

ウメ果実の発酵に適する耐酸性乳酸菌 FPL2 株の性質と同定

小林恭一*・久保義人*・駒野小百合*・百木華奈子**・高橋みなみ***・谷政八****

The Characterization and Identification of Acid Tolerance Lactic Acid Bacteria FPL2 Strain

Kyoichi KOBAYASHI, Yoshito KUBO, Sayuri KOMANO, Kanako MOMOKI,
Minami TAKAHASHI, Masahachi TANI

ウメ果実の酸味を改変し、新たな発酵食品を開発することを目的に、耐酸性を有する乳酸菌として選抜した FPL2 株 (NITE P-692) は、生理生化学的性状、16S rDNA 塩基配列、*recA* 遺伝子解析結果から *Lactobacillus plantarum* subsp. *argenterotensis* と同定された。また、FPL2 株はリンゴ酸を唯一の炭素源とする培地で培養すると、リンゴ酸が減少、pH が増加し、マロラクチック発酵 (MLF) が観察された。さらに、近縁株である *L. plantarum*、*L. pentosus* より高い耐酸性を示し、ウメ果実の MLF 乳酸菌として有効性が示唆された。

キーワード：乳酸菌、耐酸性、ウメ果実、マロラクチック発酵 (MLF)、*L. plantarum*

I. 緒言

ウメは古くから梅酒や梅干などに利用されているが有機酸が多く酸味が強すぎることで用途が限定されている。また梅酒以外にも希釈補糖して酵母により発酵させた果実酒への利用がみられるが⁷⁾、pH が低いいため、本来発酵には不向きで、ウメ果実の発酵に関する報告はほとんどみられない。一方ワイン (ブドウ) では古くから味の改変に乳酸菌によるマロラクチック発酵 (以下 MLF と略記)¹³⁾が行われており、ブドウ以外の果実でもキーウイ、リンゴで報告されている^{12,14)}。そこで、ウメ果実の酸味を改変し、新たな発酵食品を開発することを目的に、耐酸性を有し、MLF を行う乳酸菌として山麩酒母より分離した FPL2 株 (NITE P-692) を選抜した¹⁰⁾。今回、本菌株の若干の性質について検討し、その同定結果について報告する。

II. 実験方法

1. 使用菌株

当研究所育成株 FPL2 を使用した。比較用の近縁株には、*Lactobacillus plantarum* NRIC1067 Type strain および *Lactobacillus pentosus* NRIC1069 Type strain (いずれも東京農業大学、岡田早苗教授より分与) を使用した。

2. 培地

通常の培養には GYP プロス⁸⁾または MRS 培地 (Difco) を使用し、培養温度は 30℃ もしくは、35℃ とした。生菌数の計測には、GYP 白亜寒天培地⁸⁾、または、BCP 加プレートカウントアガール (日水製薬) を使用した。

3. 選抜株の形質、同定

乳酸菌実験マニュアル⁸⁾に従って、細胞形態、運動性、グラム染色、カタラーゼ、ガス産生、生育温度、発酵形式、乳酸旋光性、ペプチドグリカンタイプ、好塩性・耐塩性、糖類発酵性について検討した。また、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) を用いた 16S rDNA の全塩基配列、および Sandra¹⁵⁾の方法に基づく *recA* (recombinase A protein) 遺伝子の解析は (株) テクノスルガ・ラボ (静岡県) に依頼した。

4. 耐酸性の評価

耐酸性の評価には、MRS 培地で培養した菌体を使用した。耐酸性評価用試験液に OD₆₀₀ が 0.1 となるように各菌を添加し、20℃ での生菌数の変化を測定した。試験液には 1% クエン酸 - 20% グルコース溶液 (pH 2.7)、または 0.1 M 酒石酸 - 酒石酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.7) を使用した。

5. 有機酸の測定

島津有機酸測定システム (島津製作所) を使用した pH 緩衝化ポストカラム電気伝導度検出法により、有機酸を定量した。カラム: Shim-Pack SCR-102H (φ8 × 300mm)。移動相: 5mM *p*-toluenesulfonic acid、流速: 0.8ml/min、温度: 40℃、pH 緩衝化試薬: 20mM Bis-Tris、5mM *p*-toluenesulfonic acid、100mM EDTA、検出器: 電気伝導度検出器 CDD-6A (島津製作所)。

III. 結果および考察

1. FPL2 株の同定

FPL2 株の形態的性質、性状、糖類発酵性、耐塩性を第 1 表に示す。FPL2 株は中温性ホモ発酵、グラム陽性桿菌で *Lactobacillus* に属し、乳酸旋光、ペプチドグリカンタイプ、糖類発酵性から、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2⁶⁾ によれば *L. plantarum* もしくは *L. pentosus* のいずれかであると推定された。

