



目から鱗の「発酵・腐敗」食品微生物叢（与太!?) 話

小柳 喬

世界中の人間は昔から現在に至るまで発酵食品が大好きである。コーカサス地方には紀元前6000年ごろのものとされる最古のワイン醸造の痕跡が存在し¹⁾、遊牧民たちは発酵乳を製造し、紀元前4000～3000年頃のメソポタミアにおけるビールの醸造記録もしっかり残っている。

もちろん、太古の人間には発酵食品が微生物の力によって出来上がっていたかどうかは、きっとよくわからなかったであろう。食材の味・匂い・食感が変化して新たな食品に生まれ変わるその「変化」を、実に、五感をもって食品特有の現象として肌（と舌と鼻）で感じてきたに違いない。食品の「変化」はもう一つある。「腐敗」である。人は「人間にとって好ましい変化かどうか」という、これまた実に五感重視で「発酵」と「腐敗」をざっくりと分けている。そのため、今でも両者を明確に分けられないままこれら二つが言葉として存在している。

「発酵」と「腐敗」はおんなじ？

「発酵」は美味しくなることで、「腐敗」とは不味くなること、と書いてしまえば「それは誰でも知っていること」と言われてしまいそうであるが、知れば知るほど、これら2つの現象の根幹は似ている。以前、研究室で魚介類に食塩20%を添加し、魚醤油を仕込んだことがある。仕込んだロットのうち一部では徐々にpHが下がり、pH5～5.5あたりまで低下して、得も言われぬ熟成香が漂い始めて発酵熟成がうまくいった。しかし、残る一部のロットでは熟成中pHは7.5～8付近まで上昇してしまい、鼻を突くツーンとするアンモニア臭が漂ってきた。バクテリアが生成した揮発性塩基窒素（Volatile Basic Nitrogen, VBN）が揮散し、これではもう食べられない。そのロットの魚醬は失敗作、つまり腐敗となった。しかし、塩を入れてインキュベートするという似た条件で仕込んだこれらの魚醤油のロット間で、いったいどのような差異が生じたのだろうか？原因としては、仕込み原料中の微生物組成や、ロット間での発酵条件のわずかな違いによって、熟成中に形成される細菌叢に変化が生じたことが考えられる。成功ロットでは自己消化による熟成過程を邪魔しない細菌しか生育しなかったが、失敗ロットでは残念ながらアミン類・アンモニアを旺盛に生成し、アルカ

リ化を促すバクテリアがたまたま優勢化してしまったのであろう。出来上がったものは食品として天と地ほどの差があるが、実際の差異は細菌叢の組成がただ違っただけで、微生物が食品成分を消化して代謝成分を蓄積していくプロセスは似たようなものである。おそらく成功ロットでは、耐塩性乳酸菌が乳酸を生成したか、せいぜい耐塩性のブドウ球菌辺りがあたりさわりのない代謝しか行わなかったため、風味に好ましくない変化がなかったに過ぎない。同じように仕込んだ2通りのロットがたまたま「発酵」と「腐敗」に分かれていったことは興味深く、両現象がぎりぎりの境界線で揺らいでいることを痛感する良い機会となった（勿論、魚醤油の専門製造者ではこのような失敗はないであろう）。

別の例として、無塩大豆発酵食品「納豆」を考えてみたい。*Bacillus subtilis* (natto) が生育した蒸煮大豆は糸を引き、特有の臭気を放つ。pH6.5～7.5辺りに保たれているうちは芳醇で香ばしい納豆臭がする。しかし、ちょっと室温放置して納豆菌による代謝が旺盛に進み、pH8～8.5前後までうっかりアルカリ化すると、数百mg% (mg/100g) まで蓄積したVBNが大量に揮発する。自家製の手作り納豆を人から勧められて、このような状態に達していると、アンモニアの刺激で涙が出そうになるのをこらえながら「よく発酵していますね」とお世辞を言いつつ食べる憂き目に遭うことになる。納豆は、同じ納豆菌の仕業であるはずなのに、発酵の延長線上にはすぐ腐敗が待っているという、よく考えると面白い食品である（アンモニア発生を低減させた納豆菌も育種されている）。韓国のホンオフエ (*hongeohoe*) (図1)、アイスランドのハカール (*hákarl*) といった、エイ・サメの発酵食品もある。このような食品はもとよりアルカリ性 (pH8から9近くにまで達する) であり、すでにアンモニア臭が発生している状態で食べる^{2,3)}。ホンオフエを飲み込むと、おそらくアルカリが粘膜を刺激するのであろうか、喉から食道までがカーッと熱くなる。あまり経験したことのない感覚を味わうことができる。これらの食品は、もちろん腐敗しておらず、立派な食文化として確立された伝統発酵食品である。「腐敗」と「発酵」には大して違いがないということが、このよ

