

漬物の発酵に由来する香りの研究（第 7 報）

—香味に寄与する水溶性成分の探索—

岩佐悟*, 飛田啓輔*, 武田文宣*, 富田理**, 中村敏英**

1. はじめに

発酵白菜漬けにおける香りの解明と、その制御技術開発を目標として研究を行っている。

第 1 報から第 3 報^{1~3)}では、1 種類の乳酸菌（漬物用乳酸菌 HS-1）をスターターとして使用し、温度、塩分、脱気処理の有無などの発酵条件を変えた場合の香気成分変化の解明を行い、特に発酵温度と脱気処理が香りに影響を与えることを明らかにした。第 4 報⁴⁾からは、乳酸菌の種類の違いによる発酵漬物の香気成分の変化を明らかにし、乳酸菌の種類及び発酵条件を制御することによる漬物の香りの制御技術開発を目指して研究を行っている。第 4 報⁴⁾、第 5 報⁵⁾では、茨城県産白菜、県内漬物製品から乳酸菌採取を行い、15 菌種 68 株の乳酸菌の収集・同定を行った。第 6 報⁶⁾では、採取した乳酸菌を使用して白菜発酵漬けを試作し、官能評価とヘッドスペースガスクロマトグラフィー質量分析計による揮発性成分分析を行い、特徴的な乳酸菌 8 株の選抜と主要香気成分の探索を行った。選抜した香気成分について、添加した乳酸菌の種や株による差異を解析し、その結果を食品科学工学会第 65 回大会、及び第 28 回漬物技術研究セミナーにて発表した。発表内容は漬物技術第 32 号（一般社団法人 全国漬物検査協会）に掲載予定である。

2. 目的

本研究では、添加する乳酸菌の種・株を変えて試作した白菜発酵漬けについて、官能評価と NMR（核磁気共鳴）法による成分プロファイル解析を行い、香味に寄与する水溶性成分を探索することと、それら成分の乳酸菌ごとの生成量の違いについて比較することを目的とした。

3. 方法

3.1 白菜発酵漬けの試作

第 4 報⁴⁾、第 5 報⁵⁾で採取した乳酸菌に当センター保有の乳酸菌 7 株を加えた 75 株をそれぞれ添加した白菜発酵漬けと、対照群として乳酸菌を添加しない白菜漬けを併せて試作した。

白菜漬けは、特許⁷⁾記載の方法で作製した。白菜 2 kg に対し、食塩 600 g、酢酸 10 mL、水 2 L を加え、重石 2 kg をかけて 4 時間置いた後、30 分間水洗いした。次に食塩 1%、酢酸ナトリウム 0.5%、酵母エキス 0.1%、及び各種乳酸菌を 10^5 CFU/mL 以上になるように添加し、重石 2kg をかけて 15°C で 72 時間発酵させた。

3.2 白菜発酵漬けの品質評価

乳酸菌数の測定、pH 測定（堀場製作所 D-51）、及び官能評価を行った。乳酸菌数の測定は、MRS 白亜寒天培地を使用し、30°C 恒温器中でアネロパック・ケンキ（三菱ガス化学）を使用して 72 時間嫌気培養を行った。官能評価は職員 2 名により、酸味の強さ（無し、弱い、強い）、酸臭の有無、及び旨みの有無の評価を行った。

3.3 NMR による成分プロファイル解析

NMR による白菜発酵漬けの成分プロファイル解析を以下の方法で行った。

3.3.1 ¹H NMR スペクトル測定とバケットテーブル作成

白菜発酵漬けをマッシャーで潰し、その上澄み液 140 μ l に、内部標準物質として 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate sodium salt（以後 DSS とする）を 1.25 mM 含有する重水性 125 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0; 99.9% D, Cambridge Isotope Laboratories）を 560 μ l 加え、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した。その上清を 5.0 mm O.D. \times 103.5 mm NMR チューブ（Norell）に移し、NMR 測定に使用した。

NMR スペクトルは、自動試料移送ユニット（SampleJet, Bruker）及び極低温プローブ（CPDUL CryoProbe, Bruker）を備えた Avance III 500 MHz NMR 分光計（Bruker）（図 1）で測定した。前飽和によって溶媒の信号を除去する zgpr パルスプログラムを用いて ¹H NMR スペクトルを収集した。化学シフトは、内部標準 DSS のトリメチルシリル基の NMR 信号を基準（0.00 ppm）として校正した。

