

## 漬物の発酵に由来する香りの研究（第4報）

### —発酵試験に使用する乳酸菌の収集と同定方法の検討—

岩佐 悟\* 吉浦 貴紀\*

#### 1. はじめに

第1報から第3報<sup>1) 2) 3)</sup>では、1種類の乳酸菌（漬物用乳酸菌 HS-1）をスターターとして使用し、温度、塩分、脱気処理の有無などの発酵条件を変えた場合の香气成分変化の解明を行い、特に発酵温度と脱気処理が香りに影響を与えることを明らかにした。第4報からは、乳酸菌の種類の違いによる発酵漬物の香气成分の変化を明らかにし、乳酸菌の種類及び発酵条件を制御することによる漬物の香りの制御技術の開発を目指して研究を行う。

#### 2. 目的

本年度は、スターターとして使用する乳酸菌を収集するための条件設定を目的に以下の研究を行った。

1. 白菜及び県内の漬物製品からの菌の採取
2. スクリーニング手法の検討
3. 遺伝子解析による菌種同定手法の検討

#### 3. 実験方法

##### 3.1 白菜及び県内漬物製品からの菌の採取

白菜、及び県内の漬物製品より①～④の手順で菌を収集した。

- ①サンプル 10g に希釈水 90ml を加えストマッカー処理し、適宜希釈後、白亜 MRS 培地に混釈し、アネロパック・ケンキ(三菱ガス化学株)を使用して 30℃ 48 時間嫌気培養。
- ②酸を生成し、炭酸カルシウムを溶かしてクリアゾーンを形成したコロニーを選抜(図 1)。
- ③コロニーの形態的特徴(サイズ、色調、生酸の強弱)の異なるものを 5 株採取し、白亜 MRS 培地に画線塗抹後、30℃、24 時間嫌気培養。
- ④単コロニーを再度白亜 MRS 培地に画線塗抹後、30℃、24 時間嫌気培養して純化し、マイクロバンク(イワキ株)を使用して-60℃で保存。

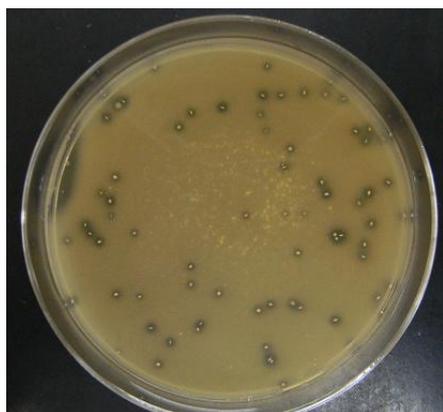


図1 クリアゾーンの形成

##### 3.2 スクリーニング手法の検討

- 3.1 で採取した株を⑤～⑦の手順でスクリーニングした。乳酸菌以外の菌を除くための試験であるが、正しく乳酸菌を選抜できるかの確認をするため、スクリーニングした全ての菌について 3.3 での同定を行った。
- ⑤ダーラム管入り MRS 液体培地に接種し、ガス発生の有無を確認(図 2)。
- ⑥グラム染色後に顕微鏡観察して判定し、形態観察を行う(図 3)。
- ⑦菌体の上に過酸化水素を注ぎ、発泡の有無を確認(カタラーゼ試験)。



図2 ガス発生試験

図3 グラム染色

##### 3.3 遺伝子解析による菌種同定手法の検討

###### 3.3.1 16SrDNA 遺伝子配列の一部解析による同定

16SrDNA 遺伝子配列解析による同定を佐藤<sup>4)</sup>らの方法をもとに⑧～⑭の手順で行った。

- ⑧菌体の DNA を InstaGene Matrix キット(Bio-Rad 社)を使用し抽出。
- ⑨16SrDNA 遺伝子増幅のための PCR 反応は、LATAq DNA polymerase(宝酒造)により 50 μl 反応容量で Gene Amp 9700 thermal cycler(Applied Biosystems)を使用して実施。プライマーは以下を使用。  
12F(TTGATCCTGGCTCAGG)  
1540R(AAGGAGGTGATCCAGCC)  
PCR 条件は、95℃、3 分熱変性後、95℃、1 分(熱変性)→52℃、30 秒(アニーリング)→72℃、1 分(伸長反応)を 35 サイクルし、伸長反応 72℃、5 分。
- ⑩PCR 産物を PCR purification キット(QIAGEN)を使用し精製。
- ⑪DNA シークエンシングは BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems) と GeneAmp 9700 thermal cycler を使用。プライマーは 12F、1540R を使用し、PCR 条件は 95℃、1 分熱変性後、96℃、10 秒→50℃、5 秒→60℃、4 分を 25 サイクル。

