

沿岸環境から分離した塩分順応性 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の発酵特性

久田 孝

東京海洋大学学術研究院食品生産科学部門

概要 これまで申請者らは、身近な沿岸域＝里海環境から分離される乳酸菌および酵母のうち、有用な機能を持つものを「里海乳酸菌・里海酵母」と位置づけ、スクリーニングを行い、発酵性が強く、発酵素材の機能性上昇させる菌株を選抜・保存してきた。乳酸球菌の *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* は伝統的な発酵乳で重要な役割を担っているが、我々が里海乳酸菌として分離・保存した株は、伝統的発酵乳から分離された基準株と比較して、塩分耐性だけではなく、豆乳の発酵能が強いなど、いくつか異なる性状を示した。

そこで本研究では、*L. lactis* subsp. *lactis* 基準株と代表的な沿岸環境由来株について、薬剤耐性(スターターやプロバイオティクスとして使用する場合に問題となる)と牛乳および豆乳の発酵性に対する塩分馴化の影響を検討した。

ディスク法で検討した 5 種類の抗生物質(バンコマイシン、シプロフロキサシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン)に対して、沿岸由来 31 株は基準株よりも耐性が強かった。代表的な沿岸由来株(Himuka-SU2)と基準株の塩分耐性を検討した結果、Himuka-SU2 は塩分 6%(w/v)でも増殖可能であった。塩分 3.4%を含む培地で 24 h の馴化培養をすることにより、試験菌株の薬剤耐性は上昇したが、その影響は基準株でより強かった。

牛乳および豆乳(大豆、ひよこ豆、レンズ豆)で調製した乳状食品の発酵試験で、基準株による pH の低下は牛乳のみでしか認められなかったが、Himuka-SU2 はいずれの試料も発酵した。この発酵性に対して塩分馴化の影響はほとんど見られなかった。Himuka-SU2 の全ゲノムを基準株と比較した結果、薬剤耐性遺伝子の種類に違いは認められなかった。一方、Himuka-SU2 では検出されたショ糖分解酵素関連遺伝子(sucrose operon repressor *scrR*, sucrose-6-phosphate *scrB*, phosphotransferase system (PTS) sucrose-specific IIB component)が基準株では検出されなかった。

これらの結果から、沿岸由来の *L. lactis* は薬剤耐性遺伝子に関する安全性の懸念は少なく、基準株と異なる性状は食品加工や機能性食品の開発にとって重要な知見であると考えられる。薬剤耐性に関する遺伝子は両菌株でほとんど差はなかったが、塩分馴化培養により特に基準株で耐性が上昇したので、今後、関連遺伝子の発現に対する影響について詳細に検討する必要がある。

1. 研究目的

環境中に生息している微生物は、基本物資の循環に大きく貢献しており、古くから醸造・発酵食品、残渣・廃液処理等を介して、人々の暮らしとかわっている。20 世紀前半からは、抗生物質など医薬品候補物質産生菌、レンネットなど有用酵素産生菌、調味料に用いられるアミノ酸や核酸関連化合物などを産生する菌など、様々な環境由来の有用微生物の探索が行われてきた。現在でも国内外の

多様な伝統的発酵食品や極限環境中からの微生物探索は精力的に行われており、それぞれの厳しい環境へ対応して進化したと考えられる遺伝子は、現在の様々な分野の工業製品、環境浄化、医療、研究に応用されている。申請者らは身近な沿岸域＝里海環境の生物および海産物を微生物の分離源とし、分離される乳酸菌および酵母のうち、有用な機能を持つものを「里海乳酸菌・里海酵母」と位置づけ、スクリーニングを行い、発酵性が強く、発酵素材の

