

発酵食品用乳酸菌スターター選択のための乳酸菌特異的菌叢解析手法の開発

— 発芽ソバ発酵エキス製造用スターターの選択 —

バイオ科 高木啓詞 太田俊也
静岡県工業技術研究所 室伏敬太
Across Bio 株式会社 山口 司

Lactic Acid Bacteria Specific Flora Analysis for Starter Culture Selection

— Starter Culture Selection for Fermentation of Soba Sprout Extract —

Hiroshi TAKAGI, Toshiya OHTA, Keita MUROFUSHI, Osamu YAMAGUCHI

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles of PCR amplified V3 region of 16S rRNA genes were used to microbial flora analysis. In this paper, we have developed lactic acid bacteria (LAB) specific flora analysis method based on typical PCR-DGGE protocol of total bacteria flora analysis. LAB 16S rRNA specific PCR primer pair was designed and used to amplify LAB derived 16S rRNA gene from fermented soba sprout extract as 1st PCR. After that, V3 region of 16S rRNA gene was amplified with GC-clamp using standard DGGE primer pair for total bacteria as 2nd PCR. LAB derived DGGE bands were selected and condensed with 1st PCR process which enabled to detect minor LAB such as *Leuconostoc citreum* in the fermented soba sprout extract. In addition, the electrophoretic mobility of those LAB derived DGGE bands were not affected by 1st PCR process. The results showed that our method is quite effective to analyze LAB flora in fermented food to identify important species and to develop LAB starter culture for fermentation.

Keywords : PCR-DGGE, fermentation, lactic acid bacteria, flora analysis

キーワード : PCR-DGGE、発酵、乳酸菌、菌叢解析

1 はじめに

日本では、6次産業化の推進に伴い、野菜類を乳酸菌によって発酵させた食品が注目されている。その製造には、大きく分けて2つの方法がある。野菜類に付着している乳酸菌を利用した自然発酵と、スターター乳酸菌を添加する種菌添加発酵である。自然発酵による製造は安定生産が困難であり、スターター乳酸菌添加による安定化が求められている。スターター乳酸菌の添加は発酵制御に有望であり、発酵を安定化する技術として広く利用されている¹⁾。

発酵食品の製造に関与する乳酸菌については多くの報告があり²⁾、乳酸菌の挙動が発酵食品の風味や品質に大きな影響を与えることが知られている³⁾。このことから、品質の安定化にはスターター乳酸菌の選択は重要であり、自然発酵から種菌添加発酵に代えて製造する場合、従来の製造法による発酵過程での乳酸菌をはじめとした微生物叢の挙動を把握し、発酵の安

定化に寄与する乳酸菌を調査する必要がある。

調査方法としては、多数の分離株の培養結果から解析を行う培養法⁴⁾が一般的に行われているが、作業が繁雑となることが多く、菌叢解析を頻繁に行う場合の手法としては不向きと考えられる。一方、2000年以降、培養非依存的な変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)法やT-RFLP法が菌叢解析に利用され⁵⁾、最近では次世代シーケンサーによる報告も増えつつある。中でも、DGGE法は16S rRNA遺伝子のPCR産物を分離する手法であり、解析コストが安く、菌叢の全体的な把握とともに個々の菌種を決定することができるため、広く利用されている。しかし、一般細菌全般を対象とした解析は数多く報告されており、使用するプライマーや電気泳動条件は標準化されつつある⁶⁾が、DGGEによる解析では相対的な菌数が電気泳動後のゲル中のバンドの濃さとして現れるため、菌数が少ない非優先株はバンドとして検出できず、解析できないとい

う問題点がある。乳酸菌発酵食品中には、乳酸菌以外にも様々な微生物が存在するため、PCR-DGGE法で乳酸菌を高感度に解析するためには、乳酸菌選択的解析を行う必要がある⁷⁾。

