

石川県の伝統発酵食品から分離した乳酸菌を用いた 新規機能性食品開発

— 米，海藻を原料とした乳酸発酵食品の製造工程の検討 —

辻篤史* 勝山陽子* 道嶋俊英** 中村静夫* 松井圭三***

近年，石川県で製造される伝統発酵食品の微生物菌叢や生理的機能が解明されつつある。本研究では，能登地方の伝統発酵食品「アジなれ鮓」より分離された免疫賦活作用を持つ乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ANP7-1株を用いて，米または海藻を主原料とした新規乳酸発酵食品の開発を行った。米発酵食品については，乳酸発酵条件，殺菌条件を決定し，嗜好性の良いカップタイプのヨーグルト様食品を完成した。海藻乳酸発酵食品については，プロテアーゼによる発酵前処理の検討，乳酸発酵の検討を行い，ドレッシングタイプの発酵食品を試作した。

キーワード：発酵食品，機能性食品，乳酸菌

Development of New Functional Foods Using Lactic Acid Bacteria Derived from Traditional Fermented Foods of Ishikawa Prefecture

- Research on the Manufacturing Processes of Fermented Foods Made from Rice or Seaweed-

Atsushi TSUJI, Yoko KATSUYAMA, Toshihide MICHIHATA, Shizuo NAKAMURA and Keizo MATSUI

Recently, the microbiological floras contained in traditional fermented foods made in Ishikawa Prefecture and their physiologies have been identified. In this study, we developed a new fermented food made mainly from rice or seaweed by using the strain of the lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum* ANP7-1, which has an immunostimulatory property, from Ajinarezushi, a kind of sushi made with horse mackerel in the area of Noto. For fermented food using rice, we determined the optimal conditions for fermentation and sterilization, and produced a yogurt-like food with a good flavor, which was packed in cups. As for food using seaweed, we studied the conditions for pre-process treatment by means of protease and fermentation, and produced an experimental dressing-type fermented food.

Keywords : fermented foods, functional foods, lactic acid bacteria

1. 緒 言

石川県央・北部地域では、「カブラ寿し」「こんか漬け」「アジなれ鮓」等の農水産物を原料に使用した多種類の発酵食品が伝統的に製造されてきた。近年，我々のグループはこれらの食品の生理活性機能を明らかにし，同時に発酵過程で消長する微生物の分離・同定を行ってきた¹⁾。また，分離した乳酸菌のライブラリが構築され，この中から生理活性物質高生産株や腸管免疫に関与する株の探索を行っている。これまでに，能登地方の伝統発酵食品であるアジなれ鮓から乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ANP7-1株を分離した。本菌体

は，マウスへの経口投与試験の結果，免疫関連タンパク質であるインターフェロン- γ 量を有意に上昇させることが明らかとなり，免疫賦活作用を有する可能性が示唆された²⁾。

清酒業界では，約30年前より売上げの長期低迷が続いており，近年は伝統的な発酵技術を生かした新商品の開発に力を注いでいる製造業が多い。同時に，消費者の健康志向への関心の高まりから，健康食品市場は年々市場規模が拡大している。そこで，免疫賦活作用を示す乳酸菌ANP7-1株を活用した乳アレルギー対象者でも摂取可能な米，米麴，水のみを原料としたヨーグルト様発酵食品の開発を目指し，乳酸発酵条件の検討，殺菌工程の検討及び試作品の評価を行った。

*化学食品部 **企画指導部 *** (株)福光屋

一方、能登地方には、地元では食されるが市場にはほとんど流通していない豊富な種類の海藻が存在する。本研究では、青のり、カジメ、ワカメ、神馬藻、つるもの5種類の能登産海藻を使用し、ANP7-1株による発酵を取入れた高付加価値な地場特産加工食品(海藻ドレッシング)について試作・検討を行った。

