

DNA解析からのゴチュジャン膨れ事故原因解明

白 至桓¹・鈴木 市郎^{2,3*}・武田 穰²・小泉 淳一²

¹横浜国立大学大学院工学府機能発現工学専攻・²横浜国立大学大学院工学研究院機能の創成部門

³横浜国立大学リスク共生社会創造センター

(2018年10月19日受付 2019年3月4日受理)

Microbial DNA profile of gochujang involved in swelling incident

Ji Hwan Back¹, Ichiro Suzuki^{2,3*}, Minoru Takeda², Jun-ichi Koizumi² (*Division of Chemical and Energy Engineering, Graduate School of Engineering, Yokohama National University*¹, *Faculty of Engineering, Yokohama National University*², *Center for Creation of Symbiosis Society with Risk, Yokohama National University*³, 79-5 Tokiwadai, Hodogaya, Yokohama, Kanagawa 240-8501, Japan¹⁻³) *Seibutsu-kogaku* **97**: 246–252, 2019.

Gochujang is typical fermented food in Korea, and when produced without preservatives, sometimes, it swells after shipping. This study reports the microbial causes of gochujang “swelling” and swelling “incidents” through both DGGE and NGS analyses of the 16S rRNA gene fragments of microbial samples obtained from gochujang products and matured mashes. *Bacillus amyloliquefaciens* is a microbe that causes swelling; it is present in the red pepper powder added to the gochujang just before the pasteurization process. Meanwhile, the bacterial profiles obtained from NGS analysis revealed that the swelling “incident” of the product occurs when the fraction of lactic-acid bacteria, especially that of *Lactobacillus*, in the microbial composition is extremely low.

[**Key words**: Microbial, Profile, Gochujang, Swelling, Incident]

緒 言

ゴチュジャン (Gochujang) は唐辛子の辛味のみならず、発酵・熟成による独特の風味を有している発酵食品である。最近の添加物に対する消費者の忌避感の高まり^{1,2)}から、食品工業製品として製造されているゴチュジャンでは加熱と酒精添加で保蔵期間を保証するようになった。しかしながら、常温流通が一般であるため、製品からガスが発生する“膨れ事故”が起きるようになった³⁻⁶⁾。これまで、ゴチュジャンの“膨れ事故”の原因は、耐塩性酵母³⁻⁶⁾であると報告されていたが、低温殺菌後の製品に残存する *Bacillus amyloliquefaciens* や *Bacillus licheniformis* などの *Bacillus* 属細菌が“膨れ事故”の原因であったことを前報⁷⁾で報告した。

この“膨れ事故”は、前報での調査対象製造所 (韓州社: HANJU Co., Ltd. Kwangju, Korea) の1月に製造を開始した製品で発生し、他の製造期の製品では発生の記録がないという特徴があることから、製造期により微生物叢に違いがあると推定できる。本研究の目的は、細菌 16S rRNA 遺伝子を指標とした変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE)⁸⁾ と次世代シーケンス (NGS)⁹⁻¹³⁾ の二つの手法で製造期が異なるゴチュジャンを解析し、“膨れ事故”に至る微生物叢と至らない微生物叢の差異を明らかにすることである。

実験方法

試料 ゴチュジャンの製造工程は大きく分けると、発酵・熟成工程と調合・低温殺菌工程の二つから成り、

*連絡先 E-mail: suzuki-ichiro-db@ynu.ac.jp

瓶詰めを経て最終製品となる。蒸麦（5 t：数値は実際の仕込みでの実数）と麴菌（4 kg）から麦麴を製麴し（約30°C，2日），この麦麴全量に水（2 t）と塩（700 kg）を加え，諸味とし，高さ3.5 mの槽で温度が30°C以上とならないよう制御し，発酵を開始する。4週間の発酵の後，全量を同じ形状の槽に播砕しながら移し，6週間熟成させる。調合・低温殺菌工程は，熟成後の諸味を分け取り（1,030 kg），それに水飴（100 L）を加え，攪拌しながら75°Cまで加熱する。75°Cとなった時点で唐辛子粉（240 kg）を加え，75°Cの低温殺菌を30分続ける。冷却ののち，水飴（60°C，350 L）を加え，保存期間の延長を目的とした酒精（室温，30 L）を添加し，瓶詰めし，製品となる。上述した製造所において9月，1月，3月のそれぞれに製造を開始し，4週間の発酵工程に続く6週間の熟成工程終了時に表面から1 mの深さから採取した諸味（M-Sep，M-Jan，M-Mar）と調合・低温殺菌・瓶詰め後の製品（P-Sep，P-Jan，P-Mar）とを試料とした。

