

混合乳酸菌スターターの開発とグラム陽性菌の生育阻止

加藤丈雄^{*1}、矢野未右紀^{*1}、長谷川渚^{*1}、鳥居貴佳^{*1}、山本晃司^{*1}、深谷伊和男^{*2}

Development of Mixed Lactic Acid Bacteria Starter Cultures and Inhibition of Gram-positive Bacteria

Takeo KATO, Miyuki YANO, Nagisa HASEGAWA, Takayoshi TORII,
Koji YAMAMOTO and Iwao FUKAYA

Food Research Center, AITEC^{*1} Principal Researcher^{*2}

混合乳酸菌スターターを使用して野菜サラダを乳酸発酵した結果、汚染細菌の生育は完全に阻止された。乳酸発酵を停止するために加熱殺菌し、30℃で保存試験を行った結果、28日後においても汚染菌は検出されなかった。豆味噌麹から分離した乳酸菌（2株）をスターターとして溜を調製した結果、麹及び調味中の汚染細菌の生育は完全に阻止された。

1. はじめに

現在、食品にはかつてないほど厳しい衛生管理と品質管理が要求されている。さらに、食品保存料の低減化、低塩・低糖化、非加熱殺菌（もしくは不完全な殺菌）などの要求により、食品の安全性確保はますます困難になっている。食品の製造プロセスに乳酸菌によるバイオリザベーションを導入することにより、有害細菌の生育阻止による安全性の確立と品質の向上が可能となる¹⁻³⁾。本研究では、混合乳酸菌スターターを用いて、野菜サラダ及び溜（溜醤油）を汚染するグラム陽性細菌の生育阻止を行った。

2. 実験方法

2.1 試料

野菜サラダの原材料として、ジャガイモ、ニンジン、タマネギを使用した。各野菜は細切後、水煮した。放冷後、滅菌したポリエチレンフィルムに充填し、使用するまで-30℃で保存した。

溜の原材料として、脱脂加工大豆及び焙炒割砕小麦を使用した。

乳酸菌として、*Leuconostoc* sp. D-133、*Lactobacillus casei* L-14及び豆味噌麹から分離した *Leuconostoc* sp. と *Pediococcus* sp. を使用した。

2.2 乳酸発酵野菜サラダの調製

凍結保存したジャガイモを解凍し、乳鉢で摩砕してマッシュポテトとした。これに混合乳酸菌 (*Leuc.* sp. D-133, *Lb. casei* L-14, 1:1) を 10^7 cfu/g となるように接種した。十分に攪拌した後、解凍したニンジンとタマネギを添加して攪拌した。これを滅菌したポリエチレン袋に密

封包装し、30℃で24時間培養し乳酸発酵野菜サラダを調製した。さらに一部のサラダは70℃で30分加熱殺菌し、30℃で28日間保存試験を行った。

2.3 乳酸発酵溜の調製

脱脂加工大豆に等量の水を加えて5℃で一晩浸漬し、120℃で60分加熱殺菌した。放冷後、大豆重量の20%の焙炒割砕小麦を添加し十分に攪拌した。次に、味噌麹分離菌の混合乳酸菌 (*Leuconostoc* sp. : *Pediococcus* sp., 1:1) を 10^7 cfu/g となるように接種し、30℃で乳酸発酵と製麹を同時に行った。乳酸発酵麹について、目標塩分が18%となるように13水仕込みを行って溜もろみを調製した。溜もろみは、滅菌したポリエチレン袋に密封包装し、30℃で培養（熟成）した。

2.4 微生物測定

一般細菌数は Nutrient agar (Difco, U.S.A.) を使用して測定した。乳酸菌数は MRS agar を使用して測定した。

3. 実験結果

3.1 乳酸発酵野菜サラダの微生物変化と保存試験について

表 1-a に乳酸発酵野菜サラダの微生物変化を示した。乳酸菌は培養 24 時間で 10^8 cfu/g 以上に増殖し、サラダの pH は 4.0 に低下した。一方、最初 10^6 cfu/g 存在した一般細菌（グラム陽性菌）は、乳酸発酵により検出限界以下となった。なお、乳酸発酵しないサラダは、一般細菌数が 10^8 cfu/g となり腐敗した（データ省略）。

