論文

キムチ酵母の分離と圧力感受性変異株の作出

Isolation of Yeasts from Kimchi and Construction of
a Hydrostatic-Pressure Sensitive Mutant小林 正義^{1,2*}Masayoshi KOBAYASHI^{1,2*}川村 麻梨子²Mariko KAWAMURA²小林 篤²Atsushi KOBAYASHI²山崎 彬²Akira YAMAZAKI²福田 雅夫¹Masao FUKUDA¹

Yeast strains isolated from different Kimchi products were indicated to belong to *Kazachstania* (*Saccharomyces*) *servazzii* by their rRNA gene sequences. One isolate, the strain MK1 was used to obtain the hydrostatic-pressure sensitive mutant, MK1-HPS, by repeating three cycles of 100-MPa hydrostatic-pressure treatment for 10 min and selection of colonies appeared in a delayed fashion after treatment. MK1-HPS was significantly sensitive to hydrostatic-pressure treatment, and it formed no colonies and did not produce gas in an airtight-sealed culture after 200-MPa hydrostatic-pressure treatment for 60 min. MK1-HPS exhibited the similar fermentation activity as MK1. Production of Kimuchi using MK1-HPS is expected to suppress gas formation during storage after high-pressure treatment.

[Kimchi, Yeast, hydrostatic pressure, sensitive mutant, sterilization]

1. はじめに

発酵製品は酵母、乳酸菌、糸状菌などの微生物の力を利用しているが、微生物を制御するために、高濃度の塩分や食品添加物を加えて保存性を高めている[1,2]。非加熱あるいは加熱殺菌が不完全な場合は、酵母や糸状菌がガスを産生することがある[3,4]。特にキムチやヨーグルトなど酵母と乳酸菌による複合発酵で熟成が進む食品は、長期保存による過発酵によって主として酵母によるガスの発生が起こり、品質が低下する[3]。一方、この発酵を制御するために加熱殺菌を行うと、風味や食感、栄養価が顕著に低下する[1,5]。

笹川らは、熟成した発酵食品に室温で 300 MPa、

5 分間の高圧処理を施すことにより、圧力感受性の酵母は殺菌され、圧力に耐性な乳酸菌は生き残って、選択的な殺菌処理ができることを明らかにしている[6]。これによりキムチの食味への影響を抑えつつ、ガスの発生、甘味の減少、酸味の増加など、酵母による過発酵の弊害を抑制できることを報告している。しかし、300 MPa の高圧処理を施すと外観や食感に変化が生じ、キムチではしなびた外観になり、ヨーグルトでは著しい固化が生じるなど、高圧処理による弊害も生じた[7]。一方、200 MPa 以下の中低圧処理を用いれば外観や食感の変化が低減されると期待されたが、200 MPa 以下の圧力処理では食品中の酵母を殺菌できなかったことが報告されている[6,8]。

¹ 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1 長岡技術科学大学 生物系
Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology, 1603-1 Kamitomioka, Nagaoka, Niigata 940-2188

² 〒947-0102 新潟県小千谷市高梨町 1003-1 越後製菓株式会社 総合研究所
Research Institute, Echigo Seika Co., Ltd., 1003-1 Takanashi, Ojiya, Niigata 947-0102

* Electronic address: m-kobayashi@echigoseika.co.jp

このような経緯を踏まえ、本研究では酵母による過発酵の弊害であるガスの発生を抑制して流通期間の延長等を実現することを目指し、キムチに含まれる主要酵母を分離し、200 MPaの圧力処理で殺菌が可能な圧力感受性の変異酵母を作出することを目的とした。

2. 材料と方法

2.1 供試酵母と培地

製造元の異なる4種類のキムチを用いた。各キムチ5gに0.85%生理食塩水45mlを加え、Homogenizer AM-3(日本精機(株)製)を用いてホモゲナイズし、得られた懸濁液を希釈してYM寒天培地(Agar 20.0 g/l, Glucose 10.0 g/l, Peptone 5.0 g/l, Yeast extract 3.0 g/l, Malt extract 3.0 g/l, pH 6.2, Difco)に塗布した。48時間培養後に生じたコロニーを単離し、供試酵母とした。酵母の液体培養はYM培地(Agarなし)を用い30℃にて行った。

