

①

# 米粉糖化発酵飲料に関する食物学的研究

富永美穂子

## 論文目次

### 序章 研究の背景と目的

- 1. 食生活の現状と課題・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
- 2. 高齢者用食品と発酵食品・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4
- 3. 健康志向と発酵飲料・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11
- 4. 本研究の目的・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 15

### 第1章 米粉の糖化

- 第1節 糖化酵素の還元糖生成に及ぼす影響・・・・・・・・・・ 20
  - 1. 序論
  - 2. 実験方法
  - 3. 実験結果および考察
- 第2節 糊化度の還元糖生成に及ぼす影響・・・・・・・・・・ 27
  - 1. 序論
  - 2. 実験方法
  - 3. 実験結果および考察

### 第2章 乳酸菌による糖化液の発酵

- 第1節 市販ヨーグルトスターターによる糖化液の乳酸発酵・・・・ 36
  - 1. 序論
  - 2. 実験方法
  - 3. 実験結果および考察
- 第2節 ケフィアからの乳酸菌の単離・・・・・・・・・・・・・・・・ 49
  - 1. 序論
  - 2. 実験方法
  - 3. 実験結果および考察



第3節 ケフィアからの単離乳酸菌を中心とする糖化液の乳酸発酵・・・	60
1. 序論	
2. 実験方法	
3. 実験結果および考察	

### 第3章 ケフィアからの単離乳酸菌による発酵糖化液の酸生成に及ぼす要因

第1節 糖化液中の成分の影響・・・・・・・・・・・・・・・・	75
1. 序論	
2. 実験方法	
3. 実験結果および考察	
第2節 糖化酵素自己消化物の影響・・・・・・・・・・・・・・・・	82
1. 序論	
2. 実験方法	
3. 実験結果および考察	
第3節 糖化酵素自己消化物中の酸生成・生育促進物質・・・・・・・・	89
1. 序論	
2. 実験方法	
3. 実験結果および考察	

### 第4章 酵母による糖化液の発酵

第1節 ケフィアからの酵母の単離と同定・・・・・・・・	101
1. 序論	
2. 実験方法	
3. 実験結果および考察	
第2節 ケフィアからの単離酵母を中心とする糖化液の発酵・・・・・・・・	111
1. 序論	
2. 実験方法	
3. 実験結果および考察	

第3節 酵母の発酵性などに及ぼす培養法の影響	124
1. 序論	
2. 実験方法	
3. 実験結果および考察	
第5章 乳酸発酵糖化液の飲料としての調製条件とその嗜好性	
第1節 乳酸発酵飲料としての調製条件の検討	135
1. 序論	
2. 実験方法	
3. 実験結果および考察	
第2節 乳酸発酵糖化液の官能評価	146
1. 序論	
2. 実験方法	
3. 実験結果および考察	
終章 総括および今後の課題と展望	
第1節 研究結果の要約	157
第2節 総括および今後の課題と展望	161

## 序章 研究の背景と目的

### 1. 食生活の現状と課題

現代日本の食卓には、季節を問わず、多種多様な食品が並び飽食の時代といわれて久しい。戦後の高度経済成長による国民の所得水準の向上および流通、食品加工、保存、調理技術などの進歩がその背景にあり、豊かな食生活が楽しみ、個々人の嗜好性に応じて、欲しいものを自由に選択して食べられる時代を迎えている。しかしこのような嗜好中心の食事から偏食や栄養過剰摂取、カルシウムなどの特定の栄養素不足の傾向が生じてきている。また、これまでの食習慣の蓄積の影響が大とされる心臓病、高血圧、糖尿病をはじめとする生活習慣病が増加し、その発現が子どもにもみられ、低年齢化傾向にあり、大きな社会問題の一つとなっている。生活習慣病 (Life-style related disease) は「食習慣、運動習慣、休養、喫煙、飲酒等の生活習慣が、その発症、進行に関与する疾患群」と定義されている。1996年の公衆衛生審議会意見具申のなかで、生活習慣を改善することにより、疾病の発症や進行が予防できるという観点から、従来成人病が改称されたものである (厚生省 1997)。

このような背景から現在の食生活が省りみられ、健康志向の風潮が高まっている。そのためヨーグルトなどの健康によいといわれる食品の需要が増すとともに、欧米化した食生活への反省から、栄養バランスのとれた日本型食生活も見直されてきている。日本型食生活とは、わが国の食生活における炭水化物 (Carbohydrate)、タンパク質 (Protein)、脂質 (Fat) の3大栄養素PFCのエネルギー比率が米国ではほぼ理想的な目標値 (P:F:C=12:30:58) とされたものに近いものとなっていたことと、食生活の急激な変化により、栄養および食料自給のバランスが崩れだしたことによる栄養学的観点および食料自給率維持の観点から、1980年の農政審答申のなかで提言されたものである。その特徴として、1) 欧米諸国に比較し熱量水準が低く、そのなかに占める澱粉質比率が高い、2) 動物性タンパク質と植物性タンパク質の摂取量がほぼ半々である、3) その内動物性に占める水産物の割合が高いことなどが挙げられる (豊川 1987)。このような食生活は、欧米とは異なった歴史や風土の所産であり、脂質エネルギー比率の高い欧米諸国からも注目されてきている。しかし、1995年の国民栄



養調査成績ではエネルギー、炭水化物が減少傾向であるのに対して、動物性タンパク質、動物性脂質は微増傾向がみられ、脂質摂取量はエネルギー比率の適正上限とされる25%を超え、25.8%となっていており、徐々にバランスを欠きつつある（厚生省保健医療局 1996）。

日本型食生活の基盤となっているのが米である。米は今から4000～5000年前に南アジアで栽培されはじめ、日本には縄文時代晩期から弥生時代に伝来したとされている。現在のところ最も古い水田の遺跡は約2300～2500年前と推定され（今村 1995, 関矢 1996）、日本の気候風土や嗜好に適したジャポニカ種が定着したといわれる（倉澤 1982, 斎尾 1993）。日本が国家として形を整えた初期から、米は税として経済の中心にあり、稲作を中心とする経済生活は日本人の特性となって定着し、現在に至っている。欧米の肉食文化と対比されるように、米を中心とする独自の米食文化がこれまでの日本および日本人を形成してきたともいえるであろう（関矢 1996）。

米の栄養といえば、澱粉を主とする炭水化物が約75%を占めている。脂質は1.3%と少なく、タンパク質は7%程度で、必須アミノ酸のリジンが不足するが、他の穀類に比較し、アミノ酸価（Amino acid score, 各種タンパク質の窒素1gあたりの必須アミノ酸量を比較タンパク質の必須アミノ酸量と比較して、それより少ない含量を示す第一制限アミノ酸の百分率）、生物価（Biological value, 体内における食品タンパク質の利用率）ともに高く栄養的に優れている食品である。近年、食品の栄養といった側面の他に、生体の生理活性や免疫にかかわるような食品の機能性が注目されてきている。米においては、微量に含まれるオリザシスタチン（システインプロテイナーゼを特異的に阻害するタンパク質である植物性シスタチン）や $\gamma$ -オリザノール（フェルラ酸とトリテルペンアルコールのエステル）などが抗ウィルス作用や細胞膜保護といった機能をもつとされる。しかし、一方で、生体内で有害に働くようなアレルゲンとなるものも存在しており、有効成分を強化したり、アレルゲンを消去する試みが検討されている（荒井 1995）。

穀物は食物エネルギーの50%を占めており、その重要性はあらゆる食品のなかで極めて高いものである。食の多様化とともに、パンやスパゲティーなどの小麦製品の需要が伸び、米の消費量は年々減少してきているが、総カロリーの



25%は米から摂取され（日本農業年鑑刊行会 編 1996），主食として依然重要な地位を占めている。また，稲作は日本の農業の中心的役割も担っており，水田は洪水防止用のダム機能，土壌浸食防止，生態系保全など国土保全，自然環境維持といった面でも大きな役割を果たしてきている（関矢 1996）。

日本の食生活の急速な変化による多種多様な食生活の裏では，食料自給の低下をともなっており，その食料自給率はカロリーベースで1995年には42%と先進国中最低である（厚生省保健医療局 1996）。国民一人当たりの国土面積が少なく，70%近くが急峻な山地で，農地面積が14%とイギリスの72%，フランスの55%，アメリカの44%に比して非常に少なく，日本の国土自体が食料生産に適さないことは事実である。しかし，食料自給率は1965年の時点では73%あり，わずか30年の間に激減している（関矢 1996）。さらに，地球規模の激的な人口増加，温暖化，環境破壊など食生活を揺るがし，悪化させるような危険因子は多数存在する。食料生産量に対して，その消費は食料分配の不平等さに原因もあるが，日本のような飽食の国がある一方で，8億人以上の人々が飢餓に苦しんでいる現状がある。資源の枯渇など，人口増加に食料生産が追いつかなくなる可能性も否定できず，現代日本の飽食が永続するとは限らない（藤原 1990，荏開津 1994）。豊穡の喜びを知らせる田園風景は現在まで大切に受け継がれてきたものであり，未来の子孫たちに残しておく義務もある。したがって，長期的視野で見れば稲作による食料の安定した自給力を備えておくことは恒久的に重要な課題であるといえる。

さらに，1994年のガット・ウルグアイラウンド交渉の一環による米の一部自由化にともない，輸入米も店頭にならぶようになった。「平成米騒動」とも呼ばれる1993年の冷夏による米の大凶作の際に，緊急輸入された外国産米が日本人消費者にはあまり利用され得なかった事実もあり，それら輸入米がすべて日本人の嗜好に適しているとは限らない。加えて，米は長期貯蔵すると米糠中のリポキシゲナーゼにより脂質が酸化し，古米臭が生じて風味が劣化する。また，米の家計に占める割合は2%程度と低いので，多少高くても嗜好性のよいものを求める傾向は年々高まっている。そのため主食としての米だけでなく，嗜好性に劣るあるいは合わないような古米や輸入米の利用を含め，過剰米対策として米の新しい加工食品を開発するなど，米消費拡大への試みを図っていくこと



は、今後さらに必要となってくるであろう。現在においてもかなり多くの米の新加工食品が開発されているが、その一例として斎尾（1993）が記している表を改変し、Table 1 に示した。米の伝統的な加工食品としては、清酒や味噌などの発酵食品が代表的なものとして挙げられるが、味醂や醤油などにもみられるように微生物を利用して原料を発酵させ、香味を増したり、保存性を高めたりする発酵技術は、日本人の伝統的な食の知恵である（小泉 1989）。これら伝統的食品や新加工食品に加えて、新たなものを開発していく際には、高齢者などに好まれるという視点もこれからの時代には必要と考えられる。現在の日本では65歳以上の人口が全人口の7%から15%になるまでの期間が25年と非常に短く、我が国の高齢化は他国に類をみないスピードで進行している（河野 1991）。そして、2050年にはその人口が32.3%になると試算されている（厚生省 1997）。国民の3人に1人が高齢者となろうとする時代を控え、いかにして高齢者が健康で快適な日常生活を維持できるかが今後の大きな課題の一つといえる。なかでも食生活はその基本ともいえ、楽しく、美味しく食べることは栄養源としての生命維持の面からはもとより、生き甲斐の一つとなり、健康維持へとつながるであろう。

## 2. 高齢者用食品と発酵食品

高齢社会を迎え、1992年、厚生省によって、高齢者用食品規格基準検討会報告書が提出された。「咀嚼困難者用食品」，「咀嚼・嚥下困難者用食品」が特定栄養食品の特別用途食品として位置付けられ、その許可基準が示されている（柳沢 1994）。また、高齢者用食品開発には骨粗鬆症予防に最重点がおかれており、カルシウムが有効に摂取できるようにするためにいくつかのカルシウム源の利用効率（小林ら 1987）が検討されたり、牛骨粉や、乳清、卵殻カルシウムなど新たなカルシウム源としての利用性の検討が行われている（廣野 1994，塚原と江澤 1997）。老化は生物学的なものだけではなく、生活環境も大きく影響しており、なかでも食生活との関わりが深い。それを少しでも予防していこうとする観点からデザイナーフーズ（植物性食品中の有効成分を主体に癌予防のためにデザインされた食品）の活性酸素消去，抗菌性，変異原性抑制効果をもつ成分が注目されてきている（越智 1997）。これらの高齢者用食

表 1 米の加工食品の分類

Table 1 Classification of processed rice food.

	Traditional processed rice food (米の伝統的加工食品)	New processed rice food (米の新加工食品)
Alcoholic beverages (酒類)	Sake (Japanese rice wine) (清酒) Japanese distilled spirit (焼酎)	Rice wine (ライスワイン), Beer (ビール)
Glutinous rice cakes (餅類)	Rice cake (餅), Glutinous rice cakes (白玉餅), Packaging rice cake (包装餅), Frozen rice cake (氷餅)	Aseptic packaging rice cake (無菌包装餅)
Rice crackers (米菓類)	Rice cubes (あられ), Rice cracker (煎餅)	
Snack cakes (スナック類)		Rice snack (ライスナック), Flakes (フレーク)
Confectioneries (菓子類)	Japanese style confectionery (和菓子), Dumpling (団子)	Frozen dumplings (冷凍団子類)
Noodles (麺類)	Rice noodle (ビーフン)	Rice noodle (ライスヌードル)
Rice flour (穀粉類)	Nonglutinous rice flour (上新粉), Glutinous rice flour (白玉粉, 糯粉), Rice granule (寒梅粉)	Precooked rice flour (アスター化米粉), Brown rice flour (玄米粉)
Condiments (調味料)	Mirin (sweet liquid flavoring) (味醂), Rice vinegar (米酢), Fermented rice paste (米味噌)	
Favorite beverages (嗜好品)	Brown rice tea (玄米茶)	
Cooked rices (米飯類)	Dried cooked rice (干飯), Perboiled rice (パーボイルドライス), Vinegared rice with fish and vegetables (飯ずし類)	Retortable cooked rice (レトルト米飯), Canned cooked rice (缶詰米飯), Frozen cooked rice (冷凍米飯), Cupped rice (カップライス), Precooked rice (アスター化米)
Rice gruels (粥類)		Retortable pouched rice gruel (レトルト米粥), Canned rice food (缶詰), Rice powder (粉末), Pressed brown rice (圧べん玄米)
Processed rices (加工米)	Roasted rice (焼き米)	Vitamin enriched rice (ビタミン強化米) Precooked brown rice (易炊飯玄米)
Breads (パン類)	Brown rice bread (玄米パン)	Rice bread (ライスパン)
Materials (素材類)	Rice oil (米油), Rice starch (米澱粉)	
Cooked foods (調理食品類)		Pilaf (ピラフ), Chahan (fried rice) (炒飯)



品の開発は以下のような高齢者の特徴をふまえて検討されているものである。

高齢者の一般的な身体的特徴は、加齢にともない徐々に変化する生理的現象である老化に集約できる。具体的には、細胞数、水分、骨量の減少などの身体組織の変化、神経伝達速度、基礎代謝率、心肺機能をはじめとする各臓器、器官の機能の低下が挙げられる。食生活にかかわる身体機能面では、消化吸収能力の低下、口の粘膜や味蕾の萎縮などによる味覚感覚機能の低下、全身的な組織量の減少による代謝機能の低下、歯根の萎縮、歯の欠損による咀嚼力の低下がみられる。これらの老化現象が食欲、食事摂取能力を左右し、高血圧、心臓病、糖尿病、慢性便秘など高齢者に多い疾病に大きな影響を与えている（島菌 1984）。さらに老化にともなう骨芽細胞の機能低下により、骨形成が破骨細胞による骨からの体内へのカルシウム供給（骨吸収）に追いつかなくなり骨量が減少していくといわれる。特に女性で頻度の高い骨粗鬆症も高齢期の食生活を考えるうえで重大な問題の一つとなっている（山崎と杉橋 1989）。また、高齢者は精神的機能の低下により、情緒的にも不安定であり、家庭内における人間関係のトラブルなどに起因する食欲不振、経済的な原因による食費の節減などにより容易に低栄養の状態に陥りやすい。しかしながら、一方では、さまざまな食品があふれ飽食時代にあるなかで、美食・過食による栄養の摂りすぎ状態も存在している。以上のような高齢者を取り巻く環境や特徴を含めて高齢者の食生活において考慮すべき点を挙げてみる（山崎と杉橋 1989, 飯塚 1989）。第一は加齢にともなう老化現象により、身体機能、消化吸収能力、咀嚼力の低下が顕著になることである。第二に高齢者の食は保守的で、各個人の長年にわたる食習慣・嗜好により食品の選択、料理の範囲、味付けの好みが固定化してきている。第三に高齢期は免疫機能の低下をともない、各種疾患の発症や老化の進行を早めるので、免疫機能を維持したり、高める働きのある各種ビタミン類やミネラル、不飽和脂肪酸などの栄養素を多く含む食品の摂取が望ましいと考えられている。上記高齢者用食品の開発においてはカルシウムや生理活性物質を食品に添加して用いることに重点がおかれている。添加物としてではなく、新しく高齢者用食品の調製を試みていく場合、以上の三点から消化吸収性が良く、栄養的にも優れ、しかも保守的な嗜好に合致したものが望まれてくると考えられる。そのような既存の食品の一つとして、発酵乳や納豆などの発酵食品



が挙げられる。これらの発酵食品は原料がもつ優れた栄養や生理的機能をベースにし、これに発酵による成分変化により生じた機能ならびに発酵中に増殖した微生物の人体に対する保健的機能が付加されているからである（内藤 1992）。

例えば発酵乳を例にとると、発酵乳は20世紀初頭に、Metchnikoffが発酵乳飲用による「不老長寿説」を唱えたことから、急速に全世界に広まったとされる。その後、1960年代より開始されたヒトや動物の消化管菌叢に関する研究により、乳酸菌および発酵乳の健康や疾病に及ぼす影響が明らかにされてきている（高野 1996）。日本では1950年頃から発酵乳の本格的な製造がはじめられたとされているが、厚生省の「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」（乳等省令）によると、“はっ酵乳”とは乳またはこれと同等以上の無脂乳固形分を含む乳等を、乳酸菌または酵母で発酵させ、糊状または液状にしたもの、またはこれらを凍結させたものをいう、となっている（足立と伊藤 1987）。発酵乳の原料である乳（牛乳）はアミノ酸組成が優れており、ミネラル、ビタミンなど必要とするほとんどすべての栄養素を含み、それら栄養素の消化吸収率も高い（山崎と杉橋 1989）。しかし、牛乳中には4～5%のラクトース（乳糖）が含まれており、日本人にはこのラクトースをグルコースとガラクトースに分解する酵素が少ないか、欠乏している人がかなり存在する。したがって、ラクトースが分解されずに腸管内に蓄積し、牛乳を飲んだ場合に下痢や腹痛など乳糖不耐症と呼ばれる症状が現れる場合がある。乳酸菌は糖類を発酵し、乳酸を生成する細菌の総称で、乳中においてはラクトースを分解し、生じたグルコースを乳酸に変換する。また、乳酸菌の産生する乳糖分解酵素も腸内で乳糖不耐症軽減に寄与している。したがって、牛乳が飲めない乳糖不耐症の人にとっては好適食品といえる。

乳酸菌は食品中では発酵乳製造に主として利用されているが、その他に清酒、ワイン、パン、味噌、漬物などの雑菌の繁殖防止や風味付けなどにも重要な役割を果たしている。乳酸菌は細胞形態により、桿菌と球菌に、また発酵形式によりホモ型とヘテロ型に大別される。1980年頃までは、*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*の4属に分類されていた。しかし、乳酸菌の分離技術の向上および近年における核酸（DNA, RNA）などの塩基配列の解析により、分類・同定の技術が進歩し、現在では上記4属の他に新たに7



属が加わり、11属に分類されている（岡田 1995）。

乳酸菌が乳酸を生成する過程は、以下のようになっている。乳糖などの糖をグルコースなどの単糖に分解し、グルコースから乳酸のみを生成するホモ発酵の場合、Fig. 1に示すようにそこからEMP経路（エムデン・マイヤーホフ・パルナス経路，Embden-Meyerhof-Parnas pathway）を經由してピルビン酸まで代謝される。好氣的条件下（呼吸）では、ピルビン酸からアセチルCoAを経て、クエン酸サイクルを經由し、ATPを生産しながら最終的には炭酸ガスと水に代謝される。しかし、酸素の供給が不十分な嫌氣的条件下（発酵）の場合にはピルビン酸は筋肉の収縮で見られるように乳酸として蓄積される。乳酸以外に酢酸、エタノール、炭酸ガスなどを生成するヘテロ発酵では、好氣的なHMP経路（六炭糖リン酸経路，Hexose monophosphate shunt）で糖がピルビン酸まで代謝される。あるいはEMP経路途中でホスホケトラーゼ経路（Phosphoketolase shunt）に分岐し、エタノールや酢酸の生成をとめないピルビン酸まで代謝される（三崎ら 1984，佐藤 1992，奥脇 1994，Cogan 1995，金子 1995）。また、乳酸菌の種類により、酸生成度や乳酸の種類（D型，L型，DL型）が異なっており、それらの特徴が乳酸菌の同定の指標の一つとなっている。

発酵乳の酸味はそれら乳酸菌が作る乳酸による。乳酸は腸管で吸収されるが、その栄養生理効果としては、胃液の分泌を促進し、ぜんどう運動を活発にする、pHを下げるため他の有害微生物の生育を抑制する、カルシウム、リン、鉄の利用性を高めるなどといった作用が挙げられる（川瀬 1996）。そして、発酵乳は乳酸菌により、タンパク質が予備消化され、吸収されやすくなっていると同時に新たにビタミンなどが生成され、牛乳よりも栄養価値がさらに高くなっている。今日においては、発酵乳の整腸作用や肝臓病予防、血中コレステロール低減作用、血圧降下作用、抗癌作用など種々の生理効果が明らかにされ、発酵乳由来の乳酸菌が腸内菌叢を改善することによる効果も広く認識されるに至っている（内藤 1992，高野 1996）。乳酸菌および発酵乳がもつとされる栄養生理効果をまとめてTable 2に示した。近年における研究の進歩により、摂取乳酸菌の腸内への付着、乳酸菌による乳酸を主とする有機酸の産生、有害酵素の活性阻害、癌増殖の抑制物質の生成、免疫担当細胞の機能を高めるなどといった生理効果を示す乳酸菌の産生物質が解明されつつある。しかし、発酵乳摂取





表 2 発酵乳および乳酸菌の栄養生理効果 (高野 1996を一部変更)

Table 2 Nutritional and physiological effects of fermented milk and lactic acid bacteria.

Effects (効果)	Functions (機序)	Roles of lactic acid bacteria (乳酸菌の役割)
Nutritive reinforcement (栄養増強) Extension of life (寿命延長)	Improvement of nutritive value (栄養価の改善) Promotion of absorption (吸収促進)	Preliminary digestion of protein by proteolytic enzyme (タンパク質分解酵素によるタンパク質の予備消化) Formation of vitamins (ビタミン生成) Promotion of minerals absorption (ミネラル吸収促進) Formation of lactase and lactic acid (乳糖分解酵素および乳酸の生成)
Defense of infection (感染防御)	Improvement of lactose intolerance (乳糖不耐改善) Prevention of intestinal disorders (整腸効果) Improvement of intestinal flora (腸内フローラの改善) Inhibition of harmful bacteria (有害菌の抑制)	Formation of antibacterial substances (抗菌物質の生成) Affinity between bacteria and intestinal tract (菌体と腸管との親和性)
Cancer suppresion (抑制)	Inhibition of harmful metabolic activity (有害代謝活性の抑制) Antimutagenic activity (抗変異原性) Stimulation of immune system (免疫賦活)	Adsorption of mutagens by structure component of bacteria (polysaccharides, components of bacterial wall, surface structure of cell) (菌体構成成分(多糖類, 菌体壁成分, 細胞表面構造)による変異原物質の吸着) Macrophage activation (マクロファージ活性化)
Prevention of circulatory disease (循環器病予防)	Lowering of blood cholesterol (血中コレステロール低減)	Inhibition of synthesis, inhibition of absorption and promotion of excretion of cholesterol (コレステロールの合成阻害, 吸収阻害, 排泄促進)
	Lowering of blood pressure (血圧降下)	Inhibition of angiotensin converting enzyme (アンジオテンシン変換酵素阻害)

によるコレステロールの低下は認められないという報告や菌種、菌株により産生物質の生理活性の程度にかなりの差が見られる。また、発酵乳を摂取する各個人の食習慣、年齢などの差異によりその効果の発現の有無は異なってくる。したがって、菌株レベルでの乳酸菌の効果の検討が必要であるといえる（Sanders 1993, 高野 1996, 横倉 1996）。

高齢期には腸内菌叢が変化し、健康維持につながるビフィズス菌や乳酸桿菌が減少し、腸内腐敗、毒素性、病原性菌が増加する傾向にあるといわれている（光岡 1984）。発酵乳（乳酸）の摂取により、腸内の有害菌の増殖を抑制し、ビフィズス菌を増やすなどして腸内菌叢を良好に保つことは、健康維持、病気の予防・治療などに重要といえる。このように栄養面、保健的な面からも優れている発酵乳類は高齢者向けの食品として有用であると考えられる。しかし、乳・乳製品の消費の増加は高度経済成長以降で、独特の香り、食感の面からヨーグルトなどの乳製品をあまり好まない高齢者も存在すると考えられる。以上のような高齢者の特性をふまえると、米粉などの澱粉材料を糖化させたものの乳酸発酵液は好まれる可能性があるであろう。

### 3. 健康志向と発酵飲料

上述のような乳酸菌の働きが注目され、動物性のミルクではなく、植物性食品の発酵に応用し、乳酸菌、植物性食品双方の利用性を拡大するために人類の主食である穀類（Hamad and Fields 1979）や大豆などの豆類で乳酸発酵が試みられ、発酵乳様食品が調製されてきている。しかし、主として風味に問題があり、その嗜好性の評価はあまり高くない。穀類のなかでも米を中心とする乳酸発酵は、日本と同様米を主食とする韓国やフィリピンなどにおいて若干試みられており、大豆タンパク質（Mok et al. 1991）やミルク（Hong and Ko 1991）などの栄養成分を添加してヨーグルト様食品が調製されている。また、米（米粉）を用いた発酵飲料の調製も報告されており（Lee et al. 1992）、従来のものと比較すると接種菌により風味が向上し、嗜好性がかなり改善されているようであるが、その製造工程はかなり複雑であり、まだ改良の余地が多い。

また、米を糖化発酵させた食品としては、清酒が代表的である。清酒は、黄麹カビ（*Aspergillus oryzae*）により蒸し米を糖化させ、それを酵母



(*Saccharomyces cerevisiae*) により発酵させ、調製される。稲作の伝播とともに酒も作られるようになったといわれており、日本における酒作りの歴史は長い。通常、微生物はグルコースを代謝し、エネルギーを獲得していく。澱粉はグルコースのポリマーであるが、微生物には澱粉を細胞内に取り込む機構がなく、そのままでは利用できない場合が多い。そこで、澱粉を糖（グルコース）に分解する過程が必要となる。清酒用酵母はその分解酵素（アミラーゼ）を生成できないため、従来より酒作りには上述の黄麹カビが米澱粉の糖化に利用されてきた。微生物は、Fig. 2 に示すように動植物と同様に核膜のある核を持つ真核生物（Eukaryotes）の高等微生物（Higher protists）と核膜のない核をもつ原核生物（Prokaryotes）の下等微生物（Lower protists）に分けられる（佐藤 1992）。前述の乳酸菌などの細菌類が下等微生物に属する。カビ、酵母はともに菌類のなかの真菌類として高等微生物に属している。

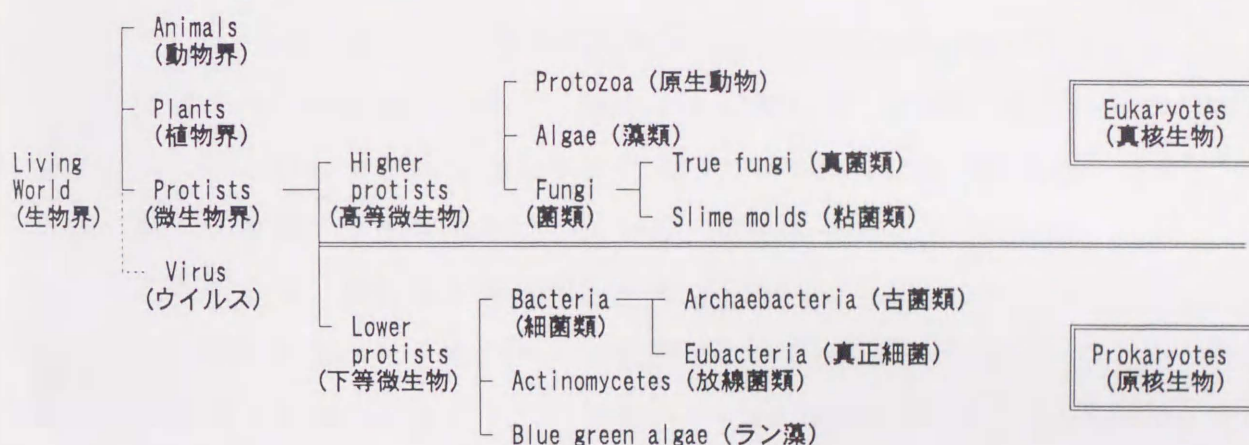


Fig. 2 Classification of microorganisms.

図 2 微生物の分類

カビは果物、野菜、穀類の腐敗、変敗菌として知られているが、糸状菌の *A. oryzae* は清酒、焼酎、味噌、醤油などの発酵食品製造に欠かせないカビで、酵素作用、特にアミラーゼ、プロテアーゼの活性が高い。また、同属の *A. niger* などは高活性のアミラーゼ、ペクチナーゼ、セルラーゼなどの酵素を有し、ク



エン酸、グルコン酸などの有機酸を生成し、工業的に利用されている。*Aspergillus*属以外にアミラーゼを持つカビとしてはクモノスカビ属の*Rhizopus niveus*がある。それらのようなカビから酵素を精製し、澱粉からグルコースを製造するのに工業的に利用されている（渡辺 1989）。澱粉をグルコースに分解するアミラーゼはグルコアミラーゼ（ $\text{exo-}\alpha\text{-1,4-Glucosidase}$ ）と呼ばれ、基質となる糖質の $\alpha\text{-1,4}$ -グルコシド結合に作用し、非還元性末端グルコース残基のグルコシド結合をグルコース単位に切る酵素である。また、 $\alpha\text{-1,6}$ 結合にも作用する場合が多く、澱粉をグルコースに完全に分解していく。澱粉を分解していく場合には $\alpha$ -アミラーゼが併用される場合が多い。 $\alpha$ -アミラーゼ（ $\alpha\text{-1,4-Glucan-4-Gluconohydrolase}$ ）は液化型または糊性化アミラーゼとも呼ばれ、澱粉やグリコーゲンなどの $\alpha\text{-1,4}$ グルコシド結合を無秩序に切断する。枯草菌の*Bacillus subtilis*から精製されるが、分解により可溶性デキストリン、オリゴ糖などを生じ、溶液の粘度を急激に低下させる。グルコアミラーゼと $\alpha$ -アミラーゼを併用すると単独処理の場合よりも分解率が大となる。

酵母のアルコール生成経路は、上述のようにカビのもつアミラーゼにより澱粉が分解され、Fig. 1に示したように生成したグルコースをEMP経路でピルビン酸に代謝するまでは乳酸菌をはじめとした他の微生物とも共通である。そして、そこからクエン酸回路を通らずにピルビン酸デヒドロゲナーゼにより脱炭酸され、アセトアルデヒドとなり、それが還元されてエタノールが生成される。酒は百薬の長とも称されるように、適量を守れば食欲増進、ストレス緩和などの精神面のケアには一役をかってしている面もある。しかし、栄養面でのメリットは少なく、アルコールは肝臓で最終的には炭酸ガスと水に分解されるが、分解途中にアセトアルデヒドが血中に蓄積し、多量飲酒はしばしば頭痛、めまい、吐き気などをともなったりする。日本人はアルデヒド分解酵素が少ないことが知られており、アルデヒドが蓄積しやすい。また、長期にわたる多量飲酒は、肝臓への負担が増し、肝硬変を引き起こしたり、その他の生活習慣病との関連も指摘されている（吉武 1997）。さらに習慣的飲酒によるアルコール依存症、アルコール精神病など飲酒による害も広く知られており、飲酒者本人だけの問題で済まない場合も多い。日本酒は、高齢者を含め多くの日本人の嗜好にあった飲料の一つであるが、含有アルコールが飲み方次第でしばしば問題となる。

厚生省の成人病予防のための食生活ガイドラインにも「禁煙，摂酒で健康長寿」ということが盛り込まれている（武藤 1996）。

日本酒製造においてはアルコールとともに「基調香」，「上立香」，「含み香」が生成されるといわれている。低温で熟成され，フルーティーな風味の加わった吟醸酒が高く評価されるように，その副産物として生成される香気成分が風味形成上大きな役割を果たしている。その香りには一次香と呼ばれる原料自体とその加工物である麴に由来する香り，酵母が原料を発酵することによって作られる香り（二次香），熟成によって生成してくる熟成香がある。日本酒の香りの成分は300種近くあるといわれるが，主な香りの成分はフェネチルアルコールやイソアミルアルコールなどの高級アルコール類や酢酸エチル，酢酸イソアミルなどのエステル類および有機酸やカルボニル化合物である。また，極微量成分の硫黄化合物や含窒素化合物なども特徴ある香り形成に関与している。加えて成分中の低沸点のものは酒に華やかな香りを与え，高沸点のものは酒の基本的香りとともに香味を和らげるとされている（秋山 1994，石川 1995）。

酵母による高級アルコールの生成経路は，2-オキソ酸が脱炭酸反応を受け，アルデヒド類となり，それが還元されアルコール類となる。ピルビン酸からエタノールが生成される経路と同様な反応形式である。この2-オキソ酸の由来がアミノ酸かグルコースかの差で2通りの生成経路があるが，アミノ酸の供給量，前駆アミノ酸の相互関係やアンモニウム塩など共存する窒素源の質と量により，高級アルコールの生成経路および生成量が制御されている（石川 1995）。日本酒をはじめ，ワインやビールなどのアルコール発酵飲料の調製には *Saccharomyces* 属の酵母が最も利用されているが，*Saccharomyces* 属以外にも *Hansenula* 属，*Pichia* 属などに属する酵母は天然のエッセンスとして利用できる程よい香りを発するものが存在する。食品中の香気成分は，微量で複雑な構造のため，以前はその揮発性成分の分離同定が非常に困難であった。近年のキャピラリーカラムによる高分離能ガスクロマトグラフィー，構造決定のための各種スペクトロメトリーの発達により，分離分析技術が進歩し（小林 1997），醸造用酵母などによって生成される揮発性香気成分の分離同定が可能になってきている（Pastore et al. 1994, Albertazzi et al. 1994, Fabre et al. 1995）。しかし，そのような酵母による芳香性を重視し，アルコール度が無視できる程



度に少ない発酵飲料に関する検討例は見当たらない。

飲料においては近年の健康志向の高まりにより、自然・天然、簡便性などが求められ、烏龍茶、緑茶、紅茶などの茶系飲料が全体の4分の1を占める一方で、スポーツ飲料やミネラルウォーターなどの消費が増加している。また、ビタミン、カルシウム、各種エキスなどの「機能性」と呼ばれる素材がプラスされた飲料も、種類、消費ともに年々増加中である。飲料全般が低糖化傾向にあり、低カロリー・甘味料が使用される場合も多く、あっさりした味を好む傾向が強まっている（川島と長峯 1997）。嗜好性の高い飲料には好ましい香りが必要とされ、健康志向、天然志向が強まっているなかで、アメリカなどでは天然素材使用のものには“Natural”のことばが認められている。そして、天然のフレーバーに他種起源の天然フレーバーを添加して利用するWONF(With Other Natural Flavors)の考え方が重要となってきたという（川崎 1992）。したがって、微生物の生成する香りをはじめとする風香味を活かした飲料は、今後さらに利用性が高まっていく可能性が高い。

#### 4. 本研究の目的

日本人の主食である米は、穀類のなかでは栄養的にも優れており、清酒や味噌などの発酵食品をはじめ、餅や煎餅、和菓子など、さまざまに加工され利用されている。しかし、その消費は年々減少の傾向にある。一方、食料自給や稲作のもつ国土保全、自然環境維持などの面から米の消費拡大を図っていくことは必要であり、米の消費拡大のために従来加工品以外にも新たな利用法の開発が試みられている。現在では調理加工されたピラフ、炒飯、カップライスなどが手軽に利用できるようになっている。今後は、これらの利用法に加えて古米や輸入米の有効利用や、若年者だけでなく高齢者にも好まれるという視点なども米の利用開発を考えるうえで重要となるであろう。我が国の高齢化は他国に例をみないスピードで進行しており、いかにして高齢者が健康で快適な日常生活を維持できるかが大きな課題となっている。なかでも食生活はその基本といってもよく、加齢による身体機能の低下など的高齢者の特徴をふまれば、消化吸収性が良く、栄養的に優れ、しかも高齢者の嗜好性に合致したものが望まれてくると考えられる。そのような食品の一つとして発酵乳などの発酵食品

が挙げられるが、米などの澱粉材料を利用した発酵飲料が調製できれば、より高齢者に好まれる可能性がある。

米の発酵飲料は清酒が代表的なものであるが、含有アルコールによって健康を害する場合もある。発酵乳のように米を乳酸発酵させた試みやアルコール含量が無視できる程度に少ない発酵飲料の調製例は現在のところ見られない。また、健康志向の高まりなどから、天然物のみを利用した米からの発酵飲料が調製できれば意義があるであろう。そこで、本論文では米の利用法の一つとして、高齢者用の食品としての利用も考慮しながら、米粉をアミラーゼにより糖化させ、乳酸菌や酵母による米粉糖化液の発酵を試み、消化性や嗜好性の良好な発酵飲料を調製することとした。

第1章では、米粉を市販の数種アミラーゼで糖化させ、添加酵素量や糊化加熱時間を変えて、最適な糖化条件を検討しながら糖化液の調製を試みた。そして、第2、3および4章で米粉糖化液を発酵するのに適した乳酸菌や酵母を選択し、形態的性質や生理学的性質を中心にそれら菌の同定を試みるとともに、調製糖化液を発酵させ、それら使用菌の生育性、発酵性などに影響する諸条件を検討しながら、発酵糖化液を調製した。第5章ではこれまで調製してきた乳酸発酵液を乳酸発酵飲料として利用していくための調製条件を検討するとともに調製した発酵液が実際に高齢者の嗜好性に合うものかどうか若年者（学生）との嗜好性を比較しながら米粉糖化発酵液の飲料としての有用性を判断した。終章で本研究内容を要約し、今後の課題および展望について考察した。



## 引用文献

- 秋山祐一：日本酒，岩波書店，東京，pp. 120-145. (1994)
- 足立達，伊藤敏敏：最新食品加工講座 乳とその加工，建帛社，東京，pp. 278-280. (1987)
- Albertazzi, E., Cardillo, R., Servi, S., and Zucchi, G.: *Biotechnol. Lett.*, **16**, 491-496. (1994)
- 荒井綜一：東京大学公開講座61 コメ（吉川弘之 代表），東京大学出版会，東京，pp. 65-87. (1995)
- Cogan, T. M.: *J. Appl. Bacteriol.*, **79**, 49S-64S. (1995)
- 荏開津典生：「飢餓」と「飽食」，講談社，東京，pp. 8-44. (1994)
- Fabre, C. E., Duviau, V. J., Blanc, P. J., and Goma, G.: *Biotechnol. Lett.*, **17**, 1207-1212. (1995)
- 藤原邦達：食糧輸入反対の事典，農村漁村文化協会，東京，pp. 65-96. (1990)
- Hamad, A. M., and Fields, M. L.: *J. Food Sci.*, **44**, 456-459. (1979)
- 廣野治子： *New Food Industry*, **36**(1), 49-52. (1994)
- Hong, O. S., and Ko, Y. T.: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 587-592. (1991)
- 飯塚美和子：食生活と栄養（日本家政学会 編），朝倉書店，東京，pp. 145-147. (1989)
- 今村啓爾：東京大学公開講座61 コメ（吉川弘之 代表），東京大学出版会，東京，pp. 149-154. (1995)
- 石川雄章：シリーズ＜食品の科学＞ 酒の科学（吉澤淑 編），朝倉書店，東京，pp. 42-48. (1995)
- 金子安之：食品微生物学ハンドブック（好井久雄，金子安之，山口和夫 編），技報堂出版，東京，pp. 126-135. (1995)
- 川崎通昭： *New Food Industry*, **34**(6), 49-56. (1992)
- 川瀬興三：シリーズ＜食品の科学＞ 乳の科学（上野川修一 編），朝倉書店，東京，pp. 97-103. (1996)
- 川島英治，長峯興治：食品と科学， **39**(2), 89-95. (1997)
- 小林彰夫：日食工誌， **44**, 169-176. (1997)

- 小林正, 岡野登志夫, 増田園子, 竹内敦子, 津川尚子: 栄食, **40**, 293-298.  
(1987)
- 小泉武男: 発酵, 中央公論社, 東京, pp. 111-146. (1989)
- 河野友美: 食の科学選書3 食文化と嗜好, 光琳, 東京, pp. 171-172. (1991)
- 厚生省: 厚生白書(平成9年版)「健康」と「生活の質」の向上をめざして,  
厚生問題研究会, 東京, pp. 50-73, 100-101. (1997)
- 厚生省保健医療局健康増進栄養課: 平成8年版 国民栄養の現状(平成6年  
国民栄養調査成績), 第一出版, 東京, pp. 31-74. (1996)
- 倉澤文夫: 米とその加工, 建帛社, 東京, pp. 3-4. (1982)
- Lee, C. H., Min, K. C., Souane, M., Chung, M. J., Mathiasen, T. E., and Adler-Nissen,  
J.: *Food Biotechnol.* **6**, 239-255. (1992)
- 三崎旭, 山田靖宙, 角田万里子: 生化学 ライフサイエンスの基礎, 培風館,  
東京, pp. 77-89. (1984)
- 光岡知足: 日食工誌, **31**, 285-296. (1984)
- Mok, C. H., Han, J., Kim, Y. J., Kim, N., Kwon, D. Y., and Nam, Y. J.: *Korean J. Food  
Sci. Technol.*, **23**, 745-749. (1991)
- 武藤泰敏: 健康の科学シリーズ2 食と健康II(日本栄養・食糧学会 監修,  
武藤泰敏 編), 学会センター関西, 大阪, p. 34. (1996)
- 内藤毅: *New Food Industry*, **34**(7), 55-63. (1992)
- 内藤茂三: 食品と科学, **39**(5), 94-101. (1997)
- 日本農業年鑑刊行会 編: 日本農業年鑑, 家の光協会, 東京, pp. 220-221.  
(1996)
- 農林統計協会: 図説 農業白書(平成8年度版), pp. 14-19, 68-74. (1997)
- 奥脇義行: 新 微生物学(奥脇義行 編), 建帛社, 東京, pp. 39-44. (1994)
- 岡田早苗: 食品微生物学ハンドブック(好井久雄, 金子安之, 山口和夫 編),  
技報堂出版, 東京, pp. 59-56. (1995)
- 越智宏倫: *New Food Industry*, **39**(1), 17-28. (1997)
- Pastore, G. M., Sato, H. H., Yang, T. S., Park, Y. K., and Min, D. B.: *Biotechnol.  
Lett.*, **16**, 389-392. (1994)
- 斎尾恭子: 澱粉科学, **40**, 155-161. (1993)

Sanders, M. L. :Advances in Food and Nutrition Research, Vol. 37, Academic Press, San Diego, pp. 67-130. (1993)

佐藤一精：家政学シリーズ10 食生活と食品素材（日本家政学会 編），朝倉書店，東京，pp. 141-160. (1992)

関矢信一郎：新たな時代の食料生産システム - 低投入・持続可能な農業に向けて -（システム農学会 編），農林統計協会，東京，pp. 36-52. (1996)

島菌順雄：標準栄養学各論，医歯薬出版，東京，pp. 105-124. (1984)

高野俊明：乳酸菌の科学と技術（乳酸菌研究集談会 編），学会出版センター，東京，pp. 311-322. (1996)

豊川裕之：「食生活指針」の比較検討 - 栄養素から献立へ -，農村漁村文化協会，東京，pp. 38-54. (1987)

塚原典子，江澤郁子：*New Food Industry*, **39**(9), 75-79. (1997)

山崎文雄，杉橋啓子：高齢者のための栄養・調理，社会福祉法人 全国社会福祉協議会，pp. 24-37. (1989)

柳沢幸江：*New Food Industry*, **36**(10), 10-15, (1994)

横倉輝男：乳酸菌の科学と技術（乳酸菌研究集談会 編），学会出版センター，東京，pp. 323-336. (1996)

吉武泰男：食の科学，235号，pp. 10-16. (1997)

渡辺忠雄：四訂版 食品学，講談社，東京，pp. 224-238. (1989)



# 第1章 米粉の糖化

## 第1節 糖化酵素の還元糖生成に及ぼす影響

### 1. 序論

米は粒のまま炊いたり、蒸したりして食べる（粒食）ことがほとんどであり、清酒や味噌に代表されるように精白米それ自体が優れた加工特性を有している。しかし、米を粉にしてきた（粉食）歴史も古く、全国各地には非常に多くの種類の米粉を加工した商品がみられ、多くの種類が用途にあわせて作られており、同一のものでも地域によりその呼び名が異なるものが多い（斎藤 1980, 奥野 1989）。米粉を原料や製造工程により分類したものをFig. 1-1-1に示す（倉澤 1982）。また近年における食の多様化により、米離れが進み、過剰米が増加してきたためその対応策として米の粒食から粉食への利用に関心もたれ、米粉のパンや麺などへの添加が考案されはじめ、食品加工原料としての米粉、米澱粉、特に上新粉や上用粉などの生のままの米粉の製造や性質などが注目されるようになってきた（斎藤 1980, 奥野 1989）。

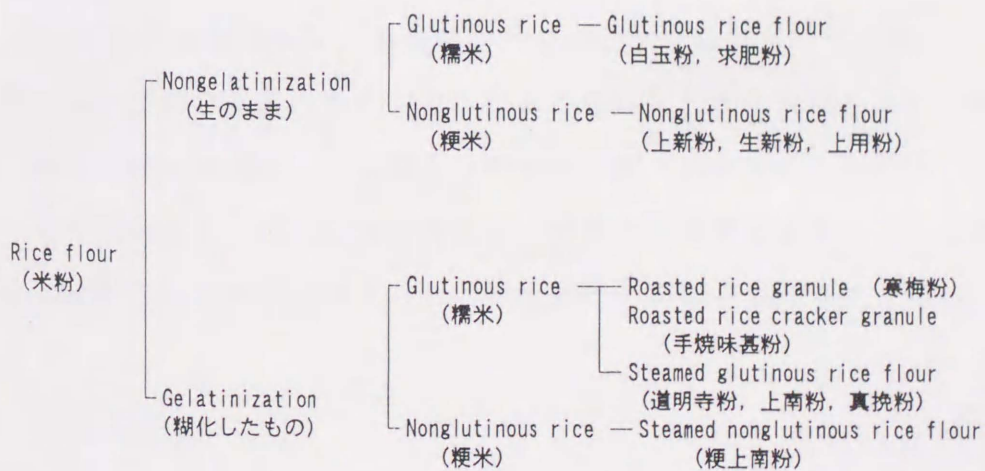


Fig. 1-1-1 Classification of rice flour.

