

低酸・低塩ドレッシングにおける *Lactobacillus fructivorans* の制御中山素一<sup>1\*</sup>, 細谷幸一<sup>1</sup>, 朱 丹<sup>1</sup>, 佐藤豊樹<sup>2</sup>, 畑 朋美<sup>2</sup>, 宮本敬久<sup>3</sup><sup>1</sup> 花王株式会社安全性科学研究所<sup>2</sup> アサマ化成株式会社<sup>3</sup> 九州大学大学院農学研究院Control of *Lactobacillus fructivorans* in Low-acid and -salt DressingMotokazu Nakayama<sup>1\*</sup>, Kouichi Hosoya<sup>1</sup>, Tan Shu<sup>1</sup>, Toyoki Sato<sup>2</sup>,  
Tomomi Hata<sup>2</sup> and Takahisa Miyamoto<sup>3</sup><sup>1</sup> Kao Corporation, Global R&D-Safety Science, 2606 Akabane Ichikai-machi, Haga-gun, Tochigi 321-3497<sup>2</sup> Asama Chemical Co. Ltd., 20-3 Nihonbashi Kodenma-cho, Chuo-ku, Tokyo 103-0001<sup>3</sup> Division of Food Science and Biotechnology, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581

*Lactobacillus fructivorans* has been identified as a spoilage bacterium in dressing, since it is strongly resistant to acetic acid. In recent years, the spoilage of dressing has increased in frequency because of the reduced concentrations of both acetic acid and NaCl in dressings. To develop new control methods for *L. fructivorans* in low-acetic acid dressing, the properties of *L. fructivorans* were investigated. Doubling time of the bacterium was longer than that of other lactic acid bacteria. In addition, the incorporation rate of fluorescent dye or esterase activity of the bacterium was also lower than observed with *Lactobacillus brevis*. These results suggest the importance of increasing the incorporation of acetic acid into the bacterial cells. For this purpose, chitosan was employed. Cells treated with chitosan showed a nearly 10-fold increase in the incorporation of SYTO green compared to control cells. Chitosan adsorbed onto the surface of *L. fructivorans* and increased the surface hydrophobicity of the cells. The chitosan-treated cells localized at the water-oil interface of the dressing, resulting in decreased combined antibacterial action of chitosan and acetic acid. The addition of 0.04% thiamine dilaurylsulfate, an amphipathic antibacterial compound, completely inhibited the growth of *L. fructivorans* in the dressing with 0.04% chitosan and 3.5% NaCl at pH 4.1, for 60 days at 30°C.

(Received Sep. 29, 2012; Accepted Dec. 26, 2012)

**Keywords** : *Lactobacillus fructivorans*, chitosan, thiamine dilaurylsulfate, low-acid and -salt dressing**キーワード** : *Lactobacillus fructivorans*, キトサン, チアミンラウリル硫酸塩, 低酸低塩ドレッシング

乳酸菌は食品原料や製造工程から高頻度に検出され、かつ低温・低 pH 等他の一般的な細菌が増殖できない過酷な条件でも増殖が可能であることから、発酵食品、菓子類、水産練り製品など様々な種類の食品で腐敗事故を引き起こしてきた<sup>1,2)</sup>。乳酸菌が食品中で増殖すると膨張、軟化、異臭、ネトなど、消費者が容易に認識できる腐敗現象を引き起こし、商品価値を著しく低下させることから、食品業界では乳酸菌の制御は極めて重要であるとされてきた<sup>1)~3)</sup>。

乳酸菌の中でも *Lactobacillus fructivorans* は様々なストレス、特に酢酸に対する耐性が高く、更に耐熱性も他の乳酸菌よりも高い。このため、ドレッシングやマヨネーズ等

の酢酸と塩が微生物制御因子である酸性調味料では最も制御が難しい危害菌となる<sup>4)</sup>。近年、消費者の健康志向やマイルドな風味の要求によりドレッシングの減酸・減塩化が進んでいる。その結果として微生物が生育しやすくなっており、これが近年のドレッシングにおける *L. fructivorans* による腐敗事故の原因であると考えられる。このため、減酸・減塩ドレッシングでは *L. fructivorans* を完全に制御できる技術の確立が強く求められている。

*L. fructivorans* の制御技術の確立には *L. fructivorans* の生育特性や食品中での存在状態を良く理解し、その特性から最も効果が高いと期待される抗菌剤を選択して利用することが重要である。しかしながら、*L. fructivorans* は、経験的に生育速度が遅いことは知られているが、その他の特徴は良く理解されていない。我々は *L. fructivorans* の微生物学的な特性の解析結果に基づいて *L. fructivorans* に

<sup>1</sup> 〒321-3497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606<sup>2</sup> 〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町 20-3<sup>3</sup> 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

