総 説

食品保蔵における乳酸菌の利用

森 地 敏 樹*

Utilization of Lactic Acid Bacteria for Food Preservation

Toshiki MORICHI*

* Technical Adviser, Ariake Japan, Co., Ltd. 3-2-17 Ebisu-minami, Shibuya Ward, Tokyo, 150-0022

は じ め に

食品の保蔵には、適切な加熱、水分活性や pH の調整、真空あるいはガス置換包装、低温の利用、保存料の添加など、各種の手法が用いられる。さらに、近年は食生活の質的な向上に伴って、できるだけ素材の特徴を生かした、ナチュラルで新鮮感覚の食品を求める傾向が強まってきた。そのために、不必要な加熱を避けるとか、できれば化学的に合成された保存料の代わりに、「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性物質」(バイオプリザバティブ¹⁾)を効果的に活用しようとする食品保蔵技術、すなわちバイオプリザベーションに強い関心が集まっている²⁾。

バイオプリザバティブの定義に当てはまる物質として、酢酸などの有機酸、エタノールなどのアルコール類、抗菌性蛋白質(卵白リゾチームなど)、香辛料成分などがすぐ思い浮かぶ。例えば、香辛料は食肉などの貯蔵に長年利用されてきた。私たちが日常的に摂取している各種の食品中に効果的で安全な抗菌性物質を探索する動きはいま非常に活発化している³⁾。

ところで、人類は昔から乳酸菌などの微生物の働きを巧みに利用して、多種多様な発酵食品を作り出してきた。乳は腐敗しやすく、また大量に得られる季節に限られていたため、牧畜民族は乳を保存性のよい乳製品に加工しなければならなかった。乳加工に用いられるいくつかの基本的手法のなかで、最も自然な方法が乳酸発酵であったといえる。乳製品だけでなく、醸造製品、漬物、そのほかの伝統的な乳酸発酵食品における乳酸菌の役割

は現在ほぼ解明されている⁴⁾⁵⁾。

このような伝統的な食品加工・貯蔵技術において発揮される乳酸菌の制菌作用の本質を明らかにし、得られた知見を新しい食品保蔵法の開発に応用することは、いわば“温故知新”的な新技術であり、加熱殺菌を施すことができない生鮮食品や調理済み食品の保存性を高めるためにも適用できるはずである。また、冷蔵条件下でも生育する一部の低温性食中毒菌(*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* など)の抑制にも役立つものと期待されている²⁾。

1. 乳酸菌の種類とスターター

1-1 乳酸菌の種類

乳酸菌は、炭水化物を発酵してエネルギーを獲得し、多量の乳酸を生成する一群の細菌の総称である。グラム陽性の球菌または桿菌で、カタラーゼ陰性、内生孢子を形成せず、一般に運動性はない。消費した糖類から 50% 以上の割合で乳酸を生成する⁶⁾。

乳酸菌は、チーズ、発酵乳、乳酸菌飲料、発酵バター、発酵ソーセージ、熟成ハム、馴れずし、魚糠漬、菜漬(野沢菜、高菜、広島菜、キムチ、すんき、酸菜、搾菜、泡菜、ザワークラウトなど)、根菜漬(たくわん、糠みそ漬、すぐき漬、赤かぶ漬など)、オリーブやキュウリの漬物、野菜ジュース、発酵茶、発酵豆乳、清酒、ワイン、ウイスキー、味噌、醤油、パン(サワーブレッドなど)、クラッカーなど、多くの種類の食品の加工に関与するだけでなく、飼料(サイレージ)の保存にも不可欠な細菌である。また、人や動物の消化管内でも重要な役割を果たすことがよく知られている^{2)4)~7)}。

* アリアケジャパン株式会社技術顧問(〒150-0022 東京都渋谷区恵比寿南 3-2-17)

表 1 表現形質による乳酸菌の属レベルの識別 (Axelsson⁸⁾)

検 査 項 目	桿 菌		球 菌							
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
四連球菌の形成	—	—	+	—	—	—	+	—	+	—
グルコースからの CO ₂ 生成	—	±	—	—	—	+	—	—	—	+
10℃ での発育	+	±	+	+	+	+	±	—	+	+
45℃ での発育	—	±	—	+	—	—	±	±	—	—
6.5% NaCl 耐性	ND	±	+	+	—	±	±	—	+	±
18% NaCl 耐性	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
pH 4.4 での発育	ND	±	—	+	±	±	+	—	—	±
pH 9.6 での発育	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—
乳酸の旋光性	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L	D, DL

注 (1) 表中の+は陽性, —は陰性, ±は菌種によって異なる。NDは測定結果なし。

(2) *Weissella* は菌種によって形態が桿状を呈する場合もある。

(3) グルコースからの CO₂ 生成で, —はホモ発酵型, +はヘテロ発酵型を意味する。*Lactobacillus* の±は, 菌種によりホモまたはヘテロの相違があることを示す。

(4) *Carnobacterium* は培地の種類によっては少量の CO₂ を生成する場合がある。

(5) 乳酸の旋光性が2または3種類併記されている場合は, 菌種によって相違があることを意味する。

現在の分類体系では, 乳酸菌は表1に示した12属に分けられる⁸⁾。これらは16SリボソームRNAに基づくグラム陽性細菌低GC含量(53%以下)グループの進化系統樹において, 1つのクラスターにまとまった菌群を構成する⁹⁾。表1に示した属のほかに *Atopobium* 属なども知られているが, 本属の分離源は臨床材料で, 系統的にも通常の乳酸菌とは著しく離れた菌群である⁹⁾。

1-2 乳酸菌スターター

食品原料にはいろいろな種類の“野生型”乳酸菌が分布する。昔の発酵乳やチーズの製造は自然の乳酸発酵に任せるか, あるいは偶然によくできた製品の一部を友種式に添加して行なわれた。このことはパルメザンチーズの伝統的な製造法などに見られる。また, 漬物類の製造でも多くの場合, 野菜に付着している乳酸菌を巧みに生育させる手法が用いられる。

これに対して, スターター用乳酸菌は人々が長い年月をかけて利用目的に適った優良な菌種・菌株を自然界から選抜・馴致した, いわば“ドメスティケートされた”菌である。一例を挙げると, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* は作物や生乳に広く分布し, どちらかといえば野生的な乳酸菌である。一方, この菌の亜種とされる *L.*

lactis subsp. *cremoris* は, 発酵乳製品(チーズなど)を除き, 自然界にはまったく存在せず, これは人間が育成した乳酸菌のひとつと考えることができる。

表2に示した通り, 現在かなり多くの種類のスターター用乳酸菌が市販されており, 容易に入手できる。しかも, 従来の伝統的なスターター管理方式が徐々に直接接種型濃縮スターター利用に移行する傾向がある。もちろん種菌(マザースターター)を継代・増菌する方式が今後も広く利用されることは間違いないが, 一方で液体窒素凍結または凍結乾燥した濃縮菌液スターター(frozen or freeze-dried concentrated culture)の利用も次第に普及すると予想される。この技術は, 伝統的に乳酸菌を使い慣れている乳業界だけでなく, それ以外の食品加工分野においても乳酸菌スターターの利用をきわめて容易にした点で画期的な意義をもつものである²⁾⁹⁾。

