

冬期ベトナム北部における野菜発酵食品由来微生物の 収集と特性評価

食品総合研究所 企画調整部 食品衛生対策チーム
稲津康弘

Survey and Collection of Fermenting Bacteria from Lightly Fermented Vegetable Sold in North Vietnam in Winter Season

Ya suhiro INATSU

Food Hygiene Team, Research Planning and Coordination Division,
National Food Research Institute
Kannondai 2-1-12, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

1. 目的

乳酸発酵は食品保全技術として全世界的に古くから利用されている¹⁾。これは乳酸菌の生産する有機酸による pH の低下と、「ナイシン」に代表される抗菌物質（バクテリオシン）の相乗作用により、競合する有害微生物の発育を防止しようとするものである^{2,3)}。特に東アジア地域からインドシナ半島中北部地域にかけては、多種多様の野菜発酵食品が生産されていることが知られているが、これは加熱殺菌が困難な生食用野菜を安全に長期間保存するための生活の知恵と言えらる^{4,5)}。これまでも種々のバクテリオシン生産菌が野菜発酵食品から分離されてきたが、ベトナム地域については調査報告が少ない。そのため、今回、ベトナム食品工業研究所（FIRI）の協力を受けて、現地で市販される野菜発酵食品の微生物学的特性を調査した。食中毒死亡リスクが高いことで知られる *Listeria monocytogenes* の非加熱的制御手法の開発が国内外で求められていることから、同菌に有効なバクテリオシン生産菌のスクリーニングもあわせて実施した。

2. 探索概要

2003年3月3日から3月16日の期間、ベトナム国ハノイ市に滞在し、市内7箇所の公設市場および露地で販売された野菜発酵食品を収集した（表1）。検体の収集は午前中に行い、同日中にベトナム食品工業研究所において分析を行った。10gの検体を90gの蒸留水にて乳剤化後、「HORIBA Compact Ion Meter C-122 Na+」および「新電源 ISFET pH 計 KS723」を用いて、塩濃度ならびに pH を測定した。検体の一般生菌数・大腸菌群数は標準寒天培地およびデソキシコール酸培地を

使用し、「食品衛生検査指針」⁶⁾に準拠して計数した。乳酸菌数の計数には1%炭酸カルシウム添加BCP寒天培地を用いた。

コロニー形状を元に大腸菌群50株を分離後、グラム染色による検鏡、TSI・LIM試験およびIMViC試験を実施した。うち25株についてapi20E(日本ビオメトリュー)を使用して菌種の決定を行った。

乳酸菌200株をランダムに選抜後、コロニー形状およびグラム染色による検鏡に基づいて50株を選抜し、api50CH(日本ビオメトリュー)を用いて糖発酵試験を行い、菌種の決定を行った。

検体乳液5mlを100℃、10分加熱後、普通寒天培地上にスプレッドすることで耐熱性孢子形成菌の分離を行い、菌種同定およびファージタイピング等の特性評価を行った⁷⁾。

バクテリオシン生産性はAgar well法⁸⁾によって検定した。MRS液体培地で24時間静置培養した乳酸菌の培養上澄20μlを、*Lactobacillus plantarum* ATCC8014または*Listeria monocytogenes* ATCC43256培養液をあらかじめ混釈した寒天固形培地のウェルに分注し、30℃で24時間培養後の阻止円形成能を検定した。枯草菌についてもNB培地にて24時間培養後の上澄を用いて同様の試験を行った。

Lactococcus lactis ssp. *lactis*の生産するバクテリオシンはナイシンである可能性が高いと考えられたため、70度4時間の加熱処理に対する耐性およびプロテアーゼK処理に対する感受性についても検討を行った。さらに既報のナイシンA、ナイシンZ構造遺伝子(*nisA*, *nisZ*)の塩基配列^{9,10)}を元にプライマー設計を行い、KOD polymeraseにてPCR反応を行った。これを鋳型DNAとしてBig-dye terminator法にてdirect sequencingを行うことで、塩基配列の確認を行った。

