

乳酸菌のマロラクティック発酵によるマルメロの 低酸味飲料の開発

大坪 雅史, 宮崎 俊一, 青木 央, 梅原 泰男, 澤谷 拓治

Development of Low Acid Drink of Quince (*Cydonia oblonga* MILL.) by Malolactic Fermentation of Lactic Acid Bacteria.

Masashi Otsubo, Shunichi Miyazaki, Hiroshi Aoki,
Yasuo Umehara and Takuji Sawaya

要 旨

前報¹⁾で報告した乳酸菌 No. 3 株 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) を用いてマルメロ (スミルナ) の発酵を検討した。マルメロにはポリフェノールが含まれているので²⁾, 風味改善と発酵の進行のために, ゼラチン SSC 処理でポリフェノールを低減化し (2180ppm→580ppm), No. 3 株の乳酸発酵を進行させずに, マロラクティック酵素によるマロラクティック発酵を行った。発酵後, 糖含量には変化がなく, リンゴ酸が消失 (1%→ND) し, pH の上昇 (3.4→3.7) や L-乳酸の蓄積 (ND→0.6%) が認められた。このことから, No. 3 株の代謝系路を調節して果汁の発酵を行うことが可能と推定された。

1. 緒 言

近年, 乳酸菌のマロラクティック発酵 (MLF) を応用した発酵果汁飲料が開発され, グレープ³⁾, リンゴ³⁾⁻⁵⁾, アンズ⁶⁾等の発酵について報告されている。MLF は, 減酸効果を有していることから, 果汁は発酵前と比較して酸味が柔らかいものとなる³⁾⁻⁶⁾。一般に乳酸菌による果汁の発酵を行うと, 糖やクエン酸からジアセチルが生成される^{3), 7)}。ジアセチルは乳製品では良いフレーバであるが, 果汁においては好ましいとはいえない^{3), 6)}。そこでジアセチルの生成を抑制するために, 果汁の pH を調整して発酵を行う方法が開発されている^{3), 6)}。一方ポリフェノールを多く含む果汁においては, 乳酸菌による発酵が行われない^{3), 8)}。このため, 植物繊維, イオン交換樹脂などの処理剤を用いたポリフェノールの低減化方法が報告されている^{3), 6)}。

大野町 (北海道亀田郡) で栽培されているマルメロは, ナシ科の果実である。果汁の特徴として, マ

ルメロ特有の芳香を有していること, 適度の糖分を含んでいること, pH は低く有機酸としてリンゴ酸のみを有していること, そしてポリフェノール含量は比較的高いことがあげられる²⁾。我々はこれまで, 農産資源の高度有効利用の立場から, マルメロからのジャムやワインなどの加工について研究を行ってきた^{2), 9)}。さらに, 乳酸菌の MLF による農産資源からの発酵食品の開発を目的に MLF 高活性乳酸菌 No. 3 株 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) を分離し, MLF の主要な反応である L-リンゴ酸から L-乳酸への直接変換を行うマロラクティック酵素 (MLE) の生合成メカニズムについて遺伝解析を行ってきた¹⁾。本研究は, マルメロの高度加工を目指し, 乳酸菌による発酵の進行と風味改善のためにポリフェノールの除去, および MLF 高活性乳酸菌である No. 3 株を用いて MLF について検討し, マルメロからジアセチルなどの異臭のない低酸味飲料の開発を行った。

2. 実験方法

2.1 材料

マルメロは大野町で収穫されたスミルナ果実を用いジューサーで搾汁してマルメロ果汁とした。

乳酸菌は当センターで分離したMLF高活性乳酸菌No.3株¹⁾ (*Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*)を用いた。培養は、清澄リンゴ果汁を培地として、30℃、16時間静置培養して行った。

2.2 マルメロ果汁のポリフェノール除去

マルメロ果汁にゼラチン(和光)またはスタンダードスーパーセル(SSC)(和光)を1%添加,あるいは両者を各々1%ずつ添加し,室温で30分攪拌後,濾紙(アドバンテックNo.5C)を用いて濾過した。

