

伝統的製法による醤油諸味中の物質動態と菌叢解析

田中友紀子・斎藤悠衣¹・塩見裕一郎²・濱田英介

Chemical Dynamics and Microbiological Diversity in Fermented Unrefined Soy Sauce Produced by Traditional Production Process

Yukiko TANAKA, Yui SAITO¹, Yuichiro SIOMI², and Eisuke HAMADA

(Accepted August 18, 2012)

Abstract Various kinds of bacteria in soy sauce brewing affect the quality of the soy sauce product. Therefore, observation of the chemical and microbiological dynamics in the production process is very important. The concentration of lactic acid in a fermented unrefined soy sauce (*moromi*) produced by a traditional soy sauce maker fluctuated greatly depending on the ambient temperature, reaching a peak at 1235.4 mg/100 ml. The concentration of leucine, which peaked at 1422.9 mg/100 ml, was the highest of all free amino acids in the *moromi*, followed by glutamic acid and asparagine acid. Thirteen species of bacteria were detected in the *moromi* by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); of these, one *Staphylococcus gallinarum* and two *Tetragenococcus halophilus* species were identified by 16S rDNA sequencing methods.

Keywords [Soy sauce, lactic acid, DGGE, *Tetragenococcus*, amino acid]

1 序論

醤油醸造には、様々な微生物が関与しており、これらの働きによって醤油の品質は大きく左右される。従って、醸造過程での微生物の管理は大変重要となる。醤油醸造における主要発酵微生物は乳酸菌および酵母菌であり、諸味中においては、まず耐塩性乳酸菌が増殖し乳酸発酵を行う。それにより pH が低下することで乳酸菌は減少し、次に酵母が増殖し始めアルコール発酵が起こるとされている。しかし、仕込み当初の菌叢になんらかの変動があった場合には異常な発酵形態となり、商品として扱えないような醤油ができることもある。また、乳酸発酵とアルコール発酵には生成される乳酸やアルコールの量にかなりのばらつきが生ずることがあり、その結果醬

油の風味に微妙な差異が生ずることになる。発酵過程にある醤油諸味では複雑な微生物群の相互作用により醤油の風味が形成されている。例えば乳酸菌は糖の発酵性、クエン酸の代謝能、アミノ酸変換能、生育に至適な温度と pH、乳酸発酵能などで各々異なる性質を持った複数の種あるいは亜種からなる微生物群であり、酵母においても同じことが言える¹⁻³⁾。

また、仕込み初期の温度によっても醤油の品質は大きく左右される。天然仕込み蔵の場合、夏仕込みでは、全窒素、グルタミン酸、乳酸の生成量が低くなり良い品質の醤油ができにくい、春仕込みは発酵もよく品質的にも優れているといわれている。このことから、一般的に冷温仕込みが行われており、仕込み後 20~30 日間は温度を約 15°C に保つのが良いとされる。冷温仕込みは出麹から持ち込まれる非

1 サントリープロダクツ株式会社

2 長友味噌醤油醸造元 (カネナみそしょうゆ)

耐塩性細菌の死滅や耐塩性乳酸菌の活動を停めることにより、pHの急激な低下を抑え、アルカリ性あるいは中性プロテアーゼの活性を促進させる。しかし、逆に温度を下げ過ぎたり、低温期間が長く続いたりすると発酵が遅れ、品質的にも良くないとされている⁴⁾。

このように微生物同士の相互作用や日々変化する温度などの環境条件の影響を受け、伝統食品である味噌や醤油製造プロセスの諸味熟成工程は非常に複雑さを有する生態系であると考えられる。このプロセスはブラックボックスとしてこれまで十分な解析の困難な手つかずのフィールドであった。一方、自然環境中に見られる複雑な生態系の解析の手段として、多くの場合、特定の機能に着目し、選択培地等を用いた培養により検出や単離、機能評価が行われてきたが、この方法では、その培地で生育可能な微生物に限られた知見しか得られなかった。これに対し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(denaturing gradient gel electrophoresis : DGGE)によれば微生物を培養することなく、検出や特定を容易に行うことが可能とされる。PCR-DGGE法は環境中の微生物から直接抽出した核酸をPCR増幅し、16S-rDNA塩基配列の違いにより分離するものである。これにより、微量のサンプルから培養せずにその環境に存在する微生物を検出できる。ポリアクリルアミドゲル上に分離されたDNAをバンドとして可視化できるため、その環境中にどれくらいの種類の微生物が存在するかを容易に判断することが可能である。具体的には土壌中や浄水槽内の菌叢、生ゴミのコンポスト化過程における細菌の遷移、伝統的なチーズ中の生物多様性⁵⁾や焼酎発酵における乳酸菌多様性の観察⁶⁾等、様々な環境における菌叢やその変化が研究されている。DGGE法はゲル上のバンドの位置や数の比較により、場所、培養前後、時間経過等の異なるサンプル間で微生物群集構造の比較が容易にできる。さらにゲル上のバンド(DNA)を切り出しPCR増幅した後、シーケンシングすることによってそれぞれの微生物種をほぼ同定することができる⁷⁾。

DGGEは本来染色体DNAの点変異を比較的容易に検出する手法として、FisherとLerman(1983)によって発表された。石井ら⁷⁾によるとDGGE法が微生物生態分野にも利用可能であることは、オランダのGerard Muyzerによって1992年に世界で初めて紹介され、さらに1993年、MuyzerらがApplied and Environmental Microbiology誌にDGGE法の微生物生態分野への適用を紹介したことで、この方法はヨーロッパにおいて急速に普及したとされる。同時期に、ドイツGBFのSmallaもDGGE法と同様の温

度勾配ゲル電気泳動法(temperature gradient gel electrophoresis : TGGE)の確立を行った。その後これらの方法は短期間のうちに微生物生態分野において急速に普及し、応用されている^{7,8)}。

これまで、培養法において様々な菌叢解析研究がなされてきたが、本研究ではPCR-DGGE法によって醤油諸味中の菌叢を解析し、菌叢の変化と諸味中のpH、乳酸、アミノ酸濃度等の物質動態の関係を明らかにすることを目的とした。

2 方法

2.1 諸味試料の取得

宮崎県宮崎市の長友味噌醤油醸造元から、それぞれ仕込み時期の異なる醤油諸味(諸味試料1~4)を採取した。各諸味試料の仕込み日や仕込み時期から採取・分析までの諸味試料熟成期間等を表1に示した。