測定した ¹H NMR スペクトルを、TopSpin ソフトウェア（バージョン 3.2, Bruker）を用いて処理した。多変量解析に使用するために、Amix ソフトウェア（バージョン 3.9.14, Bruker）のバケット積分機能を用いて ¹H NMR スペクトルをバケットテーブルに変換した。スペクトルの 10.00 - 0.50 ppm を 0.04 ppm ごとに区画化（バケッティング）し、各バケット内にある信号面積値を算出した。5.14-4.70 ppm に含まれる 12 のバケットは、残留水信号を含んでいることから除外した。これにより、サンプルごとに 226 バケットを作成した。各サンプルの内部標準の信号面積値を用いて正規化を行い、バケットテーブルとした（図 2）。



図 1 Avance III 500 MHz NMR 装置

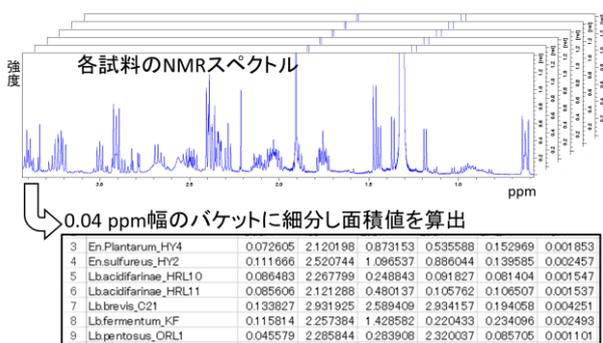


図 2 スペクトルからのバケットテーブルの作成

3.3.2 多変量解析

3.3.1 で作成した各バケットの面積値は、そのスペクトル範囲で検出される成分の濃度を反映している。そこで、全サンプルの全体的な特徴差を非標的に解析し、添加する乳酸菌の種・株の違いより変化する成分の傾向を探索するために主成分分析 (PCA) を行った。次に、官能評価の結果と相関のある成分を直行最少二乗 (OPLS) 回帰分析と判別分析 (OPLS-DA) により探索した。多変量解析は SIMCA ソフトウェア (バージョン 14.0.0.1359, Umetrics) を使用した。

3.3.3 香味寄与成分の乳酸菌の種や株ごとの比較

多変量解析で重要性が明らかとなった候補成分について、標品とのスペクトル比較による同定を行った。各成分の信号をマニュアル操作で積分し、エタノール、酢酸、乳酸、クエン酸、コハク酸の信号面積値を得た。これら成分については乳酸菌の種や株ごとの比較を行った。

4. 結果

4.1 品質評価結果

3.1 で試作した白菜発酵漬けのうち、乳酸菌の増殖 (10^6 CFU /g 以上) が確認できた 7 菌種 47 株の乳酸菌を使用した白菜発酵漬けと、対照群として乳酸菌添加無し白菜漬け 9 点を以降の分析に使用した (表 1)。

表 1 使用した乳酸菌と発酵後の pH

菌種 [※]	菌株数	pH
<i>Lactobacillus brevis</i>	2	4.3~4.4
<i>Leuconostoc carnosum</i>	2	4.6~4.9
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	14	4.2~5.5
<i>Lactobacillus pentosus</i>	7	4.5~4.8
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7	4.4~5.0
<i>Lactobacillus sakei</i>	11	4.4~5.2
<i>Pediococcus parvulus</i>	4	5.4~5.6

[※]16S rRNA 遺伝子配列の解析による

4.2 添加した菌により変化する白菜発酵漬けの水溶性成分の傾向

PCA の結果、全分散のうち 54.7%及び 21.5%をそれぞれ占める第一・第二主成分 (PC1・PC2) が得られた (図 3)。関連のある要素を探索したところ、PC1 と PC2 軸に対しそれぞれ負と正の方向にある試料の pH が低く、PC2 軸に対し正方向側にヘテロ発酵菌[※]の試料が多い傾向が見られた。次に、PCA に寄与した成分をローディングプロット (図 4) から探索すると、PC1 軸では正方向側に糖 (グルコース及びフルクトース) が、負方向側に乳酸の寄与が大きく、PC2 軸では正方向側に酢酸とエタノールの寄与が大きかった。PC1 は乳酸発酵の進行度の違いを示し、PC2 軸は発酵形式の違いを主に表していると考えられた。

※乳酸菌は発酵形式によりホモ発酵とヘテロ発酵に分けられ、ホモ発酵では糖を使用して乳酸を生成し、ヘテロ発酵では乳酸と同時に酢酸、エタノール、二酸化炭素などを生成する。