2.2 DNAの抽出

1.5 mlにて48時間培養した酵母菌体を入れた2 mlのポリプロピレンチューブにガラスビーズ0.5 g (0.5 mmφ 0.2 g, 0.1 mmφ 0.3 g), 1 mlのSTE溶液(100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)と0.2 mlの10% SDSを加えて懸濁し、マルチビーズショッカー(安井器械(株)製)を用い2,500 rpm, 80秒にて細胞を破碎した。破碎溶液を65℃で1時間保温後、室温で13,000 rpm, 10分間遠心分離し、上清を0.5 ml回収した。0.25 mlのPEG溶液(30% Polyethylene glycol 6000, 1.6 M NaCl)を加えて室温で一夜放置後、4℃, 15,000 rpmで20分間遠心分離し、沈殿を0.5 mlのTE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)に溶かした。0.25 mlの7.5 M 酢酸カリウムを加えて氷上で5分間静置後、4℃, 15,000 rpmで30分間遠心分離し、上清を回収した。フェノール/クロロホルムを等量加えて混和後に、室温にて15,000 rpm, 10分間遠心分離して上清を0.3 ml回収する操作を2回繰り返した。集めた上清0.6 mlに等量のイソプロパノールを加えて-20℃にて15分間保持後、4℃, 15,000 rpmで20分間遠心分離した。沈殿を1 mlの70% エタノールで2回洗浄(4℃, 15,000 rpm, 5分間遠心分離)して自然乾燥し、50 μlのDeoxyribonuclease フリー Ribonuclease A (RNase A

10 mg/ml, (株)ニッポンジーン製)入りTE溶液(5 μl RNase A, 45 μl TE, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)に溶解し、DNAサンプルとした。

2.3 rRNA遺伝子のPCR増幅と解析

18S rRNA-ITS1-5.8S rRNA-ITS2-26S rRNAを含むrRNA遺伝子領域内の約700 bp (Fig. 1)を増幅するため、DNAサンプルに対し、Ex Taq DNA polymerase (タカラバイオ(株)製)とITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG)およびITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC)プライマー[9]をEx Taq DNA polymeraseのマニュアルに従って用い、MJ Mini Thermal Cycler (BIO-RAD社製)にてPCR反応を行った。PCR反応は、変性94℃, 30秒, アニーリング50℃, 30秒, 伸長72℃, 90秒の条件で30サイクル行った。PCR産物は、0.8%アガロースゲル電気泳動で分離後、GelGreen (Biotium社製)で染色して検出した。

PCR-RFLP解析には約700 bpのDNA断片を電気泳動後のアガロースゲルからQIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN社製)を使用して抽出し、それぞれ制限酵素Hae IIIおよびHha I (株)ニッポンジーン製, Hinf I (東洋紡績(株)製)を用いてマニュアルに従い37℃, 2時間反応後、3%アガロースゲル電気泳動で分離して検出した。

DNA塩基配列の解析には抽出した約700 bpのDNA断片に対し、DTCS Quick Start kit (Beckman Coulter社製)を用いてMJ Mini Thermal Cyclerに

Fig. 1. The rRNA gene sequence amplified by PCR for identification experiments. The 18S-, 5.8S-, and 26S-rRNA genes are presented by shaded boxes. The DNA region of 775 bp was amplified by PCR using the primers ITS1 and ITS4, which are indicated by solid horizontal arrows.

てマニュアルに従ってシークエンス反応を行った。反応後マニュアル通りに調製した DNA 試料の DNA 配列を CEQ 2000 System (Beckman Coulter 社) を用いて解析した。得られた DNA 配列のブラスト検索は DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) の BLAST プログラムにて行った。

変性密度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) に用いた真菌 26S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域の増幅には GC クランプ配列を付加した NL1 (5'-CGCCCCGCC GCGCGCGGCGGGCGGGCGGGGCCATATC AATAAGCGGAGGAAAAG) および LS2 (5'-AT TCCCAAACAACCTCGACTC) プライマー [10] を用い、前述のように PCR 反応を行った。PCR 反応は、変性 94°C、30 秒、伸長 72°C、40 秒の条件を用い、アニーリングは 62°C から 53°C まで 1°C ずつ温度を下げながら 30 秒行い、各温度のアニーリング条件で 3 サイクルの増幅を実施した。最後に 52°C、30 秒のアニーリング条件で 15 サイクルの増幅を行った。変性密度勾配ゲルは Chang ら [11] の条件に従い、Dcode システム (BIO-RAD) を使用し、8 % アクリルアミド/ビスにて 30%~60% の変性濃度勾配のゲルをマニュアル通りに調製し、増幅産物 DNA を 80 V、14 h、60°C で泳動した。

