

漬物の発酵に由来する香りの研究（第8報）

—乳酸菌の選抜とそれらを利用した発酵食品の香り制御技術の開発—

岩佐悟*、飛田啓輔*、武田文宣*

1. はじめに

漬物産業では近年、健康志向に伴う発酵、菌ブームにより、発酵漬物が注目されている。しかし、発酵漬物には独特の香りがあり、消費者ごとにその好みは大きく異なる。そのため消費者の好みに応じて発酵漬物の香りを制御する技術の開発が求められている。そこで、漬物の発酵に由来する香りを分析し、それらを制御することを目的に研究を行っている。

第1報から第3報では、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¹⁻³⁾。第4報からは、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、乳酸菌の種類を変えることにより香りを制御する技術の開発を行っている⁴⁾。第4報、第5報では、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^{4, 5)}。第6報、第7報では、採取した乳酸菌をそれぞれ使用して白菜発酵漬物を試作し、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（以下、GC/MS とする）による分析、NMR（核磁気共鳴）法による成分プロファイル解析を行い、乳酸菌の違いによる白菜発酵漬物の風味の変化とその原因となる香気成分、水溶性成分の探索を行った^{6, 7)}。

2. 目的

第6報で実施した乳酸菌ごとの白菜発酵漬物の香気成分分析の結果⁶⁾を基に、香気成分の組成が大きく異なる乳酸菌5株を選抜し、以下の通り命名した。

- IBARAKI-TS1 株（ラクトバチルス プランタラム）
- IBARAKI-TS2 株（ラクトバチルス ペントーサス）
- IBARAKI-TS3 株（ラクトバチルス プレビス）
- IBARAKI-TS4 株（ラクトバチルス サケイ）
- IBARAKI-TS5 株（ロイコノストック メセンテロイデス）

これらの菌を使用して白菜、豆乳を発酵させた場合の香気成分の比較を行った。また、それぞれの菌の発酵条件の評価、同一菌種の標準株との糖資化性の比較を通じ、菌の新規性について検討を行った。

3. 方法

3.1 乳酸菌ごとの香気成分比較①—白菜発酵漬

3.1.1 白菜発酵漬の製造

乳酸菌株ごとに2回ずつ白菜漬を作製した。試作ごとに同一の製造条件で乳酸菌添加なしの漬物も作成し対照とした。まず、白菜を4つ割りにした後、葉の隙

間まで十分に水で洗った。その後、塩と酢との相乗効果による殺菌工程も兼ねて、白菜10kgに対し、食塩3kg、酢酸50mL、水10Lを加えて4時間下漬けした。下漬け終了後、流水で30分間脱塩した。上記のように脱塩処理した下漬け白菜に、食塩1%（w/w）、酢酸ナトリウム0.5%（w/w）、酵母エキス0.1%（w/w）、及び乳酸菌をそれぞれ 10^5 CFU/gになるよう添加して15°Cで72時間発酵させた。

3.1.2 乳酸菌ごとの白菜発酵漬の香気成分分析

試作した白菜発酵漬から1gを試料として取り、GC/MSによる香気成分分析を概報³⁾の条件で行った。香気成分は、白菜発酵漬の香りに重要と考えられる5種類（表1）を選抜し^{6, 8-12)}、検出値の比較を行った。

表1 測定した香気成分

香気成分	香りの特徴 ^{8)~12)}
ジアセチル類	ヨーグルト様の発酵香
脂肪族アルデヒド類 ^{※1)}	野菜の香り、青臭い
イソチオシアネート類 ^{※2)}	アブラナ科植物の香り
ジメチルトリスルフィド	漬物の香り
メチルメルカプタン	野菜の香り構成、腐敗臭

