

糠床のマイクロフローラと乳酸菌の共生

阪本 直茂*・中山 二郎

我が国の伝統的発酵食品の縁の下で力持ち「糠床」には、「究極の」という枕詞がよく似合う。一つに糠床は、「究極の自然発酵食品」と言えよう。米糠という、いわば食品廃棄物の再利用を図る点、そして、防腐剤など一切使用することなく、自然発酵だけに頼り、しかし特に数百年間もの間にわたり保存されうる。まさしく究極の自然発酵食品といえよう。そしてこれは「究極のスローフード」とも言える。米糠を自然発酵させ、糠床を準備し、それから野菜を漬け、食するまでには何週間も必要となる。しかも毎日の攪拌という作業がその間たえず必要となる。しかし、熟成を繰り返せば繰り返すほど、その風味に深みが加わっていく。福岡県には、このような糠床の中でも、100年を超える熟成期間を経た究極の熟成糠床が多く存在する。筆者ら九州大学では、これらの超熟成糠床のマイクロフローラに興味をもち、約10年間の年月をかけて研究を行ってきた。特に近年、次世代型シーケンサーを用いた細菌叢解析法という究極の菌叢解析システムを用いてこれら超熟成糠床のマイクロフローラの解析を行った。そしてその結果、「究極のマイクロフローラ」とも言える乳酸桿菌（ラクトバチルス）の群集構造が顕になった。この特集の場を借りて、その研究結果を

紹介したいと思う。なお、本研究結果については International Journal of Food Microbiology¹⁾に発表しているので、詳細についてはそちらを参照されたい。

熟成糠床に生息する乳酸菌の多様性

複合微生物系である熟成糠床の群衆構造解析を行うにあたり、次世代型DNAシーケンサーを利用し、網羅的な細菌叢解析を行った。北部九州地区を中心に4つの糠床店と12の家庭でそれぞれ調製されている糠床をサンプリングした(表1)。細菌叢解析は、16の熟成糠床よりゲノムDNAを抽出後、16S rRNA 遺伝子のV6-V8領域(約400 bp)の増幅産物について、計約16,000本、各サンプルあたり約1000本のDNA配列を解析した。得られた配列について、Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>)の分離株データベースとの相同性検索を行い、各サンプルの菌種レベルでの組成情報を得た²⁾。16サンプルのうち2つを除いた14サンプルにおいて *Lactobacillus* 属が50%以上の最優占属として検出された(表1)。平均すると *Lactobacillus* 属の占有率は87.5%を占めた。これは、糠床という環境が *Lactobacillus* 属乳酸菌に好ましいニッチとなっていることを示してい

表1. 使用した熟成糠床サンプルと熟成糠床中の16S rRNA 遺伝子の構成^a

糠床	採取場所	熟成 期間 (年)	Firmicutes										Proteobacteria	Actinobacteria	その他
			Lactobacillus		Lactococcus		Leuconostoc		Pediococcus		その他				
			%	種の数	%	種の数	%	種の数	%	種の数	%	種の数			
A	築上（家庭）	>100	95.4	13	0	0	0.4	2	1.3	1	0.6	2	1.8	0.4	0.2
B	築上（家庭）	>100	80.7	4	0	0	0.5	1	1.4	1	0.9	2	14.9	0.5	1.2
C	築上（家庭）	>40	92.3	4	0.1	1	0	0	0	0	1.1	4	5.7	0.7	0
D	築上（家庭）	15	82.8	10	0.6	1	0.2	1	0	0	2.0	3	13.9	0.5	0
E	築上（家庭）	>100	98.7	13	0	0	0	0	0	0	0.9	5	0.2	0.2	0
F	博多（糠床店）	>150	99.0	25	0	0	0	0	0.6	2	0.3	3	0	0.1	0
G	小倉（糠床店）	1	98.1	16	0	0	0	0	0	0	0.2	1	1.4	0.3	0
H	博多（糠床店）	1	91.9	14	0.1	1	0	0	0.1	0	1.0	3	6.8	0.1	0
I	博多（家庭）	1	97.2	16	0.3	2	0.3	1	0	0	0.8	5	1.0	0.3	0.1
J	博多（家庭）	1	98.9	13	0.1	1	0.1	1	0	0	0.3	2	0.7	0	0
K	博多（家庭）		96.9	14	0	0	0.1	1	0.2	1	1.0	7	1.5	0.3	0
L	熊本（家庭）	1	92.8	12	0	0	0.1	1	6.8	2	0	0	0.2	0.1	0
M	熊本（糠床店）	1	70.5	11	0	0	0.1	1	27.2	1	1.8	8	0.3	0.2	0
N	熊本（家庭）	1	23.7	6	0.6	2	11.4	4	0	0	2.9	2	60.0	1.2	0.2
O	博多（家庭）	4~5	34.1	9	0	0	0.3	1	0.1	0	0.1	1	0.1	65.3	0
P	広島（家庭）	5	87.8	4	0	0	0.3	1	10.1	2	0.1	1	1.5	0.2	0
All	—	—	87.5	44	0.1	3	0.5	5	3.3	4	0.8	36	4.3	3.5	0.1

