

# サトウキビ酢の高品質化に関する研究

松永一彦\*, 瀬戸口真治\*, 下野かおり\*, 亀澤浩幸\*, 中村寿一\*\*

## Study on Manufacturing to Lose Impurity of Sugarcane Vinegar

Kazuhiko MATSUNAGA, Shinji SETOGUCHI, Kaori SHIMONO,  
Hiroyuki KAMESAWA and Toshikazu NAKAMURA

サトウキビ酢の品質低下の要因になっている濁り成分の同定と生成機構の解明を行った。その結果、濁り成分はデキストランと同じ -1,6-グルコシド結合を主体とする多糖類であった。また、濁りの程度は多糖類の量と関連し、多糖類が多くなるほど濁りが甚だしくなった。デキストランはある種の乳酸菌によって生成され、今回単離・同定した乳酸菌の中では、*Lactobacillus nagelii*がデキストランを生成した。この*Lactobacillus nagelii*の制御法について検討したところ、サトウキビ搾汁液を煮沸することで死滅できた。サトウキビ酢の濁りは、デキストランを生成する乳酸菌を抑制することで抑えられるが、そのためには乳酸菌が増殖する前の早い時期に仕込みを行い、また加熱により乳酸菌を殺菌することで可能になることが分かった。

**Keyword** : サトウキビ酢, 濁り, デキストラン, 乳酸菌

### 1. 緒言

サトウキビ酢は無機成分やポリフェノールに富む醸造酢で、調味料としての用途以外に、その機能性の高さから「飲むお酢」として認知されている<sup>1)</sup>。鹿児島県内では、種子島と奄美群島にある9つのメーカーが静置発酵法により製造し、サトウキビ搾汁液を原料にアルコール発酵、酢酸発酵、熟成を経て商品化している。

原料のサトウキビ搾汁液はシュクロースを主成分としていることから、雑菌汚染を受けやすく品質の低下や腐敗を招きやすい。このような中、品質の安定や管理を目的として、鶴木ら<sup>2)</sup>は工業的製造法を確立し、また筆者ら<sup>3)</sup>は産膜酵母に対する制御技術を提案した。しかしながら、市販品の中には濁りのあるサトウキビ酢が見受けられることから、品質の高いサトウキビ酢の製造技術が十分に確立されていないと言える。さらに、濁りはクレームの原因になりやすいと同時に、商品価値を低下させる要因になっている。

そこで、濁り成分の同定とその生成機構の解明をとおして、濁りを抑えた製造技術について検討を行った。

### 2. 実験方法

#### 2.1 成分分析

##### 2.1.1 濁り成分の重量測定

50mL容遠沈管にサトウキビ酢15mL及び99.5%エタノール30mLを入れ、3,000rpmの回転数で15分間遠心処理した。上

清を除去した後に沈殿物を105℃で乾燥させ、乾固物の重量を測定して1L当たりの重量として算出した。

##### 2.1.2 濁りの測定

着色度を2通りの方法で求めた。一つは試料を3,000rpm、10分間の条件で遠心分離し、その上澄み液の420nmにおける吸光度を測定した(A)。他方は、前処理としてまず上澄み液3mLに99.5%エタノール6mLを加えて18,000rpm、20分間の条件で遠心分離した。次に、上澄み液の420nmにおける吸光度を測定し、希釈倍率の3を乗じて算出した(B)。

(B)/(A)を濁りの指標とした。

##### 2.1.3 タンパクの測定

Pierce 660nm Protein Assay Kit (PIERCE製)により求めた。

##### 2.1.4 ポリフェノールの測定

Folin-Ciocalteu法に準拠して行った<sup>4)</sup>。

##### 2.1.5 全糖量の測定

フェノール・硫酸法に準拠して求めた<sup>5)</sup>。本法は還元性を持った単糖やポリフェノール類が測定対象になることから、一般的にはポリフェノール類が測定値に反映されないよう酢酸鉛などでポリフェノールを除去する必要があったが、ポリフェノール量が糖分に比べて極めて少ないことから今回はポリフェノール除去の前処理を行わず直接測定を行った。

