

漬物用乳酸菌スターターの開発

加工食品部 橋本 俊郎*

1. はじめに

食品加工における微生物の利用は古くから行われ、酒、ビール、ワイン、味噌・醤油、納豆など多くの発酵食品が生まれた。乳酸菌は酵母と並んで古くから利用されており、人々はその食品に適した乳酸菌を自然界から分離し、純粋培養した後、培養液そのまま、濃縮液状品、凍結品あるいは凍結乾燥品などの形状でスターターとして利用している¹⁾。乳酸菌の菌種として、ヨーグルトは *Lactobacillus bulgaricus* と *Streptococcus thermophilus*、味噌の醸造には耐塩性の *Pediococcus halophilus* というように各食品に適した種類の乳酸菌が使用される。

一方、野菜漬物では特有の風味の形成に乳酸菌が作用していると考えられているが、未だに自然の乳酸菌、即ち環境由来や野菜付着の乳酸菌が発酵の主役となっている。そのため、保存性や風味などが乳酸菌の種類や増殖度に影響され、品質的に安定を欠いている。また、近年の低塩漬物の拍車化によって非加熱漬物における大腸菌群等の食中毒菌の増殖が危惧され、乳酸菌による大腸菌群の抑制が提唱されている。乳酸発酵を漬物製造工程の一部に取り込むことにより、安全で健康に良く風味の優れた漬物の開発が期待される。この場合に漬物用乳酸菌スターターとしては、食塩耐性を有する植物性乳酸菌で発酵温度は室温または室温以下の中温性もしくは低温性乳酸菌が望ましく、ガス発生を伴わないホモ発酵乳酸菌が適すると考えられる。

これらの条件を満たす乳酸菌として、キムチより *Lactobacillus sakei* HS-1 を発見し、スターターとして検討した結果、優れた性質を有することが明らかになったので報告する。

2. 実験方法

2.1 材料

乳酸菌の分離源として、近在で味が良いと評判の韓国

風発酵白菜キムチの3種類を入手して用いた。いずれも漬け込み後、1～2週間のものである。

2.2 微生物試験法及び乳酸の光学異性体の判別法

乳酸菌の分離及び計数には MRS プロス (Difco) に寒天及び炭酸カルシウムを加えた培地を用いた。生理試験用の液体培養には GYP 培地を用いた。即ち、グルコース 1g、酵母エキス 1g、ペプトン 0.5g、酢酸ナトリウム 0.2g、塩類溶液 (1ml あたり硫酸マグネシウム 40mg、硫酸マンガン 2mg、硫酸鉄 2mg、食塩 2mg が含まれる。) 0.5ml 及びツイーン 80 溶液 (50mg / ml 水溶液) 1ml を蒸留水 100ml に溶かした。同定試験は乳酸菌実験マニュアル²⁾に従った。発酵乳酸の異性体の判別は、大塚ら³⁾の方法に従い HPLC 分析によった。生育条件の比較として *L. plantarum* IFO-15891, *L. sakei* IFO-15893, *E. coli* IFO-3972 を用いた。この場合、*E. coli* は酢酸塩で生育が阻害されるので酢酸ナトリウムを除いた GYP 培地を用いた。

2.3 野菜の食塩浸出液での生育試験法

(1) HS-1 生育増強成分の調査

細切りしたハクサイあるいはダイコンに野菜重量の5%の食塩を加えて重石を乗せ、冷蔵庫で5日間放置して食塩浸出液 (下漬液) を得た。メンブランフィルターで除菌した浸出液の食塩分は 5.4～5.5% であった。これに滅菌蒸留水を加えて2倍に希釈したものを培地として用いた。GYP 培地に比べ生育が劣ったのでグルコース (1%)、酵母エキス (1%)、ペプトン (0.5%)、塩類溶液 (0.5%)、ツイーン 80 溶液 (1%) 及び酢酸ナトリウム (0.2%) のそれぞれを加えた場合の生育への影響を調べた。

(2) ダイコンの食塩浸出液と麹エキス混合液における培養温度の生育への影響

酵母エキスの代替として麹エキスを使用した。ダイコン 500g に水 250g、食塩 37.5g、酢酸 1.5ml を加えて重石を乗せ、3日間漬けた。濾過して 490ml の下漬液が得られたので、5分間煮沸し、続けて水酸化ナトリウ

ム溶液でpH6.8に中和後、麹エキス(定法による)200mlと水を加えて1,000mlとして、オートクレーブ処理した。HS-1を含む3種類の乳酸菌を接種して5～30℃で培養し、生育への影響を調べた。

