

食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究成果報告書

研究課題	滋賀地域の発酵産業の振興を指向した発酵微生物の探索及び評価
研究種別	<input type="checkbox"/> 共同 <input checked="" type="checkbox"/> 個人
研究組織	島 純（農学部・教授）
研究期間	<input type="checkbox"/> 1年研究 <input checked="" type="checkbox"/> 2年研究
キーワード	(1) 微生物 (2) 発酵 (3) 醸造 (4) 乳酸菌 (5) 酵母 (6) 発酵醸造食品

1. 研究計画(簡潔にまとめて記入してください。)

1. 発酵微生物の探索

伝統的な発酵食品製造の中心的な役割を果たす発酵微生物は酵母及び乳酸菌である。様々な分離源から発酵微生物の単離を行う。微生物の単離にあたっては、酵母、乳酸菌、その他の細菌が取得できる条件を設定する。また、微生物数が少ない試料からは集積培養により微生物を増加させてから単離する。微生物の分離源となる発酵食品は、滋賀県産のものを中心とする。具体的には、植物性の漬物や動物性のなれ寿司などを用いる。

2. 発酵微生物ライブラリーの構築

取得された微生物は、コロニー形状、顕微鏡により形態観察及びカタラーゼ試験などの簡易同定を行い、おおまかな分類をした後、ライブラリーとなす。また、取得された微生物は、グリセロールに懸濁した後、超低温槽で保存する。

3. 微生物の同定・評価

植物性発酵食品及び動物性発酵食品において、微生物叢を占めている微生物に関して、糖の資化性、栄養要求性、最適発酵温度などの評価を行い、微生物叢の特性を解析する。また、4. の研究項目に連結するため、微生物の特性を評価する。

4. 地域発酵食品への応用研究

1. ～ 3. までの研究結果を基礎として、簡便かつ風味豊かな漬物等の発酵食品製造に寄与する乳酸菌及び酵母の選択を行う。さらに、地域の発酵食品製造企業との産学連携研究等への発展を目指す。

2. 研究成果の概要(4 ページ程度)

1. 発酵微生物の探索

1-1. 微生物分離源

以下に示す試料を微生物分離源として用いた。

1) 植物性材料を用いた発酵食品 (約 20 試料)

日野菜漬け、キムチ、カクテキ、沢庵漬け等を主に滋賀県内の食料品店から購入した。一部、自家製の漬け物も用いた。

2) 淡水魚を材料として用いた発酵食品 (約 15 試料)

フナ寿司、ハス寿司等を滋賀県内の食料品店から購入した。

3) 海水魚を材料として用いた発酵食品 (約 15 試料)

淡水魚発酵食品分離株と比較検討するために、へしこ、鯖寿司、ますの寿司等の海水魚材料発酵食品を石川県及び福井県内の食料品店から購入した。

4) 琵琶湖の湖水等 (約 10 試料)

環境中の発酵微生物の探索のため、琵琶湖の湖水及び浮遊植物等を採取して用いた。

1-2. 酵母の分離と簡易同定

酵母の分離にあたっては、主に YPD 培地 (1%酵母エキス、2%ペプトン、2%グルコース) を用いた。細菌の増殖が酵母の分離を困難にするため、50 µg/ml クロラムフェニコールを添加した。

分離源中の酵母密度が高いと推定される場合には、生理食塩水に懸濁した後、YPD 寒天培地に塗抹した。分離源中の酵母密度が低いことが想定される場合には、YPD 液体培地を用いて 2-3 日間集積培養を行った後に、YPD 寒天培地に塗抹した。塗抹した YPD 寒天培地は 30℃で 2-4 日間保温した。

YPD 寒天培地に出現したコロニーの性状観察及び光学顕微鏡観察を行い、簡易的に同定を行った。簡易同定であるため、完全に独立しているとは断定できないが、1-1.で示した分離源から約 30 酵母菌株が取得された。それらの酵母株は 15%のグリセロール溶液に懸濁した後、-80℃において保存した。

