

## にがりを応用した新発酵漬物の基盤的解析

黒飛 知香<sup>1</sup>, 多山 賢二<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 広島修道大学健康科学部, <sup>2</sup> 県立広島大学地域創生学部

### 概要

食品は近年の健康志向に伴い、減塩化が進んでいる。しかし、長寿の視点からは1975年型のような塩分のある漬物や出汁の量が多い食事が好ましいとの報告も存在する。本研究では、保存性が高い減塩発酵漬物の簡便な調製方法について検討した。まず、細菌の増殖抑制については、32 mM MgCl<sub>2</sub>(にがり)を培地に添加した結果、pH 3 下にて増殖可能な細菌 *Komagataeibacter xylinus* の増殖誘導期を顕著に遅らせ、この阻害効果は同モル濃度で NaCl や KCl を上回っていた。次に、3 mM グルタミン酸ナトリウム(GluNa)が呈する旨味は、7.4 mM MgCl<sub>2</sub>の添加によって増強された。また、この両物質が共存した場合は、51 mM(0.30%)NaCl の味強度を高めた。さらに、これら三者共存の場合は、0.05%の乳酸や酢酸の添加によって、全体の呈味強度が高まった。そこで、これらの各成分・各味の濃度順位が本漬液において維持できるよう検討し、「にがり添加発酵漬物」の試作に着手した。

葉物野菜には、小松菜および白菜を用いた。本漬液は、様々な乳酸菌源の他に GluNa 源や乳酸菌の増殖促進栄養源を検討し、少量の食酢(防腐)を添加した。試作方法は、5% NaCl(菜の2倍重量)に菜を3日間浸漬した(下漬)。次に、本漬液は菜の1倍重量の本漬液(MgCl<sub>2</sub>や乳酸菌源など含有)中に菜を入れ、4日間・30°Cで発酵させた(重石なし)。

本漬後の種々の分析結果より、(1) 雑菌対策は菜の前処理(65°C・20分)が好ましい、(2) 乳酸菌源は市販乳酸菌飲料(Y社)が最適、(3) GluNa 源と乳酸菌栄養源にはコンソメ使用が簡便、(4) 乳酸菌が  $2 \times 10^7 \sim 3 \times 10^8$  CFU/mL まで増殖、(5) 菜中のナトリウムイオン濃度  $1.0 \sim 1.3 \times 10^4$  ppm であり、低塩化を実現、(6)本漬終了時の液は、pH 3.4~4.4、食塩換算濃度 3~4%、L-乳酸と酢酸の合計 0.3~0.4%(Glu は 0.1~0.3%含まれ、MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O は 0.75%となるよう添加)であることが確認された。以上より、試作漬物はいずれも食中毒細菌の増殖が困難であると判断できた。さらに、官能評価より、試作漬物が充分喫食可能な風味であることを明らかにした。その他、本漬液に寒天を添加した場合では、酸味の増強が確認された。しかし、この液は微細寒天粒子懸濁液であり、現状の物性測定では解析が困難であった。

以上より、本研究では白菜をはじめとした葉物野菜を用いた減塩タイプの長期保存が可能な発酵漬物を1週間で簡便に試作できる方法を確立し、基盤技術として示した。

### 1. 研究目的

生活習慣病の予防に関心が高まる中、食塩摂取量と胃癌発生率が正の相関を示すことが報告されている<sup>1)</sup>。醤油で調理された佃煮や漬物の頻繁な摂取が胃がんによる死亡の危険因子とする報告<sup>2)</sup>の影響もあり、漬物に関しては減塩の動きが強まっている。それゆえ、現代では浅

漬けが市場に多く出回るようになった。浅漬の利点は、企業側が簡単に製造できる点があげられる。しかし、浅漬は製品の食塩含量が2~3%と低く、冷蔵で2週間程度と賞味期限が短い。そのため、浅漬製品には、加熱殺菌のほか、pH調整剤や保存料の添加によって賞味期限を延長しているものが多い。一方、浅漬の2倍程度に相

当する食塩濃度 5~6%<sup>3)</sup>である福神漬、高菜漬、ぬかみそ漬けなども販売されており、一定の需要がある。

近年では廃棄物削減の観点から、産業界において食品の賞味期限を延長させる動きが始まっており<sup>4)</sup>、漬物にも広まる可能性がある。したがって、賞味期限延長のためには、浅漬けよりも乳酸発酵が加わった発酵漬物とする方が好ましい。

本研究では、上述のような漬物に関する状況から発酵漬物を対象とすることとした。さらに、我々の予備実験において、にがりには細菌の増殖誘導期を延長させる効果および味増強作用があることが示唆された。そこで、本研究では、これらのにがりの効果を応用して保存性が高い減塩発酵漬物の開発を目指した。

## 2. 研究方法

### 2.1 細菌の増殖抑制判定方法

発酵漬物では、完成品の pH が低くなる。そのため、本研究では、酸性域においても増殖可能な細菌を用いた「にがり」の増殖抑制効果を判定する必要がある。そこで、本研究では菌の増殖程度を確認するため、企業から提供された *Komagataeibacter xylinus* を用い、本菌の増殖と連動する厚膜形成能(厚膜の厚さ)を測定することとした。基本培地は、2%(W/V)D-グルコース、0.5%(W/V)酵母エキス、0.2%(W/V)ポリペプトン、0.2%(V/V)エタノール、4%(V/V)酢酸および0.6%(W/V)グルコン酸を含むものとした。食酢を培地とする場合は、国内メーカー2社の穀物酢を用い、25°Cで好氣的に静置培養を行った。

### 2.2 ビフィズス菌の消化液耐性試験

まず、我々は、ビフィズス菌含有発酵乳として市販されている国内8品目を購入した。人工胃液の処理は、東らの方法<sup>5)</sup>に準じて行った。人工小腸液の処理については、中村の方法<sup>6)</sup>に従った。人工モデル大腸液は、15°Cの脱イオン水 1L 当り、TOS プロピオン酸寒天培地(以下、TOS 培地、ヤクルト薬品工業)6.3 g、ガラクトオリゴ糖(和光純薬)1 g、粉末酵母エキス D-3H(日本製薬)1 g、酢酸 1.5 g をそれぞれ添加し、0.45 μm 滅菌フィルターにてろ過したろ液とした。さらに、このろ液に各市販発酵乳を 1/100 量加えて、37°C・24 時間放置した後、残存するビフィズス菌数を TOS 培地にて測定した。ビフィズス菌の残存率については、計 2 日間の上記 3 種の処理の各生存率を乗じて、製品中に

元々含まれる生菌数が最終的にどの程度まで減少するかを算出した。

### 2.3 発酵漬物の試作方法

葉物野菜の発酵漬物の試作方法は、広島菜漬の作り方<sup>7-9)</sup> および一般的な乳酸発酵漬物の試作方法<sup>9-10)</sup> を参考にした。なお、葉物野菜 100 g を用いる場合の分量・方法は、以下の手順で行った。