* 福井県食品加工研究所
** 仁愛女子短大
*** 仁愛女子短大、現在 中瀬整形外科
**** 仁愛大学

また、16S rDNA の全塩基配列は *L. plantarum* および *L. pentosus* の 16S rDNA に対し、99.6%以上の高い相同性を示した (データ省略)。

L. plantarum と *L. pentosus* の 16S rDNA 塩基配列は極めて類似しており、これらに *L. paraplantarum* を含む *L. plantarum* グループ³⁾の分類はDNA-DNA ハイブリダイゼーションを基礎としている^{1, 2, 16)}。これらの帰属分類群の推定に *recA* 遺伝子を用いた塩基配列解析が有効であることから^{4, 15)}、*recA* 遺伝子の部分塩基配列 300bp を決定し、上記3種の既知 *recA* 遺伝子との分子系統解析を行った。

第1表 FPL2の生理・生化学的性状

分離源	山麩酒母				
形質的 形状	細胞形態	桿菌	胞子の有無	なし	
	運動性	なし	グラム染色性	陽性	
生理学的 形状	カタラーゼ	-	乳酸旋光性	DL	
	ガス生産	-	ペプチドグリカンタイプ	meso-DAP	
	発酵形式	homo			
	生育温度	15°C	+	40°C	+
		20°C	+	45°C	-
		30°C	+		
糖類 発酵性	glucose	+	Na-gluconate	+	
	L-arabinose	-	galactose	+	
	D-ribose	+	rhamnose	-	
	D-xylose	-	cellobiose	+	
	fructose	+	maltose	+	
	mannose	+	melibiose	+	
	lactose	+	salicin	+	
	sucrose	+	trehalose	+	
	raffinose	+	merititors	-	
	mannitol	+	Starch	-	
	sorbitol	+	inulin	-	
glycerol	-				
耐塩性	0%	+	7.5%	+	
	3%	+	10%	-	
	4%	+	12.5%	-	
	6.5%	+			

+ : positive, - : negative

BLAST を用いた GenBank/DDBJ/EMBL に対する相同性検索の結果、FPL2 株の *recA* 遺伝子部分塩基配列は *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* 基準株 DKO22 株に対し 100%の相同率を示した。そこで、*L. plantarum* subsp. *argenteratensis* を中心に既知の *Lactobacillus* 属 (第2表) *recA* 遺伝子塩基配列をもとに分子系統解析を行った結果を第1図に示した。FPL2 株はブートストラップ値 97% 以上で *L. plantarum* の 2 亜種で形成されるクラスターに含まれたが、*L. plantarum* subsp. *plantarum* のクラスターとは明らかに異なる分子系統学的位置を示した。また、近縁の *L. pentosus*、*L. paraplantarum* のクラスターとは大きくかけ離れた。以上のことから、FPL2 株は種レベルでは *L. plantarum* に帰属し、亜種レベルで *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* と推定され、生理生化学的性状、

16S rDNA 塩基配列結果、*recA* 遺伝子解析結果になんら矛盾を生じなかった。

第2表 分子系統樹解析に供した塩基配列の由来

株名	アクセッション番号
FPL2	
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> LMG 16673 ^T	AJ621662
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> LMG 18402	AJ271963
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> NIRD-P2	AJ271964
<i>Lactobacillus pentosus</i> LMG 10755 ^T	AJ286118
<i>Lactobacillus pentosus</i> LMG 10755 ^T	AJ621666
<i>Lactobacillus pentosus</i> LMG 18401	AJ292254
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i> A7	AJ640080
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i> DKO 22 ^T	AJ640079
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917 ^T	AJ286119
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> B41	AJ271962
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> WCFS1	AL935263
<i>Lactobacillus brevis</i> LMG 7944 ^T	AJ621625
<i>Lactobacillus collinoides</i> LMG 9194 ^T	AJ621631