発酵食品試料及び環境試料のいずれからも酵母株が取得できたが、後述する乳酸菌と比較して菌株の多様性の度合いは低いと考えられた。また、ほぼ全ての分離源から酵母株を取得するためには、集積培養が必要であった。

1-3. 乳酸菌の分離と簡易同定

乳酸菌の分離にあたっては、主に MRS 培地 (Difco 社より購入) を用いた。また、培養の際には、酸素分圧を下げる必要があるため、アネロパック (三菱化学より購入) を密閉容器内で使用した。

分離源中の乳酸菌密度が高いと推定される場合には、MRS 液体培地に懸濁した後、MRS 寒天培地に塗抹した。分離源中の乳酸菌密度が低いことが想定される場合には、MRS 液体培地を用いて 2-3 日間集積培養を行った後に、MRS 寒天培地に塗抹した。塗抹した MRS 寒天培地は 30℃で 2-4 日間保温した。

MRS 寒天培地に出現したコロニーの性状観察、光学顕微鏡観察及びカタラーゼ試験 (乳酸菌はカタラーゼ陰性) をを行い、簡易的に同定を行った。一部、カタラーゼ試験を完了しておらず、また簡易同定であるため、完全に独立しているとは断定できないが、1-1.で示した分離源から約 80 乳酸菌株が取得された。それらの株は 15%のグリセロール溶液に懸濁した後、-80℃において保存した。

発酵食品試料及び環境試料のいずれからも乳酸菌株が取得された。塩分濃度の低い試料からは性質の異なる多様な株が取得された。しかし、塩分濃度が高くなるにつれて、乳酸菌の多様性レベルが低下した。これは、高い塩耐性を有する乳酸菌株は限定的であることを示唆すると考えられる。乳酸菌の分離のスキームを図 1 に示した。また、分離した乳酸菌の顕微鏡観察の一例を図 2 に示す。

2. 滋賀県産の発酵食品に含まれる微生物の特性評価

2-1. フナ寿司に出現する乳酸菌の解析

フナ寿司は、淡水魚であるフナを発酵させて製造する滋賀県を代表する発酵食品である。伝統的に、その発酵プロセスにおいては、スターター（発酵を効率的に促進する発酵微生物）を添加しない。すなわち、環境微生物が発酵環境に混入することで発酵が進むと考えられる。したがって、発酵・熟成の期間や製造場所により多様な乳酸菌が出現する可能性が想定される。

以上の背景から、滋賀県近江八幡市近郊の食料品店から異なる 8 種類のフナ寿司製品を購入し、各々の製品から出現する乳酸菌のパターンを調べた。乳酸菌の出現は、1-3.と同様に観察した。その結果、以下の傾向があることが示唆された。1) 1年または2年間長期熟成された製品から乳酸菌は検出されない、2) 菌体外多糖（EPS）を産生する乳酸菌株が高頻度で検出される、3) 製造する企業（工場）により乳酸菌の出現頻度が異なる。

1) については、熟成期間の延長により乳酸菌が死滅したと考えられる。また、熟成製品の口当たりの良さと乳酸菌の死滅に相関がある可能性も考えられる。2) については、EPSにより製品にまろやかさが加わっている可能性が考えられる。3) については、スターターを使用していないため、発酵に関与する乳酸菌に多様性があるとの仮説を支持すると考えられる。

フナ寿司は、その独特の臭い等のために、好き嫌いが分かれる発酵食品である。将来的に、乳酸菌の代謝物のもつマスキング（味や臭いを覆い隠すこと）能力の活用等による新たな風味を持つ特産品の生産技術に繋げていきたい。これらの知見フナ寿司製造プロセスの効率化等に有用な知見であると考えられる。

2-2. 日野菜漬けに検出される乳酸菌と食味との相関性

日野菜は、滋賀県日野町が原産とされるカブの一種である。日野菜を食塩や食酢で漬けた日野菜漬けは滋賀県の特産品である。一般にスターターを使わずに発酵が行われる。日野菜漬け製品の食味と日野菜漬けに含まれる乳酸菌の出現パターンに関連性が想定される。

