

食品汚染細菌に対して抗菌活性を示す 乳酸菌の分離とその抗菌特性

宮本 拓・守中 修・松本 博志・片岡 啓
睦 宗洙

(生産物利用学講座)

Isolation and Antibacterial Properties of Lactic Acid Bacteria Exhibiting Antagonistic Effects against Food Spoilage Bacteria

Taku Miyamoto, Osamu Morinaka, Hiroshi Matsumoto,
Kei Kataoka and Jong Soo Mok

(Department of Agricultural Products Technology)

The 124 strains of lactic acid bacteria in this study were screened for antibacterial activities against food spoilage bacteria. All lactic strains were fermented for 3-5 days in 10 % reconstituted skim milk supplemented with 0.5 % yeast extract and 0.5 % glucose. Culture filtrates from skim milk media adjusted to pH 4.5, centrifuged at 15,000 rpm and filter-sterilized, were tested for antagonistic activities by paper disc assays, using *Escherichia coli*, *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* as test organisms. One out of 124 lactic strains showed greater inhibitory activities against the 4 test organisms. The strain from Inner Mongolian cheese, designated as IMC-1, belonged to the *Lactobacillus acidophilus* group and was selected for further studies. This strain showed considerable inhibitory effects against other lactic strains such as *Lactobacillus helveticus* and *Streptococcus thermophilus* under conditions that reduced the effects of organic acids. The antibacterial activities against *Pseudomonas fragi* IFO 3458 were lost at more than pH 5.2, and the remaining inhibition rate after treatments at 121 °C for 20 min was approximately 63.5 %. The antibacterial substance was extracted from skim milk culture filtrates with ethanol and was passed through Sephadex G-25 columns. It was presumed to be a bacteriocin-like substance with a molecular weight of 1,000~3,500.

Key words : lactic acid bacteria, antibacterial activity, food spoilage bacteria,
Lactobacillus acidophilus group, antimicrobials

緒 言

発酵食品を製造するためにスターターカルチャーを用いることは、既に古くから行われており、中でも乳酸菌は、発酵乳、チーズ、酒類、味噌、醤油、肉製品などの製造に重要な役割をはたしている。その役割は、乳酸発酵、タンパク質分解、脂肪分解などによって発酵食品に風味を与えるとともに、発酵

食品の保存性の向上にも関与している。特に、食品中に発生する病原菌や腐敗菌に対して、スターターカルチャーが顕著な拮抗作用を示すことが最近の研究によって明らかにされ、スターターカルチャーの抗菌性について関心が高まっている。

乳酸菌が生産する抗菌性物質には、乳酸をはじめ

Received October 1, 1997

とする有機酸, 揮発性脂肪酸, 過酸化水素, 安息香酸などが知られている。また, 乳酸菌はバクテリオシンと呼ばれるタンパク質性の抗菌性物質を生産することも報告されている。乳酸菌の生産するバクテリオシンについては, ディプロコクシン²⁾, ナイシン³⁾, ヘルベティシン⁴⁾などの多数の抗菌性ペプチドが単離されている。しかし, これらのバクテリオシンのほとんどが, 類縁菌ないしはある種のグラム陽性菌に対して有効性を示すものであり, グラム陰性菌に対して作用するものはまれである。

本研究では, 発酵食品の製造に有効な抗菌性物質を生産する乳酸菌スターターの検索および抗菌性物質を直接利用した食品の開発に資する目的で, 食品汚染細菌に対して抗菌活性を示す乳酸菌を探索した。そして, 強い抗菌活性を示す菌株については, その菌株の生産する抗菌性物質の性質を調べた。

材料と方法

1. 供試菌株

研究室保存の乳酸菌124株を供試した。被検菌には *Pseudomonas fragi* IFO 3458, *Escherichia coli* RB, *Bacillus subtilis* IFO 3025 および *Staphylococcus aureus* IAM 1011 を使用した。

2. 乳酸菌の抗菌活性測定法

抗菌活性の測定は, ペーパーディスク法によって行った。すなわち, 酵母エキスとグルコースをそれぞれ0.5%含む10%還元脱脂乳培地の3~5日間培養液をpH4.5に調整したのち, 15,000 rpm で遠心分離し, その上清液をフィルター濾過したもの(培養濾液)をペーパーディスク(13mm)に含浸させた。そして, 被検菌を1%量接種した寒天培地5mlをペトリ皿(内径9cm)に分注し, その上にペーパーディスクをのせて, 所定時間培養したのち, ディスクの回りにできる阻止円の直径を測定した。なお, 抗菌活性物質の性質を調べる試験においては, Reddy と Ranganathan の方法⁵⁾に準じて標準曲線を作成し, 抗菌活性の力価(Units)を算出することによって比較した。

