

石川県産発酵食品からの抗菌物質生産乳酸菌の選抜 および抗菌物質の特性評価

辻篤史* 井上智実* 小柳喬**

近年、乳酸菌の生産する物質としてバクテリオシン等の抗菌物質が注目され、保存料としての利用が広がっている。我々はこれまで、石川県産の様々な伝統発酵食品から乳酸菌の分離・同定を進め、乳酸菌株のライブラリを構築してきた。本研究では、本ライブラリより抗菌物質を生産する乳酸菌株の選抜を行い、イカ赤作り(塩辛)から分離した乳酸菌 *Enterococcus faecium* I106株がバクテリオシン様抗菌物質(bacteriocin-like substance, BLS)を生産することを明らかにした。I106株の生産するBLSは、リステリア属細菌等に対して抗菌性を示し、幅広いpH領域で活性を有する、酸性領域で耐熱性を有するなどの特長が認められた。また、I106株は、同属の乳酸菌で生産が報告されている多種類のエンテロシン構造遺伝子を有しており、多種類のバクテリオシンを生産している可能性が示唆された。得られた乳酸菌株は今後、発酵食品の品質改善や保存料への応用が期待できる。

キーワード: 発酵食品, 乳酸菌, バクテリオシン

Isolation of Lactic Acid Bacteria that Produce Antibacterial Substances from Fermented Foods in Ishikawa Prefecture and Evaluation of the Properties of the Substances

Atsushi TSUJI, Tomomi INOUE and Takashi KOYANAGI

Recently antibacterial substances such as bacteriocin, which are produced by lactic acid bacteria, have attracted attention and their use as preservatives is expanding. We have been conducting the isolation and identification of lactic acid bacteria from various traditional fermented foods produced in Ishikawa Prefecture, and have constructed a library of lactic acid bacteria strains. In this study, lactic acid bacteria strains that produce antibacterial substances were selected from this library, and it was clarified that the lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* I106 strain isolated from *Ika-Akadzukuri* produces a bacteriocin-like substance (BLS). The BLS was found to have antibacterial activity over a wide pH range, heat resistance in the acidic range, and antibacterial activity against bacteria such as the genus *Listeria*. In addition, the I106 strain has many types of enterocin structural genes that have been reported to be produced by lactic acid bacteria of the same genus, suggesting that the strain produces many types of bacteriocins. The obtained lactic acid bacteria strain can be expected to improve the quality of fermented foods and be applied as a preservative in the future.

Keywords: fermented food, lactic acid bacteria, bacteriocin

1. 緒 言

乳酸菌は有機酸、過酸化水素、ジアセチル、ペプチド等の抗菌物質を生産し、様々な環境下で他の微生物に対して優位となるような生存戦略を有している。近年、消費者の高品質・自然志向に因るため、天然の抗菌物質を利用した食品保存法であるバイオプリザベーション技術の開発が進んでいる。中でも、風味に影響を与えにくい抗菌性ペプチド・バクテリオシンは注

目されており、各種乳酸菌が異なる構造や抗菌スペクトルを持つバクテリオシンを生産することが明らかにされている¹⁾。特に、発酵乳由来の *Lactococcus lactis* が生産するバクテリオシン・ナイシンは、*Bacillus* 属、*Staphyrococcus* 属等の幅広いグラム陽性細菌に対して強い抗菌性を示し、日本を含む世界中でチーズ、乳製品、缶詰等の保存料として使用されている²⁾。また、保存料としての利用だけではなく、バクテリオシン生産乳酸菌自体をスターターとして添加する製造方法も数多

*化学食品部 **石川県立大学 生物資源環境学部

く研究されている³⁾。

これまでに我々は、石川県産伝統発酵食品の発酵過程で消長する微生物を分離・同定するとともに、分離した200株以上の乳酸菌株のライブラリを作製してきた。また、ライブラリ中より、GABA等の機能性成分高生産株や腸管免疫活性化・抗アレルギー作用等の機能性を有する株の探索を行ってきた⁴⁾。

本研究では、石川県産発酵食品由来の乳酸菌をバイオプリアザバティブとして利用するため、乳酸菌ライブラリよりバクテリオシン生産乳酸菌株の探索を行った。特に、食品利用への利便性の観点から、中性域で高い抗菌活性を有する、耐熱性に優れる、特徴的な抗菌スペクトルを有する等の有用な特長を持つバクテリオシン生産株の取得を目指した。

