

博士論文

高静水圧によるキムチにおける
微生物の制御

平成 25 年（2013 年）11 月

長岡技術科学大学大学院工学研究科
生物統合工学専攻

小林 正義

博士論文

高静水圧によるキムチにおける
微生物の制御

平成 25 年（2013 年）11 月

長岡技術科学大学大学院工学研究科
生物統合工学専攻

小林 正義

目次

第1章	諸言	1
1.1	食品の機能性	2
1.2	発酵食品の機能性	2
1.3	発酵漬物	3
1.4	キムチとその微生物	4
1.5	酵母による変敗の制御	6
1.6	食品の高圧処理と微生物制御	7
1.7	発酵漬物への高圧処理の適用	10
1.8	本研究の目的	11
	参考文献	12-20
第2章	圧力処理キムチの変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) による 菌叢解析	21
2.1	はじめに	22
2.2	実験方法	23
2.2.1	供試菌株	23
2.2.2	キムチの調整	23
2.2.3	pH の測定	24
2.2.4	生菌数の測定	24
2.2.5	キムチの高圧処理	24
2.2.6	細菌の単離	25
2.2.7	キムチ及び細菌からの DNA の抽出	25

2.2.8	単離した細菌の 16S rRNA 遺伝子および 酵母の ITS 領域の解析	26
2.2.9	変性密度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 解析	27
2.2.10	DGGE で分離した DNA バンドからの DNA 抽出と増幅	28
2.2.11	DNA 塩基配列の解析	29
2.3	結果と考察	30
2.3.1	キムチからの乳酸菌の単離	30
2.3.2	キムチの発酵過程における微生物挙動	33
2.3.3	高圧処理を加えたキムチにおける微生物挙動	37
2.3.4	スターターを加えたキムチにおける微生物挙動	42
	参考文献	44-46
第3章	キムチ酵母の分離と圧力感受性変異株の作出	47
3.1	はじめに	48
3.2	実験方法	49
3.2.1	供試酵母と培地	49
3.2.2	DNA の抽出	49
3.2.3	r RNA 遺伝子の PCR 増幅と解析	50
3.2.4	圧力感受性酵母のスクリーニング	52
3.2.5	圧力感受性試験	54
3.2.6	資化性試験	54
3.2.7	発酵試験	55
3.2.8	ガス発生量の定量	56
3.3	結果と考察	57

3.3.1	キムチ発酵酵母の単離	57
3.3.2	圧力感受性株の取得	62
3.3.3	資化性試験	65
3.3.4	発酵試験	67
3.3.5	ガス発生量の調査	69
	参考文献	73-74
第4章 総括		75
4.1	本論文のまとめ	76
4.2	総合考察	78
	参考文献	80
謝辞		81

第 1 章

諸 言

1.1 食品の機能性

近年、社会全体の健康に対する意識は非常に高まっており、健康にかかわる食品の市場規模が増加している。この背景には、豊かな食生活にありがちな美食や偏食に由来する高血圧や肥満、糖尿病などの生活習慣病への危惧があり、食の改善によってこれを未然に防ぎたいという人々の願望を反映している。さらに、高齢化社会の到来がこの健康志向に拍車をかけている。文部省科学研究費特定研究「食品機能の系統的解析と展開」において提唱された「食品機能論」によると、食品を体内に摂取した時の「働き」すなわち「機能」は以下のように類型化される[1]。

- ・一次機能：栄養面での働き
- ・二次機能：嗜好面での働き
- ・三次機能：生体調節面での働き

「機能性食品」とは三次機能を強化した食品を意味しており、学術的には「生体の調節によって生活習慣病のリスクを軽減し、その発症を遅らせることによって健康寿命を延ばすことに役立つ補助食品」とする考え方が大勢を占めている。機能性食品という言葉は広く社会に普及するに至っており、企業も有用な機能性を発掘して活用し、付加価値を高めた食品を開発することに注力している。機能性食品の研究開発は、年々その重要性を増している。

1.2 発酵食品の機能性

わが国における平成 24 年の発酵乳生産量は、年間で 100 万キロリットルを超え、4 年連続で増加を続けている[i]。発酵食品が持つ機能性への認識が広まり、健康への意識の高まりと相俟って発酵乳の生産量が大きく伸びた要因となっている。

わが国では 1960 年代から、腸内細菌叢（腸内フローラ）に関する先駆的な産学協同研究が展開され[2]、ビフィズス菌や乳酸菌ならびにこれらの菌の増殖を促進するオリゴ糖が腸内フローラの健全化を通じて健康に寄与することが広く知られるようになった。Fuller は 1989 年に「腸内フローラのバランスを改善することにより、宿主（ヒトなど）に有益な作用をもたらす、生きた微生物」というプロバイオティクスの定義を提唱した[3]。さらに 2001 年のプロバイオティクスに関する FAO-WHO 合同専門家会議報告で「適量を摂取した時に、宿主に健康効果を与える生菌」と再定義された[4]。プロバイオティクスに関するこれまでの研究により、腸内フローラの改善といった、いわゆる整腸作用[5]の他に、免疫の活性化[6]や感染防御[7,8]、アレルギーの予防[9-13]などの機能が明らかにされている。

1.3 発酵漬物

野菜漬物は日本だけでも 300 種類以上存在し、少なくとも 1,000 年以上の歴史があると推測されている[14]。野菜漬物は、野菜をおいしく調理する技術であると同時に、保存性を向上させる技術でもある。新鮮な野菜を入手しにくい冬季にはビタミンなどの貴重な摂取源であった。発酵漬物は主に乳酸菌のつくる乳酸によって腐敗の防止を実現している。発酵漬物の代表的な製品としては、キムチ、サワークラウト、すぐき漬け、柴漬け、千枚漬け、すんき漬け、赤カブ漬けなどが存在する。しかし、漬物製造の産業化に伴い、安定した品質の製品をより簡便に製造できる発酵を伴わない調味液漬け技術が採用されるようになり、現在では発酵食品に分類される発酵漬物は、ごく一部に留まっている。

先述したように、近年ヨーグルトなどの発酵乳をはじめとする乳

製品において乳酸菌のもつ健康効果が注目されているが、発酵漬物中には、乳製品以上の乳酸菌が存在すると言われている[15]。また、最近わが国では、ヨーグルトやチーズなどの発酵乳製品に含まれる乳酸菌を「動物性乳酸菌」と呼び、キムチやサワークラウト等の漬物、味噌、醤油など植物性発酵食品に含まれる乳酸菌を「植物性乳酸菌」と呼称することが提案されており、両者は性質が異なることが報告されている[16]。例えば、動物性乳酸菌は主に牛乳に含まれている乳糖を発酵するが、植物性乳酸菌はブドウ糖、果糖、ショ糖、麦芽糖など様々な糖類を発酵する。植物性乳酸菌は動物性乳酸菌と比べ栄養成分の乏しい飢餓環境や高塩分濃度、低 pH などのストレス環境下でも生育することができる。このストレス抵抗性により植物性乳酸菌は動物性乳酸菌に比べて生きたまま腸管に到達する割合がはるかに高いことが示されており[15]、植物性乳酸菌に富む発酵漬物は優れたプロバイオティクス食品である。また、漬物には消化管上部で分解・吸収されず、大腸の腸内フローラを健全に保って人の健康の増進維持に役立つ有用細菌の栄養源となる食品成分（プレバイオティクス）である食物繊維が豊富に含まれている。従って発酵漬物はプロバイオティクスとプレバイオティクスを兼ね備えた優れた健康食品と言える。

1.4 キムチとその微生物

キムチは世界的に知られた韓国の発酵漬物である。非常にたくさんの種類が存在するが、最も一般的なものは、白菜を用いたペチュキムチである。日本で主に食べられるキムチは、本格キムチと呼ばれる発酵熟成させたキムチよりも、あらかじめ塩漬けした白菜などの野菜に調味液を混ぜ合わせた即席風のキムチが主体である。キム

チの国内での生産量の伸びは顕著であり、1980年には全漬物生産量115万トン中6.7万トンで僅か6%であったものが、2012年には全生産量71万トンのうちの19万トンと27%を占めるに至っており、市場の縮小[ii]が続く今日の漬物業界にあつて、業界を支える柱の一つになっている。発酵キムチは塩漬けした白菜に、赤トウガラシやニンニク、ネギ、リンゴなどをよく混ぜ合わせたものを葉の間に挟みこみ、最後に白菜の外葉で包み込んで甕に漬け込み、低温発酵させて作られる。

キムチの発酵に関与する微生物は、乳酸菌では、主に *Leuconostoc mesenteroides*、*Streptococcus faecalis*、*Str. faecalis var. liquefaciens*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus brevis* が知られている。他の発酵漬物と同様に発酵初期には *Achromobacter*、*Flavobacterium*、*Pseudomonas* の増殖がみられ、発酵の進行につれ徐々に死滅していくと報告されている。食べ頃となる発酵開始後約1週間から60日の期間は乳酸菌が優位に立って pH が4.0~4.2程度になるとされており、乳酸菌の産生する酸味が腐敗細菌の増殖を抑制することも含め乳酸菌の存在は非常に重要である。発酵末期には、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus brevis* が優位になると報告されている。キムチ中のビタミン B₁、B₂、B₁₂ は初期に減少するが、発酵の進行に伴って増加し、食べ頃には初期の約2倍量となるということが報告されており、ビタミン B₁ は *Bacillus megaterium* によるものと推定されている[17]。

酵母では、耐塩性の *Saccharomyces* 属、*Torulopsis* 属、*Debaryomyces* 属、*Zigosaccharomyces rouxii* などが報告されている。酵母の生成するアルコール類やアルコールが酸と結合して生成されるエステル類が漬物独特の風味を付与するため、酵母は乳酸菌

同様に重要な存在である[18]。漬物を変敗させる有害な酵母もいる。*Candida* 属、*Pichia* 属、*Zigosaccharomyces rouxii* var. *halomembranis* などの産膜性酵母は、風味成分を消費して風味の低下や不快臭を発生するほか、pHを上昇させて腐敗細菌の増殖を招くこともある。漬物の産膜性酵母は環境ストレス耐性が高く、食塩濃度 20%あるいは pH2.0 の環境で生育するものが多い。一方、有用な株を含めて酵母は過発酵によるガス発生を引き起こすことがあり、製品における「湧き」や「膨れ」の原因となって保存や流通上の問題を生じる。

1.5 酵母による変敗の制御

酵母による変敗や過発酵を制御するには、加熱処理、浸透圧調整、低温保存、保存性向上剤の使用などが効果的とされている[19]。

酵母は熱に弱く、加熱により容易に死滅する。加熱殺菌は通常 65℃～85℃程度で行われることが多いが、漬物の種類、包装形態、包装袋の形状、pH、保存料の有無などによって殺菌効果が異なるので、殺菌温度や殺菌時間の設定にあたっては慎重に検討する必要がある。また、加熱処理は製品ごとの熱伝導の差異による加熱不足のほか、不十分な脱気による熱伝導不足、ヒートシール不良による加熱処理後の汚染などのリスクが存在する。

高濃度の糖類、食塩、あるいはエタノールを含む漬物では、それらの溶質が有する浸透圧によって発酵性酵母の生育が抑制される。しかし、食塩や糖濃度を高くするのは現代の消費者が求める減塩・健康志向にはそぐわない。

低温保存は通常 10℃前後が用いられるが、酵母は細菌よりも低温で増殖できるものが多く、5℃以下で保存することが望ましいとされ

ている。しかし、一時的な温度の上昇でも急速に酵母が増殖して品質の低下を招く恐れがあり、一貫して低温を維持しなければならないという流通上の課題を生じる。

酵母の抑制に効果的な日持向上剤・保存料として、ソルビン酸[20]、有機酸[21]、グリセリン酸脂肪酸エステル類[22]、チアミンラウリル硫酸塩[23]、香辛料抽出物[24]、ユッカフォーム[25]などがある。これら食品添加物は、効果および安全性に関する科学的知見に基づいて使用基準が設定されているが、内閣府食品安全委員会が実施した「食の安全性に対する意識調査」によると、食品添加物に対して「不安を感じている」と回答した人は残留農薬に次いで2番目であった[26,27]。消費者が食品添加物に対して抱いている潜在的な不安は、食品加工業者が実際のリスクが小さくても食品添加物を使用し難い一因となっていると考えられる。

1.6 食品の高圧処理と微生物制御

人類は約50万年前から火を利用してきたとされているが[28,29]、圧力の利用はE. Torricelli、B. Pascal、R. Boyleといった17世紀の科学者が、圧力を熱と同様の状態変換因子と認識してからの400年程度である。酵母による変敗や過発酵を含め製品の品質保持においては加熱による処理が最も一般的であり、古くから利用され、その安全性や経済性は広く知られている。しかし近年、加熱処理の過程で起こるメイラード反応等による栄養分の損失、成分の熱変性、異臭や有害物質の生成などが問題とされており、加熱処理と同じく状態変換因子である圧力による処理（高圧処理）が脚光を浴びるようになった。

食品の高圧による加工処理は、有害微生物の殺菌だけでなく、品

質を損なう食品中の酵素の不活化、新しい物性や機能性を付与する食品加工などに焦点を当てた研究開発が行われている。タンパク質水溶液に圧力を加えると、体積の減少する方向へタンパク質の立体構造が変化する。圧力の増加に伴い、可逆的変性から不可逆的変性となり凝固やゲル化を起こす。この圧力変性は、タンパク質の三次構造を形成している水素結合や疎水結合などの非共有結合が崩れることによって生じる。タンパク質に限らず、核酸や多糖類（デンプンなど）、脂質など、非共有結合により構造を保っている生体高分子は高圧の影響を受けやすく、細胞膜のような脂質とタンパク質の複合体もその構造が破壊される[30]。不可逆的に構造を破壊する圧力の大きさは物質によって異なるが、一般に脂質とタンパク質の複合体やタンパク質の四次構造の破壊は 200～300MPa、核酸、デンプン、酵素などの個々の分子の構造破壊はそれよりもさらに高い圧力が必要となる[31]。

園池は、過去約 100 年間に発表された微生物の高圧殺菌にかかわる研究報告の結果をグラム陽性菌群、グラム陰性菌群、酵母・カビ群、耐熱性孢子群に分類し、それらの耐圧性をまとめている[32]。この報告によると、ほとんどの栄養細胞は不活化に 400MPa、20 分以上の処理を要するが、グラム陰性菌、カビ、酵母はそれより温和な処理で死滅する圧力感受性を示すケースが多かった。早川は、グラム陽性菌はグラム陰性菌よりも細胞壁の物理的強度に勝り、徐圧時に生じる細胞内部の水の断熱膨張による細胞膜破壊が起こりにくいと推測している[33]。細胞形態については、微生物細胞のサイズが大きいほど圧力感受性が高くなり[34]、球菌よりも桿菌の方が圧力感受性であることが報告されている。一方、100MPa 以上で脂質二重膜が相転移することから、圧力による死滅の要因として、圧力

による細胞膜およびオルガネラ膜系の障害が挙げられている。

酵母は細菌と比較して圧力耐性が低いことが知られているが、温度にもよるものの、50MPa 程度までは増殖が可能とされている [35, 36, 37]。100MPa の圧力条件では、核膜が影響を受け始め [38]、四倍体およびホモ二倍体の誘導が報告されている [39]。150MPa 以上になると核酸合成能が停止し [40]、核損傷を引き起こすことが電子顕微鏡を用いて観察されている [41, 36]。アミノ酸輸送にかかわる膜タンパク質の機能障害 [42, 35] や細胞骨格タンパク質複合体の損傷 [36]、タンパク質分解系の損傷 [43] などとも報告されている。150MPa 以上の高圧力条件では *S. cerevisiae* に圧力感受性が認められ、増殖が阻害され [44]、タンパク質などの高分子合成能の喪失等の細胞障害が生じ、不活性化する酵母が増加する [45]。また塩濃度・浸透圧などの外的環境により生残性が鋭敏に変化することも報告されている [46]。Perrier-Cornet らは 250MPa の圧力処理での酵母 *Saccharomyces fibligera* の細胞内成分の漏出を観察しており [47]、特に不活性化した酵母では細胞体積が 65% 程度まで半減することから、高圧処理による細胞膜のダメージを示唆している [48]。嶋田らは 400MPa 以上で酵母の生残率は 50% 以下になり、生理活性がほとんど失われて成分の漏出が認められたと報告している [49]。また、各細胞小器官における膜の破壊が認められている。

S. cerevisiae において圧力感受性もたらず要因として、トリプトファンなどのアミノ酸合成系や取り込み系の欠損による栄養要求性変異 [50, 51] や Hsp104、Hsc70 などの分子シャペロンの欠損変異が報告されている [52, 53]。また重松らは、紫外線を変異原として得られた圧力感受性変異においてミトコンドリアに由来する呼吸能の欠損を報告している [54]。一方、細胞内のトレハロースが圧力耐性を

付与することが報告されている[55]。

1.7 発酵漬物への高圧処理の適用

高圧処理を発酵漬物に適用した例としては、松本の報告が最も早く、しょう油もろみ漬けなど 5 種類の漬物について、100MPa から 600MPa の高圧処理を施し、物性変化と殺菌の両面から高圧処理の有効性について検討している[56]。その結果、5 種類の漬物全てにおいて酵母が 400MPa 以上で殺菌されることを報告した。その後も、野沢菜漬およびわさび加工食品[57]、無塩味噌[58]などにおいて高圧処理により微生物を抑制する試みが報告されてきた。