表1 探索・収集日程表

年月日	行程	行動内容
2003年 3月	3日 つくば市→東京国際空港→ベトナム国ハノイ市	移動(陸路, 空路)
	4日 ハノイ市	ベトナム食工研研究打合わせ
	4-14日 ハノイ市	探索収集・菌分離測定
	15日 ハノイ市	資料整理
	16日 ハノイ市→東京国際空港→つくば市	移動(陸路, 空路)

3. 収集成果

1) 野菜発酵食品の微生物相

冬期ハノイ市内では「カブの葉」(cole leaf)、「小玉ナス」(small eggplant)、「線切キャベツ」(cutted cabbage)、「ラッキョ」(shallots)および「乾燥小タマネギ」(small onion)を原料とする、5種類の野菜発酵食品が至る所で販売されていた。ハノイ市内7箇所を選び、計37品目について特性評価を行った(Table 2)。塩濃度は0.4%付近のものが多いが、ナス漬は塩濃度が1%以上のものも多く、タマネギ漬も塩濃度が0.5%以上であった。pHは3付近のものから中性付近のものまで種々あり、それは販売段階での発酵度合いの違いを反映しているものと考えられた。一般細菌数(APC)は4-8 log CFU/g台と広く分布しており、その大部分は乳酸菌(LAB)であった。またLABが多い検体ほどpHが下がっている傾向が見られた。大腸菌群(Coliform)は2-5 log CFU/g台であり、

APC あるいは LAB 数と明確な関係は見出せなかった。大腸菌群は野菜の常住細菌であり、野菜に 5 log CFU/g 以上付着していることも珍しくない¹¹⁻¹⁴。グラム陽性菌と比較すると、大腸菌群は弱酸およびバクテリオシンに対する感受性が低いことが知られていることから、乳酸菌の増殖によっても十分に大腸菌群の増殖が抑制されなかったケースがあったものと考えられた。

Table 2. pH, salt concentration and the number of bacteria.

Sample	pH	Salt (%)	Bacteria (Log CFU/g)		
			APC	Coliform	LAB
cole leaf	3.7	0.34	6.6	3.0	6.9
	4.0	0.30	7.3	2.3	7.3
	4.0	0.34	7.5	2.5	7.1
	4.2	0.94	7.7	2.4	7.4
	4.3	0.30	8.1	3.4	8.0
	4.3	0.33	7.8	5.1	7.9
	4.9	0.32	7.1	2.3	7.7
	5.0	0.27	7.9	2.3	7.8
	5.3	0.39	7.8	3.9	7.7
	6.1	0.42	4.4	3.4	5.1
small eggplant	3.4	1.00	8.0	5.0	7.8
	3.6	0.94	7.4	3.7	7.3
	3.9	1.40	4.8	2.3	5.0
	3.9	2.60	6.3	2.5	6.1
	4.0	1.90	7.4	2.3	7.2
	4.5	0.80	6.7	3.6	6.2
	5.5	1.90	5.0	2.3	4.3
	6.2	1.20	7.8	5.0	7.7
	6.5	2.90	5.4	4.0	4.8
	7.0	2.10	7.4	2.3	6.0
cutted cabbage	3.8	0.37	8.0	2.3	8.1
	4.1	0.43	7.5	2.3	6.9
	4.3	0.36	6.8	4.8	7.1
	5.5	0.35	7.8	4.3	8.0
	5.9	0.41	7.5	2.9	7.5
	6.0	0.49	7.1	2.3	8.9
	6.3	0.36	5.9	2.4	6.2
	6.4	0.27	7.9	4.5	7.8
6.4	0.38	6.4	4.5	6.1	
shallots	3.5	0.35	5.5	3.1	4.8
	4.0	0.43	7.3	2.3	7.0
	6.5	0.30	7.3	2.3	7.5
	6.6	1.35	5.6	2.3	5.2
Small onion	3.2	0.65	6.5	2.3	6.4
	3.7	1.10	4.7	2.3	4.7
	5.0	0.85	7.8	2.3	7.9
	6.3	0.54	7.7	2.3	7.5

