沖縄産海藻の新規利用法の開発

誌名	研究報告 / 沖縄県工業技術センター
ISSN	
著者名	比嘉,賢一 山城,利枝子 鎌田,靖弘
発行元	沖縄県工業技術センター
巻/号	4号
掲載ページ	p. 13-18
発行年月	2002年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

沖縄産海藻の新規利用法の開発
－アナアオサ酵素分解液の乳酸発酵条件の検討－

比嘉賢一・山城利枝子・鎌田靖弘

1　緒言

沖縄が属している亜熱帯の海域は、多種類の海藻が生育する海藻資源の宝庫であると同時に海藻養殖にも適した環境にある。しかし現在の沖縄の海藻利用状況をみると海藻生産量の95%以上をモズクが占めており、豊富な海藻資源を有効に利用しているとは言い難い。また、海藻の加工状況は塩蔵や乾燥などの１次加工品が主体であり、付加価値の高い加工品はあまり見られないのが現状である。

そこで本研究では、海藻の高付加価値化と用途拡大を図るために、養殖による大量生産が可能な海藻の軟化または液化による新素材の開発を行うとともに、海藻の有用成分の検索と分画を行い、新素材を活用して海藻の機能性を付加した食品の開発及び利用法について検討する。前年度は緑藻（アナアオサ、ヒトエグサ）の酵素分解による液化及びペースト化を検討し、近海海藻について幾つかの機能性スクリーニングを行った。平成13年度は前年度の素材化の結果を受けて、海藻酵素分解液の香味の改善を目的として乳酸発酵の条件を検討したので報告する。

2　実験方法

2－1　アナアオサの酵素分解

原料海藻：アナアオサ（Ulva sp.　沖縄県水産試験場で養殖）

酵素製剤：XP-415、XP-425（ナガセケムテックス㈱社製）

前報[1]にしたがいアナアオサを前処理後ペースト状にした。ペーストに３倍量の水を加え塩酸でpHを調製した後、酵素製剤を添加し40℃で４時間撹拌しながら酵素分解を行った。得られた酵素分解物を以後本文中では、酵素分解液と称する。またペーストに水を添加せず酵素分解を行った酵素分解物を以後、酵素分解ペーストと称する。

2－2　海藻酵素分解物の乳酸発酵

2－2－1　供試菌株

IAM 10062　*Lactobacillus casei*

IAM 12472　*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

IAM 10069 *Leuconostoc mesenteroides subsp. sake*

IAM 12283　*Pediococcus acidilactici*

IFO　15891　*Lactbacillus plantarum*

2－2－2　スターター溶液の調製

MRS broth に保存菌株１白金耳添加し、IAM12472株は培養温度37℃、その他の菌株については培養温度30℃にて３日間培養を行った。培養後、遠心分離にて集菌し、20%グリセロール溶液を加えて均一に分散後-85℃にて保存した。これをスターター溶液として適宜希釈を行い以後の試験に用いた。

2－2－3　乳酸発酵の方法

三角フラスコに海藻の酵素分解液または酵素分解ペースト50mLを入れ、所定量の副原料を溶解させた後、121℃、15分間滅菌した。冷却後、無菌的に所定濃度に調整したスターター溶液１mLを添加し発酵を行った。

2－2－4　乳酸菌数の測定

BCP加プレートカウント寒天培地を用い混釈平板とし、培養温度37℃で72時間培養後、黄変しているコロニーを乳酸菌としてカウントした[2]。

2－2－5　乳酸の定量

発酵後の海藻乳酸発酵液を10,000rpm、10分間遠心分離後、0.45μmのフィルターにて濾過し、ダイオネクス社製イオンクロマトグラフDX-120にて乳酸の測定を行った。

