

## チンチャウゲルの分解微生物

小崎道雄、新村洋一<sup>1</sup>、飯野久和、カプチ・ラハユ・クスワント<sup>2</sup>

### Decomposition Microorganisms of Cincau

MICHIO KOZAKI, YOUICHI NIMURA<sup>1</sup>, HISAKAZU IINO,  
and KAPTI RAHAYU KUSWANTO<sup>2</sup>

Indigenous agar like food "Cincau" has made from extract of leaves and stem of *Cyclea* and *Mesona* in Java island. Raw leaves was soaked and crumpled in 20 times water and then filtered through gauze cloth, the filtrate occurs gelation like agar after 1-2 hours. The "Cincau Gel" has been preferable for dessert in Java.

This gel decomposed easily in the room, but sterilized gel remains in this state even 3 weeks. Decomposing gel was infected by bacteria, so this bacteria was isolated and after identified to *Bacillus pumilus*, this species spread widely in the nature and isolate strain decomposed gel within one day, therefore decomposing bacteria of "Cincau gel" will supposed *B. pumilus*.

This 'Cincau' is expected to the material of food fiber in future.

チンチャウ (Cincau) はジャワ島でデザートとして広く食べられている半透明の寒天様食品であり、原料の植物もチンチャウと同じ呼び名で総称される。しかし、ジャワではしばしばチャムチャウ (Camucau)、スダではタウル (Taulu) と呼ばれることがある<sup>1)</sup>。このゲル化物質の原料となる植物はつる性の木本性植物があり、ツヅラフジ科の *Cyclea barbata* MIERS (和名カンテンツヅラ)<sup>2)</sup>、クマツヅラ科の *Premna divaricata* WALL (クロマエハマクサギ)、およびシソ科の *Mesona procumbens* MEMSL (センソウ) であるが、最もポピュラーなものはつる性のカンテンツヅラからのチンチャウである。

チンチャウをつくるカヅラ類は庭の片隅や棚づくりの堀代わりに這わせてあり、特別に栽培されることはない。ゲル状の食品の製法は生葉50～60gを約20倍の水に浸け柔らかく成分を揉みだし、ガーゼのような目の粗い綿布または笊で濾過し、緑色の液汁を得、そのまま1～2時間放置することによりゲル状になる。この製品は葉由来の葉緑素などの成分を含むため、やや濃い緑色を呈した半透明の少し青臭い無味のゲルである。また、木本性のセンソウの場合は、葉と茎を熱湯で煮出し、布濾過した濾液にキャッサバ澱粉を加え、しばらく放置し、灰を添加することによりゲル化する黒褐色半透明の寒天様ゲルであることから、ブ

#### <所属>

1; 東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科

2; ガジャマダ大学食品工学工学科

1; Department of Bioscience, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture

2; Laboratory of Food Biotechnology, Faculty of Agricultural Technology, Gadjah Mada University