2.4 圧力感受性酵母のスクリーニング

(1) MK1 培養液 3 ml を MES 緩衝液 (0.1 M, pH 4.5) 10 ml 中に添加し、ガスバリア性軟質樹脂袋に入れて脱気後に密封した。この樹脂袋について食品用高圧特機 (石川島播磨重工業㈱製) を用いて 100 MPa にて 10 分間の圧力処理を施した。昇圧および減圧の時間は各 2 分とし、30°C にて行った。処理後の菌液を適宜希釈して 100 µg/ml クロラムフェニコールを含む YM 寒天培地に塗布して 30°C で培養した。培養 48 時間後より 24 時間ごとにコロニーを確認し、144 時間後まで培養を続けて出現が遅いコロニーを選抜した。(2) MES 緩衝液 10 µl を染み込ませた滅菌ペーパーディスク (φ6 mm, アドバンテック東洋㈱製) に選抜したコロニーをかき取って移し、ガスバリア性軟質樹脂フィルムでペーパーディスクを挟んでヒートシールにより密閉した。密閉したペーパーディスクについて食品用高圧特機を用いて 200 MPa、10 分間の圧力処理を上述と同様に行った。各ペーパーディスクを YM 培地 5 ml に投入して 30°C で培養し、増殖が遅いか増殖が見られない株を選抜した。(3) 選抜した株について

100 MPa、150 MPa および 200 MPa での圧力感受性試験 (次項 2.5) を行い、圧力感受性が最も高い株 1 株を選抜した。この 1 株を用いて以上の (1) (2) (3) の操作を反復し、再び 1 株を選抜した。選抜株は生育が著しく遅かったため、YM 培地で 30°C にて 16 回植え継いで生育速度が MK1 と同程度に回復した株を選び、200 MPa での圧力感受性試験で高い圧力感受性を示す株 1 株を取得した。この株を用いて上述の (1) (2) (3) の操作を再び反復し、圧力感受性が高い株 1 株を選抜した。更に YM 培地で 30°C にて 12 回植え継いで生育速度が回復した株を選び、200 MPa での圧力感受性試験で高い圧力感受性を示す株 1 株を選抜して、圧力感受性株 MK1-HPS を得た。

2.5 圧力感受性試験

MK1 および MK1-HPS を、初発菌数が約 10⁷ CFU/ml となるように MES 緩衝液 (0.1 M, pH 4.5) に接種し、ガスバリア性軟質樹脂袋に 10 ml ずつ分注して脱気後に密封した。この樹脂袋を 100 MPa、150 MPa あるいは 200 MPa にて 10 分間の圧力処理 (前項 2.4) を施した後、菌液を適宜希釈して 100 µg/ml クロラムフェニコールを含む YM 寒天培地に塗布して 30°C で培養した。培養 6 日後にコロニー数を計測して生菌数と算出した。また 200 MPa においては 1 分間、5 分間、10 分間、20 分間の高圧処理を施して、それぞれ生菌数を算出し、得られた死滅曲線より D 値を求めた。滅菌キムチペーストにおける圧力感受性試験では、キムチを MILLSER-750G (岩谷産業㈱製) を用いてペースト状にホモゲナイズし、121°C、15 分間のオートクレーブ処理にて滅菌して上述の MES 緩衝液の代わりに用いた。

2.6 資化性試験

酵母の資化性試験には 6.7 g/l Yeast Nitrogen Base (Difco), 50 mg/l Yeast extract (Difco), 50 mg/l Casamino acids DAIGO (和光純薬㈱製) の組成の培地に 50 g/l の炭素化合物溶液 (67 g/l Yeast Nitrogen Base) を 1/10 量加えて使用した。内径 16 mm の試験管に炭素化合物を含む資化性試験用培地 5 ml を入れ、30°C、2 日間培養して無菌性を確認した後、供試酵母懸濁液 (10⁴ CFU/ml) を 0.5% 接種して 30°C で 4 週間静置培養した。1 週間ごとに観察しながら、試験管の背面に置いた白紙の

5 mm 間隔の黒色平行線（幅 0.75 mm）の視認性を指標に各炭素源での増殖性を判定した。ネガティブコントロールとして炭素化合物を加えない試験管を用いた。

2.7 発酵試験

MK1 および MK1-HPS を，初発菌数が約 10^7 CFU/ml となるように YM 培地に接種し，ガスバリア性軟質樹脂袋に 5 ml ずつ分注して脱気後に密封した。この樹脂袋を 30°C, 20°C, 10°C, 4°C の各温度の恒温槽にて静置培養した。24 時間後までは 4 時間ごとに，24 時間以降は 24 時間ごとに樹脂袋を取り出し，培養液の OD₆₀₀ を計測した後，セルロースアセテートフィルター（孔径 0.45 μ m）でろ過し，密封して分析まで -80°C のフリーザーにて保管した。