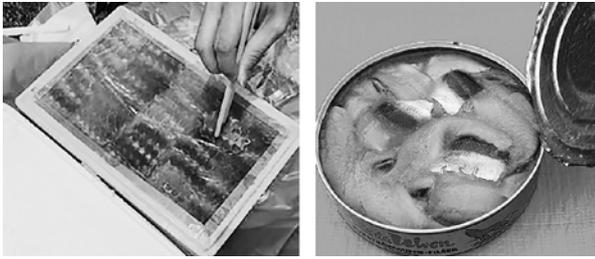


図1. 韓国のエイの発酵食品・ホンオフェ（左）とスウェーデンのニシンの発酵食品・シュールストレミング（右）

うな食品を考えると実に分かりやすいと思う。

「食べられる」と「食べられない」の境界線

清酒や醤油、味噌などの、いわば洗練された微生物制御プロセスを有する食品とは一線を画したもう一つの例として、伊豆諸島のくさや汁を考えてみたい。くさや汁には多くのバクテリアが棲み付いており、くさやの製造時に浸けられる魚介類から染み出す栄養分がフィード（供給）されることにより、これらのバクテリアの生存が支えられている。くさや汁は、定期的に微生物の利用基質を補給するという形式から、元祖の流加培養の一形態とも捉えられるのが面白い。汁中のバクテリアが蓄積した代謝物により与えられる独特の臭気は、やはり、くさやを初めて食べる人を驚かせる。Fujiiらによると、くさや汁の塩分濃度が島によって微妙に異なり、八丈島では若干高く、細菌叢も他と異なり特徴的であったとのことである⁴⁾。塩分濃度が高い八丈島のくさや汁では、偏性嫌気性菌である *Halanaerobium* 属細菌の存在が特徴的である。一方で、大島や新島ではそれよりも汁の塩分濃度が低く、*Tissierella* 属細菌が顕著に存在する特徴的な細菌叢がみられている（実はこの *Tissierella* 属細菌は、先述のハカールの細菌叢で優勢な細菌でもある）。

このくさや汁であるが、同じく Fujii の報告によると、しばらく魚を浸けず、つまり汁中のバクテリアを栄養源の不足状態にさらすと、次第に pH が 8.5 前後まで上昇し悪臭を発生して使えなくなってしまうそうである。おそらく微生物組成が変化してしまうのであろうが、人間の「魚をコンスタントに浸ける」という操作が細菌叢の安定性、ひいては腐敗の如何そのものに影響を及ぼしているのが興味深い。もちろん、「腐敗」していないくさや汁そのものも、強い臭気により、もともと腐敗との境界線上にあると見なすならば、余計に「腐敗」とは何だろう？と考え込むことになる。イタリアのチーズバエの幼虫を繁殖させたチーズ「カス・マルツウ」(*casu marzu*)

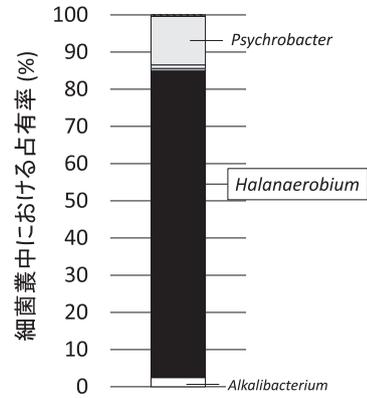


図2. メタ16S解析 (Illumina MiSeq) によるシュールストレミングの細菌叢 (属レベル). 解析には V3-V4 可変領域を使用。

は「腐ったチーズ」という意味であるらしく、中国の「腐乳」などになってくると、果たしてそれらが発酵したものなのか、あるいは腐敗したものなのかを推量することすら難しい。