APC: Aerobic plate counts, LAB: Lactic acid bacteria

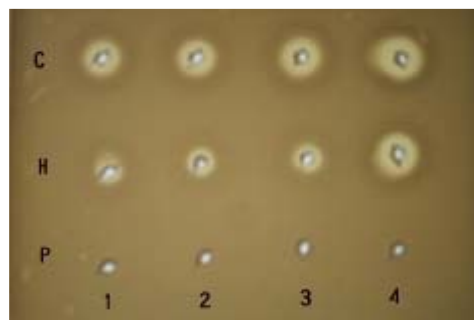


Fig. 1. Heat trerance and protease sensitivity of nisin
C: Control, N: Heat treated, P: Protease treatment.

1: nisin producing strain, 2:nisinZ producing strain, 3: NFRI7426,

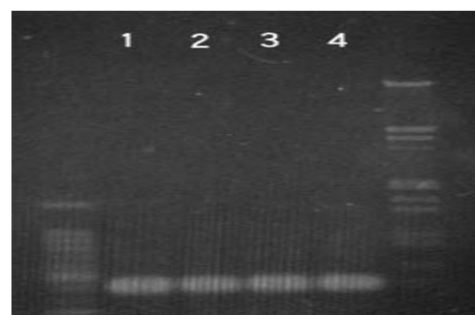


Fig 2. PCR results of nisA gene
1: nisin producing strain, 2:nisinZ producing strain, 3: NFRI7426,

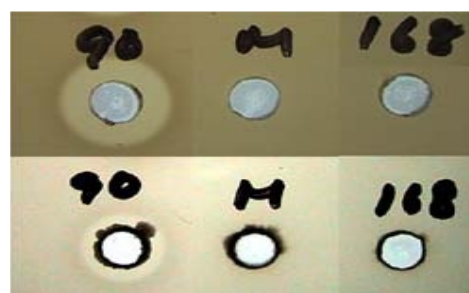


Fig. 3. Antibiotic production of bacillus subtilis NFRI8390, Miyagino and Marberg168 strains
Upper: Lactobacillus plantarum, Lower: Listeria monocytogenes

2) 分離細菌の同定

分離菌株の同定結果を Table 3 に示した。分離された大腸菌群は野菜の常住細菌として知られる *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia* 属であり、糞便汚染指標菌として用いられる大腸菌 (*Escherichia coli*) や他の病原性腸内細菌は検出されなかった。乳酸菌については *Lactobacillus* が全ての種類の検体から分離され、*Lactococcus*, *Leuconostoc* あるいは *Pediococcus* を含む検体もあった。これらはいずれも日本の野菜発酵食品からよく分離されるものと一致していた¹⁵⁾。一般に野菜漬物においては、発酵初期に比較的耐酸性の弱い *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* が出現し、発酵の進展に伴い *L.plantrum* や *L.brevis*, *Lc.lactis* が優勢菌相をなすことが知られている¹⁶⁾。調査地域においては種々の発酵状態の漬物が販売されていたことから、幅広い種類の乳酸菌が分離できたものと考えられた。

Table 3. Identified Gram negative and lactoacidic bacteria

Sample	Gram negative bacteria	Lactic acid bacteria
cole leaf	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Lactobacillus coprophilus</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
		<i>Lactobacillus pentosus</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
		<i>Pediococcus pentosaceus</i>
small eggplant	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
		<i>Lactobacillus coprophilus</i>
		<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii</i>
		<i>Lactobacillus pentosus</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> <i>Leuconostoc lactis</i>
cutted cabbage	<i>Citrobacter youngae</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Enterobacter amnigenus</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
shallots	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Citrobacter youngae</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Small onion	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii</i>
	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>