そこで本研究では、発芽ソバ発酵エキス製造用スターター乳酸菌選択のための乳酸菌選択的菌叢解析手法の構築を目的とした。DGGEの泳動条件検討が不要な乳酸菌選択的菌叢解析を実施するため、全細菌を対象とした遺伝子解析と同領域で、乳酸菌のみの遺伝子を選択的に増幅する2段階PCR法の開発を行った。また、開発した手法の有効性を評価するために、発芽ソバ発酵エキスの製造過程における菌叢を一般細菌解析手法と比較した。

2 方法

2.1 試料

試料には、(株)不二工芸製作所(静岡県富士宮市)より提供された発芽ソバ発酵エキスを用いた。発酵エキスは発芽させたソバの種を自然発酵させたものであり⁸⁾、発酵初期から発酵終了まで経時的に採取し、供試まで-20℃の冷凍庫で保存した。

2.2 乳酸菌の分離

発酵1日目から5日目までの発酵エキスを生理食塩水で適宜希釈した後、0.5%炭酸カルシウムと1.5%寒天(Agar : Bacto)を含むMRS培地(Lactobacilli MRS Broth : Difco Laboratories)に塗布し、30℃で培養を行い、ハローを形成したコロニーを乳酸菌として分離した。

2.3 乳酸菌および発酵エキスからのDNA抽出

(1) 分離した乳酸菌からのゲノムDNA抽出

分離した乳酸菌は4 mlのMRS培地で30℃、24時間培養し、培養液を白金耳で1.5%寒天を含むMRS培地に塗布し30℃で培養した。単一コロニーを釣菌し、100 μlの50 mM NaOH水溶液に懸濁させ、95℃、10分間アルカリ熱抽出した。放冷後、20 μlの0.5M Tris-HCl (pH 7.0)を加え、4℃、20,000×g、1分間遠心し、上清を回収し、DNA粗抽出液とした。

(2) 発酵エキスからのゲノムDNA抽出

解凍した発酵エキスを脱脂綿ろ過し、得られたろ液1.8mlを2 mlポリプロピレンチューブに入れ、4℃、20,000×g、2分間遠心し、菌体を含むペレットを回収した。ペレットを液体窒素で凍結させ、手動式ミルSK-100G((株)トッケン製)を用い、1分間の凍結粉碎を1分間のインターバルを挟み3回繰り返した。粉碎したペレットに100 μlの10mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH8.0 (TE)を加え、4℃、20,000×g、1分間遠心し、上清を回収し、DNA粗抽出液とした。

(3) ゲノムDNAの精製

分離した乳酸菌または発酵エキスのDNA粗抽出液80 μlにフェノール/クロロホルムを等量加えて混和後に、4℃、20,000×g、5分間遠心して上清を80 μl回収した。これに1/10量の3 M酢酸ナトリウムと2.5倍量のエタノールを加えて、4℃、20,000×gで30分間遠心した。沈殿を100 μlの70%エタノールで洗浄し、4℃、20,000×g、5分間遠心した後、遠心エバポレーターで乾燥し、80 μlのTEに溶解し、ゲノムDNAサンプルとした。

表1 本研究で使用したPCRプライマー

プライマー	塩基配列 (5'→3')	用途
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16SrRNA遺伝子解析
1492r	GGTACCTTGTTACGACTT	16SrRNA遺伝子解析
Ec338f	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	一般細菌解析
EUB2	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTG	一般細菌解析
LactS6	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC	乳酸菌選択的解析
LactR9	ACGTGTGTAGCCAGGTCATAAG	乳酸菌選択的解析
Ec338fGC	CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG	DGGE
Ec517r	GTATTACCGCGGCTGCTGGC	DGGE

【報告】

2.4 分離した乳酸菌の16SrRNA遺伝子の増幅

分離した乳酸菌のDNA サンプルからのPCR増幅は、KOD-Plus-Neo（東洋紡（株）製）を用い、マニュアルに従って行った。PCR 反応には2720 Thermal Cycler（Applied Biosystems社製）を用い、変性を98℃で10秒、アニーリングを50℃で30秒、伸長を68℃で60秒の条件で実施した。乳酸菌の16S rRNA 遺伝子（約1500bp）の増幅には27Fおよび1492Rのプライマーセット（表1）を用い、PCR反応を30サイクル行った。

