

有機食品向け新規発酵素材の開発に向けた調査研究

岩佐 悟*

1. はじめに

昨今の生物多様性の保全や地球温暖化防止等への関心の高まりの中、農業生産に由来する環境への負荷をできる限り低減した生産管理システムである有機農業の生産や需要が拡大している。それに伴い、有機加工食品の市場拡大も予想されているが、添加物使用や化学的处理に制限があるため、大規模生産における保存方法や風味の改善が難しいことが課題である。そこで、添加物の代替となる素材の開発が求められている。

2. 目的

乳酸菌発酵技術は有機加工食品に利用可能であり、ヨーグルトや漬物の風味改善や保存性向上に利用されてきた¹⁾。これらの機能を有機加工食品に応用して新しい発酵素材を開発できれば、有機加工食品の大規模生産や品質向上が期待できる。その時の課題は、少量添加で効果をもたらす必要があること、および原料や発酵由来の雑香味の存在である。

このうち、当センターは雑香味対策や風味改善について基礎技術を有している²⁾。令和7年度は、乳酸菌の保存性向上効果の指標である抗菌活性に関する知見や技術の導入を目的に、調査研究を実施した。

3. 内容

3.1 抗菌活性の調査

乳酸菌の有する抗菌活性について、学術論文を検索し、抗菌活性をもたらす因子を調査した。その結果、バクテリオシン、有機酸、ジアセチル、エタノールなど、乳酸菌が生成する抗菌成分と、乳酸菌体有する効果として栄養利用の競合等の効果が確認された^{3)、4)}。

次に、抗菌因子と、抗菌活性の対象となる微生物(対象菌)の関係について、論文を検索した。その結果、抗菌因子の効果が、対象菌の種類ごとに異なることが確認された。微生物の種類は、大きく細菌類と真菌類に分かれ、細菌類はグラム陽性菌と陰性菌に分けられる。グラム陽性菌は乳酸菌や枯草菌が属し、陰性菌は大腸菌等が属しており、これらはさらに菌種や株に分類される(図1)。抗菌因子の効果の違いとして、バクテリオシンは近縁種である乳酸菌への効果が高く、有機酸は乳酸菌以外の細菌に対する効果が高いことが確認された⁵⁾。つまり、単独の抗菌因子では、対象菌の種類が限定される。バクテリオシンや有機酸等の効果を組み合わせた発酵素材の開発を行うことができれば、幅広い対象菌に対する増殖抑制が期待できる。

さらに、抗菌活性を有する乳酸菌の利用例について、論文および特許を調査した。対象菌が乳酸菌の場合、発酵の安定化や過剰増殖の抑制により品質低下を防ぐなど、食品の保存性向上への利用が確認された^{6)、7)}。

対象菌がグラム陽性菌の場合、枯草菌等の耐熱性菌を多く含むことから、加熱済食品の腐敗防止や、耐熱性食中毒菌の危害発生防止への利用が期待されている⁸⁾。一方で、対象菌を細菌類・真菌類全般へ拡張することは、技術的に困難で事例も確認されなかったが、実現すれば食中毒・腐敗菌全般の増殖抑制に寄与し、安全性・保存性の向上が期待できる。

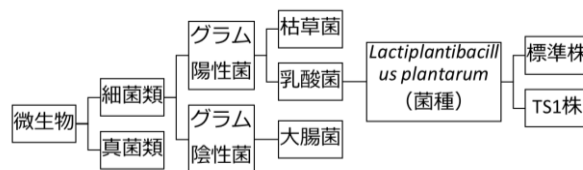


図1 微生物の種類（研究に使用した菌を抜粋）

3.2 抗菌活性評価手法の探査

抗菌活性を評価する手法について文献調査を行った。菌体生成物による抗菌活性を評価する手法として、Spot-on-lawn 法⁹⁾、アガーウェル拡散法¹⁰⁾、濁度法¹¹⁾が開発されている。乳酸菌体自体による効果も含めた総合的な抗菌活性評価の方法としては、フレミング法¹²⁾が開発されている。

3.3 センター保有乳酸菌5株の抗菌活性評価

3.3.1 評価方法

抗菌活性評価法の導入と、当センター保有乳酸菌の抗菌活性の検証を行った。評価は総合的に抗菌活性を評価できるフレミング法で実施した。試験菌は、センターが保有する乳酸菌(IBARAKI-TS1株～TS5株)と、各株が属する菌種の標準株を使用した。対象菌は評価に使用したのと同じ標準株と、枯草菌、大腸菌を使用した。評価方法を、以下に示す。

- 直径9 cmのシャーレにMRS寒天培地(BD)を加えて平板とし、その表面に10 μlの試験菌を滴下した後、30℃24時間アネロパック(株スギヤマゲン)による嫌気培養を行い集落を形成させた。
- この上に対象菌培養液を1%含むトリプトソーヤ寒天培地(アキュディア)7mlを重層して固化させた後、30℃24時間培養した。
- 試験菌の周囲に形成される透明な阻止円のサイズにより、対象菌に対する生育抑制効果を判定した。判定基準は、阻止円の幅が0.5 mm未満を-、0.5 mm以上1 mm未満を±、1 mm以上を+とした。図2に阻止円を示す。

