

発酵食品の保存性を高める乳酸菌の探索

化学食品部 ○辻篤史 井上智実 道嶋俊英

1. 目的

近年、食品の保存技術として、植物、動物、微生物及びその生産する抗菌物質を活用するバイオプリザベーション技術が注目されており、乳酸菌も有機酸、抗菌ペプチド等の様々な抗菌物質を生産することが報告されている。特に、乳酸菌の生産する抗菌ペプチド・バクテリオシンは、幅広いグラム陽性細菌に抗菌性を示すとともに、少量で効果を発揮することから食品の風味への影響が少ない。バクテリオシンは、安全性も高いことが知られ、日本においてもバクテリオシンの1種であるナイシンAが保存料として認可され、乳・食肉・卵加工品等実際に使用されている。このように、精製されたバクテリオシンは保存料として使用されているが、これとは別に、一部加工食品においてはバクテリオシン生産乳酸菌を添加することで腐敗菌による変質を防ぐ方法も実施されている。

工業試験場ではこれまで、県産発酵食品から分離した乳酸菌を用いて新しい発酵食品の試作・開発に取り組んできた。そのような中、様々な食材の発酵を行い、なおかつ減塩した製品を製造する場合には、保存性が大きな課題となることが明らかとなった。

そこで本研究では、発酵食品の保存性を高めることを目的とし、地域乳酸菌ライブラリより抗菌物質生産株の探索を行った。また選抜した乳酸菌株の生産する抗菌物質について、抗菌スペクトル(どのような種類の微生物に抗菌活性を示すか)、耐熱・耐酸性、長期保存性等の各種性質決定を行ったので報告する。

2. 内容

2.1 抗菌物質生産乳酸菌株の探索

石川県で製造された発酵食品から分離した乳酸菌約 220 株(地域乳酸菌ライブラリ)の培養上清を使用し、代表的な腐敗微生物である枯草菌(*Bacillus subtilis*)、表皮ブドウ球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、腸球菌(*Enterococcus faecalis*)に対して抗菌活性を示す乳酸菌株をハロー試験(以後、抗菌試験と略す)により1次選抜した。次に、比較的高い抗菌活性が認められた菌株の中で、幅広い食品への応用性を考慮し、中性付近(pH6.5-7.0)においても活性を示す菌株を2次選抜した。その結果、腸球菌に対して高い抗菌活性を示すイカ黒作り(イカ塩辛にイカ墨を混合した食品)由来の乳酸菌株1株(I106株)を見出した。16S-rDNAシーケンス解析の結果、I106株は *Enterococcus faecium* と同定され、近縁種である腸球菌(*E. faecalis*)に対して抗菌活性を有していることが明らかとなった。

2.2 乳酸菌株の生産する抗菌物質の性質決定

I106株培養上清の腸球菌に対する抗菌活性を指標に、発酵時間毎の抗菌活性を測定した結果、抗菌活性は菌数の対数増殖期に急激に上昇することが明らかとなった。尚、抗菌活性は、培養上清を2倍ずつ段階希釈したものを抗菌試験に供し、目視にて阻止円が消失した希釈倍率をAU(activity unit)として定量化した。

次に、I106株の生産する抗菌物質の性質決定を行った。この抗菌物質は、中性付近のpHで抗菌活性(阻止円)が保持されること、限外ろ過膜(分子量3000)で処理したろ過液で抗菌活性が消失すること、タンパク質分解酵素処理により抗菌活性が消失することなどから、乳酸等の有機酸ではな

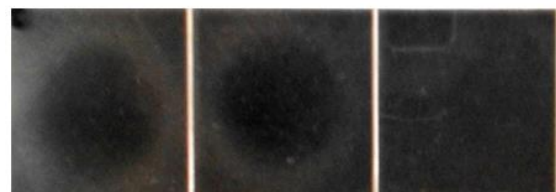


図1 I106株培養上清の抗菌試験

(A:培養上清, B: pHを中性付近に調整,
C:タンパク質分解酵素処理)

くペプチド性のバクテリオシンである可能性が強く示唆された(図 1)。

また、I106 株培養上清を用いて各種グラム陽性細菌・グラム陰性細菌標準株に対する詳細な抗菌スペクトルを調査した。その結果、この抗菌物質は、耐熱性腐敗菌である枯草菌の近縁種 *Bacillus coagulans* や低温増殖性食中毒菌であるリステリア菌の近縁種 *Listeria innocua* に対して既知のナイシン生産株よりも高い抗菌活性を示すことが明らかとなった(表 1)。

さらに、各種pHに調整した培養上清を様々な温度条件にて保持することでpHと熱に対する耐性を調べた結果、pH2.0-7.0 で 92℃、20 分間加熱後も加熱前と同等の抗菌活性を保持しており、酸性から中性域における熱耐性に優れていた(図 2)。さらに、-20℃(冷凍)、4℃(冷蔵)、30℃(常温)における抗菌性の保存試験を行った結果、冷凍・冷蔵条件下では約 1 ヶ月後にも 1/2 以上の抗菌活性を保持していることが明らかとなった。

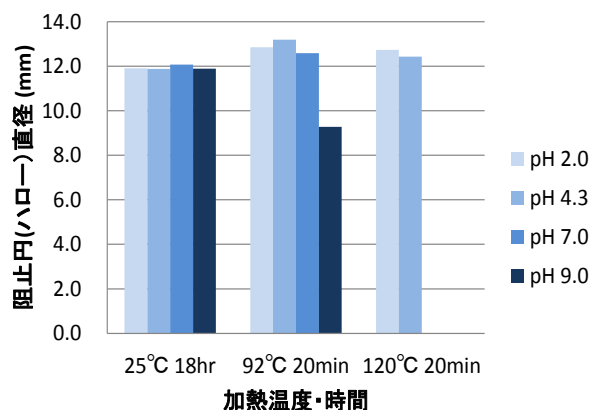


図 2 I106株が生産する抗菌物質の熱・pH耐性

表 1 I106株培養上清の抗菌スペクトル

対象微生物	抗菌活性 (AU/mL)	
	<i>E. faecium</i> I106 strain	<i>L. lactis</i> JCM7638 (nisinZ production)
<i>Bacillus coagulans</i> JCM2257	12800	3200
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090	3200	200
<i>Enterococcus faecalis</i> NBRC12966	3200	ND
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC12993	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> NBRC3009	-	+
<i>Salmonella enteritidis</i> NBRC3313	-	-

3. 結果

地域乳酸菌ライブラリより抗菌物質生産乳酸菌 I106 株(イカ黒作り由来)を選抜し、本菌株が高い熱・pH耐性、長期保存性を有するペプチド性の抗菌物質を生産していることを明らかとした。本菌株は、*B. coagulans*, *L. innocua*, *E. faecalis*等に高い抗菌活性を有する一方で、効果を発揮できる汚染微生物が限定されているため、実際の食品への応用には、他の抗菌物質や抗菌物質生産乳酸菌との併用を検討していく必要がある。