表1. 諸味試料の仕込み日と採取日

諸味試料 No	仕込み日	採取日	熟成期間 (ヶ月)
1-1	2011.05.16 ~06.16	2011.05.20	0.1
1-2		07.01	1.5
1-3		08.12	2.9
1-4		08.24	3.3
1-5		10.19	5.1
1-6		12.02	6.6
2-1	2011.03.08 ~04.05	2011.05.20	2.4
2-2		07.01	3.8
2-3		08.12	5.1
2-4		08.24	5.5
2-5		10.19	7.4
2-6		12.02	8.8
3-1	2011.01.18 ~03.12	2011.07.01	5.4
3-2		08.12	6.8
3-3		08.24	7.1
3-4		10.19	9.0
3-5		12.02	10.4
4-1	2010.12.01 ~ 2011.01.27	2011.05.20	5.6
4-2		07.01	7.0
4-3		08.12	8.3
4-4		08.24	8.7

各諸味試料は採取時に熟成期間が異なるが、全諸味試料の分析結果を概観することで醤油諸味中の菌叢変化や物質動態の把握を試みた。製品化までの熟成期間は約12ヶ月で、採取した全21諸味試料のう

ち諸味試料 1-1、-2、-3、-4、2-1、-2 は熟成初期であり、同 1-5、-6、2-4、-5、3-1、-2、-3、4-1、-2 は熟成中期、同 2-6、3-4、-5、4-3、-4 は熟成後期にあたるものとした。長友味噌醤油醸造元では、伝統的製造法に則り、熟成の過程で乳酸菌や酵母等の微生物添加を行わず、諸味タンク内の温度や pH 管理も特段に行わず、温度は蔵内温度としている。

2.2 醤油諸味の特性

2.2.1 色

醤油諸味の熟成の指標として、茶系統色の色調分類が詳細な標準土色帖⁹⁾を用いて熟成期間の異なる各諸味試料の色調を決定した。

2.2.2 乳酸濃度

醤油諸味中の乳酸濃度は、各諸味試料を蒸留水で 1000 倍希釈し、乳酸測定キット(RQflex MERCK 社製)を用いて測定した。

2.2.3 pH

pH 測定器(twin pH B-212 堀場製作所)を用いて各諸味試料の pH を測定した。

2.2.4 遊離アミノ酸濃度

諸味試料を蒸留水で 10 倍に希釈した溶液をろ過し、遊離アミノ酸分析に供した。高速液体クロマトグラフィー(LC-10AD 島津製作所)を用いて上記の溶液中のイソロイシン(Ile)、ロイシン(Leu)、フェニルアラニン(Phe)、バリン(Val)、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)、プロリン(Pro)の定量を行った。これらアミノ酸の分離は光学分割カラム(MCI®GEL CRS10W 三菱化学)を使用した。各アミノ酸の分離条件を表 2 に示した。

表 2. 高速液体クロマトグラフィーによるアミノ酸の分離条件

種類	溶離液濃度 CuSO ₄ (mM)	流速 (mL/min)
Ile	2.0	0.5
Leu	2.0	1.0
Phe	2.0	1.0
Val	1.0	1.0
Asp	2.0	0.5
Glu	2.0	1.0
Pro	1.0	1.0

2.3 醤油諸味中の菌叢解析

2.3.1 DNA 抽出

各諸味試料 0.2g から DNA 抽出キット(ISOFE CAL 日本ジーン)を用いて所定の方法で全 DNA を抽出した。

2.3.2 DNA 増幅

表 3 に示した組成の PCR 試薬(タカラバイオ株式会社)を調製し、抽出した全 DNA から 16S-rDNA 領域の PCR を行った。プライマーは、大腸菌の 16S-rRNA 塩基配列部位 341-357 に相当する領域の一方に GC クランプを結合させた細菌に特異的な GC-341F(5'-GCCGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCG TCCCGCCGCCCGCCCGCCTACGGGAGGCAG CAG-3')及び、大腸菌の 16S-rRNA 塩基配列部位 907-926 に相当する 907R(5'-CCGTCAATTCCTTT [A/G]AGTTT-3')を用いた。PCR のサイクリング条件は、表 4 に示した。PCR 産物の DNA 量は、2%アガロースゲルで電気泳動を行って目視確認した。

表 3. PCR 反応液組成(total 50µl)

10X Ex Taq Buffer	5µl
dNTP Mixture(2.5mM each)	5µl
GC-341F (25µM)	0.5µl
907R (25µM)	0.5µl
TaKaRa Ex Taq [®] (5 units/µl)	2.5µl
滅菌蒸留水	36.75µl
抽出 DNA	2µl

表 4. PCR 条件(GC-341F-907R)

温度(°C)	時間(分:秒)	
94	2:00	
94	1:00	20 サイクル
65(ΔT: - 0.5)	1:00	
72	3:00	
94	1:00	10 サイクル
55	1:00	
72	3:00	
72	10:00	
4	∞	

2.3.3 DGGE

DGGE 法はユニバーサルミュートーション検出システム(Dcode BIORAD 社)を用いた。尿素濃度の異なる 3 種類のゲル溶液(65、30、0%、表 5)を調製し、ガラスプレートに尿素濃度グラディエントゲル(尿素濃度 65~30%)を作成し、当ゲルのウェルに PCR 産物 20µl とローディングバッファー 4µl を添加した。当ゲルは 60°C の 1×TAE バッファー槽にセットし、110V で 14 時間電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを SYBR[®] Gold 核酸染色溶液(10µl/100ml TAE)に浸し、染色された DNA バンドをトランスイルミネータ上(254nm)で確認して、写真を撮影した。

表 5. グラディエントゲル作製用溶液の組成

試薬	65%	30%	0%
Formamide (ml)	5.2	2.4	0
Urea (g)	5.46	2.52	0
40% AA/Bis mix. (ml)	3	3	3
50×TAE buffer (ml)	0.4	0.4	0.4
dH2O (ml)	to 20	to 20	to 20
Dye Solution(ml)	0.4	0	0
10% APS(μl)	180	180	0
TEMED(μl)	18	18	0