実際に, 乳酸菌スターターの利用は, 当初発酵乳製品が中心であったが, 次第に利用範囲が広がってきている。例えば, 乳酸菌はセミドライまたはドライソーセージの製造において, 練り肉の熟成期間を短縮し, 適度な酸味と独特のびりっとしたフレーバーを生じるとともに, 発酵ソーセージ特有のしまりのあるテクスチャーと

表 2 スターターとして利用される主な乳酸菌の特徴

乳酸菌の菌種	菌形態	発酵形式	酸素との関係	常用培養温度(℃)	牛乳中の酸度(%)	分布と主な用途
<i>Lactococcus cremoris</i>	連鎖球菌	ホモ	通性嫌気性 (酸素の乏しい環境を好む)	20-25	0.7-0.9	発酵バター、チーズ
<i>Lactococcus lactis</i>	双球菌	ホモ		30	0.7-0.9	
<i>Lactococcus diacetylactis</i>	双球菌	ホモ		30	0.7-0.9	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	連鎖球菌	ホモ		37-43	0.7-0.9	発酵乳、チーズ
<i>Enterococcus faecium</i>	双球菌	ホモ		37-40	0.5-0.8	腸管；チーズ
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	四連鎖菌	ホモ		30	酸生成せず	醸造食品；食肉加工
<i>Leuconostoc cremoris</i>	連鎖球菌	ヘテロ		20-25	酸生成せず	発酵バター、フレッシュチーズ、発酵乳
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	桿菌	ホモ		37-43	1.5-1.7	発酵乳、乳酸菌飲料
<i>Lactobacillus lactis</i>	桿菌	ホモ		37-43	1.5-1.7	チーズ
<i>Lactobacillus helveticus</i>	桿菌	ホモ		37-43	2.5-2.7	チーズ
<i>Lactobacillus jugurti</i>	桿菌	ホモ		37-43	2.5-2.7	発酵乳、乳酸菌飲料
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	桿菌	ホモ		37-40	0.3-1.9	腸管；発酵乳、乳酸菌飲料
<i>Lactobacillus casei</i>	桿菌	ホモ		30	1.2-1.5	チーズ、乳酸菌飲料
<i>Lactobacillus plantarum</i>	桿菌	ホモ		30	0.3-1.2	醸造食品；漬け物、サイレージ；食肉加工

注 1) *Lactococcus cremoris* の現行の学名は *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* であり、また *Lactobacillus bulgaricus* は *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* が分類学的に認められた学名である。この表には、ほかにも同様なケースがあるが、実際面では便宜的に上記のような省略的な呼び方をしても間違いを生じるおそれはない。

2) フレッシュチーズ、発酵バター、サワークリームなどのスターターには、*Lactococcus* に属する菌種数株と *Leuconostoc cremoris* を混合して用いる場合がある。また、ヨーグルトのスターターは国際的にみると、*Lactobacillus bulgaricus* と *Streptococcus thermophilus* を併用するのが一般的である。

3) 発酵ソーセージの製造に用いる *Pediococcus* は、現行の分類では *P. acidilactici* と *P. pentosaceus* である。

するため、重要な役割を果たす。さらに、乳酸菌は製造工程の衛生的安全性を確保し、製品の貯蔵性を高める効果をもつ。この最後の点が本稿の主題である。

2. 乳酸菌の制菌作用

人類は、数千年にわたって各種の乳酸発酵食品を摂取し続けてきた。その結果、食中毒や毒素生産の心配がまったくなく、安全性に優れていることが確認され、現在乳酸菌の有する食品保蔵効果を積極的に応用しようとする気運が著しく高まってきている。すなわち、乳酸菌の病原細菌や腐敗細菌に対する抗菌活性^{2) 8) 10) 11)}を合理的に利用し、必要があれば、個々の乳酸発酵食品が有する特有の匂いや酸味などの問題点を除く技術開発も試みられている。そのためには有害微生物に対して乳酸菌が

発揮する抗菌効果の本体を理解しなければならない。

2-1 有害微生物に対する乳酸菌の制菌効果

図1に、黄色ブドウ球菌の乳中での増殖に対して、乳酸菌 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) が発揮する制菌効果を例示した。これは滅菌脱脂乳に黄色ブドウ球菌を 10^5 /ml 接種し、それに乳酸菌の脱脂乳培養 (スターター) をそれぞれ 1%, 0.1%, 0.01% あるいは 0.001% 量接種して、30℃で培養し、乳酸菌無添加区と比較したもので、図1には選択培地を用いて追跡した黄色ブドウ球菌の消長を示してある。黄色ブドウ球菌は、乳酸菌が増加し、脱脂乳が酸凝固する頃から指数的に死滅した。通常、チーズなどの製造に使うスターター接種量は 1~2% であるから、その条件では黄色ブドウ球菌の増殖は事実上、ほぼ完全に抑えられることになる。ただし、図1か

図 1 脱脂乳中における *Staphylococcus aureus* IAM 1011 の生育に及ぼす *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIAI Sc 10 添加の効果

ら明らかな通り、効果的な制菌には乳酸菌数（添加量）と活性（酸生成速度）が重要であることに留意しなければならない。

著者らの実験では、サルモネラ属 (*Salmonella* Typhimurium, *S. Anatum*), 腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) ならびにシュドモナス属 (*Pseudomonas fluorescens*, *P. putrefaciens*) やバチルス属 (*Bacillus coagulans*, *B. subtilis*) も、乳中で乳酸菌と一緒に培養すると、菌種によって死滅速度には多少の違いがあるが、図 1 とほぼ同様の経過をたどって死滅した。

食品では、加熱殺菌で生き残った細菌胞子（芽胞）が不適切な温度での貯蔵中に発芽・増殖して腐敗や毒素産生をおこす危険性が考えられる。そのモデルとして、*Bacillus coagulans* の精製胞子を 80°C、30 分熱活性化したのち脱脂乳に 10^5 /ml 接種し、乳酸菌 (*L. lactis* subsp. *lactis*) スターターの添加量を変えて、その制菌効果を調べた結果を図 2 に示した。乳中で *B. coagulans* 胞子は 30°C、4 時間以内に 99% 発芽し、ある程度増殖した栄養細胞は、乳酸菌による酸凝固が始まるすこし前に死滅期に入り、顕著な制菌効果が認められた。しかし、少数の未発芽胞子はそのまゝ生存しており、この乳酸菌菌株の制菌作用は及ばなかった点に注意を要する¹²⁾。

図 2 脱脂乳中における *B. coagulans* IAM 1194 (胞子、80°C、30 分で活性化) の生育に及ぼす *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIAI Sc 10 添加の効果

乳酸菌が制菌効果を示す有害細菌は、*Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Vibrio* などに属する食中毒細菌や腐敗細菌だけでなく、特に最近では *Listeria monocytogenes* に対する効果が注目されている。

一方、有害細菌に制菌効果を示す乳酸菌の種類についても、*Lactococcus lactis* だけでなく、*Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. gelidum*, *Pediococcus cerevisiae* (学名は原報による), *P. pentosaceus*, *P. acidilactici*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. sake*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *Carnobacterium piscicola* などの菌種の有効性が知られている^{2) 5) 13) 14)}。

酵母の生育に対する乳酸菌の抑制効果についてはまだ定説がないようであるが、糸状菌の生育やマイコトキシン産出を抑制する乳酸菌の効果についてはいくつかの報告例^{15) 16)}がある。著者ら¹⁷⁾も乳業用混合スターターに含まれる *Leuconostoc mesenteroides* の 1 亜種が *Penicillium*, *Aspergillus* または *Fusarium* に属する一部の菌