図 1-1-1 米粉の分類

上新粉，上用粉ともにウルチ精白米を製粉したもので，大福餅，柏餅などの餅菓子，団子類に使用され，上用粉の方が粒度が細かい。製造方法は，ウルチ精白米を水洗後水切りし，これを通風乾燥機で水分を20%前後に調節し，製粉後乾燥させ製品としている（斎藤 1980）。

澱粉糖化工業の起こりは，甘藷，米などを澱粉原料とし，麦芽を酵素給源とした水飴の製造からである。1948年頃から， $\alpha$ -アミラーゼが澱粉液化剤として利用されるようになり，高温液化法が開発され，今日の澱粉液化法の基礎技術が確立された。グルコアミラーゼを用いる酵素糖化法は1941年頃に予測され一般に紹介されたのは1959年頃で，酵素利用による澱粉糖化がなされるようになってまだ比較的日子が浅い。澱粉糖化により，澱粉はさとうきび，甜菜に次ぐ第三番目の甘味資源となった（福本 1960，小巻 1983）。糖化に用いるアミラーゼ生産には，我が国では主に各種の糸状菌が利用されてきており，糖化型アミラーゼはほぼ100%グルコースに分解する*Rhizopus*型と最大80%程度しか分解しない*Aspergillus*型に大別されている。両型の分解率には賛否があるが（檜作 1987，久留島 1974），菌種や菌株により分解率や糖化力などの特徴が異なっている（小巻 1960，服部 1961，佐藤 1961，栗村と遠藤 1963，Hayashida 1975）。また，澱粉の種類（不破と杉本 1985）や米の品種（吉澤ら 1978，何ら 1989）などでも酵素による分解が異なるという報告もあり，酵素自体の反応特性および酵素の澱粉類に対する反応性には未だ不明な点も多い。本実験では，澱粉や酵素の種類による糖化への影響を調べるために上新粉に5種のアミラーゼを作用させ，還元糖生成活性や，分解のされ方を比較することにより，乳酸発酵に適していると考えられる糖化酵素の選択を試みることにした。

## 2. 実験方法

### (1) 糖化液の調製

市販品の上新粉を蒸留水に懸濁させ，5%懸濁液になるよう調製した。懸濁液250mlを500mlビーカーに入れアルミ箔をかぶせ，できるだけ均一な状態になるようときどきビーカーを揺らしながら20分間，ガス加熱し，糊化させた。糖化用酵素として，グルコアミラーゼ「アマノ」（グルコアミラーゼ 300U/mg， $\alpha$ -アミラーゼ 65U/mg，酸性プロテアーゼ 250U/mg，酸性カルボキシペプ



チダーゼ 40U/mg, 以後グルコアミラーゼ Aと略す), グルクザイム AF6 (グルコアミラーゼ 6U/mg, 以後グルクザイムと略す), グルクザイム NL 4.2 (液状糖化酵素, グルコアミラーゼ 4.2U/ $\mu$ l, 以後液状グルクザイムと略す), グルク SB (液化力 150U/mg以上, 糖化力 40U/mg以上, 以後グルクと略す), アミラーゼ AD「アマノ」( $\alpha$ -アミラーゼ 10U/mg, 以後 $\alpha$ -アミラーゼ ADと略す)のいずれも天野製薬恵与の5種の酵素を使用した。これら酵素を単独または $\alpha$ -アミラーゼ ADとの併用で試験管中の糊化溶液10gに対して, 1.25mg (液状は1.25 $\mu$ l), 2.50mg (2.50 $\mu$ l), 併用の場合は $\alpha$ -アミラーゼ ADを 0.5mg, 1.0mgの割合で添加し, 56 $\pm$ 1 $^{\circ}$ Cの温浴中で3時間加温し, 糖化させた。

## (2) 還元糖の定量

Somogyi-Nelson法 (福井 1990) により以下のように定量した。酵素反応を止めるため, 各糖化液を経時的 (10, 30, 60, 180分) にあらかじめ用意しておいた氷水中の遠沈管に各糖化液を約2ml取りだし, 10,000 $\times$ g, 20分間遠心分離を行い, その上清を250倍に希釈し, 定量用試料とした。グルコース標準溶液をグルコース量が10, 50, 100, 150, 200 $\mu$ g/0.5mlになるように調製した。試験管に希釈した糖化液, 調製したグルコース標準溶液の各試料0.5mlと銅試薬0.5mlを加えて, アルミ箔でキャップをし, 沸騰湯浴中に10分間保った。その後急冷してNelson試薬 0.5mlを加えて攪拌し, 液量がそれぞれ12.5mlになるように蒸留水11.0mlを加えて攪拌し, 15分間放置した。島津 Spectronic 20Aで500nmの吸光度を測定し, 試料中の還元糖量を求めた。

## 3. 実験結果および考察

米の品種 (吉澤ら 1978 b, 何ら 1989) や酵素の種類 (小巻 1960, 服部 1961, 佐藤 1961, 栗村と遠藤 1963, Hayashida 1975) により, 還元糖生成活性や分解に差があることはすでに報告されている。米の品種による差については賛否があるが (深井ら 1993), 主として酵素の種類が澱粉の分解特性に大きく関与していることは紛れもないことであろう。本実験においても酵素, 酵素力価, 精製が不十分な酵素に含まれている各種分解酵素などが異なることから, 当然還元糖生成活性に差がでてくると考えられる。米粉糊化液の酵素の種類による還元糖生成活性に及ぼす影響をFig. 1-1-2, 1-1-3に示す。

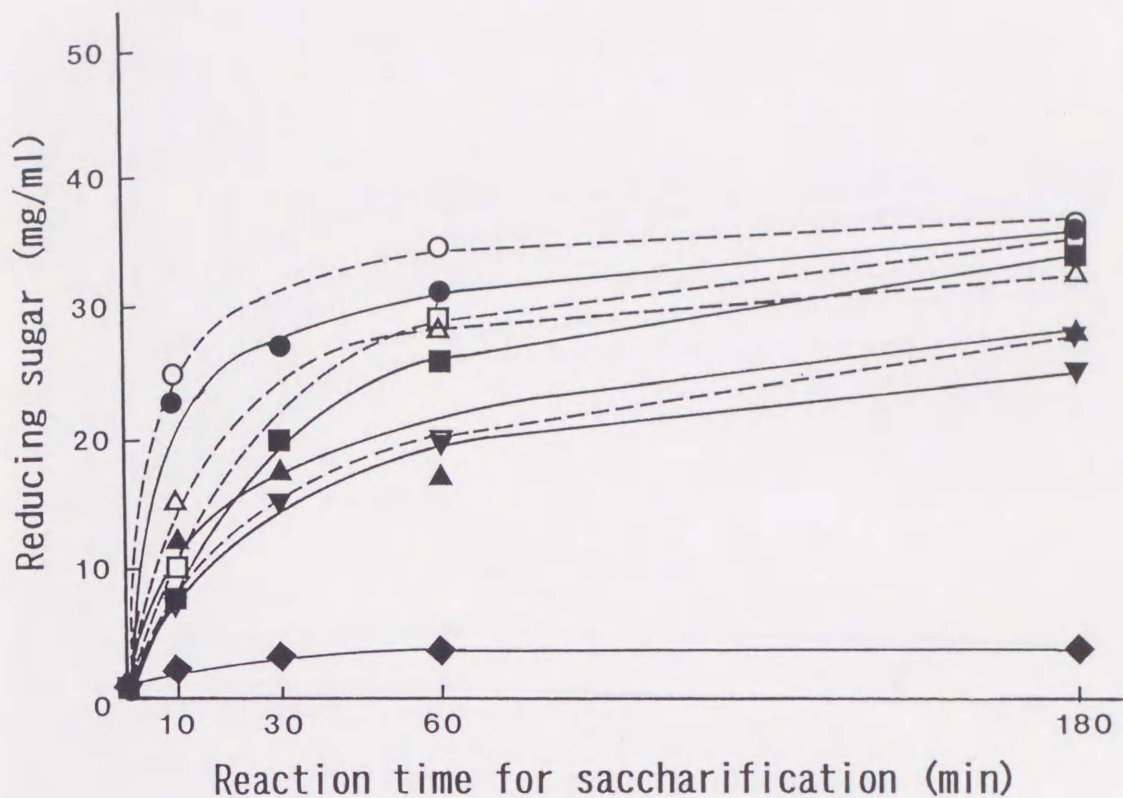


Fig.1-1-2 Effect of enzyme species and reaction time on reducing sugar formation.

Enzymes used for saccharification: Glucoamylases (0.125mg/g or 0.125 $\mu$ l/g),  $\alpha$ -Amylase (0.125mg/g, when supplemented).

Substrate: 5% Rice flour solution.

(●) Glucoamylase A, (■) Gluczyme, (▲) Liquid gluczyme, (▼) Gluc, (◆)  $\alpha$ -Amylase AD, (○) Glucoamylase A +  $\alpha$ -Amylase AD, (□) Gluczyme +  $\alpha$ -Amylase AD, (△) Liquid gluczyme +  $\alpha$ -Amylase AD, (▽) Gluc +  $\alpha$ -Amylase AD.

図 1-1-2 還元糖生成に及ぼす酵素の種類と反応時間の影響  
— 添加糖化酵素量が0.125mg (0.125 $\mu$ l) / gの場合 —

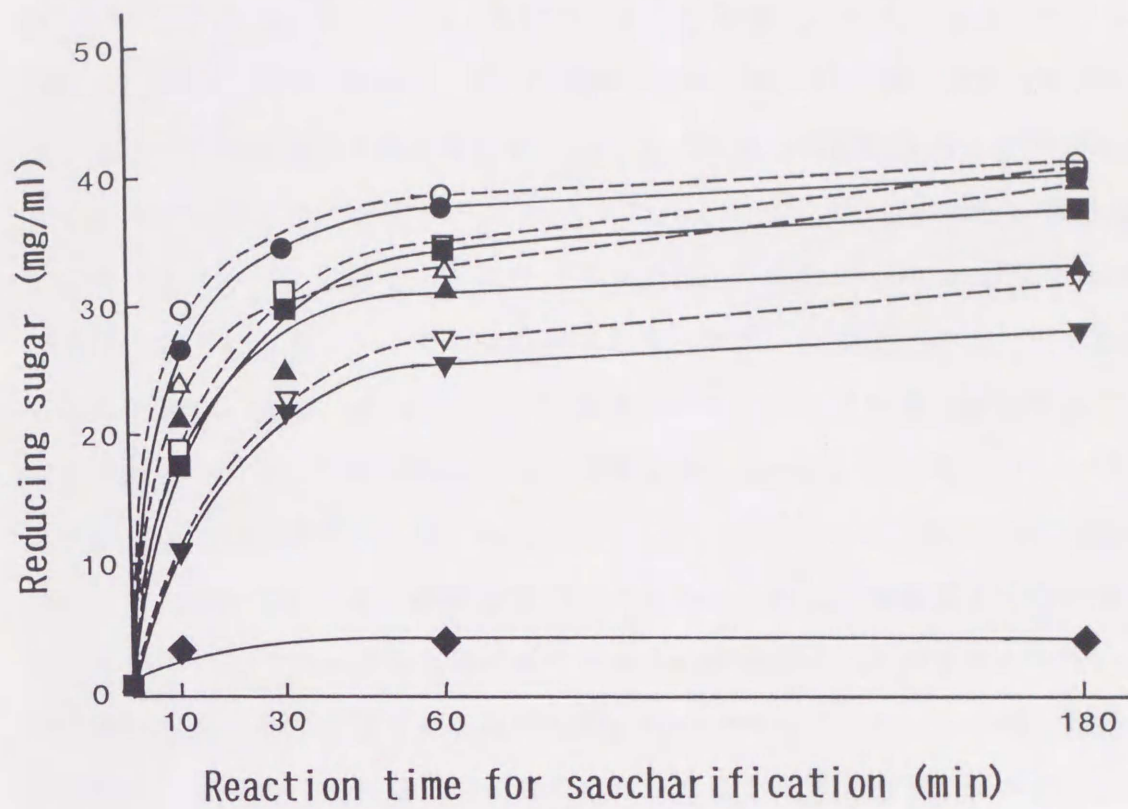


Fig.1-1-3 Effect of enzyme species and reaction time on reducing sugar formation.  
 Enzymes used for saccharification:Glucoamylases (0.25mg/g or 0.25 $\mu$ l/g),  $\alpha$ -Amylase (0.25mg/g, when supplemented).  
 Substrate:5% Rice flour solution.  
 (●)Glucoamylase A, (■)Gluczyme, (▲)Liquid gluczyme, (▼)Gluc, (◆) $\alpha$ -Amylase AD, (○)Glucoamylase A +  $\alpha$ -Amylase AD (□)Gluczyme +  $\alpha$ -Amylase AD, (△)Liquid gluczyme +  $\alpha$ -Amylase AD, (▽)Gluc +  $\alpha$ -Amylase AD.

図 1-1-3 還元糖生成に及ぼす酵素の種類と反応時間の影響  
 -添加糖化酵素量が0.25mg(0.25 $\mu$ l)/gの場合-



ガス加熱糊化後はやや粘性のある状態であったが酵素を添加し、タッチミキサーで攪拌すると、反応開始10分後にはかなり液化しており、その液化の進行は、グルク、グルコアミラーゼ Aにおいてより顕著であった。多少バラツキはみられるが、グルコアミラーゼ A処理のものが高い還元糖生成活性を示した。そして、酵素反応開始10分後においてもその活性は他の酵素と比較すると大であった。グルコアミラーゼ Aはグルコアミラーゼとしての活性が最も高い酵素であるから、ほぼ予想どおりの結果であったといえる。 $\alpha$ -アミラーゼ ADを単独で反応させることで液化はかなり進んだが、糖化活性はほとんど認められなかった。他方、 $\alpha$ -アミラーゼ ADを各グルコアミラーゼと併用すると、グルコアミラーゼ単独の添加よりも生成量が多くなった。特に液状グルクザイムの場合は、他の酵素と比較すると $\alpha$ -アミラーゼ併用による相乗効果(楡作 1987)が大きいといえる。酵素量を増加させると、還元糖生成量も比較的多くなっていき、その生成速度も速くなるとともに酵素間の差も狭まってきている。酵素量の多少にかかわらず反応は60分間の時点でほぼ完了し、それ以後は緩やかな伸びとなった。反応開始3時間後には、グルク処理と液状グルクザイム単独処理を除く活性はほとんど同程度となった。グルクは液化力が高く、酵素反応中においてもそれが認められたが、還元糖生成活性の方はそれほど伸びず、酵素力価からするとグルコアミラーゼ Aの次ぐらいの活性を示してもよいと考えられたが、その活性は最低であった。これは、この酵素のpHや反応温度に対する安定性が他の酵素よりも低いからではないかと推測される。また、 $\alpha$ -アミラーゼ ADを添加してもそれほど効果は認められていないので、酵素自体に含まれている $\alpha$ -アミラーゼも最大量に近かったのではないかと考えられる。高濃度の $\alpha$ -アミラーゼの共存のもとではグルコース生成量が逆に抑制されるという佐藤と加藤(1965)の報告もあり、その影響がでているのかもしれない。

本実験においては、ほぼ60分間で還元糖生成量は最大近くになっているが、糖化を比較的速く行うために、添加酵素量を若干多めにしている。また、還元糖量をSomogyi-Nelson法(福井 1990)で求めたことから、グルコース以外の他の糖も含まれている可能性が高い。添加酵素量が多いと、グルコースからイソマルトースへの逆合成反応が起こるといふ報告もあり(鈴木 1961, 田村ら 1961, 福本 1961), グルコースの直接的定量や、クロマトグラフィー法など

により経時的に糖量やその組成を検討する必要があると考えられる。



## 第2節 糊化度の還元糖生成に及ぼす影響

### 1. 序論

発酵糖化液を調製する場合、飲料として利用することを考慮すれば、ある程度の甘味が必要とされると考えられる。また、基質に対して、多量の酵素を使用すれば、短時間に基質を分解することは可能であるが、添加酵素量はできるだけ少ない方が望ましい。生澱粉にグルコアミラーゼを作用させ、糖化活性の測定がなされているが、酵素の種類とともに、米などに含まれるアミロース含量（何ら 1989, 不破 1982）、タンパク質含量（吉澤ら 1978 a）、澱粉の存在部位（何と鈴木 1989）、糊化温度（Evers and Juliano 1976）などで活性が異なっている。そのような報告から澱粉と他成分の存在状態が酵素反応に関与している可能性は高く、用いる米粉の種類や濃度に適した添加酵素量および酵素反応が進行しやすい糊化度があると考えられる。

第1節で糖化用酵素として4種の市販グルコアミラーゼを用い、還元糖生成に及ぼす影響を測定した結果、米粉糊化液の糖化においてはグルコアミラーゼ Aで作用させたものが最も還元糖生成量が多くなり、次にグルクザイム処理の生成量が多いという結果が得られた。また、酵素反応を180分間で終了したが、それまでに生成してきた糖がグルコースだけであるとは限らない。そこで、米粉糖化において還元糖生成量の多かった上記2種のグルコアミラーゼを用い、米粉懸濁液の濃度を10%として糖化液を調製することとし、酵素反応時間を延長し、添加酵素量を最少限にとどめ、最良の糊化条件を検討し、糖化液調製のための最適条件を選択することとした。

### 2. 実験方法

#### (1) 糖化液の調製

上新粉10%懸濁液250mlを500mlのビーカーに入れ、アルミ箔をかぶせ、3, 5, 10, 20分間それぞれガス加熱し、糊化させた。糊化溶液を試験管に10gずつ分注し、第1章 第1節に用いたグルコアミラーゼ Aまたはグルクザイムを0.025~0.25mg/g,  $\alpha$ -アミラーゼ ADを0.1mg/g添加し、 $56 \pm 1$ ℃の温浴中で24時間保温し、糖化させた。

## (2) 還元糖の定量

各糖化液を経時的に(1, 3, 5, 10, 24時間), 第1章 第1節 2. 実験方法に従ってサンプルを採取し, Somogyi-Nelson法(福井 1990)により還元糖の定量を行った。

## (3) 薄層クロマトグラフィー (TLC)

薄層板(シリカゲル 70 F<sub>254</sub> プレート, 20×20cm, 和光純薬工業製)に経時的に採取した糖化液を50%に希釈し塗布し, アセトン:蒸留水=9:1を展開溶媒とし, TLCを行った。展開後, 90℃の乾燥機で2~3分加熱して溶媒を完全に除去し, 塩化 2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム(2,3,5-Triphenyl-tetrazolium Chloride, TTC) 試薬による糖発色を行った。TTC 0.5%クロロホルム溶液と1N 水酸化ナトリウムを使用直前に等量ずつ混合して薄層板に少量噴霧し, ドライヤーで乾燥させた。この操作を数回繰り返す, 90℃で30分間加熱し発色させた。

## 3. 実験結果および考察

### (1) 還元糖生成量に及ぼす添加酵素量の影響

適度な甘味をもった発酵液を調製するために米粉懸濁液の濃度を10%として20分間ガス加熱し, 糊化させ, グルコアミラーゼ A, グルクザイムの添加量を変えて還元糖生成量を測定した結果をFig. 1-2-1に示す。

添加酵素量にかかわらず, グルコアミラーゼ A処理の方が還元糖生成量が多くなった。また, グルコアミラーゼ A処理では0.25mg/gの添加量で酵素反応3時間後には還元糖生成量はほぼプラトーに達した。さらに, 添加酵素量をその10分の1にして反応させても24時間後にはほぼ最大量に達している。他方, グルクザイム処理糖化液では, 0.25mg/gの添加量であっても最大生成量に達するには24時間程度を必要とし, 添加酵素量を減らすとそれに応じて, 酵素活性は著減し, 還元糖生成量は激減した。グルコアミラーゼ Aとグルクザイムでは酵素起源が*Aspergillus*起源, *Rhizopus*起源とでそれぞれ異なっており, グルコアミラーゼとしての酵素力価もグルコアミラーゼ Aの方が50倍程度高い。したがって, このような酵素起源や酵素の純度などが還元糖生成量に大きく影響したと考えられる。生澱粉のグルコアミラーゼによる分解率は精製酵素



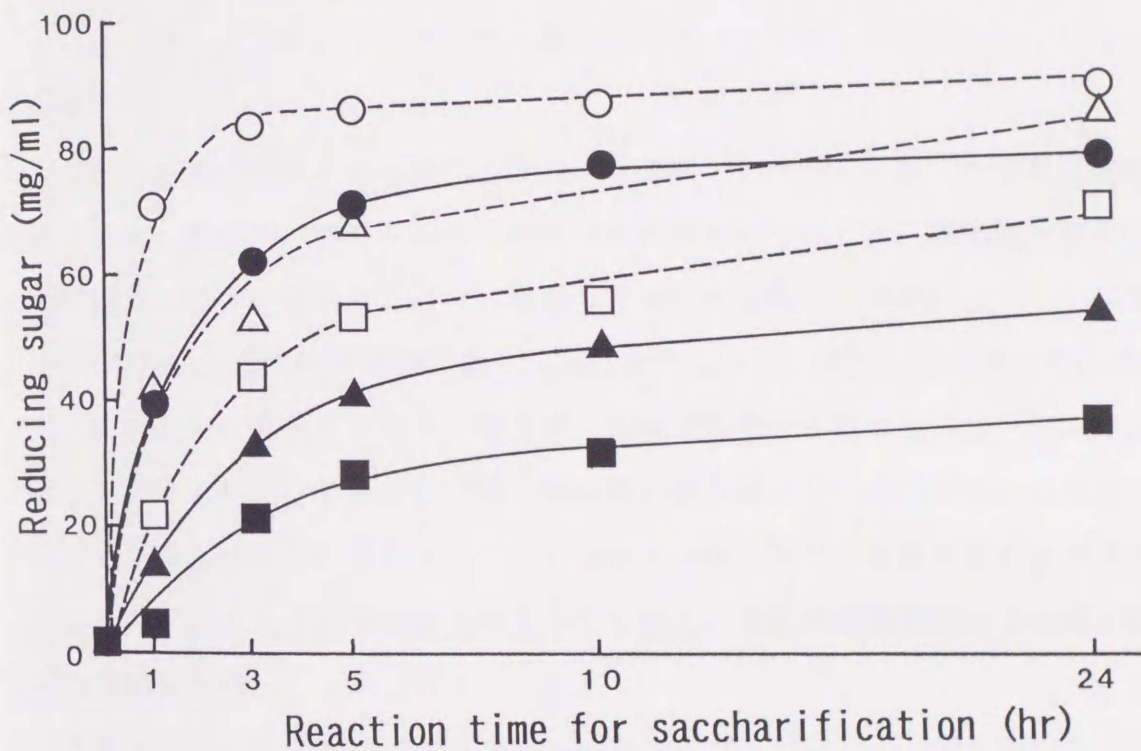


Fig.1-2-1 Reducing sugar formation by treatment of gelatinized rice flour with glucoamylase A or gluczyme.  
 Amount of glucoamylase A and  $\alpha$ -amylase AD(---): ( $\square$ ) 0.025 and 0.1mg/g, ( $\triangle$ ) 0.05 and 0.1mg/g, ( $\circ$ ) 0.25 and 0.1mg/g.  
 Amount of gluczyme and  $\alpha$ -amylase AD(—): ( $\blacksquare$ ) 0.025 and 0.1mg/g, ( $\blacktriangle$ ) 0.05 and 0.1mg/g, ( $\bullet$ ) 0.25 and 0.1mg/g.

図 1-2-1 糊化米粉のグルコアミラーゼ A またはグルクザイム処理による還元糖生成に及ぼす影響

よりも粗酵素の方が高く、その差は粗酵素に含まれる $\alpha$ -アミラーゼの相乗効果によるという何ら（1989）の報告がある。本実験においては、精製酵素のなかにも $\alpha$ -アミラーゼの活性が含まれており、分解率に影響していると考えられる。

## （2）糊化度の還元糖生成に及ぼす影響

グルクザイム処理においては、糖化にある程度の酵素量が必要であると考えられたため、10%米粉糊化液に対し添加酵素量を0.25mg/gとして糖化液を調製することとした。適度な糊化条件を検討するために糊化のための加熱時間を3、5、10、20分間として経時的に還元糖生成量を測定した結果をFig. 1-2-2に示す。

米粉懸濁液の加熱による温度上昇は、3分間で60~70℃程度、5分間で80℃以上になっており、加熱5分間で懸濁液が粘性をもちはじめ、糊化開始温度にほぼ相当していると推察された。糊化のための加熱時間にかかわらず、グルコアミラーゼ A処理の方が還元糖生成量は大きくなった。また、3分間程度の加熱では両処理の糖化液ともに、還元糖生成量が最大生成量の約50%と低レベルにとどまっていた。加熱5分間後で両処理の糖化液ともに還元糖量はほぼ最大のものが得られた。したがって、5分間以上加熱すれば、良好な糖化液を調製することができ、十分に糊化させるよりもむしろ糊化開始時期のものの方が澱粉に酵素が反応しやすいと考えられた。

酵素反応開始後、経時的に生成糖を薄層クロマトグラフィーで分離分析したところ、グルコアミラーゼ A処理糖化液においては、糊化のための加熱時間および酵素反応時間にかかわらずグルコースの発色位置付近にのみTTCによる発色が認められた。一方、グルクザイム処理糖化液の場合には、反応1時間ではグルコース、マルトースの発色位置付近の他にスポット位置に近い方にもう1カ所、計3カ所の発色が認められた。そして、酵素反応が進むにつれてスポット位置付近の発色がみられなくなり、グルコースの位置付近の発色が濃くなっていった。酵素反応3時間後でも、グルコースの他にマルトース位置付近の発色は残っていた（Fig. 1-2-3）。

おいしいご飯の条件として、色が白く、艶のあるもの、噛み締めて若干甘い感じがして、他に特別の味がないもの、噛んだときに独特の粘りと腰（硬さ）



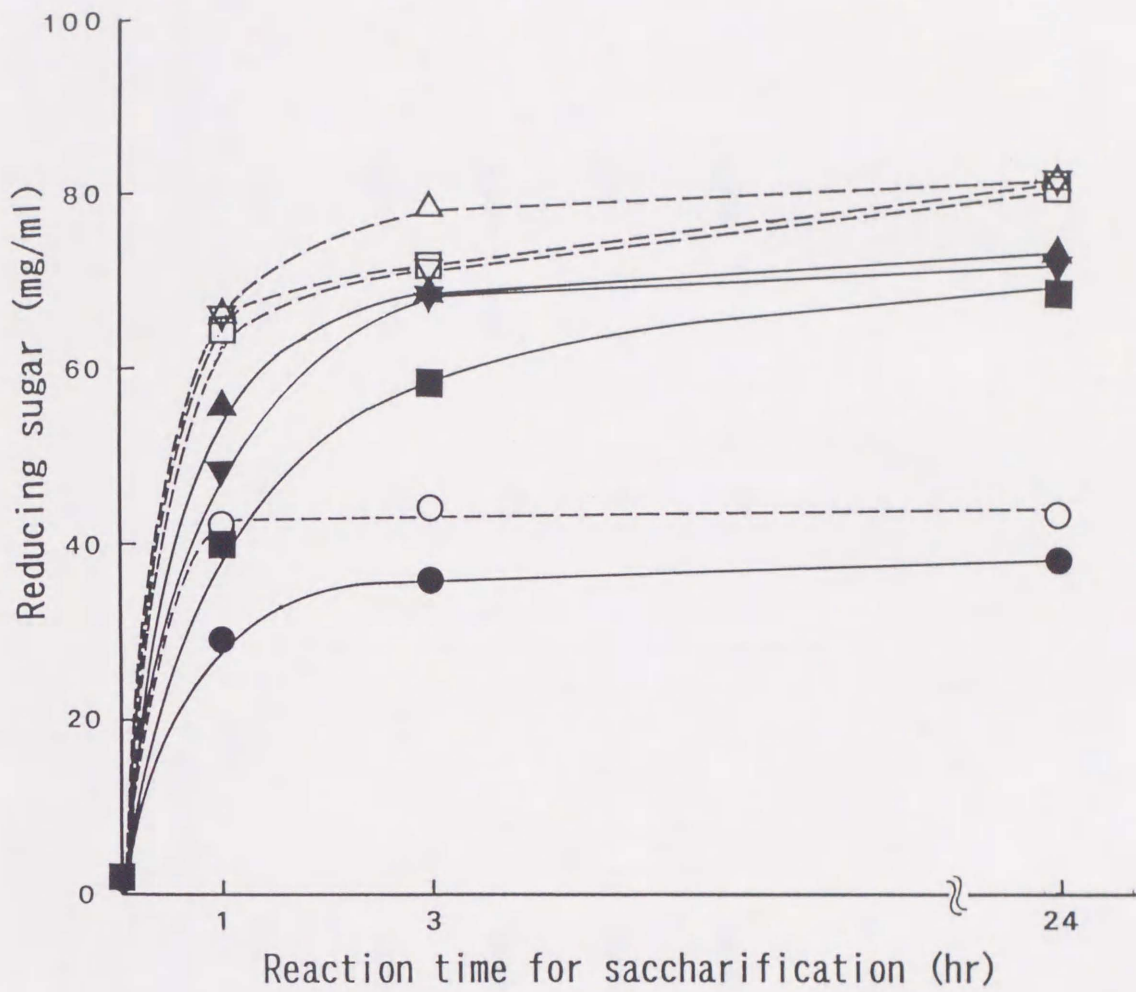


Fig.1-2-2 Effect of heating time for gelatinization on reducing sugar formation by incubation with glucoamylase A or gluczyme. Enzymes used for saccharification : (---)Glucoamylase A (0.25mg/g) +  $\alpha$ -Amylase AD (0.1mg/g), (—)Gluczyme +  $\alpha$ -Amylase AD (0.1mg/g). Heating time for gelatinization: (○, ●)3min, (△, ▲)5min, (□, ■)10min, (▽, ▼)20min.

図 1-2-2 糊化のための加熱時間の還元糖生成に及ぼす影響

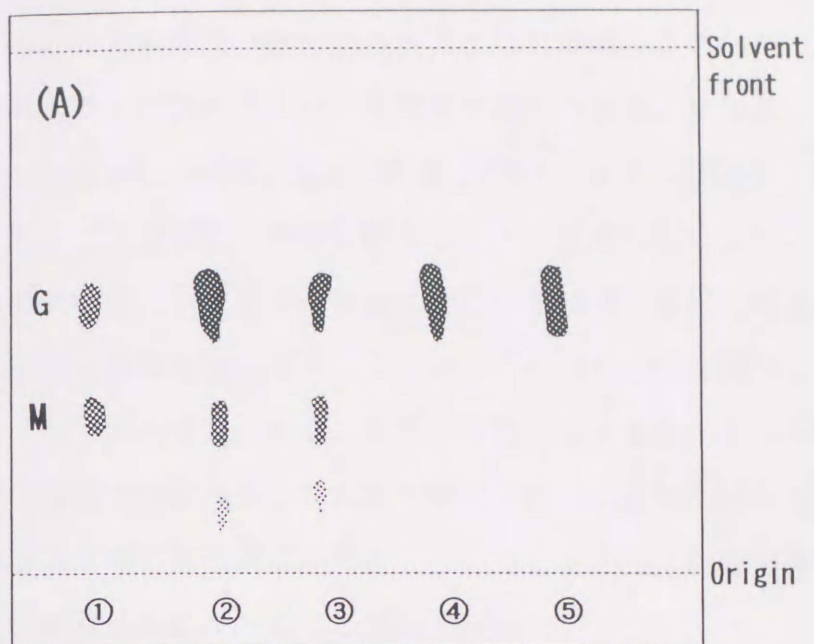


Fig.1-2-3 Thin layer chromatography of rice flour saccharified solutions.

Samples: ①Authentic (G:Glucose, M:Maltose), ②Gluczyme-treated saccharified solution (Heating time for gelatinization:5min), ③Gluczyme-treated saccharified solution (Heating time:20min), ④Glucoamylase A-treated saccharified solution (Heating time:5min), ⑤Glucoamylase A-treated saccharified solution (Heating time:20min). Reaction time:(A)1hr, (B)3hr.

図 1-2-3 糖化液の薄層クロマトグラフィー



があること、香りを含め独特の風味があることなどが挙げられ、このことは、米のタンパク質含量、澱粉のアミロース含量や洗米の方法、水加減、火加減などによるといわれている（金谷 1990, 持田 1990）。また、地域差、個人差もかなりあり、さまざまな要素が複雑に絡み合っ、ご飯のおいしさは決定されるが、今回の実験結果より、酵素の種類における澱粉の分解のされ方やそれとともに生成する還元糖量を測定することにより、おいしさの評価ができる可能性があるのではないかと考えられる。また、今回はガス加熱のみで糊化を行ったが、予備的な実験では電子レンジ加熱で糊化を行っても糖化は良好に進んだ。糊化加熱時間により還元糖生成量が異なっていることから、糊化方法によっても酵素による分解特性が異なってくる可能性がある。

## 引用文献

- Evers, A. D., and Juliano, B. O. : *Die Starke*, **28**, 160-166. (1976)
- 深井洋一, 高木悦子, 小林昭一 : 澱粉科学, **40**, 263-269. (1993)
- 福井作蔵 : 還元糖の定量法 第2版, 学会出版センター, 東京, pp. 9-11.  
(1990)
- 福本寿一郎 : 澱粉糖技研報, (21), 24-31. (1960)
- 福本寿一郎 : 澱粉糖技研報, (24), 133-141. (1961)
- 不破英次 : 澱粉科学, **29**, 99-106. (1982)
- 不破英次, 杉本温美 : 電子顕微鏡, **19**, 200-207. (1985)
- 服部行彦 : 澱粉糖技研報, (23), 28-33. (1961)
- Hayasida, S. : *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 2093-2099. (1975)
- 檜作進 : 澱粉科学, **34**, 98-105. (1987)
- 金谷昭子 編 : 調理学, 医歯薬出版, 東京, p. 106. (1990)
- 小巻利章 : 澱粉糖技研報, (21), 109-121. (1960)
- 小巻利章 : 日食工誌, **30**, 181-189. (1983)
- 倉澤文夫 : 米とその加工, 建帛社, 東京, pp. 332-342. (1982)
- 栗村俊郎, 遠藤衛男 : 澱粉糖技研報, (27), 13-16. (1963)
- 久留島通俊, 佐藤淳司, 北原覚雄 : 農化, **48**, 379-384. (1974)
- 持田恵三 : 日本の米 風土, 歴史, 生活, 筑摩書房, 東京, pp. 217-221.  
(1990)
- 何光存, 鈴木裕, 木暮秩 : 澱粉科学, **36**, 161-167. (1989)
- 何光存, 鈴木裕 : 農化, **63**, 981-989. (1989)
- 奥野員敏 : 米のはなし II (横尾政雄 編), 技報堂出版, 東京, pp. 67-73.  
(1989)
- 斎藤昭三 : 澱粉科学, **27**, 295-313. (1980)
- 佐藤友太郎 : 澱粉糖技研報, (23), 42-51. (1961)
- 佐藤友太郎, 加藤清昭 : 澱粉糖技研報, (31), 42-52. (1965)
- 鈴木繁男 : 澱粉糖技研報, (23), 52-62. (1961)
- 田村太郎, 柴田茂久, 川瀬延也, 佐伯文夫, 鈴木繁男 : 澱粉糖技研報, (24),



52-62. (1961)

吉澤淑，池見元宏，石川雄章，鈴木英弥，池田哲郎：醜工，**56**, 116-121.

(1978 a)

吉澤淑，池見元広，石川雄章，宝玉俊信，池田哲郎：醜工，**56**, 122-126.

(1978 b)

## 第2章 乳酸菌による糖化液の発酵

### 第1節 市販ヨーグルトスターターによる糖化液の乳酸発酵

#### 1. 序論

発酵乳は、原料乳に乳酸菌を接種して発酵させ、生じる乳酸により、乳中のタンパク質を凝固させたものである。歴史的にはバルカン地方、中近東などで発達してきたが、20世紀はじめにMetchnikoffが、「不老長寿の効能がある」と唱えてから急速に世界に広まっていった（小泉 1989）。今日においては、健康食品としてその消費も急成長しており、甘味、酸味、風味などが日本人の嗜好に適するように改善され、フルーツやアロエなどが添加されたりした各種ヨーグルトをはじめとし乳酸菌飲料などさまざまな種類のものが市場に出回っている（内藤 1992）。

乳酸菌は序章でも述べたとおり、整腸作用、腸内菌叢の正常化、乳糖不耐症低減作用など、さまざまな生理効果をもつことが知られている（山本 1993, 鈴木 1993, 光岡 1984, 川瀬 1996）。

そのような乳酸菌を用いて、小麦、大麦、米、トウモロコシなどの穀類を発酵させ、発酵によるそれら穀類のタンパク質の質についてHamadとField (1979)らが検討している。米の乳酸発酵食品としては、米を蒸気膨化させた饅頭様のフィリピンのPutoがあり、朝食や軽食として食されているが、そこからは*Leuconostoc*種が数種単離されている（Kelly et al. 1995）。また、韓国では*Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. delbrueckii*や*Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*を単独、あるいは混合で使用し、ミルクや大豆などで栄養強化させ、発酵乳様食品、発酵飲料が調製されている。接種菌により嗜好性はかなり改善されているものもあるが、製造工程の複雑さなどの問題点が残されており、まだ成功例は得られていない（Mok et al. 1991 ab, Hong and Ko 1991, Lee et al. 1992）。米の好み異なるように、国により嗜好差はかなりあると考えられ、調製されたものの嗜好性が一致しているとは限らない。日本においても、穀類を原料とした乳酸発酵飲料の調製方法についての特許や工業的に調製が試みられたこと



もあるようであるが、まだ製造販売の段階には至ってはならず、検討が不十分な点が多い。

そこで、本章では第1章で還元糖生成活性の高かったグルコアミラーゼ A とグルクザイムに  $\alpha$ -アミラーゼ AD を併用して処理した糖化液を用い、糖化液を主体として乳酸発酵を行い、発酵飲料的な利用について検討することにした。また、乳酸菌は栄養要求がかなり複雑であり、糖化液のみでは乳酸菌の生育に必要な成分が不足している可能性があるため、各種成分の添加を含めて検討することにした。

接種菌としては、通常ヨーグルトのスターターとして使用されている *Lactobacillus helveticus* と *Streptococcus thermophilus* を用いることにした。

## 2. 実験方法

### (1) *Lactobacillus helveticus* B-1, *Streptococcus thermophilus* の前培養および保存培養

脱脂粉乳（雪印スキムミルク）を蒸留水に溶かし、10%スキムミルク溶液を調製し、あらかじめ150℃で2時間以上乾熱滅菌しておいた紙栓付き試験管に10mlずつ分注した。そして82±1℃の温浴中で30分間殺菌後、急冷し、これを *L. helveticus* および *S. thermophilus* の前培養培地、保存培養培地として用いた。冷蔵庫の中で4℃に保存してある *L. helveticus*, *S. thermophilus* をタッチミキサーでよく攪拌し、それらをアルミ箔に包んであらかじめ2時間以上乾熱滅菌しておいた綿栓付き駒込めピペット(5ml)を用いて、無菌箱の中で前培養培地と保存培地にそれぞれ2滴ずつ接種した。これらをタッチミキサーでよく攪拌し、37℃のインキュベーター中で24時間培養し、前培養液、保存培養液として用いた。

### (2) 糖化液の調製

糖化液の調製は、第1章 第1節 2. 実験方法に従って行った。なお、糖化液培地にヨーグルトスターターとして使用されている乳酸菌が生育するかどうかを確認するため、上新粉懸濁液の濃度は5%とし、酵素反応時間も1時間に短縮して行った。

### (3) 酵母エキス、大豆ペプチド、酢酸ナトリウム、各種カルシウム塩添加糖

#### 化液培地での*L. helveticus*, *S. thermophilus*の本培養

(2) で調製した糖化液をあらかじめ、150℃で2時間以上乾熱滅菌しておいたアルミキャップ付き試験管に分注し、各試験管に酵母エキス、大豆ペプチド、酢酸ナトリウム、酢酸カルシウム、乳酸カルシウムをそれぞれ単独で所定量(1~20mg/ml 糖化液)添加し、培養培地総量が10mlになるように調製した。添加後、タッチミキサーでよく攪拌し、オートクレーブで121℃、2分間加熱殺菌を行い培地を調製した。冷蔵庫の中に保存してある*L. helveticus*, *S. thermophilus*の前培養液をタッチミキサーでよく攪拌し、アルミ箔で包んであらかじめ乾熱滅菌しておいた綿栓付き駒込めピペット(5ml)を用いて、無菌箱の中で各培地に2滴ずつ接種した。タッチミキサーでよく攪拌後、37℃のインキュベーター中で24時間培養した。

#### (4) 糖化液とスキムミルク溶液との混合培地での*L. helveticus*, *S. thermophilus*の本培養

(2) で調製した糖化液と10%スキムミルク溶液をあらかじめ150℃で2時間以上乾熱滅菌しておいたアルミキャップ付き試験管に所定の割合で分注し、全体が10mlになるようにした。それをオートクレーブを用いて121℃で2分間加熱殺菌後、急冷した。次に*L. helveticus*, *S. thermophilus*の前培養液をタッチミキサーでよく攪拌し、あらかじめ乾熱滅菌しておいた綿栓付き駒込めピペット(5ml)を用いて、無菌箱の中で、上で調製した各培地に2滴ずつ接種した。タッチミキサーでよく攪拌後、37℃のインキュベーター中で24時間培養した。

#### (5) 市販ヨーグルトスターターの本培養

(2) で調製した糖化液と10%スキムミルク溶液を所定の割合で混合し、(4)と同様に培地を調製した。市販のヨーグルトをあらかじめ乾熱滅菌しておいた綿栓付き駒込めピペット(5ml)を用いて、無菌箱の中で各培地に2滴ずつ接種した。タッチミキサーでよく攪拌した後、37℃のインキュベーター中で24時間培養した。

#### (6) 酸度およびpHの測定

培養した発酵液の酸度は中和滴定法(平林と佐藤 1987)により測定した。三角フラスコに試料を約2.0g秤取し、蒸留水を10ml加えた。これに、フェノー



ルフタレイン 10mgを50%エタノール 10mlに溶かして調製した0.1%フェノールルフタレイン指示薬を1mlピペットで2~3滴加え、0.1N水酸化ナトリウムで滴定した。30秒間微紅色が消失しない点を滴定値とした。この滴定値から次のように酸度（乳酸%，試料100gに対する乳酸量）を計算した。

$$\text{酸度 (\%)} = \frac{0.1\text{N 水酸化ナトリウム標準液の滴定値} \times 0.009}{\text{秤量した試料の重量 (g)}} \times 100$$

また、24時間発酵させた試料のpHをTwin pH B-111（堀場製作所）により、必要に応じてそれぞれ測定した。

### 3. 実験結果および考察

#### (1) 酵母エキス，大豆ペプチド，酢酸ナトリウム，カルシウム塩の添加効果

*L. helveticus*, *S. thermophilus*接種のいずれにおいても糖化液のみではほとんど乳酸発酵は進まなかった。糖化液のみではこの2種の乳酸菌の生育に必要な成分がいくつか欠如していることがうかがえた。そこで、乳酸菌の生育に良好とされる酵母エキス（平林と佐藤 1987），大豆ペプチド，酢酸ナトリウムを糖化液に添加し，それらの酸生成に及ぼす影響を比較検討した。

*L. helveticus*接種の場合の糖化液および添加物の酸生成に及ぼす影響をFig. 2-1-1に示す。添加物添加量が10mg/mlまでは，グルクザイム処理糖化液の方が酸度上昇率が高く，酵母エキスなどの添加物添加でその上昇率はより高くなった。また酵母エキス，大豆ペプチド添加の場合，糖化液の種類にかかわらずそれらの添加量が増加するにともない酸度も上昇した。その上昇率は酵母エキスの方がかなり高く，*L. helveticus*の生育に適していることが確認できた（平林と佐藤 1987）。酢酸ナトリウムの添加は，グルクザイム処理糖化液を用いた場合，最大で酸度が0.4%強まで上昇し，多少の効果が認められたが，20mg/mlあたりが最大添加量であると推測され，その添加量で酸度が急激に低下する場合もみられた。

*S. thermophilus*接種の場合，*L. helveticus*接種の場合とほぼ同様の傾向が認められ，グルクザイム処理糖化液の方がいくぶん酸度上昇率が高くなってい

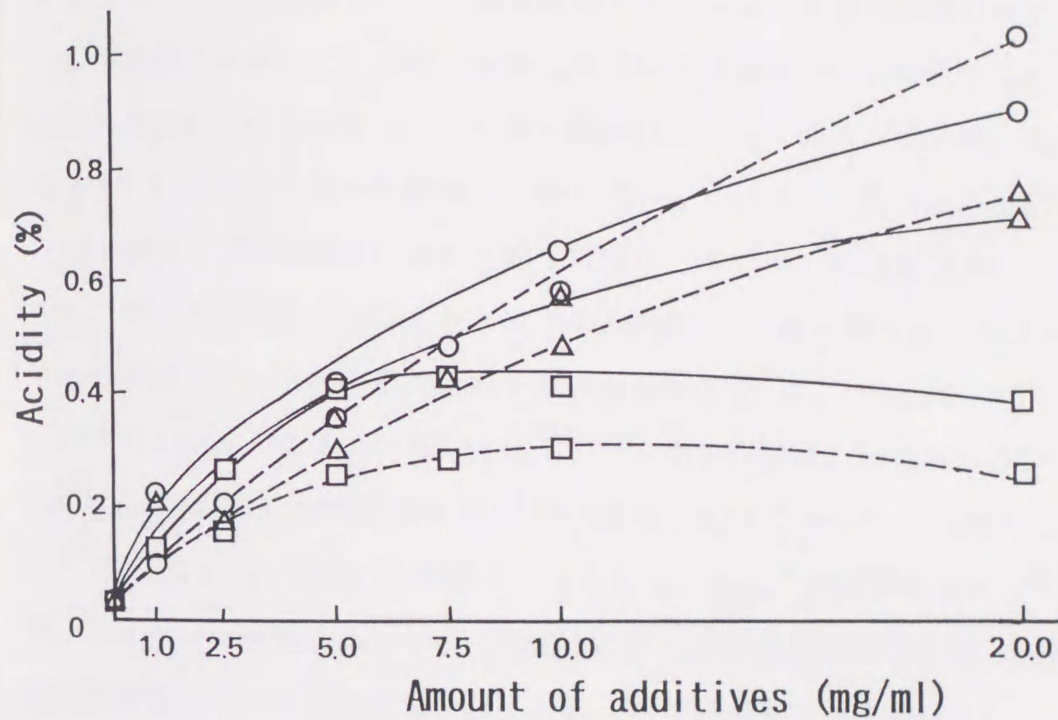


Fig.2-1-1 Effect of enzyme treatments and additives on the acid formation by *L. helveticus*.

Enzymes used for saccharification: (---) Glucoamylase A, (—) Gluczyme. Additives: (○) Yeast extract, (△) Soybean peptide, (□) Sodium acetate.

図 2-1-1 *L. helveticus*による酸生成に及ぼす酵素処理と添加物の影響



る (Fig. 2-1-2)。大豆ペプチド添加においては両者の処理による違いはほとんどみられなかった。また、酵母エキス、大豆ペプチド添加量を増加させるとそれだけ酸度も上昇した。しかしながら酸度の伸びは、*L. helveticus*よりも緩やかで、酵母エキスと大豆ペプチドの酸度の開きも狭まっている。酢酸ナトリウムの効果もほとんどみられなかった。

酢酸ならびに乳酸カルシウム添加の酸生成に及ぼす影響をFig. 2-1-3に示す。これら添加の場合もグルクザイム処理糖化液の方が酸生成度が高くなっている。酢酸カルシウム添加の場合は、ほぼ酢酸ナトリウムと同様の傾向を示し、最高酸度も同程度であった。10mg/mlあたりが最大添加量であると考えられ、その後は急激に酸生成度が低下している。乳酸カルシウム添加の場合は、添加量が増加するにともない徐々に酸度は上昇している。分子量の違いはあるにせよ、10mg/ml添加以降は酸度の上昇も鈍化気味であるので、添加効果としては酢酸カルシウムの方があるといえる。*S. thermophilus*接種の場合も、酢酸ナトリウム添加の場合とほぼ同様な傾向で最高酸度も0.1%以下であった。

発酵液のpHは、酵母エキス、大豆ペプチド添加の場合、糖化液の種類にかかわらず*L. helveticus*接種のものでは3.5前後、*S. thermophilus*接種のものでは4.5前後にあり、添加量を増加させてもほとんどpHには影響しなかった。酢酸ナトリウム、酢酸カルシウム、乳酸カルシウムの添加の場合には、塩添加の影響が顕著に現われ添加量が増加するにともないpHも上昇を続けた。

第1章の実験結果では、グルコアミラーゼ A処理糖化液の方が還元糖生成量が多かったが、実際に乳酸発酵を行うと、酸生成はグルクザイム処理の方がむしろ高くなった。グルコース含量としては両者の糖化液ともに十分量あると考えられること、グルクザイム処理糖化液にはグルコース以外に別の糖も検出されていることから、酵素による澱粉の切り方が異なり、糖組成が若干異なるため、それらが発酵性に影響している可能性が考えられる。しかしながら、いずれの糖化液においても酵母エキス、大豆ペプチド添加においては独特の臭いがあり、それらがわずかの添加でも感じられ、風味に乏しかった。また、酢酸ナトリウム、酢酸カルシウム添加の場合は酢酸の味が強調され、乳酸カルシウム添加のものは味があまり感じられず、酸度の上昇はみられてもこれらの添加物を単独で添加して食品として利用するにはあまり好ましくないと考えられた。

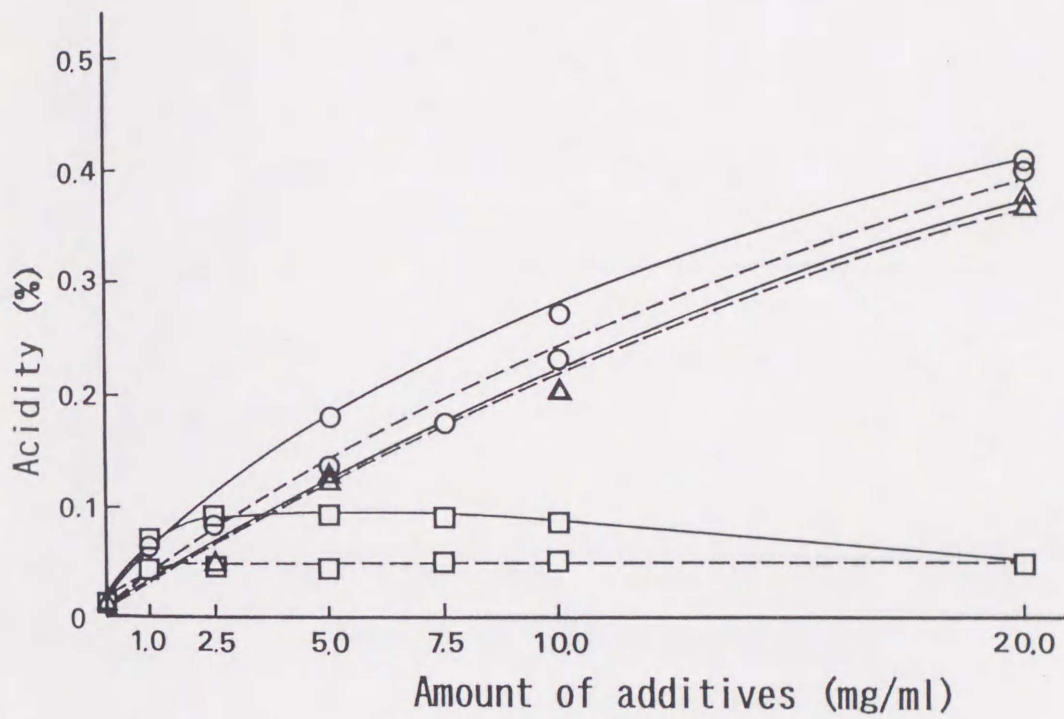


Fig.2-1-2 Effect of enzyme treatments and additives on the acid formation by *S. thermophilus*.  
 Enzymes used for saccharification: (---)Glucoamylase A, (—)Gluczyme. Additives: (○)Yeast extract, (△)Soybean peptide, (□)Sodium acetate.

図 2-1-2 *S. thermophilus*による酸生成に及ぼす酵素処理と添加物の影響



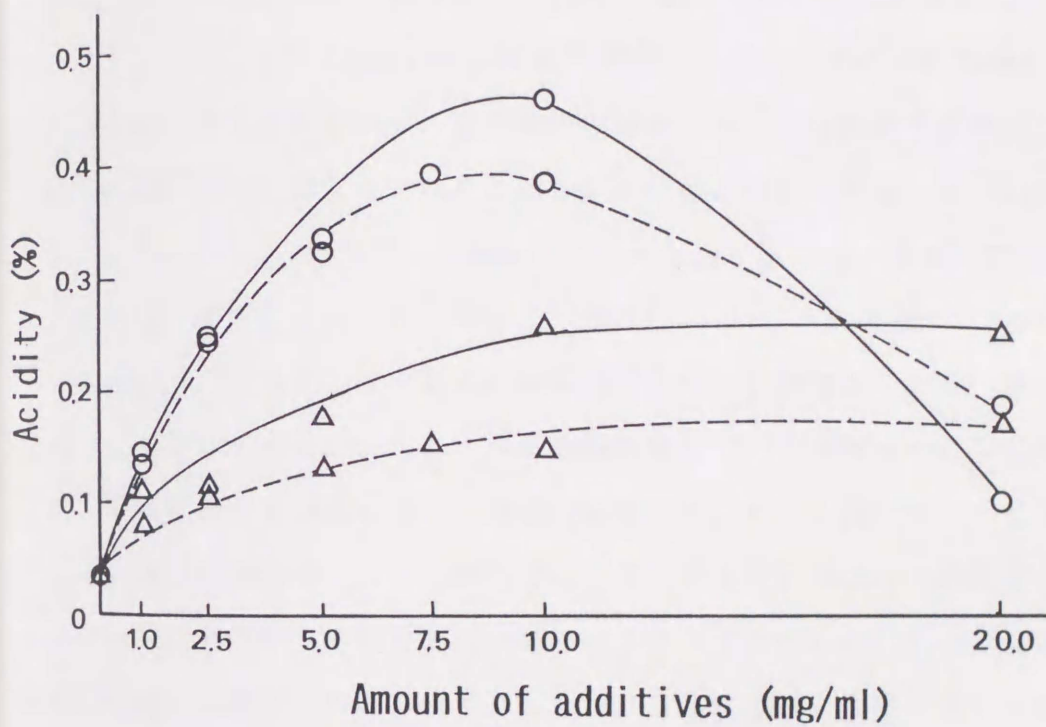


Fig. 2-1-3 Effect of enzyme treatments and additives on the acid formation by *L. helveticus*.  
 Enzymes used for saccharification: (---) Glucoamylase A, (—) Gluczyme. Additives: (○) Calcium acetate, (△) Calcium lactate.

