

秋田県総合食品研究所報告

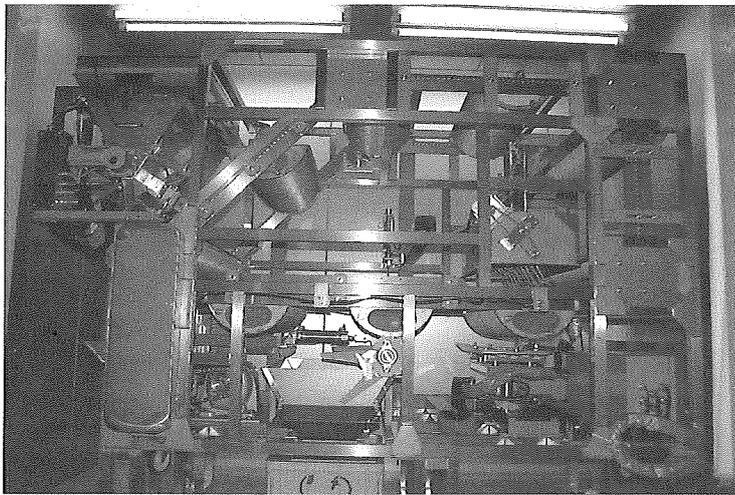
第 4 号

平成14年 (2002年)

Bulletin of the Akita Research
Institute of Food and Brewing
(*ARIF*)

No.4, 2002

Akita Research Institute of Food and Brewing *ARIF*



麴生産システム



正誤表

p.2 30~36 行目 数式

誤 : $T = (T_0 - T_i) / (T_0 - T_e)$

正 : $T = (T_i - T_e) / (T_0 - T_e)$

誤 : $dT/dt = -k(1-T)$

正 : $dT/dt = -kT$

誤 : $\ln(1-T) = -kt$

正 : $\ln T = -kt$

同, 31 行目

誤 : 相对温度 [-]

正 : 冷却率 [-]

目 次

1. 原著論文（報文）

- 「きりたんぼ製造における製品の冷却特性」 1
○高橋 徹、熊谷昌則、佐々木康子、大久長範
- 「秋田県の伝統的食品「赤ずし」に関する微生物的考察」 6
○佐々木康子、菅原真理、柴本憲夫
- 「しよつつる風新調味料の開発（第6報）－ハタハタ・イワシ 11
を用いたしよつつるの試験醸造－
○高橋光一、戸松 誠、柴本憲夫、熊谷昌則
- 「米味噌のHEMF生成における仕込条件の影響」 19
○尾張かおる、高橋光一、渡辺隆幸
- 「 γ -アミノ酪酸高含有米糠の製造法」 25
○戸枝一喜、青木淳子、熊谷 亮、伊藤 汎
- 「酒粕及び麹菌からの糖質関連有用物質の生産について」 30
○木村貴一、高橋慶太郎、立花忠則、高橋砂織
- 「遠心分離方式による清酒の上槽工程自動化技術の開発」 42
○田口隆信、中田健美、立花忠則、斎藤久一
- 「栽培地区別醸造用ブドウの特徴およびワインの品質」 50
○戸松さやか、大野 剛、立花忠則

2. 原著論文（研究ノート）

- 「焼成カルシウム存在下でボイル処理されたエダマメ」 59
○大久長範、大能俊久、龐 中存
- 「学校給食用白神パンの品質に関する研究」 62
○熊谷昌則、高橋慶太郎、高橋砂織

3. 特許の要約（3件） 67

4. 学会発表（34件） 69

5. 外部発表論文再録（12件） 87

6. その他の外部発表論文リスト（8件） 151

1. 原著論文（報文）

「きりたんぼ製造における製品の冷却特性」
○高橋 徹、熊谷昌則、佐々木康子、大久長範

「秋田県の伝統的食品「赤ずし」に関する微生物的考察」
○佐々木康子、菅原真理、柴本憲夫

「しよつつる風新調味料の開発（第6報）－ハタハタ・イワシ
を用いたしよつつる試験醸造－」
○高橋光一、戸松 誠、柴本憲夫、熊谷昌則

「米味噌のHEMF生成における仕込条件の影響」
○尾張かおる、高橋光一、渡辺隆幸

「 γ -アミノ酪酸高含有米糠の製造法」
○戸枝一喜、青木淳子、熊谷 亮、伊藤 汎

「酒粕及び麹菌からの糖質関連有用物質の生産について」
○木村貴一、高橋慶太郎、立花忠則、高橋砂織

「遠心分離方式による清酒の上槽工程自動化技術の開発」
○田口隆信、中田健美、立花忠則、斎藤久一

「栽培地区別醸造用ブドウの特徴およびワインの品質」
○戸松さやか、大野 剛、立花忠則

きりたんぼ製造における製品の冷却特性

高橋 徹、熊谷昌則、*佐々木康子、大久長範

(秋田県総合食品研究所 食品開発部門、*応用発酵部門)

Toru TAKAHASHI, Masanori KUMAGAI, *Koko SASAKI, and
Naganori OHISA

【要約】

きりたんぼ製造工程で二次汚染の原因となっている冷却工程の自動化にむけ、いくつかの冷却条件下におけるきりたんぼの冷却特性を明らかにすることを目的とした。従来行われてきた自然冷却と送風による強制冷却とを比較すると、強制冷却時の冷却速度定数は自然冷却の約1.5倍であり、送風によってきりたんぼは速やかに冷却された。また、冷却ブース試作機を用いた冷却実験の結果、ブース内温度が25℃程度であっても、ファンによりブース内の空気を攪拌した場合、製品の冷却に要した時間は30分間程度であり、ブースの冷却能力は実用上問題ないことが確認された。さらに、雰囲気温度を制御することでより迅速なきりたんぼの冷却が可能であることが明らかになった。

【緒言】

「きりたんぼ」は、秋田の冬の味覚として全国的にも知られるようになった米加工食品のひとつである。きりたんぼを製造する食品加工業のほとんどは、家内工業的生産とならざるを得ないのが現状であるが、おいしさはもとより、広域流通を目的とした食品としての安全性や品質に対する消費者の要求も年々厳しさを増している。手作り感を残しながら、しかも微生物やデンプンの老化などに対して安定な品質を有するきりたんぼが求められている¹⁾。

焼成工程直後のきりたんぼは、ほぼ無菌状態であるが、冷却および包装工程が手作業のため、微生物による二次汚染が問題となっている。特に長時間外気にさらされる冷却工程の自動化と清浄化が求められている。しかしながら、きりたんぼ製造時における製品の冷却特性は明らかにされていない。そこで本研究は、きりたんぼ冷却工程の自動化で重要となる製品の冷却特性を種々の冷却条件下における測定から解明することを目的とした。

【実験方法】

きりたんぼ冷却時における送風がその冷却特性に与える影響を検討した。すなわち、焼成直後のきりたんぼに熱電対を挿入し、その

温度履歴を計測した。送風条件は自然冷却（送風なし）ならびに強制冷却（風速7m/s）、測定は室温（22℃）で行った。

また、冷却ブースの試作機を用いたきりたんぼの冷却特性についても検討した。図1に冷却ブースを示したが、外形寸法は奥行きおよび高さは実機とほぼ同じ、幅は約1/10となるようにした。上部に送風ファンを設置し、約300mm間隔にプラスチック製容器（底面が網状）を冷却棚として設け、その1枚にきりたんぼを20本ずつランダムに配置し、その温度履歴を計測した。本試作機における

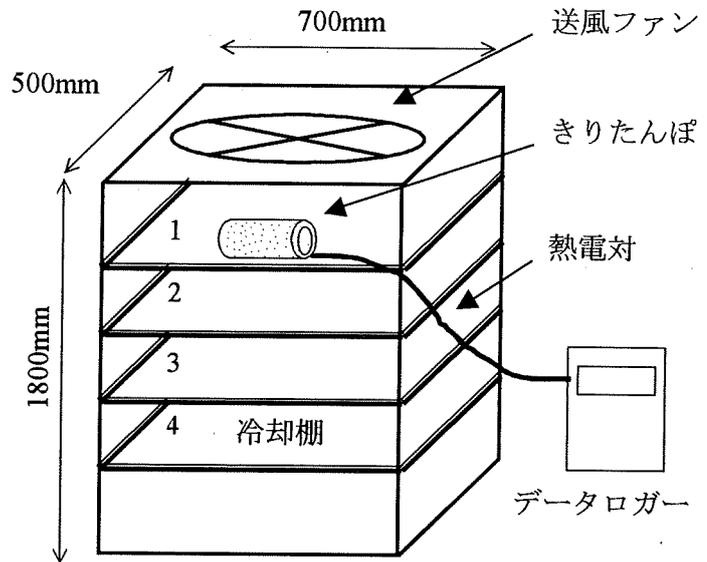


図1 きりたんぼ冷却ブース

冷却棚1枚あたりのきりたんぼの本数を20本としたが、この理由は、冷却棚単位面積あたりのきりたんぼの占有本数が製造時と同等になるように計算から求めた。なお、製造時における連続式冷却の場合、冷却ブース内での製品の滞留時間を約40分間としたため、きりたんぼを10分間おきに下の棚へ移動した。最上部の冷却棚における風速は約10m/sであった。

【結果および考察】

食品の冷却特性の解析にはいくつかの方法²⁾があるが、本研究では冷却速度定数を求め、その値からきりたんぼの冷却特性を考察することとした。まず、冷却曲線を(1)式によって基準化し、相対温度を求めた。

$$T = (T_0 - Tt) / (T_0 - T_e) \dots (1)$$

ここで、 T : 相対温度 [-]、 T_0 : 初期製品温度 [℃]、 Tt : 時間 t における製品温度 [℃]、 T_e : 平衡温度 [℃]である。 T の変化は下記の式で与えられる。

$$dT/dt = -k(1 - T) \dots (2)$$

(2) 式を $t=0$ の条件で解き、(3) 式を得た。

$$\ln(1 - T) = -kt \dots (3)$$

ここで、 k : 冷却速度定数 [min^{-1}] である。

図2は自然冷却および強制冷却によるきりたんぼの温度履歴曲線である。焼成直後のきりたんぼの品温は約95℃であったが、その品

温は時間経過にしたがって指数関数的に低下した。また、冷却時の送風が、きりたんぼの品温を速く低下させることがこの図より明確であるが、式(1)～(3)により冷却速度定数(k)を求めたところ、強制冷却による k は自然冷却の約1.5倍であった。

物質の冷却時での熱移動は、物質表面における熱伝導が主と考えられるが、食品のような多水分系の場合、本来食品中に含まれる水の蒸発潜熱($40.66\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; 100°C)による影響も考慮されなければならない。きりたんぼは、焼成後においても50%程度の水分を含んでおり、水の蒸発潜熱によって製品が冷却されることも十分に考えられる。しかしながら、本実験系においては、時間経過にしたがって変化する水の蒸発潜熱を測定することは困難であったため、製品の冷却は熱伝導のみによるものとした。

きりたんぼ製造における冷却工程は、次の工程である包装工程の作業性や包装後の製品外観の面からも重要とされ、製品温度が 30°C 程度のとき、作業が容易であり、製品から発生する水蒸気も少量となるため包装後の包材内側へのいわゆる「汗かき」現象もほとんど見られないことが経験的にわかっている。自然冷却と強制冷却を比較した場合、製品温度が 30°C まで達するのに強制冷却では約20分間であったのに対して、自然冷却では40分間以上も必要であった(図2)。果実の冷却の場合も強制通風冷却が自然冷却よりもその冷却速度が大きいことが報告されている³⁾。したがって、冷却時の送風はきりたんぼ温度を速やかに低下させ、その結果、冷却工程の時間短縮化となり、生産性向上に寄与すると考えられる。

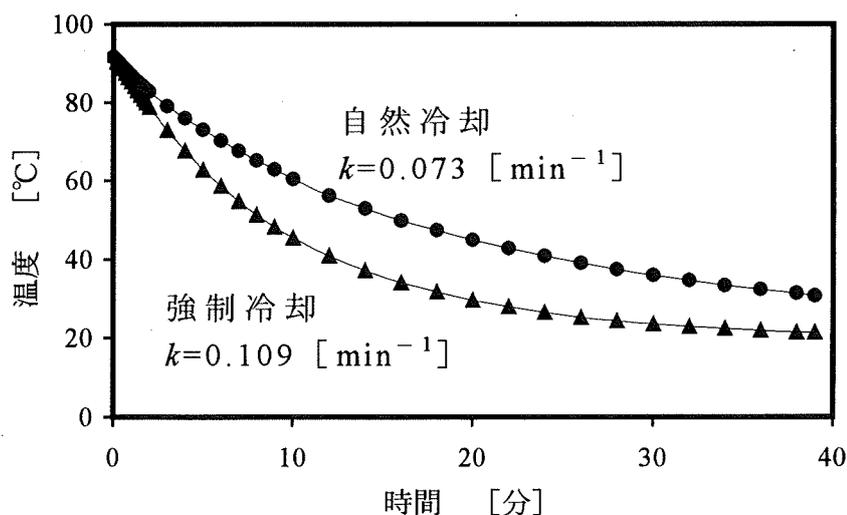


図2 送風がきりたんぼの冷却曲線に与える影響

図3に冷却条件が異なる場合の冷却ブースにおける、きりたんぼの温度履歴曲線を示す。また、そのときの冷却速度定数を表1に示す。ブース内温度を5℃で送風した場合（以後、5℃送風有り）の k は最も大きく、ブース内温度を5℃で送風しなかった場合（同、5℃送風無し）の約2倍であった。一方、25℃送風有りの k は、5℃送風有りと比較して小さくなったものの、5℃送風無しよりも大となった。また、製品温度が30℃に達するまで、5℃送風有りは約10分間、25℃送風有りおよび5℃送風無しの場合は約25分間であった。25℃送風有りの k は、5℃送風無しよりも大となったにもかかわらず、製品温度が30℃まで達するのに要した時間が同じとなったことは、冷却がある程度進行すると製品温度が雰囲気温度に影響されることを示唆している。実際に、5℃送風無しの最終的な製品温度は、25℃送風有りよりも低くなった。これらより、きりたんぼの冷却に関しては、雰囲気温度の調節もさることながら、製品の冷却に対する送風の効果が大きいことが明らかとなった。

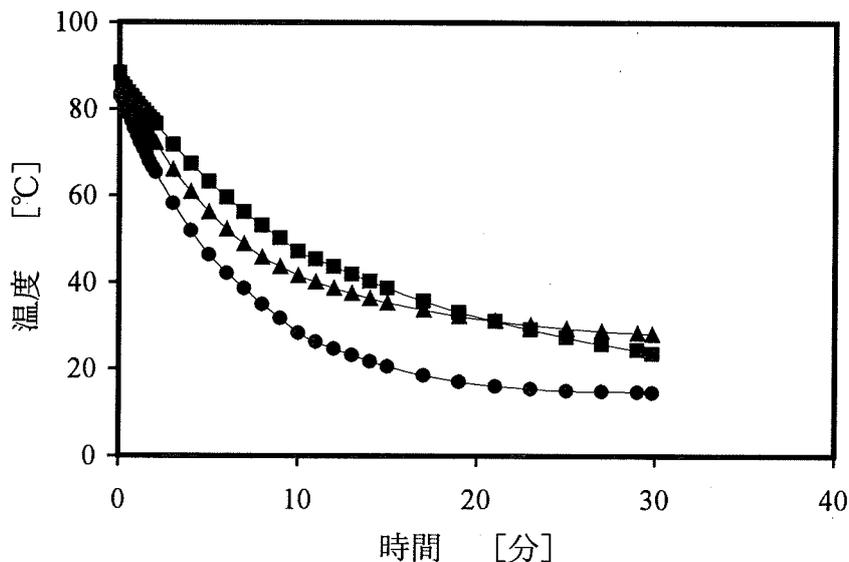


図3 冷却ブース内におけるきりたんぼの冷却曲線
 ●—5℃（送風有）、▲—25℃（送風有）、■—5℃（送風無）

表1 冷却条件が冷却速度定数に与える影響

冷却条件		k [min ⁻¹]
温度 [°C]	送風	
5	有	0.164
25	有	0.132
5	無	0.085

農産物や食品の冷却は、その生化学的変化や化学的変化等による品質劣化を抑制する⁴⁾ ことであり、低温障害を受けない程度で可能な限り冷却を速やかに行うことが必要となる。そこで、空気冷却の場合はエアコンディショナー等で雰囲気温度を低くして冷却する場合も多いが、ランニングコストも高くなる。きりたんぼの場合もブース内を冷蔵温度(2~5℃)に設定すれば、冷却時間のさらなる短縮化によって、大量生産の実現も可能となる。しかしながら、ランニングコストが高くなること、また、冷却後の包装工程の完全自動化は行われていないため、冷却工程の所要時間が極端に短縮された場合に包装工程への負担が大きく、包装時のシール不良等による品質低下や作業環境の安全面が危うくなることも考慮され、現時点では冷却時間を30~40分間程度に設定するのが好ましい。この条件を満たすには、ブース内温度を20℃前後に保持されるように冷却機の運転条件を設定すればよいと考えられる。

これらから、きりたんぼの冷却条件を総合的に判断すると、送風によって雰囲気空気が循環されていれば、室温程度であっても製品は十分に冷却される。また、雰囲気温度を低くすることで、製品の冷却がより迅速で二次汚染防止の効果も高いと考えられるものの、現状では、包装工程の面から冷却ブースを冷蔵温度(2~5℃)にまで低温にする必要はないと思われ、ランニングコストの節約にもつながる。今後は、冷却ブース実機によるきりたんぼの冷却特性や二次汚染の制御を従来工程と比較し、さらに包装工程が完全自動化され、生産能力がより向上した場合の冷却ブース運転条件の検討も必要である。

【謝辞】

最後に、本研究を遂行するにあたり、ご協力いただきました株式会社トーヨーならびに農事組合法人秋田ニューバイオフィームに深謝いたします。

【文献】

- 1) 熊谷昌則、高橋徹、佐々木康子、大久長範：秋田県総合食研報、2、1-8 (2000)
- 2) 種谷真一：食品工学ポケットブック、工業調査会、175-184 (1994)
- 3) Mohsenin, N. N.、林弘通監訳：食品の熱物性、光琳、194-221 (1985)
- 4) 渡辺尚彦：食品工学基礎講座5、加熱と冷却、光琳、89-110 (1991)

秋田県の伝統食品「赤ずし」に関する微生物的考察

佐々木康子，菅原真理，柴本憲夫（秋田県総合食品研究所応用発酵部門）
Koko SASAKI, Mari SUGAWARA, and Norio SHIBAMOTO

【要約】

「赤ずし」は、うるち米もしくはもち米のご飯を食塩、砂糖で調味し、キュウリの塩漬と塩もみした赤ジソを加えて、漬け込んで作られるいずしである。漬込は、通常2日間であるが、一部の地域では漬込4時間程度で製品として流通させている。赤ずしが漬込後、どれ位の時間で発酵食品として位置づけられるか、乳酸菌数の測定を行ったところ、漬込直後から乳酸菌が多数確認され、漬込後24時間で食中毒菌も死滅することから、漬込後24時間以上経過したものを発酵食品として扱うのが、食品の安全性の観点から妥当であると考えられる。

【緒言】

「赤ずし」は、秋田県で、夏期、特にお盆のときに作られるいずしで、けいとまま、赤漬け、赤まとも呼ばれる。赤ずしは、うるち米もしくはもち米のご飯を食塩、砂糖で調味し、キュウリの塩漬と塩もみした赤ジソを加えて、漬け込んで作られる。漬込は、通常2日間であるが、一部の地域では漬込4時間程度で製品として流通させている。漬込後、どれ位の時間で、赤ずしが発酵食品として扱えるのか調べるために、乳酸菌数の測定を行った。また、食中毒菌の存在の有無について、実験を行った。

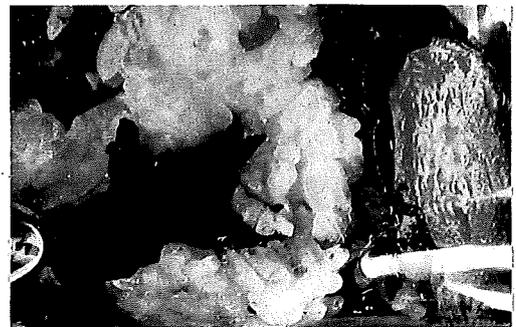


写真1 赤ずし（漬込8時間後）



写真2 赤ずし（漬込72時間後）

【実験方法】

1) 試料調製

試料とした赤ずしは、秋田県内の赤ずし製造業者により製造されたものである。

製造方法は次の通りである。

- (1) キュウリは輪切り後、1日塩漬けにする。
- (2) 米は炊いて塩・砂糖少々で調味し、半日自然冷却させる。
- (3) 赤ジソは塩もみして汁を捨てる。
- (4) 樽に笹の葉を敷き、炊いた米、塩もみ赤ジソ、塩漬キュウリの順に重ねる。
- (5) 炊いた米、塩もみ赤ジソ、塩漬キュウリを三段重ねする。
- (6) 炊いた米、笹の葉を重ねる。
- (7) さらし布と落とし蓋をし、重石をのせて2日間放置する（途中で数回混合）。
- (8) 汁気を吸い取り、冷蔵保管し、混合して包装出荷する。

なお、前記の製造業者による製造時期は、7月中旬から8月中旬であり、品質保持期間は、10℃以下で5日間に設定されている。このように製造されている赤ずしを、

漬込後、1時間、4時間、8時間、12時間、24時間、48時間、72時間後にサンプリングして試料とし、微生物検査、pH、水分活性の測定を行った。

また、赤ずしの原材料（未洗浄のキュウリ、洗浄後塩漬したキュウリ、未洗浄の赤ジソ、洗浄した赤ジソ、洗浄後塩もみした赤ジソ、味付けしたご飯、洗浄した笹の葉）について、微生物検査を行った。

2) 微生物検査

各サンプルを5gずつ秤量し、滅菌生理食塩水45mlを加えて、マスティケーターで30秒間磨砕した。得られたマスティケーター磨砕液を滅菌生理食塩水を用いて、さらに数段階希釈し、微生物検査用試料とした。

微生物検査に使用した培地は、次の通りである。

一般生菌	ペトリフィルム(好気性細菌数測定用；スリーエムヘルスケア社製)
大腸菌群及び <i>E. coli</i>	ペトリフィルム(<i>E. coli</i> 測定用；スリーエムヘルスケア社製)
乳酸菌	BCP加プレートカウントアガール(日水製薬社製)
サルモネラ	MLCB培地(日水製薬社製)
ブドウ球菌	マニット食塩培地(日水製薬社製)
黄色ブドウ球菌	スタフィロLA(デンカ生研社製)
クロストリジウム	クロストリジウム寒天培地(日水製薬社製)

3) pH

微生物検査で用いたマスティケーター磨砕液をpHメーター（TOA社製）で測定した。

4) 水分活性

各サンプルを常法により、水分活性測定装置（novasina社製 TH2/RDT-33/BS）で測定した。

5) 赤ずしの乳酸菌の同定

2)の微生物検査において、BCP加プレートカウントアガールで検出された乳酸菌を、漬込時間毎に、無作為に各10株釣菌した。釣菌した乳酸菌の同定は、乳酸菌同定キット「アピ50CHL」（日本ビオメリュー社製）を用いて行った。

6) 赤ずしのクロストリジウムの同定

2)の微生物検査において、72時間後の赤ずしに検出されたクロストリジウムを無作為に10株釣菌し、同定を行った。クロストリジウムの同定には、嫌気性菌同定キット「アピケンキ」（日本ビオメリュー社製）を用いた。

【結果と考察】

1) 漬込中の赤ずしの菌数、pH及び水分活性の推移

表1に漬込中の赤ずしの菌数、pH及び水分活性の推移を示した。また、図1に漬込中の赤ずしの菌数及びpHの変化を示した。表2には、秋田県の「食品等の衛生指導基準」より、いずし、漬物等の非加熱摂取食品の衛生指導基準を抜粋して示した。

表1の結果より、*E. coli* 及び黄色ブドウ球菌は、全ての区分で陰性であった。大腸菌群は、1～24時間後までは陽性であるが、48時間以降、陰性になり、製品中には存在していなかった。サルモネラは24時間後以降、陰性になり、ブドウ球菌は、72時間以降、陰性になった。クロストリジウムは、時間の経過とともに減少していくが、全ての区分で陽性であった。ただし、別ロットの製品では、クロストリジウムが陰性であり、ロット間のばらつきがあった。

図1の乳酸菌数とpHの結果より、漬込直後から乳酸菌数の増加が確認され、pHも次第に低下しているため、赤ずしは、発酵食品であるといえる。また、pHが4.5以下の食品では、ポツリヌス菌の生育が抑制されるが、漬込12時間後以降には、赤ずしのpHは4.5以下になっていた。さらに、漬込24時間以降には、サルモネラ、ブドウ球菌が陰性になったので、これらの結果から、pHを指標として、漬込後24時間以上経過した赤ずしを発酵食品として扱うのが、食品の安全性の面から、最も妥当であると考えられる。

表1 漬込中の赤ずしの菌数、pH及び水分活性の推移

	1時間後	4時間後	8時間後	12時間後	24時間後	48時間後	72時間後
一般生菌	6.9×10^6	2.0×10^8	8.7×10^7	1.1×10^8	1.1×10^7	6.0×10^6	8.5×10^8
大腸菌群	2.3×10^4	1.0×10^5	2.4×10^4	3.7×10^4	1.6×10^3	陰性	陰性
<i>E. coli</i>	陰性						
乳酸菌	1.8×10^7	3.5×10^8	9.5×10^7	9.6×10^7	6.2×10^6	1.2×10^6	9.7×10^8
サルモネラ	8.0×10^2	1.5×10^3	1.2×10^3	1.5×10^2	陰性	陰性	陰性
ブドウ球菌	1.6×10^4	1.5×10^4	3.0×10^3	6.0×10^2	陰性	5.0×10	陰性
黄色ブドウ球菌	陰性						
クロストリジウム	1.2×10^3	5.7×10^2	8.5×10^2	5.5×10^2	2.5×10	8.0×10	1.0×10^2
pH	5.98	5.25	4.97	4.46	4.02	3.97	3.95
水分活性	0.976	0.979	0.973	0.973	0.973	0.976	0.976

