

福島県産資源に由来する食品製造用微生物の探索(第2報)

Search for microorganisms for food production derived from Fukushima Prefecture resources(2nd)

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。得られた菌株は、ワインやビール、乳製品などの食品利用実績のある複数の微生物であった。また、分離株の一部はビールやワインの製造に必要な麦汁発酵性や亜硫酸耐性を有していた。今後は、これらの安全性の確認を進めるとともに、食品製造に向けた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、県内加工食品業界からは県独自の微生物の開発が求められてきた。当所ではこれまで、清酒製造用の酵母を開発し、うつくしま夢酵母、うつくしま煌酵母3種類、うつくしま煌酵母改良株3種類、リンゴ酸高生産株52-5S-38が県内清酒製造場で使用されている。

一方、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。

昨年は「試験研究用試料採取要領」を設定し、試料採取方法および培養方法を構築した。農作物や植物、発酵食品等を中心に試料を採取し、28株の細菌や酵母を簡易同定した。本年も引き続き、試料採取と微生物分離に取り組み、新たに190株の細菌と酵母を簡易同定した。また、分離酵母株を用い、酒類製造のために必要な特性について調べた。

2. 実験

2. 1. 試料採取

本研究は、昨年設定した内規「試験研究用試料採取要領」に基づいて実施した。「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、滅菌水への試料浸漬にて採取した。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、麹汁培地)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(フルジオキシニル)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

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。

装置に添付された試料調製法に従い、エタノール - ギ酸抽出法により試料を調製した。すなわち、寒天上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。

2. 4. 麦汁発酵性試験

昨年実施した簡易同定試験および 2. 3. にて酵母と同定された株のうち 4 2 株を用いた。酵母は YPD 培地にて前培養した。比重 1.060、pH5.17 の麦汁（ホップ無添加）10mL に終濃度 4×10^6 cells/mL となるように酵母を添加し、15℃で 1 4 日間、または 20℃で 7 日間静置した後、麦汁の pH および比重を測定した。

対照には、RIB No.1057 *Saccharomyces cerevisiae* Wine yeast OC-2、RIB No.2010 *Saccharomyces pastorianus* Beer yeast（いずれも独立行政法人酒類総合研究所保有遺伝子資源の分譲）、市販ビール酵母 S-11（Brewing Science 社）、SafAle™ US-05（Fermentis 社）を使用した。なお、図表内において、RIB No.1057 *Saccharomyces cerevisiae* Wine yeast OC-2 は「OC-2」、RIB No.2010 *Saccharomyces pastorianus* Beer yeast は「NRIB_Lager」、S-11 および US-05 は順不同で「ale01」、「ale02」と示した。

2. 5. 亜硫酸耐性試験

Difco™ yeast carbon base（Becton, Dickinson and Company）、Difco™ yeast nitrogen base（Becton, Dickinson and Company）にて調製した最小培地を希塩酸で pH3.5 として滅菌した。滅菌後の最小培地に 0.2μm フィルターでろ過滅菌したピロ亜硫酸カリウム溶液を pH3.5 における亜硫酸終濃度が 50～300ppm になるように添加し、亜硫酸耐性試験培地とした。

酵母は 2. 4. と同じ株を使用し、30℃で 7 2 時間静置培養した。

3. 結果

3. 1. 試料採取

令和 7 年 5 月から令和 8 年 2 月にかけて、採取許可を得た県内の発酵食品製造場（自然発酵パン製造所、酵母無添加クラフトサケ製造所、清酒製造場の木製道具保管蔵）、自然林、農場、木材加工所の 6 地点から分離源となる試料を採取した。

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。塩分が高い分離源からは生湯（醤油）を含む高塩分・高浸透圧培地を用いて分離した。

なお、分離および単離作業は昨年採取した 9 地点の試料からも継続して実施し、このうち安定して継代培養が行えた 2 4 1 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の結果、スコア 1.71 以上の信頼性が得られた株を表 1 に示す。供試した 2 4 1 菌株のうち、1 9 0 菌株の同定

