

県内資源を活用した加工食品の開発 ～長崎県産物由来の植物性乳酸菌及び酵母を活用した加工食品の開発～

食品・環境科 科 長 河村俊哉
 食品・環境科 専門研究員 晦日房和
 食品・環境科 主任研究員 玉屋圭
 食品・環境科 研究員 松本周三
 長崎国際大学 薬学部 教授 榊原隆三
 長崎国際大学 薬学部 講師 野嶽勇一
 食品製造企業 5社

長崎県産の発酵食品や農産物から植物性乳酸菌 623 株及び酵母 132 株を分離し、得られた菌の食品に寄与する機能（機能性、保存性、呈味性）を調べることで有用微生物を獲得した。また、得られた有用微生物を活用し、長崎県大村市特産の黒田五寸人参のジュースを更に機能性に優れたものできないかという観点から、乳酸発酵人参ジュースの試作を行った。官能試験と機器分析の結果から味、香りに優れた果実由来の *Lactobacillus plantarum* SK-40 で製造し、さらにアミノ酸や抗酸化作用を調べることで製品の特徴を見出し、商品化に至った。

1. 緒言

生活習慣に起因するメタボリックシンドローム等により医療費が増加する中、セルフケアという観点より毎日の食事から健康を維持していくことが重要とされる。食品業界にもその責務が求められ、さまざまな研究、技術開発を行い対応にあたっている。これまでの研究により「プロバイオティクス(腸内の微生物のバランスを改善することにより、人や動物に有益に働く菌体のこと)」等の概念が次第に広まり、古くから食される微生物を利用した発酵食品は特に見直されている。

そのような中で乳酸菌を活用した市場は、植物性乳酸菌を含む飲料を投入したことで、売上高が約1.5倍となった乳酸菌飲料市場をはじめ、乳製品市場、化粧品市場、健康食品市場、さらにはペット市場にまで大きな広がりを見せており、潜在的な市場が存在すると考えられる。また、発酵食品業界では価格競争が厳しいこともあり、乳酸発酵にかかわる微生物資源の探索や、機能性を付加した新しい商品の開発が強く求められているのが現状である。

そこで、機能性成分や良好な呈味・香気成分、抗菌成分を生産する有用な微生物を探索した。そして、それらの微生物を活用し発酵食品の味や香りを改善し、保存性を向上させ、効率的に食品機能の改善、品質の安定化を図った。また、製品の食味、香り、食感の評価、比較を行うことで差別化し、付加価値の高い商品開発、消費の拡大に繋がる技術支援を目的に本研究を行った。

2. 実験方法

2.1 乳酸菌培養液のアミノ酸分析

試作で使用する表1の19株について、その培養液のアミノ酸分析を行った。培養液はMRS培地5mlに菌を添加し、37℃、48時間嫌気条件下で培養したものを0.22µmのフィルターでろ過した後、アミノ酸分析装置JLC-500(日本電子社製)に供した。

表1 試作に使用した乳酸菌

No.	分離源	特徴
1	漬物(古漬)	乳酸生産量が多い
2	漬物(古漬)	抗酸化能が高い
3	漬物(白菜漬)	抗酸化能が高い
4	漬物(キムチ)	抗酸化能が高い
5	漬物(浅漬)	抗酸化能が高い
6	果物(イチジク)	抗酸化能が高い
7	果物(カキ)	乳酸生産量が少なく、リンゴ酸を全て消費
8	果物(カキ) SK-37	乳酸生産量が比較的多い
9	果物(カキ) SK-38	抗酸化能が高い
10	果物(カキ) SK-40	乳酸生産量が比較的多い
11	漬物(浅漬)	乳酸生産量、抗酸化能ともに高い
12	漬物(古漬)	抗菌性が見られる
13	漬物(床漬)	抗酸化能が高い
14	漬物(糠漬)	乳酸生産量が比較的多い
15	醤油もろみ	乳酸生産量に対しリンゴ酸消費量が少ない
16	米麴	抗酸化能が高い
17	米麴	乳酸生産量が比較的多い
18	焼酎粕	乳酸生産量が多く、リンゴ酸消費量が少ない
19	焼酎粕	乳酸生産量が多い

2.2 乳酸発酵人参ジュースの試作試験

2.2.1 使用乳酸菌のスクリーニング試験

得られた乳酸菌の中から特長を有している表1の乳酸菌19株で試作(1次スクリーニング)を行った。試作は黒田五寸人参汁 100 ml(酸化防止のためビタミンCを添加)に各乳酸菌を添加し、37℃、48時間嫌気条件下で培養したものを官能試験で評価した。高評価の菌株で再度試作し、味、香りの評価が最も高く、pHの低下も十分な菌株を製造に使用することとした(2次スクリーニング)。