表 3 サルモネラの生育可能最低 pH の酸の種類による差異 (CHUNG, K.C. and GOEPFERT, J.M., 1970 より)¹⁸⁾

酸の種類	生育可能最低 pH*
塩 酸	4.05
クエン酸	4.05
酒石酸	4.10
グルコン酸	4.20
フマル酸	4.30
リンゴ酸	4.30
乳酸	4.40
コハク酸	4.60
グルタル酸	4.70
アジピン酸	5.10
ピメリン酸	5.10
酢 酸	5.40
プロピオン酸	5.50

* 各種 pH に調整したトリプトン・酵母エキス・グルコースブロスに *Salmonella* Anatum, *S. Tennessee* または *S. Senftenberg* を 10^4 個/ml 接種して培養し、10 倍以上の増殖が認められた最低 pH 値。

種の生育を阻止することを見出した。

2-2 乳酸菌の生成する抗菌性物質

乳酸菌が他の微生物に対して発揮する抑制効果として第一にあげるべきものは、乳酸の生成とそれに伴う pH の低下である。食中毒細菌の多くは、食品の pH が 5 以下であれば生育しないか、あるいは生育してもその増殖速度は微々たるものとなり、一般に pH 4 以下では生育がまったく起こらない。微生物が死滅しはじめる pH は、生育が阻止される pH よりわずかに (0.1~0.4) 低いところにある¹⁸⁾。

微生物の生育に対する酸の阻止作用は水素イオン濃度に依存することはもちろんであるが、同じ pH の場合は塩酸や硫酸などの無機酸よりも、乳酸や酢酸のような有機酸の方が阻止効果が強い。表 3 に例示した通り、微生物が生育し得る最低 pH は、酸の種類によってかなり大幅に相違する。すなわち、酸による微生物生育の阻止作用は、水素イオンだけでなく、陰イオンあるいは酸の非解離分子も関与すると考えられている。表 3 から、サルモネラに対して乳酸は、酢酸ほどではないにしても、かなり強い生育阻止効果を示すことが明らかである¹⁸⁾。また、乳酸は各種細菌に対して、生育阻止作用のみならず、増殖の誘導期を延長させる効果があり、通常の有機酸ではほとんど抗菌作用が期待できない pH 7.0、温度 25℃

のような条件下でも、細菌の増殖誘導期を顕著に延長させるという特徴を有し、松田²¹⁾は乳酸ナトリウムの有効性を詳しく論じている。

乳酸菌の生成する抗菌性物質として、乳酸のほかに、副生する少量の揮発性脂肪酸 (酢酸、ギ酸)、過酸化水素、ジアセチル、アセトアルデヒド、 β -ヒドロキシプロピオンアルデヒド (ロイテリン)、2-ピロリドン-5-カルボン酸など、一群の低分子化合物が挙げられる。微量のジアセチルは発酵バターなどの香気成分であるが、大腸菌やサルモネラに対して生育阻害作用を示すのは数百 ppm の濃度以上とされ、単独で抗菌作用の主役となる物質とは考えられず²²⁾、アセトアルデヒドについても同様なことが言える。乳酸菌には過酸化水素の生成機構がいくつかあるが²³⁾、基本的にカタラーゼを持たない菌群であるため、この物質は培養液中に蓄積する。一般に *Lactobacillus* 属には過酸化水素産生能の高い菌株が多く、例えば *L. plantarum* や *L. acidophilus* では $13 \mu\text{g}/\text{ml}$ あるいは $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の蓄積が報告されている^{19) 20)}。冷蔵食品中に *Lactobacillus* や *Pediococcus* を接種しておく、pH の低下なしに *Pseudomonas* などの低温細菌の生育が効果的に抑制された²¹⁾。その場合には過酸化水素が関与した可能性が高いと推定されている^{22) 23)}。

最近特に注目されているのは乳酸菌のバクテリオシンであり、これを産生する菌種としては *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. sakei*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. delbrueckii*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Enterococcus faecalis*, *E. hirae*, *Leuconostoc gelidum*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Weissella paramesenteroides*, *Carnobacterium piscicola*, *C. divergens* などが挙げられる^{8) 10) 23)}。

乳酸菌の生成するバクテリオシンは、クラス I : ランチオニン [S-(2-アミノ-2-カルボキシエチル)-L-システイン] を含むランチビオティクス、クラス II : 分子量が小さく (10 kDa 以下)、比較的熱安定性が高く、ランチオニンを含まない膜活性ペプチド、クラス III : 分子量が大きく (通常 30 kDa 以上)、熱に不安定な蛋白質、クラス IV : リピド/炭水化物を含む複合蛋白質の 4 群に分類される^{8) 24)}。一般にバクテリオシンは抗菌スペクトルが狭く、本来は生産菌にごく近縁の菌のみを阻害する。

しかし、一部に抗菌スペクトルが比較的広いものが存在する。クラスⅠのランチビオティクスに属するナisin (nisin) やクラスⅡに属するペディオシン (pediocin) PA-1 がその例である。

ナisinは *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* が生成するバクテリオシンで、34 アミノ酸残基より成る分子量 3.5 kDa のペプチドである。通常 2~4 量体で作用する。活性型分子にランチオン、 β -メチルランチオン、デヒドロアラニン、デヒドロブチリンが含まれることが特徴である。ナisin A の N 末端から 27 番目のヒスチジンがアスパラギンで置換されたものがナisin Z であるが、両者の抗菌活性には差がない²⁵⁾。ナisinは医療用に使われておらず、消化管内でキモトリプシンによって分解され、バクテリオシンのなかで GRAS (Generally Recognized As Safe) として認められている唯一の物質であり²⁶⁾、1 日許容摂取量は 33 000 IU/kg 体重 (ナisin 1 ppm は 40 IU) であり、FAO と WHO との合同食品添加物専門家会議 (JECFA) では A₁ ランクに分類されている²⁾。

ナisinはグラム陽性菌全般に抗菌作用を示し、近縁の乳酸菌のほかに *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum* などに効果的で、チーズ、ハム・ソーセージ、缶詰などの保存料として世界中で 60 ヶ国近くの国・地域で利用が認められている²⁾。特に芽胞に対するナisinの阻害効果は食品工業全般にわたって有用と考えられる。*B. stearothermophilus* や *C. thermosaccharolyticum* などの高温細菌の芽胞 (耐熱性が非常に高い) に対して 0.025 mg/ml 以下のレベルで有効であり、また *C. botulinum* の芽胞の発芽後生育 (outgrowth) の抑制に効果的である点は注目される²⁵⁾。わが国ではナisinの利用が認められていないが、国際的調和化と食品の安全性確保の見地から、今後その利用は検討に値するものと考えられる。

ナisinの抗菌作用は、細菌細胞膜に侵入し、孔をあけて、ATP やアミノ酸などを細胞外に漏出させ、プロトン駆動力を破壊することによって生じる^{23) 27)}。ただし、芽胞に対する阻害機構はまだ不明である。

一方、*Pediococcus acidilactici* に属する菌株が生成するペディオシン PA-1^{28) 29)} の利用性も注目されている。*Pediococcus* 属は、食肉や野菜の発酵に広く用いられる乳酸菌である。このバクテリオシンは 44 アミノ酸残基より成る分子量約 4.6 kDa のペプチドで、熱安定性が高い。特殊なアミノ酸を含まないため消化管内で分解されやすい。*Listeria monocytogenes* を含めて多くのグラム

