

バイオプリザベーション技術を活用した甘酒の開発

鳥居貴佳^{*1}、加藤丈雄^{*1}、山本晃司^{*1}、西田淑男^{*1}、伊藤彰敏^{*1}、
山崎久義^{*2}、天野 誠^{*2}、山崎厚夫^{*2}、深谷伊和男^{*3}

Development of Sweet Drink Made from Fermented Rice Using Biopreservation Technique

Takayoshi TORII, Takeo KATO, Kouji YAMAMOTO, Yoshio NISHIDA, Akitoshi ITO,
Hisayoshi YAMAZAKI, Makoto AMANO, Atsuo YAMAZAKI and Iwao FUKAYA

Food Research Center, AITEC^{*1} Yamazaki & Co., Ltd.^{*2} Principal Researcher^{*3}

甘酒製造に抗菌性物質「ナイシン」を生産する乳酸菌による発酵工程を導入するため、製造条件の検討及び試作試験を行った。糖化物を10時間以上発酵させると高いナイシン活性が検出され、同時に高い保存性が得られた。従来製法甘酒と乳酸発酵甘酒を混合したところ、乳酸発酵甘酒を3割以上混合させることにより高い保存性が維持できた。

1. はじめに

甘酒には糖類、アミノ酸類、ビタミン類が豊富に含まれ、古くから飲用されている。家庭で造られることが多かったが、現在では食品工場における製造が大半を占める。このため、製品の長期保存性が求められるようになっている。多くの場合、熱水殺菌や熱充填処理により保存性の向上が図られている。しかし、アミノカルボニル反応による製品の着色、殺菌効率向上のための米粒破碎による風味の低下など、商品として問題を持っている。また、不完全な殺菌や、糖化温度の低下は芽胞形成菌や野生乳酸菌など有害微生物による製品の腐敗、酸敗を引き起こすことがある。そこで、これらの生育を阻止することが問題解決に最も重要であると考え、製造工程に抗菌性乳酸菌による発酵を導入し、乳酸菌が生産する抗菌性物質により有害微生物の生育を阻止することを試みた。

2. 実験方法

2.1 甘酒の製造方法

麹、炊飯米、水を重量比1:1:2で混合し、62℃で糖化を行った。乳酸発酵にはナイシン生産菌 *Lactococcus lactis* IF012007株を使用した。

2.2 糖濃度の測定法

全糖の測定はフェノール硫酸法、グルコースの測定はグルコース B-テストワコー(和光純薬(株))を用いた。

2.3 着色度の測定法

甘酒を遠心分離し、上清を得た。この上清の400nmにおける吸光度を測定し、着色の指標とした。

2.4 乳酸発酵促進物質の調製方法

米麹、大豆、赤糠を水に浸漬し、3時間煮熟させた。煮熟後、直ちに濾紙で濾過し、麹エキス、大豆抽出液、赤糠抽出液とした。

2.5 乳酸菌数・生菌数の測定方法

乳酸菌数はMRS寒天培地、生菌数はニュートリエント寒天培地に試料を塗抹した。培養後に出現したコロニーの数を計測した。

2.6 ナイシン活性の測定方法

Bacillus subtilis ATCC19659をナイシン活性測定の指標菌として用い、寒天拡散法(Agar well diffusion assay)により抗菌活性を測定した¹⁾。

3. 実験結果及び考察

3.1 従来製法による甘酒の製造条件

甘酒の製造工程に乳酸発酵を導入することに先立ち、糖化時間及び殺菌温度・時間と着色度の関係について麹、蒸米、水を混合し、糖化させる従来製法により検討した。

3.1.1 糖化時間

甘酒製造において、糖化時間は生産効率と製品の品質を決定する重要な要素である。そこで最適な糖化時間の検討を行った(図1)。4時間の糖化でグルコース濃度約15%、全糖濃度約20%となった。さらに糖化時間を延長したが、顕著な糖濃度の増加は認められなかった。製品の糖濃度、着色への影響を考慮すると糖化は4時間程度でよいと考えられた。

