



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

## 次世代シーケンサーを用いた発酵食品の微生物群集構造解析に関する研究

メタデータ	言語: 出版者: 公開日: 2024-06-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大野, 智生 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/0002000736">http://hdl.handle.net/20.500.12099/0002000736</a>

次世代シーケンサーを用いた発酵食品の微生物群集  
構造解析に関する研究

2023 年

岐阜大学大学院連合農学研究科

生物資源科学

(岐阜大学)

大野 智生

次世代シーケンサーを用いた発酵食品の微生物群集  
構造解析に関する研究

大野 智生

## Abstract

Fermented foods are produced through a series of processes after introducing microorganisms to foods by inoculation of isolated strains, utilization of microorganisms in the environment, and inoculation of culture media without isolated strains. Understanding the microbial dynamics during the fermentation process is considered to be important in terms of optimization of the production process, monitoring of unwanted microorganisms, and prevention of their invasion in the production of fermented foods. In addition, it is known that fermented foods can serve as a model ecosystem that can be easily handled experimentally, and understanding the microbial community during fermentation may be important in providing fundamental insights into the microbial community. Currently, a tool called Next Generation Sequencer (NGS) is widely used to comprehensively analyze DNA in samples without relying on culture for the study of microbial community structure, including fermented food products. In this study, we investigated the microbial community of fermented foods by mainly using NGS-based sequence analysis and examined the microbial dynamics during the fermentation process and the details of the microorganisms involved in fermentation.

Rice vinegar is frequently used in Japanese cooking and is produced through two stages of alcoholic and acetic acid fermentation. In the current industrial production of vinegar, the submerged fermentation method is used to achieve high acetic acid concentration, but the acetic acid bacteria used in this fermentation method are difficult to isolate, and culture media are sometimes used as fermentation starters. The sample supplier brews rice vinegar by the submerged fermentation method, and in some cases, alcohol vinegar made from brewing alcohol is used as a starter. The acetic acid bacteria in this rice vinegar fermentation have not been isolated, and the details of the acetic acid bacteria are not known. In addition, the types and roles of microorganisms including

acetic acid bacteria working in the rice vinegar fermentation process are also unknown, and their investigation may be useful for the optimization of the fermentation process. Here, we investigated the structural changes of the bacterial community during submerged fermentation of rice vinegar by 16S rRNA amplicon sequencing. Two types of rice vinegar, high acidity rice vinegar, and low acidity rice vinegar were used as samples, and differences in acetic acid concentration were also examined. As the results, we detected microbial genera other than acetic acid bacteria in the early stage of fermentation and also observed a rapid increase in the ratio of acetic acid bacteria of the genus *Komagataeibacter* at the time when the ethanol concentration started to decrease, and the maintenance of dominance after the increase in the ratio in both types of submerged fermentation rice vinegar, which confirmed the stability of microbial composition in the brewing of submerged fermentation rice vinegar.

The bacterial community structure at the genus level during fermentation of submerged-fermentation rice vinegar was investigated, and it is important to clarify the details of the acetic acid bacteria species because they greatly influence the fermentation characteristics during vinegar brewing. Acetic acid bacteria have not been isolated from inoculated alcohol vinegar, and it is difficult to apply the culture method. Here, we performed a metagenomic analysis of the inoculated alcohol vinegar samples. The results suggest that the microbial community of the alcohol vinegar samples is composed of almost pure acetic acid bacteria and that the acetic acid bacteria species responsible for rice vinegar fermentation is *Komagataeibacter europaeus*, which is common in submerged fermentation vinegar. It is also estimated that this acetic acid bacteria is closely related to the strains from European submerged fermentation vinegar among the same species, suggesting that bacteria closely related to those from other submerged fermentation vinegar play a major role in the submerged fermentation of rice vinegar that was investigated. The bacterial community structure at the genus level

during fermentation of submerged-fermentation rice vinegar was investigated, and it is important to clarify the details of the acetic acid bacteria species because they greatly influence the fermentation characteristics during vinegar brewing. Acetic acid bacteria have not been isolated from inoculated alcohol vinegar, and it is difficult to apply the culture method. Here, we performed a metagenomic analysis of the inoculated alcohol vinegar samples. The results showed that microbial genera other than acetic acid bacteria were detected in the early stage of fermentation, and that the percentage of acetic acid bacteria of the genus *Komagataeibacter* increased rapidly when the ethanol concentration began to decrease in both types of submerged fermented rice vinegar. The dominance of this genus was maintained until the end of fermentation, confirming the stability of the microbial composition in submerged fermentation rice vinegar brewing. Ishizuchi-kurocha is a post-fermentation tea produced in Saijo City, Ehime Prefecture, and undergoes a two-step fermentation process: a primary fermentation mainly by mold and a secondary fermentation mainly by lactic acid bacteria. The basic production process of Ishizuchi-kurocha has not changed from the traditional one, but the containers used for the secondary fermentation have been changed from wooden barrels to polyethylene bags and buckets for the sake of production stability and hygiene. This change makes the fermentation conditions more anaerobic, which is expected to promote the growth of lactobacilli and inhibit the growth of aerobic microorganisms, thereby making lactic acid fermentation more stable. However, the wooden barrel is considered to be less anaerobic during fermentation, and if this difference affects the microorganisms, there is a possibility that teas with different flavors can be produced. The origin of the lactobacilli is unknown since no artificial addition of microorganisms is made in the production of Ishizuchi-kurocha. Lactobacilli are especially important for the fermentation of Ishizuchi-kurocha, and clarification of their dynamics in the fermentation process may lead to improvement of the production method. Here, we

evaluated the effect of different production conditions, including the production vessel, on the microorganisms. From the results, it was confirmed that the microbial community during fermentation is affected by the difference in the production container used in the secondary fermentation and that the microbial community structure differs depending on the fermentation site of the tea leaves. This study may lead to the application of the traditional production method of Ishizuchi-kurocha to increase the diversity of products and to the stabilization of the production process by improving the Ishizuchi-kurocha production process.

In this study, the microbial community of fermented foods was investigated by methods centered on NGS sequencing. NGS-based analysis enables comprehensive and culture-independent evaluation of microbial communities, and when used in combination with culture methods, it is considered to be effective in the evaluation of microbial communities in fermented foods. In this study, we examined the details of major microorganisms in fermented foods such as rice vinegar and Ishizuchi-kurocha. We also found differences in the microbial community structure in each food depending on the differences in manufacturing methods and other conditions. The evaluation of microorganisms in the production of fermented foods is considered to be important in terms of optimizing the production process and improving the safety of the products.

第1章	序論.....	4
第2章	深部発酵米酢発酵時の細菌組成変動.....	5
2.1	緒言 .....	5
2.2	実験方法 .....	7
2.2.1	試料の採集 .....	7
2.2.2	16SrRNA アンプリコンシーケンシング .....	8
2.2.3	配列解析 .....	8
2.3	結果 .....	10
2.3.1	高酸度米酢醸造時における細菌群集構造の変化 .....	10
2.3.2	低酸度米酢醸造時における細菌群集構造の変化 .....	10
2.4	考察 .....	11
第3章	酢醸造における植菌源のメタゲノム解析.....	13
3.1	緒言 .....	13
3.2	実験方法 .....	14
3.2.1	試料の採集 .....	14
3.2.2	DNA 抽出及び配列決定 .....	14
3.2.3	配列解析 .....	15



3.3	結果 .....	17
3.3.1	米酢植菌源の微生物群衆構造解析 .....	17
3.3.2	米酢植菌源由来ゲノムの系統解析 .....	17
3.3.3	植菌源由来メタゲノムアセンブリゲノムと <i>K. europaeus</i> ゲノムの比較	18
3.4	考察 .....	18
第4章	石銚黒茶の発酵条件が微生物に与える影響 .....	21
4.1	緒言 .....	21
4.2	実験方法 .....	23
4.2.1	石銚黒茶の製造と茶葉の採取 .....	23
4.2.2	乳酸菌及び真菌の単離と同定 .....	25
4.2.3	DNA 抽出及びアンプリコンシーケンシング .....	27
4.2.4	配列解析 .....	27
4.2.5	茶葉成分の分析 .....	29
4.3	結果 .....	30
4.3.1	発酵の各工程での微生物コロニー数の変化 .....	30
4.3.2	培養法による各発酵工程における微生物の同定 .....	31

4.3.3	石鏈黒茶試料の細菌及び真菌群集構造解析 .....	32
4.3.4	石鏈黒茶試料の成分分析 .....	34
4.4	考察 .....	34
第5章	結論.....	38
	謝辞.....	40
	文献.....	41
	表.....	57
	図.....	68

## 第1章 序論

発酵食品は微生物等による発酵を利用して製造される食品であり、世界中で日常的に消費されている。発酵による食品成分の変化は、食品に特有の風味を付与するほか、人間の健康上有益な影響を与えることが知られており、注目されている(Marco et al., 2017)。発酵食品製造に利用される微生物については、分離菌株を接種する他、環境中の微生物を利用する、菌株未分離の培養液を接種するなどの方法によって食品に持ち込まれる。発酵開始後、一連の過程を経て発酵食品が製造されるが、このような発酵過程における微生物の動態への理解は、発酵食品製造において、製造過程の最適化や、不要な微生物の監視、侵入防止といった点から重要になると考えられる。また、発酵食品が持つ入手の容易さ、製造の再現性などの特性から、実験的に扱いやすい生態系のモデルとなり得ることが知られており、微生物群集についての基礎的な洞察の提供という面においても、発酵食品の微生物動態への理解が重要となる可能性がある(Leech et al., 2020; Wolfe & Dutton, 2015)。

現在、発酵食品を含む微生物群集構造についての研究において、次世代シーケンサー (NGS) と呼ばれる機器を用いて試料中 DNA の塩基配列を網羅的に解析する手法が広く用いられている。発酵食品を含め、環境中の微生物には培養が困難なものや現状培養できないものが多数存在していることが知られている(Amann et al., 1990; J. Wang et al., 2023)。NGS を用いた手法は培養を行うことなく微生物群集を解析可能であるため、これらの培養不能な微生物についての知見も得ることができる。このような手法の中でも、試料中生物遺伝子の特定領域を標的とした PCR 増幅後に増幅産物に対して配列決定を行う、アンプリコンシーケンシングが特に頻繁に用いられている。アンプリコンシーケンシングにおいて標的とされる遺伝子領域には、細菌 16S rRNA 遺伝子や真菌 Internal

Transcribed Spacer (ITS) 遺伝子などがある。この手法は一般的に属レベルまでの解析となり、種レベル以上の分類では精度が下がる可能性がある(J. S. Johnson et al., 2019)。また、試料中の遺伝子についての情報が必要な場合は予測によるものとなり、直接的に得ることはできない(Langille et al., 2013)。このような欠点を補う方法として、ホールゲノムショットガンシーケンシング (WGS) が存在する。これは試料中の全 DNA を断片化後に配列決定する手法であり、高コストではあるが種レベル以上での解析が可能であり、遺伝子についての解析も直接的に行うことができる(Kuczynski et al., 2012; Langille et al., 2013; Ranjan et al., 2016)。

本研究では、ハイスループットシーケンシンスを用いた解析手法を利用し、深部発酵米酢、後発酵茶といった発酵食品の微生物群集構造についての調査を行い、各食品の発酵過程における微生物動態、発酵に関与する微生物の詳細について検討した。

## 第2章 深部発酵米酢発酵時の細菌組成変動

### 2.1 緒言

酢は世界中で一般的な調味料であり、果物や穀物など、様々な原料から製造される。米を原料とした米酢は、日本料理において頻繁に用いられ、米から酒のアルコール発酵、酒から酢への酢酸発酵の2つの段階を経て製造される。現在、主な食酢醸造法には表面発酵法と深部発酵法が存在するが、現在の工業的な酢生産では、主に高酢酸濃度を達成することができる深部発酵法が用いられる(Entani et al., 1985; Yamada, n.d.)。深部発酵では、外気導入により発酵槽内全体で発酵を進めることができるため、酢酸の生産速度が速い(Yamada, n.d.)。食酢生産に用いられる酢酸菌については、食酢からの分離培養が困難なことが知られており(Gullo et al., 2006; Sokollek et al., 1998)、発酵のスターターとして、純粋

な酢酸菌分離株でなく、酢酸発酵中の培養液を用いることがある(Gullo et al., 2014).

試料提供元では、米酢醸造において、米を原料としたアルコール発酵、酒を米酢に発酵させる酢酸発酵の工程を同じ工場で行っている。工場では深部発酵法による米酢醸造を行っており、一部の品種ではスターターとして醸造用アルコールを原料とするアルコールビネガーを用いている。アルコールビネガーから酢酸菌は単離されておらず、液体培養の継続により維持されている。そのため、酢酸発酵に関連する酢酸菌の詳細については調査されておらず、また、発酵中の細菌群集構造についても知られていない。酢酸発酵においてはたらく微生物の種類、役割を明らかにすることは、発酵過程の最適化に役立つ可能性がある。また、最終産物にどのような微生物が存在しているか監視することは食品衛生上重要である。発酵原料となる酢もろみに対しては、アルコール発酵後に珪藻土による濾過が行われるが、発酵中の酢もろみは常に発酵室の空気にさらされており、酢酸菌以外の細菌が発酵槽内で増える可能性がある。また、酢もろみにアルコールビネガーを植菌した直後の段階では酢酸発酵が活発に起こらず、アルコール濃度はあまり変化しない。この期間は酢酸濃度が比較的低く、様々な細菌が増殖し得る環境にあると考えられ、発酵進行に伴う酢酸濃度上昇後には酢酸菌が優占すると考えられ、この一連の流れが細菌組成の変化につながると予想される。また、酢酸発酵の進行後については、完成した酢である発酵液の排出、酢もろみの追加の2工程から成る回分式発酵のサイクルが繰り返されており、酢酸、エタノール濃度の一時的な変化が生じるため、この操作が細菌群集に影響を与える可能性も考えられる。次世代シーケンサーを用いた16SrRNA アンプリコン解析は、細菌群集構造を調査するための標準的な手法であり(Kubo et al., 2022; Trček et al., 2016; Z. M. Wang et al., 2015)、培養に依存しないため、酢酸菌など、培養が困難な細菌についても解析を行うことが可能である。しかし、現

在のところ、深部発酵米酢について、16S rRNA 解析によって細菌群集構造を調査した研究はほとんどない。

ここでは、いままで調べられたことのない、試料提供元での深部発酵米酢醸造過程における細菌群集構造変化について、試料 DNA を用いた 16S rRNA アンプリコンシーケンシングによって調査した。試料として、高酸度米酢 (最終酢酸濃度 10.0~13.0% w/v 程度)、低酸度米酢 (最終酢酸濃度 4.5~5.0% w/v 程度) の 2 種類を使用し、酢酸濃度の高低による細菌群集構造変化の差異についても検討した。各米酢の原料である米酢もろみには不可飲処置により酢酸が添加されているが、発酵開始時にコンタミネーション防止のためさらに酢酸添加を行う。目的の最終酸度等により酢酸添加量は異なり、試料とした高酸度米酢では発酵開始時から高酢酸濃度に、低酸度米酢では比較的低酢酸濃度に調製されているため、低酸度米酢では、発酵開始時及び発酵中における酢酸濃度の低さから、酢酸菌以外の細菌が比較的生存しやすいことが予想される。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 試料の採集

内堀醸造株式会社の高酸度深部発酵米酢及び低酸度深部発酵米酢試料を試料とした。試料は植菌直後から発酵停止時まで経時的に採集 (高酸度 13 試料, 低酸度 15 試料. Table 1, 2) し, -20°Cで保存した。試料採取時のエタノール濃度変化については、アルコールセンサーによって経時的に測定した (Fig. 1, 2)。

### 2.2.2 16SrRNA アンプリコンシーケンシング

米酢試料については、以下の手順によって DNA 抽出を行った。試料 50 ml を遠心 (15000 rpm, 10 分間) し、上清を除去した沈殿を Tris-EDTA (TE) Buffer 500  $\mu$ l に懸濁した後、懸濁液 250  $\mu$ l を用いて試料中 DNA を抽出した。DNA 抽出には EZ-extract for DNA (株式会社エーエムアール, 日本) を用い、実験操作はキットのプロトコルに従った。最終的な DNA の溶出には TE Buffer 100  $\mu$ l を用い、DNA 溶液は-20°Cで保存した。

PCR 増幅においては、細菌 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を標的とし、5'末端側に Illumina アダプター配列を付加したプライマーを使用した。フォワードプライマーについては、Illumina アダプター配列と標的領域特異的配列の間に試料識別用の 6 塩基の Index 配列を付加した。標的領域特異的部分の配列は、341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') および 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')(Klindworth et al., 2013) を用いた。PCR 反応は総容量 25  $\mu$ L で行い、試料 DNA 溶液 2.5  $\mu$ L, 各プライマー終濃度 0.3  $\mu$ M, KAPA HiFi HS ReadyMix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) 12.5  $\mu$ L を用いた。PCR では、初期変性 (95°C, 5 分間) 後、変性 (98°C, 20 秒間), アニーリング (60°C, 15 秒間), 鎖伸長 (72°C, 15 秒間)を 26 サイクル繰り返し、最終伸長 (72°C, 5 分間)を行った。