(菌数の単位はCFU/g)

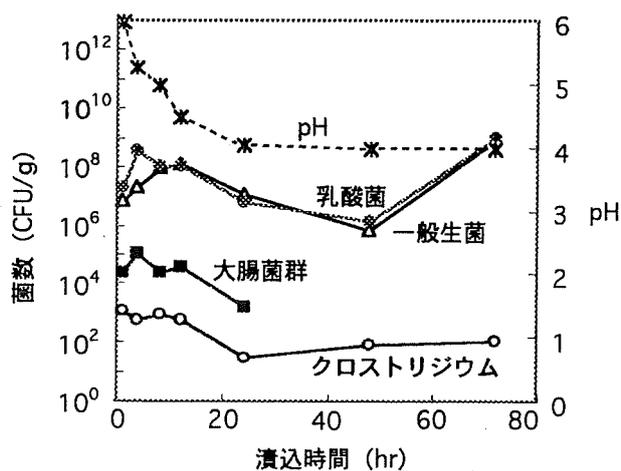


図1 漬込中の赤ずしの菌数及びpHの変化

表2 いずし、漬物等の非加熱摂取食品の衛生指導基準 (秋田県)

一般細菌数 ¹⁾	基準なし
大腸菌群	基準なし
<i>E. coli</i>	陰性
食中毒原因菌	陰性

1) 備考

一般細菌数にあつては、発酵食品、乳酸菌等を添加した食品及びこれらを原材料とした食品には適用しない。

2) 赤ずしの原材料の微生物検査結果

赤ずしの微生物汚染の原因を調べるため、原材料の微生物検査を行い、その結果を表3に示した。キュウリ、赤ジソ、笹の葉には、一般細菌、大腸菌群がともに多数検出された。クロストリジウムについては、洗浄・塩もみ後の赤ジソ、洗浄後の笹の葉で多く検出されたので、赤ずし製品のクロストリジウムは、これらの原料由来であると考えられる。

表3 赤ずしの原材料の菌数

	キュウリ (未洗浄)	キュウリ (洗浄、 塩漬)	赤ジソ (未洗浄)	赤ジソ (洗浄)	赤ジソ (洗浄、 塩もみ)	ご飯 (味付け)	笹の葉 (洗浄)
一般生菌	4.3×10^4	3.6×10^5	5.4×10^3	1.2×10^5	6.4×10^5	6.5×10^3	1.5×10^5
大腸菌群	1.3×10^2	1.9×10^3	陰性	1.0×10^2	6.6×10^3	1.4×10^3	3.0×10^3
乳酸菌	2.2×10^3	2.1×10^5	3.0×10^5	3.5×10^8	2.1×10^5	6.5×10^2	1.5×10^5
サルモネラ	陰性	5.0×10	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
ブドウ球菌	4.5×10^2	3.5×10^3	2.0×10	5.0×10^2	2.2×10^4	5.0×10	4.0×10^2
クロストリジウム	3.0×10	9.5×10^2	1.0×10^2	2.0×10^2	7.9×10^3	7.5×10	2.0×10^3

(単位はCFU/g)

3) 漬込時間の経過による乳酸菌の種類の変化

図1より、赤ずし中の乳酸菌数に増減があることが判明した。このことから、赤ずし中の乳酸菌の種類が変化していることが推測されたので、漬込時間毎の乳酸菌の優先種を調べるため、無作為に各10株ずつ乳酸菌を釣菌し、同定を行った。

乳酸菌の同定の結果、漬込8時間後には、*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* が4株、*Leuconostoc citreum* が4株、*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* / *dextranicum* 1 が2株、漬込12時間後には、*Lactobacillus coprophilus* が3株、*Leuconostoc citreum* が4株、*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* / *dextranicum* 1 が3株、漬込24時間後には、*Leuconostoc citreum* が1株、*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* / *dextranicum* 1 が4株、*Lactobacillus coprophilus* が1株、*Leuconostoc lactis* が3株、*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* / *dextranicum* 2 が1株、漬込48時間後には、*Leuconostoc citreum* が1株、*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* / *dextranicum* 1 が2株、*Leuconostoc lactis* が5株、*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* / *dextranicum* 2 が1株、*Lactobacillus curvatus* が1株、漬込72時間後には、*Leuconostoc citreum* が6株、*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* / *dextranicum* 1 が4株検出された。

乳酸菌の同定結果より、乳酸菌の種類毎の菌数の割合を算出し、図2に、各漬込時間における赤ずし中の乳酸菌の種類別割合を示した。図2より、経時的に、乳酸菌の種類及びその割合が異なっていることがわかった。このことから、赤ずしの乳酸発酵は、単一の乳酸菌によって行われるのではなく、漬込時間の経過に伴い、異なる数種類の乳酸菌の関与によって、行われていることが推察された。

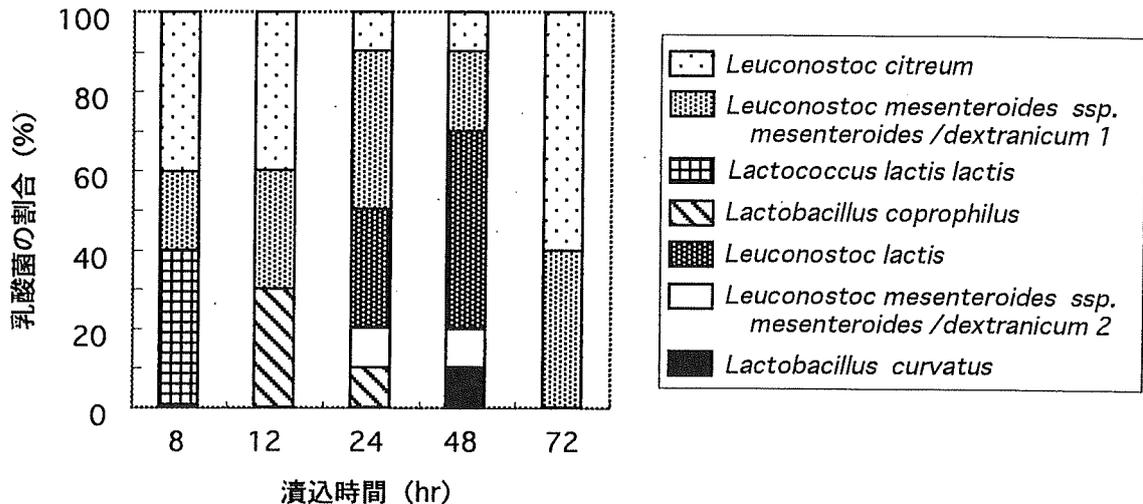


図2 各漬込時間における赤ずし中の乳酸菌の種類別割合

4) 赤ずしのクロストリジウムの同定

赤ずしのクロストリジウムの同定の結果、赤ずしで検出されたのは、*Bacteroides ovatus*、*Bacteroides thetaiotaomicron*であることがわかった。*Bacteroides*は、グラム陰性の嫌気性桿菌で、芽胞を形成せず、ヒトや動物の口腔、腸管などに生息しており、食中毒菌ではない。しかし、本菌に汚染されているということは、一般に、不衛生な環境で製造されているという指標になる。

5) まとめ

秋田県の「食品等の衛生指導基準」によると、そう菜（非加熱処理）については、一般細菌数が 10^6 以下（食品1gあたり）という基準があるが、発酵食品では基準を適用しないことになっている。今回調査した赤ずしについては、これまで、発酵食品とそう菜のどちらに該当するかという判断基準がなかった。そこで、秋田県生活環境文化庁生活衛生課食品衛生班の依頼により、赤ずしの微生物検査を行ったところ、漬込直後から乳酸菌数の増加が確認され、pHも次第に低下していることがわかった。乳酸菌数の増加及びpHの低下は、製造日の異なる別ロットの製品についても確認されたので、赤ずしは、発酵食品であるといえる。また、pHが4.5以下の食品では、ポツリヌス菌の生育が抑制されるが、漬込12時間後以降には、赤ずしのpHは4.5以下になっていた。さらに、漬込24時間以降には、サルモネラ、ブドウ球菌が陰性になったので、これらの結果から、pHを指標として、漬込後24時間以上経過した赤ずしを発酵食品として扱うのが、食品の安全性の面から、最も妥当であると考えられる。

なお、赤ずしの製造法の今後の改善点として、原料由来の大腸菌群や食中毒原因菌を減少させるためには、野菜類を洗浄するとき、0.1~0.3%の酢酸水溶液または、200ppmの次亜塩素酸ソーダ水溶液で洗浄する方法が効果的である。また、笹の葉は、必須のもの（例えば、飾りのため）ではないので、プラスチックフィルムで代用するか、笹の葉を使用する場合には、煮沸消毒して用いるとよい。

しよつつる風新調味料の開発（第6報）

—ハタハタ・イワシを用いたしよつつるの試験醸造—

高橋光一，戸松誠，柴本憲夫（秋田県総合食品研究所応用発酵部門）

熊谷昌則（秋田県総合食品研究所食品開発部門）

Koichi TAKAHASHI, Makoto TOMATSU, Norio SHIBAMOTO, and

Masanori KUMAGAI

【要約】

冷凍のハタハタとイワシを原料に、市販の酵素剤と米麴を用いて、しよつつるの試験仕込みを行った。ハタハタと食塩区は、仕込から31ヶ月目で魚体の大部分が溶解したが、全窒素は1.5%と低く、アミノ酸総量も少なかった。しよつつるは、旨味不足で塩角や魚臭が残っていた。ハタハタと酵素剤添加区は10ヶ月目で魚体は溶解し、全窒素は1.8%台であった。しよつつるは発酵香のある、旨味の良好なものであった。ハタハタと米麴添加区は、食塩区より溶解が速く、15ヶ月目で溶けていた。仕込初期よりY値の低下が特異的であり、アミノ酸ではLysが少なくAspが多かった。しよつつるの色は、やや濃いめであるが旨味と甘味に特徴があった。イワシと食塩区は、油の分離が多くて魚体の溶解が遅く、31ヶ月目でも塊が残っていたが、成分的には窒素成分やアミノ酸総量が多かった。塩角は残るが香りは良好で、旨味の有るしよつつるであった。イワシと酵素剤添加区は、31ヶ月目で魚体は完全に溶けていたが、溶液は粘性の強いものであった。全窒素は2.5%と非常に高く、アミノ酸はGlu・Lysの組成比が高く、有機酸では乳酸の組成が高かった。色は濃いめであるが、発酵香のある旨味の強いしよつつるであった。

【緒言】

しよつつるのイメージが強いハタハタと、県内自家醸しよつつるの聞き取り調査結果で、美味しいと言われているイワシを用いたしよつつるの試験醸造を行った。県内では、昭和40年から50年代にかけて大漁に獲れたハタハタは、企業でのしよつつるや自家製のしよつつるの原料として用いられた。しかし急激なハタハタ漁の落ち込みに伴い、ハタハタは高騰し原料として利用できなくなり、しよつつる製造業者が減少し、自家製しよつつるも作られなくなった。現在市販しよつつるの原材料の表示からは、ハタハタ使用は2社であり、他はイワシ・アミ・魚の表示になっている。2社のハタハタもハタハタすしなどの水産加工残渣の利用と推察される。ハタハタ本来のしよつつるとイワシ単独のしよつつるの品質解明を目的に、市販の酵素剤と味噌用米麴を併用したしよつつるの試験醸造を、仕込から31ヶ月間常温

で発酵管理を行い品質等について検討した。

【実験方法】

1. 原材料

(1) 使用魚

秋田県沖で捕獲され、急速凍結されたハタハタとイワシを、室温で一日かけて解凍し、洗浄後しよつつるの試料に供した。魚は処理することなくラウンドの状態で使用した。

(2) 酵素剤

酵素剤は市販のプロテアーゼM「アマノ」(天野エンザイム株式会社)を使用した。

(3) 米麴

米麴は県内味噌製造工場から購入した味噌用米麴を使用した。

2. 試験区分

ハタハタは魚体量に食塩30%を混合した対照区、ハタハタに食塩30%と酵素剤を0.5%を添加した区、ハタハタに食塩30%と米麴を20%添加した区の3区分で行った。

イワシは魚体量に食塩30%を混合した区と、イワシに食塩30%と酵素剤を0.5%を添加した区の2区分で検討した。仕込の原料配合については表-1に示した。

表-1 原料配合

	A 1	A 2	A 3	B 1	B 2
	ハタハタ	ハタハタ+酵素剤	ハタハタ+米麴	イワシ	イワシ+酵素剤
原料重 (k g)	2.3	1.5	1.5	2.1	2.1
食 塩 (k g)	6.9	4.5	5.4	6.3	6.3
酵素剤 (g)	—	7.5	—	—	10.0
米 麴 (k g)	—	—	3	—	—

酵素剤：プロテアーゼM「アマノ」

3. しよつつる諸味の管理とサンプリング

しよつつる諸味は、仕込から31ヶ月間常温で管理を行い、その間8回にわたって攪拌とサンプリングを行った。仕込から15ヶ月間は重石を掛け、魚体の溶解で液汁が増加した時点で重石をはずした。

4. 成分分析方法

前報¹⁾の方法に従って行った。

5. 官能試験

仕込から31ヶ月目の諸味を、東洋濾紙No. 2の濾紙でろ過し、濾液を直火で加熱し沸騰後1分間保持したしよつつるを室温で自然冷却した。その間発生したしよつつるのオリを、同様の濾紙でろ過した清澄な液を官能試験に供した。

【結果】

1. しよつつる諸味の経時変化

(1) ハタハタ

A1は、4ヶ月目で内臓部より溶解し、6ヶ月目で魚体の表面より3割程度の溶解、10ヶ月で全体の5割程度まで進んだ。その後の溶解は遅く24ヶ月目で魚体の8割が、31ヶ月目で魚体のほとんどが溶解し、底部に骨の残渣が残った。

A2は、2ヶ月目で魚体が崩れ、4ヶ月目では幾分魚体の塊が残るものの、6ヶ月目ではほとんどが溶解し、底部に骨の残渣が堆積した。10ヶ月目では完全に溶解し、底部の骨も細かくなっていた。その後の諸味は、幾分粘性に低下が見られたが大きな変化は無く、31ヶ月目まで着色が進んだ。

A3は、A1より魚体の溶解が早く、4ヶ月目で3割、6ヶ月目で5割程度の溶解が進み、10ヶ月目では塊が1割程度残っていた。15ヶ月目では完全に溶解し着色も進んでいた。米麴の粒は溶けきらず残っていた。以後諸味の形態は麴の粒が少なくなったが、大きな変化が見られず着色が進んだ。

(2) イワシ

B1は、4ヶ月目で内臓部分が、6ヶ月目で魚体の表面の溶解が見られたが、10ヶ月目で全体の約2割程度の溶解で、魚体の形ははっきりと残っていた。20ヶ月目では、魚体の5割程度が砕けており骨だけの部位もあった。24ヶ月目では魚体はかなり溶解したが、頭と骨の部位が残っており、溶解液はかなり粘性のあるヘドロ状であった。31ヶ月目でも魚体の2割が塊として残っていた。また、20ヶ月目以降着色が進んだ。

B2は、4ヶ月目で魚体の表面から2割程度が溶解し、油分が多い状態であった。6ヶ月目では魚体はかなり軟らかく身が崩れており、魚の形がなくなっていた。15ヶ月目では魚体の7割程度の溶解が見られたが、頭部の形は残っており、諸味はかなりの粘性があった。24ヶ月目では頭部も分解し、31ヶ月目では魚体の溶解は終わっているが、骨の分解には至ってなかった。B2は15ヶ月目以降着色の進行が早かった。

2. 一般成分分析

(1) 全窒素の変化

図-1に示した全窒素の経時変化は、全ての試験区で仕込から6ヶ月目まで

に急増して最大値を示したが、それ以降の変動は少なかった。6ヶ月目以降食塩のみでの試験区は31ヶ月目まで緩やかに増加し、麴添加区は24ヶ月目までは微増したが、以後の変化は見られなかった。全窒素量は酵素剤添加区での値が大きく、食塩区に比べて0.5%以上多い結果であり、イワシの全窒素はハタハタに比べ約1.5倍多い結果であった。

(2) ホルモン窒素の変化

図-2に示したホルモン窒素の経時変化は全窒素に類似しており、全試験区で10ヶ月目まで急増し、以後は緩やかな増加であった。魚体の溶解が早いA2とA3は、20ヶ月目で最大となり以後の変化は少なかった。イワシの試験区はハタハタの試験区に比べ何れも高い値を示し、特に酵素剤添加区でイワシは1.4%と高かったが、ハタハタの試験区は1%以下と低い結果となった。

(3) pHの変化

図-3に示したpHの経時変化は、A1を除く試験区は仕込時から熟成と共に徐々に低下した。A1は仕込から15ヶ月目まで低下し、その後徐々に高く推移し24ヶ月目以降7付近まで上昇した。ハタハタは5.45~6.82と試験区分によりその差が大きく、イワシは5~5.54と試験区に関わらず一定に推移した。

(4) 滴定酸度の変化

図-4に示した滴定酸度Iの経時変化は、pHの低下と共に何れの試験区でも増加し、イワシの値が大きくハタハタの値は少なかった。図-5に示した滴定酸度IIの経時変化は、仕込から6ヶ月目までに急激に増加し以後の変化は少なかった。ハタハタよりイワシの値が高い傾向であった。ハタハタの麴添加区の値が他の2区より高いのが特徴であった。

(5) 測色値の変化

図-6に示した測色値(Y%)の経時変化は、仕込から徐々に低下したが魚体の分解の速い酵素剤試験区の着色が大きかった。魚体の分解の遅いA1は熟成期間終了時まで緩やかに低下した。米麴試験区は仕込から熟成初期の段階で急激なY%の低下が見られ、20ヶ月目で10%以下と着色が進んだ。

直接還元糖分は、米麴試験区が仕込時より10%台で推移し、他の試験区では1%以下であった。

(6) 一般成分値

31ヶ月経過したしよつる諸味の、一般成分値を表-2に示した。

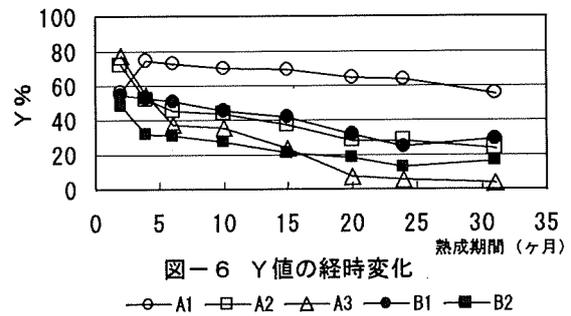
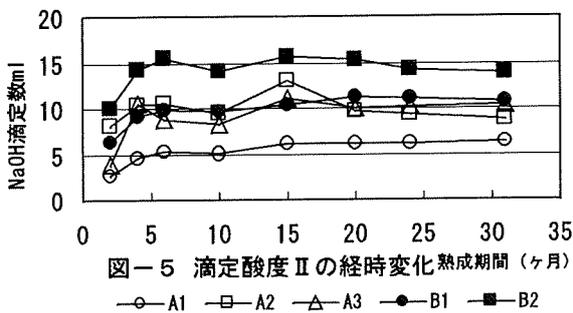
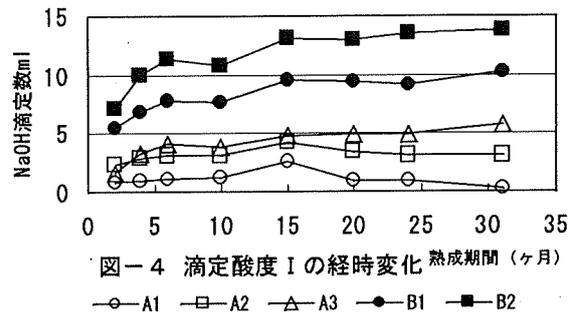
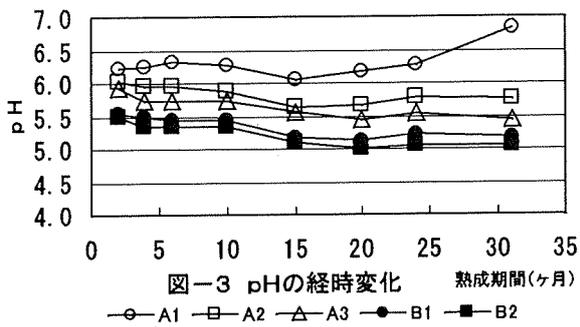
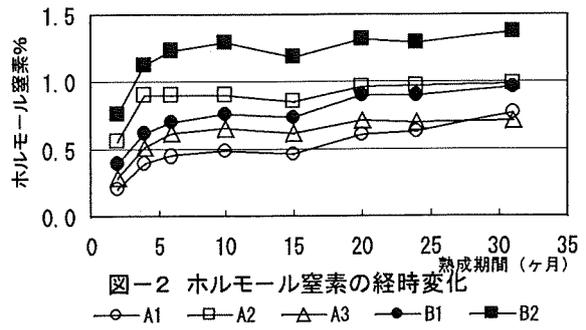
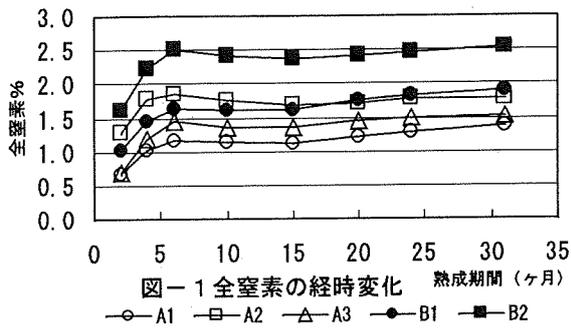


表-2 一般成分値(31ヶ月目)

	A 1	A 2	A 3	B 1	B 2
全窒素 (%)	1.38	1.77	1.50	1.88	2.54
ホルモン窒素 (%)	0.77	0.98	0.71	0.95	1.37
pH	6.82	5.76	5.45	5.17	5.04
Y値 (%)	55.4	23.2	3.3	29.4	16.8
食塩分 (%)	28.9	28.1	27.0	27.6	26.2
無塩可溶性固形分 (%)	9.1	13.2	12.3	11.4	16.4
直接還元糖分 (%)	0.24	0.39	8.56	0.91	0.72
滴定酸度 I (ml)	0.3	3.2	5.7	10.2	13.8
滴定酸度 II (ml)	6.4	8.7	10.4	10.7	13.9

3. 遊離のアミノ酸分析

図-7に示した遊離のアミノ酸総量は、窒素成分と同様な経時変化を示し、A 1以外6ヶ月目までに最大となった。イワシはハタハタの5割増の値であり、酵素剤試験区は食塩試験区より5割増の結果であった。A 2の総量は仕込前半はA 1より高く推移したが終了時には差がなかった。個々のアミノ酸では何れの区もG l u・L y s・V a lの順に組成比が高く、麴試験区ではL y sが少なくA s p・L e uが多いのが特徴であった。また、イワシはハタハタに比べH i sの多い(図-8)のが特徴であった。仕込31ヶ月目の遊離のアミノ酸量については表-3に示した。

表-3 遊離のアミノ酸量(31ヶ月目) mg/100ml

Free amino acid	A 1	A 2	A 3	B 1	B 2
Taurine	112	119	327	339	369
Aspartic acid	375	619	567	495	764
Threonine	253	506	272	475	827
Serine	260	472	314	397	614
Glutamic acid	730	1,042	666	852	1,368
Glycine	266	325	229	234	401
Alanine	408	630	441	629	941
Cystine	76	146	78	106	163
Valine	315	626	337	585	906
Methionine	187	196	176	325	284
Isoleucine	223	367	254	342	424
Leucine	511	545	463	554	514
Tyrosine	25	11	28	33	52
Phenylalanine	204	329	247	310	463
Histidine	73	148	248	642	798
Ornithine	251	12	21	25	21
Lysine	510	805	394	833	1,306
NH ₄	174	113	88	94	118
Arginine	42	607	252	528	839
Proline	34	250	134	267	455
Total	5,029	7,867	5,534	8,062	11,627

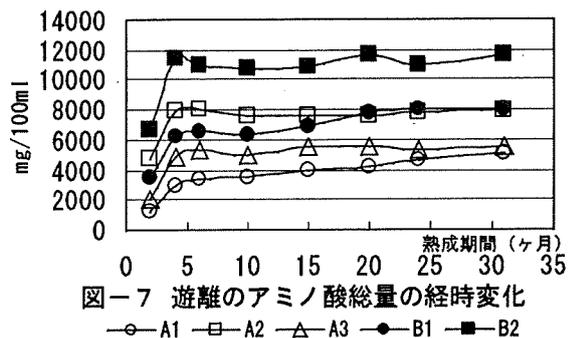


図-7 遊離のアミノ酸総量の経時変化
—○—A1 —□—A2 —△—A3 —●—B1 —■—B2

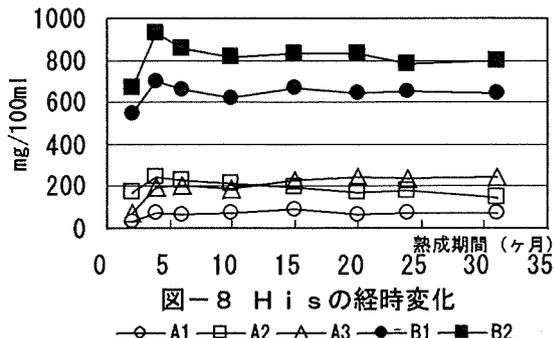


図-8 Hisの経時変化

—○—A1 —□—A2 —△—A3 —●—B1 —■—B2

4. 有機酸分析

図-9に示した有機酸総量の経時変化は、仕込2ヶ月目より6ヶ月目まで増加し、それ以降熟成後期まで全ての試験区で微増傾向を示した。

有機酸総量はハタハタで300~500 mg/100ml、イワシで1,000~1,200 mg/100mlの間で推移し、酵素剤試験区は他より10%程度多い傾向であった。

