

# ヨーグルト製造用途乳酸菌の効率的な評価選抜スキームの構築

濱岡 直裕

## Efficient Evaluation and Selection Scheme of Lactic Acid Bacteria for Yoghurt Production

Naohiro Hamaoka

In this study, a selection scheme for identifying lactic acid bacteria (LAB) suitable for yoghurt production was investigated using molecular biology techniques and a gene encoding a cell envelope protease in LAB. The *prtS* protease gene sequence from *Streptococcus thermophilus* was employed in this novel isolation method of evaluating LAB ability for decreasing pH in milk. This procedure was applied to screen LAB from raw milk samples, and the validity of this scheme was confirmed as the first selection of raw milk samples containing LAB suitable for yogurt production.

**KEY-WORDS** : lactic acid bacteria, yoghurt, protease, PCR, isolation

**キーワード** : 乳酸菌, ヨーグルト, プロテアーゼ, PCR, 分離

健康志向から消費者の発酵食品に対する関心は高く、中でも手軽に乳酸菌を摂取できるヨーグルト製品の消費が旺盛である。特に独自の乳酸菌や生乳にこだわった製品の売上が高く、メーカー間では特徴ある差別性の高い製品の開発競争が激化している。道内の乳製品企業からも、「地域の特徴ある生乳と北海道由来の乳酸菌を組み合わせ、差別性の高いヨーグルト開発」に対する強いニーズが寄せられているが、現状ではメーカーおよび道総研でも、ヨーグルト製造に適した北海道由来の乳酸菌は保有しておらず、この探索と供給体制が早急に求められている。

しかし、菌株の分離後に凝乳特性を直接評価する従来の方法では、供試点数に限界があり、短期間に能力の高い乳酸菌を選抜取得することは困難であることから、効率的な新しい評価・選抜手法の開発が必要である。一方、乳酸菌の増殖によるpH低下と乳酸菌が保有するプロテ

アーゼ遺伝子発現の間に関連が見出されるなど、乳酸菌の基本的なヨーグルト適性に関与する遺伝子が報告されていることから、これをマーカーとした選抜法を導入することにより、多数の生乳を短期間に供試できる評価・選抜スキームの構築が可能と考えられる。

そこで本研究では、乳酸菌のプロテアーゼ活性を指標とした、ヨーグルト適性の高い乳酸菌の評価・選抜スキームを構築し、実用性のある乳酸菌の分離を試みることで、本スキームの実用性を検証した。

### 実験方法

#### 1. 試薬

乳酸菌培養用の培地は、スキムミルク（雪印メグミルク）または0.5%（w/v）ラクトースを含有するM17 broth acc. to TERZAGHI（Merck）（以下M17培地）を用いた。嫌気培養には、酸素吸収・炭酸ガス発生剤の

アネロパック・ケンキ（三菱ガス化学）を入れた嫌気ジャーを使用した。菌株のDNA抽出にはMightyPrep reagent for DNA（Takara）を、PCRの酵素にはGo Taq Green Master Mix（Promega）を用いた。乳酸菌数の測定にはBCP加プレートカウントアガール（日水製薬）を用いた。そのほかの一般試薬は、和光純薬工業製またはナカライテスク製を用いた。

## 2. 標準菌株および試料

プロテアーゼ活性を有する乳酸菌の陽性対照（PC）として、市販の乳酸菌スターター STI-12（クリスチャンハンセン）から単離した菌株を用いた。本スターターは *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*（以下、*S.thermophilus*）のみで構成されている。この菌株は、*prtS* 遺伝子を保有する菌株であることをPCR法による予備試験により確認している。

乳酸菌探索に供した試料生乳は、道総研・酪農試験場（旧・根釧農業試験場）から24サンプル（延べ215頭分相当、採取時期：2018年6月から10月）、および公益社団法人北海道酪農検定検査協会（札幌、帯広、釧路、根室の各検査所）から84サンプル（延べ約1,680頭分相当、採取

時期：2018年6月から10月）の合計108サンプルを用いた（表1）。各サンプルは、乳牛10頭から20頭分の生乳をまとめたものであり、当所に到着後、ポリプロピレン製50mL遠沈管に分注し、 $-30^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

## 3. 試料の濃縮

試料の濃縮は、次のように行った。試料の解凍後に高速遠心分離（ $10,000\times g$ 、15分間）により脂質および乳清を除去し、得られた沈殿を生理食塩水1.0mLに懸濁した。懸濁液は遠心分離（ $15,000\times g$ 、5分間）を行い再度沈殿を得て、さらに沈殿を生理食塩水で洗浄し、濃縮試料とした。

## 4. DNA抽出

濃縮試料からのDNA抽出は、ボイル法で行った。濃縮試料は、遠心分離（ $15,000\times g$ 、5分間）を行い、沈殿をTEに懸濁した上で、抽出試薬（MightyPrep reagent for DNA, Takara）を加え、 $95^{\circ}\text{C}$ 、10分間加熱後、遠心分離（ $15,000\times g$ 、3分間）によりdebrisを沈殿させ、上清を回収した。

