

# きゅうり古漬けから単離された乳酸菌の同定と諸性質\*

玉川 英幸\*\*、伊藤 良仁\*\*

きゅうり古漬けから乳酸菌の単離を試みた。得られた乳酸菌候補株を諸性質に基づき分類したところ、得られた微生物種は発酵の特性により 3 つのグループに分類されることが明らかになった。それぞれのグループに含まれる代表株 1 株の 16S rDNA 解析し、各諸性質を合わせて生物種の同定を行ったところ、3 種の株はそれぞれ *Pediococcus pentosaceus*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus plantarum* であることが示された。3 種の単離株とそれぞれの標準株を用いて、8%塩化ナトリウムを含むきゅうり破碎液において増殖試験を行ったところ、各単離株はそれぞれの標準株より優れた増殖特性を示した。また、各単離株をスターターとしてきゅうりの漬物を作製し、その香气成分を分析したところ使用する乳酸菌によっていずれも異なる香气パターンを示すことが明らかになった。これらの結果は使用する乳酸菌によって漬物の香味をつくり分けられる可能性を示している。

**キーワード:** 乳酸菌、きゅうり古漬け、*Pediococcus pentosaceus*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus plantarum*

## Isolation, identification, and characterization of lactic acid bacteria from furuzuke: a traditional well-pickled Japanese cucumbers

Hideyuki Tamakawa and Yoshihito Ito

In this study, we isolate, characterize, and identify lactic acid bacteria (LAB) in furuzuke, which is a traditional well-pickled Japanese cucumbers (*Cucumis sativus*). The isolates from furuzuke are divided into three different bacterial groups according to phenotypic and biochemical characteristics, and sequencing 16S ribosomal DNA of representative strains in each group shows that these LAB represent three genera: *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus brevis*, and *Lactobacillus plantarum*. In cucumber juice containing 8% NaCl, all isolates grow faster than their type strains. The pickled cucumbers inoculated by isolated LAB have different flavor patterns, respectively. These results suggest that specific pickles can be produced using LAB as starter.

**key words :** Lactic acid bacteria, well-pickled cucumbers, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*

### 1 緒 言

乳酸菌は酵母と並んで古くから食品加工に利用されており、人類は各発酵食品に適した様々な乳酸菌を自然界より分離してきた。野菜を原料とする発酵漬物からも様々な乳酸菌種が単離されており、例えば、韓国のキムチからは *Lactococcus lactis*、*Lactobacillus plantarum* が、台湾の酸菜からは *Pediococcus pentosaceus*、*Tetragenococcus halophilus* などの乳酸菌種の単離が報告されており<sup>1-3)</sup>、これら乳酸菌は各漬物特有の風味醸成に寄与していると考えられている。

ヨーグルトには *Lactobacillus delbrueckii* と *Streptococcus thermophilus*<sup>4)</sup>、チーズには *Lactococcus*

*lactis*<sup>5)</sup> というように特に乳製品においては乳酸菌スターターの活用は一般的ではあるが、多くの漬物においてスターターとして乳酸菌を接種している事例は極めて少なく、未だ天然の乳酸菌、すなわち、製造環境や野菜由来の乳酸菌が発酵の主役となっている。

古漬けとは長期間漬込みを行った漬物の総称であり、一般的には 20%以上の塩分存在下で数ヵ月以上漬込みを行うことで製造される<sup>6)</sup>。日本国内では特にきゅうりや高菜の古漬けが有名であり、全国各地で地域の特色ある古漬けが製造されている。古漬けは長期間に渡る漬込み工程において pH が低下することが確認されているが、“きゅうりの古漬け”と称されている商品、あるいはその

\* 平成 27 年度 技術シーズ形成研究事業（発展ステージ）

\*\* 食品技術部

製造工程よりこれまで乳酸菌が単離された報告はない。そこで本研究では、岩手県内で製造中のきゅうり古漬けより乳酸菌を単離・同定し、その諸性質を明らかにするとともにきゅうりの漬物製造にスターター利用した際の発酵特性について解析を行った。

## 2 実験方法

### 2-1 使用菌株

実験に使用した乳酸菌株は Table 1 に示した。

Table 1 Strains of LAB in this work.