分析条件

分離カラム：IonPac ICE-AS1

溶　離　液：1.0mmol/L オクタンスルホン酸

流　　量：1.0mL/min

検　出　器：電気伝導度検出器

2－3　発酵条件の検討

2－3－1　副原料

添加副原料として豆乳、スキムミルク、蔗糖、グルコース及び黒糖について発酵原料の０～20%の添加量の範囲で検討を行った。特に記載がなければ添加量はそれぞれ５%添加で実験を行った。

2－3－2　発酵期間

発酵期間の検討では、１～８日間で発酵を行った。特に記載がなければ発酵期間は３日間で行った。

２－３－３　発酵温度

発酵温度の検討では15～40℃の範囲で発酵試験を行った。特に記載がなければ発酵温度は30℃で行った。

２－３－４　スターター菌数

スターター菌数は発酵液中の乳酸菌数が１×10^4～１×10^8　CFU/mLの範囲で検討を行った。特に記載がなければスターター菌数は１×10^5CFU/mLで行った。

２－３－５　海藻酵素分解ペーストの殺菌条件

70、80、90及び105℃の温度設定で殺菌時間30分間加熱殺菌を行い、一般生菌数の検出は常法にしたがい標準寒天培地を用いた混釈平板で確認した[3)]。

３　実験結果及び考察

３－１　副原料の検討

海藻の酵素分解液中には乳酸菌の栄養源となるタンパク質並びに糖質が少ないため栄養源の添加が必要であることが予想された。菌株の選定の前に、今回使用する菌株の乳酸発酵に必要な栄養源として添加する副原料を発酵中の乳酸菌数及び生成乳酸量を指標として検討を行った。

表１及び２に海藻酵素分解液及び各副原料を添加した発酵３日目における乳酸菌数並びに生成乳酸量を示す。

表１及び２に示すように海藻酵素分解液だけの乳酸発酵では５菌株中２株しか増殖せず、生成乳酸量も少ないうえ官能評価においても海藻特有の臭いを改善するには至っていなかった。副原料として蔗糖を10%添加した場合、５株中３株において乳酸菌数及び生成乳酸量がやや低下する傾向が見られたが、増殖可能な菌株は４株に増え、香味の改善も認められた。副原料として豆乳を５％添加した場合、全菌株が増殖可能となると共に、発酵３日目の菌数並びに乳酸生成量も大幅に増加した。これより海藻酵素分解液の乳酸発酵には栄養源としてタンパク質が必要であり、糖質は補助的な効果があることが示唆された。しかし、豆乳を副原料として用いた場合、発酵は良好であったが、官能評価では豆乳の香が強く飲料としては不適であった。

タンパク源としてスキムミルク、糖質として蔗糖を用いた副原料の検討を行った結果、豆乳添加に比較して菌数に差は認められないが、生成乳酸量が大きく増加し、香味の改善も認められた。以後この組み合わせを副原料として以下の試験では用いた。また、IAM10062株は菌数に比較して生成乳酸量が豊富であり、他の菌株とは異なる発酵特性を示したが、逆に酸臭の強い飲料となり香味の点で他の菌株に劣る結果となるため以後の試験より除外した。

３－２　発酵期間の検討

図１、２及び３に乳酸菌数の経時変化、pH変化及び生成乳酸量の経時変化を示す。

図１に示すように、８日間の発酵期間中、乳酸菌数は２～３日目で平衡に達し、以後暫時減少し、乳酸菌数で見る限り発酵期間は２日程度必要であることが示唆され

表１　副原料添加における乳酸菌数の変化　（単位：CFU/mL）

菌　株	IAM10062	IAM12472	IAM10069	IAM12283	IFO15891
海藻酵素分解液	1.0×10 >	1.0×10 >	1.0×10 >	1.8×10^8	1.9×10^7
蔗糖添加	1.6×10^4	1.0×10 >	7.1×10^6	4.2×10^7	5.9×10^6
豆乳添加	2.4×10^7	2.6×10^7	9.1×10^6	9.6×10^8	6.4×10^8
ｽｷﾑﾐﾙｸ＋蔗糖添加	1.1×10^6	2.3×10^7	4.6×10^6	2.1×10^8	5.2×10^8