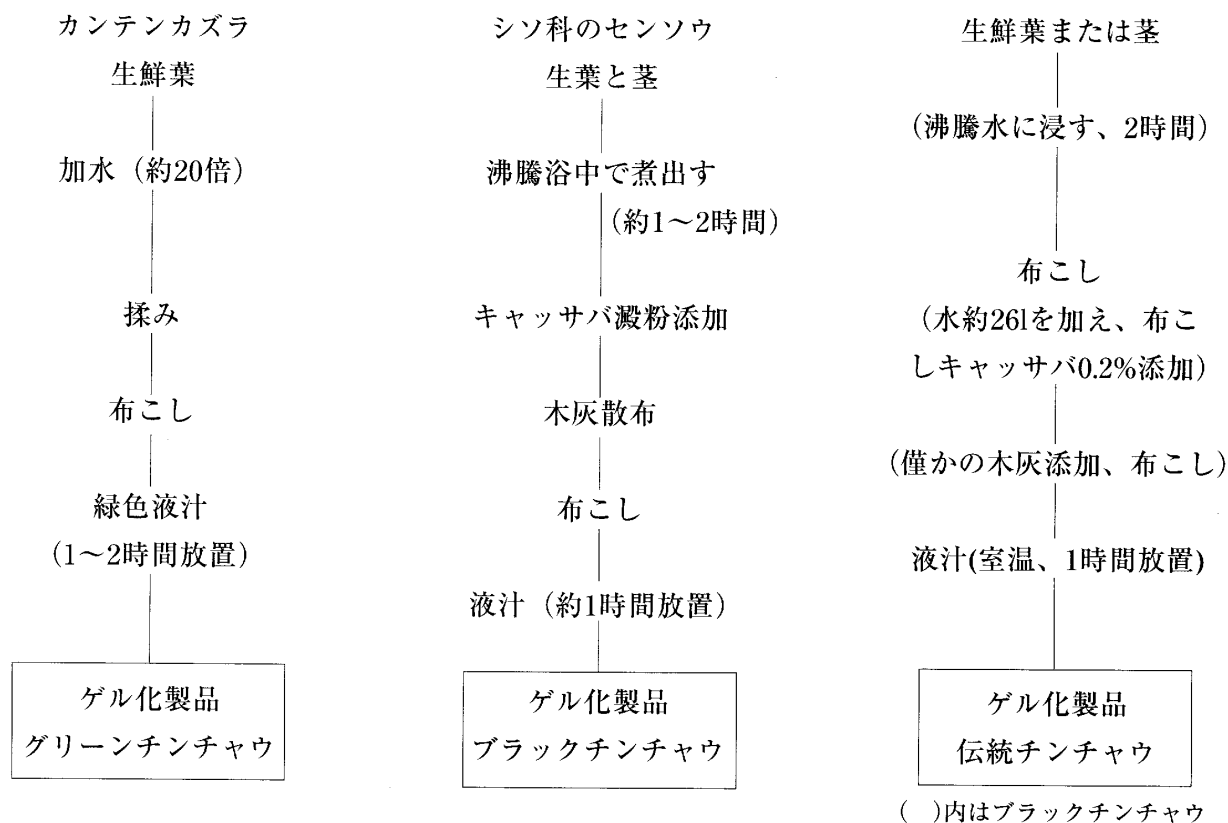


Fig. 1. チンチャウの一般製法

ラックチンチャウ (Cincau hitam) と呼ばれる。一方、カンテンカヅラの製品は緑色を呈することからグリーンチンチャウ (Cincau hijau) と称される。

ゲル化したチンチャウは食用に供される際、適当な大きさに切られ、水に浸けて市販されている。一般には、デザートとしてみつ豆様食品あるいは砂糖またはココナツミルクをかけて食べられる。チンチャウの製造は農家レベルで作られることがほとんどであるため、製造に際しては経験に頼るばかりでその品質は必ずしも一定ではなく、ゲル形成、物性あるいは衛生学的な側面からの科学的な研究はほとんどなされていない。

先に辻村ら<sup>1)</sup>は、カンテンカヅラチンチャウのゲル化物質の本体を知るため粗チンチャウ乾燥物を加水分解後、濾紙クロマトグラフィーなどによりその構成糖の糖の確認を行い、そのゲル化成分はガラクトタンと報告した。また、伊瀬<sup>3)</sup>はカ

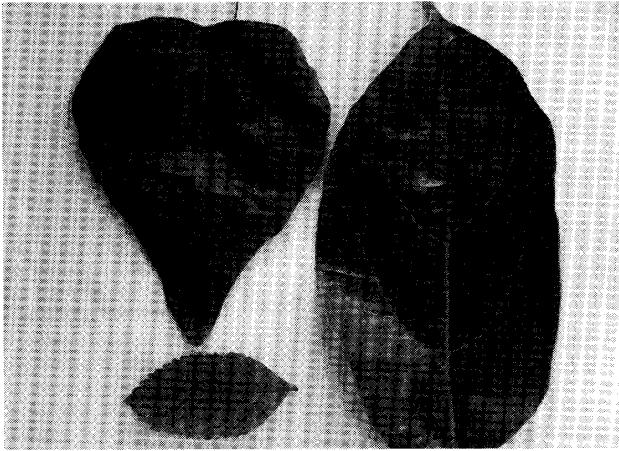
ンテンツヅラおよびセンソウのチンチャウからゲル形成する単一物質を取得し、プレナムのゲル化物質は分子量200,000~300,000のラムノガラクトタンであり、カンテンツヅラは5,000~10,000の分子量をもつアラビノガラクトタンと報告すると共に、ラットによる摂取量と排泄量をセルロースを対照とし検討したところ、食物繊維効果を持つことも併せて報告した。しかし、チンチャウゲルのゲル化物質は未だ十分に研究はされていない。

