

原 著

糠床への浸漬による野菜に付着する微生物叢の変化

古田 吉史 田中 貴絵 甲斐 達男

＜要 旨＞

米糠を自然発酵させて調製する糠床に、種々の野菜を漬けて造る糠漬は日本の伝統的発酵食品の一つである。糠床の微生物叢に関する研究は多いものの、糠漬野菜の微生物叢とその変化についてはほとんど報告されていない。本研究では、85年以上経過した熟成糠床3種と新たに調製した糠床1種にナスとキュウリを漬け込み、それら野菜に付着する微生物叢の変化を調べた。まず糠床中の微生物叢を調べたところ、今回使用した4種の糠床間で乳酸菌数と酵母数、その割合に大きな違いが見られた。浸漬野菜（糠床に18時間浸漬後、水洗いした野菜）に関しては、コントロール（水洗いした野菜）と比べて、何れの糠床に浸漬した場合でも、一般細菌数は著しく減少し、乳酸菌・酵母数は増大した。付着した乳酸菌・酵母数は全体的にキュウリと比べてナスの方が多く、また糠床自体の乳酸菌・酵母数が多いほど付着菌数も多いと思われた。糠床中の乳酸菌数を高く維持すること等により、糠漬野菜のプロバイオティクスとしての利用が今後期待される。

キーワード：糠床、糠漬、微生物叢、乳酸菌、プロバイオティクス

I. 諸 言

米糠を自然発酵させて調製した「糠床」に、種々の野菜を漬けて込むことで作製する「糠漬」は我が国特有の伝統的発酵食品の一つであり、その独特の香味は他の漬物には見られない複雑さがある。糠床は、通常、米糠に塩と水を混ぜ、食用としない所謂“捨て野菜”を漬け込み、攪拌（床返し）を行うことで調製されるが、熟成した香味を形成するためには数ヶ月間を要することが知られている¹⁾。また、熟成を繰り返せば繰り返すほどに風味に深みが加わっていくため、福岡県を中心とする九州北部には、数十年さらには小倉城主小笠原忠真公の時代から引き継がれる糠床に代表されるような数百年という熟成期間を経た究極とも呼べる糠床も多く存在する。

糠床に関する研究としては、これまでに今井らが糠床中の菌叢の推移と糠床成分およびフレーバー成分変化との関連性について¹⁻³⁾、並びに酵母フローラの消長について⁴⁾、支倉らが糠床中のビタミンB群の増加や風味向上を目的としたタンパク質分解酵素の添加効果等について⁵⁻⁷⁾報告している。さらに近年では、中

山・園元らを中心とする九州大学のグループが次世代型シーケンサーを用いた遺伝子解析により、糠床中に生息する乳酸菌の菌種レベルでの網羅的な解析を行っている⁸⁻¹⁰⁾。

しかしながら、これまでの研究の多くは糠床そのものに関するものであり、浸漬した野菜に着目した研究、特にその微生物学的調査については行われていない。通常、糠床に浸漬した野菜を食するには、糠床の風味があまり落ちない程度に軽く水洗いをした後に食する機会が多いが、その際に糠床から付着した微生物が浸漬野菜に残存していることが予想される。野菜に残存する菌数、特に有用菌として一般的である乳酸菌数等が多ければ、乳製品等に代表されるプロバイオティクスとしての機能も将来的には期待される。そこで本研究では、熟成糠床への浸漬による野菜に付着する微生物叢（一般細菌、酵母、乳酸菌）と微生物数の変化について検討を行った。

II. 方法

1. 使用糠床

熟成糠床として、少なくとも85年以上経過しているとされる北九州市内で市販されているA糠床とB糠床、百年以上経過していると思われる築上郡の民家より貰い受けたC糠床、および新鮮な米糠から新たに作製したD糠床の4種を用いた。新たに作製した糠床の調製法を以下に記した。

