

農産物発酵用乳酸菌の分離とマロラクティック発酵の遺伝解析

大坪 雅史 宮崎 俊一 青木 央 野辺 秀文* 澤谷 拓治

Isolation of Lactic Acid Bacteria for Agricultural Products Fermentation and Genetic Analysis of Malolactic Fermentation

Masashi Otsubo, Shun-ichi Miyazaki, Hiroshi Aoki, Hidefumi Nobe*,
and Takuji Sawaya

要 旨

農産物のマロラクティック発酵のためにマロラクティック発酵高活性乳酸菌をスクリーニングした。分離菌株は、*Lenconostoc mesenteroides* sub sp. *mesenteroides*と同定した。この菌株のマロラクティック酵素 (MLE) 生合成メカニズムについて遺伝解析を行った結果、MLEはL-リンゴ酸によってm-RNA合成時すなわち転写レベルで誘導合成されることが推定された。

1. 緒 言

マロラクティック発酵 (MLF) は、2価の酸であるL-リンゴ酸から1価の酸であるL-乳酸への脱炭酸化反応で、多くの乳酸菌で行われる¹⁾。この発酵は、酸度と酸味を低減化させる効果をもつことから赤ワインの製造工程に重要で、ワインの酸味と香味の調節に利用されている²⁾。MLFの主体はマロラクティック酵素 (MLE) で、多くの乳酸菌から精製され研究がなされている²⁻⁵⁾。また微生物遺伝学的解析も一部の菌株で行われ、*Lactobacillus* sp.におけるMLE誘導メカニズムの研究^{6, 7)}や*Lactococcus lactis*のMLE調節遺伝子の塩基配列も決定されている⁸⁾。

近年、乳酸菌のMLFは、ワインにとどまらず各種の果実や野菜の発酵に応用され、新しい発酵飲料が開発されている⁹⁻¹²⁾。北海道内には、マルメロ、コケモモ、ハスカップなどのリンゴ酸含量の高い果実

が数多く栽培され、それらへのMLFの応用が期待される。そこで道産農産物へのMLFの利用のため、高MLF乳酸菌を自然界より分離し、同定を行った。さらに分離菌株のMLEの誘導メカニズムについて遺伝解析を行った。

2. 実験方法

2.1 乳酸菌の分離と同定

分離源として各種農産物や函館市近郊の土壌を用い、一次スクリーニングはL-リンゴ酸を最終濃度0.5%となるように添加し、pH6.0に調整したBCP加プレートカウント寒天培地 (日水) を使用して30℃、2日間平板培養して行った。2次スクリーニングは1次スクリーニングで得た黄変haloを釣菌し、0.5% L-リンゴ酸を含むMRS液体培地 (pH4.0) に接種し行った。30℃、2日間培養後、pH上昇の最も大きい株を減酸効果の高い、すなわちMLF高活性株とし

*現 日本化学飼料 (株) 中央研究所

た。菌株の保存はMRS液体培地に培養後、最終濃度12.5%グリセリンを加え-80℃で保存した。分離菌株の同定はBergey's manual など^{13, 14)}を参照して行った。

2. 2 洗浄菌体の調製

乳酸菌接種用培地(日水)を用い、分離菌株を30℃にて対数増殖後期まで培養後、遠心分離(30℃ 8000rpm, 20分)して集菌した。これを30℃で0.05Mリン酸緩衝液(pH5.1)を用いて3回洗浄し洗浄菌体を得た。

2. 3 マロラクティック粗酵素液の調製

神戸らの方法¹⁵⁾を参考に行った。菌体を、0.05Mリン酸緩衝液(pH6.0)で3回洗浄後、同緩衝液5mlにけん濁し、氷冷下、超音波細胞破碎機(Branson. Sonifier Cell Disruptor 250, Output Control 6, duty cycle 60%)で20kHz, 10分間処理して菌体を破碎した。得られたホモジネートを遠心分離(4℃, 12000rpm, 30分)してその上清をMLE粗酵素液とした。

2. 4 マロラクティック酵素活性測定

原らの方法²⁾を参考に行った。L-リンゴ酸20μmol, β-NAD 10μmol, MnCl₂ 6μmolを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0) 1.9mlに粗酵素液0.1mlを加え30℃で30分間反応させた。反応後、反応液を沸騰水中で5分間加熱して反応を停止し、遠心分離(10000rpm, 5分)後、生成したL-乳酸を酵素法¹⁶⁾で定量した。活性の単位は上記の条件で1分間に1μgのL-乳酸を生成する酵素量を1単位とした。