グルコース量の測定には，SUGAR KS-804 (8.0×300 mm, Shodex) および SUGAR KS-801 (8.0×300 mm, Shodex) のカラムを接続して使用し，超純水を移動相（流速 1.0 ml/min）に用いて高速液体クロマトグラフィー Jasco PU-980/LG-980-02 システム（日本分光㈱製）にて分離し，示差屈折計 Jasco RI-2030（日本分光㈱製）を用いて検出・定量した。エタノール量の測定には F-kit Ethanol（Roche Diagnostics 社製）を使用し，マニュアルに沿って定量した。

2.8 ガス発生量の定量

MK1 および MK1-HPS を，初発菌数が約 10^7 CFU/ml となるように YM 培地に接種し，ガスバリア性軟質樹脂袋に 10 ml ずつ分注して脱気後に密封した。この樹脂袋を 200 MPa にて 20 分，40 分または 60 分間の保圧条件で高压処理を施した。圧力処理後は恒温槽に静置して 30°C にて培養を行い，4 時間ごとに樹脂袋を水中に沈めて測定した全容量から容量変化を計測し，ガス発生量を定量した。実験は 1 試験区について 3 回実施した。

3. 結果と考察

3.1 キムチ発酵酵母の単離

日本国内で入手した 3 種類のキムチ A, B, C と韓国で入手したキムチ D から YM 培地に酵母の分離を行い，各試料から 6 個のコロニーを選んで単離した。各コロニーが酵母のコロニーであることは顕

Fig. 2. PCR-RFLP analysis of the isolated strain, MK1. The PCR-amplified rRNA fragment was digested by HaeIII (lane 1), HhaI (lane 2), and HinfI (lane 3) and subjected to agarose gel electrophoresis. Lane M contains molecular size markers and the molecular sizes are indicated on the left. The HaeIII and HinfI digests of *Kazachstania servazzii* CECT11353 DNA was reported to include 335-, 250-, and 190-bp fragments and 400- and 375-bp fragments, respectively [10]. The two HinfI fragments were not separated sufficiently and looks like one fused fragment.

微鏡観察にて確認した。また，キムチ A については 3 ヶ月後に再度，YM 培地に 6 個のコロニーを選んで単離した。各コロニー由来の菌株を YM 培地で培養後に DNA を抽出し，ITS1-5.8S rRNA-ITS2 を含む遺伝子領域を増幅する ITS1 及び ITS4 のプライマーを用いた PCR-RFLP 解析を行った。その結果，全ての分離株において制限酵素 Hae III, Hha I, Hinf I の切断パターンが同じで，Hae III と Hinf I の断片長が *Kazachstania* (*Saccharomyces*) *servazzii* CECT11353^T[12] とほぼ一致した (Fig. 2)。また，キムチ A 由来の 4 コロニー，キムチ B 由来の 7 コロニー，キムチ C 由来の 7 コロニー，キムチ D 由来の 6 コロニーを培養後に抽出した DNA から ITS1 及び ITS4 のプライマーを用いて PCR 増幅した DNA の塩基配列を決定し，得られた DNA 配列の最長配列を用いてブラスト検索を行った結果，*Kazachstania* (*Saccharomyces*) *servazzii* NBRC1383 の配列に対してキムチ A およびキムチ D 由来の 2 配列は 100%，キムチ C 由来の配列は 99.5%，キムチ B 由来の配列は 99.4% の相同性をそれぞれ示した (Fig. 3)。また，*Kazachstania aerobia* とは 95