Strain	Relevant genotype	Reference
<i>Pediococcus pentosaceus</i>		
AO-105	Wild type	This work
NBRC107768	Wild type (Type strain)	NBRC
<i>Lactobacillus brevis</i>		
AO-115	Wild type	This work
NBRC107147	Wild type (Type strain)	NBRC
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
AO-118	Wild type	This work
NBRC15891	Wild type (Type strain)	NBRC

### 2-2 きゅうり古漬けからの乳酸菌単離

県内漬物メーカーのきゅうり漬込み槽から、漬込み 58 日目の漬液をサンプリングした。漬液は適宜希釈し、BCP 加プレートカウントアガール(Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) に塗布した。35°C で 3 日間培養後、酸生成によって黄色に変化したコロニーを釣菌し、MRS 液体培地 (Merck, Darmstadt, Germany) を用いて 30°C で 3 日間静置培養した。良好な増殖を示し、かつ得られた培養液に含まれる乳酸量を測定し、消費したグルコースに対して 50%以上の割合で乳酸を生成している株を選抜した。選抜した株は発酵特性と形態観察に基づきグルーピングを行った。

### 2-3 16S rDNA 領域のシーケンスとデータベース検索

乳酸菌菌体からのゲノム DNA の抽出には ZR Fungal/Bacterial DNA Kit (Zymo Research, Irvine, CA) を用い、付属のプロトコールに従い行った。PCR は Takara OCR Thermal Cycler Dice (Shiga, Japan) と EX Taq (TaKaRaBio) を用いて行った。各乳酸菌の 16S rDNA 配列は、それぞれの乳酸菌のゲノム DNA を鋳型として 10F (5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3') と 800R (5'-TACCAGGG TATCTAATCC-3') のプライマーセットを用いて増幅した。反応は 94°C 3 分の変性を行った後、94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 90 秒の 3 ステップ 30 サイクルとし、サイクル終了後は 4°C に保持した。PCR 産物は ExoSAP-IT (GE Healthcare, Chalfont St Giles, England) を用いて精製した。シーケンス反応は先の PCR で使用したプライマーセットと BigDye Terminator v1.1 Cycle Terminator Removal Kit (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) を用いた。得られた塩基配列のデータベース検索には、国立生物工学情報センター (米: National

Center for Biotechnology Information, NCBI) が提供する BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いた。

### 2-4 糖類発酵性試験、温度生育性試験

糖類発酵性試験、温度生育性試験は乳酸菌実験マニュアル<sup>7)</sup>に従った。すなわち、YP 培地 (10 g/L 酵母エキス、5 g/L ペプトン、2 g/L 酢酸ナトリウム、20 mg/L 硫酸マグネシウム、1 mg/L 硫酸マンガン、1 mg/L 硫酸鉄、1 mg/L 塩化ナトリウム、50 g/L Tween 80) に炭素源として適切な糖源を 10 g/L となるように添加した培地を用いて、30°C で静置培養を行い、OD<sub>660</sub> と pH を測定した。なお、温度生育性試験の炭素源にはグルコースを使用した。

### 2-5 走査型電子顕微鏡写真撮影

乳酸菌の固定には 2% グルタルアルデヒドが溶解した 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7) を用いた。限界点乾燥法を用いて試料調整した後、走査型電子顕微鏡 JSM-6320F (JEOL, Tokyo, Japan) で撮影を行った。

### 2-6 きゅうり破碎液の調整と塩分生育性試験

市販のきゅうりをジューサーで破碎した後、121°C、15 分間オートクレーブ処理を行った。-30°C で凍結、20°C で融解した後、遠心分離によって固形物を除去した。さらにガラス繊維ろ紙、0.8 μm フィルター、0.22 μm フィルターを用いた吸引ろ過を段階的に行うことにより、きゅうり破碎液の無菌化を行った。塩分生育性試験には、塩化ナトリウムを添加したきゅうり破碎液を用いた。塩化ナトリウムを添加後は 0.22 μm フィルターを用いて滅菌ろ過を行い、30°C、静置条件で培養を開始し、経時的に OD<sub>660</sub> を測定した。

### 2-7 漬込試験

乳酸菌の前培養にはきゅうり破碎液を用いた。きゅうりは 100 ppm の次亜塩素水に 15 分間浸漬した後、アルコール消毒したまな板と包丁を用いて 1 cm 幅にカットした。

