

研究論文

酵母と酢酸菌の共生系を用いた発酵緑茶の特性

近藤徹弥*1、北澤優輔*2

Characteristics of Fermented Green Tea Made with a Symbiotic System of Yeast and Acetic Acid Bacteria

Tetsuya KONDO*1 and Yusuke KITAZAWA*2

Food Research Center*1 College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University*2

酵母として *Saccharomyces* 属と *Kluyveromyces* 属から各 1 株、酢酸菌として *Acetobacter* 属、*Gluconacetobacter* 属及び *Gluconobacter* 属から各 1 株を選別し、酵母と酢酸菌の混合培養系を用いた発酵緑茶の特性について検討した。その結果、酵母と酢酸菌の菌株の組合せや添加糖の組成により、グルクロン酸、グルコン酸、酢酸等の生成量を変えることができた。一方、緑茶に含まれるカテキン類の組成や抗酸化性については、菌株や発酵条件の違いによる変化は認められなかった。

1. はじめに

茶浸出液にスクロース(Suc)を加え、主要微生物として酵母とセルロース生産性酢酸菌からなる菌塊(scooby)を入れて、2 週間程度発酵させたものは「Kombucha (コンブチャ)」と呼ばれ、フルーティな香りと酸味を呈する飲料として海外では何世紀にもわたって飲用されてきた。Kombucha には、茶由来のカテキン類、発酵により生じる有機酸類(酢酸、グルクロン酸、グルコン酸)やビタミン類が含まれており、抗菌作用、抗酸化性や抗がん作用、腸内改善等の健康効果が期待されている^{1),2)}。現在も、Kombucha の発酵や生理機能性に関する研究は精力的に行われているが、研究の多くは発酵原料として紅茶を用いたものであり、日本独自の伝統飲料である緑茶の例は多くない。また、Kombucha の発酵では、発酵スターターとして scooby が継代的に用いられてきた。しかし、混合培養系であるため、培養条件の変化で菌叢の菌種構成や存在比が変化しやすい。結果的に、得られる発酵物の成分や機能性に関する結果も異なり、再現性も低くなると考えられる。

そこで、本研究では研究例に乏しい緑茶に注目し、酵母と酢酸菌の組合せや発酵条件を定めた上で、緑茶を発酵させ、これらの条件が発酵緑茶の有機酸等の成分や生理機能性(抗酸化性)に及ぼす影響について検討した。

2. 実験方法

2.1 酵母及び酢酸菌

酵母として 17 株、酢酸菌として 12 株を用いた。使用した酢酸菌及び酵母のリストを表 1 に示す。酵母は、

YM 液体培地(グルコース(Glc)10 g/L、ペプトン 5 g/L、酵母エキス 3 g/L、麦芽エキス 3 g/L、pH6.0)で 3 日間、30°C で静置培養した。培養後、遠心分離によって集菌したものを滅菌生理食塩水に懸濁して、酵母懸濁液とした。酢酸菌は、GYP 平板培地(Glc30 g/L、ペプトン 2 g/L、酵母エキス 5 g/L、寒天 40 g/L、pH6.0)で 3 日間、30°C で培養した。生育したコロニーを白金耳で掻き集め、滅菌生理食塩水に懸濁して酢酸菌懸濁液とした。特に述べない限り、酵母及び酢酸菌の懸濁液は、吸光度がそれぞれ OD₆₀₀=0.5 及び 0.2 となるように調製した。

