

福山壺づくり純米黒酢の発酵過程における一般成分及び乳酸菌の動態変化 ～ 2005 年から 2008 年まで 4 年間の総まとめ～

瀬戸口賀子¹⁾, 大西 智子¹⁾, 久徳 由佳¹⁾, 鹿籠六彩子¹⁾, 松永 香織¹⁾
 赤澤 佳美¹⁾, 田島 智美¹⁾, 小脇 舞子¹⁾, 新屋敷翔子¹⁾, 木下 聡子¹⁾
 汐満 真弓¹⁾, 中西麻梨子¹⁾, 村山 由佳¹⁾, 宇都宮央美¹⁾, 長 育美¹⁾
 片岡 玲奈¹⁾, 杉安 佳奈¹⁾, 濱田 彩¹⁾, 竹下 温子¹⁾, 吉川 毅²⁾
 坂田 泰造²⁾, 上野晋太郎³⁾, 藤井 暁³⁾, 橋口 和典³⁾, 長野 正信³⁾

要 旨

福山壺づくり純米黒酢（壺酢）は鹿児島県霧島市福山町で造られている鹿児島県独自のお酢で、文政 12 年（1829 年）福山の商人竹之下松兵衛が壺を用いて吹上浜で色酢が造られているのを見て、その製法を福山に伝えたことが始まりといわれており、「松兵衛酢」、「アマン」、などと呼ばれ親しまれてきた。壺酢は陶器の壺の中に、麴、蒸した三分搗き米、地下水を加え、あとは壺に棲みついていると思われる自然の酵母と酢酸菌が順次働いて出来上がる¹⁾²⁾³⁾。壺酢の仕込みは春と秋の年 2 シーズン行われている。壺酢には酵母、酢酸菌の他に、仕込み初期から多種類の乳酸菌が棲息している。壺酢の乳酸菌については、円谷ら¹⁾、小泉ら²⁾、Haruta ら⁴⁾の報告がある。

我々は福山の坂元醸造株式会社で、毎年 4 本の壺に仕込みを行い、主として乳酸菌について研究してきた。その中で乳酸菌は、他の微生物がもはや棲息していない、仕込み 150 ～ 270 日の壺に 1ml 中約 100 個棲息していることを 2001 年に柳田ら⁵⁾ 2003 年に小牧ら⁶⁾が観察し報告した。これは、もろみ中に含まれる澱粉を分解する乳酸菌が存在するためではないかと考え、2004 年に大西、久徳が嫌気培養と好気培養で分離した約 2000 株の乳酸菌について澱粉分解能を検討した。その結果、嫌気培養からの分離は確認されなかったが、好気培養からは仕込み 6 ヶ月後に 7 株の澱粉分解乳酸菌が分離された。また、我々は以前壺酢中の乳酸菌が発酵に伴って種類と数に変動をみせることを報告してきた⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。しかしながら発酵過程に伴う乳酸菌の動態変化と一般成分の変化との関係についての詳細な報告はこれまでにない。我々は、2005 年から 4 年間に渡って 16 本の壺について一般成分の定量と約 7000 株の乳酸菌について DNA を分離し、RAPD 法でグループ分け後、代表の菌株を選び 16S rDNA の塩基配列を決定し、相同性検索により菌の同定を行った。その結果、酸度が 5～6% に達した 2005、2006 年仕込みでは、仕込み初期に *Lactobacillus fermentum* (*L. fermentum*)、*Pediococcus acidilactici* (*P. acidilactici*) が優勢であったが、酸度 1% までに達しなかった壺ではこれらの菌は見られず、*L. casei*, *L. pluntarum* が優勢であった。また 2007、2008 年仕込みでは、発酵日数に伴って乳酸菌数が減少した後、再び上昇することが判明した。仕込みの時期が 10 月下旬以降になると酢酸発酵が進まず、仕込みの時期が酢酸発酵に大きな影響を与えることが示唆された。