白菜キムチに対しては、渡辺ら[59]が 100~500MPa の高圧処理を施したときの品質保持について報告しており、一般生菌数が無処理区では 10^9cfu/ml であるのに対し、300MPa 以上の加圧処理で 10^4cfu/ml まで低減し、酸の生成が認められないことが確認されている。また、生酸菌数の顕著な減少がみられない 200MPa の圧力処理でも酸の生成の抑制効果が認められた。これは高圧処理により乳酸菌が損傷を受け、代謝機能が低下して酸の生成量が減少し、損傷の大きなものが経時的に死滅していくことによると考察している[60]。Shon ら[61]は、高圧処理を施したキムチのテクスチャが処理圧力 400MPa まで変化せず、同時に 200MPa 以上の高圧処理を施すと、包装容器の「膨れ」防止に効果的であることを報告している。また、400MPa 以上の圧力処理では、キムチが茶色く変色する傾向が加速度的に速まることも報告している。笹川らは、発酵段階の異なる 2 種類のキムチに 300MPa の高圧処理を施し、包装容器の「膨れ」を抑え、甘味と旨味が増加して賞味期限の延長が期待できるとしている[62]。一方で、キムチの組織が軟化して煮炊きしたようになるこ

とも報告している。

このように高圧処理が変敗や過発酵の防止に効果を持つことを示す結果が得られているが、300MPa や 400MPa では、キムチの外観を損なう結果となることが示唆されている。外観の変化を抑えるには 200MPa 以下の高圧処理が適切と考えられるが、200MPa 以下の圧力では食品中の酵母を殺菌できないことが報告されている [56, 62]。

1.8 本研究の目的

前述のように、発酵漬物は、プレバイオティクスとプロバイオティクスを兼ねる有望な機能性食品であるが、主に酵母による過発酵に由来する包装容器の「膨れ」や風味低下などの課題を抱えている。この酵母による過発酵の抑制には、加熱殺菌等が適さないため、高圧処理は最も有望な手段の一つであるが、外観の変化を抑えるには 200MPa 以下の高圧処理が適切と考えられる。

以上の経緯を踏まえ、本論文では発酵漬物としてキムチを取り上げ、外観の変化を抑える 200MPa 以下の高圧処理で製品の殺菌製造が可能なシステムの確立を目指し、200MPa で殺菌可能な高圧感受性酵母の開発を目的とした。具体的には、キムチの発酵過程における微生物群集構造（微生物叢）の解析を行い（第 2 章）、その結果選抜したキムチの主要酵母について 200MPa で殺菌可能な高圧感受性株の作出とその解析（第 3 章）を行った。

参考文献

- [1] 荒井綜一 , 農芸化学の事典, (朝倉書店, 東京), pp. 1439-1442 (2003).
- [2] Mitsuoka T., Intestinal flora and the host. *Pharmacia.*, **5**, 608-609 (1969).
- [3] Fuller R., Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.*, **66**, 365-378 (1989).
- [4] JOINT FAO/WHO Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria (2001).
- [5] 田中隆一郎, 大脇真, 健常人の腸内常在菌とその代謝活性および免疫能に及ぼす *Lactobacillus casei* 発酵乳の飲用効果, 「腸内フローラと食餌」, 光岡知足編, (学会出版センター, 東京), pp. 85-104 (1992).
- [6] 横倉輝男, 制癌, 免疫賦活作用, 「乳酸菌の科学と技術」, 乳酸菌研究集談会編, (学会出版センター, 東京), pp. 322-334 (1996).
- [7] Hatakka, K., Savilahti, E., Pönkä, A., Meurman, J. H., Poussa, T., Näse, L., Saxelin, M. and Korpela, R., Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ.*, **322**, 1327-1332 (2001).
- [8] 辨野義己, 「ビフィズス菌パワーで改善する花粉症」, (講談社, 東京), pp. 1-170 (2007).
- [9] Isolauri, E., Arvola, T., Sütas, Y., Moilanen, E. and Salminen, S., Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy.*, **30** (11), 1604-1610 (2000).

- [10] Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P. and Isolauri, E., Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet.*, **357**, 1076-1079 (2001).
- [11] Xiao, J. Z., Kondo, S., Yanagisawa, N., Takahashi, N., Odamaki, T., Iwabuchi, N., Iwatsuki, K., Kokubo, S., Togashi, H., Enomoto, K. and Enomoto, T., Effect of probiotic *Bifidobacterium longum* BB536 [corrected] in relieving clinical symptoms and modulating plasma cytokine levels of Japanese cedar pollinosis during the pollen season. A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J Investig Allergol Clin Immunol.*, **16** (2) , 86-93 (2006).
- [12] Xiao, J. Z., Kondo, S., Yanagisawa, N., Takahashi, N., Odamaki, T., Iwabuchi, N., Miyaji, K., Iwatsuki, K., Togashi, H., Enomoto, K. and Enomoto, T., Probiotics in the treatment of Japanese cedar pollinosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy.*, **36**, 1425-1435 (2006).
- [13] Odamaki, T., Xiao, J. Z., Iwabuchi, N., Sakamoto, M., Takahashi, N., Kondo, S., Iwatsuki, K., Kokubo, S., Togashi, H., Enomoto, T. and Benno, Y., Fluctuation of fecal microbiota in individuals with Japanese cedar pollinosis during the pollen season and influence of probiotic intake. *J Investig Allergol Clin Immunol.*, **17** (2) , 92-100 (2007).
- [14] 小崎道雄, 「乳酸発酵の文化譜」, 雪印乳業健康生活研究所, 小崎道雄編, (中央法規出版, 東京), (1996).

- [15] 廣瀬行博, 漬物の健康機能性と乳酸発酵のキムチ, *Monthly Food Research*, **627**, 37-41 (2007).
- [16] Uhlman, L., Schillinger, U., Rupnow, J. R. and Holzapfel, W. H., Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables. *Int J Food Microbiol.*, **16**(2), 141-151(1992).
- [17] 宮尾茂雄, 漬物における微生物研究の歩み (3), *New Food Industry*, **31** (7), 33-39 (1989).
- [18] 婦人之友編集部, 漬けもののおいしさはどこから?, 「おいしい漬けもの」, (婦人之友社, 東京), pp. 7-9 (1979).
- [19] 宮尾茂雄, 漬物及び惣菜の酵母による変敗とその防止技術, 防菌防黴, **27** (12), 811-818 (1999).
- [20] 小林敏男, 「漬物製造学」, (光琳, 東京), (1989).
- [21] 熊谷進, 大腸菌 O157 の細菌学的評価等に関する研究 食品汚染大腸菌 O157 のコントロールに関する研究, *食品衛生研究*, **47** (11), 29-34 (1997).
- [22] 川口隆二, 曾我部泰男, 徳島県食品加工試験報, **23** (11), (1975)
- [23] 綱脇由起, 惣菜のおいしさ・品質の向上 チアミンラウリル硫酸塩を利用した惣菜の静菌効果, *フードケミカル*, **15** (3), 42-48 (1999).
- [24] 宮尾茂雄, 第3節 漬物, 「食品鮮度・食べ頃事典」, 太田英明, 椎名武夫, 佐々木敬卓編, (サイエンスフォーラム, 東京), pp. 326-332, (2002).
- [25] 山本正次, ユッカフォーム抽出物の食品への利用, *フードケミカル*, **12** (10), 105-109 (1996).

- [26] 内閣食品安全委員会,「食の安全性に関する意識」についての
食品安全モニター調査結果と国政モニター調査結果の比較につ
いて (2003).
- [27] 内閣食品安全委員会, 食品安全モニターアンケート「食の安
全性に関する意識調査」の結果 (2004).
- [28] 堤一郎, 機械技術史概説 - 道具の使用と火の使用 -, 実践教
育, **5**, 72-75 (1990).
- [29] 中山秀太郎, ≪21世紀に向けて≫第1部技術進歩と人間 技
術進歩と社会, 設計・製図, **26**, 228-234 (1991).
- [30] Heremans. K., High Pressure Effects on Proteins and
other Biomolecules. Ann. Rev. Bioeng., **11**, 1 - 21 (1982) .
- [31] 林力丸, 食品工業における科学・技術の進歩IV, 日本食品工
業学会編, (光琳, 東京) p. 55 (1990) .
- [32] 園池耕一郎, 高压殺菌技術—その実用化における課題, 日本
食品科学工学会誌, **44** (7) , 522-530 (1997) .
- [33] 早川功, 食品産業への圧力利用, 日本食品科学工学会誌, **47**
(9) , 651-659 (2000) .
- [34] Cheftel, J. C., High-pressure, microbial inactivation and
food preservation. Food Sci Technol Int., **1**, 75-90 (1995) .
- [35] Abe, F., Chap9: Effects of Growth-Permissive Pressures on
the Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. in
“High-Pressure Microbiology,” eds. Michiels, C., Bartlett, D.
H. and Aersten, A., (ASM Press, Washington DC, 2008) , pp.
167-179
- [36] Kobori, H., Sato, M., Tameike, A., Hamada, K., Shimada, S.
and Osumi, M., Ultrastructural effects of pressure stress to

- the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*: a study by immunoelectron microscopy using frozen thin sections. *FFMS Microbiol. Lett.*, 132, 253-258 (1995) .
- [37] Abe, F. and Horikoshi, Koki., Hydrostatic pressure promotes the acidification of vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *FFMS Microbiol. Lett.*, 130, 307-312 (1995) .
- [38] Shimada, S., Andou, M., Naito, N., Yamada, N., Osumi, M. and Hayashi, R., Effects of hydrostatic pressure on the ultrastructure and leakage of internal substances in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40(1), 123-131 (1993)
- [39] Hamada, K., Nakatomi, Y. and Shimada, S., Direct induction of tetraploids or homozygous diploids in the industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* by hydrostatic pressure. *Curr. Genet.*, 22 (5) , 371-376 (1992) .
- [40] Iwahashi, H., Odani, M., Ishidou, E. and Kitagawa, E., Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high hydrostatic pressure causing growth inhibition. *FEBS Lett.*, 579 (13) , 2847-2852 (2005) .
- [41] 大隅正子, 酵母細胞に及ぼす高圧の影響, 「加圧食品－研究と開発－」, 第 1 版, 林力丸編, (さんえい出版, 京都), pp157-164 (1990) .
- [42] Abe, F. and Horikoshi, K., Tryptophan Permease Gene TAT2 Confers High-Pressure Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 8093-8102 (2000).
- [43] Tanaka Y., Higashi T., Rakwal R., Shibato J., Wakida S.,

- and Iwahashi, H., The role of proteasome in yeast *Saccharomyces cerevisiae* response to sub-lethal high pressure treatment. *High Pressure Research*, 30, 519-523 (2010).
- [44] Iwahashi, H., Kaul, S. C., Obuchi, K. and Komatsu, Y., Induction of barotolerance by heat shock treatment in yeast. *FFMS Microbiol. Lett.*, 80, 325-328 (1991) .
- [45] Fernandes, P. M. B., Chapter 8: *Saccharomyces cerevisiae* Response to High Hydrostatic Pressure. in “High-Pressure Microbiology,” eds. Michiels, C., Bartlett, D. H. and Aersten, A., (ASM Press, Washington DC, 2008) , pp. 145-166.
- [46] Ueno, S., Shigematsu, T., Hasegawa, T., Higashi, J., Anzai, M., Hayashi, M. and Fujii, T., Kinetic Analysis of *E. coli* Inactivation by High Hydrostatic Pressure with Salts. *J. Food Sci.*, 76 (1) , M47-M53 (2011) .
- [47] Perrier-Cornet, J. M., Maréchal, P. A. and Gervais, P., A new design intended to relate high pressure treatment to yeast cell mass transfer. *J. Biotechnol.*, 41 (1) , 49-58 (1995).
- [48] Perrier-Cornet, J. M., Hayert, M. and Gervais, P., Yeast cell mortality related to a high-pressure shift: occurrence of cell membrane permeabilization. *J. Appl. Microbiol.*, 87 (1) , 1-7 (1999).
- [49] 嶋田昇二, 高田良雄., 第 2 章 高圧下における微生物の生理・生態と殺菌, 「食品への高圧利用」, 第 1 版, 林力丸編 (さんえい出版, 京都) , pp. 31-51 (1989).
- [50] Iwahashi, H., Fujii, S., Obuchi, K., Kaul, S. C., Sato, A.

- and Komatsu, Y., Hydrostatic pressure is like high temperature and oxidative stress in the damage it causes to yeast. *FFMS Microbiol. Lett.*, 108, 53-57 (1993) .
- [51] Abe, F. and Minegishi, H., Global Screening of Genes Essential for Growth in High-Pressure and Cold Environments: Searching for Basic Adaptive Strategies Using a Yeast Deletion Library. *Genetics.*, 178, 851-872 (2008) .
- [52] Iwahashi, H., Obuchi, K., Fujii, S. and Komatsu, Y., Barotolerance is dependent on both trehalose and heat shock protein 104 but is essentially different from thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 25 (1) , 43-47 (1993) .
- [53] Iwahashi, H., Nwaka, S. and Obuchi, K., Contribution of Hsc70 to barotolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Extremophiles.*, 5 (6) ,417-421 (2001) .
- [54] Shigematsu, T., Nasuhara, Y., Nagai, Gen., Nomura, K., Ikarashi, K., Hirayama, M., Hayashi, M., Ueno, S. and Fujii, T., Isolation and Characterization of Barosensitive Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Obtained by UV Mutagenesis. *J. Food. Sci.*, 75 (8) , M509-M514 (2010) .
- [55] Iwahashi, H., Nwaka, S. and Obuchi, Kaoru., PHYSIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY: Evidence for Contribution of Neutral Trehalase in Barotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (12) 5182-5185 (2000) .
- [56] 松本正, 漬物の殺菌への高圧利用, 「高圧科学と加圧食品」,

- 第 1 版, 林力丸編, (さんえい出版, 京都), pp. 368-376(1991).
- [57] 栗林剛, 宮下勉, 野沢菜漬およびわさび加工食品の高圧処理効果, 「高圧バイオサイエンス」, 第 1 版, 功刀滋, 嶋田昇二, 鈴木敦士, 林力丸編, pp. 314-319 (1994).
- [58] 北村靖則, 安平仁美, 高圧処理技術の味噌製造への応用, 信州味噌研究所研究報告, **35**, 29-33 (1994).
- [59] 渡辺恒夫, 宮間浩一, 柳沢洋, 食品の高圧利用に関する研究
高圧利用による漬物の品質保持, 栃木県工業試験研究機関研究
集録 (平成 4 年度), 175-180 (1993).
- [60] 田中龍夫, 畑中耕一, ヨーグルトの高圧処理によるアフター
アシディフィケーション抑制方法の検討, 日本食品科学工学会
誌, **39** (2), 173-177 (1992).
- [61] Shon, K. H. and Lee, H. J., Effects of high pressure
treatment on the quality and storage of kimchi. *International
Journal of Food Science and Technology.*, **33**, 359-365 (1998).
- [62] 笹川秋彦, 星野純, 小林篤, 西海理之, 鈴木敦士, 藤井智幸,
小西徹也, 山崎彬, 山田明文, 圧力処理によるキムチの発酵制御
とその特徴, 日本高圧力学学会誌, **16** (2), 167-178 (2006).
- [63] Iwamoto, T., Tani, K., Nakamura, K., Suzuki, Y., Kitagawa,
M., Eguchi, M. and Nasu. M., Monitoring impact of in situ
biostimulation treatment on groundwater bacterial
community by DGGE. *FEMS Microbiol Ecol.*, **32** (2), 129-141
(2000).