まず、菜を 65°Cの湯浴に浸漬させ、20 分間放置して殺菌した。その後、殺菌した菜はジップロックに移し入れ、5% (W/V)食塩水溶液を 200 mL 注入し、空気を抜いた状態で封をした。この袋は、25°Cの恒温器へ移し入れ、72 時間放置して下漬け(重石なし)を行った。下漬け終了後、ジップロックから菜を取り出し、水道水を満たしたバケツ内に投入し、流水状態にて 5 秒間菜を水にさらした。菜に付着した食塩水を流水にて除去した菜は、バケツから取り出して上下に 10 秒間振り、菜表面の水分をおおよそ取り除いた。続いて、未使用のジップロックに下漬けされた菜を入れ、以下の本漬け液を 100 mL 注入し、空気を抜いて封をした。

葉物野菜に小松菜を用いた場合は、乳酸菌源に(1) Bifix プレーンヨーグルト(江崎グリコ)およびヤクルト(65 mL 入りの乳酸菌飲料)を混合したもの、(2) 市販糠床(ジョイスチャレンジ、祇園ばんや「ぬかの花」)の 2 種類を使用した。本漬け液は、それぞれ以下の組成とした。

(1)では、まず食塩 1.5 g、乾燥真昆布(今中物産)0.5 g、塩化マグネシウム(MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O の食品添加物:富士フィルム和光純薬)0.7 g、寒天(一級:和光純薬)0.3 g、乳清(市販牛乳に穀物酢を添加し pH 4.5 に調整後、ろ紙でろ過した液)50 mL、L-アスコルビン酸 20 mg、水 50 mL を混合し、95°Cで 5 分間加熱して寒天を溶解した。その後、溶解液を室温まで放冷して溶解液に Bifix プレーンヨーグルト 5 g、ヤクルト 2.5 mL を添加したものを本漬け液とした。(2)では、上記の昆布 0.45 g、塩化マグネシウム 0.75 g、寒天 0.3 g、水 100 mL、コンソメ(顆粒:味の素)2.5 g を混合し、95°Cで 5 分間加熱して寒天を溶解した。それから、溶解液を室温まで冷却した後に糠床 5 g を添加したものを本漬け液とした。上記(1)、(2)いずれも、MgCl<sub>2</sub>の本漬け液中の濃度は 37 mM となる。

葉物野菜に白菜を用いた際は、乳酸菌源はヤクルトのみを使用した。さらに、白菜ではコンソメを用いた。まず、コンソメを 12%(W/V)となるよう 65°Cの水道水 100 mL に溶

解後、容器を流水下で放冷し、油脂部分を固化させた。その後、固化したコンソメ溶液をろ紙(アドバンテック No.2)でろ過を行い、得られたろ液を12%コンソメ溶液とした。本漬け液は、12%コンソメ溶液50 mLに水道水50 mL、塩化マグネシウム0.75 g、ヤクルト2 mL、穀物酢(Mizkan 製)2 mLを混合したものとした。必要に応じて寒天を0.4%となるよう上記の水道水に添加し、90°Cで溶解後、放冷したのちに使用した(寒天の本漬け液での最終濃度は0.2%)。

本漬け(発酵)は、上記いずれにおいても30°C・4日間で行った。本漬け終了後は、まず菌数測定を当日中に実施した。官能評価を含むその他の分析については、-20°Cに保管し、後日実施した。

## 2.4 分析方法

### 2.4.1 理化学分析

酸度測定は、1 mol/L NaOH 溶液で滴定する方法(指示薬:フェノールフタレイン)を用い、市販乳酸溶液と比較を行うため、乳酸換算の酸度(%:W/V)とした。菜中に含まれるそれぞれの成分濃度は、ホモジナイザー(シャフトジェネレーターHT-1008, アズワン)によって固形物を破碎し(27000 rpm, 30 秒)、遠心分離(久保田商事;高速冷却遠心機6000, 10000 × g, 5 分)をした後の上清を用いて測定した。分析には、ナトリウムイオン(Na<sup>+</sup>)メーター(堀場), pHメーター(堀場), 各種酵素測定キット(JK インターナショナルのL-乳酸, 酢酸, L-グルタミン酸(Glu))を用いた。

### 2.4.2 乳酸菌の生菌数測定

乳酸菌は、BCP 加プレートカウント寒天培地(以下、BCP 培地:日本製薬)の表面に塗布し、好氣的に35°C・72時間にて培養した。

### 2.4.3 乳酸菌の同定

乳酸菌コロニーの種レベルでの同定は、16S rRNA の遺伝子解析により行った(受託企業に依頼)。最初のPCRプライマーは27F/1492Rを使用し、94°C・30秒, 53°C・30秒, 72°C・60秒のサイクルを35回繰り返す方法に準じ、コロニーのDNAを増幅した。続いて、このPCR産物をテンプレートとし、シーケンスプライマー(518F/800R)で塩基配列を決定した。機器は、Applied Biosystems 3730x1 DNA analyzerを使用した。

### 2.4.4 物性測定

物性測定には、クリープメーター(山電;RE2-33005C)を用いた。測定部位は茎部分(厚さ3 mm~5 mm)とし、

1 cm 角に切断後、茎の繊維方向と垂直にくさび型プランジャーをロードセル20 N にセットして測定した。測定条件は、再現性の高かった圧縮率60%, 圧縮速度5 mm/secとし、最大荷重を調べた。

### 2.4.5 色調の測定

色調測定には、コニカミノルタの色彩計(カラーリーダー CR-20)を用いて、L\*, a\*, b\*を測定した。

### 2.4.6 Time-Intensity(TI)法による寒天溶液の呈味に及ぼす影響

評価パネルは、広島修道大学健康科学部健康栄養学科の20代学生8名とした。試料は、10倍希釈のりんご酢溶液(酸度0.5%)中に寒天が0.1, 0.2, 0.3%(W/V)となるよう加熱溶解して調製した5種類とした。なお、対照には、キサンタンガム(食品添加物グレード)を同濃度で加えて溶解して調製した液を用いた。試料調製後は、20°C恒温器内にて翌日の評価まで保管した。評価には、TI法を適用し、J-SEMS, TI(株式会社メディア・アイ)のソフトウェアを用いて、酸味について評価した。サンプル量は2.5 mLとし、一口で口に含み、直ちに飲み込むよう指示した。その他の算出パラメーターや条件などについては、既報<sup>11)</sup>に準じた。

### 2.4.7 Short Back Extrusion(SBE)法による寒天溶液の粘度測定

SBE法は、クリープメーター(山電;RE2-33005C)を用い、干野の方法<sup>12)</sup>に準じて行った。

### 2.4.8 寒天ゲル中の見かけの拡散係数の測定

ゲルには、円柱形の3%(W/W)アガロースを用いた。ゲルは、天然ゴムのプローブカバーに包含し、30°Cの浸漬液中に21時間放置後、液と接触していた表面から2 mm厚程度の円盤状で順次切断した。断片は細かく破断した後、抽出液について各成分を分析した。浸漬液は、5%(W/V)NaCl, 0.5%(W/V)グルタミン酸ナトリウム, 2%(W/V)酢酸を単独もしくは最終濃度が上記となるよう混合したものとした。その他の細かい条件や見かけの拡散係数の算出などは、既報<sup>13)</sup>に従った。