キーワード：天然つば酢、乳酸菌、16S rDNA、酢酸発酵

はじめに

相生らは分離した乳酸菌をグラム染色し、球菌と桿菌の出現割合を調べ、球菌が仕込み初期の 15 日のみに出現することを報告した³⁾。円谷、小泉らの報告した乳酸菌はすべて桿菌で球菌が存在しなかったため、2003 年小牧らは小泉の用いた糖分解によるグループ化と 16S rDNA の遺伝子解析を併用して初期には *Lactococcus lactis* を見出し、澱粉分解性の乳酸菌も数株発見した⁶⁾。

2004 年三角らは仕込み 15 日までの初期に乳酸菌は大きく動態が変化するのではないかと考え、初期に集中して二日置きに菌を分離し同定したが、ほとんど差は見られず、*P. acidilactici* が優勢のままであった⁸⁾。

2004 年大西、久徳らは澱粉分解性の乳酸菌を嫌気および好気培養でもろみ中から分離することを目的とし研究を行い、2005 年は鹿籠六、松永、2006 年は赤澤、田島、2007 年は木下、中西、汐満、村山、2008 年は宇都宮、長、片山、杉安、濱田が、壺ごとに乳酸菌の動態変化がみられるかを目的とし研究を行ったのでこれらについて報告する。

1) 鹿児島純心女子大学看護栄養学部健康栄養学科

2) 鹿児島大学水産学部食品資源・資源利用学分野

3) 坂元醸造株式会社

実験材料および方法

鹿児島県霧島市福山町の坂元醸造株式会社で2004年は10月5日、2005年は10月12日、2006年は9月29日、2007年は10月31日、2008年は11月1日に秋仕込みをおこなった。前報³⁾に従って、仕込み、サンプル採取、発酵過程における乳酸菌数測定および分離を行った。

黒酢の発酵過程における酸度測定は、中和滴定法⁹⁾で、残留エタノール測定は酸化法⁹⁾に従った。乳酸菌のDNA抽出および精製はBenzyl Chloride法¹⁰⁾で行った。

Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting (RAPD)法¹¹⁾はTakara Ex Taq (タカラバイオ株式会社)を用い、Primer E (GGCGTCGGTT)はInvitrogenに委託合成したものを用いた。PCRは、【95℃：9分→94℃：5分→36℃：5分→72℃：5分】×4サイクル、【94℃：1分→36℃：1分→72℃：2分】×30サイクル→72℃：10分→4℃：保存】の反応条件で行った。反応後、マーカーにPHY (100ng/μl：宝酒造株式会社)を用いて1.0%アガロース電気泳動に

てバンドのパターンを確認し、グループ分けを行った。

乳酸菌代表菌株の16S rDNAのPCR反応¹²⁾はRAPD法と同じ反応試薬を用い、Primerは8F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 8-27)、15R (AAGGAGGTGATCCARCCGCA 1541-1522)をInvitrogenに委託合成したものを用いた。PCRは【95℃：10分→95℃：1分→60℃：2分→72℃：3分】×35サイクル→4℃保存】の反応条件で行った。PCR増幅産物が、16S rDNAの全長が増幅されているか確認するためマーカー6 (100ng/μl：Wako NIPPON GENE)とともに電気泳動を行い、1490bp付近にバンドを確認した。

16S rDNAのPCR増幅産物の塩基配列の決定¹³⁾は、Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いて、PCRは【96℃：1分→96℃：10秒→50℃：5秒→60℃：4分】×25サイクル→4℃保存】の反応条件で行った。Sequence PCR後、ホルムアミド処理を行い、鹿児島大学遺伝子実験施設に委託して塩基配列を決定した。相同性検索は