図 2-1-3 *L. helveticus*による酸生成に及ぼす酵素処理と添加物の影響

また、カルシウム塩添加の場合はミルク成分と混合する方が吸収性が増すと考えられる。そこで、安全性、カルシウムの吸収性、乳酸菌による風味形成の良好な点からスキムミルクを添加し、検討することにした。

## (2) スキムミルクの添加効果

糖化液とスキムミルク溶液を所定の割合で混合し、乳酸菌を接種し酸度とpHを測定した結果をFig. 2-1-4, 2-1-5に示す。*L. helveticus*接種については2種類の酵素処理による差はほとんど認められなかった。したがって、糖化液よりも、むしろミルク中の成分が*L. helveticus*の生育にかなり有効に作用しているといえる。*S. thermophilus*接種の場合は、グルクザイム処理糖化液の方が酸度の上昇率が若干高く、糖化液中の糖組成もしくは微量含有物が、*S. thermophilus*の生育に多少なりと関与していると考えられる。*L. helveticus*, *S. thermophilus*のいずれの乳酸菌においてもスキムミルク溶液の割合を増加させるほど酸度は上昇した。その上昇率は*L. helveticus*接種のものの方がかなり高く、スキムミルクのわずかな添加でもかなり酸度が上昇し、酸生成能が高いことがわかった。スキムミルク溶液培養においても両者の乳酸菌には酸度に3倍程度の開きがあるので、当然の結果ともいえる。pHについては、スキムミルク溶液の添加率が2~3割までは下がってきているが、それ以後スキムミルク溶液量が増加するにともない徐々に上昇してきている。そのpH変動性は*S. thermophilus*接種のものが大であった。こうしたpHの変動はミルクの緩衝作用によることが考えられ、pH低下を抑制しようとして働き、ミルクの比率が高くなれば酸度がかなり上昇してもpHはほぼ一定に保たれたままか、ミルクと酸度との関係で徐々に上昇していくような結果となったと推察される。

スキムミルク添加で、風味形成も良好となり、*S. thermophilus*接種の場合、甘味、酸味などの微妙な調節は必要であるが酸度が0.2~0.3%、糖化液の比率が7~8割の間で飲料として適当なものが調製できた。また、スキムミルク溶液の比率を増加させていくと、ヨーグルト様発酵食品としての利用も可能になると考えられ、スキムミルクだけの調製よりも糖化液が多少含まれている方が味が濃厚に感じられ、食しやすかった。また、両者の糖化液により調製した発酵液の味が異なり、その嗜好には個人差があると考えられる。*L. helveticus*接種の場合の方が酸生成度が高く、糖化液とスキムミルク溶液の比率が9:1



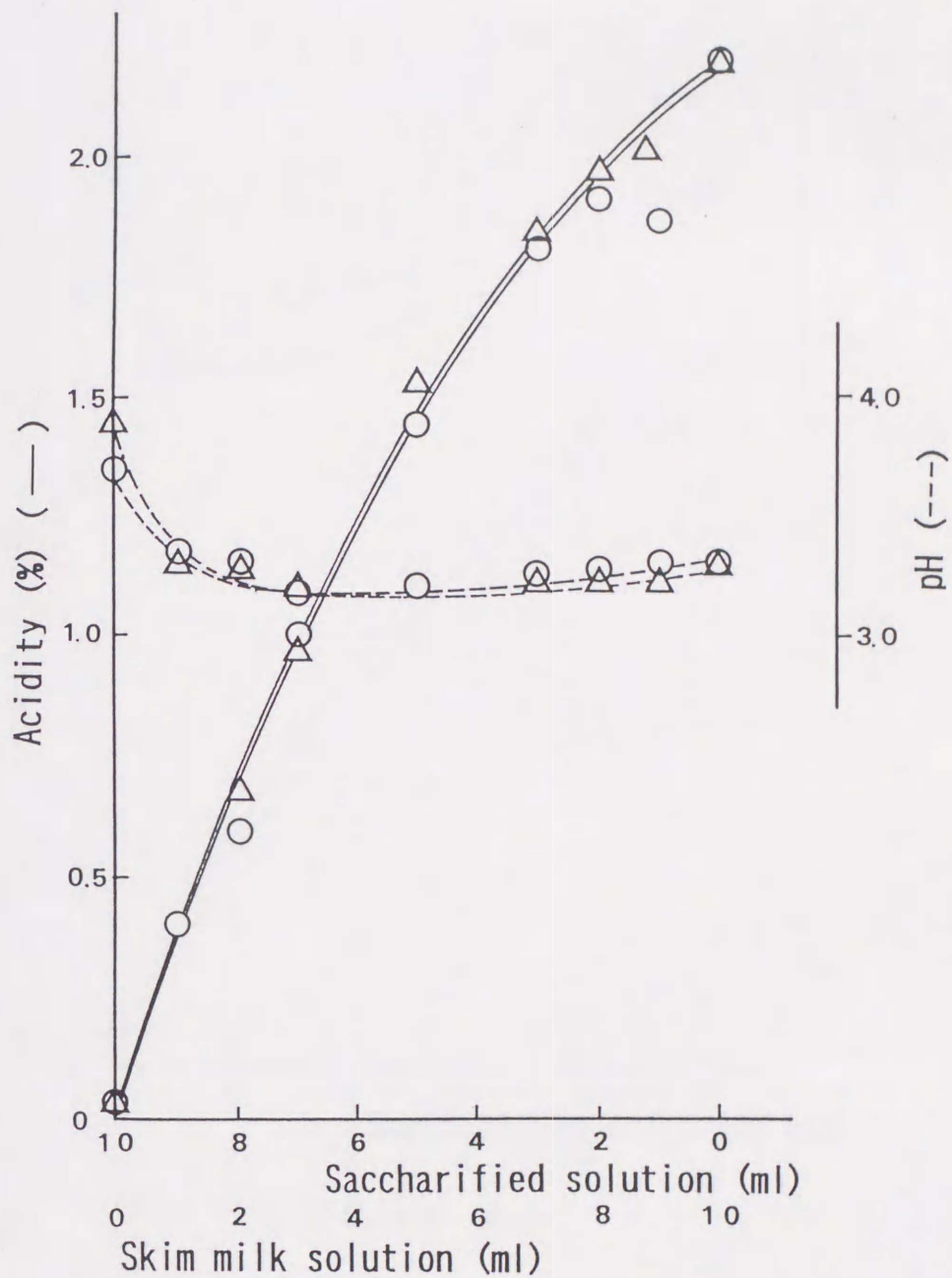


Fig.2-1-4 Effect of mixing ratio of saccharified solutions and skim milk solution on the acid formation and pH in the culture of *L. helveticus*.

Enzymes used for saccharification: (○) Glucoamylase A, (△) Gluczyme.

図 2-1-4 *L. helveticus*の酸生成およびpHに及ぼす糖化液とスキムミルク溶液の混合比率の影響

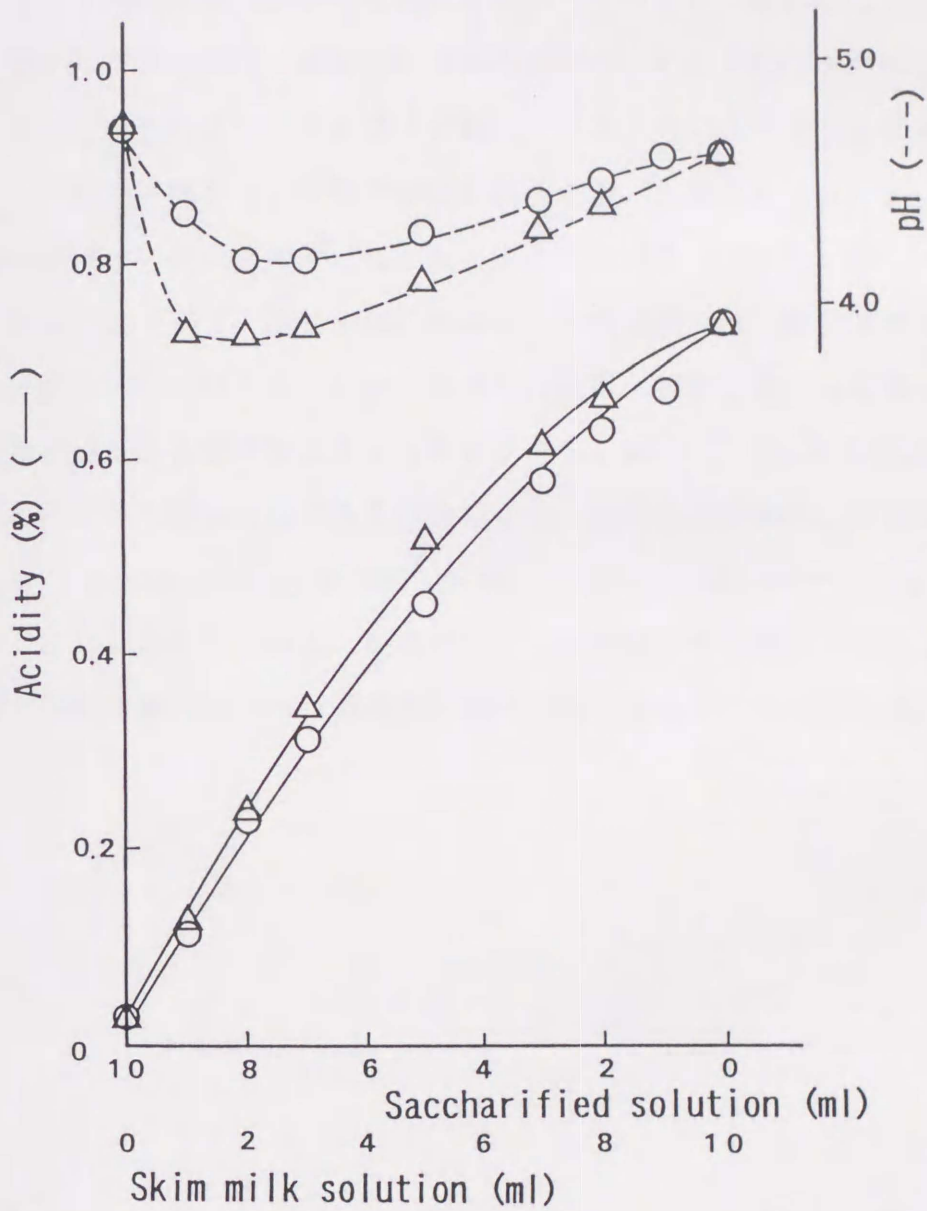


Fig.2-1-5 Effect of mixing ratio of saccharified solutions and skim milk solution on the acid formation and pH in the culture of *S. thermophilus*.

Enzymes used for saccharification: (○) Glucoamylase A, (△) Gluczyme.

図 2-1-5 *S. thermophilus*の酸生成およびpHに及ぼす糖化液とスキムミルク溶液の混合比率の影響



(酸度=0.42%) であっても、味が薄いわりにはかなり酸味を感じ、飲料としては刺激が強すぎる感があった。

酵素処理により糖化液の発酵性に微妙な差がでているが、糖化液のみで発酵可能な乳酸菌が存在すれば、糖化液における差についてさらに分析可能となるのではないかと考えられる。そこで、市販ヨーグルトのスターター3種を用い、スキムミルク溶液を混合し、同様な解析を試みたが、いずれのスターターを用いても糖化液のみでは乳酸発酵はほとんど進まなかった (Fig. 2-1-6)。したがって、通常のヨーグルト調製の際に使用される乳酸菌では、糖化液のみでは発酵が不可能に近いといえる。しかしながら、菌種、菌株が異なれば糖化液のみでも発酵可能になる菌が存在する可能性はある。例えば、Leeら (1992) は韓国の伝統的な乳酸発酵食品であるSikhaeから、乳酸菌を単離し、そのなかの *Leuconostoc mesenteroides* を糖化液で発酵させるとリンゴジュースのような風味があることを報告している。したがって、乳酸菌などが混在するある種の発酵食品から糖化液のみでも発酵可能な菌の単離を試みることは意義がある。

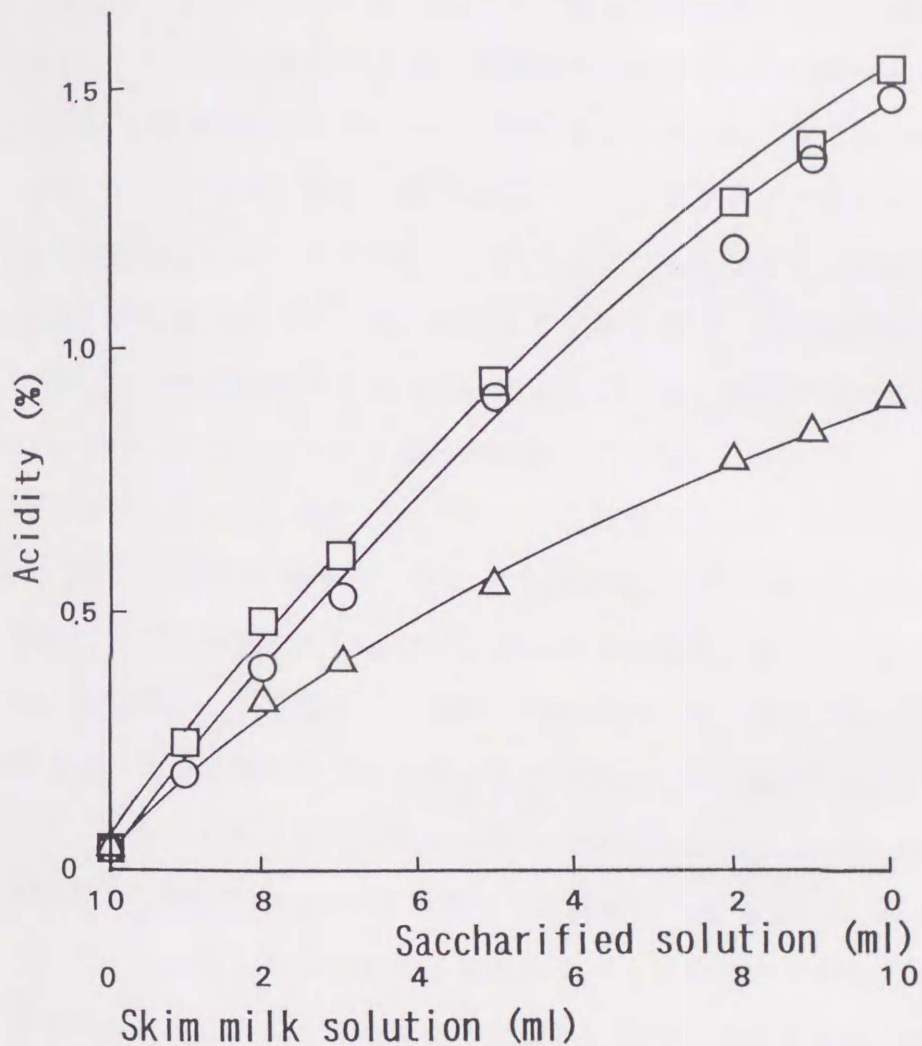


Fig.2-1-6 Effect of mixing ratio of saccharified solution and skim milk solution on the acid formation of commercial yogurt starters.

Starters: (○)Product of A company, (△)Product of B company, (□)Product of C company.

図 2-1-6 市販ヨーグルトスターターの酸生成に及ぼす糖化液とスキムミルク溶液の混合比率の影響



## 第2節 ケフィアからの乳酸菌の単離

### 1. 序論

ケフィアは、旧ソ連や東欧地域の伝統的な発酵飲料で、主として乳酸菌と酵母の共生するカリフラワー状のケフィア粒をスターターとして用い、原料乳で培養するとそれらの相互作用により独特の風味をもった発酵乳が調製され、ケフィア粒も増殖を続けていくという特質をもっている（廣中ら 1993）。中江（1989）はケフィアに関する説明を総括し、「ケフィアとはコーカサス地方産の伝統的なアルコール発酵乳の一種であり、牛乳などを主原料に乳酸菌や酵母を含む粒状物（ケフィア粒）を加えて発酵させた、爽快な酸味と発泡性のあるアルコール性保健飲料である」と定義している。最近ではアメリカ、イギリス、カナダ、日本においても普及傾向がみられる。

ケフィア、ケフィア粒については、その構造（Rea et al. 1996）や生理的効果（廣中ら 1993）を含め、さまざまな研究がなされてきているが（中江 1989）、未だに不明な点が多い。ケフィアの菌叢は、ケフィアの入手先、培養時間、培養温度などで変化し、ある一定の状態を常に維持することが非常に困難である。このような特異な菌叢をもつケフィアから菌を単離し、同定する試みはいくつかなされておられ（中江 1989, 廣中ら 1993, Angulo et al. 1993, 吉田と豊島 1994）、それらの単離された菌の一例をTable 2-2-1に示す。このようにケフィアそれ自体に関する報告やケフィアの菌叢から菌を単離・同定した研究は多数みられ、その単離菌の諸性質に関する報告もある（Orellano et al. 1996, Kwak et al. 1996）。しかし、ケフィアから単離された菌を新たな発酵食品調製のために利用する試みは見当たらない。また、ケフィアに存在する乳酸菌のなかには、ヨーグルトスターターに使用される乳酸菌とは異なり、糖化液のみでも発酵可能な菌の存在する可能性がある。そこで、本実験では糖化液のみでも生育可能な乳酸菌をケフィアより探索し、その単離乳酸菌を分類するために、形態観察および糖の資化性を中心とする生理学的性質について検討を試みることにした。

表 2-2-1 ケフィア粒から単離された酵母と細菌類

Table 2-2-1 Yeasts and bacterial species isolated from kefir grains. (Angulo et al. 1993, Kwak et al. 1996)

Yeasts	Lactic acid bacteria
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>L. viridescens</i>
<i>S. unisporus</i>	<i>L. kefir</i>
<i>S. calshbergensis</i>	<i>L. bulgaricus</i>
<i>Candida kefir</i>	<i>L. cellobiosus</i>
<i>C. holmii</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>C. friedrichii</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>tolerans</i>
<i>K. marxianus</i>	<i>L. casei</i> subsp. <i>pseudoplantrum</i>
<i>K. fragilis</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>Pichia fermentans</i>	<i>L. gasseri</i>
<i>Torula kefir</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>
Contaminants	<i>L. filant</i>
<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Leuconostoc dextranicum</i> .
<i>Bacillus</i> spp.	<i>L. mesenteroides</i>
<i>Acetobacter</i> spp.	<i>L. kefir</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
	<i>Pediococcus</i> spp.



## 2. 実験方法

### (1) 糖化液に生育可能な乳酸菌の選択

上新粉を蒸留水に懸濁させ、10%懸濁液を調製し、第1章 第1節 2. 実験方法に従って糖化液を調製した。あらかじめ150℃で2時間以上乾熱滅菌しておいたアルミキャップ付き試験管に調製した糖化液を10mlずつ分注し、オートクレーブを用いて121℃、2分間加熱殺菌し、急冷した。そこに、10%スキムミルク溶液培養のケフィアをあらかじめ乾熱滅菌しておいた綿栓付き駒込めピペット（5ml）を用いて無菌箱の中で各培地に2滴ずつ接種し、タッチミキサーで攪拌後、インキュベーター中で温度（20, 25, 30, 37℃）を変えて24時間培養した。乳酸菌培養培地として市販の一般乳酸菌接種用培地（日水製菓製、酵母エキス 5.5g, ペプトン 12.5g, グルコース 11.0g, リン酸二水素カリウム 0.25g, リン酸一水素カリウム 0.25g, 酢酸ナトリウム 10.0g, 硫酸マグネシウム 0.1g, 硫酸マンガン 5.0mg, 硫酸第一鉄 5.0mg/蒸留水 1000ml）を調製した。調製した一般乳酸菌接種用培地をあらかじめ2時間以上乾熱滅菌しておいた紙栓付き試験管に10mlずつ分注し、オートクレーブを用いて121℃、10分間加熱滅菌し、急冷した。比較的生育の良好であった30℃で培養した糖化液をあらかじめ乾熱滅菌しておいた綿栓付きパスツールピペットを用いて無菌箱の中で一般乳酸菌接種用培地に2滴ずつ接種し、30℃で24時間培養した。

### (2) 糖化液に生育可能な乳酸菌の単離

一般乳酸菌接種用培地に寒天を2%加え、沸騰湯浴中で寒天が溶解するまで10分間程度保温した。その後、オートクレーブを用いて121℃で10分間加熱滅菌後、急冷した。寒天が固まらないうちに、無菌箱の中で直径約8.5cmの滅菌済みプラスチックシャーレに各培養液を25~30mlずつ分注し、寒天培地を調製した。(1)で調製した培養液を0.9%生理食塩水で数個のコロニーができる状態になるよう希釈し、あらかじめ2時間以上乾熱滅菌しておいたパスツールピペットを用いて、無菌箱の中でシャーレ中央の寒天培地上に一滴落とし、コンラージ棒で広げ、30℃でコロニーが比較的大きくなるまで数日間培養した。できたコロニーを無菌箱の中で白金耳を用いて、糖化液の培養培地に植菌し、タッチミキサーで攪拌後、30℃で24時間培養した。その培養液を再び一般乳酸菌接種用培地に接種し、24時間培養後これを同様にシャーレ中の寒天培地に培

養し、再びコロニーをとり培養していく方法を数回繰り返す、糖化液に生育可能な乳酸菌を単離した。

### (3) 単離乳酸菌の保存培養

一般乳酸菌接種用培地に2%寒天を加え、沸騰湯浴中で寒天を煮溶かし、あらかじめ2時間以上乾熱滅菌しておいた紙栓付き試験管に10mlずつ分注し、オートクレーブを用いて121℃で10分間滅菌し、斜面培地を作った。その培地に、単離した乳酸菌のコロニーを無菌箱の中で、白金耳を用いて各斜面培地に植菌し、30℃で24時間培養したものをケフィアより単離した乳酸菌の保存培養とした。

### (4) 菌の顕微鏡観察

ケフィアの菌叢および単離菌の形態に関してはオリンパス BH323N 透過型ノマルスキー微分干渉顕微鏡により観察し、必要に応じて写真撮影を行った。

### (5) 単離乳酸菌の電子顕微鏡観察

ケフィア乳酸菌、ケフィア乳酸菌が属する可能性のある菌種である *Leuconostoc mesenteroides* IAM 13004の菌体を高分子フィルター上に置き、0.2M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4, 0.2M カコジル酸ナトリウム溶液 50mlと0.2M 塩酸溶液 2.7mlを混合したもの) で数回洗浄し、同緩衝液中で2.5%になるようグルタルアルデヒドを添加し、2時間固定した。固定後、遠心分離にかけ、上清を捨て緩衝液で洗浄し、遠心分離をかける操作を繰り返した。その後上清を捨て、50%エタノールを入れ、強振し乳酸菌をよく分散させ、5~10分間放置した。その後遠心分離を行い上清を捨てた。同様な操作を60, 70, 80, 90, 100%とエタノール濃度を上げながら脱水した。脱水後100%の酢酸イソアミルに置換し、10分間放置した。よく分散させた後、臨界点乾燥装置に入れ乾燥させ、試料を白金でコーティングした。その後、菌体を走査電子顕微鏡 (日本電子, JSM-6401F) で加速電圧5 kVで観察し、写真撮影を行った。

### (6) デキストラン生成用培地による観察

Vrbaskiらのデキストラン生成培地 (ショ糖 100.0g, 酵母エキス 2.5g, リン酸二水素カリウム 5.0g, 硫酸アンモニウム 0.2g, 硫酸マグネシウム 0.2g, 塩化ナトリウム 0.6g/蒸留水 1000ml) を調製した。調製培地を滅菌済み試験管に10mlずつ分注し、115℃で20分間加熱滅菌した。その後無菌箱の中で一般



乳酸菌接種用培地培養のケフィア乳酸菌または*L. mesenteroides*を滅菌済みパスツールピペットで2滴ずつ接種し、30℃で24時間培養した (Holzapfel and Schillinger 1992)。

### (7) 糖の資化性試験

実験方法(1)の一般乳酸菌接種用培地をグルコースの添加を除いて調製した。その調製培地に1%濃度になるように各種糖類を添加し、滅菌済み試験管に10mlずつ分注した。その後121℃で10分間加熱滅菌した。無菌箱の中で一般乳酸菌接種用培地で培養したケフィア乳酸菌または*L. mesenteroides* IAM 13004を滅菌済みパスツールピペットで2滴ずつ接種し、30℃で24~48時間培養後、酸度を中和滴定法(平林と佐藤 1987)により測定した。

## 3. 実験結果および考察

### (1) ケフィアからの乳酸菌の単離

培養時間、培養温度により、ケフィアの菌叢もかなり異なっていると考えられるが、ミルク培地で培養したケフィアには単球菌、双球菌、連鎖球菌、桿菌、酵母などが混在しており、どちらかといえば乳酸菌の方が多量に存在していた。種々の菌が混在したケフィアの菌叢から、糖化液のみで生育可能である乳酸菌を数株単離した。そして、それらのなかから比較的発酵性、風味が良好であった乳酸菌を選択した。

一般乳酸菌接種用培地での培養では双球菌がほとんどで、単球菌や三連球菌などもみられた。数回、コロニーをとり培養しても同様な状態であったので、これらの球菌は同一のものであると考えられる。この一般乳酸菌接種用培地で培養したものをグルクザイム処理糖化液、グルコアミラーゼ A 処理糖化液にそれぞれ接種すると菌数はかなり減るが、生育するものが見られ、グルクザイム処理糖化液では双球菌が多く、連鎖球菌なども存在していた。一方、グルコアミラーゼ A 処理のものでは単球菌が多くなっており、糖化液の種類により乳酸菌の形態が変化していた。両酵素処理の糖化発酵液をそれぞれ糖化液を入れ換えて接種しても同様の傾向がみられた。処理酵素の異なる調製糖化液により、単離乳酸菌の生育が異なった。そして、単離した乳酸菌は、菌の形態などから *Leuconostoc* 属のいずれかに属する可能性が高いと考えられた。



*Leuconostoc*は砂糖工場で発生した粘着物質からCienkowskiにより、1878年に最初に単離された。その後、1900年代に入り、バターや発酵バター、発酵乳製品などから単離されてきた。近年の単離、同定技術の進歩により、*Leuconostoc mesenteroides*の他に1990年前後から多数の種に別れ、現在では新たに属として独立したものを含め、約10~13種の存在が認められている(Thunell 1995)。単離される場所もさまざまに食品関係では上記乳製品をはじめチーズや漬物、ワイン、ソーセージなどの肉類などから単離されている。そして、酸味とともにそれら製品の風味形成に重要な役割を担っている(Vedamuthu 1994, Thunell 1995)。

それら菌の共通特徴として、形態は球菌または球菌状の桿菌、グラム染色では陽性、グルコースから炭酸ガスを発生、D型乳酸を生成するヘテロ発酵型乳酸菌であるということが挙げられる。他の乳酸菌と比較し、菌の形態が不規則で、D型乳酸菌を生成するところおよび菌種によっては含シヨ糖培地でデキストランと呼ばれる非常に粘性をもった多糖類を生成することが大きな特徴といえる。また、バンコマイシン耐性であることが近年明らかとなり、乳酸菌が混在するところにバンコマイシンを添加して*Leuconostoc*属のみを単離していくことも可能となっている(Mathot et al. 1994)。それら*Leuconostoc*属の特徴をまとめてTable 2-2-2に示した(Thunell 1995)。上述の主たる特徴をはじめとし、その性質は他の乳酸菌とは非常に異なっている。

## (2) 単離乳酸菌の電子顕微鏡写真

ケフィアから単離した乳酸菌は、一般乳酸菌接種用培地での培養における形態的特徴から*Leuconostoc*属に属する可能性が高いと推定された。そこで、*Leuconostoc*属の代表的菌種である*L. mesenteroides* IAM 13004と比較するために、電子顕微鏡による形態観察を行った。その結果をFig. 2-2-1に示す。ケフィア乳酸菌、*L. mesenteroides* IAM 13004ともに、その形態は短桿状に近い球状で双球菌状または連鎖球菌状で、両者の乳酸菌は非常に類似している。

*Leuconostoc*属のなかでも*L. mesenteroides*などはシヨ糖からデキストランと呼ばれる多糖類を生成することが知られており、このデキストラン生成の有無で、ある程度菌種が絞られてくる。デキストラン生成用培地で培養したところ、両者でその形状は若干異なっていたが、いずれもデキストラン様物質の生

表 2-2-2 *Leuconostoc*属の特徴

Table 2-2-2 Characteristics of genus *Leuconostoc*.  
(Thunell 1995)

---

Gram-positive coccus
Spherical cells, often lenticular on agar
Occur usually in pairs and chains
Nonmotile
Catalase-negative
Not spore forming
Facultative anaerobes
Cytochromes absent
Arginine not hydrolyzed
Nonproteolytic
Indole not formed
Nitrates not reduced
Nonhemolytic
Vancomycin resistant
Generally regarded as nonpathogenic
Optimal temperature 20 to 30°C
Chemoorganotrophs (require rich, complex media)
All species require nicotinic acid, thiamine, biotin, and pantothenic acid or one of its derivatives
Heterofermentative (uses a combination of the pentose phosphate and phosphoketolase pathways)
Produces primarily D(-)-lactate
Milk is usually not acidified and clotted without added yeast extract (except <i>Leuconostoc lactis</i> )
Some, but not all, species produce dextran from sucrose

---



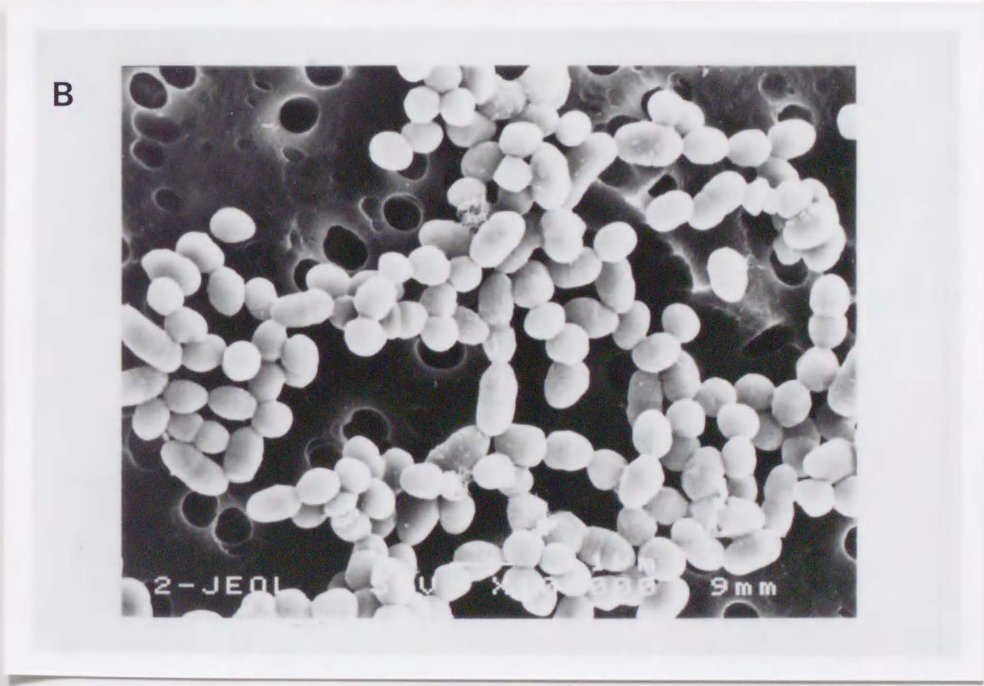
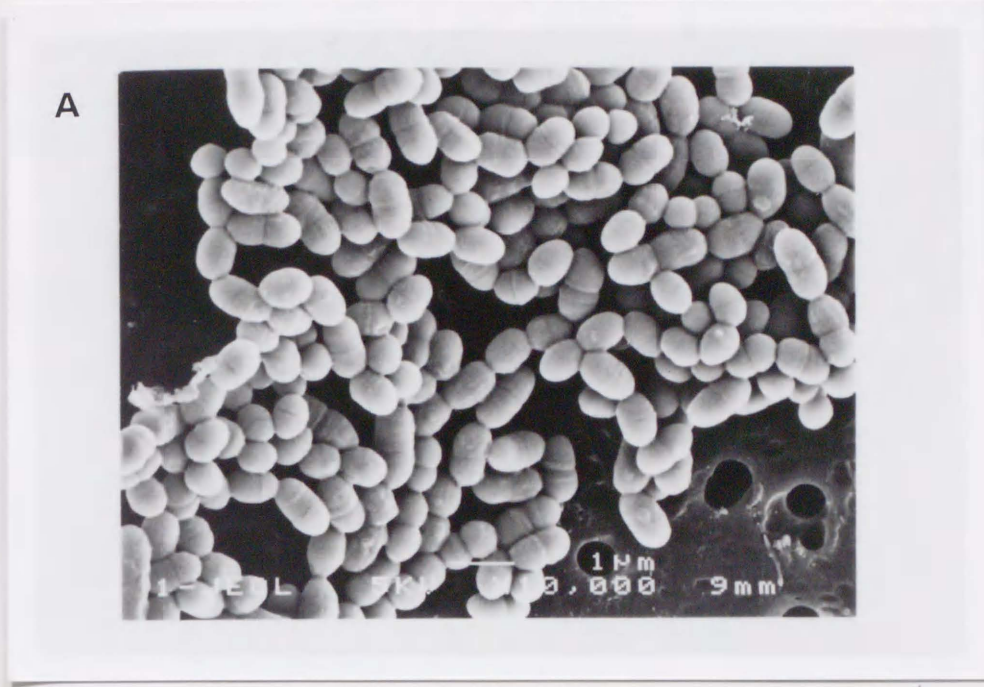


Fig.2-2-1 Scanning electron micrographs of (A) kefir-bacterium and (B) *L. mesenteroides* IAM 13004.

図 2-2-1 乳酸菌の電子顕微鏡写真

成が認められた。両菌のデキストラン様物質についての詳細な分析は行っていないが、ケフィアから単離した乳酸菌は、*L. mesenteroides*の菌株に属する可能性が高いといえる。

### (3) 単離乳酸菌の性質

乳酸菌をはじめ、菌類の生理学的特徴を検討する場合にまずは糖の資化性、発酵性が調べられることが多い。*Leuconostoc*属においても、菌種により糖類の資化性はかなり異なっている。そこで、培養培地に糖の種類を変えて、ケフィア乳酸菌および*L. mesenteroides* IAM 13004を接種し、24~48時間培養後の酸度測定を行った。その結果をTable 2-2-3に示す。ケフィア乳酸菌の方が資化可能な糖が少なく、*L. mesenteroides* IAM 13004と異なりメリビオース、ラフィノース、キシロースが資化できず、アラビノース添加培地で最も酸度は上昇した。また、マルトース、マンニトールについては48時間程度培養しなければ酸度上昇が認められず、マルトースやマンニトールを糖源として用いた場合、菌体のもつそれら糖の分解酵素が少ないのか、利用速度は緩やかであった。糖の資化性からみると*L. mesenteroides*とは若干相違が認められる。糖類の資化性を中心とする*Leuconostoc*属の推定的な同定をVillaniら(1997)が試みており、その系統図をFig. 2-2-3に示す。それによるとデキストランの形成が認められ、アラビノースを資化する、ラフィノースを資化しない、リボースを資化しない、マンニトールを資化することからケフィア乳酸菌は*L. citreum*の菌株に属する可能性が高くなった。また、*L. mesenteroides* IAM 13004の糖の資化性の試験結果をその系統図に合わせると、*L. mesenteroides*に属している。

*L. citreum*はFarrowら(1989)によって1989年に命名された乳酸菌で、以前は*L. mesenteroides*として扱われていたと推察される。同年に同定された*L. amelibiosum* (Schillinger et al. 1989)、日本では饅頭もとから単離された*Lactobacillus batatas* (岡田ら 1982)が*L. citreum*ではないかという報告がある(Takahashi et al. 1992)。そして、*L. citreum*はほとんどの菌株でレモン色の色素を持っており、*Leuconostoc*属のなかでは特徴的といえる (Holzapfel and Schillinger 1992)。ケフィアから単離した乳酸菌もそのコロニーはレモン色の色素を有していた。これら糖の資化性試験の結果により、ケフィア乳酸菌は、*L. citreum*に属すると推定される。この*L. citreum*について



表 2-2-3 各種糖類の乳酸菌の酸生成およびpHに及ぼす影響

Table 2-2-3 Effect of various saccharides on the acid formation and pH of lactic acid bacteria.

Addition of saccharides (10mg/ml of medium)	Kefir-bacterium				<i>L. mesenteroides</i> IAM 13004			
	Acidity (%)		pH		Acidity (%)		pH	
	Cultivation time (hr)							
	24	48	24	48	24	48	24	48
None	0.165	0.165	6.4	6.3	0.139	0.167	6.3	6.3
Arabinose	1.221	1.268	4.5	4.5	0.744	0.840	4.9	4.8
Cellobiose	0.179	—	6.1	—	0.196	—	6.0	—
Fructose	0.576	—	5.0	—	0.550	—	5.1	—
Galactose	0.178	0.173	6.3	6.0	0.281	0.347	5.7	5.4
Lactose	0.166	0.177	6.3	6.2	0.197	0.238	6.1	5.7
Maltose	0.352	0.651	5.4	4.9	0.629	0.619	5.0	4.9
Mannitol	0.168	0.184	6.2	6.0	0.211	0.233	6.1	5.8
Mannose	0.204	0.678	5.9	4.8	0.236	0.407	5.8	5.3
Melibiose	0.207	0.181	6.3	6.2	0.678	0.679	4.9	4.9
Raffinose	0.156	0.152	6.4	6.4	0.629	0.604	5.0	5.0
Ribose	0.243	—	5.9	—	0.484	—	5.1	—
Salicin	0.202	—	5.9	—	0.188	—	6.1	—
Sucrose	0.510	0.508	5.2	5.1	0.500	0.500	5.1	5.1
Trehalose	0.650	—	4.8	—	0.679	—	4.8	—
Xylose	0.210	0.223	6.0	5.9	0.598	0.664	5.0	5.0
Glucose	0.641	0.672	4.9	4.9	0.686	0.708	4.9	4.9

*Leuconostoc* spp.: cocci or coccoidal rods, Gram-positive, gas from glucose, no NH<sub>3</sub> from arginine, D-Lactic acid from glucose

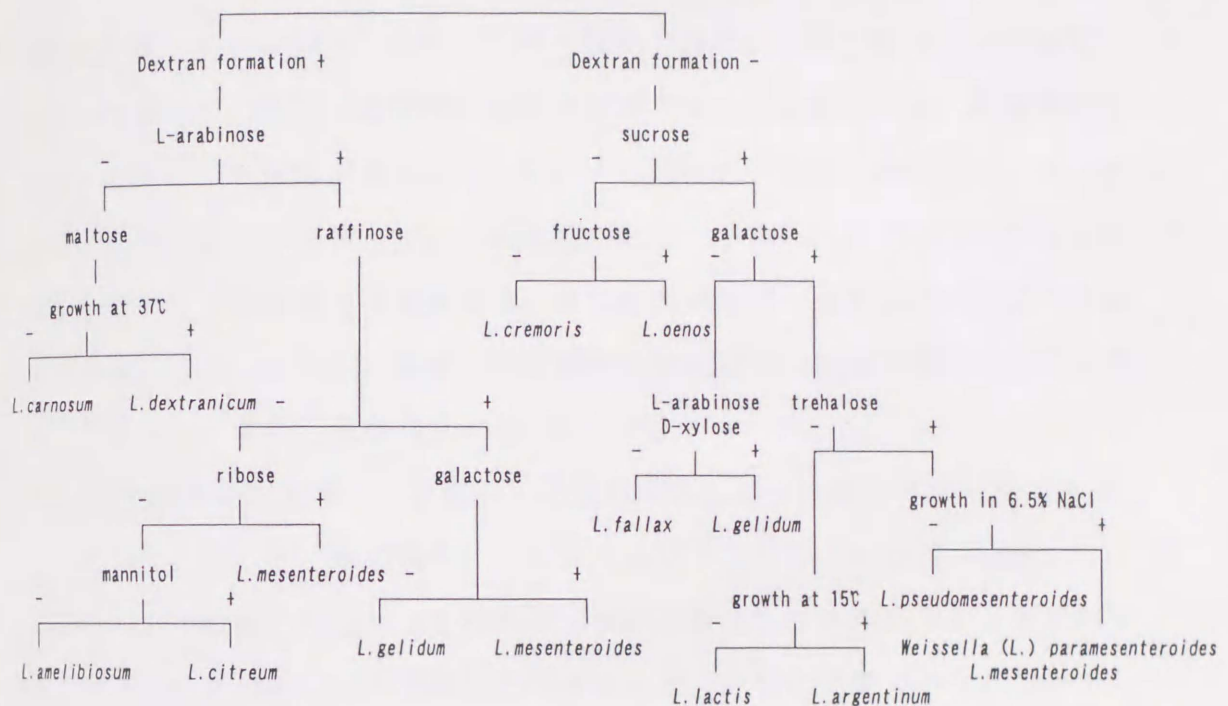


Fig.2-2-2 Scheme for presumptive identification of *Leuconostoc* spp. (Villani et al. 1997)

図 2-2-2 *Leuconostoc*種の推定的な同定のための系統図

の報告は糖の発酵性や核酸分析による同定試験が行われている (Farrow et al. 1989, Villani et al. 1997)。この菌株に属する乳酸菌はライ麦の穂, 血中 (Farrow et al. 1989) フィリピン伝統的な発酵食品であるPuto (発酵コメ饅頭) (Kelly et al. 1995) などから単離されている。単離, 同定以外には他の発酵食品中にみられる乳酸菌と生成多糖類の比較が行われた報告がある (Ludbrook et al. 1997)。上述のように菌種が詳細に分類されるようになったのは, 核酸 (DNA, RNA) 分析によるもので, ケフィア乳酸菌の核酸分析による最終的な同定については今後の検討課題である。



### 第3節 ケフィアからの単離乳酸菌を中心とする糖化液の乳酸発酵

#### 1. 序論

ケフィアから糖化液のみでも生育可能で、風味形成の比較的良好な乳酸菌を単離した。糖の資化性の結果などから単離乳酸菌は*L. citreum*の菌株に属する可能性の高いことが推定された。これを種類の異なる酵素で処理した糖化液に植菌した場合に、24時間培養後の糖化液培地の濁りや沈殿の状態、顕微鏡観察における菌の生育状態が異なっていた。その発酵性の差は、糖化液中の成分組成など微妙な条件が影響している可能性が高い。そこで、良好な発酵飲料を調製するために、糖化条件や培養温度、添加物添加などの培養条件を変えて乳酸菌を培養し、ケフィアから単離した乳酸菌の糖化液での最適培養条件を検討することとした。また、代表的な*Leuconostoc*種の一つである*L. mesenteroides* IAM 13004も同様に培養し、生育性および発酵性などを比較しながら検討することにした。そして、添加物としては第1章で用いた*L. helveticus*や*S. thermophilus*の場合に生育および風味形成が改善されたスキムミルクを添加することとし、ケフィアから単離した乳酸菌などで同様な影響がみられるかどうかについても検討した。

#### 2. 実験方法

##### (1) 使用酵素および乳酸菌

糖化用酵素として、第1章 第1節のグルコアミラーゼ A、グルクザイムおよび $\alpha$ -アミラーゼ ADを使用した。乳酸菌として、第2章 第2節においてケフィアから単離した乳酸菌（以後ケフィア乳酸菌）および*L. mesenteroides* IAM 13004を使用した。

##### (2) 糖化液の調製および培養

ケフィア乳酸菌および*L. mesenteroides* IAM 13004の培養には市販の一般乳酸菌接種用培地を調製し、使用した。あらかじめ150℃で2時間以上乾熱滅菌しておいた綿栓付き試験管に一般乳酸菌接種用培地を10mlずつ分注し、オートクレーブを用いて121℃で10分間加熱滅菌後、急冷した。冷蔵庫保存のケフィア乳酸菌、*L. mesenteroides* IAM 13004の各保存用斜面培地に培養した菌を、

無菌箱の中で白金耳を用いて、各々の培養培地に適宜植菌し、タッチミキサーで攪拌後、30℃のインキュベーター中で24時間培養した。

上新粉を蒸留水に懸濁させ、10%懸濁液250mLを調製した。第1章 第2節 2. 実験方法に従い、糊化のための加熱時間を3, 5, 10, 20分間と同様に變化させた糊化液を用いて糖化液を調製した。なお、酵素反応は15時間行った。調製した糖化液をあらかじめ乾熱滅菌しておいたアルミキャップ付き試験管に10mLずつ分注し、オートクレーブを用いて121℃, 2分間加熱殺菌後、急冷した。無菌箱の中で、あらかじめ乾熱滅菌しておいた綿栓付きパスツールピペットを用いて、乳酸菌および*L. mesenteroides* IAM 13004の培養液を各々の糖化液に2滴ずつ接種した。接種後、タッチミキサーで攪拌し、30℃のインキュベーター中で24時間培養した。乳酸菌が糖化液に生育可能であることを確認し、一般乳酸菌接種用培地からの味を消すために、この発酵糖化液を同様に再度糖化液に接種し、30℃で24時間培養したものを乳酸菌および*L. mesenteroides* IAM 13004の前培養液として用いた。本培養も上記糖化液を用い、あらかじめ乾熱滅菌しておいたアルミキャップ付き試験管に分注した。また、必要に応じて10%スキムミルク溶液を所定の割合で混合し、全体を10mLとした。オートクレーブを用いて121℃で2分間殺菌後、急冷した。ケフィア乳酸菌および*L. mesenteroides* IAM 13004の前培養液をあらかじめ乾熱滅菌しておいた綿栓付きパスツールピペットを用いて、無菌箱の中でそれら調製培地1本につき2滴ずつ接種した。その後、タッチミキサーで攪拌し、20, 25, 30および37℃で96時間まで培養した。なお、菌を接種していないものをコントロールとして用いた。

### (3) 生育度、酸度およびpHの測定

糖化液培養中の生育度については、A. D. S-D 富士デジタル濃度計（秋山電機）により、経時的（3, 6, 9, 12, 24, 48, 96時間）に660nmの濁度を測定し、別に求めた濁度と570nmまたは600nmでの吸光度との関係式を用い、吸光度に換算した（Ueda et al. 1978）。また、必要に応じてそのときの酸度を中和滴定法（平林と佐藤 1987）、pHをTwin pH B-111（堀場製作所）により、第2章 第1節 2. 実験方法に従い測定した。



### 3. 実験結果および考察

#### (1) 酸生成に及ぼす糊化度の影響

第1章 第2節で、糊化度の違いにより調製した糖化液の還元糖生成量が異なり、5分間以上の加熱時間があれば良好な糖化液が調製できた。調製糖化液の濁度などが微妙に異なり、糊化度の違いにより酸生成に差がでることも考えられる。それら糊化度の異なる糖化液に乳酸菌を接種し、96時間培養後の酸度を測定した結果をTable 2-3-1に示す。

表 2-3-1 乳酸菌の酸生成に及ぼす酵素処理および糊化のための加熱時間の影響

Table 2-3-1 Effect of enzyme treatments and heating time for gelatinizatin on the acid formation of lactic acid bacteria.

Heating time (min)	Kefir-bacterium Acidity (%)		<i>L. mesenteroides</i> IAM 13004 Acidity (%)	
	Glucoamylase A	Gluczyme	Glucoamylase A	Gluczyme
	3	0.076	0.216	0.107
5	0.076	0.229	0.089	0.136
10	0.063	0.246	0.067	0.094
20	0.076	0.228	0.112	0.112

\*Acidity was measured after 96hr fermentation at 30°C.

