

有用微生物の探索と機能性食品の開発

加島隆洋、小寺美有紀、中嶋美奈子*、小林勝巳**、横山慎一郎

Search for Useful Microorganisms and Application to Food

Takahiro KASHIMA, Miyuki KODERA, Minako NAKASHIMA*, Katsumi KOBAYASHI** and Shin-ichiro YOKOYAMA

赤かぶの無塩発酵漬物である“酸菜”の品質の向上と安定化を目指し、コハク酸の生産に関与する微生物を分離・選抜し、発酵スターターとして利用する製法を検討した。その結果、コハク酸の生産に関与する発酵微生物は乳酸菌であり、酵母はほぼ関与しないものと考えられた。また、赤かぶの搾汁液を発酵させ、コハク酸醸成量を基に有望株を選抜した結果、ヘテロ発酵型の乳酸菌6株が選抜された。それら選抜株を発酵スターターとして接種した酸菜では現行品(酸菜種添加品)よりもコハク酸含量が高くなる傾向にあることが実証試験において示された。さらに選抜株No.25を発酵スターターとしたものでは γ -アミノ酪酸含量が31 mg/100 gとなった。

1. はじめに

岐阜県高山市は赤かぶ漬けの名産地であることはよく知られるところであるが、南東部の御嶽山麓に位置する高根町(旧大野郡高根村)では“酸菜(すな)”と称される赤かぶの無塩発酵漬物が伝統的に食べ継がれていることはほとんど知られていない。この酸菜であるが、古くは飛州志¹⁾に詳細な記述があり、「飛驒地域で常食される郷土の漬菜である」こと、「毎年十月初めの亥の日に漬け込みが行われ、菜を水で洗い湯にひたし湯気の立つうちに桶に詰めて重石を置く製法を採る」こと、「塩を加えないことで味わいが“酸い”ので酸菜漬けという」こと、「寒冷な飛驒では他地域のように芋や大根は貯えにくいので酸菜漬けが夫食(おかず)の第一のものである」等と記されており、かつては貴重品であった塩を全く使わない貯蔵食として江戸末期頃まで飛驒全域に普及していたものと考えられている。

一方、現代社会においては、塩分の過剰摂取が問題視され、循環器系の疾病予防のため、厚生労働省の推奨する塩分摂取量は成人男性で7.5 g未満/日とされている²⁾。この減塩化の流れは県内でも塩分の過剰摂取地帯とされ、漬物製造業が重要な地場産業でもある飛驒地域において喫緊の行政課題として捉えられており、かつての主菜である酸菜の復権を目指す動きへとつながっている。しかし、酸菜種(前年に作ったものの冷凍品)を共種とする現行の製法では発酵が進まず腐敗に至る場合もあり、普及を妨げる一因となっている。また、品質面でも旨味成分としてコハク酸が含まれると推測されるものの、その含量や醸成に関与する微生物などの詳細は明らかにされていない。そこで、酸菜の品質向上と安定化を目論み、コハク酸を生産する微生物を分離・選抜し、発酵スターターとして利用する製法を検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

発酵・貯蔵期間或いは製造者の異なる酸菜およびその漬汁10品を試料とした。

2.2 コハク酸分析

上記試料についてコハク酸量を調べた。コハク酸はF-kitコハク酸(JKインターナショナル)もしくはHPLC³⁾にて分析した。

2.3 微生物検査

酸菜の漬汁を滅菌生理食塩水で段階的に希釈し、その0.1 mlを培地に塗抹培養した。乳酸菌はGYP白亜寒天培地(グルコース 1 g, 酵母エキス 1 g, ペプトン 0.5 g, 牛肉エキス 0.2 g, 酢酸ナトリウム三水和物 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 20 mg, MnSO₄·4H₂O 1 mg, FeSO₄·7H₂O 1 mg, NaCl 1 mg, Tween80 2.5 mg, CaCO₃ 0.5 g, 寒天 1.2 g, 水 100 ml, pH6.8)を用いて30℃で72時間培養後、クリアゾーンを形成したコロニーを計測した。酵母はクロラムフェニコール加ポテトデキストロース寒天培地(日水)を用いて20℃で5日間培養後、生育したコロニーを計測した。

2.4 コハク酸生産菌の分離・選抜

2.3の結果を基にコハク酸含量の比較的高い試料においてフローラ優勢種である乳酸菌群からコハク酸高生産株の取得を試みた。すなわち2.3で得られた乳酸菌の培養プレートより、希釈段階と形成されたコロニーの特徴(形状、色沢、クリアゾーン形成性)を参考に主要な乳酸菌を分別・分離した。純化操作を行った後、GYP液体培地(グルコース 1 g, 酵母エキス 1 g, ペプトン 0.5 g, 酢酸ナトリウム三水和物 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 20 mg, MnSO₄·4H₂O 1 mg, FeSO₄·7H₂O 1 mg, NaCl 1 mg, Tween80 2.5 mg, 水 100 ml, pH6.8)で前培養し、加熱殺菌した飛驒紅かぶの搾汁液へ接種後、30℃で72時間炭酸ガス培養を行った。得られた発酵液の有機酸をHPLC分析し、コハク酸については必要に応じてF-kitコハク酸で確認した。発酵液中のコハク酸含量を指標に有望株を選抜した。