## 5. PCR

抽出DNAを鋳型にして、目的の遺伝子の有無をPCRで検出した。対象とした遺伝子配列は、16S rRNAをコードする遺伝子、*S.thermophilus*菌の16S rRNAをコードする遺伝子のうち同菌に特徴的な配列、およびプロテアーゼPrtSをコードする遺伝子の塩基配列のうちそれぞれ一部分とした。使用したプライマーの塩基配列は表2のとおりで、オリゴヌクレオチドの合成はSigma Aldrichに外注した。装置は、GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystems）を使用した。

表1 収集生乳サンプル（平成30年6月～10月収集）

道総研酪農試験場（旧根釧農試）	24サンプル
北海道酪農検定検査協会	札幌 36サンプル
	帯広 18サンプル
	釧路 9サンプル
	根室 21サンプル

表2 PCRプライマー塩基配列

(a) 16S rRNAをコードする遺伝子	上流529bpを増幅する塩基配列部位（長島ら）
（16S rRNAプライマー）	
（5' → 3'）順方向	pA AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
逆方向	pD* GTATTACCGCGGCTGCTG
(b) <i>S.サーモフィラス</i> 菌の16S rRNAをコードする遺伝子のうち	上流157bpを増幅する塩基配列部位（Tabascoら）
（thermoプライマー）	
（5' → 3'）順方向	Thermfor ACGCTGAAGAGAGGAGCTTG
逆方向	Thermrev GCAATTGCCCTTTCAAATA
(c) プロテアーゼPrtSをコードする遺伝子 <i>prtS</i> の一部を増幅する塩基配列部位	
（MCF <i>prtS</i> プライマー）890bpを増幅する塩基配列部位（Dandoyら）	
（5' → 3'）順方向	<i>prtS</i> -F-MCF GGTTTCTGTTGTTATTGCAGCT
逆方向	<i>prtS</i> -R-MCF ATACCTGCACCTTGTGGCG
（M社 <i>prtS</i> プライマー） <i>prtS</i> 下流側の684bpを増幅する塩基配列部位（山本）	
（5' → 3'）順方向	<i>prtS</i> -F-M社 GACTTGAAGAAACAGCGCGT
逆方向	<i>prtS</i> -R-M社 TAGGTGGAGGCGTTACAGTG

反応は、抽出DNA液 5  $\mu$ Lに、上記プライマー 20  $\mu$ M液0.5  $\mu$ Lずつ、Go Taq Green Master Mix 12.5  $\mu$ L、滅菌蒸留水6.5  $\mu$ Lを加え、下記の条件で行った。

(a) 16S rRNAをコードする遺伝子 (16S rRNAプライマー)<sup>1)</sup>

93°C 3 min→ 93°C 30sec, 50°C 15sec, 72°C 30sec  
を36サイクル→ 72°C 7 min

(b) *S.thermophilus*菌の16S rRNAをコードする遺伝子 (thermoプライマー)

93°C 3 min→ 93°C 30sec, 60°C 15sec, 72°C 30sec  
を40サイクル→ 72°C 15min

(c) プロテアーゼPrtSをコードする遺伝子

(MCF *prtS*プライマー) 890bpを増幅する塩基配列部位<sup>2)</sup>

93°C 3 min→ 93°C 30sec, 50°C 15sec, 72°C 30sec  
を36サイクル→ 72°C 7 min

(M社 *prtS*プライマー) 上記より下流の684bpを増幅する塩基配列部位<sup>3)</sup>

93°C 3 min→ 93°C 30sec, 63°C 15sec, 72°C 30sec  
を36サイクル→ 72°C 7 min

PCR産物は、2.0%アガロースゲル電気泳動 (PrimeGel Agarose LE, Takara使用) を行い、GelRed (Biotium) で染色して、470nmトランスイルミネーターで確認した。

## 6. 発酵試験

候補の菌株についての発酵能評価は以下のように実施した。菌株をM17液体培地に接種し、42°C、一夜培養してスターターを調製し、10% (w/v) スキムミルク液に1.0% (v/v) 接種して、42°C、6時間での凝乳試験を実施した。評価は、一定時間ごとにpH、酸度、生菌数を測定することで行った。pHは電極を直接接点させて測定した。酸度は、試料9.0gを秤量し、蒸留水20mLを加え、1.0M NaOHを滴下しpHが8.4になるまでに要した液量から算出した。

## 実験結果

### 1. 試料の濃縮と被検試料としての有効性の確認

凍結生乳サンプル50mLを解冻後、10,000×gで15分間の高速遠心分離を行ったところ、脂質分は上層に固形として、乳清は液体のまま除去でき、かつ、約1.0mL程度の沈殿が得られ、本操作で約50倍濃縮することが出来た。