### 2.2.3 配列解析

試料 DNA からの 16S rRNA 遺伝子 PCR 産物を岐阜大学 NGS サービスに提出し、次世代シーケンサーにより、各試料の塩基配列決定を Miseq (Illumina, アメリカ合衆国) により行った。Nextera XT Index Kit v2 を用いたライブラリー調製

後、配列決定用試薬として MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle) を使用し、ペアエンド合計 600 サイクルでの配列決定を行った。

岐阜大学 NGS サービスから受け取った Illumina ペアエンドリードは、フォワードプライマーに付加した Index 配列により試料別に分離した。その際、Index 部分において Q score 30 未満の塩基を持つリードを除去した。分離後リードに対し、fastp 0.23.2 (Chen et al., 2018) によるフィルタリングを行った。リードのフィルタリングでは、フォワード 5' 末端側 23 塩基及びリバース 5' 末端側 21 塩基切り捨てによるプライマー配列除去、3' 末端 1 塩基除去、平均 Q score 30 未満のリードの除去、8 塩基平均 Q score 30 未満切り捨ての Sliding window 法による 3' 末端側低品質部分の除去を行った。

フィルタリング後リードに対し、QIIME 2 2022.8 (Bolyen et al., 2019) を用いて細菌群集構造解析を行った。配列のノイズ除去には DADA2 (Callahan et al., 2016) (q2-dada2 を経由) を用い、Amplicon sequence variants (ASVs) を作成した。各 ASV への細菌分類割り当てには、q2-feature-classifier (Bokulich et al., 2018) プラグインの classify-sklearn naïve Bayes taxonomy classifier を使用した。この過程で使用した分類器は、RESCRIPt (Robeson et al., 2021) によるデータベース整理 (Curation) 実行後の Silva release 138.1 SSU 99% (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014) データベースを基に、増幅プライマー配列に基づく V3-V4 領域の抽出及び qiime feature-classifier fit-classifier-naive-bayes による訓練を経て作成した。RESCRIPt による Curation では、5 個以上の曖昧塩基または 8 塩基長以上のホモポリマーを含む低品質配列の除去、塩基長フィルタリング (以下の基準を満たしていない配列の除去: 古細菌  $\geq 900$ bp, 細菌  $\geq 1200$ bp, 真核生物  $\geq 1400$ bp) 及び重複配列の削除を行った。分類割り当ての結果から葉緑体およびミトコンドリア由来であると推定された ASVs は、ASV 集計表から除去した。



各試料における細菌組成の  $\alpha$  多様性を示す Shannon  $H'$  指数については, R パッケージである Vegan 2.6-4(Oksanen et al., 2022)を用いて計算した.

## 2.3 結果

### 2.3.1 高酸度米酢醸造時における細菌群集構造の変化

各試料 16SrRNA V3-V4 アンプリコンシーケンシングリードの QIIME2 を用いた解析により, 高酸度及び低酸度米酢醸造時の細菌群集構造の経時変化の動態が推定された (Fig. 3).

高酸度試料については, 植菌時及び発酵初期試料で *Sphingomonas* 属が高相対存在比を示した. 酢酸菌である *Komagataeibacter* 属は試料 1 (植菌後 1.0 時間) から試料 4 (植菌後 92.3 時間) では相対存在比 0~0.3%であったが, 試料 5 (植菌後 205.7 時間) で相対存在比 93.1%を占めるまで増加し, 以降は優占を維持した. *Komagataeibacter* を除き, 酢酸菌 *Acetobacterales* 科は, 試料 8 で *Granulibacter* 属がごく低存在比で検出されたのみであった. 発酵初期に高存在比を示した *Sphingomonas* 属は, 試料 5 以降の多くで 10%未満であったが, 試料 10, 11 において比較的高い存在比(試料 10 : 33.0%, 試料 11 : 21.8%)を示した.

### 2.3.2 低酸度米酢醸造時における細菌群集構造の変化

低酸度発酵試料の細菌群集構造においては, 植菌時及び発酵初期の試料 1~3 で *Pseudomonas* 属, *Staphylococcus* 属, *Gardnerella* 属, *Lactobacillus* 属など複数属が確認された. 酢酸菌 *Komagataeibacter* 属は試料 1 (植菌後 1.0 時間) から試料 3 (植菌後 51.1 時間) では低相対存在比 (試料 1 : 2.5%, 試料 2 : 4.4%, 試料 3 : 1.3%) を示したが, 試料 4 (植菌後 67.7 時間) では相対存在比 85.0%を占めるま

で急激に増加した。その後は発酵終了まで 86.9%~96.2%と高存在比を維持しており、酢酸菌の存在比変化については高酸度試料と同様の傾向を示した。また、低酸度発酵試料では *Komagataeibacter* 属以外の *Acetobacterales* 科は検出されなかった。発酵初期に最も高い相対存在比 (試料 1 で 17.1%, 試料 2 で 19.2%, 試料 3 で 32.4%) を示した *Pseudomonas* 属は、試料 4 以降では 0~5.4%と低存在比で確認された。

両発酵法各試料における細菌組成の  $\alpha$  多様性を示す Shannon H' 指数を計算したところ、低酸度発酵については発酵進行により低下する傾向がみられ、高酸度発酵については顕著な変化を示さない傾向がみられた (Fig. 4)。

## 2.4 考察

16SrRNA アンプリコンシーケンシングによる米酢試料中の属レベル細菌群集構造解析の結果において、まず、今回調査を行った高酸度米酢において、発酵初期には酢酸菌割合が低く、*Sphingomonas* 属細菌が優占した状態であることが示唆された。しかし、エタノール濃度低下後にはこの属の存在比は大きく低下し、酢酸菌である *Komagataeibacter* 属の存在比が大きく増加し、試料 5 以降優占を維持していた。

低酸度米酢においては、発酵初期は酢酸菌割合が低く、酢酸菌以外の細菌が低割合で複数属存在する状態であることが示唆された。発酵開始時において低酸度米酢は高酸度米酢より低酢酸濃度であり、酢酸菌以外の細菌の生存に比較的適した条件であったことから、複数属の細菌が確認された可能性が考えられる。低酸度においてもエタノール濃度が低下し始めた発酵開始 50~70 時間の間にこれらの属は大きく存在比を低下させ、酢酸菌である *Komagataeibacter* 属の存在比が大きく増加し、試料 4 以降では 85%以上優占した状態で安定していた。

低酸度試料における、発酵開始時に多種存在する細菌が発酵進行により酢酸菌優占へと移るといふ細菌群集の変化は、発酵進行時の細菌多様性指標の低下 (Fig. 4) から確認できる。なお、高酸度米酢については発酵開始時から *Sphingomonas* 属細菌が優占しており、発酵進行に伴い優占属が *Komagataeibacter* 属に移ったが細菌多様性が低い状態は維持され、顕著な多様性指標低下が確認されなかったと考えられる。

高酸度、低酸度米酢両方の発酵系において、エタノール濃度低下が確認された直後の試料における *Komagataeibacter* 属の大幅な存在比上昇が認められた。これは、酢酸菌の誘導期が終了して対数期に入ったためであると考えられ、その際に他属細菌の増殖は確認されなかったことから、酢酸濃度が比較的低い状態でも、発酵槽内で将来的に優占可能であったことが示唆された。今回調査を行った高酸度、低酸度発酵では、どちらも発酵終了まで酢酸菌優占に十分な酸濃度が維持されていることが示唆され、発酵液排出、酢もろみ追加という回分式発酵サイクルに伴う発酵液組成の変化が及ぼす、細菌群集構造への顕著な影響は確認されなかった。エタノール濃度低下開始までの期間については高酸度米酢で長期間、低酸度米酢で短期間であったが、これは、初期の酢酸濃度の違いによる差異である可能性があり、培養開始時の酢酸濃度が高い場合において、*K. europaeus* の誘導期が延長されることが知られている (Trcek et al., 2006)。

高酸度発酵においては、発酵初期に *Sphingomonas* 属細菌が優占しており、エタノール濃度減少後に大きく存在比を減らしたものの、回分発酵開始後の試料で一時的な増加が確認された。この属が高割合を示した高酸度発酵試料 10 については、採取時のアルコールセンサー値に小刻みな変動が確認され、これは発酵槽上部で発泡が起き、泡がセンサーに触れることによって起きたと考えられる。試料 10 における *Sphingomonas* 属の増加は試料採集時の泡の混入による可能性があり、発泡部ではこの属が高割合で存在すると推定される。この属は表

面発酵酢及び深部発酵酢において以前に検出例があり (Milanović et al., 2018; Román-Camacho, García-García, et al., 2022), 菌体外多糖を生成する能力を持つ種の存在からバイオフィーム形成への寄与が考察されている. *Sphingomonas* 属の増加時においても酢酸発酵自体は問題なく進行しており, 増加は一時的なものであったが, 発泡の原因, 酢醸造におけるこの属の役割, 高濃度酢酸への耐性等については, さらなる研究が必要である.

### 第3章 酢醸造における植菌源のメタゲノム解析

#### 3.1 緒言

試料提供元では, 米酢醸造においてスターターとして醸造用アルコールを原料とするアルコールビネガーを用いている. 前章では, これら深部発酵米酢について 16S rRNA アンプリコンシーケンシングにより発酵時の細菌群集構造を調査したが, これは属レベルまでの解析に留まる. 酢酸菌種は酢醸造時の発酵特性に大きく影響することが知られており (Gullo et al., 2014), 酢酸菌についてより詳細な情報を得るためには, 種以上についての解析を行う必要がある. 酢酸菌の食酢からの単離は非常に効率が悪いことが知られており, 現在のところアルコールビネガーから酢酸菌は単離されておらず, 培養に依存した方法を適用することが困難である. また, このアルコールビネガーについても, 酢酸菌割合が高いことが予想されるものの, 実際の微生物群集構造は未知である.

ここでは, 酢酸発酵を行う酢酸菌種についてより詳細に検討するため, 高酸度発酵, 低酸度発酵の米酢でスターターとして用いられるアルコールビネガーについて, 種レベル以上の解析が可能であるメタゲノム解析を行った.

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 試料の採集

メタゲノムショットガンシーケンス解析に供するため、内堀醸造株式会社の米酢発酵における酢酸菌源であるアルコールビネガーの提供を受け、試料とした。採集後試料は DNA 抽出まで-20°Cで保存した。

### 3.2.2 DNA 抽出及び配列決定

アルコールビネガーについては、以下の手順によって DNA 抽出を行った。試料 100 ml を遠心 (15000 rpm, 10 分間) し、上清を除去した。沈殿を TE Buffer 500  $\mu$ l に懸濁し、懸濁液 500  $\mu$ l から DNA を抽出した。抽出には Extrap soil DNA kit plus Ver.2 (株式会社バイオダイナミクス研究所, 日本) を用い、実験操作はキットのプロトコルに従った。最終的な DNA 溶出には TE Buffer 100  $\mu$ l を用い、DNA 溶液は-20°Cで保存した。

試料 DNA 溶液を岐阜大学 NGS サービスに提出し、2 機種 of 次世代シーケンサーにより、試料の塩基配列決定を行った。試料 DNA 溶液について、Nextera DNA Flex Library Prep Kit を用いたライブラリー調製の後、MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle)を使用した Miseq による短鎖配列決定を行った。また、Miseq による短鎖配列決定に加え、R9.4.1 フローセルを用いた MinION (Oxford Nanopore Technologies, イギリス) による長鎖の配列決定も行った。MinION 試料に対するライブラリー調製には、SQK-RBK004 Rapid Barcoding Kit (Oxford Nanopore Technologies, イギリス) を使用した。

### 3.2.3 配列解析

解析の前処理として、アルコールビネガー試料全 DNA から得た Illumina ペアエンドリードについては、平均 Q score 30 未満のリード除去、最低リード長 20 塩基、3'末端 1 塩基除去の条件でのフィルタリングを fastp 0.23.2 によって実行した。Minion リードについては、5'末端 50bp の除去及び 30bp 以下リードの切り捨てを、Nanofilt 2.8.0 (De Coster et al., 2018) によって実行した。

フィルタリング後の Illumina リードに対し、MetaPhlan 4.0.6 (Blanco-Míguez et al., 2023) を用いた分類割り当てを行い、微生物の相対存在比を推定した。分類割り当てでは、デフォルトの設定に加えて unclassified\_estimation オプションを使用し、分類不能リードの相対存在比についても推定した。

フィルタリング後の Illumina, Minion 両リードを使用し、SPAdes 3.13.0 (Bankevich et al., 2012) の、Nanopore オプションを用いた metaSPAdes コマンドにより配列アセンブリを行った。アセンブリ後の Scaffolds に対し、Maxbin2 2.2.6 (Wu et al., 2016)によるビンニングを行った。ビンニングによって作成した各ビンは、個別の生物ゲノムに由来するように Scaffolds を分別することで構成された配列の集まりであり、1つのビンが1生物のゲノムを表す。作成したビンについては、GTDB-TK 2.3.0 (Chaumeil et al., 2020) の classify\_wf ワークフローによる分類割り当てと、CheckM 2 1.0.8 (Chklovski et al., 2023) による品質評価を行った。GTDB-TK のデータベースとしては、Release 214 を使用した。

高完成度で構成された1ビンをメタゲノムアセンブリゲノム (MAG) とし、NCBI データベースから利用可能な8つの *K. europaeus* ホールゲノムアセンブリ (Andrés-Barrao et al., 2011; Valera et al., 2015) に対し、共有遺伝子に基づく遺伝子比較解析 (パンゲノム解析) を行った。まず、各ゲノムについて、DFAST 1.2.20 (TANIZAWA et al., 2016) による遺伝子機能のアノテーションを行った。

ゲノムのアノテーション情報を基にしたコア遺伝子及びアクセサリ遺伝子の推定には, Roary 3.13.0 (Page et al., 2015) を使用し, コア遺伝子のアラインメントには MAFFT 7.520 (Katoh & Standley, 2013)を用いた. コア遺伝子アラインメントを用いた最尤法による系統樹の推定には, IQ-TREE 2.2.2.7 (Minh et al., 2020)を使用した. 系統樹推定における塩基置換モデルは ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017) により選択し, GTR+F+R2 モデルを用いた. 系統樹における各分岐の支持率は, SH-aLRT 法 (1000 回繰り返し) 及び Ultrafast Bootstrap 法 (1000 回繰り返し) により計算した. 解析結果及びコア遺伝子由来系統樹は roary\_plots.py ([https://github.com/sanger-pathogens/Roary/blob/master/contrib/roary\\_plots/roary\\_plots.py](https://github.com/sanger-pathogens/Roary/blob/master/contrib/roary_plots/roary_plots.py), Marco Galardini) により視覚化した. 遺伝子機能についての比較のため, DFAST によりアノテーションされた遺伝情報を基に, egg-NOG-Mapper v2.1.12 (Cantalapiedra et al., 2021) により各遺伝子のアミノ酸配列に Clusters of Orthologous Groups (COGs) 機能カテゴリを割り当て, 予測される機能カテゴリをゲノム別に集計した (Fig. 6). なお, 参照データベースとして egg-NOG 5 (Huerta-Cepas et al., 2019) を選択し, 遺伝子機能が複数カテゴリに割り当てられた場合については合計して集計を行った. また, MAG に存在する代謝経路について予測し, 同種ゲノムとの比較を行った. まず GhostKOALA Version 2.0 (Kanehisa et al., 2016) により各遺伝子のアミノ酸配列に KEGG Ortholog 割り当てを実行することで遺伝子機能の特徴付け, KEGG-Decoder V.1.3 (Graham et al., 2018) によって各ゲノムにおける代謝経路の完全性を予測した (Fig. 7). COGs 機能カテゴリ及び代謝経路のゲノム間での比較におけるヒートマップによる視覚化は, R 4.2.2 (R\_Core\_Team, 2016) の pheatmap 1.0.12 (<https://github.com/raivokolde/pheatmap>) パッケージにより行った.

### 3.3 結果

#### 3.3.1 米酢植菌源の微生物群衆構造解析

アルコールビネガーを試料とし、試料中全 DNA を断片化後、配列決定を行った。Illumine Miseq により配列決定された各リードに対し、Metaphlan 4 による微生物分類割り当てを行ったところ、63.6%が *Komagataeibacter europaeus* に分類され、36.4%については分類が割り当てられなかった (Table 3).

