

大根塩漬けからの乳酸菌単離とスターターとしての検討*

玉川 英幸**

大根の一本漬は自然に起こる発酵を通して製造される日本の伝統漬物である。本研究では、塩漬け大根より乳酸菌の単離を試みた。乳酸菌菌叢の変化を解析した結果、漬込みの初期の発酵は *Leuconostoc mesenteroides* によって開始され、その後 *Lactobacillus curvatus* と *Lactobacillus sakei* が次いだ。各単離株をスターターとして大根塩漬の試作試験を行ったところ、*Leu. mesenteroides* 分離株と *Lb. curvatus* 分離株を用いた場合には良好な発酵が行われた。特に *Leu. mesenteroides* 分離株を用いた場合には酢酸に起因する強い酸味が感じられた。

キーワード : 乳酸菌、大根塩漬け、*Leuconostoc mesenteroides*、*Lactobacillus curvatus*、*Lactobacillus sakei*

Isolations of lactic acid bacteria from pickled daikon (Japanese white radish) and effect as inoculation of starter cultures on the fermentation.

Hideyuki Tamakawa

Daikon ippon-zuke is a traditional pickled white radish from Japan. Such radish was produced via spontaneous fermentation. In this study, we attempted to isolate, characterize, and identify lactic acid bacteria (LAB) in such pickled daikon. The analysis of changes in LAB flora indicated that the fermentation process was initiated by *Leuconostoc mesenteroides*, and followed by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei*. Using these isolates as the initiation of fermentation process, the trial production of pickled daikon was demonstrated. As the result, improved fermentation was efficiently made using the isolates of *Leu. mesenteroides* and *Lb. curvatus*. A strong acid taste due to acetate, however, was felt by inoculation of isolated *Leu. mesenteroides*.

keywords : Lactic acid bacteria, pickled white radish from Japan,

Leuconostoc mesenteroides, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*

1 緒言

漬物とは、様々な野菜を漬け込み材料とともに漬け込むことで、保存性を高めるとともに熟成させ、風味を良くした食品の総称である。漬物には醤油漬けや酢漬けのように微生物の発酵を伴わないタイプの漬物と塩漬けや粕漬けのように発酵を伴うタイプの漬物が存在する。後者においては、主に野菜に付着している乳酸菌が野菜自体の糖분을代謝して風味の変化が起こっていることが知られており、Pederson が報告したザワークラウトの漬込み試験においては、漬込み初期に *Leuconostoc* 属、*Enterococcus* 属、*Pediococcus* 属などの乳酸球菌が増殖し、後期には *Lactobacillus plantarum* などを中心とした *Lactobacillus* 属の乳酸桿菌が増殖すると報告されている¹⁾。こうした前半に乳酸球菌、後半には乳酸桿菌が増殖するという菌叢変化は漬物の製造において、極めて一般的なものと考えられているものの、実際には様々な外的要因によって容易に変化する。すなわち、漬込み前の野

菜の洗浄状況、漬込み時の気温、またそもそもの野菜原料に付着している微生物種によっては、発酵が不十分だったり、逆に過発酵に至ったりすることは珍しくない。こうした状況を改善する目的として有望な乳酸菌菌株をスターターとして接種することが効果的と考えられている。

本研究においては、岩手県内メーカーが製造する大根塩漬け製造工程の主要な菌叢変化を確認するとともに、分離された乳酸菌のスターターとしての機能を検討したので報告する。

2 実験方法

2-1 使用菌株

実験に使用した乳酸菌株を Table 1 に示す。

* 平成 28 年度 技術シーズ創生研究事業 プロジェクトステージ

** 食品技術部

Table 1 Strain used in this study.

