碁石茶の発酵に關与する微生物†

岡田早苗*・高橋尚人**・小原直弘***

内村 泰***・小崎道雄****

Microorganisms in Fermentation of *Goishi-cha*, Japanese Fermented Tea Leaves

(Microorganisms Involving in the Fermentation of
Japanese Fermented Tea Leaves Part II)

Sanae OKADA*, Naoto TAKAHASHI**, Naohiro OHARA***,
Tai UCHIMURA*** and Michio KOZAKI****

* Culture Collection Center, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1,
Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156

** Department of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156
(Present : Kagome Co. Ltd., Research Institute, Nishitomiya 17,
Nishinasuno-machi, Nasu-gun, Tochigi 329)

*** Department of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156

**** Showa Women's University, Graduate School, 1-7, Taishido,
Setagaya-ku, Tokyo 154

Goishi-cha is a local tea produced in Kochi prefecture in Japan. The drinking tea prepared from it contains abundant lactic acid. Two processes of natural fermentation by molds and lactic acid bacteria participate on the procedure of *Goishi-cha* production. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. and *Scopulariopsis brevicaulis* were identified from molded tea leaves. Lactic acid bacteria isolated from fermenting broth containing tea leaves tightly packed in a tub was only *Lactobacillus plantarum*. *A. fumigatus*, one of the molds appeared on molded tea leaves, possessed the activity to disintegrate a filter paper. Then it was considered that tea leaves are wounded by *A. fumigatus*, and nutrients leaked from their cells are utilized by lactic acid bacteria in the following fermentation.

(Received Feb. 26, 1996)

高知県大豊町に碁石茶¹⁾²⁾と呼ばれる独特の地方茶がある。碁石茶も前報³⁾で報告した阿波晩茶と同様に微生物

物による発酵過程がある。

摘まれた茶葉を蒸煮(阿波晩茶では「煮沸」)して熱を

† 日本産微生物発酵茶に關与する微生物 (第2報)

* 東京農業大学菌株保存室 (〒156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)

** 東京農業大学農芸化学科 (〒156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)
現在, カゴメ(株)総合研究所 (〒329 栃木県那須郡西那須野町西富山 17)

*** 東京農業大学農芸化学科 (〒156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)

**** 昭和女子大学大学院 (〒154 東京都世田谷区太子堂 1-7)

通し、それを冷ました後 25~30 cm の厚さに堆積して、上からむしろをかけて 7 日間ほど放置する。この工程の後、茶葉を桶に詰め込む。詰め込む際には、茶葉を蒸煮したときにできた蒸し汁（茶葉中を通り抜けた水蒸気が途中で凝縮還流し、褐色になった液体）を茶葉が覆われるまで注入し、重石で 7 日から 10 日間発酵させる。発酵後、茶葉を桶から取り出し、一辺が 40~50 mm、厚さが 5~10 mm のやや厚みを持った四角形に裁断され、夏の強い天日で乾燥して製品にされる (Fig. 1)。製品は褐色をした茶葉の塊である。茶葉の塊に湯を通し飲用とされたり、茶粥のための茶として利用される¹⁾。この茶湯には緑茶や紅茶と比較して有機酸が多く、特に乳酸含有量が高いこと（100 ml の茶湯中に乳酸 272.9 mg）⁴⁾が、阿波晩茶と並び本茶の特徴であろう。

著者らは 1982 年に事前調査をし、碁石茶ができあがるまでに微生物が関与する工程として、茶葉の堆積期間、その間の蒸し汁の放置期間、および桶中での発酵期間であることを確認した⁵⁾。すなわち、堆積している間の茶葉には多くのカビが増殖し、放置されていた蒸し汁や桶中での発酵期間には乳酸菌が主体に認められた。本報では、それぞれの工程に関与している微生物の分離同

定を詳細に行うとともに、特に放置されている間の蒸煮液および桶に詰め込まれ発酵が行われている 7 日間前後の微生物の遷移を明らかにした。また、碁石茶の製造では、桶に漬け込む前に茶葉を堆積してカビを増殖させる点が阿波晩茶の製造方法と大きく異なることから、カビの役割を調べることも併せ行った。さらに茶葉を蒸煮してできた褐色の蒸し汁とともに茶葉を桶に漬け込み、発酵が進行する中で、そこに関与する微生物の種類などにも興味がある。本報告では以上の点を重点に調べ、碁石茶の製造に関わる微生物相を明らかにしたので報告する。

