

食塩中のミネラル類が醤油発酵微生物に与える影響（第2報）

バイオ応用室 鈴木 健
食品醸造室 宮崎 浩子
食品化学部 田中 正男
東京農業大学短期大学部 館 博, 安藤 達彦

Effects of Included Minerals in Salt on Microorganisms during Soy-sauce Fermentation (II) Takeshi SUZUKI, Hiroko MIYAZAKI, Hiroshi TACHI¹, Tatsuhiko ANDO¹ and Masao TANAKA

¹Tokyo University of Agriculture

カリウム塩を用いた醤油醸造と通常塩化ナトリウムを用いた醤油醸造を行い、醸造過程に関与する微生物の挙動を経時的に調査した。微生物に対するカリウム塩の影響を明らかにするとともに、醸造諸味中の微生物相の消長を微生物の遺伝子を利用したT-RFLP法による発酵管理の可能性を検討した。

1. はじめに

本研究では、100 %カリウム塩を用いた醤油醸造（KC1区）と通常塩化ナトリウムを用いた醤油醸造（NaCl区）を行い、醸造過程に関与する微生物の挙動と成分の変化を経時的に調査し、それらに対するカリウム塩の影響を明らかにすることを目的とし、醤油醸造で重要な微生物の挙動をT-RFLP¹⁾で検討した。

その結果、カリウム塩を用いた醤油醸造諸味中では、微生物の挙動や成分の変化が通常醤油醸造とは異なることを明らかにした。

2. 実験方法

2.1 仕込み試験

常法により製麹した醤油麹5リットルを塩水6リットルで仕込み、15℃で30日間、その後20℃で醸造した。

仕込み塩水として23 % 塩化ナトリウム水溶液及び23 % 塩化カリウム水溶液を使用した。

また、醤油乳酸菌（ビオック社製）は仕込み時に 1.8×10^8 個/gになるように諸味に添加し、醤油酵母（ビオック社製）は仕込み後1ヵ月目に 1.4×10^5 個/gになるように諸味に添加した。

2.2 試料の調製

各試験区より諸味1 gを7日ごとに採取した。DNAの抽出は、諸味1 gを10 mlの10 % NaCl水溶液で希釈し不織布でろ過した液を回収し、遠心

分離により集菌した。集菌した菌体を400µlのTEで再けん濁してDNAの抽出を行った。

DNAの抽出精製は、プロテアーゼK処理+フェノール・クロロホルム抽出により行った。

2.3 T-RFLP解析用プライマー

T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism; 制限酵素末端断片長解析)による菌相解析のために、原核生物菌相分布解析には、16S rRNA遺伝子増幅用ユニバーサルプライマー530 f (5' GGGTTGCMGCCGCG3')プライマーにBECKMAN-COULTER Dye (D4) 蛍光ラベルしたプライマーと、1100 r プライマー (5' GGGTTGCGCTCGTTG 3')を使用した。

また、真核生物菌相分布解析には、rRNA遺伝子ITS領域増幅用ユニバーサルプライマーITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG 3')にBECKMAN-COULTER Dye (D4) 蛍光ラベルしたプライマーと、ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')を使用し、PCRにより遺伝子を増幅しフラグメント解析を行った。

2.4 遺伝子の増幅及び制限酵素処理

PCRの増幅条件は、BECKMAN-COULTER CEQ Fragment Analysis Systemマニュアルに従って行い、20サイクルの増幅を行った。

増幅されたPCR産物をエタノール沈殿によって精製し、制限酵素処理に用いた。

微生物菌相分布解析に用いる制限酵素の選択

は、醤油醸造で重要な微生物が明確に判別できるように4塩基認識制限酵素を中心に多数の酵素で検討した。

その結果、原核生物の判別には、制限酵素 *Xba* I, *Hinf* I 及び *Hae* III を同時に使用し、真核生物の判別には、制限酵素 *Sma* I 及び *Dra* I を同時に使用して、フラグメント化すると菌種判別の良好な結果が得られたため、これらの制限酵素をT-RFLP解析に使用した。