上記のように得られた沈殿のうち、北海道酪農検定検査協会札幌検査所の12サンプル、酪農検定検査協会の28サンプルを被検試料にして、沈殿の生理食塩水懸濁液を

10% (w/v) スキムミルクアガー培地に塗抹し、42°C、24時間培養して菌株分離を試行したところ、1サンプル中にハローを形成する菌株が40株程度含まれることを確認できた。

また、同じ上記の高速遠心分離による濃縮試料から、ボイル法でDNA抽出を行い、16S rRNAをコードする遺伝子の一部分を増幅するPCRを行ったところ、該当する大きさのPCR産物が得られ、この手法で対象とする遺伝子検索が可能であると推定した。

これら2つの結果より、生乳サンプルの高速遠心分離により得た50倍濃縮試料が、菌株分離および遺伝子検索の被検試料となり得ることの確認を得た。

### 2. PCR検出感度の検証

市販の乳酸菌スターターから単離した*prtS*遺伝子保有菌株 (以下、STI-12) を用いて、16S rRNAプライマー、thermoプライマー、2種の*prtS*プライマー (MCF *prtS*プライマー、M社 *prtS*プライマー) による検出感度について検討した。

前培養 (M17培地、42°C、16時間) したSTI-12菌液を10倍階段希釈し、一定量を10% (w/v) スキムミルク液に添加したサンプルを-30°Cで一度凍結し、融解後に高速遠心分離で沈殿を得てから、ボイル法でDNAを抽出した。この抽出DNAを鋳型にPCRを実施したところ、増幅産物の確認には16S rRNAプライマーでは $10^3$  cfu/mL以上の菌数、thermoプライマーでは $10^3$  cfu/mL以上の菌数で明確に確認できた (図1) 一方、*prtS*プライマーでは二種類ともに $10^5$  cfu/mL以上の菌数が必要である (図2) ことが明らかになった。

一方、M17培地で42°C、16時間培養したSTI-12菌液そのものを、生理食塩水で段階希釈し、遠心沈殿から抽出したDNAを鋳型に*prtS*のPCRを行ったところ、二種類の*prtS*プライマーともに菌数  $4 \times 10^2$  cfu/mL以上で明確に検出された (図3, 4)。STI-12菌液添加10% (w/v) スキムミルク液での検討では、*prtS*増副産物は菌数 $10^5$  cfu/mL以上で確認可能であったので、乳成分による感度低下の可能性が推定された。

乳成分により検出感度が低くなることを考慮し、STI-12菌液を接種した市販牛乳を42°C、6時間加温培養後にDNA抽出してPCRに供した結果、初発のSTI-12菌数が $10^1$  cfu/mL程度でも、MCF *prtS*プライマー、M社 *prtS*プライマーともに検出できることが明らかになった (図5, 図6)。(ただし、 $10^7$  cfu/mLを摂取し培養した試料では、加温により凝乳したため、DNA抽出効率が下がり、検出されなかったものと考えられた。) これら