実験方法

1. 試料採取

試料採取は 1985 年 7 月に高知県大豊町 O 氏宅で 9 日間にわたって実施した。試料として、堆積中のカビが増殖している茶葉、その間放置されている蒸し汁および桶中の漬け込み液を採取した。漬け込み液の採取は桶上面より約 20 cm 下の液体をピペットを用い採取した。

2. 成分分析

放置されている蒸し汁と桶中の漬け込み液に含まれる

Fig. 1 Procedure for the preparation of Goishi-cha

* Mushi-jiru : drain liquid remained after steaming tea leaves.

還元糖、総アミノ酸、2, 3-ブタンジオール、およびエタノールを、経過に従って分析した。除タンニンや分析方法は前報告³⁾に従った。

3. 微生物の分離培地

乳酸菌、グラム陰性菌、酵母、カビを対象に分離を行った。各分離培地の組成は前報告³⁾に従った。

4. 生菌数の測定および分離

放置されていた蒸し汁および漬け込み液中の乳酸菌、グラム陰性菌、酵母、カビについては前報告³⁾に示した方法の通りに行った。また、堆積中の茶葉からのカビの分離は、次のように行った。茶葉1から2gを50 mlの滅菌生理食塩水にて良く攪拌し懸濁液を作成した。懸濁液調製後は、前報告³⁾に示した方法に従い、カビの菌数測定および分離を行った。

5. 分離株の同定

乳酸菌および酵母の同定は前報告³⁾に従った。

カビの同定にはジャイアントコロニーの形状・形態観察とスライド培養法による顕微鏡観察によった。YM寒天平板培地 (glucose 10 g, yeast extract (Difco) 3 g, peptone 5 g, malt extract (Difco) 3 g, agar 15 g, water 1 000 ml, pH 6.0) を直径 90 mm のペトリ皿に作成し、その上にジャイアントコロニーを形成させた。培養は 25℃ で 7 日から 9 日間行った。培養後、ジャイアントコロニーの表面および裏面の性状、色調、水滴の有無とその量、培地の色調変化などについて観察した。一方、スライド培養は常法に従い、YM寒天培地 (上記と同組成) を用い、25℃ で 2 日から 3 日間培養を行った。

顕微鏡観察では、菌糸の隔壁 (septum) の有無、孢子囊 (sporangium) / 孢子頭 (conidial head) のいずれかの確認とその形態、頂囊 (vesicle) の形態などについて観察をした。得られた観察判定結果を菌類図鑑 (上・下)⁶⁾ と照合しながら菌種の同定を行った。

6. 濾紙崩壊試験

供試カビのジャイアントコロニーより 1 白金耳の胞子を探り、作成した濾紙崩壊試験用培地に接種し、30℃ で 2 週間振とう培養した。判定は、経時的に濾紙片の形状を観察した。濾紙崩壊試験用培地⁷⁾ は、(NH₄)₂ SO₄ 1.4 g, KH₂PO₄ 2.0 g, Urea 0.3 g, MgSO₄·7H₂O 0.3 g, FeSO₄·7H₂O 5.0 mg, MnSO₄·H₂O 1.6 mg, ZnSO₄·H₂O 1.4 mg, CoCl₂ 2.0 mg, Bactopeptone (Difco) 1.0 g, yeast extract (Difco) 5.0 g, Tween 80 1.0 g, 濾紙 (Whatman No. 1) (10 mm×15 mm) 1 片、蒸留水 1 000 ml, pH 3.5 である。

結 果

1. 各工程の状態観察

蒸煮後、放冷された茶葉は 50~60 cm の厚さに堆積され、7 日間放置された。24 時間目以降発熱があり 50℃ 近くまで達した。その後の温度の上昇は見られなかった。3 日目の茶葉表面にはカビの菌塊が多く見られるようになった。