2. 実験方法

2. 1 使用微生物および培地

乳酸菌ライブラリとして、石川県産の発酵食品（なれ寿し、かぶら寿し・大根寿し、イカ塩辛等）から分離した乳酸菌株220株を用い⁴⁾、培養にはMRS broth (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を使用した。なお、選抜菌株の比較対照として、ナイシンZ生産乳酸菌株 *Lactococcus lactis* JCM7638を使用した。

スクリーニング用の指示菌として、*Bacillus subtilis* NBRC3009、*Staphylococcus epidermidis* NBRC12993、*Enterococcus faecalis* NBRC12966を使用した。指示菌プレートは、1.5(w/v)%寒天加Luria-Bertani (LB)培地をオートクレーブ・冷却後、LB液体培地にて37℃で24時間前培養した各指示菌を0.1(v/v)%添加して混合し、シャーレ内で固化して作製した。

抗菌スペクトル評価用の指示菌は、上記3菌種に加えて *Latilactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157、*Pediococcus pentosaceus* JCM5885、*Bacillus coagulans* JCM2257、*Kocuria rhizophila* NBRC12708、*Listeria innocua* ATCC33090、*Bacillus astrophaeus* NBRC13721、*Citrobacter freundii* NBRC12681、*Escherichia coli* NBRC3806、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* NBRC3313、*Serratia marcescens* NBRC3046、*Enterobacter aerogenes* NBRC12010を使用した。*L. sakei* および *P. pentosaceus* はMRS brothを、*B. coagulans* はNutrient broth No.2 (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を、*K. rhizophila* は細菌用培地No.802 (ハイポリペプトン1(w/v)%、酵母エキス0.2(w/v)%、MgSO₄・7H₂O

0.1(w/v)%を、*L. innocua*はBrain Heart Infusion Medium (Merck KGaA)を、その他の細菌はLB培地を使用して、1.5(w/v)寒天加指示菌プレートを作製した。

2. 2 抗菌物質生産乳酸菌株の選抜

1次スクリーニングでは、各乳酸菌株を30℃で48時間培養した上清を0.22μm滅菌メンブレンフィルターにてろ過し、抗菌性評価溶液として使用した。評価溶液20μLを7mm四方の滅菌ろ紙に吸収させた後、指示菌プレート上に載せて37℃で24時間培養し、生育阻止円が形成された乳酸菌株を選抜した。

2次スクリーニングでは、1次選抜した乳酸菌株を30℃で48時間培養し、上清を1N NaOHでpH6.5-7.0に調整した後、0.22μm滅菌メンブレンフィルターにてろ過し、抗菌性評価溶液とした。1次スクリーニングと同様に、評価溶液をろ紙に吸収させた後、指示菌プレート上で培養し、生育阻止円を指標に乳酸菌株を絞り込んだ。

2. 3 抗菌物質生産乳酸菌株の菌種同定

選抜した乳酸菌株の同定は、約700 bpの16S rDNA上流側の部分塩基配列(V1-V4超可変領域を含む)の決定((株)テクノスルガラボに委託)とBLAST検索⁵⁾により行った。

2. 4 抗菌物質生産タイムコース測定

選抜した乳酸菌株を30℃で培養し、経時的に培養液を採取し、生菌数測定とpHメーター(D-25、(株)堀場製作所)によるpH測定を行った。

抗菌活性の測定は、*E. faecalis* NBRC12966を指示菌とし、KAWAIらの方法⁶⁾を参照して行った。採取した培養液上清を1N NaOHでpH6.5-7.0とした後に容量を調整し、0.22μm滅菌メンブレンフィルターにてろ過して抗菌性評価溶液を作製した。評価溶液を滅菌蒸留水にて2倍ずつ段階希釈した後、各希釈液10μLを指示菌プレートにスポットし、37℃で24時間培養した。抗菌活性値は、生育阻止円の認められた最高希釈倍率をArbitrary Unit (AU)と定義して算出した。

2. 5 抗菌物質の特性評価

選抜した乳酸菌株の生産する抗菌物質がペプチド性であるかを確認するため、Proteinase K (富士フィルム和光純薬(株)) 0.1(w/v)%で37℃にて1.5時間作用させた乳酸菌株培養上清10μLを指示菌プレート(*E. faecalis*