原料：海藻酵素分解液、発酵温度：30℃、初発菌数：1.0×10^5 CFU/mL

表２　副原料添加における生成乳酸量の変化　（単位：mg/L）

菌　株	IAM10062	IAM12472	IAM10069	IAM12283	IFO15891
海藻酵素分解液	1472	82	16	747	927
蔗糖添加	1047	18	143	750	595
豆乳添加	3776	1707	2283	3874	8667
ｽｷﾑﾐﾙｸ＋蔗糖添加	7314	3685	556	4093	9408

原料：海藻酵素分解液、発酵温度：30℃、初発菌数：1.0×10^5 CFU/mL

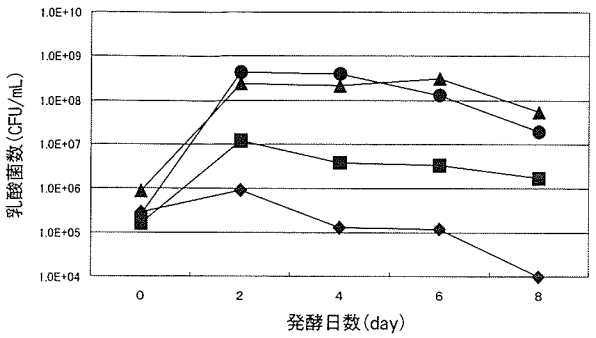

図１　供試菌株の発酵期間中における
乳酸菌数の経時変化

－◆－IAM12472　－■－IAM10069　－▲－IAM12283　－●－IF015891
原料：海藻酵素分解液、
副原料：スキムミルク５％、蔗糖５％、
発酵温度：30℃、初発菌数：1.0×10^5 CFU/mL

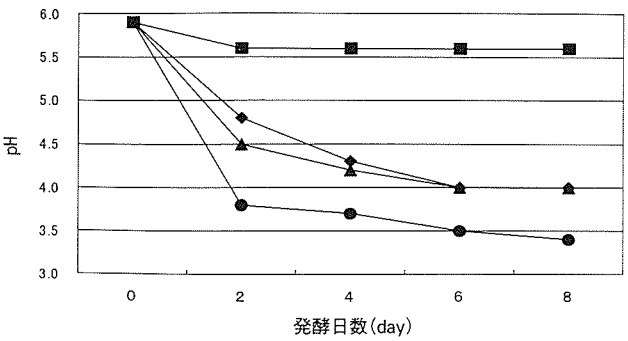

図２　供試菌株の発酵期間中におけるｐＨの経時変化

－◆－IAM12472　－■－IAM10069　－▲－IAM12283　－●－IF015891
原料：海藻酵素分解液、副原料：スキムミルク５％、蔗糖５％、
発酵温度：30℃、初発菌数：1.0×10^5 CFU/mL

るが、pHは４～６日目で平衡に達し、生成乳酸量に関しては菌株によって異なるが８日間の発酵期間では平衡に達していないことが確認された。発酵中の官能評価は発酵日数２～３日目までは香味の改善が認められたが、特に乳酸生産量の高いIFO15891株やIAM12472株において、４日目以降酸臭に近い香りが香味の主体を占める傾向が認められた。

以上の結果より発酵期間は３日以内が適していると判断した。

３－３　菌株の選定

前述のようにIAM10062株は副原料の検討の時点で除外した。乳酸発酵液を飲料または他の素材として利用するには、これまで発酵原料として用いてきた酵素分解液だけではなく酵素分解ペーストも発酵する必要性がある。図４に酵素分解ペーストを発酵原料に用いた場合の乳酸菌数の経時変化を示す。

