

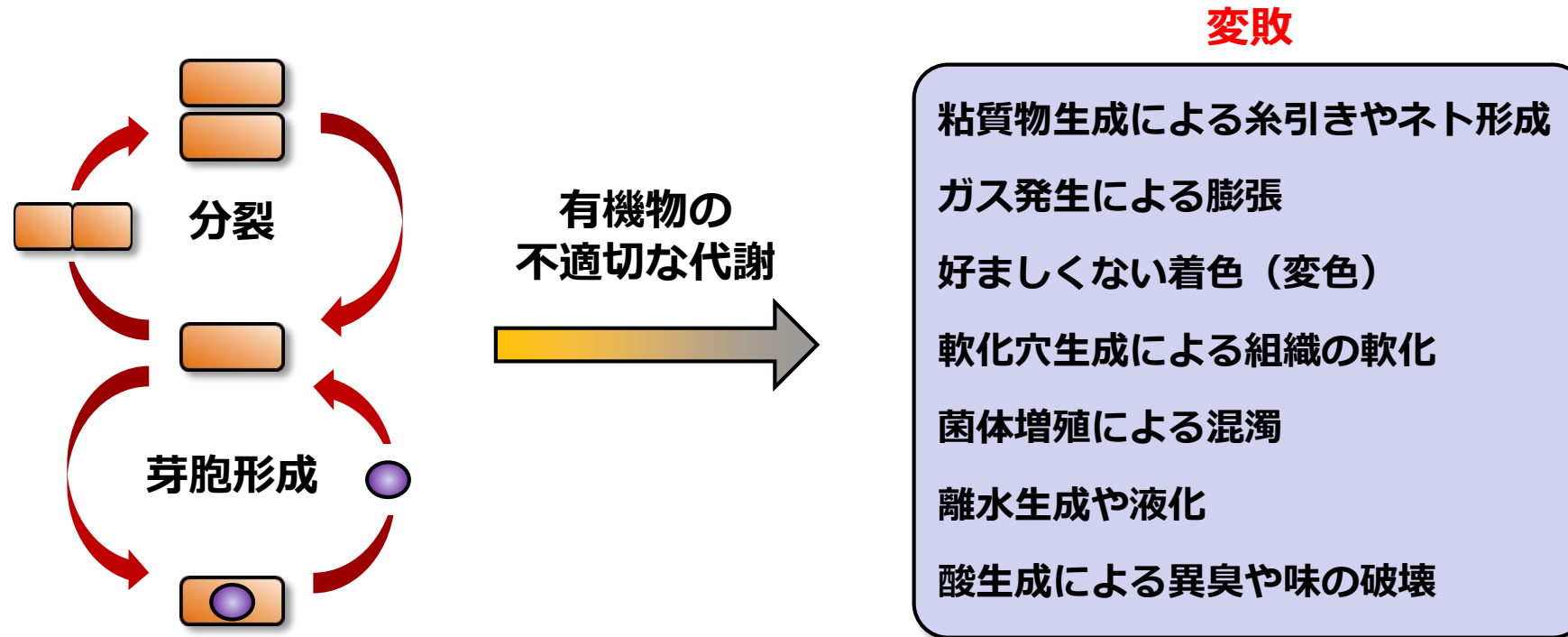
JST新技術説明会2019  
2019年8月6日  
市ヶ谷 JSTホール

# 発酵食品の製造工程で 活躍する新規乳酸菌

信州大学農学部 農学生命科学科  
准教授 河原 岳志

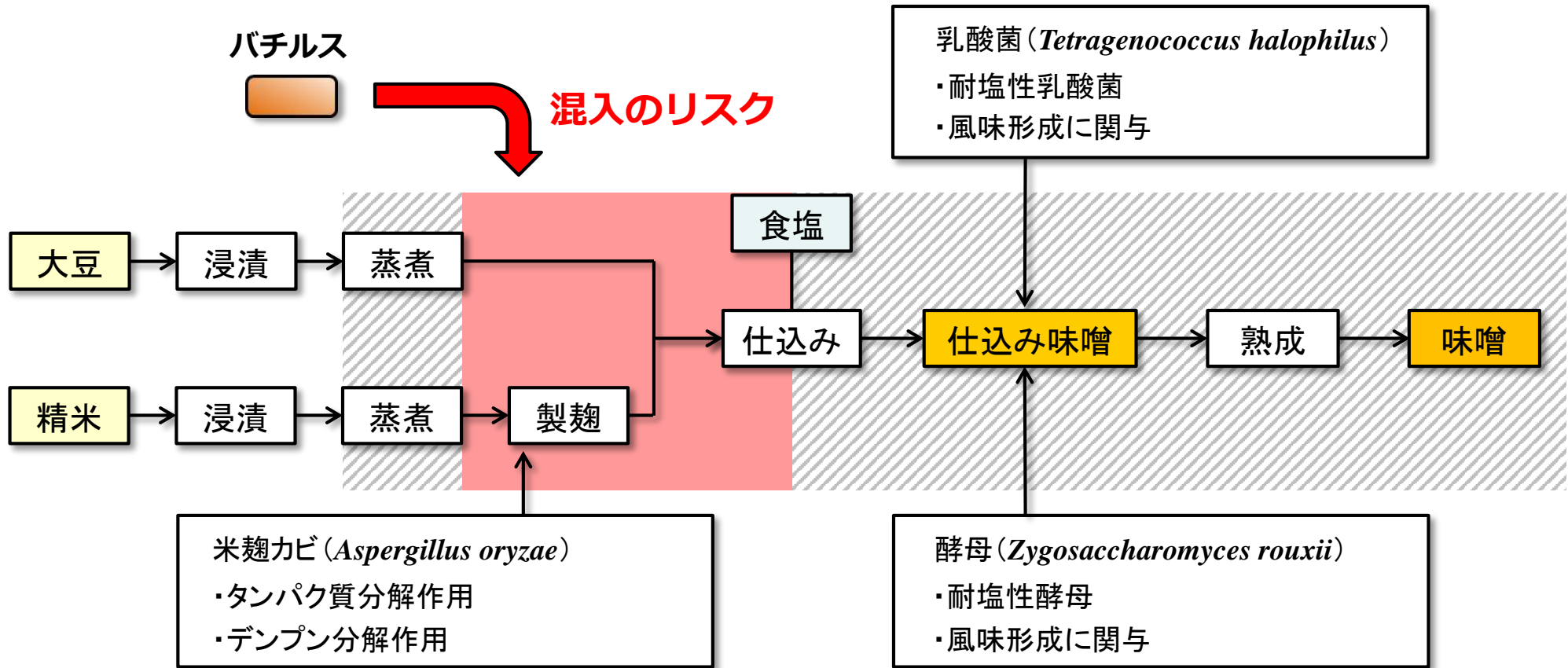
# バチルス属細菌による変敗

バチルス属細菌のうち、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) , バチルス・プミルス (*Bacillus pumilus*) , バチルス・リケニフォルミス (*Bacillus licheniformis*) , バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) などが代表的な変敗の原因菌として知られる。

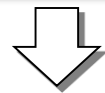


***Bacillus*属細菌は食品産業において  
特に注意されるべき変敗の原因菌種**