表1 使用したプライマー

Primer*	Sequence (5'-3')	Target gene	Predicted length of PCR product (bp)	Reference
EntA-F	GGTACCACTCATAGTGGAAA	EntA	138	Aymerich et al. (1996) ⁵⁾
EntA-R	CCCTGGAATTGCTCCACCTAA			
EntB-F	GCTACGCGTTCATATGGTAAT	EntB	201	Casaus et al. (1997) ⁶⁾
EntB-R	TCCTGCAATATTCTCTTTAGC			
EntP-F	CAAAATGTAAAAGAATTAAGATCG	EntP	87	Cintas et al. (1997) ⁷⁾
EntP-R	AGAGTATACATTTGCTAACCC			
Ent50B-F	ATGGGAGCAATCGCAAAATTA	Ent50B	274	Cintas et al. (1998) ⁸⁾
Ent50B-R	TAGCCATTTTCAATTTGATC			

*F: Forward, R: Reverse

NBRC12966)にスポットし、37℃で24時間培養後、生育阻止円形成の有無を確認した。

抗菌スペクトルの評価は、2.4と同方法にて各指示菌に対する抗菌活性値を測定した。

抗菌物質のpH耐性および熱耐性は、乳酸菌株30℃24時間培養上清について1N NaOH水溶液または1N HCl水溶液でpH調整と容量調整を行い、得られた溶液を25-120℃で各時間保温した後、*L. innocua* ATCC33090の指示菌プレートに各10μLをスポットし、37℃で24時間培養後に生育阻止円の直径平均を数値化した。

抗菌物質の保存性は、2.2と同様に中性域にpH調整した評価溶液を30℃(常温)、4℃(冷蔵)、-20℃(冷凍)で0-28日間保管し、経時的に*L. innocua* ATCC33090に対する抗菌性を2.4と同方法にて抗菌活性値を測定することで評価した。

2.6 PCRによるバクテリオシン遺伝子検出

プライマーは、既報⁷⁾⁻¹⁰⁾にある *Enterococcus* 属の生産する4種類のバクテリオシン(エンテロシン)遺伝子の塩基配列情報を基に作製した(表1)。選抜した乳酸菌株のゲノムDNAは、MRS broth培養液から Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp.)を用いて抽出し、鋳型として用いた。PCRは、PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (タカラバイオ(株))を使用して、変性温度95℃で30秒、アニーリング温度56℃で30秒、伸長温度72℃で30秒を30サイクル実施し、電気泳動にて87-274 bpの各種エンテロシン遺伝子に由来するPCR断片の増幅の有無を確認した。

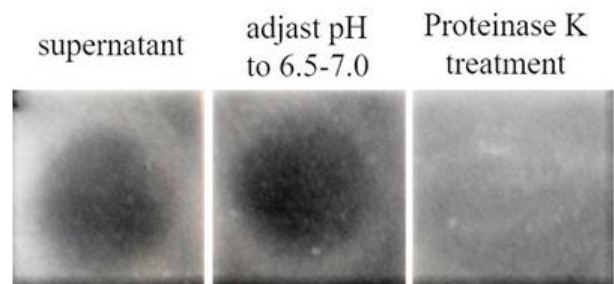
3. 結果および考察

3.1 抗菌物質生産乳酸菌株の選抜

乳酸菌の生産する多くのバクテリオシンは、特にグラム陽性細菌に対する抗菌性を有することが知られている。そこで、食品利用の観点から、耐熱性芽胞を形成する *Bacillus* 属細菌、比較的低pHや低水分活性の環境下に耐性を有するブドウ球菌と腸球菌に対する抗菌性を指標に乳酸菌株の選抜を実施した。

まず、石川県産発酵食品由来の乳酸菌220株の培養液について1次スクリーニングを行った結果、*B. subtilis* NBRC3009と腸球菌 *E. faecalis* NBRC12966に対して抗菌性を示す乳酸菌株を、それぞれ50株と5株選抜した。一方、ブドウ球菌 *S. epidermidis* NBRC12993に対して抗菌性を示す菌株は確認できなかった。

