

タイ産発酵食品由来乳酸菌および
Staphylococcus 属の多様性評価と特性

平成28年度

東京農業大学 農学研究科
環境共生学専攻

宮下 美香

目次

序論 研究の背景および目的	6
第1章 発酵食品微生物の収集と種の多様性.....	10
1.1. 発酵食品からの微生物の分離と遺伝子解析による同定	10
1.1.1. タイ産発酵食品由来微生物の選抜と再同定	10
1) 供試菌株の決定	10
2) <i>pheS</i> 遺伝子解析による <i>Lactobacillus plantarum</i> group に含まれる分離株の 再同定	12
1.1.2 日本産発酵食品由来微生物の分離と同定	12
1) 日本産発酵食品の収集.....	12
(1) 富山産発酵食品	13
(2) 沖縄産発酵食品	13
2) 発酵食品由来微生物の分離	15
3) 遺伝子解析による同定.....	16
(1) 16S rRNA 遺伝子の解析	16
(2) <i>pheS</i> 遺伝子の解析	17
1.2. 分離株の種の多様性と構成種の比較.....	17
1.2.1. タイ産発酵食品に由来する分離株の種の構成.....	17
1.2.1. 日本産分離株との構成種比較からみたタイ分離株の種の多様性.....	18
1) 日本産分離株の分離株数と属種の構成	18

2) タイ産分離株と日本産分離株の構成種の比較.....	18
(1) 乳酸菌種の比較.....	18
(2) <i>Staphylococcus</i> 属菌種の比較.....	19
1.3. まとめ.....	20
第2章 タイ産発酵食品由来微生物の環境ストレスに対する耐性.....	25
2.1. 試験方法.....	25
2.1.1. 各生育試験に共通する基礎培地と測定方法.....	25
2.1.2. 生育 pH 試験.....	25
2.1.3. 生育温度試験.....	26
2.1.4. 生育 NaCl 濃度試験.....	26
2.2. タイ産発酵食品由来微生物の耐性の分布.....	26
2.2.1. タイ分離株の耐性の分布.....	26
2.2.2. 日本産分離株との耐性の分布の違い.....	27
2.3. タイ産発酵食品由来乳酸菌分離株の耐性.....	32
2.3.1. それぞれの環境ストレスに対する耐性.....	32
1) 酸耐性.....	32
2) アルカリ耐性.....	32
3) 塩耐性.....	33
4) 低温耐性と高温耐性.....	33
2.3.2. 各耐性の関連性.....	33

1) 酸耐性と高温耐性.....	33
2) アルカリ耐性と高温耐性.....	35
3) pH 8.5 までのアルカリ耐性と酸耐性.....	35
4) 塩耐性とアルカリ耐性.....	35
5) タイ分離株の乳酸菌が示した耐性の組み合わせ.....	36
6) 基準株との比較.....	36
2.3.3. タイ産発酵食品由来乳酸菌分離株が示した耐性の日本産分離株との比較.....	37
1) 塩耐性.....	37
2) 酸耐性と高温耐性.....	37
3) アルカリ耐性と高温耐性.....	42
4) pH 8.5 までのアルカリ耐性と酸耐性.....	42
5) 低温耐性と高温耐性.....	42
2.3.4. タイ産発酵食品由来乳酸菌分離株における特徴的な耐性.....	42
2.4. タイ産発酵食品由来 <i>Staphylococcus</i> 属分離株の耐性.....	43
2.4.1. それぞれの環境ストレスに対する耐性.....	43
2.4.2. アルカリ耐性と塩耐性の関連性.....	43
2.4.3. 日本産分離株との比較とタイ産発酵食品由来 <i>Staphylococcus</i> 属分離株の耐性 の特徴.....	46
2.5. まとめ.....	49
第3章 タイ産発酵食品由来微生物の糖の発酵性.....	51

3.1. 試験方法	51
3.2. タイ産発酵食品由来微生物の糖の発酵パターン	51
3.3. タイ産発酵食品由来乳酸菌の糖発酵性	57
3.3.1. クラスター解析から見たタイ分離株乳酸菌の種内多様性	57
3.3.2. 日本産分離株との比較	63
3.3.3. タイ分離株に含まれない日本産分離株の種における糖発酵性の多様性	64
3.3.4. 分離種による糖発酵性の種内多様性の違い	65
3.4. タイ産発酵食品由来 <i>Staphylococcus</i> 属の糖発酵性	71
3.4.1. クラスター解析から見たタイ分離株 <i>Staphylococcus</i> 属株の種内多様性	71
3.4.2. 日本産分離株との比較	73
3.5. まとめ	75
第4章 タイ産発酵食品由来微生物の酵素生産能および GABA 生産能	77
4.1. 試験方法	77
4.1.1. カゼイン分解能試験	77
4.1.2. スターチ分解能試験	77
4.1.3. GABA 生産能試験	78
4.2. タイ産発酵食品由来微生物の生産能と日本産分離株との比較	78
4.3. まとめ	81
結論	82
謝辞	87

引用・参考文献.....88

序論 研究の背景および目的

乳酸菌は食品の製造や保存に利用され、ヒトの免疫賦活機能を有するなど産業的にも有用であり、大きな需要がある。乳酸菌の中には、ヨーグルトなどの乳を原料とする発酵乳製品に関わる乳酸菌のほかに、魚や肉の発酵食品や野菜などの漬物に関わる乳酸菌があり、これらの間には生育に利用できる栄養源（糖の種類など）や様々なストレスに対する耐性の強さなどの性質に違いがある。特に日本をはじめとするアジア各国では、多様な性質を持つ乳酸菌として注目されている後者の乳酸菌による独特の伝統的な魚や野菜の発酵食品が数多くある。

近年日本では、各地域に由来する乳酸菌を始めとした微生物を用いた新たな商品開発や、廃棄物の資源利用を目的とした研究開発が盛んに行われている。そこでは多様な微生物を収集し、微生物資源としてその特性を活かし新たな応用利用に繋げることが期待されている。地域の企業支援を目的とした公設試験研究機関による、地場産業の活性化に向けた取り組みや研究報告からも、その需要の高さを知ることが出来る。北海道における耐塩性乳酸菌を用いたヤナギダコ醤油の開発（吉川ら、2009）や乳酸菌に加えて *Staphylococcus* 属細菌を利用したサケ発酵乾製品の開発（能登ら、2013）、東京都の乳酸発酵野菜を利用した新たなソース開発（三枝、2009）、埼玉県の前漬物から分離した乳酸菌を利用した新たな減塩漬物製造技術の開発（鶴菌ら、2013）、愛知県の赤カブの発酵漬物製造への乳酸菌の利用（石川、2012）、新潟県の雪室保存の前漬物から分離した乳酸菌の利用（西脇ら、2012）といった発酵食品の開発や、納豆や味噌の製造過程で排出される大豆蒸煮液の有効利用を目指した乳酸菌を用いた発酵食品の開発研究（松田ら、1995；吉田ら、2014）といった廃棄

物の資源利用を目指した研究など多岐にわたる。地域の特産物やそれらの製造工程で生じる副産物を素材とし、利用されている微生物は市販のスターター菌種や、特産発酵食品などから分離された地元由来の菌株まで様々である。日本の伝統的な発酵食品は、その保存性を高める目的から多量の食塩が加えられる。また発酵による酸性化も保存性の向上に役立っており、これら発酵食品の製造には、高塩濃度や酸性などの環境ストレスに対して耐性をもった菌株が不可欠である。さらには特色ある製品開発のために、旨味や香気成分、機能性物質の生産能といった付加的な価値を生み出す微生物が求められており、それら微生物を利用した製品開発に関する研究では、スターター菌種の違いが最終製品の品質に影響するとの報告もあり（船津ら，2013；寺島ら，2012a，2012b），これら発酵食品の製造や廃棄資源の二次利用にはスターターとなる菌株が大きな役割を担うと考えられる。

米を主食とし、魚介類を主菜、野菜や果実を副菜とする食文化は東南アジアにも共通していて、伝統的な発酵食品にも共通性が多いことが知られている（角野，2004）。これらの地域には特に魚や大豆、野菜を素材とした発酵食品が数多く存在し、そこに生息する乳酸菌を中心とした微生物はストレス耐性など多様な性質を持つ可能性があると考えられる。

東南アジアに位置するタイは、比較的涼しく温帯作物が生産される北部、肥沃な大穀倉地帯を抱える中央部、顕著な熱帯モンスーン気候で熱帯特有の作物が採れる南部と、土地生産性が低いから古くから発酵食品が好んで食されてきた東北部から構成され、淡水魚の漁場となる大河が中央部に流れる。そのため農作物や水産物の種類は豊富で、それらを発酵させた多様な発酵食品が存在し、その独特の味には発酵食品に生息する微生物による発酵が大きく関わっていると考えられる。

筆者はこれまでタイで、特に発酵食品から乳酸菌を主とする細菌を分離し、その多様性を評価してきた。タイのローカルマーケットでは野菜や果実、大豆、魚、肉を原料とした様々な発酵食品が扱われている。また副原料として炊いた米やもち米、炒って砕いた生米などが加えられている発酵食品が多く、ニンニクや唐辛子などの香辛料が加えられている発酵食品もある。魚の発酵食品は主に淡水魚が用いられ、野菜の発酵食品でも日本とは異なる種類の野菜が見られた。また発酵食品の種類によって添加する水分量や副原料、塩濃度によって酸味や塩味の違いがあった。これら様々な発酵食品を2008年7月と2009年5月にタイ東北部、中部、および北部南寄り地域の主要都市部にあるローカルマーケットで収集し、合計120の発酵食品を分離源として1046株の分離株を得た。得られた分離株は16S rRNA 遺伝子配列を解析して近縁種を決定し、分離株同士の配列の類似度と分離源情報および分離条件を考慮して重複株を除き、454株を保存した。これら454株の分離株は410株の乳酸菌と44株の *Staphylococcus* 属細菌に別れた。これら分離株のうち乳酸菌410株については、16S rRNA 遺伝子解析に基づいた分類学的な多様性の評価を学術誌に報告した (Miyashita *et al.*, 2012)。

筆者がこれまでに行ってきたタイ原産の発酵食品に由来する微生物の分類学的な多様性研究の結果、分離源であるタイ発酵食品の高い塩濃度に応じて高い塩耐性を持つという特徴と、糖の発酵性においても近縁な種とは異なる特徴を示す幾つかの新しい種が見つまっている。このように、日本では得られないタイの発酵食品に由来する微生物には、未だ知られていない特徴を持つ株が存在し、新たな応用が期待できる重要な微生物資源であり、食品製造のスターターカルチャーなど日本国内での活用が期待される。発酵食品を始めと

した微生物の利用において、製造工程における温度管理や対象とする発酵原料など、利用に応じて想定される条件に適した菌株の選択が必要であり、菌株の性質に関する情報は菌株利用や選択において重要な情報となる。しかしその性質を微生物資源としての観点から網羅的に研究した報告はなく、タイ産微生物の活用へは繋がっていない。

そこで本研究では、タイ産発酵食品に由来する乳酸菌と *Staphylococcus* 属分離株について、菌株利用の基礎的な情報となる生育環境におけるストレス耐性や糖の発酵性、および付加的な価値を付与する情報として旨味や香気成分の生成に関与するプロテアーゼ活性とアミラーゼ活性、および機能性物質として注目されている γ -アミノ酪酸 (Gamma Amino Butyric Acid, 以下 GABA という) の生産能を調査するとともに、日本産発酵食品に由来する微生物との比較から、タイの分離株の特徴を明らかにすることを目的とした。

第 1 章 発酵食品微生物の収集と種の多様性

1.1. 発酵食品からの微生物の分離と遺伝子解析による同定

1.1.1. タイ産発酵食品由来微生物の選抜と再同定

1) 供試菌株の決定

タイ産発酵食品から分離した乳酸菌 410 株および *Staphylococcus* 属 44 株で構成される 454 株の分離株の中から、本研究に供する菌株を決定するために、分離源とした発酵食品から原料や塩濃度、pH、採集地を考慮して 9 種類の発酵食品を選択し、選択した発酵食品に由来する 63 株を供試菌株とした。選択した発酵食品の原料は野菜、大豆、魚、肉で、pH は pH 4.5~5.0 の酸性であり、NaCl 濃度は野菜の発酵食品で 3~5.5 % と低めで、対して大豆や魚、肉の発酵食品は 15~30 % と高かった。供試菌株とした分離株の分離源である発酵食品のリストを表 1-1 にまとめた。

表 1-1. 分離源としたタイ産発酵食品

発酵食品名 (タイ名)	主要原材料	数	pH	NaCl (%)
Noa mai dong	野菜	1	5.0	5.5
Pak kard dong	野菜	1	5.0	3.0
Hua chai pow chem	野菜	1	4.5	15.0
Tuaw jaew	大豆	1	5.0	18.0
Mum	肉	1	5.0	19.0
Pla-ra	魚	1	5.0	25.0
Pla-jaw	魚	1	5.0	30.0
Pla-jom	魚	1	nd	nd
Pla-som	魚	1	nd	nd

nd: not determined



図 1-1. 分離源としたタイ産発酵食品の写真

1. Noa mai dong (タケノコの漬物) ; 2. Pak kard dong (カラシナの漬物) ; 3. Hua chai pow chem (ダイコンの漬物) ; 4. Tuaw jaew (大豆の発酵食品) ; 5. Mum (肉の発酵食品) ; 6. Pla-ra (魚の発酵食品) ; 7. Pla-jaw (魚の発酵食品) ; 8. Pla-jom (魚の発酵食品) ; 9. Pla-som (魚の発酵食品)

2) *pheS* 遺伝子解析による *Lactobacillus plantarum* group に含まれる分離株の再同定

16S rRNA 遺伝子配列では識別できない *Lactobacillus plantarum* group に含まれる分離株について、ゲノム DNA を鋳型として *pheS* 遺伝子をターゲットに PCR 増幅し、得られた PCR 増幅産物から 16S rRNA 遺伝子の解析と同様の方法で配列を決定した。プライマーは PCR 増幅およびシーケンシング反応共に *pheS*-21-F および *pheS*-23-R を用いた (Naser *et al.*, 2005)。

得られた分離株の *pheS* 遺伝子配列と *L. plantarum* group に含まれる既知種基準株の配列を基に系統解析を行い、近縁種を決定した。系統解析は 16S rRNA 遺伝子配列に基づく解析と同様の方法で行った (Miyashita *et al.*, 2012)。

1.1.2 日本産発酵食品由来微生物の分離と同定

1) 日本産発酵食品の収集

年間を通して高温多湿であるタイに対して、日本には四季があるため、タイと同様に季節を問わず仕込まれる発酵食品に加えて冬の寒い時期に仕込まれる発酵食品が存在する。冬季に仕込まれる発酵食品として富山県から冬季に、季節を問わず仕込まれる発酵食品としてタイと比較的類似した環境である沖縄県から夏季に、それぞれ発酵食品を収集した。

(1) 富山産発酵食品

富山県富山市，南砺市，氷見市の食品加工所で 2013 年 11 月に発酵食品を収集した。富山県では，気温が下がり降雪の始まる 11 月頃から仕込みが始まる発酵食品が多数存在する。また下漬け処理の後に塩抜きを経て本漬けを行うなど行程が多く，それぞれの製造工程によって塩濃度や添加物に変化していた。富山県では県の公設試験所や食品加工所の協力の下，最終製品のみならず，製造過程にある各工程のサンプルを採集した。糠や麴など，タイの発酵食品とは異なった副原料が加えられる場合が多かった。分離源とした発酵食品は pH 3.5～7.0 で，中性域のサンプルも含む。NaCl 濃度は野菜の発酵食品では低めで，大豆や魚の発酵食品で高いという傾向はタイの発酵食品と共通していたが，赤カブ漬けの下漬け液では 9%とやや高い塩濃度のサンプルも含まれた。分離源とした 15 の発酵食品のリストを表 1-2 にまとめた。

(2) 沖縄産発酵食品

沖縄県南城市，那覇市，宮古島市の市場で 2014 年 7 月に発酵食品を収集した。タイと同様に特に仕込みの時期はなく，通年製造されている発酵食品が主要であった。糠漬けが含まれるが，糠以外の副原料としては塩のみの発酵食品が多かった。分離源とした発酵食品は pH 4.0～6.5 で，中性域のサンプルも含む。NaCl 濃度は野菜の発酵食品では低めで，大豆や魚の発酵食品で高いという傾向はタイの発酵食品と共通していた。分離源とした 9 つの発酵食品のリストを表 1-2 にまとめた。

表 1-2. 分離源とした日本産発酵食品

原産地	発酵食品名	主要原材料	数	pH	NaCl (%)
富山	赤カブ漬け	野菜	5	3.5-6.0	1.8-9.3
	赤カブ	野菜	1	7.0	0
	かぶらずし	野菜	3	4.5-6.0	1.0-2.0
	カブの塩漬け	野菜	1	6.0	1.0
	キュウリの糠漬け	野菜	2	4.5-5.5	1.0-4.8
	味噌	大豆	1	5.0	15.7
	こんか漬け	魚	2	6.0	13.0
沖縄	ラッキョウの塩漬け	野菜	2	4.0-5.5	0.7-1.0
	ゴーヤの糠漬け	野菜	1	4.0-4.5	1.5
	キュウリの糠漬け	野菜	1	5.0-5.5	1.0
	味噌	大豆	2	5.0-5.5	3.0-10.5
	スクガラス	魚	1	6.0-6.5	16.0
	イカの塩辛	イカ	1	6.0	6.0
	豚肉の塩漬け	肉	1	6.5	3.5

2) 発酵食品由来微生物の分離

分離方法はタイ産発酵食品からの微生物の分離方法と同じ方法を用いた。分離培地は de Man Rogosa Sharpe (MRS) 培地 (MERCK 社製) を基礎培地とし、塩濃度 0 ~15% (5% 刻み) と pH 4.0 ~10.0 (1.5 刻み) を組み合わせた 20 種類の条件に調整した平板培地を用いた。収集した発酵食品サンプルは pH と塩濃度を測定した後、滅菌生理食塩水に約 1 g を懸濁して段階希釈し、分離培地に塗抹して嫌気条件下、30°C で培養した。嫌気培養には アネロパック・ケンキ (三菱ガス化学社製) を用いた。生育したコロニーのなかから、形態の異なるコロニーを釣菌して分離培地と同条件の MRS 平板培地に画線塗抹を繰り返すことにより純化を行った。

3) 遺伝子解析による同定

(1) 16S rRNA 遺伝子の解析

解析方法はタイ産発酵食品からの微生物の解析方法と同じ方法を用いた。全ての分離株について、ゲノム DNA を鋳型として 16S rRNA 遺伝子をターゲットに PCR 増幅し、得られた PCR 増幅産物からダイレクトシーケンシングによって配列を決定した。ダイターミネーター法 (BigDye Terminator Version 3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) におけるシーケンシング反応後、得られたサンプルはキャピラリー電気泳動により解析した (ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer, Applied Biosystems)。PCR 増幅には 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG) および 1510R (5'-GGCTACCTTGTTACGA) の 2 種類のプライマーを、シーケンシング反応には 9F と 1510R に加えて 785F (GGATTAGATACCCTGGTAGTC) と 802R (TACCAGGGTATCTAATCC) の 4 種類のプライマーを用いた (Brosius *et al.*, 1978)。

得られた 16S rRNA 遺伝子配列は BLAST 検索によって近縁種を推定するとともに、分離株同士の配列の類似度と分離源情報および分離条件を考慮して重複株を除いた。

