

タイ産発酵食品由来乳酸菌および *Staphylococcus* 属分離株の糖発酵性と機能性物質生産能について

宮下美香^{1)*}, 鎌倉由貴¹⁾, 杉本昌子¹⁾, 柴田千代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、その微生物資源としての応用利用性と特徴を明らかにするために、糖の発酵性および酵素活性と GABA 生産能を調べた。分離株の糖発酵性は、乳酸菌と *Staphylococcus* 属株で顕著な違いが見られ、*Staphylococcus* 属株に比べて乳酸菌は多様な糖が発酵可能だった。糖発酵性試験結果に基づくクラスター解析の結果、分離株はそれぞれ基本的な種の特徴を反映していたが、乳酸菌には同種内で多様性がある種も見られた。日本国内の発酵食品に由来する分離株も含めて解析したところ、同種内で幾つかのクラスターに分かれた種は分離地域も複数に渡っており、糖発酵性における多様化のしやすさと環境への適応力の高さが推測された。糖発酵性に多様性が見られた種は、日本産分離株では全て複数の地域で共通して分離された種だったが、タイ分離株には他の地域では分離されなかった種が含まれていた。一方で、基準株と同じクラスターにまとまった乳酸菌種は、タイ・富山・沖縄の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。以上から、タイ産分離株には日本産の株とは異なる発酵性を示す株が多く含まれていることが示された。またタイ分離株の乳酸菌には GABA 生産能を示す株が、*Staphylococcus* 属株にはプロテアーゼ活性を示す株が見つかっており、特徴ある微生物資源であることが明らかとなった。

キーワード：糖類発酵性, 乳酸菌, タイ産発酵食品

序 文

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、菌株の生育条件や環境ストレス耐性、糖発酵性は基礎的な情報として重要である。加えて近年、特色ある製品開発のために、旨味や香り成分、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報告がされている (寺島ら, 2012a, b)。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)、多様な菌株の収集・保存とその性質に関する情報は、新たな菌株利用への一助となると考えられるが、これまでに網羅的に調査された報告はない。著者らはこれまでに、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 属細菌について、その分類学的な多様性の評価と、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に着目した分離株の特徴を調査し、本学会誌に報告した (Miyashita *et al.*, 2012; 宮下ら, 2016)。本報告では、発酵に利用する際の基礎的な情報として糖の発酵性と、付加的な価値を付与する情報として旨味や香り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、応用利用性を検討するとともに、基準株や日本産発酵食品に由来する分離株との比較から、タイ産発酵食品に由来する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

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 株について、生育環境における

*Corresponding author

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

Accepted: September 14, 2016

ストレス耐性について報告した(宮下ら, 2016)。これら63株のうち、好塩好アルカリ性乳酸菌の *Tetragenococcus* 属分離株を除く62株を供試菌株とした。タイ分離株62株は *Enterococcus* 属(3種4株), *Lactobacillus* 属(11種2亜種38株), *Pediococcus* 属(2種6株), *Weissella* 属(2種2株)の合計4属18種の乳酸菌と、*Staphylococcus* 属7種12株を含む。分離株の種名は16S rRNA 遺伝子解析の結果に基づいて決定し(Miyashita *et al.*, 2012), 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(宮下ら, 2016)。

比較対照として、日本産発酵食品に由来する微生物を供試菌株として用いた。富山県の発酵食品15サンプルと、沖縄県の発酵食品9サンプルから、それぞれ分離した株(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)のうち、好塩好アルカリ性乳酸菌を除いた富山分離株75株と沖縄分離株29株を供試菌株とした。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20株を試験した。富山分離株75株は、*Carnobacterium* 属(1種1株), *Enterococcus* 属(3種8株), *Lactobacillus* 属(9種42株), *Leuconostoc* 属(3種12株), *Pediococcus* 属(2種3株), *Weissella* 属(2種3株)の6属20種の乳酸菌と、*Staphylococcus* 属3種6株を含む。沖縄分離株29株は、*Enterococcus* 属(3種3株), *Lactobacillus* 属(4種7株), *Leuconostoc* 属(3種3株), *Pediococcus* 属(1種1株), *Weissella* 属(4種8株)の5属15種の乳酸菌と、*Staphylococcus* 属4種7株を含む。分離株の種名は16S rRNA 遺伝子配列解析、加えて *L. plantarum* group に含まれた分離株は *pheS* 遺伝子解析の結果に基づいて決定した(宮下ら, 2016)。