陽性細菌に対する生育阻止効果が重視されているが、まだ食品への使用は認められていない。

現在、乳酸菌のバクテリオシンに関する研究は非常に盛んであり、100 種類以上が報告されているが²³⁾、今のところ実用的にはナisinを越えるバクテリオシンは見出されていない。

乳酸菌による食品保蔵の実際面では、この菌が有するいくつかの抗菌作用が複合的に発揮される。一般に、2 種類以上の抗菌因子を組み合わせれば、単独の場合に比べて、より高い効果が期待される。例えば、ナisinはグラム陰性細菌には無効であるが、それに乳酸塩やクエン酸を併用すると、ナisinが細胞内に浸透しやすくなり、サルモネラや大腸菌をかなり効果的に抑制できる^{30) 31)}。また、突然変異で生じた *L. monocytogenes* のナisin抵抗性株を抑えるために、ナisinとは別のタイプのバクテリオシンを生産するスターター (*Lactobacillus sake*, *Enterococcus faecium*) を組み合わせ使用した事例³²⁾もある。

3. 乳酸菌を利用した食品保蔵

いろいろな種類の食品に分布する乳酸菌の特徴的な菌種を整理して示すと表 4 の通りである^{4) 5) 13) 33)}。この表の乳酸菌のなかには、スターターとして添加するものだけでなく、自然に増殖する主な菌種も含まれる。これらの乳酸菌がそれぞれの食品において果たす役割は多岐にわたるが、本稿では食品保蔵の面のみで論ずる。

3-1 乳製品

はじめに述べたように、乳酸発酵は乳の保存と加工に用いる基本的な手法のひとつである。したがって、発酵乳やチーズなど、乳酸発酵乳製品はすべて乳酸菌の保蔵効果を利用したものといえることができる。

通常のチーズ製造用の乳酸菌スターターは *Lactococcus lactis* に属するいくつかの亜種である (表 2、表 4)。また、一部の硬質チーズ (カードのクッキング温度が高いタイプ) では、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. helveticus*, *Streptococcus thermophilus* などもスターターとして利用される (表 4)。これらのスターターならびにその他の自然に増殖する乳酸菌は、有害細菌の増殖を抑制する。これは、多くの場合開放状態で製造されるチーズの安全性を確保する重要な役割である。

いまから半世紀前に、スイスチーズの clostridia による変敗を防ぐために、ナisin生産性の *Lactococcus* 属スターターが用いられた³⁴⁾。これは食品のバイオプリザ

表 4 各種食品に分布する特徴的な乳酸菌⁴⁾⁵⁾¹³⁾³³⁾

食品の種類	特 徴 的 な 乳 酸 菌
発酵乳、乳酸菌飲料 (ヨーグルト、アシドフィラス ミルク、発酵バターミルク、ケ フィールなど)	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. kefirano</i> faciens, <i>L. casei</i> , <i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
フレッシュチーズ、バター (カテージチーズ、クワルク、 クリームチーズ、サワークリー ム、発酵バターなど)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
熟成型チーズ (ゴーダ、チェダー、エダム、 パルメザン、エメンタール、 ロックフォール、カマンベ ール、ピラミッドなど)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
発酵肉製品 (サマーソーセージ、セルベ ラート、チューリングァー、サラ ミ、ペパロニなど)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. sake</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>Carnobacterium divergens</i> , <i>C. piscicola</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P.</i> <i>pentosaceus</i> , <i>Leuconostoc carnosum</i> , <i>L. gelidum</i>
発酵魚製品 (馴れずし、糠漬、マリネ魚肉 など)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. kefir</i> , <i>Carnobacterium</i> <i>piscicola</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Pediococcus parvulus</i>
野菜・果実加工品 (各種野菜の漬物・ピクルス、 発酵茶葉、オリーブの実、バナ ナ果肉の貯蔵など)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. sake</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L.</i> <i>pentosus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P.</i> <i>pentosaceus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> , <i>L.</i> <i>mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
穀実加工品 (発酵豆乳、発酵ピーナッツミ ルク、サワーブレッド、ソーダ クラッカーなど)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. sanfrancisco</i> , <i>L.</i> <i>farciminis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. pontis</i> , <i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
清 酒	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus sake</i>
ワイン	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. hilgardii</i>
味噌・醤油	<i>Tetragenococcus halophilus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>

ベーションの嚙矢といふことができる。ただし、ナイン生産性スターターをチーズの製造と熟成に用いることは、他の乳酸菌の働きを阻害する恐れがあり、必ずしも常に成功するとは限らなかった。しかし、ナインそのものはプロセスチーズの嫌気性腐敗菌 (*Clostridium sporogenes*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* など) の制

御に直ちに応用され^{25) 35)}、その後乳製品以外の各種食品の保蔵に広く利用されるに至ったことは既に述べた通りである^{2) 25) 36)}。

ところで、わが国では食品媒介による *Listeria monocytogenes* 感染症はまだ確認されていないが、欧米諸国では最も重要な食品媒介病原菌の一つとされている。乳

製品の中では、ソフトまたはセミソフトタイプのナチュラルチーズがしばしば問題となるため、わが国ではこれらの輸入チーズにリステリア陰性を義務付けている。チーズにおける *L. monocytogenes* の制御については多数の報告があり、ナイシンとペディオシン PA-1 の効果は確認されている^{37) 38)}。チェダーチーズやカマンベールチーズの製造に *Lactococcus lactis* ナイシン生産株を用いると、リステリアが効果的に抑制された^{39) 40)}。さらに、ナイシン以外のバクテリオシンを生産する *L. lactis*⁴¹⁾、*Enterococcus faecalis*、*Lactobacillus paracasei*^{40) 42)}、*E. faecium*⁴³⁾ などがチーズの製造におけるリステリア制御に役立つと報告されている。また、*L. monocytogenes* を接種したモッツァレラチーズに *L. lactis* の加熱菌液を添加すると、5℃ 貯蔵中のリステリアの増殖を抑制できた⁴⁴⁾。

3-2 食肉・肉製品

セミドライまたはドライソーセージなどの発酵食肉製品の製造において、練り肉の熟成期間を短縮するため、*Lactobacillus plantarum*、*L. sake*、*L. curvatus*、*Pediococcus acidilactici*、*P. pentosaceus* などが添加される(表 4)。食肉では乳酸菌が利用できる炭水化物の含量が低いいため、適量の糖を加えて発酵の度合を調整する。

発酵ソーセージの製造においては、未殺菌の原料肉を使用し、さらに大部分の製品は加熱殺菌せずに供食する。一般に原材料は $10^4 \sim 10^6$ /g 程度の様々な微生物に汚染されており、黄色ブドウ球菌、サルモネラ、ウェルシュ菌などが存在する可能性が高い。練り肉の発酵温度は 20～30℃ で、これらの食中毒起因菌の増殖の適温に近い。特に黄色ブドウ球菌が最も危険とされ、そのほかにカンピロバクターやリステリアなどの危険性も潜在する。スターターとして添加した乳酸菌が増殖して支配的菌叢を形成し、それが生成する乳酸によってソーセージの pH が低下し、他の菌が生育できない環境をつくらなければならない。

