

# 福井県産の梅果実「紅サシ」に関する研究

## — 梅果汁の乳酸発酵と有機酸組成の変化 —

百木 華奈子・高橋 みなみ・小林 恭一\*・谷 政八

(2010年1月30日受理)

## Study of Prunus mume "Benisashi" of Fukui Prefecture product

### — Lactic acid fermentation of Prunus mume juice and change in organic acid composition —

Kanako Momoki, Minami Takahashi, Kyoichi Kobayashi\*, Masahachi Tani

The prunus mume fruit (Benisashi) is, pH low microbial fermentation is conducted for the screening of lactic acid bacterium can be grown from being unsuitable. Screening method using GYP liquid medium, botanical lactic acid bacterium a degree of growth observed in the 100 strains prunus mume juice. Perform a full scan testing of lactic acid fermentation using selected strains, malolactic fermentation observed in prunus mume juice.

Lactic acid bacterium were selected YH3 strain, good prunus mume juice diluted three times if you have a reproducible and stable pH without adjustment, it was possible to malolactic fermentation. Sour prunus mume is suppressed, was obtained by testing a mild fermented prunus mume juice. A botanical lactic acid bacterium is used as a beverage made of prunus mume, can be used to promote a new prunus mume fruit.

#### キーワード (key words)

梅果汁 Prunus mume "Benisashi" juice、植物性乳酸菌 Botanical lactic acid bacterium、

スクリーニング Screening、乳酸発酵 Lactic acid fermentation、

マロラクティック発酵 Malolactic fermentation

## 序 論

梅果実は和歌山県、群馬県及び長野県をはじめ日本全国で栽培されており、生産量が年間10万トン程度で、福井県では2000トンから3000トンが生産されている。福井県若狭湾沿いの三方地区では「紅サシ」という品種の梅が栽培されており、名前のとおり、陽光面が強く紅色に着色し、独特

の外観を持った梅果実の産地となっている。梅果実の収穫シーズンが終わる5月～6月には、福井県内あちこちで梅干しをつくる光景が見られるようになる。また、梅酒、梅肉エキス、梅ジャムなどを作る家庭も多い。さらに梅ワイン、ドレッシングなどが加工販売されている。このように、梅の加工品は、福井の食文化として根付いており、福井県民の健康長寿にもつながっているのではな

\* 福井県食品加工研究所

いかと考えられる。

一般に梅果実は、有機酸を主体とし糖分が少ないため生食されることはほとんどなく、古くから加工して食されており、ほとんどは梅酒や梅干しとして利用されている。近年、梅果実は海外から安価で大量に輸入されており、価格競争では国産品は太刀打ちできないため、最高の原料を使用し、高度な技術で加工し、他の追従を許さない高品質を求めなければならない、国内の産地においてはより付加価値の高い製品の開発が求められている<sup>1)</sup>。

梅果実「紅サシ」の成分分析は、幼果のうちでは、有機酸成分のリンゴ酸が主体である。成熟するに従ってクエン酸生成量が圧倒的に多くなる。梅にはブドウ糖、果糖、ショ糖、ソルビトールが含まれるが、このうちショ糖は成熟に伴い増加を示している。ブドウ糖、果糖、ソルビトールは低めであるが、ショ糖含量が高い傾向を示している。また、遊離アミノ酸も成熟に伴い増加し、その総量も高めの傾向である。カルシウムなどミネラルが豊富なのも紅サシの特徴である<sup>2)</sup>。

梅果実は一般的にクエン酸、リンゴ酸が多く、pHが低いため、本来、発酵には不向きであると言われる。しかし、梅果汁を希釈、補糖して、酵母により発酵させた果実酒への利用<sup>1)</sup>は見られるがこれ以外に梅果実の発酵に関する報告はみられない。一方、ブドウではワインの酸味と香味の調節を目的に、乳酸菌によってリンゴ酸を乳酸と炭酸ガスに分解し、有機酸の組成を変化させる「マロラクティック発酵」が行われている<sup>3)</sup>。ブドウ以外の果実でもキウイやリンゴにおいて乳酸飲料などへの利用の報告<sup>4) 5)</sup>が見られる。しかし、ウメ果汁を乳酸発酵させて有機酸組成を変える試みはなされていない。

