

徳島県三好市で生産される茶葉の微生物相解析

—徳島県内産阿波番茶茶葉微生物との比較—

環境微生物班（徳島生物学会）

佐藤 高則^{1*} 藤井 美月² 荒井 誠司² 駒原 大樹² 武田 万稀² 長谷川 愛²
中恵真理子³ 秋吉 研二³

要旨：阿波番茶は徳島県内でのみ生産され、上勝町および那賀町の阿波番茶より単離培養された細菌では *Lactobacillus plantarum* と *Klebsiella pneumoniae* が主要な細菌との報告もあるが、三好市産茶葉の微生物相についてはこれまで報告がない。そこで本研究では、徳島県三好市で生産される阿波番茶および非発酵番茶中の微生物相について知見を得るために、徳島県内産発酵茶13種および非発酵茶2種の茶葉微生物のクローンライブリー法による16S rRNA遺伝子の解析を行い、他の県内産阿波番茶のものと比較検討を行った。

その結果、10種の県内産阿波番茶由来細菌としては、3種の *Lactobacillus* 属細菌および *Leuconostoc* 属細菌などの乳酸菌や *Klebsiella pneumoniae* が主に検出された。一方、三好市産非発酵茶2種では乳酸菌群は検出されなかったが、3種の三好市産発酵茶では *Lactococcus* 属、2種の *Lactobacillus* 属、3種の *Klebsiella* 属、および *Acetobacter* 属細菌などが検出され、他の県内産茶葉試料とは異なる特徴が見られた。

キーワード：阿波番茶、クローンライブリー、16S rRNA遺伝子、乳酸菌

1. はじめに

東アジアでは、中国をはじめ台湾、韓国などで様々な発酵茶が存在する。発酵茶には、微生物による発酵茶（後発酵茶）と茶葉の酸化酵素による発酵茶（強発酵茶、半発酵茶）が存在し、前者の代表的なものとして *Aspergillus* 属、 *Penicillium* 属、 *Eurotium* 属などのカビ等で発酵するプーアール茶（黒茶）が、後者では紅茶（強発酵茶）やウーロン茶（半発酵茶）がそれぞれ挙げられる（梶田、1992；郭ら、2004）。このうち前者の微生物発酵による後発酵茶は日本にも存在し、特に四国地方には碁石茶、石鎚黒茶、阿波番茶などの発酵茶が複数存在する（宮川ら、1989）。碁石茶は高知県大豊町で生産される微生物発酵茶で、蒸した茶葉をカビ付けし、その後桶に漬け込み発酵させ乾燥させたものであり、主要な微生物として *Aspergillus fumigatus* および *Lactobacillus plantarum* が報告されている（小谷、1991；田村ら、1994；

岡田ら、1996）。また石鎚黒茶は愛媛県西条市小松町で製造される後発酵茶で、蒸した茶葉を桶に詰めカビ付けを10日ほど行った後、さらに漬け込みを行うものである。石鎚黒茶に存在する微生物として *Mucor* 属のカビおよび *Lactobacillus* 属細菌の存在が示唆されている（宮川ら、1989；田村ら、1994）。こうした発酵茶を製造、飲用する地域は日本でも珍しく、その微生物相や含まれる成分と機能などに関して、種々検討がなされている（Horieら、2016）。

本研究対象の阿波番茶は徳島県内でのみ生産される微生物後発酵茶であり、その製法は、茶葉を煮て揉捏し、石で重しをして桶で漬け込むことで嫌気的に発酵させるものである。阿波番茶の主な生産地としては、上勝町や那賀町相生地区が挙げられる（南、1975；宮川ら、1989）。過去の知見において、上勝町や那賀町の阿波番茶より単離培養された細菌としては、*Lactobacillus plantarum* と *Klebsiella pneumoniae* が主要な細菌であり、これらが発酵過

1 徳島大学大学院社会産業理工学研究部理工学域 2 徳島大学総合科学部 3 徳島大学大学院総合科学教育部

* 〒770-8506 徳島市南常三島町2-1 徳島大学理工学部生物化学研究室 tsatoh@tokushima-u.ac.jp

程に関与しているとの報告がある（岡田ら, 1996）。一方、徳島県内で茶の主要な生産地として三好市があり、三好市においても発酵茶および非発酵茶が生産されているが、三好市産発酵茶や非発酵茶茶葉の微生物相に関する報告はこれまでない。そこで本研究では、これまで知見のない徳島県西部の三好市で生産される3種の後発酵茶（阿波番茶）および2種の非発酵番茶中の微生物相について知見を得るために、各茶葉洗浄液に含まれる細菌の16S rRNA遺伝子を用いたクローンライブラリー法による解析を行い、上勝町、那賀町など徳島県内で生産された10種の阿波番茶茶葉の微生物相と比較検討を行った。

2. 実験方法

1) 阿波番茶および非発酵番茶試料

本研究で用いた阿波番茶（後発酵茶）および非発酵茶茶葉は、2016年1月から2017年3月の期間に、市販商品を購入または個人より入手した。三好市以外で生産された阿波番茶茶葉試料は、試料A, E, F, Gが上勝町産、試料B, C, Dが那賀町相生産、試料Mが神山町産、試料J, Lが徳島県内産のものを用いた。三好市産の阿波番茶試料は、試料HおよびSCが三好市山城町産、HIBが三好市東祖谷で生産されたものである。一方、三好市産の非発酵番茶は、試料IBが三好市東祖谷産、BBが三好市山城町産の市販商品を購入し、実験に使用した。表1に試料として用いた茶葉の概要を、図1に各茶葉試料の写真を示す。

表1 本研究で用いた阿波番茶および非発酵番茶試料と分析したクローン数

試料名	生産地	分類	入手時期	入手方法	茶葉試料(g)	分析したクローン数
A	上勝町	発酵茶	2016年1月	個人供与	0.864	16
B	那賀町相生	発酵茶	2016年1月	個人供与	0.820	17
C	那賀町相生	発酵茶	2016年1月	商品購入	0.802	18
D	那賀町相生	発酵茶	2016年3月	商品購入	0.765	19
E	上勝町	発酵茶	2016年6月	個人供与	0.761	23
F	上勝町	発酵茶	2016年10月	個人供与	0.924	18
G	上勝町	発酵茶	2017年3月	商品購入	1.30	24
H	三好市山城町	発酵茶	2017年3月	商品購入	1.15	23
SC	三好市山城町	発酵茶	2017年1月	商品購入	1.35	22
HIB	三好市東祖谷	発酵茶	2017年3月	個人供与	0.900	15
J	徳島県内	発酵茶	2017年3月	商品購入	1.15	15
L	徳島県内	発酵茶	2017年3月	商品購入	1.05	16
M	神山町	発酵茶	2017年3月	商品購入	1.30	16
IB	三好市東祖谷	非発酵茶	2017年1月	商品購入	1.33	25
BB	三好市山城町	非発酵茶	2017年2月	商品購入	1.20	25
					合計	292

2) 発酵茶および非発酵茶茶葉中の細菌由来16S rRNA遺伝子のクローンライブラリー作製と塩基配列解析

まず、13種の発酵茶（A - H, J, L, M, SC, HIB）および2種の非発酵茶（IB, BB）の茶葉試料（図1）より、表1に示した重量の茶葉を無菌的に採取し、10mLのTE緩衝液（1 mM EDTAを含む10mM Tris-HCl 緩衝液（pH8.0））で茶葉を30°C、1時間振とうして洗浄した。茶葉洗浄液を静置後、その上澄みを遠心分離（15,000rpm、5分、室温）し、沈殿を回収した。この沈殿よりWizard SV genomic DNA purification kit (Promega) を用いて、茶葉洗浄液に含まれる細菌の全ゲノムDNAを調製した。その後、Beffaらの方法（Beffaら, 1996）を参考に、*E.coli* 16S rRNA遺伝子の11–26位に相当するUpper primer : 5'-ATTCTAGAGTTGATCATGGCTCA-3'