2) 糖発酵性試験

分離株の糖の発酵性を API 50 CH (シスメックス・ビオメリユー社製)を用いて調べた。方法は製品添付の説明書に従った。乳酸菌分離株は MRS 培地(メルクミリポア社製), *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% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 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、API 50 CHL 培地に懸濁した。菌懸濁液を API 50 CH 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 社製)。

3) 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, 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) 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, 0.2% Yeast extract, 0.2% K_2HPO_4 , 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。

5) 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、イソチオシアン酸フェニル (PITC) で誘導体化した後に HPLC (model LC-20AB apparatus, 島津製作所製)で測定した。カラムは Wakosil-PTC (4.0×200 mm), 移動相は PTC-Amino Acids Mobile Phase A と PTC-Amino Acids Mobile Phase B (和光純薬工業社製)

を用いた。分析条件はカラム温度 40℃、流速 1.0 ml/min、検出波長 254 nm、リニアグラジエント法 (B 液 0-100%, 20 min) で行った。

結果と考察

1) タイ産発酵食品由来分離株の糖発酵性

(1) 分離源の原材料による違い

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比較すると、野菜、大豆、魚の発酵食品に由来するそれぞれの分離株において 50% 以上の株が発酵可能だった糖の数は 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見られた糖を見ると、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、魚の発酵食品から分離した種は *Staphylococcus* 属種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と顕著に多様だった (Fig. 1)。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、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のは、構成種にこの属の割合が高いことが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。

(2) タイ産発酵食品由来乳酸菌の糖発酵性

① 基準株との比較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ー解析を行った結果、分離株は概ね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、分離株の糖の発酵パターンは種の特徴を反映していた。しかし分離株の中には同種でありながら複数のクラスターに分かれた種も見られた (Fig. 2)。

タイ分離株の乳酸菌で、同種内の株が複数のクラスターに分かれたのは *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 (Table 1)。これら種内でクラスター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。大豆の発酵食品由来の 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ーを形成した *E. avium*, *E. gilvus* or *E. raffinosus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. modestisalitolterans*, *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、同種内の株で複数に分かれたクラスター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 つにまとまるものを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見られたことや、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。

② 日本産乳酸菌分離株との比較

富山と沖縄の分離株を加えてクラスター解析を行った結果 (Fig. 3)、タイ分離株の解析において同種内で複数に分かれたクラスターを形成した種のうち、*E. durans* or *E. faecium* では、タイ分離株 1 株 (NB858) は基準株や他の分離株のクラスターどちらからも独立し、富山分離株は 1 つにまとまった。*L. acidipiscis* と *L. pentosus* のタイと富山の分離株はそれぞれ同種