一方、この間並行して屋外にて雨水が入らないように放置されていた蒸し汁は、当初 pH 5.5 であったものが 4 日後には pH 4 前後にまで低下した。この間液表面の一部に薄い皮膜が見られたが、液中からのガス発生はなかった。また放置期間最終段階の蒸し汁を直接顕微鏡観察したところ、わずかの酵母が見られたが多くのグラム陽性桿菌であった。

次に堆積された茶葉は大桶 (口径 1.2 m, 高さ 1.5 m) に蒸し汁と共に詰め込まれた。桶に落とし蓋と重石が施され 9 日間の発酵 (熟成) が行われた。漬け込み開始 1~2 日の間に漬け込み液は桶の口まで上昇し、3 日目頃からは表面に薄い菌膜の形成が見られた。また、この頃になると、阿波晩茶で観察されたほど強くはないが、桶の中心部より微弱なガス発生が見られた。発酵の終了近くなると菌膜はさらに厚くなるのが観察された。菌膜の直接顕微鏡観察では、グラム陽性細菌の他、酵母も多く見られた。

蒸し汁 (初日、5 日目) および漬け込み液 (3 日目と 9 日目) に含まれる成分の分析結果を Table 1 に示した。還元糖と総アミノ酸は蒸し汁よりも漬け込み液において多く含まれ、乳酸菌などの発酵性微生物の生育により適した環境が形成されていることが観測された。また蒸し汁や漬け込み液の経過時間中のエタノールや 2, 3-ブタンジオールは検出されず発酵性酵母や発酵性グラム陰性大型桿菌 *Klebsiella pneumoniae* (阿波晩茶で認められた³⁾) の存在はないと考えられた。

なお、乳酸の経時変化は蒸し汁や漬け込み液の黒色のために酸度滴定が不能であったことと除タンニン後の試料においても高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析が不能に陥ったため測定を断念した。

2. 生菌数の推移

茶葉の積み重ね中およびその間放置されている蒸し汁については最初の 5 日間、桶中での発酵に関しては漬け込み後 9 日間にわたり、カビ、グラム陽性菌 (乳酸菌)、グラム陰性菌、酵母の経時変化を調べ、Fig. 2 で示した。

Table 1 The time-course of the changes in components contained in broth on the fermentation of *Goishi-cha*

Constituents	Stored broth* (days)		Broth during fermentation (days)	
	0	5	3	9
Reducing sugar [mg/ml] (as glucose)	3.11	1.12	15.22	12.33
Total amino acid [mg/ml] (as glutamic acid)	0.77	0.55	10.20	9.55
2,3-butanediol [mg/ml]	0.00	0.09	0.02	0.04
Ethanol [mg/ml]	0.00	0.03	0.04	0.06
Tannin [mg/ml]	2.69	3.90	10.39	7.83

* Broth is the solution used to boil tea leaves.

Fig. 2 Changes in the microflora during fermentation on *Goishi-cha* production

(Ia), Piled tea leaves on early 5 days;

(Ib), Left *Mushi-jiru** on early 5 days. (* drain liquid yielded after steaming tea leaves.)(II), Fermented tea leaves in a big tub with left *Mushi-jiru*.

Symbols: —●—, Temperature; —▲—, pH; —○—, Gram positive bacteria; —△—, Gram negative bacteria; —□—, Yeasts; —■—, Molds

堆積中の茶葉では1日目より灰色、黒色系の外生胞子を着生したカビが増殖を始め、2日目以降菌糸が茶葉全面にはびこるようになり、カビの菌数も最大 (10^{10} 個オーダー) に達した。放置されていた蒸し汁では、初期にはグラム陰性菌が 10^6 個後半のオーダーで存在したが、その後急激に減少し、4日目以降には全く検出されなかった。グラム陰性菌に入れ替わるようにグラム陽性菌が増殖し、2~3日目には優位になり、最大 10^8 個オー

ダーに達した。酵母は24時間目には 10^5 個のオーダーに達したが、これらは産膜性酵母であり、蒸し汁表面に観察された皮膜を形成した酵母と思われる。酵母は放置期間最後まで同菌数で推移した。漬け込み桶では、グラム陽性桿菌と酵母が両者とも 10^6 個前後で推移し、終盤には乳酸菌が優勢となった。漬け込み桶ではグラム陰性菌と糸状菌は認められなかった。