\* 連絡先 (Corresponding author) nakayama.motokazu@kao.co.jp

対して有効な抗菌剤の選択および制御方法の確立を試みた。

乳酸菌に対して抗菌性を有する食品添加物としてはキトサン、チアミンラウリル硫酸塩（以下VB1）などが代表的である<sup>5)</sup>。キトサンは抗菌スペクトルが広いが収斂味があり、単独添加ではドレッシングのように開封後数ヶ月間連続して使用する食品において *L. fructivorans* を風味上問題のない添加量で完全に制御することは不可能であると考えられた。またVB1は、抗菌力は高いが油性であるため、水相に存在する細菌を完全に制御することは難しいと考えられてきた<sup>5)</sup>。

今回、我々は、*L. fructivorans* の特性解明の結果をもとに、キトサンおよびチアミンラウリル硫酸塩を併用することにより両者の添加量を削減し、大幅な減塩・減酸をしたドレッシングにおいても *L. fructivorans* を完全に制御できることを明らかにし、風味と保存性向上の両立が可能となったので報告する。

## 実験方法

### 1. 供試菌株

*Lactobacillus fructivorans* JCM 1117 および *Lactobacillus brevis* JCM 1059 は理化学研究所より購入した。*Escherichia coli* NBRC 3972 は(独)製品評価技術基盤機構生物資源保存施設より購入した。*Leuconostoc mesenteroides* は食品原料からの分離した K-0107 株を使用した

### 2. *L. fructivorans* の微生物学的な特性解析

#### (1) 世代時間測定

ドレッシングにおいて危害性の最も高い乳酸菌である *L. fructivorans*, *L. fructivorans* よりも酢酸耐性や耐熱性が低い乳酸菌 *L. brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* および、ドレッシングで増殖不可であるものの世代時間が短い *Escherichia coli* について世代時間を測定した。乳酸菌の前培養は全て M.R.S.寒天培地（オキソイド社）を用いて 30℃ で 3 日間アネロパック（三菱ガス株式会社）を用いて嫌気培養を行った。大腸菌は SCD 培地（DIFCO, 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用いて 35℃ で 1 日間前培養を行った。

前培養した乳酸菌は M.R.S.液体培地（オキソイド社）に接種して 30℃ で培養した。大腸菌は LB 液体培地（DIFCO, 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）に接種して 35℃ で培養した。それぞれ平板培養法にて対数でプロットした場合に増殖が直線性を示す対数増殖期  $t_0$  の菌数  $N_0$  と  $t_0$  を 0 時間目としたときの  $t$  時間後の菌数  $N$  を測定し、下記の数式より世代時間  $g(t)$  を算出した。

$$g(t) = 0.693/u, u: \text{反応速度} = 2.303 (\log N - \log N_0) / (t - t_0) \quad (1)$$

#### (2) 細菌の物質取り込み能の評価

拡散による菌種間の物質の取り込み能の比較には *L.*

*fructivorans* JCM 1117 株および *L. brevis* JCM 1119 株を用い、拡散により菌体内に取り込まれ、エステラーゼ活性を有する生菌のみ蛍光を発する CFDA を用いた。試薬は Bacstain CFDA solution（株式会社同仁化学研究所）を用いた。乳酸菌は M.R.S.寒天培地（オキソイド社）を用いて 30℃ で 3 日間嫌気培養を行った。培養後の菌体を 0.1 mM リン酸緩衝液に  $10^6$  cfu/ml となるように懸濁し、この菌懸濁液に 10 ml 対して 0.1 ml Bacstain CFDA solution を添加して 15 分間室温で反応させた。反応後の菌液 0.1 ml を孔径 0.45  $\mu\text{m}$  の CELLULOSE ACETATE フィルター（アドバンテック東洋株式会社）を用いて吸引ろ過し、生菌をフィルター上に定着させた。定着させた菌体を、共焦点レーザー顕微鏡（LSM510, Carl Zeiss 社）を用いて観察（励起波長：480 nm, 蛍光波長：530 nm）し、菌体の蛍光強度から *L. fructivorans* と *L. brevis* の物質の取り込み速度の差を推定した。

#### (3) 細菌膜損傷程度の評価

キトサン単独および VB1 との併用による物質の取り込みに対する影響は膜が損傷した菌の菌体内にのみ侵入し、核酸と反応して蛍光を発する SYTOX Green Nucleic Acid Stain（Molecular Probes 社）を用いて調べた。キトサン単独での評価には *L. fructivorans* JCM 1117 株を 0 および 0.6% キトサン水溶液に  $10^4$  cfu/ml になるように懸濁した。キトサンと VB1 の併用による評価は 0.6% キトサン水溶液に 0.04% の VB1 を溶解させたヘキサデカンを混合して用いやはり  $10^4$  cfu/ml になるように懸濁した。室温にて 30 分反応後、菌体を 10 mM HEPES Buffer (pH 7.0) で 2 回洗浄し、同 Buffer に再度懸濁した。洗浄後の菌液に終濃度が 5  $\mu\text{M}$  になるように SYTOX Green を添加し、SPECTRA MAX GEMINI EM（日本モレキュラーデバイス株式会社）を用いて経時的に蛍光測定（励起波長：480 nm, 検出波長：530 nm）した。

