

分子生物学的手法を用いた発酵食品微生物の解析 ～T-RFLP 法によるラッキョウ塩漬における微生物群集の変遷～

バイオ応用室 藤枝 正之, 鈴木 健, 佐川 巖
コミヤ味工株式会社 古宮 真一

Analysis of Microbial Succession in Salting Process of Pickled Rakkyo by T-RFLP Method Masayuki FUJIEDA, Takeshi SUZUKI, Iwao SAGAWA and Shinichi KOMIYA¹

¹KOMIYA MIKO Co., Ltd

発酵食品製造において微生物管理は必須であり、優良な微生物を選定して使用することが品質向上につながる。本研究では、T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)法について、製造工程の微生物管理に対する有効性を調べることを目的とし、ラッキョウ酢漬工程のひとつである塩漬における菌相の解析を同法により試みた。

1. はじめに

日本の家庭では食卓上に漬物が彩られることが多く、食生活を豊かなものとしている。わが県においても、農産物を利用した鉄砲漬、酢漬、麴漬等の漬物が各種生産されている。

コミヤ味工株式会社(館山市)では、国内産ラッキョウを使用して塩漬(下漬)から酢漬・熟成までラッキョウ酢漬の一貫製造を行っている。本研究は、同社の下漬工程における微生物群集の経時的な変遷を、16S rRNA 遺伝子のT-RFLP 解析により解明するために実施した。T-RFLP 法は、微生物群集を網羅的にモニタリングすることが可能であり、微生物の菌種数及び相対的な微生物量を直接把握することができる。本法により発酵微生物の動向を捉えることによって製造管理のみならず品質向上や新製品開発の一助となることが期待される。

2. 実験方法

2.1 試料の採取

ラッキョウを約15重量パーセントの食塩水に漬込んだ発酵槽より、漬液を定期的(4, 6, 12, 22, 36, 54, 75, 97, 125日目)にサンプリングした。なお、ラッキョウの塩漬は7月上旬(平成17年)から開始した。

2.2 乳酸及びpHの測定

ラッキョウ塩漬液を滅菌水で10倍に希釈し0.45 μ m フィルターに通した。さらに、このろ液を10倍希釈し、これを乳酸測定溶液として、

キャピラリー電気泳動装置(Hewlett-Packard社製G1600A)を用いて、検量線法により定量した。測定値(定量値)を100倍し実際の乳酸値として算出した。また、pHは東亜電波工業社製pHメーターHM-30Sにより測定した。

2.3 微生物のゲノム抽出

ラッキョウ塩漬液(約200ml)をTOYO No.2ろ紙によりろ過し、ろ液を遠心分離して微生物を集菌した。集菌した微生物群は、PBSにより洗浄し、再度遠心分離した後、上澄みを捨て、Lysis buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 2% Triton X-100, 1% SDS) 0.2ml, フェノール・クロロホルム溶液 0.2ml, ガラスビーズ(No.6) 0.3gを加え、5分間懸濁した後、遠心分離した。上清を等量のTE bufferと混合し、フェノール・クロロホルム処理により精製し、エタノール沈殿、減圧乾燥を行った。得られた沈殿を滅菌水50 μ lに溶解してDNAテンプレートとした。

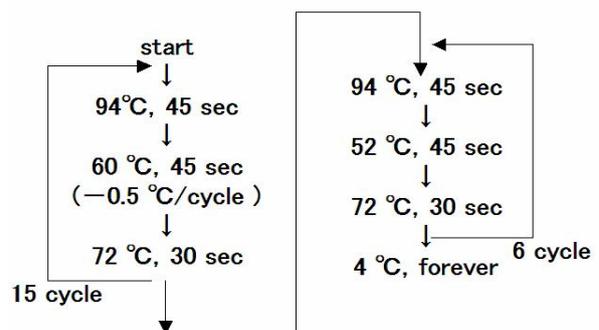


図1 PCRの反応条件

2.4 T-RFLP 法による微生物群集解析

2.4.1 PCR 反応条件

漬液中の微生物の 16S rRNA 遺伝子を増幅するため、5' 末端に蛍光色素 (D4) が結合した 27f-D4 (5' -D4-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') と 519r (5' -GTATTACCGCGGCTGCTG-3') をプライマーとして用い、Betain を最終濃度 1M となるように反応系に添加した。DNA ポリメラーゼは、Platinum *Taq* (Invitrogen 社製) を用いた。

