

日本食品保蔵科学会誌

VOL. 39 NO. 6

会 長	高井 陸雄	副 会 長	太田 英明	小宮山美弘	早坂 薫
編集委員長	太田 英明				
編 集 委 員	石田 裕	稲熊 隆博	井上 茂孝	今堀 義洋	竹永 章生
	津久井亜紀夫	東尾 久雄	古庄 律	松田 茂樹	

<報 文>

積算温度を指標としたコマツナの

遠赤外線乾燥における品質変化の評価 (311)

／岡本慎太郎・折笠貴寛・畑中咲子・菰田俊一
齊藤順一郎・富樫千之・村松良樹
小出章二・椎名武夫・田川彰男

ホスホトランスフェラーゼシステムを欠損した

*Lactobacillus plantarum*の代謝解析 (319)

／佐藤英一・梶川揚申・岡田早苗・辻 聡

<報 文> (英文)

β-ラクトグロブリンとグリアジンの分子間相互作用が製パン性に与える影響 (325)

／岡 大貴・菊池千尋・塩野弘二
野口智弘・高野克己

<研究ノート>

ニンジン個体あるいは組織が異なる切片の

微生物密度に対する電解水処理の効果 (331)

／阿部一博・阿知波信夫

シークワシャー (*Citrus depressa* Hayata) 搾汁残渣を原料とした

有用成分の酢抽出：ノビレチン、シネフリンに着目して (337)

／宮城一葉・新垣江梨子・照屋 亮
和田浩二・太田英明・広瀬直人

国産赤ワインにおけるフェノール系オフフレーバーの発生頻度 (343)

／恩田 匠・小松正和

<講 座>

身近な野菜・果物～その起源から生産・消費まで (22) ニンニク (347)

／山崎博子

<文献抄録> (355)

<本会記事> (356)

<会 告> (357)

Food Preservation Science

CONTENTS OF VOL. 39 NO. 6 (2013)

<Article> (Japanese)

- Evaluation of Quality Change in the Far-infrared Drying of Komatsuna Leaves
Using Cumulative Temperature as an Indicator
OKAMOTO Shintaro, ORIKASA Takahiro, HATANAKA Sakiko, KOMODA Toshikazu,
SAITO Junichiro, TOGASHI Chiyuki, MURAMATSU Yoshiki,
KOIDE Shoji, SHIINA Takeo and TAGAWA Akio (311)

- Metabolic Analysis of a Phosphotransferase System-deficient Strain
of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826
SATO Eichi, KAJIKAWA Akinobu, OKADA Sanae and TSUJI Akira (319)

<Article> (English)

- Effect of the Molecular Interactions between
 β -lactoglobulin and Gliadin on the Baking Quality
OKA Daiki, KIKUCHI Chihiro, SHIONO Kouji,
NOGUCHI Tomohiro and TAKANO Katsumi (325)

<Research Note> (Japanese)

- Effects of Electrolyzed Acidic Water on the Microorganisms
on Sections and Different Tissue of Carrot
ABE Kazuhiro and ACHIWA Nobuo (331)

- Extraction of Nobiletin and Synephrine from the Waste Peels
of Shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata) by Using Vinegar
MIYAGI Kazuna, ARAKAKI Eriko, TERUYA Ryo,
WADA Koji, OHTA Hideaki and HIROSE Naoto (337)

- Frequency of Phenolic Off-flavors in Red Wines Produced in Japan
ONDA Takumi and KOMATSU Masakazu (343)

<Serialization Lecture> (Japanese)

- Garlic
YAMAZAKI Hiroko (347)

積算温度を指標としたコマツナの 遠赤外線乾燥における品質変化の評価

岡本慎太郎^{*1}・折笠 貴 寛^{*2§}・畑 中 咲 子^{*3}・菰 田 俊 一^{*3}
齊藤順一郎^{*4}・富 樫 千 之^{*1}・村 松 良 樹^{*5}
小 出 章 二^{*2}・椎 名 武 夫^{*6}・田 川 彰 男^{*7}

* 1 宮城大学大学院食産業学研究科

* 2 岩手大学農学部

* 3 宮城大学食産業学部

* 4 東洋興産 (株)

* 5 東京農業大学生物産業学部

* 6 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所

* 7 千葉大学大学院園芸学研究科

Evaluation of Quality Change in the Far-infrared Drying of Komatsuna Leaves Using Cumulative Temperature as an Indicator

OKAMOTO Shintaro^{*1}, ORIKASA Takahiro^{*2§}, HATANAKA Sakiko^{*3}, KOMODA Toshikazu^{*3},
SAITO Junichiro^{*4}, TOGASHI Chiyuki^{*1}, MURAMATSU Yoshiki^{*5},
KOIDE Shoji^{*2}, SHIINA Takeo^{*6} and TAGAWA Akio^{*7}

* 1 Graduate School of Food, Agriculture and Environmental Science, Miyagi University,
2-2-1 Hatatate, Taihaku, Sendai, Miyagi 982-0215

* 2 Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate 020-8550

* 3 School of Food, Agriculture and Environmental Science, Miyagi University,
2-2-1 Hatatate, Taihaku, Sendai, Miyagi 982-0215

* 4 Toyo Kosan, Co., Ltd., 6-7-10 Nishikigaoka, Aoba, Sendai, Miyagi 989-3123

* 5 Faculty of Bio-industry, Tokyo University of Agriculture, 196 Yasaka, Abashiri, Hokkaido 099-2493

* 6 National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

* 7 Graduate School of Horticulture, Chiba University, 648 Matsudo, Matsudo, Chiba 271-8510

In this study, we determined the quality changes (surface color, and L-ascorbic acid, carotenoid, and chlorophyll contents) and drying rate during far-infrared drying and hot-air drying of Komatsuna leaves. Three different drying temperatures ranging from 44°C to 55°C were employed in both methods. Cumulative temperature was used as an indicator of quality change. The measured moisture content changes under each set of drying conditions agreed with those calculated using an exponential model. An Arrhenius-type equation was used to establish the relationship between the drying rate constant k and the average surface temperature during drying. Under the ideal drying conditions, the cumulative temperature at the sample surface served as a useful index of the decrease in the L-ascorbic acid content. In addition, the surface color of the Komatsuna leaves changed to a lesser extent as the cumulative surface temperature decreased. Etiolation of the sample during drying was

* 1 〒982-0215 宮城県仙台市太白区旗立 2-2-1

* 2 〒020-8550 岩手県盛岡市上田 3-18-8

§ Corresponding author, E-mail: orikasa@iwate-u.ac.jp

* 3 〒982-0215 宮城県仙台市太白区旗立 2-2-1

* 4 〒989-3123 宮城県仙台市青葉区錦ヶ丘 6-7-10

* 5 〒099-2493 北海道網走市八坂196

* 6 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

* 7 〒271-8510 千葉県松戸市松戸648

caused by the decrease in the chlorophyll rather than the decrease in the carotenoid content.

(Received Mar. 6, 2013; Accepted Aug. 5, 2013)

Key words: *Komatsuna, far-infrared drying, cumulative temperature, drying rate, quality evaluation*
コマツナ, 遠赤外線乾燥, 積算温度, 乾燥速度, 品質評価

青果物は、収穫された後、一般的に出荷団体や小売店等の流通市場を経て、消費者の手に渡る。しかし、その流通過程で規格外品や未成熟品、余剰品が発生し、青果物の国内総生産量の約18%が廃棄処分されている¹⁾。これは有用資源を無駄にしているばかりでなく、環境にも悪影響を及ぼすため無視できない。これに対処するには、廃棄処分されている青果物を適正に処理・加工し、有効利用することが考えられる。そして、青果物廃棄量の削減、すなわち環境負荷の低減効果も期待される。一方、2011年3月11日に発生した東日本大震災により、多くの住民が避難所生活を余儀なくされた。その避難所生活の長期化に伴い避難住民の栄養不足が深刻化したという報告²⁾がある。そのような状況において、規格外品や廃棄処分品が乾燥食品や栄養補助剤などの原料として商品化・備蓄化できれば、これら諸問題解決策の一助になることが期待される。主要な葉菜類の一つであるコマツナは、アスコルビン酸やビタミンA等の栄養成分を豊富に含んでいる³⁾。また、施設栽培技術が普及したため、年間を通して容易に入手できる。しかし、平成22年度の統計表⁴⁾によると、出荷量は生産量と比べて約15%少なく、出荷されないコマツナの多くは収穫後に廃棄処分となっていると推察される。さらに、コマツナをはじめとする葉菜類は貯蔵できないものとして扱われているため⁵⁾、出荷された後も相当量の葉菜類が廃棄処分されていると考えられる。したがって、廃棄量を削減し、有効資源の利用率を高めるために、コマツナにおいても適切な加工技術の確立が必要である。加工操作のひとつである乾燥は、貯蔵安定性や輸送性の向上⁶⁾、栄養成分の濃縮等の高付加価値化および調理工程の簡便化⁷⁾等を図るために実施される。乾燥の対象となる青果物は多岐にわたり、原料の特性や乾燥の目的に応じて、様々な乾燥方法が用いられているが、熱風乾燥は、操作が簡便であり、かつ汎用性も高いことから、青果物の乾燥処理には広く用いられている。一方、遠赤外線は、周囲の空気に吸収されず被加熱物表面に到達し加熱効果を表す⁸⁾ことが特徴であり、HEBBARら⁹⁾は遠赤外線乾燥および遠赤外線を併用した通風乾燥は熱風乾燥と比べて乾燥のエネルギー効率は良好であると報告している。遠赤外線乾燥は米麦など穀物の乾燥¹⁰⁾への適用事例が報告されており、その技術は実用段階にあるが、遠赤外線乾燥の青果物への適用例は数例^{11)~13)}に留まっている。最適な乾燥方法・条件の選定や高品質な乾燥食品を得るためには、乾燥に伴う品質変化に関する知見は不可欠である。岡本ら¹⁴⁾は、コマツナの遠赤外線乾燥実験を行い、コマツナの乾燥過程に

