

漬物の発酵に由来する香りの研究（第5報）

—発酵試験に使用する乳酸菌の収集—

岩佐 悟* 吉浦 貴紀*

1. はじめに

第1報から第3報^{1,2,3)}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⁴⁾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

今年度は、スターターとして使用する乳酸菌の収集・同定を行った。

3. 実験方法

3.1 白菜及び県内の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(三菱ガス化学株式会社)を使用して 30°C 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。
- 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°C、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°C、24 時間嫌気培養して純化し、マイクロバンク(イワキ株式会社)を使用して-60°Cで保存。

3.2 スクリーニング

3.1 で採取した株について形態・生理的性質を調べ、乳酸菌とは異なる性質を持つ菌を除いた。

- ①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。
- ②グラム染色後に顕微鏡観察して判定し、形態観察を行う。
- ③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)。

3.3 遺伝子解析による菌種同定

3.3.1 16SrDNA 遺伝子配列解析による同定

既報⁴⁾では初めに配列の一部を解析し、同定しきれなかった株について改めて全配列を解析していたが、今年度はプライマーの種類を調整し、最初から全配列

を解析することとした。また、H27 年度は遺伝子解析部分の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（現 食品研究部門）で行ったが、今年度は工業技術センターで行い、設備が一部異なったために方法を変更した(図1)。

- ①菌体からの DNA 抽出は InstaGene Matrix キット (Bio-Rad 社) を使用し行った。
- ②16SrDNA 遺伝子増幅のための PCR 反応は、LATAq DNA polymerase(宝酒造)により 50 μ l 反応容量で Gene Amp 9700 thermal cycler (Applied Biosystems) を使用して行った。プライマーは以下を使用した。
12F (TTGATCCTGGCTCAGG)
1540R (AAGGAGGTGATCCAGCC)
PCR 条件は、95°C、3 分熱変性後、95°C 1 分(熱変性)→52°C 30 秒(アニーリング)→72°C 1 分(伸長反応)を 35 サイクルし、さらに 72°C 5 分の伸長反応を行った。
- ③PCR 産物の精製は PCR purification キット (QIAGEN) を使用して行った。
- ④DNA シークエンシング及びエタノール沈殿は Genomlab Dyerterminator Cycle Sequencing with Quick Start kit (BECKMAN COULTER) により GeneAmp 9700 thermal cycler を使用して行った。プライマーは PCR 反応で使用した 12F、1540R 及び 1100R (AGGGTTGCGCTCGGTTG) を使用し、PCR 条件は 96°C 20 秒→50°C 20 秒→60°C 4 分を 30 サイクルした。
- ⑤配列の決定は CEQ8000 (BECKMAN COULTER) を使用して行った。
- ⑥配列解析、結合(アッセンブル)は GENETYX 遺伝子情報処理ソフトウェア (株式会社ゼネティックス) を使用して行った。
- ⑦National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST プログラムにより相同性解析を行い、簡易同定を行った。

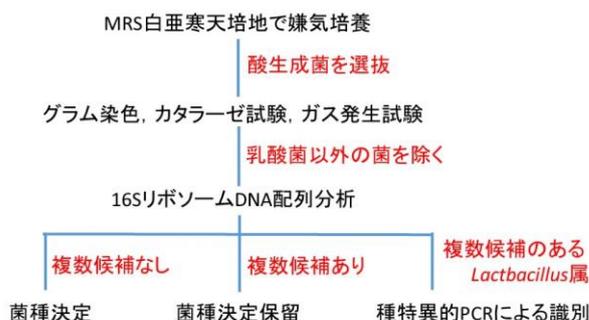


図1 乳酸菌の採取・同定手順

*食品バイオ部門

3.3.2 種特異的 PCR による同定

既報⁴⁾の手順によりラクトバチルス属菌の同定を行った。

4. 研究結果及び考察

4.1 白菜及び県内の漬物製品からの菌の採取

平成 27 年度より茨城県産黄真白菜, 県内の漬物製品としてキムチ 4 点, 白菜下漬け 3 点, 糠床 2 点, ラッキョウ下漬け 5 点, 胡瓜古漬け 1 点, ナス浅漬け 1 点, 瓜の鉄砲漬け 1 点から 102 株を採取した。

