

タイ産発酵食品由来乳酸菌および *Staphylococcus* 属分離株の環境ストレス耐性の特性

宮下美香^{1)*}, 杉本昌子¹⁾, 鎌倉由貴¹⁾, Pattaraporn Yukphan²⁾,
Wanchern Potacharoen²⁾, 中川恭好¹⁾, 鈴木健一郎¹⁾, 田中尚人³⁾

¹⁾ 独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) バイオテクノロジーセンター (NBRC)
〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8

²⁾ BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)
113 Thailand Science Park, Phahonyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

³⁾ 東京農業大学菌株保存室 (NRIC) 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

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、その資源としての特徴および有用性を評価するため、生育環境におけるストレス耐性を調べた結果、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した。このうち酸耐性と高温耐性は乳酸菌の、アルカリ耐性と高塩濃度耐性は *Staphylococcus* 属分離株の特徴が主に反映されていた。そこでタイの気候や発酵食品の特徴を考慮して収集した日本国内の発酵食品に由来する分離株と比較した結果、タイ産発酵食品に由来する乳酸菌は酸耐性を示す株の割合が日本の分離株に比べて顕著に高く、酸耐性と高温耐性の両方を併せもつ株はタイの分離株のみであった。また、酸性域からアルカリ域までの広い pH 範囲に対する適応もタイ産発酵食品に由来する乳酸菌が優れていた。タイ産発酵食品に由来する *Staphylococcus* 属分離株の特徴としたアルカリ耐性や高塩濃度耐性をもつ株は日本の同属の分離株にも見つかると、類似環境に生息する *Staphylococcus* 属細菌には地域問わずこれらの耐性をもつ株が広く分布していると考えられた。タイと日本の乳酸菌と *Staphylococcus* 属分離株の種の分布には特段共通性が認められず、これら種分布の違いが分離株の生育特性の違いに反映していると考えられた。しかし、酸耐性や高温耐性を示した分離株については、日本産発酵食品に由来する分離株と同じ乳酸菌種がタイ産発酵食品に由来する分離株にも含まれ、タイの分離株には加えて多数の種が存在した。さらにタイの分離株では同種の株でも耐性に多様性が見られる場合もあり、株レベルでの性質の多様性が確認された。したがって様々な素材から製造された多様性に富んだタイの発酵食品から得られた分離株は、ストレス環境に適応した耐性を示す、日本では得られない微生物資源であると考えられた。

キーワード：環境ストレス耐性, 乳酸菌, タイ産発酵食品

序 文

近年、乳酸菌を利用した新たな発酵食品の開発や、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。地域の企業支援を目的とした公設試験研究機関の研究報告からも、その需要の高さを知ることができる。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漬物から分離した乳酸菌の利用 (西脇, 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, 2004) 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。こういった発酵食品の製造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。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

*Corresponding author

E-mail: miyashita-mika@nite.go.jp

Accepted: January 12, 2016

である。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も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、年間を通じて高温多湿な環境であり食材が豊富で、魚や大豆、野菜を素材とした様々な発酵食品が豊富に存在する。筆者らはタイ国各地で収集した発酵食品から分離・収集した乳酸菌および *Staphylococcus* 属細菌のうち乳酸菌については、これまでに 16S rRNA 遺伝子解析に基づいた分類学的な多様性の評価を本学会誌に報告した (Miyashita *et al.*, 2012)。

日本では得られないタイの発酵食品に由来する微生物は、微生物資源のひとつとして新たな可能性を秘めており、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。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。

材料と方法

1) 供試菌株

(1) タイ産発酵食品由来分離株

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）で、これまでに種の多様性を報告した乳酸菌 (Miyashita *et al.*, 2012) および *Staphylococcus* 属

細菌の中から、分離源情報を基に選抜し、9つの発酵食品から分離した63株を供試菌株とした。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* 遺伝子解析の結果に基づいて近縁種を再同定した (Naser *et al.*, 2005)。供試菌株の分離源であるタイ産発酵食品のリストを Table 1 に示した。