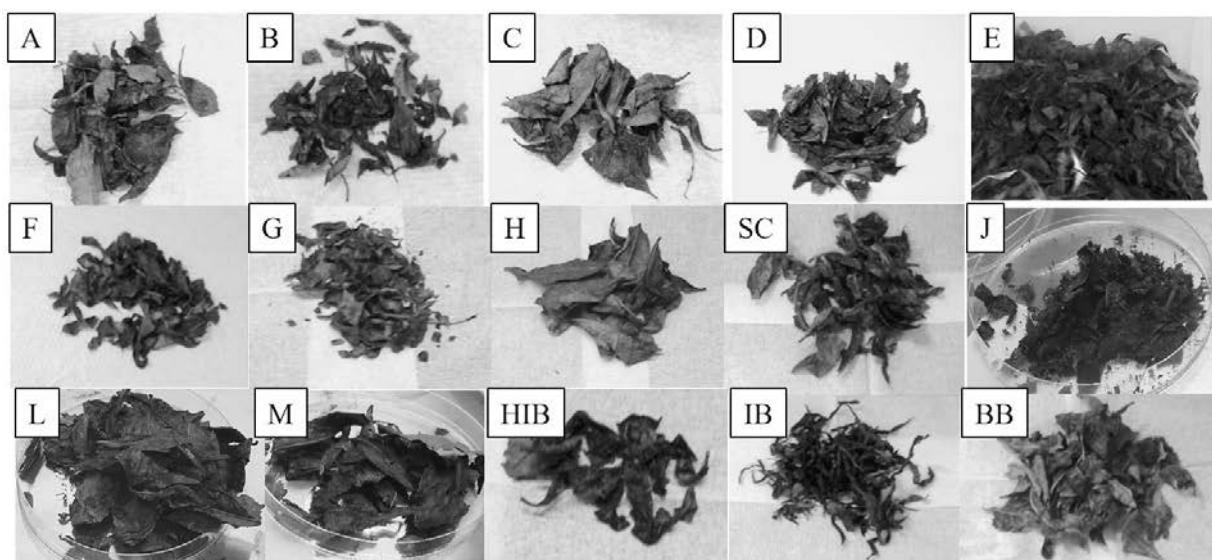


図1 本研究で用いた阿波番茶および非発酵番茶茶葉試料
各茶葉試料名は表1に対応し、IBおよびBBのみ非発酵番茶である。

(24mer, Tm=53°C) およびE.coli 16S rRNA遺伝子の1393-1411位に相当するLower primer: 5'-ATGGTACCGTGTGACGGCGGTG TGTA-3' (27mer, Tm=67°C) を用いて、得られたゲノムDNAを錆型にして、ASTEC社製PC707サーマルサイクラーによりPCRを行った。PCRプログラムは、98°Cで10秒間DNAを変性させ、55°Cで60秒間primerをアニーリングし、72°Cで90秒間DNA鎖の伸長を行うサイクルを30サイクル繰り返した。得られたPCR産物をpGEM-Tベクター (Promega社製) に挿入し、各茶葉試料細菌由来16S rRNA遺伝子のクローンライブラリーを作製した。表1に示したように、各茶葉試料につき16~25クローン（計292クローン）を、ABI社製310 Genetic analyzerでDNA塩基配列決定を行った。解析可能であった約1300bpについて塩基配列をNCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) のblastnプログラムでDNA塩基配列データベースと照合し、各茶葉に含まれる細菌の推定を行なった。一方、塩基配列の相同性解析はDDBJ (DNA Data Bank of Japan) のClustal W ver.2.1プログラム (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) を用い、系統樹の作成・解析はTreeViewプログラムによりNJ (Neighbor joining method) 法により行なった。その際、乳酸菌群の解析にはBacillus subtilis (枯草菌) を、Klebsiella属細菌の解析にはE.coliの16S rRNA遺伝子の塩基配列をそれぞれOutgroupとして用い、Bootstrap値の計算を1000回行ない、結果を進化距離として表した。

3. 実験結果

1) 発酵茶および非発酵茶茶葉細菌由来16S rRNA遺伝子のPCRによる増幅とクローンライブラリー作製

上記2.で述べたように、13種の発酵茶 (A - H, J, L, M, SC, HIB) および2種の非発酵茶 (IB, BB) の茶葉試料をTE緩衝液で洗浄し、各茶葉中の細菌の全ゲノムDNAを調製した。次に、これらを錆型としてE.coli 16S rRNA遺伝子に相同的なprimerを用いてPCRを行った。PCR産物のアガロースゲル電気泳動の結果を図2に示す。茶葉に細菌が含まれていれば、細菌は16S rRNA遺伝子を有するため、PCRでこの遺伝子が増幅される。図2の結果より、検討した15種の茶葉洗浄液すべてにおいて、細菌の16S rRNA遺伝子の長さに相当する約1.5kbpのPCR増幅

断片が見られたため、各茶葉における細菌の存在が明らかとなった。そこで、これらの細菌の同定を行うために、16S rRNA遺伝子と推定されるPCR増幅産物を精製後、pGEM-T vectorに挿入したクローンライブラリーを作製した。各茶葉試料由来の得られたクローン（計292クローン）よりプラスミドDNAを調製し、M13 forwardおよびM13 reverseシークエンスプライマーを用いて、クローニングした各16S rRNA遺伝子の塩基配列 (1300-1500bp) を決定した。

2) 10種の徳島県内産発酵茶（阿波番茶）茶葉の16S rRNA遺伝子解析による細菌の同定

徳島県内で生産された発酵茶（阿波番茶）10種（試料A, B, C, D, E, F, G, J, L, M）について、上記1) で決定した塩基配列のうち、PCRプライマーの塩基配列を除いた塩基配列データを、NCBI BLASTのblastnプログラムでDNAの塩基配列データベースと照合し、茶葉に存在する細菌の同定を行なった（表3）。

その結果、試料AではStaphylococcus属細菌が最も多く（10クローン）、その他Paenibacillus属、Bosea属、Burkholderia属細菌や（相同性99.5%以上）、乳酸菌の一種であるLactobacillus vaccinostercusと相同的なクローン（A12）が1クローン検出された（相

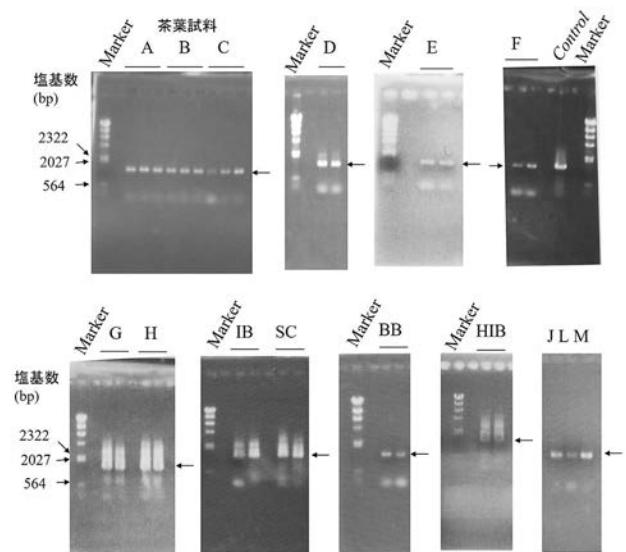


図2 阿波番茶および非発酵茶茶葉由来細菌の16S rRNA遺伝子のPCR増幅

阿波番茶および非発酵茶茶葉洗浄液に含まれる細菌のゲノムDNAを錆型とし、E.coli 16S rRNA遺伝子に相補的なprimerおよびTakara ExTaq DNA polymeraseを用いてPCRを行った。このうち反応液10μlを電気泳動に用いた。PCR産物（矢印）を切り出し後、pGEM-Tベクターに挿入し、DNA塩基配列を決定した。M1は分子量マーカー（λ/Hind III）であり、Controlは約1500bpのPCR産物であり、予想されるPCR産物は1300-1500bpである。

