

植物発酵エキスの熟成過程における菌叢解析と攪拌の影響

能登裕子・中川良二・八十川大輔・長島浩二・福士宗光*

Microflora Analysis and Influence of Stirring on Maturation Process of Fermented Extract Made from Plants

Hiroko NOTO, Ryoji NAKAGAWA, Daisuke YASOKAWA,
Koji NAGASHIMA and Munemitsu FUKUSHI*

Recently, consumers have been showing more concern about health and there is a growing market for health related food and drinks. We have studied a fermented soft drink made from vegetables and elucidated some microbial properties during fermentation and maturation. Some instability in fermentation was found and improvements in the fermentation process were considered.

In the present study, we produced fermented extract made from several plants, such as vegetables and mushroom, with stirring once a day and without stirring, and compared their microbial floras, organic acids and pH through fermentation and maturation. Throughout the fermentation and maturation, the number of microorganisms, especially acid-producing bacteria, of the stirred sample were remarkably less than without stirring. From the sample without stirring, we isolated *Staphylococcus* sp. and *Lactobacillus* sp., which may be major lactic acid-producing bacteria. Those strains were not isolated from the sample with stirring, and lactic acid content was much lower in the aerated sample than in the unstirred sample. Those data indicated that aeration to microorganisms during the fermentation was not beneficial to quality.

近年の健康志向により、様々な健康食品や清涼飲料水が販売されている。ここで取り上げたケルプ研究所が製造するF&Eは、数十種類の植物から糖抽出したエキスを数ヶ月発酵させた植物発酵エキス飲料（発酵清涼飲料水）である。本製品は、肝機能障害を有する患者、特に高脂血症あるいはアルコール性肝炎など食生活との関連の強い患者群に有効であることなどの健康機能が示されている¹⁾。また、本製品は昆布エキスなどを含み高血圧や糖尿病予防に適した飲料としても販売されている。しかしながら、これまで本製品の発酵過程における微生物の動態に関しては、明確にはなっていない。さらに、発酵の制御は経験に頼る部分が多く、その科学的なデータは示されていない。

そこで、本研究ではF&Eの原料となる植物発酵エキスの熟成過程での微生物の動態及び発酵熟成時における攪拌操作の影響について調べた。

実験方法

1. エキスの製造

一定の大きさに裁断した植物原料（数十種類の野菜などを含む）に約30%の砂糖を混合して樽に漬け込み（これを仕込みという）、冷蔵庫に1週間放置した。これを網で漉して濾液を発酵樽に移し、37°Cの発酵室で発酵熟成させた（これを熟成という）。

熟成過程における攪拌の影響を明らかにするために、濾液を2つの発酵樽に分け、一方は攪拌せず（方法A）、

* 株式会社ケルプ研究所（〒002-8081 札幌市北区百合が原10-8-1）

事業名：受託研究

課題名：植物を原料とする発酵清涼飲料水の研究

他方は一日一回充分に攪拌し（方法 B），熟成を行った。

2. サンプリング

濾過した日を熟成期間 0 日目とし，10 日目まで毎日濾液のサンプリングを行った。その後 5 日毎にサンプリングし，30 日目までサンプリングを行った。

3. 菌数測定

一般生菌数は標準寒天培地（以下 SPC と表記）を用いて 35°C で 48 時間培養し測定した。酸生成菌数は BCP 加プレートカウント培地（以下 BCP と表記）を用いて 35°C で 48 時間培養し測定した。真菌数はクロラムフェニコール添加ポテトデキストロース寒天培地（以下 PDA と表記）を用いて 35°C で 96 時間培養した。それぞれの培地上に出現したコロニーを計数し，各菌数を cfu/ml として表した。

4. 細菌同定

SPC, BCP, MRS 培地（35°C, 48 時間培養）以下 MRS と表記）及び PDA 上に出現したコロニーをそれぞれ 4 個ずつ菌し，細菌は，16 S rRNA 遺伝子配列に基づいた方法²⁾により菌種の同定を行った。真菌については，Haugland ら³⁾のガラスビーズ法に基づいて抽出した DNA と 64 F primer: GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 及び 636 R primer: GGTCCTGTTTCAAGACGG を用いて 28 S rRNA 遺伝子の一部を PCR により増幅し，その塩基配列に基づいて同定した。当該遺伝子の PCR 増幅は，94°C 1 分の前処理の後，94°C 30 秒，52°C 30 秒，72°C 30 秒のサイクルを 35 回繰り返すことで行った。同遺伝子の塩基配列は，64 F primer と BigDye Terminator FS ver.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて決定した。得られた塩基配列を National Center for Biotechnology Information のデータベースと照合し，一致率の最も高い菌種を同定菌種とした。