^a Sakamoto *et al.*⁽¹⁾ 論文中的 Table 2 より、米由来と考えられる Chloroplast の16S rRNA 遺伝子を除いたデータを示している。

* 著者紹介 九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門微生物工学研究室(学術研究員) E-mail: digitatum@hotmail.com

る。一方、比較的異なる群集構造を示した糠床サンプルNとOでは、*Proteobacteria*門に属する*Acetobacter pasteurianus*と*Candidatus Liberibacter* sp.や*Actinobacteria*門に属する*Corynebacterium variabile*などが多くみられた。比較的熟成期間の短い糠床L, M, N, Pにおいては、*Leuconostoc*, *Pediococcus*属乳酸菌が0.1～11.4%, 0～27.2%程度検出された。これらの乳酸球菌は、糠床の発酵初期においてよく検出されるが、その後時間を重ねることで、球菌は検出されず桿菌が主体の細菌叢へ変遷していくことが知られている³⁾。これは球菌と桿菌のpHや塩分濃度に対する耐性能の違いのためと考えられ、熟成糠床を種糠として継代することにより*Lactobacillus*属乳酸菌が集積されていくと考えられる。

図1に熟成糠床に生息する乳酸菌組成をヒートマップで示した。興味深いことに、ヒートマップ左上部において、糠床F, G, H, I, J, Kの6サンプル中で12菌種の*Lactobacillus*から成るコアクラスターが見られる。ヒートマップの右方においては、各サンプル特有の乳酸菌種がみられる。この16サンプルの熟成糠床の乳酸菌叢は、大きく3つのグループに分類された。まず1つ目は糠床F, G, H, I, J, Kの*Lactobacillus acetotolerans*と*Lactobacillus namurensis*を優占種として持つグループI、次に*Lb. acetotolerans*と*Lb. namurensis*以外の乳酸菌で構成されるグループII、最後に糠床A, B, Cの*Lb. acetotolerans*のみを最優占種としてもつグループIIIに分けられた。ここで、これらの細菌叢のタイプ決めに、どのような因子

が関連しているのかという疑問が生じる。熟成糠床中の細菌叢とpHや乳酸濃度などの相関関係は見いだされなかったが、グループIIIの糠床A, B, Cは古くから伝わりとされる糠床で熟成期間が40～100年間であり、糠床Fを除くグループIの糠床は、約1年と比較的若い糠床であった。ここに熟成期間が長くなるとともに、*Lb. acetotolerans*と*Lb. namurensis*で作られる細菌叢のバランスが、徐々に*Lb. acetotolerans*を主体とする細菌叢になる傾向が見られる。

糠床の発酵・熟成過程における菌叢変化

糠床が時に人の寿命以上の長期にわたり維持される1つの要因には、足し糠による再発酵がある。足し糠をする頻度や量は地域や家庭の流儀によっても異なり、またその時々糠床の状態によっても異なる。また、販売を目的とする場合などには、種糠の量を減らし足し糠を多くして糠床自体の量を増やすこともする。この過程を一重に微生物学的に説明することはできないが、強いて言えば、継代培養と連続培養の中間の操作を、複合微生物系サンプルで延々と繰り返しているといった具合に考えることができる。実験的に、この過程を一概に再現することは困難であるが、多くの発酵食品の研究で行われているように、筆者らも実験室モデル糠床を作製し、模擬的に糠床の発酵・熟成過程のモニタリングを試みた。ただし、ここでいう熟成は、これまで述べてきた何年間にわたる経年“aging”のことではなく、足し糠を加えて

