

# 乳酸菌の生理活性作用の利用\*

## (無塩味噌製造における雑菌増殖抑制に関する研究)

上野義栄 \*\*  
河村真也 \*\*\*  
宮島直人 \*\*  
早川 潔\*\*\*\*

### [要 旨]

食品に血圧抑制機能を付与することを目的とし、酵母を利用した無塩味噌の製造時における糖化中の雑菌増殖抑制法について検討し、無塩味噌の試作を行った。

### 1. 緒 言

乳酸菌は、古来より醸造食品や漬物中に含まれ、その乳酸発酵により食品に風味を付与してきた。特に京都では、酒、味噌、醤油等の醸造食品やすくき等の乳酸発酵による漬物など多くの伝統食品があり、乳酸菌が関与している。この様に古来より伝統的に利用されてきた乳酸菌であるが、麹菌や酵母の様に積極的に微生物制御を行いながら利用されだしたのは近年である。また、乳酸菌が関与する醸造食品中には、様々な生理活性物質が含まれており、乳酸菌が作り出す生理活性物質が最近注目されている。

一方、味噌等の大豆発酵食品には、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害ペプチドによる血圧抑制作用が報告されている<sup>1、2)</sup>。しかし、味噌等に含まれている高塩分のために、その血圧抑制作用が十分に機能していない可能性が高い。

その為筆者らは、塩分を含まない無塩味噌の製

造を目指し、*Zygosaccharomyces rouxii* 等の酵母を接種することによる無塩味噌の製造の検討を行ってきた<sup>3)</sup>。更に、血圧抑制物質である  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 生産乳酸菌の検索を行い<sup>4)</sup>、この GABA 生産乳酸菌を用いて無塩味噌中で GABA を生産することを検討してきた。

本研究では、血圧抑制機能を強化した無塩味噌の製造を行うために、無塩味噌の製造時における雑菌増殖抑制法について検討した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 味噌原料

カナダ産白目中粒大豆、米麹 (水分含量約35%の蒸米に種菌を散布し、常法により42時間製麹したものを) を使用した。

#### 2.2 使用菌株

*Bacillus subtilis* IFO3134

*Zygosaccharomyces rouxii* IAM12880

#### 2.3 *Bacillus* の培養

*B. subtilis* は、Nutrient broth(0.5%肉エキス, 1% Polypeptone, 0.5%NaCl, pH7.0) 30℃、24時間振とう培養を行った。

\* : 本研究報告は、けいはんな RSP 事業可能性試験として実施したものです。

\*\* : 応用技術課技師

\*\*\* : 応用技術課主任研究員

\*\*\*\* : 応用技術課課長

## 2.4 酵母の培養

*Z. rouxii* は、麦芽エキス培地 ( 2 % Glucose、2 % Yeast extract、0.1 % Polypeptone ) で30、24時間静置培養を行った。

## 2.5 無塩味噌の糖化法

蒸煮大豆、米麴及び水を麴歩合15の割合 ( Table I ) で混合後、*B. subtilis* を $10^6$  Cells/g になるように添加し、55 で18時間糖化した。

Table I 無塩味噌原料混合割合

原 料	( weight % )
蒸煮大豆*	65.0
米麴	37.5
エタノール	0 ~ 4

\* : カナダ産

## 2.6 無塩味噌の製造

次の方法で製造した。

蒸煮大豆、米麴、エタノール及び水を麴歩合15の割合 ( Table I ) で混合後、55 で18時間糖化後に、*Z. rouxii* を $10^5$  Cells/g になるように添加し、25 で1週間醸造した。

## 2.7 味噌中の生菌数測定

味噌中の生菌数は、抗黴培地「ダイゴ」( 日本製薬 ) を用いて、希釈平板培養法により測定した。

酵母数は、クロラムフェニコール添加麦芽寒天培地を用いて、希釈平板培養法により測定した。

## 2.8 味噌のアミノ酸分析

アミノ酸分析は、HPLC ( 島津製作所製、LC - 9A ) にアミノ酸分析用カラム ( 強酸性陽イオン交換樹脂カラム Shim-pack ISC 07型 ) を用い、o - フタルアルデヒドを反応試薬として、蛍光波長 ( Ex

= 348nm、Em = 450nm ) による測定を行った。

## 3. 実験結果

### 3.1 無塩味噌の製造時における糖化中の雑菌増殖抑制

無塩味噌糖化時には、NaCl が含まれないために、特に *Bacillus* 等の雑菌が増殖することがある。雑菌が増殖すると、糖化後の添加酵母の増殖の妨げになり、無塩味噌の製造時における問題となっていた。

そのため、無塩味噌糖化時の雑菌増殖を抑制するために、糖化時のエタノールの添加による雑菌増殖抑制効果を検討した。雑菌の指標菌として、*B. subtilis* を用いて検討した結果 ( Fig. 1 )、2 % 以上のエタノールにより増殖抑制効果があり、3 % 以上で、1 / 1000 に *B. subtilis* が減少した。