2. 糠床の調製

無農薬の生糠：1kg、粗塩：200g、ミネラルウォーター：1.2L、山椒：50g、昆布：5g、赤唐辛子：5～6本を4L容のプラスチックバケツ（蓋付）に入れ十分に混合した。その後、2週間までは毎日1回攪拌（床返し）を行いつつ、カブの葉、キャベツ、ナス、キュウリ、ニンジン、ハクサイ、サツマイモ等の野菜を「捨て野菜」として漬け込み、それを2日毎に取り換えた。2週間後から3ヶ月までは、1週間に1回捨て野菜を漬け込み（漬け込み時間は上記と同じく2日）、2日に1回のペースで攪拌を行いながら25℃の部屋で糠床を熟成させた。

3. 微生物検査

本実験は同一条件で4回（野菜の微生物検査については野菜のせん断・浸漬からストマッカー、微生物数測定に至るまでの操作を別々に4回、糠床の微生物検査については糠床の採取からストマッカー、微生物数測定に至るまでの操作を別々に4回）実施し、平均値を算出した。

1) 野菜の浸漬およびサンプル調製

野菜への微生物のコンタミに十分配慮しつつ消毒した包丁でナスおよびキュウリの中央部を輪切りにして作製した10gの野菜切片（皮つき）を、A～Dの熟成糠床それぞれに約18時間浸漬した。滅菌したピンセットで糠床から浸漬野菜を取り出し、野菜表面に付着した糠が肉眼で見えなくなる程度に水道水で水洗いした後（実際の食形態に近い状態）、ストマッカー袋に無菌的に封入した。また、コントロールとして、糠床に浸漬していない10gのナスおよびキュウリについても同様に水洗いした後にストマッカー袋に無菌的に封入した。その後、滅菌した9倍量の生理食塩水をストマッカー袋に加え、120秒間ストマッカー（BagMixer[®], interscience社製）にかけてホモジナイズした。得られた溶液（サンプル原液）と、これを

さらに滅菌した生理食塩水で $10^1 \sim 10^3$ 倍希釈したものを微生物検査用のサンプル希釈液として用いた。

また、糠床中に生息する微生物を検出するために、A～Dの各糠床10gを試料としてストマッカー袋に封入後、上記と同様に9倍量の滅菌した生理食塩水を加えてストマッカーにかけ、得られた溶液を $10^1 \sim 10^5$ 倍に希釈したものをサンプル希釈液として用いた。

2) 使用培地および培養方法

一般細菌測定用として日水製薬株式会社製の標準寒天培地を、酵母測定用に0.01%クロラムフェニコールを添加したYPD寒天培地（1%酵母エキス、2%ポリペプトン、1%グルコース、1.5%寒天）を、乳酸菌測定用に1%炭酸カルシウムと0.005%シクロヘキシミドおよび0.001%アジ化ナトリウムを添加したMRS寒天培地（BD社製）を使用した。ストマッカー後の各サンプル希釈液をそれぞれの培地に100 μ l塗布し、一般細菌については35℃で48時間、酵母については25℃で72時間、乳酸菌については30℃で72時間培養を行った後に形成されたコロニー数をカウントし、各試料1g当たりの生菌数を算出した。

4. 糠床の理化学検査

1) 水分量

各糠床約5gを105℃で6時間常圧乾燥し、水分量を測定した。

2) pHおよび酸度（乳酸として）

各糠床約5gを95mlの蒸留水に混和後、pHを測定した。その後、0.1Nの水酸化ナトリウムでpH8.3になるまで中和し、その滴定量から酸度を算出した。

$$\text{酸度 \% (w/w)} = \text{滴定量 (ml)} \times 0.9 / \text{糠重量 (g)}$$

3) 塩分濃度

各糠床中に含まれるナトリウム量を原子吸光光度法により求め、食塩相当量に換算した。

$$\text{食塩相当量} = \text{ナトリウム量 (g)} \times 2.54$$

III. 結果

1. 各糠床の理化学検査および微生物検査の結果

各糠床の理化学的性質および微生物検査の結果をまとめたものを表1に、微生物検査の具体例としてA糠床のプレート写真（サンプル 10^3 倍希釈液）を図1に示した。また、表1には各糠床の官能的な評価については記載していないが、各糠床を入れたプラスチック容器の蓋を開けた瞬間に糠床表層から10cm程度に鼻