NBRC1383	TTTTTCGTTGCTTTGCGAGGAGACACTATACCTGCTGGACCAGCGCTTAAT	TGCGCGGTTTGGTGGGTCTCTGTAGCTCAGTAGCACTATTACACACAGTG
D (KML#6)	-----	-----
A (KA2)	-----	-----
C (S4)	-----C-----	-----
B (D4)	-----C-----	-----C-----
NBRC1383	GAGATTTTATAATTCTTTGTCATGCTTCTTTGGGC	TGCTTCGGCGGCC AGGAGTGACAAACACAAACAATTTTGAATTTTATGAAGTGTAGTCAAAACC
D (KML#6)	-----	-----
A (KA2)	-----	-----
C (S4)	-----A-----	-----
B (D4)	-----	-----
NBRC1383	AGAATTCAGGAAGATTATCTTTTGTAAATATTAACAAATATTAATA	CTTTCAACACGGATCTCTTGGTTCTGCGATCGATGAAGAACGCAGCGAA
D (KML#6)	-----	-----
A (KA2)	-----	-----
C (S4)	-----	-----
B (D4)	-----	-----
NBRC1383	ATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAA	TCCTT GAACGCACATTGCGCCCTCTGCTATTCCAGGGGCATGCCTGTTTGAGCG
D (KML#6)	-----	-----
A (KA2)	-----	-----
C (S4)	-----	-----
B (D4)	-----A-----	-----
NBRC1383	TCATTTCTCTCTCAACAGCAATGTTGGTTGTGAGTGATACTCTTTCCG	AGTTAGCTTGAAATTGCTGGCCGATGGCTGTTGTTGGTTGAGTGTCTCCCT
D (KML#6)	-----	-----
A (KA2)	-----	-----
C (S4)	-----	-----
B (D4)	-----	-----
NBRC1383	TCGGGGAGAGCGCTTGCTGCGTTAAGGGACGCTCGTGGACATCTTCGT	ATTAGTTCTACCAACTTCAAGACGGTTAGCGGGGAGTTCTGCACTGAG
D (KML#6)	-----	-----
A (KA2)	-----	-----
C (S4)	-----	-----
B (D4)	-----	-----
NBRC1383	TGTAGTGCTTTTACTACGTTGCACCATGGCGAAGTGTCTTTTAAGTT	TGACCTCA
D (KML#6)	-----	100%
A (KA2)	-----	100%
C (S4)	---A-----	100%
B (D4)	---A-----	99.5%
		99.4%

Fig. 3. Alignment of rRNA gene sequences of the yeast isolates with that of *Kazachstania servazzii*.

The 656-bp rRNA region sequence of *Kazachstania servazzii* NBRC1383 was aligned with the corresponding sequences of yeast isolates from Kimchi A to D. Yeast isolates are indicated by the source Kimuchi (A to D) plus the strain number in parenthesis. The entire NBRC1383 sequence and the nucleotides of isolates different from NBRC1383 sequence are presented. A deletion is indicated by a space. The nucleotide, which is the same as that of NBRC1383, is indicated by “-”. The percentages of identity are presented at the end of each sequence. Each line contains a couple of 50 nucleotides separated by a space.

～96%, *Kazachstania unispora* と 93～94% の相同性を示した。

以上の結果から使用した4種類のキムチ試料においては、共通して *K. servazzii* が含まれていることが示唆された。さらにキムチ A とキムチ D から DNA を抽出し、真菌 26S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域を PCR 増幅した断片を変性密度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) にて解析したところ、1 本のバンドのみが検出された (data not shown)。このバンドの DNA を抽出して塩基配列を決定したところ、*K. servazzii* Lu9-14 の D1/D2 領域 (GenBank HM146913) と 100% 一致した。この結果からキムチ A とキムチ D において *K. servazzii* が優占化していることが示唆された。

以後の実験には、キムチ D に由来する一株を *K. servazzii* MK1 と命名して用いた。MK1 は 100 MPa の静水圧で 10 分間保持しても生残性に影響がなく、

生残率は 100% であった。200 MPa、10 分間の加圧では 1 桁程度生残率が低下した (Fig. 4)。研究に汎用される *Saccharomyces cerevisiae* や *Shizosaccharomyces pombe* では 200 MPa で著しく生残性が低下することが報告されており [13], *K. servazzii* は比較的高い耐圧性を有していると思われる。高浸透圧の保存性食品の腐敗の原因となる *Zygosaccharomyces bailii* でも高い耐圧性が報告されており [14], 耐圧性が浸透圧の高い環境と関連する可能性も考えられる。

3.2 圧力感受性株の取得

MK1 の圧力感受性株を取得するにあたり、感受性株は高圧処理後にダメージから回復するのに時間がかかって生育が遅くなると仮定し、材料と方法に述べたように MK1 が本来耐性を示す 100 MPa の静水圧を加えた後に生育が遅くなった変異株から圧

Fig. 4. The log survival ratios of the wild-type and MK1-HPS strains against the different pressure level. Cells grown in YM broth were suspended in MES solution and kept at the pressure indicated for 10 min. Survival fraction was determined by counting the colonies appeared within 144 h on YM agar plates containing 100 μ g/ml chloramphenicol. The cell concentration prior to the pressure treatment (N_0) was compared with that after the pressure treatment (N) to estimate each of the log survival ratio. White and grey bars represent the survivals of the wild-type MK1 and MK1-HPS strains, respectively. The pressure levels applied are indicated at the bottom.

