

報告

熟成期間の異なる糠床の美味しさの評価 ～細菌叢解析ならびに官能評価による比較～

船越 淳子* 飯田 健一郎** 波多野 淳子***
千々和 勝己** 近江 雅代*,***

＜要 旨＞

福岡県北部に位置する北九州地域では、糠床を利用した「糠漬け」や「糠炊き」が郷土料理として浸透している。これまでに、糠床を対象とした菌叢解析や菌叢変化に関する研究は行われているが、糠漬けの美味しさとの関連性についての報告は少ない。本研究は、熟成年数の異なった糠床を用いて細菌叢解析ならびに糠漬け（きゅうり）の官能評価による比較検討を行った。糠床の細菌叢解析の結果、熟成糠床は *Lactobacillus* 属が94%、*Edaphochlorella* 属が6%を占めており、新成糠床では、熟成6ヵ月後まで *Lactobacillus* 属のみが占めていた。さらに全ての糠床において、*L. acetotolerans* を確認し、熟成期間に従ってその割合が高くなることを認めた。糠漬け（きゅうり）を用いた官能評価結果から、熟成糠床ならびに新成糠床（2ヵ月）の比較では、熟成糠床の評点は0.71～1.86、新成糠床（2ヵ月）は-1.44～1.43を示し、熟成糠床において旨味が有意に高いことを確認した ($p<0.01$)。一方、熟成糠床ならびに新成糠床（6ヵ月）では、塩味において熟成糠床で有意に高いことを認めた ($p<0.01$)。糠漬けの美味しさの違いは、糠床の成分や食塩濃度に加え、細菌叢やそのバランスが影響しているものと推察された。

キーワード：糠床、糠漬け、細菌叢解析、*Lactobacillus* 属、官能評価

I. はじめに

糠漬けは、日本で古くから食されてきた漬物で伝統的な発酵食品の一つである。米糠に食塩や香辛料を加えて混ぜ込み、自然発酵させた「糠床」に様々な野菜を漬け込んで製造されている。福岡県北部に位置する北九州地域では、糠床を利用した「糠漬け」や「糠炊き」が郷土料理として浸透しており、代々受け継がれ、長期間熟成された糠床を所有している家庭も少なくない。また、糠床、糠漬けは、近年、様々な機能性を有する微生物が存在していることから、発酵食品としての注目が高まっている。

糠床に関するこれまでの研究では、今井ら^{1)~3)}による熟成中の糠床成分と菌叢の変化や香气成分の生成に関する影響について、また、阪本ら⁴⁾は、糠床のミクロフローラと乳酸菌の共生について報告している。2014年には小野・中山ら⁵⁾によって、次世代シーケンサーを用いた発酵食品の菌叢解析によって、糠床に存在する乳酸菌の菌種レベルでの詳細な検討が報告され

ている。

これまでに、糠床を対象とした菌叢解析や熟成期間における菌叢変化、糠床で生成される成分に関する研究は行われているが、糠漬けに関する報告では、品質特性の報告⁶⁾はあるものの、美味しさとの関連性についての報告は少ない。また、糠床の製造方法は家庭や企業によって多様であるため、詳細に検討されたものも少ない。そこで本研究では、糠床の栄養学的価値と美味しさとの関連を探ることを目的として、熟成年数の異なった糠床を用いて、細菌叢解析ならびに糠漬けの官能評価による比較検討を行った。

II. 実験方法

1. 糠床の調製

北九州市内の糠床専門店で購入した、熟成期間が100年以上経過しているとされる糠床（熟成糠床）ならびに熟成糠床と同じ方法で調製した糠床（新成糠床）

* 西南女学院大学保健福祉学部栄養学科
*** 北九州小倉・糠床糠炊き研究会

** 公益財団法人北九州生活科学センター

の2種を用いた。新成糠床の調製には、米糠1kg、天然塩120g、水1kg、熟成糠床（種糠）150g、赤唐辛子5本、青唐辛子5本、山椒の実、昆布、だいたい果皮、しょうがを加え十分に混合した。その後、毎日攪拌し、1か月後までは、キャベツ、大根、にんじん、きゅうりなどの野菜を「捨て野菜」として漬け込み、2日ごとに取り換えた。新成糠床の調製1か月後から12か月後までは、室温で保管し2日に1回の攪拌を行った。さらに、2週間に1回のペースで2日間の野菜の漬け込みを継続し、糠床を熟成させた。