#### 3.3.2 米酢植菌源由来ゲノムの系統解析

Miseq 及び Minion により配列決定されたリードの両方を用いたハイブリッドアセンブリにより、長鎖ゲノム配列を再構築した。生物ゲノムを分別するため、アセンブリによって再構築された長鎖配列の集まり (Scaffolds) に対し Maxbin2 によるビンニングを行ったところ、2つのビンが作成された。作成されたビンの CheckM2 による品質評価において、ビン 1 についてはゲノムとしての完成度を示す Completeness が 6.41%、ゲノムへの他生物由来配列の混合率を示す Contamination が 0.27%と推定された。ビン 2 については、Completeness 99.93%、Contamination 1.73%であった (Table 4)。また、GTDB-TK による分類割り当てにより、高完成度で再構築されたビン 2 は *Komagataeibacter europaeus* に分類され、ビン 1 については分類が割り当てられなかった (Table 5)。



### 3.3.3 植菌源由来メタゲノムアセンブリゲノムと *K. europaeus* ゲノムとの比較

得られた MAG と NCBI データベース中の *K. europaeus* ゲノム (Table 6) を比較するため、パンゲノム解析を実行した。解析の結果、9 ゲノムすべてで共通するコア遺伝子は 2046 個特定された。1 ゲノムのみから検出された遺伝子は 3860 個、2~8 ゲノムで検出された遺伝子は 2581 個であった。全てのゲノムでの共通遺伝子であるコア遺伝子アラインメントに基づく系統解析において、今回得られた MAG は、*K. europaeus* 5P3 株と同クラスターに分類された (Fig. 5)。

MAG と同種ゲノムとの遺伝子機能の比較のため、各ゲノム COGs 機能カテゴリの集計及び KEGG 代謝経路の完全性比較を行った。COGs 機能カテゴリ計数の結果は Figure 6 に示した通りであり、株間で顕著な差は観察されなかった。各ゲノムの KEGG 代謝経路完全性の比較においては、MAG のみに見られる特徴として、Cytochrome bd complex 欠損、Cytochrome c oxidase cbb3 type 経路保有等が予測された (Fig. 7)。

## 3.4 考察

アルコールビネガーのメタゲノム解析結果から、リードに対する分類割り当てにおいて、Unclassified を除く全リードが *Komagataeibacter europaeus* 由来と推定され、アセンブリ及びビニングにより作成された高完成度のメタゲノムビンについても、*K. europaeus* に分類された。これらのことから、米酢醸造でスターターとして用いられるアルコールビネガーの微生物組成については、ほぼ純粋な *K. europaeus* で構成されていると考えられ、アンプリコンシーケンシング解析において他属酢酸菌がほぼ確認されなかった点からも、この酢酸菌種が高酸

度及び低酸度発酵の両方において働いていることが示唆された。アンプリコンシーケンシング解析において高酸度発酵開始時に高相対存在比で確認された *Sphingomonas* 属細菌等、酢酸菌を除く細菌はアルコールビネガーからは検出されず、発酵原料である米酒や、発酵タンクや発酵室等の環境に由来すると考えられる。*K. europaeus* については、10~20%の高酢酸濃度での酢酸発酵に適応することが知られ、この種による発酵は他の原料を用いた深部発酵酢での研究と一致している (Román-Camacho, Mauricio, et al., 2022; Sievers et al., 1992)。今回の調査により、米酢深部発酵においても *K. europaeus* が発酵の主体を担うことが示唆された。

より詳細に分類を検討するため、MAG と NCBI データベース中の利用可能な *K. europaeus* ゲノムを用い、その共通部分であるコア遺伝子を基に系統解析を行ったところ、MAG は *K. europaeus* 5P3 株と最も近縁であると推定され、次点は Type strain である LMG18890 株であった。この2株はどちらも欧州の深部発酵酢から分離された株であり、これらと近縁と推定された MAG の由来株についても、深部発酵酢醸造に適応した特徴を持つことが予想される。一方で、5P3 株と LMG18890 株は分離されているが、我々はまだ MAG 由来株の分離に成功していない。このことから、今回解析した株が回分式深部発酵に高度に適応した結果、コロニー形成能等の機能を欠損している可能性が考えられる。ただし、利用可能な *K. europaeus* ゲノム数が少なく、系統推定においては地理的な起源や分離源ごとのクラスター形成が観察できなかった。

遺伝子機能についても、COGs 機能カテゴリ及び代謝経路の完全性について、MAG と同種他株との比較を行った。各ゲノムにおける COGs 機能カテゴリの計数においては、MAG と他ゲノムの間に顕著な差は確認されなかった。KEGG 代謝経路の完全性比較においては、Cytochrome bd complex 欠損や、Cytochrome c oxidase cbb3 type 経路の保有等、一部経路において MAG と他ゲノムの間に差が

確認された。シトクロム bd は生体エネルギー獲得または代謝経路駆動のための細菌の酸素消費を可能にし、酸素毒性や低酸素、培地アルカリ化、高温、脱共役剤や抗生物質などの毒性化合物、一酸化窒素、シアン化物、硫化水素などの呼吸阻害物質への暴露など、様々なストレス条件からの保護をもたらすことが示唆されている (Borisov et al., 2021)。この欠損が酢酸菌株の生育条件等に影響を及ぼす可能性も考えられるが、*K. europaeus* と同科である *Gluconobacter oxydans* においては、シトクロム bd オキシダーゼ欠損は酸素過剰または酸素制限条件下での成長および呼吸活性に影響を及ぼさないことが確認されている (Richhardt et al., 2013)。また、MAG 由来株での存在が示唆された cbb3 型オキシダーゼについては、プロテオバクテリア門に存在し、酸素の乏しい環境での生育を可能にするために微好氣的条件に応答して発現することが知られている (Pitcher & Watmough, 2004)。これらのような代謝経路における違いが株の生育条件等にもどのような影響を与えるかについては、さらなる研究が必要である。また、今回行ったこれらの解析はメタゲノムシーケンシングデータからベニングにより再構築された MAG を用いたものであり、アルコールビネガーで優占している酢酸菌株の実際のゲノムを完全に表しているとは限らない。より詳細に各種遺伝子やその機能の比較を行う場合については、未知の条件を見つけ出し、当該酢酸菌株の分離を行う必要がある。

今回の調査対象となった施設では現状発酵菌株を保存できず、バックアップの体制がない。そのため、増殖状態を保ちながらアルコールビネガーとして維持されている。災害などにおいてはこの維持が困難となり、アルコールビネガーを再生できなくなる場合も想定される。本研究の結果は、復興に伴う再生時にはより近縁の菌株を入手することで、近い品質のアルコールビネガーを再生できる可能性を示している。

## 第4章 石鎚黒茶の発酵条件が微生物に与える影響

### 4.1 緒言

石鎚黒茶は、愛媛県西条市で製造される後発酵茶の一つである。後発酵茶は、茶葉を微生物により発酵させることで製造される茶で、石鎚黒茶はカビを主とした一次発酵に続き、乳酸菌を主とする二次発酵を行う二段発酵という特徴的な方法で製造される。石鎚黒茶は少なくとも江戸時代から製造されているとされ、2023年3月には、「石鎚黒茶の製造技術」として重要無形民俗文化財に指定されている。現在、石鎚黒茶は西条市で製造されているが、元々は旧石鎚村で製造されていた。その後、製造工程が複雑で労力を要する石鎚黒茶の製造者は減少し、一時期には一軒のみとなったが、有志により製法が受け継がれ、現在は西条市の3団体が製造を行っている。石鎚黒茶は1年のうち7～8月の夏期のみ製造され、この期間に6回程度繰り返す。製造期間中、木箱やポリバケツといった発酵に用いられる容器は、洗浄後、以降の製造ロットで再利用されている。

石鎚黒茶の基本的な製法は旧石鎚村でのものと変わっていない。しかし、石鎚黒茶を商品として販売する場合、製造年、製造ロット、製造者による品質のばらつきを抑えることと、予期しない微生物の増殖を防ぐことが特に重要となる。予期せぬ微生物の増殖は、病原菌の侵入リスクとなる上、石鎚黒茶の製造において最も重要な乳酸発酵が正常に行われない場合、商品価値を失う可能性がある。これらのことから、現在の石鎚黒茶製造においては、基本となる製法を維持しつつ、製造の安定性や衛生面に配慮した製法の改良が行われている。具体的な変更点として、二次発酵時のポリ袋とポリバケツの使用が挙げられる。石鎚黒茶の二次発酵では、乳酸桿菌（主に *Lactiplantibacillus plantarum* および *Levilactobacillus brevis* の2菌種）が優占種となって乳酸発酵が行われる(Horie et

al., 2019). これらの乳酸桿菌は通性嫌気性菌であるため、発酵時の条件をより嫌氣的にすることで、乳酸桿菌の増殖を促進できる上、好氣的微生物の増殖を抑えられる。ポリ袋は、タイの後発酵茶ミャンの製造でも用いられており(Horie et al., 2020), 今日の後発酵茶の製造において重要な役割を担っている。ポリ袋とポリバケツの使用により乳酸発酵がより安定し、ロット間での風味の変動を抑え、製品品質を揃えることができると考えられる。一方、旧石鎚村でつくられていた当時の石鎚黒茶の二次発酵は、発酵容器として木桶を用いて行われていた。木桶は、水が漏れない程度の気密性があり、発酵時には嫌気条件を得られると推測されるが、ポリ袋と比較すると発酵時の嫌気度は低いと考えられる。この嫌気度の差は、二次発酵における乳酸菌やその他の微生物の増殖に影響を与える可能性がある。また、石鎚黒茶の二次発酵では、一次発酵での優占種である *Aspergillus* 属が検出されず、酵母が検出される(Yamamoto et al., 2019)。酵母も石鎚黒茶の風味形成に重要な役割を果たすと考えられるが、製造容器による嫌気度の変化により、生育や代謝に影響を受ける可能性がある。製造容器による微生物への影響は、石鎚黒茶の品質に影響を与えると考えられ、伝統的な木桶を用いた製造法により、現在のものとは異なる風味の茶が製造できる可能性がある。

また、石鎚黒茶の製造では、発酵に関与する微生物の人為的な添加は行わない。二次発酵では特定菌種の乳酸菌が増殖するが、これらがいつ、どこから来るのかは明らかでない。二次発酵後に優占種となる *L. plantarum* や *L. brevis* が原料茶葉から分離されることは稀で、加えて1時間の蒸し工程後では、乳酸菌のコロニーが検出されない(Horie et al., 2019)。蒸し工程後に *L. plantarum* や *L. brevis* が茶葉に混ざると考えられるが、どの段階で侵入するかは未知である。一次発酵は上部が開放された木箱で行われるが、茶葉内部については、積極的な通気は行われず、*Aspergillus* 属等の微生物が酸素を消費することで嫌気状態とな

っている可能性がある。この段階で乳酸菌が混入していた場合、茶葉の内部では一次発酵の段階で乳酸菌に適した環境が生じ、増殖が可能となっている可能性がある。このような石銚黒茶の発酵時の部位による微生物の違いは、現在まで検討されていない。乳酸菌は石銚黒茶の発酵にとって特に重要な要素であり、侵入時期や経路、発酵における動態を明らかにすることは、発酵過程の安定化など、製造法の改善に繋がり得る。また、石銚黒茶の製造は夏の間複数回行われており、製造ロット間での微生物の違いを調査することは、石銚黒茶製造の安定性を考える上で重要である。

本研究では、二次発酵時の製造容器、各発酵工程中の茶葉の部位及び製造ロットの違いにより、乳酸菌、真菌等の微生物への影響があるのかという視点から石銚黒茶の製造方法の検討を行った。

## 4.2 実験方法

### 4.2.1 石銚黒茶の製造と茶葉の採取

製造容器の違いを検討するために用いた石銚黒茶については、2021年の最初のロットとして2021年6月24日から製造を開始した (Fig. 8)。この製造ロットは試験発酵 (2021年度 Lot # 0) とした。2021年度 Lot # 0 については、一次発酵場所に近い愛媛県西条市大保木公民館 (愛媛県西条市中奥1号45番地) の広場で、前日に刈り取った茶葉を、ボイラーを用いて1時間蒸した。蒸したあとの茶葉から枝やゴミを取り除き、容量の8割程度になるように木箱に詰めて布をかぶせ、一次発酵場所まで運び、一次発酵を行った。一次発酵は、6月24日から29日まで5日間行った。一次発酵後の茶葉を箱から取り出す際、茶葉塊の表層及び内部から茶葉を採取した。表層については木箱表面2cmほどまでを採取し、

内部は木箱から茶葉の塊を取り出した際に、塊の中心部分から 20~30g 程度を採取した。一次発酵後の茶葉については洗濯板を用いて揉んだ後、半分に分けた。半分に分けた片方については 775mm×775mm のビニール袋（低密度ポリエチレン製）に詰めて口を縛り、ポリバケツに入れた後、ビニール袋の上から体重をかけて茶葉を踏み、よく脱気した。落とし蓋をした上から茶葉重量の 2 倍程度の重石を載せ、二次発酵を開始した（ポリバケツ試料）。半分に分けたもう一方については、洗浄した木桶に、ポリ袋を用いることなく直接茶葉を詰め、落とし蓋をした後、同様に重石を載せ、二次発酵を開始した（木桶試料）。二次発酵は、7 月 20 日まで 21 日間行った。二次発酵後の茶葉についても表層及び内部を採取した。

試料提供元においては、試験発酵の他にも商品として出荷するため、2021 年には Lot # 1~6 まで、異なる日程で 6 度の製造を行った。これらについても、試験ロットとの比較の為に試料採取を行った (Fig. 9)。微生物分離のため、Lot #2, 5 については一次発酵後（表層及び内部）及び二次発酵後試料を採取した。また、微生物群集構造解析に供するため、Lot #1 については一次発酵後（表層及び内部）、Lot #2 については二次発酵後、Lot #5 については一次発酵後及び二次発酵後試料を採取した。これらのロットについては、二次発酵後の試料は表層と内部とに分けずに混合したものを採取した。各製造ロットにおける製造日程については、Figure 9 に示した。なお、発酵容器として用いられる木桶、ポリバケツは、洗浄の後、以降の製造ロットで再利用しており、今回採取した試料においては、Lot #1 及び Lot #5 において同容器を使用した。

#### 4.2.2 乳酸菌及び真菌の単離と同定

発酵に関わる微生物種について検討するため、茶葉試料からの乳酸菌及び真菌の分離同定を行った。湿重量 1 g の茶葉に対し、10 ml の滅菌蒸留水を添加し混合した液を滅菌蒸留水で 10 倍ずつ段階希釈し、各種寒天平板に塗抹した。乳酸菌分離には、MRS 寒天平板 (メルク) を用い、アネロパックケンキ (三菱ガス化学) を用いて嫌気ジャー中で 37°C、二日間培養を行った。石鎚黒茶では乳酸菌以外の細菌も報告されていることから(水野 et al., 2020; 田村 et al., 1994)、乳酸菌以外の細菌について、Luria-Bertani (LB) 寒天平板 (蒸留水 1 l 中にトリプトン (メルク) 10 g, 酵母エキス (メルク) 5 g, NaCl (富士フイルム和光純薬) 10 g, 寒天 (富士フイルム和光純薬) 15 g) を用い、37°C で 2 日間培養後に計数した。真菌分離には、ポテトデキストロース寒天平板 (PDA, 日水製薬) を用い、25°C で 7 日間培養した。これらのコロニーについて、培養終了後に計数を行った。

各種寒天平板に生じた形や色の異なる代表的なコロニーについて、菌種同定を行った。滅菌爪楊枝でとり、MRS 寒天培地上のコロニーは 10 ml の MRS 液体培地に移し、37°C で一晩静置し培養した。PDA 培地上の酵母様コロニーは 10 ml の YPD 液体培地に移し、30°C で一晩、振とう培養した。各培養液 1 ml を 10,000 rpm, 10 分間遠心し、上清を捨てた後、菌体を 180 µl の TE で再懸濁し、Bioruptor (ソニック・バイオ) により、10 秒照射、5 秒休みで 5 分間超音波処理を行った。懸濁液に protease K 溶液 25 µl を加え、DNeasy Blood & Tissue kit (キアゲン) を用い、DNA を抽出した。抽出操作はキットのプロトコルに従った。各抽出 DNA を鋳型として、Takara Ex Taq (タカラバイオ) を用い、16S rRNA 遺伝子領域 (乳酸菌様コロニー) または 28S rRNA 遺伝子領域 (酵母様コロニー) をターゲットとした PCR を行った (PCR 条件: 95°C 3 分間→95°C 30 秒間, 55°C 55 秒間, 72°C 1 分間を 40 サイクル→72°C 10 分間)。PCR 用プライマー配列は以下のものを



用いた. 乳酸菌用 : 27 F : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(LANE, 1991) および 1492R : 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Youssef et al., 2009). 酵母用 : LR0R : 5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3'(Rehner & Samuels, 1994) および LR7 : 5'-TACTACCACCAAGATCT-3'(Vilgalys & Hester, 1990). 得られた PCR 産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-upkit (マッハライ・ナーゲル) を用いて精製し, 16S または 28S リボソーム RNA 遺伝子配列の決定は, 株式会社マクロジェン・ジャパン (東京) への委託により行った. 配列決定には, 以下のプライマーを用いた. 乳酸菌用 : LAB-seqF : 5'-TCCTGGCTCAGGACGAACGCT-3'. 酵母用 : プライマーLR0R. 得られた塩基配列に対し, NCBI Standard Nucleotide BLAST (blastn, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (M. Johnson et al., 2008) を用いて相同性の高い塩基配列を検索し, 各コロニーの生物種同定を行った.