そこで本研究は、梅果実「紅サシ」の新規利用と酸味の改善を目的に、梅果実に生育できる乳酸菌のスクリーニングを行い、選抜したうちの優良乳酸菌を用いた梅果汁の良好な乳酸発酵をさせるための条件について検討した。

## 試料及び方法

### 1. 梅果実で生育する乳酸菌のスクリーニング

#### 1-1. 試料

福井県園芸試験場（福井県美浜町）で、2005年6月30日に収穫し冷凍保存しておいた「紅サシ」の青梅、黄化梅を自然解凍後圧搾し、果汁を10,000rpmで15分間遠心分離にかけ、上澄液を用いた。

#### 1-2. 方法

##### 1) 供試乳酸菌株

福井県食品加工研究所（坂井市丸岡町）で漬物、総菜など食品から分離・保有している乳酸菌100株をGYP高層培地からGYP液体培地に移し、30℃で24時間培養した。

##### 2) GYP+ 梅果汁液体培地での発酵性の検討

GYP × 2	glucose	10.0g
	yeast extract	10.0g
	peptone	5.0g
	Na-acetate · 3H <sub>2</sub> O	2.0g
	salts solution	5.0ml
	Tween 80 solution	10.0ml
	Water	500ml

\*<sup>1</sup> salts solution 1 ml中には、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 40mg、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 2mg、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2mg、NaCl 2mgが含まれる。

\*<sup>2</sup> Tween 80 solution = 50mg/ml水溶液

上記培養液をメジウムビンに加え攪拌・溶解し、液体培地150mlと試料の梅果汁150mlを混ぜ合わせた。黄化梅液体培地・青梅液体培地のそれぞれを70mlずつ三角フラスコ4個に分け、1N-NaOHでpH5, 4, 3.5, 3に調整し、3mlずつ試験管に分注した。GYP × 2を2倍に希釈し、3mlずつ試験管に分注し対照とした。アルミキャップをしてオートクレーブで121℃、10分間殺菌した。

培養した供試乳酸菌株のGYP乳酸菌液体培地から、パスツールピペットを用い梅果汁液体培地に1滴ずつ加え攪拌して30℃で3～5日間培養した。培養後、培養液を各300 μlずつ96穴マイクロプレートに移

Table 1. GYP白亜寒天培地の組成

組成① (pH6.8)		組成②	
glucose	1.0g	CaCO <sub>3</sub> *3	0.5g
yeast extract	1.0g	ager	1.2g
peptone	0.5g		
meat extract	0.2g		
Na-acetat・3H <sub>2</sub> O	0.2g		
salts solution *1	0.5ml		
Tween 80 solution *2	1.0ml		
Water	100ml		

培地調整法：組成①を初めに調整し、そこへ組成②を加える。

オートクレーブ：121℃、15分

\*1 salts solution 1 ml 中には、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 40mg、MnSO<sub>4</sub>・4H<sub>2</sub>O 2mg、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 2mg、NaCl 2mgが含まれる。

\*2 Tween 80 solution = 50mg/ml 水溶液

\*3 180℃、30分乾燥滅菌したもの

し、マイクロプレートリーダー（IWAKIEZS-ABS）で630nmの吸光度を測定し、濁度により生育を判定した。

### 3) 梅果汁における発酵性の検討

上記の実験において、pH3.0で生育した株について、さらに「紅サシ」の黄化ウメ果汁を2倍、4倍に希釈し、グルコースが1%になるように調整後、濾過滅菌し、3mlずつ分注し、生育の高かった菌株の培養液を接種後、30℃で培養をおこなった。吸光度（630nm）を測定し、濁度を測定することによって生育を判定した。また、生菌数の測定もおこなった。GYP白亜寒天培地を培地とし、乳酸菌実験マニュアル<sup>6)</sup>に従って、下記の組成を用いた。

