

植物由来乳酸菌 *Lactobacillus sakei* 発酵野菜と利用

大野信子, 佐藤弥生, 斉藤正好, 細谷幸夫,
久信田清人, 藤田正三, 押久保悦之, 小林文男

Application and Benefits of Plant Origin *Lactobacillus sakei* on Fermented Vegetables

Nobuko OHNO, Yayoi SATO, Masayoshi SAITO, Yukio HOSOYA,
Kiyoto KUSHIDA, Shozo FUJITA, Yoshiyuki OSHIKUBO and Fumio KOBAYASHI

Vegetables fermented with lactic acid bacteria have particular flavor and tastes contributed by the bacteria. This report deals with the isolation of a plant origin *Lactobacillus sakei* HS-1 from a well know fermented food called as Kimchi and the application as a starter culture in the productions of fermented vegetables and typical Japanese tsukemono to determine the improvement in taste and probiotic properties of the strain.

In addition to the known organoleptic properties of the fiber and umami flavor found in fermented vegetables tsukemono, the metabolic products from the *L. sakei* starter culture will make possible the production of low 1.5 % salt fermented vegetables. The lactic acid fermentation will result in a low salt product with improved umami flavor making it possible to consume the product like a fresh salad. The viable *L. sakei* will also act as a probiotic to reduce the unwanted bacteria in the intestinal tract. This report shows some of the results.

(1) *L. sakei* HS-1 was used to ferment white chinese cabbage kimchi. The microbial growth was rapid and a pH change was seen. On the 4th day of fermentation the level of coliforms was negative. (2) Three types of fermented vegetables; Asazuke cucumber, diced cabbage and diced chinese cabbage kimchi were made with *L.sakei* and without.

(3) The consumption of *L. sakei* fermented vegetables will improve bowel movement and there was a tendency to lose weight. Stools were tested for viable lactic acid bacteria and found in 88% order. This *L. sakei* is a homofermentative bacteria so no gas is formed in the intestine.

キーワード：植物性乳酸菌 (Plant origin lactic acid bacteria)、ホモ型乳酸発酵菌 (Homofermentative lactic acid bacteria)、発酵野菜 (Fermented vegetable)、白菜キムチ (Chinese cabbage kimchi)、発酵キャベツ (Fermented cabbage)

緒言

発酵野菜は主に乳酸菌の関与により、独特の風味付けや食味向上に大きく寄与している。従来から乳酸菌は味噌、醤油などの大豆発酵食品や漬物、また乳製品などにおいて重要な役割を担ってきた。近年、乳酸菌は肉類、乳類などに関与する動物性由来の乳酸菌と大豆や野菜、果物類などに関わる植物性由来の乳酸菌に大別されつつあり、両者の生育環境や生理的性質などの相異が明らかにされはじめている。

本報告では伝統的発酵食品のキムチから分離された植物性由来乳酸菌 *Lactobacillus sakei* HS-1 株を漬物製造用スターター株として用い、数種類の発酵野菜・漬物を製造して食味向上ならびに生体における影響やプロバイオティクスとしての効果について検討した。

発酵野菜・漬物は本来持っている野菜の繊維質機能や旨味成分に加え、植物性乳酸菌 *L. sakei* HS-1 株の発酵代謝物によって食塩濃度1.5%の低塩発酵を実現し、また乳酸発酵による塩慣れとまろやかな旨味成分の増加により、従来食している漬物野菜をより手軽に、いつでもサラダ感覚で食せるようにと試みた。また同時に生きた乳酸菌の摂取によって、いわゆる善玉菌の増殖による悪玉菌の抑制などにより、腸内環境の改善にも注目し、若干の結果を得たので報告する。

実験材料および方法

1. 使用菌株

発酵野菜製造のスターター株は乳酸菌 *Lactobacillus sakei* HS-1 株を使用した。本菌は茨城県工業技術センターにおいて「美味しい本格漬物の製造」を目的にキムチより分離され、野菜をよく発酵する漬物用スターターとしての特性をもつ乳酸菌である。(特許番号 第3091196号)。*L. sakei* HS-1 株は低温 (10~15℃) でも増殖可能であり、また食塩耐性は8%である¹⁾。本菌による発酵物のpH低下はpH4程度でとどまるため、酸味への影響は穏やかとされる。