3. 分離微生物株の同定

(1) 乳酸菌

放置されていた蒸し汁および漬け込み桶から採取した試料から分離した乳酸菌のコロニーは、GYP 白亜寒天培地の中程に形成し、レンズ形をしており、炭酸カルシウムを良く溶かしていた。出現したコロニーはサイズや形に違うものではなく、画一的であった。分離株 (50 株) はいずれもグラム陽性、カタラーゼ陰性の桿菌であり、コロニーや細胞形態の特徴が一致していたことから、7 株にしぼり詳細に同定し、結果を Table 2 に示した。同定株は何れも桿菌で、ホモ発酵型で乳酸を産生したことから *Lactobacillus* 属と判定した。さらに、7 株はグルコン酸またはペントースを発酵することから、*Lactobacillus* 属のうち条件的ヘテロ発酵 (facultatively heterofermentative)⁸⁾ に該当する。また何れもが中温性で DL 乳酸を生産し、発酵できる糖類の種類が多く (21 試験糖類のうち、16~19 種類を発酵している)、ペプチドグリカンタイプが DAP 型であった。条件的ヘテロ発酵の *Lactobacillus* 属菌種のうち、DAP 型ペプチドグリカンタイプを持つものは *Lactobacillus agilis*⁸⁾、*Lactobacillus maltaromicus*⁸⁾、*Lactobacillus plantarum*⁸⁾ である。これら三者のうち、生成乳酸が DL であるものは *L. plantarum* だけである。以上のことから 7 株全てを *L. plantarum* と同定した。

(2) グラム陰性菌

放置されていた蒸し汁の初期に現れたグラム陰性菌は阿波晩茶で見られたような大きいサイズの細胞はしておらず、また発酵性も持っていなかった。そこで、ここで見られたグラム陰性菌は直ちに消滅したこと、さらに本発酵にあたる桶中の漬け込み液にも認められなかったことから、グラム陰性菌は碁石茶の発酵には直接関わっていないと判断し、詳細な同定を省略した。

(3) 酵母

放置されていた蒸し汁と漬け込み液の両者から、合計 58 株の酵母を分離した。細胞形態、グルコースからのガス発生有無、皮膜形成の有無、子嚢胞子の有無及び形態、ビタミン要求性、硝酸塩資化性などを調べ、特に細胞形態と糖類の資化性の特徴から、分離株 58 株を 2 つのグループ (group I と group II) に分けた。すなわち、group I は細胞が球形または卵球形で資化できる糖類の種類 (Table 3 参照) が多い酵母 (49 株) と group II は細胞が楕円形または円筒形で資化できる糖類の種類が group I に比べて少ない酵母 (9 株) である。group I より 10 株、group II より 3 株の合計 13 株を選択した。

group I・II の酵母は蒸し汁と漬け込み桶中の両方に認められた。

選択した 13 株について詳細な同定試験を行い、group I から代表株 2 株、group II から代表株 1 株の同定結果を Table 3 に示した。group I の 10 株はつぎのような特徴を持っていた。細胞は球形または卵球形で多極出芽により増殖をした。また接合により子嚢を形成し、1 つの子嚢中に 1~2 個の球形の胞子を形成した。液体培地では皮膜を形成しながら生育をした。グルコースを微弱に発酵するものの強い発酵性ではなく、非発酵性と判断した。以上の特徴から group I の酵母を *Debaryomyces* 属⁹⁾ と判定した。つぎに "The yeasts"⁹⁾ に従い、種の同定を行った。すなわち糖類のうち、スクロース、マルトース、D-キシロースおよびエリスリトールを資化性し、さらにビタミンの要求性があったことから、これらの株全てを *Debaryomyces hansenii*⁹⁾ と同定した。group II の 3 株は、group I の酵母と同様、液体培地で皮膜を形成しながら生育をした。細胞は楕円形または円筒形で、子嚢中に 3~4 個の球形の胞子を形成した。また硝酸塩の資化性はなかった。グルコースを微弱に発酵したが、いずれも強いものではなく、非発酵性であった。これらの特徴から 3 株は *Pichia* 属と判定された。種の同定を飯塚・後藤の酵母の分類同定法¹⁰⁾ に従うと、"*Pichia polymorpha*" または "*Pichia pseudopolymorpha*" と同定される。しかし、これら両株は胞子の電子顕微鏡的特徴、キノンタイプや DNA レベルの研究などから *Debaryomyces* 属菌種とされている¹¹⁾。このことにより、group II の酵母を *Debaryomyces* 属と考え、"The yeasts"⁹⁾ に従い、種の同定を行った。その結果、スクロース、マルトース、および D-キシロースを資化し、エリスリトールは資化せず、さらにビタミンの要求性があること、そしてグルコースまたはスクロースを発酵しないか微弱に発酵する特徴を有していたことから、group I と同じく *Debaryomyces hansenii*⁹⁾ と同定した。