重複を除いた分離株の 16S rRNA 遺伝子配列と BLAST 検索によって判明した近縁種基準株の配列を基に以下の方法を用いて系統解析を行い、分離株の近縁種を決定した。分離株および近縁種基準株の配列を Clustal X version 2.1 (Larkin, *et al.*, 2007) でアライメントを行い、得られたマルチプルアライメントは必要に応じて BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) でマニュアル修正した。修正したマルチプルアライメントに基づいて近隣結合法 (Saitou & Nei, 1987) によ

り系統樹を構築した。推定進化距離 (K_{nuc} 値) は木村 2 変数法により算出した (Kimura, 1980)。アライメントによるギャップや未同定塩基は計算に含めなかった。系統樹の有意性はブートストラップ・リサンプリング法 (Felsenstein, 1985) により検定した。

(2) *pheS* 遺伝子の解析

16S rRNA 遺伝子配列では識別できない *Lactobacillus plantarum* group に含まれる分離株については、*pheS* 遺伝子配列を決定し系統解析を行った。解析方法はタイ産発酵食品からの微生物の解析方法と同じ方法を用いた。

1.2. 分離株の種の多様性と構成種の比較

1.2.1. タイ産発酵食品に由来する分離株の種の構成

タイ産発酵食品に由来する分離株 (以後、タイ分離株と略す) 63 株は、*Lactobacillales* 目に属する乳酸菌 51 株と *Bacillales* 目に属する通性嫌気性菌である *Staphylococcus* 属 12 株から構成された。乳酸菌分離株は *Enterococcus* 属 (3 種 4 株)、*Lactobacillus* 属 (11 種 2 亜種 38 株)、*Pediococcus* 属 (2 種 6 株)、*Tetragenococcus* 属 (1 種 1 株)、*Weissella* 属 (2 種 2 株) の合計 5 属 19 種、*Staphylococcus* 属株は 7 種に別れた (図 1-2, 1-3, 1-4)。*Lactobacillus* 属に含まれた株のうち *L. plantarum* group に近縁な 3 株は、既知種とは異なる遺伝子型や表現性状を示したため、*L. plajomi* および *L. modestisalitolerans* の 2 新種として報告した (Miyashita *et al.*, 2015)。

1.2.1. 日本産分離株との構成種比較からみたタイ分離株の種の多様性

1) 日本産分離株の分離株数と属種の構成

富山県と沖縄県の発酵食品からはそれぞれ 94 株と 32 株を分離した（以降、富山産発酵食品に由来する分離株を富山分離株、沖縄産発酵食品に由来する分離株を沖縄分離株と略す）。富山分離株は乳酸菌 88 株と *Staphylococcus* 属 6 株、沖縄分離株は乳酸菌 25 株と *Staphylococcus* 属 7 株で構成された。

富山分離株の乳酸菌は *Carnobacterium* 属（1 種 1 株）、*Enterococcus* 属（3 種 8 株）、*Lactobacillus* 属（9 種 42 株）、*Leuconostoc* 属（3 種 12 株）、*Marinilactibacillus* 属（1 種 3 株）、*Pediococcus* 属（2 種 3 株）、*Tetragenococcus* 属（1 種 16 株）、*Weissella* 属（2 種 3 株）の合計 8 属 22 種、*Staphylococcus* 属株は 3 種に別れた。

沖縄分離株の乳酸菌は *Enterococcus* 属（3 種 3 株）、*Lactobacillus* 属（5 種 7 株）、*Leuconostoc* 属（3 種 3 株）、*Pediococcus* 属（1 種 1 株）、*Tetragenococcus* 属（2 種 3 株）、*Weissella* 属（4 種 8 株）の合計 6 属 18 種、*Staphylococcus* 属株は 4 種に別れた。

2) タイ産分離株と日本産分離株の構成種の比較

(1) 乳酸菌種の比較

タイ分離株では *Lactobacillus* 属の占める割合が 60%（63 株中 38 株）と富山・沖縄に比べて高い割合を占め、種数も 11 種 2 亜種と最も多様だった。好塩好アルカリ性乳酸菌は、タイ分離株には *Tetragenococcus* 属 1 株のみと少なく、沖縄分離株でも *Tetragenococcus* 属 3 株と少なかったが、富山分離株には *Tetragenococcus* 属 16 株に加えて

Marinilactibacillus 属 3 株の合計 19 株 (94 株中, 20%) と高い割合を占めた. 富山分離株には *Marinilactibacillus* 属の他, *Carnobacterium* 属, *Leuconostoc* 属とタイ分離株にはなかった属が含まれた. 沖縄分離株にも *Leuconostoc* 属が含まれ, タイ, 富山分離株に比べて *Weissella* 属の占める割合が高かった (32 株中 8 株, 25%).

タイ, 富山, 沖縄の 3 地域の乳酸菌分離株の合計 164 株は 40 種 2 亜種に別れ, 3 地域で共通して分離されたのは 4 種, いずれかの 2 地域から分離されたのは 11 種で, 他の地域と重複しなかった種は 26 種だった. 他地域と重複しなかった種はタイ, 富山, 沖縄でそれぞれ 11 種, 9 種, 6 種と, タイ分離株で最も多かった.

(2) *Staphylococcus* 属菌種の比較

タイ分離株における *Staphylococcus* 属の割合は 19% (63 株中 12 株) と *Lactobacillus* 属の次に高かった. 沖縄分離株においても *Staphylococcus* 属の割合は 2 番目に高く 22% (32 株中 7 株) で, 富山分離株における *Staphylococcus* 属の割合は 6% (94 株中 6 株) と低かった. タイ分離株の *Staphylococcus* 属は 7 種に別れ, 富山, 沖縄分離株に比べて最も多様だった.

タイ, 富山, 沖縄の 3 地域の *Staphylococcus* 属分離株の合計 25 株は 10 種に別れ, 3 地域で共通して分離されたのは 1 種, いずれかの 2 地域で分離されたのは 2 種, 他地域と重複しなかったのは 7 種だった. 他地域と重複しなかった種数はタイ分離株で最も多く, タイ, 富山, 沖縄でそれぞれ 4 種, 2 種, 1 種だった.

1.3. まとめ

以上より，分離株の乳酸菌と *Staphylococcus* 属細菌のどちらにおいても，他地域の分離種と重複しなかった種の割合が高く，それぞれの地域で異なる菌種が主に分離されたことが分かった．また他の地域と重複しなかった種数はタイ分離株で最も多く，日本の分離株とは種の分布が異なっていることが分かった（表 1-3）．

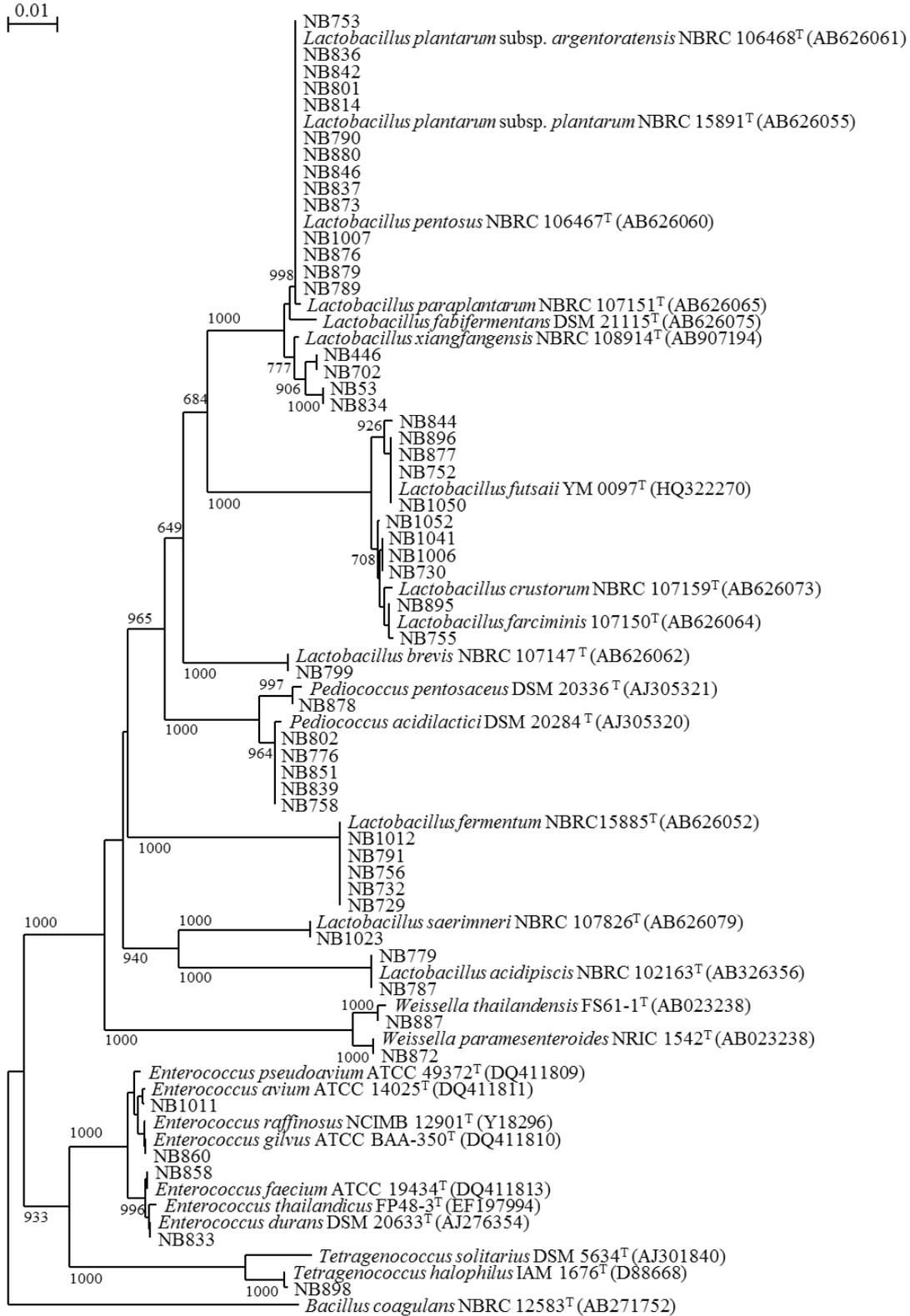


図 1-2. タイ分離株乳酸菌の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹

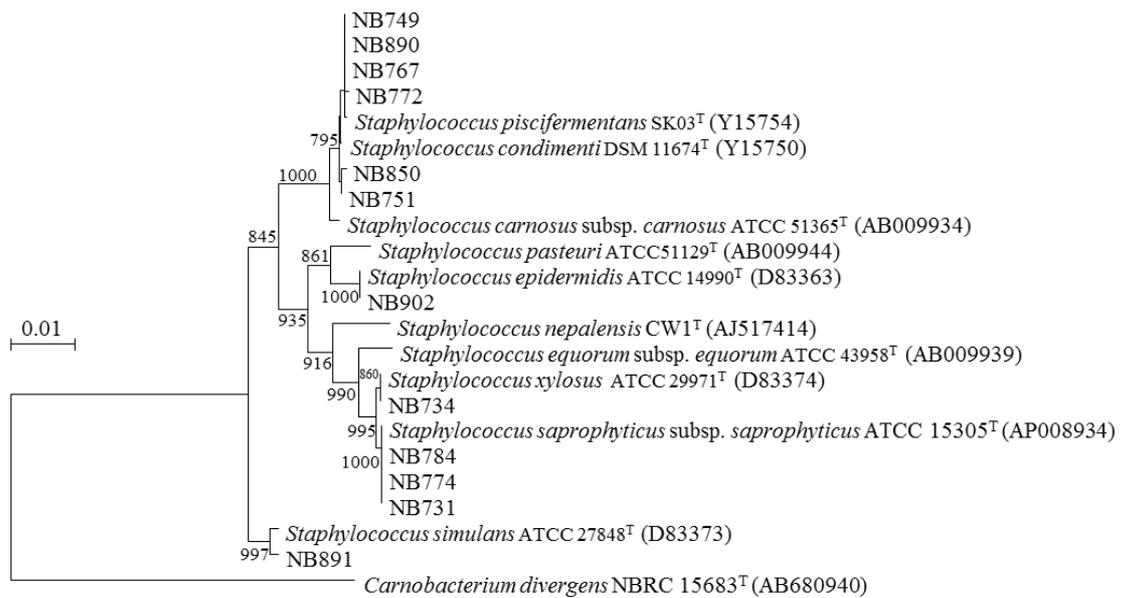


図 1-3. タイ分離株 *Staphylococcus* 属の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹

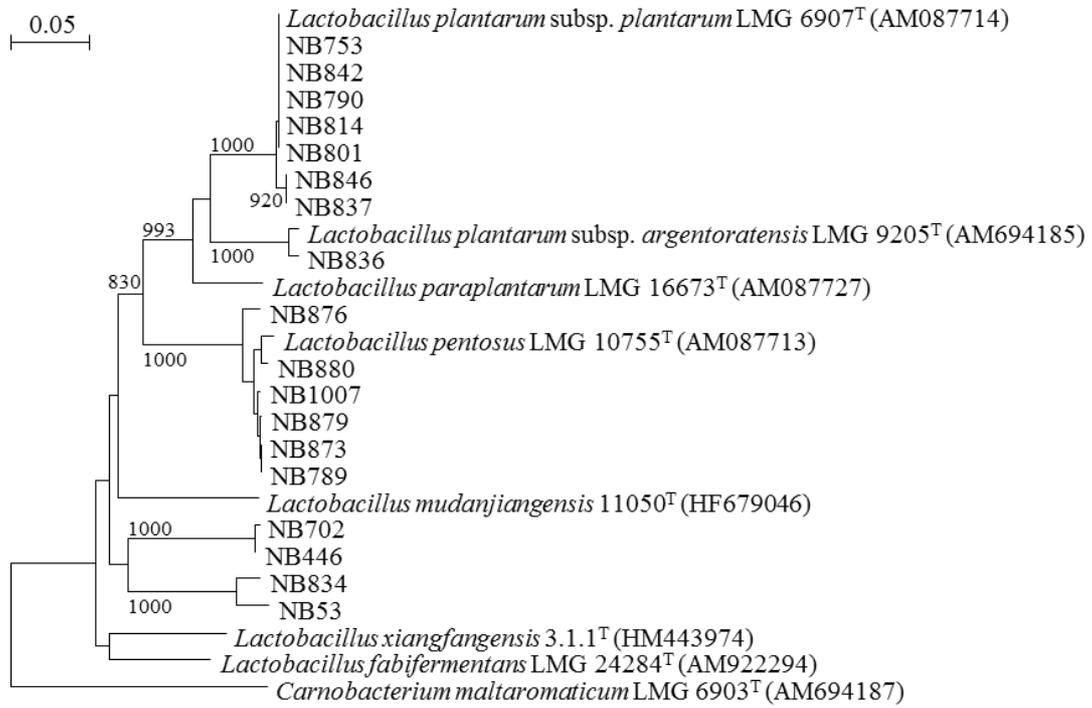


図 1-4. タイ分離株乳酸菌で *L. plantarum* group の *pheS* 遺伝子配列に基づく系

統樹

表 1-3. 属種別の分離株数

属	種	分離株数		
		タイ	富山	沖縄
<i>Carnobacterium</i>	<i>C. divergens</i>		1	
<i>Marinilactibacillus</i>	<i>M. psychrotolerans</i>		3	
<i>Enterococcus</i>	<i>E. avium</i>	1		
	<i>E. durans</i> or <i>E. faecium</i> ^a	2	6	1
	<i>E. faecalis</i>		1	1
	<i>E. gilvus</i> or <i>E. raffinosus</i> ^a	1		
	<i>E. pseudoavium</i>		1	
	<i>E. thailandicus</i>			1
<i>Tetragenococcus</i>	<i>T. halophilus</i>	1	16	2
	<i>T. solitarius</i>			1
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidipiscis</i>	2	6	
	<i>L. alimentarius</i>		5	1
	<i>L. animalis</i>			1
	<i>L. brevis</i>	1	2	1
	<i>L. curvatus</i>		7	
	<i>L. farciminis</i>	6		
	<i>L. fermentum</i>	5		
	<i>L. futsaii</i>	5		
	<i>L. modestisalitolerans</i>	2		
	<i>L. pentosus</i>	6	6	
	<i>L. plajomi</i>	1		
	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>	1		
	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	7	7	3
	<i>L. saerimneri</i>	1		
	<i>L. sakei</i>		7	1
	<i>Lactobacillus</i> sp.	1	1	
	<i>L. verismoldensis</i>		1	
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>	5		
	<i>P. inopinatus</i>		1	
	<i>P. parvulus</i>		2	
	<i>P. pentosaceus</i>	1		1
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. citreum</i>		4	1
	<i>L. kimchii</i>		1	
	<i>L. lactis</i>			1
	<i>L. mesenteroides</i>		7	1
<i>Weissella</i>	<i>W. cibaria</i>		1	3
	<i>W. hellenica</i>			1
	<i>W. paramesenteroides</i>	1		2
	<i>W. soli</i>		2	
	<i>W. thailandensis</i>	1		
	<i>W. viridescens</i>			2
小計		51	88	25
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. condimentii</i>	2		
	<i>S. condimentii</i> or <i>S. piscifermentans</i> ^a	1		
	<i>S. epidermidis</i>	1	1	3
	<i>S. equorum</i>		1	
	<i>S. nepalensis</i>		4	
	<i>S. pasteurii</i>			1
	<i>S. piscifermentans</i>	3		
	<i>S. saprophyticus</i>	3		2
	<i>S. simulans</i>	1		
	<i>S. xylosus</i>	1		1
小計		12	6	7
合計		63	94	32

^a両種に同等に近縁なため併記した。

第 2 章 タイ産発酵食品由来微生物の環境ストレスに対する耐性

2.1. 試験方法

2.1.1. 各生育試験に共通する基礎培地と測定方法

各生育試験の試験培地は、各分類群に適した培地を基礎とし、それぞれの培地に含まれる NaCl 量および pH は試験に応じて調整した。乳酸菌 (*Tetragenococcus* 属株と *Marinilactibacillus* 属株を除く) と *Staphylococcus* 属株は MRS 培地, *Tetragenococcus* 属株は MRS 培地に NaCl 6.5 %を加えた培地 (pH 7.5-8.0), *Marinilactibacillus* 属株は 2.5 % NaCl GYPFK 培地[1 % Glucose, 0.5 % Polypepton (和光純薬工業社製), 0.5 % Yeast extract (BD 社製), 0.5 % Extract Bonito (和光純薬工業社製), 2.5 % NaCl, 1 % K₂HPO₄, 0.02 % MgSO₄·7H₂O, 0.001 % MnSO₄·4H₂O, 0.001 % FeSO₄·7H₂O, pH 8.5] (Ishikawa *et al.*, 2003) を基礎培地とした。

各生育試験における吸光度は分光光度計 (Ultrospec 500 pro, アマシャム・バイオサイエンス社製) で測定した。24 時間ごとに測定波長 660 nm における吸光度を測定し、7 日目の結果を解析に用いた。

2.1.2. 生育 pH 試験

全ての分離株において、試験培地は基礎培地を pH 3.5, 4.0, 8.5, および 9.0 に調整した液体培地を用いた。基礎培地に含まれる塩濃度はそのまま維持した。pH 3.5 および pH 4.0 の培地の pH 調整には HCl を用いた。また pH 8.5 の培地では TAPS (ナカライテスク社製)

を、pH 9.0 の培地には CHES（ナカライテスク社製）を緩衝剤として用い、本培養の接種当日に調整した。前培養した培養液を 0.85 %滅菌生理食塩水で 10 倍希釈し、1 滴を試験培地に接種して 30°C で静置培養した。