2. 実験方法

2. 1 米乳酸発酵食品の開発

2. 1. 1 発酵原料及び乳酸発酵条件の検討
発酵原料は、殺菌済み米糖化液((株)福光屋製 おこめみるく)を使用し、乳酸発酵は、(株)柳田食産製アジなれ鮭より単離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ANP7-1株を使用して行った。米糖化液20mLにMRS培地(Oxoid Ltd.製)にて前培養したANP7-1株を 10^5 - 10^6 cells/mLとなるよう添加して30°Cで静置培養を行い、経時的に発酵液を採取し、分析用試料とした。

2. 1. 2 カップ包装および殺菌条件検討

カップ包装は、50mL容ラミコンカップ(LR72-50WR)とKNPNフィルム(バリヤーナイロン15 μ /ナイロン15 μ /熱溶着層50 μ (総厚80 μ))を使用し、カップ包装機((株)シンワ機械製 SN-2)にて170°C、2秒でシールを行った。この際の殺菌用包装条件は、シールテスター((株)サン科学製 FKT-100)にて加熱前の破裂強度を測定し、容器包装詰加圧加熱殺菌食品の規格基準である最大破裂強度20kPa以上であることを確認した。さらに、加熱殺菌後製品のピーリング強度をプッシュプルテスター((株)アトニック製 AP-50N)で測定し、開封しやすさの目安である10-25Nの範囲内であることを確認した。

殺菌は、レトルト装置((株)アルプ製 RK-3030)を使用し、温度条件は、90°Cで開始後、100°Cで15-35分間もしくは110°Cで17分間行った。レトルト時の熱履歴はデータロガー((株)グラフテック社製 GL220)にて取得し、殺菌値の目安値 F_0 値を算出した。

2. 1. 3 米乳酸発酵食品の試作調製

米乳酸発酵液の調製は、(株)福光屋にて以下の通り行った。発酵スケールは12L、原料の配合は麴歩合20%、汲水歩合100%(麴2:蒸米8:水10)とした。1日目に水に米麴を投入し酵素を溶出させ、約3時間後に

蒸米を投入した。これを55°Cで16時間放置後、30°Cに冷却し、米糖化液とした。ANP7-1株はMRS培地1Lにて培養し、遠心集菌と菌体の洗浄を行い、最終的に水10mLに混濁して米糖化液に添加した(初発菌数:約 10^7 - 10^8 cells/mL)。これを30°Cで発酵し、発酵3日目に適当なpHの低下(pH3.6付近)と官能的に好ましい酸味を示したところで、速やかにミキサー処理し、5°Cにて包装時まで保管した。発酵物をカップ包装する前に、容器内への空気の抱込みを減少させるため、20cm×20cmのパウチに約200mLずつ投入し、80°C恒温槽で加熱、50°C達温後、真空包装機で脱気処理を行った。

2. 1. 4 保存試験

100°Cで15分間のレトルト殺菌を行った外観上白色のサンプル(A)、100°Cで35分間殺菌を行った褐変したサンプル(B)を30°C恒温器内で120日間保管し、一般生菌数、真菌数、色調の測定を行った。

2. 1. 5 分析評価

pHは、ハンディpHメーター((株)堀場製作所製 D-25)を用いて測定した。乳酸菌数、一般生菌数、真菌数測定にはそれぞれ、1%寒天加MRS培地、標準寒天培地(日水製薬(株))、100 μ g/mLクロラムフェニコール添加PDA培地(日水製薬(株))を使用した。

有機酸分析は、発酵液を水で10倍希釈後、10分間の超音波処理を行った。その後、6000rpmで5分間遠心分離を行った上清を0.22 μ mフィルター(日本ミリポア(株)製 Millex)で濾過し、有機酸分析計(日本ダイオネクス(株)製 ICS-1500)を用いて測定した。

硬さは、レオメータ((株)サン科学製 CR-500DX-SII)を使用し、破壊荷重を測定することにより評価した。色調の測定は、測色色差計((株)日本電色製 SE6000)を用いて反射法にて行った。

2. 1. 6 嗜好性評価

試作品の嗜好性は、食品開発展2011(2011年10月5日-10月7日、東京ビッグサイト)にて240名の来場者に対し、5項目(酸味、甘味、匂い、濃さ、テクスチャー)に関して3段階評価でアンケート調査を行い、その結果を基に全体および年代別の傾向を評価した。