※1：アセトアルデヒド、プロパナール、2, 4-ヘプタジエナール

※2：3-ブテンニル及び4-ペンテニルイソチオシアネート

3.2 乳酸菌ごとの香気成分比較②—発酵豆乳

3.2.1 発酵豆乳の製造

市販の豆乳を購入し、1試料あたり10mLを13mL容の滅菌チューブに入れた。この滅菌チューブ中に、各乳酸菌株を 10^6 CFU/mlになるよう添加し、30°Cにて12時間静置にて発酵した。対照として、同一製造条件で乳酸菌を添加しないサンプルも作製した。

3.2.2 発酵豆乳の香気成分分析

試作した発酵豆乳1gを試料として分取し、香気成分を3.1.2に記載の方法で分析した。

3.3 選抜した乳酸菌の特性の検討

選抜した5株の乳酸菌と、同一菌種の標準株について、増殖可能な温度、塩分、及び糖資化性を比較した。

3.3.1 増殖可能温度の比較

一般的な乳酸菌の増殖条件を考慮し、GYP培地を用い5、10、20、30、37°Cの温度条件にて培養した。増殖の評価は、培養前、および培養1、3、5日目に

Lactobacilli MRS Agar に炭酸カルシウム 0.5%を添加した培地を使用した混釈法による菌数計測にて実施し、菌数が培養前に比較して10倍以上に増加するかを判断指標とした。尚、培養条件はアネロパック・ケンキ(三菱ガス化学㈱)を使用した嫌気培養とした。

3.3.2 増殖可能塩分の比較

塩分を0、2、4、6、8、10%になるように調整したGYP培地における30℃での増殖の評価を行った。

3.3.3 糖質化性の比較

細菌同定検査キット アピ50CH (シスメックスバイオメリュー) を用いて調べた。試験菌株を GYP 寒天培地で 30℃、4 日間培養した。形成されたコロニーを釣菌しアピ50CHL培地(シスメックスバイオメリュー)で菌液を調製した。その調製菌液を細菌同定検査キット アピ50CH によって 30℃、48 時間培養後、乳酸生成度を pH 指示薬 (プロモクレゾールパープル) の色で目視観察し、陰性 (pH 指示薬が紫色)、弱陽性 (pH 指示薬が緑色)、陽性 (pH 指示薬が黄色) の 3 段階で発酵性を評価した。

4. 結果

4.1 乳酸菌ごとの香り成分比較①-白菜発酵漬物

4.1.1 白菜発酵漬の製造

発酵終了後の各試料中の乳酸菌数及びpHを表2に示す。なお、対照において原料に由来する菌の増殖は確認されなかった。乳酸菌添加区では全ての菌の増殖が確認され、pHが低下した。

表2 試作した白菜発酵漬の乳酸菌数、pH測定結果

菌株	乳酸菌数 (CFU/g)		pH	
	開始時	終了時	開始時	終了時
対照	300以下	300以下	5.5	5.4
TS1	1.6×10^5	1.1×10^8	5.5	4.7
TS2	1.8×10^5	3.7×10^8	5.5	4.6
TS3	1.2×10^5	1.5×10^8	5.5	4.6
TS4	1.3×10^5	1.5×10^8	5.5	4.5
TS5	2.2×10^5	3.5×10^8	5.5	4.3

4.1.2 乳酸菌ごとの白菜発酵漬の香り成分比較

各成分の比較結果を図1に示した。ジアセチルの産生量は、対照と比べて、TS1株、TS2株及びTS5株を使用した発酵により検出値が2倍以上と有意に増加し、特にTS5株の増加率が大きかった。一方でTS3株を使用した発酵では2分の1未満と有意な減少が見られた。脂肪族アルデヒドであるプロパナールは、TS3株及びTS5株を用いた発酵では、対照と比べ検出値が5分の1未満まで減少していた。他の脂肪族アルデヒド類 (アセトアルデヒド、2,4-ヘプタジエンール) でも同様の傾向であった (データ非掲載)。