のことより、加温培養するプロトコルを加えることで  $prtS$  遺伝子を有する乳酸菌を低菌数であっても検出でき

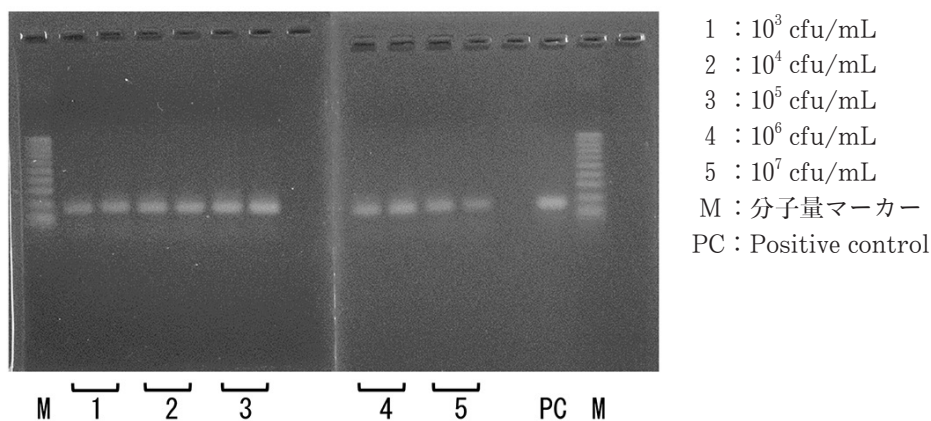


図1 STI-12添加スキムミルク液のサーモフィラス特異的プライマー(thermoプライマー)によるPCR産物の電気泳動

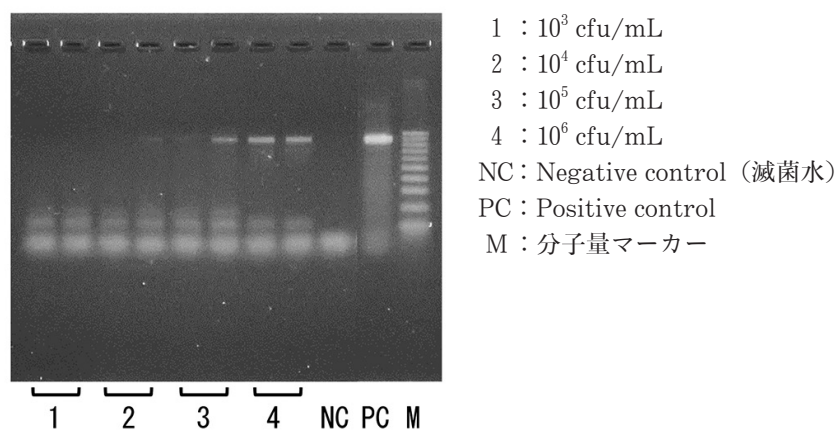


図2 STI-12添加スキムミルク液のMCF  $prtS$ プライマーによるPCR産物の電気泳動

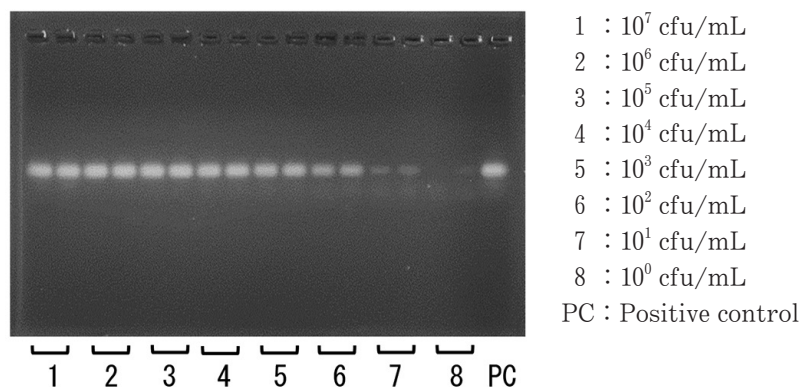


図3 STI-12菌液を階段希釈したM17液のMCF  $prtS$ プライマーによるPCR産物の電気泳動



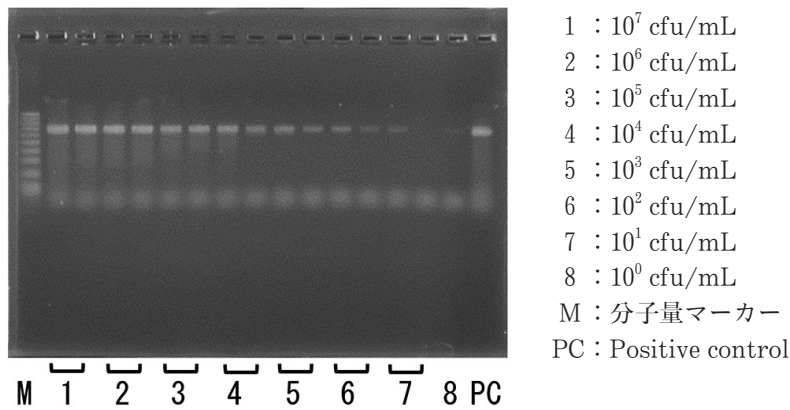


図4 STI-12菌液を階段希釈したM17液のM社の*prtS*プライマーによるPCR産物の電気泳動

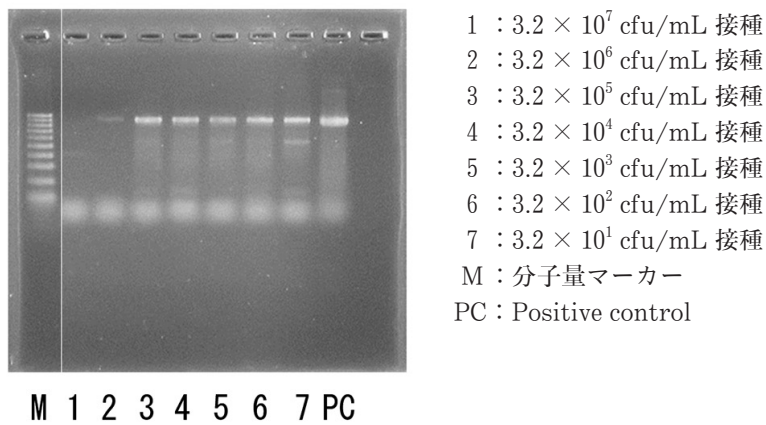


図5 STI-12菌液を接種し加温培養した市販牛乳のMCF *prtS*プライマーによるPCR産物の電気泳動

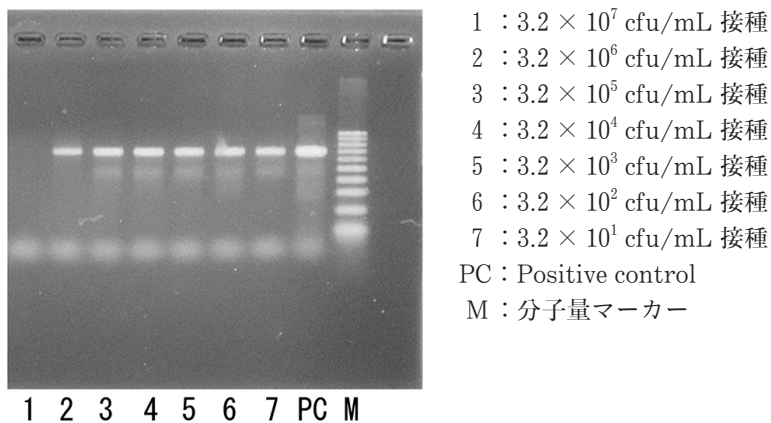


図6 STI-12菌液を接種し加温培養した市販牛乳のM社 *prtS*プライマーによるPCR産物の電気泳動

### 3. 濃縮試料中のターゲット遺伝子検出

すべての生乳試料108サンプルについて、高速遠心分離により濃縮試料を調製し、ボイル法によって得た抽出DNAについて、16S rRNAをコードする遺伝子およびプロテアーゼ*prtS*遺伝子に対するPCRを実施した。

その結果、すべてのサンプルで16S rRNAをコードする遺伝子の増幅産物は確認されたが、*prtS*遺伝子の増幅産物を確認することはできなかった。

そこで、収集した生乳中について、*S.thermophilus*菌の存在を検討するため、高速遠心分離試料からボイル法で抽出したDNAを鋳型にthermoプライマーによるPCRを実施した。その結果、酪農試24サンプル中7サンプル、酪農検定検査協会84サンプル中23サンプルに増幅産物を確認し、*S.thermophilus*菌の存在が示唆された(図7)。

収集したすべてのサンプルから直接*prtS*増幅産物を検出することは出来なかったが、同試料に対して、*S.thermophilus*特異的配列プライマー(thermoプライマー)によるPCR増幅により30サンプルに*S.thermophilus*菌の存在が示唆されたことは、本手法が有望菌株を有する試料の一次選抜法として有効であると考えられた。

しかし、thermoプライマーでのPCRで増幅産物が見られたボイル法抽出DNA 30サンプル(酪農試7, 酪農

検定検査協会23)について、再度、2種の*prtS*プライマーでPCRを行ったが、いずれのサンプルも増幅産物は確認されなかった。