この未知のゲル食品チンチャウはゲル形成後、放置すると数時間で容易に液化される欠点を持つなど、その保存性に問題がある。しかしながら、チクレンを含有するためジャワ島では解熱や胃腸病に用いられる伝統的民間保健薬的食品であるものの、その消化吸收等に関しての研究もなされていない。

本研究では、これら未解明な点の多いチンチャウゲルについて、ゲル形成について検討すると

ともに、その保存性に関して常在菌による分解性、また消化吸収については腸内細菌によるゲ

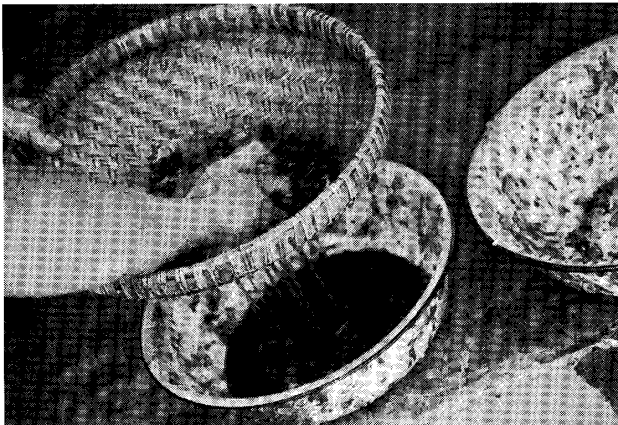
ル分解性等について微生物学的側面より検討した。



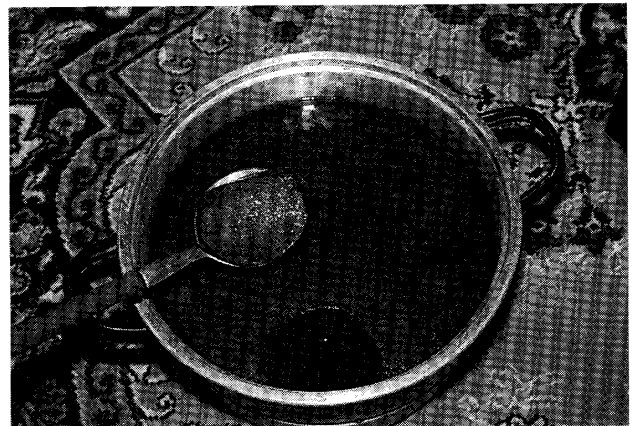
Phot. 1. チンチャウの原料葉  
a; *Cyclea barbata* M. (カンテンカズラ)  
b; *Premna divaericata* W. (クロエハマグサギク)  
c; *Mesona procumbens* H. (センソウ)  
aとbはグリーンチンチャウ用  
cはブラックチンチャウ用



