

阿波晩茶に生息する乳酸菌の地域性

-2022年と2023年製造分の調査-

Regional Characteristics of Lactic Acid Bacteria Inhabiting Awa-bancha

-Survey on Production in 2022 and 2023-

西岡 浩貴^{*1}, 横山 直人^{*2}, 平田 真樹^{*3}, 森松 文毅^{*3}, 堀江 祐範^{*4}

NISHIOKA Hiroki, YOKOYAMA Naoto, HIRATA Maki, MORIMATSU Fumiki and HORIE Masanori

抄 録

阿波晩茶に生息する乳酸菌の地域性を検証するため、2022年と2023年に製造された阿波晩茶から乳酸菌を分離し、菌種の同定と菌株のタイピングを実施した。MRS寒天平板により乳酸菌を分離し、菌種を同定したところ、徳島県東部の那賀町と上勝町では *Lactiplantibacillus pentosus* が、西部の三好市では *Lactiplantibacillus plantarum* が最も多く分離され、過去の研究と同様の結果が得られた。また、*L. pentosus* と *L. plantarum* の菌株タイピングでは、おおよそ生産者ごとにグルーピングされた。これらの結果から、阿波晩茶に生息する乳酸菌は製造地域により優占種が異なり、生産者ごとに固有の菌株が存在する可能性が示唆された。

1 はじめに

阿波晩茶は微生物の発酵によりつくられる後発酵茶の一つである。阿波晩茶の製法は、夏期の成熟した茶葉を収穫し、茶葉を茹でた後に揉捻して、空気が入らないよう桶に茶葉を詰め込み、重石を載せて2~4週間程度嫌気発酵させた後、天日乾燥させて完成する¹⁾。嫌気発酵工程では乳酸菌を中心とした微生物が茶葉の成分を変化させ²⁾、独特の爽やかな風味が形成される。

著者らは過去の研究で、2018~2020年に製造された阿波晩茶の嫌気発酵後茶葉から乳酸菌を分離し、菌種を同定したところ、徳島県東部の那賀町と上勝町からは *L. pentosus* が、西部の三好市からは *L. plantarum* が最も多く分離された。この結果から、阿波晩茶に生息する乳酸菌には地域性が存在することが示唆された³⁾。

本研究では、阿波晩茶に生息する乳酸菌の地域性を再検証するため、各生産地の阿波晩茶から乳酸菌を分離して菌種を同定するとともに、分離した菌株のタイピングを行った。

2 実験方法

2・1 分離用試料と乳酸菌の分離

2022年に那賀町の阿波晩茶生産者A, B, C, 上勝町の生産者D, E, 三好市の生産者F, Gから嫌気発酵中の発酵液を採取し、2023年には生産者AとGから嫌気発酵後の茶葉を採取して、乳酸菌の分離用試料とした。なお、生産者A, D, F, Gは過去の研究^{2) 3)}でも嫌気発酵後茶葉から分離した乳酸菌の菌種を解析したが、生産者B, C, Eは本研究で初めて分離用試料を採取した。

分離用試料1gにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)9gを加えて1分間振盪した後、PBSで適宜希釈し、MRS(Merck KGaA)寒天平板または10%塩化ナトリウム添加MRS寒天平板に塗抹し、アネロパック・ケンキ(三菱ガス化学)を使用して35°Cで2日間培養し、コロニーを生じさせた。MRS寒天平板に発生したコロニーについて、2022年は色や形状が異なるものを約10個、2023年は1個を滅菌した爪楊枝でかきとり、爪楊枝をねじり試験管に入った10mLのMRS液体培地に入れ、35°Cで1~2日間培養した。また、10%塩化ナトリウム添加MRS寒天平板に発生したコロニーについても同様に釣菌し、ねじり試験管に入った10mLの10%塩化ナトリウム添加MRS液体培地中で35°C、3日間培養した。