おける成分変化や電力効率について詳細に調べている。しかしながら、乾燥空気温度などの乾燥条件の範囲は限定的であり、遠赤外線乾燥過程における品質変化の温度依存性の把握までは至っていない。さらに、遠赤外線乾燥と熱風乾燥で乾燥速度が同じ場合、遠赤外線乾燥における葉面温度が約3℃低いために、遠赤外線乾燥後のコマツナのL-アスコルビン酸残存率は熱風乾燥後のそれと比べて有意に大となることを報告している¹⁴⁾が、アスコルビン酸残存率をはじめとする乾燥過程における品質変化を検討する際には、葉面温度のみではなく乾燥時間にも着目する必要があると考えられる。そこで、本研究では、遠赤外線乾燥がコマツナの乾燥特性および品質に及ぼす影響を3段階の乾燥温度で検討し、遠赤外線乾燥過程における乾燥速度および各種成分変化の温度依存性について考察した。特に、L-アスコルビン酸残存率については積算温度に着目して考察し、積算温度が最適乾燥方法を選定する際に新しいかつ有用な評価法になり得る可能性が示されたので併せて報告する。

実験方法

1. 供試材料

供試材料は、コマツナ (*Brassica rapa* var. *perviridis*) で、地元の量販店において入手した。入手時期は2012年5月から2012年11月とした。なお、産地は宮城県産のものとし、品種は限定しなかった。試料は、保存中の成分変化を限りなく少なくするために武田ら¹⁵⁾の報告を参考にし、入手後直ちにポリエチレン袋に非密封の状態に入れ、約5℃の冷蔵庫内で床面に対して垂直になるように保存し、7日以内に実験に供した。供試する際には、株元から10mmのところを切断し、葉身および葉柄部を使用した(以下、試料)。105℃-24h烘乾法にて試料の初期含水率を測定したところ、 16.40 ± 1.2 (n=18) (d.b. decimal) (0.94 ± 0.002 (w.b. decimal))であった。以後、含水率はすべて乾量基準含水率 (d.b. decimal) で表すこととした。

2. 乾燥方法

遠赤外線乾燥と熱風乾燥2通りの方法で試料を乾燥させた。試料の初期投入量は約45gとした。なお、目標含水率を0.2 (d.b. decimal) と設定し、目標含水率以下になるまで乾燥させた。

(1) 遠赤外線乾燥 遠赤外線乾燥機 (A10-S, 東洋興産 (株)) を用いて遠赤外線乾燥特性を測定した。この乾燥機の乾燥室は縦1,140×横560×奥行830mmであり、450×1,100mmの遠赤外線放射パネル (電気式遠赤外

線面状ヒータ, 東洋興産(株))が手前・奥に, 700×1,100 mmの遠赤外線放射パネルが左・右にそれぞれ装着しており, それらが熱源となる。なお, 本研究で用いた遠赤外線放射パネルの遠赤外線放射特性(放射率および分光放射輝度)をFig.1に示す。機内の圧力は, ひずみゲージ式圧力センサ(PG-2, (株)共和電業)を用いて測定し, アンプ(WGA-710-5, (株)共和電業)でひずみを電圧に変換させ, データロガ(GL220, グラフテック(株))に記録した。なお, 機内圧力は94.7-96.6kPa(大気圧は98.0-99.9kPa), 機内の風速は0.2~0.5m/sであった。試料の初期投入量は約45 gで, 遠赤外線乾燥機における専用のトレイ(W460×L700mm)に試料をそれぞれ均等間隔にかつ, それぞれの試料が重ならないよう, 乾燥室内の中間の高さに静置した。葉面温度の測定には, 蛍光式光ファイバー温度計(FL-2000, 安立計器(株))および光ファイバーセンサ(FS100-3M, 安立計器(株))を用いた。センサの測定部を葉面に厚さ0.058mm, アセテートフィルム製のメンディングテープ(CM-12, スコッチ)で固定し, 葉面温度を1秒間隔で測定した。乾燥機の設定温度は35, 40および45℃の3段階と設定した。なお, 遠赤外線放射パネルの温度は設定した入力電圧によって変動する。本研究で設定した入力電圧(100 V)では, 3つの設定温度すべてにおいて, 遠赤外線放

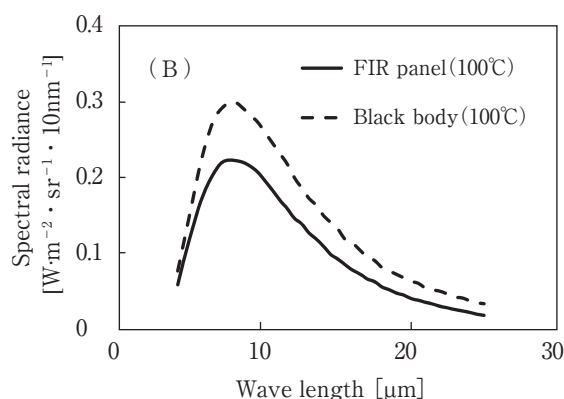
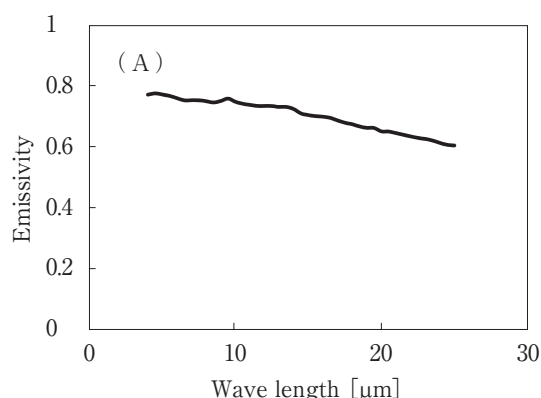


Fig.1 Far-infrared radiation characteristic of the panel

(A) is the emissivity of the panel; (B) is the spectral radiance of the panel

射パネルの温度は設定温度と比べて約15℃高い値で推移した。Fig.2に遠赤外線乾燥における葉面温度の推移を示す。Fig.2から葉面温度の乾燥開始から乾燥終了までの平均温度(以下, 葉面温度)は, 35, 40および45℃でそれぞれ49.3, 53.6および54.5℃であった。

(2) 熱風乾燥 熱風乾燥には定温送風乾燥機(DK 600, ヤマト科学(株))を用いた。本研究では, 同じ乾燥速度において2種類の方法(遠赤外線乾燥と熱風乾燥)により乾燥させた試料の品質や理化学的特性などを比較することを目的としたため, 予備実験より, 遠赤外線乾燥と同程度の乾燥速度となるように設定温度を調整した。Fig.3に熱風乾燥における葉面温度の推移を示す。設定温度を47, 51および56℃としたところ, その際の葉面温度は44.4, 50.2および54.3℃となった。なお, 葉面の温度測定には, 素線径0.6mmのT型熱電対を用いて測定し, データロガ(GL220, グラフテック(株))に1秒間隔で記録した。風速は0.2~0.5m/sとした。

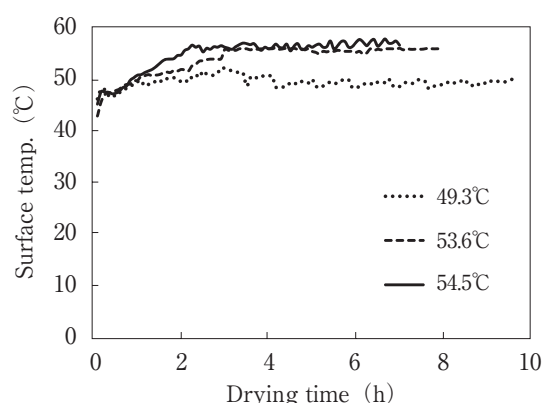


Fig. 2 Changes in surface temperature during far-infrared drying at three temperature ranges

Temperatures of explanatory note mean average temperature of the sample surface during far-infrared drying.