2.1.3. 生育温度試験

全ての分離株において、基礎培地を試験培地として用いた。前培養した培養液を 0.85 %滅菌生理食塩水で 100 倍希釈し、1 滴を試験培地に接種して 10, 15, 45°C で静置培養した。

2.1.4. 生育 NaCl 濃度試験

Staphylococcus 属と *Tetragenococcus* 属を除く分離株においては基礎培地を NaCl 濃度 6~10% の 1% 刻み、pH 7.5 に調整した液体培地を試験培地として用いた。高い耐塩性が知られている *Staphylococcus* 属と *Tetragenococcus* 属は NaCl 濃度 10~20% の 5% 刻み、pH 7.5 に調整した液体培地を試験培地として用いた。前培養した培養液 1 滴を試験培地に接種して 30°C で静置培養した。

2.2. タイ産発酵食品由来微生物の耐性の分布

2.2.1. タイ分離株の耐性の分布

タイ産発酵食品に由来する分離株について、生育試験結果の OD660 値に基づいて箱ひげ図を作成した。タイ分離株は酸性域での生育に耐性をもつ株が多く、また高塩濃度や高アルカリ性、高温で生育可能な株が存在することが分かった（図 2-1a）。

各生育条件下での培養 7 日目の OD660 値が 1.0 以上を示した株数の割合 (%) をみると (表 2-1), タイ分離株は pH 3.5 や pH 4.0 の酸性域や pH 8.5 で生育可能な株が過半数を占め, pH 9.0 や 10 % NaCl, 45°C の条件下ではそれぞれ 2 割程度の株が生育可能だった。

タイ分離株で酸耐性 (pH 3.5, pH 4.0 で OD660 値 1.0 以上の生育) を示した株は全て乳酸菌で, 高温条件下 (45°C) においても同様に乳酸菌のみが生育を示した。乳酸菌では pH 9.0 で生育可能な株数は pH 8.5 に比べて急激に減少した。一方, タイ分離株の中でアルカリ耐性 (pH 9.0) や高塩濃度耐性 (10 % NaCl) を示した菌株は *Staphylococcus* 属株が多数を占め, それぞれに 9 株と 11 株が耐性を示した。また *Staphylococcus* 属分離株では pH 8.5 および pH 9.0 のどちらの条件下でも生育可能な株数にほとんど違いが見られなかった (表 2-2)。

2.2.2. 日本産分離株との耐性の分布の違い

富山分離株と沖縄分離株それぞれの生育試験結果の OD660 値に基づいて作成した箱ひげ図 (図 2-1b, c) をタイ分離株の箱ひげ図と比較すると, 富山分離株と沖縄分離株は類似した結果を示し, タイ分離株とは酸性条件下での生育において顕著な違いが見られた。富山分離株と沖縄分離株はタイ分離株とは異なり酸耐性を示す株が少ない上にばらつきが多く, 一方でタイ株と同様に pH 8.5 や pH 9.0 のアルカリ域で生育可能な株や, 10 % NaCl 存在下で生育可能な株が含まれた。

タイ分離株で 50 % を超えた酸性域で生育可能な株の割合は, 富山と沖縄の分離株では 13 ~ 26 %, 45°C の条件下ではタイ分離株の 21 % に対して富山と沖縄分離株で 5 % と 6 % であ

り、大きな差がみられた。一方で、10℃で生育可能な株はタイ分離株では見つからなかったのに対して、富山と沖縄の分離株ではそれぞれ 21 %と 16 %と、特に富山分離株で低温耐性をもつ株が多いことが分かった。pH 8.5 で生育可能な株の割合は富山分離株でやや低く、pH 9.0 のアルカリ域や 10 % NaCl, 15℃の条件下における生育可能な株の割合には大きな差は無かった (表 2-1)。

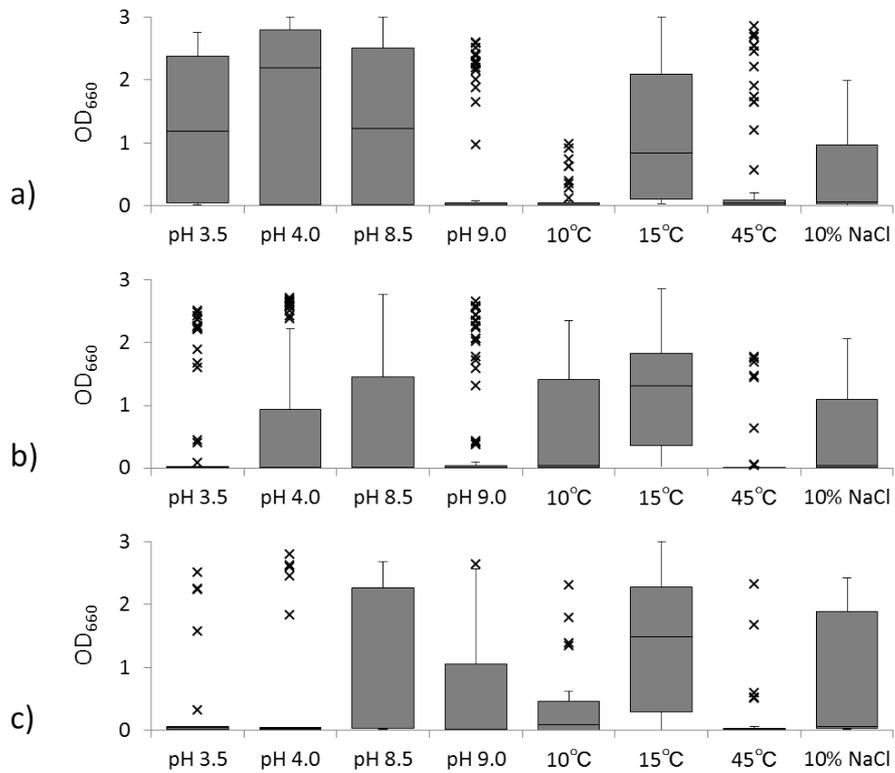


図 2-1. 原産地による分離株の各ストレス条件下における生育の比較

a), タイ分離株 ; b), 富山分離株 ; c), 沖縄分離株.

各条件下で培養 7 日目に測定した OD₆₆₀ に基づき作成した箱ひげ図.

表 2-1. 各ストレス条件における耐性株の割合 (%)

原産地	各条件下における耐性株数 ^a と割合(%)							
	pH 3.5	pH 4.0	pH 8.5	pH 9.0	10°C	15°C	45°C	NaCl 10%
タイ	33 ^b (52) ^c	39 (62)	32 (51)	14 (22)	0 (0)	27 (43)	13 (21)	15 (24)
富山	13 (14)	24 (26)	31 (33)	17 (18)	20 (21)	54 (57)	5 (5)	28 (30)
沖縄	4 (13)	5 (16)	14 (44)	8 (25)	5 (16)	18 (56)	2 (6)	10 (31)

^aOD 1.0 以上を示した分離株を耐性株とした.

^b株数.

^c原産地ごとの試験した株数に対する耐性株の割合. 試験した株数はタイ, 63 株; 富山, 94 株; 沖縄, 32 株.

10, 15, または 45°Cでの生育試験は pH 6.2, 0 % NaCl 条件下で, pH 3.5, 4.0, 8.5, または 9.0 での生育試験は 30°C, 0 % NaCl 条件下で, 10 % NaCl 存在下での生育は pH 7.5, 30°Cで培養した.

表 2-2. タイ分離株の乳酸菌と *Staphylococcus* 属の各ストレス条件における耐性

株数

ストレス条件:	耐性株数 ^a	
	乳酸菌	<i>Staphylococcus</i> 属
45℃	13	0
pH 3.5	33	0
pH 4.0	39	0
pH 8.5	22	10
pH 9.0	5	9
10% NaCl	4	11

^a 試験した乳酸菌 51 株, *Staphylococcus* 属 12 株のうち, OD 1.0 以上を示した株数.

45℃での生育試験は pH 6.2, 0 % NaCl 条件下で, pH 3.5, 4.0, 8.5, または 9.0 での生育

試験は 30℃, 0 % NaCl 条件下で, 10 % NaCl 存在下での生育は pH 7.5, 30℃で培養した.

2.3. タイ産発酵食品由来乳酸菌分離株の耐性

2.3.1. それぞれの環境ストレスに対する耐性

1) 酸耐性

タイ産発酵食品に由来する乳酸菌 51 株のうち 33 株が pH 3.5 に耐性を示し、タイ分離株乳酸菌の 65%と高い割合を占めた。酸耐性 (pH 3.5) を示した 33 株のうち 31 株が *Lactobacillus* 属で、2 株が *Pediococcus* 属だった。一方で酸耐性を示さなかった 18 株には *Enterococcus* 属 (4 株) や *Pediococcus* 属 (4 株), *Tetragenococcus* 属 (1 株), *Weissella* 属 (2 株) が含まれ、*Lactobacillus* 属は 7 株と占める割合が低かった。

酸耐性 (pH 3.5) を示した株は分離源とした発酵食品に偏り無く分布しており、分離源に共通する弱酸性 (pH 4.5 - 5.0) は分離株の酸耐性との関連性が考えられるが、分離株が耐性を示した pH 3.5 とは開きがあり、他にも酸耐性を獲得した要因があると推測される。

2) アルカリ耐性

乳酸菌では pH 9.0 に耐性を示した株は 5 株と少なく、そのうち 4 株は *Enterococcus* 属、1 株は *L. pentosus* だった。pH 8.5 に耐性を示した株は 22 株であり、pH 9.0 で生育可能な株数は pH 8.5 比べて急激に減少したことが分かった。pH 9.0 に耐性を示さず pH 8.5 までの耐性を示した 17 株のうち 14 株は *Lactobacillus* 属 (*L. farciminis*, 5 株; *L. plantarum*, 5 株; *L. pentosus*, 4 株) で、この他の 3 株は *Pediococcus acidilactici*, *Weissella paramesenteroides*, *Tetragenococcus halophilus* がそれぞれ 1 株ずつだった。

3) 塩耐性

10% NaCl に対する耐性を示した乳酸菌は、好塩性の *Tetragenococcus* 属 1 株を含む 4 株のみだった。好塩性乳酸菌を除く乳酸菌分離株 50 株において、6%~9% NaCl 存在下で生育を示した株はそれぞれ 40 株 (80%)、35 株 (70%)、26 株 (52%)、14 株 (28%) だった。10%を越える塩濃度に耐性を示す株は好塩性の株を含めて 4 株と少ないものの、8%までの塩濃度には半数以上の乳酸菌が耐性を示し、6%においては 80%と非常に高い割合となった。

4) 低温耐性と高温耐性

通年高温多湿であるタイの発酵食品に由来する株には高温耐性を示す株は存在したが、低温耐性を示す株は見つからなかった。タイ分離株の中で高温耐性を示したのは乳酸菌 13 株のみで、*Lactobacillus fermentum* と *Pediococcus acidilactici* が 5 株ずつと多数を占めた。

2.3.2. 各耐性の関連性

1) 酸耐性と高温耐性

タイ分離株で乳酸菌のみが示した pH 3.5 と 45°C への耐性について、それぞれの条件下における乳酸菌の OD660 値を基に作成した散布図から、酸耐性と高温耐性の両方を持つ株は乳酸菌の中でも少数であり、ほとんどの株は酸耐性または高温耐性のどちらか一方を有することが示された (図 2-2)。

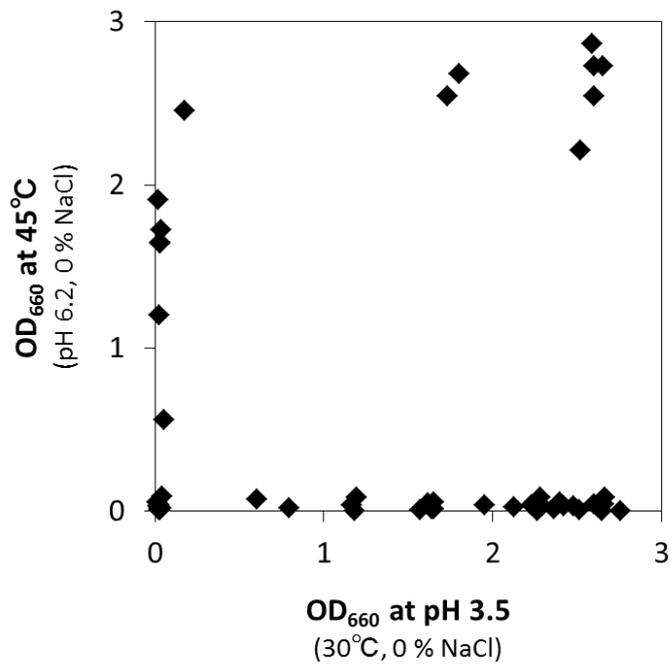


図 2-2. タイ分離株の乳酸菌が示す pH 3.5 と 45°C における生育

散布図は pH 3.5 (30°C, 0% NaCl) と 45°C (pH 6.2, 0% NaCl) でそれぞれ培養 7 日目に測定した OD₆₆₀ に基づき作成した。

2) アルカリ耐性と高温耐性

タイ分離株の乳酸菌で pH 9.0 に生育可能なアルカリ耐性を示した 5 株は、10 % NaCl 存在下では生育できず、酸耐性も示さないが、45℃での生育には耐性を示す株が *Enterococcus* 属で 2 株存在した。

3) pH 8.5 までのアルカリ耐性と酸耐性

タイ分離株の乳酸菌で比較的多かった pH 9.0 には生育しないものの pH 8.5 までの耐性を示した株は、他の生育条件に対する耐性において、pH 9.0 へも耐性を示した株とは違いがみられた。pH 8.5 までの耐性を示した 17 株のうち 8 割 (14 株) を占めた *Lactobacillus* 属は、10 % NaCl 存在下および 45℃では生育できなかったが pH 3.5 の酸性域でも生育が可能だった。*Lactobacillus* 属以外の 3 株は pH 3.5 には耐性を示さなかった。これら 3 株のうち、*Pediococcus acidilactici* と *Tetragenococcus halophilus* の 2 株は 10 % NaCl に耐性を示し、*P. acidilactici* は 45℃でも生育した。

4) 塩耐性とアルカリ耐性

アルカリ耐性 (pH 9.0) を示したタイ分離株の 5 株中 4 株が塩濃度の高い大豆の発酵食品 (18% NaCl) から分離されたにも拘わらず塩耐性は示さなかった。アルカリ性や塩ストレスに対する耐性機構にはイオンポンプの働きが重要であるなど共通する部分が多く、また低分子有機化合物の取り込み・排出がストレスに対する抵抗性を与えていることが知られている (澤渡ら, 2010 ; 杉本ら, 2010)。アルカリ耐性を示した株の多くは大豆または魚の

発酵食品に由来した。これらの発酵食品はタンパク質を豊富に含むほか、塩分はもちろん米などの副原料が加えられている場合が多く、また発酵によってアミノ酸などの分解産物も多く含まれると考えられ、タイ分離株が示したストレス耐性には分離源の塩濃度や pH 以外の要因が関わっていることが推測される。

5) タイ分離株の乳酸菌が示した耐性の組み合わせ

タイ分離株の乳酸菌が示した耐性の組み合わせをみると、酸耐性 (pH 3.5) と高温耐性 (45°C)、アルカリ耐性 (pH 9.0) と高温耐性、酸耐性と pH 8.5 までのアルカリ耐性をそれぞれ同時に示す株が存在した。

タイ分離株の乳酸菌の多くが酸耐性または高温耐性を示す中、その両方を示した株は *Lactobacillus fermentum* と *Pediococcus acidilactici* だった。乳酸菌の中では少数だったアルカリ耐性に加えて高温耐性も示したのは *Enterococcus* 属、pH 8.5 までのアルカリ耐性と酸耐性の組み合わせを示したのは *Lactobacillus farciminis*, *L. pentosus*, *L. plantarum* subsp. *plantarum* だった。以上より、タイ分離株の持つ耐性には種レベルの傾向があることが明らかとなった。

6) 基準株との比較

P. acidilactici の基準株は分離株と同じく酸耐性と高温耐性を示したが、*L. fermentum* の基準株は高温耐性と pH 4.0 での生育は示したものの pH 3.5 への酸耐性はみられず、タイ分離株は基準株の示す酸耐性がより強化された耐性を示したといえる。*Enterococcus* 属

の基準株は分離株と同様にアルカリ耐性を示したが高温での生育は見られなかった。 *L. farciminis* の基準株は分離株と同様に pH 8.5 までのアルカリ耐性と酸耐性のどちらも示したが、 *L. pentosus* と *L. plantarum* subsp. *plantarum* の基準株は酸耐性は示したものの pH 8.5 での生育は見られなかった。

以上のように、タイ分離株は基準株が示した種としての性質がそのまま反映されている場合がみられた一方、基準株が示さなかった耐性やより強化された耐性を示した場合もみられた。

2.3.3. タイ産発酵食品由来乳酸菌分離株が示した耐性の日本産分離株との比較

1) 塩耐性

10% NaCl に対する耐性を示す乳酸菌株はタイ・富山・沖縄の分離株の全てにおいて少なかったものの、8% NaCl に耐性を示す株が富山分離株で 28%、沖縄分離株で 0% に対してタイ分離株の乳酸菌では 52% と半数を超えており、顕著に高い割合であった。分離源とした発酵食品の NaCl 濃度 (%) もタイ産発酵食品で高塩濃度のものが多いことが影響していると考えられる (表 2-3)。

2) 酸耐性と高温耐性

タイ分離株の一部の乳酸菌が示した酸性かつ高温での生育における全分離株の分布を調べるために、富山株と沖縄の分離株も含めた全ての分離株について、pH 3.5 と 45℃での

OD660 値を基に散布図を作成した (図 2-3). 酸耐性または高温耐性のどちらか一方を示す株は富山分離株および沖縄分離株でも見つかったが, 酸耐性と高温耐性の両方を併せ持つ株はタイ分離株の乳酸菌だけであることが分かった.

耐性を示した株の菌種をみると (表 2-4), 酸耐性と高温耐性の両方を示したのは *Lactobacillus fermentum* または *Pediococcus acidilactici* だった. 高温耐性を示さず酸耐性を示した株はタイ分離株には 7 種 2 亜種が含まれ, 富山の 3 種, 沖縄の 2 種と比較しても顕著に多様であり, *L. brevis* と *L. plantarum* subsp. *plantarum* はタイ, 富山, 沖縄分離株で共通していて, *L. pentosus* はタイと富山で重複した. これ以外の菌種は全てタイ分離株であり, 耐性の有無に関わらず富山と沖縄分離株では分離されなかった菌種だった.

酸耐性を示さず高温耐性のみを示した分離株では *Enterococcus durans / faecium* が 3 地域で共通した菌種で, これ以外の菌種はそれぞれの地域で重複しなかった. 同種でありながら原産地によって耐性の有無が異なるという種は見つからず, 分離種の分布自体に違いがあることから, 3 地域の比較 (図 2-1 と表 2-1) でみられた耐性の違いは種の違いに現れていると考えられる. 一方でタイ分離株の *P. acidilactici* では pH 3.5 に耐性を示す株と示さない株が混在するなど, 同じ地域で分離された同種内に耐性の多様性がある種が存在した. また分離株が示した耐性は, ほとんどの近縁種基準株においても同様に観察されたが, *L. brevis* と *L. fermentum* の基準株は pH 3.5 で生育せず, 基準株と分離株で異なる生育特性がみられた.

