The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN).
IAM: Institute of Applied Microbiology, Tokyo University,
NRIC: NODAI Reserach institute Culture Collection Center. Tokyo University of Agriculture.

† 現在は、本菌種は *Tetragencoccus halophilus*として分類されているが、本稿ではBergey's Manual第8版の記載に従い、*Pediococcus halophilus*と記した。

および今回味噌から分離した耐塩性(好塩性)乳酸菌の培養には、食塩を5%添加し、pHを7.5に調整したLactobacilli MRS broth (以下、食塩添加MRS培地という)を用いた。これらの乳酸菌菌株は、抗菌性物質産生菌検索のための試験菌として供試した。

抗菌性物質検索のための指示菌としては、いわゆる有害菌として *Bacillus subtilis* JCM1465[†]および *Staphylococcus aureus* IAM12544[†]の2株を主に用いた。これら指示菌の培養には、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(150strock/min.)した。さらに、上記の培地を寒天培地として用いるときには、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℃で15分処理した。

供試菌株の保存は、穿刺培養した培地を4℃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、菌株の活性を高めた。

2-3 抗菌性物質産生菌の検索方法の確立

抗菌性物質産生菌の検索は、対象菌株の培養液の抗菌活性の有無を確認することにより行った。抗菌活性の検索方法として、spot test法⁹⁾とagar well diffusion法⁹⁾を用いて、比較・検討した。

2-4 乳酸菌の簡易同定

分離した乳酸菌菌株のうち抗菌活性が示された菌株については、簡易同定のため、いくつかの生化学的性状を調べた。すなわち、グラム染色、光学顕微鏡による形態観察、乳酸発酵形式などについて、乳酸菌実験マニュアル⁵⁾をもとにして同定を行った。

3. 実験結果および考察

3-1 味噌試料からの乳酸菌の分離

今回の実験における味噌試料からの乳酸菌の分離には、7.5%の食塩を添加したMRS寒天培地および食塩添加GYP

Table 3 Lactic acid bacterial strains isolated from miso-products

origin	strain No.
companyA	GM001~260
companyB	MR001~310
companyC	MY101~150
companyD	OK001~100
companyE	FJ001~90

寒天培地を用いたが、各試料から得られる生菌数には差異が認められなかったため、調製が簡便なMRS培地を主に使用した。

今回得られた乳酸菌菌株をTable 3に示す。今回の実験に供試した味噌試料は、乳酸菌をスターターとして使用していないものであったが、それらの製品中には高い菌濃度の乳酸菌が検出された。これらの味噌試料中に旺盛な生育を示す乳酸菌群が存在したことから、それらの起源に興味をもたれた。

3-2 抗菌活性の検索方法の確立

抗菌性物質を産生する乳酸菌菌株の検索は、その培養液中の抗菌活性の有無を検討することにより行った。抗菌活性の検索方法として、spot test法⁷⁾およびTAGGとMcGIVEN⁸⁾が開発したagar well diffusion法を用いた。乳酸菌は著量の乳酸を生成するため、抗菌活性検出の際に得られた抗菌活性が、乳酸菌から産生されるbacteriocinなどの抗菌性物質によるものか、あるいは著量に生成される乳酸によるものかの判定が困難であった。spot test法とagar well diffusion法の両法による抗菌活性の検出について観察した結果、指示菌に対する乳酸の接触が少なく、比較的多量の試験液が添加できるagar well diffusion法が有効であると判断し、TAGGとMcGIVENの方法を改変して以下の方法を確立した。[改変agar well diffusion法]

本方法の流れをFig. 1に示した。シャーレに寒天培地を5mmの厚さで作製し、この寒天培地に6mm径のコルクボーラーを用いて6個の穴を開け、約20 μ lの融解した寒天培地を注入して、試料孔(well)を完成させた。このwellに、抗菌活性検出のための試験液を添加した。試験液は、抗菌

性物質産生菌検索のための試験菌の培養液について遠心分離(3,500rpm, 20min.)により菌体を除き、1Nまたは0.1N水酸化ナトリウム溶液で中和(pH6.8 \pm 0.2)したものを供試した。寒天培地は試験液を注入後、2~3時間37 $^{\circ}$ Cで放置し、抗菌性物質の寒天培地への拡散を促した後、シャーレの上蓋を落とした。この後、指示菌の対数増殖期の培養液100 μ lを、融解させて50 $^{\circ}$ Cに調整した軟寒天培地とともによく混合し、シャーレの上蓋で表裏が逆転した寒天培地上に重層した。さらに37 $^{\circ}$ Cで一晩培養後、wellの周囲のclear zone形成の有無を観察した。

3-3 抗菌性物質産生菌の検索

今回確立した改変agar well diffusion法を用いて、菌株保存機関や関連企業から得た乳酸菌菌株74株、および味噌試料から分離した菌株のうち約200株の中から、抗菌活性を有する菌株の検索を行った。その結果、指示菌として用いた*B. subtilis*および*S. aureus*の生育を阻害する、比較的最強いと考えられる抗菌活性を示す菌株1株を得た(Fig. 2)。また、抗菌活性の発現に再現性が乏しいが、弱い活性を示す菌株3株と合わせて計4株を得た(Table 4)。この*Pediococcus*属の3株の抗菌活性については再検討の余地があることが考えられた。

3-4 抗菌性物質産生菌の簡易同定

抗菌活性が認められた乳酸菌菌株のうち、GM005はグラム陽性で連鎖状の細胞配列を示す球菌であり、ホモ型乳酸発酵したことから、*Streptococcus*属系統(*Streptococcus*, *Enterococcus*あるいは*Lactococcus*属)の乳酸菌であることが分かった。また他の3株は、グラム陽性で四聯状の細胞配列を示す球菌であり、ホモ型乳酸発酵したことから、