# 信州味噌製造過程におけるバチルス混入問題



蒸煮後から仕込みまでの工程はバチルス混入に対するウイークポイントとなる。



抗菌作用をもつ乳酸菌の導入によるバチルス混入の防止を実現したい。

## 従来技術とその問題点

乳酸菌由来の保存料として既に実用化されているものには、抗菌性ペプチド（バクテリオシン）であるナイシンAがあるが、味噌への添加を考慮した場合に、

① **プロテアーゼ活性の存在する場では失活してしまう。**

\* 味噌の製麹工程は麹カビのプロテアーゼ活性が共存する場である。

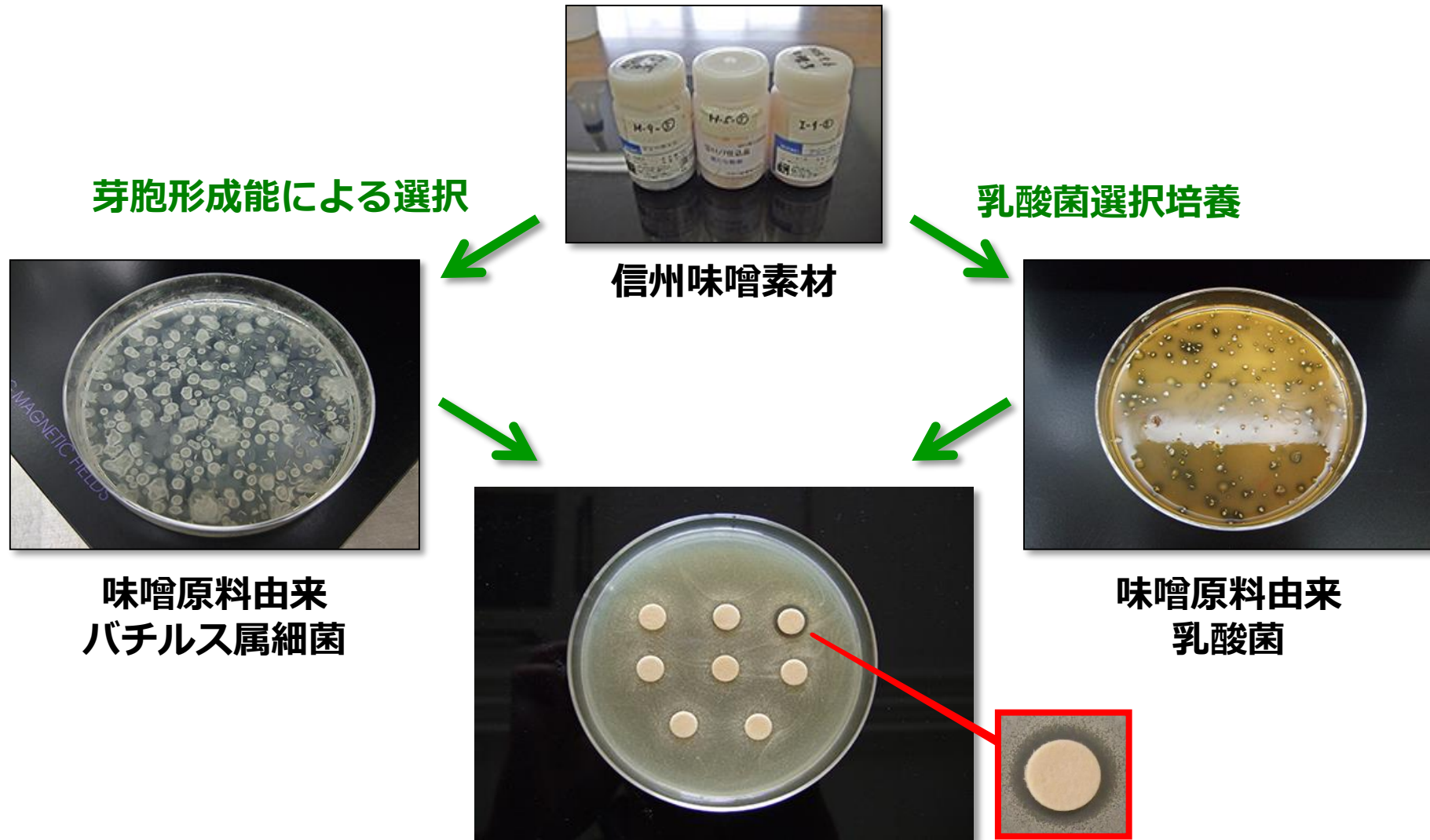
② **現状では添加量に制限が設けられている。**

\* 食品衛生法第11条第1項の規定に基づき、味噌における添加使用基準は5.0 mg/kg以下と定められている。

③ **継続的な添加はコストの面でも厳しい。**

等の課題があり、味噌において一般的に利用されるまでには至っていない。

# 抗バチルス乳酸菌株取得法の概要



バチルスに抗菌活性を持つ乳酸菌の選抜  
(ペーパーディスク法、濁度測定法)

