

「奈良漬の製造工程に適応した微生物とその品質への役割の解明」

奈良屋本店

奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域
准教授 渡辺 大輔

【序論】

奈良漬は日本の食文化に古くから根付いている伝統的な発酵食品とされ、他の発酵漬物と同様に微生物の関与が推測されてきた。1970年代の研究では、奈良漬から *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lacticaseibacillus paracasei* といった乳酸菌や、*Saccharomyces* sp., *Pichia* sp.などの酵母が単離されたことが報告されている(Yamagata & Fujita (1974); Kitamura *et al.* (2016))。しかし、これらの微生物が奈良漬の微生物叢においてどの程度の割合を占めるのか、またそれらの特性については十分に解明されていない。さらに、奈良漬の製造過程における微生物叢の変遷や、それらが品質に与える影響についての知見も不足している。そのため、奈良漬が発酵食品であると厳密に定義できるかどうかも明確ではない。

奈良漬の製造には、高濃度エタノールを含む熟成酒粕に塩漬野菜を漬け込むという、他の漬物とは異なる独特の方法が用いられる(図 1)。このため、奈良漬には塩分やエタノールに適応した微生物による特有の生態系が形成されていると考えられる。奈良漬を安定的に生産し、さらにその付加価値を向上させるためには、微生物学的な知見が不可欠であるが、他の漬物と比較しても未解明の点が多く残されている。

本研究では、奈良漬における微生物生態系の存在とその形成原理を明らかにすることを目的とする。奈良漬の製造工程における微生物叢のダイナミクス、品質への影響、および微生物の生育特性を解析することで、奈良漬の製造環境に適応した微生物の特徴を解明することを目指す。

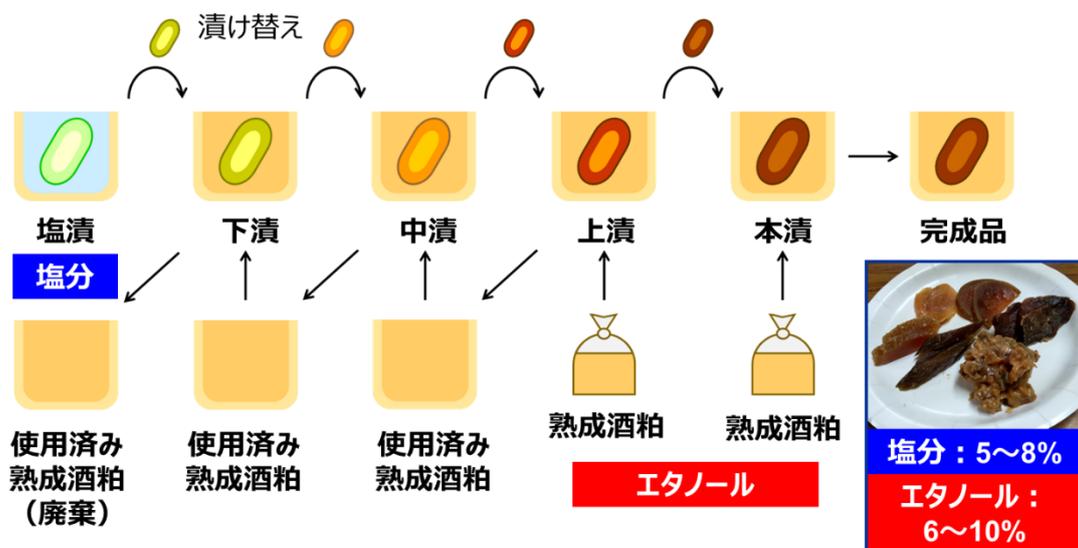


図 1. 奈良漬の製造方法

【結果と考察】

1. 奈良漬の微生物叢解析

本研究では、奈良漬の製造過程の微生物生態系の全体像を明らかにするため、原材料として塩漬野菜と熟成酒粕、仕掛品前半として中漬(前回製造時の使用済み熟成酒粕に 2 回漬替えた状態)、仕掛品後半として上漬(中漬が終わった仕掛品を未使用の熟成酒粕に漬替えた状態)、および完成品の奈良漬をサンプルとして、各製造工程の微生物叢解析を実施した。サンプル中のそれぞれの微生物の占有率を調べるために、真菌では ITS1 領域、細菌・アーキアでは 16S rDNA V4 領域に基づくアンプリコンシーケンス解析を行った。さらに、各製造工程でどのような微生物が生息しているかを調べるために、微生物の単離・簡易同定についても併せて実施した。これら 2 種類の実験データを統合して奈良漬の生態系の特徴付けを行った。