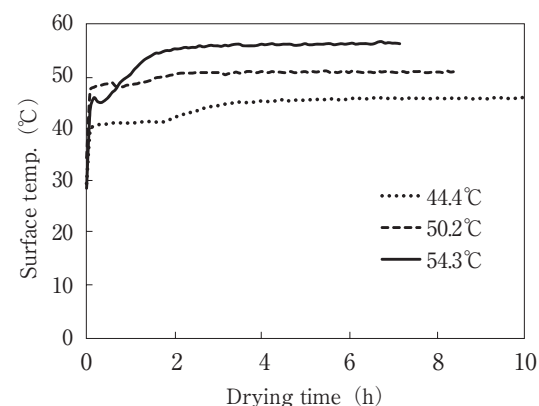


Fig. 3 Changes in surface temperature during hot air drying at three temperature ranges

Temperatures of explanatory note mean average temperature of the sample surface during far-infrared drying.

3. 測定項目

(1) 乾燥過程における質量(含水率)変化 各乾燥過程における試料質量変化は、60分間隔で電子天秤(GF-300, (株) エー・アンド・デイ)を用いて測定した。減少した質量は全て蒸発水分量とみなし、乾量基準含水率(d.b. decimal)に換算した。

(2) 積算温度 光ファイバー温度計およびT型熱電対を用いて測定した葉面の温度変化を乾燥開始から乾燥終了まで積算した値を積算温度 T_{cum} ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}$)と定義した。すなわち、 T_{cum} は時間 t における温度 $T(t)$ を乾燥開始から乾燥終了まで積分した値に等しくなるので、以下の式(1)で表すことができる。

$$T_{cum} = \int_{t_1}^{t_2} T(t) dt \quad (1)$$

ここで、 t_1 は乾燥開始時間(h)、 t_2 は乾燥終了時間(h)である。

上式より算出した遠赤外線乾燥および熱風乾燥における積算温度は、Table 1に示した。

(3) 乾燥前後におけるL-アスコルビン酸含有量変化 L-アスコルビン酸は非常に酸化されやすく¹⁶⁾、かつ熱を加えると分解速度が大きくなる性質¹⁶⁾があり、乾燥青果物の品質劣化の指標として度々用いられている¹⁷⁾ため、本研究においてもL-アスコルビン酸含有量(mg/100 g-FW)を、藤原ら¹⁸⁾の測定法を改変した方法で測定した。すなわち、設定した含水率まで乾燥した試料を5% (w/w) メタリン酸溶液とともにホモジナイザ(RH91, (株) エスエムテ)にて摩砕(約8,000rpm, 10min, 0-4 $^{\circ}\text{C}$)し、ろ過した溶液のL-アスコルビン酸含有量(mg/100ml)を反射式光度計(RQ-flex10, メルク(株))を用いて測定した。得られた値に希釈倍率を乗じて試料100 gあたりのL-アスコルビン酸含有量(mg/100 g-FW)に換算した。乾燥処理後の乾物1 gあたりのL-アスコルビン酸含有量(mg/g-DW)を乾燥処理前のそれで除すことにより、L-アスコルビン酸残存率を算出した。

(4) 乾燥前後における色彩変化 試料の色彩は色彩色差計(CR-13, コニカミノルタセンシング(株))を用いて、 $L^*a^*b^*$ 表色系により測定した。1試料につき葉面の4点を測定し、その平均値を実験値とした。乾燥前後の L^* 値、 a^* 値および b^* 値の差(ΔL^* , Δa^* および Δb^*)から以下の式(2), (3)および(4)により色差 ΔE 、彩度 C^* および色相角 h° をそれぞれ算出¹⁹⁾した。

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (2)$$

$$C^* = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (3)$$

$$h^{\circ} = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (4)$$

また、青果物の黄化の指標として用いられている黄化度 YI ²⁰⁾を以下の式(5)により算出した。

$$YI = \frac{L^* \times a^*}{|b^*|} \quad (5)$$

(5) 乾燥前後におけるカロテノイド等含有量変化

カロテノイド(ルテイン、 β -カロテン)およびクロロフィルa, b含有量は、色彩および品質変化の指標として測定した。満田らの簡易抽出法²¹⁾を改変して試料溶液を調製し、HPLCにて分析した。カラムには4.6 $\times$ 150mmのMGIIカラム((株)資生堂)を、検出器にはUV検出器(L-2400, 日立製作所(株))をそれぞれ用いた。移動相にはアセトニトリル:水(9:1)(以下A)および酢酸エチル(以下B)を用いた。移動相はまずAのみとし、その後、直線的にBの濃度を上げて20分後にはA:B=50:50になるような条件とした。流速は1.2ml/min、測定波長は450nmとした。分析用溶液は乾燥前試料の場合には約3 gに、乾燥後試料の場合については約0.3 gにアセトンを30ml程度加え、ホモジナイザ(RH91, (株) エスエムテ)にて摩砕抽出(約8,000rpm, 10min, 0-4 $^{\circ}\text{C}$)し、これを3回繰り返した後、微量高速冷却遠心機(MX-301, (株) トミー精工)にて遠心分離(8,000rpm, 10min, 4 $^{\circ}\text{C}$)後、その上清を100mlに定容し、HPLC分析用供試液とした。ルテインは0.005~0.10mg/ml、 β -カロテンは0.012~0.24mg/100mlおよびクロロフィルa, bは0.005~0.10mg/mlの標準溶液を用いた絶対検量線法により、溶液中のルテイン、 β -カロテンおよびクロロフィルa, b濃度(mg/100ml)を測定し、含有量(mg/100 g-FW)に換算した。

乾燥処理後の乾物1 gあたりのルテイン、 β -カロテンおよびクロロフィルa, b含有量(mg/g-DW)を乾燥処理前のそれで除すことにより、ルテイン、 β -カロテンおよびクロロフィルa, b残存率に換算した。

実験結果および考察

1. 乾燥過程における含水率変化

Fig. 4に遠赤外線乾燥における含水率変化の一例を示す。Fig. 4より、いずれの乾燥温度においても含水率は時間の経過とともになめらかな曲線を描きながら減少していることがわかる。Fig. 5に遠赤外線乾燥における乾燥特性曲線を示す。Fig. 5より、乾燥開始から乾燥速度

Table 1 The relationship between surface temperature during each drying of Komatsuna leaves and cumulative temperature calculated from equation (1)

	Surface Temp. ($^{\circ}\text{C}$)		Cumulative Temp. ($^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}$)
Far-Infrared	49.3	→	4.76×10^2
	53.6	→	4.25×10^2
	54.5	→	3.82×10^2
Hot Air	44.4	→	4.68×10^2
	50.2	→	4.24×10^2
	54.3	→	3.93×10^2

Surface temperature means average temperature of the sample surface during drying.

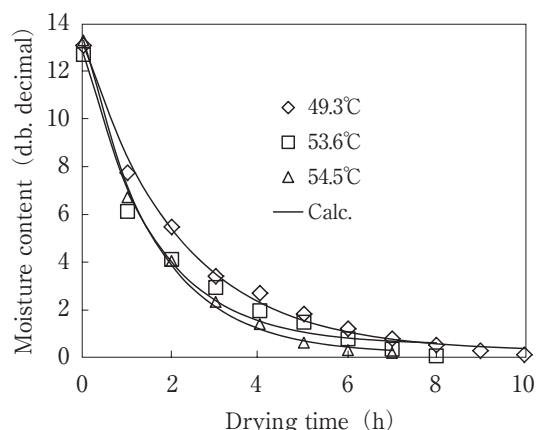


Fig. 4 Changes in moisture content of Komatsuna leaves during far-infrared drying

Temperatures of explanatory note mean average temperature of the sample surface during far-infrared drying.
Solid lines show the calculated value from exponential model.