# PP165株の抗バチルス作用

vs. *Bacillus subtilis* A株



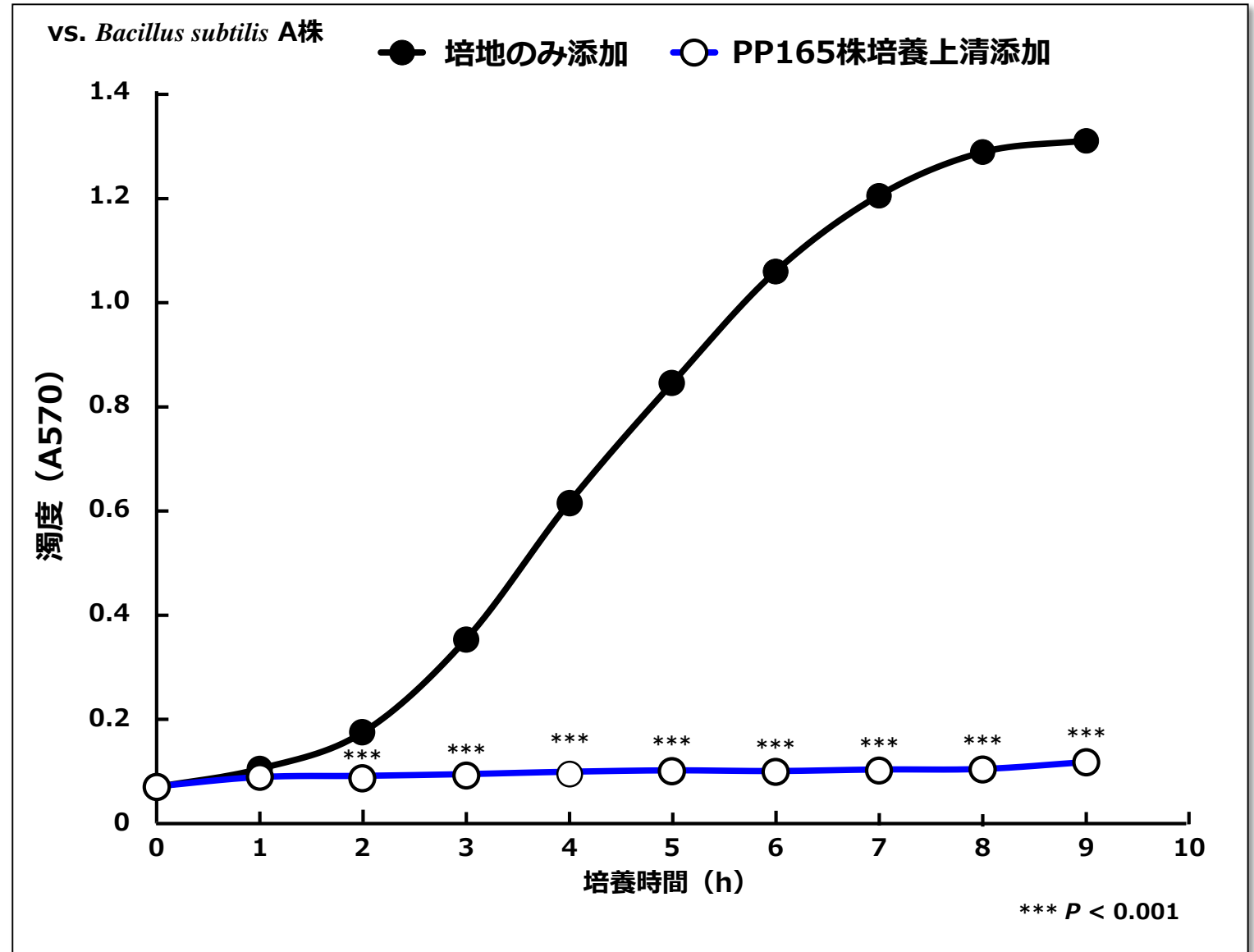
vs. *Bacillus pumilus* B株



vs. *Bacillus amyloliquefaciens* C株

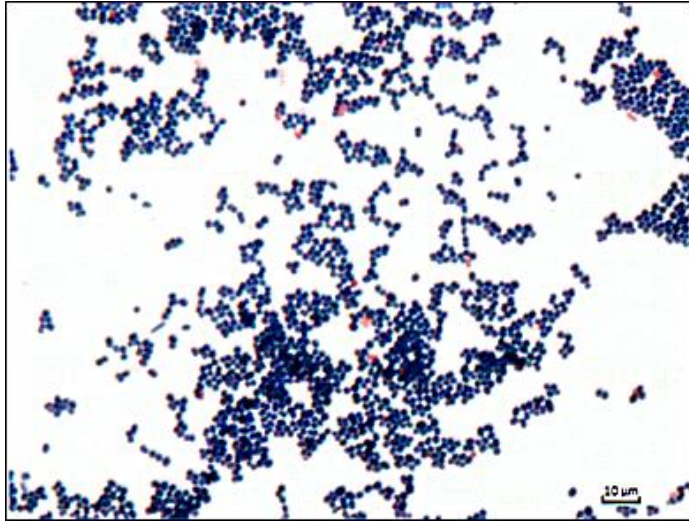


vs. *Bacillus methylotrophicus* D株



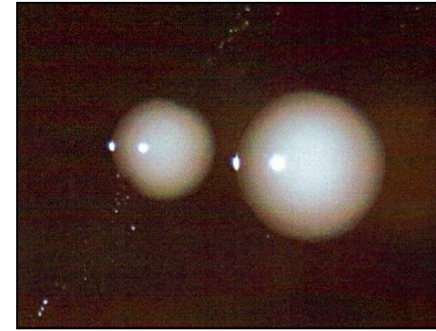