ITS1 領域のアンプリコンシーケンス解析(図 2)では、原材料から完成品までのすべての製造工程を通して標準的な製法を用いた 2 社(そのうちの 1 社が奈良屋本店)で類似した傾向を示した。新粕および熟成酒粕では、*Aspergillus* 属と *Saccharomyces* 属が大部分を占めていた。これらは清酒醸造に用いられた麹菌と清酒酵母にそれぞれ対応すると考えられる。細菌の増殖を抑制するためにク

ロラムフェニコールを加えた YPD 培地を用いて真菌の単離を試みたところ、熟成酒粕からは *Aspergillus* 属や *Saccharomyces* 属の真菌は単離されなかった。したがってこれらの微生物は酒粕の熟成以降の工程では生菌として残存しているわけではないことが推察された。塩漬野菜においては、アンプリコンシーケンス解析の結果から、*Zygosaccharomyces* 属の酵母が優占的であることが明らかになった。また、2社のメーカーの塩漬野菜からクロラムフェニコール含有 YPD 培地において *Zygosaccharomyces rouxii* が単離されたことから、塩漬野菜中で *Z. rouxii* が優占種であることが示唆された。*Z. rouxii* は耐塩性の酵母として知られており、醤油や味噌などの高塩分な食品の発酵に関わっている。したがって、奈良漬の原材料である塩漬野菜の製造においても *Z. rouxii* が関与している可能性が示された。仕掛品および完成品の奈良漬では、塩漬野菜で優占的であった *Zygosaccharomyces* 属の酵母は減少し、原材料の熟成酒粕と類似した微生物叢となった。

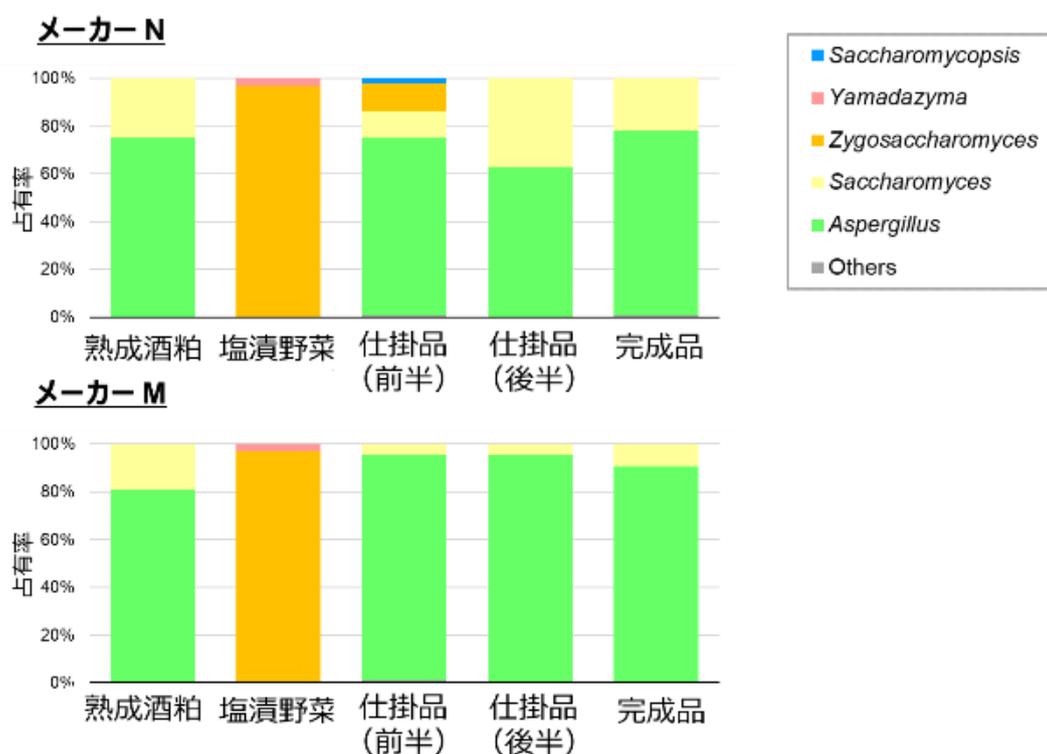


図 2. 奈良漬の製造工程における真菌の微生物叢(属レベル)