は直線的に低下し、含水率と乾燥速度の間に直線の関係が得られた。これより試料の遠赤外線乾燥および熱風乾燥過程は、減率乾燥第一段であることがうかがえる。減率乾燥第一段の含水率変化は以下の式(6)で与えられる²²⁾。

$$\frac{M - M_e}{M_0 - M_e} = \exp(-kt) \quad (6)$$

ここで、 M は t 時間における含水率 (d.b. decimal), M_e は平衡含水率 (d.b. decimal), M_0 は初期含水率 (d.b. decimal) k は乾燥速度定数 (h^{-1}) である。

遠赤外線乾燥および熱風乾燥の含水率変化の測定データを式(6)に当てはめ、非線形最小二乗法により定数 k を算出した。Fig. 3に式(6)による含水率の計算値と測定値の比較を示す。計算値と測定値の平均平方誤差(RMSE)²³⁾は0.20~0.49 (d.b. decimal), 決定係数(R^2)は0.94~0.99であったことから、実験値に対する式(6)の適合性は高く、乾燥期間は減率乾燥第一段であることが示された。また、非線形最小二乗法により決定した k の値をTable 2に示す。いずれの乾燥法においても、葉面温度が高くなるにつれて乾燥速度定数が大きくなっていることがわかる。乾燥速度定数 k の温度依存性を調べるために、 k を以下の式(7)²⁴⁾に乾燥法ごとに最小二乗法を適用して当てはめた。

$$k = d \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) \quad (7)$$

ここで、 d は係数 (h^{-1}), E はみかけの活性化エネルギー (J/mol), R はガス定数 ($=8.314 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$), T は葉面絶対温度 (K) をそれぞれ表す。

Fig. 6に遠赤外線乾燥および熱風乾燥の乾燥速度定数 k のArrheniusプロットを示す。Fig. 6より、式(7)の適合性が良好であることが示され、遠赤外線および熱風乾燥の乾燥速度定数 k はArrhenius型の温度依存性を有し

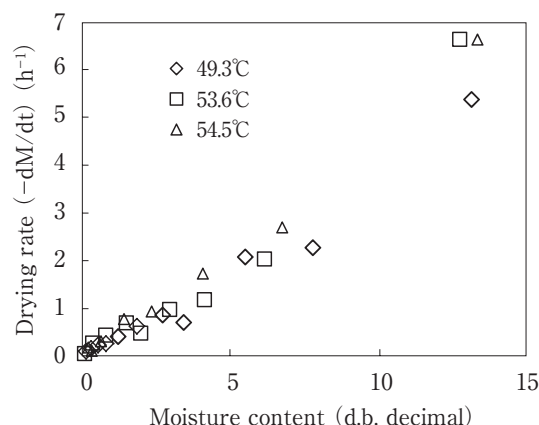


Fig. 5 Relationship between the drying rate and the moisture content of Komatsuna leaves

Temperatures of explanatory note mean average temperature of the sample surface during far-infrared drying.

Table 2 Drying rate constants k and root mean squared error (RMSE) of the exponential model by far-infrared drying and hot air drying

Surface Temp.	Far-Infrared k (h^{-1})	Surface Temp.	Hot Air k (h^{-1})
49.3	0.458	44.4	0.403
53.6	0.629	50.2	0.692
54.5	0.631	54.3	0.808

Surface temperature means average temperature during drying.

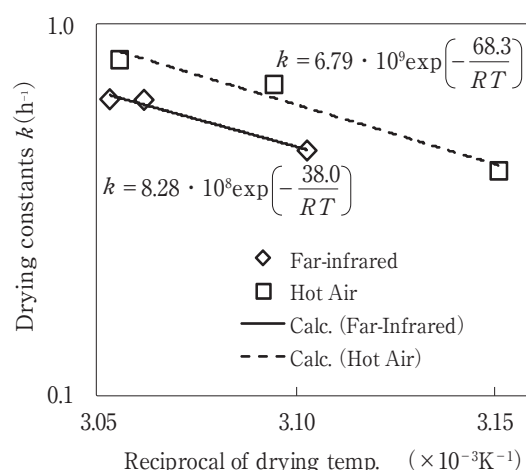


Fig. 6 Arrhenius plot of the drying contents k vs. the reciprocal of drying temperature $1/\text{K}$ for Komatsuna leaves

ていることが確認できた。一方、みかけの活性化エネルギー E の値は、遠赤外線乾燥で38.0kJ/mol, 熱風乾燥で68.3kJ/molであり、熱風乾燥における乾燥速度定数の温度依存性は遠赤外線乾燥のそれよりも強いことが示された。

2. 乾燥過程におけるL-アスコルビン酸含有量変化と葉面積算温度の関係

岡本ら¹⁴⁾は、コマツナ乾燥過程におけるL-アスコルビン酸残存率変化について、試料温度をパラメータとして反応速度論を用いて解析している。しかし、乾燥温度が異なると乾燥時間も変動するため、乾燥温度と乾燥時間双方の影響を同時に考慮する必要がある。そこで本研究では、乾燥温度と乾燥時間の双方を同時に評価できる積算温度に着目して、L-アスコルビン酸の残存率について考察することとした。Fig. 7に葉面積算温度の積算値を横軸に、L-アスコルビン酸残存率を縦軸にとった結果を示す。Fig. 7より、有意差はみられなかったものの、遠赤外線乾燥のL-アスコルビン酸残存率が、熱風乾燥のそれと比べて高い傾向となっている。また、積算温度が大きいほど、L-アスコルビン酸残存率が大きい傾向がみられる。Table 1より、本研究で設定したコマツナの乾燥においては、葉面積算温度が低く、かつ乾燥時間が長いほど積算温度が大きくなる。そのため、低温かつ長時間の乾燥条件（積算温度が大きい条件）において、コマツナ乾燥過程

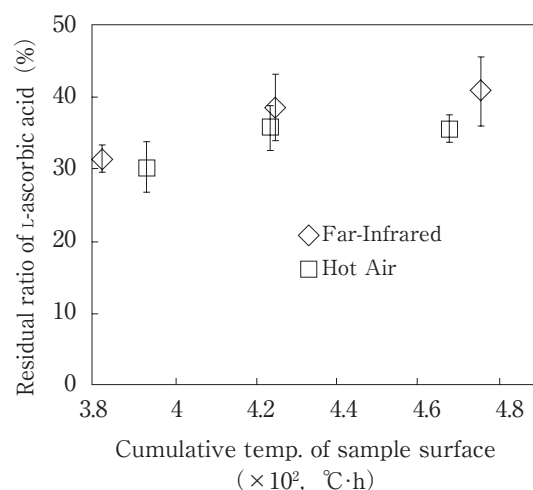


Fig. 7 Relationships between the cumulative sample surface temperature and the residual ratio of L-ascorbic acid

Each value is mean $\pm$ S.D. (n=4).

におけるL-アスコルビン酸の減少を抑制できると考えられる。また、コマツナの遠赤外線乾燥および熱風乾燥におけるL-アスコルビン酸残存率は、積算温度 $4.1 \times 10^2 ^\circ\text{C} \cdot \text{h}$ 近傍に境界点があることが伺える。すなわち、積算温度が $4.1 \times 10^2 ^\circ\text{C} \cdot \text{h}$ 以上になるような乾燥条件（例えば、葉面積算温度が 50°C における乾燥時間は8.3時間程度）を設定することにより、L-アスコルビン酸の減少を抑制できる乾燥条件決定が容易に行える可能性がある。今後、乾燥試料や乾燥法の違いによる積算温度の境界点について詳細な検討が必要であるものの、コマツナの乾燥過程において、積算温度がL-アスコルビン酸の減少の指標となる可能性が示された。

3. 乾燥前後における色彩変化とクロロフィル・カロテノイド成分の関係

乾燥前後における色差 ΔE 、彩度 C^* 、色相角 h° および黄化度 YI の値をTable 3に示す。乾燥前後における色差は、遠赤外線乾燥および熱風乾燥のいずれの乾燥条件においても6.2~8.0で、これは色差の感覚的表現では「大いに異なる」レベルとなる¹⁹⁾。それぞれ有意差は見られなかったものの、葉面積算温度が上昇する（すなわち、葉面積算温度が少くない）とともに色差の変化量が少なくなる傾向がみられた。一般に、色差が小さいほど品質がよいと判断されている¹⁹⁾ことから、葉面積算温度を小さくするように乾燥させることにより、視覚的な品質劣化を抑制できることが示唆された。また、彩度 C^* が生の試料と比べて大となったことから、色素成分の濃縮により色が濃く変化したことがうかがえる。色相角を乾燥前後で比較すると、乾燥後の色相角は乾燥前のそれと比較して小さくなった。 a^*b^* 色度図によると 180° は緑色、 90° は黄色となる¹⁹⁾。本研究における色相角は 180° から 90° の方向へ変化していることから、乾燥処理により色彩が緑色から黄色方向に向かって変化した（黄化）ことが示された。このことは、乾燥後試料の黄化度が乾燥前試料のそれと比較して大となったことから明らかである。

Fig. 8に遠赤外線乾燥および熱風乾燥後のカロテノイド成分（ルテイン、 β -カロテン）およびクロロフィル $a+b$ の残存率を示す。黄色成分であるルテインおよび β -カロテンの残存率は50~60%前後であるのに対し、緑色

Table 3 Color changes in fresh and dried Komatsuna leaves by far-infrared drying and hot air drying

		Far-Infrared				Hot air	
		Surface Temp. (°C)					
	Fresh	49.3	53.6	54.5	44.4	50.2	54.3
ΔE		8.03±0.44	6.87±0.41	6.24±0.79	8.00±0.84	7.56±0.65	6.55±0.54
C^*	17.7±0.72	21.3 ±0.58	21.7 ±0.59	20.1 ±0.81	19.4 ±0.50	21.4 ±0.45	18.7 ±0.61
h°	123.3±0.79	111.8 ±0.57	109.5 ±0.77	108.9 ±0.76	111.5 ±0.57	109.7 ±0.62	109.5 ±0.96
YI	54.3±0.92	100.8 ±3.31	119.3 ±4.52	120.4 ±5.87	99.0 ±4.37	119.4 ±4.83	104.7 ±4.22

All values are mean $\pm$ S.D. (n=20-30)

Surface temperature means average temperature during drying.