2.4 HS-1を用いたハクサイ発酵試験

下漬ハクサイにHS-1を添加して、発酵させた場合の性状を調べた。下漬法は通常と異なり、高食塩濃度で迅速に漬ける方法とした。即ち、ハクサイ2個(4.3Kg)に最終濃度で食塩30%、酢酸0.5%及び差し水4.3Lを加え、6時間漬けた。3.5Kgとなった下漬ハクサイに差し水5%、食塩1%、酢酸ナトリウム0.5%、酵母エキス0.1%及びHS-1を 1.6×10^5 CFU/gを添加し、重石を加えて15℃で発酵させた。

3. 実験結果及び考察

3.1 漬物からの乳酸菌の分離と同定

仕込み後1～2週間のキムチをストマッカー処理し、グラム陰性菌や真菌を抑制するためアジ化ナトリウムとシクロヘキシミドを添加した白亜MRS培地で分離培養した。培養して酸生成を示したコロニー群から

無作為に1コロニーずつ選択してダーラム管入りGYP液体培地に接種、培養した。ヘテロ発酵菌は膨れなどの原因となるのでガス発生を示したコロニーは除いた。残った細菌の形状を顕微鏡で観察し、桿菌をスターターの候補として選んだ。これらの桿菌はいずれもグラム染色陽性で、カタラーゼ-、グルコースから乳酸のみを生成する乳酸菌であった。最後に、ハクサイの食塩浸出液に接種し、生育の良好なコロニーから順に番号を付与した。

表1に分離した乳酸桿菌R-1の生理的性質を示した。分離したコロニーはいずれもR-1と同様な性質を示し、比較に用いた*L. plantarum* IFO-15891とはいくつかの点で異なっていた。ペプチドグリカンのタイプが非DAPであること、ラフィノース、マンニトール、ソルビトールを資化しないこと、酢酸塩の存在下で生成乳酸の異性体タイプがDL型からL型に変化することが主な相違点であった。特に異性体タイプの変化は*L. sakei*のみに観察されていることから、この乳酸菌R-1は*L. sakei*と同定した。以降、R-1は*L. sakei* HS-1またはHS-1と称する。

表1 白菜キムチから分離した乳酸桿菌の性質

	R-1	<i>L. plantarum</i> *
15℃での生育	+	+
45℃での生育	-	-
発酵形式	ホモ	ホモ
生成乳酸異性体タイプ	DL	DL
酢酸存在下での乳酸異性体タイプ	L	DL
ペプチドグリカンの型	非DAP	DAP
糖類発酵性		
アラビノース	+	+
リボース	+	+
キシロース	-	-
フラクトース	+	+
マンノース	+	+
ラクトース	+	+
シュクロース	+	+
トレハロース	+	+
ラフィノース	-	+
マンニトール	-	+
ソルビトール	-	+
グルコン酸ナトリウム	+	+
マルトース	+	+
ガラクトース	+	+
メリビオース	+	+
6.5%食塩存在下での生育	+	+
同定菌種名	<i>Lactobacillus sakei</i>	*IFO-15891
+ :陽性, - :陰性		

L. sakei は、名前の由来通り酒のもろみから発見されたが、これまで日本の漬物から分離された報告はみあたらない。著者⁴⁾は、先に市販浅漬から分離しており、この乳酸菌種は漬物に普遍的に存在して漬け込み初期に有用な働きをしていると考えている。

3.2 GYP 培地における生育条件の比較

なお、分離の際に棄却したヘテロ乳酸菌(*Leuconostoc mesenteroides* と思われた。)で発酵させたハクサイ漬は、香りが悪く、スターターとして不適当と思われた。

(1) 生育温度

HS-1 は、タイプカルチャーである *L. sakei* IFO-15893 より広い 5 から 40 の温度範囲で生育を示した。また、大腸菌は 10 から 45 の範囲で増殖が可能であった(表 2)。

表 2 各微生物の生育温度

培養温度(℃)	HS1	<i>L. plantarum</i> IFO15891	<i>L. sakei</i> IFO15893	<i>E. coli</i> IFO3972
5	+	-	-	-
10	+	+	+	+
15	+	+	+	+
40	+	+	-	+
45	-	-	-	+

培地 :GYP(酢酸Naを除く)培養期間 :5日間

- : <0.1 at abs.660nm

(2) 生育に対する pH の影響、発酵最終 pH

培地 pH が生育に及ぼす影響を表 3 に示した。HS-1 は大腸菌と同様の pH 4 で生育が抑制された。*L. plantarum* は pH3.5 まで生育可能であった。HS-1 の発酵最終 pH は 3.9 であり *L. plantarum* に比べて酸味が強すぎないレベルで発酵が終了した。

表 3 初発pHの増殖への影響

	HS1	<i>E. coli</i> IFO3972	<i>L. plantarum</i> IFO15891
pH3.5	-	-	+
pH4.0	-	-	+
pH4.5	+	+	+
pH5.0	+	+	+

