

焼酎もろみ中の乳酸菌同定

竹下 淳子*¹・工藤 哲三*²・山本 英樹*²・水谷 政美*²・柏田 雅徳*²

Identification of Lactic Acid Bacteria in Shochu Mash

Junko TAKESHITA, Tetsuzo KUDO, Hideki YAMAMOTO,
Masami MIZUTANI and Masanori KASHIWADA

焼酎もろみから乳酸菌を分離し、65株を選定した。そのすべてについて遺伝子解析と生理試験から同定を試みた。16S rDNA解析により、65株中の多くが、*Lactobacillus paracasei ssp. tolerans* または *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*と相同性が高いことが認められた。

キーワード：焼酎もろみ、乳酸菌、遺伝子解析、糖類発酵性

1 はじめに

これまで、焼酎もろみから乳酸菌を分離して、65株を選定した¹⁾。本研究では、16S rDNA解析と生理試験から同定を試みた。16S rDNA解析で分離株65株と相同性が高かったのは11菌種であった。今回は、そのType strain（標準株）の生理試験も行い、分離株の試験結果と比較した。

2 実験方法

2-1 同定した菌株

焼酎もろみからの分離株65株とType strain 11株。表1にType strainを示す。

表1 Type strain

JCM 1059	<i>Lactobacillus brevis</i>
JCM 1115	<i>Lactobacillus buchneri</i>
JCM 1149	<i>Lactobacillus plantarum</i>
JCM 1155	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
JCM 1162	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
JCM 1171	<i>Lactobacillus paracasei ssp. tolerans</i>
JCM 1173	<i>Lactobacillus fermentum</i>
JCM 1558	<i>Lactobacillus pentosus</i>
JCM 5889	<i>Pediococcus parvulus</i>
JCM 8130	<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i>
JCM 8797	<i>Pediococcus acidilactici</i>

*1 非常勤職員

*2 応用微生物部

2-2 16S rDNA解析による同定

分離株の菌体をMilli-Q水で洗浄後、Bio-Rad InstaGene Matrixを用いてゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNAを鋳型として、PCRにより16S rDNAの5'-末端側の約500bpを増幅し、塩基配列をシーケンスして解析した。

PCRからサイクルシーケンスまでの操作は、Applied Biosystems社のプロトコル(P/N 4308132 Rev.B)に従った。PCR、サイクルシーケンスにはGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, U.S.)、DNAシーケンスにはABI PRISM 310™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems, U.S.)を使用した。

相同性検索、系統樹作成には、MicroSeq™ Microbial Identification System Software v1.4.3を用い、照合検索にはMicroSeq™ Bacterial 500 Library v.0023 (Applied Biosystems, U.S.)を用いた。

2-3 グラム反応、カタラーゼ試験

簡便法²⁾を用いてグラム反応試験、カタラーゼ試験を行った。

グラム反応試験は、3%水酸化カリウム水溶液1滴に菌体1白金耳量取ってよくかき混ぜた。持ち上げたとき粘性を帯びて糸を引くものをグラム陰性、サラサラと溶解して糸を引かないものをグラム陽性と判定した。

カタラーゼ試験は、菌体1白金耳量に3%過酸化水素水を滴下した。このとき菌体から気泡を発生するものを陽性、発生しないものを陰性とした。

2-4 グラム染色、形態観察

グラム染色（和光純薬工業、グラム染色液neo-B&Mワコー）後、顕微鏡にて形態観察を行った。

2-5 発酵形式（glucoseからのガス発生）

ダーラム管を入れたGYP液体培地に分離株の培養液を接種し、30°Cで培養した。

ダーラム管に発生するガスを観察した。

2-6 糖類発酵性による同定

Apiキット（BIOMERIEUX）を用い、30°C（JCM1112、1115、1173は37°C）で48時間培養後、培地の色の変化を見た。同定はApi webにて行った。判定が不明瞭なものについては、CaCO₃、各糖添加の寒天平板培地で再試（各菌株の培養液を寒天培地へ穿刺し、CaCO₃の溶解環を見る³⁾）を行った後、Bergey's Manual⁴⁾での同定も試みた。

3 実験結果

3-1 16S rDNA解析による同定結果

表2に16S rDNA解析による同定結果を示す。65株のうち、その多くが*Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* または *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* と相同性が高いことが認められた。