(2) 比較対象

比較対象として、日本産発酵食品に由来する微生物を供試菌株とした。四季のある日本の発酵食品製造に特徴的な、冬季に仕込みを行う製造手法が用いられる富山県の発酵食品 15 サンプルと、年間を通じて高温多湿なタイと類似した環境である沖縄県の発酵食品 7 サンプルから、それぞれ分離した株を用いた（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）。加えてタイ産発酵食品に由来する分離株に近縁な基準株 36 種を試験した。発酵食品からの分離方法と 16S rRNA 遺伝子解析による近縁種の決定、および *L. plantarum* group に含まれる分離株の *pheS* 遺伝子解析による同定方法は、タイ産発酵食品由来微生物と同じ方法を用いた (Miyashita *et al.*, 2012)。分離に用いた富山県と沖縄県の発酵食品を Table 2 にまとめた。

2) 耐性試験

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* 属株には MRS 培地、*Tetragenococcus* 属株には MRS 培地に NaCl 6.5% を加えた培地 (pH 7.5-8.0)、*Marinilactibacillus* 属株には 2.5% NaCl GYPFK 培地 [1% Glucose, 0.5% Polypepton (和光純

Table 1 List of isolation sources collected in Thailand

Name	Main material	Number	pH	NaCl (%)
Noa mai dong	Vegetable	1	5.0	5.5
Pak kard dong	Vegetable	1	5.0	3.0
Hua chai pow chem	Vegetable	1	4.5	15.0
Tuaw jaew	Soybean	1	5.0	18.0
Pla-ra	Fish	1	5.0	25.0
Pla-jaw	Fish	1	5.0	30.0
Pla-jom	Fish	1	nd	nd
Pla-som	Fish	1	nd	nd
Mum	Meat	1	5.0	19.0

nd: not determined

Table 2 List of isolation sources collected in Japan

Place of origine	Name	Main material	Number	pH	NaCl (%)
Toyama	Akakabuzuke	Vegetable	5	3.5-6.0	1.8-9.3
	Red turnip	Vegetable	1	7.0	0
	Kaburazushi	Vegetable	3	4.5-6.0	1.0-2.0
	Salted turnip	Vegetable	1	6.0	1.0
	Pickled cucumber in rice bran paste	Vegetable	2	4.5-5.5	1.0-4.8
	Miso	Soybean	1	5.0	15.7
	Konkazuke	Fish	2	6.0	13.0
	Okinawa	Salted shallots	Vegetable	2	4.0-5.5
Pickled goya in rice bran paste		Vegetable	1	4.0-4.5	1.5
Pickled cucumber in rice bran paste		Vegetable	1	5.0-5.5	1.0
Miso		Soybean	2	5.0-5.5	3.0-10.5
Sukugarasu		Fish	1	6.0-6.5	16.0
Salted squid guts		Squid	1	6.0	6.0
Salted pork		Meat	1	6.5	3.5

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% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 8.5] (Ishikawa *et al.*, 2003) を基礎培地とした. 生育試験における吸光度は分光光度計 (Ultrospec 500 pro, アマシヤム・バイオサイエンス社製) で測定した.

(1) 生育 pH 試験

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. 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) 生育温度試験

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. 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.

(3) 生育 NaCl 濃度試験

基礎培地を NaCl 濃度 10%, 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. 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.

結果と考察

1) 分離株の種分布の比較

タイ産発酵食品に由来する 63 株の分離株は, *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. 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. 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 株に別れた (Table 3).

タイ分離株の乳酸菌は *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 種に分かれた. *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. modestisalitolterans* の 2 新種として報告した (Miyashita *et al.*, 2015). 富山分離株の乳酸菌は 8 属 22 種, 沖縄分離株の乳酸菌は 6 属 18 種に分かれた. 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.

タイ, 富山, 沖縄分離株の *Staphylococcus* 属株はそれぞれ 7 種, 3 種, 4 種に別れた. 3 地域で分離されたのは 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

Table 3 List of isolates

Genus	Species	Number of strains		
		Thailand	Toyama	Okinawa
<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. versmoldensis</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
Subtotal		51	88	25
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. condimenti</i>	2		
	<i>S. condimenti</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	
Subtotal		12	6	7
Total		63	94	32

^aThe isolates showed same similarity to both species.