5. その他の分析

有機酸（クエン酸，リンゴ酸，乳酸，酢酸，コハク酸）は OA-pack カラムを装備した HPLC（東ソー）を用いて測定した。

pH は pH メーター（堀場製作所）を用いて測定した。アルコール濃度は，F キット (Roche)⁴⁾⁵⁾を用いて測定した。

実験結果

1. 熟成時における菌数の変化

図 1 に，方法 A により熟成させた試料の一般生菌数，酸生成菌数及び真菌数の熟成期間中の推移を示した。一

般生菌，酸生成菌及び真菌の各菌数は 4 日目に最大になり，その値は何れも約 7.0 log [cfu/ml] であった。その後 20 日目（約 3.5 log [cfu/ml]）まで穏やかに減少した。

図 2 には，方法 B により熟成させた試料について同様に各菌数の推移を示した。一般生菌数，真菌数は 3 日目，酸生成菌数は，5 日目に最大となり，それぞれ約 4.5 log [cfu/ml]，約 6.3 log [cfu/ml]，約 4.0 log [cfu/ml] であった。6 日目以降は穏やかに減少し，20 日目には約 1.5 log [cfu/ml]，約 0.8 log [cfu/ml]，約 1.2 log [cfu/ml] となった。

2. 主要菌の解明

エキス熟成期間中の菌相を明らかにするために，各サンプリング日のエキスの菌数検査において SPC, BCP, MRS 及び PDA 上に出現したコロニーを各 4 個ずつ約

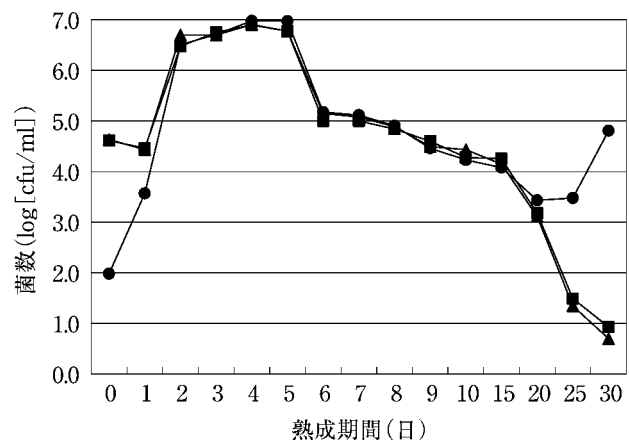


図 1 方法 A により熟成させたサンプルの菌数の変化

■ 一般生菌 ▲ 酸生成菌 (BCP) ● 真菌

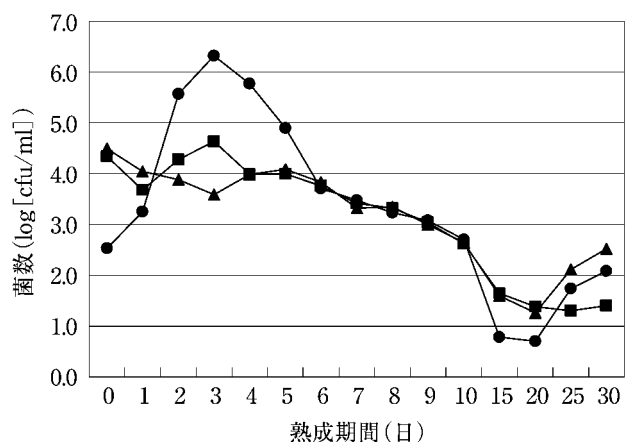


図 2 方法 B により熟成させたサンプルの菌数の変化

■ 一般生菌 ▲ 酸生成菌 (BCP) ● 真菌

菌し, SPC, BCP, MRS 出現コロニーについては細菌 16 SrRNA 遺伝子増幅用プライマーを用いて, PDA 出現コロニーについては真菌 28 SrRNA 遺伝子増幅用プライマーを用いて PCR を行ったが, 増幅産物が得られない場合があった。これは, 前者の細菌用培地に酵母が, 後者の真菌用培地に細菌が生育していたためと思われた。このため, 解析可能であったコロニーの数は十分とは言えないが, 方法 A によって製造した異なる 2 ロットにつ