表 1 県産資源から分離した微生物の簡易同定結果

区分	食品製造用途	種属	株数	分離源
細菌	あり	<i>Lactococcus lactis</i>	15	パン種6、ウイスキーもろみ9
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	パン種
		<i>Schleiferilactobacillus harbinensis</i>	2	クラフトサケもろみ
		<i>Lactococcus lactis</i>	4	ウイスキーもろみ
		<i>Tetragenococcus halophilus</i>	2	桃
		<i>Gluconobacter cerinus</i>	1	醤油もろみ
		<i>Bacillus cereus</i>	1	リンゴ果汁
	なし	<i>Bacillus mobilis</i>	12	トマト
		<i>Bacillus mycoides</i>	7	トマト、樹液
		<i>Bacillus thuringiensis</i>	3	樹液
	食中毒菌	<i>Bacillus cereus</i>	3	トマト、樹液
			51	
区分	食品製造用途	種属	株数	分離源
酵母	あり	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	1	カスミソウ
		<i>Metschnikowia viticola</i>	2	桃
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42	桜、トマト、パン種、クラフトサケ
		<i>Saccharomyces kudriavzevii</i>	4	桜、パン種
		<i>Saccharomyces paradoxus</i>	4	桜
		<i>Starmerella davenportii</i>	7	トマト
		<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1	カスミソウ
		<i>Torulaspora delbrueckii</i>	6	桜（容保・はるか）
		<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	72	八重桜、トマト
			139	
未同定		ライブラリ外	29	トマト、もろみ他
		ピーク非検出	22	パン種、醤油もろみ、トマト他

