

研究ノート

信州地域の家庭で漬けられた漬物からの乳酸菌の分離と同定

木藤 伸夫・小林 愛実

The Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria
Obtained From Home Made Pickles in the “Shinshu” Region of Japan

KIDO Nobuo and KOBAYASHI Aimi

要 旨

長野県では各家庭で漬物を漬ける習慣があり、現在でも漬物を漬けている家が多い。中でも野沢菜を漬ける家は多く、信州を代表する漬物でもある。本研究では家庭で漬けられた野沢菜漬けから乳酸菌の分離を行った。野沢菜の漬け汁には、漬ける方法(レシピ)に関わらず1mlあたり 10^4 個以上の生きた乳酸菌が含まれており、多くは 10^7 個以上の乳酸菌を含んでいた。すべての試料から *Lactobacillus sakei* が分離された。レシピの違いに関わらず、いずれの試料からも同一の乳酸菌が分離されたことは、この乳酸菌が長期間保存される発酵漬物である野沢菜漬けに特徴的なものであると考えられた。*L. sakei* の健康への影響や、食品保存以外の活用法について考察する。

キーワード

乳酸菌 漬物 野沢菜 発酵 プロバイオティクス

目 次

I. 序論

II. 方法

III. 結果

IV. 考察

文献

I. 序論

乳酸菌がヒトの健康や寿命に対して良好な効果を示すことに初めて注目したのは、ノーベル賞受賞者のメチニコフであると言われている。メチニコフはヨーグルト摂取量の多いコーカサス地方の住民に長寿者が多いのは、ヨーグルトに含まれる乳酸菌の効果によるとし、ヨーグルトによる不老長寿説を提唱した¹⁾。現在、ヨーグルト、チーズ、バターなどの発酵乳以外にも、発酵食品から分離された様々な乳酸菌が種々の食品に添加され、「乳酸菌入り」を標榜した製品が販売されているが、その発端はカゴメ株式会社が京都の代表的な漬物である「すくき」から乳酸菌の一種であるラブレ菌 (*Lactobacillus brevis*) を分離し、乳酸飲料として販売したことであろう。それまで注目されていたヨーグルトに含まれる乳酸菌と区別し、植物に由来する乳酸菌は植物性乳酸菌とも呼ばれ、他の乳酸菌よりも胃酸などのストレスに強く、生きたまま腸に達するとされている²⁾。乳酸菌は、宿主の腸内細菌叢のバランスを改善することにより、宿主に良い効果をもたらす効果があるとされ、プロバイオティクスの概念の誕生に深く関わったとされている¹⁾。乳酸菌による整腸作用に加え、腸内有害菌からの感染防御作用、宿主の免疫賦活作用、抗アレルギー作用、抗腫瘍活性、血圧降下作用、血糖値の上昇抑制効果など、乳酸菌の機能性に関する研究も盛んに行われている¹⁴⁾。

平成13年度に行われた長野県民の主な食品群別摂取量調査によると、長野県民は生乳、緑黄色野菜、油脂類、砂糖類、菓子類、及び漬物類などの食品群の摂取量が全国平均に比べて多く、なかでも漬物摂取量 (31.4g) は全国平均の1.74倍と群を抜いて高かった⁵⁾。全県的な減塩運動により県民の平均寿命が延びたと考えられているが、平成24年の国民栄養・健康調査⁶⁾では、塩分摂取量は男女とも全国2位であった。一方、野菜摂取