2. 5 マロラクティック酵素の誘導実験

MLEの誘導は各種塩類, グルコース, カザミノ酸を含む反応培地に誘導物質としてL-リンゴ酸を0.5%となるように添加し、洗浄菌体を接種して行った。経時的に菌体培養液を採取して速やかに0℃に冷却後、MLE粗酵素液を調製し、MLE活性を測定した。またクロラムフェニコール(Cm) やリファンピシン(Rf)による阻害は各々10μg/ml, 2μg/mlとなるように培養液に加え同様に行った。

3. 実験結果

3. 1 分離株の同定

約100検体の分離源からMLF高活性株として, No.3株を分離した。No.3株の同定結果を表1および表2に示した。No.3株は, グラム(+), 球菌,カタラーゼ(-), 運動性(-), 胞子形成(-), グルコースからのガス発生(+), 乳酸旋光性D(-), リトマスミルクでの生育(-), 嫌気下での生育(+), 糖からの主な代謝産物は乳酸であることからLeuconostoc属に属し, デキストラン形成(+), pH耐性, 生育温度, アルギニン加水分解, 食塩耐性, 糖から酸の生成試験(特にアラビノースから酸の生成)などの結果からLeuconostoc mesenteroides sub sp. mesenteroidesと同定した。

表1. No.3株同定結果

グラム染色	+
形態	球菌
大きさ	1.2μ×0.8~1.2×0.9μ
カタラーゼ	-
運動性	-
嫌気下での生育	+
グルコースからのガス発生	+
牛乳凝固	-
乳酸旋光性	D(-)
グルコースからの主な代謝産物	乳酸
アルギニンからNH ₃ の生産	-
生育温度 15℃	+
" 37℃	+
" 45℃	-
糖から酸の生成	
グルコース	+
キシロース	-
ラムノース	-
マンノース	+
アラビノース	+
リボース	-
ラクトース	-
セロビオース	+
ソルビトール	-

表2. No.3株同定結果

糖から酸の生成	マンニトール	+
	マルトース	+
	ガラクトース	+
	トレハトース	+
	フルクトース	+
	サリシン	+
	アミグダリン	+
	メレピオース	-
	ラフィノース	-
	メレチトース	-
	サッカロース	+
	エスクリン	+
	コーンスターチ	-
デキストラン形成		+
pH 3.7での生育		-
4.8 "		+
6.5 "		+
ethanol 10%での生育		-
NaCl 3%での生育		+
6.5%での生育		+
Yeast glucose litmasmilk		
酸凝固		+
還元		+
ガス発生		+
グルコース培地での最終pH		4.5

3.2 No.3株のマロラクティック酵素誘導メカニズム

乳酸菌のMLE誘導に関して、これまで *Lactobacillus murinus*⁶⁾ や *Lactobacillus thermobacterium* 5 (CNR2)313⁷⁾ について報告されている。この両株はホモ発酵型であることから、菌体中のMLE合成量測定は菌体培養液に生じるL-リンゴ酸由来のCO₂量を定量して行っている。しかしながら、分離菌No.3株はヘテロ発酵型であるために、グルコース由来のCO₂発生も考えられ、この活性測定法を用いることができない。そこで本菌株におけるMLE合成量は、反応培地におけるMLE合成誘導後、菌体から調製したMLE粗酵素液を用い、L-リンゴ酸から生成したL-乳酸を測定して求めた。MLE誘導実

験の結果を図1に示した。MLEの活性は反応培地だけでは認められなかった。しかし、L-リンゴ酸を添加すると、培養30分後からMLE活性が認められ、直線的に増加した。Cmまたは、RNAポリメラーゼ阻害剤であるRfを培養開始時、L-リンゴ酸を含む培地に添加すると、MLE活性は確認されなかった。また、これらの阻害剤を培養開始30分後に添加するとCmの場合は同様にMLE活性は認められなかった。しかし、Rfの場合はMLE活性が認められ、添加後30分で活性は添加しない時より低い値で一定となった。

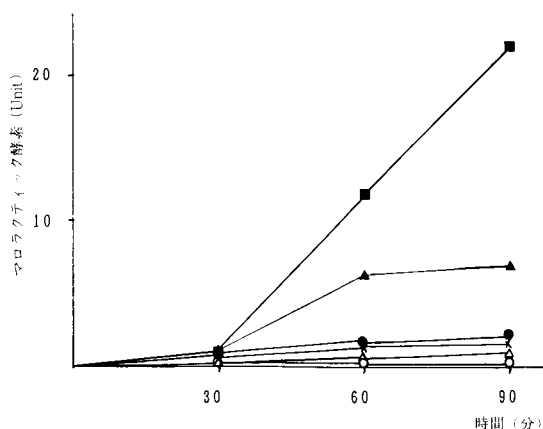


図1. No.3株によるマロラクティック酵素の生合成

反応培地組成 (g/l): KH₂PO₄ 0.25, K₂HPO₄ 0.25, CH₃COONa 10.0, MgSO₄ 0.1, MnSO₄ 0.005, FeSO₄ 0.005, カゼイン分解物 5, グルコース 5,