以上の背景から、滋賀県甲賀市近郊の食料品店から 6 種類の日野菜漬けを購入し、出現する乳酸菌パターンと食味との関連性を調べた。乳酸菌の出現は、1-3.と同様に観察した。食味は、ボランティアを募り官能試験で調査した。その結果、以下の傾向が示唆された。

1) 漬け物製造の際に添加する調味料（みりん、清酒、食酢、食塩、香料等）及び発酵期間により含まれる乳酸菌数が大きく異なる（ 10^0 - 10^7 細胞/ml）、2) 乳酸菌が多く含まれる製品は古漬けの臭いが強くなる、3) 乳酸菌数は、苦みなどの他の評価指標は大きく影響しない。

1) については、エタノールや酢酸のもつ抗菌作用が多く影響したと考えられる。これらの製品は、いわゆる浅漬けに位置づけられると考えられた。こうした製品では、調味液の味が大きく食味に影響を与える。以下に述べる微生物発酵を伴う製品と比較して、食味の評価としては高く位置づけられる結果となったと考えられる。2) については、乳酸菌を多く含む製品は、食味の総合評価として低く位置づけられた。古漬けの臭いは、必ずしも不快臭とはいえないが、人によって好き嫌いが大きく分かれると考えられる。特に、若い世代には不慣れな臭いであるため、今回のアンケートでは低評価につながったと考えている。3) については、乳酸菌の生産する乳酸や EPS により、日野菜自体の持つ苦みをマスキングする効果を期待していたが、今回はそのような仮説を支持するデータは取得できなかった。

日野菜漬けは、製造企業により様々に異なる風味付けがなされており、含まれる乳酸菌の種や数が多様であることが示唆された。日野菜漬けの高品質化に適する乳酸菌の探索や育種に向けて、その基盤となる知見が得られたと考えている。

2-3. 琵琶湖の湖水等からの微生物の分離

淡水域からの発酵微生物の探索については、研究例が少なく、新たな分離源として琵琶

湖の湖水や水生植物に由来する浮遊物等を用い酵母や乳酸菌の分離を行った。これらの発酵微生物は、栄養豊富な自然環境に生息するとされている。湖水等から乳酸菌や酵母の検出の可能性は小さいと想定していたが、複数の乳酸菌及び酵母が分離できた。今後の遺伝資源探索において、淡水環境も微生物分離源として有効である可能性が得られたと考えている。

2-4. フナ寿司に由来する乳酸菌の機能性の解析

フナ寿司に由来する乳酸菌であり詳細な特性が明らかになっている *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415 株をモデル菌株に設定して、その健康機能性に関する評価を行った。本菌株は、動物の腸内免疫機能や腸内フローラの健全化に有効である可能性を指摘することができた。これらの知見を基盤として、1-3.で述べた実験で得られた新たな乳酸菌株の機能性解明に繋げていく。

3. 発酵食品等の製造への応用研究

3-1. 発酵乳製造への応用

分離した乳酸菌の発酵乳（ヨーグルト）生産への応用に向けて研究を進めた。発酵乳生産を行う際には、乳糖（牛乳に含まれる糖）の資化性、高度な乳酸生成能及びフレーバー生成能が、乳酸菌に望まれる特性である。フナ寿司に由来する乳酸菌株には、乳糖資化性とフレーバー生成能を有する乳酸菌株が含まれていることが示唆された。現在、発酵乳生産に十分な乳酸生成能を有しているか確認中である。今後、スケールアップ試験や産学連携研究を介して、滋賀県産の乳酸菌株を用いた発酵乳生産に繋げていく。