糊化のための加熱時間の差にかかわらず、いずれの乳酸菌を用いてもグルクザイム処理の方がグルコアミラーゼ A 処理糖化液よりも酸度は高いという結果が得られた。また、2種の糖化酵素による酸生成の差は、*L. mesenteroides* IAM 13004よりもケフィア乳酸菌の方が大きく、グルクザイム処理糖化液の場合ケフィア乳酸菌の方が酸度はより高くなった。96時間培養後においては加熱糊化時間の差による乳酸菌の酸生成の差はほとんどみられず、いずれの糊化度においても同様な酸度の得られる発酵液が調製できた。したがって、以後の実験は5分間加熱糊化液を用いて糖化液および発酵液を調製することとした。

## (2) 発酵糖化液中の乳酸菌の生育度および酸度の経時的变化

糖化液中での生育状況を知るために、ケフィア乳酸菌、*L. mesenteroides* IAM 13004を接種し、経時的に生育度を測定した結果をFig. 2-3-1に示す。生育度はグルクザイム処理の方がいずれの乳酸菌を用いても高い値を示し、培養96時間後にはケフィア乳酸菌の方が2倍程度高くなった。他方、グルコアミラーゼ A 処理糖化液の場合には、両者の乳酸菌ともに同様の生育度を示した。生育度とともに経時的な酸度変化を測定したのがFig. 2-3-2である。グルクザイム処理の方が酸度が高くなるのは、Table 2-3-1に示したとおりであるが、ケフィア乳酸菌の方が酸生成速度が速く、24時間培養後でも*L. mesenteroides* IAM 13004と比較すると、2倍程度その酸度は高かった。*L. mesenteroides* IAM 13004接種グルクザイム処理糖化液培養の場合、酸度は徐々に上昇する傾向が認められた。生育度と酸生成度を比較した場合、96時間培養後にはケフィア乳酸菌および*L. mesenteroides* IAM 13004の酸生成度はかなり近接してきているが、生育度は2倍程度の開きがある。また、ケフィア乳酸菌の生育度は培養24時間後以降も上昇しているのに対して、酸度は大きくは変化していない。一方、*L. mesenteroides* IAM 13004の場合、生育度は24時間培養後以降は大きく上昇していないのに対して、酸度は2倍程度変化している。したがって、生育度と酸度にはある程度の相関関係が認められるが、ケフィア乳酸菌接種グルクザイム処理糖化液の場合には、菌の増殖とともに濁度に影響するようなものが同時に若干生成されている可能性があると考えられる。あるいは、生菌数や菌自体の酸生成能などが両者の乳酸菌で異なっているとも考えられる。その点の検討については今後の課題である。



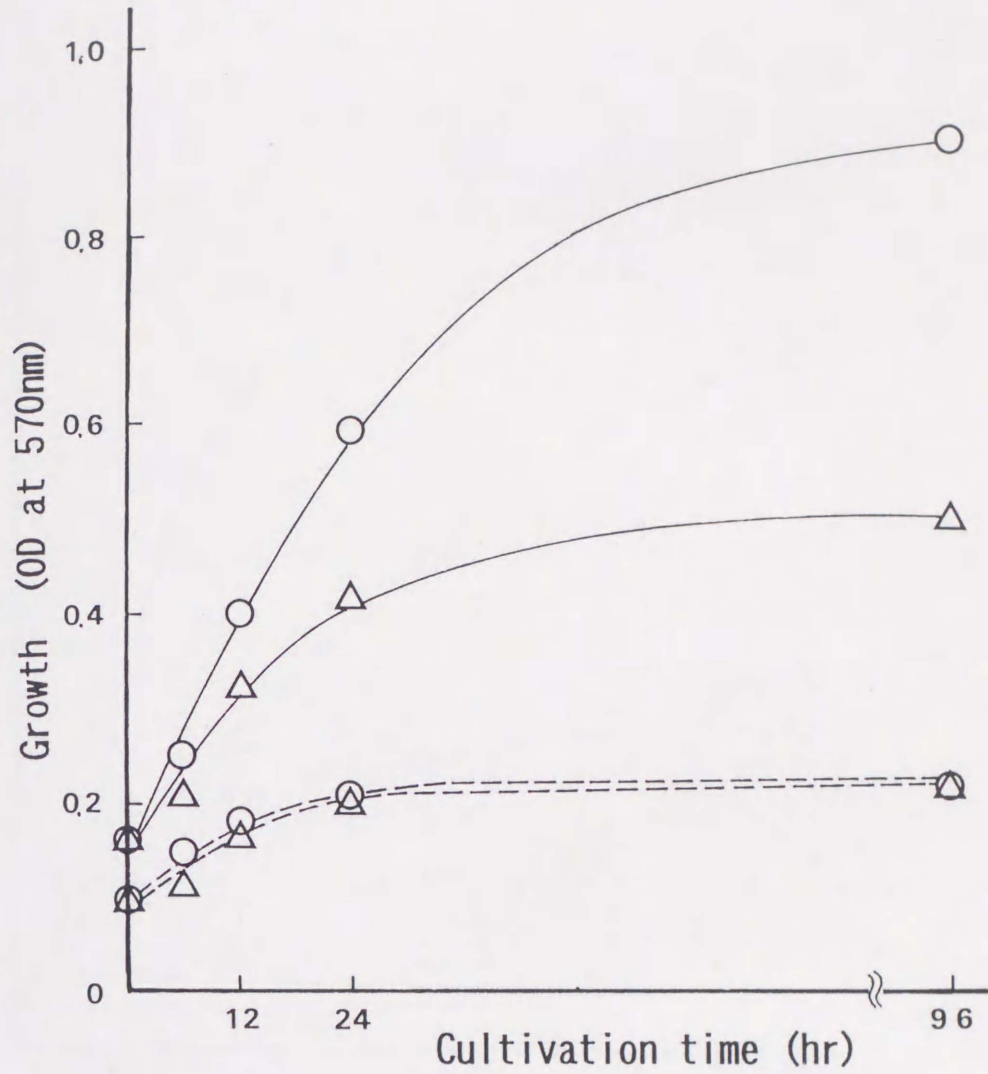


Fig.2-3-1 Effect of enzyme treatments on the growth of lactic acid bacteria.

Enzymes used for saccharification: (---) Glucoamylase A, (—) Gluczyme. Inoculated bacteria: (○) Kefir-bacterium, (△) *L. mesenteroides* IAM 13004.

図 2-3-1 乳酸菌の生育に及ぼす処理酵素の影響

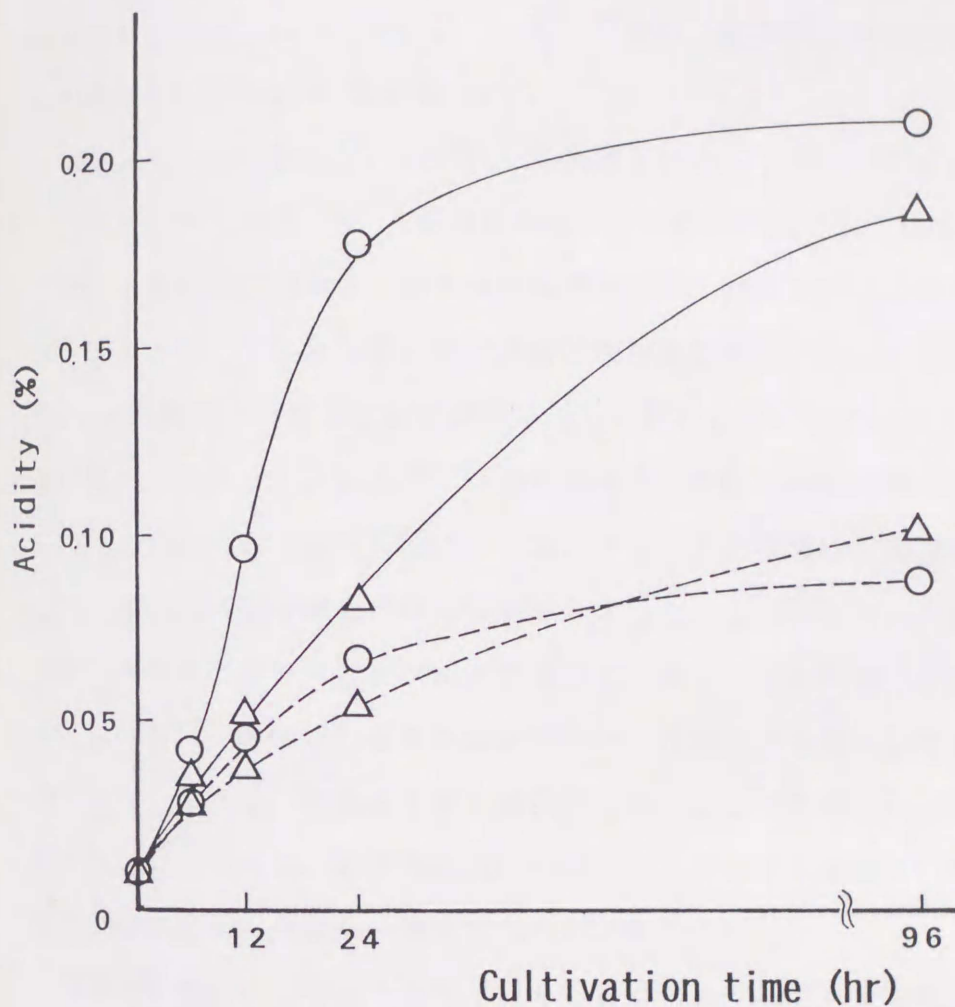


Fig.2-3-2 Effect of enzyme treatments on the acid formation of lactic acid bacteria.

Enzymes used for saccharification: (---)Glucoamylase A, (—)Gluczyme. Inoculated bacteria: (○)Kefir-bacterium, (△)*L. mesenteroides* IAM 13004.

図 2-3-2 乳酸菌の酸生成に及ぼす処理酵素の影響



### (3) 培養温度の酸生成に及ぼす影響

*Leuconostoc*属の培養至適温度は20~30℃といわれており (Garvie 1986) , これまで30℃で培養してきたが、酸生成の良好な培養温度を検討するために、各乳酸菌を接種し、20, 25, 30, 37℃で培養し、経時的に酸度変化を測定した。その結果をFig. 2-3-3, 2-3-4に示す。

培養温度にかかわらず、いずれの乳酸菌を用いてもグルクザイム処理糖化液の方がグルコアミラーゼ A 処理糖化液よりも酸生成度は高くなった。グルクザイム処理糖化液の場合、いずれの乳酸菌も20~30℃の間で良好に酸度は上昇した。しかし、37℃で培養すると急激に酸生成能が低下し、*L. mesenteroides* IAM 13004接種の場合には酸生成がほとんど認められなくなった。培養時間を96時間以上延長したところ20℃培養が最終的な酸度は両乳酸菌ともに高くなり、*L. mesenteroides* IAM 13004は0.27%、ケフィア乳酸菌は0.28%程度まで上昇し、両者の乳酸菌の酸生成はほぼ同等となった。*L. mesenteroides* IAM 13004は糖化液培養においてはケフィア乳酸菌に比較し、直接利用できる栄養成分が不足しており、酸生成に必要な成分を徐々に作りながら酸を生成していると推察される。しかし、発酵糖化液を調製する場合にはできるだけ短時間に調製可能な方がよいといえ、培養24時間の時点ではケフィア乳酸菌を30℃で培養したものが酸生成度は最も高く適当でないかと考えられた。

両者の乳酸菌を比較すると、かなり共通性がみられるが、糖化液の発酵性は培養初期ではケフィア乳酸菌の方が良好で、味もどちらかといえばケフィア乳酸菌の方がフルーティーさが強く感じられた。

### (4) 糖化液とスキムミルク溶液との混合培地の酸生成に及ぼす影響

*L. helveticus*および*S. thermophilus*を用いた場合はミルク成分を混合することで菌の生育が良好となり、ミルク成分添加量を増加すればそれだけ酸度も上昇した (Fig. 2-1-4, 2-1-5) 。糖化液の種類による発酵性の差は、*L. helveticus*の場合ではほとんどみられなかったが、*S. thermophilus*の場合はその違いが現れ、グルクザイム処理糖化液で発酵させた方が酸生成度は若干高くなった。ケフィア乳酸菌および*L. mesenteroides* IAM 13004は糖化液のみでも両者で生育に差が出たことから、ミルク成分を混合することによってその差がさらに顕著になり、前者二種の乳酸菌とは異なった傾向を示す可能性がある。

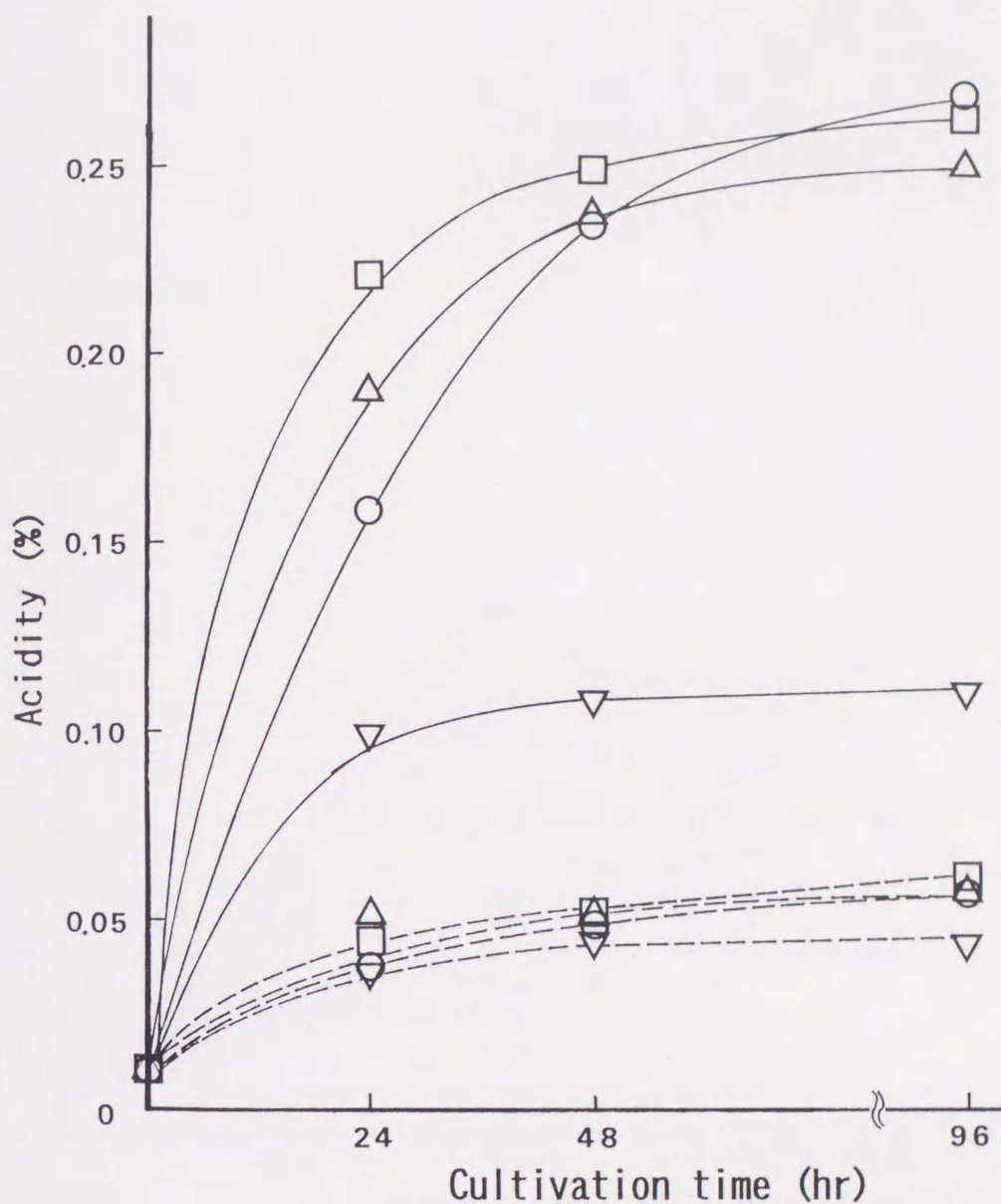


Fig.2-3-3 Effect of cultivation temperature and enzyme treatments on the acid formation of kefir-bacterium. Enzymes used for saccharification: (---)Glucoamylase A, (—)Gluczyme. Cultivation temperature: (○)20°C, (△)25°C, (□)30°C, (▽)37°C.

図 2-3-3 ケフィア乳酸菌の酸生成に及ぼす培養温度および処理酵素の影響



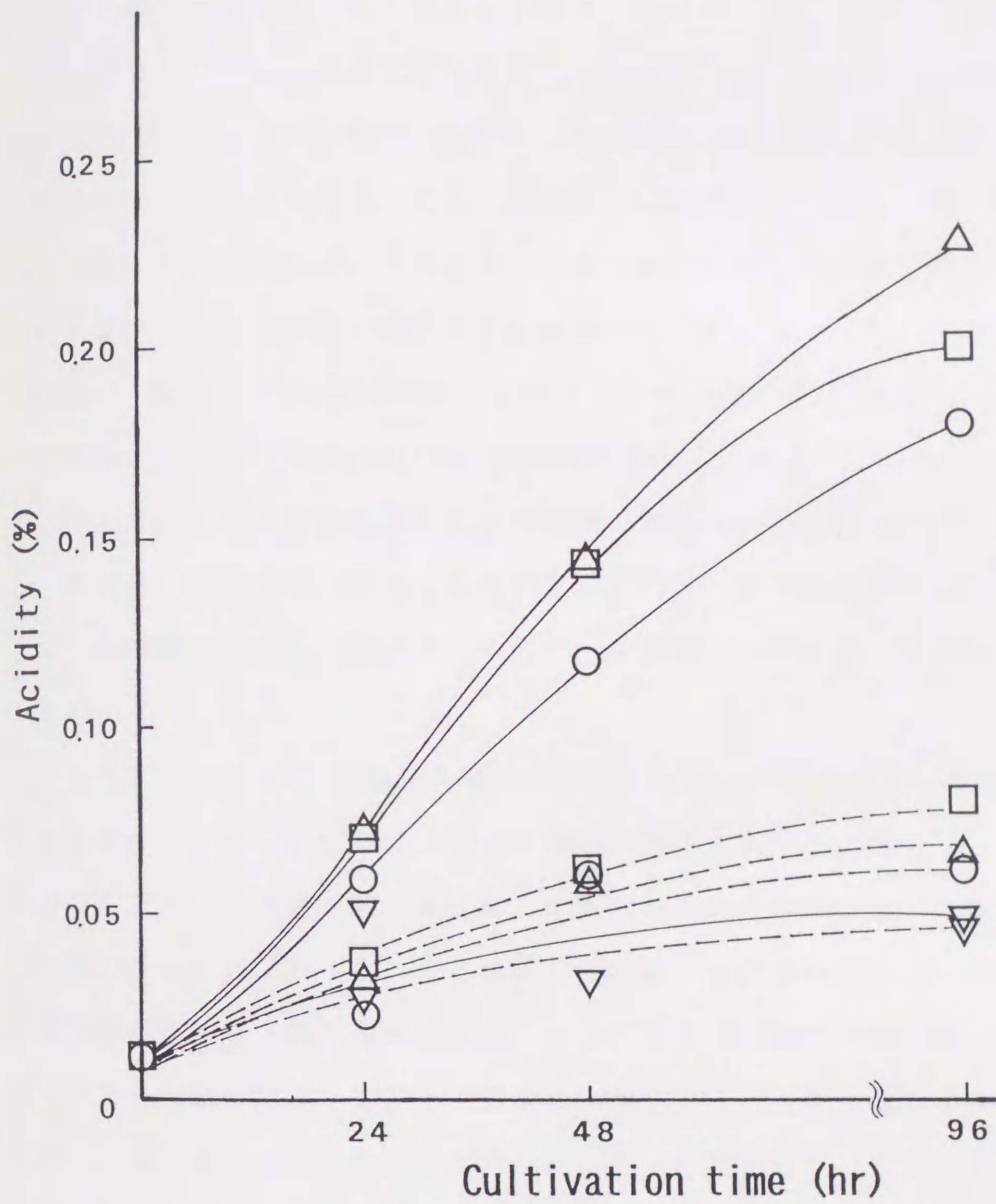


Fig. 2-3-4 Effect of cultivation temperature and enzyme treatments on the acid formation of *L. mesenteroides* IAM 13004.

Enzymes used for saccharification: (---) Glucoamylase A, (—) Gluczyme. Cultivation temperature: (O) 20°C, (Δ) 25°C, (□) 30°C, (▽) 37°C.

図 2-3-4 *L. mesenteroides* IAM 13004の酸生成に及ぼす培養温度および処理酵素の影響

スキムミルク溶液と糖化液を混合した培地に、ケフィア乳酸菌を接種し、酸度とpHを測定して比較検討した場合の結果をFig. 2-3-5に示す。

グルクザイム処理糖化液との混合の場合、スキムミルク溶液との混合率が5 : 5程度のものが最も酸度の上昇率が高くなった。しかしながら、最高酸度も0.5%程度であり、*L. helveticus*や*S. thermophilus*と比較すると酸生成能はそれほど強くないといえる。また、糖化液との混合率が8 : 2 ~ 5 : 5までは溶液の凝固がみられたが、それ以降スキムミルク溶液の添加量が増加するにともない凝固しなくなった。pHは徐々に直線的に上昇していった。酸味はpHが比較的lowく、酸度が0.3%程度の8 : 2 ~ 7 : 3のものが強く感じられた。7 : 3のものはほぼ*S. thermophilus*と同程度の酸度であるが、*S. thermophilus*の場合のようにミルク成分の混合により風味が良好になるとはいえず、どちらかといえば糖化液のみで発酵させる方がフルーティーさも強く感じられた。ミルク成分の添加で味の傾向が変化するので、生成物に違いが出てきている可能性がある。

グルコアミラーゼ A処理糖化液で発酵させると、グルクザイム処理糖化液とは異なり、ミルク成分が多くなるに従い、酸度も徐々に上昇している。しかしながら、その上昇率はグルクザイム処理のものと比較するとかなり低く、溶液の凝固もみられなかった。糖化液のみの場合、両酵素処理における酸度の開きは2倍程度あり、糖化液の比率が7 : 3のあたりの酸度の差が最大であった。pHはミルク成分を添加することで急激に上昇し、ミルク添加量の多少にかかわらず、ミルク添加後のpHの変動は少なかった。したがって、グルコアミラーゼ A処理糖化液では、ミルク成分添加によっても、それが菌の生育には大きく影響せず、ミルクの緩衝作用をより受けやすいといえそうである。

*L. mesenteroides* IAM 13004 で同様にスキムミルク溶液を混合し、検討した結果をFig. 2-3-6に示す。ケフィア乳酸菌とほぼ同様の傾向を示しており、グルクザイム処理糖化液の場合、5 : 5 ~ 3 : 7の比率あたりで最も酸度上昇率が高くなった。また、pHの変動性もケフィア乳酸菌とほぼ同様な傾向がみられた。グルコアミラーゼ A処理においては、ケフィア乳酸菌と比較するとミルク成分添加で酸度の上昇率は若干高くなり、溶液の凝固も認められた。pHは若干高めであるがグルクザイム処理の場合とほぼ同様の上昇傾向を示していた。



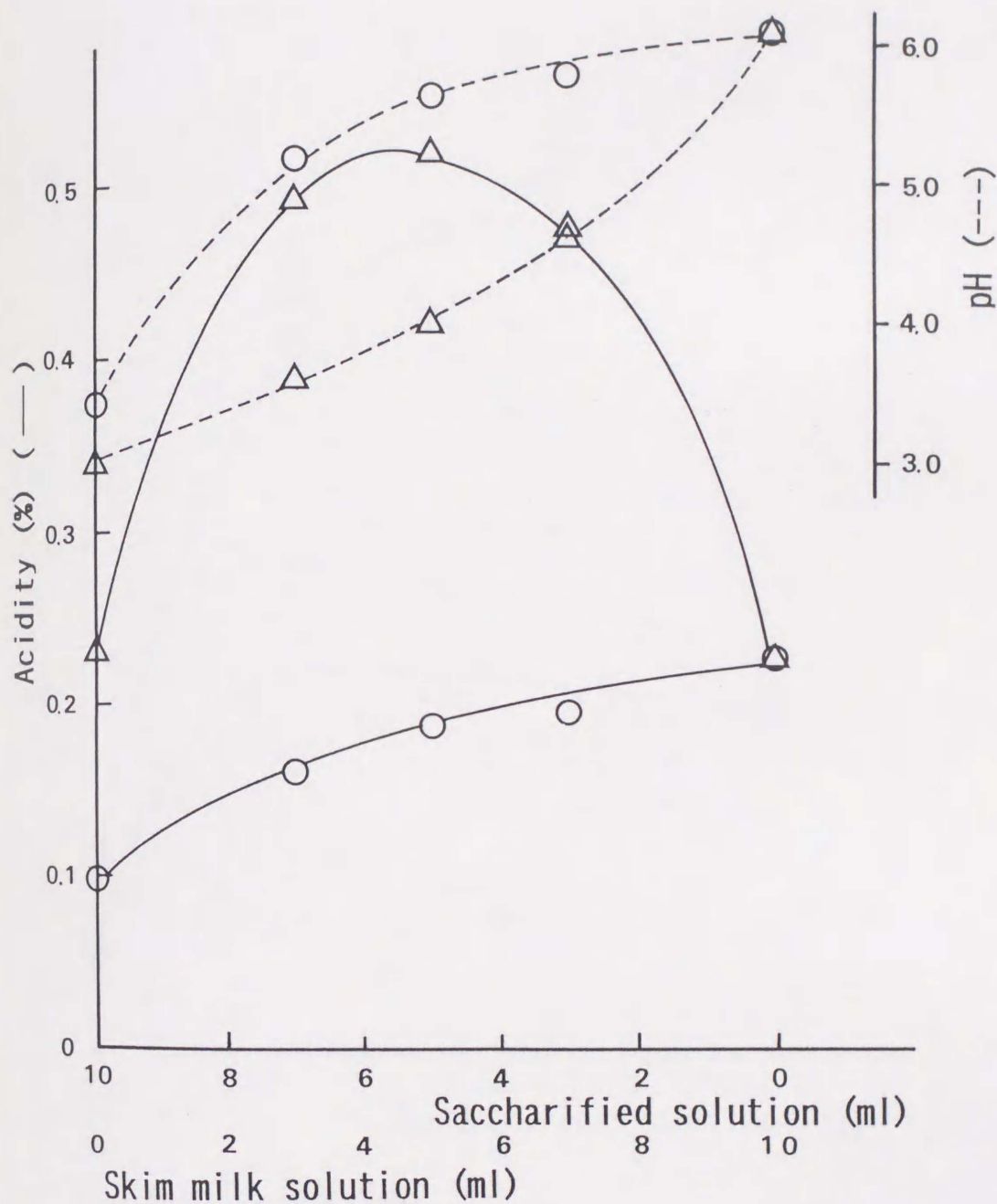


Fig. 2-3-5 Effect of mixing ratio of saccharified solutions and Skim milk solution on the acid formation and pH in the culture of kefir-bacterium.

Enzymes used for saccharification: (○) Glucoamylase A, (△) Gluczyme.

図 2-3-5 ケフィア乳酸菌の酸生成とpHに及ぼす糖化液とスキムミルク溶液の混合比率の影響

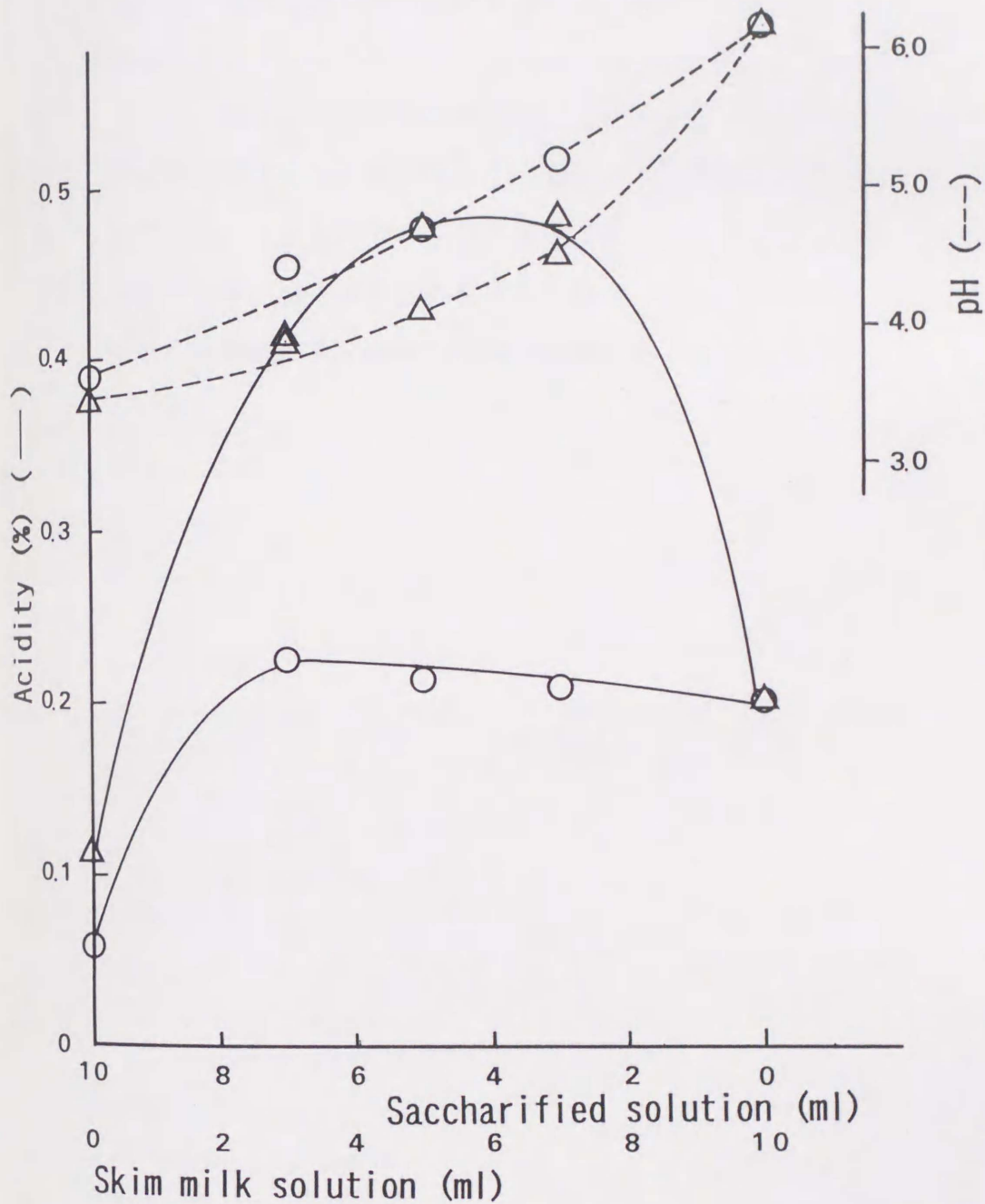


Fig.2-3-6 Effect of mixing ratio of saccharified solutions and Skim milk solution on the acid formation and pH in the culture of *L. mesenteroides* IAM 13004. Enzymes used for saccharification: (○)Glucoamylase A, (△)Gluczyme.

図 2-3-6 *L. mesenteroides* IAM 13004の酸生成とpHに及ぼす糖化液とスキムミルク溶液の混合比率の影響



これらの結果を総合すると、ケフィア乳酸菌と *L. mesenteroides* IAM 13004 はほぼ同様な乳酸菌といえるが、糖化液のみでの発酵性はケフィアからのものの方が良好で、風味形成も勝っていると感じられた。両乳酸菌ともにグルクザイム処理糖化液を用いた方がグルコアミラーゼ A 処理よりも酸度は高くなっている。また、ミルク成分を混合すると、グルクザイム処理糖化液との混合の場合、両者の乳酸菌ともに混合率 5 : 5 程度のものが酸生成度は最も高くなった。したがって、ミルク成分中の栄養素を添加することによって、菌の生育に効果をもたらすが、糖化液がある程度含まれていないと酸度は低下するため、グルクザイム処理糖化液中のある成分が必要であることには相違ない。

## 引用文献

- Angulo, L., Lopez, E., and Lema, C. : *J. Dairy Res.*, **60**, 263-267. (1993)
- Dicks, L. M. T. : *Syst. Appl. Microbiol.*, **18**, 99-102. (1995)
- Farrow, J. A. E., Facklam, R. R., and Collins, M. D. : *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 279-283. (1989)
- Foucaud, C., Francois, A., and Richard, J. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 301-304. (1997)
- Garvie, E. I. : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G., Ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1071-1075. (1986)
- Hamad, A. M., and Fields, M. L. : *J. Food Sci.*, **44**, 456-459. (1979)
- 平林照美, 佐藤一精 : 家政誌, **38**, 817-821. (1987)
- 廣中貴宏, 谷久典, 大石一二三 : *New Food Industry*, **35**(8), 35-43. (1993)
- Holzappel, W. H., and Schillinger, U. : *The Prokaryotes*, second edition, Vol. 2 (Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H., Ed.), Springer-Verlag, New York, pp. 1508-1534. (1992)
- Hong, O. S., and Ko, Y. T. : *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 587-592. (1991)
- 川瀬興三 : シリーズ<食品の科学>乳の科学 (上野川修一 編), 朝倉書店, 東京, pp. 97-103. (1996)
- Kelly, W. J., Asmundson, R. V., Harrison, G. L., and Huang, C. M. : *Int. J. Food Microbiol.*, **26**, 345-352. (1995)
- 小泉武夫 : 発酵, 中央公論社, 東京, pp. 113-116. (1989)
- Kwak, H. S., Park, S. K., and Kim, D. S. : *J. Dairy Sci.*, **79**, 937-942. (1996)
- Lee, C. H., Min, K. C., Souane, M., Chung, M. J., Mathiasen, T. E., and Adler-Nissen, J. : *Food Biotechnol.*, **6**, 239-255. (1992)
- Ludbrook, K. A., Russell, C. M., and Greig, R. I. : *J. Food Sci.*, **62**, 597-600. (1997)
- Lucey, C. A., and Condon, S. : *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 1789-1796. (1986)
- Mathot, A. G., Kihal, M., Prevost, H., and Divies, C. : *Int. Dairy Journal*, **4**,

- 459-469. (1994)
- Mok, C., Han, J., Kim, Y. J., Kim, N., Kwon, D. Y., and Nam, Y. J. : *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 739-744. (1991 a)
- Mok, C., Han, J., Kim, Y. J., Kim, N., Kwon, D. Y., and Nam, Y. J. : *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 745-749. (1991 b)
- 光岡知足 : 日食工誌, **31**, 285-296. (1984)
- 中江利孝 : 健康長寿の可能性『ケフィール』, 女子栄養大学出版部, 東京, pp. 10-107. (1989)
- 内藤毅 : *New Food Industry*, **34**(7), 55-63. (1992)
- 岡田早苗, 小原直弘, 小崎道雄 : 醗工, **60**, 403-408. (1982)
- Orellano, M. E. E., Ascheri, A. M. P., Tosetti, M. I. S., and Segovia, R. : *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **60**, 107-113. (1996)
- Rea, M. C., Lennartsson, T., Dillon, P., Drinan, F. D., Reville, W. J., Heapes, M., and Cogan, T. M. : *J. Appl. Bacteriol.*, **81**, 83-94. (1996)
- Schillinger, U., Holzzapfel, W., and Kandler, O. : *Syst. Appl. Microbiol.*, **12**, 48-55. (1989)
- 鈴木英毅 : 食の科学, (188), pp. 22-28. (1993)
- Takahashi, M., Okada, S., Uchimura, T., and Kozaki, M. : *Int. Syst. Bacteriol.*, **42**, 649-651. (1992)
- Thunell, R. K. : *J. Dairy Sci.*, **78**, 2514-2522. (1995)
- Ueda, S., Sato, K., and Shimizu, S. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **24**, 477-489. (1978)
- Vedamuthu, E. R. : *J. Dairy Sci.*, **77**, 2725-2737. (1994)
- Villani, F., Moschetti, G., Blaiotta, G., and Coppola, S. : *J. Appl. Microbiol.*, **82**, 578-588. (1997).
- 山本哲郎 : *New Food Industry*, **35**(3), 1-7. (1993)
- 吉田忠, 豊島琴恵 : 栄食, **47**, 55-59. (1994)



### 第3章 ケフィアからの単離乳酸菌による発酵糖化液の酸生成に 及ぼす要因

#### 第1節 糖化液中の成分の影響

##### 1. 序論

米粉糖化液のみでも生育可能な乳酸菌をケフィアより単離したが、単離乳酸菌や *L. mesenteroides* IAM 13004 で培養した場合に処理酵素により生育度および酸度が異なるという結果が得られた。そしてその発酵性は、還元糖生成活性の低いグルクザイム処理の方が良好であった。この発酵性の差は、米粉糖化中に生成された物質の影響や量の違いによると推測される。米粉は糖化酵素により処理されているので、その主たる生成物はグルコースを主成分とする糖である。薄層クロマトグラフィーによってもグルコアミラーゼ A とグルクザイムで若干糖の組成は異なっており、その糖が発酵性に影響していることはあり得ると考えられる。また、糖化酵素の起源や純度が異なるため糖化酵素含有成分が影響を及ぼしている可能性もある。そこで、まず、糖自体の影響を調べるために、ジャガイモ澱粉を同様に糖化させ糖化液を調製し、乳酸菌の生育に有効な酵母エキスなどの添加物を添加し、両者の糖化液で発酵性を検討するとともに、各々の失活酵素を添加し、その生育度や酸生成に及ぼす影響を検討することとした。

##### 2. 実験方法

###### (1) 使用酵素および乳酸菌

糖化用酵素は第1章 第1節のグルコアミラーゼ A、グルクザイムおよび  $\alpha$ -アミラーゼ AD を使用した。乳酸菌は第2章 第2節で単離したケフィア乳酸菌および *L. mesenteroides* IAM 13004 を用いた。

###### (2) 糖化液の調製および培養

米粉 5~15% 懸濁液、ジャガイモ澱粉 5% 懸濁液を調製し、第1章 第1節 2. 実験方法に従って糖化液を調製した。調製糖化液に必要な応じて、スキムミルク、酵母エキス、アスペルギルス粉末などの添加物を mg/ml の割合で、ま

た、調製糖化液に各々の失活酵素を糖化液調製時と同量の0.25mg/ml添加し、殺菌した。各添加物添加糖化液に、第2章 第3節 2. 実験方法に従って調製した乳酸菌前培養液を接種し、30℃で96時間培養した。

### (3) 生育度および酸度の測定

乳酸菌接種後の培養液の生育度は、第2章 第3節 2. 実験方法に従って測定した。また、96時間培養後の酸度は中和滴定法（平林と佐藤 1987）により、第2章 第1節 2. 実験方法に従って測定した。

## 3. 実験結果および考察

### (1) 糖化酵素の影響

米粉からの還元糖生成量は、グルコアミラーゼ Aで処理した方がグルクザイムで処理したものよりも多かったが、得られた糖化液の発酵性は糊化度や培養条件にかかわらず、グルクザイム処理の方が良好であった。したがって、糖化酵素グルクザイムに含まれている成分が酸生成に何らかの影響を及ぼしている可能性が高いと考えられる。そこで、各々の失活酵素を添加し、ケフィア乳酸菌および*L. mesenteroides* IAM 13004を接種し、生育度を測定した。その結果をFig. 3-1-1, 3-1-2に示す。

失活酵素を添加することで、両乳酸菌ともに若干の生育度の上昇が認められた。また、グルクザイム処理糖化液での培養において、失活グルコアミラーゼ Aを添加した方が失活グルクザイムを添加したものの方より生育度は高くなった。したがって、酵素の含有成分が異なっており、グルクザイムには含有されていないグルコアミラーゼ A中の成分が乳酸菌の生育に有効に働いた可能性が考えられる。しかしながら、グルコアミラーゼ A処理糖化液にいずれの失活酵素を添加してもほとんど生育度に影響しなかった。これらの実験結果から、糖化酵素の含有成分のなかに乳酸菌の生育促進物質が含まれているという可能性は低くなった。

### (2) 糖の影響

糖化液中の主要成分は糖であるため、その糖および糖含量の違いが関係しているとも考えられる。糖濃度の影響を調べるために、糖化液の糖濃度を5～15%まで変化させ、糖自体の影響を調べるためにジャガイモ澱粉を同様に糖化さ



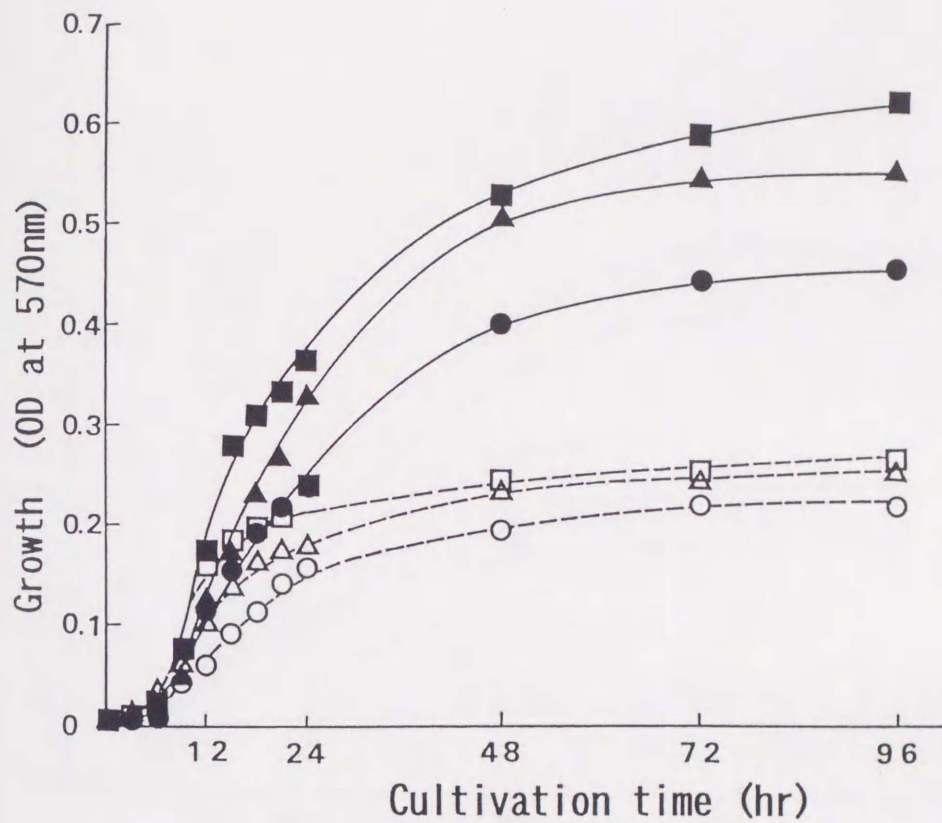


Fig.3-1-1 Effect of saccharified solutions and addition of inactivated enzymes on the growth of kefir-bacterium. Enzymes used for saccharification: (---) Glucoamylase A, (—) Gluczyme. Addition of inactivated enzymes to the medium of glucoamylase A: (○) None, (□) Inactivated glucoamylase A, (△) Inactivated gluczyme and to the medium of gluczyme: (●) None, (■) Inactivated glucoamylase A, (▲) Inactivated gluczyme.

図 3-1-1 ケフィア乳酸菌の生育に及ぼす糖化液と失活酵素の影響



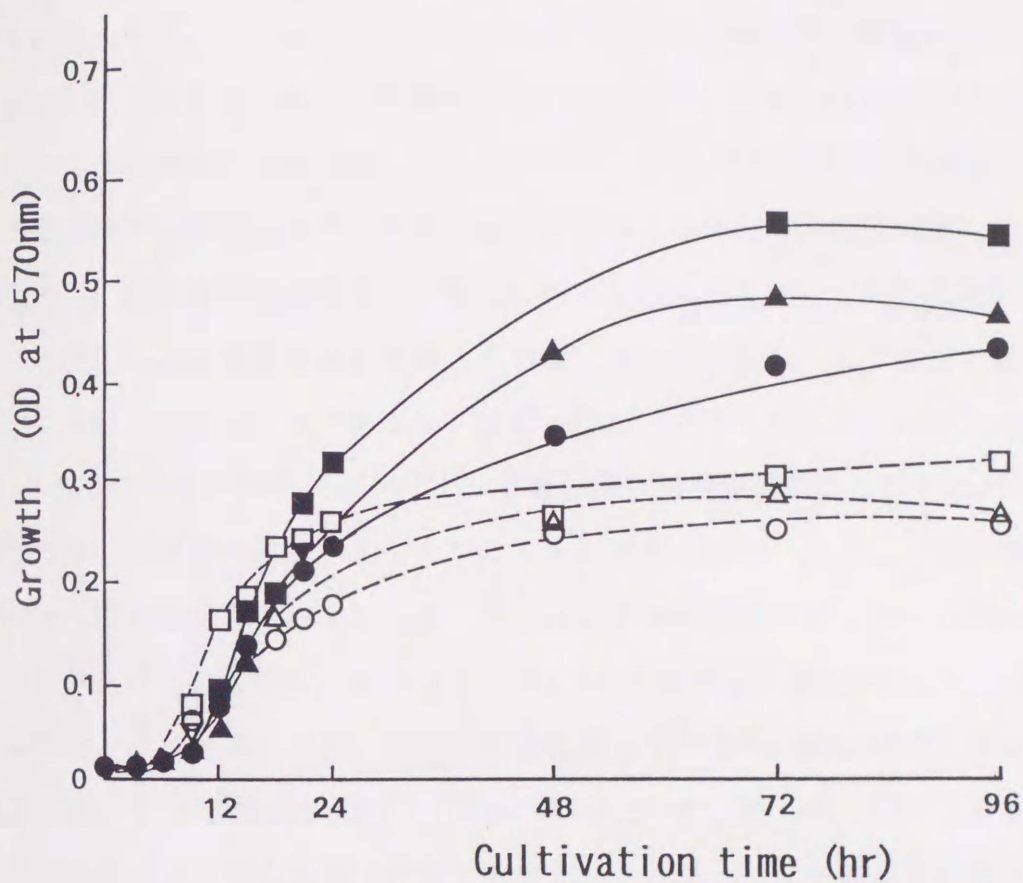


Fig. 3-1-2 Effect of saccharified solutions and addition of inactivated enzymes on the growth of *L. mesenteroides* IAM 13004.

Enzymes used for saccharification: (---) Glucoamylase A, (—) Gluczyme. Addition of inactivated enzymes to the medium of glucoamylase A: (○) None, (□) Inactivated glucoamylase A, (△) Inactivated gluczyme and to the medium of gluczyme: (●) None, (■) Inactivated glucoamylase A, (▲) Inactivated gluczyme.

図 3-1-2 *L. mesenteroides* IAM 13004の生育に及ぼす糖化液と失活酵素の影響

せ検討してみることにした。また、糖のみでは微量栄養成分が欠乏しており、それだけで乳酸菌の生育が困難であると考えられるため、生育に有効といわれる酵母エキスをはじめとし、アスペルギルス粉末およびスキムミルクを添加することとした。各々の培地にケフィア乳酸菌を接種し、96時間培養後の酸度を測定した結果をTable 3-1-1に示す。

酸度と生育度はある程度の相関関係が認められ、酸生成が良好なものは生育度も高かった (Fig. 2-3-1, 2-3-2)。グルクザイム処理では、澱粉のみのものを除き、酸度はどれも高く、糖濃度が高くなるに従い、また添加物を添加することでさらに酸度は上昇した。グルコアミラーゼ A 処理では添加物の添加なしでは相対的に酸度は低かったが、糖濃度が高くなるに従い酸度は徐々に上昇している。添加物を添加すると糖濃度に対応し酸度は上昇していることから、グルコースによる阻害はないと考えられる。また、スキムミルク添加の場合を除き、酵母エキス、アスペルギルス粉末を添加することによりグルコアミラーゼ A 処理の酸度上昇がグルクザイム処理の場合と同程度認められたため、発酵性の差は生成糖に起因するものではないと推測される。スキムミルク添加の場合は、微量添加にもかかわらず、グルクザイム処理糖化液においてのみ酸度上昇に効果が認められた。グルコアミラーゼ A 処理糖化液に酵母エキスなどの添加物を添加することで、いずれの糖化液を用いても同様の酸度を示す発酵液を作ることが可能となった。しかし、酵母エキス、アスペルギルス粉末のような添加物添加の場合は風味がかなり劣化し、飲料としての利用は困難であると感じられた。

*Leuconostoc*属は、栄養要求が複雑な乳酸菌の一種で多種類のアミノ酸やビタミンを要求するが、栄養が豊富にあると生育は遅くなるという特徴をもつ (David et al. 1991)。加えて、乳糖を利用できない、タンパク質加水分解酵素を持たないという特質から、ミルク中では乳糖である糖が利用できず、またカゼインなどの乳タンパク質を分解できないためその生育がほとんど困難であることが知られている (Corgan and Jordan 1994)。そこに、グルコースと酵母エキスが添加されると生育可能となり、酸生成およびミルクの凝固が認められる (Garvie 1986)。糖化液中にはグルコースは十分量供給されており、グルコアミラーゼ A 処理液では酵母エキスで生育が促進され、スキムミルク

表 3-1-1 ケフィア乳酸菌の酸生成に及ぼす添加物の影響

Table 3-1-1 Effect of additives on the acid formation during fermentation by kefir-bacterium.<sup>a</sup>

Additives	Addition of additives (mg/ml)	Acidity (%)		Acidity (%)		Acidity (%)			
		5% Rice flour	10% Rice flour	15% Rice flour	5% Potato starch				
		(Ga) <sup>b</sup>	(Gz) <sup>b</sup>	(Ga) <sup>b</sup>	(Gz) <sup>b</sup>	(Ga) <sup>b</sup>	(Gz) <sup>b</sup>		
None		0.042	0.131	0.078	0.177	0.106	0.210	0.032	0.068
Skim milk	1.0	0.065	0.229	0.079	0.304	0.125	0.340	0.035	0.127
Yeast extract	1.0	0.271	0.229	0.320	0.270	0.322	0.300	0.218	0.178
Aspergillus powder	1.0	0.213	0.218	0.227	0.246	0.256	0.272	0.189	0.183

<sup>a</sup>Acidity was measured after 96hr fermentation at 30°C.

<sup>b</sup>(Ga) shows the treatment with glucoamylase A and (Gz) shows the treatment with gluczyme for the preparation of saccharified solution.