力感受性株を選抜する操作を3回繰り返し、圧力感受性株 MK1-HPS を取得した。なお、選抜操作において増殖速度の低下が認められたため、2回目と3回目の圧力感受性株を選抜する操作を完了した後、植え継ぎにより増殖速度が回復した株を選抜する操作を行った。

MK1-HPS の圧力感受性を調べるため、野生株 MK1 とともに菌濃度 10^7 CFU/ml の MES 溶液について 100 MPa と 200 MPa で 10 分間の加圧をしたところ、200 MPa で MK1 に比べて 4 桁程度生残率が低下し、明確な違いが認められた (Fig. 4)。また、200 MPa、40 分間の処理では MK1 が 10^{3-4} CFU/ml 程度生残したのに対し、MK1-HPS では生残菌は認められなかった (10^1 CFU/ml 以下) (Data not shown)。次に加圧時間を変えながら 200 MPa で圧力処理を行い、生残性を調べて、5 分までのグラフにおける近似直線に基づいて 90% 死滅するに要する時間 (D 値) を算出したところ、MK1-HPS では 1.54 分、MK1 では 5.83 分であった。また、圧力処理時間が長くなると処理時間に伴う生

Fig. 5. The log survival ratios of the wild-type and MK1-HPS strains against the different pressure time at 200 MPa. Experimental settings are the same as those in Fig. 4. The log survival ratios of the wild-type MK1 and MK1-HPS were represented by filled diamonds and filled circles, respectively. The log survival ratios of each strain at 0 min and 5 min and those at 5 min and 20 min are connected by straight lines, respectively, to estimate the D values as mentioned in the text. The data are the means of three independent experiments, and the error bars represent 1 standard deviation.

残性の低下が抑えられる傾向が見られ、処理時間 5 ~ 20 分の生残菌数から 90% 死滅する D 値は MK1 で 17.1 分、MK1-HPS で 6.4 分となった (Fig. 5)。

一方、MK1-HPS の圧力感受性がキムチ中でも発揮されるかを調べるため、キムチ破砕ペースト 1 ml 中に 10^7 CFU/ml にて菌を懸濁し、加圧時間を変えながら 200 MPa で圧力処理を行い、生残性を調べた (Fig. 6)。MK1-HPS および MK1 は共に圧力感受性が低下する傾向が見られ、200 MPa、40 分間の処理でも 10^2 CFU/ml 程度が生残していた。このことより、キムチ成分が圧力処理に対する保護効果を示す可能性が示唆された。

今回のスクリーニングでは増殖の遅れた株を選抜し、そこから圧力感受性株 MK1-HPS を選抜したが、増殖の遅れた株の中には圧力感受性ではない株もあり、増殖の遅れた株が全て圧力感受性ではなかった。したがって増殖が遅れる変異には多様性があり、その一部が圧力感受性に関連していると考えられる。一方、増殖が遅れた株を植え継いで増殖を MK1 並みに戻した場合には、圧力感受性でなくなった株も得られた。このことから使用した増殖の遅れた株には増殖が遅れる変異が複数あり、圧力感受

Fig. 6. The log survival ratios of the wild-type and MK1-HPS strains in the sterile kimchi paste against the different pressure time at 200 MPa. Experimental settings are the same as those in Fig. 4. The log survival ratios of the wild-type MK1 and MK1-HPS were represented by filled diamonds and filled circles, respectively. The data are the means of three independent experiments, and the error bars represent 1 standard deviation.

性と関連した変異と圧力感受性と関連しない変異が含まれていることが想像される。圧力感受性でなくなった株は圧力感受性と関連した増殖が遅れる変異を回復する復帰変異が生じたと考えられ、逆に、MK1-HPSは、圧力感受性と関連しない増殖が遅れる変異を回復する復帰変異が生じたと考えられる。以上の結果から、MK1-HPSには圧力処理による3回の選抜と植え継ぎによる2回の増殖能回復の少なくとも5つの変異が存在すると考えられる。

3.3 資化性試験

各種の糖、グリセロール、プロリン、グルタミン酸、ギ酸などの炭素源に対する資化性を、30℃にて28日後まで液体培養して検討した。その結果、MK-1およびMK1-HPSに共通して8種類の炭素源に対する資化性が認められた。一方、L-Proline、D-Raffinoseについては、MK-1でのみ資化性が認められた (Table 1)。L-Proline、D-Raffinoseに関しては、MK1-HPSで資化能を損なう変異が起きたと推測されるが、それらの変異が圧力感受性にかかわっているかどうかは不明である。

3.4 発酵試験

MK1-HPSにおいてL-ProlineおよびD-Raffinose資化能が欠損していたことから、圧力感受性獲得が発酵能に変化を及ぼした可能性が考えられた。そこでYM培地を用い、グルコースを基質

Table 1. Growth characteristics of the strain MK1-HPS.