*高山市高根支所

**一般財団法人 高根村観光開発公社

2.5 選抜株を発酵スターターとした実証試験

酸菜の原料は高根町産の飛騨紅かぶを用い、製造は常法に従った。選抜株の赤かぶ発酵液をスターターとし、用量は刻んだ原料重量の1/1000とした。漬込み後14日から約2ヶ月経過後に各種分析・検査に供し、同時期に現行法で製造されたもの(酸菜種N及びS使用)と比較した。

2.6 アミノ酸分析

2.5で得られたものの一部について、グルタミン酸とγ-アミノ酪酸(GABA)の定量分析⁴⁾を行った。

3. 結果と考察

試料の詳細とコハク酸などの分析結果を表1に示した。酸菜の旨味成分としてコハク酸が含まれることを確認した。その含量は77-951ppmと幅があり、製造者の違いにより高低が観られたことから共種として用いられた酸菜種の発酵微生物の違いが影響したものと推測された。その発酵微生物に関し、冷凍品(No.2及び10)からは乳酸菌・酵母とも検出されず、冷凍品を酸菜種とする現行の製法に疑問が持たれた。おそらく冷凍品では、発酵微生物の供給源としての効果が低下しており、腐敗に至る一因となっていると推測された。また、酸菜の発酵過程ではガスの発生が旺盛に観られることからヘテロ発酵型乳酸菌と酵母の関与が推測されたが、結果としては酵母の関与はほぼ無いと判断され、むしろヘテロ発酵型乳酸菌の生産する酢酸により生育阻害されていると推測された。以上の結果から、品質の安定化には乳酸菌発酵スターターの開発が必須であり、コハク酸高生産株を選抜・利用できれば品質の向上も期待できると考えられた。

続いてコハク酸生産菌の分離・選抜結果(抜粋)を表2に示した。6試料(No.1, 3, 4, 5, 7, 9)より74株(ホモ発酵型24株、ヘテロ発酵型50株)を分離し、赤かぶ搾汁液の発酵を行った結果、いずれもヘテロ発酵型である6株(Strain No.3, 4, 24, 25, 49, 56)を選抜した。しかし、最もコハク酸含量の高かった試料No.9からは高生産株が取得できず、製造後の冷蔵貯蔵が長かったために低温性乳酸菌が増殖し、菌叢が変遷した可能性が考えられた。

次に実証試験品の有機酸含量を表3に示した。発酵スターター接種品ではいずれもヘテロ発酵型乳酸菌が10⁸/mlレベルで検出され、良好な酸菜が得られた。コハク酸含量に関してもスターター接種品では115~490 ppmとなり、現行品の113~269 ppmよりも高い傾向にあった。一方で酸菜種N-1およびN-2とN-1使用のものではホモ発酵型乳酸菌が10⁶/mlレベルで検出され、これらが発酵に関与したことで乳酸含量が高く、酢酸含量が顕著に低くなり、マロラクチック発酵によるリンゴ酸の消費を招くことが推測された。さらに酢酸に関しては単に酸味の付与だけでなく、香气成分としても重要であることから風味の醸成という意味においてもヘテロ発酵型乳酸菌スターターの利用は優位であるといえる。また、実証試験品では選抜試験時よりも最終的にコハク酸含量が高くなったが、これは赤かぶ

表1 試料のコハク酸含量等

No.	試料	製造年月	入手日	pH	コハク酸	乳酸菌	酵母
					(ppm)	(/ml)	(/ml)
1	酸菜(冷蔵品)	2019.11	2020.11.24	3.67	323	3.3×10 ⁶	不検出
	漬菜部			-	315	-	-
酸菜(冷凍品)	3.66			321	不検出	不検出	
漬菜部	-			315	-	-	
3	漬汁	2020.11	2020.11.25	3.71	77	6.6×10 ⁷	不検出
4	漬汁		2021.03.17	3.55	97	6.0×10 ⁵	4.0×10 ³
5	酸菜	2020.11	2021.03.17	3.62	149	6.0×10 ⁷	不検出
6	酸菜			3.53	139	5.0×10 ⁶	不検出
7	酸菜			3.51	173	5.0×10 ⁷	不検出
8	酸菜			3.79	144	7.0×10 ⁵	不検出
9	酸菜(冷蔵品)	2020.11	2021.03.17	4.38	899	8.0×10 ⁵	不検出
10	酸菜(冷凍品)	2020.12		4.11	951	不検出	不検出

表2 コハク酸生産菌の分離・選抜結果(抜粋)