真菌分離株のうち, カビ様のコロニーについては, PDA 培地上 (35°C) で生育を行い, 黒色胞子を形成するコロニーを得た, 胞子の一部を白金線で釣菌し, 0.1%酵母エキス添加ポテトデキストロース液体培地に接種した. 接種翌日に形成された菌糸を回収し, ジルコニアビーズ入りチューブ内で菌体を破碎し, 350 µl の LETS バッファ (20 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M LiCl) に懸濁し, 等量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加えて, 混和した. 遠心分離後に上層を取り, 定法の通りエタノール沈殿により DNA を回収した. この DNA を鋳型として, 菌種同定のための PCR 及び部分塩基配列解析を行った. PCR には EmeraldAmp PCR Master Mix(タカラバイオ)を用い, ITS 配列プライマーは ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') および ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE, 1990) を用いた. さらに詳細に菌種同定を行うために, カルモジュリン遺伝子部分配列を AnigCMF (5'-CCCCACTTTGCGGGGCAGAT-3') および AnigCMR (5'-

TCACCGTCCTGGTCCGCCTC-3')(Toyotome et al., 2020) を用いて増幅した。それぞれの増幅 DNA 断片の塩基配列を決定し, NCBI Standard Nucleotide BLAST (M. Johnson et al., 2008) によって相同性検索し, 菌種同定を行った。

#### 4.2.3 DNA 抽出及びアンプリコンシーケンシング

微生物群集構造解析のため, 茶葉試料を使用し, 細菌 16S rRNA 及び真菌 ITS 領域のアンプリコンシーケンシングを行った。

茶葉からの DNA 抽出は, ISOSPIN Fecal DNA (ニッポンジーン) を使用し, プロトコルに従って行った。菌体破碎には, Micro Smash (トミー精工) を用いた。細菌 16SrRNA の増幅部位は 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を標的とし, フォワードプライマーとして Bakt\_341F (S-D-Bact-0341-b-S-17 : 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'), リバープライマーとして Bakt\_805R (S-D-Bact-0785-a-A-21 : 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Klindworth et al., 2013) に Illumina アダプター配列を付加したものをを用いた。真菌 ITS 領域に対しては, フォワードプライマーとして ITSF (5'-GTGARTCATCGARTCTTTG-3'), リバープライマーとして ITSr (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')を用いた (Ihrmark et al., 2012)。PCR 増幅産物はゲノムリード株式会社 (高松) への委託により, Miseq (illumina 株式会社) を用いてペアエンド合計 600 サイクルで配列決定された。

#### 4.2.4 配列解析

受け取ったペアエンドリードに対し, fastp (Chen et al., 2018) によるフィルタリングを行った。16SrRNA 配列に対してはフォワード 5'末端側 17 塩基, リバー

ス 5'末端側 21 塩基切り捨てによるプライマー部分の除去, 3'末端 1 塩基除去, 平均 Q score 30 未満リード除去, 3'末端側から 4 塩基平均 Q score 30 未満切り捨てを行った. ITS 領域に対してはフォワード 5'末端側 16 塩基, リバース 5'末端側 15 塩基切り捨てによりプライマー部分の除去を行い, その他の条件は 16SrRNA と同じものを用いた.

フィルタリング後リードに対し, QIIME 2 2021.4 (Bolyen et al., 2019) を用いて配列解析を行った. リバースリードとフォワードリードの結合及び配列のノイズ除去には DADA2 (Callahan et al., 2016) (q2-dada2 を経由) を用い, Amplicon sequence variants (ASVs) を作成した. 各 ASVs 代表配列への細菌分類割り当てには, q2-feature-classifier (Bokulich et al., 2018) classify-sklearn によるナイーブベイズ分類法を用いた. 分類割り当てに用いるデータベースとして, 16SrRNA アンプリコンリードに対しては Silva release 138.1 SSU 99%, (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014) の V3-V4 領域部分を, ITS 領域に対しては Unite version 8.3 dynamic ITS developer (Nilsson et al., 2019) を, どちらも q2-feature-classifier fit-classifier-naive-bayes による処理後に使用した. Silva release138.1 を基にした分類器については, RESCRIPt (Robeson et al., 2021) によるデータベース整理及び増幅プライマー配列に基づく V3-V4 領域の抽出後に, qiime feature-classifier fit-classifier-naive-bayes による処理を行った. RESCRIPt によるデータベース整理においては, 5 個以上の曖昧塩基または 8 塩基長以上のホモポリマーを含む低品質配列除去, 塩基長フィルタリング (以下の基準を満たしていない配列を除去: 古細菌  $\geq 900\text{bp}$ , 細菌  $\geq 1200\text{bp}$ , 真核生物  $\geq 1400\text{bp}$ ) 及び重複配列の削除を行った. 分類割り当て後, ASV 集計表からは, 葉緑体及びミトコンドリア由来と推定された ASVs を除去した.

#### 4.2.5 茶葉成分の分析

発酵終了後の 2021 年度 Lot #0 (木桶及びポリバケツ) 茶葉試料及び 2021 年度 Lot #2 茶葉試料については、天日乾燥及び凍結乾燥後にミルサー (IMF-700G, 岩谷産業) で粉末化して、成分分析に供した。有機酸分析は高速液体クロマトグラフィー (日本分光) を使用した。分析試料は、茶粉末に水を加えて 100 mg/ml にした後、室温で 1 時間振盪し、0.45  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過して調製した。カラムには RSpak KC-811 (8 mm  $\times$  300 mm; 昭和電工) 2 本を 60°C で使用した。移動相は 4.0 mM  $\text{HClO}_4$  で、流量は 1.0 ml/min だった。反応相は 0.2 mM ブロモフェノールブルー (関東化学株式会社), 15.0 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (関東化学株式会社) で、流量は 1.5 ml/min だった。有機酸を検出した波長は 445 nm だった。遊離アミノ酸類は高速アミノ酸分析計 (LA8080, 日立製作所) で分析した。分析試料は、茶葉粉末に 5% (w/w) トリクロロ酢酸を加えて 10 mg/ml の濃度にした後、室温で 1 時間振盪し、4°C, 10,000 $\times$ g, 20 分の条件で遠心した後、上清を 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過して調製した。カテキン類とカフェインの分析には、高速液体クロマトグラフィー (島津製作所) を用いた。分析試料は、茶粉末に 5 mg/ml の濃度になるよう水とアセトニトリル等量混合溶液を加え、室温で 40 分間振盪した後、上清を 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過して使用した。カラムは CAPCELL PAK C18 UG120 (S3) (4.6 mm  $\times$  100 mm; 資生堂) を 40°C で使用した。移動相は、0.5% (v/v) リン酸/メタノール (富士フィルム和光純薬株式会社) = 82/18, 流量は 0.8 ml/min だった。カテキン類及びカフェインは、280 nm の波長で検出した。

## 4.3 結果

### 4.3.1 発酵の各工程での微生物コロニー数の変化

製造工程の各段階で茶葉を採取し、主に乳酸菌の検出のために MRS 寒天平板培地を、主にカビや酵母の真菌の検出のために PDA 培地を、その他の好氣的細菌については LB 寒天平板を用いた培養法により茶葉 1 g (湿重量) あたりの菌数を測定した (Table 7). 試験ロット (2021 年度 Lot #0) について、採取、洗浄後茶葉の MRS 寒天平板での菌数は、 $4.2 \times 10^3$  CFU/g であったが、蒸し工程後ではコロニーは検出されず、一次発酵後でも表層及び内部の茶葉ともにコロニーが生じなかった。乳酸菌の原料茶葉への付着は認められるが、蒸し工程により検出限界以下になっており、一次発酵後でも同様であった。二次発酵後試料では、木桶表層が  $2.6 \times 10^7$  CFU/g、内部が  $1.3 \times 10^7$  CFU/g であった。ポリバケツでは、表層が  $9.0 \times 10^8$  CFU/g、内部が  $1.4 \times 10^7$  CFU/g であり、表層で菌数が多かった。木桶に比べ、ポリバケツ試料において乳酸菌は比較的多数検出された。2021 年度 Lot #2 では、Lot #0 において検出されなかった一次発酵後試料からも MRS 寒天平板にコロニーが生じ、表層  $1.0 \times 10^5$  CFU/g、内部  $9.3 \times 10^7$  CFU/g で、特に内部において菌数が多かった。MRS 培地における Lot #2 での二次発酵後における菌数は  $4.0 \times 10^8$  CFU/g であり、Lot #0 ポリバケツ試料と顕著な差はなかった。

2021 年度 Lot #0 試料の PDA における菌数は、洗浄後試料においては  $1.9 \times 10^7$  CFU/g で、ほぼ全て酵母様コロニーであった。一次発酵後では表層  $7.4 \times 10^8$  CFU/g、内部  $3.3 \times 10^6$  CFU/g で、表層の菌数が多かった。これらは多くがカビ様であったが、酵母様コロニーも少数観察された。二次発酵後試料では、酵母様コロニーが木桶表層で  $4.1 \times 10^4$ 、内部で  $2.7 \times 10^5$ 、ポリバケツ表層で  $4.4 \times 10^4$  CFU/g、内部で  $3.7 \times 10^5$  CFU/g であった。カビ様コロニーは木桶表層で  $1.3 \times 10^4$  CFU/g、木桶内部で  $5.3 \times 10^4$  CFU/g、ポリバケツ表層で検出無し、内部で  $1.0 \times 10^4$  CFU/g

であった。二次発酵後では木桶及びポリバケツ試料の両方で酵母様コロニーが多くを占め、それぞれ内部において数がより多い傾向が確認された。二次発酵後において、カビ様コロニーについては一次発酵時から減少したものの一部残存しており、ポリバケツ試料と比較し木桶試料で多く計数された。2021 年度 Lot #2 では、一次発酵後試料での酵母様コロニーは表層で  $2.3 \times 10^{11}$  CFU/g、内部で  $8.0 \times 10^8$  CFU/g であり、カビ様コロニーは表層で  $7.3 \times 10^{10}$  CFU/g、内部で検出無しであった。Lot #2 の二次発酵後試料ではカビ様コロニーはみられず、酵母様コロニーは  $4.0 \times 10^5$  CFU/g であった。

LB で Lot #0 の一次発酵後試料から生じたコロニーは全てカビ様であったが、二次発酵後ではそれらは認められず、大きさが異なる 2 種類のコロニーが生じた。Lot #2 では一次発酵後においてもカビ様コロニーとともにカビ様でないコロニーが 1 種類確認され、二次発酵後においては 2 種類のカビ様でないコロニーが認められた。

#### 4.3.2 培養法による各発酵工程における微生物の同定

MRS 寒天平板から、外観が異なる代表的なコロニーを単離し、液体培地で増殖が確認できた菌について、16S, 28S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性を基に同定を行った (Table 8)。2021 年度 Lot #0 では、一次発酵後試料では MRS 寒天平板上にコロニーは形成されなかったが、二次発酵後では、木桶、ポリバケツ茶葉両方でコロニーが形成された。これらはいずれも乳酸桿菌で、木桶茶葉から *L. plantarum* が、ポリバケツ茶葉から *L. plantarum* および *L. brevis* が検出された。一方、2021 年度 Lot #2 では一次発酵後試料からも MRS 寒天平板上にコロニーが形成され、Lot #2 一次発酵後試料では、表層からは *Leuconostoc mesenteroides* が、内部からは *L. plantarum* が検出された。Lot #2 の二次発酵後試料からは、Lot

#0 ポリバケツ試料と同様 *L. plantarum* および *L. brevis* が検出された。Lot #5 でも、一次発酵後試料から MRS 寒天平板上にコロニーが形成され、*L. plantarum* および *L. brevis* のほか、*Weissella paramesenteroides* が検出された。二次発酵後試料からは、Lot #0 ポリバケツ試料、Lot #2 と同様 *L. plantarum* および *L. brevis* が検出された。

真菌分離用の PDA 寒天平板を用いた培養では、Lot #0 一次発酵後試料からカビ様コロニーが多数形成された。カビ様コロニーから真菌種を同定したところ、木箱表層では *A. niger* および *A. luchuensis* が、木箱内部では *A. neoniger* が検出された。また、二次発酵後についても、木桶試料において *A. luchuensis* が検出された。木桶試料由来の酵母様コロニーについては、*W. anomalus* が検出された。一方、ポリバケツの茶葉では、二次発酵後では PDA 上に酵母様コロニーのみが形成され、*P. manshurica* が検出された。Lot #0 において検出された酵母種は、木桶で *W. anomalus*、ポリバケツ試料で *P. manshurica* で、発酵容器による違いが確認された。Lot #2 でも一次発酵後茶葉では PDA 上にカビ様コロニーが形成されたが、二次発酵後では酵母様コロニーのみであった。Lot #2 一次発酵後茶葉からは表層で *A. niger* が、表層内側両方で *A. luchuensis* が、二次発酵後では酵母である *P. kudriavzevii* および *P. manshurica* が検出された。Lot #5 においては一次発酵後で *A. niger*、*A. luchuensis* 及び *A. neoniger* が検出された。検出されたカビについては、*A. niger*、*A. luchuensis* 及び *A. neoniger* が主であり、発酵容器やロットによる傾向の違いは観察されなかった。

#### 4.3.3 石鎚黒茶試料の細菌及び真菌群集構造解析

Illumina Miseq を用いた細菌 16S rRNA V3-V4 領域および真菌 ITS 領域のアンプリコンシーケンシングにより、Lot #0, 1, 2, 5 について各試料中の細菌及び真菌

の組成を推定した (Fig. 10, 11). 細菌について, Lot #0 では, 一次発酵後は表層, 内側両方で *Klebsiera* が, 内部では *Bacillus*, *Pantoea* が比較的高割合で確認された. 一次発酵時の乳酸桿菌については, 表層では確認されず, 内部においてごく低割合 (0.36%) で *Lactiplantibacillus* が検出された. 二次発酵後は木桶, ポリバケツ試料とともに *Lactiplantibacillus* が高割合で確認され, その存在比は表層試料と比較し内側試料でより高かった. *Levilactobacillus* も確認され, ポリバケツ試料において木桶試料より高割合で見られた. また, ポリバケツ試料では *Dysgonomonas* および *Sphingobacterium* の割合が木桶試料より高かった. そのほか, 両製法において *Klebsiella* は一次発酵から引き続き確認され, *Pseudomonas* が高割合で見られた. Lot #5 では, 一次発酵後において Lot #0 と同様に *Klebsiera*, *Bacillus* および *Pantoea* が比較的多く見られたほか, *Lactiplantibacillus* も高割合で見られた. Lot #5 の二次発酵後においては *Lactiplantibacillus* の割合が上昇し, *Levilactobacillus* が高割合で見られた.

真菌については, Lot #0 では, 一次発酵後において木桶, ポリバケツ試料の両方で *Aspergillus* が優占していた. 二次発酵後では *Aspergillus* の割合が低下して *Wickerhamomyces* が増加したが, 木桶試料でより高割合であった. 一方, ポリバケツ試料においては *Pichia* の割合も増加した. Lot #5 では, Lot #0 と同様に一次発酵後は *Aspergillus* がほとんどを占め, 二次発酵後では Lot #0 ポリバケツ試料と同様に *Aspergillus* の割合低下及び *Wickerhamomyces* および *Pichia* の割合増加が見られた.



#### 4.3.4 石銚黒茶試料の成分分析

製造後 2021 年度 Lot #0 茶葉試料及び Lot #2 茶葉試料について、有機酸類、カフェイン及びカテキン類、遊離アミノ酸類について成分分析を行った (Table 9, 10, 11).

カフェイン及びカテキン類については、Lot #0 において木桶とポリバケツで同程度の濃度で検出された (Table 9). Lot #2 については、Lot #0 と比較し、エピガロカテキンガレート含量が高かった.

有機酸類についても、Lot #0 において木桶とポリバケツで同程度の濃度で検出された (Table 10). また、Lot #2 については、Lot #0 と比較し、シュウ酸含量、総有機酸量が低かった.

遊離アミノ酸類についても、Lot #0 において木桶とポリバケツで同程度の濃度で検出された (Table 11). Lot #2 については、 $\gamma$  アミノ酪酸、オルニチンを除いて Lot #0 の 2 試料より低含量を示し、総量についても Lot #0 の半分以下であった.

#### 4.4 考察

本研究では、石銚黒茶の製造工程において、二次発酵に木桶を用いた場合とポリバケツを用いた場合に発酵に関与する微生物に影響があるのか、また、各発酵工程中の部位、製造ロットにより微生物群集構造に違いがあるのか、という視点から評価を行った. 伝統的な石銚黒茶の製造方法では、二次発酵において木桶に直接茶葉を詰めて発酵を行っていたが、現在ではポリ袋に茶葉を入れ、密閉された状態で発酵を行っている.