Substrate	MK1 (wild)	MK1-HPS
α -D-Glucose	+++	+++
D-Galactose	+++	+++
D-Treharose	+++	+++
Amygdalin	++	++
Glycerol	+++	++
D-Ribose	+++	++
Sucrose	++	++
L-Proline	++	—
D-Raffinose	+	—

+++ , vigorous growth; ++ , apparent growth; + , weak growth; — , no growth

としたアルコール発酵能を30℃、20℃、10℃、4℃にて嫌氣的に培養して検討した。30℃および10℃における結果をFig. 7に示した。濁度は30℃、20℃試験区において差は見られなかった。10℃、4℃試験区においては、MK1-HPSはMK-1と比較して増殖がやや低下する傾向が見られた。一方、グルコース減少量とエタノール生成量では、エタノール生成量でMK1-HPSがMK-1に劣る傾向が見られたが、各温度においてMK-1とMK1-HPSの間で大きな差は認められなかった。以上より、MK1-HPSの発酵能はMK-1と同程度であると結論した。

3.5 ガス発生量の調査

圧力感受性株のMK1-HPSの発酵途中におけるガス発生を高圧処理で抑えることが出来るかを調べるため、MK1およびMK1-HPSをYM培地に接種後、ガスバリア性軟質樹脂袋に密封し、200 MPaの高圧処理を施した。処理後の樹脂袋を30℃にて培養して経時的にガスの発生量を測定し、Fig. 8に示した。また、高圧処理直後の生菌数をTable 2に示した。高圧処理後の生菌数は、MK1では60分処理後に検出限界以下となったが、MK1-HPSは20分間の処理で検出限界以下となった。

高圧処理はガス産生のタイミングに明確な影響を与え、MK1とMK1-HPSの間で顕著な差が見られた。高圧処理をしない場合にはMK1もMK1-HPSも培養初期からガス産生が始まり、10時間程度で飽和した。MK1では20分間の高圧処理で28時間後、60分間の高圧処理で40時間後からガス産生が始まり、いずれも10時間程度で飽和した。一方、MK1-HPSでは60分間の高圧処理で3パック全て

Fig. 7. Fermentative capacity of the wild-type and MK1-HPS strains. The wild-type MK1 and MK1-HPS grown in YM broth were inoculated into YM broth at about 10^7 cells/ml and 5-ml aliquots were cultivated anaerobically at the indicated temperature. Panels A and B present the results at 30°C and at 10°C, respectively. Growth (circles), residual amount of glucose (squares), and production of ethyl alcohol (triangles) of the MK1 (filled symbols) and MK1-HPS (open symbols) were measured periodically. The initial consumption of glucose was indicated by the glucose concentration at start, which was less than the estimated initial concentration (42.7 mM).

においてガスの産生は認められなかった。40 分間の高圧処理では 3 パック中 2 パックで 80 時間後と 94 時間後にガスの産生が認められ、それぞれ 88 時間後と 104 時間後に飽和した。残る 1 パックはガスの産生が認められなかった。20 分間の高圧処理では 92 時間後にガスの産生が認められ、104 時間後に飽和した。

以上の結果から、MK1 では 200 MPa、60 分間の高圧処理でもガス発生が生じるのに対し、MK1-HPS では高圧処理によりガス発生が抑えられることが示唆された。Table 2 の結果では MK1-HPS の生残性は 20 分を越える高圧処理で検出限界以下と

Fig. 8. Gas evolution by the wild-type and MK1-HPS strains in YM broth. The wild-type MK1 (panel A) and MK1-HPS (panel B) grown in YM broth were inoculated into YM broth at about 10^7 cells/ml and 10-ml aliquots were kept at 200 MPa for 20 min (open squares), 40 min (open triangles), or 60 min (filled triangles). A 10-ml aliquot without pressure treatment was employed as a control (open circles). Then they were cultivated anaerobically at 30°C. Gas evolution was represented by an increase in volume.

