

乳酸菌のバクテリオシンを利用する バイオプリザベーション

善藤 威史¹・島田 信也²・谷本 保英²
相馬さやか³・中山 二郎¹・園元 謙二^{1*}

1. バイオプリザベーション

嗜好が多様化した現代では、本来の風味を保ちながらも、安全性の高い食品が求められている。食品あるいは中間原料中の有害微生物を制御する最も一般的な手段は加熱処理であるが、過度の加熱は食品などの品質を大きく損なう。消費者の生鮮・高品質化志向に応え、かつ安全性の高い食品を供給するには、より穏和な条件での殺菌・保存処理法の確立が望まれる。そこで、人々が長年にわたり食品として、あるいは食品とともに、何らの害作用もなしに食べてきた植物・動物あるいは微生物起源の抗菌物質（バイオプリザバティブ）を利用した保存法、“バイオプリザベーション”が注目を集めている。そして、バイオプリザバティブのなかでも近年大きな期待を寄せられているのが、乳酸菌が生産するタンパク質性の抗菌物質、バクテリオシンである。¹⁾

2. 新しいバクテリオシンの利用方法の開拓

我々はこれまで、新奇バクテリオシン産生乳酸菌の検索・同定、バクテリオシンの精製と構造および遺伝子解析、特性の検討、発酵生産の最適化、連続生産バイオリクターの開発、などについて取り組んできた。²⁾ また、産学官より成る「機能性食品製造プロセス開発チーム」を作り、バクテリオシンの食品製造プロセスあるいは食品への応用について、構成メンバーの特徴を生かした研究項目に取り組み、顕著な研究成果を得ることができた。³⁾

このような産学官共同研究の成果をさらに発展させるために、関連企業数社を含む「九州大学新生理活性ペプチド事業準備室」を発足させ、ナイシンZなどさまざまなバクテリオシンの実用化研究を展開中である。たとえば、ナイシンZの製造に関しては、現在、1日あたり3000 lの発酵液を調製し、限外ろ過による除菌、ナノろ過による濃縮で、ナイシンZ濃縮液 (10,000 U/ml) 1000 lを生産できるパイロットプラントが完成している。また、ナイシンZ粉末体の供給も可能となった。このようにして調製された粗精製ナイシンZは単体でも効力を発揮したが、抗菌スペクトルが特異的であることから、幅広い菌

叢への静菌効果を得るためには他の静菌剤との併用が望ましいことがわかり、さまざまな食品あるいは中間原料など目的に合致した有効な静菌結果が得られた。対象となる食品についても、非加熱食品、十分な殺菌が行われない食品、再加熱されることなく食される食品などに対して広範囲に検討を行っている。

ところで、芽胞菌は芽胞を形成すると一般の殺菌条件で殺菌できず、条件が有利になったとき発芽して増殖を開始する。芽胞菌が増殖すると不快臭を発生し、芽胞菌が増殖した食品は風味が低下する。100°C以上での加圧加熱殺菌はいわゆるレトルト臭を発生すると共に、味、食感、色など、本来食品が有する風味を劣化させるため、一般の食品製造工程では採用できない場合が多い。風味の良い上質の食品を製造するうえで芽胞菌の問題は生産者を最も苦しめるものである。ナイシンZは芽胞菌の栄養細胞に対して著しい殺菌効果を示すが、芽胞の発芽を抑制するものの芽胞そのものには殺菌効果がなく、非加熱食品中の芽胞数をナイシンで減らすことは困難となっている。

そこで今回、粗精製ナイシンZを芽胞殺菌に利用する手段のひとつとして発芽誘導物質との併用を検討した。すなわち、発芽誘導物質の存在下で芽胞が栄養細胞型になることを利用し、発芽誘導物質添加後にナイシンZを作用させることで非加熱的に芽胞数を減らす方法を試みた。⁴⁾

試験方法は芽胞懸濁液に発芽誘導物質としてL-アラニンを追加したもの、ナイシンZを追加したもの、両方を同時に追加したもの、およびアラニンを追加した30分から4時間後にナイシンZを追加したものを用意し、30°Cに保温し経時的に芽胞菌数（生存芽胞と発芽した栄養細胞との合計数）の計測を行った。その結果、L-アラニン添加区にはいずれも発芽誘導が認められ、芽胞の99%が栄養細胞型に変換した。さらにアラニンを添加して4時間後に粗精製ナイシンZを追加した実験区は、その99%の栄養細胞型芽胞菌が殺菌され最終的に芽胞数を99%除去することができた (Fig. 1)。一方、アラニンとナイシンZを同時に追加した場合は芽胞数が減らなかった。原