培養法及び細菌群集構造解析の結果において、試験製造ロット (2021 年度 Lot #0) の木桶試料とポリバケツ試料及び本製造ロット (2021 年度 Lot #2, 5) の二次発酵後に優占している細菌は、発酵部位によらず *Lactiplantibacillus* 属であり、

木桶製造においても、乳酸菌の増殖が可能な嫌気度に達していることが示唆された。細菌群集構造解析において *Lactiplantibacillus* は、二次発酵後 Lot #0 の表層試料と内部試料を比較すると、ポリバケツ及び木桶試料の両方において内部試料で高い割合を示した。このことから、二次発酵中の茶葉内部は、酸素濃度の低さなどから *Lactiplantibacillus* 属の生育により適した条件になっていると考えられる。*L. brevis* については、Lot #0 ポリバケツ試料及び Lot #2, 5 で分離されたが、Lot #0 木桶試料においては分離されなかった。細菌群集構造解析の結果においても Lot #0 ポリバケツ試料及び Lot #5 において比較的高割合で *Levilactobacillus* が確認されたが、例年、同年度の製造ロットでも *L. brevis* の検出に差があることから、製造法による差であるかどうかは明確ではない(Horie et al., 2019)。

2021 年度の初回製造ロットである Lot #0 では、二次発酵後の茶葉については、*L. plantarum* および *L. brevis* が分離されているが、一次発酵後の茶葉から乳酸菌が分離されなかった。一方、Lot #2, 5 からは一次発酵後の茶葉からもこれらが分離されている。また、細菌群集構造解析において Lot #0 の一次発酵後試料からの *Lactiplantibacillus* の検出割合はごく僅か (表層: 0%, 内部: 0.4%) であるが、Lot #1 については割合が上昇し(表層: 0.1%, 内部: 7.0%), Lot #5 の一次発酵後試料においては比較的高割合 (15.6%) で検出されている。一次発酵は好気的条件下で行われるが、茶葉内部には積極的な空気供給はなく、麴菌生育に伴う酸素消費と発酵熱で乳酸菌の至適生育条件に近い環境となり、一次発酵試料においても乳酸菌が増殖した可能性がある。また、ロットが進むにつれて一次発酵試料での *Lactiplantibacillus* の検出割合が増加していることから、この乳酸菌については前製造ロットからの持ち込みがある可能性が考えられる。特に、一次発酵に使う木箱は同年度中に使いまわしており、Lot #5 では 2021 年に一度製造を行った木箱が用いられている。これらは製造後に洗浄、乾燥を経て再利用さ

れるが、後製造ロットとなるに従い、発酵容器経由で選抜された菌が持ち込まれ、スターターとなって発酵が安定するのかもしれない。一方、年度初回の製造では持ち込みの影響は少ないと考えられるため、乳酸発酵の安定に時間がかかる可能性がある。

真菌については、一次発酵後試料で *Aspergillus* 属真菌が検出された点においては試料間で共通していたが、二次発酵後試料において、木桶試料とポリバケツ試料で検出された酵母に明確な違いが認められた。Lot #0 の木桶で二次発酵を行った茶葉からは、*W. anomalus* が分離されたが、ポリバケツで二次発酵を行った茶葉からは *P. manshurica* が分離された。Lot #0 試料について、PDA 培地による培養では、一次発酵ではカビ様のコロニーに占められていたが、二次発酵後では酵母様のコロニーが大部分を占めていた。一次発酵で優占していた *Aspergillus* が二次発酵後には分離されないことは以前にも報告されている (Yamamoto et al., 2019)。真菌群集構造解析においても、一次発酵後では全ての試料で *Aspergillus* の優占が確認され、二次発酵後では酵母も確認された。また、Lot #0 で二次発酵後に多存在比で見られた酵母は、木桶で *Wickerhamomyces*、ポリバケツで *Pichia* であり、この傾向も培養法と一致していた。しかし、培養法においては二次発酵後に大きく減少した *Aspergillus* は、真菌群集構造解析においては二次発酵後でも高割合で確認された。これは、二次発酵時に *Aspergillus* の多くが死滅または培養不可能となったが、生物量の多さからゲノムが残存していたためであると予想される。Lot #0 のポリバケツを用いた二次発酵試料からは *Aspergillus* が分離されなかったが、木桶を用いた試料では少数が分離された。これは木桶での比較的好気的な条件に起因する可能性があるが、石鎚黒茶の二次発酵での *Aspergillus* 属真菌の役割については不明であり、その製品品質への影響についても検討が必要である。

石銚黒茶の風味形成には、乳酸菌や *Aspergillus* 属真菌のほか、酵母について重要であると考えられている (Toyotome et al., 2019). Lot #0 木桶試料から分離された *Wickerhamomyces anomalus* については、ブドウやワインから頻繁に分離され、酢酸エチルの過剰生産によるワイン変質と関連付けられている。しかし、ワインの香りや微生物制御において良好な影響を与え得ることも知られており、酒造に応用する研究が行われている (Padilla et al., 2018)。この種は好氣的な条件を好み (Walker, 2011)、木桶での好氣的条件によって増殖が促進された可能性がある。また、Lot #0 及び Lot #2 におけるポリバケツによる発酵で検出された *Pichia manshurica* は、石銚黒茶の二次発酵時で検出例があり (Toyotome et al., 2019)、中国伝統酢の醸造において、その接種がエタノール、酢酸の生産量、酢中の総エステル含有量増加や風味の向上をもたらすことが知られている (Zhang et al., 2017)。これらの酵母は茶製造においてその香りや微生物制御において影響を及ぼすと考えられ、製造容器の種類によって異なる酵母が増殖することで、最終製品品質の違いにつながる可能性がある。また、二次発酵後 Lot #0 の内部、表層試料と比較し、表層試料においてより高割合で酵母が確認されたことから、表層部分の比較的好氣的な条件により、酵母の生育が促進された可能性がある。

茶葉成分分析においては、Lot #0 の木桶、ポリバケツ試料のカフェイン類及び有機酸、遊離アミノ酸に顕著な差はみられなかった。そのため、製造容器による最終製品品質への影響は主要な成分において限定的であると推定される。しかし、Lot #0 と Lot #2 においては遊離アミノ酸含量において顕著な差が確認された。Lot #2 において  $\gamma$  アミノ酪酸、オルニチン含量が高く、その他のアミノ酸は低含量であった。これは、Lot #0 と 2 での二次発酵期間の違い (Lot #0: 22 days, Lot #2: 18 days) によるものである可能性が考えられるが、詳細については、さらなる研究が必要である。

今回の調査により、現在の製法を用いた場合と伝統的な製法を用いた場合の石銚黒茶製造への影響を検討した。製造時に優占する微生物は一次発酵、二次発酵ともに製造容器によらず同じである点、主要な成分に顕著な差がみられない点から、ポリバケツを用いた現在の製造においても、木桶での伝統的な製造に近い品質の製品が製造可能であると示唆された。石銚黒茶を商品として考える場合、飲みやすく、安定した風味を持つものを製造することが重要である。安定した茶製造を行う場合については、二次発酵にポリ袋及びポリバケツを使用する方法が有効であると考えられる一方、木桶を用いた場合、風味が変化し、可能性があり、その差を付加価値とすることができるかもしれない。増殖する酵母種及び *Aspergillus* 属の二次発酵時での残存について、製造容器による差が確認されており、これらは香り成分など、製品品質に影響を与える可能性がある。また、初回製造かそれ以降での製造かについても、重要となる可能性が示唆された。Lot #0 より後期の製造では一次発酵後においても乳酸菌が検出されており、乳酸菌の前ロットからの持ち込みが示唆された。持ち込みを考慮してロットにより発酵条件を変更するなど、製法の改良が考えられるほか、木桶を用いた製法を応用する場合、二次発酵を安定して行うために初回ロットではポリバケツを用い、それ以降のロットで実行するといったことが考えられる。発酵部位についても、一次発酵後の茶葉について、茶葉内部の試料でより高割合の乳酸菌が検出されていることから、一次発酵後の茶葉内部のみを使用して二次発酵を行うことで、より安定した石銚黒茶製造が行えるかもしれない。

## 第5章 結論

第2章では、16S rRNA アンプリコンシーケンスを用い、深部発酵法米酢の製造時における細菌群集構造変化の調査を行った。酸度の異なる2種類の深部発

酵米酢の両方において、エタノール濃度が減少し始めるタイミングにおける *Komagataeibacter* 属酢酸菌割合の急激な増加、増加後の高割合での優占の維持が確認された。これらの結果から、深部発酵による米酢醸造における微生物組成の安定性が確認された。この結果は米酢深部発酵の微生物に関する基礎的な情報を提供するものであり、米酢醸造における発酵過程の最適化に役立つ可能性がある。

第3章では、深部発酵米酢における植菌源である、アルコールビネガー対してメタゲノム解析を行い、より詳細な酢酸菌分類について検討した。結果から、深部発酵米酢において発酵を行う酢酸菌については、深部発酵で一般的にみられ、高酢酸濃度に対する耐性を持つ、*Komagataeibacter europaeus* であることが示唆された。また、この菌株は、同種の中でも、ヨーロッパで生産される深部発酵酢から分離された株と近縁であると推定された。今回調査を行った米酢深部発酵においても主要な働きをする細菌は他の深部発酵酢と同様であることが示唆され、災害時など植菌源が失われた場合において、より近縁な株の導入により近い品質のものを再生できる可能性が示された。

第4章では、石鎚黒茶製造法の変更がその微生物群集に与える影響について、培養法及び細菌 16S rRNA、真菌 ITS アンプリコンシーケンシングによって調査した。結果から、二次発酵時に用いる製造容器の違いが発酵時の微生物群集に影響を与えること、茶葉の発酵部位により微生物群集構造が異なることを見出した。本研究により、石鎚黒茶の伝統的な製法の応用による製品の多様性の向上や、石鎚黒茶製造過程改良による製造の安定化に繋がる可能性がある。

本研究では、発酵食品の微生物群集について、アンプリコンシーケンシング解析及びメタゲノム解析を中心とした手法を用いて調査を行った。ハイスループットシーケンサーを用いた解析は、培養非依存で網羅的な微生物群集評価が可能であり、これらの手法を複数用いたり、培養法等と組み合わせて利用した

りすることは、発酵食品の微生物評価において有効であると考えられる。今回調査を行った米酢、石鎚黒茶といった発酵食品において、発酵に関連する主要な微生物の詳細について検討した他、製造法等の条件による微生物群集構造の違いが見いだされた。結果から、米酢においては植菌源消失の際に近縁株入手で醸造が再開できる可能性が示唆され、石鎚黒茶においては増殖微生物の違いを付加価値にできる可能性が考えられた。発酵食品製造における関連微生物についての評価は、製造条件間の比較、微生物特性の検討による製造の最適化、多様化や、不要微生物の監視、侵入防止による製品の安全性向上につながり得る点で重要である。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教官として多大なご指導を頂きました岐阜大学応用生物科学部 岩橋均教授に深謝致します。また、同学部 中村浩平准教授、並びに産業技術総合研究所 堀江祐範博士には、本論文作成にあたり、副指導教官として適切なお助言を賜りました。深く感謝申し上げます。

成分分析にご協力いただいた徳島県立工業技術センター 西岡浩貴博士、真菌同定にご協力いただいた帯広畜産大学獣医学研究部門 豊留孝仁准教授、米酢発酵に関して多大なお助言を賜りました内堀醸造株式会社 蒲野悟史氏に深く感謝の意を表します。また、研究材料として、米酢試料をご提供頂いた内堀醸造株式会社の皆様、石鎚黒茶試料をご提供いただいた NPO 法人石鎚スクエア就労継続支援 B 型事業所 Visee の皆様に感謝申し上げます。

学位取得の機会を与えて下さった科学捜査研究所所員の皆様に深く感謝申し上げます。

## 文献

Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., & Stahl,

D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 56, Issue 6).

Andrés-Barrao, C., Falquet, L., Calderon-Copete, S. P., Descombes, P., Pérez,

R. O., & Barja, L. C. C. (2011). Genome sequences of the high-acetic acid-resistant bacteria *Gluconacetobacter europaeus* LMG 18890T and *G.*

*europaeus* lmg 18494 (reference strains), *G. europaeus* 5P3, and

*Gluconacetobacter oboediens* 174Bp2 (isolated from vinegar). In *Journal of Bacteriology* (Vol. 193, Issue 10, pp. 2670–2671).

<https://doi.org/10.1128/JB.00229-11>

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A.

S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V.,

Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A.

(2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, *19*(5), 455–477.

<https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>

Blanco-Míguez, A., Beghini, F., Cumbo, F., McIver, L. J., Thompson, K. N.,

Zolfo, M., Manghi, P., Dubois, L., Huang, K. D., Thomas, A. M., Nickols,



W. A., Piccinno, G., Piperni, E., Punčochář, M., Valles-Colomer, M., Tett, A., Giordano, F., Davies, R., Wolf, J., ... Segata, N. (2023). Extending and improving metagenomic taxonomic profiling with uncharacterized species using MetaPhlAn 4. *Nature Biotechnology*.

<https://doi.org/10.1038/s41587-023-01688-w>

Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A., & Gregory Caporaso, J. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, 6(1).

<https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857.

<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>

Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Paiardini, A., Hoogewijs, D., Forte, E., Giuffrè, A., & Poole, R. K. (2021). Bacterial Oxidases of the Cytochrome bd Family: Redox Enzymes of Unique Structure, Function, and Utility As Drug

- Targets. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 34, Issue 16, pp. 1280–1318). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8039>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., & Huerta-Cepas, J. (2021). eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(12), 5825–5829.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab293>
- Chaumeil, P. A., Mussig, A. J., Hugenholtz, P., & Parks, D. H. (2020). GTDB-Tk: A toolkit to classify genomes with the genome taxonomy database. *Bioinformatics*, *36*(6), 1925–1927.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz848>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, *34*(17), i884–i890.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Chklovski, A., Parks, D. H., Woodcroft, B. J., & Tyson, G. W. (2023). CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality

using machine learning. *Nature Methods*, 20(8), 1203–1212.

<https://doi.org/10.1038/s41592-023-01940-w>

De Coster, W., D’Hert, S., Schultz, D. T., Cruts, M., & Van Broeckhoven, C. (2018). NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*, 34(15), 2666–2669.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty149>

Entani, E., Ohmori, S., Masai, H., & Suzuki, K.-I. (1985). ACETOBACTER POLYOXOGENES SP. NOV., A NEW SPECIES OF AN ACETIC ACID BACTERIUM USEFUL FOR PRODUCING VINEGAR WITH HIGH ACIDITY. In *J. Gen. Appl. Microbiol* (Vol. 31).

Graham, E. D., Heidelberg, J. F., & Tully, B. J. (2018). Potential for primary productivity in a globally-distributed bacterial phototroph. *ISME Journal*, 12(7), 1861–1866. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0091-3>

Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., & Giudici, P. (2006). Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar.” *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 209–212.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.024>

Gullo, M., Verzelloni, E., & Canonico, M. (2014). Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and

- biotechnological aspects. In *Process Biochemistry* (Vol. 49, Issue 10, pp. 1571–1579). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.003>
- Horie, M., Ruengsomwong, S., & Wannissorn, B. (2020). Field research for production method of miang: Post-fermented tea in thailand. *Japan Journal of Food Engineering*, *21*(3), 125–137. <https://doi.org/10.11301/jsfe.20573>
- Horie, M., Tada, A., Kanamoto, N., Tamai, T., Fukuda, N., Sugino, S., Toyotome, T., & Tabei, Y. (2019). Evaluation of lactic acid bacteria and component change during fermentation of Ishizuchi-kurocha. *Journal of Food Processing and Preservation*, *43*(11), e14186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpp.14186>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., Von Mering, C., & Bork, P. (2019). EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D309–D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>
- Ihrmark, K., Bödeker, I. T. M., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., Strid, Y., Stenlid, J., Brandström-Durling, M., Clemmensen, K. E., & Lindahl, B. D. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS*

*Microbiology Ecology*, 82(3), 666–677. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01437.x>

Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>

Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>

Kanehisa, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *Journal of Molecular Biology*, 428(4), 726–731. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular*

*Biology and Evolution*, 30(4), 772–780.

<https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

Kubo, M., Niwa, R., Ohno, T., & Iwahashi, H. (2022). Variations in fungal and bacterial microbiome and chemical composition among fermenting Kishu-Narezushi batches. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 86(12), 1705–1717. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbac165>

Kuczynski, J., Lauber, C. L., Walters, W. A., Parfrey, L. W., Clemente, J. C., Gevers, D., & Knight, R. (2012). Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 1, pp. 47–58). <https://doi.org/10.1038/nrg3129>

LANE, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 125–175.

<https://cir.nii.ac.jp/crid/1571980074572101888>

Langille, M. G. I., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., Clemente, J. C., Burkepille, D. E., Vega Thurber, R. L., Knight, R., Beiko, R. G., & Huttenhower, C. (2013). Predictive functional profiling

of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, 31(9), 814–821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>

Leech, J., Cabrera-Rubio, R., Walsh, A. M., Macori, G., Walsh, C. J., Barton, W., Finnegan, L., Crispie, F., O’Sullivan, O., Claesson, M. J., & Cotter, P. D. (2020). Fermented-Food Metagenomics Reveals Substrate-Associated Differences in Taxonomy and Health-Associated and Antibiotic Resistance Determinants. *mSystems*, 5(6). <https://doi.org/10.1128/msystems.00522-20>

Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E. J., & Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 44, pp. 94–102). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>

Milanović, V., Osimani, A., Garofalo, C., De Filippis, F., Ercolini, D., Cardinali, F., Taccari, M., Aquilanti, L., & Clementi, F. (2018). Profiling white wine seed vinegar bacterial diversity through viable counting, metagenomic sequencing and PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology*, 286, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.022>

Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., Lanfear, R., & Teeling, E. (2020). IQ-TREE 2: New

Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530–1534.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>

Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F. O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: Handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D259–D264.