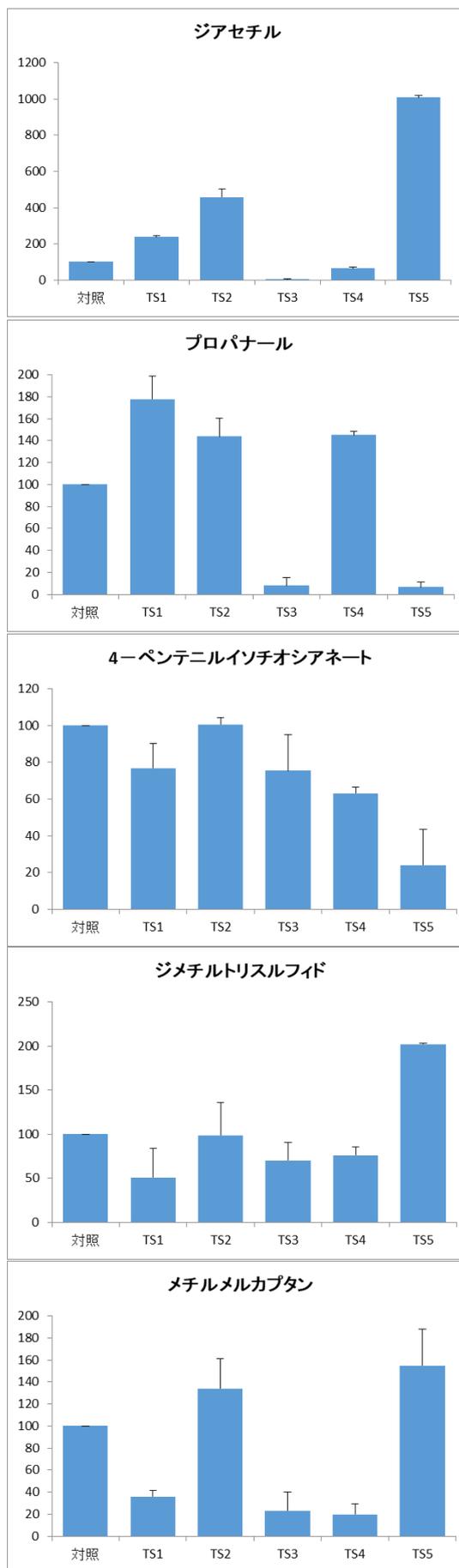


図1 乳酸菌ごとの白菜発酵漬の香り成分比較
※縦軸は対照 (乳酸菌非添加) のGCMS検出値を100とした面積比 (N=2)。

イソチオシアネート類である4-ペンテニルイソチオシアネートの産生量は、TS5株を使用した発酵により、対照と比べて検出値が2分の1未満に減少していた。この傾向は、3-ブテニルイソチオシアネートでも同様であった（データ非掲載）。

ジメチルトリスルフィドは、TS5株を用いた発酵で、対照と比べて検出値が2倍以上の増加が見られた。

メチルメルカプタンは、TS1株、TS3株及びTS4株を使用した発酵により、対照と比べて2分の1未満に有意に減少していた（図1）。

4.2 乳酸菌ごとの香気成分比較②—発酵豆乳

4.2.1 発酵豆乳の製造

発酵終了後の各試料中の乳酸菌数及びpHを表2に示す。対照において原料に由来する菌の増殖は確認されず、一方で、乳酸菌添加区ではどの菌も増殖が確認され、pHには差が見られた。TS3株を除く4株では固化が確認された。

表3 試作した発酵豆乳の乳酸菌数、pH測定結果

菌株	乳酸菌数(CFU/g)		pH		固化
	開始時	終了時	開始時	終了時	
対照	300以下	300以下	6.7	6.7	なし
TS1	2.2×10^6	3.0×10^7	6.7	5.4	あり
TS2	3.6×10^6	4.8×10^7	6.7	5.3	あり
TS3	2.0×10^6	8.8×10^6	6.7	6.5	なし
TS4	1.3×10^6	1.8×10^7	6.7	5.6	あり
TS5	1.1×10^6	1.8×10^7	6.7	5.4	あり