有機酸の組成比では、乳酸とピログルタミン酸が全体の76%~88%を占め、ハタハタはピログルタミン酸が40%以上、イワシは乳酸が50%以上と高い比率であった。

A1試験区は酢酸の比率が他の区に比べて10%と高いのが特徴であり、ハタハタの試験区では少量ではあるが、イ吉草酸が検出されている。経時的には何れの試験区も、ピログルタミン酸が2ヶ月目より増加し、ハタハタの試験区の増加が大きかった。乳酸の経時変化は、仕込時から熟成終了時まで何れの試験区でも変化が見られなかった。仕込から31ヶ月目の有機酸量については表-4に示した。

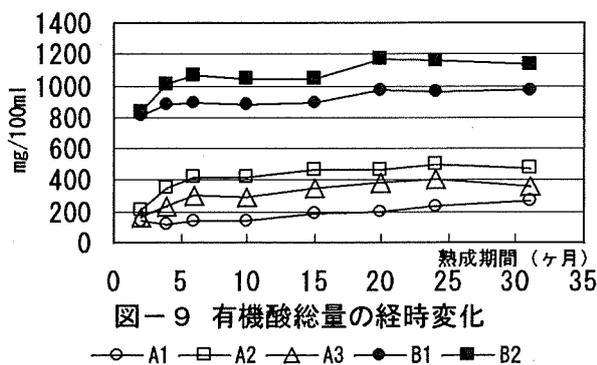


図-9 有機酸総量の経時変化

—○—A1 —□—A2 —△—A3 —●—B1 —■—B2

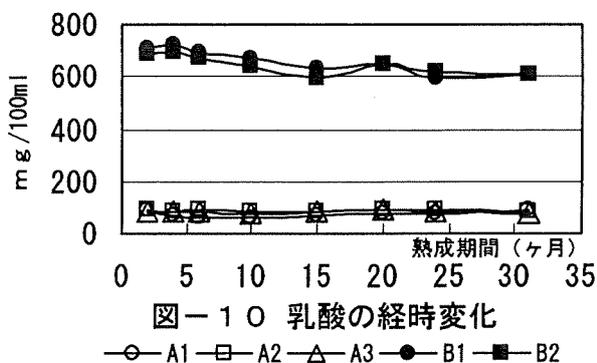


図-10 乳酸の経時変化

—○—A1 —□—A2 —△—A3 —●—B1 —■—B2

5. 官能試験

A1: 色は淡黄色で冴えがあり透明感が強い、香りは幾分魚臭が感じられるが、悪い香りではなく、味はやや塩角が立つが旨味が後から感じられた。

A2: 色はやや褐色がかっているが冴えがあって透明感が強い、香りは魚臭が

なく発酵香が有りスッキリしており、味はまろやかで旨味が強く感じられ、味の調和が良好であった。

A 3 : 色は黒褐色（濃口醤油様）で冴えがあり、香りは発酵香が有り魚臭はほとんど少なく、幾分麴の香りがする、味は塩味、甘味に次いで旨味が最後に強く感じられる。

B 1 : 色は褐色で冴えがあり透明感があって綺麗であり、香りは旨味を感じるような香りで良好であった、味は幾分塩角が立つものの旨味が強く味の調和が良好であった。

B 2 : 色は幾分濃いめの褐色であるが冴えがある、香りは発酵香がありスッキリして良好である、味は塩角がなく旨味が強いが、幾分酸味が感じられた。

表-4 有機酸量 (31ヶ月目) mg/100ml

	A 1	A 2	A 3	B 1	B 2
クエン酸	4	11	22	20	20
コハク酸	5	9	18	17	16
乳酸	92	86	78	607	611
酢酸	29	15	14	35	38
ピロギルミン酸	117	311	203	238	391
イ吉草酸	7	17	5	0	0
有機酸総量	254	449	340	917	1,076

【結論】

ハタハタのしょつつるは、常温で食塩30%の従来法では魚体の溶解に2年半以上を要し、窒素成分も増加したが全窒素は1.5%以下と低いものであった。仕込から2年目以降は、A r g の分解によるアンモニアの増加に伴いpHの上昇が確認された。また、酵素剤添加区では10ヶ月で、米麴添加区では15ヶ月で魚体は溶解し、熟成期間の短縮が明らかとなった。全窒素も24ヶ月で1.5%以上と高く、アミノ酸ではG l u の比率の高いのが特徴であった。

イワシを用いたしょつつるの熟成期間が2年半では、酵素剤添加区の魚体は溶解するが、従来法では2割程度の塊が残存した。イワシは油分が比較的多く溶解の妨げとなっており、諸味も他のしょつつるに比べて、粘性の高いのが特徴であった。全窒素は2.5%と高く、アミノ酸ではL y s とH i s が、有機酸では乳酸の比率が高いのが特徴であった。官能的にも旨味が非常に強いしょつつるであった。

【文献】

- 1) 高橋光一・戸松誠・柴本憲夫・熊谷昌則 秋田総食研報告 第1号 69~78, (1999)

米味噌の HEMF 生成における仕込条件の影響

尾張かおる、高橋光一、渡辺隆幸

(秋田県総合食品研究所 応用発酵部門)

Kaoru OWARI, Koichi TAKAHASHI and Takayuki WATANABE

【要約】

米味噌において、仕込条件の違いが 2(or5)ethyl-4-hydroxy-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF) の生成にどのように影響するかを調べるために、小仕込試験を行って検討した。水分と食塩を調節することで水分活性を変えた仕込では高水分仕込や低食塩仕込の味噌の HEMF 生成量が多かった。そこで、他の仕込条件も検討したところ、キシロースを添加することにより HEMF 生成量は顕著に増加したが、着色が激しく官能評価は良くなかった。生成量も充分で、官能評価も良かったのはアルコール脱水麴¹⁾添加仕込であった。

【緒言】

HEMF は醤油・味噌の重要な香気成分のひとつであり²⁾、その強いカラメル様の甘い香りは塩味緩和効果を持つ³⁾他、抗酸化性⁴⁾・抗腫瘍性⁵⁾等の機能性も報告されている。そのため味噌中の生成量を増やすことには重要な意義がある。県内の米味噌の香味をよりよくすることを目的に、仕込条件が HEMF 生成に与える影響を検討した。

【実験方法】

1) 原料

大豆は中国大豆、米麴は秋田県内味噌製造工場から購入、酵母は *Zygosaccharomyces rouxii* AM2⁶⁾ を用いた。

2) 仕込試験 1

基本配合は麴歩合 10 歩、水分 45%、食塩 12%、大豆は加圧蒸 (0.8kg/cm²、40 分) とし、水分と食塩の配合を下記のように変えて 5 区分仕込んだ。仕込総量各 10kg で、発酵・熟成温度は 25℃、同期間は 120 日間とした。

		目標水分 %	目標食塩 %
1	コントロール	45.0	12.0
2	低水分	42.0	12.0
3	高水分	47.5	12.0
4	低食塩	45.0	10.0
5	高食塩	45.0	13.0

3) 仕込試験 2

基本配合は麴歩合 10 歩、水分 45%、食塩 12%、大豆処理は加圧蒸 (0.9kg/cm²) とし、仕込条件を下記のように設定し仕込総量各 10kg で 6 区分仕込んだ。発酵・熟成温度は 25°C、同期間は 120 日間とした。

変更条件	
1 散湯蒸煮	大豆蒸煮条件
2 コントロール	
3 低食塩	食塩
4 高水分	水分
5 アルコール脱水麴	麴 50%置換
6 キシロス 2%添加	

4) 成分分析

一般成分は基準味噌分析法に準じた。酵母生菌数はプレート法で、エタノールはガスクロマトグラフ (GC) 法で、水分活性は NOVASINA 社 AW センターを用いて分析した。HEMF は林田らの方法⁷⁾で抽出後、尾張らの方法⁸⁾に準じて GC 法で測定した。

5) 官能評価はパネル 5 人により 5 点法 (1:良い、3:普通、5:悪い)で行った。

【結果と考察】

試験仕込 1

- 1-1) 一般成分の変化：色 (Y%) や pH においては、高水分区の変化が他の 4 区分に比べて穏やかであった。エタノール生成量は、30 日目以降高水分区と低食塩区がコントロールや低水分、高食塩区分に比べ多かった。酵母生菌数はどの区分でも 30 日目から 60 日目にかけて増殖のピークがあった。その中で高水分区と低食塩区では他の区分より菌数が多かったが 60 日目以降急激に減少した。(図 1)
- 1-2) HEMF の変化：すべての試験区で 30 日目から 60 日目にかけて急激に生成した後、90 日目まで微増し、その後減少していた。高水分区、次いで低食塩区は 30 日目以降コントロールより生成量が多く (約 20 μg/g)、この条件による HEMF 増強効果が認められた。逆に高食塩区と低水分区では少なく、高水分区と低食塩区の約 1/2 しかなかった。(図 2)
- 1-3) 水分活性：仕込後 60 日目まではどの試験区も急激に減少したが、それ以降は横這いであった。コントロールに比べて低食塩区と高水分区が高い値を示し、高食塩区と低水分区は低かった。HEMF の生成は (図 2)、エタノールの生成や水分活性の低下に伴う酵母の増殖と減少に大きく左右さ

れていることが示唆された。

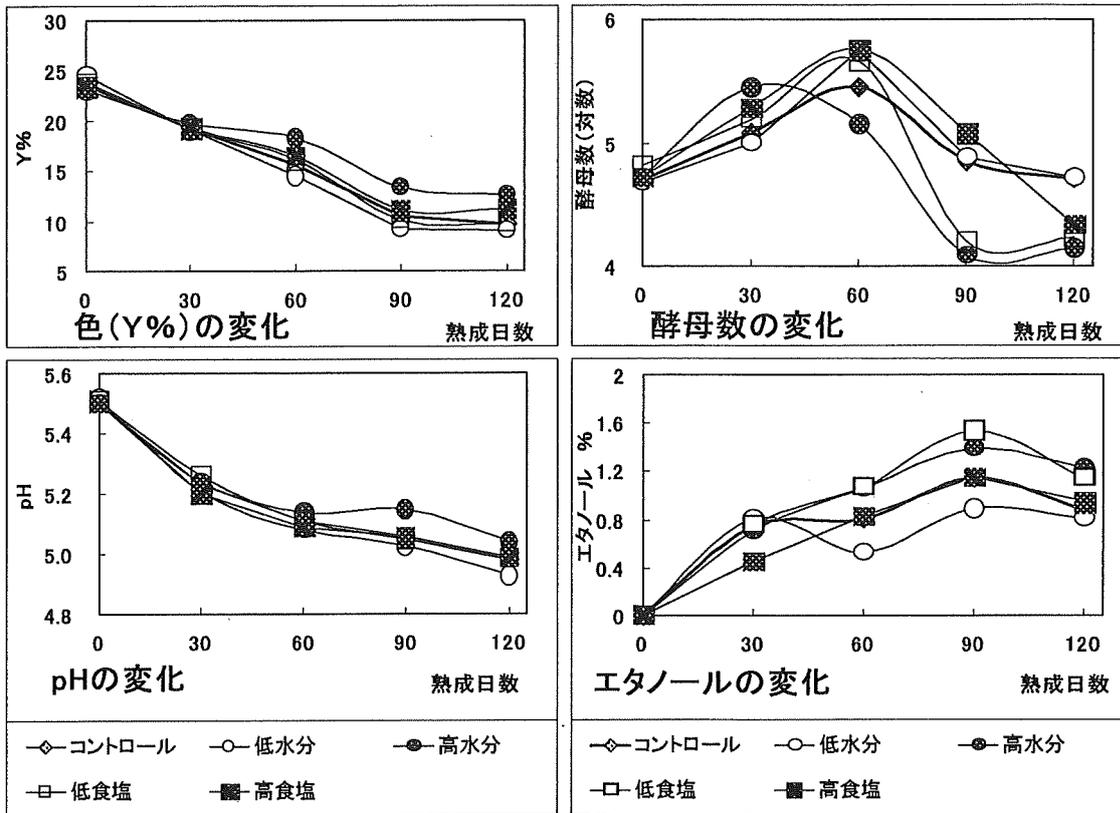


図1 試験仕込1の一般成分の変化

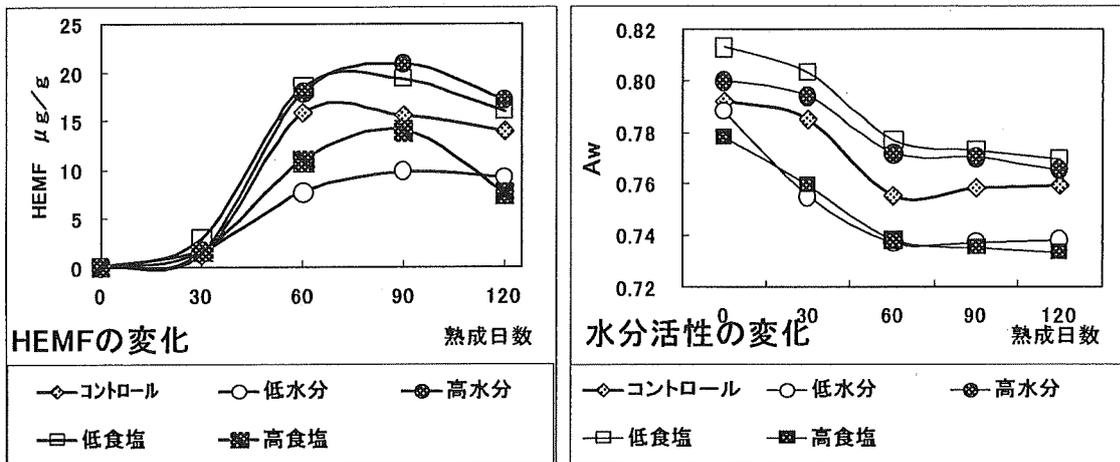


図2 試験仕込1のHEMFと水分活性の変化

試験仕込2

2-1) 基本配合で仕込んだものをコントロールとし、大豆の蒸煮方法、食塩・水分配合、アルコール脱水麴添加、HEMFの前駆体と言われるペントース(キシロース)添加の影響を検討した。

一般成分：色(Y%)、pHにおいては、キシロース添加区が他と大きく異なっていた。HEMF生成量もキシロース添加区が他の区分の2倍以上である 53

$\mu\text{g}/\text{g}$ 生成した。他の 4 区分ではすべて $20\mu\text{g}/\text{g}$ 以上生成し、コントロールとほとんど差がなかった。今回の試験仕込条件の変化では HEMF 生成量に大きな影響を与えず、仕込試験 1 の結果の生成量と同じ程度生成できた。(表 1)

2-2) 香気成分の変化：味噌において芳香を持つといわれている香気成分の消長を見ると、生成量にはかなり違いはあるものの、キシロース添加区が他と大きく異なっていた。生成量が際だって多かったのは 2-phenol-ethanol、HMMF、HEMF であり、逆に少なかったのは HDMF、仕込条件や熟成期間に影響を受けなかったのが maltol であった。HEMF 以外のフラノンの生成にも、ペントースの一種であるキシロースが大きく影響を与えていることから、味噌中の香気成分は糖のコントロールも重要であることが示唆された。(図 3) また、HEMF の消長を見ると、アルコール脱水麴添加区分はキシロース添加区以外のものに比べ 60 日目における生成量が多いことが特徴的であった。

表 1 試験仕込2の一般成分 (25°C、120日温醸後4°C保存官能評価時)

	食塩 %	粗水分 %	A w	Y %	pH	HEMF $\mu\text{g}/\text{g}$
1. 散湯蒸煮	12.3	48.8	0.736	14.1	4.93	22.8
2. コントロール	11.7	48.3	0.752	15.3	4.93	24.7
3. 低食塩	11.0	49.3	0.742	14.4	4.94	23.5
4. 高水分	12.1	50.0	0.759	16.2	4.96	21.2
5. アルコール脱水麴	11.6	48.5	0.749	14.3	4.92	23.2
6. キシロース2%添加	12.1	47.9	0.754	3.2	4.70	53.0

表 2 試験仕込2の官能評価結果 (5点法、パネル5人)

官能評価 結果	総合	色	香	味	組成
1. 散湯蒸煮	3.2	3.4	2.6	3.2	2.8
2. コントロール	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
3. 低食塩	3.0	3.8	2.2	2.8	3.4
4. 高水分	3.2	3.2	2.6	2.6	3.2
5. アルコール脱水麴	2.2	2.2	2.6	2.6	3.0
6. キシロース2%添加	4.2	5.0	3.4	3.4	3.6

2-3) 官能評価：コントロールを 3(普通)として、他の区分を相対評価した。キシロース添加区は、メイラード反応が進みすぎた結果着色が強かつ焦げ臭が強かったため、HEMF 生成量が多いにも関わらず官能評価が良くなかった。総合して良かったのはアルコール脱水麴添加区で、色・香り・

味においてコントロールより良いと評価された。特に色の評価が良かった。香りの点では低食塩区の評価が良かったが、色がぼけていたため総合ではコントロールよりよい評価にはならなかった。(表2)

2-4) まとめ:キシロース添加は味噌の HEMF の生成量を顕著に増加させたが、メイラード反応が進みすぎることにより激しい着色と焦げ臭があった。また HEMF 以外の香気成分の消長にも影響を与えていたことから、香りのバランスが他の区分と異なることも官能評価を低くした一因だったのかもしれない。生成量も充分で、官能評価も良かった条件はアルコール脱水麴添加であった。HEMF の最適量を今回の仕込試験結果から考えると、 $50 \mu\text{g/g}$ では多すぎて、 $20 \mu\text{g/g}$ 前後が良いと考えられた。

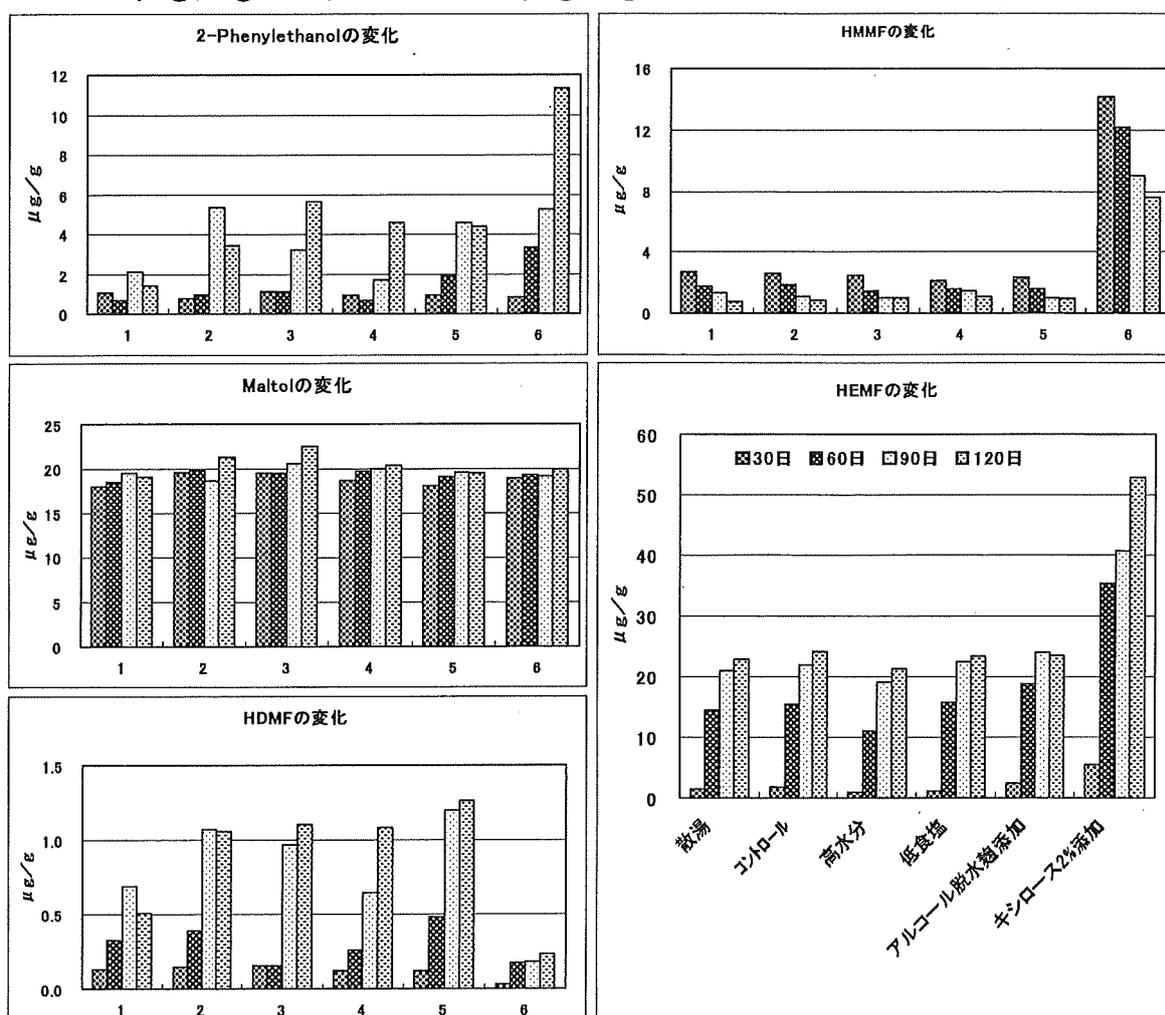


図 3 試験仕込 2 の香気成分変化

【文献】

- 1) 斎藤久一、渡邊誠衛、田口隆信、高橋仁、中田健美、岩野君夫、石川雄章：日本醸造協会誌、87, 915-921 (1982)

- 2) 菅原悦子：日本食品工業学会誌、38, 491-493 (1991)
- 3) 横塚保、布村伸武、佐々木正興、浅尾保夫：特開、昭 51-148072 (1976)
- 4) T. Koga, K. Moro and T. Matsudo : J. Agric. Food Chem. , 46, 946-951 (1998)
- 5) A. Nagahara, H. Benjamin, J. Storkson, J. Krewson, K. Sheng, W. Liu and M. W. Pariza : Cancer Reseach, 52, 1754-1756 (1992)
- 6) 渡辺隆幸：日本醸造協会誌、93, 22-27 (1998)
- 7) 林田安生、松田茂樹、西村賢了：熊本県工業技術センター報告、36、47-51 (1998)
- 8) 尾張かおる、高橋光一、渡辺隆幸：日本醤油研究所雑誌、26, 191-195 (2000)

γ-アミノ酪酸高含有米糠の製造法

戸枝一喜、青木淳子（秋田県総合食品研究所食品開発部門）

熊谷亮（物産中仙株式会社）

伊藤汎（伊藤技術士事務所）

Kazuki TOEDA, Junko AOKI, Makoto KUMAGAI, and Hiroshi ITO

【要約】γ-アミノ酪酸（GABA）を高含有させた米糠の製造法を検討した。その結果、米糠重量に対し 2-20%に相当するグルタミン酸ナトリウム（MSG）水溶液を加え、30℃で 3 時間反応させると米糠重量の 0.61-1.06%（w/w）の GABA が生成することが判明した。しかし、MSG の添加量が増加すると、GABA への変換効率は減少した。反応時の pH を 5.5 から 6.0 に調整すると 2%の MSG 添加量でも GABA が 1.03%（w/w）生成した。また MSG をグルタミン酸に置き換えた場合、pH 無調整でも米糠重量の 1.23%の GABA が生成した。反応温度としては反応 4 時間では 20℃が良好であり、18 時間では 15℃の方が良好で、4%の MSG 添加量で米糠重量の 1.38%（w/w）の GABA が生成した。

【緒言】

米糠は経時的劣化が早く酸化価が増大し、米糠臭が発生するために、食品用には迅速な加工が必要である。県外では米油の生産原料として利用されているものの、県内においては米油の精製メーカーが無く、食品用途としては漬物等に一部用いられているのみである。しかし、米糠には油脂、蛋白質、ビタミン、食物繊維が多く含まれる他、種々の機能性成分も含まれるため、加工法によっては有望な食品素材となる可能性がある。

一方、GABA は動植物¹⁾に広く存在し、血圧降下作用²⁾を持つことが知られている。また、米胚芽に存在するグルタミン酸脱炭酸酵素を利用し GABA を富化した製品が開発^{3,4)}されている。米糠には胚芽が含まれているが含有量が少ないため GABA の生成量は期待できない。そこで米糠中のグルタミン酸脱炭酸酵素を利用し、GABA の原料である MSG を加えることにより、GABA の高生産を検討した結果、1.4%の GABA を含有した米糠の製造法を開発したので報告する。

【原料および実験方法】

1) 米糠

米糠は仙北産のあきたこまちを精米して得たものを用いた。米糠は実験に供するまで -20℃で保存した。

2) GABA の分析

米糠を含む反応混合液 5ml に 40%TCA（トリクロロ酢酸）0.8ml を添加後、遠心分離（2900G×10 分）により除タンパクした。得られた上澄液中の GABA をアミノ酸分析機 JLC-300（日本電子）で分析した。

3) MSG 添加量の検討

米糠 10g、MSG 0.2–2g (米糠重量に対し 2–20%に相当)、水 40ml の混合液を 30℃ で 3 時間反応させた。経時的に反応混合液から 5ml をサンプリングし GABA の分析に供した。

4) 反応 pH の影響

米糠 10g、MSG 0.2g、水 40ml の混合液を 30℃ で 3 時間反応させた。pH 調整区は塩酸溶液にて 1 時間ごとに pH を 5.5–6.0 に調整した。一方、MSG の代わりにグルタミン酸 0.2g 置き換えた試験区を実施した。なお、その場合には pH は無調整とした。経時的に反応混合液から 5ml をサンプリングし GABA の分析に供した。

5) 反応温度の影響

米糠 10g、MSG 0.4g、pH5.5、0.2M クエン酸緩衝溶液 40ml の混合液を 15–30℃ の反応温度で 1–4 時間反応させた。なお、15℃ および 20℃ については 18 時間反応させた。経時的に反応混合液から 5ml をサンプリングし GABA の分析に供した。

6) GABA 高含有米糠粉の調製

米糠 200g、MSG 8g、pH5.5、0.2M クエン酸緩衝溶液 1000ml の混合液を 15℃ で 18 時間反応させた。これをスーパーマスコロイダー MKZB 6-5 型 (増幸産業) にて湿式摩砕した。次に、摩砕したスラリーをダブルドラムドラヤー JM-T 型 (ジョンソンボイラー) により乾燥し、粉砕した。