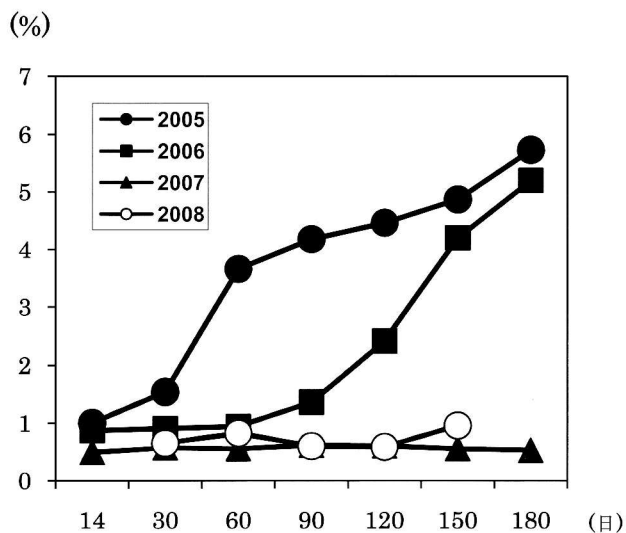


図1. 発酵過程における酸度

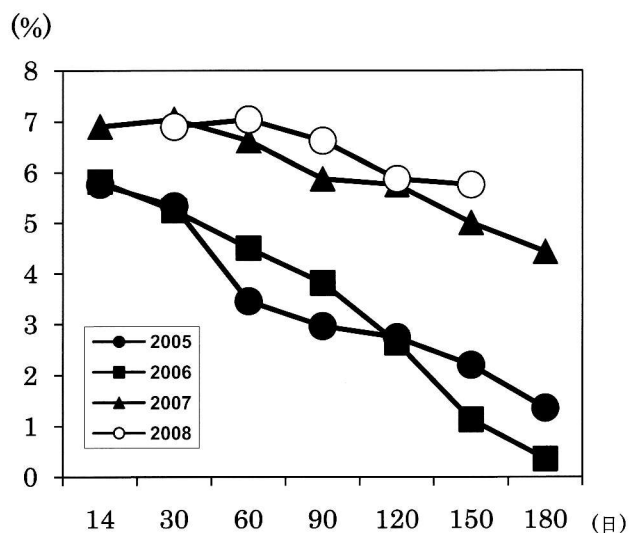


図2. 発酵過程におけるエタノール量

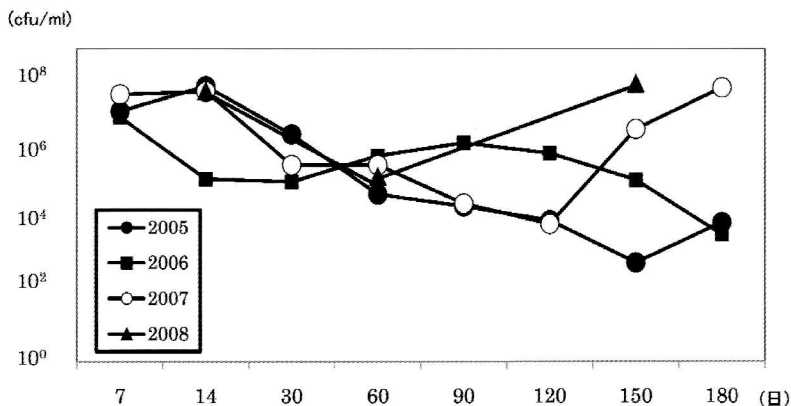
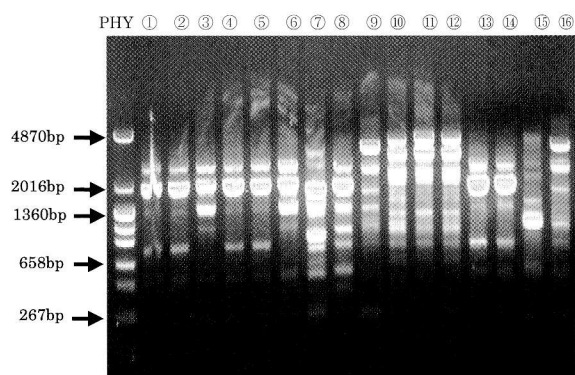
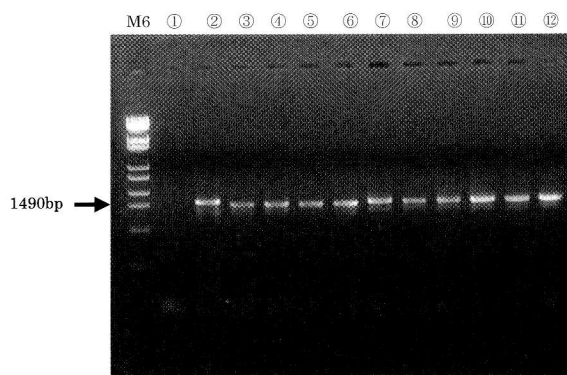