2.3.4 ゲルからの DNA 抽出

ゲルカット用のチップでバンド部分のゲルをカットし、凍結融解法によって DNA を抽出した。

2.3.5 TA クローニング

GC クランプを結合させていないプライマー-341F 及び 907R を用いて、ゲルから抽出した DNA の PCR 増幅を行った。PCR 条件は表 6 に示した。PCR 産物の DNA 量は、2%アガロースゲルで電気泳動を行って目視確認した。得られた PCR 産物をフェノール抽出及びエタノール沈殿によって精製し、TA クローニングキット(pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems、プロメガ)を用いて指定の方法で TA クローニングを行った。ブルーホワイトセレクションによりクローニングの有無を確認し、プラスミド DNA 精製キット(FastGene™ Plasmid Mini 日本ジェネティクス)でプラスミド DNA の精製を行った。

表 6. PCR 条件(341F-907R)

温度(℃)	時間(分:秒)	
94	2:00	30 サイクル
94	0:15	
55	0:30	
72	1:00	
72	5:00	
4	∞	

2.3.6 16S-rDNA 解析

16S-rDNA 解析は、テクノスルガ・ラボ株式会社(静岡県清水市)に依頼した。DGGE 解析によって得られたバンドの塩基配列解析は、サイクルシーケンスに BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA)、プライマーに 341F、907R を使い、シーケンスには AIB PRISM3130 xl Genetic Analyzer System (Applied Biosystems, CA, USA)を使用し、ChromasPro 1.4 (Technelysiu

Pty Ltd., Tewantin, AUS)により配列決定を行った。相同性検索および簡易分子系統解はソフトウェアアポロン 2.0 DB-BA7.0 (テクノスルガ・ラボ、静岡)および国際塩基配列データベース(GenBank/DDBJ/EMBL)から行われた。

3 結果及び考察

3.1 醤油諸味の特性

3.1.1 色

5月に採取した諸味試料 1-1(仕込み直後)、同 2-1(熟成期間 2.4 ヶ月)、および同 4-1(同 5.6 ヶ月)の色は、それぞれ黄褐色、オリーブ褐色、オリーブ褐色であり、黄色の色調がやや強かった。7月以降それらは、赤みを帯びた褐色となった。10月以降に採取した諸味試料 3-4 を除く全て、及び熟成後期の同 4-4(熟成期間 8.7 ヶ月)は暗褐色であった(表 7)。醤油諸味は基本的に褐色系の色調であり、諸味熟成期間の長短による色の変化は大きくなく、外気温が比較的低い熟成期間中は黄みを帯びており、その後外気温が上って発酵が盛んになると赤みを帯びて、最終的には暗褐色になることが示された。

表 7. 標準土色帖による諸味試料の色調

No	色		
1-1	黄褐	Hue 2.5Y	5/6
1-2	褐	Hue 10YR	4/6
1-3	褐	Hue 10YR	4/6
1-4	褐	Hue 7.5YR	4/4
1-5	暗褐	Hue 7.5YR	3/4
1-6	暗褐	Hue 7.5YR	3/4
2-1	オリーブ褐	Hue 2.5Y	4/4
2-2	褐	Hue 10YR	4/6
2-3	褐	Hue 10YR	4/6
2-4	褐	Hue 10YR	3/4
2-5	暗褐	Hue 10YR	3/4
2-6	暗褐	Hue 10YR	3/4
3-1	褐	Hue 7.5YR	4/4
3-2	褐	Hue 10YR	4/6
3-3	褐	Hue 7.5YR	4/6
3-4	褐	Hue 7.5YR	4/4
3-5	暗褐	Hue 10YR	3/4
4-1	オリーブ褐	Hue 2.5Y	4/3
4-2	褐	Hue 7.5YR	4/4
4-3	褐	Hue 7.5YR	4/6
4-4	暗褐	Hue 10YR	3/4

3. 1. 2 乳酸濃度及び pH

5~6 月仕込みの諸味試料 1 の乳酸濃度は仕込み後 4 日目から 3.3 ヶ月目までに 0.7mg/100ml から 1171.0mg/100ml へと急激に増加し、それに合わせて pH も 5.7 から 4.8 に低下した。仕込み後 5.1、6.6 ヶ月には、491.2、776.2mg/100ml と変化し、pH は 4.7、4.6 と変化した。3~4 月仕込みの諸味試料 2 の乳酸濃度は、仕込み後 2.4、3.8 ヶ月には、25.6 mg/100ml から 1069.9 mg/100ml へと急激に増加したが 5.1 ヶ月目には 49.4mg/100ml と急激に低下し、その後 5.5、7.4、8.8 ヶ月目はそれぞれ 45.4、24.3、25.2mg/100ml と大きな変化は見られなかった。pH は 5.2、5.0、5.1、5.1、4.9、5.0 と若干変化した。1~3 月仕込みの諸味試料 3 の乳酸濃度は仕込み後 5.4 ヶ月目は 49.4mg/100ml と低かったが、その後 6.8、7.1 ヶ月目にかけて 1226.2、1235.4mg/100ml と急激に上昇し、pH は 5.2 から 4.9 に低下した。9.0 ヶ月には 454.5mg/100ml と低下し 10.4 ヶ月目には 583.2mg/100ml と再び上昇した。12 月~1 月仕込みの諸味試料 4 の乳酸濃度は、仕込み後 5.6、7.0、8.3、8.7 ヶ月にそれぞれ 216.4、297.6、453.9、453.9 mg/100ml で、他の諸味試料ほど乳酸濃度は増大せず、pH は常に 5.2 であった。各試料の熟成期間と乳酸濃度及び pH を図 1 に示した。諸味試料 1、2、3 とともに乳酸濃度は 1000~1200mg/100ml 程度にまで増加するが、その増減の様子は仕込み時期の違いによって大きく異なった。乳酸濃度と pH には相関がみられるが、採取時期が熟成初期であった諸味試料 1 の pH 低下が他の諸味試料に比べて大きいのは、アミノ酸発酵が進んでおらず pH 緩衝能の低い時期に乳酸濃度が急激に上昇したためであると考えられる。