*1 食品工業技術センター 発酵技術室 *2 山崎合資会社 *3 統括研究員

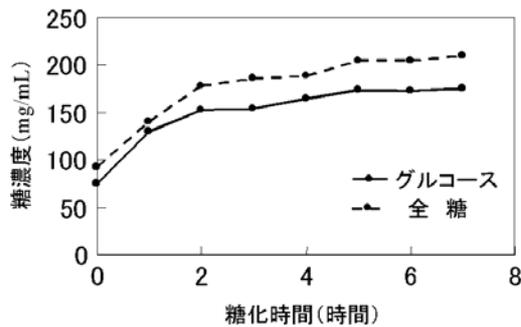


図1 甘酒の糖濃度の経時変化

3.1.2 殺菌温度・時間と着色の関係

甘酒には糖が多く含まれ、加熱殺菌により褐変しやすい。そこで殺菌温度と殺菌時間が着色に及ぼす影響を調べた(図2)。殺菌温度の上昇、及び殺菌時間の延長により吸光度の増加が認められた。吸光度の増加は着色の進行を示唆している。特に殺菌温度 100 では他の温度と比較して大幅に吸光度が増加した。この結果より殺菌条件は 90 で 15 分間とした。

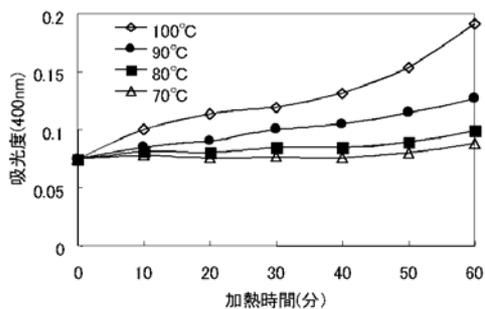


図2 殺菌温度と着色度の関係

3.2 乳酸発酵を導入した甘酒の製造法

抗菌性乳酸菌 *Lc. lactis* IF012007 株を使用して有害微生物が存在しない乳酸発酵炊飯米と乳酸発酵麹を調製し、甘酒を製造することを試みた(図3)。米を乳酸発酵するための乳酸発酵促進物質の検討、乳酸発酵米の抗菌性の検討を行い、甘酒の試作試験を行った。

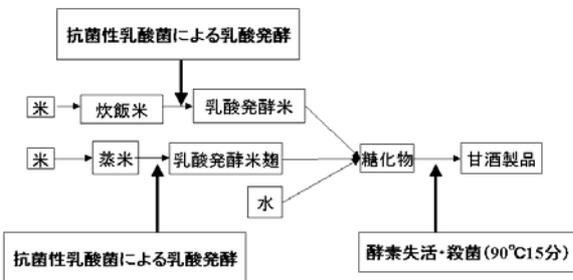


図3 原料を乳酸発酵させる方法

3.2.1 乳酸発酵促進物質の検索

乳酸菌には強い栄養要求性があり、通常の炊飯米に含まれている栄養分のみでは乳酸菌は十分に増殖しない。そこで乳酸菌の増殖を促進する物質の検索を行った。種々の物質を米の浸漬水に添加し、蒸米を調製した。添

加量は浸漬水の全量あるいは 10% とした。これに乳酸菌を接種し、増殖量とナイシン活性を測定した(表1、表2)。大豆抽出液の添加は、他の添加物と比較して乳酸菌の増殖及びナイシン活性を増加させた。また過度の pH の低下も生じなかった。

大豆抽出液の添加を 10% に低下させてもナイシン活性に変化が見られなかった。

表1 乳酸発酵促進物質(米浸漬水)の検討

時間(hr)	0	24	48
麹エキス10%			
乳酸菌数(cfu/g)	6.6×10^6	3.9×10^8	4.6×10^8
pH	6.22	4.95	4.60
大豆抽出液のみ			
乳酸菌数(cfu/g)	8.9×10^6	8.2×10^8	1.0×10^9
pH	6.43	6.08	6.12
大豆抽出液10%			
乳酸菌数(cfu/g)	7.1×10^6	4.6×10^8	5.3×10^8
pH	6.10	5.39	5.41
赤糠抽出液のみ			
乳酸菌数(cfu/g)	4.5×10^6	2.9×10^8	2.6×10^8
pH	6.54	5.85	5.66

表2 乳酸発酵促進物質を添加して発酵させた蒸米のナイシン活性(AU/g)

時間(hr)	24	48
麹エキス10%	2000	2000
大豆抽出液のみ	4000	4000
大豆抽出液10%	4000	4000
赤糠抽出液のみ	2000	1000

Agar well diffusion assay法による

3.2.2 乳酸発酵蒸米の抗菌活性

大豆抽出液を米の浸漬水に 10% 添加して調製した乳酸発酵蒸米の抗菌活性を測定した。*B. subtilis* ATCC19659、*Micrococcus roseus* IF03746、*Listeria innocua* ATCC33091 を指標菌として寒天培地に接種し、乳酸発酵米をおくと、米の周辺に指標菌が増殖しない阻止円が確認された(図4)。このことから乳酸発酵米は抗菌活性が存在することが明らかとなった。