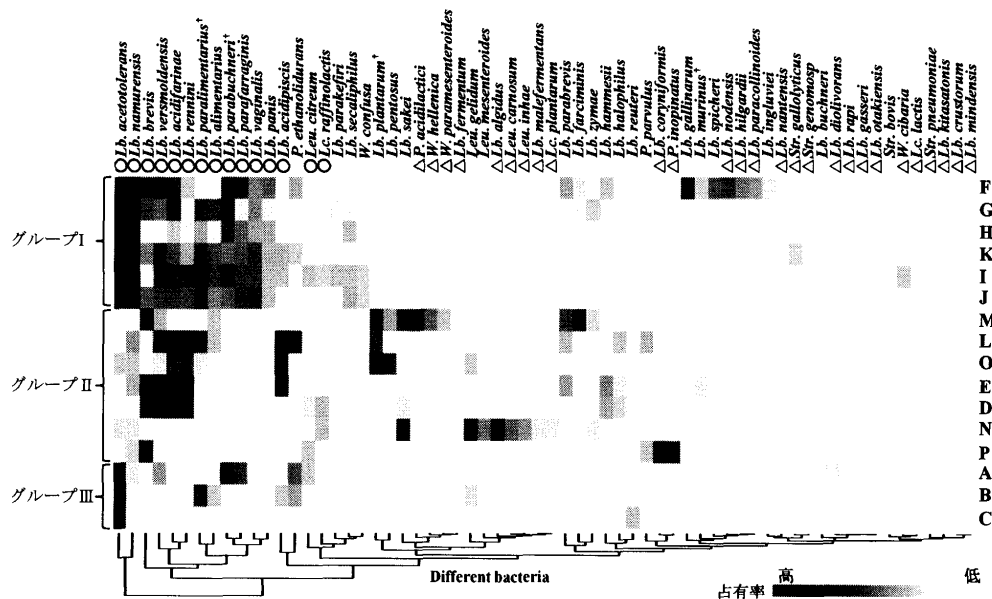


図1. 熟成糠床に生息する乳酸菌のヒートマップ。横軸のデンドログラムは、糠床中の乳酸菌叢をもとにクラスタリング、縦軸は、各々の細菌種の占有率をもとにクラスタリングを行った。○, 6サンプル以上で検出された細菌種; △, サンプル特有の細菌種。+, 同じV6-V8領域の配列を有する細菌種。Lb, *Lactobacillus*; Lc, *Lactococcus*; Leu, *Leuconostoc*; P, *Pediococcus*; St, *Streptococcus*; W, *Weissella*。

特 集

乳酸発酵がおよそ終了した後の数週間の過程“ripening”を示す。具体的には、福岡市内の糠床老舗「千束」より（可能性としては小笠原忠真が1632年小倉城に入城の折に、北九州に持ち込んだ糠床に起源をもつという説がある）より長期熟成糠床を提供いただき、それに20倍量の生糠を混合し、千束で用いているものとはほぼ同じスパイスを加え、また、毎日の攪拌操作を行いながら、経時的に微生物菌叢と有機酸・糖量をモニタリングした。図2にそのモデル糠床中の有機酸およびグルコース濃度、pHの変化（A）、細菌叢の変遷（B）を示している。ピロシーケンス解析の結果、検出された細菌種は、その増殖挙動から4つのタイプに分けることができる。1つは発酵開始時には優占種であるが、発酵とともに減少する *A. pasteurianus* や *Candidatus Liberibacter* sp. などである。これらは米糠に存在する野生菌と思われる。2つ目は、*Lb. namurensis* であり、発酵開始から速い増殖速度で増殖する。本菌の増殖は乳酸濃度の上昇にリンクしており、*Lb. namurensis* が主体的に乳酸発酵していることが伺える。3つ目として、緩慢に増殖し続ける *Lb. acetotolerans* が観察される。本菌は長い倍加時間で発酵開始後から増殖を続け、約2週間後に最優占種となる。この発酵後期の *Lb. acetotolerans* の増殖に伴い、糠床のpHが4.8から4.4まで減少する。このpHのさらなる低下が、

糠床の腐敗防止に重要な役割を果たしていると考えられる。他に、*Lactobacillus acidifarinae*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus nodensis*, *Lactobacillus spicheri*, *Lactobacillus zymae* などの *Lactobacillus* 属乳酸菌の増殖も確認された。これらの乳酸菌は、発酵前期にサブドミナントとして増殖し、発酵後期から熟成期にかけて、そのポピュレーションを一定に保つ。