抗酸化性や抗糖化性を上昇させる乳酸菌を選抜・保存してきた^{1,2)}。

乳酸球菌の *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* は伝統的な発酵乳で重要な役割を担っているが、我々が分離した沿岸環境および魚類腸管から分離した株は、基準株と比較して乳の発酵能が弱いものの、豆乳の発酵能が強いなどいくつか異なる性状を示した³⁾。また、塩分耐性は株ごとに異なったが、塩分 6% (w/v) で増殖を示す菌株をいくつか確認した¹⁾。この高塩分濃度培地に順応した菌体は、至適塩分濃度で増殖した細胞とは異なる細胞膜機能や、浸透圧調節因子、その他の代謝産物を持つ可能性がある。そこで本研究では *L. lactis* subsp. *lactis* 基準株と沿岸環境由来株について、塩分耐性および薬剤耐性(スターターやプロバイオティクスとして使用する場合に問題となる)を比較し、選抜した代表的な菌株の牛乳および豆乳の発酵性に対する塩分馴化の影響を検討した。さらに、選抜株のゲノム情報から薬剤耐性や発酵性にかかわる遺伝子を基準株と比較した。

2. 研究方法

2.1 薬剤耐性

供試菌株として、本研究室で保有している沿岸環境由来の乳酸球菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 31 株とその基準株 NBRC100933^T を使用した。薬剤耐性試験には臨床現場で一般的に使用される 10 種類の抗生物質の BD センシ・ディスク(日本ベクトン・ディッキンソン)を使用し(Table. 1), Kirby-Bauer 法⁴⁾を測定原理とする Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) が示す方法に沿って行った⁵⁾。具体的には、GAM ブロス(ニッスイ製薬)で培養した菌液を McFarland 0.5~1.0 に調製し、滅菌綿棒を用いて MRS 寒天培地(Thermo Scientific-Oxoid)に塗抹した。各薬剤ディスクを置き、37°C、24 h 培養後、クリアーゾーンの直径をデジタルノギスで測定した。

2.2 増殖に及ぼす塩分の影響

基準株と、上の実験結果より選抜した代表的な沿岸由来菌株(Himuka-SU2)を、GAM ブロスに接種し 30°C、24 h 前培養した。塩分を 0.8%(通常の GAM ブロス)、2.2%、3.4%および 6.0% (w/v) に調製した GAM ブロス 4 mL に前培養液を 0.04 mL 接種し($n = 3$)、30°C で 48 h 培養し、継時的に培養液 0.2 mL を 96 well マイクロプレートに移し OD 600 nm の濁度を測定した。

2.3 薬剤耐性に及ぼす塩分馴化培養の影響

上記と同様の基準株と Himuka-SU2 の前培養液 0.03 mL を、塩分 0.8%および 3.4%の GAM ブロス 3 mL に接種し 37°C、24 h 馴化培養した($n = 3$)。この培養菌体について、上記と同様に薬剤耐性試験を行った。

2.4 牛乳および豆乳の発酵性に及ぼす塩分馴化培養の影響

上記と同様の基準株と Himuka-SU2 の前培養液 0.03 mL を、塩分を 3.4%に調製した GAM ブロス 3 mL に接種し 30°C、24 h の馴化培養を 2 回行った($n = 3$)。市販豆乳および豆乳製品 3 mL に菌液 0.03 mL ずつ接種し($n = 3$)、30°C、48 h 培養後に pH およびスーパーオキシドアニオン(O₂⁻)ラジカル消去能を測定(非酵素的 NBT 法⁶⁾)した。

2.5 薬剤耐性および糖分解酵素関連遺伝子の比較

Himuka-SU2 の全ゲノムについて、(株)生物技研に委託し、抽出および DNBSEQ-G400 (MGITsch)を用いたシーケンスを行った⁷⁾。得られたシーケンスは Prokka ver 1.14.5 (<https://github.com/tseemann/prokka>)を用いてアセンブルし全ゲノムを構築した。得られた全ゲノム配列について PATRIC (BV-BRC <https://www.bv-brc.org/>)を用いて薬剤耐性および糖分解酵素関連遺伝子を基準株の情報と比較した。