3. 乳酸菌の同定試験

抗菌活性の強い菌株については分類学的な性状試験を実施した。まず, 菌の細胞形態・細胞配列, 発酵形式および生成乳酸の光学異性によって菌属に分類し, 次に生育温度, L-アルギニンからのアンモニ

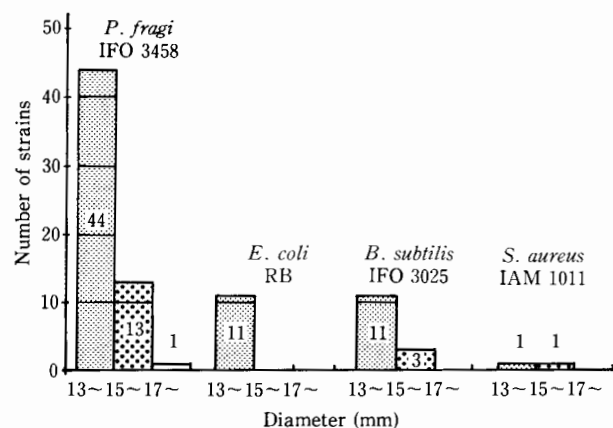


Fig. 1 Screening of lactic acid bacteria exhibiting antibacterial activities against food spoilage bacteria using paper disc assay.

ア生成, 糖類発酵性などによって菌種の同定を試みた。

4. 抗菌活性に及ぼす諸要因の検討

選別した菌株の生産する抗菌性物質の性質を調べる目的で, 他の乳酸菌に対する抗菌スペクトル並びに抗菌活性に及ぼす培養時間, 熱処理およびpHの影響などを検討した。

結果と考察

1. 抗菌性物質を生産する乳酸菌の探索

ペーパーディスク法によって抗菌活性を示す乳酸菌を選別した結果を Fig.1 に示した。供試した乳酸菌124株のうち, *Pseudomonas fragi* に対して抗菌活性を示した菌株の内訳は, 阻止円の直径が13mmより大きく15mm以下の菌株は44株, 15mmより大きく17mm以下の菌株は13株, 17mmより大きかった菌株は1株であった。同様に, *Escherichia coli* では, 阻止円の直径が13mmよりも大きく15mm以下の菌株は11株であった。また, *Bacillus subtilis* および *Staphylococcus aureus* に対しては, 15mmよりも大きく17mm以下の菌株がそれぞれ3株と1株であった。

全体としてみた場合, *P. fragi* に対して抗菌活性を示した菌株が124株のうち58株含まれていた。しかし, *S. aureus* に対しては2株のみであった。このうち, *P. fragi*, *E. coli*, *B. subtilis* および *S. aureus* の被検菌すべてに対して抗菌活性を示した菌株が1株あった。この菌株は内蒙古原産チーズより単離したものであり, *P. fragi* に対して17.5mm, *E. coli* に対して14.5mm, *B. subtilis* に対して17.0mmおよび

S. aureus に対して16.0mmであった。また、この菌株は供試した乳酸菌の中で最も強い抗菌活性を示した。

2. 抗菌活性の強い乳酸菌の同定

抗菌活性の強かった内蒙古原産チーズ起源の乳酸菌 IMC-1 株の形態的並びに生理的性質を調べた。IMC-1 株は15°Cで生育せず45°Cで生育するホモ発酵型乳酸桿菌であり、生成乳酸の旋光性はDL型であった。L-アルギニンからのアンモニア生成および馬尿酸ナトリウムの分解性は陰性であった。また、供試した22種類の糖類のうちグルコース、マンノース、フルクトース、ガラクトース、スクロース、マルトース、セロビオース、ラクトース、トレハロース、エスクリンおよびサリシンを発酵した。しかしアラビノース、キシロース、ラムノース、リボース、メリビオース、ラフィノース、メレジトース、マンニトール、ソルビトール、アミグダリンおよびグルコン酸ナトリウムの発酵性はみられなかった。対照菌の性状⁶⁾と比較することによって、*Lactobacillus acidophilus* グループ乳酸菌であると同定した。

