

I-2-1 竹パウダーの糠床への利用

—キュウリ糠漬け作製時の微生物菌叢の変遷について—

応用微生物学研究室 北村 義明

応用微生物学研究室 山本 直子

【目的】

埜町の竹資源の有効利用の1つとして、糠漬けの糠床に竹パウダー(伐採した竹をチップ状から粉末状に細かくしたもの)を添加することが考えられている。竹パウダーを添加することにより糠漬けの漬かりが速くなり、また、おいしくなるとも云われている。そこで一昨年度、昨年度の研究では、竹パウダーを添加した糠床を調製し、竹パウダーの添加の有無によるキュウリの糠漬け作成時の細菌叢への影響および豚肉の糠漬け作成時の食品衛生微生物の消長を調べた。その結果、米糠および竹パウダー添加米糠による漬かりの速さ・おいしさの差は明確には認められなかったが、糠床の菌叢は明らかに異なることから、これら微生物の制御を行うことにより、糠漬けの味の改善を図ることができる可能性が示された。一方、竹パウダーは入手の時期により、入手時時点でカビの発生等がみられることから、その入手時期と入手後の保管管理を行う必要があることが、経験的に明らかになってきた。そこで、今年度は、滅菌操作を施した竹パウダーを利用した糠漬けの検討を行い、再度糠床への竹パウダーの利用の可能性を探った。

【方法】

材料と方法

(1) 糠床の作製

市販米糠(有限会社 高田米糠店、京の米職人こだわりの米糠)と竹パウダー(福島県埜町産)に食塩、と一度沸騰させた水道水を表1の割合で混合し、6種の糠床を2連で、計12試験区の糠床を作製した。

糠床1では足し塩、足し糠、水抜きを行わず、キュウリ約90gを3日に1回2日間漬け、糠床2では足し糠、水抜きを行わず15日目に初期全体量の2%にあたる20gの塩を再添加し、その後キュウリ約45gを3日に1回一晚漬けた。

糠床1、糠床2ともに25℃のインキュベーター内で静置し、熟成させ、14日ごとにサンプルを採取し、これを糠床が腐るまで続けた。

採取した糠床は分析まで-30℃で保管した。

(2) 水分含量測定

試料約3gを秤量瓶に入れ正確に測ったのち、80℃の乾熱乾燥機を使用して、恒量となるまで乾燥させ、重量を正確に測り、水分を測定した。

(3) 塩分測定

試料約3gを正確に測り、純水27mlを加えた。これを10.0ml正確に採取し10%クロム酸カリウム溶液を1.5ml加え、ファクターが判明している硝酸銀溶液で滴定した。赤褐色が発生し、5秒ほど攪拌しても赤褐色が焼失しない点を終点とした。

表 1 糠床の仕込み組成

| 糠床 1 | A | A' | B | B' | C | C' | D | D' | E | E' | F | F' | | |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 滅菌済み竹パウダー(g) | 250 | 250 | 250 | 250 | | | | | | | | | | |
| 竹パウダー(g) | | | | | 250 | 250 | 250 | 250 | | | | | | |
| 市販米生糠(g) | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | 500 | 500 | 500 | 500 | | |
| 食塩(g) | 70 | | | | | | | | | | | | | |
| 水 (ml) | 500 | | | | | | | | | | | | | |
| きゅうり (g) | 90 | | | | | | | 90 | | 90 | | | | |

| 糠床 2 | A | A' | B | B' | C | C' | D | D' | E | E' | F | F' | | |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 滅菌済み竹パウダー(g) | 200 | 200 | 200 | 200 | | | | | | | | | | |
| 竹パウダー(g) | | | | | 200 | 200 | 200 | 200 | | | | | | |
| 市販米生糠(g) | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 500 | 500 | 500 | 500 | | |
| 食塩(g) | 70 | | | | | | | | | | | | | |
| 水 (ml) | 500 | | | | | | | | | | | | | |
| きゅうり (g) | 45 | | | | | | | 45 | | 45 | | | | |

(4) 糠床中の有機酸測定

糠床 1 の A、B、F(表 1)を使用した。

各試料 3.00 gをコニカルチューブに採取し、そこに 27.0 mlの超純水を加えて試験管ミキサーによって攪拌し、11000 rpm、10 分間遠心分離した。これを 0.45 μm シリンジフィルターでろ過し、以下の分離条件で分析した。

HPLC システム : Shimadzu LC-10 システム

Column : Inertsil ODS-4 5 μm 4.6 φ x 250 mm

Solvent : 10mM NH₄H₂PO₃ pH 2.6

Flow : 0.8ml/min

Detection : UV at 210 nm

カラム温度 : 40 °C

注入量 : 10 μl

(5) 糠床 DNA の抽出

糠床熟成中、比較的早期に産膜酵母と考えられるものが表面上に発生した糠床 1 の A を、加工食品からの DNA 抽出キット(株式会社ニッポン・ジーン GM quicker4)を使用し、プロトコル 2:水分を多く含む食品からの DNA 抽出方法により糠床全 DNA を抽出した。(図 1)