【結果と考察】

1) MSG 添加量の検討

MSG 添加量の増加にともない GABA 生成量が増加した。20% の添加量では反応 3 時

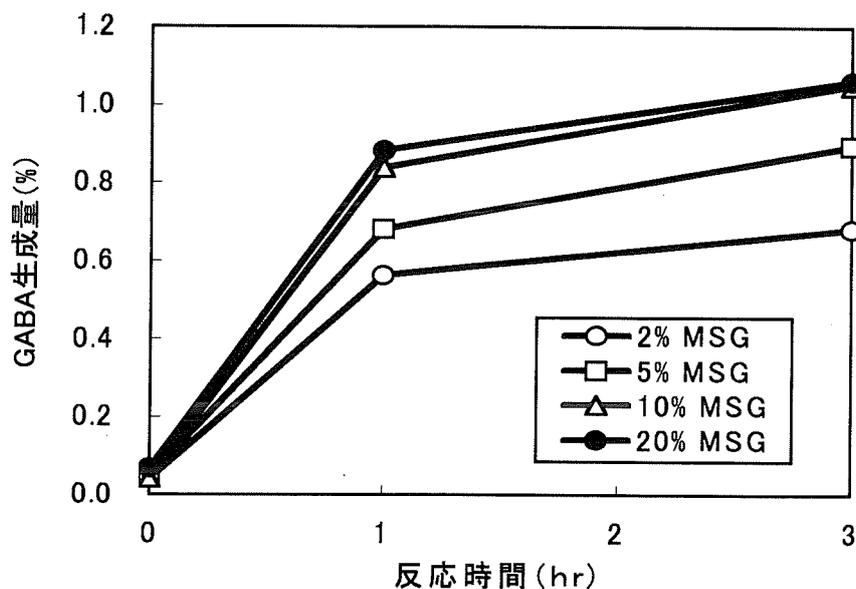


図 1 グルタミン酸ナトリウム添加量の影響

間で米糠重量の 1.06% (w/w) の GABA が生成したが、GABA の変換効率は MSG 添加量 5% 以上では急激に低下した (図 1)。反応 3 時間後の pH は 6.9–7.2 に上昇した。MSG の高濃度において GABA への変換効率が低下する原因としてはグルタミン酸の消費に伴い、ナトリウム蓄積し、pH 上昇が起こり、グルタミン酸脱炭酸酵素の活性低下またはグルタミン酸脱炭酸酵素の補酵素であるピリドキサルリン酸の不足が考えられる。

2) 反応 pH の影響

反応時の pH を調整すると、2% の MSG 添加でも反応 3 時間後において米糠重量の 1.03% (w/w) の GABA が生成した。(図 2)。一方 MSG をグルタミン酸に置き換えた場合、pH を調整しなくても GABA の生成量は MSG (pH 調整) 試験区より増加し 1.23% に達した。

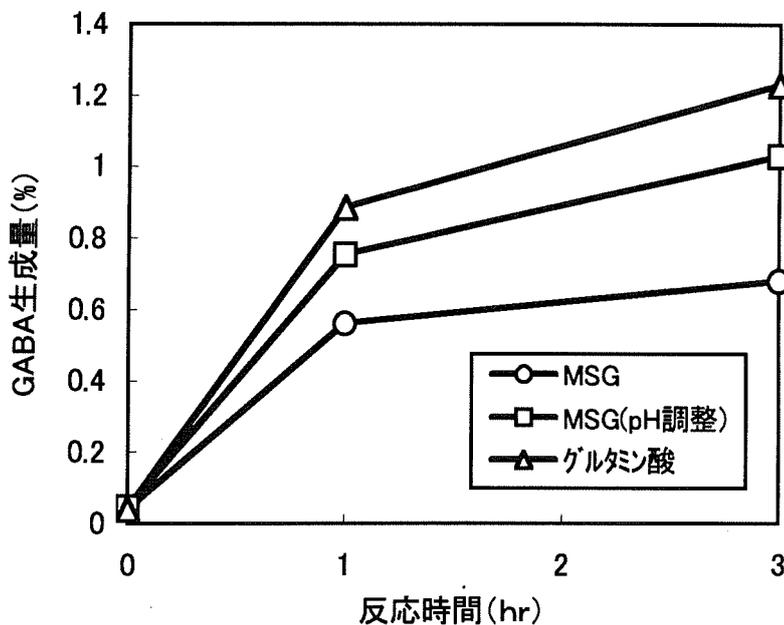


図2 反応pHの影響

3) 反応温度の影響

反応 4 時間では反応温度の上昇に伴い 20°C までは GABA 生成量が増加したが、それ以上の温度では減少した (図 3)。一方、反応 18 時間では 20°C より 15°C の方が好ましく、米糠重量の 1.38% (w/w) の GABA が生成した (図 4)。反応 18 時間では反応液中の微生物も増加するため、GABA の生成には米糠中のグルタミン酸脱炭酸酵素以外に微生物の関与も考えられる。

4) GABA 高含有米糠粉

試作により、平均粒度約 100 ミクロンの食味の改善された GABA 高含有した米糠粉が製造できた。また、GABA 高含有米糠粉は加熱処理されているので、米糠油の酸化劣化等は殆ど起こらないと考えられる。GABA 高含有米糠粉の利用例としてはパン製造において、小麦粉の 2 割を GABA 高含有米糠粉に置き換え可能であった(デ

ータ示さず)。

以上の結果より、反応時間、反応温度、反応 pH および MSG 添加量をコントロールすることにより、種々の GABA 含有量の米糠が生産可能であり、その乾燥品である GABA 高含有米糠粉も種々の食品へ利用可能であることが示唆された。

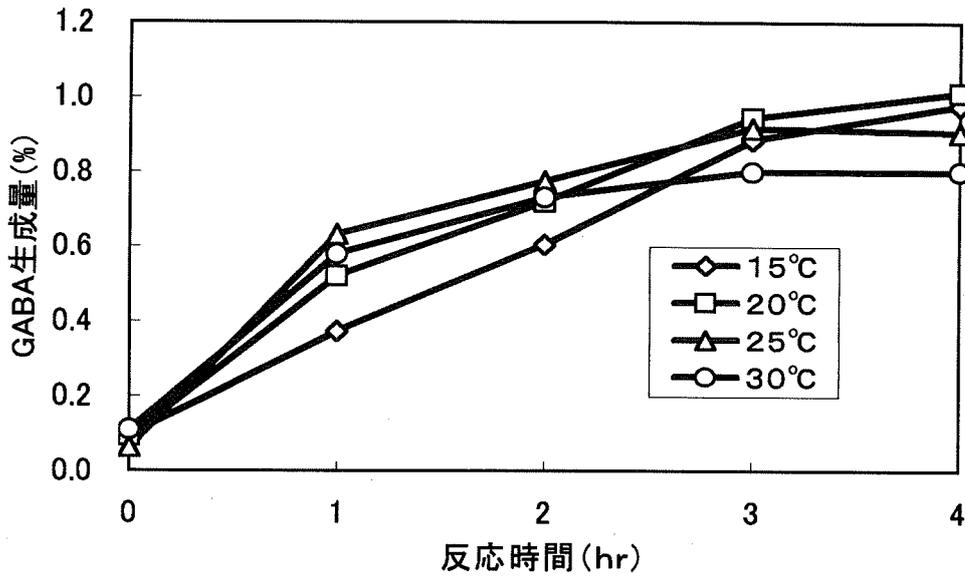


図3 反応温度の影響

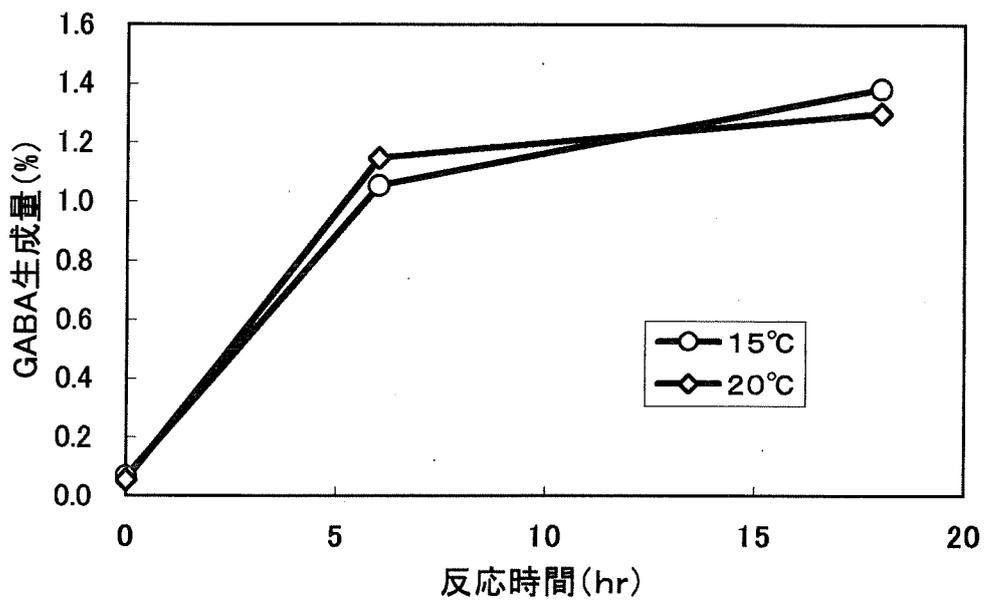


図4 反応温度の影響

【文献】

- 1) 浜田尚樹、村北宏之：島津評論、45, 183-187 (1988)
- 2) H. C. Stanton: Arch. Int. Pharmacodyn., 143, 195-204 (1963)
- 3) T. Saikusa, T. Horino and Y. Mori: J. Agric. Food Chem., 42, 1122-1125 (1994)
- 4) 戸枝一喜：植物資源の生理活性物質ハンドブック、590-593 (1998)

酒粕及び麹菌からの糖質関連有用物質の生産について

- *Bacillus* sp. D-35株由来キチナーゼの諸性質とその応用 -

木村貴一、高橋慶太郎、*立花忠則、高橋砂織
(秋田県総合食品研究所生物機能部門、*酒類部門)
Kiichi KIMURA, Keitaro TAKAHASHI, *Tadanori
TACHIBANA, Saori TAKAHASHI

【要約】

酒粕中に含まれる麹菌糸体を構成するキチンに着目し、キトオリゴ糖類の生産を検討し、高付加価値化を目指した。

秋田県内の土壌よりキチン分解酵素活性の高い細菌を分離し、分離株由来のキチン分解酵素について酵素の精製を行い、その諸性質を検討した。

分離菌は*Bacillus* 属の細菌で、D-35株と名付けた。菌体培養上清中にはメインとなる2種類のキチナーゼ、36kDa キチナーゼと、43kDa キチナーゼが存在し、それらを単離精製し諸性質を検討した。

これらキチナーゼにて麹菌糸体や酒粕を分解したところ、麹菌糸体からGlcNAcが、酒粕からは(GlcNAc)₂が生成した。

【緒言】

秋田県の主力産業の一つである清酒製造業より生じる酒粕は直接食用に供される割合は少なく、また、焼酎や漬物以外の有効利用法は開発されておらず、酒粕の高度有効利用が強く望まれている。酒粕の有効利用法に関しては、これまでに鮮度保持や食材としての利用方法の開発などが研究されてきた。しかしながら、その高度利用についての研究はなされていない。

本研究では、酒粕の酵素等による有効利用技術を開発し、高付加価値化を目指した。酒粕中に含まれる麹菌糸体を構成するキチンに着目し、キトオリゴ糖類を含むシロップの製造を目的とし、秋田県内の土壌より分離した菌株由来のキチン分解酵素等の諸性質を検討した。

【実験方法】

1. 使用培地

(a) LB培地 (NaOHでpH 7.5に調整)

1% Polypepton, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl

(b) AGS Yeast extract(AGS-Y)培地 (NaOHでpH 7.0に調整)

A液 5% K₂HPO₄, 5% NaCl

B液 2.5% MgSO₄ · 7H₂O

C液 1% FeSO₄ · 7H₂O, 0.1% CuSO₄ · 5H₂O, 0.1% ZnSO₄ · 7H₂O, 0.1% MnCl₂ · 4H₂O

A液 20ml, B液 20ml, C液 1mlを混合しYeast extract を0.1%となるように加え、1

Lにメスアップした。

LB培地は一般細菌生育用に使用し、AGS-Y培地はコロイダルキチンを加え、キチナーゼ生産菌の分離や、酵素取得を目的とした培養に使用した。

コロイダルキチンを追加するときは上記の培地に乾燥重量で0.5%となるように加え、ソニックでよく分散させてからオートクレーブした。

(c) Schaeffer's sporulation medium (DSM)

A液 0.8% Nutrient Broth(Difco), 0.1%(W/V) KCl, 0.012%(W/V) MgSO₄ · 7H₂O, 0.5mM NaOH

B液 1M Ca(NO₃)₂, 10mM MnCl₂, 1mM FeSO₄

A液、B液をそれぞれオートクレーブし、植菌直前にA, B液を1,000: 3で混合する。

2. 使用基質

(a) キチン[フナコシ株式会社 KF-0001-02]

フレーク状不溶性のキチンで、大きさが不揃いであり、コロイダルキチンやグリコールキチン等の基質調製に用いた。また、カラムに充填し、キチンアフィニティカラムの担体として使用した。

(b) コロイダルキチン(以下 CC)

不溶性のキチンで粒子が細かい。0.1M リン酸緩衝液 pH 6で0.2% CCに調整した物は活性測定の基質として使用した。製法は、キチン10gを乳鉢に入れ、かき混ぜながら少量ずつアセトン 20mlを加え、その後アセトンを揮発する。濃塩酸 200mlを少量ずつ加え、シロップ状になるまでかきまぜ、ガラスウールを用いて吸引濾過し、濾液を50% エタノール 500ml中に流し込む。CCが析出するのでよくかき混ぜて粒子を細かくする。10,000 rpm 10分間遠心し上清を捨てる。脱塩水を加えCCをよく洗浄し、10,000 rpm 10分間遠心し上清を捨てる。このステップを数回繰り返す。CC洗浄後、脱塩水に懸濁し透析チューブにつめ、流水で二日間、脱塩水で二日間透析する。透析終了後、10,000 rpmで10分間遠心し、上清を除き4℃で保存する。あらかじめ重さを量ったチューブに適当な重さのCCをとり、凍結乾燥してCC含量をはかる。(w/w)

(c) グリコールキチン(以下 GC)

水溶性のキチン。0.1M リン酸緩衝液 pH6で0.2% GCに調整した物は活性測定の基質として使用した。製法は、キチン5gに42%(W/W)水酸化ナトリウム 100mlを加え、ときどき攪拌しながら室温で減圧下に4時間以上置く。このキチンをガラスフィルターを用いて吸引濾過し、ガラスフィルター上に残った固形物を42%(W/W)水酸化ナトリウム約20mlで洗浄する。ガラスフィルターに残った固形物を乳鉢に移し、容器を冷やしながらクラッシュアイス50~70g, 少量ずつ加え、固形物を押しつぶす。14%(W/W) 水酸化ナトリウムを少量ずつ加え、よく混ぜながら250mlにメスアップする。大きい乳鉢に移して、氷上で冷やしながらエチレンクロロヒドリン 30mlを一滴ずつ、乳棒で混ぜながらくわえる。12時間以上、室温で放置する。一晩放置後、氷上で冷やしながら無水酢酸 10mlを一滴ずつ、乳棒で混ぜながら加える。2時間室温で放置する。酢酸を一滴ずつ加え、丁寧に中和する。透析チューブにつめ、流水で二日間、脱塩水で二日間透析する。透析終了後、10,000 rpm 10分間遠心し、上清を回収する。ロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、4℃で保存する。あらかじめ重さを量ったチューブに適当な重さのGCをとり、凍結乾燥してGC含量をはかる。(w/w)

(d) 麴菌糸体基質

麴菌を麴菌用液体培地にて25℃で7日間培養した物を、遠心し蒸留水で洗浄後、乾熱滅菌したものを、0.1M リン酸緩衝液 pH6 に乾燥重量で0.2%となるように希釈し、麴菌糸体基質として活性測定に使用した。

(e) 酒粕基質

脱塩水に酒粕を20%になるように加え、ホモジナイズし、オートクレーブ処理後、遠心。沈殿を回収し、蒸留水で洗浄後、20%に調整した物を使用した。

3. Lowry法(Folin法)によるタンパク質定量法¹⁾

A液は1% CuSO₄と2% 酒石酸ナトリウムと2% Na₂CO₃(in 0.1M NaOH)を1:1:100の割合で混合した。A液 1.5mlに試料300 μlを加え室温で10分間放置する。続いて1N フェノール試薬を150 μl加え室温で30分放置後、O. D. = 750 nmを測定した。これを検量線から牛血清アルブミン(以下、BSA)相当量に換算した。

4. Schales変法によるキチナーゼ活性測定方法²⁾

(a) 水溶性基質に対する酵素活性を測定する場合

0.2%GC溶液1mlと酵素溶液0.5mlを混合し、37℃で一定時間反応させた後、Schales試薬2mlを加え、15分間ヒートブロックにて100℃に加熱し、氷水中で冷却後、O. D. = 420 nmを測定した。

(b) 不溶性基質に対する酵素活性を測定する場合、0.2%CC懸濁溶液を基質とし、Schales試薬2mlを添加後、冷却遠心機で2000rpm 10分遠心し上清を回収した。回収上清を15分間ヒートブロックにて100℃に加熱して測定した。

GlcNAcで検量線を作成し、吸光度の減少から還元糖量を求めた。キチナーゼ活性の1 unitは、1分間に1 μmolのGlcNAcに相当する還元糖量を生成する酵素量とした。

5. SDS-PAGEとZymogram

(a) SDS-PAGE (Laemmli法^{3, 4)})

タンパク質の精製度確認のためにSDS-PAGEを行った。アクリルアミド濃度5~20%の市販グラジエントゲルPAGEL NPG-520L [ATTO]を用いて電気泳動を行い、泳動終了後、タンパク質をコマシーブリリアントブルーR-250で染色した。Zymogramに用いるSDS-PAGEゲルは常法に従い10%アクリルアミドゲルを作成した。トリス-グリシンを泳動用バッファーに用いて、20mAで泳動した。

(b) Zymogram

0.02% GCを含むアガーシートを作成し、泳動が終了したPAGEゲルのSDS除去処理をし、このゲルをアガーシートと密着させ、37℃で12~18時間反応させる。反応後、アガーシートは0.1% コンゴレッド溶液にて染色した。

6. キチナーゼ生産菌の分離

(a) 土壌からのキチン分解菌の分離法

土壌約0.3gを生理食塩水10mlに懸濁し、懸濁液10 μlを0.5% CCを炭素源として含むAGS-Y平板培地(20ml)で混釈法にて30℃3日間培養した。この平板培地はCCが存在するため白色不透明である。キチナーゼ生産菌はCCを分解しクリアゾーンを形成するので、簡単に選択できる。このクリアゾーンを形成したコロニーを選択し単離した

後、終濃度20% グリセロール溶液中に -80°C で凍結保存した。

(b) ペーパーディスク法によるキチナーゼ活性の評価

直径5 mmのペーパーディスクを0.5% CCを含む寒天プレート上にならべ、ろ過上清20 μl を滴下し、 37°C で1~2日間インキュベート後、プレート上に形成されたクリアゾーンの大きさから選抜した。

(c) キチンアズール法によるキチナーゼ活性の評価

キチンアズール含量が0.2%の0.1 M リン酸緩衝液 pH 6.0溶液を用意し、0.2% キチンアズール溶液1mlにろ過上清1mlを加え、 37°C で60分インキュベート後、遠心し、上清を回収、 100°C で5分間加熱し、酵素を失活した。O. D. = 560nmで生成したアズールを測定し、酵素活性とした。

7. キチナーゼの精製

(a) 培養方法

前培養として、LB培地上のシングルコロニーをLB液体培地で 30°C 、12時間培養した。さらに本培養として0.5% CCを含むAGS-Y液体培地に1/100量の前培養液を添加し、 30°C で3日間培養した。

培養終了後、培養液を遠心し、上清を得た。これを培養上清とした。

(b) 硫酸分画

培養上清に対して目的の濃度になるように硫酸アンモニウムを加え、タンパク質を塩析した。塩析物は遠心にて回収し20mM リン酸緩衝液 pH 6.0にて透析を行った。これを粗酵素とした。

(c) Sephacryl S-100HR を用いたゲルろ過

0.02% アジ化ナトリウムと0.15 M NaClを含む20mM リン酸緩衝液 pH 6.0を用いて常法に従って行った。これを限外ろ過濃縮した物をゲルろ過画分とした。

(d) キチンアフィニティーカラム

キチンを0.1M リン酸緩衝液 pH6.0に懸濁し、カラムに充填した。さらに、ベット体積の2倍~3倍量の20mM リン酸緩衝液 pH6.0で平衡化した。サンプルは常法に従って添加した。続いて、ベット体積と等量の20mM リン酸緩衝液 pH6.0にてキチンを洗浄し、バッファーを20mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.0 に切り換えて、ベット体積の3倍量流し吸着性の弱いタンパク質を溶出した。キチンに強い吸着性をもつタンパク質の溶出は20mM 酢酸にて行い、ベット体積の約2倍量を流した。20mM 酢酸溶出画分には0.4M リン酸緩衝液 pH 6.0 を1/5量加え、酵素の失活を防いだ。

8. N末端アミノ酸配列の分析

SDS-PAGE終了後のゲルから、タンパク質をPVDF膜に転写し、コマシーブリリアントブルーR-250で染色した。目的のバンドを切り出し、プロテインシーケンサー

PPSQ-10 [島津製作所]にてN末端アミノ酸配列を決定した。

9. ダイオネクスによる基質分解生成物の分析

HPLC-PAD法糖類分析システム DX-500 [日本ダイオネクス株式会社]を用いて分解糖類を分析した。カラムはCarboPac™ PA-1 (4 x 250 mm)を用い、100mM 水酸化ナトリウムの20~50%グラジエントで溶出した。

【結果と考察】

1. キチン分解微生物の土壌からの分離

秋田県内土壌よりキチナーゼ生産菌を新規に取得するため、土壌を田沢湖抱返溪谷、森吉山からそれぞれ300地点、計600地点で採集した。これら土壌から前述のキチン分解菌の分離法に従い、キチナーゼ生産株218株を取得した。

1次スクリーニングは218株を0.5% CCを含むAGS-Y平板培地で培養し、培地上に生成したクリアゾーンの大きさから41株を選んだ。

2次スクリーニングは、41株を0.5% CCを含むAGS-Y液体培地にて30℃で3日間培養し、培養上清を無菌ろ過した物を試料とし、ペーパーディスク法とキチンアズール・GC・CCを基質とした活性測定を行い決定した。

最初にペーパーディスクを行い、プレート上に形成されたクリアゾーンの大きさから29株を選抜した。続いてキチンアズールを用いた活性測定と、Schales法の常法に従いGC、CCを用いた活性測定を行った。その結果、14株を選んだ。

3次スクリーニングでは、ペーパーディスク法、キチンアズール法・GC・CCを基質とした活性測定を行い、さらに、キチナーゼの熱安定性を調べて選抜した。培養上清を60℃15分または80℃15分加熱後、Schales法で活性測定した。その結果、キチナーゼ活性が高く熱安定性が高いキチナーゼ生産菌、放線菌D-3株、細菌D-35株、D-53株の、合計3株が得られた。このうち、キチナーゼ活性と熱安定性が最も高く、増殖の速いD-35株で研究を進めることにした。(図. 1)

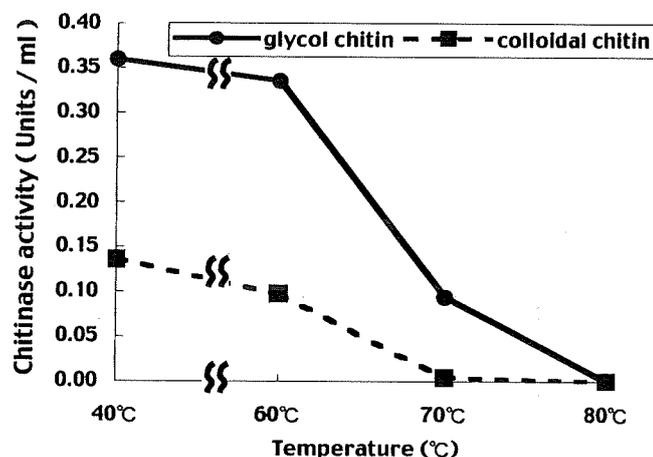


図. 1 D-35株の熱安定性

2. D-35株の諸性質について

(a) 芽胞形成とグラム染色

D-35株はLB培地で良く生育し、キチン存在下でキチナーゼを誘導する。平板培地上では直径2~3 mmの黄白色・円形で、全体的に平らなコロニーを形成する。

D-35株を芽胞形成培地DSMで30℃、24時間培養したところ、芽胞を形成した。微分干渉顕微鏡にて撮影したD-35株を図. 2に示す。菌体は長桿菌で、胞子は楕円形、胞子形成時に細胞の形が変わらない*Bacillus*型であった。

また、グラム染色を行ったところグラム(+)細菌であった。これらの特徴をふまえると、D-35株は*Bacillus*属と考えられ、今後D-35株は*Bacillus*. sp. D-35 (以下D-35株)と呼ぶことにした。