3) バクテリオシン生産乳酸菌の特性評価

乳酸菌 200 株から 3 株のバクテリオシン生産菌が分離され、うち 2 株は同一のものであった。ナス漬物由来株 (NFRI7426) およびタマネギ漬物由来株 (NFRI7427) はいずれも *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* と同定され、いずれもナイシン構造遺伝子 *nisA* と 100% の相同性を示す遺伝子を保持していた (Fig. 2)。これらの菌が生産する耐熱性・プロテアーゼ感受性の抗菌物質は *L. plantarum* のみならず食中毒原因菌である *Listeria monocytogenes* に対しても作用した (Fig. 1)。

4) 粘物質生産性枯草菌の特性評価

耐熱性孢子形成能を持つグラム陽性桿菌が全ての種類の検体から分離された。うち、ナス漬物から分離された *Bacillus subtilis* (NFRI8390) は、アミラーゼおよびプロテアーゼ生産性を持ち、粘物質生産性検定培地である GSP 培地上で日本の納豆菌と類似の形態を示したが、ファージタイプは日本の納豆菌と異なっていた。日本の納豆製造に使用される宮城野株と異なり、NFRI8390 株は *Listeria monocytogenes* のみならず病原大腸菌 O157:H7 株、*Salmonella* Enteritidis に対しても抗菌作用を持つ物質を生産することが確認された (Fig. 3)。*Bacillus licheniformis* および *Bacillus subtilis* の一部はバシトラシンを生産し¹⁷⁾、またある種の *B. subtilis* は "Bacterial Lysozyme" を生産することが知られている¹⁸⁾。しかし、これらはいずれも主としてグラム陽性菌に対して抗菌作用を示す物質であることから、本株はこれら以外の新規な抗菌性物質を生産している可能性もある。

4. 所感

ベトナムの野菜発酵食品は日本のそれと比較すると低塩であり、常温製造・流通している関係からか、比較的、発酵が浅い状態のものも店頭に並んでいる。そのため、発酵に伴う菌層の均一化を強く受けていないものと考えられ、多様な微生物の分離源としてはすぐれているものと考えられた。しかしながら、菌株の持ち出しおよび利用については二国間の調整面で困難が伴い、本収集も結果として事前調査の域を出ることができなかった。今回分離されたバクテリオシン生産菌は食品由来の安全な微生物制御物質として応用可能であると考えられるが、産業利用に関してはベトナム側との合意が必須である。なお、本調査の成果の一部については 2004 年度農芸化学学会大会の報告が予定されている。

本調査を実施するにあたりご協力いただいた、ベトナム工業省食品工業研究所および国際協力事業団の関係者各位に感謝申し上げます。

5. 参考文献

- 1) Herbert J. Buckenhuuskes (2001). Fermented Vegetables in M.D. Doyle ed. Food Microbiology ASM Press. pp. 665.
- 2) Martin R. Adams and Linda Nicolaidis (1997) Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. Food Control 8: 227-239.
- 3) O' Sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. (2002). Potencial of bacteriocin- producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochemie 84: 593-604.