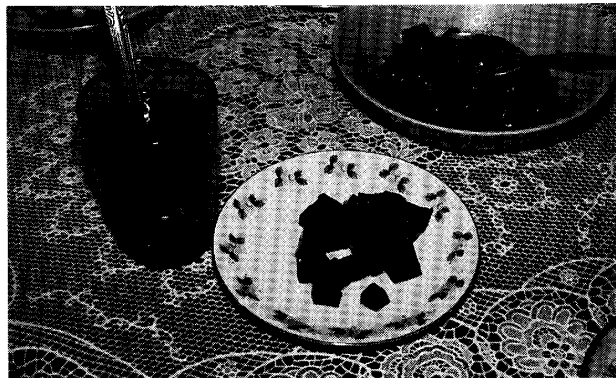
Phot. 2. カンテンカズラ  
添木に巻きついている



Phot. 3 カンテンカズラの葉水を加え、潰しながら濾す



Phot. 4. スプーンで掬ったグリーンチンチャウ濾液を1~2時間放置するとゲル化する



Phot. 5 ブラックチンチャウ  
(ミツマメ様デザート食品に加える)  
グリーンチンチャウも同様にサイコロ型に切断し供される

## 方 法

**試料** インドネシア国ジャワ島のヨクジャカルタ市郊外の数軒の農家から試料を採取した。農家の雑木あるいは塀に気根を伴い絡みついているカンテンカツラから緑葉部と茎部を摘み取り実験に供した。採取した葉の一部はガジャマダ大学生物化学工学科の研究室へ素早く持ち帰り、水洗後、天日および熱風乾燥した。また、残りの大部分は寒冷剤を入れた保冷箱につめ日本に持ちかえり、 $-80^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に保管後、凍結乾燥し、乾燥物は試料の均一をはかるため粉碎処理をおこない、以後の実験に供した。

**成分分析** 凍結乾燥試料をAOACの方法<sup>4)</sup>に従って水分、粗タンパク、粗脂肪、炭水化物、灰分等の分析をおこない特殊性の有無をしらべた。

**チンチャウの製造条件の設定** 温度は0から $100^{\circ}\text{C}$ まで、pHは3.0より12.0の範囲を、金属イオンの影響については一価、二価および三価の金属を用い、それぞれ設定条件で調製したゲルのゲル硬度を測定し、最良のゲル生成条件を求めた。

**チンチャウゲル分解菌の分離** 微生物分離などに使用するためのチンチャウゲルの調製法は一定の条件の基に調製されたものを用いた。すなわち、チンチャウ粉碎葉10gを蒸留水に懸濁し、ホモジナイザーで10,000rpm、5分間粉碎処理したのちガーゼ濾過により繊維質などを除去後、15分以上静置しゲル化を行ったものを用いた。無菌チンチャウゲルの調製は原料葉が加熱によってもゲル化の低下のないことを知ったことから、カンテンカツラの葉を加熱殺菌後、殺菌蒸留水中に懸濁し、上述同様の操作を無菌的に行い調製した。

この様に調製されたそれぞれのチンチャウゲルを室温に1両日放置し、ゲルの崩壊が顕著な試料から、火炎殺菌した白金耳で細菌のコロニーを

釣菌し、一般細菌分離用PYG培地およびチンチャウゲル培地にて28から $30^{\circ}\text{C}$ での平板培養を繰り返し、単細胞分離をおこない分離菌の純化を試みた。

**チンチャウゲル分解性腸内細菌の分離** 健康なラットの盲腸内容物を分離源として、好気性菌分離にはPYG培地およびチンチャウゲルをそのまま用い、上述の平板法で分離を試みた。また、嫌気性菌の場合はチンチャウを炭素源としたGAM半流動培地（日水製薬）を使用したスチールウール法による嫌気ジャーを用いた偏性嫌気培養を行った。

**分離株の同定** 分離細菌の同定にはManual for the identification of medical bacteria 2ed. (1974) およびBergey's manual of determinative bacteriology (1994) に準拠しておこなった<sup>5)</sup>。

## 結果および考察

**チンチャウ葉の成分分析** 新鮮な葉について常法にしたがって分析した結果をTable 1に示した。成分としてはハクサイやキャベツなどの葉菜類よりやや水分は少なく、炭水化物の多くは繊維質であり、一般的な草本類の成分と比較し特徴的な差はなかった。

**ゲル化の条件** pH、温度および金属イオンとゲル形成の関係はTable 2に示した。pHのゲル化に対する影響は、酸性側で硬く、pH10.0ではゲル形成は認められず、ゲル形成後は水に全く不溶で加熱しても崩壊しない不可逆性のゲルであった。抽出温度とゲル形成の関係は、 $80^{\circ}\text{C}$ まではゲル形成に問題なく、 $90^{\circ}\text{C}$ のときゲルは不安定であった。金属イオンの影響は一価金属より二価金属によって促進された。