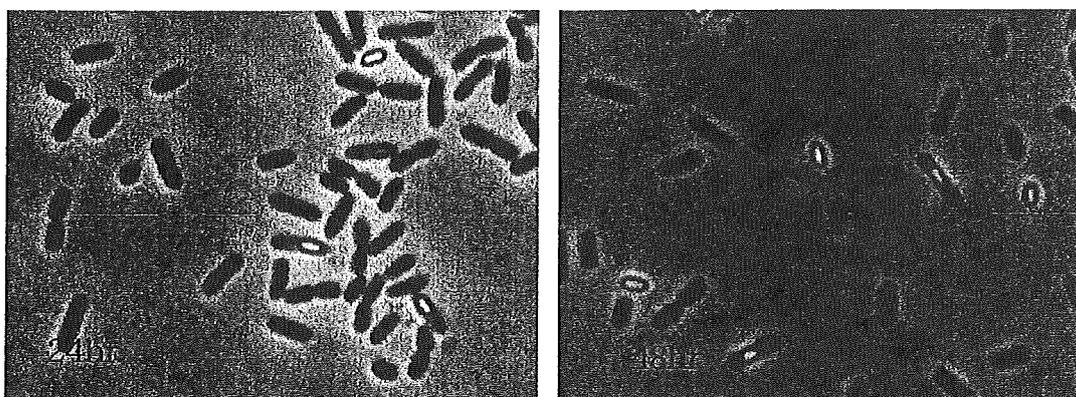


図. 2 D-35株の芽胞形成

培養24時間で芽胞形成が確認された。
黒く見えるのが菌体、白く見えるのが芽胞である。
菌体は長桿菌を示している。
DSM培地 pH 7, Agar plate
微分干渉顕微鏡、1,000倍

(b) D-35株のキチナーゼ生産タイムコース

D-35株キチナーゼの誘導条件を決めるため、0.5%のキチン、またはCCを炭素源として含むAGS-Y液体培地にて酵素誘導を試みた。培養温度は30℃とし、経時的にサンプリングを行い、上清中に含まれるキチナーゼ活性をGC、CCを基質としたSchales法で測定した。

その結果、CCでは培養2日目より酵素誘導が最大になるのに対し、キチンでは4日目以降にキチナーゼ活性が見られた。また、CCで誘導した方が活性が高かった。図. 3に示すように、酵素活性の誘導が早く活性の高いCCが培養時の誘導基質として適当と考えられた。以上より、今後の実験には0.5% CCを炭素源として含むAGS-Y培地にて30℃で3日間培養することにした。

(c) キチナーゼの確認

D-35株培養上清中のキチナーゼをSDS-PAGEとそれに続くZymogramで確認した。その結果、キチナーゼ活性を持つ5本のタンパク質バンドが検出された。デンスト

グラフで分子量を計算したところ、分子量の大きい順に47 kDa, 43 kDa, 40 kDa, 39 kDa, 36 kDaであった。このうちメジャーバンドである43 kDaと36 kDaについて酵素的性質を検討した。(図. 4)

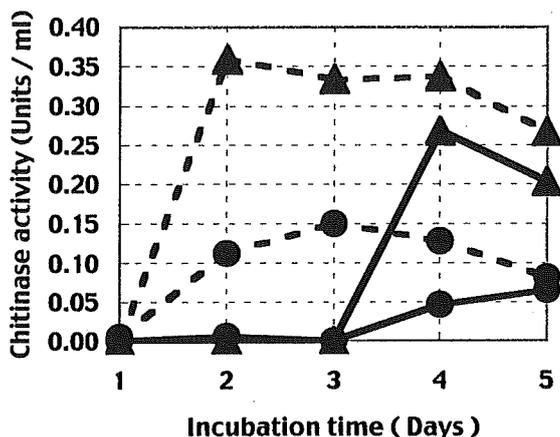


図. 3 D-35株由来キチナーゼ生産のタイムコース

培養基質としてキチンを加えた場合を実線で、コロイダルキチンを加えた場合を破線で表示。活性測定にGCを基質としたものは▲、CCを基質とした物は●で表示。

3. 43 kDaと36 kDaキチナーゼの精製方法

(a) 粘性物質の除去

培養上清中に含まれるタンパク質の濃縮と粘性物質の除去を目的に、様々な方法を検討したところ、硫酸分画が適当とわかった。D-35株培養上清中には粘性を持った多糖類と思われる物質が存在し、限外ろ過膜が目詰まりをおこした。また、凍結乾燥を行った場合、再溶解時に沈殿の発生や、強度の粘性を示した。粘性物質を除去しないとイオン交換カラム、ゲルろ過カラムなど以後の実験にも悪影響を及ぼすため硫酸分画を行ない、粘性物質の除去に成功した。

(b) 硫酸分画

粘性物質の除去に硫酸分画が有効とわかったことから、培養上清に添加する硫酸濃度の検討を行った。硫酸分画により生成した沈殿は、遠心(12,000 rpm, 30分, 4℃)にて回収し、20mM リン酸緩衝液 pH 6にて透析した物を試料として使用した。

その結果、硫酸濃度が40%飽和以下だと沈殿をほとんど得られず、80%飽和を越えるとフローティングペレットを形成し、遠心にて沈殿を回収出来なかった。そこで硫酸濃度を60%~75%飽和まで5%刻みで検討したところ、60%飽和で43 kDaと36 kDaキチナーゼが特異的に沈殿し比活性が高くなった。また、65%飽和以上では、比活性が低下した。

以上より、硫酸濃度60%が適当とわかった。60% 飽和硫酸分画におけるタンパク質回収量は培養上清中の6~8%程度と非常に少なかった。しかしながら粘性除去に適当な方法がないため以後の研究には60%硫酸分画透析物を試料として使用した。(表. 1, 図. 5 レーン 3)

表. 1 各硫酸濃度におけるタンパク質回収量とキチナーゼ活性

硫酸濃度	Total proteins (mg)	Specific activity (units / mg)	活性上昇率 (倍)	タンパク質回収率 (%)
0%	48.51	0.41	1	100
20%	0.07	N. D.	N. D.	1.37
40%	0.14	N. D.	N. D.	2.93
60%	3.04	2.64	6.39	6.26
65%	3.13	1.97	4.78	6.44
70%	2.73	1.48	3.59	5.63

N. D. : Not Detected

(A) CBB-staining (B) Zymogram

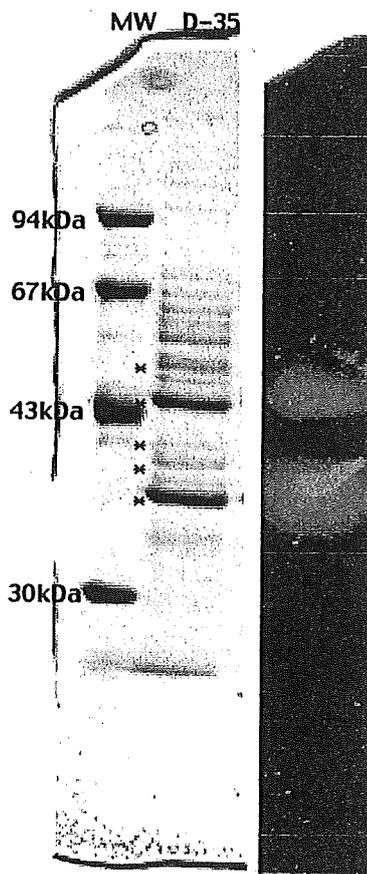


図. 4 D-35株培養上清のSDS-PAGE後のCBB染色(A)とZymogram(B)

Zymogramの結果、*で示したバンドに活性が確認された。

分子量は上から順に47 kDa, 43 kDa, 40 kDa, 39 kDa, 36 kDaと求められた。標準タンパク質としてホスホリラーゼb(94kDa)、牛血清アルブミン(67kDa)、オボアルブミン(43kDa)及びカーボニックアンハイドラーゼ(30kDa)を用いた。

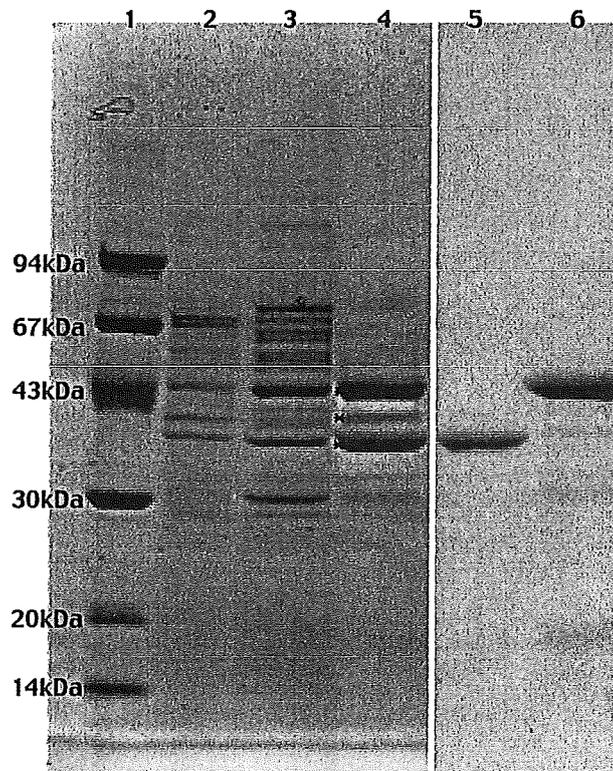


図. 5 36kDaと43kDaキチナーゼの精製

レーン1: MWマーカー, レーン2: 培養上清, レーン3: 60% 硫酸画分, レーン4: ゲルろ過画分, レーン5: 酢酸ナトリウム緩衝液溶出画分, レーン6: 酢酸溶出画分

レーン4*で示したバンド 43 kDa, 40 kDa, 36 kDaのN末端アミノ酸配列を分析した。

(c) Sephacryl S-100HR を用いたゲルろ過

60%硫酸画分をSephacryl S-100HRでゲルろ過で分画したところ、43 kDaと36 kDaキチナーゼを含む画分を得られた。SDS-PAGEで精製度を確認し各画分を1つにまとめた後、限外ろ過(YM-10膜)にて濃縮した物をゲルろ過画分として使用した。(図. 5 レーン 4)

(d) キチンアフィニティーカラム

43 kDaと36 kDaキチナーゼは分子量が近いいためゲルろ過で分離されず、ともに陰・陽イオン交換樹脂に非吸着である。そこでキチンアフィニティーカラムを行った。

その結果、43 kDaと36 kDaキチナーゼ以外のタンパク質は20mM リン酸緩衝液 pH 6の洗浄溶媒で溶出された。36 kDaキチナーゼはキチンに対して弱い吸着性を示し、20mM リン酸緩衝液 pH 6や20mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5の洗浄溶媒で溶出された。(図. 5 レーン 5)43 kDaキチナーゼはキチンに対して強い吸着性をもち酢酸にて溶出された。(図. 5 レーン6)

SDS-PAGEにて精製度を確認したところ、2つのキチナーゼの単離精製が確認された。精製ステップと収量を表. 2に示す。

表. 2 D-35株由来キチナーゼの精製

Purificationstep	Total volume (ml)	Total activity (units)	Total proteins (mg)	Specificactivity (units / mg)	Yield (%)
培養上清	2700	903	1206	0.75	100
硫酸分画	70	75.60	40.91	1.85	8.4
ゲルろ過・限外ろ過濃縮	23	53.7	5.03	10.7	6.0
36kDaキチナーゼ	93	28.8	1.51	19.1	3.2
43kDaキチナーゼ	22	1.78	1.27	1.41	0.2

基質：グリコールキチン

4. N末端アミノ酸配列の分析と相同性比較

各キチナーゼのN末端アミノ酸配列を分析し、BLASTにて相同性検索を行った。精製43 kDaキチナーゼ30残基と精製36 kDaキチナーゼ18残基、また、ゲルろ過画分の40kDaキチナーゼ20残基の相同性を比較した。

その結果、43 kDaキチナーゼは*Bacillus circulans* WL-12 chitinase A(MW = 73kDa, 69kDa, ChiAと表記)と、精製36 kDaキチナーゼは*Bacillus circulans* WL-12 chitinase D(MW = 55kDa, 39kDa, 38kDa, ChiDと表記)、40kDaキチナーゼは*Bacillus circulans* licheninase (EC 3.2.1.73)と相同性が高いことがわかった。(図. 6)

<i>B. circulans</i> WL-12 ChiA	41	N - <u>ADSYKIVGYPSWAAYGRNYNVADIDPTKV</u>
<i>Bacillus</i> sp. 43kDa	1	N - ADSYKIVGYPSWAAYGRNYDVADIDP*KV
<i>B. circulans</i> licheninase	32	N - <u>APNKPFQHTTYTSGSIKPN</u>
<i>Bacillus</i> sp. 40.4kDa	1	N - APNKPFQHTSYT*G*IKPN
<i>B. circulans</i> WL-12 ChiD	183	N - <u>NPGPSGSKWLIGYWHNFD</u>
<i>Bacillus</i> sp. 36kDa	1	N - HNPGPSGSKWLIGY**F

図. 6 D-35株由来キチナーゼのN末端アミノ酸配列及びそれらの相同性タンパク質

下段がD-35株N末端アミノ酸配列、上段が相同性の高いタンパク質

5. 43 kDaと36 kDaキチナーゼの諸性質

(a) 基質特異性

0.2%GC、0.2%CC、0.2%麩菌糸体を基質として基質特異性を調べた。

その結果、36 kDaキチナーゼはGCに対して基質特異性が高く、43 kDaキチナーゼはCCに対して基質特異性が高いことがわかった。また、麩菌糸体に対する分解活性は両酵素ともあまり強くないが、36 kDaキチナーゼの分解活性が高いことがわかった。分子量36 kDaと43 kDaのキチナーゼは基質特異性が異なることから、D-35株がキチンを効率良く炭素源として利用していると考えられた。(図. 7)

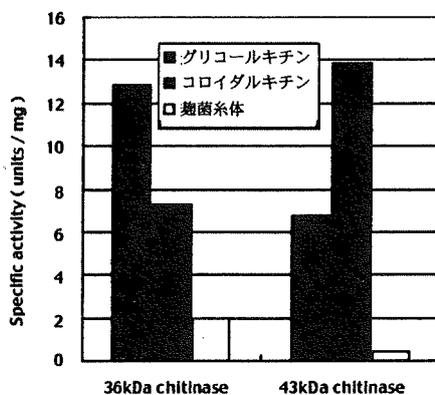


図. 7 基質特異性

(b) 至適温度

36 kDaキチナーゼは0.2%GCを、43 kDaキチナーゼは0.2%CCを基質として、至適温度を調べた。

その結果、36 kDaキチナーゼの至適温度は70℃、43 kDaキチナーゼの至適温度は65℃とわかった。(図. 8)

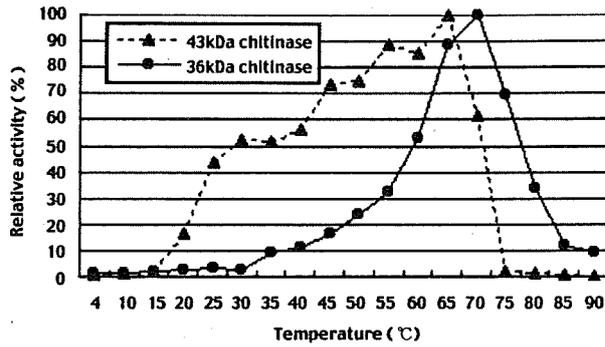


図. 8 至適温度

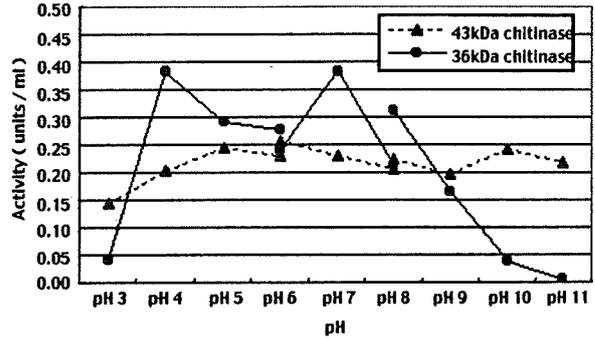


図. 9 至適pH

(c) 至適pH

36 kDaキチナーゼは0.2%GCを、43 kDaキチナーゼは0.2%CCを基質として、至適pHを調べた。pH 3~5は0.1Mのクエン酸-リン酸ナトリウム緩衝液を、pH 6~8は0.1Mのリン酸2ナトリウム-リン酸1ナトリウム緩衝液を、pH 8~11は0.1Mのグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液を使用した。

その結果、36kDa キチナーゼはpH 4~8まで安定していることがわかった。43kDa キチナーゼはpH 3~11の広いpHレンジで活性を持つことがわかった。(図. 9)

6. 麹菌糸体および酒粕のキチナーゼ分解産物

36 kDaキチナーゼ、43 kDaキチナーゼ、そして両キチナーゼの混合物であるゲルろ過画分を麹菌糸体基質及び、20%酒粕希釈液と4日間37°Cで反応させ、経時的にサンプリングを行い、上清中に見いだされるキトオリゴ糖類を分析した。

その結果、36 kDaキチナーゼ、43 kDaキチナーゼ、ゲルろ過画分すべてにおいて、麹菌糸体からはGlcNAc、酒粕からは(GlcNAc)₂を生成することがわかった。(図. 10)

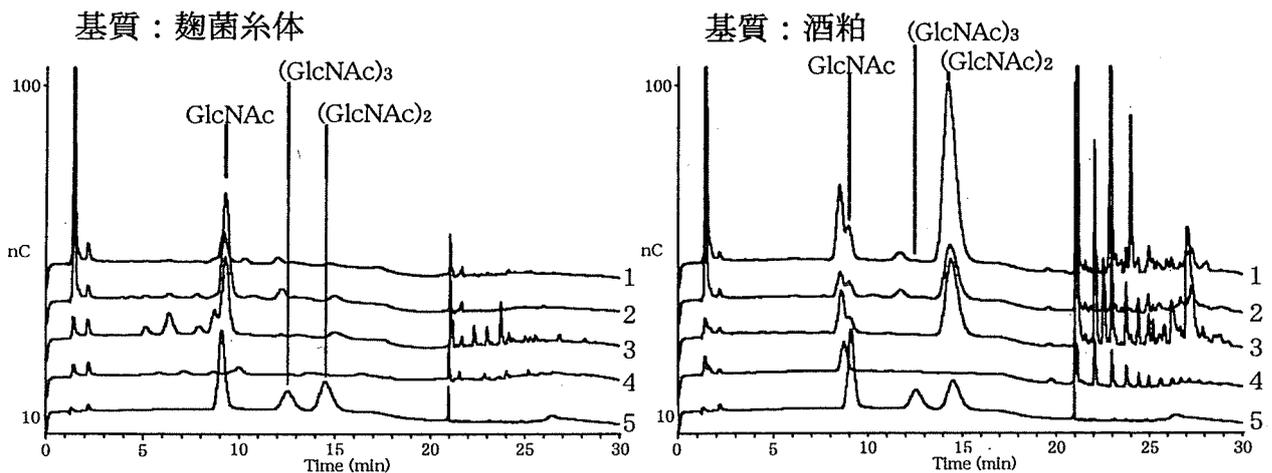


図. 10 麹菌糸体分解産物(左)と酒粕分解産物(右)

- ライン 1, 43kDa chitinase
- ライン 2, 36kDa chitinase
- ライン 3, ゲルろ過画分
- ライン 4, 基質
- ライン 5, GlcNAc STD

【まとめ】

- 1) 酒粕中に含まれる麹菌糸体を構成するキチンに着目し、キトオリゴ糖類を含むシロップの製造を目的としたキチナーゼ生産菌の分離や、キチナーゼの諸性質を検討した。
- 2) 秋田県内土壌より取得した新規キチナーゼ生産細菌、D-35株は長桿菌で芽胞を形成することや芽胞の特徴から、*Bacillus*属と判断された。
- 3) D-35株が培養上清中に主に生産するキチナーゼは分子量36 kDaと43 kDaの2種類であり、それぞれを単離精製し諸性質を検討した。両キチナーゼのN末端アミノ酸配列分析の結果、*B. circulans* WL-12と高い相同性を示した。
- 4) 36 kDaと43 kDaのキチナーゼと、単離前のゲルろ過画分で麹菌糸体と酒粕を分解し、分解生成物を分析したところ、両キチナーゼで麹菌糸体からはGlcNAcを、また、酒粕からは(GlcNAc)₂を生成した。

【参考文献】

- 1) O.H.Lowry, N.J.Rosenbrough, A.L.Farr, and R.J.Randall *J.Biol.Chem.*, 193, 265-265(1951)
- 2) Imoto, T. and K.Yagishita *Agric.Biol.Chem.*, 35, 1154-1156(1971)
- 3) Ames, G.F.L. *J.Biol.Chem.*, 249, 634-644(1974)
- 4) Laemmli, U.K. *Nature(London)*., 227, 680-685(1970)

遠心分離方式による清酒の上槽工程自動化技術の開発

田口隆信、中田健美、立花忠則、齋藤久一

(秋田県総合食品研究所 酒類部門)

Takanobu TAGUCHI, Takemi NAKATA, Tadanori TATIBANA, and Kyuichi SAITO

【要 約】

現在、清酒もろみを清酒と酒粕に分離する上槽方法としては圧搾法が主流であるが、吟醸もろみから吟醸酒を分離する場合、香気成分の飛散が問題となっている。そこで、遠心分離法を利用して吟醸酒の香気成分の飛散が少ない上槽装置の開発について検討した。

その結果、吟醸もろみの香気成分を飛散させずに吟醸酒を上槽する条件としては、吟醸もろみを遠心分離容器内に満杯にすること、密閉にすること、冷却することの3つの条件が必要であることが分かった。そこで、これらの条件をすべて満足できる「吟醸もろみ上槽システム」を開発した。さらにその装置を使用して吟醸もろみの上槽を行なった結果、吟醸酒の酒質や香気成分の値も良好であったので報告する。

【緒 言】

清酒もろみの分離上槽方法はフィルタープレスによる圧搾法が主流であるが、香気成分が品質上非常に重要な要素となる吟醸酒では、かねてから他の上槽方法が期待されていた。遠心分離による清酒もろみの分離試験としては布川ら¹⁾の二段階遠心分離で行なった報告があるが、香気成分に注目した上槽方法の研究はほとんど見当たらない。前報告²⁾において著者らは清酒もろみを全自動で清酒と酒粕に分離できるシステムの開発について報告しているが、香気成分の飛散が課題として残っていた。

そこで、本報では、香気成分飛散防止に注目した清酒もろみ分離システムの開発についての研究を行なった。

【実験方法】

1. 供試試料

1) 香気成分の標準液の調製

15%エタノール溶液にイソアミルアルコール100ppm、酢酸イソアミル10ppm、カプロン酸エチル10ppmを溶解させた香気成分標準液を調製し、小型遠心分離機を使用した香気成分飛散試験に使用した。

2) 吟醸もろみ上槽システムで使用した吟醸もろみ

精米歩合40%の白米を使用した総米100kgの吟醸もろみを仕込み、吟醸もろみ上槽システムを使用した上槽試験に供した。

2. 小型遠心分離機による香気成分飛散要因の検討

1) 開放遠心分離における香気残存率への冷却効果

香気標準液40mlを50ml容量のファルコンチューブに入れ、キャップをしないで、5℃～30℃で、3,000rpm、60分遠心分離を行ない、香気成分をヘッドスペース法³⁾により分析した。

2) 密閉遠心分離における香気残存率への冷却効果

香気標準液40mlを50ml容量のファルコンチューブに入れ、シーロンフィルムで密閉後、キャップをして、5℃～30℃で、3,000rpm、60分遠心分離を行ない、香気成分をヘッドスペース法により分析した。

3) 密閉冷却遠心における香気残存率への空隙の影響

遠心分離中の容器内の空隙が香気成分の飛散に与える影響を調べるために50ml容量ファルコンチューブに香気標準液を10～50ml入れ、シーロンフィルムで密閉後、キャップをして、5℃と30℃で、3000rpm、60分遠心分離を行ない、香気成分をヘッドスペース法により分析した。

3. 吟醸もろみ上槽システムの開発

1) 遠心分離回転体の密閉方式の検討

清酒もろみを清酒と酒粕に遠心分離する際、香気を飛散させないための回転体の密閉方法や清酒もろみの供給方法、清酒及び酒粕の回収方法について検討した。

2) 遠心分離回転体の冷却方式及び清酒もろみの満杯検知方法の検討

清酒もろみを清酒と酒粕に遠心分離する際、香気を飛散させないために、遠心分離中の清酒もろみを冷却する方法や回転体中に清酒もろみを満杯にする方法について検討した。

3) 遠心分離後の吟醸酒の回収条件の検討

吟醸もろみを吟醸酒と酒粕に分離した後、吟醸酒の香気成分が飛散しない回収条件について検討した。

4) 吟醸もろみ上槽システムの構造の検討

清酒もろみを遠心回転体中に満杯にして、密閉し、冷却しながら3,000rpmで遠心分離し、清酒と酒粕を別々に回収することのできる全自動の連続遠心分離機「吟醸もろみ上槽システム」の開発を行なった。

4. 遠心分離上槽清酒の成分と酒質

「吟醸もろみ上槽システム」で分離した清酒の成分を分析し、従来の上槽方法の中でも最良の方法とされる袋吊り法で分離した清酒との成分比較を行なった。さらに、きき酒による官能評価も行なった。

【結果と考察】

1. 小型遠心分離機による香気成分飛散要因の検討

1) 開放遠心分離において冷却が香気残存率へ与える影響

開放遠心分離後の香気成分残存率を図1に示した。その結果、20℃と30℃における60分の開放遠心分離では香気成分の残存率はほぼ0になってしまい5℃と10℃でも残存率は30%程度であった。開放遠心分離では、冷却による香気成分飛散防止効果は少なかった。

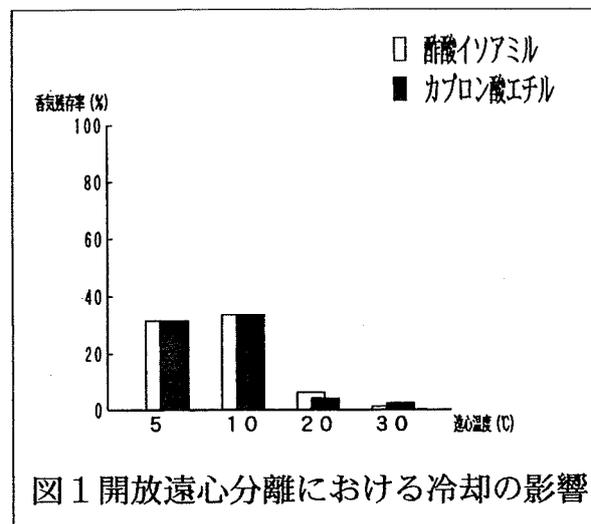


図1 開放遠心分離における冷却の影響

2) 密閉遠心分離において冷却が香気残存率へ与える影響

密閉遠心分離後の香気成分残存率を図2に示した。その結果、30℃における60分の遠心分離でも香気成分残存率は90%程度残り、5℃の遠心分離では残存率が100%近くであった。密閉遠心分離では、冷却による香気成分飛散防止効果はややみられたが、密閉することによる効果の方が大きいことが確認された。

