

《温故知新プロジェクト》

相知高菜漬の製造過程における微生物および香気成分の消長

宮尾 茂雄* 佐藤 吉朗*

Changes in Microflora and Flavor during Production of *Ohti-Takanazuke*

Shigeo MIYAO and Yoshio SATO

1. はじめに

高菜漬は、主に九州で生産されている漬物で、新高菜と古高菜がある。新高菜は2~3%の食塩で漬けられ、新鮮な味覚と明るい緑色を特徴とする浅漬風の漬物である。一方、古高菜は6~12%の食塩濃度で乳酸発酵をおこなった発酵漬物で、べっこう色を呈している。高菜漬の原料となる高菜 (*Brassica juncea* Coss.) は、からし菜に属する漬物野菜で、九州北部には三池高菜、山汐高菜、かつお菜など、中部には阿蘇高菜がある。かつて佐賀県の高菜漬として栽培されていた相知(おうち)高菜が姿を消し、十数年間、「まぼろしの高菜」といわれていたが、2007年に相知町の農家で種子が発見された。その後、栽培、種子採集がおこなわれ、2009年以降、前田食品工業有限会社で相知高菜漬が復活、生産されるようになった。

わが国の発酵漬物に関する微生物学的研究は、古くは中山ら^{1)~3)}、河東田ら⁴⁾や岩井ら⁵⁾、近年では荻原ら⁶⁾、総説では、宮尾⁷⁾の報告がある。また、香気成分に関する報告では、糠味噌漬を対象とした今井ら^{8)~10)}の報告があるが、相知高菜を用いた高菜漬の製造過程における微生物と香気成分の消長について検討した報告は見当たらない。そこで、相知高菜を原料とし、6~12%の食塩を加えて高菜漬を製造した場合の製造過程における菌叢および香気成分の消長について調べた。

2. 実験方法

1) 材料および高菜漬の製造

高菜漬の原料野菜は、佐賀県西浦郡相知町で2014年に収穫された相知高菜で、収穫後、朝露が乾いたところで切り込みを行い、半日天日干ししたものを冷蔵状態で当研究室に搬入したものをを用いた。高菜漬の製造は、相知高菜をそれぞれ約7kg下漬後、ウコン塩(ウコン粉末を2.7%含有する食塩)を用い、それぞれ食塩濃度が6、9、12%となるように漬込みをおこない、室温下で2014年4月3日から100日間、発酵、熟成させた。なお、重石はそれぞれ相知高菜とほぼ同重量となるようにおこなった。

2) 微生物学的試験

(1) 試料の調製

漬込み直後および一定期間発酵、熟成をおこなった試験区から各100gを可能な限り無菌的に採取し、均一となるよう細片したもののなかから、25gを秤量し、滅菌した生理的食塩緩衝液を加えて250mLとし、ストマッカーで1分間処理したものを微生物学的試験の試料原液とした。

(2) 微生物菌数の測定

試料原液からの各菌数の測定は、常法により10倍段階希釈を行った後、以下の方法によっておこなった。

(i) 生菌数の測定

トリプチケースソイ寒天(BD社製)を用い、混釈培養法により、30℃、72時間好気培養後、生育した集落を計数し、生菌数とした。

(ii) 乳酸菌数の測定

MRS培地(BD社製)にアジ化ナトリウムおよびシクロヘキシミドを添加したものをを用い、嫌気培養装置(アネロパックシステム、三菱ガス化学(株)製)を用い、30℃、72時間嫌気培養後、生育した集落を計数し、乳酸菌数とした。

(iii) グラム陰性菌数の測定

CVT寒天培地(栄研(株)製)を用い、混釈培養法にて、25℃、72時間、好気培養後、TTCを赤変した集落を計数し、グラム陰性菌数とした。

(iv) 大腸菌群数の測定

X-GAL培地(白水製薬(株)製)を用い、混釈培養法にて37℃、24時間好気培養後、生育した典型的な青色集落を計数し、大腸菌群数とした。

(v) 真菌数の測定

PDA培地(栄研(株)製)にクロラムフェニコールを添加した培地を用い、28℃、72時間培養後に生育した典型的な集落を計数し、真菌数とした。

(3) 乳酸菌の同定

各試験区において発酵が十分に進行した高菜漬の乳酸菌数の計数に用いたMRS培地から無作為に20菌株を釣菌

* 東京家政大学 (Tokyo Kasei University)