Barefoot と Klaenhammer は *L. acidophilus* の52株について、抗菌性物質生産菌の分布を調べ、*L. acidophilus* には抗菌性物質を生産する菌株が広く分布していることを認めている⁷⁾。また、*L. acidophilus* は消化管の中で小腸下部から大腸にかけて生息するといわれ、これらの菌が生産する抗菌性物質が腐敗

細菌の増殖を抑制して、整腸作用に寄与していると考えられる。このような観点からも *L. acidophilus* グループ乳酸菌は発酵食品のスターターとして有効なものと思える。

3. 選別した乳酸菌株の抗菌活性に及ぼす諸要因の検討

Table 1 は食品汚染細菌4株および乳酸菌25株に対する抗菌活性を調べた結果である。内蒙古原産チーズ起源の *Lactobacillus acidophilus* グループ乳酸菌 IMC-1 株は、同じグループの乳酸菌である *acidophilus* NIAI L-54, JCM 1132, *L. amylovorus* JCM 1126, *L. gasseri* JCM 1131, *L. crispatus* JCM 1185 および *L. gallinarum* JCM 2011 に対して抗菌活性を示さなかった。しかし、供試したその他の乳酸菌に対してかなり強い抗菌活性を示すものが多くあり、この菌株の生産する抗菌性物質は広い抗菌スペクトルを示すものと思われる。一方で、乳製品等の発酵食品の製造に混合スターターとして用いる場合には、併用菌の増殖に対する影響を考慮する必要がある。

次に、被検菌として *Pseudomonas fragi* IFO 3458 を使用し、IMC-1 株の脱脂乳培地の培養濾液について、抗菌活性に及ぼす培養時間、熱処理およびpHの影響を調べた。Fig. 2 は培養濾液の抗菌活性および脱脂乳培地のpHを経時的に調べた結果である。pHは24時間後に3.78とかなり低下したのち、48時間

Table 1 Antibacterial activity of *Lactobacillus* species strain IMC-1 from Inner Mongolian cheese

Test organism	Inhibitory zone (mm) ^{a)}	Test organism	Inhibitory zone (mm) ^{a)}
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		<i>Pseudomonas fragi</i> IFO 3458	17.5
subsp. <i>bulgaricus</i> 7235	24.5	<i>Escherichia coli</i> RB	14.5
subsp. <i>lactis</i> 1135	21.5	<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3025	17.0
subsp. <i>delbrueckii</i> ATCC 9649	25.5	<i>Staphylococcus aureus</i> IAM 1011	16.0
<i>Lactobacillus helveticus</i> 4811	27.5	<i>Streptococcus thermophilus</i> NIAI 510	21.0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NIAI L-54	—	<i>Streptococcus thermophilus</i> 18235	22.5
<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM 1132	—	<i>Lactococcus lactis</i>	
<i>Lactobacillus amylovorus</i> JCM 1126	—	subsp. <i>lactis</i> NIAI 527	19.5
<i>Lactobacillus gasseri</i> JCM 1131	—	subsp. <i>lactis</i> NIAI N-7	17.0
<i>Lactobacillus crispatus</i> JCM 1185	—	subsp. <i>cremoris</i> NIAI H-61	22.0
<i>Lactobacillus gallinarum</i> JCM 2011	—	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	—	subsp. <i>mesenteroides</i> OR-2	—
<i>Lactobacillus casei</i> NIAI L-14	—	subsp. <i>dextranicum</i> 619	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> IFO 3070	—	<i>Pediococcus acidilactici</i> JCM 5885	—
<i>Enterococcus faecalis</i> RIMD 3116001	18.0	<i>Pediococcus dextrinicus</i> JCM 5887	—
<i>Enterococcus faecium</i> IFO 3826	19.0	<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5890	—

a) Diameter of paper disc was 13 mm.