DNA抽出と変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）

試料0.5 gからFast DNA SPIN Kit for Soil（MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA）でDNAを抽出した。抽出したDNAより，Thapa Chettriら¹⁴⁾と同じ方法で，プライマー対GC-341F/534R⁸⁾を用い，16S rRNA遺伝子の高度可変領域V3を含む約190 bpを増幅した。増幅したV3領域を含むDNA断片を30～60%の変性濃度勾配ゲルでmini-DGGE system NB-1490（日本エイドー，東京）で泳動した（50 V，60°C，3 h）。

次世代シーケンス（NGS） 試料から上記と同様に抽出したDNAよりプライマー対515F/806R¹⁵⁾を用い16S rRNAの高度可変領域V4領域をPCRにて増幅した。一つの試料に対し，独立にPCR増幅した二つの増幅断片それぞれについて，次世代シーケンサーMiSeq（Illumina, San Diego, CA, USA）でのTarget Sequencing法による解析を，ファスマック社（厚木，神奈川）に依頼した。得られた16S rRNA遺伝子アンプリコン（約250 bp）の塩基配列より，97%の配列類似性を評価基準として菌叢解析パイプライン（QIIME-ver1.9.1）¹⁶⁾上でGreengenes 13_8_99を参照データベースとしたUCLUST¹⁷⁾を用いて53,323個の操作的分類単位（operational taxonomic units: OTUs）と各OTUの推定系統，出現頻度（リード数）を得た。

pH，乳酸含量，熟成温度 試料，M-Sep，M-Jan，M-Mar，P-Sep，P-Jan，P-MarのpHはpHメータ（HI83141，Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA）で測定した。また，P-Sep，P-Jan，P-Marについては，それぞれ3 gを日本食品分析センター（渋谷，東京）に送付し，乳酸

量の測定を依頼した。M-Sep，M-Jan，M-Marを得た熟成工程では，諸味表面から1 mの深さの温度を，熟成開始14日目，28日目，42日目に測定し，それらの平均を熟成期間の代表値とした。

結果と考察

DGGEによる製造期の異なるゴチュジャンの細菌叢

解析 9月，1月，3月に製造を開始したゴチュジャンの製品（P-Sep，P-Jan，P-Mar）から調製した16S rRNA遺伝子のアンプリコンと，“膨れ事故”を起こした製品から単離した“膨れ事故”の原因微生物，*B. licheniformis* (strain A2, A9) および*B. amyloliquefaciens* (strain B3, B8)⁷⁾のDNAを鋳型とした16S rRNA遺伝子アンプリコンのDGGEの結果をFig. 1に示す。P-Jan（レーンJan）には*B. amyloliquefaciens*（レーンB3, B8）のメジャーバンドと同じ移動度のバンドが観察された（図中◁）。P-SepとP-Mar（レーンSep, Mar）では，P-Janほどには明瞭には観察されず，1月の製品の“膨れ事故”と*B. amyloliquefaciens*との関連が示唆された。