し、MRS 培地を用いて純粋菌株を得た。純粋分離した菌株は、集落の性状等から絞り込みをおこなった後、API-50CHL システム (BIOMERIEUX 社製) により同定をおこなった。

3) 理化学的試験

(1) 試料の調製

漬込み直後および一定期間発酵、熟成をおこなった試験区から各 100 g を可能な限り無菌的に採取し、均一となるよう細片し、ホモジナイザーで磨砕したものから、10 g を秤量し試料とした。

(2) pH 測定

試料に精製水 90 mL を加えて混合したものをろ過し、pH メーターでガラス電極法により測定した。

(3) 香気成分の測定

(i) 香気成分の吸着

高菜漬からの香気成分の吸着法について検討した結果、におい吸着フィルムを用いる方法よりも SPME ファイバーを用いる方法の感度が優れていたことから¹¹⁾、図1のように密閉容器中に高菜漬試料を封入し、その上層(気相)に SPME ファイバーを挿入し、ファイバーの先端に塗布固定された樹脂に香気成分を 40℃、30 分間処理することによって吸着させ、そのファイバーを GC に導入した。

(ii) 香気成分の分析

香気成分の分析には、GERSTEL 社製の ODP2 を装備した Agilent Technologies 社製の GC/MS で、におい嗅ぎ装置が装備されているものを使用した。GC は 7890A、MS は 5975C を用いた。カラムは Agilent Technologies 社製の DB-WAX (長さ 30 m × 内径 0.25 μm × 膜厚 0.50 μm) を使用し、測定条件は以下のとおりでおこなった。

昇温条件：60℃(1 min)→10℃/min-160℃→20℃/min-240℃→240℃(3 min)、注入口温度：250℃(スプリットレス)、イオン化法：EI 法、イオン源温度：230℃、四重

極温度：150℃、測定モード：SCAN。

これまでの漬物の香気成分分析は揮発成分についてすべて観測されるピークについて成分を同定し、漬物の香気成分としてきた。しかし、本装置は、分離された成分を直接ヒトの鼻でにおいを嗅ぐことができることから、あらかじめ漬物のおいを嗅いで、においを記憶させ、におい嗅ぎ装置で実際に漬物のおい分析時ににおい嗅ぎ装置にて、におい嗅ぎを行い、どの成分が漬物試料の主たるにおい成分であるかを判別することが可能である。

3. 結果および考察

1) 発酵、熟成過程における微生物叢の変遷

漬込む前の相知高菜の微生物叢について調べた結果、生菌数は 8.2×10^6 CFU/g、乳酸菌数は 300 以下 CFU/g、グラム陰性菌数は 5.4×10^6 CFU/g、大腸菌群数は 2.3×10^3 CFU/g、真菌数は 300 以下 CFU/g で、高菜に付着している微生物の多くはグラム陰性菌であった。また、pH を測定したところ 6.2 であった。つぎに相知高菜の発酵、熟成過程における微生物叢および pH の変化について調べた結果を食塩濃度別にそれぞれ図 2、3、4 に示した。

食塩濃度が 6% の場合は、5 日目頃から乳酸菌の増加がみられ、20 日目には 10^8 CFU/g に達した。30 日目には乳酸発酵の進行にともない pH 4.0 以下となり、グラム陰性菌および大腸菌群は減少、死滅した。一方、酵母は 20 日目頃から増殖し始め、一時 10^6 CFU/g に達したが、その後は減少した。40 日目以降は乳酸菌、酵母ともに減少傾向がみられるようになり、100 日目にはいずれも 10^4 CFU/g 台となった。

食塩濃度が 9% の場合は、10 日目頃から乳酸菌の増加がみられ、20 日目には 10^8 CFU/g に達し、その後、徐々に減少した。30 日目には乳酸発酵の進行にともない pH 4.0 以下となった。グラム陰性菌および大腸菌群は 10 日目には、減少、死滅した。酵母は 30 日目頃から増殖し始め、 10^6 CFU/g に達したが、その後は減少し、 10^4 CFU/g 台で推移した。40 日目頃からは乳酸菌、酵母ともに減少傾向がみられるようになり、100 日目にはいずれも 10^4 CFU/g 台となった。