糠床の菌叢の安定性

時として100年以上の熟成期間を経て絶妙な風味を醸し出す究極のスローフードとも言える糠床であるが、四季の気候変動の大きな日本において、どのようにその品質は保たれているのであろうか。もちろん、その1つに微生物フローラが絡んでいることは疑いない。上に示したように乳酸桿菌を主体とするフローラでは、1%程度の乳酸に加えて、酢酸およびエタノールといった有機酸とアルコール類が生産される。これらは、pHの低下とともに、抗菌効果を示す。つまり、いったん乳酸菌主体のフローラが構築されれば、雑菌の混入・増殖は有効的に抑えられると考えられる。それでは、実際に、糠床のフローラはどの程度安定しているのであろうか。この疑問に答えるために、筆者らは、千束より四季を通じて糠床をサンプリングし、その菌叢をPCR/DGGE法により解析した⁴⁾。すると興味深いことに、*Lb. acetotolerans* はどの季節の糠床にも優占種として存在していた。しかし、それ以外の増幅断片のバンドにはかなりの変化が見られた。また、異なる季節の熟成糠床サンプルを種糠とするモデル糠床による発酵・熟成のモニタリングを行った。その結果、驚くべきことに、*Lb. namurensis* がまず早い速度で増殖し、一方、*Lb. acetotolerans* は *Lb. namurensis* が増殖を停止した後も緩慢に増殖を続け、最後には最優占種になるという変遷パターンは常に再現された。この結果から、増殖速度の異なるこの2つの乳酸桿菌による協調的乳酸発酵が糠床の菌叢の堅牢性に貢献していると考えられる。

次に、試しに糠床を接種しないモデル糠床を作製し、菌叢とpH、有機酸の変化をモニタリングした。その結果、*Lb. namurensis* の増殖は実験開始後10日後に、*Lb. acetotolerans* は30日後にほんのわずかの増殖が見られた。そしてこの乳酸発酵の遅延に伴い、*Bacillus* 属や *Staphylococcus* 属などの野生菌の増殖が見られた。種糠を接種しない条件では *Lb. namurensis* と *Lb. acetotolerans* の協調発酵をうまく導き出せないと思われる。先人達は無意識のうちに種糠を利用することで安定な乳酸菌叢を継代しつつ、2菌種による効率的な糠の協調発酵を促進

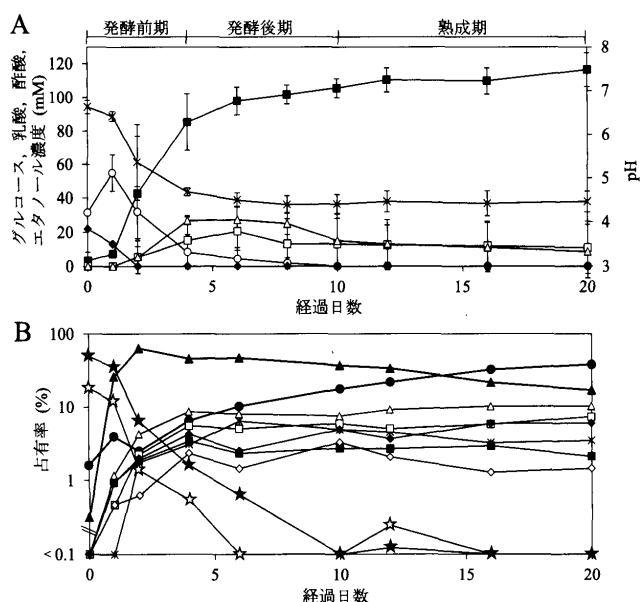


図2. モデル糠床中の化学組成（A）、細菌叢の変遷（B）。（A）グルコース（○）、乳酸（■）、酢酸（□）、エタノール（△）、pH（*）の変化。（B）優占種の存在割合の変化（ピロシーケンス）。*A. pasteurianus*（★）、*Candidatus Liberibacter* sp.（☆）、*Lb. acetotolerans*（●）、*Lb. acidifarinae*（△）、*Lb. alimentarius*（*）、*Lb. brevis*（■）、*Lb. namurensis*（▲）、*Lb. nodensis*（□）、*Lb. spicheri*（◇）、*Lb. zymae*（◆）。