## 2.5 試作した調味液および試作漬物の官能評価

評価パネルは、広島修道大学健康科学部の学生(20~22歳)10名前後および著者らを含む数名とした。

試作漬物の官能評価は、2点嗜好法を用いた。評価項目は、①色(外観), ②塩味の加減, ③酸味の加減, ④シ

ヤキシヤキ感, ⑤かたさ, ⑥漬物としての好ましさ(単体), ⑦米飯との相性の計7項目とした。なお, 上記の②, ③は葉と茎と一緒に食べ合わせて評価を行い, ④, ⑤については茎のみを喫食した時の評価とした。⑦米飯との相性の評価については, 温めた調理済み米飯(サトウのごはん:サトウ食品)5gの上に, 試作漬物の葉部分(3cm四方)および茎部分(1cm四方)を重ねた状態とし, これらをまとめて喫食するよう指示した。

## 2.6 倫理性の配慮

本研究を行うにあたっては, 研究の趣旨および意義の説明を口頭と文書にて十分に行い, 同意を得た上で実施した。なお, 本研究はヘルシンキ宣言に基づき, 広島修道大学研究倫理委員会によって承認を得て行った。(承認番号:第2022-0011号)

## 3. 研究結果

### 3.1 にがりの増殖抑制作用

今回用いた *K. xylinus* の試験管における増殖の様子を Fig. 1 に示した。矢印で示される厚膜の厚さについて基本培地を用いて測定した結果, 同一モル濃度の塩化物では,  $Mg^{2+}$ と  $Ca^{2+}$ が顕著に本菌の増殖を抑制することが明らかとなった (Fig. 2)。なお  $Cl^-$ の抑制作用は  $SO_4^{2-}$ よりは強いが,  $NO_3^-$ よりは弱いこともわかった。穀物酢を用いた場合には,  $MgCl_2$ を32mM添加することで十分な生育抑制効果がみられた (Fig. 3)。さらに, ほぼ同モル濃度の比較では,  $Ca^{2+}$ を上回る抑制効果が  $Mg^{2+}$ に認められた (Fig. 3)。

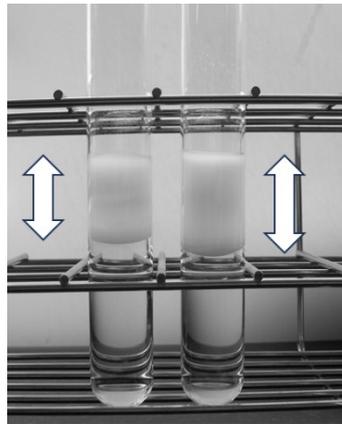


Fig. 1 Pericille formation by the growth of *Komagataeibacter xylinus* in test tube.

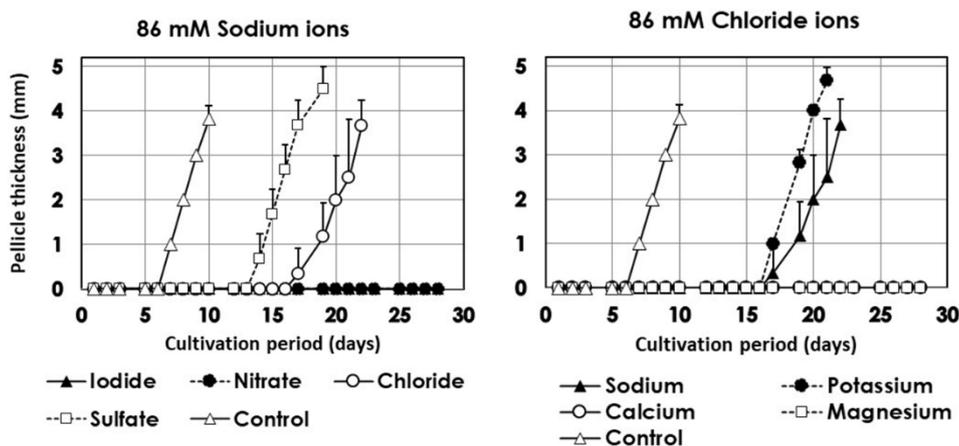


Fig. 2 Effect of sodium salts and magnesium chloride on the growth of *Komagataeibacter xylinus*.

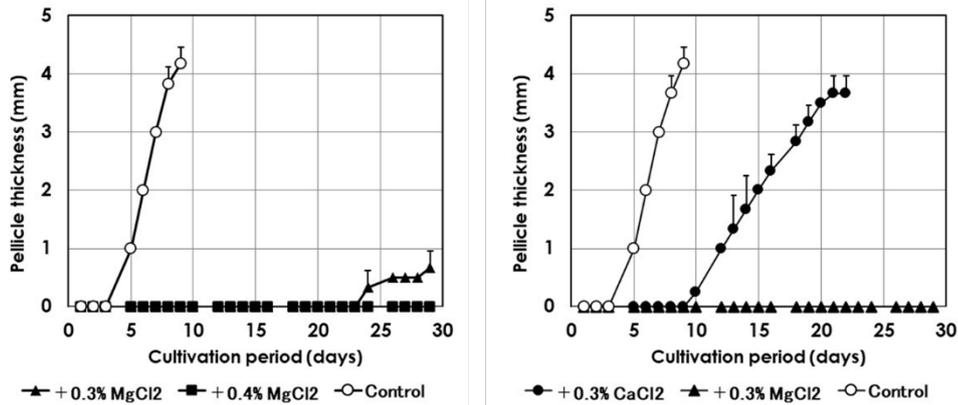


Fig. 3 Effect of magnesium chloride on the growth of *Komagataeibacter xylinu* in commercial vinegar.

### 3. 2 にがりなどの味増強作用

呈味の増強作用の結果について Fig. 4 に示した。評価人数は少ないが、3.0 mM のグルタミン酸ナトリウム水溶液の旨味は、4 mM MgCl<sub>2</sub>を共存させることで明らかに呈味が増強された。この両者の混合液に、さらに 0.3% (51 mM) 塩化ナトリウムを添加した場合には、溶液の全体的な味の強さがより高まった。この三者の混合液に、0.05%の酢酸もしくは乳酸が含まれるよう調製した溶液では、全体的な味の強度が強くなった。また、これら 4 成分を含む溶液に対して、寒天の最終濃度が 0.1%、0.2%、0.3% (W/V) となるよう添加・加熱溶解して酸味の強さを評価したところ、寒天無添加品と比較していずれも強く感じた。さらに、その酸味の増強レベルは、0.2%試料が最も強く、0.1%試料が最も弱かった。

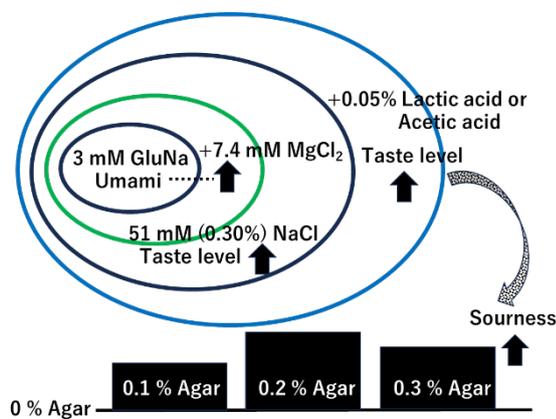


Fig. 4 Image diagram of changes in taste due to mixing of substances.

