

ソバもやし水耕栽培における微生物の増殖とフローラ

山梨大学医学工学総合研究部・ワイン科学研究センター
高柳 勉・齋藤 誠也

Microbial Growth and Flora in Buckwheat (Soba) Sprouts

Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering &
The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi
Tsutomu TAKAYANAGI and Seiya SAITO

要 約

プラズマ水殺菌システムをソバもやし栽培の水供給に利用するための基礎データとして、ソバもやし栽培中の微生物の増殖とフローラを検討した。ソバもやしの植物体には、栽培初期（2日目）から $10^6 \sim 10^7$ cfu/gFWの一般細菌が検出され、栽培期間を通してほぼ一定であった。また、蛍光灯による光照射は、一般細菌数に影響しなかった。ソバもやしから分離した代表的な3種類の菌の16S rRNAの部分塩基配列を解析し、データベースと比較したところ、*Escherichia*属 (99.8%)、*Enterobacter*属 (99.6%)、*Pantoea*属 (99.6%) と高い相同生が示された。

Abstract

Microbial growth and flora attached to buckwheat (soba) sprouts were investigated. The buckwheat sprouts examined consistently harbored 6 to 7 log cfu/gFW of native bacteria from 2 days after seeding to the harvest time. Irradiation with white light had no effect on the bacterial cell number in the buckwheat sprouts. Microbial flora in the buckwheat sprouts was analyzed by the method based on the partial nucleotide sequences of 16S ribosomal RNA gene. The sequences of three bacteria isolated from the buckwheat sprouts were highly homologous with that of *Escherichia* sp. (99.8%), *Enterobacter* sp. (99.6%) and *Pantoea* sp. (99.6%) .

1. 緒 言

もやしは、一般に豆・麦類などの種子を水に浸漬して発芽させたもので、調理材料として広く利用されている。もやしの製造は、28~40℃、湿度80~90%という高温・高湿の環境下で数日間の栽培を行うことから、微生物の増殖による問題が生じやすい。すなわち、もやしの生育を阻害する植物病害菌の増殖による生育不良や人にとって有害な食中毒菌の増殖などである。特に、ソバもやしのよう、サラダとして生食に用いるものは、食中毒菌による汚染は重大な問題となる。プラズマ水殺菌システムを利用して、もやし栽培用の水を効率的に殺菌できれば、このような微生物汚染を軽減すると同時に、水使用量を節約できると期待される。本研究では、プラズマ水殺菌システムをソバもやし栽培の水供給に利用するための基礎データとして、ソバもやし栽培中の微生物の増殖状況を検討した。すなわち、ソバもやし栽培中の一般細菌数の変化を測定し、その種類を16S rRNAをコードしているDNAの部分塩基配列から推定した。

2. 実験方法

2-1 ソバもやしの栽培

ソバもやしの種子を3時間浸漬後、水気をとり、1昼夜、低温（4℃）暗室で保存した。この種子をトレーのネットの上に均一に蒔き、水に種子が接触しない程度に水を入れた。種子は浸漬処理後に重さを測り、1トレーあたり100g播種した。トレーの上部を厚手のダンボール用紙で覆い、光を遮断し、25℃で栽培した。もやしの全長が10cm以上の大きさになったところで、ダンボールを取り除き、蛍光灯の直下30 cmの位置で光を照射した。

2-2 一般細菌数の測定

滅菌したピンセットを用いて、トレーよりソバもやしを取り出し、2.0gになるように調整した。バグミキサー用破砕袋に2.0gの検体と滅菌水20mlを入れ、バグミキサー装置 (MinMix, アズワン) を用いて、破砕した（強さ 8, 1 min）。破砕溶液1.0mlを滅菌した9 mlの生

理食塩水 (NaCl8.0g, KCl0.2g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 3.58 g, KH₂PO₄ 0.24g, 滅菌水1.0L) に加えて, 10倍希釈溶液を作成した. 以後同様に, 10²倍から10⁷倍の希釈系列を作成した. それぞれの希釈液から1.0ml取り出し, 滅菌シャーレの中で50℃に保温しておいた9.0mlの標準寒天培地「ダイゴ」(日本製薬) と混ぜ合わせた. 暫く静置して, 培地が凝固したら, シャーレのフタを閉め, パラフィルムを巻き, 25℃で48時間培養した. それぞれのプレート上に出現したコロニーを計数し, 各菌数を colony forming unit / g of fresh weight (cfu / g FW) として表した.

2-3 DNA解析

もやしの製造工程において発生する一般的な細菌¹⁾, *Pseudomonas* (DQ133572), *Enterobacteriaceae* (DQ124676), *Acinetobacter* (DQ130041), *Moraxella* (AY880059), *Flavobacterium* (M59053) の16S rRNA をコードする遺伝領域の塩基配列をデータベースより入手し, 全ての菌に共通して存在する部位よりプライマーを設計した (Esc16S-FW, 5'-CCA GAC TCC TAC GGG AGG CA-3'; Esc16S-RW, 5'-ACA TGC TCC ACC GCT TGT GC-3'). ソバもやし培養5日目の10⁴倍希釈で発生した代表的な3つの菌を単離培養し, CTAB法²⁾にて, そのDNAを抽出した. このDNAサンプルと設計したプライマーを用いて, PCRを行なった. PCR増幅条件は, 94℃ 1分の前処理の後, 94℃ 1分, 61℃ 1分, 72℃ 1分のサイクルを35回繰り返す, 最後に72℃で7分保持した. 得られた増幅遺伝子の塩基配列は, National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のデータベースと照合し, 相同率の高い上位3菌種を同定菌種とした.

