

氏 名 (本 国 籍)	大野 智生 (岐阜県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 8 1 9 号
学 位 授 与 年 月 日	令和 6 年 3 月 2 5 日
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	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
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 准教授 中 村 浩 平 副査 岐阜大学 教 授 岩 橋 均 副査 産 総 研 教 授 堀 江 祐 範

論 文 の 内 容 の 要 旨

発酵食品は、分離菌株の接種、環境中の微生物の利用、菌株未分離の培養液の接種などの方法によって食品に微生物を導入し、一連の過程を経て製造されるが、このような発酵過程における微生物動態への理解は、発酵食品製造において、製造過程の最適化、不要微生物監視、侵入防止といった点から重要であると考えられる。また、発酵食品は扱いやすい生態系のモデルとなり得ることが知られ、微生物群集についての基礎的な洞察を提供する点でも、発酵過程における微生物群集への理解が重要となる可能性がある。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、培養に依存せずに試料中 DNA を網羅的に解析する手法が広く用いられている。本研究では、NGS を用いた配列解析を中心とした手法により発酵食品の微生物群集について調査を行い、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。

米酢は日本料理において頻繁に用いられ、アルコール発酵、酢酸発酵の 2 段階を経て製造される。現在の工業的酢生産では、高酢酸濃度を達成可能な深部発酵法が用いられるが、用いられる酢酸菌は単離が困難であり、発酵スターターとして培養液を用いることがある。試料提供元では深部発酵法による米酢醸造を行っており、一部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。この発酵における酢酸菌は単離されておらず、酢酸菌の詳細は知られていない。また、この米酢発酵過程ではたらく酢酸菌を含む微生物の種類、役割も知られておらず、その調査は発酵過程の最適化に役立つ可能性がある。ここでは、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、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、低酸度米酢の 2 種を使用し、酢酸濃度による差異についても検討した。結果から、発酵初期に酢酸菌以外の微生物属が検出されたほか、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、増加後の優占維持が観察され、深部発酵米酢醸造における微生物組成の安定性が確認された。

深部発酵米酢について、発酵時の属レベル細菌群集構造を調査したが、酢酸菌種は酢醸造時

の発酵特性に大きく影響するため、その詳細を明らかにすることは重要である。植菌源であるアルコールビネガーから酢酸菌は単離できておらず、培養法の適用は困難である。ここでは、植菌源アルコールビネガー試料についてメタゲノム解析を行った。解析結果から、試料の微生物群集はほぼ純粋な酢酸菌から構成され、米酢発酵を行う酢酸菌種については、深部発酵酢で一般的な *Komagataeibacter europaeus* であることが示唆された。また、この酢酸菌は同種の中でも欧州の深部発酵酢由来株と近縁であると推定され、調査を行った米酢深部発酵においても、他深部発酵酢のものと近縁の細菌が主要な働きをしていることが示唆された。このことは、災害で発酵液を消失した際には欧州から近縁株を入手することで醸造が再開できる可能性を示している。