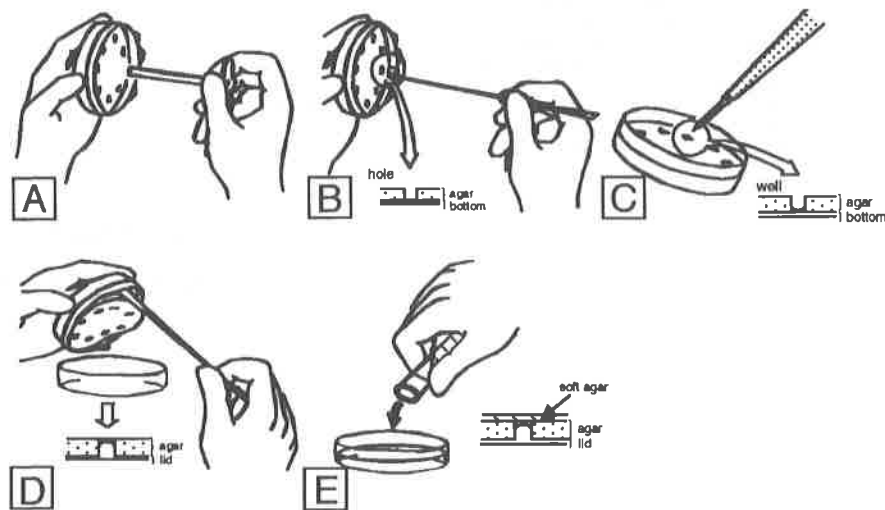


Fig. 1 Procedure of modified agar well diffusion assay

[A] Schales were filled with medium (agar; 1.5%) to a thickness 5mm. Six holes were punched out of agar with a cork borer of 6mm diameter. [B] Punched agars were hollowed out with sterile spatula. In this way, holes were completed. [C] The base holes were sealed with 20 μ l of melted medium. In this way, wells were completed. In the next place 100 μ l of samples were applied to the wells. The inoculated plates were left for 2-3 hours to allow for diffusion of antibacterial substance into the agar. [D] The agar was loosened from the edge of the schale with a sterile supatula. In this way, the bottom surface of the agar was exposed. [E] The freshly exposed surface was inoculated by flooding soft-agar medium with a logarithmic phase culture of indicator strains.

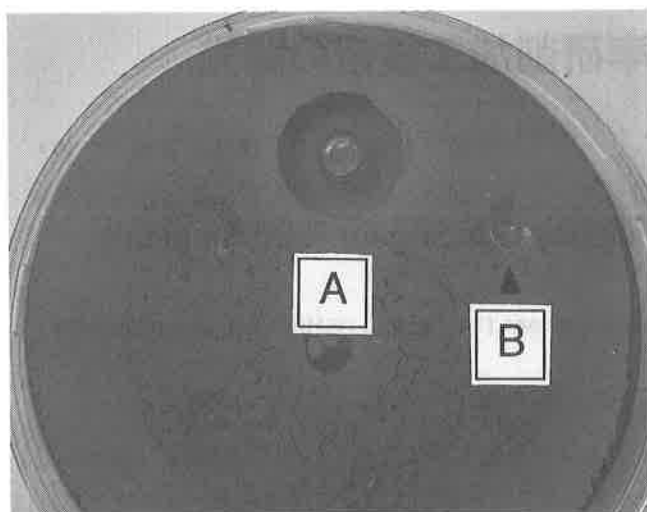


Fig. 2 Inhibition of *B. subtilis* by isolate GM005
A; clear zone by strain GM005, B; strain GM001 (negative)

Table 4 Isolates showed inhibitory activity

Strain	indicator strain	
	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>
GM005	+	+
MR059	±	±
MR101	±	±
FJ 002	±	±

+ ; strong activity, ± ; weak activity.

結 言

今回の研究から得られた抗菌性物質産生菌の詳細な同定試験および産生される抗菌性物質の諸性状の検討を行い、食品への利用の適性について検討する必要がある。また、味噌製造に用いる乳酸菌は、*Pediococcus halophilus* が主体となるため、本菌種の抗菌性物質産生菌の分離が望まれる。

参考文献

- 1) 岡田 早苗 : 微生物, 4, 88 (1988)
- 2) 大西邦男・田中直樹 : 日本醸造協会誌, 89, 269 (1994)
- 3) KLAENHAMMER, T. R. : *Biochimie*, 70, 337 (1988)
- 4) De VUYST, L. and VANDAMME E. J. : Bacteriocins of lactic acid bacteria, Blackie Academic and Professional, London (1994)
- 5) HARRIS, L. J. FLEMING, H. P. and KLAENHAMMER, T. R. : *Food Research International*, 25, 57 (1992)
- 6) 小崎道雄監修 : 乳酸菌実験マニュアル(朝倉書店, 東京) (1992)
- 7) OLYMPIA, M., ONO, H., SHINMYO, H. and Takano, M. : *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 72, 193 (1992)
- 8) 日本生物工学会編 : 生物工学実験書(培風館, 東京) p.32 (1992)
- 9) TAGG, J. R. and McGIVEN, A. R. : *Journal of Applied Microbiology*, 21, 943 (1976)

Pediococcus (または *Tetragenococcus*) 属の乳酸菌であった。

今後、得られた抗菌活性を有する乳酸菌について、糖類の発酵性などを詳細に検討して菌種レベルの同定を行い、同時に抗菌活性を示す物質の同定および諸性質について検討を行う必要があった。