

伝統的発酵食品醸造に関わる微生物集団の分子生物学的解析

春田 伸

(東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻)

研究の目的：

伝統的な醸造技術では十分な無菌操作を行うことなく、微生物を集団として利用しており、その発酵は長年にわたって安定に進行している。このような微生物集団による発酵は純粋菌の培養と異なり、環境条件の変動にも比較的安定で、他微生物の混入にも抵抗性があると考えられる。しかしこれまで発酵食品に見られる微生物集団としての特性はほとんど解明されていない。その大きな理由の一つは培養法での解析の限界である。そこで本研究では従来の培養法に加え、微生物の培養を伴わない分子生物学的手法を用いて微生物集団を解析し発酵食品、特に伝統的な食酢醸造について新たな知見を得ることを目的とした。

方法：

鹿児島県福山町で約 200 年前から製造されている壺酢（米黒酢、坂元醸造（株））を対象とした。使用する原料は蒸煮玄米、水および米麹のみで他の種菌は添加していない。これらを陶製の壺（容量 54L）に投入し、最後に水面を覆うように米麹を振り撒く。この発酵壺は屋外に設置され、約 3 ヶ月の発酵期間を経た後、熟成させる。本研究では仕込みから 3 ヶ月の期間について 10 数回発酵液を採取し、化学成分の定量（有機酸、エタノール、グルコース）および微生物解析を行った。PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) 法には遠心集菌した微生物細胞から全DNAを抽出し、細菌特異的プライマーにより 16S rDNAの可変領域をPCR増幅した。DNA抽出およびPCR-DGGEは既報の方法に従った¹⁾。

結果：

化学成分の分析から、発酵開始 20 日目までに糖化・アルコール発酵が進行し、20 日目以降、アルコール濃度の減少と酢酸濃度の直線的な上昇が確認された。約 20 日間の発酵で酢酸発酵に移行するこの結果は過去の報告と一致する²⁾。また発酵開始から数日でpHは4以下に低下するが、これは乳酸生成によるものと考えられ、乳酸濃度は20日目以降も100mM前後を保っていた。

以上の結果を基に発酵開始から 20 日目までを 3 ~ 5 日おきに、その後は 10 ~ 15 日おきに発酵液を採取し、細菌群集について PCR-DGGE 解析を行った (図 1)。バンドパタ

ーンは 15 日から 30 日にかけて変化しており、その前後のパターンは比較的安定していた。このように糖化・アルコール発酵から酢酸発酵過程に至る細菌叢の遷移が明確に示された。三つの発酵壺を同時に解析したが、この変遷は再現的に観察され、壺による差はみられていない。ただし発酵前の原料から同様に PCR-DGGE 法により微生物を検出すると、仕込み壺毎に違いが見られた。しかし発酵開始から一日が経つと類似のバンドパターンが観察されており、発酵開始時には多種存在していた微生物が壺酢発酵に適した集団に自己集積・選択増殖していることを示している。

各発酵過程に特徴的なバンドについてその塩基配列を決定したところ、糖化・アルコール発酵過程に主要であり、その後の過程で減少していく細菌として、*Lactobacillus fermentum* (バンド ~)、*Lactococcus lactis* (バンド)、*Pediococcus acidilactici* (バンド) に近縁な乳酸菌が検出された。また一方、酢酸発酵過程に移行すると、*Acetobacter pasteurianus* (バンド) とともに *Lactobacillus acetotolerans* (バンド) の出現が観察された。培養法では発酵初期から *Lactobacillus casei* および *Lactobacillus plantarum* が単離された。過去の単離・同定研究でも、これらが発酵初期の主要な乳酸菌と報告されている^{3, 4)}。しかしこれら乳酸菌に対応するバンドは検出されておらず、培養法と非培養法の違いが示された。またバンド ~ は *L. fermentum* に近縁であるが、その相同性は 97% と低くこれまで未単離の *Lactobacillus* 属細菌であると推測される。特にバンド は酢酸発酵過程でも続いて検出されている唯一の微生物であり、その性質に興味を持たれる。また酢酸発酵過程で主要バンドとして検出された *Lactobacillus acetotolerans* は高濃度酢酸耐性を持つ乳酸菌として知られており、培養法では検出されていない。本菌は静置発酵による粕酢醸造過程からも検出されており、広く食酢醸造に存在する微生物であると推察される。