その結果、酵素分解ペーストを原料としても良好な菌の増殖を示したIAM12283及びIFO15891株を海藻の乳酸発酵に適した菌株として選定した。両菌株とも発酵生成物に特徴的な香味を示し、IAM12283株は乳酸の生産性が低く、海藻の香りを主体とした香味特性を持ち、IFO15891株は乳酸の生産性が高く、乳酸飲料に特徴的な酸の香りを主体とした香味特性を持つ菌株であった。また原料に酵素分解ペーストを用いることにより、発酵生成物全体として香豊かな発酵生成物を得ることができた。

３－４　発酵温度の検討

選定された２株について、発酵温度の検討を行った。

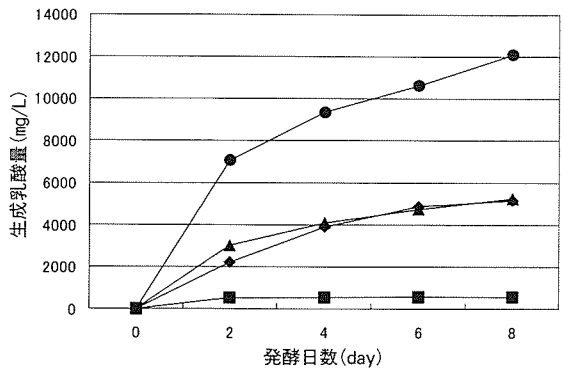

図３　供試菌株の発酵期間中における
生成乳酸量の経時変化

－◆－IAM12472　－■－IAM10069　－▲－IAM12283　－●－IF015891
原料：海藻酵素分解液、副原料：スキムミルク５％、蔗糖５％、
発酵温度：30℃、初発菌数：1.0×10^5 CFU/mL

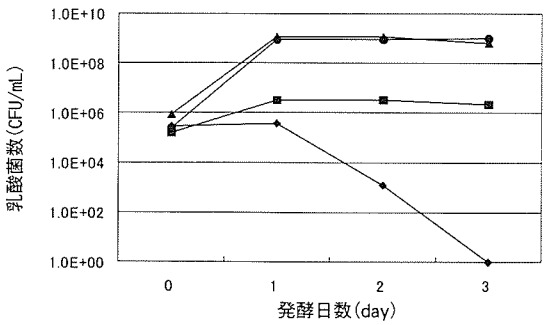

図４　酵素分解ペーストを原料とした乳酸発酵における
乳酸菌数の経時変化

－◆－IAM12472　－■－IAM10069　－▲－IAM12283　－●－IF015891
原料：海藻酵素分解ペースト、
副原料：スキムミルク５％、蔗糖５％、
発酵温度：30℃,初発菌数：1.0×10^5 CFU/mL

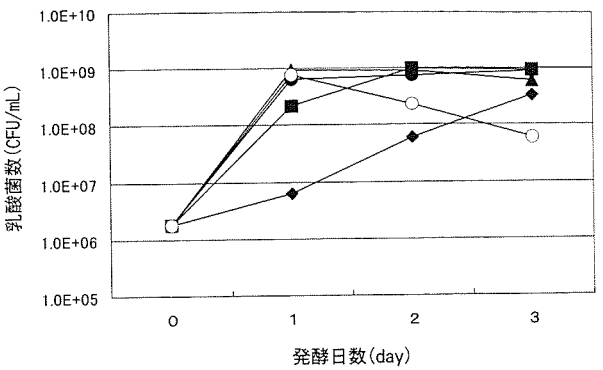

図５　IAM12283株の各発酵温度における乳酸菌数の経時変化

―◆―15℃　―■―25℃　―▲―30℃　―●―37℃　―○―40℃
菌株：IAM12283、原料：海藻酵素分解ペースト、
副原料：スキムミルク５％、蔗糖５％、
初発菌数：1.0×10^5 CFU/mL