<https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>

Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., ... Weedon, J. (2022). *vegan: Community Ecology Package*. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>

Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2018). Challenges of the non-conventional yeast *wickerhamomyces anomalus* in winemaking. In *Fermentation* (Vol. 4, Issue 3). MDPI AG.

<https://doi.org/10.3390/fermentation4030068>

Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid



- large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, *31*(22), 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Pitcher, R. S., & Watmough, N. J. (2004). The bacterial cytochrome cbb3 oxidases. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1655, Issues 1–3, pp. 388–399). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2003.09.017>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H. S., & Perkins, D. L. (2016). Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *469*(4), 967–977. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.083>
- R\_Core\_Team. (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Http://www.R-Project.Org/](http://www.R-project.org/). <https://cir.nii.ac.jp/crid/1574231874043578752>
- Rehner, S. A., & Samuels, G. J. (1994). Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological*

*Research*, 98(6), 625–634. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80409-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80409-7)

- Richhardt, J., Luchterhand, B., Bringer, S., Büchs, J., & Bott, M. (2013). Evidence for a key role of cytochrome bo<sub>3</sub> oxidase in respiratory energy metabolism of *gluconobacter oxydans*. *Journal of Bacteriology*, 195(18), 4210–4220. <https://doi.org/10.1128/JB.00470-13>
- Robeson, M. S., O'Rourke, D. R., Kaehler, B. D., Ziemski, M., Dillon, M. R., Foster, J. T., & Bokulich, N. A. (2021). RESCRIPt: Reproducible sequence taxonomy reference database management. *PLoS Computational Biology*, 17(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009581>
- Román-Camacho, J. J., García-García, I., Santos-Dueñas, I. M., Ehrenreich, A., Liebl, W., García-Martínez, T., & Mauricio, J. C. (2022). Combining omics tools for the characterization of the microbiota of diverse vinegars obtained by submerged culture: 16S rRNA amplicon sequencing and MALDI-TOF MS. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1055010>
- Román-Camacho, J. J., Mauricio, J. C., Santos-Dueñas, I. M., García-Martínez, T., & García-García, I. (2022). Unraveling the Role of Acetic Acid Bacteria Comparing Two Acetification Profiles From Natural Raw Materials: A

Quantitative Approach in *Komagataeibacter europaeus*. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.840119>

Sievers, M., Sellmer, S., & Teuber, M. (1992). *Acetobacter europaeus* sp. nov., a Main Component of Industrial Vinegar Fermenters in Central Europe. *Systematic and Applied Microbiology*, 15(3), 386–392. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80212-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80212-2)

Sokollek, S. J., Hertel, C., & Hammes, W. P. (1998). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. In *Journal of Biotechnology* (Vol. 60).

TANIZAWA, Y., FUJISAWA, T., KAMINUMA, E., NAKAMURA, Y., & ARITA, M. (2016). DFAST and DAGA: web-based integrated genome annotation tools and resources. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 35(4), 173–184. <https://doi.org/10.12938/bmfh.16-003>

Toyotome, T., Saito, S., Koshizaki, Y., Komatsu, R., Matsuzawa, T., & Yaguchi, T. (2020). Prospective survey of *Aspergillus* species isolated from clinical specimens and their antifungal susceptibility: A five-year single-center study in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 26(2), 321–323. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.09.002>

Toyotome, T., Yamamoto, M., & Horie, M. (2019). Draft Genome Sequence of the Yeast *Pichia manshurica* YM63, a Participant in Secondary Fermentation of Ishizuchi-Kurocha, a Japanese Fermented Tea .

*Microbiology Resource Announcements*, 8(27).

<https://doi.org/10.1128/mra.00528-19>

Trček, J., Mahnič, A., & Rupnik, M. (2016). Diversity of the microbiota involved in wine and organic apple cider submerged vinegar production as revealed by DHPLC analysis and next-generation sequencing. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 57–62.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.007>

Trcek, J., Toyama, H., Czuba, J., Misiewicz, A., & Matsushita, K. (2006).

Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(3), 366–373. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0073-z>

Valera, M. J., Poehlein, A., Torija, M. J., Haack, F. S., Daniel, R., Streit, W. R., Mateo, E., & Mas, A. (2015). Draft genome sequence of *Komagataeibacter europaeus* CECT 8546, a celluloseproducing strain of vinegar elaborated by the traditional method. *Genome Announcements*, 3(5).

<https://doi.org/10.1128/genomeA.01231-15>

Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several *Cryptococcus*

Species. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*.

<https://journals.asm.org/journal/jb>

Walker, G. M. (2011). *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, *99*(1), 25–34.

<https://doi.org/10.1007/s10482-010-9491-8>

Wang, J., Hao, S., & Ren, Q. (2023). Uncultured Microorganisms and Their Functions in the Fermentation Systems of Traditional Chinese Fermented Foods. In *Foods* (Vol. 12, Issue 14). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/foods12142691>

Wang, Z. M., Lu, Z. M., Yu, Y. J., Li, G. Q., Shi, J. S., & Xu, Z. H. (2015). Batch-to-batch uniformity of bacterial community succession and flavor formation in the fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar. *Food Microbiology*, *50*, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.012>

WHITE, T. J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications.*, 315–322. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1571980074049760640>

Wolfe, B. E., & Dutton, R. J. (2015). Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. In *Cell* (Vol. 161, Issue 1, pp. 49–55). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.034>

- Wu, Y. W., Simmons, B. A., & Singer, S. W. (2016). MaxBin 2.0: An automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics*, *32*(4), 605–607.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv638>
- Yamada, M. (n.d.). *Vinegar, the Gift of Acetic Acid Fermentation*.
- Yamamoto, M., Horie, M., Fukushima, M., & Toyotome, T. (2019). Culture-based analysis of fungi in leaves after the primary and secondary fermentation processes during Ishizuchi-kurocha production and lactate assimilation of *P. kudriavzevii*. *International Journal of Food Microbiology*, *306*, 108263. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108263>
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Priesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and “all-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Youssef, N., Sheik, C. S., Krumholz, L. R., Najjar, F. Z., Roe, B. A., & Elshahed, M. S. (2009). Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(16), 5227–5236.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00592-09>

Zhang, Q., Huo, N., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, R., & Hou, H. (2017). Aroma-enhancing role of *Pichia manshurica* isolated from Daqu in the brewing of Shanxi Aged Vinegar. *International Journal of Food Properties*, *20*(9), 2169–2179. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1297823>

水野智文, 岩橋均, & 堀江祐範. (2020).

後発酵茶, 石鎚黒茶の微生物叢に関する研究. *美味技術学会誌*, *19*(1), 46–52. [https://doi.org/10.11274/bimi.19.1\\_46](https://doi.org/10.11274/bimi.19.1_46)

田村朝子, 加藤みゆき, 大森正司, 難波敦子, & 宮川金二郎. (1994).

後発酵茶に存在する微生物の特徴. *日本家政学会誌*, *45*(12), 1095–1101. <https://doi.org/10.11428/jhej1987.45.1095>

表

Table 1. Sampling conditions for high acidity rice vinegar samples

Sample number	Sampling date	Sampling time	Elapsed time after inoculation (h)	Notes
1	2020/2/21	20:30	1.0	1 hour after inoculation
2	2020/2/23	7:50	36.3	2 days after inoculation
3	2020/2/25	15:50	92.3	4 days after inoculation
4	2020/2/27	17:00	141.5	6 days after inoculation
5	2020/3/1	9:10	205.7	Start of acetification
6	2020/3/2	10:15	230.8	After 1st charge
7	2020/3/4	8:55	277.4	1st discharge
8	2020/3/4	18:30	287.0	After charge After 1st discharge
9	2020/3/5	12:35	305.1	2nd discharge
10	2020/3/12	8:15	468.8	11th discharge
11	2020/3/12	15:40	476.2	After charge after 11th discharge
12	2020/3/17	12:20	592.8	17th discharge
13	2020/3/30	15:20	907.8	End of fermentation



Table 2. Sampling conditions for low acidity rice vinegar samples

Sample number	Sampling date	Sampling time	Elapsed time after inoculation (h)	Notes
1	2020/2/7	14:40	1	1 hour after inoculation
2	2020/2/8	17:30	27.8	1 day after inoculation
3	2020/2/9	16:45	51.1	2 days after inoculation
4	2020/2/10	9:20	67.7	Start of acetification
5	2020/2/10	18:10	76.5	Before 1st charge
6	2020/2/11	9:35	91.9	1st discharge
7	2020/2/11	14:40	97	After charge
8	2020/2/12	11:48	118.1	3rd discharge
9	2020/2/12	17:30	123.8	After charge
10	2020/2/13	13:15	143.6	5th discharge
11	2020/2/13	18:30	148.8	After charge
12	2020/2/14	12:10	166.5	Before 7 th discharge
13	2020/2/21	12:35	334.9	28th discharge
14	2020/2/21	17:05	339.4	After charge
15	2020/2/25	5:00	423.3	End of fermentation

Table 3. Classification assignment results to metagenomic reads derived from inoculated source alcohol vinegars.

Taxonomy	Relative_abundance (%)
UNCLASSIFIED	36.4
<i>Komagataeibacter_europaeus</i>	63.6

Table 4. Evaluation of metagenomic bins by CheckM2

Name	Completeness	Contamination	Completeness_Model_Used	Coding_Density	Contig_N50	Average_Gene_Length	Genome_Size	GC_Content	Total_Coding_Sequences
maxbin2.001	6.41	0.27	Neural Network (Specific Model)	0.813	17733	217.5840266	479986	0.57	601
maxbin2.002	99.93	1.74	Neural Network (Specific Model)	0.845	137942	301.3950845	3475987	0.62	3255

Table 5. Results of classification assignment to metagenomic bins by GTDB-TK

user_genome	classification	fastani_reference	fastani_reference_radius	fastani_taxonomy	fastani_ani	fastani_af	classification_method
maxbin2.001	Unclassified	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
maxbin2.002	<i>Komagataeibacter europaeus</i>	GCF_000285295.1	95	<i>Komagataeibacter europaeus</i>	98.1	0.827	ani_screen

Table 6. Geographic, Biological Origins and data sources of *K. europaeus* genomes used for pan genome analysis.

Assembly Accession	Assembly Name	Intraspecific Name/Strain	Total Sequence Length	Assembly Level	WGS project accession	Geographic origin	Biological origin
GCF_002173515.1	ASM217351v1	SRCM101446	3797909	Complete Genome		South Korea	Food
GCF_025994375.1	ASM2599437v1	LMG 18890	3963914	Contig	BAQH01	Esslingen Germany	Submerged culture vinegar generator
GCF_000285295.1	ASM28529v1	type strain LMG 18890	4227398	Scaffold	CADP01	Esslingen Germany	Submerged culture vinegar generator
GCF_001273645.1	ASM127364v1	CECT 8546	4113774	Contig	LHUQ01	Tarragona, Spain	Grape vinegar produced by the traditional method
GCF_014121165.1	ASM1412116v1	GH1	3809040	Contig	JACHUU01	Kazakhstan: Nur-Sultan	Kombucha tea
GCF_000227545.1	ASM22754v1	LMG 18494	3991281	Scaffold	CADR01	Ljubljana Slovenia	Red wine vinegar produced in submerged bioreactor
GCF_000285335.1	ASM28533v1	SP3	3989313	Scaffold	CADS01	Switzerland	Submerged red wine vinegar
GCF_000964485.1	ASM96448v1	NBRC 3261	3631393	Scaffold	BANI01	Nishinomiya Japan	<i>Myrica rubra</i> , fruit

Table 7. Results of microbial counting using culture method from Ishizuchi-kurocha samples manufactured in 2021.

Production lot	Isolation medium	Colony morphology	Before fenentation		After primary fermentation		After secondary fermentation			
			After Wash	After steaming	Wood box		Wooden barrel		Plastic bucket	
					Outside	Inside	Outside	Inside	Outside	Inside
Lot #0	MRS		$4.2 \times 10^3$	n.d.	n.d.	n.d.	$2.6 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7$	$9.0 \times 10^8$	$1.4 \times 10^7$
	PDA	Yeast like	$1.9 \times 10^7$	n.d.	$7.4 \times 10^{8*}$	$3.3 \times 10^{6*}$	$4.1 \times 10^4$	$2.7 \times 10^5$	$4.4 \times 10^4$	$3.7 \times 10^5$
		Mold like	n.d.				$1.3 \times 10^4$	$5.3 \times 10^4$	n.d.	$1.0 \times 10^4$
	LB	Large	$4.8 \times 10^5$		n.d.	n.d.	$3.1 \times 10^6$	$1.5 \times 10^5$	$4.2 \times 10^5$	$3.2 \times 10^4$
		Small	n.d.	n.d.			$2.0 \times 10^7$	$4.2 \times 10^6$	n.d.	$4.3 \times 10^6$
		Mold like	n.d.		$8.4 \times 10^8$	$1.2 \times 10^6$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Lot #2	MRS				$1.0 \times 10^5$	$9.3 \times 10^7$				$4.7 \times 10^8$
	PDA	Yeast like			$2.3 \times 10^{11}$	$8.0 \times 10^8$				$4.0 \times 10^5$
		Mold like	n.t.	n.t.	$7.3 \times 10^{10}$	n.d.	n.t.	n.t.		n.d.
	LB	Large			$4.0 \times 10^{10}$	$8.9 \times 10^9$				$3.8 \times 10^5$
		Small								$2.5 \times 10^8$
		Mold like			$7.3 \times 10^9$	n.d.				n.d.

n.d.: No colonies detected. n.t.: Not tested. Lot #2 does not undergo secondary fermentation in wooden barrels.

In PDA after primary fermentation of Lot #0, colony morphology was not counted separately, but many mold-like colonies were observed, and a few yeast-like colonies were also observed.

Table 8. Lactic acid bacteria, yeast, and mold in Ishizuchi-kurocha manufactured in 2021 identified by culture method.

n.d.: No colonies detected. n.t.: Not tested.

		Lactic acid bacteria	Mold	Yeast	
Lot #0	After primary fermentation	Outside	n.d.	<i>A. luchuensis, A. niger</i>	n.d.
	After primary fermentation	Inside	n.d.	<i>A. neoniger</i>	n.d.
	After secondary fermentation Wooden barrels	Outside	<i>L. plantarum</i>	<i>A. luchuensis, P. citrinum</i>	<i>W.anomalous</i>
	After secondary fermentation Wooden barrels	Inside	<i>L. plantarum</i>	<i>A. luchuensis</i>	<i>W.anomalous</i>
	After secondary fermentation Plastic buckets	Outside	<i>L. plantarum, L. brevis</i>	n.d.	<i>P.manshurica</i>
	After secondary fermentation Plastic buckets	Inside	<i>L. plantarum</i>	n.d.	<i>P.manshurica</i>
Lot #2	After primary fermentation	Outside	<i>L. mesenteroides</i>	<i>A. luchuensis, A. niger</i>	n.d.
	After primary fermentation	Inside	<i>L. plantarum</i>	<i>A. luchuensis</i>	<i>P.manshurica</i>
	After secondary fermentation Plastic buckets	Mixed	<i>L. plantarum, L. brevis</i>	n.d.	<i>P.manshurica, P.kudriavzevii</i>
Lot #5	After primary fermentation	Mixed	<i>L. plantarum, L. brevis,</i>	<i>A. luchuensis, A. niger,</i>	n.t.
			<i>W. paramesenteroides</i>	<i>A. neoniger</i>	
	After secondary fermentation Plastic buckets	Mixed	<i>L. plantarum, L. brevis</i>	n.t.	n.t.

Table 9. Caffeine and catechin content analysis results of Ishizuchi-kurocha samples manufactured in 2021.

Caffeine, Catechins (mg/100g)	2021_Lot #0_Wooden barrel	2021_Lot #0_Plastic bucket	2021_Lot #2_Plastic bucket
Caffeine	1680.3	1843.3	1656.5
Epigallocatechin	1597.7	1538.8	1362.6
Catechin	137.7	135.0	206.1
Epigallocatechin gallate	18.1	19.0	317.3
Epicatechin	-	-	32.9
Epicatechin gallate	-	-	49.4
Total catechins	1753.5	1692.7	1968.3



Table 10. Organic acid content analysis results of Ishizuchi-kurocha samples manufactured in 2021.

Organic acids (mg/100g)	2021_Lot #0_Wooden barrel	2021_Lot #0_Plastic bucket	2021_Lot #2_Plastic bucket
Oxalic acid	1021.4	1157.0	396.8
Citric acid	-	-	44.2
Malic acid	-	-	-
Succinic acid	145.9	133.8	97.7
Lactic acid	4904.3	4815.5	4666.3
Acetic acid	207.3	174.8	474.1
Pyroglutamic acid	25.5	27.7	24.8
Total organic acids	6304.3	6308.8	5703.9

Table 11. Free amino acid content analysis results of Ishizuchi-kurocha samples manufactured in 2021.