し、安心して食することのできる糠漬け文化を継承してきたと考えられる。

酵母と細菌の相互作用

糠床を作製する過程で糠床の表面を覆うように増殖する産膜酵母が見られる。産膜酵母は、過剰に繁殖するとシンナーやカビ臭の原因菌となる。こういった産膜酵母は乳酸菌の生産する乳酸をわずかながら資化すると言われており⁵⁾、糠床の乳酸菌と良好な共生関係にあると考えられる。そこで、糠床の産膜酵母が乳酸菌に与える影響について調べた。上記のモデル糠床と同様の実験系により、抗真菌剤を用い酵母の増殖を抑制したモデル糠床を作製し、酵母が細菌叢に与える影響を調べた。しかし、抗真菌剤を加えて、酵母の増殖を完全に抑えても細菌叢に大きな変化は見られなかった。一方、糠床中の有機酸濃度を解析した結果、抗真菌剤を添加した糠床の酢酸とエタノールの濃度が比較的高い値を示した。産膜酵母は、エタノール資化能があり、ワインなどの風味成分を生成することが知られている。このことから糠床中の酵母は、細菌叢と片利共生であり、糠床の独特なにおい成分に寄与していることが示唆される。

熟成糠床中に存在する緩慢増殖・難培養性

Lb. acetotolerans の実態

先に述べたように、*Lb. acetotolerans* は、北部九州地方の糠床に共通して存在し、また糠床の発酵・熟成に重要な働きをしているようである。そこで、筆者らは当然のことながら熟成糠床からの *Lb. acetotolerans* の培養分離を試みた。しかし、数々の試みにも反し、以前その培養分離には成功していない。糠床中の *Lb. acetotolerans* の 16S rRNA/16S rDNA の比率を調べてみると、他の乳酸菌に比べて異常に低いことが分かっている⁴⁾。つまり、*Lb. acetotolerans* は熟成糠床中で代謝活性を非常に低く保ちながら生息していると考えられる。この性質ゆえに、*Lb. acetotolerans* が培養困難な状態に陥っていると思われる。*Lb. acetotolerans* は米酢から汚染菌として分離され、基準株として登録されている⁶⁾。熟成糠床中で検出された *Lb. acetotolerans* の完全 16S rDNA の約 1500 bp と 16S-23S のスペーサー領域について、基準株の *Lb. acetotolerans* JCM3825^T のそれと比較解析した。その結果、それぞれの *Lb. acetotolerans* は、基準株と 99% 以上の相同性を示した。筆者らは基準株についても火落ち菌

検出培地で培養することで、液体培地中の菌数と寒天培地中の菌数が顕著に異なり、培養困難な状態に移行することを見いだしている。それと同時に、菌長が 10 倍程伸長し、それに伴いグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼが多く発現されていることを見いだしている。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼは、*Lactobacillus plantarum* などにおいてもストレス条件下で誘導されることが報告されており⁷⁾、大変興味深い。

おわりに

今回、究極のスローフードであり究極の自然発酵食品である糠床のマイクロフローラについてその深淵を覗き込んで見た。保存菌株などのスターターをまったく使用せず、原材料の滅菌も施さず、100 年以上の長期間、発酵と熟成を繰り返すという操作の結果生まれてきたフローラは意外とシンプルであるが堅牢であることが分かった。特に興味深い点は、ダブリングタイムの異なる 2 つの乳酸桿菌を優占種としていることである。この 2 つの乳酸桿菌の継年を経ての優占化は、糠という環境に物理的そして栄養的に適していたということで説明可能と思われるが、さらに、数週間から 1 月に一回程度生糠を加えてリフレッシュするという周期に、これらの 2 菌種の増殖周期が適合していたのではないかと考えられる。先人達が自然と行ってきた作業であるが、それを繰り返すうちにその環境に最も適したものが自然と集積されてきた。至極あたりまえのことであるが微生物生態学の基本原理を糠床の世界の中に垣間見た思いである。今後は、実際に、*Lb. namurensis* と *Lb. acetotolerans* の間にどのような協調的相互作用が存在しているのか、遺伝子および物質レベルで解明していきたいと考えている。

文 献

- 1) Sakamoto, N. *et al.*: *Int. J. Food Microbiol.*, **144**, 352 (2011).
- 2) Nakayama, J.: *Biosci. Microflora*, **29**, 83 (2010).
- 3) 今井正武ら: 農化, **57**, 1105 (1983).
- 4) Nakayama, J. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 481 (2007).
- 5) Kurtzman, C. P. and Mikkelsen, L. L.: *The Yeast, a Taxonomic Study*, Elsevier Science (1998).
- 6) Entani, E. *et al.*: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**, 544 (1986).
- 7) Saad, N. *et al.*: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 1635 (2009).