##### 2.1.6 構造解析

99.5%アルコール添加による沈殿物の生成及び純水での再溶解を繰り返すことで多糖類を精製し、それをNaBH<sub>4</sub>で還元した。次に、透析により多糖類ポリマーを取り出して、

\* 食品工業部

\*\* 食品工業部(現 デザイン・工芸部)

2,2-ジメチル-2-シラペンタン-5-スルホン酸ナトリウムを評品としてNMRで解析した<sup>6)</sup>。

装置：Bruker AVANCE 500 spectrometerに $^{13}\text{C}$ - $\{^1\text{H}\}$ Cryo ProbeTMを装着したNMR装置

測定周波数：600MHz，500MHz，300MHz

## 2.2 乳酸菌の単離・同定及び培養

### 2.2.1 乳酸菌の単離・同定

クロラムフェニコール添加MRS寒天培地で嫌気培養を繰り返して乳酸菌を単離した。また、16S rDNA部分塩基配列を公共のデータベースと照合し、相同検索することで同定を行った。

### 2.2.2 培養

表1の培地組成で液体培養を行った。

シュークロース	2.0	%
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.5	%
Yeast.ext.	0.5	%
Bacto Peptone	0.25	%
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01	%
NaCl	0.01	%
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.005	%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001	%
pH7.4		

## 3. 結果及び考察

### 3.1 濁り成分の同定とその生成機構について

サトウキビ酢の濁りを除去する目的で、遠心分離あるいは濾紙やケイ藻土による濾過を試みたが、濁りを除去することは出来なかった。しかし、サトウキビ酢に99.5%エタノールを加えて遠心分離で処理したところ、清澄な上澄み液を得ることが出来た。

今回、サトウキビ酢に99.5%エタノールを添加することで、濁りについて検討を行った(図1)。

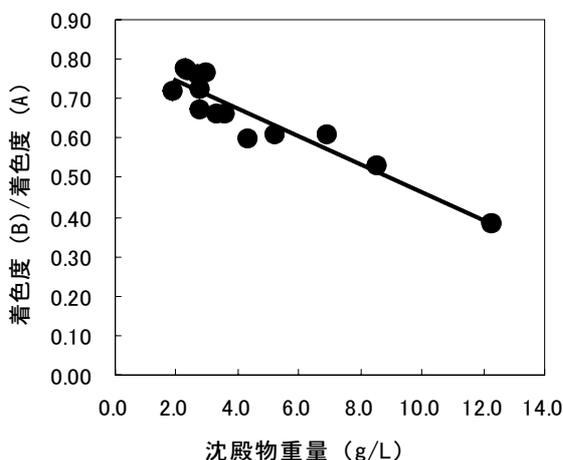


図1 濁りとエタノール添加による沈殿物重量

試料に用いた14種類のサトウキビ酢を観察したところ、濁りの程度に差が見られた。この濁りについて測定した結果、着色度の比(B)/(A)は0.38~0.78の広範囲に分散し、着色度の比が小さいサトウキビ酢で濁りが甚だしく、逆に1に近づくにつれて清澄になっていく傾向があった。また沈殿物重量は1.9~12.3g/Lの範囲に分散し、エタノール添加による沈殿物が濁りの程度に大きく関与していることが示唆された(図1)。

一般に、高濃度アルコールによってタンパクや多糖類、褐変物質などの高分子物質は沈殿する。そこで、高濃度エタノールを添加して得られた沈殿物の成分組成について検討した。

沈殿物を水で再溶解させた試料について、タンパク及びポリフェノール量を分析した結果、それぞれ検出されなかった。このことから、沈殿物の主成分はタンパク及びポリフェノールではないと判断された。同様に、同じ試料を用いて全糖分析を行った結果、沈殿物の主成分が多糖類であることが分かった。

次に、精製した沈殿物をNMRで構造解析した。その結果、沈殿物はデキストランのスペクトルと一致し、-1,6-グルコシド結合を主体とする多糖類であることが明らかになった(図2(1),(2))。