同性99.6%)。試料Bでは*Burkholderia*属細菌が最も多く検出され(7クローン, 相同性99.6–99.8%), 試料A同様, *Staphylococcus*属(相同性99.4–99.6%), *Bosea*属(同98.5–99.1%)も見られた。これらの細菌に加え, *Brevundimonas*属(相同性99.8–99.9%), *Propionibacterium*属(同100%), *Anaerococcus*属(同99.4%), *Veillonella*属(同99.6%), *Streptomyces*属細菌(同99.8%)が見られ, 乳酸菌は検出されなかった。試料Cでは*Staphylococcus*属, *Escherichia*属, *Rahnella*属細菌が4クローンずつ検出され(相同性99.3–100%), *Streptomyces*属(同99.5–99.9%), *Paenibacillus*属細菌(同99.6%)も見られた。また乳酸菌の一種である*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dex-*

*tranicum*に相同的なクローン(C52)が1クローン検出された(同99.4%)。試料Dは試料A~Cと異なり, 乳酸菌である*Lactobacillus*属細菌が優占種であり(14クローン, 相同性99.5–100%), 岡田ら(岡田ら, 1996)が報告している*Klebsiella pneumoniae*(同99.5–99.9%)も3クローン検出された。試料Eでは, *Klebsiella pneumoniae*が5クローン(相同性99.5–99.9%), *Lactobacillus*属細菌が4クローン検出され(同97.5–100%), その他*Staphylococcus*属, *Propionibacterium*属, *Bosea*属, *Geobacillus*属, *Brevundimonas*属細菌などが見られた(同99.2–100%)。試料Fでは*Staphylococcus*属および*Sphingomonas*属細菌がそれぞれ4クローンずつ見られ(相同性99.6

表2 16S rRNA遺伝子解析による10種の徳島県内産阿波番茶茶葉の細菌種の同定

Identified species	Obtained clones	Accession number	Homology (%)	Identified species	Obtained clones	Accession number	Homology (%)				
Awa Bancha A (Kamikatsu)											
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	10	HG941660, LN998078	99.5–100	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	CP004406	99.9				
<i>Paenibacillus campinasensis</i>	2	FN429977	99.6	<i>Peptoniphilus harei</i>	1	NR_026358	99.8				
<i>Lactobacillus vaccinostercus</i>	1	NR_114978	99.6	<i>Edaphobacter sp.</i>	1	KY434001	100				
<i>Bosea thiooxidans</i>	1	AJ250800	99.6	<i>Methylolovatilis lusitanum</i>	1	EU741086	99.5				
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	AY741338	99.7	<i>Methylovatilis discipulorum</i>	1	NR_136516	99.3				
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	1	KU248349	98.7	<i>Brevundimonas diminuta</i>	1	GU397389	99.9				
Awa Bancha B (Naka, Aioi)											
<i>Burkholderia cepacia</i>	7	AB114607	99.6–99.8	<i>Sphingomonas urinicola</i>	4	NR_04082	99.7–100				
<i>Bosea thiooxidans</i>	2	AJ250800	98.5–99.1	<i>Corynebacterium sp.</i>	1	KY593177	100				
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	LN998078	99.4–99.6	<i>Rahnella aquatilis</i>	1	JX86052	99.9				
<i>Brevundimonas diminuta</i>	2	GU397389	99.8–99.9	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4	KY347702, HG941660	99.6–99.9				
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	KF933807	100	<i>Escherichia coli</i>	1	CP017100	99.7				
<i>Anaerococcus sp.</i>	1	EF419420	99.4	<i>Uncultured proteobacterium</i>	1	JF703299	98.0				
<i>Veillonella sp.</i>	1	HM596287	99.6	Awa Bancha G (Kamikatsu)							
<i>Streptomyces blastmyceticus</i>	1	NR_043357	99.8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	CP022143, CP021757, CP022023, CP022127	99.4–99.8				
Awa Bancha C (Naka, Aioi)											
<i>Rahnella aquatilis</i>	4	JX860521	99.3–99.6	<i>Lactobacillus vaccinostercus</i>	5	NR_114978, AB218793	99.8				
<i>Escherichia coli</i>	4	CP014348, CP012127, CP014272, AP012030	99.6–99.7	<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	2	LC065033	99.9				
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	4	LN998078	99.8–100	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3	KY203670, CP020564	98.9–99.7				
<i>Streptomyces blastmyceticus</i>	1	FJ799187	99.5	<i>Comamonas terrigena</i>	2	M184229, KP895478	99.4–99.9				
<i>Streptomyces cinnamoneus</i> subsp. <i>Albosporus</i>	1	EF654100	99.9	<i>Pseudomonas putida</i>	2	AF094744, MF455219	99.6–99.9				
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	1	LC096223	99.4	<i>Pseudomonas geniculata</i>	1	KC934806	99.3				
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	KJ571204	99.9	<i>Roseburia faecis</i>	1	AY804150	93.5				
<i>Bosea thiooxidans</i>	1	AJ250800	99.5	<i>Acetobacter surrathaniensis</i>	1	NR_146709	99.8				
<i>Paenibacillus campinasensis</i>	1	DQ232773	99.6	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	1	AB680037	99.9				
Awa Bancha D (Naka, Aioi)											
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	7	KU551238	99.5–100	Awa Bancha J (Tokushima)							
<i>Lactobacillus fermentum</i>	7	KT159934, AB362625, KT159935	98.7–99.9	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	2	CP017713	99.6–99.7				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	KF933767, KR905686	99.5–99.9	<i>Lactobacillus collinoides</i>	1	LC062900	100				
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	AB114607	99.6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	CP026743	99.4–99.6				
<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	1	CP003938	99.3	<i>Lactobacillus vaccinostercus</i>	1	AB218793	99.5				
Awa Bancha E (Kamikatsu)											
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	CP004406	100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	CP014123, CP025211, CP024038	99.5–99.7				
<i>Lactobacillus vaccinostercus</i>	3	AB218793	97.5–99.5	<i>Klebsiella variicola</i>	1	CP013985	99.6				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	KY347730, CP011313, CP014294, CP017385, CP019772	99.5–99.9	<i>Methylovatilis discipulorum</i>	1	NR_136516	99.7				
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	KF933802	99.9	<i>Sphingobium xanthum</i>	1	NR_133860	97.2				
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	1	KU248349	99.4	<i>Unidentified bacterium</i>	1	AF234686	91.9				
<i>Bosea thiooxidans</i>	2	AJ250800	99.5	Awa Bancha L (Tokushima)							
<i>Finegoldia magna</i>	3	AP008971, NR_113383	99.6	<i>Lactobacillus fermentum</i>	6	LT906621, AP017973	99.2–99.8				
<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	1	KC494325	99.9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	4	CP026743, CP020861	91.4–99.8				
<i>Brevundimonas diminuta</i>	1	GU397389	100	<i>Methylovatilis discipulorum</i>	3	NR_136516	92.7–99.6				
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	5	KY347702, CP013911, HG941660	99.2–99.9	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1	CP027365	99.5				
Awa Bancha M (Kamiyama)											
<i>Lactobacillus plantarum</i>	12	CP026743	94.8–99.8								
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	CP02514	99.5–99.9								
<i>Sphingomonas koreensis</i>	1	KC329837	99.0								
<i>Methylovatilis discipulorum</i>	1	NR_136516	99.4								

*表に示したAccession Numberは、本研究で解析した細菌の16S rRNA遺伝子の塩基配列データが、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) などのDNAデータベース上で最も一致するものを示した。