サンプルとしたものは、滅菌した竹パウダーと野菜が漬かっていた A、A の対照として滅菌した竹パウダーが入っているものの野菜を漬けていない B、竹パウダーも野菜も使用していない F の 3 種の 0、14、28、37 日目の計 12 種である。

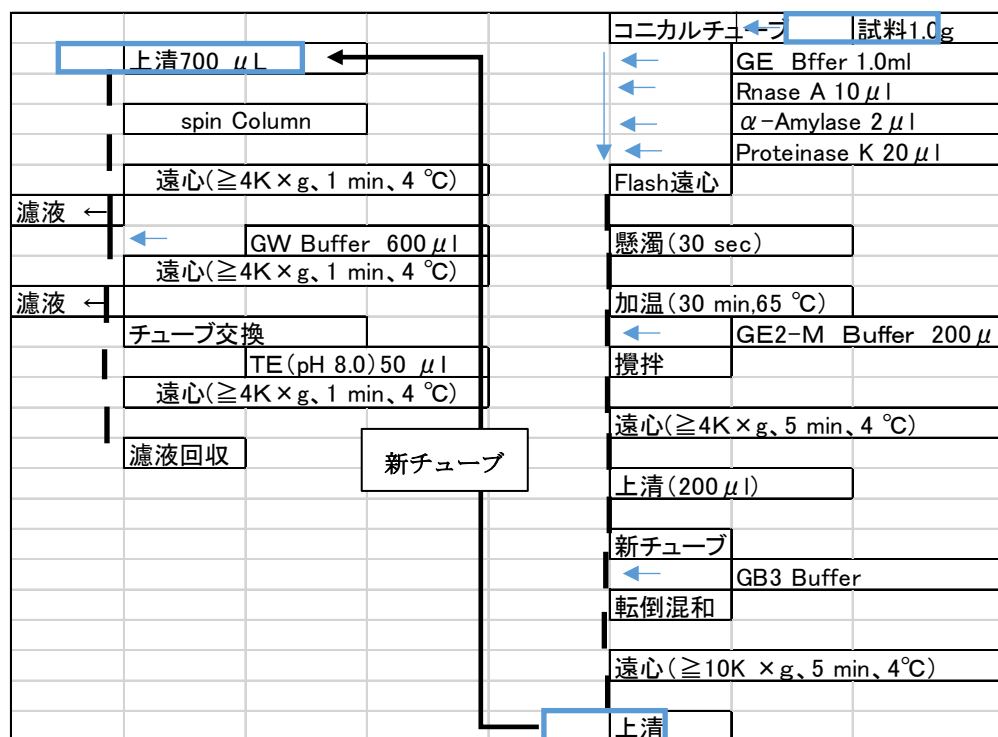


図 1 DNA4抽出手順

(6) PCR による DNA の増幅

酵素として PCR Master Mix KOD One(東洋紡株式会社)を用いて、糸状菌 18 S r DNA または真正細菌 16 S rDNA を下記のプライマーを使用し PCR 装置(appliedbiosystems MiniAmp Plus Thermal Cycler)にて反応させて増幅した(反応サイクル 表 2)。

【糸状菌分析用】

NS1 : 5′-gta gtc ata tgc ttg tct c -3′

GCFung : 5′-cgc ccg ccg cgc ccc gcg ccc ggc ccg ccg ccc ccg ccc cat tcc ccg tta ccc gtt g-3′

【真正細菌用】

F984GC : 5′-cgc ccg ggg cgc gcc ccg ggc ggg gcg ggg gca ccg ggg aac gcg aag aac ctt ac-3′

R1378 : 5′-cgg tgt gta caa ggc ccg gga acg-3′

増幅後、DNA 抽出後同様にアガロースゲル電気泳動にて増幅を確認し、ナドドロップにて核酸濃度を測定した。

その後 Gel and PCR Clean-up(MACHEREY-NAGEL)を使用して増幅した DNA のクリーンアップを行い、再度アガロースゲル電気泳動にて確認し、ナノドロップを使用して核酸濃度を測定した。

表 2 反応サイクル

| | | | |
|-------|-------|--------|-----------|
| Step1 | 95 °C | 3 min | ×1 cycle |
| Step2 | 95 °C | 30 sec | ×35 cycle |
| | 60 °C | 30 sec | |
| Step3 | 95 °C | 3 min | ×1 cycle |

(7) DGGE 法

1)ゲル作製

グラジエントメーカー(サンプラテック 密度勾配装置 No.2)を用い、表 3 の通りに低濃度ゲル及び高濃度ゲルの GEL mix を調製し、ゲルが固まるまで3時間以上静置した。