を近づけて立ち上ってくる香りを嗅いだところ、AとD糠床は酸味が少なくマイルドな風味を、B糠床は柑橘系の酸味を、C糠床は非常に酸味が強くスパイシーな風味を有していた。

まず理化学的性質について、水分量とpHに関しては、水分量：59.2～63.1%、pH：4.2～4.8と糠床間で大きな違いは見られなかったが、酸度と塩分に関しては、酸度：4.0～5.6%、塩分：4.4～6.5%と比較的大きな差が見られた。

次に、微生物検査の結果については、今井らの報告¹⁾にもあるように、何れの糠床も主要微生物は乳酸菌および酵母で、後述する図2に示すような明瞭な一般細菌はほとんど検出されなかった。但し、図1のプレート写真上では確認できないが、一般細菌用のプレート

上に酵母および乳酸菌に由来すると思われる（コロニーと呼べない程度の）微小で非常に色の薄いコロニーらしきものが多数見られた。

一方、各糠床の酵母数と乳酸菌数および両者の比率には大きな違いが見られた。A糠床には酵母もある程度存在するものの乳酸菌数が 2.2×10^8 cfu/gと非常に多かった。B糠床では酵母と乳酸菌数が共に約 5×10^6 cfu/gと同程度であった。C糠床については、酵母はほとんど存在せず乳酸菌が約 10^7 cfu/g存在した。熟成期間の短いD糠床については、逆に乳酸菌に比べて酵母数の方が多かった（100倍程度）。また、今回使用した4種の糠床の中で、乳酸菌と酵母を合わせた生菌数が最も多いA糠床については、他の糠床と比べて水分量が高く、酸度が低い傾向にあった。

表1. 各糠床の理化学的性質と微生物数の比較

	% (w/w)			pH	微生物数* (cfu** /g)		
	水分	酸度	塩分		一般細菌	酵母	乳酸菌
A糠床	63.1	4.0	4.8	4.8	<10 ³ ***	8.5×10^6	2.2×10^8
B糠床	59.2	5.6	5.1	4.2	<10 ³	5.6×10^6	4.5×10^6
C糠床	62.9	5.1	4.4	4.2	<10 ³	<10 ³	9.5×10^6
D糠床	59.6	4.2	6.5	4.4	<10 ³	7.0×10^7	7.0×10^5