後では3.47, 72時間後では3.32と大きな変化はなかった。しかし, 抗菌活性は24時間後に4.42 units/ml, 48時間後に7.82 units/ml, 72時間後に11.65 units/mlとなり, 時間の経過とともに活性が強くなった。

一方, 低温保持殺菌条件である63°C・30分間の熱処理および121°C・20分間のオートクレーブ処理後の抗菌活性を調べたところ, 未処理が11.65 units/mlであったのに対して, 63°C・30分処理では9.95 units/mlで, オートクレーブ処理では7.40 units/mlとなり, 残存活性はそれぞれ85.4%と63.5%であった。Fig. 3は脱脂乳培地の培養濾液のpHを4.0~7.0に調整したときの抗菌活性に及ぼす影響を検討した結果である。抗菌活性はpHの上昇につれて低下し, pH5.2以上では

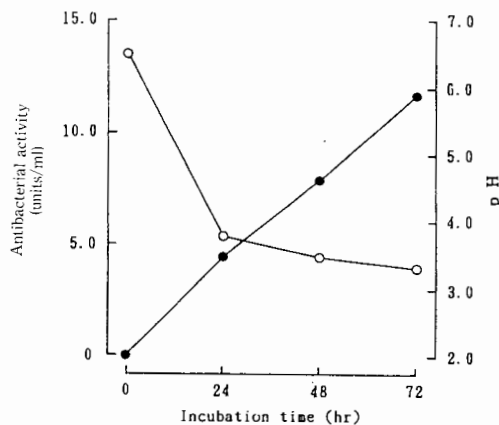


Fig. 2 Changes in the antibacterial activity (●) against *Pseudomonas fragi* IFO 3458 and pH (○) of skim milk during the cultivation with lactic acid bacterial strain IMC-1.

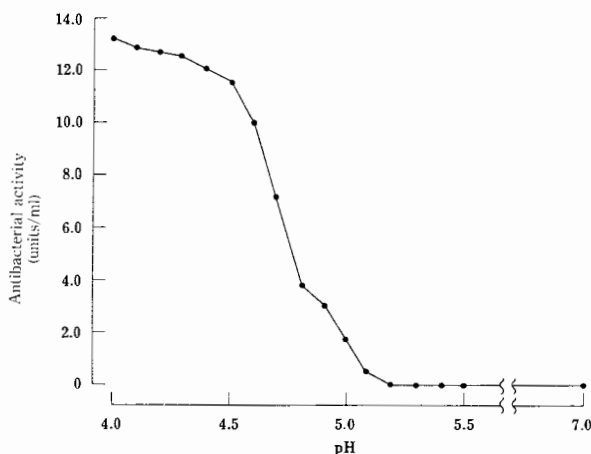


Fig. 3 Effect of pH on the antibacterial activity against *Pseudomonas fragi* IFO 3458 of lactic acid bacterial strain IMC-1.

失活したが, pHを下げると再活性化した。以上のように, IMC-1株の生産する抗菌性物質は熱に対して比較的安定であり, 酸性域で活性の強いことが示された。

4. 抗菌性物質の部分精製

Lactobacillus acidophilus グループ乳酸菌 IMC-1株の生産する抗菌性物質を特定する目的で, まず, 脱脂乳培地の培養濾液に対して10倍量の99.5%冷エタノールを加え, エタノール可溶性と不溶性画分を得た。これらの画分の抗菌活性を調べたところ, 活性はすべてエタノール可溶性画分に存在していた。次に, エタノール可溶性画分をセファデックス G-25 カラムを用いてゲル濾過し, 抗菌活性を調べた。Fig. 4に示すように, 抗菌活性は分画番号56~64の画分に認められた。この活性画分は分画分子量3,500の透析膜に保持されなかった。また, セファデックス G-25 の分画分子量が1,000~5,000であることを考え合わせると, IMC-1株の生産する抗菌性物質は, 分子量が1,000~3,500のバクテリオシン様物質であると考えられる。

現在までに報告されている *Lactobacillus acidophilus* グループ乳酸菌の生産する抗菌性物質としてアシドリリン⁸⁾, ラクタシン B⁹⁾, ラクタシン F¹⁰⁾, アシドフィルシン A¹¹⁾, アシドシン 8912¹²⁾, ギャセリシン A¹³⁾およびアシドシン A¹⁴⁾が上げられる。しかし, 本研究で用いた IMC-1株の生産する抗菌性物質は抗菌スペクトル並びに性質において上述のものとは