3. 研究結果

3.1 薬剤耐性

L. lactis subsp. *lactis* 基準株は試験に供した 10 種類の抗生物質のうち 9 種類(アンピシリン ABPC, テトラサイクリン TC, ペニシリン PCG, エリスロマイシン EM, ゲンタマイシン GM, ストレプトマイシン SM, クロラムフェニコール CP, バンコマイシン VCM, カナマイシ KM)に対して感受性(S)を示し、シプロフロキサシン CPFX に対して中間の感受性(IS)を示した(Table. 1)。沿岸由来 31 株のうち、27 株が KM に、20 株が CPFX に対して耐性(R)を示した。また、27 株が SM および GM に、21 株が VCM に対して IS を示した。31 株全てが PCG, ABPC, CP, EM, TC に対して感受性を示したが、平板培地上発育阻止円は明らかに基準株より小さかった。この実験で沿岸環境の代表的な分離株として Himuka-SU2 株を選抜した。

Table. 1 Resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains to antibiotics in disc methods.

Antibiotics*	PCG	ABPC	VCM	CPFX	SM	GM	KM	CP	EM	TC
Type strain resistance**	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
(IZD: mm)	39.54	45.10	29.01	16.54	33.42	34.50	27.25	32.65	38.86	41.62)
Number of isolates R**				20	2	1	27			
from coasts I			21	11	27	27	4			
S	31	31	10		2	3		31	31	31
<i>L. lactis</i> Himuka-SU2	S	S	I	R	I	I	R	S	S	S
(IZD: mm)	26.40	26.95	16.96	13.48	15.13	15.62	12.13	22.00	25.28	29.26)

* PCG: benzil penicillin, ABPC: ampicillin, VCM: vancomycin, CPFX: ciprofloxacin, SM: streptomycin, GM: gentamicin, KM: kanamycin, CP: chloramphenicol, EM: erythromycin, TC: tetracycline.

** S: susceptible (inhibition zone diameter (IZD) >20 mm), I: intermediate susceptible (IZD =15-20 mm), R: resistant (IZD <15 mm).

3. 2 増殖に及ぼす塩分の影響

基準株および Himuka-SU2 株の増殖に及ぼす塩分濃度の影響を Fig. 1 に示す。いずれの塩分濃度でも Himuka-SU2 の濁度が大きかったが、いずれの株も塩分 3.4%でも 24 h 以内にピークに達する増殖を示した。一方 6.0%では増殖が抑制され、基準株では 48 h でも濁度はわずかに検出されなかったが、Himuka-SU2 は 36 h で明らかな増殖を示した。

3. 3 薬剤耐性に及ぼす塩分馴化の影響

塩分 3.4%で馴化培養した菌体の薬剤耐性を通常の培地で培養した菌体と比較した結果(阻止円直径:6 mm)を Fig. 2 に示す。両株とも阻止円は塩分馴化により小さく(薬剤耐性が強く)なったが、その影響は基準株より顕著であった。

3. 4 牛乳および豆乳の発酵性に及ぼす塩分馴化培養の影響

牛乳の場合は両株とも塩分馴化によらず発酵性を示し、カードの形成が確認された。初期 pH は約 6.4 で、基準株の塩分馴化なしで 4.23, ありで 4.15 と有意差はあったもののその差はわずかであった (Fig. 3A)。Himuka-SU2 で培養後は約 pH 4.4 で基準株より若干高く、塩分馴化の影響はみられなかった。豆乳では基準株によるカード形成は認められず、Himuka-SU2 は固めのカードを形成した。初期 pH は約 6.6 で、基準株ではほとんど低下しなかったが、

Himuka-SU2 で約 4.3 まで低下した (Fig. 3B)。牛乳、豆乳とも発酵前には明確な O₂ラジカル消去能は検出されなかったが、発酵の示されたサンプルでは濃度依存的な活性が認められた (Fig. 3C, 3D)。また、牛乳の基準株による発酵では塩分馴化の影響がわずかに認められた。