製品の試料（P-Mar）と調合・低温殺菌工程を行う前の発酵・熟成工程終了時の試料（M-Mar）の16S rRNA

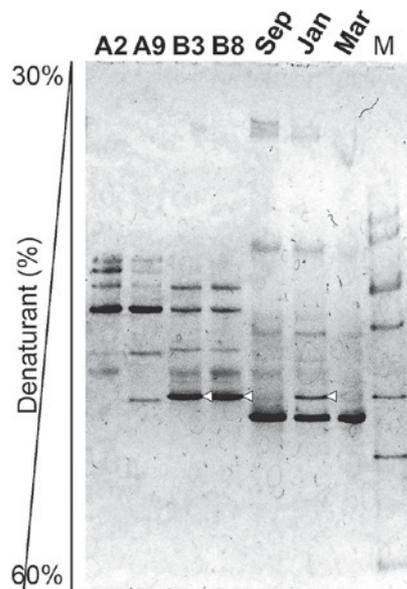


Fig. 1. DGGE gel image of the PCR amplified 16S rRNA gene fragments amplified from total DNA of gochujang products and causative bacteria of swelling incident. A2, A9, B3, B8: *Bacillus* strains, A2, A9, B3 and B8 isolated from swelling gochujang product, respectively. Sep, Jan, Mar: products of which manufacture began in September (P-Sep), January (P-Jan) and March (P-Mar), respectively. M: DGGE maker (Nippon Gene, Tokyo). Several minor signals observed in the lanes A2, A9, B3, and B8 would be non-16S rRNA gene-specific PCR products derived from the genomic DNA of each *Bacillus* isolate.

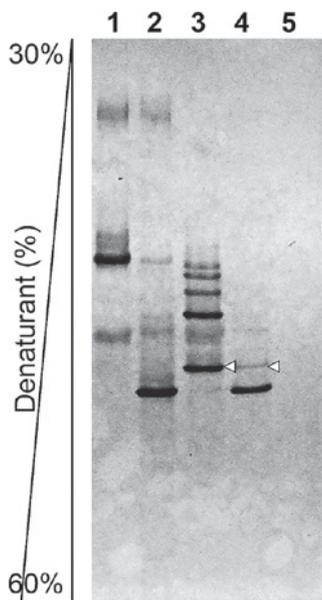


Fig. 2. DGGE gel image of 16S rRNA gene fragments amplified from total DNA of gochujangs and gochujang additives. 1: gochujang mash sampled from the end of maturation process (M-Mar), 2: gochujang product (P-Mar), 3: mixture of amplified 16S rRNA gene fragments from *B. amyloliquefaciens* and *B. licheniformis*, 4 and 5: red pepper and sugar syrup employed in the manufacturing site, respectively.

遺伝子アンプリコンをDGGEで比較したところ (Fig. 2, レーン1, 2), “膨れ事故”原因の *B. licheniformis* と *B. amyloliquefaciens* の16S rRNA 遺伝子のPCR産物を混合した試料 (Fig. 2, レーン3) と同じ移動度のバンドは観察されなかった。さらに、このM-MarのDGGEバンドパターン (Fig. 2, レーン1) は、製品 (P-Mar) のバンドパターン (Fig. 2, レーン2およびFig. 1, レーンMar) とも異なっていた。調合・低温殺菌工程がM-MarからP-Marの間にあり、ここで唐辛子と水飴が発酵・熟成工程終了後のM-Marに加えられる。そこで、調合時に添加される唐辛子粉と水飴から同様に16S rRNA 遺伝子のPCRによる増幅を行い、DGGEで比較したところ、水飴からは16S rRNA 遺伝子の増幅は確認できなかったが (Fig. 2, レーン5)、唐辛子粉からは“膨れ事故”の原因微生物群と同じ移動度のバンドが観察された (Fig. 2,

レーン4: 図中◁)。すなわち“膨れ事故”の原因微生物は、調合に用いられる唐辛子粉に随伴して製品に混入したと結論できた。

調べた唐辛子粉は3月期製造に用いた唐辛子粉であり、唐辛子粉からの混入は通年の現象と推定できる。そこで、特定の製造期のみ、唐辛子粉からの原因微生物混入が“膨れ事故”にまで至ることについて、さらに分析と解析を続けた。Fig. 1および2で◁で示したバンドよりも製品 (P-Sep, P-Jan, P-Mar) と唐辛子粉で観察される移動度が大きく、強度が高いバンドについては、続くNGSの結果を参照し、後述する。