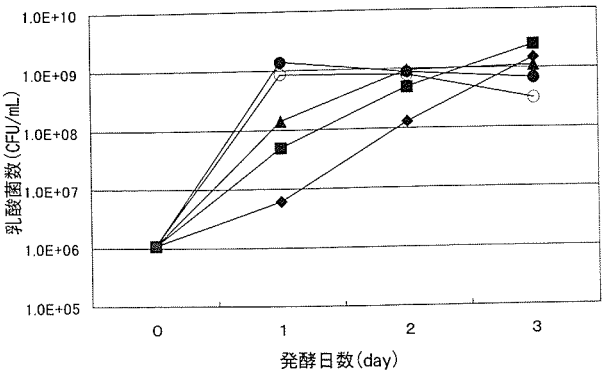

図６　IF015991株の各発酵温度における乳酸菌数の経時変化

―◆―15℃　―■―25℃　―▲―30℃　―●―37℃　―○―40℃
菌株：IF015891、原料：海藻酵素分解ペースト、
副原料：スキムミルク５％、蔗糖５％、
初発菌数：1.0×10^5 CFU/mL

図５及び６に各菌株の乳酸菌数経時変化の結果を示し、図７及び８に生成乳酸量の経時変化を示す。

IAM12283株は図５に示すように発酵温度15℃を除き発酵１日目で乳酸菌数は平衡状態に達しているが、発酵温度40℃では発酵時間の経過と共に乳酸菌数の減少が認められた。また図７に示すようにIAM12283株は発酵温度37℃以上では乳酸生成速度が高く、乳酸を指標とした発酵制御に困難が伴うと予想され、最適発酵温度は25～30℃であると判断した。IFO15891株は30℃以下の発酵温度では発酵日数３日目まで乳酸菌数は平衡に達せず増加傾向を示し、それ以上の発酵温度ではIAM12283株同様２日目以降乳酸菌数の減少が見られた（図６）。IFO 15891株は37℃以上の発酵温度において発酵日数３日目に乳酸生成量及び乳酸菌数の減少が認められこと、また発酵温度によらず乳酸生成速度に変化がないことから、最適発酵温度は30℃であると判断した。

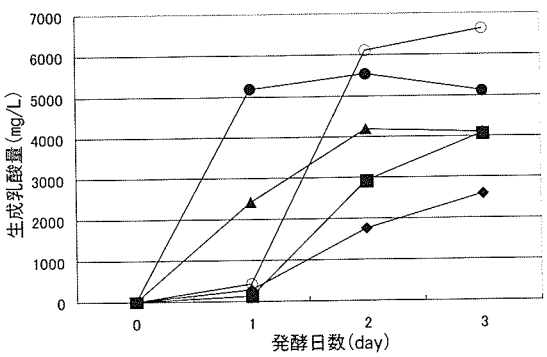

図７　IAM12283株の各発酵温度における生成乳酸量の経時変化

―◆―15℃　―■―25℃　―▲―30℃　―●―37℃　―○―40℃
菌株：IAM12283、原料：海藻酵素分解ペースト、
副原料：スキムミルク５％、蔗糖５％、
初発菌数：1.0×10^5 CFU/mL

３－５　スターター菌数の検討

仕込時のスターター菌数の検討を行った結果を図９及び10に示す。なお図中の1E4は１×10^4 CFU/mLを表し、乳酸菌数及び生成乳酸量ともに発酵３日目の測定値である。

両菌株ともスターター菌数濃度を変えて仕込みを行っても発酵１日目で乳酸菌数は1×10^8 CFU/mLの一定値に達していた。IAM12283株は初発菌数が多いと発酵３日目でやや乳酸菌数が減少する傾向があり、乳酸生成量は初期菌数が多いほど生成乳酸量は高い傾向を示した。それに対してIFO15891株は初発菌数が多いほど３日目の乳酸菌数が少ない傾向を示し、1×10^7 CFU/mL以上

