

北海道における発酵食品微生物の収集

食品総合研究所
応用微生物部・酵母研究室

森 勝美, 山田(伊豫)知枝
中島博文, 島 純

Collection of microorganisms for fermented foods in Hokkaido

Katsumi MORI, Chie YAMADA-IYO, Hirofumi NAKAJIMA, and Jun SHIMA

Yeast Laboratory, Applied Microbiology Division, National Food
Research Institute, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642 Japan

1. 目的

わが国には、北海道のような寒冷な地域に発酵食品の種類が多く、古くから受け継がれて来ている。それらは自然発酵によるものがほとんどであるが、長い間に製造技術もある程度洗練されて、高品質の製品が多い。発酵食品の品質には、そこに存在する発酵微生物の働きが強く影響している。したがって、高品質の発酵食品中には、優良な機能を有する発酵微生物の存在が期待できる。

これまでに、北海道の農産発酵食品である漬物類の微生物に関する少数の研究報告はあるが、本格的な発酵微生物の調査・収集の報告は見あたらない。特に、近年生産量が増加している水産物が入った野菜漬物からの乳酸菌の収集例がないので、本事業により、それらの探索・収集を試みた。また、寒冷な高糖質の環境（植物体またはその周囲など）には、低温下でも強い機能を有する酵母菌の存在が期待されたので、それらも併せて探索・収集を試みた。

2. 実施の概要

表1および図1に示したように北海道において、平成8年11月26日より5日間に亘って微生物分離源サンプルの収集を行った。

収集したサンプルは、大きく分けて2種類であった。収集した全サンプルをまとめて表2に示したが、ひとつは主として乳酸菌分離用の魚介入りの漬物類で、他は酵母菌分離用の土壌・サイレージ・海藻などである。漬物サンプルは、全て食用に最適の状態のものおよび雑菌混入を防ぐ包装形

態のものを市場にて選択し入手した。入手後すぐに無菌袋に入れ、低温（約5°C）になるように保冷庫に保管し、研究室へ搬送した。土壌、サイレージ類、海藻などは全て、好気性細菌の増殖を抑制し酵母菌を分離するために、採集後すぐに嫌気培養用の容器にYPD液体培地（酵母エキス0.3%，ペプトン0.3%，デキストロース2%，pH5.6）と共に入れ嫌気状態を維持しながら、研究室へ搬送した。

酵母の分離は、以下のように行った。研究室へ到着したサンプルを、嫌気状態のままYPD液体培地とともに45°Cおよび30°Cで培養した。その結果、YPD液体培地に濁りを生じ何らかの微生物の増殖が認められたのは、30°C培養のサンプルのみであった。微生物の増殖が認められたYPD液体培地をYPD寒天培地（酵母エキス0.3%，ペプトン0.3%，デキストロース2%，寒天1.5%，pH5.6）平板へ塗抹し、前と同温度・同条件にて培養して生じた單一コロニーを釣菌した。

乳酸菌の分離は、各サンプルの液汁を、1.5%食塩加MRS寒天平板（BBL製）へ塗抹し、嫌気培養（30°C）して生じたコロニーを釣菌することにより行った。各サンプルについて、無作為に釣菌することにより、10菌株を分離した。全菌株の16SリボゾームDNAの塩基配列を森らの方法により決定し、基準菌株のそれと比較し、分離菌を同定した。

3. 収集成果

既述した酵母菌の分離の方法により、表3に示した9株が得られた。しかしながら、顕微鏡観察の結果、これらの菌株は酵母菌ではなかった。嫌気培養により、細菌などの雑菌の増殖を抑制しながら分離する方法を採用したが、完全ではなかったものと考えられた。

水産物と野菜からなる漬物からは、表3に示した40株を得た。全菌株を同定した結果、3種からなることが明らかになった。菌相の構成としては、*Lactobacillus curvatus*が最も優勢であったが、*Lactobacillus bavaricus*や*Leuconostoc mesenteroides*の比率もかなり高かった。これまでに、*Lactobacillus curvatus*は牛乳から、*Lactobacillus bavaricus*は塩漬け野菜から、*Leuconostoc mesenteroides*は野菜漬物からそれぞれ分離された例が報告されている。また、野菜のみの漬物では、*Leuconostoc mesenteroides*に加えて*Lactobacillus plantarum*が多数分離される例が多いので、*Lactobacillus plantarum*が全く分離されない水産物を加えた漬物類は、野菜のみの漬物の菌相とは多少異なる菌相を有しているものと考えられた。