2. 保存培養とスターターの調製

L. sakei HS-1 株は、(有) 那須バイオファームにて調製したものをを用いた。*L. sakei* HS-1 株保存培地は標準寒天培地 (栄研化学株式会社) を使用し、培養は高層標準培地に穿刺培養して20~25℃で行った。これを3ヶ月毎に継代して実験に使用した。

L. sakei HS-1 株の調製用の液体培地組成は清酒5%、酵母エキス1.25%、グルコース1.0%、

食品添加物用酢酸ナトリウム0.1%と硫酸マグネシウム0.02%を用い、pH7.0 に調整して121℃で20分殺菌し、培養は20℃において120時間行った。スターターの保存は、食品添加物用炭酸カルシウムを1.0%添加してポリスタンド袋に充填し7℃以下とした。通常スターターの消費期限は、10℃冷蔵庫内で保管し未開封において製造後3ヶ月である。スターター使用量は原料野菜1kgに対して1gとし、発酵は室温または冷蔵庫内で行った。

3. *L. sakei* HS-1 株の規格および分析方法

L. sakei HS-1 株の性状・特徴としてはホモ型乳酸菌であり刺激臭やガス生成を認めない。製品は淡黄色液状品である。規格値は乳酸菌数1g当たり 10^8 個以上であり、一般生菌数は1,000個以下、カビ・酵母は1,000個以下、大腸菌群陰性である。また乳酸菌数はBCP培地または標準寒天培地²⁾、一般生菌数は標準寒天培地、カビ・酵母はPDA培地、大腸菌群はDESO培地を用いて計測した。

4. 発酵野菜の製造方法

1) 白菜キムチの製造

丸ごと1株販売の市販白菜を使用し、外葉数枚を落とし水洗して4cm大にカットした。食塩濃度5%溶液に1時間落とし蓋をして浮き漬けとした。下漬け白菜に対しキムチ生タレを外割りで10%になるよう計量し、タレに*L. sakei* HS-1株を加え混合して、下漬け白菜に混ぜ合わせた。混合後、スタンド袋に入れ、約20℃で5日間発酵した。

2) 刻み白菜浅漬け

白菜を四つ割にし、洗浄剤と水道水にて2回洗浄した。これを1.5~2cm幅にカットして調味塩を振り、半日漬け込みした。その後、白菜の水を切り、これにカット人参と昆布を加え混ぜた後、*L. sakei* HS-1株を加え混合した。その後、袋詰めにして空気を除きゴム止めで製品とした。

3) 刻み白菜キムチ

刻み白菜浅漬けの製法にしたがい、生白菜を四つ割にしてから洗浄後、1.5~2cm幅にカットした。これに調味塩を振り半日下漬けした。漬け込みは白菜を天タルに移して*L. sakei* HS-1株を添加し、冷蔵庫内で1晩漬け込んだ。次に重石をして白菜の水を切り、キムチのタレ、カット人参やニラなどを混ぜ合せた後、袋に詰め調味液を入れて、脱気しゴム止めで製品とした。

4) きゅうり浅漬け

きゅうりはプールにて流量制御による次亜塩素酸(200ppm)供給システム洗浄、ブライン併用抜気洗浄後、水洗した。次に下漬け液に、一晚浮き漬けした。その後、漬け液を切り、