#### (4) 菌体疎水度の測定

菌体疎水度（Cell Surface Hydrophobicity: CSH）の評価は Geertsema-Doornbusch らの方法で実施した<sup>6)</sup>。すなわち培養後の *L. fructivorans* JCM 1117 株を生理食塩水を用いて 2 回洗浄し、10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し SPECTRA MAX GEMINI EM を用いて濁度 (OD<sub>550</sub>) を 0.15 に調整した。菌液 7 ml をガラス試験管に回収し、キトサン処理試験区には終濃度が 0.04%, 0.12% になるようにキトサンを添加し水相とした。水相に 3 ml ヘキサデカンを添加して 1 分間室温で激しく攪拌を行った。25℃ で 20 分間静置した後、水相の濁度 (OD<sub>550</sub>) を測定し、下記の数式より疎水度 (CSH) を算出した。

$$\text{CSH}(\%) = (1 - \text{攪拌静置後の濁度} / \text{攪拌前の濁度}) \times 100 \quad (2)$$

表 1 モデルドレッシングの処方

原料名	試験 1 (%)	試験 2 (%)	試験 3 (%)	試験 4 (%)
水	51.246	51.036	50.759	48.318
還元水飴	7.14	7.14	7.14	7.14
果実酢 (酸度 10%)	3.85	3.85	3.85	3.85
クエン酸	0.054	0.054	0.054	0.054
食塩	3.255	2.442~4.325	2.442~4.325	2.442~4.325
醸造酢 (酸度 15%)	2.1	2.1	2.1	2.1
畜肉エキス	0.7	0.7	0.7	0.7
上白糖	0.267	0.267	0.267	0.267
椎茸エキス	0.21	0.21	0.21	0.21
キサントガム	0.119	0.119	0.119	0.119
グルタミン酸ソーダ	0.261	0.702	1.259	2.119
酵母エキス	0.028	0.028	0.028	0.028
コハク酸ナトリウム	0.056	0.056	0.056	0.056
リボタイド	0.014	0.014	0.014	0.014
サラダ油	30.7	30.7	30.7	30.7
水相部の pH	3.7	3.9	4.1	4.2
水相部の NaCl 濃度 (%)	4.7	3.5~6.2	3.5~6.2	3.5~6.2

表 2 細菌の世代時間

菌種名	菌株名	培養温度 (°C)	倍化時間 (hr.)
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	JCM 1117	30	4.1
<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM 1059	30	0.8
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	K-0107	30	0.9
<i>Escherichia coli</i>	NBRC 3972	35	0.3

### (5) *L. fructivorans* 菌体表面の微細観察

菌体表面の微細観察には走査型電子顕微鏡 SEM S-4300 SE/N (株式会社日立製作所) を用いた。*L. fructivorans* 菌体を 0 および 0.6% キトサン水溶液に  $10^4$ cfu/ml になるように懸濁し、1 時間反応後、菌体を 10mM HEPES Buffer (pH 7.0) で 2 回洗浄した。洗浄後の菌体の観察用試料調製は Morrill らの方法に従った<sup>7)</sup>。

### 3. ドレッシングの調製方法

各評価に用いるモデルドレッシングは、*L. fructivorans* が増殖することを確認した上で、酢酸量を 1.1% に固定し、抗菌剤の効果を評価する処方として塩分濃度 4.7%, pH 3.7 (表 1-試験 1) を用い、抗菌剤の効果に対する塩分濃度や pH の影響を評価する処方として塩分濃度を 3.5~6.2% に調整し、pH はグルタミン酸ソーダを用いて 3.9, 4.1, 4.2 に調整して試験に供した (表 1-試験 2, 3, 4)。この処方においてキトサンを添加する場合はモデルドレッシングの水相部には必要に応じてキトサン (ハイシャン KG; アサマ化成株式会社) を添加し、原料をホモディスパー (特殊機化工業) により攪拌し、均一に溶解した。混合後の溶液を常温から加熱して 80°C に到達してから 4 分間保持することにより水相部を殺菌処理した。油相部は、VB1 (ビタゲン AS5 号 田辺三菱製薬株式会社) を市販大豆ナタネサラダ

油に添加し、攪拌混合しながら 60°C まで加温し、VB1 を完全に溶解させた後、常温まで冷却して調製した。ドレッシングは水相部:油相部を 7:3 の割合で混合することにより調製し、調整直後に *L. fructivorans* を接種し 30°C にて保存試験を行った。