* 各微生物数は4回の実験の平均値

** colony forming unit

*** 最低希釈倍率(10¹)のサンプル希釈液で顕著なコロニーが検出されなかったことを示す

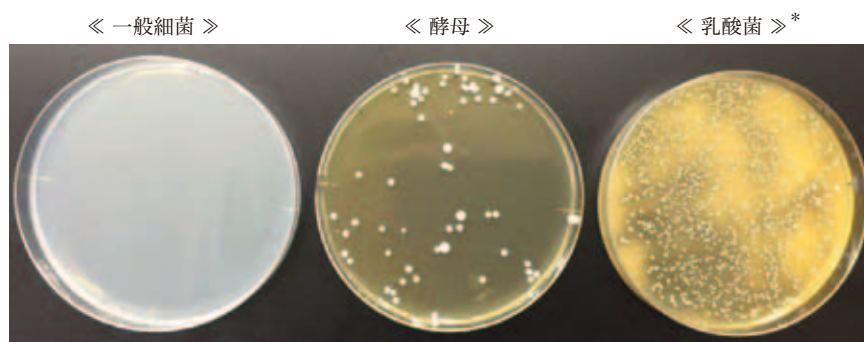


図1. A糠床の微生物検査プレート写真（サンプル10³倍希釈液）

* 乳酸菌測定用培地には炭酸カルシウムが含まれているため、乳酸菌が生育すると生成された酸により炭酸カルシウムが溶けてコロニーの周囲にクリアゾーンが形成される

2. 糠床への浸漬によるナスおよびキュウリに付着する微生物数の変化

各糠床へ浸漬した際の微生物数の変化について、表2にナスの結果を、表3にキュウリの結果を示した。それぞれの表中のコントロールは、ナスおよびキュウリを糠床へ浸漬せずに水洗いした場合に検出される微生物数を示している。また図2に、微生物検査結果の具体例として、ナスのコントロールのプレート写真とA糠床への浸漬後のプレート写真を比較して示した。

まず特筆すべきは、一般細菌数の変化である。先の近江らの報告¹¹⁾にもあるように、栽培・加工・流通等の過程で野菜類には元々多くの細菌が付着し（菌数は野菜の種類や栽培条件、季節等により変動するものと思われる）、水洗い程度ではあまり除去されずに野菜表面に残存する。今回用いた何れの糠床の場合でも、糠床への18時間の浸漬中に、野菜に付着した一般細菌の多くが消失した。特に一般細菌数が多いキュウリについては、コントロールの一般細菌数が 10^6 cfu/gレベルであったものが、浸漬後水洗いした状態では

10^3 cfu/g レベル若しくはそれ以下となり、糠床への浸漬により一般細菌数は1/1000程度に減少した。一方、一般細菌数がそれほど多くないナスについては、コントロールの一般細菌数が 10^4 cfu/g レベルであったものが、浸漬後水洗いした状態では 10^2 cfu/g レベル若しくはそれ以下となり、1/100程度に減少した。

次に、酵母および乳酸菌に関しては、ナスとキュウリどちらの場合も、（元々酵母数が少ないC糠床浸漬後の酵母数を除き）各糠床に18時間浸漬することで、それぞれの菌数はコントロールと比べて顕著に増大した。ナスにおける付着した乳酸菌数の最大値はA糠床浸漬後の 4.3×10^6 cfu/g、酵母についてはD糠床浸漬後の 4.3×10^5 cfu/g、同じくキュウリにおける付着した乳酸菌数の最大値はA糠床浸漬後の 7.0×10^5 cfu/g、酵母についてはD糠床浸漬後の 1.0×10^5 cfu/gであり、全体的にキュウリと比べてナスの方が付着菌数は多かった。また先の表1に示した結果と照らし合わせると、糠床自体の乳酸菌・酵母数が多いほど、ナス・キュウリそれぞれへの付着菌数も多い傾向にあった。

表2. 各糠床への浸漬によるナスの微生物数の変化

	微生物数* (cfu** /g)		
	一般細菌	酵母	乳酸菌
コントロール	1.3×10^4	1.0×10^2	< 10^2 ***
A糠床浸漬後	< 10^2	1.9×10^5	4.3×10^6
B糠床浸漬後	< 10^2	3.8×10^4	2.0×10^4
C糠床浸漬後	< 10^2	5.0×10^2	3.1×10^4
D糠床浸漬後	3.5×10^2	4.3×10^5	1.1×10^5

コントロール；ナスを水洗いした後に微生物数を測定

A～D糠床浸漬後；A～D糠床にナスを浸漬後、水洗いした後に微生物数を測定

* 各微生物数は4回の実験の平均値

** colony forming unit

*** ストマッカー後のサンプル原液で顕著なコロニーが検出されなかったことを示す

表3. 各糠床への浸漬によるキュウリの微生物数の変化

	微生物数* (cfu** /g)		
	一般細菌	酵母	乳酸菌
コントロール	3.2×10^6	2.0×10^2	1.6×10^3
A糠床浸漬後	3.3×10^3	1.2×10^4	7.0×10^5
B糠床浸漬後	3.1×10^3	1.5×10^4	9.5×10^3
C糠床浸漬後	3.0×10^2	2.5×10^2	3.0×10^4
D糠床浸漬後	4.5×10^3	1.0×10^5	2.8×10^4