真空包装用の袋にきゅうり 100 g、8% 塩化ナトリウム 100 mL、乳酸菌培養液を初発 OD<sub>660</sub>=0.001 となるように添加し、減圧条件下でヒートシールを行い、15°C で漬込みを行った。複数種の乳酸菌を同時に接種する場合は、それぞれの乳酸菌の初発 OD<sub>660</sub> が 0.001 となるように接種を行った。

### 2-8 分析方法

酢酸、乳酸、エタノールの定量は Shi らの高速液体クロマトグラフィーによる方法を一部改変して行った<sup>8)</sup>。60°C で保持した IC Sep-ION-300 カラム (Tokyo Chemical Industry, Tokyo) を用い、溶媒として 0.01 N 硫酸 (流速 0.4 mL/min) を使用した。検出には示差屈折率検出器 (RID-10A, Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いた。

香気成分分析にはフラッシュ GC ノーズ HERACLES II (Alpha MOS, Toulouse, France) を用いた。漬液 1 mL を封入したバイアルを 60°C、1200 秒加温し、ヘッドス

ペース気層 5 mL を GC に導入した。カラムオープン は 1°C /sec の速度で 250°C まで昇温させ、検出には FID を用いた。主成分分析はフラッシュ GC ノーズ HERACLES II 解析ソフト付属の機能を用いて行った。

漬液中乳酸菌の生菌数はコロニー形成単位 (colony formation unit; cfu) で算出した。漬液を適宜希釈後 BCP 培地に混釈して 30°C で 48 時間培養し、形成したコロニー数を計測した。

### 3 結果と考察

#### 3-1 きゅうり古漬けからの乳酸菌分離と同定

きゅうり古漬けの漬液を適宜希釈し、BCP 寒天培地で黄色を示す 200 コロニーをピックアップした。得られた 200 株を MRS 液体培地での増殖試験に供し、良好な増殖 ( $OD_{600} > 1$ ) を示す 18 株を選抜した。選抜された 18 株の MRS 培地での各有機酸生産性と形態を評価したところ、3 つのグループに分類された。すなわち、(1) ホモ型発酵様式を示す四連球菌、(2) ヘテロ型発酵様式を示す桿菌、(3) ホモ型発酵様式を示す桿菌がそれぞれ 8 株、7 株、3 株得られた。18 株を用いて再現性試験を行い、そこで各グループから最も再現良く乳酸生成能の高い株を 1 株ずつ選抜し、それぞれを A0-105 株、A0-115 株、A0-118 株とした。なお、A0-115 株には菌体の凝集性が認められ、走査型電子顕微鏡写真では細胞間を接着している糸状物質が確認された (Figure 1)。

次に 16S rDNA 配列のシーケンス解析を行うことで菌種の同定を試みた。データベース検索の結果、A0-105 株、A0-115 株の 16S rDNA 配列は *P. pentosaceus* および *Lactobacillus brevis* の配列とそれぞれ 100% 一致した。

A0-118 株については *Lb. plantarum*、*Lactobacillus pentosus* とそれぞれ 100% 一致し、16S rDNA 配列では一種に同定することができなかった。乳酸菌実験マニュアル<sup>7)</sup>に記載されている乳酸菌ダイアグラムによれば、キシロースの発酵性を評価することで *Lb. plantarum* と *Lb. pentosus* の識別することができる可能性が記載されている。すなわち、*Lb. pentosus* はキシロースを利用できる一方で、*Lb. plantarum* はキシロースを利用できる株とできない株が存在することが報告されている。キシロ

ースの利用性を評価したところ、A0-118 株はキシロースを唯一の炭素源とする培地で増殖せず、pH の低下も確認できなかった。これらの結果を踏まえて A0-118 株は *Lb. plantarum* であると同定した。

#### 3-2 各標準菌株との発酵特性の比較

単離・同定された 3 種の乳酸菌の特性を解析するために糖類発酵性、温度発酵性、きゅうり破碎液での塩分増殖性についてそれぞれの標準菌株と比較試験を行った。

A0-115 株については標準株である *Lb. brevis* NBRC107147 と同じ糖の資化スペクトルを示したのに対して、A0-115 株についてはメリビオース、スクロース、ラフィノースの資化性を、A0-118 株についてはアラビノースの資化性を有していなかった (Table 2)。きゅうりは遊離糖としてはグルコース、フルクトース、ガラクトースを含有しているが、遊離型のアラビノース、あるいはスクロースなどのオリゴ糖は含有しないことが報告されている<sup>9)</sup>。これらは長年に渡って繰り返された古漬けの製造において、不要な形質を欠失したものと推測された。