表 3 ゲル組成

| Gel Stock | 糸状菌 | | 真正細菌 | |
|---------------|---------|---------|---------|---------|
| | 濃度 | 20% | 45% | 35% |
| 40%AcA (ml) | 8.75 | 8.75 | 10.00 | 10.00 |
| 50×TAE(ml) | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| Formamide(ml) | 4.00 | 9.00 | 7.00 | 13.00 |
| URERA(g) | 4.20 | 9.45 | 7.00 | 13.67 |
| 超純水(ml) | to50.00 | to50.00 | to50.00 | to50.00 |

2) 糠床中の菌叢解析

あらかじめ 60 °C にした 1×TAE 緩衝液を満した電気泳動装置(日本エイドー NB-1480A)をセットし、その中にグラジエントゲルをセットし、1×TAE をゲル板が漬かるまで注いだ後、60 °C に温度を上げた。

クリーンアップ後の DNA の核酸量が 200 ng になるように採取し、同量の×2 Loading Buffer(ニッポン・ジーン)を加えたものをゲルにアプライした。マーカーは糸状菌叢解析では(ニッポン・ジーン DGGE Maker IV)を、真正細菌叢解析では(ニッポン・ジーン DGGE Maker II 及び III)を 5 μl アプライした。

糸状菌叢解析では 50 V で 20 時間、真正細菌では 65 V で 15 時間電気泳動を行った。

電気泳動が終了したら泳動装置からグラジエントゲルを取り出し、コーム部分を切り落とし、10,000 倍希釈した GELGREEN(富士フィルム)で 30 分間染色し、ブルーフィルターを装着したトランスイルミネーターでバンドの観察および撮影を行った。

【結果および考察】

(1) 水分含量

各糠床の結果を図1、図2、表1、表2に示す。

実験結果のグラフでは野菜有を実線、野菜無を点線、滅菌竹入を青、滅菌無竹入を橙、竹無を緑に色分けをしている。

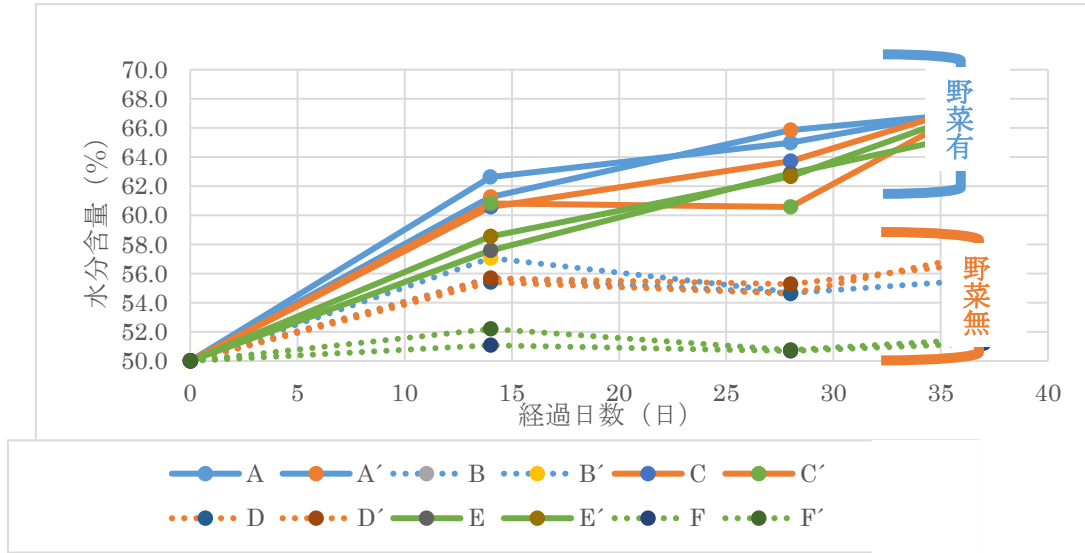


図1 糠床1の水分含量

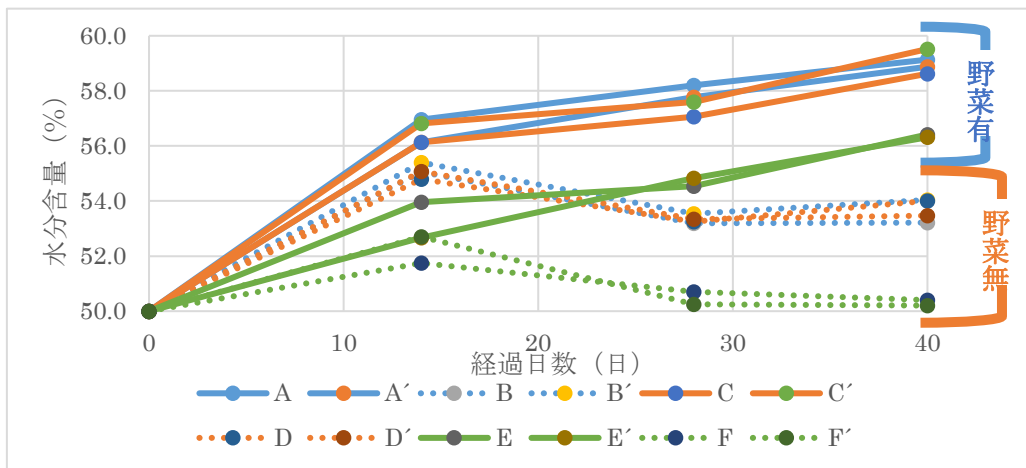


図2 糠床2の水分含量

表 1 糠床 1 の水分含量 (%)