結論：

PCR-DGGE 法により壺酢醸造過程の細菌叢の変遷を明らかにした。主要バンドとして検出された微生物は培養・単離法による結果と異なっており、さらに新種と思われる微生物の存在が示唆された。また壺酢醸造は発酵開始前に検出される微生物には左右されず、再現的な微生物の変遷により、安定に進行していることが明らかとなった。

文献：

- 1) Haruta S. et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60: 224-231 (2002).
- 2) Koizumi, Y. et al., *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 36: 237-244 (1989).
- 3) Entani, E. and Masai, H., *J. Brew. Soc. Japan*, 80: 200-205 (1985).
- 4) Koizumi, Y. et al., *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 43: 347-356 (1996).

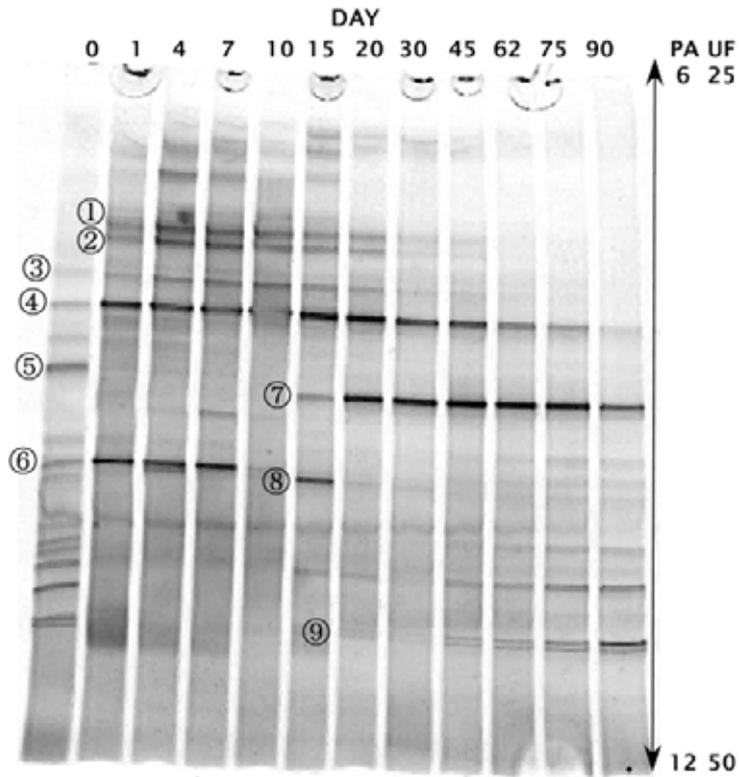


図1 細菌群集のPCR-DGGE プロファイル

発酵開始前を0日とし、発酵を終了する90日までを解析した。矢印はポリアクリルアミド (PA 6-12%) と変性剤 (UF 25-50%) の濃度勾配を示す。番号を付したバンドについて塩基配列を決定した。相同性検索結果は以下の通り。最近縁種名および相同性 (%) を示す。1, *Lactobacillus fermentum* (97); 2, *L. fermentum* (97); 3, *L. fermentum* (97); 4, *L. fermentum* (98); 5, *Aspergillus oryzae* (98); 6, *Lactococcus lactis* (100); 7, *Lactobacillus acetotolerans* (100); 8, *Pediococcus acidilactici* (100); 9, *Acetobacter pasteurianus* (100).