また、pH未調整、pH3.0に調整を行ない、果汁で再度生菌数を測定した。培地は乳酸菌実験マニュアルの組成に従ってGYP白亜寒天培地を用いた。果汁の有機酸組成は、島津有機酸分析システム（HPLC）により測定した。

## 2. 梅果汁乳酸菌発酵試験

選抜したYH3株を用いて安定的に再現性が良好なウメ果汁を発酵させるための条件について検討した。

### 2-1. 試料

冷凍の「紅サシ」の黄化梅（2006年7月2日収穫、福井園試）を自然解凍後圧搾し、

10,000rpmで15分間遠心分離にかけ、上澄液を用いた。

## 2-2. 方法

### 1) 果汁希釈の影響

梅果汁を2倍、3倍、4倍希釈後、グルコースを10%添加し、65℃、15分間加熱殺菌を行ない、冷却後、YH3株を1/500量接種し、30℃で培養し生菌数を、乳酸菌実験マニュアルに従ったGYP白亜寒天培地の組成<sup>6)</sup>を用いて測定した。

### 2) 初発pHの影響

梅果汁を3倍に希釈し、グルコースを7%添加し、果汁同量ずつに1%炭酸水素ナトリウムを0～3ml加えpHを変えて65℃、15分間火入れを行ない、YH3株を1/500量接種し、吸光度（630nm）を測定し、濁度により生育を判定した。

今回の発酵スタート時の未調整がpH2.85で、1%炭酸水素ナトリウムの添加量に伴い、pH3.13まで上昇した。

### 3) 発酵経過

黄化梅果汁に水、グルコースを加え、3倍希釈し、50mlずつわけ、65℃、15分間加熱殺菌を行ない、冷却後、YH3株を1/500量加えて菌数を測定した。

30℃で培養を行ない、1試料ずつ生菌数をGYP白亜寒天培地を用いて測定した。その後、冷凍保存した。スタート時（接種直後）から10日目まで測定を行った。

冷凍保存した試料は有機酸の含量を測定した。

## 3. DPPHラジカル消去活性

### 3-1. 試料

上記3)の発酵経過の発酵試験後、冷凍保存しておいた試料（スタート時から10日目）を用いてDPPHラジカル消去活性<sup>7)</sup>にて抗酸化能を測定した。

### 3-2. 方法

試料を用いて配合割合に従って、調整した。

それぞれの濃度の試料検液に、MES・DPPH・EtOH混合液 (0.2M MESバッファ<sup>\*1</sup> 12ml、400 $\mu$ M DPPH<sup>\*2</sup> 12ml、20%エタノール 12ml) 0.9mlを加え、攪拌し、正確に20分間放置後、吸光度 (520nm) を測定した。

Table.2 検液の配合割合

試料 a $\mu$ l	(0,30,60,90,120,150 $\mu$ l)
80%エタノール 300 - a $\mu$ l	(300,270,240,210,180,150 $\mu$ l)

標準物質にはTrolox<sup>\*3</sup> を用いた。

<sup>\*1</sup> 10.2M MES buffer = MES

(2-morpholinoethanesulphonic acid) 8.53gを蒸留水に溶かし、NaOHでpH6.0に調整後、200mlとしたもの。

<sup>\*2</sup> 400  $\mu$  M DPPH = 和光純薬社製のDPPHを使用する場合。

乳鉢で微粉状態にし、4℃で保存。DPPH3.94mgにEtOH 25mlを加え、マグネチックスターラー上で30分程度かけて十分に攪拌溶解する。次第に退色してくるので2時間以内に使用することが望ましかった。

<sup>\*3</sup> Trolox = Sigma社製Troloxを測定サンプルと同じ溶媒 (本実験では80% EtOH) に溶解する。小分けし-20℃で保存しておき、一度開封したものは測定日に使い切るようにした。