Table 2. Viable cell counts of the wild-type MK1 and MK1-HPS after pressure treatment at 200 MPa for gas evolution measurement.

strain	Viable cell counts (CFU ^a /ml)			
	none	20 min ^b	40 min ^b	60 min ^b
MK1 (wild)	8.9×10^6	1.2×10^4	1.4×10^2	< 30
MK1-HPS	6.6×10^6	< 30	< 30	< 30

^aColony-forming unit

^bPressure time

なっていたが、20 分間及び 40 分間の高圧処理でガス産生が見られた。MK1-HPS の圧力処理後の回復

が遅く、野生株に比べて増殖が遅れた結果とも考えられるが、Table 2 の生残性試験では培養を 144 時間まで延長してコロニーを計数しており、その可能性は低いと考えられる。生残性が検出限界以下でも、培養液中には最大 300 CFU が残っている可能性があり、僅かに生き残った細胞が増殖した結果と思われる。

4. おわりに

発酵食品は、流通の間も発酵が進行することにより、味や成分が変わり、特に酵母のヘテロ発酵により炭酸ガスが発生し、容器のふくらみや破裂を生じることがある。これらは発酵食品産業における課題であり[15]、発酵食品中の菌叢の制御や代謝のコントロールが重要な技術となる。現在流通している製品には加熱殺菌したものや、発酵させず調味料添加のみにより流通期間の延長や味の安定化を図っているものもある[16]。今回使用した酵母は、韓国や日本の複数のメーカーで作られたキムチに共通して存在する酵母 *Kazachstania* (*Saccharomyces*) *servazzii* であり、少なくともキムチでの主要酵母であると考えられる。本研究で作出した圧力感受性株 MK1-HPS は、野生株と同等の発酵能は保持しており、キムチの食感への悪影響を抑えられる 200 MPa での圧力処理によりガス発生を抑えて、流通段階での膨張事故防止と賞味期限延長に寄与すると期待される。また、MK1-HPS は圧力処理後に増殖が遅い株を選抜する単純な手法を基本に取得したもので、人為的な変異導入過程を経ずに圧力感受性酵母を得たことは、食品の安心、安全面で付加価値を与えると考えられる。この手法は、他の食品で利用されている酵母や乳酸菌の圧力感受性株の作出にも応用できると推測され、将来、重要な技術となることが期待される。

謝 辞

本研究は「新たな農林水産政策推進する実用技術開発事業」(農林水産省・農林水産技術会議)の補助を受け進めたものです。本論文の作成にご協力いただいた(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品

総合研究所 食品工学研究領域 食品高圧技術ユニット ユニット長・山本和貴氏に感謝いたします。また、キムチを提供して頂いた李賢淑 (Lee Hyunsook) 氏、株式会社 フーディーネットジャパン (旧 有限会社アリランハウス)、他、関係の方々の御支援に対し深く御礼を申し上げます。

参考文献

- [1] 中山正夫：食の科学，**6**, 15 (1987).
- [2] 稲津康弘，川本伸一：食品科学工学会誌，**54**, 425 (2007).
- [3] 宮尾茂雄：防菌防黴，**27**, 811 (1999).
- [4] 宮尾茂雄：防菌防黴，**30**, 383 (2002).
- [5] 大嶋孝之：生物工学会誌，**81**, 403 (2003).
- [6] 笹川秋彦，星野純，小林篤，西海理之，鈴木敦士，藤井智幸，小西徹也，山崎彬，山田明文：高圧力の科学と技術，**16**, 167 (2006).
- [7] 田中龍夫，畑中耕一：日本食品科学工学会誌，**39**, 173 (1992).
- [8] 浜田和広，嶋田昇二：高圧科学と加圧食品，林力丸編 (さんえい出版，京都，1991)，第 16 章，pp. 181-188.
- [9] T.J. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor: in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (Academic Press, London, 1990), Chap. 38, pp. 315-322.
- [10] L. Cocolin, L.F. Bisson, D.A. Mills: FEMS Microbiol. Lett., **189**, 81 (2000).
- [11] H.W. Chang, K.H. Kim, Y.D. Nam, S.W. Roh, M.S. Kim, C.O. Jeon, H.M. Oh, J.W. Bae: Int. J. Food Microbiol., **126**, 159 (2008).
- [12] M.T. Fernandez-Espinar, B. Esteve-Zarzoso, A. Querol, E. Barrio: Antonie van Leeuwenhoek, **78**, 87 (2000).
- [13] M. Sato, H. Kobori, S.A. Ishijima, Z.H. Feng, K. Hamada, S. Shimada, M. Osumi: Cell Struc. Function, **21**, 167 (1996).
- [14] E. Palou, A. Lopez-Malo, G.V. Barbosa-Canovas, J. Welti-Chanes, P.M. Davidson, B.G. Swanson: J. Food Prot., **61**, 1657 (1998).
- [15] J.W. Lee, D.S. Cha, K.T. Hwang, H.J. Park: Int. J. Food Sci. Technol., **38**, 519 (2003).
- [16] 稲津康弘，前田稷，一色賢司，川本伸一：食品工業，**47**, 46 (2004).

[2012 年 9 月 12 日受付，2012 年 10 月 10 日受理]

© 2013 日本高圧力学会