いての解析結果を考慮すると, 表 1 の結果は本エキスのサンプリング日における優性菌種をかなり良く反映していると考えられた。方法 A の 0 日目では, 原料の野菜に付着していたと推定される様々な菌種が検出されたが, 2 日目には *Staphylococcus* 属細菌 (乳酸及び酢酸生成菌) や *Pichia* 属酵母が優性となり, 4 日目から 8 日目頃には, *Pichia* 属酵母が最優性となるように思われた。8 日目頃から *Saccharomyces* 属酵母が優勢菌となり始め,

表 1 微生物同定結果

熟成期間	菌種	培地	コロニー数	一致率	熟成期間	菌種	培地	コロニー数	一致率	
方法 A	<i>Pantoea</i> sp.	SPC	3	99%	8 日	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PDA	1	99%	
		BCP	1	98%		<i>Pichia anomala</i>	PDA	3	99%	
	<i>Serratia plymuthica</i>	SPC	1	99%	10 日	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS	3	97%	
	<i>Enterobacter</i> sp.	BCP	2	99%		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PDA	2	99%	
		MRS	1	99%	<i>Pichia anomala</i>	PDA	2	99%		
	0 日	<i>Escherichia senegalensis</i>	BCP	1	99%	15 日	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS	3	99%
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MRS	2	99%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		PDA	4	99%	
	2 日	<i>Pantoea agglomerans</i>	MRS	1	99%	20 日	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS	3	95%
		<i>Lecythophora hoffmannii</i>	PDA	1	99%		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PDA	4	99%
	4 日	<i>Pichia anomala</i>	PDA	1	99%	25 日	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	MRS	1	95%
		<i>Staphylococcus succinus</i>	SPC	1	99%		<i>Zygosaccharomyces pseudorouxii</i>	PDA	2	98%
	6 日	<i>Pichia anomala</i>	PDA	3	99%	30 日	<i>Bacillus</i> sp.	SPC	4	97%
		<i>Torulaspota delbrueckii</i>	PDA	1	99%		<i>Paenibacillus</i> sp.	BCP	1	98%
	方法 B	<i>Pantoea</i> sp.	SPC	2	99%	6 日	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PDA	2	96%
BCP			2	99%	8 日	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PDA	2	97%	
<i>Pantoea agglomerans</i>		BCP	1	100%	10 日	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PDA	4	99%	
0 日		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	SPC	1	99%	15 日	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PDA	4	99%
<i>Enterobacter</i> sp.		SPC	1	99%	20 日	<i>Bacillus arbutinivorans</i>	SPC	1	97%	
		MRS	2	99%		<i>Bacillus anthracis</i>	SPC	1	100%	
<i>Enterobacter cancerogenus</i>		BCP	1	99%	<i>Bacillus senegalensis</i>	SPC	1	95%		
<i>Klebsiella</i> sp.		MRS	1	99%	25 日	<i>Bacillus</i> sp.	SPC	1	100%	
		SPC	2	99%		<i>Bacillus</i> sp.	BCP	2	99%	
2 日		<i>Enterobacter</i> sp.	BCP	1	99%	<i>Bacillus cereus</i>	BCP	1	99%	
		<i>Pantoea</i> sp.	SPC	2	99%	<i>Zygosaccharomyces pseudorouxii</i>	PDA	1	100%	
4 日		<i>Pantoea agglomerans</i>	BCP	2	99%	30 日	<i>Bacillus</i> sp.	SPC	2	99%
		<i>Pichia anomala</i>	PDA	1	95%		<i>Bacillus niacini</i>	SPC	1	95%
6 日		<i>Candida lactis-condensi</i>	PDA	1	97%	25 日	<i>Bacillus</i> sp.	SPC	1	98%
	<i>Enterobacter</i> sp.	SPC	1	99%	<i>Paenibacillus</i> sp.		BCP	2	98%	
8 日	<i>Enterobacter</i> sp.	BCP	2	99%	30 日	<i>Bacillus</i> sp.	SPC	2	98%	
	<i>Pantoea</i> sp.	SPC	2	99%		<i>Bacillus arbutinivorans</i>	SPC	1	97%	
10 日	<i>Candida lactis-condensi</i>	PDA	1	95%	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	BCP	1	98%		

10日目から20日目頃には酵母では *Saccharomyces* 属酵母が、細菌では *Lactobacillus* 属乳酸菌等が最優性となるようであった。その後は、*Bacillus* 属細菌(芽胞形成細菌)や *Zygosaccharomyces* 属酵母が優勢となるようであった。