–100%), 他の試料とは異なる *Peptoniphilus* 属, *Edaphobacter* 属, *Methylobacterium* 属, *Methylover-satilis* 属細菌も 1 クローンずつ検出された (同99.3–100%)。試料 G は *Klebsiella pneumoniae* が 6 クローン (相同性99.4–99.8%), *Lactobacillus* 属細菌が10 クローン (相同性98.9–99.9%) 検出され, これらが優占種であった。その他 *Pseudomonas* 属, *Acetobacter* 属細菌は, 徳島県内産試料ではこの試料 G のみで検出された (相同性99.3–99.9%)。試料 J では, *Lactobacillus* 属細菌 (相同性99.4–100%) および *Klebsiella* 属細菌 (相同性99.5–99.7%) がそれぞれ 6 クローンずつ検出され, これらが優占種であった。試料 L では, *Lactobacillus* 属細菌が優占種 (10 クローン, 相同性91.4–99.8%) であり, 他試料でも見られた *Methylover-satilis* 属細菌も 3 クローン検出された (同92.7–99.6%)。最後に試料 M では *Lactobacillus plantarum* が 12 クローンと優占種であり (相同性94.8–99.8%), 他に *Klebsiella pneumoniae* が 2 クローン見られた (同99.5–99.9%)。以上より徳島県内産阿波番茶では, 特に試料 D, G, J, L, Mにおいて, 乳酸菌である *Lactobacillus* 属細菌や, 発酵に関与が示唆されている *Klebsiella* 属細菌が多く検出された。また阿波番茶10種で見られた乳酸菌において, 岡田らが報告している *Lactobacillus plantarum* に加え (岡田ら, 1996), 本研究の解析により *Lactobacillus vaccinostercus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus collinoides*, *Leuconostoc mesenteroides* の存在が新たに示唆された。

3) 三好市産発酵茶（阿波番茶）および非発酵茶茶葉の16S rRNA遺伝子解析による細菌の同定

これまで報告のない三好市で生産された 3 種の発酵茶（試料 H, SC, HIB）および 2 種の非発酵茶（番茶, 試料 BB および IB）茶葉に存在する細菌相について, 上記と同様に得られた各クローンの 16S rRNA 遺伝子の塩基配列データを, NCBI BLAST の blastn プログラムで DNA の塩基配列データベースと照合し, 各茶葉に存在する細菌の同定を行い, 上記 2) の徳島県内で生産された発酵茶（阿波番茶）茶葉の細菌と比較検討した（表 3）。

まず三好市産発酵茶 3 種の茶葉の細菌同定の結果, 試料 H では他の阿波番茶試料ではほとんど検出されなかった *Acetobacter* 属細菌 (相同性93.6–99.2%) が 15 クローンと優占種であり, また *Klebsiella* 属細菌も 3 クローン検出された (相同性99.4–99.8%)。さらに *Gluconacetobacter* 属, *Comamonas* 属, *Sphingobium* 属, *Sphingobacterium* 属細菌など (相同性99.4–99.7%), 他の阿波番茶では見られない細菌が多く検出された。試料 HIB では, *Lactobacillus* 属細菌と *Klebsiella* 属細菌 (両者とも相同性99.6–99.9%) のみが検出され, *Lactobacillus vaccinostercus* (8 クローン) および *Klebsiella pneumoniae* (5 クローン) が優占種であった。また試料 SC では, *Lactobacillus* 属細菌 (13 クローン, 相同性94.2–99.9%) が優占種であり, その他 *Klebsiella* 属細菌 (4 クローン, 同94.2–99.9%), *Enterobacter* 属細菌 (3 クローン, 同

表 3 16S rRNA遺伝子解析による三好市産発酵茶および非発酵茶茶葉の細菌種の同定

Identified species	Obtained clones	Accession number	Homology (%)
Awa Bancha H (Yamashiro, fermented)			
<i>Acetobacter ghanensis</i>	14	LC103255	98.9-99.2
<i>Acetobacter peroxydans</i>	1	NR_113554	93.6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	CP015134	99.4-99.6
<i>Klebsiella varicola</i>	1	CP017289	99.8
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	1	LC103264	99.6
<i>Comamonas terrigena</i>	2	AM184229	99.6
<i>Sphingobacterium yanoikuyae</i>	1	KX507119	99.7
<i>Sphingobacterium multivorarum</i>	1	AB680559	99.4
Awa Bancha HIB (Higashi-Iya, fermented)			
<i>Lactobacillus vaccinostercus</i>	8	AB218793	99.6-99.9
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	CP026743	99.9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	CP018671, CP026751, CP027160, CP025140, CP025140	99.6-99.9
<i>Klebsiella varicola</i>	1	CP009274	99.6
Awa Bancha SC (Yamashiro, fermented)			
<i>Lactobacillus plantarum</i>	13	CP019722, CP013753, CP002222, KJ921812	94.2-99.9
<i>Lactococcus lactis</i>	1	KU291415	99.9
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	CP017928, CP020358, JN644535	94.2-99.6
<i>Klebsiella varicola</i>	1	CP017289	99.9
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	CP014280, KMS17773	99.3-99.6
<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	1	CP003938	99.3
IB (Higashi-Iya, non-fermented)			
<i>Acidovorax wautersii</i>	1	NR_109656	99.9
<i>Escherichia coli</i>	1	LT795502	99.8
<i>Pseudomonas lutea</i>	1	AB495128	99.8
<i>Chryseobacterium camelliae</i>	1	NR_133724	99.7
<i>Herbaspirillum sp.</i>	1	KP743003	99.7
<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	1	AB695722	99.5
<i>Bosseia sp.</i>	1	LC133745	99.5
<i>Sphingomonas pseudosanguinii</i>	1	HE716953	99.3
<i>Hymenobacter metalli</i>	1	NR_1088905	97.3
<i>Uncultured bacterium clone</i>	1	JF048640	97.2
<i>Camellia sinensis var. sinensis chloroplast</i>	15	KJ806281	99.7-100
BB (Yamashiro, non-fermented)			
<i>Enterobacter ludwigii</i>	1	KC355281	100
<i>Brachybacterium sp.</i>	1	AB617574	99.8
<i>Brevibacterium maritimum</i>	1	NR_042586	99.7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	CP020463	99.6
<i>Brevibacterium sp.</i>	1	DQ910839	99.6
<i>Bosseia thiooxidans</i>	1	AJ25080	99.5
<i>Brevibacterium linens</i>	1	CP017150	98.2
<i>Methylobacterium oxidans</i>	1	AB695685	95.8
<i>Camellia sinensis var. sinensis chloroplast</i>	17	KJ806281	99.5-100

*表中の Accession Number は、表 2 と同様に示した。

99.3–99.6%）などが見られた。さらに、乳酸菌の一種である *Lactococcus lactis*（相同性99.9%）や *Klebsiella oxytoca*（相同性94.2–99.6%）は、解析した全試料のうち試料SCのみで検出された。

一方、三好市産非発酵茶（番茶）の細菌については、BB、IBとも乳酸菌や *Klebsiella* 属細菌は検出されず、ほとんどが茶葉葉緑体由来の塩基配列 (*Camellia sinensis* var. *sinensis* chloroplast) を持つクローンであった (IB, 15クローン; BB, 17クローン)。また非発酵茶茶葉の細菌については、IBでは *Acidovorax* 属、*Escherichia* 属、*Pseudomonas* 属、*Chryseobacterium* 属、*Herbaspirillum* 属、*Methylobacterium* 属、*Bosea* 属、*Sphingomonas* 属細菌などが検出され（相同性99.3–99.9%），一方BBでは、*Enterobacter* 属、*Brachybacterium* 属、*Brevibacterium* 属、*Staphylococcus* 属、*Bosea* 属細菌などが検出された（相同性