参考 URL

[i] http://www.nyusankin.or.jp/production/pdf/Nyusankin_480_c.pdf

[ii] <http://www.fmric.or.jp/stat/index.html>

第 2 章

圧力処理キムチの 変性剤濃度勾配 ゲル電気泳動 (DGGE) による菌叢解析

2.1 はじめに

キムチは酵母と乳酸菌による複合発酵で熟成が進む食品であるが、過発酵により炭酸ガスの発生や酸敗が起こり、品質が低下することが知られている。笹川ら[1]は、キムチに 300 MPa の高圧処理を施すことにより、酵母を殺菌し、圧力耐性がある乳酸菌を残存させる選択的な微生物制御が可能であることを報告している。

過発酵の原因となる酵母を選択的に抑制した結果、ガスの発生を抑え、食味を向上させている。しかし、300 MPa の高圧処理でキムチの外観は大きく損なわれ、煮物のようになった。そこで、我々はキムチ由来の酵母から 200 MPa の高圧処理で殺菌可能な圧力感受性酵母を作出し、キムチの外観を損なわずにガスの発生を抑えることに成功した[2]。圧力感受性のキムチ酵母を利用することにより、キムチを密封包装形態で提供でき、長期的な品質の安定も期待されている。しかしながら、高圧処理により、キムチの微生物がどのように変化したかは分かっていない。

本研究では、まずキムチの発酵過程における菌叢の変化を明らかにし、さらに高圧処理による微生物叢への影響を調査した。キムチについては 20 日目前後までの菌叢変化が既に報告されている[4, 10]。キムチの賞味に適する期間は 10 日目～2 カ月とされているが、この間に酸度の低下が進むことが知られており、20 日以降の更なる菌叢変化が予想される。そこで、本研究では 60 日目までに至る長期の菌叢変化を調べた。

2.2 実験方法

2.2.1 供試菌株

キムチに添加する酵母としてキムチ由来酵母 *Kazachstania (Saccharomyces) servazzii* MK1-WT (NBRC109522) を、また、乳酸菌には漬物用植物性乳酸菌として市販されている *Lactobacillus sakei* HS-1 (日本グリーンパックス㈱) を使用した [3]。

2.2.2 キムチの調製

試験に用いたキムチの原料には、5%食塩水に1日漬けた白菜を使用した。韓国の合わせ調味料であるヤンニョムは市販のものを使用した。水切りした白菜 850 g とヤンニョム 300 g を混合し、必要に応じて酵母や乳酸菌を添加して 10℃ で発酵熟成させた。

キムチに添加する酵母は YM 液体培地 (Glucose 10.0g/l, Peptone 5.0 g/l, Yeast extract 3.0 g/l, Malt extract 3.0 g/l, pH6.2, Difco) に接種し、30℃ で 24 時間振とう培養した。培養後の菌体を遠心分離にて集菌し、生理食塩水で 3 回洗浄した後に 10^6 cfu/ml に懸濁し、 10^4 cfu/g の濃度となるように添加した。乳酸菌の HS-1 は、乾燥菌体を 10^7 cfu/g の濃度となるよう生理食塩水に懸濁して添加した。対照区には酵母や乳酸菌を加えなかったキムチを使用した。

サンプルの採取は 30 日目まで 3 日ごとに行い、30 日目以降は 45 日目および 60 日目に実施し、10 g ずつサンプルを採取した。各サンプルについては酵母菌数およ

び乳酸菌数の計測（2連の平均を算出）、pHの計測を行い、DGGE解析のために残ったサンプルから10gずつを-80℃にて保存した。

2.2.3 pHの測定

キムチ15gを蒸留水35mlに懸濁し、ホモジナイザーを用い100rpmにて5分間ホモジナイズした後に、ガラス電極法にてpHを計測した。

2.2.4 生菌数の測定

キムチの浸出液0.5mlに4.5mlの生理食塩水(0.85% NaCl)を加えた溶液を希釈して生菌数を計測した。酵母は100mg/lクロラムフェニコールを含むYM寒天培地(Agar 20.0g/l)、乳酸菌はMRS寒天培地(Peptone 10.0g/l, 'Lab-Lemco' Powder 8.0g/l, Yeast extract 4.0g/l, Glucose 20.0g/l, Sorbitan mono-oleate 1ml/l, Di-potassium hydrogen phosphate 2.0g/l, Sodium acetate-3H₂O 5.0g/l, Tri-ammonium citrate 2.0g/l, Magnesium sulphate-7H₂O 0.2g/l, Manganese sulphate-4H₂O 0.05g/l, Agar 10.0g/l, pH 6.2, OXOID)を用いて混釈法により菌液を分散し、30℃にて6日間培養後にコロニーを計数して生菌数を算出した。

2.2.5 キムチの高圧処理

漬け込み開始から20日目のキムチの半量を軟質樹脂袋に入れ、脱気後に密封した。食品用高圧特機(石川島播磨重工業株製 最大圧力686MPa;容量3L(内径110

mm×深さ 380 mm)) を用いて、密封したキムチに 30℃にて 200 MPa, 60 分間の高圧処理を施した。昇圧および減圧の時間は各々 2 分間とした。

2.2.6 細菌の単離

細菌の単離は表面塗抹平板法にて行い、製造後 30 日目まで経時的に採取したキムチ浸出液を生理食塩水で希釈した後に 5 %ブロモフェノールブルーを含む MRS 寒天培地に塗布した後に 30℃で培養を行った[4]。コロニー性状により分類して菌種の比率を調べた後に細菌を単離した。

2.2.7 キムチ及び細菌からの DNA の抽出

キムチ 0.5 g を 2 ml のポリプロピレンチューブに入れ、ガラスビーズ 0.5 g (ϕ 0.5 mm 0.2 g, ϕ 0.1 mm 0.3 g), 0.5 ml の STE 溶液 (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) と 0.2 ml の 10 % SDS を加えて懸濁した。乳酸菌は 10 ml の MRS 液体培地で 30℃、24 時間培養後に集菌し、STE 溶液 1 ml に 0.2 ml の 10 % SDS を加えて懸濁した。細胞懸濁液をマルチビーズショッカー (安井器械 (株) 製) を用い 2,500 rpm, 80 秒にて細胞を破碎した。破碎溶液を 65℃で 1 時間保温後、室温で 13,000 rpm, 10 分間遠心し、上清を 0.5 ml 回収した。0.25 ml の PEG 溶液 (30 % Polyethylene glycol 6000, 1.6 M NaCl) を加えて室温で一夜放置後、4℃, 15,000 rpm で 20 分間遠心し、沈殿を 0.5 ml の TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶かした。0.25 ml の 7.5 M 酢

酸カリウムを加えて氷上で 5 分間静置後、4℃, 15,000 rpm で 30 分間遠心して上清を回収した。フェノール/クロロホルムを等量加えて混和後に、室温にて 15,000 rpm, 10 分間遠心して上清を 0.3 ml 回収した。等量のイソプロパノールを加えて -20℃にて 15 分間保持後、4℃, 15,000 rpm で 20 分間遠心した。沈殿を 1 ml の 70 % エタノールで洗浄後に遠心 (4℃, 15,000 rpm, 5 分間) する操作を 2 回繰り返した後、自然乾燥し、50 µl の 10 mg/ml Ribonuclease A (DNase free, 株ニッポンジーン製) 入り TE に溶解し、DNA サンプルとした。

2.2.8 単離した細菌の 16S rRNA 遺伝子および酵母の ITS 領域の解析

それぞれの DNA サンプルからの各遺伝子領域の PCR 増幅は、Ex Taq DNA polymerase (タカラバイオ(株)製) を用い、マニュアルに従って行った。PCR 反応には MJ Mini thermal cycler (BIO-RAD 社製) を用い、変性を 94℃ で 30 秒、アニーリングを 50℃ で 30 秒、伸長を 72℃ で 90 秒の条件で実施した。細菌の 16S rRNA 遺伝子 (約 1,400 bp) の増幅には 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)[5] および 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT)[6] をプライマーに用い、PCR 反応を 40 サイクル行った。酵母の 18S rRNA-ITS1-5.8S rRNA-ITS2-26S rRNA にまたがる ITS 領域 (約 700 bp) の増幅には ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG) および ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) をプライマーに用い [7]、

PCR 反応を 30 サイクル行った。それぞれの PCR 産物は、0.8 % アガロースゲル電気泳動で分離後、GelGreen (Biotium 社製) で染色して、目的の DNA バンドを切り出した。切り出した DNA 断片は QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を使用して抽出した。

2.2.9 変性密度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 解析

DGGE に用いる細菌 16S rRNA 遺伝子配列 (約 200 bp) の増幅は、GC クランプ配列を持つ GC-Bacteria341F (CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCCTACGG GAGGCAGCAG) および Bacteria518R (ATTACCGCGGCTGCTGG) プライマー [8] を用い、前述に従って PCR 反応を行った。PCR 反応は、変性を 94°C で 30 秒、アニーリングを 60°C で 30 秒、伸長を 72°C で 40 秒の条件で 3 サイクル行った後、アニーリング温度を 50°C まで 1°C ずつ下げながら 3 サイクルの増幅を繰り返し、最後にアニーリング温度を 50°C として 15 サイクルの増幅を行った。DGGE に用いる真菌 26S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域 (約 470 bp) の増幅には GC クランプ配列を持つ GC-NL1 (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGGCCATA TCAATAAGCGGAGGAAAAG) および LS2 (5'-ATTCCCAAACAACACTCGACTC) プライマー [9] を用い、前述に準じて PCR 反応を行った。PCR 反応は、変性を 94°C で 30 秒、アニーリングを 62°C で 30 秒、伸長を 72°C で 40 秒の条件で 3 サイクル行った後、アニーリング温度を 52°C まで 1°C ずつ下げながら 3 サイクルの増幅を繰り返し、最後にアニーリング温度を 52°C として 15 サイクルの

増幅を行った。

変性密度勾配ゲルは Dcode システム (BIO-RAD) を使用し、Chang ら [10] の条件に従い、8 % アクリルアミド/ビスにて 30 % ~ 60 % 尿素の変性濃度勾配のゲルをマニュアル通りに調製した。泳動はレーンごとに 50 μ l の DNA 試料を添加し、80 V にて 60 $^{\circ}$ C で 14 時間行った。泳動後のゲルを GelGreen (Biotium 社製) で染色し、DNA バンドを検出した。

2.2.10 DGGE で分離した DNA バンドからの DNA 抽出と増幅

泳動後のゲルから DNA バンドを切り出し、QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を使用してマニュアルに従って DNA を抽出した。抽出した細菌の DNA については Bacteria341F (CCTACGGGAGGCAGCAG) および Bacteria518R (ATTACCGCGGCTGCTGG) プライマー [8] を、酵母の DNA については GC-NL1 (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) および LS2 (5'-ATTCCCAAACAACACTCGACTC) プライマー [9] を用い、変性を 94 $^{\circ}$ C で 30 秒、アニーリングを 52 $^{\circ}$ C で 30 秒、伸長を 72 $^{\circ}$ C で 40 秒の条件にて 40 サイクルの PCR 反応を行った。増幅産物は、3.0 % アガロースゲル電気泳動で分離後、前述の方法に従い DNA を抽出した。細菌については抽出した DNA を直接 DNA 塩基配列の解析に用いた。酵母の DNA については pT7Blue ベクター (Novagen 社) に連結した後、*E. coli* XL2-Blue (アジレント・テ

クノロジー(株)に導入し、50 µg/ml のアンピシリンを添加した LB 寒天培地 (Bacto-tryptone 10 g/l, Yeast extract 5 g/l, NaCl 5 g/l, Agar 15 g/l) にて選抜した形質転換体を 5 ml LB 液体培地にて培養してプラスミド DNA を抽出し、挿入を確認した。挿入が確認された DNA を DNA 塩基配列の解析に用いた。

2.2.11 DNA 塩基配列の解析

抽出した DNA 断片に対し、DTCS Quick Start kit (Beckman Coulter 社製) を用いてマニュアルに従って PCR 反応等を行い、DNA 試料を調製した。DNA 配列は CEQ 2000 System (Beckman Coulter 社) を用いて解析した。得られた DNA 配列の BLAST 検索は DNA Data Bank of Japan の BLAST プログラム [i]にて行った。

2.3 結果と考察

2.3.1 キムチからの乳酸菌の単離

A社、B社、C社の3社のキムチについて5日、9日、11日、16日、20日、24日、30日と経時的にコロニーを単離し、16S rRNA 遺伝子配列を調べた。単離した細菌種の16S rRNA 遺伝子配列にもとづく系統樹を図2.1に示した。A社のキムチからは *Leuconostoc* 属と *Lactobacillus* 属を主とする9種の乳酸菌が、B社のキムチからはほとんど *Weissella cibaria* に一致する1種（O12DA）のみが、C社のキムチからは *Weissella* 属と *Leuconostoc* 属、*Lactobacillus* 属の各1種、合計3種（それぞれ Y12DD, Y12DB, Y12DC）が主に見いだされ、検出された細菌はいずれも乳酸菌であった。また、白菜（*Brassica napus*）のミトコンドリアやクロロプラスト由来の16S rRNA 遺伝子も検出された。A社のキムチではC社のキムチの Y12DB および Y12DC と一致する F11DB および F30DC が一過性に認められたが、その他の種は製造元により異なっており、原料や製法の違いが3社のキムチで検出された乳酸菌の多様性に反映したと推定された。単離した細菌および白菜の16S rRNA 遺伝子をPCR増幅したDNAのDGGE結果を図2.2に示した。乳酸菌及び酵母の各単離株と白菜のDNAを等量混合してPCR増幅したもの（レーン13）を、以降の実験で指標として用いた。

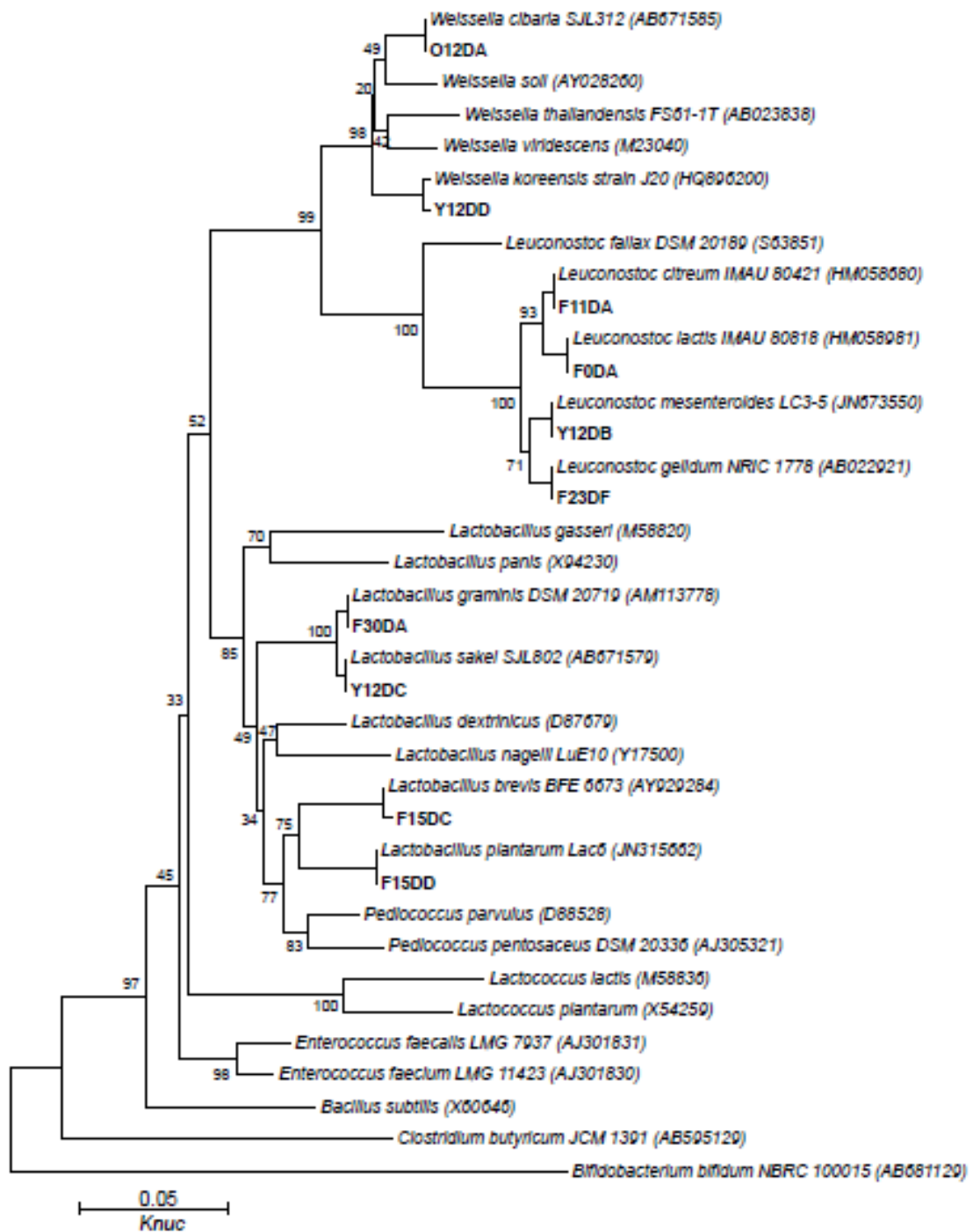


図 2.1. 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分離株と乳酸菌の系統樹

ClustalW プログラムを用いた近隣結合 (neighbor-joining) 法により作成した。枝上の数字はブートストラップ値 (%、1000 回繰り返し) を、スケールバーは塩基置換 % (0.01 は 1% 置換) を示す。Bifidobacterium bifidum NBRC100015 及び Clostridium butyricum JCM1391 を外群 (out group) として使用し、分離株は株番号を太字で示した。