量は男女とも全国1位となっており、これらの統計結果は、漬物を食べることにより塩分(ナトリウム)摂取量は増大するが、野菜に含まれるカリウムを同時に摂取することで、摂取した塩分を体外に排出している可能性を示唆している。さらに、漬物等の発酵食品の摂取により、それらに含まれる寿命延伸に効果のある成分を摂取している可能性も考えられた。長野県特有の漬物としては野沢菜漬けや木曾地方のすんき漬けがある。すんき漬けには複数の乳酸菌が含まれることが調べられているが⁷⁾、Watanabeらはすんき漬けから4種の新種の乳酸菌を分離し、*Lactobacillus* の新しい菌種として名前を提案した⁸⁾。これらの事例は、機能食品への応用が可能となる様々な微生物が漬物に含まれており、日常生活で恒常的に乳酸菌を摂取することにより、健康的な生活が維持される可能性や、未発見の有用微生物が漬物から分離される可能性を強く示唆している。漬物を食べることが塩分摂取量の増大を介して健康へ悪影響を与えるだけなのか、それ以外に長寿へ好影響を与える因子が存在しているのかを明らかにする目的で、県内各地の各家庭の漬物(主に野沢菜漬け)を集め、含まれる乳酸菌の分離を行った。

II. 方法

1. 漬物からの乳酸菌の分離

試料として用いた漬物は、自家製漬物として各家庭で漬けられたものを譲り受けた。本実験では、野沢菜漬とすんき漬けから乳酸菌を分離した。また、市販されている漬物も購入して試料とした。滅菌生理食塩水を用いて各漬け汁の 10^2 、 10^4 、 10^6 倍希釈液を準備し、全ての希釈系列について培養を行った。菌数が少なかった試料については、漬け汁の原液も用いて再度培養を行い、生菌の有無を確認した。各希釈液 $100\mu\text{l}$ を

滅菌シャーレに分取し、1%炭酸カルシウムを加えて滅菌後50℃まで冷却したM.R.S.(de Man, Rogosa, Sharpe)寒天培地(サーモフィッシュサイエンティフィック株式会社)とよく混ぜて固化した後、炭酸カルシウムを加えないM.R.S.寒天培地で重層し、25℃で2~3日培養した。また、わさび漬けなど汁気のない漬物は、マイクロチューブに少量のサンプルを採り、重量を測定した後滅菌蒸留水1mlを加えて混合し、その上清を同様に用いた。菌数の決定には数十~300程度のコロニーを計測できるプレートを用いた。菌数決定に用いたプレートの前後の希釈倍率のプレートに見られたコロニー数から、菌数のオーダー(桁数、次数)に矛盾がないことを確認した。

生じたコロニー周辺が透明になっているもの(酸産生菌)について、形状が異なる独立したコロニーを選択し、M.R.S.寒天培地にて純粋培養を行った。純粋培養は、菌を接種したシャーレと嫌気パック(三菱ガス化学株式会社)を嫌気ジャーに入れ密閉し、25℃で2~3日培養した。なお、M.R.S.寒天培地に生じたほぼ全てのコロニーは酸を産生していた。

2. DNA塩基配列による菌株の同定

純粋培養した分離菌のコロニーを、マイクロチューブに加えた滅菌蒸留水100 μ lに懸濁し、95℃、15分間の加熱処理を行った。その後4℃、15,000 \times g、1分間遠心し、上清を鋳型DNAとして使用した。16S rDNA領域の増幅には、EmeraldAmp PCR Master Mix(Takara)を用い、プライマーとして、16S-27f-b:AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG、16S-1510r:GGTTACCTTGTTACGACTTを用いた。PCRによるrDNA領域の増幅は、95℃1分間の加熱後、94℃30秒、55℃30秒、72℃90秒のサイクルを30回繰り返して行った。反応終了後、0.9%アガロースゲル電気泳動を行い、rDNAの増幅を確認した。

増幅が確認できたrDNA断片は、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up(Takara)キットを用いて精製した。最終的に30 μ lの溶出液に溶解したDNA断片を、塩基配列決定の鋳型DNAとして用いた。

DNA塩基配列の決定は、プライマーと混合した後、ユーロフィンジェノミクス株式会社に解析を依頼した。使用したプライマーは、上記16S rDNAの増幅に用いたものに加え、16S-516f: TGCCAGCAGCCGCGGTA、16S-1066r: CTGACGACARCCATGCAを用い、増幅した1503塩基対rDNAの両鎖について、1200~1400塩基対の塩基配列を決定した。決定した塩基配列を用い、米国National Center for Biotechnology InformationのBasic Local Alignment Search Tool(BLAST)にて相同性の高い塩基配列を検索して、菌種を同定した。