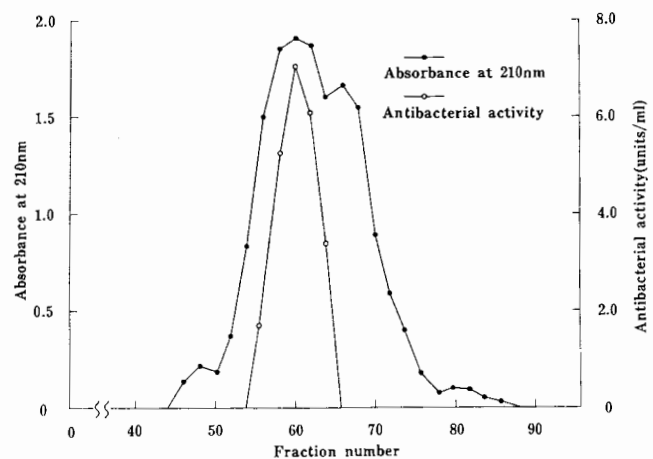


Fig. 4 Elution profile of antibacterial substances produced by lactic acid bacterial strain IMC-1 through Sephadex G-25.

異なっており、新規な抗菌性物質の可能性がある。今後、この菌株の生産する抗菌性物質の解明およびスターター乳酸菌としての応用研究が望まれる。

謝 辞

この研究は、平成6年度から8年度までの3年間に亘る岡山大学学内特定研究『特殊環境生物の機能開発と物質生産への応用』を分担して行ったものである。

摘 要

食品汚染細菌に対して拮抗作用を示す乳酸菌を探索するために、ペーパーディスク法によって乳酸菌培養乳の抗菌活性を調べた。供試した乳酸菌124株のうち、被検菌の *Pseudomonas fragi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* および *Staphylococcus aureus* に対して抗菌活性を示した菌株数は、それぞれ58, 11, 14および2株であった。その中で、すべての被検菌に対して強い抗菌活性を示した菌株が1株あった。これは内蒙古原産チーズより単離した乳酸菌であり、*Lactobacillus acidophilus* グループ乳酸菌と同定した。この菌株の生産する抗菌性物質は、他の乳酸菌11株に対しても抗菌活性を示した。その抗菌活性は121°C・20分間のオートクレーブ処理において完全には失なわれず、pH5.2以上で失活することより、比較的熱に安定で酸性域において活性を示す物質であった。透析処理、エタノールによる溶剤分別およびセファデックス G-25 カラムによるゲル濾過での検討結果より、抗菌性物質は分子量1,000~3,500のバクテリオシン様物質であると推定した。今後、この菌株の生産する抗菌性物質の解明およびスターター乳酸菌としての応用研究が望まれる。

文 献

- Muriana, P. M. : Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. J. Food Prot., **Supplement**, 54-63 (1996)
- Davey, G. P. and B. C. Richardson : Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. Appl. Environ. Microbiol., **41**, 84-89 (1981)
- Hurst, A. : Nicin. Appl. Microbiol., **27**, 85-123 (1981)
- Joerger, M. C. and T. R. Klaenhammer : Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol., **167**, 439-446 (1986)
- Reddy, N. S. and B. Ranganathan : Preliminary studies on antimicrobial activity of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. J. Food Prot., **46**, 222-225 (1983)
- Fujisawa, T., Y. Benno, T. Yaeshima and T. Mitsuo-ka : Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). Int. J. Syst. Bacteriol., **42**, 487-491 (1992)
- Barefoot, S. F. and T. R. Klaenhammer : Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol., **45**, 1808-1815 (1983)
- Hamdan, I. Y. and E. M. Mikolajcik : Acidolin, an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. J. Antibiotics, **27**, 631-636 (1974)
- Barefoot, S. F. and T. R. Klaenhammer : Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Antimicrob. Agents Chemother., **26**, 328-334 (1984)
- Muriana, P. M. and T. R. Klaenhammer : Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. Appl. Environ. Microbiol., **57**, 114-121 (1991)
- Toba, T., E. Yoshioka and T. Itoh : Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. Lett. Appl. Microbiol., **12**, 106-108 (1991)
- Tahara, T., K. Kanatani, K. Yoshida, H. Miura, M. Sakamoto and M. Oshimura : Purification and some properties of acidocin 8912, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* TK8912. Biosci. Biotech. Biochem., **56**, 1212-1215 (1992)
- Kawai, Y., T. Saito, T. Toba, S. K. Samant and T. Itoh : Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gasserin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. **58**, 1218-1221 (1994)
- Kanatani, K., M. Oshimura and K. Sano : Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 1061-1067 (1995)