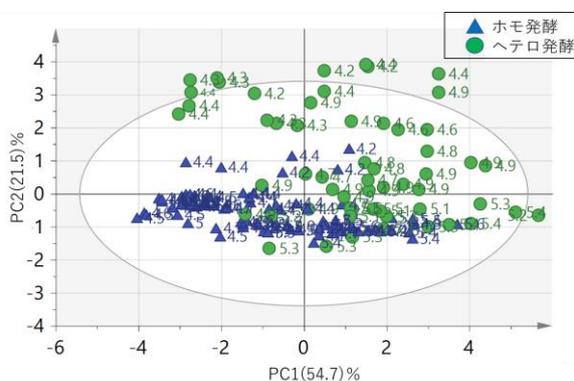


図 3 主成分スコアプロット結果 (点は各試料を表し、近い試料ほど成分組成が似ていることを示す。図中の数字は試料 pH)

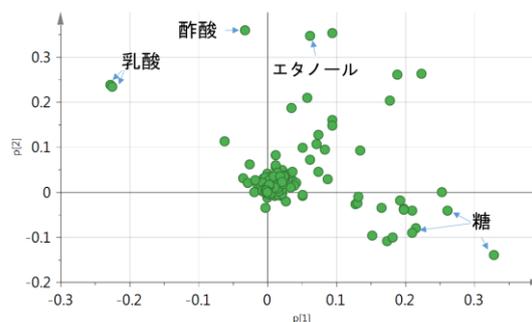


図 4 ローディングプロット (点は各バケットを表しており、中心から遠いほど強い寄与を示す)

4.3 酸味に寄与する成分の探索

NMR の測定データと、官能評価における酸味の強度（無し、弱い、強い）との間で相関のある成分を OPLS 回帰分析により探索した。その結果、酸味の強さに対し乳酸の寄与が最も大きいことが S-plot において示された（信頼度 0.85）。酸味の強さは主に乳酸に起因していると考えられた（図 5）。

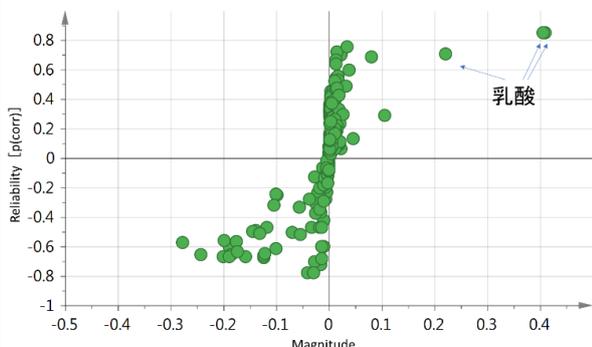


図 5 OPLS 回帰分析から算出された S-plot
(x 軸正方向ほど酸味の強さに寄与し、
y 軸で|1.0|に近づくほど信頼度が大きい)

4.4 酸臭に寄与する成分の探索

NMR の測定データと、酸臭の有無の結果との間で相関のある成分を OPLS-DA で探索した。その結果、S-plot において酢酸 (-0.75) の寄与が大きく、ほかに乳酸 (0.67)、エタノール (-0.69) の寄与も大きいことが示された（図 6）。乳酸とエタノールは酸臭を呈さないが、ヘテロ乳酸発酵において酢酸と同時に生成されるために一致した挙動を示したと見られる。したがって、実質的に酸臭に寄与したのは酢酸であると考えられた。

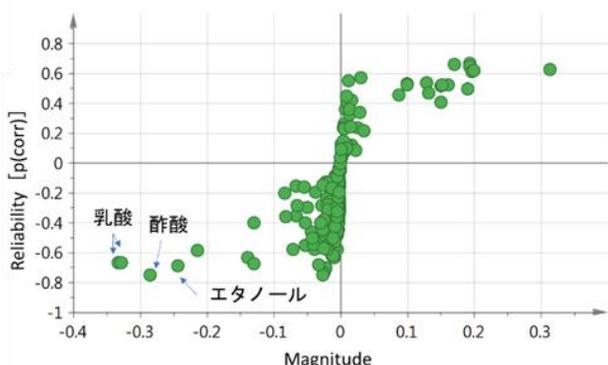


図 6 OPLS-DA から算出された S-plot
(x 軸負方向ほど酸臭の強さに寄与し、
y 軸で|1.0|に近づくほど信頼度が大きい)

4.5 旨味に寄与する成分の探索

NMR の測定データと、旨味の有無の結果との間で相関のある成分を OPLS-DA で探索した。その結果、S-plot において「旨味有り」ではリンゴ酸（有機酸）、コハク酸（有機酸）、ウリジン（核酸）の寄与が大きいことが示された（図 7）。このうち、リンゴ酸は酸味成分、コ