この方法により増幅された PCR 産物の 5' 末端には、蛍光色素が結合される。

PCR 反応の温度条件は、図 1 に示すように、始めの 15 サイクルはアニーリング温度をサイクルごとに 0.5 °C 下げていくステップ・ダウン方式で行い、その後アニーリング温度 52 °C で 6 サイクルの反応で完了するプログラムを用いた。

PCR 産物は、PERFORMA DTR Gel Filtration Cartridges (Edge Bio Systems 社製) により精製した。

2.4.2 T-RFLP 条件の検討

一般的に漬物中に存在することが知られている微生物^{1), 2), 3)} の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列をデータベース (SRS : <http://srs.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) から取得した。T-RFLP 解析を行うにあたり、適当な制限酵素を選択するために、GENETYX ver 6.0 を用いて上記の塩基配列の制限酵素サイトを検索した。5' -末端側のフラグメント・サイズが適当な大きくなる制限酵素について検討し、本実験では、制限酵素 *Hae* III (GG/CC) を用いた。

2.4.3 T-RFLP 法によるフラグメント解析

精製後、減圧乾燥した PCR 産物を滅菌水 10

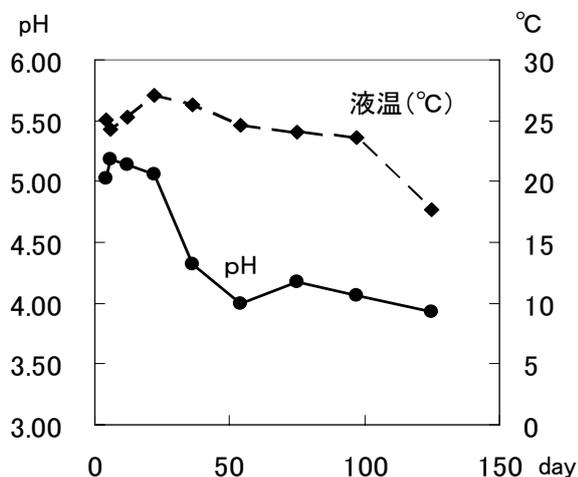


図2 ラッキョウ塩漬液中における pH の経時変化

μ l に溶解し、そのうち、 4μ l に *Hae* III (15 unit/ μ l) 0.5μ l, M Buffer 0.5μ l を加え、制限酵素処理を 37 °C で 1 晩行った。なお、使用した制限酵素量は、反応基質である PCR 産物よりも大過剰量とした。

この制限酵素処理したサンプル 1μ l に Size Marker-600 を 0.2μ l, Sample Loading Solution (SLS) を 40μ l 混合し、DNA シーケンサー CEQ 8000 (Beckman Coulter 社製) によりフラグメント解析を行った。

3. 結果及び考察

ラッキョウ塩漬液の pH 値と測定時の液温 (°C) の経時変化を図 2 に、乳酸値を図 3 にそれぞれ示す。22 日目以降乳酸値の上昇とともに pH が下がっており、pH の低下は乳酸によるものと考えられる。

T-RFLP 解析結果を図 4 に示す。さらに、この解析結果を用いて、主要な微生物由来のフラグメントについて、検出された各フラグメント・サイズ (以下、F. S. と略す) 上の蛍光強度 (Dye Signal) $I(x)$ を SizeMarker-600 の蛍光強度 (Dye Signal) の平均値 $I(m. a)$ により除したものを $I(f)$ と定義し、 $I(f)$ の経時変化を図 5 に示す。

また、16S rRNA 遺伝子の塩基配列から、*Hae* III によって生じる F. S. を GENETYX によりシミュレーションを行い、微生物の推定を行った。

