

## 県内発酵食品から分離した乳酸菌\*

高山 清子\*<sup>1</sup>・水谷 政美\*<sup>1</sup>・山本 英樹\*<sup>1</sup>・越智 洋\*<sup>1</sup>・長友 絵美\*<sup>2</sup>・工藤 哲三\*<sup>1</sup>

### Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Food

Kiyoko TAKAYAMA, Masami MIZUTANI, Hideki YAMAMOTO, Hiroshi OCHI, Emi NAGATOMO  
and Tetsuzo KUDO

県内の焼酎製造場、醤油製造場、漬物製造工場で採集した試料から乳酸菌の分離を試みた。分離した乳酸菌は 16S rDNA 解析を行った。その結果、分離源の違いにより様々な菌が確認された。また、下漬けたくあんにおいて、製造法の違いによる乳酸菌相の違いが確認された。

キーワード：乳酸菌，ソバ焼酎もろみ，たくあん，醤油もろみ

#### 1 はじめに

これまで焼酎もろみから乳酸菌を分離して、その特性について調べてきた<sup>1-5)</sup>。

今回はこれまでに調査をしていないソバ焼酎もろみについて乳酸菌の分離、分類を試みた。

また、本県の特産品であるたくあんの下漬けや醤油もろみ中の乳酸菌についても調査した。

#### 2 実験方法

##### 2-1 発酵食品からの乳酸菌の分離および計測

乳酸菌の分離および計測には、炭酸カルシウムを 0.5%、シクロヘキシミドとアジ化ナトリウムをそれぞれ 10ppm となるように添加した MRS 培地(Difco 社製)を使用した<sup>6)</sup>。0.05%トリトン X 水溶液にて適宜希釈した希釈液を 100  $\mu$ L 塗抹し、嫌気ジャーにて 30  $^{\circ}$ C 48 時間培養した。コロニーの周りにハローを形成したものを乳酸菌とした。

##### 2-2 分離した乳酸菌の16S rDNA解析による分類

分離した乳酸菌は純粋培養後、DNA を抽出した。乳酸菌の DNA 抽出は、InstaGene<sup>TM</sup> Matrix (BIO-RAD 製) を用いた<sup>5)</sup>。PCR からサイクルシーケンスまでの操作は、Applied Biosystems 社の

プロトコルに従った。PCR、サイクルシーケンスには GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, U.S.製)、DNA シーケンスには ABI PRISM 310<sup>TM</sup> Genetic Analyzer(Applied Biosystems, U.S.製)を使用した。

#### 3 結果および考察

##### 3-1 ソバ焼酎もろみ中の乳酸菌

ソバ焼酎一次もろみと二次もろみ中の乳酸菌数、分離株と菌株数を表 1 に示した。ソバ焼酎一次もろみ中の乳酸菌数は 0 ~ 6.3  $\times$  10<sup>2</sup>CFU/mL であり、分離した乳酸菌は全て *Lactobacillus plantarum/pentosus* (以後 *Lb.plantarum/pentosus* と表記)であった。一方、ソバ焼酎二次もろみ中の乳酸菌数は 30~90CFU/mL と少なく、分離した乳酸菌は *Lb.plantarum/pentosus* 3 株、*Lb.paracasei* 3 株、*Lb.brevis* 2 株であった。

表 1 ソバ焼酎もろみ中の乳酸菌

分離源	乳酸菌数(CFU/mL)	分離株	株数
ソバ一次もろみ	0~6.3 $\times$ 10 <sup>2</sup>	<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	5
		<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	3
ソバ二次もろみ	30~90	<i>Lactobacillus paracasei</i>	3
		<i>Lactobacillus brevis</i>	2

##### 3-2 下漬け干したくあん中の乳酸菌

宮崎県干したくあん研究会の参加企業 10 社より、約 1 年間下漬けした干したくあんを採取し乳

\* 有用乳酸菌を利用した発酵技術の開発

\* 1 応用微生物部 \* 2 食品開発部

酸菌の分離を試みた。10社中8社のサンプルから乳酸菌を分離し、遺伝子解析を行った(表2)。8社中6社が冷蔵で下漬けを実施しており、*Lb.sakei sakei*が多く検出された。一方、2社は地下タンクによる下漬けを行っており、様々な乳酸菌が検出された。

表2 下漬け干したくあん中の乳酸菌

漬物製造場	漬け方	分離株	株数
A	地下タンク	<i>Lactobacillus curvatus curvatus</i>	1
		<i>Lactobacillus pentosus</i>	1
		<i>Lactobacillus farciminis</i>	1
		<i>Lactobacillus coryniformis coryniformis</i>	1
B	地下タンク	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	1
C	冷蔵	<i>Lactobacillus sakei sakei</i>	2
D	冷蔵	<i>Lactobacillus sakei sakei</i>	2
		<i>Lactobacillus coryniformis coryniformis</i>	1
E	冷蔵	<i>Lactobacillus sakei sakei</i>	2
F	冷蔵	<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	1
G	冷蔵	<i>Lactobacillus sakei sakei</i>	2
H	冷蔵	<i>Lactobacillus sakei sakei</i>	2
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1

### 3-3 醤油もろみ中の乳酸菌

県内の醤油製造場より、仕込みから約2ヶ月経過した醤油もろみを採取し、乳酸菌の分離、同定を試みた(表3)。その結果、醤油もろみ中には*Lactobacillus*属以外に*Enterococcus*属、*Pediococcus*属、*Weissella*属の乳酸菌が確認された。

表3 醤油もろみ中の乳酸菌

分離株	株数
<i>Enterococcus durans/faecium</i>	4
<i>Pediococcus parvulus</i>	4
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2
<i>Weissella confusa</i>	1

## 4 まとめ

県内の焼酎製造場、醤油製造場、漬物製造場にてサンプリングをおこない、乳酸菌の分離を試みた。そして、分離した乳酸菌について16S rDNA解析をおこない分類したところ、以下の知見が得られた。

1) ソバ焼酎一次もろみ中の乳酸菌数は0~6.3 × 10<sup>2</sup>CFU/mlであり、分離した乳酸菌は全て

*Lactobacillus plantarum/pentosus*であった。

2) ソバ焼酎二次もろみ中の乳酸菌数は30~90CFU/mlと少なく、分離した乳酸菌は*Lb.plantarum/pentosus* 3株、*Lb.paracasei* 3株、*Lb.brevis* 2株であった。

3) 冷蔵による下漬け干したくあんでは、*Lb.sakei sakei*が多く検出された。一方、地下タンクによる下漬け干したくあんでは様々な乳酸菌が検出された。

4) 醤油もろみ中には*Lactobacillus*属以外に*Enterococcus*属、*Pediococcus*属、*Weissella*属の乳酸菌が確認された。

## 5 参考文献

- 1) 竹下淳子, 工藤哲三, 山本英樹, 水谷政美, 柏田雅徳: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 49, 127-131 (2004)
- 2) 竹下淳子, 工藤哲三, 山本英樹, 水谷政美, 柏田雅徳: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 49, 119-125 (2004)
- 3) 高山清子, 工藤哲三, 水谷政美, 山本英樹, 柏田雅徳: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 50, 117-119 (2005)
- 4) 高山清子, 水谷政美, 山本英樹, 越智洋, 工藤哲三: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 51, 107-114 (2006)
- 5) 高山清子, 水谷政美, 工藤哲三: 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 51, 115-117 (2006)
- 6) 小崎道雄: 乳酸菌実験マニュアル, (朝倉書店, 東京), (1992)