2. 2 海藻乳酸発酵食品の開発

2. 2. 1 試料

谷川醸造(株)より提供を受けた能登産海藻5種乾燥物(青のり、カジメ、わかめ、神馬藻(ギバサ)、つるも)を、多機能粉碎機((株)グローエンジニアリング製RD2-15)でシャークミルによる粗切り後、ハンマーミルによって微粉末化した。また、乳酸菌株はANP7-1株を使用した。

2. 2. 2 酵素処理の検討

酵素は、プロテアーゼとしてパンチダーゼMP(ヤクルト薬品工業(株)製)、セルラーゼとしてセルラーゼY-2NC(ヤクルト薬品工業(株)製)を使用した。酵素処理は、海藻粉末の2%(w/v)水懸濁液を調製し、10分間のボイル殺菌を行った後、酵素を懸濁液重量の1%量添加して攪拌後、45°Cで3日間処理した。

2. 2. 3 乳酸発酵の検討

MRS培地で前培養したANP7-1株を、プロテアーゼ処理液に約 10^7 cells/gとなるよう添加し、30°Cで5日間発酵した。

2. 2. 4 発酵青のりドレッシングの試作

青のり乳酸発酵物の調製は、上述の条件に従い、酵素処理、乳酸発酵を行った。この際、青のり懸濁液は、2.5%青のり粉末水溶液400mLを煮沸殺菌して使用した。ドレッシングの調製は、青のり乳酸発酵物に谷川醸造(株)製の味噌、醤油、甘酒の他、各種調味料を加えることで風味を調整した。

2. 2. 5 分析評価

アミノ酸量は、2%(w/v)海藻水溶液を同量の0.02N HClにて、室温、2時間抽出後、0.22 μ mメンブレンフィルターにてろ過したものを適宜希釈して、アミノ酸分析計((株)日立製作所製 L-8900)を使用して測定した。有機酸分析用試料はHClではなく、水でアミノ酸分析同様に調製した。有機酸量、pH及び乳酸菌数は、米糖化液発酵物と同様の方法で測定した。

3. 結果及び考察

3. 1 米乳酸発酵食品の開発

3. 1. 1 乳酸発酵条件の検討

米糖化物の発酵におけるpHの経時変化を図1に、乳

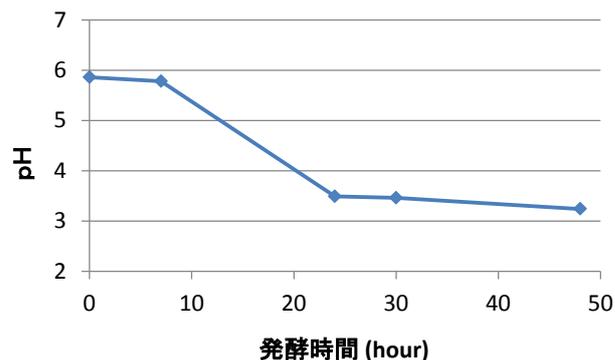


図1 米糖化物乳酸発酵時のpH変化

表1 米糖化物の乳酸発酵に伴うpH、乳酸菌数、乳酸量、風味の変化

発酵時間 (hour)	pH	乳酸菌数 (cfu/mL)	乳酸量 (mg/100mL)	官能評価
0	5.86	5.0×10^5	51	酸味なし、マイルドな甘味
7	5.78	-	-	-
24	3.49	5.0×10^8	547	適度な酸味、後に残る優しい甘味
30	3.46	-	-	-
48	3.24	-	-	ピリッとした酸味、甘味弱い、やや漬物臭

酸菌数、乳酸量及び風味の経時変化を表1に示す。pHは24時間の発酵でpH3.5付近にまで急激に、その後は緩やかに低下した。また乳酸菌数、乳酸量ともに発酵24時間で急激に増加し、乳酸発酵が生じていることを確認した。