| | 0 日目 | 14 日目 | 28 日目 | 37 日目 |
|----|------|-------|-------|-------|
| A | 50.0 | 62.6 | 64.9 | 67.3 |
| A' | 50.0 | 61.3 | 65.8 | 67.1 |
| B | 50.0 | 55.7 | 54.6 | 55.5 |
| B' | 50.0 | 57.1 | 54.7 | |
| C | 50.0 | 60.6 | 63.7 | 67.7 |
| C' | 50.0 | 60.8 | 60.5 | 67.7 |
| D | 50.0 | 55.4 | 54.6 | 57.3 |
| D' | 50.0 | 55.7 | 55.2 | 56.7 |
| E | 50.0 | 57.6 | 62.8 | 65.7 |
| E' | 50.0 | 58.6 | 62.6 | 67.4 |
| F | 50.0 | 51.1 | 50.6 | 51.2 |
| F' | 50.0 | 52.2 | 50.7 | 51.5 |

表 2 糠床 2 の水分含量 (%)

| | 0 日目 | 14 日目 | 28 日目 | 40 日目 |
|----|------|-------|-------|-------|
| A | 50.0 | 56.9 | 58.2 | 59.1 |
| A' | 50.0 | 56.1 | 57.7 | 58.8 |
| B | 50.0 | 55.0 | 53.1 | 53.2 |
| B' | 50.0 | 55.3 | 53.5 | 54.0 |
| C | 50.0 | 56.1 | 57.0 | 58.6 |
| C' | 50.0 | 56.8 | 57.5 | 59.5 |
| D | 50.0 | 54.7 | 53.2 | 54.0 |
| D' | 50.0 | 55.0 | 53.3 | 53.4 |
| E | 50.0 | 53.9 | 54.5 | 56.4 |
| E' | 50.0 | 52.6 | 54.8 | 56.3 |
| F | 50.0 | 51.7 | 50.7 | 50.4 |
| F' | 50.0 | 52.7 | 50.2 | 50.2 |

