

新規有用微生物の探索に関する研究

浅田 聡*¹

上野 義 栄*²

[要 旨]

産業的に有用な微生物を得ることを目的に、発酵食品である漬物と酢から微生物の分離を行った。漬物から分離した菌については、乳酸菌、酵母、その他のグループに分類ができた。

また、酵母については、酢酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸を生成する菌株が確認できた。

酢から分離した菌については、酢酸菌とバチルス菌に分類ができた。また、酢酸菌1株については、セルロースを生成する菌株であることが確認できた。

1 はじめに

今日の微生物利用産業は、多種多様な食品、医薬品、化学製品などの生産を通じてバイオテクノロジーの実質的部分を担っている。また、微生物産業で用いられている多くの微生物は、もともと自然界に存在していたものであり、有用な微生物を得ることは産業的に有用な物質の大量生産を可能にするだけでなく、新たな商品の開発にもつながる。

そこで、本研究では有用な微生物を得ることを目的に、微生物の安全性を考慮に入れ、発酵食品である漬物と酢から微生物の分離を行い、その性質について検討を行った。

2 実験方法

2.1 漬物からの菌の分離と同定

微生物分離用の試料として千枚漬け、千枚漬け漬液、白菜漬け漬液、すぐき漬け、青味大根漬け、青味大根漬液を用い、標準寒天培地、ポテトデキストロース寒天培地、GYP寒天培地²⁾、BCP加

プレートカウント寒天培地それぞれに試料を混釈し、30℃で1～5日間平板培養を行った後、出現したコロニーから菌の分離を行った。

分離を行った菌については、形態観察、グラム染色及びカタラーゼ試験を行い、乳酸菌と予想されるグループ、酵母のグループ及びその他のグループに分類を行った。

次に、乳酸菌と予想されるグループについては、シスメックス・ビオメリユー(株)製細菌同定検査キット(アピ50CHL)を用いて簡易同定を行い、酵母のグループについてはGYP液体培地で一晚振とう培養を行った後、6日間静置培養を行うことによって培地のpHが低くなる菌株(酸生成菌株)を選び、リボソームRNA遺伝子の介在領域(IT S領域)の塩基配列による菌の同定を行った。

2.2 漬物から分離した酵母の同定

酵母菌体からのDNAの抽出には、TaKaRa Gen とるくん(酵母用)を用いた。抽出したDNAのIT S領域のPCR(増幅)には、プライマーとしてIT S 1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')とIT S 4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')を使用し、PCR装置としてContinental

*1 応用技術課 主任

*2 応用技術課 主任研究員

Laboratory Products社製APOLLO Thermal Cycler ATC401を用いた。PCR後の生成物は、(株)ベックスにてシーケンス（塩基配列解析）を行った後、DDBJ（DNA Data Bank of Japan）にて相同性検索を行い、分離した菌株の同定を行った。

2.3 酢からの菌の分離と同定

微生物分離用の試料として米酢仕込み用樽内の菌膜及び仕込み液と、玄米酢仕込み用樽内の仕込み液を用いた。分離用の培地としてポテト浸出液末0.4%、グルコース2%、エタノール0.5%、ペプトン0.3%、酵母エキス0.5%、CaCO₃0.5%、寒天1.5%を含むもの（培地A）とグルコース1%、エタノール1%、ペプトン0.5%、ポリペプトン0.5%、酵母エキス1%、酢酸0.5%、寒天2.4%を含むもの（培地B）を用い、平板に試料を塗抹後30℃で3～5日間培養を行った後、出現したコロニーから菌の分離を行った。

分離を行った菌については、形態観察、グラム染色及びカタラーゼ試験を行い、酢酸菌と予想されるグループとその他のグループに分類を行った後、16SリボソームRNA遺伝子（16S-rDNA）による菌の同定を行った。

2.4 酢から分離した菌の同定

菌体からのDNAの抽出は、TritonX-100を1%加えたTE Buffer中に菌体を入れ、100℃10minの加熱による方法で行った。抽出したDNAの16SリボソームRNA遺伝子のPCR（増幅）には、プライマーとして10F（5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'）と800r（5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'）を使用し、PCR装置としてContinental Laboratory Products社製APOLLO Thermal Cycler ATC401を用いた。PCR後の生成物は、(株)ベックスにてシーケンス（塩基配列解析）を行った後、DDBJ