糠床の細菌叢解析は、熟成糠床、新成糠床の熟成2ヵ月後（新成糠床（2ヵ月））、新成糠床の熟成6か月後（新成糠床（6ヵ月））を用いて行った。官能評価には、これら3種類の糠床に野菜を漬け込み糠漬けを作製し、試料とした。

2. 野菜の漬け込み

野菜の漬け込みにはきゅうりを用いた。きゅうり表面に塩0.5gを摺り込み、それぞれの糠床に室温で約12時間漬けた。

3. 菌数測定

1) DNAの抽出及び精製

検体（糠床）1gを2mL容スクリーキャップ付きチューブに測り取り、DNA抽出液（200mM EDTA, 100mM Tris-HCl (pH8.0)）を加え全量を2mLとし、スマッシャーにて検体を均一化したものを試料液とした。次に、15mL容チューブにDNA抽出液を1.9mL取り、均一化した試料液を0.1mL加え、全量を2mLとした。この溶液0.2mLを1.5mL容エッペンドルフチューブに取り、菌体破壊前試料（蛍光染色菌数測定用）とした。残りの溶液には、30% SDS溶液0.2mLを加え再び全量を2.0mLとし（SDS濃度3%）、超音波破碎機（BRANSON社製、デジタルソニファアドバンスド450D）で超音波処理（15秒、3回）を行い、これを菌体破壊後試料溶液とした。菌体破壊後試料溶液0.2mLを1.5mL容エッペンドルフチューブに取り、菌体破壊後試料（蛍光染色菌数測定用）とした。菌体破壊後試料溶液0.7mLを1.5mL容エッペンドルフチューブに移し、TE緩衝液（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0）飽和Phenol溶液0.5mLを加え転倒混和後、遠心分離機（クボタ社製、3520）で5分間の遠心分離（12,000×g、室温）を行った。上清をAmicon Ultra Centrifugal Filter Devices（MILLIPORE社）を用いて、限外濾過法にて濃縮し、

洗浄後（PBS×2回、TE×2回）DNAを回収した（DNA溶液）。

2) 蛍光染色法（全菌数および菌体破壊率の算出）

菌体破壊前試料（蛍光染色菌数測定用）または菌体破壊後試料（蛍光染色菌数測定用）0.02mLに、染色用緩衝液（0.1M Na₂HPO₄, 0.5mM EDTA, 850mM NaCl, pH8.5）0.98mLを加え混合した。その溶液にEtBr水溶液（2mg/mL）0.05mLを加え室温で10分間染色を行い、メンブレンフィルター（孔径0.02μm）を用いて吸引ろ過後、フィルターを蛍光顕微鏡（Olympus BX50）で検鏡した。1試料につき30視野、細菌様の形状物を計測（破壊前、破壊後）し全菌数を算出後、菌体破壊率（%）を算出した。

3) 好気培養法

試料液の10倍希釈系列を作製したものを標準寒天培地（日水製薬社製）を用いて滅菌シャーレ2枚に混釈後、35°Cで培養し、48時間後にコロニー数をカウントした。

4. 細菌叢解析

DNA溶液を用いてPCRで細菌16S-rRNA領域の上流約550bpを増幅した。

用いたプライマーは下記の通りとした。

341F: 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'

907R: 5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3'
(M: A/C, R: A/G)

予想されるPCR産物の大きさは約580bpであり、実際にこのサイズのPCR産物を得た。得られたPCR産物はTOPO TAクローニングキット（Invitrogen社）を用いてサブクローニングを行い、付属コンピテントセル（TOP10）へ形質転換を行った。出現したコロニーからランダムに選択した96コロニーを選び、DNAシーケンサー（Applied Biosystems社製、ABI 3500XL Genetic Analyzer）を用いて、クローニングされたDNA領域のDNAシーケンスを決定した。これらの配列をデータベース（NCBI-BLAST）に照合し、細菌叢を決定した。

