

研究論文

バイオプリザベーションのマッシュルーム発酵調味料への利用

山本晃司*¹、長谷川 撰*¹、石原那美*²、鳥居貴佳*³
小原章裕*⁴、井上五郎*⁵、野田 廣*⁵

Utilization of Biopreservation on Fermented Mushroom

Koji YAMAMOTO*¹, Osamu HASEGAWA*¹, Nami ISHIHARA*², Takayoshi TORII*³, Akihiro OHARA*⁴, Goro INOUE*⁵ and Hiroshi NODA*⁵

Food Research Center, AITEC*¹⁻³, Meijo University*⁴, Koide Bussan Co., Ltd.*⁵

マッシュルームに黒麹菌を接種して調製した麴を用いる発酵調味料の製造工程に抗菌性乳酸菌によるバイオプリザベーションの利用を試みた。バイオプリザベーションにより耐熱性芽胞菌の生育を阻止し、高温高圧殺菌工程をなくしたマッシュルーム発酵調味料生産方法を確立した。また、バイオプリザベーションを利用したマッシュルーム発酵調味料は、対照と同等の栄養成分及び抗酸化性を有していた。

1. はじめに

マッシュルーム発酵調味料は、黒麹菌 (*Aspergillus saitoi*) でマッシュルーム麴を調製し、麴に加熱マッシュルーム、食塩を加えて発酵・熟成することで旨味・風味を増したペースト状の発酵調味料¹⁾である。しかし、マッシュルーム麴を調製する際に耐熱性芽胞菌対策として、原料の高温高圧殺菌を行っている。醸造用麴の耐熱性芽胞菌対策としては、乳酸菌 (*Lactococcus lactis subsp. lactis*) によるバイオプリザベーションが、有効な手段として報告されている^{2,5)}。本研究では、マッシュルーム麴調製工程において、乳酸菌によるバイオプリザベーションを導入することで、低コスト・省エネ化を兼ねたマッシュルーム麴用の原料殺菌及び耐熱性芽胞菌の制御技術を確立することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 原材料

原材料のマッシュルームは、舟形マッシュルーム (山形県) を使用した。麴には、熱風乾燥したマッシュルームを使用した。

2.2 供試菌

種麹菌として *Aspergillus saitoi* IAM2210 (*A. saitoi*) 孢子を可溶性デンプンで 10 倍量に増量して使用した。

抗菌性乳酸菌として *Lactococcus lactis subsp. lactis* JCM7638 (*Lc. lactis*) を使用した。

汚染指標菌として耐熱性芽胞菌 *Bacillus subtilis* ATCC19659 (*B. subtilis*) を使用した。

2.3 乳酸発酵試験

乾燥マッシュルームに試験区に応じて加水後 *Lc. lactis* を 1.0×10^7 /g、*B. subtilis* を 1.0×10^5 /g となるように接種し、30℃で 24 時間培養した。培養後、ナイシン活性、pH 及び菌数測定を行った。

2.4 マッシュルーム麴の調製

乾燥マッシュルームあるいは、乳酸発酵マッシュルームを水分調整 (水分 50%) した後、*A. saitoi* の種麹を 0.5% 添加し、均一に攪拌した。その後、密閉環境にて、30℃、48 時間製麴を行った。

2.5 微生物菌数の測定

乳酸菌数は、MRS 寒天培地を使用して、塗抹法により 30℃にて 48 時間平板培養して出現したコロニー数を測定した。

Bacillus 数は、Nutrient 寒天培地を使用して、塗抹法により 30℃にて 48 時間平板培養して出現したコロニー数を測定した。

2.6 ナイシン活性の測定

試料 1g を秤量し、5ml の希塩酸 (pH2.0) /0.5% Tween-20 を加え、5℃にて 3 時間振とう抽出した。抽出液について *B. subtilis* を指標菌とした agar well diffusion assay³⁾ によりナイシン活性 AU/g を測定した。AU/g=活性が認められた希釈倍率×50

2.7 成分分析

一般栄養成分は、五訂日本食品標準成分表分析マニュアル⁶⁾に従い行なった。

2.8 酵素活性の測定

マッシュルーム麴を 5g 秤量し、0.5% NaCl を含む 10mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) 25mL を加え、5℃で一晩抽