- ⑫ DNA シークエンシング後の精製は Big Dye X Terminator purification kit を使用。  
⑬ 配列の決定は ABI PRISM 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) を使用。  
⑭ 配列解析後、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の BLAST プログラムにより相同性解析を行い同定。

### 3.3.2 16SrDNA 遺伝子配列の全配列解析による同定

16SrDNA 遺伝子配列の一部解析では同定しきれない株について、⑮の手順で行った。

- ⑮⑩で精製した PCR 産物について、以下のプライマーを使用して⑪～⑭の作業を行い、16SrDNA 遺伝子全配列を解析して同定。

12F (TTGATCCTGGCTCAGG)  
520F (ACCGCGGCTGCTGGC)  
1100F (GCAACGAGCGCAACCC)  
350R (CTGCTGCCTCCCGTAG)  
800R (CTACCAGGGTATCTAAT)  
1100R (AGGGTTGCGCTCGGTTG)  
1540R (AAGGAGGTGATCCAGCC)

### 3.3.3 種特異的 PCR による同定 (*Lactbacillus plantarum*/*pentosus*/*paraplantarum* の識別)

16SrDNA 遺伝子配列の全配列解析を行い、類似した菌種である「*Lactbacillus* 属の *plantarum*, *pentosus*, *paraplantarum* のどれか」という結果が出た株について、Trriani<sup>5)6)</sup>らの方法を元に⑯～⑳の手順で同定を行った。

- ⑯ recA 遺伝子増幅の為の PCR 反応は、⑧で抽出した DNA を使用し、LATAq DNA polymerase により 20  $\mu$  l 反応容量で GeneAmp 9700 thermal cycler を使用して実施。プライマーは以下を混合して使用。

pREV (TCGGGATTACCAAACATCAC)  
planF (CCGTTTATGCGGAACACCTA)  
pentoF (CAGTGGCGCGGTTGATATC)  
paraF (GTCACAGGCATTACGAAAA)

PCR 条件は熱変性 94°C, 3 分後, 94°C, 30 秒→54°C, 10 秒→72°C, 30 秒を 30 サイクルし、伸長反応 72°C 5 分。

- ⑰ PCR 産物を 2.0% アガロースゲル電気泳動 (100V, 20 分) し、バンドを検出。  
⑱ *plantarum* は 300bp, *pentosus* は 200bp, *paraplantarum* は 100bp にバンドが検出されることで判断し、同定。

### 3.3.4 種特異的 PCR による同定 (*Lactbacillus curvatus*/*sakei* の識別)

16SrDNA 遺伝子配列の全配列解析を行い、

「*Lactbacillus* 属の *curvatus* か *sakei* のどちらか」という結果が出た株について、Berthier<sup>7)</sup>らの方法を元に⑲～㉑の手順で同定を行った。

- ⑲ recA 遺伝子増幅の為の PCR 反応は、⑧で抽出した DNA を使用し、LATAq DNA polymerase により 20  $\mu$  l 反応

容量で GeneAmp 9700 thermal cycler を使用して実施。プライマーは、3' 側に 3' Lb. *sakei* (ATGAAACTATTAAATTGGTAC) を使用したものと 3' Lb. *cur* (TTGGTACTATTTAATCTTAG) を使用したものをそれぞれ使用し、5' 側はどちらも 5' Lb. *cur-sakei* (GCTGGATCACCTCCTTTC) を使用し、反応。

PCR 条件は熱変性 94°C, 3 分後, 94°C, 15 秒→53°C, 35 秒→68°C, 120 秒を 35 サイクルし、伸長反応 72°C 5 分。

- ⑳ PCR 産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動 (100V, 20 分) し、バンドを検出。

- ㉑ 200bp において 3' Lb. *sakei* のプライマーを使用した PCR 産物でバンドが出れば *Lactbacillus sakei* と推定し、3' Lb. *cur* のプライマーを使用した PCR 産物でバンドが出れば *Lactbacillus curvatus* と同定。

## 4 結果及び考察

### 4.1 白菜及び県内の漬物製品からの菌の採取

茨城県産黄真白菜、県内の漬物としてキムチ 2 点、糠床 2 点、ラッキョウ下漬け 5 点、キュウリ古漬け 1 点から計 73 株を採取した。

### 4.2 スクリーニング検討

27 株についてスクリーニングを行った (表 1 スクリーニング結果)。乳酸菌はグラム陽性、カタラーゼ試験陰性菌である。カタラーゼ試験陽性菌で乳酸菌に該当しない菌が 3 株 (HY3, HY5, HY6) あった。