5. 糠漬けの官能評価

官能評価には、熟成糠床ならびに新成糠床（2ヵ月、6ヵ月）を用いて調製した糠漬けを試料とした。平均年齢19.9±1.0歳、本学女子学生18名により、糠漬けの外観、香り、塩味、酸味、うま味、みずみずしさ、

しゃきしゃき感の7項目について7段階評点法（普通を0として、-3から3まで）を用いて実施した。糠漬けは、流水で10秒間の洗浄後水分を拭き取り、3mmの厚さで輪切り状にしたものを試料として供した。統計解析はSPSS（Ver. 24）を用い、群間差の検定にはMann-WhitneyのU検定を行った。

6. 倫理的配慮

本研究の官能評価は、西南女学院大学の倫理委員会の承認を受けて行った（2019年度 受付番号3号）。研究の実施に際し、口頭で研究の目的、意義、内容、アレルギーについて十分な説明を行い、無記名の評価票の提出をもって同意が得られたものとした。

Ⅲ. 結果

1. 糠床の菌数測定

糠床の菌数測定では、全ての試料において、菌体破壊率は基準である70%よりも高い値であり、標準寒天培地での好気培養で得られたコロニー数は、いずれも全菌数の0.1%未満を示した。以上の結果より、全ての試料において細菌叢解析に必要な菌数が得られたことを確認した（表1）。

2. 糠床の細菌叢解析について

糠漬けは発酵を利用した漬物として、日本の伝統的な発酵食品の一つであり、北九州では昔から受け継がれている糠床を所有する家庭も多くみられる。本研究においては、北九州市内の糠床専門店で使用されている熟成期間が100年以上経過した熟成糠床ならびに、新成糠床（2ヵ月、6ヵ月）を試料として用いた。熟成糠床では*Lactobacillus*属が94%、*Edaphochlorella*属が6%であり、新成糠床（2ヵ月、6ヵ月）ではどちらも*Lactobacillus*属が100%を占めていた。

次に菌種別では、いずれの糠床においても*Lactobacillus acetotolerans*が存在しており、熟成糠床では83%と最も高い割合を示し、新成糠床（6ヵ月）で66%、新成糠床（2ヵ月）で47%であった。新成糠床（2ヵ月）では、*L. acetotolerans*に次いで、*Lactobacillus namurensis*が42%を占め、この2種類が約90%を占めていた。しかしながら、新成糠床（6ヵ月）では*L. acetotolerans*の割合は増加しているものの、*L. namurensis*が消失し、新成糠床（2ヵ月）では出現していない*Lactobacillus versmoldensis*（15%）や*Lactobacillus nodensis*（10%）をはじめとする新たな菌種を確認した（図1）。

表1：糠床菌数測定

	全菌数 (cells/g) A	好気培養 (CFU/g) B	菌体破壊率 (%)	全菌数に対する 好気性菌の割合 B/A (%)
熟成糠床	2.2×10^8	1.0×10^5	84.4	0.05
新成糠床 (2ヵ月)	1.6×10^8	5.7×10^4	83.8	0.03
新成糠床 (6ヵ月)	1.0×10^9	1.4×10^5	92.8	0.01