次に、乳酸等の有機酸生成によるpH低下が抗菌性に及ぼす影響を排除するため、培養液のpHを中性に調整した後、同方法にて2次スクリーニングを実施した。その結果、1次スクリーニングで *B. subtilis* に対する抗菌性を示した50株の生育阻止円は全て消失し、これらの菌株培養液の抗菌効果は有機酸によるpH低下が原因と考えられた。一方、*E. faecalis* に対する抗菌性を示した5株のうち、1株(イカ赤作り由来I106株)の培養液は中性域においても抗菌性を示した(図1.中央)。このこ

図1 *E. faecium* I106株培養上清の生育阻止円

とから、本菌株を中性域で効果を発揮する抗菌物質を生産する有望株として、以後の実験に使用した。

3. 2 抗菌物質生産乳酸菌株の菌種同定

イカ赤作り由来乳酸菌I106株の16S rDNAの部分塩基配列の決定と解析の結果、*Enterococcus faecium*と99-100%の高い相同性が認められ、同種と同定した。

3. 3 抗菌物質生産タイムコース測定

E. faecium I106株の抗菌物質生産タイムコースを図2に示す。生菌数増加とpH低下に連動して抗菌活性の上昇が生じ、その後16-48時間の菌数の定常期においても、抗菌活性が安定して保持されることが明らかになった。

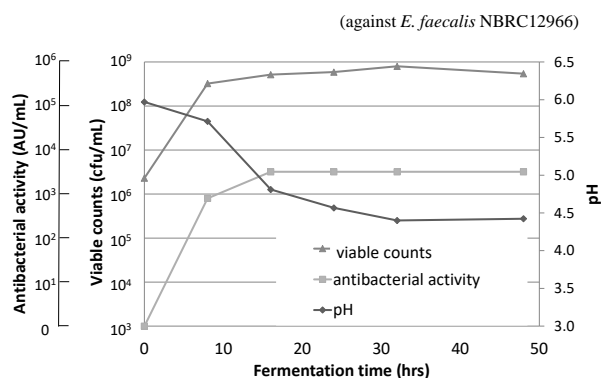


図2 *E. faecium* I106株の抗菌物質生産タイムコース

3. 4 抗菌物質の特性評価

選抜した*E. faecium* I-106株の生産する抗菌物質は、中性域における抗菌性を示したことから、バクテリオシンである可能性が示唆された。そこで、培養上清のプロテアーゼ処理物の抗菌性を確認した結果、プロテアーゼ処理により抗菌阻止円は完全に消失した(図1.右)。このことから、I106株の生産する抗菌物質はBLSであることが明らかになった。

I106株の生産するBLSの抗菌スペクトルを表2に示す。I106株由来のBLSは、近縁種である*E. faecalis*に加え、乳酸菌*Lactobacillus sakei*、耐熱性芽胞形成菌*Bacillus coagulans*や低温発育性細菌*Listeria innocua*(いずれもグラム陽性細菌)に対する抗菌活性を有していた。ナisinZ生産菌培養液と比較して抗菌スペクトルは狭いものの、*B. coagulans*、*L. innocua*、*E. faecalis*に対してはナisinZ生産菌よりも高い抗菌活性を示した。乳酸菌の生産するバクテリオシンは、翻訳後修飾を受けた異常アミノ酸を含む5kDa以下のクラスI (e.g. ナisinA, Z)と異常アミノ酸を含まない10kDa以下のクラスII (e.g. ペディオシンPA-1, エンテロシンAS-48)に大きく分類されている。特にクラスIIaに属するバクテリオシンは、重篤な症状をもたらす食中毒菌・リステリア属細菌に対して高い抗菌活性を示し、*Enterococcus*属においても多種類のクラスIIaバクテリオシンが報告されている⁷⁾⁻¹⁰⁾。これらのことから、

表2 *E. faecium* I106株の生産するBLSの抗菌スペクトル

Indicator strain	Antibacterial activity (AU/mL)	
	<i>E. faecium</i> I106 strain	<i>L. lactis</i> JCM7638 (nisinZ-producing strain)
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM1157	400	25600
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM5885	-	3200
<i>Bacillus coagulans</i> JCM2257	12800	3200
<i>Kocuria rhizophila</i> NBRC12708	-	800
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090	3200	200
<i>Enterococcus faecalis</i> NBRC12966	3200	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> NBRC12993	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> NBRC3009	-	+
<i>Bacillus astrophaeus</i> NBRC13721	-	+
<i>Citrobacter freundii</i> NBRC12681	-	-
<i>Escherichia coli</i> NBRC3806	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> NBRC3313	-	-
<i>Serratia marcescens</i> NBRC3046	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> NBRC12010	-	-

