

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14687

研究課題名(和文) 伝統的食酢醸造過程の分子生態学的解析

研究課題名(英文) Molecular ecological analysis for traditional rice vinegar brewing

研究代表者

石井 正治 (Ishii, Masaharu)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：30193262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：黒酢醸造プロセス全体として重要な熟成期に対して微生物学的メスを入れ、多面的に解析することを主たる目的とした。壺寄せ直後から熟成開始後約300日のサンプルについて、それぞれ3つの壺の発酵液を16S rRNAを対象とした次世代シーケンサー解析に供した。なお、サンプルは壺表面下約20 cm から採取した。

各菌叢において、最も優占的に存在しているのはFirmicutes門、次いで優占的なのはAlphaproteobacteria綱であった。また、熟成開始後307日の菌叢について大きな変化が認められた。

研究成果の概要(英文)：Maturation period, which is a very important period for the traditional rice vinegar brewing, was analyzed microbiologically. After "Tsubo-yose" various samples were analyzed through next generation DNA sequencer in terms of 16S rRNA. Samples were collected 20 cm below the water level.

In each period, Firmicutes was most abundant, and second most abundant was Alphaproteobacteria. Also, there was a big change for the microbiological member in 307-day sample after "Tsubo-yose."

研究分野：応用微生物学

キーワード：黒酢

1. 研究開始当初の背景

鹿児島県霧島市福山町で生産されている「壺造り純米黒酢」は、1805年に福山町で酢作りが開始されて以来、約200年もの間、伝統的方法を受け継ぎ作られ続けている。

製法は以下の通りである。まず、蒸煮した精米歩合97%の米7.6 kg、米糠(混ぜ麹)3 kg、地下水32 Lを、径約43 cm・高さ62 cm・容量54 Lの屋外に設置した壺の中に入れ混合する。その後、乾燥させた米麹(振り麹)を液面に隙間なく振り撒く。仕込み後は野外で発酵・熟成させる。発酵には数ヶ月かかり、その間に糖化・アルコール発酵、酢酸発酵が順に進んだ後、6ヶ月から2年間の熟成を経て、さらにろ過・殺菌により、製品となる。(図1)

黒酢の製法は表面発酵法の一つであるが、(1)壺を野外に並べ温度管理をしない、(2)種酢を加えず、種菌は米麹のみを使う、(3)一つの壺の中で糖化・アルコール発酵、酢酸発酵が連続的に進む、という一般的な表面発酵法とは全く異なる特徴を有する。因みに、一般の食酢醸造ではエタノール発酵期と酢酸発酵期は明確に区別され、さらにスターターとして種酢を添加するので、上記の黒酢の製法は微生物学的に見ても極めて珍しいものである。

申請者は、この製造過程を微生物学的に明らかにすることを通して、新たな微生物学領域の開拓を図っている。

これまでに、アルコール発酵、酢酸発酵期に関わる微生物を明らかにしてきた。即ち、唯一の種菌の米麹(混ぜ麹・振り麹)中の微生物を解析した結果、PCR-DGGE法により発酵初期から中期で主要な乳酸菌と主要な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が、混ぜ麹あるいは振り麹由来であることを示してきた。一方で、酢酸濃度の上昇時に現れる主要乳酸菌 *Lactobacillus acetotolerans* と酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* は、拭き取り法により検出されたことから壺内に存在していることも示してきている。

2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究においては、プロセス全体として重要な熟成期に対して微生物学的メスを入れ、多面的に解析することを主たる目的とする。熟成期では、酢酸濃度は当初から高いため、多くの微生物が生育阻害を受けるような条件となっている。そのため、時間経過に伴う物理化学的パラメータの変化は、発酵期に比べれば緩やかなものとなっているが、期全体では明確な変化を伴ったものになっている。それ故、この期の微生物を解析する必然性は高いと言える。一方では、生育阻害を受けるような条件とは、微生物にとっては、定常期的生育をせざるを得ない条件でもある。つまり、熟成期を微生物

学的に解析することで、『定常期の微生物学』を展開させることに繋がっていくこととなる。

3. 研究の方法

本研究では、伝統的発酵食品醸造プロセスを、現代科学の最先端の手法により微生物学的に解き明かして行くことを目的としている。『熟成期』の微生物に関して次世代シーケンサーを用いて解析を加えると共に、培養法により得られる知見、さらに、物理化学的パラメータを合わせ、熟成期で生じている事柄を正確に記述していく。

4. 研究成果

熟成期の菌叢解析

壺寄せ直後から熟成開始後約300日のサンプルについて、それぞれ3つの壺の発酵液を16S rRNAを対象とした次世代シーケンサー解析に供した。なお、サンプルは壺表面下約20 cmから採取した。