# PP165株の菌種判定結果

## 形態観察結果



形態学的特徴：球菌

グラム染色性：陽性  
芽胞形成：陰性



コロニー色調：クリーム色

## 糖資化性パターン解析による菌種判定結果

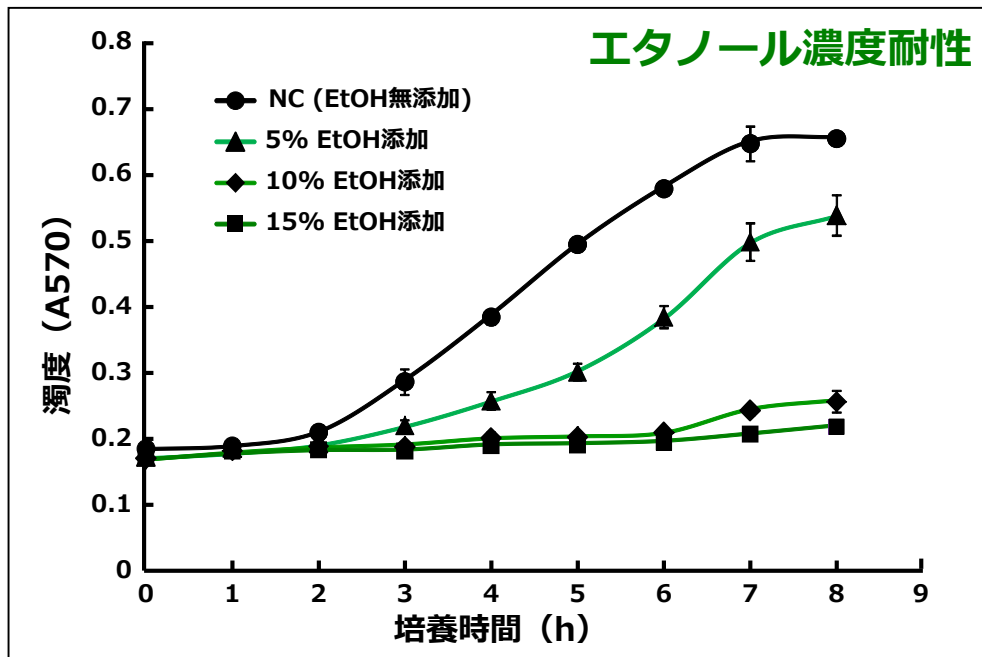
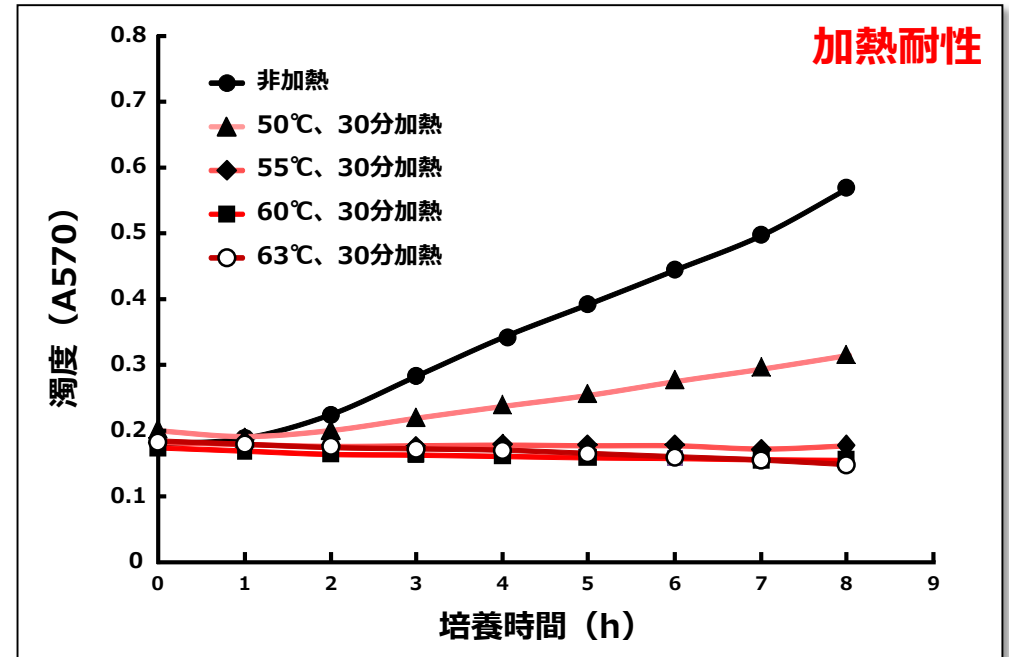
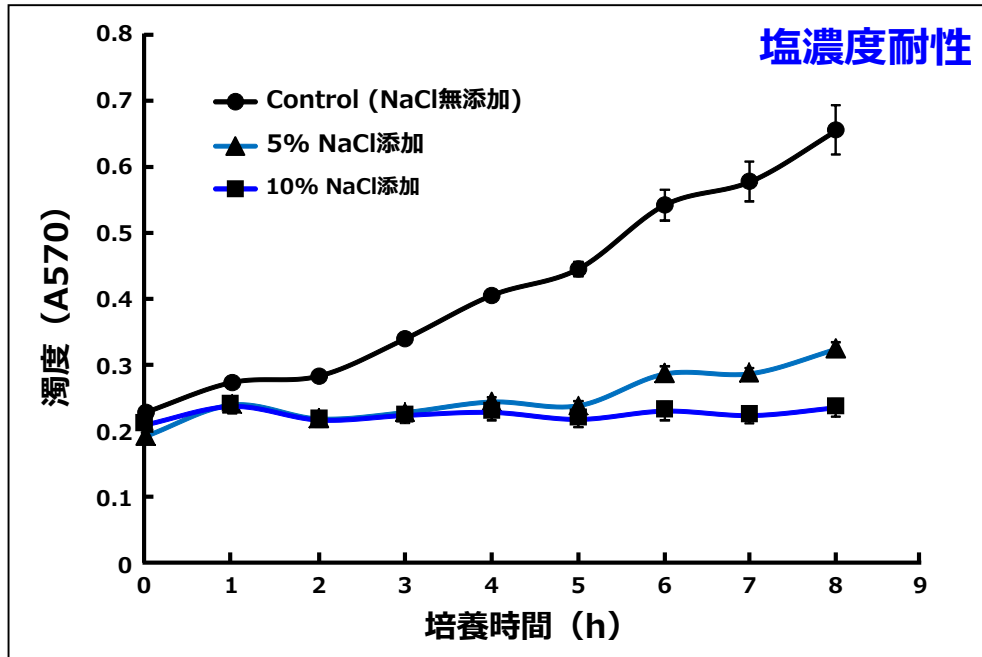
*Pediococcus pentosaceus* 99.9%、*Lactobacillus brevis* 0.1%