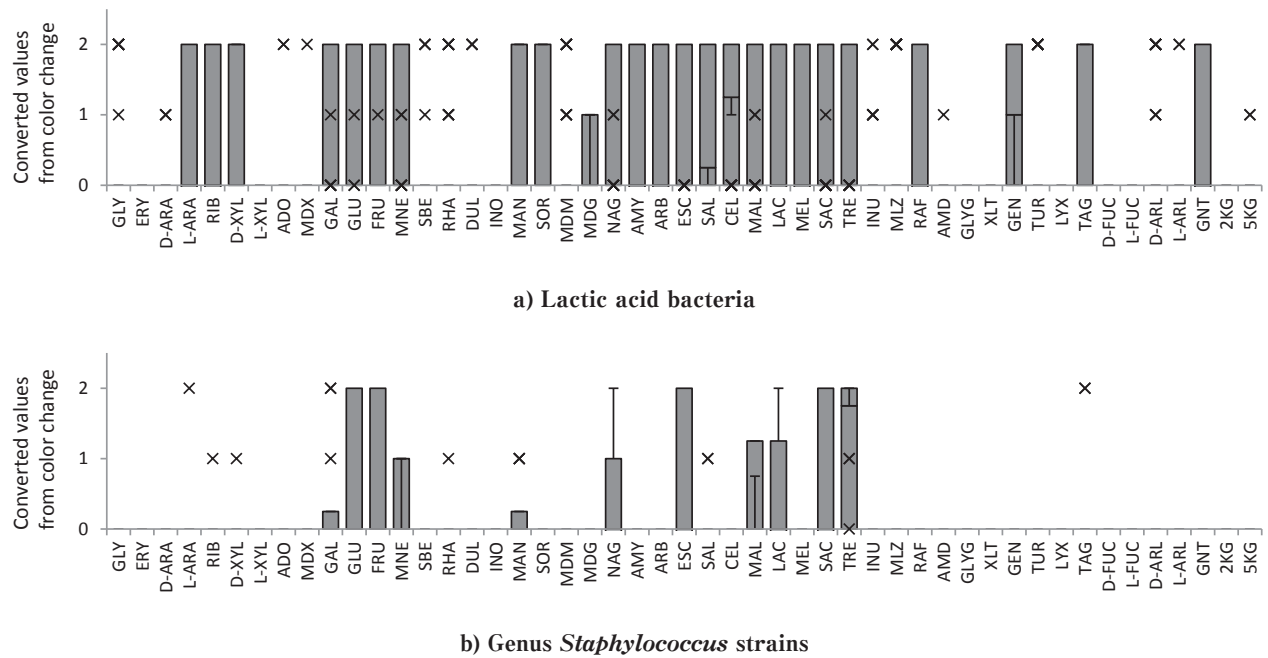


Fig. 1 Comparison of fermentation abilities of lactic acid bacteria and *Staphylococcus* strains isolated from Thai fermented foods. ×, outlier. Box plots show carbohydrate fermentation ability, as detected by using the API 50 CH system. Observations were made after 48 h of incubation. Results that were negative, weakly positive, and positive were converted to values ranging from 0 to 2 and used for the box plot analysis.

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-ketogluconate; 5KG, 5-ketogluconate

内でグループが分かれることが分かった。 *L. plantarum* subsp. *plantarum* はタイと富山の分離株は種内でグループが分かれたが、沖縄分離株のみを見ると基準株とともにまとまったクラスターを形成した。 *P. pentosaceus* はタイと沖縄の分離株1株ずつ (NB878, J45M06-1) が基準株から独立した1つのクラスターを形成した。

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、富山と沖縄の両分離株にも含まれる種は *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。

同種内でクラスターが複数に分かれる種とまとまる種は、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1つのクラスターにまとまった種で、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1つのクラスターにまとまった種で富山や沖縄の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分離種による糖発酵性の種内多様性の違い