*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 *2 食品工業技術センター 分析加工技術室

*3 食品工業技術センター 保蔵包装技術室 *4 名城大学 *5 (株) 小出物産

出した。抽出液をろ紙(No.5C)を用いてろ過したものを試験液とした。

α -アミラーゼ活性は α -アミラーゼ活性測定キット(キッコーマン(株))、グルコアミラーゼ活性は糖化力分別定量キット(キッコーマン(株))、酸性カルボキシペプチダーゼ活性は酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット(キッコーマン(株))を用いて測定した。酸性プロテアーゼ活性は国税庁所定分析法⁷⁾に従って測定した。

2.9 遊離アミノ酸分析

発酵もろみの熱水抽出液をクエン酸リチウム緩衝液(pH2.2)で希釈し、アミノ酸自動分析装置((株)日立ハイテクノロジーズ)を用いて測定した。

2.10 DPPH ラジカル消去能

乾燥マッシュルームはそのまま、マッシュルーム発酵調味料は、凍結乾燥物に10倍量の80%エタノールを加えて抽出した。抽出液をろ過後、希釈して測定に用いた。

脂質過酸化実験法⁸⁾に従い、試料によるDPPHの退色を測定し、Trolox相当量として算出した。

2.11 スーパーオキシド消去能

DPPH ラジカル消去能測定に用いたものと同一試料についてSOD Assay Kit-WST((株)同仁化学研究所)を用いてスーパーオキシド消去能を測定した。

3. 実験結果及び考察

3.1 抗菌性乳酸菌による発酵条件の検討

最初に乾燥マッシュルームに加水して水分を50%に調整後、*Lc. lactis*と*A. saitoi*を同時に添加しナイシン生産と製麴を同時進行することを検討したところ*Lc. lactis*が増殖せず、ナイシン生成が認められなかった。そのため、乾燥マッシュルームに対する加水量及びブドウ糖添加の*Lc. lactis*の増殖及びナイシン生産への影響について検討を行った。その結果を表1に示した。

表1 マッシュルームの*Lc. lactis*による乳酸発酵試験

ブドウ糖無添加			
配合 (マッシュルーム:水)	乳酸菌数 (24h後)	pH	ナイシン活性(AU/g)
1:3	$2.5 \times 10^8/g$	5.96	64,000
1:6	$2.2 \times 10^8/g$	5.78	128,000
1:10	$1.2 \times 10^8/g$	5.56	4,000
1:20	$7.8 \times 10^7/g$	5.12	2,000
ブドウ糖1%添加			
配合 (マッシュルーム:水)	乳酸菌数 (24h後)	pH	ナイシン活性(AU/g)
1:3	$2.2 \times 10^9/g$	4.52	256,000
1:6	$1.8 \times 10^9/g$	4.31	256,000
1:10	$9.8 \times 10^8/g$	4.14	64,000
1:20	$9.0 \times 10^8/g$	4.03	4,000

表2 マッシュルーム麴の菌数とpH (24時間経過時)

試験区	乳酸菌数	汚染指標菌数	pH
<i>B. subtilis</i>	—	$5.4 \times 10^7/g$	6.06
<i>Lc. lactis</i>	$3.8 \times 10^6/g$	300以下/g	6.05
<i>Lc. Lactis/B. subtilis</i>	$5.2 \times 10^6/g$	300以下/g	6.03

表3 マッシュルーム麴の酵素活性

酵素活性 (U/gdry麴)	酵素活性	
	α -アミラーゼ活性	グルコアミラーゼ活性
対照	6	456
乳酸菌添加	6	450
酵素活性 (U/gdry麴)	酵素活性	
	酸性プロテアーゼ活性	酸性カルボキシペプチダーゼ活性
対照	15,472	13,855
乳酸菌添加	15,769	14,113

表4 マッシュルーム発酵調味料の仕込配合

	(kg)
蒸煮マッシュルーム(食塩10%)	26.4
マッシュルーム麴	2.7
食塩	1.4
水	9.5
合計	40

表5 もろみの生菌数

試験区	1ヶ月	2ヶ月
対照	$2.9 \times 10^6/g$	$1.4 \times 10^7/g$
乳酸菌添加	$1.8 \times 10^3/g$	$7.4 \times 10^3/g$

表6 試作品の栄養成分

成分 (g/100g)	対照	乳酸菌添加
水分	82.4	82.9
灰分	9.2	9.1
脂質	0.4	0.4
たんぱく質	3.3	3.2
食物繊維	2.6	2.5
糖質	2.1	1.9
食塩	8.6	8.6