| Strain | Relevant genotype | Reference |
|----------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| <i>Lactobacillus sakei</i> | | |
| NBRC15893 ^T | Wild type (Type strain) | NBRC |
| NW34625 | Wild type | This work (from Tank 46 in day 20) |
| <i>Lactobacillus curvatus</i> | | |
| NW33915 | Wild type | This work (from Tank 39 in day 22) |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | | |
| NBRC100496 ^T | Wild type (Type strain) | NBRC |
| NW24612 | Wild type | This work (from Tank 46 in day 20) |
| NW33920 | Wild type | This work (from Tank 39 in day 22) |
| NW35418 | Wild type | This work (from Tank 54 in day 18) |

2-2 漬液の生菌数、代謝物の測定および乳酸菌の分離

県内漬物メーカーの大根漬込み槽から経時的に漬液をサンプリングした。一般生菌数はサンプリングした漬液を適宜希釈し、標準寒天培地(Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) に塗布し、35°C で3日間培養後、塗布漬液 1 ml あたりのコロニー数を計測することで算出した (colony formation unit; cfu)。また、乳酸菌数は同じサンプルを 10 g/L 炭酸カルシウム、10 mg/L アジ化ナトリウム、10 mg/L シクロヘキシミドを含む MRS 液体培地 (Merck, Darmstadt, Germany) に塗布し、30°C、2-7 日間培養後にハローを形成したコロニー数を計測することで算出した。ハローを形成したコロニーは同じ培地に塗布し、再度ハロー形成を確認した後、各種増殖試験、菌種の同定試験、漬込み試験に供した。

2-3 機器分析

グルコース、フルクトース、マンニトール、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による方法を一部改変して行った²⁾。60°C で保持した ICsep-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。

2-4 乳酸菌種の同定

乳酸菌種の識別、同定には PCR-RFLP 法を用いた³⁾。MRS 培地で培養した乳酸菌菌体から PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)を用いてゲノム DNA の抽出を行った。PCR には SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)を用いた。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 27FC(5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 1490RC(5'-GTTACCTTGTTACGACTTC-3')のプライマーセットを用いて EX Taq HS (Takara)で増幅した。反応は 94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C、90 秒の 3 ステップ 35 サイクルとし、サイクル終了後は 4°C に保持した。PCR

産物はフェノール/クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈殿で精製した後、*MboI* と *XspI* (Takara)で 37°C、24 時間処理した。制限酵素処理溶液は 2.5%アガロース S (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いてゲル電気泳動し、文献 3 に示された DNA の断片化パターンを照合することで乳酸菌種の同定を行った。

2-5 増殖試験

増殖試験には大根破砕液もしくは MRS 液体培地を用いた。大根破砕液は市販の大根をジューサーで破砕することで調製した。破砕液は 121°C、15 分間オートクレーブ処理を行った後、ガラス繊維ろ紙で吸引ろ過した。ろ液は 30°C で凍結、20°C で融解した後、1.0 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、無菌化を行った。

各乳酸菌を MRS 液体培地、もしくは大根破砕液に接種後、30°C、静置条件で培養を行い、72 時間後の OD₆₆₀ と代謝物を測定した。

2-6 漬込試験

乳酸菌の前培養には大根破砕液を用いた。大根は 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カットした。

真空包装用の袋で 500 g 大根、12.5 g 食塩、0.4 g 醸源 (87.9% 炭酸カルシウム、5.5% サッカリン Na、6.6% 食品素材;大和食品工業)、0.5 g 新砂糖 (93% グルコース、5% サッカリン Na、2% クエン酸;株式会社三幸)、57.1 ml 滅菌水 を混合した。乳酸菌培養液を初発 OD₆₆₀=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、10°C で 40 日間漬込みを行った。

3 結果と考察

3-1 大根漬液中の代謝物と菌叢解析

3 つの塩漬け大根漬樽から経時的に 3 回のサンプリングを行い、各種生菌数および代謝物測定を行ったところ、乳酸菌数の増加と発酵に起因すると思われる乳酸と酢酸の生成が認められた(Table 2)。特に樽番号 46 と 54 に関

Table 2 Biochemistry of salted radish.