では促進効果が認められなかったことから、アミノ酸やペプチドなどの何らかの窒素源が関係している可能性が高いと考えられた。

## 第2節 糖化酵素自己消化物の影響

### 1. 序論

処理糖化酵素の違いで *Leuconostoc* 種のいずれの乳酸菌においても生育や酸生成などの発酵性が異なり、この発酵性の違いに失活糖化酵素中に含有される成分および糖濃度、糖組成の影響は少ないと考えられた。また、その発酵性は微量の酵母エキスやアスペルギルス粉末などの添加で改善されたことから、糖以外の微量成分が乳酸菌の酸生成に作用していることが考えられる。添加物添加実験において、スキムミルク添加の場合のみグルコアミラーゼ A 処理糖化液の酸度の上昇がみられないことから、ミルク中には十分含まれていない成分が関与している可能性の高いことが推定される。グルコアミラーゼ A に比較してグルクザイム中にはグルコアミラーゼの他にかなり活性の高いプロテアーゼなども含まれている。したがって、米粉糖化反応を行う場合にはそのプロテアーゼなどで酵素反応中に混在するタンパク質が分解されるとともに酵素自体も部分的に自己消化され、単に酵素を失活させたものとは成分が異なっていることが考えられる。そこで、糖化酵素のみを蒸留水に懸濁させ、酵素反応と同様に反応させたものを糖化液に添加して検討を試みることにした。

### 2. 実験方法

#### (1) 使用酵素および乳酸菌

糖化用酵素として、第1章 第1節のグルコアミラーゼ A、グルクザイムおよび  $\alpha$ -アミラーゼ AD を使用した。乳酸菌は第2章 第2節で単離したケフイア乳酸菌および *L. mesenteroides* IAM 13004 を用いた。

#### (2) 糖化液および糖化液培養培地の調製

糖化液の調製および培養は第2章 第3節 2. 実験方法に従って行い、必要に応じて糖化酵素自己消化物を添加した。酵素自己消化物はグルコアミラーゼ A およびグルクザイム 100mg を 3ml の蒸留水に懸濁し、56℃ で 15 時間保温し、反応させ自己消化させた後に 121℃ で 10 分間加熱滅菌して調製した。

#### (3) 酸度ならびにアミノ酸量の測定

(2) で調製した糖化液に乳酸菌を接種し、30℃ で 96 時間培養後の発酵糖化

液の酸度を中和滴定法（平林と佐藤 1987）により，第2章 第1節 2. 実験方法に従って定量した。また，糖化酵素の保温前後のアミノ酸量をニンヒドリン法（Moore and Stein 1954）により以下のように定量した。

ニンヒドリン 500mgとヒドリンダンチン 75mgをエチレングリセロールモノメチルエーテル 19mlに溶解させ，調製し，アルミ箔で覆い，使用直前まで冷蔵庫中に保存した（A液）。4N 水酸化ナトリウムと4N 酢酸を混合し，pH5.5に調整し，4N 酢酸ナトリウムバッファーを調製した（B液）。A液，B液，蒸留水を4：5：6の比率で混合し，ニンヒドリン反応液とした。標準曲線の作成にはロイシンを蒸留水に溶解し，使用した（0.1～0.5 $\mu$ M/ml）。試料を2～10倍に希釈し，試験管に1mlとり，ニンヒドリン反応液を1ml加えて混合した。100℃の沸騰湯浴中で5分間保温後，急冷した。その後，50%エタノールを5ml加え，タッチミキサーで攪拌し，15分間静置後，570nmの吸光度を島津Spectronic 20Aで測定した。

### 3. 実験結果および考察

#### (1) 糖化酵素の保温前後の酸生成に及ぼす影響

異なる酵素で処理した糖化液での乳酸菌の発酵性の差に糖や失活酵素自体の影響はあまり認められなかったので，酵素反応と同時に生成するようなものの影響が高いと推定された。そこで，糖化酵素のみを失活させたものとその酵素を56℃で保温させた後に失活させたものをそれぞれ糖化液に添加し，酸度を測定し，その影響を検討した。

その結果をTable 3-2-1に示した。酵素を失活させただけのものの添加では，生育度でも示したようにグルコアミラーゼ A処理糖化液の酸生成にはほとんど影響を及ぼさなかった。しかし，酵素のみを保温し自己消化させたグルクザイムをグルコアミラーゼ A処理糖化液に添加すると，グルクザイム処理の場合と同程度の酸度上昇を示した。したがって，グルクザイムの自己消化物中の何らかの成分が乳酸菌の酸生成に影響を及ぼしている可能性が高いと推測された。

#### (2) 糖化酵素保温自己消化後のアミノ酸量

ケフィア乳酸菌および*L. mesenteroides* IAM 13004の生育に糖化酵素自己消



表 3-2-1 失活酵素または保温後失活させた酵素のケフィア乳酸菌発酵中の酸生成に及ぼす影響

Table 3-2-1 Effect of additions of inactivated enzyme or enzyme inactivated after incubation on the acid formation during fermentation by kefir-bacterium. <sup>a</sup>

Additives	Addition of additives (mg/ml)	Acidity(%)	
		Glucoamylase A	Gluczyme
None		0.078	0.177
Inactivated glucoamylase A	0.25	0.087	0.203
Inactivated gluczyme	0.25	0.116	0.191
Glucoamylase A inactivated after incubation	0.25	0.085	0.207
Gluczyme inactivated after incubation	0.25	0.175	0.193

<sup>a</sup>Acidity was measured after 96hr fermentation at 30°C.

化物が関与していると考えられたため、糖化酵素グルコアミラーゼ A、グルクザイムの自己消化反応前後のアミノ酸量を比較した。その結果をFig. 3-2-1に示す。グルコアミラーゼでは保温前後のアミノ酸量がほとんど変化していないのに対して、グルクザイムでは保温により遊離アミノ酸量が保温前後で4倍程度著増していた。これは、酵素標品中に不純物として含まれるプロテアーゼの混入量が多く、自己消化が進行したためと推定される。また、いずれの糖化酵素のロットを換えても同様の結果が得られた。以下、このように保温して自己消化させたグルクザイムを“保温グルクザイム”(Incubated gluczyme)とする。

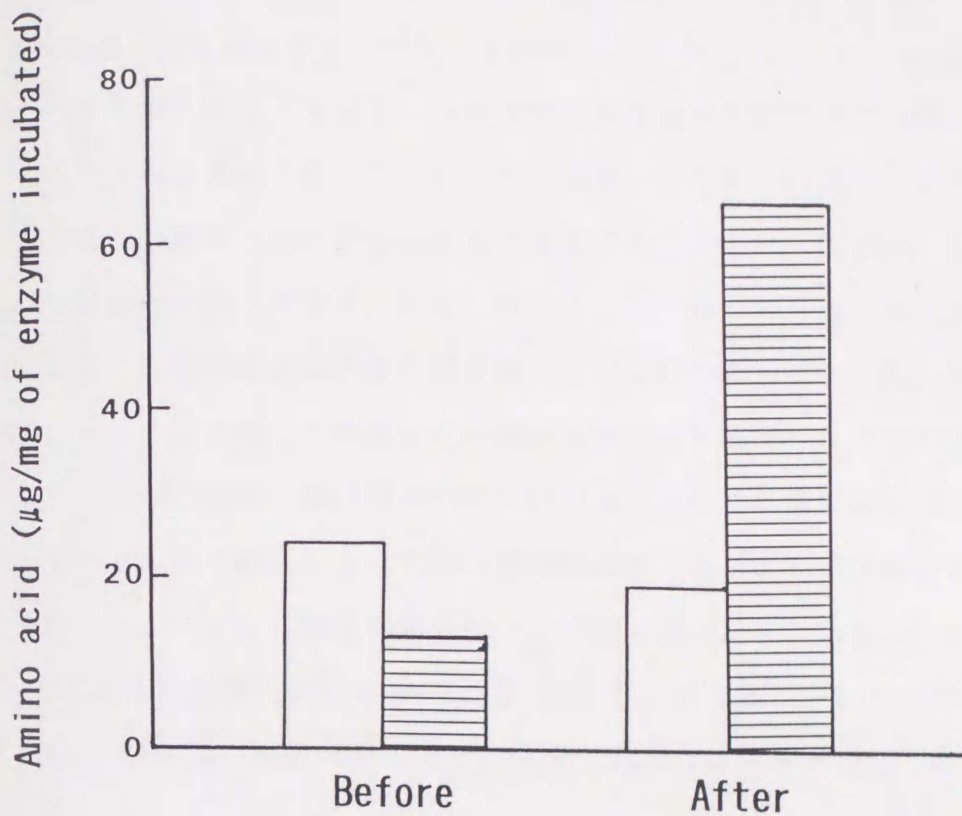


Fig.3-2-1 Contents of amino acids measured before and after incubating of the suspensions (100mg/3mℓ each) of glucoamylase A (□) and gluczyme (▨) at 56°C for 15hr.

図 3-2-1 グルコアミラーゼ A とグルクザイムの懸濁液を56°Cで15時間保温前後に測定したアミノ酸量

### (3) 保温グルクザイムの添加効果

糖化液に保温グルクザイムの添加量を変えて添加し、ケフィア乳酸菌または *L. mesenteroides* IAM 13004 を接種した場合の結果を Fig. 3-2-2 に示す。両乳酸菌ともにグルクザイム処理糖化液に保温グルクザイムを添加して生育させた場合、その培養液の酸度上昇はわずかしか認められなかった。グルコアミラーゼ A 処理糖化液に保温グルクザイムを添加した場合には、1～5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の添加量あたりで急激に酸度が上昇し、それ以後は添加量を増加させても緩やかに上昇するという程度であった。したがって、保温グルクザイム中には微量で乳酸菌の酸生成を促進する物質が存在する可能性が推定された。第2章 第3節で、短時間の培養では30℃程度が、生育、酸生成ともに良好であるという結果が得られ、37℃で培養の場合は酸度上昇がほとんど認められなくなった。ケフィア乳酸菌が30℃を若干越える培養でもそれほど酸生成に影響しなかったのに対して、*L. mesenteroides* IAM 13004 の場合は培養温度による酸生成の差が顕著で、30℃を2～3℃以上越えるといずれの処理糖化液においても酸度は著しく低下し、保温グルクザイムの添加効果もほとんど認められなくなった (Fig. 3-2-3)。*Leuconostoc* 属の培養至適温度範囲は20～30℃とされており、*L. mesenteroides* IAM 13004 の場合は、30℃が酸生成能を発揮できるほぼ限界であると考えられる。



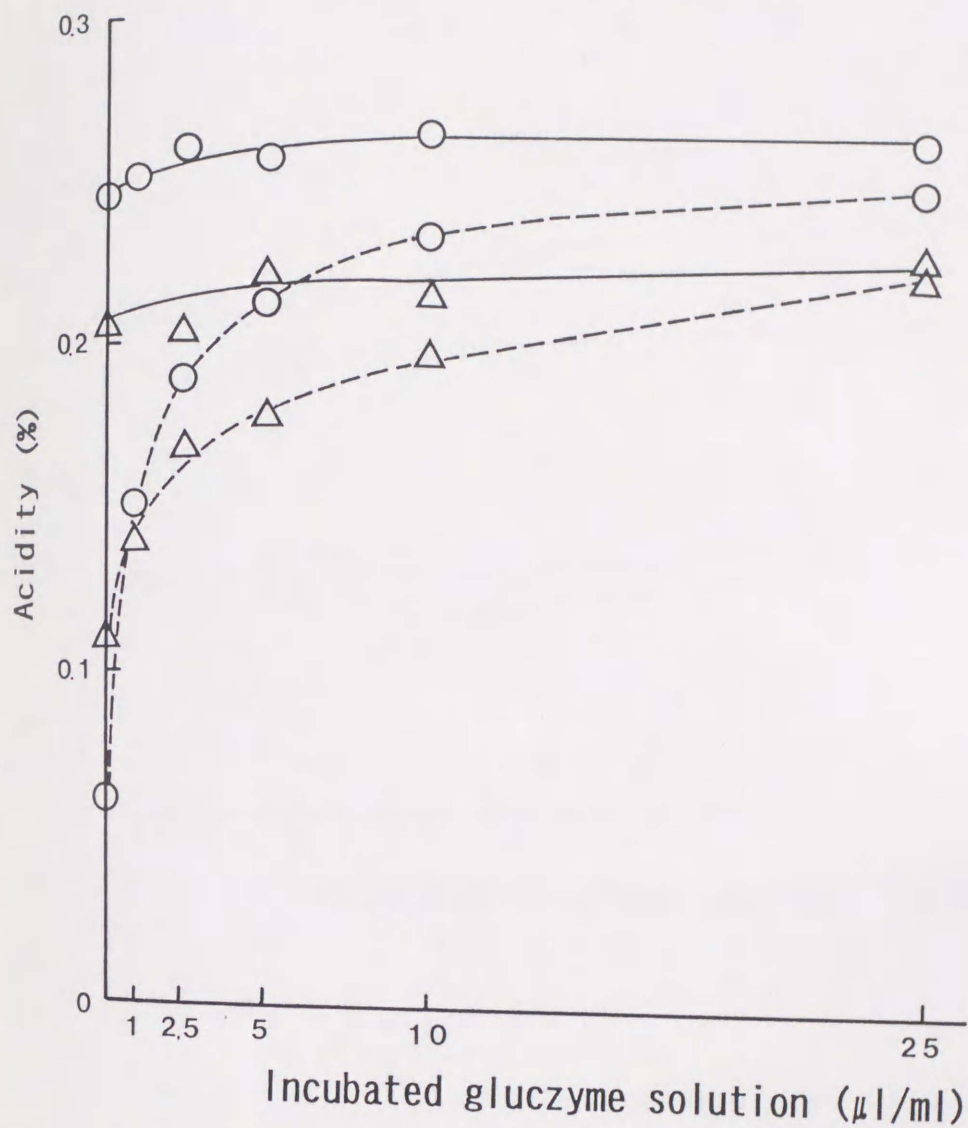


Fig. 3-2-2 Effect of incubated gluczyme on the acid formation by lactic acid bacteria.

Enzymes used for saccharification: (---) Glucoamylase A, (—) Gluczyme. Inoculated bacteria: (○) Kefir-bacterium, (△) *L. mesenteroides* IAM 13004. Acidity was measured after 96hr of cultivation at 30°C.

図 3-2-2 30°C培養における保温グルクザイム添加の乳酸菌の酸生成に及ぼす影響

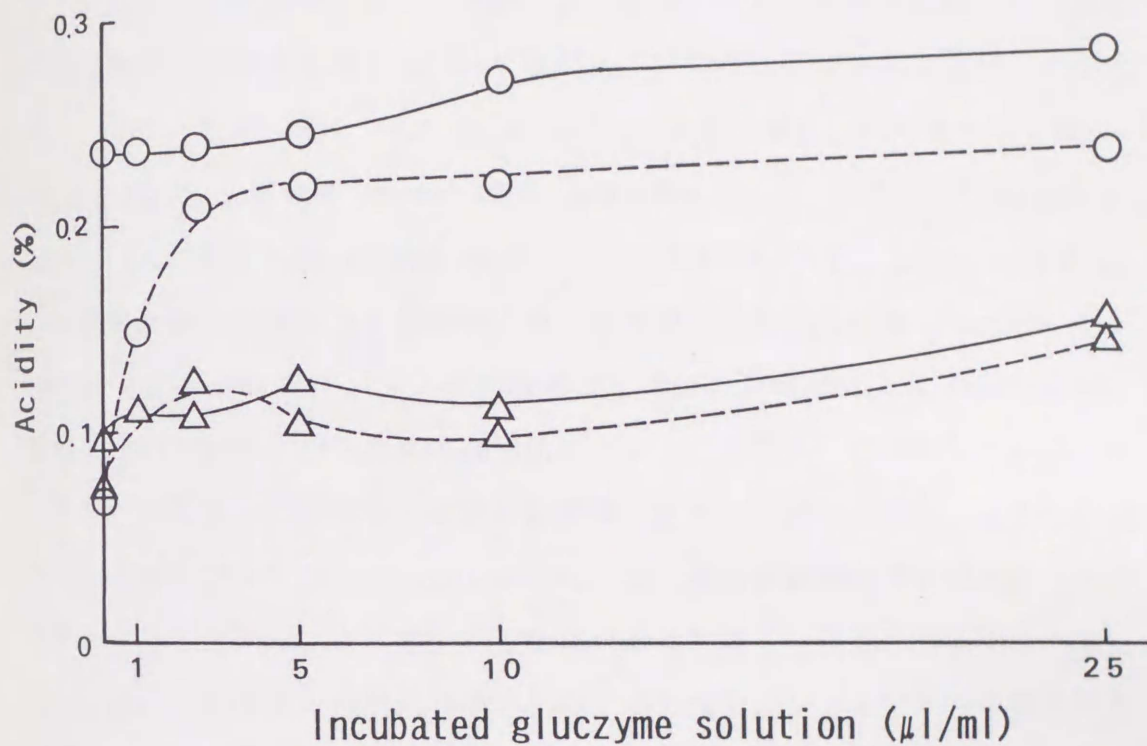


Fig.3-2-3 Effect of incubated gluczyme on the acid formation by lactic acid bacteria.  
 Enzymes used for saccharification: (---)Glucoamylase A, (—)Gluczyme. Inoculated bacteria: (○)Kefir-bacterium, (△)*L. mesenteroides* IAM 13004. Acidity was measured after 96hr of cultivation at ca. 32°C.

図 3-2-3 32°C培養における保温グルクザイム添加の乳酸菌の酸生成に及ぼす影響

### 第3節 糖化酵素自己消化物中の酸生成・生育促進物質

#### 1. 序論

処理酵素の違いで発酵性が異なり、その原因を追求したところ、糖化酵素グルクザイムの方が酵素が不純なため、その酵素に含まれているプロテアーゼなどによって、分解生成したアミノ酸などの影響が大きいと考えられた。このような乳酸菌の生育促進因子については種々の研究がなされてきており（東尾ら 1977, 平林と佐藤 1987, 中島 1996）, *Leuconostoc*種についてもアミノ酸（Garvie 1967）や有機酸（Cogan 1987, Loubiere et al. 1992, Bellengier et al. 1994）, 酸素（Lucey and Condon 1986, Plihon et al. 1995）の有無などが代謝産物や生育に与える影響について比較検討されている（Cogan and Jordan 1994）。また、ケフィア乳酸菌と*L. mesenteroides* IAM 13004における糖化酵素自己消化物の効果は酸生成にほとんど同じように作用しているため、酵素自己消化物中の酸生成・生育促進物質がすべて共通のものか、またその成分が通常言われている*L. mesenteroides*における生育促進物質と同様なものであるかどうかということも検討する余地があると考えられる。そこで本実験においては、糖化酵素自己消化物中のどのような成分がケフィアから単離した乳酸菌および*L. mesenteroides* IAM 13004の酸生成を促進するのかを明らかにすることを目的に検討することとした。

#### 2. 実験方法

##### (1) 使用酵素および乳酸菌

糖化用酵素として、第1章 第1節のグルコアミラーゼ A, グルクザイム,  $\alpha$ -アミラーゼ ADを使用した。乳酸菌は第2章 第2節で単離したケフィア乳酸菌および*L. mesenteroides* IAM 13004を用いた。

##### (2) 糖化液および糖化液培地の調製

糖化液の調製および培養は第2章 第3節 2. 実験方法に従った。また必要に応じて、第3章 第2節 2. 実験方法で調製した保温グルクザイムおよびアミノ酸などの添加物を添加した。アミノ酸としては、既報告（Garvie 1967）や後述のグルクザイム自己消化物中の活性画分に多く含まれていたアミ



ノ酸を参考とし、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-フェニルアラニン、L-バリン、L-メチオニン、L-トリプトファン、L-シスチン（いずれも和光純薬工業製）、L-グルタミン酸ナトリウム（半井化学薬品製）を糖化液培地に単独、または混合させ5~10 $\mu$ g/ml添加して使用した。

### (3) 酸度ならびにアミノ酸量の測定

糖化酵素中の含有遊離アミノ酸量をニンヒドリン法 (Moore and Stein 1954) により、第3章 第2節 2. 実験方法に従って測定した。また、乳酸菌を接種し、30 $^{\circ}$ Cで96時間培養後の発酵糖化液の酸度を中和滴定法 (平林と佐藤 1987) により、第2章 第1節 2. 実験方法に従って測定した。

### (4) 薄層クロマトグラフィー (TLC) , 濾紙電気泳動, アミノ酸分析

グルクザイムの自己消化物を薄層板 (Whatman K2 セルロース 5 $\times$ 20cm) 1枚につき、70 $\mu$ lずつ塗布し、1-ブタノール:酢酸:蒸留水=4:1:2を展開溶媒とし、TLCを6枚ずつ行った。展開後、その1枚にニンヒドリン反応を行い発色させた。残りの薄層板はスポットから溶媒上昇位置までの間をニンヒドリンで発色させたものの位置に対応させ、スポット側から約3.0, 2.4, 1.7, 2.4, 2.5, 3.0cmのところを区切り、蒸留水で溶出し、濃縮乾固後、塗布量と同量の蒸留水70 $\mu$ lに溶解し、画分F1~F6とした。各画分のアミノ酸量をニンヒドリン法で測定するとともに糖化液に5 $\mu$ l/ml添加し、ケフィア乳酸菌を接種して発酵性を検討した。活性画分については、含有アミノ酸をアミノ酸自動分析計 (日本分光 EP-920) により分離分析するとともに、濾紙 Whatman 3MM Chr (2 $\times$ 40cm) を用い、0.52N 酢酸または0.02M トリスバッファーを緩衝液として、800V, 90分間電気泳動を行った。濾紙を5mm間隔で切断し、その切片を1本ずつ試験管に入れ、グルコアミラーゼ A処理糖化液を各試験管に10mlずつ分注した。殺菌後、ケフィア乳酸菌を接種し、30 $^{\circ}$ Cで96時間培養後の酸度を測定するバイオオートグラフィーを行った。

## 3. 実験結果および考察

### (1) 保温グルクザイムのTLC

保温グルクザイム中の乳酸菌の酸生成に有効に作用している物質を検討するために保温グルクザイムの成分のTLCによる分離を試みた。TLCによる分離状況

をFig. 3-3-1に示す。さまざまなアミノ酸が含まれているが、その発色に応じF1~F6の6つの画分に分けた。ニンヒドリンの発色はF2が最も濃く、次にF5が濃かった。なお、保温したグルコアミラーゼ Aの場合はこのようなニンヒドリンの発色がほとんど認められなかった。これら各溶出画分のアミノ酸量と各TLC溶出液添加糖化発酵液の酸度を測定した。その結果をTable 3-3-1に示す。

F1とF6はニンヒドリンの発色が認められなかった画分で、アミノ酸もほとんど含まれていなかった。グルコアミラーゼ A処理糖化液の場合には、F5画分を加えたもののみ酸度が上昇し、画分すべてあるいは保温グルクザイムを添加したものに近い酸度上昇を示した。したがって、含まれている成分すべてが相乗効果的に作用するというよりもむしろ、ある特定の成分が有効に作用していると考えられた。また、グルクザイム処理糖化液にF5画分を添加した場合には酸度上昇はほとんど認められなかった。ニンヒドリン陽性部分に活性が認められたため、酸生成促進物質としてアミノ酸関連物質の可能性が高くなった。さらに、その検討を進めるために、活性画分F5だけを多量に集め電気泳動を行い、その画分の物質がアミノ基をもつかどうかについての検討を行った。

### (2) 活性画分 (F5) の濾紙電気泳動

F5画分を0.52N 酢酸で電気泳動を行い、泳動後一部でニンヒドリン反応を行うとともに0.5cm間隔で残りの部分の濾紙を切断し、グルコアミラーゼ処理糖化液に添加して酸度測定をした結果をFig. 3-3-2に示した。陰極側に濃いものと薄いものとの2カ所にニンヒドリンの発色が認められ、F5画分には少なくとも2種類以上のアミノ基をもつものが存在していることが判明した。菌の酸度を測定すると、濃い発色のみられた泳動位置付近が高くなった。また、0.05M トリスバッファーで泳動を行った場合には原点付近から少し陰極側にニンヒドリンの発色がみられ、トリスバッファーの場合は画分が分離しなかったが、酸度もそのあたりが高くなった (Fig. 3-3-3)。したがって、F5画分の物質はアミノ基を有していることが確定できた。

### (3) 生育促進物質の同定

酸生成・生育促進物質をアミノ酸のようなものであると仮定した場合にTLCにおける活性画分の上昇位置から推定すると、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンのような比較的疎水性のアミノ酸の可能性が高く、電気泳動にお



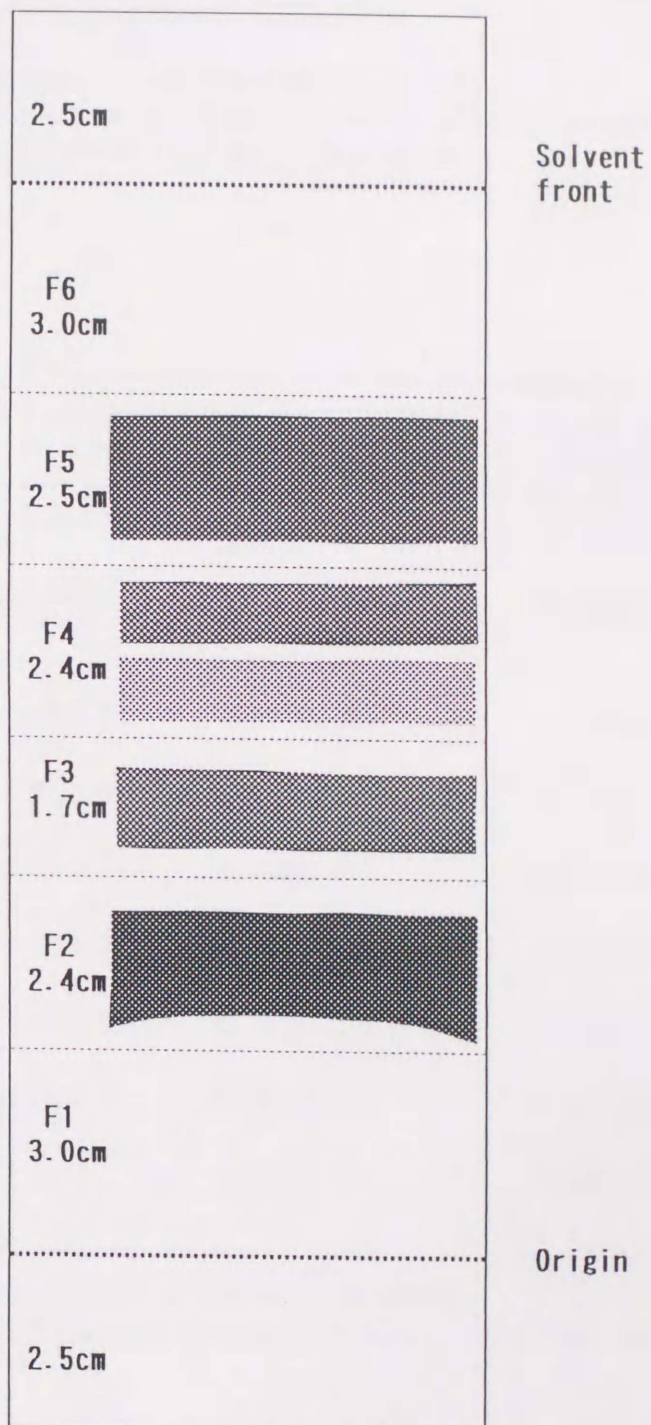


Fig. 3-3-1 Thin layer chromatography of incubated gluczyme.

図 3-3-1 保温グルクザイムの薄層クロマトグラフィー



表 3-3-1 ケフィア乳酸菌の酸生成に及ぼす保温グルクザイムの  
TLC-画分の発酵糖化液添加の影響

Table 3-3-1 Effect of the addition of TLC-fractions of  
incubated gluczyme to fermented saccharified solutions  
on the acid formation of kefir-bacterium. <sup>a</sup>

Addition	Amino acid <sup>b</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ of medium)	Glucoamylase A treatment Acidity (%)	Gluczyme treatment Acidity (%)
Control	—	0.092 $\pm$ 0.003	0.230 $\pm$ 0.010
Incubated gluczyme	20.17 $\pm$ 4.91	0.205 $\pm$ 0.003	0.242 $\pm$ 0.011
F1	0.77 $\pm$ 0.23	0.090 $\pm$ 0.003	0.247 $\pm$ 0.005
F2	6.64 $\pm$ 0.87	0.077 $\pm$ 0.006	0.240 $\pm$ 0.010
F3	3.85 $\pm$ 0.56	0.080 $\pm$ 0.011	0.234 $\pm$ 0.009
F4	3.62 $\pm$ 1.01	0.084 $\pm$ 0.012	0.238 $\pm$ 0.007
F5	4.17 $\pm$ 0.95	0.174 $\pm$ 0.014	0.234 $\pm$ 0.019
F6	0.61 $\pm$ 0.24	0.081 $\pm$ 0.012	0.244 $\pm$ 0.001
F1-F5	—	0.203 $\pm$ 0.005	0.242 $\pm$ 0.032

<sup>a</sup>Acidity was measured after 96hr of fermentation at 30°C.

<sup>b</sup>The contents of amino acids were determined by the ninhydrin method of Moore and Stein (1954).

Each value is the mean  $\pm$  S.D.

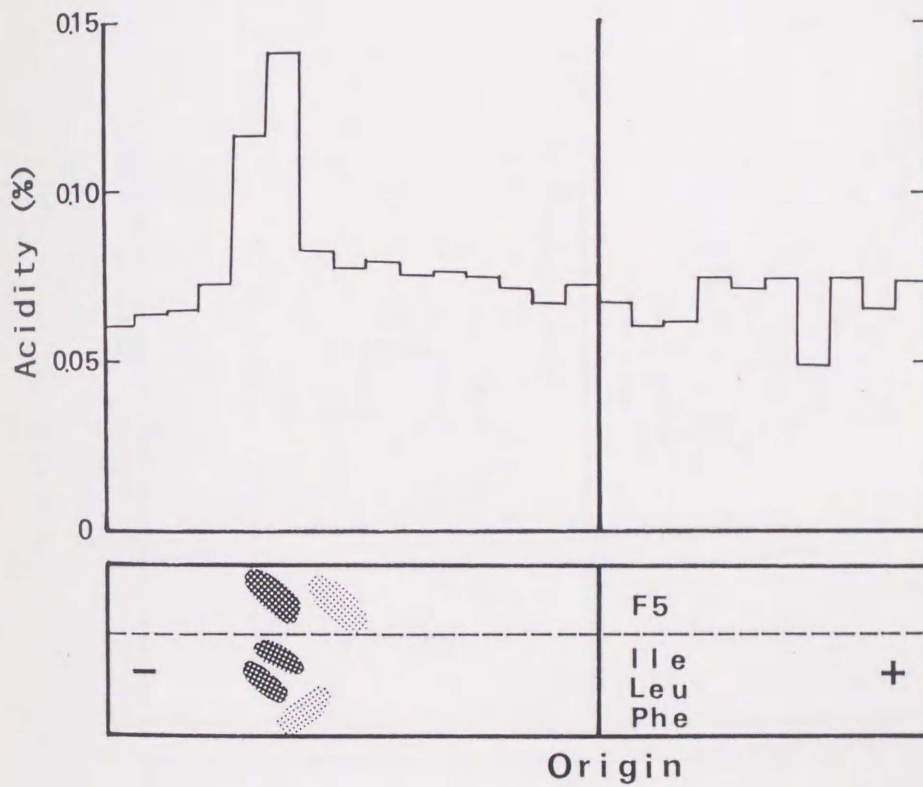


Fig.3-3-2 Paper electrophoresis-bioautography of the TLC-active fraction (F5) of incubated gluczyme. Conditions:0.52N Acetic acid,800V,90min. Acidity was measured after 96hr of fermentation at 30°C.

図 3-3-2 保温グルクザイム中の0.52N 酢酸によるTLC-活性画分の濾紙電気泳動-バイオオートグラフィー

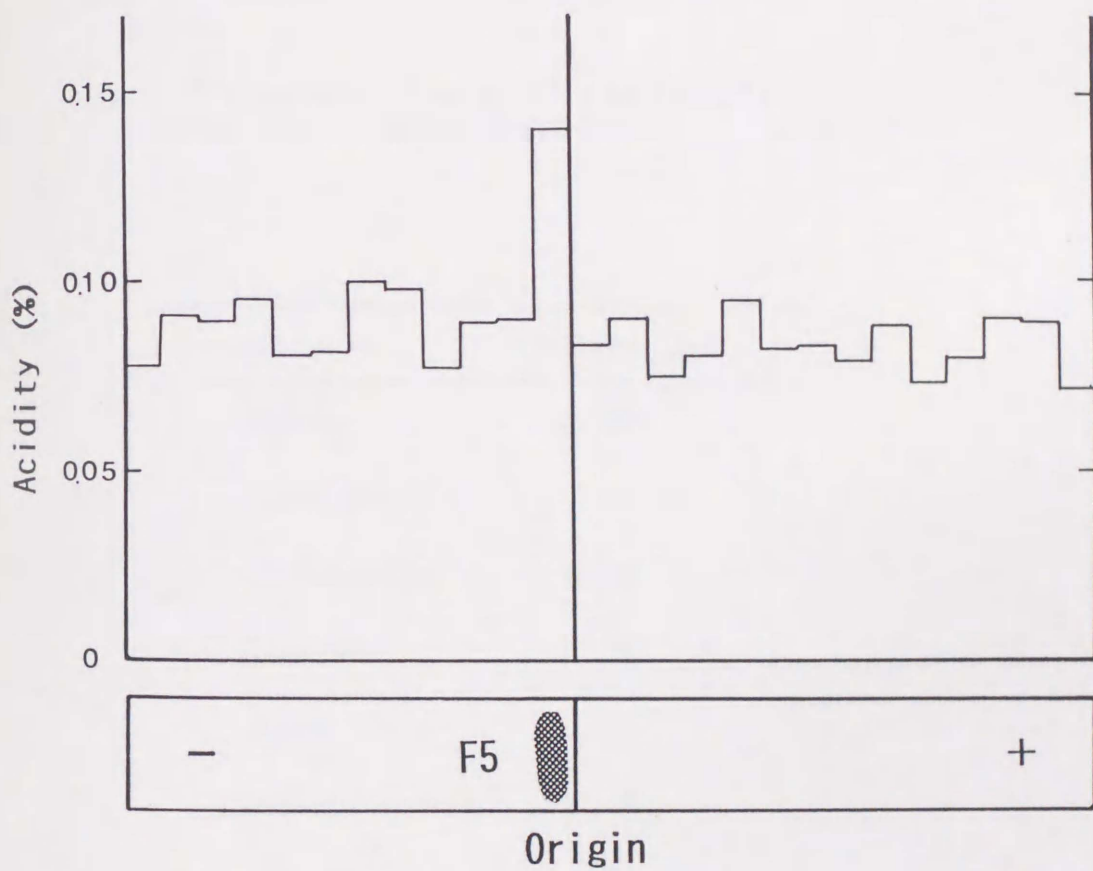


Fig. 3-3-3 Paper electrophoresis-bioautography of the TLC-active fraction (F5) of incubated gluczyme. Conditions: 0.02M Tris-HCl buffer, pH 8.2, 800V, 90min. Acidity was measured after 96hr of fermentation at 30°C.

図 3-3-2 保温グルクザイム中の0.02M トリスバッファーによる TLC-活性画分の濾紙電気泳動-バイオオートグラフィー



いても0.52Nの酢酸ではロイシンおよびイソロイシンの泳動位置付近の活性が高くなっていた。また、その活性画分のアミノ酸を分析したところTable 3-3-2に示すようにロイシン、イソロイシン、フェニルアラニンの3種のアミノ酸が主に含まれており、その他にチロシン、バリン、グルタミン酸などが若干含まれていた。

表 3-3-2 保温グルクザイムのTLC-活性画分中のアミノ酸分析

Table 3-3-2 Analysis of amino acids in TLC-active fraction (F5) of incubated gluczyme.

Amino acid	Contents ( $\mu\text{g}$ )
Leucine	55.09
Isoleucine	43.94
Phenylalanine	42.94
Tyrosine	5.16
Valine	3.81
Glutamic acid	1.69
Alanine	0.80
Serine	0.42
Glycine	0.37
Threonine	0.22

他方, *Leuconostoc*種の生育に対するアミノ酸要求性については, Garvie(1967, 1986)のバリン, グルタミン酸が必須でメチオニンがほとんどの*Leuconostoc*種に要求されるという報告がある。そこで, アミノ酸分析によりTLCの活性位置に含まれていると判明した主たるアミノ酸のロイシン, イソロイシン, フェニルアラニンにバリン, グルタミン酸を加え, それらの単独または混合の糖化液への添加効果について検討を試みた。Table 3-3-3にその添加効果を示すが, ケフィア乳酸菌, *L. mesenteroides* IAM 13004ともにイソロイシンを除き, アミノ酸単独の添加ではほとんど効果がみられなかった。また, 若干の酸生成・生育促進効果を示したイソロイシンの添加量を増加させても一定以上の酸度上昇はほとんど認められず, 0.1mg/mlの添加量であると酸生成が阻害される傾向が認められた。混合添加においては, 活性画分に含有量の多かったロイシン, イソロイシン, フェニルアラニンの3種については, 2種混合および3種混合添加で検討を行ったが, イソロイシン単独の添加の場合と大きく違わなかった。さらに, バリン, グルタミン酸を加え, 混合添加の効果について検討した。

混合添加において, ケフィア乳酸菌の場合には主としてイソロイシンとロイシン, バリンの添加によって, また, *L. mesenteroides* IAM 13004ではイソロイシンとバリンの添加で相加効果が認められ, 酸度が2倍程度上昇した。このように両菌に対し, 酸生成・生育促進作用を有するものはイソロイシンで, その作用をバリンやロイシンが強めることが判明した。酸生成度と生育度との間には比較的相関関係が認められ, 酸生成促進作用を有するものは, 生育促進作用も有していた。また, 本実験とほぼ同時期にBellengierら(1997)は使用した14株の*L. mesenteroides*すべてが, ロイシン, イソロイシン, バリン, グルタミンを要求することを報告した。これらのアミノ酸の要求性を検討した実験と保温グルクザイム中の酸生成・生育促進物質を検討した本実験とは条件が異なっているが, 両者とも有効なアミノ酸はグルタミン酸を除いて一致していた。このことは, グルコアミラーゼ A処理糖化液中に存在するアミノ酸量が微量で制限的になっており, アミノ酸の要求性を調べる条件に近似していたことが考えられる。*L. mesenteroides*がイソロイシンを要求することは, Bellengierら(1997)によって明らかにされたが, 本実験の成果はそれを支持

表 3-3-3 ケフィア乳酸菌または *L. mesenteroides* IAM 13004 の酸生成に及ぼす糖化液中へのアミノ酸添加の影響

Table 3-3-3 Effect of various amino acids on the acid formation by kefir-bacterium or by *L. mesenteroides* IAM 13004 in a saccharified solution. <sup>a</sup>

Amino acids	Amount of additives ( $\mu\text{g/ml}$ of medium)	Acidity (%)	
		Kefir-bacterium	<i>L. mesenteroides</i> IAM 13004
Control		0.065 $\pm$ 0.021	0.079 $\pm$ 0.013
L-Leucine (L)	5	0.075 $\pm$ 0.006	0.088 $\pm$ 0.008
	10	0.066 $\pm$ 0.016	0.090 $\pm$ 0.010
L-Isoleucine (I)	5	0.115 $\pm$ 0.010	0.116 $\pm$ 0.010
	10	0.122 $\pm$ 0.012	0.118 $\pm$ 0.009
L-Phenylalanine (F)	5	0.077 $\pm$ 0.013	0.091 $\pm$ 0.016
	10	0.075 $\pm$ 0.007	0.093 $\pm$ 0.007
L-Valine (V)	5	0.059 $\pm$ 0.019	0.089 $\pm$ 0.010
	10	0.062 $\pm$ 0.010	0.087 $\pm$ 0.011
L-Glutamic acid monosodium salt (E)	5	0.071 $\pm$ 0.006	0.093 $\pm$ 0.010
	10	0.070 $\pm$ 0.013	0.087 $\pm$ 0.007
L+I	each 5	0.119 $\pm$ 0.007	0.102 $\pm$ 0.022
L+F		0.070 $\pm$ 0.016	0.080 $\pm$ 0.012
I+F		0.104 $\pm$ 0.014	0.116 $\pm$ 0.009
I+V		0.113 $\pm$ 0.011	0.160 $\pm$ 0.023
L+V		0.066 $\pm$ 0.013	0.065 $\pm$ 0.014
L+I+F		0.119 $\pm$ 0.007	0.099 $\pm$ 0.016
L+I+V		0.177 $\pm$ 0.024	0.150 $\pm$ 0.016
L+I+F+V		0.193 $\pm$ 0.019	0.161 $\pm$ 0.022
L+I+F+E		0.120 $\pm$ 0.008	0.106 $\pm$ 0.013
L+I+V+E		0.176 $\pm$ 0.011	0.167 $\pm$ 0.022
L+F+V+E		0.058 $\pm$ 0.016	0.084 $\pm$ 0.008
I+F+V+E		0.096 $\pm$ 0.019	0.160 $\pm$ 0.011
L+I+F+V+E		0.186 $\pm$ 0.011	0.167 $\pm$ 0.012

<sup>a</sup>Acidity was measured after 96hr of fermentation at 30°C.  
Each value is the mean  $\pm$  S.D.



するとともにグルコアミラーゼ A 処理液の酸生成・生育促進作用を有する主たるアミノ酸であることが判明した。その他に、*L. mesenteroides*において要求性が比較的認められるメチオニン、トリプトファン、シスチンについての添加効果についても検討したが、いずれの乳酸菌においても単独効果は認められず、それらアミノ酸すべてを混合しても、イソロイシンを除くと他のアミノ酸と同様に酸生成促進効果はほとんど認められなかった。

*Leuconostoc*種において必須要求のグルタミン酸、あるいは要求度の高いメチオニンなどの添加効果が認められなかったことから、グルコアミラーゼ A 処理糖化液中にそれらアミノ酸が必要量を充足するだけ含まれていた可能性が高い。また、米粉糖化液を培地としたことにより、他の栄養成分も制限的になっており、*Leuconostoc*本来の代謝経路とは異なって代謝されていることも考えられる。*L. mesenteroides*は、MRS培地のような乳酸菌用の培地 (de Man et al. 1960) で生育させると、D型乳酸、酢酸、エタノールを代謝産物として生成するが、糖化液を乳酸発酵させた場合にはその他にリンゴ酸やコハク酸の生成を認める報告もある (Lee et al. 1992)。

他方、乳酸球菌にはペプチドに生育促進作用があるという報告もある (Smid et al. 1989)。保温グルクザイム中の活性画分のアミノ酸分析の結果、TLCでは通常上方には上昇しないセリンやグルタミン酸などが含まれていたことから (Table 3-3-2)、活性画分にはそれらを含むペプチドも含まれていたと考えられる。したがって、酵素自己消化物中の酸生成・生育促進物質がイソロイシンを含むペプチドである可能性も否定できない。いずれにしても、イソロイシンの糖化液培養中での代謝や酸生成との関係などについては今後の課題である。

## 引用文献

- Bellengier, P., Hemme, D., and Foucaud, C. : *J. Appl. Bacteriol.*, **77**, 54-60.  
(1994)
- Bellengier, P., Richard, J., and Foucaud, C. : *J. Dairy Res.*, **64**, 95-103. (1997)
- Cogan, T. M. : *J. Appl. Bacteriol.*, **63**, 551-558. (1987)
- Cogan, T. M., and Jordan, K. N. : *J. Dairy sci.*, **77**, 2704-2717. (1994)
- David, A. W., Poolman, B., Hemme, D., and Konings, W. N. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3350-3354. (1991)
- de Man, J. C., Rogosa, M., and Sharpe, M. E. : *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 130-135.  
(1960)
- Garvie, E. I. : *J. Gen. Microbiol.*, **48**, 439-447. (1967)
- Garvie, E. I. : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2* (Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G., Ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, 1071-1075. (1986)
- 東尾侃二, 吉岡八州男, 菊地俊彦 : *農化*, **51**, 203-208. (1977)
- 平林照美, 佐藤一精 : *家政誌*, **38**, 817-821. (1987)
- Lee, C. H., Min, K. C., Souane, M., Chung, M. J., Mathiasen, T. E., and Adler-Nissen, J. : *Food Biotechnol.*, **6**, 739-744. (1992)
- Loubiere, P., Salou, P., Leroy, M. J., Lindley, N. D., and Pareillex, A. : *J. Bacteriol.*, **174**, 5302-5308. (1992)
- Lucey, C. A., and Condon, S. : *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 1789-1796. (1986)
- Moore, S., and Stein, W. H. : *J. Biol. Chem.*, **211**, 907-913. (1954)
- 中嶋昭正 : *家政誌*, **47**, 663-670. (1996)
- Plihon, F., Taillandier, P., and Strehaiano, P. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 117-122. (1995)
- Smid, E. J., Plapp, R., and Konings, W. N. : *J. Bacteriol.*, **171**, 6135-6140. (1989)



## 第4章 酵母による糖化液の発酵

### 第1節 ケフィアからの酵母の単離と同定

#### 1. 序論

第2章 第2節で糖化液を発酵する乳酸菌をケフィアより単離し、その単離菌によりフルーティーな味が感じられる比較的良好な乳酸発酵液が調製できた。

他方、*Saccharomyces*属に代表される酵母では日本酒やワインなどの発酵飲料が作られている。また、酵母は天然のエッセンスとして利用できる程よい香りを発するものも多数存在し、そのような揮発性香气成分の分離同定が試みられてきている (Pastore et al. 1994, Albertazzi et al. 1994, Fabre et al. 1995)。しかし、酵母による芳香性を重視し、アルコール度の低い発酵飲料に関する検討例は見当たらない。第2章 第2節 Table 2-2-1に示したようにケフィア中には酵母も多数存在し、ケフィア独特の芳香性は酵母による影響も大きい。そこで、そのような香味に優れた発酵飲料を調製するためにケフィアから芳香性の良好な酵母の単離を試みることにした。また、多数種存在する酵母のなかで、ケフィアからの単離酵母がどのような酵母に属するのか、分類・同定試験も試みることにした。

#### 2. 実験方法

##### (1) 糖化液に生育可能な酵母の選択

酵母選択用培地としてYM培地 (グルコース 10g, ペプトン 5g, 酵母エキス 3g, 麦芽エキス 3g/蒸留水 1000ml) を調製し、使用した以外は、第2章 第2節 2. 実験方法の乳酸菌の選択方法に従った。

##### (2) 糖化液に生育可能な酵母の単離

培養培地としてYM培地を用い、それ以外は、第2章 第2節 2. 実験方法の乳酸菌の単離方法に従った。

##### (3) 単離酵母の保存培養

培養培地としてYM培地を用い、それ以外は、第2章 第2節 2. 実験方法の乳酸菌の保存培養法に従った。



#### (4) ケフィアから単離した酵母（以下、ケフィア酵母）の形態学的性質および培養的性質

酵母の分類・同定試験法は、飯塚と後藤（1980）、長谷川ら（1984）、Barnettら（1990）の各方法に基づいて以下の試験を行った。

1) YM培地での生育：（1）で調製した加熱滅菌したYM培地10mℓに、ケフィア酵母を無菌箱の中で1白金耳植菌して30℃で3日間振盪培養し、顕微鏡観察により生育状態および栄養細胞の形態を観察した。

2) 子のう胞子の観察：人参片培地（飯塚と後藤 1980）、改良Gorodkova培地（Lindegren and Lindegren 1943, グルコース 1g, ペプトン 10g, 塩化ナトリウム 5g, 寒天 20g/蒸留水 1000mℓ）、Kleyn培地（Kleyn 1954, グルコース 0.62g, ペプトン 2.5g, 塩化ナトリウム 0.62g, 酢酸ナトリウム 5g, 寒天20g/蒸留水 1000mℓ）およびMcClary培地（McClary et al. 1959, グルコース 0.1g, 塩化カリウム 0.18g, 酵母エキス 0.25g, 酢酸ナトリウム 0.82g, 寒天 1.5g/蒸留水 1000mℓ）の4種の子のう胞子形成培地を用いた。人参片培地は人参を楔形に切り、大きめの試験管に入れ、そこに少量の蒸留水を加えて紙栓をした。他の3種の培地は沸騰湯浴中で寒天が溶けるまで10分間程度加熱し、McClary培地のみ試験管に10mℓずつ分注した。その後すべての調製培地をオートクレーブを用いて121℃で15分間加熱滅菌した。Gorodkova培地およびKleyn培地は寒天が固まらないうちに無菌箱の中で滅菌済みプラスチックシャーレに25~30mℓ分注し、寒天培地を調製した。各々の調製培地に斜面培地培養のケフィア酵母を白金耳を用いて無菌箱の中で適宜植菌し、30℃で胞子形成が認められるまで顕微鏡で観察しながら1週間程度培養した。

3) スライド培養：PDB寒天培地（Potato Dextrose Broth (DIFCO) 2.4%, 寒天2%）を調製し、121℃で10分間加熱滅菌した。無菌箱の中で寒天が固まらないうちに、乾熱滅菌しておいたシャーレ中のスライドガラスにその調製液を薄く固化させ、これにケフィア酵母を新鮮なコロニーから画線状に接種し、カバーガラスをかぶせて、30℃で2日間培養し顕微鏡観察によりその生育状態を観察した。

#### (5) 生理学的性質

1) 発酵性：Wickerhamの方法（飯塚と後藤 1980）に従い、Durham発酵管法で

以下のような試験を行い、各種糖に対する発酵性を観察した。試験管に蒸留水を9ml分注し、Durham管を入れ、紙栓をし、オートクレーブ中で121℃で10分間加熱滅菌した。Table 4-1-1の(A)に示したYNB(Yeast Nitrogen Base (DIFCO))培地を10倍濃度に調製し、各種炭素源を1%添加後、その1mlを上述の滅菌済み試験管に無菌濾過して加え、10mlとした。そこに、新鮮なケフィア酵母を無菌箱の中で1白金耳ずつ植菌し、30℃で培養しながら発酵管中の気泡の蓄積があるかどうかを観察することにより発酵性の有無を評価した。

2) 糖の資化性：試験管に蒸留水を9ml分注し、紙栓をし、121℃で10分間加熱滅菌した。YNB(Yeast Nitrogen Base (DIFCO))培地を10倍濃度になるように調製し、炭素源として各種糖類を1%添加し、その1mlを上述の滅菌済み試験管に無菌濾過して加え、10mlとした。これにYM培地で2日間培養し、その後生理食塩水で洗浄したケフィア酵母を無菌箱の中で約 $10^5$ 個/mlとなるように接種し、30℃で3週間まで振盪培養を行い、濁度を測定することで資化性の有無を観察した。

3) 硝酸塩の資化性：上述のように調製した滅菌済み蒸留水9mlに、Table 4-1-1の(B)に示した硝酸塩培地( $\text{KNO}_3$  0.1%, YCB(Yeast Carbon Base (DIFCO)))を10倍濃度になるように調製したものを1ml無菌濾過して加え、10mlとした。そこに、糖の資化性と同様に、洗浄したケフィア酵母を無菌箱の中で接種し、振盪培養を行い、資化性の有無を観察した。

4) ビタミン要求性：滅菌済み蒸留水9mlに、Table 4-1-1の(C)に示したビタミン欠乏培地(Vitamin Free Yeast Base (DIFCO))を10倍濃度になるように調製したものを1ml無菌濾過して加え、10mlとした。そこに、糖の資化性と同様に洗浄したケフィア酵母を無菌箱の中で接種し、培養し、その生育を観察した。

### 3. 実験結果および考察

#### (1) ケフィアからの酵母の単離

ケフィア中から酵母は5株ほど単離したが、そのなかで糖化液培養中最も芳香性の良好なものを選択した。単離酵母をグルクザイム処理糖化液で培養すると所々に菌の凝集がみられた。24時間培養後の炭酸ガスの発生はパン酵母や清酒酵母に比較すると少ないが、ケフィア酵母の生育状態は比較的良好であった。



表 4-1-1 Wickerhamの合成培地 (長谷川 1984)

Table 4-1-1 Media composition of Wickerham.