2.5 DNA塩基配列の解析

2.4で増幅したPCR反応液はエタノール沈殿による精製後、シークエンス反応をPCR反応に用いたプライマーセットの一方とともに、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems社製）を用いて行い、BigDye XTerminator（Applied Biosystems社製）により精製後、DNAシークエンサーABI310（Applied Biosystems社製）を用いて塩基配列を解析した。相同性検索ウェブサイト^{*1}において、シークエンス解析により得られた塩基配列情報を用いたBLASTN検索を行った。

2.6 乳酸菌選択プライマーの設計

乳酸菌選択プライマーを設計するため、DDBJのClustalW^{*2}を用いて、分離した乳酸菌の16S rRNA遺伝子で保存されている配列を検索した。全細菌の基準株を対象としたProbe Match^{*3}によって、保存配列のうち乳酸菌のみに一致する配列の検索を行った。

2.7 DGGE解析

(1) 全細菌由来の16SrRNA遺伝子のV3-V4領域の増幅

発酵エキスのDNA サンプルから、全細菌由来の16S rRNA遺伝子のV3-V4領域（約500bp）を増幅するために、Ec338fおよびEUB2をプライマーに用い、前述に従ってPCR 反応を行った。PCR反応は、変性を98℃で10秒、アニーリングを58℃で30秒、伸長を68℃で30秒の条件で30サイクル行った。

(2) 乳酸菌由来の16SrRNA遺伝子のV3-V7領域の選択的増幅

発酵エキスのDNA サンプルから、乳酸菌由来の16S rRNA 遺伝子のV3-V7領域（約900bp）を選択的に増

幅するために、Lact-S6およびLact-R9の乳酸菌選択プライマーを用い、前述に従ってPCR反応を行った。PCR反応は、変性を98℃で10秒、アニーリング、伸長を68℃で30秒の条件で30サイクル実施した。

(3) DGGE解析

DGGEに用いる16SrRNA遺伝子のV3領域（約200bp）の増幅には、GCクランプを付したEc338f-GCおよびEc517rをプライマーに用い、それぞれのプライマーの最終濃度が0.6 μ Mになるように反応液を調製した。2.4および2.7の(1)、(2)で増幅したPCR反応液をエタノール沈殿で精製したものを鋳型として、前述に準じてPCR 反応を行った。PCR反応は、変性を98℃で10秒、アニーリングを62℃で30秒、伸長を68℃で30秒の条件で35サイクル実施した。増幅したPCR反応液はエタノール沈殿による精製後、DGGEのサンプルとした。

電気泳動にはDCodeシステム（BIO-RAD社製）を使用し、泳動ゲルは変性剤（100%：尿素7M、ホルムアミド40%（v/v））の濃度勾配が30%～60%になるように調節した8%ポリアクリルアミドゲルをマニュアル通りに調製した。DGGEは1×TAE中で、60℃、150Vの条件で4時間行った。泳動後のゲルをSYBR Green I（タカラバイオ（株）製）で染色し、DNAバンドを検出した。

(4) DGGEで分離したDNAバンドの解析

泳動後のゲルからDNAバンドを切り出し、切り出したゲルを100 μ lのTEで洗浄した後、1 mm×1 mm程度の断片をPCR反応液に直接加え、鋳型とした。切り出したDNAバンド由来の16S rRNA 遺伝子（約200bp）の増幅には、Ec338fおよびEc517rをプライマーに用い、前述に従ってPCR 反応を行った。PCR反応は、変性を98℃で10秒、アニーリングを62℃で30秒、伸長を68℃で30秒の条件で30サイクル実施した。増幅したPCR反応液は2.5と同様に塩基配列解析を行った。