（DNA Data Bank of Japan）にて相同性検索を行い、分離した菌株の同定を行った。

2.5 漬物から分離した酵母培養液の有機酸測定及びアミノ酸測定

漬物から分離した酵母のグループのうち酸生成菌株について、GYP液体培地での振とう培養（一晚）及び静置培養（6日）後の培養液の有機酸及びアミノ酸測定を行った。

3 実験結果及び考察

3.1 漬物からの菌の分離結果

各試料から分離した菌株数を表1に示す。各培地からの菌の分離は、コロニーの形状が特異的なものや、コロニーの大きさが比較的大きいもの、もしくは比較的小さいものを選んで行った。

分離後の菌株については、形態観察、グラム染色、及びカタラーゼ試験を行い、乳酸菌と予想されるグループ（21株）、酵母のグループ（82株）及びその他のグループ（89株）に分類を行った。

3.2 漬物から分離した菌の同定結果

乳酸菌と予想されるグループについての細菌同定検査キット（アピ50CHL）による簡易同定の結果を表2に示す。

細菌同定検査キットでの簡易同定では、%IDの数値の高い菌名が有力な候補として結果が出るが、

表1 漬物からの菌の分離結果

試料	分離菌株数（株）
千枚漬け	33
千枚漬け漬液	45
白菜漬け漬液	39
すぐき漬け	23
青味大根漬け	16
青味大根漬液	36
合計	192

表2 漬物から分離した乳酸菌の簡易同定結果

試料	No.	菌名1	%ID	菌名2	%ID
千枚漬け漬液	1-22	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	<i>Lactobacillus pentosus</i>	0.1
	1-41	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	92.4	<i>Lactobacillus paracasei</i>	4.2
千枚漬け	2-51	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	31.5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	30.0
	2-55	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97.3	<i>Lactococcus lactis</i>	2.0
	2-57	<i>Lactobacillus curvatus</i>	99.9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.1
	2-61	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	41.4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	40.7
	2-62	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	31.5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	30.0
白菜漬け漬液	4-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.9	<i>Lactobacillus brevis</i>	0.1
	4-3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	71.5	<i>Lactobacillus curvatus</i>	27.0
	4-4	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	55.9	<i>Lactobacillus curvatus</i>	38.8
	4-5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	53.5	<i>Lactobacillus curvatus</i>	41.6
	4-6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.9	—	—
	4-7	<i>Weissella viridescens</i>	32.7	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	29.3
	4-22	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	60.6	<i>Weissella viridescens</i>	39.0
	4-26	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.9	<i>Lactobacillus brevis</i>	0.1
	4-28	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	83.0	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	16.3
	4-36	<i>Lactobacillus curvatus</i>	99.9	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0.1
すぐき漬け	5-9	<i>Lactobacillus pentosus</i>	98.6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.3
	5-11	<i>Lactobacillus collinoides</i>	95.2	<i>Lactobacillus brevis</i>	4.2
	5-21	<i>Lactobacillus brevis</i>	50.6	<i>Lactobacillus collinoides</i>	49.1
青味大根漬液	7-24	<i>Pediococcus damnosus</i>	96.2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3.2

表3 漬物から分離した酵母の同定結果

試料	No.	菌名1	同一性(%)	菌名2	同一性(%)
千枚漬け漬液	1-A	<i>Debaryomyces hansenii</i>	99	<i>Saccharomycetaceae sp.</i>	99
	1-B	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	100	<i>Saccharomycete sp.</i>	100
	1-C	<i>Pichia anomala</i>	97	<i>Candida membranifaciens</i>	97
千枚漬け	2-A	<i>Debaryomyces hansenii</i>	99	<i>Saccharomycetaceae sp.</i>	99
	3-A	<i>Candida sake</i>	97	<i>Candida tritomae</i>	89
白菜漬け漬液	4-A	<i>Cryptococcus arboriformis</i>	95	<i>Trichosporon shinodae</i>	93
	4-B	<i>Debaryomyces hansenii</i>	99	<i>Saccharomycetaceae sp.</i>	99