(2) 塩分含量

各糠床の結果を図3、図4、表3、表4に示す。

実験結果のグラフでは野菜有を実線、野菜無を点線、滅菌竹入を青、滅菌無竹入を橙、竹無を緑に色分けをしている。

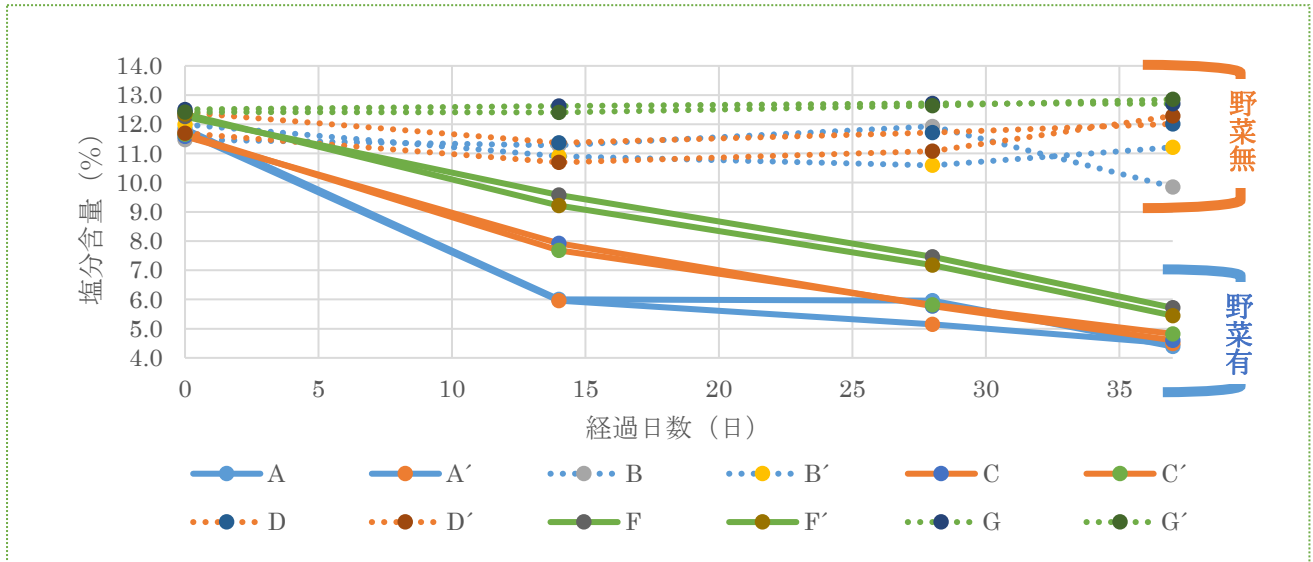


図3 糠床1の塩分含量

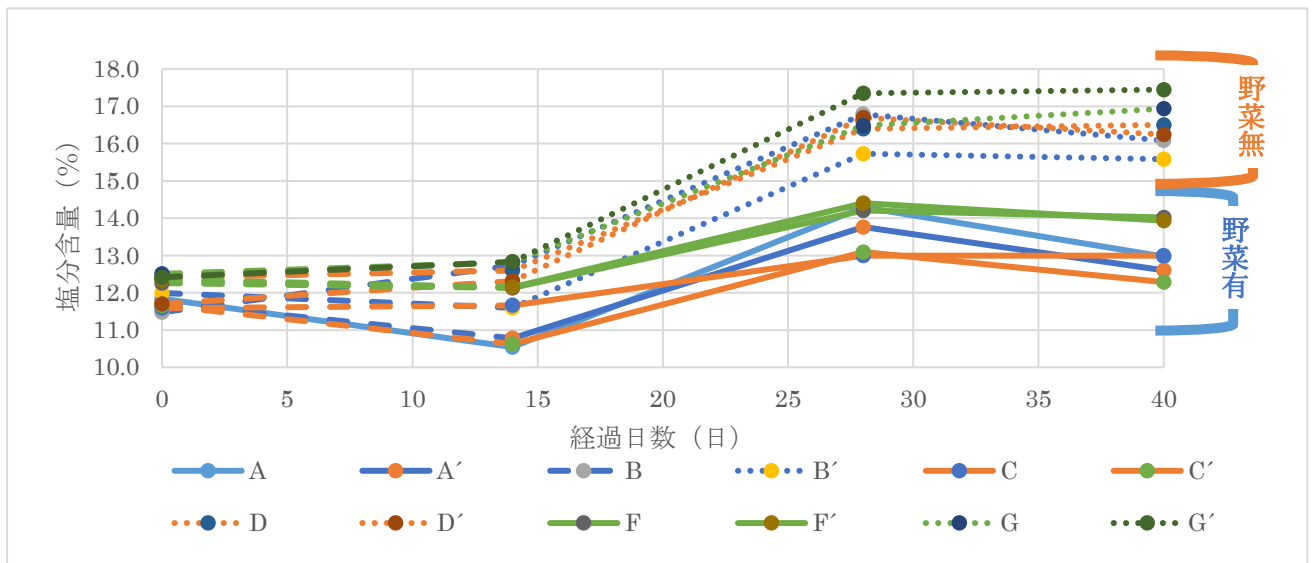


図4 糠床2の塩分含量

表3 糠床1の塩分含量 (%)

| 糠床 | 0日目 | 14日目 | 28日目 | 37日目 |
|----|-----|------|------|------|
| A | 7.1 | 3.6 | 3.5 | 2.6 |
| A' | 7.0 | 3.5 | 3.0 | 2.6 |
| B | 6.8 | 6.7 | 4.5 | 5.9 |
| B' | 7.1 | 6.5 | 4.2 | 6.7 |
| C | 6.9 | 4.7 | 3.4 | 2.7 |
| C' | 6.9 | 4.6 | 3.4 | 2.8 |
| D | 7.4 | 6.8 | 7.0 | 7.2 |
| D' | 7.0 | 6.4 | 6.6 | 7.3 |
| E | 7.3 | 5.7 | 4.4 | 3.4 |
| E' | 7.4 | 5.5 | 4.3 | 3.2 |
| F | 7.5 | 7.5 | 7.6 | 7.6 |
| F' | 7.4 | 7.4 | 7.5 | 7.7 |

表4 糠床2の塩分含量 (%)

| 糠床 | 0日目 | 14日目 | 28日目 | 40日目 |
|----|-----|------|------|------|
| A | 7.1 | 6.3 | 8.5 | 7.7 |
| A' | 7.0 | 6.4 | 8.2 | 7.5 |
| B | 6.8 | 7.6 | 10.0 | 9.6 |
| B' | 7.1 | 6.9 | 9.4 | 9.3 |
| C | 6.9 | 6.9 | 7.7 | 7.7 |
| C' | 6.9 | 6.3 | 7.8 | 7.3 |
| D | 7.4 | 7.5 | 9.8 | 9.9 |
| D' | 7.0 | 7.3 | 10.0 | 9.7 |
| E | 7.3 | 7.2 | 8.5 | 8.4 |
| E' | 7.4 | 7.2 | 8.6 | 8.3 |
| F | 7.5 | 7.6 | 9.8 | 10.1 |
| F' | 7.4 | 7.6 | 10.4 | 10.4 |