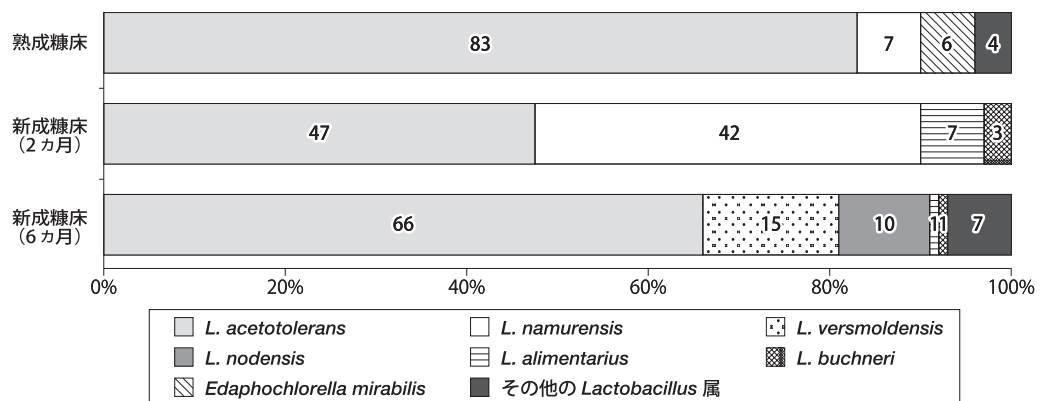


図1：糠床細菌叢解析

糠床に関する研究において、今井ら¹⁾は、調製初期の糠床に占める *Lactobacillus* 属の割合は、わずか15%程度であったが、熟成30日間でほぼ100%近くが *Lactobacillus* 属となり、その後60日、90日においても *Lactobacillus* 属が優勢であり、その他のグラム陽性菌およびグラム陰性菌の増殖は見られないと報告している。また、超長期熟成糠床の菌叢解析ではこれまでに報告されていた乳酸菌と異なり、*L. acetotolerans* や *L. namurensis* といった比較的希少種である乳酸桿菌が優占種として存在すると報告している⁷⁾。本研究において新成糠床(2ヵ月)では *Lactobacillus* 属のみが占めており、熟成6ヵ月後までは同様の傾向を示した。さらに菌種の比較において熟成糠床ならびに新成糠床ともに *L. acetotolerans* の存在を確認し、熟成期間が長くなることによってその割合が増加することを認めた。

3. 糠漬けの官能評価

糠床の細菌叢の変化と美味しさとの関連を評価する

ため、熟成糠床ならびに新成糠床(2ヵ月、6ヵ月)を用いて糠漬けを作成し、糠漬けによる官能評価を行った。熟成糠床ならびに新成糠床(2ヵ月)の比較では、熟成糠床の評点は0.71~1.86、新成糠床(2ヵ月)では、-1.14~1.43を示し、熟成糠床の旨味において有意に高いことを確認した($p<0.01$)。一方、熟成糠床ならびに新成糠床(6ヵ月)の結果では、熟成糠床は0.33~1.61、新成糠床(6ヵ月)は-0.67~1.39であり、熟成糠床において塩味が有意に高いことを確認した($p<0.01$)。新成糠床(2ヵ月)を用いた官能評価では、旨味以外では有意差は認められなかったものの、全ての項目で熟成糠床の評点が高い傾向であったが、新成糠床(6ヵ月)との比較では、同様の傾向は認められなかった。さらに、熟成糠床と新成糠床(2ヵ月)および新成糠床(6ヵ月)の評点の差を比較した結果、新成糠床(6ヵ月)において、香り、旨味、酸味、みずみずしさの項目で熟成糠床との評点の差が減少傾向を示した(図2)。