図3. 発酵過程に乳酸菌数の変化



①#1 ②#2 ③#4 ④#5 ⑤#6 ⑥#7 ⑦#8 ⑧#9 ⑨#11
⑩#12 ⑪#13 ⑫#14 ⑬#15 ⑭#16 ⑮#18 ⑯#22

図 4. RAPD 法によるグループ分け
(2007 年：赤澤・田島)



①#189 ②#190 ③#195 ④#197 ⑤#198 ⑥#199
⑦#151 ⑧#152 ⑨#153 ⑩#156 ⑪#181 ⑫#1

図 5. 16S rDNA の PCR 増幅産物の確認
(2007 年：赤澤・田島)

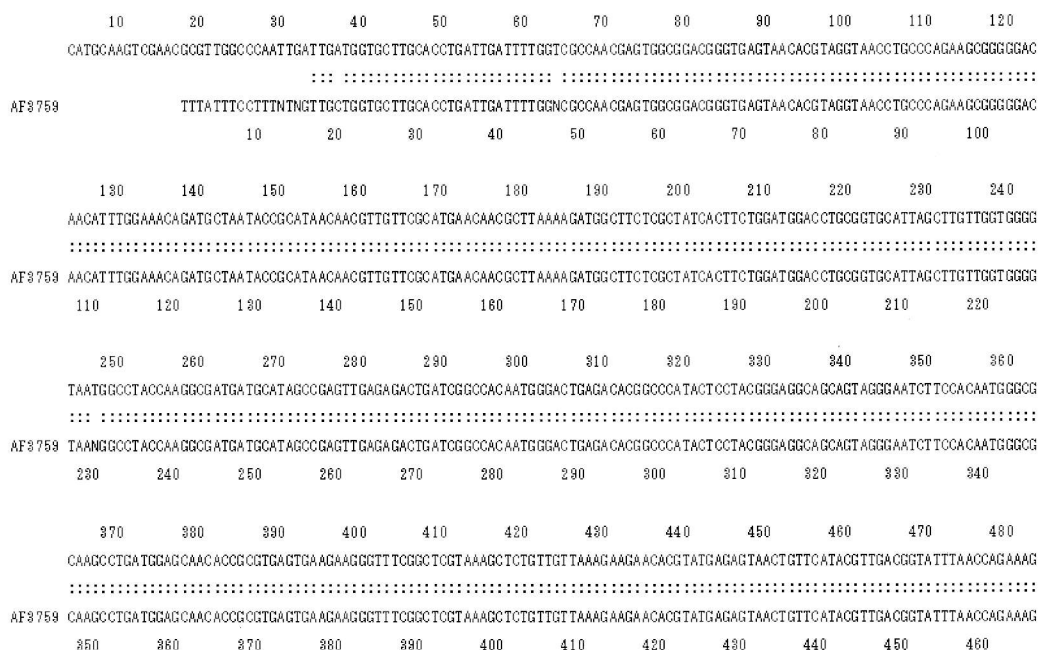


図 6. 16S rDNA 塩基配列に基づく乳酸菌 #29 (上段) と AF3759 (*L. fermentum*) (下段) の相同性検索
(2006 年：松永・鹿籠六)

DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の相同性検索エンジン FASTA を用い、乳酸菌を同定した。

結果および考察

図 1 に発酵過程における酸度の変化、図 2 に発酵過程におけるエタノール量の変化を示した。2005、2006 年では 1～2 ヶ月を過ぎたあたりから酸度は上昇し始め、仕込み後 6 ヶ月目には約 5% に達し、エタノール量は、酸度が増え始めた 1～2 ヶ月あたりから減少し始め、4 ヶ月で約 3%、6 ヶ月で約 1% 前後にまで減少した。このことよりエタノールを酢酸菌が利用して酢酸が造られたことが確認できた。しかしながら、仕込みを 10 月下旬から 11 月初旬に行った、2007、2008 年の酸度は

6 ヶ月経っても 1% 以下で、エタノール量は 6 ヶ月目でも 5% にしか減少しなかった。これらのことより仕込みの時期は、酢酸発酵に大きく影響することがわかり、秋仕込みであれば 10 月 15 日までが酢酸発酵がうまくすすむ限界であることが示唆された。

