

学 位 論 文 題 名

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF INDIGENOUS LACTIC
ACID BACTERIA, THEIR ROLE AND APPLICATION IN
PRODUCTION OF URUTAN, A BALINESE FERMENTED SAUSAGE

（乳酸菌の分離と分類、および機能解析と
バリの伝統的発酵ソーセージ、ウルタンへの応用）

学位論文内容の要旨

バリ島の伝統的な発酵食品の一つウルタンの発酵に関与する乳酸菌について研究した。熱帯の発酵ソーセージの独特の微生物叢を明らかにした。さらに単離した乳酸菌をスターターとして使用し、速やかな発酵と品質の良いウルタンを製造する技術へと結びつけた。

発酵ソーセージは、ヨーロッパではサラミを代表として、多数の種類が知られており、その発酵に伴う微生物についての研究も多数ある。ヨーロッパの発酵ソーセージと比較するとバリの発酵ソーセージであるウルタンは、大きく異なった要素がある。第一に、発酵温度、熱帯のしかも日向で発酵が行われるため、発酵中の品温は、日中は50℃以上、夜間は30℃まで下がる。この発酵条件は、ヨーロッパのソーセージが、通常 25℃以下の環境で、しかも日影で発酵が行われるのとは、極端な相違である。さらに、ウルタンには、豚肉のほかに、多量のスパイスが使用される。生ショウガ、ターメリック等、地方色豊かなスパイスが、多量に入れられる。この2つの要因で、発酵に関与する微生物は、特徴的な種類の存在が、予想された。

乳酸菌の分類には、遺伝学的な解析が不可欠である。従来の形態的および生理学的分類では、系統進化学的な変化を反映していないことが、明確になってきた。ここ 10 年で、かなりの数の乳酸菌が再分類された。本研究においては、系統進化学に基づく方法で、最新の分類を行った。

1. ウルタン発酵に関与する微生物の同定および単離

バリ島で製造されたソーセージから、5日間の発酵の各時期から微生物を分離して、分類し、発酵の過程でどのような微生物が活動しているのか、変遷はあるのかを調べた。

発酵中のウルタンから 71 株の微生物を分離した。形態学的にみると 77%が桿菌で、23%が球菌であった。さらに、生理学的性質を加えて、13 のグループに分けられ、各グループから任意に代表株を選択して、16S rRNA による系統進化学的分類法によって、単離株を同定した。

その結果、特徴的な微生物変遷があることが判明した。すなわち、発酵の初期においては、*Lactobacillus plantarum* に分類される乳酸菌が、急速に生育した。しかし、発酵後半では、減少した。代わりに *Pediococcus acidilactici* が、生育してくることが明らかになった。

この変遷には、実に巧妙なる発酵のメカニズムが、隠されていることがさらなる研究の結果わかつ

てた(後述)。これらのほかにも、*Lb. farciminis*、*Lb. hilgardii*、*Lb. plantarum*などの乳酸菌の存在を明らかにした。ウルタンの微生物を調べた研究は過去にも存在したが、最新の系統進化学的方法を用いて、部生物の変遷を明らかにしたのは、著者が始めてである。

2. *Lactobacillus plantarum* の性質

単離された *Lb. plantarum* は、乳酸生成力が強く、発酵の初期に急速に増殖するとともに乳酸を急速に生成した。それによって肉の pH は、速やかに低下した。これは、重要な利点を生み出す。すなわち、pH 低下によって食中毒を引き起こす微生物類の生育を抑制し、殺すことができる。肉類で問題になる食中毒菌、*Clostridium* や *E. coli* あるいは、*S. aureus* の生育は、低 pH によって抑制された。さらに pH の低下によって豚肉のタンパク質は、凝固して、ソーセージとしてのまとまりをつくる。さらに離水を促進して、その水は、ケーシングを通過して蒸発して、水分活性を下げる。これらによって微生物の成育を抑制する条件をつくり、保存に役立っている。

3. *Pediococcus acidilactici* の性質と発酵での役割

P. acidilactici は、4つの球形の細胞が正方形に並んだような形態が見える。ウルタン発酵の後期に増加する本菌は、タンパク性の抗生物質であるバクテリオシンを生産することがわかった。しかも、本バクテリオシンの抗菌スペクトラムを調べたところ、*Lb. plantarum* の生育も阻害した。バクテリオシンの生産と温度との関係も興味深く、30~35℃でバクテリオシンは旺盛に生産される。一方、生育は45℃が最も活発であった。このことは、ウルタンが、バリ島の自然条件の中で発酵されることと深い意味がある。日中の高温の時には、生育が旺盛で、夜間の温度の下がった時期にバクテリオシンが生産されていることになる。