スウェーデンにシュールストレミング (*surströmming*) というニシンの塩蔵食品がある (図1)。この食品からは八丈島のくさやと同じ *Halanaerobium* 属細菌が検出されており⁵⁾、高速シーケンサーを使用したメタ16SリボソームRNA遺伝子塩基配列解析 (メタ16S解析) でもこの菌が優勢菌となっていることがわかった (図2)。シュールストレミングの仕込みでは、最初に高濃度でニシンが塩蔵されるが、本漬け時に平均8.8%という常温保管の伝統塩辛にしては若干低めの塩分濃度で仕込まれているそうである⁶⁾。通常、塩蔵食品で優勢菌として名を馳せるのは *Tetragenococcus* 属乳酸菌や *Staphylococcus* 属細菌であるが、前述の微妙な低さの塩分濃度と密閉された缶の中という独特の嫌気状態が、きっとこの偏性嫌気性菌を優勢化させるのであろう。シュールストレミングは生ごみ臭に硫黄臭を加えたような強烈で凄まじい香りを有する。しかしながら、発酵中にはスカトールやインドールなどの、腐敗にとって致命的となる臭気成分は生成されないとのことで、ぎりぎりの線で腐敗の境界線を越えないというのはこういうことなのかもしれない⁶⁾。舌に乗せてシュールストレミングを味わうと、確かにこれは食べられると得心するから不思議である。

「発酵」は再現性良く特定の微生物叢が導かれるのに対し、「腐敗」は細菌叢が不定形であるという分類は正確ではない。一定の工程を経て製造される食品では、腐敗時に形成される微生物叢にもある程度の定まった型があり、生育する微生物にもちゃんとパターンがあるからである。かくして、「発酵」と「腐敗」を線引きするこ

とは実に至難を極める。むしろ、「食べられる」と「食べられない」の境界線を追い求める終わりのない旅、と言った方が当たりであろう。

発酵食品の微生物叢解析の歴史的発展と現在

「発酵」「腐敗」で頭の中が一通り混乱したところで、一度発酵食品のことに話を戻したい。発酵食品の微生物研究の根幹は、もっとも基本的な操作である分離同定である。1934年のKatagiriらの報告を読むと、著者らは寒天培地を用いて54種の生もと系酒母から57株の乳酸菌を分離し、短桿菌状の乳酸菌に対して初めて*Lactobacillus sake* (原著の記載は*Lactobacillus Saké*) の名を与えている⁷⁾。もちろん、現在のような16SリボソームRNA遺伝子(16S rDNA)塩基配列をもとにした同定技術は使用できないので、細胞形状、生育至適温度などの基本性状のほか、さまざまな糖存在下での発酵能、アルコール生成の有無、リトマス還元能などの生化学性状、乳の凝集能など、さまざまな試験を行って既知の菌種との比較により新規菌種か否かを判断している。このような、栄養寒天培地上で生育した微生物に直に語り掛けるような解析を通じて、「どうやらこの発酵食品ではこの菌が優勢らしい」ということがわかり、それを足掛かりとして数多くの発酵食品の発酵菌叢が推測されてきた。培地を用いた微生物分離は現代においても非常に大切で、分離株を手元に残すことができるため、分離後に菌株の持つ性状を調べることで発酵食品における働き方(代謝物の生成など)を推し量ることもできる。1950~70年代にかけての、生もと系酒母に関する微生物学的研究の報文を見ると、その解析の精密さに驚かされる。発酵食品の微生物叢は、以下の3つの観点から全容の把握がきわめて困難である。すなわち、①必ずしも加熱殺菌工程を経ないため初発菌叢がロット間で異なる場合がある、②種菌を接種しないタイプの食品ではロットごとに細菌叢変動の挙動が異なる場合がある、③仕込み条件のわずかな違いが微生物叢に影響を及ぼし得る、の3点である。これらの要因が複合的に絡み合うことで微生物叢は非常に複雑となるため、その解析にはきわめて高い精密性が必要となる。しかし、過去の研究者はこれらの課題に果敢に挑戦し、多数の発見がなされている。たとえば、生もと系酒母の微生物学的研究では、先述の新規乳酸桿菌が発見されるとともに、重要乳酸菌として存在する*Leuconostoc*属細菌や、*Pseudomonas*属細菌を中心とする硝酸還元菌の役割が解明された。また、系に存在する硝酸還元菌の種類による菌叢変動への影響や、種々の仕込み条件が生もと系酒母に含まれる乳酸菌の生育に及ぼす影響、さらにこれ

ら硝酸還元菌や乳酸菌が酵母の活動に与える影響なども明らかにされた。このように、その時代の技術の粋を集めたきわめて精密な解析が、先達者により情熱を持って行われてきた。

しかしその後、難培養性の微生物の存在などが知られるにつれ、培地を用いた分離依存的な解析のみでは、菌叢の特徴を完全に把握するには不十分であることが強く意識されるようになった。このような背景とPCR技術の発達に伴って、遺伝子ベースでの解析がメインに行われるようになった。16S rDNAを利用したT-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)やPCR-DGGE(Denaturing gradient gel electrophoresis)といった技術が用いられるようになったことも、微生物群衆解析をさらに発展させる大きな力となった。その後、次世代シーケンス法として454 GS FLXによるパイロシーケンス法やIlluminaの高速シーケンサーなどが利用できるようになり、誰もがメタ16S解析を通して菌叢解析を手軽にかつ詳しく行える時代が到来している。