次に温度増殖性の評価を行った。3 種の単離株、およびその標準株はいずれも 30-37°C で最大の増殖性を示し、45°C では低下した。また、いずれの菌株においても 10°C 以下では増殖性が低下し、5°C では増殖できなかった (Table 3)。したがって、これらの乳酸菌をスターターとして漬物を製造した場合、無殺菌条件であっても十分に冷蔵して保管することでさらなる発酵を抑制することが可能である。A0-105 株と A0-118 株は各標準株とほぼ同じ温度増殖性パターンを示したのに対して、A0-115 株はその標準株が増殖できない 45°C でも増殖可能であった。酵母では *FLO1* や *FLO5* など凝集に関わる因子が耐熱性に関わることが知られており<sup>10)</sup>、A0-115 株の 45°C での増殖性も、その標準株が有していない凝集性に起因している可能性が考えられる。*Lb. brevis* 細胞間の凝集に関わる因子は報告されていないが、*Lb. brevis* のヒト消化管接着には細胞表面に存在する S-レイヤータンパク質の関与が示唆されており<sup>11)</sup>、A0-115 株の細胞表面構造にも興味を持たれる。

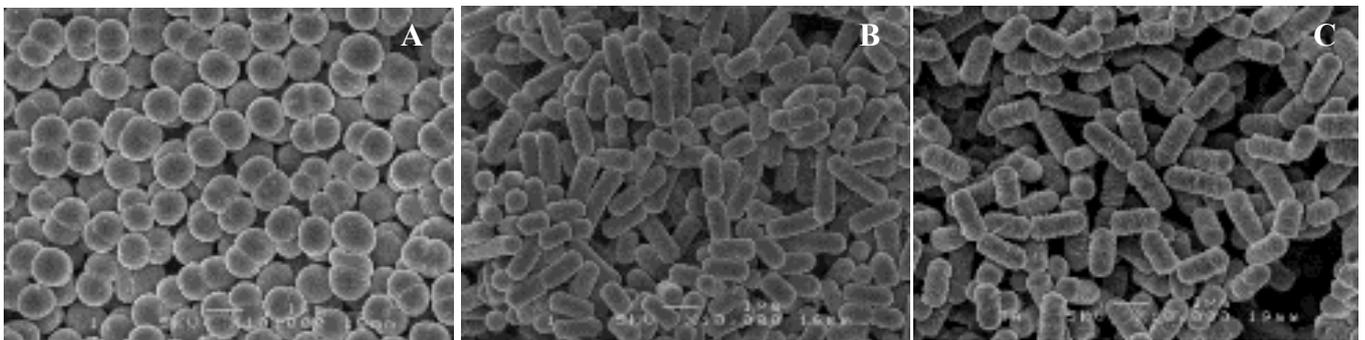


Figure 1 Morphology of the isolates LAB strains *P. pentosaceus* AO-105 (A), *Lb. brevis* AO-115 (B), and *Lb. plantarum* AO-118 (C). Strains were grown on MRS medium, and their cells were viewed by scanning electron microscopy, as described in Materials and Methods.

Table2 Assimilation of sugar by isolates LAB.

Sugar	<i>P. pentosaceus</i>		<i>Lb. brevis</i>		<i>Lb. plantarum</i>	
	AO-105	NBRC107768	AO-115	NBRC107147	AO-118	NBRC15891
Arabinose	+	+	+	+	-	+
Xylose	+	+	+	+	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	-	-	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	+	+	-	-	+	+
Lactose	+/-	+	-	-	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	+	+	+	+	+
Sucrose	-	+	-	-	+	+
Raffinose	-	+	-	-	+	+
Trehalose	+	+	-	-	+	+
Mannitol	-	-	-	-	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	+	+
Soluble starch	-	-	-	-	-	-

Table 3 Effect of temperature on growth of isolates LAB.