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。

分離株の乳酸菌と *Staphylococcus* 属株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。

2) タイ産発酵食品由来微生物の耐性の特性

(1) 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 OD_{660} 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 (Fig. 1a)。

富山分離株と沖縄分離株それぞれの生育試験結果の OD_{660} 値に基づいて作成した箱ひげ図 (Fig. 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。

各生育条件下での培養7日目の OD_{660} 値が1.0以上を示した株数の割合 (%) を見ると (Table 4), 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の分離株で5%と6%であり、大きな差が見られた。一方で、10°C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

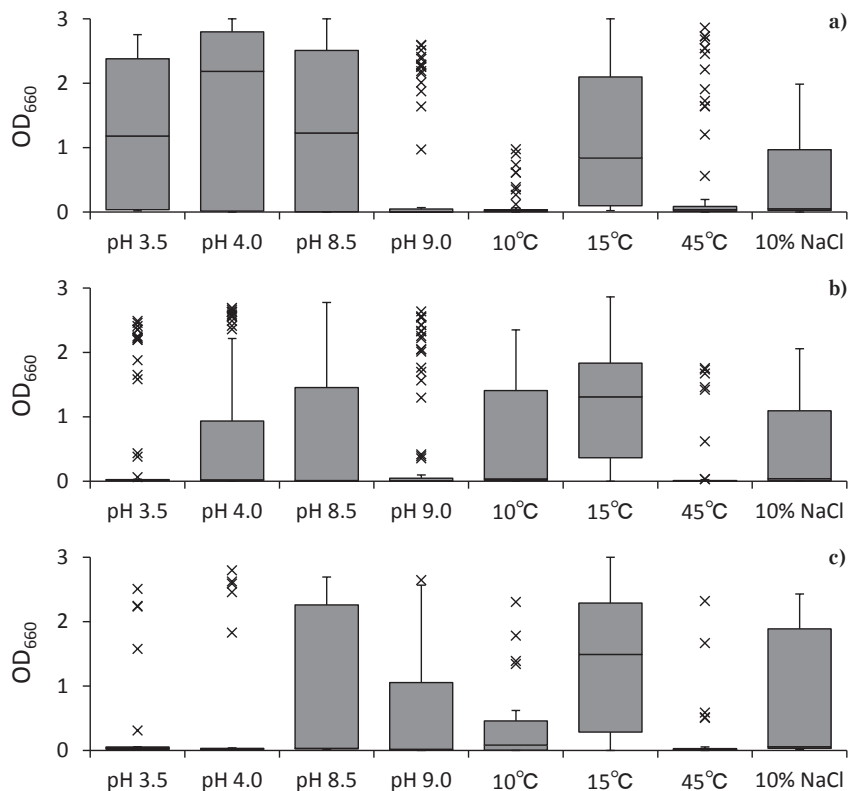


Fig. 1 Distribution of growth ability under the different conditions

a), Thai; b), Toyama; c), Okinawa. Box plot showing the growth detected by optical density at 660 nm (OD_{660}) after 7 days cultivation for each strain under the different conditions.

Table 4 Number and percentage (%) of tolerant strains in different conditions

Region of origin	Number and percentage (%) of tolerant strains ^a to each condition							
	pH 3.5	pH 4.0	pH 8.5	pH 9.0	10°C	15°C	45°C	10% NaCl
Thailand	33 ^b (52) ^c	39 (62)	32 (51)	14 (22)	0 (0)	27 (43)	13 (21)	15 (24)
Toyama	13 (14)	24 (26)	31 (33)	17 (18)	20 (21)	54 (57)	5 (5)	28 (30)
Okinawa	4 (13)	5 (16)	14 (44)	8 (25)	5 (16)	18 (56)	2 (6)	10 (31)

^aTolerant strains which showed growth to OD 1.0.

^bNumber of tolerant strains.

^cPercentage of tolerant strains out of the tested strains of each region. Total number of tested strains of Thailand, Toyama, and Okinawa are 63, 94, and 32. Growth at 10, 15 or 45°C was examined at pH 6.2 and 0% NaCl, growth at pH 3.5, 4.0, 8.5 or 9.0 were examined at 30°C and 0% NaCl, and growth at 10% NaCl was examined at pH 7.5 and 30°C.