| Tank No. | Storage period (day) | pH | Brix | Salt (%) | cfu | | Substrates and products (g/L) | | | | | |
|----------|----------------------|------|------|----------|------------------------|------------------------|-------------------------------|----------|---------|---------|---------|--|
| | | | | | Plate Count Agar | MRS | Glucose | Fructose | Lactate | Acetate | Ethanol | |
| 39 | 8 | 5.77 | 4.50 | 3.20 | 4.80 x 10 ⁴ | 0.00 | 2.8 | 0.5 | 0.1 | 0.1 | 1.2 | |
| | 22 | 5.52 | 4.80 | 2.63 | 6.70 x 10 ⁶ | 6.30 x 10 ⁶ | 4.3 | 1.7 | 1.0 | 0.3 | 2.2 | |
| | 43 | 4.50 | 2.50 | 1.55 | ND ¹⁾ | ND ¹⁾ | 0.9 | 0.1 | 1.5 | 0.2 | 0.8 | |
| 46 | 6 | 5.88 | 4.40 | 3.10 | 5.25 x 10 ⁴ | 1.32 x 10 ⁴ | 3.4 | 0.6 | 0.1 | 0.1 | 1.2 | |
| | 20 | 4.18 | 4.30 | 2.71 | 3.46 x 10 ⁸ | 3.24x10 ⁸ | 1.2 | 0.4 | 2.1 | 0.4 | 2.5 | |
| | 41 | 3.93 | 3.20 | 1.69 | ND ¹⁾ | ND ¹⁾ | 1.7 | 0.3 | 1.1 | 0.5 | 1.8 | |
| 54 | 4 | 5.80 | 4.70 | 3.50 | 2.22 x 10 ⁴ | 4.00 x 10 ² | 2.0 | 0.4 | 0.1 | 0.0 | 0.5 | |
| | 18 | 4.33 | 4.50 | 2.69 | 2.31 x 10 ⁸ | 1.69 x 10 ⁸ | 2.9 | 0.6 | 1.8 | 0.4 | 1.9 | |
| | 39 | 4.18 | 2.50 | 1.38 | ND ¹⁾ | ND ¹⁾ | 2.6 | 1.0 | 1.8 | 0.3 | 1.2 | |

¹⁾No data

しては、漬込み20日前後のサンプリングにおいて、乳酸菌数(MRS 培地によって検出される)が 10⁶~10⁸ cfu まで増加していた。これらの結果は、今回サンプリングを行った3つの樽に関しては健全な発酵が行われていることを示している。一方、グルコースやフルクトースについては樽間で増減に差が認められた。また、樽番号46の乳酸濃度は漬込み41日目より20日目の方が高かった。

野菜は塩漬けにすることにより、脱水に伴う原形質分離によって細胞が死滅し、細胞内の成分が漬液中へ浸出する⁴⁾。通常の野菜の漬込みにおいては、こうした野菜の細胞内成分浸出と漬液中での微生物の発酵が同時に起こっている。したがって、発酵が速ければ糖類は減少し、発酵が遅ければ糖類は増加するとともに乳酸菌が生成した乳酸は希釈され減少する。樽番号39に関しては、漬込み8日目では乳酸菌は検出されず、漬込み22日目でグルコースとフルクトース濃度が増加したことから漬込み初期の発酵は遅かったものと想定される。しかし、43日目の漬込みでは各糖濃度は大きく減少し、乳酸濃度も増加し続けたことから漬込みの後半は発酵が活発になっていることが示唆される。樽番号46については、漬込み20日の乳酸濃度が高いものの、43日目では減少していること、グルコース濃度も増加していることから漬込み初期は活発な発酵が行われたものの、後半は乳酸菌の活性が低下していたことが想定される。樽番号54については、樽番号39と46の間程度の速度で発酵が進んだものと思