細菌・アーキアについても、原材料から完成品までのすべての製造工程を通して標準的な製法を用いた 2 社で類似した傾向を示した。アンプリコンシーケンス解析の結果(図 3)では、熟成酒粕は主に *Staphylococcus* 属や *Bacillus* 属などの

細菌で構成されていた。塩漬野菜では、好塩性の種が多く属する Halomonadaceae 科や Halobacteriaceae 科などの多様な細菌やアーキアが見られた。仕掛品および完成品では、アンプリコンシーケンス解析の結果から、Lactobacillaceae 科が優勢であることがわかった。その大部分は単一のシーケンスから構成されており、該当するシーケンスは *Fructilactobacillus fructivorans* の 16S rDNA の部分配列と合致していた。単離実験では、当初実験に使用した一般的な乳酸菌用培地として知られる MRS 培地(エタノール非含有)では *F. fructivorans* の出現頻度は高くなかったが、奈良漬の製造環境により近いと考えられる 10%エタノール含有 SI 培地に切り替えたところ、標準的製法の 2 社に共通して仕掛品、完成品のいずれからも *F. fructivorans* のみが単離されるに至った。原材料としてウリ以外の野菜を用いた奈良漬でも、*F. fructivorans* が優占している点は共通していた。一方、非標準的製法で製造されたメーカー A、B、C の完成品は Bacillaceae 科の細菌や、*F. fructivorans* 以外の乳酸菌などによって構成されており、標準的製法とは異なる傾向を示した。したがって、奈良漬の標準的製法の製造環境に適応した微生物であると考えられる(図 4)。

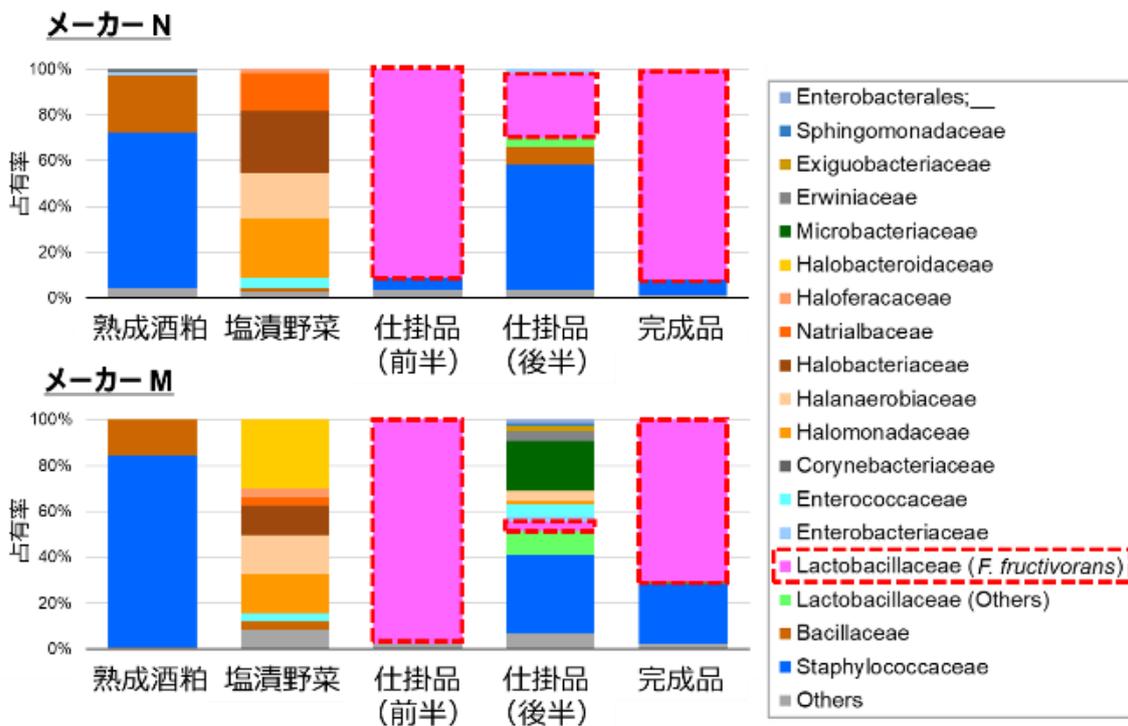


図 3. 奈良漬の製造工程における細菌・アーキアの微生物叢(科レベル)