ハク酸は旨味成分として知られている成分である。一方、「旨味無し」では、乳酸の寄与が大きかった。この原因として、官能評価において酸味が旨味をマスキングした、または乳酸菌が旨み寄与成分を消費し、同時に乳酸を生成した結果である可能性が考えられた。

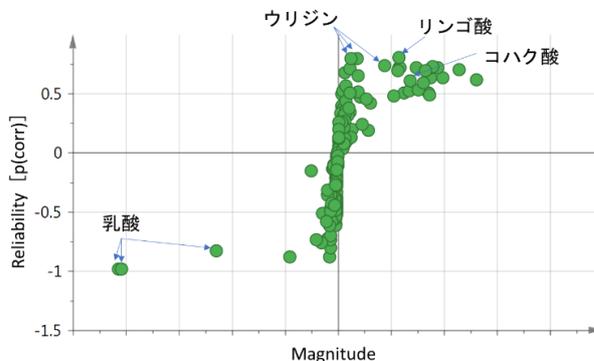


図 7 判別分析から算出された S-plot
(x 軸正方向ほど旨味の強さに寄与し、
y 軸で|1.0|に近づくほど信頼度が大きい)

4.6 乳酸菌の種・株ごとの香味寄与と成分の比較

酸味の寄与成分と考えられた乳酸は、乳酸菌添加無しの試料に対して *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei* を添加した試料で有意に増加し（図 8）、その他の乳酸菌を添加した試料でも増加傾向がみられた。

酸臭の寄与成分と考えられた酢酸は *Lb. brevis* で有意に増加し、*Leu. carnosum*, *Leu. mesenteroides* の一部の株で増加傾向がみられた。増加の見られた 3 菌種はいずれもヘテロ発酵菌であり、エタノールについても傾向が一致していたため、ヘテロ発酵による生成の影響が大きいと考えられた。ただし、白菜発酵漬け試作工程において、酢酸、酢酸ナトリウムを使用しており、厳密な酢酸生成量の比較はできなかった。

旨味の寄与成分と考えられたコハク酸は *Lb. pentosus*, *P. parvulus* で減少傾向がみられた。リンゴ酸は *Lb. brevis*, *Lb. sakei* で有意に減少した。一部の乳酸菌がコハク酸、リンゴ酸を消費したために減少した可能性がある。

5. まとめ

添加する乳酸菌の種や株を変えて試作した白菜発酵漬けについて、官能評価と NMR による成分プロファイル解析を行い、データ全体の傾向を把握するための主成分分析、香味に寄与する成分の探索、及びそれら成分の乳酸菌ごとの生成量の違いについて比較し、以下の結果を得た。

- ・主成分分析の結果、全試料の成分プロファイルの特徴差には乳酸発酵の進み具合と発酵形式の違いが主に関与していると考えられた。
- ・「酸味」、「酸臭」、及び「旨味」に寄与する成分としてそれぞれ、「乳酸」、「酢酸」、及び「リンゴ酸、コハク酸、ウリジン」が選抜された。