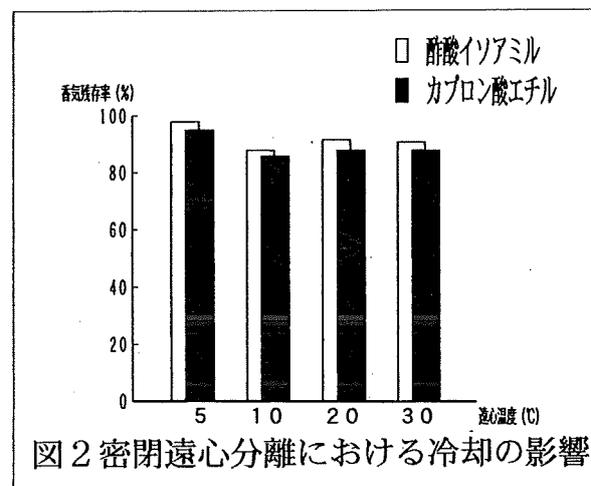


図2 密閉遠心分離における冷却の影響

3) 密閉冷却遠心において空隙が香気残存率へ与える影響

密閉条件における5℃と30℃の有空隙遠心分離後の香気成分残存率を図3に示した。その結果、30℃における遠心分離では液量10mlで空間が40mlある条件下では香気成分残存率が60%近くまで減少することから、遠心分離中の空隙は香気成分飛散に影響を与えることが示唆された。また、同条件下での5℃遠心分離時の香気成分残存率は80%近くまで回復し、有空隙遠心分離では香気成分飛散防止に冷却の効果があるものと考えられた。

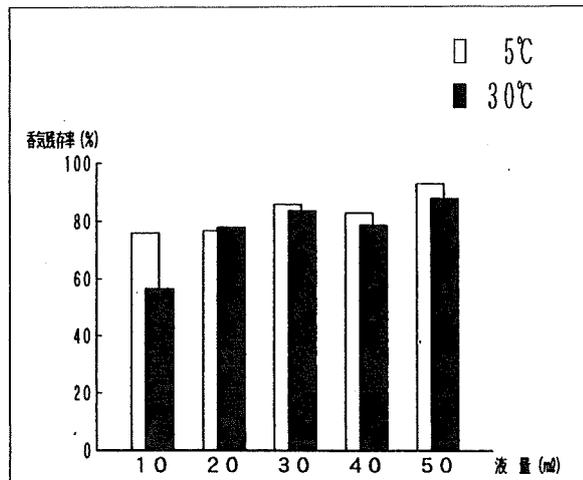


図3 密閉有空隙遠心分離における冷却の影響

2. 吟醸もろみ上槽システムの開発

1) 遠心分離回転体の密閉方式の検討

これまでの結果から、香気成分飛散防止には遠心回転体を密閉条件にすることが必須であることが分かったため、遠心回転体の密閉方式について検討した。その結果、図4に示したようにH型の円柱体を上下させて回転体を密閉にする方式を考案した。

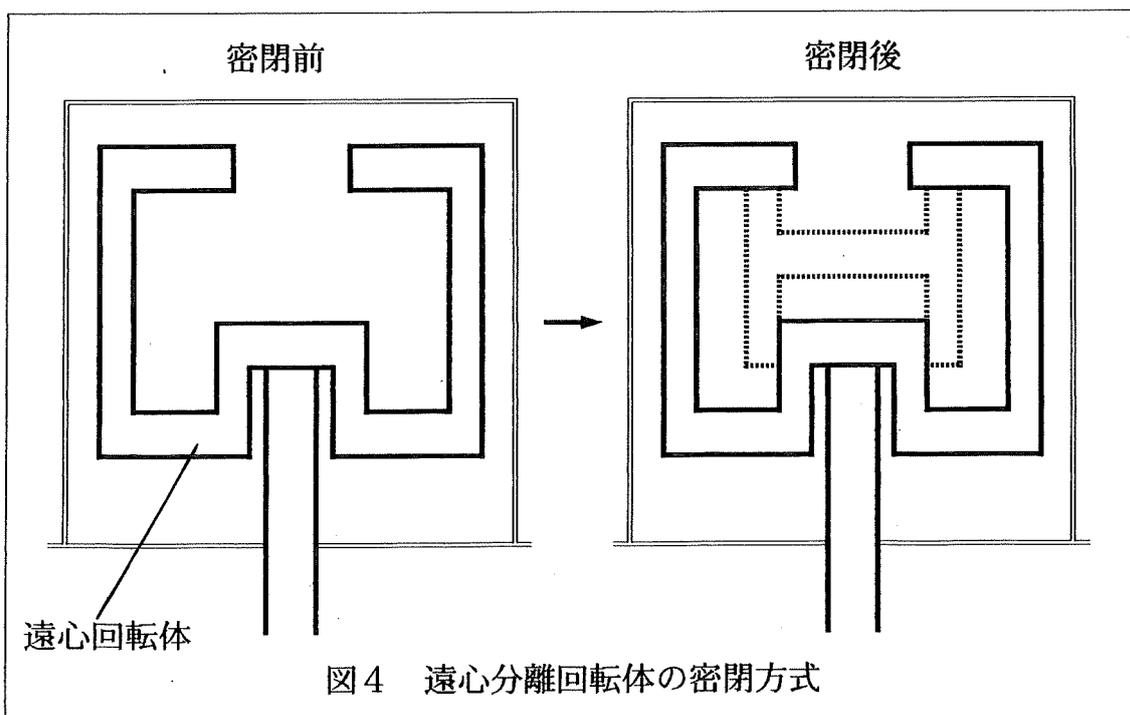


図4 遠心分離回転体の密閉方式

2) 遠心分離回転体の冷却及び満杯検知方式の検討

密閉遠心分離でも30℃有空隙条件では香気成分が飛散する可能性が示唆されたことから、遠心回転体中の清酒もろみを冷却する方法について検討した。

その結果、図5に示したように回転軸と回転体蓋の横側に冷媒管を配置して冷却する方法を採用し、遠心分離後の清酒の温度を測定したところ、もろみ温度からの上昇は4~5℃程度で、冷却効果が大きいことが確認された。また、満杯検知方式は図5に示したように、満杯になったもろみが検知器をはね上げる方式を採用した。

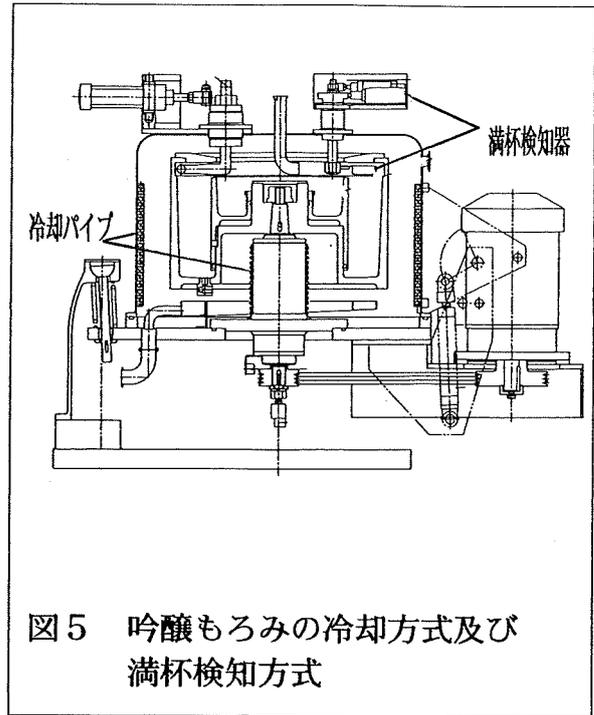


図5 吟醸もろみの冷却方式及び満杯検知方式

3) 遠心分離機後の吟醸酒の回収条件の検討

遠心分離後の吟醸酒の回収の際、香気成分が飛散しない条件を検討した結果、図6に示したように回転体の上部からスキミングパイプにより回収する方式を採用することとし、回収時の回転数は400rpm以下が香気成分の飛散が少なく良好な結果であった。

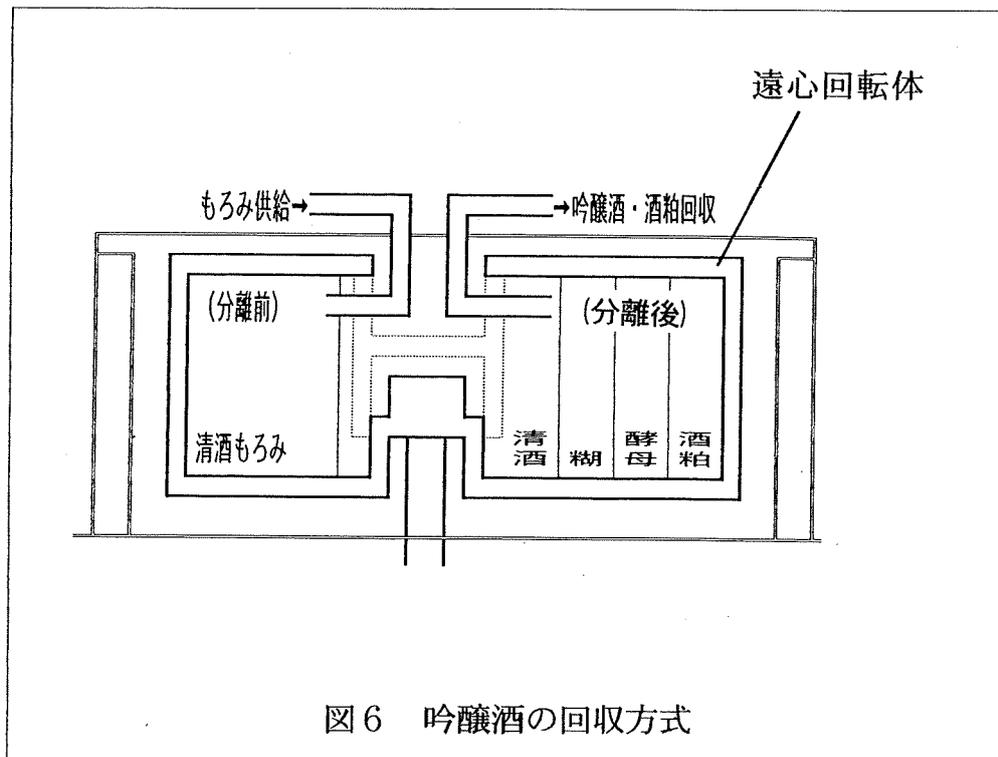


図6 吟醸酒の回収方式

4) 吟醸もろみ上槽システムの開発

これまでの試験結果を基にして、図7、図8に示したような回転体容量35ℓ、最大回転数3,000rpm（遠心力3,000G）の密閉冷却型で、吟醸もろみ自動供給、吟醸酒自動回収、酒粕自動回収できる全自動遠心分離機「吟醸もろみ上槽システム」を開発した。

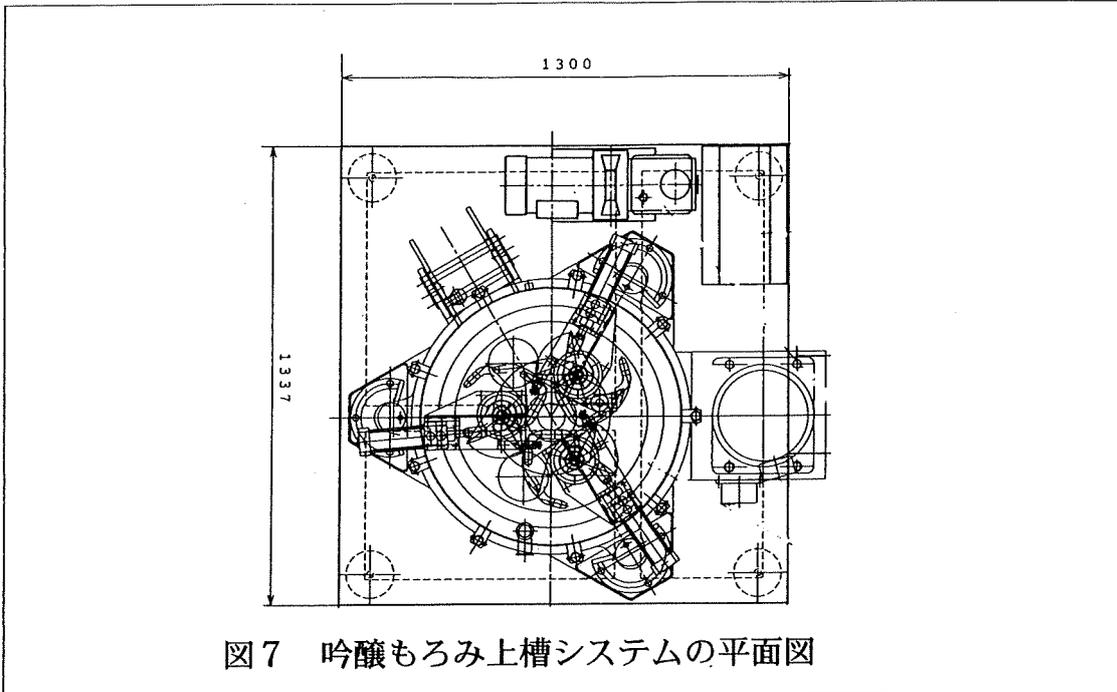


図7 吟醸もろみ上槽システムの平面図

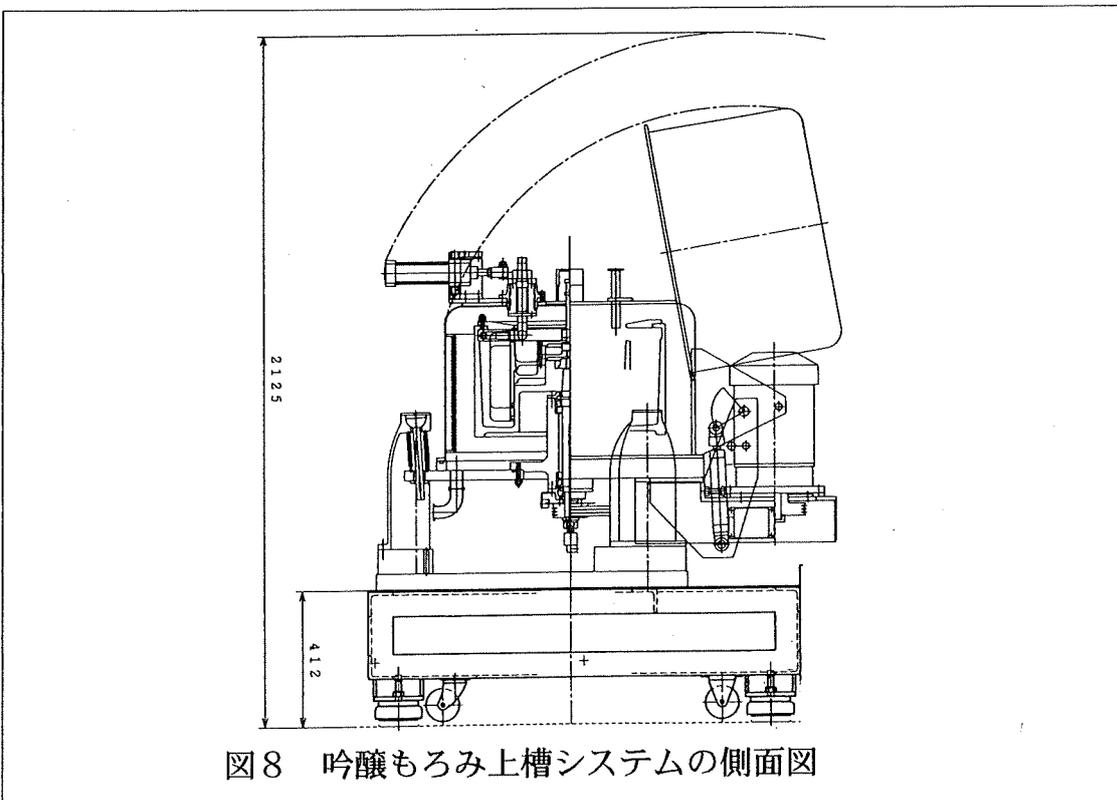


図8 吟醸もろみ上槽システムの側面図

3. 遠心分離上槽清酒の成分と酒質

7種類の吟醸清酒もろみについて、「吟醸もろみ上槽システム」と従来の上槽方法である「袋吊り法」で分離した清酒の成分を分析し、表1～表5に示した。その結果、メータやアルコール度数に大きな違いはないものの、香気的主要成分である酢酸イソアミルやカプロン酸エチルの比較では、「吟醸もろみ上槽システム」で分離した清酒の方が高い値を示し、またきき酒による評価でも「吟醸もろみ上槽システム」清酒の方が評価が高かった。これらのことから、「吟醸もろみ上槽システム」の有用性が実証された。

表1 日本酒度(メータ)の比較

試料NO	A:袋吊法	B:遠心法	差:B-A
1	+4.7	+4.5	-0.2
2	+4.5	+4.4	-0.1
3	+5.1	+5.1	±0.0
4	+7.6	+7.5	-0.1
5	+4.2	+3.9	-0.3
6	+3.1	+3.1	±0.0
7	+2.8	+3.0	+0.2

表2 アルコール度数の比較(%)

試料NO	A:袋吊法	B:遠心法	差:B-A
1	17.2	17.1	-0.1
2	16.9	16.7	-0.2
3	16.8	17.2	+0.3
4	16.3	16.4	+0.1
5	16.9	16.7	-0.2
6	17.3	17.3	±0.0
7	17.5	17.1	-0.4

表3 香気成分(酢酸イソアミル)の比較(ppm)

試料NO	A:袋吊法	B:遠心法	差:B-A
1	3.5	4.2	+0.7
2	4.6	5.6	+1.0
3	3.4	4.4	+1.0
4	4.5	5.8	+1.3
5	2.7	3.4	+0.7
6	2.6	3.3	+0.7
7	2.4	3.3	+0.9

表4 香気成分(カプロン酸エチル)の比較(ppm)

試料NO	A:袋吊法	B:遠心法	差:B-A
1	2.7	3.1	+0.4
2	2.4	2.8	+0.4
3	3.0	3.9	+0.9
4	2.9	3.7	+0.8
5	1.8	2.4	+0.6
6	1.7	2.0	+0.3
7	1.8	2.3	+0.5

表5 きき酒(官能評価:5点法)(1良~5悪い)

試料NO	A:袋吊法	B:遠心法	差:A-B
1	3.33	3.00	+0.33
2	2.83	2.50	+0.33
3	2.17	1.83	+0.34
4	3.00	2.83	+0.17
5	2.83	2.50	+0.33
6	2.83	2.33	+0.50
7	2.67	2.33	+0.34

【まとめ】

この研究により開発された「吟醸もろみ上槽システム」は、

- (1) 遠心分離回転体の材質がオールステンレス製のため、清酒に袋くせや布くせが全くつかない。
- (2) 冷却された密閉状態で吟醸もろみが分離されるため、吟醸酒の高い香気成分が酒の中に残る。
- (3) 垂れの順序に関係なく酒質が均一となるため市販吟醸酒の品質が格段に向上する。
- (4) 酒粕はパイプにより自動的に回収されるため、粕はがしの手間がかからない。
- (5) 総米750kgの清酒もろみを24時間以内に上槽が可能である。

等の特徴があり、吟醸酒の新しい上槽方法として期待される。

【謝 辞】

「吟醸もろみ上槽システム」の開発にあたり構想段階から多大なるご協力をいただいた(株)コクサンに深謝いたします。

【文 献】

- 1) 布川弥太郎、鈴木明治：国税庁醸造試験場報告 135、25 (1963)
- 2) 田口隆信、渡邊誠衛、高橋 仁、石川京子、中田健美、斎藤久一、佐無田隆：平成6年日本生物工学会大会要旨 P118
- 3) 吉澤 淑：日本醸造協会誌 68、(1)、59 (1973)

栽培地区別醸造用ブドウの特徴およびワインの品質

戸松さやか、大野剛、立花忠則（秋田県総合食品研究所 酒類部門）
Sayaka TOMATSU, Tsuyoshi OHNO, Tadanori TACHIBANA

【要約】

秋田県内の3カ所（県北、中央、県南）で1998年から2000年の3カ年に栽培・収穫された醸造用ブドウ5品種について試験醸造を行い、地区ごとのブドウの特徴及びワインの品質について検討した。

収穫されたブドウの糖度、酸度等に差があり地区ごとの特徴が見られ、年度によってもばらつきが見られた。

試験醸造で生成されたワインは酸度や香り成分等で地区ごとの特徴がでていた。県北八森産のシャルドネから酸味が特徴のワインが、中央地区の果樹試験場天王分場の白品種から香りがフレッシュで味が軽快なワインが、県南横手産の赤品種から色や香りがはっきりとしたワインが作られた。

【緒言】

ワインの品質は醸造方法や使用酵母により異なるが、大半は原料ブドウの性質により決まると言われている。原料ブドウは、品種はもちろん産地や気候等の自然条件により大きく影響され、それがワインの特徴の一つになっている¹⁾。世界のワイン産地では気象要因からくる欠点を補い、むしろ欠点を風土の特徴として生かす工夫がされてきた。本県でも、県北・中央・県南の各地区で醸造用ブドウの栽培が行われており、地区別の気象条件やブドウの特徴及びワインの品質把握が地域の特徴を生かしたワインの商品化に必要である。

そこで1998年から2000年の3年間、八森町（県北）、果樹試験場天王分場（中央）、横手市（県南）で収穫された白ワイン用醸造用品種3品種、赤ワイン用醸造用品種2品種で試験醸造を行い、地区ごとのブドウの特徴及びワインの酒質について検討した。

【実験方法】

1. 供試料

秋田県果樹試験場天王分場（中央）で栽培しているシャルドネ、リースリングリオン、リースリングフォルテ、メルロー、サントリーノワールと、秋田県山本郡八森町（県北）で栽培しているシャルドネ、秋田県横手市（県南）で栽培しているリースリングリオン、リースリングフォルテ、メルロー、サントリーノワールの5品種を使用した。1998年から2000年にかけての品種、栽培地ごとの開花期、収穫期を表1に示した。開花期は品種や年度により差が見られるが、横手が他の地区より1~2週間早

く6月中旬で、他の地区は6月下旬であった。年度別では1998年が他の年より1週間から10日ほど早く、これは、ブドウの成長期に気温が高かったことが影響していると考えられる。収穫期は、シャルドネは八森が天王よりやや早く、9月中旬、他の品種は横手が1~2週間天王より早く9月中旬から10月上旬、天王は9月下旬から10月中旬であった。

表1. ブドウの開花・収穫期

品種	地区	開花期			収穫期		
		1998	1999	2000	1998	1999	2000
シャルドネ	天王	6/22	6/23	6/23	9/24	9/13	9/15
	八森	6/14	6/24	6/24	9/21	9/16	9/7
リースリング・リオン	天王	6/22	6/25	6/25	9/29	10/6	9/28
	横手	6/8	6/17	6/17	9/20	9/20	9/20
リースリング・フォルテ	天王	6/22	6/25	6/25	10/12	9/22	10/3
	横手	6/7	6/17	6/17	9/14	9/20	9/20
メルロー	天王	6/22	6/26	6/27	9/21	9/29	9/13
	横手	6/4	6/15	6/15	9/15	9/20	9/28
サントリー・ワール	天王	6/22	6/25	6/26	10/9	10/14	10/11
	横手	6/11	6/18	6/18	9/27	10/11	10/2

2. ワインの試験醸造

仕込み区分は品種及び地区別の10区分とし、常法²⁾に従い醸造した。酵母は *Saccharomyces cerevisiae*(LALVIN EC1118)³⁾ を使用し、果汁で酒母を育成した。果実はHOD-C1型(MJB)の除梗破砕機で除梗、破砕し、亜硫酸が80 ppmになるようにピロ亜硫酸カリウムを添加し、赤ワインの原料とした。白ワインの原料は5℃で4時間スキンコンタクトをして、自動圧搾機M11-60-DS型(池田機械)で搾汁し、果汁を得た。果汁は上澄み液を分離して、Brix22~24%になるように上白糖で補糖した後、酒母を3%添加し、空調により温度制御を行いながら発酵させた。発酵終了後のリースリング・リオンとリースリング・フォルテは50 ppmの亜硫酸を補充した後720 mlにビン詰めをし、15℃に貯蔵した。また、赤ワインとシャルドネは樽貯蔵した後、ビン詰めをし、15℃で貯蔵した。

3. 形態及び果汁・ワインの成分分析

果房重は収穫果実からランダムに選んだ20房について、果粒重は50粒について重量を測定し、平均値と標準偏差を求めた。

果汁・ワインの一般成分は国税庁所定分析法⁴⁾、酸度は京都電子工業(株)電位差自動滴定装置AT410、アミノ酸組成は日本電子JLC-300アミノ酸自動分析装置、有機酸は東京理化(株)カルボン酸分析計S-3000、香気成分はヘッドスペース法によりヒューレットパッカード社ガスクロマトグラフ5890型で測定した。また、ポリフェノールは米山らの方法⁵⁾で測定し、没食子酸として算出した。

官能検査はワイン生成後6ヶ月目にパネル8名により、5点法で行った。

4. 気象条件

八森町、横手市の平均気温、降水量及び日照時間は、秋田地方気象台のデータを基に、天王町は秋田県果樹試験場天王分場のデータを基に作成した。

【結果】

1. 気象条件

1998年は成長期の4, 5月と成熟期・収穫期の9, 10月は平年より2℃ほど気温が高く、降水量が8月に平年の2倍以上であるほか、平年より多めで推移し、日照時間も短く、ブドウ栽培にとっては不良年であった。