## 《算出方法》

安定な有機ラジカルであるDPPH・と抗酸化物質を反応させ、DPPH・の520nmの吸光度を測定し、濃度既知のTroloxでの吸光度に対する相対値として算出する。

## 結果及び考察

### 1. 梅果実で生育する乳酸菌のスクリーニング

供試乳酸菌株100株のうち39株がウメ果汁+GYP液体培地 (pH3.0) において、吸光度OD値0.4以上の生育を示した。39株についてさらに再試験を行った結果、生育が良好なのは10株で

Table.4 梅果汁における発酵性の検討 (10株の生菌数)

10	1.4 $\times 10^6$	125AT2	8.4 $\times 10^6$
122	4.0 $\times 10^6$	HKL3	5.6 $\times 10^6$
129	7.7 $\times 10^5$	SB6161	9.8 $\times 10^6$
YH3	8.5 $\times 10^6$	SB6162	9.1 $\times 10^6$
LB83m	2.1 $\times 10^6$	SB6163	1.1 $\times 10^7$

あった。それら上位10株の結果をTable.3に示す。下段は青梅果汁を用いた結果、上段は黄化梅果汁を用いた結果となっている。

pH3において最も吸光度が高かったのはYH3で、黄化梅果汁で1.04、青梅果汁で0.51であった。黄化梅果汁の値が青梅果汁の2倍もの吸光度を示した。結果を見てみると、どの株においても青梅よりも黄化梅は、濁度が高くなっていることから黄化梅を用いた方が乳酸菌が増殖しやすく、生育しやすいことが分かる。これらは、青梅と黄化梅の有機酸の組成の違いによるものと思われる。また、青梅が黄化梅へと変化し、完熟に近づくにつれショ糖が増加することからも<sup>2)</sup>、黄化梅果汁において吸光度が増加した原因と考えられる。

生育が良好だった10株について、ウメ果汁+グルコースでの発酵性を調べたところ、あまり濁度は上昇しなかったため、やはり梅果汁のみでは有機酸含量が多いため乳酸菌が生育できないのかと思われたが、生菌数を調べてみると、すべての株で $10^5 \sim 10^7$  CFU/mLの乳酸菌が生育していた。特にYH3株では $8.5 \times 10^6$  CFU/mL、SB6163株では $1.1 \times 10^7$  CFU/mLと $10^7$  CFU/mL程の生菌数があることが確認された。

Table.3 GYP+ 梅果汁液体培地での発酵性の検討 (生育の良かった10株の結果)

黄化梅果汁	10	122	129	YH3	LB83m	125AT2	HKL3	SB6161	SB6162	SB6163
対象	1.75	1.94	1.85	1.93	1.87	1.80	1.87	1.74	1.75	1.75
pH3	0.61	0.53	0.59	1.04	0.96	0.49	0.57	0.49	0.54	0.51
3.5	1.66	1.67	1.00	1.69	1.62	1.09	1.77	1.22	1.22	1.17
4	1.76	1.70	1.63	1.73	1.94	1.41	1.77	1.45	1.52	1.44
5	1.94	1.90	1.49	1.88	1.99	1.74	1.90	1.80	1.85	1.79
青梅果汁	10	122	129	YH3	LB83m	125AT2	HKL3	SB6161	SB6162	SB6163
pH3	0.44	0.44	0.40	0.51	0.39	0.40	0.37	0.46	0.43	0.41
3.5	1.70	1.93	1.13	1.69	1.81	0.87	1.71	0.89	1.08	0.94
4	1.94	1.88	1.84	1.85	1.89	1.43	1.83	1.56	1.64	1.45
5	1.89	1.75	2.35	1.89	1.92	1.72	1.79	1.79	1.68	1.79