諸味試料 1 及び同 2 の乳酸濃度は、5 月には低かったが、7 月には急激に上昇していた。これは、外気温が上昇したことでタンク内が乳酸菌の増殖に適した環境となり、乳酸発酵が盛んに行われたためと考えられる。しかし、諸味試料 2 では一旦上昇した乳酸濃度がその後急激に低下した。これは、乳酸菌の急激な活性の後退と乳酸を資化する微生物の増殖によるものと思われる。諸味試料 4 は、仕込みが冬だったこともあり、低温で長期間熟成されたことで、乳酸濃度は比較的 low 低く、既に熟成中期後半であったため、外気温が上がってもそれほど乳酸菌が増殖しなかったものと思われる。諸味試料 3 は熟成中期にも関わらず、乳酸濃度が急激に上昇した。その後 11 月には諸味試料 1 及び同 3 の乳酸濃度が同じように低下した。これは、外気温が下がったことにより乳酸菌の生育が抑えられたためと考えられる。これらの乳酸濃度は 12 月に再び上昇した。この結果について

ては今後更なる検討が必要である。図 2 に諸味試料の採取月と乳酸濃度を示した。

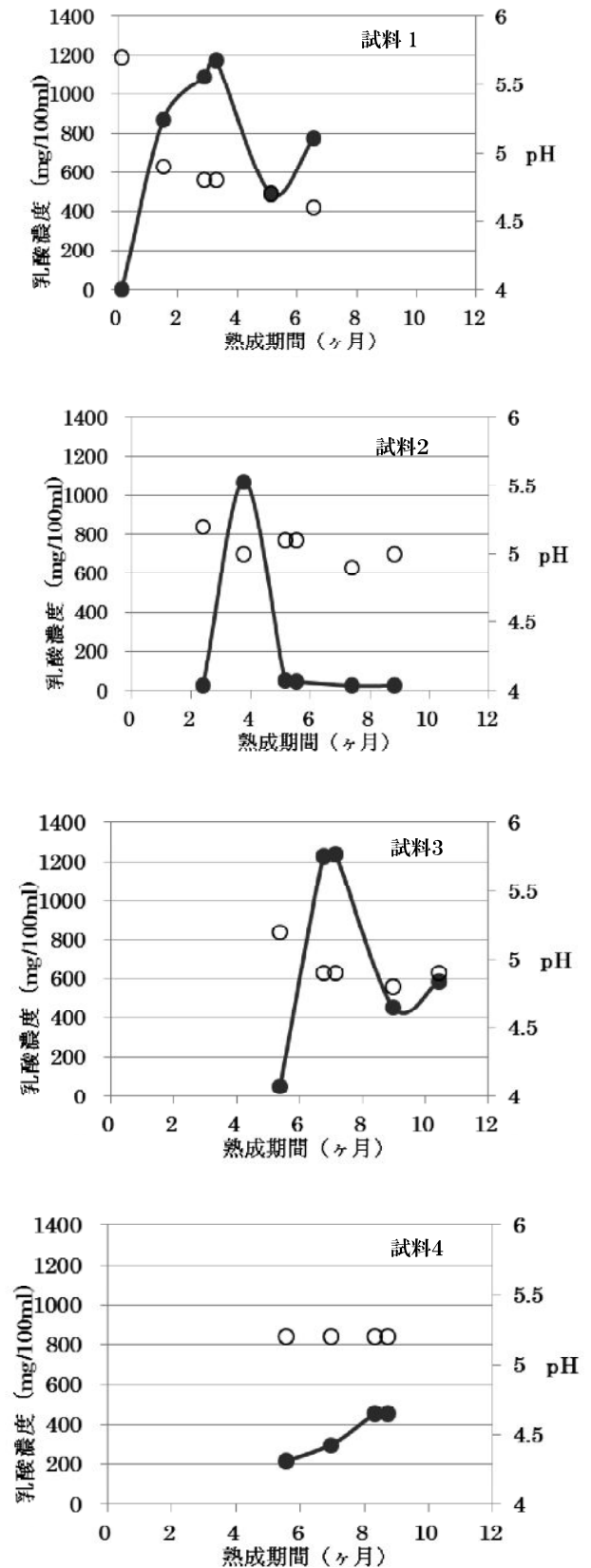


図 1. 熟成期間と各諸味試料中の乳酸濃度及び pH (●: 乳酸濃度, ○: pH)

諸味が熟成されていた期間の宮崎県宮崎市青島の月平均気温は、冬(2010年12月、2011年1、2月)は10.4、5.7、10.3℃、春(3~5月)は10.6~20.5℃、夏(6~8月)は23.5~27.5℃、秋(9~11月)25.2~17.1℃、12月は9.8℃で年平均気温は17.8℃であった(図3)。これによると諸味試料1の仕込み時期である5月と諸味試料4の仕込み時期である12、1月では約15℃の気温差が認められ、この温度差がその後の乳酸生成に影響を及ぼしたと考えられる。乳酸発酵は温度やその他の要因によって大きく左右されるため、特段の温度管理を行わない伝統的製造法による醤油諸味では、仕込み時期により同じ熟成期間を経た諸味でも乳酸濃度は大きく変動するものと思われる。

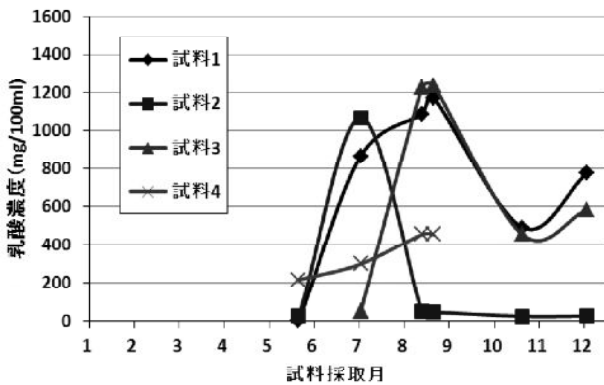


図2. 諸味試料の採取月と乳酸濃度

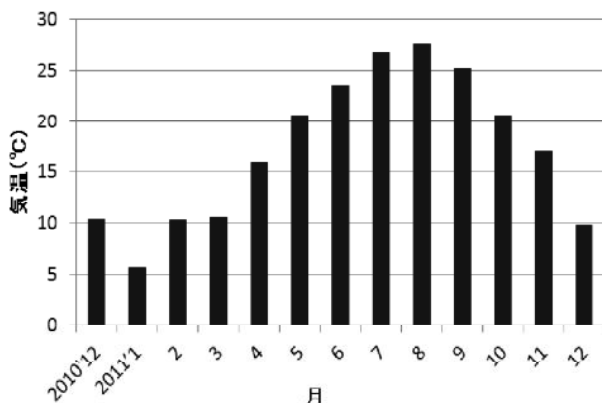


図3. 宮崎県宮崎市青島の各月の平均気温 (国土交通省気象庁¹⁰⁾)