## 16S rDNA領域配列解析による菌種判定結果

*Pediococcus pentosaceus* 基準株との相同性が最も高い

**PP165株が*Pediococcus pentosaceus*に帰属する菌株であると判断された。**

# PP165株の生育特性



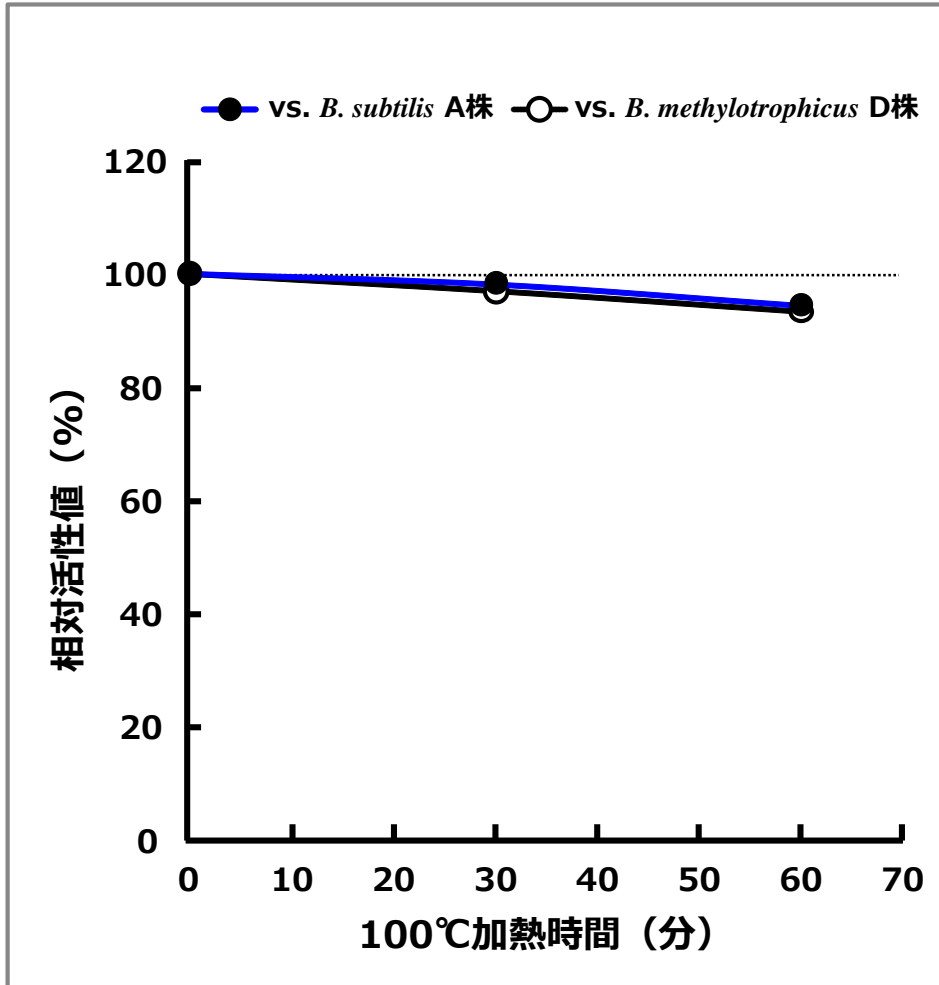
**PP165株の生育特性として...**

- 5%程度までのNaCl濃度で生育する
- 10%程度までのEtOH濃度で生育する
- 60℃で30分間の加熱で死滅する

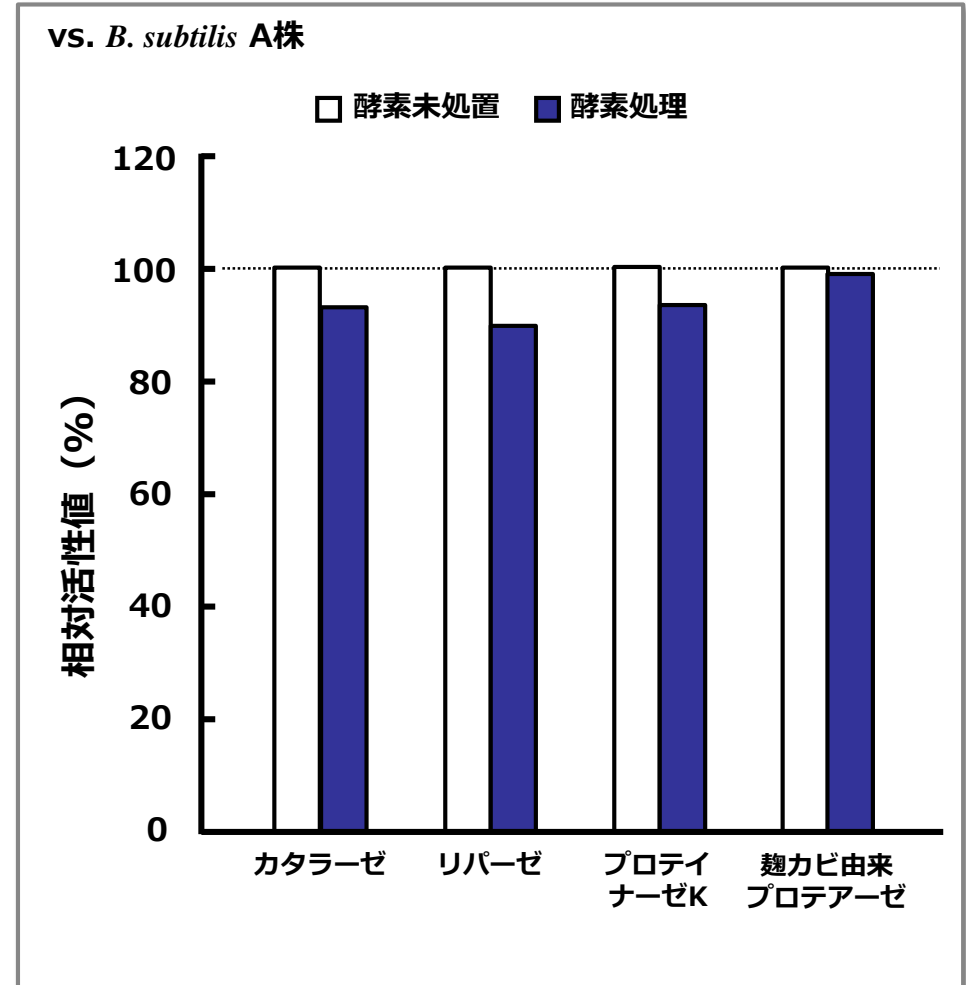


# PP165株の示す抗菌作用の特性

加熱耐性試験結果



酵素処理耐性試験結果