製品のpHと乳酸濃度 製品 (P-Sep, P-Jan, P-Mar) のpHとそこに含まれる乳酸の測定値をTable 1にまとめた。P-JanのpHは4.69と *Bacillus* 属細菌の孢子発芽を抑制するとされる4.5¹⁸⁾を超えており、他の製品、P-SepとP-Marでは4.5よりも低く、特にP-Sepは他の製造時期より低いpHを示した。また、乳酸濃度はpHの値と負の相関を示し、製品のpHは乳酸によって規定されていると推定できた。

NGSデータからの推定系統 NGSで各試料より2回ずつ解析を行い、総リード数が多い方の解析結果を選抜して集計したOTU全数は53,323であり、ゴチュジャンの原材料が植物 (麦, 唐辛子) と黄麹であるためクロロプラストとミトコンドリアの16S rRNA 遺伝子のV4領域も検出された^{19,20)}。特にクロロプラストのリード数は全体の約70%であった。したがって、Fig. 1および2で◁で示したバンドよりも移動度が大きく、強度が高い、製品 (P-Sep, P-Jan, P-Mar) と唐辛子粉で観察されたバンドはクロロプラスト由来と考えられる。

OTU全数53,323からクロロプラストとミトコンドリア由来のOTUを除くと35,737であり、さらに、そのうちの97 OTUsだけで35,737 OTUsのリード数累積の95%を占めていた。この97 OTUsの各DNA塩基配列をそれぞれBLAST²¹⁾に供し、sequence identity 98%以上を基準として、門、目、科、属および種名に関する菌叢解析パイプライン (QIIME-ver1.9.1) 上で行った簡易分類の結果を検証した。検証した系統を属レベル以上で

Table 1. pH, lactic acid and typical temperature of sample sources of gochujang.

Source	P-Sep	P-Mar	P-Jan	M-Sep	M-Mar	M-Jan
pH	4.34	4.49	4.69	4.21	4.54	4.84
Lactic acid (mg-lactic acid/g-gochujang)	1.08	1.02	0.77	ND	ND	ND
Typical temperature (°C)	RT	RT	RT	24.7	18.6	11.0

RT: Room Temperature, ND: Not Determined

整理した。ただし、前報⁷⁾で“膨れ事故”原因微生物として取得した*B. amyloliquefaciens*および*B. licheniformis*に該当したものは種レベルで整理した。*Bacillus*属のうち二つのOTUが、*B. amyloliquefaciens*に該当する配列を有していた。また、*Bacillus*属の別の一つのOTUが、もう一方の“膨れ事故”原因微生物である*B. licheniformis*に該当する配列を有していた。それぞれについてのリード数割合をTable 2にまとめた。

製造期の異なるゴチュジャンのNGS 製品(P-Sep, P-Mar, P-Jan)の*Bacillus*属についてのNGS解析結果(Table 2)は、P-SepとP-Marでは20%以下であったが、P-Janは約40%と、他の製造時期より高く、1月の微生物叢の全体でもかなりのリード数を占めていた。そして

この*Bacillus*属のほとんどが*B. amyloliquefaciens*であり、*B. licheniformis*などは*B. amyloliquefaciens*の割合の1/50から1/100程度であった。*B. amyloliquefaciens*は、ゴチュジャンの“膨れ事故”を再現させた実験⁷⁾において、*B. licheniformis*が270 mL/weekのガス発生であったのに対し、460 mL/weekのガス発生を示した種でもあり、“膨れ事故”の主たる原因微生物は*B. amyloliquefaciens*のほうであると考えられる。

一方、*B. subtilis*などの*Bacillus*属細菌がゴチュジャンの発酵・熟成に関する主な微生物群であるとする報告²²⁻²⁴⁾があるが、熟成終了時の試料、M-Sep, M-Mar, M-Janをみると、M-Sepでは微生物叢の約30%を占めてはいるものの、M-JanとM-Marでは1%以下であった

Table 2. Bacterial profiles of sample sources of gochujang.