3.1.3 遊離アミノ酸濃度

4つの諸味試料の熟成期間と遊離アミノ酸濃度を図4に示した。全ての諸味試料でロイシンが最も多く、熟成後期にかけて1000~1400mg/100ml程度に増加し、本諸味中にロイシン生産能の高い微生物の存在が示唆された。次いでアスパラギン酸、グルタ

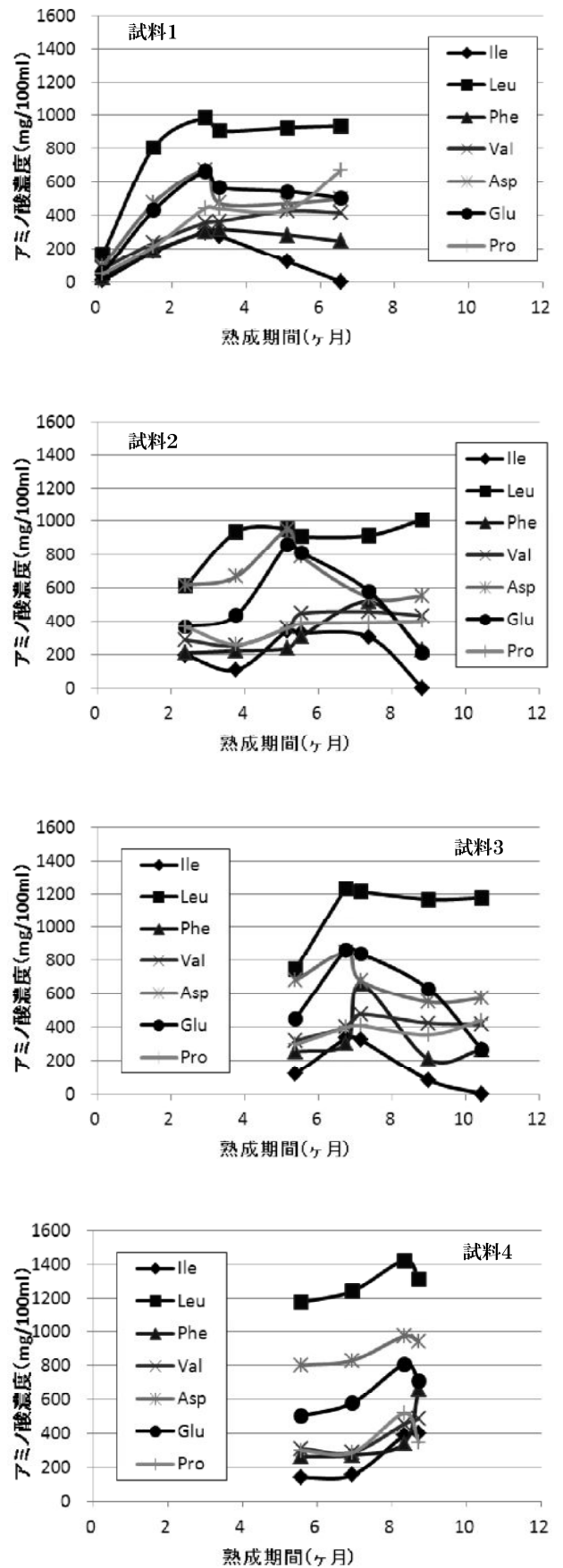


図4. 諸味試料の熟成期間と遊離アミノ酸濃度

ミン酸の濃度も比較的高く、それぞれ最大で 975.5、863.0mg/100ml に増加した。これらのアミノ酸は元々大豆に多く含まれており、大豆中のタンパク質が各種微生物によって分解され、溶出されたと考えられる。通常大豆あるいは醤油に含まれるアミノ酸は、グルタミン酸が最も多いとされる。夏仕込みの諸味では一般的にグルタミン酸が少ない場合のあることが報告されている¹¹⁾が、本研究では冬あるいは春仕込みの諸味試料でも比較的低いグルタミン酸濃度となっていた。これは、仕込み時期の温度や pH 以外にグルタミン酸を生産する微生物、あるいは米麴に何らかの原因があると考えられるが、詳細な検討は今後の課題である。

3.2 醤油諸味中の菌叢解析

3.2.1 DGGE

DGGE 法によって各諸味試料から合計 13 種類のバンド(a~m)が検出されたことで、全諸味試料中には少なくとも 13 種類の細菌が存在することが確認された(図 5)。全諸味試料にほぼ共通して現れるバンドは 3 種(a, c, e)であった。各諸味試料のバンド数は諸味試料 1 では 7, 8 本でほぼ同数であった。諸味試料 2 では 4~7 本と熟成期間ごとに異なり、この時期にある諸味中では菌叢の変化が著しいと推測された。諸味試料 3 では 6~8 本、同 4 では 7~9 本であった。

熟成初期にある諸味試料 1 のバンドの数からは一見諸味中の菌叢は均一に見えるが、仕込み直後の試料 1-1 に存在した 8 種類の細菌(バンド a, c, e, h, j, k, l, m)の内 5 種(同 h, j, k, l, m)が 1.5 ヶ月後の試料 1-2 には確認されず、新たに別の 4 種(同 d, f, g, i)が現れた。諸味試料 2 は、仕込み後 2.4 ヶ月の試料 2-1 で 6 種(同 a, c, e, i, l, m)が存在し、同 3.8 ヶ月 2-2 ではその内の 2 種(同 l, m)が消失し、新たに 4 種(同 b, d, f, g)が現れた。このことは、熟成初期の諸味中で菌叢の著しい変動があることを示している。仕込み時に出麴や水等によって持ち込まれた細菌は、高濃度食塩環境下で非耐塩性のものが死滅し、代わりに元々蔵や醸造用タンク内に存在した耐塩性の細菌が増殖したと考えられる。乳酸濃度が急激に低下した諸味試料 2-3(5.1 ヶ月)では同 2-2 で認められた 4 種(同 b, d, f, g)が認められなかった。この内 3 種(同 d, f, g)は、他の諸味試料で乳酸濃度が上昇した際にも現れており、この 3 種のいずれか、あるいは複数種の乳酸生成への関与が示唆される。また、諸味試料 2 の遊離アミノ酸濃度との相関性が小さかったことは、菌叢の著しい変化と関連があるものと考えられ、これらの微生物のいずれかがアミノ酸生成に関与していることが推測された。