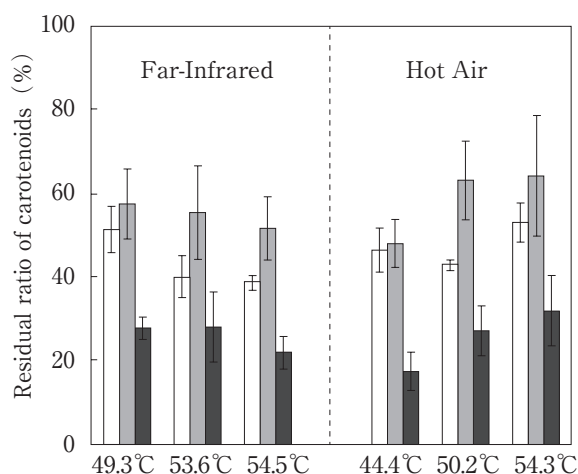


Fig. 8 The residual ratio of carotenoids and chlorophyll by far-infrared drying and hot air drying

□ : Lutein, ■ : β-carotene, ■ : Chlorophyll a+b
Each value is mean ± S.D. (n = 4)

成分であるクロロフィルa, bの残存率は30%前後と低いことが示された。クロロフィルa, bの減少率がカロテノイドよりも大きいことから、コマツナの乾燥処理での黄化は、クロロフィルa, bの大幅な減少が主要因であることが示唆された。クロロフィルa, bはクロロフィラーゼ²⁵⁾、クロロフィルオキシターゼ²⁶⁾により酵素的に、あるいは紫外線²⁷⁾などにより非酵素的に分解され、非常に分解されやすい物質である。青果物保存中の黄化の原因はこれらのクロロフィル分解系がクロロフィルを分解するために起こるとされている^{25)~27)}。今後、乾燥過程におけるクロロフィル分解は酵素的もしくは非酵素的分解のどちらが優勢であるのかを明らかにし、黄化を抑制する方法について検討する必要があると考えられる。

要 約

コマツナを試料として、遠赤外線乾燥および熱風乾燥における乾燥速度および品質変化の温度依存性について検討し、以下の知見を得た。

- ① 含水率変化はいずれの乾燥条件においても指数モデルで表され、乾燥速度定数 k にArrhenius型の温度依存性があることが示された。
- ② L-アスコルビン酸残存率は積算温度 $4.1 \times 10^3 ^\circ\text{C} \cdot \text{h}$ 近傍に境界点がみられ、積算温度がそれ以上となる乾燥条件では分解を抑制した。
- ③ 色彩変化は葉面の積算温度が小さいほど変化量が小さいことが示され、乾燥に伴う黄化はクロロフィルa, bの大幅な減少が主要因であることが示唆された。
- ④ 温度と時間の2つのパラメータを同時に考慮できる積算温度を品質評価の指標とすることにより、最適乾燥条件の検討の際に有用となる可能性が示唆された。

謝 辞 本研究の一部は、科学研究費補助金（若手研究B, 23780268）の助成により実施されたものである。ここに記して謝意を表す。

東洋興産株式会社 取締役製造本部長 齊藤義郎氏には遠赤外線乾燥機を使用・改良する際に貴重かつ有益な御助言を頂いた。心より御礼申し上げる。

文 献

- 1) 吉川直樹・天野耕二・島田幸司：日本の青果物消費に伴う環境負荷とその削減ポテンシャルに関する評価，環境システム研究論文集，**35**，499～509（2007）
- 2) 加藤真奈美：東日本大震災における宮城県内被災者への栄養食生活支援，ビタミン，**85**，426～429（2012）
- 3) 石川秀次：五訂食品成分表，（第一出版，東京），pp.109～147（2001）
- 4) 農林統計協会：第86次農林水産省統計表（平成22年～平成23年），（農林統計協会，東京），p.177，545（2012）
- 5) 農山漁村文化協会：野菜園芸大百科21品質・鮮度保持，（農山漁村文化協会，東京），pp.170～174（2004）
- 6) 林 弘通：講座 食品の乾燥（第一回）—その歴史と製造技術—，調理科学，**24**，333～338（1991）
- 7) MURAMATSU, Y., TAGAWA, A. and SAKAGUCHI, E.: Thin Layer Drying Model for Cooked Soybeans, 2009 ASABE Annual Intl. Meeting, Paper Number: 095770, 1～8, Nevada（2009）
- 8) 渡辺敦夫・清水 賢：化学技術誌Mol 2月号，（オーム社，東京），pp.64～72（1988）
- 9) HEBBAR, H.U., VISHWANATHAN, K.H. and RAMESH, M.N.: Development of combined infrared and hot air dryer for vegetables, *J. Food Eng.*, **65**, 557～563（2004）
- 10) 秀永伸作：遠赤外線穀物乾燥機と大豆乾燥への利用，農業機械学会誌，**63**，17～19（2001）
- 11) MANEECHOT, P., TOJO, S. and WATANABE, K.: Computed Tomographic Analysis of Vegetable during Far Infrared Radiation Drying Process, *J. Soc. Agric. Structures*, **37**, 123～132（2006）
- 12) VISHWANATHAN, K. H., HEBBAR, U. H. and RAGHAVARAO, K.S. M.S.: Hot Air Assisted Infrared Drying of Vegetables and Its Quality, *Food Sci. Technol. Res*, **16**, 381～388（2010）
- 13) AFZAL, T.M., ABE, T. and HIKIDA, Y., Energy and quality aspect during combined FIR-convection drying of barley, *J. Food Eng.*, **42**, 177～182（1999）
- 14) 岡本慎太郎・折笠貴寛・桑嶋学人・菰田俊一・齊藤順一郎・矢野歳和・村松良樹・小出章二・椎名武夫・田川彰男：コマツナの乾燥への遠赤外線の利用，日本食品科学工学会誌，**59**，465～472（2012）
- 15) 武田吉弘・太田保夫：青果物の保存姿勢が品質およ

- び鮮度保持に及ぼす影響, 農業および園芸, **58**, 809~812 (1983)
- 16) 小澤美奈子: スタンダード栄養・食物シリーズ 5 食品学—食品成分と機能性—, (東京化学同人, 東京), pp. 61~106 (2011)
- 17) SCALA, K.D. and CRAPISTE, G.: Drying kinetics and quality change during drying of red pepper, *LWT—Food Sci. Tech.*, **41**, 789~795 (2008)
- 18) 藤原隆広・熊倉裕史・大田智美・吉田裕子・亀野貞: 市販ハウレンソウのL-アスコルビン酸および硝酸塩含量の周年変動, 園芸学研究, **4**, 347~352 (2005)
- 19) 須賀長市: 耐候光と色彩, (スガ試験機, 東京), pp. 197~290 (1988)
- 20) 廣田智子: ピーマンの冷凍加工における収穫時期, ブランチングおよび解凍方法が果皮の色調と硬さに及ぼす影響, 兵庫県立農林水産技術総合センター研究報告, **59**, 34~35 (2011)
- 21) 満田幸恵・新本洋士・小堀真珠子・津志田藤二郎: 高速液体クロマトグラフィーによる野菜のカロテノイドおよびクロロフィルの同時分析, 日本食品科学工学会誌, **49**, 500~506 (2002)
- 22) 安藤泰雅・折笠貴寛・椎名武夫・五月女格・五十部誠一郎・村松良樹・田川彰男: 調理用トマトの乾燥およびブランチングへのマイクロ波の適用, 日本食品科学工学会誌, **57**, 191~197 (2010)
- 23) MURAMATSU, Y., TAGAWA, A., SAKAGUCHI, E. and KASAI, T.: Water Absorption Characteristics and Volume Change of Milled and Brown Rice During Soaking, *Cereal Chem.*, **83**, 624~631 (2006)
- 24) 保坂秀明: 「食品工学入門」—基礎と操作—, (株式会社化学工業社, 東京), pp. 57~79 (1972)
- 25) YMAUCHI, N., YOSHIURA, M. and SHONO, Y., Chlorophyll Degradation in Mitsuha Leaves during Storage, *Food Sci. Tech. Res.*, **42**, 709~714 (1995)
- 26) 秋山 裕・高橋千夏・山内直樹: 大根子葉の黄化時におけるクロロフィル分解系, 日本食品科学工学会誌, **47**, 296~301 (2000)
- 27) 瀬戸美江・佐伯俊子・中西洋子・梶田武俊: 緑葉クロロフィルの分解におよぼす光の影響, 日本調理科学会誌, **23**, 367~372 (1990)
- (平成25年3月6日受付, 平成25年8月5日受理)

ホスホトランスフェラーゼシステムを欠損した *Lactobacillus plantarum*の代謝解析

佐藤 英一*・梶川 揚申*・岡田 早苗*・辻 聡**

* 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

Metabolic Analysis of a Phosphotransferase System-deficient Strain of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826

SATOHI Eiichi*, KAJIKAWA Akinobu*, OKADA Sanae* and TSUJI Akira**

* Department of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

It is important to consider not only biosynthetic pathways but also the sugar-transport system in order to construct a substrate production system for bacterial fermentation. A phosphotransferase system (PTS)-deficient strain of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 was obtained, and its sugar-transport properties were compared with those of the wild-type strain. Based on metabolic analysis, the wild-type strain was found to utilize 13 kinds of sugar via the PTS. Four kinds of sugar, which are thought to be taken up via non-phosphotransferase systems, were also utilized via the PTS. Since the PTS-deficient mutant was able to utilize only glucose and maltose as carbon sources, non-phosphotransferase systems were considered to be functional in the mutant. The PTS-deficient mutant lost the ability to utilize several sugars. Thus, the ability of the wild-type strain to utilize a variety of sugars depends on its PTS. We also found that disruption of the PTS affects the biosynthesis of lactic acid in the mutant strain.