また、加温培養するプロトコルを経たサンプルにおいても、*prtS*検出プライマーでPCR産物は確認されなかったため、thermoプライマーによるPCR増幅で陽性を確認したサンプルに絞って次項以降の検討を行った。

### 4. 塗抹展開の釣菌

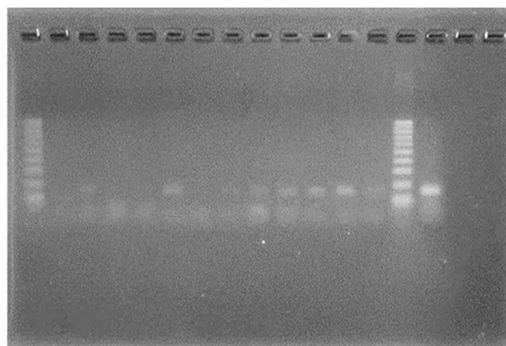
前述の結果を受け、*S.thermophilus*菌の存在がPCR検出で示唆された30サンプル(酪農試7, 酪農検定検査協会23)について、生乳を高速遠心分離することにより濃縮試料を調製し、10% (w/v) スキムミルクアガー培地に塗抹展開した。42°C, 24~48時間、嫌気培養後にハロー形成菌株を確認したところ、15サンプルから約90株のハロー形成コロニーが得られた。

釣菌した菌株は、M17培地1.0mL, 2本に接種し、42°C, 16時間培養し、増殖した菌株については、菌液1本からボイル法によりDNAを抽出、残りの1本には30% グリセロールを添加し-80°C保存した。

抽出したDNAを鋳型に*prtS*プライマーによるPCR増幅したところ、*prtS*遺伝子保有を示唆する20株を分離することができた(図8)。

表3 prtS(+)-分離株の6時間発酵能と推定菌種名(乳酸菌のみ抜粋)

分離株名	pH	酸度	菌種名(推定)
S10-10-118	5.83	0.37	<i>Enterococcus faecalis</i>
S10-10-9	5.96	0.37	<i>Enterococcus faecalis</i>
S10-10-10	6.00	0.33	<i>Enterococcus faecalis</i>
S10-10-19	5.92	0.37	<i>Enterococcus faecalis</i>
S10-10-109	5.93	0.37	<i>Enterococcus faecalis</i>
S10-10-110	5.91	0.37	<i>Enterococcus faecalis</i>
S10-10-112	5.90	0.37	<i>Enterococcus faecalis</i>
O8-1-5	5.80	0.41	<i>Enterococcus faecalis</i>
O8-1-14	5.79	0.41	<i>Enterococcus faecalis</i>
O8-1-17	5.80	0.41	<i>Enterococcus faecalis</i>
S10-10-108	6.17	0.25	<i>Streptococcus thermophilus</i>
K8-2-9	5.98	0.36	<i>Enterococcus faecalis</i>
N10-5-101	5.96	0.32	<i>Streptococcus thermophilus</i>
酪9-1-1	5.84	0.44	<i>Enterococcus faecalis</i>
酪9-1-6	5.88	0.40	<i>Enterococcus faecalis</i>