しかし、古い時代に微生物を分離するため、試行錯誤の末に開発された培地に関する知見やその歴史は現在でも大いに役立っている。食品製造・加工現場での微生物分離や食中毒細菌の増菌・鑑別などに選択培地の使用が現在でも欠かせず、食品衛生検査指針に準拠する公定法としてさまざまな培地が指定されている。DHL寒天やデゾキシコレート寒天を用いて腸内細菌科の菌を分離したり、TCBS寒天を用いてビブリオを分離したりすると、その便利さと優れた微生物選択性・識別性に先人の培地開発の苦勞を感じ取ることができる(ただし、選択培地はターゲットとなる微生物を100%選択できる万能品ではなく、あくまでも菌の種類「絞り込み」を行うためのツールであることも忘れてはならない)。微生物を分離して実際にコロニー像や顕微鏡像を確認したり、生化学試験を行ったりすると、それぞれの菌の性質に関する情報が頭の中でリンクし、分離微生物の表現形質、いわば、その菌の「顔」をいち早く知ったり推測したりするための「勘」を育てることができる。DNAを抽出して菌叢解析のみを行うことが現在先行しがちであり、実際そこからもっとも信頼性の高い菌叢情報が得られるのは確かである。しかし、学生はじめ若い方々には、是非分離菌の素顔に触れるようなウェットな実験にも慣れ親しんでいただきたいし、そうなれば嬉しい限りである。

「発酵」と「腐敗」のみぎわ〜

食品発酵型：“food fermentype”を見極めるために

ともあれ、DNA塩基配列解析の高速化とともに、こ

の10~15年で細菌叢解析のトレンドはめまぐるしく変化した。腸内細菌の解析に多用され始めた高速シーケンサーが食品分野に持ち込まれ、16S rDNAの部分塩基配列を網羅的に解析することにより近縁系統を推測し、一気に細菌叢の概要を掴んでしまうことができる。これにより、以前はどうしてもブラックボックスとなっていた「この食品において本当はこの菌は全細菌の何%占めているのか」という情報が簡単に得られるようになった。上記のくさややシュールストレミングの解析例は、本手法により行われたものである。これまで、食品ごとのケーススタディとしてしか認識されてこなかった細菌叢であるが、現在、世界中で発酵食品における菌叢解析例が報告されている。それに伴い、異なる食品における細菌叢の見えなかった共通性が解明され、「食品細菌叢」の全容が総合的に語られることにつながっていくと感じる。その際には、注目されがちな発酵食品の菌叢だけではなく、腐敗食品の菌叢も同時に把握することが必ず重要となると考えられる。くさややシュールストレミングのような「臭い」発酵食品が示しているように、元来、「発酵」と「腐敗」の境界線は曖昧である。したがって、一見雑多な細菌に支配されているように見える「ぎりぎり発酵と腐敗の境界線上にある食品」の細菌叢を真剣に解析すれば、必ず「発酵とは、腐敗とは何か」という永遠の命題の答えに近づくことができると考えられる。その際には、各食品に含有される微生物代謝物の網羅的解析も不可欠となるであろう。

最後に、手元にある発酵食品のメタ16S細菌叢解析のデータを、細菌叢の傾向を掴む一例としてまとめてみた(図3)。いずれしなれずし(かぶら寿し, 図中・灰色丸)⁸⁾やなれずし(能登のなれずし, 図中・黒枠灰色丸)^{9,10)}、生もと系酒母(山廃酒母, 図中・黒丸)^{11,12)}では乳酸発酵が顕著であり、*Lactobacillus*属細菌に代表される乳酸菌が優勢化するケースが多くみられる。図中に示したように、発酵初期には乳酸菌以外の細菌が優勢な微生物叢であっても(たとえば、かぶら寿し発酵初期には*Staphylococcus*属細菌が多くみられる)、発酵が進むにつれて細菌叢は*Lactobacillus*優勢型に収斂していく(図3・点線矢印)。山廃酒母でも、初期の*Pseudomonas*属細菌や腸内細菌科菌群等の存在から同様の*Lactobacillus*優勢型への収斂経過をたどる。これらの食品は、塩分濃度が数%以内に収まる低塩分(山廃酒母は無塩分)食品であり、*Lactobacillus*属細菌をはじめとする乳酸菌の優勢化にとって有利である。したがって、類似の発酵条件で製造される食品群の多くがこの発酵形式を有している。