Strain No.	HPLC分析(ppm)					F-kitコハク酸(ppm)
	リンゴ酸	乳酸	酢酸	クエン酸	コハク酸	
3	3167	7617	1992	1259	153	161
4	3318	7169	1957	1279	141	162
24	3162	7768	1935	1341	153	143
25	3245	7234	1974	1330	136	143
26	3395	6825	1924	1386	122	
27	3289	7256	1937	1392	137	
28	3427	6802	2133	1343	126	
29	3296	7322	2169	1355	133	129
33	3425	6785	2114	1345	124	
34	3425	6785	2114	1345	124	
49	3440	7496	2157	1330	125	136
53	3364	7786	2156	1315	125	
56	3364	7971	2197	1344	130	140
未接種	4520	2340	不検出	1268	不検出	70

表3 実証試験品の有機酸含量

発酵期間 もしくは採取日	スターターNo. もしくは酸菜種	HPLC分析(ppm)				
		リンゴ酸	乳酸	酢酸	クエン酸	コハク酸
2021.10.13 ~ 2021.11.1	No.24	1380	5860	1033	577	142
	No.49	1339	5693	1187	540	244
	No.3+4	1731	4847	1253	654	115
2021.10.13 ~ 2021.12.21	No.24	27	5674	2474	201	355
	No.49	24	6541	1732	175	490
	No.3+4	36	3578	3042	162	384
2021.11.19 ~ 2021.12.21	No.49	1263	6470	2927	987	179
	No.25	1045	7395	2636	877	299
	No.56	1475	5653	2536	873	142
2021.11.1採取	酸菜種N-1	64	15959	924	201	159
	酸菜種N-2	57	9361	479	161	113
2021.11.19採取	酸菜S-1	1961	4187	1795	637	222
2021.12.21採取	酸菜種N-1使用	91	13868	633	279	269
	酸菜S-2	1126	3216	1790	1013	185
	酸菜S-3	1762	3599	2023	980	137

の収穫時期(選抜試験は8月、実証試験は10-11月)の違いによるものと推測され、資化性糖類が多く含まれる10, 11月でより発酵が進んだ結果であると考えられた。

続いて実証試験で得られたNo.25およびNo.56株接種品(いずれも2021.12.21採取)について、グルタミン酸とGABAの定量分析を行った結果を表4に示した。両試験品とも同一原料で仕込み、同じ発酵経過を辿ったものであるがNo.25株接種品ではL-グルタミン酸がGABAにほぼ変換されており、No.25株がGABA高生産株であるとともに両株が発酵スターターとして確実に作用したことを示唆する結果となった。機能性表示食品制度においては、GABA 28 mg/日の摂取で血圧降下作用の表示が可能となる⁹⁾。近年ではグルタミン酸ナトリウム(MSG)の添加と*L. buchneri*を接種した野沢菜漬けでGABAの富化と緑色保持を図った研究が報告されている⁹⁾。本研究は緑色保持を目的とするものではないためMSGは添加していないが、飛騨紅かぶを原料とし、No.25株を発酵スターターとして接種した酸菜では100 g程度の摂取でGABA 28 mg/日を達成できることから、“血圧降下作用のある赤かぶ漬け”としてその普及に取り組みたいと考えている。

表4 実証試験品におけるアミノ酸含量

スターターNo. (採取日)	アミノ酸(mg/100 g)	
	L-グルタミン酸	GABA
No.25(2021.12.21)	2	31
No.56(2021.12.21)	38	1

4. まとめ

酸菜の品質の向上と安定化を目指し、コハク酸を生産する微生物を分離・選抜し、発酵スターターとして利用する製法を検討したところ、以下の結果が得られた。

- ・酸菜のコハク酸生産に関与する発酵微生物を分離・選抜した結果、ヘテロ発酵型乳酸菌6株を取得した。
- ・選抜株を接種した酸菜では現行品(酸菜種添加品)よりもコハク酸含量が高くなる傾向があることが実証試験において示された。
- ・選抜株No.25を発酵スターターとした酸菜ではGABA含量が31 mg/100 gとなった。

【謝 辞】

酸菜および飛州志に関するご助言を賜りました山下喜一郎氏(山一商事株式会社)に深謝いたします。

【参考文献】

- 1) 長谷川忠嵩著, 岡村利平編, 飛州志, 岐阜日日新聞社刊, 1969
- 2) 厚生労働省, 「日本人の食事摂取基準(2020年版)」策定検討会報告書, 1-7ミネラル, <https://www.mhlw.go.jp/content/10904750/000586565.pdf>
- 3) 中小企業のための分析機器利用マニュアル, 有機酸分析用液体クロマトグラフシステム 有機酸分析, 近畿地域イノベーション創出協議会
- 4) 食品中機能性成分の分析法マニュアル集, 4-8 柑橘のγ-アミノ酪酸, 四国地域イノベーション創出協議会・地域食品健康分科会編, 平成22年3月
- 5) 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)「農産物の研究レビュー」(GABA), https://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/sys-review/pdf/NARO_NARI_review_GABA2-1.pdf
- 6) 水谷ら, 日本食品科学工学会誌, 68 (5), pp.206-211, 2021