3. 5 薬剤耐性関連遺伝子の比較

ゲノム解析で得られた Himuka-SU2 の一般的な性状と PATRIC に登録されている基準株の情報との比較を Table. 2 に示す。GC 含量, ゲノム長, タンパク質に対応する配列の数はいずれも Himuka-SU2 でわずかに低い値であった。Fig. 4 は特定の生物学的プロセスまたは構造複合体と一緒に実装する一連のタンパク質をであるサブシステムを示しているが、両菌株で大きな違いはみられない。Table. 3 上段に示されている 7 つのデータベース上で相同性のある薬剤耐性とかかわる遺伝子の数は Himuka-SU4 でわずかに少ないものの、下段に示した PATRIC で解析された薬剤耐性関連遺伝子は両菌株で全て一致した。

3. 6 糖分解酵素関連遺伝子の比較

Himuka-SU2 でショ糖分解酵素関連遺伝子として、Sucrose operon repressor gene *scrR*, Sucrose-6-phosphate hydrolase *scrB*, phosphotransferase system (PTS) sucrose-specific IIB component などが検出されたが、基準株では検出されなかった。

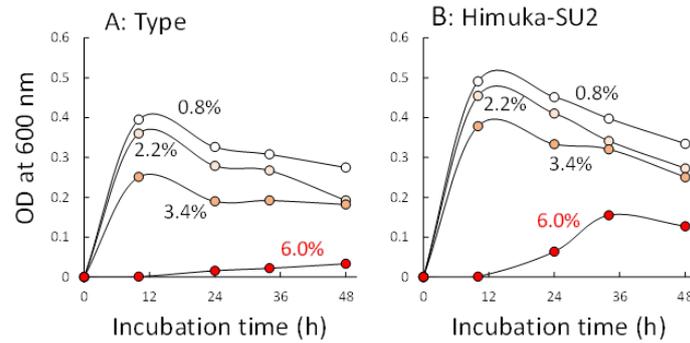


Fig. 1 Growth curves of *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* type strain (A) and Himuka-SU2 (B) in medium broth containing 0.8% (w/v), 2.2%, 3.4%, or 6.0% salt.

Values are mean \pm standard errors of the means (SEM, $n = 3$).

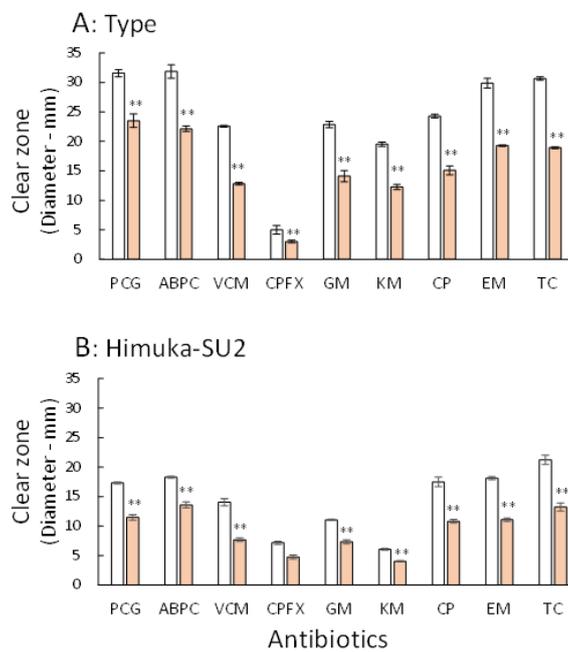


Fig. 2 Effect of salt acclimatisation in on antimicrobial resistance of *L. lactis* subsp. *lactis* type strain (A) and Himuka-SU2 (B).

The strains were acclimatized in 0.8% (w/v) salt culture (open columns) or 3.4% (w/v) salt (closed columns) at 37°C for 24 h. The cultures were spread on an MRS agar. Values are mean \pm standard errors of the means (SEM, $n = 3$). ** $p < 0.01$.