食塩濃度が 12% の場合は、6、9% の場合よりも変化が遅くなり、20 日目頃から乳酸菌の増加がみられ、30 日目に 10^6 CFU/g に達したが、6、9% の場合と異なり、 10^8 CFU/g 以上に達することはなく、 10^6 CFU/g にとどまった。その後、40 日目以降は徐々に減少した。食塩濃度が 12% と高濃度であったことから、乳酸発酵の進行が遅く、pH 4.0 近辺に達したのは 60 日後であった。なお、グラム陰性菌は 6、9% の場合と異なり、30 日後においても 10^2 CFU/g の菌数が生残していたが、40 日目以降は検出されなくなった。

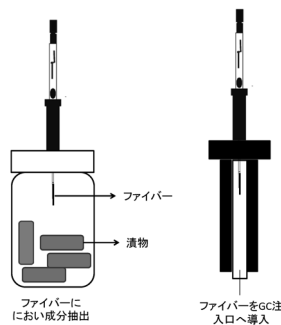


図1 SPME ファイバーを用いた香気成分の抽出

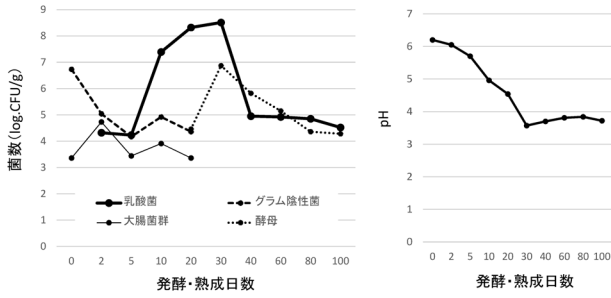


図2 相知高菜の発酵、熟成工程における微生物叢および pH の変化（食塩濃度6%）

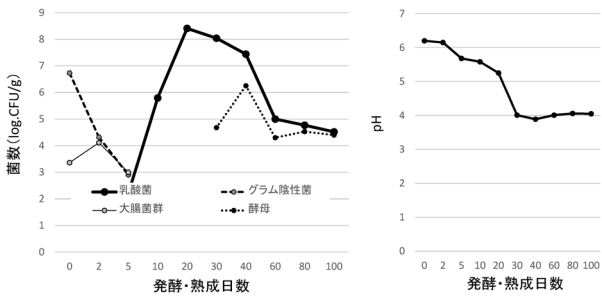


図3 相知高菜の発酵、熟成工程における微生物叢および pH の変化（食塩濃度9%）

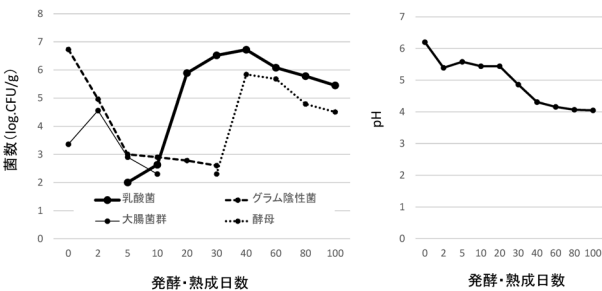


図4 相知高菜の発酵、熟成工程における微生物叢および pH の変化（食塩濃度12%）

一方、酵母は40日目頃から増殖し、 10^5 CFU/g 台に達したが、その後は減少し、 10^4 CFU/g 台で推移した。40日目からは乳酸菌、酵母ともに減少傾向がみられるようになったが、100日目は、6、9%の場合よりも多く、 10^5 CFU/g 台であった。

このように、いずれの食塩濃度においても、漬込み当初、多くみられたグラム陰性菌は、乳酸発酵にともなう pH の低下により、減少、死滅する傾向が見られ、pH が5以下になると乳酸菌が優勢となった。発酵、熟成の後期になると次第に酵母が増殖するようになったが、食塩濃度が高くなるほど乳酸菌や酵母の出現する時期は遅くなる傾向が見られた。

表1 相知高菜漬の優勢乳酸菌

食塩濃度	主な分離乳酸菌
6.0%	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
9.0%	<i>Weisella confusa</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
12%	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>

表2 相知高菜漬より分離した *Lactobacillus plantarum* の主な性状

No.	Tests	<i>L. plantarum</i>
1	Gram stain	+
2	Catalase reaction	-
3	Shape	Rods
4	Glycerol	-
5	Erythritol	-
6	D-Arabinose	-
7	L-Arabinose	+
8	Ribose	+
9	D-Xylose	-
10	Adonitol	-
11	Galactose	+
12	D-Glucose	+
13	D-Fructose	+
14	D-Mannose	+
15	L-Sorbose	-
16	Rhamnose	-
17	Dulcitol	-
18	Mannitol	+
19	Sorbitol	+
20	Esculine	-
21	Salicine	+
22	Maltose	+
23	Lactose	+
24	Sucrose	+
25	Trehalose	+
26	Melezitose	+
27	D-Raffinose	+
28	Starch	-
29	Xylitol	-
30	Gluconate	+