培地 :GYP(酢酸Naを除く)培養期間 :30 ,6日間

pHの調整 :塩酸と水酸化Na - : <0.1 at abs.660nm

大腸菌は HS-1 と同様に pH4.5 の GYP 培地で生育可能であり、共存した場合に pH による抑制が難しいと思われたが、pH の調整を乳酸で行った場合は pH4.5 で生

育できなかった(表 4)。従って、HS-1 の乳酸発酵で pH が低下した場合、大腸菌の生育は抑制されると考えられる。

表 4 *E. coli*の増殖に対する乳酸(0.5%)の影響

	HS1	<i>E. coli</i>
pH4.5	+	-
pH5.0	+	+

培地 :GYP(酢酸Naを除く)

培養期間 :30 ,6日間

pHは水酸化ナトリウムで調整

(3) 食塩耐性

HS-1 は *L. plantarum* と同様に食塩濃度 8%まで生育を示した(表 5)。しかし、生育菌数を調べると食塩 5%以上で増殖度(生菌数)は劣ることがわかった。

表 5 各微生物の耐塩性

食塩濃度(%)	HS1	<i>L. plantarum</i> IFO15891	<i>L. sakei</i> IFO15893	<i>E. coli</i> IFO3972
6	+	+	+	+
7	+	+	-	+
8	+	+	-	-
9	-	-	-	-

培地 :GYP(酢酸Naを除く)培養期間 :30 ,5日間

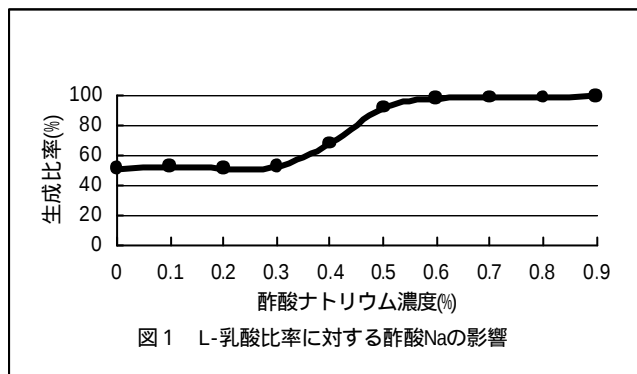
- : <0.1 at abs.660nm

HS-1 の食塩耐性からは、食塩 4%以下の低塩漬物に適すると思われる。

(4) 酢酸塩添加による L-乳酸生成比率の上昇

乳酸は光学異性体として D 型と L 型があり、人間は L-乳酸だけを生成する。幼児や高齢者は健康のため D-乳酸の大量摂取を避けるべきであるという勧告が、FAO と WHO の合同委員会から出されている。微生物は、D-乳酸を主に生産する D 型菌種、L-乳酸を主に生産する L 型菌種及び D-乳酸と L-乳酸のいずれも同時に生産する DL 型菌種があり、同定上の重要な性質となっている。*L. sakei* は、通常の培地では DL 型であるが、酢酸塩が存在する場合は L 乳酸を生成する。

図 1 に酢酸ナトリウム濃度と L 乳酸生成比率の関係を示した。培地中の L-乳酸比率は、酢酸ナトリウム濃度が 0.6%以上の場合に、ほぼ 100%となった。



以上のことより、HS-1 は低温で生育が可能で、pH を過度に低下させず、食塩濃度 4%までは充分な生育を示し、条件によりL-乳酸だけをつくることが判明した。しかし、漬物用スターターとして塩漬野菜で生育が良好であるかどうかは不明であるので、次に野菜の食塩浸出液を用いて生育状況を調べた。

3.3 野菜の食塩浸出液での生育

ハクサイまたはダイコンの食塩浸出液で HS-1 を培養した場合、pH は低下するものの生育菌数は GYP 培地に比べてかなり劣った。しかし、表 6 に示したように、酵母エキスやペプトンを添加することでかなりの生育改善が認められた。

表5 ダイコンの食塩浸漬液での生育

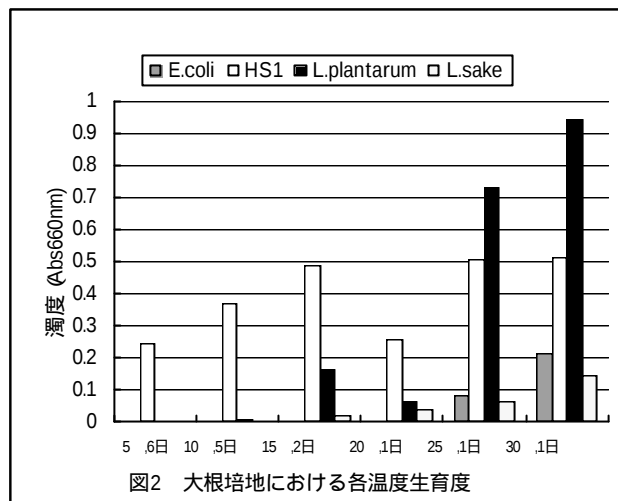
培地の種類	濁度(660nm)
GYP	1.82
ダイコン	0.14
ダイコン+ グルコース	0.1
ダイコン+ 酵母エキス	0.71
ダイコン+ ペプトン	0.33
ダイコン+ 塩溶液	0.09
ダイコン+ Tween 80	0.13
ダイコン+ 酢酸Na	0.23