官能評価の結果、発酵開始時には酸味は感じられなかったが、発酵24時間では適度な酸味があり、甘味と酸味のバランスが良い嗜好性に優れた風味となった。発酵48時間においては、酸味が強く、漬物臭のような不快臭が感じられた。また、発酵に伴う色調の変化は観察されなかった。さらに、4L、9Lにスケールアップを行い、発酵曲線及び風味の再現性を確認した。

これらの結果から、約1日間の発酵によりpHを3.5付近(3.4-3.6)に低下させた後、加熱殺菌等により発酵を停止させることで、官能的に好ましい乳酸発酵物の製造が可能であることが明らかとなった。

3. 1. 2 カップ包装および殺菌条件の検討

使用菌株ANP7-1は、死菌体においてもマウス小腸のパイエル板リンパ球細胞のインターフェロン- γ 生産量の増加を引き起こす事が報告されている²⁾。このこ

とから、製品の品質保持を目的とし、レトルト装置を用いた乳酸発酵物の殺菌条件を検討した。この際、濃厚感のあるヨーグルト様カップ型製品の開発を目指し、発酵試験に用いた糖化液に比べ固形分(米, 米麴)含量の高い糖化液を作製し、容器は耐熱性カップを使用した。

カップ型製品を試作する前に、発酵試験に用いた発酵物でのレトルト殺菌試験を行った結果、110°C、17分の条件で色調の変化はなく、微生物制御も十分に可能であった。しかし、固形分含量の高い糖化液発酵物を同条件にて殺菌したところ、殺菌前との色差 ΔE^* は22.7であり(表2)、外観上顕著な褐変が見られた。そのため、100°Cで15分間の殺菌を行った結果、 ΔE^* は5.1であり、殺菌前と外観上の違いは認められなかった。一般的に、 ΔE^* が13.0-25.0の範囲は区別ができる程度の色の差、 ΔE^* が3.2-6.5の範囲は印象レベルで同色として扱われる範囲とされており³⁾、外観上の評価と一致する。温度履歴から計算された100°C、15分のF0値は0.39、110°C、17分のF0値は5.3と殺菌値には10倍以上の差があったが、100°C、15分殺菌品についても一般生菌数及び真菌数はそれぞれ<300、<100cfu/gであった。このことから、殺菌前に約 10^8 - 10^9 cells/mL存在する乳酸菌は、100°C、15分の条件で十分に殺菌可能であることが明らかとなった。

3. 1. 3 保存試験

試作品の保存試験を行った結果、30°Cで120日間保管した後も一般生菌数と真菌数は増加せず、有機酸量にも変化はなかった。色調に関しては、100°C、15分間殺菌した白色サンプル(A)と、100°C、35分間殺菌した褐変サンプル(B)を30°Cで保管した結果、Bの方が黄味・青味の指標である b^* 値の増加が顕著であり、保存時に褐変が進行しやすい傾向が見られた(図2)。米菓等米加工品の加熱時には褐変の原因であるアミノ・カルボニル反応(メイラード反応)が生じることが知られている⁴⁾が、メイラード反応では誘発的にフリーラジカルが発生することから、褐変は加速的に進行すると推察される。これらのことから、殺菌後製品は b^* 値を品質管理指標として検品を行うことが有効であると考えられる。また、有機酸量及びレオメーター測定による破断時の最大荷重について、殺菌前後で大きな差は認められなかった。

表2 発酵物レトルト殺菌後の外観及び微生物数

評価項目	殺菌前	100°C, 15分	110°C, 17分
ΔE^*	-	5.07	22.7
一般生菌数 (cfu/g)	-	< 300	< 300
真菌数 (cfu/g)	-	< 100	< 100