また、水道水でも十分な強度のゲルが得られる結果も得たのでチンチャウゲルの崩壊の強弱に

Table 1. Chemical Components of Cincau

Sample	Water content	Crude Protein	Lipid	Carbohydrate	Ash
A	90.6	3.0	0.2	3.5	1.5
B	90.2	2.8	0.2	3.3	1.3
C	90.5	3.0	0.2	3.4	1.5

Table 2. Influence of pH, Temperature and Metal Ions to Cincau Gel

pH	Gel strength	Temp, °C	Strength	Metal	Strength	Metal	Strength
3.0	++	0	+	Li <sup>+</sup>	+	Fe <sup>2+</sup>	++
3.8	++	30	+	Na <sup>+</sup>	+	Co <sup>2+</sup>	++
5.1	++	80	+	K <sup>+</sup>	+	Ni <sup>2+</sup>	++
5.8	++	90	±			Cu <sup>2+</sup>	++
7.0	+	100	-	Mg <sup>2+</sup>	++	Zn <sup>2+</sup>	++
8.0	+	120	-	Ca <sup>2+</sup>	++	Pb <sup>2+</sup>	++
9.0	+			Sr <sup>2+</sup>	++		
10.0	±			Ba <sup>2+</sup>	++	Al <sup>3+</sup>	++
12.0	-			Mn <sup>2+</sup>	++	Fe <sup>3+</sup>	++

よって微生物分解の尺度としうる事がわかった。

チンチャウ分解菌の分離および同定 無菌チンチャウゲルは無菌の状態室温に保存し、毎日崩壊および着色などを3週間観察を続けた結果、まったく変化はみられず作成当時のままであった。一方、無菌化しなかったゲルは2日後には崩壊が肉眼で明瞭に観察でき、1週間後には完全に崩れおち、細菌の付着が肉眼的にも認められた。このことからチンチャウゲルは外部からの細菌によってゲルが壊されることが立証できた。

チンチャウ分解菌の分離は、崩壊ゲルより平板培養を繰り返して試み、分解能を有する数十株を集め、一次単離として11株を得た。しかし、単離純化の操作が進むにしたがって、崩壊力は次第に減少し、純化し得た5次単離後でのゲル崩壊能をつよく保持した株はGAM-3の一株のみで

あった。

GAM-3株の同定結果をTable 3に示したが、ゲル化の減退した3株のG-4、G-6、P-3についてもGAM-3株と同様に同定をおこなった。

P-3株以外の供試株3株はともにグラム陽性、好気性桿菌で細胞の中心部に丸形の内生胞子を形成した。また、生育温度、食塩耐性および生理学的諸性質から*Bacillus pumilus*と同定された。本菌種は*B. subtilis*と類似した性質を有するものの、*B. pumilus*はデンプン分解能を欠いていることから別菌種とされている。

一方、P-3株は内生胞子が明らかでなく、耐熱試験で内生胞子の存在が示唆されたことから*Bacillus*属と同定した。また、45°Cに生育できないなどから*Bacillus*属ではあるが、種までの同定には至らなかった。

さらにGAM-3株をチンチャウに接種した結果、

**Table 3. Characteristics of Isolated Strains from spoiled Cincau**

Items	G-4	G-6	P-3	GAM-3	<i>Bacillus pumilus</i>
Gram stain	+	+	+	+	+
Shape	rod	rod	rod	rod	rod
Size	1~2.5 $\mu$ m	0.8~ 2.5	0.8~1.5	1~ 3.0	
Spore shape & position	round center	round center	+	round center	round center
Growth at 45°	+	+	-	+	+
Growth at 65°	-	-	-	-	-
Growth at pH5.7	+	+	+	+	+
Growth in 7% Nacl	+	+	-	+	+
Utilization of citrate	+	+	+	+	+
Growth in glucose broth	-	-	-	-	-
Starch hydrolysis	-	-	-	-	-
Nitrate reductoin	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-
Gelatin hydorolysis	+	+	+	+	+
Casein hydorolysis	+	+	+	+	+
Urease hydorolysis	-	-	-	-	-
Lysozyme sensitirty	+	+	+	+	0