3-2 グラム反応、カタラーゼ試験

選択した65株、Type strain 11株のすべてがグラム陽性、カタラーゼ陰性であった。

3-3 グラム染色、形態観察

選択した65株、Type strain 11株のすべてがグラム陽性であった。分離株4株（L'M-2、LM-2、LG-1、LG-3）とType strain 2株（JCM 5889、8797）が球菌（0.9 μm）で、残りはすべて桿菌（0.45 μm × 0.9 μm）であった。

3-4 発酵形式（glucoseからのガス発生）

選択した65株中、24株がglucoseからガスを発生させ、41株がガスを発生させなかった。

Type strain 11株中、5株がglucoseからガスを発生させ、6株がガスを発生させなかった。

表2 16S rDNA解析による同定結果

<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	18株
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> または <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	12株
<i>Lactobacillus buchneri</i>	4株
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	3株
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1株
<i>Lactobacillus pentosus</i>	1株
<i>Lactobacillus plantarum</i> または <i>Lactobacillus pentosus</i>	4株
<i>Lactobacillus fermentum</i>	3株
<i>Lactobacillus brevis</i>	5株
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	3株
<i>Pediococcus acidilactici</i>	1株
<i>Pediococcus parvulus</i>	3株
未同定	7株

3-5 糖類発酵性による同定

表3に分離株65株とType strainのApiキットでの糖類発酵性を示す。+は陽性、-は陰性、?は判定が不明瞭だったことを示す。菌の増殖が遅いものもあり、Apiキットでの、一様に48時間の培養時間で判定するのは難があると感じた。培地の色の変化（青色から黄色）を見て判定するのだが、黄緑色のものも多数あり、どの色までを黄色（陽性）と判定するのかの判断が難しい。

表4に分離株65株とType strainの寒天平板培地での再試結果を示す。+は陽性（CaCO₃の溶解環が認められたもの）、-は陰性（CaCO₃の溶解環が認められなかったもの）、±は微陽性（CaCO₃の溶解環がわずかに認められたもの）を示す。

表5にType strainのApiキットでの同定結果を示す。JCM 1112、1155、1162、1171、5889はApi webのデータベースにないため、このような同定結果となった。

表6に分離株の16S rDNA解析、Apiキット、Bergey's Manualでの同定結果を示す。

表3 Apiキットでの糖類発酵性

Table with 50 columns (1-50) and 100+ rows. Columns 1-10 list sugar types (Glycerol, Erythritol, D Arabinose, L Arabinose, Ribose, D Xylose, L Xylose, Adonitol, beta-Methyl-D Xyloside, Galactose, Glucose, Fructose, Mannose, Sorbose, Rhamnose, Dulcitol, Inositol, Mannitol, Sorbitol, alpha-Methyl-D Mannoside, alpha-Methyl-D Glucoside, N Acetyl Glucosamine, Amygdalin, Arbutin, Esculin, Salicin, Cellobiose, Maltose, Lactose, Melibiose, Sucrose, Trehalose, Inulin, Melezitose, Raffinose, Starch, Glycogen, Xylitol, Gentioibiose, D Lyxose, D Turanose, D Tagatose, D Fucose, L Fucose, D Arabinol, L Arabinol, Guaconate, 2 Keto-gluconate, 5 Keto-gluconate, Contorol). Rows list various samples (e.g., AM-1, AG-1, BM-1, BG-1, DG-1, GM-1, GG-1, L'M-2, L'G-1, MM-1, MG-1, LM-1, JMN) and their fermentation results (e.g., +, -, ?, -).

表 4 糖類発酵性 (寒天平板培地での再試)