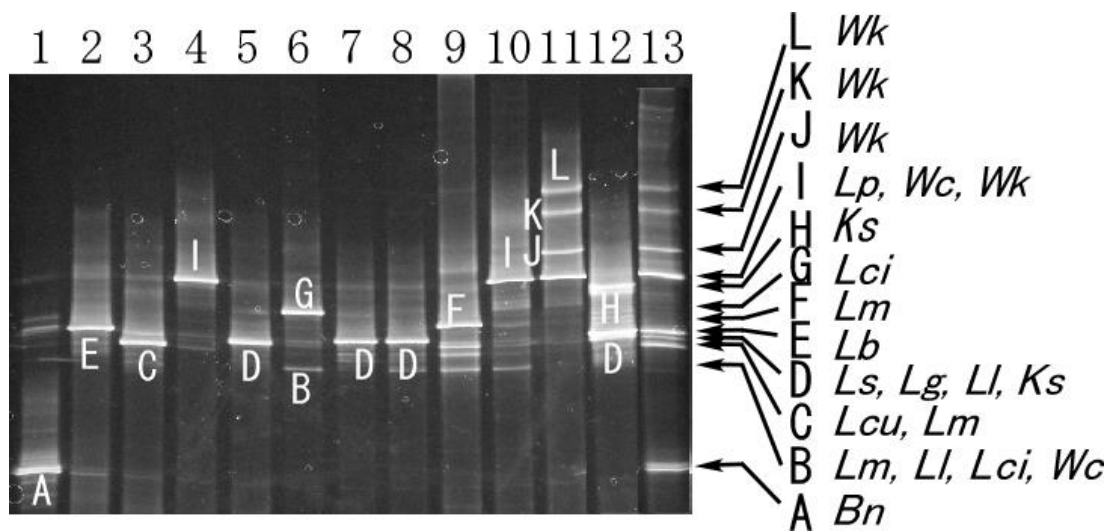
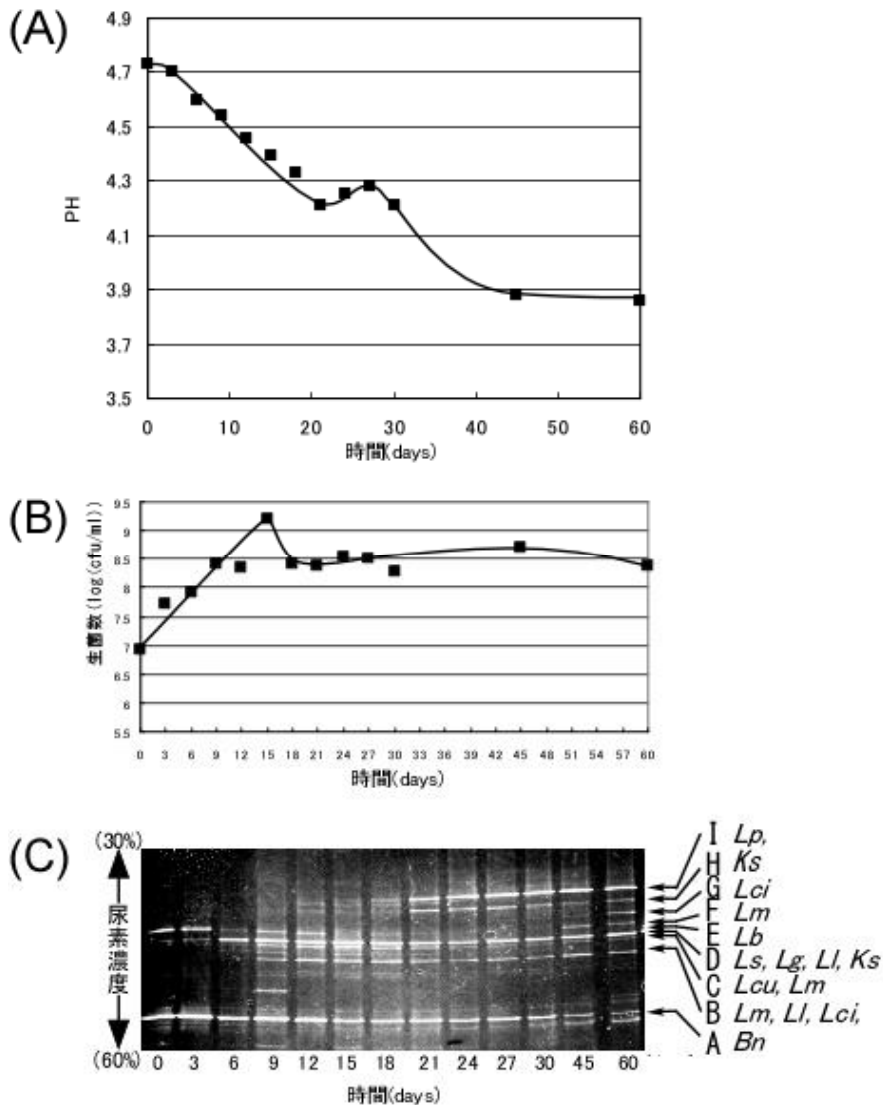


図 2.2. 単離した乳酸菌の DGGE におけるバンドパターン
 レーン 1, *Brassica napus* (Bn); 2 *Lactobacillus brevis* (Lb); 3, *Lactobacillus curvatus* (Lcu); 4, *Lactobacillus plantarum* (Lp); 5, *Lactobacillus sakei* (Ls); 6, *Leuconostoc citreum* (Lci); 7, *Leuconostoc garlicum* (Lg); 8, *Leuconostoc lactis* (Ll); 9, *Leuconostoc mesenteroides* (Lm); 10, *Weissella cibaria* (Ws); 11, *Weissella koreensis* (Wk); 12, *Kazachstania servazzii* (Ks); 13, 乳酸菌・酵母の各単離株と白菜の DNA 混合物からの増幅産物.各菌株を代表するバンドにアルファベット A~L を付与して、右端およびゲル中に示した。

2.3.2 キムチの発酵過程における微生物挙動

A社のキムチの発酵過程における経時的な pH の推移を図 2.3 (A) に示した。発酵開始後 20 日までは一定の速度で pH が下がり続けて pH 4.2 に達した後、30 日まで pH 4.2~4.3 付近で一時停滞し、以降は 40 日に向けて pH が下がり pH3.9 付近で維持された。一方、発酵過程における乳酸菌の増殖は 15 日付近で最大となって 1.7×10^9 cfu/ml に達し、以降は定常期となり 3.2×10^8 cfu/ml 前後で推移した (図 2.3B)。この過程での乳酸菌 16S rRNA 遺伝子 DNA の DGGE 結果を図 2.3C に示した。



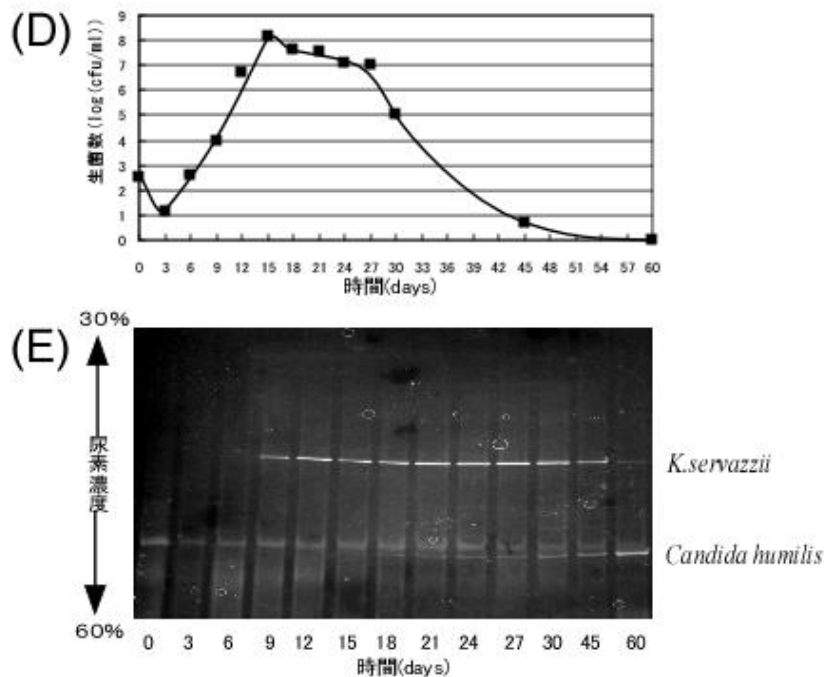


図 2.3. キムチの発酵過程における微生物挙動

発酵過程における pH 変化 (A)、乳酸菌生菌数 (B)、細菌プライマー増幅産物の DGGE (C)、酵母生菌数 (D)、酵母プライマー増幅産物の DGGE (E) をそれぞれ示した。

発酵開始から増殖が最大となる 21 日目までは菌叢の変化があり、pH の低下が再開される 21 日目以降は一定の菌叢で安定した後、pH が下がりきった 45 日以降は再び菌叢に変化が生じることが示唆された。この間、A と D のバンドが安定して認められたが、バンドから抽出した DNA の塩基配列を決定したところ、A は白菜由来の DNA、D は *L. sakei* (F30DC) を含んでいた。培養 21 日以降にはバンド I が強く認められ、抽出した DNA の塩基配列から *L. plantarum* が示唆された。また培養末期の 45 日以降に *L. mesenteroides* (バンド B + C + F) と *L. citreum* (バンド B + G) が認められた。培養末期の 45 日以降

は pH が急激に下がった時期であり、これらの 2 菌株は低 pH での増殖に優れている可能性が考えられる。

発酵過程における酵母の生菌数はクロラムフェニコールを添加した YM 培地で計数したが、15 日まで増加して 1.4×10^8 cfu/ml となり、27 日まで漸減して 1.0×10^7 cfu/ml となった後、急激に低下して 45 日には 10 cfu/ml を割り込んだ (図 2.3D)。酵母の動態を調べるため、26S rRNA 遺伝子中の D1/D2 領域 DNA を PCR 増幅し、DGGE 解析した (図 2.3E)。この結果、9~45 日目にかけて *Kazachstania servazzii* が優占化し、18 日以降の後半には *Candida humilis* が漸増して 60 日目には優占化したことが示唆された。上述のように 60 日目の真菌の濃度は極めて低く、キムチ製造における主要酵母が *K. servazzii* であることが示唆された。

これまで、様々な食品について DGGE を用いた菌叢解析が既に行われており、発酵食品においてもぬか床 [11]、味噌 [12] を含む報告がある。キムチにおいても Chang ら [10] が乳酸菌と酵母の菌叢の動態を報告している。Chang らは漬け込み開始から 19 日目までの pH と菌叢の変化を報告しているが、その結果は 20 日目までの今回の結果とほぼ同じである。Chang らは 19 日目には *Weissella* 属、*Leuconostoc* 属、*Lactobacillus* 属の乳酸菌と *Kazachstania (Saccharomyces)* 属の酵母が主となったと報告している。したがって 20 日目以降の今回の結果、特に 30 日目以降の更なる pH の低下や 60 日目の大きな菌叢の変化は、これまで報告されていないユニークな研究成果だと考えられる。

今回、合計 11 種類の乳酸菌を同定したが、個々の菌株から分離した複数のコロニーについて 16S-rRNA 遺伝子配列を調べ、配列が一致することを確認しており、各菌株は少なくともある程度は純化されていると考えられる。更に DGGE ゲル上に認められたサンプルのバンドについて、その移動度を分離した菌株のバンドと比較することにより、菌種を推定した。実際に DGGE で生じた主なバンドから DNA を抽出して PCR 増幅後に DNA シーケンスを行って推定した菌種の配列と一致することを確認しており、今回得られた結果は信頼性が高いと考えている。

pH の変化を見ると 21 日目に一旦 pH 4.2 付近で停滞し、一時的に pH4.3 付近にまで上昇した。酵母が食品中の酢酸や乳酸、クエン酸などの有機酸を分解して pH を高めることが知られている [13]。酵母菌数は 15~27 日目にプラトーに達しており、酵母が pH 上昇をもたらした可能性が示唆される。さらに、30 日目以降に再び下降を示し pH 3.9 付近まで下がった。これに対し、21 日目から *L. plantarum* が出現しており、30 日目以降の pH 低下との関連性が考えられる。*L. plantarum* は pH 低下に先立って 15~18 日目から増え始めていることと、乳酸菌が酸生成に優れていることから *L. plantarum* が 30 日目以降の pH 低下に寄与していると考えられる。したがって 21 日目までの pH 低下と 30 日目以降の pH 低下で、酸生成にかかわる乳酸菌が入れ替わると想像される。

純粹分離した酵母 *K.servazzii* および新鮮なハクサイから調整したトータル DNA について、使用した DGGE

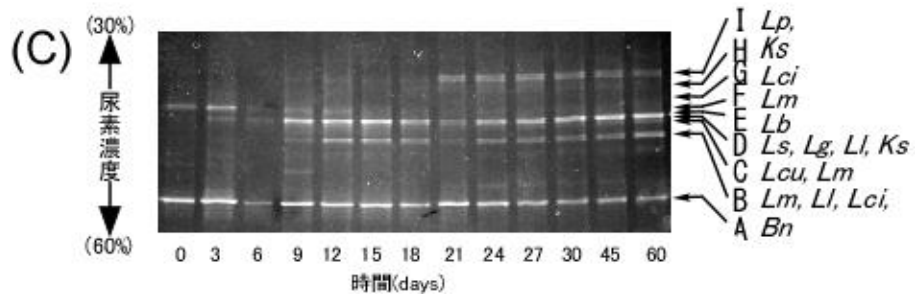
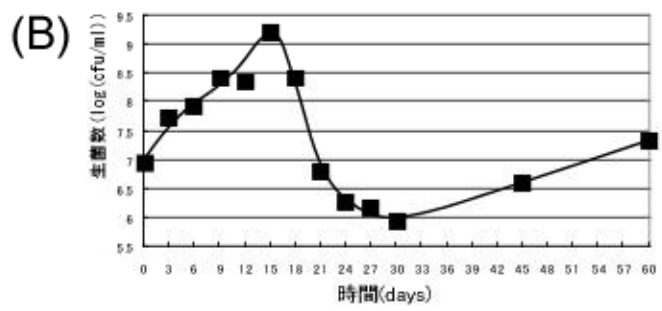
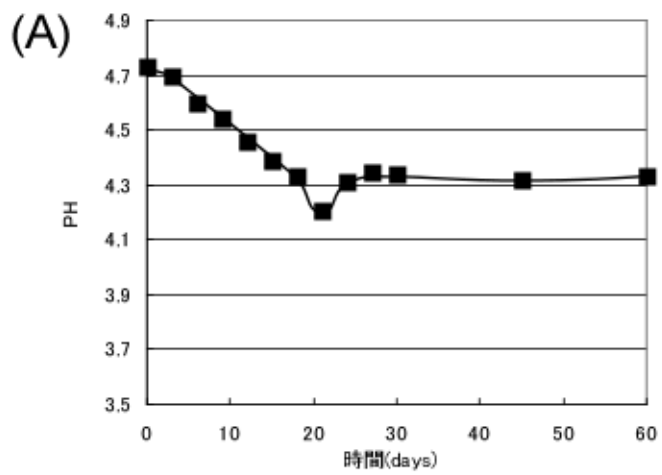
バクテリア用のプライマーで PCR を行い DGGE にかけたところ明瞭なバンドが出現した (図 2.2)。酵母やカビのミトコンドリアのゲノムにはバクテリアの 16s-rRNA と相同性を有する 15S rRNA 遺伝子が含まれ、植物のクロロプラストのゲノムにも同様に相同性を有する 16S rRNA 遺伝子が含まれており、これらの遺伝子配列が PCR で増幅されたと考えられる [14]。しかしながら、D1/D2 領域を用いた DGGE の結果に比べると、図 3.3 の 9~18 日以前や 60 日目などで経時変化の挙動が一致しておらず、酵母の細胞数が少ないこともあり、細菌由来の DNA との競合や細菌由来の増幅産物によるマスキング等があったりして酵母の挙動は反映されなかったと推定される。

K. servazzii は 9~12 日目に DGGE のバンドが生じており、DGGE で検出されるのは $10^4 \sim 10^5$ cfu/ml と考えられる。30 日目以降の pH 低下に伴って酵母の菌数は減少するが、DGGE のバンドは検出され続けており、高圧処理で死滅した死菌の細胞が分解されずに残留し、このような細胞から抽出された DNA に由来してバンドが生じたと考えられる。

2.3.3 高圧処理を加えたキムチにおける微生物挙動

高圧処理を加えたキムチの発酵過程における経時的な pH の推移を図 2.4A に示した。キムチの発酵が進んで美味しくなるのが 20 日目頃であり、酵母菌数がプラトーに達して高圧処理の効果が明確になることを考慮して 21 日目に高圧処理を実施した。図 2.3A と同様に

20日目までは pH 4.2 達した後に pH 4.3 に戻すが、高圧処理を加えた 21 日目以降は pH の低下が見られなかった。一方、乳酸菌数は 18 日まで図 2.3B と同様に推移したが、21 日目の高圧処理により 2.3×10^8 cfu/ml から 6.3×10^6 cfu/ml に急減した。この後 30 日目まで漸減して 8.3×10^5 cfu/ml となったが、以降は回復傾向になり 60 日目には 2.0×10^7 cfu/ml になった (図 2.4B)。以上の結果から高圧処理により乳酸菌数が減って pH の低下が抑えられたことが示唆された。この過程での乳酸菌の DGGE の結果を図 2.4C に示した。図 2.3C に比べると解像度が劣るが、主要なバンドに大きな違いがなかった。21 日目の高圧処理で生菌数が激減したことを考えると、21 日目以降のバンドは死菌に由来する DNA を反映していると考えられる。生菌数は 21 日から 30 日にかけて更に漸減しているが、DGGE では特に *Lactobacillus sakei* のバン



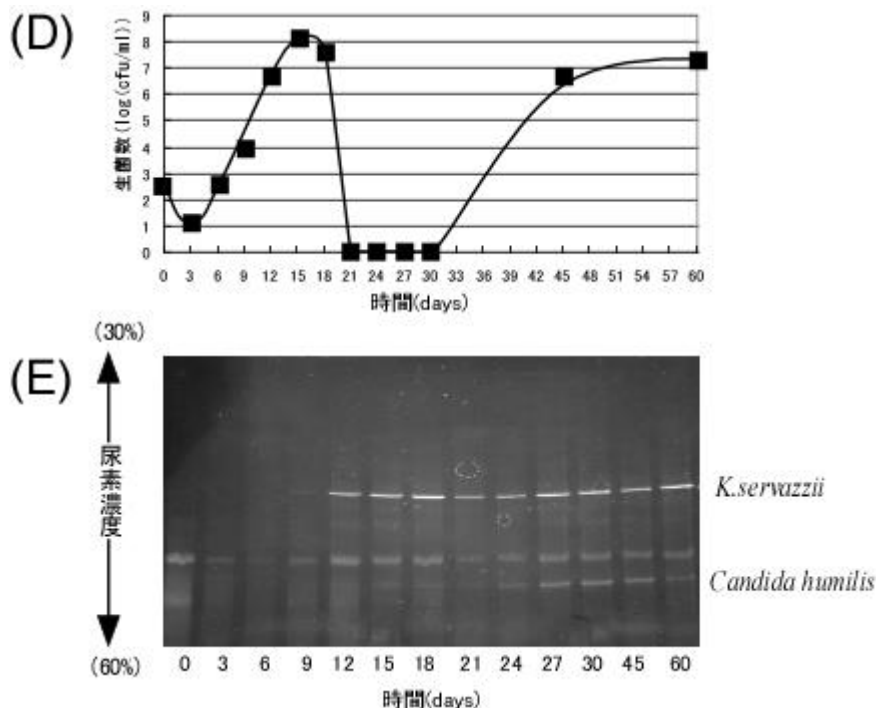


図 2.4. 21 日目に高圧処理を加えたキムチの発酵過程における微生物挙動

発酵過程における pH 変化 (A)、乳酸菌生菌数 (B)、細菌プライマー増幅産物の DGGE (C)、酵母菌生菌数 (D)、酵母プライマー増幅産物の DGGE (E) をそれぞれ示した。