表 1 使用した酵母と酢酸菌

| 略号 | 菌名 | 備考 |
|------------|---|-----------------|
| 酵母 | | |
| Z1130 | <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> NBRC1130 | 耐塩性、醤油用酵母 |
| Z0488 | <i>Z. pseudobailii</i> NBRC0488 | 耐塩性、醤油用酵母 |
| F2 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FIA2 | 清酒酵母 |
| F2-2 | <i>S. cerevisiae</i> FIA2-2 | リンゴ酸・コハク酸高生産 |
| F2-11 | <i>S. cerevisiae</i> FIA2-11 | リンゴ酸・コハク酸高生産 |
| K18 | <i>S. cerevisiae</i> K18 | 高香気性 |
| K701 | <i>S. cerevisiae</i> Kyokai701 | 清酒酵母 |
| K901 | <i>S. cerevisiae</i> Kyokai901 | 清酒酵母 |
| OKY14 | <i>S. cerevisiae</i> OKY14 | 桜の花から分離 |
| Nissin | <i>S. cerevisiae</i> Nissin | パン酵母 |
| OC2 | <i>S. cerevisiae</i> OC2 | ワイン酵母 |
| C0622 | <i>Candida glabrata</i> NBRC0622 | 耐塩性、醤油用酵母 |
| D0855 | <i>Debaryomyces hansenii</i> NBRC0855 | 醤油用酵母 |
| K1777 | <i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC1777 | エタノール発酵性 |
| K36907 | <i>K. marxianus</i> ATCC36907 | エタノール発酵性 |
| K1267 | <i>K. lactis</i> NBRC1267 | 乳糖発酵性 |
| Kcan1 | <i>K. lactis</i> cantal1 | 乳糖発酵性、チーズから分離 |
| 酢酸菌 | | |
| A3281 | <i>Acetobacter aceti</i> NBRC3281 | |
| A3191 | <i>A. pasteurianus</i> NBRC3191 | |
| MiA1 | <i>A. pasteurianus</i> MiA1 | 食酢から分離 |
| 微2号 | <i>A. pasteurianus</i> No.2 | |
| TC1 | <i>A. pasteurianus</i> TC1 | 食酢から分離 |
| OKA5 | <i>A. tropicalis</i> OKA5 | 37°C で生育可 |
| AA1 | <i>Gluconacetobacter xylinus</i> AA1 | セルロース生成、食酢から分離 |
| YM1 | <i>Komagataeibacter europaeus</i> YM1 | セルロース生成、食酢から分離 |
| A13693 | <i>Komagataeibacter xylinus</i> NBRC13693 | セルロース生成 |
| MiA3 | <i>Gluconacetobacter xylinus</i> MiA3 | セルロース非生成、食酢から分離 |
| G3290 | <i>Gluconobacter frateurii</i> NBRC3290 | |
| G12528 | <i>Gluconobacter oxydans</i> NBRC12528 | |

*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室(現保蔵包装技術室) *2 中部大学応用生物学部

2.2 緑茶培地の調製

緑茶の中でも日常的に飲まれ、カテキン含有量も多い煎茶を発酵原料として使用した。煎茶(静岡県産)の茶葉 10 g 当たり 90°C の精製水を 200 mL 注ぎ、時々かき混ぜながら 5 分間抽出したものをろ紙でろ過後、オートクレーブ殺菌をした。これに、別途滅菌した Suc、Glc、またはフルクトース(Fru)を所定量添加後、100 mL 当たり茶葉 2 g 相当の濃度となるように滅菌水を加えて、糖含有緑茶培地とした。

2.3 緑茶培地での培養

糖含有緑茶培地を試験管に入れ、培地の 1/10 量の酵母懸濁液及び酢酸菌懸濁液を添加した後、30°C で培養した。特に述べない限り、培養は 2 週間静置で行った。

2.4 培養液(発酵緑茶)の分析

培養液をメンブランフィルター(孔径 0.45 μm 、酢酸セルロース製)にてろ過後、各種分析に供した。糖やエタノール(EtOH)含量は、KS-801 カラム(昭和電工(株)製)を用いた HPLC 法により測定した。有機酸含量は、有機酸分析システム((株)島津製作所)にて測定した。カテキン含量は ODS カラムを用いた HPLC 法により測定した³⁾。DPPH ラジカル消去活性は、沖の方法⁴⁾に従って測定し、培養液当たりのトロロックス相当量(nmol-TE/ μL)に換算した。

3. 実験結果及び考察

3.1 単独培養

酵母と酢酸菌の混合培養に用いる菌株の選択を行うため、各菌の緑茶培地での増殖特性を調べた。Suc を 2% 含む緑茶培地に酵母を単独で接種して、30°C で 1 週間の静置培養を行った。培養後の糖、EtOH 及び有機酸量を測定した結果を図 1 に示す。本研究で用いた *Candida* 属(C0622)や *Zygosaccharomyces* 属(Z0488、Z1130)の酵母は、単独培養では緑茶培地において Suc をほとんど代謝せず、有機酸もほとんど生成しなかった。*S. cerevisiae* は、いずれの株も Suc を代謝して著量の EtOH、及びリンゴ酸(Malic)、コハク酸(Succi)、酢酸(AcOH)を生成したが、Fru が残存した。*S. cerevisiae* の中でも特に F2-11 は、Malic や Succi を多く生成した。*K. marxianus* (K1777、K36907)は著量の EtOH を生成したが、*S. cerevisiae* と異なり Fru は残存せず、AcOH を比較的多く生成した。興味深いことに、*K. lactis* (K1267、Kcan1)では、Suc の一部が少量の EtOH に変換されたものの、大部分の Suc は加水分解されて Glc 及び Fru として残存した。カテキン類については、緑茶培地調製時のオートクレーブ殺菌により、緑茶の主要なカテキン類であるエピガロカテキンガレート(EGCG)やエ