以上の結果から、ここで同定された酵母はいずれも産膜性で *Debaryomyces hansenii* であった。発酵性を有する酵母は認められなかった。

(4) 糸状菌 (カビ)

堆積工程の茶葉より糸状菌 20 株を分離した。ジャイアントコロニーの形態、色調、さらに胞子頭の形状により 6 タイプに分けた。それぞれより代表 1 株を選択し、各性状を Table 4 にまとめた。MG27 と MG93 の両株は菌糸に隔壁を持ち、筆状 (penicillus) に分生胞子 (con-

Table 2 Characteristics of lactic acid bacteria isolated from *Goishi-cha*

Characters	Strains						
	GS1-1	GS2-1	GF1-1	GF2-3	GF4-1	GF8-1	GF9-2
Shape	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods
Size (μm)	0.8-1.0 × 1.0-3.0	0.7-0.8 × 1.5-2.5	0.8-1.2 × 1.0-2.0	0.8-1.0 × 1.0-1.2	1.0-1.2 × 1.5-2.0	1.0-1.2 × 1.2-1.5	0.8-1.0 × 1.5-2.0
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+
Motility	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-	-
NO ₃ to NO ₂	-	-	-	-	-	-	-
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 15°C	+	+	+	+	+	+	+
45°C	-	-	-	-	-	-	-
Fermentation type	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo
Optical form of lactic acid	DL	DL+D(-)	DL	DL	DL	DL	DL
Peptidoglycan type	DAP	DAP	DAP	DAP	DAP	DAP	DAP
Fermentation of							
L-Arabinose	+	-	+	+	+	+	+
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	+
Gluconate	+	+	w	+	+	w	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	-
Mannose	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	w	-	w	w	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	-	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	-	+	-	+	+
Salicine	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	w	+	+
Melezitose	+	+	-	-	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	-	-	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-
Sugar free	-	-	-	-	-	-	-

+ : positive activity, - : negative activity, w : weak activity.

DAP : diaminopimelic acid (= A₂pm)

idial spore) を着生していた。さらに MG27 株の分生胞子の着生状態から *Scopulariopsis brevicaulis*⁶⁾ とし、また MG93 株は球形の分生胞子を有していたことから

Penicillium 属⁶⁾ としたが種の決定には至らなかった。MG 88, MG 96 および MG 99 の各株は分生胞子を着生した球形 (globose) または円筒形 (columnar) の胞子

Table 3 Characteristics of yeasts isolated from *Goishi-cha*

Characters	Isolates		
	Group I (10 strains)		Group II (3 strains)
	G-1	G-157	G-59
Shape	Sp.ov.	Sp.ov.	El.-Cy.
Pellicle	Islets	Wrinkled	Islets
Ascospore :	+	+	+
Number in ascus	1~2	1~2	3~4
Shape	Sp.	Sp.	Sp.
Fermentation of :			
Glucose	w	w	w
Galactose	—	—	—
Sucrose	—	w	—
Maltose	—	—	—
Lactose	—	—	—
Assimilation of :			
Glucose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Lactose	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+
D-Arabinose	—	—	—
D-Xylose	+	+	+
Raffinose	+	+	—
Rhamnose	+	+	—
Melibiose	+	+	—
Inositol	—	—	—
Erythritol	+	+	—
Mannitol	+	+	+
Citric acid	—	—	—
Nitrate	—	—	—
Vitamin requirement	+	+	+
Identified as :	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>

Sp.ov. : Spheroidal ovoidal, Sp. : Spheroidal, El. : Ellipoidal, Cy. : Cylindrical.