Taxon names							Samples					Red
Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	P-Sep	P-Mar	P-Jan	M-Sep	M-Mar	M-Jan	Pepper
<i>Firmicutes</i> (44)												
<i>Bacilli</i> (44)												
<i>Bacillales</i> (26)												
<i>Bacillaceae</i> (14)												
<i>Bacillus</i> (6)						19.0%	14.0%	44.2%	29.3%	0.3%	0.4%	77.9%
<i>amyloliquefaciens</i> ^{a)} (2)						18.6%	13.7%	43.8%	28.1%	0.3%	0.3%	77.9%
<i>licheniformis</i> ^{b)} (1)						0.0%	0.1%	0.4%	1.2%	0.0%	0.1%	0.0%
Others (3)						0.4%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Others (8)						1.3%	1.6%	1.3%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%
<i>Staphylococcaceae</i> (8)												
<i>Staphylococcus</i> (8)						8.1%	30.4%	42.2%	52.0%	78.1%	97.8%	0.0%
Others (4)						0.1%	0.5%	0.3%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%
<i>Lactobacillales</i> (18)						3.8%	15.3%	3.2%	15.2%	21.4%	1.2%	4.9%
<i>Lactobacillaceae</i> (6)												
<i>Lactobacillus</i> (6)						1.8%	0.8%	0.2%	12.2%	0.9%	0.2%	0.0%
<i>Leuconostocaceae</i> (4)												
<i>Weissella</i> (4)						0.5%	7.7%	2.2%	1.0%	18.9%	0.5%	2.2%
Others (8)						1.5%	6.8%	0.8%	2.0%	1.6%	0.5%	2.7%
<i>Proteobacteria</i> (35)						56.4%	37.7%	5.0%	0.1%	0.1%	0.0%	17.0%
<i>Gammaproteobacteria</i> (24)						52.6%	32.5%	4.3%	0.1%	0.0%	0.0%	16.7%
Others (11)						3.8%	5.2%	0.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%
Others (14)						11.3%	0.2%	3.8%	0.4%	0.1%	0.4%	0.0%
Unassigned (4)						0.0%	0.3%	0.0%	2.8%	0.0%	0.0%	0.2%

(): Number of observed OTUs involved with respective taxonomic groups.

a) 2 OTUs are closely related to *B. amyloliquefaciens* NBRC15535 [accession no.: AB255669] (sequence similarities: 100% and 98.4%), the same as to *B. velezensis* FZB42 [NR_075005] (100%, 98.4%), and to *B. subtilis* 168 [NR_102783] (100%, 98.4%).

b) Closely related to *B. licheniformis* AK39422 [HQ234338] (98.4%), the same as to *B. sonorensis* F3-49 [KT735226] (98.4%).

(Table 2). *Bacillus* 属細菌の発酵・熟成に対する役割は、あったとしても、限定的であり、普遍的とは言えないと判断できた。

また、製品P-Janでは*B. amyloliquefaciens*の割合が40%以上であるにもかかわらず、調査・低温殺菌工程前のM-Janでの*B. amyloliquefaciens*は0.3%にすぎなかった。一方、M-Marの*B. amyloliquefaciens*の割合はM-Janと同程度でありながら、製品P-Marでは*B. amyloliquefaciens*の割合はP-Janの1/3にとどまっていた。調査・低温殺菌工程で添加する唐辛子粉の*Bacillus*属細菌のほとんどは*B. amyloliquefaciens*であり、その割合は約80%であり(Table 2)、これが製品にみられる*B. amyloliquefaciens*の源のほとんどと考えられるが、P-MarではP-Janの1/3に、そしてM-Sepは30%でありながら、製品P-Sepでは20%程度に低減している。低温殺菌工程後に観察された*Bacillus*属細菌の微生物叢での割合は、低温殺菌工程での昇温をトリガーとして孢子化した孢子に由来するものと考えられ、NGSから得た微生物叢割合が高い数値であっても、P-SepとP-Marでは低pHで発芽が抑制され、“膨れ事故”にいたらなかったものと考えられる。