表 2-3. 塩耐性を示す乳酸菌株の割合 (%)

	耐性株の割合 (%) ^a		
	タイ	富山	沖縄
6% NaCl	80	79	50
7% NaCl	70	61	27
8% NaCl	52	28	0
9% NaCl	28	18	0
10% NaCl	6	10	0

^aOD 1.0 以上を示した分離株を耐性株とし、原産地ごとの試験した乳酸菌分離株数に対する耐性株の割合を示す。試験した乳酸菌分離株数はタイ, 51 株; 富山, 88 株; 沖縄, 25 株。

表 2-4. pH 3.5 と 45°C に耐性を示した分離株の種と株数

	種	耐性株数		
		タイ	富山	沖縄
ストレス条件:				
pH 3.5	<i>Lactobacillus brevis</i>	1 ^a /1 ^b	2/2	1/1
	<i>Lactobacillus farciminis</i>	5/6		
	<i>Lactobacillus futsaii</i>	3/5		
	<i>Lactobacillus modestisalitolerans</i>	2/2		
	<i>Lactobacillus pentosus</i>	6/6	4/6	
	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i>	1/1		
	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	7/7	7/7	3/3
	<i>Lactobacillus</i> sp.	1/1		
	pH 3.5 および 45°C	<i>Lactobacillus fermentum</i>	5/5	
<i>Pediococcus acidilactici</i>		2/5		
45°C	<i>Enterococcus durans</i> or <i>E. faecium</i> ^c	2/2	5/6	1/1
	<i>Lactobacillus animalis</i>			1/1
	<i>Lactobacillus saerimneri</i>	1/1		
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	3/5		

^aOD 1.0 以上を示した分離株を耐性株とした。種ごとの耐性株数を示す。

^b試験した各原産地の分離株の中で同種に含まれる分離株の総数。

^c両種に同等に近縁なため併記した。

3) アルカリ耐性と高温耐性

アルカリ耐性と高温耐性を同時に示す株は、富山と沖縄の分離株でも存在し、タイ分離株と同様に *Enterococcus* 属株だった。

4) pH 8.5 までのアルカリ耐性と酸耐性

タイ分離株の乳酸菌の複数でみられた酸性域から pH 8.5 までの耐性を示した株は沖縄分離株では見つからず、富山分離株では *L. pentosus* の一部の株が示したのみだったことから、広い pH 範囲への適応はタイ分離株の顕著な特徴のひとつと考えられる。

5) 低温耐性と高温耐性

通年高温多湿であるタイの発酵食品に由来する株に高温耐性を示す株が多く、低温耐性を示す株は見つからず、冬季に仕込みを行う富山の発酵食品に由来する株に低温耐性を示す株が多かったことは、外気温の影響が強く出ていると推測できる。しかし沖縄株では外気環境は比較的富山県よりもタイに類似しているにも拘わらず、高温耐性または低温耐性を示した株の割合は富山分離株に近かった。日本の発酵食品の製造現場やそれらの販売時における温度管理と、タイでの開放的な製造方法や温度管理がされていないローカルな市場での販売形態の違いに起因する影響を考慮する必要がある。

2.3.4. タイ産発酵食品由来乳酸菌分離株における特徴的な耐性

タイ分離株の乳酸菌には 10% NaCl に対する耐性を示す乳酸菌株は少ないものの、6~9%

NaCl に耐性を示す株の割合は日本産分離株の乳酸菌に比べて顕著に高く、中程度の耐塩性を示す株が多いことがわかった。基準株と分離株で同様に酸耐性と高温耐性を示した *P. acidilactici* および pH 8.5 までのアルカリ耐性と酸耐性を示した *L. farciminis* は、本研究で供した富山と沖縄の発酵食品からは分離されておらず、また *L. farciminis* においては、既報のタイ分離株の乳酸菌 410 株中 91 株と、全体の 2 割を超える株が *L. farciminis* に近縁な株であったことから、タイ産発酵食品の環境に適応した種である可能性が考えられる (Miyashita *et al.*, 2012)。少数ながらタイ分離株のみで見つかった酸性と高温の両方に対する耐性と、日本産の分離株ではほとんど見つからずタイ分離株で多数見つかった酸性から pH 8.5 までのアルカリ性に生育可能な広い pH 範囲に対する適応能力は、タイ分離株に特徴的なストレス耐性と考えられる。

2.4. タイ産発酵食品由来 *Staphylococcus* 属分離株の耐性

2.4.1. それぞれの環境ストレスに対する耐性

タイ産発酵食品に由来する *Staphylococcus* 属株 12 株で、酸耐性 (pH 3.5 と pH 4.0) や低温耐性、高温耐性を示す株はなかった。一方、アルカリ耐性 (pH 9.0) と塩耐性 (10 % NaCl) はそれぞれにほとんどの株 (9 株と 11 株) が耐性を示した。

2.4.2. アルカリ耐性と塩耐性の関連性

タイ分離株の *Staphylococcus* 属株が示した 10 % NaCl と pH 9.0 への耐性について、それぞれの条件下における OD660 値を基に作成した散布図から、ほとんどの株がアルカリ耐

性と高塩濃度耐性の両方を有するという特徴を示した (図 2-4).

高塩濃度耐性とアルカリ耐性を示したタイ分離株の *Staphylococcus* 属株は全て塩濃度の高い発酵食品 (15 - 30 % NaCl) から分離されているため、高塩濃度耐性は分離源の塩濃度と相関性があると考えられるが、どの分離源も弱酸性であり、分離源の pH はアルカリ耐性に影響があるとは考えられない。一方で、アルカリ性と高塩濃度に対する耐性機構は似ているという報告があることから、高塩濃度に適応したことで結果的にアルカリ耐性を獲得した可能性がある (藤浪ら, 2012)。

Staphylococcus 属株がアルカリ性および高塩濃度に対する耐性機構の類似した両耐性を同時に示す一方で、前述したタイ分離株の乳酸菌では、pH 9.0 のアルカリ性に耐性を示す株は高塩濃度の発酵食品から分離されたにも拘わらず、10% NaCl への耐性は示さなかった。耐性の組み合わせに顕著な違いがみられ、分類群による耐性機構の違いが推測された。

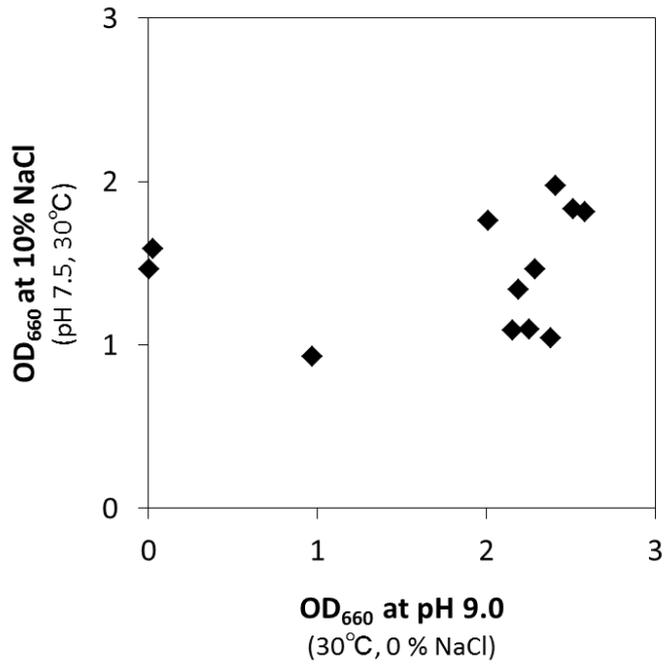


図 2-4. タイ分離株の *Staphylococcus* 属株が示す pH 9.0 と 10% NaCl 存在下における生育

散布図は pH 9.0 (30°C, 0% NaCl) と 10% NaCl (pH 7.5, 30°C) でそれぞれ培養 7 日目に測定した OD₆₆₀ に基づき作成した。

2.4.3. 日本産分離株との比較とタイ産発酵食品由来 *Staphylococcus* 属分離株の耐性の特徴

タイ分離株の *Staphylococcus* 属株が示したアルカリ性かつ高塩濃度での生育における全分離株の分布を調べるために、乳酸菌も含めた全ての分離株について、pH 9.0 と 10 % NaCl 存在下での OD660 値を基に散布図を作成した (図 2-5)。富山と沖縄の分離株でも両耐性を示す株が見つかり、それらの株の分類群には *Staphylococcus* 属が 3 地域で共通して含まれていた。3 地域で共通していた *Staphylococcus* 属について pH 9.0 と 10 % NaCl に耐性を示した株の菌種を比較すると (表 2-5)、3 地域ともに種に多様性がみられるが、両耐性を示した株の菌種はタイ分離株で最も多様だった。タイ分離株の *S. condimentii* や沖縄分離株の *S. epidermidis* では pH 9.0 に対して、富山分離株の *S. nepalensis* では 10 % NaCl に対して、それぞれ耐性を示す株と示さない株が混在するなど、同じ地域で分離された同種内に耐性の多様性がある種が存在した。

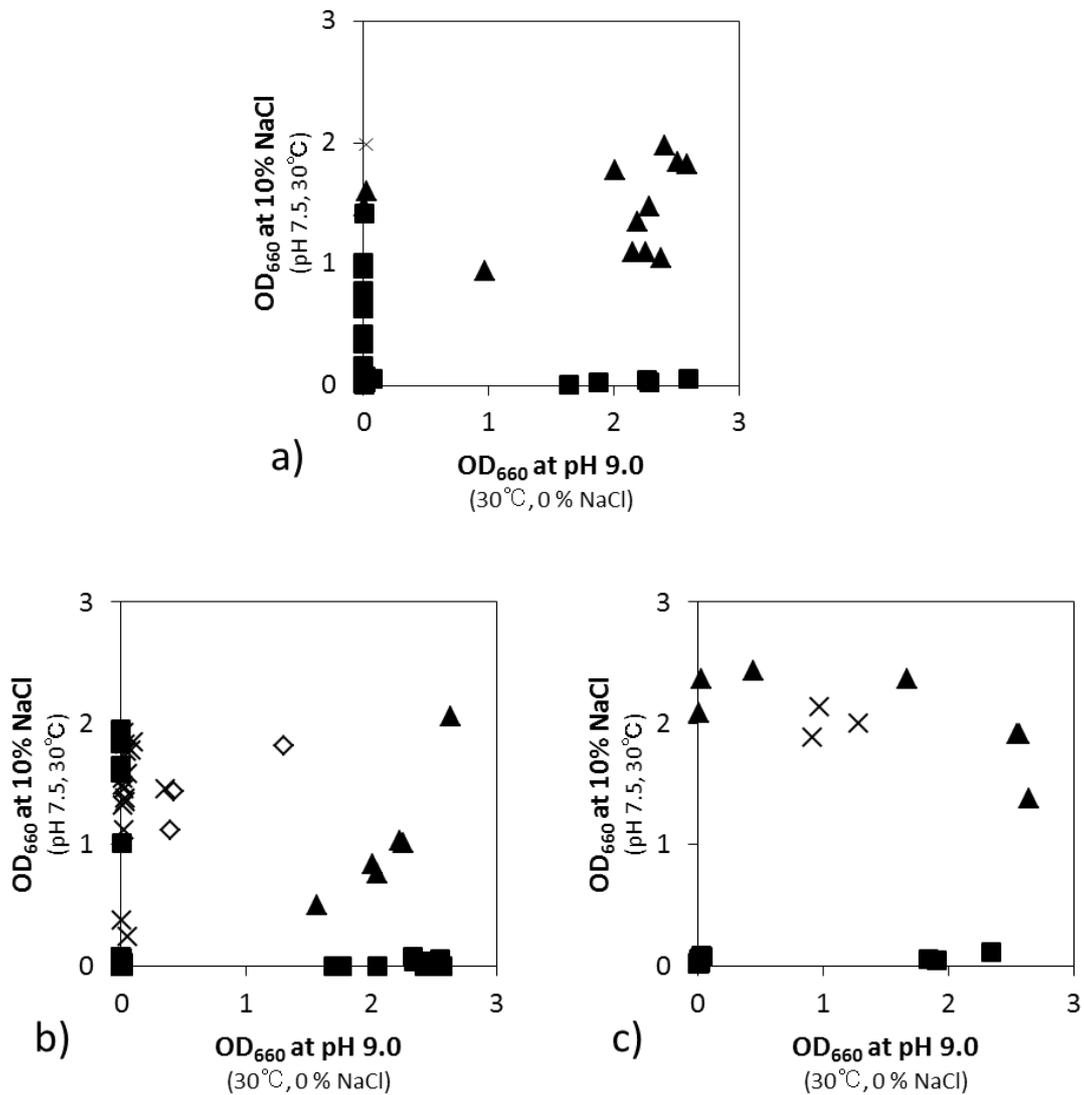


図 2-5. 全分離株の pH 9.0 と 10% NaCl 存在下における生育

a), タイ分離株; b), 富山分離株; c), 沖縄分離株. ▲, *Staphylococcus* 属; ×, *Tetragenococcus* 属; ◇, *Marinilactibacillus* 属; ■, 乳酸菌 (*Tetragenococcus* 属と *Marinilactibacillus* 属を除く).

散布図は pH 9.0 (30°C, 0% NaCl) と 10% NaCl (pH 7.5, 30°C) でそれぞれ培養 7 日目に測定した OD_{660} に基づき作成した.

表 2-5. pH 9 と 10% NaCl に耐性を示した *Staphylococcus* 属分離株の種と株数

種	耐性株数		
	タイ	富山	沖縄
ストレス条件:			
pH 9.0	<i>S. equorum</i>		1/1
	<i>S. nepalensis</i>		2/4
pH 9.0 および 10 % NaCl	<i>S. condimentii</i>	1 ^a /2 ^b	
	<i>S. epidermidis</i>	1/1	1/1
	<i>S. piscifermentans</i>	3/3	
	<i>S. saprophyticus</i>	3/3	
	<i>S. simulans</i>	1/1	
	<i>S. nepalensis</i>		2/4
	<i>S. xylosum</i>		
10 % NaCl	<i>S. condimentii</i>	1/2	
	<i>S. condimentii</i> or <i>S. piscifermentans</i> ^c	1/1	
	<i>S. epidermidis</i>		2/3
	<i>S. pasteurii</i>		1/1

^aOD 1.0 以上を示した分離株を耐性株とした. 種ごとの耐性株数を示す.

^b試験した各原産地の分離株の中で同種に含まれる分離株の総数.

^c両種に同等に近縁なため併記した.

2.5. まとめ

タイ分離株には酸耐性や高温耐性を有する乳酸菌株が数多く存在し、両耐性を同時に有する株はタイ分離株の乳酸菌の一部にしか存在しなかった。また酸性域からアルカリ域までの広い pH 範囲に適応した株も複数みられ、10% NaCl に対する耐性を示す乳酸菌株は少ないものの 6~9% の中程度の塩耐性を示す株も多く、タイ分離株の乳酸菌は日本産の株とは異なる特徴を有していた。アルカリ耐性や 10% の高塩濃度耐性をもつ株はタイ、富山、沖縄の分離株全てから見つかり、タイ分離株では *Staphylococcus* 属株がその特徴を示し、ほとんどの *Staphylococcus* 属株が両方の耐性を示した。富山分離株と沖縄分離株の *Staphylococcus* 属株も、その半数以上がアルカリ耐性や高塩濃度耐性の両耐性を示し、分離株に存在した *Staphylococcus* 属細菌の 10 種全てでアルカリ性または高塩濃度に耐性のある株が見つかったことから、*Staphylococcus* 属細菌にはこれらの耐性をもつ株が広く分布していると考えられる。タイ分離株の *Staphylococcus* 属株では有する耐性がアルカリ耐性と高塩濃度耐性であるのに対し、タイ分離株の乳酸菌では酸耐性と高温耐性と異なる特徴を示すことから、それぞれ違う発酵段階に役割を持つと推測できる。

分離株が示したそれぞれの耐性は原産地との相関性はみられず、3 地域の分離種は重複する種自体が少なかったことから、分離株の性質の違いは種の違いに現れていると考えられる。タイ分離株に特徴的であった酸耐性と高温耐性を示した *P. acidilactici* および pH 8.5 までのアルカリ耐性と酸耐性を示した *L. farciminis* は、本研究で供した富山と沖縄の発酵食品からは分離されていないことから、タイ産発酵食品の環境に適応した種が発酵に関わっていると考えられる。一方で、タイ分離株の *P. acidilactici* では pH 3.5 に耐性を示す

株と示さない株が混在し、*S. condimentii* では pH 9.0 に対して耐性を示す株と示さない株が混在するなど、同種の株でも耐性に多様性がみられる場合もあり、株レベルでの性質の違いが確認された。

第3章 タイ産発酵食品由来微生物の糖の発酵性

3.1. 試験方法

好塩好アルカリ性乳酸菌を除いたタイ分離株 62 株，富山分離株 75 株，沖縄分離株 29 株を供試菌株として，糖の発酵性を API50CH（シメックス・バイオメリユー社製）を用いて調べた．方法は製品添付の説明書に準じた．乳酸菌分離株は MRS 培地，*Staphylococcus* 属株は 802 培地 [1% Polypepton（和光純薬工業社製），0.2% Yeast extract（BD 社製），0.1% MgSO₄・7H₂O，pH 7.0] を用いて前培養した．それぞれ液体培地で前培養した菌体を集菌し，滅菌生理食塩水で 2 回洗浄した後，API50CHL 培地に懸濁した．菌懸濁液を API50CH プレートに接種後 30°C で培養し，24 時間，48 時間，72 時間後に色調の変化を目視により観察・記録した．48 時間後と 72 時間後ではどの株においても結果に差が見られなかったため，製品添付の説明書で推奨されている 48 時間後の結果を解析に用いた．糖発酵性試験の結果を色調変化によって判定した陰性 (-)，弱陽性 (w)，陽性 (+) を，箱ひげ図には 0，1，2，に，クラスター解析には 0，0.5，1.0 にそれぞれ置き換えた数値を用いた．クラスター解析はユークリッドの距離を算出し，アルゴリズムは UPGMA 法を用いた (BioNumerics Ver.4.61, Applied Maths)．

3.2. タイ産発酵食品由来微生物の糖の発酵パターン

糖発酵性試験の結果に基づいて作成した箱ひげ図を，タイ分離株と基準株で比較した結果，顕著な違いは見られなかった (図 3-1)．タイ分離株の糖発酵性を，分離源である発酵食品の素材別に作成した箱ひげ図で比較すると，野菜や大豆の発酵食品から分離した株で

は発酵可能な糖の種類が多く、魚の発酵食品から分離した株では発酵可能な糖の種類が少ないことが分かった（図 3-2）。それぞれに由来する分離株において 50%以上の株が陽性を示した糖の数は 49 種類中それぞれ 20, 22, 13 種類だった。グルコースなどの六炭糖やトレハロースなどのオリゴ糖を発酵可能な分離株は、どの発酵食品に由来する分離株にも共通して高い割合で含まれていた。糖発酵性に陽性を示す分離株の割合に差がみられた糖をみると、野菜や大豆の発酵食品由来株では魚の発酵食品由来株に比べて amygdalin, L-arabinose, arbutin, gluconate, D-melibiose, D-ribose といった主に五炭糖やグリコシドの発酵性に陽性を示す株の割合が高かった。野菜の発酵食品由来株では前述の糖に加えて五炭糖である D-xylose の発酵性に陽性を示す株が多く、大豆の発酵食品由来株では D-mannitol, D-raffinose, D-sorbitol といった糖アルコールの発酵性に陽性を示す株が多く含まれた。野菜の発酵食品から分離した株は 10 種（20 株）、大豆の発酵食品からは 7 種（15 株）、魚の発酵食品からは 14 種（24 株）で構成され、魚の発酵食品からは最も多様な種が分離されたが、分離株の種の多様性は発酵可能な糖の多様さに比例していなかった。魚の発酵食品から分離した種には *Staphylococcus* 属株が多数を占めていた（6 種 9 株）。タイ分離株の乳酸菌と *Staphylococcus* 属株についてそれぞれ作成した箱ひげ図を比較すると、発酵可能な糖の種類はタイ分離株の乳酸菌で顕著に多様だった（図 3-3）。生育に糖が必須ではない *Staphylococcus* 属株は、糖が少なくタンパク質が豊富な魚の発酵食品に適応していると考えられ、構成種にこの属の割合が高いことが、魚の発酵食品由来株全体の発酵可能な糖の種類が少ない要因だと考えられる。一方で野菜や大