+ : Positively active, — : Negatively active, w : Weakly active.

頭 (conidial head) を持ち、いずれも *Aspergillus* 属と判定した。MG 88 および MG99 の両株は高温度 (53℃) で生育できたことから *Aspergillus fumigatus*⁶⁾ と同定した。また MG 96 株は分生胞子の色調の特徴から *Aspergillus niger*⁶⁾ と同定した。分離したカビのうち *A. fumigatus* と同定された 8 株は濾紙崩壊活性 (濾紙の繊

維の絡みつきをほぐして原形を消失させる) を有していた。

考 察

蒸煮された茶葉が約 1 週間堆積されている間、2 日目以降 50℃ 近くまで温度が上昇するのが観察された。こ

Table 4 Characteristics of molds isolated from piled tea leaves for *Goishi-cha* making

Characters	Selected strains					
	MG27	MG88	MG93	MG96	MG99	MG111
Color of colony	light brown	greenish gray	light gray	dark brown	greenish gray	grayish brown
Sporangium						round
Rhizoid						+
Septum	+	+	+	+	+	—
Conidia	+	+	+	+	+	
Conidial head	penicillus	globose	penicillus	globose	columnar	
Vesicle		round		round	cylindrical	
Growth at 53°C	—	+	—	—	+	—
Breakdown of filter paper	—	+	—	—	+	—
Total strains	2	1	4	9	2	2

Identified as: MG27=*Scopulariopsis brevicaulis*, MG88 and MG99=*Aspergillus fumigatus*, MG93=*Penicillium* sp., MG96=*Aspergillus niger*, MG111=*Syncephalatum racemosum*.

の間の茶葉表面から分離されたカビのうち、*Aspergillus fumigatus* 8 株は 53°C の高温でも生育ができ、本菌種がこの堆積段階で主に働いていると考えられた。またこれら 8 株は濾紙の原形を崩壊させる活性を有していた。この活性は茶葉細胞壁に傷を付け、栄養物に富んだ細胞内容物を放出させ、発酵微生物に栄養補給を行っていることが推察できた。阿波晩茶では桶に漬け込む前に熱を通した茶葉を機械（揉捻機）で摺り潰す工程があることと対比される点である。また *Scopulariopsis brevicaulis* は同属の完全世代である *Chaetomium* 属が高いセルロース分解活性を有するカビとして知られている⁶⁾。本研究での分離株の中にはセルロース分解活性を有する株は見出されなかったが、さらなる分離を繰り返せば分離できる可能性もある。

一方、蒸し汁が屋外に放置されていた期間に認められた乳酸菌および茶葉の漬け込み期間中の桶の中から認められた乳酸菌は、双方とも細胞壁ペプチドグリカンタイプが DAP 型である *L. plantarum* のみであった。*L. plantarum* はホモ発酵で乳酸を多量に作る菌種であり、また茶葉中のタンニンに強い耐性を持つことも明らかにされている^{13) 14)}。乳酸菌は菌数も相当数認められたことから、碁石茶熟成に関与する主要微生物であると結論した。

漬け込み桶中の発酵期間に見られた酵母は *D. hansenii* のみであった。この菌種は発酵力のない産膜性の酵母である。蒸し汁や桶の漬け込み液表面には菌膜が観察されていることから、これらの酵母の存在は十分に

考えられる。また発酵性の強い *Saccharomyces* 属酵母が認められていないことから、桶の中心部で発酵に関与していた酵母はいなかったものと結論できる。従って、ここで同定された酵母は野菜類の漬物の漬液表面にも良く見られるもので、碁石茶特有とはいえない。また阿波晩茶で認められた発酵性の強いグラム陰性大型桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)³⁾ は碁石茶の漬け込み桶から全く検出されなかった。阿波晩茶も碁石茶も桶に漬け込む工程は同じであるが、グラム陰性大型桿菌の存否は大きな違いである。