### 3. 3 消化液耐性の高いビフィズス菌の選抜

まず、ビフィズス菌の生存率は、モデル胃液および小腸液を用いて検討した。その結果、市販発酵乳 4 種のビフィズス菌生存率が高いことが明らかとなった。そこで、これらの 4 製品については、さらにモデル大腸液における生存性を調べた。次に、4 製品それぞれの最終生菌濃度について、製品購入時の生菌濃度に 3 処理の各生存率を乗じて算出して求めた値を Fig. 5 に示した。その結果、図中の製品 D, M, Y は、2 日間の処理によって生菌濃度が減少しているのに対し、製品 G (Bifix プレーンヨーグルト) では生菌濃度がほとんど減少しないことが明らかとなった。

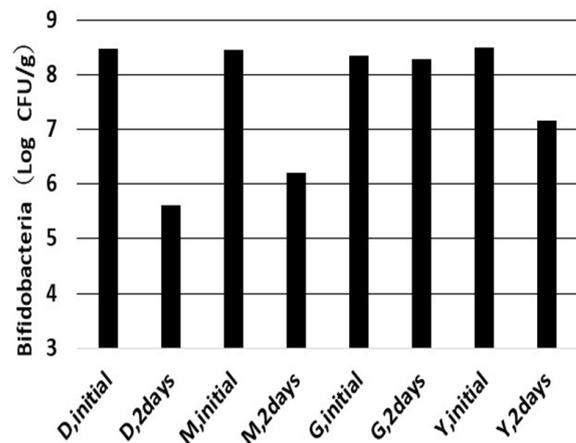


Fig. 5 Availability of Bifidobacteria after three consecutive treatments.

### 3. 4 小松菜を用いた試作品の分析・評価

小松菜を用いた実験では、上述の Bifix プレーンヨーグルトとヤクルトを併用する試験系も実施した。しかし、Bifix プレーンヨーグルトには乳酸菌も含まれることから、Fig. 6 に示した試作によって増えた乳酸菌がどの乳酸菌か特定することができない。そこで、最大の希釈倍率のプレートで形成された 2 個のコロニーについて 16S rRNA の DNA 塩基配列を決定した。その結果、*L. paracasei* (= *L. casei*) の公知ゲノム配列の 1496 bp もしくは 1499 p の PCR 断片の配列と 100%一致したことから、いずれもヤクルトに含まれる乳酸菌であると判断するのが妥当な結果を得た。

市販の糠床および Bifix プレーンヨーグルトとヤクルトで作成した各小松菜漬物については、2 点嗜好法による官能評価を行った。その結果、いずれの官能評価項目においても両者に有意差は認められなかった (Fig. 7)。なお、糠床

を使用した場合、本漬け液に含まれる乳酸菌数を MRS 培地で測定したところ、本漬け後の乳酸菌数は 1 mL 当たり  $10^7$  CFU レベルまで到達しておらず、増殖し難い環境であることも明らかとなった。また、茎部分の最大荷重の測定結果からは、乳酸菌源が異なる両者間において有意差は認められなかった。色調についても、両者間に顕著な違いは認められなかった。

官能評価においてご飯との相性で好まれる傾向を示した Bifix ヨーグルトおよびヤクルトで作成された漬物 (n = 3) の菜中の  $\text{Na}^+$ 濃度の平均値は、 $1.3 \times 10^4$  ppm であった (食塩換算濃度  $3.4 \pm 0.078\%$  (平均値  $\pm$  標準偏差))。発酵終了時の本漬液の分析値 (n = 3) の平均は、pH  $4.4 \pm 0.46$ 、食塩換算濃度  $4.3 \pm 0.19\%$ 、L-乳酸と酢酸の合計濃度  $0.28 \pm 0.066\%$ 、グルタミン酸濃度  $0.052 \pm 0.0037\%$  であった。

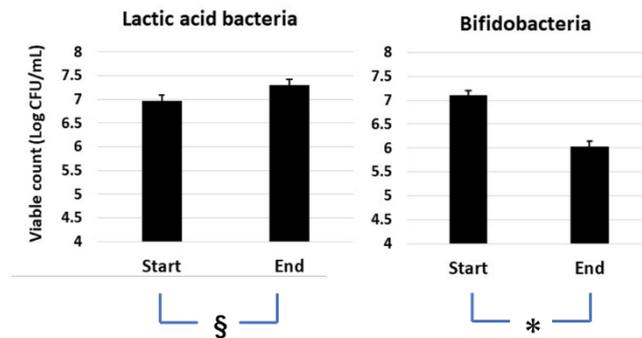


Fig. 6 The number of viable bacteria before and after fermentation in Komatsuna. §:  $p < 0.1$ , \*  $< 0.05$

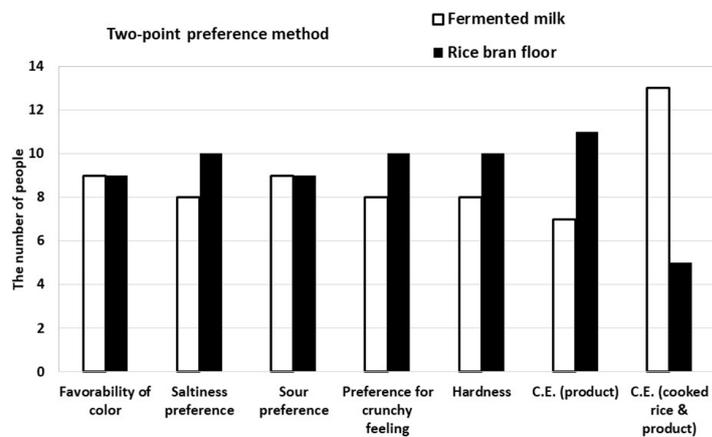


Fig. 7 The results of the sensory evaluation using Komatsuna. (C.E.: Comprehensive evaluation)