Table 5 Number of tolerant strains by taxonomic group in the strains isolated from Thai fermented foods

Tolerant to:	Number of tolerant strains ^a	
	Lactic acid bacteria	Genus <i>Staphylococcus</i>
45°C	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

^aNumber of tolerant strains which showed growth to OD 1.0 out of 51 strains of lactic acid bacteria or 12 strains of genus *Staphylococcus*.

Growth at 45°C was examined at pH 6.2 and 0% NaCl, growth at pH 3.5, 4.0, 8.5 or 9.0 were examined at 30°C and 0% NaCl, and growth at 10% NaCl was examined at pH 7.5 and 30°C.

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°C の条件下における生育可能な株の割合には大きな差はなかった。

(2) タイ産発酵食品由来乳酸菌の耐性の特性

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 (Table 5)。

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もつ株は乳酸菌の中でも少数であり、ほと

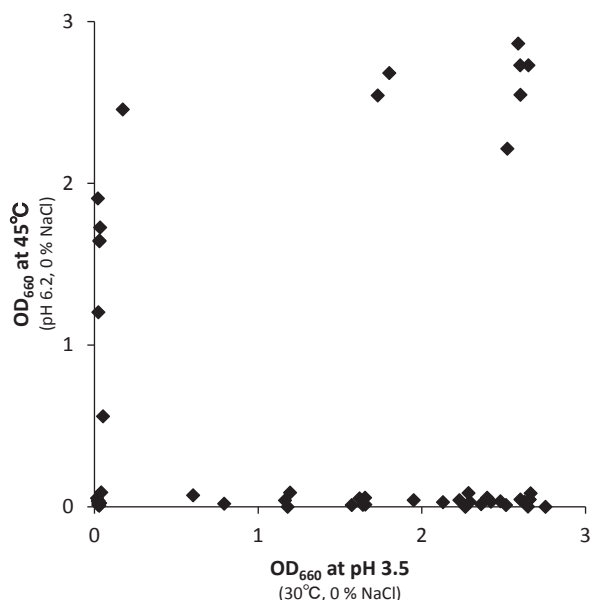


Fig. 2 Relation of tolerance to two different conditions (pH 3.5 and 45°C) of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented foods. Scatter plots showing the growth ability (OD₆₆₀) at each condition. Optical density at 660 nm (OD₆₆₀) detected after 7 days cultivation was used for analysis.

Growth at pH 3.5 was examined at 30°C and 0% NaCl and Growth at 45°C was examined at pH 6.2 and 0% NaCl.

んど株は酸耐性または高温耐性のどちらか一方を示すことが示された (Fig. 2)。

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°C での OD₆₆₀ 値を基に散布図を作成した (Fig. 3)。酸耐性または高温耐性のどちらか一方を示す株は

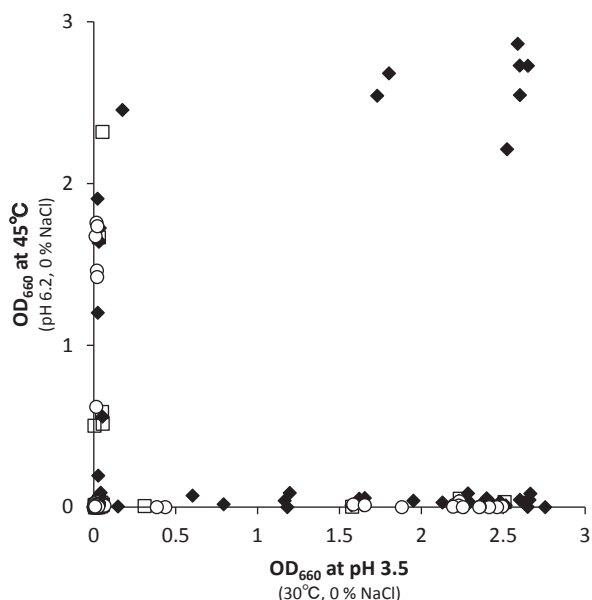


Fig. 3 Relation of tolerance to two different conditions (pH 3.5 and 45°C) of all isolates.