図 3 に発酵過程における乳酸菌数の変化を示した。すべての年度において、初期の乳酸菌数は発酵過程に伴って減少した。酸度が上がらなかった 2007、2008 年度では、仕込み後期に再度ほぼ同じ量の乳酸菌数にまで増加した。この傾向は何が原因かは不明であるが非常に興味深く、今後の検討が必要であると思われる。

図 4 に RAPD のアガロース電気泳動パターン の 1 例を示した。同じパターンを示す菌株を 1 つのグループ

表 1 発酵過程における乳酸菌の同定 (2006 年: 鹿籠六・松永)

発酵 日数	RAPD グループ	代表 菌 株番号	Accession Number	菌名	相同性 (%)
7	1	2	AF243149 AF243149.1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99.82
	2	4	AL935255 AL935255.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100
60	3	11	DQ462440 DQ462440.1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99.06
	4	13	AY675252 AY675252.1	<i>Lactobacillus casei</i>	99.45
	5	14	AY675252 AY675252.1	<i>Lactobacillus casei</i>	99.59
	6	16	DQ462440 DQ462440.1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99.18
	7	18	DQ462440 DQ462440.1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99.60
	8	24	AY675252 AY675252.1	<i>Lactobacillus casei</i>	100
	9	26	AB205055 AB205055.1	<i>Lactobacillus buchneri</i>	95.98
	10	32	AB205055 AB205055.1	<i>Lactobacillus buchneri</i>	97.19
	11	33	AY675252 AY675252.1	<i>Lactobacillus casei</i>	99.46

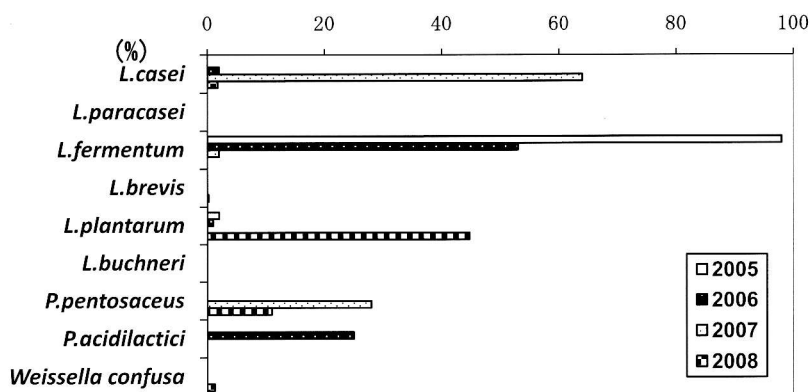


図 7. 仕込み初期 14 日目の乳酸菌出現割合

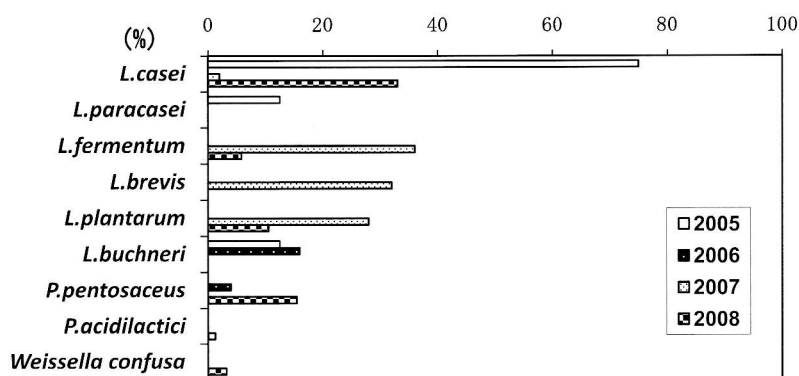


図 8. 仕込み後期 120 日目の乳酸菌出現割合

とすると 6 グループに分けることができた。同じグループから 1 つ代表菌株を選び、その菌株の DNA を鋳型にして 16S rDNA の PCR 反応を行った。その結果図 5 に示すとおり、約 1490bp 付近にバンドが確認されたため、16S rDNA の全長が増幅されていることが確認できた。