Temperature	<i>P. pentosaceus</i>		<i>Lb. brevis</i>		<i>Lb. plantarum</i>	
	AO-105	NBRC107768	AO-115	NBRC107147	AO-118	NBRC15891
5°C	-	-	-	-	-	-
10°C	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
15°C	+	+	+	+	+	+
20°C	++	++	++	++	++	++
30°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++
37°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++
45°C	++	++	++	-	+/-	+/-

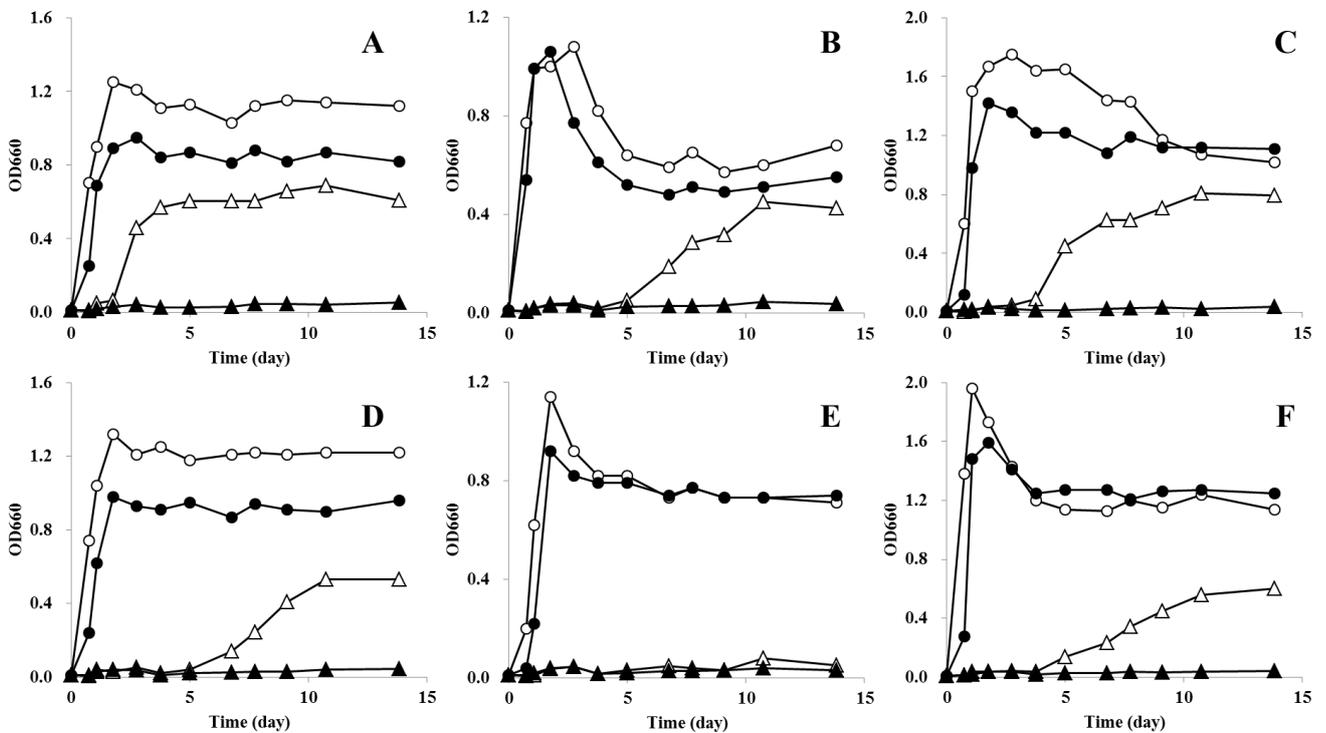


Figure 2 Growth curve for *P. pentosaceus* AO-105 (A), *Lb. brevis* AO-115 (B), *Lb. plantarum* AO-118 (C), *P. pentosaceus* NBRC107768 (D), *Lb. brevis* NBRC107147 (E), and *Lb. plantarum* NBRC15891 (F) in cucumber juice containing NaCl.

Symbols; 0% NaCl (opened circles), 4% NaCl (closed circles), 8% NaCl (opened triangles), 12% NaCl (closed triangles).