この考察と前述のpHと乳酸含量の結果を併せ考えると、発酵から熟成工程における*Bacillus*属細菌以外の、特に乳酸菌 (lactic acid bacteria: LAB) の役割を考慮する必要があると言える。しかしながら、これまでゴチュジャンからLABは検出されないと報告²⁴⁻²⁶⁾されており、また本研究の試料ゴチュジャンと同じ食塩濃度 (7および10% NaCl) に調整したMRS培地でのコロニー形成は観察できていなかった⁷⁾。

NGSでの乳酸菌 (LAB) 検出 NGSによる分析 (Table 2) で、熟成工程終了時の試料のみならず製品からも*Lactobacillus*属細菌6種 (*L. sakei*, *L. acidipiscis*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. guizhouensis*, *L. halophilus*) の6 OTUs, *Weissella*属細菌3種 (*W. paramesenteroides*, (2), *W. thailandensis*, *W. ghanensis*: 複数のOTUが相当した種については、そのOTU数を()内に記した) の4 OTUsが、また他にLABと分類される*Lactococcus* (*Lactococcus lactis*: 後述), *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Trichococcus*, *Atopostipes*, *Tetragenococcus*属細菌^{27,28)}それぞれ1種の計8 OTUsが検知された。NGSは試料中に存在するDNAに基づいて微生物叢の構成を示しているため、これらのLABがDNA抽出時に生存し、活動していたことは保証できないが、DNA抽出時までの活動の累積を示しており、製品の乳酸含量は、これらのいずれかの活動の結果と言える。また、これまでのゴチュジャンにはLABがない

という報告^{7,24-27)}は、それらの検出法がNGSよりも鋭敏でなかったことに起因したものと考えられる。

ゴチュジャンの微生物叢 熟成工程終了時において、M-JanのLABの割合はM-SepとM-Marの1/10以下と、非常に低い割合であり、pHの結果と矛盾はなかった。一方、LABの割合の高かったM-SepではLABの約80%が*Lactobacillus*属細菌であり、*Weissella*属細菌他は低かった。これに対し、M-MarではLABの大半を*Weissella*属細菌が占めており、このLABの大半を*Weissella*属細菌が占めているという結果はM-Janにおいても同様であった (Table 2)。

ただし、製品においては、P-JanのLAB割合は、P-Sepのそれと、ほぼ同じ割合を示し、またP-MarのLAB割合はM-Marよりも高くなっていった。NGSに供した試料のDNA濃度は揃えられているため、これらの変動は熟成工程終了に続く調査・低温殺菌工程、瓶詰、保存の過程での微生物叢変化である。そして、LABの構成については、P-SepではM-Sepと同様に*Lactobacillus*属細菌が多くを占め、一方、製品でのLAB全体の割合ではP-Sepと同等かそれ以上のP-JanとP-Marでは*Lactobacillus*属細菌よりも*Weissella*属他の細菌群の割合が高い状態が維持されており、LAB構成は調査・低温殺菌、瓶詰、保存の過程で、おおよそ保持されたといえる。熟成工程終了時および製品でのLAB構成の結果から、ゴチュジャンの乳酸含量そしてpHを決定しているのは*Lactobacillus*属細菌と帰結できるであろう。

また、すべての試料について*Staphylococcus*属細菌の微生物叢全体における割合は高く、特に熟成工程終了時での割合は微生物叢全体の約半数以上であった (Table 2)。Leeら²⁴⁾はゴチュジャンについて培養法により*Staphylococcus*属は*Bacillus*属細菌より少なかったと報告しているが、本研究結果との相違は手法の違いによるものと考えられる。

熟成工程の温度とLAB 一般的なLABの生育温度は25~37°Cであり、下限でも15°Cと報告されている²⁷⁻²⁹⁾。9月、1月、3月の熟成工程の14、28そして48日目に、表面から1mの深さの温度を測定した。熟成工程では諸味の切り返しがあり、切り返しによる外気の影響が大きかったため、上述の平均温度を代表温度としてTable 1に示している。瓶詰後の製品については常温保存であるためRTと記した。