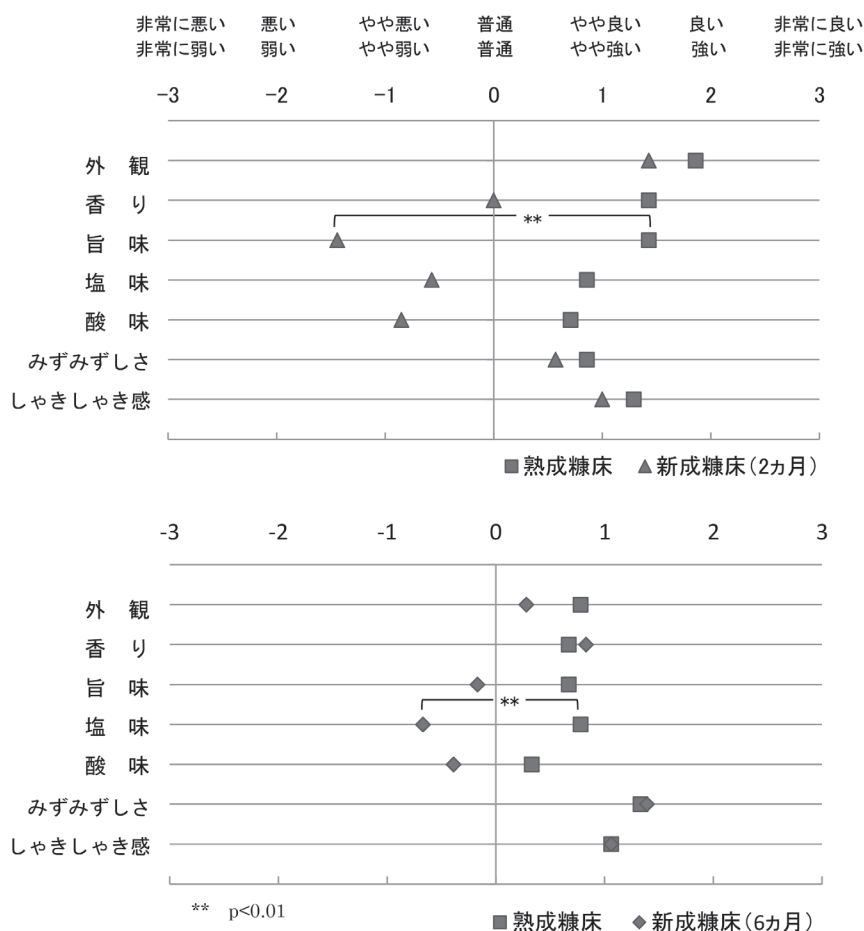


図2：糠漬け官能評価

IV. 考察

小野らは、*L. acetotolerans*のみを優占種としている糠床は熟成期間が40～100年程度長期間熟成された糠床で認められたと報告している⁵⁾。さらに、*L. acetotolerans*は低いpHでも耐性があることから、乳酸生成に伴い他の菌の増殖が停止した後に、増殖を続けることができ、また、増殖速度は非常に緩慢であると示している^{8),9)}。本研究においても糠床中に*L. acetotolerans*が存在することを確認した。実験に使用した熟成糠床は100年以上受け継がれてきた糠床であるため、長い熟成期間を通して*L. acetotolerans*が優占種となったと考えられ小野らの報告と一致した。一方、宮尾は¹⁰⁾発酵初期では*Enterococcus*属、*Leuconostoc*属、*Pediococcus*属が出現するが、発酵の進行に伴い、比較的早い段階で*Lactobacillus plantarum*や*Lactobacillus brevis*が優占菌になると報告している。さらに、小野ら⁵⁾は*L. plantarum*が優占種となった糠床を受け継ぐことによって、次第に*L. namurensis*と*L. acetotolerans*が優占種となると示している。本研究では、新成糠床(2ヵ月)で*L. acetotolerans*について*L. namurensis*が高い割合であり、新成糠床(6ヵ月)では、*L. acetotolerans*が最も高い割合を示していた。これは新成糠床の調製の際に、米糠の15%量の熟成糠床を加えているため、新成糠床では*L. plantarum*などの菌種は認められず、熟成初期段階から熟成糠床の優占種となっていた*L. acetotolerans*が存在し、熟成期間に伴ってその割合が増加したと考えられる。このことから、新規に糠床を調製する際には、熟成した糠床を添加することによって、早い期間で糠床の熟成が進み、安定した細菌叢を有する糠床となることが推察された。

次に、図2に示した糠漬けによる官能評価結果より、熟成糠床ならびに新成糠床(2ヵ月)の比較では、熟成糠床の旨味において有意に高い値であり、その他の項目では有意差は認められなかった。今井ら¹⁾は、糠床の粗脂肪量は熟成期間を経るに従って増加し、粗タンパク質は減少傾向を示したと報告している。さらに、糠漬けの風味には、糠床の成分だけでなく、糠床に含まれる酵母、乳酸菌、乳酸菌以外のグラム陽性菌などのバランスも影響していると報告している。これらのことから、新成糠床(2ヵ月)は、熟成期間が短いため、熟成糠床と同様の菌種は含んでいるものの、その割合の違いが糠漬けの嗜好性に影響していることが推察さ

れる。一方、新成糠床(6ヵ月)を用いた官能評価では、有意差は認められなかったものの、香りならびにみずみずしさで、新成糠床(6ヵ月)の評点が高い傾向を示し、塩味においては熟成糠床で有意に高い値を確認した。糠床の食塩濃度は、酸の生成や微生物の生育だけでなく、糠漬けを作成する際に野菜から水分を引き出す力にも影響を持つと考えられている。新成糠床(6ヵ月)を用いた糠漬けの官能評価結果から、新成糠床(6ヵ月)の食塩濃度が低下していたことが考えられ、これによって野菜中に水分が残存し、糠漬けの食感に影響したと推察される。また、乳酸菌による乳酸発酵には、糖質から乳酸のみを生成するホモ発酵型と、乳酸以外に酢酸などの有機酸、二酸化炭素やアルコールといった物質を生成するヘテロ発酵型がある。乳酸菌の菌種によって乳酸発酵の形式が異なるため、糠床に存在する乳酸菌の菌種が変化することによって、嗜好性に関連する成分の生成に違いが生じることが考えられた。