3. 結果

3-1 ソバもやし生育中の一般細菌数の変化

ソバもやしに含まれる一般細菌数の変化を図1に示した. 中国産ソバもやしの生菌数は播種1日目から9日目まで測定し, 光照射は8日目から行なった. 国産信州大ソバの生菌数は2日目から8日目まで測定し, 7日目から光照射を行なった. 両者とも, 生菌数は栽培初期(2日目)に10⁶~10⁷cfu/g FWとなり, その後, 栽培期間を通してほぼ一定であった. また, 光照射による生菌数の変化は見られなかった.

3-2 ソバもやしから検出される細菌のDNA分類

図2は, 栽培5日目のソバもやしから抽出した液の培養プレート(10⁴倍希釈)に発生したコロニーを示している. 丸印を付けた代表的な3つの菌からDNAを抽出し, 今回設計したプライマーを用いてPCRを行なっ

た(図3). 増幅したDNAバンドの塩基配列をNCBIのデータベースと照合した結果(表1), コロニー1は *Escherichia*属および *Enterobacter*属, コロニー2, コロニー3は *Pantoea*属と高い相同率を示した.

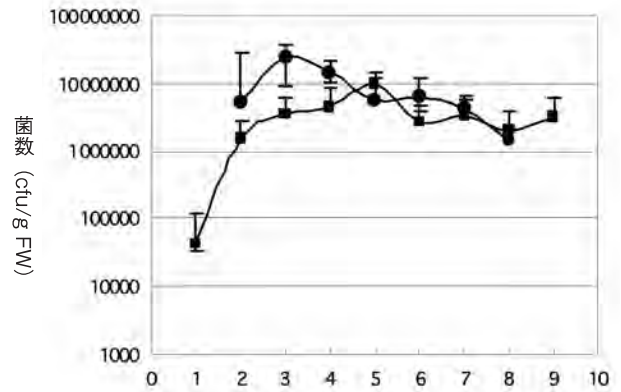


図1 ソバもやし生育中の一般細菌数の変化

■: 中国産ソバもやし; ●: 国内産ソバもやし



図2 栽培5日目のソバもやしのホモジナイズ液を培養したプレート(10⁴倍希釈)

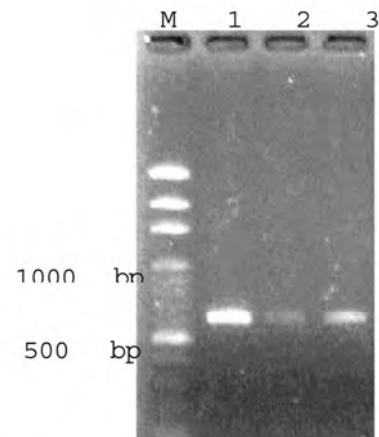


図3 増幅されたDNA断片のアガロース電気泳動
M, マーカー; 1~3, 図2のコロニー番号

表1 PCR増幅DNAの塩基配列と相同率の高い菌種

コロニー番号	菌種	相同率
	<i>Escherichia</i> sp. CPD32	99.8%
1	<i>Enterobacter endoymbiont of Metaseiuls</i>	99.6%
	<i>Escherichia senegalensis</i>	99.6%
2	<i>Pantoea agglomerans</i>	99.6%
	<i>Pantoea agglomerans strain BJ-Tobacco</i>	99.6%
	<i>Pantoea agglomerans</i>	99.6%
3	<i>Pantoea ananatis</i> strain BD622	99.3%
	<i>Pantoea ananatis</i> strain BD602	99.3%
	<i>Erwinia uredovora</i>	99.3%

4. 考 察

ソバもやしから検出される一般細菌数は、発芽初期(2日目)から、 $10^6 \sim 10^7$ cfu/gFWと高いレベルにあり、その後、大きな変化は観察されなかった。これは、種子に付着していた細菌が、ソバもやし栽培環境下で迅速に増殖し、その後、定常状態を維持していることを示している。一般に、種子に付着している微生物は*Bacillus* sp.などが多いが¹⁾、実際にソバもやしから検出される微生物は、*Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp. などであり、ソバ栽培環境に適した菌種が、特異的に増殖したと考えられる。

5. 結 言

ソバもやしの水耕栽培において、栽培初期から $10^6 \sim 10^7$ cfu/gFW程度の一般細菌が検出され、栽培期間を通してほぼ一定であった。今後、プラズマ水殺菌システムをソバもやしの栽培トレーと連結し、定期的にトレー下部の水を殺菌するとともに、トレー上部から水シャワーとしてソバもやしを洗浄するシステムを作成する。このシステムにより、ソバもやし栽培の水環境をどの程度クリーンにできるか、すなわち、問題となる微生物の増殖がどの程度低減されるかを検討する予定である。

参考文献

- 1) 宮尾茂雄・山本敦芳：New Food Industry, Vol.30, No.1, P. 27-30 (1988)
- 2) 向井譲・山本直樹：木本植物のDNA・RNA単離法, 秀潤社, P. 54-58 (1995)