

発酵食品中の微生物を探ろう

高橋 俊成

我々人類は昔から発酵食品を食しており、知らず知らずのうちに微生物の恩恵を受けてきた。発酵食品とは、カビ、酵母、乳酸菌など微生物の力を利用した食品であり、多くの場合、複数種の微生物が共生し、相互作用することにより作りだされる。世界的にみると、ヨーグルト、チーズ、パン、ウイスキーなどがあげられる。日本においても、清酒、味噌、醤油、漬物などが食されてきた。発酵食品の製造においては、微生物の生育環境を経験的にコントロールしてきたが、その微生物集団としての特性はほとんど解明されていない。本稿では、複合微生物系における群集構造解析技術を利用した発酵食品中の微生物相の解析について紹介する。

分離培養を基本とした分類・同定法に端を発する複合微生物系における群集構造解析は、PCRの出現により大きく進歩した。従来の分離培養法では、培養困難な微生物を検出することができなかったが、PCRをベースにした解析技術はDNAを標的とするため、培養困難な微生物相の解析も可能である。標的DNAとしては、リボソームRNA (rRNA) 遺伝子が一般的である。食品などの複合微生物群を含む試料より核酸を抽出し、乳酸菌などの細菌の場合、微生物種ごとに塩基配列に多様性がある16S rRNA遺伝子の可変領域をPCRで増幅し、増幅産物をさまざまな解析に供することになる。PCR産物の解析方法をいくつか紹介すると、まずはPCR産物をプラスミドにクローニングし、大腸菌で増幅後、塩基配列の解析を行うCloning/Sequencing法がある。この手法では、クローニング作業に多大な時間と費用を要することが問題となる。そこで、クローニングを介さない手法が開発された。一つは、TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis: 温度勾配ゲル電気泳動) 法である。これは、DNAが変性する温度は配列に依存し、水素結合を3本持つGC結合の割合が多くなるほど高くなるという性質を利用して、温度勾配をつけた泳動ゲル中で電気泳動を行うことにより混合状態のDNAを分離する方法である。また、温度勾配の代わりにホルムアミドや尿素などのDNA変性剤の濃度勾配をつけた泳動ゲル中で電気泳動を行うDGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法もよく利用されている。

春田ら¹⁾は鹿児島県福山町で約200年前から製造され

ている壺酢を対象としたDGGE解析を行い、糖化・アルコール発酵から酢酸発酵過程に移行する段階で、*Acetobacter pasteurianus*とともに*Lactobacillus acetotolerans*が出現することを明らかにしている。*Lactobacillus acetotolerans*は高濃度酢酸耐性の乳酸菌であり、培養法では検出されないことから、DGGE法は食品中の微生物相を把握するための有効な手段であると考えられる。また、増田²⁾らは、清酒製造においてアルコール発酵を行う清酒酵母を純粋培養する工程「生酀」を対象としてDGGE解析を行っている。生酀とは、蒸米、米麴、水をすり潰した後、自然の乳酸菌を生育させ、乳酸菌が生成した乳酸酸性環境下で清酒酵母を純粋培養する工程である。生酀酒母において生育する乳酸菌としては、*Leuconostoc mesenteroides*および*Lactobacillus sakei*が知られており、DGGE解析によっても両菌種が検出され、生酀製造における品質管理への応用が可能となった。

その他の解析方法としては、蛍光標識したプライマーを用いたPCR産物を制限酵素処理し、蛍光色素が付加されたDNAの断片長によって分離を行うT-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) 法や、最近では次世代型DNAシーケンサーやMALDI-TOF-MSを用いた微生物相解析手法も行われるようになった。阪本³⁾らは、次世代型DNAシーケンサーを用いて熟成糠床の微生物相解析を行い、*Lactobacillus acetotolerans*と*Lactobacillus namurensis*で作られる微生物相のバランスが熟成の進行に伴い、*Lactobacillus acetotolerans*を主体とする微生物相に変わっていくことを定量的に明らかにしている。次世代型DNAシーケンサーを用いる解析では、莫大な数のシーケンスデータが出現頻度を表すことから、検出した乳酸菌の占有率がわかるため、定量的な微生物相解析が可能となる。

以上、発酵食品中の微生物相解析について述べたが、今後も伝統的な発酵食品に新しい科学のメスが入ることにより品質管理が徹底され、我々の食文化がより豊かになることを願う次第である。

- 1) Haruta, S. *et al.*: *Int. J. Food Microbiol.*, **109**, 79 (2006).
- 2) 増田ら: *生物工学*, **90**, 684 (2012).
- 3) Sakamoto, N. *et al.*: *Int. J. Food Microbiol.*, **144**, 352 (2011).