生菌数測定の結果から生育の高かったYH3、SB6163株を用い、pH未調整(pH2.7)とpH3.0に調整を行った果汁で再度生菌数を測定した結果、SB6163株はpH未調整、調整した果汁どちらにおいても生菌数が $10^6$ CFU/mlから10日目には $10^2$ CFU/mL程度まで減少した。一方、YH3株では未調整果汁でも $10^7$ CFU/mLの生菌数を維持し、調整をおこなった果汁では $10^8$ CFU/mLまで増加が認められた。これらの結果より、梅果実の発酵に適した乳酸菌として優良菌株YH3株を選択した。乳酸菌実験マニュアルに従って形態、発酵形式、糖類発酵性などについて調べた結果、YH3株はホモ発酵桿菌*Lactobacillus*属であると思われる。なお、YH3株は精酒もろみより分離した乳酸菌である。

この株で発酵させたウメ果汁の有機酸含量を測定したところ、発酵前と発酵後では有機酸の組成が変化していることが分かった。pH未調整、調整した果汁も共にクエン酸はわずかに減少し、リンゴ酸も低下した。特にpH3に調整をおこなった試料ではリンゴ酸がほとんど消失し、乳酸生成が認められた。梅果汁においてもいわゆるマロラ

クティック発酵が確認された。

マロラクティック発酵に関与する乳酸菌としては、球菌の*Leuconostoc*属、桿菌の*Lactobacillus*属など数多く報告されている。主となるのは*Leuc. oenos*と*Lb. plantarum*である<sup>3)</sup>。*Lb. plantarum*は植物由来の発酵食品から優勢な菌種として分離されており、主に穀類を原料とする発酵食品に利用されている<sup>3)</sup>。YH3ももろみから分離されており植物由来の発酵食品から分離されていることから、*Lb. plantarum*のようなマロラクティック発酵に関与した乳酸菌である可能性が高いと考えられる。

またこれら乳酸菌によるマロラクティック発酵の生起や乳酸菌の生存性には、pH、温度、アルコール濃度などが関与しており<sup>3)</sup>、マロラクティック発酵がしやすい状態にあったと考えられる。

## 2. 梅果汁乳酸菌発酵試験

さらにYH3株を用いて安定的に再現性よく梅果汁を発酵させるための条件について検討した。まず、希釈条件と果汁のpHの影響について実験をおこなったところ、果汁希釈の影響においては、2倍希釈した梅果汁では10日後には生菌数が $2.5 \times 10^4$ CFU/mLまで低下したが、3倍希釈したものは $2.0 \times 10^6$ CFU/mLで横ばいの状態で推移し、生菌数の低下は見られなかった。次にpHの影響については、pHを2.85から3.13まで変化させた梅果汁においてpHが低くなるにつれて吸光度OD値は低い値を示し、生育は抑制されていた。しかし、未調整pH2.85の梅果汁でも吸光度が上昇しており、乳酸菌の増加が認められた。

これら希釈条件とpHの影響の発酵試験の結果から、希釈のみ行えばpH調整を行わなくても発酵が可能と判断されたので、この条件でさらに発酵経過を観察した。発酵経過をFig.2に示した。乳酸菌を接種した直後のスタート時から3日目まではほとんど菌数変化が見られず $10^6$ CFU/mL程であったが、3～4日目にかけ急激に菌数が増加した。3日目以降乳酸菌数は増加し5日で $10^8$ CFU/mlに達した。

その時の糖含量(左)、有機酸含量(右)の変化をFig.3に示す。糖含量は、グルコースは経時

Table. 5 梅果汁の有機酸組成の変化

	mg/100ml			
	citrate	malate	lactate	acetate
pH2.7 before	1817	157	0	0
pH3.0 before	2320	183	0	0
pH2.7 YH3	1777	110	210	0
pH3.0 YH3	2065	0	336	39