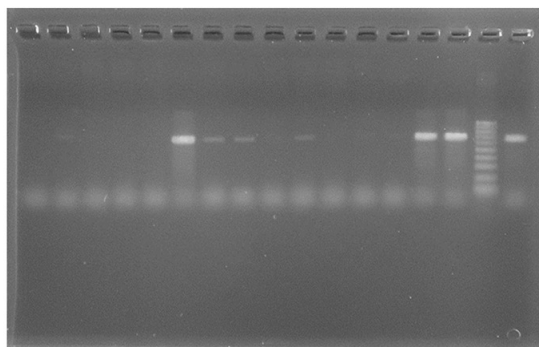
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M PC

1 ~ 12 : 生乳由来試料

M : 分子量マーカー

PC : Positive control

図7 サーマフィラス特異的遺伝子配列検出PCR産物の電気泳動結果の一部



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M PC

1 ~ 15 : 生乳由来試料

M : 分子量マーカー

PC : Positive control

図8 prtS遺伝子検出PCR産物の電気泳動結果の一部 (M社 prtSプライマー使用)

### 5. 釣菌した菌株の遺伝子解析と性状

上記の20株をそれぞれM17培地に接種し、42℃、一夜培養してスターターを調製し、10% (w/v) スキムミルク液に1.0% (v/v) 接種して、42℃、6時間での凝乳試験を実施した。その結果、すべてのサンプルである程度の凝乳を目視確認できたが、すべてpH 5.79、酸度0.41以下であり、市販スターター (STI-12, 同条件でpH 5.0、酸度0.61) に比べて発酵能は低かった (表3)。

また、上記の20株について、16S rRNAをコードする遺伝子塩基配列のうち約500bpを決定し、データベ

スでの相同性検索で菌種同定を行った結果、これらは *S.thermophilus* 菌2株のほか、*Enterococcus faecalis*等と同定され、*S.thermophilus* 菌以外にもprtS遺伝子を有する菌として検出されることが明らかになった。

これらのことから、乳酸菌の遺伝子配列を指標にして、生乳からヨーグルト製造に適性が見込まれる乳酸菌を検出するスキームを構築した (図9)。一方、ヨーグルト製造に適する有望菌株の分離には、発酵能に基づく効率的な分離選抜法がさらに必要と考えられた。

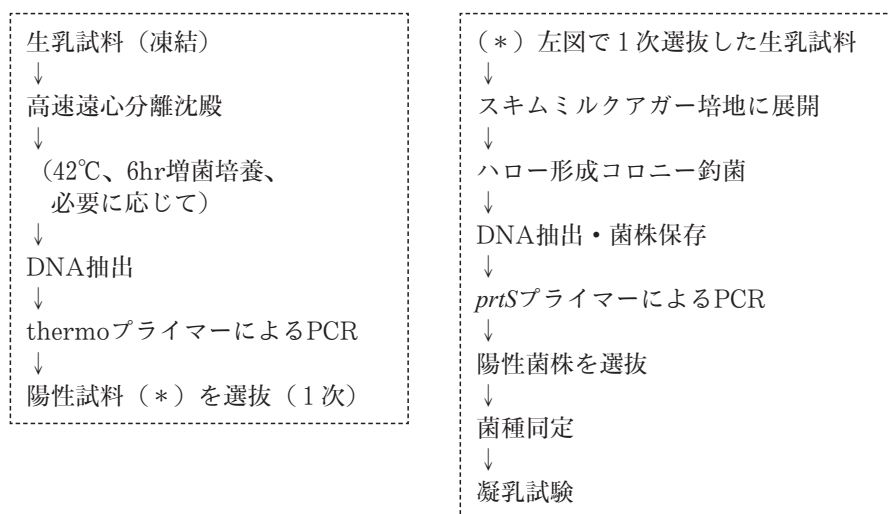


図9 本研究で構築した選抜スキームの概略

## 考 察

本研究では、乳酸菌のプロテアーゼ活性を指標に、遺伝子工学的な手法を用いて、ヨーグルト適性の高い乳酸菌の評価・選抜スキームの構築を検討した。

乳酸菌は、ヨーグルト製造で重要な役割を担っている。ヨーグルトは、生乳中で乳酸菌が増殖することにより、産生された乳酸によって生乳のpHが低下し、カゼインを中心とした乳タンパク質が凝集した食品と解釈できる。

そのため、ヨーグルト製造用の乳酸菌には、生乳成分を資化して増殖する能力（増殖能）、乳酸を産生する能力（発酵能）や、適度な香りと粘度を形成する能力などが求められる。特に増殖能は、現代の工場生産において作業者の労働時間の制約上、ある一定以上の速度が必要であり、商業生産に利用するためには重要かつ不可欠な能力といえる。