◆, Thai; □, Okinawa; ○, Toyama.

Scatter plots showing the growth ability (OD_{660}) at each condition. Optical Density at 660 nm (OD_{660}) detected after 7 days cultivation was used for analysis.

Growth at pH 3.5 was examined at 30°C and 0% NaCl and Growth at 45°C was examined at pH 6.2 and 0% NaCl.

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も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見ると (Table 6), 酸耐性と高温耐性の両方を示したのは *Lactobacillus fermentum* と一部の *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、*L. pentosus* はタイと富山の分離株に共通していた。これ以外の菌種は全てタイ分離株であり、耐性の有無にかかわらず富山と沖縄の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、これ以外の菌種は複数の地域に共通するものはなかった。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 (Fig. 1 と Table 4) で見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、

Table 6 Species of pH 3.5 and/or 45°C tolerant strains

	Species	Number of tolerant strains		
		Thailand	Toyama	Okinawa
Tolerant to:				
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 and 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		

^aNumber of tolerant strains which showed growth to OD 1.0 out of strains tested. Total number of tested strains of Thailand, Toyama, and Okinawa are 63, 94, and 32.

^bNumber of strains of *Lactobacillus brevis* in tested strains isolated from Thai fermented foods.

^cThe isolates showed same similarity to both species of *E. durans* and *E. faecium*.

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見られた。

酸耐性または高温耐性を示したタイ乳酸菌は、分離源とした発酵食品に偏りなく分布しており、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株は少なく、5 株中 4 株が *Enterococcus* 属で、そのほとんどは 10% NaCl 存在下では生育できず、酸耐性も示さず、45℃での生育には耐性を示す株が存在した。

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。

アルカリ耐性を示したタイ分離株の *Enterococcus* 属は 4 株中 3 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かか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・園元, 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 以外の要因がかかわっていることが推測される。

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主に *Lactobacillus* 属種に含まれた。これら 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見られ、pH 8.5 までのアルカリ耐性を示した乳酸菌株のほとんどは 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。

タイ分離株の乳酸菌の複数で見られた酸性域から 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。

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。しかし沖縄分離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かかわらず、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。

⑤各耐性の関連性

タイ分離株の乳酸菌が示した耐性の組み合わせを見ると、酸耐性と高温耐性、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 *L. fermentum* と *P. 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 *L. farciminis*, *L. pentosus*, *L. plantarum* subsp. *plantarum* だった。以上より、タイ分離株のも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 への酸耐性は見られず、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見られた一方、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見られた。

⑦タイ分離株の乳酸菌における特徴的な耐性

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 410 株中 91 株と、全体の 2 割を超える株が *L. farciminis* 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。

(3) タイ産発酵食品由来 *Staphylococcus* 属分離株の耐性の特性

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 (Table 5).

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 (Fig. 4).

タイ分離株の *Staphylococcus* 属株が示したアルカ

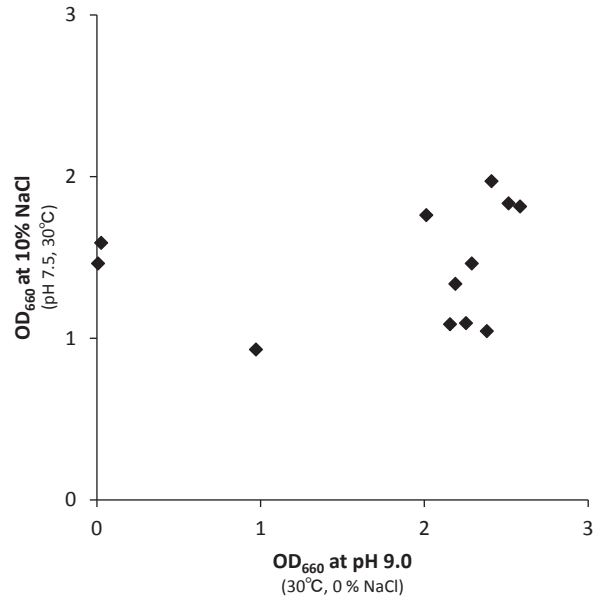


Fig. 4 Relation of tolerance to two different conditions (pH 9.0 and 10% NaCl) of *Staphylococcus* strains isolated from Thai fermented foods.

