

ガスクロマトグラフ質量分析計による清酒香気成分の定量分析

大西 茂彦, 久保 和子, 浅井 貴子, 松原 梓, 西村 冨加

清酒の香気成分は、その品質を決定する重要な要素であり、消費者の嗜好にも強く関わっている。製品の品質評価や個性の把握において極めて重要である香気成分の分析を実施するため、ヘッドスペースオートサンプリング付きガスクロマトグラフ質量分析計（HS-GC/MS）での清酒香気成分分析法を検討した。その結果、確立した分析手法は清酒 6 香気成分の標準物質の検量線において相関係数 0.999 以上、5 回の反復分析の変動係数 5%未満であり、十分な分析精度を有していることを確認した。本法で市販の清酒の香気成分を分析したところ、製造方法の違いによる香りの特徴を評価することができた。

1 緒言

清酒の香気成分は、アルコール度数、日本酒度、酸度あるいはアミノ酸度などとともに、品質を決定する主な要素であり、消費者の嗜好にも強く関わっている。香気成分の分析は、製品の品質評価や個性の把握において極めて重要である。また、香気成分の分析により、酵母や発酵条件の管理および最適化が可能となり、品質の安定化や差別化を図ることができ、清酒の価値向上にも寄与する。しかしながら、清酒香気成分の分析には高額な分析機器が必要であるため、中小の清酒製造業者は独自で分析できないことから、公設試験研究機関において分析する体制を整備する必要がある。

本研究では、独立行政法人酒類総合研究所が作成した「全国新酒鑑評会出品酒香気成分分析手順書」¹⁾を参考に、香川県産業技術センターが保有するヘッドスペースオートサンプリング付きガスクロマトグラフ質量分析計（HS-GC/MS）での清酒香気成分分析法を検討したので報告する。

2 材料と方法

2.1 試薬および清酒

香気成分の標準物質（酢酸エチル、ノルマルプロパノール、イソブタノール、イソアミルアルコール、酢酸イソアミル、カブロン酸エチル）および内部標準物質（カブロン酸メチル、ノルマルアミルアルコール）は、富士フィルム和光純薬製で、カブロン酸エチルは試薬一級、それ以外の香気成分は試薬特級を使用した。香気成分標準溶液および内部標準溶液の調製には 99.5%エタノール試薬特級（富士フィルム和光純薬）および超純水を使用した。香気成分分析に供した清酒は、市販されているものを購入した。

2.2 香気成分標準物質の調製

香気成分標準溶液は、表 1 の濃度で各香気成分を含む 17%エタノール溶液として調製した。香気成分秤量時に重量を記録し、検量線作成時に表 1 の濃度を補正した。作成した香気成分標準溶液（st0～st4）は、20 mL 容ガラスバイアルに 8 mL ずつ分注して密封し、使用するまで -30℃で保存した。内部標準溶液は、50 mg/L カブロン酸メチル、2,000 mg/L ノルマルアミルアルコールを含む 17%エタノール溶液として調製し、20 mL 容ガラスバイアルに 8 mL ずつ分注して密封し、使用するまで -30℃で保存した。

2.3 清酒香気成分の定量分析法

全国新酒鑑評会出品酒香気成分分析手順書では、香気成分の検出に水素炎イオン化検出器を使用しているが、本研究では四重極型質量分析計を採用した。HS-GC/MS による清酒香気成分の定量分析は、表 2 の条件で行った。

表 1 香気成分標準溶液濃度

香気成分[mg/L]	st0	st1	st2	st3	st4
酢酸エチル	0.0	37.5	75.0	112.5	150.0
ノルマルプロパノール	0.0	25.0	50.0	75.0	100.0
イソブタノール	0.0	37.5	75.0	112.5	150.0
イソアミルアルコール	0.0	75.0	150.0	225.0	300.0
酢酸イソアミル	0.0	2.5	5.0	7.5	10.0
カブロン酸エチル	0.00	3.75	7.50	11.25	15.00

表 2 ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)分析条件

GC/MS	島津製作所 GCMS-QP2010 Ultra
カラム	InertCap Wax (30 m×0.32 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, ジーエルサイエンス)
オーブン温度	85℃
カラム流量	54.8 cm/s(線速度, ヘリウム)
パージ流量	3.0 mL/min
インターフェース	290℃
検出器電圧	チューニング結果からの相対値
マスレンジ	m/z 29-400
分析モード	スキャン
スキャンスピード	20,000 u/sec
HS	島津製作所 HS-20
HS 加熱温度, 時間	50℃, 30 分
注入モード	ループ(1 mL), スプリット(1:30)

清酒試料 0.9 mL を 20 mL 容ヘッドスペースオートサンプリング用バイアルに採取し、内部標準溶液 0.1 mL をマルチピペット M4（エッペンドルフ）を用いて加えて密封し、HS-GC/MS による香気成分分析に供した。

清酒香気成分の定量は、香気成分標準溶液 st0～st4 の分析結果から作成した検量線を用い、同一試料を 3 回反復分析した平均値を定量値とした。

3 結果と考察

3.1 清酒香気成分分析手法の確立

清酒香気成分標準液のトータルイオンクロマト(TIC)を図 1 に示した。標準物質 6 成分と内部標準物質 2 成分

を3分以内に検出することができた。表1の濃度で調製した香気成分標準物質を分析し、TICにおける各物質のピークエリア(PA)および内部標準物質2成分のPAから式1によりピークエリア比を算出し、最小二乗法により検量線および相関係数(R^2)を算出した(図2~7)。

(式1) ピークエリア比 = 香気成分標準物質のPA /
(カプロン酸メチルのPA +
ノルマルアミルアルコールのPA)

6成分のいずれの検量線も $R^2=0.999$ 以上の相関係数を示し、少ない誤差範囲での分析が可能であった。

次に、表1に示した6種類の香気成分を各濃度段階(st1~st4)ごとに、それぞれ5回ずつ分析し、図2~7の検量線で得られた濃度の平均値、標準偏差、変動係数(CV(%))を算出した。

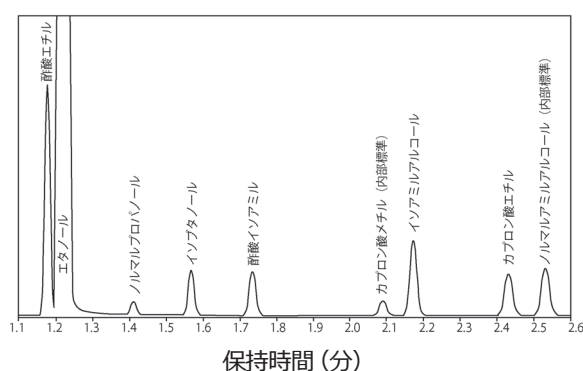


図1 香気成分標準溶液(st4)のクロマトグラフ

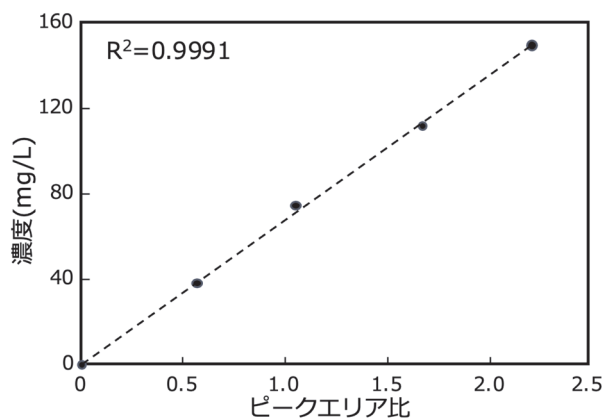


図2 酢酸エチルの検量線

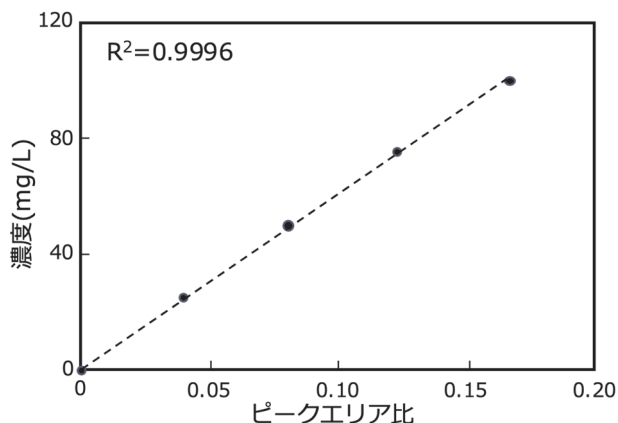


図3 ノルマルプロパノールの検量線

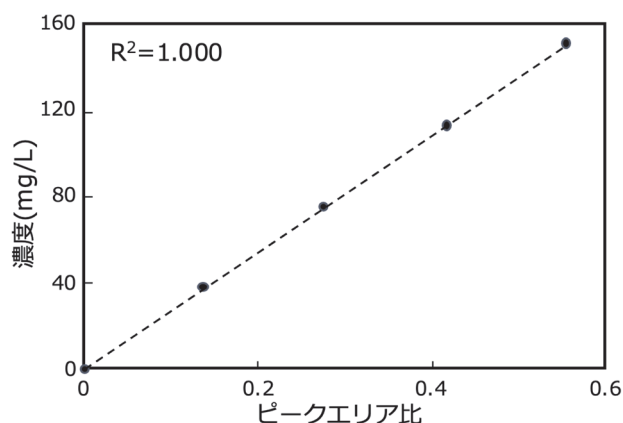


図4 イソブタノールの検量線

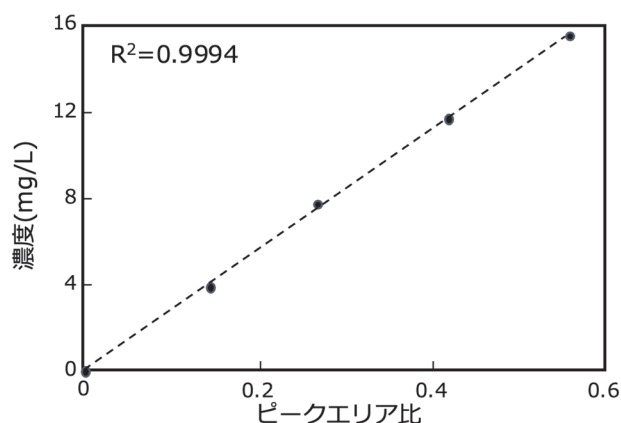


図5 酢酸イソアミルの検量線

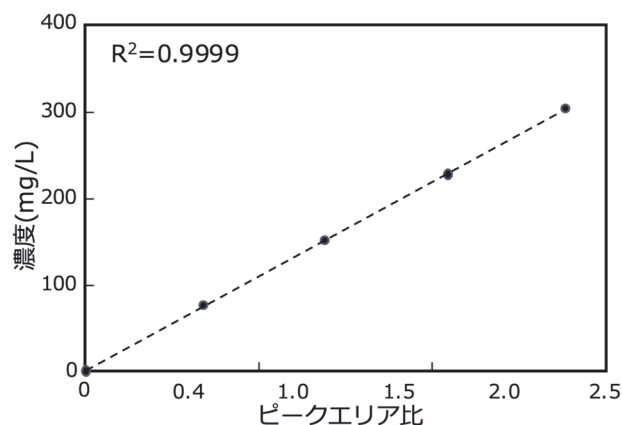


図6 イソアミルアルコールの検量線

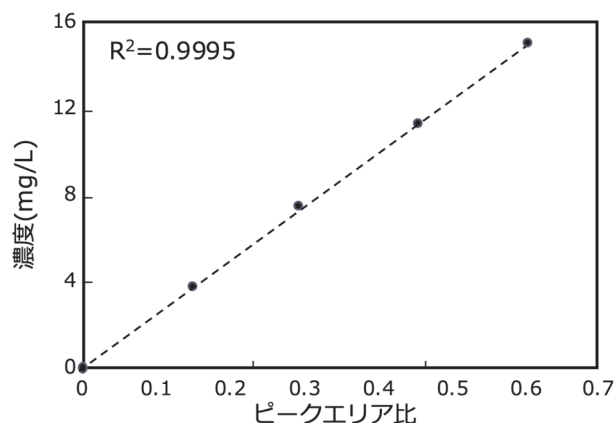


図7 カプロン酸エチルの検量線

表3 香気成分標準物質 st1 の定量結果

	平均値 [mg/L]	標準 偏差	CV[%]
酢酸エチル	38.8	1.40	3.6
1-プロパノール	24.7	0.66	2.7
イソブタノール	38.0	0.24	0.6
酢酸イソアミル	4.0	0.17	4.3
イソアミルアルコール	75.5	0.86	1.1
カプロン酸エチル	3.8	0.19	4.9

表4 香気成分標準物質 st2 の定量結果

	平均値 [mg/L]	標準 偏差	CV[%]
酢酸エチル	71.2	0.84	1.2
1-プロパノール	49.8	0.55	1.1
イソブタノール	75.3	0.62	0.8
酢酸イソアミル	7.5	0.06	0.8
イソアミルアルコール	151.5	1.74	1.2
カプロン酸エチル	7.2	0.10	1.3

表5 香気成分標準物質 st3 の定量結果

	平均値 [mg/L]	標準 偏差	CV[%]
酢酸エチル	114.5	1.56	1.4
1-プロパノール	75.5	1.53	2.0
イソブタノール	114.6	1.04	0.9
酢酸イソアミル	11.9	0.25	2.1
イソアミルアルコール	228.9	1.69	0.7
カプロン酸エチル	11.5	0.17	1.5

表6 香気成分標準物質 st4 の定量結果

	平均値 [mg/L]	標準 偏差	CV[%]
酢酸エチル	153.5	4.01	2.6
1-プロパノール	98.8	2.06	2.1
イソブタノール	150.3	1.46	1.0
酢酸イソアミル	16.0	0.37	2.3
イソアミルアルコール	298.9	4.22	1.4
カプロン酸エチル	15.5	0.40	2.6

表3～6に示すとおり, 6種類の香気成分の各濃度段階において, 5回の反復分析の変動係数(CV)は5%未満であった。

3. 2 市販清酒の分析

本研究で確立した香気成分分析法で市販清酒の香気成分を分析した。その結果(表7, 有効数字2桁で表記), 吟醸酒系はカプロン酸エチルの濃度が高く, 純米酒系は酢酸イソアミル濃度が高いなど, 製法の違いによる香気成分の違いを評価することができた。

表7 市販清酒の香気成分分析結果

香気成分[mg/L]	清酒1	清酒2	清酒3	清酒4
酢酸エチル	90	68	55	58
1-プロパノール	130	100	75	85
イソブタノール	83	68	48	53
酢酸イソアミル	4.1	3.9	2.5	2.3
イソアミルアルコール	200	190	130	140
カプロン酸エチル	0.9	1.3	7.2	3.1

清酒1: 特別純米酒, 清酒2: 純米酒, 清酒3: 純米吟醸, 清酒4: 純米吟醸

4 結言

本研究では, 独立行政法人酒類総合研究所が作成した全国新酒鑑評会出品酒香気成分分析手順書を参考に, HS-GC/MSによる6種の清酒香気成分の定量分析法を確立するとともに, その高い再現性を確認した。香川県産業技術センターでは令和7年度より, 本法を用いた依頼分析を開始し, 県内清酒製造業の振興に活用する予定である。

参考文献

- 1) 全国新酒鑑評会出品酒香気成分分析手順書 更新初版, 独立行政法人酒類総合研究所 品質・評価研究部門(2022)。

小麦由来アラビノキシランの定量について

木村 功

小麦由来のアラビノキシランを汎用的な機器で分析するため、示差屈折率検出器（RID）を備えた高速液体クロマトグラフ（HPLC）による定量性を検討した。相対標準偏差値 5% を分析装置のしきい値とした場合、キシロースおよびアラビノース標準糖液の定量下限値は、それぞれ 4.8 mg/100 mL および 5.3 mg/100 mL と算出された。また、本分析法で自家調製したアラビノキシラン 10 mg、20 mg および 50 mg をそれぞれ秤量し分析したところ、いずれも相対標準偏差値 3% 以下で定量できた。得られた標準糖液の定量下限値に基づき、小麦および小麦加工品に含まれるアラビノキシランの定量下限値を 3.0 g/100 g と見積った。一方、本分析法を用いて市販の小麦ふすま加工品および全粒粉中のアラビノキシラン含量を定量したところ、それぞれ 18.4 g/100 g および 3.2 g/100 g となり、定量範囲内で分析が可能であった。

1 緒言

アラビノキシランは、植物細胞壁に存在するヘテロ多糖類の一種で、キシロースの主鎖にアラビノースの側鎖が結合した構造を有している¹⁾。小麦全粒粉や小麦ブラン（ふすま）などに多く含まれており、お腹の調子を整え便通を改善する効果や、高脂血症等の予防および改善効果が報告されている²⁾。近年、小麦由来アラビノキシランを機能性関与成分とする届出が相次いでおり、その数は、県内製粉・製麺企業も含め 20 件余りとなっている³⁾。本成分は食物繊維とともに意識的に摂取することで、健康増進効果が期待される成分であるが、小麦由来アラビノキシランの定量は、操作が煩雑であるとともに高額な分析装置を用いるため、分析に対応できる機関は限られており、本成分の用途拡大を妨げる一要因となっている。

アラビノキシランの定量にはいくつかの方法^{4, 5)}があるが、一般的には、酸による加水分解を行い、その後中和と脱塩を経て、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）ポストカラム法による高感度分析⁴⁾が行われている。しかし、ポストカラム法は、複数の送液ポンプや高価な検出機器を必要とするため、導入経費が高額であることと、装置の汎用性が問題となっている。

そこで本研究では小麦由来アラビノキシランの用途拡大を目指して、定量時の操作性を簡便にするとともに、糖分析の汎用機器である示差屈折率検出器（RID）を用いて、その定量性を検討したので報告する。

2 材料および実験方法

2. 1 材料

稲わらアラビノキシランは、福本らの方法⁶⁾に基づいて調製した。分析に係わる試薬は富士フィルム和光純薬株式会社製を用いた。小麦は、令和元年北海道産の「春よ恋」を使用した。小麦ふすま加工品は、県内製粉メーカーより分譲された。

2. 2 分析試料の調製

食品試料をミキサー（岩谷産業株式会社）で粉砕し、目開き 500 μm の篩を通した後、所定量を試験管に精秤した。本試験管に 0.5 mL の 75% (w/v) 硫酸を添加し、

室温で 1 時間混合した後、14 mL の蒸留水で 100 mL 三角フラスコに洗い込み、オートクレーブ中において 121°C、1 時間加水分解した。

加水分解後の試料（約 15 mL）に炭酸バリウム（約 7 g）を発泡がおさまるまで少量ずつ添加し、pH 試験紙で中性付近であることを確認した。その後、ろ紙 No. 5 C（アドバンテック東洋株式会社）を用いてろ過し、ろ紙上の沈殿物を十分洗浄した後、ろ液と洗浄液を 100 mL メスフラスコに定容した。

本溶液の一定量に内部標準物質として 1% (w/v) *myo*-イノシトール 50 μL を添加し、1 g の Dowex 50 W (H⁺) で脱塩処理後、試験管濃縮器 TC-8（タイテック株式会社）で減圧濃縮し、定容したものを分析試料とした。

2. 3 構成糖の分析

標準糖液は、各単糖を五酸化リンデシケーター中で乾燥後、所定量を秤量して調製した。構成糖の分析は、Shodex SP-0810 カラム（昭光サイエンス株式会社）を接続した LaChrom HPLC システム（株式会社日立ハイテクフィールドディング）を用いて行った。なお糖の検出には L3350 RID（株式会社日立ハイテクフィールドディング）を用いた。分析操作は以下の手順で行った。まず、HPLC システムのカラム恒温槽の温度を 60°C に設定し、送液ポンプの流量を 0.8 mL/分 に調整した。次に、レオダイン注入装置を用い 20 μL の試料を分析装置に注入すると同時にクロマトレコーダーをスタートした。なお、溶離液として高純度蒸留水を使用した。

3 結果および考察

3. 1 標準糖の分離

標準糖液は、一般的な食品に認められる単糖（グルコース、キシロース、ガラクトース、アラビノースおよびフルクトース）を選別し、それぞれを精秤して調製した。これらの単糖類は、Shodex SP-0810 カラムを 2 本連結することで、いずれも重複することなく、良好に分離できた（図 1）。また、内部標準物質として用いた *myo*-イノシトールも上述の 5 種類の糖と重複することなく、完全に分離することが確認された（未掲載）。

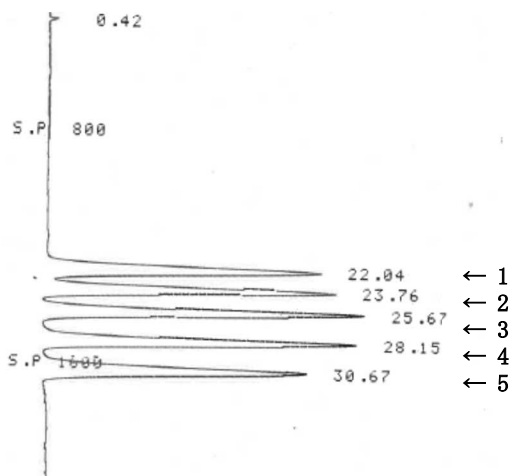


図1 標準糖液混合物のHPLCクロマトグラム

1:グルコース, 2:キシロース, 3:ガラクトース,
4:アラビノース, 5:フルクトース

3. 2 標準糖液の分析再現性と定量下限値

所定の濃度に調製した標準糖液を用いて独立した5回の繰り返し試験を行い、得られた定量値を統計解析した。その結果、いずれの標準糖液においても0.01% (w/v) 以上の濃度において、相対標準偏差値が4%以下となることが認められた(表1)。

表1 各標準糖液の分析時における相対標準偏差値

糖濃度 (%)	Glc	Xyl	Gal	Ara	Fru
0.5	0.03	0.20	0.04	0.10	0.06
0.1	0.63	0.38	0.50	0.48	0.29
0.05	0.95	0.97	0.71	0.28	0.63
0.01	2.92	3.47	2.10	2.04	2.93
0.005	3.64	14.76	12.19	29.41	17.10

糖濃度は質量対容量百分率 (w/v) %として示した。糖の相対標準偏差値は、所定の標準糖液をそれぞれ5回分析して算出した。

Glc: グルコース, Xyl: キシロース, Gal: ガラクトース,
Ara: アラビノース, Fru: フルクトース

次に表1の分析結果について、上本の報告⁷⁾を参考に、相対標準偏差値が5%となる標準糖濃度を定量下限値と設定し、キシロースおよびアラビノースの定量下限値を算出したところ、それぞれ4.8 mg/100 mLおよび5.3 mg/100 mLとなった。

3. 3 稲わらアラビノキシランの定量分析

福本らの方法⁶⁾に従って、稲わらよりアラビノキシランを調製し、2.2に基づいて粉末とした(写真1)。



写真1 稲わらアラビノキシラン

本アラビノキシランの所定量を加水分解後、中和・脱塩処理し、構成糖を分析した(図2)。

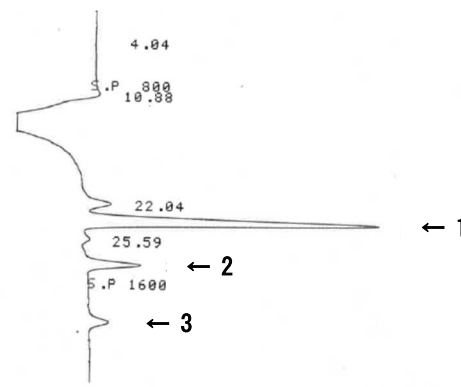


図2 稲わらアラビノキシラン加水分解物の構成糖

1:キシロース, 2:アラビノース, 3:内部標準 (myo-イノシトール)

稲わらアラビノキシランの主要な構成糖はキシロースとアラビノースであり、クロマトグラムで確認された単糖類のうち、それぞれ75%および14%となった。また10%程度のグルコースが認められ、桜井ら⁸⁾が報告しているように、アラビノキシランの他に微量のキシログルカンが混入していることが示唆された。構成糖分析の結果から、自家調製した稲わらアラビノキシランは主としてキシロースおよびアラビノースから構成され、本実験材料として適合すると判断した。

次に、分析試料の採取量が異なる独立した3回の繰り返し試験を行い、倉沢の報告⁹⁾および一般財団法人日本食品分析センターの報告⁴⁾に従って、アラビノキシラン量を算出した。その結果、稲わらアラビノキシランの採取量を10 mg, 20 mg および50 mgとした場合においても100 g当たりのアラビノキシラン量に大差は認められず、いずれも相対標準偏差値は3%以下となった(表2)。

表2 試料の採取量が分析値に及ぼす影響※

試料採取量 (mg)	10	20	50
平均値 (g/100 g)	49.17	46.73	45.56
標準偏差値 (±)	1.50	1.19	1.29
相対標準偏差値 (%)	3.00	2.55	2.83

※独立した分析を3回実施し、統計解析した。

構成糖分析では、試料採取量の増加に伴い精度が向上するが、加水分解後の中和処理が煩雑になることが課題となっている。特に、中和処理に伴って生成する硫酸バリウムのろ過や沈殿物の洗浄に多大な時間が費やされている。しかしながら今回、本分析法で採用した試料採取量は、アラビノキシランの定量性を損なうものでないことが示唆された。

各標準糖を用いた定量下限値を基に、日本食品分析センター⁴⁾および倉沢の報告⁹⁾を参考として、本分析法に

おけるアラビノキシランの定量下限値は3.0 g/100 g と見積もられた。一方、農研機構食品研究部門では、HPLC ポストカラム蛍光分析法を用いたアラビノキシランの定量下限値を0.3 g/100g と示しており¹⁰⁾、これは本分析法の定量下限値の1/10 倍量であった。

3. 4 小麦ふすま加工品中のアラビノキシラン含量

本分析法で、市販の小麦ふすま加工品および全粒粉中のアラビノキシラン含量を分析したところ、表3に示す結果となった。小麦ふすま加工品AおよびBは産地が異なるものの、それぞれのアラビノキシラン含量は同程度であった。全粒粉および自家調製全粒粉のアラビノキシラン含量は、それぞれは3.2 g/100 g および4.0 g/100 g となり、本分析法の定量範囲内の値であった。