豆の発酵食品から分離した株で発酵可能な糖の種類が多いのは、植物基質が含む多様で量的には少ない糖源を資化して発酵を進めるのに適応しているためと推測できる。

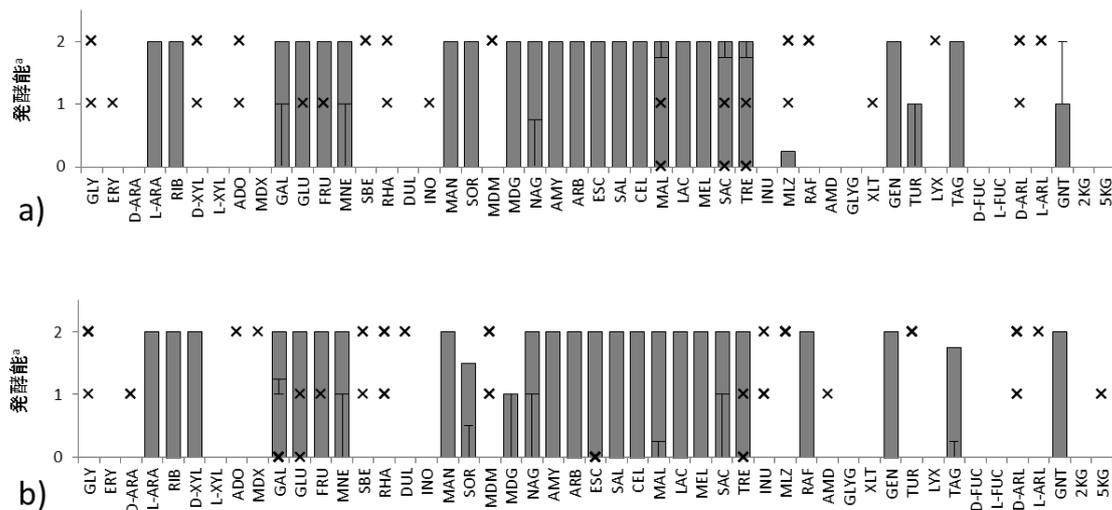


図 3-1. 糖発酵パターンのタイ分離株と基準株の比較

a), 基準株 ; b), タイ分離株.

^a 色調変化によって判定した陰性 (-), 弱陽性 (w), 陽性 (+)をそれぞれ 0, 1, 2, に置き換えた数値を解析に用いた.

GLY, glycerol; ERY, erythritol; D-ARA, D-arabinose; L-ARA, L-arabinose; RIB, D-ribose; D-XYL, D-xylose; L-XYL, L-xylose; ADO, D-adonitol; MDX, methyl-β- D-xylopyranoside; GAL, D-galactose; GLU, D-glucose; FRU, D-fructose; MNE, D-mannose; SBE, L-sorbose; RHA, L-rhamnose; DUL, dulcitol; INO, inositol; MAN, D-mannitol; SOR, D-sorbitol; MDM, methyl-α-D-mannopyranoside; MDG, methyl-α-D-glucopyranoside; NAG, N-acetyl glucosamine; AMY, amygdalin; ARB, arbutin; ESC, esculin ferric citrate; SAL, salicin; CEL, D-cellobiose; MAL, D-maltose; LAC, D-lactose; MEL, D-melibiose; SAC, D-sucrose; TRE, D-trehalose; INU, inulin; MLZ, D-melezitose; RAF, D-raffinose; AMD, starch; GLYG, glycogen; XLT, xylitol; GEN, gentiobiose; TUR, D-turanose; LYX, D-lyxose; TAG, D-tagatose; D-FUC, D-fucose; L-FUC, L-fucose; D-ARL, D-arabitol; L-ARL, L-arabitol; GNT, gluconate; 2KG, 2-ketoglyconate; 5KG, 5-ketoglyconate.

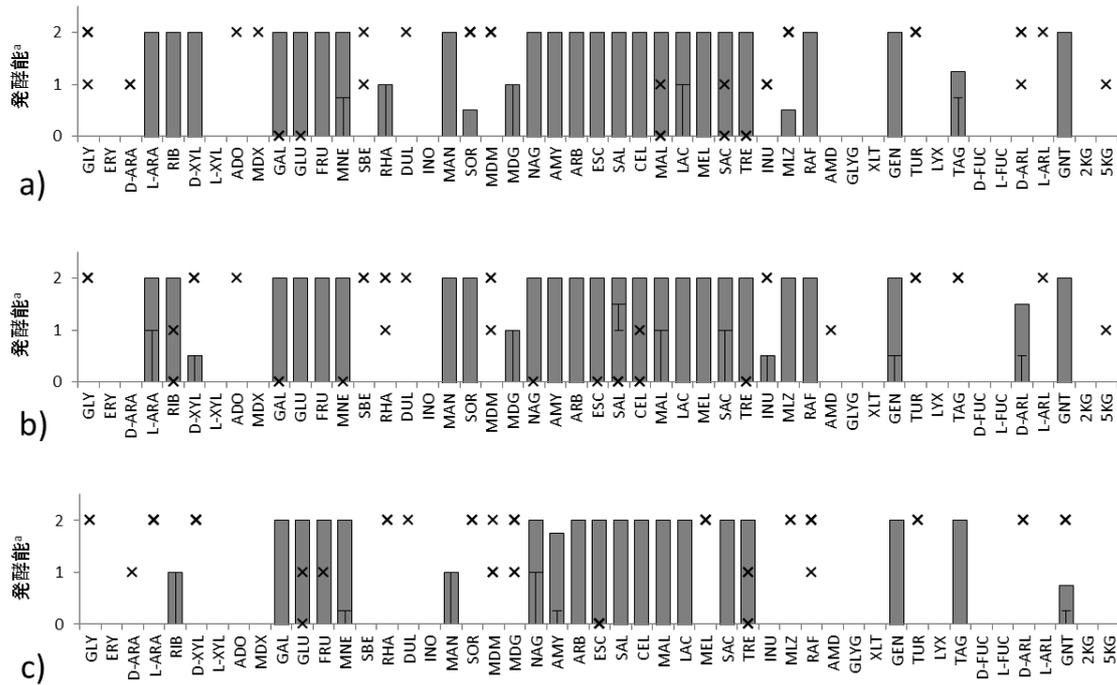


図 3-2. タイ分離株の分離源の素材別に見た糖発酵パターンの比較

a), 野菜由来株 ; b), 大豆由来株 ; c), 魚由来株.

a 色調変化によって判定した陰性 (-), 弱陽性 (w), 陽性 (+)をそれぞれ 0, 1, 2, に置き換えた数値を解析に用いた.

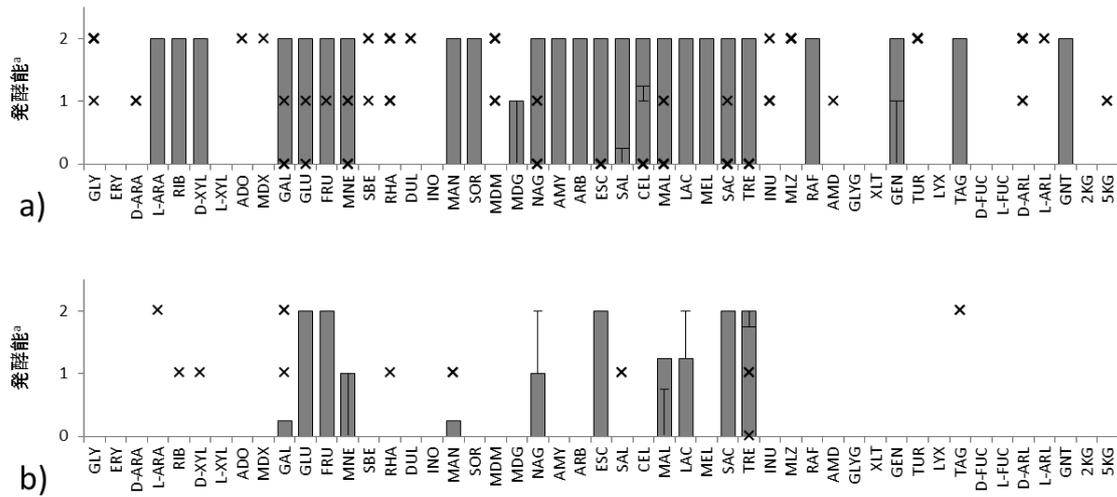


図 3-3. タイ分離株の乳酸菌と *Staphylococcus* 属株の糖発酵パターンの比較

a), 乳酸菌 ; b), *Staphylococcus* 属株.

^a色調変化によって判定した陰性 (-), 弱陽性 (w), 陽性 (+)をそれぞれ 0, 1, 2, に置き換えた数値を解析に用いた.

3.3. タイ産発酵食品由来乳酸菌の糖発酵性

3.3.1. クラスタ解析から見たタイ分離株乳酸菌の種内多様性

糖の発酵性試験結果を基に、タイ分離株の乳酸菌について、近縁種基準株の結果を加えてクラスタ解析を行った結果、分離株は基本的に、種ごとに近縁種基準株を含むまとまったクラスタを形成した。このことから分離株の糖の発酵パターンは種の特徴を反映していると考えられる。しかし分離株の中には同種でありながら離れたクラスタを形成する株も見られた (図 3-4)。タイ分離株の乳酸菌で、同種内の株で離れたクラスタを形成したのは *E. durans* or *E. faecium*, *L. acidipiscis*, *L. farciminis*, *L. futsaii*, *L. pentosus*, *L. plantarum* subsp. *plantarum*, *P. pentosaceus* で、それぞれ 7~16 種類の糖において発酵性に多様性が見られた (表 3-1)。これら種内でクラスタが分かれた種の分離株で、基準株から離れた 8 株の分離源は魚 (3 株)、大豆 (4 株)、野菜 (1 株) の発酵食品だった。大豆由来の 2 株 (NB833, NB858) では D-raffinose や D-melibiose といった大豆に含まれる糖の発酵性を獲得し、基準株と比べて発酵可能な糖の種類が増えていたが、その他の株では糖源の少ない魚の発酵食品に由来する分離株を中心に基準株よりも発酵可能な糖の種類が少なかった。まとまったクラスタを形成した *E. avium*, *E. gilvus* or *E. raffinosus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. modestisalitolans*, *L. plantarum* subsp. *argentratensis*, *L. saerimneri*, *P. acidilactici*, *W. paramesenteroides*, *W. thailandensis* においても、基準株と分離株の糖発酵性が完全に一致した *L. saerimneri* 以外の種では、それぞれ 1~11 種類の糖発酵性に違いが見られ、同種内の株で離れたクラスタを形成した種よりも少ないながら、種内で糖発酵性に多様性があることが分かった。糖の発酵パタ

ーンと分離源の素材には基本的に相関性が見られなかったが、*L. fermentum* においては大きく1つにまとまるものの詳細に比較すると野菜由来株と魚由来株でグループが別れ、発酵可能な糖の種類が野菜の発酵食品に由来する株で多い傾向がみられたことや、基準株からクラスターが離れた分離株における基準株との糖発酵性の違いとそれぞれの分離源の関係から、一部に確認された基準株とは異なる糖の発酵性を示した分離株には、それぞれの分離源である発酵食品環境の影響が現れていると推測される。

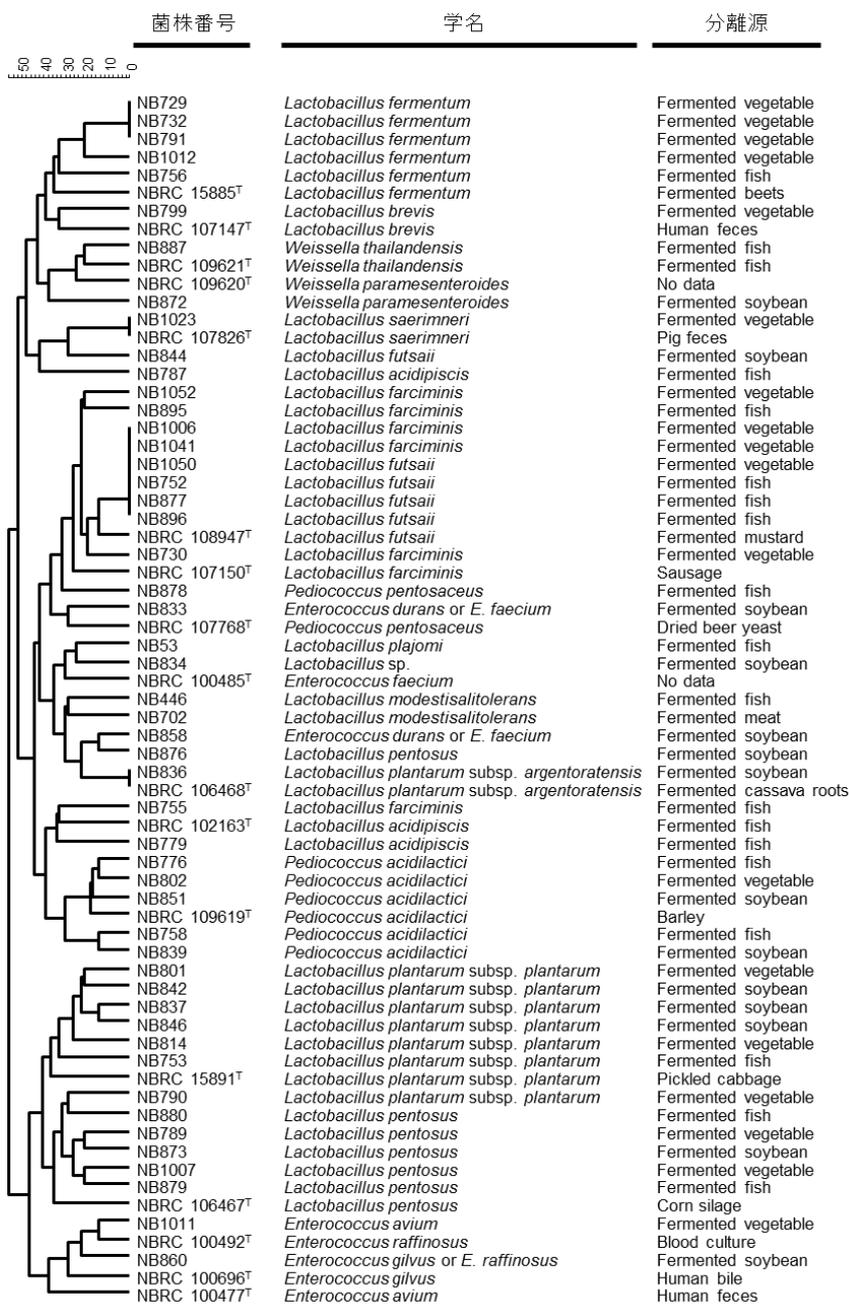


図 3-4. タイ分離株の乳酸菌の糖発酵性試験結果に基づくクラスター解析

糖発酵性試験は API50CHL を用いて試験し、色調変化によって判定した陰性 (-)、弱陽性 (w)、陽性 (+)をそれぞれ 0, 0.5, 1.0 に置き換えた数値を解析に用いた。作成したデンドログラムはユークリッド距離および UPGMA 法による。

表 3-1. つづき

種	菌株番号	図 3-4 における スター	図 3-5 における スター	分離源の原材料 または基準株	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMID	GLYG	XLT	GEN	TUR	LXN	TAG	D-FUC	L-FUC	D-ARL	L-ARL	GNT	2KG	5KG
					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus avium</i>	NBRC 100477 ¹			基準株	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB1011			野菜	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Enterococcus faecium</i>	NBRC 100485 ⁵			基準株	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB833	II	II	大豆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
<i>Enterococcus durans</i> or <i>E. faecium</i>	NB858	III	III	大豆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
	NBRC 100696 ⁶			基準株	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Enterococcus raffinosus</i>	NBRC 100492 ⁷			基準株	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Enterococcus gilvus</i> or <i>E. raffinosus</i>	NB860			大豆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	NBRC 102163 ³			基準株	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB779			魚	w	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB787	II	II	魚	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Lactobacillus brevis</i>	NBRC 107147 ¹			基準株	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
	NB799			野菜	-	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
<i>Lactobacillus farciminis</i>	NBRC 107150 ⁰			基準株	-	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
	NB1041			野菜	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB1052			野菜	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB1006			野菜	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB730			野菜	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB755	II	II	魚	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB895			魚	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Lactobacillus fermentum</i>	NBRC 15885 ¹			基準株	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB791			野菜	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
	NB1012			野菜	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
	NB729			野菜	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
	NB732			野菜	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
	NB756		II	魚	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
<i>Lactobacillus futsaii</i>	NBRC 108947 ¹			基準株	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB1050			野菜	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB752			魚	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB877			魚	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB896			魚	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB844	II	II	大豆	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Lactobacillus modestisalitolerans</i>	NB446 ⁷			魚	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB702			肉	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Lactobacillus pentosus</i>	NBRC 106467 ¹			基準株	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB789			野菜	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB1007			野菜	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB879			魚	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB880			魚	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
	NB873			大豆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB876	II	II	大豆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Lactobacillus plajomi</i>	NB53 ³			魚	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w		
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenterotensis</i>	NBRC 106468 ⁸			基準株	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	w	
	NB836			大豆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	NBRC 15891 ¹			基準株	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
	NB790	II	III	野菜	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB801		II	野菜	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB814		II	野菜	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
	NB753		II	魚	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB837		II	大豆	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
	NB842		II	大豆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB846		II	大豆	+	+	+	+	+	w	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	
<i>Lactobacillus saerimneri</i>	NBRC 107826 ⁶			基準株	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB1023			野菜	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Lactobacillus</i> sp.	NB834			大豆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w		
<i>Pediococcus acidilactici</i>	NBRC 109619 ⁹			基準株	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB802			野菜	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	
	NB758			魚	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB776			魚	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB839			大豆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB851			大豆	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	NBRC 107768 ⁸			基準株	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	NB878	II	II	魚	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>Weissella paramesenteroides</i>	NBRC 109620 ⁰			基準株	-	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	w		
	NB872		II	大豆	w	w	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	w		
<i>Weissella thailandensis</i>																												

GLY, glycerol; ERY, erythritol; D-ARA, D-arabinose; L-ARA, L-arabinose; RIB, D-ribose;
D-XYL, D-xylose; L-XYL, L-xylose; ADO, D-adonitol; MDX, methyl- β -D-xylopyranoside;
GAL, D-galactose; GLU, D-glucose; FRU, D-fructose; MNE, D-mannose; SBE, L-sorbose;
RHA, L-rhamnose; DUL, dulcitol; INO, inositol; MAN, D-mannitol; SOR, D-sorbitol;
MDM, methyl- α -D-mannopyranoside; MDG, methyl- α -D-glucopyranoside; NAG,
N-acetyl glucosamine; AMY, amygdalin; ARB, arbutin; ESC, esculin ferric citrate; SAL,
salicin; CEL, D-cellobiose; MAL, D-maltose; LAC, D-lactose; MEL, D-melibiose; SAC,
D-sucrose; TRE, D-trehalose; INU, inulin; MLZ, D-melezitose; RAF, D-raffinose; AMD,
starch; GLYG, glycogen; XLT, xylitol; GEN, gentiobiose; TUR, D-turanose; LYX,
D-lyxose; TAG, D-tagatose; D-FUC, D-fucose; L-FUC, L-fucose; D-ARL, D-arabitol;
L-ARL, L-arabitol; GNT, gluconate; 2KG, 2-ketoglyconate; 5KG, 5-ketoglyconate.

