

福島県産資源に由来する食品製造用微生物の探索

Search for microorganisms for food production derived from Fukushima Prefecture resources

会津若松技術支援センター 醸造・食品科 中島奈津子 鈴木英二 松本大志

県産品加工支援センター 企画支援チーム 齋藤嵩典

県内食品製造業で利活用できる県独自の食品製造用微生物ライブラリの構築を目指し、県内の豊かな環境に生息する微生物の単離を行った。様々な分離源から集積培養および抗生物質等を用いて微生物を単離した。得られた菌株について、菌体内タンパク質を網羅的に質量分析できる装置を行い、菌の種属を簡易同定した。ワインやビール、食酢やパンなどの食品利用実績のある複数の微生物であることがわかった。今後は、これらの安全性の確認を進めるとともに、食品製造のための特性把握試験を進めていく。

Key words: 微生物、自然界、発酵食品、酒類、県産品

1. 緒言

福島県内の企業において加工食品を開発するにあたり、高品質な製品であることはもちろん、福島独自の個性や他地域との差別化が必要とされている。特に、微生物を用いた発酵食品の製造では、製造方法を工夫したり、原料に地域特産品を用いたりして製品の個性の創出に取り組んでいるものの、香味の付与に寄与し、発酵食品製造の要となる微生物については、市販の微生物菌株を購入して使用しているのが現状で、県独自の微生物の開発が求められてきた。県独自の微生物について、当所ではこれまでうつくしま酵母、うつくしま燐酵母、うつくしま燐酵母改良株といった複数の清酒製造用の優良株を育種・開発してきた。

現在福島県内には果実酒やビール、ウィスキー、クラフトサケ、クラフトジンなどの酒類製造業者増加が著しく、県内の特産品を活かした高品質な酒類の開発や製造に取り組んでいる。また、食品業界においても、地域特産品を生かした漬物やパン、味噌などの開発が精力的に行われている。そこで、新たな食品製造用微生物の育種・開発を行い、県内酒類・食品製造への活用に繋げていきたいと考えた。

育種開発方法としては、広く行われている既存の微生物への遺伝子変異ではなく、県内の豊かな資源を生かし、さまざまな生育環境に棲む特徴的な微生物(酵母および細菌)を探索することとした。

初年度である本年は、試料採取方法および培養方法を構築し、農作物や植物、発酵食品等を中心に試料採取と微生物の単離に取り組んだ。また、試料から単離した一部の微生物について、菌種の簡易同定を行ったので報告する。

2. 実験

2. 1. 試料採取

本研究を遂行するにあたり、試料採取のための「試験研究用試料採取要領」を内規として設定した。試料採取にあたっては、これをもとに「試験研究用試料採取計画書」を作成して採取先へ打診し、「試験研究用試料採取承諾書」として採取先からの許可を得た。

微生物の分離源となる試料は、対象物に応じて高枝用切りばさみ、剪定用ハサミによる直接採取のほか、滅菌済みの綿棒による拭き取り、滅菌水へ浸漬して採取した。液体試料からは滅菌済みろ紙の浸漬または採取容器への直接汲み取りにより採取した。

なお、全ての試料採取において手袋を装着し、採取容器および器具類は滅菌済みのチューブ等を使用するか、または70%エタノールにて都度殺菌を行って使用した。

2. 2. 試料の集積培養およびコロニーの単離

採取した試料は、液体培地（YPD 培地、MM 培地、MRS 培地、麴汁培地）により25～30℃で集積培養を行った。

液体培地の混濁が確認できたものから順次上記液体培地にて継代培養を行った。また、一部は液体培地の上部に流動パラフィンを上層し、嫌気環境として継代した。

寒天培地にてコロニーを形成させ、形状や大きさごとに分離・選抜を行った。寒天培地は上記液体培地に2%寒天を加えたもの、および市販の標準寒天培地(日水製薬)、ポテトデキストロースアガー培地(日水製薬)を用いた。なお、細菌用抗生剤としてアンピシリン、クロラムフェニコール、抗真菌剤としてキャンディン系(ミカファンギン)、グルタリイミド系(シクロヘキシミド)、抗糸状菌剤としてフェニルピロール系(フルジオキソニル)薬剤を適宜使用した。なお、抗生剤および抗真菌剤、抗糸状菌剤は予め阻害濃度の100倍～1000倍に調製し、ろ過滅菌したものをオートクレーブ滅菌後