-: not detected, +: detected but not quantified antibacterial activity

I106株由来の生産するBLSは、クラスIIaクラスのバクテリオシンであると推察された。

I106株の食品利用への可能性を探るため、指示菌に *L. innocua* を使用し、BLSのpH耐性および熱耐性を調査した結果を図3に示す。I106株のBLSの抗菌活性は、常温(25℃)ではpH 2-11の広いpH領域で安定して保持された。一方、80℃または92℃で加熱した場合、アルカリ側で活性の低下が認められ、pH 11で活性は完全に消失した。また、120℃でオートクレーブ処理を行うと、低pH域では活性が保持されるものの、pH 7以上で完全に活性が消失することが明らかとなった。ナイシンは、低pH域で極めて安定な物質であり、pH 2-6では100℃で30分間加熱しても抗菌性は保持される一方で、アルカリ性には弱く、pH 8で2時間、pH 9で1時間、pH 10で30分間の加熱により完全に失活する¹¹⁾。また、*E. faecium*の生産する一部エンテロシンについても、幅広いpH域で活性を維持するものの、100℃で60分以上の加熱での失活が報告されている¹²⁾。I106株の生産するBLSも同様に、酸性域で安定、かつ中性～アルカリ領域で熱に不安定なナイシンや一部エンテロシンと類似した性質を持つ物質であることが明らかになった。

次に、I106株の生産するBLSの冷凍・冷蔵・常温における保存性を評価した結果を図4に示した。冷凍・冷蔵保存では、1週間は活性が保持され、その後は低下傾向が見られたものの、約1ヶ月保存後も初発の半分の活性を保持していた。常温では、冷凍・冷蔵よりも活性低下の進行が速く、1週間で半分、約1ヶ月で1/4の活性となった。

以上の結果から、イカ赤作り由来 *E. faecium* I106株の生産するBLSは特に、リステリア菌のリスクが高い賞味期限1ヶ月以内の冷蔵食品において最も効果を発揮

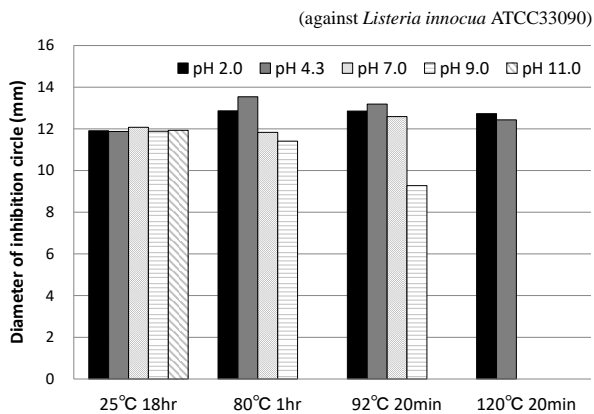


図3 *E. faecium* I106株のBLSのpH耐性と熱耐性

できると考えられた。

3. 5 バクテリオシン遺伝子の確認

これまで多数の *Enterococcus* 属細菌株において、エンテロシンA, B, P等のいずれもクラスIIに属する各種バクテリオシンの生産が報告されており、精製とアミノ酸配列の決定がなされている⁷⁻¹⁰⁾。I106株が生産するバクテリオシンの種類を推定するため、既知エンテロシン遺伝子の塩基配列を基に作製したプライマーを用いて、PCRによりエンテロシン構造遺伝子の有無を調査した。その結果、調査したEntA, EntB, EntP, EntL50Bの全遺伝子について、予想される鎖長のPCR産物を確認した(図5)。このことから、I106株は少なくとも4種類のエンテロシン構造遺伝子をゲノム上に保有することが明らかになった。*E. faecium*については既に、3種類以上のバクテリオシンを生産する菌株が確認されており¹²⁾、I106株も同様に、多種類のバクテリオシンを生産する菌株であることが示唆された。