Codexによるヨーグルトの規格では、かつては乳酸桿菌*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*（以下*Lb.bulgaricus*）と、乳酸球菌*S.thermophilus*の両方を用いて乳酸発酵させたものとしていたことから、これまでに発酵過程における2菌種の関係性について研究が進んでいる。特に、この2菌種が同時に存在することにより発酵速度が促進されることが示され<sup>4)</sup>、この共生関係は、代謝物質の相互供与として、ペプチド・アミノ酸が

*Lb.bulgaricus*から*S.thermophilus*へ、ギ酸が*S.thermophilus*から*Lb.bulgaricus*へやりとりされていることが示されている<sup>5)</sup>。

したがって、この共生によって、2菌種が自身の増殖に必要な物質の生産を互いに補い合っているといえる<sup>6)</sup>が、これは、ヨーグルト製造によく用いられる*S.thermophilus*のほとんどが、カゼインを分解する細胞壁結合型セリンプロテアーゼであるPrtSを産生しないため、自己の増殖因子を自己で産生できないからである<sup>7)</sup>。

一方、このPrtSを産生する*S.thermophilus* CNRZ385株は、単菌のみで生乳中で生育できることが確認されている<sup>8)</sup>。そして、*prtS*遺伝子を有する*S.thermophilus* DGCC7110株は、40°Cの10% (w/v) スキムミルク液中で、6時間程度でpHを5.0まで低下させられるが、*prtS*遺伝子を欠失させた株ではpH低下能力がほぼ失われることが示されている<sup>2)</sup>。

そのため、PrtSをコードする遺伝子*prtS*を有する*S.thermophilus*は、単菌で乳成分を資化し、乳を発酵させ、ヨーグルトを生成する能力があると想定される。

クリスチャンハンセン社のチーズ用スターター STI-12は、*S.thermophilus*のみから構成された製品であり、製品の仕様書では41°Cの試験用9.5%スキムミルク液で、培養5時間でpHが5.0を下回る能力があるとされている。ここから鈎菌した菌株は、所内でも同様にpH低下能力が確認でき、*prtS*遺伝子検出のPCRを実施すると当該



増幅産物を明確に確認することができる。

これらの知見を基に、本研究では、乳酸菌 *S.thermophilus* のセリンプロテアーゼPrtSに注目し、このタンパク質をコードするprtS遺伝子を生乳中で検出することで、プロテアーゼ活性のある菌株を探索する方法として、PCR法での評価系を確立した。

本研究の評価系の構築検討過程では、できるだけ簡便なDNA抽出方法とすることを優先させた。そのため、抽出回収DNA液に乳成分が残り、このことによりPCR検出感度が低下することが推定された。

生乳中の細菌数は乳等省令で1 mL当たり400万以下(直接個体鏡検法)であり、未殺菌の原料乳においてもこの数値より大幅に多い細菌が存在するとは考えられない。一方で、本研究において、生乳からprtS遺伝子を検出するPCRの感度が $10^5$  cfu/mL以上と見積もられたが、これではターゲットとする乳酸菌が $10^4$  cfu/mL以下の場合、検出不可能と考えられた。

そこで、生乳試料を短時間加温することでターゲット乳酸菌を自己増殖させて生菌数を増加させる方法と、プロテアーゼ遺伝子とは別の属特異的な遺伝子配列を検索するPCR増幅との併用法の2法を検討した。

試料を42°Cで6時間加温培養した後にPCR増幅する方法では、prtS遺伝子を持つ乳酸菌株を添加したモデル試料で、菌数が $10^1$  cfu/mL程度であっても、prtS遺伝子を検出できることが明らかになった。しかし、実際の生乳試料では、prtS遺伝子を検出するPCR増幅で陽性を示す試料は確認できず、抽出回収DNA液の精製などさらにステップを追加する必要等が考えられた。

一方で、prtS遺伝子を検出できなかった試料においても、*S.thermophilus* 特異的な遺伝子配列をPCR増幅すると、陽性を示す試料が確認された。そのため、この方法を第一段階選抜とすることで、多数の試料からターゲットとする乳酸菌が含まれる試料を選び出すことが可能と考えられた。本研究では、当初の108試料から30試料に絞り込むことができ、作業効率が向上されたと考えた。しかし、ターゲット乳酸菌の存在が示唆された試料について、改めてprtS遺伝子を検出するPCR増幅した結果、いずれの試料からも増幅産物が確認されなかった。

そこで、従来法の平板培地塗抹を併用することとして、*S.thermophilus* 特異的な遺伝子配列でのPCR陽性試料を10% (w/v) スキムミルクアガー培地に塗抹したところ、30試料中15試料から約90株のハロー形成コロニーを得ることが出来た。そして、これらの菌株から抽出したDNAについてprtS遺伝子を検出するPCR増幅した結果、