反応培地への添加物:

- × 無添加
- L-リンゴ酸 (0.5%最終濃度)
- L-リンゴ酸 (0.5%最終濃度) + Cm (10μg/ml最終濃度, 培養開始時に添加)
- △ L-リンゴ酸 (0.5%最終濃度) + Rf (2μg/ml最終濃度, 培養開始時に添加)
- L-リンゴ酸 (0.5%最終濃度) + Cm (10μg/ml最終濃度, 培養開始30分後に添加)
- ▲ L-リンゴ酸 (0.5%最終濃度) + Rf (2μg/ml最終濃度, 培養開始30分後に添加)

反応培地への添加後、最終pHを5.1に調整した。

4. 考 察

高MLE活性を指標に分離したNo.3株はLeuconostoc sub sp. mesenteroidesであった。Leuconostoc sp.は乳酸菌の中で最もMLEF活性が高いとの報告^{1, 2)}があり、この分離株のMLEFによる農産物への応用が期待できる。

No.3株におけるMLEの生合成はL-リンド酸によって誘導され、培養30分後からMLEの合成が確認された。一方、CmやRfを培養開始時から添加すると、MLE生合成は完全に阻害された。しかしながら、誘導培地での培養30分後に、これらの抗生物質を添加するとCmは同様に完全な阻害効果を示したが、Rfの場合にはMLEの合成が認められた。Cmはリボゾーム阻害剤であることおよびRfはRNAポリメラーゼ阻害剤であることから、培養開始30分間にL-リンド酸の誘導によってm-RNAが蓄積し、その後、翻訳が開始してMLEが合成されていると考えられる。

以上のことから、分離菌No.3株におけるMLEのL-リンド酸による誘導は、転写レベルで作用することが推定された。SaadらはLactobacillus murinus⁶⁾やLactobacillus thermobacterium⁷⁾においてL-リンド酸によるMLE合成は培養20分後から開始され、誘導は転写レベルで生じるとの同様の結果を報告している。今回明らかにしたNo.3株におけるMLE誘導メカニズムは、Saadらが行ったLactobacillus属^{6, 7)}や他の微生物で明らかになった遺伝的調節メカニズム¹⁷⁻¹⁹⁾と同様であると思われる。

参 考 文 献

- 1) 原 昌道：醸協，62 (8)，803 (1967)
- 2) 原 昌道，水野昭博：醸工，59(1)，17(1981)
- 3) Pascal Naouri, Patrice Chagnaud, Alain Arnaud and Pierre Galzy : J. Basic. Microbiol, 30 (8), 577 (1990)
- 4) Ana Maria Strasser De Saad, Aida A. Pesce de Ruiz Holgado and Guillermo Oliver : J. Appl. Biochem, 6, 374-383 (1984)
- 5) A. Lonvaud-Funel and A. M. Strasser de saad : Appl. Environ. Microbiol, 43(2), 357(1982)
- 6) Ana M. Strasser de saad, Aida A. Pesce de Ruiz Holgado and Georgio Oriver : Biochimie, 70 357-365 (1988)
- 7) Ana. M. Strasser de Saad, G. Oviver and Aida A. Pesce de Ruiz Holgado J. Gen. Microbiol, 89, 26-30 (1975)
- 8) Pierre Renault, Claude Gaillardin and Henri Heslot : J. Bacteriol, 171 (6), 3108 (1989)
- 9) 丹羽源廣，松岡道子，中林 明，品川京子，土田富士夫，片山博之：果汁協会報，No.325 22 (1985)
- 10) 高波修一，小栗 勇，吉田 勤：缶詰時報，66 2 (1987)
- 11) 高波修一，小栗 勇，吉田 勤：缶詰時報，67 2 (1988)
- 12) 大澤純也，山本 忠：岩手県醸造食品試験場報告，24号 (1990)
- 13) Peter H. A. Sneath, Nicholas S. Mair, M. Elisabeth Sharpe and John G. Holt : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, P. 1070, (Williams & Wilkins Co., Baltimore. London. Los Angeles. Sydney) 1986
- 14) E. I. Garvie : Methods Microbiol, 16 147-178(1984)
- 15) 神戸千幸，内田金治：農化，57 (12)，1211 (1983)
- 16) Noll, F : in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H. U., ed) 3rd, ed vol. 6 pp582-588, Verlag chemie, Weinheim, Deerfield Beach/florida, Basel (1984)
- 17) COVE. D. J : Biochi. et. biophys. acta 113, 51-56 (1966)
- 18) Englesberg. E, Irr. J, Power. J, Iee. N : J. Bacteriol, 90. 946. (1965)
- 19) Jacob. F, Monoo. J : J. Mol. Biol. 3. 318- 356 (1961)