発酵初期には、*Lb. plantarum* が主要な微生物となり、その後減少し、一方、発酵後半で *P. acidilactici* が増加する独特の微生物変遷は、バクテリオシンの生産と関連していたに違いない。この微生物変遷が起こることによって、ウルタンの品質にも貢献している。*Lb. plantarum* への減少によって pH が低下しすぎず、よって離水も制御され、しっかりとまとまったソーセージとなっている。

本バクテリオシンを分配クロマトなどを利用して精製・純化した。分子量は、4611で44個のアミノ酸で構成されたペプチド抗生物質であり、100℃15分でも活性を保つ耐熱性バクテリオシンであった。そのN末端から20個のアミノ酸配列を分析の結果、pediosin PA-1と90%類似するが、2個のチロシンがシスチンに置換されており、新規のバクテリオシンといえる。

4. 単離乳酸菌をスターターとして用いたウルタン発酵

単離株のうち *Lb. plantarum* U201 と *P. acidilactici* U318 株をそれぞれ純粋培養して、スターターとしてウルタン発酵をおこなった。発酵状態を比較するとともに *E. coli* あるいは、*S. aureus* など害を生じる可能性のある菌も添加して、殺菌活性なども調べた。発酵温度は、30℃と45℃と12時間ごとに入れ替えて5日間行った。

Lb. plantarum U201 のみをスターターとして添加した実験区では、乳酸による pH 低下は、速やかに起きた。しかし、大腸菌群の菌数の減少も緩やかだった。*P. acidilactici* U318 単独の添加では、1日後の pH が4.8以上と酸性化が遅れ、ソーセージとしての肉のまとまりが悪かった。これは、SDS電気泳動で調べた可溶性タンパク質の挙動と一致していた。2つの菌をスターターとして同時に添加した場合は、発酵初期には、*Lb. plantarum* U201 が旺盛に増殖して、pH も急速に下がり、その後、菌

数は、定常値から減少に転じ、一方、*P. acidilactici* U318 の生育が亢進した。自然界で起こる発酵の再現がなされた。スターターを使用した場合は、いつも安定した発酵を起こせることが利点であり、自然発酵における不安定性のリスクを回避することができる。

本研究によって熱帯での発酵ソーセージにおいて見られる乳酸菌の役割分担とその仕組みを解明することができた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 野 行 蔵

副 査 教 授 松 井 博 和

副 査 教 授 横 田 篤

学 位 論 文 題 名

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF INDIGENOUS LACTIC ACID BACTERIA, THEIR ROLE AND APPLICATION IN PRODUCTION OF URUTAN, A BALINESE FERMENTED SAUSAGE

(乳酸菌の分離と分類、および機能解析と
バリの伝統的発酵ソーセージ、ウルタンへの応用)

本論文は、5章からなり、図 18、表 10、文献 94 を含む総頁数 88 の英文論文である。別に参考論文 1 編が付されている。

バリ島の伝統的な発酵食品の一つウルタンについて研究し、熱帯の発酵ソーセージの独特の微生物叢を明らかにした。さらに単離した乳酸菌をスターターとして使用し、速やかな発酵と品質の良いウルタンを製造する技術へと結びつけた。

発酵ソーセージは、ヨーロッパでは、多数の種類が知られて、これらと比較するとバリの発酵ソーセージであるウルタンは、大きく異なった要素がある。第一に、発酵温度、熱帯のしかも日向で発酵が行われるため、発酵中の品温は、日中は 50℃以上、夜間は 30℃まで下がる。この発酵条件は、ヨーロッパのソーセージが、通常 25℃以下の環境で、しかも日影で発酵が行われるのとは、極端な相違である。ウルタンには、豚肉のほかに、多量のスパイス、生ショウガ、ターメリック等が、入れられる。この 2 つの要因で、発酵に関与する微生物は、特徴的な種類の存在が、予想された。