2.5 フラグメント解析

制限酵素処理した試料1 μ lとBECKMAN-COULTERフラグメントスタンダード600を0.4 μ lとホルムアミド溶液40 μ lを混合し、BECKMAN-COULTER CEQ-8000 DNAシーケンサーによりフラグメント解析を行った。フラグメント解析では、蛍光末端からフラグメント長は、データベース等から微生物菌種を推定できる。

その蛍光強度はアニールしたプライマー量を示し、微生物菌数と相関すると考えられる。断片化したフラグメントの蛍光強度は、添加した

フラグメントスタンダード600の蛍光強度を100として、フラグメントの蛍光強度倍数を比率として表し、菌種別の経時変化を調べた。

3. 結果及び考察

3.1 原核生物の菌相解析

原核生物では16S rRNA遺伝子領域のT-RFLP解析結果を図1に示す。図1はNaCl区で醸造64日目の醤油諸味で *Tetragenococcus halophilus* (以下 *T. halophilus* という)、麴由来の *Bacillus subtilis* 等6種類以上の細菌種が存在していることがわかった。

今回の菌種解析条件では、醤油醸造で重要な乳酸菌である *T. halophilus* は図1の③123 bpのフラグメントとして検出された。なお、装置のフラグメント長の分解能は2bpであった。

また、蛍光強度が最も強い⑤138bpの微生物は *Bacillus subtilis* と推定された。

Bacillus subtilis は、製麴中に増殖した微生物や胞子が醤油醸造中にも多く残存しているために、遺伝子として検出されたと推察できる。

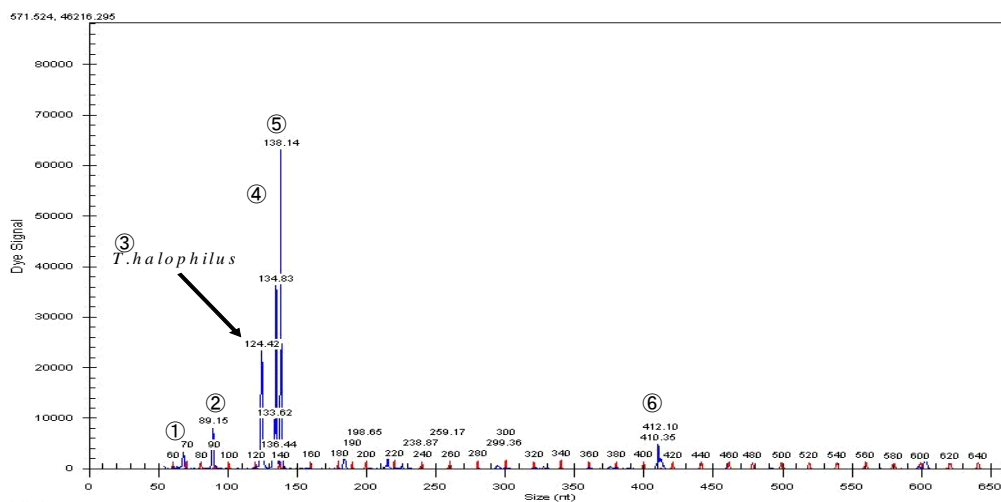


図1 NaCl区における醸造64日目の原核生物16S-rRNA領域のT-RFLPフラグメントチャート(制限酵素 *Xba* I, *Hinf* I 及び *Hae* III)

3.2 乳酸菌 *T. halophilus* の醸造中の経時変化

醤油醸造で重要な乳酸菌 *T. halophilus* は乳酸菌添加区においては仕込み当初に 1.8×10^6 個/g 添加し、T-RFLP解析では123bpフラグメントの蛍光強度比として経時変化を調べた。その結果、KCl区、NaCl区とも発酵初期では大きな差は見られなかった。しかし、KCl区においては乳酸菌酵母添加区では36日目に蛍光強度の急激な上昇を示し、乳酸菌無添加区では64日目に上昇を