### 3.5 白菜を用いた試作品の分析・評価

小松菜の試作法よりも原材料を絞り込んだ白菜の試作品では、発酵前後の pH および酸度が Fig. 8 に示したように有意に変化した。また、寒天未使用で MgCl<sub>2</sub> を添加して発酵させた後には、乳酸菌は初発より 50 倍以上増殖し 2.6~5.3 × 10<sup>8</sup> CFU/mL (平均値 3.6 × 10<sup>8</sup>) となった。発酵終了時の本漬液の分析値 (n=3) の平均は、L-乳酸と酢酸の合計濃度 0.45 ± 0.041%，グルタミン酸濃度 0.27 ± 0.036%，Na<sup>+</sup> 濃度から算出した食塩換算濃度 2.7 ± 0.13% であり、菜中に含まれる食塩換算濃度は 2.5 ± 0.051% であった。官能評価では、寒天の有無に関わらず、おいしく喫食できるとの評価を得た。また、MgCl<sub>2</sub> 添加品は、MgCl<sub>2</sub> 無添加品より全体の味がはっきりしている、シャープになっているとの評価が得られた。また、MgCl<sub>2</sub> 添加品においては、寒天を加えることで酸味がやや強くなる傾向が示された。

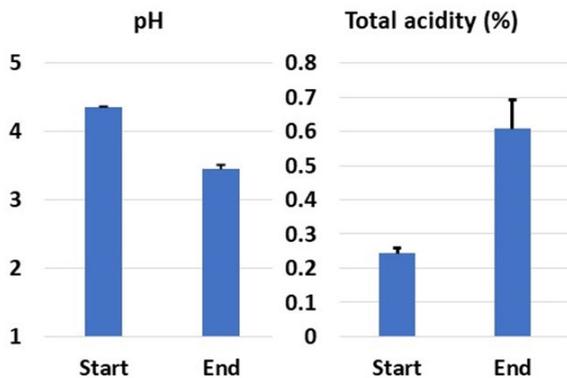


Fig. 8 Acidity and pH in the solution before and after fermentation using Chinese cabbage.

### 3.6 寒天溶液の呈味に及ぼす影響

#### 3.6.1 寒天溶液を用いた TI 法

TI 評価の結果を Fig. 9 に示した。キサンタンガムでは、ほぼ全ての時間帯で高粘性ほど酸味強度が弱くなった。一方、寒天の酸味の最大強度値 (Imax) 時では、寒天 0.2% が最も酸味を強く感じ、最も低粘性の 0.1% で酸味を弱く感じた。これは、酸度 0.05% の溶液を用いて少人数で得られた前の結果 (Fig. 4) と一致する結果であった。

#### 3.6.2 寒天アガロースゲル中の拡散

アガロース中の拡散係数を測定した結果の概要を Fig. 10 に示した。多めの NaCl の存在がグルタミン酸イオンの拡散をわずかに遅らせること、グルタミン酸ナトリウムのみの溶液に浸漬した場合、本来は拡散速度の速い Na<sup>+</sup> を Glu が抑制することが明らかとなった。また、酢酸が共存した場合は、グルタミン酸ナトリウム由来の Na<sup>+</sup> は酢酸並みの速い拡散速度でゲル内を移動することがわかった。

#### 3.6.3 寒天溶液を用いた SBE 法

著者らは、果肉のような固形物を含むジャムにおいて SBE 法にて正確に粘度測定ができることを確認している。そこで、本研究においても本手法が適用できるかどうか 0.2% 寒天液にて試みた。しかし、測定結果は、Fig. 11 に示したように、測定初期の波形に乱れが認められ、ノイズも大きすぎることから解析は困難であった。対照としてジャム測定時の波形も提示したが、これとの違いは明白であった。本研究結果より、今回のような低粘度溶液を対象とした場合は、今後さらに SBE 測定の条件などの検討が必要であると思われる。

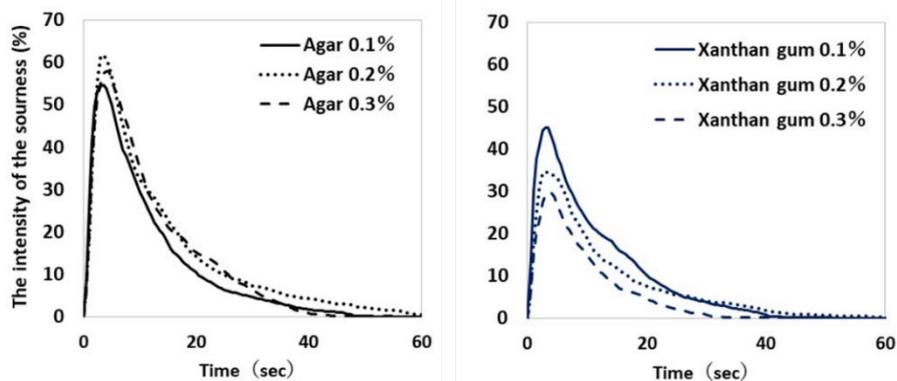


Fig. 9 The time course of sourness determined by the time-intensity method.

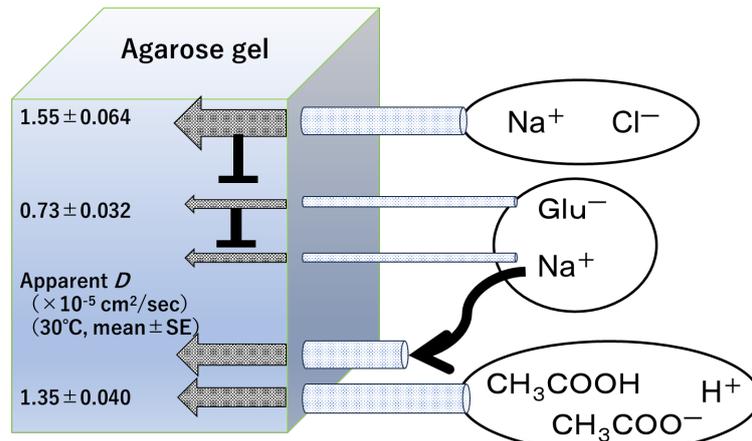


Fig. 10 Diffusion of various substances in agarose gel.

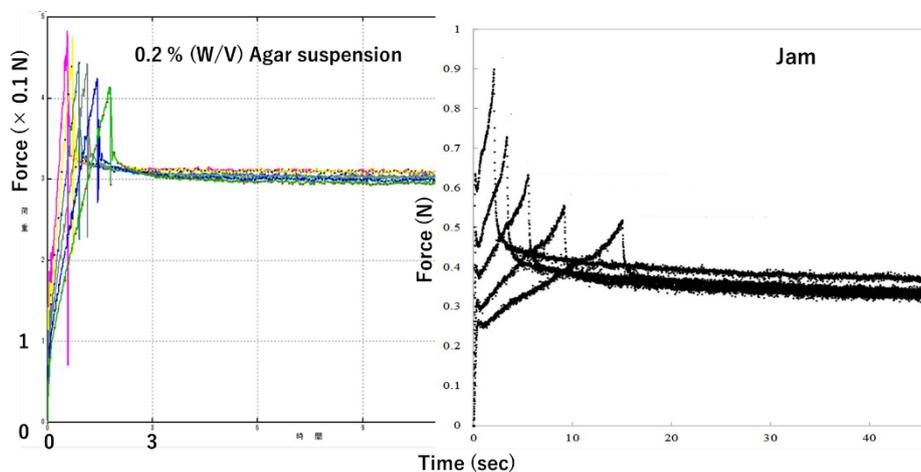


Fig. 11 Measurement results of 0.2% agar suspension using the short back extrusion method.