Free amino acids (mg/100g)	2021_Lot #0_Wooden barrel	2021_Lot #0_Plastic bucket	2021_Lot #2_Plastic bucket
Phosphoserine	189.4	172.2	73.3
Taurine	327.9	297.3	83.1
Phosphoethanolamine	-	-	-
Urea	-	-	-
Aspartic acid	252.1	239.1	123.5
Threonine	88.8	81.9	42.1
Serine	75.7	70.4	24.8
Asparagine	-	-	-
Glutamic acid	366.1	326.5	98.1
Glutamine	-	-	-
Theanine	10.0	9.4	7.1
2-Aminoadipic acid	-	-	-
Glycine	54.1	50.8	35.8
Alanine	166.5	144.8	73.3
Citrulline	-	-	-
Alpha-aminobutyric acid	14.8	13.7	8.2
Valine	123.6	112.2	68.3
Cysteine	-	-	-
Methionine	29.1	23.5	10.2
Cystathionine	-	-	-
Isoleucine	122.2	113.0	47.9
Leucine	281.3	250.9	126.3
Tyrosine	156.1	140.3	27.9
Beta-alanine	-	-	-
Phenylalanine	163.5	146.8	71.2
$\beta$ -Aminoisobutyric acid	-	-	-
Gamma-aminobutyric acid	36.1	34.4	47.5
2-Aminoethanol	-	-	-
Ammonium chloride	150.9	158.4	60.9
Hydroxylysine	-	-	-
Ornithine	6.5	9.1	54.4
1-Methylhistidine	-	-	-
Histidine	89.2	77.9	36.7
Lysine	183.8	170.0	118.3
3-Methylhistidine	-	-	-
Tryptophan	51.5	48.8	-
Anserine	-	-	-
Carnosine	-	-	-
Arginine	262.8	226.5	30.9
Hydroxyproline	-	-	-
Proline	86.7	79.9	44.3
Total free amino acids	3288.8	2997.7	1314.2

(\*Theanine and sarcosine have the same retention time and are difficult to distinguish, but tea is known to contain theanine, so theanine is used.)

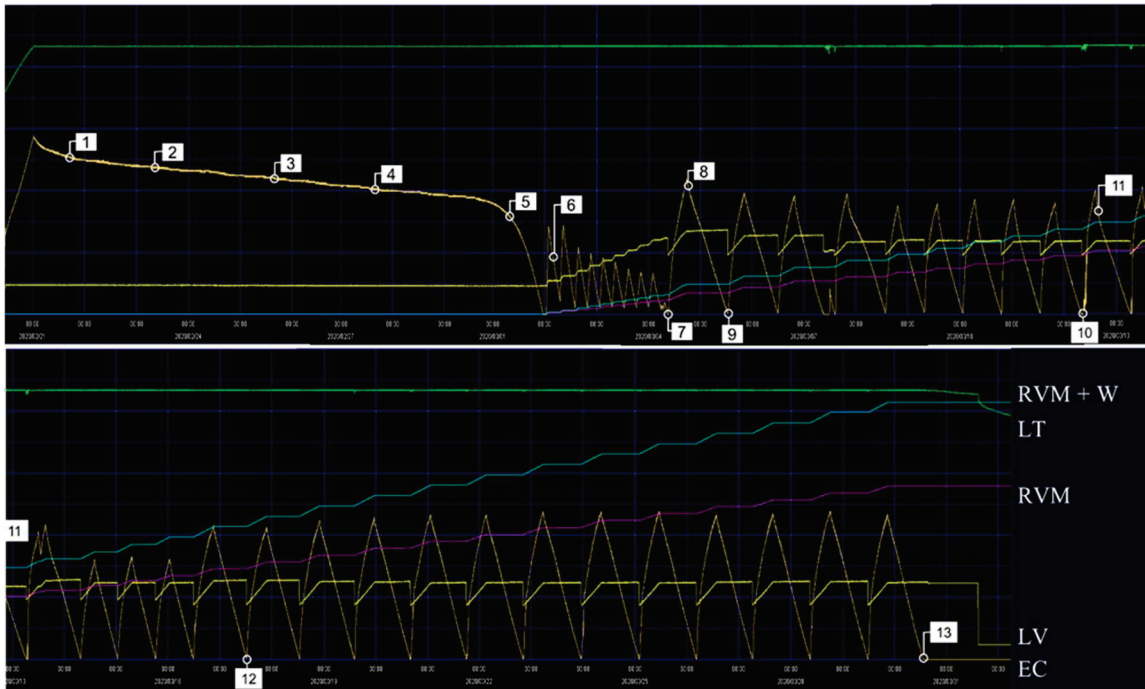


Figure 1. Ethanol concentration change and sampling timing of high-acidity rice vinegar samples.

Dark yellow: Ethanol concentration (EC), Green: Liquid temperature (LT), Light yellow: Liquid volume in fermentation tank (LV), Purple: Input amount of rice vinegar mash (RVM), Light blue: Input amount of rice vinegar mash and water (RVM + W). All values are relative.

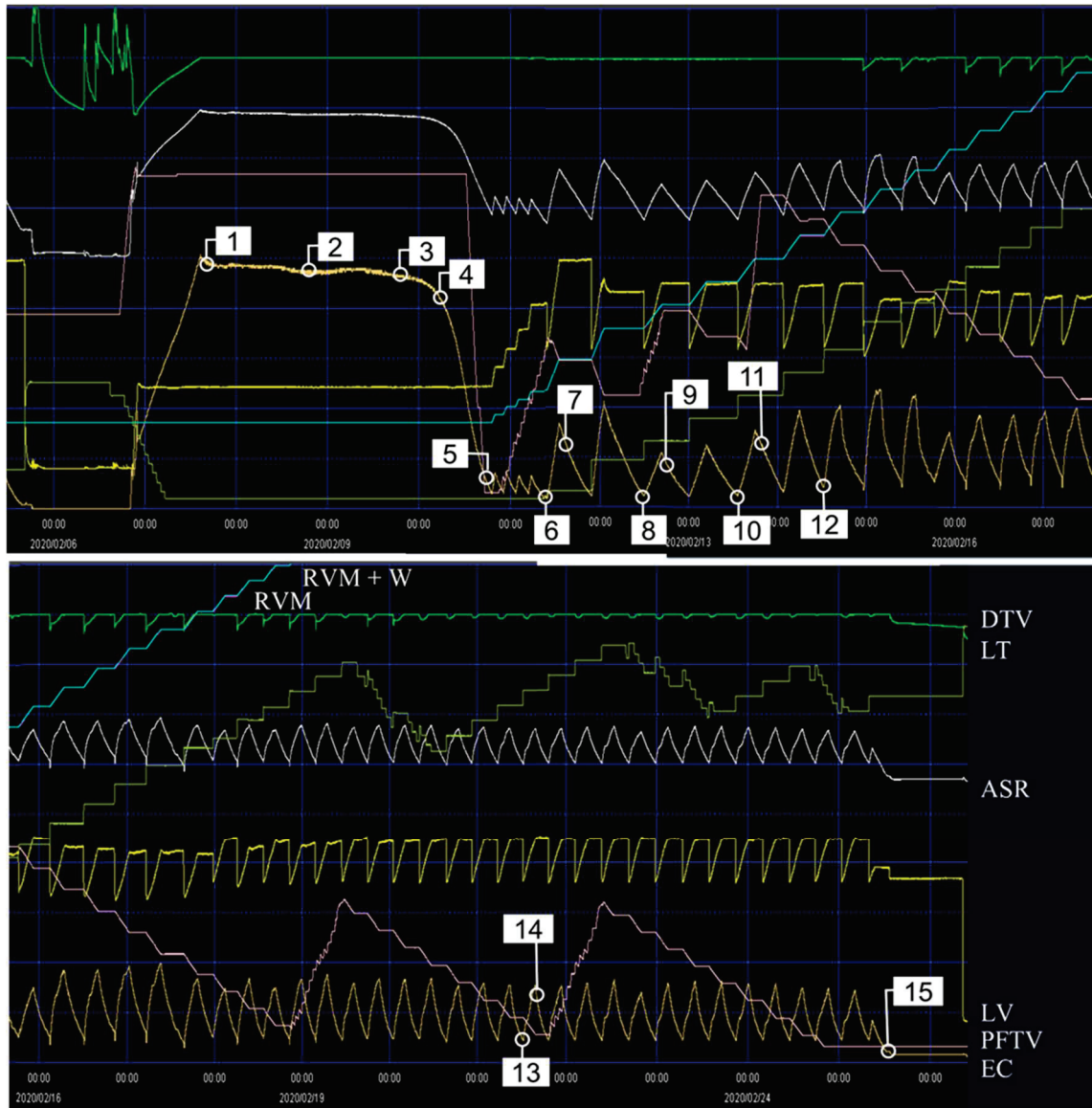


Figure 2. Ethanol concentration change and sampling timing of low-acidity rice vinegar samples.

Dark yellow: Ethanol concentration (EC), Green: liquid temperature (LT), Light yellow: Liquid volume in fermentation tank (LV), Purple: Input amount of rice vinegar mash (RVM), Light blue: Input amount of rice vinegar mash and water (RVM + W), White: Alcohol sensor resistance (ASR), Light green: Destination tank volume (DTV), Pink: Pre-filling tank volume (PFTV). All values are relative.

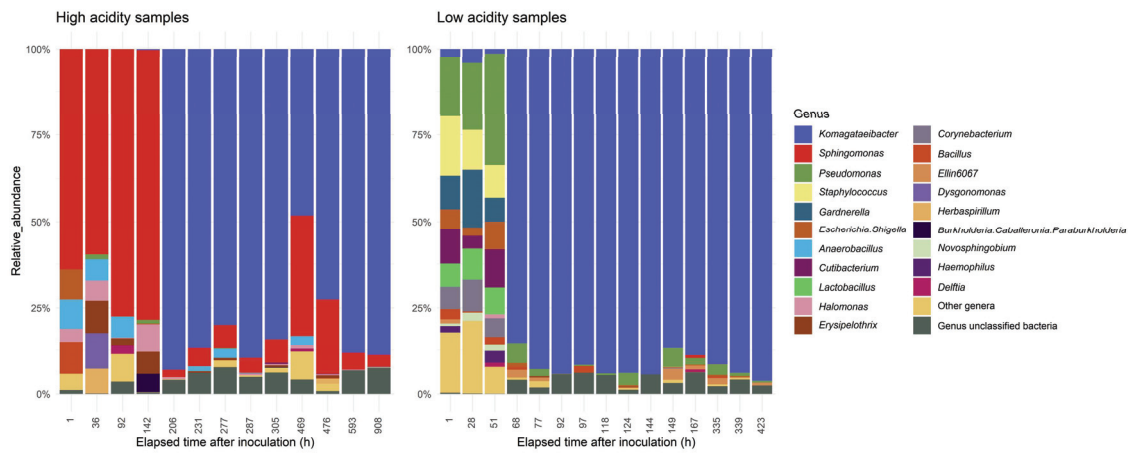


Figure 3. Results of microbiome analysis by 16S rRNA amplicon sequencing of high-acidity rice vinegar and low-acidity rice vinegar samples.

Relative abundance of the top 20 bacterial genera in high and low acidity rice vinegar samples.

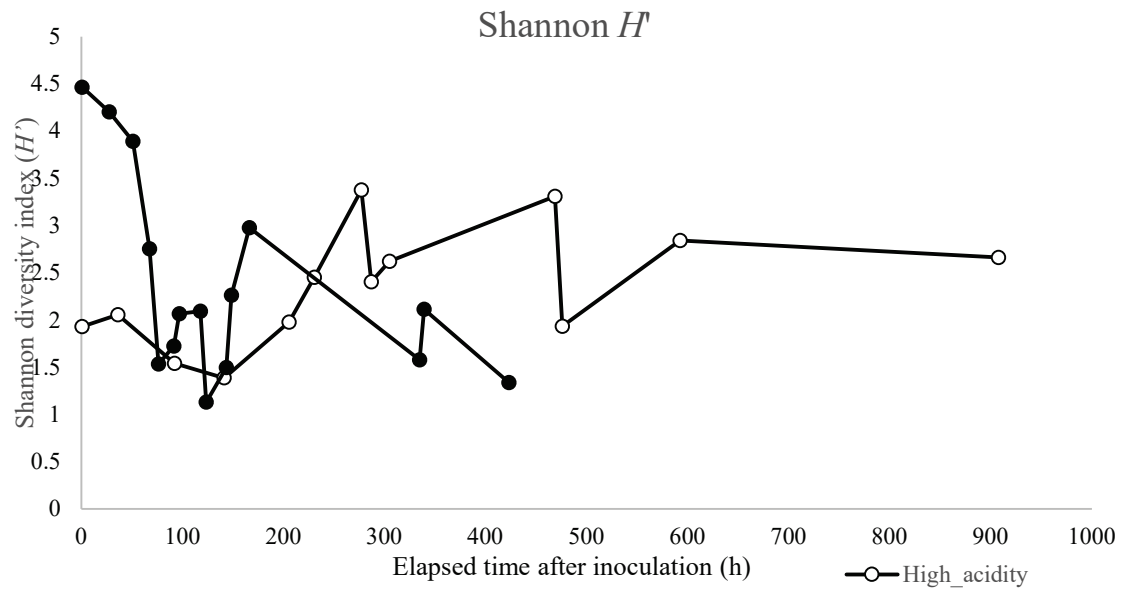


Figure 4. Change over time in microbiome alpha diversity (Shannon  $H'$ ) of high and low acidity rice vinegar samples.

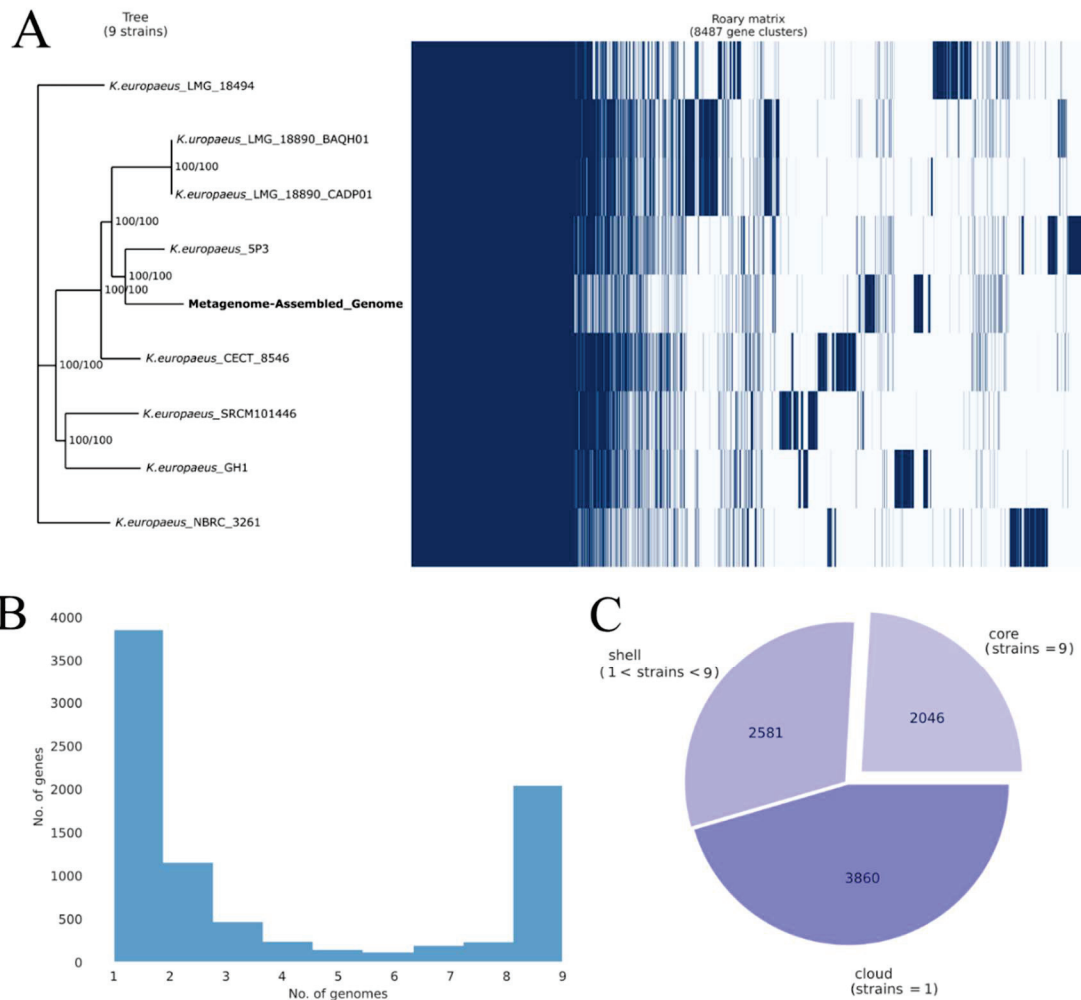


Figure 5. Results of pan genome analysis of metagenome assembly genomes from alcohol vinegar samples and *K. europaeus* genomes in the NCBI database.

A: Phylogenetic tree derived from the core genome assembly and gene presence/absence plots against the phylogenetic tree. The values of the branches of the phylogenetic tree show the support values calculated by SH-aLRT and UFBoot.

B: Pan genome frequency plot. C: Core, Shell, and Cloud gene count graph.