今回単離した乳酸菌は、高濃度の塩分が存在するきゅうり古漬けから単離されており、標準菌株と比較して塩分耐性が高いことが想定された。そこできゅうり破砕液に塩化ナトリウムを添加し、増殖試験を行った。その結果、今回単離した3株はいずれもその標準株よりも塩分存在下での増殖性に優れており、いずれの株においても特に 8%塩化ナトリウムを添加した条件でその差が顕著であった。特に *Lb. brevis* AO-115 株はその標準株 (NBRC107147 株)が増殖できない 8%塩化ナトリウムで増殖が可能であった。これらの結果は、今回単離した3株がそれぞれの標準株と比較して耐塩性に優れている可能

性を示すものである。なお、12%塩化ナトリウムを添加した条件では評価に使用したすべての乳酸菌株は増殖できなかった。きゅうりの古漬けは 20%以上の塩分を添加して製造されているが、塩分添加によってきゅうりから水分が抽出されており、漬込み槽内で塩分濃度は均一化されていない。今回の試験において、単離された3株は12%塩化ナトリウム存在下で増殖できなかったが、古漬けの製造現場では局所的に塩分濃度が低いところで増殖しているのかもしれない。

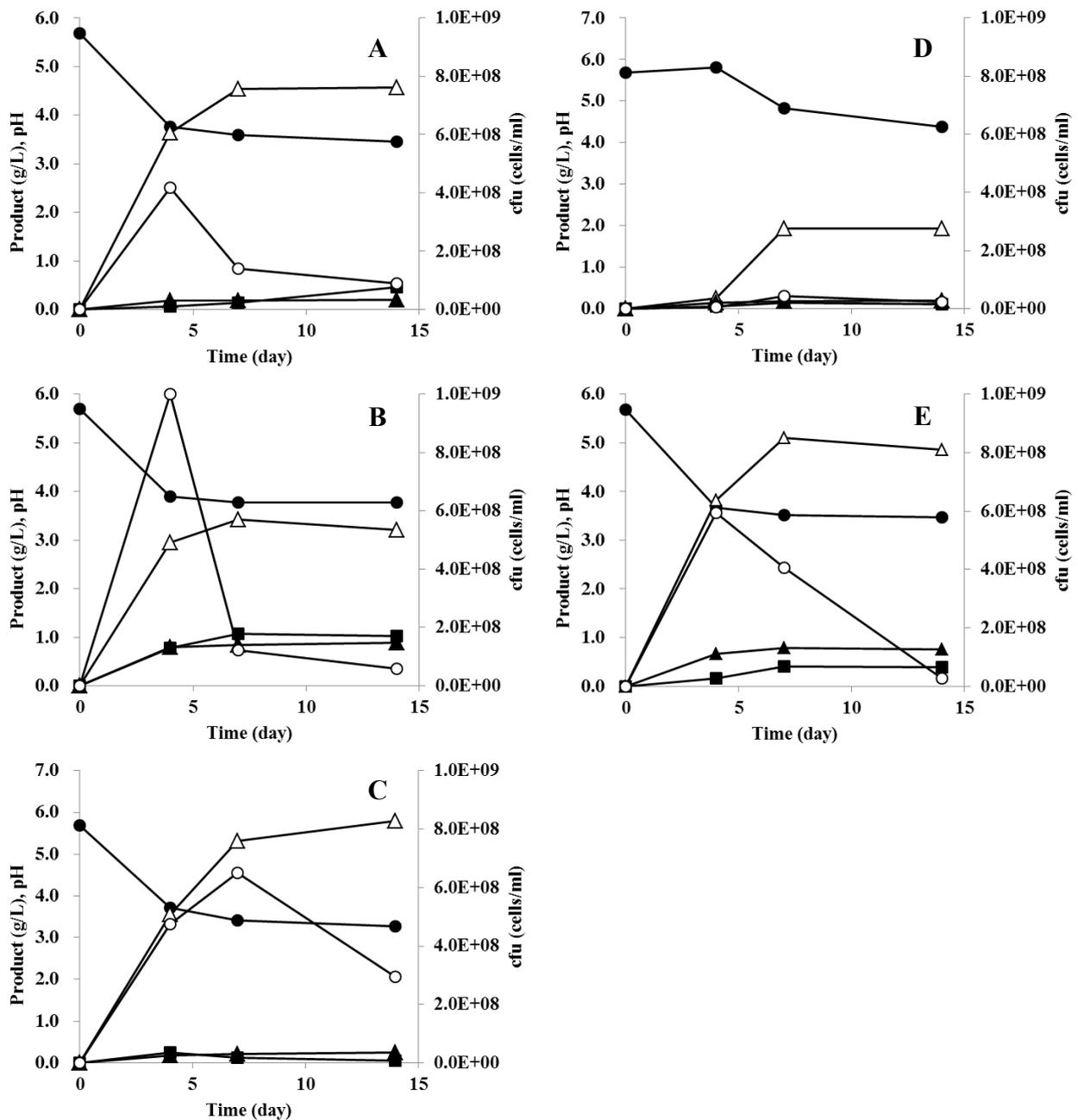


Figure 3 Time course of LAB during the fermentation of cucumbers. Panels A, B, C, D, and E show the results for *P. pentosaceus* AO-105, *Lb. brevis* AO-115, *Lb. plantarum* AO-118, without strain, and mixture of three strains, respectively. Symbols; cfu (opened circles), pH (closed circles), lactate (opened triangles), acetate (closed triangles), and ethanol (closed squares).