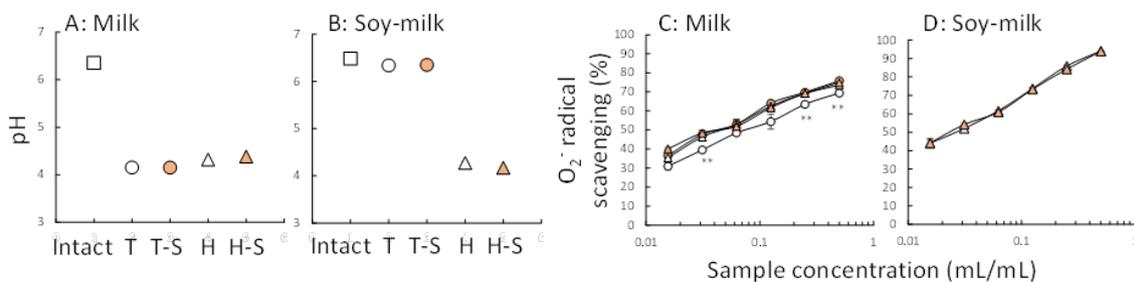


Fig. 3 Values of pH (A, B) and superoxide anion radical scavenging capacity (C, D) in cow milk and soymilk fermented for 48h at 30°C with *L. lactis* subsp. *lactis* type strain (circles) and Himuka-SU2 (triangles).

The strains were acclimatized salt acclimatization on antimicrobial resistance of *L. lactis* subsp. *lactis* type strain (A) and Himuka-SU2 (B). The strains were acclimatized in 0.8% (w/v) salt culture (open symbols) or 3.4% (w/v) salt (closed symbols). Values are mean \pm standard errors of the means (SEM, $n = 3$). ** $p < 0.01$.

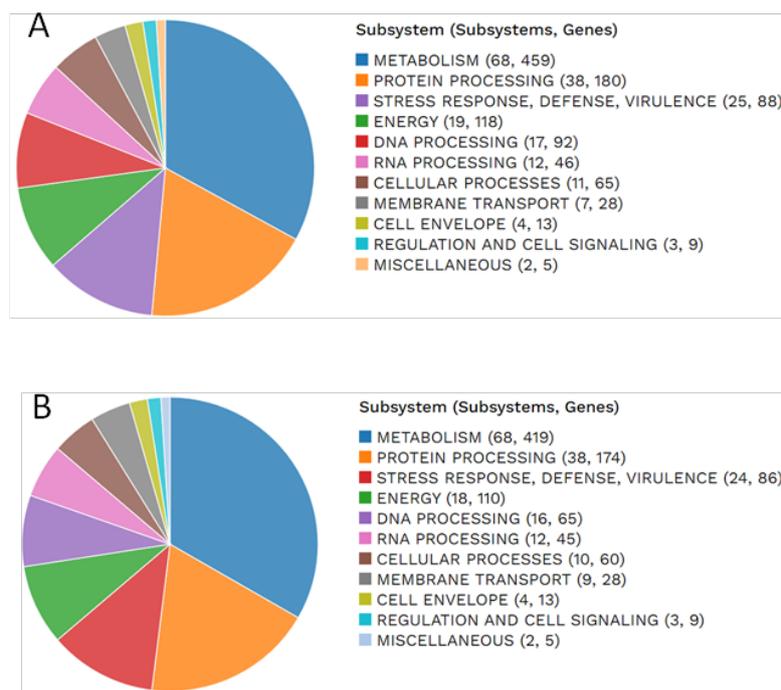


Fig. 4 Subsystem and gene numbers of the *L. lactis* subsp. *lactis* type strain (A) and Himuka-SU2 (B). A subsystem is a set of proteins that together implement a specific biological process or structural complex.

Table. 2 Genetic characterization of *L. lactis* subsp. *lactis* type strain and Himuka-SU2 analysed using PATRIC

	NBRC100933 ^T	Himuka-SU2 (LC276826)
GC content	35.23	34.84
Plasmids	0	0
Genome length (bp)	2,527,003	2,404,679
Annotated genome features		
Protein coding sequences	2,789	2,343
tRNA	46	58
rRNA	4	7
Protein features		
Hypothetical proteins	635	582
Proteins with functional assignm	2,154	1,761
Proteins with EC number assignrr	708	627
Proteins with GO assignments	623	547
Proteins with Pathway assignmer	523	463