1999年は成熟・収穫期の7~9月の気温が平年より2~3℃高く、9月にやや雨量が多かったものの、年間降水量や年間日照時間は平年並みであった。

2000年は7, 9月の気温が平年より1~2℃高く、8月に降水量が平年の10~20%と極端に少なく、年間でも平年より100~200 mm少ない雨量で、ブドウにとっては良年であった。

地区別に見ると平均気温は横手市、天王町、八森町の順で高く、八森町と横手市とでは1℃ほど差があった。有効積算温度は横手市が他の地区より50~100℃高かった。降水量は地域による差が大きく、特に横手市は他の地区より7, 8月に多く、9, 10月は少ない傾向があった。日照時間は天王町、横手市、八森町の順で長くなっていた。

これらのことから、八森町は他と比べて気温が低い、降水量が少ない、天王町は降水量が少なく、日照時間が長い、横手市は一日の気温差が大きく、収穫期の降水量が少ないという特徴がある気象であった(表2)。

表2. 1998年から2000年の気象状況(4月~10月)

	有効積算温度(℃)			降水量(mm)			日照時間(hr)		
	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
八森町	1808.3	1840.5	1765.0	1458.0	792.0	706.0	871.3	1041.8	936.7
天王町	1756.5	1790.1	1795.2	1304.5	798.0	706.0	953.6	1258.5	1174.6
横手市	1875.4	1904.6	1876.4	1370.0	906.0	771.0	906.4	1092.2	1018.1

2. 果房重・果粒重

果房重は全体的に横手産のブドウが平均234.6 gと大きく、特にリースリングリオンが大きい傾向にあった。また、シャルドネは地域間差が小さかった。メルローは平均148.9 gと他の品種と比べて小さかったが、フランスのメルロー⁶⁾とほぼ同程度の大きさであった(表3)。また、天候の悪かった1998年は全体的に小さい傾向にあった。

果粒も横手産のブドウが大きい傾向にあり、特にリースリングリオンやリースリングフォルテが大きい傾向にあった。

表3. 果実の形態

品 種	地区	果房 (n=20)(g)		果粒 (n=50)(g)		百粒重(g)
		重量	標準偏差	重量	標準偏差	
シャルドネ	(天王)	136.80	55.19	1.60	0.39	160.07
	(八森)	145.79	56.28	1.66	0.43	165.99
リースリング・リオン	(天王)	217.11	84.18	2.32	0.70	231.91
	(横手)	275.24	97.10	2.76	0.84	276.42
リースリング・フォルテ	(天王)	139.78	54.75	2.39	0.77	239.55
	(横手)	242.17	90.85	2.72	0.91	272.38
メルロー	(天王)	114.95	50.95	1.67	0.45	167.00
	(横手)	182.93	56.97	1.77	0.48	176.83
サントリー・ワール	(天王)	130.44	56.12	2.09	0.42	208.78
	(横手)	237.88	67.14	2.66	0.54	265.75
平均値		182.31	66.95	2.17	0.59	216.47

3. 果汁の一般成分

果汁の一般成分を品種、地区、年度別に表4に示した。シャルドネは平均17.7%で他の品種より糖度が高い傾向にあり、地域間差が小さくなっていたが、酸度で大きな差が見られ、八森産のシャルドネは酒石酸換算で平均0.9 g/100mlであり、山梨のシャルドネ⁷⁾と比べてもかなり高い値であった。リースリング・リオンは糖度の差が最も大きく、特に横手産は平均13.6%と極端に低く、未熟な段階で収穫したものと思われた。また、リースリング・フォルテは比較的地域間の差が小さいが糖度の平均が14.8%と低くなっていた。赤品種は糖度の差は小さいが、サントリー・ワールで酸度の差が見られ、天王産の方が横手産より高くなっていた。

気象条件と糖分の蓄積との関係は見られず、逆に気象の良い2000年に糖度の平均値が低くなっていたのは、天王の白品種が他の年に比べて早い段階で収穫してしまったためと考えられる。また、ほとんどが糖度18%以下であったことから、全体的に果実が完全に熟す前に収穫したと思われた。

pHは気象の悪い1998年が高い傾向にあり、気象が良かった2000年は低くなっていた。

表4. 果汁の一般成分

品 種	地区	Bx(%)			pH			還元糖(%)			酸度		
		1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000	1998	1999	2000
シャルドネ	(天王)	19.7	17.7	16.4	3.35	3.05	2.91	18.86	16.56	16.03	0.54	1.00	0.72
	(八森)	18.3	16.5	18.1	3.23	3.19	2.98	17.37	15.47	16.75	0.85	0.89	0.96
リースリング・リオン	(天王)	17.8	19.3	15.5	3.11	3.00	2.88	17.12	18.20	12.20	0.85	1.02	1.14
	(横手)	12.8	14.3	13.8	2.90	2.90	2.86	9.16	12.56	11.49	1.17	1.06	0.92
リースリング・フォルテ	(天王)	16.6	15.8	13.3	3.47	3.26	3.27	15.63	11.91	10.83	0.56	0.72	0.62
	(横手)	15.9	13.1	14.5	3.14	3.06	3.05	14.22	11.81	11.23	0.76	0.70	0.60
メルロー	(天王)	17.8	18.3	17.6	3.38	3.21	3.24	17.26	16.56	16.09	0.62	0.59	0.59
	(横手)	17.3	14.9	16.1	3.11	3.09	3.11	15.86	13.49	13.79	0.68	0.59	0.63
サントリー・ワール	(天王)	14.0	15.3	14.1	3.40	3.27	3.25	12.95	13.45	11.44	0.73	0.72	0.74
	(横手)	14.2	16.1	14.7	3.29	3.44	3.34	12.92	14.74	14.81	0.80	0.49	0.55
平均値		16.4	16.1	15.4	3.24	3.15	3.09	15.13	14.47	13.47	0.76	0.78	0.75
標準偏差		2.2	1.9	1.6	0.17	0.16	0.18	2.87	2.18	2.30	0.18	0.20	0.19

酸度: 酒石酸換算(g/100ml)

4. 果汁の有機酸およびアミノ酸組成

果汁の有機酸組成は3年間の平均値として図1に示した。果汁酸度の高い八森産シャルドネとリースリングリオンの含量が多く、特に八森産のシャルドネはリンゴ酸の割合が高かった。また、ほとんどの品種で気象の悪かった1998年にリンゴ酸の含量が多く、ブドウ生育期間中のリンゴ酸の減少は降雨と密接な関係がある⁶⁾と言われていることを裏付けられるデータであった。

アミノ酸組成は3年間の平均値として図2に示したが、含量は40~140mg/100mlで、年度や品種、地区により差が見られた。シャルドネは八森、リースリングリオン、リースリングフォルテ、メルローは天王産、サントリーノワールは横手産が含量が多く、横手産は年度による差が他の地区に比べて少なかった。また、主成分はプロリン、アルギニン、アラニンであり、既報⁸⁾と同様の傾向が見られたが、プロリンの占める割合はすべての品種で天王産のブドウが多くなっていった。

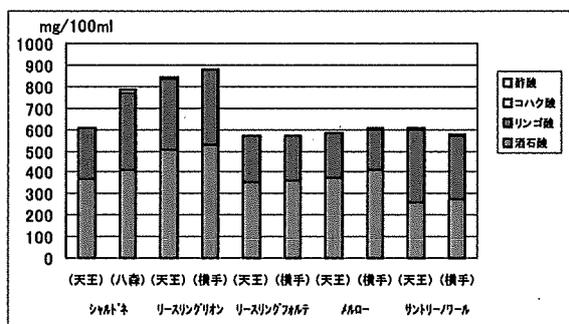


図1. 果汁の有機酸組成

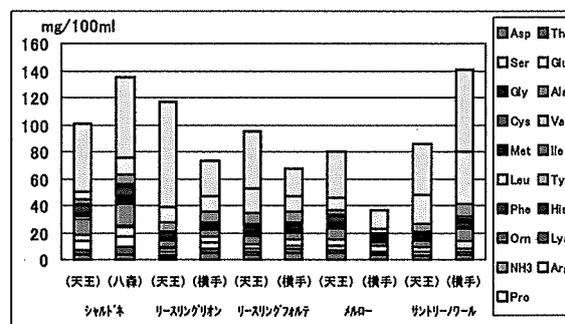


図2. 果汁のアミノ酸組成

5. 発酵経過

品種により発酵経過に若干差が見られ、1999年度の横手産メルローで発酵が緩慢になったが、他は順調に発酵し、白ワインは4週間前後、赤ワインは2週間程で主発酵が終了し、アルコール12~13%のワインが生成された。

6. ワインの一般成分

生成したワインの成分は表5に地区ごとの平均値を示した。白ワインはアルコールが13.2~13.7%、エキス分は2.4~3.4 g/100ml、赤ワインはアルコールが12.2~12.8%、エキス分は2.6~2.7 g/100mlで、どちらもドライタイプのワインとなった。酸度は果汁酸度の高い八森産シャルドネやリースリングリオンで高くなった。また、酸度の平均は白品種で0.84 g/100ml、赤品種で0.72 g/100mlであり、第35回全国果実酒鑑評会に出品された新酒ワイン⁹⁾と比較しても、酸度が高いという特徴があり、特に白品種でその差が顕著であった。

また赤ワインの色は、3カ年の平均では地域間で大きな差が見られなかったが、色の薄い年は果実の糖度も低い年であり、糖分や色素が蓄積する前の未熟果実であったと思われ、果実の状態がワインにそのまま反映していた。また、ある程度熟した果実であれば、天候の良い年に色が濃くなっており、天候の影響も大きいと言える。

ポリフェノールはメルローが約1,500ppmであるが、年度により含量の差が大きく、色と同様、果実の熟度と気象の影響が見られた。サントリーノワールは約700ppmで横手産の方が高い傾向にあったが、どちらもライトタイプのワインであった。

表5. ワインの一般成分

品種	地区	pH	酸度	アルコール(%)	エキス分(g/100ml)	色	ポリフェノール(ppm)
シャルドネ	(天王)	3.1	0.76	13.7	2.4	0.0566	280.6
	(八森)	3.2	0.83	13.5	3.0	0.0523	277.2
リースリングリオン	(天王)	2.9	0.95	13.2	3.3	0.1569	392.0
	(横手)	2.8	1.05	13.3	3.4	0.0509	286.7
リースリングフォルテ	(天王)	3.2	0.70	13.7	3.0	0.0519	307.7
	(横手)	3.0	0.75	13.2	3.0	0.0423	264.5
平均値(白)		3.1	0.84	13.4	3.0	0.0685	301.4
標準偏差		0.2	0.14	0.4	0.5	0.0485	56.2
品種		pH	酸度	アルコール(%)	エキス分(g/100ml)	色(5倍希釈)	ポリフェノール(ppm)
メルロー	(天王)	3.4	0.79	12.1	2.7	0.6338	1610.1
	(横手)	3.3	0.70	12.3	2.6	0.6071	1476.8
サントリーノワール	(天王)	3.5	0.72	12.4	2.6	0.2778	621.0
	(横手)	3.5	0.67	12.8	2.6	0.2527	800.9
平均値(赤)		3.4	0.72	12.4	2.6	0.4428	1127.2
標準偏差		0.1	0.06	0.4	0.1	0.2528	520.2

酸度: 酒石酸換算 (g/100ml)

7. ワインの有機酸組成

ワインの有機酸組成は、主成分が酒石酸とリンゴ酸であるのは果汁と変わらないが発酵により乳酸、コハク酸、酢酸の生成がみられた(図3)。第35回全国果実酒鑑評会に出品された新酒ワイン⁹⁾と比べて、八森産シャルドネ、リースリングリオン、赤ワインはリンゴ酸の含量が多い傾向にあり、秋田県産のブドウでは酸味が特徴となるワインであるといえる。

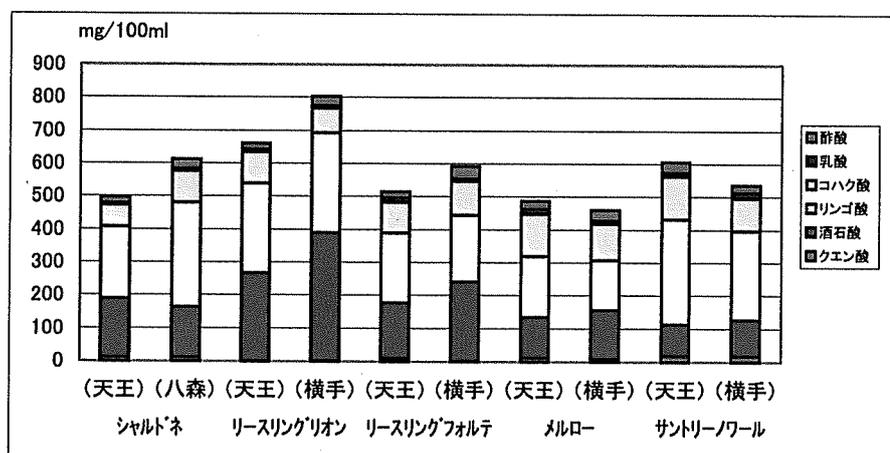


図3. ワインの有機酸組成

8. 香気成分

ワイン中の高級アルコールとエステルを3年間の平均値として表6に示した。白ワインは高級アルコールでは地域間差がほとんどないが、イソブタノールが12~21 ppmで白ワイン中の含量の平均が65 ppm¹⁰⁾であることから、40 ppmも少なく、これはワイン中の含量としてはきわめて低い値であった。篠原ら¹¹⁾によれば、高級アルコールの生成は酵母、発酵温度、発酵環境等の種々の要因が影響を及ぼすことが知られ、また、清酒では通気によりイソブタノールが著増するとの報告¹²⁾もあり、本試験で白ワインの発酵は低温で行い、アルコール発酵が制御された条件であったことによると考えられた。また、A/B比が市販テーブルワインの値¹¹⁾と比べ、かなり高い値になったが、ブドウ果汁中の総窒素量が少ないときA/B比が高く、特にイソブタノールの生成量が減るとの報告^{11, 16, 17)}もあるように、果実が比較的良い状態で収穫されたときに多く生成される傾向があったことから、イソブタノール量が少ないことは、未熟果の影響も考えられる。A/B比はシャルドネで地域間で最も差が見られたが、八森産のシャルドネが比較的多くイソブタノールを生成したためであった。

赤ワインはイソアミルアルコールが300~400 ppmで、赤ワインの含量の平均が227 ppm¹⁰⁾であることから、100~180 ppm多くなっていた。赤ワインではイソアミルアルコールが多いと香味に巾を感じさせて好ましいとの報告¹³⁾もあり、苦み成分であるイソアミルアルコール¹⁴⁾の含量が多いことは欠点となるものではなかった。

エステルはリースリングフォルテを除いて、天王産のワインの含量が少なくなっており、また、白ワインより赤ワインの方が酢酸エチル含量が多いという既報¹⁵⁾とは異なる数値であった。

表6. ワインの高級アルコール及びエステル

品種		EtOAc	I-AmOAc	n-PrOH	I-BuOH	I-AmOH	高級Alc計	A/B
シャルドネ	(天王)	40.2	0.920	24.3	15.3	271	311	18.41
	(八森)	65.9	2.361	36.5	21.3	243	301	11.45
リースリングリオン	(天王)	46.3	1.560	32.5	12.3	217	262	17.66
	(横手)	75.8	2.689	31.7	13.7	213	259	15.97
リースリングフォルテ	(天王)	72.6	3.975	47.7	13.6	214	275	15.84
	(横手)	46.3	1.397	29.0	15.7	211	256	14.87
メルロー	(天王)	64.9	0.789	24.0	50.5	386	460	7.59
	(横手)	83.3	0.539	16.1	50.5	299	366	5.92
サントリーノワール	(天王)	37.2	0.925	35.5	60.4	407	503	6.79
	(横手)	51.2	0.740	51.4	57.4	392	501	6.89

(ppm)

高級Alc計 : n-PrOH、I-BuOHとI-AmOHの和

A/B : I-AmOH/I-BuOH

9. 官能評価

シャルドネは樽の熟成香がする、ボディあるワインで、特に八森産は酸味が特徴となっていた。リースリングリオンはフレッシュな香りがあるが、酸味が強く、味が不

調和であるとの指摘があった。リースリングフォルテは果実のフレッシュなアロマがはっきりする、軽快なライトタイプのワインであり、評価が高かった。白品種は、横手産のワインは酸味が特に強調されたため、バランスの面で天王産のワインの評価が高かった。

メルローは品種特徴香のある重厚でボディあるワインであるが、若く、酸がはなれとの指摘があり、これは熟成により品質が向上するものと思われた。サントリーノワールは色が淡く、タンニンが少ない軽快なライトタイプのワインであり、比較的评价が高かった。赤品種は特徴がはっきりとする横手産のワインの評価が高かった。

【考察】

秋田県は47都道府県の中では6番目に面積が大きく、気候は概ね出羽山地によって海岸部と内陸部の2つに区分される。海岸部は冬の積雪が少なく、内陸部は夏が比較的高温で、冬は積雪が多い。今回試験をした八森町と天王町は沿岸部にあり似たような気候であるが、夏の気温が0.5℃ほど八森町が低く、日照時間は天王町が長くなっていた。横手市は内陸部にあり、夏の気温が高く、降雨も他の地区とは異なる傾向にあった。日本でブドウ栽培の盛んな甲府がウィンクラー博士の世界ワイン産地の気候分類法によると REGION II¹⁾ であり、試験した3地区は REGION IIIに相当することを考えると、研究の盛んな山梨県とはブドウの品質はもちろん、ワインの特徴も異なると容易に想像できる。

1999年、2000年は秋田県内の各地とも平均値と比べて降水量が少なく、日照時間が長くなっており、ブドウにとっては比較的良好な気象条件だったと言える。しかし、各地区とも収穫期の雨や虫害、病気等に悩まされ、収穫時期が必ずしも適当であったとは言えず、今後の大きな課題となった。

今回の試験は、3地区すべてで同じ品種を栽培してはいたため、天王町を中心に比較した。シャルドネは果汁糖度やpHは地域間差がほとんどないが、酸度の差が大きく、地域の特徴が現れているものと思われた。天王町と横手市との比較では、白品種は横手産のpHが低く、酸度が高いため、酸味が強調されたワインとなり、赤品種は逆に天王町産のワインが酸味が強い傾向にあった。また、横手産の赤品種は色が濃く、ポリフェノールの多いワインであり、1日の気温差が大きいことはブドウの色素形成に重要である¹⁾ことから、横手市の気候の特色によるものと考えられ、横手産ワインの特徴となると言える。

終わりに、原料ブドウをご提供いただいた八森ワインブドウ生産組合、秋田県果樹試験場天王分場、横手ワインぶどう生産組合の各位に感謝いたします。

【文献】

- 1) 中山正男：日本醸造協会誌、88、654-659(1993)
- 2) 山梨県工業技術センター：葡萄酒醸造法(2000)
- 3) 横塚弘毅：日本醸造協会誌、94、958(1999)

- 4) 注解編集委員会：第4回改正 国税庁所定分析法注解、62-79(1993)
- 5) 米山智恵子、櫛田忠衛：山梨大学発酵研究所 研究報告、16、9-14(1981)
- 6) 岩野貞雄：ワイン事典、柴田書店、p213、p218(1979)
- 7) K. Yokotsuka、T. Shimizu and T. Seki：山梨大学発酵研究所 研究報告、28、23-35(1993)
- 8) 戸川英夫、竹沢泰平：日本醸造協会誌、73、469-472(1978)
- 9) 国税庁醸造研究所：醸造研究所報告、170、13-26(1998)
- 10) 日本醸造協会：醸造物の成分、308(1999)
- 11) 篠原隆、渡辺正澄：日本農芸化学会誌、52、309-316(1978)
- 12) 吉沢淑：日本醸造協会誌、75、451-457(1980)
- 13) 飯野修一、渡辺正平：山梨県工業技術センター研究報告、3、69-72(1989)
- 14) 飯野修一、渡辺正平：日本醸造協会誌、89、996-998(1994)
- 15) T. Shinohara and M. Watanabe：Agr.Biol.Chem.、40、2475-2477(1976)
- 16) 吉沢淑：日本醸造協会誌、61、481-485(1966)
- 17) 吉沢淑：日本醸造協会誌、61、585-589(1966)

2. 原著論文（研究ノート）

「焼成カルシウム存在下でボイル処理されたエダマメ」

○大久長範、大能俊久、龐 中存

「学校給食用白神パンの品質に関する研究」

○ 熊谷昌則、高橋慶太郎、高橋砂織

焼成カルシウム存在下でボイル処理されたエダマメ

大久長範・大能俊久（秋田県総合食品研究所食品開発部門）

龐 中存（中華人民共和國甘肅省農業科学院果樹研究所）

Naganori OHISA, Toshihisa OHNO and Zhongcum PANG

【緒言】

未熟な大豆を食用に供するエダマメは、収穫後に甘味、うま味及び食味が急速に低下する^{1, 2)}。収穫直後の食味をそのまま保存する方法として急速凍結法がある。生のままあるいは塩茹でしたエダマメを凍結し保存・流通させるものであり、輸入農産物の代表格としての地歩を築いている³⁻⁴⁾。最近、塩茹でしたエダマメを低温で流通・販売する「ひたし豆」が上市された。ひたし豆は解凍する必要がないので、何時でも何処でも手軽に賞味できる利点がある。しかしこのひたし豆は要冷扱いで、今のところ季節商品に止まっている。また、ひたし豆に類似したものとしてエンドウの真空調理があるが⁵⁾、90℃で処理されたものは5℃で7日以内の保存が望ましいと報告されている。ひたし豆の賞味期限を延長する為に、焼成カルシウムと加熱処理を組み合わせる方法を検討したので報告する。

【実験方法】

1) 試料・製造方法：エダマメ（一人娘）は2000年の10月に秋田市民市場から入手した。宮城ミドリ豆を使用した「ひたし豆」と「ビールと枝豆」は（株）菅野漬物食品（福島県相馬郡鹿島町）から入手した。

2) 温度処理：滅菌可能なポリ袋（KNy/PE, 200x300mm）に未熟な大豆種子20gと2% NaClと0.2%焼成カルシウムからなる溶液10 mlを加え、減圧密封した。この袋を沸騰湯煎で10分間加熱処理後、直ちに氷水で冷却した。

3) 保存方法と色調測定：上記の処理袋を10℃の恒温低温器（日本医科器械製）で4週間保存した。1週間毎にエダマメを取り出し、表面のハンター色調（L・a・b）を色彩色度計（ミノルタ社製、CR250）を用いて測定し、黄化度の指標である $L \cdot b / |a|$ として表示した。

4) 一般微生物（生菌数）の測定：10℃で保存した袋から0.1mlの封入液をシャーレに取り出し、標準寒天培地（日水製薬）を注ぎ平板を作成した。この平板を30℃で2日間培養し、出現したコロニーから生菌数を求めた。

5) 糖成分分析：エダマメ試料10gに80%熱エタノールを加え粉碎・抽出した後、可溶性窒素成分はロイシンを標準溶液としたニンヒドリン法により定量した。遊離糖はエ

タノール抽出液を100倍に希釈し、脱脂処理した後、高速液体クロマトグラフィー (DIONEX DX500)を用いて測定した。

【結果及び考察】

市販品の「ひたし豆」と「ビールと枝豆」の一般生菌数が封入水1ml当たり 10^6 個検出され、豆表皮の黄化度 ($L \cdot b / | a |$)が180~190であった。

0.2%焼成カルシウムで処理したエダマメと未処理種子の表面の色調変化を図1に示す。黄化度の進行は焼成カルシウムの存在下で抑制され、4週間後でも黄化度が180以下であった。ワラビを焼成カルシウム処理すると緑色が強くなるという結果も得ているが⁶⁾、今回の結果はそれを支持するものである。

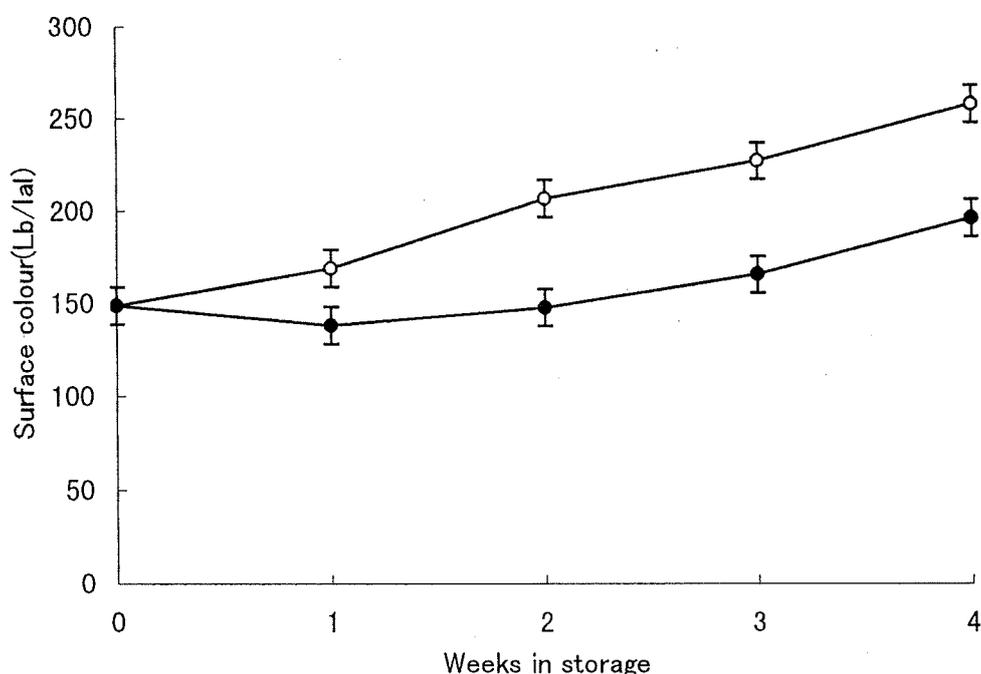


図1 焼成カルシウム溶液で処理したエダマメ表皮色調 (黄化度) の変化
○ : -Ca、ボイル処理、● : +Ca、ボイル処理

0.2%焼成カルシウム含む試作品を10°Cで1から4週間保存した。封入液中の生菌数は、100個/ml以下のままであった(表1)。今回の実験(ボイル処理)で焼成カルシウム有無の差が認められなかったのは、初発菌数が少なかった為と考えられる。通常、80°Cでは *Bacillus* 胞子は殺菌されないが、焼成カルシウムを共存させると胞子の死滅を促進させることができた⁷⁾。