L. sakei HS-1 株を添加して混合した。これを袋に詰めして、調味液を加えて、脱気を行った後、ゴム止めして製品とした。

5) 発酵キャベツ

キャベツを食塩1.5%濃度で漬け込み、この時に*L. sakei* HS-1 株を添加して一晩冷蔵庫中で発酵させたものを試験区の試料とした。

6) 対照野菜

発酵野菜と同時に*L. sakei* HS-1 株無添加の対照野菜も調製して比較した。

5. 遊離アミノ酸の分析

L. sakei HS-1 株の添加による乳酸発酵の旨味成分解明のために発酵後5日間の野菜キムチの遊離アミノ酸組成を分析して、対照野菜と比較検討した。アミノ酸の分析はアミノ酸アナライザーにより日本食品分析センターにて行った。

6. 摂食試験・官能試験

被験者をランダムに振り分け、試料は1日当たり約100gとし、3週間継続して摂食させ、便通の改善や体重の増減などについてのアンケート調査を行った。

また、発酵野菜の官能試験を行った。検査項目、旨味、香り、食感、色調および総合評価の5項目について5点満点の評点尺度で評価した³⁾。

7. 糞便からの*L. sakei* HS-1 株の検出

1) 検体糞便の回収方法

大腸がん検診などに用いられるブラシ形キャップ付き採便容器(本多プラス株式会社製)を用いて便中にブラシ部分を刺し込み付着した糞便を検体とした。

2) *L. sakei* HS-1 株測定用検体の調整

回収検体糞便はブラシ部分に約10~40mgの検体が付着しており、採便容器に滅菌生理食塩水1mlを加え、ボルテックスミキサーで攪拌して分散させた(10²希釈液とした)。分散溶液を更に滅菌生理食塩水にて順次希釈し、10⁶、10⁸希釈液を測定用検体とした。

3) 培養および測定

培養は市販乳酸菌検出BCP培地(日本製薬製)を用い、検体1mlを直径9cmの滅菌シャーレに採り滅菌培地を混合する混釈培養方法にて行った。

培養は12~15℃の低温で3日間行い、生酸変色コロニーの内本菌の生育時に示す紡錘形をしたコロニーをカウントした。10⁶希釈液で検出されない検体については10²希釈液0.2mlをシャーレに採り再度培養して検出を試みた。

実験結果および考察

1. *L. sakei* HS-1 株の白菜キムチにおける発酵試験

1) 菌数の生育経過

L. sakei HS-1 株を用いて、白菜キムチを製造し、発酵過程における微生物の消長について検討した。白菜キムチ製造5日間のpH変化と乳酸菌数および大腸菌群の変動を、キムチ液体部分について1g中の生菌数を測定し表1に示した。

表1 白菜キムチ発酵中における生菌数の推移

<i>L. sakei</i> HS-1 株		製造経過(日)				菌数 個/g
		初日	2日目	3日目	4日目	5日目
添加区	乳酸菌	4.0×10^6	1.6×10^{10}	4.2×10^{10}	2.7×10^{10}	3.3×10^{10}
	大腸菌	5.0×10^6	1.0×10^6	2.4×10^2	N.D.	N.D.
	pH変化	5.1	4.4	4.2	4.1	4.1
無添加区	乳酸菌	1.0×10^6	1.0×10^6	2.0×10^7	1×10^8	2.0×10^8
	大腸菌	5.0×10^6	9.0×10^5	5.0×10^3	3.0×10^2	1.0×10^1
	pH変化	5.1	5.0	4.3	4.1	4.0

L. sakei HS-1 株添加区の場合は白菜キムチ中に高い生菌数が示され、速やかな乳酸菌の増加と共にpHの低下が認められた。また、大腸菌群は発酵初期に検出されたが、4日経過すると検出されなかった。一方、無添加区では野生の生酸菌が多く検出されpH低下が認められたものの、大腸菌群は発酵5日目でも確認された。

本菌の添加により、乳酸菌の増殖とともに乳酸の生成により大腸菌群の生育に影響を与えたものと考えられる。本菌の大腸菌増殖抑制作用についてはすでに報告されているが¹⁾、ヘテロ型の乳酸菌や酢酸菌、またカビ、酵母などを抑制する効果も期待されている。

L. sakei HS-1 株添加区無添加区ともにpHは発酵3~4日目でpH4.1を示しており、発酵期間中に過剰な酸味を呈するほどのpH低下を示さなかった。

本実験において*L. sakei* HS-1 株添加の白菜キムチ製造は、*L. sakei* HS-1 株の、前培養など特別な工程を経ずに行った。市販のキムチのタレには食塩以外にも多くの香辛料が含まれているが、乳酸菌の増殖に影響は見られなかった。このことより*L. sakei* HS-1 株を用いた発酵野菜を製造において、調味料と*L. sakei* HS-1 株を同時に添加する簡易な方法で生菌数の高い発酵野菜を製造できることが示唆された。