#### 4. 考察

にがり、すなわち  $\text{MgCl}_2$  の抗菌性については、複数の報告がなされている<sup>14)</sup>。生菌数については、細菌を 150 mM  $\text{MgCl}_2$  と低 pH で 20 分間接触させることで、顕著な低下が認められ、他の無機塩類では無効との報告がある<sup>14, 15)</sup>。また、黄色ぶどう球菌は、40 mM  $\text{MgCl}_2$  を 40 分間接触させることで、生存率が 40% にまで低下したとの報告もある<sup>15)</sup>。これらの報告では、 $\text{MgCl}_2$  との短時間接触による細菌の増殖能低下を見ているが、培地中に  $\text{MgCl}_2$  が共存した場合の研究報告は著者らが調べた範囲では見当たらなかった。そこで、我々はカオトロピックアニオンが膜蛋白の可溶化に用いられていることに着目し、酸耐性細菌をモデルとして、 $\text{NaCl}$  よりも抗菌性が高いナトリウム塩を探索した。その結果、 $\text{NaCl}$  より抗菌性が高いナトリウム塩にはヨウ化ナトリウムなどがあることを見出した。一

方、塩化物の中で抗菌性が高い塩は、 $\text{CaCl}_2$  と  $\text{MgCl}_2$  が同モル濃度において  $\text{NaCl}$  を上回る抗菌性を示すことが明らかとなった。重金属に属さない金属そのものの抗菌作用のメカニズムは、未だに詳細が明らかにされていない。つまり、著者らの実験における  $\text{Mg}^{2+}$  が  $\text{Ca}^{2+}$  よりも酸耐性菌への抗菌作用が高い結果を含め、これらのメカニズムの解明は今後の課題と考えている。

$\text{MgCl}_2$  の旨味増強を含む今回示した各種物質の呈味や味強度への影響については、すでにいくつか報告がみられ、著者らの今回得た知見が新規とまでは考えていない。低濃度の酸味であれば、塩味を増強する現象は、すでに報告されている上に、これらと旨味を組み合わせた市販調味料も見出すことができる。ただ、ヒトが感じる適度な 3 mM グルタミン酸ナトリウム水溶液の旨味を 16 mM  $\text{MgCl}_2$  が強めたことから、この知見はにがりの応

用に活かせるものと考え、著者らは発酵漬物へ利用するために本格的に取り組んだ。今後は、上述の抗菌性付与の効果を合わせ、実際の食品製造への活用を検討していきたい。

ビフィズス菌を含む発酵乳や市販糠床を用いた小松菜の試験区分では、様々な食品材料の添加によって、ビフィズス菌や乳酸菌の増殖を高める試みを行ったが、有意な効果は得られなかった。これは、これらの菌の増殖に適した条件がかなり狭い領域であったためと考えられる。本研究で使用するビフィズス菌は、菌自体における耐性が最も高い菌を選択した。しかし、ビフィズス菌の増加は認められず、むしろ約 1/10 まで減少した。これは、発酵開始時の pH などが問題である可能性も考えられる。本研究では、脱酸素剤の用途として L-アスコルビン酸を添加した。しかし、嫌気性菌であるビフィズス菌を発酵漬物内で増殖させるためには、より一層の細かい条件設定が必要と思われた。

食塩濃度を低下させた系では、初発の雑菌濃度を下げることによって腐敗防止を行う必要がある。そこで我々は、下漬けの前段階で菜の加熱殺菌を組み込むこととした。野菜の加熱殺菌処理に関しては、いくつか報告があり、例えば長野県で作られている「すんき漬」は無塩の発酵漬物として知られているが、原料野菜を湯に一定時間浸漬した後に漬けこみ、乳酸発酵させているのが特徴である。具体的な加熱処理の検討例では、グラム陽性細菌は 55°C・30 分処理によって 1/10000 に生菌数が減少し、グラム陰性細菌は 55°C・10 分処理でほとんど死滅したとされている<sup>16)</sup>。本研究では、菜の加熱処理の有効性レベルを細かく調べてはいないものの、65°Cの処理は非加熱の場合よりも持ち込みの雑菌数が少なくなる知見は得ており、一定の効果はあると考えている。

本研究の白菜発酵漬物の試作では、本漬け初期の腐敗を予防する目的で、少量の食酢を加えた。漬物作成時に有機酸を加えることは、いくつか検討されており、浅漬けの下漬け時および調味液に酢酸を利用した場合の保存性を調べた例がある。15°C保存の場合、対照は 2 日で白濁した一方で、酢酸にて pH 4.8 まで下げた際には 5 日後に白濁が生じ、保存性が高まったとの報告がある<sup>9, 16)</sup>。また、キュウリの浅漬けでは、酢酸を 0.25%以上添加することで、10°Cで少なくとも 1 週間は一般生菌数の増加はな

かったこと、*Escherichia coli* O157 の浅漬け中の 10°Cでの増殖が、酢酸 0.1%の添加によって 1 週間認められなかったことが報告されている<sup>17)</sup>。白菜を用いた本研究においては、開始時の本漬け液中での酢酸濃度が 0.1%程度となるよう食酢を添加した。この濃度設定は、上記の浅漬けでの利用例を参考にし、さらに乳酸菌による乳酸発酵が必要であることから、その発酵に支障がない濃度として設定した。減塩も目的とする場合には、食酢の少量の利用は好ましいと考えている。

今回、白菜漬けでは乳酸菌の種菌としてヤクルトのみを使用し、発酵温度は 30°Cとした。乳酸菌の種類は、植物性乳酸菌を含む市販製品を用いて予備実験にて耐塩性を中心に pH 低下能を指標として調べた。その結果、ヤクルト、すなわち *Lactobacillus casei* (現在の分類体系では *Lacticaseibacillus paracasei* に名称が変更)が最も耐塩性に優れていたことから、本研究ではこの *L. casei* を使用することとした。しかし、一般的には発酵漬物における主要な乳酸菌は 8 種とされており、*L. casei* は含まれていない<sup>18)</sup>。実際、低食塩大根漬物に適した乳酸菌を広く調べた研究で、36 種類の乳酸菌の中に *L. casei* が 1 株含まれていたものの、その菌株は 10°C・2 週間の放置でも増殖が悪かったとしている<sup>19)</sup>。ただし、大根と種菌を混合して 10°Cにおいて長期間 (60 日間) 発酵させた実験では、*L. casei* の 1 菌株が乳酸を 0.44%まで生成したとの報告もある<sup>20)</sup>。さらには、漬物から分離した *L. casei* は、15°Cでは発酵できたが、45°Cでは発酵しなかったことも報告されており、発酵温度と期間の設定が重要であることが示唆されていた<sup>21)</sup>。我々は、ヤクルトの添加量が多くなると乳製品の香りや味が強くなり、発酵漬物らしさが消失することを確認した。以上より、本漬け液へのヤクルト添加量は 2% (V/V) にとどめた。さらに、試作品の官能評価では、おいしく喫食できるとの評価を得たため、30°C・4 日間の発酵条件は適切であると考えている。一方、本漬け液には、微生物耐性の向上および旨味を増強するために MgCl<sub>2</sub> を添加した。この添加濃度は 37 mM であり、本実験で使用した酸耐性菌が増殖阻害を受ける 32 mM をやや上回る濃度設定としたが、本試験で使用したヤクルト由来の *L. casei* は Fig. 8 および Fig. 9 で示されるように十分な発酵能を示した。つまり、本菌は、MgCl<sub>2</sub> 耐性にも優れた細菌であることが示唆された。