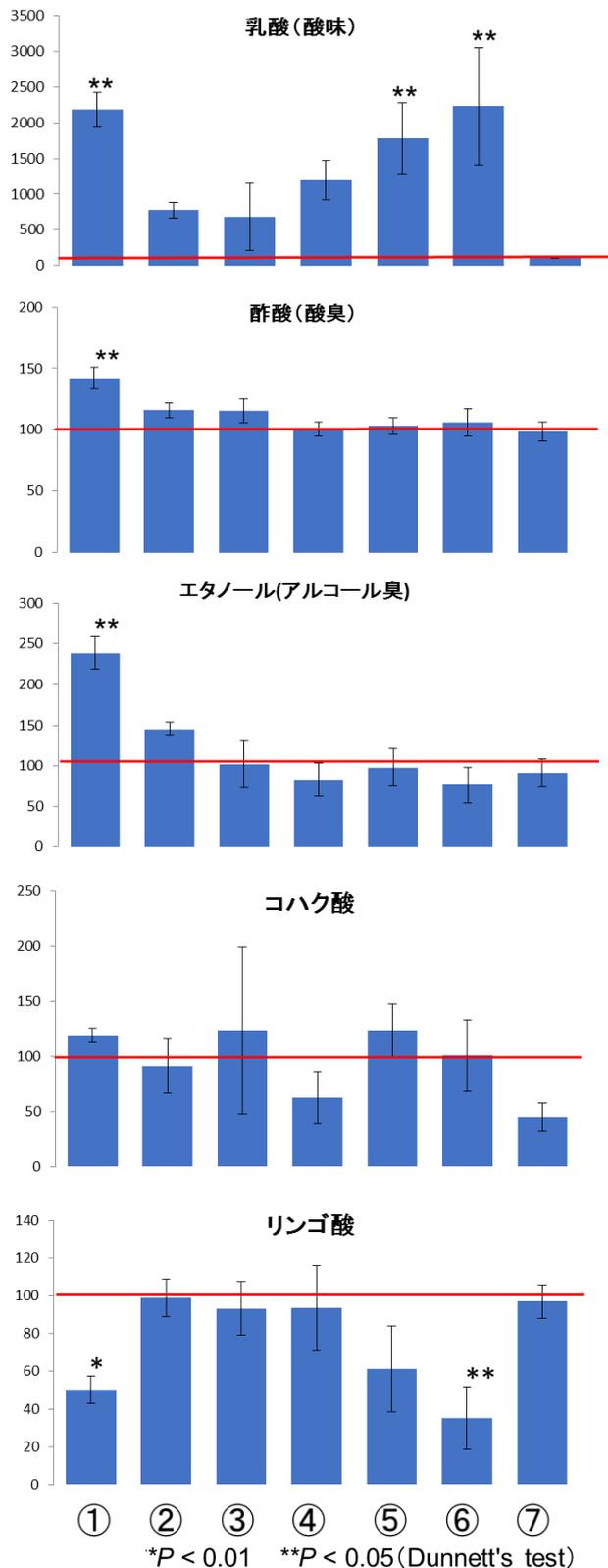


図 8 菌種^{*1}ごとの NMR 面積値^{*2}の違い

*1 ① *Lb. brevis* ② *Leu. carnosum* ③ *Leu. mesenteroides* ④ *Lb. pentosus* ⑤ *Lb. plantarum* ⑥ *Lb. sakei* ⑦ *P. parvulus*

*2 同時に作成した乳酸菌添加無し試料における信号面積値を 100 とする相対値

- 酸味の寄与成分と考えられた乳酸は *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei* で有意に増加した。
- 酸臭の寄与成分と考えられた酢酸は *Lb. brevis*, *Leu. mesenteroides* の一部の株で増加傾向がみられた。ヘテロ発酵による生成の影響が大きいと考えられた。
- 旨味の寄与成分と考えられたコハク酸は *Lb. pentosus*, *P. parvulus* で減少傾向がみられ、リンゴ酸は *Lb. brevis*, *Lb. sakei* で有意に減少した。一部の乳酸菌がコハク酸、リンゴ酸を資化したために減少した可能性がある。

6. 今後の課題

本研究により、乳酸菌を添加した白菜発酵漬けにおける主要な代謝成分の傾向を見ることができた。一方で、それ以外の低濃度成分については、原料白菜の差異など反復間差の影響が大きく、特徴差への寄与を明確に捉えることができなかった。本研究の結果を元に、反復間差を抑える試験デザインを構築することで、低濃度代謝物も探索できる可能性があり、今後の課題とした。

7. 参考文献等

- 1) 岩佐悟ら, 漬物の発酵に由来する香りの研究 (第 1 報) 茨城県工業技術センター研究報告 第 41 号, p13-16 (2013)
- 2) 岩佐悟ら, 漬物の発酵に由来する香りの研究 (第 2 報) 茨城県工業技術センター研究報告 第 42 号, p25-28 (2014)
- 3) 岩佐悟ら, 漬物の発酵に由来する香りの研究 (第 3 報) 茨城県工業技術センター研究報告 第 43 号, p25-28 (2015)
- 4) 岩佐悟ら, 漬物の発酵に由来する香りの研究 (第 4 報) 茨城県工業技術センター研究報告 第 44 号, p29-32 (2016)
- 5) 岩佐悟ら, 漬物の発酵に由来する香りの研究 (第 5 報) 茨城県工業技術センター研究報告 第 45 号, p13-14 (2017)
- 6) 岩佐悟ら, 漬物の発酵に由来する香りの研究 (第 6 報) 茨城県産業技術イノベーションセンター研究報告 第 46 号, p17-20 (2018)
- 7) 乳酸菌を用いた漬物の製造方法 特許 3091196

8. 謝辞

NMR 解析は国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構(農研機構)高度解析センターで行った。本研究は、文部科学省の特別電源所在県科学技術振興事業補助金により行った。