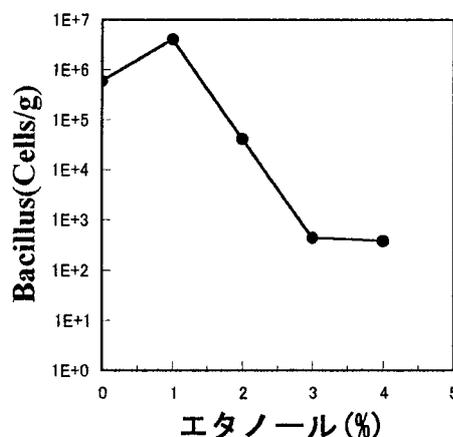


Fig. 1 無塩味噌中の *B. subtilis* へのエタノールの影響

### 3.2 エタノール添加による無塩味噌の試作

無塩味噌糖化時における雑菌増殖抑制として、効果の確認された2 %のエタノールを糖化時に添加し、無塩味噌の試作を行った。

醸造中の *Z. rouxii* 及び雑菌数は、Fig 2のとおりであり、雑菌の増殖が押さえられている。また、醸造後の無塩味噌のアミノ酸組成は、Table IIのとおりである。

Table II 無塩味噌のアミノ酸組成

Asp (%)	0.30
Thr	0.22
Ser	0.18
Glu	0.52
Pro	0.05
Gly	0.10
Cys	0.00
Val	0.14
Met	0.03
Ile	0.12
Leu	0.25
Tyr	0.12
Phe	0.16
GABA	0.03
His	0.08
Lys	0.15
Arg	0.24

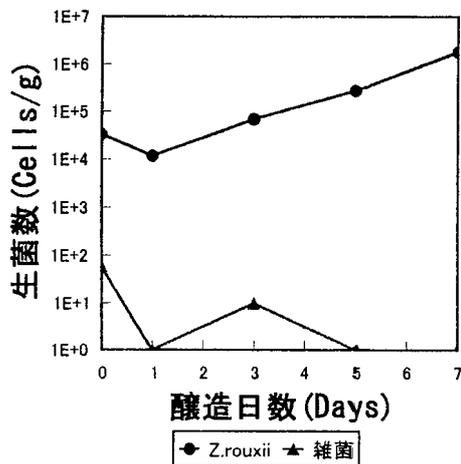


Fig 2 無塩味噌醸造時の酵母及び雑菌数

#### 4. 考 察

高血圧症は現在我が国人口の約20%にあたる2,000万人以上が罹患していると推定されている。この高血圧症の90%以上は、いわゆる本態性高血

圧症と呼ばれ、その原因が特定されていない。この様な中、医薬品としての血圧抑制剤としても様々なものがあるが、生活習慣病の一つである高血圧症の予防としては、食品が持つ穏やかな血圧抑制作用を利用し、日常的にその食品を摂取することが有効と思われる。

また、食品に含まれる血圧抑制物質として、最近 ACE 阻害ペプチドが注目されており、様々な食品より発見されてきている。味噌、醤油等の発酵食品からの分離の報告も多く見られる。しかし、食品としての摂取では、味噌等に含まれる高塩分が、血圧上昇の因子にもなり得ることが懸念されていた。

そのため筆者らは、味噌より塩の弊害を取り除き、味噌本来が持つ血圧抑制作用等の様々な機能<sup>5, 6)</sup>を有効に活用するために、*Z. rouxii* 等を用い、酵母が作り出すエタノールの殺菌作用を利用した無塩味噌の製造法の検討を行ってきた。しかし、味噌工場において本無塩味噌を試作するに当たり、無塩味噌の糖化工程中での雑菌増殖が問題となった。一般的な味噌においては、食塩が含まれるために、糖化工程においても雑菌の増殖は、食塩により抑制されている。しかし、無塩味噌は、食塩を含まないために、糖化工程中に雑菌が増殖出来る環境となっていた。

この対策として、*B. subtilis* を指標菌として、エタノールの添加による雑菌増殖抑制について検討し、2%以上のエタノールの添加により *B. subtilis* の増殖が抑制されることが確認された。更に、2%のエタノールを糖化時に添加した無塩味噌の試作を行い、その効果を確認した。

このように製造された無塩味噌は、味噌が持つ ACE 阻害ペプチド等により、血圧抑制作用が期待される場所である。また、筆者らは、血圧抑制物質である GABA を乳酸菌が生産することに

注目し、GABA 高生産乳酸菌を選抜及び分離してきた。今後は、無塩味噌の血圧抑制作用を増強するために、GABA 高生産乳酸菌により、無塩味噌中で血圧抑制物質である GABA を生産させることを引き続き検討する予定である。

#### **(参考文献)**

- 1) 岡本 章子、柳田 藤治：食品工業、40、( 8 )  
70 - 79 ( 1997 )
- 2) 河村 幸雄：食品工業、40、( 12 )73 - 82 ( 1997 )
- 3) 早川潔、上野義栄、河村眞也、宮野要一、菊島直、荘咲子、林力丸：農化、69、1021 - 1026  
( 1995 )
- 4) 早川潔、上野義栄、河村眞也、谷口良三、小田耕平：生物工学、74、4、239 - 244 ( 1997 )
- 5) 岩下 敦子、高橋 裕司、河村 幸雄：日醸、89、869 - 872 ( 1994 )
- 6) 海老根英雄：味噌の科学と技術、43、339 -