ラッキョウ下漬けについて, 漬け込み 1 週間後では白亜 MRS 培地菌で 10⁵CFU/g 検出されたが, 漬け込みから 3 か月以上経過しているラッキョウではほとんど検出されなかった (300CFU/g 以下)。好塩菌が増殖している可能性を考え, NaCl を 10% 添加した白亜 MRS 培地にて 30℃ で 7 日間嫌気培養すると 10³~10⁴CFU/g 検出された。

奈良漬け, 梅干しからも菌の採取を試みたが, 採取できなかった。

4.2 スクリーニング

採取した 102 株中 86 株についてスクリーニングを行った。カタラーゼ試験 (図 2) により, 乳酸菌でない (カタラーゼ試験陽性) と判定した菌が 18 株あり, 残りの 68 株を遺伝子解析することとした。



図 2 カタラーゼ試験

(左: 発泡なし (陰性) 右: 発泡あり (陽性))

4.3 遺伝子解析による菌種同定

遺伝子解析を行った 68 株は全て乳酸菌であった。このうち, 59 株は菌種まで同定でき, 9 株は属レベルでの同定をすることができた。15 菌種 68 株の乳酸菌を収集した (表 1)。

キムチについては, 製造 3 日目までの製品から採取すると *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc carnosum* が主体であり, 製造 1 週間以上経過した製品からは *Lactobacillus sakei* が採取された。一般的に *Leuconostoc mesenteroides* が漬け込み初期に現れ, *Lactobacillus* 属乳酸菌が後期に現れることが知られており⁵⁾, 今回の結果と挙動が一致していた。

ラッキョウでは漬け込み 1 週間後では *Lactobacillus plantarum* が採取され, 漬け込み 3 か月以上では *Lactobacillus acidipiscis*, *Lactobacillus acidifarinae* (または *namurensis*) が採取された。

表 1 採取した乳酸菌

菌種	由来サンプル (採取株数)
<i>Lactobacillus sakei</i>	キムチ (7 株)
	ラッキョウ下漬け (1 株) 白菜下漬け (5 株)
<i>Lactobacillus brevis</i>	胡瓜古漬け (2 株)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ラッキョウ下漬け (5 株)
	胡瓜古漬け (2 株)
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	ラッキョウ下漬け (3 株)
<i>Lactobacillus acidifarinae</i> または <i>namurensis</i>	ラッキョウ下漬け (8 株)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	ぬか漬け (7 株)
	ラッキョウ下漬け (1 株)
<i>Leuconostoc carnosum</i>	キムチ (4 株)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	キムチ (7 株)
	ナス浅漬け (4 株)
	ラッキョウ下漬け (1 株)
<i>Leuconostoc citreum</i>	ラッキョウ下漬け (2 株)
<i>Leuconostoc lactis</i>	白菜 (1 株)
<i>Enterococcus sulfureus</i>	白菜 (1 株)
<i>Enterococcus plantarum</i> または <i>haemoperoxidus</i>	白菜 (1 株)
	鉄砲漬け (1 株)
<i>Pediococcus parvulus</i>	ラッキョウ下漬け (4 株)
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	胡瓜古漬け (1 株)

5. まとめ

1. 茨城県産黄真白菜, 県内の漬物製品から 102 株の菌を採取した。
2. 86 株についてスクリーニングを行い, 乳酸菌と思われる 68 株を選抜した。
3. 15 菌種 68 株の乳酸菌を収集した。

6. 今後の課題

- ・来年度は収集した乳酸菌を使用し, 菌種による香気成分の違いを明らかにする。
- ・乳酸菌の種類及び発酵条件を制御することによる香りの生成技術を確認し, 安定して好ましい香りのする漬物製品の開発を可能にする。
- ・漬物の香りを向上させる乳酸菌の選抜とスターターの製品化を目指す。

8. 参考文献等

- 1) 岩佐悟ら, 漬物の発酵に由来する香りの研究 (第 1 報) 茨城県工業技術センター研究報告 第 41 号, p13-16 (2012)
- 2) 岩佐悟ら, 漬物の発酵に由来する香りの研究 (第 2 報) 茨城県工業技術センター研究報告 第 42 号, p25-28 (2013)
- 3) 岩佐悟ら, 漬物の発酵に由来する香りの研究 (第 3 報) 茨城県工業技術センター研究報告 第 43 号, p25-28 (2014)
- 4) 岩佐悟ら, 漬物の発酵に由来する香りの研究 (第 4 報) 茨城県工業技術センター研究報告 第 44 号, p29-32 (2015)
- 5) 好井久雄ら: 食品微生物学 (技法堂出版) 227 (1988)