ド D が濃くなる傾向が見られた。また、21 日目の乳酸菌由来のバンドが薄くなる傾向が認められ、高圧で損傷した細胞に由来する不純物により 260 nm の吸収が増大して DNA 濃度が実際より高く見積もられた可能性が想像される。

一方、酵母の生菌数は 21 日目の高圧処理で検出限界以下となり、30 日までこの状態が続き、45 日目では 5.1×10^6 cfu/ml まで回復した (図 2.4D)。酵母の DGGE の結果でも 21 日目以降のバンドは死菌の DNA に由来すると考えられるが、45 日以降には増殖してきた酵母の生

菌数が反映されていると推定される。しかし 45 日目以降と 30 日目以前とで大差がなく、30 日から 45 日にかけては主に *K. servazzii* が増殖してきたことが示唆された (図 2.4E)。

高圧処理を行わなかった場合には 60 日目に優占化した *Candida humilis* は、高圧処理で pH の低下が生じなかった場合には優占化しておらず、*K. servazzii* より優れた耐酸性を持つことが考えられる。*K. servazzii* については YM 培地中において 200 Mpa、60 分の処理で死滅することを報告している [2]。しかしながら DGGE のバンドの濃さが 30 日目以降に増加に転じる推移から 30 日目以降に増殖してきた酵母は *K. servazzii* と予想され Ym 培地の結果と異なる結果となった。食塩濃度が高くなるにつれて高圧処理で死滅しにくくなることが *Zygosaccharomyces rouxii* で報告されており *S. cerevisiae* でも同様の報告がある [15,16]。今回分離した *K. servazzi* でも食塩濃度が高いと高圧処理で死滅しにくくなる結果が得られており [16]、キムチペースト中での圧力抵抗性の上昇が報告されている [17]。おそらく YM 培地に比べ食塩濃度の高いキムチ中で圧力抵抗性が上昇し、200 MPa, 60 分の処理でも一部が生き残って増殖してきたと思われる。

高圧処理を施したところ、菌叢の変化は無いまま乳酸菌の菌数ならびに酵母の菌数が激減し、pH は 60 日目まで pH4.3 付近で安定した。高圧処理により多くの菌が死滅し、キムチにおける発酵 = 酸生成が停止したことが示唆される。通常であれば更なる pH の低下により食味が

低下するところであるが、発酵が停止したことから食味が良好なまま維持されると予想され、賞味期間の延長につながると期待される。

2.3.4 スターターを加えたキムチにおける微生物挙動

本研究では、高圧感受性酵母を利用することを目標としているが、利用する際には発酵開始時にスターターとして加えて優占化させるのが有力な方法である。そこで乳酸菌と酵母をスターターとして添加した場合の菌叢変化を調査した。スターターとして *L.sakei* および *K.servazzii* 野生株をそれぞれ 2×10^6 cfu/ml および 1×10^4 cfu/ml となるように添加したキムチについても同様の実験を行った。細菌 DNA の DDGE の結果 (図 2.5A) ではスターターとして加えた *L.sakei* が 3 日目に優占化しており、スターターを加えない場合より *L.sakei* の優占化が 3 日程度早まったことが示唆された。菌叢の変化は 24 日目頃まで早まって推移したが、27 日目以降はほぼ同じとなった。したがってスターターの添加は特に初期の発酵過程を若干早めたものの菌叢自体を変化させる効果はなかったと思われる。酵母の生菌数の結果 (図 2.5B) ではスターターとして加えた *K.servazzii* 野生株が増殖を早めたことが示唆されたが、12 日目以降は差がなくなった。しかし、スターターを添加した場合の pH の変化、乳酸菌の生菌数、DDGE における酵母 DNA の挙動は図 2.3 とほぼ同じであり (data not shown)、キムチの発酵に目立った変化を与えることはなかった。

また、21 日目に高圧処理を加えた場合も *L.sakei* の早

期の優占化や酵母の増殖の早まりが見られたが、高圧処理の影響やその後の推移は図 2.4 とほぼ同じとなり (data not shown)、やはりスターターの添加がキムチの発酵に目立った変化を与えることはなかった。

以上の結果は、スターターの効果がなかったこと意味し、スターターの菌を優占化させるには高圧処理後に添加するなどの工夫が必要であることが示唆された。一方、実際に試食したところ香りに明確な違いがあり、スターターの効果を検証するには異なる指標も必要だと考えられる。

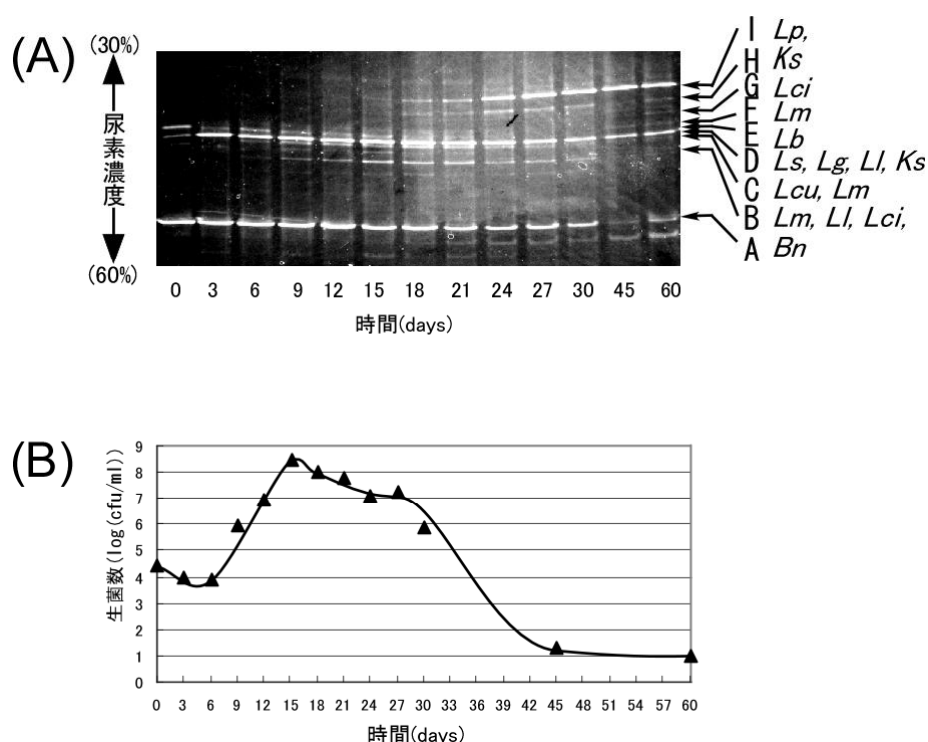


図 2.5. スターターとして *Lb.sakei* および *K.servazzii* を加えたキムチの発酵過程における微生物挙動
発酵過程における細菌プライマー増幅産物の DGGE (A)、
酵母生菌数 (B) をそれぞれ示した。

参考文献

- [1] 笹川秋彦, 星野純, 小林篤, 西海理之, 鈴木敦士, 藤井智幸, 小西徹也, 山崎彬, 山田明文, 圧力処理によるキムチの発酵制御とその特徴, 日本高圧力学会誌, **16** (2), 167-178 (2006).
- [2] 小林正義, 川村麻梨子, 小林篤, 山崎彬, 福田雅夫, キムチ酵母の分離と圧力感受性変異株の作出, 日本高圧力学会誌, **23** (1), 59-67 (2013).
- [3] 橋本俊郎. 乳酸菌スターターHS-1の漬物への利用, 食品と技術, **07**, 10-13 (2005).
- [4] Lee, K. and Lee, Y., Effect of *Lactobacillus plantarum* as a Starter on the Food Quality and Microbiota of Kimchi. *Food Sci. Biotechnol.*, **19** (3), 641-646 (2010).
- [5] Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P. and Palmer, J.D., Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **46** (4), 327-338 (1999).
- [6] Lane, D.J., 16S/23S rRNA sequencing. In "Nucleic acid techniques in bacterial systematic," eds. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., John Wiley and Sons, New York, pp. 115-175 (1991).
- [7] White, T. J., Bruns, T., Lee, S. B. and Taylor, J., Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In "PCR protocols: a guide to methods and applications," eds.

- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J., Academic Press, San Diego, pp. 315-322 (1990).
- [8] Muyzer, G., Waal, E. C. and Uitterlinden, A. G., Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** (3), 695-700 (1993).
- [9] Cocolin, L., Bisson, L. F. and Mills, D. A., Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.*, **189** (1), 81-87 (2000).
- [10] Chang, H.W., Kim, K.H., Nam, Y.D., Roh, S.W., Kim, M.S., Jeon, C.O., Oh, H.M. and Bae, J.W., Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.*, **126**, 159-166 (2008).
- [11] 阪本直茂, 中山二郎, 糠床のマイクロフローラと乳酸菌の共生, *生物工学*, **89** (8), 482-485 (2011).
- [12] 恩田匠, 柳田藤寿, 辻政雄, 荻野敏, 篠原隆, 内村泰, 味噌醸造過程における細菌叢の変遷解析, *日本乳酸菌学会誌*, **11** (1), 20 (2000).
- [13] 催善圭, キムチ製造の化学 5, *食の科学*, **194**, 50-58 (1994).
- [14] Gray, M. W., Sankoff, D. and Cedergren, R. J., On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA.

- Nucleic. Acids Res., **12** (14) , 5837-5852 (1984).
- [15] 野口 誠 , 高圧処理による醤油中の
Zygosaccharomyces rouxii の殺菌 . 日本醸造協会誌 ,
95, 46-52 (2000).
- [16] Ortega, M. P. , 酵母の高圧不活化に及ぼす塩濃度
及び冷蔵保存の影響 . Presented at 日本農芸化学会
2011年度大会 , 京都 , March 26-28, 231 (2000).
- [17] 山本和貴 , 酵母のキムチ中での高圧処理 .
Presented at 日本農芸化学会 2011年度大会 , 京都 ,
March 26-28, 231 (2000).

引用 URL

- [i] <http://www.ddbj.nig.ac.jp> (2013.3.12)

第 3 章

キムチ酵母の分離と 圧力感受性変異株 の作出

3.1 はじめに

発酵製品は酵母，乳酸菌，糸状菌などの微生物の力を利用しているが，微生物を制御するために，高濃度の塩分や食品添加物を加えて保存性を高めている[1, 2]。非加熱あるいは加熱殺菌が不完全な場合は，酵母や糸状菌がガスを産生することがある[3, 4]。特にキムチやヨーグルトなど酵母と乳酸菌による複合発酵で熟成が進む食品は，長期保存による過発酵によって主として酵母によるガスの発生が起こり，品質が低下する[3]。一方，この発酵を制御するために加熱殺菌を行うと，風味や食感，栄養価が顕著に低下する[1, 5]。

笹川らは，熟成した発酵食品に室温で 300 MPa，5 分間の高圧処理を施すことにより，圧力感受性の酵母は殺菌され，圧力に耐性な乳酸菌は生き残って，選択的な殺菌処理ができることを明らかにしている[6]。これによりキムチの食味への影響を抑えつつ，ガスの発生，甘味の減少，酸味の増加など，酵母による過発酵の弊害を抑制できることを報告している。しかし，300 MPa の高圧処理を施すと外観や食感に変化が生じ，キムチではしなびた外観になり，ヨーグルトでは著しい固化が生じるなど，高圧処理による弊害も生じた[7]。一方，200 MPa 以下の中低圧処理を用いれば外観や食感の変化が低減されると期待されたが，200 MPa 以下の圧力処理では食品中の酵母を殺菌できなかったことが報告されている[6, 8]。

このような経緯を踏まえ，本研究では酵母による過発酵の弊害であるガスの発生を抑制して流通期間の延長等を実現することを目指し，キムチに含まれる主要酵母を分離し，200 MPa の圧力処理で殺菌が可能な圧力感受性の変異酵母を作出することを目的とした。

3.2.2 実験方法

3.2.1 供試酵母と培地

製造元の異なる4種類のキムチを用いた。各キムチ5gに0.85%生理食塩水45mlを加え、Homogenizer AM-3（日本精機（株）製）を用いてホモゲナイズし、得られた懸濁液を希釈してYM寒天培地(Agar 20.0 g/l, Glucose 10.0 g/l, Peptone 5.0 g/l, Yeast extract 3.0 g/l, Malt extract 3.0 g/l, pH 6.2, Difco)に塗布した。48時間培養後に生じたコロニーを単離し、供試酵母とした。酵母の液体培養はYM培地(Glucose 10.0 g/l, Peptone 5.0 g/l, Yeast extract 3.0 g/l, Malt extract 3.0 g/l, pH 6.2, Difco)を用い30℃にて行った。

3.2.2 DNAの抽出

1.5 mlにて48時間培養した酵母菌体を入れた2 mlのポリプロピレンチューブにガラスビーズ0.5 g (0.5 mm ϕ 0.2 g, 0.1mm ϕ 0.3 g), 1 mlのSTE溶液(100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)と0.2 mlの10% SDSを加えて懸濁し、マルチビーズショッカー(安井器械（株）製)を用い2,500 rpm, 80秒にて細胞を破碎した。破碎溶液を65℃で1時間保温後、室温で13,000 rpm, 10分間遠心分離し、上清を0.5 ml回収した。0.25 mlのPEG溶液(30% Polyethylene glycol 6000, 1.6 M NaCl)を加えて室温で一夜放置後、4℃, 15,000 rpmで20分間遠心分離し、沈殿を0.5 mlのTE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)に溶かした。0.25 mlの7.5 M 酢酸カリウムを加えて氷上で5分間静置後、4℃, 15,000 rpmで30分間遠心分離し、上清を回収した。フェノール/クロロホルムを等量加えて混和後に、室温にて15,000 rpm, 10分間遠心分離して上清を0.3 ml回収する操作を2回繰り返した。集めた上清0.6 mlに等量のイソプロパノール

を加えて-20℃にて 15 分間保持後、4℃、15,000 rpm で 20 分間遠心分離した。沈殿を 1 ml の 70%エタノールで 2 回洗浄（4℃、15,000 rpm、5 分間遠心分離）して自然乾燥し、50 μl の Deoxyribonuclease フリー-Ribonuclease A（RNase A 10 mg/ml、（株）ニッポンジーン製）入り TE 溶液(5 μl RNase A, 45 μl TE, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)に溶解し、DNA サンプルとした。

3.2.3 rRNA 遺伝子の PCR 増幅と解析

18S rRNA-ITS1-5.8S rRNA-ITS2-26S rRNA を含む rRNA 遺伝子領域内の約 700 bp (図 3.1)を増幅するため、DNA サンプルに対し、Ex Taq DNA polymerase（タカラバイオ（株）製）と ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG) および ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC)プライマー [9]を Ex Taq DNA polymerase のマニュアルに従って用い、MJ Mini thermal cycler（BIO-RAD 社製）にて PCR 反応を行った。

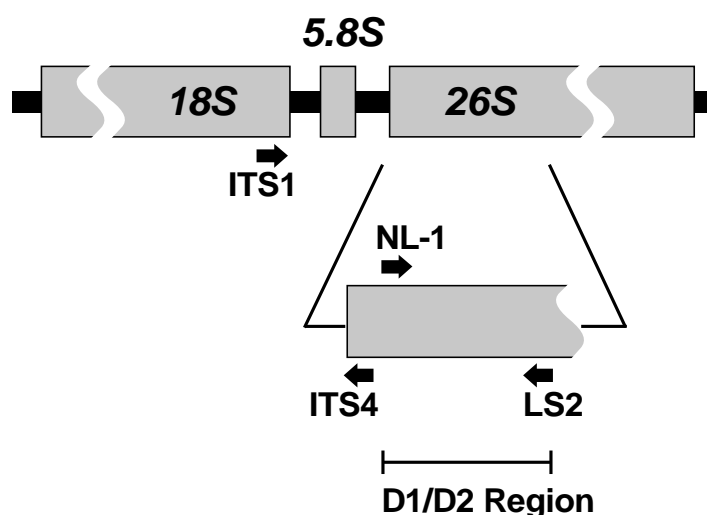


図 3.1. 同定のために PCR 増幅した rRNA 遺伝子配列

18S, 5.8S, 26S の各 rRNA 遺伝子はグレーのボックスで示した。黒い矢印で示した ITS1 及び ITS4 プライマーを用いて 775 bp の DNA 領域を PCR 増幅した。

PCR 反応は、変性 94°C, 30 秒, アニーリング 50°C, 30 秒, 伸長 72°C, 90 秒の条件で 30 サイクル行った。PCR 産物は、0.8%アガロースゲル電気泳動で分離後、GelGreen (Biotium 社製) で染色して検出した。

PCR-RFLP 解析には約 700 bp の DNA 断片を電気泳動後のアガロースゲルから QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を使用して抽出し、それぞれ制限酵素 Hae III ((株)ニッポンジーン製), Hha I ((株)ニッポンジーン製), Hinf I (東洋紡績(株)製) を用いてマニュアルに従い 37°C, 2 時間反応後、3%アガロースゲル電気泳動で分離して検出した。