### 4. モデルドレッシングにおける菌体局在部位の測定

モデルドレッシングにおける菌体の局在部位の測定は下記の方法で行った。*L. fructivorans* が死滅しないことを確認したキトサンを 0% および 0.05% 添加した、表 1 の試験 1 に示した 10ml のモデルドレッシングを Centrifuge Tubes with Triple Seal Cap (旭硝子株式会社) に移した後、*L. fructivorans* を  $10^4$ cfu/ml となるように接種し、vortex を用いて 1 分間激しく攪拌を行い室温で静置した。その後、経時的に油水界面近傍の水相、水相の中層 (最下部からの距離 3.5cm) および下層 (最下部からの距離 0.1cm) からガラス製駒込ピペットを用いて振動を与えないように 100  $\mu$ l モデルドレッシングの水相を回収し、平板培養法により生菌数を測定した。

### 5. ドレッシングの保存試験

ドレッシングの保存試験に用いた *L. fructivorans* JCM1117 株は M.R.S.寒天培地 (オキソイド社) を用いて 30°C で 3 日間前培養を行った。培養はアネロパック (三菱

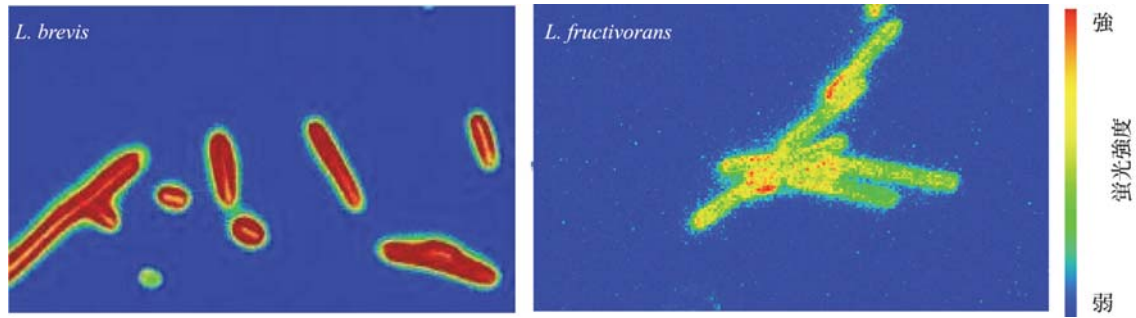


図1 蛍光基質 CFDA を用いた拡散輸送およびエステラーゼ活性の評価

*L. brevis* および *L. fructivorans* を Bacstain CFDA solution (pH7.0) 中で、室温にて15分間処理後、蛍光顕微鏡観察を行った。

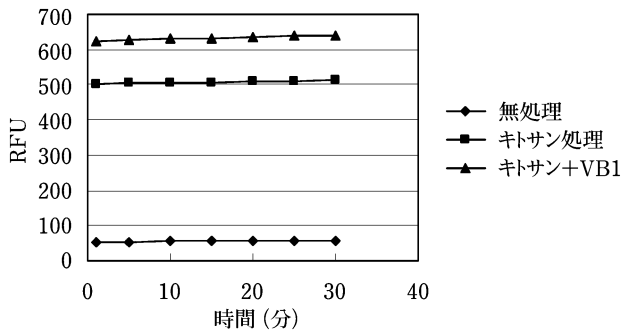


図2 キトサン単独およびキトサンとVB1併用が *L. fructivorans* 菌体の蛍光基質 SYTOX Green の取り込みに及ぼす影響

*L. fructivorans* をキトサンおよびVB1溶液 (pH7.0) 中、室温で処理を行い、経時的に SYTOX Green Nucleic Acid Stain を用いて蛍光強度を測定した。

◆, 無処理区; ▲, キトサン処理区 (キトサン 0.6%); ■, キトサン+VB1処理区 (キトサン濃度 0.6%, VB10.04%)。

RFU: Relative Fluorescence Units (相対蛍光強度)。

ガス化学株式会社) を用いて嫌気状態を維持した。各モデルドレッシングに菌を初発菌数  $10^{3-4}$  cfu/g になるように接種し、30℃で保存した。保存0, 7, 14, 21, 30, 45, 60日後に検体1gを9mlの滅菌生理食塩水を用いて必要に応じ段階希釈し、M.R.S. 寒天培地に塗布して30℃で3日間嫌気的に培養後に生菌数を測定した。保存による菌の消長から、最低菌数より1オーダー以上の増殖が認められた場合は制御不可、増殖が認められなかった場合は制御可能とした。

## 6. 官能試験方法

市販レタス40gにキトサンおよびVB1を種々の濃度で添加した表1の試験1に示したモデルドレッシングを15gかけ、パネル3名により食味評価を行った。

評価は、以下に示す基準に従って行った。すなわち、キトサンおよびVB1無添加のモデルドレッシングと風味上差がない場合は○(合格)、風味上許容できない場合は×(不合格)とした。

## 実験結果

### 1. *L. fructivorans* の微生物学的特性

#### (1) 世代時間

*L. fructivorans*, *L. brevis*, *L. mesenteroides* および *E. coli* の世代時間を表2に示す。一般的なドレッシングにおいて増殖不可であるものの、世代時間が短い *E. coli* では至適温度である35℃培養における世代時間は0.3時間であるのに対し、今回試験に用いた各乳酸菌の至適温度である30℃での世代時間は *L. brevis* が0.8時間、*L. mesenteroides* が0.9時間であったが、*L. fructivorans* は4.1時間のに対し、*L. fructivorans* は他の細菌と比較して世代時間が極めて長く、明らかに増殖が緩慢であった。

