

特別演習報告：糠床中の乳酸菌の活性化に関する研究

渡邊 一哉¹、垣内 彩実²

【要旨】 本報告は、生命エネルギー工学研究室において平成 28 年度に学部 2 年垣内彩実が行った特別演習の成果をまとめたものである。本特別演習では、野菜の糠漬けの解析を通して菌叢の利用法や解析法を学ぶとともに、計画から報告までの一連の研究活動を体験することを目的とした。学期中に家で糠漬けを行い、その中の発酵産物や菌叢の解析は夏休みや春休みに行った。しかし、初めての糠漬けで乳酸発酵が思うように進まず、おいしいと思われる糠漬けを作ることができなかった。そこで、糠床中の乳酸菌を活性化する方法を検討することとし、糠床にいくつかの食品を直接混合して乳酸濃度と菌叢の変化を観察した。このようにして活性化した糠床からは分子系統的に新種の可能性がある乳酸菌が検出され、学術的にも興味深い成果が得られた。今後、乳酸菌を活性化した糠床に野菜を漬けてその効果を評価していきたい。

1. はじめに

糠漬けとは日本に伝わる伝統的な漬物で、米糠を乳酸発酵させて糠床を作り、その中に野菜などを漬けるものである。米糠とは、玄米を精米して白米にする時に削りとられる外皮のことを指す。漬物は今から 2000 年ほど前の大和朝廷時代にはすでに存在し、糠漬けの原型は奈良時代にはあったと言われている。このような漬物文化が日本で広がった理由としては、春夏に収穫した野菜を保存しておく必要性が挙げられ、その保存のために塩漬けが始まったとされている。さらに、乳酸菌が野菜の糖分を分解して酸味やうま味を産出するため、野菜がより美味しくなる方法として糠漬けが広まったと考えられる。さらに、白米の普及とともに米糠が大量に余ったことも普及の一因と思われる。糠漬けの特徴は、糠床に多くの栄養分が含まれていることである(1)。脚気が流行っていた頃、ビタミン B1 を多く含む糠漬けが広まったと言われている。

乳酸菌など糠漬けに関与する微生物の研究は広く行なわれ、今までに *Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Leuconostoc*、*Pediococcus* などが糠床中に存在することが明らかにされている。例えば、九州大学の坂本らは、糠床形成過程に出現する微生物群集を対象として 16S rRNA 遺伝子を用いた分子微生物生態解析を行い、発酵初期と熟成期には異なる種の *Lactobacillus* が優占化することを報告している(2)。しかし、塩分濃度などの糠漬け条件や漬ける野菜の種類によって出現する乳酸菌がどのように異なるかなど、糠漬け中の乳酸菌には未だ不明な点が多い。

私は糠漬け中で機能する微生物の多様性に興味をもち、自身で糠漬けをつくり、その中に出現する微生物を調査したいと考えた。そこで、家で糠床を立ち上げ野菜を漬けてみたが、なかなか十分に酸味やうま味が増した糠漬けを作ることができなかった。そこで本研究では、糠漬けを定量的に評価する方法として乳酸濃度を測定する方法や糠床内の菌叢解析法を確立した。また、乳酸菌の発酵を促進すると考えられる食品(バナナ、牛乳、ビールなど)を糠床に直接添加し、一定期間放置後の乳酸量と微生物菌叢を解析した。

¹生命科学部 応用生命科学科 生命エネルギー工学研究室

²生命科学部 応用生命科学科

2. 材料と方法

2.1. 材料

糠床の立ち上の際には、ぬか (400g)、食塩 (52g、最終塩分濃度は約 13%)、水 (400cc) を混合し、昆布 (2 本)、干し椎茸 (2 個、味に深みを加え、糠床の余分な水分を吸収する役割がある)、唐辛子 (2 本、辛味を加え、糠床の防腐作用がある) を添加した。