表 1-b に乳酸発酵を停止するために加熱殺菌して、30℃で保存したサラダの微生物変化を示した。乳酸発酵野菜サラダは 28 日間保存しても微生物はまったく検出され

*1 食品工業技術センター 発酵技術室 *2 統括研究員

表1 野菜サラダの乳酸発酵と保存試験

a) 乳酸発酵

	培養時間(時間)	
	0	24
一般細菌数	1.0x10 ²	<100
乳酸菌数	1.7x10 ⁷	2.1x10 ⁹
pH	4.8	4.0

保存温度:30°C.

b) 保存試験

	培養時間(日)				
	0	7	14	21	28
一般細菌数	<100	<100	<100	<100	<100
乳酸菌数	<100	<100	<100	<100	<100
pH	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1

加熱殺菌:70°C, 30分. 保存温度: 30°C.

なかった。なお、乳酸発酵しないサラダは保存2日後に腐敗した(データ省略)。したがって、乳酸発酵は野菜サラダの保存性向上に極めて効果的であることが明らかとなった。使用した乳酸菌はバクテリオシン生産菌ではないため、抗菌活性は乳酸や酢酸などの有機酸によると考えられた。なお、サラダのpHは4.1と低く、サラダとしてはやや酸っぱく感じられた。したがって、乳酸発酵時間を一晚程度に短縮する必要が認められた。

表2 溜の乳酸発酵

a) 乳酸発酵と製麹

	培養時間(時間)		
	0	24	48
一般細菌数	1.0x10 ²	<100	<100
乳酸菌数	1.7x10 ⁷	2.1x10 ⁹	3.0x10 ¹⁰
pH	6.1	4.6	5.6

培養温度: 30°C.

b) もろみの熟成

	培養時間(週)				
	0	1	2	3	4
一般細菌数	7.1x10 ⁹	1.4x10 ⁹	1.8x10 ⁸	<100	<100
乳酸菌数	<100	<100	<100	<100	<100
pH	5.9	6.1	6.1	6.0	5.9

培養温度: 30°C.

3.2 乳酸発酵溜の微生物変化について

表2-aに乳酸発酵・製麹中の微生物変化を示した。乳酸菌は培養24時間で10⁹cfu/gに増殖した。一般細菌数は検出限界以下であった。なお、乳酸菌を接種しないと一般細菌は10⁵⁻⁶cfu/g程度検出された。また、乳酸発酵は麹菌の生育に影響せず、良好な麹が得られた。

表2-bに諸味熟成中の微生物変化を示した。乳酸菌は徐々に死滅し、3週間後には検出限界以下となった。このことによりもろみの過度のpH低下は生じなかった。一般細菌数は検出限界以下であった。6か月間熟成した溜もろみは良好な風味を呈した。*Leuconostoc* sp. と *Pediococcus* sp. はナイシン生産菌 (*Lactococcus lactis* IF012007) よりも強い抗菌活性を示した。これら乳酸菌の生産する抗菌性物質については、バクテリオシンではないことが示唆されている。麹の生育に影響しないことから酢酸ではないと考えられ、乳酸ではこの様な高い抗菌活性を発揮しない。抗菌性物質の実態については不明であり、今後の検討が必要である。

4. 結び

混合乳酸菌スターターを使用して野菜サラダを調製した結果、汚染細菌の完全生育阻止が可能であった。また、野菜サラダは30で4週間以上の高い保存性を示した。

豆味噌麹から分離した乳酸菌を使用して溜を調製した結果、溜麹及び溜もろみ中の汚染細菌の生育を完全に阻止することができた。以上のように、乳酸菌を利用した(バイオプリザベーションによる)食品中の汚染細菌の生育阻止が可能である事が実証された。

文献

- 1) 松田敏生: バイオプリザベーション, 乳酸菌による食品微生物制御, P1 (1999), 幸書房
- 2) 松田敏生: 食品の非加熱殺菌ハンドブック, P181 (2001), サイエンスフォーラム
- 3) 森地敏樹: 食科工, 49, 207 (2002)