2.2.2 発酵条件検討

発酵条件の検討はpHを指標に、①乳酸菌添加量、②温度について行った。

①MRS培地 0.1、1、10 mlで前培養した乳酸菌、SK-40を5,000 × g で遠心し、上清を除去した後、生理食塩水で菌体を洗浄した。洗浄を再度行い、少量の純水に懸濁させ、黒田五寸人参汁 100 mlに添加した。30℃、好気条件下に静置し24時間後のpHを測定した。

②黒田五寸人参汁100 mlに1% (v/v) のMRS培地で前培養したSK-40を上記の方法で洗浄し、添加した。温度は15、20、25、30、37℃に設定し、好気条件下で静置培養した。製品として必要とされるpH 4.0以下になるまで発酵を続けた。

2.2.3 プラントスケール試験

(株)バイオジェノミクスにおいて、殺菌を行った黒田五寸人参汁に1/100培養液量の菌を添加し、30℃で発酵を行った。発酵したジュースを(有)シュシュにおいて調製、殺菌、瓶詰めした。

2.3 乳酸発酵人参ジュースの成分、味及び香り分析

2.3.1 有機酸分析

測定にはHPLC Waters 660、Waters 431電気伝導度検出器(Waters社製)を用いた。カラムはOrganic Acid 7.8 × 300 mm(Waters社製)を2本つなぎ、温度は50℃、移動相は5 mM p-トルエンスルホン酸水溶液、感度を向上させるための緩衝液は100 mM EDTA・2Na、20 mM Bis-Trisを含む5 mM p-トルエンスルホン酸水溶液で流速は共に0.8 ml/minとした。試料は遠心分離し(10,000 × g、10分間)、上清を純水で10倍希釈した。0.22 µmのフィルターでろ過した後、測定に供した。

2.3.2 遊離アミノ酸分析

試料2.5 mlにエタノール7.5 mlを加えて攪拌し、抽

出した後、遠心分離により上清を得た。溶媒を乾固させたものをWaters AccQ-Tag法に供し、遊離アミノ酸を測定した。

2.3.3 味認識装置及び官能試験による分析

味の測定には、試料を3倍希釈したものを用いた。比較対象として、既存の黒田五寸人参ジュースを用い、測定に供した。本測定にはインテリジェントセンサーテクノロジー社製の味認識装置TS-5000Zを用い、酸味、旨味、塩味、苦味、渋味、旨味コク、苦味雑味、渋味刺激の8種の味を測定した。

2.3.4 におい識別装置による分析

試料10 mgをにおい識別装置測定用バッグに入れ、純窒素封入後、室温で2時間放置した。これをにおい識別装置FF-2A(島津製作所社製)に供した。

2.4 乳酸菌SK-40の同定

乳酸菌SK-40をMRS培地 1 mlで37℃、48時間嫌気培養し、5,000 × g で遠心し菌体を回収した。TEN(TE buffer -0.1 M NaCl)で2回洗浄し、bacteria genomic Prep Mini Spin Kit (GEヘルスケア社製)を用いてTotal DNAを調製した。

16S rRNA をコードする1500 bpの遺伝子は、各0.5 µM の27f primer (forward)、1525r primer (Reverse)を用いて^[1] Takara EX Taq酵素で反応した。反応条件は、ABJ社のサーマルサイクラーモデル9700を用いて①96℃、5分、②96℃、30秒、58℃、20秒、72℃、90秒を30サイクル、③72℃、4分行い、最終的に4℃で冷却した。

反応物を1.5%低融点アガロース(プロメガ社製、タイプLMP)に供し、電気泳動後1500 bpに相当するDNAバンドを切り出した。アガロースからのDNAの溶出はMiniElute Gel Extraction Kit (キアゲン社製)を用いて行った。

得られたDNAの sequence は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (ABJ社製)を用いて、primerはforward側5'より27f、fE1L、f2L、f2L'、f3L、f4Lの6種類、一方Reverse側は5'より1525r、r4L、r3L、r2L'、r1L、rE1Lの6種類を使用した^[1]。反応条件は、①96℃、2分、②96℃、10秒、50℃、5秒、60℃、4分を25サイクル、③4℃で冷却した。