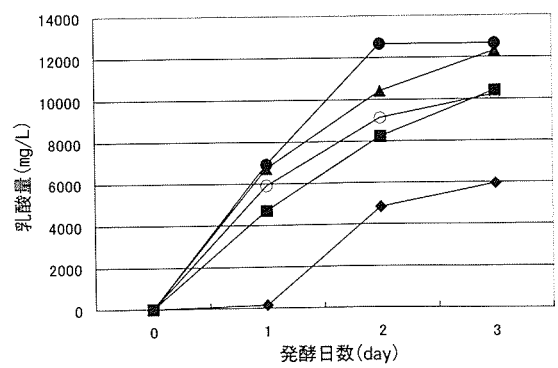

図８　IF015891株の各発酵温度における生成乳酸量の経時変化

―◆―15℃　―■―25℃　―▲―30℃　―●―37℃　―○―40℃
菌株：IAM12283、原料：海藻酵素分解ペースト、
副原料：スキムミルク５％、蔗糖５％、
初発菌数：1.0×10^5 CFU/mL

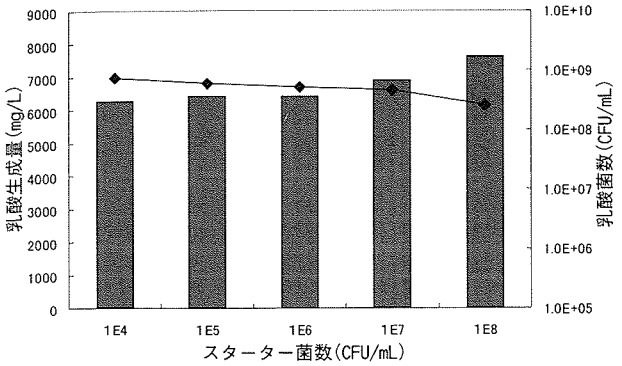

図９　IAM12283株のスターター菌数と
生成乳酸量及び乳酸菌数の関係

■ 生成乳酸量　　－◆－乳酸菌数

菌株：IAM12283、原料：海藻酵素分解ペースト、
副原料：スキムミルク５％、蔗糖５％、発酵温度：30℃

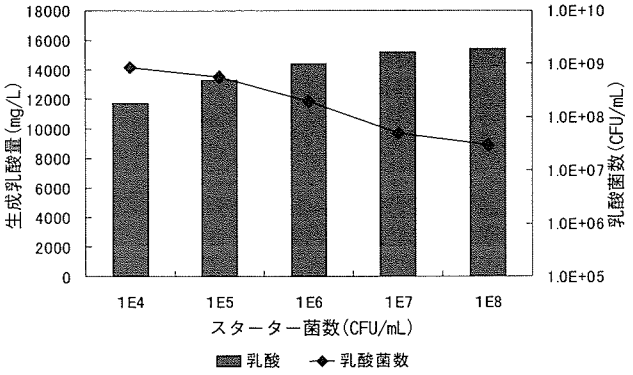

図10　IF015891株のスターター菌数と
生成乳酸量及び乳酸菌数の関係

■ 生成乳酸量　　－◆－乳酸菌数

菌株：IF015891、原料：海藻酵素分解ペースト、
副原料：スキムミルク５％、蔗糖５％、発酵温度：30℃

の初発菌数では発酵３日目における生成乳酸量に差は認められない。以上の結果よりIAM12283株についてはスターター菌数の影響はなくIFO15891株については1×10^{6} CFU/mL以下の濃度となるように仕込みを行う必要がある。実際の仕込を行う場合スターター菌数1×10^{7} CFU/mL以上の調製には大量の前培養液が必要であり、コスト面から考えても最適スタータ菌数は両菌株とも1×10^{5} ～1×10^{6} CFU/mLであると考える。