門レベルでの菌叢解析

各菌叢において、最も優占的に存在しているのは Firmicutes 門、次いで優占的なのは Alphaproteobacteria 綱であった。また、熟成開始後307日の菌叢について大きな変化が認められた。(図2、3)

多様性解析

存在比率を考慮しない方法により多様性解析を行ったところ、各菌叢における種多様性は熟成日数に応じて変化しており、熟成日数とリンクした菌叢変化が示唆された。(図4)

種レベルでの菌叢解析

上記の多様性解析で菌叢変化が認められたサンプル間について、各日数における優占種5種の挙動を調べた(5月にサンプリング)すると、熟成開始後75日から155日について、*Lactobacillus acetotolerance* の減少と *Komagataeibacter xylinus* の特徴的な増加がみられた。また、熟成開始後155日から307日について、*L. acetotolerance* の減少と *Acetobacter pasteurianus* の爆発的な増加がみられた(図5、6)。

熟成開始後307日のサンプルに関しては明確な味の違いが認められたので、この菌叢変化が味の変化と関与している可能性が示唆された。

一方で、12月にサンプリングを行った発酵液(熟成250~350日)についても菌叢解析を行った。その結果、ほぼ同じ熟成日数のサンプルであっても、5月サンプリング分の菌叢とは全く異なる傾向(乳酸菌の消失、酢酸菌の存在比率増加)が認められた。このことから、熟成期として纏めて捉えることは適切ではなく、個々の壺の変遷をも考慮にい

れた解析が必要なが分かってきた。(図7)

D-アミノ酸高含有サンプルの菌叢解析

熟成期において、一部のサンプルについて顕著に D-アミノ酸を多く含んでいることが過去の研究で明らかとなった。今回は、D-アミノ酸高含有サンプルおよび低含有サンプルについて、その菌叢を比較解析した。

多様性解析

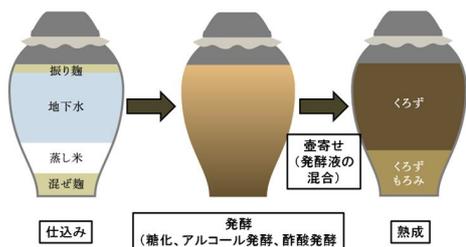
D-アミノ酸高含有サンプルについて、わずかな菌叢の相同性が示唆されたが、明確に菌叢に違いがあるとはいえなかった

種レベルでの菌叢解析

D-アミノ酸高含有サンプルの菌叢について、*L. acetotolerance* が有意に多く存在していることが示された。現に何種類かの他の乳酸菌について、D-アミノ酸を生合成できるラセマーゼ(異性化酵素)を持っているという報告があり、黒酢醸造においても D-アミノ酸生合成に乳酸菌が関わっていること、特に *L. acetotolerance* が大きく関与していることが示唆された。なお、乳酸菌については、壺から多数の株を得ており、D-アミノ酸生成性について、精査した。