98.2–100%）。これらのIBおよびBBの細菌群は、乳酸菌がほとんど見られなかった県内産阿波番茶茶葉（試料fなど）の細菌種と類似していた。

4) 発酵茶（阿波番茶）茶葉の16S rRNA遺伝子解析による乳酸菌群の系統解析

上記の結果より、徳島県内および三好市で生産された発酵茶（阿波番茶試料A, C, D, E, F, G, J, L, M, SC, HIB）には、これまで報告された *Lactobacillus plantarum* 以外の乳酸菌である *Lactobacillus* 属、*Lactococcus* 属、および *Leuconostoc* 属細菌の存在が示唆された。そこで、表4に本研究で検出された乳酸菌由来クローン一覧をまとめた。さらに各阿波番茶に存在する乳酸菌の系統関係を検討するため、表4の決定した16S rRNA遺伝子の塩基配列 (1151~1402bp) について、DDBJのClustal W ver2.1を用いて多重アライメント解析および系統樹

表4 阿波番茶茶葉における乳酸菌由来クローンの16S rRNA遺伝子解析

Samples			Identified bacteria				Samples			Identified bacteria			
Clones	Length (bp)	Accession number*	Identified species	Length (bp) in database	Accession number	Homology (%)	Clones	Length (bp)	Accession number*	Identified species	Length (bp) in database	Accession number	Homology (%)
Awa Bancha A (Kamikatsu)							Awa Bancha L (Tokushima)						
A12	1401	LC317917	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1553	NR_114978	99.6	L42	1397	LC379401	<i>Lb. fermentum</i>	1569	LT906621	100
Awa Bancha C (Naka, Aioi)							L39	1399	LC379398	<i>Lb. fermentum</i>	1573	AP017973	99.8
C52	1378	LC317949	<i>Le. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	1493	LC096223	99.4	L45	1398	LC379403	<i>Lb. fermentum</i>	1569	LT906621	99.7
Awa Bancha D (Naka, Aioi)							L32	1400	LC379392	<i>Lb. fermentum</i>	1569	LT906621	99.4
D1	1390	LC317960	<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	1528	KU551238	100	L43	1398	LC379402	<i>Lb. fermentum</i>	1569	LT906621	99.4
D15	1389	LC317970	<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	1528	KU551238	99.7	L38	1399	LC379397	<i>Lb. fermentum</i>	1569	LT906621	99.2
D2	1390	LC317961	<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	1528	KU551238	99.6	L34	1389	LC379393	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	99.8
D3	1390	LC317962	<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	1528	KU551238	99.6	L40	1387	LC379399	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	99.6
D6	1390	LC317965	<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	1528	KU551238	99.6	L37	1389	LC379396	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP020861	99.6
D18	1390	LC317973	<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	1528	KU551238	99.6	L47	1392	LC380666	<i>Lb. plantarum</i>	1528	KU551231	91.4
D14	1389	LC317969	<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	1528	KU551238	99.5	Awa Bancha M (Kamiyama)						
D16	1399	LC317971	<i>Lb. fermentum</i>	1524	KT159934	99.9	M4	1388	LC379406	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	100
D10	1398	LC317967	<i>Lb. fermentum</i>	1524	KT159934	99.7	M9	1389	LC379408	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	99.8
D19	1398	LC317974	<i>Lb. fermentum</i>	1533	KT159935	99.7	M53	1384	LC380668	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	99.8
D20	1399	LC317975	<i>Lb. fermentum</i>	1533	KT159935	99.6	M15	1388	LC379409	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	99.7
D22	1399	LC317977	<i>Lb. fermentum</i>	1533	KT159935	99.4	M37	1389	LC379415	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	99.6
D23	1398	LC317978	<i>Lb. fermentum</i>	1533	KT159935	99.1	M51	1388	LC379419	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	99.6
D13	1399	LC317968	<i>Lb. fermentum</i>	1569	AB362625	98.7	M5	1387	LC379407	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	99.6
Awa Bancha E (Kamikatsu)							M39	1390	LC379416	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP023772	99.6
E1	1399	LC318161	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1569	AB218793	99.5	M28	1392	LC379411	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	99.5
E29	1398	LC318164	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1569	AB218793	99.4	M29	1388	LC379412	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	99.4
E13	1396	LC318163	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1569	AB218793	97.5	M49	1389	LC379418	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	99.4
E2	1388	LC318162	<i>Lb. plantarum</i>	1390	CP004406	99.8	M44	1402	LC380667	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP023174	94.8
Awa Bancha F (Kamikatsu)							Awa Bancha SC (Yamashiro)						
F53	1389	LC318174	<i>Lb. plantarum</i>	1390	CP004406	99.9	SC37	1390	LC318267	<i>Lb. plantarum</i>	1390	CP013753	99.9
Awa Bancha G (Kamikatsu)							SC60	1390	LC318272	<i>Lb. plantarum</i>	1390	CP019722	99.9
G7	1398	LC318191	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1553	NR114978	99.7	SC49	1390	LC318270	<i>Lb. plantarum</i>	1390	CP019722	99.8
G30	1397	LC318204	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1569	AB218793	99.6	SC18	1390	LC318266	<i>Lb. plantarum</i>	1390	CP019722	99.8
G32	1394	LC318205	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1553	NR114978	99.3	SC1	1390	LC318262	<i>Lb. plantarum</i>	1390	CP019722	99.8
G12	1399	LC318195	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1569	AB218793	98.7	SC52	1388	LC318271	<i>Lb. plantarum</i>	1390	CP019722	99.7
G53	1401	LC318212	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1569	AB218793	98.4	SC3	1390	LC318263	<i>Lb. plantarum</i>	1390	CP019722	99.7
G15	1391	LC318197	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	1513	LC065033	99.9	SC22	1386	LC318273	<i>Lb. plantarum</i>	1390	CP019722	99.6
G23	1391	LC318201	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	1513	LC065033	99.9	SC6	1390	LC318264	<i>Lb. plantarum</i>	1390	CP019722	99.5
G22	1388	LC318200	<i>Lb. plantarum</i>	1502	KY20367	99.7	SC9	1390	LC318265	<i>Lb. plantarum</i>	1390	CP019722	99.5
G25	1388	LC318203	<i>Lb. plantarum</i>	1502	KY20367	98.6	SC43	1390	LC318269	<i>Lb. plantarum</i>	1390	CP019722	99.4
G47	1390	LC318211	<i>Lb. plantarum</i>	1502	CP020564	98.6	SC42	1388	LC318268	<i>Lb. plantarum</i> subsp. <i>coryniformis</i>	1390	CP002222	99.7
Awa Bancha J (Tokushima)							SC10	1151	LC318275	<i>Lb. plantarum</i>	1412	KJ921812	94.2
J7	1389	LC379380	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	1579	CP017713	99.7	SC35	1371	LC318274	<i>Lc. lactis</i>	1492	KU291415	99.9
J2	1388	LC379379	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	1579	CP017713	99.6	Awa Bancha HIB (Higashi-Iya)						
J20	1388	LC379388	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	99.6	HIB3	1399	LC379268	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1569	AB218793	99.9
J110	1388	LC380665	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	99.4	HIB18	1399	LC379274	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1569	AB218793	99.8
J11	1388	LC379383	<i>Lb. collinoides</i>	1485	LC062900	100	HIB1	1399	LC379266	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1569	AB218793	99.7
J109	1400	LC379390	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1569	AB218793	99.5	HIB11	1402	LC379271	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1553	NR114978	99.7
							HIB17	1398	LC379273	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1569	AB218793	99.7
							HIB19	1399	LC379275	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1569	AB218793	99.7
							HIB23	1399	LC379278	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1569	AB218793	99.7
							HIB6	1398	LC379269	<i>Lb. vaccinostercus</i>	1569	AB218793	99.6
							HIB21	1391	LC379277	<i>Lb. plantarum</i>	1576	CP026743	99.9