*フード・ケミカルグループ



図2 試験菌の周囲に形成される阻止円

3.3.2 結果と考察

表1に評価結果を示す。TS1株、TS2株およびそれら菌種の標準株を試験菌とした場合、全ての対象菌に対し生育抑制作用を示し、*Lb. pentosus* に対しては標準株よりTS株の生育抑制効果が高かった。TS3株とその標準株、TS4株を試験菌とした場合は*Lb. plantarum*を除く対象菌に対し生育抑制効果を示し、TS4株菌種の標準株を試験菌とした場合は*Lb. pentosus*への生育抑制効果も認められなかった。TS5株は、*Lb. sakei*、枯草菌、大腸菌への生育抑制効果を示し、標準株ではそれに加えて*Lb. brevis*、*Leu. mesenteroides*への生育抑制効果を示した。

多くの対象菌に生育抑制効果を示したTS1株、TS2株は、有機酸の生成量が多いことを報告している¹²⁾。また、全ての試験菌から生育抑制効果を受けた納豆菌や大腸菌は、乳酸菌と比較して有機酸の耐性が低い。

以上から考えると、本評価で主に作用する抗菌因子は有機酸であり、有機酸生成量によって抗菌活性に差がある可能性が示唆された。今後、抗菌因子の検証を進める必要がある

4. まとめと今後の課題

本調査研究では、抗菌活性およびその評価技術の調査、抗菌活性評価手法の試験的導入を行い、センター保有の乳酸菌TS株が乳酸菌、枯草菌、大腸菌への抗菌活性を有していることを確認した。

今後は、Spot-on-lawn法での評価により生育抑制効果に寄与する抗菌因子の特定を進めるとともに、保

有する他の乳酸菌株の抗菌活性を評価し、高抗菌活性株の選抜を行う。その後、発酵原料および発酵条件の最適化を図り、少量添加で保存性向上効果を付与できる発酵素材の開発へ展開する予定である。

5. 参考文献等

- 1) 安井久雄、食品微生物学ハンドブック、技法堂出版、1995
- 2) 岩佐悟、乳酸菌株の選択による発酵漬物などの香りデザイン、香料、303、49-55、2024
- 3) 森地敏樹、バイオプリザベーション、日本食生活学会誌、16、190-193、2005
- 4) 田中勝ほか、我が国における乳酸菌由来バクテリオシンの研究とその利用性、ミルクサイエンス、65、89-96、2016
- 5) 澤 稔彦ほか、乳酸菌バクテリオシンによる微生物制御、日本醸造協会誌、103、223-229、2008
- 6) 恩田 匠ほか、味噌由来バクテリオシン産生乳酸菌の製麴への利用、日本醸造協会誌、101、173-177、2006
- 7) 東海漬物株式会社ほか、特許第5738561号
- 8) 横山定治ほか、魚肉含有培地での製麴におけるバクテリオシン生産性乳酸菌の雑菌汚染防止効果、日本醸造協会誌、106、431-438、2011
- 9) A. Mayr-Harting et al., Methods for Studying Bacteriocins, Methods Microbiology, 7、315-422、1972
- 10) 斎藤忠夫ほか、乳酸菌の生産するバクテリオシンの特徴とその利用、乳業技術、47、90-100、1997
- 11) 原和志ほか、発酵乳製造用乳酸菌における生育抑制作用ならびに *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* の生産する抗菌性物質について、日本畜産学会報、65、674-681、1994
- 12) 岩佐悟ほか、乳酸菌の選抜とそれらを利用した発酵食品の香り制御技術の開発、茨城県工業技術センター研究報告、49、35-38、2021

表1 フレミング法による抗菌活性評価

対象菌	試験菌									
	TS1株	標準株	TS2株	標準株	TS3株	標準株	TS4株	標準株	TS5株	標準株
	NBRC15891	NBRC15891	NBRC106467	NBRC106467	NBRC107147	NBRC107147	NBRC15893	NBRC15893	NBRC100496	NBRC100496
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>		<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>		<i>Levilactobacillus brevis</i>		<i>Latilactobacillus sakei</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> NBRC15891	±	±	±	±	-	-	-	-	-	-
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i> NBRC106467	+	±	+	±	±	±	±	-	-	-
<i>Levilactobacillus brevis</i> NBRC107147	±	±	±	±	±	±	±	±	-	±
<i>Latilactobacillus sakei</i> NBRC15893	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NBRC100496	+	+	+	+	±	±	±	+	-	±
<i>Bacillus subtilis</i> (枯草菌) NBRC3134	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> (大腸菌) NBRC3972	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

阻止円の幅のサイズにより評価 0.5 mm未満:- 0.5 mm以上1 mm未満:± 1 mm以上:+