Scatter plots showing the growth ability (OD₆₆₀) at each condition. Optical density at 660 nm (OD₆₆₀) detected after 7 days cultivation was used for analysis.

Growth at pH 9.0 was examined at 30°C and 0% NaCl and Growth at 10% NaCl was examined at pH 7.5 and 30°C.

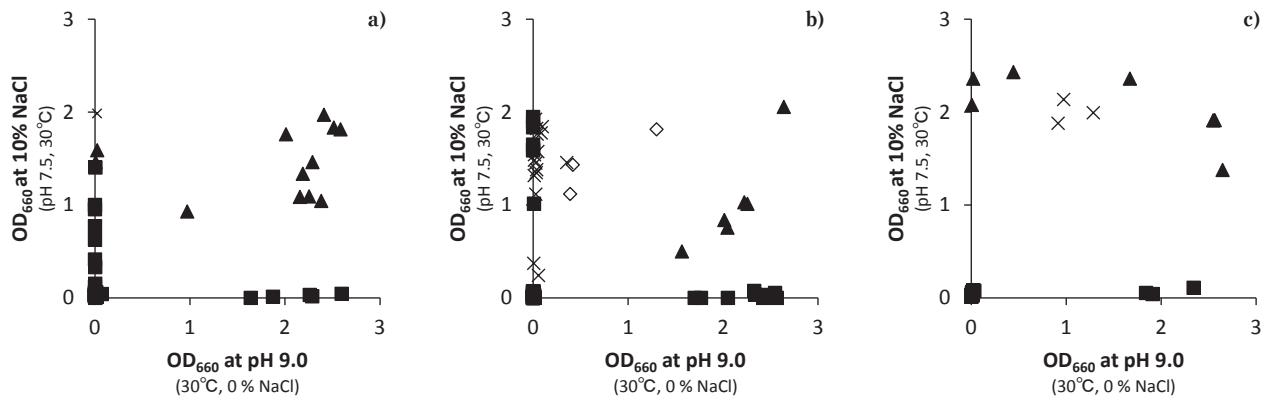


Fig. 5 Relation of tolerance to two different conditions (pH 9.0 and 10% NaCl) of all isolates.

a), Thai; b), Toyama; c), Okinawa. ▲, Genus *Staphylococcus*; ×, Genus *Tetragenococcus*; ◇, Genus *Marinilactibacillus*; ■, Lactic acid bacteria except genera *Tetragenococcus* and *Marinilactibacillus*.

Scatter plots showing the growth ability (OD₆₆₀) at each condition. Optical density at 660 nm (OD₆₆₀) detected after 7 days cultivation was used for analysis.

Growth at pH 9.0 was examined at 30°C and 0% NaCl and Growth at 10% NaCl was examined at pH 7.5 and 30°C.

Table 7 Species of pH 9.0 and/or 10%NaCl tolerant strains of genus *Staphylococcus*

	Species	Number of tolerant strains		
		Thailand	Toyama	Okinawa
Tolerant to: pH 9.0	<i>Staphylococcus equorum</i>		1/1	
	<i>Staphylococcus nepalensis</i>		2/4	
pH 9.0 and 10% NaCl	<i>Staphylococcus condimentii</i>	1 ^a /2 ^b		
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1/1	1/1	1/3
	<i>Staphylococcus piscifermentans</i>	3/3		
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	3/3		2/2
	<i>Staphylococcus simulans</i>	1/1		
	<i>Staphylococcus nepalensis</i>		2/4	
	<i>Staphylococcus xylosum</i>			1/1
10% NaCl	<i>Staphylococcus condimentii</i>	1/2		
	<i>Staphylococcus condimentii</i> or <i>S. piscifermentans</i> ^c	1/1		
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			2/3
	<i>Staphylococcus pasteurii</i>			1/1

^aNumber of tolerant strains which showed growth to OD 1.0 out of tested strains of genus *Staphylococcus*. Total number of tested *Staphylococcus* strains of Thailand, Toyama, and Okinawa are 12, 6, and 7.