略記号 : *Lb.* : *Lactobacillus*, *Lc.* : *Lactococcus*, *Le.* : *Leuconostoc*

*表に示した各クローンの16SrRNA遺伝子の塩基配列データは、試料欄に示したAccession Numberにより、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録されている。

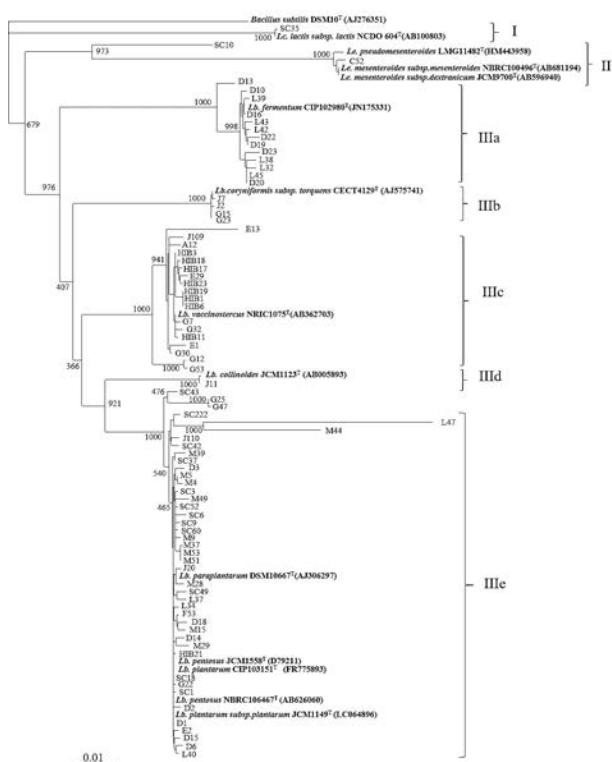


図3 阿波番茶茶葉由来クローネの16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく系統樹(近接結合(NJ)法)

図中の数字は1000回計算のBootstrap値を、バーは1%の塩基配列の相違をそれぞれ示す。Outgroupは、*Bacillus subtilis*の16S rRNA遺伝子の塩基配列(AJ276351)を使用した。

細菌グループ；I : *Lactococcus* sp. (Lc.), II : *Leuconostoc* sp. (Le.), III : *Lactobacillus* sp. (Lb.)

による系統解析を行なった(図3)。その結果、徳島県内で生産された阿波番茶茶葉には、3属(*Lactococcus*属、*Leuconostoc*属、*Lactobacillus*属)の乳酸菌群の存在が示唆された。*Lactococcus*属細菌(図3グループI)は三好市産試料SCでのみ検出され、*Lactococcus lactis*と99.9%塩基配列が一致した。また*Leuconostoc*属細菌(図3グループII)は那賀町相生産試料Cでのみ検出され、*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*と99.4%一致した。この2属の乳酸菌は田村ら(1994)および岡田ら(1996)の阿波番茶中の微生物に関する報告には含まれておらず、本研究で新たに阿波番茶茶葉での存在が示唆された。一方、最も多く見られたのは*Lactobacillus*属細菌(図3グループIII)で、徳島県産試料A, D, E, F, G, J, L, M, および三好市産試料SC, HIBにおいて計80クローネ検出された(表4)。さらに図3の系統解析の結果より、*Lactobacillus*属細菌は5サブグループ(図3グループIIIa-IIIe)に分類され、それぞれ*Lactobacillus* (*Lb.*) *fermentum*(図3グループIIIa), *Lb. coryniformis* subsp. *coryni-*

表5 阿波番茶茶葉における*Klebsiella*属細菌由来クローネの16S rRNA遺伝子解析

Samples	Identified bacteria			
	Clones	Length (bp)	Accession number*	Homology (%)
Awa Bancha D (Naka, Atoi)				
D8	1364	LC317966	<i>K. pneumoniae</i>	1501 KF933767 99.9
D17	1366	LC317972	<i>K. pneumoniae</i>	1476 KR05686 99.6
D21	1365	LC317976	<i>K. pneumoniae</i>	1501 KF933767 99.5
Awa Bancha E (Kamikatsu)				
E26	1364	LC318159	<i>K. pneumoniae</i>	1364 CP017385 99.9
E8	1362	LC318157	<i>K. pneumoniae</i>	1475 KY347730 99.6
E15	1362	LC318158	<i>K. pneumoniae</i>	1364 CP014294 99.6
E30	1364	LC318160	<i>K. pneumoniae</i>	1364 CP019772 99.9
			<i>subsp. pneumoniae</i>	
E11	1366	LC318150	<i>K. pneumoniae</i>	1364 CP011313 99.5
			<i>subsp. pneumoniae</i>	
Awa Bancha G (Kamikatsu)				
G11	1363	LC318194	<i>K. pneumoniae</i>	1363 CP022023 99.8
G6	1365	LC318190	<i>K. pneumoniae</i>	1365 CP022143 99.7
G14	1364	LC318196	<i>K. pneumoniae</i>	1363 CP021757 99.7
G8	1363	LC318192	<i>K. pneumoniae</i>	1363 CP021757 99.6
G43	1364	LC318209	<i>K. pneumoniae</i>	1364 CP022127 99.6
G24	1402	LC318202	<i>K. pneumoniae</i>	1402 CP022127 99.4
Awa Bancha J (Tokushima)				
J17	1364	LC379385	<i>K. pneumoniae</i>	1554 CP024038 99.7
J16	1366	LC379384	<i>K. pneumoniae</i>	1550 CP014123 99.6
J218	1362	LC379391	<i>K. pneumoniae</i>	1550 CP014123 99.6
J8	1366	LC379381	<i>K. pneumoniae</i>	1550 CP014123 99.5
J10	1366	LC379382	<i>K. pneumoniae</i>	1550 CP025211 99.5
J22	1362	LC379389	<i>K. variicola</i>	1554 CP013985 99.6
Awa Bancha M (Kamiyama)				
M42	1364	LC379417	<i>K. pneumoniae</i>	1550 CP025140 99.9
M24	1367	LC379410	<i>K. pneumoniae</i>	1550 CP025140 99.5
Awa Bancha H (Yamashiro)				
H43	1366	LC318230	<i>K. pneumoniae</i>	1364 CP015134 99.6
H32	1360	LC318225	<i>K. pneumoniae</i>	1364 CP015134 99.4
H4	1363	LC318213	<i>K. variicola</i>	1359 CP017289 99.8
Awa Bancha SC (Yamashiro)				
SC204	1363	LC318261	<i>K. variicola</i>	1364 CP017289 99.9
SC13	1363	LC318258	<i>K. oxytoca</i>	1402 CP017928 99.6
SC39	1364	LC318259	<i>K. oxytoca</i>	1364 CP020358 98.7
SC40	1363	LC318260	<i>K. oxytoca</i>	1412 JN644535 94.2
Awa Bancha HIB (Higashi-Iya)				
HIB20	1364	LC379276	<i>K. pneumoniae</i>	1528 CP027160 99.9
HIB22	1364	LC380664	<i>K. pneumoniae</i>	1550 CP025140 99.8
HIB2	1364	LC379267	<i>K. pneumoniae</i>	1554 CP018671 99.6
HIB8	1364	LC379270	<i>K. pneumoniae</i>	1554 CP018671 99.6
HIB16	1366	LC379272	<i>K. pneumoniae</i>	1550 CP026751 99.6
HIB24	1364	LC379279	<i>K. variicola</i>	1555 CP009274 99.6