2) *L. sakei* HS-1 株によるガス発生の確認

L. sakei HS-1 株の添加区と無添加区の白菜キムチ製造して、これをポリスタンド袋に充填し、10℃で3週間保管してガス発生の有無を確認した。両区とも同量のキムチを充填したものの、無添加区においてはガスの発生により袋内が膨くらみ内容物が沈下し、内容量が減少したような差が見受けられた(図1)。



図1 *L. sakei* HS-1 株によるガス発生の抑制

L. sakei HS-1 株はホモ型乳酸菌であり、ガス発生による膨張は生じないとされている¹⁾。このガス発生による膨張は、野生のヘテロ型乳酸菌が生育し、酢酸や炭酸ガスを生成して膨張したものと考えられる。したがって*L. sakei* HS-1 株は乳酸菌生菌数が高く検出され(表1)、袋の膨張も認められないことから、添加区で増殖した乳酸菌はホモ型乳酸菌の可能性が高く、また混在するガス生産菌などを抑制したものと考えられる。

発酵野菜のガス発生は、品質劣化をもたらす要因でもある。*L. sakei* HS-1 株による野生の生酸菌や腐敗菌などの生育を抑制しガス発生を抑えることは、発酵野菜を製造流通する上で、極めて有利な点の一つであると考えている。

3) *L. sakei* HS-1 株が食味におよぼす影響

L. sakei HS-1 株の添加が発酵野菜の食味におよぼす影響を調べるため、白菜キムチを試料として、その遊離アミノ酸含有量を測定した(表2)。

表2 白菜キムチの遊離アミノ酸の含有量

アミノ酸	<i>L. sakei</i> HS-1 株	
	添加区	無添加区
アルギニン	34	29
リシン	24	24
ヒスチジン	11	11
フェニルアラニン	20	20
チロシン	12	12
ロイシン	30	30
イソロイシン	19	19
メチオニン	7	7
バリン	28	28
アラニン	87	87
グリシン	18	18
プロリン	37	41
グルタミン酸	1,330	1,510
セリン	30	29
トレオニン	23	23
アスパラギン酸	34	37
トリプトファン	4	4
シスチン	N.D.	N.D.
総量	1,748	1,929

(mg/100 g)

その結果、使用したタレ中のアミノ酸含有量の影響が大きかったためか、本菌の添加によるアミノ酸の増加は顕著に認められなかった。

したがって、発酵野菜の旨味や塩慣れの効果はその他の成分（核酸や乳酸菌の発酵代謝産物）の生産によるものと思われる。また、*L. sakei* HS-1 株菌体そのものがマイルド感を与え、極微量の成分が効果をだしているものと考えられた。

2. *L. sakei* HS-1 株による発酵野菜の官能試験

官能試験の試料は刻み白菜浅漬け、刻み白菜キムチ、浅漬けきゅうりおよび発酵キャベツの4種類を用い、パネル17名でおこなった。この結果を図2に示したが、*L. sakei* HS-1 株添加区が、無添加区と比較して高い評価が得られる傾向を示した。前述のように、*L. sakei*