2.3 分析方法

(1) 全ポリフェノール量:フォーリンデニス法¹⁰⁾で測定し, D-カテキンとして表した。

(2) 有機酸組成:カルボン酸アナライザー(東京理化S-14)で測定した。

(3) 糖組成:高速液体クロマトグラフ(東ソーCCPD)により下記の分析条件で測定し,検出は示差屈折率検出器(島津RID-6A)で行った。

カラム:(Chromato Packing Center, ULTRON PS-80P, 8mm×30cm)

移動相:蒸留水

流速:1ml/分

(4) D-, L-乳酸量:D-乳酸脱水素酵素(D-LDH), L-乳酸脱水素酵素(L-LDH)を用いる酵素法¹¹⁾で測定した。

2.4 乳酸菌No.3株によるマルメロの発酵

90℃, 30分加熱処理したマルメロ搾汁液に培養した供試乳酸菌を接種し, 30℃, 2日間静置して発酵を行った。その後, 90℃, 30分間加熱殺菌を行って発酵を停止した。

3. 結果と考察

3.1 マルメロのポリフェノール低減化

マルメロ果汁には高濃度のポリフェノールが含まれている。一般的にポリフェノールは渋みの成分であり, 飲料の風味としては好ましくないこと, また乳酸菌の生育に対し阻害効果を持つことが知

られていることから, ポリフェノールの低減化を試みた。表1に示した結果より, 未処理の果汁のポリフェノール含量は2180ppmであるが, SSC処理で2000ppm, ゼラチン処理で760ppmに減少し, さらに, ゼラチンSSC処理で580ppmとなった。

表1 マルメロ果汁のポリフェノール除去結果

処 理 区	ポリフェノール	
	含有量 (ppm)	低減化率 (%)
未 処 理	2180	-
S S C	2000	8.3
ゼラチン	760	65.1
ゼラチンSSC	580	73.4

これらの処理によるポリフェノールの低減化率はそれぞれ8.3%, 65.1%, 73.4%であり, ゼラチンSSC処理のポリフェノール除去効果が最も高かった。そして, この処理区はマルメロ果汁の持つ渋みも感じられなくなった。一方, 果汁中のリンゴ酸含量, pH, 糖度(BX)は, いずれのポリフェノール除去処理によっても影響を受けなかった。従って, ゼラチンSSC処理により, 他成分含量を変化させることなく, ポリフェノールのみを特異的に低減化させることが可能となった。