略記号；K: *Klebsiella* *表に示した各クローネの16S rRNA遺伝子の塩基配列データは、試料欄に示したAccession Numberにより、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録されている。

formis(同IIIb), *Lb. vaccinostercus*(同IIIc), *Lb. collinoides*(同IIId), *Lb. plantarum/pentosus*(同IIIe)と相同なクローネが多数見られた。サブグループIIIaは徳島県内産試料DおよびLのみ、IIIbは県内産試料JおよびGのみ、サブグループIIIdは試料Jのみでそれぞれ見られたことから、これらは各阿波番茶に特異的に存在している可能性が考えられる。さらにサブグループIIIcは試料A, E, G, J, HIBで見られ、上勝町産試料および今回検討した三好市産試料HIBで多く検出された。一方、グループIIIeは*Lb. plantarum/pentosus*について、田村ら(1994)および岡田ら(1996)もその存在を報告しており、IIIeは検討した発酵茶13種のうち8種(D, E, F, G, J, M, SC, HIB)より検出され、特に試料D, M, SCでは優占種として存在していることが示唆された。以上より本研究で検討した結果、阿波番茶茶葉にはIIIa, IIIb, IIIc, IIIdに分類される*Lactobacillus*属細菌の存在が新たに明らかになった。

5) 発酵茶（阿波番茶）茶葉の16S rRNA遺伝子 解析による*Klebsiella*属細菌の系統解析

これまでの検討により、徳島県で生産される阿波番茶茶葉の細菌相、特に乳酸菌群の系統分類上の特徴について述べてきた。上記1.で触れたが、四国の発酵茶のうち阿波番茶と石鎚黒茶の発酵の過程において、乳酸菌とともに寄与していると考えられているのが*Klebsiella*属細菌である（田村ら、1994、岡田ら、1996）。*Klebsiella*属細菌を含む発酵食品は珍しく、その細菌の機能や生産物質に関する注目が集まっている（Tamang, 2016）。そこで本研究において検討したクローニングのうち*Klebsiella*属細菌（表5）の系統関係を検討するため、各16S rRNA遺伝子の塩基配列（1360～1402bp）を、DDBJのClustal W ver 2.1を用いて多重アライメント解析および系統樹による系統解析を行なった（図4）。

その結果、検討した阿波番茶茶葉には少なくとも3種の*Klebsiella*属細菌（図4 グループI～III）が存在していると推定された。グループIは*Klebsiella oxytoca*で（図4 グループI）、三好市産試料SCのSC13、SC39、SC40の塩基配列は最も*Klebsiella oxytoca*に類似していた（表5）。ただし、SC39は98.7%、SC40は94.2%と類似性は低く、SC13のみが99.6%と高い相同意を示したことから、茶葉試料内で種間に相違があるものと推定される。一方、グループIIの*Klebsiella pneumoniae*はこれまで報告があり、本研究においても、県内産試料D、E、G、J、Mや三好市産試料H、HIB由来の計28クローニングが*Klebsiella pneumoniae*に高い相同意を示した（99.4～99.9%）。また、クローニング間の塩基配列の相違も1%以内とサブグループII内では高い類似性が見られた。さらにグループIIの中には、第3のグループとして*Klebsiella variicola*に類似したクローニング（J22、SC204）が含まれており（図4 グループIII）、三好市産茶葉試料（H、SC、HIB）では3種の*Klebsiella*属細菌の存在が示唆された。一方、県内産茶葉試料ではグループIの*Klebsiella oxytoca*に相同的なクローニングは検出されず、*Klebsiella variicola*も1クローニング（J22）のみであったことから、*Klebsiella pneumoniae*が主要な細菌であると考えられる。

4. まとめ

本研究では、徳島県三好市で生産される阿波番茶および非発酵番茶中の微生物相について知見を得る

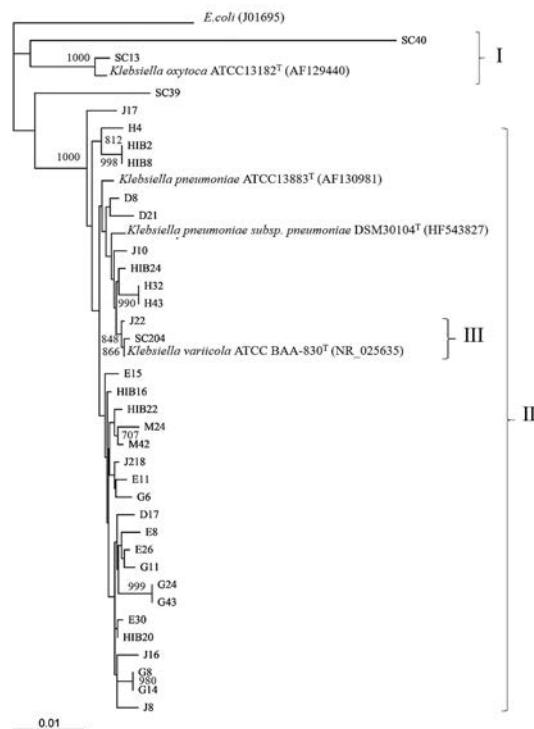


図4 阿波番茶茶葉の*Klebsiella*属細菌由来クローニングの16S rRNA遺伝子塩基配列に基づく系統樹（近接結合（NJ）法）

図中の数字は1000回計算のBootstrap値を、バーは1%の塩基配列の相違をそれぞれ示す。Outgroupは、*E.coli*の16S rRNA遺伝子の塩基配列（J01695）を使用した。

細菌グループ；I : *K. oxytoca*, II : *K. pneumoniae*, III : *K. variicola*

ために、徳島県内産発酵茶（阿波番茶）13種および非発酵茶（番茶）2種の茶葉微生物のクローニング法による16S rRNA遺伝子の解析を行い、他の県内産阿波番茶のものと比較検討を行った。

その結果、県内産阿波番茶茶葉由来細菌の特徴としては、乳酸菌群として3属（*Lactococcus*属、*Leuconostoc*属、*Lactobacillus*属）の存在が挙げられる。このうち、*Lactococcus*属細菌（図3 グループI）は三好市産試料SCでのみ検出され、*Leuconostoc*属細菌（図3 グループII）は那賀町相生産試料Cでのみ見られた。さらに、最も多く検出された*Lactobacillus*（Lb.）属細菌はさらに5サブグループ（図3 グループIIIa～IIIe）に分類され、*Lb. fermentum*、*Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis*、*Lb. vaccinostercus*、*Lb. collinoides*、*Lb. plantarum*/pentosusを含むことが明らかとなった。このうち、三好市産発酵茶試料（H、SC、HIB）では特に*Lb. plantarum*または*Lb. vaccinostercus*が優占種であった。

以上より、*Lactococcus*属、*Leuconostoc*属、および*Lactobacillus*属細菌のうち4種（*Lb. fermentum*、*Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis*、*Lb. vaccinostercus*）

tercus, Lb. collinoides) については、田村ら (1994) および岡田ら (1996) の阿波番茶中の微生物に関する報告には含まれておらず、本研究で新たに阿波番茶茶葉での存在が示唆された。乳酸菌群は26属に分類され、*Lactococcus*属はL-乳酸を生成するホモ発酵型球菌、*Leuconostoc*属はD-乳酸などを生成するヘテロ発酵型球菌である。前者は主に乳製品に、後者は漬物などに含まれる (中川ら、2001, 辨野, 2011)。一方*Lactobacillus*属は乳酸菌の中で最も種類が多く、ホモ発酵型 (乳酸のみ生成) もしくはヘテロ発酵型 (乳酸、エタノール、酢酸、CO₂などを生成) 桿菌であり、多くの乳製品や発酵食品から見つかっている (中川ら、2001, 麻植ら、2014, Tamangら、2016)。遠藤らの分類に従うと、本研究で見出した5種の*Lactobacillus*属細菌は、*Lb. plantarum*と*Lb. collinoides*が*Lb. plantarum*グループ、*Lb. fermentum*が*Lb. reuteri*グループ、*Lb. coryniformis*と*Lb. vaccinostercus*はその他となっている (遠藤ら、2008)。これらはグループにより発酵過程や生成物が異なるため、発酵茶に含まれる乳酸菌と生成物の関係、そしてプロバイオティクスなど保健効果などについては大変興味深く、今後検討する必要がある。