以上のことから、碁石茶の製造工程での微生物の役割は次のように考えられる。蒸煮された茶葉は *A. fumigatus* によって茶葉細胞壁が傷付けられ、栄養素に富んだ細胞内容物が漏出する。この茶葉が桶に漬け込まれると、栄養素に富んだ環境下になるとともに空気が遮断され、茶葉に含まれるタンニンによって生育が阻害を受けない *L. plantarum* が増殖をする。そして製品には乳酸が多く含まれた特有の香りを持った碁石茶ができあがると考えられる。

なお難波の論文¹⁵⁾ に、茶葉を桶に詰め込み終わると、桶の上面にビニールシートを施し、重石をして発酵させ、そしてその発酵が盛んになると重石が持ち上がるほど激しく泡を吹き上げるとの記載がある。しかし我々が調査した 1982 年および 1985 年はビニールシートの施しはなく、また激しい泡の発生も確認しなかった。同時進行させていた阿波晩茶では激しい発泡が観察されたのに対し、碁石茶ではそれがなかったことに注目し、そのこ

とを調査資料⁵⁾としてすでに報告している。また1996年1月に碁石茶製造者であるO氏に電話で取材したところ、泡を吹く年と吹かない年があるとの回答であった。従って、発泡のある微生物の存否は今後の調査で明らかにしていきたい。

要 約

(1) 碁石茶の製造の主体である発酵過程に関わっている微生物について調査した。

(2) 主要微生物として、蒸したあと堆積して放置期間に *Aspergillus* の糸状菌が現れ、特に高温度 (53°C) にも生育できる *A. fumigatus* が多く認められた。*A. fumigatus* は濾紙を崩壊させる活性を有していた。

(3) 放置されている蒸し汁および桶中の漬け液中に乳酸菌として *L. plantarum* が主に認められた。

(4) 糸状菌 *A. fumigatus* は茶葉細胞壁に傷をつける役割を持ち、*L. plantarum* は乳酸を蓄積し、製品に酸味を付与していることが考えられた。

(5) 発砲を伴う強い発酵性を有する微生物の存否については、今後調査して行く。

本研究を進めるにあたり、試料採取に御協力をいただいた高知県大豊町小笠原正春氏に深く感謝いたします。また、カビ同定に多大なる御協力をいただいた東京家政大学教授一戸正勝先生に感謝いたします。本実験に協力していただいた根本庄一、大場啓一の各諸氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 高橋克夫：四国民俗（四国民俗学会誌），12，1（1984）。

- 2) 守屋 毅：お茶のきた道，NHK ブックス（No. 398），（日本放送出版協会，東京），（1981）。
- 3) 岡田早苗・高橋尚人・小原直弘・内村 泰・小崎道雄：日本食品科学工学会誌，43，12（1996）。
- 4) 岡田早苗・小崎道雄：食品と開発，（健康新聞社），24，60（1989）。
- 5) 岡田早苗・小崎道雄：東京農業大学農学集報，27，269（1983）。
- 6) 宇田川俊一・椿 啓介・堀江義一・三浦宏一郎・箕浦久兵衛・山崎幹夫・横山竜夫・渡辺昌平：菌類図鑑（上・下），（講談社，東京），（1978）。
- 7) MURAO, S., KANAMOTO, J. and ARAI, M.: *J. Ferment. Technol.*, 57, 151（1979）。
- 8) KANDLER, O. and WEISS, N.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, eds. by SNEATH, P.H.A., et al., (The Williams and Wilkins Co., Baltimore·London·Los Angeles·Sydney), p. 1209（1986）。
- 9) KREGER-VAN RIJ, N.J.W.: *The Yeasts*, ed. by KREGER-VAN RIJ, N.J.W., (Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam), p. 130（1984）。
- 10) 飯塚 広・後藤昭二：酵母の分類同定法，第3版，（東京大学出版会，東京），p. 103（1980）。
- 11) KURTZMAN, C.P.: *The Yeasts*, ed. by KREGER-VAN RIJ, N.J.W., (Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam), p. 295（1984）。
- 12) 西山隆造：博士論文（東京農業大学）（1978）。
- 13) OKADA, S., DAENGSUBHA, W., UCHIMURA, T., OHARA, N., and KOZAKI, M., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 32, 57（1986）。
- 15) 難波敦子：日本の後発酵茶，宮川金二郎編，（さんえい出版，京都），p. 11（1994）。

（平成8年2月26日受理）