表3 小麦ふすま加工品中のアラビノキシラン含量※

分析試料	産 地	アラビノキシラン (g/100 g)
加工品A	豪 州	18.4
加工品B	国 産	18.5
全粒粉	カナダ・豪州	3.2
自家調製全粒粉	国 産	4.0

※独立した分析を2回実施し、その平均値を示した。

一方、小麦ふすま加工品AおよびBに含まれるアラビノキシラン含量は、いずれも18 g/100 g 以上となった。今回分析した小麦ふすま加工品を用いることで、これまでアラビノキシランを機能性関与成分として届出された小麦ふすま関連商品³⁾に相当する商品の開発が可能であることが考えられ、本分析法が関連企業の新商品開発に寄与し得る可能性が示された。

4 結言

RIDを備えたHPLCを用いて、小麦ふすまおよび小麦加工品に含まれるアラビノキシランの定量性を検討し、本アラビノキシランの定量下限値を3.0 g/100 g と見積もった。

謝辞

小麦ふすま加工品を提供いただいた木下製粉株式会社に感謝いたします。

参考文献

- 1) 阪本龍司，尾崎嘉彦：食品系未利用バイオマスの高度利用化の現状と可能性，化学と生物，Vol. 52，No. 1，33-39 (2014)。
- 2) 青江誠一郎：穀類含有食物繊維の肥満関連指標に対する改善効果に関する研究，日本栄養・食糧学会誌，Vol. 75，No. 6，261-265 (2022)。
- 3) 消費者庁：機能性表示食品の届出検索 (URL: <https://www.fld.caa.go.jp/caaks/cssc01/>) [2024年8月27日検索]
- 4) 一般財団法人日本食品分析センター：小麦ブラン由来アラビノキシランの定量試験法および定性試験法 (URL: https://www.fld.caa.go.jp/caaks/cssc04/bunsekihoho?bunsekihohoFile=E421%255CE421_bunsekihoho.pdf) [2024年8月22日検索]
- 5) 農業研究センター：硬軟質小麦の製粉性と胚乳細胞壁成分との関連解明による簡易評価技術の開発 (URL: <https://agresearcher.maff.go.jp/kadai/show/79006>) [2024年8月22日検索]
- 6) 福本寿一郎，辻阪好夫，竹西繁行：ヘミセルラーゼに関する研究(第1報) *Aspergillus niger* のヘミセルラーゼの精製とその性質，日本農芸化学会誌，Vol. 44，No. 11，447-456 (1970)。
- 7) 上本道久：検出限界と定量下限の考え方，ぶんせき，Vol. 5，216-221 (2010)。
- 8) 桜井直樹，山本良一，加藤陽治 (1991) 植物細胞壁と多糖類，pp138，培風館。
- 9) 倉沢新一：食物繊維の定量法－定義と定量法の変遷－，日本食物繊維学会誌，Vol. 11，No. 1，1-14 (2007)。
- 10) 農研機構食品研究部門：機能性成分含有量データ(抜粋)分析法 (URL: https://www.naro.go.jp/laboratory/nfri/contents/ffdb/ffdb_pdf/bunseki.pdf) [2024年8月22日検索]

米デンプンの酵素処理について

ー未糊化デンプンのアミロース含量の低減化についてー

木村 功

県産米「おいでまい」から未糊化デンプンを調製し、各種アミラーゼ (α -アミラーゼ, β -アミラーゼ, アミログルコシダーゼおよびブルナーゼ) によってアミロース含量の低減化を図った。走査電子顕微鏡を用いて酵素処理デンプンの表面構造を観察したところ、 α -アミラーゼならびに β -アミラーゼで処理したデンプン表面にはディンプルの形成が認められ、それぞれのアミロース含量は対照とした未糊化デンプンの85%および79%となった。一方、アミログルコシダーゼで処理した場合には有孔デンプンの特徴的な構造が認められたが、アミロース含量は未糊化デンプンと同等であった。

1 緒言

近年、地域経済の活性化と環境負荷の軽減を目的とした地産地消の推進により、地元の農産物を活用した様々な食品が製造販売されている。またコロナ禍の後、食品流通事業者において、消費・賞味期限の延長が図られた商品が求められている。

食品の消費・賞味期限の延長が求められる背景には、食品ロス削減や物流の効率化、消費者の利便性向上などがあり、このニーズに応えるためには、食品の品質を長期間にわたって維持する技術が重要となっている。その一つの課題が「デンプンの老化」対策と考えられる。

デンプンの老化を防ぐ方法としては、急速冷却・冷凍技術や糖を混合すること、水分を調節するなどの方法があるが、近年、デンプン自体を化学的に改変し耐老化性を高めた加工デンプンが開発されている。しかしながら、加工デンプンは食品添加物に分類されるため、一部の消費者から敬遠されることもあり、表示義務がない酵素を用いたデンプンの物性改善技術が期待されている¹⁾。

デンプンの老化には、組織に含まれるアミロース含量が関係しており、高度に分岐したアミロペクチン含量が増加することで、老化を抑制することが報告されている²⁾。そのため、アミラーゼを用いてデンプンのアミロースを分解し、アミロペクチンを増やすことが試みられている³⁾。

このような背景の下、本県では地域ブランド米「おいでまい」を原材料とした和菓子類が販売されるに至り、その消費期限の延長が求められている。「おいでまい」の精米中のアミロース含量は20%程度(19.4%)⁴⁾と報告されており、当該米粉のアミロース含量等を酵素で改変できれば、耐老化性が高まり、用途の拡大が期待される⁵⁻⁷⁾。そこで本研究では、酵素を用いて「おいでまい」の耐老化性を高める技術の開発を目的として、酵素処理が未糊化デンプンのアミロース含量に及ぼす影響を検討したので報告する。

2 材料および方法

香川県産「おいでまい」は、令和5年度に収穫され、2024年5月下旬に精米された市販品を用いた。 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、アミログルコシダーゼおよびブル

ナーゼは、メルク株式会社より購入した。その他の試薬は、富士フィルム和光純薬株式会社製を用いた。

2. 1 未糊化デンプンの調製

未糊化デンプンは、Matsunaga ら⁸⁾および山本ら⁹⁾の方法に基づいて調製した。おいでまい100gを水道水で洗浄した後、600mLの蒸留水に4℃で一昼夜浸漬した。ファイバーミキサーMX-X43(パナソニック株式会社)に全量を移し、30秒の摩砕を4回繰り返した後、摩砕液を4層のガーゼでろ過した。ろ液を遠心分離(5,000×g, 15分)し、沈殿を回収した。沈殿物に蒸留水を加え懸濁液を調製した後、100 μ mの篩に通した。ろ液を回収し懸濁した後、56 μ mの篩を通過させ4℃で2日間静置した。上澄みを傾斜法で除去した後、2Lの0.2%(w/v)の水酸化ナトリウム溶液を沈殿に添加し、氷冷下において30分攪拌した後、4℃で18時間静置した。水酸化ナトリウムにおける処理を3回繰り返した後、沈殿物に蒸留水を添加し、溶液のpHが7以下になるまで繰返し洗浄した。懸濁溶液は遠心分離(5,000×g, 15分)し、回収した沈殿物を凍結乾燥した。

2. 2 酵素処理デンプンの調製

未糊化デンプンのアミラーゼ処理は、表1に示した市販酵素標品を用い、Keeratiburana ら¹⁰⁾の方法で行った。すなわち、未糊化デンプン100mgを20mM酢酸緩衝液pH5.5に懸濁し、100U/gデンプン濃度になるよう各種アミラーゼを添加し、反応溶液の最終液量を1mLにした。

表1 市販酵素標品

番号	酵素種類	起源
1	α アミラーゼ	<i>Bacillus</i> 属
2	アミラーゼ(マルトース生成)	<i>Bacillus</i> 属
3	β アミラーゼ	大麦
4	ブルナーゼ	細菌
5	アミログルコシダーゼ	<i>Aspergillus</i> 属
6	α アミラーゼ	<i>Aspergillus</i> 属
7	α アミラーゼ	ヒト
8	アミログルコシダーゼ	<i>Rhizopus</i> 属

本反応溶液を40℃の恒温槽中で120rpmで24時間振とうした後、3mLの98%(w/v)エタノールを添加し、遠心分

離 (5,000×g, 3分) によって沈殿物を回収した。本沈殿物を透析チューブ(分画分子量 12,000~14,000)に入れ、蒸留水を外液として 18 時間透析後、内容物を凍結乾燥したものを酵素処理デンプンとした。なお酵素反応にカルシウムを要する場合には、所定濃度の塩化カルシウムを含む緩衝液を用いた。

2. 3 各種分析

酵素処理デンプンの電子顕微鏡写真(以下、SEM 写真とする)は、走査電子顕微鏡 JCM-6000 PLUS(日本電子株式会社)を用い、運転条件(真空モード, High-vac.; 信号, SED 二次電子; プローブ電流, PC-std. および加速電圧 15 kV)を設定して撮影した。

未糊化デンプン酵素処理液の分析は、高速液体クロマトグラフ (HPLC) LaChrom システム (株式会社日立ハイテック製) を用い、Shodex KS-802 カラム(昭光サイエンス株式会社製)を 2 本連結し、カラム温度 60℃において、蒸留水を溶離液として流速 0.8 mL/分で分析を行った。なお、糖の検出は示差屈折率計を用いた。

酵素処理デンプンのアミロース含量は、AMYLOSE/AMYLOPECTIN 定量キット (Megazyme 社製) を用い、凍結乾燥した酵素処理デンプンを試料として定量した。

3 結果および考察

2. 1 の方法によって、浸漬した「おいでまい」100 g から 15.6 g の未糊化デンプン凍結乾燥物が調製できた。本デンプンを SEM 観察したところ、表面が平滑で凹みがなく、角ばった 5 μm 程度のほぼ均一な粒状であった (図 1)。

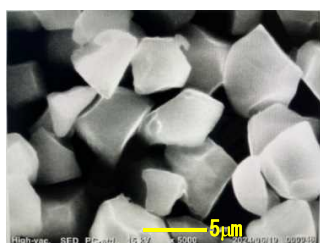


図 1 未糊化デンプン

3. 1 酵素処理デンプンの表面構造

各種アミラーゼで処理した未糊化デンプンの表面構造を図 2 に示した。いずれのアミラーゼも未糊化デンプンの表面に多数のディンプルが形成され、部分的に分解していることが認められた。α-アミラーゼ (酵素番号 1) ならびに β-アミラーゼ (酵素番号 3) のように作用様式が異なるアミラーゼ処理においても、SEM 観察において表面構造は類似していた。

カビおよびヒト由来の α-アミラーゼ (酵素番号 6 および 7) は未糊化デンプン表面のみならず、デンプン内部まで分解が進行しデンプン粒に孔が形成されていた (図 2)。一方、細菌由来の α-アミラーゼは、未糊化デンプンの表面に多数のディンプルを形成することが認められた (図 2)。

アミログルコシダーゼには、酵素番号 7 のように未糊化デンプンの内部まで分解する作用 (図 2) と、酵素番号 8 のように表面にディンプルを形成することなく、デンプン表面を均等に分解する作用など、酵素起源に

より異なる作用が認められた (図 2)。

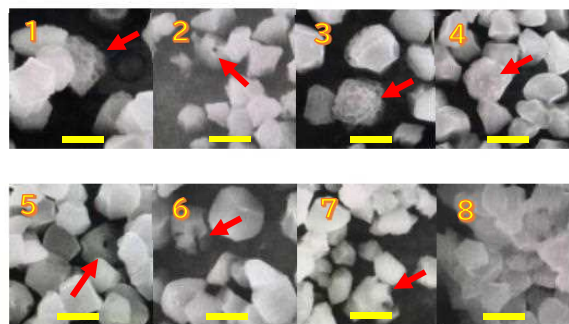


図 2 酵素処理デンプンの SEM 画像
写真左上の番号は表 1 の酵素番号に相当
赤矢印 (←) は特徴的な有孔形状を示す
写真下段の黄直線 (—) はスケール 5 μm

3. 2 未糊化デンプン酵素処理液のクロマトグラム

未糊化デンプンの酵素分解に伴う、デンプン由来の各糖の生成を HPLC で分析したところ、酵素番号 1 の *Bacillus* 属 α-アミラーゼにのみ、マルトトリオース以上のマルトオリゴ糖が確認できた (図 3)。一方、エキソ型で作用するアミログルコシダーゼおよび β-アミラーゼでは、グルコースやマルトース以外の糖成分は確認できなかった (図 3)。特に、β-アミラーゼ処理では未糊化デンプンからのマルトースの遊離量が少ないことが HPLC クロマトグラムにより認められた。

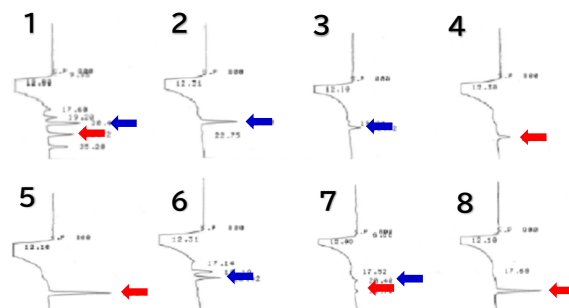


図 3 酵素処理液のクロマトグラム
図左上の番号は表 1 の酵素番号に相当
赤矢印 (←) はグルコースの溶出位置
青矢印 (←) はマルトースの溶出位置

未糊化デンプンの HPLC クロマトグラムでは、アミロース領域の分解を特定することが困難であった。そこで、SEM 画像で特徴的な表面構造が観察された試験区について、アミロース含量を定量した。α-アミラーゼ処理 (酵素番号 6)、β-アミラーゼ処理 (酵素番号 3) およびアミログルコシダーゼ処理 (酵素番号 8) について定量したところ、α-アミラーゼ処理で 16.5%、β-アミラーゼ処理で 15.4%、アミログルコシダーゼ処理で 19.7% となった。「おいでまい」の精米中のアミロース含量は 20% 程度 (19.4%)⁴⁾ と報告されていることから、α-アミラーゼおよび β-アミラーゼ試験区のア

ミロース含量は、未糊化デンプンに比較して 85%および 79%に低下していることが明らかとなった。一方、アミログルコシダーゼ (酵素番号 8) による処理では、**図 3**に示したように、他の酵素に比較してグルコースの生成量が多いにもかかわらず、アミロース含量は未糊化デンプンと同等となり、当該酵素が未糊化デンプンのアミロース領域およびアミロペクチン領域の双方を分解していることが推測された。

今回、 α -アミラーゼおよび β -アミラーゼを「おいでまい」の未糊化デンプンに作用させることで、アミロース含量を効果的に低減化できることが明らかとなった。特に β -アミラーゼは、未糊化デンプンからマルトースの遊離量が低く、デンプン自体の分解を抑えながらアミロースを低減化でき、未糊化デンプンの耐老化性を高める有用な酵素であることが示され、効果的に食品に使用することで消費期限の延長が図れるものと考えられた。

4 結言

県産米から調製した未糊化デンプンをエキソ型およびエンド型のアミラーゼで処理し、SEMで観察したところ、それぞれ特徴的な表面構造が認められた。

α -アミラーゼおよび β -アミラーゼによって処理されたデンプンのアミロース含量は未糊化デンプンに比較して有意に低減化していた。特に β -アミラーゼは未糊化デンプン自体の分解を低く抑えながら、アミロース含量を低減化する作用を有しており、酵素加工デンプンの調製に有用であることが示唆された。

参考文献

- 1) 山城 寛：澱粉老化を遅らせろ，生物工学会誌，Vol.100，No.10，565（2022）.
- 2) 山田 博：デンプンの老化，紙パ技協誌，Vol.41，No.2，25-33(1987).
- 3) 松木順子：澱粉の加工と食品利用，応用糖質科学，Vol.8，No.4，284-290（2018）.
- 4) 新田洋司，天井友加里，浅木直美，塩津文隆，大久保敏明：国内産銘柄米における理化学的特性と構成成分間の関係，日本作物学会関東支部会報 No.29，34-35（2014）.
- 5) 斎藤昭三：食品加工原料としてのコメ澱粉とコメ粉，澱粉科学，Vol.27，No.4，295-313（1980）.
- 6) 楠瀬千春：米粉とデンプンの調理性，日本調理科学会誌，Vol.42，No.5，361-365（2009）.
- 7) 松木順子：米粉利用のための特性評価の現状と課題，応用糖質科学，Vol.2，No.1，7-11（2012）.
- 8) Matsunaga N., Takahashi S., and Kainuma K.: Rice starch isolation from newly developed rice cultivars by the improved alkali method. *J. Appl. Glycosci.*, Vol.50, 9-13（2003）.
- 9) 山本和夫，沢田澄恵，小野垣俊雄：米澱粉調製の際のアルカリ溶液の濃度と種類の影響，澱粉科学，Vol.28，No.4，241-244（1981）.
- 10) Keeratiburana, T., Hansen, A.R., Soontaranon, S., Blennow, A. and Tongta, S.: Porous high amylose rice starch modified by amyloglucosidase and maltogenic α -amylase. *Carbohydrate polymers* (2019), doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115611>

「おいでまい」糊化米粉について —うるち米糊化米粉を用いた菓子種の試作—

木村 功

県産ブランド米「おいでまい」の米粉をオートクレーブ処理（121℃，30 分間）し，その後凍結乾燥を行うことで糊化米粉を得た．当該糊化米粉は未糊化米粉に比較して，蒸留水およびエタノールの吸収量がそれぞれ約 7 倍および約 3 倍に増加していた．また，糊化米粉は未糊化米粉の約 3 倍の膨潤力を示した．当該糊化米粉の特性を活用し，菓子種の試作を行った結果，米粉濃度が 2～8%の範囲で良好な菓子種の調製が可能であることが確認された．

1 緒言

近年，米粉を細かく粉にする技術¹⁾が進化したことで，パンやケーキ，麺類など，様々な種類の加工品が米粉で作れるようになった．また，日本米粉協会が高品質な米粉の普及に向け，米粉の「用途別基準」に適合する製品に協会の「推奨マーク」を付与する仕組みを開始したことで²⁾，用途に適した米粉を選択できるようになり，新たな食感や風味を求める消費者への提供が可能となった．

特に，米粉はグルテンを含まないため，グルテンフリーの食事を求める消費者にとって魅力的な選択肢となっており，健康志向やアレルギー対策として，米粉を使用したグルテンフリー製品の需要が増加している．一方，健康志向のみならず，地域農産物を加工し地域産品の原料とすることは，地産地消の観点から地域経済の活性化や環境負荷の低減に寄与し，地域農産物の消費拡大を促進するものであり，地域の特産品を活用した商品開発は，地元の消費者に対しても新たな価値を提供している．

米粉は製粉過程において米をそのまま製粉する β 型（未糊化製品）と加熱処理をした α 化型（糊化製品）があり³⁾，これまで様々な食品加工に利用されており，それぞれの用途に適した特性が報告されている⁴⁻⁶⁾．特に，加湿熱風処理を施した米粉は，短時間で糊化特性が大きく変わることが特徴である⁷⁾．一方で，乾熱や湿熱処理を施した米粉では，糊化温度の上昇や，加熱時の最高粘度の低下とともに，米粉の明度が低下し，赤色度および黄色度の増加が報告されている⁸⁾．

一方，米粉の加工適性を向上させるため，物理的あるいは化学的な手法で，糊化製品の表面積を特異的に増加させる手法が報告されているが^{9,10)}，いずれも加工処理に長時間を要するため，近年，実用的な方法としてオートクレーブを用いた加熱処理方法が報告されている¹¹⁾．当該手法は多孔性の糊化米粉を調製できるが，処理工程で多量のエタノールを利用することが課題となっている．

そこで今回，糊化処理した「おいでまい」米粉を凍結乾燥することで，新たな糊化米粉として調製できる可能性を得るとともに，菓子種としての現場利用を検討したので報告する．

2 材料および方法

2. 1 材料および試薬

香川県産「おいでまい」は，令和 5 年度に収穫され，2024 年 5 月下旬に精米された市販品を用いた．その他の試薬は，富士フィルム和光純薬株式会社製を用いた．

2. 2 糊化米粉の調製

「おいでまい」を粉エース（A-8）製粉機（株式会社国光社）で粉砕し，70 μm の篩を通過させた．本画分を 5% (w/v) 濃度で蒸留水に分散し 30 分間攪拌した後，オートクレーブ処理（121℃，30 分）した．糊化米粉の粉末化は，Patindol らの方法¹¹⁾に基づき以下の通り行った．すなわち米粉懸濁液と同容量の 99.5%エタノールにオートクレーブ後の溶液を流し入れ素早く攪拌した．沈殿物を傾斜法で回収し，風乾した後，乳鉢で摩砕し粉末とした．一方，同濃度で調製した米粉懸濁溶液をオートクレーブ処理した後，ステンレスバットに流し入れ，-20℃で一昼夜凍結し凍結乾燥機 FDU 830（東京理科大学株式会社）で乾燥した．乾燥物は小型ホモジナイザー IFM 7202（岩谷産業株式会社）を用いて粉砕処理し粉末とした．

糊化米粉の菓子種は以下の方法で調製した．米粉濃度が異なる菓子種は，所定量の米粉を秤量し蒸留水で 50 mL に定容後，上述の方法に従って調製した．

2. 3 各種分析

糊化米粉の電子顕微鏡写真（以下，SEM 写真とする）は，走査電子顕微鏡 JCM-6000 PLUS（日本電子株式会社）を用い，運転条件（真空モード，High-vac.；信号，SED 二次電子；プローブ電流，PC-std. および加速電圧 15 kV）を設定して撮影した．

糊化米粉の蒸留水およびエタノール吸収量ならびに膨潤力は，Patindol らの方法¹¹⁾に基づき，未糊化米粉を対照として分析した．

糊化米粉で調製した菓子種の破断強度は，クリープメータ 2 軸物性試験システム RE2-33005C（株式会社山電）を用い，円柱プランジャー（ $\phi 5$ mm）を装着し圧縮速度 1 mm/秒，ひずみ率 70%まで圧縮した．

3 結果および考察

調製方法の異なる糊化米粉を図 1 に示した．見かけ上，エタノール処理された糊化米粉は，未糊化の米粉粉末に

類似した形状を有していたが、凍結乾燥によって得た糊化米粉は空隙を有する棉状の粉末となった。

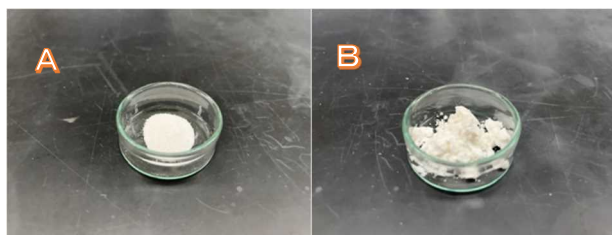


図1 糊化米粉調製物

A, エタノールによる脱水処理による調製物；B, 凍結乾燥による調製物

それぞれの微細構造を SEM で観察し、図2に示した。オートクレープ処理で糊化した米粉懸濁物は、エタノールによる脱水処理と凍結乾燥処理で形状が著しく異なることが認められた。エタノール処理では糊化米粉は、多孔質の粒子(図2 A)となっていたが、凍結乾燥物では薄い剥片の集合体(図2 B)であった。

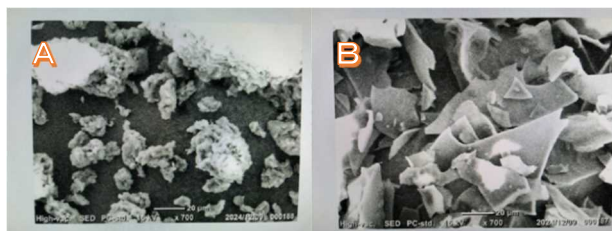


図2 糊化米粉調製物の SEM 写真

AおよびBは、図1の脚注と同様である。

次に糊化米粉調製物それぞれの特徴を明らかにするため、Patindol らの方法¹¹⁾に基づき、蒸留水およびエタノールの吸収量を比較した。

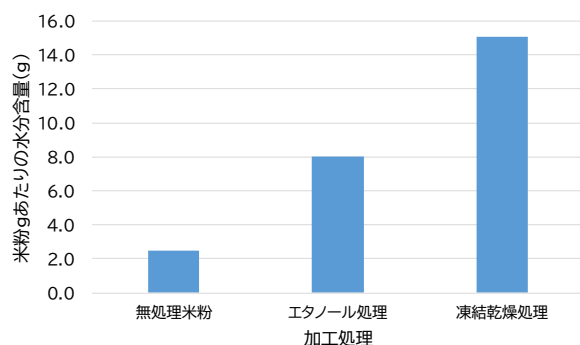


図3 糊化米粉調製物の蒸留水吸収量

その結果、エタノール処理で調製した糊化米粉は、未糊化米粉の約4倍程度の吸収量であったが、凍結乾燥によって調製した糊化米粉は、未糊化米粉に比較して、約7倍の吸収量となった(図3)。凍結乾燥によって調製した糊化米粉の微細構造、すなわち剥片の集合体であることが、高い水分吸収に関与したものと考えられた。

一方、エタノールの吸収量は、エタノール処理した糊化米粉では未糊化米粉と差異が認められなかったが、凍結乾燥によって調製した糊化米粉では、未糊化米粉の約3

倍の吸収量を示した(図4)。エタノールの吸収に関して、蒸留水と同様に糊化米粉の微細構造が関係していると推測された。

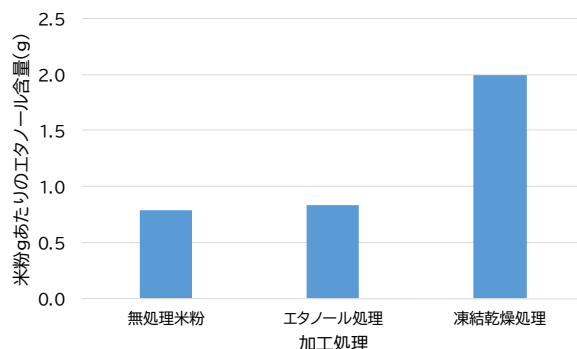


図4 糊化米粉調製物のエタノール吸収量

さらに、糊化米粉調製物それぞれの膨潤力を Leach らの方法¹¹⁾で比較した。その結果、エタノール処理で調製した糊化米粉は、未糊化米粉の約3倍程度の膨潤力であったが、凍結乾燥処理による糊化米粉では、未糊化米粉に比較して約4倍の膨潤力となった(図5)。