示し、その後急激に減少した(図2)。これに対し、NaCl区では比較的緩やかに変化した(図2)。一方、第1報で示したように培養法による一般菌数は、KCl区、NaCl区とも菌数に大きな差は無いが、乳酸菌酵母添加でのKCl区では、35日目付近に一般細菌数の若干の増加が認められる。T-RFLP解析の蛍光強度の推移から推察すると乳酸菌による増加と考えられる。培養法では、*Bacillus* 属等も同時に計るために顕著な差とな

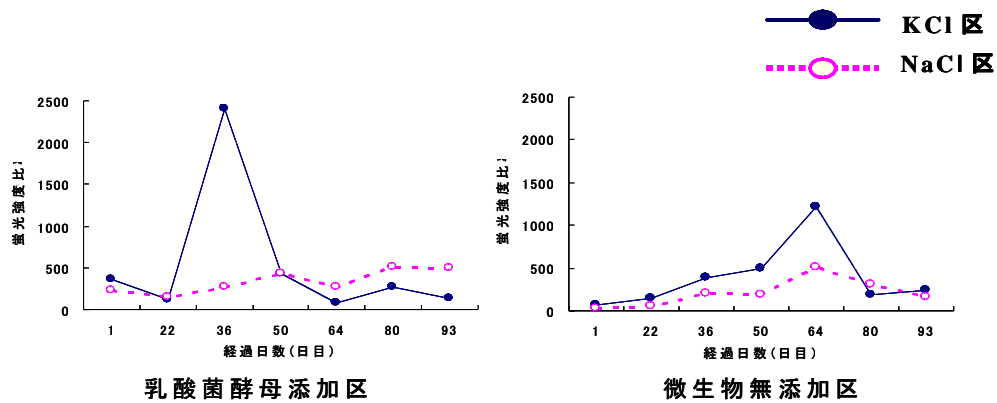


図2 T-RFLPによる *T. halophilus* の経時変化

らないが、T-RFLP法では特定の微生物として捉えて計るために、特定の微生物の挙動を正確に捉えていると考えられ、微生物の醸造管理の有効な手段と思われた。

3.3 真核生物の菌相解析

真核生物では、NaCl区64日目のrRNA ITS遺伝子領域のT-RFLP解析結果から、醤油醸造で重要な酵母は、*Zygosaccharomyces rouxii* (以下

*Z. rouxii*という) は図3の⑤186bpのフラグメントとして検出された。

また、麴由来の③*Aspergillus oryzae*等の6種類以上の真核微生物が存在していることがわかった(図3)。蛍光強度が強いのは、麴由来の*Aspergillus oryzae*で64日目の諸味中においても遺伝子として残存していると考えられた。

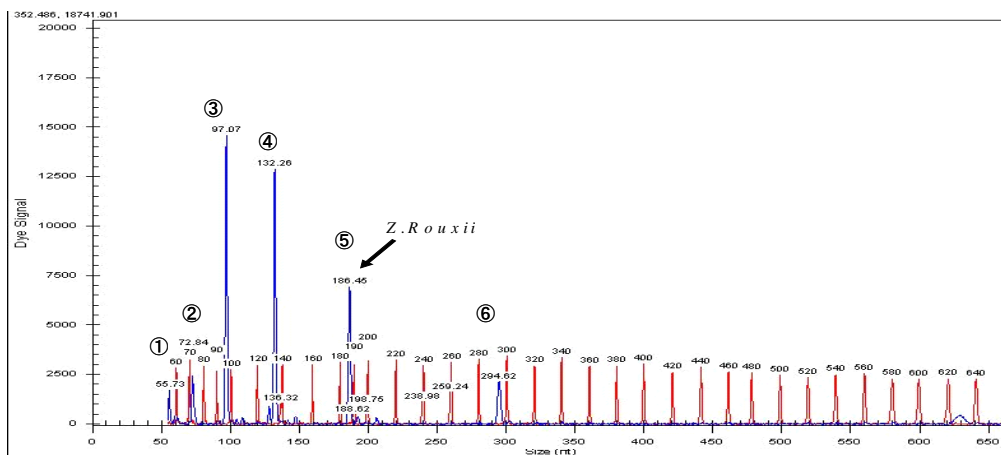


図3 NaCl区における醸造64日目の真核生物ITS領域のT-RFLPフラグメントチャート(制限酵素 *Sma*I 及び *Dra*I)