3. 塩分濃度の測定

塩分濃度の測定にはポケット塩分計PAL-ES1(アタゴ(株))を用いた。測定法は取扱説明書に従った。

Ⅲ. 結果

1. 野沢菜、すんき漬けに含まれる乳酸菌数

試料として、各家庭で漬けられた野沢菜漬けの漬け汁を譲ってもらい、乳酸菌の分離を試みた。野沢菜漬けは各家庭で独自の漬け方があり、塩分量の違いや、しょう油、砂糖の添加など、細かなレシピは異なる。今回は、試料提供者からの聞き取りに基づき、しょう油や麴が添加されたものはその旨を記し、それ以外の試料については、塩漬けと表記した。野沢菜漬けの塩分濃度は1.6%~3.3%の範囲で、家庭により大きく異なっ

た。また、野沢菜漬けと共に分与いただいたすんき漬けの漬け汁についても乳酸菌の分離を行ったが、こちらの塩分濃度は0.37~0.40%と低く、木曾地域特有のすんき漬けが無塩乳酸発酵であることが確認できた。

各試料に含まれる乳酸菌数(colony forming unit, CFU)を表1に示した。上で述べたように、各試料のレシピは各家庭により異なり、保存状況、漬けてからの日数等も異なることから、試料間の菌数を厳密に比較することはあまり重要でないと考え、有効数字2桁で示した。各家庭の野沢菜漬けには、概ね1mlあたり $10^7 \sim 10^8$ の生きた乳酸菌が含まれていることが明らかになった。しょう油に加え、麴を添加した野沢菜漬けでは、含まれる乳酸菌数が 6.0×10^4 と少なく(I家)、乳酸菌の発酵があまり進んでいないようであった。漬けた時期の違いや、麴の添加がその原因かもしれない。また、すんき漬けに含まれる乳酸菌数は、2試料とも少ない傾向にあった。

2. 野沢菜漬けに含まれる乳酸菌種

分離した酸産生菌の菌種を、16S rDNAの塩基配列を用い同定した。各試料につき4~6コロ

ニーを選択して、塩基配列の決定を行った。結果を表1に示した。野沢菜のしょう油麴漬けを除く野沢菜漬けから分離された乳酸菌は*L. sakei*のみであり、他の乳酸菌は分離されなかった。この結果から、漬け方のレシピが異なり、塩分量、調味料の違いはあっても、含まれる乳酸菌の大半を*L. sakei*が占めている可能性が考えられた。また、しょう油麴漬けからは*L. sakei*に加えて*Enterobacter*属の菌が分離された。この菌株については種名まで決定することができなかった。

すんき漬けについては1家庭の試料について乳酸菌を同定した。その結果、*L. sakei*に加えて、*L. plantarum*が分離されたことから、複数種の乳酸菌による発酵が進んでいるものと考えられた。

3. 市販の漬物に含まれる乳酸菌種とその数

次に比較のために市販されている漬物を試料に、乳酸菌数の確認と分離・同定を行った。結果を表2に示した。キムチ漬けとわさび漬けからは乳酸菌が検出されたが、その生菌数は1ml(わさび漬けは1g)あたり $2.0 \times 10^3 \sim 2.1 \times 10^4$ 個で、表1の家庭で漬けた自家製の漬物に比べて、生菌数

表1 野沢菜漬け、すんき漬けに含まれる乳酸菌とその菌数

試料	菌数 (CFU / ml)	分離菌
I家、野沢菜のしょう油麴漬け	6.0×10^4	<i>Enterobacter</i> 属 <i>L. sakei</i>
M家、野沢菜塩漬け	1.2×10^5	n.d.
O家、野沢菜塩漬け	2.7×10^7	<i>L. sakei</i>
S家、野沢菜塩漬け	1.8×10^8	n.d.
S家、野沢菜しょう油漬け	1.5×10^7	<i>L. sakei</i>
T1家、野沢菜塩漬け	4.4×10^7	<i>L. sakei</i>
T2家、野沢菜塩漬け	5.4×10^7	<i>L. sakei</i>
M家、すんき漬け	2.4×10^5	n.d.
T1家、すんき漬け	2.0×10^3	<i>L. sakei</i> <i>L. plantarum</i>

n.d., not determined.