HS-1株添加の有無において遊離アミノ酸量に差は認められなかったが、官能試験の結果では添加区の方が高い評価を得た。

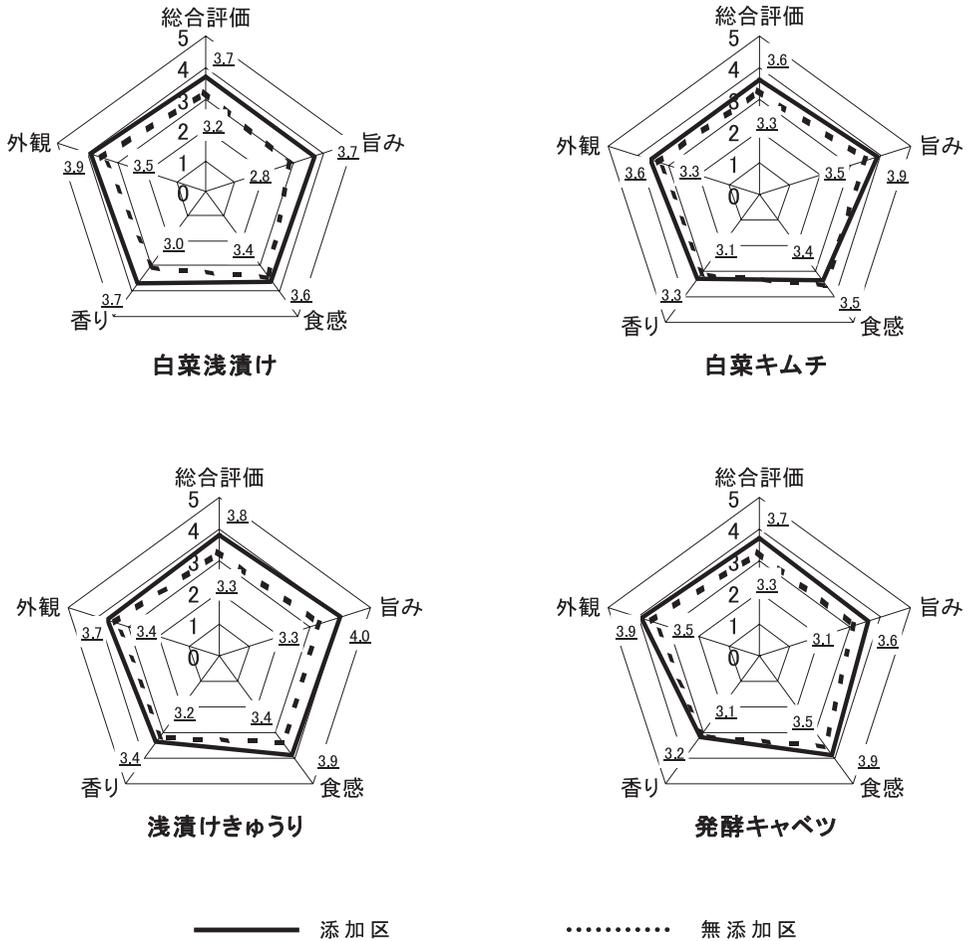


図2 *L. sakei* HS-1株による発酵野菜の官能試験

さらに、浅漬け白菜、浅漬けきゅうり、発酵キャベツなどいずれも旨みの評価が高い結果を得た。旨味の他にも浅漬け白菜では香りが良い、またきゅうりやキャベツでは食感が良いとの評価が得られた。原料野菜の種類によって*L. sakei* HS-1株の与える風味などに相違があることが示唆された。

3. *L. sakei* HS-1株による発酵野菜の摂食試験

1) 摂食による便通の改善

植物性乳酸菌を含む発酵乳の便通に及ぼす影響については、すでに報告がなされている⁴⁾。

今回は、*L. sakei* HS-1 株による発酵野菜を用いた摂食試験を行い、被験者の整腸作用、特に便通に関するアンケートを試みた。アンケートは《便の回数が増えた》《便通が改善した》と記入されたものを改善したとカウントし、特に記入がなかったものを変化なしとして集計した。