加藤^{45) 46)} は、嫌気的条件下でソーセージを *L. plantarum* または *P. acidilactici* で乳酸発酵することによって、黄色ブドウ球菌を $10^5 \sim 10^6$ /g 接種したにもかかわらず、その増殖が阻止され、 10^6 /g 以下の接種ではエンテロトキシンの産生も阻止されることを示した(食肉では 10^6 /g 以上の黄色ブドウ球菌の汚染は稀である)。実際には、微生物汚染の少ない原料肉を使用し、亜硝酸塩を添加し、十分な乳酸発酵と乾燥(燻煙)を組み合わせることにより、安全な発酵ソーセージを製造することができる⁴⁵⁾。また、生ハム(非加熱食肉製品)の保存性

も、水分活性、亜硝酸などいくつかの要因に依存するが、自然の乳酸発酵もその重要な因子である。

発酵製品以外の食肉製品では、乳酸発酵による酸味は品質低下につながり、異臭や変色の原因となる。真空包装冷蔵肉の場合には、変敗の原因となる乳酸菌を別の風味に影響しない乳酸菌で抑えるという考え方もあるが、例えばフランクフルトソーセージのスライム(ねと)の原因となる *L. sake* を *L. alimentarius* では抑制できなかったと報告されている⁵⁰⁾。欧米では一般にペディオシン PA-1/AcH やサカシン A などの利用が検討されている(pH の関係で、食肉の場合はナイシンは必ずしも効果的ではない)³³⁾。ただし、日本ではバクテリオシン製剤を保存料として使用することは認められていないので、乳酸菌の菌体または培養物の利用を工夫するしかないようである。

生肉・加工肉で最も重視すべき汚染菌はリステリアとされている。ウインナソーセージの表面の滲出液に *L. monocytogenes* とともに *Pediococcus acidilactici* を接種し、4℃ と 25℃ に貯蔵すると、*P. acidilactici* は 4℃ では生育しないが、25℃ では生育してペディオシンを生成し、リステリアの増殖を阻止した⁴⁷⁾。このような乳酸菌の使い方は、製品が不適切な温度に置かれた場合に機能する安全装置(fail-safe)ということができる。また、低温で生育できてバクテリオシンを生成する *Lactobacillus sake*、*Carnobacterium piscicola*、*Leuconostoc gelidum* の添加もリステリアなどの抑制に効果的である^{33) 48)}。また、加熱肉製品に自生した固有の *L. sakei* 株をスライスハムまたはセルベラートソーセージ(真空包装品)に接種すると、*L. monocytogenes* と *E. coli* O157:H7 の生育が阻止され、しかもこの乳酸菌菌株は肉製品の風味には悪影響を及ぼさなかった⁴⁹⁾。

3-3 水産食品

塩辛、くさや、魚醤油、ふなずし、魚の糠漬けのような水産加工品は、魚自体の自己消化酵素や微生物の働きを積極的に利用しており、水産発酵食品と総称される^{5) 50) 51)}。

塩辛は、魚介類の筋肉や内臓などに食塩を加え、腐敗を防ぎながら主として自己消化酵素の作用で旨味を醸成するものである。魚醤油(しょっつる、いしるなど)も高濃度の食塩とともに 1 年から数年熟成させた調味料であるが、好塩性の *Tetragenococcus* が保存性に寄与する可能性があるという⁵¹⁾。

一方、馴れずしでは乳酸菌が重要な役割を演じる。ふなずしは滋賀県の特産で、独特の強い匂いと酸味を持つ

図 3 5°C に貯蔵した真空包装スモークドサーモンにおける *Listeria monocytogenes* の生育に及ぼす *Carnobacterium piscicola* 添加の効果⁵⁴⁾

注) ■ *L. monocytogenes* 057 のみを接種
 ● *L. monocytogenes* 057 と *C. piscicola* A9b (バクテリオシン生産性) を接種
 ★ *L. monocytogenes* 057 と *C. piscicola* A10a (バクテリオシン非生産性) を接種
C. piscicola A9b および A10a は、いずれも 7×10^6 CFU/g 接種し、貯蔵 3 日後には約 4×10^8 CFU/g まで増殖した。スモークドサーモン上では、いずれの菌株でも抗リステリア成分は検出されなかった。

ており、わが国に現存する馴れずしのなかで最も古い形態を残しているといわれている。ふなずしはニゴロブナを約 1 年塩漬けたのち、塩を混ぜた米飯とともにさらに約 1 年間熟成する。熟成に参与し、腐敗細菌の増殖を抑制する乳酸菌としては、*Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. kefir*, *L. alimentarius*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus parvulus* (表 4) などが知られている⁵¹⁾。

魚の糠漬けは、イワシ、ニシン、フグなどを塩蔵し、麴とともに糠に漬け込んで 6 カ月から 1 年熟成させたもので、主産地は石川県である⁵²⁾。その熟成中の主な微生物は乳酸菌と酵母で、*L. plantarum* や好塩性の *pediococci* の存在が報告されている⁵⁰⁾。

一般に魚の腸管などから *carnobacteria*, *lactococci*, *enterococci* が分離されるが、そのうち *Carnobacterium piscicola* と *C. divergens* のバクテリオシン生産株は *Listeria monocytogenes* の生育抑制に有効と報告されている⁵³⁾。実際にスモークドサーモンは、ごく少数 (1g 当たり 10 個以下) ではあるが、*L. monocytogenes* の污染を受けることがあり得る。これを 4~5°C で 3~6 週間貯蔵すると、リステリアがかなり高い菌数まで増殖する可

能性がある。スモークドサーモン (真空包装品) に *C. piscicola* を接種すると、図 3 のようにリステリアの増殖が抑えられた⁵⁴⁾。この場合、バクテリオシン非生産株でも、生産株と同様な効果が認められたが、これは乳酸菌とリステリアとの栄養素の競合によるものと考えられる。*C. piscicola* が旺盛に生育しても、スモークドサーモンの官能的品質には影響を及ぼさなかった⁵⁴⁾。また、加塩したエビ (NaCl 約 3%) を 4.5°C 前後に冷蔵する際、ナイシン Z を添加すると、無添加区のシェルフライフが 10 日であるのに対し、31 日までの延長が認められたという⁵⁵⁾。

3-4 漬物類など

漬物は種類が多く、わが国だけでも 300 種類を越えるといわれている。漬物には、発酵したものと発酵させないものがある。発酵漬物は乳酸菌や酵母が関与し、特有の風味を醸成し、保存性を付与する⁵⁶⁾。

無塩漬物 (すんき、中国の酸菜、ネパールのグンドルックなど) では、発酵によって酸やアルコールを生成させ、pH を低下させて *Bacillus* 属などの腐敗細菌を抑える。また、生成した乳酸やその他の抗菌性物質によって雑菌の増殖を阻止する。乳酸発酵を促すため、以前に漬けた種菌が付着した漬菜を新鮮な菜類と交互に漬け込むか、種菌を含む漬液を注ぎ込むか、あるいは前によくできた菜漬の乳酸菌が付着した容器 (かめ) を洗わずに、次に使用する⁵⁶⁾。

低塩漬物 (野沢菜漬、泡菜、搾菜、ザワークラウトなど) の保存性にも、乳酸菌は役立っている。例えば、ザワークラウトは陰干しし、細切したキャベツに 2~3% の食塩を加え、5~10°C で 40 日以上乳酸発酵する。酸は 1.5% 程度となる⁵⁶⁾。キャベツだけでなく、キュウリやオリーブも塩水に漬けて発酵するが、その過程で生育する *Pediococcus pentosaceus* がベディオシン A を生成し、発酵野菜の保存に重要な役割を果たすことはかなり以前から認められていた⁵⁹⁾。無塩・低塩漬物の代表的な乳酸菌としては *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* などが挙げられる (表 4)⁵¹⁾⁵⁶⁾。食塩濃度が低いと、初期に *L. mesenteroides*、発酵中期に *P. pentosaceus*、次いで *L. brevis* が優勢になるというように、何種類かの乳酸菌が連続的に働くといわれている。韓国のキムチ (沈菜) にその例が見られる⁴⁾。