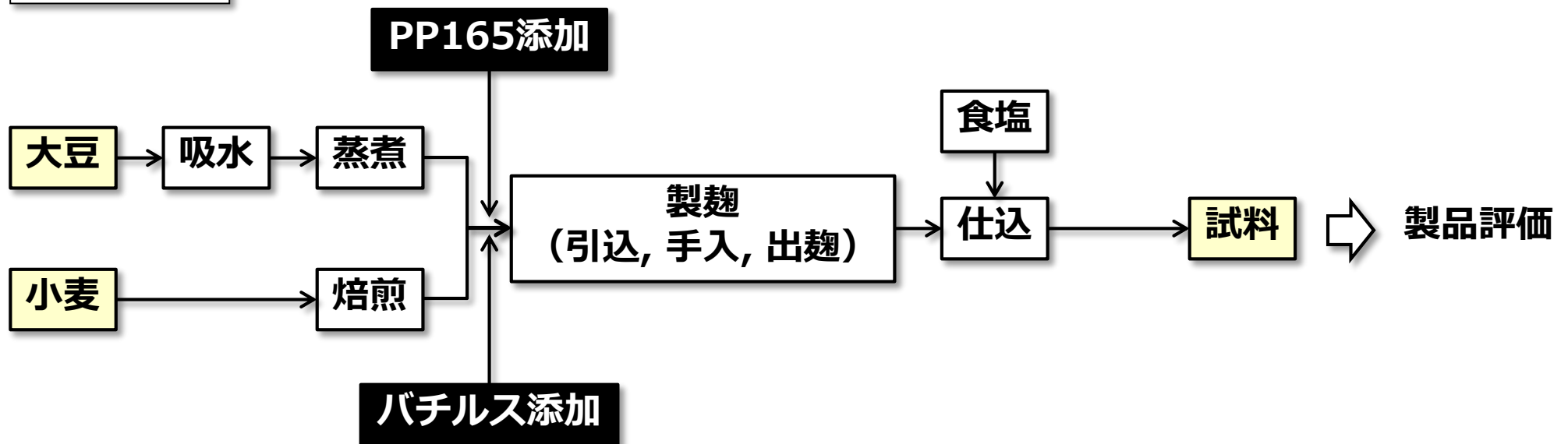


PP165株の抗菌作用には有機酸が関与している可能性が高いと考えられた。

# 醤油豆製造における実証試験

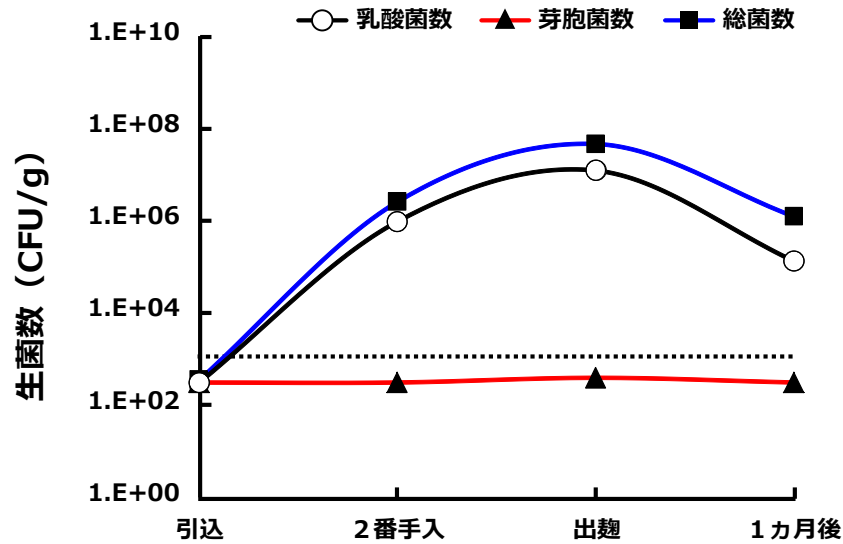
- 原料1gあたり $1 \times 10^7$ CFUのPP165株を添加
- **乳酸菌を加えるタイミングは、バチルスが混入すると考えられる蒸煮の直後**
- 原料中のバチルス数は少ないため、乳酸菌添加時にバチルス ( $1 \times 10^3$ CFU/g) 添加
- 得られた完成試料の製品評価は、乳酸菌数測定、芽胞形成細菌（バチルス）菌数測定、ならびに風味判定により総合的に行う。