Table. 3 Antimicrobial resistance related genes of *L. lactis* subsp. *lactis* type strain and Himuka-SU2 analysed using PATRIC

Specialty genes	Source	NBRC100933 ^T	Himuka-SU2
Antibiotic Resistance	CARD	3	2
Antibiotic Resistance	PATRIC	29	26
Drug Target	DrugBank	10	8
Drug Target	TTD	4	2
Transporter	TCDB	71	66
Virulence Factor	VFDB	1	1
Virulence Factor	Victors	8	7

Antimicrobial resistance genes

Antibiotic target in susceptible <i>rlmA(II)</i>	<i>alr, ddl, EF-G, EF-Tu, folA, dfr, folP, gyrA, gyrB, inhA, fabI, Iso-tRNA, kasA, murA, rpoB, rpoC, S10p, S12p</i>	<i>alr, ddl, EF-G, EF-Tu, folA, dfr, folP, gyrA, gyrB, inhA, fabI, Iso-tRNA, kasA, murA, rpoB, rpoC, S10p, S12p</i>
Antibiotic target modifying enzyme	<i>rlmA(II)</i>	<i>rlmA(II)</i>
Gene conferring resistance via absence	<i>gidB</i>	<i>gidB</i>
Protein altering cell wall charge conferring antibiotic resistance	<i>gdpD, pgsA</i>	<i>gdpD, pgsA</i>
Protein involved in antibiotic sequestration	<i>fabK-like</i>	<i>fabK-like</i>
Regulator modulating expression of antibiotic resistance genes	<i>liaF, liaR, liaS</i>	<i>liaF, liaR, liaS</i>

4. 考察

環境ストレス、例えば食塩の添加が、GM および EM に対するブドウ球菌の薬剤耐性を増加させることがすでに報告されている⁸⁾。さらに、沿岸土壌の塩分濃度が環境最近の薬剤耐性遺伝子を調節することも示唆されている⁹⁾。しかし、本研究の結果では、海岸由来の *L. lactis* は基準株よりも薬剤耐性が高いものの、関連遺伝子にはほとんど差がないことが示された。また、興味深いことに、塩分馴化により基準株の薬剤耐性は沿岸由来株と同程度まで増加したが、Himuka-SU2 ではこの効果はみられなかった。これらのことから、沿岸由来 *L. lactis* は薬剤耐性遺伝子に関する安全性の懸念は少なく、さらに、塩分馴化により発酵乳由来の *L. lactis* 株に機能性を持たせることができる可能性が示唆された。これは、食品加工や機能性食品の開発にとって重要な知見であると考えられる。

Himuka-SU2 と基準株とでは、豆乳の発酵性が大きく異なった。ここでは詳細に示さないが、ひよこ豆やレンズ豆などの乳状試料で同様の試験を行った場合も Himuka-SU2 のみが発酵性を示した。牛乳の主な糖分は乳糖で、大豆の場合はスクロースとラフィノースが主な糖である¹⁰⁾。これまで我々がスクリーニングの過程で行ってきた糖発酵試験では、基準株にスクロース発酵能が認められないものの、沿岸由来株の多くがスクロース利用能を示した³⁾。今回のゲノム解析でも豆類の発酵性の違いはショ糖分解関連遺伝子の有無によるものであり、塩分馴化の影響をほとんど受けなかったが、より多様な環境由来株についても検討を加えることで微生物生態学的に有用な知見となると考えられる。

5. 今後の課題

薬剤耐性に関する遺伝子は両菌株でほとんど差はなかったが、塩分馴化培養により特に基準株で耐性が上昇した

ので、今後、関連遺伝子の発現に対する影響について詳細に検討する必要がある。

6. 謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なご援助を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼申し上げます。