3.3.2. 日本産分離株との比較

富山と沖縄の分離株を加えてクラスター解析をおこなった結果、タイ分離株の解析において同種内で離れたクラスターを形成した種は富山と沖縄の分離株でも同様にクラスターが分かれ、まとまったクラスターを形成した種は同様にまとまった (図 3-5). *E. durans* or *E. faecium* はタイ分離株の 1 株が大きく離れ、他の分離株は富山分離株が 1 つにまとまり、そのすぐ近傍に沖縄分離株とタイ分離株が分岐し、*E. faecium* の基準株からはどの分離株も離れた。今回の解析には *E. durans* の基準株が含まれておらず分離株は *E. durans* の糖発酵パターンに近縁な可能性があるが、タイ分離株 1 株は *E. durans* の基準株や他の分離株のクラスターどちらからも離れていること、また富山分離株は 1 つにまとまることが分かった。*L. acidipiscis* はタイ分離株 1 株と基準株、タイ分離株 1 株と富山分離株 1 株、富山分離株 4 株または 1 株の 4 グループに分かれ、*L. pentosus* は基準株とタイ分離株 5 株、タイ分離株 1 株と富山分離株 3 株、富山分離株 3 株のグループに分かれ、これら 2 種のタイと富山の分離株はそれぞれ同種内でグループが分かれることが分かった。*L. plantarum* subsp. *plantarum* は基準株と富山分離株 4 株と沖縄分離株 3 株、タイ分離株 6 株または 1 株、富山分離株 3 株の 4 グループに分かれ、タイと富山の分離株は種内でグループが分かれたが、沖縄分離株だけをみると種内でクラスターは分かれず基準株とまとまった。*P. pentosaceus* はタイと沖縄の分離株 1 株ずつがまとまって基準株から離れた。タイ分離株のみでは基準株とまとまった *W. paramesenteroides* は、沖縄分離株 2 株が加わったことにより基準株と沖縄分離株がまとまりタイ分離株は基準株から離れた。

タイ分離株の解析において同種でまとまったクラスターを形成した 8 種の中で、富山と沖縄の分離株に含まれた種は *L. brevis* のみで、タイ分離株も含めて 1 つにまとまった。それ以外の 7 種はタイ分離株のみに含まれた種だった。タイ分離株の解析では基準株とまとまった *L. fermentum* および *W. paramesenteroides* は、富山と沖縄の分離株が加わったことにより基準株と分離株の距離が大きくなり、両種に含まれるタイ分離株の全てはそれぞれ基準株から独立した。タイ分離株のみ解析において分離源の原材料に相関性が見られていた *L. fermentum* の 6 株は、富山と沖縄の分離株も含めた解析では分離源の原材料に対応したクラスターがより明確に離れる結果となった。

同種内でクラスターが複数に分かれる種とまとまる種では、タイ、富山、沖縄のどの分離株にも見られ、それぞれに該当する種の構成は異なった。クラスターが分かれた種で基準株から離れた株は、それぞれの発酵食品環境の影響を反映している可能性が考えられる。同種でまとまった種で、タイ分離株のみに含まれる種は 7 種と多く、同じように同種でまとまったクラスターを形成し、富山分離株のみ、沖縄分離株のみに含まれた種も存在しており、これらの種はそれぞれの発酵食品環境に適応した種である可能性が考えられる。

3.3.3. タイ分離株に含まれない日本産分離株の種における糖発酵性の多様性

タイ分離株には含まれず富山分離株と沖縄分離株の両方またはどちらかに含まれる種では、種内で離れたクラスターを形成したのは *Leuconostoc citrium* と *Leu. mesenteroides* で、沖縄分離株はそれぞれ 1 株ずつのため同一原産地での種内の多様性は確認できなかった。

たものの、*Leu. citrium* は富山分離株 3 株または 1 株と沖縄分離株 1 株の 3 グループに、*Leu. mesenteroides* は富山分離株 4 株と沖縄分離株 1 株、富山分離株 2 株または 1 株の 3 グループに分かれ、富山分離株は同種内で複数のグループに分かれることが分かった。

タイ分離株には含まれず富山分離株と沖縄分離株の両方またはどちらかに含まれる種で、同種でまとめたのは富山と沖縄の両地域の分離株を含む *E. faecalis*, *L. alimentarius*, *W. cibaria* の 3 種と、富山分離株のみの *L. curvatus*, *L. sakei*, *P. parvulus* の 3 種、沖縄分離株のみの *E. thailandicus*, *W. virescens* の 2 種だった。

3.3.4. 分離種による糖発酵性の種内多様性の違い

原産地が同じにも拘わらず同種内でグループが分かれたり基準株から離れた株がみられたのはタイ分離株で 9 種、富山分離株で 6 種、沖縄分離株では 2 種だった。これらのうち 2 地域以上で分離された種はそれぞれ 6 種、6 種、2 種で、タイ分離株の 3 種 (*L. farciminis* と *L. fermentum*, *L. futsaii*) 以外の種はいずれかの地域で共通して分離された種であり、種内の糖発酵性に多様性がある種は原産地が複数に渡っていることから、これらの種は糖発酵性の多様化がしやすく、そのため適応できる生息環境が広がったと推測できる。タイ分離株で種内での糖発酵性に多様性が認められた 9 種のうち富山と沖縄の分離株には含まれなかった 3 種において、*L. fermentum* は分離源の原材料と発酵パターンに相関性がある傾向が見られ、主に野菜の発酵食品に由来し、塩耐性は他のタイ分離株乳酸菌に比較して低い傾向が見られた。タイの野菜の発酵食品は塩濃度が低く、一方で富山の野菜の漬物は最終的な製品の塩濃度は低いものの、本漬け前の塩漬けは塩濃度が高い。*L. fermentum*

は日本の無塩発酵漬物であるすんきの主要な乳酸菌であるとの報告もあり (Endo *et al.*, 2008), 低塩で植物基質の環境を好むと推測される. *L. farciminis* と *L. futsaii* は系統的にも近縁で分離株数も多く, 糖発酵パターンもクラスター解析において近い位置を占めていた. 糖発酵性に種内多様性がみられた種で基準株から離れた分離株の糖発酵性には, それぞれの発酵食品環境への適応の特徴が反映されている可能性がある. タイ分離株の乳酸菌でクラスター解析において基準株から離れた株は, 主に大豆や魚の発酵食品に由来する株だった. これらの株の糖発酵性を基準株と比較すると, 大豆由来株ではメリビオースやラフィノースといった大豆に含まれる糖の発酵性が陽性になっており, また大豆と魚由来の分離株どちらにおいても, 基準株に比べて発酵可能になった糖の数よりも, 発酵性が失われた糖の数が多く, この傾向は糖源が少ないと推測される魚の発酵食品由来株で特に顕著だった. これらの株は環境に適応して, 一部では適した発酵能を獲得し, 多くは不必要な発酵能を落とした可能性が考えられる.

一方, 原産地が同じで同種内でまとまったクラスターを形成した種はタイ分離株で 8 種, 富山分離株で 7 種, 沖縄分離株では 8 種で, これらのうち他の地域でも分離された種はそれぞれ 1 種, 4 種, 6 種と, 種内で糖発酵性に多様性があった種に比べて複数の地域から分離された種は少なく, それぞれの地域でのみ分離された種が多数を占め, その種数はタイ分離株で最も多かった (表 3-2). 基準株とまとまったクラスターを形成し, それぞれの地域でのみ分離された種は, それぞれの地域の発酵食品環境に適応した特徴的な糖発酵性を示す種の可能性が考えられる. タイ分離株の 7 種, 富山分離株の 3 種, 沖縄分離株の 2 種の糖発酵性を比較すると, タイ分離株の乳酸菌では日本産分離株に比べてキシロース, ラ

フィノース，糖アルコールの発酵性が高く，植物基質に含まれる糖の発酵能が高いという特徴がみられた．また糖の発酵性は種によって違いがあることから，タイ分離株には日本産分離株とは異なる発酵性を示す分離株が多数含まれることが示された．

菌株番号	学名	原産地 または基準株	分離源
J11Y5E-2	<i>Enterococcus durans</i> or <i>E. faecium</i>	Toyama	Fermented vegetable
J12Y5D-4	<i>Enterococcus durans</i> or <i>E. faecium</i>	Toyama	Fermented vegetable
J15Y0E-1	<i>Enterococcus durans</i> or <i>E. faecium</i>	Toyama	Fermented vegetable
J18Y5E-1	<i>Enterococcus durans</i> or <i>E. faecium</i>	Toyama	Fermented vegetable
J19Y0E-1	<i>Enterococcus durans</i> or <i>E. faecium</i>	Toyama	Fermented vegetable
J9N0E-1	<i>Enterococcus durans</i> or <i>E. faecium</i>	Toyama	Fermented vegetable
J40EM0E-2	<i>Enterococcus durans</i> or <i>E. faecium</i>	Okinawa	Fermented soybean
NB93	<i>Enterococcus durans</i> or <i>E. faecium</i>	Thai	Fermented soybean
J33M0E-2	<i>Enterococcus thailandicus</i>	Okinawa	Fermented fish
NBRC 101867T	<i>Enterococcus thailandicus</i>	Type	Fermented sausage
J24N5B-1	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	Toyama	Fermented fish
J26Y5C-1	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	Toyama	Fermented soybean
J25N5E-2	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	Toyama	Fermented fish
J25N5C-1	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	Toyama	Fermented fish
NBRC 100485T	<i>Enterococcus faecium</i>	Type	No data
J5N5E-2	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Toyama	Fermented vegetable
J5N0D-3	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Toyama	Fermented vegetable
J12Y10E-1B	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Toyama	Fermented vegetable
NB440	<i>Lactobacillus modestus/alticola/erans</i>	Thai	Fermented fish
NB70	<i>Lactobacillus modestus/alticola/erans</i>	Thai	Fermented meat
J45M0E-1	<i>Weissella coriifera</i>	Okinawa	Fermented vegetable
NB878	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Thai	Fermented fish
NBRC 100499T	<i>Weissella coriifera</i>	Type	Sugar cane
NBRC 107199T	<i>Lactobacillus crustorum</i>	Type	Wheat sourdough
NBRC 3181T	<i>Enterococcus hirae</i>	Type	No data
J6T30	<i>Lactobacillus faciminius</i>	Thai	Fermented vegetable
NBRC 108947T	<i>Lactobacillus futsaii</i>	Thai	Fermented mustard
J6T06	<i>Lactobacillus faciminius</i>	Thai	Fermented vegetable
NB1041	<i>Lactobacillus faciminius</i>	Thai	Fermented vegetable
NB1050	<i>Lactobacillus futsaii</i>	Thai	Fermented vegetable
NB75	<i>Lactobacillus futsaii</i>	Thai	Fermented fish
NB877	<i>Lactobacillus futsaii</i>	Thai	Fermented fish
J6E8E	<i>Lactobacillus futsaii</i>	Thai	Fermented fish
NBRC 107183T	<i>Lactobacillus nantensis</i>	Type	Wheat sourdough
NB1052	<i>Lactobacillus faciminius</i>	Thai	Fermented vegetable
NB89	<i>Lactobacillus faciminius</i>	Thai	Fermented vegetable
NBRC 107150T	<i>Lactobacillus faciminius</i>	Type	Sausage
J11N5C-4	<i>Leuconostoc cirium</i>	Toyama	Fermented vegetable
J9N0D-1	<i>Leuconostoc cirium</i>	Toyama	Fermented vegetable
J17N0D-3	<i>Leuconostoc cirium</i>	Toyama	Fermented vegetable
NB72	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	Toyama	Fermented vegetable
J16N5E-2	<i>Weissella cibaria</i>	Toyama	Fermented vegetable
J5E0E-1	<i>Weissella cibaria</i>	Okinawa	Fermented vegetable
J38M0E-3	<i>Weissella cibaria</i>	Okinawa	Fermented vegetable
J5M5E-4	<i>Weissella cibaria</i>	Okinawa	Fermented vegetable
J38M5E-2	<i>Leuconostoc citreum</i>	Okinawa	Fermented vegetable
NBRC 107152T	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	Type	Sourdough
J12Y10E-1	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	Toyama	Fermented vegetable
J17N0E-3	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	Toyama	Fermented vegetable
J4N5E-1	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	Toyama	Fermented vegetable
J5N5E-1	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	Toyama	Fermented vegetable
J16N0E-3	<i>Pediococcus kimohii</i>	Toyama	Fermented vegetable
J9N0C-2	<i>Carnobacterium divergens</i>	Toyama	Fermented vegetable
J17Y5E-1	<i>Enterococcus faecalis</i>	Toyama	Fermented vegetable
NBRC 100489T	<i>Enterococcus faecalis</i>	Type	No data
NBRC 15895T	<i>Enterococcus faecalis</i>	Type	Milk products
J11N5B-1	<i>Lactobacillus sakei</i>	Toyama	Fermented vegetable
J16N5C-1	<i>Lactobacillus sakei</i>	Toyama	Fermented vegetable
J9N0E-1	<i>Lactobacillus sakei</i>	Toyama	Fermented vegetable
J37M5E-2	<i>Weissella hellenica</i>	Okinawa	Fermented vegetable
J2N5E-1	<i>Lactobacillus sakei</i>	Toyama	Fermented vegetable
J13N0C-2	<i>Lactobacillus sakei</i>	Toyama	Fermented vegetable
J3N0E-3	<i>Lactobacillus sakei</i>	Toyama	Fermented vegetable
J4N5E-4	<i>Lactobacillus sakei</i>	Toyama	Fermented vegetable
J45M0E-3	<i>Lactobacillus sakei</i>	Okinawa	Fermented vegetable
NB83	<i>Lactobacillus olgajoi</i>	Thai	Fermented fish
NB834	<i>Lactobacillus sp.</i>	Thai	Fermented soybean
J3N10C-2	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	Toyama	Fermented vegetable
J8N5E-3	<i>Enterococcus pseudocitrium</i>	Toyama	Fermented vegetable
J17N5B-3	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Toyama	Fermented vegetable
J18N0C-3	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Toyama	Fermented vegetable
J18N5C-3	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Toyama	Fermented vegetable
J19Y0D-2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Toyama	Fermented vegetable
J2N0D-2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Toyama	Fermented vegetable
J9N5E-2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Toyama	Fermented vegetable
J9N5E-2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Toyama	Fermented vegetable
NBRC 102103T	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	Thai	Fermented fish
NB70	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	Thai	Fermented fish
J27M0E-1	<i>Weissella vindescens</i>	Okinawa	Fermented vegetable
J38M0E-1	<i>Weissella vindescens</i>	Okinawa	Fermented meat
J4N5C-1	<i>Lactobacillus sakei</i>	Toyama	Fermented vegetable
NB1023	<i>Lactobacillus saerimneri</i>	Thai	Fermented vegetable
NB84-1	<i>Lactobacillus futsaii</i>	Type	Fig leaves
NBRC 107820T	<i>Lactobacillus saerimneri</i>	Thai	Fermented soybean
J4N0E-1	<i>Lactobacillus veromoldensis</i>	Toyama	Fermented vegetable
NBRC 107189T	<i>Lactobacillus nantensis</i>	Type	Sourdough
NBRC 15885T	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Type	Fermented beets
J33M0E-3	<i>Lactobacillus animalis</i>	Okinawa	Fermented fish
J33M0E-3	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Thai	Fermented fish
NB802	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Thai	Fermented vegetable
NB81	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Thai	Fermented soybean
NBRC 109619T	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Type	Barley
NBRC 103219T	<i>Lactobacillus pobzhii</i>	Type	Fermented gummingcordia
NB753	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Thai	Fermented fish
NB839	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Thai	Fermented soybean
J19Y0E-1	<i>Pediococcus parvulus</i>	Toyama	Fermented vegetable
J19N0C-1	<i>Pediococcus parvulus</i>	Toyama	Fermented vegetable
J19N5B-1	<i>Pediococcus populinus</i>	Toyama	Fermented vegetable
NBRC 100100T	<i>Lactobacillus parvulus</i>	Type	Human feces
NB75	<i>Lactobacillus faciminius</i>	Thai	Fermented fish
NB4N10E-2	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	Toyama	Fermented fish
NB787	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	Thai	Fermented fish
NB729	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Thai	Fermented vegetable
NB730	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Thai	Fermented vegetable
NB731	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Thai	Fermented vegetable
NB732	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Thai	Fermented vegetable
J8N0E-1	<i>Weissella soli</i>	Toyama	Fermented vegetable
NB78	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Thai	Fermented fish
NBRC 109618T	<i>Lactobacillus rapae</i>	Type	Pickles
J8N0C-1	<i>Weissella soli</i>	Toyama	Fermented vegetable
J3N5C-1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Toyama	Fermented vegetable
J6N0E-1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Toyama	Fermented vegetable
NBRC 107765T	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Type	Fermenting apple juice
NBRC 107147T	<i>Lactobacillus brevis</i>	Type	Human feces
J37M0E-4	<i>Lactobacillus brevis</i>	Okinawa	Fermented vegetable
NB79	<i>Lactobacillus brevis</i>	Thai	Fermented vegetable
J11N5C-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Toyama	Fermented vegetable
J13N5E-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Toyama	Fermented vegetable
J13N0D-3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Toyama	Fermented vegetable
J15N5E-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Toyama	Fermented vegetable
J37M0E-5	<i>Leuconostoc lactis</i>	Okinawa	Fermented vegetable
J37M5E-4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Okinawa	Fermented vegetable
NB83	<i>Weissella thailandensis</i>	Thai	Fermented fish
NBRC 109621T	<i>Weissella thailandensis</i>	Type	Fermented fish
J35M5E-2	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Okinawa	Fermented vegetable
J45M5E-1	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Okinawa	Fermented vegetable
NBRC 109620T	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Type	No data
J8N5E-3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Toyama	Fermented vegetable
J8N5E-2	<i>Leuconostoc cirium</i>	Toyama	Fermented vegetable
J16N0E-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Toyama	Fermented vegetable
J9N0D-3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Toyama	Fermented vegetable
NB872	<i>Weissella paramesenteroides</i>	Thai	Fermented soybean
NBRC 107768T	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Type	Dried beer yeast
NB801	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Thai	Fermented vegetable
NB842	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Thai	Fermented soybean
NB843	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Thai	Fermented soybean
NB840	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Thai	Fermented soybean
NB814	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Thai	Fermented vegetable
NB75	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Thai	Fermented fish
J11Y5D-1	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Toyama	Fermented vegetable
J19Y0E-2	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Toyama	Fermented vegetable
J19Y5C-1	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Toyama	Fermented vegetable
J45M0E-2	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Okinawa	Fermented vegetable
NBRC 15891T	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Type	Fermented vegetable
J35M0E-1	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Okinawa	Fermented vegetable
J16M0E-2	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Okinawa	Fermented vegetable
J8N5E-1	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Toyama	Fermented vegetable
NBRC 106468T	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argentinaensis</i>	Thai	Fermented soybean
J3N5E-1	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Toyama	Fermented vegetable
J9N0E-1	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Toyama	Fermented vegetable
J19Y5D-1	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Toyama	Fermented vegetable
NB876	<i>Enterococcus durans</i> or <i>E. faecium</i>	Thai	Fermented soybean
NB70E	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Thai	Fermented soybean
J17Y10E-1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Toyama	Fermented vegetable
J9N5E-2	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Toyama	Fermented vegetable
J8N5E-2	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Toyama	Fermented vegetable
NB790	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Thai	Fermented vegetable
NB890	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Thai	Fermented fish
NB789	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Thai	Fermented vegetable
NB87	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Thai	Fermented soybean
NB1007	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Thai	Fermented vegetable
NB879	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Thai	Fermented fish
NBRC 106467T	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Thai	corn silage
NB1011	<i>Enterococcus avium</i>	Type	Fermented vegetable
NBRC 100492T	<i>Enterococcus raffinosus</i>	Type	Blood culture
NB900	<i>Enterococcus gilvus</i> or <i>E. raffinosus</i>	Thai	Fermented soybean
NBRC 100599T	<i>Enterococcus gilvus</i>	Type	Human bile
NBRC 100477T	<i>Enterococcus avium</i>	Type	Human feces

図 3-5. タイ, 富山, 沖縄分離株の乳酸菌の糖発酵性試験結果に基づくクラスター
解析

糖発酵性試験は API50CHL を用いて試験し, 色調変化によって判定した陰性 (-), 弱陽性 (w), 陽性 (+)をそれぞれ 0, 0.5, 1.0 に置き換えた数値を解析に用いた. 作成したデンドログラムはユークリッド距離および UPGMA 法による.