水分含量、塩分含量では、野菜を漬けた糠床は継時的に水分含量が増加していた。採取的に野菜の量が多かった糠床では17~19%ほど、野菜の量を少なくした糠床では6~9%ほど水分含量が増加していたのに対し、塩分含量は減っていった。塩分含量では、足し塩を行わなかった糠床で5%前後の減少が確認でき、足し塩を行った糠床でも14日ごとに1~2%ずつ減少していることが確認できた。逆に、野菜を漬けていない糠床では、水分含量、塩分含量ともに大きな変化は見られなかった。

(3) 糠床中の有機酸量

A、B、Fの糠床について、糠中に含まれる有機酸をHPLC法により測定した。図5、図6、図7に示した通り、有機酸測定ではすべての糠床でクエン酸を確認することができ、継時的にクエン酸、乳酸が増加傾向にあった。乳酸、クエン酸においては、野菜を漬けていた糠床のほうが多く検出されていた。しかし、野菜を漬けていた糠床のみコハク酸が減少傾向にあった。乳酸

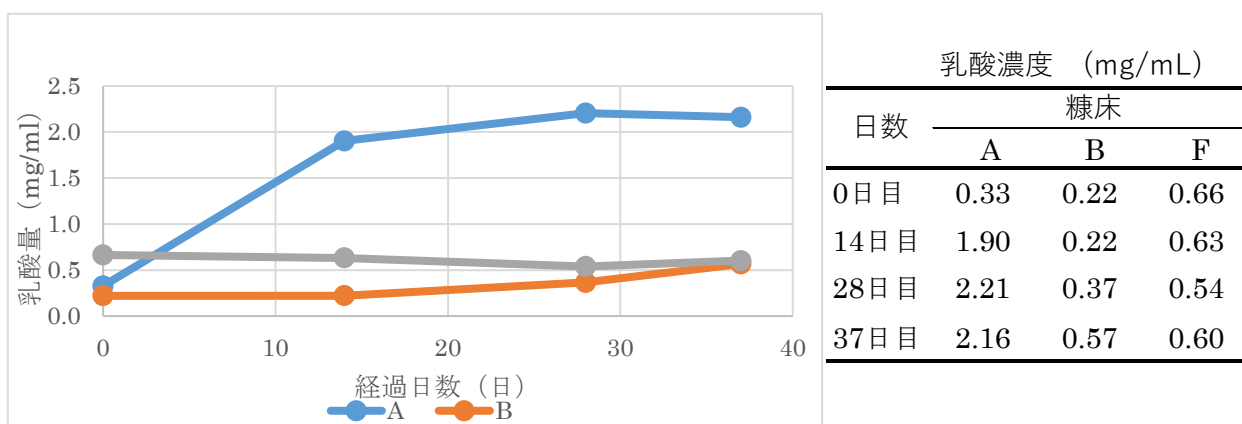
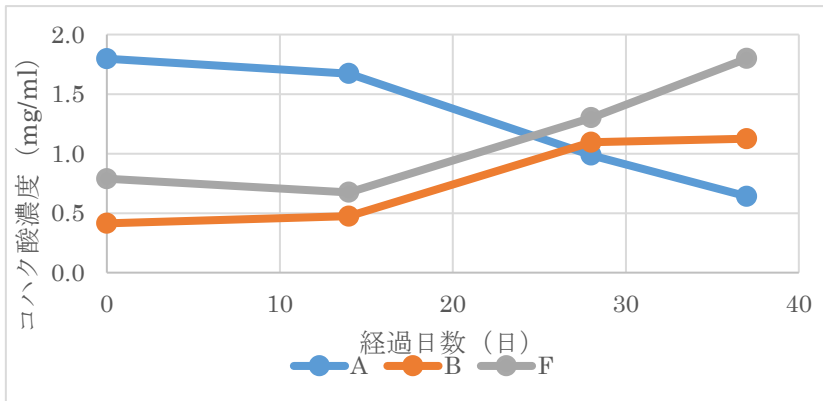
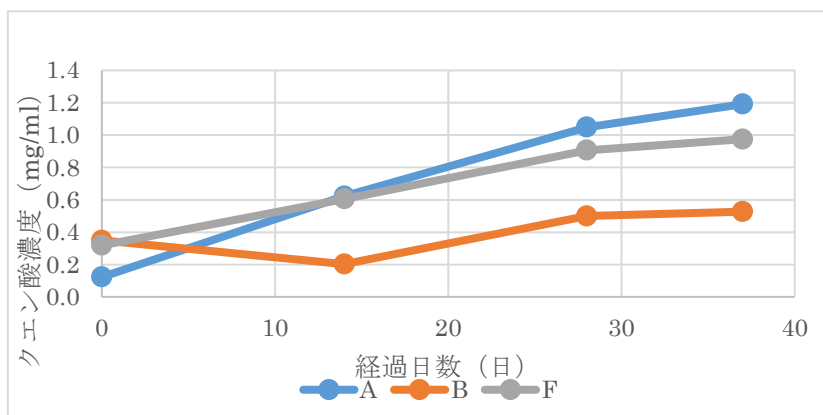