米粉の膨潤力が高いことは、食感の向上、料理の多様性、材料の節約といった多くのメリットを提供すること^{8,12,13)}から、凍結乾燥による糊化米粉の有用性が示唆された。

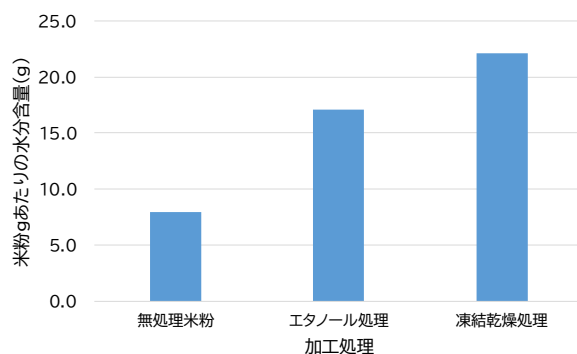


図5 糊化米粉調製物の膨潤力

水分吸収量や膨潤力が高いことは、菓子類の製造にも適している¹⁴⁾ことから、調製した糊化米粉を用いて、菓子種の試作を検討した。



図6 異なる米粉濃度で調製した菓子種

A, 米粉2%; B, 米粉4%; C, 米粉6%; D, 米粉8%

その結果、米粉濃度が2から8%の範囲で、いずれも良好な菓子種の調製が可能であることが確認された(図6)。

調製した菓子種をクリープメータで分析した結果、米粉濃度が高まるにつれて、応力が増加することが認めら

れた。米粉濃度8%での菓子種の最大応力は、市販のおかきを水浸漬した試料の最大応力0.68 MPaに等しく¹⁵⁾、極めてやわらかい食感を有する素材であることが示唆された(図7)。

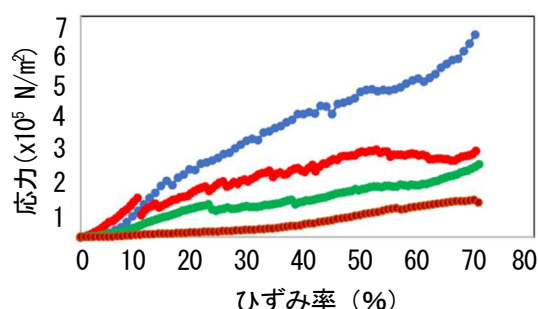


図7 糊化米粉で調製した菓子種の応力-ひずみ率曲線

●, 米粉2%; ●, 米粉4%; ●, 米粉6%; ●, 米粉8%

4 結言

県産ブランド米「おいでまい」の米粉を糊化处理し、その後凍結乾燥を行うことで糊化米粉を得た。当該糊化米粉の蒸留水およびエタノールの吸収量ならびに膨潤力を調べるとともに菓子種の試作を行った。

謝辞

クリーブメータによる物性解析を実施いただいた、産業技術センター食品研究所の三好主任技師に深謝いたします。

参考文献

- 1) 農林水産省：米粉用製粉機械の紹介，<https://www.maff.go.jp/j/seisan/keikaku/komeko/ricemill.html> (検索日：2025.2.3)
- 2) 日本米粉協会：米粉の用途別基準，<https://www.komeko.org/standard/> (検索日：2025.2.3)
- 3) 米・米粉情報まとめサイト：米粉の利用，https://www.okome-summary.jp/08/rice_flour_characteristic04.html (検索日：2025.2.3)
- 4) 長沼誠子：米粉の理化学的性質および調理特性に及ぼす微粉化の影響，秋田大学教育文化学部 紀要自然科学，Vol. 58，pp. 29-35，(2003)。
- 5) 長沼誠子：米粉の調理への利用，日本調理科学会誌，Vol. 42，No. 3，pp. 208-211(2009)。
- 6) 高橋節子，近堂知子，平尾和子：和菓子用米粉の物性と調理法に関する研究，日本調理科学会誌，Vol. 46，No. 2，pp. 100-106 (2013)。
- 7) 後藤清和：加湿熱風処理による米粉の糊化特性の変化，美味技術研究会誌，No. 11，pp. 40-46 (2008)。
- 8) 高橋徹，篠田和雄，三浦靖，金哲，小林昭一：加熱処理が米粉の物理化学的特性に及ぼす影響 加熱処理米粉の調理・加工への利用，日本食品科学工学会誌，Vol. 49，pp. 757-764 (2002)。
- 9) Xiao H, Lin Q, Liu GQ : Effect of cross-linking and enzymatic hydrolysis composite modification on the properties of rice starches, *Molecules*, Vol. 17, pp. 8136-8146 (2012)。
- 10) Weirong Y, Huiyuan Y. : Adsorbent characteristics of porous starch, *Starch - Starke*, Vol. 54, pp. 260-263 (2002)。
- 11) Patindol J, Shih F, Ingber B, Champagne E, Boue S : Porous rice powder from the precipitation of gelatinized flour or starch paste with ethanol, *Starch - Starke*, Vol. 65, pp. 296-303 (2013)。
- 12) 高橋徹，篠田和雄，三浦靖：加熱処理が米粉の物理化学的特性に及ぼす影響，秋田県総合食品研究所報告，Vol. 5，pp. 96-103 (2005)。
- 13) 庄子真樹，羽生幸弘，毛利哲，畑中咲子，池田正明，富樫千之，藤井智幸：製粉方法の異なる米粉の粉体特性と吸水特性の評価，日本食品科学工学会誌，Vol. 59，pp. 192-198 (2012)。
- 14) 東海農政局：米粉の種類と用途，<https://www.maff.go.jp/tokai/seisan/shinko/komeko/type.html> (検索日 2025.2.3)
- 15) 下山亜美，関道子，橋口美智留，羽深太郎，吉川秀樹：高齢者施設向け米菓類の物性評価，京都光華女子大学京都光華女子大学短期大学部研究紀要，Vol. 60，pp. 19-28 (2023)。

オリーブ果実全粒を用いた新規食品素材の開発

藤川 護, 久保 和子, 浅井 貴子, 松原 梓, 西村 冨加

オリーブ新規食品素材開発のため、オリーブ果実全粒を用いたペーストを試作し品質評価を行った。硬い種子を含む果実であっても、石臼式磨砕機を用いて二段階で処理することにより、滑らかなペーストを得ることができた。果実全粒をペースト化することにより、従来の種子を除いた可食部のみのペーストと比較して食物繊維が増加し、より健康イメージに訴求する新規オリーブ素材が開発できた。

1 緒言

県内におけるオリーブの栽培面積の拡大に伴い、今後、オリーブ果実の増産が見込まれており、新たな用途開発が喫緊の課題となっている。オリーブ果実は主にオリーブオイルや果実の塩蔵に加工されるほか、一部がペースト等に加工されている。オリーブを様々な用途に展開しやすいペースト状にするためには、喫食には適さない硬い種子を除去し可食部のみにする工程が必要であるが、非常に煩雑な操作であり、生産効率や歩留りの悪化が問題となる。短時間かつ安価にペースト化する方法として臼状の磨砕機を用いて種子ごとペースト化する方法が考えられるが、処理条件やその品質についてはこれまで検討されていない。

本研究では、クリープメーター2 軸物性試験システムを用い、滑らかさを指標として果実全粒をペースト化するための条件を検討するとともに、種子を除去する既存の果実ペーストと果実全粒のペーストの栄養成分を比較し評価した。

2 実験方法

2. 1 原料果実の調製

香川県農業試験場小豆オリーブ研究所で2024年10月下旬に収穫したミッションの果実を用いた。果実は常法¹⁾に従い脱渋後、-20℃で冷凍保存した。

2. 2 オリーブ果実の磨砕

スーパーマスコロイダーMKCA6-8 (増幸産業株式会社製) にグラインダー (MKE6-46#) を装着後、上下のグラインダーのクリアランスを20 μm に設定し、常温に戻した果実を1,500rpm、約1 kg/min の処理速度で磨砕した。磨砕した果実を同条件で再度磨砕し、これを MKE6-46#処理区とした。次に、グラインダーを MKGC6-80#に変更し、同様に2回磨砕した試験区を MKGC6-80#処理区とした。使用した各グラインダーの特徴を表1に示す。なお、初めにMKGC6-80#を使用して果実を処理した場合は、装置に過剰な負荷がかかり装置が停止したため、上記の2段階で磨砕処理を行った。得られた両処理区のペーストを48時間凍結乾燥後にフー

ドプロセッサで粉砕し、実体顕微鏡M80 (ライカマイクロシステムズ社製) を用いて、外観の観察を行った。次に、凍結乾燥後の粉砕物5 gを、開き目1 mmと0.5 mmの篩で分級し、篩上の残存物の重量を測定し、残存率を算出した。

2. 3 滑らかさの評価

摩擦試験機クリープメーター2 軸物性試験システム RE-33005B[XZ] (山電株式会社製) を用い滑らかさを評価した。ユニバック A-4 (70 mm×50 mm、厚さ0.04mm) 中に約5 gのオリーブ磨砕物を封入し、袋内で均一な厚さに伸展した後、XZ2の治具を用い、垂直荷重1 N、速度5 mm/s、摺動距離30 mm、データ取込速度0.05 sとして荷重を測定し、摺動距離における荷重の微分値 (以下、微分値) を算出した。

2. 4 栄養成分分析

脱渋後の果実から種子を取り除き、フードプロセッサで粉砕した試験区を種抜き区とし、MKGC6-80#処理区と種抜き区の栄養成分を新食品分析法²⁾ に準じて分析した。

3 結果

3. 1 オリーブ果実磨砕物の外観

脱渋後のオリーブ果実と種子を図1に、磨砕装置を用いて磨砕した両処理区の実体顕微鏡画像を図2に示す。果肉を除いた種子の重量は約0.44 gであり (n=50)、ミッション果実の平均重量は2.5-3.0 gであることから³⁾、果実重量に占める種子重量は約15%程度であると推定された。両処理区の外観については、MKE6-46#処理区ではペースト内に長径約1 mm程度の種子片が複数残存していたが、MKGC6-80#処理区では同様の種子片は認められなかった。次に、開き目が1 mmと0.5 mmの篩上に残存したオリーブペースト粉砕物の残存率とその外観を表2に示す。開き目が1 mmと0.5 mmの篩上に残存したオリーブペースト粉砕物の残存率は、MKE6-46#処理区ではそれぞれ1.0%と9.6%であったのに対して、MKGC6-80#処理区ではそれぞれ0.2%と5.3%であり、各開き目においてMKE6-46#処理区の

表1 各グラインダーの特徴

砥石型番	材質	用途	砥石粒度
MKE6-46 (深溝)	SiC+Al ₂ O ₃	軟質原料の微粉砕	#46 (微粉砕用)
MKGC6-80 (標準)	SiC	繊維質の微粉砕	#80 (超微粉砕用)



図1 オリーブ果実と種子

a: 果実, b: 種子

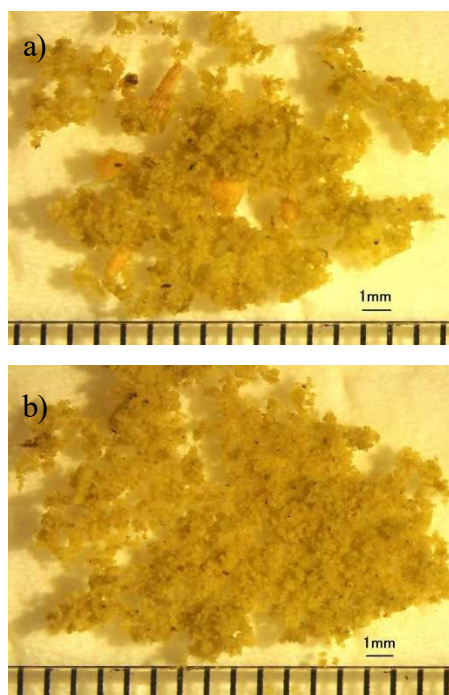


図2 摩砕後のペースト凍結乾燥物
a : MKE6-46#処理区, b : MKGC6-80#処理区

残存率が高かった。また、MKE6-46#処理区では篩上に残存した粉碎物中には磨砕しきれなかった果皮と硬い種子片が混じっていたのに対して、MKGC6-80#処理区では種子片は僅かで果皮が多く含まれていた。以上の結果より、MKE6-46#処理のみでは果実の約 15%を占める種子を十分に磨砕することはできないが、より目の細かい MKGC6-80#で処理することにより硬い種子を細かく磨砕でき、より細やかなペーストを調製できることが判明した。

3. 2 クリープメーター2 軸物性試験システムによる滑らかさの評価

クリープメーター2 軸物性試験システムを用い、微分値の変化の大きさと分布を指標としてペーストの滑らかさを評価した。両ペーストの代表的な微分値の変化を図3に示す。MKE6-46#処理区ではグラフが上下に大きく変動しているのに対して、MKGC6-80#処理区では変動は僅かであった。

次に両処理区における全 120 個の微分値の分布を図4に示す (n=5)。MKE6-46#処理区では微分値が -1 N/mm 以下から 1 N/mm 以上まで幅広く分布するのに対して、MKGC6-80#処理区では分布が -0.5 N/mm から 0.5 N/mm までに限られていた。特に -0.25 N/mm から 0.25 N/mm までの分布はMKE6-46#処理区では88.3%であるのに対して、MKGC6-80#処理区では99.0%であった。以上の結果より、MKE6-46#処理区では測定時に複数の硬い種子片に治具が繰り返し接触することで微分値が大きく変動したが、MKGC6-80#処理区では種子片も細かく磨砕されたため微分値の変動が小さくなったものと考えられ、これは実体顕微鏡での観察結果を反映していた。また、官能による評価ではMKE6-46#処理区は種子片によるざらつきを感じたが、MKGC6-80#処理区はMKE6-46#処理区と比較して滑らかな食感であり、外観の観察結果から 0.5 mm 以上の種子片が少なればざらつきを感じにく

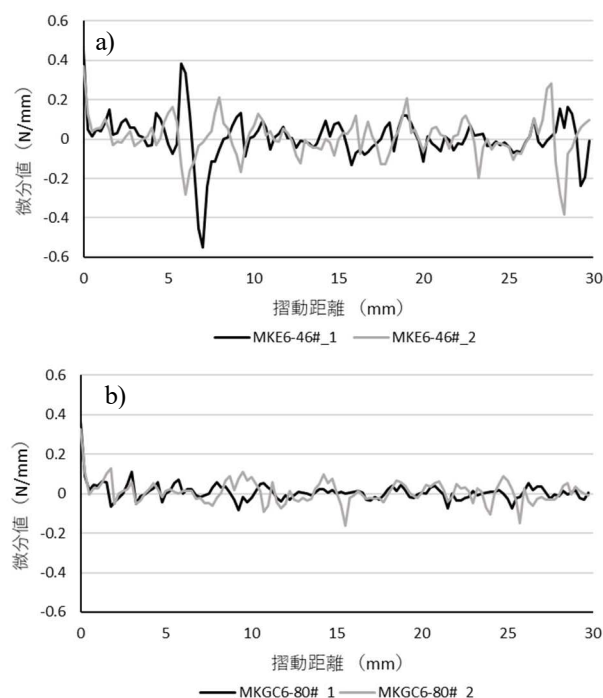


図3 微分値の変化
a : MKE6-46#, b : MKGC6-80#

表2 オリーブペースト粉末の分級

		開き目 1 mm 残存	開き目 0.5 mm 残存	開き目 0.5 mm通過
MKE6-46#	残存率 (%)	1.0%	9.6%	-
MKGC6-80#	残存率 (%)	0.2%	5.3%	-

いと推測された。

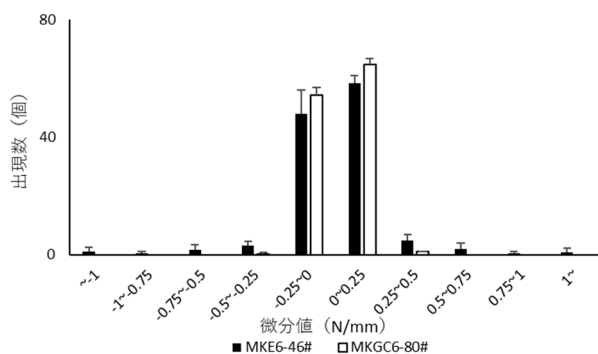


図4 微分値の分布

3. 3 オリーブペーストの栄養成分

MKGC6-80#処理区と種抜き区の栄養成分を表3に示す。種子ごとペースト化することで、MKGC6-80#処理区は種抜き区と比較して水分と糖質が減少し、脂質と食物繊維及び灰分が増加した。これは果肉が水分や糖質を豊富に含むのに対

表3 オリーブペーストの栄養成分

	(g/100 g)	
	MKGC6-80#	種抜き
水分	73.6	82.8
たんぱく質	1.4	1.3
脂質	10.2	7.8
炭水化物		
糖質	2.5	5.7
食物繊維	11.7	2.1
灰分	0.6	0.3

して、種子は主に食物繊維や脂質、たんぱく質及びミネラルで構成されており⁴⁾、種子ごと摩砕することで、種子に含まれるこれらの成分がそれぞれ増加し、相対的に水分や糖質が低下したためと考えられた。

以上の結果より、オリーブ果実全粒を石臼式磨砕機で処理することにより、既存の果実ペーストと比較して食物繊維を5倍多く含有するペーストを調製することができた。

4 結言

石臼式磨砕機を用いることで果実全粒を容易にペースト化することが可能であり、この全粒ペーストは既存のペーストと比較して豊富に食物繊維を含有することが判明した。全粒ペーストは既存のペーストとは風味が異なることから、今後、風味の特徴を活かしつつ、さらに健康イメージに訴求できる用途開発を行う予定である。

参考文献

- 1) 松岡博美, 柴崎博行: 新漬けオリーブの硬度保持に関する検討, 香川県産業技術センター報告, Vol. 18, pp. 91-92 (2017).
- 2) 日本食品科学工学会 新・食品分析法編集委員会編, 新・食品分析法, (光琳, 東京), pp. 6-105(1996).
- 3) 香川県庁: オリーブの品種・生態, <https://www.pref.kagawa.lg.jp/noshishozu/noshiolive/hinshu.html/> (検索日: 2025. 3. 14)
- 4) D Maestri, D Barrionuevo, R Bodoria, A Zafra, J Jiménez-López and J. D. Alche: Nutritional profile and nutraceutical components of olive (*Olea europae* L.) seeds, J. Food Sci. Technol., Vol. 56, No. 9, pp. 4359-4370(2019).

オリーブ葉を用いた後発酵茶の試作開発（第1報）

－製麹・乳酸発酵条件について－

佐々原 浩幸

醤油醸造に關与する麹菌及び乳酸菌を用いたオリーブ葉の後発酵茶の試作を行った。麹菌菌糸はオリーブ葉の断面で生育し、製麹 24 時間から 48 時間において最大の生育速度を示し、48 時間目における麹菌体量は 3.8 mg/g 乾燥麹となった。製麹時間の延長により麹菌体量は増加するものの生育は緩慢となり、孢子着生が過剰となった。製麹時のグルコース量は、製麹 24 時間で最大値 (18 mg/g 乾燥麹) を示した。乳酸発酵は不発酵となった。

1 緒言

後発酵茶は世界的に見ても珍しく、中国のプーアル茶、ミャンマーのラペソー、ミエン、また日本では高知県の基石茶、愛媛県の石鎚黒茶、徳島県の阿波番茶、そして富山県北部、新潟県糸魚川流域にバタバタ茶と、4 つの後発酵茶が存在し、長い歴史を有し地域特有の文化として継承されている。四国において香川県は後発酵茶の文化がなく、平成 14 年～16 年において、香川県の県花、県木であるオリーブの葉を用い、生茶葉の酸化酵素を利用した前発酵茶及び、乳酸発酵タイプの後発酵茶の開発について検討した経緯がある¹⁻³⁾。その際に試作された発酵茶は味質（渋味）、着色や乳酸発酵に課題があり、これら課題を解決するため、試作品は茶葉の混合比が極めて高いものとなった。

今回、オリーブ葉のみの後発酵茶を開発するため、本県の主要地場産業である醤油製造業において、使用されている麹菌 (*Aspergillus sojae*, *A. oryzae*) や醤油乳酸菌 (*Tetragenococcus halophilus*) を用い、醤油の「発酵」技術を基盤とし、オリーブ葉の後発酵茶を試作したので、その結果について報告する。

2 実験方法

2. 1 使用菌株

麹菌は *Aspergillus sojae* ATCC 200440、醤油乳酸菌は当研究所で培養配布のため保存している *Tetragenococcus halophilus* に属する醤油乳酸菌を用いた。

2. 2 製麹条件

乾燥オリーブ葉を粉砕したものに、120%散水し、121℃、20 分オートクレーブを行った。麹菌孢子懸濁液 (O.D. 600 nm=100) を乾燥オリーブ葉に対し 1 v/w% 添加した。培養温度は 30℃とし、温度経過を確認しながら、製麹 24 時間、48 時間で手入れを行い、80 時間で出麹とした。

2. 3 仕込み

出麹時の重量から、乾燥オリーブ葉に対して 200%散水となるよう加水し、乳酸菌を 0.1 v/w% 添加した。培養温度は 30℃とした。

2. 4 試料調製

経時的に試料を採取し、凍結乾燥後に粉砕したものを試料として用いた。

2. 5 分析

麹菌体量は試料を Yatalase 処理し、溶出した N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 量を藤井らの方法⁴⁾にて測定した。オレウロペイン、総ポリフェノール量は試料を 80%メタノールにて 3 回振とう抽出し、定容後にオレウロペインは HPLC 法⁵⁾、総ポリフェノール量はフォーリン・チオカルト試薬を用いたフォーリン法にて測定した⁶⁾。単糖及び乳酸は試料を超純水で 5 回抽出し、定容後に単糖は HPLC 法⁷⁾、乳酸は Lactate Assay Kit-WST (同仁化学研究所製) にて測定した。

2. 6 茶の調製と色調

試作したオリーブ葉後発酵茶は天日乾燥した。乾燥茶葉 2 g をティーパックに採り、100℃の熱水 100 ml にて 5 分間抽出したものをお茶とした。茶の色調測定は日本電色工業 (株) の分光測色計 SE7700 を用いた。

3 結果と考察

3. 1 オリーブ葉における麹菌の生育

オリーブ葉を用いた製麹 36 時間目の麹の状態を図 1 に、GlcNAc から換算した後発酵茶試作工程中の麹菌体量を図 2 に示した。麹菌はオリーブ葉の断面で生育し、表面に生育し難かった。図 2 より麹菌の生育は製麹 24 時間から 48 時間にかけて最大の生育を示し、その後、生育は緩慢となり孢子着生が過剰となった。オリーブ葉は揉捻操作が困難であり、ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性も低い。麹菌 PPO を用いて着色させるためには、麹菌を十分に生育させることが必要であり、オリーブ葉を裁断 (今回は乾燥して破碎) する必要性が示唆された。製麹中の品温経過はほぼ一定ではあるが二番手入れ前には 32.7℃を示した。



図1 オリーブ葉麹の状態

3. 2 後発酵茶試作工程での糖類の推移

図3に試作工程中の糖類の推移を示した。グルコース量の推移は24時間目に最大値18 mg/g 乾燥麹となり、その後、緩やかに減少した。

オリーブ葉（植菌0日目）には光合成産物であるショ糖が10 mg/g 乾燥麹程度、認められ、製麹48時間で消失した。製麹24時間で果糖（3 mg/g 乾燥麹）が生じ、

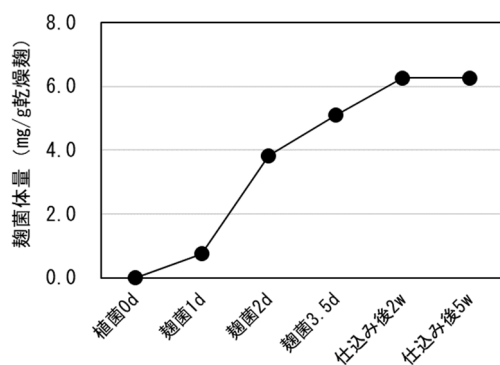


図2 後発酵茶の麹菌体量の推移

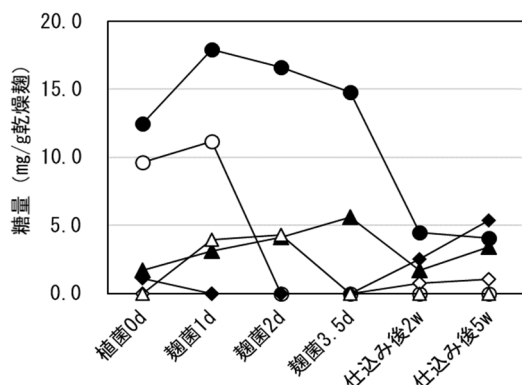


図3 後発酵茶の糖類の推移

グルコース (●), スクロース (○), ガラクトース (▲), フルクトース (△), アラビノース (◆), キシロース (◇)

仕込み時には消失した。ガラクトースもオリーブ葉に存在（2 mg/g 乾燥麹）し、出麹時（80時間）に最大値（5 mg/g 乾燥麹）を示し、仕込み後は減少傾向を示した。アラビノース、キシロースは仕込み後に生成された。

3. 3 乳酸発酵

図4に乳酸の推移を示した。図3から仕込み時のグルコースは15 mg/g 乾燥麹、存在した。しかしながら仕込み後の乳酸量はほとんど変化しないか、減少傾向を示した。

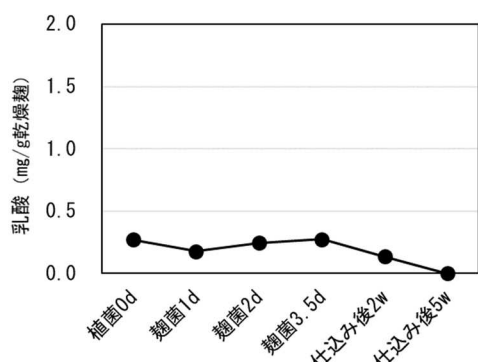


図4 後発酵茶の乳酸の推移

阿波番茶の乳酸発酵では、総ポリフェノール量の低い阿波番茶において、*Lactobacillus* 属以外の菌株が出現することが報告されている⁸⁾。また醤油乳酸菌はオリーブ葉抽出液培地での生育が極めて緩慢で、総ポリフェノール量20 mg/g 乾燥麹以下の環境が必要との知見も得られている（データ未掲載）。今回の試作されたオリーブ葉後発酵茶の総ポリフェノール量は44 mg/g 乾燥麹であった。オリーブ葉後発酵茶において乳酸発酵を行うためには、総ポリフェノール量を低下させると同時に基質を確保するか、高ポリフェノール環境下において増殖が可能な乳酸菌の選択が必要と考えられた。

3. 4 茶の評価

オリーブ葉を乾燥し、粉碎した茶と比較した。後発酵茶の色は褐色を呈し（図5、表1）、麹菌PP0による酸化反応が促されていた。味質（渋味）は若干の改善は認められるものの渋味は残存していた。

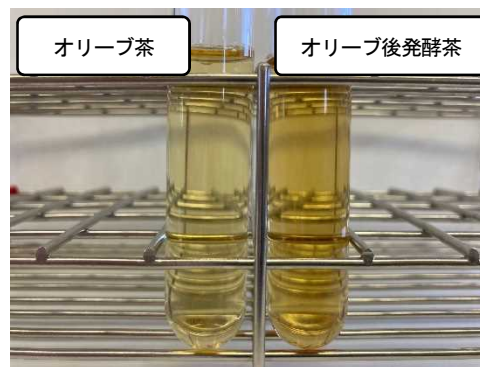


図5 オリーブ茶とオリーブ後発酵茶

表1 オリーブ茶とオリーブ後発酵茶の色調

	L*	a*	b*
オリーブ茶	92.82	-2.34	24.48
後発酵茶	86.60	0.11	42.66

オリーブ葉の主要なポリフェノールであるオレウロペインは製麹中に減少し、仕込み後2週間で消失していた。前報で指摘されたオレウロペインアグリコンの存在は製麹中に確認されたもののオレウロペインの消失と共に消失した（データ未掲載）。試作された後発酵茶の渋味は総ポリフェノール量に起因するのではないかと推測された。

4 結言

醤油製造業において、使用されている麹菌や醤油乳酸菌を用い、オリーブ葉の後発酵茶を試作し、製麹や乳酸発酵における基礎的なデータの収集を行った。

麹菌はオリーブ葉の断面で生育し、製麹24時間から48時間にかけて最大の生育を示した。製麹時間は48時間～60時間と決定した。尚、試作を繰り返すなかで、オリーブ葉は乾燥が早く、製麹に用いる容器は密閉タイプのものを選択するか、手入れ毎に蒸散による重量変化分の加水が必要であった。

オリーブ葉由来の糖としてショ糖、グルコース、ガラクトースが存在し、製麹中にフルクトースが、仕込み後の

乳酸発酵中にアラビノース、キシロースが生成した。最も存在量の多いグルコースは製麹24時間で18 mg/g乾燥麹であった。

醤油乳酸菌による乳酸発酵は生じなかった。既報より阿波番茶の乳酸発酵において総ポリフェノール量の低い阿波番茶において、*Lactobacillus* 属以外の菌株が出現すること、耐塩性乳酸菌はオリーブ葉抽出液培地での生育が極めて緩慢であることから、*Tetragenococcus halophilus* 以外の乳酸菌の選択も必要と考えられた。

試作された後発酵茶の味質（渋味）は若干の改善は認められるものの渋味は残存していた。

参考文献

- 1) 稲津忠雄, 藤澤浩子: オリーブ葉及び茶葉を原料とした発酵茶製造方法の検討 (第1報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 3, pp. 85-87 (2002).
- 2) 稲津忠雄, 藤澤浩子: オリーブ葉及び茶葉を原料とした発酵茶製造方法の検討 (第2報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 4, pp. 94-96 (2003).
- 3) 末澤保彦: オリーブ葉及び茶葉を原料とした発酵茶製造方法の検討 (第3報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 6, pp. 102-105 (2005).