	(A)	(B)	(C)
Trace elements			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	500 $\mu$ g	500 $\mu$ g	500 $\mu$ g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	40	40	40
KI	100	100	100
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	200	200	200
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	400	400	400
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	200	200	200
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	400	400	400
Vitamins			
Biotin	2 $\mu$ g	2 $\mu$ g	—
Pantothenic acid-Ca	400	400	—
Folic acid	2	2	—
Inositol	2000	2000	—
Niacin	400	400	—
p-Aminobenzoic acid	200	200	—
Pyridoxine-HCl	400	400	—
Riboflavin	200	200	—
Thiamine-HCl	400	400	—
Amino acids			
L-Histidine-HCl	10mg	1.0mg	10mg
DL-Methionine	20	2.0	20
DL-Tryptophan	20	2.0	20
Minerals			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0g	1.0g	1.0g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	0.5	0.5
NaCl	0.1	0.1	0.1
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1	0.1	0.1
Carbon source			
Glucose	—	10.0g	10.0g
Nitrogen source			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.0g	—	5.0g
Asparagine	—	—	—
Agar	—	—	—
Distilled water	1000ml	1000ml	1000ml



グルコアミラーゼ A 処理糖化液で培養すると、グルクザイム処理の場合のように菌の凝集はみられず、菌の形態がやや伸長、縮小しており、数的にも減少していた。24時間培養後においても、炭酸ガスの発生はグルクザイム処理より少なかった。また、パン酵母、清酒酵母においてもグルコアミラーゼ A 処理糖化液を用いた場合には炭酸ガスの発生はかなり減少した。酵母の場合も乳酸菌の場合と同様、糖化液の種類により生育性が異なった。

### (2) ケフィア酵母の形態学的特質

ケフィア酵母のYM培地30℃、3日間培養後の栄養細胞の形状は球状ないし楕円形で、多極出芽による増殖が観察された (Fig. 4-1-1(A))。清酒酵母や発酵パン用の *Saccharomyces cerevisiae* と比較すると、菌体がいくぶん小さいと感じられた (Fig. 4-1-1(B), (C))。また、スライド培養においては偽菌糸の形成が確認された (Fig. 4-1-2)。胞子形成用培地では、1子の中に1~4個の腎臓形胞子の形成が確認され (Fig. 4-1-3)、特に McClary 培地で胞子の形成率が良好であった。McClary 培地は、培地組成が最もシンプルであり、他の胞子形成用培地では多くの胞子が認められなかったため、ケフィア酵母は微量な栄養源で生育できる可能性が高いと考えられた。

### (3) ケフィア酵母の生理学的性質

ケフィア酵母の生理学的特徴をまとめて Table 4-1-2 に示した。これらの生理学的性質のなかで、乳糖およびラフィノースの資化性、発酵性を有すること、マルトースの資化性がないこと、硝酸塩を資化しないこと、生育にビタミンを要求すること、および形態的性質として腎臓形の子のう胞子を形成することなどの特徴により、本菌を *Kluyveromyces marxianus* に属すると同定した (飯塚と後藤 1980, 長谷川 1984, Barnett et al. 1990)。そこで、以下本菌を *Kluyveromyces marxianus* HU-1 と呼ぶことにした。*Kluyveromyces marxianus* の主な特徴を Table 4-1-3 に示した。*Kluyveromyces* 属の *K. lactis* や *K. fragilis* は乳糖を発酵できるため乳酒の製造などに使用され、牛乳やチーズなどからも単離されている (山口 1995, 石川 1995)。そして、*K. marxianus* や *K. lactis*, *K. fragilis* などの *Kluyveromyces* 属はケフィアからも単離されている (Angulo et al. 1993, Kwak et al. 1996)。高温性の菌であることから、45℃、乳糖存在下でエタノールを生産でき (Simpson et al. 1995)、その高

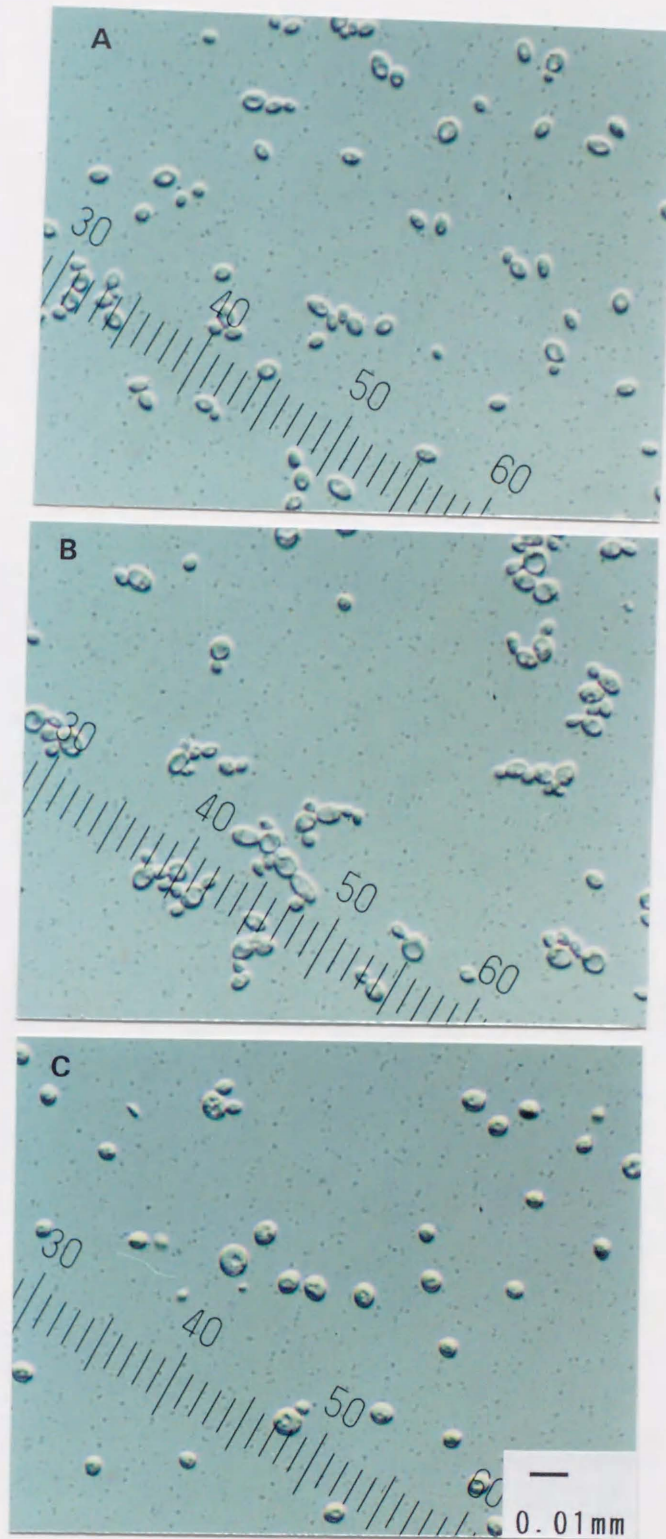


Fig.4-1-1 The nutritive cell of yeasts cultured in YM shaking media at 30°C for 3days.  
Inoculated yeasts: (A)Kefir-yeast, (B)*S. cerevisiae* IAM 4512, (C)*S. cerevisiae* IAM 4178.

図 4-1-1 YM培地30℃で3日間培養した酵母の栄養細胞



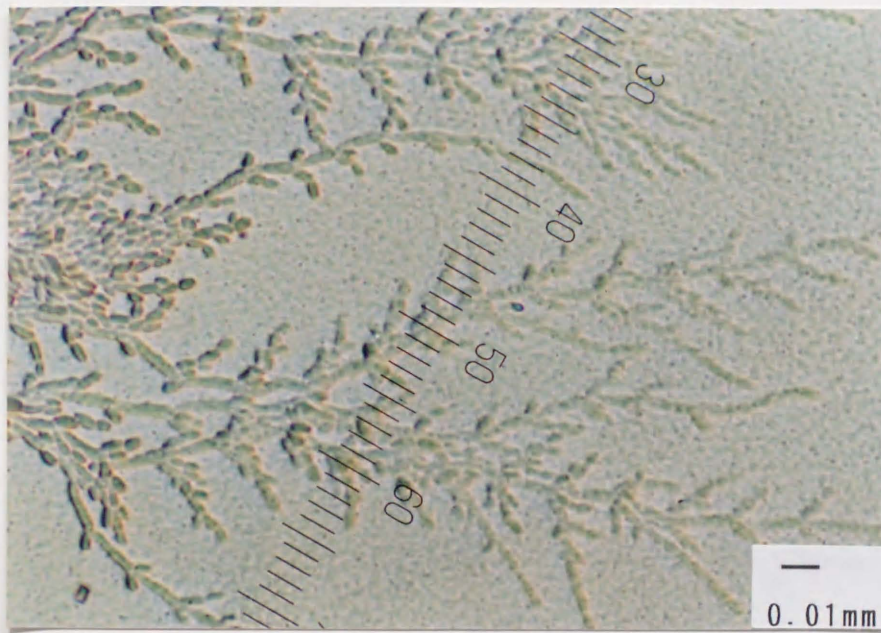


Fig.4-1-2 The pseudomycelium of kefir-yeast cultured in PDB agar medium at 30°C for 2days.

図 4-1-2 PDB寒天培地30℃，2日間培養でみられたケフィア酵母の偽菌糸



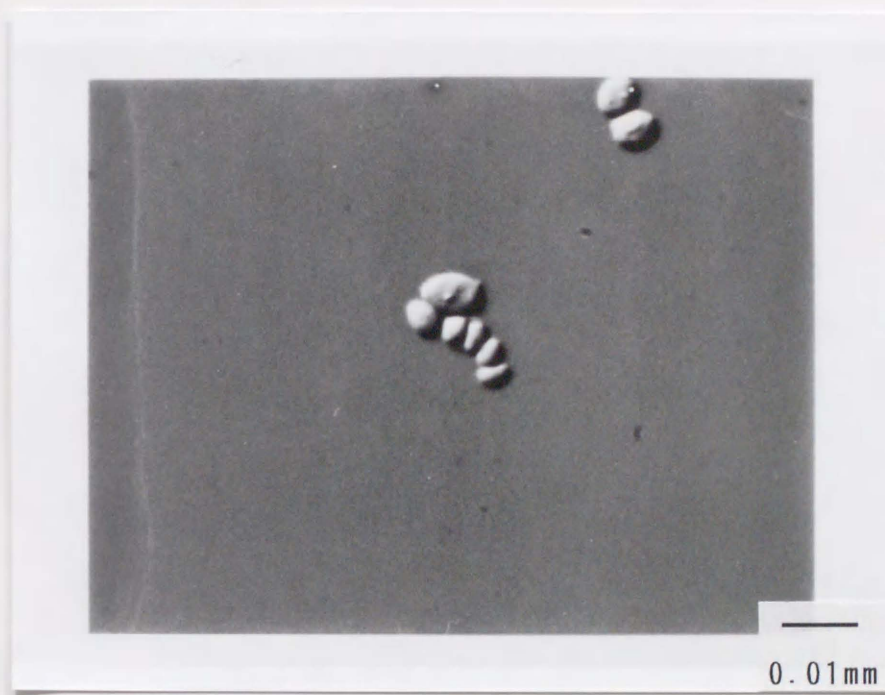


Fig.4-1-3 The ascospore of kefir-yeast cultured in McClary medium at 30°C for 6days.

図 4-1-3 McClary培地30℃, 6日間培養でみられたケフィア酵母の子のう胞子

表 4-1-2 ケフィア酵母の特徴

Table 4-1-2 Characteristics of kefir-yeast.

Pseudomycelium	+	Assimilation: Arbutin	+
Ascospore	+	Sucrose	+
Growth of vitamin-free medium	-	Maltose	-
Growth at 37°C	+	Cellobiose	+
Fermentation: Glucose	+	Trehalose	-
Galactose	+	Lactose	+
Sucrose	+	Raffinose	+
Lactose	+	Soluble starch	-
Raffinose	+	D-Xylose	+
Maltose	-	D-Arabinose	+
Trehalose	-	L-Rhamnose	-
Inulin	+	Erythritol	-
Assimilation: Glucose	+	Citrate	-
Galactose	+	Assimilation: KNO <sub>3</sub>	-
Sorbose	-	L-Lysine	+
		Cadaverine	+

Abbreviations: (+)Positive, (-)Negative.

表 4-1-3 *Kluyveromyces marxianus*の特徴

Table 4-1-3 Characteristics of *Kluyveromyces marxianus*.  
(Barnett et al. 1990)

---

White, cream to pink, butyrous colonies
Vegetative reproduction by budding
Filaments, none, or simple to elaborate pseudohyphae
Evanescent asci, containing 1 to 4 smooth, oval, round or reniform ascospores, conjugation, none, or cell-cell
Fermentation (+): D-glucose, sucrose, lactose, raffinose, (-): maltose, melibiose, cellobiose, melezitose, starch, D-xylose
Growth (+): D-glucose, D-galactose, D-xylose, sucrose, raffinose, inulin, lactose D-mannitol, L-lysine, cadaverine, thiamine, 25~40°C (-): L-sorbose, L-rhamnose, maltose, melibiose, starch, erythritol, nitrate,
Starch formation (-)
Acetic acid production (-)
Urea hydrolysis (-)
Diazonium blue B reaction (-)

---

温性を利用した廃水処理への応用も試みられている（鈴木ら 1991）。また、その酵母のもつ糖分解酵素、イヌリナーゼやキシラーゼなどについても検討されてきており（Ongen-Baysal and Sukan 1996）、応用範囲が広がっている。*K. marxianus* HU-1により、芳香性および風味の良好な発酵糖化液が調製できれば、新たな利用価値を付加することができると考えられる。



## 第2節 ケフィアからの単離酵母を中心とする糖化液の発酵

### 1. 序論

ケフィアから単離した芳香性の良好な酵母は*K. marxianus*に属すると同定したが、その*K. marxianus*をはじめとする数種の*Kluyveromyces*属は乳糖を発酵できるため、食品中では乳酒やケフィアなどに使用されている。しかし、*Saccharomyces*属が主として利用される米の糖化発酵に*Kluyveromyces*属を使用し、発酵飲料の調製を試みた例は見当たらず、*K. marxianus* IIIU-1の糖化液培地での挙動についてはほとんど不明である。そこで清酒用および発酵パン用酵母の*S. cerevisiae*と比較しながら*K. marxianus* IIIU-1の糖化液中での生育や発酵性について検討することとした。また、*K. marxianus* IIIU-1を糖化液で培養した場合、ケフィア乳酸菌と同様に処理酵素の違いで発酵性が異なり、栄養要求性などもケフィア乳酸菌に類似している可能性が考えられる。そこで、乳酸菌の酸生成や生育促進に有効であった酵母エキスや保温グルクザイムを添加してそれらの生育度に及ぼす影響などについても検討し、酵母の生育に及ぼす諸要因についての検討を試みることにした。

### 2. 実験方法

#### (1) 使用酵素および酵母

糖化用酵素として、第1章 第1節のグルコアミラーゼ A、グルクザイム、 $\alpha$ -アミラーゼ ADを使用した。酵母として、第4章 第1節で単離したケフィア酵母 (*K. marxianus* IIIU-1)、清酒用酵母の*Saccharomyces cerevisiae* IAM 4512および発酵パン用酵母の*Saccharomyces cerevisiae* IAM 4178を用いた。

#### (2) 糖化液の調製および培養

糖化液の調製および培養は、酵母を接種した以外はすべて第2章 第3節 2. 実験方法に従って行った。また、必要に応じて、酵母エキス、第3章 第2節で用いた保温グルクザイムおよび各種アミノ酸を添加した。アミノ酸としては、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリン、L-セリン、L-グリシン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-トレオニン、L-リジン（和光純薬工業製）を培地につき50 $\mu$ g/mlを単独または混合して添加した。

### (3) 生育度および残存糖, アミノ酸量の測定

各種酵母接種培養液の生育度測定は, 第2章 第3節 2. 実験方法に従って行い, 残存糖はSomogyi-Nelson法 (福井 1990) により, 第1章 第1節 2. 実験方法に従い, アミノ酸はニンヒドリン法 (Moore and Stein 1954) により, 第3章 第2節 2. 実験方法に従ってそれぞれ測定した。

### (4) 生菌数およびエタノール生成量

培養中の生菌数については, プレートカウント法により算出し, エタノール生成量についてはエタノール測定用キット (Boehringer Mannheim) により以下のように定量した。測定試料を100~1000倍に希釈した。キットに含まれているpH 9.0のリン酸バッファー 3mlで, NAD 4mg, アルデヒド脱水素酵素 0.8Uの成分を含む錠剤を溶解した (A液)。A液に試料を0.1ml添加し, 混和3分後に340nmの吸光度を測定した ( $E_1$ )。アルコール脱水素酵素 7000Uを0.05ml加え, 混和し, 10分後に340nmの吸光度を測定した ( $E_2$ )。測定中はパラフィルムで蓋をして行い, ブランクとして蒸留水で同様に行った。

$\Delta E = (E_2 - E_1)$  試料 - ( $E_2 - E_1$ ) ブランクとし, 次の式でエタノール量を求めた。

$$\begin{aligned} \text{エタノール (g/l)} &= \frac{V \times MV}{\epsilon \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta E \times \text{希釈率} \\ &= \frac{3.15 \times 46.07}{6.3 \times 1 \times 0.1 \times 2 \times 1000} \times \Delta E \times \text{希釈率} \\ &= 0.1152 \times \Delta E \times \text{希釈率} \end{aligned}$$

V: 反応液量, MV: 分子量, d: 光路長,  $\epsilon$ : 吸光係数, v: 試料量



### 3. 実験結果および考察

#### (1) 糊化度の違いの生育度に及ぼす影響

糖化液を発酵させる際の最良の糖化および生育条件を検討するために、糊化のための加熱時間を5分間と20分間として調製した糖化液に酵母を接種し、生育度を比較検討した結果をFig. 4-2-1, 4-2-2に示す。加熱糊化時間および酵母の種類にかかわらず、グルクザイム処理糖化液の方がグルコアミラーゼ A 処理液よりも生育度は高い値を示した。また、グルクザイム処理糖化液培養の場合、糊化のための加熱時間が5分間の方が20分間よりも生育度は良好となった。3種の酵母の生育度を比較した場合、グルコアミラーゼ A 処理糖化液の場合には、3種の酵母による生育度の差はほとんど認められず、炭酸ガスの発生も少なく、いずれの酵母においても芳香性はあまり強くはなかった。他方、グルクザイム処理糖化液では、糊化のための加熱時間にかかわらずいずれの酵母も良好に生育しているが、*K. marxianus* IIIU-1の生育度が若干低めであり、炭酸ガスの発生も少なかった。しかし、フルーティーで甘い感じのする芳香性は、*K. marxianus* IIIU-1が最も強く感じられた。第1章 第2節で糊化度の違いによる還元糖生成量は糊化のための加熱時間が5分間のものが還元糖生成量も高く、生育も良好なので以後の実験は5分間加熱糊化液を用いることとした。

#### (2) 酵母エキス、保温グルクザイムおよび各種アミノ酸の添加効果

酵母を用いても処理酵素の違いで乳酸菌の場合と同様に生育度が異なり、乳酸菌の場合に生育や酸生成促進効果の認められた酵母エキスおよび保温グルクザイムをグルコアミラーゼ A 処理およびグルクザイム処理糖化液に添加して、96時間培養後の生育度を測定した。その結果をFig. 4-2-3に示す。酵母エキス、保温グルクザイムを添加することでその添加量に応じ生育度は上昇し、その上昇率はグルコアミラーゼ A 処理糖化液においてより顕著となった。保温グルクザイムの添加では、*K. marxianus* IIIU-1, *S. cerevisiae* IAM 4512のいずれも同様な添加効果がみられたが、酵母エキス添加の場合、その効果は*S. cerevisiae* IAM 4512の方が大であった。

さらに、グルコアミラーゼ A 処理液にイソロイシン、バリンをはじめとする各種アミノ酸を添加し、それら添加物の酵母の生育度に及ぼす影響を検討した。その結果をFig. 4-2-4に示した。*K. marxianus* IIIU-1にはリジンに、*S.*



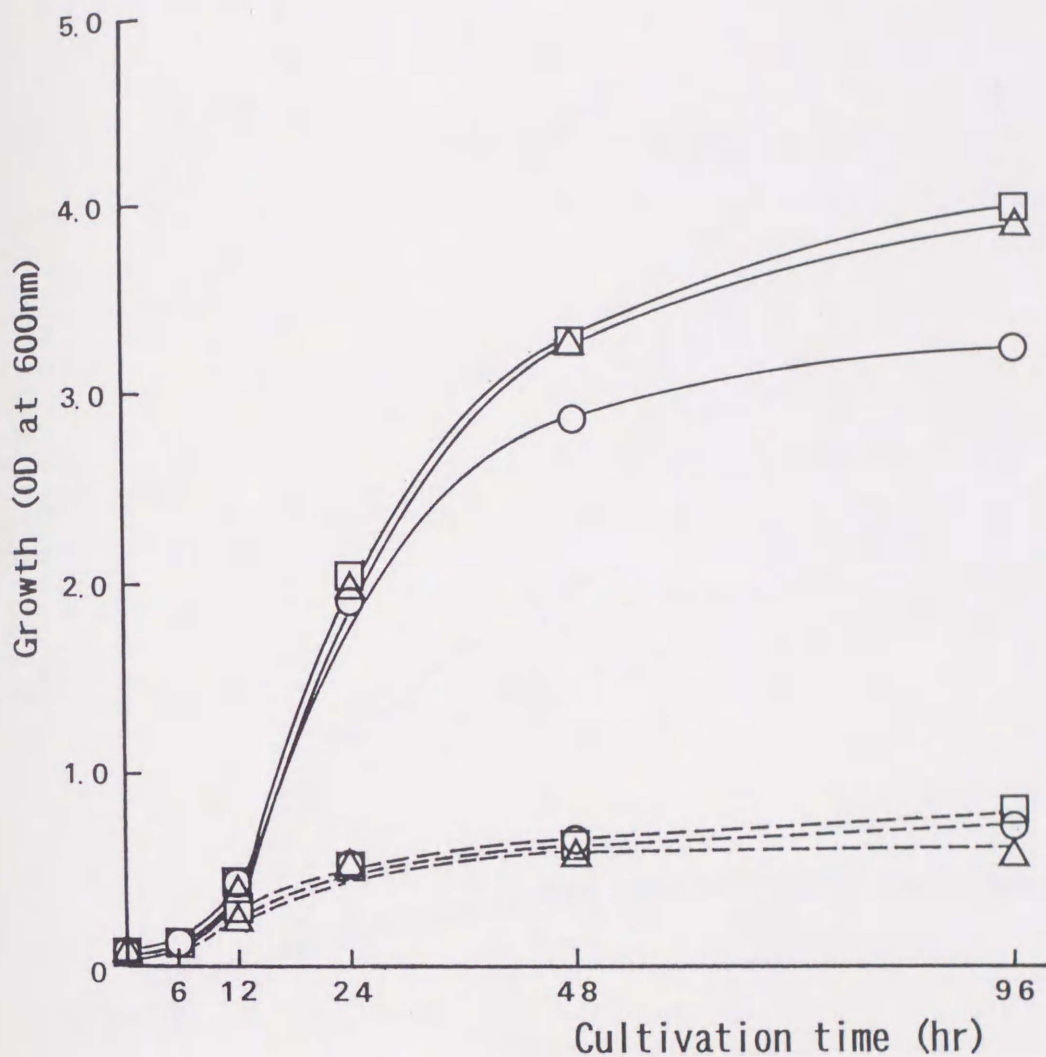


Fig.4-2-1 Effect of saccharified solutions on the growth of yeasts. - Heating time for gelatinization : 5min - Enzymes used for saccharification: (---)Glucoamylase A, (—)Gluczyme. Inoculated yeasts: (○)*K. marxianus* HU-1, (△)*S. cerevisiae* IAM 4512, (□)*S. cerevisiae* IAM 4178.

図 4-2-1 酵母の生育に及ぼす糖化液の影響  
-糊化のための加熱時間が5分間の場合-

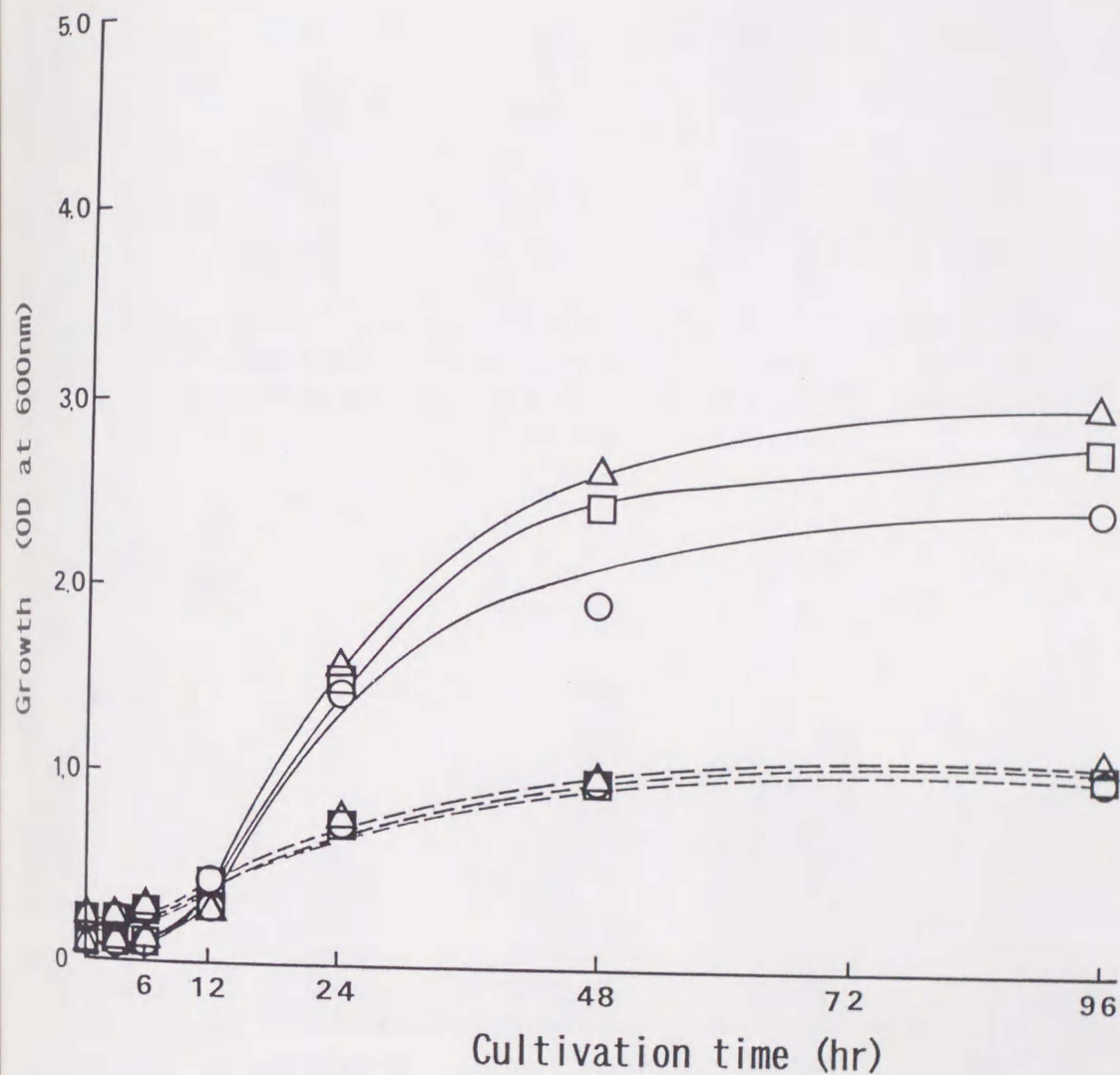


Fig. 4-2-2 Effect of saccharified solutions on the growth of yeasts. - Heating time for gelatinization : 20min -  
 Enzymes used for saccharification: (---) Glucoamylase A, (—) Gluczyme. Inoculated yeasts: (O) *K. marxianus* HU-1, (Δ) *S. cerevisiae* IAM 4512, (□) *S. cerevisiae* IAM 4178.

図 4-2-2 酵母の生育に及ぼす糖化液の影響  
 -糊化のための加熱時間が20分間の場合-

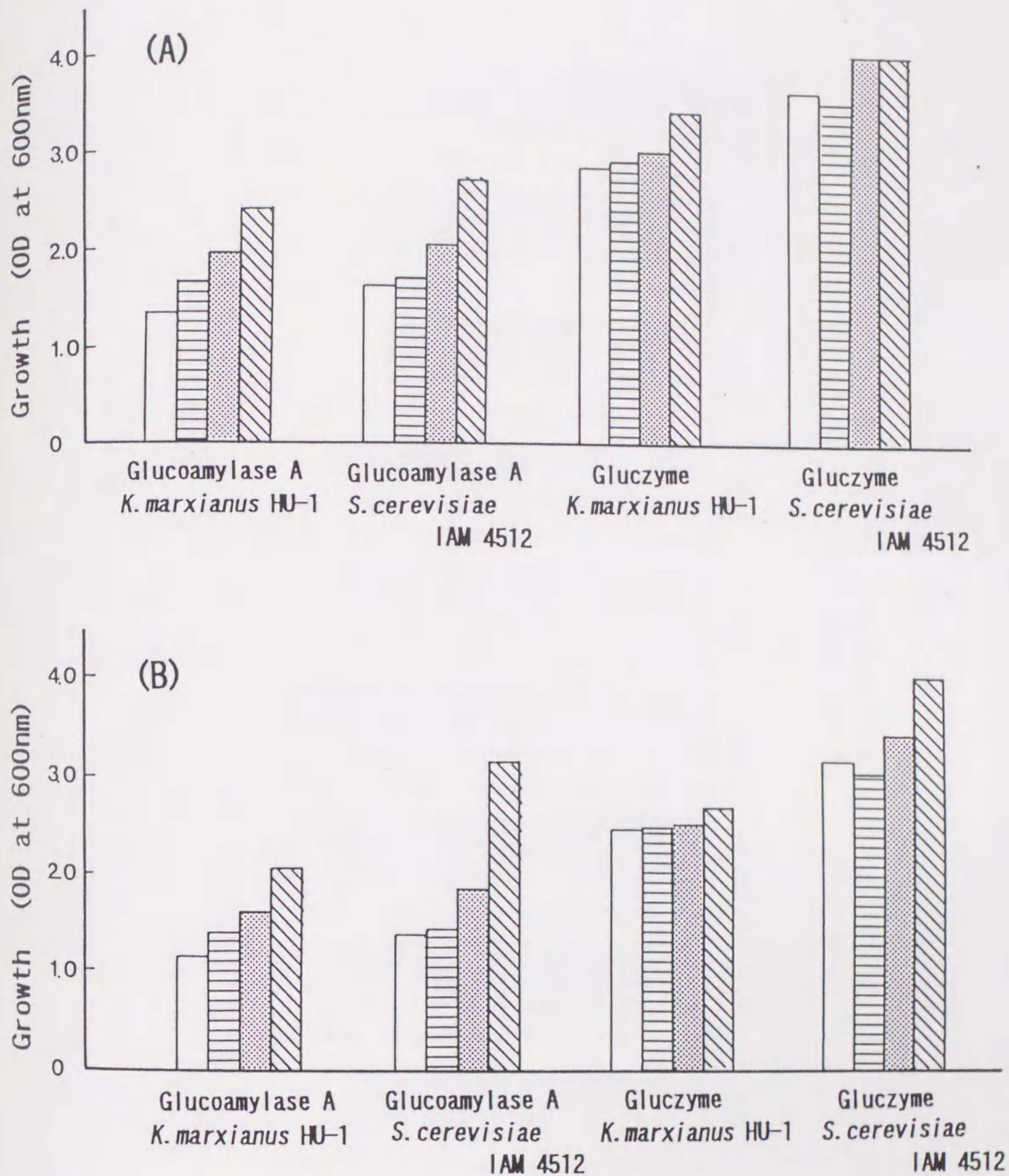


Fig.4-2-3 Effect of the additions of (A) yeast extract or (B) incubated gluczyme on the growth of yeasts. Additions of yeast extract(mg/mℓ of medium): (□)None, (▨)0.01, (▩)0.1, (▧)0.25. Additions of incubated gluczyme(μℓ/mℓ of medium): (□)None, (▨)1.0, (▩)10, (▧)50.

図 4-2-3 酵母エキスまたは保温グルクザム添加の酵母の生育に及ぼす影響



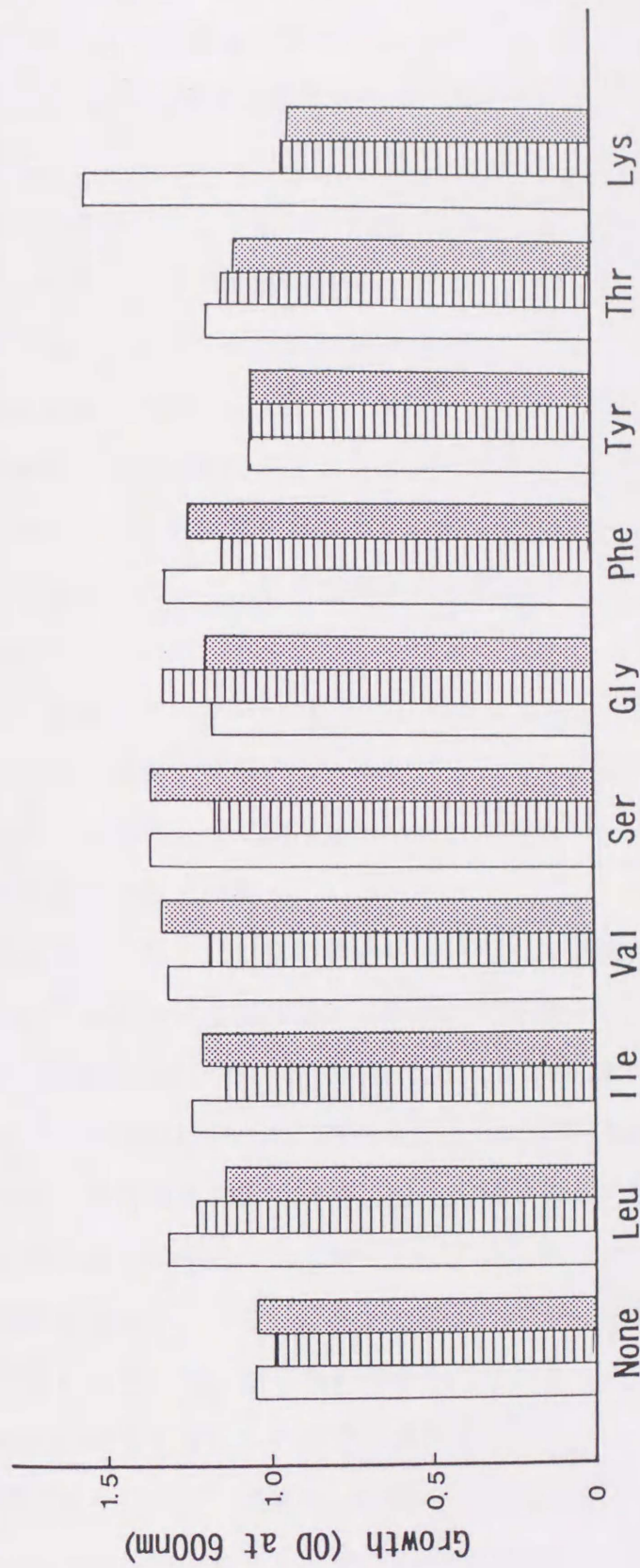


Fig.4-2-4 Effect of the additions of amino acids to glucoamylase A treated saccharified solution on the growth of yeasts.  
 Inoculated yeasts: (□) *K. marxianus* HU-1, (▨) *S. cerevisiae* IAM 4512, (▩) *S. cerevisiae* IAM 4178.

図 4-2-4 アミノ酸添加の酵母の生育に及ぼす影響

*cerevisiae* IAM 4512にはグリシンに、*S. cerevisiae* IAM 4178においてはセリンに単独添加のなかでは比較的促進効果が認められた。また、リジン添加においては、*S. cerevisiae*接種の場合はいずれも若干の生育阻害が認められ、その香りも変化していた。どちらかといえば、アミノ酸単独の要求性は、*S. cerevisiae*同士よりも、むしろ*K. marxianus* IIIU-1と*S. cerevisiae* IAM 4178の方が類似していた。いずれの酵母の場合もアミノ酸を混合して添加したものが生育度は高く、またそれら添加物の添加量の増加にともない生育度は上昇していく傾向が認められた。また、グルコアミラーゼ A 処理糖化液とグルクザイム処理糖化液で糖化液中のアミノ酸量を定量したところ、糖化液中のアミノ酸量もグルクザイム処理糖化液の方が多かった。糖化酵素グルクザイム中のプロテアーゼ活性によって、酵素自体が自己消化されるとともに米粉中のタンパク質も分解されており、その生成量は生育の良好であった5分加熱糊化糖化液の方が多く生成していた (Fig. 4-2-5)。したがって、酵母の場合にはある特定のアミノ酸が生育促進に働いているというよりもむしろ、アミノ酸の相乗効果的な影響が生育性に大きく関与していると考えられた。

### (3) 残存糖およびアミノ酸量

発酵糖化液を飲料として利用する場合にある程度の甘味が必要とされると考えられるため、培養における残存糖の経時的变化を測定した。その結果をFig. 4-2-6に示す。生育度が低かったグルコアミラーゼ A 処理糖化液においては、糖の消費が最大30%程度にとどまっていた。*S. cerevisiae*接種グルクザイム処理糖化液では、96時間培養後には糖化液中の糖はほぼ消費されており、発酵糖化液の甘さもほとんど感じられなかった。一方、*K. marxianus* IIIU-1の場合には、96時間培養後においても残存糖量が調製糖化液の半量程度残っており、他の2種の酵母と比較すると糖の消費は少ないといえる。残存アミノ酸量についてもその経時的变化を測定した。その結果をFig. 4-2-7に示すが、アミノ酸は酵素の種類にかかわらず、最初の24時間の培養でほとんど利用されており、アミノ酸の消費率についてもグルクザイム処理糖化液では*K. marxianus* IIIU-1の方が若干少なめであった。糖とアミノ酸の消費パターンを比較すると、アミノ酸が最初に急激に消費され、その後徐々に糖の消費が進む傾向にあり、グルコアミラーゼ A 処理糖化液のように培養初期の段階で供給されるアミノ酸量

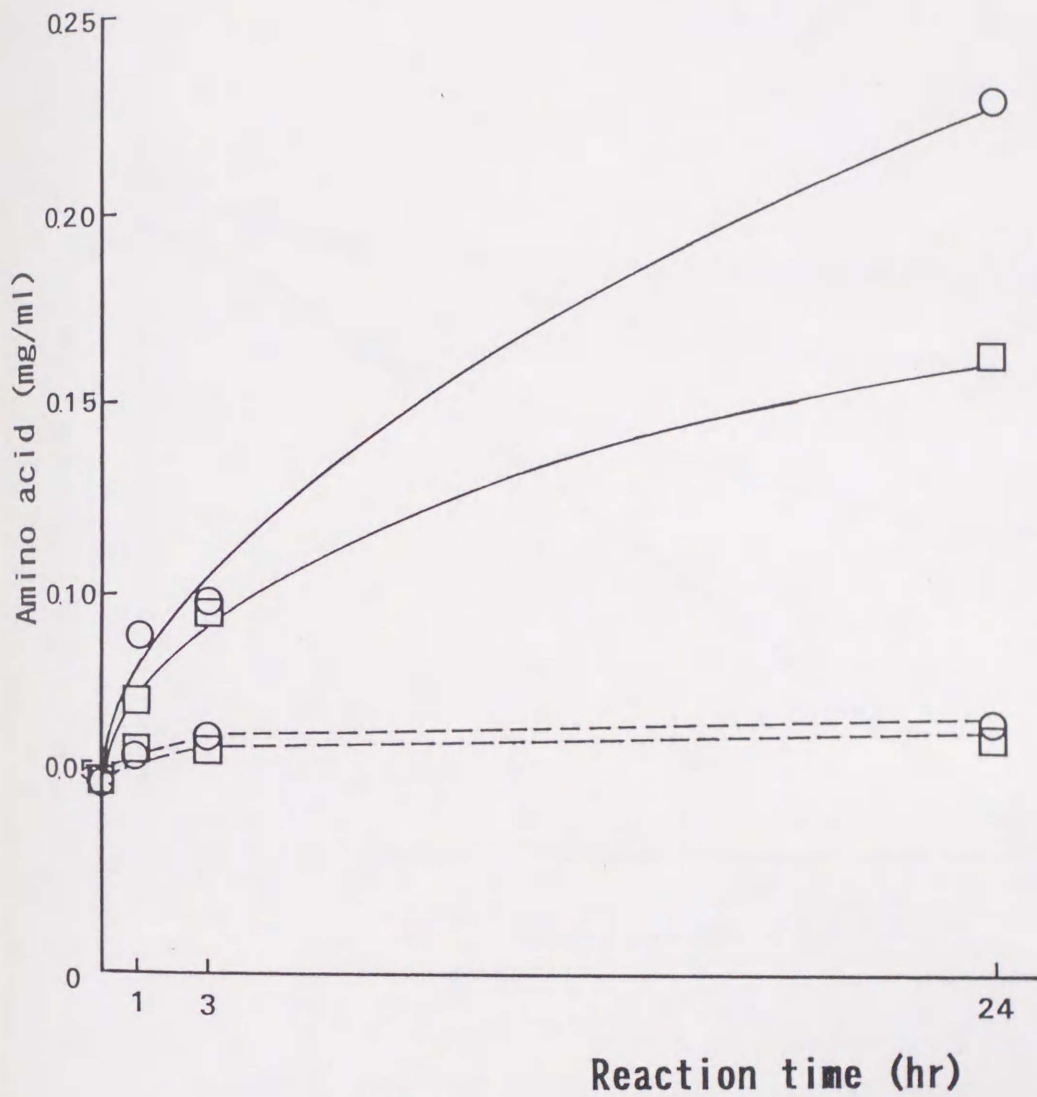


Fig.4-2-5 Effect of enzymes for saccharification and heating time for gelatinization on amino acid formation. Enzymes used for saccharification: (---)Glucoamylase A, (—)Gluczyme. Heating time for gelatinization: (○)5min, (□)20min.

図 4-2-5 糖化酵素と糊化のための加熱時間がアミノ酸生成量に及ぼす影響



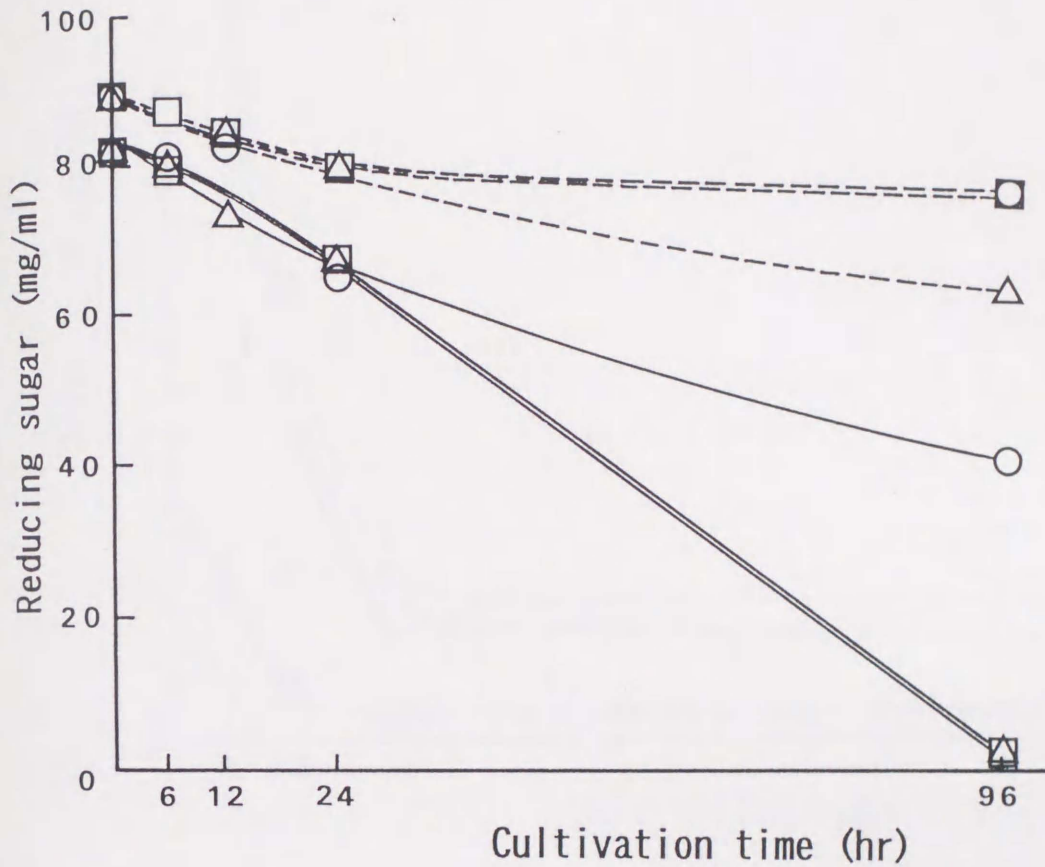


Fig.4-2-6 Effect of saccharified solutions and yeasts on expenditure of reducing sugar.  
 Enzymes used for saccharification: (---)Glucoamylase A, (—)Gluczyme. Inoculated yeasts: (○)*K. marxianus* HU-1, (△)*S. cerevisiae* IAM 4512, (□)*S. cerevisiae* IAM 4178.

図 4-2-6 還元糖の消費に及ぼす糖化液および酵母の影響

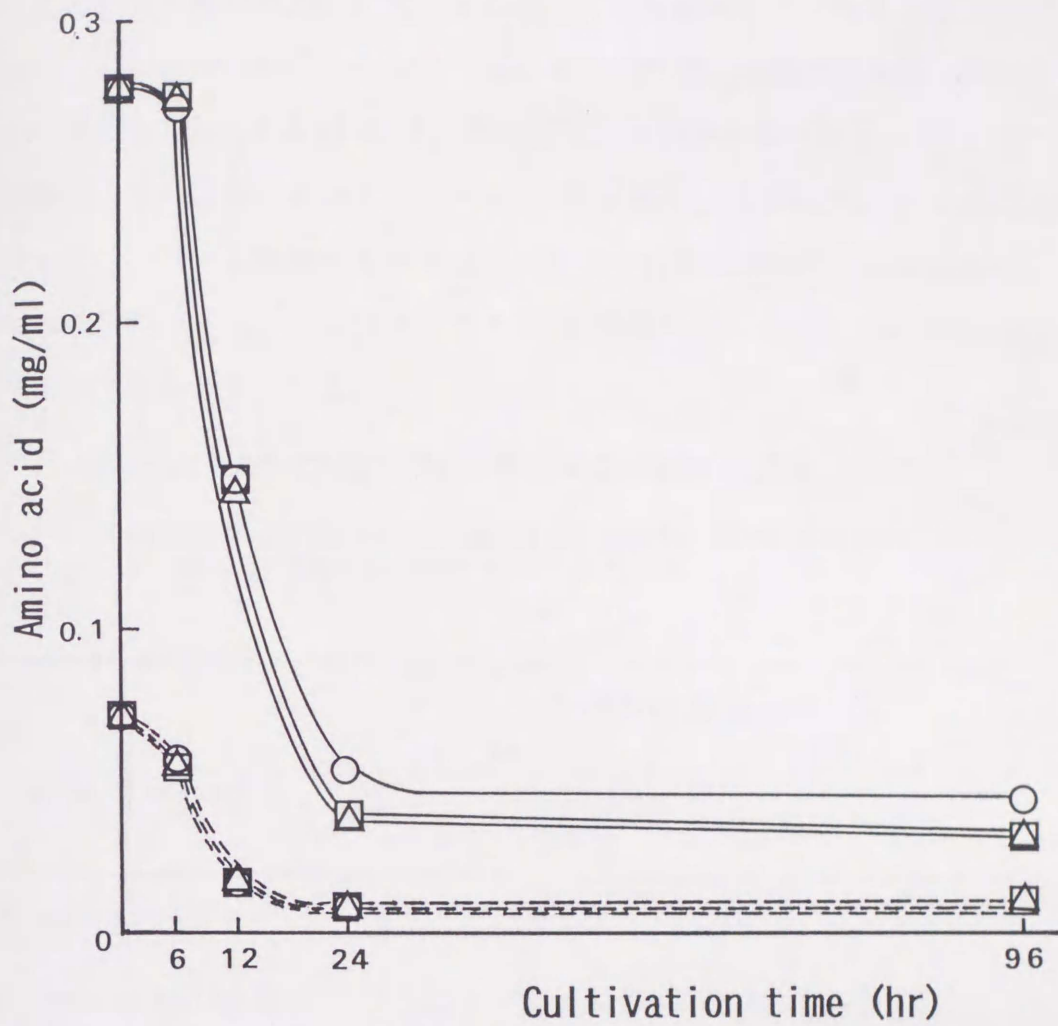


Fig.4-2-7 Effect of saccharified solutions and yeasts on expenditure of amino acid.

Enzymes used for saccharification: (---)Glucoamylase A, (—)Gluczyme. Inoculated yeasts: (○)*K. marxianus* HU-1, (△)*S. cerevisiae* IAM 4512, (□)*S. cerevisiae* IAM 4178.

図 4-2-7 アミノ酸の消費に及ぼす糖化液および酵母の影響

が少ないと糖が消費できず、生育度も上昇し得ないのではないかと考えられる。

#### (4) 生菌数およびエタノール生成量

ケフィア酵母の糖の消費が少ないことから、糖化液培地では生育が困難な状況にあることが推測される。そこで、24または96時間培養後の生菌数を測定した。その結果をTable 4-2-1に示す。両処理で生菌数を比較すると、グルクザイム処理糖化液の方がグルコアミラーゼ A処理糖化液よりも約1.5~4倍高い値となった。ケフィア酵母の生菌数はグルクザイム処理では*S. cerevisiae* IAM 4512に次いで多く、グルコアミラーゼ A処理においては*S. cerevisiae*よりも2倍程度高い値を示した。

表 4-2-1 30℃で24または96時間培養後の酵母の生菌数

Table 4-2-1 Viable cell counts of yeasts after cultivation at 30C for 24hr or 96hr. <sup>a</sup>

Inoculated yeasts	Cultivation time (hr)			
	24		96	
	(Ga) <sup>b</sup>	(Gz) <sup>b</sup>	(Ga) <sup>b</sup>	(Gz) <sup>b</sup>
<i>K. marxianus</i> HU-1	3.5±0.8	5.1±1.6	2.1±0.8	5.9±1.4
<i>S. cerevisiae</i> IAM 4512	1.3±0.3	5.4±1.5	0.7±0.3	6.9±0.8
<i>S. cerevisiae</i> IAM 4178	1.7±0.7	4.4±1.3	0.8±0.7	4.1±1.3

<sup>a</sup>Values are cfu (×10<sup>7</sup>/ml) ± S.D.

<sup>b</sup>The column, (Ga) shows the treatment with glucoamylase A and (Gz) shows the treatment with gluczyme for the preparation of saccharified solution.