^bNumber of strains of *Staphylococcus condimentii* in tested Thai isolates.

^cThe isolates showed same similarity to both species of *S. condimentii* and *S. piscifermentans*.

り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 (Fig. 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* 属細菌が 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* 属細菌について pH 9.0 と 10% NaCl に耐性を示した株の菌種を比較すると (Table 7)、3 地域ともに種に多様性が見られるが、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。

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)。

3) まとめ

以上の結果から、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見られ、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もつと推測できる。

分離株が示したそれぞれの耐性は原産地との相関性は見られず、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。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. condimenti* 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見られる場合もあり, 株レベルでの性質の違いが確認された。

発酵食品に由来する微生物のストレス耐性は, 分離源となる発酵食品の塩濃度や pH だけでなく, 原料の種類や製造工程の違いによっても影響を受けると考えられる。日本にはない素材の多様性や, 日本とは異なる製造工程の影響を受けたタイの発酵食品由来微生物は, 日本の発酵食品に由来する微生物とは異なる特徴を有していて, これらの性質を利用した新たな応用利用の可能性を秘めており, 微生物資源としての活用が期待される。

謝 辞

本研究に用いたタイ産発酵食品由来微生物は, タイの国立遺伝子工学バイオテクノロジーセンター (BIOTEC) との共同研究により収集した株であり, タイと日本の両国で保存・分譲しています。

本研究を行うにあたり, 情報提供や現地での試料収集に多大なるご尽力を賜りました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博士に深く感謝申し上げます。

文 献

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 **90** : 692-695.

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.

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.

角野 猛 2004. 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.

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.

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 modestisalitolers* 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.

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 **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.

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, 京都.

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, 京都.

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**.

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.

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.

Environmental adaptability and stress tolerance of lactic acid bacteria and the genus *Staphylococcus* isolates from fermented foods in Thailand

Mika Miyashita¹, Masako Sugimoto¹, Yuki Kamakura¹, Pattaraporn Yukphan², Wanchern Potacharoen², Yasuyoshi Nakagawa¹, Ken-ichiro Suzuki¹ and Naoto Tanaka³

¹NITE Biological Resource Center (NBRC), National Institute of Technology and Evaluation (NITE),

²BIOTEC Culture Collection (BCC), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC),

³NODAI Culture Collection Center, Tokyo University of Agriculture

To evaluate the usefulness of the lactic acid bacteria and staphylococci isolated from Thai fermented foods, we investigated their environmental adaptability and stress tolerance. Most of the strains isolated were tolerant to acidic conditions (pH 3.5 or 4.0). There were also some strains tolerant to high NaCl concentration (10%NaCl), high temperature (45°C), or alkalinity (pH 8.5 or 9.0). Tolerance to stress, acidity, and high temperature was found mainly among lactic acid bacteria strains, whereas tolerance to alkalis and high NaCl concentration occurred mainly in *Staphylococcus* strains. Comparison of strains isolated from Thai fermented foods and those isolated from Japanese fermented foods showed that the percentage of acid-resistant strains was significantly higher in Thai fermented foods, and that strains with both acid and high-temperature tolerance were isolated only from the Thai foods. Adaptability to a broad pH range was also greater in the strains isolated from Thai fermented foods. Resistance to alkaline conditions or high NaCl concentration was found mainly in *Staphylococcus* strains, isolated from either Thai or Japanese fermented foods. Our finding that all of the *Staphylococcus* species isolated showed either alkaline or high-NaCl-concentration tolerance, or both, indicated that *Staphylococcus* species with these tolerances were widely distributed in these fermented foods. Because the relationship between tolerance and source locality of the isolates was low, and the characteristics of the species isolated differed between Thailand and Japan, there appear to be differences in environmental adaptability and stress tolerance among the different constituent species. Strains that showed tolerance to acid or high temperature and were isolated from Thai fermented foods were assigned to a greater diversity of species than were the Japanese isolates. Furthermore, strains of the same species isolated from Thai fermented foods showed a variety of tolerances to environmental stress. These results reveal the distinctive nature of the strains isolated from Thai fermented foods; these strains are unique biore-sources that should be suitable for various applications.