が少ないことがわかった。それ以外の5種類の漬物からは乳酸菌は検出されなかった。韓国のキムチ製造者から取り寄せたキムチの漬け汁からは、1mlあたり 10^8 個以上の乳酸菌が検出された。

国内で市販されている韓国産キムチ1から分離された菌は*L. mesenteroides*であったが、国産キムチとわさび漬けからは*Enterobacter*属の菌が分離された。韓国のキムチ製造者から直接入手した韓国産キムチ2の漬け汁には1mlあたり 10^8 CFUほどの乳酸菌が含まれていたが、*L. mesenteroides*に加え、*L. gelidum*、*L. lactis*、*Weissella koreensis*など、多種類の乳酸菌が分離された。

IV. 考察

日本人は伝統的に発酵食品を口にする機会が多く、乳製品以外の発酵食品が数多く存在するが、近年漬物などに含まれる植物由来の乳酸菌が注目されている。乳製品などに使用される動物性乳酸菌と異なり、低温、高塩濃度などの過酷な環境で生育していることから、摂食された場合、胃酸で殺菌されず、生きたまま腸に達する乳酸菌として商品化が進んでいる。

長野県では冬になると各家庭で漬物を漬ける

習慣が残っており、特に野沢菜漬けは信州を代表する漬け物として、全国的に名前が知られている。漬物は乳酸発酵食品として知られており、5~10%という高い塩分濃度で、低温に置くことで乳酸発酵が進む⁷⁾。高い塩分濃度と低温貯蔵のため一般細菌の増殖は抑制されるが、乳酸菌は生育することができる。また、乳酸菌が漬物中の糖分から乳酸を作り出して酸性にすることで一般細菌の増殖が抑えられ、保存性や風味が増し、いつまでも美味しく食べることができる。ヨーグルトなどの発酵乳製品を食べる習慣のなかった昔から、乳酸菌は日本でも身近な存在であったといえる。本研究では、家庭で漬けられた自家製の漬物に含まれる乳酸菌数とその菌種の同定を行い、スーパーマーケットなどで市販されている漬物とは、含まれる乳酸菌の生菌数で大きな違いがあることを明らかにした。市販されている漬物は、流通・販売過程で発酵が進み過ぎることによる品質劣化を避け、より保存性を持たせるために、殺菌処理が行われている可能性がある。また、最近の漬物の多くは新漬、あるいは浅漬とよばれる食塩濃度が1~3%のものが増える傾向にあり、場合によっては乳酸発酵が品質の低下を招くことにもなる。

表2 市販されている漬物からの乳酸菌の分離と同定

試料	菌数 (CFU / ml)	分離菌
韓国産キムチ1	2.0×10^3	<i>L. mesenteroides</i>
国産キムチ	2.0×10^3	<i>Enterobacter</i> 属
べったら漬	<10	—
味付メンマ	<10	—
しば漬け1	<10	—
しば漬け2	<10	—
すぐき漬	<10	—
わさび漬	2.1×10^4	<i>Enterobacter</i> 属
韓国産キムチ2(製造元から入手)	3.1×10^8	<i>L. gelidum</i> <i>L. lactis</i> <i>L. mesenteroides</i> <i>W. koreensis</i>