一方、方法 B においても、方法 A と同様に 0 日目は原料由来の様々な菌種が検出されるが、2日目から4日目では *Enterobacter* や *Pantoea* 属細菌(何れも腸内細菌科)及び *Pichia* や *Candida* 属酵母が優勢となり、6日目以降15日目頃までは *Saccharomyces* 属酵母が最優勢菌種となるようであった。20日目以降は、*Bacillus* 属が優勢菌種となるように思われた。

3. 有機酸量の変化

図3及び図4にそれぞれ方法 A 及び B の熟成期間中の有機酸量変化を示した。方法 A では6日目以降に乳酸

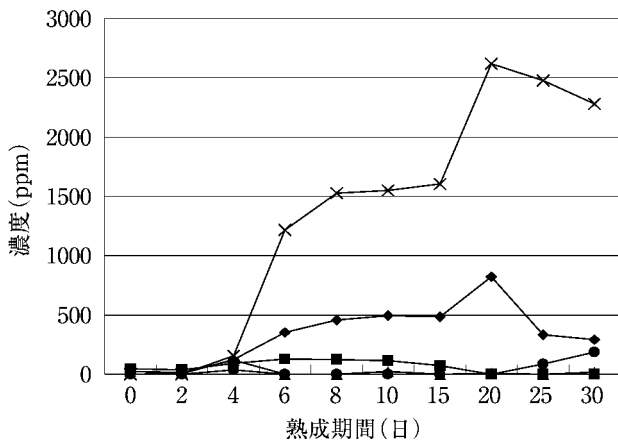


図3 方法 A により熟成させたサンプルの有機酸濃度変化

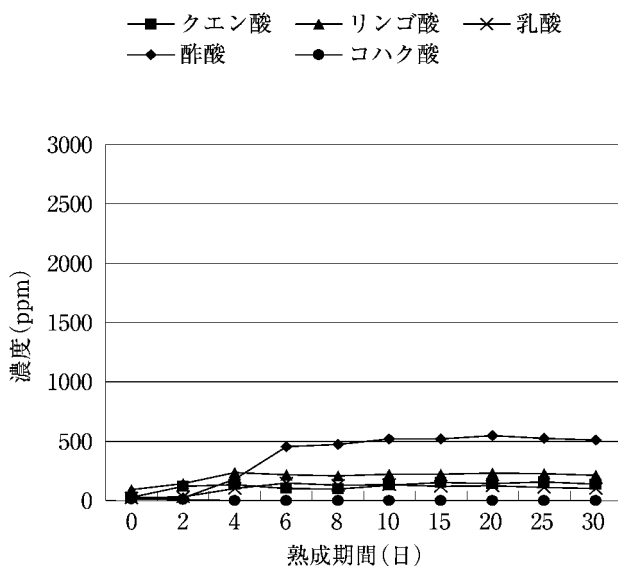


図4 方法 B により熟成させたサンプルの有機酸濃度変化

及び酢酸の生成が顕著となり、何れも20日目に最大となり、2,600及び900 ppm となった。クエン酸、リンゴ酸、コハク酸は非常に少なく、200 ppm 以下であった。

一方、方法 B では全ての有機酸の生成量が少なく、生成量の最も多い酢酸で最大 550 ppm であった。乳酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸は全て 200 ppm 以下であった。

4. pH, アルコール濃度及び液温の変化

表2に方法 A 及び B の熟成期間中の pH, アルコール濃度及びサンプリング時の液温を示した。方法 A での pH は、0 日目では pH 5.7 であったが、25 日目まで低下し続け pH 3.2 まで達した。アルコール濃度はほとんど変化がなく、0.04%程度であった。液温は、3 日目まで上がりきり、その後は 36°C前後で推移した。

一方、方法 B では熟成期間中の pH 低下は方法 A よりも遅く、pH 4 程度までしか下がらなかった。アルコール濃度は 0.04%程度であった。液温は、6 日目で 36°C前後に達した。

考 察

植物発酵エキスは、非攪拌熟成(方法 A)の場合、以下のような過程をへて熟成が進行したと考えられた。8 日目頃までの初期過程において、液温の上昇と共に *Staphylococcus* 属の酸生成細菌や *Pichia* 属や *Saccharomyces* 属の酵母などが増加し、乳酸や酢酸などの有機酸