樽番号39と46の間程度の速度で発酵が進んだものと思われる。

3つの漬樽から3回行ったサンプリングのうち、それぞれ最初の2回について乳酸菌の分離とPCR-RFLP法を用いた乳酸菌種の識別と同定を行った。今回、PCR-RFLP法で乳酸菌の識別を行ったところ、乳酸菌種が検出されたすべてのサンプリングにおいて *Leuconostoc mesenteroides* が検出された(Table 3)。また、それぞれの樽の2回目のサンプリングにおいては、*Lactobacillus curvatus* もしくは *Lactobacillus sakei* が検出された。漬込み初期に乳酸球菌が増加し、中期から後期に乳酸桿菌が増殖するという現象は、漬物の乳酸菌菌叢を解析した過去の報告と矛盾ないものである¹⁾。なお、引用文献3によれば、評価に用いた99種のうち52種の乳酸菌については、制限酵素断片化パターンが特異的であり、同定し得る可能性があることと示されているが、今回検出した3つの菌種については特異的な制限酵素断片化パターンを示すものであり、同定し得る菌種である。*Lb. curvatus* と *Lb. sakei* は16S rDNA 配列の相同性が98.2%であり、系統分類学的には極めて近い菌種である^{3,5)}。

乳酸菌の系統分類学的な報告を行った Felis と Dellaglio の報告では、どちらも *Lactobacillus sakei* グループに属する菌種として分類されている。3つの樽において同様の微生物種が似たような増殖パターンを示したことから、少なくとも今回分離を行った加工場においては、こうした菌叢変化がどこでも起こっているのかもしれない。

Table 3 Identification of isolates.

| Tank No. | Storage period (day) | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | <i>Lactobacillus curvatus</i> | <i>Lactobacillus sakei</i> | Total analyzed |
|----------|----------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------|
| 39 | 8 | | | | 0 |
| | 22 | 5 | 2 | | 7 |
| 46 | 6 | 19 | | | 19 |
| | 20 | 6 | | 1 | 7 |
| 54 | 4 | 4 | | | 4 |
| | 18 | 4 | | 3 | 7 |

Table 4 Fermentation of LAB in MRS and radish juice.

| Inoculated LAB | Medium | OD ₆₀₀ | Substrates and products (g/L) | | | | | |
|---------------------------|--------------|-------------------|-------------------------------|----------|---------|---------|---------|-----|
| | | | Glucose | Fructose | Lactate | Acetate | Ethanol | |
| without strain | MRS | 0.000 | 18.9 | 0.0 | 0.1 | 4.0 | 0.2 | |
| <i>Lb. sakei</i> | NW34625 | MRS | 4.800 | 4.3 | 0.0 | 12.9 | 5.1 | 0.2 |
| <i>Lb. curvatus</i> | NW33915 | MRS | 4.440 | 3.7 | 0.5 | 13.3 | 4.3 | 0.2 |
| <i>Leu. mesenteroides</i> | NW24612 | MRS | 2.040 | 0.7 | 0.0 | 9.3 | 4.4 | 4.1 |
| <i>Leu. mesenteroides</i> | NW33920 | MRS | 3.820 | 0.2 | 0.2 | 10.2 | 4.4 | 2.4 |
| <i>Leu. mesenteroides</i> | NW35418 | MRS | 2.780 | 0.6 | 0.3 | 8.5 | 4.6 | 2.9 |
| without strain | Radish juice | 0.000 | 21.8 | 18.2 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | |
| <i>Lb. sakei</i> | NW34625 | Radish juice | 0.042 | 19.0 | 18.0 | 1.9 | 0.1 | 0.2 |
| <i>Lb. curvatus</i> | NW33915 | Radish juice | 0.039 | 19.3 | 17.8 | 1.8 | 0.1 | 0.2 |
| <i>Leu. mesenteroides</i> | NW24612 | Radish juice | 0.158 | 14.3 | 6.2 | 3.6 | 2.2 | 0.2 |
| <i>Leu. mesenteroides</i> | NW33920 | Radish juice | 0.211 | 14.3 | 6.4 | 3.6 | 2.1 | 0.2 |
| <i>Leu. mesenteroides</i> | NW35418 | Radish juice | 0.159 | 13.8 | 6.7 | 2.7 | 2.0 | 0.2 |