摂食前よりも便通が改善した人数は塩キャベツ摂食区では14名中4名、発酵キャベツ摂食区では16名中6名得られた。その結果を図3に示した。

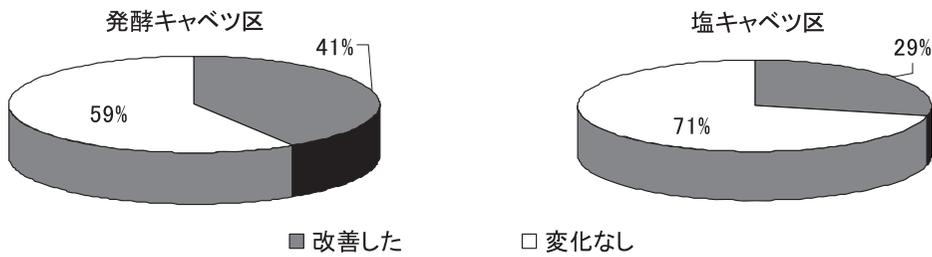


図3 発酵野菜摂食による便通の変化

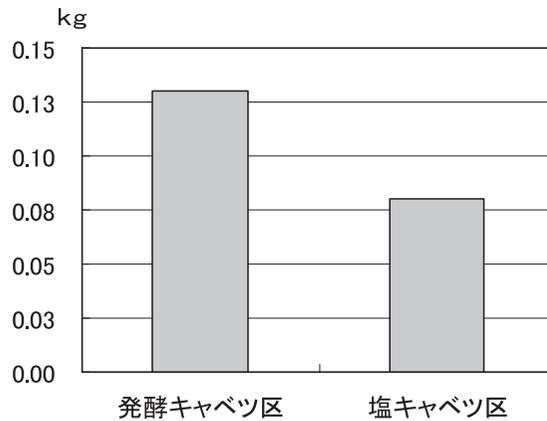


図4 発酵野菜摂食による体重の減少 (平均値)

対照区と比較して発酵キャベツ区では、改善されたと回答をした被験者の割合が高く得られた。対照区においても改善がみられたが、これはキャベツの食物繊維成分の影響と考えられる。*L. sakei* HS-1株添加により野菜の食物繊維による便通改善を強化できることが示唆された。

2) 摂食による体重の変動

体重の変動について塩キャベツ区14名中6名、発酵キャベツ区16名中7名より有効回答を得た。被験者の摂食前3日間の体重平均値から摂食日最後の3日間の体重平均値より摂食前と摂食後の体重差を得て、試験区ごとの体重差平均を求めた。結果を図4に示したように、被験者により体重の増減幅のばらつきが大きい。対照区と比較して発酵キャベツ摂食区は、体重の減少が高く得られた。体重の減少傾向は、便通改善効果と関わりがあるものと考えている。

3) 糞便からの *L. sakei* HS-1 株の検出

発酵キャベツ摂食区の被験者について検便を行い乳酸菌の検出を行った。*L. sakei* HS-1株は通常の乳酸菌と異なり10~15℃でよく増殖する¹⁾。そのためBCP培地にて12℃の低温培養で得られた乳酸菌のコロニーを*L. sakei* HS-1株であると仮定し、検出の目安とした。

本菌は、消化液の耐性ならびに摂取回収試験から、生きたまま腸内に達し、排泄されることが明らかとされているが^{5) 6)}、その検出率については明らかとなっていなかった。

本検討では回収糞便16検体中14検体は植物性乳酸菌*L. sakei* HS-1株を $10^8/g$ 以上の出現を観察した。

低温培養で検出されなかった2検体については、生酸菌が得られず再度培養したにも関わらず検出不能となった。また、この検体を30℃で更に培養した結果、酸を生成しないコロニーは 10^8 以上出現した。これは生酸菌の出現したシャーレの臭いに比べるとアンモニアやメルカプタン臭など腐敗臭に近い臭気が強く、ヒト腸管内有害菌の関与が考えられた。

乳酸菌に関しては、*L. gasseri* および*L. casei*などの便通改善効果や腸内有害菌抑制効果が報告されている^{3) 7)}。本研究においても*L. sakei* HS-1株の高い検出率と高い菌数が得られたことから、同様の効果が期待される。

4. 発酵野菜の今後の利用

発酵野菜を長期間継続して、いつでも気楽にサラダ感覚で食べられるようにするには、食べやすく飽きがこないことも条件の一つである。

本実験の被験者である発酵キャベツの摂食者より、一日の摂取量が多く飽きてしまうとのアンケート回答が得られた。これは今回設定した1日の摂取量100gが量的に多かったため

と思われた。この点を解決するために、発酵野菜に味のバリエーションを持たせることを考え予備的検討も行った。

実験に供したのは、ロースト黒ゴマ7~13%、塩吹き昆布(細切りタイプ)適量、ピクルス(アジア系スパイスの混在粉末)3~5%を用いた。これを例えば食する直前に発酵キャベツに和えるように混合し、味の変化をもたせることによって、長期間の摂食への対応ができるのではないかと考えている。これら3種類についての摂食アンケートでは個々の好みによる幅広い結果が得られている(データ未掲載)。また、共同研究者の斉藤、小林等はマウスを用いた*L. sakei*生菌経口投与による抗腫瘍性や経腸生存性を確認し興味深い結果を得ている。今後、様々なサンプルを用いて発酵野菜のバリエーションに幅をもたせ、食生活の欧米化による食物繊維摂取の補助材料の一つとして位置付け、また健康維持やメタボリックシンドローム対策の素材として提案しながら、発酵野菜の消費・普及拡大に努めたいと考えている。