F. S. 83 及び 110 の微生物は、すべての期間に存在し、F. S. 199 の微生物は 57 日目を最大として暫減していった (これら 3 種については適当な微生物を推定できなかった)。

Lactobacillus 属 (F. S. 279, 理論値 F. S. 282)

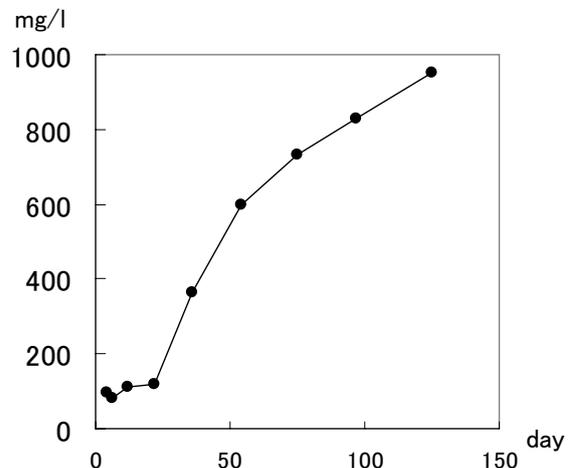


図3 ラッキョウ塩漬液中における乳酸値の経時変化

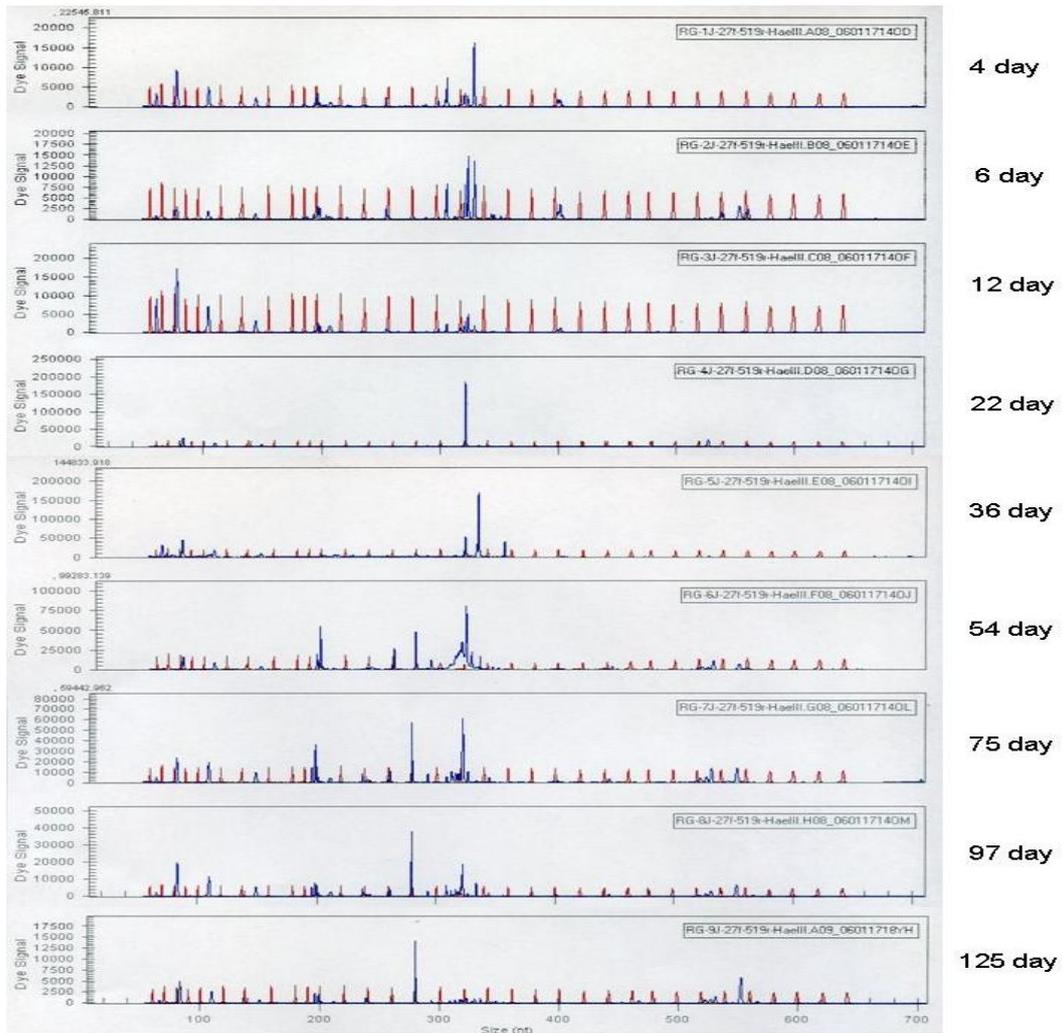


図4 T-RFLP 法によるフラグメント解析 (27f-519r PCR/*Hae* III)

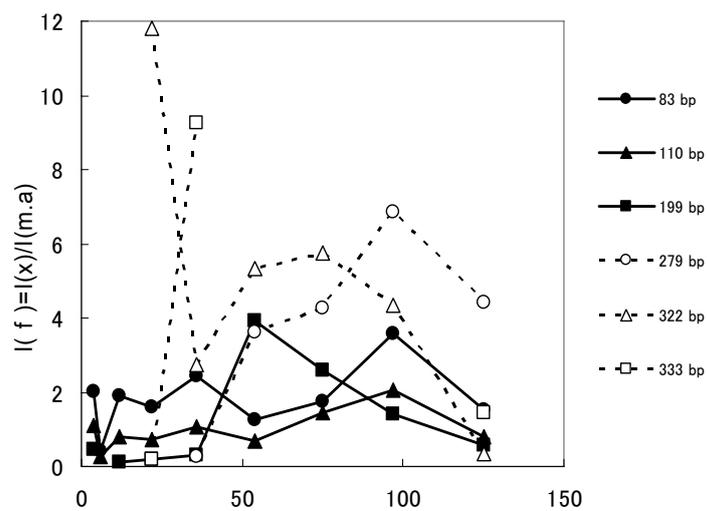


図5 T-RFLP 法によるフラグメント解析(主要の微生物の経時変化)
(27f-519r PCR/*Hae* III)

は 36 日目から現れはじめ、徐々に増加し、97 日目を最大として以後減少した。

Chromohalobacter 属 (F. S. 322, 理論値 F. S. 322) は 22 日目に最優先種となり徐々に減少した。*Leuconostoc mesenteroides* (F. S. 333, 理論値 F. S. 331) は 36 日目に最優先種となったが、他の時期ではほとんど見られなかった。