発酵産物であるエタノール生成量についても、24時間および96時間培養後で比較し、その結果をFig. 4-2-8に示した。いずれの酵母を用いても、グルクザイム処理糖化液の方がエタノール生成量が多く、また、グルクザイム処理、96時間培養後の*K. marxianus* HU-1のエタノール生成量は*S. cerevisiae*の半量程度であった。グルコアミラーゼ A処理糖化液を用いると、いずれの酵母を使用して調製しても糖がかなり残存し、アルコール生成も少ない発酵飲料が調製できるが、発酵が良好に進んでいないため、風味に乏しかった。



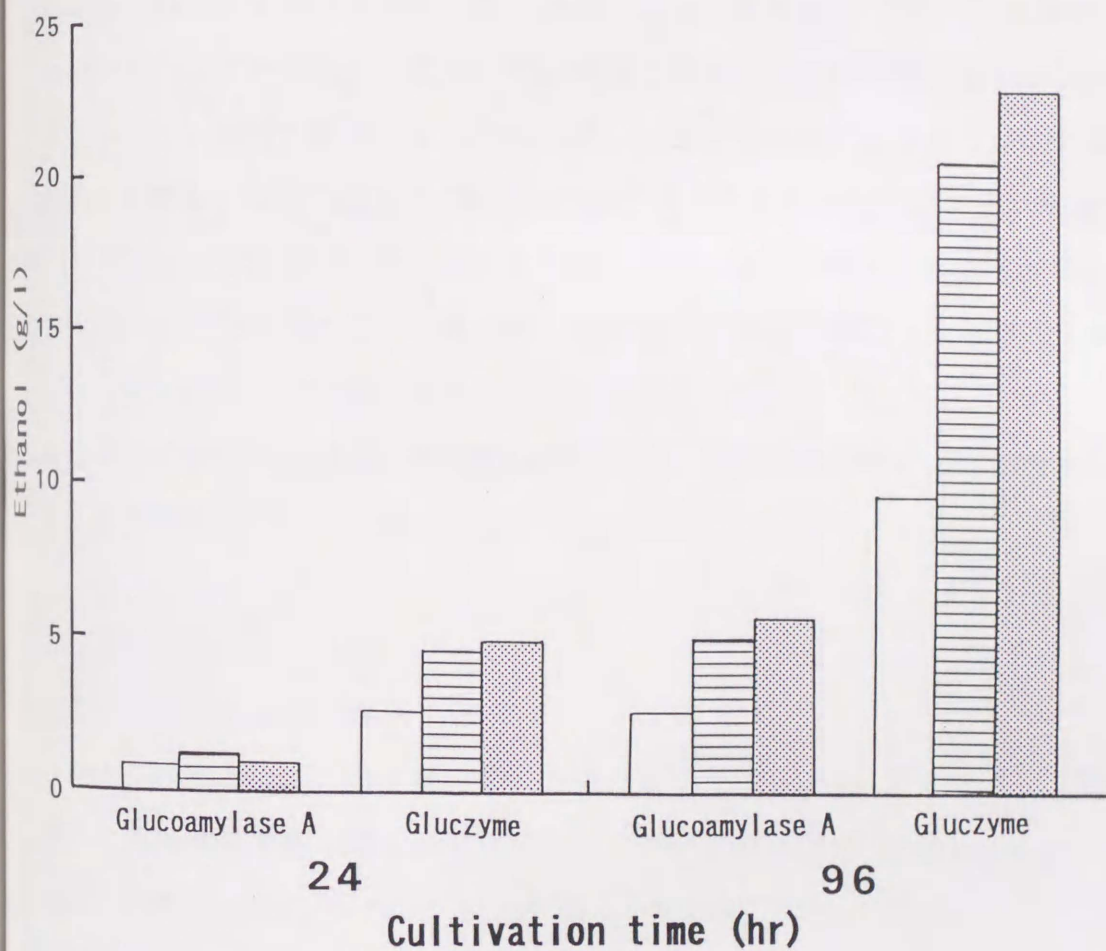


Fig.4-2-8 Effect of saccharified solutions and yeasts on production of ethanol.  
 Inoculated yeasts: (□) *K. marxianus* HU-1, (▨) *S. cerevisiae* IAM 4512, (▩) *S. cerevisiae* IAM 4178.

図 4-2-8 エタノール生成量に及ぼす糖化液および酵母の影響

### 第3節 酵母の発酵性などに及ぼす培養法の影響

#### 1. 序論

酵母の場合にも乳酸菌と同様にグルコアミラーゼ A 処理糖化液よりもグルクザイム処理糖化液の方が生育度や芳香性、発酵性が良好であるという結果を得た。グルコアミラーゼ A 処理糖化液を用いた場合、アミノ酸などの栄養成分が欠如するため酵母はほとんど生育せず、いずれの酵母で発酵させても甘味がかなり残り、エタノール生成量も少なかった。グルコアミラーゼ A 処理糖化液を用いることで甘く、アルコール含量の少ない発酵液が得られたが風味に乏しかった。他方、酵母による芳香性は、培地に含まれているアミノ酸の種類や量が影響し（石川 1995）、良好な香りを得ようとするならばアミノ酸量がある程度培地に必要であると考えられる。また、*K. marxianus*の発酵において、培養法により生成する香りが異なり、その香りは静置培養よりも振盪培養の方が良好であるという報告がある（Fabre et al. 1995）。そこで、芳香性、発酵性の良好なグルクザイム処理糖化液を用い、培養法を変え、生育度および発酵性を検討することとした。

#### 2. 実験方法

##### (1) 使用酵素および酵母

糖化用酵素として、第1章 第1節のグルクザイムと $\alpha$ -アミラーゼ ADを使用し、酵母は第4章 第1節で単離したケフィア酵母 (*K. marxianus* HU-1) および清酒用酵母 *S. cerevisiae* IAM 4512を用いた。

##### (2) 糖化液および糖化液培地の調製

糖化液の調製は糊化のための加熱時間を5分間とした以外は、第2章 第3節 2. 実験方法に従った。なお、培養は静置培養と振盪培養の2種類で行った。

##### (3) 還元糖量および生育度の測定

各酵母接種糖化液培養中の残存糖量をSomogyi-Nelson法（福井 1990）により、第1章 第1節 2. 実験方法に従って測定した。酵母の糖化液での生育は第2章 第3節 2. 実験方法に従って測定した。

#### (4) 生菌数およびエタノール生成量の測定

各酵母接種糖化液の24, 48, 72および96時間培養後の生菌数をプレートカウント法により算出し, 24および96時間培養後のエタノール生成量を測定用キット(Boehringer Mannheim)により, 第4章 第2節 2. 実験方法に従って測定した。

### 3. 実験結果および考察

#### (1) 酵母の生育度

グルコアミラーゼ A 処理糖化液とグルクザイム処理糖化液培養の清酒用の *S. cerevisiae* IAM 4512 と発酵パン用の *S. cerevisiae* IAM 4178 の挙動は同様であったため, 振盪培養においては *S. cerevisiae* IAM 4512 を用いることとし, *K. marxianus* HU-1 とその生育度を比較することとした。静置培養と振盪培養で両酵母の生育度を測定した結果を Fig. 4-3-1 に示す。

振盪培養を行うと, いずれの酵母ともに静置培養よりも高い生育度を示したが, 静置培養とは逆に *K. marxianus* HU-1 の方がよく生育した。また, 通気培養では培養約 9 時間後から急激に増殖を開始し, *K. marxianus* HU-1 の方が, *S. cerevisiae* IAM 4512 より良好な生育度を示した。通気の影響は *S. cerevisiae* IAM 4512 よりも *K. marxianus* HU-1 の生育に対してより顕著であった。

#### (2) 残存糖の変化

培養後の残存糖量を知るために振盪培養においても培養24および96時間後の残存糖量を測定した。その結果を Fig. 4-3-2 に示す。培養24時間後では培養法, 接種酵母にかかわらず, 残存糖量は多く, 調製糖化液の60%以上残存していた。*K. marxianus* HU-1 の場合は, 静置, 振盪培養ともに培養96時間後においても残存糖が調製糖化液の半量程度存在し, 甘味が感じられるとともに発酵後の風味はフルーティーさが比較的強く感じられた。一方, *S. cerevisiae* IAM 4512 は培養法にかかわらず, 96時間後には糖化液中の糖はほぼ消費されており, 発酵糖化液の甘さもほとんど感じられなかった。

#### (3) 生菌数およびエタノール生成量

*K. marxianus* HU-1 は *S. cerevisiae* IAM 4512 に比較し, 静置培養では糖の消費が少なく, 生育度も若干低めであったが, 振盪培養においては生育度は高



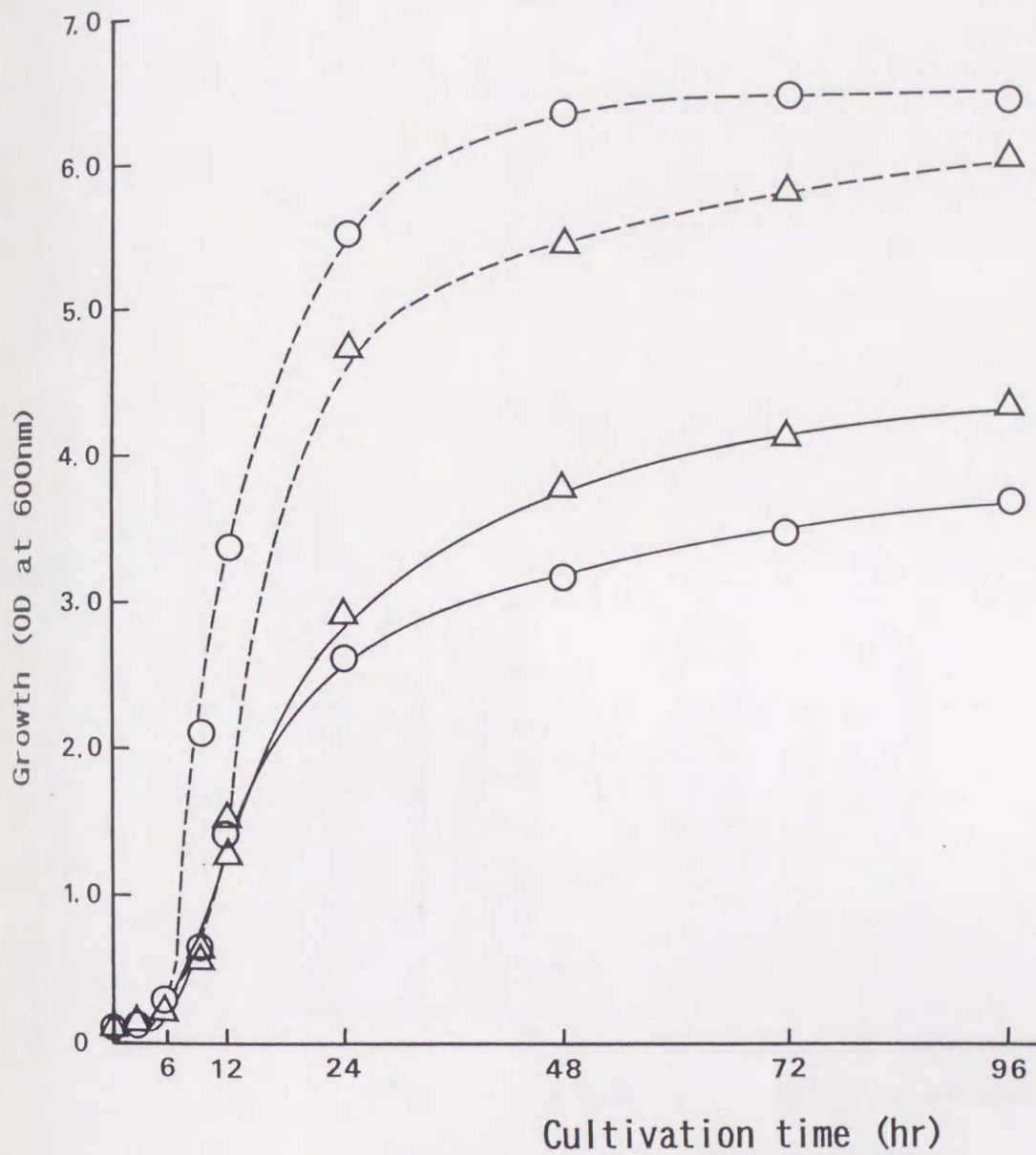


Fig. 4-3-1 Effect of culture conditions on the growth of yeasts.  
 Culture conditions: (—) Static, (---) Shaking. Inoculated yeasts: (○) *K. marxianus* HU-1, (□) *S. cerevisiae* IAM 4512.

図 4-3-1 酵母の生育に及ぼす培養法の影響

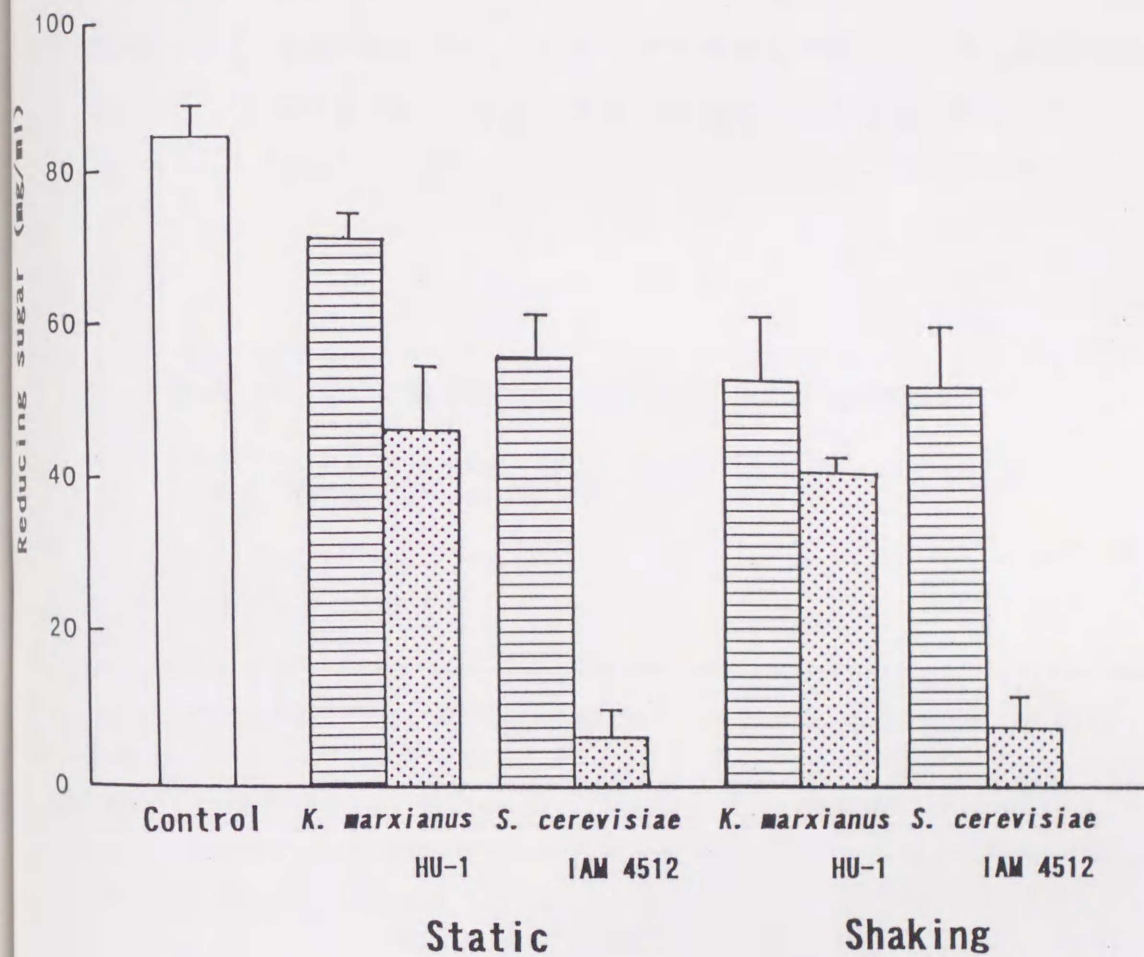


Fig.4-3-2 Effect of culture conditions and yeasts on expenditure of reducing sugar after 24hr or 96hr cultivation.

Cultivation time: (□)0hr, (▨)24hr, (▩)96hr.

Control is the culture medium of saccharified solution without inoculation of yeasts.

図 4-3-2 24または96時間培養後の還元糖の消費に及ぼす培養法および酵母の影響

いにもかかわらず，糖の消費量は少なかった。この振盪培養における *K. marxianus* HU-1の生育度と糖の消費の矛盾点を検討するために，まず，培養24時間以降経時的に生菌数を測定し，菌の生存状況を調べた。その結果をTable 4-3-1に示す。値に多少バラツキはみられるが，*K. marxianus* HU-1は培養96時間目にはいずれの培養法においても生菌数は減少しており，特に振盪培養の場合，培養48時間をピークに顕著に減少した。一方，*S. cerevisiae* IAM 4512は，静置培養では*K. marxianus* HU-1よりも生菌数は多く存在しており，振盪培養の場合，*K. marxianus* HU-1とは逆に培養96時間後の生菌数が最も多くなっていた。

表 4-3-1 30℃における24から96時間培養後の酵母の生菌数

Table 4-3-1 Viable cell counts of yeasts after cultivation for 24hr to 96hr at 30°C. <sup>a</sup>

Inoculated yeasts	<i>K. marxianus</i> HU-1		<i>S. cerevisiae</i> IAM 4512	
	Static	Shaking	Static	Shaking
Cultivation time(hr)				
24	2.83±0.75	10.88±0.76	4.27±1.27	5.09±1.08
48	3.01±0.53	15.48±4.14	6.42±2.42	4.00±1.52
72	3.15±0.89	6.77±0.61	3.92±0.36	7.79±0.38
96	2.21±0.13	3.60±0.51	4.45±0.66	11.68±3.23

<sup>a</sup>Values are cfu ( $\times 10^7$ )/ml  $\pm$  S.D.



発酵産物であるエタノール生成量の測定結果をFig. 4-3-3に示した。*K. marxianus* HU-1の静置培養, 96時間後のエタノール生成量は約1%, 振盪培養においては培養時間にかかわらず, 0.2%以下とわずかであった。一方, *S. cerevisiae* IAM 4512の場合, 培養法による差はそれほど大きくなく, 96時間培養後には2%前後と*K. marxianus* HU-1の静置培養の場合の2倍程度の生成量が認められた。*K. lactis*の場合も *S. cerevisiae*と同様に通気培養により生育度が増すとともに, エタノールの生成が認められている (Gonzales et al. 1996)。また, Fig. 4-3-2に示したように*K. marxianus* HU-1の場合には, 残存糖量が培養96時間後にも相当量存在しているため, まだ増殖可能と推測されるが, 生菌数は減少しており (Table 4-3-1), 恐らく糖以外の必須成分の不足などにより, それ以上糖が利用できなくなっている可能性が高いと考えられる。なお, 糖化液中のアミノ酸は培養初期の段階でほとんど利用し尽くされており (Fig. 4-2-7), 両酵母ともにアミノ酸量の少ない培地では生育度が低いという結果が得られている。そこで, 糖化液に酵母エキスを添加して検討したところ, 生育度は静置, 振盪いずれの培養でも高くなった (Fig. 4-3-4)。また, 酵母エキス添加で培養初期の *S. cerevisiae* IAM 4512は生育速度は速くなる傾向が認められたが, *K. marxianus* HU-1の場合は緩やかになり, 酵母エキスからの成分の利用効率が両者の酵母でかなり異なっていると考えられる。酵母エキス添加で *K. marxianus* HU-1も96時間後の振盪培養において, *S. cerevisiae* IAM 4512と同様に糖をかなり消費しており, 糖以外の成分の欠如が生育度や残存糖量に関係していると考えられる。しかしながら, 静置培養の場合には糖の消費に酵母エキスの添加効果は認められなかった (Table 4-3-2)。

振盪培養における挙動および酵母エキス添加効果から判断すると, *S. cerevisiae* IAM 4512の場合, 生育度に比して振盪培養の生菌数が少なく, 酵母エキス添加でその増殖は速くなったことから, 糖化液では栄養分が不足し, 十分な増殖をしていない若い菌体であったので, 96時間まで増殖を続けていたと考えられる。それに対して, *K. marxianus* HU-1は, TCA回路でのエネルギー獲得などのようなより効率的なグルコース代謝が可能で, グルコースを *S. cerevisiae* IAM 4512のように消費せずに増殖できるのではないかと推定されるが, この点についての検討は今後の課題である。いずれにしても, *K.*

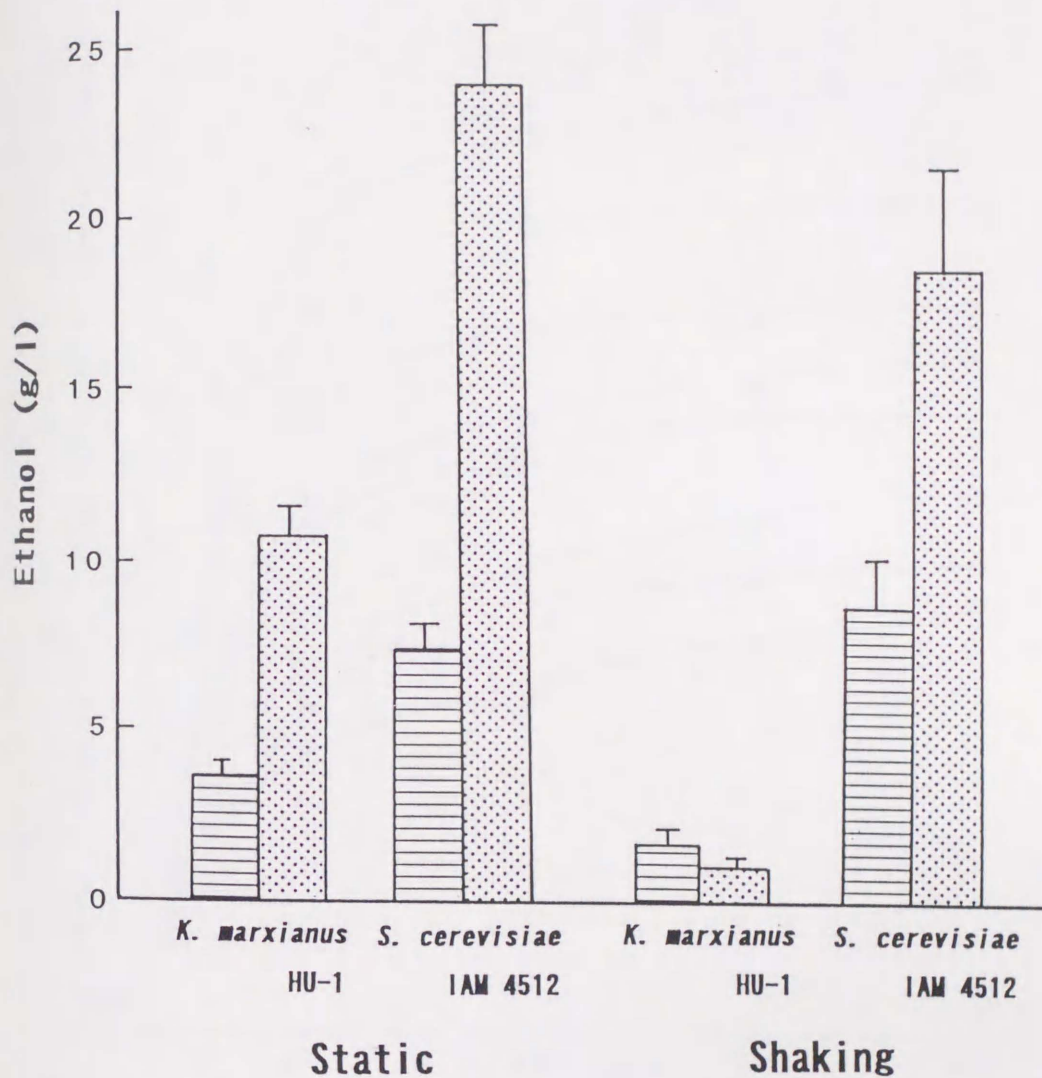


Fig.4-3-3 Effect of culture conditions and yeasts on production of ethanol after 24hr or 96hr cultivation. Cultivation time: (≡)24hr, (◻)96hr.

図 4-3-3 24または96時間培養後のエタノール生成量に及ぼす培養法および酵母の影響

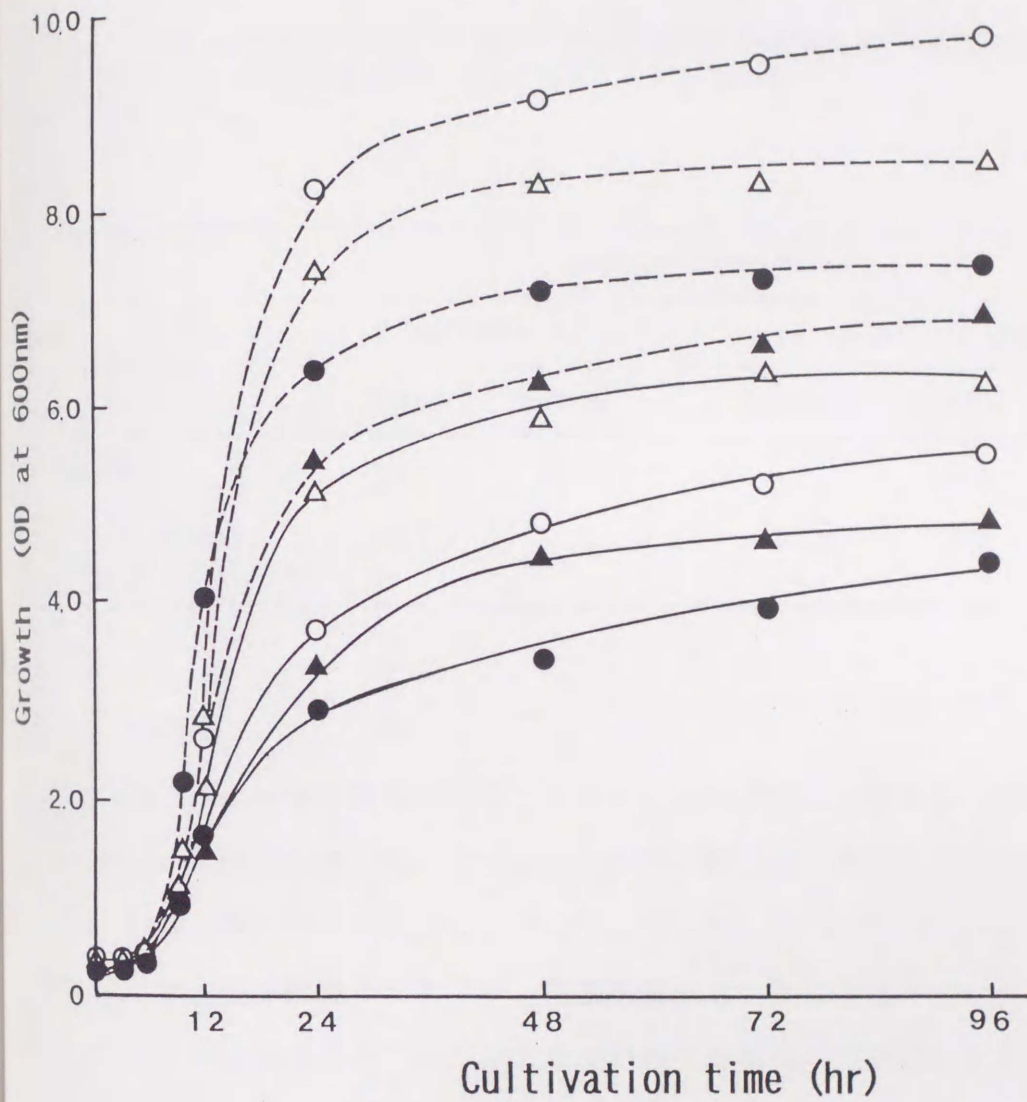


Fig.4-3-4 Effect of addition of yeast extract on the growth of yeasts.  
 Culture conditions: (—)Static, (---)Shaking  
 Inoculated yeasts: (●) *K. marxianus* HU-1, (▲) *S. cerevisiae* IAM 4512, (○) *K. marxianus* HU-1 + Yeast extract, (△) *S. cerevisiae* IAM 4512 + Yeast extract.

図 4-3-4 酵母の生育に及ぼす酵母エキス添加の影響



表 4-3-2 96時間培養後の酵母の還元糖消費に及ぼす酵母エキス添加の影響

Table 4-3-2 Effect of addition of yeast extract on expenditure of reducing sugar after 96hr cultivation.

Additives	Reducing sugar (mg/ml)			
	<i>K. marxianus</i> HU-1		<i>S. cerevisiae</i> IAM 4512	
	Static	Shaking	Static	Shaking
None	46.2	45.5	3.9	12.0
Yeast extract (mg/ml of medium)	48.0	13.5	11.0	9.5

*marxianus* HU-1は残存糖量が多く、エタノール生成能は比較的低い酵母であり、飲料としての利用を考えていく場合には非常に好都合な性質といえるであろう。*K. marxianus*の揮発性香気成分については、Fabreら（1995）によって静置培養ではバナナ様の酢酸イソアミル、振盪培養においては花様のイソアミルアルコール、フェネチルアルコールなどをその菌の芳香性の主要成分として同定している。しかし、菌株や培地組成、培養条件などでその揮発性香気成分は変化する可能性が高く、本実験においても培養法の違いで芳香性およびその強さが異なっており、振盪培養の方がその芳香性は強く、高級アルコール風の香りが感じられたが、それとともにあまり好ましくないような香りも同時に生成しているようであった。したがって、*K. marxianus* HU-1の場合はどちらかといえは、静置培養の芳香の方が良好といえる。米粉糖化液培養における揮発性香気成分を中心とするフルーティーさを示す成分の分析およびその嗜好性の評価については今後の検討課題である。

## 引用文献

- Albertazzi, E., Cardillo, R., Servi, S., and Zucchi, G. : *Biotechnol. Lett.*, **16**, 491-496. (1994)
- Angulo, L., Lopez, E., and Lema, C. : *J. Dairy Res.*, **60**, 263-267. (1993)
- Barnett, J. A., Payne, R. W., and Yarrow, D. : *Yeasts, Characteristics and Identification*, Second edition., Cambridge University Press, New York, pp. 407-408, 734-736. (1990)
- Fabre, C. E., Duviau, V. J., Blanc, P. J., and Goma, G. : *Biotechnol. Lett.*, **17**, 1207-1212. (1995)
- Gonzalez Siso, M. I., Ramil, E., Cerdan, M. E., and Freire-Picos, M. A. : *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 585-591. (1996)
- 福井作蔵 : 還元糖の定量法 第2版, 学会出版センター, 東京, pp. 9-11. (1990)
- 長谷川武治 : 微生物の分類と同定 改訂版, 学会出版センター, 東京, pp. 153-254. (1984)
- 飯塚廣, 後藤昭二 : 酵母の分類同定法 第3版, 東京大学出版会, 東京, pp. 1-78. (1980)
- 石川雄章 : シリーズ<食品の科学> 酒の科学 (吉澤淑 編), 朝倉書店, 東京, pp. 25, 42-48. (1995)
- Kleyn, J. G. : *Wallerstein Lab. Commun.*, **17**, 91-97. (1954)
- Kwak, H. S., Park, S. K., and Kim, D. S. : *J. Dairy Sci.*, **79**, 937-942. (1996)
- McClary, D. O., Nulty, W. L., and Miller, G. R. : *J. Bacteriol.*, **78**, 362-368. (1959)
- Moore, S., and Stein, W. H. : *J. Biol. Chem.*, **211**, 907-913. (1954)
- Lindgren, C. C., and Lindgren, G. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **29**, 306-312. (1943)
- Ongen-Baysal, G., and Sukan, S. S. : *Biotechnol. Lett.*, **18**, 1431-1434. (1996)
- Pastore, G. M., Sato, H. H., Yang, T. S., Park, Y. K., and Min, D. B. : *Biotechnol. Lett.*, **16**, 389-392. (1994)
- Simpson, J., Brady, D., Rollan, A., Barron, N., McHale, L., and McHale, A. P. :

*Biotechnol. Lett.*, **17**, 757-760. (1995)

鈴木修，佐藤俊一，家藤治幸，下飯仁，蓼沼誠，吉澤淑：醗工，**69**, 83-87.

(1991)

山口和夫：食品微生物学ハンドブック（好井久雄，金子安之，山口和夫 編），

技報堂出版，東京，p. 38. (1995)



## 第5章 乳酸発酵糖化液の飲料としての調製条件とその嗜好性

### 第1節 乳酸発酵飲料としての調製条件の検討

#### 1. 序論

ケフィアから単離した乳酸菌は、市販ヨーグルトスターターとは異なり、糖化液のみでも発酵可能で、むしろ糖化液のみで乳酸発酵させる方がフルーティーな味が感じられる発酵液が調製できた。糖化酵素グルコアミラーゼ A またはグルクザイムで処理した糖化液の発酵性はかなり異なり、還元糖生成量の少ないグルクザイム処理糖化液の方が発酵性は良好であった。その発酵性の差は第3章で明らかになったようにイソロイシンをはじめとするアミノ酸の種類や量が影響していたが、糖化液の味自体も両者で異なっていた。乳酸発酵させていない糖化液と比較すると、発酵させたグルクザイム処理糖化液では酸味が比較的強く、甘味が控えめに、グルコアミラーゼ A 処理糖化液を用いると酸味があまり強くなり、甘味が比較的強くなっていた。両者の発酵糖化液で味に長短があり、それら調製した発酵糖化液を飲料として利用していく場合にどの程度の酸味、甘味があれば良好なものが調製できるのか、両者の混合比率を変えて検討することとした。また、*Leuconostoc*属の発酵生成物の主たるものは、D型乳酸、酢酸、エタノールであることが知られているが (Garvie 1986)、*L. mesenteroides*を糖化液で発酵させた場合に乳酸、酢酸の他にリンゴ酸やコハク酸などの生成を認めている (Lee et al. 1992)。したがって、本実験で用いたケフィア乳酸菌もリンゴ風味に似たフルーティーな味が感じられることから通常の代謝産物以外の生成物が独特のフルーティーさに影響している可能性がある。そこで、発酵糖化液中のどのような成分がフルーティーさに寄与しているのかを含有有機酸の分析を中心に試みることにした。

#### 2. 実験方法

##### (1) 使用酵素および乳酸菌

糖化用酵素として、第1章 第1節のグルコアミラーゼ A およびグルクザイム、 $\alpha$ -アミラーゼ ADを使用した。乳酸菌として、第2章 第2節で単離し

たケフィア乳酸菌を用いた。

## (2) 糖化液および糖化液培養培地の調製

糖化液の調製および培養は第2章 第3節 2. 実験方法に従って行った。

## (3) 酸度および含有有機酸，エタノール量の測定

各酵素処理糖化液を混合率を変えて混合し，30℃で24時間培養後の発酵液の酸度およびpHを中和滴定法（平林と佐藤 1987）およびTwin pH B-111（堀場製作所）により，第2章 第1節 2. 実験方法に従い測定した。また，発酵性が良好でフルーティーさの強いグルクザイム処理発酵糖化液の含有有機酸を測定用キット（Boehringer Mannheim）により定量するとともに高速液体クロマトグラフィー（HPLC，日本分光 PU-980型）により分離分析した。測定用キットにおいてはD型乳酸，L型乳酸，酢酸，L型リンゴ酸，コハク酸を定量した。各有機酸の測定方法はTable 5-1-1の（A）～（D）に示したとおりである。なおブランクとして蒸留水を用い，340nmの吸光度を島津Spectronic 20Aで測定した。乳酸の測定方法であるが，まず試料をキットの測定限界内に希釈した。Table 5-1-1の（A）の乳酸の測定方法に従い，そこに示した成分組成の溶液Iを1.00ml，溶液IIを0.20ml，蒸留水を0.90ml，溶液IIIを0.02ml，試料を0.1ml混合し，約5分間後に吸光度 $E_1$ を測定した。測定後溶液IVを0.02ml加え，混和し，約20分間反応させた後，吸光度 $E_2$ を測定した。測定後溶液Vを0.02ml加え，混和し，約20分間反応させた後，吸光度 $E_3$ を測定した。 $\Delta E$  D型乳酸 =  $(E_2 - E_1)$  試料 -  $(E_2 - E_1)$  ブランク， $\Delta E$  L型乳酸 =  $(E_3 - E_2)$  試料 -  $(E_3 - E_2)$  ブランクとし，Table 5-5-1の（A）に示した計算方法に従い各乳酸含量を求めた。以下の酢酸，L型リンゴ酸，コハク酸もTable 5-1-1の（B），（C），（D）の各方法に従い同様に測定した。

HPLCは以下のような方法で分析した。移動相として3 mM 過塩素酸（ $\text{HClO}_4$ ，和光純薬工業製）水溶液を用いることとし，60%  $\text{HClO}_4$  0.5gに蒸留水を加えて1000mlとした。その後吸引濾過し，アスピレーターで15分間減圧脱気した。反応液として，プロモチモールブルー（BTB，ナカライテスク製）125mgを10mlのエタノールに溶解した。リン酸水素二ナトリウム・12水（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）5.3gを約500mlの蒸留水に溶解し，BTB溶解液を混合し蒸留水を加えて1000mlとした。その後吸引濾過し，アスピレーターで15分間減圧脱気した。標準試料と



表 5-1-1 測定用キットによる有機酸の測定方法

Table 5-1-1 Measurements of organic acids by UV-method

(A) D-Lactic acid, L-Lactic acid

Preparation of reagents

	Solution I	Solution II	Solution III	Solution IV	Solution V
Composition	Glycylglycine buffer:pH10.0 L-Glutamic acid 440mg:Stabilizers	NAD:210mg (Dissolve with 6ml dist.water)	(GPT):1100U	(D-LDH): 3800U	(L-LDH): 3800U

Procedure	Blank		Sample		Calculation
					$C (g/l) = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E$
	Solution I	1.00ml	1.00ml		V (Final volume) : 2.24ml D-Lactic acid : 2.26ml L-Lactic acid v (Sample volume) : 0.10ml MW (Molecular weight) : 90.1 d (Light pass) : 1cm ε (Absorption coefficient of NADH at 340nm):6.3 [ $l \cdot mmol^{-1} / cm^{-1}$ ]  D-Lactic acid (g/l) = $\frac{2.24 \times 90.1}{6.3 \times 1 \times 0.1 \times 1000} \times \Delta E$ D-Lactic acid  L-Lactic acid (g/l) = $\frac{2.26 \times 90.1}{6.3 \times 1 \times 0.1 \times 1000} \times \Delta E$ L-Lactic acid
	Solution II	0.20ml	0.20ml		
	Dist.water	1.00ml	0.90ml		
	Solution III	0.02ml	0.02ml		
	Sample	-	0.10ml		
Mix the above materials and read the absorbances ( $E_1$ ) after ca. 5min.					
	Solution M	0.02ml	0.02ml		
Mix the solution M and wait until the termination of the reaction (ca.20min) and read the absorbances ( $E_2$ ).					
	Solution Y	0.02ml	0.02ml		
Mix the solution Y and wait until the termination of the reaction (ca.20min) and read the absorbances ( $E_3$ ).					

$$\Delta E_{D-Lactic\ acid} = (E_2 - E_1) Sample - (E_2 - E_1) Blank$$

$$\Delta E_{L-Lactic\ acid} = (E_3 - E_2) Sample - (E_3 - E_2) Blank$$



表 5-1-1 測定用キットによる有機酸の測定方法

Table 5-1-1 Measurements of organic acids by UV-method

(B) Acetic acid

Preparation of reagents

	Solution I	Solution II	Solution III	Solution IV
Composition	Glycylglycine Buffer:pH10.0 L-Glutamic acid 440mg:Stabilizers	$\beta$ -NAD:210mg (Dissolve with 6ml dist.water)	Glutamate- oxaloacetate transaminase (GOT):160U	L-Malate dehydro- genase (L-MDH):2400U

Procedure

	Blank	Sample
Solution I	1.00ml	1.00ml
Solution II	0.20ml	0.20ml
Dist.water	2.00ml	1.90ml
Sample	-	0.10ml

Mix the above materials and read the absorbances ( $E_0$ ).

Solution III	0.01ml	0.01ml
--------------	--------	--------

Mix the solution III and read the absorbances ( $E_1$ ) after ca.3min.

Solution IV	0.02ml	0.02ml
-------------	--------	--------

Mix the solution IV and wait until the termination of of the reaction (ca.10~15min) and read the absorbances ( $E_2$ ).

Calculation

$$C \text{ (g/l)} = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E$$

V (Final volume) :3.23ml

v (Sample volume):0.10ml

MW (Molecular weight):60.05

d (Light pass) : 1cm

$\epsilon$  (Absorption coefficient of NADH at 340nm):6.3 [ $1\text{-mmol}^{-1}/\text{cm}^{-1}$ ]

$$\text{Acetic acid(g/l)} = \frac{3.23 \times 60.05}{6.3 \times 1 \times 0.1 \times 1000} \times \Delta E$$

$$\Delta E = \left[ \frac{(E_1 - E_0)^2}{(E_2 - E_0)} \right] \text{Sample} - \left[ \frac{(E_1 - E_0)^2}{(E_2 - E_0)} \right] \text{Blank}$$

表 5-1-1 測定用キットによる有機酸の測定方法

Table 5-1-1 Measurements of organic acids by UV-method

(C) L-Malic acid

Preparation of reagents

	Solution I	Solution II	Solution III	Solution IV
Composition	Triethanolamine buffer:pH 8.4 L-Malic acid:134mg MgCl <sub>2</sub> :67mg	ATP:175mg CoA:18mg NAD:86mg (Dissolve with 7ml dist. water)	Malate dehydrogenase (MDH):ca.1100U Citrate synthase: 270U	Acetyl-CoA- synthetase: 5U (Dissolve with 0.25ml dist.water)

Procedure

	Blank	Sample
Solution I	1.00ml	1.00ml
Solution II	0.20ml	0.20ml
Dist. water	1.00ml	0.90ml
Solution III	0.01ml	0.01ml
Sample	-	0.10ml

Mix the above materials and read the absorbances (E<sub>1</sub>) after ca. 3min.

Solution IV	0.01ml	0.01ml
-------------	--------	--------

Mix the solution N and wait until the termination of (ca. 5~10min) read the L-Malic acid(g/l) absorbances (E<sub>2</sub>).

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Sample}} - (E_2 - E_1)_{\text{Blank}}$$

Calculation

$$C \text{ (g/l)} = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E$$

V (Final volume) : 2.22ml

v (Sample solution) : 0.10ml

MW (Molecular weight) : 134.09

d (Light path) : 1cm

$\epsilon$  (Absorption coefficient of NADH at 340nm): 6.3 [1·mmol<sup>-1</sup>/cm<sup>-1</sup>]

$$2.22 \times 134.09$$

$$\text{L-Malic acid(g/l)} = \frac{2.22 \times 134.09}{6.3 \times 1 \times 0.1 \times 1000} \times \Delta E$$

$$6.3 \times 1 \times 0.1 \times 1000$$

表 5-1-1 測定用キットによる有機酸の測定方法

Table 5-1-1 Measurements of organic acids by UV-method

(D) Succinic acid

Preparation of reagents

	Solution I	Solution II	Solution III	Solution IV
Composition	Glycylglycine buffer:pH8.4 NADH:6mg (Dissolve with dist. 13ml water)	1 tablet CoA:0.75mg ITP:0.7mg PEP:0.3mg (Dissolve 1 tablet with 1ml solution I)	Pyruvate kinase: 250U Lactate dehydro- genase:230U	Succinyl-CoA synthetase:12U

Procedure

	Blank	Sample
Solution II	1.00ml	1.00ml
solution III	0.05ml	0.05ml
Sample	-	0.10ml
Dist. water	2.00ml	1.90ml

Mix the above materials and after ca. 5min incubation at 37°C read the absorbances ( $E_1$ ).

Solution IV	0.02ml	0.02ml
-------------	--------	--------

Mix the solution N and wait until the termination of the reaction (ca. 20min at 37°C) and read the absorbances ( $E_2$ ).

$$\Delta E = (E_1 - E_2)_{\text{Sample}} - (E_1 - E_2)_{\text{Blank}}$$

Calculation

$$C \text{ (g/l)} = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E$$

V (Final volume) : 3.07ml

v (Sample volume) : 0.10ml

MW (Molecular weight) : 128.09

d (Light path) : 1cm

$\epsilon$  (Absorption coefficient of NADH  
at 340nm): 6.3 [ $l \cdot \text{mmol}^{-1} / \text{cm}^{-1}$ ]

$$\text{Succinic acid (g/l)} = \frac{3.07 \times 128.09}{6.3 \times 1 \times 0.1 \times 1000} \times \Delta E$$



して、有機酸混合標準液Ⅲ（ $\alpha$ -ケトグルタル酸，クエン酸，ピルビン酸，リンゴ酸，コハク酸，乳酸，蟻酸，酢酸，ピログルタミン酸，日本分光工業製）を用いた。有機酸分析用試料を除タンパクするために20%スルホサリチル酸水溶液を9：1の割合で加え，振盪後遠心分離を5000×g，10分間行った。その上清を0.45 $\mu$ mメンブランフィルタで濾過後その10 $\mu$ lを注入した。HPLCの装置と測定条件は，Table 5-1-2に示すとおりである。

含有エタノール量については測定用キット（Boehringer Mannheim）により第4章 第2節 2. 実験方法に従い定量した。

表 5-1-2 高速液体クロマトグラフィーの測定条件

Table 5-1-2 Measurement conditions of HPLC.

Organic acid analysis system (有機酸分析システム)

---

Dagasser (デガッサ) : DG-980-50  
Pump (ポンプ) : PU-980  
Autosampler (オートサンブラ) : AS-950  
Column oven (カラムオーブン) : CO-960  
Organic acid reagent unit (有機酸反応ユニット) : 895-51  
Detector (検出器) : UV-970  
Control & integrator (コントロール&インテグレーター) : LCSS-905

---

Measurement conditions (測定条件)

---

Column (カラム) : Shodex Ionpak KC-810-P ( $\phi$  6mm × 50mmL, プレカラム)  
KC-811 ( $\phi$  8mm × 250mmL) × 2  
Eluent (移動相) : 3mM HClO<sub>4</sub>  
Flow rate (流量) : 1.0ml/min  
Column temperature (カラム温度) : 60°C  
Reagent (反応液) : 0.2mM BTB + 15mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
Flow rate (流量) : 1.5ml/min  
Injection volume (注入量) : 10 $\mu$ l  
Wave length (検出波長) : 445nm

---

### 3. 実験結果および考察

#### (1) 乳酸発酵糖化液の飲料としての調製条件の検討

グルコアミラーゼ A 処理, グルクザイム処理の各糖化液で発酵させた発酵液について予備的に官能検査をしたところ, グルコアミラーゼ A 処理糖化液では乳酸菌の酸生成に必要な栄養成分が欠如しているため, 酸生成がほとんど進まず, 味を物足りなく感じる人が多く, 逆にグルクザイム処理であると, 乳酸発酵がやや進行し過ぎ, 発酵液の酸味が強すぎるという評価が得られた。そこで, 両者の糖化液を混合し, 嗜好性が良好と感じられるような混合割合について検討した。両糖化液を混合しケフィア乳酸菌を接種し, 30℃で24時間培養した発酵液の酸度およびpH測定の結果をFig. 5-1-1に示す。

酸度は, グルコアミラーゼ A 処理糖化液では0.06%, グルクザイム処理糖化液では0.20%前後で, 酸生成度に3倍程度の開きがあった。この差は第3章でも明らかにしたが, グルコアミラーゼ A 処理糖化液にはケフィア乳酸菌の酸生成に必要なイソロイシン, ロイシン, バリンのようなアミノ酸が欠如しているためである。混合割合を変えて酸度を測定した結果, グルクザイム処理糖化液をグルコアミラーゼ A 処理糖化液に3割程度添加するだけで, グルクザイム処理のみと同様な酸度を示した。ヨーグルトの酸度は1%前後を示すのに対して, 発酵糖化液の酸度はその5分の1とそれほど高くないが, ヨーグルトのようにミルクの緩衝作用を受けないので, pHが3程度まで下がり, そのため酸味を強く感じてしまうと推察される。

*Leuconostoc*種は低温貯蔵により, ジアセチルの生成量などが増加し, 風味形成に良好なことが知られている (Vedamuthu 1994)。本実験においても低温貯蔵によってフルーティーさが強く感じられるようになった。混合発酵液の味と酸度を検討した結果, 冷蔵貯蔵中の若干の酸度上昇を考慮するとpHが3.3前後で酸度が0.13%程度, グルコアミラーゼ A 処理糖化液とグルクザイム処理糖化液の混合比率が9:1程度が適当と考えられた。

#### (2) 乳酸発酵糖化液の含有有機酸およびエタノール

*Leuconostoc*種はヘテロ発酵型乳酸菌であることが知られており, その菌の主たる発酵生成物はD型乳酸, 酢酸, エタノールである (Garvie 1986, Holzapfel and Schillinger 1992)。また, その他にピルビン酸, アセトイン,

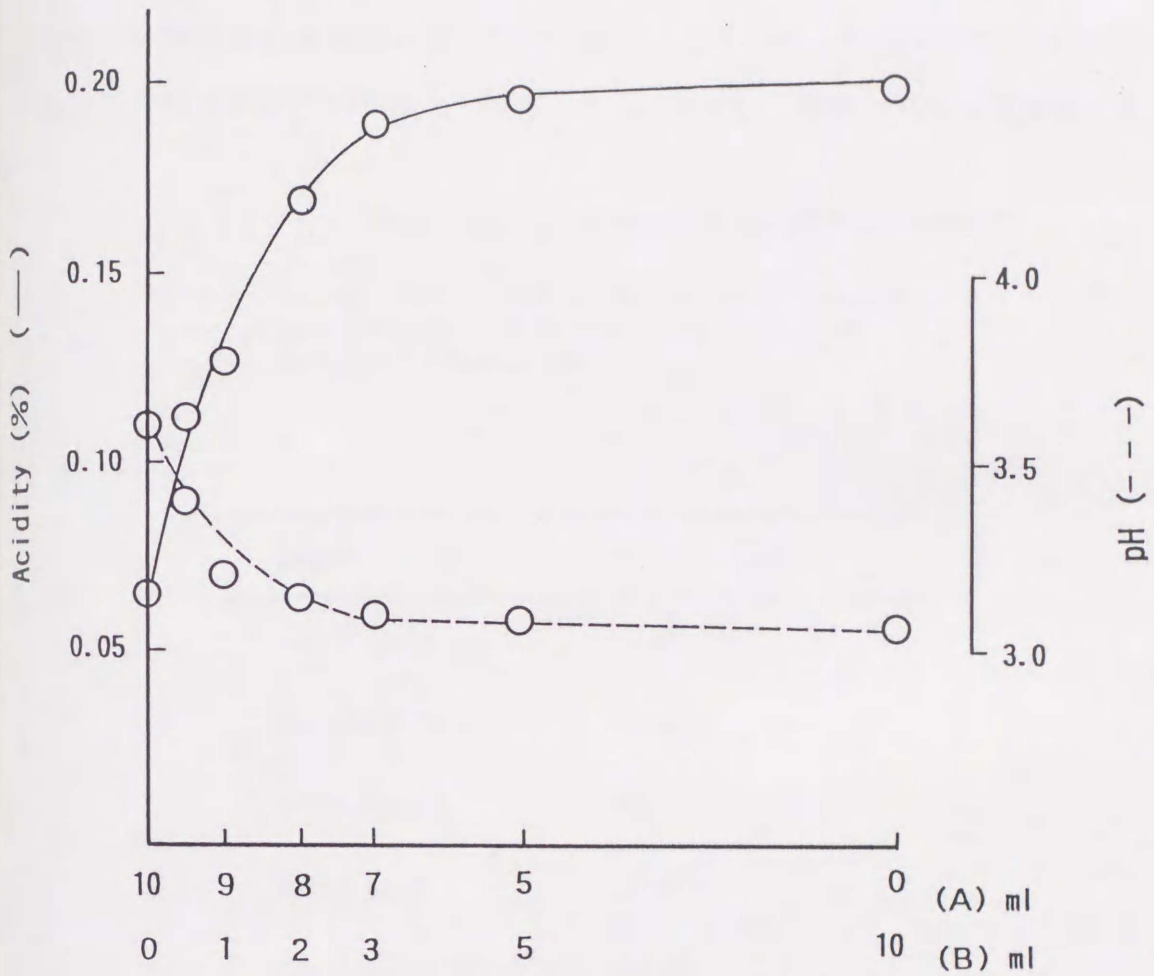


Fig.5-1-1 Effect of mixing ratio of (A) glucoamylase A-treated and (B) gluczyme-treated saccharified solution on the acid formation and pH after the fermentation by kefir-bacterium.