*1 食品・応用生物担当, *2 企画総務担当,

*3 徳島大学, *4 産業技術総合研究所

2・2 乳酸菌の同定

2022年に分離した乳酸菌の同定には MALDI Biotyper (Bruker) を使用し、操作はトレーニングテキスト Version4.1.6 に従った。測定用コロニーは、乳酸菌培養液を MRS 寒天平板に塗抹し、アネロパック・ケンキを使用して、35℃で48時間培養して作製した。MALDI Biotyper Compass 4.1 で菌種を同定し、スコア値が 2.0 以上の結果を採用した。試料は初めにセルスマア法で調製して測定し、スコア値が 2.0 未満の試料についてはエタノール・ギ酸抽出法で再調製して測定した。

2023年に分離した乳酸菌は、*recA* 遺伝子に対するマルチプレックス PCR⁴⁾ と 16S rRNA 遺伝子の相同性⁵⁾ により同定し、方法は既報³⁾ に準じた。

2・3 乳酸菌の菌株タイピング

阿波晩茶または石鎚黒茶から分離された *L. pentosus* と *L. plantarum* について、フーリエ変換赤外分光システムの IR Biotyper (Bruker) を使用してタイピングを実施した。供試菌株を表 1 に示す。測定用コロニーは 2・2 と同様の方法で作製した。IR Biotyper の操作はトレーニングテキスト Version1.0.8 に従った。乳酸菌コロニーを 1 菌株につき 4 回測定し、Quality test が 0.4 以上の測定結果を使用して主成分分析を行った。

表 1 IR Biotyper の測定に使用した菌株

菌株	菌種	地域	生産者	分離年	分離源
A1921	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	那賀町	A	2019	嫌気発酵後茶葉
A2001	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	那賀町	A	2020	嫌気発酵後茶葉
A2210	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	那賀町	A	2022	発酵液
A2218	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	那賀町	A	2022	発酵液
A2305	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	那賀町	A	2023	嫌気発酵後茶葉
B2204*	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	那賀町	B	2022	発酵液
B2206*	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	那賀町	B	2022	発酵液
C2204	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	那賀町	C	2022	発酵液
C2212	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	那賀町	C	2022	発酵液
D1915	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	上勝町	D	2019	嫌気発酵後茶葉
D2201	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	上勝町	D	2022	発酵液
D2210	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	上勝町	D	2022	発酵液
E2201	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	上勝町	E	2022	発酵液
F1931	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	三好市	F	2019	嫌気発酵後茶葉
F2001	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	三好市	F	2020	嫌気発酵後茶葉
F2221	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	三好市	F	2022	発酵液
F2208	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	三好市	F	2022	発酵液
F2321	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	三好市	F	2023	嫌気発酵後茶葉
G2002	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	三好市	G	2020	嫌気発酵後茶葉
G2206	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	三好市	G	2022	発酵液
IYO2310	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	愛媛県 西条市		2023	嫌気発酵後茶葉 (石鎚黒茶)

*: 同一ロットから分離

3 結果と考察

3・1 阿波晩茶から分離された乳酸菌の菌種

乳酸菌を同定し、各製造地域の菌種の割合を図 1 に、各生産者の菌種を表 2 に示す。那賀町と上勝町の全ての生産者で *L. pentosus* が最も多く分離され、両地域とも分離菌株数の 80%以上を占めた。一方で、三好市の全ての生産者では *L. plantarum* が最も多く分離され、分離菌株数の約 80%を占めた。その他の菌種について、*Staphylococcus warneri* 以外は過去の研究でも阿波晩茶から分離された^{2) 3) 6) 7)}。 *Secundilactobacillus collinoides* や *Paucilactobacillus suebicus*, *Loigolactobacillus coryniformis*, *Levilactobacillus brevis* は乳酸桿菌で、このうち *L. coryniformis* はタイの後発酵茶ミャンから、*L. brevis* はミャンと石鎚黒茶からも検出されている^{8) 9)}。 *Klebsiella pneumoniae* はグラム陰性桿菌で、石鎚黒茶からも検出されている¹⁰⁾。また、10%塩化ナトリウム添加 MRS 寒天平板で分離された *S. warneri* はヒトの皮膚の常在菌で¹¹⁾、作業者の手を介して混入したものと考えられる。三好市からは *L. brevis* が分離されたが、この菌種は過去にも三好市の阿波晩茶から分離されている。*L. brevis* は石鎚黒茶の嫌気発酵後茶葉から *L. plantarum* の次に多く分離されると報告されており⁸⁾、石鎚黒茶と三好市の阿波晩茶の乳酸菌叢は似ている可能性がある。