* 著者紹介 (代表) 九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門 (教授) 〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

TEL/FAX. 092-642-3019 E-mail: sonomoto@agr.kyushu-u.ac.jp <http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/biosci-biotech/biseibutu/>

¹ 九大院農, ² オーム乳業(株), ³ (株)やまやコミュニケーションズ

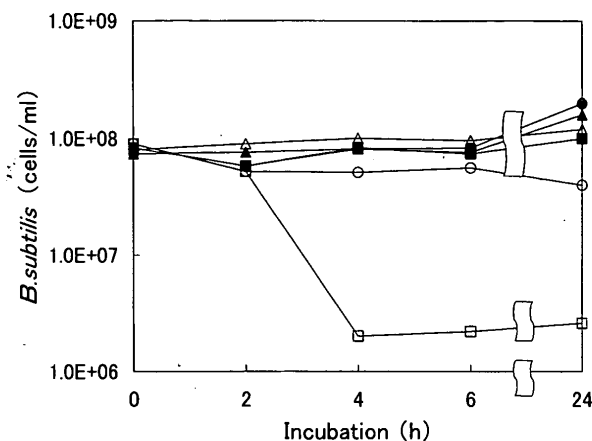


Fig. 1. Synergistic effect of nisin Z and alanine on *Bacillus subtilis* spores. Spore suspension of *B. subtilis* (1×10^8 cells/ml–0.85% NaCl) was incubated at 30°C in the presence of the indicated additives. Symbols: ●, without additives; ○, L-alanine (5 mM) added at 0 h; ▲, nisin Z (100 U/ml) added at 0 h; △, L-alanine (5 mM) and nisin Z (100 U/ml) added at 0 h; ■, nisin Z (100 U/ml) added at 4 h; □, L-alanine (5 mM) added at 0 h and nisin Z (100 U/ml) added at 4 h.

因としては、発芽誘導物質であるアラニンと発芽抑制効果をもつナイシンZが拮抗的に働くことが考えられた。

米、麦、とうもろこしなどの穀類や大豆などの豆類を原料とする麹は発酵食品の中間原料であり、麹の品質がそのまま最終製品の品質を左右する。麹の製造工程において穏和な条件下で雑菌、特に芽胞菌の発育を極力抑制して細菌叢を正常に保ち、雑菌に汚染されない良質の麹を得る技術が求められている。そこで、上記の方法を麹の製造工程に用いた場合についても検討を行った。吸水・蒸煮した大豆に麹菌を接種した後、ナイシンZを添加したものと、アラニンを添加した後4時間後にナイシンZを

添加したものを用意し、開放系での発酵過程における麹菌数と芽胞菌数を測定した。その結果、ナイシンZ単体を添加した場合、添加直後は栄養細胞の殺菌により芽胞菌数が低下するが、3日目以降は無添加区とほぼ変わらない数値となった。一方、アラニンとナイシンZを時間差で添加した場合は5日目になっても無添加区より2オーダー以上芽胞菌数が低かった (Fig. 2A)。なお、大豆の吸水工程や蒸煮工程でのナイシンの添加は効果が認められなかった。麹菌は無添加区では雑菌汚染により生育は見られなかったが、ナイシンZ単体およびアラニン・ナイシンZ併用区ではいずれも良好な生育を示した (Fig. 2B)。アラニン・ナイシンZ併用区では芽胞数が低いことから、発酵物の風味・色調も良かった。⁵⁾

ナイシンはカルシウムイオンやマグネシウムイオンなどの2価のカチオンの存在下でリステリア菌に対する抗菌力を失うことが報告されていたが、⁶⁾他の菌に対する知見がないことから、芽胞菌に対する粗精製ナイシンZとカルシウムイオンの併用効果について検討を行った。試験方法は、芽胞菌液にナイシンZを添加したもの、塩化カルシウムを添加したもの、塩化カルシウムの添加1時間後にナイシンZを添加したもの、ナイシンZの添加1時間後に塩化カルシウムを添加したものを用意し、35°Cで培養して経時的に菌数を測定した。その結果、ナイシンZと塩化カルシウムの併用区はいずれも著しい静菌効果を示した。特にナイシンZを先に添加した場合に高い静菌効果が得られ、24時間後の菌数は無添加区と比較して6～7オーダー減少した (Fig. 3)。また、時間差については30分から1時間が最も効果的であった (特許出願