ピカテキンガレート(EGC)が大幅に減少し、代わりにガロカテキンやガロカテキンガレート(GCG)、カテキンガレートが増加した(図示せず)。これらのカテキン類の含量は、D0855 以外の酵母では培養後も変化しなかった。D0855 では、EGCG や GCG が減少し、没食子酸と EGC が増加した。また、Glc や Fru を含む緑茶培地においても、有機酸の生成は Suc 含有培地と同様の傾向を示した。緑茶培地の DPPH ラジカル消去活性 (20.8 nmol-TE/ μL)は酵母の培養に良く用いられる麹汁培地 (0.08 nmol-TE/ μL)よりも 200 倍以上高いが、酵母の培養による活性の増減は認められなかった(図示せず)。

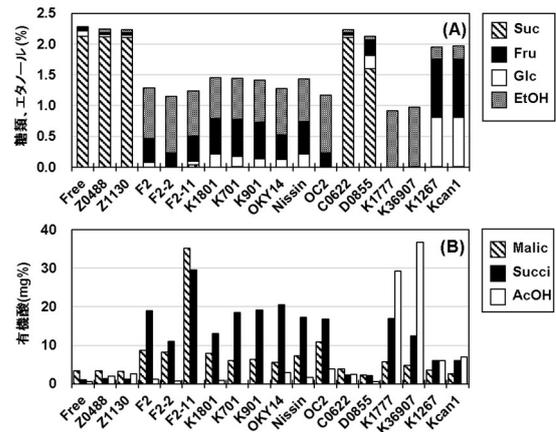


図 1 2% Suc 含有緑茶培地における酵母の生育 (A) 糖、エタノール、(B) 有機酸類

酢酸菌について同様に単独培養を行ったところ、Suc や Fru 含有緑茶培地では、いずれの酢酸菌も増殖が悪く、これらの糖をほとんど代謝しなかった(図示せず)。一方、Glc 含有緑茶培地では、*Komagataeibacter*、*Gluconacetobacter*、*Gluconobacter* 属の酢酸菌で Glc の代謝が比較的良く、グルコン酸(Glcn)と微量のグルクロン酸(Glcr)を生成した(図示せず)。また、*Komagataeibacter* と *Gluconacetobacter* 属(MiA3 を除く)の酢酸菌は、培養液表面にゲル状の菌膜を形成した。次に、酵母との混合培養による EtOH 生成を想定して、2% Glc 含有緑茶培地に EtOH を 0.5% となるように添加して酢酸菌を培養した。図 2 に培養後の各成分の濃度を示す。A3281、AA1、YM1、MiA3、A13693、G3290 及び G12528 が、Glc から少量ではあるが Glcr を生成した。Glcn は多くの酢酸菌で生成したが、A3281、OKA5、MiA3 では低かった。EtOH からの AcOH 生成は、OKA5 と AA1 が低かった。また、カテキン含量や DPPH ラジカル消去活性については、酵母と同様に酢酸菌の培養による増減は認められなかった。

これらの結果を踏まえて、酵母として、EtOH とともに Malic や Succi を比較的多く生成する F2-11 と、Suc

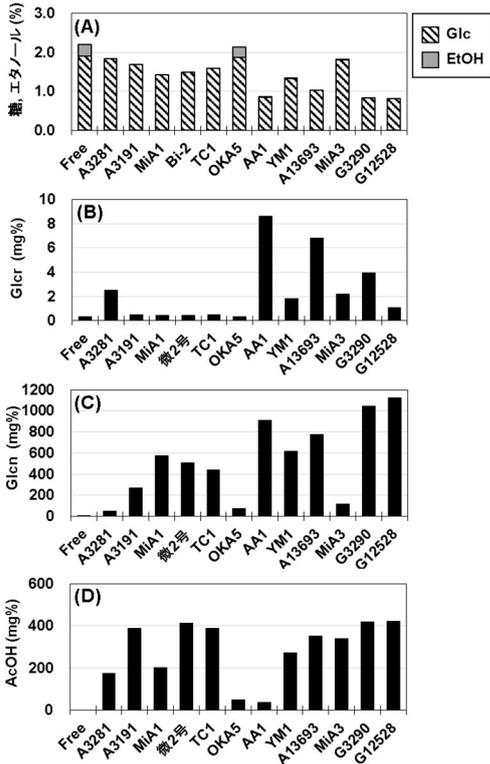


図 2 2% Glc 含有緑茶培地における酢酸菌の生育 (A) 糖、エタノール、(B) グルクロン酸、(C) グルコン酸、(D) 酢酸

を加水分解して Glc と Fru にするがこれらの糖をあまり代謝しない Kcan1 を選択した。酢酸菌としては、Glc から Glcn と Gler を多く生成する AA1 と、Glc から Gler はあまり作らず Glcn を顕著に生成する G12528、対照として A3281 の 3 株を選択した。これらの菌株を組み合わせることによって、Malic、Succi、Glc、Gler、AcOH の含量を変化させることができると期待された。