		Amygdalin	Arabinose	Cellulose	Esculin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melzitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose
1	AM-1	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
2	2	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
3	3	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
4	4	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
5	4'	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
6	AG-1	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
7	2	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
8	3	-	+	-	-	+	+	+	±	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	±	-	+
9	4	-	-	-	+	+	+	+	±	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
10	BM-1	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
11	2	-	+	-	-	+	+	+	±	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
12	3	-	+	-	-	+	+	+	±	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
13	4	-	+	-	-	+	+	+	±	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
14	BG-1	-	±	-	-	+	+	+	±	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
15	2	-	+	-	-	+	-	+	±	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
16	3	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	±	+	-
17	4	+	-	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
18	5	-	+	-	-	+	+	+	±	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19	6	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
20	7	-	-	+	+	+	+	+	±	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
21	8	+	-	+	+	+	+	+	±	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
22	DM-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
23	3	-	+	-	-	+	+	+	±	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
24	DG-1	+	-	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
25	2	-	+	-	-	+	+	+	±	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
26	3	+	-	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
27	4	-	-	-	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
28	5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
29	GM-1	-	-	-	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
30	2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
31	3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
32	4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
33	GG-1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
34	2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
35	3	-	+	-	-	-	+	+	±	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
36	4	-	+	-	-	+	+	+	±	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
37	5	-	-	-	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
38	6	+	-	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
39	IM-1	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
40	2	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
41	3	-	+	-	-	+	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
42	4	-	+	-	-	+	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
43	IG-1	-	-	-	-	+	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
44	2	-	-	-	-	+	-	+	±	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
45	4	-	-	-	-	+	-	+	±	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
46	JM-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
47	L'M-2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
48	L'G-1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
49	3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
50	MM-1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
51	2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
52	MG-1	-	-	+	+	+	+	+	±	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
53	2	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-

		Amygdalin	Arabinose	Cellulose	Esculin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melzitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose
54	LM-1	-	+	-	-	+	+	+	±	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
55	2	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
56	3	+	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
57	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
58	5	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
59	6	-	+	-	-	+	+	+	±	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
60	7	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-
61	LG-1	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
62	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
63	3	-	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
64	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
65	5	-	+	-	-	+	+	+	±	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
JCM	1059	-	+	-	-	+	+	+	±	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
	1112	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	1115	-	+	-	-	+	+	+	±	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
	1149	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	1155	-	-	-	-	+	+	+	±	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
	1162	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	1171	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1173	-	-	-	-	+	+	+	±	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
	1558	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	5889	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8130	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
	8797	-	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+

表5 Type strain のApiキットでの同定結果

	菌株名	Apiキットによる同定
JCM	1059 <i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i> 3
	1112 <i>L. reuteri</i>	<i>L. fermentum</i>
	1115 <i>L. buchneri</i>	<i>L. buchneri</i>
	1149 <i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> 1
	1155 <i>L. hilgardii</i>	<i>L. brevis</i> 3
	1162 <i>L. parabuchneri</i>	<i>L. buchneri</i>
	1171 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. heleveticus</i>
	1173 <i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
	1558 <i>L. pentosus</i>	<i>L. pentosus</i>
	5889 <i>P. parvulus</i>	<i>P. damnosue</i> 2
	8130 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 3
	8797 <i>P. acidilactici</i>	<i>P. acidilactici</i>

表6 分離株の同定結果

	16S rDNA解析による同定	Apiキットによる同定	Bergey's Manual による同定
1	AM-1 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 3	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
2	2 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 3	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
3	3 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 3	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
4	4 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 2	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
5	4' <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 2	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
6	AG-1 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
7	2 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> または <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 2	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
8	3 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. brevis</i> 3	<i>L. brevis</i>
9	4 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> または <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 2	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
10	BM-1 <i>L. buchneri</i>	<i>L. brevis</i> 3	同定不能
11	2 <i>L. parabuchneri</i>	<i>L. buchneri</i>	同定不能
12	3 <i>L. parabuchneri</i>	<i>L. buchneri</i>	同定不能
13	4 <i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
14	BG-1 <i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
15	2 <i>L. fermentum</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. fermentum</i>
16	3 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. plantarum</i> 1	<i>L. agilis</i>
17	4 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
18	5 <i>L. parabuchneri</i>	<i>L. buchneri</i>	同定不能
19	6 <i>L. buchneri</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. buchneri</i>
20	7 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 2	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
21	8 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 2	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
22	DM-1 <i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> 1	<i>L. plantarum</i>
23	3 未同定	<i>L. brevis</i> 3	<i>L. brevis</i>
24	DG-1 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
25	2 未同定	<i>L. brevis</i> 3	<i>L. brevis</i>
26	3 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> または <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
27	4 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
28	5 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> または <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
29	GM-1 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> または <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1,2	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
30	2 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> または <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1,2	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
31	3 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> または <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1,2	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
32	4 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> または <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1,2	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
33	GG-1 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> または <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1,2	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
34	2 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> または <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1,2	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
35	3 <i>L. buchneri</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. buchneri</i>
36	4 <i>L. buchneri</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. buchneri</i>
37	5 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> または <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1,2	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>
38	6 <i>L. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> または <i>paracasei</i>	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	<i>L. agilis</i>
39	IM-1 <i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i> 3	<i>L. brevis</i>
40	2 <i>L. hilgardii</i>	<i>L. brevis</i> 3	<i>L. fructivorans</i>
41	3 未同定	<i>L. brevis</i> 3	<i>L. fructivorans</i>
42	4 未同定	<i>L. brevis</i> 3	<i>L. fructivorans</i>