DNA 塩基配列の解析には抽出した約 700 bp の DNA 断片に対し、DTCS Quick Start kit (Beckman Coulter 社製) を用いて MJ Mini thermal cycler にてマニュアルに従ってシーケンス反応を行った。反応後マニュアル通りに調製した DNA 試料の DNA 配列を CEQ 2000 System (Beckman Coulter 社) を用いて解析した。得られた DNA 配列のブラスト検索は DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)の BLAST プログラムにて行った。

変性密度勾配ゲル電気泳動(DGGE)に用いた真菌 26S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域の増幅には GC クランプ配列を付加した NL1 (5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG)

および LS2 (5'-ATTCCCAAACAACACTCGACTC)プライマー[10]を用い、前述のように PCR 反応を行った。PCR 反応は、変性 94°C, 30 秒, 伸長 72°C, 40 秒の条件を用い、アニーリングは 62°C から 53°C まで 1°C ずつ温度を下げながら 30 秒行い、各温度のアニーリング

条件で3サイクルの増幅を実施した。最後に52℃、30秒のアニーリング条件で15サイクルの増幅を行った。変性密度勾配ゲルはChangら[11]の条件に従い、Dcodeシステム(BIO-RAD)を使用し、8%アクリルアミド/ビスにて30%~60%の変性濃度勾配のゲルをマニュアル通りに調製し、増幅産物DNAを80V、14h、60℃で泳動した。

3.2.4 圧力感受性酵母のスクリーニング

圧力感受性株MK1-HPSを以下に記した手順を経て取得した。また、各段階で選抜したコロニー数を末尾に表として記した。

(1) YM培地にて一夜培養したMK1の培養液3 mlをMES緩衝液(0.1 M, pH 4.5) 10 mlと混合し、ガスバリア性軟質樹脂袋に入れて泡を除いて脱気した後にヒートシールにより密封した。この樹脂袋について食品用高圧特機(石川島播磨重工業(株)製)を用いて100 MPaにて10分間の圧力処理を施した。昇圧および減圧の時間は各2分とし、30℃にて行った。処理後の菌液を適宜希釈して100 µg/mlクロラムフェニコールを含むYM寒天培地に塗布し、30℃で培養した。培養48時間後より24時間ごとにコロニーを確認し、144時間後まで培養を続けて出現が遅いコロニーを選抜した。選抜したコロニーの一部を新たなYM寒天培地に移し、30℃で培養してコロニーが生じたプレートをレプリカとして保管し、ステップ(3)以降の操作に使用した。

(2) MES緩衝液10 µlを染み込ませた滅菌ペーパーディスク(6 mmφ、アドバンテック東洋(株)製)に選抜したコロニーをかき取って移し、ガスバリア性軟質樹脂フィルムでペーパーディスクを挟んでヒートシールにより密閉した。密閉したペーパーディス

クについて食品用高圧特機を用いて200 MPa、10分間の圧力処理を上述と同条件にて行った。開封後に各ペーパーディスクをYM培地5 mlに投入して30℃で培養し、増殖が遅いか増殖が見られない株を選抜した。

(3) 選抜した株についてレプリカのコロニーを接種源に用いて100 MPa、150 MPaおよび200 MPaでの圧力感受性試験（次項2.5）を行い、最も高い圧力感受性を示した1株を選抜した。

(4)この1株を用いてステップ(1)(2)の操作を反復し、再び1株を選抜した。

(5)選抜した株の生育が著しく遅かったため、YM培地で30℃にて16回植え継いで生育速度がMK1と同程度に回復した株を選び、ステップ(3)に記した圧力感受性試験を行って、最も高い圧力感受性を示した1株を選抜した。

(6)この株を用いてステップ(1)(2)の操作を反復し、圧力感受性が高い株1株を選抜した。

(7)選抜した株をYM培地で30℃にて12回植え継いで生育速度が回復した株を選び、ステップ(3)に記した圧力感受性試験を行って、最も高い圧力感受性を示した1株を選抜し、圧力感受性株MK1-HPSを得た。

スクリーニング操作 1回目	実験対象コロニー数	9405
	スクリーニングで選抜した 増殖遅れコロニー数	90
	感受性の確認操作で選抜した 圧力感受性候補株の数	3
スクリーニング操作 2回目	実験対象コロニー数	1900
	スクリーニングで選抜した 増殖遅れコロニー数	64
	感受性の確認操作で選抜した 圧力感受性候補株の数	4
スクリーニング操作 3回目	実験対象コロニー数	6059
	スクリーニングで選抜した 増殖遅れコロニー数	72
	感受性の確認操作で選抜した 圧力感受性候補株の数	2

3.2.5 圧力感受性試験

MK1 および MK1-HPS を，初発菌数が約 10^7 CFU/ml となるように MES 緩衝液(0.1 M, pH 4.5)に接種し，ガスバリア性軟質樹脂袋に 10 ml ずつ分注して脱気後に密封した。この樹脂袋を 100 MPa, 150 MPa あるいは 200 MPa にて 10 分間の圧力処理（前項 3.2.4）を施した後，菌液を適宜希釈して 100 μ g/ml クロラムフェニコールを含む YM 寒天培地（各希釈段階でプレート 2 枚ずつ）に塗布して 30°C で培養した。培養 6 日後にコロニー数を計測して平均し、生菌数を算出した。また 200 MPa においては 1 分間，5 分間，10 分間，20 分間の高圧処理を施して，それぞれ生菌数を算出し，得られた死滅曲線より D 値を求めた。滅菌キムチペーストにおける圧力感受性試験では，キムチを MILLSER-750G（岩谷産業（株）製）を用いてペースト状にホモゲナイズし，121°C，15 分間のオートクレーブ処理にて滅菌して上述の MES 緩衝液の代わりに用いた。

3.2.6 資化性試験

酵母の資化性試験には6.7 g/l Yeast Nitrogen Base (Difco), 50 mg/l Yeast extract (Difco), 50 mg/l Casamino acids DAIGO (和光純薬(株)製)の組成の培地に50 g/lの炭素化合物溶液(67 g/l Yeast Nitrogen Base)を1/10量加えて使用した。内径16 mmの試験管2本に炭素化合物を含む資化性試験用培地5 mlを入れ, 30°C, 2日間培養して無菌性を確認した後, 供試酵母懸濁液(10^4 CFU/ml)を各々0.5%接種して30°Cで4週間静置培養した。1週間ごとに観察しながら, 試験管の背面に置いた白紙の5 mm間隔の黒色平行線(幅0.75 mm)の視認性を指標に各炭素源での増殖性を判定した。ネガティブコントロールとして炭素化合物を加えない試験管を用いた。

3.2.7 発酵試験

MK1 および MK1-HPS を, 初発菌数が約 10^7 CFU/ml となるように YM 培地に接種し, ガスバリア性軟質樹脂袋に 5 ml ずつ分注して脱気後に密封した。この樹脂袋を 30°C, 20°C, 10°C, 4°C の各温度の恒温槽にて静置培養した。24 時間後までは 4 時間ごとに, 24 時間以降は 24 時間ごとに樹脂袋を取り出し, 培養液の OD₆₀₀ を計測した後, セルロースアセテートフィルター(孔径 0.45 μ m)でろ過し, 密封して分析まで - 80°C のフリーザーにて保管した。

グルコース量の測定には, SUGAR KS-804 (8.0×300 mm, Shodex) および SUGAR KS-801 (8.0×300 mm, Shodex) のカラムを接続して使用し, 超純水を移動相(流速 1.0 ml/min) に用いて高速液体クロマトグラフィー Jasco PU-980/LG-980-02 システム(日本分光(株)製)にて分離し, 示差屈折計 Jasco RI-2030(日本分光(株)製)を用いて検出・定量した。エタノール量の測定には F-kit Ethanol (Roche Diagnostics 社製)を使用し, マニュアルに沿って定量した。

3.2.8 ガス発生量の定量

MK1 および MK1-HPS を，初発菌数が約 10^7 CFU/ml となるように YM 培地に接種し，ガスバリア性軟質樹脂袋に 10 ml ずつ分注して脱気後に密封した。この樹脂袋を 200 MPa にて 20 分，40 分または 60 分間の保圧条件で高圧処理を施した。圧力処理後は恒温槽に静置して 30℃ にて培養を行い，4 時間ごとに樹脂袋を水中に沈めて全容量を測定し容量変化を計測し，ガス発生量を定量した。実験は 1 試験区について 3 回実施した。

3.3. 結果と考察

3.3.1 キムチ発酵酵母の単離

日本国内で入手した 3 種類のキムチ A, B, C と韓国で入手したキムチ D から YM 培地にて酵母の分離を行い, 各試料から 6 個のコロニーを選んで単離した。各コロニーが酵母のコロニーであることは顕微鏡観察にて確認した。また, キムチ A については 3 ヶ月後に再度, YM 培地に 6 個のコロニーを選んで単離した。各コロニー由来の菌株を YM 培地で培養後に DNA を抽出し, ITS1-5.8S rRNA-ITS2 を含む遺伝子領域を増幅する ITS1 及び ITS4 のプライマーを用いた PCR-RFLP 解析を行った。その結果, 全ての分離株において制限酵素 Hae III, Hha I, Hinf I の切断パターンが同じで, Hae III と Hinf I の断片長が *Kazachstania (Saccharomyces) servazzii* CECT11353^T[12]とほぼ一致した(図 3.2)。

また, キムチ A 由来の 4 コロニー, キムチ B 由来の 7 コロニー, キムチ C 由来の 7 コロニー, キムチ D 由来の 6 コロニーを培養後に抽出した DNA から ITS1 及び ITS4 のプライマーを用いて PCR 増幅した DNA の塩基配列を決定し, 得られた DNA 配列の最長配列を用いてブラスト検索を行った結果, *Kazachstania (Saccharomyces) servazzii* NBRC1383 の配列に対してキムチ A およびキムチ D 由来の 2 配列は 100%, キムチ C 由来の配列は 99.5%, キムチ B 由来の配列は 99.4% の相同性をそれぞれ示した(図 3.3)。また, *Kazachstania aerobia* とは 95~96%, *Kazachstania unispora* と 93~94% の相同性を示した。

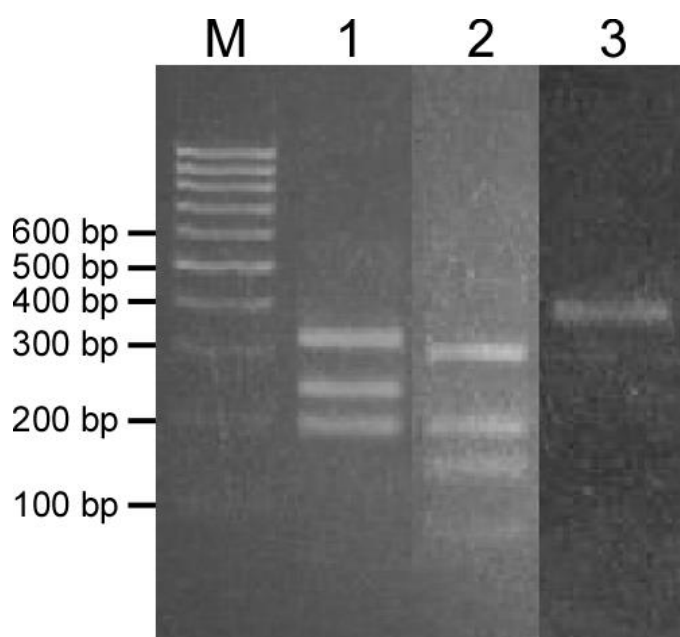


図 3.2. 分離した MK1 株の PCR-RFLP 分析

PCR 増幅した rRNA 断片を HaeIII (レーン 1), HhaI (レーン 2), HinfI (レーン 3) の各制限酵素で切断後、アガロースゲル電気泳動にかけた。分子サイズマーカーをレーン M にて泳動し、サイズを左側に記した。*Kazachstania servazzii* CECT11353 株から PCR 増幅した rRNA 断片は、HaeIII と HinfI で切断すると、それぞれ 335 bp, 250 bp, 190 bp の断片と 400 bp, 375 bp の断片を生じることが報告されている [10]。2 本の HinfI 断片は十分に分離されておらず、一本のバンドに見える。

```

NBRC1383 TTTTTCGTTGCTTTGCAGGAGACACTATACTGCTGGACCAGCGCTTAAT TCGCGGTTTGGTGGTCTCTGTAGCTCAGTAGCACTATTACACACAGTG
D (KML#6) -----
A (KA2) -----
C (S4) -----C-----C-----
B (D4) -----C-----C-----

NBRC1383 GAGATTTTATAATTC TTGTCATGCTTCTTTGGGC TGCTTCGGCGGCC AGGAGTGACAAACACAAACAATTTGTAATTTTATGAACTAGTCAAAACC
D (KML#6) -----
A (KA2) -----
C (S4) -----A-----
B (D4) -----

NBRC1383 AGAATTCAGGAAGATTTATCTTTTGTAAATTTAAAACAATATTTAAA CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGTCATCGATGAAGAAGCAGCGAA
D (KML#6) -----
A (KA2) -----
C (S4) -----
B (D4) -----

NBRC1383 ATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGGTAATCATCGAA TCTTT GAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATCCAGGGGCGATGCCCTGTTGAGCG
D (KML#6) -----
A (KA2) -----
C (S4) -----
B (D4) -----A-----

NBRC1383 TCATTTCTTCTCAAACAGCAATGTTGGTTGTGAGTGATACTCTTTCCG AGTTAGCTTGAAATGCTGGCOGATGGCTGTTGTGGTTGAGTGTCTCCCT
D (KML#6) -----
A (KA2) -----
C (S4) -----
B (D4) -----

NBRC1383 TCGGGGAGAGCGCTTGCTGCGTTAAGGGACGTCCTGCTGGACATCTTCGT ATTAGGTTCTACCAACTCGAAGACGGTTAGCGGGGAGTTCTGCAGTGAG
D (KML#6) -----
A (KA2) -----
C (S4) -----
B (D4) -----

NBRC1383 TGTAGTGCTTTTACTACGTTGCACCATGGCGAACAGTGTCTTTTAAAGTT TGACCTCA 100%
D (KML#6) ----- 100%
A (KA2) ----- 100%
C (S4) ---A----- 99.5%
B (D4) ---A----- 99.4%

```

図 3.3. 分離株と *Kazachstania servazzii* NBRC1383 の rRNA 遺伝子配列のアラインメント

A から D のキムチから分離した酵母と *Kazachstania servazzii* NBRC1383 の 656 bp の rRNA 遺伝子配列を並べた。酵母株は分離したキムチのアルファベット及び NBRC 番号で示した。NBRC1383 株は全配列を、分離株は NBRC1383 株と異なる配列のみを示し、同じ配列は - で示した。配列が欠失している場合はスペースで表した。NBRC1383 株に対する相同性%を配列の末尾に記した。各行は 50 塩基ずつの 2 組をスペースで区切って示した。

以上の結果から使用した4種類のキムチ試料においては、共通して *K. servazzii* が含まれていることが示唆された。さらにキムチ A とキムチ D から DNA を抽出し、真菌 26S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域を PCR 増幅した断片を変性密度勾配ゲル電気泳動(DGGE)にて解析したところ、1本のバンドのみが検出された(data not shown)。このバンドの DNA を抽出して塩基配列を決定したところ、*K. servazzii* Lu9-14 の D1/D2 領域(GenBank HM146913)と 100%一致した。この結果からキムチ A とキムチ D において *K. servazzii* が優占化していることが示唆された。

以後の実験には、キムチ D に由来する一株を *K. servazzii* MK1 と命名して用いた。MK1 は 100 MPa の静水圧で 10 分間保持しても生残性に影響がなく、生残率は 100%であった。200 MPa、10 分間の加圧では 1 桁程度生残率が低下した(図 3.4)。

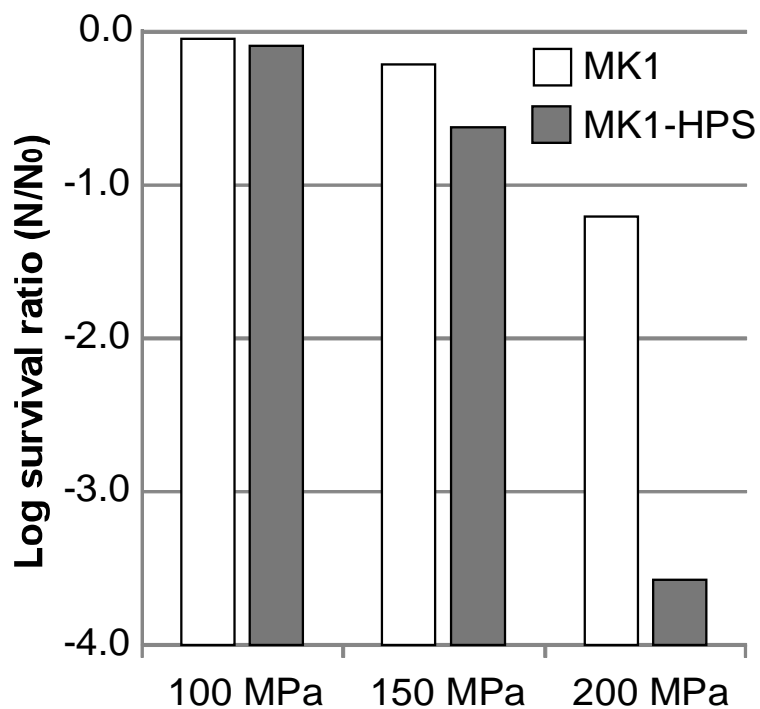


図 3.4. 野生株と MK1-HPS 株の各圧力処理後の生残性

YM broth で生育させた細胞を MES 緩衝液に懸濁し、グラフ中に記した圧力で 10 分間処理した。100 $\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコールを含む YM broth 寒天プレート上で 144 時間培養後に生じたコロニー数から生残数を算出した。高圧処理前の細胞濃度(N_0)と高圧処理後の細胞濃度(N)を比べてそれぞれの対数生残率を算出した。白いバーは野生株 MK1 の、黒いバーは MK1-HPS の生残率を表し、加えた圧力はグラフの下側に示した。