3.2 酵母と酢酸菌の混合培養

3.1 の結果を基に選択した酵母 2 株(F2-11、Kcan1)と酢酸菌 3 株(A3281、AA1、G12528)を組み合わせ、2% Suc 含有緑茶培地における発酵特性を評価した。図 3 に培養経過の一例を示す。F2-11 の単独培養の結果から予想されたように、F2-11 と AA1 の組合せでは、酵母により Suc が Glc と Fru に加水分解され、Glc と Fru の減少とともに EtOH が増加した。並行して Malic と Succi が増加した。Glc が酵母に優先的に消費されたためか、Gler や Glcn の生成量は少なかった。一方、Kcan1 との組み合わせでは、Kcan1 により Suc が加水分解されて生成した Glc が培養経過とともに減少し、代わりに Gler と Glcn が大きく増加した。

緑茶培地中の糖を 2% Suc、8% Suc または 2% Glc として、2 週間静置培養後の有機酸生成を比較した(図 4)。糖の種類や濃度に関わらず、酢酸菌として A3281 や AA1 を用いた試験区で Gler 含量が高かった。興味深い

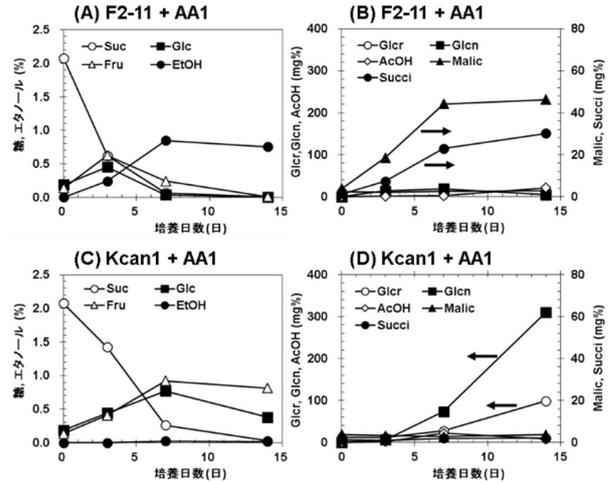


図 3 2% Suc 含有緑茶培地における酵母と酢酸菌の混合培養 (A, B) F2-11+AA1、(C, D) Kcan1+AA1 (A, C) 糖、エタノール、(B, D) 有機酸類

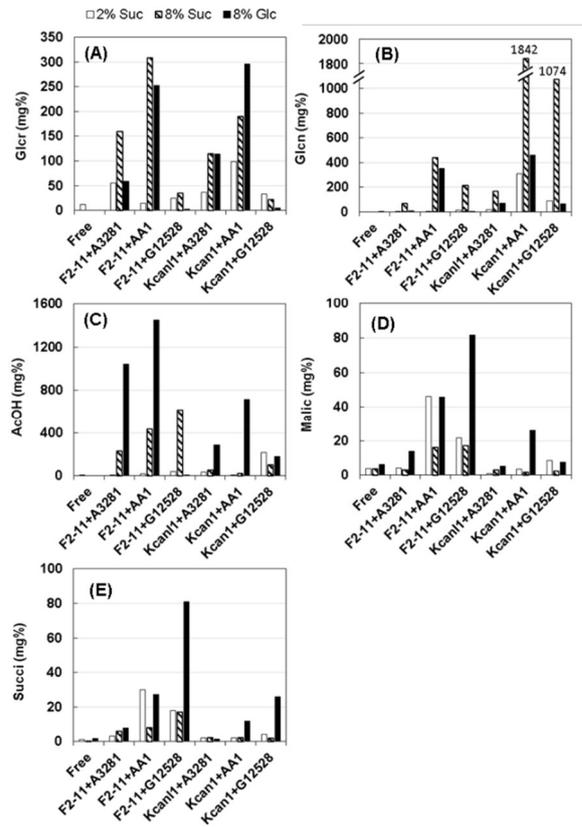


図 4 糖含有緑茶培地 (2% Suc、8% Suc、又は 8% Glc 含有)における酵母と酢酸菌の混合培養 (A) グルクロン酸、(B) グルコン酸、(C) 酢酸、(D) リンゴ酸、(E) コハク酸