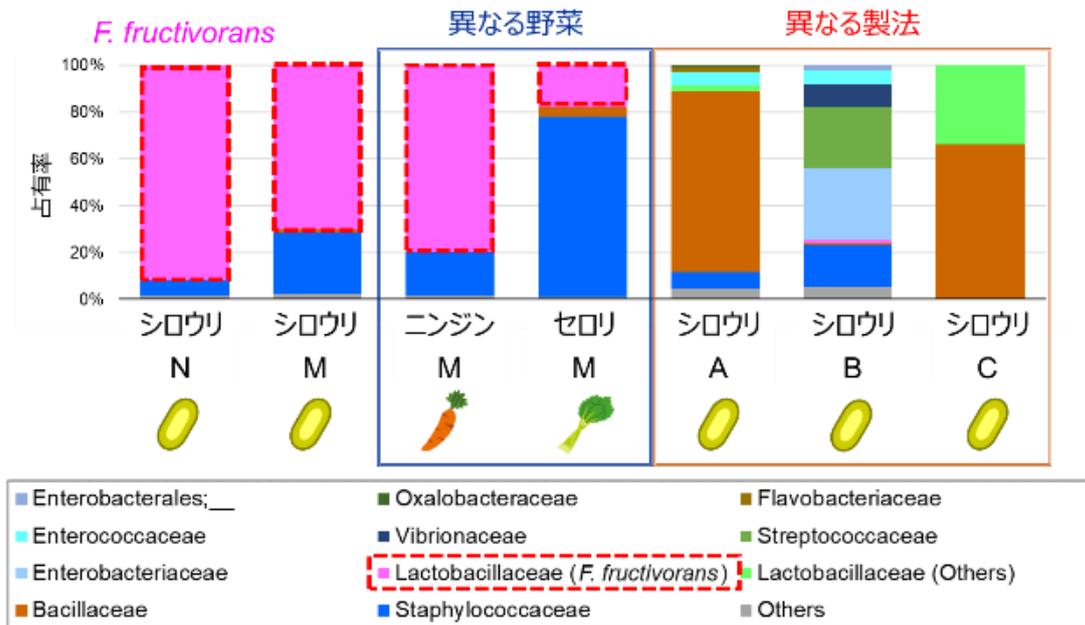


図 4. 原材料・製法の異なる奈良漬の完成品における細菌・アーキアの微生物叢 (科レベル)

2. 奈良漬から単離された *F. fructivorans* の生育特性の解析

奈良漬は飽和濃度の食塩水に漬けた塩漬野菜を、エタノールを含んだ熟成酒粕に漬けて製造する。原材料や環境中に存在する微生物は、高濃度の塩分やエタノールによるストレスに晒されていると考えられる。したがって奈良漬の優占種である *F. fructivorans* はこれらのストレス環境に適応した生育特性を有しており、選択的に増殖していると推察される。そこで、奈良漬から単離した *F. fructivorans* の生育特性を、他の発酵食品由来株などと比較しつつ明らかにすることで、奈良漬環境に適応した微生物の特徴を見出すことを目的とした。

まず、0%~15%の NaCl を含んだ SI 培地に *F. fructivorans* を植菌し、経時的に OD₆₀₀ を測定した(図 5)。基準株 NBRC 13954 とドレッシング由来株 NBRC 14747 では、それぞれ最大 7.5%、10% NaCl 含有培地で増殖可能であった。清酒由来株 JCM 1198、NBRC 15887、NBRC 13118 では、それぞれ最大 5%、2.5%、0% NaCl 含有培地で増殖可能であった。本研究において単離された奈良漬由来株 CS-2、MS-5 株では、それぞれ最大 7.5%、2.5% NaCl 含有培地で増殖可能であった。これらの結果から、奈良漬に含まれる塩分に対する高い適応能力は認められなかった。