### 4.3 遺伝子解析による菌種同定手法の検討

#### 4.3.1 16SrDNA 遺伝子配列の一部解析による同定

全ての株で属の同定をすることができた。27 株中 24 株が乳酸菌であった (表 1)。ほとんどが乳酸菌であったのは、漬け込み後時間の経過した漬物はすでに優先菌が乳酸菌になっていることが多いこと。さらに菌の採取 (3.1) において乳酸菌の性質である嫌気培養で増殖し酸を生成する菌のみを採取したためと考えられた。

種の同定については乳酸菌 24 株中 8 株の同定ができた (*Lactbacillus sakei* 5 株, *Leuconostoc mesenteroides* 1 株, *Leuconostoc carnosum* 1 株, *Enterococcus sulfureus* 1 株)。

#### 4.3.2 16SrDNA 遺伝子配列の全配列解析による同定

16SrDNA 遺伝子配列の一部解析による同定では菌種を決定できなかった株について、16SrDNA 遺伝子全配列を解析した。その結果、さらに 2 株 (*Leuconostoc carnosum* 1 株, *Leuconostoc lactis* 1 株) を同定することができたが、*Lactbacillus* 属菌 13 株, *Enterococcus* 属菌 1 株は複数の候補が残ったままであった。

### 4.3.3 種特異的 PCR による同定 (*Lactbacillus plantarum*/*pentosus*/*paraplantarum* の識別)

*Lactbacillus* 属菌は同定できていない株が多いことから、種特異的 PCR 法によりさらに絞り込みを行った。12 株について実施し、*Lactbacillus plantarum* 5 株、*Lactbacillus pentosus* 7 株を同定できた。

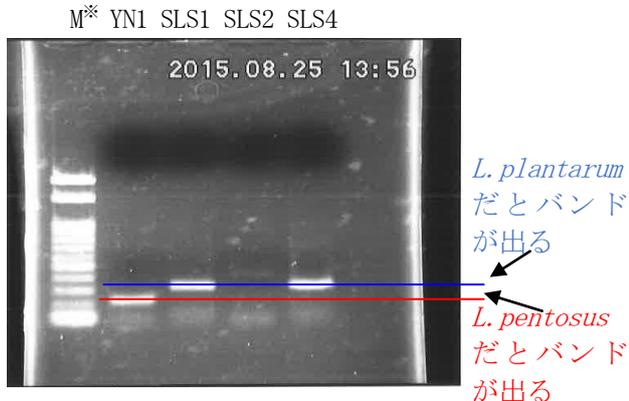
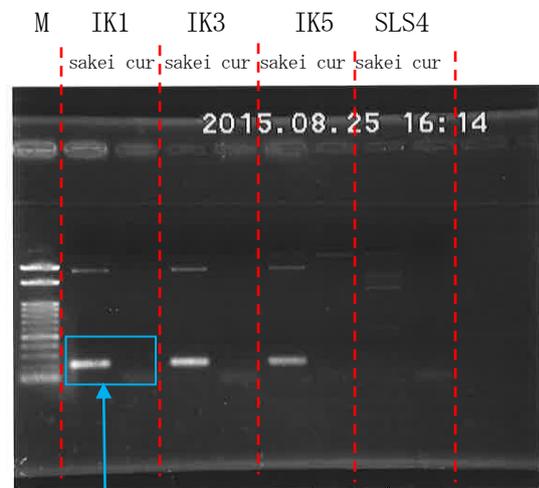


図4 種特異的 PCR (*Lactbacillus plantarum*/*pentosus*/*paraplantarum* の識別)  
※M: マーカー

### 4.3.4 種特異的 PCR による同定 (*Lactbacillus curvatus*/*sakei* の識別)

*Lactbacillus* 属の *curvatus* か *sakei* のどちらかという結果が出た 1 株について実施し、*Lactbacillus sakei* と同定できた。さらに、16SrDNA 遺伝子配列の全配列解析により既に *Lactbacillus sakei* であると同定できていた 5 株についても実施したところ、種特異的 PCR でも同じ結果となった。

以上により、採取した乳酸菌 24 株について 23 株の菌種を同定でき、1 株については属レベルでの同定をすることができた(表1 遺伝子解析結果)。



左側にバンドが出れば *sakei*  
右側にバンドが出れば *curvatus*  
どちらにも出なければ別の菌種  
図5 種特異的 PCR  
(*Lactbacillus curvatus*/*sakei* の識別)

### 4.3.5 スクリーニング結果と遺伝子解析結果の比較

スクリーニングで乳酸菌ではないという結果が出た 3 株 (HY3, HY5, HY6) は、遺伝子解析の結果で乳酸菌でない *Aerococcus Viridans* という結果となった(表1)。グラム染色、カタラーゼ試験は遺伝子解析前のスクリーニングとして有効であることが確認できた。ガス発生試験、形態観察の結果は遺伝子解析結果で同定された菌が有する性質<sup>8)</sup>と一致しており、遺伝子解析結果を補完できると考えられた(厳密には糖類発酵試験等も併せて行う必要がある)。