反応物をエタノール沈殿、Hi-Di Formamide 溶解、熱処理を行い、サンプルをGenetic Analyzer 310 (ABJ社製)に供した。ForwardおよびReverseからの配列を

各々繋ぎ、GenetexソフトウェアによりReverse配列をcomplementary配列に置き換えてForward配列と一致するのを確認した。

最終的に決定したDNA配列を基にDNA Data Bank of Japan (DDBJ) のBlastを用いてホモロジー検索することにより菌株の同定を行った。

3. 結果及び考察

3.1 乳酸菌培養液のアミノ酸含有量

乳酸菌培養液の主なアミノ酸含有量を図1に示した。旨味成分であるグルタミン酸を産生する菌株が見られ、これらの菌は呈味性に寄与することが考えられる。

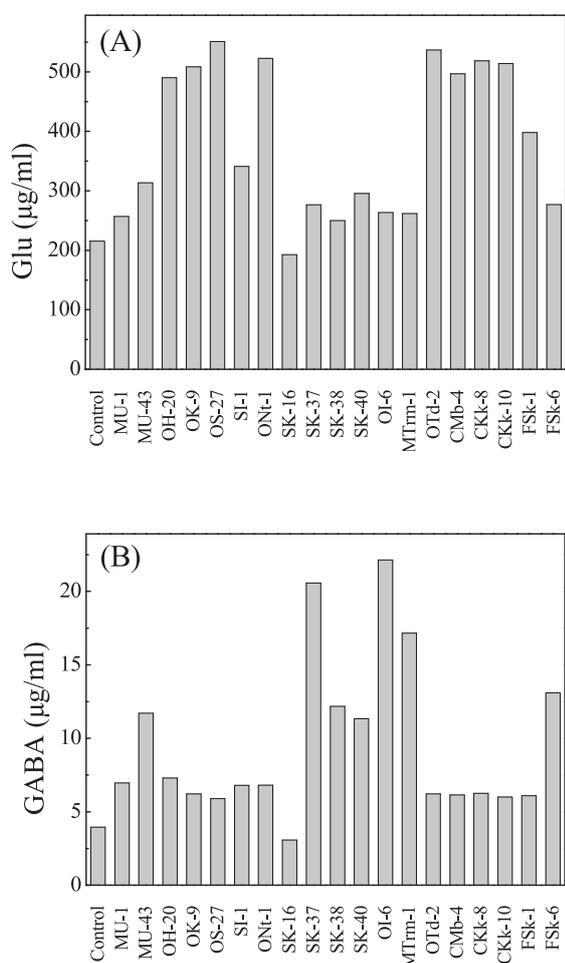


図1 乳酸菌培養液の主なアミノ酸量

(A) グルタミン酸、(B) γ -アミノ酪酸

一方、そのグルタミン酸を消費して γ -アミノ酪酸(以下GABA)を産生している菌株があることが示唆された。GABAの作用としては血圧降下作用^[2]やリラックス効果^[3]等が報告されている。これらの菌株は旨味を低減させる代わりに機能性を付加した食品開発への利用が期待される。

3.2 乳酸発酵人参ジュースの試作試験

1次スクリーニングでは、人参の風味が活きていることを基準とした。試作品の香りは分離源に似ているという官能評価が多く、人参ジュースとしては不快臭に感じるものが見られた。そのなかで、果物のカキから分離された乳酸菌で発酵したものは、香りがフルーティーで酸味とのバランスがよいという評価が多かったことからSK-37、SK-38、SK-40を選んだ。2次スクリーニングでは既存のクエン酸を添加した人参ジュースと比較した。味、香りが近いという観点から、最終的にSK-40に決定した。

発酵条件検討は、まず、各量の乳酸菌を加え24時間以内にpH 4.0以下になるかを確認した。前培養液1 ml、1% (v/v)以上添加したときpH 4.0を示したことから、乳酸菌の添加量は本培養時の1/100以上と決定した。温度条件検討の試験結果は図2に示す。25℃以下ではpHの低下に48時間程度かかり、15℃ではpH 4.0以下に低下しなかった。初期段階にpHがまったく低下しておらず、pHが低下し始めてからの低下速度に大きな差がないことから、菌の増殖速度に温度の影響が大きいことが示唆された。また、30℃と37℃を比較したところ、pH変化に大きな差がなかったことから発酵温度は30℃以上とした。