Table 5 Fermentation of salted white radish by inoculated LAB.

| Inoculated LAB | OD ₆₀₀ | pH | Brix | Salt (%) | Gas | Substrates and products (g/L) | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|------|------|----------|------|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | | | | Glucose | Fructose | Mannitol | Lactate | Acetate | Ethanol | |
| without strain | 0.41 | 5.62 | 6.4 | 2.23 | +/- | 12.9 | 9.6 | 0.5 | 0.1 | 0.1 | 1.2 | |
| <i>Lb. sakei</i> | NBRC15893T | 0.78 | 4.13 | 6.5 | 2.21 | + | 11.7 | 9.8 | 0.5 | 3.2 | 0.1 | 1.3 |
| <i>Lb. sakei</i> | NW34625 | 0.41 | 5.67 | 6.5 | 2.15 | +/- | 13.9 | 10.3 | 0.6 | 0.1 | 0.1 | 1.3 |
| <i>Lb. curvatus</i> | NW33915 | 1.79 | 3.95 | 6.4 | 2.19 | + | 10.5 | 9.1 | 0.4 | 4.1 | 0.2 | 1.2 |
| <i>Leu. mesenteroides</i> | NBRC100496T | 0.94 | 3.94 | 6.1 | 2.20 | +++ | 6.8 | 0.0 | 9.9 | 3.4 | 1.7 | 1.4 |
| <i>Leu. mesenteroides</i> | NW24612 | 1.78 | 3.70 | 6.1 | 2.20 | +++ | 5.4 | 0.0 | 10.1 | 4.2 | 1.7 | 2.0 |
| <i>Leu. mesenteroides</i> | NW33920 | 1.38 | 3.76 | 6.0 | 2.18 | +++ | N.D. ¹⁾ | N.D. ¹⁾ | N.D. ¹⁾ | N.D. ¹⁾ | N.D. ¹⁾ | N.D. ¹⁾ |
| <i>Leu. mesenteroides</i> | NW35418 | 1.61 | 3.83 | 6.0 | 2.17 | +++ | 5.8 | 0.8 | 9.2 | 3.5 | 1.6 | 1.9 |

¹⁾Not Detected

3-2 分離乳酸菌の増殖特性

Leu. mesenteroides は乳酸の他に酢酸やエタノールを生成するヘテロ型発酵を示す菌種である。*Lb. curvatus* と *Lb. sakei* は糖濃度が高い環境では乳酸を主に生成する条件付きヘテロ型発酵を示す菌種である(糖濃度が低くなると乳酸以外の代謝物も生成する)。今回、単離・同定された乳酸菌の特性を確認するために MRS 培地と大根破砕液中での増殖、発酵能を解析した。なお、解析は各漬樽から分離された乳酸菌種のうち代表的な1株を用いて行った(Table 2)。

分離されたいずれの菌株においても MRS 培地に接種した場合は良好な増殖を示した (Table 4)。特に *Leu. mesenteroides* に分類された菌種についてはグルコースをほぼ完全に消費し切っており、約 10 g/L の乳酸と 2-4 g/L のエタノールが生成された。*Lb. curvatus*、*Lb. sakei* に分類された菌種については主要な生産物として主に乳酸を生成し、その濃度はおおよそ 12 g/L であった。これらの結果は、菌種の特徴を反映していることから、同定結果と矛盾ないものである。

しかし、一方でいずれの菌株も大根破砕液中での増殖性は乏しかった (Table 4)。*Leu. mesenteroides* に分類された菌種については OD₆₀₀ が 0.2 程度まで増加したものの、*Lb. curvatus*、*Lb. sakei* では 0.05 程度までしか増加しなかった。大根漬液中で優勢だった菌種が破砕液中で増殖性が乏しかった理由は不明ではあるが、調製時の加熱処理で必要な栄養素が失活した可能性、物理的破碎によって抽出される成分と原形質分離によって抽出される成分に差異がある可能性、培養初期に生育した微生物の代謝物を生育に要求する可能性が考えられ、これらについては今後詳細な調査が必要である。