2.2. 糠床の立ち上げと維持

以下の手順で 2016 年 4 月 29 日に糠床を立ち上げ、その後維持した。

- ① 糠床に入れる水を沸騰させた後に食塩を加えて食塩水を作り、あら熱を取り除くために放置した。
- ② 上記で作った食塩水を 3 回に分けて米糠と混ぜ、均一に混合した。
- ③ 耳たぶくらいの固さになったら、昆布、干し椎茸、唐辛子を加え混ぜた。
- ④ 本漬けをする前に、糠の発酵を促すために「捨て漬け」を行った。クズ野菜を水でよく洗い、糠床に埋め込んだ。糠床を平らにならし、フタをして常温で保存した。風通りが良く、比較的涼しい場所に置いた。
- ⑤ 1 日に 1 回程度かき混ぜた。1 週間程度で「捨て漬け」を終了し、本漬けに移った。
- ⑥ 本漬けではキュウリやニンジンなどの野菜を中心に漬けていった。
- ⑦ 糠のサンプリングを、本漬け開始後一週間ごとに行った。サンプルは、速やかに -20°C の冷凍庫に保存した。

2.3. 添加物の効果の調査

乳酸発酵を促進させる添加物を検討するため、以下の食品を糠 (7 月 1 日) 20 g に添加し、よく混合した：牛乳 (2.1 mL)、ビール (2.2 mL)、チーズ (破碎物 2.4 g)、はちみつ (2.4 g)、バナナ (破碎物 2.5 g)。これらを、 30°C に保持し、10 日後と 37 日後に乳酸量を測定した。また、10 日後の糠からは DNA の抽出も行った。何も加えずに 30°C に保った糠をコントロールとした。

2.4. 乳酸濃度の測定

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて行った。糠 500 mg と水 500 μL を混合しボルテックスにより攪拌後、遠心して上澄みを回収した。この上澄みをフィルターろ過し、HPLC のサンプルとした。測定においては、カラムとして ZORBAX SB-Aq (4.6 \times 150 mm, 5-Micro ; Agilent)、移動相としてリン酸バッファー (pH 2) (H_3PO_4 : 0.75 mL, KH_2PO_4 : 1.18 g, アセトニトリル : 10 mL/L) を用いた HPLC system (1100 series ; Agilent) を、Newton らの方法により使用した (3)。注入量 5 μL 、流速 1 mL/min、カラム温度 25°C 、UV 検出波長 210 nm とし、標準物質の保持時間やピーク面積の比較から乳酸を定量した。

2.5. 菌叢の解析

以下の 10 サンプルを解析に用いた：①2016/5/13、②2016/5/27、③2016/6/10、④2016/7/1、⑤添加物実験のコントロール (無添加、一か月培養後)、⑥チーズ、⑦バナナ、⑧はちみつ、⑨ビール、⑩牛乳。DNA 抽出には FastDNA Spin Kit for Soil (Q-BioGene 社) を用いた。このキットの 1 チューブに糠 0.5g を加え、キットの指示書に従って DNA を抽出した。抽出後、Nano-drop 吸光光度計により DNA 濃度の測定と品質検定を行った。得られた DNA サンプルから 16S rRNA 遺伝子断片を増幅した。PCR 溶液の組成や増幅条件は文献を参考にした (4)。これらプライマーには、パイロシーケンス用のアダプター配列とサンプル識別のためのタグ配列が付加されていた。PCR 増幅物の確認は、アガロースゲル電気泳動により行った。PCR 産物の精製には QIAquick PCR Purification Kit を用いた。精製物中の DNA 濃度を測り、各サンプル中の DNA 量が同じになるように混合し、パイロシーケンス解析を行った。決

定された配列については、NCBI データベースに対する BLAST 検索を行い、各配列が帰属される分子系統を決定した。さらに、各分子系統に含まれるリードの数を CLC Genomics Workbench version 6.5.1 により計算した。代表的な配列については、分子系統的な位置を明確にするため、系統樹を作成した。NCBI データベースから比較対象の配列を抽出し、それらと決定した配列のアライメントおよび近隣接合法による系統樹の作成を MEGA7 (5) により行った。