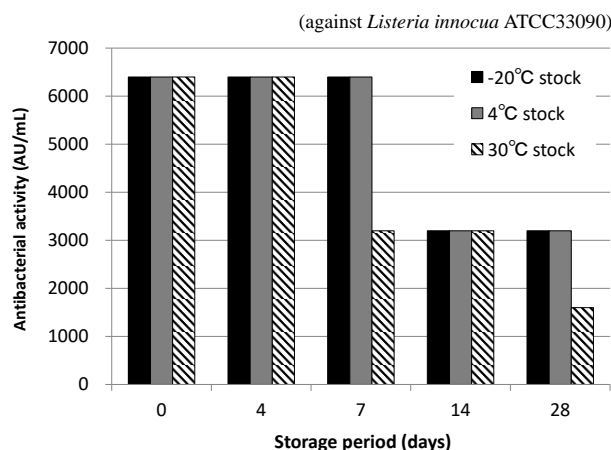


図4 *E. faecium* I106株のBLSの保存性

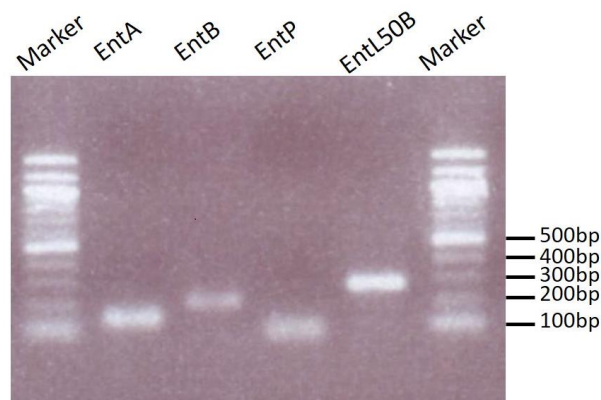


図5 既知エンテロシン構造遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCRの産物

4. 結 言

石川県産発酵食品由来の乳酸菌株約220株から特長のある抗菌物質を生産する菌株の選抜を行い、イカ赤作り由来の*Enterococcus faecium* I106株を見出した。

E. faecium I106株の生産する抗菌物質は、バクテリオシン様物質(BLS)であり、リステリア属細菌、腸球菌、一部の*Bacillus*属細菌、乳酸桿菌*L. sakei*に対して抗菌性を示した。また、幅広いpH領域で抗菌活性を有すること、酸性域での耐熱性に優れること等の食品利用の観点から好ましい特長を有していた。

さらに、*E. faecium* I106株は多種類の既知エンテロシン構造遺伝子をゲノム上に有しており、多種類のバクテリオシンを生産している可能性が示唆された。

今後、I106株の生産するBLSの詳細な性質を調査するとともに、各種食品への利用可能性について検討を進めたい。

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. 京都大学学術出版会, 2010.
- 2) 益田時光, 善藤威史, 園元謙二. ナイシン—類稀な抗菌物質—. ミルクサイエンス. 2010, vol.59, no.1, p.59-65.
- 3) 森地敏樹. 食品保蔵における乳酸菌の利用. 日本食品科学工学会誌, 2002, vol.49, no.4, p.207-219.
- 4) 文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラム都市エリア型 (一般)【石川県央・北部エリア】平成23年度年度報告書.
- 5) “Basic Local Alignment Search Tool”. National Center for Biotechnology Information. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (参照 2021-06-12).
- 6) KAWAI Yasushi, et al. Primary amino acid and DNA sequences of gassericin T, a lactacin F-family bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2000, vol.64, no.10, p.2201-2208.
- 7) AYMERICH Teresa, et al. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. Applied and Environmental Microbiology. 1996, vol.62, no.5, p.1676-1682.
- 8) CASAUS Pilar, et al. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. Microbiology. 1997, vol.143, no.7, p.2287-2294.
- 9) CINTAS Luis M., et al. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. Applied and environmental microbiology. 1997, vol.63, no.11, p.4321-4330.
- 10) CINTAS Luis M, et al. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. Journal of bacteriology. 1998, vol.180, no.8, p.1988-1994.
- 11) 慶田雅洋. ナイシンの食品工業への応用. 日本食品工業学会誌. 1967, vol.14, no.1, p.31-40.
- 12) PARK S H, ITOH K, FUJISAWA T. Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. Journal of applied microbiology. 2003, vol.95, no.2, p.294-300.