図5 糠床内に含まれる乳酸濃度



| クエン酸濃度 (mg/mL) | | | |
|----------------|------|------|------|
| 日数 | 糠床 | | |
| | A | B | F |
| 0日目 | 0.12 | 0.35 | 0.32 |
| 14日目 | 0.62 | 0.20 | 0.61 |
| 28日目 | 1.05 | 0.50 | 0.91 |
| 37日目 | 1.19 | 0.53 | 0.97 |

図 6 糠床内に含まれるクエン酸濃度



| コハク酸濃度 (mg/mL) | | | |
|----------------|------|------|------|
| 日数 | 糠床 | | |
| | A | B | F |
| 0日目 | 1.80 | 0.41 | 0.79 |
| 14日目 | 1.67 | 0.47 | 0.67 |
| 28日目 | 0.99 | 1.10 | 1.30 |
| 37日目 | 0.64 | 1.13 | 1.80 |

図 7 糠床内に含まれるコハク酸濃度

(4) 糠床 DNA の菌叢解析

糸状菌用 PCR プライマーを使用して増幅した 18 S rDNA の DGGE パターンを図 8 に示す。同一種の菌株由来とみなされる電気泳動バンドは同じ色の矢印で示している。各バンドはそれぞれ

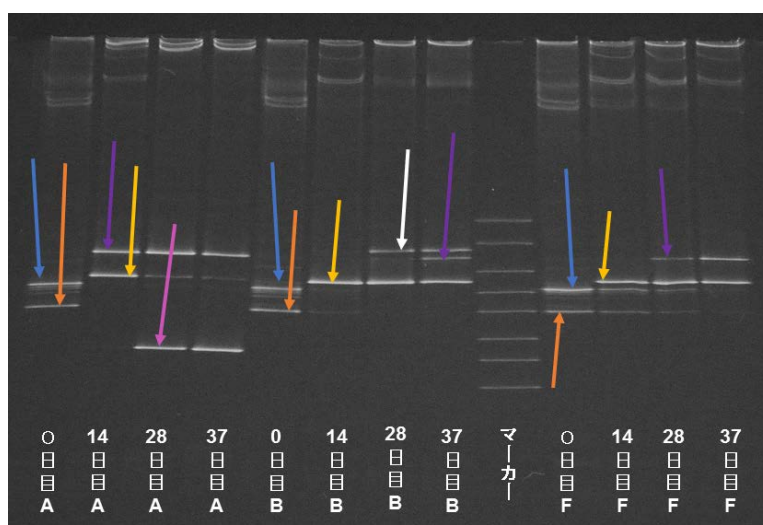


図 8 糸状菌 18 S rDNA の DGGE

れ固有の菌種が存在していたことを示し、バンドの濃さはおおよそその菌体量を示している。例えば、図 8 の糠床 A においては、0 日目には青色とオレンジ色の矢印で示されるバンドを持つ糸状菌株が主に生育していたが、14 日目には両種は見られなくなり、新たに紫色と黄色の矢印の示される菌種に置き換わり、さらに 28 日目では黄色が減ってピンクが増えてきていることがわかる。

A は、キュウリを漬けた減菌竹パウダー入り糠床、B は同じ糠床にキュウリを仕込まなかったもの、F は対照として作製した米ぬかだけの糠床（キュウリなし）である。B と F の比較から、竹パウダーを加えたものでは 28 日目以降に白のバンドが増えているが、それ以外は大きな差はない。一方キュウリを漬けた A では紫のバンドの増加が早く、また他にはない 28 日目以降にピンクのバンドが多く、紫とピンクで安定した菌叢が形成されていることがうかがえる。