*株名の末尾のTはType strain であることを示す

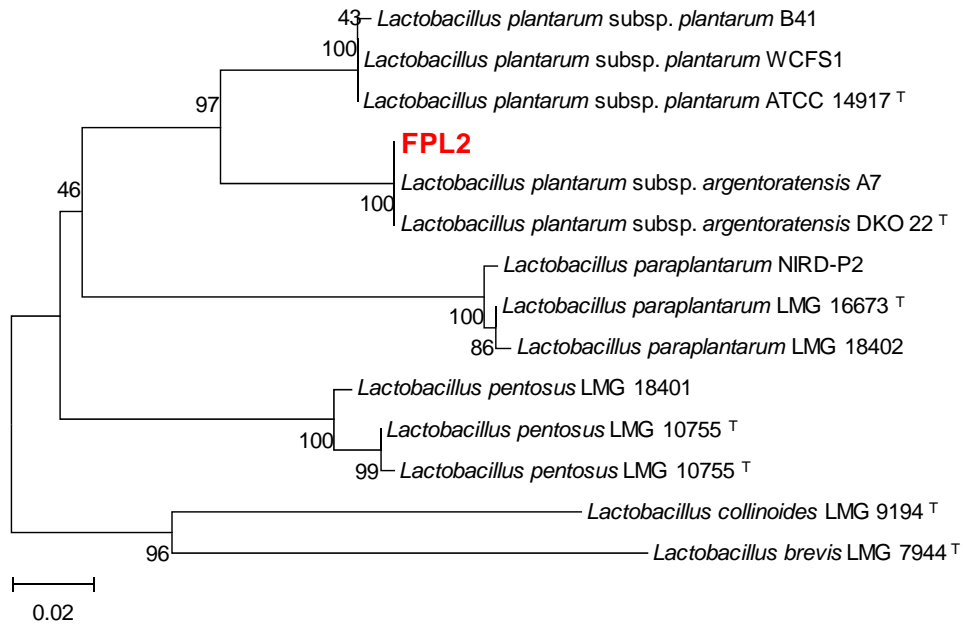
2. FPL2 株による MLF

リンゴ酸を唯一の炭素源として含む MalYP プロス (pH6.8) に FPL2 株を接種し、30°Cで培養したときの培地中の有機酸、pH の変化を第2図に示した。濁度 (OD₆₀₀) は徐々に低下したが、乳酸は徐々に増加を示し、リンゴ酸も速やかに減少し pH の増加が認められ、FPL2 株による MLF が観察された。MLF に関与する乳酸菌としては球菌の *Oenococcus oeni*、*Leuconostoc mesenteroides*、桿菌の *L. plantarum*、*L. hilgardii*、*L. brevis* などが知られており^{5,11,13)}、特に *O. oeni*、*L. plantarum* は MLF のスターターとしての価値が見いだされている⁹⁾。FPL2 株も *L. plantarum* であることから MLF のスターターとして利用できる可能性が示唆される。

3. FPL2 株の耐酸性

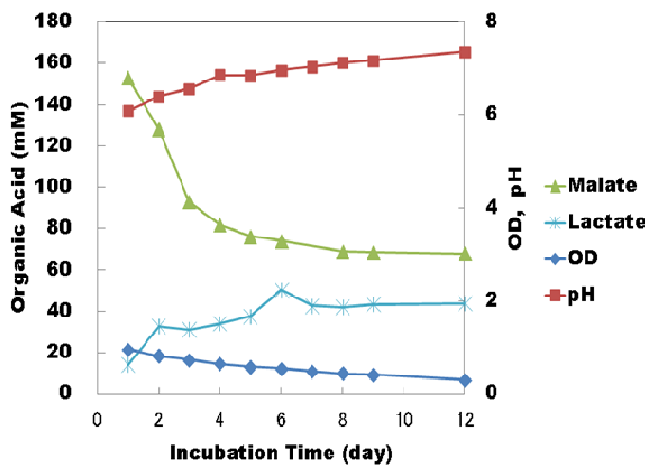
FPL2 株の近縁株である *L. plantarum* NRIC1067^T、*L. pentosus* NRIC1069^T との耐酸性の差異を確認するため、比較試験を行った。FPL2 は梅果汁を発酵する能力を有していることから、耐酸性の比較にはウメ糖抽出液の組成を参考にした 1% クエン酸 - 20% グルコース溶液 (pH 2.7) を使用した。第3図に示すように、近縁株の耐酸性は低く試験開始以降短時間のうちに生菌数の減少が認められた。特に *L. pentosus* は試験開始 2 時間で生菌数が 1/100 程度にまで減少しており、3 株の中で最も低い耐酸性を示した。*L. plantarum* の生菌数は開始後 2 時間までは緩やかな減少であったが、それ以降死滅速度は速くなった。一方、FPL2 株の生菌数は殆ど変化しておらず、他の 2 株とは異なる高い耐酸性を示した。

FPL2 株は低い pH を示すウメ果実の発酵に適し、MLF により果実に含まれるリンゴ酸を低下させ酸味を改変することができる乳酸菌として有望であると思われる。

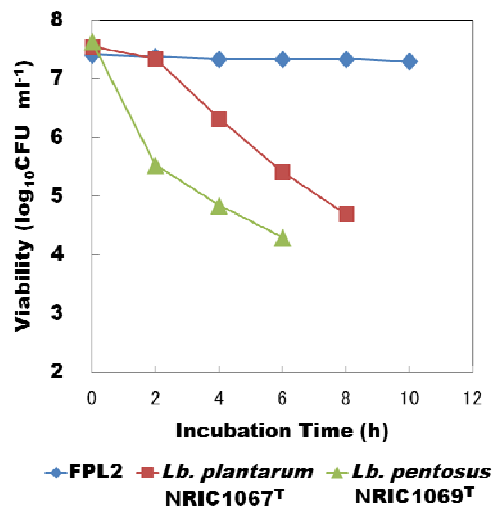


第1図 FPL2のrecA遺伝子塩基配列に基づく分子系統樹

左下の線はスケールバー, 系統枝の分岐に位置する数値はブートストラップ値, 菌株名の末尾のTはType strain であることを示す.



