

伝統的黒酢製造時に生成される膜状堆積物中の細菌

木村 啓太郎

農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

[〒305-8642 つくば市観音台 2-1-12]

Bacteria involved in sediment formation during black vinegar fermentation

Keitarou KIMURA

National Food Research Institute,

National Agriculture and Food Research Organization

1. 目的

伝統的黒酢は、長期間（通常は1~3年）の発酵・熟成を経て製造される（柳田, 1990）。酢酸発酵を促すために酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* が添加される場合が多い。天日下、壺内で醸造されるため、米麹などの原材料に含まれる微生物の他、壺表面や周辺環境に由来する微生物が発酵中の黒酢には混在する。これらは風味や色、香気など伝統的黒酢の特性形成に関わっていると考えられる。膜状堆積物は熟成後期に生成されるコンニャクのような肉厚の物質であり、混在菌が生産するバクテリアルセルロースによって形成される。黒酢特有の性質と堆積物蓄積の関係は不明であるが、膜状堆積物の生成とその形態は壺毎に異なっており、生成に関与する微生物の違いを反映している可能性がある。堆積物生成菌の多様性および黒酢特有の性質との関連を解明する端緒とするために、堆積物生成菌の探索・収集を行い、分離した細菌の堆積物生成能を検証した。

2. 材料および方法

1) 膜状堆積物に含まれる微生物の分離と同定

鹿児島県内で生産された伝統米黒酢から膜状堆積物を採取した。採取は、同じ壺畠内の異なる壺5つ（AからE）から独立に行った。滅菌したピンセットで試料約0.1グラムを分取し、GYP寒天培地（グルコース1%，ポリペプトン0.5%，酵母エキス0.3%，麦芽エキス0.3%，寒天1.5%）上に画線して30°Cで培養した。

画線培養後、単コロニーをGYP液体培地(2ml)で振とう培養し、定法にしたがってゲノムDNAを精製した。16SリボソームDNAを、バクテリア共通のプライマー27f, 1492r, 787f, 63f, 1387r（藤本・福井, 2005）と市販のPCRキット（KOD-plus, TOYOBO）を使って増幅し、増幅断片

をアガロースゲル電気泳動で分離・精製後、DNA シークエンサー (Applied Biosystem, ABI310) を用いた塩基配列解析に供した。

2) 試験管内の堆積物生成

分離・同定した菌株を寒天培地より釣菌し、2ml (径 18mm 試験管使用) および 100ml (100ml 三角フラスコ使用) の GYP 液体培地に植菌し、30°Cで 1~4 週間、静置培養した。培地表面の膜状堆積物の形成は目視で観察した。6%酢酸を加えた GYP 培地でも同様に試験した。

3. 結果

1) 微生物の分離と同定

伝統黒酢の膜状堆積物（図 1）に含まれる微生物を GYP 寒天培地に画線培養した（図 2）。培養後に現れたコロニー形態はほぼ均一であったので、膜状堆積物中に優占種が存在すると考えられた。

16S リボソーム DNA を增幅し、その塩基配列の相同性解析を行った。分離した 5 つの優占種中、4 つは *Gluconacetobacter diazotrophicus* と最も高い相同性を示し、1 つは *Bacillus amyloliquefaciens* と最も高い相同性を示した。解析した範囲の塩基配列の相同性はいずれも 98%以上であった。



図 1. 伝統黒酢中に生成する堆積物の 1 例
(写真提供：鹿児島県工業技術センター松永一彦氏)

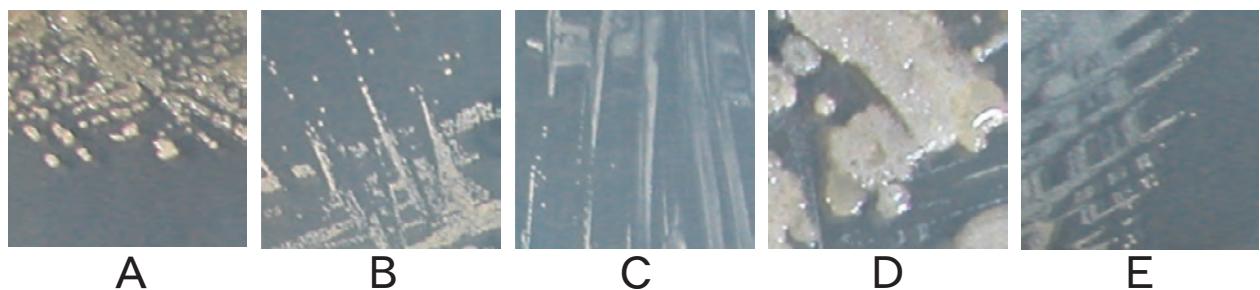


図 2. 堆積物から分離された微生物のコロニー形態 (GYP 寒天培地上で 30°C, 3 日間培養した)