分離地が同じにもかかわらず同種内でグループが

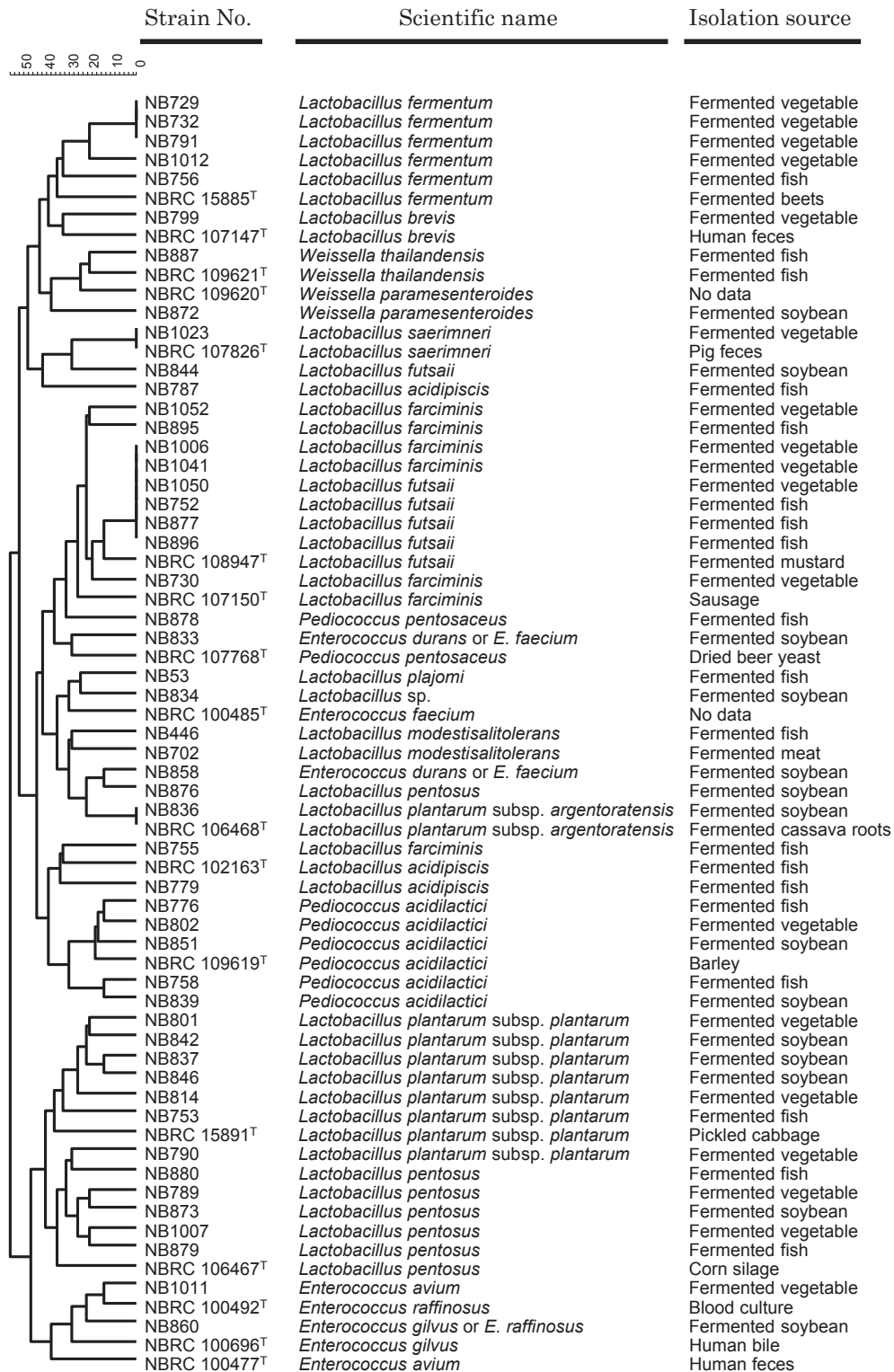


Fig. 2 Cluster analysis of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented foods and related type strains, based on the results of carbohydrate fermentation testing. Scale bar indicates distance percentages. Carbohydrate fermentation tests were performed by using the API 50 CH system. Observations were performed after 48 h of incubation. Results that were negative, weakly positive, and positive were converted to values of 0, 0.5, and 1.0, respectively, and used for the cluster analysis.