乾燥マッシュルームに対する加水量を比較すると、ブドウ糖無添加及び添加区ともに3倍加水と6倍加水の試験区で *Lc. lactis* の増殖及び高いナイシン活性 (*B. subtilis* 抗菌活性) が認められた。また、ブドウ糖を添加した試験区は、無添加区に比べて乳酸生成により pH が低下し、ナイシン活性も高かった。そこで、マッシュルーム麴の調製は、マッシュルームに対して6倍加水後、*Lc. lactis* による乳酸発酵を 30℃で24時間行い、乳酸発酵マッシュルームに乾燥マッシュルームを加えて、水分50%に調製後、*A. saitoi* 胞子を添加し、密閉環境下で30℃、48時間発酵することとした。

マッシュルーム麴の調製工程へのバイオブリザベーションの効果を検討した結果を表2に示した。マッシュルームに対して *B. subtilis* のみを添加した試験区は、出麴時に $5.4 \times 10^7/g$ の *B. subtilis* が検出された。*Lc. lactis* のみ及び *Lc. lactis* と *B. subtilis* を添加した試験区は、乳酸菌数は、ほとんど変化しなかったが、*B. subtilis* はともに 300/g 以下であった。麴の pH に関してはどの試験区も約 pH6 であった。以上の結果から *Lc. lactis* によるバイオブリザベーションを導入することで、熱性芽胞菌 (*B. subtilis*) の生育を阻止してマッシュルーム麴を調製することができた。

表7 試作品の遊離アミノ酸組成

(mg/100g)	対照	乳酸菌添加
Asp	56	56
Thr	27	31
Ser	30	29
Asn	29	34
Glu	118	132
Gln	0	0
Pro	26	25
Gly	18	23
Ala	54	57
Val	35	33
Cys	9	7
Met	18	16
Ile	33	34
Leu	62	63
Tyr	37	35
Phe	52	45
Trp	10	12
Lys	55	59
His	18	11
Arg	50	10
合計	737	712

マッシュルーム麴の酵素活性を測定した結果を表3に示した。 α -アミラーゼ活性が低く、酸性プロテアーゼ及びカルボキシペプチダーゼ活性が高かった。対照と乳酸菌添加区は、ほぼ同等であった。バイオブリザベーションを利用することでマッシュルーム麴の酵素活性が低下することはなかった。

3.2 マッシュルーム発酵調味料の試作試験

バイオブリザベーション技術により調製したマッシュルーム麴を用いてマッシュルーム発酵調味料の中規模(40kg)試作試験を行った。その仕込配合を表4に示した。麴に対して加えたマッシュルームは、食塩10%存在下で蒸煮したものをを用いた。マッシュルーム発酵調味料目標塩分は10%とした。マッシュルーム発酵調味料の熟成は25℃で2ヶ月間行い、経時的に菌数測定及び成分分析を行った。もろみの生菌数測定の結果を表5に示した。もろみの生菌数は、1ヶ月後で対照区が $2.9 \times 10^6/g$ で乳酸菌添加区が $1.8 \times 10^3/g$ であり、2ヶ月後の対照区が $1.4 \times 10^7/g$ で乳酸菌添加区が $7.4 \times 10^3/g$ であった。試作試験では、完全に生菌数を抑えることができなかったが、対照区に比べて生菌数を 1/1000 以下に減少させることができた。実験室規模のように生菌数が 300 以下にならなかったのは、スケールアップにより仕込が無菌的にで