Gluconacetobacter diazotrophicus 4 株と *Bacillus amyloliquefaciens* 1 株は全て GYP 寒天培地上で粘性のあるコロニー (mucoid colony) を形成した。3 株の *Gluconacetobacter diazotrophicus* のコロニーは固く、スパークル等で押しても崩れなかつたが、MAFF 117458 は柔らかい水飴状のコロニーを形成した（図 2A, 表 1）。*Bacillus amyloliquefaciens* と同定された MAFF 117462 のコロニーは、それより更に柔らかい水飴状で、培地を傾けると容易に流れた。

表1. 分離された優占種の堆積物生成能

壺	優占種	コロニー性状 ^{a)}	堆積物生成能		MAFF 番号
			培養スケール 2 ml	100 ml	
A	<i>G. diazotrophicus</i>	水飴状	○	○	117458
B	<i>G. diazotrophicus</i>	固い	○	×	117459
C	<i>G. diazotrophicus</i>	固い	○	×	117460
D	<i>B. amyloliquefaciens</i>	水飴状	×	○	117462
E	<i>G. diazotrophicus</i>	固い	○	×	117461

a) GYP寒天培地で生育.

2) 試験管内での堆積物生成

同定された優占種の膜状堆積物生成能を試験管培養で検討した(表1). 培養は、伝統黒酢の発酵・熟成状態を模るために静置培養とし、経時観察を行った。対照として伝統黒酢に添加されることが多い *Acetobacter pasteurianus* も同様に試験した。

Gluconacetobacter diazotrophicus と同定された4株はいずれも2 ml培養では膜状堆積物を生成したが、100 ml培養ではMAFF 117458のみが堆積物を生成した。このMAFF 117458は水飴状のコロニーを示すA壺由来株であり、最も顕著な堆積物生成能を示した。すなわち、生成された膜状堆積物が一定の大きさになると沈降し、新たな膜状堆積物が何層にも重なるように形成された(図3)。*Bacillus amyloliquefaciens* と同定されたMAFF 117462は100 ml培養では膜状堆積物を生成できたが、2 ml培養では生成できなかった。*Acetobacter pasteurianus* はいずれの条件下でも堆積物を生成することはなかった。

伝統黒酢は麹菌、乳酸菌、酵母、酢酸菌による複合発酵で作られる。発酵初期には乳酸菌が生産する乳酸の蓄積が見られ、pHの低下と雑菌の増殖抑制に働いている。発酵後期には乳酸は消費されて微量となり、代わりに酢酸による酸度の上昇(pHの低下)が起こる。膜状堆積物は伝統黒酢醸造の熟成後期に生成される。この背景を探るため、酢酸培地での膜状堆積物の形成を検討した。熟成期には酢酸濃



図3. 壺Aから単離した *G. diazotrophicus* MAFF 117458による膜状堆積物の生成

度が7%程度まで上昇する。そこで、GYP培地に酢酸を6%加えた条件下でも試験を行ったが、酢酸存在下では堆積物の生成は認められなかった。

発酵初期に膜状堆積物が生成しないのは、生産菌に乳酸資化能がない（あるいは低い）ためである可能性を考え、*Acetobacter pasteurianus*と表1の分離株を、乳酸を唯一の炭素源とした培地（LN培地；1%（w/v）乳酸ナトリウム、0.2%（w/v）Yeast nitrogen base、0.5 x MT mix*、S7 base**）で振騰培養した。乳酸培地では*Acetobacter pasteurianus*とD壺から分離された*Bacillus amyloliquefaciens*は増殖したが、他は増殖しなかった（グルコースを炭素源とすると増殖した）。