- 4) 藤井史子, 尾関健二, 神田晃敬, 浜地正昭, 布川弥太郎: 市販酵素剤を利用した麹菌体量簡易測定法, 醸協, **87**, 757-759 (1992).
- 5) 柴崎博行, 藤澤浩子, 八木利枝: テーブルオリーブス脱渋液からのポリフェノールの回収, 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 7, pp. 97-98 (2006).
- 6) Swain, T and W. E. Hillis. The phenolic constituents of *prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents, *J. Sci. Food Agric.*, Vol. 10, pp. 63-68. (1959).
- 7) 松岡博美, 大島久華, 久保和子, 浅井貴子, 松原梓, 藤川護: ニンニク加工品の品質評価 (第2報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 19, pp. 61-64 (2018).
- 8) 内野昌孝, 小山翔大, 高野克己: 徳島県産後発酵茶「阿波番茶」の微生物とポリフェノールについて, 日本食品保蔵科学会誌, Vol. 46, pp. 63-69 (2020).

オリーブ葉を用いた後発酵茶の開発（第2報）

－麹菌のスクリーニング－

佐々原 浩幸

オリーブ葉を用いた後発酵茶の試作開発において、麹菌菌糸の生育不良、分生胞子の着生過多の課題を解決するため、オリーブ葉を原料とした製麹条件、最適な麹菌の検索、製麹条件の検討を行った。

当センター保有の麹菌 15 株を用い、菌糸の生育速度、麹菌体量及び胞子着生について検討し、*Aspergillus sojae* ATCC 200440 を優良株として選定した。本菌株を用いた製麹条件はオリーブ葉への散水量 120%、製麹温度は 30℃、製麹時間は 48 時間～60 時間であった。

1 緒言

四国において香川県は後発酵茶の文化がなく、平成 14 年～16 年において、香川県の県花、県木であるオリーブの葉を用い、生茶葉の酸化酵素を利用した前発酵茶及び、乳酸発酵タイプの後発酵茶の開発について検討した経緯がある¹⁻³⁾。その際に試作された発酵茶は味質（渋味）、着色や乳酸発酵に課題があり、これら課題を解決するため、試作品は茶葉の混合比が極めて高いものとなった。

今回、オリーブ葉の利用用途拡大・産業活性化を目的に、本県の主要地場産業である醤油の「発酵」技術を用いたオリーブ葉の後発酵茶の試作を行った⁴⁾。オリーブ葉の製麹工程においては麹菌の生育不良や胞子の着生過多、また乳酸不発酵の問題が確認された。

今回、オリーブ葉を用いた麹菌による製麹について、麹菌の選定、製麹条件について検討したので、その結果について報告する。

2 実験方法

2.1 培地

オリーブ葉抽出液 YM 培地（OLEx-YM 培地）を用いた。オリーブ葉抽出液は、10 g のオリーブ葉を熱水 100 ml にて 100℃、20 分間煮沸し、pH を 6.2 に調整後、ろ過した。市販の YM 培地に水の代わりにオリーブ葉抽出液を加え 121℃、15 分オートクレーブ処理した。

2.2 供試菌株

醤油用麹菌として保存している標準菌株を含む、当研究所保有株 15 株を試験に供した。

2.3 一次検索

培養温度 30℃にて、OLEx-YM 培地を用い、ジャイアントコロニーを形成させた。経時的に菌糸の伸長を計測し、生育 48 時間から 96 時間における菌糸伸長速度を求めた。値は 2 連の平均値とした。

2.4 二次検索

オリーブ葉 20 g を用い、シャーレ内にて製麹（120% 散水、30℃）を行った。経時的に試料を採取し、麹菌体量は藤井らの方法⁵⁾にて測定した。測定方法を図 1 に示した。胞子の着生については製麹段階で目視により確認すると共に、製麹した茶葉を市販のお茶パックを用い、茶を調製し、濁りを確認した。

2.5 製麹

オリーブ葉 150 g を用いて製麹を行った。散水量は乾燥オリーブ葉に対し 120% の散水とした。培養温度は 30℃とし、経時的に試料を採取し麹菌体量を測定した。

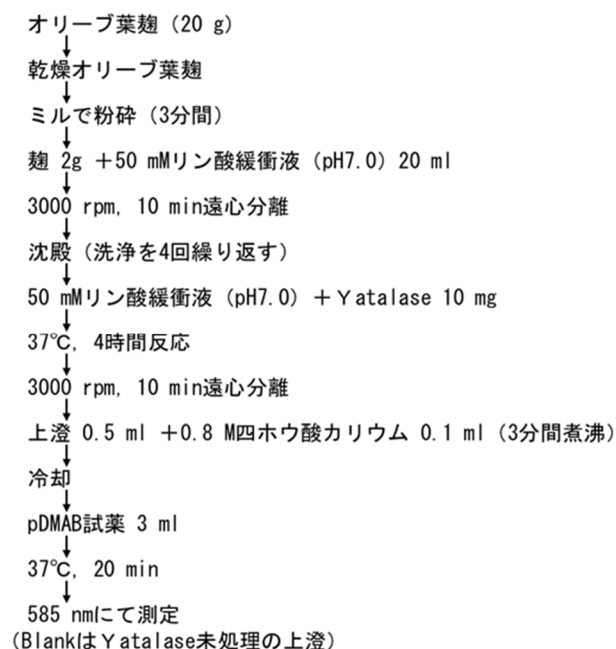


図 1 麹菌体量の測定法

3 結果と考察

3.1 麹菌の一次検索

図 2 に No. 10 及び No. 8 の 96 時間目の OLEx-YM 培地でのコロニーを示した。菌糸伸長速度には倍近い差異が確認された。表 1 に供試菌株 15 株の菌糸伸長速度を示した。上位 6 株と、対照として最も伸長速度が小さい No. 10 を二次検索に供した。

3.2 麹菌の二次検索

図 3 に No. 8, No. 16, 及び対照 No. 10 における 36 時間目のオリーブ葉麹の状態を示した。目視において麹菌菌糸はオリーブ葉の破断面で生育し、表面にはほとんど生育しなかった。No. 8 においては 36 時間目には胞子着生の過多が認められた。対照の No. 10 は菌糸の生育も一部に限定されていた。

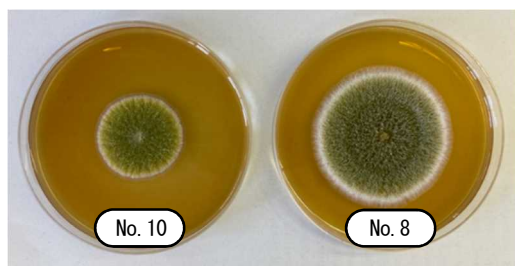


図2 OLEx-YM培地上での麹菌コロニー

表1 菌糸伸長速度

菌株No.	菌糸生育速度 (mm/h)
1	0.604
2	0.646
3	0.634
4	0.483
5	0.636
6	0.607
8	0.652
9	0.425
10	0.355
11	0.635
12	0.616
13	0.532
15	0.585
16	0.649
17	0.529



図3 オリーブ葉を用いた製麹の状態 (36時間目)

表2 オリーブ葉麹の麹菌体量 (72時間)

菌株No.	麹菌体量 (mg/乾燥麹g) ※
2	1.17
3	0.66
5	1.77
8	0.92
11	0.93
16	0.97
10	0.58

※: 139 μ gGlcNAcで1 mgの麹菌体量として換算した

表2に供試菌株の麹菌体量を示した。供試株No. 5は高い菌体量を示したが、胞子着生が過多であり、茶作成時に濁りが生じた。No. 2, No. 8, No. 11も同様であった。No. 16が比較的、麹菌体量が多く、培養72時間目においても、目視による胞子の着生はほとんど見受けられなかった(図4)。No. 3及び対照のNo. 10においては菌糸の生育が不良であった。以上の結果から、No. 16



図4 オリーブ葉を用いた製麹の状態 (72時間目)

(*Aspergillus sojae* ATCC 200440) を優良株として選定した。

3. 3 製麹における麹菌体量の推移

麹菌の菌体量から製麹24時間～48時間の間で、最大の生育速度を示した(図5)。その後、製麹時間の延長により麹菌の菌体量の増加は認められるが、72時間の時点で胞子着生が目視で確認された。

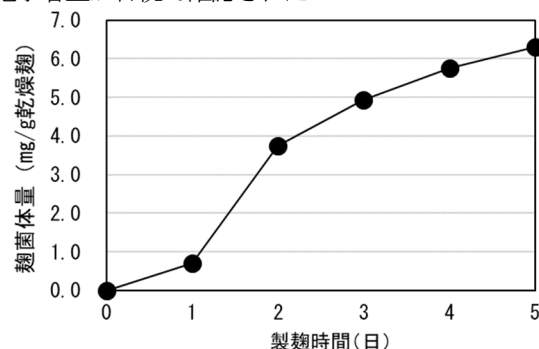


図5 オリーブ葉における麹菌の生育

4 結言

オリーブ葉を用いた後発酵茶の試作において、製麹での麹菌の生育不良や胞子の着生過多が認められた。そのためオリーブ葉を用いた後発酵茶に適した麹菌の選定を実施した。当研究所保存株15株から、OLEx-YM培地上での菌糸生育速度から6株を選定した。更にオリーブ葉を用いて製麹を行い、麹菌体量、及び胞子着生の度合いから *Aspergillus sojae* ATCC 200440 を選択した。

麹菌体量の推移(図5)から製麹時間は48時間～72時間程度が望ましく、72時間目には胞子着生が認められたことから60時間で出麹とした。

参考文献

- 1) 稲津忠雄, 藤澤浩子: オリーブ葉及び茶葉を原料とした発酵茶製造方法の検討(第1報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 3, pp. 85-87 (2002).
- 2) 稲津忠雄, 藤澤浩子: オリーブ葉及び茶葉を原料とした発酵茶製造方法の検討(第2報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 4, pp. 94-96 (2003).
- 3) 末澤保彦: オリーブ葉及び茶葉を原料とした発酵茶製造方法の検討(第3報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 6, pp. 102-105 (2005).
- 4) 佐々原浩幸: オリーブ葉を用いた後発酵茶の開発(第1報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 25, pp. 86-88 (2024).
- 5) 藤井史子, 尾関健二, 神田晃敬, 浜地正昭, 布川弥太郎: 市販酵素剤を利用した麹菌体量簡易測定法, 醸協, Vol. 87, pp. 757-759 (1992).

オリーブ葉を用いた後発酵茶の開発（第3報）

ーオリーブ葉におけるシイタケ菌（*Lentinula edodes*）の培養・乳酸発酵条件についてー

佐々原 浩幸

オリーブ葉を用いた後発酵茶の試作開発において、麴菌にて試作した後発酵茶の渋味（苦味）の改善のため、白色腐朽菌であるシイタケ菌（*Lentinula edodes*）を用い、オリーブ葉での培養条件の検討を行った。散水量は160%、25℃にて密閉容器内にて培養した。シイタケ菌体量の推移から製麴時間の決定は困難であった。仕込み後の乳酸発酵の基質であるグルコース量の推移から培養時間を2週間と決定した。醤油乳酸菌による乳酸発酵は仕込み後5週間目に確認され、茶葉の総ポリフェノールを20 mg/g 乾燥茶葉程度まで低下させる必要があると考えられた。

1 緒言

後発酵茶は世界的に見ても珍しく、中国のプーアル茶、ミャンマーのラペソー、ミエン、また日本では高知県の基石茶、愛媛県の石鎚黒茶、徳島県の阿波番茶、そして富山県北部、新潟県糸魚川流域にバタバタ茶と、4つの後発酵茶が存在し、長い歴史を有し地域特有の文化として継承されている。四国において香川県は後発酵茶の文化がなく、平成14年～16年において、香川県の県花、県木であるオリーブの葉を用い、生茶葉の酸化酵素を利用した前発酵茶及び、乳酸発酵タイプの後発酵茶の開発について検討した経緯がある¹⁻³⁾。その際に試作された発酵茶は味質（渋味）、着色や乳酸発酵に課題があり、これら課題を解決するため、試作品は茶葉の混合比が極めて高いものとなった。

前回、醤油醸造に関与する麴菌、醤油乳酸菌を用いて後発酵茶の試作を行ったところ、味質（渋味）について若干の改善は認められたものの、渋味は残存していた⁴⁾。今回、味質の改善を目的に白色腐朽菌であるシイタケ菌を用いて後発酵茶の試作を行い、基礎的知見を得たので、その結果について報告する。

2 実験方法

2. 1 使用菌株

麴菌は *Aspergillus sojae* ATCC 200440、醤油乳酸菌は当研究所で培養配布のため保存している *Tetragenococcus halophilus* に属する乳酸菌を用いた。シイタケ菌は当研究所保存菌株を用いた。

2. 2 シイタケ菌による製麴

乾燥オリーブ葉を粉碎したものに、120%散水し、121℃、20分オートクレーブを行った。シイタケ菌の植菌は鮫島らの方法⁵⁾に準じた。培養温度は25℃とし、培養時間は4週間とした。手入れは1週間毎に行った。随時、乾燥による重量変化分の滅菌水を添加した。

またオリーブ葉にシイタケ菌を培養後、麴菌による製麴を行った試験も合わせて実施した。麴菌による製麴は30℃、60時間とした。

2. 3 仕込み

培養終了時のオリーブ葉重量から、乾燥オリーブ葉に対して200%散水となるよう加水し、乳酸菌を1 v/w%添加した。培養温度は30℃とした。

2. 4 試料調製

経時的に試料を採取し、凍結乾燥後に粉碎したものを試料として用いた。

2. 5 分析

シイタケ菌体量は試料を37℃、1%Yatalase+0.5%セルラーゼ ONOZUKA R-10 にて4時間処理し、溶出したN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）量を藤井らの方法⁶⁾にて測定した。オレウロペイン、総ポリフェノール量は試料を80%メタノールにて3回振とう抽出し、定容後にオレウロペインはHPLC法⁷⁾、総ポリフェノール量はフォーリン・チオカルト試薬を用いたフォーリン法にて測定した⁸⁾。単糖及び乳酸は試料を超純水で5回抽出し、定容後に単糖はHPLC法⁹⁾、乳酸はLactate Assay Kit-WST（同仁化学研究所製）にて測定した。

2. 6 茶の調製と色調

試作されたオリーブ葉後発酵茶は天日乾燥した。乾燥茶葉2gをティーパックに採り、100℃の熱水100 mlにて5分間抽出したものをお茶とした。茶の色調測定は日本電色工業（株）の分光測色計SE7700を用いた。

3 結果と考察

3. 1 オリーブ葉におけるシイタケ菌の生育

目視によるシイタケ菌の生育は、培養1週間目で部分的に菌糸が認められ、2週間目において全体に菌糸が蔓延した。手入れ後も1週間毎に菌糸が蔓延し、オリーブ葉麴は白色を呈した。図1にシイタケ菌体量をGlcNAc量で示した。製麴2週間以降においてGlcNAc量は変化せず、酵素処理条件を再検討する必要性があり、得られたシイタケ菌体量の結果から製麴時間の適正化は困難であった。

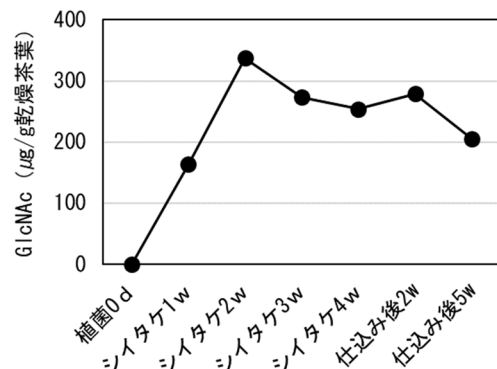


図1 後発酵茶のGlcNAc量の推移

シイタケ菌を4週間生育させたのちに、麹菌を接種し、前報⁴⁾に従い、30℃にて製麹を行った。麹の生育に特に問題はなく、48時間に麹菌菌糸は蔓延し、60時間で出麹とした。ここでも今回の酵素処理条件では、麹菌生育に伴うはずであるGlcNAc量の増加は確認できなかった(図2)。

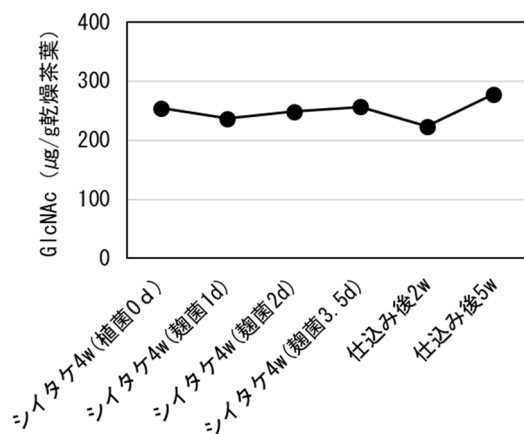


図2 後発酵茶のGlcNAc量の推移

3. 2 後発酵茶試作工程での糖類の推移

図3に試作工程中の糖類の推移を示した。グルコース量の推移は2週間目に最大値18.3 mg/g 乾燥茶葉となり、麹菌による製麹の最大値と同等であった。培養4週間目では7.6 mg/g 乾燥茶葉となった。仕込み2週間目で2.2 mg/g 乾燥茶葉まで低下し、その後は一定であった。

またシイタケ菌の培養後、麹菌により製麹を行ったところ製麹24時間で11.8 mg/g 乾燥茶葉まで増加し、その後は減少した(図4)。

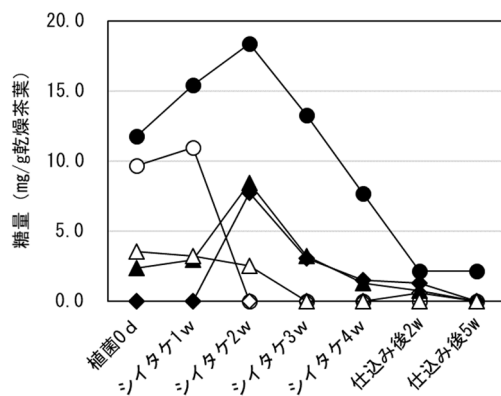


図3 後発酵茶の糖類の推移

グルコース (●), スクロース (○), ガラクトース (▲), フルクトース (△), アラビノース (◆), キシロース (◇)

その他の糖としては、オリーブ葉(植菌0日目)には光合成産物であるショ糖が10 mg/g 乾燥茶葉程度認められ、シイタケ菌での培養2週間目で消失した。2週間目まで果糖(3 mg/g 乾燥茶葉)が存在し、3週間目には消失した。ガラクトース及びアラビノースは2週間目に最大値(ガラクトース:8.4 mg/g 乾燥茶葉, アラビノース:7.7 mg/g 乾燥茶葉)を示した。その後は減少し、仕込み前にはそれぞれ1.3 mg/g 乾燥茶葉, 1.5 mg/g 乾燥茶葉となり、仕込み後はピークとして検出されるものの1 mg/g 乾

燥茶葉以下となった。キシロースは仕込み後に生成された(図3)。

シイタケ菌の培養の後に麹菌により製麹した麹のグルコース以外の糖については、シイタケ菌培養中にほぼ消失してはいるが、麹菌の生育により、ガラクトース, キシロース, アラビノースは増加傾向を示した(図4)。

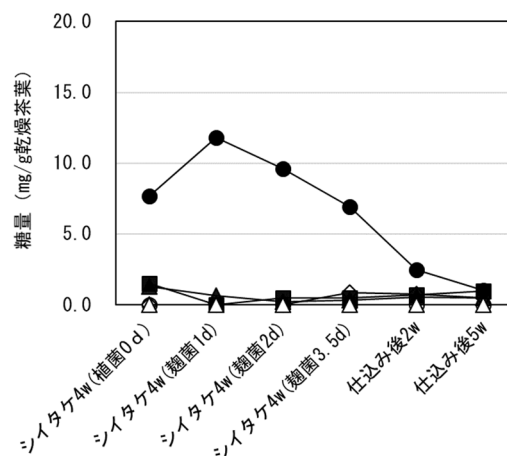


図4 後発酵茶の糖類の推移

グルコース (●), スクロース (○), ガラクトース (▲), フルクトース (△), アラビノース (◆), キシロース (◇)

3. 3 乳酸発酵

シイタケ菌を用いて試作した後発酵茶の乳酸の推移は初期の乳酸量から減少を示し、仕込み後の乳酸発酵は生じなかった(データ未掲載)。一方、シイタケ菌の培養後に麹菌を用いて製麹を行った後発酵茶では、仕込み後5週間目に乳酸が1.6 mg/g 乾燥茶葉生成しており(図5)、添加した醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* が生育したものと推定した。

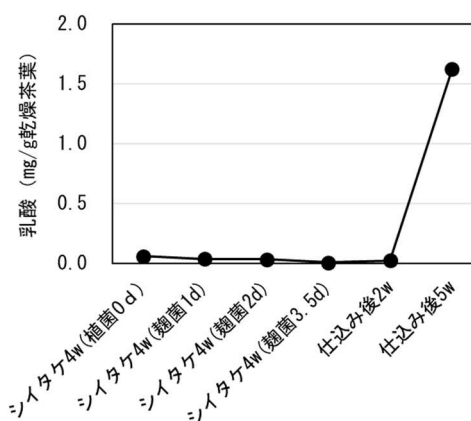


図5 後発酵茶の乳酸量の推移

阿波番茶の乳酸発酵においては、総ポリフェノール量が低い阿波番茶において、*Lactobacillus* 属以外の菌株が出現することが報告されている¹⁰⁾。また醤油乳酸菌はオリーブ葉抽出液培地での生育が極めて緩慢である知見も得られている(データ未掲載)。前報における麹菌での後発酵茶の仕込み時における総ポリフェノール量は65 mg/g 乾燥茶葉, 今回のシイタケ菌による後発酵茶の仕込み時における総ポリフェノール量は37 mg/g 乾燥茶葉, シイタケ菌及び麹菌による後発酵茶の仕込み時における総

ポリフェノール量は 20 mg/g 乾燥茶葉であった。また仕込み後 5 週間目の総ポリフェノール量は各々、44 mg/g 乾燥茶葉、32 mg/g 乾燥茶葉、及び 19 mg/g 乾燥茶葉となり、仕込み後に総ポリフェノール量は低下傾向を示した (図 6, 7)。

オリーブ葉の後発酵茶において、醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* による乳酸発酵を生じさせるためには、茶葉の総ポリフェノールを 20 mg/g 乾燥茶葉程度まで低下させる必要があると考えられた。