さらに、調味液に漬けて販売される漬物が多いことなどが乳酸菌が分離されない理由として考えられた。

野沢菜から分離された乳酸菌のほとんどが *L. sakei* であったことは興味深い。*L. sakei* はグラム陽性の通性嫌気性乳酸桿菌で、清酒(生もと)を製造する時に使用されており、“酒”にちなんで命名された。キムチに含まれる代表的な乳酸菌の一つでもあるが⁹⁾、発酵させた肉・魚から分離される優先種で、南ヨーロッパのソーセージなどからも分離されている^{10, 11)}。

近年 *L. sakei* を含む野菜漬物の保存性や風味に着目し、漬物用乳酸菌スターターとしての開発が行われた¹²⁾。さらに、白菜キムチにおいて大腸菌群の増殖抑制が見られ、官能評価において風味が向上し、便通の改善もみられたとの評価も得られている¹³⁾。また、低温での増殖性という性質を用いた定性試験ではあるが、摂食者の糞便中に同菌が検出されたことから¹³⁾、*L. sakei* は胃酸で殺菌されずに腸に到達し、腸管で増殖することで上記便通の改善につながったものと考えられている。

また、菊正宗酒造総合研究所では、生酛から乳酸菌を分離しプロバイオティクスへの応用を検討している。分離された乳酸菌の中で最も IL-12 産生誘導能が高い株が *L. sakei* であった¹⁴⁾。IL-12 はナチュラルキラー (NK) 細胞刺激因子として知られていることから、NK 細胞による抗腫瘍作用や抗ウイルス作用が期待されるとともに、IL-12 のヘルパー T 細胞分化誘導から、ヘルパー T 細胞の Th1 と Th2 のバランスを介してアレルギーを緩和する作用も期待される。実際モデルマウスを使った実験で、*L. sakei* の死菌を事前に投与することで、アレルギー症状が軽減されることが示されている¹⁵⁾。

市販の漬物からは *Enterobacter* 属が分離された。この菌は腸内細菌科に属し、ヒトや動物の腸管内、糞便中に常在しており、土壌中や水、下

水、野菜などの自然界にも広く存在している。大腸菌群に含まれるため衛生指標菌の一つとして利用されているが、野菜や魚介類などの生鮮食品には土や泥、環境水の一部が残存していることが多いため、必ずしも糞便等の混入による非衛生状態を示すものではない。キムチから分離される腸内細菌科の菌の中では、*Enterobacter* 属の菌が最も多いことが知られている¹⁶⁾。*Enterobacter* 属の菌はブドウ糖から主として乳酸、ギ酸を生成するが、培養時間の経過に伴いギ酸は減少し、主たる有機酸は乳酸となるとされており、*Enterobacter* 属細菌はキムチの乳酸発酵に関与していると推測されている。以上の結果から、市販品から分離された *Enterobacter* 属細菌は、原材料の野菜等に付着していたと考えられ、乳酸菌と同様に乳酸発酵を行い、漬物の熟成に関わっていたと推定された。

近年 *L. sakei* は、その低温での増殖性や耐塩性、バクテリオシン産生性などを生かして、国内外で漬物や発酵食品のスターターとして、あるいは乾燥肉魚類の保存に工業的に使用されている。一方、ヒト糞便から分離されることから^{11, 13)}、食べ物と共に口に入った場合、ヒトの消化管で生き残り腸に生存すると予測されている。これらの結果から、「生きた微生物を腸に届け、腸内細菌叢の改善により宿主に良い効果をもたらす」というプロバイオティクスの概念に適応する菌種といえる。今後は、分離した *L. sakei* を用いて食品等の開発を行い、食品保存以外の目的での活用法を模索したい。

謝辞

本研究は、平成27・28年度松本大学地域志向教育研究経費の助成を受けて行われました。野沢菜漬け等、貴重な試料を分与いただいた皆様に感謝いたします。また、各種漬けものから乳酸菌を分離、保存していただいた渡邊彩さんに感謝いたします。