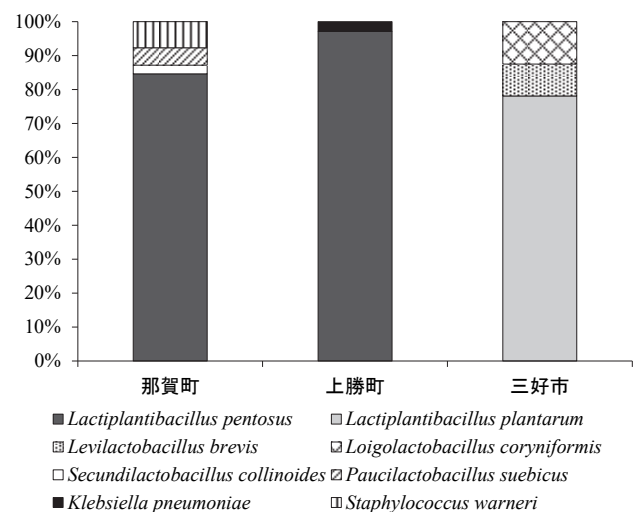


図 1 各製造地域から分離された菌種の割合

表 2 各生産者から分離された菌種

生産者	A		B	C	D	E	F	G	
地域	那賀町		那賀町	那賀町	上勝町	上勝町	三好市	三好市	
分離年	2022	2023	2022	2022	2022	2022	2022	2022	2023
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	12	1	8	12	11	11	—	—	—
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	—	—	—	—	—	—	11	13	1
<i>Levilactobacillus brevis</i>	—	—	—	—	—	—	—	3	—
<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	—	—	—	—	—	—	2	2	—
<i>Secundilactobacillus collinoides</i>	1	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Paucilactobacillus suebicus</i>	2	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—	—	—	—	1	—	—	—	—
<i>Staphylococcus warneri</i> *	—	—	—	3	—	—	—	—	—

—: 検出せず

*: 分離培地は10%塩化ナトリウム添加MRS寒天平板

3・2 *L. pentosus* と *L. plantarum* のタイピング

阿波晩茶から分離した *L. pentosus* と *L. plantarum* について、IR Biotyper の測定結果で主成分分析を行った (図 2)。どちらの菌種もおおよそ生産者ごとにグルーピングされた。*L. pentosus* については、那賀町の生産者 A, B, C から分離された菌株は左側、上勝町の生産者 D, E から分離された菌株は右側にプロットされる傾向にあった (図 2A)。*L. plantarum* についても、三好市の生産者 F, G から分離された菌株は、石鎚黒茶から分離された菌株とは異なる位置にプロットされた (図 2B)。このことから、阿波晩茶の乳酸菌は製造地域および生産者ごとに特徴があることが示唆された。

4 結言

2022, 2023 年に製造された阿波晩茶について、乳酸菌を分離して菌種を同定したところ、過去 (2018, 2019, 2020 年製造分) と同様に那賀町と上勝町は *L. pentosus* が優占種で、三好市では *L. plantarum* が優占種であることが示された。少なくとも 2018 年から、阿波晩茶の乳酸菌叢に大きな変化は無いことが考えられる。また、本研究では過去の研究^{2) 3)}とは異なる生産者からも乳酸菌を分離しており、このことが乳酸菌の地域性をさらに支持していると言えよう。