それぞれの年度の発酵過程における 16S rDNA の PCR 増幅産物の塩基配列の決定を行い、相同性検索エンジン FASTA にて相同性検索した 1 例を図 6 に示した。

表 1 に発酵過程における乳酸菌の相同性検索による同定結果の一部を示した。

図 7 に 2005, 2006, 2007, 2008 年の仕込み初期 14 日目の各乳酸菌出現割合を示した。酸度が 6% まで上がった 2005, 2006 年は桿菌の *L.fermentum* がそれぞれ 98%, 54% と優勢であったが、酸度が 1% 以上に上がらなかった 2007, 2008 年では *L.casei* が 60%, *L.plantarum* が 45% と優勢で、このように初期の段階で *L.casei* が出現するのは稀であった。また 2007 年から 2009 年では球菌である *P.pentosaceus* や *P.acidilactici* などが出現し、1996 年に小泉らが報告した初期には桿菌の *L.plantarum* が 100% という結果とは異なる結果を示した。

図 8 に発酵後期仕込み 120 日目の乳酸菌出現割合を

示した。2005 年では *L.casei*, 2006 年は *L.bucheneri*, 2007 年 は *L.fermentum*, *L.brevis*, *L.plantarum*, 2008 年は *L.casei*, *P.pentosaceus*, *L.plantarum* などが見られ, 初期の 14 日目ほど顕著な差が見られなかった。

これらの結果より, 発酵過程において乳酸菌の動態変化の違いがみられることがわかった。これらの乳酸菌は仕込み原料に由来するのか, もしくは壺に由来する乳酸菌なのかは未だ不明である。よって今後は乳酸菌の由来について検討していく必要があると考えられる。

文 献

- 1) 円谷悦造・正井博之 (1985) 福山黒酢の醸造工程中の香味成分および微生物の叢の変化 発酵工学会誌 63: 211- 220
- 2) 小泉幸道 他 (1996) 壺酢製造中から分離した乳酸菌, 酵母, 酢酸菌の同定 日本食品科学工学会誌 43: 347- 356
- 3) 相生衣理 他 (2000) 福山黒酢の仕込み方法と発酵過程におけるエタノール量, 酸度, 総窒素量, アミノ酸及び微生物の変化 地域・人間・科学 5: 145- 160
- 4) S.Haruta et al. (2006) Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 109: 79-87
- 5) 柳田由希子 (2001) 福山黒酢の発酵過程における乳酸菌の分離と 16S rDNA を用いた乳酸菌の同定 学位 授与機構提出論文
- 6) 小牧真悠子 (2003) 福山黒酢の発酵過程における乳酸菌の動態変化 学位授与機構提出論文
- 7) 元山奈緒子 (2002) 福山黒酢の発酵過程における微生物の分離と同定 学位授与機構提出論文
- 8) 三角春奈 (2004) 福山つぼ造り純米黒酢の発酵過程初期における乳酸菌の動態変化 学位授与機構提出論文
- 9) 柳田藤治 (1987) 醸造・食品学実験書 技報堂
- 10) Zhu,H.,F.Qu,and L.Zhu (1993): Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* 21: 5279 - 5280
- 11) 光岡知足 他 (1998) 腸内フローラとプロバイオティクス: 腸内フローラシンポジウム 5 No.5, 57 - 73: 160
- 12) J.Sanbrook & D.W. Russel (1988) *Molecular Cloning* Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 13) 光岡知足 他 (1998) 腸内フローラの分子生態学: 16S rRNA の塩基配列を利用した発酵乳製品中の *Lactobacillus* および *Bifidobacterium* の菌の同定

Determination of Acetic Acid, Ethanol Concentration and Characterization of Lactic Acid Bacterial Population During Black Pot Vinegar Fermentation At Fukuyama

Yoshiko Setoguchi¹⁾, Tomoko Ohnishi¹⁾, Yuka Kyutok¹⁾, Saiko Kagoroku¹⁾
Kaori Matsunaga¹⁾, Yoshimi Akazawa¹⁾, Tomomi Tashima¹⁾, Maiko Kowaki¹⁾
Shouko Sinyashiki¹⁾, Satoko Kishita¹⁾, Mayumi Shiomitsu¹⁾, Mariko Nakanishi¹⁾
Yuka Murayama¹⁾, Hiromi Utsunomiya¹⁾, Ikumi Osa¹⁾, Reina Kataoka¹⁾
Kana Sugiyasu¹⁾, Aya Hamada¹⁾, Haruko Takeshita¹⁾, Takeshi Yoshikawa²⁾
Taizo Sakata²⁾, Shintarou Ueno³⁾, Akira Fuzii³⁾, Kazunori Hashiguchi³⁾
Masanobo Nagano³⁾