コントロール；キュウリを水洗いした後に微生物数を測定

A～D糠床浸漬後；A～D糠床にキュウリを浸漬後、水洗いした後に微生物数を測定

* 各微生物数は4回の実験の平均値

** colony forming unit

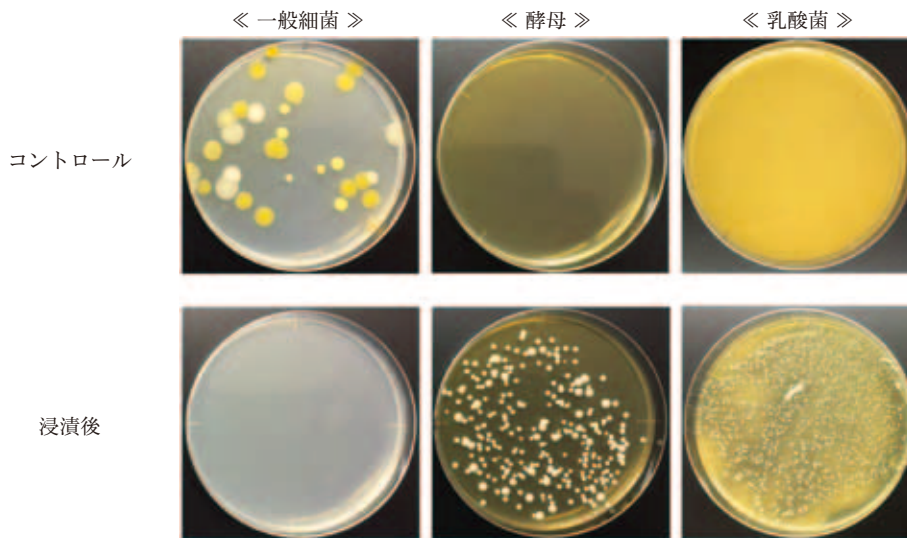


図2. A 糠床へのナス浸漬前後の微生物検査プレート写真
(サンプル 10^1 倍希釈液)

コントロール; ナスを水洗いした後に微生物数を測定

浸漬後; A 糠床にナスを浸漬後、水洗いした後に微生物数を測定

IV. 考 察

まず、本研究で使用した4種類の糠床A～D間では香りが大きく異なっていたが、これは恐らく、糠床を熟成する際に香味の付与のために添加する山椒の実や唐辛子、生姜、陳皮、柚子の皮等の量や種類が各糠床で異なっていることが大きな要因として考えられた。

次に、図1の一般細菌用のプレート上に多数見られた微小で非常に色の薄いコロニーらしきものに関して、図1に示した3種のプレートには同一のサンプル希釈液を塗布している。細菌の生育阻害剤であるクロラムフェニコール、真菌の生育阻害剤であるシクロヘキシミド、好気性微生物の生育阻害剤であるアジ化ナトリウムを全く含んでいない一般細菌用の標準寒天培地上には、酵母や乳酸菌も生育するものと予想されるが、恐らくは栄養要求性の違いやそれに伴う増殖速度の違いから、これらの酵母や乳酸菌が一般細菌用のプレート上ではコロニーとして検出可能なレベルにまで生育できなかったのではないかと推察された。

また、表2および表3に示した糠床への浸漬前後におけるナス・キュウリに付着する微生物数変化の結果は、野菜の糠床への浸漬により、糠床が熟成されることにより形成された乳酸菌や酵母を中心とした所謂“堅牢な微生物叢”への接触、あるいは比較的高い酸度や塩分濃度、低いpHの環境下に置かれることで、野菜に付着していた初発の微生物の多くが消失し(つ