2) 発酵、熟成工程から分離した主要乳酸菌の性状

各試験区において無作為に釣菌した乳酸菌株のうち、発酵、熟成に重要な役割を果たしていると思われる乳酸菌株を絞り込んだ後、それぞれ API50CHL システム (BIOM-ERIEUX 社製) により同定をおこなったところ、表1に示すように、食塩濃度6%の場合は、*Leuconostoc mesenteroides* および *Lactobacillus plantarum*、食塩濃度9%

の場合は、*Lactobacillus plantarum* および *Weissella confusa*、食塩濃度12%の場合は、*Lactobacillus plantarum* および *Lactobacillus brevis* であった。そのなかで最も優勢な乳酸菌は API50CHL システムによる同定の結果、99.5%の確率で *L. plantarum* であった。主な性状試験の結果を表2に示した。

3) 発酵、熟成工程における香気成分の変化

相知高菜漬の発酵、熟成工程から香気成分を SPME ファイバーに吸着させたものをにおい嗅ぎ装置付きの GC/MS で分析した結果、相知高菜漬の特徴的な香気成分として、アリルイソチオシアネート (AIC)、ジメチルトリサルファイド (DMS)、3-ヘキセン-1-オール (HO)、1-ブテン-4-イソチオシアネート (BIC)、ヘプタジエナール (HDA)、3-メチルチオプロピルイソチオシアネート (MPIC) が検出された。

図5、6、7で示すように、試料の相知高菜から香気成分として AIC が検出され、漬込み後、日数が進むにつれ減少する傾向にあった。これは塩分濃度にかかわらず、同じ傾向を示した。なお、AIC は抗菌活性も示すため、漬込

みの初期段階においてグラム陰性菌、大腸菌群の増殖を抑制していることが推察された。発酵に生成された香気成分と考えられる DMS は塩分濃度6、9、12%いずれの漬物においても、乳酸菌の増殖曲線とほぼ同様の挙動を示し、脂肪酸の分解物である HO は日数とともに増加する傾向であった。この結果、DMS あるいは BIC の挙動を観測することにより、熟成度を予測することが可能になると考えられた。

4. 要 約

近年、佐賀県の伝統野菜として復活した相知高菜を原料として用いた高菜漬を製造した場合の微生物叢および香気成分の変遷について調べた。

その結果、漬込みの初期段階では食塩濃度にかかわらず漬込み前の相知高菜に付着しているグラム陰性菌が優勢であったが、20日目頃から減少、死滅する一方で、10日目頃から増殖し始めた乳酸菌が優勢となった。食塩濃度が6%、9%の場合には 10^8 CFU/g を超えるまで増殖した。40日を超えると乳酸菌数も減少し、 10^4 CFU/g 程度で推移するようになった。40日目頃からは酵母が 10^6 CFU/g 程度観測され、食塩濃度が低いほど多い傾向がみられた。漬込み直後の pH は、6.0 付近であったが、乳酸発酵の進行にともない、pH 4.0 付近まで低下した。しかし、その後は大きな変化はみられなかった。pH は、食塩濃度が高いほど下がり方は遅い傾向がみられた。

相知高菜漬の発酵、熟成過程における香気成分の変化をにおい嗅ぎ付き GC/MS を用いて調べた結果、原料野菜の相知高菜に由来するアリルイソチオシアネート (AIC) が、漬込み直後に高い濃度で生成したが、発酵、熟成日数の経過とともに減少した。AIC は抗菌活性を有することから漬込み後のグラム陰性菌や大腸菌群の減少、死滅に影響したことが推察された。また、発酵、熟成の際に生成したと考えられるジメチルトリサルファイド (DMS) や1-ブテ