3. 結果

3.1. 糠漬け中の乳酸の濃度

糠漬けを開始後約 2 か月経った糠中の乳酸濃度を測定し、一緒に実験を行った益田さんの糠の値と比較した。その結果、益田さん糠中の乳酸濃度は約 90 mM あり、一方私の糠中の乳酸濃度は約 14 mM で、6 分の 1 程度と低いものであった。この結果は、私の糠漬けは十分に漬け物の味がせず、おいしくなかったことと関連すると考えられた。原因としては乳酸菌が十分に生育していないことが考えられたので、糠中の乳酸菌を増やす方法の検討をすることにした。

3.2. 添加物の乳酸濃度への影響

乳酸菌は主に糖を発酵し乳酸を生成することにより生育する。そこで、糖を含む食品などを糠に添加し、乳酸濃度が上昇するかを調査した。添加物として、牛乳、ビール、チーズ、はちみつ、バナナを検討した (図 2)。その結果、牛乳、ビール、チーズ、バナナを添加した糠において顕著に乳酸濃度が上昇した。1 週間後と 1 ヶ月後の乳酸濃度には大きな違いが見られなかったことから、比較的速やかに乳酸発酵が進行したと考えられた。一方、はちみつには乳酸濃度を上昇させる効果は見られなかった。

3.3. 添加物の糠中菌叢への影響

添加物により乳酸濃度が上昇したので、どのような乳酸菌が出現したかに興味をもたれた。そこで、16S rRNA 遺伝子断片を用いた菌叢解析を行った。PCR 産物を電気泳動により確認した結果を図 3 に示す。どの糠サンプルにおいてもバンドが 2 本観察されているが、これらは原核生物の 16S rRNA 遺伝子由来の短いバンドと真核生物 (糠プラズチド) の 18S rRNA 遺伝子由来の長いバンドと考えられる。