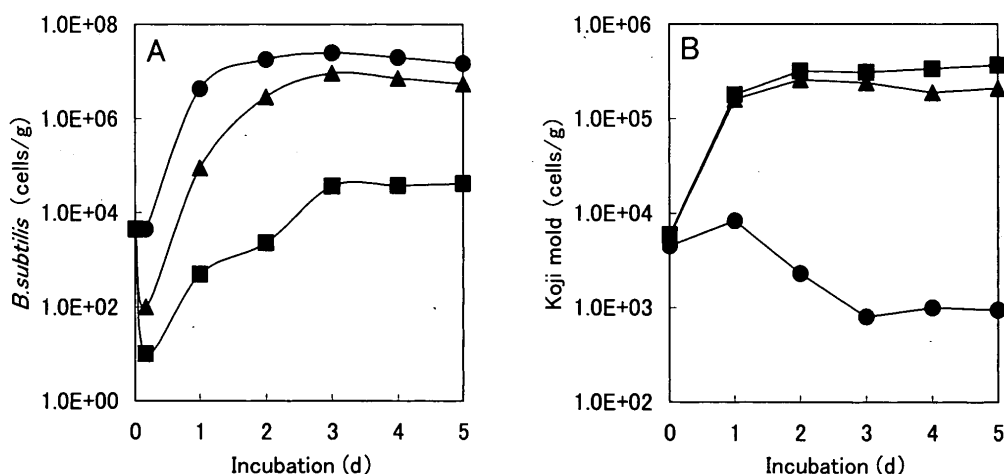


Fig. 2. Synergistic effect of nisin Z and alanine on microbial changes of (A) *Bacillus subtilis* and (B) koji mold during koji fermentation. Soybeans cooked and crushed were inoculated with koji mold and incubated for 2 d at 30°C in the presence of the indicated additives. Koji thus obtained was then stored at 5°C. Symbols: ●, without additives; ▲, nisin Z (400 U/g) added at 0 h; ■, L-alanine (5 mg/g) added at 0 h and nisin Z (400 U/g) added at 4 h.

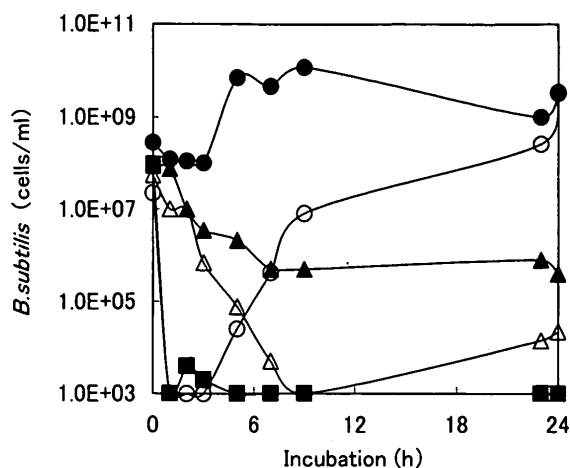


Fig. 3. Synergistic effect of nisin Z and CaCl_2 on *Bacillus subtilis*. *B. subtilis* was inoculated into soybean milk at a level of ca. 10^8 cells/ml and incubated at 35°C in the presence of the indicated additives. Symbols: ●, without additives; ○, nisin Z (200 U/ml) added at 0 h; ▲, CaCl_2 (5% w/v) added at 0 h; △, CaCl_2 (5% w/v) added at 0 h and nisin Z (200 U/ml) added at 1 h; ■, nisin Z (200 U/ml) added at 0 h and CaCl_2 (5% w/v) added at 1 h.