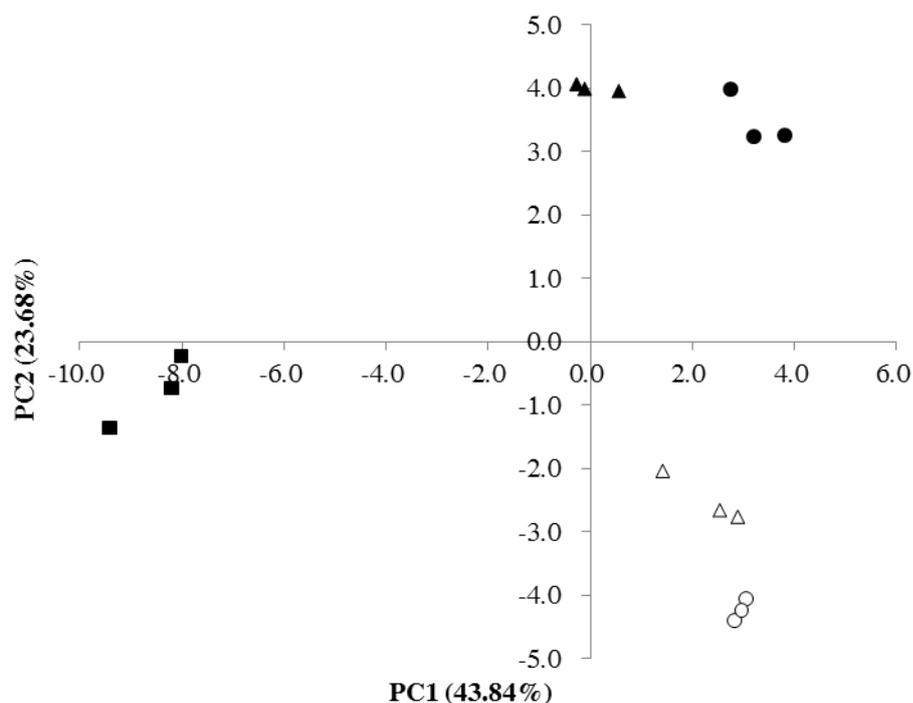


Figure 4 Multivariate analysis by PCA via the ultra-fast gas chromatography Heracles II from Alpha MOS Co.

Symbols; *P. pentosaceus* AO-105 (closed circles), *Lb. brevis* AO-115 (opened circles), *Lb. plantarum* AO-118 (closed triangles), mixture of three strains (opened triangles), and without strain (closed squares). Data were shown as results of three analyses per one sample.

### 3-3 乳酸菌スターターを用いたきゅうり漬物の製造

単離した乳酸菌のきゅうり漬込みにおける性質を確認するため、きゅうりの漬込みを行った際の発酵パラメーターと香気成分について解析を行った。

主要な発酵パラメーターについて Figure 3 に示した。生菌数はすべての群においてはいずれも漬込み 4 日目から 7 日目にピークに達しており、その後は減少した。乳酸、酢酸、エタノールなどの発酵産物も 4 日目には、ほぼ飽和に達しており、主要な乳酸発酵はこの期間で終了していることが示唆された。A0-105 株、A0-115 株、A0-118 株は乳酸を最大 4.57 g/L、3.24 g/L、5.79 g/L 生成しており、pH が 3.4-3.7 程度まで下がっていたのに対して、乳酸菌非接種群において乳酸濃度は 1.9 g/L であり、pH も 4.3 までしか下がっていなかった。ヘテロ型の発酵形式を示す A0-115 株は乳酸菌接種群の中で乳酸の生成量は最も低かったが、酢酸とエタノール生産が最も多く、それぞれ 0.84 g/L、1.07 g/L 生成していた。3 種の乳酸菌を混合して発酵させた場合、乳酸量は A0-118 株に次いで多く最大 4.86 g/L 生成した。また、酢酸とエタノールも A0-115 株に次いで多く、それぞれ 0.39 g/L、0.76 g/L 生成していた。