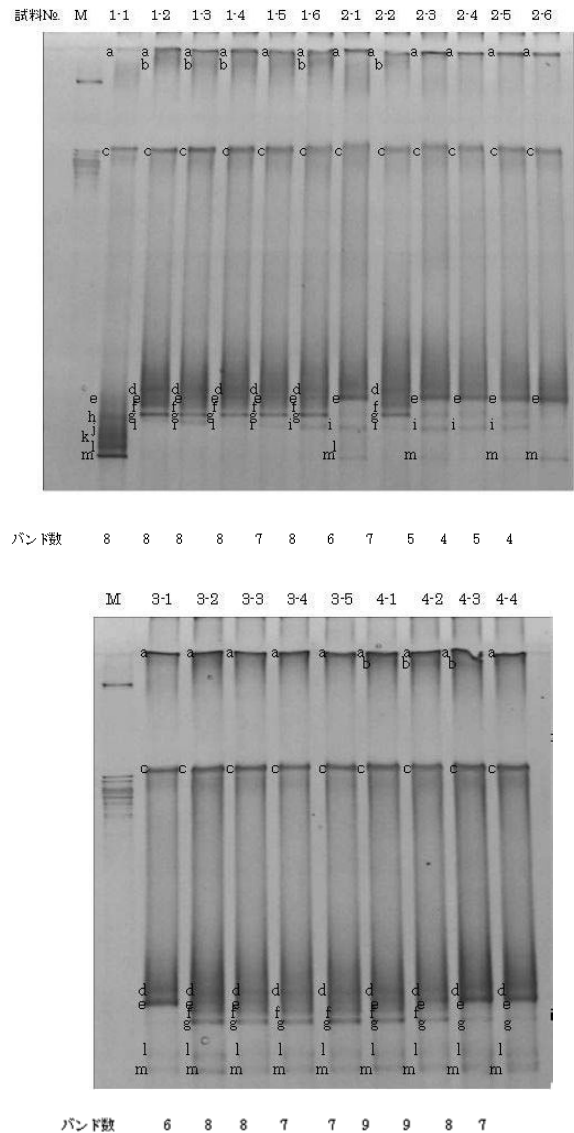


図 5. DGGE 法による各諸味試料中の 16S-rDNA バンド

3.2.2 16S-rDNA 解析

前記バンド e(図 5)の 16S-rDNA 塩基配列は、BLASTを用いたアポロンDB-BA7.0に対する相同性検索の結果、*Staphylococcus gallinarum*に由来する 16S-rDNA に対し 100%の最も高い相同性を示した。また、GenBank/DDBJ/EMBL に対する相同性検索の結果において、uncultured bacterium の 16S-rDNA に対し高い相同性を示した。アポロン DB-BA 7.0 の相同性検索によって得られた相同率の高い菌株由来の 16S-rDNA を用い、簡易分子系統解析を行った結果、バンド e 由来の DNA は、*Staphylococcus gallinarum*の 16S-rDNA と系統枝を形成し近縁であることが示された(図 6)。従ってバンド e 由来の DNA は *Staphylococcus gallinarum* に由来する配列である可能性が高いと考えられた¹³⁾。

バンド d 及び g 由来の DNA の 16S-rDNA 塩基配列は、BLAST を用いたアポロン DB-BA7.0 に対する相同性検索の結果、*Tetragenococcus halophilus* に由来する 16S-rDNA に対し 99.8% の最も高い相同性を示した。また、GenBank/DDBJ/EMBL に対する相同性検索の結果において、*Tetragenococcus halophilus* の 16S-rDNA に対し高い相同性を示した。これらの相同性検索の結果得られた相同率の高い菌株由来の 16S-rDNA を用いて簡易分子系統解析を行った結果、バンド d および g 由来の DNA は、*Tetragenococcus halophilus* の 16S-rDNA と系統枝を形成し近縁であることが示された(図 7)。従ってバンド d および g 由来の DNA は *Tetragenococcus halophilus* に由来する配列である可能性が高いと考えられた¹³⁾。

DGGE においては 1 つの配列が 1 つのレーンでいくつかのバンドとして見られることがある¹⁴⁾ が、バンド d 及び g は、各諸味試料に必ず揃って存在する訳ではなく、また 16S-rDNA 中数か所で塩基配列の相違が見られたことから、双方が亜種レベルでそれぞれ異なる細菌と考えられた。

Tetragenococcus halophilus(以前は *Pediococcus halophilus* と呼ばれた)は、醤油醸造における主要発酵微生物としてよく知られている¹⁾。この細菌は、グルコースから乳酸だけを生成するホモ型の 4 連球菌である。諸味中では 5~10% の食塩濃度で最適の増殖を示し、好塩性で、22% の食塩濃度の中でも生育できる。役割としては、諸味中で乳酸を生成し、諸味の pH を下げ、食塩存在下で増殖する耐塩性酵母の増殖最適 pH にする¹⁵⁾。また、低 pH は醤油の変質や微生物による汚染を防ぎ、保存性を高める。この他、乳酸が増加すると酸による塩なれと押し味を付与する¹⁶⁾。*Tetragenococcus halophilus* は、複数のタイプに分けられ、クエン酸から酢酸、ペントースから乳酸と酢酸を生成するもの¹⁷⁾や、糖資化性、生育速度、低 pH 感受性などで異なるタイプが存在する¹⁸⁾。

Staphylococcus gallinarum は、グラム陽性、非運動性、非孢子性で、至的溫度 37°C の通性嫌気性細菌である。これまでも醤油諸味や味噌から主要菌種として検出されている¹⁹⁻²¹⁾が、諸味中でのその役割については分かっていない。この細菌は乳酸菌が産生するバクテリオシンに対して感受性を示し、増殖を阻害される²¹⁾。また、*Staphylococcus gallinarum* Tue3928 株は、ランチオニン含有ポリペプチド抗生物質ガリデルミンを作り出す²²⁾。DGGE では、バンド e が濃く現れている諸味試料では他のバンドが薄いように見え、バンド e の薄い諸味試料ではバンド d あるいは g が濃く現れているように見える。この結果から、*Staphylococcus gallinarum* の出す物質