90株中20株で増幅産物が確認できたことから、平板培地併用法が効率的であることが推測された。

これらの結果をもって、本研究では、ヨーグルト適性の高い乳酸菌*S.thermophilus*の評価・選抜するスキームを構築したが、今回得られた20株は、残念ながらプロテアーゼ活性を十分に発揮せず、乳pHを必要十分に下げることが出来なかった。しかし、prtS遺伝子の検出を指標にする乳酸菌検索アプローチ方法は、山本ら<sup>3)</sup>も報告し、実用面で活用している方法であり、今後さらなる検討を加えることで、効率的な新たな有用乳酸菌探索方法として用いることができるものと考えられた。

本研究では、乳酸菌*S.thermophilus*固有のプロテアーゼ遺伝子配列を指標にして、生乳からヨーグルト製造に適性が見込まれる乳酸菌*S.thermophilus*を検出する手法が確立できたこと、道内から収集した生乳試料に本法を適用し、有望菌株を有する生乳試料の一次選抜法としての有効性を確認したこと、有望菌株の分離に向けては、発酵能に基づく効率的な分離選抜手法の必要性が示唆されたこと、が主な成果である。今後、本法が特定の乳酸菌探索ツールとして用いる手法となり得るものと考えている。

## 要 約

凍結生乳サンプルから、 $10,000 \times g$ での高速遠心分離によって、50倍濃縮する前処理法を確立し、濃縮試料から抽出したDNAについて、PCRで特定遺伝子を増幅できることを確認した。

市販乳酸菌スターターより分離したprtS遺伝子保有菌株(以下STI-12)を用いて、2種のprtSプライマーによる検出感度について検討した。STI-12を10% (w/v) スキムミルク液に添加した結果、2種のprtSプライマーともに、増幅産物の確認には $10^5$  cfu/mL以上の菌数が必要だったが、42°C、6時間の増菌培養によって、初発菌数が $10^1$  cfu/mL程度で増幅産物の確認が可能となり、生乳サンプル中のprtS遺伝子保有菌株の検出法を確立した。

上記で確立した手法を収集した生乳サンプル濃縮試料に適用したところ、今回収集したすべてのサンプルでprtS増幅産物は検出されなかった。一方、同試料に対して、*S.thermophilus* 特異的配列プライマー(thermoプライマー)によるPCR増幅を試みた結果、30サンプルに*S.thermophilus* 菌の存在が示唆され、有望菌株を有する試料の一次選抜法として有効であることを確認した。

上記の30サンプルより、10% (w/v) スキムミルクア

ガー培地におけるハロー形成菌株を釣菌し、*prtS*プライマーによるPCR増幅により*prtS*遺伝子保有を示唆する20株を分離した。

上記の20株からスターターを調製し、10% (w/v) スキムミルク液に1.0% (v/v) 接種で、42°C、6時間での凝乳試験を実施した。その結果、ある程度の凝乳を目視確認できたが、すべてpH 5.79、酸度0.41以下であり、市販スターター (STI-12, 同条件でpH 5.0, 酸度0.61) に比べて発酵能は低かった。そのため、有望菌株の分離には、発酵能に基づく効率的な分離選抜法が必要と考えられた。

上記の20株について、16S rRNAをコードする遺伝子の塩基配列による菌種同定を行った結果、*S.thermophilus* 菌2株のほか、*E.フェカリス*等と同定され、*S.thermophilus* 菌以外にも*prtS*遺伝子を有する菌種が存在することが明らかになった。

以上のことから、乳酸菌の遺伝子配列を指標にして、生乳からヨーグルト製造に適性が見込まれる乳酸菌を検出するスキームを構築した。

## 文 献

- 1) 長島浩二ら (1998). 塩基配列に基づく細菌同定法の食品マイクロフローラ. 日本食品科学工学会誌, **45**, 58-65.
- 2) Dandoy, et al. (2011). The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS, *Microbial Cell Factories*, **10** (Suppl 1): S21.
- 3) 山本恵理ら (2019). 国産生乳から分離した *Streptococcus thermophilus* の *prtS* 遺伝子の解析および発酵性の検証, 日本乳酸菌学会2019年度大会
- 4) Robinson, et al. (2007). Tamime and Robinson's Yoghurt - Science and technology, Woodhead Publishing Ltd. UK.
- 5) Suzuki, et al. (1986). Groth of *Lactobacillus bulgaricus* in milk, Cell elongation and the role of formic acid in milk, *J. Dairy Sci.*, **69**, 311-320.
- 6) 佐々木泰子 (2015). ヨーグルトを造る乳酸菌共生発酵研究の最近の知見, *Jpn. J. Lactic Acid Bacteria*, **26**, 109-117.
- 7) Gilbert, et al., (1996). A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the *prtB* gene from *Lactobacillus delbruekii* subsp. *Bulgaricus*, *J. Bacteriol.*, **178**, 3059-3065.
- 8) Courtin, et al., (2002). Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk, *Microbiology*, **148**, 3413-3421.