

論文内容の要旨

氏名 小林 正義

発酵食品は、わが国の伝統食品の一つである。特に発酵漬物は、プレバイオティクスとプロバイオティクスの両方の機能を持つ「シンバイオティクス」として理想的な食品であり、近年ますます高まりつつある健康へのニーズに対応した機能性食品として、大いに期待されている。また、漬物製造における新たな方向性の一つとなっている。発酵は酵母、乳酸菌、糸状菌などの微生物の力を利用しているが、過発酵して膨張や風味低下が生じることがある。発酵後の微生物の余分な活動を制御するために、これまでは加熱殺菌、高濃度の塩分やエチルアルコールなどの添加物を利用してきた。しかし、加熱殺菌等を利用すると、食味や栄養価の低下が顕著である。

本研究では、年々注目度を増している醗酵食品に付加価値を高める製造技術を確認することを目標とした。対象として加熱殺菌が不適で、酵母による過発酵の問題を抱えている発酵漬物であるキムチに焦点を絞り、熱と同様に食品の組成を変えない状態変換因子である「圧力」＝高静水圧を利用した微生物制御技術の開発を目的とした。

まず、キムチの製造にかかわる微生物を把握するため、細菌用ならびに酵母用培地を用いて微生物を分離し、抽出した DNA を用いて rRNA 遺伝子配列を PCR 増幅してシーケンス解析し、主要な微生物種を特定した。細菌では *Lactobacillus*, *Leuconostoc* および *Weissella* 属を含む 11 種の乳酸菌を分離した。酵母では *Kazachstania (Saccharomyces) servazzii* が優占種として共通して含まれることを明らかにした。次に、キムチの発酵過程における微生物叢を発酵開始から 60 日目まで調査した。キムチから抽出した DNA から PCR 増幅した rRNA 遺伝子部分断片を変性密度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) にて分離し、それぞれの DNA バンドから抽出した DNA の塩基配列をシーケンシングにより調べた。60 日間のキムチ発酵過程で、pH は 3.9 まで二段階で低下し、乳酸菌濃度は 15 日目に最大になった後、 3.2×10^8 cfu/ml に保たれた。乳酸菌の中では *L. sakei* が一定して認められ、*L. plantarum* が 21 日目以降に見られた。一方、酵母では *Kazachstania servazzii* がもっぱら検出され、その菌濃度は 15 日目に最大となり 1.4×10^8 cfu/ml に達し、27 日目以降は検出限界以下へと減少した。以上の結果から、発酵の進行に伴って複数の乳酸菌が交互に消長すること、酵母では *Kazachstania servazzii* が優占化することを明らかにした。また、発酵 21 日目

に 200 MPa, 60 分の高圧処理をキムチに加えたところ、高圧処理以降の pH 低下が止まるとともに、乳酸菌と酵母の菌濃度は急激に低下し、それぞれ 8.3×10^5 cfu/ml ならびに検出限界以下となった。その後、乳酸菌は緩やかに回復したのに対し、酵母は速やかな回復を見せた。最終的には、高圧処理の有無による微生物叢の違いは認められなくなった。また、発酵開始時にスターターとして *L. sakei* と *K. servazzii* 野生株をそれぞれ 2×10^6 cfu/ml および 1×10^4 cfu/ml となるように添加したキムチについても同様な調査を試みたが、発酵後期の微生物叢における明確な違いは見られなかった。

次に、キムチにおける過発酵の原因となる酵母の圧力感受性株の開発をおこなった。キムチから単離した *K. servazzii* MK1 を使用し、100 MPa で 10 分間の加圧後の培養で増殖が遅い株を選抜する方法にて圧力感受性をスクリーニングした。3 回のスクリーニングの繰り返しと 2 回の増殖速度が回復した株の選抜を経て圧力感受性株 MK1-HPS を選抜した。MK1-HPS は 200 MPa の圧力処理における 90% 死滅時間 (D 値) が 1.5 分となり、野生株の 5.8 分に比べ明確な圧力感受性を示した。また、MK1-HPS は L-Proline および D-Raffinose の資化性を失っていたが、その他の多様な炭素源に対する資化性及びグルコースからのアルコール発酵能は、野生株の MK1 とほぼ同じ程度であった。MK1 と MK1-HPS を培養後、200 MPa、60 分間の圧力処理をして更に培養を続けたところ、MK1 では 40 時間後からガス発生が認められたが、MK1-HPS では 120 時間後でもガス発生は認められなかった。キムチにおける圧力感受性株の利用が期待される成果が得られた。

以上、本研究では、キムチの発酵過程における微生物叢の動態を把握するとともに、各キムチに共通して認められる酵母の圧力感受性変異株を作出する技術を開発し、圧力感受性を取得した。また、その圧力感受性の効果を確認した。圧力処理による発酵食品の微生物制御は食品の商品価値を高める技術となると考えられており、本研究の成果は、圧力処理を発酵食品に広く利用するための重要な基盤技術になると期待される。