文献

- 1) 森地敏樹, 富田房男, 岡田早苗, 山本憲二, 佐々木隆, 「序論 乳酸菌・ビフィズス菌の研究の現状と将来」『乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス』京都大学学術出版会, pp.1-6 (2010).
- 2) 杉山政則, 「第2章 乳酸菌にはさまざまな種類がある」『植物乳酸菌の挑戦 未病および生活習慣病から化粧品まで』広島大学出版会, pp.30-59 (2012).
- 3) 杉山政則, 「第4章 腸管免疫を高める」『植物乳酸菌の挑戦 未病および生活習慣病から化粧品まで』広島大学出版会, pp.76-83 (2012).
- 4) Lim S-M, Jeong J-J, Woo KH, Han MJ, Kim D-H, "Lactobacillus sakei OK67 ameliorates high-fat diet-induced blood glucose intolerance and obesity in mice by inhibiting gut microbiota lipopolysaccharide production and inducing colon tight junction protein expression", Nutr. Res. 36, pp.337-348 (2016).
- 5) 佐々木隆一郎, 古川善行, 「長野県の健康長寿に関する一検討, その1: 死亡の現状と生活習慣の特徴」『信州公衆衛生雑誌』1 (2006).
- 6) 厚生労働省, 平成24年国民健康・栄養調査結果の概要, (2012).
<https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750.../0000099296.pdf> (閲覧日 2018.8.21)
- 7) 宮尾茂雄, 「漬物と微生物 身近で活躍する有用微生物 食品と有用微生物—和食文化と微生物5」『モダンメディア (栄研化学株式会社)』61, pp.330-337 (2015).
- 8) Watanabe K, Fujimoto J, Tomii Y, Sasamoto M, Makino H, Kudo Y, Okada S, "Lactobacillus kisoensis sp. nov., Lactobacillus otakiensis sp. nov., Lactobacillus rabi sp. nov. and Lactobacillus sunkii sp. nov., heterofermentative species isolated from sunki, a traditional Japanese pickle", Int. J. Sys. Evol. Microbiol. 59, pp.754-760 (2009).
- 9) 李宋勲, 「韓国キムチにおける乳酸菌研究の進展—キムチ発酵に関与する乳酸菌層の解析を中心に—」, Milk Science, 58, pp.153-158 (2009).
- 10) Champomier-Verges MC, Chaillou S, Cornet M, Zagorec M, "Lactobacillus sakei: recent developments and future prospects", Res. Microbiol., 152, pp.839-848 (2001).
- 11) Amadoro C, Rossi F, Piccirilli M, Colavita G, "Features of Lactobacillus sakei isolated from Italian sausages: focus on strains from Ventricina del Vastese", Ital. J. Food Saf., 4, pp. 220-224 (2015).
- 12) 橋本俊郎, 「漬物用乳酸菌スターターの開発」, 『茨城県工業技術センター研究報告』, 30, pp.34-38 (2002).
- 13) 大野信子, 佐藤弥生, 斉藤正好, 細谷幸夫, 久保田清人, 藤田正三, 押久保悦之, 小林文男, 「植物由来乳酸菌 *Lactobacillus sakei* 発酵野菜と利用」, 『和洋女子大学紀要』, 49, pp.45-56 (2009).
- 14) Masuda Y, Takahashi T, Yoshida K, Nishitani Y, Mizuno M, Mizoguchi H, "TLR ligands of Lactobacillus sakei LK-117 isolated from seed mash for brewing sake, are potent inducers of IL-12", J. Biosci. Bioeng. 112, pp.363-368 (2011).
- 15) Masuda Y, Takahashi T, Yoshida K, Nishitani Y, Mizuno M, Mizoguchi H, "Anti-allergic effect of lactic acid bacteria isolated from seed mash used for brewing sake is not dependent on the total IgE levels." J. Biosci. Bioeng., 114, pp.292-296 (2012).
- 16) 角野猛, 会田久仁子, 金子憲太郎, 金田尚志, 「嫌気性培養および好気性培養によるキムチの一般生菌数ならびに腸内細菌科に属する細菌群について」『日本調理科学会誌』28, pp.253-256 (1995).