また、図 2, 3 に示すように 22 日目から 54 日目にかけて、pH の低下が大きく、乳酸量も急増している。この時期には、図 5 において *Leuconostoc mesenteroides* が増殖しており、この乳酸菌が乳酸発酵に関与していると推定される。さらに、54 日以降も引き続いて乳酸量が増加しており、*Lactobacillus* 属が乳酸発酵を引き続き行っていると考えられる。

以上、ラッキョウ酢漬の下漬工程において、まず好塩性の *Chromohalobacter* 属が増殖し、次に乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides*, さらに、*Lactobacillus* 属が優先種となることが示された。しかし、*Leuconostoc mesenteroides* については、最優先種となった 36 日目以後現れておらず、125 日目になって再度出現するという

挙動を示しており、なお検討する余地があると思われる。

4. おわりに

今回の実験により、ラッキョウ塩漬の乳酸発酵において微生物群集の変遷をある程度把握することができ、T-RFLP 法による解析が、発酵食品製造における菌相解析に有効な手段となる可能性が示された。今後、更にデータの蓄積を進め、より詳細な微生物種の特定、製品の出来と微生物相との関連等を調べる必要があるであろう。

参考文献

- 1) 小川敏男：漬物製造学, 光琳 (1989)
- 2) 宮尾茂雄：「日本の漬物」, 東京都立食品技術センター研究報告 第 12 号 (2003)
- 3) 小林恭一：「ラッキョウ下漬け発酵用乳酸菌の選抜と添加効果」, 平成 10 年度 食品加工に関する試験成績, 福井県食品加工研究所 (1999)