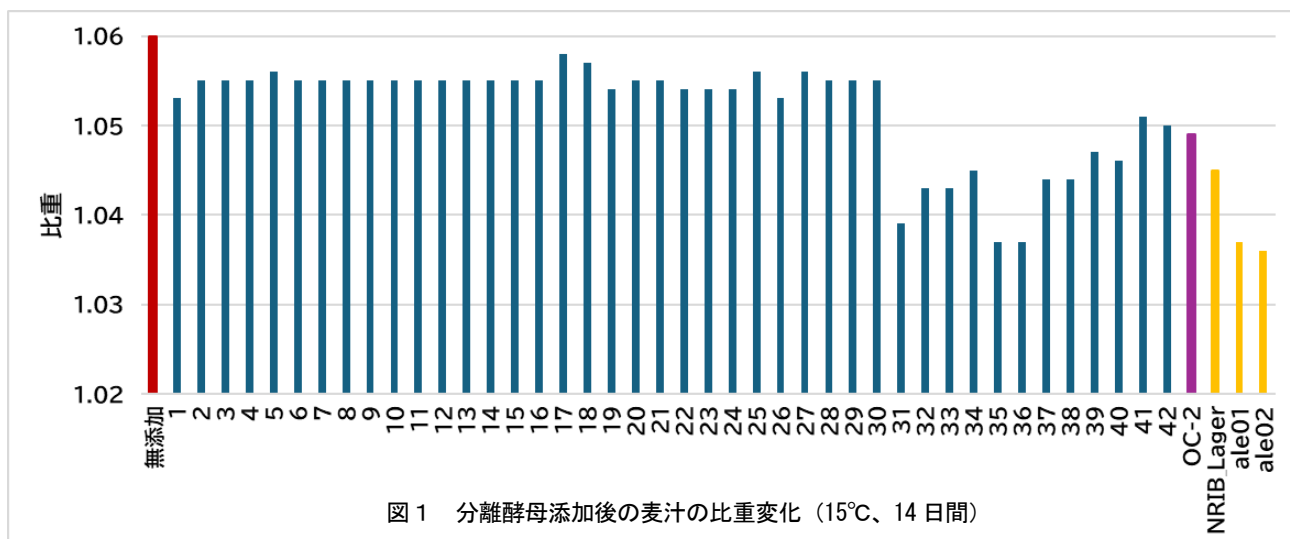


図1 分離酵母添加後の麦汁の比重変化（15℃、14日間）

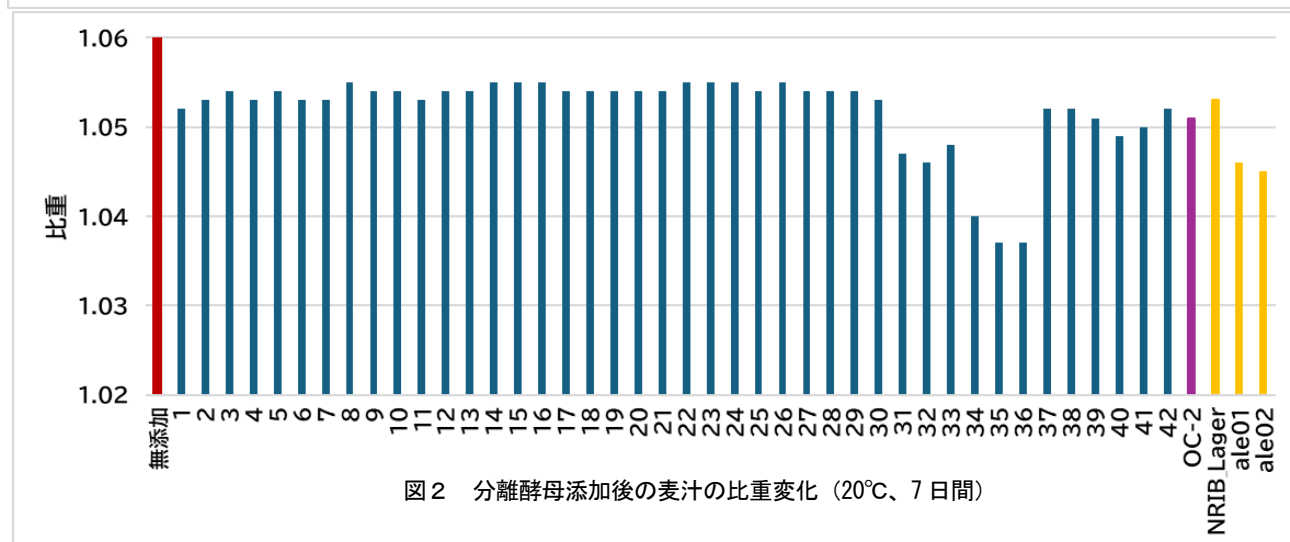


図2 分離酵母添加後の麦汁の比重変化（20℃、7日間）

結果が得られた。なお、醤油もろみから分離した酵母様の菌株複数を含む51菌株はピーク未検出の判定となり種属の同定には至らなかった。

3. 4. 麦汁発酵性試験

酵母のうち42株および対照株の麦汁発酵性について、酵母添加静置後の麦汁の比重変化を図1および図2に示す。

多くの分離株では比重が低下しなかったが、一部の分離株は対照株と同程度またはそれ以上に比重が低下した。このことから、これらの株は15℃および20℃で麦汁発酵が可能であることがわかった。また、試験後の麦汁pHは4.7～4.8程度となり、対照株と同程度であった。よって、分離株は極端に酸を生成しないこともわかった。

3. 5. 亜硫酸耐性試験

酵母42株および対照株の亜硫酸耐性試験結果を図3に示す。試験に供した分離株はいずれも亜硫酸100ppmまでの培地で、さらにほとんどの株で300ppm亜硫酸培地でも増殖した。このことから、分離株は低