(Received Jun. 3, 2013 ; Accepted Sep. 30, 2013)

Key words : *Lactobacillus plantarum*, phosphotransferase system, metabolic analysis, gene disruption, lactic acid bacteria,

ラクトバチルスプラントルム, ホスホトランスフェラーゼシステム, 代謝解析, 遺伝子破壊, 乳酸菌

微生物による発酵生産の例は枚挙に暇がないが、効率的な物質生産を目的として、従来は優良株の分離や突然変異株の分子育種に精力が注がれてきた。これらの成果の多くは現在の工業利用には欠かせないものとなっている。近年では分子生物学的な手法を用いて物質生産に関与する代謝経路を直接改変することにより、目的物質の生産効率を向上させることが可能となってきた。このような代謝改変の宿主には培養コストが低く生育の速い大腸菌やコリネ型細菌などの好気性菌が一般に使われる。好気性菌は酸素存在下では呼吸により効率的な生育が可能であるが、消費した炭素源の大部分を菌体増殖に使ってしまうため物質生産を目的とした場合は、十分な菌体を得た後に改めて嫌気条件下での発酵により代謝産物を回収する必要がある。通性嫌気性菌である乳酸菌は数多くの発酵食品の製造に欠かせない有用微生物の代表格だ

が、これまで物質生産の宿主菌として注目されることは稀であった。この背景には遺伝子操作が大腸菌などに比べ容易でないことなどがあげられるが、近年の分子生物学的手法の進展により状況は大きく変わってきている。遺伝子操作のための基盤も整備され、多くの乳酸菌株の全ゲノム配列も解読されるようになった。このため従来は食品の発酵菌として認識されることの多かった乳酸菌も物質生産菌として着目され始めている。

Lactobacillus plantarum NCIMB 8826 (以下、野生株)は乳酸菌の中で2例目にゲノムの全塩基配列が決定された*L. plantarum* WCFS1株と由来を同じにする株であり¹⁾、このゲノム情報を基盤に遺伝子工学・分子生物学的手法によりコハク酸やソルビトールなどの発酵生産を行う宿主菌としての利用が検討されている^{2), 3)}。また、野生株のゲノム全長は3.3Mbpとこれまでに公開されて

* 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

§ Corresponding author, E-mail: at202493@nodai.ac.jp

いる乳酸菌の中でもとりわけ大きいことが特筆すべき点としてあげられる。この大きなゲノムサイズは他の乳酸菌と比べて糖代謝や糖取込みに関連する遺伝子を数多く保持することに拠るものである¹⁾。しかし、野生株の糖取込み経路に関してはゲノム情報からの予想にとどまり、表現型としては不明な点が多い。発酵生産の宿主菌として利用するためには細胞内の代謝経路の改変だけでなく、基質である糖の取込み経路に関する知見を疎かにすることはできず、さらに言えば生成物の排出経路までもを念頭に置いた総括的な検討が求められる。

ここで基質の取込み経路に注目してみると、微生物における糖の取込み経路は、一次的能動輸送、二次的能動輸送、ホスホトランスフェラーゼシステム (PTS) の3つに大別される⁴⁾。このなかで乳酸菌の主要な糖取込み経路はPTSであるとされる。PTSはEnzyme I (EI), Phosphocarrier protein (Hpr), ABCのサブユニットから成るEnzyme II (EII ABC) の3つの成分から構成されており、ホスホエノールピルビン酸をピルビン酸に変換する反応と共役して糖をリン酸化し、糖リン酸として細胞内に取込むための経路である (Fig. 1)。またEIとHprは共通して1つずつ存在するのにに対し、EIIは取込む糖に対し特異的であり、その種類に応じて複数個存在する。野生株もEIとHprをコードする遺伝子を1個ずつ、EIIをコードする遺伝子を25個保持していることが判明している¹⁾。このEIIの数はすでにPTSの機能が解析されている *Lactobacillus johnsonii* や *Lactobacillus acidophilus* など他の乳酸菌と比べても多い^{5), 6)}。そのため、野生株が多様な糖を生育に利用できるという表現型はEIIの種類に起因すると考えられる。しかし、PTSが必ずしも発酵生産における優れた糖の取込み経路であるとは限らず、コリネ細菌などで糖取込み経路をPTSから非PTS系に切り換えることでアミノ酸の発酵効率が向上し

たとの報告がある^{7), 8)}。そのため、野生株においてもPTSの破壊により潜在的な他の糖取込み経路を誘導することで代謝効率の優れた株に育種できる可能性がある。

そこで本研究では、PTSのEI遺伝子を破壊することにより糖取込み能を欠如させた変異株を作出し、PTS破壊株と野生株の代謝解析から *L. plantarum* NCIMB 8826 の糖取込み系を明らかにすることにした。

実験方法

1. 供試菌株および培養

野生株はMRS液体培地 (Difco社製) を用い37℃で静置培養した。また、糖類発酵性試験にはYP培地 (Yeast extract 1%, Polypeptone 0.5%, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40mg/ml $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2mg/ml, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2mg/ml, NaCl 2mg/ml, Tween 80 50mg/ml, pH6.8) を基礎培地とし、これに1%の糖 (D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, D-Cellobiose, D-Lactose, D-Maltose, D-Sucrose, Salicin, D-Trehalose, D-Mannitol, D-Sorbitol, D-Rhamnose, D-Ribose, Gluconate, Galactose, Melibiose, Raffinose, Melezitose) を添加したものを用いた。各種糖を含むYP培地10mlに14~16時間前培養した野生株またはPTS破壊株を1%量接種し、37℃で静置培養した。また、糖を添加していないYP培地を用いて同様に培養したものを対照株とした。培養に際してはエリスロマイシン (Em) を5μg/mlになるように添加した。前述の要領で24時間培養し、660nmにおける吸光度の測定結果から糖類発酵性を判定した。一方、有機酸分析、残糖分析にはMRS培地を用いて糖類発酵性試験と同様の条件で培養した。

2. EI遺伝子欠損株の作出

Staphylococcus 由来の温度感受性プラスミド pBT 2 を基にエリスロマイシン (Em) 耐性遺伝子を選択マーカーとして使えるように改良したプラスミド pBTE を作成した⁹⁾。まず、pBT 2 を *Sna* BI と *Eco* RV で消化し、再環状化させることでクロラムフェニコール耐性遺伝子を除去した pBT2ΔCm を構築した。pBT2ΔCm を *Sma* I で消化し、pE194 由来の Em 耐性遺伝子¹⁰⁾ を組み込み pBTE を構築した。次に、野生株の染色体 DNA から EI 遺伝子の上流および下流領域約 300bp をそれぞれ PCR 法により取得し、これらの DNA 断片を連結することで EI 遺伝子の内部配列を除去した約 600bp の ΔEI を作成した。この ΔEI を *Pst* I と *Bam* HI で消化し、同制限酵素により消化した pBTE に組み込み、最終的に EI 遺伝子破壊用プラスミド pBTE::ΔEI を構築した (Fig. 2)。このプラスミドをエレクトロポレーション法により野生株に形質転換し¹¹⁾、二重交叉相同組換え法により野生株の EI 遺伝子を破壊した変異株 (以下、PTS 破壊株) を作出した。

3. 非PTS系遺伝子の発現量解析

グルコースまたはマルトースを唯一の糖源とした YP 培地 2 ml に 14~16 時間前培養した野生株または PTS 破壊

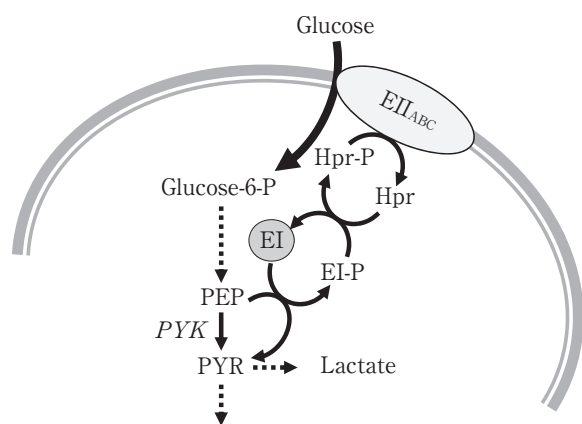


Fig. 1 The metabolic pathways related to phosphotransferase system in *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826

EI; Enzyme I, P; Phosphate, Hpr; Phosphocarrier protein, EII; Enzyme II, PEP; Phosphoenolpyruvate, PYR; Pyruvate, PYK; Pyruvate kinase.