#### (2) 物質の取り込みに対するキトサンの影響

エステラーゼの基質であるCFDAを用いた *L. fructivorans* と *L. brevis* の評価結果を図1に示す。*L. brevis* はCFDA反応開始後約15分で蛍光強度が飽和状態に達したのに対し、*L. fructivorans* では反応15分後でもほとんどの菌体で大幅な蛍光強度の上昇は認められなかった。長時間の反応でも *L. fructivorans* の蛍光強度は緩やかにしか上昇しなかった。以上の結果より、*L. fructivorans* は他の細菌に比べるとエステラーゼ活性が低いか、物質の取り込み速度が極めて緩慢な菌であると思われた。

核酸蛍光染色色素 SYTOX Green を用いて測定したキトサン処理の細菌の物質の取り込みに対する影響を図2に示す。キトサン単独およびVB1との併用処理を行った *L. fructivorans* 菌体では未処理菌体に比べて SYTOX Green の取り込み量が約10倍に増大し、更にVB1と併用することにより SYTOX Green の取り込み量の増大が認められ、損傷が大きくなっていることが明らかとなった。

#### (3) 菌体疎水度およびモデルドレッシングにおける菌体の局在性に対するキトサンの影響

キトサン処理による *L. fructivorans* の疎水度を示すCSHの変化は表3に示す。キトサン未処理の *L. fructivorans* 菌体のCSHは28.5%であるが、0.04%のキトサン存在下

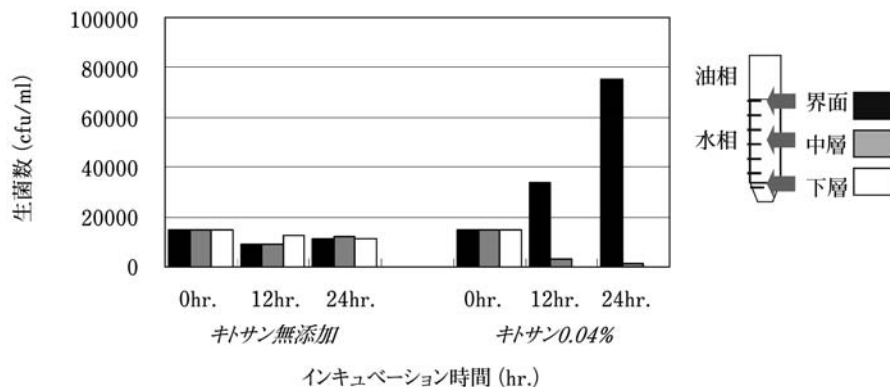


図 3 ドレッシングにおける *L. fructivorans* の局在性に対するキトサンの影響

表 3 キトサン処理の菌体疎水度 (CSH) に対する影響

	無添加	0.04%キトサン	0.12%キトサン
CSH (%)	28.5	68.9	77.8

処理条件；濁度 (OD<sub>550</sub>) を 0.15 に調整した菌液 7ml にキトサン処理区には終濃度が 0.04%, 0.12% になるようにキトサンを添加し水相とし, 3ml ヘキサンを添加して 1 分間室温で激しく攪拌を行い 20 分間静置した後, 水相の濁度 (OD<sub>550</sub>) を測定し, CSH を計算した。

では CSH は 68.9%,更に 0.12% までキトサンを添加すると CSH は 77.8% に向上した。以上の結果より, キトサンの濃度依存的に菌体が疎水化することが明らかとなった。

モデルドレッシングにおける *L. fructivorans* の局在性に対するキトサンの影響を図 3 に示す。キトサン無添加のモデルドレッシングでは *L. fructivorans* は水相全体に均一に分布し, 経時的な変化は認められなかったが, 0.04% キトサン存在下では *L. fructivorans* は時間の経過とともに油相界面に移行した。

(4) 菌体表面の微細構造

キトサン処理による菌体表面の微細構造変化の観察結果を図 4 に示す。キトサン未処理の菌体は表面が滑らかであるのに対し, 0.6% キトサン処理では菌体表面の粗面化が認められた。これはキトサンが細胞表層に吸着したためと考えられた。

2. モデルドレッシングにおける *L. fructivorans* の生育に対するキトサンおよび VB1 の影響

抗菌剤の効果を評価する処方である pH3.7, NaCl 濃度 4.7% モデルドレッシングにおける *L. fructivorans* の消長を図 5, 6 に示す。キトサン単独では 0.04, 0.05% では無添加と比較して増殖の遅延が認められたものの, 保存 30 日後から増殖を示し, *L. fructivorans* を制御することが出来なかった。キトサン 0.12% 添加では菌接種後 21 日目に検出限界以下まで低下し, その後も増殖は認められなかった。以上の結果より, キトサン単独では 0.12% の添加で *L. fructivorans* の制御が可能であることが明らかとなった