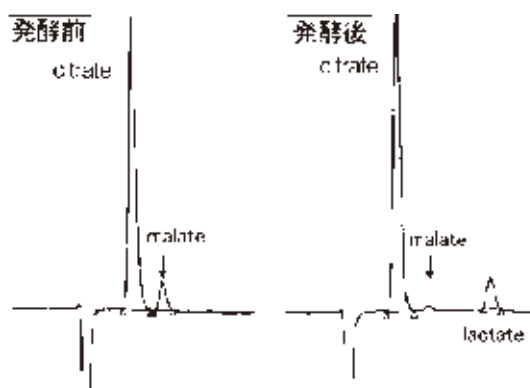


Fig.1 梅果汁の有機酸の組成 (HPLC クロマトグラム)



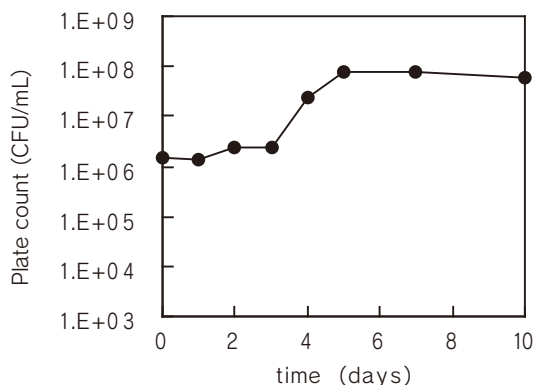


Fig.2 梅果汁の発酵経過

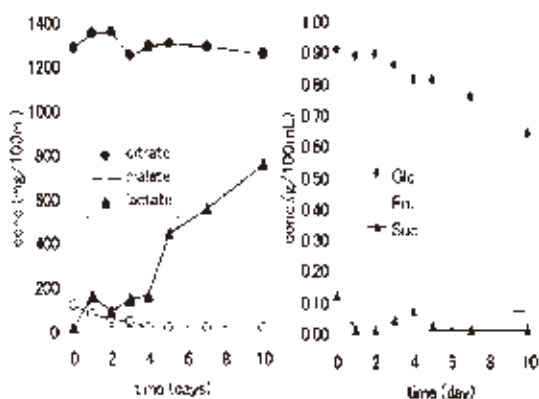


Fig.3 糖含量及び有機酸含量の変化

的に低下し、スクロースは低下し一度3日目から4日目にかけて上昇するが、その後すぐに低下した。フルクトースは少しずつではあるが増加した。有機酸含量は、リンゴ酸は発酵開始直後から低下し4日目には消失した。クエン酸はわずかだが低下傾向が認められ、乳酸は4日目までは徐々に増加しそれ以降大きく増加した。この梅果汁の官能評価をおこなったところ、3日目では酸味がマイルドに感じられ、4日目以降は酸味が徐々に強まる傾向があり、7日目以降はジアセチル臭を呈するようになった。このため、3日目の梅果汁においてまろやかで飲みやすいという高い評価が得られた。発酵開始3日目の梅果汁はリンゴ酸が完全には消失しておらず、乳酸生成がそれほど高くない時期であり、有機酸含量の変化の結果を反映しているようだった。また、糖質組成はわずかにグルコースの消費が見られたが、その他は発酵前と

後でほとんど差がないことから、乳酸発酵過程において梅果実独特の香味の発生などで有用なマロラクティック発酵が優先して起きているものと推測された。

### 3. 抗酸化作用について

DPPHラジカル消去活性による抗酸化能は、梅果汁の乳酸発酵が進むにつれて増加する傾向が見られた。しかし、梅果汁の発酵試験で行った官能評価で最も評価の高かった3日目は抗酸化能力が弱く、10日目が最も強いという結果になった。しかし、10日目ともなると発酵している臭いが強く、つまりダイアセチルが生成されていることがはっきりと分かった。味については、梅果実独特のさわやかな酸味が失われた。ダイアセチルはチーズなどの香りの一つで、清酒やビールなどでは不快香とされているが<sup>3)</sup>、発酵食品には存在する。10日目のものは抗酸化作用が強いものの、飲料としては不向きであり、味と香り、そして抗酸化作用とは伴わないという結果となった。