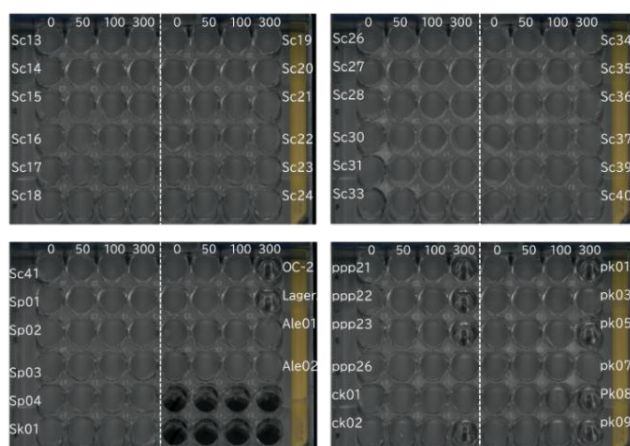


図3 分離酵母の亜硫酸耐性試験結果（0～300は亜硫酸濃度）

pH下で十分な亜硫酸耐性を有することがわかった。

4. 考察

4. 1. 試料採取

発酵食品は主に25～30℃程度の中温域で製造され

る。そのため、この温域での生育に適した微生物を取得するため、自然環境からの分離については外気温がこの範囲となる春から夏にかけて試料採取を行った。

自然林や製材所では樹液や樹皮を採取した。樹液には多糖が含まれるため、これらを栄養源とする微生物の存在を期待した。食品製造場は市販の微生物を使用しない天然発酵(自然発酵)での製造を行っている複数企業の協力を得た。すでに発酵食品を製造していることから、微生物取得には大きな期待がある。微生物を取得できた場合は、現在企業で製造している品目とは異なる品目へ活用していきたいと考えている。

また、冬期間に清酒製造場の道具蔵での採取を実施した。蔵内は気温が低く、木製の道具類の乾燥が進んでいたため、乾燥耐性および耐冷性のある微生物の取得を期待している。

4. 2. 試料の集積培養およびコロニーの単離

微生物の育種や分離を行う際は、具体的な製造品目や求める特性が明らかな場合、それに合わせた培地設計や選択圧の設定をする。例えば、清酒製造用酵母で特定の香気成分を高生産する株を取得したい場合、香気合成経路の阻害剤を含む培地上に生育した株を選抜することで高確率に香気高生産株を取得できる。

本研究はこれとは異なり、具体的な製造品目や特性を想定せずに網羅的な微生物分離を行い、その後個々の特性や特徴を見出し、分離した微生物がそれぞれどのような食品製造に適しているか分類していくものである。そのため、一部を除き集積および分離には選択圧のない一般的な培地を用いている。

本年採取した分離源からは、食品製造場の試料から酵母様のコロニーと酸生成能力のある細菌を取得した。また、樹液および樹皮の一部からは粘性のあるコロニーのほか、培地上に平面的に広がらず、立体的に盛り上がった形状のコロニーを取得した。他の分離源については分離作業を進めている最中である。

4. 3. 簡易同定

簡易同定の結果、多くの乳酸菌が同定できた。この中で、*Lactobacillus plantarum*は耐塩性とオリゴ糖生成能力が特徴的で、発酵茶の製造に用いられている。植物含有糖を利用して増殖できる可能性があることから、本県でも野菜の漬物や発酵茶製造などへの活用が期待される。今後、本菌株の耐塩性や糖発酵性について試験を行っていく。また、*Lacticaseibacillus paracasei*はヨーグルトなどの発酵乳製造、*Lactococcus lactis*はチーズなどの乳製品、*Lacticaseibacillus rhamnosus*は整腸作用と高い酸耐性を有し、機能性の高い乳製品製造に用いられる。今回、様々な乳酸菌が取得でき、県オリジナル微生物を用いた乳製品が製造できる可能性が高まった。それぞ

れの株の特性を試験し、どのような製品に活用できるか検討していきたい。

酵母については、浸透圧耐性を持ち、ワイン製造に用いられることもある分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*が同定された。また *Wickerhamomyces anomalus*、*Starmerella davenportii*、もワイン製造への利用が報告されている。なお、*Metschnikowia viticola*、*Torulaspora delbrueckii*は選抜された同属株がワイン製造優良株として海外メーカーから市販されている。

*Saccharomyces cerevisiae*は酒類製造や製パンなどに広く使われる最も汎用的な酵母で、安全性も担保されている。複数の株を取得できたので、株ごとの特性を調べ、様々な用途への活用を目指したい。また、*Saccharomyces kudriavzevii*、*Saccharomyces paradoxus*は *Saccharomyces cerevisiae*の類縁種として知られている。主に果実酒やビールなどの酒類製造の報告があるが、*Saccharomyces cerevisiae*よりも低温耐性が高いなどの特性は酒類以外への応用も期待される。