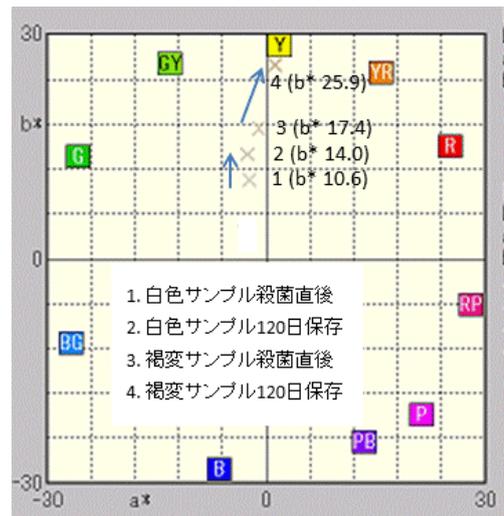


図2 米発酵食品保存時の色調変化 (横軸: a^* , 縦軸: b^*)

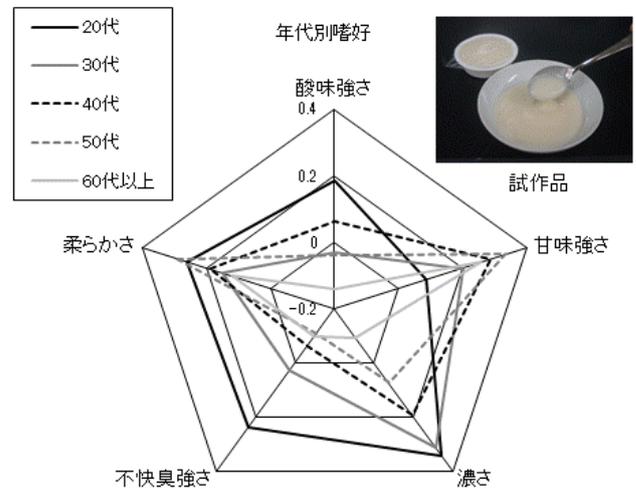


図3 米発酵食品試作品と年代別嗜好性の傾向

3. 1. 4 米乳酸発酵食品試作及び官能評価以上の条件検討に従い、米糖化液(12Lスケール)をpH3.6付近までANP7-1株で発酵した発酵物を、100°Cで15分間殺菌したカップ型乳酸発酵食品(図3右上)を試作し、約240名による嗜好性に関するアンケート調査

を行った。

製品に対する総合評価は、酸味、甘味、匂い、濃さとテクスチャー5項目全てにおいて、「ちょうど良い」と答えた人数が最も多かった。また、これら5項目に対し、「強すぎる(抑えるべき)」「濃すぎる」「臭い」「食感が柔らかすぎる」を+1, 「ちょうど良い」を0, 「弱すぎる(物足りない)」「薄すぎる」「よい香り」「食感が硬すぎる」を-1とし、各年代の合計値を各年代の有効回答数で割った値を指標とした年代別嗜好の傾向を図3に示す。年齢層が高い程、甘味が強すぎる(指標が+値)、濃さは薄すぎる(指標が-値)と感じている傾向があった。また匂いに関しては、20歳代は圧倒的に臭い(指標が+値)と感じているが、40代以上ではむしろ好ましく(指標が-値)感じる傾向が見られた。テクスチャーに関しては、全ての年代で、柔らかすぎると感じている傾向があった。このように、年齢層により嗜好が大きく異なるために、今後はターゲット層に合わせた製品改善を行っていく必要があると考えられる。

3. 2 海藻乳酸発酵食品の開発

3. 2. 1 酵素処理条件の検討

海藻は一般的に発酵源として適しておらず、その原因は、海藻に含まれる糖類が乳酸発酵の際の炭素源となりにくいと考えられている⁵⁾。また、タンパク質含有量が少なく(乾燥重量7-20%)、旨味となるアミノ酸含有量も少ないことから、そのままでは調味料としての活用には不適な素材である。そこで、海藻をプロテアーゼ処理やセルラーゼ処理した後に発酵を行う方法が報告されている⁶⁾。このことから、本研究においても海藻の酵素による前処理を検討した。