3 結果

3.1 乳酸菌の分離と属種の推定

発芽ソバ発酵エキスから乳酸菌を合計125株分離し、コロニーの色、形状観察および顕微鏡観察の結果から特徴の異なる6株を選択し、それぞれの16S rRNA遺

*1) 米国国立衛生研究所医学図書館生物工学情報センター（NCBI）：Basic Local Alignment Search Tool.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>（2013.10.30アクセス）

*2) DDBJ：ClustalW. <http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>（2013.12.2アクセス）

*3) Ribosomal Database Project：Probe Match. <http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>（2013.12.2アクセス）

伝子の塩基配列を調べた。塩基配列を解析したところ、表2の6種の乳酸菌と推定された。また、分離した乳酸菌の16S rRNA遺伝子のV3領域をPCR増幅したDNAのDGGE結果を図1に示す。レーン1とレーン3のバンドの移動度は近接していたが、同時に泳動した際に区別可能であったため、これらの乳酸菌は16S rRNA遺伝子のV3領域を対象としたDGGE解析で分離可能であることが確認された。

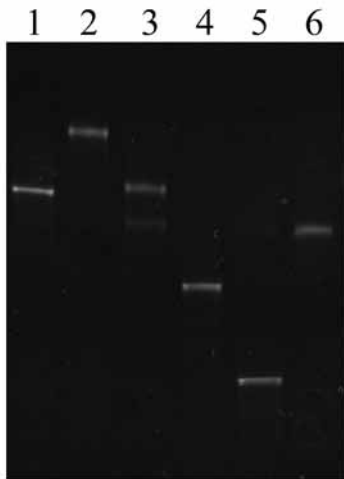


図1 単離乳酸菌のDGGE結果

レーン1, S4-4(*Leuconostoc pseudomesenteroides*);
2, A1(*Lactobacillus plantarum*); 3, C1(*Enterococcus casseliflavus*); 4, C2(*Pediococcus pentosaceus*);
5, E2(*Lactococcus lactis*); 6, E3(*Lactobacillus brevis*)
カッコ内は推定された属種

3.2 乳酸菌選択プライマーの構築

発芽ソバ発酵エキスから分離した乳酸菌6種の16S rRNA遺伝子の塩基配列データから、塩基配列が保存されている領域を探索し(データ未掲載)、表1のプライマーLact-S6およびLact-R9を設計した。Lact-S6およびLact-R9は*Lactobacillales*の基準株のうち81%と配列

が完全一致し、97%と1塩基違いで一致した。*Lactobacillales*を除く全細菌の基準株については完全一致する基準株は8.5%だけであり、1塩基違いでも11%しか一致しないことが確認された。

3.3 DGGEによる発酵エキスの菌叢解析

発芽ソバ発酵エキスの発酵過程における菌叢の変化について、全細菌を対象とした解析と乳酸菌のみを対象とした解析で評価した。2つの異なる増幅法(2.7(1)、(2)、(3))により調製したPCR反応物をDGGEで解析した結果を図2に示す。PCR-DGGE法による一般細菌解析では、乳酸菌のバンドの他に、*Pseudomonas*属や*Leucobacter*属、腸内細菌科(*Enterobacteriaceae*)の細菌が確認された。これらの乳酸菌以外の細菌は、発酵が進むにつれてバンド強度が弱くなっていくことがわかる。一方、乳酸菌については、発酵が進むにつれてバンド強度が強くなっていることから、発酵によって乳酸菌の菌叢に占める割合は増加することが確認された。また、検出されたバンドの多くは、全細菌を対象とした解析でも確認されていたが、*Leu. citreum*は乳酸菌選択的菌叢解析でなければ検出できなかった。しかし、今回発芽ソバ発酵エキスから分離した乳酸菌のうち*Lb. brevis*と*E. casseliflavus*は乳酸菌選択的菌叢解析でも検出されなかった。