**Tabel 4. Characteristics of Isolated Strains from Rat Cecum**

Item	A3-2	B4-1	E3-1	E4-1
Gram stain	+	+	+	+
Shape	rod	rod	rod	short rod
Spore fomation	+	+	+	+
Gronth at 45°	+	+	+	+
Growth in 7% Nacl	+	+	+	+
Anaerobic growth	-	-	-	-
Starch hydrolysis	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-

24時間後には崩壊現象が認められた。本菌種は土壌、食物などに広く分布する菌種であり高温にも生育できるから、インドネシアなどの熱帯圏では容易にチンチャウの製品を汚染し崩壊させると考えられる。特にインドネシアのマーケットや家庭では常にチンチャウが曝露された状態にあるため、ゲル崩壊細菌は新しくチンチャウが作られるたびに、繰り返し淘汰をうけて強力な崩壊菌が育成されている状態と想像された。また、チンチャウゲルの細菌による崩壊は、細菌の鈍化が進むにしたがって遅延傾向が見られ、細菌相互の共生形も示唆された。

**チンチャウゲル分解腸内細菌の分離** チンチャウのゲル化成分はラクタンあるいはペクチン様の高分子とされてはいるものの明確でないことから、摂取したチンチャウが消化吸収されるか否か、腸内でのチンチャウの分解、吸収の運命は未知である。その解明の一つとして、腸内細菌によるチンチャウの分解性を検討した。

ラットの盲腸を分離源とした腸内細菌 A3-2, B4-1, E3-1, A4-1の4株を用い、チンチャウ分解試験を行った。また、用いられた4株はTable 4に示したようにのように*B. pumilus*と同定され、その同定結果はチンチャウ崩壊菌として分離・同定された菌株と同様であった。しかし、一般には*Bacillus*属は腸内に常在する細菌としては優勢的な菌群とは捉えられていないことや、腸内構成菌として優勢菌群であり、牛ルーメン内でデキストランを分解する腸内常在菌の*Bacteroides*属などを試験菌とすることも一法と考えるが、本報では分離されなかった。

チンチャウはインドネシアで胃腸病や解熱の民間薬として珍重されてきたが、今後はさらに食物繊維食品、低カロリー食品の素材として期待されることから、食餌としてチンチャウを与え場合からの消化吸収の測定を実施し、チンチャウの効果をも検討すべきものと考えた。

本研究をするにあたっては、一部大日本明治製糖株式会社研究所の援助を得た。また試料採取には、ガジャマダ大学のマリー・アツシ博士、同大学大学院学生の助力によって進められた。心から感謝申し上げる。

## 要 旨

チンチャウは、ジャワ島で食されるツヅラ科やシソ科の茎葉から抽出した固有の寒天様食品のチンチャウがある。その製法は、原料生葉を約20倍の水に浸けて揉み、布越し後、濾液を1-2時間放置することによりゲル化するデザート食品である。このゲルは無菌的な条件下では3週間後でも分解されなかったのに対し、自然放置では2日後に完全崩壊し、且つ細菌の汚染が認められた。汚染細菌を分離・同定した結果、*Bacillus pumilus*であった。本株は分布の広い種であり、また短時間でゲルを分解する能力を持っていたことから、チンチャウの主崩壊菌と想定した。

## 文 献

- 1) 辻村克良、馬場徹、化学と生物、18、768-769 (1978)
- 2) E. J. H. Coner、渡辺清彦；図説熱帯植物集成、広川書店
- 3) 伊瀬哲也、東京農業大学修士論文 (1990)
- 4) AOAC (1987)
- 5) Peter H. A. Sneath : Bergey's manual of Systematic Bacteriology 2, Williams & Wilkins, Baltimore (1986)