* 100 x MT mix: for 1 L, 1 M HCl 2.0 ml, Mg₂H₂O 40.6 g, CaCl₂·2H₂O 10.29 g, MnCl₂·4H₂O 0.99 g, ZnCl₂ 13.6 mg, FeCl₃·6H₂O 135 mg

** S7 base: for 1 L, K₂HPO₄ 0.85 g, KH₂PO₄ 0.65 g, (NH₄)₂SO₄ 1.35 g

4. 考察

同一の壺畠から採取した膜状堆積物中に生息する優占種として、解析したサンプル数が少ないにも関わらず、属レベルで異なる*Gluconacetobacter diazotrophicus*と*Bacillus amyloliquefaciens*の2つが同定された。分離された株は、試験管内で膜状堆積物を生成したので、これらが伝統黒酢中でも膜状堆積物の形成に関与していると考えられた。ただし、分離の際に嫌気培養を行っていないので、乳酸菌など嫌気性の微生物が堆積物中にさらに混在している可能性は否定できない。

分離された菌株の違いは、壺に住み着いている菌種の違い、あるいは発酵・熟成条件の微細な違い（原料ロットや攪拌、周辺環境、温度など）を反映していると考えられる。*Gluconacetobacter diazotrophicus*と同定された4株には、堆積物生成条件に違いが見られた（表1）。また、好気性菌の*Bacillus amyloliquefaciens*と同定されたMAFF 117462は100 ml培養時にのみ堆積物を生成した。100 mlの培養は2 ml試験管培養よりも表面積が広くエアレーションが良いと考えられる。酸素供給量の微妙な違いが、優占株の選択に影響するのかも知れない。

熟成後期での膜状堆積物生成の背景を探るため、酢酸存在下で試験を行った。しかし、予想に反して堆積物は生成されず、むしろ菌の増殖そのものも抑えられた。この結果は、酸度の緩やかな上昇が増殖（馴化）と膜状堆積物生産の両方に必要であるという可能性を示唆している。また、*Gluconacetobacter diazotrophicus*に分類された4株に乳酸資化能はなく、それが発酵後期に膜状堆積物が発生する一因であることも考えられる。

*Gluconacetobacter*属のバクテリアルセルロース生産に関する先行研究例は多い（Römling, 2002）。本報では、膜状堆積物の生成は目視で観察しただけであり、壺内および試験管内で生成された堆積物の化学分析を行っていないが、伝統黒酢の膜状堆積物から*Gluconacetobacter*属が分離されることは想定していた。しかし、バクテリアルセルロースを生産する*Bacillus*属細菌は未報告である。分離したMAFF 117462が試験管内で生成した堆積物は、*Gluconacetobacter diazotrophicus*が生成した堆積物よりも柔らかく、厚みは同等であったが崩壊し易かった。今後、化学組成を詳しく分析し、両者を比較したいと考えている。

5. 謝辞

伝統黒酢の堆積物は、鹿児島県工業技術センター主任研究員松永一彦氏から分与いただきました。厚くお礼申し上げます。

6. 参考文献

- 藤本淳治・福井学 (2005). 腸内フローラの構造解析：16S rDNA-クローンライブラー法. 腸内細菌学雑誌 19: 47-52.
- Römling, U. (2002). Molecular biology of cellulose production in bacteria. Res. Microbiol. 153: 205-212.
- 柳田藤治 (1990) . 壺酢—酢造りの原点を探る. 化学と生物 28: 271-276.

Summary

Ceramic tanks that are placed in an open field are used for the traditional rice vinegar (black vinegar) fermentation. During the fermentation, thick layers formed by bacterial cellulose appeared on the surface of tanks. We examined microbes involved in the cellulose layer formation. Bacteria were isolated from five independent cellulose layers sampled from different ceramic tanks. Dominant species flourished in each of the sample. By determining 16S rDNA nucleotide sequences, it was revealed that four isolates belonged to *Gluconacetobacter diazotrophicus* and one belonged to *Bacillus amyloliquefaciens*. Production of the thick cellulose layer by isolated bacteria was confirmed in vitro. These bacteria produced the thick layer in different conditions, which suggests that a variety of bacterial strains are involved in the cellulose layer formation during the black vinegar fermentation.