なぜ製造地域により乳酸菌の優占種が異なってくるのか、原因は未だわかっていない。*L. pentosus* と *L. plantarum* は共に *L. plantarum* グループに属し、16S rRNA 遺伝子の相同性が 99.5%以上の近縁種である¹²⁾。なお、同グループの *Lactiplantibacillus paraplanarum* は 2020 年に三好市の阿波晩茶から分離されたものの、なぜか分離頻度は少ない。阿波晩茶や石鎚黒茶から分離された *L. plantarum* について遺伝子多様性を調査した報告では、後発酵茶由来 *L. plantarum* に特有の遺伝子群は確認されなかった¹³⁾。

阿波晩茶の製法は生産者により違いはあるものの、基本的な工程は同じである。嫌気発酵の容器は木桶またはポリバケツが使用されるが、乳酸菌の優占種への影響は見られない。なお、石鎚黒茶の乳酸菌は嫌気発酵に使用する容器の材質によらず *Lactiplantibacillus* 属が優占するが、酵母の菌種には影響を与える可能性が報告されている¹⁴⁾。また、阿波晩茶と同様に嫌気発酵によりつくられるミャンは、*L. plantarum* が優占種との報告がある⁹⁾。これらから、阿波晩茶の製法が乳酸菌の地域性に影響を与えているとは考えにくい。

地理的に那賀町と上勝町は隣接しているが、三好

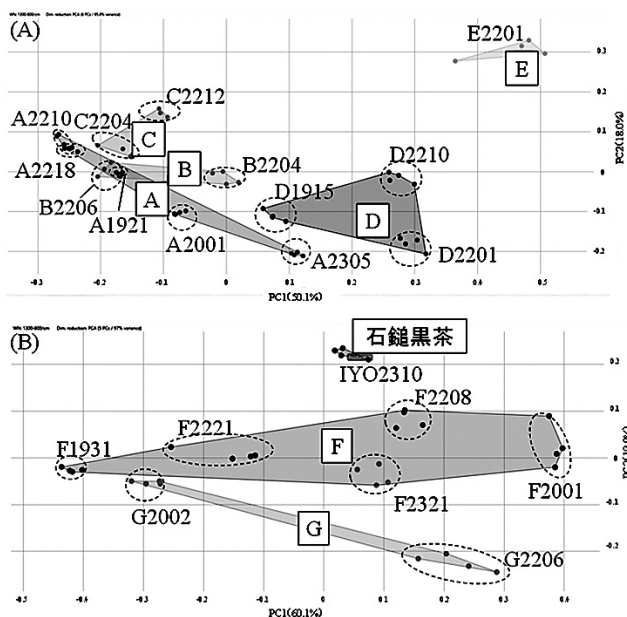


図 2 *L. pentosus* (A) と *L. plantarum* (B) の菌株タイピング

市とは直線距離で約 70 km 離れており、この間には西日本 2 位の高峰である標高 1,955 m の剣山がある。何らかの環境的要因が乳酸菌の地域性に影響している可能性もあるが、推測の域を出ない。また、優占種の境目はどこにあるのかや、他の地域で阿波晩茶を製造すると優占種が何になるのかは、非常に興味が持たれる。

そもそも阿波晩茶の乳酸菌は、どこからやってくるのだろうか。茶葉に元々生息する微生物は、茶葉を茹でる工程で耐熱性菌以外は死滅していると考えられるので、この後の工程で製造道具等から混入することが推察される。なお、著者は過去に洗浄済みの木桶や重石をスワブで拭き取り、MRS 寒天平板で乳酸菌の検出を試みたことがあるが、嫌氣的ではない環境なので、乳酸菌は検出されなかった。阿波晩茶の乳酸菌は、菌株のタイピングや *dnaK* 遺伝子に基づく系統樹から³⁾、生産者ごとに固有の菌株が生息していることが示唆されている。製造道具を含む、製造環境に生息する乳酸菌が、生産者ごとの風味の特徴に寄与していることが考えられる。今後の研究で、阿波晩茶に生息する乳酸菌について地域性の原因が究明されることが期待される。