梅果実の収穫時期における抗酸化力に関する研究は、既にDPPHラジカル消去活性は早期の梅の果実の方が強く、熟すにつれて低下するという結果が報告されている<sup>8)</sup>。またDPPHラジカル消去能はポリフェノール含有量との相関性が指摘されており<sup>9)</sup>、梅にはリオネシノールと呼ばれるポリフェノールが含まれていることが近畿大学農学部、吉栖肇先生らの研究で明らかにされている。今後は梅果実のポリフェノールの定量も行うと関係が明らかになるものと推察する。

また、食品の抗酸化機能を評価する方法として

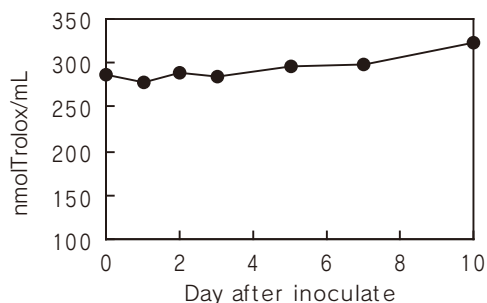


Fig.4 DPPH ラジカル消去活性

は種々の方法が提案されており、これらには一長一短がある。今回は簡易迅速な手法であり、かつ多検体分析に威力を発揮するDPPH分光測定法を用いたが、抗酸化能を測定する方法は他にもあるので生体内に近い条件での実験をする必要がある。

## ま と め

今回の研究は、pHが低いため発酵には不向きであるといわれている梅果実において生育できる乳酸菌のスクリーニングを行った。スクリーニング方法はGYP液体培地を用いて、保有している植物性乳酸菌の梅果汁における生育度を観察した。さらに選抜された乳酸菌株を用いて発酵試験を行ったところ梅果汁におけるマロラクティック発酵が観察できた。

選抜した乳酸菌を用いて安定的な再現性を有している、良好な梅果汁を発酵させる条件について検討した。その結果、3倍希釈を行えばpH調整しなくてもマロラクティック発酵させることが可能であることがわかった。その発酵試験では梅の酸味が抑えられ、まろやかな梅果汁が得られた。これらを活用することにより梅の飲料などへの利用ができ、梅果実の新規利用を図ることが可能となった。

本研究の概要は、平成20年7月 日本乳酸菌学会2008年度大会(京都)で報告した。研究にあたり、福井県食品加工研究所 研究員の皆様にご指導をいただきお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 坂本 尚:「地域資源活用 食品加工総覧」社団法人 農山漁村文化協会, 東京, 2001;79-94(ウメ)
- 2) 小林恭一, 杉本雅俊, 池田華子, 倉内美奈, Claudia Y. Soyama:白干しウメ加工における「紅サシ」と「南高」の品種比較, 平成14年度食品加工に関する試験成績, 16 (2003)
- 3) 乳酸菌研究集談会:「乳酸菌の科学と技術」学会出版センター, 東京, 1996;253
- 4) 二宮順一郎:キウイフルーツの乳酸発酵果汁, 愛媛県工業技術センター, 1997
- 5) 大澤純也, 山本忠:マロラクティック発酵によるリンゴ乳酸飲料の製造条件の確立と品質評価, 岩手県醸造食品試験場報告, 1991
- 6) 小崎道雄:「乳酸菌実験マニュアル-分離から同定まで-」朝倉書店, 東京, 1992;126・13
- 7) 篠原和毅, 鈴木建夫:「食品機能研究法」光琳, 東京, 2000;218-220(抗酸化機能)
- 8) 徳江健, 佐藤正義:梅果実の抗酸化性評価法の検討, 群馬県工業試験場研究報, 2002
- 9) 下橋淳子, 寺田和子:果実のラジカル消去能と食品の加熱および褐変化によるラジカル消去能への影響, 駒沢女子短期大学研究紀要第36号, 2003