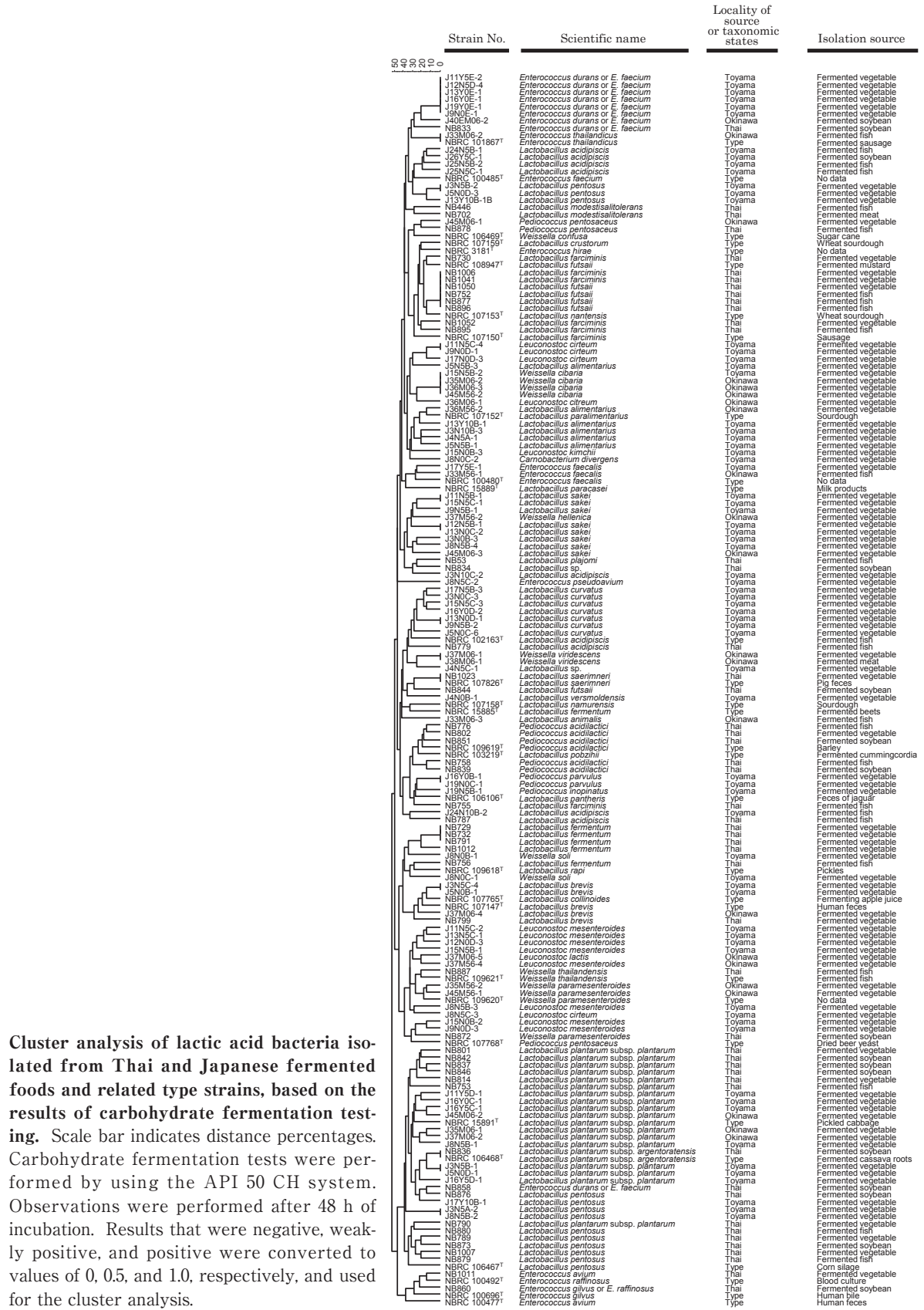


Fig. 3 Cluster analysis of lactic acid bacteria isolated from Thai and Japanese fermented foods and related type strains, based on the results of carbohydrate fermentation testing. Scale bar indicates distance percentages. Carbohydrate fermentation tests were performed by using the API 50 CH system. Observations were performed after 48 h of incubation. Results that were negative, weakly positive, and positive were converted to values of 0, 0.5, and 1.0, respectively, and used for the cluster analysis.

Table 2 List of species of lactic acid bacteria which were divided or bundled at the cluster analysis

Locality of source	At the dendrogram of Thai isolates (Figure 2)		At the dendrogram of all isolates (Figure 3)	
	Thai	Thai	Toyama	Okinawa
Divided	<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>		
	Bundled	<i>E. avium</i>	<i>E. avium</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. modestisalitolerans</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. modestisalitolerans</i>		<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argentransensis</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argentransensis</i>		<i>L. saerinneri</i>	<i>P. parvulus</i>	<i>W. cibaria</i>
<i>L. saerinneri</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>				