真正細菌 16 S rDNA の DGGE パターンを図 9 に示す真性細菌叢では同一菌株由来と考えられるバンドを矩形で囲って示している。

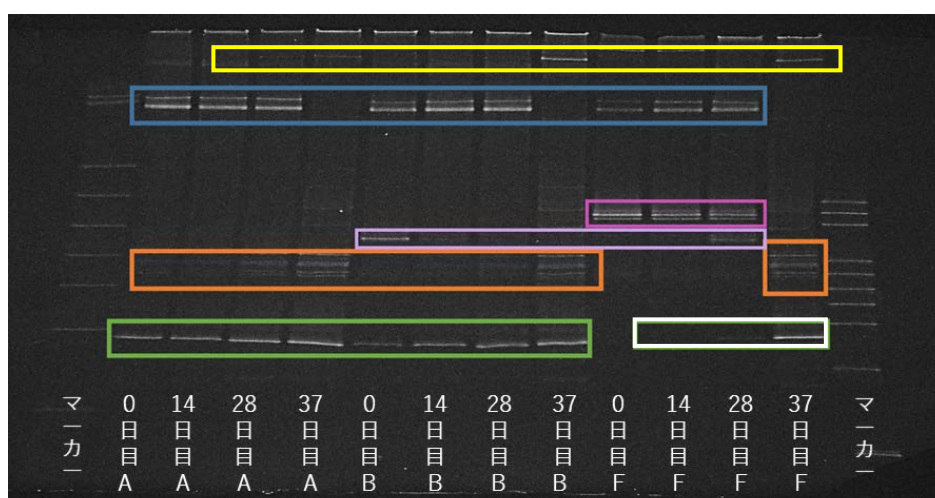


図 9 真正細菌 16 S rDNA の DGGE 電気泳動

A(減菌竹パウダー、キュウリ入り)、B(竹パウダー入り、キュウリなし)、F (米糠のみ、キュウリなし) のそれぞれ 0 日目は、糠床原料由来の細菌を示すものであるが、黄緑色で示した菌種は竹パウダーのみで見られる菌株であり、竹パウダー入り糠床で 37 日目でも安定に存在しているが、滅菌処理済みであるため竹パウダーからの生菌の持ち込みは考えにくい。37 日目では白と黄色で示した菌株が現れ、またオレンジ群も増えてきている。

3 考察

野菜を漬けた糠床では水分が増加していくのに対し、塩分量は減少していったが、野菜の入っていない糠床ではほとんど横ばいの結果となっていた。わずかな差ではあるが竹パウダーが入っているかつ野菜の入っている糠床 (A、B) では、糠床 1、糠床 2 とともに、竹パウダーが入っていないかつ野菜の入っている糠床 (E) よりも水分含量は 2%前後多くなっていて、塩分含量では 1~1.5 % ほど減少している。

これは、竹パウダーが米糠よりも大きい粒子であるため、竹パウダーが入っていない場合よりも浸透圧がかかり、水分と塩分にわずかな差が発生したと考えられる。

今回夏場に糠床の作製を行ったため、原料竹パウダーが到着時にすでに発酵臭があり、何らか

の発酵が起こっていたため、未滅菌の竹パウダーを用いた糠床では腐敗が進みやすかった。したがって、今回比較的良好な発酵香が得られた糠床 A とそのコントロールとして、キュウリを入れない糠床 B、米ぬかだけの糠床 F に焦点を絞り、有機酸分析と菌叢解析を実施した。

有機酸測定では、キュウリを漬けた糠床 A で、比較的安定した乳酸の生成が確認でき、野菜から持ち込まれた糖等により順調に乳酸菌が生育したためであると考えられる。

PCR-DGGE 法による糸状菌叢解析では、0 日目のみ竹パウダーが含まれている糠床と竹パウダーが含まれていない糠床ではバンドの濃淡以外にバンドパターンに顕著な差は確認することができなかったが、14 日目以降のバンドパターンでは A と B、F でバンドパターンに差が見られた。また、黄色、紫色の矢印で示したバンドは 3 種の糠床すべてで共通しているため、この 2 種類は米糠に由来する糸状菌だと考えられる。A 糠床（滅菌竹パウダー入り）で 28 日目以降に確認されるピンクで示された菌株は、この糠床にのみ確認され、野菜を漬け込んだ結果得られた糸状菌株であるので、漬物香に寄与する耐塩性酵母である可能性もあり、この同定と本菌株の生育制御により、竹パウダー入り糠床による漬物の特徴を出すことができる可能性が考えられた。

細菌叢解析では、竹粉が添加して野菜を漬けていた糠床と、それ以外の糠床で 14 日目以降のバンドパターンに差が見られた。これは、野菜に付着していた菌が繁殖した結果、初日は発生していたであろう菌の繁殖が妨げられ、死滅したのではないかと考えた。

竹パウダーにはデンプンが含まれているため¹⁾、出荷、到着時点でカビの発生や腐敗がおこりやすい。このため、竹パウダーの食品用途での利用に関しては、衛生管理として殺菌処理済みの試料を用いての検討が必要である。一方、竹の繊維に関しては、抗菌作用があることも報告されており²⁾、これを利用した用途開発も今後検討して参りたい。

参考文献

- 1) Yoko Okahisa, Tsuyoshi Yoshimura and Yuji Imamura, Seasonal and height-dependent fluctuation of starch and free glucose contents in moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*) and its relation to attack by termites and decay fungi, *Journal of Wood Science* 52, 445–451(2006)
- 2) 山本直文、「竹繊維」、繊維製品消費科学、48 巻 7 号 455-459 (2007)