得られた遺伝子配列の BLAST 検索から存在する微生物の分子系統を推定した (図 3)。決定された配列には稲のプ

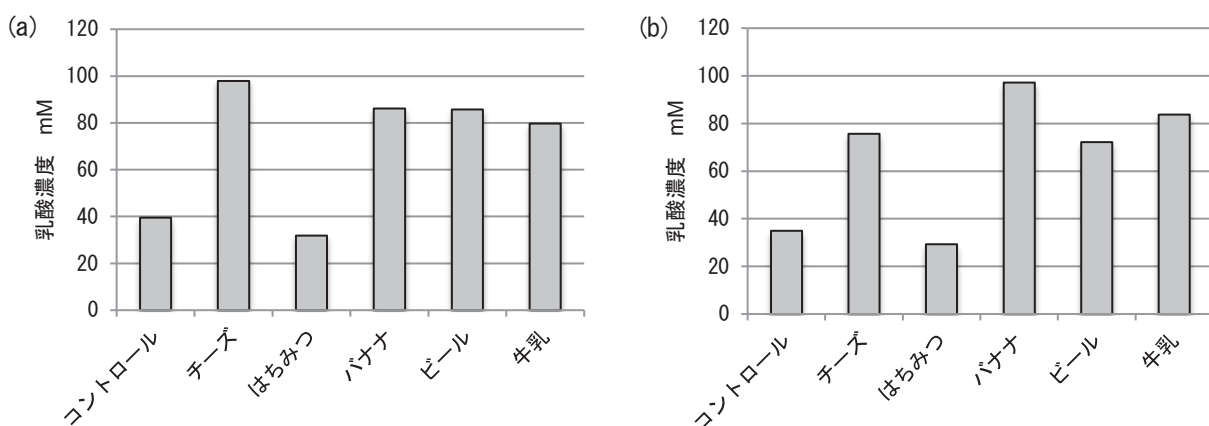


図 1. 添加から 1 週間後 (a) および 1 ヶ月後 (b) の乳酸濃度

ラスチド由来のものが多数存在したので、それらは以降の解析からは除外した。この結果はPCR産物の電気泳動結果(図2)に対応するものであり、電気泳動において短いバンドのみを回収すれば、原核生物由来の配列を選択的に決定することができたと考えられる。図3aに示すように、網レベルでは*Bacilli*が最も多かった。*Bacilli*は糠漬けを始めた当初は少なかったが、その後増加し、添加剤を加えて乳酸濃度が増加した糠サンプル中では大多数を占めるようになった。このことは、*Bacilli*に属す細菌が乳酸発酵に関わっていたことを示している。増加した*Bacilli*においては、科レベルでは多様な乳酸菌を含む*Lactobacillaceae*が多数を占め、その中でも*Pediococcus*属が一番多く、次いで*Weissella*属が多かった。これら乳酸菌が添加剤を発酵して乳酸濃度を高めた可能性が考えられた。

そこで、多数検出された*Pediococcus*属細菌のさらに詳細な分子系統的位置を知るため、代表的な配列およびデータベースに登録されている*Pediococcus*属細菌 Type strain の配列を用いて分子系統樹を作成した(図4)。この系統樹が示すように、本研究により糠から検出された配列は、*Pediococcus pentosaceus*に近縁であるものの、既知の*Pediococcus*属細菌とは異なる一群を形成しており、それらは新種と考えられた。

4. 考察

家で始めた糠漬けはなかなか美味しくならなかったが、乳酸濃度が上昇しなかったことが確認され、乳酸菌が増えなかったことが原因と考えられた。乳酸菌が増えなかった原因の一つとして、糠床と野菜の比率にあるのではないかと考えた。糠床には最初から乳酸菌がいるわけではなく、野菜の周りに付着した植物性乳酸菌が、糠床の塩分によって野菜から引き出された養分をエサにして繁殖すると言われている。つまり、十分な量の野菜を漬けないと、乳酸菌の繁殖が滞ってしまうと考えられる。私の糠床では糠の量に対して野菜の量が少なく、そのため乳酸菌があまり増加しなかったものと考えられた。また、漬ける前に野菜を過剰に水洗いし、乳酸菌を洗い流してしまったことも一因ではないかと思われた。

糠にいくつかの食材を加えて乳酸濃度が上昇するか調べた結果、はちみつ以外の食材で乳酸濃度の上昇がみられた。乳酸を増やすためには、乳酸菌が発酵可能な糖質を供給することが必要であるが、乳酸菌を効率よく増やすためには他の栄養素(アミノ酸、ビタミン、核酸塩基、金属塩など)も必要と考えられた。その理由は、バナナには可食部100gあたり21.4gの糖質が含まれているが、ハチミツにはそれ以上(70g以上)の糖質が含まれるから

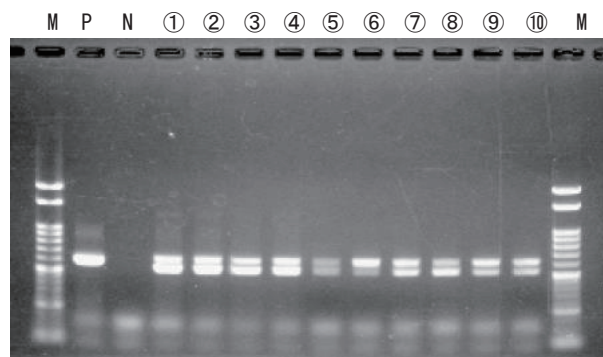


図2. 16S rDNA 遺伝子断片のPCR産物のアガロースゲル電気泳動。M: マーカー, PC: ポジティブコントロール(シュウネラ菌のDNAを添加), NC: ネガティブコントロール(DNA非添加), ①~⑩: 「2.5. 微生物菌叢の解析」に示したサンプル由来のDNAを用いたもの。