済). ナイシンは一般に速効性の殺菌効果を示すが、長時間食品に接触している間にそれ自体の効力が低下しやすく、以後の雑菌の増殖を許す傾向がある。一方、カルシウムイオンは速効性はないが効力を維持する傾向にあり、この両者を併用することで食品を長期保存することができる。併用効果については、対象となる菌の種類やその機構など、今後詳細に検討する必要がある。さらに本方法を麴の製造工程に用いた場合についても検討を行った。吸水・蒸煮した大豆に麴菌を接種し、静菌剤を添加後、開放系で培養期間中の麴菌数と芽胞菌数を測定

した。その結果、ナイシンZを添加して1時間後に塩化カルシウムを添加した試験区において6日目でも無添加区より2オーダーほど芽胞菌数が低下した (Fig. 4A)。一方、麴菌はいずれの静菌剤添加区も良好な生育を示した (Fig. 4B)。ナイシンZ+カルシウム添加区は芽胞菌数が低いことから、得られた麴は甘い芳香を有し、白色ないし黄土色であった (特許出願済)。これらの結果から、今後併用により粗精製ナイシンZの汎用性が広がることが予想される。

以上、芽胞菌の殺菌や増殖抑制に関して新しい方法を紹介してきた。すなわち、ナイシンZと発芽誘導物質やカチオンを併用することで食品中に混入する芽胞菌を著しく減少させることができた。その間、芽胞菌の殺菌・抑制に加熱や加圧などの物理的処理を一切行わないので、食品が元来有する微妙な風味が損なわれない。その結果、食品本来の風味を残したまま芽胞菌数が激減し、その製造過程において芽胞菌が劣勢になり、製品の風味が一段と向上する。本方法は麴の製造工程での雑菌阻止に有効であるばかりでなく、今後、特に非加熱食品中の芽胞を減らす方法として期待される。

3. その他の応用例

乳酸菌バクテリオシンについては単独の効果を検討するだけでなく、前述した我々の研究のように、種々の抗菌物質や殺菌法との併用による相乗作用が広く検討されている。異なる作用機作をもつ抗菌物質や殺菌法の併用は、相加的あるいは相乗的に作用して個々の処理の軽減を可能にする。結果として、処理による食品の劣化を最

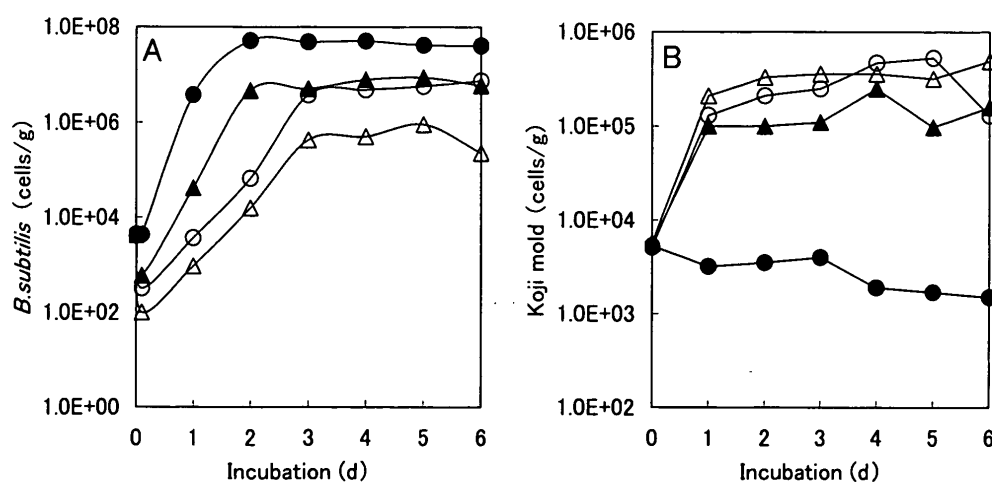


Fig. 4. Synergistic effect of nisin Z and CaCl_2 on microbial changes of (A) *Bacillus subtilis* and (B) koji mold during koji fermentation. Soybeans cooked and crushed were inoculated with koji mold and incubated for 2 d at 30°C in the presence of the indicated additives. Koji thus obtained was then stored at 5°C . Symbols: ●, without additives; ○, nisin Z (200 U/g) added at 0 h; ▲, CaCl_2 (5% w/w) added at 0 h; △, nisin Z (200 U/g) added at 0 h and CaCl_2 (5% w/w) added at 1 h.