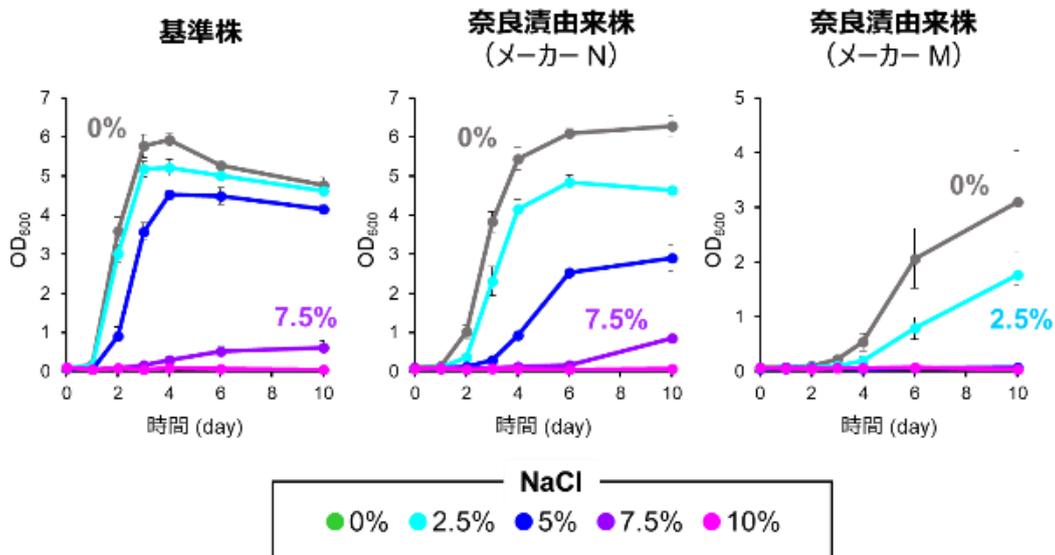


図 5. NaCl 含有 SI 培地における *F. fructivorans* の生育

次に、0%~20%のエタノールを含んだ SI 培地に *F. fructivorans* を植菌し、経時的に OD₆₀₀ を測定した(図 6)。基準株 NBRC 13954 とドレッシング由来株 NBRC 14747 は、ともに最大 12.5%エタノール含有培地で増殖可能であった。清酒由来株 JCM 1198、NBRC 15887、NBRC 13118 は、それぞれ最大 12.5%、17.5%、17.5%エタノール含有培地で増殖可能であった。本研究において単離された奈良漬由来株 CS-2、MS-5 株は、それぞれ最大 15%、17.5%エタノール含有培地で増殖可能であった。以上の結果から、奈良漬由来株は基準株やドレッシング由来株よりもエタノール耐性が高く、清酒由来株と同等の高いエタノール耐性を示す傾向が見られた。

それに加えて、奈良漬由来株 CS-2、MS-5 は、好エタノール性を有していることを見出した。基準株 NBRC 13954 やドレッシング由来株 NBRC 14747 は、エタノール非含有培地で最も良好な増殖を示し、2.5%以上のエタノールを含む条件では濃度の増加に伴って増殖遅延が見られた。これに対し、清酒由来株や奈良漬由来株ではエタノール非含有培地よりも 2.5%~12.5%のエタノールを含有する条件の方が良好な生育を示した。例えば、奈良漬由来株 MS-5 では 5%~7.5%のエタノールを含有する条件で最適な生育を示した。エタノール非含有培地での生育速度が他の株と比べて顕著に低いことから、単にエタノールによって生育が促進されるというよりも、健全な生育のためにエタノールを要求する性質を有すると推測される。