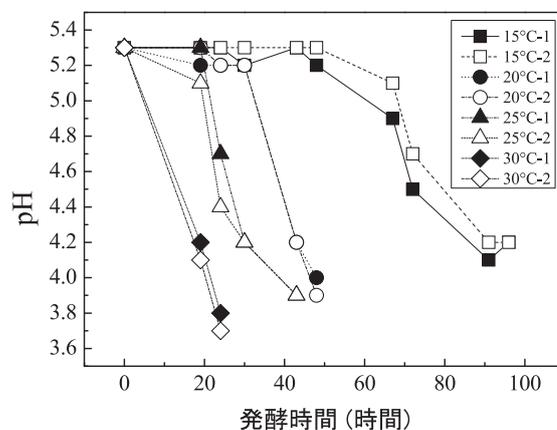


図2 各温度における発酵時間とpHの変化

プラントスケールでの試作及び製造は図3の(株)バイオジェノミクスの発酵タンクを用いて行った。試作時及び製造時のpH変化を図4に示す。各回とも安定して24時間以内にpH 4.0以下に低下し、48時間程度でpH 3.6前後まで低下している。また、官能評価で味・香りとも問題なく安定して製造できることが実証できた。

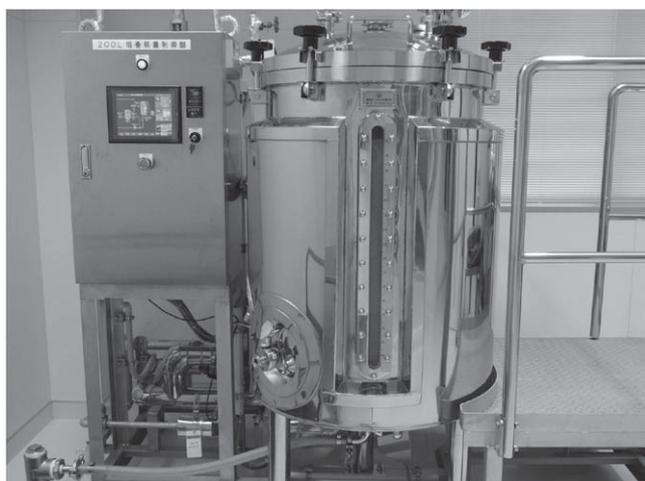


図3 発酵タンク

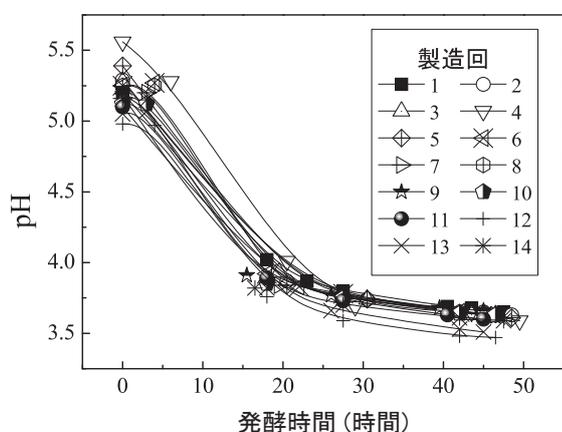


図4 各製造時の発酵時間とpHの変化

3.3 乳酸発酵人参ジュースの成分分析結果と味、香り分析の官能検査との比較

乳酸発酵人参ジュースの主な有機酸及びアミノ酸分析結果を表2及び表3に示す。試作品中の有機酸について、クエン酸は加えていないため値が低く、乳酸は乳酸発酵により十分量増えている。また、甘味や旨味を呈するアラニンやグルタミン酸が2倍量に、GABAも1.5倍量に増えていることが明らかになった。

次に味認識装置による分析結果を図5に示す。数値は従来品を基準とした場合の差を示している。従来品と比較すると先味(食品を口に含んだ瞬間の味)である苦味雑味と渋味刺激の値が上昇していた。一方で官能評価では「人参風味が減少している」、「まろやか」という意見が多く、乳酸発酵により強くなった苦味雑味と渋味刺激が人参独特のくせを軽減し、先味の強さが後味のまろやかさにつながっているのではないかと考えられた。

表2 乳酸発酵人参ジュースの有機酸量

有機酸 (mg/100 ml)	従来品 (クエン酸添加)	商品
クエン酸	433	18
リンゴ酸	189	85
乳酸	0	619
酢酸	0	14

表3 乳酸発酵人参ジュースの遊離アミノ酸量

アミノ酸 (mg/100 ml)	従来品 (クエン酸添加)	商品
アラニン	12.0	23.8
グルタミン酸	4.7	10.7
アスパラギン酸	5.4	6.2
GABA	6.9	10.4