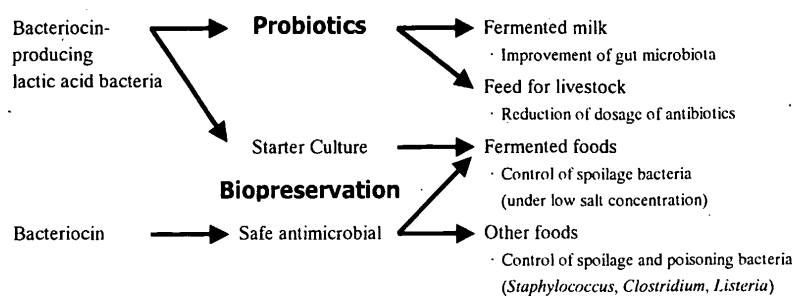


Fig. 5. Applications of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and bacteriocins.

低限にとどめることができるばかりでなく、処理コストの削減や耐性菌の出現を未然に防ぐことも可能となろう。バクテリオシンは、一般にグラム陽性菌にのみにしか抗菌活性を示さないが、相乗作用によってグラム陰性菌やカビ、酵母などの真菌類への効果も期待される。現在までに、ナイシンについては、他の抗菌物質や殺菌法との併用による相乗作用が多数報告されている。^{7,8)}

他の抗菌物質との組み合わせでは、乳酸やプロピオン酸などの有機酸,⁹⁾ リゾチーム,¹⁰⁾ ラクトパーオキシダーゼ¹¹⁾ との併用によって、ナイシンAの効果が相乗的に上昇することが報告されている。また、乳酸菌のバクテリオシンは外膜が存在するグラム陰性菌に対しては抗菌活性を示さないが、EDTA やクエン酸ナトリウムなどのキレート剤との併用により、ナイシンAが大腸菌やサルモネラ菌などのグラム陰性菌の生育も阻害することが明らかとなっている。¹²⁾

複数の乳酸菌バクテリオシンの併用によっても相乗作用が認められている。ナイシンAとペディオシンPA-1の組み合わせは、リステリア菌やボツリヌス菌に対して相乗的に作用した。¹³⁾ 両バクテリオシンは作用機作が異なると考えられており、併用によってそれらの使用量を軽減できるばかりでなく、耐性菌の出現頻度が大きく低下することが予想される。

他の殺菌法との組み合わせでは、食品のフレーバーを維持するために過度の加熱を避けるという観点から、特に非加熱殺菌法との併用がさかんに試みられている。高圧処理では、ナイシンAとの併用でグラム陽性菌だけでなく、グラム陰性菌に対しても相乗的な効果が見られた。¹⁴⁾ また、高電圧パルスとナイシンAの併用によっても相乗的な効果が認められた。¹⁵⁾ このような物理的な殺菌処理は標的細胞に構造上の損傷を与えるため、同様に標的細胞の膜に作用して孔を開けることで抗菌作用を示すバクテリオシンと相乗作用を生じやすいと考えられる。以上のような方法の他にも、炭酸ガス置換包装によってリステリア菌に対するナイシンAの効果が著しく高め

られたことが報告されている。¹⁶⁾

ナイシンをはじめとするバクテリオシンは、前述のように一般に即効性の殺菌効果を示すが、食品成分との作用によりその効力が低下しやすく、効果が維持されにくい傾向がある。それを改善するために、フィルム材やリポソーム中にバクテリオシンを固定化して用いる方法^{17,18)} や、バクテリオシン産生乳酸菌を食品に添加して食品中でバクテリオシンを生産させる方法などが試みられている。これらの方法では、バクテリオシンを食品中に徐々に供給することができ、その効果を長期間維持することができると考えられる。バクテリオシン産生乳酸菌を添加する方法としては、バクテリオシン産生乳酸菌をスターターカルチャーとして用い、チーズや味噌などの発酵食品中の汚染菌を制御した例が報告されている。^{19,20)}

バクテリオシンとバクテリオシン産生乳酸菌の主な用途を図に示した (Fig. 5)。バクテリオシン産生乳酸菌は、先に述べたスターターカルチャーとしてのバイオプリザベーションへの利用以外にも、プロバイオティクスとしての利用も考えられる。腸管内で生産されるバクテリオシンが有害菌の生育を抑えることにより、さらに優れた腸内フローラ改善効果が期待される。プロバイオティクスとしては、ヒトだけでなく、家畜への利用もさかんに試みられている。家畜への過剰な投与が問題視されている抗生物質の代替品として、バクテリオシン産生乳酸菌は大きな期待を寄せられている。