4 考察

今回発芽ソバ発酵エキスから分離した6種の乳酸菌のうち4種の乳酸菌がPCR-DGGE法で検出されたが、*Lb. brevis*と*E. casseliflavus*は検出されなかった。この2種の乳酸菌は発酵エキス中で菌叢に占める割合が少ないため、検出できなかったと考えられる。培養法によって分離できたのは、これらの乳酸菌が生育しやすい条件であり、コロニー形状の違いから分離しやすい

表2 発芽ソバ発酵エキスから乳酸菌選択培地により分離された菌種
(相同性検索ウェブサイト*1での16SrRNA遺伝子塩基配列の照合結果)

菌株名	候補菌種	Accession No.	相同性 (%)
S4-4	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	KF879157	100
A1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KF192886	99
C1	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	AB681222	100
C2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	NR_075052	100
E2	<i>Lactococcus lactis</i>	JX119011	99
E3	<i>Lactobacillus brevis</i>	FJ532366	99

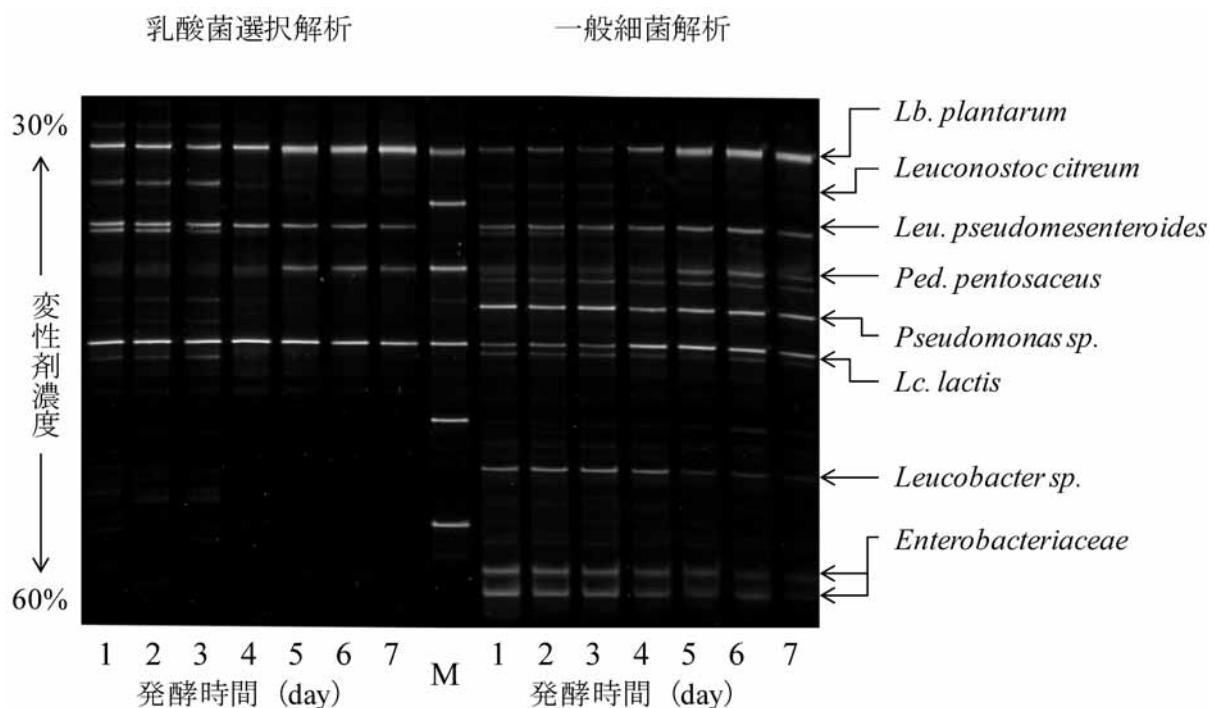


図2 発酵エキス製造過程におけるDGGE結果

製造過程の発酵エキスサンプルからDNAを抽出し、抽出したDNAを全細菌を対象とした解析（右側）と乳酸菌を対象とした解析（左側）で評価した。レーンMは乳酸菌由来の遺伝子を含むオリジナルDGGE用マーカーである。