熟成工程の前段の発酵工程の温度は、発酵による温度上昇が30°C以上にならないように制御されていたが、熟成工程の温度は外気温による季節変動を示していた。微生物叢におけるLAB全体の割合が高く、またその構成において*Lactobacillus*属が多数を占めていたM-Sep

の平均温度は24.7°Cであり、*Weissella*属細菌が多数を占めていたM-Marは18°Cであった。これに対し、生育の下限とされる温度よりも低い温度が観察されたM-Janでは、LAB全体の割合も低く、その中の構成でも*Lactobacillus*属の構成割合は非常に低かった。

これらから、発酵・熟成工程を通してゴチュジャンの乳酸含量を高め、pHを低下させているのは*Weissella*属よりも*Lactobacillus*属細菌の方が乳酸発酵の効率が高いためと言える。そして唐辛子粉に随伴する*B. amyloliquefaciens*の発芽を防腐剤などの添加ではなく低いpHで抑制するためには、これまで温度制御を施していなかった熟成工程においても、適切な温度管理が必要であることを示唆している。製造所では、これまでゴチュジャン製造工程において、発酵温度上限(30°C)と低温殺菌温度(75°C)が管理点として採用されてきたが、“膨れ事故”防止の観点からは、熟成工程、特に冬季の基準温度設定と熟成槽の温度管理が必要であることが、NGSを用いた微生物叢の解析から初めて判明したといえる。

結 論

防腐剤無添加のゴチュジャンでは、冬季の製造製品で“膨れ事故”が発生することがある。16S rRNA遺伝子をマーカーとしてDGGEとNGSのTarget Sequencing法を併用し“膨れ事故”の原因微生物と“膨れ事故”に關与する微生物叢を解析した。

ゴチュジャンの微生物叢は主に*Bacillus*属細菌、*Staphylococcus*属細菌そしてLABに分類される細菌から構成されていた。また、*Bacillus*属細菌のほとんどはゴチュジャンの“膨れ事故”の原因微生物*B. amyloliquefaciens*であり、最後の調合・低温殺菌工程で添加する唐辛子粉に随伴して製品に混入することが初めて判明した。

冬季製造製品では、熟成工程終了時にLABの割合が低く、またLABの構成において*Weissella*属細菌よりも*Lactobacillus*属細菌が少ないという特徴があった。これを原因として熟成工程終了時に乳酸の含量が低く、pHが4.5以上となり、結果として低温殺菌工程で、*B. amyloliquefaciens*の発芽が抑制できないため“膨れ事故”に至ったと考えられる。

要 約

ゴチュジャンは韓国の代表的な発酵食品であるが、時として流過程で“膨れ事故”を発生する。本研究は、16S rRNA遺伝子をマーカーとして変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)と次世代シーケンシング(NGS)

技術を用い、ゴチュジャン“膨れ事故”の原因を追究した結果を報告している。DGGEとNGSの双方から“膨れ事故”そのものの原因微生物は主に*Bacillus amyloliquefaciens*であったことを示し、そして、この*B. amyloliquefaciens*は諸味の熟成後に添加、調合する唐辛子粉由来であることを明らかにした。また、添加した唐辛子粉に随伴する*B. amyloliquefaciens*による“膨れ事故”は、熟成工程の微生物叢において乳酸菌(LAB)の割合が低く、さらにLABを構成する*Lactobacillus*属細菌の割合が低い製造で発生することを、初めて明らかにしている。