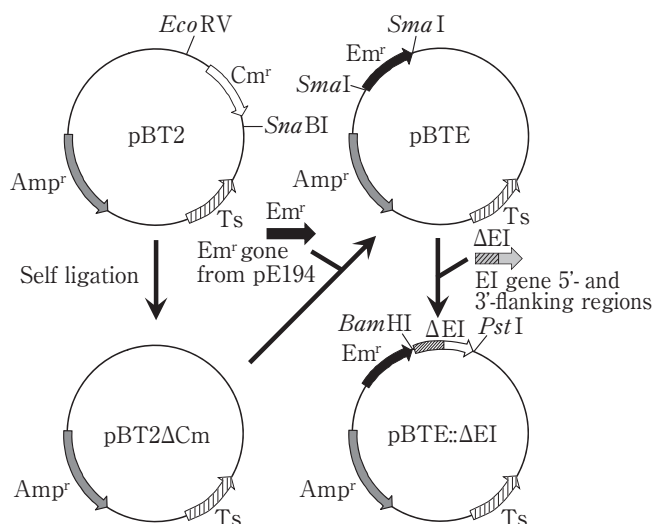


Fig. 2 Construction of a gene disruption plasmid

株を1%接種し、37℃で12時間静置培養した。各培養条件で得た菌体からISOGEN II (和光純薬工業製) を用いて総RNAを調製した。得られた総RNAを鋳型に逆転写酵素を用いてcDNAを合成し定量RT-PCRに供した。このときハウスキーピング遺伝子である16S rRNA遺伝子の発現量を内部標準とし、相対的な発現量を解析した。

4. HPLCによる有機酸分析および残糖量分析

培養24時間後の培養液2 mlを遠心分離し (15,000 rpm, 1 min, 4℃), 上清中の有機酸をHPLC (Waters 2695 Separation Module, Waters 2996 Photodiode-Array, カラム; Rspak KC-811, Rspak KC-G, 移動相; 0.08% HClO₄) により分析した。また, 上清中の残糖量はHPLC (Waters 2695 Separation Module, Waters 2414 Refractive Index Detector, カラム; Shodex Asahipak NH 2 P-50 4E, 移動相; 75% CH₃CN) により測定した。

実験結果および考察

1. PTS破壊株の作出と糖類発酵性試験

野生株は他の乳酸菌と比較しても糖代謝や糖取込みに関連する遺伝子を多数保有しており, 表現型においても多くの糖を資化することができる。この糖取込み能はPTSに起因していると考えられるものの詳細は不明である。そのため, 二重交叉相同組換え法により野生株のEI遺伝子を破壊した変異株 (以下, PTS破壊株) を作出し, 野生株が資化可能な18種類の糖の発酵性を比較した (Table 1)。

まず, PTSを介して取込まれると考えられる11種類の糖のうち, フルクトース, ソルビトールなど9種類の糖を唯一の炭素源とした場合にPTS破壊株は生育することができなかった。このことから, 野生株はこれら9種類の糖をPTSのみを利用して細胞内に取込んでいることが強く示唆された。また, PTS破壊株はこれらの糖の中で

Table 1 Carbohydrate utilization profiles of the *L. plantarum* NCIMB 8826 and derivative

Sugertype	Carbohydrate	Wild type	Mutant
PTS	D-glucose	++	+
	D-fructose	++	—
	D-mannose	+	—
	D-cellobiose	++	—
	D-lactose	++	++
	D-maltose	++	—
	D-sucrose	++	—
	salicin	++	—
	D-trehalose	++	—
	D-mannitol	+	—
	D-sorbitol	++	—
Non-PTS	D-rhamnose	++	+
	D-ribose	+	++
	gluconate	+	++
	galactose	++	—
	melibiose	++	—
	raffinose	++	—
	melezitose	++	—

The carbohydrate utilization profiles of *L. plantarum* NCIMB 8826 and its derivative were determined after 24 hours incubation. The ability or inability to utilize carbohydrates is represented by + or —, respectively.

グルコースとマルトースを資化可能であった。そのため, 野生株は何らかの非PTS系を介して細胞内にグルコースとマルトースを取込む機構を保持することが明らかとなった。

次に, PTSを介さずに取込まれると考えられる7種類の糖を唯一の炭素源とした発酵性試験の結果から, PTS破壊株はラムノース, リボース, グルコン酸を資化可能であった。PTS破壊株はガラクトース, メリビオース, ラフィノース, メレジットースの4種類の糖では生育しなかったことから, これら4種類の糖もPTSを介して細胞内に取込まれていることが示唆された。しかし, これらの糖を基質として特異的に反応するEIIは存在していない。さらに, EIIは主に反応する糖の他に補助的に別の糖を取込むことが他菌種において報告されている¹²⁾。このことから, 野生株においても同様の現象が起きていると考えられる。

2. 非PTS系遺伝子の発現解析

前述の糖類発酵性試験の結果から, 野生株はグルコースとマルトースを非PTS系を介して細胞内へ取込んでいる可能性がある。野生株のゲノム情報よりPTSによる取込み以外の経路としてグルコースに特異的なプロトンシンポーター遺伝子 (Lp_2503) が候補遺伝子として推定された。また, マルトースについても特異的なABCトランスポーター遺伝子 (Lp_3635) が推定された。これらの輸送系は同属乳酸菌に広く保存されていることから,

PTS破壊株は上記の非PTS系を介して糖を取込むことで生育していると考えられる。そこで、PTS破壊株において生育が確認できたグルコースとマルトースの輸送系遺伝子の発現量を定量RT-PCRにより比較した。

PTS破壊株におけるグルコースシンポーター遺伝子の発現量（相対値）は 3.15 ± 0.53 であり、野生株の 1.11 ± 0.16 に対して約2.8倍の値を示した。この発現量の上昇はPTSの破壊に伴い、このグルコースシンポーターの発現が誘導されたためだと考えられる。そのため、PTS破壊株はこの経路を利用してグルコースを取込んでいることが強く示唆された。

また、マルトース特異的ABCトランスポーターは野生株とPTS破壊株において発現量に差がみられなかった（データ示さず）。この結果より、マルトース特異的なABCトランスポーターはPTSの破壊に影響されず、常に発現し機能を保持していると考えられる。

3. 野生株およびPTS破壊株の代謝解析

これまでの野生株とPTS破壊株の比較から、PTS破壊株ではグルコースの取込み経路が変化していると考えられる。そこで、グルコースを唯一の炭素源とした場合の野生株とPTS破壊株の代謝解析から両株を比較した。

その結果、野生株とPTS破壊株の生育を経時的に比較すると、PTS破壊株では対数増殖期に至るまでの立ち上がりの遅れが確認された（Fig. 3A）。また、グルコースの消費速度も減少していた（Fig. 3B）。これはPTSとグルコースシンポーターの糖取込み形態の差に由来すると考えられる。PTSではグルコースはグルコース-6-リン酸として細胞内に取込まれる。これに対し、グルコースシンポーターにより菌体内に取込まれたグルコースは、グルコキナーゼによって1分子のATPを消費してグルコース-6-リン酸に変換される。この代謝の初期段階で必要なATPを確保するために生育の遅れを招いたと推

察される。このようなPTS破壊株にみられる生育の遅れは、PTS関連遺伝子を欠損した大腸菌でも確認されている¹²⁾。このことから、PTSを介した糖代謝により乳酸を生成することは野生株が生育するうえで効率の良い糖取込み手段であることが裏付けられる。

野生株とPTS破壊株は共に主要な代謝産物として乳酸を生成しているが、PTS破壊株では経時的な乳酸生成量の低下が認められた（Table 2）。これと同様に、野生株とPTS破壊株における経時的な残糖量を比較すると、PTS破壊株の糖消費速度の低下が認められた。PTS破壊株はEIを欠損したことで、ホスホエノールピルビン酸からピルビン酸の合成が低減している。これに伴い、ピルビン酸から乳酸への代謝が低減したことがPTS破壊株の乳酸生産量の低下を招いたと考えられる。

これらの結果より、短時間で乳酸を生産させるにはPTSを利用するほうが有利であると判断できた。しかし、野生株とPTS破壊株の乳酸生産量は48時間培養時では差

Table 2 Organic acid concentrations in a MRS medium produced by *L. plantarum* NCIMB 8826 and its derivatives

<i>L. plantarum</i> strains	Time (hour)	Fermentation product (mM)		
		Lactate	Acetate	Acetoin
Wild type	24	170.3 ± 0.61	0.83 ± 0.02	6.13 ± 0.45
Mutant		141.1 ± 1.34	0.83 ± 0.02	5.62 ± 0.26
Wild type	48	190.1 ± 1.85	0.88 ± 0.05	6.73 ± 0.34
Mutant		189.9 ± 2.63	0.89 ± 0.04	6.68 ± 0.57

Values represent the mean and standard error derived from three independent experiments, with each experiment performed in triplicate.