## 工程の概要

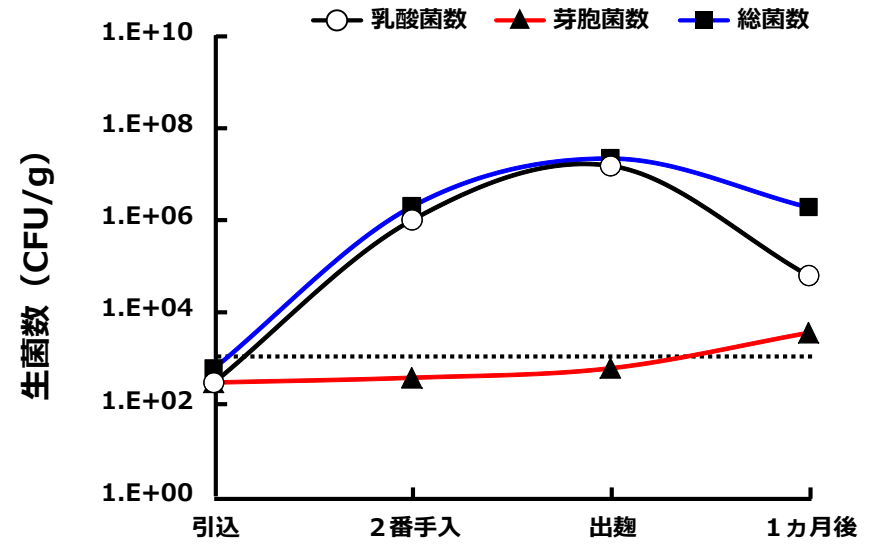


# 醤油豆における実証試験結果

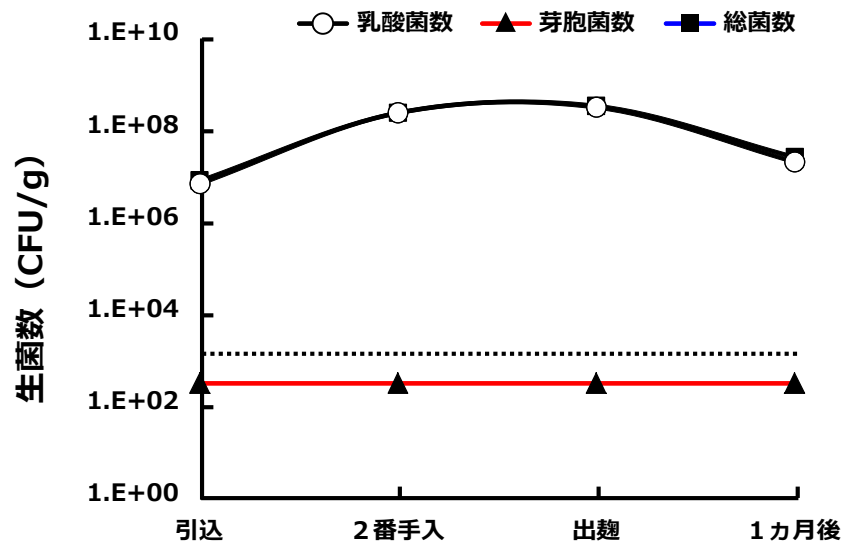
無添加区



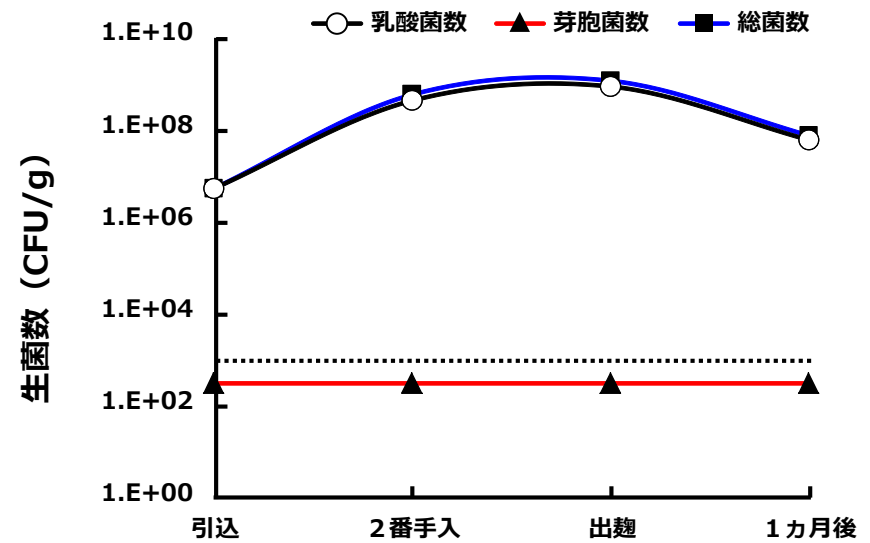
バチルス添加区



PP165株添加区



PP165株+バチルス添加区



# 実証試験の結果から明らかになったこと

- ① PP165株の製麴時での添加より、醤油豆素材中の耐熱性芽胞菌数の増殖が検出限界以下まで抑制された。
- ② PP165株添加による麴カビ生育への悪影響は観察されなかった。
- ③ PP165株添加によって製造された醤油豆製品の味が良好でかつマイルドになるなど、風味改善効果がみられた。