３－６　スキムミルク添加量の検討

スキムミルクの最適添加量を検討するために添加量を変えて発酵試験を行った。その結果を図11及び12に示す。両菌株ともスキムミルク３％以上の添加では発酵日数３日目の乳酸菌数に差は認められない。IAM12283株は添加量10％まで生成乳酸量が増加し、IFO15891株は添加量20％でも乳酸生成量は増加している。スキムミルク添加を多くした場合、発酵液中の粘性が高くなり以後の濾過処理等の操作が困難となること、生成乳酸量は発酵温度及び発酵日数で制御できること、添加量と乳酸菌数に相関が認められない点を考慮するとスキムミルク添加量は３～５％添加が最適添加量であると判断した。

３－７　蔗糖添加量の検討

蔗糖の最適添加量を検討するため蔗糖の量を変えて発酵試験を行った。その結果を図13に示す。発酵３日目において蔗糖無添加仕込みに比較して乳酸生成量は高い値を示すが、添加量に対して生成乳酸量は相関が認められない。また、データは示さないが添加する糖を蔗糖の代わりに黒糖及びグルコースに置き換えても同様な結果であった。このことは、海藻の乳酸発酵において、糖質は

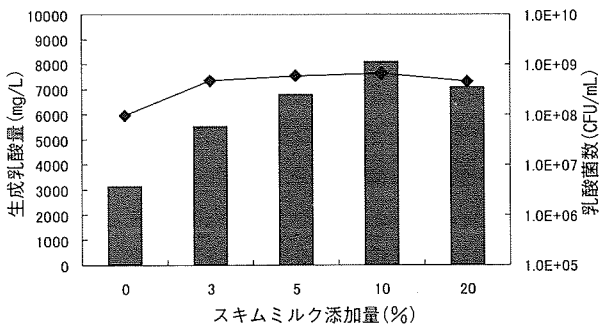

図11　IAM12283株のスキムミルク添加
量と生成乳酸及び菌数との関係

■ 生成乳酸量　　－◆－乳酸菌数

菌株：IAM12283、原料：海藻酵素分解ペースト、
副原料：蔗糖５％、
発酵温度：30℃、初発菌数：1.0×10^{5} CFU/mL

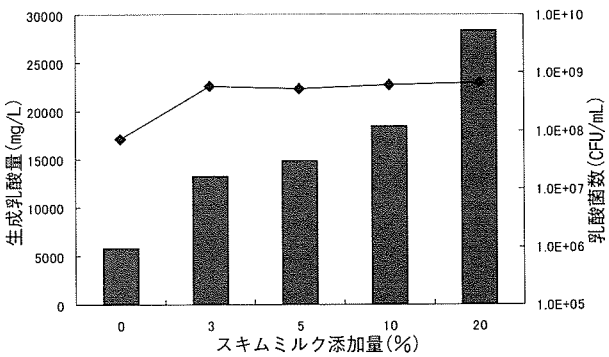

図12　IF015891株のスキムミルク添加
量と生成乳酸及び菌数との関係

■ 生成乳酸量　　－◆－乳酸菌数

菌株：IF015891、原料：海藻酵素分解ペースト、
副原料：蔗糖５％、スキムミルク0～20％、
発酵温度：30℃、初発菌数：1.0×10^{5} CFU/mL

栄養源として補助的な役割を持ち、発酵に大きな影響を与えないと考えられる。しかし、糖質の添加量により海藻乳酸飲料の品質は大きく異なることが認められており、官能評価を基準として添加量を決定する必要がある。

３－８　海藻酵素分解ペーストの殺菌条件

生の海藻には2.0×10^4 CFU/mLの生菌数が確認され、これは酵素分解処理後も同量の菌数が確認されている。健全な乳酸発酵を行うため原料の殺菌条件を検討した結果を表３に示す。

その結果80℃、30分間の加熱で殺菌が可能である。しかし、緩やかな70℃加熱でもアナアオサの緑色は退色してしまうため乳酸発酵物を原料として利用する場合、他の殺菌方法を利用するか、乳酸菌の生酸力による抗菌効果等の影響を検討する必要がある。