プロテアーゼ処理前後の5種海藻懸濁液の遊離アミノ酸量変化を海藻100g中含有量として算出した値を図4に示す。5種類全ての海藻中において、遊離アミノ酸量が劇的に増加した。特に青のりでは、遊離アミノ酸総量は0.3g/100gから22.2g/100gに増加し、旨味成分である遊離グルタミン酸量についても、865mg/100gと高い値となった。一方、同様の条件で青のりにセルラーゼを作用させた結果、遊離アミノ酸総量は約半分であった。さらに、プロテアーゼとセルラーゼを同時に作用させた場合に、プロテアーゼのみと比較して遊離アミノ酸量の大きな増加はなかった。そこで、遊離アミノ酸による風味の向上および製造コストを考慮し、前処理としてプロテアーゼ処理のみを行うこととした。

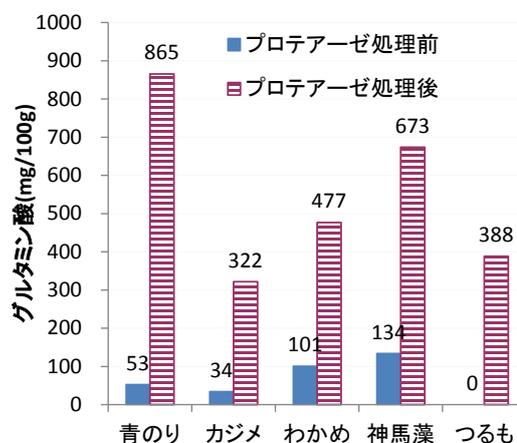
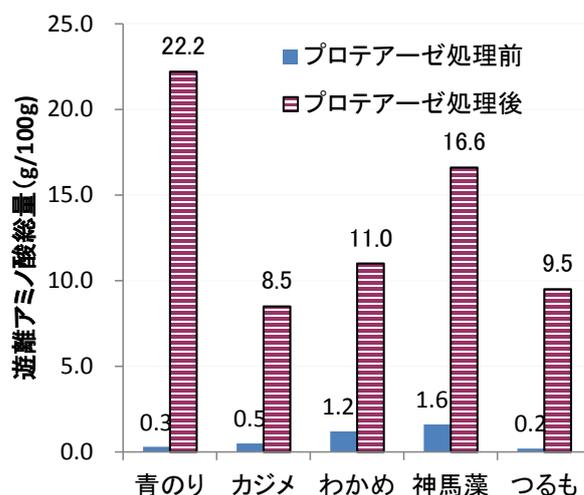


図4 プロテアーゼ処理による海藻の遊離アミノ酸総量及び遊離グルタミン酸量の変化

表3 5種海藻プロテアーゼ処理物発酵時のpHおよび乳酸量変化 (ND: not detected)

海藻の種類	発酵開始時		発酵5日目	
	pH	乳酸量 (mg/100g)	pH	乳酸量 (mg/100g)
青のり	5.7	1	3.6	895
カジメ	6.5	ND	3.9	327
わかめ	6.6	ND	3.9	608
神馬藻	6.3	1	3.6	1087
つるも	5.9	ND	3.4	962

3. 2. 2 乳酸発酵の検討

プロテアーゼ処理を行った各海藻懸濁液に乳酸菌 ANP7-1株を添加した際のpH及び乳酸量変化を表3に示す。発酵5日で全ての海藻でpHは4以下となり、かつ乳酸量の増加が見られ、乳酸発酵が生じていることを確

認した。また、発酵前後で遊離アミノ酸量、遊離アミノ酸組成には大きな変化は見られなかった。

調製した海藻乳酸発酵物の匂い及び風味等について3名のパネラーによる嗜好性評価を行った結果、青のりが最も香りが好ましく、海藻らしさを感じる風味であった。また神馬藻とつるもについても、海藻らしさを感じる好ましい風味であった。これらの海藻は、能登地方独特の食文化を伝える素材として、今後の活用が期待される。