3.2 マルメロ果汁のマロラクティック発酵

*L. mesenteroides*による乳酸の生成経路を図1に示した。

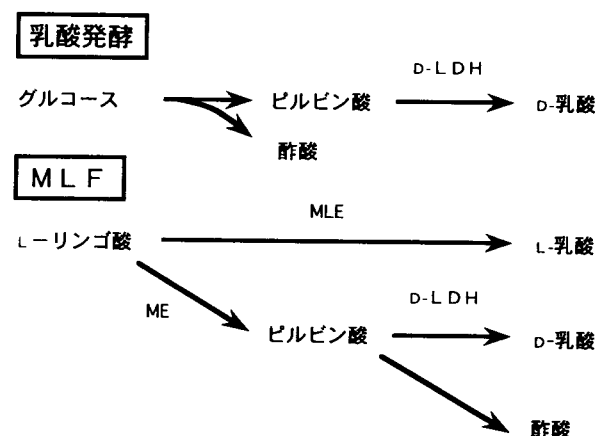


図1 *L. mesenteroides*による乳酸の生成

D-LDH: D-乳酸脱水素酵素,

MLE: マロラクティック酵素, ME: リンゴ酸酵素

*L. mesenteroides*は解糖系を通じて糖から乳酸への変換反応である乳酸発酵を行い, 活動エネルギー

ギーであるATPを獲得している。そして、この乳酸菌はヘテロ型であるため、乳酸以外に酢酸やCO₂等を生成する。また、L-LDHを持たずD-LDHのみを有するため生成する乳酸の旋光性はD(-)型である¹²⁾。この発酵はpHが中性付近では進むが、4.3以下では行われない¹⁾。一方、MLFについては、MLEによるL-リンゴ酸からL-乳酸への直接変換反応とL-リンゴ酸からピルビン酸を経由してD-乳酸または酢酸へ至る反応があり、前者の至適pHは3~4、そして後者の至適pHは5~6である¹³⁾。従来よりリンゴ酸は乳酸菌の生育向上効果を持つことが知られているが、これは、MLFの反応を通してATPが生成されるためであると報告されている¹⁴⁾。次に、乳酸菌によるジアセチルの生成経路を図2に示した。

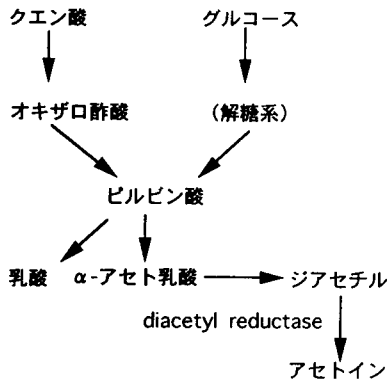


図2 乳酸菌によるジアセチルの生成

ジアセチルは糖またはクエン酸から変換されたピルビン酸を経由して生成される^{3),7)}。特にクエン酸を含む低いpHの果汁の場合、citrate permeaseの活性が高まり、クエン酸の菌体内への取り込みが積極的に行われる。そして菌体に取り込まれたクエン酸はピルビン酸へ変換され、菌体内のピルビン酸濃度が高まる。また、pHが低いためにピルビン酸から乳酸への変換反応が進まず、そしてdiacetyl reductaseの活性も低下し、ジアセチルが多く生産される³⁾。ジアセチルの生成は、果汁のpHを高くすることによって減少するので、pHを高く調整した果汁を用いた発酵を行うことによってジアセチルの蓄積が抑えられることが報告されている^{3),6)}。

L. mesenteroides による各種の発酵果汁飲料を開発する場合、風味を良くするためには酢酸やジア

セチルの生成を抑制することが重要であると考ええる。このためには、上記で述べた乳酸菌による発酵のうち、乳酸発酵、クエン酸からのジアセチルの生成、及びピルビン酸を経由するMLFの反応を抑制し、MLEによるMLFのみを進行させなければならない。MLEによるMLFの至適pHは3~4であり、乳酸発酵及びピルビン酸経由のMLFの至適pHとは異なっている。本研究で用いたマルメロ果汁のpHは3.3であることからpHの調整を行う必要がない。一方、このpHではクエン酸からのジアセチルの生成が予想されるが、マルメロ果汁には、クエン酸が含まれていないので問題とはならない。さらに、乳酸発酵が抑制された条件では糖は消費されず、マルメロ果汁に含まれる適度の糖分(糖度10.8)が保持されることになる。従って、*L. mesenteroides*によるマルメロ果汁の発酵は、pHの調整を行わなくても、MLEによるMLFのみが進行し、風味の点で問題となる酢酸やジアセチルの生成が抑制され、かつ糖分も消費されず、目的とする低酸味飲料の開発が可能であると考えた。そこでゼラチンSSC処理マルメロ果汁を用い、No.3株による発酵を行った。発酵のモニタリングは、発酵液のD-, L-乳酸を経時的に定量して行った。結果を図3に示した。

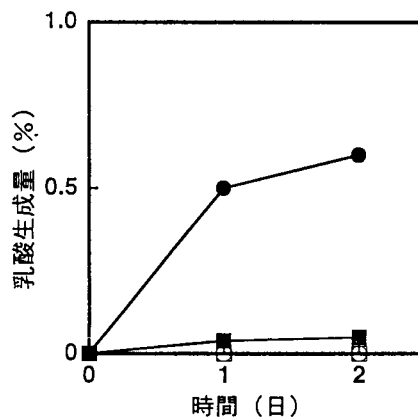


図3 No.3株によるマルメロ果汁の発酵
未処理果汁 : □D-乳酸, ○L-乳酸
ゼラチンSSC処理果汁 : ■D-乳酸, ●L-乳酸

No.3株による発酵は、ポリフェノール除去未処理のマルメロ果汁では予想通り全く進行しなかったが、ゼラチンSSC処理マルメロ果汁ではL-乳酸が生成し、そして少量のD-乳酸が検出された。このことから、ポリフェノールを低減化させることに