以上により、白菜、漬物製品からの乳酸菌収集・同定手法を決定することができた(図6)。

表1 スクリーニングと遺伝子解析結果

菌株名*	スクリーニング結果				遺伝子解析結果
	グラム染色	カタラーゼ	ガス発生	形態観察	
IK1	陽性	陰性	無し	桿菌	<i>Lactbacillus sakei</i>
IK3	陽性	陰性	無し	桿菌	
IK5	陽性	陰性	無し	桿菌	
IK7	陽性	陰性	無し	桿菌	
IK8	陽性	陰性	無し	桿菌	
SLS2	陽性	陰性	無し	桿菌	
IK2	陽性	陰性	有り	球菌	<i>Leuconostoc carnosum</i>
IK4	陽性	陰性	有り	球菌	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
IK6	陽性	陰性	有り	球菌	
SLS1	陽性	陰性	無し	桿菌	<i>Lactbacillus plantarum</i>
SLS3	陽性	陰性	無し	桿菌	
SLS4	陽性	陰性	無し	桿菌	
SLS5	陽性	陰性	無し	桿菌	
SLS6	陽性	陰性	無し	桿菌	
YN1	陽性	陰性	無し	桿菌	
YN2	陽性	陰性	無し	桿菌	
YN3	陽性	陰性	無し	桿菌	
YN4	陽性	陰性	無し	桿菌	
YN5	陽性	陰性	無し	桿菌	
YN6	陽性	陰性	無し	桿菌	
YN8	陽性	陰性	無し	桿菌	
HY1	陽性	陰性	有り	球菌	<i>Leuconostoc lactis</i>
HY2	陽性	陰性	無し	球菌	<i>Enterococcus sulfureus</i>
HY3	陽性	陽性	無し	球菌	<i>Aerococcus Viridans</i> (乳酸菌でない)
HY5	陽性	陽性	無し		
HY6	陽性	陽性	無し		
HY4	陽性	陰性	無し	球菌	<i>Enterococcus Plantarum/haemoperoxidus</i>

※IK: キムチ由来, SLS: ラッキョウ下漬け由来,  
YN: ぬか漬け由来, HY: 白菜由来

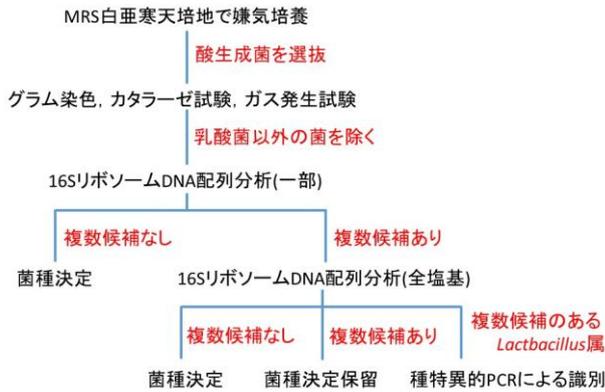


図6 乳酸菌の採取・同定手順

### 5. まとめ

1. 茨城県産黄真白菜，県内の古漬け製品から73株の菌を採取した。
2. 27株についてスクリーニング，遺伝子解析による同定を行った結果，24株が乳酸菌であった。
3. 乳酸菌の収集・同定手法を決定した。

### 6. 今後の課題

本研究で決定した菌種同定方法により，来年度はさらに多くの漬物から乳酸菌を採取予定である。

### 7. 謝辞

遺伝子解析に関する研究は，国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所が実施する依頼研究員制度を利用して研究を行いました。応用微生物研究領域 酵母ユニットの皆様には感謝いたします。

本研究は，文部科学省の特別電源所在県科学技術振興事業補助金により行ったものです。

### 8. 参考文献等

- 1) 茨城県工業技術センター研究報告 vol141, 13 (2012)
- 2) 茨城県工業技術センター研究報告 vol142, 25 (2013)
- 3) 茨城県工業技術センター研究報告 vol143, 25 (2014)
- 4) 佐藤留美, 蒲生卓磨, 島純, 河本伸一: 食総研報 No. 66, 9(2002)
- 5) Trriani, S., Felis, G. E. and Dellaglio: Appl. Environ. Microbiol., 66, 9(2000)
- 6) 鈴木チセ:平成20年度農林水産省補助事業(食品産業クラスター展開事業)食品機能栄評価マニュアル集第Ⅲ集 社団法人食品科学工学会, 41
- 7) Berthier, F. and Ehrlich, S. D.: Int. J. Syst. Bacteriol., 49, 997(1999)
- 8) 小崎道雄監修, 内村泰, 岡田早苗: 乳酸菌実験マニュアル(朝倉書店)127(1992)