浅漬は原料野菜の新鮮な風味を生かすことを特徴とする漬物で、加熱殺菌工程がなく、食塩濃度が 2% 前後と

低く、また合成保存料を使用しない場合が多いことから、漬物のなかで最も微生物管理が難しいものとされている。浅漬で、ある程度の乳酸菌の増殖は適度な酸味を付与するとともに、グラム陰性細菌の生育を抑制し、亜硝酸の生成を抑えるなど、最初は好ましい効果を示すが、乳酸菌が過度に増殖すると品質劣化（酸敗）の原因となるので、注意を要する⁵⁷⁾。なお、浅漬の場合は、バイオブリザティブとしてキトサンやカラシ抽出物などが利用されている⁵⁷⁾。

中国雲南省やタイ、ミャンマなどには、漬物のように乳酸発酵した茶が存在し、わが国の碁石茶、阿波晩茶、富山黒茶もその流れを汲むものである。タンニンの阻害を受けにくい *L. plantarum* が主要菌種であり、近年、乳酸発酵茶の健康に対する効果が注目されている⁴⁾。

3-5 生食用野菜

わが国でも生食用野菜の消費は増大しつつある。弁当および惣菜の衛生規範では、サラダや生野菜（未加熱処理）の一般生菌数は 10^5 CFU/g 以下が望ましいとされ、業界の自主基準では 10^5 CFU/g 以下となっている⁶⁰⁾。特に生食用芽物野菜やカット野菜については、腸管出血性大腸菌、サルモネラ、腸炎ビブリオなどの汚染を念頭において、栽培から収穫後、消費に至るまでの一貫した衛生管理を行わなければならない^{60) 61)}。また、低温で増殖可能な *Listeria monocytogenes* や *Aeromonas hydrophila* にも注意を払う必要がある⁶²⁾。

生食用野菜の貯蔵期間を延長し、安全性を確保するために、乳酸菌の利用が試みられている。例えば、Vescovo ら^{62) 63)} は *Lactobacillus casei* が中温性細菌数や大腸菌群数を減らす効果があり、さらに *A. hydrophila*, *S. Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* を死滅させると報告した。また、奥田ら⁶⁴⁾ はカイワレダイコンの養液に *Lactococcus* 属の乳酸菌を加えて、*E. coli* O157:H7 に対する抑制効果を明らかにした。さらに、Bennik ら⁶⁵⁾ は *Enterococcus mundtii* の生成するバクテリオシン (mundtcin)⁶⁶⁾ が CA 貯蔵した芽物野菜 (mungbean sprout) における *L. monocytogenes* の抑制に有効であることを示した。生食用野菜のグラム陰性腐敗細菌や食中毒細菌を乳酸菌で抑制する技術は今のところ未完成であるが⁶⁷⁾、洗浄殺菌、CA 貯蔵ならびに低温保持だけに頼らざるを得ない生食用野菜の保蔵に乳酸菌の自然な抗菌力を活用する余地は十分あると考えられる。

3-6 穀実加工品

豆乳を乳酸菌で発酵してバターミルクあるいはヨーグ

ルトに似た製品をつくることができる。発酵豆乳は健康食品としても注目されている。乳酸菌としては、*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* のほか、*L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* などが用いられる。乳酸発酵により、大豆臭が消え、フレーバーとテクスチャーが改善され、保存性も向上する^{68) 69)}。また、ピーナッツミルク⁷⁰⁾ やキャッサバ⁷¹⁾ の発酵にも乳酸菌が関与する。

ライ麦でつくるサワーブレッドのパン種には *L. casei* など中温性乳酸桿菌の存在が生地の物性改善とフレーバーの面から不可欠である。サンフランシスコサワーブレッドではヘテロ発酵型の *L. sanfrancisco* などが利用される（表4）^{33) 72) 73)}。また、通常のパン（食パンなど）の製造においても、酵母と共存している乳酸菌が食味（テクスチャーなど）に好ましい影響を及ぼすと言われている。この効果が認識されたのは比較的最近のことである^{73) 74)}。また、乳酸菌はパンの保存性向上に寄与することは、日持ちのよいイタリアのパネトーネに好例が見られる通りである^{73) 74)}。

乳酸菌はソーダクラッカーの製造工程でも重要であり、均一でフレーバーの優れた製品をつくるため、ソーダクラッカーの生地に *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. leichmannii* を添加して発酵する場合がある⁷⁵⁾。

3-7 醸造製品

醸造製品でも乳酸菌が有用な働きを示す例が少なくない。酒造りでは乳酸菌は腐造（火落ち）の原因となるが、清酒の伝統的な手法（生酛、山廃酛）では逆に乳酸菌の力が利用されている。この場合は *Leuconostoc mesenteroides* や *L. sake* が増殖して、清酒酒母の自然純粹培養に導く環境整備の役割を果たす。清酒、ワイン、ビールなどの醸造中にナイシンやアシドシン 8912 (*L. acidophilus* 由来) などで、有害乳酸菌による腐敗を防ぐ試みもなされている⁷⁴⁾。

ワインのリンゴ酸を乳酸に分解する *Oenococcus oeni* など（表4）の減酸効果はよく知られている。また、清酒の場合と同様に、ジアセチルを多量につくる有害乳酸菌の抑制にもナイシンの利用が検討されている⁷⁴⁾。

醤油醪は食塩濃度が高いので耐塩性のある *Tetragenococcus halophilus* が増殖し、醤油の淡色化に寄与するとされている⁵⁾。また、味噌の味に悪影響を及ぼす汚染菌の一つである枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を抑えるため、バクテリオシンをつくる味噌定着型の乳酸菌の活用が提案されている。すなわち加藤^{76) 78)} は、加熱殺菌（蒸煮）直後の無菌状態に近い大豆をナイシン生産菌

表 5 ナイシン生産性乳酸菌による豆味噌中の枯草菌の完全生育阻止（加藤⁷⁷⁾）

	培 養 時 間 (日)						
	乳酸発酵		製麴		熟 成		
	0	1	3	10	17	24	31
豆味噌 (11% NaCl)							
<i>B. subtilis</i>	—	<10	<10	<10	<10	<10	<10
乳酸菌	3.7×10^6	2.8×10^9	1.5×10^9	2.0×10^7	7.1×10^3	<10	<10
ナイシン (IU/g)	—	6.4×10^4	8.0×10^3	4.0×10^3	2.0×10^3	2.0×10^3	検出せず
対照 (乳酸菌接種せず)							
<i>B. subtilis</i>	—	1.3×10^6	2.4×10^9	2.9×10^8	1.7×10^8	3.4×10^8	1.4×10^8
			(腐敗)		(孢子形成)		
無塩豆味噌							
<i>B. subtilis</i>	—	<10	<10	<10	<10	<10	<10
乳酸菌	4.8×10^6	4.4×10^9	3.3×10^9	2.3×10^9	2.2×10^7	<10	<10

30℃, 24 時間乳酸発酵した大豆に麴菌と *Bacillus subtilis* ATCC19659 (10^5 /g) を接種し, 30℃, 48 時間培養して製麴, 次に, NaCl を 11% 添加して (仕込み), 30℃ で熟成発酵した. 乳酸菌: *Lactococcus lactis* IFO12007 (ナイシン生産菌) を使用.