表 3-2. 乳酸菌分離株のクラスター解析において種内でクラスターが分かれた種と

まとまった種

原産地	タイ分離株のデンドログラム(図 3-4)におけるクラスターリング	全分離株のデンドログラム(図 3-5)におけるクラスターリング		
	タイ	タイ	富山	沖縄
分かれた種	<i>E. durans</i> or <i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i> or <i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i> or <i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i> or <i>E. faecium</i>
	<i>L. acidipiscis</i>	<i>L. acidipiscis</i>	<i>L. acidipiscis</i>	<i>P. pentosaceus</i>
	<i>L. farciminis</i>	<i>L. farciminis</i>	<i>L. pentosus</i>	
	<i>L. futsaii</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	
	<i>L. pentosus</i>	<i>L. futsaii</i>	<i>Leu. citreum</i>	
	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>Leu. mesenteroides</i>	
	<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>W. paramesenteroides</i>		
まとまった種	<i>E. avium</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
	<i>E. gilvus</i> or <i>raffinosis</i>	<i>E. gilvus</i> or <i>raffinosis</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>E. thailandicus</i>
	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. alimentarius</i>
	<i>L. fermentum</i>	<i>L. modestisalitolers</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>L. modestisalitolers</i>	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argentratis</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argentratis</i>	<i>L. saerimneri</i>	<i>P. parvulus</i>	<i>W. cibaria</i>
	<i>L. saerimneri</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>W. cibaria</i>	<i>W. paramesenteroides</i>
	<i>P. acidilactici</i>	<i>W. thailandensis</i>		<i>W. virescens</i>
	<i>W. paramesenteroides</i>			
	<i>W. thailandensis</i>			

3.4. タイ産発酵食品由来 *Staphylococcus* 属の糖発酵性

3.4.1. クラスタ解析から見たタイ分離株 *Staphylococcus* 属株の種内多様性

糖の発酵性試験結果を基に、タイ分離株の *Staphylococcus* 属株について、近縁種基準株の結果を加えてクラスタ解析を行った結果、分離株は基本的に、種ごとに近縁種基準株を含むまとまったクラスタを形成した。このことから *Staphylococcus* 属株の糖の発酵パターンにおいても、種の特徴を反映していると考えられる。しかし分離株の中には乳酸菌同様、同種でありながら離れたクラスタを形成する株も見られ (図 3-6)、系統的に近い *S. condimenti* と *S. piscifermentans* の株が同一クラスタ内に混在したが、これら 2 種に含まれる株で発酵性の異なった糖は 8 種類で、まとまったクラスタを形成した *S. epidermidis* と *S. saprophyticus* はそれぞれ 1 または 7 種類であり、乳酸菌と比べて種内の発酵性の違いが小さかった。 *Staphylococcus* 属は生育に糖が必須では無く、乳酸菌に比べて発酵可能な糖の種類自体が少ないことや、大多数の分離株 (12 株中 9 株) が魚の発酵食品に由来することが、糖発酵性の種内多様性が少ない要因として考えられる。

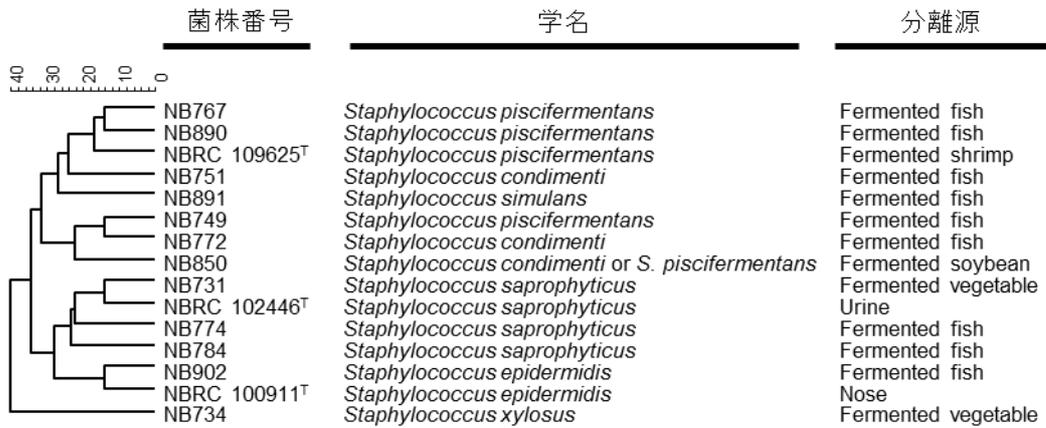


図 3-6. タイ分離株の *Staphylococcus* 属株の糖発酵性試験結果に基づくクラスタ

一解析

糖発酵性試験は API50CHL を用いて試験し、色調変化によって判定した陰性 (-)、弱陽性 (w)、陽性 (+) をそれぞれ 0, 0.5, 1.0 に置き換えた数値を解析に用いた。作成したデンドログラムはユークリッド距離および UPGMA 法による。

3.4.2. 日本産分離株との比較

富山と沖縄の *Staphylococcus* 属株を加えてクラスター解析を行った結果、一部に種内でクラスターが分かれた種もあり、*S. xylosus* ではタイ分離株 1 株と沖縄分離株 1 株が離れ、*S. nepalensis* で富山分離株 4 株が 3 グループに分かれた。またタイ分離株のみの解析結果と同様に、系統的に近い *S. condimenti* と *S. piscifermentans* の株が、富山分離株の *S. nepalensis* のひとグループを含む形で同一クラスター内に混在した。しかしタイ分離株は基本的に、種ごとに近縁種基準株を含むまとまったクラスターを形成し、分離源の素材に加えて原産地との相関性も見られなかった（図 3-7）。

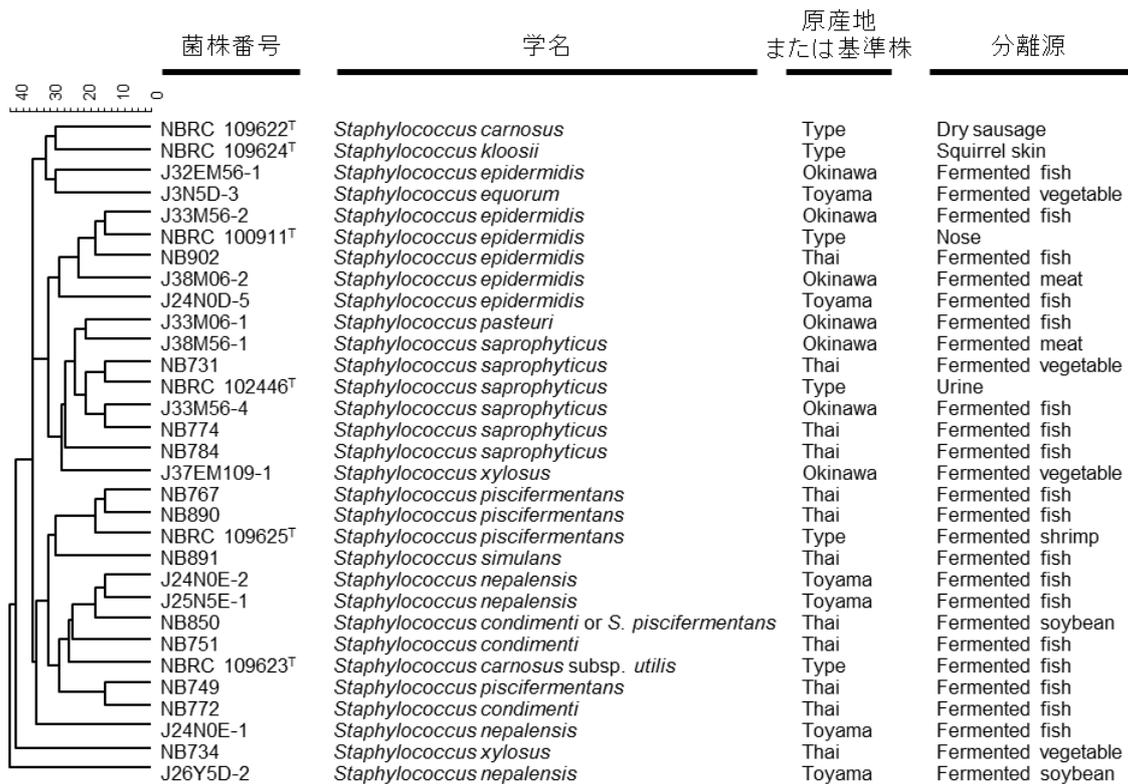


図 3-7. タイ，富山，沖縄分離株の *Staphylococcus* 属株の糖発酵性試験結果に基づくク

ラスター解析

糖発酵性試験は API50CHL を用いて試験し，色調変化によって判定した陰性 (-)，弱陽性

(w)，陽性 (+)をそれぞれ 0，0.5，1.0 に置き換えた数値を解析に用いた．作成したデンド

ログラムはユークリッド距離および UPGMA 法による．

3.5. まとめ

調査した 49 種類の糖における分離株の発酵性は、分離源別に比較すると、野菜の発酵食品に由来する分離株では魚の発酵食品に由来する分離株に比べて発酵可能な糖の種類が多い傾向が見られた。野菜や大豆の発酵食品由来株では魚の発酵食品由来株に比べて主に五炭糖やグリコシドの発酵性に陽性を示す株の割合が高かった。野菜の発酵食品由来株では前述の糖に加えて D-xylose の、大豆の発酵食品由来株では糖アルコールの発酵性に陽性を示す株が多く含まれた。分離種をみると、野菜や大豆の発酵食品から分離した株には乳酸菌の割合が高く、魚の発酵食品に由来する株には *Staphylococcus* 属の割合が高かった。乳酸菌と *Staphylococcus* 属株では発酵可能な糖の種類に顕著な違いがあり、*Staphylococcus* 属株に比べて乳酸菌は多様な糖の発酵が可能で、同種内の株における糖発酵パターンの多様性も大きかった。植物基質が含む多様で量的には少ない糖源を資化して発酵を進めるのに適応した結果、タイ分離株の乳酸菌は多様な糖を発酵し、同種内の株における糖発酵パターンの多様性も大きくなったと推測される。一方で、生育に糖が必須ではない *Staphylococcus* 属株は、乳酸菌と比べて種内の発酵性の違いも小さく、糖が少なくタンパク質が豊富な魚の発酵食品の環境に適応していると考えられた。

基準株との比較から、分離株の発酵性は基本的に種の特徴を反映していたが、同種内でも数種類の糖の発酵性に違いがあるなど株による多様性があることが分かった。しかし種内の多様性には原産地や分離源による明確な相関性は見られなかった。

クラスター解析により、同種内に糖発酵性の多様性があった種の多くは分離地も複数に渡り、適応力の高さが推測された。タイ分離株では 9 種の乳酸菌に種内での多様性が認め

られ、このうち6種が富山や沖縄分離株にも含まれた種だった。残りの3種である *L. farciminis* と *L. fermentum*, *L. futsaii* は種内に多様性があったが本研究で得られた富山と沖縄の分離株には含まれなかった種で、*L. fermentum* は分離源の原材料と発酵パターンに相関性がある傾向が見られ、*L. farciminis* と *L. futsaii* は系統的にも近縁で分離株数も多かった。種の基準株から離れた株は、糖発酵性の種内多様性による発酵食品環境への適応を反映している可能性が考えられ、これらの株の糖発酵性における基準株との違いから、環境に適応して一部では適した発酵性を獲得し、多くは不必要な発酵性を落としていることがわかった。一方、同種でまとまったクラスターを形成した種はそれぞれの地域でのみ分離された種が多数を占め、その種数はタイ分離株で最も多かった。これらの種はそれぞれの発酵食品環境に適応した特徴的な糖発酵性を示す可能性が考えられ、日本産分離株との比較から、タイ分離株の乳酸菌は植物基質に含まれる糖の発酵性が高いという特徴がみられた。また糖の発酵性は種によって違いがあることから、日本産分離株とは異なる発酵性を示す分離株が多数含まれることが示された。

以上より、タイ分離株には、タイ産発酵食品の環境に適応した日本産の株とは異なった発酵性を持つ分離株が多数存在することが分かった。

第4章 タイ産発酵食品由来微生物の酵素生産能およびGABA 生産能

4.1. 試験方法

4.1.1. カゼイン分解能試験

乳酸菌分離株は MRS 培地, *Staphylococcus* 属株は 802 培地で前培養した菌液をスキムミルク培地 [2 % Skim milk powder (和光純薬工業社製), 0.5 % Yeast extract (BD 社製), 1.5 % Agar, pH 7.0] に画線塗抹した後 30°C で培養した. 乳酸菌は嫌気条件下で, *Staphylococcus* 属は嫌気および好気条件下で培養した. 嫌気培養にはアネロパック・ケンキ (三菱ガス化学社製) を用いた. 培養 4 週間後までにコロニー周辺に透明帯が形成された株を陽性とした.

4.1.2. スターチ分解能試験

乳酸菌分離株は MRS 培地, *Staphylococcus* 属株は 802 培地で前培養した菌液をスターチ培地 [1 % Starch from corn (SIGMA 社製), 1 % Polypepton (和光純薬工業社製), 0.2 % Yeast extract (BD 社製), 0.2 % K₂HPO₄, 1.5 % Agar, pH 7.0] に画線塗抹した後 30°C で培養した. 乳酸菌は嫌気条件下で, *Staphylococcus* 属は嫌気および好気条件下で培養した. 嫌気培養にはアネロパック・ケンキ (三菱ガス化学社製) を用いた. 培養 4 週間後までにコロニー周辺に透明帯が形成された株, および培養 4 週間後にヨウ素溶液を滴下し, ヨウ素デンプン反応によりコロニー周辺の培地が青紫色に染まらなかった株を陽性とした.

4.1.3. GABA 生産能試験

乳酸菌分離株は MRS 培地, *Staphylococcus* 属株は 802 培地にそれぞれ 5% グルタミン酸ナトリウム一水和物 (Monosodium Glutamate, MSG と略す) を加えた試験培地で 5 日間培養後, 遠心分離により菌体を除いて 1000 倍希釈した培養上清を, PITC で誘導体化した後 HPLC (model LC-20AB apparatus; Shimadzu) で測定した. GABA 生産能が知られている *Lactobacillus brevis* NBRC 12005 および *L. senmaizukei* NBRC 103853^T を陽性対照として用いた (図 4-1).

4.2. タイ産発酵食品由来微生物の生産能と日本産分離株との比較

タイ分離株の乳酸菌 50 株および *Staphylococcus* 属 12 株について, カゼイン分解能試験によるプロテアーゼ活性, スターチ分解能試験によるアミラーゼ活性, および GABA 生産能を調べた結果, アミラーゼ活性を示す株は見つからなかったが, プロテアーゼ活性はタイ分離株の *Staphylococcus* 属株が好気条件下で 7 株 (58%) が示し, このうち 2 株は嫌気条件下でも分解能を示した. GABA 生産能はタイ分離株の乳酸菌 3 株 (6%) が示した (表 4-1).

アミラーゼ活性は富山と沖縄の分離株でも見つからなかった. プロテアーゼ活性を示した株は, 富山分離株と沖縄分離株で乳酸菌 1 株と *Staphylococcus* 属株 1 株の合計 5 株がそれぞれ見つかった. GABA 生産能を示す株は富山と沖縄の分離株では見つからなかった.

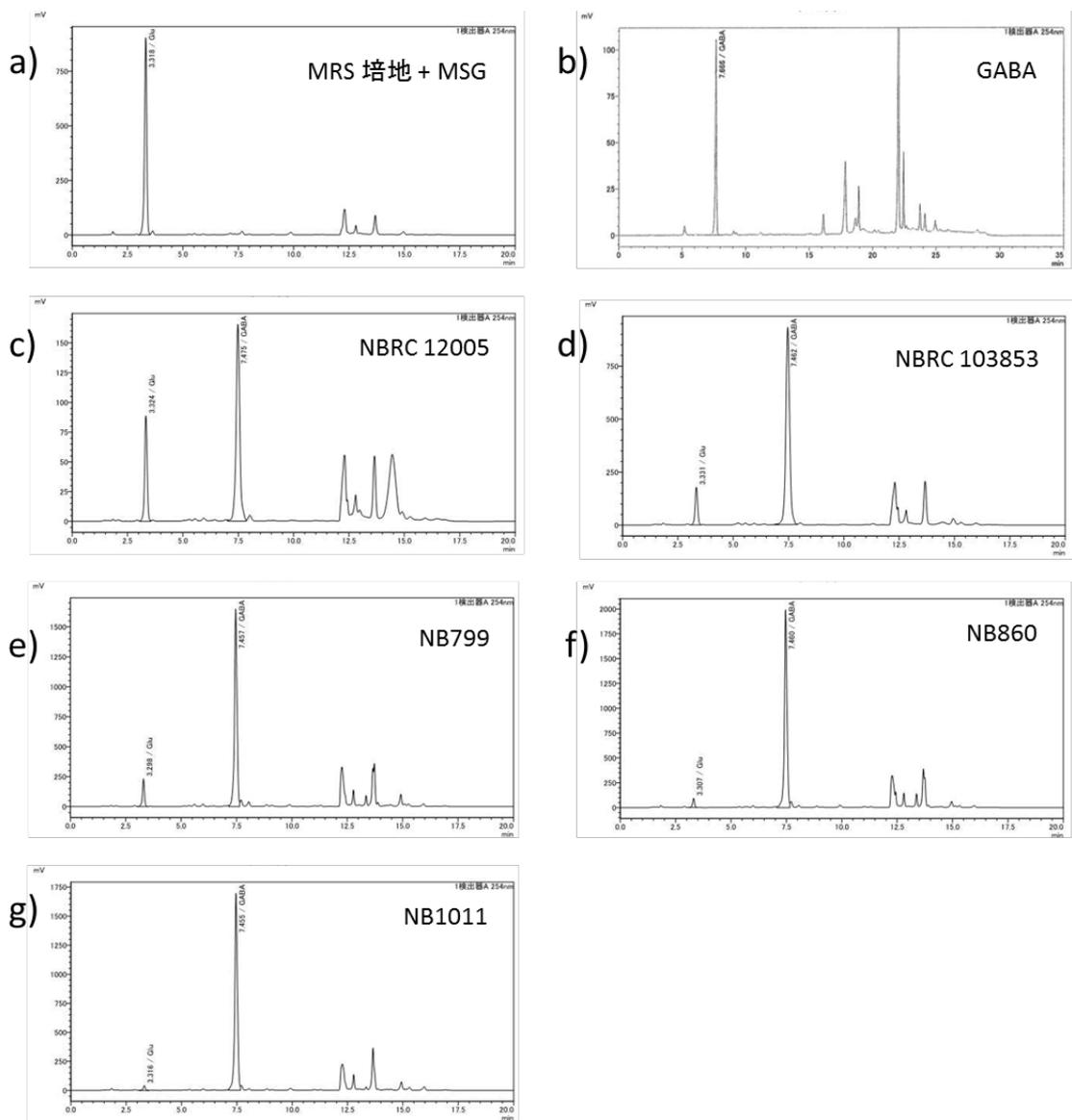


図 4-1. HPLC による培養上清からの GABA の検出

a) 未接種の試験培地 (MRS 培地+5% グルタミン酸ナトリウム) ; b) 2.5 μ mol/L GABA 溶液 ; c) NBRC 12005 ; d) NBRC 103853 ; e) NB799 ; f) NB860 ; g) NB1011.