次に得られた漬物の質的な違いを確認するために漬込み 14 日目のきゅうり漬液の香気成分分析を行った。Alpha MOS 社のフラッシュ GC ノーズ HERACLES II は導入した気体サンプルを DB-5 カラムと DB-WAX カラムを用い

てそれぞれ同時分析を行うことができる。DB-5 を用いた場合では 33 本のピークが、DB-WAX を用いた場合では 16 本のピークが検出されたため、計 49 ピークについて各積分値を用いて多変量解析を行った。Figure 4 には主成分分析の結果について示した。第一主成分はスターター乳酸菌を使用しなかったサンプルが分離されており、スターターとして乳酸菌を使用したかどうかを識別する軸として機能していると考えられる。また、第二主成分は A0-105 株と A0-118 株が高い値を示し、A0-115 株と 3 種混合群が低い値を示したことから、使用した乳酸菌がホモ型の発酵をするかヘテロ型の発酵をするかを識別する軸として機能していることが示唆された。これらの結果は、使用する乳酸菌種によって香気パターンが異なることを示すものであり、乳酸菌種によって香気成分の異なる漬物を作り分けられる可能性を示唆している。

## 4 結 言

本研究では、きゅうり古漬けより初めて乳酸菌種の単離を行い、*P. pentosaceus*、*Lb. brevis*、*Lb. plantarum* の単離に成功した。単離株はそれぞれの標準株と諸性質が若干異なっており、特に塩分存在下でのきゅうり破碎液の増殖に優れていた。また、それぞれの単離株を用いてきゅうりの漬込みを行い、乳酸菌種によって香気成分の異なる漬物を作り分けられる可能性が示された。香気成分の詳細な差異に関する解析については今後の課題

ではあるが、本研究は漬物製造におけるスターター乳酸菌の重要性を示すものである。

## 謝 辞

本試験を実施するにあたり製造現場からの乳酸菌分離を快く提供していただいた(株)青三様に深く感謝いたします。また、分離に関わる実験補助にご協力いただいた阿部敏之氏に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Rhee CH and Park HD: Three glycoproteins with antimutagenic activity identified in *Lactobacillus plantarum* KLAB21, *Appl Environ Microbiol*, 67, p3445-3449 (2001).
- 2) Choi HJ, Cheigh CI, Kim SB and Pyun YR: Production of a nisin-like acteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi, *J Appl Microbiol*, 88, p563-571 (2000).
- 3) Chen YS, F Yanagida and JS Hsu: Isolation and characterization of lactic acid bacteria from suan - tsai (fermented mustard), a traditional fermented food in Taiwan, *J Appl Microbiol*, 101, p125-130 (2006).
- 4) Rawson HL and Marshall VM: Effect of 'ropy' strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on rheology of stirred yogurt, *Int J Food Sci*, 32, p213-220(1997).
- 5) Ryan, M. P., Rea, M. C., Hill, C., & Ross, R. P.. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, p612-619(1996).
- 6) 前田安彦: 漬物の化学と製造技術の体系化, 日本栄養・食糧学会誌, 47, p257-266(1994).
- 7) 小崎道雄, 内村泰, 岡田早苗: 乳酸菌実験マニュアル 内村泰・岡田早苗編 (1992).
- 8) Shi NQ, Cruz J, Sherman F, Jeffries TW, SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*, *Yeast*, 19, p1203-1220 (2002).
- 9) 楠瀬博三, 沢村正義: 野菜類果実の炭水化物に関する研究-2-キュウリ果実の炭水化物, 高知大学学術研究報告 農学, 29, p47-51(1980).
- 10) Hodgson JA, Berry DR and Johnston JR: Discrimination by heat and proteinase treatments between flocculent phenotypes conferred on *Saccharomyces cerevisiae* by the genes *FLO1* and *FLO5*. *Microbiology*, 131, p3219-3227(1985).
- 11) Hynönen U, Westerlund-Wikström B, Palva A and Korhonen TK: Identification by flagellum display of an epithelial cell-and fibronectin-binding function in the *SlpA* surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J Bacteriol*, 184, p3360-3367 (2002).