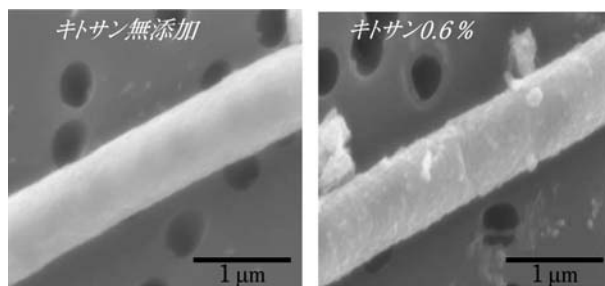


図 4 キトサンの *L. fructivorans* 菌体表層構造に対する影響 *L. fructivorans* 菌体を各濃度のキトサン溶液 (pH7.0) で, 室温 1 時間処理後, 定法に従って試料を調製し, 走査電子顕微鏡観察を行った。

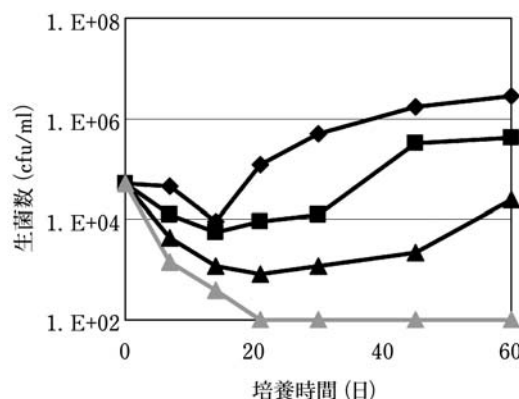


図 5 モデルドレッシングにおける *L. fructivorans* の増殖に対するキトサンの影響

キトサンを 0% (●), 0.04% (■), 0.05% (▲), 0.12% (▼) 添加したモデルドレッシング (塩分濃度 4.7%, pH3.7) 中に *L. fructivorans* を接種し, 30℃ で保存中の生菌数を経時的に MRS 培地を用いて測定した。

(図 5)。VB1 単独では 0.06% でも *L. fructivorans* の増殖が認められ, 制御出来なかった。一方, 0.04% キトサンと 0.04% VB1 を併用した結果, 菌接種 7 日後に速やかに検出限界以下となり, *L. fructivorans* を完全に制御できた (図 6)。

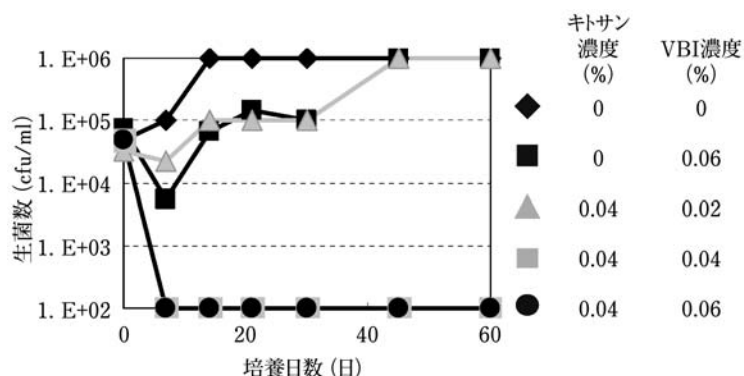


図6 モデルドレッシングにおける *L. fructivorans* の増殖に対するキトサンおよびVB1の影響

キトサンおよびVB1を図に示した濃度で添加したモデルドレッシング(塩分濃度4.7%, pH3.7)中に *L. fructivorans* を接種し, 30°Cで保存中の生菌数を経時的にMRS培地を用いて測定した。

表4 キトサンおよびVB1添加濃度のドレッシングの風味に対する影響

		キトサン濃度 (%)				
		0	0.03	0.04	0.05	0.06
VB1濃度 (%)	0	○	○	○	×	×
	0.02	○	○	○	×	×
	0.04	○	○	○	×	×
	0.06	○	○	○	×	×
	0.08	×	×	×	×	×

0.04%キトサンおよび0.04%VB1の併用に対する塩分濃度やpHの影響を評価する処方における *L. fructivorans* の制御については, pH3.7, 3.9, 4.1では塩分濃度3.5%以上で *L. fructivorans* は30°Cで60日間制御可能であったが, pH4.2までpHが上昇すると, 6.2%NaClでも30°C培養30日目以降に菌の増殖が認められた (data not shown)。

### 3. キトサンおよびVB1添加濃度のドレッシングの風味に対する影響

モデルドレッシングにおけるキトサン, VB1単独および2剤を添加したドレッシングの官能試験結果を表4に示す。キトサン単独では0.04%までは風味上問題がなかったが, 0.05%以上では風味上許容できなかった。VB1単独の場合, 0.06%では風味上問題がなかったが, 0.08%以上で風味上許容できなかった。また, キトサンとVB1の併用では単独と同様に0.04%キトサン, 0.06%VB1までは風味上問題がなかったが, それ以上の濃度では風味上許容できなかった。