細菌数は CFU/g で示した. ナイシン検出限界: 7.5 IU/g 以下

(*Lactococcus lactis* IFO12007) によって乳酸発酵することにより, 大豆に乳酸菌の独占的菌叢を形成させ, 生産されたナイシンにより, その後の工程で大豆や麴を汚染する有害細菌の増殖を阻止して, 味噌の品質と加工適性を改善する方法を開発した. 表 5 に乳酸発酵豆味噌の微生物変化を示した^{76) 77)}.

乳酸菌をほぼ 10^6 /g 接種して 30℃ で 24 時間乳酸発酵した大豆に枯草菌を 10^5 /g 接種すると, この菌はナイシンの作用により直ちに死滅した. 大豆麴に食塩水を加え, 30℃ で熟成を行った結果, *L. lactis* は耐塩性がないので, 仕込み時に添加された食塩 (11%) により急速に減少, 死滅するため, 味噌の過度の pH 低下 (酸敗) は阻止された. ナイシンは乳酸発酵により大量に生産されたが, 熟成中に麴菌の生産したプロテアーゼによって分解, 消失した. また, 表 5 に示したように, ナイシン生産菌の利用により, 枯草菌の存在しない無塩味噌を調製することができた (食塩濃度は自由に調整できる).

同様の手法により, 好ましい風味の米味噌を調製することもできる^{77) 78)}. 米味噌の場合は, 蒸米には乳酸菌の増殖に必要な栄養成分が不足しているため, そのままでは十分に乳酸発酵することができないが, 大豆煮汁の添加によってナイシン生産性乳酸菌を旺盛に増殖させることができた⁷⁶⁾. このような加藤ら^{45) 76) 77)}の技術開発は, 乳酸菌による食品保蔵の実用化の事例として高く評価さ

れるものである.

お わ り に

従来から, 人々が乳酸発酵の風味が存在することを認めている食品で, 乳酸菌を積極的に保蔵に利用することは比較的容易である. しかし, 食品の種類によっては, 乳酸発酵を経ないで有害微生物を抑制したい場合もある. 残念ながら, このような乳酸菌の利用法は, ごく少数の事例を除いて, まだ実用の域に達していない.

その理由のひとつは, わが国ではナイシンの食品への添加が認められていないことである. 本文中でも指摘したように, ナイシンの特徴を生かすことができる分野への利用は, 今後わが国でも検討に値すると考える.

乳酸菌を利用した食品保蔵として, 本稿では乳製品, 食肉・肉製品, 水産食品, 漬物類, 生食用野菜, 穀実加工品, 醸造製品における実例を示した. このほかの食品にも応用できるとし, 特にそのまま供食する調理済み食品などの微生物制御には有用と考えられる.

現在, 乳酸菌の抗菌性についてはバクテリオシンに研究が集中しており, 乳酸菌由来の新しい有用なバクテリオシンの発見が期待されるが, これと同時に乳酸菌の菌体や発酵産物が発揮する複合的な抗菌作用も重視すべきであろう. 乳酸菌のバクテリオシンは, 主としてグラム陽性細菌に対して有効であるが, 有害微生物のなかには

いろいろな種類のグラム陰性細菌も存在する。この種の菌群を抑制するには、単一のバクテリオシンではなく、その他の抗菌因子との併用が効果的と考えられる。

また、これまでの研究開発では食中毒菌を中心とする病原細菌が主な標的であったが、食品工業では腐敗菌・変敗菌（一部の食品では乳酸菌そのものも含めて）の制御も非常に重要な課題であることは言うまでもない。

数千年来、人類に親しく利用され、安全性が実証されている乳酸菌による食品保蔵技術の今後の発展を期待したい。

文 献

- 1) RAY, B.: *Food Biopreservatives of Microbial Origin*, RAY, B. and DAESCHEL, M., eds. (CRC Press, Boca Raton), p. 1 (1992).
- 2) 松田敏生・森地敏樹: バイオブリザベーションー乳酸菌による食品微生物制御一, 森地敏樹・松田敏生編著 (幸書房, 東京), p. 1, 8, 42, 154 (1999).
- 3) 七山征子・川瀬興三・山内恒治・戸田真佐子・島村忠勝・中谷延二: 日本食品微生物学会雑誌, **12**, 209 (1996).
- 4) 細野明義・森地敏樹・伊藤敏敏・今井誠一・松本伊左尾・秋山裕一・北野一好・宮尾茂雄・伊藤寛・加藤司郎・岡田早苗: 乳酸発酵の文化譜, 小崎道雄編著 (中央法規出版, 東京), p. 12, 36, 74, 116, 146, 166, 184, 206, 226, 256 (1996).
- 5) 岡田早苗・柳田藤寿・鈴木健一郎・橋場 炎・加藤丈雄・藤井建夫・大桃定洋・鈴木一郎・伊藤敏敏・辨野義己: 乳酸菌の科学と技術, 乳酸菌研究集談会編 (学会出版センター, 東京), p. 9, 229, 287 (1996).
- 6) 森地敏樹: ミルクサイエンス, **46**, 1 (1997).
- 7) 森地敏樹: 日本乳酸菌学会誌, **9**, 69 (1999).
- 8) AXELSSON, L. and OUWEHAND, A.C.: *Lactic Acid Bacteria*, 2nd Ed., SALMINEN, S. and von WRIGHT, A., eds. (Marcel Dekker, New York), p. 1, 139 (1998).
- 9) 森地敏樹: 乳技協資料, **44**, 68 (1994).
- 10) LINDGREN, S.E. and DOBROGOSZ, W.J.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **87**, 149 (1990).
- 11) VANDENBERGH, P.A.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 221 (1993).
- 12) 森地敏樹: 新殺菌工学実用ハンドブック, 高野光男・横山理雄監修 (サイエンスフォーラム, 東京), p. 155 (1991).
- 13) SMITH, J.L. and PALUMBO, S.A.: *J. Food Protect.*, **44**, 936 (1981).
- 14) DAESCHEL, M.A.: *Food Technol.*, **43**(1), 164 (1989).
- 15) KARUNARATNE, A., WEZENBERG, E. and BULLERMAN, L.B.: *J. Food Protect.*, **53**, 230 (1990).
- 16) GOURAMA, H. and BULLERMAN, L.B.: *J. Food Protect.*, **58**, 1249 (1995).
- 17) SUZUKI, I., NOMURA, M. and MORICHI, T.: *Milchwissenschaft*, **46**, 635 (1991).
- 18) 森地敏樹: 食品保蔵学, 加藤博通・倉田忠男編 (文永堂出版, 東京), p. 159 (1999).
- 19) PRICE, R.J. and LEE, J.S.: *J. Milk Food Technol.*, **33**, 13 (1970).
- 20) COLLINS, E.B. and ARAMAKI, K.: *J. Dairy Sci.*, **63**, 353 (1980).
- 21) GILLILAND, S.E. and SPECK, M.L.: *J. Food Sci.*, **40**, 903 (1975).
- 22) 松田敏生: 日本乳酸菌学会誌, **9**, 88 (1999).
- 23) 指原紀宏・園元謙二・石崎文彬: 日本乳酸菌学会誌, **10**, 2 (1999).
- 24) KLAENHAMMER, T.R.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 39-86 (1993).
- 25) International Dairy Federation: The Use of Nisin in Cheesemaking, Bulletin of the IDF 329 (1998).
- 26) Food and Drug Administration: Fed. Reg. **53**: 11247, FDA (1988).
- 27) ABEE, T., KROCKEL, L. and HILL, C.: *Int. J. Food Microbiol.*, **28**, 169 (1995).
- 28) GONZALEZ, G.F. and KUNDA, B.S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2534 (1987).
- 29) HENDERSON, J.T., CHOPKO, A.L. and van WASSENAAR, P.D.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **295**, 5 (1992).
- 30) 土戸哲明: バイオブリザベーション (前掲書), p. 141 (1999).
- 31) CUTTER, C.N. and SIRAGUSA, G.R.: *J. Food Protect.*, **58**, 977 (1995).
- 32) SCHILLINGER, U., CHUNG, H.S., KEPPLER, K. and HOLZAPFEL, W.H.: *J. Appl. Microbiol.*, **85**, 657 (1998).
- 33) STILES, M.E.: *Antonie van LEEUWENHOEK*, **70**, 331 (1996).
- 34) HIRSCH, A., GRINSTED, E., CHAPMAN, H.R. and MATTICK, A.T.R.: *J. Dairy Res.*, **18**, 205 (1951).
- 35) MCCLINTOCK, M., SERRES, L., MARZOLF, J.J., HIRSCH, A. and MOCQUOT, G.: *J. Dairy Res.*, **19**, 187 (1952).
- 36) VANDENBERGH, P.A.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 221 (1993).
- 37) PUCCI, M.J., VEDAMUTHU, E.R., KUNKA, B.S. and VANDENBERGH, P.A.: *Appl. Environ. Microbiol.*,