一方、もう一つの主要な細菌の*Klebsiella*属細菌については、三好市産茶葉試料 (H, SC, HIB) では3種の*Klebsiella*属細菌 (*Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*) の存在が示唆され、特に試料SCでは*Klebsiella pneumoniae*に相同なクローニは見つからず、残り2種の*Klebsiella*属細菌のみであった。一方、三好市以外の県内産茶葉試料では*Klebsiella oxytoca*に相同なクローニは検出されず、*Klebsiella variicola*も1クローニのみであったことから、*Klebsiella pneumoniae*が主要な細菌であると考えられる。Drancourtらによると、グラム陰性桿菌である*Klebsiella*属細菌は大きく3つのクラスターに分けられ、*Klebsiella pneumoniae*はクラスターI、*Klebsiella oxytoca*はクラスターIIIに属する (Drancourtら、2001)。これらは生育温度や炭素源として利用可能な糖の種類が異なり、また岡田らは阿波番茶の*Klebsiella pneumoniae*が発酵によりアルコールを生成すると報告している (岡田ら、1996)。一方*Klebsiella variicola*は、2004年にRosenbluethらにより系統的に*Klebsiella pneumoniae*と異なる新種として提唱され、adonitolは非発酵/rhamnose発酵性と報告されている (Rosenbluethら、

2004)。以上の*Klebsiella*属細菌について、これまで報告のない*Klebsiella oxytoca*および*Klebsiella variicola*が三好市産阿波番茶茶葉に含まれる可能性を本研究で初めて見出した。*Klebsiella*属細菌と生成物、阿波番茶の成分への寄与などについても、今後検討する必要がある。

一方非発酵茶である番茶茶葉試料 (BB, IB) では、茶葉の揉捻作業より茶葉が傷つけられるが、阿波番茶のように発酵工程がないため、茶葉中の葉緑体 (*Camellia sinensis* var. *sinensis* chloroplast) に起因する16S rRNA遺伝子クローニが多数検出された。検出されたクローニ数は少ないものの、細菌としては*Acidovorax*属、*Methyllobacterium*属、*Pseudomonas*属、*Sphingomonas*属などの細菌が茶葉に付着していることが示唆された (表3)。これらの細菌の一部は発酵茶茶葉試料の一部でも検出されており (表2)、茶の栽培土壤中や茶の根にも見られる細菌であることから (Gulatiら、2011, Liら、2016,) 検討した試料においても茶の栽培土壤由来の細菌が検出されたものと推定される。これらの細菌は茶の土壤からの炭素や窒素利用に寄与しており、土壤中の細菌叢が安定した茶の栽培や収量等に影響を与えると考えられる (Gulatiら、2011)。そのため本研究の細菌に関する知見は、三好市で栽培される茶の栽培土壤の維持管理につながると期待される。

最後に、茶の栽培は中山間地域や山間部で行われるため、栽培農家の後継者育成が問題となっており、また阿波番茶の製造者も減少しているため、次世代に栽培、製造法や茶の文化をどのように継承するかが課題となっている。2018年現在、国の文化審議会は、四国で伝承されている発酵茶の製造技術を記録作成等の措置を講ずべき無形の民俗文化財に選択するよう答申している。このような状況から、現在製造されている阿波番茶茶葉の微生物相に関する知見を文献として記録しておくことは重要であり、意義深いと考えられる。ただし、本研究で検討した徳島県内産阿波番茶でも、発酵性微生物が見られない、もしくは少ないものもあったため、阿波番茶製品の微生物検査などを行えれば、阿波番茶の品質管理や品質保持に役立つものと思われる。また本稿で報告した潜在的に存在する微生物について、培養条件を適切に設定して微生物株の探索・単離を行い、得られた菌株の系統保存なども今後必要であろう。

参考文献

- Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P.F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J.L., Aragno, M. (1996) Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 degrees C) . *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 5, 1723–1727.
- 辨野義己 (2011) プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能, モダンメディア, 57, 10, 277–287.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., Rousselier, P. (2001) Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornitholytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 925–932.
- 遠藤明仁, Dicks, L.M.T (2008) *Lactobacillus*属乳酸菌の分類と非典型的な特徴, *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria*, 19, 3, 152–159.
- Gulati, A., Sood, S., Rahi, P., Thakur, R., Chauhan, S., Chadha, I.C. (2011) Diversity Analysis of Diazotrophic Bacteria Associated with the Roots of Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), *J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 6, 545–555.
- Horie, M., Nara, K., Sugino, S., Umeno, A., Yoshida, Y. (2016) Comparison of antioxidant activities among four kinds of Japanese traditional fermented tea, *Food Sci. Nutr.*, 5, 639–645.
- 梶田武俊 (1992) お茶の話, 調理科学, 25, 51–59.
- 郭斐飛, 呂毅, 駱少君, 坂田完三 (2004) 黒茶—微生物発酵を取り入れた茶, 日本食品科学工学会誌, 51, 323–331.
- 小谷隆 (1991) 墓石茶の発酵微生物に関する研究, 墓女子短期大学紀要, 26, 15–23.
- Li, Y. C., Li, Z., Li, Z. W., Jiang, Y. H., Weng, B. Q., Lin, W. X. (2016) Variations of rhizosphere bacterial communities in tea (*Camellia sinensis* L.) continuous cropping soil by high-throughput pyrosequencing approach, *J. Appl. Microbiol.*, 121, 787–799.
- 南廣子 (1975) 地方茶の研究(1) 徳島県丹生谷地方の阿波番茶について, 名古屋女子大学紀要, 21, 51–57.
- 宮川金二郎, 大坪藤代, 片渕きょう子 (1989) 日本の後醸酵茶, 日本家政学会誌, 40, 545–551.
- 中川弘, 水野竹美, 清水隆浩, 金子旬一, 角野政弥, 伊藤武, 坂井千三, 寺田厚 (2001) 漬物の乳酸菌叢に関する検討, *Jpn. J. Food Microbiol.*, 18, 2, 61–66.
- Oe, Y., Abe, M., Endoh, Y., Sakata, M., Zesem, I., Janlav, M., Ohashi, M., Satoh, T. (2014) Phylogenetic analysis of bacteria from Mongolian animal milks and their dairy products by clone library method, *Natural Science Research*, 28, 4, 31–40.
- 岡田早苗, 高橋尚人, 小原直弘, 内村泰, 小崎道雄 (1996) 阿波晩茶の発酵に関する微生物, 日本食品科学工学会誌, 43, 1019–1027.
- Rosenblueth, M., Martinez, L., Romero, E. M. (2004) *Klebsiella variicola*, A Novel Species with Clinical and Plant-Associated Isolates, *System. Appl. Microbiol.*, 27, 27–35.
- Tamang, J. P., Shin, D. H., Jung, S. J., Chae, S. W. (2016) Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–13.
- 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, 1095–1101.

Comparison of Bacterial Diversity among the Awa Bancha Tea Leaves Produced at Miyoshi City and Tokushima Prefecture
SATOH Takanori*, FUJII Mitsuaki, ARAI Seiji, KOMAHARA Daiki, TAKEDA Maki, HASEGAWA Ai, NAKAE Mariko and AKIYOSHI Kenji

* Laboratory of Biochemistry, Faculty of Science and Technology, 2-1 Minamijosanjimacho, Tokushima 770-8506, JAPAN

Proceedings of Awagakkai, No.62 (2019), pp.179–188.