## 考 察

食品における微生物制御技術の開発には, 危害菌の特性を深く理解することが重要である。今回我々は酸性調味料の最重要危害菌である *L. fructivorans* の微生物学的な特性を解析し, 風味に影響を与えない制御技術を開発した。 *L. fructivorans* と比較して様々なストレスに対して若干耐

性が低く, ドレッシングにおける危害性も低い *L. brevis* 等の乳酸菌を用いた保存試験では, 菌は接種後速やかに死滅するのに対し, *L. fructivorans* は菌数減少が緩やかであるが, 1ヶ月保存後に増殖に転じることが示された (data not shown)。この現象は, *L. fructivorans* は酢酸, NaClなどドレッシングの微生物制御因子が菌体内に取り込まれにくいために死滅が緩やかであり, 一部の菌が馴化或いは耐性化し増殖することによるためであると推定された。微生物の増殖速度を示す世代時間および, 酢酸と同様に拡散により菌体内に取り込まれるエステラーゼの基質であるCFDAを用いて調べた結果, *L. fructivorans* は危害性が低い他の乳酸菌の4倍以上世代時間が長く, かつ細胞外からの拡散による物質の取り込み速度またはエステラーゼ活性が極めて低い菌であることが明らかとなった。ドレッシングの主要な微生物制御因子である酢酸は非乖離分子が拡散により菌体内に取り込まれ, 菌体内で乖離しpHの低下, 蛋白質漏洩および呼吸を阻害することが知られている<sup>5)</sup>。従って, *L. fructivorans* は, 他の菌と比較して酢酸の菌体内への自由拡散速度が遅いために死滅も緩慢であり, 酢酸に対して馴化或いは耐性化するのに十分な時間的猶予があり, 高い酢酸耐性を示したものと考えられた。今後は遺伝子発現パターン解析等により酢酸への耐性獲得機構の詳細を解析する予定である。

以上の微生物学的な特性より, *L. fructivorans* を制御するには, 細胞表層を損傷させることにより酢酸の細胞内への拡散を高める抗菌物質が適していると考えられた。キトサンは細胞表層に作用する抗菌性物質であることが知られている<sup>8)</sup>。電子顕微鏡観察や蛍光色素を用いて検討した結果, キトサンは *L. fructivorans* の膜に吸着し, キトサン処理後には *L. fructivorans* においてSYTOXGreenの取り込みを約10倍に増大させ菌の損傷が顕著になったことから, *L. fructivorans* 制御のための抗菌物質として適していると考えられた。各濃度でキトサンを添加したモデルドレッシングの保存試験の結果より, 0.12%の添加で *L. fructiv-*

orans の制御が可能であった。しかしながら、0.12% の添加量ではキトサン特有の苦味が強く感じられ、ドレッシングの商品価値を著しく低下させてしまうために実用的ではなかった。このような風味上の問題を解決するために、併用効果が高い抗菌剤の選択を試みた。キトサンはポリカチオンであり、かつセルロースと同じ $\beta$ 1,4 結合の主鎖を持つ物質である<sup>8)</sup>。我々は菌表面の負電荷と、キトサンの正電荷が打ち消しあうことから、菌体に静電的にキトサンが吸着するとセルロースと同様に菌体の疎水度を増大させるのではないかと予想した。菌体の疎水度を示す CSH が、*L. fructivorans* 菌体においてキトサン処理の濃度依存的に増大したこと、更にはサンプリングによる菌数誤差が出たと思われるものの、キトサン処理 12, 24 時間において油水界面以外の他の層の菌数が極めて少なくなり、殆どの菌が界面に集まることが確認され、油相のあるドレッシングではキトサン添加により菌体が保存中に油水界面に局在するようになると考えられた。このキトサンによる疎水化の現象は *L. brevis* においても確認されキトサンが効果を示す、すなわちキトサンが吸着する菌であれば多くの菌で起こる現象だと考えられる (Data not shown)。このようなキトサン存在下での菌体の特徴から、「油水界面に局在し、かつ乳酸菌に対して高い抗菌性を有する抗菌剤」との併用が極めて有効であると考えた。

VB1 はラウリル基を親油性基、硫酸基を親水性基とする両親媒性物質であり、ラウリル基が細菌の脂質二重膜を貫通することにより膜の恒常性を低下させて損傷させ、酸性で各種乳酸菌に対して抗菌性を示すことが知られている<sup>9)</sup>。VB1 はドレッシングにおいては油水界面に存在しやすいために、水相に均一に分布する菌に関しては効果が低いが、キトサン処理により界面に局在するようになる菌に関しては抗菌効果が高いと考えられた。キトサンと VB1 の併用を検討した結果、緩衝液系で膜損傷の促進が認められ、さらにはモデルドレッシングにおいてもキトサン、VB1 共にわずか 0.04% という風味に影響を与えない低い添加量で *L. fructivorans* の死滅傾向を示し生育を完全に阻害した。キトサンと VB1 の一般的な抗菌目的での添加量は 0.1~0.3% であることから添加量を約 1/10 に低減することが可能であり、本技術は風味だけでなく、コストに関しても優れた制御技術であると考えられる。