# PP165株添加後の味噌中の有機酸含有量

## ◎ 通常味噌

塩分濃度：5%（添加時） → 11%（製品）

	試験区	クエン酸	リンゴ酸	乳酸	酢酸	コハク酸
味噌A	乳酸菌無添加	727	31	22	69	7
	PP165添加	661	19	<b>438</b>	<b>99</b>	<b>27</b>
味噌B	乳酸菌無添加	660	30	182	355	44
	PP165添加	663	21	<b>206</b>	<b>383</b>	<b>45</b>

\* 数値はmg/100 g試料

## ◎ 減塩味噌

塩分濃度：5%（添加時、製品）

	試験区	クエン酸	リンゴ酸	乳酸	酢酸	コハク酸
減塩味噌C	乳酸菌無添加	849	32	33	30	11
	PP165添加	941	13	<b>226</b>	<b>105</b>	<b>43</b>

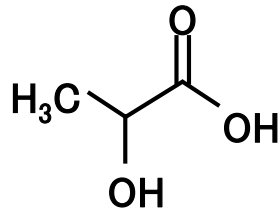
\* 数値はmg/100 g試料

**PP165株添加により、乳酸だけでなく、酢酸・コハク酸の増加がみられた。**

# PP165株添加で増加した有機酸の特徴

成分	特徴
乳酸	解糖系や乳酸発酵で生成。 <b>抗菌作用</b> を持ち乳酸菌発酵食品の <b>保存性</b> に寄与。
酢酸	食酢の主成分。古くから <b>抗菌作用</b> が知られ食品の調味料や <b>防腐剤</b> として幅広く利用。
コハク酸	貝類のうま味成分で調味料や酸味料として利用。 <b>抗菌作用</b> を持つ。

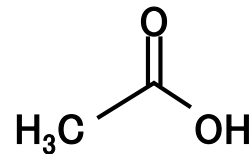
乳酸



抗バチルス効果

塩味の角を取る効果  
(塩慣れ効果)

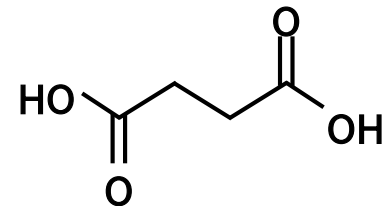
酢酸



抗バチルス効果

調味効果

コハク酸



抗バチルス効果

旨み増強効果

**PP165株のもつ抗バチルス、風味改善効果は有機酸の複合的な作用？**

# PP165株のブランド展開



味噌



しょうゆ漬



甘酒



日本酒 (山廃仕込)

## 新技術の特徴・従来技術との比較

- プロテアーゼに感受性の高いバクテリオシン添加と比較して、より幅広い食品製造の現場で安定で長期間にわたる抗菌作用が期待できる抗菌性乳酸菌PP165株を取得することができた。
- PP165株は味噌中で生育して効果を発揮するため、添加量やコストの面で制限があるバクテリオシン添加と比較して、より安価でバチルスに対する抗菌作用を製品に付与することが可能となった。
- バクテリオシンは風味に影響を及ぼさないが、PP165株は製品中で有機酸を産生することで、バチルス抑制による間接的な効果に加え、直接的な風味改善効果が期待できる。



## 想定される用途

- バチルスによる製品のロットアウトが問題となっている幅広い食品・飲料製造現場での添加による歩留まりの向上の追究。
- 減塩製品の開発などで想定されるバチルス汚染や製品の風味低下に対する防止策としての添加による製品価値の向上。
- 麹カビや酵母との共存が可能なことにより、発酵作用が安定しない伝統的な発酵食品製造の安定化のサポート役となるスターターとしての添加。

## 実用化に向けた課題

- 現在は、PP165株の生菌を素材中に添加することを想定しているため、素材の特定上、生菌添加ができない食品・飲料への提供については対応が難しい状況にある。
- 抗バチルス作用のためにPP165培養環境中に増加する有機酸の関与が重要と考えられているが、完全な活性成分の特定（その成分が必須となるのか）についても解明が課題となっている。
- 生菌の安定的な供給体制が整えば、将来的には生菌添加の必要がない培養上清の提供に向けても検討を進めていきたい。

## 企業への期待

- バチルス対策のために、まずはPP165株を生菌で添加する形で検討いただける企業での導入を期待している。
- 本菌株の添加による風味改善作用がみられていることから、減塩による抗菌性と風味の低下が懸念される加工を検討には本技術の導入が有効と思われ、導入をお勧めしている。
- 伝統的な製法によりロットアウトが問題となっている企業には、共存微生物や風味形成への影響を考慮しながら最適なタイミングでの添加をアドバイスさせていただいている。

# 本技術に関する知的財産権

- **発明の名称** : バチルス属細菌の増殖を抑制する抗菌性乳酸菌株、及び、それを用いた食品の製造方法
- **出願番号** : 特開2018-82695
- **出願人** : 信州大学、信州中野商工会議所
- **発明者** : 河原 岳志

# 問い合わせ先

株式会社信州TLO



**T E L 0268-25-5181**

**F A X 0268-25-5188**

**e-mail [info@shinshu-tlo.co.jp](mailto:info@shinshu-tlo.co.jp)**