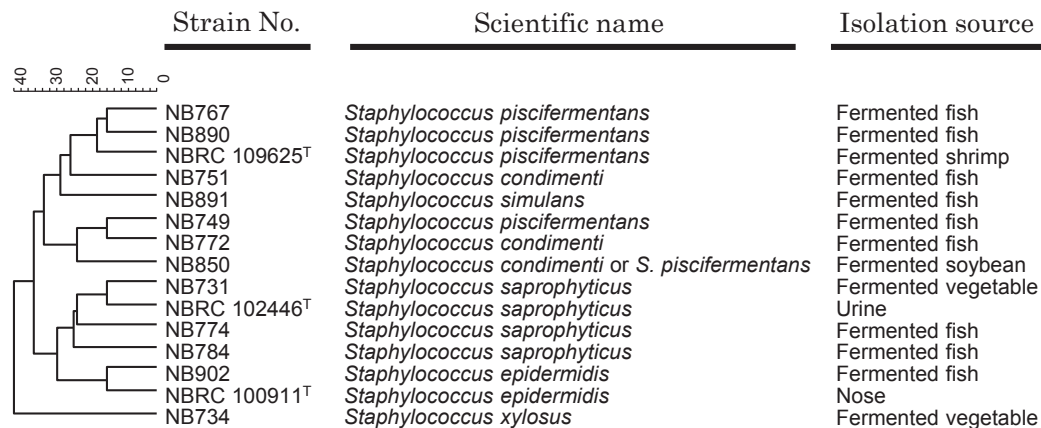


Fig. 4 Cluster analysis of genus *Staphylococcus* strains isolated from Thai fermented foods and related type strains, based on the results of carbohydrate fermentation testing. Scale bar indicates distance percentages. Carbohydrate fermentation tests were performed by using the API 50 CH system. Observations were performed after 48 h of incubation. Results that were negative, weakly positive, and positive were converted to values of 0, 0.5, and 1.0, respectively, and used for the cluster analysis.

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なく、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。

②日本産 *Staphylococcus* 属分離株との比較

富山と沖縄の分離株を加えたクラスター解析では、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 (NB734) と沖縄分離株 1 株 (J37EM109-1) がそれぞれ独立し、*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. condimentii* と *S. piscifermentans* の株が、富山分離株の *S. nepalensis* の 1 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 (Fig. 5)。