本研究では、糠床の栄養学的価値と美味しさとの関連を探ることを目的として、熟成年数の異なる糠床を用いて、細菌叢解析ならびに糠漬けの官能評価による比較検討を行った。官能評価において糠漬けの風味に対する変化を確認したが、糠床の栄養成分や糠漬けの物理的評価との関連性を検討できていないため、今後はこれらの品質特性との関係についても検討を加える予定である。また、北九州地域では「糠漬け」だけでなく、糠床を利用した「糠炊き」が郷土料理として昔から広く食されている。そのため、地域や企業によって糠炊きの特性は異なるものと考えられる。今後、それらについても栄養学的価値と美味しさを評価することによって、北九州の郷土料理として糠漬けや糠炊きの良さを提示でき、北九州を代表する食の一つとしてその魅力を発信することに役立てたいと考える。

参考文献

- 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: 糠みそ床の香气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) 阪本直茂, 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
- 5) 小野浩, 中山二郎: 次世代シーケンサーを用いた発酵食品の細菌叢解析—見えてきた複雑系の深部—, 日本乳酸菌学会誌. 25, 3-12, 2014
- 6) 深井洋一, 塚田清秀: 速醸糠漬けの品質特性の検討—糠漬けの品質特性に関する研究(第1報)—, 日本調理科学会誌. 40, 22-26, 2007
- 7) 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 of rice bran dominated by slow-growing lactobacilli., *J. Biosci. Bioeng.*, 104: 481-489, 2007
- 8) Tanaka K, Tajiri S, Sawada R, Kawamoto Y, Matsubara T, Hoshino M and Matsusaki H: Acid-tolerant lactic acid bacterium isolated from rice vinegar. *J. res. Appl. Natural Soc. Sci.*, 3, 29-36, 2015
- 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) 宮尾茂雄: 漬物における微生物研究の歩み, *New Food Indust.*, 31, 1-26, 1990

Evaluation of Taste in Nukadoko with Different Aging Periods – Comparison by Microbiota Analysis and Sensory Evaluation –

Atsuko Funakoshi ^{*}, Kenichiro Iida ^{**}, Junko Hatano ^{***},
Katsumi Chijiwa ^{**}, Masayo Oumi ^{*,***}

<Abstract>

“Nukazuke” and “nukadaki” using “nukadoko” are pervasive as local food in Kitakyushu, which is located in the northern part of Fukuoka. So far, there are few reports regarding taste of nukazuke, despite the fact that research on microbiota analysis and microbiota changes in the nukadoko. In this study, we investigated microbiota analysis of nukadoko with different ages and sensory evaluation of pickled cucumber in nukadoko. As a result of the microbiota analysis, the long-aged nukadoko contained *Lactobacillus* (94%) and *Edaphochlorella* (6%), the newly prepared nukadoko contained only the *Lactobacillus* until 6 months of aging. Further long-aged nukadoko and newly prepared nukadoko contained *L. acetotolerans*, which increased with longer aging period. In the sensory evaluation results of the long-aged nukadoko pickles scored 0.71 to 1.86, and newly prepared nukadoko (2 month of aging) pickles scored -1.44 to 1.43, confirming that “umami” was significantly different ($p < 0.01$). Comparing the long-aged nukadoko pickles and the newly prepared nukadoko (6 month of aging) pickles, the salty taste of long-aged nukadoko pickles was significantly higher ($p < 0.01$). These results suggested that taste of nukazuke might be influenced by the components of nukadoko, salt concentration, microbiota and balance of microbiota.

Keywords: nukadoko, nukazuke, microbiota analysis, *Lactobacillus*, sensory evaluation

* Seinan Jo Gakuin University
** Kitakyushu Life Science Center
*** Kitakyushu Kokura Nukadoko Nukadaki Kenkyukai