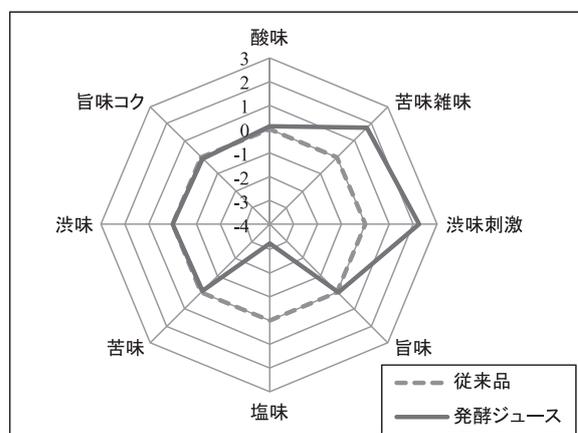


図5 味認識装置による乳酸発酵人参ジュースの分析結果

におい識別装置の分析結果は図6に示す。数値は従来品を基準とした場合の差を示している。有機酸系やエステル系に比較的差が出ている。クエン酸や乳酸は揮発性が低いため、それらの成分の増減よりは乳酸発酵により産生された他の香りによる影響が大きいと考えられる。

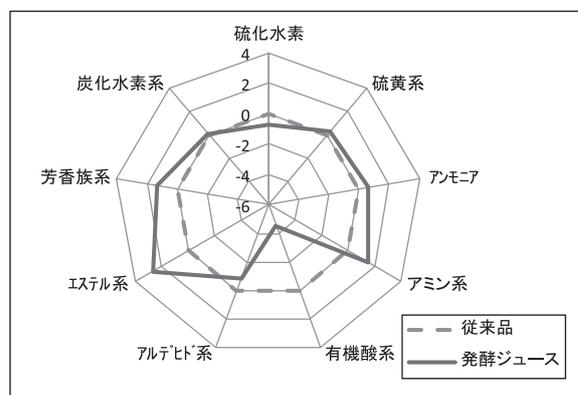


図6 におい識別装置による乳酸発酵人参ジュースの分析結果(類似度)

3.4 乳酸菌SK-40の同定

SK-40株から得られた16S rRNAをコードする遺伝子の塩基配列を調べた結果、1560 bpであることがわかった。その配列を基にホモロジー検索を行った結果、*Lactobacillus plantarum*の配列と100%一致することから同菌であることが判明した。

4. 結 言

これまでに行ってきた乳酸菌培養液の有機酸分析、抗酸化能分析^[4]に加え、アミノ酸分析を行うことでより有用な乳酸菌の獲得に至った。さらに、(有)シュシュ、(株)バイオジェノミクス、当センターとの共同研究により、獲得した乳酸菌を用いて黒田五寸人参を乳酸発酵させた新商品「黒田五寸人参プレミアム！」(図7)を開発し、その特長を見出すことができた。

本商品は第43回 長崎県特産品新作展(農産加工・酒・飲料品部門)で最優秀賞を受賞し、地域資源、県内資源を活かした商品として、今後さらなる展開が期待される。

当センターでは平成24年度以降、「長崎乳酸菌ライブラリーを活用した加工食品の開発」として引き続き乳酸菌の研究に取り組み、乳酸菌をより製造に使いやすい体制を整えるとともに新製品開発へとつなげていく。

参考文献

- [1] 篠田吉史、加藤暢夫、森田直樹：島津評論, Vol. 57, No. 1・2, pp. 121-132 (2000)
- [2] 梶本修身ら：日本食品科学工学会誌, Vol. 51, No. 2, pp. 79-86 (2004)
- [3] 岡田忠司ら：日本食品科学工学会誌, Vol. 47, No. 8, pp. 596-603 (2000)
- [4] 河村俊哉ら：長崎県工業技術センター研究報告, Vol. 40, pp. 1-3 (2010)

謝 辞

終わりに臨み、共同研究者であり、乳酸菌や酵母の分離源となるサンプルの提供や試作及び製造のアドバイス等をいただいた県内食品製造企業5社の皆様、また本研究に関わる一連のご指導、ご協力をいただきました、長崎国際大学薬学部の榊原隆三教授、野嶽勇一講師を始め関係する方々に深くお礼を申し上げます。



図7 黒田五寸人参プレミアム！
左：720 ml、右：180 ml