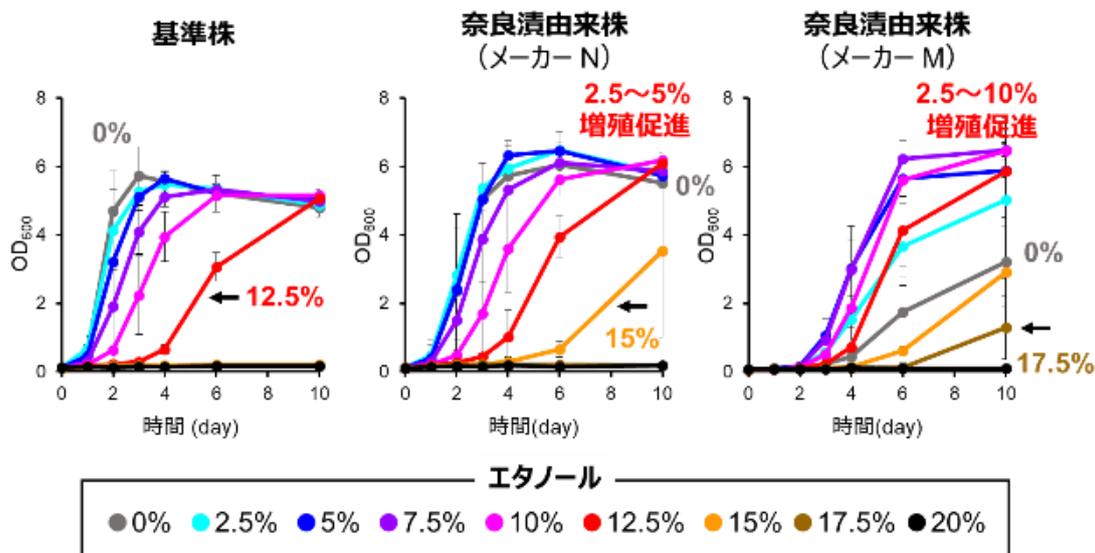


図 6. エタノール含有 SI 培地における *F. fructivorans* の生育

強力なエタノール耐性や好エタノール性は、奈良漬由来株と清酒由来株といったエタノールを含んだ環境から単離された株に共通していた。これらのエタノールに対する適応能力が、奈良漬の製造過程で *F. fructivorans* が優占種となる現象の鍵を握っていると考えられる。

3. 奈良漬の発酵試験

伝統的な漬物の多くは、乳酸菌や酵母などの微生物が関与する発酵食品である。微生物の発酵作用により、乳酸などの有機酸やアルコールなどの成分が産生され、漬物独特の風味が形成される。上述の微生物叢解析により、奈良漬の製造過程で乳酸菌 *F. fructivorans* が優占種となることが示された。したがって、奈良漬においても製造時に *F. fructivorans* による発酵が行われ、それに伴う成分変化が起こっていると推測される。本研究では、小スケールで奈良漬の製造を再現する発酵試験を実施した。発酵試験中の微生物の動態や成分変化を調べることで、*F. fructivorans* が奈良漬に及ぼす影響を検証した。具体的には、中漬の状態のサンプル(仕掛品前半に該当)を未使用の熟成酒粕に漬けて嫌氣的条件で培養を行うことで、上漬(仕掛品後半に該当)を再現した。コントロールとして、仕掛品前半の代わりに塩漬野菜を熟成酒粕に漬ける実験も行った(図 7)。