4.2.2 乳酸菌ごとの発酵豆乳の香気成分比較

発酵豆乳の香気成分を測定した結果、白菜の特有香であるイソチオシアネート類と、その分解産物であるメチルメルカプタンは検出されなかったが、乳酸菌が生成するジアセチル、野菜全般が有する香気成分である脂肪族アルデヒド類、及びジメチルトリスルフィドが検出され、菌ごとの産生量に違いがあった（図2）。

ジアセチルはTS1株、TS2株、およびTS5株を使用した発酵で検出値が2倍以上に増加し、特にTS1株、TS2株の増加が顕著であった。一方で、TS3株では2分の1未満まで減少していた。

プロパナールの産生量は、TS3株又はTS5株を使用した発酵では、対照と比べて検出値が50分の1未満に大きく減少していた。他の脂肪族アルデヒド類（アセトアルデヒド、2,4-ヘプタジエンール）でも同様の傾向であった（データ非掲載）。

ジメチルトリスルフィドは、TS5株を使用した発酵では、対照と比べて検出値が4倍以上に増加していた。

以上のように、選抜した乳酸菌は、香気成分の生成量に相違があり、菌種を選択することで、香気成分の生成量を変化させることができることが確認できた。また、菌株ごとの香気成分の生成量の傾向は白菜発酵漬と発酵豆乳で類似していた。

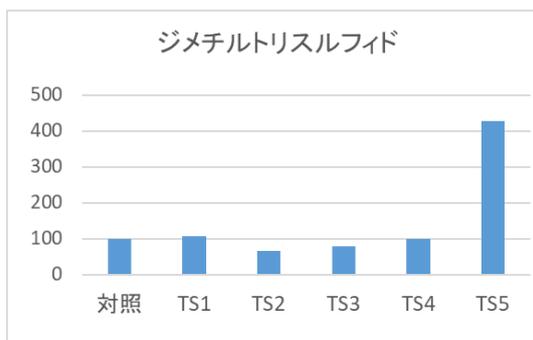
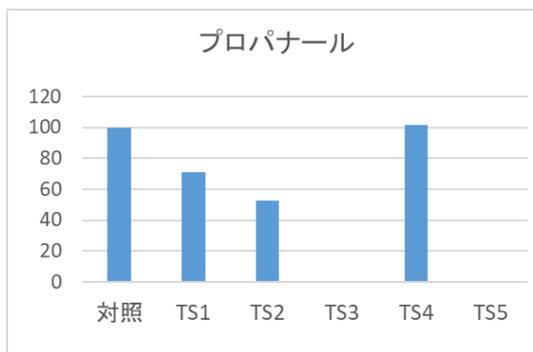
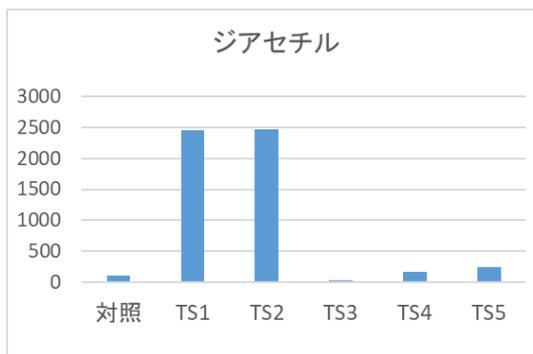


図2 乳酸菌ごとの発酵豆乳の香気成分比較
縦軸は対照（乳酸菌非添加）のGCMS検出値を100とした面積比。

4.3 選抜した乳酸菌の特性の検討

4.3.1 増殖可能温度の比較

選抜した菌株間ではTS1株、TS2株、TS3株は20℃～37℃で良好に増殖し、10℃でも増殖が可能で、5℃では増殖が確認されなかった。一方、TS4株、TS5株では20℃～37℃で良好に増殖し、5℃、10℃でも増殖が可能であった。同種の標準株との比較では、TS4株において、標準株よりも生育温度の下限が低かった（表4）。