京都で作られているすぐき漬は、塩漬後に発酵室に入れ、40°C程度で乳酸発酵を行う方法で、発酵漬物を製造している。このような加温による発酵漬物の製造は、世界でも「すぐき漬け」が唯一とされている<sup>9)</sup>。これから分離された4種の乳酸菌は、NaCl 4%までなら全て増殖が可能であり、多くが35°C付近に増殖至適温度があると報告されている<sup>22)</sup>。我々の研究は、すぐき漬までの高温とはしないものの、一般家庭における比較的暖かい環境下を想定した方法とした。さらに、本研究の乳酸源には含まれる乳酸菌が一定量含まれる市販品を選定した。また、本研究では乳酸菌の増殖を促進させるためにコンソメを加えた。このコンソメ添加は、失敗せず、漬物の発酵を確実に進めさせる鍵であると考えている。

今回の白菜発酵漬物の試作品では、菜中のNa<sup>+</sup>濃度から食塩換算した濃度は2.5%であった。日本食品成分表<sup>3)</sup>によると市販漬物中の食塩濃度は1.6~6.9%(22種の平均値3.5%)であるため、試作品は比較的low塩の漬物に仕上がっていると思われた。発酵終了時の本漬液として見た場合には、液のpHが3.4程度、食塩換算濃度は2.7%程度、乳酸発酵によって生成した乳酸と元々含まれる酢酸の合計濃度は0.45%程度であった。酢酸の抗菌性について調べた報告では、*Escherichia coli* O157:H7、*Salmonella enteritidis*、*Bacillus cereus* など細菌の30°C・4日間の増殖を完全に抑制する効果が0.1%酢酸添加培地にあるとしている<sup>23)</sup>。また別の報告では、黄色ぶどう球菌への殺菌力は、乳酸が酢酸と同程度であることも示されている<sup>24)</sup>。これらの知見から、本研究で試作した白菜漬物は、食中毒細菌に対する十分な抗菌性を有すると考えられる。さらに、栽培および収穫時期が秋から冬とされている広島菜においても先述の白菜を用いた発酵漬物の試作方法が適用できるかどうか検討した。その結果、広島菜においても白菜と同程度の品質の発酵漬物を試作できることが明らかとなった。したがって、本研究で用いた原材料を絞った白菜での試作方法は、再現性が極めて高く、様々な葉物野菜において発酵漬物をつくることのできる調製法であると考えている。本方法が、発酵漬物の基盤技術となって広まっていくことを期待したい。

液状食品では、粘度の増大に伴って呈味に影響を及ぼし、粘度の増加や多糖類が一定濃度以上になることで甘味強度が減少することが示されている<sup>25)</sup>。一方、多糖類

をわずかに添加した際には、甘味強度が増加する現象もあり、メカニズムに関しては、舌の感覚器官への付着時間の増大や甘味受容体との接触時間の延長が考えられている<sup>25)</sup>。今回、低濃度の寒天で酸味が増強される知見が得られ、TI評価からも確認することができ、寒天の奇妙な特性が示唆された。寒天溶液は「微細寒天粒子懸濁液」と見なすべきであり、固形物を含む試料においても解析可能なSBE法の適用を試みた。しかし、本研究に用いた寒天溶液では、従来のSBE測定の条件による解析が不能であったため、今後より詳細について検討していく予定である。また、固形化したアガロースゲルの中では、グルタミン酸ナトリウム由来のナトリウムイオンが酢酸の共存によって拡散速度が高まる現象を見出した。謎の多い寒天に着目した解析については、今後も研究を進めていきたい。

心血管疾患死亡率と食との関連を調べる国内調査が男女各1万人以上を対象に行われた。その結果、男性の心血管疾患の死亡率が米摂取量と逆相関が見出されたが、パンや麺の摂取量とは関連していなかった<sup>26)</sup>。つまり、穀物料理は米を選ぶことで、副菜にもより健康的な食品が使われる可能性が高いとされている<sup>26)</sup>。また、1975年型食事メニュー(和食中心)が日本人の健康維持には最適との研究結果が出されている<sup>27)</sup>。つまり、昔は漬物を多く摂取することで、日本人が野菜摂取不足になっていなかった可能性も考えられる。本研究における発酵漬物の試作方法は、野菜中に乳酸菌の栄養源がなくても適用可能な手法である。本研究が、にがりの特性を活かした減塩かつ賞味期限を長く設定可能な発酵漬物の広がりとともにご飯食の復活の一助となることを期待している。

## 5. 今後の課題

本研究は、大規模な生産まで意識した試作方法ではないため、スケールアップを考えた場合には、いくつかの課題が出てくる。

## 6. 文献

1. Tsugane S., Sasazuki S., Kobayashi M. and Sasaki S.: Salt and salted food intake and subsequent risk of gastric cancer among middle-aged Japanese men and women, *Br. J. Cancer*, **90**, 128-134 (2004)
2. Kurosawa M., Kikuchi S., Xu J. and Inaba Y.: Highly salted food and mountain herbs elevate the risk for stomach cancer death in a rural area of Japan, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **21**, 1681-1688 (2006)
3. 医歯薬出版 編: 野菜類, 日本食品成分表 2018 七訂, 医歯薬出版(東京) (2018)