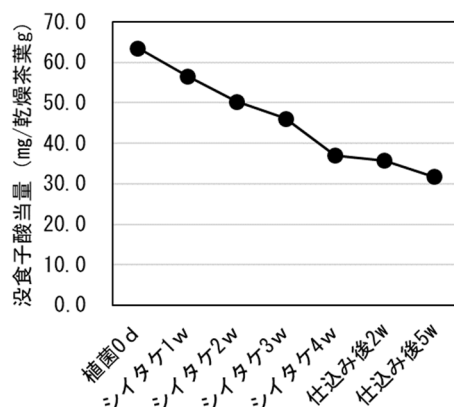


図 6 後発酵茶の総ポリフェノール量の推移

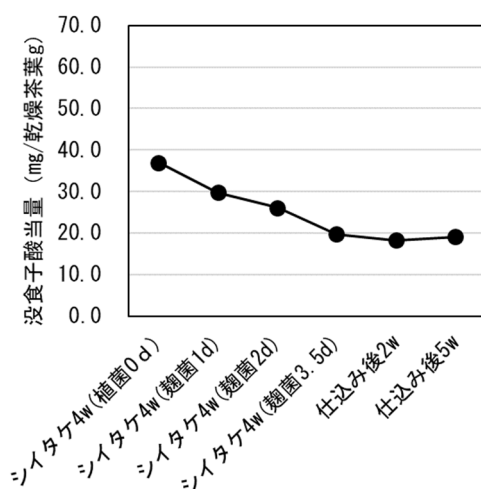


図 7 後発酵茶の総ポリフェノール量の推移

3. 4 茶の評価

オリーブ葉を乾燥し、粉碎したものと比較した。着色は褐色を呈し (図 8, 表 1), シイタケ菌 PPO による酸化反応が促されていた。シイタケ菌を用いることで、オリーブ葉の渋味は消失した。一方で 4 週間のシイタケ菌培養により、試作された後発酵茶にはシイタケの香味が付与される結果となった。またシイタケ菌の培養の後に麹菌にて製麹した後発酵茶においては、付与されたシイタケの香味は減退し、後発酵茶の色調も淡色化を示した。

前報と同様に、オリーブ葉の主要なポリフェノールであるオレウロペインはシイタケ菌による培養期間中に減少し、培養 4 週間で消失していた。またオレウロペインアグリコンの存在も製麹中に確認されたもののオレウロペインの消失と共に消失した (データ未掲載)。試作され

た後発酵茶の渋味の消失は、麹菌とシイタケ菌の分解様式の差異より、最終的な総ポリフェノール量に起因するのではないかと推測された。

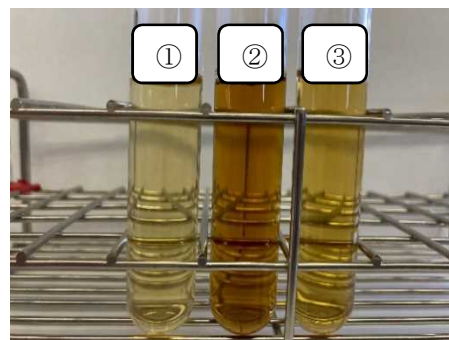


図 8 オリーブ茶と後発酵茶

①: オリーブ茶, ②: 後発酵茶 (シイタケ菌)
③: 後発酵茶 (シイタケ菌→麹菌)

表 1 オリーブ茶とオリーブ後発酵茶の色調

	L*	a*	b*
オリーブ茶①	92.82	-2.34	24.48
後発酵茶②	70.87	12.48	69.39
後発酵茶③	85.11	-0.10	47.21

4 結言

オリーブ葉を用いた後発酵茶の試作において、白色腐朽菌であるシイタケ菌 (*Lentinula edodes*) を用い、培養条件や乳酸発酵における基礎的なデータの蓄積を行った。

シイタケ菌はオリーブ葉を覆うように生育し、培養 2 週間でオリーブ葉全体を菌糸が覆った。手入れ後は 1 週間でオリーブ葉全体を菌糸が覆う状態となった。シイタケ菌体量を GlcNAc 量で確認を試みたが、培養 2 週間で定常となり、今回の酵素処理条件では、シイタケ菌体量の測定は困難であった。また前報と同様に培養中のオリーブ葉の乾燥を防止するため、培養に用いる容器は密閉タイプのものが良く、蒸散による加水操作の頻度を手入れ毎とするために、オリーブ葉への散水量は 160% が適性であった。これによりシイタケ菌の良好な生育、糸状菌等の汚染を防止できた。

オリーブ葉由来の糖としてショ糖、グルコース、ガラクトースが存在し、製麹中にガラクトース、フルクトースは消失し、アラビノース、キシロースが生成した。最も存在量の多いグルコースは製麹 2 週間で 18.3 mg/g 乾燥茶葉と最大値を示し、その後は減少した。仕込み後の乳酸発酵の基質となる糖量から考えれば、シイタケ菌の培養時間は 2 週間程度が適正と推定された。

シイタケ菌の培養後に麹菌の製麹を行うことで、製麹 24 時間目でグルコース量は 7.6 mg/g 乾燥茶葉から 11.6 mg/g 乾燥茶葉まで増加した。

醤油乳酸菌による乳酸発酵はシイタケ菌培養後に麹菌により製麹したオリーブ葉において、仕込み後 5 週間目に乳酸発酵が生じた。既報¹⁰⁾より阿波番茶の乳酸発酵において、総ポリフェノール量の低い阿波番茶では *Lactobacillus* 属以外の菌株が出現することから、後発酵

茶製造に醤油乳酸菌を用いる場合には、総ポリフェノール量 20 mg/g 乾燥茶葉以下の環境を構築し、乳酸発酵の基質となるグルコース等を確保する必要がある。基質の確保の点から考えれば *Tetragenococcus halophilus* 以外の乳酸菌の選択が必要と考えられた。

シイタケ菌により試作された後発酵茶の渋味は消失した。

参考文献

- 1) 稲津忠雄, 藤澤浩子: オリーブ葉及び茶葉を原料とした発酵茶製造方法の検討 (第1報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 3, pp. 85-87 (2002).
- 2) 稲津忠雄, 藤澤浩子: オリーブ葉及び茶葉を原料とした発酵茶製造方法の検討 (第2報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 4, pp. 94-96 (2003).
- 3) 末澤保彦: オリーブ葉及び茶葉を原料とした発酵茶製造方法の検討 (第3報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 6, pp. 102-105 (2005).
- 4) 佐々原浩幸: オリーブ葉を用いた後発酵茶の開発 (第1報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 25, pp. 86-88 (2024).
- 5) 鮫島由香, 鈴木扶沙子, 田畑麻里子, 松井徳光: スエヒロタケの発酵能により調製した後発酵茶の特徴, 日本きのこ学会誌, Vol. 25, pp. 66-69 (2017).
- 6) 藤井史子, 尾関健二, 神田晃敬, 浜地正昭, 布川弥太郎: 市販酵素剤を利用した麹菌体量簡易測定法, 醸協, Vol. 87, pp. 757-759 (1992).
- 7) 柴崎博行, 藤澤浩子, 八木利枝: テーブルオリーブス脱渋液からのポリフェノールの回収, 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 7, pp. 97-98 (2006).
- 8) Swain, T and W. E. Hillis. The phenolic constituents of *prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents, *J. Sci. Food Agric.*, Vol. 10, pp. 63-68. (1959).
- 9) 松岡博美, 大島久華, 久保和子, 浅井貴子, 松原梓, 藤川護: ニンニク加工品の品質評価 (第2報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 19, pp. 61-64 (2018).
- 10) 内野昌孝, 小山翔大, 高野克己: 徳島県産後発酵茶「阿波番茶」の微生物とポリフェノールについて, 日本食品保蔵科学会誌, Vol. 46, pp. 63-69 (2020).

オリーブ葉を用いた後発酵茶の開発（第4報）

ー乳酸菌のスクリーニングー

佐々原 浩幸

オリーブ葉を用いた後発酵茶の試作開発において、醤油乳酸菌による乳酸発酵が抑制され、乳酸発酵を行うためには、シイタケ菌及び麹菌を生育させ、総ポリフェノール量を低下させた環境下（20 mg/g 乾燥茶葉）において、基質となるグルコース等の糖質を添加する必要があった。一方で *Lactobacillus* に属すると推定される乳酸桿菌は、醤油乳酸菌で認められたようなオリーブ葉抽出液での阻害は確認されなかった。オリーブ葉抽出液培地にて生育旺盛で pH 低下の大きい菌株、更に低温発酵性を有する菌株5株を選定株とした。5株についてはオリーブ葉麹（20 g）での仕込みを行い、良好な乳酸発酵が確認された。

1 緒言

四国において香川県は後発酵茶の文化がなく、平成14年～16年において、香川県の県花、県木であるオリーブの葉を用い、生茶葉の酸化酵素を利用した前発酵茶及び、乳酸発酵タイプの後発酵茶の開発について検討した経緯がある¹⁻³⁾。その際に試作された発酵茶は味質（渋味）、着色や乳酸発酵に課題があり、これら課題を解決するため、試作品は茶葉の混合比が極めて高いものとなった。

既報において、オリーブ葉の利用用途拡大・産業活性化を目的に、本県の主要地場産業である醤油の「発酵」技術を用いたオリーブ葉の後発酵茶の試作を行った⁴⁻⁵⁾ところ、乳酸不発酵の問題が確認された。

醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* による乳酸発酵はシイタケ菌及び麹菌を生育させたオリーブ葉において仕込み後、5週間目に乳酸生成が確認され、総ポリフェノール量が低下した環境下において、生育、乳酸発酵が生じるものと考えられた⁵⁾。

旺盛な乳酸発酵を生じさせるためには、グルコース等、基質となる糖が十分に存在することが必須であり、総ポリフェノール量が高い環境下での生育、乳酸発酵が求められた。今回、醤油乳酸菌に限定せず、既存の後発酵茶から分離される *Lactobacillus* (*Lactiplantibacillus*) 属乳酸菌のオリーブ葉後発酵茶への利用について、当研究所保存株より菌株の検索を行ったので、その結果について報告する。

2 実験方法

2.1 培地

オリーブ葉は、乾燥したもの（イ）、麹菌を生育させたもの（ロ）、シイタケ菌を生育させたもの（ハ）、シイタケ菌及び麹菌を生育させたもの（ニ）を用いた。各乾燥オリーブ葉10 gを熱水100 mlにて100℃、20分間煮沸し、pHを6.2に調整後、ろ過した。市販のMRS培地に水の替わりにオリーブ葉抽出液を加え121℃、15分オートクレーブ処理した。

それぞれの培地は OLEx-MRS（イ）、OLEx-A-MRS（ロ）、OLEx-L-MRS（ハ）、OLEx-LA-MRS（ニ）とした。

2.2 供試菌株

醤油乳酸菌及び *Lactobacillus* (*Lactiplanti-*

bacillus) 属と推定される乳酸桿菌は当研究所保存株を用いた。

2.3 醤油乳酸菌の一次検索

オリーブ葉抽出液を20%、50%及び100%とした OLEx-MRS 培地を用いた。30℃、2週間培養し、660 nmにおける濁度を測定した。

2.4 醤油乳酸菌の二次検索

培養温度 30℃にて、OLEx-A-MRS、OLEx-L-MRS、OLEx-LA-MRS 培地を用い、660 nmにおける濁度を測定するとともに、培地の pH 低下を測定した。

2.5 *Lactobacillus* 属乳酸菌の検索

OLEx-MRS 培地における生育及び pH 低下を測定するとともに、選択された菌株について、オリーブ葉20 g規模の小仕込み試験を行い、仕込み後1週間目の乳酸生成量を測定した。

3 結果と考察

3.1 醤油乳酸菌の検索

当研究所保存株の醤油乳酸菌を、20% OLEx-MRS 培地にて培養し、生育の良好な菌株を50% OLEx-MRS 培地にて培養した。同様に生育の良好な10株について100% OLEx-MRS 培地にて2週間培養したが、同培地での生育は確認されなかった。

10株について再度、OLEx-A-MRS、OLEx-L-MRS、OLEx-LA-MRS 培地にて30℃、2週間培養した結果を表1に示した。

表1 醤油乳酸菌選択株の各培地での濁度と pH

No.	OLEx-A-MRS	OLEx-L-MRS	OLEx-LA-MRS
1	—	—	0.120 (5.585)
2	—	0.124 (5.577)	0.251 (5.380)
3	—	—	0.238 (5.423)
4	—	0.081 (5.611)	0.348 (5.328)
5	—	—	0.294 (5.350)
6	—	—	0.213 (5.407)
7	—	—	0.212 (5.400)
8	—	—	0.214 (5.375)
9	0.079 (5.612)	0.116 (5.575)	0.422 (5.290)
10	—	—	0.421 (5.306)
BLANK	(5.661)	(5.686)	(5.771)

— : OD660nm の BLANK との差異が 0.05 以下、括弧内は pH

醤油乳酸菌はOLEx-LA-MRS 培地で生育を示し、仕込み試験の結果と一致した⁵⁾。オリーブ葉の抽出条件より、培地中の総ポリフェノール量は、仕込み試験での総ポリフェノール量の1/5程度と推定されるが、醤油乳酸菌が抑制される傾向は同様であった。シイタケ菌及び麹菌を生育させ、オリーブ葉の総ポリフェノール量が低い環境下でなければ醤油乳酸菌の生育は困難と考えられた。またこの時、乳酸発酵の基質となる糖類は、グルコース (6.9 mg/g 乾燥茶葉) が残存しているが、阿波番茶や石鎚黒茶の乳酸量と比較して、乳酸発酵に十分な基質量ではない。オリーブ葉を用いた後発酵茶において、醤油乳酸菌を用いて乳酸発酵を行うためには、シイタケ菌及び麹菌を生育させ、総ポリフェノール量を低下させた環境下において、基質となるグルコースを添加する必要がある。

そこで阿波番茶や石鎚黒茶において主体的に働いている乳酸菌である *Lactobacillus* 属乳酸菌のオリーブ葉後発酵茶への利用について検討した。

3. 2 *Lactobacillus* 属乳酸菌の検索

当研究所保存株のうち漬物由来の乳酸桿菌50株について、OLEx-MRS 培地での生育、培地 pH の低下について検討した (図1)。

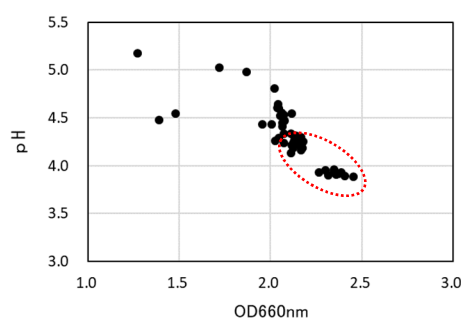


図1 OLEx-MRS 培地での乳酸桿菌の生育

Lactobacillus に属すると推定される乳酸桿菌は醤油乳酸菌で認められたようなオリーブ葉抽出液での大きな阻害は確認されなかった。培養温度 30℃、24 時間の培養で、生育が旺盛で pH 低下の大きい21株を一次検索株とした。更にオリーブ葉の得られる剪定時期(2月)に合わせ、培養温度 15℃にて 72 時間培養し、低温発酵性を有する菌株5株を二次検索株とした。5株はいずれもホモ型の乳酸発酵を行うグラム陽性桿菌であった。5株についてはオリーブ葉麹(20 g)での仕込みを行い、乳酸生成量を確認した。5株とも同程度の乳酸生成量を示した(表2)。検索された *Lactobacillus* に属すると推定される乳酸桿菌は、総ポリフェノール量が高い環境下においても安定的な乳酸発酵が可能であった。

表2 検索された乳酸桿菌の生育

菌株 No.	30℃, 24h 660 nm (pH)	15℃, 72h 660 nm (pH)	オリーブ葉 (乳酸量 mg/g 乾燥茶葉)
7	2.349 (3.946)	2.114 (3.950)	10.25
8	2.388 (3.934)	2.009 (3.935)	10.22
9	2.405 (3.892)	2.281 (3.837)	11.02
46	2.358 (3.908)	2.280 (3.864)	10.78
50	2.264 (3.928)	2.220 (3.961)	10.08

4 結言

オリーブ葉を用いた後発酵茶の試作において、醤油乳酸菌の生育阻害が生じた。醤油乳酸菌はシイタケ菌及び麹菌を生育させたオリーブ葉抽出液 MRS 培地 (OLEx-LA-MRS 培地) にて生育はするものの、オリーブ葉抽出液により顕著な生育阻害が生じた。オリーブ葉を用いた後発酵茶では、醤油乳酸菌による乳酸発酵を行うためには、シイタケ菌及び麹菌を生育させ、十分に総ポリフェノール量を低下させた環境下において、基質となるグルコースを添加する必要がある。

一方で *Lactobacillus* に属すると推定される乳酸桿菌は醤油乳酸菌で認められたようなオリーブ葉抽出液での大きな阻害は確認されなかった。培養温度 30℃において生育が旺盛で pH 低下の大きい菌株を検索し、更に培養温度 15℃にて培養し、低温発酵性を有する菌株5株を選定株とした。5株についてはオリーブ葉麹(20 g)での仕込みを行い、乳酸生成量を確認した。5株とも同程度の乳酸を生成し、後発酵茶試作時において、総ポリフェノール量が高い環境下においても安定的な乳酸発酵が可能となった。

参考文献

- 1) 稲津忠雄, 藤澤浩子: オリーブ葉及び茶葉を原料とした発酵茶製造方法の検討 (第1報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 3, pp. 85-87 (2002).
- 2) 稲津忠雄, 藤澤浩子: オリーブ葉及び茶葉を原料とした発酵茶製造方法の検討 (第2報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 4, pp. 94-96 (2003).
- 3) 末澤保彦: オリーブ葉及び茶葉を原料とした発酵茶製造方法の検討 (第3報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 6, pp. 102-105 (2005).
- 4) 佐々原浩幸: オリーブ葉を用いた後発酵茶の開発 (第1報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 25, pp. 86-88 (2024).
- 5) 佐々原浩幸: オリーブ葉を用いた後発酵茶の開発 (第3報), 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 25, pp. 91-94 (2024).

大豆加工食品副産物の活用方法の検討 ー圧搾豆腐の麺への利用ー

松岡 博美, 松原 梓, 浅井 貴子, 西村 冨加, 久保 和子

豆腐製造の際に生じる未利用資源である圧搾豆腐の麺への利用について検討を行った。その結果、小麦粉の約 10%を豆腐で置換することにより、小麦粉麺よりたんぱく質を約 1.4 倍多く含む麺が開発できる可能性が示された。この豆腐配合麺の硬さは小麦粉麺に比べてやや弱くなるものの、官能評価において概ね高評価であった。

1 緒言

近年、植物性食品（＝プラントベースフード）は動物性食品と比べて健康的というイメージが消費者にも浸透してきたことから、日本人に古くから親しみのある豆腐、しょうゆ、みそ、納豆などの大豆加工食品が再注目されつつある。大豆には機能性成分であるイソフラボンが豊富に含まれていることが知られており¹⁾、これまでにイソフラボンの機能性を訴求したさまざまな加工食品が開発されてきた。もともと「畑の肉」といわれるほど栄養価が高く、特にたんぱく質が豊富に含まれている²⁾ため、今後は大豆の機能性だけでなく予測されるたんぱく質源不足対策としての活用も期待されている。

豆腐製造の際に生じる型崩れした豆腐や豆腐の切れ端は、市販されている豆腐と栄養価は変わらないにも関わらず、水分が多く腐敗しやすいことから他の食品に利用されることは少ない。そのため、県内豆腐製造業者の中にはこれらの豆腐を圧搾して産業廃棄物として廃棄せざるを得ないところがある。

そこで、現在未利用となっているこれらの豆腐をたんぱく質源とする新たな商品が開発できれば、大豆加工食品副産物のアップサイクルにつながると考えた。本研究では廃棄予定の圧搾豆腐の有効活用方法を模索するため、麺への利用について検討を行ったので報告する。

2 実験方法

2. 1 試料

市販の小麦粉は中力粉（株式会社日清製粉ウェルナ）、豆腐は木綿豆腐（さとの雪食品株式会社）の木綿豆腐、塩は食塩（公益財団法人塩事業センター）を用いた。豆腐の圧搾は、豆腐をキッチンペーパーで包み、4.8 kg の重りをのせて6時間（以下、6h）および24時間（以下、24h）保持して水分を除いたものと、120℃、20 分間オートクレーブ処理（以下、OC）を行い、水分を除いたものを調製した。

2. 2 製麺方法

麺の試作は小麦粉、食塩、水を主原料とするうどんとし、稲津らの方法³⁾を参考に、表 1 に示す配合で小麦粉の一部を豆腐（以下、未処理）および圧搾豆腐で置換した。製麺は小麦粉 300 g（水分 13.5%水分換算）に小麦粉以外の原材料と塩水（塩 15 g＋水 120 g）を加え、パンニーダー（PK660D、日本ニーダー株式会社）で、5 分間混捏

した。手捏ねで団子に生地調製し、室温で 30 分間熟成を行った。生地の足踏み（5 分、3 セット）を行い、パスタマシン（Atlas150、MARCATO 社製）でロール圧延、裁断を行い、麺厚 2.5 mm、麺幅 3.5 mm、長さ 30 cm の麺線を調製した。

表 1 試作麺の原料配合

		小麦粉	未処理	6h	24h	6h+	OC
中力粉	g	300.0	278.4	264.7	254.5	249.9	254.4
豆腐	g	－	120	－	－	－	－
圧搾豆腐	g	－	－	120	120	150	125
塩	g	15	15	15	15	15	15
水	g	120	120	120	120	120	120

※原材料は予め水分測定を行い 13.5%水分換算し加水量で調製した。

2. 3 ゆで麺の調製

ゆで麺は、20 倍量の沸騰水中で所定の時間ゆでた後、流水中で 30 秒間冷却、さらに 30 秒間麺表面のぬめりを手で取り除いた。その後、水切りしてキムタオルで麺表面の余分な水分を取り除いた。なお、各種試験に用いたゆで麺は、ゆで上がり状態を一定とするため、ゆめ生麺を 2 つの異なる時間でゆでた時の水分含量の結果から、ゆで麺の水分含量が 70%になるゆで時間を決定し、調製した。

2. 4 顕微鏡観察

麺生地およびゆで麺の観察は実体顕微鏡（M80、ライカマイクロシステムズ株式会社）により行った。また、生麺断面の卓上電子顕微鏡（JCM-6000PLUS、日本電子株式会社）観察も併せて行った。

2. 5 品質評価

2. 5. 1 一般生菌数

生麺の一般生菌数は食品衛生検査指針⁴⁾に従い、標準寒天培地法で測定した。

2. 5. 2 成分分析

生麺およびゆで麺の成分分析は食品表示基準⁵⁾に従い、以下の方法で行った。水分は常圧加熱乾燥法、灰分は直接灰化法、全窒素およびたんぱく質はケルダール法、脂質は酸分解法、ナトリウムは原子吸光光度法によりそれぞれ測定した。大豆イソフラボンは、高速液体クロマトグラフで測定した⁶⁾。

2. 6 物性測定

ゆで麵の破断特性は、クリープメータ (RE2-33005C, 株式会社山電) を用いて測定した。測定条件は、プランジャーNo. 49 (くさび型), ロードセル 20 N, アンプ倍率 1 倍, 格納ピッチ 0.01, 測定速度 1 mm/sec とした。各試験区のゆで上がり直後 (2 分後) および 15 分後の麵線について各 10 回測定を行った。

2. 7 官能検査

ゆで麵の風味および食感評価を、当センター職員 6 名で実施した。

3 結果と考察

3. 1 原料豆腐の成分値

表 2 に小麦粉、豆腐および圧搾豆腐の主な成分値を示した。豆腐の圧搾時間に比例して水分量は減少し、未処理、6h、24h の水分量と大豆イソフラボン (アグリコン当量) 量には負の相関 ($R^2=1$) がみられたことから、圧搾により水分のみが除かれたと考えられた。一方で 0C では 24h と同程度まで水分が減少したが、大豆イソフラボン (アグリコン当量) 量は 24h の約 70% まで減少していた。したがって、0C では高温・高圧処理による大豆イソフラボンの分解および流出が考えられ、他の圧搾豆腐とは性質が異なる可能性が考えられた。

表 2 原料の成分値 (100 g あたり)

		小麦粉	未処理	6h	24h	6h+	0C
たんぱく質	g	10.0	7.6	12.9	16.9	14.8	16.1
水分	g	12.4	84.4	74.6	67.2	71.1	68.4
大豆イソフラボン (アグリコン当量)	mg	N.D.	23.1	34.4	42.8	34.2	29.1

N.D.: 検出せず

3. 2 豆腐配合麵の製麺性

豆腐や圧搾豆腐は水分を多く含んでいるため、製麺時に加える水は少量となることから、原料に塩水として塩を加えることは難しかった。そのため、あらかじめ豆腐に食塩と水を混合し、少量ずつ小麦粉と混ぜることで均一に分散することができた。小麦粉に配合する前の豆腐の状態を図 1 に示した。未処理および 6h は食塩と水を混ぜると滑らかな豆腐ペーストとなり、麵生地も滑らかであり圧延、裁断もうまくできた。24h および 0C は食塩と水を混ぜるとそばろ状になり、麵生地には小さな豆腐の塊がみられた。そのため表面はザラついており、圧延時には麵帯の端が割れたり荒れたりしたものの、何とか製麺することができた。そこで、豆腐の配合割合がなるべく多くなるようにペースト状の圧搾豆腐である 6h を



図 1 配合する豆腐の状態

(左: ペースト状 (未処理, 6h), 右: そばろ状 (24h, 0C))

1.25 倍多く置換した 6h+ の製麺を試みたが、24h や 0C ほどではないが未処理や 6h と比べると製麺性は悪くなった。

試作した麵生地およびゆで麵表面の実体顕微鏡写真を図 2 に、生麵の電子顕微鏡写真を図 3 に示した。上述のとおり、未処理および 6h の生地やゆで麵の表面は、小麦粉と同様に滑らかであり、生麵断面の電子顕微鏡観察においてもデンプン粒子が規則正しく並んでいる様子が確認できた。24h および 0C の生地表面は荒れており、ゆで麵に粒状の豆腐が練り込まれている様子 (→) が確認できた。生麵断面の観察でも大きな豆腐の塊 (○) がみられ、グルテンおよびデンプン粒とあまり絡んでいない様子がみられた。豆腐の塊がグルテン形成だけでなくデンプン粒をつなぐ妨げとなり、製麺性が悪くなったと考えられた。6h+ の生地表面は、24h および 0C の生地表面の荒れた