	16S rDNA解析による同定	Apiキットによる同定	Bergey's Manual による同定
43	IG-1 未同定	<i>L. brevis</i> 3	<i>L. fructivorans</i>
44	2 <i>L. hilgardii</i>	<i>L. brevis</i> 3	<i>L. hilgardii</i>
45	4 <i>L. hilgardii</i>	<i>L. brevis</i> 3	<i>L. hilgardii</i>
46	JM-1 <i>L. pentosus</i>	<i>L. plantarum</i> 1	<i>L. plantarum</i>
47	L'M-2 <i>P. acidilactici</i>	<i>P. pentosaceus</i> 1	同定不能
48	L'G-1 <i>L. paracasei ssp. tolerans</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> 2	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>
49	3 <i>L. paracasei ssp. tolerans</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> 2	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>
50	MM-1 未同定	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> 1	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>
51	2 <i>L. paracasei ssp. tolerans</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> 1	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>
52	MG-1 <i>L. paracasei ssp. tolerans</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> 2	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>
53	2 未同定	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i> 1	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>
54	LM-1 <i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i> 3	<i>L. brevis</i>
55	2 <i>P. parvulus</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. acidilactici</i>
56	3 <i>L. plantarum</i> または <i>pentosus</i>	<i>L. plantarum</i> 1	<i>L. plantarum</i>
57	4 <i>L. plantarum</i> または <i>pentosus</i>	<i>L. plantarum</i> 1	<i>L. plantarum</i>
58	5 <i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i> 3	<i>L. brevis</i>
59	6 <i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i> 3	<i>L. brevis</i>
60	7 <i>L. paracasei ssp. tolerans</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. paracasei ssp. paracasei</i>
61	LG-1 <i>P. parvulus</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. acidilactici</i>
62	2 <i>L. plantarum</i> または <i>pentosus</i>	<i>L. plantarum</i> 1	<i>L. plantarum</i>
63	3 <i>P. parvulus</i>	<i>P. acidilactici</i>	<i>P. acidilactici</i>
64	4 <i>L. plantarum</i> または <i>pentosus</i>	<i>L. plantarum</i> 1	<i>L. plantarum</i>
65	5 <i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i> 3	<i>L. brevis</i>

4 まとめ

焼酎もろみからの分離株65株について同定、生理試験を行った。

- 1) 65株すべてがグラム陽性、カタラーゼ陰性であった。
- 2) 65株中、4株 (L'M-2、LM-2、LG-1、LG-3) が球菌 (0.9 μm) で、残りはすべて桿菌 (0.45 μm × 0.9 μm) であった。
- 3) 65株中、24株がglucoseからガスを発生させ、41株がガスを発生させなかった。
- 4) 16SrDNA解析の結果、65株中、*Lactobacillus* 属が54株、*Pediococcus*属が4株であった。
- 5) 16S rDNA解析の結果、65株中、多くが *Lactobacillus paracasei ssp. tolerans* または *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* と同一性が高いことが認められた。
- 6) 16S rDNA解析による同定結果と糖類発酵性からの同定結果とは必ずしも一致せず、乳酸菌の同定法についてはまだ課題が残る。

5 参考文献

- 1) 竹下淳子他, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 49, p127 (2004)
- 2) 伊藤武; 食品衛生物の簡便迅速測定法はここまで変わった!, サイエンスフォーラム, p 229-230 (2002)
- 3) 小崎道雄, 内村泰, 岡田早苗; 乳酸菌実験マニュアルー分離から同定までー, 朝倉書店p99-100 (1992)
- 4) Bergey, D.H., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2, Williams & Wilkins, p1209-1234 (1986)