乳酸菌の一種である *Leuconostoc* 属は、シュークロースからデキストランをつくることで一般的に知られている<sup>7)</sup>。今回、サトウキビ酢から検出したデキストランも乳酸菌によって生成した可能性が考えられたことから、サトウキビ搾汁液から乳酸菌を単離・同定し、その特性について検討した。

クロラムフェニコール添加MRS寒天培地で嫌気培養を繰り返して行うことで乳酸菌2種を単離した。また、この2種について16SrDNA部分配列解析による検索を行った結果、*Lactobacillus plantarum*及び*Lactobacillus nagelii*と同定した。

さらに、これら乳酸菌のデキストラン生成能について調べた。それぞれの乳酸菌を培養した培養液に高濃度エタノールを添加して沈殿物を生成させ、それをエタノールで洗浄した。*Lactobacillus nagelii*の培養液からは十分量の精製物を得ることが出来たが、*Lactobacillus plantarum*の培養液の場合、精製過程で高濃度エタノールに溶解し消失してしまった。今回、得られた*Lactobacillus nagelii*培養液の沈殿物についてだけ構造解析を行った。その結果、沈殿物は-1,6-グルコシド結合を主体とする糖質であって、これはデキストランのスペクトルと一致することを確認した(図2(3))。

デキストランは図3に示したように、デキストラン合成酵素によりシュークロースから合成され、その一方でフラ

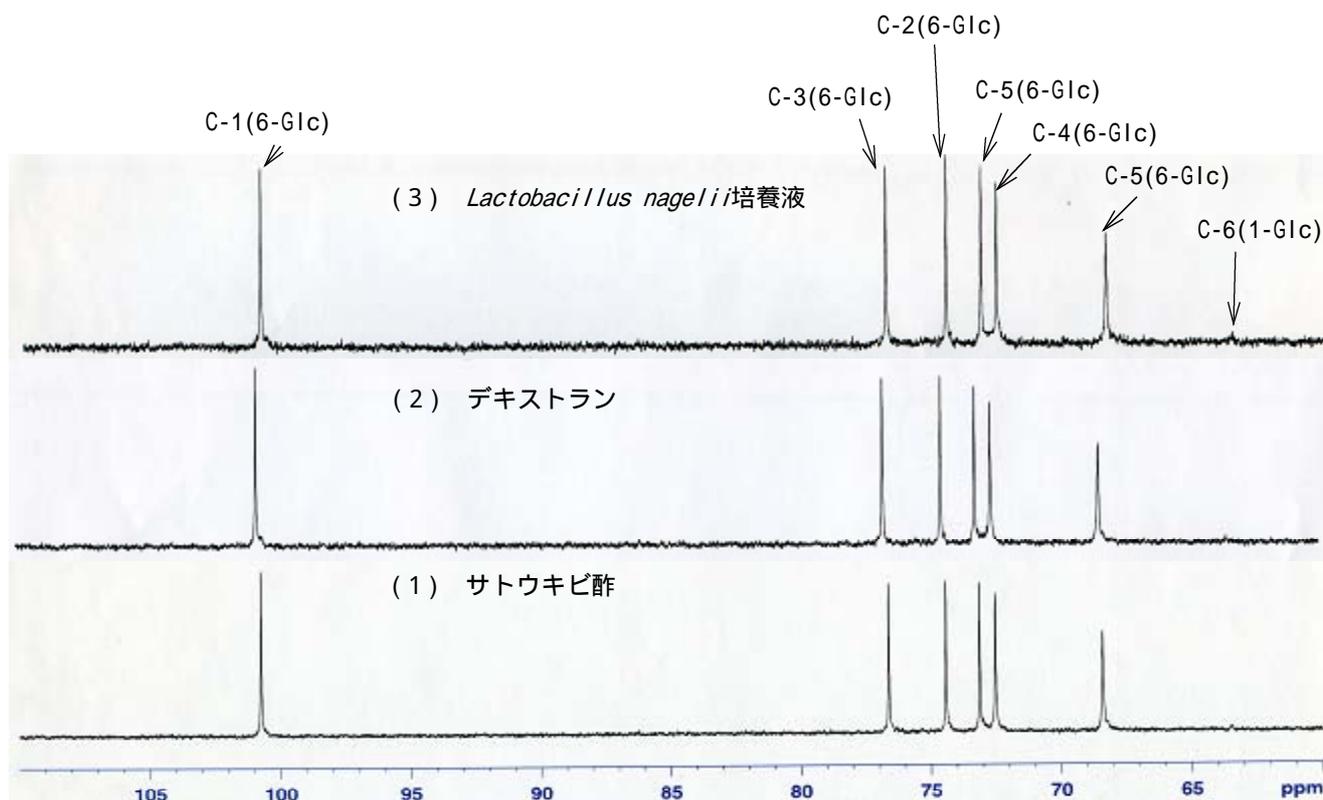


図2  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル

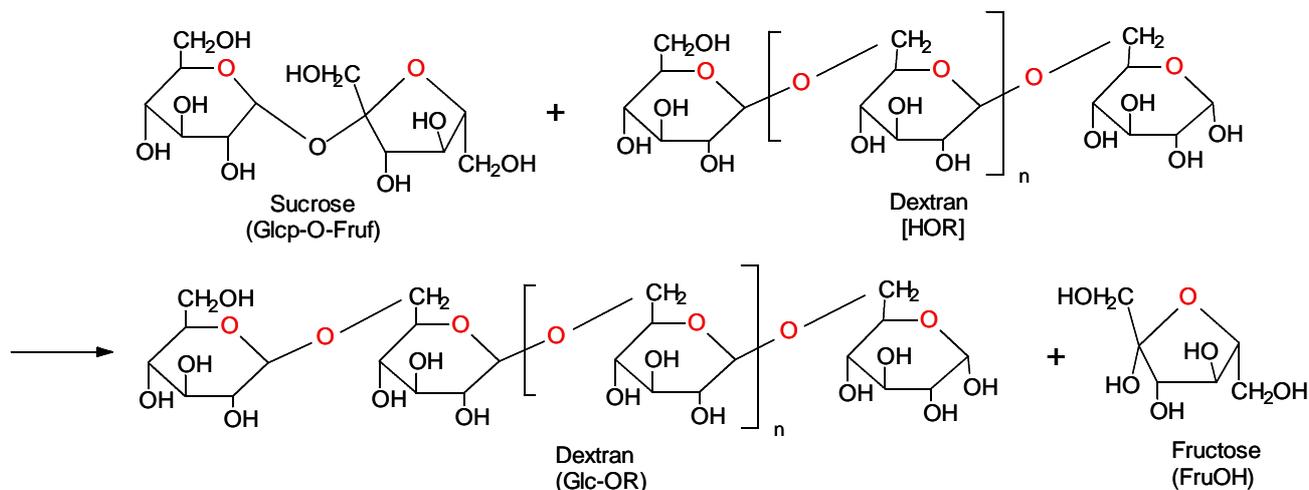


図3 デキストランの生成

クトースを遊離することが知られている<sup>7)</sup>。そこで、*Lactobacillus nagelii*を培養した液の糖組成を高速液体クロマトグラフで分析したところ、シュクロースが減少しフラクトースが増加していた。このことから、*Lactobacillus nagelii*においてもデキストラン合成酵素によりデキストランを合成していると推測された。

### 3.2 濁りの抑制について

デキストランを生成する乳酸菌の種は幾つかあるが、今回*Lactobacillus nagelii*がデキストランを生成することが示された。そこで、*Lactobacillus nagelii*の制御技術に関して検討した。