3-2. パン製造への応用

分離した酵母を製パンに利用する際には、優れた発酵能（糖から二酸化炭素を発生する能力）に加えて、環境ストレス（微生物に負荷されるマイナスの環境因子）に対する高い耐性を有する酵母株を選択する必要がある。具体的には、菓子パンを製造する際には、菓子パン生地に大量に含まれるショ糖に起因する浸透圧ストレス耐性が酵母に負荷される。従って、浸透圧耐性を有する酵母の取得が必要となる。探索により得られた酵母株の環境ストレス耐性を評価したところ、高い浸透圧ストレス耐性を有する株が含まれていることが示唆された。さらに、培養特性や発酵特性の解析を進め、パンの産業生産への応用に繋げる。

3-3. 油脂製造への応用

酵母には、優れた油脂の生産能を有する株が含まれていることが知られている。油脂は、バイオディーゼルや化成品の原料として重要な化学物質である。現在までに、微生物の生産する油脂は食用には供されていない。しかし、将来的には安価の食品用油脂の供給に向けて、微生物油脂が注目されつつある。また、油脂生産微生物の培養に、未利用バイオマス由来の糖であるキシロースを活用することが可能となれば、環境保全に極めて有効な技術となり得る。本研究では、グルコース及びキシロースを同時に資化できる酵母株を見いだすことができた。このような酵母株の詳細な特性解明を介して、油脂生産の実生産に繋げていく。

図表



図1 乳酸菌分離のスキーム

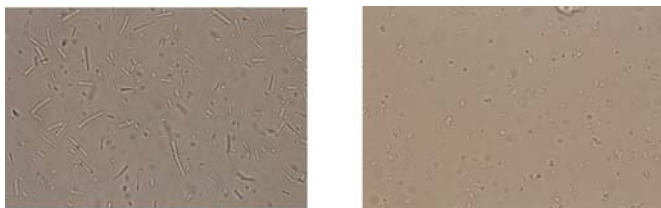


図2 フナ寿司から分離した乳酸菌の光学顕微鏡像
左図では桿菌が、右図では短桿菌が観察される

3. 収支報告

(非公開)

4. 研究発表等(研究代表者及び研究分担者)

<学会発表>

1) 島 純、酵母による食品廃棄物のエネルギー変換技術-その実用化への展望-、日本応用細胞生物学会シンポジウム (2017.12.09. 京都)

<発表論文(査読有り)>

- 1) Tanimura, A., Takashima, M., Sugita, T., Ohkuma, M., Kinoshino, S., Ogawa, J., Shima, J. Lipid production through simultaneous utilization of glucose, xylose, and L-arabinose by *Pseudozyma hubeiensis*: a comparative screening study, *AMB Express*, 6:58, 2016.
- 2) Komatsuzaki, N., Okuma, R., Sakurai, M., Ueki, Y., Shima, J. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fruits and humus: Their suitability for bread making, *Prog. Biol. Sci.*, 6:1-9, 2016.
- 3) Komatsuzaki, N., Aoi-Yoshida, A., Shima, J. Effects of live *Lactobacillus paracasei* NFRI 7415 on intestinal immune system and intestinal microflora of mice, *Int. J. Biotech. Food Sci.*, 5:55-62, 2017.
- 4) Yamada, Y., Endou, M., Morikawa, S., Shima, J., Komatsuzaki, N. Lactic acid bacteria isolated from Japanese fermented fish (Funa-Sushi) inhibit mesangial proliferative glomerulonephritis by alcohol intake with stress, *J. Nutr. Metab.* 6491907, 2018.

<発表論文(査読無し)>

1) 谷村あゆみ, 岸野 重信, 小川 順, 島 純、でん粉からバイオ燃料を作る、砂糖類・でん粉情報 1: 47-53、2017.

<著書>

- 1) 島 純、発酵と醸造のいろは (共著) 2017. NTS
- 2) 島 純、食と微生物の事典 (共著) 2018. 朝倉書店

<学外資金獲得状況>

- 1) 島 純、平成 29 年度、杉山産業化学研究所研究助成、代表、「食の循環」の持続に資する環境ストレス適応性酵母の探索及びその利用、100 万円
- 2) 島 純、平成 30 年度、杉山産業化学研究所研究助成、代表、「食の循環」の健全化に資する微生物間相互作用の解析、100 万円 (申請中)