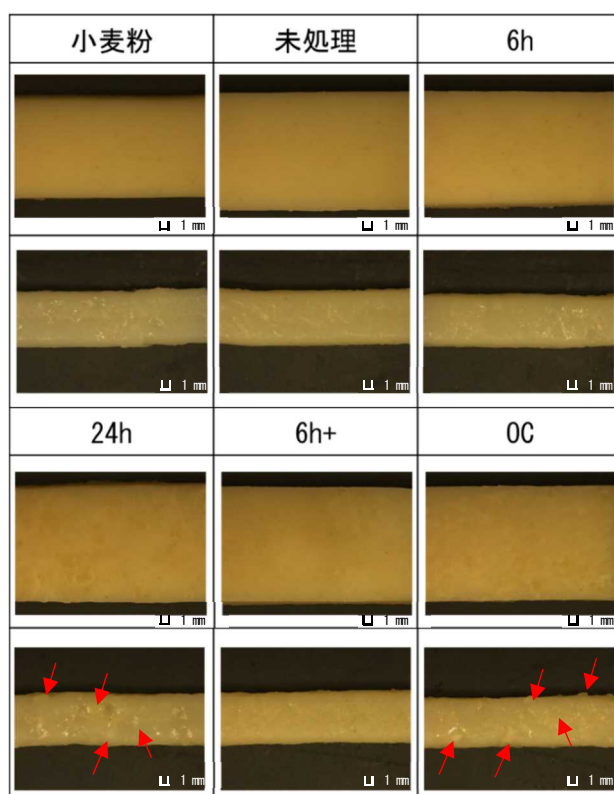


図 2 試作麵の実体顕微鏡写真
(上段: 麵生地表面, 下段: ゆで麵表面)

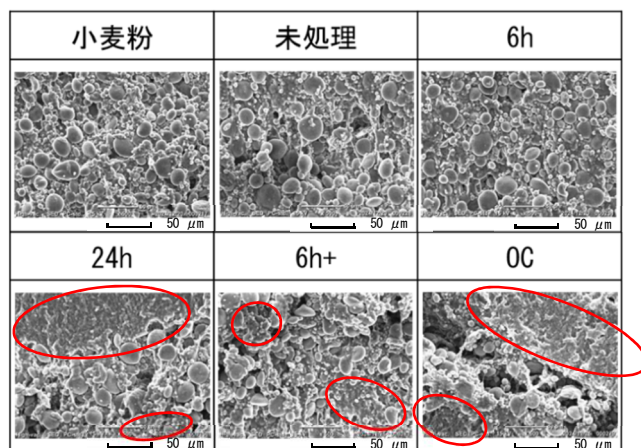


図 3 生麵断面の電子顕微鏡写真 (500 倍)

様子に比べると比較的滑らかにみえたが、生麺断面の電子顕微鏡観察では未処理や6hと比べると麺の内部の豆腐の割合が多いため、豆腐の塊がデンプン粒の間に存在し、グルテンの形成を弱めていることがわかった。以上のことから、配合する豆腐の状態に関わらず、置換する豆腐の割合によりグルテン形成の程度が異なることが、製麺性が悪くなる原因の一つと考えられた。

3. 3 生麺およびゆで麺の成分分析結果

表3に試作した生麺の一般生菌数を示した。今回は原料として市販の豆腐を使用したため、副産物として生じる豆腐を利用した場合と同じとは一概には言えないが、腐敗が早い豆腐を使用しても製麺工程で微生物が増えることなく、生麺の本県の食品の成分規格に関する指導基準である 3×10^6 /gを大幅に下回っていた。

表3 試作生麺の一般生菌数(1 gあたり)

小麦粉	未処理	6h	24h	6h+	OC
3.1×10^2	<300	<300	4.9×10^2	<300	<300

表4に生麺の成分値を示した。生麺では豆腐の割合に比例して豆腐由来のたんぱく質量、脂質量、および大豆イソフラボン(アグリコン当量)量が増加していた。加える豆腐が多ければ多いほど、たんぱく質や大豆イソフラボンを多く含むうどんを作ることができると考えられるが、一方で、豆腐の配合割合を多くすると製麺性が悪くなることは今回の試験でも明らかであった。今回試作した麺における豆腐固形分が占める割合は、未処理、6h、24h、6h+、OCの順にそれぞれ原料ベースで6.2%、10.2%、13.1%、14.4%、13.2%となっている。したがって製麺性を考慮すると、小麦粉に対して約10%の置換(6h)が最大の配合割合であると考えられた。以上のことから、小麦粉麺と6h麺の比較により豆腐を配合することで小麦粉麺の約1.4倍のたんぱく質量となる生麺の商品設計が可能であると考えられた。

表4 試作生麺の成分値(100 gあたり)

		小麦粉	未処理	6h	24h	6h+	OC
エネルギー	kcal	252	256	260	262	264	263
たんぱく質	g	7.1	8.8	10.0	10.7	11.3	10.7
脂質	g	1.1	2.3	3.1	3.7	4.2	3.8
炭水化物	g	53.4	50.1	47.9	46.4	45.2	46.5
水分	g	34.4	34.9	34.9	35.0	35.2	35
灰分	g	4.0	3.9	4.1	4.2	4.1	4.0
食塩相当量	g	4.1	3.6	3.8	3.8	3.8	3.8
大豆イソフラボン	mg	N.D.	4.5	7.2	9.5	10.1	7.5
(アグリコン当量)							

ND.: 検出せず

次に表5にゆで麺の成分値を示した。ゆで麺においても6h麺では小麦粉麺の約1.4倍のたんぱく質が含まれていた。また、大豆イソフラボン(アグリコン当量)量はゆで処理によりわずかに減少するものの、概ね80%程度残存していることが明らかとなった。

一方で、ゆで時間は小麦粉、未処理、6h、24h、6h+、OCの順にそれぞれ11分50秒、18分43秒、19分23秒、22

分50秒、22分3秒、17分8秒となり、OCを除いて配合する豆腐の割合に比例してゆで時間が長くなることがわかった。生麺の水分量はいずれも35%前後であるにも関わらず、ゆで時間に大きな差がみられた。一般的にうどんをゆでると小麦粉デンプンが吸水して膨潤し α 化すること⁷⁾や、ゆで時間が長いほど麺の水分量は多くなること⁸⁾が知られている。したがって、豆腐を配合した麺のゆで時間が長くなったのは、小麦粉の割合が少ないために吸水できる小麦粉デンプンが少なかったことに加えて、豆腐が小麦粉デンプンほどゆでても吸水、膨潤しなかったためと考えられた。

表5 試作ゆで麺の成分値(100 gあたり)

		小麦粉	未処理	6h	24h	6h+	OC
エネルギー	kcal	120	120	127	122	126	124
たんぱく質	g	3.6	4.4	5	5.4	5.8	5.4
脂質	g	0.5	1	1.7	1.9	1.9	1.9
炭水化物	g	25.3	23.4	22.8	20.8	21.5	21.2
水分	g	70.4	70.9	70.2	71.6	70.4	71.1
灰分	g	0.2	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4
食塩相当量	g	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
大豆イソフラボン	mg						
(アグリコン当量)		N.D.	1.7	2.9	3.6	3.8	2.6

ND.: 検出せず

3. 4 ゆで麺の物性試験結果

試作麺の食感評価を行うため、ゆで麺の破断強度測定を行った。破断応力は値が高いほど硬く、破断歪率は値が高いほど弾力があると考えられる。図5にゆで麺の破断強度測定結果の一例を示し、表6および表7に破断強度特性値を示した。ゆで上がり直後(2分後)の破断応力および破断歪率は概ね豆腐の割合が多くなると低くなる結果となった。麺に占める小麦粉の割合が少なくなったことで相対的に小麦粉デンプンのもつ粘弾性の影響が弱くなり、結果として硬さや弾力が弱くなったと推察された。15分後の破断応力および破断歪率は、2分後と比較して全体的に低くなっていたが、2分後と15分後の破断

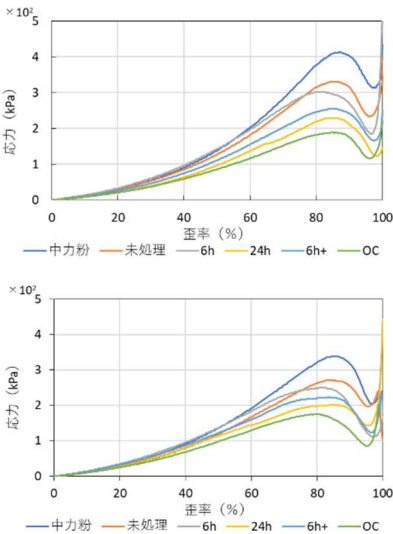


図5 試作ゆで麺の破断強度測定結果の一例 (上: 2分後, 下: 15分後)

表6 ゆで麺の破断強度解析(ゆで上げ2分後)

		小麦粉	未処理	6h	24h	6h+	OC
破断応力	[kPa]	401±	323±	305±	214±	253±	203±
		22	26	22	30	33	15
破断歪率	[%]	89±2	86±2	85±2	85±3	85±1	84±3

表7 ゆで麺の破断強度解析(ゆで上げ15分後)

		小麦粉	未処理	6h	24h	6h+	OC
破断応力	[kPa]	322±	277±	243±	199±	230±	188±
		33	22	36	35	21	22
破断歪率	[%]	85±2	83±2	82±2	84±3	80±3	82±3

強度を示す波形には大きな差異はみられなかった。また、小麦粉麺と比較して豆腐の割合が多いほど破断応力の低下割合は小さくなっており、豆腐麺は小麦粉デンプンが少ないためゆでのびの影響を受けにくかったことや小麦粉麺に比べてはじめてから柔らかい麺であったことが影響したと考えられた。

3. 5 官能評価

試作した4種類(小麦粉, 未処理, 6h, 24h)のゆで麺の風味および食感評価を実施した。未処理麺は小麦粉麺と比べて違和感がなく、豆腐を配合したことによるデメリットはみられなかった。6h麺は小麦粉麺に比べて弾力は弱いものの豆腐の風味(甘味)も感じられたと高評価であった。一方で、24h麺では豆腐の風味が強く、表面のざらつきやボソボソした食感のため不評であった。したがって、官能評価においても、豆腐の配合割合は小麦粉に対して約10%の置換が最大であると考えられ、それ以上になると麺の風味や食感に悪影響を及ぼすと推察された。

4 結言

今回の試験では、小麦粉に対して豆腐の置換割合が10%の範囲までは製麺適性があると判断した。この豆腐配合麺は小麦粉麺に比べてたんぱく質量が約1.4倍多く、大豆イソフラボンも含まれることから、健康ニーズに対応した商品開発の可能性が示された。

参考文献

- 1) 太田智樹, 渡部晴男: 北海道産大豆品種「ゆきぴりか」きな粉のイソフラボン含量, 組成および品質におよぼす焙煎温度の影響, 北海道立総合研究機構食品加工研究センター研究報告, Vol. 12, pp. 47-52 (2017).
- 2) 山内文男, 大久保一良編: 大豆の科学 (1992).
- 3) 稲津忠雄, 立住千賀香, 大谷尚美, 藤井浩子: 繊維状セルロースの麺への添加効果, 香川県産業技術センター研究報告, Vol. 19, pp. 73-75 (2018).
- 4) 日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針微生物編 2018 改訂第2版, (2018).
- 5) 食品表示基準について(平成27年3月30日消費表第139号)別添栄養成分等の分析方法等別添 栄養成分等の分析方法等.
- 6) 大豆イソフラボンを含む特定保健用食品等の取扱いに関する指針(食安発第0823001号).
- 7) 遠藤繁: 製麺適性に関与する小麦粉成分, 日本食生活学会誌, Vol. 8, pp. 32-35 (1997).
- 8) 阿部芳子, 上船津暢子, 市川朝子, 下村道子: 麺の食味と物性におよぼす卵の影響, 日本調理科学会誌, Vol. 39, No. 5, pp. 289-295 (2006).

大豆加工食品副産物の活用方法の検討 －豆腐しょうゆ醸造の可能性調査－

松岡 博美, 藤川 護, 松原 梓, 浅井 貴子, 西村 冴加, 久保 和子

大豆の代替原料として豆腐の製造工程で生じる圧搾豆腐を用いてしょうゆの試作を行った。冷凍保存した圧搾豆腐を原料とした場合であっても、もろみ製造工程において大豆と同様の取扱いが可能であった。試作したしょうゆの成分分析を行ったところ、大豆を用いて試作したしょうゆと同等の分析値が得られたことを確認した。また、冷凍保存した圧搾豆腐を利用できることは、豆腐の安定供給の面でも大きな利点となると思われ、未利用資源である圧搾豆腐の活用法の一つとしてしょうゆ醸造への利用の可能性が示された。

1 緒言

豆腐製造工程ではおからや型崩れした豆腐が副産物として発生する。これらの副産物には原料の大豆に由来する有効成分が豊富に含まれていることが知られている^{1, 2)}が、豆腐は腐敗しやすく冷凍による物性変化が顕著であることから、冷凍保存に適さないため保存性が悪く、他の食品への利用は少ない。そのため、一部は飼料として利用されているものの、多くは圧搾して産業廃棄物として廃棄されている。

これまでに、これらの副産物を有効活用するために、おからを用いた調味料の開発^{3, 4)}や食品への活用方法^{1, 2)}についてさまざまな検討が報告されているが、ほとんどがおからについての報告であり、圧搾豆腐の活用方法についての報告はみられない。

そこで、本研究では大豆の代替原料として圧搾豆腐を用いたしょうゆの試作を行い、圧搾豆腐の新たな活用方法について検討を行ったので報告する。

2 実験方法

2. 1 もろみの調製、熟成

県内企業から入手した圧搾豆腐は試験開始まで -20°C で冷凍保存した。冷蔵庫内で一晩（約16時間）浸漬した丸大豆および解凍した圧搾豆腐は、 121°C 、30分間オートクレーブ処理後、室温となるまで自然放冷した。小麦はフライパンで焙煎後、割砕した。これらをこいくちしょうゆの原料配合⁵⁾を参考にして、表1の配合比で混合した後、種麴（ビオック社製「種麴 旨味（醤油作り用）」）を添加し製麴した。

表1 麴の原料配合

	乾物重量(g)			
	丸大豆	圧搾豆腐	小麦	種麴
大豆区	100	－	105	0.38
豆腐区	－	46	105	0.38

製麴は不織布を敷いたかごに厚さ約3 cmに盛りこみ、図1の条件で開始44時間後を出麴とした。手入れは製麴開始から18時間後と24時間後の2回行った。

仕込み方法は全量麴とし、冷却した飽和食塩水（塩分約

26%）を360 mL、乳酸菌用醤油培地で3日間培養した醤油乳酸菌（*Tetragenococcus halophilus*）培養液0.36 mLを加えてよく攪拌し、適宜攪拌しながら 10°C に静置した。23日目からもろみ温度を徐々に上げていき、もろみのpHが5.3未満となっていることを確認後、30日目に酵母用醤油培地で3日間培養した醤油酵母（*Zygosaccharomyces rouxii*）培養液5 mLを加えてよく攪拌した。その後、適宜攪拌を続けながら、 30°C で6か月間熟成させた。

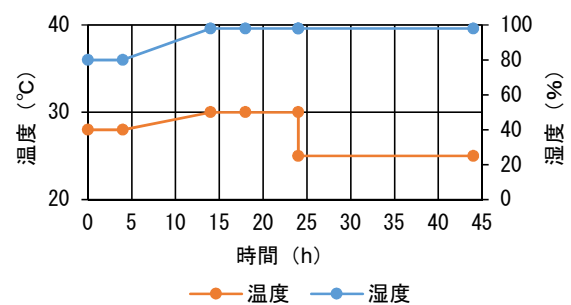


図1 製麴条件

2. 2 ろ過、火入れ

熟成が終了したもろみは、遠心分離後上澄みをガーゼでろ過し、生揚げしょうゆとした。生揚げしょうゆを 80°C の湯浴で30分、続いて 60°C の湯浴で1時間加熱後、上澄みをガーゼでろ過し、火入れしょうゆとした。

2. 3 成分分析

全プロテアーゼ活性および一般成分分析は、しょうゆ試験法⁶⁾に基づき分析した。

3 結果と考察

3. 1 原料の成分比較

原料の水分およびたんぱく質を表2に示した。通常

表2 原料の水分およびたんぱく質

	水分	たんぱく質
	g/100 g	
丸大豆	8.4	34.7
圧搾豆腐	77.7	11.7
焙煎小麦	3.2	14.0

こいくちしょうゆの麴の原料配合は大豆と小麦を当量とする⁵⁾ところ、今回の試験では圧搾豆腐（湿重量）を小麦の2倍量配合したため、豆腐区の麴原料のたんぱく質量は大豆区の約80%となっていた。

3. 2 麴の酵素活性の比較

製麴した麴（図2）の全プロテアーゼ活性を表3に示した。豆腐区は大豆区に比べて約80%の酵素活性となっていたが、今回の製麴条件において豆腐麴が作製可能であることを確認した。



図2 出麴の写真
(左：大豆区、右：豆腐区)

表3 全プロテアーゼ活性	
	units/g
大豆区	350
豆腐区	280

3. 3 もろみの比較

図3および図4にもろみの経時変化を示した。40日経過後のもろみでは両試験区で酵母による発酵が進んでいることが確認できた。3か月経過後のもろみでは発酵が落ち着き始め、豆腐区では固形物が分解されている様子も確認できた。大豆区に比べて豆腐区の方が早い段階で発酵が始まり、発酵終了までの期間も長かった。その後、熟成が終了する6か月後まで両試験区において産膜酵母の発生は認められなかった。

3. 4 試作品の成分比較

表4に試作したしょうゆの成分値を示した。大豆区と豆腐区で大きな差は認められなかったため、しょうゆ醸造に大豆の代替原料として冷凍圧搾豆腐の利用が可能であることが明らかとなった。また、冷凍した豆腐を利用できることは、豆腐の保存性や原料の安定供給の観点から大きな利点となると思われる。一方で、試作したしょうゆの塩分濃度は25%以上と高く、アルコールの生成量が少なかった。今回の試験では、仕込みから6か月間1L容ビーカーにラップをして30℃の恒温槽内でもろみを熟成させており、熟成途中でもろみ成分の経時変化を確認するため、途中でサンプリングも行っていたことから、保管中やサンプリング作業中に水分が減少したことが推察される。そのため、塩分の高さにより酵母による発酵が抑制され、アルコールの生成が低くなった可能性が考えられた。また、大豆区に比べて豆腐区で全体的に分析値が高くなっていたが、原料の配合を初期の重量比をもとに行ったため、煮熟大豆と圧搾豆腐の水分量の調整を行っておらず、仕込み段階で豆腐区の水分が少なかったためと考えられた。これらについては今後の試験での改善点としたい。

4 結言

今回の試験では、大豆を用いて試作したしょうゆと

圧搾豆腐を用いて試作したしょうゆの成分値に大きな差は認められなかった。引き続き経時サンプリングしたもろみを分析し、各種成分の経時変化を解析し、発酵期間中の詳細な変動を明らかにする予定である。また、今回の試験でみられた問題点を改善し、今後豆腐製造工程で生じるおからとともに再度小仕込み試験を行い、しょうゆ醸造における大豆代替原料への可能性についてさらに検討する。

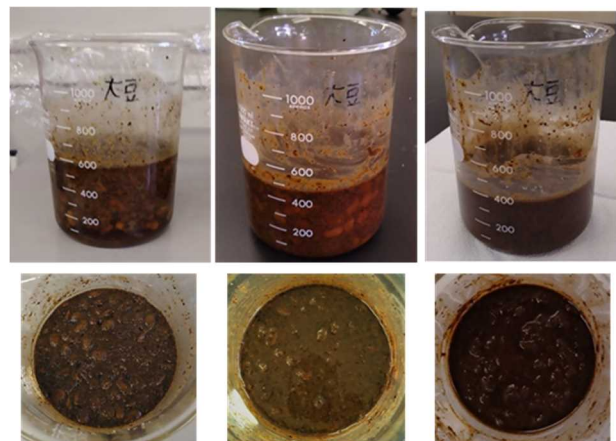


図3 大豆区の写真
(左：40日後、中：3か月後、右：6か月後)

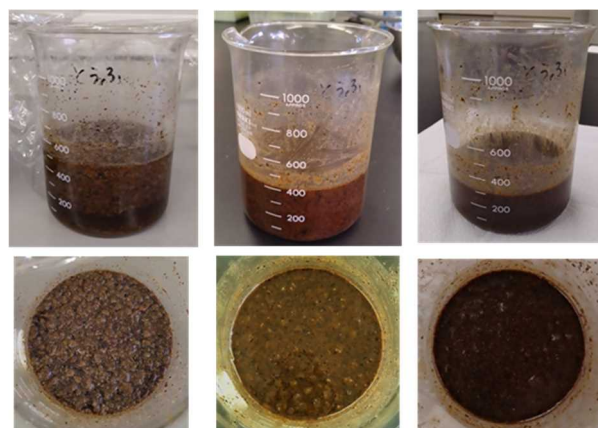


図4 豆腐区の写真
(左：40日後、中：3か月後、右：6か月後)

表4 試作しょうゆの成分値

	大豆区	豆腐区	大豆区	豆腐区
	生揚げ		火入れ	
	%			
全窒素	1.37	1.41	1.38	1.40
塩分	25.41	27.62	25.00	27.44
無塩可溶性固形分	12.5	12.2	12.8	12.4
アルコール	0.58	0.39	0.55	0.38
pH	4.62	4.57	4.64	4.57

謝辞

本研究の実施にあたり、しょうゆ醸造全般にわたるご指導をいただいた産業技術センター食品研究所大西茂彦主席研究員ならびにご助言をいただいた佐々原浩幸主任

研究員に深謝いたします。

参考文献

- 1) 大竹嘉尚：食品副産物を利用した機能性食品の開発，茨城県工業技術センター研究報告，Vol. 23, pp. 28-31 (1994)．
- 2) 秋山聡子，池田昌代，鈴野弘子：おから粉末を利用した魚肉つみれの高齢者向け介護食品としての品質評価，日本調理科学会誌，Vol. 52, pp. 249-257 (2019)．
- 3) 白川武志，田村桂子，上枝加代子，香川典子：オカラ醤油の仕込み—オカラの再利用—，香川県産業技術センター研究報告，Vol. 2, pp. 98-100 (2001)．
- 4) 櫻井正晃，佐藤茂，高和剛：茨城県産大豆由来のオカラを用いた醤油風調味料の開発（第2報），茨城県工業技術センター研究報告，Vol. 42 (2013)．
- 5) 東和男編著：発酵と醸造 I (2002)．
- 6) 財団法人日本醤油研究所，しょうゆ試験法(1985)．

希少糖を含む佃煮調味液から生成する香気成分の解析

三好 美玖, 木村 功, 稲津 忠雄, 田村 啓敏*, 何森 健*, 秋光 和也*

醤油とアミノ酸調味液に希少糖シロップ (RSS, 含まれる主な希少糖: アルロース, ソルボース, タガトース及びアロース), ブドウ糖果糖液糖 (GF) 及び白砂糖 (WS) を混ぜた 3 種類の佃煮調味液を調製し, その香気生成について検討した. ヘッドスペースオートサンプラー付きガスクロマトグラフ質量分析装置 (HS-GC/MS) で分析したところ, RSS で調製した佃煮調味液の着色度は, GF や WS で調製した佃煮調味液よりも有意に高かった. また, 香気成分の主成分分析により, RSS からは GF や WS よりも 1.1~4.5 倍多くの furfural, furfuryl alcohol, 2,5-diethyltetrahydrofuran, 3-phenylfuran などのフラン類が生成し, 佃煮調味液の特徴的な香気成分に寄与していることが明らかになった. これらの結果は, RSS に含まれる 4 つの希少糖が香気形成に関与していることを示唆している.

1 緒言

佃煮に使用する多量の糖は風味を引き立てるだけでなく, 水分活性を下げ, 焙煎香を付与する目的で使用されてきた. 特に, 調味液を加熱することで生成するメイラード反応由来の香りは, 嗜好性を高める上で重要である. 孟琦ら¹⁾は, 醤油, みりん, 糖類を含む調味液で調理や加熱をおこなうと, 食品の風味が変化することを報告している. しかしながら, 佃煮は大量の糖を使用して調理されるため, 糖を減らした健康に良い新しい佃煮の開発が求められている.

血糖値を下げる機能を持つ希少糖含有シロップ (以下, RSS と略す) には, ブドウ糖 44.3%, 果糖 31.9%, 希少糖 (アルロース, ソルボース, タガトース及びアロース) が約 15% 含まれている²⁾. さらに, RSS には, 味のkokや風味の増加³⁾等のメリットがあり, さまざまな調理食品や加工食品に使用されてきた. 特に, 佃煮など長時間煮込む加工品に使用すると, 他の甘味料を使用した場合よりも風味が増すことが推測される.

これまで, D-アルロース⁴⁾やD-タガトース⁵⁾のメイラード反応による香気生成は報告されているが, 希少糖アルロース, ソルボース, タガトース, アロースを含む RSS については検討されていない. 糖分が多く, 長時間調理される佃煮は, メイラード反応によって, より多くの特徴的な香気成分を生成する⁶⁾ため, 製造工程における香気生成と制御は重要な課題である. 本研究では, RSS, ブドウ糖果糖液糖 (以下, GF と略す) 及び白砂糖 (以下, WS と略す) を使用した佃煮調味液モデルの調理過程で生成される香気成分をヘッドスペースオートサンプラー付きガスクロマトグラフ質量分析装置 (以下, HS-GC/MS と略す) で定量し, 希少糖を原料とした香気生成とその特徴を明らかにした.

2 実験方法

2.1 試料

RSS (松谷化学工業株式会社製), WS (三井製糖株式会社製), GF (日本食品化工株式会社製), 濃口醤油 (盛田株式会社製), アミノ酸調味液 (ダイヤアミノ酸液-低塩 NK-12, 播州調味料株式会社製) は市販品を購入した.

2.2 佃煮調味液の調製

佃煮調味液は, 青山ら⁷⁾の方法に基づいて調製した. すなわち醤油 30 g, アミノ酸液 8 g に RSS, WS または GF を加え, 最終濃度が Brix18% になるように蒸留水で 100 g に調製した. 20 mL 容バイアル瓶に調製した佃煮調味液 2 mL を分注し, 内部標準液として 2000 ppm の 1-propanol を 500 μ L 添加した後, 密封した.