- 4) Cherl-Ho Lee (1997). Lactic acid fermentated foods and thier benefit in Asia. Food control 8: 259-269.
- 5) 吉田集而 (1999). 世界における発酵文化圏の構想. 食の科学.261: 8-27.
- 6) 厚生省生活衛生局 (1990). 食品衛生検査指針 (日本食品衛生検査協会).
- 7) Inatsu, Y., Kimura, K. and Itoh, Y. (2002). Characterization of *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in Southeast Asia: Comparison with *B. subtilis* (natto) Starter Strains. JARQ 36: 169-175.
- 8) Kawamoto, S., Shima, J., Sato, R., Eguchi, T., Ohomoto, S., Shibato, J., Horikoshi, N., Takeshita, K. and Samehima, T. (2002). Biochemical and genetic characterization of Mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. App. Env. Microbiol. 68: 3830-3840.
- 9) Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., Siezen, R.J. and De Vos, W.M. (1993). Characterization of the nisin gene cluster *nisABTCIPR* of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisI* genes for development of immunity. Eur. J. Biochem. 216: 281-291.
- 10) Park, S.H., Itoh, K., Kikuchi, E., Niwa, H. and Fujisawa, T. (2003). Identification and characteristics of Nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Kimchi. Curr. Microbiol. 46: 385-388.
- 11) Ercolani, G.L. (1976). Bacteriological quality assment of fresh marketed lettuce and fennel. Appl. Env. Microbiol. 31: 847-852.
- 12) Ueda, S. and Kuwabara, Y. (1998). Bacteriological Study on Fresh Vegetables. J. Antibact. Antifung. Agents 26: 673-678.
- 13) Kaneko, K., Hayashidani, H., Ohtomo, Y., Kosege, J., Kato, M., Takahashi, K., Shiraki, Y. and Ogawa, M. (1999). Bacterial contamination of Redy-to-eat foods and fresh products in retail shops and food factories. J. Food Prot. 62: 644-649.
- 14) Konishi, N., Kai, A., Matushita, S., Noguchi, Y., Takahashi, Y., Sekiguchi, K., Arai, T., Morozumi, S. and Kokubo, Y. (2001). Bacterial contamination of fresh vegetables and epidemiological investigation of the isolates. Jpn. J. Food Microbiol. 18 (1): 9-14.
- 15) Morita, H., Miyamoto, T., Mori, K., Kataoka, K. and Izumimoto, M. (1990). Isolation and identification of lactic acid bacteria from Pickles. Jap. J. Dairy Food Sci. 39: 183-193.
- 16) Nakagawa, H., Mizuno, T., Shimizu, T., Kaneko, J., Kadono, M., Itoh, T., Sakai, S. and Terada, A. (2001). Lactic acid bacteria flora isolated from salted vegetables. Jpn. J. Food Microbiol. 18: 61-66.
- 17) Azevedo, E.C., Rios, E.M., Fukushima, K. and Campos-Takashi, G.M. (1993). Bacitracin production by new strain of *Bacillus subtilis*. App. Biochem. Biotech. 42: 1-7.
- 18) Okada, S. and Kitahata, S. (1973). Purification and some properties of bacterial lysozyme. J. Ferment. Technol. 51: 705-712.

Summary

The lightly fermented vegetables sold in Hanoi city were collected in March 2003. Salt concentrations, pH and micro flora of 5 kinds of 37 samples were analyzed. The salt concentrations tend to be lower than that of Japanese lightly fermented vegetables and some samples did not ferment enough to increase the acidity. The aerobic plate count varied between 5 to 8 log CFU/g. Most of them were lactic acid bacteria (LAB), including *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* and *Pediococcus*. Two to five log CFU/g of coliform bacteria also detected; all of identified strains were same as known natural flora on fresh vegetables however. Bacteriocin producing strains effective for *Listeria monocytogenes* were screened. Three of nisin producing *Lactococcus lactice* spp. *lactis* strains were isolated from 200 LABs. The DNA sequences of *nisA* gene (structural gene of nisin A) were completely same as that of reported ones. One polyglutamic acid producing *bacillus subtilis* strain was also isolated for the candidate of an antibiotic producing strains against *Listeria monocytogenes* or other Gram negative bacteria.

微生物の探索収集プロフィール



キクの立枯症状 (築尾)



長野県塩尻市のダイズシストセンチュウ発生圃場
(相場・水久保・伊藤)



沖縄本島で見られた葉白症状を呈する
サトウキビ (対馬)



箱入り麴 (柏木)



麴製品 (柏木)



サトウキビ白すじ病 (ペンシルライン)
(対馬)



漬物の路上販売 (稲津)