4. 所感

有用な微生物の収集は、偶然の産物ではなく収集技術の産物だと言われるように、収集現場での判断や、その後の採集物の処理、保管などそれぞれの段階で多くの難問に直面した。事前にかなりの調査・準備を行って実施したにも拘わらず、クリアできない問題もあった。

微生物を分離した結果、乳酸菌は多数収集できたが、酵母菌は少なく、予定していた強い発酵能を有する*Saccharomyces cerevisiae*は見いだせなかった。分離された乳酸菌については、菌種がかなり限られており、環境によく適応したもののみが選択的に生息しているものと考えられた。

5. 謝辞

今回の探索・収集は、多くの方々の絶大なるご協力を頂いて実施することができました。大変なお世話になりました釧路支庁釧路西部地区農業改良普及センター岡田竜太郎所長、牧野清一次長、元山良平主査、武藤紀子改良普及員、農林水産省北海道農業試験場畜産部飼料評価研究室名久井忠室長、野中和久研究員、農林水産省畜産試験場加工部微生物利用研究室大桃定洋室長に、心より感謝申し上げます。

6. 参考文献

- 1) 小玉健太郎・大谷宏子・菅浦敏夫・宮本芳夫. 1990. パン酵母スクリーニング源としての海洋酵母. イースト技報. (60). pp. 27-31.
- 2) K. Mori et al.: Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. International Journal of Systematic Bacteriology, Vol. 47, No.1, pp.54-57.
- 3) 森勝美. 1997. 16S リボゾーム RNA 遺伝子情報を用いた乳酸菌の同定システム. 日本醸造協会誌. 92巻, pp. 188-194.

Summary

Exploration and collection of yeasts and lactic acid bacteria with high fermenting ability were conducted in Hokkaido of Japan.

In this study, yeasts couldn't be isolated from many samples (silage, soil, apple, and seaweed) by the anaerobic cultivation on 30°C or 45°C. It was considered that the anaerobic condition had not been complete.

On the other hand, 40 strains of lactic acid bacteria were isolated from four samples of the pickles made of vegetables and fish in Hokkaido by the anaerobic condition using MRS medium on 30°C. The sequence of 16S rDNA of these strains were determined, and the species were identified by comparison of the sequences of the isolates with those of type strains of lactic acid bacteria. The species of 30 strains were *Lactobacillus curvatus*, 6 strains were *Lactobacillus bavaricus*, and 4 strains were *Leuconostoc mesenteroides* as showing in Table 3.



図1 北海道における探索・収集地点

表1 収集日程表

年月日	行 程	行 動 内 容
H8.11.26	つくば～札幌 (北農試)	移動 打ち合わせ, 協力依頼, サンプリング
H8.11.27	札幌	サンプリング
H8.11.28	札幌～釧路	移動 移動, 打ち合わせ, 協力依頼, サンプリング
H8.11.29	釧路, 白糠町	サンプリング
H8.11.30	釧路～つくば	移動

表2 サンプルの種類、入手地および点数

サンプル番号	採集場所	採 集 物	点 数
No.1～No.10	北農試・牛舎	グラスサイレージ	10
No.11～No.20	北農試・養蜂場	巣箱跡地土壌	10
No.21～No.28	北農試・花卉圃場	土壌	8
No.29～No.30	北農試・花卉圃場	ネギの葉	2
No.31～No.40	北農試・果樹圃場	(樹上の) リンゴ	10
No.41～No.50	北農試・果樹園	(落下した) リンゴ	10
No.51～No.60	北農試・牛舎	トウモロコシサイレージ	10
No.61～No.76	白糠町・酪農家	グラスサイレージ	16
No.77～No.80	同上	トウモロコシサイレージ	4
No.81～No.100	白糠町・海岸	海藻	20
TA	釧路市・S社	漬物(カサネ漬け)	1
TB	釧路市・W社	漬物(ハクサイ・ニシン漬け)	1
TC	札幌市・N社	漬物(大根・ニシン漬け)	1
TD	釧路市・S社	漬物(カブ・ハサミ漬け)	1