モデル加熱調理は, GC/MS-QP2010 Ultra HS-GC/MS (株式会社島津製作所製) のヘッドスペースオープンを使用して, 佃煮調味液が入ったバイアルを 85°C で 60 分間振とう加熱した. 同様の操作を 3 回繰り返した.

2.3 香気成分の分析

ヘッドスペース中の香気成分はガスクロマトグラフ質量分析装置 (以下, GC/MS と略す) に注入され, キャピラリーカラム SLB-5ms (膜厚 0.25 mm, 長さ 30 m, 内径 0.25 mm, シグマアルドリッチ製) を用いて香気成分を分析した. 香気成分の吸着剤には Tenax を用い, トラップ冷却温度は 50°C, トラップ加熱温度は 200°C, トランスファーライン温度は 150°C とした.

GC/MS は, キャリヤーガスとして超高純度ヘリウムガスをを用い, 一定圧力 (37.1 kPa) 下で, スプリットレスで注入した. 分析における加熱条件は, オープン温度を 50°C で 10 分保持した後, 3°C/分で昇温し, 300°C に達した後 5 分間保持した. 質量分析はスキャンモードにて, イオン源を 200°C, インターフェース温度を 250°C, 40~400 m/z の質量範囲で, 電子イオン化法 (EI 法) によって質量分析した.

成分の同定には, FFNSC2 質量スペクトルデータベース (島津製作所) と NIST 質量スペクトルライブラリ 11 (NIST) と保持指標 (Retention Index. 以下, RI と略す) を使用した. なお, 分析前に n-アルカン (C7-C22) 混合標準溶液 (林純薬工業株式会社製) を用いて, 溶出時間から RI を算出した. HS-GC/MS 分析で検出された香気成分は, トータルイオンクロマトグラムのピーク面積の平均値 $\pm$ 標準偏差として示した. 相対定量値は, 検出された化合物のピーク面積と内部標準 1-propanol のピーク面積の比を使用して計算した (リテンションタイム: 7.2 分). 分析データは, Pirouette ver. 4.0 (GL Sciences 株式会社) を使用して主成分分析 (以下, PCA と略す) し, 佃煮調味液の香り特性を評価した.

*香川大学国際希少糖研究教育機構

2. 4 各種分析

佃煮調味液の着色度は420 nmの吸光度とし、分光光度計(U-2001型、株式会社日立製作所製)を用いた。

また同溶液のpHは、コンパクトpHメーター(B-712型、堀場製作所製)を用いて測定した。

糖類の分析は、前処理として、電気透析膜(AC-110-10、株式会社アストム製)を備えたマイクロアシライザーG1(旭化成株式会社製)にて脱塩処理を行った。その後、既報⁸⁾に基づいて、配位子交換型カラム(CARBOSep CHO-882×2、株式会社エーディーエステック製)を備えたCorona Veo-Ultimate 3000(Thermo Fisher Scientific株式会社製)を用い、超純水を溶離液としてカラム温度55℃にて糖分析を行った。メイクアップ液はアセトニトリルを用いた。

アミノ酸分析では、調味液を適量希釈し、遠心式限外濾過フィルター(Amicon Ultra NMWL 3K, Merck KGaA製)で濾過した。濾液は、オルトフタルアルデヒド(OPA)ポストカラム誘導体化システム(日本分光株式会社製)と#2619PHカラム(4.0×150 mm、株式会社日立ハイテック製)を備えた高速液体クロマトグラフを使用した。

3 結果及び考察

3. 1 佃煮調味液の着色とアミノ酸及び糖組成の変化

RSSを含む佃煮調味液の着色度は、GFとWSを含む調味液よりもそれぞれ2% ($p < 0.05$), 4% ($p < 0.05$)と高く、またpHはRSS, GF, WSでそれぞれ5.03, 5.10, 5.13であった。RSSのpH(5.03)は最も低かったが、これらのpH間に有意な差はなかった。メイラード反応中にはH⁺イオンが形成されるため、反応混合物のpHが低下する⁹⁾。RSSを含む佃煮調味液のpHが最も低かったことから、GFやWSを含む佃煮調味液より、メイラード反応の影響を、より受けていたことを示唆している。

調味液中の糖組成を調べたところ、RSS, GF及びWSの佃煮調味液における糖の減少総量は56.12 mg/mL, 60.52 mg/mL, 29.14 mg/mLであった。またWSでは、加熱処理前にグルコース6.79 mg/mLとフルクトース4.90 mg/mLが検出されたが佃煮調味液の原料である醤油に由来するものと考えられた。

一方、加熱によるアミノ酸の減少総量としては、RSS, GF, WSでそれぞれ4.96 mg/mL(減少率16%), 3.66 mg/mL(減少率12%), 5.29 mg/mL(減少率16%)であった。特に、加熱後の佃煮調味液におけるグルタミン酸の残存量はRSS 4.86 mg/mL, GF 5.37 mg/mL, WS 5.20 mg/mLとなり、それぞれの残存量間に有意差が認められた($p < 0.05$)。Motai¹⁰⁾は、さまざまなアミノ酸やペプチドを糖と共に加熱しメラノイジンを生成したところ、リジン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸が、最も褐変しやすいことを報告している。RSS中の希少糖はメイラード反応性が高いため、グルコースやフルクトースを主体とするGFと比較してもRSSに含まれる希少糖が、メイラード反応を起こしやすいことが示唆された。

3. 2 加熱による佃煮調味液の香気成分の生成

GC/MSライブラリを使用して43成分の香気成分が同定された(表1)。RSSを含む佃煮調味液の香気成分と、GF及びWSの香気成分の定量されたピーク面積を比較

したところ、RSSには2-ethylhexanol(グリーン¹¹⁾), 2-heptanone(フルーツ¹²⁾), furfuryl alcohol(硫黄, エステル¹³⁾), 3-phenylfuran(甘い¹⁴⁾) が、GF ($p < 0.01$) 及びWS ($p < 0.05$) を含む佃煮調味液よりも有意に高かった。また、メチオニン由来と考えられる硫黄含有アミノ酸3-methylthiopropionaldehyde(調理したジャガイモと醤油の香り¹⁵⁾)のピーク面積の検出が最小値となり、また加熱によるメチオニンの減少率はRSSが最も低かったことから(RSS: 17.4%, GF: 24.0%, WS: 30.8%), RSSでは3-methylthiopropionaldehydeの生成が抑制されていると結論付けられた。

3. 3 生成された香気成分の主成分分析(PCA)

表1で特定された芳香成分43成分について、PCAを実行した。スコアプロットを図1に示した。第1主成分(以下、PC1と略す)は39.9%を占め、第2主成分(以下、PC2と略す)は18.1%であり、PC1とPC2は、全体の分散の58.0%を説明できた。WSはPC1の右側にあり、RSSはPC1の左側にプロットされていることから、PC1は、3種類の佃煮調味液の褐変強度と相関し、メイラード反応性と関連している可能性が示唆された。また、RSS, GF及びWSの加熱による総アミノ酸含有量の損失は、それぞれ4.96, 3.66, 5.29 mg/mLであったため、PC2は3種類の佃煮調味液の総アミノ酸含有量の損失に関連していると考えられた。

次に図2では、各佃煮調味液の香り特性を分類するためのローディングプロットを示した。WSは、PC1の正の領域に位置しており、アルデヒド類の生成により特徴づけられていた。またGFは、PC2の正の領域に位置することから、硫黄含有化合物の生成により特徴づけられていた。一方、RSSはPC1の負の領域に位置することから、フラン類の生成により特徴づけられていた。RSSに特徴的なフラン類には、furfural, furfuryl alcohol, 3-phenylfuran及び2,5-diethyltetrahydrofuranが挙げられる。特に、furfuryl alcoholと3-phenylfuranはGF及びWSよりもRSSで有意に多く生成されていた(表1)。さらに、2-pentylfuranは、スコアプロット(図2)のGFに対応するPC2の正の領域に位置し、他の化合物よりも有意に多いピーク面積を示した(表1)。

フルクトースは、メイラード反応における様々な芳香化合物の前駆体として知られている²⁰⁾。Shenら²¹⁾は、イチゴジャムにフルクトースを使用すると、グルコースやスクロースと比べて約2倍のフラン類が生成されることを報告している。またChoら⁵⁾は、タガトースが、グルコース、ガラクトース、フルクトースよりも多くのフラン類を生成し、反応中に甘くフルーティーなキャラメルのような香りが形成されることを報告している。さらにSawettanunら²²⁾は、パンにアルロースを使用するとスクロースよりも多くのフラン類が生成され、特徴的なローストしたキャラメルのような香りが生じると報告している。これまでフラン類生成の基質アミノ酸として、セリン、システイン、アラニン、スレオニン及びアスパラギン酸が報告²³⁾されているが、本研究ではこれらのアミノ酸の減少に有意差は認められず、グルタミン酸の減少率のみがRSSとGF及びWSで有意差を示したことから、当該アミノ酸が香気

表 1 各種糖類を含む佃煮調味液を加熱して生成する香気成分

No	香気成分	RI ^{aa}	RSS		GF		WS		香り			
			RI ^{bb}	ピーク面積 (×10 ³)	RI ^{bb}	ピーク面積 (×10 ³)	RI ^{bb}	ピーク面積 (×10 ³)				
×	アルコール											
1	isopentyl alcohol	729	732	28301.3	734	27513.8	739	28779.5	グリーン ^{1 1)}			
2	vinyl amyl carbinol	978	979	41.4	980	37.4	981	29.6				
3	2-ethylhexanol	1030	1028	214.3	a*	1028	140.2	1029		93.2	a*	
4	phenethyl alcohol	1113	1109	968.6	1109	892.8	1109	866.9				
5	4-ethylguaiacol	1275	1271	223.7	1271	238.9	1271	238.4				
6	4-vinylguaiacol	1309	1307	34.0	1307	44.9	1307	58.8			ローストピー ナッツ ^{1 3)}	
△	アルデヒド											
7	3-methylcrotonaldehyde	780	783	1758.2	786	1953.2	790	2914.9				
8	benzaldehyde	960	958	4776.5	b** c**	959	5283.8	b** d**	960	6704.0	c** d**	鋭い, 甘い ^{1 3)}
9	phenylacetaldehyde	1045	1040	9522.4	1040	10046.3	1041	11800.3			草 ^{1 3)}	
10	nonanal	1104	1101	127.6	1102	117.9	1102	138.8				
11	2-phenylpropenal	1148	1152	353.2	e*, f*	1152	437.3	e*	1152	1368.9	f*	鋭い芳香 ^{1 8)}
12	decanal	1208	1202	29.4	1203	43.3	1203	43.7				
13	<i>alpha</i> -ethylidene- benzeneacetaldehyde	1265	1265	121.1	g*	1266	139.1	1266	159.6	g*	キャラメル, 煙 ^{1 9)}	
14	dodecanal	1410	1406	21.1	1406	35.4	1406	45.5				
15	5-methyl-2-phenyl-2- hexenal	1485	1481	13.9	1482	14.7	1482	33.0				
▲	エステル											
16	2-methylpropyl chloroacetate	946	948	89.3	948	115.2	948	116.9				
17	2-ethylallyl butyrate	1013	1012	235.3	1013	212.1	1013	220.8				
18	ethyl benzoate	1170	1167	11.4	1167	17.0	1167	28.4			花 ^{1 2)}	
19	diethyl succinate	1183	1176	130.2	1176	119.5	1177	136.4			無臭 ^{1 2)}	
20	ethyl phenylacetate	1246	1239	87.8	1239	74.0	1251	38.8			甘い蜜 ^{1 2)}	
21	2-phenethyl acetate	1257	1251	23.1	1251	29.6	1251	38.8				
22	methyl <i>para-tert</i> - butylphenylacetate	1502	1503	121.6	h**	1455	1200.6	h**, i**	1454	162.1	i**	グリーン ^{1 6)}
23	ethyl palmitate	1993	1993	36.0	j*	1993	35.6	k**	1993	95.5	j*, k**	ワックス ^{1 7)}
◆	酸											
24	isovaleric acid	842	836	392.3	837	457.2	838	597.7			バレリアン様 ^{1 2)}	
+	ケトン											
25	2-heptanone	853	849	593.6	l*	850	405.9	l*	852	466.8	フルーツ ^{1 2)}	
26	ethyl butyl ketone	885	882	149.7	m**	883	229.4	m**, n*	884	177.3	n*	フルーツ ^{1 7)}
27	5-methyl-3-heptanone	938	940	240.1	940	218.5	941	294.0				
28	3-octanone	986	983	21.5	o**, p**	984	62.1	o**, q*	984	112.7	p**, q*	フルーツ ^{1 2)}
29	hexyl methyl ketone	989	988	9.1	990	6.7	990	16.0			カーネーシ ョン様 ^{1 2)}	
30	6-methylhept-5-en-2- one	986	991	230.7	r*	991	295.1	r*	991	249.9	柑橘, グリー ン ^{1 7)}	
31	acetophenone	1068	1062	124.1	1062	144.8	1062	167.9			苦いアーモン ドオイル ^{1 2)}	

表 1 続き

表 1 概観											
● フラン											
32	furfural	831	825	1930. 5		826	1031. 8		828	877. 9	甘い, 木 ^{1 3)}
33	furfuryl alcohol	849	846	<u>584. 5</u>	S*, t**	848	130. 8	S*	850	198. 2	硫黄, エステル ^{1 3)}
34	2,5-diethyltetrahydrofuran	896	897	328. 7		897	302. 3		899	307. 4	
35	2-pentylfuran	991	987	10. 6	U**, V**	987	<u>116. 5</u>	U**, W**	988	45. 8	フルーツ, グリーン ^{1 3)}
36	tetrahydro-2,2-dimethyl-5-(1-methylpropyl) furan	1018	1024	100. 0		1024	88. 2		1025	81. 4	
37	3-phenylfuran	1216	1219	<u>445. 2</u>	X**, y**	1219	328. 4	X**	1219	352. 9	甘い ^{1 4)}
○ 窒素含有化合物											
38	bipropionyl	801	801	557. 4		803	590. 8	Z**	804	<u>993. 6</u>	バター ^{1 7)}
39	2-ethyl-6-methylpyrazine	1000	1000	330. 9		1000	317. 6		1001	287. 5	グリーンナッツ, キャラメル ^{1 3)}
40	2(or 3)-ethyl-3,5(or 2,5)-dimethylpyrazine	1081	1078	47. 3		1078	59. 6		1078	67. 2	
41	2-butyl-3,5-dimethylpyrazine	1306	1310	18. 9		1310	20. 8		1310	24. 5	
◇ 硫黄含有化合物											
42	3-methylthiopropionaldehyde	909	902	2890. 1		905	3077. 8		906	3054. 2	調理したポテト, 醤油 ^{1 5)}
43	dimethyl trisulfide	969	964	620. 5		964	798. 1		965	606. 7	新鮮なネギ ^{1 3)}
ピーク面積総量				56867. 2		57425. 0		63092. 5			

内部標準 1-propanol (1000 µg) のピーク面積は 4493770 であった。下線は有意差のある最大ピーク面積であり、各値は平均値±標準偏差 (n = 3) として示した。

RI^{aa}, FFNSC2, NIST11 によるライブラリ値; RI^{bb}, 測定値; a-z, 同じ行の同じ文字の値は、一元配置分散分析および多重比較テスト (Bonferroni-Dunn) による有意差があるものを示した (** p < 0.01; * p < 0.05)。

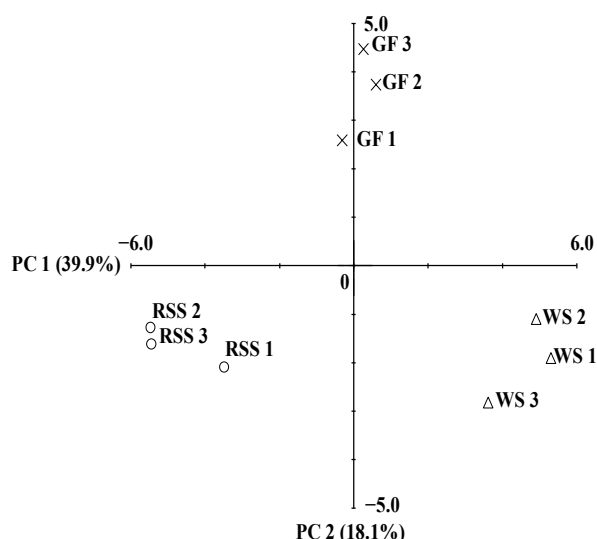


図 1 3種類の佃煮調味液のスコアプロット
○; RSS, ×; GF, △; WS.
数字は独立した実験番号を示した。

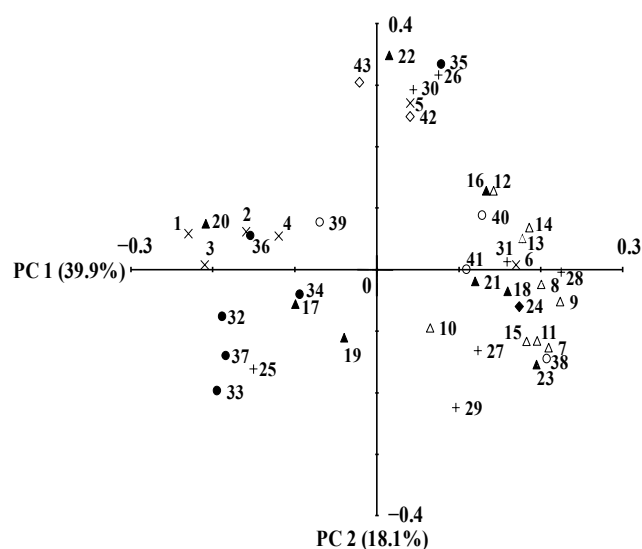


図 2 佃煮調味液から生成した香気成分のローディングプロット
×; アルコール類, △; アルデヒド類, ▲; エステル類,
◆; 有機酸類, +; ケトン類, ●; フラン類, ○; 含窒素化合物類,
◇; 含硫化合物類.
数字は表 1 の香気成分の数字に対応している。

生成に影響を及ぼしていることが示唆された。藤巻ら²⁴⁾は、グルタミン酸がグルコースと反応し、furfural 及び 5-Hydroxymethyl-furfural が生成することを報告している。本研究においては、RSS 中に含まれる希少糖がグルタミン酸と反応し、フラン生成に深く関与している可能性が示された。これらの結果から、希少糖 RSS を含む佃煮調味液を加熱することで、フラン類の香りが特徴的に生成されることが示唆された。

4 結言

HS-GC/MS を用いて RSS, WS, GF で調製した佃煮調味液の香気成分の生成を解析した。その結果、RSS を使用した佃煮調味液では、香気成分としてフラン類が特徴的に生成されており、希少糖を含む RSS にはフラン類の香りを高める効果があることが示唆された。

(本報告は *Food Science and Technology Research*, 30, 171-180 (2024) より抜粋した。)

参考文献

- 1) 孟琦, 今村美穂, 小幡明雄, 菅原悦子: 加熱における醤油調味液の香気成分の変化, *日本調理科学会誌*, Vol. 48, pp. 249-254 (2015) .
- 2) 山田貴子, 新谷知也, 飯田哲郎, 岸本由香, 大隈一裕: ヒトにおける希少糖含有シロップ摂取による血糖応答に及ぼす影響, *日本栄養・食糧学会誌*, Vol. 70, pp. 271-278 (2017).
- 3) 内山明子: 希少糖含有シロップの味質改善効果, *月刊フードケミカル*, Vol. 7, pp. 61-66 (2020).
- 4) 田村啓敏, 何森健, 徳田雅明: 食品または医薬品の芳香を改善する方法, 特開 2008-48685 (2008).
- 5) Cho I. H., Lee S., Jun H. R., Roh H. J. and Kim Y. S.: Comparison of volatile Maillard reaction products from tagatose and other reducing sugars with amino acids, *Food Sci. Biotech.*, Vol. 19, pp. 431-438 (2010).
- 6) 奥村蒸司: メイラード反応とフレーバーの生成, *日本醸造協会誌*, Vol. 88, pp. 178-187 (1993).
- 7) 青山康司, 岡崎尚, 米田達雄: 昆布佃煮の変敗に及ぼす水分活性, 初発酵母菌数及び貯蔵温度の影響, 広島県立食品工業技術センター研究報告, Vol. 22, pp. 7-12 (2000).
- 8) Miyoshi M., Kimura I., Inazu, T. and Izumori K.: High Sensitivity Analysis and Food Processing Stability of Rare Sugars, *Food Sci. Technol. Res*, Vol. 25, pp. 891-901, (2019)
- 9) Davies C.G.A. and Labuza T.P.: The Maillard reaction: application to confectionery products, *Confect. Science*, Vol. 33, pp. 35-66 (1997) .
- 10) Motai H.: Color tone of various melanoidins produced from model systems, *Agr. Biol. Chem.*, Vol. 37, pp. 1679-1685 (1973).
- 11) 早瀬文孝, 渡辺寛人: つゆの香気成分とコク寄与成分, *日本醸造協会誌*, Vol. 109, pp. 161-167 (2014).
- 12) 堀口博: 香料事典, 共立出版 (1955).
- 13) Starowicz M., and Zieliński H.: How Maillard reaction influences sensorial properties (color, flavor and texture) of food products?, *Food Rev. Int.*, Vol. 35, pp. 707-725 (2019) .
- 14) Ono, T., Usami, A., Nakaya, S., Shinpuku, H., Yonejima, Y., Ikeda, A., and Miyazawa, M.: Agroecosystem development of industrial fermentation waste-characterization of aroma-active compounds from the cultivation medium of *Lactobacillus brevis*-, *J. Oleo Sci.*, Vol. 64, pp. 585-594 (2015).
- 15) John, W.: 3-(Methylthio)propionaldehyde, *Perfumer & Flavorist*, Vol. 39, pp. 18-20 (2014).
- 16) メルク株式会社:
<https://www.sigmaaldrich.com/JP/ja/product/aldrich/w269018> (検索日: 2025. 1. 14)
- 17) The Good Scents Company Information System :
<http://www.thegoodscentscompany.com/index.html> (検索日: 2025. 1. 14)
- 18) Huang X.H., Zheng X., Chen Z.H., Zhang Y.Y., Du M., Dong X.P., Qin L. and Zhu B.W.: Fresh and grilled eel volatile fingerprinting by e-Nose, GC-0, GC-MS and GC×GC-QTOF combined with purge and trap and solvent-assisted flavor evaporation, *Food Res., Int.*, Vol. 115, pp. 32-43 (2019).
- 19) Jati, M., and Ariza, B.T.S.: Use of gas chromatography-olfactometry in combination with solid phase micro extraction for cocoa liquor aroma analysis, *Int. Food Res. J.*, Vol. 18, pp. 829-835 (2011).
- 20) Kraehenbuehl K., Davidek T., Devaud S. and Maurox O.: Basic and acidic sugars as flavor precursors in the maillard reaction, *Exp. of Multidisciplinary Flavour Science*, pp. 267-270 (2010).
- 21) Shen M., Liu L., Zhang F., Jiang Y., Huang Z., Xie J., Zhong Y., Nie S., and Xie M.: Effects of processing parameters on furan formation in canned strawberry jam, *Food Chem.*, Vol. 358 (2021).
- 22) Sawettanun S. and Ogawa M.: Physicochemical parameters, volatile compounds and organoleptic properties of bread prepared with substituted sucrose with rare sugar D-allulose, *Food Sci. Technol.*, Vol. 57, pp. 5931-5942 (2022) .
- 23) Nie S., Huang J., Hu J., Zhang Y., Wang S., Li C., Marcone M. and Xie M.: Effect of pH, temperature and heating time on the formation of furan in sugar-glycine model systems, *Food Sci. Hum. Wellness*, Vol. 2, pp. 87-92 (2013).
- 24) 藤巻正生, 倉田忠男: 食品の加熱香気, *化学と生物*, Vol. 9, pp. 85-95 (1971).