謝辞

阿波晩茶の嫌気発酵後茶葉または発酵液をご提供頂いた岡田正子様、武市功様、中島真知子様（山城茶業組合）、松下章孝様、宮口由基子様（宮口園）、森容子様、吉田敏美様、石鎚黒茶の嫌気発酵後茶葉をご提供頂いた篠塚忍様（就労継続支援 B 型事業所 Visee）のご厚意に感謝いたします。

また、試料の採集にご協力頂いた西部総合県民局農林水産部三好庁舎にし阿波ブランド推進担当の近藤誠志主任（現在：東部農林水産局吉野川庁舎農業支援担当）、川村泰史主席（現在：農業大学校）、実験の一部を遂行して頂いた徳島県立工業技術センター食品・応用生物担当の十川誠研究員に感謝いたします。

参考文献

1) 徳島県民環境部スポーツ・文化局文化資源活用課編。「阿波晩茶製造技術」調査報告書。徳島県、

2020, 371p.

2) Nishioka, H., Mizuno, T., Iwahashi, H. and Horie, M. “Changes in lactic acid bacteria and components of Awa-bancha by anaerobic fermentation”. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2020, Vol. 84, No. 9, p. 1921-1935.

3) Nishioka, H., Ohno, T., Iwahashi, H. and Horie, M. “Diversity of lactic acid bacteria involved in the fermentation of Awa-bancha”. *Microbes Environ.*, 2021, Vol. 36, No. 4, ME21029.

4) Torriani, S., Felis, G. E. and Dellaglio, F. “Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers”. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, Vol. 67, No. 8, p. 3450-3454.

5) Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons, 1991, 370p.

6) 岡田早苗, 高橋尚人, 小原直弘, 内村泰, 小崎道雄. “阿波晩茶の発酵に関する微生物”. *日食科工学会誌*, 1996, Vol. 43, No. 1, p. 12-20.

7) 内野昌孝, 小山翔大, 高野克己. “徳島県産後発酵茶「阿波番茶」の微生物とポリフェノールについて”. *日本食品保蔵科学会誌*, 2020, Vol. 46, No. 2, p. 63-69.

8) Horie, M., Tada, A., Kanamoto, N., Tamai, T., Fukuda, N., Sugino, S., Toyotome, T. and Tabei, Y. “Evaluation of lactic acid bacteria and component change during fermentation of Ishizuchi-kurocha”. *J. Food Process. Preserv.*, 2019, Vol. 43, No. 11, e14186.

9) Chaikaew, S., Baipong, S., Sone, T., Kanpiengjai, A., Chui-Chai, N., Asano, K. and Khanongnuch, C. “Diversity of lactic acid bacteria from Miang, a traditional fermented tea leaf in northern Thailand and their tannin-tolerant ability in tea extract”. *Journal of Microbiology*, 2017, Vol. 55, No. 9, p. 720-729.

10) 水野智文, 岩橋均, 堀江祐範. “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*, 2020, Vol. 19, No. 1, p. 46-52.

11) Kloos, W. E. and Schleifer, K. H. “Isolation and

Characterization of Staphylococci from Human Skin II. Descriptions of Four New Species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*". International journal of systematic bacteriology, 1975, Vol. 25, No. 1, p. 62-79.

1 2) 遠藤明仁. “乳酸菌の分類・同定法の変遷と *Lactobacillus* 属再分類の動き”. 日本乳酸菌学会誌, 2020, Vol. 31, No. 1, p. 3-9.

1 3) Sato, K., Ikagawa, Y., Niwa, R., Nishioka, H., Horie,

M. and Iwahashi, H. “Genome Sequencing Unveils Nomadic Traits of *Lactiplantibacillus plantarum* in Japanese Post-Fermented Tea”. Curr. Microbiol., 2024, Vol. 81, 52.

1 4) 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, 2024, Vol. 23, No. 1, p. 19-33.