- 1) Faculty of Nursing and Nutrition, Kagoshima Immaculate Heart University
- 2) Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Kagoshima University
- 3) Sakamoto Kurozu, Inc

Key words : Natural Pot Vinegar, Lactic Acid Bacteria, 16s rDNA, Acetic Acid Fermentation

Abstract

In Bunsei Period, Takenoshita Matubei who was a merchant of Fukuyama, happened to see the people of Hukiage hama shore were making colored rice vinegar with Kome-Koji, *Aspergillus oryzae* grown steamed rice. He learned how to make it and taught the method to Fukuyama's people. Since then pure rice black vinegar has been made at Fukuyama by the almost same method for two hundred years ago. The method is that at first, Kome-Koji, the second, steamed unpolished rice (3%unpolished), the third, water from underground are put into ceramic pots sitting outside pot-field (Tubo-hatake) in exact order, mix well and in final, light Kome-Koji are scattered on the surface. This procedure is called Shikomi. Shikomi has been done twice a year Haru-Shikomi April to May and Aki-Shikomi September to October. After the Shikomi, pots are left for at least one year. During the fermentation, at first rice starch was hydrolyzed to glucose by *A.oryzae*, then ethanol was produced from glucose by *Scereviciae* and finally acetic acid (about 7%) was produced by acetic acid bacteria. Except of these *A.oryzae*, *Scereviciae* and acetic acid bacteria, abundant lactic acid bacteria grew in the pot from the first day to several month after the Shikomi even though no glucose seemed to exist. Entani et al, Koizumi et al, and Haruta et al, isolated and reported some lactic acid bacteria during the fermentation. We can find some lactic acid bacteria Kome-Koji and pore of ceramic pot before Shikomi, but it is not clear yet exactly, why so many lactic acid bacteria grew in the pot after Shikomi.

The aim of this study was to characterize lactic acid bacterial population change at the species level according to the fermentation process and to investigate that are there some rule the population change relate to acetic acid formation.

We made Aki-Shikomi from 2005 year to 2008 year with four pots every year at Sakamoto kurozu company Fukuyama, Kirishima city and determined concentration of ethanol and acetic acid, and isolated about seven thousand single colonies from sixteen pots according to the fermentation process from October to March (six month). Bacterial DNA was prepared from these colonies and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Fingerprinting was done to separate these colonies to several groups having the same RAPD electrophoresis pattern. From each group, chose some represent bacteria sequenced 16s ribosomal DNA and identified the bacterial species with comparison of 16s ribosomal DNA sequence using searching engine FASTA of DNA Data Base of Japan.

In case of 2005 year Shikomi and 2006 year Shikomi, concentration of acetic acid after six month fermentation reached to 6% and 5% respectively. The dominant population of lactic acid bacteria at early stage, fermentation fourteen days after from Shikomi was *L.fermentum* (98%) in 2005 year and *L.fermentum* (54%) and *Pediococcus acidilactici* (25%) in 2006 year. Both Shikomis were done before the middle of October and the

fermentation process was normal.

But in case of 2007 and 2008 Shikomis, concentration of acetic acid after six month, reached to only 0.5% and 1% respectively and dominant population of lactic acid bacteria in early stage fermentation after fourteen days from Shikomi was *L.casei* (ca 65%) and *L.plantarum*(45%) respectively and no *L. fermentum* appeared. In these case, Shikomi was done at end of October and beginning of November respectively and the fermentation was abnormal. These result shows Shikomi after the late October, acetic acid bacteria could not grow normally because of low temperature of the outside and populations of lactic acid bacteria were also different from the pot which showed normal fermentation. The time of Shikomi is important to get the good acetic acid fermentation.

The result suggest that it is better to do Shikomi before the middle of October.