- 54, 2349 (1988).
- 38) ZOTTOLA, E.A., YEZZI, T.L., AJAO, D.B. and ROBERTS, R.F. : *Int. J. Food Microbiol.*, **24**, 227 (1994).
- 39) ROBERTS, R.F., ZOTTOLA, E.A. and MCKAY, L.L. : *J. Dairy Sci.*, **75**, 2353 (1992).
- 40) MAISNIER-PATIN, S., DESCHAMPS, N., TATINI, S.R. and RICHARD, J. : *Lait*, **72**, 249 (1992).
- 41) RYAN, M.P., REA, M.C., HILL, C. and ROSS, P. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 612 (1996).
- 42) SULZER, G. and BUSSE, M. : *Int. J. Food Microbiol.*, **14**, 287 (1991).
- 43) GIRAFFA, G., PICCHIONI, N., NEVIANI, E. and CARMINATI, D. : *Food Microbiol.*, **12**, 301 (1995).
- 44) STECCHINI, M.L., AQUILI, V. and SARAI, I. : *Int. J. Food Microbiol.*, **25**, 301 (1995).
- 45) 加藤丈雄：バイオブリザベーション (前掲書), p. 72 (1999).
- 46) 加藤丈雄：日食工誌, **38**, 1063 (1991).
- 47) YOUSEF, A.E., LUCHANSKY, J.B., DEGNAN, A.J. and DOYLE, M.P. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1461 (1991).
- 48) HUGAS, M. : *Meat Science*, **49**, S139 (1998).
- 49) BREDHOLT, S., NESBAKKEN, T. and HOLCK, A. : *Int. J. Food Microbiol.*, **53**, 43 (1999).
- 50) 藤井建夫：Foods Food Ingredient J. Jpn., No. 171, 22 (1997).
- 51) 藤井建夫：バイオブリザベーション (前掲書), p. 80 (1999).
- 52) 藤井建夫：伝統食品・食文化 in 金沢, 横山理雄・藤井建夫編著 (幸書房, 東京), p. 1 (1996).
- 53) PILET, M.F., DOUSSET, X., BARRE, R., NOVEL, G., DESMAZEAUD, M. and PIARD, J.C. : *J. Food Protect.*, **58**, 256 (1995).
- 54) NILSSON, L., GRAM, L. and HUSS, H.H. : *J. Food Protect.*, **62**, 336 (1999).
- 55) EINARSSON, H. and LAUZON, H.L. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 669 (1995).
- 56) 伊藤 寛：バイオブリザベーション (前掲書), p. 90 (1999).
- 57) 宮尾茂雄：バイオブリザベーション (前掲書), p. 103 (1999).
- 58) BJORKKROTH, J. and KORKEALA, H. : *Int. J. Food Microbiol.*, **38**, 117 (1997).
- 59) FLEMING, H.P., ETHELLE, J.L. and COSTILOW, R. N. : *Appl. Microbiol.*, **30**, 1040 (1975).
- 60) 上田成子：食品の保全と微生物, 藤井建夫編 (幸書房, 東京), p. 97 (2001).
- 61) 一色賢司：HACCPにおける微生物危害と対策, 日本食品保全研究会編, 春田三佐夫監修 (中央法規出版, 東京), p. 32 (2000).
- 62) VESCOVO, M., TORRIANI, S., ORSI, C., MACCHIAROLO, F. and SCOLARI, G. : *J. Appl. Bacteriol.*, **81**, 113 (1996).
- 63) VESCOVO, M., ORSI, C., SCOLARI, G. and TORRIANI, S. : *Lett. Appl. Microbiol.*, **21**, 121 (1995).
- 64) 奥田俊郎, 内田普紀, 田口英夫, 岡田早苗：日本防菌防黴学会第24回年次大会講演要旨集, p. 39 (1997).
- 65) BENNIK, M.H.J., VAN OVERBEEK, W., SMID, E.J. and GORRIS, L.G.M. : *Lett. Appl. Microbiol.*, **28**, 226 (1999).
- 66) BENNIK, M.H.J., VANLOO, B., BRASSEUR, R., GORRIS, L.G.M. and SMID, E.J. : *Biochim. Biophys. Acta*, **1373**, 47 (1998).
- 67) 松田敏生：食衛誌, **41**, 163 (2000).
- 68) WANG, H.L., KRAIDEJ, L. and HESSELTINE, C.W. : *J. Milk Food Technol.*, **37**, 71 (1974).
- 69) MITAL, B.K. and STEINKRAUS, K.H. : *J. Food Protect.*, **42**, 895 (1979).
- 70) BUCHER, E.R., Jr., MITCHELL, J.H., Jr. and JOHNSON, M.G. : *J. Food Sci.*, **44**, 1534 (1979).
- 71) NGABA, P.R. and LEE, J.S. : *J. Food Sci.*, **44**, 1570 (1979).
- 72) KLINE, L. and SUGIHARA, T.F. : *Appl. Microbiol.*, **21**, 459 (1971).
- 73) 田中康夫：Contemporary Health Digest (雪印乳業(株) 健康生活研究所刊), Vol. 15, No. 5 (2000).
- 74) 岡田早苗・柳田藤寿：バイオブリザベーション (前掲書), p. 125 (1999).
- 75) SUGIHARA, T.F. : *J. Food Protect.*, **41**, 977 & 980 (1978).
- 76) 加藤丈雄：日食工誌, **47**, 752 (2000).
- 77) 加藤丈雄：蛋白質 核酸 酵素, **45**, 631 (2000).
- 78) KATO, T., INUZUKA, L., KONDO, M. and MATSUDA, T. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 330 (2001).

(平成13年11月20日受理)