石鎚黒茶は、愛媛県西条市で製造される後発酵茶であり、製造過程においてカビを主とする一次発酵、乳酸菌を主とする二次発酵の二段階発酵を行う。石鎚黒茶の基本的製法は伝統的なものから変わっていないが、製造の安定性や衛生面に配慮し、二次発酵に用いる容器が木桶からポリ袋及びポリバケツに変更されている。この変更によって発酵条件は嫌氣的になり、乳酸桿菌の増殖促進、好氣的微生物の増殖抑制により乳酸発酵がより安定することが期待されるが、木桶は発酵時の嫌気度が低いと考えられ、この違いが微生物に影響を与えた場合、異なる風味の茶が製造できる可能性がある。また、石鎚黒茶製造では微生物の人為的添加は行わず、乳酸菌がいつ、どこから来るのかは未知である。乳酸菌は石鎚黒茶の発酵にとって特に重要であり、その発酵における動態を明らかにすることは製造法の改善に繋がり得る。ここでは、製造容器を含む製造条件の違いによる微生物への影響を評価した。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が確認された。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、NGS による配列決定を中心とした手法により調査した。NGS 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、培養法等と併用することで、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、米酢、石鎚黒茶といった発酵食品において、主要な微生物の詳細について検討した他、製造法等、条件の違いによる微生物群集構造の差が見いだされた。これらのような発酵食品製造における微生物評価は、製造の最適化、製品の安全性向上に繋がる点などから重要である。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者大野智生は、自然発酵食品における発酵過程は微生物生態系のモデルとなり得ると考え、先ず、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から得られる知見情報を整理した。続いて、発酵微生物の分離が困難で発酵微生物が特定されていない岐阜県内の酢酸醸造を研究対象とした。当該醸造では、酢酸発酵が進行中の発酵液を、事前調整された日本酒発酵液に添加することで酢酸醸造を開始している。醸造開始後は日本酒発酵に由来すると推定される酢酸菌以外が多種検出された。その後エタノールの減少と共に酢酸菌が優勢となり、*Komagataeibacter* 属酢酸菌割合の急激な増加、増加後の優占維持が観察され、深部発酵米酢醸造における微生物組成の安定性が確認された。また発酵液をメタゲノム解析することで、発酵の中心となっている微生物種を特定、*Komagataeibacter europaeus* で、欧州の深部発酵酢由来株と近縁であると推定した。災害で発酵液を消失した際には欧州から近

縁株を入手することで醸造が再開できる可能性を示した。また、石鎚黒茶の発酵に貢献する微生物群集が構成される要因についても解析し考察を行った。

審査委員会は、上記の内容が学術的に充分であることを確認した。

基礎となる学術論文

- 1) 大野智生, 蒲野悟史, 古田真優, 三島周平, 岩橋均: 深部発酵米酢細菌群集における *Komagataeibacter* 属酢酸菌の重要性, 日本食品科学工学会誌, 印刷中
- 2) 大野智生, 篠塚忍, 西岡浩貴, 豊留孝仁, 岩橋均, 堀江祐範: 石鎚黒茶の発酵条件が発酵時の微生物に与える影響, 美味技術学会誌, 印刷中

既発表学術論文

- 1) Hibi A., Ohno, T., Moriyama, A., Himaki, T., Takahashi, J., Iwahashi, H., : Evaluation of the effect of high pressure carbon dioxide-pasteurized food on animal health. High Pressure Research 39 (2), 357-366, 2019
- 2) Yu, T. Kuwahara, S. Ohno, T. Iwahashi, H., : Recycling Salmon Meat by Decontamination under Mild Conditions Using High-Pressure Carbon Dioxide. Waste Mangement 124:102-109, 2021
- 3) Ueda, H., Fukuta, R. Ohno, T., Moriyama, A., Himaki, T., Iwahashi, H., Moritomi, H., : Assessment of biological effects and harm to Japanese medaka due to carbonized carbon fibers generated by a pyrolysis carbon fiber recycling process Journal of Material Cycles and Waste Management 23, 1071-1080, 2021
- 4) Nishioka, H., Ohno, T., Iwahashi, H., and Horie, M. : Diversity of Lactic Acid Bacteria Involved in the Fermentation of Awa-bancha. Microbes Environ. 36(4), 2021
- 5) 刘子路、久保実希、蒋磊、李佐乾、Yolani Syaputri、Tonghuan Yu、大野智生、西岡浩貴、堀江祐範、内藤敬司、岩橋均: 上ヶ流乳酸菌発酵茶の創製に関する研究、美味技術学会誌、21(1), 6-11, 2022
- 6) Li, Z., Jiang, L. Wei, L., Ohno, T., Syaputri, Y., Horie, M., Iwahashi, H., Controlling the Microbial Composition during the Fermentation of Ishizuchi-kurocha Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 86, 117-124, 2022
- 7) Kubo, M., Niwa, R., Ohno, T., Iwahashi, H., Variations in fungal and bacterial microbiome and chemical composition among fermenting Kishu-Narezushi batches Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 86(12), 1705-1717, 2022