指標菌: *B. subtilis* ATCC19659

図4 乳酸発酵米の抗菌活性

3.2.3 乳酸発酵麹及び乳酸発酵炊飯米の調製

乳酸発酵麹は大豆抽出液を米の浸漬水に 10% 添加して調製した乳酸発酵蒸米に清酒用麹菌を接種し、48 時間の製麹を行い調製した (表 3)。製麹中には乳酸菌は増殖しなかった。ナイシン活性は蒸米の乳酸発酵終了時 4000 AU/g であったが、製麹終了後には検出されなかった。これは製麹中に麹菌が生産するプロテアーゼによりナイシンが分解されたためと考えられる²⁾。このため製麹中や、製麹終了後における有害微生物による汚染には対応できないことが判明した。

乳酸発酵炊飯米は大豆抽出液を米浸漬水に 10% 添加して炊飯後、乳酸菌を接種して調製した (表 4)。乳酸発酵後のナイシン活性は 8000 AU/g となり、乳酸発酵蒸米のナイシン活性と比較して 2 倍に増加した。

表 3 乳酸発酵米麹の調製

時間 (hr)	蒸米の乳酸発酵		製麹
	0	24	72
乳酸菌数 (cfu/g)	5.7×10^6	4.3×10^8	1.0×10^8
pH	6.49	5.68	5.18
ナイシン活性 (AU/g)	—	4000	<250

表 4 乳酸発酵炊飯米の調製

時間 (hr)	炊飯米の乳酸発酵	
	0	24
乳酸菌数 (cfu/g)	5.3×10^6	8.9×10^8
pH	6.19	5.58
ナイシン活性 (AU/g)	—	8000

表 5 乳酸発酵米麹、乳酸発酵炊飯米を用いた甘酒の試験製造

	糖化後	殺菌後		
		7	14	21
乳酸菌数 (cfu/g)	<100	<100	<100	<100
pH	5.89	5.48	5.32	5.32
ナイシン活性 (AU/g)	50	<50	<50	<50
生菌数 (cfu/g)	<100	2.3×10^6	1.3×10^8	1.9×10^8

3.2.4 甘酒の試作試験

3.2.3 で調製した乳酸発酵麹及び乳酸発酵炊飯米を用いて甘酒を試作した (表 5)。乳酸発酵炊飯米に由来するナイシン活性は糖化後 50 AU/g であった。乳酸発酵炊飯米に存在していたナイシンは糖化中に麹由来のプロテアーゼにより分解されたと推測された。加熱殺菌によりナイシン活性は減少しなかったが、保存試験開始から 7 日後には検出されなくなった。生菌は糖化後、及び殺菌後には検出されなかったが、30 で密封保存すると 7 日後には 2.3×10^6 cfu/g となり腐敗した。これは製麹作業中に有害微生物の芽胞が混入して、保存試験中に発芽・増殖したためであると考えられた。

この結果から、製麹中の作業方法、製麹及び糖化中におけるナイシンの分解防止法を検討する必要があると考えられた。

3.3 糖化物を乳酸発酵させる製造法

糖化時におけるナイシンの分解を防ぐため、従来製法で炊飯米と麹を調製し、糖化处理後に乳酸発酵を導入することを試みた (図 5)。

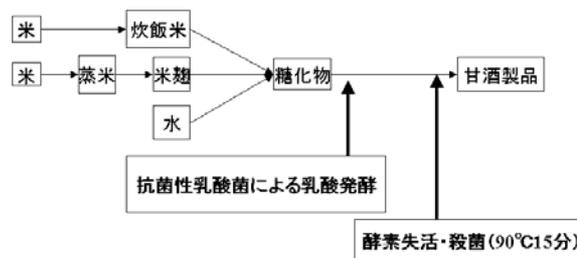


図 5 糖化物を乳酸発酵させる方法

3.3.1 乳酸発酵時間の検討

最適な糖化物の乳酸発酵時間を検討するため、乳酸菌の増殖、ナイシン活性、pH の測定を行った (表 6)。乳酸菌は糖化物中において 10 時間の培養で 1.1×10^9 cfu/g まで増殖した。この時ナイシン活性は 1000 AU/g となり、有害微生物の生育を阻止することが可能であると考えられた。

ナイシン活性は 8 時間から 10 時間の乳酸発酵で飛躍的に増大した。乳酸発酵の更なる長時間化は pH を低下させるので、酸味の抑制とナイシンの生産性を考慮すると 10 時間の乳酸発酵を行うことが適当であると考えられた。