まりリセットされ)、糠床自体の微生物叢に置換されるということをはじめて裏付けたデータのの一つとして考えられる。

さらに、糠床への浸漬後水洗いした野菜に付着・残存する乳酸菌・酵母数が糠床自体に生息するそれらにある程度比例するという結果から、今後糠漬け野菜のプロバイオティクスとしての利用を模索する上では、糠床自体の菌数をどれだけ高く維持することができるかが重要となる。しかしながら、表1に示したように、今回使用した4種の糠床間でも乳酸菌・酵母数に大きな差がある。特にA～C糠床は、各メーカーや家庭で経験的な手法により長い年月をかけて熟成されたものであり、その差を考察するための科学的データに乏しいのが現状である。また、近年の報告^{12, 13)}では、小野らが香辛料の添加や発酵温度、塩分濃度が糠床菌叢に及ぼす影響について検討しているが、主に遺伝子解析により糠床から検出される乳酸菌の種類に差が生じるかに焦点を当てたものであり、乳酸菌や酵母等の生菌数に着目したものではない。一般的には、糠床中に生息するその他の細菌類・真菌類が優勢とならない程度に、高水分・低酸度・低塩分濃度に維持した方が、乳酸菌や酵母の生育にも好都合であると考えられる(今回使用した4種の糠床の中で、乳酸菌と酵母を合わせた生菌数が最も多いA糠床の水分量が比較的高く、酸度も低いことからこの傾向が若干見られる)。しかしながら、糠床に関して、これらのファクターが与える影響について科学的に立証したデータ(特に同

一の糠床間で)はほとんど報告されていない。そこで今後は、糠床の水分量・酸度・塩分濃度あるいは攪拌(床返し)の頻度等が、糠床中の乳酸菌・酵母の生菌数に及ぼす影響について詳細な検討を行いたいと考えている。糠漬け野菜のプロバイオティクスとしての機能性を模索するという目的だけではなく、糠床中の乳酸菌や酵母の生菌数が多いということは、つまり『糠床の発酵力が強い=糠床が元気である』という証拠でもあり、より風味豊かな糠漬け野菜を造ることに寄与できるのではないかと期待している。

さらに近年、島根県特産の津田かぶ漬けから、胃酸・胆汁酸耐性を有し、ヒトの腸管まで生きて届く可能性のある植物性乳酸菌が分離されたことが報告されている¹⁴⁾。今後は、糠床中の特に浸漬野菜に付着・残存する乳酸菌の中から、このようなヒトの胃酸・胆汁酸に耐性を示す乳酸菌の分離を試みたいと考えている。さらに、その分離株を食品グレードの培地素材¹⁵⁾で増殖させた後に糠床へ添加し、糠床の風味への影響・浸漬野菜への付着性等について検討を行う予定である。

V. 結 言

本研究で得られた結果から、糠床への野菜の浸漬により、野菜表面に付着した初発の一般細菌の多くが消失し、乳酸菌や酵母を中心とした糠床中の微生物叢に置換されることが示された。今後は、糠床中の生菌数を高めるための発酵条件(特に水分量や塩分濃度)の検討、並びに糠床中からヒトの胃酸・胆汁酸耐性を有する乳酸菌を探索すること等により、糠漬け野菜のプロバイオティクスとしての利用の可能性を探求していきたいと考えている。また、このような研究を通じて、九州北部に古くから伝わる糠床・糠漬け野菜の高付加価値化とその文化の継承に貢献していきたいと考えている。