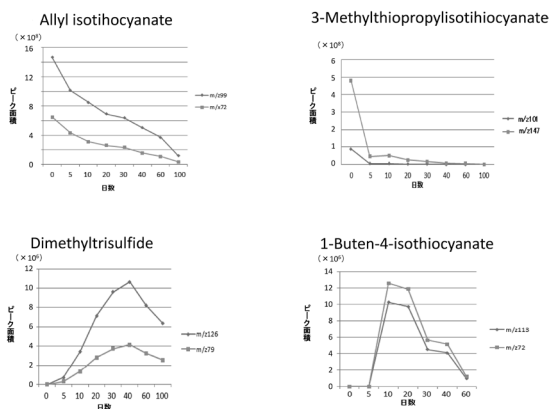


図5 相知高菜漬（食塩濃度6%）の発酵、熟成過程における香気成分の変化

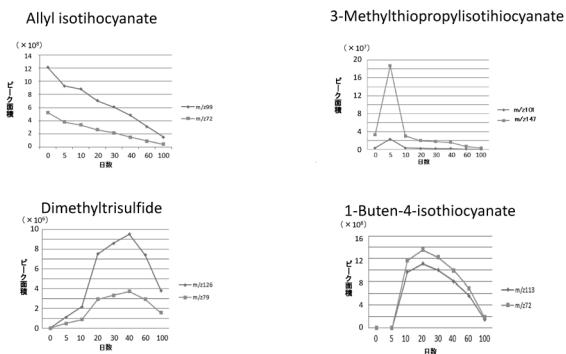


図6 相知高菜漬（食塩濃度9%）の発酵、熟成過程における香気成分の変化

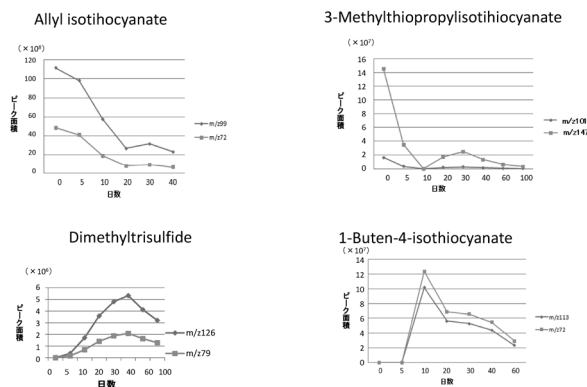


図7 相知高菜漬（食塩濃度12%）の発酵、熟成過程における香気成分の変化

ン-4-イソチオシアネート (BIC) の生成量の変化をみると乳酸菌の増殖曲線と類似の挙動を示したことから、DMS や BIC の挙動を観測することにより、発酵、熟成度を予測することが可能になると考えられた。

謝 辞

本研究をおこなうに当たり、原料野菜の相知高菜やウコン塩を供与していただくとともにさまざまな面でご協力をいただきました前田食品工業有限公司の前田節明氏に心より感謝申し上げます。また、本研究は東和食品研究振興会助成金により行われたもので、ここに心から感謝の意を表す。

文 献

- 1) 中山大樹：木曾のスグキの細菌に就いて。農化，**23**，497-499 (1950)。
- 2) 中山大樹，小池弘子：食塩を使わない漬物「スンキ」の乳酸菌群について (第1報) 菌の分離および桿菌群の同定。醗酵工学雑誌，**43**，157-164 (1965)。
- 3) 中山大樹，小池弘子：食塩を使わない漬物「スンキ」の乳酸菌群について (第2報) 球菌群の同定。醗酵工学雑誌，**43**，799-806 (1965)。
- 4) 河東田茂義，高橋文秀，小川充佳，上木勝司，上木厚子：アツミカブ糠床熟成中の微生物フローラと糠床から分離した酵母の同定。山形大学紀要，**11**，789-795 (1993)。
- 5) 岩井正憲，今原広次，万 雄治，中浜敏雄：発酵食品の製造に関係する耐塩性乳酸菌 (第3報) すぐきの製造に関係する乳酸菌。醗酵工学雑誌，**43**，791-797 (1965)。
- 6) 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)。
- 7) 宮尾茂雄：日本の漬物。Japanese J. Lactic Acid Bacteria，**13**，2-22 (2002)。
- 8) 今井正武，平野 進，饗場美恵子：糠床の熟成に関する研究。農化，**57**，1105-1112 (1983)。
- 9) 今井正武，平野 進，饗場美恵子：糠床の熟成に関する研究 熟成中のフレーバー成分の変化。農化，**57**，1113-1120 (1983)。
- 10) 今井正武，後藤昭二：糠床熟成中の酵母フローラの消長と分離菌株の同定。農化，**58**，545-551 (1984)。
- 11) 宮尾茂雄，佐藤吉郎：伝統漬物における微生物学的解析及び香気成分の研究。東京家政大学生生活科学研究報告，**37**，45-47 (2014)。