表 4-1. カゼイン分解能または GABA 生産能を示したタイ分離株

菌株番号	種	分離源の 原材料	カゼイン分解能		GABA 生産能
			嫌気	好気	
NB731	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	野菜	-	+	-
NB734	<i>Staphylococcus xylosus</i>	野菜	-	+	-
NB751	<i>Staphylococcus condimenti</i>	魚	-	+	-
NB784	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	魚	-	+	-
NB890	<i>Staphylococcus piscifermentans</i>	魚	-	+	-
NB891	<i>Staphylococcus simulans</i>	魚	+	+	-
NB902	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	魚	+	+	-
NB799	<i>Lactobacillus brevis</i>	野菜	-	n.d.	+
NB860	<i>Enterococcus gilvus</i> or <i>E. raffinosus</i>	大豆	-	n.d.	+
NB1011	<i>Enterococcus avium</i>	野菜	-	n.d.	+

+, positive; -, negative; n.d., not determined.

4.3. まとめ

タイ分離株でカゼイン分解能を示しプロテアーゼ活性を有する株は全て *Staphylococcus* 属株だった。活性を示した 7 株のうち 5 株が魚の発酵食品由来であり、タンパク質が豊富な環境に適応し風味形成に関わっていることが推測できる。*Staphylococcus* 属は乳酸菌と同様に通性嫌気性菌だが、多くの場合、嫌気条件下よりも好気条件下での生育が良好であることが知られている。これら分離株も嫌気と好気のどちらの条件下でも生育が可能だが、好気条件下での生育はより良好で、プロテアーゼ活性においても好気条件下では 7 株全てが活性を示した。一方で嫌気条件下での生育も可能であり、2 株は嫌気条件下でも活性を示し、発酵過程における嫌気的な条件下での利用が期待できる。

GABA 生産能は、富山や沖縄の分離株では見つからなかったのに対して、タイ分離株の乳酸菌から 3 株が見つかった。GABA を生産する乳酸菌は多くの報告があり分離頻度も高い (Dhakal *et al.*, 2012, Franciosi *et al.*, 2015, Siragusa *et al.*, 2007, Zareian *et al.*, 2012)。本研究で得られた 6% という割合は非常に少ないが、主要な GABA 生産菌種として挙げられる *L. brevis* の他、報告の少ない *Enterococcus* 属種の株が得られており、野菜や大豆の発酵食品に由来する株であるこれらの株は、機能性を付与した発酵食品製造における新たな選択肢の 1 つとして活用が期待できる。

以上から、タイ分離株には特色ある製品開発に活用可能な、旨味や香気成分、機能性物質の生産能といった付加的な価値を生み出す菌株が存在することが明らかとなった。

結論

微生物が大きな役割を担う発酵食品は、地域の環境や文化を反映して様々な種類が存在する。発酵に関わる代表的な微生物として特に乳酸菌では、ヨーグルトなどの乳を原料とした発酵乳製品に関わる乳酸菌のほかに、魚や肉の発酵食品や野菜などの漬物に関わる乳酸菌があり、これらの間には生育に利用できる栄養源（糖の種類など）や様々なストレスに対する耐性の強さなどの性質に違いがある。魚や肉、野菜の発酵食品は発酵乳製品に比べて限られた糖源と高塩濃度などストレスが高い環境であることから、そこに生息する乳酸菌を中心とした微生物は多様な性質を持つと考えられる。

米を主食とし、魚介類や野菜を主菜、副菜とする日本には魚や野菜の発酵食品が豊富で、共通した食文化を有する東アジアや東南アジアの多くの国々でも同様の傾向が見られる。東南アジアに位置するタイにも、特に魚や野菜の様々な発酵食品が存在し、そこに生息する微生物はストレス耐性などを有する可能性が考えられる。またタイの発酵食品は日本の発酵食品とは異なる種類の野菜や魚が用いられており、加えて製造工程や流通、販売における温度管理にも違いがあり、最終的な製品の味も日本の発酵食品とは異なることから、関与する微生物も異なる可能性がある。著者がこれまでにやってきた分類学的な調査結果から、タイ産発酵食品に由来する乳酸菌と *Staphylococcus* 属細菌は分類学的に多様だった。また幾つかの新しい種も見つかっており、日本では得られない魅力的な微生物資源であると考えられた。しかしこれらの分離株について、微生物資源としての観点から網羅的に研究された報告はなく、タイ産発酵食品に由来する微生物の活用へは繋がっていない。そこでタイ産発酵食品に由来する乳酸菌と *Staphylococcus* 属分離株について、菌株利用の基礎

的な情報となる生育環境におけるストレス耐性や糖の発酵性、および付加的な価値を付与する情報として旨味や香気成分の生成に関与するプロテアーゼ活性とアミラーゼ活性、および機能性物質として注目されている GABA の生産能を調査しタイ分離株の性質を明らかにすると共に、日本の発酵食品に由来する分離株との比較からタイ分離株の特徴を見いだすことを目的とした。

タイと日本の分離株について、まず構成種を比較した結果、分離株の乳酸菌と *Staphylococcus* 属細菌のどちらにおいても共通する種は少なく、タイ、富山、沖縄それぞれの地域で異なる菌種で構成されていた。他地域と共通しなかった菌種はタイ分離株で最も多く、タイ分離株は日本の分離株とは種の分布が異なっていることが分かった。

環境ストレスに対する耐性を調べると、タイ分離株の乳酸菌には酸耐性や高温耐性を有する株が数多く存在し、また酸性域からアルカリ域までの広い pH 範囲に適応した株も複数みられ、10% NaCl に対する耐性を示す乳酸菌株は少ないものの 6~9% の中程度の塩耐性を示す株も多くみられた。酸耐性と高温耐性を同時に示す株はタイ分離株の一部にしか見つからず、広い pH 範囲に適応した株も日本産の株では富山分離株の一部が示したのみであったことから、タイ分離株の乳酸菌は日本産の株とは異なる特徴を有していることが分かった。アルカリ耐性や 10% の高塩濃度耐性をもつ株はタイ、富山、沖縄の分離株全てから見つかった。タイ分離株では *Staphylococcus* 属株がその特徴を示し、ほとんどの株が両方の耐性を示した。一方で *Staphylococcus* 属に加えて富山分離株では *Marinilactibacillus* 属、沖縄分離株では *Tetragenococcus* 属がその特徴を示し、両耐性を示す種の構成が属レベルで異なっていた。また両耐性を示す分離株のうち、3 地域に共通した *Staphylococcus* 属株

の種を比較するとタイ分離株で最も多様であることが分かった。タイ分離株の *Staphylococcus* 属にはプロテアーゼ活性を示す株が複数見つかり、環境ストレス耐性以外の性質においても乳酸菌とは異なる性質を示していた。同じ耐性を示しても属種が異なれば、共通した耐性以外の性質が異なり、そのため発酵に用いた場合には異なった発酵産物が生成されると推測できる。

乳酸菌と *Staphylococcus* 属細菌の性質の違いは糖の発酵性においても顕著で、*Staphylococcus* 属株に比べて乳酸菌は多様な糖の発酵が可能で、同種内の株における糖発酵パターンの多様性も大きかった。植物基質が含む多様で量的には少ない糖源を資化して発酵を進めるのに適応した結果、タイ分離株の乳酸菌は多様な糖を発酵し、同種内の株における糖発酵パターンの多様性も大きくなったと推測される。一方で、生育に糖が必須ではない *Staphylococcus* 属株は、乳酸菌と比べて種内の発酵性の違いも小さく、糖が少なくタンパク質が豊富な魚の発酵食品の環境に適応していると考えられた。基準株との比較から、タイ分離株の発酵性は乳酸菌と *Staphylococcus* 属株ともに、基本的に種の特徴を反映していたが、同種内でも数種類の糖の発酵性に違いがあるなど株による多様性があることが分かった。日本産の分離株も含めた解析結果から、同種内に糖発酵性の多様性があった種の多くは分離地も複数に渡っており、異なる環境への適応力の高さが推測された。種内多様性がみられた種でクラスター解析において基準株から離れた株は、基準株との糖発酵性の違いにそのタイ産発酵食品環境への適応の特徴が反映していると考えられた。基準株との比較から、これらのタイ分離株は環境に適応して一部で適した発酵能を獲得し、多くは不必要な発酵能を落としていることが分かった。一方で、同種でまとまったグループを

作った種は、それぞれの地域で共通しない種が多数を占めていた。タイ分離株で特にその種数が多く、これらの種はそれぞれの発酵食品環境に適応した特徴的な糖発酵性を示していると考えられる。日本産分離株との比較から、タイ分離株の乳酸菌は植物基質に含まれる糖の発酵性が高いという特徴がみられ、野菜などの発酵食品への応用が期待できる。

環境ストレス耐性と糖発酵性のどちらにおいても、タイ分離株は基本的に種の特徴を反映しており、分離株の種の構成自体に重複が少なかったことから、それぞれ地域によって異なる性質を有する株で構成されていると考えられる。原産地や分離源である発酵食品の原材料との明確な相関性はみられなかったが、種内の性質は一定では無く幅があり、その多様性には、分離源や分離源である発酵食品の製造環境の影響を受けていると考えられる性質もみられた。また糖の発酵性においては、種内に多様性が生じやすく、そのため幅広い適応力をもつと考えられる種と、それぞれの地域や発酵食品に適した種が存在すると考えられ、タイ分離株は日本の株とは異なる性質を持つことが示された。

加えてタイ分離株には、GABA 生産能を有する乳酸菌やプロテアーゼ活性を示す *Staphylococcus* 属株も見つかっており、これらの株を用いて機能性を付与した発酵食品への活用が期待できる。

以上から明らかとなったタイ分離株の特長を活かし、例えばタイ分離株の乳酸菌に特徴的だった酸耐性と高温耐性の両耐性を示した *Lactobacillus fermentum* と *Pediococcus acidilactici* を用いれば、初発 pH の低い果実や野菜などを原料とし、高温発酵生産による発酵野菜ジュースの製造に活用が期待できる。また糖アルコール発酵能を示した大豆の発酵食品に由来する分離株やタイ分離株で見つかった新種である *Lactobacillus plajomi* を利

用して、基質を糖アルコールに制限することにより、他の微生物の繁殖の制御が容易になり、また糖アルコールは人が代謝できない甘味料であるため、食品中に残存してもゼロカロリー食品の製造が可能であると考えられる。耐塩性を特徴とした *Staphylococcus* 属分離株はプロテアーゼ活性を示した 7 株を用いて、発酵肉製品や塩辛など魚の発酵食品の風味形成に活用が期待できる。このように、本研究で示したタイ分離株の特徴は、菌株利用において直接的に利用可能なデータであると考えられる。

以上より、本研究はタイ産発酵食品に由来する乳酸菌および *Staphylococcus* 属細菌の、日本産分離株とは異なる特徴を明らかにし、タイ分離株の応用利用へ繋げる新たな価値を見いだした。本研究の成果が、微生物資源としてのタイ分離株の活用に繋がること、そして未だ埋もれている、またはこれから分離される微生物資源の活用に繋げる 1 つの検討手段となることを期待する。

謝辞

本研究を行うにあたり，環境共生学専攻の諸先生方ならびに諸先輩方には様々な角度から多くの貴重なご助言・ご指導をいただきました。また，本研究の研究対象とした微生物を共に分離・収集したタイ国立遺伝子工学バイオテクノロジーセンターの Dr. Pattaraporn Yukphan には温かい理解と励ましをいただきました。比較対象とした日本産発酵食品の収集には，富山県農林水産総合技術センターの寺島晃也博士，富山県砺波農林振興センターの石川弘子氏，東京農業大学宮古亜熱帯農場の菊野日出彦先生には多大なるご助言とご尽力を賜りました。これら多くの皆さまのご指導，ご援助，ご協力に改めて深く感謝申し上げます。

また本研究の遂行にあたり，加えて本論文を構成する柱となる基礎論文の作成において多大なるご助言とご指導を賜りました鈴木健一郎博士に深く感謝申し上げます。

学位審査において，ご多忙の中にも拘わらず副査を引き受けてくださった東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科 内野昌孝先生，東京農業大学大学院農学研究科環境共生学専攻 古庄律先生，亀山慶晃先生に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり多大なるご助言とご指導を賜り，またご多忙の中にも拘わらず副査を引き受けてくださった岡田早苗先生に深く感謝申し上げます。

最後に，指導教授として終始根気強くご指導ご鞭撻を賜りました東京農業大学大学院農学研究科環境共生学専攻 田中尚人先生に深く感謝申し上げます。

引用・参考文献

[英文]

Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J. & Noller, H.F. (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **75**: 4801–4805.

Dhakal, R., Bajpai, V.K. & Baek, K.-H. 2012. Production of gaba (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. Braz. J. Microbiol. **43**:1230-1241.

Endo, A., Mizuno, H. & Okada, S. (2008). Monitoring the bacterial community during fermentation of sunki, an unsalted, fermented vegetable traditional to the Kiso area of Japan. Letters in applied Microbiology **47**: 221-226.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution **39**: 783-791.

Franciosi, E., Carafa, I., Nardin, T., Schiavon, S., Poznanski, E., Cavazza, A., Larcher, R. & Tuohy, K.M. 2015. Biodiversity and γ -aminobutyric acid production by lactic acid bacteria isolated from traditional alpine raw cow's milk cheeses. Biomed. Res. Int. **2015**:Article ID 625740, 11 pages.

Ishikawa, M., Nakajima, K., Yanagi, M., Yamamoto, Y. & Yamasato, K. (2003).

Marinilactibacillus psychrotolerans gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic

marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 711-720.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111–120.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**:2947-2948.

Miyashita, M., Yukphan, P., Chaipitakchonlatarn, W., Malimas, T., Sugimoto, M., Yoshino, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Kirtikara, K., Tanticharoen, M. & Suzuki, K. 2012. 16S rRNA gene sequence analysis of lactic acid bacteria isolated from fermented foods in Thailand. *Microbiol. Cult. Coll.* **28**: 1-9.

Miyashita, M., Yukphan, P., Chaipitakchonlatarn, W., Malimas, T., Sugimoto, M., Yoshino, M., Kamakura, Y., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanaka, N., Nakagawa, Y. & Suzuki, K. 2015. *Lactobacillus plajomi* sp. nov. and *Lactobacillus modestisalitolerans* sp. nov., isolated from traditional fermented foods. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**: 2485-2490.

- Naser, S.M., Thompson, F.L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M. & Swings, J. 2005. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology* 151: 2141-2150.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C.G., Coda, R. & Gobbetti, M. 2007. Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of italian cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7283-7290.
- Zareian, M., Ebrahimpour, A., Bakar, F.A., Mohamed, A.K.S., Forghani, B., Ab-Kadir, M.S.B., Saari, N. 2012. A glutamic acid-producing lactic acid bacteria isolated from Malaysian fermented foods. *Int. J. Mol. Sci.* 13:5482-5497.

[和文]

- 石川健一 2012. 赤カブの色彩を保つ乳酸菌を利用した発酵漬物製造法について. あいち産業科学技術総合センター研究報告 1 : 84-87.
- 角野 猛 2014. 日本, 中国, 韓国及び東南アジアの伝統塩蔵発酵食品に関する総合的研究. 日本調理科学会誌 37 (2) : 124-134.
- 三枝弘育 2009. 乳酸醗酵野菜を利用した新たな焼き肉のたれ「東京アキバ・ソース味のたれ」の開発. 東京都農林総合研究センター研究報告 4: 25-29.

- 澤渡優喜, 石川森夫, 横田 篤 2010. 第2章7. 3. アルカリ, 日本乳酸菌学会 (編), 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, p. 233-238, 京都大学学術出版会.
- 杉本真也, 園元謙二 2010. 第2章7. 4. 塩, 日本乳酸菌学会 (編), 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, p. 238-240, 京都大学学術出版会.
- 鶴菌 大, 細井永次, 富永達矢, 常見崇史 2013. 新規減塩漬物の製造技術の開発. 埼玉県産業技術総合センター研究報告 11.
- 寺島晃也, 多田耕太郎, 加藤一郎, 中川義久, 平野 寛, 鈴木敏郎 2012a. GABA 生産乳酸菌の非加熱発酵ソーセージへの応用. 日本微生物資源学会誌 28 : 19-27.
- 寺島晃也, 多田耕太郎, 加藤一郎, 中川義久, 平野 寛, 鈴木敏郎 2012b. γ -アミノ酪酸 (GABA) 生産乳酸菌 *Pediococcus acidilactici* TOYAMA の「かぶらずし」への応用. 日本微生物資源学会誌 28 : 29-33.
- 西脇俊和 2012, 酵素・微生物を利用した地域特産農産物の食品加工. 生物工学会誌 90: 742-743.
- 能登裕子, 河野慎一, 熊林義晃, 田村吉史 2013. 発酵技術を使ったサケ乾製品の試作. 北海道立総合研究機構食品加工研究センター研究報告 10: 9-15.
- 藤浪俊, 守野正人, 伊藤政博 2012. 好アルカリ性細菌のアルカリ適応機構. 生物工学会誌 11: 692-695.
- 船津保浩, 川上 誠, 徳山武宏, 酒井 彩, 谷口亮輔, 岩崎智仁, 石下真人, 山本克博 2013. 組成や形状の異なる塩を用いて製造した発酵ソーセージの品質特性, 特にスターター菌の違いについて. *New Food Industry* 55 : 34-42.

松田茂樹, 上田誠之助 1995. 大豆煮汁の乳酸菌による有効利用と大豆成分の変化. 日本醸造協会誌 90 (8) : 592-596.

吉川修司・田村吉史・阿部 茂・佐藤敬彦*・小山 洋 2009. 耐塩性微生物スターターを用いた発酵ヤナギダコ醤油の開発. 北海道立食品加工研究センター報告 8 : 29-33.

古田正範, 樋口智子 2004. 食品関連未利用資源の素材化に関する調査研究 大豆蒸煮液を利用した乳酸発酵食品の試作. 福岡県工業技術センター研究報告 14 : 39-42.