要 約

1. *L. sakei* HS-1株による白菜キムチの発酵において乳酸菌は速やかな生育を示し、高い生菌数が確認された。乳酸菌増加と共にpHの変化が認められた。また、発酵初期に大腸菌を検出したが、発酵4日目には検出できなかった。これは生成した乳酸によるpH低下と、本菌増殖によって大腸菌群が抑制されたと考えられる。一方、無添加の場合にもpH低下を伴うが、本菌の添加区よりも強い大腸菌群抑制作用は見られなかった。
2. *L. sakei* HS-1株はホモ型乳酸菌であり、乳酸のみを生成するため、味質は刺激臭がなく穏やかである。*L. sakei* HS-1株添加区の白菜キムチ試験においてはガスの発生を認めなかった。
3. *L. sakei* HS-1株による発酵野菜4試料を用い官能試験を行った結果、本菌添加した場合、無添加のものと比較して風味向上の付与などにおいて高い評価を得た。
4. 発酵キャベツの摂食試験により、排便改善や体重の変動について、つぎの結果を得た。
 - 1) 摂食者は無添加の塩漬けキャベツ摂食者と比較して便通が改善したとの回答が多く得られた。
 - 2) 摂食による体重の変動は、発酵キャベツ摂食者の方が、摂食前と比較して体重が若干減少傾向を示した。
 - 3) 摂食者について糞便中の生菌存在について調べた結果、採取した16名中14名に乳酸菌が検出(88%)された。
5. 発酵野菜をサラダ感覚で摂取可能なように、発酵野菜にバリエーションをもたせること

を考え、予備的に発酵キャベツを用いて3種類を試作した。今後、発酵野菜の消費・普及の拡大と同時に健康面への効果が期待できればと考え、検討中である。

謝 辞

発酵野菜官能検査ならびに摂食試験にご協力いただきました和洋女子大学家政学群健康栄養学類の教職員ならびに学生の皆様に心からお礼申し上げます。

また、各種乳酸菌のサンプルや助言を頂きました、バイオ資源株式会社 兼時常忠氏に心から謝意を表します。

引用文献

1. 橋本俊郎：漬物用乳酸菌スターターの開発、茨城県工業技術センター研究報告、30、34-38、(2002)
2. 小崎道雄監修、内村 泰、岡田早苗著：乳酸菌実験マニュアル、6-33、(1992) 朝倉書店
3. 古川秀子：おいしさを測る 官能試験の実際 (1994) 幸書房
4. 瀬野 公子、熊谷 武久、渡辺 紀之、岡田 早苗：植物性乳酸菌を含む発酵乳の便通に及ぼす影響、日本食品科学工学会誌、Vol.47、No.7、555-559、(2000)
5. 橋本 俊郎、田畑 恵、：乳酸菌 *Lactobacillus sakei* HS-1 のヒト消化管における生存性、日本食品科学工学会誌、Vol.51、No.6、309-311、(2004)
6. 田畑 恵、橋本俊郎：乳酸菌等を利用した食品加工技術開発、茨城県工業技術センター研究報告、(2005)
7. 東 幸雅、伊藤 和徳、佐藤 学：*Lactobacillus gasseri* NY0509 および *Lactobacillus casei* NY1301の人工消化液耐性並びに腸内有害菌抑制効果、日本食品科学工学会、Vol.48、No.9、656-663、(2001)

大 野 信 子 (和洋女子大学生生活科学系調理学 I 研究室)

佐 藤 弥 生 (同 上)

斉 藤 正 好 (千葉大学大学院医学研究院)

細 谷 幸 夫 (丁 烹 ・ 喜 多 蜂)

久信田 清 人 (茨城中央園芸農業協同組合)

藤 田 正 三 (茨城中央園芸農業協同組合)

押久保 悦 之 (ラクトベジータ株式会社)

小 林 文 男 (有限会社那須バイオファーム、有限会社ラヴィアンサンテ)