4. 今後の課題

バクテリオシンに限らず、抗菌物質の継続的な利用により最も懸念されるのは、耐性菌の出現である。耐性菌の蔓延を阻止するには、未だ詳細が明らかとなっていない耐性機構や作用機作を完全に解明し、それに基づくバクテリオシンの適正な利用法を検討する必要がある。ここで述べた作用機作の異なる抗菌物質や殺菌法との併用は、耐性菌の出現を未然に防ぐ非常に有効な手段と考

Table 1. New bacteriocin-producing lactic acid bacteria in our laboratory.

Species	Strain	Source	Bacteriocin
<i>Lactococcus lactis</i>	IO-1	Kitchen sink	Nisin Z
<i>Lactococcus lactis</i>	Chizuka, Yasaka	Fermented rice bran (Nukadoko)	Nisin Z
<i>Lactococcus lactis</i>	QU 1	Seaweed	Nisin Z
<i>Lactococcus lactis</i>	QU 3	Corn	Nisin Z
<i>Lactococcus lactis</i>	QU 8	Carrot	Nisin Z
<i>Lactococcus lactis</i>	WNC 20	Fermented sausage (Nham)	Nisin Z
<i>Lactococcus lactis</i>	12N, 18N	Fermented rice noodle	Nisin Z
<i>Lactococcus lactis</i>	61-14	River water	Nisin Q
<i>Lactococcus lactis</i>	QU 4	Corn	Lactococcin Q
<i>Enterococcus mundtii</i>	QU 2	Soybean	Mundticin
<i>Enterococcus faecium</i>	WHE81	Soft cheese	Enterocin A, B
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TISTR 536	Fermented sausage (Nham)	Pediocin PA-1
<i>Pediococcus acidilactici</i>	S3	Fermented sausage	Pediocin PA-1

えられる。さらに、併用によって、これまでバクテリオシンのみでは困難とされてきた、芽胞菌やグラム陰性菌、真菌の制御の実現も期待される。最近の我々の研究では、これまで主な分離源とされてきた発酵食品に限らず、自然界に広くバクテリオシン産生乳酸菌が存在していることが明らかとなってきた（Table 1）。作用機作の異なる新奇バクテリオシンの発見も期待され、それらの併用だけでなく、対象となる食品や制御すべき雑菌にあわせて適切なバクテリオシンを選択することも可能となるであろう。

本稿を作成するに当たり、「九州大学新生理活性ペプチド事業準備室」の関係者にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 森地敏樹, 松田敏生編著: バイオプリザベーション—乳酸菌による食品微生物制御—, 幸書房 (1999).
- 2) 園元謙二: 生物機能の新展開—人類の生存をかけて—, p. 65, 日本食品出版 (2000).
- 3) 園元謙二, 石崎文彬: 生物工学, **79**, 182 (2001).
- 4) 特開2002-330740: 芽胞の殺菌方法
- 5) 特開2002-330715: 麴の製造方法
- 6) Abee, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1962 (1994).
- 7) Delves-Broughton, J. *et al.*: *Antonie van Leeuwenhoek*, **69**, 193 (1996).
- 8) Cleaveland, J. *et al.*: *Int. J. Food Microbiol.*, **71**, 1 (2001).
- 9) Paster, N. *et al.*: *J. Food Prot.*, **62**, 1223 (1999).
- 10) Chung, W. and Hancock, R.E.W.: *Int. J. Food Microbiol.*, **60**, 25 (2000).
- 11) Boussoel, N. *et al.*: *Int. J. Food Microbiol.*, **60**, 169 (2000).
- 12) Stevens, K. A. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3613 (1991).
- 13) Hanlin, M. B. *et al.*: *J. Food Prot.*, **56**, 252 (1993).
- 14) Ter Steeg, P. F. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4148 (1999).
- 15) Pol, I. E. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 428 (2000).
- 16) Nilsson, L. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 769 (2000).
- 17) Scannell, A.G.M. *et al.*: *Int. J. Food Microbiol.*, **60**, 241 (2000).
- 18) Benech, R.-O. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3683 (2002).
- 19) Kato, T. *et al.*: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 330 (2001).
- 20) Harris, L. J. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1484 (1992).