今回開発した技術により pH4.1 以下であれば 3.5% の低塩分濃度でも *L. fructivorans* を完全に制御することが可能である。酢酸の pK 値は 4.7 であり、pH が下がるほど抗菌性が高い非乖離分子の酢酸が増加する。キトサンおよび VB1 の 2 剤の併用で菌体表層部が損傷して恒常性が乱され、非乖離分子の酢酸の菌体内への取り込みが促進されるため、*L. fructivorans* に対して致死的に作用していると考えられた。以上のように、キトサン、VB1、非乖離分子の酢酸、更には NaCl が複合的に作用することにより、*L.*

*fructivorans* に対して極めて強力な抗菌効果を発揮していることが明らかとなった。今回開発した制御技術を用いることにより、今まで処方開発の実績が無いようなマイルドな風味の処方開発と微生物学的な安全性を両立することが可能となった。

消費者の健康志向や風味嗜好性から今後も食品の低酸・低塩化は大きく進み、日持ち向上剤を用いた微生物制御技術は重要性を増すことが予想される。今後は更に、他の食品にも応用可能な汎用性の高い微生物制御技術の確立を目指していく予定である。

## 要 約

酸性調味料における腐敗事故は、高酢酸耐性の *Lactobacillus fructivorans* によって引き起こされる。近年、消費者の健康志向や風味の要求性からドレッシングの低酸・低塩化が進み、それに伴い処方耐菌性が低下したため、*L. fructivorans* の制御技術の確立が強く求められている。まず、*L. fructivorans* の世代時間および拡散による物質の取り込み速度を評価したところ、*L. fructivorans* は他の乳酸菌と比較して増殖および取り込み速度が非常に遅い菌であることが明らかとなった。これより、酢酸の取り込み速度も遅いことが酢酸耐性の要因であると示唆された。このため、制御技術としては、膜を損傷し酢酸の取り込みを促進すると考えられるキトサンの利用が適していると考えられた。しかしながら、キトサン単独で膜の損傷を起こす濃度で添加すると風味に影響を与えた。そこで、キトサンによる菌体表面の疎水化および疎水化により菌体が油水界面に局在化することに着目し、油水界面に局在しやすく膜をさらに損傷するチアミンラウリル硫酸塩の併用を検討した。その結果、pH4.1、塩分濃度 3.5% の低酸・低塩ドレッシングにおいて、0.04% キトサンおよび 0.04% チアミンラウリル硫酸塩の併用により風味に影響を与えることなく *L. fructivorans* の制御が初めて可能となった。

## 文 献

- 1) 伊藤 武, 森地敏樹, 酸性下で増殖可能な微生物「食品のストレス環境と微生物」, 第 1 版 (サイエンスフォーラム, 東京), pp. 143-157 (2004).
- 2) 食品腐敗変敗防止研究会, 乳酸菌による変敗「食品変敗防止ハンドブック」, 第 1 版 (サイエンスフォーラム, 東京), pp. 83-97 (2006).
- 3) 宇田川俊一, 畜産品および畜産加工品, 水産加工品「微生物汚染事例・現場検査法」, 第 1 版 (サイエンスフォーラム, 東京), pp. 79-131 (2003).
- 4) Hoon, L. O., Yong, J. K., Eun, J. C. and Jee, Y. K., Antimicrobial characteristics of chitosans against food spoilage microorganisms in liquid media and mayonnaise. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2378-2383 (2001).
- 5) 松田敏生, 食品保存効果を持つ化学的合成品, 食品保存・殺菌が主目的でない物質「食品微生物制御の科学」, 第 1 版 (幸書房, 東京) (1998).
- 6) Geertsema-Doornbusch, G. I., Van, D. M. H. C. and Busscher,

- H. J., Microbial cell surface hydrophobicity. *J. Microbiol. Methods*, **18**, 61-68 (1993).
- 7) J. B. Morrill, Scanning electron microscopy of embryos. *Methods Cell Biology*, **27**, 263-293 (1986).
- 8) Lim, S-H. and Hudson, S. M., Review of chitosan and its derivatives as antimicrobial agents and their uses as textile chemicals. *J. Macromol. Sci. Polym. Rev.*, **43**, 223-269 (2003).
- 9) 早川夕紀子, 吉田和雄, 杵川 洋, めん製品へのチアミンラウリル硫酸塩(ビタミン B1) 製剤の日持ち向上効果, 食品工業, **55**, 80-84 (2012).
- (平成 24 年 9 月 29 日受付, 平成 24 年 12 月 26 日受理)
-