研究に汎用される *Saccharomyces cerevisiae* や *Shizosaccharomyces pombe* では 200 MPa で著しく生残性が低下することが報告されており [13]、*K. servazzii* は比較的高い耐圧性を有していると思われる。高浸透圧の保存性食品の腐敗の原因となる *Zygosaccharomyces bailii* でも高い耐圧性が報告されており [14]、耐圧性が浸透圧の高い環境と関連する可能性も考えられる。

3.3.2 圧力感受性株の取得

MK1 の圧力感受性株を取得するにあたり、感受性株は高压処理後にダメージから回復するのに時間がかかって生育が遅くなると仮定し、材料と方法に述べたように MK1 が本来耐性を示す 100 MPa の静水圧を加えた後に生育が遅くなった変異株から圧力感受性株を選抜する操作を 3 回繰り返す、圧力感受性株 MK1-HPS を取得した。なお、選抜操作において増殖速度の低下が認められたため、2 回目と 3 回目の圧力感受性株を選抜する操作を完了した後に、植え継ぎにより増殖速度が回復した株を選抜する操作を行った。

MK1-HPS の圧力感受性を調べるため、野生株 MK1 とともに菌濃度 10^7 CFU/ml の MES 溶液について 100 MPa と 200 MPa で 10 分の加圧をしたところ、200 MPa で MK1 に比べて 4 桁程度生残率が低下し、明確な違いが認められた(図.3.4)。また、200 MPa、40 分間の処理では MK1 が 10^{3-4} CFU/ml 程度生残したのに対し、MK1-HPS では生残菌は認められなかった(10^1 CFU/ml 以下)(Data not shown)。次に加圧時間を変えながら 200 MPa で圧力処理を行い、生残性を調べて、5 分までのグラフにおける近似直線に基づいて 90% 死滅するに要する時間 (D 値) を算出したところ、MK1-HPS では 1.54 分、MK1 では 5.83 分であった。また、圧力処理時間が長くなると処理

時間に伴う生残性の低下が抑えられる傾向が見られ、処理時間 5～20 分の生残菌数から 90%死滅する D 値は MK1 で 17.1 分、MK1-HPS で 6.4 分となった(図 3.5)。

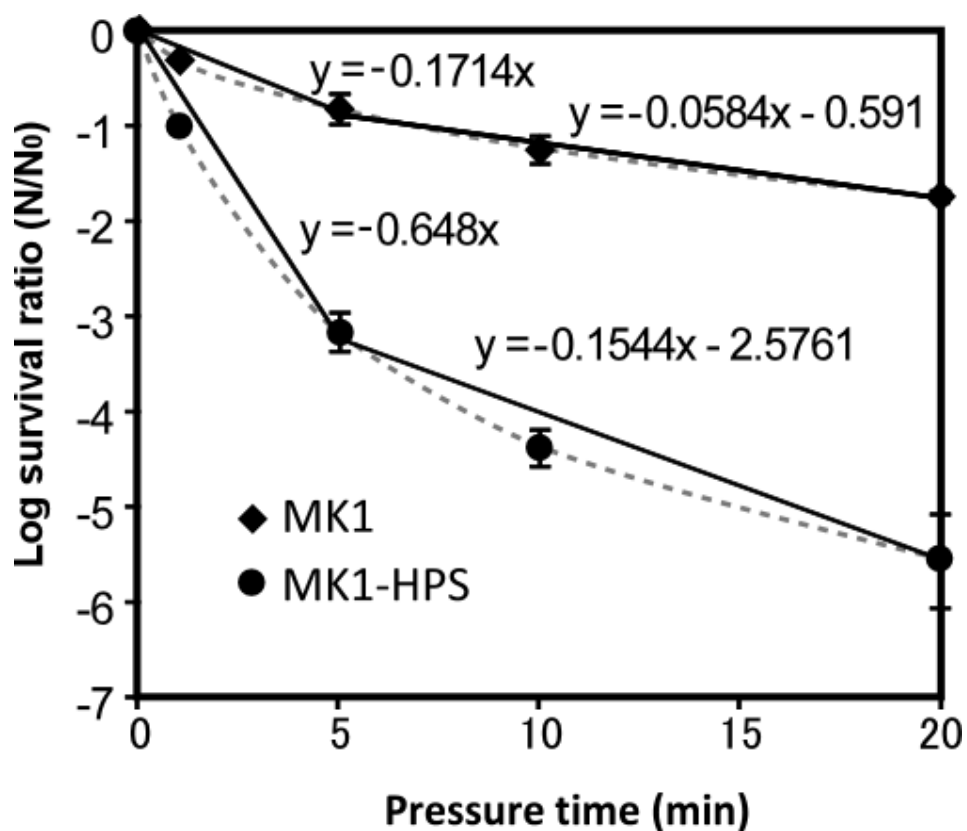


図 3.5. 野生株と MK1-HPS 株の 200 MPa 高圧処理後の生残性

実験条件は図 3.4 と同じである。野生株と MK1-HPS 株の対数生残率を、それぞれ黒菱形と黒丸で示した。本文に記載した通り、対数生残率の 0 分と 5 分及び 5 分と 20 分を直線で結んで D 値を算出した。データは別々に実施した 3 回の実験の平均であり、エラーバーは標準偏差を表している。

一方、MK1-HPS の圧力感受性がキムチ中でも発揮されるかを調べるため、キムチ破碎ペースト 1 ml 中に 10^7 CFU/ml にて菌を懸濁し、加圧時間を変えながら 200 MPa で圧力処理を行い、生残性を調べた(図 3.6)。MK1-HPS および MK1 は共に圧力感受性が低下する傾向が見られ、200 MPa、40 分間の処理でも 10^2 CFU/ml 程度が生残していた。このことより、キムチ成分が圧力処理に対する保護効果を示す可能性が示唆された。

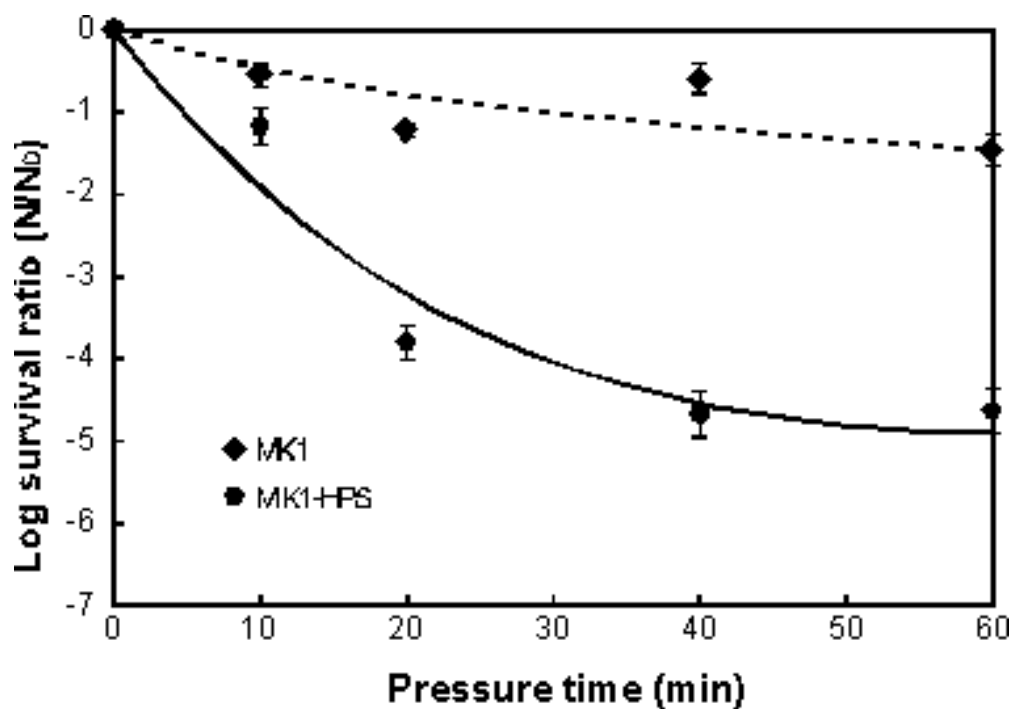


図 3.6.滅菌キムチペースト中における野生株と MK1-HPS 株の 200 MPa 高圧処理後の生残性
 実験条件は図 3.4 と同じである。野生株と MK1-HPS 株の対数生残率を、それぞれ黒菱形と黒丸で示した。データは別々に実施した 3 回の実験の平均であり、エラーバーは標準偏差を表している。

今回のスクリーニングでは増殖の遅れた株を選抜し、そこから圧力感受性株 **MK1-HPS** を選抜したが、増殖の遅れた株の中には圧力感受性ではない株もあり、増殖の遅れた株が全て圧力感受性ではなかった。したがって増殖が遅れる変異には多様性があり、その一部が圧力感受性と関連していると考えられる。一方、増殖が遅れた株を植え継いで増殖を **MK1** 並みに戻した場合には、圧力感受性でなくなった株も得られた。このことから使用した増殖の遅れた株には増殖が遅れる変異が複数あり、圧力感受性と関連した変異と圧力感受性と関連しない変異が含まれていることが想像される。圧力感受性でなくなった株は圧力感受性と関連した増殖が遅れる変異を回復する復帰変異が生じたと考えられ、逆に、**MK1-HPS** は、圧力感受性と関連しない増殖が遅れる変異を回復する復帰変異が生じたと考えられる。以上の結果から、**MK1-HPS** には圧力処理による 3 回の選抜と植え継ぎによる 2 回の増殖能回復の少なくとも 5 つの変異が存在すると考えられる。

3.3.3 資化性試験

各種の糖，グリセロール，プロリン，グルタミン酸，ギ酸などの炭素源に対する資化性を，30℃にて 28 日後まで液体培養して検討した。その結果，**MK-1** および **MK1-HPS** に共通して 8 種類の炭素源に対する資化性が認められた。一方，**L-Proline**，**D-Raffinose** については，**MK-1** でのみ資化性が認められた(表 3.1)。**L-Proline**，**D-Raffinose** に関しては，**MK1-HPS** で資化能を損なう変異が起きたと推測されるが，それらの変異が圧力感受性にかかわっているかどうかは不明である。

表 3.1. MK1-HPS の各種糖及びプロリンの資化性

Substrate	MK1 (wild)	MK1-HPS
α -D-Glucose	+++	+++
D-Galactose	+++	+++
D-Treharose	+++	+++
Amygdalin	++	++
Glycerol	+++	++
D-Ribose	+++	++
Sucrose	++	++
L-Proline	++	—
D-Raffinose	+	—

+++ , vigorous growth ; ++ , apparent growth ; + , weak growth ; - , no growth

3.3.4 発酵試験

MK1-HPS において L-Proline および D-Raffinose 資化能が欠損していたことから、圧力感受性獲得が発酵能に変化を及ぼした可能性が考えられた。そこで YM 培地を用い、グルコースを基質としたアルコール発酵能を 30℃、20℃、10℃、4℃にて嫌氣的に培養して検討した。30℃および 10℃における結果を図 3.7 に示した。濁度は 30℃、20℃試験区において差は見られなかった。10℃、4℃試験区においては、MK1-HPS は MK-1 と比較して増殖がやや低下する傾向が見られた。一方、グルコース減少量とエタノール生成量では、エタノール生成量で MK1-HPS が MK-1 に劣る傾向が見られたが、各温度において MK-1 と MK1-HPS の間で大きな差は認められなかった。以上より、MK1-HPS の発酵能は MK-1 と同程度であると結論した。

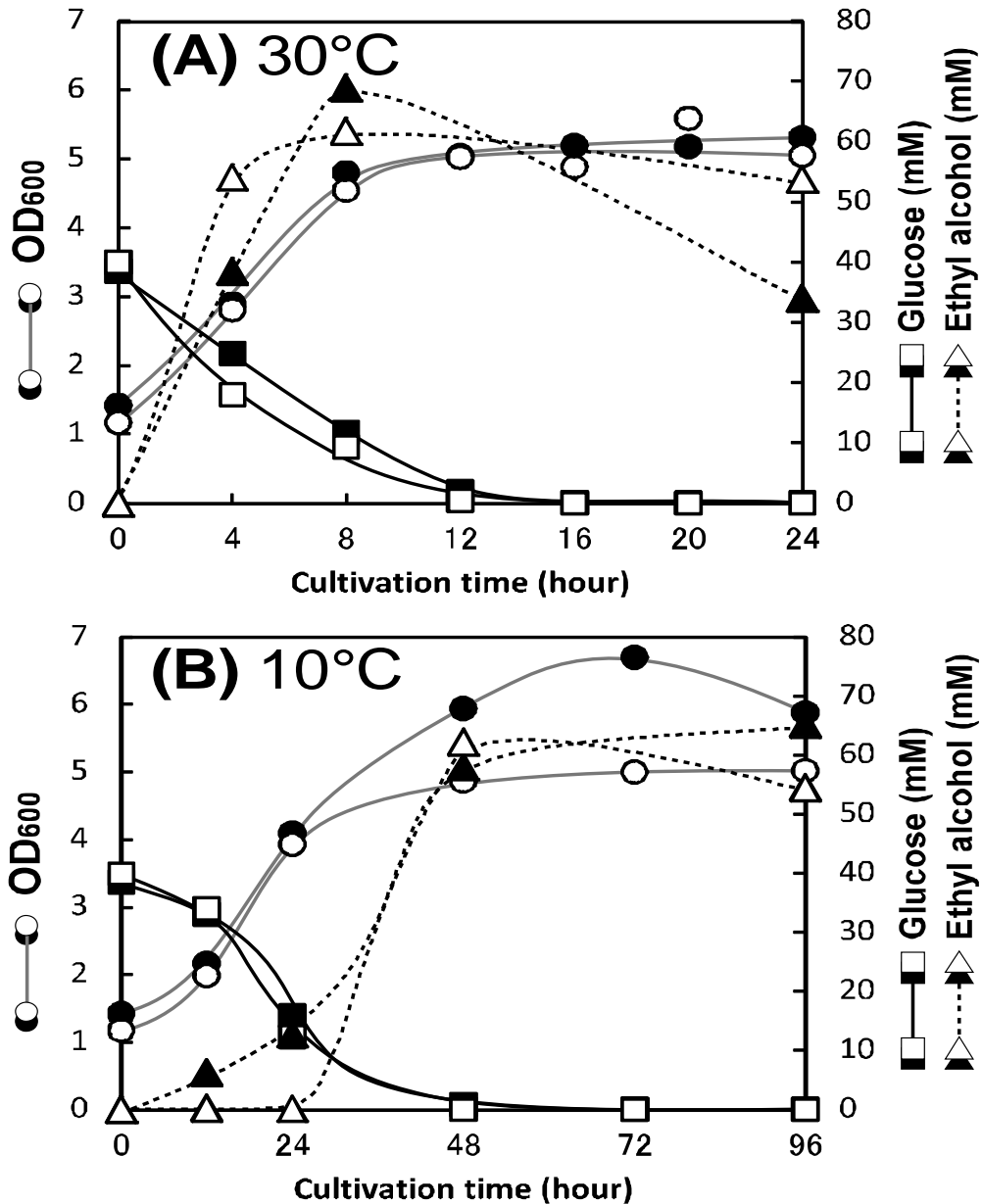


図 3.7.野生株と MK1-HPS 株の発酵能

YM broth で生育させた野生株 MK1 と変異株 MK1-HPS を約 10^7 cells/ml の濃度で YM broth に接種し、5 ml ずつ密閉バッグに封入した後、30°C (パネル A) 及び 10°C (パネル B) で培養した。増殖(丸), グルコース残存量(四角), エチルアルコール生産量(三角)を MK1 (黒色)及び MK1-HPS(白色)について経時的に測定した。開始時(0分)のグルコース濃度の実測値は初期濃度の 42.7 mM を下回っており、測定時までのグルコース消費を反映したと思われる。

3.3.5 ガス発生量の調査

圧力感受性株の MK1-HPS の発酵途中におけるガス発生を高圧処理で抑えることが出来るかを調べるため、MK1 および MK1-HPS を YM 培地に接種後、ガスバリア性軟質樹脂袋に密封し、200 MPa の高圧処理を施した。処理後の樹脂袋を 30°C にて培養して経時的にガスの発生量を測定し、図 3.8 に示した。また、高圧処理直後の生菌数を表 3.2 に示した。高圧処理後の生菌数は、MK1 では 60 分処理後に検出限界以下となったが、MK1-HPS は 20 分間の処理で検出限界以下となった。

表 3.2.野生株 MK1 と変異株 MK1-HPS におけるガス発生調査のための 200 MPa 高圧処理後の生菌数

strain	Viable cell counts (CFU ^a /ml)			
	none	20 min ^b	40 min ^b	60 min ^b
MK1 (wild)	8.9×10 ⁶	1.2×10 ⁴	1.4×10 ²	<30
MK1-HPS	6.6×10 ⁶	<30	<30	<30