3-3 乳酸菌スターターを用いた塩漬け大根の発酵

単離した乳酸菌の大根塩漬けにおける性質を確認するため、大根の漬込みを行った際の発酵パラメーターの解析を行った。

漬込み 40 日目の主要な発酵パラメーターについて Table 4 に示した。乳酸菌を接種しなかった群においては、乳酸生成は認められず、発酵によるガス産生も認められ

なかったものの、*Lb. curvatus* もしくは *Leu. mesenteroides* をスターターとして接種した群においては有意な乳酸生成と pH の低下が認められた。それぞれの試作品について官能評価を行ったところ、*Leu. mesenteroides* をスターターとして接種した群においては強い酸味が感じられた一方で、*Lb. curvatus* 摂取群の酸味は穏やかであった。

これら菌株の摂取群で乳酸濃度こそ 3-4 g/L と同程度であったが、*Leu. mesenteroides* では 1.6 g/L の酢酸を含んでいた。これは一般的なストレートタイプの果実酢飲料と同レベルの酢酸含有量である。各有機酸と酸味の関係は、これまでに種々の検討がなされており、同じ pH であれば乳酸より酢酸の方が酸味に与える影響は大きいとされている^{6,7)}。これらの結果は大根塩漬けにおける酸味が、*Leu. mesenteroides* のような酢酸を生成するヘテロ発酵型乳酸菌に起因している可能性が考えられる。なお分離株の 1 種である *Leu. mesenteroides* NW33920 については粘性物質を生成するため、代謝物の分析が不能であった。

このように塩漬け大根に接種された *Lb. curvatus* と *Leu. mesenteroides* については良好な発酵が認められた。また、*Lb. sakei* 標準株である NBRC15893 接種群では乳酸生成は認められたものの、分離株である NW34625 の増殖は認められなかった。先の大根破碎液での増殖性も同様ではあるが、分離後の増殖試験で増殖が乏しい菌種がなぜ製造現場で優勢となっているのかは今後調査が必要と思われる。

4 結 言

本研究では、大根塩漬けより乳酸菌種の単離を行い、*Lb. sakei*、*Lb. curvatus*、*Leu. mesenteroides* の単離に成功した。単離株のうち、*Lb. curvatus* と *Leu. mesenteroides* は大根の漬込み環境下で良好な増殖を示したのに対して、分離した *Lb. sakei* 株の増殖性は乏しかった。また、

Leu. mesenteroides の生成する酢酸は最終商品に強い酸味をもたらす可能性が考えられる。

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西和賀産業公社株式会社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、小笠原唯氏に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Pederson CS: Floral changes in the fermentation of sauerkraut, *New York State Agricultural Experiment Station*, 1930.
- 2) Shi NQ, Cruz J, Sherman F, Jeffries TW: SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*, *Yeast*, 19, 1203–1220 (2002).
- 3) Tamakawa H, Ito Y: 16S rDNA genotyping using PCR-RFLP analysis among lactic acid bacteria, *J Jpn Soc Food Sci* (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi), 64, 355-364, 2017 (Japanese).
- 4) 小川敏男: 最新漬物製造技術, 食品研究社, 1986.
- 5) Felis GE, Dellaglio F: Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria, *Curr issues intestinal microbial*, 8, 44-61, 2007.
- 6) Harvey RB: The relation between the total acidity, the concentration of the hydrogen ion, and the taste of acid solutions, *J Am Chem Soc*, 42, 712–714, 1920.
- 7) Johanningsmeier SD, McFeeters RE, Drake MA: A hypothesis for the chemical basis for perception of sour taste, *J Food Sci*, 70, 44-48, 2005.