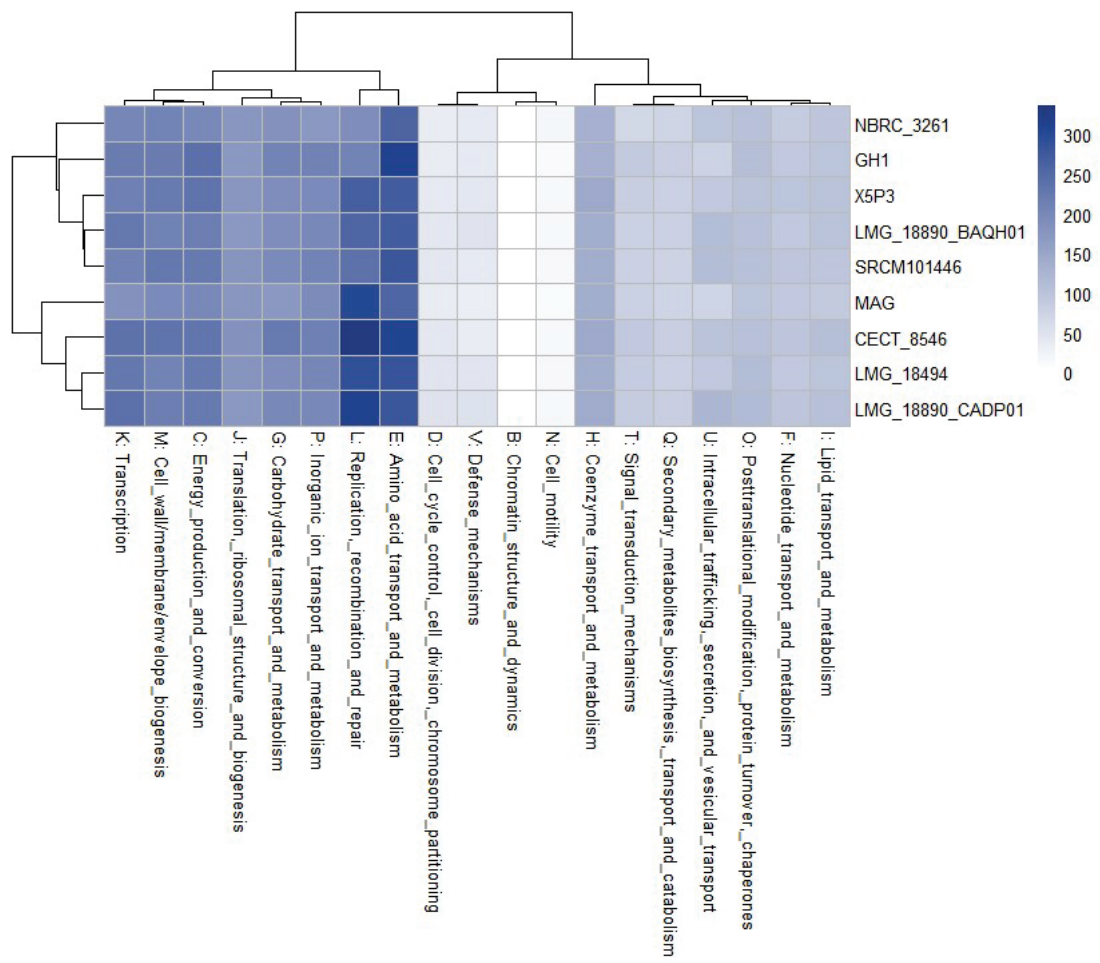


Figure 6. Heatmap of counting results for COGs categories of metagenome assembly genome and *K. europaeus* genomes in the NCBI database.



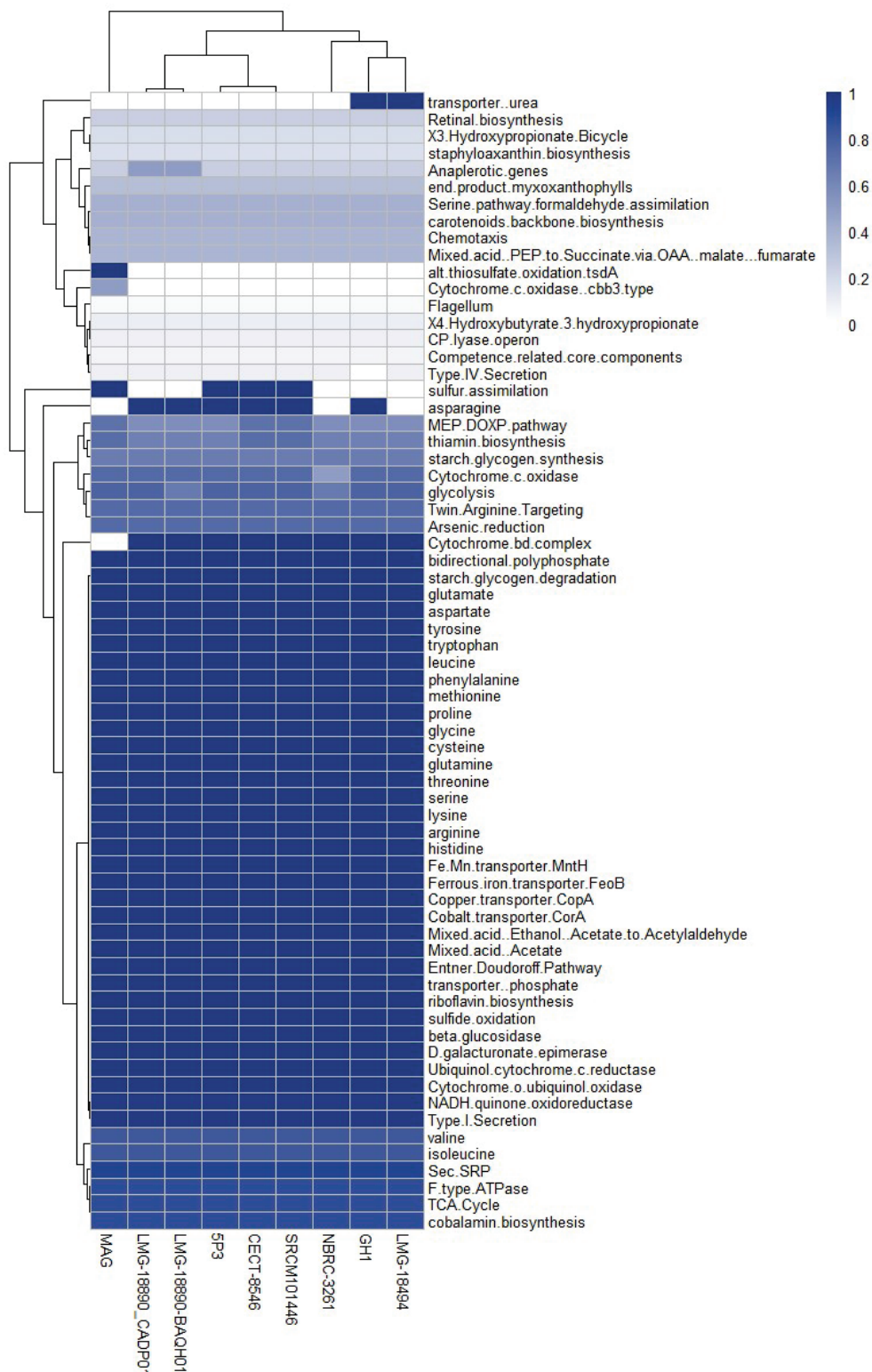


Figure 7. Heatmap of KEGG metabolic pathway completeness of metagenome assembly genome and *K. europaeus* genomes in the NCBI database.

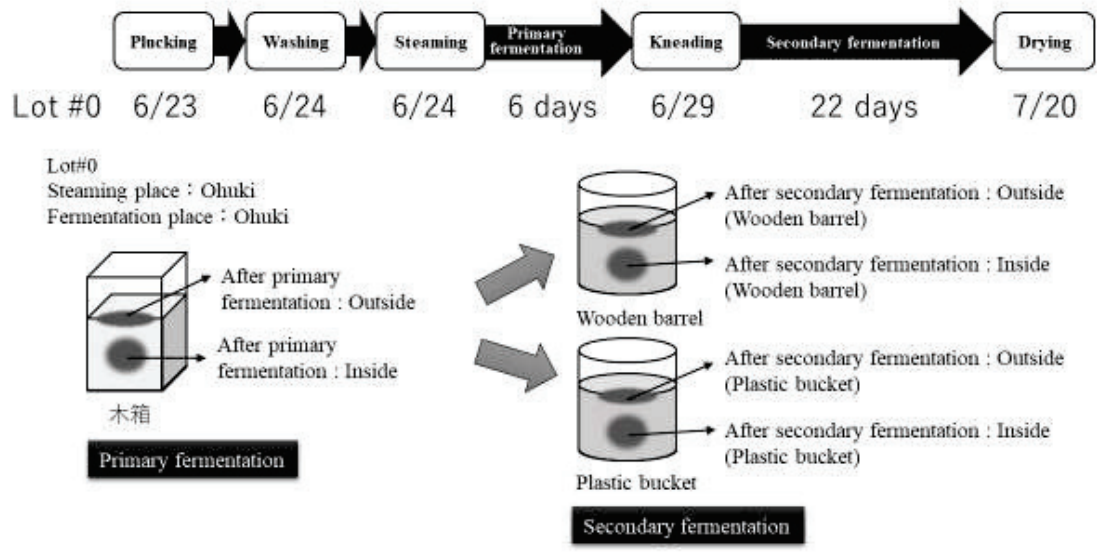


Figure 8. Ishizuchi-kurocha test lot (2021 Lot #0) Sample manufacturing method and manufacturing schedule.

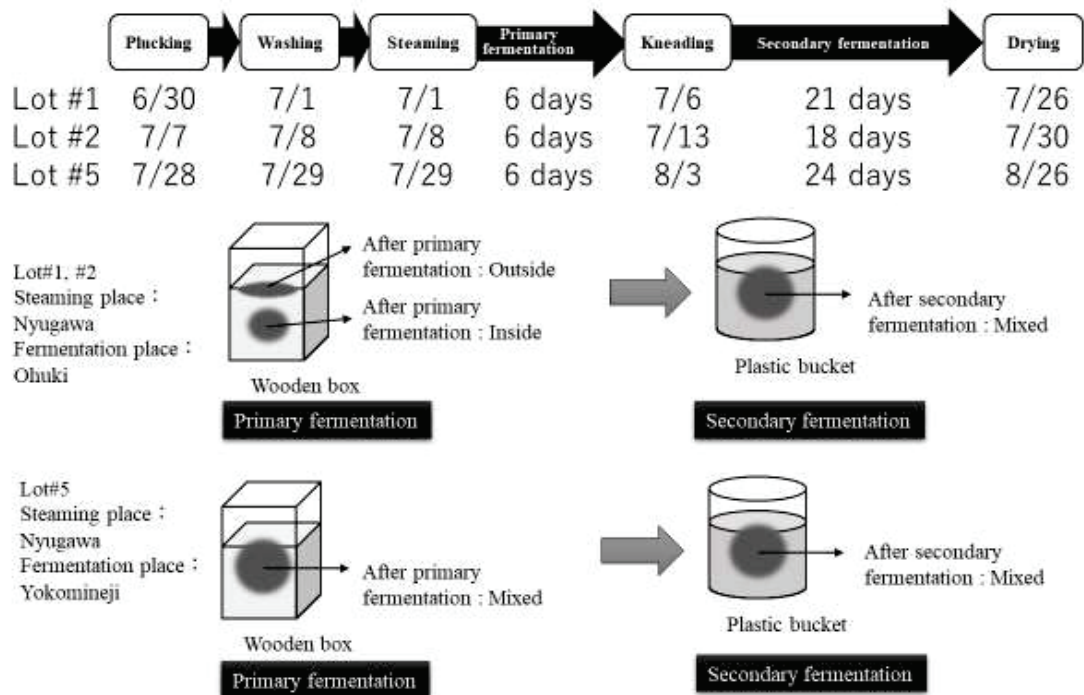


Figure 9. Ishizuchi-kurocha production lot (2021 Lot #1, 2, 5) Sample production method and production schedule.

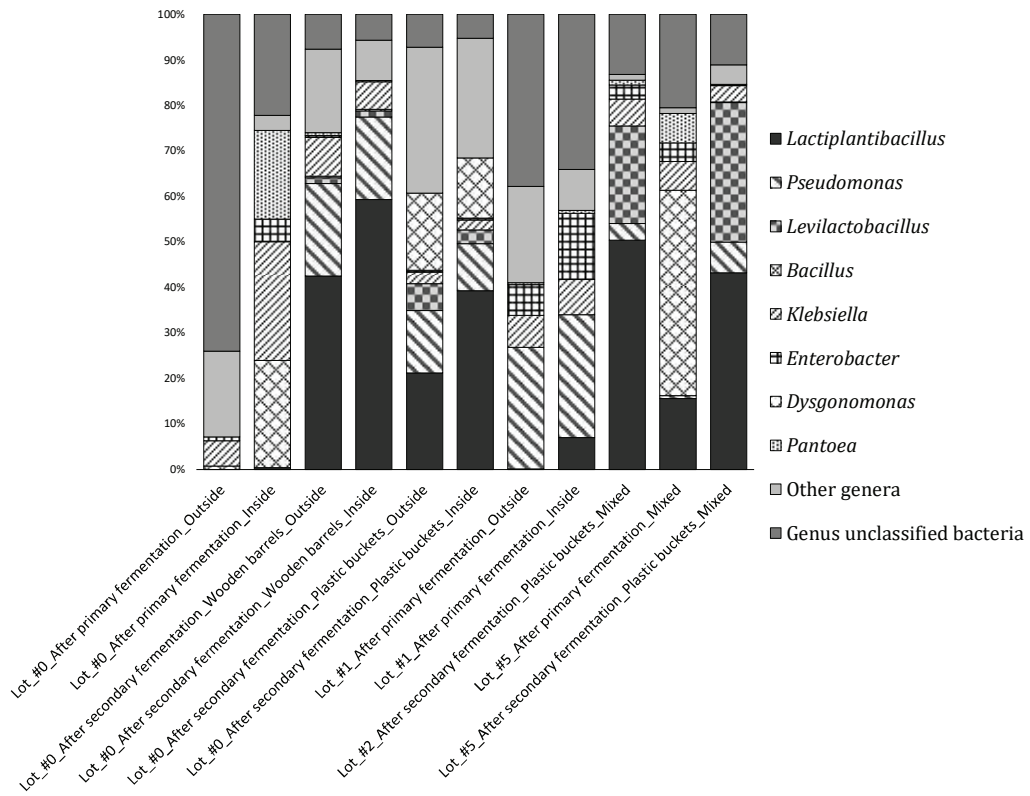


Figure 10. Results of bacterial community structure analysis of Ishizuchi-kurocha samples manufactured in 2021 by 16SrRNA amplicon sequencing.

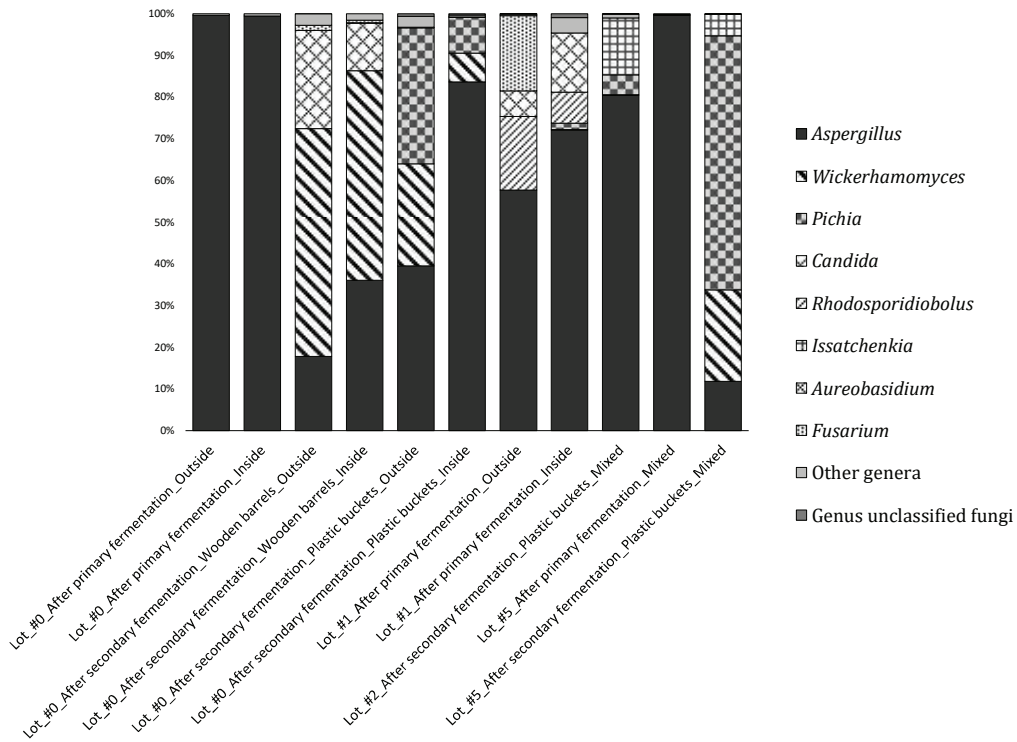


Figure 11. Results of fungal community structure analysis of Ishizuchi-kurocha samples manufactured in 2021 by ITS amplicon sequencing.