に抗菌作用があることが推測され、*Staphylococcus gallinarum* と乳酸菌は拮抗関係にあると考えられる。

4 結論

- (1) 諸味試料の色調は、外気温が比較的低い熟成期間中は黄系の褐色であり、その後外気温が上がって発酵が盛んになると赤みを帯びた褐色に変化し、最終的には暗褐色になった。
- (2) 諸味中の乳酸は、仕込み時期の相違によって、大きく変動し、濃度の変化に一定の傾向は認められなかった。しかし、乳酸が諸味中に生成する時、その濃度は最大 1000~1300mg/100ml であった。諸味中の乳酸濃度と pH は負の相関が認められたが、両者の相関性は熟成初期の諸味で大きく、熟成中期以降で小さくなる。これは、熟成に伴い、諸味の pH 緩衝能が高まるためと推測される。
- (3) 遊離アミノ酸は、全てにおいてロイシンの濃度が最も大きく、最大 1422.9mg/100ml であった。次いでグルタミン酸、アスパラギン酸の濃度が大きかった。フェニルアラニンを除く遊離アミノ酸は春から夏にかけて増加し、秋から冬にかけては、一定あるいは減少する傾向がみられ、乳酸と同じく外気温の影響を大きく受けるものと考えられた。一方フェニルアラニンは試料によって濃度変化の様子が異なり、フェニルアラニンを生産あるいは資化する微生物を増加させる要因があるものと考えられる。
- (4) DGGE 法によって全諸味試料中に少なくとも 13 種類の細菌が存在することが確認された。全諸味試料にほぼ共通して現れるバンドは 3 種(a, c, e)であった。この常在性の細菌は pH 変化や高い塩濃度に特に耐性が大きい細菌であると考えられる。その内 1 種(e)は、*Staphylococcus gallinarum* であると推定された。また、乳酸濃度が高い時期に認められ、乳酸が減少するにつれ消失するバンドが 3 種(d, f, g)認められた。その内 2 種(d, g)は *Tetragenococcus halophilus* であると推定された。バンド d 及び g 由来の 16S-rDNA は、数か所で塩基配列の相違が見られたことから、双方が亜種レベルでそれぞれ異なる細菌と考えられる。

謝辞

本研究は宮崎県食品開発センターの工藤哲三氏、水谷政美氏、高山清子氏、東京工業大学の丹治保典氏、宮永一彦氏、Reasmey Tan 氏に多大なご協力いただきました。ここに心より感謝の意を表します。