7. 文献

1. Kawahara M, Nemoto M, Nakata T, Kondo S, Takahashi H, Kimura B, Kuda T (2015). Anti-inflammatory properties of fermented soy milk with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S-SU2 in murine macrophage RAW264.7 cells and DSS-induced IBD model mice. *Int Immunopharm* 26, 295-303.
2. Yokota Y, Shikano A, Kuda T, Takei M, Takahashi H, Kimura B (2018) *Lactobacillus plantarum* AN1 cells increase caecal *L. reuteri* in an ICR mouse model of dextran sodium sulphate-induced inflammatory bowel disease. *Int Immunopharm* 56, 119–127.
3. Kuda T, Kataoka M, Nemoto M, Kawahara M, Takahashi H, Kimura B (2016). Isolation of lactic acid bacteria from plants of the coastal Satoumi regions for use as starter cultures in fermented milk and soymilk production. *LWT-Food Sci Technol* 68, 202-207.
4. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45, 493-496.
5. Sharma C, Gulati S, Thakur N, Singh BP, Gupta S, Kaur S, Mishra SK, Puniya AK, Gill JPS, Panwar, H (2017). Antibiotic sensitivity pattern of indigenous *Lactobacilli* isolated from curd and human milk samples. *3 Biotech*, 7, 53.
6. Handa N, Kuda T, Yamamoto M, Talahashi H, Kimura B (2022). In vitro anti-oxidant, anti-glycation, and bile acid-lowering capacity of chickpea milk fermented with *Lactiplantibacillus pentosus* Himuka-SU5 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Amami-SU1. *Process Biochem* 120, 15-21.
7. Nakamura A, Takahashi H, Arai M, Tsuchiya T, Wada S, Fujimoto Y, Shimabara Y, Kuda T, Kimura B (2021). Molecular subtyping for source tracking of *Escherichia coli* using core genome multilocus sequence typing at a food manufacturing plant. *PlosOne* 16, e0261352.
8. McMahan MAS, Xu J, Moore JE, Blair IS, McDowell DA (2007). Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Appl Environ Microbiol* 73, 211-217.
9. Zhang Y, Hu H, Yan H, Wang J, Lam SK, Chen Q, Chen D, He J (2019). Salinity as a predominant factor modulating the distribution patterns of antibiotic resistance genes in ocean and river beach soils. *Sci Total Environ* 668, 193-203.
10. 中澤洋三・海野つぐみ・南和弘・相根義昌子 (2020). 北海道産在来豆の消化性デンプン含量, アミロース含量, 遊離糖組成およびアミラーゼ活性. *日本食品保蔵学会誌* 45. 271-276.

Fermentation Characteristics of Salinity-Adapted *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolated from Coastal Environments

Takashi Kuda

Tokyo University of Marine Science and Technology

Summary

The lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* plays an important role in traditional fermented milk. Compared to the type strain that isolated from traditional fermented milk starter, the strains isolated from coast (*satoumi*) in Japan had shown some different properties, such as fermentability of soy milk as well as salt tolerance. In this study, effects of salinity adoption on antimicrobial resistance (AMR: which is problematic when used as a starter or probiotic) and fermentability of milk and legumes in the *L. lactis* subsp. *lactis* type strain and a selected *satoumi* strain were examined. The 31 *satoumi* strains rather than type strain were highly AMR to the five antibiotics (vancomycin, ciprofloxacin, streptomycin, gentamicin, kanamycin) examined by the disc method. The selected *satoumi* strain (Himuka-SU2) was able to grow at 6% (w/v) salinity. Interestingly, the AMR was increased by 24h acclimation incubation in a medium containing 3.4% salt, and the effect on the type strain was stronger than that on Himuka-SU2. Fermentability tests on milk and emulsified foods prepared from beans (soya beans, chickpeas and lentils) showed that the type strain could only ferment milk, whereas Himuka-SU2 fermented all samples. The effect of salt acclimatisation incubation on this fermentability was not clear. Comparison of the whole genome sequence of Himuka-SU2 with the type strain showed no difference in the AMR-related genes. In contrast, sucrose degrading enzyme-related genes, such as sucrose operon repressor *scrR*, sucrose-6-phosphate *scrB*, and phosphotransferase system (PTS) sucrose-specific IIB component, were detected only in Himuka-SU2 that were not detected in the type strain. The expression of the relevant genes needs to be studied in more detail in the future.