表2 pH, アルコール濃度及び液温の変化

熟成期間	非攪拌熟成(方法A)			攪拌熟成(方法B)		
	pH	アルコール濃度(g/l)	液温(°C)	pH	アルコール濃度(g/l)	液温(°C)
0日	5.70	0.33	14.0	5.66	0.36	15.5
1日	—	—	25.5	—	—	21.5
2日	5.10	0.40	32.5	5.62	0.44	30.0
3日	—	—	35.0	—	—	32.5
4日	4.59	0.39	35.6	4.73	0.43	34.0
5日	—	—	37.0	—	—	35.5
6日	3.96	0.44	35.0	3.91	0.36	38.0
7日	—	—	36.0	—	—	37.2
8日	3.71	0.37	36.0	3.98	0.33	37.0
9日	—	—	36.4	—	—	37.0
10日	3.63	0.31	37.0	4.05	0.31	36.8
15日	3.66	0.41	35.0	4.08	0.38	36.8
20日	3.43	0.36	37.5	4.09	0.37	37.5
25日	3.20	0.43	36.6	4.09	0.40	36.8
30日	3.28	0.43	36.4	4.07	0.37	36.2

濃度が高まり、その結果として pH が低下した。このような *Staphylococcus* 属細菌の発酵熟成への関与は、魚卵の熟成過程においても示されている⁶⁾。8 日目以降には、*Lactobacillus* 属乳酸菌などの働きによって熟成後期まで乳酸濃度が顕著に増加し、pH がさらに低下するのに伴い、徐々にエキス中の菌が死滅し、20 日目以降には *Bacillus* 属の芽胞形成細菌などが僅かに生残しているだけとなった。したがって、20 日目頃には微生物作用による発酵熟成がほぼ終了したものと推察された。

一方、攪拌熟成（方法 B）の場合、4 日目頃まで主に *Saccharomyces* 属酵母が増加したが、細菌数は初期から徐々に減少した。この間有機酸では酢酸が増加し、乳酸はほとんど生成しなかった。

また、攪拌により酸素が供給されたため、解糖系で止まる代謝プロセスがクエン酸回路（電子伝達系）まで進行し、それにより乳酸が消費され、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸量が方法 A に比べ若干増加した可能性も推察された。

したがって、本飲料の熟成時における発酵という観点（菌数の増加および乳酸生成量の増加）から考えると、熟成時における酸素供給量の増加を伴う攪拌は有効でないと思われる。

要 約

植物を原料とした F&E エキスの熟成過程での微生物の動態および熟成時におけるエキス攪拌操作の影響について調べた。その結果、非攪拌熟成（方法 A）においては、8 日目頃までに乳酸及び酢酸生産細菌である *Staphylococcus* 属細菌や酵母などの真菌数が増加し、乳酸や酢酸の生成とそれに伴う pH の低下が速やかに進行した。その後、*Lactobacillus* 属乳酸菌などの働きによって

熟成後期までさらに乳酸濃度が増加した。

一方、攪拌熟成（方法 B）では、乳酸生成菌の生育が強く抑えられると共に、呼吸活性の増加により生成した乳酸が消費され、そのため乳酸量が非攪拌熟成に比べて著しく低かったと考えられた。このことから、発酵という観点から考えると本飲料の熟成時における攪拌は有効でないと結論された。

文 献

- 1) 梶本修身, 福土宗光, 平田洋, 島田あかね, 食物エキス発酵飲料の肝機能障害患者に対する効果の臨床的検討, 第 1 回日本代替医療学会 (1998).
- 2) 長島浩二, 八十川大輔, 中川良二, 池田隆幸, 塩基配列に基づく細菌同定法の食品マイクロフローラ解析への応用, 食科工, 45, 58-65 (1998).
- 3) Haugland, R.A., Wymer, L.J., and Heckman, J.L., "Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis.", *J. Microbiol. Methods*, 37, (2), 165-176 (1999).
- 4) Beutler, H.O. & Michal, G., Neue Methode zur Enzymatischen Bestimmung von Athanol in Lebensmitteln, *Z. Anal. Chem.* 284, 113-117 (1977).
- 5) Beutler, H.O., in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.), *Verlag Chemie, Weinheim*, Deerfield Beach/Florida, Basel, 3rd, VI, 598-606, (1984)
- 6) 川上誠, 長島浩二, 中川良二, 奥村幸広, 八十川大輔, 魚卵製品における細菌菌種の解析および工程改善, 北海道立食品加工研究センター研究報告, 5, 29-33 (2002).