図1. 「壺造り純米黒酢」醸造の概要

本研究では、熟成期の壺を解析した。



図の一部は坂元醸造ホームページより引用

図2. 壺寄せ後4日の菌叢

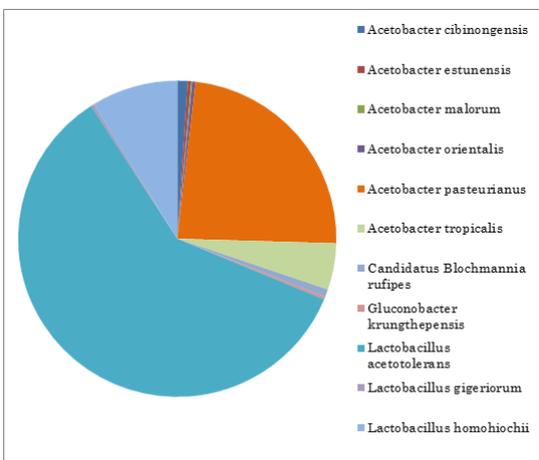


図3. 壺寄せ後300日の菌叢

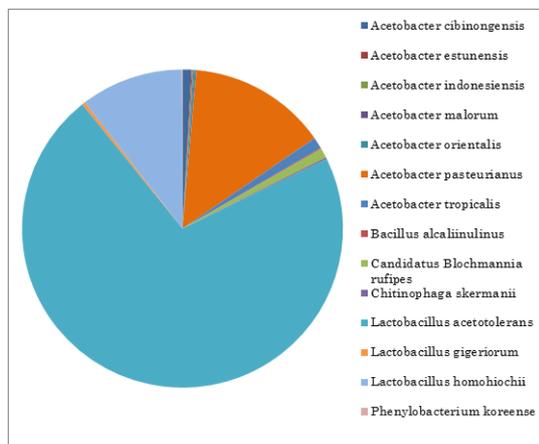


図4. 多様性解析

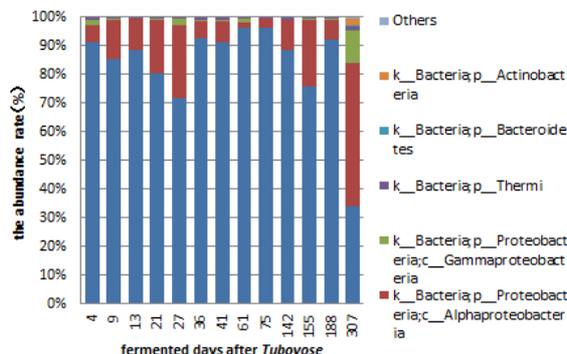


図5. 各日数における挙動

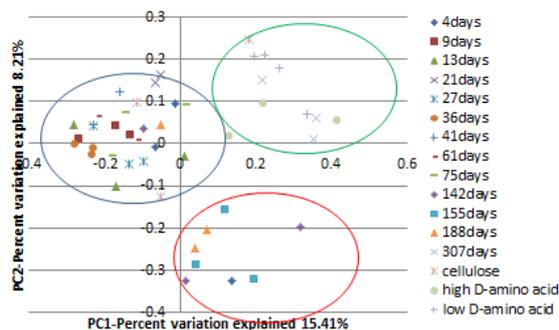


図6. *Firmicutes* の変遷

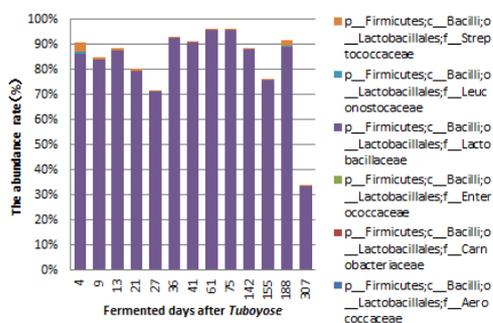
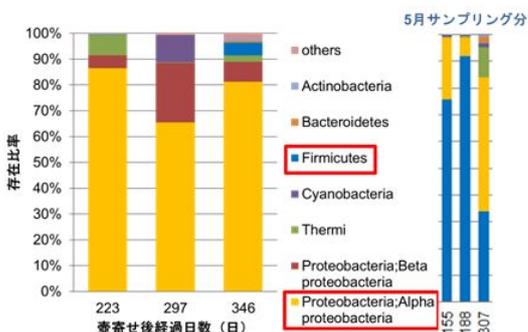


図7. サンプルング時期による違い



今後の展望

当初は、壺寄せが行われ熟成が進行していく中で、壺内の微生物叢の変化は殆ど無いだろうと考えており、そのため、定常期微生物学の創成も十分に可能であろうとしていた。しかしながら、実情は、どのような時期（季候）を経てきたサンプルであるかにより、微生物叢が大きく変化していることが読み取れた。微生物叢の変化が、季候に依存するものであるのか、あるいは、もっと別の要因があるのか否かは、今のところ不明ではあるものの、喫緊に明らかにすべき課題と捉えており、本助成が終了しても、続けて明らかにしていく。

D-アミノ酸生産性乳酸菌については、未だ明確な答えが出てはいないものの、*L. acetotolerance* がその要因菌である可能性は極めて高い。そのため、単離菌を用いた *in vitro* での実験系を立ち上げており、こちらも、本助成が終了しても、続けて明らかにしていく。

黒酢は200年以上の伝統を有する発酵食品であり、作り方に複雑な部分がある訳ではない。一方で、解析を進めれば進めるほど、微生物学的に不思議なところが多く出現してくる材料となっている。

これからも、黒酢醸造の不思議な部分を

きる限り多く解明していくことで、微生物学の新天地を開拓していくとともに生産現場へのフィードバック的な事柄も着実に履行していきたいと考えている。

本申請へのご理解に対し、厚く御礼申し上げます。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

2017年3月18日 **日本農芸化学会大会(京都)**「伝統的壺作り純米黒酢醸造における熟成期の菌叢解析」渡辺 紳太、堀 知行、青柳 智、橋口 和典、長野 正信、藤井 暁、新井 博之、石井 正治

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

石井 正治 (ISHII, Masaharu)
東京大学、大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：30193262

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()