鵜木らは、サトウキビ搾汁液を加熱することで微生物汚染を制御できることを示している<sup>2)</sup>。その結果を踏まえ、まず加熱による*Lactobacillus nagelii*の制御について検討した。煮沸した温浴に7 mLの*Lactobacillus nagelii*培養液を入れた試験管を各々の設定時間浸して生菌数を調べた(表2)。その結果、煮沸状態の温浴に浸すことによる殺菌効果は高く、2分間浸すことで生菌数は激減し、また5分間浸漬することで完全に死滅した。*Lactobacillus nagelii*は煮沸されたサトウキビ搾汁液から単離したものであったが、煮沸による殺菌効果の高さから考えて、煮沸後の冷却期に汚染を受けたと推測された。

表2 煮沸による殺菌効果

常温	煮沸			
	2分	5分	10分	15分
生菌数 (cfu/mL)	15 × 10 <sup>7</sup>	300	0	0

乳酸菌の多くが通性嫌気あるいは絶対嫌気の状態を好むことから *Lactobacillus nagelii* の好気下での制御について検討した(図4)。液体培地に *Lactobacillus nagelii* の前培養液を加え、アネロパックを使った嫌気雰囲気、空気を吹き込んだ強制曝気、そして培養器の口をアルミ箔で覆っただけの好気雰囲気の3つの条件下で培養した。その結果、*Lactobacillus nagelii* はいずれの条件においても急激に増殖したことから、好気条件で制御されないことが分かった。

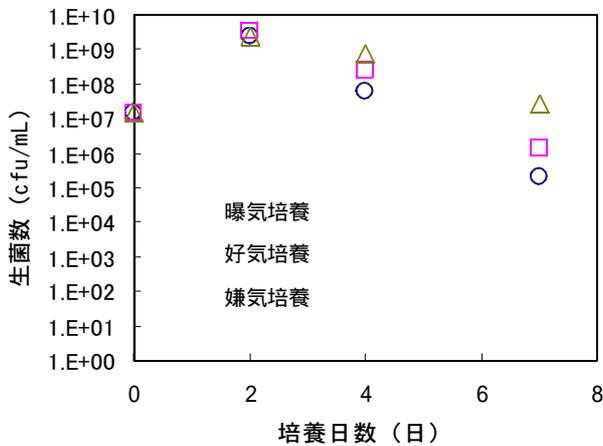


図4 *Lactobacillus nagelii* の培養

4. 結 言

サトウキビ酢の濁りを抑える技術について検討したところ、次のことが明らかとなった。

- (1)濁りの主成分は、デキストランと同じ -1,6-グルコシド結合を主体とする多糖類であった。また、多糖類の量が多くなるにつれて、濁りも甚だしくなる傾向があった。
- (2)サトウキビ搾汁液から単離した乳酸菌の中でデキストランを生成したのは、*Lactobacillus nagelii* であった。この *Lactobacillus nagelii* は、5分以上の煮沸処理を施すことで死滅させることが出来た。

謝 辞

サトウキビ搾汁液及びサトウキビ酢は(株)宗岡組及び重原義和氏から提供を受けた。乳酸菌の同定は、鹿児島純心女子大学瀬戸口賀子教授及び竹下温子助教の協力を得た。また、(独)食品総合研究所舟根和美ユニット長からは多糖類の精製や構造解析について指導していただいた。ここに感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1)吉元誠：食品工業，53，103-105(2010)
- 2)鶴木隆文，瀬戸口眞治，亀澤浩幸，下野かおり：鹿児島県工業技術センター研究報告，18，7-13(2004)
- 3)松永一彦，瀬戸口眞治，下野かおり，亀澤浩幸，西元研了，鶴木隆文：鹿児島県工業技術センター研究報告，21，11-14(2008)
- 4)“新・食品分析法( )”，光琳，68-73(2006)
- 5)“新・食品分析法”，光琳，531(1996)
- 6)K.Funane, T.Ono, T.Ishii, S.Gibu, T.Tokashiki, M. Kobayashi:Characterization of Glucans and Glucansucrases from Novel Leuconostoc Strains (Including sp.S-51). J.Appl.Glycosci.,50,379-380(2003)
- 7)舟根和美：FFIジャーナル，213,1004(2008)