第2図 リンゴ酸を炭素源としたときのFPL2培養における有機酸, pH, および濁度の変化



第3図 FPL2と近縁株との耐酸性の比較
*CFUは Colony forming units の略

IV. 引用文献

- 1) Curk M-C, Hubert J-C, Bringel F. (1996). *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov. , a new species related to *Lactobacillus plantarum*. Int J Syst. Bacteriol. 46, 595-598
- 2) Dellaglio, F. , V. Bottazzi, and M. Vescovo. (1975). Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. Int. J. Syst. Bacteriol. 25, 160-172
- 3) 遠藤 明仁, Leon M. T. Dicks (2008). *Lactobacillus* 属乳酸菌の分類と非典型的な特徴, 日本乳酸菌学会誌, Vol. 19, 152-159 .
- 4) Françoise B. , Anna C. , Daniel K. O. , Giovanna E. F. ,

- Sandra T. , Franco D. (2005). *Lactobacillus plantarum* subsp. *Argentoratensis* subsp. nov. , isolated from vegetable matrices. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1629-1634
- 5) 原昌道・水野昭博 (1981). 赤ワインのマロラクチック発酵における L-, D-乳酸の生成. 醗酵工学会誌. 59 (1). 17-22.
- 6) Kandler, O. , and Weiss, N. (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, "Vol. 2, ed. by Sneath, P. H. A. , Mair, N. S. , Sharpe, M. E. , Williams & Wilkins, Baltimore, p 1209-1234
- 7) 小林恭一(2000). ウメ 地域資源活用食品加工総覧 素材編 11 巻. 農山漁村文化協会. 東京. p82-89
- 8) 小崎道雄(1992). 乳酸菌実験マニュアルー分離から同定までー. 朝倉書店. 東京. p6-78

- 9) Lallemand Inc. Montréal, Canada (2005). MALOLACTIC FERMENTATION IN WINE. http://www.lallemandwine.com/IMG/pdf_LALLEMAND_MLF_IN_WINE.pdf
- 10) 百木華奈子・高橋みなみ・小林恭一・谷政八(2010). 福井県産の梅果実「紅サン」に関する研究. 仁愛女子短期大学研究紀要. 42. 65-71
- 11) 日本乳酸菌学会(2010). 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. 京都. p156-157
- 12) 二宮順一郎(1997). キウイフルーツの乳酸発酵果汁. 食品の試験と研究. 32. 92-94
- 13) 乳酸菌研究集談会(1996). 乳酸菌の科学と技術. 学会出版センター. 東京. p253
- 14) 大澤純也・山本忠(1991). マロラクティック発酵によるリンゴ乳酸飲料の製造条件の確立と品質評価 (第1報). 岩手県醸造食品試験場報告. 24. 21-24
- 15) Sandra T. , Giovana E. F. and Franco D. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers. *Appl. Environ. Microbiol.* . 67. 3450-3454
- 16) Zanoni, P. , J. A. E. Farrow, B. A. Phillips, and M. D. Collins. (1987). *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson and Anderson) sp. nov. , nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 339-341

The Characterization and Identification of Acid Tolerance Lactic Acid Bacteria FPL2 Strain

Kyoichi KOBAYASHI, Yoshito KUBO, Sayuri KOMANO, Kanako MOMOKI,
Minami TAKAHASHI, Masahachi TANI

Key words: LAB, Acid tolerance, Prunus Mume, MLF, *L. plantarum*

Summary

Acid tolerance lactic acid bacteria ; FPL2 strain isolated from “Yamahai Syubo” (yeast mash, starter for Sake) and selected for fermentation of Mume fruits was identified to *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* based on morphological, biochemical and molecular properties , moreover *recA* gene sequence analysis. Malic acid added in medium as only carbon source was decreased by FPL2 and malolactic fermentation (MLF) was occurred. FPL2 has high tolerance against low pH condition, compared with other typical *L. plantarum* or *L. pentosus* strains. Therefore, it may be worthwhile to inoculate the Mume fruit with FPL2 as an active strain of MLF.