寒天を用いた菓子等の調理や食感に対するアルロース（希少糖）の効果

神 幸子, 三好 美玖

アルロース、フルクトース及びグラニュー糖を用いて寒天ゼリーを調製し、各種糖が寒天ゼリーの離水率、透明度、物性に及ぼす影響を調べるとともに官能評価を行った。アルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加した寒天ゼリーは、他の糖と比較して柔らかく、なめらかな物理的特性が認められた。また離水率は、アルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加することで、グラニュー糖寒天ゼリーよりも7日間を通して低い値となった。官能評価では、アルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加した寒天ゼリーは、グラニュー糖寒天ゼリーと同程度の嗜好性となった。これらの結果から、アルロースは寒天ゼリーの透明度に影響を与えず、経時的な離水を抑え、特徴的な硬さや、なめらかさを有した寒天ゼリーを調製できることが示唆された。

1 緒言

アルロースは食後血糖改善効果¹⁾や抗肥満作用²⁾が報告されている希少糖である。また、健康志向の消費者ニーズの高まりにより、機能性表示食品の情報検索サイト³⁾において「アルロース」を機能性関与成分とした食品の届け出が30件受理(2025年2月27日現在)されており、幅広い食品で機能性を持つ糖として利用されている。

一方、寒天はゲル形成性を利用して、菓子類、乳製品、佃煮等、食品加工用に使用されている⁴⁾。特に菓子への利用では、見た目も華やかな透明感のある菓子「ネオ和菓子」の素材としても使用されており、幅広い年齢層から受け入れられている。また、原材料に動物性たんぱく質が使用されているゼラチンに対して、寒天は紅藻類を原材料としているため、ヴィーガン食向けのゲル化剤として利用されている⁵⁾。

これまでにアルロースを含む寒天ゼリー(以下、寒天とする)の物性については報告⁶⁾されているが、アルロースを添加した寒天(アルロース寒天)を保冷した際の離水や物性、透明度、風味については検討されていない。そこで本研究では、より効果的にアルロースを添加した寒天を用いた菓子等の調理や食感に対するアルロースの効果を検討した。

2 実験方法

2.1 材料

粉寒天(かんてんクック、伊那食品工業(株))、グラニュー糖(スプーン印グラニュー糖、DM三井製糖(株))、アルロース(ASTRAEA、松谷化学工業(株))、フルクトース(果糖、ウェルネオシュガー(株))を用いた。

2.2 試料調製

寒天は、安田⁶⁾の手法に準じて調製した。寒天1%(w/w)、各種糖20%(w/w)(アルロース、フルクトース、アルロースとグラニュー糖半量ずつ、グラニュー糖)になるように煮溶かし定容し、寒天溶液を調製した。

2.3 離水率

煮溶かし定容した寒天溶液を70℃で湯煎しながら、15 mL遠沈管に約6 mLずつ分注した。遠心分離(1,690

G, 2分間)の後、寒天溶液が固まるまで静置し、それぞれの遠沈管を精秤後、5℃の冷蔵庫で保冷した。寒天の離水率は、3時間、3日間及び7日間保冷した上述の遠沈管を遠心分離(1,690 G, 2分間)し、寒天から出てきた離水をろ紙で吸い取った後、当該遠沈管を精秤し、保冷前後の寒天の重量から離水率(保冷後の寒天の重量/保冷前の寒天の重量×100)を算出した。

2.4 透明度

透明度の分析は、鈴木⁷⁾の手法に準じて実施した。石英セル(内径43 mm×36 mm×10 mm)の中で寒天溶液を密閉容器内で冷やし固め、5℃の冷蔵庫で所定の時間まで冷却した。これらの試料を、測色色差計SE 7700(日本電色工業(株))を用いてL*a*b*表色系により測定した。2°視野でD65の光源を当てて、透過により明度(L*; 空気の透過度を100とした)を得た。

2.5 物性評価

寒天容器を各種測定容器に充填し、5℃の冷蔵庫で所定の時間まで冷却した。物性の分析では、クリープメータRE2-33005C((株)山電)を使用した。

2.5.1 縦方向の荷重

ステンレスシャーレ(内径40 mm×深さ15 mm)の表面が平らになるよう充填した寒天を、直径3 mmの円柱型プランジャー(No.4)で縦方向から押して、寒天にかかる荷重を測定した(図1-i)。ロードセルは20 N、アンプ倍率は10倍、格納ピッチは0.1 sec、測定速度は1 mm/secに設定した。

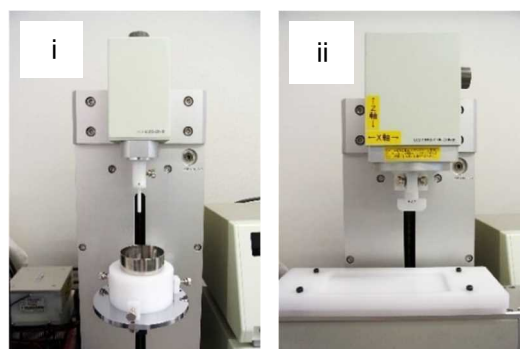


図1 物性評価の測定の様子
i, 縦方向の荷重; ii, 横方向の摩擦

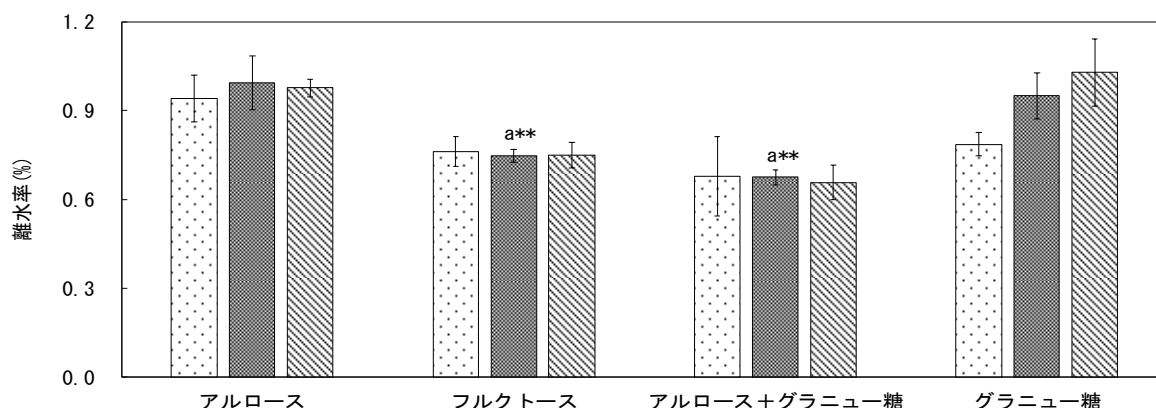


図2 各種糖における寒天の経時的な離水率の変化

□, 3 時間; ▒, 3 日目; ▨, 7 日目

同じ文字の値は、一元配置分散分析および多重比較テスト (Bonferroni-Dunn) による有意差があるものを示した (**, $p < 0.01$)

2. 5. 2 横方向の摩擦

溝付き容器 (縦 50 mm × 横 110 mm × 深さ 5 mm) の表面が平らになるように充填した寒天を、接触面積が 250 mm² (XZ7, 縦 10 mm × 横 25 mm) のプランジャーで横方向に移動させ、寒天にかかる摩擦を測定した (図 1-ii). 垂直荷重は 0.1 N, 格納ピッチは 0.1 sec, 摺動速度は 1 mm/sec, 摺動距離は 20 mm に設定した.

2. 6 官能評価

評点法及び順位法により、寒天の官能評価を実施した (20~60 代男女 17 名). 評点法では、4 種類の試料 (アルロース, フルクトース, アルロースとグラニュー糖半量ずつ, グラニュー糖) を用い、見た目, 食感, 味等 5 段階 (1~5 点) で評価した.

順位法では、評点法と同じ試料 4 種類を評価した. 総合的に好ましい方から順位を付けさせ、この順位和を基に、Kramer の検定表により検定を行った.

2. 7 統計解析

物性値及び評点法 (官能評価) の結果については一元配置分散分析を用い、有意差が認められた場合にはボンフェローニ法による多重比較を行った.

3 結果及び考察

3. 1 離水率

図 2 に各種糖を添加した寒天の離水率を示した. アルロース寒天やフルクトース寒天では、3 時間, 3 日目, 7 日目を通して離水率がほぼ一定であった. 一方、グラニュー糖寒天の離水率は、3 時間後まで他の寒天と同程度であったが、それ以後は経時的に増加していた. また、アルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加した寒天では、他の糖に比べて離水率が全体的に低く一定となった. 特に 3 日目のフルクトース寒天と比較すると離水率が有意に低値であることが示された ($p < 0.01$).

寒天ゲル中には、寒天分子近傍に水素結合により強く結びついた水分子 (結合水) と、寒天の網目の中に閉じ込められた水分子 (自由水) が存在する⁸⁾と考えられている. 後者の網目の中に閉じ込められた水分子 (自由水) は、時間とともに外へ絞り出され離水の原因と

なる. アルロースは水和速度が遅い (水和速度; スクロース > グルコース > フルクトース > アルロース)⁵⁾ ため、寒天中に存在する自由水が多くなることから、全体的に離水率が高くなったと考えられた. 一方、グラニュー糖寒天は、他の単糖類 (アルロース, フルクトース) 寒天と比較すると経時的に離水率が増加していた. アルロースのような単糖類は、二糖類のグラニュー糖と比較して分子量が小さいためゲル中の自由水が抜けにくく、水分子を保持しやすくなったと推測された. また、グラニュー糖にアルロースを半量添加することで、単糖類と同程度の離水となり、経時的な離水を抑制することが示唆された.

3. 2 物性評価

3. 2. 1 縦方向の硬さ

寒天を調製して 3 時間後に、アルロース寒天と、アルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加した寒天と比較すると、破断荷重が有意に低値 (B, $p < 0.05$) となった (図 3). 中浜⁹⁾は、寒天の硬さには寒天分子間の架橋効果の他に糖の脱水効果によって寒天分子の水和水 (結合水) を奪い、寒天分子相互の架橋を作る機会を増加させ、架橋が密に均等化し、ゲル構造の網目間にある溶液の粘度も増すことで硬く強い弾性をもつ寒天が得られることを報告している. アルロース寒天は、寒天中の水分吸収傾向が低く、自由水が多く存在する柔らかい寒天になるため⁵⁾, アルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加したものと比較して、破断荷重が有意に低値 (B, $p < 0.05$) であり、柔らかい寒天となったと考えられた. 破断後の測定図形においては、アルロース, フルクトース及びアルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加した寒天は、破断後に荷重の高い破断を繰り返す測定図形が得られたが、グラニュー糖寒天は荷重の小さな破断を繰り返す測定図形となった (図 4). これらの結果についても、自由水の多いアルロース寒天は架橋が疎な状態となり、高い荷重を繰り返す測定図形になったものと考えられた.

また、アルロース寒天では、調製後 3 時間で破断荷重が有意に低くなり (A, $p < 0.01$), 冷蔵庫で 3 日間保冷することで、寒天の強度が高くなることが認めら

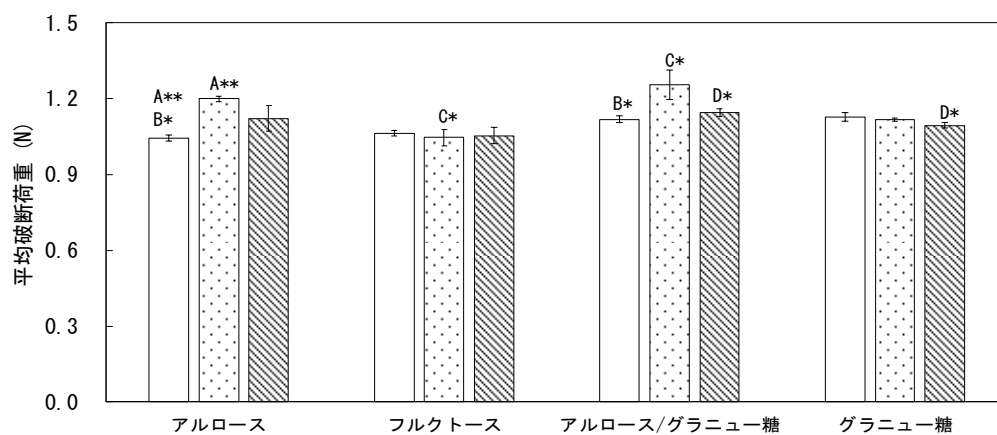


図3 各種糖における寒天の破断荷重

□, 3 時間 ; ▨, 3 日目 ; ▩, 7 日目

同じ文字の値は、一元配置分散分析および多重比較テスト (Bonferroni-Dunn) による有意差があるものを示した (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$)

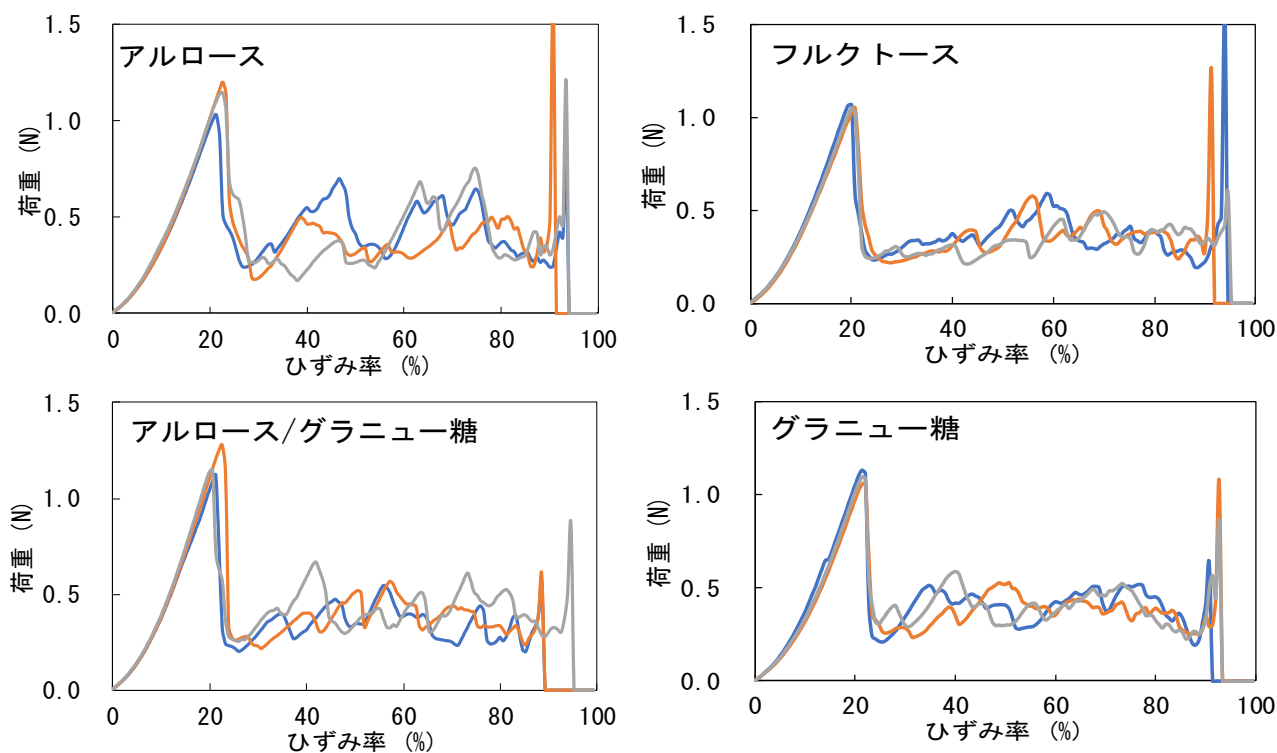


図4：縦方向の荷重における各種寒天の測定図形

—, 3 時間 ; —, 3 日目 ; —, 7 日目

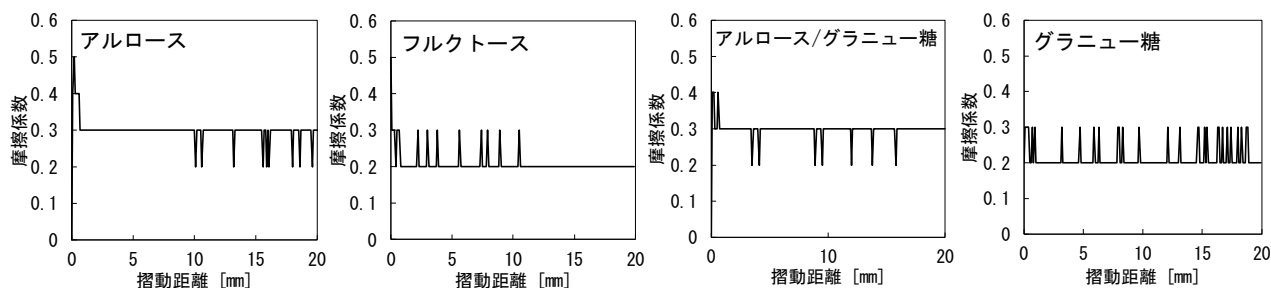


図5 横方向の摩擦における各種3時間後の寒天の測定図形

れた (図3). 有意差は確認されなかったが、アルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加した寒天においても同様の傾向が見られた。これらの要因として、水和速

度が遅いアルロースは、3 日間保冷することでフルクトースやグラニュー糖に水和速度が追い付き、同程度の水分含量になるものと考えられるが、今回は検討す

表 1 各種糖における寒天の明度変化

	3 時間	3 日目	7 日目	平均
アルロース	85.06	85.39	85.15	85.20
フルクトース	84.23	84.09	84.02	84.11
アルロース/ グラニュー糖	84.96	84.71	84.65	84.77
グラニュー糖	85.13	84.96	85.05	85.05

*空気の透過度を 100 としたときの明度 (%)

るには至らなかった。

また、本研究では 7 日間を通して、アルロース寒天とフルクトース寒天間に有意差は確認されなかった (図 3)。長坂ら¹⁰⁾は、フルクトース寒天は、グラニュー糖の主原料であるショ糖を添加した寒天と比較して、寒天の架橋密度が高くなり、架橋間の分子鎖がやや長く疎な網目構造となるため、破断応力や破断エネルギーが低くなる可能性があることを報告している。本研究においても、アルロース寒天はフルクトース寒天と有意差は確認されなかったことから、フルクトースとよく似た化学構造のアルロースは、破断応力や破断エネルギーが低くなったと推測した。

3. 2. 2 横方向の摩擦

3 時間後のアルロース寒天について、縦方向の硬さに特徴的な変化が認められたことを受け、横方向の摩擦についても検討した (図 5)。フルクトース寒天やグラニュー糖寒天では、荷重をかけた際に寒天が割れる現象があったことから摩擦係数の値は小さくなったと推察された。また、アルロースが添加された寒天やフルクトース寒天では、寒天表面のなめらかさを評価している摺動距離に対する振幅数が少なかった。これらの結果は、糖の水和速度⁵⁾と連動しており、水和速度の遅いアルロースやフルクトースは寒天表面上に自由水が多いことから、寒天表面のひっかかりが少なく、なめらかな物性になることが示唆された。

3. 3 透明度

いずれの糖においても 7 日間を通して明度に変化が

確認されず、7 日間における明度の平均値は、高い順に、アルロース、グラニュー糖、アルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加した寒天、フルクトースの順番であった (表 1)。中浜⁹⁾は、糖添加によって分子間の架橋が密になるためゲルの構造の粗さが小さくなり、均質化し、寒天に糖を添加すると透明度が増すと報告している。本研究の結果から、アルロース寒天は分子間の架橋が密になり、寒天ゲルの網目構造が均等化するため、明度が最も高くなったことが考えられた。しかし物性の結果から、アルロース寒天は疎な構造であると推測されたため、物性の結果と齟齬が生じることとなった。これらの要因として長坂ら¹⁰⁾は、寒天の網目構造の密・疎、均質、不均質なことの他に、糖と寒天分子あるいは糖と水の親和力の大小が透明度に影響すると報告しており、本研究においても、これらの要因がアルロースと寒天に相互的に影響していることが示唆された。

3. 4 官能評価

3. 4. 1 評点法による寒天の官能評価

図 6 に寒天の官能検査結果を示した。アルロース寒天の透明度は、グラニュー糖寒天と比較すると、有意に透明度が低い評価であった (a, $p < 0.05$)。噛んだ時の硬さは、アルロース寒天はフルクトース寒天と比べて有意に硬い評価だった (b, $p < 0.05$)。各種糖における寒天の 3 時間後の破断荷重 (図 3) では、いずれの糖も同等の結果だったが、アルロース寒天の方が、フルクトース寒天より破断後に荷重の高い破断を繰り返す測定図形 (図 4) であったことから、噛んだすぐ後に荷重がかかっていると示唆される。これらの荷重のかかり方の違いが、被験者の「噛んだ時の硬さ」の評価に影響したのではないかと考えられるが、この結果については更なる検討が必要である。舌ざわりについては、アルロース寒天は、アルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加した寒天と比べ、有意差が確認された (c, $p < 0.05$)。横方向の摩擦 (図 5) では、アルロース寒天と、アルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加した寒天は同様の摩擦になっており、アルロースやフルクトースを添加することで、ひっかかりが少なく、なめらかな物性になることが示唆されており、官能評価と

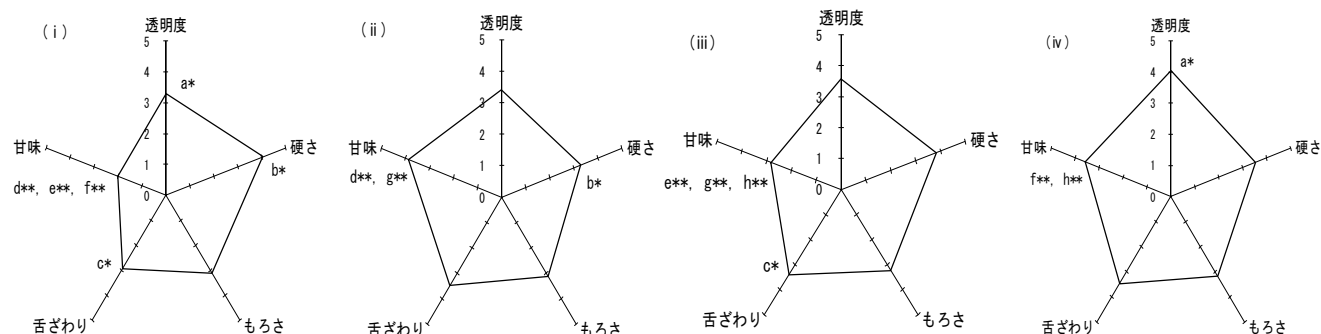


図 6 評点法による寒天の官能評価

i, アルロース; ii, フルクトース; iii, アルロース/グラニュー糖; iv, グラニュー糖

透明度, 非常にある (5 点) ~ ない (1 点); 噛んだ時の硬さ, 非常に硬い (5 点) ~ 非常に柔らかい (1 点);

噛んだ後のもろさ, 非常にもろい (5 点) ~ 非常に崩れにくい (1 点);

舌ざわり, 非常に良い (5 点) ~ 非常に悪い (1 点); 甘味, 非常に甘い (5 点) ~ 非常に不足 (1 点)

英記号間に有意差を示す. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$

表2 順位法による総合的な嗜好性評価

サンプル	1位1点 (人)	2位2点 (人)	3位3点 (人)	4位4点 (人)	合計 (点数)	平均 ^{*1} (点数)
フルクトース	10	3	4	—	28 **	1.6
グラニュー糖	4	8	4	1	36	2.1
アルロース/グラニュー糖	3	6	6	2	41	2.4
アルロース	—	—	3	14	65 **	3.8

^{*1}, 一人当たりの平均値; 有意差は残りの群に対して有意差があるもの示す. ; **, $p < 0.01$

は異なる結果であった。これらの要因として、被験者の「舌ざわり」の受けとめ方の違いがあったと推測されるが、この点についても今後の検討が必要である。一方、本実験では様々な寒天入り食品に適応できるような寒天と糖の濃度に設定したため、甘さについては、アルロース寒天やアルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加したものは、他の糖と比較して有意に甘味が不足している結果となった (d, e, f, $p < 0.01$)。

3. 4. 2 順位法による寒天の官能評価

表2は、アルロース寒天を含めた4種類の寒天について、順位法による総合的な嗜好性の評価結果を示した。嗜好性の高い順は、フルクトース、グラニュー糖、アルロースとグラニュー糖を半量ずつ、そしてアルロースであった。特にフルクトース寒天については、他の3種類の糖と比較して有意に嗜好性が高く ($p < 0.01$)、またアルロース寒天は、他の糖と比較して有意に嗜好性が低かった (アルロース, $p < 0.01$)。グラニュー糖の主原料であるスクロースの甘味を1とした場合、アルロースは0.7¹¹⁾、フルクトースは1.15~1.73¹²⁾であるため、甘味度が高い程、嗜好性が高くなることが考えられた。そのため、アルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加した寒天は、グラニュー糖によって程よい甘さとなり、また味にコクが出て美味しいという意見もあり、他の糖と比較すると有意差も確認されなかったことから、グラニュー糖寒天と同程度の嗜好性となったものと推測された。

今回の官能評価では、糖の量を控えめにしたが、糖の量を増やすことによって、甘味はもちろん、硬さや離水率もかなり変わる⁷⁾と考えられた。

4 結言

寒天を用いた菓子の糖原料としてアルロースを用いて寒天ゼリーを調製し、フルクトースあるいはグラニュー糖との比較を行い、離水率、物性、透明度及び官能評価を実施した。アルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加した寒天では、グラニュー糖寒天と比較して、7日間を通して離水率は低い値となった。また、透明度は、いずれの糖においても7日間を通して変化が確認されなかった。物性評価では、アルロースの添加により他の糖と比較して柔らかく、なめらかな物理的特性が認められた。一方、官能評価では、アルロースとグラニュー糖を半量ずつ添加した寒天は、グラニュー糖寒天と同程度の嗜好性となった。これらの結果より、アルロースを使用した寒天は様々な用途に対して活用できるとともに、機能性^{1) 2)}をもつ寒天食品が製造できる可能性が示唆された。

謝辞

本報告をまとめるにあたり、貴重なご助言、ご指導を賜りました、産業技術センター 木村功 氏に心より感謝いたします。また、官能評価にご協力いただいた方々に感謝いたします。

参考文献

- 1) 豊田行康, 森 茂彰, 梅村展子, 二村由里子, 井上博貴, 秦 毅司, 三輪一智, 村尾孝児, 西山 成, 徳田雅明: 糖尿病ラットへのグルコース負荷試験における D-プシコースの血糖低下作用, 薬理と治療, Vol. 38, 261-269, (2010).
- 2) Matsuo, T., Baba, Y., Hashiguchi, M., Takeshita, K., Izumori, K. and Suzuki, H.: Less body fat accumulation with D-psicose diet versus D-fructose diet, *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, Vol. 30, 55-65, (2001).
- 3) 消費者庁: 機能性表示食品の検索, <https://www.fld.caa.go.jp/caaks/cssc01/> (検索日: 2025.2.27).
- 4) 三浦芳助: 寒天ゲルのテクスチャーとその評価, 広島女学院大学論集, Vol. 50, 59-67, (2005).
- 5) Pelin Pocan, Sevil Cikrikci Erunsal: Exploring the effect of sucrose and d-allulose addition on the gelling ability and physical properties of agar-agar vegan gels, *European Food Research and Technology*, Vol. 250, pp. 2245-2254, (2024).
- 6) 安田由佳子: 透明和菓子の作り方. 学校法人文化学園 文化出版局, pp. 65 (2017).
- 7) 鈴木洋子: 家庭科における寒天の調理性の指導について: 砂糖の添加時期が寒天ゲルに及ぼす影響, 日本家庭科教育学会誌, Vol. 33, 292-297, (2005).
- 8) 埋橋祐二, 滝ちづる: 寒天の種類・特性と使用方法, 日本調理科学会誌, Vol. 38, 292-297, (2005).
- 9) 中浜信子: 寒天ゲルのレオロジー的研究, 家政学雑誌, Vol. 17, 197-202 (1966).
- 10) 長坂慶子, 桑野恵子, 中浜信子: 寒天ゲルの性状に及ぼす糖類の影響, 日本家政学会誌, Vol. 42, 621-627, (1991).
- 11) 飯田 哲郎, 大隈 一裕: 希少糖 (D-プシコース, D-アロース, D-タガトース) の特性とその利用, オレオサイエンス, Vol. 13, 435-440 (2013)
- 12) 前橋健二: 甘味の基礎知識, 日本醸造協会誌, Vol. 106, 818-825, (2011).