謝 辞

本研究におけるゴチュジャン細菌叢のNGS解析は、「公益財団法人 高橋産業経済研究財団」の助成を受けて実施しました。ここに記して謝意を表します。

文 献

- 1) Kim, H. C. and Kim, M. R.: *J. East Asian Soc. Diet. Life*, **15**, 126–135 (2005).
- 2) Lee, H. K.: *Consumers Union of Korea. Safe Food*, **7**, 21–25 (2012).
- 3) Lee, J. S., Choi, Y. J., Kwon, S. J., Yoo, J. Y., and Chung, D. H.: *Foods Biotechnol.*, **5**, 54–58 (1996).
- 4) Jung, Y. C., Choi, W. J., Oh, N. S., and Han, M. S.: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 253–259 (1996).
- 5) Oh, N. S., Park, H. Y., and Lee, H. K.: *J. Resource Sci.*, **5**, 245–253 (1997).
- 6) Jin, H. S. and Lee, K. J.: *Korean J. Food Nutr.*, **12**, 339–343 (1999).
- 7) Back, J. H., Suzuki, I., Takeda, M., and Koizumi, J.: *Japan J. Food Eng.*, **19**, 105–111 (2018).
- 8) Muyzer, G., Waal, E. C. D., and Uitterlinden, A. G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 695–700 (1993).
- 9) 小柳 喬: ソルト・サイエンス研究財団 助成研究報告集 平成26年度2 (医学食品科学編), p. 161–171 (2016).
- 10) Sulaiman, J., Gan, H. M., Yin, W. F., and Chan, K. G.: *Front. Microbiol.*, **5**, 1–9 (2014).
- 11) Koyanagi, T., Kiyohara, M., Matsui, H., Yamamoto, K., Kondo, T., Katayama, T., and Kumagai, H.: *Lett. Appl. Microbiol.*, **53**, 635–640 (2011).
- 12) Sakamoto, N., Tanaka, S., Sonomoto, K., and Nakayama, J.: *Int. J. Food Microbiol.*, **144**, 352–359 (2011).
- 13) Lattanzi, A., Minervini, F., Cagno, R. D., Diviccaro, A., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., Angelis, M. D., and Gobbetti, M.: *Int. J. Food Microbiol.*, **163**, 71–79 (2013).
- 14) Thapa, Chettri R., Suzuki, I., Takezaki, J., Tabusa, H., Takeda, M., and Koizumi, J.: *J. Water Environ. Technol.*, **11**, 33–47 (2013).
- 15) Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., and Knight, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 4516–

- 4522 (2011).
- 16) Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Peña, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., and Knight, R.: *Nat. Methods*, **7**, 335–336 (2010).
 - 17) Edgar, R. C.: *Bioinformatics*, **26**, 2460–2461 (2010).
 - 18) 内藤茂三：醤油の研究と技術, **34**, 21–36 (2008).
 - 19) Yadav, S., Kumar, A., Gupta, M., and Maitra, S. S.: *Curr. Microbiol.*, **75**, 1038–1045 (2018).
 - 20) Ziesemer, K. A., Mann, A. E., Sankaranarayanan, K., Schroeder, H., Ozga, A. T., Brandt, B. W., Zaura, E., Watersrist, A., Hoogland, M., Salazar-García, D. C., Aldenderfer, M., Speller, C., Hendy, J., Weston, D. A., Macdonald, S. J., Thomas, G. H., Collins, M. J., Lewis, C. M., Hofman, C., and Warinner, C.: *Sci. Rep.*, **5**, 16498 (2015).
 - 21) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J.: *J. Mol. Biol.*, **215**, 403–410 (1990).
 - 22) Koo, M. S., Kim, Y. S., Oh, H. I., and Kim, J. K.: *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 439–444 (1996).
 - 23) Kim, D. H. and Choi, H. J.: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**, 1174–1181 (2003).
 - 24) Lee, K. H., Lee, M. S., and Park, S. O.: *Korean J. Agri. Chem. Soc.*, **19**, 82–92 (1976).
 - 25) Lee, J. M., Jang, J. H., Oh, N. S., and Han, M. S.: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 260–266 (1996).
 - 26) Lee, J. S., Kwon, S. J., Chung, S. W., Choi, Y. J., Yoo, J. Y., and Chung, D. H.: *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 247–253 (1996).
 - 27) Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H.: *Int. J. Food Microbiol.*, **36**, 1–29 (1997).
 - 28) Vos, P. D., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., and Whitman, W.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, volume **3 The Firmicutes**, pp. 464–722, Springer-Verlag New York (2009).
 - 29) Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S., and Komagata, K.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 1479–1485 (2000).