ことに、単独培養(図 2)と比較して、培地の糖濃度や糖組成にも依るが、A3281 では Gler が 2.5mg%から 50~150mg%まで増加し、AA1 では、8.6mg%から 14~300mg%にまで大幅に増加した。

Glcen に関しては、Kcan1 と組み合わせた AA1 や

G12528 の試験区において、Glc 含有培地での AA1 や G12528 の単独培養と同程度の高い値が得られた。これは、Kcan1 による Suc の加水分解で生成した Glc がそのまま酢酸菌に利用されたためと考えられた。F2-11 との組合せで Glen 生成量がそれほど高くなかったのは、F2-11 による Suc から EtOH の変換により酢酸菌の利用できる Glc が少なくなったためと考えられた。このことは F2-11 との組合せで酢酸の生成量が多いことと一致する。また、単独培養の結果から予測されたように Malic や Succin 生成量は F2-11 との組合せで比較的高かったが、酢酸菌の種類により多少の差がみられた。Acetobacter 属や Gluconacetobacter 属の酢酸菌は、AcOH や Succin 等の有機酸を TCA 回路を経由して代謝するが、Gluconobacter 属の酢酸菌はコハク酸脱水素酵素が欠失しているため、これらの有機酸を代謝することができない。このことが、同じ F2-11 を用いているにも関わらず、組み合わせる酢酸菌によって Malic や Succin の生成量が異なった理由の一つかもしれない。また、今回の酵母 2 株と酢酸菌 3 株の組合せにおいて、カテキン類の含量や DPPH ラジカル消去活性は、培養前の緑茶培地と同等であり、培養によって変化しなかった。

3.3 混合培養における酵母と酢酸菌の接種量

酵母と酢酸菌の接種量(標準条件では、OD₆₀₀として酵母/酢酸菌比 = 4/10)の影響を調べた。Glc 生成量は、Kcan1 よりも F2-11 との混合培養の方が高い傾向が得られた(図示せず)。逆に Glen 生成量は、Kcan1 との組合せの方が高くなった。F2-11 と酢酸菌の組合せにのみ酢酸が生成したのは、Kcan1 では EtOH の生成量が低いためと考えられた(図 1)。しかし、酵母と酢酸菌の量比は、今回の範囲では有機酸生成に影響を及ぼしているようには見えなかった。

3.4 緑茶培地の緑茶濃度

緑茶のカテキン類には抗菌活性があることから、酵母や酢酸菌の増殖に影響を及ぼすことが考えられる。そこで、糖含有緑茶培地(5% Suc、2% Glc 及び 2% Fru 含有)

に使用された茶葉の量を通常(培地 100 mL 当たり 2 g 使用)、通常の半分(1 g 使用) 及び 2 倍(5 g 使用)の 3 通りで混合培養を行った。いずれの微生物の組合せでも、茶葉の使用量が多くなるにつれて、糖消費は大きくなったが、有機酸生成への影響は少なかった(図示せず)。

4. 結び

本研究の結果は、以下のとおりである。

- (1) 糖の資化性や有機酸生成能を指標に、酵母として F2-11、Kcan1 の 2 株、酢酸菌として A3281、AA1、G12528 の 3 株を選別し、これらの酵母と酢酸菌の混合培養による糖添加緑茶培地の発酵条件について検討した。
- (2) 単独培養に比べて、混合培養によってグルクロン酸量が増大した。
- (3) 酵母と酢酸菌の菌株の組合せや添加糖の組成により、発酵緑茶の有機酸組成を変えることができた。
- (4) 緑茶に含まれるカテキン類の組成や抗酸化性は、菌株や発酵条件の違いでは変化しなかった。

付記

本研究は、公益財団法人飯島藤十郎記念食品科学振興財団の 2020 年度研究助成を受けて実施した。

文献

- 1) C. Dufresne, E. Farnworth: *Food Res. Int.*, **33**, 409(2000)
- 2) J. M. Leal, L. V. Suárez, R. Jayabalan, R. O. J. Huerta, A. Escalante-Aburto: *CYTA J. Food*, **16**, 390(2018)
- 3) 山本(前田)万里:「食品機能性評価マニュアル集第 I 集(改訂 2 版)」, 10(2009), 日本食品科学工学会
- 4) 沖智之:「食品機能性評価マニュアル集第 II 集」, 71(2008), 日本食品科学工学会