の培地に 1/100～1/1000 量添加した。

2. 3. 簡易同定

単一コロニーを形成し、安定して継代培養が行えた菌株 38 種について、山形県工業技術センター（山形県山形市）保有の MALDI-TOF（マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型）質量分析計、MALDI-biotyper sirius (Burker 製) を用いて種属の簡易同定を行った。

装置に添付されたプロトコルに従い、エタノール-ギ酸抽出法により試料を調製した。すなわち、寒天状に生育した菌体をコロニーごと採取し、超純水に懸濁後、100%エタノールで菌体を洗浄し、遠心して菌体を回収した。回収した菌体にギ酸を添加し、細胞膜を溶解させ、溶出したタンパク質をエステル化により可溶化した後、アセトニトリルにて夾雑物を沈殿させて上清を回収した。

測定用の専用プレートに回収した上清 1μl を滴下し、風乾後に試料を覆うように専用のマトリックス溶液 1μl を滴下して風乾させ、測定に供した。

3. 結果

3. 1. 試料採取

令和 6 年 4 月から 10 月にかけて、採取許可を得た県内の観光地および農園、食品製造工場を含む 9 地点から分離源となる 64 の試料を採取した。また、市販の農産物や半加工品等からの試料採取も行った。

3. 2. 試料の集積培養およびコロニーの単離

採取した試料を液体培地に入れ、数日～数週間静置し、濁りが確認されたものから順次継代培養を行った。また、集積培養を行った際、特に植物試料において液面に浸されていない部分からカビの生育が見られ、液面を覆うように広がった。本研究ではカビではなく、酵母や細菌類の単離を目指していたことから、カビ（糸状菌）への特異的な抗菌スペクトルをもつ抗真菌剤を使用するなどしてカビの生育を抑制し、酵母の選抜を試みた。また、既知の真菌（カビや酵母）が優勢と思われる試料には抗真菌剤を用いて生育を抑制し、試料から細菌類の取得を試みた。

安定して継代培養が行えた 38 の菌株について、寒天培地上にシングルコロニーを形成させ、簡易同定試験に供した。

3. 3. 簡易同定

MALDI-biotyper sirius による微生物の種属同定結果を表に示す。供試した 38 菌株のうち、28 菌株について同定結果が得られた。

この中で信頼度の高いスコア 2.0 以上を得られた 2

0 の菌株のうち、*Saccharomyces cerevisiae* は酒類等製造に広く使用されアルコール生成能力を有することが多いと知られている。また、*Meyerozyma guilliermondii*、*Hanseniaspora vineae*、*Saccharomyces kudriavzevii*、*Torulaspora delbrueckii* は、ワイン製造に関する報告がある。その他果実酒においては、*Hanseniaspora valbyensis* を用いたシードル製造についての報告がある。また、アルコール発酵と乳酸生成を同時に行う微生物として注目され、海外のクラフトビール製造者がサワービール製造に用いている *Lachancea fermentati* が同定された。酒類以外では、パン製造に用いられたとの報告がある *Hanseniaspora vineae*、*Saccharomyces kudriavzevii* のほか、食酢製造に広く用いられる *Gluconobacter cerinus* が同定された。

一方、食品製造用ではないものの、真菌に対しての抗生物質生産を行い、他の微生物へのキラー性を有するとの報告がある *Tetrapisispora iriomotensis* や、酵素生産能力が高く、医療用および工業用の酵素生産菌としての利用が期待されている細菌 *Paenibacillus humicus* も同定された。

また、スコア 1.70-1.99 の中程度の信頼度に分類された菌株のうち、*Wickerhamomyces anomalus* は酒類製造やパン製造の報告がある。*Zygosaccharomyces bailii* は、味噌酵母として活用され、耐塩性や耐糖性に優れた *Zygosaccharomyces* 属の一種である。

同定スコアは 1.7 以下で低いものの、*Candida glabrata* や *Schizosaccharomyces pombe* も今回の試験で単離された可能性が示された。これらも発酵性を有する酵母として酒類等製造の報告がある。

4. 考察

県内各地から分離源を採取し、微生物の単離を試みた。サンプリング方法や時期、集積培養に用いる培地、培養温度などにより、微生物の取得効率は大きく異なっていた。また、自然界の分離源、特に植物では葉や実に付着していたと思われるカビが優勢となり、目的としていた酵母や細菌類の増殖を妨げることが多かった。そのため、抗生剤を活用し、糸状菌を抑え効率的に酵母や細菌の増殖を促した。