^a Colony-forming unit

^b Pressure time

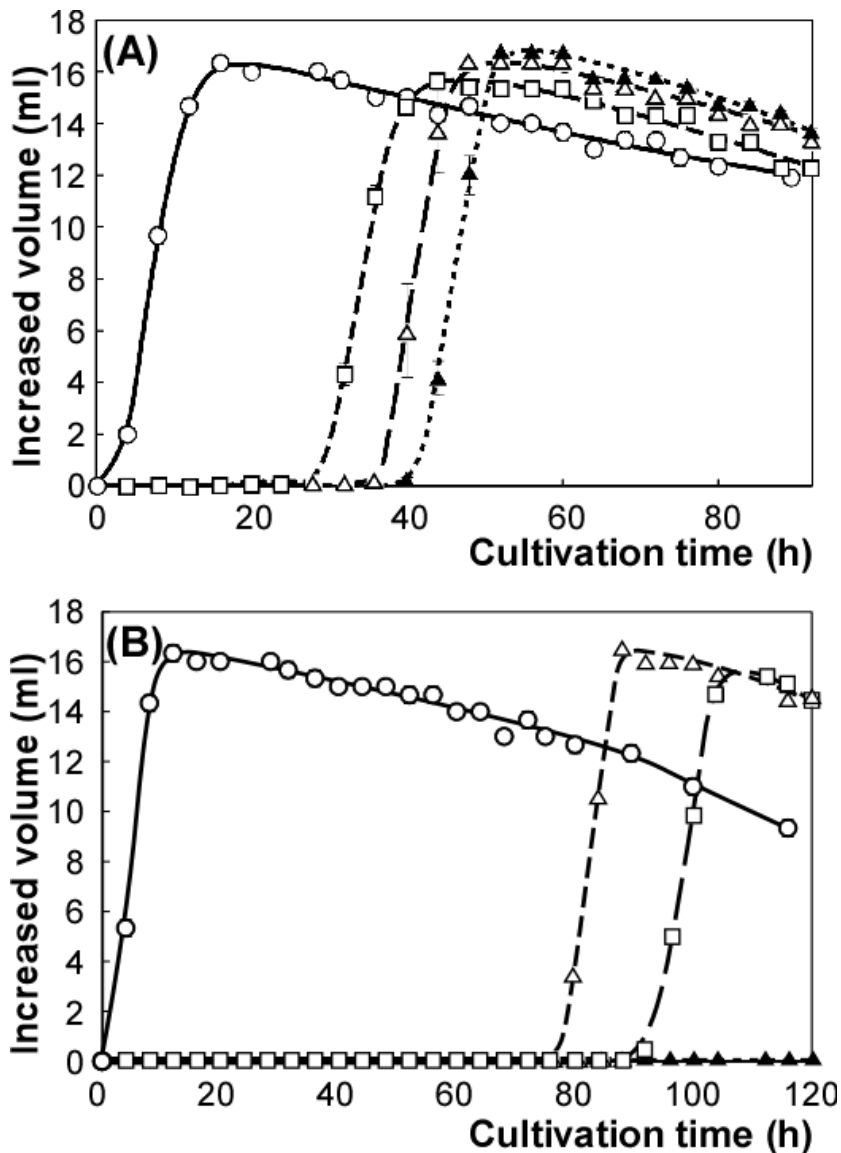


図 3.8. 野生株と MK1-HPS 株による YM broth におけるガス発生
 YM broth で生育させた野生株 MK1 (パネル A)と変異株 MK1-HPS (パネル B)を約 10^7 cells/ml の濃度で YM broth に接種し、10 ml ずつ密閉バッグに封入した後、200 MPa、20 分(白四角)、40 分(白三角)、60 分(黒三角)の高圧処理を行った。高圧処理をしなかった試料(白丸)を対照とした。処理後の試料は 30°C で培養し、ガス発生を調べるため体積の増加を測定した。

高圧処理はガス産生のタイミングに明確な影響を与え、MK1 と MK1-HPS の間で顕著な差が見られた。高圧処理をしない場合には MK1 も MK1-HPS も培養初期からガス産生が始まり、10 時間程度で飽和した。MK1 では 20 分間の高圧処理で 28 時間後、60 分間の高圧処理で 40 時間後からガス産生が始まり、いずれも 10 時間程度で飽和した。一方、MK1-HPS では 60 分間の高圧処理で 3 パック全てにおいてガスの産生は認められなかった。この 3 パックは実験終了後 5°C にて 3 カ月間保管したが、ガス発生は認められなかった。40 分間の高圧処理では 3 パック中 2 パックで 80 時間後と 94 時間後にガスの産生が認められ、それぞれ 88 時間後と 104 時間後に飽和した。残る 1 パックはガスの産生が認められなかった。20 分間の高圧処理では 92 時間後にガスの産生が認められ、104 時間後に飽和した。

以上の結果から、MK1 では 200 MPa、60 分間の高圧処理でもガス発生が生じるのに対し、MK1-HPS では高圧処理によりガス発生が抑えられることが示唆された。表 3.2 の結果では MK1-HPS の生残性は 20 分を越える高圧処理で検出限界以下となっていたが、20 分間及び 40 分間の高圧処理でガス産生が見られた。MK1-HPS の圧力処理後の回復が遅く、野生株に比べて増殖が遅れた結果とも考えられるが、表 3.2 の生残性試験では培養を 144 時間まで延長してコロニーを計数しており、その可能性は低いと考えられる。生残性が検出限界以下でも、培養液中には最大 300 CFU が残っている可能性があり、僅かに生き残った細胞が増殖した結果と思われる。一方で、キムチペースト中での MK1-HPS の 200 MPa、60 分間の高圧処理後の生残性（図 3.6）は $10^{-4\sim-5}$ 程度であり、キムチ中で MK1-HPS の過発酵を抑えるには 200 MPa、60 分間では不十分で

ある。更に厳しい条件で高圧処理をするとキムチの食感を損なうため実用的には、(1) MK1-HPS より更に高い感受性を持つ株を作出する、(2) pH 低下に伴い酵母の菌数が $10^{4\sim5}$ CFU/ml にまで減少した時点で高圧処理を行う、(3) キムチ中の抗菌成分を増強して酵母の菌数を下げるなどの対策が必要だと考えられる。

MK1-HPS においてプロリン資化能とラフィノース資化能が欠損していたことが、圧力感受性の獲得にかかわっている可能性が考えられる。酵母におけるプロリンの蓄積によるストレス耐性の増加を示し、適切なプロリン濃度とその局在化がストレスの保護効果をもたらすとした報告がある[17]。MK1-HPS のプロリン資化能欠損がプロリンの不適切な蓄積を引き起こし、高圧感受性をもたらした可能性が考えられる。一方、トレハロースの蓄積が高圧耐性をもたらすとの報告[18, 19]があるが、MK1-HPS のラフィノース資化能欠損との関連は不明である。ラフィノース資化能欠損はラフィノースの蓄積を引き起こすと考えられ、トレハロースであれば高圧耐性をもたらすと予想される。また、トリプトファンなどのアミノ酸要求変異が高圧感受性をもたらすことが報告[20]されており、MK1-HPS の栄養要求性を調べる必要があると思われる。

参考文献

- [1] 中山正夫: 食の科学, **6**, 15 (1987).
- [2] 稲津康弘, 川本伸一: 食品科学工学会誌, **54**, 425 (2007).
- [3] 宮尾茂雄: 防菌防黴, **27**, 811 (1999).
- [4] 宮尾茂雄: 防菌防黴, **30**, 383 (2002).
- [5] 大嶋孝之: 生物工学会誌, **81**, 403 (2003).
- [6] 笹川秋彦, 星野純, 小林篤, 西海理之, 鈴木敦士, 藤井智幸, 小西徹也, 山崎彬, 山田明文: 高圧力の科学と技術, **16**, 167 (2006).
- [7] 田中龍夫, 畑中耕一: 日本食品科学工学会誌, **39**, 173 (1992).
- [8] 浜田和広, 嶋田昇二: 高圧科学と加圧食品, 林力丸編 (さんえい出版, 京都, 1991), 第 16 章, pp. 181-188.
- [9] T.J. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor: in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (Academic Press, London, 1990), Chap. 38, pp. 315-322.
- [10] L. Cocolin, L.F. Bisson, D.A. Mills: FEMS Microbiol. Lett., **189**, 81 (2000).
- [11] H.W. Chang, K.H. Kim, Y.D. Nam, S.W. Roh, M.S. Kim, C.O. Jeon, H.M. Oh, J.W. Bae: Int. J. Food Microbiol. **126**, 159 (2008).
- [12] M.T. Fernández-Espinar, B. Esteve-Zarzoso, A. Querol, E. Barrio: Antonie van Leeuwenhoek, **78**, 87 (2000).
- [13] M. Sato, H. Kobori, S.A. Ishijima, Z.H. Feng, K. Hamada, S. Shimada, M. Osumi: Cell Struc. Function, **21**, 167 (1996).

- [14] E. Palou, A. Lopez-Malo, G.V. Barbosa-Canovas, J. Welti-Chanes, P.M. Davidson, B.G. Swanson: *J. Food Prot.*, **61**, 1657 (1998).
- [15] J.W. Lee, D.S. Cha, K.T. Hwang, H.J. Park: *Int. J. Food Sci. Technol.*, **38**, 519 (2003).
- [16] 稲津康弘, 前田穰, 一色賢司, 川本伸一: *食品工業*, **47**, 46 (2004).
- [17] Hiroshi Takagi, Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 211 (2008).
- [18] Iwahashi, H., Obuchi, K., Fujii, S. and Komatsu, Y., Barotolerance is dependent on both trehalose and heat shock protein 104 but is essentially different from thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **25** (1), 43-47 (1993) .
- [19] Iwahashi, H., Nwaka, S. and Obuchi, Kaoru., PHYSIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY: Evidence for Contribution of Neutral Trehalase in Barotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66** (12) 5182-5185 (2000) .
- [20] Abe, F. and Horikoshi, K., Tryptophan Permease Gene TAT2 Confers High-Pressure Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 8093-8102 (2000) .

第 4 章

総 括

4.1 本論文のまとめ

本論文では、キムチについて外観の変化を抑える 200MPa の高圧処理で製品の殺菌製造が可能なシステムの確立を目指し、200MPa で殺菌可能な高圧感受性酵母の開発を目的とした。

第 1 章では、発酵食品の微生物とその制御技術を概観し、加熱処理に適さず酵母による過発酵などの課題をかかえる漬物の品質保持への高圧処理の有効性と外観の変化を抑える 200MPa の高圧処理で殺菌可能なシステムの必要性を述べ、上記の目的の背景を説明した。

第 2 章では、キムチの製造にかかわる微生物を把握するため、細菌用ならびに酵母用培地を用いて微生物を分離し、抽出した DNA を用いて rRNA 遺伝子配列を PCR 増幅してシーケンス解析し、主要な微生物種を特定した。細菌では *Lactobacillus*, *Leuconostoc* および *Weissella* 属を含む 11 種の乳酸菌を分離した。酵母では *Kazachstania (Saccharomyces) servazzii* が優占種として共通して含まれることを明らかにした。次に、キムチの発酵過程における微生物叢を発酵開始から 60 日目まで調査した。キムチから抽出した DNA から PCR 増幅した rRNA 遺伝子部分断片を変性密度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) にて分離し、それぞれの DNA バンドから抽出した DNA の塩基配列をシーケンシングにより調べた。60 日間のキムチ発酵過程で、pH は 3.9 まで二段階で低下し、乳酸菌濃度は 15 日目に最大になった後、 3.2×10^8 cfu/ml に保たれた。乳酸菌の中では *L. sakei* が一定して認められ、*L. plantarum* が 21 日目以降に見られた。一方、酵母では *Kazachstania servazzii* がもっぱら検出され、その菌濃度は 15 日目に最大となり 1.4×10^8 cfu/ml に達し、27 日目以降は検出限界以下へと減少した。以上の結果から、発酵の進行に伴って複数の乳酸菌が交互に消長すること、酵母では *Kazachstania*

servazzii が優占化することを明らかにした。また、発酵 21 日目に 200 MPa, 60 分の高圧処理をキムチに加えたところ、高圧処理以降の pH 低下が止まるとともに、乳酸菌と酵母の菌濃度は急激に低下し、それぞれ 8.3×10^5 cfu/ml ならびに検出限界以下となった。その後、乳酸菌は緩やかに回復したのに対し、酵母は速やかな回復を見せた。最終的には、高圧処理の有無による微生物叢の違いは認められなくなった。また、発酵開始時にスターターとして *L. sakei* と *K. servazzii* 野生株をそれぞれ 2×10^6 cfu/ml および 1×10^4 cfu/ml となるように添加したキムチについても同様な調査を試みたが、発酵後期の微生物叢における明確な違いは見られなかった。

第3章では、キムチにおける過発酵の原因となる酵母の圧力感受性株の開発をおこなった。キムチから単離した *K. servazzii* MK1 を使用し、100 MPa で10分間の加圧後の培養で増殖が遅い株を選抜する方法にて圧力感受性をスクリーニングした。3回のスクリーニングの繰り返しと2回の増殖速度が回復した株の選抜を経て圧力感受性株 MK1-HPS を選抜した。MK1-HPS は200 MPa の圧力処理における90%死滅時間 (D値) が1.5分となり、野生株の5.8分に比べ明確な圧力感受性を示した。また、MK1-HPS はL-Proline およびD-Raffinose の資化性を失っていたが、その他の多様な炭素源に対する資化性及びグルコースからのアルコール発酵能は、野生株のMK1 とほぼ同じ程度であった。MK1 とMK1-HPS を培養後、200 MPa、60分間の圧力処理をして更に培養を続けたところ、MK1 では40時間後からガス発生が認められたが、MK1-HPS では120時間後でもガス発生は認められなかった。キムチにおける圧力感受性株の利用が期待される成果が得られた。

4.2 総合考察

今回使用した DGGE 解析は複数の微生物が発酵にかかわる発酵食品の製造現場で有効な手段となりつつあるが、品質管理業務で日々の検査業務に使用するには、今回実施したように発酵過程で出現する主要菌株を予め単離・同定しておくのが有効な手段と考えられる。主要菌株を同定することにより、その特性から発酵へのかかわりが予測でき、品質管理の質を高めるのに役立つと期待される。ただ、死滅した菌の DNA が長期にわたって検出される点では注意を要する。将来的には、DNA に比べて細胞中や環境中で短寿命の RNA を試料とする PCR-DGGE を使用することになる可能性もある。

作出した圧力感受性株 MK-1 HPS は、野生株と同等の発酵能を保持しており、キムチの品質低下を抑えられる 200MPa での圧力処理によりガスの発生を抑えて、流通段階での膨張事故防止と賞味期限延長に寄与すると期待される。また、MK1-HPS を選抜した手法は既に特許として公開された[1]が、他の食品で利用されている酵母や乳酸菌の圧力感受性株の作出にも応用できると推測され、将来、重要な技術となることが期待される。

MK-1 HPS をキムチ製造に使用する場合には、スターターとして発酵開始時に添加して素材由来の酵母を抑えることを考えていたが、第 2 章で行った実験では、スターターとして添加しただけでは、容易には優占化しないことが示唆された。添加量や添加時期を更に検討する必要があると考えられる。場合によっては発酵開始時に高圧処理を加えるなどして素材由来の酵母を殺菌した後に、MK-1 HPS や乳酸菌をスターターとして加え、スターターだけで発酵を行うことも検討すべきと思われる。

以上、本研究では、キムチの発酵過程における微生物叢の動態を

把握するとともに、各キムチに共通して認められる酵母の圧力感受性変異株を作出する技術を開発し、圧力感受性を取得した。また、その圧力感受性の効果を確認した。特に、本研究では以下に列挙した独創的な成果を上げることができた。

- (1) キムチについて世界で初めて 20 日を越え、60 日もの長期にわたる微生物叢の動態と pH 変化を明らかにした。
- (2) キムチについて世界で初めて発酵途中の高圧処理における微生物叢の動態と pH 変化を明らかにした。
- (3) 日本産と韓国産のキムチにおける酵母の優占種として *Kazachstania (Saccharomyces) servazzii* が共通して含まれることを示した。
- (4) 高圧処理後で増殖が遅れた株の選抜を繰り返して高圧感受性変異株を選抜する非常にユニークな手法を開発し、高圧感受性変異株の取得に成功した。
- (5) 高圧感受性変異株において高圧処理により過発酵に伴う製品の「膨れ」を抑えられることを示唆する結果を得た。

本研究の成果は。圧力処理を発酵食品に広く利用するための重要な基盤技術になると期待される。

参考文献

- [1] 山崎 彬, 小林 正義, 小林 篤, 川村 麻梨子, 福田 雅夫 特開
2012-217393 (平成 24 年 11 月 12 日)「圧力感受性微生物の作出
方法並びに発酵食品の製造方法並びに発酵食品並びに発酵食品
の殺微生物方法」

謝 辞

本研究は「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」（農林水産省・農林水産技術会議）の補助を受け進めたものです。本論文の作成にご協力いただいた（独）農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品工学研究領域 食品高圧技術ユニット ユニット長・山本 和貴氏に感謝いたします。また、キムチを提供して頂いた李 賢淑(Lee Hyunsook)氏，株式会社 フーディーネットジャパン（旧 有限会社アリランハウス），他，関係の方々の御支援に対し深く御礼を申し上げます。

また、本研究を行うにあたり多大な便宜を図っていただいた越後製菓(株)、 山崎 彬会長、星野 一郎社長、杵淵 美倭子常務、小林 篤取締役、川村 麻梨子研究員、研究所および工場の社員の皆様に深く感謝申し上げます。

終始ご指導を賜りました長岡技術科学大学工学部、 福田 雅夫教授、政井 英司教授、笠井 大輔助教に厚く御礼申し上げます。

研究を影で支えてくれている家族ならびに指導をいただいた福田研究室の面々に心から感謝いたします。