表3 国内微生物遺伝資源の現地収集実績（平成8年度実施分）

微生物群	微生物種類	菌株整理番号	対象微生物 (属・種名又は目的微生物)	収集場所	特記事項
3	06	IYO 1	酵母	白糠町	グラスサイレージ(No. 62)より分離
3	06	IYO 2	酵母	白糠町	グラスサイレージ(No. 62)より分離
3	06	IYO 3	酵母	札幌市	グラスサイレージ(No. 62)より分離
3	06	IYO 4	酵母	札幌市	グラスサイレージ(No. 62)より分離
3	06	IYO 5	酵母	札幌市	グラスサイレージ(No. 62)より分離
3	06	IYO 6	酵母	札幌市	グラスサイレージ(No. 62)より分離
3	06	IYO 7	酵母	札幌市	グラスサイレージ(No. 62)より分離
3	06	IYO 8	酵母	白糠町	グラスサイレージ(No. 62)より分離
3	06	IYO 9	酵母	白糠町	グラスサイレージ(No. 62)より分離
3	01	TA 1	<i>Le. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	釧路市	漬物(TA)より分離
3	01	TA 2	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TA)より分離
3	01	TA 3	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TA)より分離
3	01	TA 4	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TA)より分離
3	01	TA 5	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TA)より分離
3	01	TA 6	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TA)より分離
3	01	TA 7	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TA)より分離
3	01	TA 8	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TA)より分離
3	01	TA 9	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TA)より分離
3	01	TA 10	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TA)より分離
3	01	TB 1	<i>Le. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	釧路市	漬物(TB)より分離
3	01	TB 2	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TB)より分離
3	01	TB 3	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TB)より分離
3	01	TB 4	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TB)より分離
3	01	TB 5	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TB)より分離
3	01	TB 6	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TB)より分離
3	01	TB 7	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TB)より分離
3	01	TB 8	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TB)より分離
3	01	TB 9	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TB)より分離
3	01	TB 10	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TB)より分離
3	01	TC 1	<i>Lb. curvatus</i>	札幌市	漬物(TC)より分離
3	01	TC 2	<i>Lb. curvatus</i>	札幌市	漬物(TC)より分離
3	01	TC 3	<i>Lb. bavaricus</i>	札幌市	漬物(TC)より分離
3	01	TC 4	<i>Le. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	札幌市	漬物(TC)より分離
3	01	TC 5	<i>Le. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	札幌市	漬物(TC)より分離
3	01	TC 6	<i>Lb. curvatus</i>	札幌市	漬物(TC)より分離
3	01	TC 7	<i>Lb. curvatus</i>	札幌市	漬物(TC)より分離
3	01	TC 8	<i>Lb. curvatus</i>	札幌市	漬物(TC)より分離
3	01	TC 9	<i>Lb. bavaricus</i>	札幌市	漬物(TC)より分離
3	01	TC 10	<i>Lb. curvatus</i>	札幌市	漬物(TC)より分離
3	01	TD 1	<i>Lb. bavaricus</i>	釧路市	漬物(TD)より分離
3	01	TD 2	<i>Lb. bavaricus</i>	釧路市	漬物(TD)より分離
3	01	TD 3	<i>Lb. bavaricus</i>	釧路市	漬物(TD)より分離
3	01	TD 4	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TD)より分離
3	01	TD 5	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TD)より分離
3	01	TD 6	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TD)より分離
3	01	TD 7	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TD)より分離
3	01	TD 8	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TD)より分離
3	01	TD 9	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TD)より分離
3	01	TD 10	<i>Lb. curvatus</i>	釧路市	漬物(TD)より分離

Lb. : *Lactobacillus*, *Le.* : *Leuconostoc*

微生物の探索収集プロフィール



圃場でのサンプル収集
(森ら)



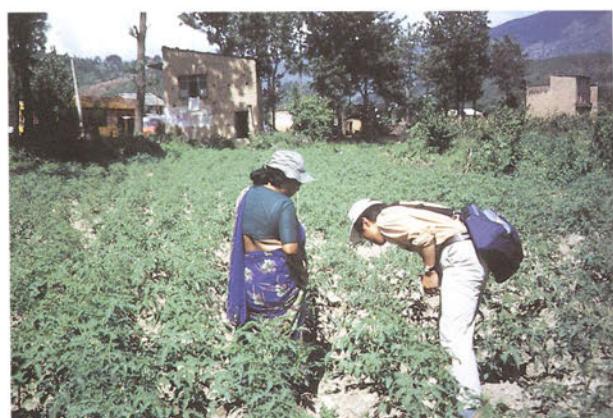
北海道の代表的な水産物の入った発酵漬物（白菜のニシン漬）
(森ら)



チャバネアオカメムシ *Plautia stali* 成虫
(三代)



カメムシを採集した寄主植物（クサギ）
(三代)



トマト圃場での拮抗細菌の探索収集
(ネパール、パスカル)
(堀田・相野)



拮抗細菌の抗菌作用により形成されたホウレン
ソウ萎ちよう病菌の生育阻止帯
(堀田・相野)