焼成カルシウム添加区の成分変化を表2に示す。0日に3.47%であった遊離糖は14日めに2.51%に減少したが4週間後でもあまり変化がなかった。アミノ酸等の可溶性窒素成分は4週間を通じて変化は少なく、初発の0.8%から0.74%に低下した程度であっ

た。遊離糖の場合は水に溶けやすいことから保存期間中にエダマメの半分量加えた封入液に流出したと考えられる。

表 1 エダマメ保存中における一般生菌数の変化

保存日数	生菌数 (cfu/ml)	
	-Ca	+Ca
0	<10 ²	<10 ²
14	<10 ²	<10 ²
28	<10 ²	<10 ²

表 2 カルシウム処理したエダマメの成分変化

保存日数	遊離糖	可溶性窒素成分
0	3.47%	0.83%
14	2.51%	0.74%
28	2.53%	0.77%

ひたし豆の賞味期限を延長する為に、焼成カルシウムと加熱処理を組み合わせる方法を検討した。エダマメ表面の黄化度の進行は焼成カルシウムの添加により抑制され、封入液の生菌数は4週間を通じて100cfu/ml以下に留まった。従来法では1週間程度であった賞味期間を、2から3週間程度まで延長することが可能と考えられた。

【謝辞】 ご指導を頂いた食品総合研究所の一色賢司上席研究官、増田亮一主任研究官及び当研究所の菅原真理さんに感謝いたします。

【文献】

- 1) 生野世方子：食品保蔵科学会誌，23，339-347（1997）
- 2) 生野世方子：日本家政学会誌，38，1057-1062（1987）
- 3) 増田亮一・橋詰和宗・金子勝芳：食科工誌、35，763-770（1988）
- 4) 比佐 勤：冷凍，72，1027-1031（1997）
- 5) 生野世方子・吉村美紀・山内直樹：食品低温保蔵学会誌，19，178-182（1993）
- 6) 大久長範・菅原真理・菅原久春・一色賢司：食科工誌、46，334-338（1999）
- 7) 大久長範・菅原真理・峯 裕喜・一色賢司：食科工誌、46，613-615（1999）

学校給食用白神パンの品質に関する研究

— 白神こだま酵母の学校給食用パンへの利用 (第2報) —

熊谷昌則、高橋慶太郎*、高橋砂織*

(秋田県総合食品研究所 食品開発部門、*生物機能部門)

Masanori KUMAGAI, Keitaro TAKAHASHI, and Saori TAKAHASHI

【要 約】

白神パンの学校給食への導入を図るにあたって、供給パンの品質水準を一定以上のものにするために、秋田県内の全ての給食パン供給企業に白神パンの試作を依頼し、それを官能評価した。その結果、企業間で白神パンの品質に差が認められたので、秋田県総合食品研究所と秋田県パン協同組合が共同で当該企業に対する技術支援を行って、最終的に秋田県内で供給される全ての学校給食用白神パンの品質が統一される見通しとなった。

【緒 言】

秋田県では、秋田県総合食品研究所が民間との共同研究により世界自然遺産の白神山地から分離・選抜した白神こだま酵母¹⁻³⁾を用いた白神パンを学校給食に導入するための検討を行っている。平成12年度に秋田県教育委員会が中心となって、学校給食会、学校栄養士会、パン協同組合、農政部、総合食品研究所などからなる秋田県学校給食用食材検討委員会を発足させた。前報⁴⁾において、県内小中学校の児童生徒ならびに教職員、約3,000人を対象とした白神パンのモニタリング調査の結果、ふわふわやわらかくモチモチした食感や、ほんのりとした甘味などが従来の学校給食用パンにはない白神パンの優れた品質であることが確認された。これを受けて秋田県では平成14年度から全ての学校給食パンを白神パンに代替する方向で準備を進めている。

そこで本研究では、白神パンの学校給食への導入にあたって、秋田県内で供給される全ての学校給食用白神パンが一定の品質となるよう、給食パン供給企業の現状の技術水準を把握し、さらなる品質の向上を目的として以下の検討を行った。

【調査方法】

秋田県パン協同組合の協力を得て、秋田県内の給食パン供給企業全21社に対して、現行の学校給食用コッペパンの配合のうち、酵母を白神こだま酵母に代替した「白神パン」の試作を依頼した。比較のため、12社については現行配合の「現行パン」を、また9社については現行配合のうち、酵母を白神こだま酵母に代替し、さらに砂糖およびショートニングを半分に減じた「白神パン 1/2 配合」の試作を依頼した。「白神パン 1/2 配合」は、白神こだま酵母の優れた特性により、砂糖およびショートニングを半分に減らしても「現行パン」に劣らない品質を得ることが可

能であるとの予備検討の結果にもとづき、今回の比較試料に加えたものである。なお、今回の試作では、初めて白神こだま酵母を使って製パンした企業が 10 社含まれている。これらの企業に対しては白神こだま酵母の製パン特性などについて事前に情報提供を行った。

以上の試作依頼により、21 社より同一製造日の 40 点が提示された。その内訳は、「白神パン」が 20 点、および比較試料の「現行パン」が 12 点、「白神パン 1/2 配合」が 8 点である。これら 40 点の試料について、その種別に関係なく全てランダムな順番に並び替えたのち、先に述べた秋田県学校給食用食材検討委員会委員 18 名を審査員とする官能評価を実施した。それぞれの審査員は学校給食用パンに精通しており、専門パネルとしての評価能力を有している。評価にあたり、文部科学省の「学校給食パンの品質判定審査採点基準」⁵⁾を一部改良した図 1 に示すようなコッペパン品質採点基準を作成し、審査員には外観（焼き色、形均整、皮質、体積）および内相（すだち、色相、触感、香り、味）について 5 段階による評価を求めた。データの集計・解析は、試料の評価得点の計が 100 点満点（60 点が基準点）となるように各評価項目に重み付けをしたのち、それぞれの試料について審査員の評価結果の最大最小値をカットした 16 名の平均評価得点を算出した。

コッペパン品質採点基準			秋田県総合食品研究所
下記の品質採点基準にもとづいて、それぞれの項目について6段階評価で採点する。			
	5	非常に優れている	(適)
	4	優れている	(適)
	3	標準的	(適)
	2	やや劣る	(不適)
	1	品質上の問題がある	(不適)
			採点の重み付け
外 観	焼き色	パンの表面が全部、一様に褐色に焼けて、“むら”や“すじ”、斑点などがないのが良い。ツヤのあるgolden brown(黄金褐色)がもっとも良く、foxy brown(きつね色、帯赤褐色)、淡い、くすんだ、焦げた、火ぶくれ、梨はだなどは良くない。頂面が焦げ、底面が白いものは不適とする。	× 2
	形均整	細長い均整のとれた棒状で、勢いよく膨らんだものが良く、スライス面は真円よりむしろ、わずかに楕円が良い。	× 1
	皮質	なめらかな肌もち、厚さがどこも均一なのが良い。	× 1
	体積	手に持って軽い感じのするのが良い。	× 2
内 相	すだち	薄い膜の細かい気泡が切り口に均等に現れているのが良い。気泡の形は真円よりも楕円または縦長のものが良い。	× 2
	色相	白よりも光沢あるクリーミーホワイトがもっとも良く、死灰白色、くすみ、灰色、褐色、すじ、斑などは良くない。	× 2
	触感	指先で圧して柔らかく弾力があり、指の凹みが直ぐ消えるのが良い。なめらかな感じのするのが良く、ところにより硬い感じのする“ふし”があるのは良くない。	× 3
	香り	酵母が発酵して出す特有の香りと、良く焼かれた結果できる芳香を持つのが良い。オフフレーバー(異臭)を持つものは良くない。	× 2
	味	一般に薄い塩味を感じ、かみしめて良い味の出るのが良い。パンの気泡の膜が舌にとろけるような感じのするのが良い。	× 5
(文部科学省 学校給食パンの品質判定審査採点基準を一部改良)			

図 1 コッペパン品質採点基準

【結果と考察】

図 2 は、「白神パン」の平均評価得点を得点順に示したものである。その結果、「白神パン」の品質には企業間で差があることが分かり、20 点中 8 点は基準点を下回っていて、品質上問題があると判断された。8 点中の 5 点 (N, O, P, R, T) は、今回初めて白神こだま酵母を使って製パンした企業のものであったため、白神こだま酵母の製パン特性に不慣れであったことがその原因ではないかと考えられた。

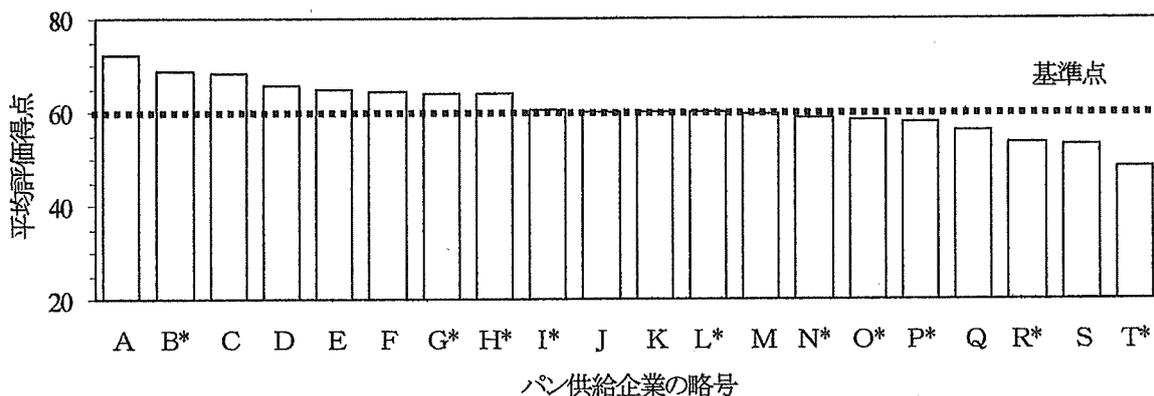


図 2 「白神パン」の試料平均評価得点

(図中の*記号は今回初めて白神こだま酵母を使って製パンした企業であることを示す)

しかしながら、図 3 に示す「現行パン」の平均評価得点との比較からは、1 点 (O) を除いて、やはり「現行パン」の評価も悪い結果となった。すなわち、「現行パン」、「白神パン」にかかわらず、むしろ当該企業の製パン技術そのものに原因があると判断したほうが妥当のようである。一方、図 3 では 11 社中 8 社の試料で、「白神パン」のほうが「現行パン」よりも平均評価得点が高いことが示されており、製パンの技術水準が同じであれば白神こだま酵母のほうが製パン特性に優れていることが示唆されている。

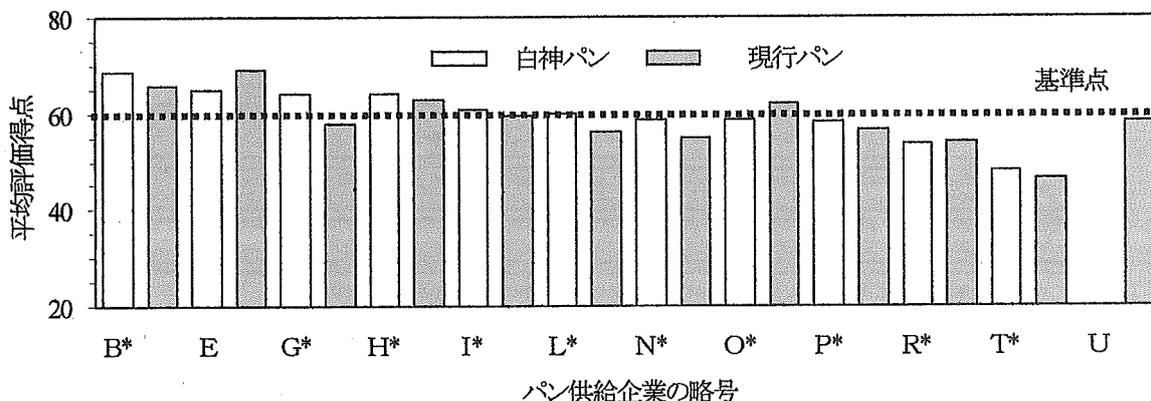


図 3 「白神パン」と「現行パン」の試料平均評価得点

(図中の*記号は今回初めて白神こだま酵母を使って製パンした企業であることを示す)

図4は「白神パン」と砂糖およびショートニングを半分に減じた「白神パン 1/2 配合」を比較した結果であるが、総じて「白神パン 1/2 配合」の平均評価得点は「白神パン」に劣っているとはいえなかった。白神こだま酵母はパンに甘味を付与し、またパサパサせずモチモチ、やわらかい食感を引き出すという優れた製パン特性を有することから、配合中の甘味分、油分を多少減らしてもおいしさが保持できることが本結果からも裏づけられた。

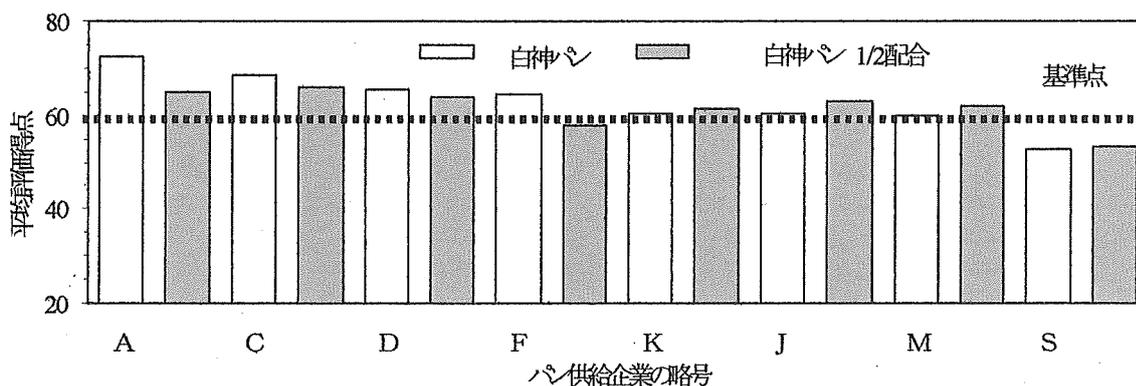


図4 「白神パン」と「白神パン 1/2 配合」の試料平均評価得点

以上の結果にもとづいて、基準点に達しなかった企業に対しては個別に、総合食品研究所とパン協同組合が共同で技術支援を行った後、パンの再提示を求め、同様の審査基準で評価した。最終的にのべ3回の再審査を繰り返した結果、秋田県内の給食パン供給企業の21社全てが基準点をクリアした。これにより、白神パンの学校給食への導入に向けては、県内全ての地区において統一された品質基準のパンを提供できる体制が整えられたことになる。これまでにも、給食パンの品質に地域間差があるとの指摘がなされていたので、今後も継続して品質を保持していく必要がある。

学校給食への白神パンの導入にあたり、本研究により全県の給食用パン供給業者の技術水準の向上化が図られた意義は大きい。学校給食用パンに限らず、一般小売り向け商品の品質にも多大な貢献がなされたものと考えている。

【文献】

- 1) 寄託番号 FERM P-17573 (独立行政法人 産業技術総合研究所 特許微生物寄託センター)
- 2) 商標登録第 4420102 号
- 3) 特願平 11-372313
- 4) 熊谷昌則、高橋慶太郎、高橋砂織：秋田県総合食品研究所報告 **3**, 57(2001)
- 5) 昭和 39 年 9 月 4 日文体給第 186 号文部省体育局長通達

3. 特許の要約

「 β -マンナナーゼ、その生産菌並びにその製造法」
○戸枝一喜、戸松 誠、川端康之

「高度分岐澱粉と該高度分岐澱粉の製造方法」
○川端康之、戸枝一喜、高橋 徹、柴本憲夫

「酒類の加熱方法」
○立花忠則、秋山美展、田口隆信、大野 剛

発明の名称： β -マンナナーゼ、その生産菌並びにその製造法
発明者：戸枝 一喜、戸松 誠、川端 康之（秋田県総合食品研究所）
公開番号（公開日）：特開2002-65257（平成14年3月5日）

【要約】

【課題】

新規な β -マンナナーゼを、安価な原料から効率よく製造できる微生物を検索し、該菌を用いる該酵素の製造法を確立すること。

【解決手段】

マンナン、グルコマンナン、ガラクトマンナンおよびそれらのオリゴ糖に作用し、その β -1, 4-D-マンノピラノシル結合を加水分解して、マンノース、マンノオリゴ糖、グルコマンノオリゴ糖、ガラクトマンノオリゴ糖を生成し、等電点が8.65（等電点電気泳動法による）であり、分子量が34 kDa（SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による）であり、N末端アミノ酸配列は配列表の配列番号1記載の配列を有する β -マンナナーゼ；該 β -マンナナーゼ生産能を有するバチルス・ポリミキサKT551株並びに該生産菌による上記 β -マンナナーゼの製造法。

発明の名称：高度分岐澱粉と該高度分岐澱粉の製造方法
発明者：川端 康之、戸枝 一喜、高橋 徹、柴本 憲夫（秋田県総合食品研究所）
公開番号（公開日）：特開2001-294601（平成13年10月23日）

【要約】

【課題】

澱粉を低分子化させずに、その溶解性の向上、老化抑制、粘度低下等を図ることのできる、高度分岐澱粉と、その製造方法、並びに該澱粉を用いた糊化澱粉の老化抑制方法と、該澱粉含有飲食物の製造方法の提供。

【解決手段】

分岐分布が陰イオン交換クロマトグラフィーによるグルコース単位鎖長分布として4～7にピークを占めており、水溶性が高く、その水溶液が低粘度であり、かつゲル濾過分析において 2.0×10^6 に分子量の分布ピークをもつ高度分岐澱粉、枝作り酵素を糊化澱粉に作用させることを特徴とする高度分岐澱粉の製造方法、前記に記載の製造方法により製造される高度分岐澱粉を糊化澱粉の固形分に対し0.1～100重量%添加することを特徴とする糊化澱粉の老化抑制方法、高度分岐澱粉を、澱粉に対し0.1～100重量%添加したものをを用いる老化の抑制された澱粉を含有する飲食物の製造方法。

特許要約

発明の名称：酒類の加熱方法

発明者：立花忠則、田口隆信、大野剛（秋田県総合食品研究所酒類部門）

秋山美展（秋田県総合食品研究所食品開発部門）

出願人：寺田典城（秋田県）

伊藤雄太郎（両関酒造株式会社）

代理人：戸田親男（東京都港区虎ノ門一丁目19番14号）

公開番号（公開日）：特開2000-237047（平成12年9月5日）

【要約】

〔課題〕従来まで酒類の品質保持は、プレートヒーター、蛇管、ピン火入れ等の伝熱方式の加熱により行われてきた。本発明は、高品質な酒類を提供するために、従来の加熱原理とは全く異なる加熱方法を提供することにある。

〔解決方法〕本発明は、清酒等の酒類の加熱にジュール熱を利用したもので、酒類に直接、交流電流を流し酒類の電気抵抗による自己発熱で加熱する方法である。この方法により吟醸酒などの高級酒の品質を損なうことなく、また微生物の殺菌や酵素類の失活及び品質保持等を図ることが出来る。

4. 学会発表

【2001年度日本農芸化学会大会、京都府】

「トチュウの糖尿病合併症予防活性成分」

○戸松 誠、柴本憲夫

「イソフラボン及びカテキンに対するサイアミンの活性酸素消去能相乗効果」

○秋山美展、飯田哲郎、川根政昭、吉城由美子、河村幸雄、大久保一良

「活性酸素消去発光系による大豆発酵食品の活性酸素消去物質の検索」

○棟方沙織、秋山美展、吉城由美子、大久保一良

「活性酸素および活性酸素消去物質の発光による視覚的定量法の
開発とその応用」

○吉城由美子、飯田哲郎、秋山美展、大久保一良、松本 均

【2001年日本食品科学工学会大会、高松市】

「フラボノイドにおける活性酸素消去能の増幅因子と相乗作用」

○秋山美展、飯田哲郎、吉城由美子、大久保一良、森 勝美

「低温気流粉碎したそば粉を用いた十割そば」

○大久長範、大能俊久、進藤 昌、Yi Wang、明石信廣

「加熱処理米粉の添加が製パン性におよぼす影響」

○高橋 徹、篠田和雄、三浦 靖、小林昭一

「無洗米処理が米飯の粘弾性に及ぼす影響」

○大能俊久、金子隆宏、大久長範

「Hydroperoxideの発光定量性およびワイン品質管理への応用」

○吉城由美子、飯田哲郎、秋山美展、大久保一良、松本 均、佐藤充克

「焙煎食品等の含有活性酸素消去発光特性」

○飯田哲郎、吉城由美子、染谷慎一、秋山美展、大久保一良

「バナナの活性酸素消去発光特性と抗酸化作用」

○染谷慎一、秋山美展、吉城由美子、大久保一良

「麹菌(*Aspergillus oryzae*)の褐変性とチロシナーゼ遺伝子の菌株間解析」

○小笠原博信、今野 宏、高橋砂織

【日本食品科学工学会平成 13 年度東北支部大会、秋田市】

「Hydroperoxide, Hydrogen donor の発光定量法および香辛料の発光特性」

○吉城由美子、秋山美展、大久保一良

「褐変食品の発光特性と活性酸素の発生」

○飯田哲郎、吉城由美子、秋山美展、大久保一良

「放線菌由来の耐酸性グルコースイソメラーゼを用いた異性化糖の
新規製法の開発」

○金子隆宏

【2001 年日本食品工学会大会、滋賀県】

「ジュール加熱を応用した発酵乳製造とインピーダンス測定による工程管理」

○秋山美展、森 勝美

【2001 年度日本応用糖質科学会大会、福山市】

「コーンハルおよびビートパルプからの高圧蒸煮による L-アラビノースの生産」

○戸枝一喜、川端康之

「*Neurospora crassa* 由来のグリコーゲン枝付け酵素の性質」

○川端康之、戸枝一喜、高橋 徹、柴本憲夫

【2001 年日本生化学会大会、京都府】

「哺乳動物由来 N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ (レニン結合タンパク質)
のヌクレオチドに対する親和性について」

○高橋砂織、高橋慶太郎、小笠原博信、堀 一之、斎藤久一、森 勝美

【2001 年度食品酵素研究会、京都府】

「N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ（レニン結合タンパク質）活性に
及ぼすヌクレオチドの影響について」

○高橋砂織、高橋慶太郎、小笠原博信、堀 一之、斎藤久一、森 勝美

【3rd International Symposium on Chitin Enzymology and 4th Conference of the European
Chitin Society, 2001, (Ancona, Italy)】

「Identification of Essential Cysteine Residues of Human N-Acetyl-D-Glucosamine
2-Epimerase(Renin Binding Protein).」

○ Saori Takahashi, Keitaro Takahashi, Takahiro Kaneko, Hironobu Ogasawara,
Sho Shindo, Kyuichi Saito, and Yukio Kawamura

【10th European Congress on Biotechnology, 2001, (Madrid, Spain)】

「Development of novel carrier for bioreactor using natural zeolite and continuous alcohol
fermentation with immobilized yeast cells」

○ Sho Shindo, Saori Takahashi, Susumu Takata, Haruo Taguchi, and Noboru Yoshimura

【2001 年度日本生薬学会、金沢市】

「Lupeol によるメラノーマ細胞分化誘導における作用機序」

○畠 恵司、堀 一之、高橋砂織

【EUROFOODCHEM XI (Norwich Research Park, Norwich, UK 2001)】

「Visual detection of hydrogen donor by photon emission」

○ Yumiko Yoshiki, Tetsuo Iida, Yoshinobu Akiyama, Kazuyoshi Okubo,
Michikatsu Sato

【2001 年第 1 回 XYZ 系活性酸素消去発光研究会、東京都】

「穀類等の食品素材への応用」

○秋山美展

【2001 年産学官地域技術交流会、秋田市】

「トチュウの糖尿病合併症予防活性成分」

○戸松 誠

【2002 年度日本農芸化学会大会、仙台市】

「キノコの抗菌性物質の単離・精製（1）－モミタケのサイクロペンテノン類
抗菌物質－」

○柴本憲夫、畠 恵司、堀 一之、石川匡子、折戸めぐみ

「キノコの抗菌性物質の単離・精製（2）－モミタケの高分子糖蛋白質性
抗菌物質－」

○石川匡子、畠 恵司、菅原真理、柴本憲夫、松永隆司

「マイタケ子実体形成に伴うプロテアーゼの動態について」

○樋渡一之、加賀屋明良、井上俊三、高橋慶太郎、高橋砂織

「高ストレス耐性野生酵母とその利用」

○高橋慶太郎、木村貴一、高橋砂織

「N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ（レニン結合タンパク質）に及ぼす
ヌクレオチドの影響について」

○高橋砂織、小笠原博信、高橋慶太郎、堀 一之、斎藤久一、森 勝美

【2002 年度日本薬学会、千葉市】

「食用キノコに含まれる骨粗鬆症予防成分」

○畠 恵司、堀 一之、高橋砂織

「生育ステージおよび部位によるミョウガ精油成分の比較」

○堀 一之、大久長範、若松繁美、木村清幸、高橋砂織

【2002 年 3 月 第 36 回秋田化学技術協会研究技術発表会、秋田市】

「 ^{13}C NMR によるジアシルグリセロール（エコナ）の位置異性分析
－グラジエントシミングを用いた分解能向上の試み－」

○堀 一之、高橋砂織

秋田県総合食品研究所報告 第4号

編集委員長	所長	森	勝美
編集副委員長	場長	立花	忠則
編集委員		柴本	憲夫
同		中田	健美
同		大久	長範
同		高橋	砂織

編集幹事		柴本	憲夫
		栗林	豊
		大山	実

発行 平成14年7月1日
発行者 秋田県総合食品研究所
〒010-1623
秋田市新屋町字砂奴寄4-26
Tel : 018-888-2000(代)
Fax : 018-888-2008



この印刷物は表紙・仕切紙を除き古紙配合率100%の再生紙を使用しています。