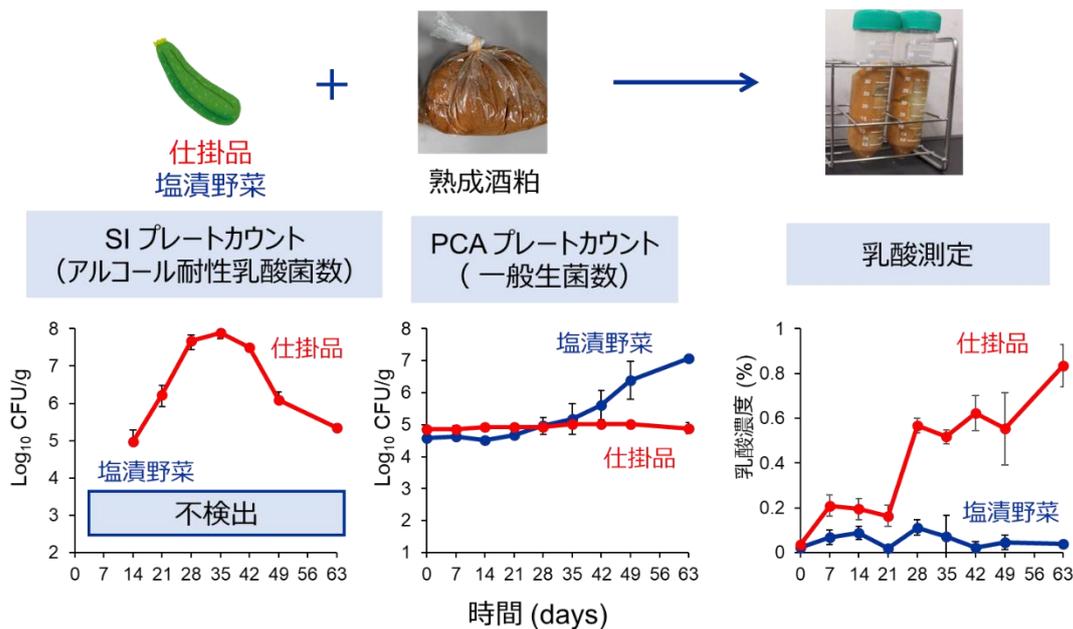


図 7. 発酵試験における微生物の生育および乳酸の生産

発酵試験中の *F. fructivorans* の生育を観察するため、経時的に 5% NaCl および 5% エタノール含有 SI 寒天培地プレートを用いて熟成酒粕に含まれるエタノール耐性乳酸菌数を測定した。その結果、仕掛品前半を熟成酒粕に漬けた条件では、14 日目に初めてエタノール耐性乳酸菌が検出され 35 日目に菌数は最大となり (7.8×10^7 cells/g)、その後徐々に減少していった。これに対し、塩漬野菜を熟成酒粕に漬けた条件では、実験を通して、エタノール耐性乳酸菌は検出限界以下であった。実験最終日 63 日目のコロニーをランダムに 15 個選び、簡易同定を行った結果、すべて *F. fructivorans* であった。また、PCA 寒天培地プレートを使用して一般生菌数の測定も行った。仕掛品前半を熟成酒粕に漬けた条件では、0 日目から 63 日目まで $7.2 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ cells/g の間でほとんど一般生菌数が変化しなかった。これに対し、塩漬野菜を熟成酒粕に漬けた条件では、63 日目まで徐々に一般生菌数が上昇していった(最大で 1.2×10^7 cells/g)。

奈良漬の製造過程で優占種となる *F. fructivorans* は乳酸菌であることから、他の伝統的な漬物と同様に乳酸発酵が行われていることが推察される。発酵試験中に経時的に乳酸濃度を測定した。仕掛品前半を熟成酒粕に漬けた条件では、0 日目から 63 日目まで徐々に増加して最終的に 0.8 wt% にまで到達した。これに対し、塩漬野菜を熟成酒粕に漬けた条件では、乳酸濃度は 0.2 wt% 以下の範囲でほとんど変化しなかった。*F. fructivorans* は、乳酸と同時に二酸化炭素を生

成するヘテロ発酵型の乳酸発酵を行うことが知られている (Zheng *et al.* (2020))。発酵試験中の目視での観察結果において、仕掛品前半を熟成酒粕に漬けた条件では、乳酸濃度が大きく上昇した 28 日目から気泡が観察された。以上の結果から、奈良漬の標準的製法に見られるような未使用の熟成酒粕に仕掛品を漬けこむ工程において二酸化炭素の発生を伴うヘテロ乳酸発酵が行われることが示された。前章で示した微生物動態の結果と併せて考えると、*F. fructivorans* がヘテロ乳酸発酵を行う主体である可能性が高い。

発酵試験中の代謝物変化を網羅的に調べるために、発酵試験前後のサンプルを用いて CE-FTMS による水溶性・イオン性成分のメタボローム解析を実施した。解糖系の代謝産物やヌクレオチド類の多くは検出されなかったが、発酵食品の風味の形成において重要な役割を果たすアミノ酸や有機酸に関連する多様な代謝産物が検出された。発酵試験中に産生される有用物質を見出すことを目的として、発酵前後で 0 日目には検出限界以下であり、63 日目に検出された化合物の探索を行った (図 8)。その結果、イノシン、グルタチオン、*S*-アデノシルメチオニンなど 25 種の化合物の含量が増加していることが明らかになった。これらの物質は乳酸菌や酵母などの微生物により生産される呈味成分・機能性成分として知られている (Kilstrup *et al.* (2005); Pophaly *et al.* (2012); Chu *et al.* (2013))。以上の結果から、奈良漬の製造過程で微生物の発酵作用により風味や機能性が付与される可能性が示唆された。