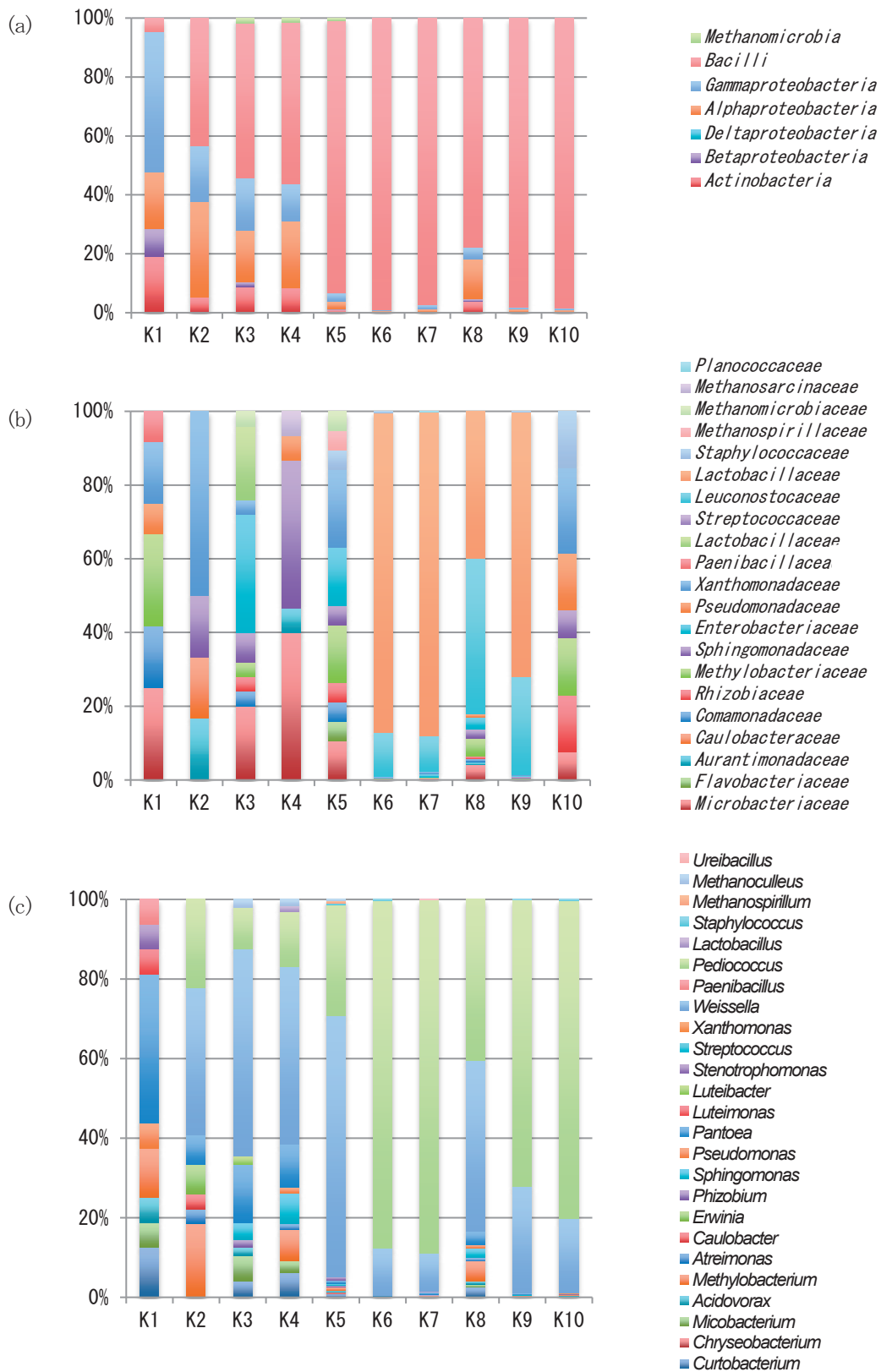


図3. 糠床中の菌叢の分子系統的構成。(a) 綱レベル、(b) 科レベル、(c) 属レベル。K1 から K10 は①が⑩の菌叢を示す。

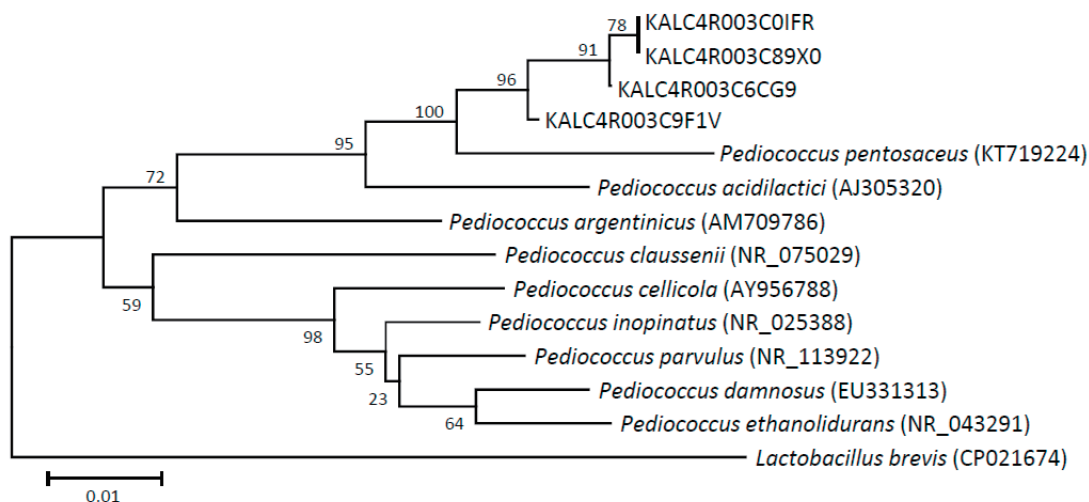


図 4. 本研究により検出された主要な *Pediococcus* 属細菌の分子系統的位置。*Lactobacillus brevis* を out group に用いた。KALC4R003 で始まる番号が本研究で決定した配列を示す。() の中の番号は、NCBI データベースにおける accession number である。ノードの番号は Bootstrap 値 (100 回解析) である。

である(1)。このことは、糖質のみでは乳酸菌を十分に増やせないことを示している。例えば、ハチミツ中のカリウム量はバナナと比べて非常に低い (100 g 中に 13 mg と 360 mg)。バナナはビタミン類やミネラル類も豊富に含んでおり、それらを利用して乳酸菌が増加できたと考えられる。

糠床の菌叢解析の結果、*Pediococcus* 属の乳酸菌が最も豊富に存在していたことが示された。*Pediococcus* 属は他の糠床菌叢解析においても検出されているが(2)、私の糠床に豊富存在していた *Pediococcus* 属は新種のものである可能性が示された。今後この細菌を単離し、新種の提唱をしていきたいと考えている。

5. 参考文献

1. 文部科学省. 日本食品標準成分表 2015 年版(七訂).
2. 阪本直茂, 中山二郎. 2011. 糠床のマイクロフローラと乳酸菌の共生. 生物工学 89:482–485.
3. Newton GJ, Mori S, Nakamura R, Hashimoto K, Watanabe K (2009) Analyses of current-generating mechanisms of *Shewanella loihica* PV-4 and *Shewanella oneidensis* MR-1 in microbial fuel cells. Appl. Environ. Microbiol. 75:7674–7681.
4. Miyahara M, Hashimoto K, Watanabe K (2013) Use of cassette-electrode microbial fuel cell for wastewater treatment. J. Biosci. Bioeng. 115:176–181.
5. Kumar S, Stecher G, and Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33:1870–1874.