2) タイ産発酵食品由来分離株の酵素活性および GABA 生産能

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 (Table 3)。GABA を生産する乳

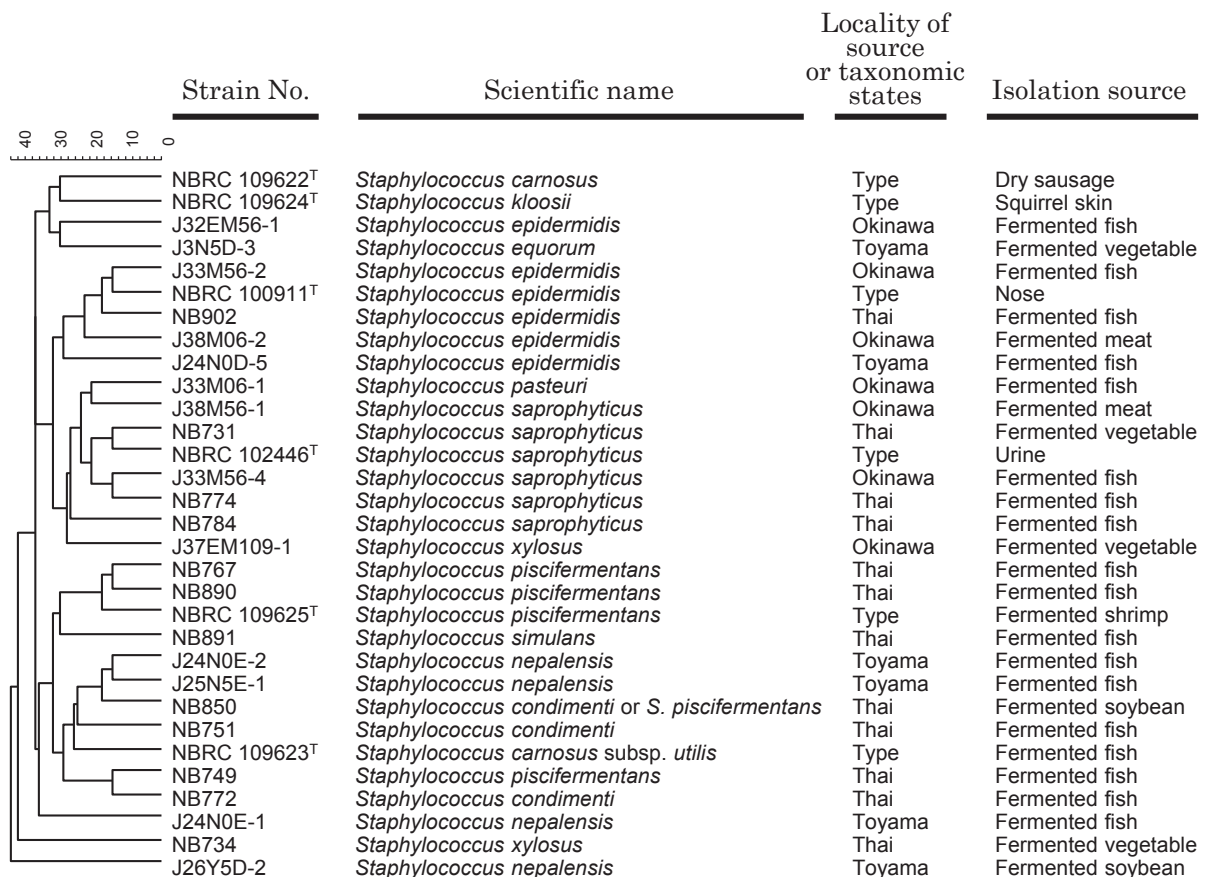


Fig. 5 Cluster analysis of genus *Staphylococcus* strains isolated from Thai and Japanese fermented foods with related type strains based on the results of carbohydrate fermentation test. Scale bar indicates distance percentage. Carbohydrate fermentation tests were performed by using the API 50 CH system. Observations were performed after 48 h of incubation. Results that were negative, weakly positive, and positive were converted to values of 0, 0.5, and 1.0, respectively, and used for the cluster analysis.

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, *Lactobacillus* 属や *Lactococcus* 属に比べて報告の少ない *Enterococcus* 属種の株が得られており, 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.

3) まとめ

タイ分離株の乳酸菌は, 糖の発酵性は基本的には種の特徴を反映しているものの, 同種であっても株ごとに数種類の糖において違いが見られた. 同種内で糖の発酵性に多様性がある種は, 複数の地域から分離された種が多数を占めたことから, 広範な環境への適応力の高さが推測される一方で, タイ分離株の乳酸菌には種内に多様性がありながら富山や沖縄の分離株には含まれなかった種があった. また同種内で類似した発酵性を示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. 同種内の株で発酵性に違いが見られた糖の多くは, 種内で株によって多様性があるとの報告がされている糖で (Bringel *et al.*, 2005, Tanasupawat *et al.*, 1993, 2000, Zanoni *et al.*, 1987), 供試菌株数が多いほど糖発酵性におけるばらつきが大きくなる傾向があるが, 一方で種の識別において指標とされる糖では, 例えば糖発酵性が類似している *P. acidilactici* と *P. pentosaceus*

の識別において指標の1つとされる maltose の発酵性は, 本研究でも分離株はそれぞれ種の基準株に一致していた. また糖発酵パターンが種内で2グループに分かれた *L. plantarum* subsp. *plantarum* を同種別亜種と識別する melizitose の発酵性は, 本研究の分離株でも両亜種ともに基準株と一致していた. *L. plantarum* group は解像度の高い *pheS* 遺伝子解析結果から同定していることもあり, 他の糖発酵性の違いは同種内の多様性と考えられるが, 種によっては限られた株数の報告が存在するに留まり, 多様性の有無が明らかではない場合もあるため, 本研究で定義する種は 16S rRNA 遺伝子配列と *L. plantarum* group は加えて *pheS* 遺伝子配列の解析に基づくものであることを考慮する必要がある. しかし分離種の構成がタイと日本の分離株で異なっており, 種間の糖発酵性の違いは種内のそれよりも基本的に大きかったことから, タイ分離株の乳酸菌には日本産の株とは異なる発酵性を示す株が多数存在することが明らかとなり, 菌株利用における選択の幅や応用の可能性が広がると考えられる. またタイ分離株の乳酸菌には GABA 生産能を示す株も見つかっており, 発酵食品製造における機能性の付与が期待できる. タイ分離株の *Staphylococcus* 属株は乳酸菌に比べて嫌気条件下で発酵可能な糖の種類が顕著に少ない一方で, 好気条件下でプロテアーゼ活性を示す株が多数含まれた. これらタイ分離株の *Staphylococcus* 属株は, 糖が少なくタンパク質が豊富な環境に適応しており, 魚や肉の発酵食品製造に適していると考えられる.