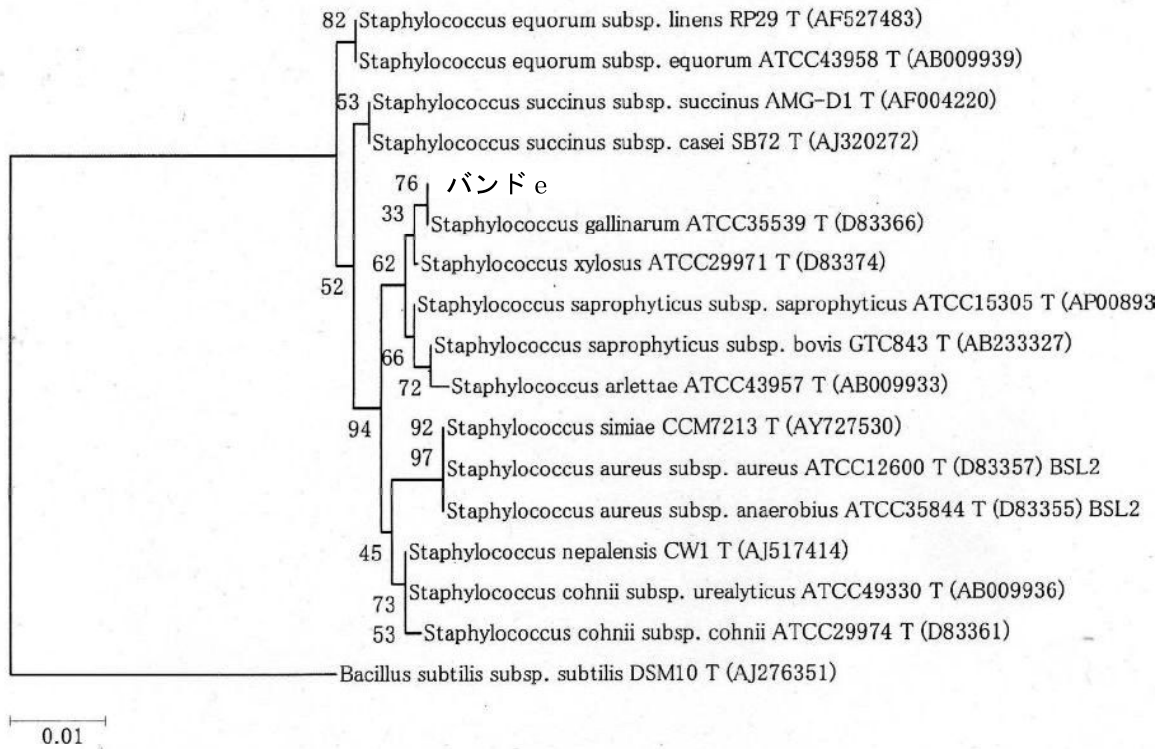


図 6. 16S-rDNA 塩基配列を用いたバンド e 由来の DNA の分子系統樹

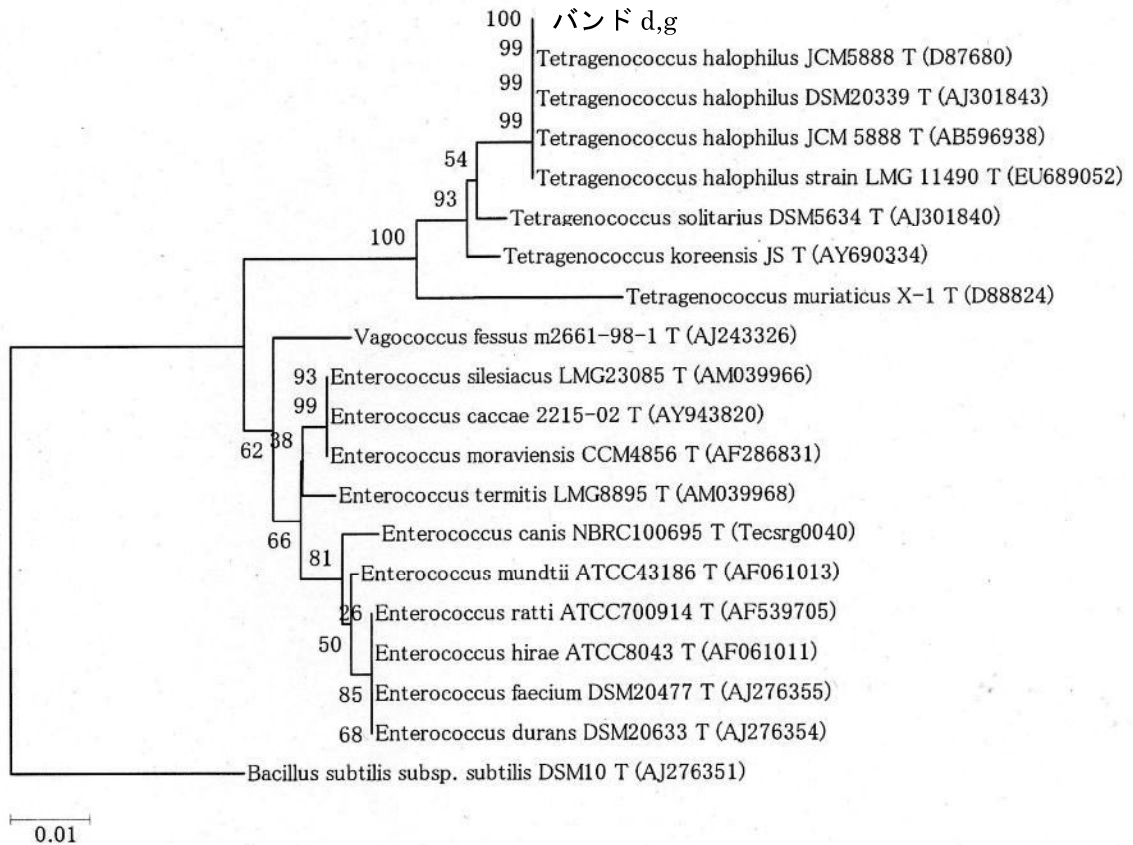


図 7. 16S-rDNA 塩基配列を用いたバンド d, g 由来の DNA の分子系統樹

参考文献

- 1)佐々原浩幸,中黒和代,岩崎賢一,谷川善弘:醤油諸味中における乳酸菌と酵母の動態,香川県発酵食品試験場報告,**80**,pp.6-10,1988.
- 2)門脇清:醤油諸味中の微生物間の相互作用・主として醤油酵母の乳酸菌に及ぼす影響について,日本醸造協会誌,**80**, pp.707-709,1985.
- 3)富山幸子,工藤哲三,日高照利,柏田雅徳:醤油諸味の発酵過程における耐塩性酵母の動態,宮崎県農業試験場・宮崎県食品加工研究開発センター研究報告,**37**, pp.149-157,1992.
- 4)江口卯三夫:中小しょうゆ工場における諸味管理,日本醸造協会誌,**80**, pp.771-779,1985.
- 5)GaberEl-Baradei , Agnes Delacroix-Buchet, Jean-Claude Ogier : Biodiversity of Ecosystems in Traditional Egyptian Domiati Cheese, Applied and Environmental Microbiology, **73**, pp.1248-1255,2007.
- 6)Endo A., Okada S. :Monitoring the Lactic Acid Bacterial Diversity during Shochu Fermentation by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Journal of Bioscience and Bioengineering, **99**, pp.216-221,2005.
- 7)石井浩介,中川達功,福井学:微生物生態学への変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用,Microbes and Environments, **15**, pp.59-73,2000.
- 8)DCode ユニバーサルミュレーション検出システム操作取扱説明書,日本バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社
- 9)小山正忠,竹原秀雄:新版標準土色帖 23 版(農林水産省農林水産技術会議事務局監修・財団法人日本色彩研究所色票監修),日本色研事業株式会社,東京,2001.
- 10)国土交通省気象庁 気象統計情報
<http://www.jma.go.jp/jma/index.html>
- 11)奥沢洋平,板倉徹,江口卯三夫:分析成分から見た県産しょうゆ諸味,醬研,**9**,pp.99-103,1983.
- 12)齋藤悠衣:味噌・醤油製造に関わる微生物の分離と特性評価,都城工業高等専門学校専攻科特別研究論文,2011.
- 13)DGGE バンド塩基配列解析報告書:株式会社テクノスルガ・ラボ,2011.
- 14)Murakami Y., Otsuka S., Senoo K.: Abundance and Community Structure of Sphingomonads in Leaf Residues and Nearby Bulk Soil, Microbes and Environment,**25**, pp.183-189,2010.
- 15)伊藤寛,童江明:味噌,醤油の微生物,日本食品微生物学会雑誌,**11**, pp.151-157,1994.
- 16)今井誠一,松本伊佐尾:味噌技術読本(新潟県味噌技術会),p.310,1990.
- 17)野田文雄:醤油諸味中における乳酸菌と酵母の拮抗現象について,日本醸造協会誌,**76**, pp.701-704, 1981.
- 18)小牧三輪子,茂木喜信:DGGE 法によりタイプ分けされる醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* の性質について,日本醸造協会誌,**104**,p.41,2009.
- 19)Kim Tae Woon, Lee Jun-Hwa, Park Min-Hee, Kim Hae-Yeong: Analysis of Bacterial and Fungal Communities in Japanese- and Chinese-Fermented Soybean Pastes Using Nested PCR-DGGE, Curr. Microbiol., **60**, pp.315-320, 2010.
- 20)田中泰史,茂木喜信,山崎達雄,浦哲二:DGGE 法による醤油醸造工程における微生物相の解析,第 57 回 日本生物工学会大会講演要旨集,**2005**,p.204,2005.
- 21)Onda T.,Tsuji M.,Yanagida F.,Shinohara T., Yokotsuka K.: Time series analysis of aerobic bacterial flora during Miso fermentation, Lett. Appl.Microbiol.,**37**,pp.162-168,2003.
- 22)Kellner R, Jung G, Hoerner T, Zaehner H, Schnell N, Entian K-D, Goetz F:Gallidermin: A new lanthionine-containing polypeptide antibiotic, Eur. J. Biochem.,**177**,pp.53-59, 1988.