表 6 糖化物の乳酸発酵

時間 (hr)	0	4	6	8	10
乳酸菌数 (cfu/g)	6.2×10^6	—	—	—	1.1×10^9
pH	5.89	5.66	5.11	4.48	4.32
ナイシン活性 (AU/g)	—	<50	50	50	1000

3.3.2 甘酒の試作試験

糖化物を乳酸発酵した甘酒を調製し、殺菌・保存試験を行った(表7)。保存開始から21日経過しても生菌は検出されなかった。この時のナイシン活性は1000 AU/gであり、十分な殺菌効果を維持した。一方、乳酸発酵を行わなかった対照品は試験開始から7日後には腐敗していた(データは省略)。pHは乳酸発酵により5.89(糖化終了時)から4.32(乳酸発酵終了時)へと低下した。低いpHは味覚的に酸味を感じさせるので、緩和する必要があると考えられた。

表7 糖化物の乳酸発酵法による甘酒の試験製造

	糖化後	10hr発酵後	殺菌後
乳酸菌数(cfu/g)	—	1.1×10^9	<100
pH	5.89	4.32	4.41
ナイシン活性(AU/g)	—	2000	2000
生菌数(cfu/g)	<100	<100	<100
保存期間(日)	7	14	21
乳酸菌数(cfu/g)	<100	<100	<100
pH	4.34	4.40	4.30
ナイシン活性(AU/g)	2000	1000	1000
生菌数(cfu/g)	<100	<100	<100

3.3.3 乳酸発酵甘酒と従来製法甘酒の混合保存試験

乳酸発酵甘酒の低下したpHを緩和するため、従来製法の甘酒と混合後、殺菌して保存性を検討した(表8)。

表8 乳酸発酵甘酒と従来製法甘酒の混合保存試験

混合比率 (乳酸発酵法:従来法)	1:9	2:8	3:7
生菌数(cfu/g)	3.3×10^6	1.0×10^7	<100
pH	5.15	5.01	4.90
ナイシン活性(AU/g)	<50	<50	50

保存開始から7日後の分析値

乳酸発酵甘酒と従来製法甘酒を重量比3:7で混合すると保存開始から7日経過しても生菌が検出されなかった。この時のナイシン活性は50 AU/gであった。pHは4.90であり、乳酸発酵法だけの甘酒(pH4.10)より高くなった。一般的な甘酒のpHは5以上であるため、やや低いが、乳酸発酵甘酒の混合比を小さくすることにより、酸味の緩和を図ることができた。

なお、乳酸発酵甘酒と従来製法甘酒を重量比3:7で混合した試作品は保存開始から21日経過しても生菌は検出されず、高い保存性を有していた(表9)。

表9 混合乳酸発酵甘酒の保存試験

保存期間(日)	7	14	21
乳酸菌数(cfu/g)	<100	<100	<100
pH	4.90	4.83	4.86
ナイシン活性(AU/g)	50	<50	50
生菌数(cfu/g)	<100	<100	<100

(混合比 乳酸発酵甘酒:従来製法甘酒 = 3:7)

4. 結び

甘酒製造に抗菌性物質「ナイシン」を生産する乳酸菌による発酵工程を導入するため、製造条件の検討及び試作試験を行った。

甘酒の原料となる麹と炊飯米の製造工程に乳酸発酵を導入して糖化を行う製造法では、大豆抽出液を米の浸漬液として使用することにより、乳酸菌の増殖が促進され、ナイシン活性が高くなることを見出した。しかし、ナイシン生産性乳酸菌で発酵した蒸米に麹菌を接種すると、麹菌が生産するプロテアーゼによりナイシンが分解され抗菌活性を示さなくなった。また、糖化中においてもナイシンは分解された。このため試作品では抗菌活性が失われ、製造工程で混入したと考えられる有害微生物が増殖したため、保存性を向上させることはできなかった。

次いで糖化物を乳酸発酵する製造方法を試みた。10時間の乳酸発酵により高いナイシン活性を得ることが可能となり、試作品は高い保存性を有した。

乳酸発酵により低下したpHを緩和するため、乳酸発酵甘酒と従来製法甘酒の混合試験を行った。高い保存性を維持するためには、乳酸発酵甘酒と従来製法甘酒を重量比3:7で混合させることが必要であった。これによりpHは混合前の乳酸発酵甘酒よりも高くなったものの、一般製品よりも若干低いため、更なる検討が必要である。

本研究により、糖化物を乳酸発酵することにより有害微生物の生育を阻止した新規な甘酒の製造方法が開発できた。

文献

- 1) T. Kato, K. Maeda, H. Kasuya and T. Matsuda
: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* , **63** , 642(1999)
- 2) 加藤丈雄: *食科工* , **47** , 752(2000)