かったためと考えられる。

一般的な漬物において、発酵初期に野菜由来の硝酸還元菌（*Pseudomonas*属）が増加することが知られており²⁾、今回の発酵エキスにおいても同様の菌叢変化が確認された。これらの細菌は乳酸菌によって生産される乳酸によって、増加が抑制されていくものと考えられる。

乳酸菌選択的菌叢解析では、乳酸菌のバンドのみが検出された。つまり、本研究で設計した乳酸菌選択プライマーが乳酸菌選択的菌叢解析に有効であることが確認された。また、今回開発した解析手法によって、一般細菌解析では検出できない*Leu. citreum*が検出されたことから、菌叢に占める割合が少ない乳酸菌についても検出できることが示唆された。この方法は、一般細菌解析と同じ泳動条件で解析できるため、泳動条件の検討を省略することができ、効率的に解析を行うことが可能となる。

*Leu. citreum*が培養法によって分離できなかった原因としては、培養温度の影響が考えられる。一般的に*Leu. citreum*は低温で増殖しやすい乳酸菌として知られており⁵⁾、今回の培養温度では他の乳酸菌と比べて生育が遅くなり、分離できなかったのだと考えられる。

発酵食品が目的の品質になった際のDGGEによる菌

叢解析結果の挙動に準じることで発酵の再現性および、品質の安定化に寄与する乳酸菌を分離できるものと考えられる。

5 まとめ

発芽ソバ発酵エキスを対象とした乳酸菌の分離とDGGEによる菌叢解析を行った。まず、発酵エキスからMRS寒天培地を用いて6種の乳酸菌を分離した。菌叢解析は全細菌を対象としたものと乳酸菌のみを対象としたものの2種類を行い、乳酸菌選択的菌叢解析については解析を効率化するために2段階PCR法を新規に開発し、その有効性を評価した。菌叢解析の結果から、発酵エキス製造過程での乳酸菌を中心とした微生物叢の挙動を明らかにした。また、乳酸菌選択的菌叢解析において、新規手法により、泳動条件検討の省略や解析結果を視覚的に比較できることを確認した。菌叢解析から得られた微生物挙動に準じてスターター乳酸菌を分離し、実際の発酵食品製造の際にこれを応用することで、発酵を安定化することが期待される。

謝辞

本研究を行うに当たり、試料を御提供いただいた株式会社不二工芸製作所に感謝いたします。

参考文献

- 1) 石川健一 他：低食塩漬物用の乳酸菌スターターカルチャーの開発．日本食品科学工学会誌，46，311-318 (1999)．
- 2) 中川弘 他：漬物の乳酸菌叢に関する検討．日本食品微生物学会誌，18，61-66 (2001)．
- 3) 宮尾茂雄：醗酵漬物における微生物制御．日本食品科学工学会誌，44，1-9 (1997)．
- 4) 宮尾茂雄 他：醗酵漬物中の各種乳酸菌群の選択計数．日本食品工学学会誌，35，610-617 (1988)．
- 5) 李宗勳：韓国キムチにおける乳酸菌研究の進展 - キムチ醗酵に關与する乳酸菌相の解析を中心に - ．Milk Science, 58, 153-159 (2009)．
- 6) Sevcan A. et al. : Use of PCR-DGGE based molecular methods to assessment of microbial diversity during anaerobic treatment of antibiotic combinations. Bioresour. Technol., 192, 735-740 (2015)．
- 7) Lopez I et al. :Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis, Appl. Environ. Microbiol., 69, 6801-6807 (2003)．
- 8) 茅原紘 他：そば芽抽出エキスを含有する食品．特開2005-304355 (2005.11.4)．