1. ウルタン発酵に関与する微生物の同定および単離

発酵中のウルタンから 71 株の微生物を分離した。形態学的にみると 77%が桿菌で、23%が球菌であった。さらに、生理学的性質を加えて、13 のグループに分けられ、各グループから代表株を選択して、16S rRNA による系統進化的分類法によって、単離株を同定した。

その結果、特徴的な微生物変遷を見いだした。すなわち、発酵の初期においては、*Lactobacillus plantarum* に分類される乳酸菌が、急速に生育したが、発酵後半では、減少した。代わりに *Pediococcus acidilactici* が、生育してきた。

この変遷には、実に巧妙なる発酵のメカニズムが、隠されていることがさらなる研究の結果わかった(後述)。これらのほかにも、*Lb. farciminis*、*Lb. hilgardii*、*Lb. plantarum*

などの乳酸菌の存在を明らかにした。ウルタンの微生物を調べた研究は過去にも存在したが、最新の系統進化学的方法を用いて、部生物の変遷を明らかにしたのは、著者が始めてである。

2. *Lactobacillus plantarum* の性質

単離された *Lb. plantarum* は、乳酸生成力が強く、発酵の初期に急速に増殖するとともに乳酸を急速に生成した。それによって肉の pH は、速やかに低下した。食中毒を引き起こす微生物類の生育を抑制し、豚肉のタンパク質を凝固させ、ソーセージとしてのまとまりをつくる。さらに離水を促進して、その水は、ケーシングを通過して蒸発して、水分活性を下げる。これらによって微生物の成育を抑制する条件をつくり、保存に役立っている。

3. *Pediococcus acidilactici* の性質と発酵での役割

P. acidilactici は、ウルタン発酵の後期に増加する菌である。単離株のうち 2 株は、バクテリオシンを生産した。抗菌スペクトラムを調べたところ、*Lb. plantarum* の生育も阻害した。バクテリオシンの生産と温度との関係も興味深く、30~35℃でバクテリオシンは旺盛に生産される。一方、生育は 45℃が最も活発であった。このことは、ウルタンが、バリ島の自然条件の中で発酵されることと深い意味がある。日中の高温の時には、生育が旺盛で、夜間の温度の下がった時期にバクテリオシンが生産されていることになる。

発酵初期には、*Lb. plantarum* が主要な微生物となり、その後減少し、一方、発酵後半で *P. acidilactici* が増加する独特の微生物変遷は、バクテリオシンの生産と関連していたに違いない。この微生物変遷が起こることによって、ウルタンの品質にも貢献している。*Lb. plantarum* にの減少によって pH が低下しすぎず、よって離水も制御され、しっかりとまとまったソーセージとなっている。

本バクテリオシンは、分子量、4611 で 44 個のアミノ酸で構成されたペプチド抗生物質であり、100℃15 分でも活性を保つ耐熱性バクテリオシンであった。その N 末端から 20 個のアミノ酸配列を分析の結果、pediosin PA-1 と 90%類似するが、2 個の Tyr が Cys に置換されており、新規のバクテリオシンといえる。

4. 単離乳酸菌をスターターとして用いたウルタン発酵

単離株のうち *Lb. plantarum* U201 と *P. acidilactici* U318 株をそれぞれ純粋培養して、スターターとしてウルタン発酵をおこなった。発酵状態を比較するとともに *E. coli* あるいは、*S. aureus* など害を生じる可能性のある菌も添加して、殺菌活性なども調べた。発酵温度は、30℃と 45℃と 12 時間ごとに入れ替えて 5 日間行った。

Lb. plantarum U201 単菌を添加した区では、pH 低下が、速やかに起きたが、大腸菌群の菌数の減少は緩やかだった。*P. acidilactici* U318 単独の添加では、1 日後の pH が 4.8 以上と酸性化が遅れ、肉のまとまりが悪かった。2 つの菌をスターターとして同時に添加した場合は、発酵初期には、*Lb. plantarum* U201 が旺盛に増殖して、pH も急速に下がり、その後、菌数は、定常値から減少に転じ、一方、*P. acidilactici* U318 の生育が亢進した。自然界で起こる発酵の再現がなされた。スターターを使用した場合は、いつも安定した発酵を起こせることが利点であり、自然発酵における不安定性のリスクを回避することができる。

本研究によって熱帯での発酵ソーセージにおいて見られる乳酸菌の役割分担とその仕組みを解明することができた。

よって審査員一同は、ニョマン セマヂィ アンタラが博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。