図 5-1-1 グルコアミラーゼ A処理およびグルクザイム処理糖化液の混合比率がケフィア乳酸菌発酵中の酸生成とpHに及ぼす影響



ブタンジオールなどを生成する菌株も存在している。米粉糖化液を *L. mesenteroides* で発酵させた場合、乳酸や酢酸の他に、リンゴ酸、コハク酸の生成を Lee ら (1992) は検出している。ケフィア乳酸菌で発酵させた場合もリンゴ風味に似た フルーティーな味が感じられることから、乳酸や酢酸以外にも別の有機酸が含まれている可能性が高いと考えられ、乳酸発酵糖化液の有機酸分析を行った。その結果を Table 5-1-3 に示した。乳酸が主たる有機酸であ

表 5-1-3 ケフィア乳酸菌による米粉糖化乳酸発酵液の有機酸分析

Table 5-1-3 Analysis of organic acids in lactic acid fermented solution from saccharified rice flour solution by kefir-bacterium.

Organic acid	Contents (mg/ml)
Lactic acid	2.322
Acetic acid	0.181
Citric acid	0.102
Malic acid	0.046
Succinic acid	0.031

り、測定用キットによる分析では D 型乳酸が 1.73mg/g 程度検出された。測定用キットによる乳酸の測定値は HPLC による分析結果と若干異なっていたが、L 型乳酸はほとんど検出されなかった。また、乳酸の他に酢酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸が含まれていた。測定用キットでの分析では酢酸が 0.23mg/g 程度含まれていたが、リンゴ酸、コハク酸はほとんど検出できなかった。HPLC での測定値をもとに、有機酸を混合しその混合液の味をみると、発酵液に比較的近い味が感じられた。リンゴ酸、コハク酸については測定値自体が微量であるため、測定用キットでは測定限界に近い濃度でしか測定できず、発酵液中の

糖やタンパク質などの他成分が影響した可能性が考えられる。その点の検討については今後の課題である。

*Leuconostoc mesenteroides*種を中心とする乳酸発酵において、グルコース存在下でクエン酸を添加すると、乳酸、酢酸が増加し、エタノールの生成が抑制され (Cogan 1987, Bellengier et al. 1994, Marty-Teyssset et al. 1996), ジアセチル, アセトイン, ビルビン酸, ブタンジオールなどの生成が認められている (Starrenburg and Hugenholtz 1991, Levata-Jovanovic and Sandine 1996)。また, 通気や酸素の有無, 培養温度, pHなどが乳酸, 酢酸, エタノール生成量に及ぼす影響についての報告は多数みられる (Lucey and Condon 1986, Schmitt et al. 1994, Pimentel et al. 1994, Firme et al. 1994, Plihon et al. 1995)。その報告はMRS培地 (de Man et al. 1960) を主体としており, 糖化液培養による*L. mesenteroides*の代謝産物の報告は上記Leeら (1992) のみである。クエン酸はグルコース存在下では急速に菌に取り込まれて利用され, クエン酸の添加無しに, 発酵液中にクエン酸が検出された報告例は見当たらない。そのクエン酸を含め, これら有機酸の混合で独特のフルーティな味が感じられると推察される。これらクエン酸, リンゴ, コハク酸が培地の違いで生成されるのか, クエン酸がケフィア乳酸菌によって特徴的に生産されるものかなどについては, 培地の種類や菌種を変えるなどし, 今後さらに分析を試みていきたいと考えている。なお, 発酵液中のエタノール生成量を測定したところ, 最も発酵性の良好なグルクザイム処理糖化液において0.07%程度で, アルコール分はほとんど含まれていなかった。

また, *Leuconostoc*種は病原性はないといわれていたが (Garvie 1986), バンコマイシンに耐性があることが近年明らかとなり, 免疫などが弱っていた場合に感染症を起こすという可能性もでてきている (Bernaldo de Quiros et al. 1991, Carapetis et al. 1994)。ケフィア乳酸菌が, バンコマイシンに耐性があるかどうか検討する必要があるが, 調製発酵液の安全性について予備的にラットを用いて動物実験を行ったところ, 摂取水分としてすべて発酵液に置換して多量に摂取させてもほとんど問題なく成長した。



## 第2節 乳酸発酵糖化液の官能評価

### 1. 序論

グルコアミラーゼ A 処理糖化液およびグルクザイム処理糖化液を用いてケフィア乳酸菌で乳酸発酵を試みても、いずれの乳酸菌ともに味に長短があった。第5章 第1節で発酵条件を検討したところ、グルコアミラーゼ A 処理糖化液とグルクザイム処理糖化液を9 : 1の比率で混合すると、フルーティーさを含め、酸味、甘味ともに比較的良好な乳酸発酵液が調製できた。そこで、調製した乳酸発酵糖化液が実際に高齢者の嗜好性に合うものかどうか、学生との嗜好差を含め検討することとした。

また、乳酸発酵糖化液中の有機酸には、乳酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸などが含まれ、揮発性有機酸は酢酸のみなので、加熱してもほとんど味には変化がみられず、むしろ加熱した方が刺激性の酢酸の風味がいくぶん除去され、良好な味となることが認められた。そこで、官能検査には100℃で5分間加熱殺菌した発酵液を用いて評価を行うこととした。

### 2. 実験方法

#### (1) 使用酵素および乳酸菌

糖化用酵素として、第1章 第1節のグルコアミラーゼ A およびグルクザイム、 $\alpha$ -アミラーゼ ADを使用した。乳酸菌は第2章 第2節で単離したケフィア乳酸菌を用いた。

#### (2) 官能検査サンプルの調製

糖化液および糖化液培養培地の調製はほぼ第2章 第3節 2. 実験方法に準じたが、官能検査用発酵液調製の際には三角フラスコを用い、通常の60倍にスケールアップをして調製した。10%上新粉懸濁液250mlを75~85℃程度になるまで約5分間ガス加熱し、糊化させた。糊化溶液に糖化用酵素を添加し、56±1℃で15時間反応させ糖化させた。その後遠心分離を7000×g、30分間行い、その上清を10%糖化液とした。10%グルコアミラーゼ A 処理糖化液および10%グルクザイム処理糖化液を9 : 1の割合で混合し、121℃で2分間殺菌した。殺菌後、糖化液培養のケフィア乳酸菌を0.5%接種し、30℃で24時間培養した。



培養後冷蔵庫中で15日以上保存し、熟成させた。官能検査用サンプルは(A) 乳酸菌を接種していない殺菌後の糖化液、(B) 上記のように調製した乳酸発酵糖化液および(C) (B) に若干酸味を和らげるために、エネルギーにはほとんど影響しない甘味料であるエリスリトールを3%添加したものの3種で行った。各サンプルは官能検査直前に100℃で5分間加熱殺菌した。

### (3) 官能検査法

学生被験者は広島大学の20歳以上の男子学生21名(平均年齢22.8歳)、女子学生17名(平均年齢21.2歳)、合計38名で行った。また、高齢者被験者は東広島熟年大学受講者の男性4名(年齢70歳代)、女性10名(年齢60歳代)、合計14名で行った。官能検査前に被験者には調製材料、調製方法について簡単に説明した。

上記(A)～(C)の3種類の試料を使い捨てのプラスチックカップに約5ml注ぎ、横一列に提示し、左から順に飲むよう指示した。また、この時3つのサンプルの提示順は6通りの組合せでそれぞれ変えて行った。検査方法は、酸味、後味、総合的な味の好みについて、順位法を用いるとともに、各サンプルの総合的な嗜好性についてヘドニックスケールを用い、非常に好きから非常に嫌いまでの7段階で評価させた。また、いくつかの形容語を示し、各サンプルの形容としてふさわしいものを複数個選択させた。

### (4) 統計分析(古川 1994)

順位法の検定は、嗜好性の高い順に1, 2, 3位として被験者の順位合計を計算し、Kendallの一致性の係数Wを用い、被験者の判定の一致性を判断した。その後、その順位合計をもとに、各試料間に有意差があるかどうかをNewellとMacFarlaneの検定表を用い判断した。

## 2. 実験結果および考察

### (1) 学生の官能評価

調製した3種のサンプルについて、学生38名が酸味、後味、総合的な味の好みについて順位法(古川 1994)で評価した。その順位合計をもとに各試料間に有意差があるかどうかを検定した結果をTable 5-2-1に示す。Kendallの一致性の係数Wを求めたところ、嗜好に一致性があると判断されたのでサンプル間

表 5-2-1 サンプルの順位法における順位合計と順位合計差  
 — 学生による評価 —

Table 5-2-1 Rank sums and rank sums differences in ranking test of samples - Evaluation by students -

Samples <sup>a</sup>	All (38)			Male (21)			Female (17)		
	Sour	After taste	Over-all	Sour	After taste	Over-all	Sour	After taste	Over-all
(A)	100	93	95	52	50	49	48	43	46
(B)	74	79	74	44	43	43	30	36	31
(C)	54	56	59	30	33	34	24	23	25
.....									
(A)-(B)	26**	14	21*	8	7	6	18**	7	15*
(A)-(C)	46**	37**	36**	22**	17*	15	24**	20**	21**
(B)-(C)	20	23*	15	14	10	9	6	13	6

<sup>a</sup>Samples: (A) Saccharified solution (mixing ratio of glucoamylase A-treated and gluczyme-treated solution = 9:1), (B) Lactic acid fermented saccharified solution by kefir-bacterium, (C) Lactic acid fermented saccharified solution by kefir-bacterium including 3% erythritol. Significant differences: \* P<0.05, \*\* P<0.01



の嗜好差をみることにした。順位合計からいずれの評価項目においても、糖化液 (A)、乳酸発酵液 (B)、乳酸発酵液に3%エリスリトールを添加したものの (C) の順に嗜好性は高くなっており、有意差検定を行っても、全体の評価では後味の (A)、(B) 間を除き、糖化液より発酵糖化液の方が嗜好性が高くなっている。また、後味の評価を除き、(B)、(C) 間には有意差は認められなかった。しかしながら、男女別に嗜好差を比較すると、男性ではいずれの評価項目においても (A)、(B) 間で有意差が認められず、総合的な評価においては3種のサンプル間に有意差が認められなかった。したがって、女性の方が嗜好性の一致度が高いと考えられる。

順位法により、糖化液を発酵させたものの方が嗜好性が高いという結果が得られたが、3種のサンプル間でどれくらい好みの幅があるのかをヘドニックスケールで評価した結果をFig.5-2-1 (A) に示す。0をどちらでもないとし、-3から+3で点数化した学生全体の評価の平均値は、糖化液のみが-1.03、発酵糖化液が+0.03、3%エリスリトール添加で+0.66であった。度数分布でみると糖化液では、-1、-2にピークがみられるが、発酵させることで、+1のところにピークが移動した。評価にバラツキがみられたのは酸味が苦手な被験者もいるためと考えられる。さらに3%エリスリトールを添加すると、マスキング効果により酸味が和らぎ、まろやかになったと考えられ、ピークが+1、+2の方に移動している。乳酸発酵により、マイナスの評価がプラスに移動し、若干の甘味料を添加することで評価はさらに高まっている。また、糖化液の評価に対しては、男女差が若干みられ、女性の方が低くなっている。18~23歳の大学生の甘、酸、塩味に対する濃度の閾値は女性の方が低いという報告があり (田口と岡本 1993)、実際に甘味が強すぎて生理的に受け入れられにくいのか、ダイエットなどで甘味の強いものに対して心理的に抵抗感があるのか、興味深いところである。予備的にレモン風味の市販品を加えて4種で評価したところ、市販品の平均値は+1.40のところにあり、調製した3種の平均値は本実験の場合と同程度の評価で市販品には及ばなかった。しかし、エリスリトール以外の添加物は一切使用しておらず、乳酸菌の発酵生成物だけでかなり良好なものが調製できたと考えられる。

糖化液を乳酸発酵させることでどのように味の感じが変化したかについて形



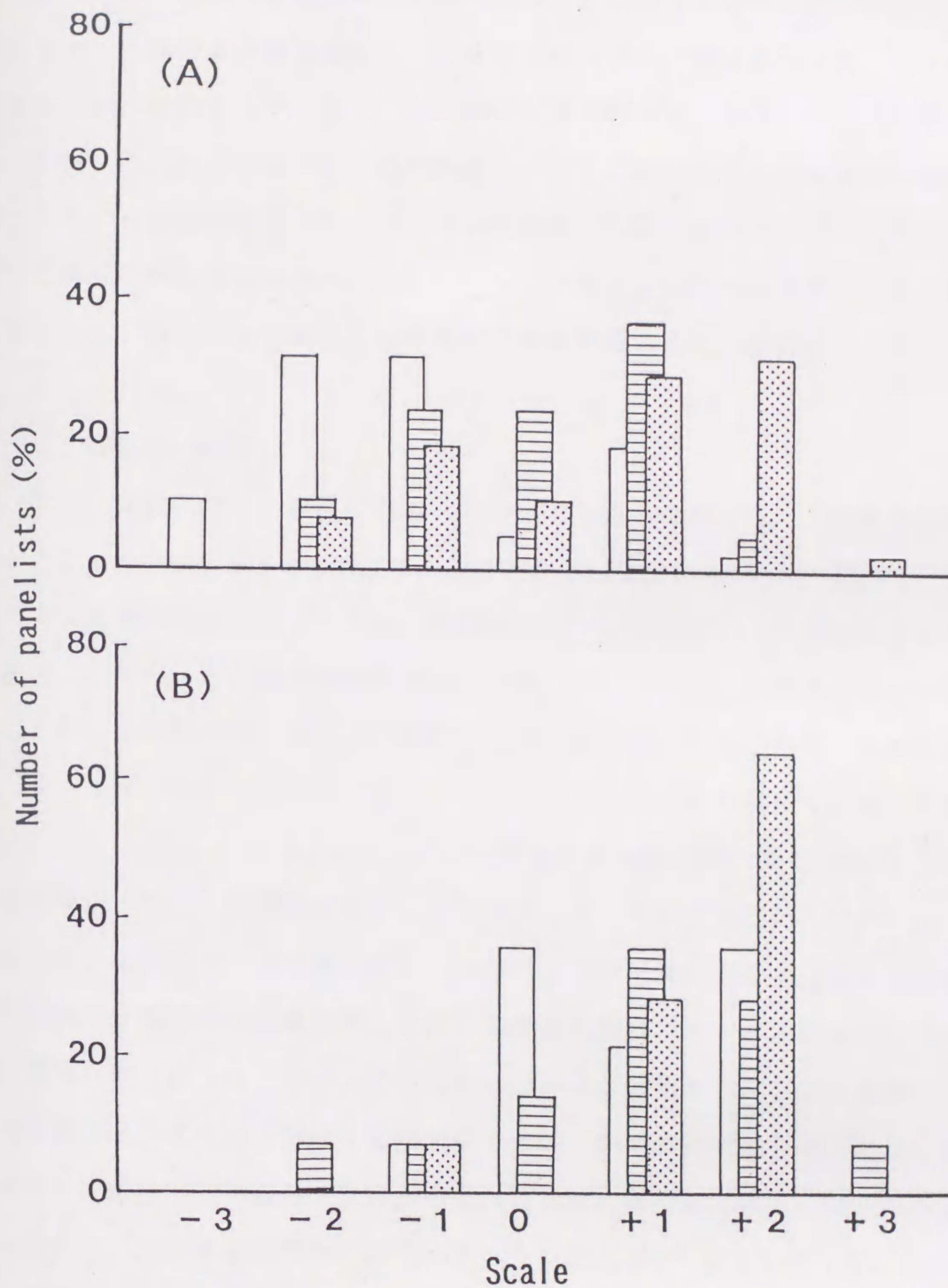


Fig.5-2-1 Sensory evaluation in hedonic scale of samples.  
 Panels: (A) Students (N=38), (B) Elderly people (N=14).  
 Samples: (□) Saccharified solution, (▨) Lactic acid  
 fermented saccharified solution, (▩) Lactic acid  
 fermented saccharified solution including 3% erythritol.

図 5-2-1 ヘドニックスケールによるサンプルの官能評価

容語で表現させた結果をFig. 5-2-2 (A) に示す。糖化液のみでは砂糖水、米のような感じを受ける被験者が7割および5割を越えていたのが、発酵させることで、お酢のような風味とともにレモンやリンゴ、梅などのフルーティーな風味が感じられるようになり、米の風味も減っていた。また、エリスリトールを添加することでお酢や梅の風味が減り、リンゴ風味を感じる被験者が増加していた。有機酸分析結果から主とする有機酸は乳酸であるが、ヨーグルトのように感じる被験者はほとんどなく、タンパク質などの他の含有成分とともに酢酸やクエン酸、リンゴ酸などの有機酸の味が味覚に大きく影響を及ぼしていると考えられる。

## (2) 高齢者の評価

学生と同様に60~70歳代の高齢者についても官能検査を行い、順位法で評価した結果をTable 5-2-2に示した。いずれの評価項目においても(A), (B)間で有意差は認められず、また、後味については3種のサンプル間に有意差は認められなかった。総合評価において(B), (C)間に有意差が認められたことから、発酵させるならば、甘味もある程度必要であることがうかがえる。

各サンプルの味の好みについて、ヘドニックスケールを用いて評価したのがFig. 5-2-1 (B)である。各サンプルの評価の平均値は糖化液で+0.86、発酵糖化液が+0.92、発酵糖化液に3%エリスリトールを添加したものが+1.50であった。糖化液のような味に対して予想以上に抵抗感は少なく、発酵糖化液と平均値でほぼ同等の評価が得られた。発酵糖化液は、+1および+2にピークは認められるが-2~+3までかなりの幅があり、嗜好にバラツキがみられた。発酵糖化液にエリスリトールを添加すると約6割の被験者が+2と評価したことから、酸味、甘味のバランスが嗜好性に大きく影響していると考えられる。

各サンプルの味を形容語で表現してもらった結果がFig. 5-2-2 (B)である。糖化液では砂糖水のような味と評価した被験者が7割程度と味の感じ方は一致しており、発酵させることでレモンのような風味となり、そこにエリスリトールを添加するとリンゴのような感じを受ける被験者が増えていた。

高齢者の場合、学生と比較して糖化液の評価が比較的高いのは、糖化液中にわずかに感じられる米のような感じを受けず、糖化液を程よい甘味の砂糖水のように感じているためと考えられる。加齢とともに味覚閾値は高くなる傾向に

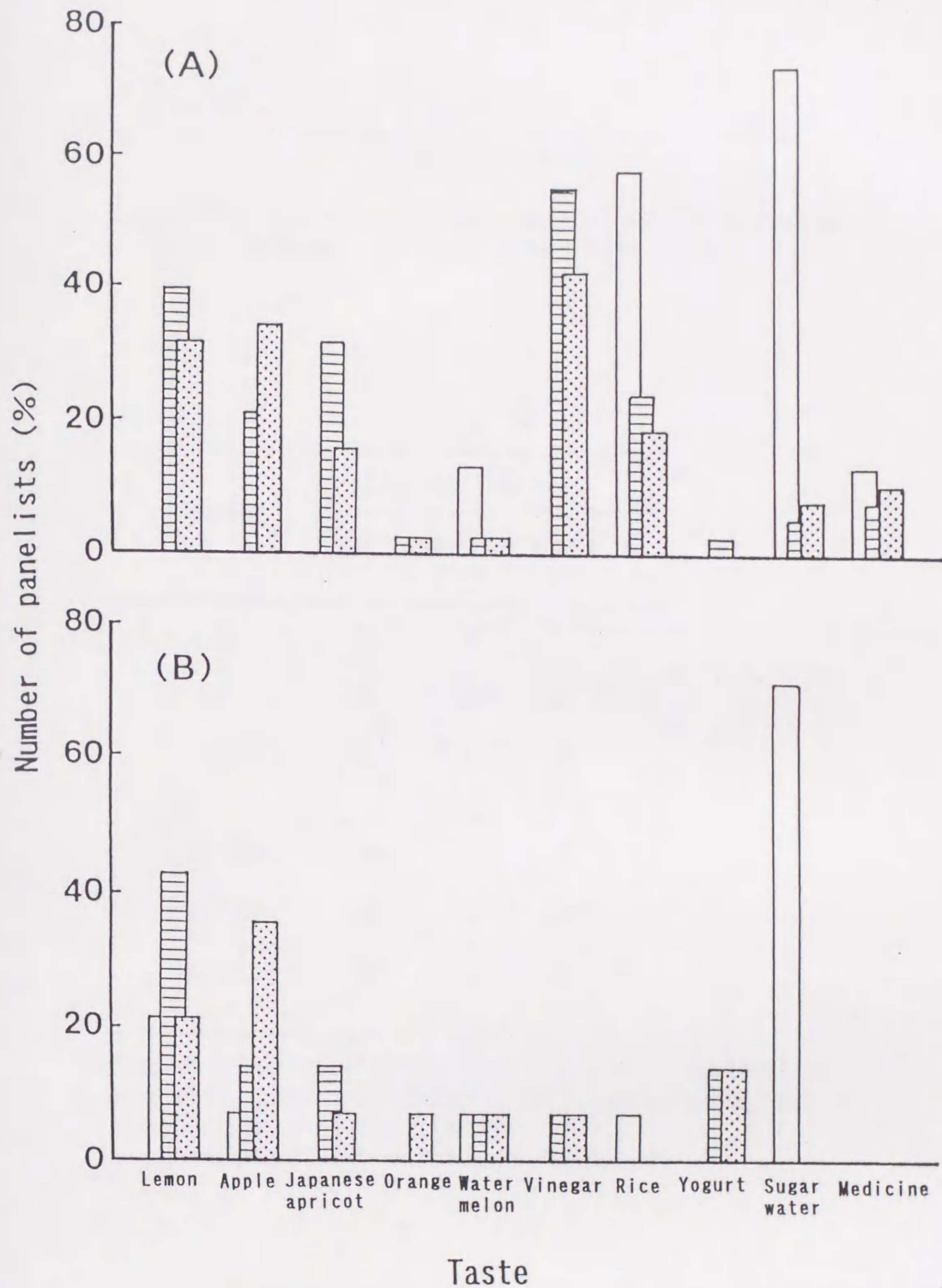


Fig 5-2-2 Expressions for taste of samples.  
 Panels: (A) Students (N=38), (B) Elderly people (N=14).  
 Samples: (□) Saccharified solution, (▨) Lactic acid  
 fermented saccharified solution, (▩) Lactic acid  
 fermented saccharified solution including 3% erythritol.

図 5-2-2 サンプルについての味の表現



表 5-2-2 サンプルの順位法における順位合計と順位合計差  
 - 高齢者による評価 -

Table 5-2-2 Rank sums and rank sums differences in ranking  
 test of samples. - Evaluation by elderly people -

Samples <sup>a</sup>	All (14)		
	Sour	After taste	Over- all
(A)	36	29	35
(B)	28	30	31
(C)	20	25	18
.....			
(A) - (B)	8	1	4
(A) - (C)	16**	4	17**
(B) - (C)	8	5	13*

<sup>a</sup>Samples: (A) Saccharified solution, (B) Lactic acid fermented saccharified solution, (C) Lactic acid fermented saccharified solution including 3% erythritol.

Significant differences: \* P<0.05, \*\* P<0.01

あり、若年者が酸味を好むのに対して、高齢者は味覚が変化し、甘味、塩味を好むようになるといわれている（田口と岡本 1991, 佐藤 1991, 丸井 1993）。本高齢被験者においても甘味に対する受容度は高く、学生とは味の強度が異なったように感じられたのではないかと考えられる。また、お酢のような揮発性の酸味に対する感受性は低くなっている傾向が認められる。高齢被験者間には個人差がかなりあると推察され、嗜好差を含め本実験結果を一般化していくには、被験者数を増やして検討する必要があるが、それは今後の課題である。

学生、高齢者ともに、発酵糖化液に3%エリスリトールを添加したサンプルの嗜好性が最も高く、酸味に対してはまだ改良の余地はあるが、酸味が感じられるような場合には適当な甘味料の添加で嗜好性はかなり改善され、飲料として利用可能なものとなると考えられる。エリスリトールは甘味度はショ糖の70~30%で、低エネルギー、非う蝕性であり、経時的な酸味増加の防止にヨーグルトなどに使用されている（田中 1991）。発酵糖化液の甘味料として利用していくには適当なものの一つではないかと考えられる。

## 引用文献

- Bellengier, P. Hemme, D., and Foucaud, C. : *J. Appl. Bacteriol.*, **77**, 54-60.  
(1994)
- Bernaldo de Quiros, J. C. L., Munoz, P., Cercenado, E., Hernandez Sampelayo, T., Moreno, S., and Bouza, E. : *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **10**, 505-509. (1991)
- Carapetis, J., Bishop, S., Davis, J., Bell, B., and Hogg, G. : *Pediatr. Infect Dis. J.*, **13**, 816-823. (1994)
- Cogan, T. M. : *J. Appl. Bacteriol.*, **63**, 551-558. (1987)
- de Man, J. C., Rogosa, M., and Sharpe, M. E. : *J. Appl. Bacteriol.*, **23**, 130-135.  
(1960)
- Firme, M. P., Leitao, M. C., and Romao, M. V. S. : *J. Appl. Bacteriol.*, **76**, 173-181.  
(1994)
- 古川秀子 : おいしさを測る 食品官能検査の実際, 幸書房, 東京, pp. 24-29, 132-133. (1994)
- Garvie, E. I. : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2* (Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G., Ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1071-1075. (1986)
- 平林輝美, 佐藤一精 : 家政誌, **38**, 817-821. (1987)
- Holzappel, W. H., and Schillinger, U. : *The Prokaryotes, second edition, Vol. 2* (Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H., Ed.), Springer-Verlag, New York, pp. 1508-1534. (1992)
- Lee, C. H., Min, K. C., Souane, M., Chung, M. J., Mathiasen, T. E., and Adler-Nissen, J. : *Food Biotechnol.*, **6**, 239-255. (1992)
- Levata-Jovanovic, M., and Sandine, W. E. : *J. Dairy Sci.*, **79**, 1928-1935. (1996)
- Lucey, C. A., and Condon, S. : *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 1789-1796. (1986)
- 丸井隆之 : 調理とおいしさの科学 (島田淳子, 下村道子 編), 朝倉書店, 東京, pp. 149-151. (1993)
- Marty-Teyssset, C., Posthuma, C., Lolkema, J. S., Schmitt, P., Divies, C., and



- Konings, W. N. : *J. Bacteriol.*, **178**, 2178-2185. (1996)
- Plihon, F., Taillandier, P., and Strehaiano, P. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 117-122. (1995)
- Pimentel, M. S., Silva, M. H., Cortes, I., and Faia, A. M. : *J. Appl. Bacteriol.*, **76**, 42-48. (1994)
- 佐藤昌康 : 味覚の生理学, 朝倉書店, 東京, pp. 40-47. (1991)
- Schmitt, P., Bernet, N., Zarzelli, Y., and Divies, C. : *Milchwissenschaft*, **49**, 183-185. (1994)
- Starrenburg, M. J. C., and Hugenholtz, J. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3535-3540. (1991)
- 田口田鶴子, 岡本洋子 : 家政誌, **41**, 509-516. (1990)
- 田口田鶴子, 岡本洋子 : 家政誌, **44**, 115-121. (1993)
- 田中潔 : 新食品開発用素材便覧 (吉積智司, 伊藤汎, 太田明一, 田村力 編), 光琳, 東京, pp. 278-283. (1991)
- Vedamuthu, E. R. : *J. Dairy Sci.*, **77**, 2725-2737. (1994)

## 終章 総括および今後の課題と展望

### 第1節 研究結果の要約

本研究では、栄養バランスのとれた日本型食生活の維持や食料自給、国土保全、自然環境維持などの面から日本人の主食である米の重要性に着目し、高齢社会の到来を考慮しながら米の新しい利用法に関して検討を行った。すなわち、上新粉を市販糖化酵素で糖化させ、その糖化液を用いて乳酸菌や酵母による発酵を試み、高齢者にも好まれるような嗜好性や消化吸収性に優れた発酵飲料の調製を試みた。

第1章では、酵素の種類やその添加酵素量および糊化状態の糖化に及ぼす影響を比較することにより、最適な上新粉糖化液を調製するための糖化条件について検討した。得られた結果は以下のとおりである。

- 1) 上新粉糖化においては市販5種の酵素を用いて検討したが、酵素の種類により、還元糖生成活性に差がみられ、糖化酵素単独処理よりも液化酵素である $\alpha$ -アミラーゼ ADと併用する方が生成量は大きくなった。
- 2) 糖化液調製には還元糖生成量の多かった上位2種の酵素グルコアミラーゼ A、グルクザイムを選択した。グルクザイムはグルコアミラーゼ Aに比し、グルコアミラーゼとしての力価が低く、添加酵素量を減少させた場合、活性がかなり低下し、添加酵素量としては10%上新粉懸濁液に対し0.25mg/g程度添加するのが適当と考えられた。
- 3) 糊化のための加熱時間を変化させて酵素反応を行った結果、糊化のための加熱時間にかかわらず、グルコアミラーゼ A処理糖化液の方が還元糖生成量が大きくなった。10%上新粉懸濁液250mlに対して、5分間加熱すると糊化開始温度にほぼ相当し、両処理の糖化液ともに還元糖生成量はほぼ最大のものが得られた。

第2章では、第1章で調製した糖化液を主体として乳酸発酵を行い、発酵飲料的な利用について検討した。得られた結果は以下のとおりである。

- 1) 糖化液のみで乳酸発酵を試みた場合、*L. helveticus*, *S. thermophilus*などの市販ヨーグルトスターターのような乳酸菌では発酵はほとんど進まなかつ



た。そのような乳酸菌を用いる場合には、10%スキムミルク溶液を2～3割混合すると飲むヨーグルト様の比較的良好な発酵飲料が調製できた。

2) 糖化液のみで発酵可能な乳酸菌について探索したところ、ケフィア中にその存在が見出された。ケフィアから単離した乳酸菌(ケフィア乳酸菌)は、菌の形態、デキストラン様物質の生成、糖の資化性などの結果から *Leuconostoc citreum* に属する可能性が高いと推定した。

3) ケフィア乳酸菌は20～30℃の間で糖化液をよく発酵し、比較検討用の *L. mesenteroides* IAM 13004 よりも酸生成速度も速く、その発酵液からはフルーティーな味が感じられた。それら乳酸菌による酸生成度は、還元糖生成量の少ないグルクザイム処理糖化液の方が、その生成量の多いグルコアミラーゼ A 処理糖化液よりも良好であったが、37℃で培養した場合にはいずれの乳酸菌も酸生成度が急激に低下した。

4) ミルク成分を混合することで、いずれの乳酸菌の場合もさらに酸度は上昇したが、フルーティーな味は糖化液のみで培養させた方が強く感じられた。

ケフィア乳酸菌を米粉糖化液で発酵させることにより、フルーティーな風味の発酵液が調製できたが、処理する糖化酵素の違いで、その発酵性が異なった。第3章では、その原因について、高い酸生成度を示したグルクザイム処理糖化液中の酸生成・生育促進物質を明らかにするための検討を試み、以下のことが明らかとなった。

1) 酸生成・生育促進に作用している可能性が考えられた糖および糖濃度、糖化酵素および糖化酵素のみを保温させて自己消化させた保温酵素などの影響を検討した結果、保温グルクザイム中に乳酸菌の酸生成にかかわる物質が含有されていることが確認された。

2) 糖化酵素グルクザイムは保温後自己消化により、アミノ酸量が著増しており、グルコアミラーゼ A 処理糖化液への微量添加で乳酸菌による酸生成が増大した。

3) 保温グルクザイムのTLCではニンヒドリン陽性の溶媒先端に近い画分(ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン付近)に酸度上昇が認められた。

4) TLCにおける活性画分のアミノ酸分析や既知アミノ酸添加効果などの結果から、糖化液培養において、ケフィア乳酸菌、*L. mesenteroides* IAM 13004と



もに酸生成・生育促進を示した主要成分はイソロイシンであることが判明した。また、イソロイシンが培地に存在している場合に限り、ロイシン、バリンに相加効果のあることが認められた。

第4章では、ケフィア中から糖化液で発酵させた場合に芳香性の良好な酵母を単離し、その単離酵母の同定を試みた。また、糖化液中での生育、発酵性について清酒用の *S. cerevisiae* IAM 4512 および発酵パン用の *S. cerevisiae* IAM 4178 と比較しながら、芳香性に優れ、アルコール度の無視できるような発酵飲料の調製を目的に検討した。得られた結果は以下のとおりである。

1) ケフィアから単離した酵母は、形態的特徴として腎臓形の子のう胞子および偽菌糸の形成が認められた。乳糖およびラフィノースの資化性、発酵性を有し、マルトースの資化性がなく、硝酸塩を資化しないなどの生理学的特徴を有した。これらの特徴から本酵母を *Kluyveromyces marxianus* と同定し、*Kluyveromyces marxianus* IIIU-1 と呼ぶことにした。

2) いずれの酵母で発酵を試みても、グルコアミラーゼ A 処理よりもグルクザイム処理糖化液の方が芳香性を含め、生育、発酵性ともに良好であり、培地の含有アミノ酸量がそれらに大きく影響していた。

3) *K. marxianus* IIIU-1 は、*S. cerevisiae* と比較すると糖化液培養中の挙動が異なっており、静置培養では *S. cerevisiae* IAM 4512 よりも生育度は若干低い値を示したが、振盪培養においては逆に高くなり、その生育速度も速かった。

4) 発酵飲料として利用していく場合、甘味の存在が必要であるが、その残存糖量を測定したところ、*K. marxianus* IIIU-1 の場合はいずれの培養法においても96時間後の残存糖量は調製糖化液の半量程度存在しているのに対して、*S. cerevisiae* IAM 4512 は96時間培養後にはほとんど糖を消費尽くしていた。

5) *K. marxianus* IIIU-1 のエタノール生成量は96時間後の静置培養においては約1%と *S. cerevisiae* IAM 4512 の約半分、振盪培養では培養時間にかかわらず、0.2%以下とわずかであった。甘い、フルーティーな芳香性を持つ *K. marxianus* IIIU-1 を用いることにより、米粉糖化液そのものの甘さを活かすことができ、しかも低アルコール度の発酵飲料が調製できる可能性が示された。

第5章では、ケフィア乳酸菌発酵糖化液を飲料として利用していくための調製条件および独特のフルーティーさに寄与する成分について含有有機酸の分析

を中心に検討を試みるとともに、調製した発酵糖化液が実際に高齢者にも好まれるかどうか学生との嗜好差を含め官能検査を実施した。そして、以下のことが明らかとなった。

- 1) 飲料としての調製条件を検討した結果、グルコアミラーゼ A 処理糖化液とグルクザイム処理糖化液との混合比率が 9 : 1 程度で、良好な発酵液が得られた。それを冷蔵庫中で貯蔵するとフルーティーな風味が増加した。
- 2) 乳酸発酵糖化液中の含有有機酸について、高速液体クロマトグラフィーや測定用キットを用いて分離分析した結果、乳酸発酵糖化液中の主要な有機酸は乳酸で、そのほとんどが D 型であった。その他に、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸などが検出された。発酵液中にクエン酸検出の報告はなく、独特のフルーティーさはクエン酸をはじめとするそれら有機酸の混合により感じられると推定した。
- 3) 乳酸発酵糖化液の嗜好性は、発酵糖化液に 3 % エリスリトールを添加したサンプルが、学生、高齢者ともに評価が高かった。
- 4) 学生は糖化液よりも発酵液の方を有意に好む傾向が認められた。高齢者の場合は 3 種のサンプルいずれも学生より評価が高く、特に糖化液においては学生との間に 2 ポイント程度の開きがあったが、サンプル間の嗜好差はそれほど大きくなかった。
- 5) 調製発酵液のフルーティーさは、被験者にレモンやリンゴ、梅などの風味として受け取られた。また、学生の 5 割以上が糖化液に米のような感じ、発酵糖化液にお酢のような感じを受けたのに対して、高齢者で同様な感じを受けた被験者は 1 名のみであった。これらの嗜好差は、高齢者の味覚閾値の上昇が関与している可能性が示唆されるが、嗜好差を含め本実験結果を一般化していくには高齢者の被験者数を増やすなど、さらなる検討が必要である。



## 第2節 総括および今後の課題と展望

米粉糖化液から発酵飲料を調製する際に、市販ヨーグルトスターターや清酒用酵母よりも風味、芳香性を含め糖化液を良好に発酵する乳酸菌および酵母をケフィア中に見出した。本研究のようにケフィアからの単離菌を用いて、新たに発酵食品を調製した例はなく、これら単離菌を使用し、高齢者にも受け入れられるような比較的良好な発酵飲料が調製できた点は意義があると考えられる。しかし、米粉糖化発酵の研究を進めていくに従い、各章でも述べてきたようにいくつかの検討課題が残された。その主要な点を今後の展望も含めて以下に示した。

酵素の種類により、上新粉糊化液の還元糖量に差がみられ、それら調製糖化液により、乳酸菌や酵母の生育や発酵性が異なった。その原因は酵素に含有されるグルコアミラーゼやプロテアーゼの活性の差により、アミノ酸の種類や生成量の差が出たためであった。したがって、これら酵素を用いることにより、米の種類による還元糖やアミノ酸生成量を比較し、またその糖化液の発酵を試みることで、おいしいといわれるご飯について何らかの示唆が得られる可能性がある。また、本研究では市販品の上新粉（ジャポニカ米）を用いて糖化液を調製したが、予備的な実験では輸入米（インディカ米）でも同様に調製でき、古米や輸入米の利用法の一つとしても応用できる可能性が高い。

ケフィア乳酸菌は、糖の資化性などの結果から *L. citreum* に属すると推定したが、DNA分析による最終的な同定が残された。また、ショ糖培養で、デキストラン様物質の生成も認められたが、ケフィア乳酸菌、*L. mesenteroides* IAM 13004 でその形状はかなり異なっており、その成分などの分析も今後の課題である。

米粉糖化液中のケフィア乳酸菌による酸生成には、イソロイシン、ロイシン、バリンなどのアミノ酸が関与していることが明らかとなったが、清酒の生もとをはじめ、蒸し糯米の饅頭（岡田ら 1982）、フィリピンの Puto（発酵米饅頭、Kelly et al. 1995）など、米の乳酸発酵には *Leuconostoc mesenteroides* が関わっている場合が多い。酸生成の少ないグルコアミラーゼ A 処理糖化液においても、生菌数的には  $10^7$ /mL 程度の存在が確認され、米中の何らかの成分が *Leuconostoc mesenteroides* 種を中心とする乳酸発酵に特異的に作用してい



る可能性があると考えられる。その点の検討も今後行っていきたい。また、米粉糖化液のケフィア乳酸菌発酵により、通常の発酵生成物の乳酸、酢酸以外にクエン酸、リンゴ酸、コハク酸などの有機酸が検出された。有機酸のなかでもクエン酸の生成は本研究で見出された新たな事実である。そのような有機酸がケフィア乳酸菌による糖化液発酵によって、特異的に生成されるのかという点や、有機酸の混合だけでそのフルーティーな味が感じられるようになるのかという点も検討課題の一つである。フルーティーな成分は冷蔵貯蔵で増加したように感じられたが、本実験においてはその冷蔵貯蔵したものしか有機酸分析を行っていない。発酵直後と冷蔵貯蔵後で有機酸分析を行う必要があるが、その場合の分析値がほぼ同一であった場合、貯蔵中にフルーティーさを感じさせる有機酸以外の成分が生成している可能性もある。また、イソロイシン、ロイシン、バリンのようなアミノ酸が糖化液の酸生成・生育促進作用を有していたことから、それらアミノ酸の単独および混合添加で有機酸組成などに変化がみられるがどうかについても、その代謝のされ方の検討を含めて今後深化発展させていきたいと考えている。

発酵飲料として利用する場合には、その栄養性、安全性、有効な生理作用などについても検討する必要がある。予備的な動物実験では調製した乳酸発酵液を多量に摂取させてもほとんど問題なく成長した。長期的な摂取の影響についても実験を重ね、さらにその乳酸菌、発酵生成物の生理的作用などについて検討していくことは今後の課題である。本研究で調製した乳酸発酵液の場合はグルコアミラーゼ A 処理糖化液とグルクザイム処理の混合割合が 9 : 1 程度のものがよく、その官能評価を行った結果、高齢者の方が評価は高く、発酵飲料として利用可能なものが調製できた。学生の評価においては、嗜好に男女差があるような傾向がみられ、女性の方がサンプル間の嗜好差は有意に高かった。高齢者の評価においても、若干そのような傾向がみられたが、結論付けるには評価人数が少ないので高齢者の評価および男女差についてはさらに検討を重ねていきたいと考えている。また、乳酸発酵液に関しては飲料としての利用だけでなく、ゼリーやシャーベットなどに加工可能と考えられ、幼児などを含め、世代間の嗜好差を考慮しながら最も食しやすい利用法についても検討していきたい。さらにグルクザイム処理発酵糖化液のように乳酸発酵がやや進行し、酸

味が強く感じられた場合には、そのフルーティーな風味を活かしたドレッシングなど、別の用途に応用可能と考えられる。

ケフィアから単離した酵母は *Kluyveromyces marxianus* と同定したが、米粉糖化液でこの菌種を発酵させた例はなく、清酒酵母 *S. cerevisiae* IAM 13004 と比較し、糖化液中の挙動がかなり異なっていることが本実験結果により判明した。*K. marxianus* HU-1 は *S. cerevisiae* IAM 4512 と同様に糖化液中で良好な生育が確認され、*S. cerevisiae* IAM 4512 よりもフルーティーな香りを呈した。また、その生育に比し、糖の消費は少なく、アルコールの生成量も *S. cerevisiae* IAM 4512 の約半分であった。したがって、飲料として用いる場合には *S. cerevisiae* よりも適当であると考えられる。酵母の発酵液については官能検査まで行うことができなかったが、酸味は少なく、乳酸発酵液とは嗜好性がかなり異なっている。両者の発酵液の嗜好性の比較検討は今後の課題である。

また、酵母の発酵液中の生成物についてはエタノール濃度の測定しか行っておらず、フルーティーな芳香成分や有機酸などの分析が残されている。*K. marxianus* HU-1 による米粉糖化発酵液は香りとともに、含むと味が広がる。どちらかといえばバナナ様の甘い香りに近いので、Fabreら (1995) が報告している酢酸イソアミルやイソアミルアルコールなどが含まれている可能性がある。しかし、培養条件、培養培地などが全く異なっているので生成物が同一とは限らず、糖化液中の発酵生成物の分析も課題の一つといえる。

さらに、本研究内容を高等学校家庭科を中心とする食物領域の教材の一つとして利用していく教科実践面も課題として残された。近年、家庭科教育は一つの大きな転換期を迎えており、1994年度から高等学校男女共修の家庭科が実施されている。今後さまざまな内容の検討が必要とされてくるであろうが、指導計画の作成にあたっては、“総授業時間数のうち、原則として10分の5以上を実験、実習に配当すること”との配慮事項が設けてある (文部省1989)。食生活領域においては調理実習はもとより、実験、実習を豊富に取り入れた内容の教材化が必要と考えられる。1997年度生用の高等学校の「家庭一般」および「生活一般」、「生活技術」の食生活に関する実験・実習例を分析すると、各種澱粉の糊化特性、グルテンを中心とする小麦粉の種類とその特性など、エネ



ルギー源である穀類を主体とする食品の性質に関する実験はほとんどの教科書に記載されている。しかし、現代の食生活において加工食品の占める部分は多いにもかかわらず、一部の教科書を除き、食品加工的な実験・実習などはほとんど扱われていない。したがって、その製造工程や原材料などの認識はかなり乏しいと推測される。それを補う教材の一つとして、発酵食品を挙げる事ができるであろう。

発酵食品は、発酵乳をはじめパンや納豆に代表されるように我々の食生活に馴染み深く、食品加工の知識を得るためにも食品の物性の変化、有用微生物の働きを知るうえでも重要な実験教材になり得ると考えられる。本研究で行った発酵液もそうした発酵食品の一つであり、その調製までの段階で種々の利用法があると考えられる。理想的には学校家庭クラブの活動の一貫として、米を粉にするところから高齢者の試飲会までを含めて行えば、食品加工、物性の変化、微生物の理解はもとより、高齢者と接触することによる学習効果も期待できる。しかし、生徒の人数、学習能力、設備、指導時間など考慮すべき点は多い。実験内容を部分的に応用していくなら、米粉の糊化においてはその糊化方法をガス加熱と電子レンジ加熱で行い、電子レンジ加熱の応用に関連づけ、米粉の糊化から糖化までに酵素で糖が分解される過程と代謝とを関係させて指導していくことも可能と考えられる。また、発酵工程の指導が困難な場合には、糖化液の調製後、殺菌の有無を比較し、食品の衛生的な取り扱い方や市販の清涼飲料水の品質表示などを参考にしながら、調製糖化液に酸味料、香料を添加した飲料を調製し、食品添加物の学習を兼ねた指導も考えられる。さらに上記発酵や代謝関係を含め、米の持つ背景から食文化、食料問題などについて類似領域にある理科や社会科との総合的な学習も可能ではないであろうか。

そのような総合的な学習を視野に入れ、男女共修を含めた食生活領域における今後の在り方の一つとして、理科と補間的に自然科学の理論を体験を通じて学習しながら（佐藤 1991）、その理論、知識をさらに日常生活のなかに応用・発展させていくことも必要ではないかと考える。本研究の米粉の糖化から乳酸発酵の過程に至るまでを考へても加熱による澱粉の糊化、酵素処理による糖化、微生物による食品の発酵などさまざまな物性の変化が起こる。これは「化学ⅠA」や「生物ⅠA」の内容を含むと同時に、家庭科のなかで食品の調理上



の特質，消化吸收のされ方，微生物の働き，その物性や有用微生物を利用した食品加工などが食品・栄養・調理の三領域にわたり，連続的，体験的に学習できる内容を含んでいる。したがって，本研究内容を教育内容として捉えた場合，その知見などを教材として応用すると，科学的理論に基づいた実験・実習が可能で，合科目的あるいは総合的学習も可能であると考えられる。他教科との連携の在り方，家庭科食物領域の実験，実習の将来の方向性を含め，実践面における本研究内容の教材面での応用，学習効果についての詳細な検討は今後の課題としたい。

## 引用文献

Fabre, C. E., Duviol, V. J., Blanc, P. J., and Goma, G. : *Biotechnol. Lett.*, **17**, 1207-1212. (1995)

Kelly, W. J., Asmundson, R. V., Harrison, G. L., and Huang, C. M. : *Int. J. Food Microbiol.*, **26**, 345-352. (1995)

文部省：高等学校指導要領解説 家庭編，実教出版，東京，(1989)

岡田早苗，小原直弘，小崎道雄：醗工，**60**, 403-408. (1982)

佐藤一精：広島大学教育学部研究紀要，**40**, 201-206. (1991)

検討した教科書（家庭科）：一橋出版，実教出版，教育図書，東京書籍の各出版社発行「家庭一般」，中教出版社発行「新・家庭一般」，一橋出版社発行「新家庭一般」，実教出版社発行「図説 高校家庭一般」，一橋出版，実教出版，教育図書，東京書籍，中教出版，学習研究社の各出版社発行「生活一般」，一橋出版，実教出版，教育図書の各出版社発行「生活技術」の1997年度生用の16冊

検討した教科書（理科）：第一学習社発行「高等学校 図解生物 I A」，「高等学校 図解化学 I A」，三省堂発行「生物 I A」，「化学 I A」，実教出版社発行「高校生物 I A」，「高校化学 I A」，東京書籍発行「生物の世界 [I A]」，「化学の世界 [I A]」，啓林館発行「高等学校 生物 I A」，「高等学校 化学 I A」の1997年度生用の10冊

## 謝 辞

本研究を進めるにあたりまして、指導教官である佐藤一精先生には、実験計画から論文作成と学部るときよりご指導を賜るとともに常に温かい励ましをいただき、あらゆる面でお世話になりました。深く感謝申し上げます。食物領域の井川佳子先生、片山徹之先生には、実験実施の際に大変お世話になるとともに、多くのご助言をいただきました。論文作成にあたりましては論文審査員の岩垂芳男先生、松橋有子先生、池田秀雄先生（理科教育学）、佐藤敏生先生（理学研究科）をはじめ、家政教育学講座の諸先生方にはご親切なご指導、ご教示を何度も賜りました。ここに厚く感謝申し上げます。

実験を行うにあたり、糖化用酵素を天野製菓（株）よりご恵与いただき、（財）飯島記念食品科学振興財団から平成8年度学術研究助成金のご援助をいただきました。また、国税庁醸造研究所の家藤治幸先生に大変お世話になるとともに後輩の三崎恵里さん、本宮ゆり香さんおよび醸造研究所の藤重郁子さんのご協力をいただきました。電子顕微鏡写真撮影、成分分析の際には日本電子（株）および日本分光（株）のご助力をいただきました。官能検査実施におきましては東広島社会福祉協議会事務局河内昌彦氏、腰本修氏のご尽力をいただき、東広島熟年大学受講生、広島大学学生有志のご協力をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

最後に、研究生活を楽しく、実りあるものにし、支えてくださいました食品学研究室の先輩方、同輩、後輩の皆様をはじめとし、多くの友人の方々に感謝いたします。