30℃, 2日間培養

アミの塩辛や魚醤が添加されているキムチで生育が良好なことから蛋白分解物や微量成分を必要とすると思われる。天然物では麹エキスも酵母エキスに劣らず HS-1 の生育に有効であったので、麹エキスを添加した大根の食塩浸出液を用いて各微生物の成育に対する温度の影響を調べた。

HS-1 の各温度における生育は、20℃以下で *L.plantarum* より優れていた(図 2)。従って、食中毒

菌増殖の危険が少ない低温で発酵させることが可能である。



3.4 HS-1 添加による大腸菌の増殖抑制

HS-1 と大腸菌の競合について、先に述べた麹エキスとダイコン浸出液培地を用いて検討した。表 6 に示した通り、大腸菌を単独に接種した場合、15℃で充分な生育を示した。しかし、HS-1 を共存させることにより添加した大腸菌は完全に死滅した。

表6 HS-1による大腸菌の増殖抑制

培養条件	添加菌数	発酵後菌数	発酵後pH
E.coli単独	1.1E+04	1.2E+05	5.4
HS-1単独	4.0E+04	1.4E+08	3.9
E.coli+HS-1 E.coli	1.1E+04	0	3.8
HS-1	4.0E+04	8.0E+07	

培地:大根エキス+麹汁
発酵:15℃, 2週間

現実のハクサイやダイコンから大腸菌が検出されることはまれであるが、HS-1 の添加は野菜に存在する大腸菌群の増殖を抑制する。大腸菌群は塩漬中に亜硝酸を生成し、漬物の亜硝酸は、発ガン物質であるニトロソアミン生成の一要因と疑われている。HS-1 を添加することにより亜硝酸の生成を抑制することができた⁵⁾。

3.4 HS-1 添加によるハクサイの発酵

表 7 に 15℃で貯蔵した場合の性状を示した。乳酸菌は 5 日で、ほぼ最大に増殖し、pH4 台に低下した。7 日目では大腸菌群及びグラム陰性菌が不検出となった。このようにしてつくられたハクサイ漬は、やや褐変するが香り、味とも自然な風味で好評であった。

表7 HS-1添加ハクサイ漬の性状

	2日後	5日後	7日後
pH	pH5.6	pH4.3	
酸度(ml)	3	14	
大腸菌群(cfu/g)	8		0
グラム陰性菌(cfu/g)	610		<10
乳酸菌(cfu/g)	2.7E+07	7.3E+08	1.0E+09
L-乳酸比率	92%		

下漬ハクサイに対し、食塩1%、酢酸ナトリウム0.5%、酵母エキス0.1%
15 で発酵

なお、本乳酸菌 HS-1 を用いた漬物の製造方法は平成 11 年に特許（第 3091196 号）として登録された。

4 要 約

漬物用乳酸菌スターターとして、発酵ハクサイキムチより新しい乳酸菌を分離した。*Lactobacillus sakei* に属する乳酸菌種で HS-1 と命名した。HS-1 の生育可能温度は 5 ~ 40 であり、20 以下では *Lactobacillus plantarum* より生育が良好であった。発酵後の最終 pH は 4 付近であり、*L. plantarum* より耐酸性は低かった。耐塩性は 8 % までであるが、5 % 以上で生育が劣った。酢酸ナトリウムが 0.6% 以上存在した場合、発酵乳酸の異性体タイプはほとんどが L 型になった。GYP 培地に比べてダイコンやハクサイの食塩浸出液での生育は劣ったが、酵母エキスや麹エキスの添加で回復した。また、同濃度の大腸菌と混在させた場合、完全に大腸菌の生育を抑制した。

5 参考文献

- 1) 森地敏樹：ニューフードインダストリー, 28, 2 (1986)
- 2) 内村泰・岡田早苗，乳酸菌実験マニュアル，小崎道雄監修，(朝倉書店，東京) (1992)
- 3) 大塚正盛・岡田早苗・内村泰・駒形和男：生物工学会誌, 72, 81 (1994)
- 4) 橋本俊郎：日本食品科学工学会誌，45, 368 (1998)
- 5) 橋本俊郎：日本食品科学工学会誌，48, 409 (2001)