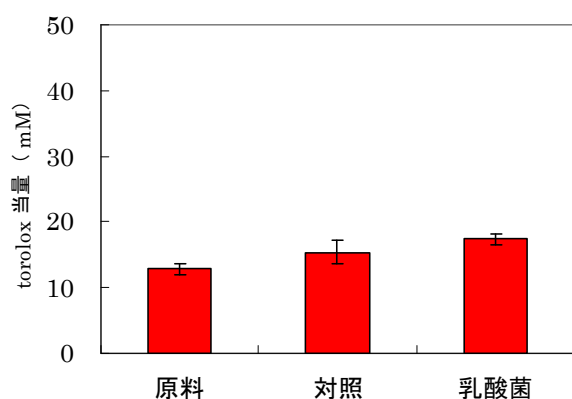


図1 DPPH ラジカル消去能

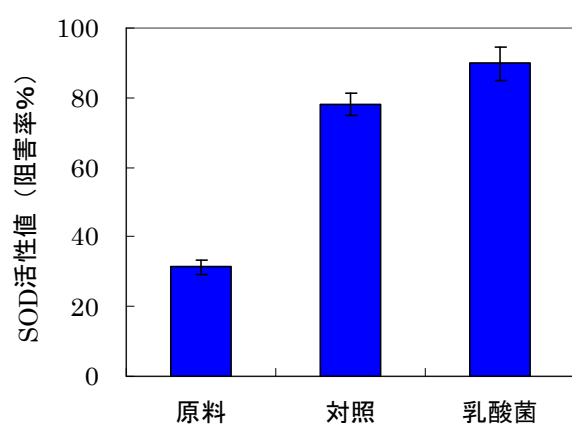


図2 SOD 様活性

きなかったためであると考えられた。

試作品の栄養成分分析結果を表6に示した。に比べて、繊維質が麹菌の酵素で分解され食物繊維が仕込時（対照 3.0%、乳酸菌 2.9%）に比べて減少し（対照 2.6%、乳酸菌 2.5%）、その分糖質が増えていた。また、食塩濃度は、予定（10%）より少なくなった。これは、蒸煮マッシュルームに食塩が十分浸透せず 10%濃度に達していなかったためと思われる。遊離アミノ酸分析結果を表7に示した。遊離アミノ酸量については、仕込直後（対照 388mg/100g、乳酸菌 395mg/100g）に比べてかなり増加（対照 737mg/100g、乳酸菌 712mg/100g）していた。対照区と乳酸菌添加区に量的には、大きな差はないが、乳酸菌添加区は、グルタミン酸が多く、ヒスチジン、アルギニンが少なかった。アルギニンが少ないのは、乳酸菌によって資化されたためと考えられた。

今回の結果から、*Lc. lactis* によるバイオプリザベーションを利用しても、対照区と比較して栄養成分、遊離アミノ酸ともに対照区とほとんど差のないマッシュルーム発酵調味料を製造できることがわかった。

3.3 マッシュルーム発酵調味料の抗酸化性評価

マッシュルーム発酵調味料は、発酵過程において黒麹菌の酵素作用などにより抗酸化性が付与されることが期待できる。そこで、マッシュルーム発酵調味料凍結乾燥物について、乾燥マッシュルームと抗酸化性の比較を行った。DPPH ラジカル消去能の測定結果を図1に、SOD 様活性の測定結果を図2示した。DPPH ラジカル消去能に関しては、原料マッシュルームに比べて発酵マッシュルームは、若干の増加は認められる程度であった。対照区と乳酸菌添加区の差もほとんどなかった。SOD 様活性については、原料マッシュルームに比べて発酵マッシュルームは活性が増大しており、対照区に比べて乳酸菌添加区の方がやや高い活性が認められた。発酵させることで SOD 様活性が増大することが明らかとなった。マッシュルーム発酵調味料の発酵において、タンパク質分解等による旨味形成だけでなく、SOD 様活性を中心とした抗酸化性が高まることがわかった。

4. 結び

マッシュルーム発酵調味料の製造工程に抗菌性乳酸菌 *Lc. lactis* によるバイオプリザベーションの利用を試みた。そして、*Lc. lactis* が生産するナイシンにより *B. subtilis* の生育を阻止してマッシュルームを調製することができた。40 キロ規模で行った中規模試験においても、バイオプリザベーションを利用した試験区は、対照区に比べて生菌数を 1/1000 以下にすることができた。また、バイオプリザベーションを利用したマッシュルーム発酵調味料は、対照区と同等の栄養成分及び抗酸化性を有していた。

文献

- 1) 特許第 3881557 号：キノコ発酵食品の製造方法
- 2) 加藤丈雄：日本醸造協会誌，**94**，696(1999)
- 3) Kato,T., Maeda,K., Kasuya,H., and Matuda,T., : *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, **63**, 642(1999)
- 4) 加藤丈雄：食品工業，**42**，33(1999)
- 5) 特許第 4411606 号：蛋白質性発酵調味料の製造方法、水産蛋白質性発酵調味料、麴製造方法、麴
- 6) 五訂日本食品標準分析マニュアルの解説：(財)日本食品分析センター(2001)
- 7) 第4回改正国税庁所定分析法注解，(1990)，日本醸造協会
- 8) 福沢健治，寺尾純二：脂質過酸化実験法，(1990)，廣川書店