物質名	PubChem CID	0 day	63 days
3-Hydroxypicolinic acid	13401	N.D.	8.2E-05
3-Methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol	10805	N.D.	3.8E-04
4-Hydroxyhippuric acid	151012	N.D.	1.4E-04
7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid	6868	N.D.	7.4E-05
8-Hydroxyoctanoic acid-1	69820	N.D.	4.7E-04
Adenosine	60961	N.D.	1.2E-02
Azetidine 2-carboxylic acid	16486	N.D.	9.1E-04
Crotonic acid	637090	N.D.	1.8E-03
Diethanolamine	8113	N.D.	1.9E-03
Glutathione (GSH)	124886	N.D.	1.1E-04
Glutathione	11161	N.D.	1.0E-03
Guanosine	6802	N.D.	3.8E-04
Imidazole-4-methanol	1745	N.D.	8.5E-05
Inosine	6021	N.D.	2.5E-04
Maleic acid	444266	N.D.	1.8E-04
Met-Val-Pro	10291254	N.D.	1.1E-03
<i>N</i> -Methylalanine	5288725	N.D.	5.4E-04
<i>N</i> ⁶ -(Δ^2 Isopentenyl)adenine	92180	N.D.	3.3E-04
Propionic acid	1032	N.D.	2.2E-03
<i>S</i> -Adenosylmethionine	34755	N.D.	2.8E-04
<i>S</i> -Carboxymethylcysteine	193653	N.D.	4.7E-05
Sebacic acid	5192	N.D.	1.4E-04
Spectinomycin +H ₂ O	15541	N.D.	6.0E-05
Spermine	1103	N.D.	4.6E-05
γ -Glu-Cys	123938	N.D.	1.2E-04
Lactic acid	612	3.4E-01	4.0E+00

図 8. 発酵試験終了時(63 日目)に特異的に検出された化合物の一覧

4. 総括

本研究を通して、伝統的発酵食品の一種である奈良漬における微生物生態系の実態とその役割に関する新たな知見を得ることができた(図 9)。特に、乳酸菌 *F. fructivorans* が製造工程を通して優占的な生育を示し、その原因の一つである好エタノール性というユニークな特性まで解明に至った点は特筆すべきである。将来的に、奈良漬の生産を安定化させるためには、発酵において中心的な役割を果たす *F. fructivorans* の健全な生育をモニターし、促進させるための方策を講じていくことが必要である。また、奈良漬の高付加価値化のためには、本研究のメタボローム解析により見出された *F. fructivorans* の有用物質生産性をさらに探求し、標的とする化合物の生産性をさらに向上させる微生物育種が有効であると考えられる。本研究を端緒として、奈良漬という伝統的発酵食品の進化・次世代化に向けての研究開発につながる重要なヒントを得ることができた。



図 9. 本研究を通して明らかにされた奈良漬の微生物生態系とその意義

【参考文献】

Chu, J., Qian, J., Zhuang, Y., Zhang, S., & Li, Y. (2013). Progress in the research of S-adenosyl-L-methionine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 41-49.

Kilstrup, M., Hammer, K., Ruhdal Jensen, P., & Martinussen, J. (2005). Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 555–590.

Kitamura, Y., Kusumoto, K., Oguma, T., Nagai, T., Furukawa, S., Suzuki, C., Satomi, M, Magariyama, Y., Takamine, K., & Tamaki, H. (2016). Ethnic fermented foods and alcoholic beverages of Japan. *In* Ethnic Fermented Foods and Alcoholic Beverages of Asia, Springer India, 193–236.

Pophaly, S. D., Singh, R., Pophaly, S. D., Kaushik, J. K., & Tomar, S. K. (2012). Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microb. Cell Fact.* **11**, 114.

Yamagata, K. & Fujita, T. (1974) Characterization of salt-tolerant yeasts isolated from the pickling process of narazuke. *J. Ferment. Technol.* **52**, 217–224.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O’Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70**, 2782–2858.

以上