4. [https://www.maff.go.jp/j/press/shokuhin/recycle/221102\\_17.html](https://www.maff.go.jp/j/press/shokuhin/recycle/221102_17.html) (農林水産省による賞味期限延長の促進活動)
5. 東 幸雄, 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誌, **48**, 656-663 (2001)
6. 中村昇二: 抗生物質産生乳酸菌およびそれを用いた機能性食品, 公開特許公報 2003-230376 (2003)
7. 岡本洋子: 広島菜の漬け方に関する実態調査, 日本調理科学会誌, **38**, 272-280 (2005)
8. 日本調理科学会編: 伝え継ぐ日本の家庭料理 漬物・佃煮・なめ味噌, うかたま別冊 9 月号, 農山漁村文化協会(埼玉), p.45 (2019)
9. 宮尾茂雄: 日本の漬物, *Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria*, **13**, 2-22 (2002)
10. 石川健一, 加藤丈雄, 小宮孝志: 漬物に適した乳酸菌の選択と発酵条件の確率, **50**, 361-364 (2003)
11. 黒飛知香, 干野隆芳, 羽倉義雄, 風見由香利, 早川文代: 市販イチゴジャムにおける風味要素の Time-Intensity プロファイリング, 日本食品科学工学会誌, **64**, 549-558 (2017)
12. Hoshino T.: Analysis of viscosity measurements obtained using the short back extrusion method. Part 1: Theory of short back extrusion in viscometry, *J. Texture Studies*, **51**, 201-203 (2020)
13. 多山賢二, 古田 歩, 荒木 彩, 岡本洋子, 谷本昌太, 橋場浩子: スチームコンベクションオーブン内における食塩およびグルコースの食材中への拡散, 日本食生活学会誌, **29**, 147-156 (2018)
14. Alarcon P.O., Sossa K., Contreras D., Urrutia H. and Nocker A.: Antimicrobial properties of magnesium chloride at low pH in the presence of anionic bases, *Magnes Res.*, **27**, 57-68 (2014)
15. Xie Y. and Yang L.: Calcium and magnesium ions are membrane-active against stationary-phase *Staphylococcus aureus* with high specificity, *Sci. Rep.*, Feb 11:6:20628. doi: 10.1038/srep20628 (2016)
16. 宮尾茂雄: 漬物の品質安定化における微生物の総合的制御, 日本食品保蔵科学会誌, **30**, 29-38 (2004)
17. 宮本敬久, 中山素一, 重宗尚文, 徳田 一, 松下知世, 古田可菜子, 目加田瑤子, 本城賢一: 緑茶抽出物の抗菌剤としてのキュウリ浅漬けへの応用, 日本食品科学工学会誌, **56**, 660-664 (2009)
18. 宮尾茂雄: 漬物と微生物, *モダンメディア*, **61**, 330-337 (2015)
19. 石川健一, 加藤丈雄, 小宮孝志: 漬物に適した乳酸菌の選択と発酵条件の確立, 日本食品科学工学会誌, **50**, 361-364 (2003)
20. 石川健一, 加藤丈雄, 小宮孝志: 低食塩漬物用の乳酸菌スターターカルチャーの開発, 日本食品科学工学会誌, **46**, 311-318 (1999)
21. 中川 宏, 水野竹美, 清水隆浩, 金子旬一, 角野政弥, 伊藤 武, 坂井千三, 寺田 厚: 漬物の乳酸菌叢に関する検討, 日本食品微生物学会雑誌, **18**, 61-66 (2001)
22. 荻原博和, 河原井武人, 古川壮一, 宮尾茂雄, 山崎眞狩, すぐきの製造工程における微生物叢および化学成分の変遷, 日本食品微生物学会誌, **26**, 98-106 (2009)
23. Entani E., Asai M., Tsujihata S., Tsukamoto Y. and Ohta M.: Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7, *J. Food Prot.*, **61**, 953-959 (1998)
24. 能勢征子, 風戸実香, 坂井千三: 腸炎ビブリオの酸性下における生存に及ぼす有機酸と食塩の影響, 食衛誌, **26**, 579-584 (1985)
25. 西成勝好: 食品のテクスチャーとフレーバーリリース, 日本調理科学会誌, **48**, 57-69 (2015)
26. Wada K., Oba S. and Nagata C.: Rice-based diet and cardiovascular disease mortality in Japan: from the Takayama study, *Nutrients*, **2022**, 14, 2291 (doi: 10.3390/nu14112291).
27. Asano M., Kushida M., Yamamoto K., Tomata Y., Tsuji I. and Tsuduki T.: Abdominal fat in overweight individuals reduced by the consumption of a 1975 Japanese diet: a randomized controlled trial, *Obesity*, **27**, 899-907 (2019)

## Fundamental Analysis of New Fermented Pickles Using Bittern (Magnesium Chloride)

Tomoka Kurotobi<sup>1</sup>, Kenji Tayama<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hiroshima Shudo University, <sup>2</sup>Prefectural University of Hiroshima

### Summary

While Japanese people are required to reduce salt intake, it has been reported that the 1975 Japanese diet, which includes fish, potatoes, fruits, mushrooms, seaweed, soybeans, vegetables including pickles, and large amounts of soup stock, is preferable in terms of longevity. Therefore, we searched for a method to make low-salt fermented pickles with a long shelf life in a short period of time. First, we investigated *Komagataeibacter xylinus*, bacteria that can grow at pH 3, and found that the addition of 32 mM MgCl<sub>2</sub> to the medium significantly delayed the lag phase of growth. This inhibitory effect exceeds NaCl and KCl at the same molar concentration. Umami taste (3 mM monosodium glutamate (GluNa)) was enhanced by the addition of 7.4 mM MgCl<sub>2</sub>. We also confirmed that the coexistence of these two substances increases the taste intensity of 51 mM (0.30%) NaCl. When these three components coexisted, the overall taste intensity could be increased by adding 0.05% lactic acid or acetic acid. Therefore, we started a trial production of fermented pickles with MgCl<sub>2</sub>, taking into consideration that the concentration ratio of each of these components could be maintained in the pickling solution.

Using Komatsuna and Chinese cabbage, we investigated various sources of lactic acid bacteria, as well as GluNa sources and nutritional sources that promote the growth of lactic acid bacteria, and used a small amount of vinegar for preservative purposes. Vegetables were soaked in 5% NaCl at twice the weight of the vegetables for 3 days, and then fermented at 30°C for 4 days in the same weight of the main pickling solution (containing MgCl<sub>2</sub> and lactic acid bacteria). The following results were obtained: (1) Treatment of vegetables at 65°C for 20 minutes is preferable as a countermeasure against germs, (2) Commercially available lactic acid bacteria drink from Japanese company is good as a source of lactic acid bacteria, (3) Commercial consommé powder was easily available as both a GluNa source and a lactic acid bacteria nutrient source, (4) Lactic acid bacteria growth was  $2 \times 10^7 \sim 3 \times 10^8$  CFU/mL, (5) Sodium ion concentration in vegetables is  $1.0 \sim 1.3 \times 10^4$  ppm, allowing for low salt content, (6) At the end of pickling, the pH of the solution is 3.4 ~ 4.4, the salt equivalent concentration is 3 ~ 4% (W/V), the total of L-lactic acid and acetic acid is 0.3 ~ 0.4% (W/V) (Glu was 0.1 ~ 0.3%, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O was added at 0.75%), it was easy to judge that the growth of food-poisoning bacteria would be difficult, (7) Evaluation by students confirmed that the food was fully edible. In addition, when agar melt was added to this pickling solution so that the agar concentration was 0.2%, it was found that sourness of the pickles was enhanced, and the physical properties of this solution could not be analyzed using conventional methods. It was found that it is difficult to analyze fine agar particle suspensions.

As described above, we have established a basic method to easily produce a prototype of low-salt fermented pickles from leafy vegetables, with Chinese cabbage being a typical example, in one week and have a long shelf life.