4.3.2 増殖可能塩分の比較

選抜した菌株間ではTS1株、TS2株は塩分0～8%で良好に増殖し、塩分10%でも増殖が可能であった。TS3株は塩分0～4%で良好に増殖し、6%で増殖が可能で、8%以上では増殖が確認されなかった。TS4株では塩分0～8%で良好に増殖し、塩分10%では増殖が確認されなかった。TS5株では塩分0～4%で良好に増殖し、6%、8%でも増殖が可能で、10%では増殖が確認されなかった。同種の標準株との比較では、いずれも標準株より耐塩性が高くなっていた。

表4 発酵可能な温度、塩分、および糖資化性の評価

		標準株		標準株		標準株		標準株		標準株
		TS1 株 15891		TS2 株 106467		TS3 株 107147		TS4 株 15893		TS5 株 100496
菌種		ラクトバチルス プランタラム		ラクトバチルス ペントーサス		ラクトバチルス ブレビス		ラクトバチルス サケイ		ロイコノストック メセンテロイデス
生育温度(°C)		10-37	10-37	10-37	10-37	10-37	0-37	5-37	10-37	5-37
耐塩性 (%)		0-10	0-8	0-10	0-6	0-6	0-4	0-8	0-6	0-8
糖 資 化 性 ※	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L-アラビノース	-	+	+	+	-	+	+	+	+
	D-リボース	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	D-ガラクトース	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	L-ラムノース	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	D-ソルビトール	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	メチル-αD-マン ノピラノシド	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	メチル-αD-グ ルコピラノシド	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	アルブチン	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	D-セルビオース	+	+	+	+	-	-	+	-	+
	D-マルトース	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	D-ラク トース	+	+	+	+	-	-	-	+	-
	D-トレハロース	+	+	+	+	-	-	-	+	+
	D-ラフィノース	+	+	+	±	-	-	-	-	+
	ゲンチオビオース	+	+	+	+	-	-	-	+	+
	D-ツラノース	-	+	-	+	-	-	-	-	+
グルコネート	-	+	-	+	+	+	+	+	+	

※-は陰性、+は陽性、±は弱陽性を表す。

4.3.3 糖資化性の比較

糖資化性の比較では、得られた 5 株はいずれも、3～6 種類の糖の資化性が標準株と異なっていた。

以上のことから、選抜した 5 株の乳酸菌は、標準株とは異なる性質を持つ新規の乳酸菌であることが確認できた。

5. まとめと今後の計画

選抜した乳酸菌は、香気成分の生成量に相違があり、菌種を選択することで、香気成分の生成量を変化させることができることが確認できた。また、発酵条件、糖資化性の評価を行い、新規の乳酸菌であることを確認した。

これまでの研究結果を基に、選抜した乳酸菌 5 株、およびそれらを使用した食品について特許出願を行った。

今後は、これらの乳酸菌を使用した様々な発酵食品について企業と製品化を進めていく予定である。

6. 参考文献等

- 1) 岩佐悟ほか、茨城県工業技術センター研究報告 第 41 号、p13-16 (2013)
- 2) 岩佐悟ほか、茨城県工業技術センター研究報告 第 42 号、p25-28 (2014)
- 3) 岩佐悟ほか、茨城県工業技術センター研究報告 第 43 号、p25-28 (2015)
- 4) 岩佐悟ほか、茨城県工業技術センター研究報告 第 44 号、p29-32 (2016)
- 5) 岩佐悟ほか、茨城県工業技術センター研究報告 第 45 号、p13-14 (2017)
- 6) 岩佐悟ほか、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) 岩佐悟ほか、茨城県産業技術イノベーションセンター研究報告 第 47 号、p21-24 (2019)
- 8) 風味の改善された豆乳乳酸発酵物 (特許第 5680910 号)
- 9) 川上美智子ほか、日本家政学会誌 Vol.60 No.10 P877～855 (2009)
- 10) 前田安彦ほか、日本農芸化学会誌 Vol.53, No8, P261～268 (1979)
- 11) 野菜フレーバーの製造方法(特開 2014-55201)
- 12) 沢庵臭の減少方法 (特許第 3909384 号)