応用利用に向けて菌株を選抜する際に, 菌株の種名は大きな指標となるが, 種名からの選択に加えて, 糖

Table 3 List of strains isolated from Thai fermented foods that showed ability of Casein degradation or of GABA production

Strain No.	Species	Isolation source	Casein degradation		GABA production
			anaerobic condition	aerobic condition	
NB731	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Fermented vegetable	-	+	-
NB734	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Fermented vegetable	-	+	-
NB751	<i>Staphylococcus condimenti</i>	Fermented fish	-	+	-
NB784	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Fermented fish	-	+	-
NB890	<i>Staphylococcus piscifermentans</i>	Fermented fish	-	+	-
NB891	<i>Staphylococcus simulans</i>	Fermented fish	+	+	-
NB902	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Fermented fish	+	+	-
NB799	<i>Lactobacillus brevis</i>	Fermented vegetable	-	n.d.	+
NB860	<i>Enterococcus gilvus</i> or <i>E. raffinosus</i>	Fermented soybean	-	n.d.	+
NB1011	<i>Enterococcus avium</i>	Fermented vegetable	-	n.d.	+

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

発酵性の違いや酵素活性の有無，機能性物質生産能に関する情報は，菌株利用に大いに活かされる情報だと考えられる。既報のタイ分離株における環境ストレス耐性の特徴（宮下ら，2016）に加えて，本研究で示した，タイ分離株における糖発酵性の特徴から，タイ分離株は日本産の株とは異なる特徴を有していることが明らかとなった。またプロテアーゼ活性やGABA生産能を示す付加的な価値を生み出す菌株も見つかっており，これらの機能性とタイ分離株に特徴的な発酵性や生育特性を組み合わせることで，微生物資源として様々な応用利用が期待される。

文 献

- Bringel, F., Castioni, A., Olukoya, D.K., Felis, G.E., Torriani, S. & Dellaglio, F. 2005. *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1629-1634.
- Dhakar, R., Bajpai, V.K. & Baek, K.-H. 2012. Production of GABA (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Braz. J. Microbiol.* **43**: 1230-1241.
- 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.
- 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.
- 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.
- 宮下美香, 杉本昌子, 鎌倉由貴, Pattaraporn Yukphan, Wanchern Potacharoen, 中川恭好, 鈴木健一郎, 田中尚人 2016. 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. *日本微生物資源学会誌* **32**: 13-24, 2016.
- 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.
- Tanasupawat, S., Okada, S., Kozaki, M. & Komagata, K. 1993. Characterization of *Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici* strains and replacement of the type strain of *P. acidilactici* with the proposed neotype DSM 20284. Request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 860-863.
- Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S. & Komagata, K. 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1479-1485.
- 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.
- Zanoni, P., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A. & Collons, M.D. 1987. *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 339-341.
- 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.

Carbohydrate fermentation patterns and functional properties of isolates from Thai fermented foods

Mika Miyashita¹⁾, Yuki Kamakura¹⁾, Masako Sugimoto¹⁾, Chiyo Shibata¹⁾, Pattaraporn Yukphan²⁾,
Wanchern Potacharoen²⁾, Yasuyoshi Nakagawa¹⁾, Ken-ichiro Suzuki¹⁾ and Naoto Tanaka³⁾

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

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

³⁾ NODAI Culture Collection Center, Tokyo University of Agriculture

To determine the usefulness of the lactic acid bacteria and staphylococci isolated from Thai fermented foods, we investigated their sugar fermentation ability and functional properties. Lactic acid bacteria fermented a much greater variety of sugars than did *Staphylococcus* strains. Cluster analysis based on the sugar fermentation patterns of strains isolated from Thai fermented foods showed that most isolates followed the species characteristics, but some lactic acid bacteria showed within-species diversity of sugar fermentation ability. Cluster analysis based on the sugar fermentation patterns of both the Thai food strains and those isolated from Japanese fermented foods showed that most of the species with diverse sugar fermentation patterns were isolated from multiple locations. These results suggest that the fermentation abilities of these strains have diversified easily and that the strains are highly adaptable. Among those species with diverse sugar fermentation patterns, those of the Japanese isolates were found in more than one location, whereas some of those of the Thai isolates were found only in Thailand. Most of the isolates clustered together with the type strain belonged to species found in a single location, and the number of such species was largest in the Thai isolates. Thus the fermentation abilities of the strains isolated from Thai fermented foods differed from those of the Japanese isolates. Some of the lactic acid bacteria isolated produced GABA, and some of the *Staphylococcus* strains produced protease. The strains isolated from Thai fermented foods are thus unique bioresources.