一方で、高塩濃度(通常15%以上)を有する魚醤油では、存在比率の程度の差はあるものの、耐塩性乳酸菌である*Tetragenococcus*属細菌が主要な細菌であることが多く、図中でも、上述した食品群とは違った位置付けとなっていることが見て取れる(図3・白丸)。シュールストレミングのように*Halanaerobium*優勢型の細菌叢を形成する場合は、無論、はるかに異なった位置にクラスタリングされることになる(図3・濃灰色丸)。このように、塩蔵タイプか否かによる細菌叢の差異、さらに細かく*Tetragenococcus*型なのか、*Halanaerobium*型なのか、また同じ水産発酵食品でも一部のくさややハカルなどのように*Tissierella*属細菌の存在が特徴的である型なのか、など、発酵食品において形成される「発酵型: fermentype (ファーメントタイプ)」ともいべき微生物叢のタイプ分けを体系立てて整理していくことが今日の細菌叢解析の技術を用いれば充分可能である。しかし、「fermentype」と呼ぶとfermentation、すなわち非呼吸的代謝や物質生産に供する発酵技術をも代表するような言い方となってしまい、不適切かもしれない。したがって、「食品発酵型: food fermentype」(もしくは両者を結合して「foomentype (フーメントタイプ) ?)とでも呼べば良いかもしれない。腐敗菌叢も併せて精密に分析していけば、「発酵」と「腐敗」を分かち、ぎりぎりの差異もきつと見極めることもできよう。

以上の試みは、扱う対象があまりに混沌としており、単なる「与太話」に終わってしまう可能性も充分にある。しかし、舌にのせて飲み込める、飲み込めない、あるいは

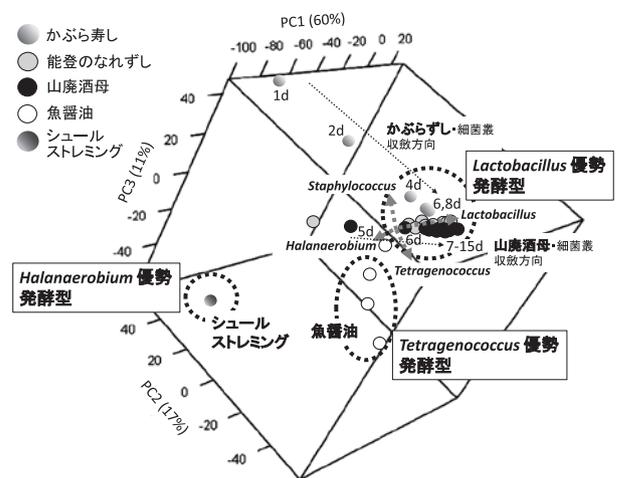


図3. 各発酵食品のメタ16S細菌叢の特徴(主成分分析を使用)。かぶら寿しおよび山廃酒母の発酵日数(d)に伴う細菌叢遷移を黒点線矢印で図中に示した。*Lactobacillus*優勢型、*Tetragenococcus*優勢型、および*Halanaerobium*優勢型の発酵型(food fermentype)を有する食品群について点線丸で囲んだ。

は食べられる, 食べられないなどの命題は, 誰もが日常で身近に感じることである。そのような命題について, 人間の個人差を超えた普遍的な腐敗・発酵の境界線が解る日がくるかもしれないと思うと, 大変わくわくするのである。

文 献

- 1) McGovern, P. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E10309 (2017).
- 2) Jang, G. I. *et al.*: *Food Microbiol.*, **61**, 72 (2017).
- 3) Osimani, A. *et al.*: *Food Microbiol.*, **82**, 560 (2019).
- 4) Fujii, T. *et al.*: *Int. J. Food Microbiol.*, **238**, 320 (2016).
- 5) Kobayashi, T. *et al.*: *Int. J. Food Microbiol.*, **54**, 81 (2000).
- 6) Skåra, T. *et al.*: *J. Ethn. Foods*, **2**, 18 (2015).
- 7) Katagiri, H. *et al.*: *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, **10**, 156 (1934).
- 8) Koyanagi, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 2125 (2013).
- 9) Koyanagi, T. *et al.*: *Lett. Appl. Microbiol.*, **53**, 635 (2011).
- 10) Kiyohara, M. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 48 (2012).
- 11) Koyanagi, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 399 (2016).
- 12) Tsuji, A. *et al.*: *Curr. Microbiol.*, **75**, 1498 (2018).