文 献

- 1) 今井正武, 平野進, 饗場美恵子: 糠床の熟成に関する研究—熟成中の菌叢および糠床成分の変化—. 日本農芸化学会誌. 57: 1105-1112, 1983
- 2) 今井正武, 平野進, 饗場美恵子: 糠床の熟成に関する研究—熟成中のフレーバー成分の変化—. 日本農芸化学会誌. 57: 1113-1120, 1983
- 3) 今井正武: 糠みそ床の香気成分の生成に関する微生物と温度の影響. 日本食品低温保蔵学会誌. 21: 161-178, 1995
- 4) 今井正武, 後藤昭二, 平野進: 糠床熟成中の酵母フローラの消長と分離菌株の同定. 日本農芸化学会誌. 58: 545-551, 1984
- 5) 支倉さつき: 糠味噌漬のビタミン B₂に関する研究. 生活科学. 10: 15-29, 1974
- 6) 支倉さつき, 川上いつゑ: 糠味噌漬におけるビタミン B₁の移行とその組織化学的検索. 家政学雑誌. 31: 252-257, 1980
- 7) 支倉さつき, 小野克枝, 白形英代: 糠味噌漬の質的向上に関する研究-5-酸性プロテアーゼの利用について. 生活科学. 7: 119-128, 1967
- 8) Nakayama J, Hoshiko H, Fukuda M, Tanaka H, Sakamoto N, Tanaka S, Ohue K, Sakai K and Sonomoto K: Molecular monitoring of bacterial community structure in long-aged nukadoko: Pickling bed of fermented rice bran dominated by slow-growing Lactobacilli. J Biosci Bioen. 104: 481-489, 2007
- 9) Sakamoto N, Tanaka S, Sonomoto K and Nakayama J: 16S rRNA pyrosequencing-based investigation of the bacterial community in nukadoko, a pickling bed of fermented rice bran. Int J Food Microbiol. 144: 352-359, 2011
- 10) 坂本直茂, 中山二郎: 糠床のマイクロフローラと乳酸菌の共生. 生物工学会誌. 8: 482-485, 2011
- 11) 近江雅代, 青木るみ子, 古田宗宜, 藤田守: 大量調理における生食用野菜の殺菌方法の有効性についての検討. 西南女学院大学紀要. 20: 67-75, 2016
- 12) Ono H, Nishio S, Tsurii J, Kawamoto T, Sonomoto K and Nakayama J: Effects of Japanese pepper and red pepper on the microbial community during nukadoko fermentation. Biosci Microb Food Health. 34: 1-9, 2015
- 13) 小野浩, 西尾翔子, 釣井隼, 河本哲宏, 園元謙二, 中山二郎: 発酵温度および塩分濃度が糠床菌叢に及ぼす影響. 第 67 回日本生物工学会大会講演要旨集. p300, 2015
- 14) 麻生祐司: 機能性乳酸菌の探索と高付加価値食品への応用. 食品加工技術. 34: 7-13, 2014
- 15) 古田吉史, 丸岡生行, 中村彰宏, 大森俊郎, 園元謙二: 乳酸菌を利用した焼酎蒸留粕の高付加価値素材への転換プロセスの構築. 生物工学会誌. 88: 114-120, 2010

Changes in Microbiota Adherent to Pickled Vegetables during Nukadoko Fermentation

Yoshifumi Furuta, Yoshie Tanaka, Tatsuo Kai

< Abstract >

'Nukazuke', pickling vegetables in 'nukadoko', is one of Japanese traditional fermented foods. Nukadoko is prepared by natural fermentation of rice bran. To the best of our knowledge, there are no previous reports regarding changes in microbiota adherent to pickled vegetables, despite numerous reports regarding changes in the microbiota of nukadoko itself. We investigated changes in microbiota adherent to eggplants and cucumbers pickled in three different long-aged nukadoko (more than 85 years) and a newly prepared nukadoko. There was a significant difference in the number of lactic acid bacteria and yeast, and their ratio between four different nukadoko used in this study. The number of general bacteria adherent to pickled eggplants and cucumbers (rinsed by water after 18 hours of pickling) in any type of nukadoko decreased remarkably, compared to those adherent to the control (just rinsed by water). On the other hand, the number of lactic acid bacteria and yeast adherent to pickled eggplants and cucumbers increased, presumably concomitant with an increase in those in nukadoko. These results suggested that nukazuke might be used as probiotics by controlling the number of lactic acid bacteria in nukadoko at a high level.

Keywords: nukadoko, nukazuke, microbiota, lactic acid bacteria, probiotics