より、No.3株の生育が可能となり、発酵が進行したと考えた。また、大部分がL-乳酸であったことから、ピルビン酸を経由する乳酸の生成、すなわち乳酸発酵並びにピルビン酸経由のMLFがほとんど進行せず、MLEによるMLFのみが進行したと考えられた。マルメロ果汁のNo.3株によるMLF後の果汁成分の分析結果を、発酵前果汁のと併せて表2に示した。

表2 No.3株によるマルメロのMLF果汁成分

	発酵前	発酵後
pH	3.4	3.7
リンゴ酸 (%)	1.0	N D
D-乳酸 (%)	N D	0.04
L-乳酸 (%)	N D	0.6
酢酸 (%)	N D	N D
ブドウ糖 (%)	1.6	1.5
フラクトース (%)	4.2	4.2
シュクロース (%)	0.3	0.3
ソルビトール (%)	1.1	1.0
糖度 (BX)	10.8	10.2

pHは3.4から3.7に上昇し、減酸効果が認められた。また果汁に1%含まれていたL-リンゴ酸が消失し、L-乳酸が0.6%そしてD-乳酸が0.04%生成した。この時のL-リンゴ酸からL-乳酸、D-乳酸、総乳酸への変換効率(モル比換算)は、それぞれ89.3%、5.3%、94.6%であり、L-リンゴ酸から乳酸への変換は効率よく行われた。一方酢酸は検出されず、さらに糖の含量は発酵前とほとんど変化しなかった。以上の結果は、当初我々が考えたように、No.3株の代謝経路を調節した発酵が進行し

たこと、すなわち、MLEによるMLFのみが進行したことを示すものである。この乳酸菌のMLFによって開発したマルメロの飲料の風味の特徴は、マルメロ特有の芳香を有し、ポリフェノールによる苦みや、ジアセチル、酢酸などの異臭も感じられなかった。またやわらいだ酸味を持ち、甘みがより強調された飲料であった。

参考文献

- 1) 大坪雅史, 宮崎俊一ほか;北海道立工業技術センター研究報告, No.2(1992), P23~26.
- 2) 宮崎俊一, 長谷川栄治ほか;北海道立工業技術センター研究報告, No.1(1990), P15~18.
- 3) 丹羽源廣, 松岡道子ほか;果汁協会報, No.325 (1985), P22~29.
- 4) 高波修一, 小栗勇ほか;缶詰時報, Vol. 66, No.2(1987), P157~160.
- 5) 大澤純也, 山本忠;岩手県醸造食品試験場報告, No.24(1990), P21~25.
- 6) 高波修一, 栗林剛ほか;缶詰時報, Vol. 67, No.2(1988), P194~198.
- 7) 稲神馨;発酵と工業, Vol. 37, No.2(1979), P122~132.
- 8) 西山隆造;農化, Vol. 52, No.12(1978), P599~605.
- 9) 宮崎俊一, 馬渡幸則ほか;北海道立工業技術センター研究報告, No.2(1992), P11~14.
- 10) 中村敏郎ほか;食品の変色とその化学(光琳), (1967), P84.
- 11) F. Noll; Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed, Vol. 6(Verlag chemie, Weinheim, Deerfield Beach/florida, Basel), (1984), P582~588.
- 12) E. I. Garvie; Methods in Microbiology, Vol. 16(Academic Press), (1984), P147~178
- 13) 原昌道, 水野昭博;発酵工学, Vol. 59, No.1 (1981), P17~22.
- 14) D. J. Cox, T. Henick-Kling; J. Bacteriol., Vol. 171, No.10(1989), P5750~5752.