また、特に細菌の分離については、培地や温度の他、培地に使用する糖源や培養環境についても考慮する必要があると思われる。今後は、分離源が農産物である場合には、そこに含まれる糖源や pH を考慮して進めていくつもりである。

微生物同定のための MALDI-TOF-MS の活用は有用で、迅速かつ安価に同定作業が行える。全ての菌株が同定できなかった理由は、菌株の鮮度や菌体量によるものと思われるが、一部の菌株でコロニーに粘性があり、

コロニーの採取や前処理に影響したものがあつた。これについては、菌株を液体培養後に遠心で集菌するなどして対策する。また、培養した寒天の一部が溶けている菌株があり、これについては菌体外に酵素を生産していると思われるため、慎重に分析を進めたい。

本研究により、ビールやワインを中心としたアルコール発酵はもちろん、食酢やパンなどの発酵食品製造に活用できそうな微生物が単離出来た。既存の微生物との組み合わせ酸味や香りの付与で製品に多様性をもたらす可能性もある。

今後はゲノム解読等でこれらの安全性を確認するとともに、発酵食品製造に向けての性質確認や特性把握のための試験を行っていく。また、単離途中のサンプルについても、微生物の選抜を進め、新たな分離源も追加し、多様性の実現を目指していく。

5. 結言

- ・福島県内の食品製造事業者が活用できる県独自の微生物の獲得を目指し、自然界の植物や環境、発酵食品等から微生物の単離を試みた。
- ・現在までに38種類のシングルコロニーを取得し、菌株の種属を簡易同定した。
- ・酒類製造、発酵食品製造の実績が報告されている微生物も複数含まれていた。
- ・今後はこれらの安全性の確認を行うとともに、発酵食品製造に向けての性質確認や特性把握のための試験を行っていく。
- ・単離途中のサンプルについても、微生物選抜を進める。
- ・新たな分離源も追加していく。
- ・消費者ニーズや食に対する嗜好の変化、多様化を見極め、県内食品製造業者が利活用できる微生物の育種を進めていく。

謝辞

試料採取にご協力いただいた各種団体、企業等に感謝します。

表 県産資源から分離した微生物の簡易同定結果

ID	Organism	score
PL	Meyerozyma guilliermondii	2.58
UH1	Hanseniaspora vineae	2.58
CK1	Saccharomyces cerevisiae	2.56
OL11	Tetrapisispora iriomotensis	2.53
Bac4	Paenibacillus humicus	2.52
Bac5	Paenibacillus humicus	2.50
NY4	Hanseniaspora valbyensis	2.41
TF1	Nakazawaea ernobii	2.39
NY1	Hanseniaspora valbyensis	2.37
Bac2	Paenibacillus humicus	2.37
TS3	Nakazawaea ernobii	2.35
y2s	Gluconobacter cerinus	2.34
CK2	Saccharomyces cerevisiae	2.31
Y5	Hanseniaspora valbyensis	2.30
OL3-2	Lachancea fermentati	2.30
Bac6	Paenibacillus humicus	2.30
AK1	Saccharomyces cerevisiae	2.24
NY3	Hanseniaspora valbyensis	2.24
UE1	Saccharomyces kudriavzevii	2.21
OL7	Torulaspora delbrueckii	2.11
OL8-2	Wickerhamomyces anomalus	1.98
TS1	No Organism Identification Possible	1.90
NP1	Hanseniaspora valbyensis	1.84
SCB2	Zygosaccharomyces bailii	1.77
PS1	Meyerozyma guilliermondii	1.76
OL2	no peaks found	1.75
SCB1	Zygosaccharomyces bailii	1.74
tsuki2	No Organism Identification Possible	1.68
TS2	Nakazawaea ernobii	1.54
SCB0	No Organism Identification Possible	1.43
OL8-1	Candida glabrata	1.31
SK5	no peaks found	0.00
tsuki1	no peaks found	0.00
OL3-1	No Organism Identification Possible	0.00
SK5 old	Schizosaccharomyces pombe	0.00
Bac1	no peaks found	0.00
Bac3	no peaks found	0.00
Bac7	no peaks found	0.00