3.4 酵母 *Z. rouxii* の醸造中の経時変化

醤油醸造で重要な醤油酵母である *Z. rouxii* の186 bpのフラグメントの蛍光強度比率の経時変化を図4に示した。仕込み後1ヵ月目に醤油酵母を 1.4×10^8 個/gになるように諸味に添加した。

その結果、T-RFLP解析では、酵母添加区では、NaCl区、KCl区ともに35日目で蛍光強度比率の

急激な増加が見られた。一方、酵母無添加ではNaCl区、KCl区ともに22日目頃から蛍光強度比率がやや高く推移した。NaCl区、KCl区ともに明確な差は認められなかった。

この結果は、第1報の培養法による酵母菌数では、醸造後期では、KCl区では、酵母菌数の減少が見られた結果と異なっていた。

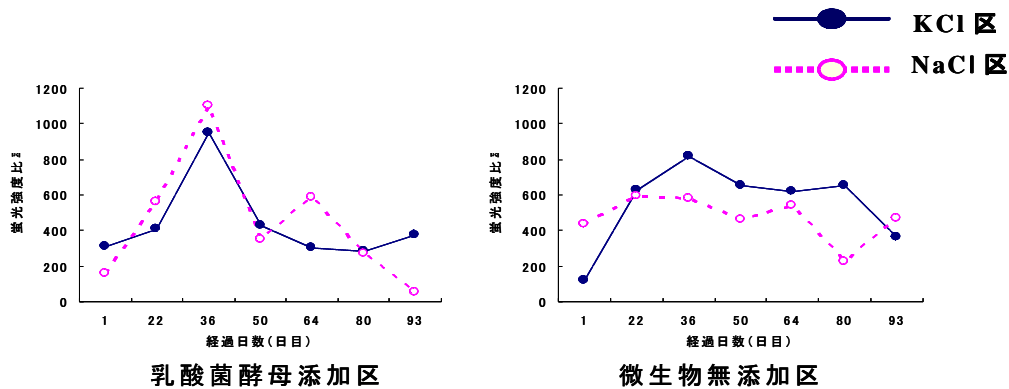


図4 T-RFLPによる*Z. rouxii*の経時変化

4. まとめ

- 1) 原核生物である細菌類については、16S rRNAのT-RFLP解析から少なくとも6種類が見出された。醤油醸造で重要な乳酸菌*T. halophilus*は乳酸菌を添加して醸造した場合にはKCl区では22日から35日目に急激に増加している結果となった。乳酸菌無添加の場合にはKCl区は54日目に最高の蛍光強度比率でゆっくり増殖したと推察された。また、NaCl区では乳酸菌の添加、無添加に関わらず蛍光強度比率が低く、増殖が抑制されたと推察された。
- 2) 真核生物については、rRNA ITS遺伝子領域のT-RFLP解析結果から少なくとも6種類の真核生物が見出された。また、醤油醸造で重要な醤油酵母である*Z. rouxii*を添加した場合には、添加直後には増加が認められるものの、KCl醸造諸味とNaCl醸造諸味に酵母類の微生物相の変化には、大きな差は

認められなかった。

- 3) 醤油醸造で重要な乳酸菌*T. halophilus*や醤油酵母*Z. rouxii*等特定の微生物の消長を把握して醸造管理するには、T-RFLP解析法は有効と思われた。

謝辞

本研究は財団法人ソルト・サイエンス研究財団平成17年度助成研究（助成番号0547）により実施したもので、関係各位に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Clement, B. G., L. E. Kehl, K. L. DeBord, and C. L. Kitts, Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities, *J. Microb. Methods*, **31** (3):135-142, 1998