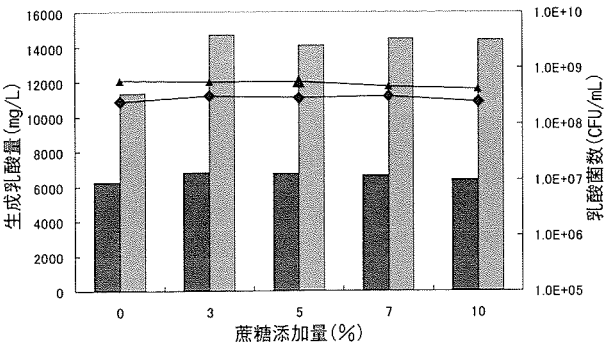

図13　蔗糖添加量と生成乳酸量及び乳酸菌数の関係

―▲―12283乳酸菌数　―◆―15891乳酸菌数

12283乳酸　15891乳酸

菌株：IAM12283、IF015891、
原料：海藻酵素分解ペースト、副原料：スキムミルク５％、
発酵温度：30℃、初発菌数：1.0×10^5 CFU/mL

表３　海藻原料の殺菌条件の検討　（単位：CFU/mL）

殺菌温度	無殺菌	70℃	80℃	90℃	105℃
一般生菌数	2.1×10^4	1.0×10>	n.d.	n.d.	n.d.
色　調*	濃緑色	淡緑色	淡緑色	淡緑色	淡緑色

殺菌時間：30min,　n.d.：検出限界以下　　＊殺菌温度が高くなるほど褐色の割合が増加

４　結言

海藻酵素分解液及び分解ペーストの香味改善を目的として乳酸発酵の条件検討を行った。その結果、アナアオサ酵素分解液及び分解ペーストの乳酸発酵に適した２乳酸菌株として、IAM12283株（*Pediococcus acidilactici*）およびIFO15891株（*Lactobacillus plantarum*）を選定した。発酵条件は、発酵温度25～30℃、発酵期間３日以内が適しており、副原料は両菌株ともタンパク源を必要とし、スキムミルクを原料に対し３～５％の添加量が適していた。また、スターター菌数、糖質濃度は本発酵において必要条件ではないが、スターター菌数は10^5～10^6 CFU/mLの添加量で良好な発酵が行われた。原料の殺菌条件は、80℃、30分の加熱で殺菌は可能であるが、加熱により海藻の緑色が退色してしまうことが明らかとなった。

今後、乳酸発酵を再現良く行うには発酵管理の指標が必要である。大庭ら[4]はブロッコリー乳酸菌飲料において、官能評価並びにビタミンＣ残存量を指標として、また工藤ら[5]はサツマイモヨーグルトにおいて、アントシアニン含有量を指標として、それぞれ発酵制御を行っている。また、清酒ではアルコール、日本酒度等従来の管理指標の他に近年、ピルビン酸濃度を管理指標として用いている。これはピルビン酸が清酒における劣化臭（木香様臭やツワリ香）の指標となるためであり、本乳酸発酵においても今後官能評価と相関を持つ管理指標の設定が必要である。

謝辞

この研究は農林水産庁の平成13年度新技術地域実用化研究促進事業により実施したものである。

この研究を行うに当たり、海藻を提供していただいた沖縄県水産試験場ならびに、酵素を提供していただいたナガセケムテックス株式会社に感謝申し上げます。

参考文献

１）山城利枝子、比嘉賢一、豊川哲也、鎌田靖弘　沖縄県工業技術センター研究報告　**3**　pp.9-13（2001）

２）春田三佐夫、細貝祐太郎、宇田川俊一　目で見る食品衛生検査法　中央法規出版（1989）

３）衛生試験法・注解　日本薬学会　金原出版（1990）

４）大庭理一郎、飯尾雅樹　日食工誌　**47**　pp.384-389（2000）

５）工藤康文、松田茂樹　日食工誌　**47**　pp.619-625（2000）