3. 2. 3 青のりドレッシングの試作評価

以上の結果を基に、図5に示す製造工程で青のりを粉砕、殺菌、プロテアーゼ処理、乳酸発酵して得られた乳酸発酵物に他の発酵食品(醤油、味噌、甘酒等)を調合した青のり発酵ドレッシングを試作した(図5右上)。試作したドレッシングは、文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラム事業成果発表会(2012年2月17日、金沢都ホテル)にて試供し、官能的に好ましい評価を得た。

4. 結 言

石川県能登地方の伝統発酵食品「アジなれ鮭」より単離した免疫賦活活性を有する乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ANP7-1株を使用して、米または海藻を原料とした乳酸発酵食品の検討を行った。

米乳酸発酵食品については、米糖化液を30°Cで約1日発酵させてpHを3.5付近にまで低下させた後、100°Cで15分のレトルト殺菌を行うことにより、嗜好性と保存性に優れたカップタイプのヨーグルト様乳酸発酵食品を開発した。

海藻発酵食品については、能登産の5種類の海藻にプロテアーゼ処理を行い、その後乳酸発酵を行うことにより海藻らしい風味を有した海藻発酵ドレッシングの試作品を完成させた。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、協力を頂いたH21-H23文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラム(都市エリア型)事業の参画機関に感謝します。

特に、乳酸菌株を分離・提供頂いた石川県立大学教授熊谷英彦氏、機能性評価を行った金沢大学教授太田富久氏に感謝します。また、原料の提供及び試作品開発に終始ご協力頂いた谷川醸造(株)に感謝します。

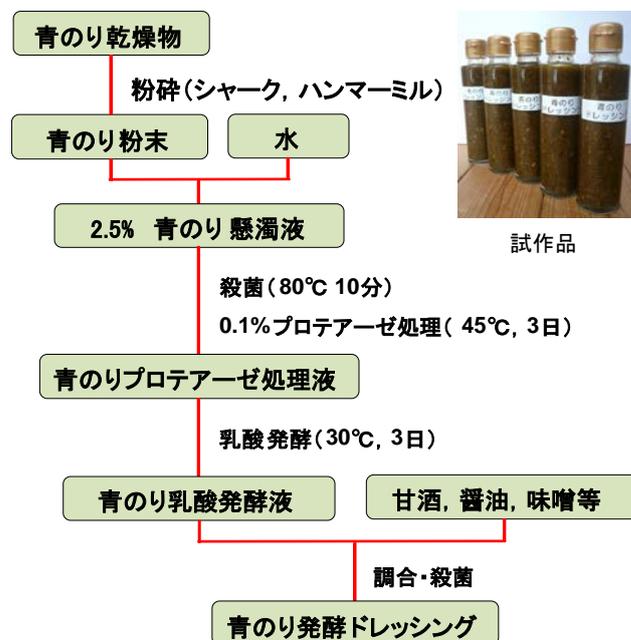


図5 青のりドレッシング製造工程及び試作品

参考文献

- 1) Masaki Kiyohara, Takashi Koyanagi, Hiroshi Matsui, Keiko Yamamoto, Harumi Take, Yoko Katsuyama, Atsushi Tsuji, Hiroto Miyamae, Tetsufumi Kondo, Shizuo Nakamura, Takane Katayama, and Hidehiko Kumagai. Changes in Microbiota Population during Fermentation of *Narezushi* as Revealed by Pyrosequencing Analysis. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*. 2012, no. 76(1), p. 48-52.
- 2) 文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラム都市エリア型(一般)【石川県央・北部エリア】平成23年度年度報告書. 文部科学省, 2011, 105 p.
- 3) 日本電色工業株式会社. “色の許容差の事例”. http://www.nippondenshoku.co.jp/web/japanese/colorstory/08_allowance_by_color.htm. (参照 2012-06-01).
- 4) 倉澤文夫. 最新食品加工講座 米とその加工. 株式会社建帛社, 1982, 236 p.
- 5) 内田基晴. 海藻を発酵させる技術とその応用. 醸造協会誌. 2011, vol. 106, no. 2, p. 71-80.
- 6) キッコーマン(株), 理研ビタミン(株). 海藻発酵組成物及びその製造方法. 特開2010-252660. 2010-11-11.