第2候補までの結果では13種類の乳酸菌名が確認できた。しかし、菌名の最終的な特定を行うには、さらに遺伝子レベルでの同定を行う必要がある。

次に、酸生成酵母についての同定結果を表3に示す。

リボソームRNA遺伝子の介在領域（ITS領域）の塩基配列による同定では、同一性（%）の数値の高い菌名が有力な候補として結果が出るが、第2候補までの結果では10種類の酵母名が確認できた。

3.3 漬物から分離した酵母培養液の有機酸測定及びアミノ酸測定結果

酸生成酵母についての培養液の有機酸測定結果を表4に示す。

対照（培地のみ）と比較して濃度が増加していた有機酸は主に酢酸、クエン酸、コハク酸の3種類であった。特にクエン酸及びコハク酸については、培地中のグルコースが酵母の好気呼吸によって代謝された副産物であると考えられる。また3種類の有機酸について、濃度の増加が見られなかった酵母については、その他の酸を生成してい

表4 有機酸測定結果

試料	No.	酢酸 (%)	クエン酸 (%)	コハク酸 (%)
千枚漬け漬液	1-A	0.18	0.38	0.39
	1-B	0.13	0.03	0.16
	1-C	0.48	0.03	0.24
千枚漬け	2-A	0.34	0.23	0.37
	3-A	0.24	0.21	0.40
白菜漬け漬液	4-A	0.20	0.00	0.14
	4-B	0.32	0.01	0.75
対照(培地のみ)	—	0.21	0.07	0.41

たものと考えられる。

なお、培養液のアミノ酸測定の結果については、対照(培地のみ)と比較して培養液中の各アミノ酸の濃度の増加はほとんど見られず、アミノ酸の生成は確認できなかった(データ省略)。

3.4 酢からの菌の分離結果

各試料から分離した菌株数を表5に示す。

分離後の菌株については、形態観察、グラム染色、及びカタラーゼ試験を行い、酢酸菌と予想されるグループ(3株)とその他のグループ(2株)に分類を行った。

3.5 酢から分離した菌の同定結果

酢から分離した菌の同定結果を表6に示す。

16SリボソームRNA遺伝子(16S-rDNA)による菌の同定では、同一性(%)の数値の高い菌名が有力な候補として結果が出るが、第2候補までの結果では酢酸菌3株とバチルス菌2株であることが確認できた。また、米酢仕込み液から分離し

表5 酢からの菌の分離結果

試料	分離菌株数(株)
米酢仕込み用樽内菌膜	1
米酢仕込み液	3
玄米酢仕込み液	1
合計	5

た菌株No.2-3については、セルロースを生成する菌株であることが確認できた。

4 まとめ

漬物から分離した菌については、乳酸菌のグループ(21菌株)、酵母のグループ(82菌株)及びその他のグループ(89菌株)に分類ができた。また、酵母のグループの中で、酢酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸を生成する菌株が確認できた。

酢から分離した菌については、酢酸菌(3株)とバチルス菌(2株)に分類ができた。また、酢酸菌1株については、セルロースを生成する菌株であることが確認できた。

今後、分離した菌株の性質について、更なる検討を行う必要がある。

表6 酢から分離した菌の同定結果

試料	No.	菌名1	同一性(%)	菌名2	同一性(%)
米酢仕込み用樽内菌膜	1-1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	100	<i>Acetobacter pomorum</i>	99
米酢仕込み液	2-1	<i>Paenibacillus favisporus</i>	84	<i>Paenibacillus chibensis</i>	82
	2-2	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	100	<i>Bacillus macroides</i>	99
	2-3	<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	100	<i>Gluconacetobacter swingsii</i>	100
玄米酢仕込み液	3-1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	100	<i>Acetobacter pomorum</i>	99

(参考文献)

- 1) R & Dプランニング:微生物の分離法 (1986)
- 2) 内村泰, 岡田早苗: 乳酸菌実験マニュアル—
分離から同定まで、朝倉書店 (1992)
- 3) 田村學造, 野白喜久雄, 秋山裕一, 小泉武夫:
酵母からのチャレンジ—応用酵母学、技報堂出
版 (1997)
- 4) 飴山實, 大塚滋: 酢の科学、朝倉書店 (1990)