*Saccharomyces cerevisiae*と簡易同定された各菌株については、今後シーケンス解析によって種属を確定し、安全性を確認するほか、野生株と既存株を判別するマーカーを用い、特定の遺伝子配列の有無により野生株であることを証明する。

今後は、各株の特性を把握しつつ、様々な酵母の混合仕込みを行い、酒類への特異的な香味の付与などについて試験していきたい。

また、ピークが検出できなかった分離株のうち、特に醤油もろみから取得した複数の菌株は、培養後の菌体が濃茶色に着色していた。培養に用いた醤油含有培地由来の色素を取り込んでいるものと思われたが、測定用試料となる菌体内タンパク質抽出液まで色素が保持されていた。ピーク未検出となったのは、この色素がイオン化や検出を阻害しているためと思われた。よって、現時点では外観から酵母様と推測しているに留まっている。今後利用を進めるためにはシーケンス解析で種属を同定する必要がある。

4. 4. 麦汁発酵性試験

分離酵母株の一部を用い、ビール製造における下面発酵および上面発酵を想定した試験を行った。この中で温度、期間を経過した麦汁の比重が市販ビール酵母と同程度またはそれ以上に低下する分離株があることを確認した。この結果から、分離株の一部は麦汁発酵能を有し、ビールや発泡酒の製造に活用できる可能性があることがわかる。今後、添加酵母量の検討、発酵初期の発酵速度の比較や最終的なアルコール、香気特性などの測定を行い、安全なビール類製造が可能か確認を進めたい。

なお、麦汁発酵ができることからこれらの酵母はウ

ィスキー製造にも活用できる可能性がある。ウィスキーの場合は発酵温度や添加量などの条件が異なるため、さらに試験を実施し、ウィスキー製造への利用の可能性について検討していきたい。

4. 5. 亜硫酸耐性試験

分離酵母株の一部を用い、果実酒製造を想定した亜硫酸耐性試験を行った。果実酒製造時には、圧搾時や発酵初期、瓶詰め時に適宜亜硫酸を添加し、意図しない微生物の増殖を抑えることが推奨されている。そのため、発酵開始時の果汁やもろみには一定量の亜硫酸が含まれており、発酵に使用する酵母は亜硫酸を含む環境下で増殖できる特性を持つ必要がある。

亜硫酸含有環境での増殖の有無を確認するにあたり、本試験では多検体を供試する必要があることから、機器分析による濁度測定ではなく目視で判断するための透明な亜硫酸添加培地を調製した。培地の pH は発酵前の果汁を想定して 3.5 とした。なお、ペプトンや酵母エキスを含む合成培地では pH4.0 付近からタンパク質の不溶化が起こり濁りを生じ、ブドウ果汁もオートクレーブ滅菌によってタンパク質の不溶化で濁りを生じたため目視判断には適さなかったことから、炭素源以外の栄養素として、無機窒素とビタミン、無機イオンを含む DifcoTM yeast nitrogen base を利用した。

一般的な仕込みの亜硫酸添加量は 50ppm 程度、原料果実が傷んでいる場合や発酵不良の場合で 100ppm 程度、食品衛生法で定める上限残存量は 350ppm である。本試験ではいずれの酵母も 100ppm での増殖が可能であった。果実酒製造時に一定量の亜硫酸を添加した場合でも増殖できることがわかり、分離株が果実酒製造へ利用できる可能性を示した。アルコール生成能力や発酵による香味および色味の変化については今後試験を重ねていく。

5. 結言

- ・ 昨年に続き、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。
- ・ 241 種類のシングルコロニーを取得し、190 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。
- ・ 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。

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、乳製品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。単独利用のほか、既存の微生物と組み合わせて酸味や香りを付与し、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、単離途中の分離源についても、微生物の単離を進め、県産発酵食品の多様性実現に向けた試験を続けていく。

謝辞

試料採取にご協力いただいた皆様に感謝します。また、分離株の特性試験の対照株として用いた遺伝子資源(ワイン酵母、ビール酵母)を分譲してくださった独立行政法人酒類総合研究所様に感謝します。