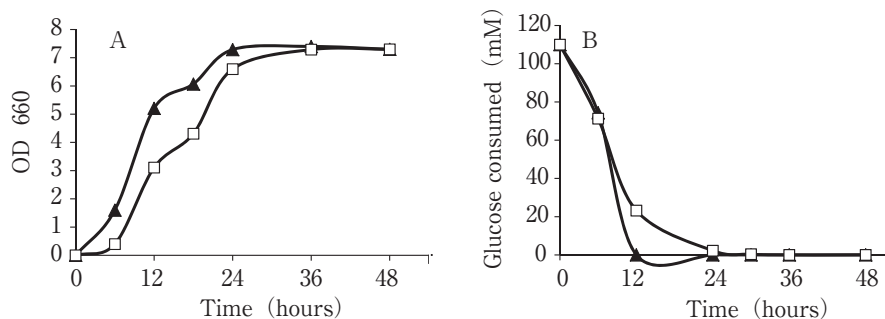


Fig. 3 A: Cell growth of *L. plantarum* NCIMB 8826 and derivatives in a MRS medium, ascertained by measuring the increase in optical density at 660nm

B: Glucose consumed of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 and derivatives in a MRS medium, ascertained by using Glucose C2-test kit (Wako Pure Chemical)

These data are mean of three independent experiments and those in parentheses are standard deviation. Symbols: ▲, *L. plantarum* NCIMB 8826; □, *L. plantarum* NCIMB 8826 EI.

がみられないことから、複数の糖源の中からグルコースのみ消費することで十分な乳酸を生産することが可能な菌株を取得できたと考えられる。今後、コハク酸やソルビトールなどの代謝改変を利用して発酵生産される物質の生産にPTSの欠損が与える影響を検討することは、さらなる有用菌株の育種につながると考えられる。

要 約

本研究では代謝改変を利用した乳酸菌による物質生産系の構築の基盤整備の一助として、糖の取込み経路に関する検討を行った。宿主として供試した *L. plantarum* NCIMB 8826 (野生株) では、代謝改変によるコハク酸やソルビトールなどの発酵生産系の構築が試みられており、本菌株の基質の取込み経路に関する知見を得ることは上記の種々の発酵生産系の発展につながると考えられる。他の乳酸菌種での報告から乳酸菌の主要な糖取込み経路はPTSであると考えられた。そこで、野生株のPTSを介した糖取込み能を欠如した変異株を作出し、野生株と諸性質を比較することで *L. plantarum* NCIMB 8826 の糖取込み系のタイプを判定した。

その結果、PTS破壊株は13種類の糖源を資化できなくなり、これらには一般にPTSを介して取込まれるフルクトース、ソルビトールなど9種類の糖と、非PTS系として扱われるガラクトースなど4種類の糖を含んでいた。そして、PTS破壊株はグルコースおよびマルトースを唯一の炭素源として生育可能であり、非PTS系による取込み経路が機能していることが明らかとなった。また、野生株とPTS破壊株の性質の比較により、非PTS系を用いた乳酸生産が菌体に与える影響の一端を明らかにした。本研究の成果を発展させることは、発酵生産系の目的物質に合わせた特定の糖原のみを利用する乳酸菌株の構築などに繋がる可能性がある。

文 献

- 1) KLEEREBEZEM, M., BOEKHORST, J., van KRANENBURG, R., MOLENAAR, D., KUIPERS, O.P., LEER, R., TARCHINI, R., PETERS, S.A., SANDBRINK, H.M., FIERS, M.W., STIEKEMA, W., LANKHORST, R.M., BRON, P.A., HOFFER, S.M., GROOT, M.N., KERKHOVEN, R., DE VRIES, M., URSING, B., DE VOS, W.M. and SIEZEN, R.J.: Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **100**, 1990~1995 (2003)
- 2) LIU, S., NICHOLS, N.N., DIEN, B.S. and COTTA, M. A.: Metabolic engineering of a *Lactobacillus plantarum* double *ldh* knocked-out strain for enhanced ethanol production, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 1~7 (2006)
- 3) TSUJI, A., OKADA, S., HOLS, P. and SATOH, E.: Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for succinic acid production through activation of the reductive branch of the tricarboxylic acid cycle, *Enzyme Microb. Technol.*, **53**, 97~103 (2013)
- 4) POOLMAN, B.: Transporters and their roles in LAB cell physiology, *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**, 147~164 (2002)
- 5) PRIDMORE, R.D., BERGER, B., DESIERE, F., VILANOVA, D., BARRETTO, C., PITTET, A.C., ZWAHLEN, M.C., ROUVET, M., ALTERMANN, E., BARRANGOU, R., MOLLET, B., MERCENIER, A., KLAENHAMMER, T., ARIGONI, F. and SCHELL, M.A.: The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC533, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **101**, 2512~2517 (2004)
- 6) ALTERMANN, E., RUSSELL, W.M., AZCARATE-PERIL, M.A., BARRANGOU, R., BUCK, B.L., MCAULIFFE, O., SOUTHER, N., DOBSON, A., DUONG, T., CALLANAN, M., LICK, S., HAMRICK, A., CANO, R. and KLAENHAMMER, T.R.: Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **102**, 3906~3912 (2005)
- 7) CHATTERJEE, R., MILLARD, C.S., CHAMPION, K., CLARK, D.P. and DONNELLY, M.I.: Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*, *APPL. Environ. Microbiol.*, **67**, 148~154 (2001)
- 8) IKEDA, M., MIZUNO, Y., AWANE, S., HAYASHI, M., MITSUHASHI, S. and TAKENO, S.: Identification and application of a different glucose uptake system that functions as an alternative to the phosphotransferase system in *Corynebacterium-glutamicum*, *APPL. Microbiol. Biotechnol.*, **90**, 1443~1451 (2011)
- 9) BRÜCKNER, R.: Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **151**, 1~8 (1997)
- 10) HORINOCHI, S. and WEISBLUM, B.: Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics, *J. Bacteriol.*, **150**, 804~814 (1982)
- 11) AUKRUST, T. and BLOM, H.: Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations, *Food Res. Int.*, **25**, 253~261 (1992)
- 12) SIEZEN, R.J., STARRENBURG, M.J., BOEKHORST, J., RENCKENS, B., MOLENAAR, D., VAN HYLCKAMA, and Vlieg, J.E.: Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* isolates from Plants Identifies mechanisms of adaptation to the

Plant Niche. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 424～436
(2008)

(平成25年 6 月 3 日受付, 平成25年 9 月30日受理)

Effect of the Molecular Interactions between β -lactoglobulin and Gliadin on the Baking Quality

OKA Daiki^{*1}, KIKUCHI Chihiro^{*2}, SHIONO Kouji^{*2},
NOGUCHI Tomohiro^{*1§} and TAKANO Katsumi^{*2}

* 1 Food Processing technology Center, Department of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku 156-8502

* 2 Faculty of Applied Bioscience, Department of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture,
1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku 156-8502

In this study, the gliadin that is water-solubilized by the action of β -Lg was identified. As a result, it became clear that β -Lg specifically interacts with the most hydrophilic ω -gliadin in each gliadin (α , β , γ , ω), and the ω -gliadin is desorbed from gliadin aggregates and becomes water-soluble. In contrast, regarding the recovery factors of baking quality using heated skim milk, where β -Lg forms a heated complex with κ -CN, the specificity of ω -gliadin is negated due to κ -CN's high affinity to each gliadin; thus, desorption from gliadin aggregates is inhibited. Furthermore, when gliadin which ω -gliadin was removed, was added to wheat flour dough, the formation of the dough becomes poor and gas retention of the dough reduced. It became clear that the degradation of the bread with skim milk is caused where ω -gliadin is desorbed from the gliadin aggregates due to the action of β -Lg.

(Received Feb. 21, 2013 ; Accepted Aug. 8, 2013)

Key words : skim milk, β -lactoglobulin, κ -casein, gluten formation, hydrophobic interaction
脱脂乳, β -ラクトグロブリン, κ -カゼイン, グルテン形成, 疎水性相互作用

Skimmed milk is added during the manufacturing of bread in order to improve the taste, flavor, baked color, and nutrition¹⁾. However, skimmed milk has been subjected to heat treatments such as spray drying and sterilization in the manufacturing process, which can affect the baking quality. When using skimmed milk subjected to lower temperature treatment, degradation in baking quality such as an increase in crumb hardness and volume reduction is observed^{2,3)}. By contrast, high-temperature treatment suppresses this degradation of baking quality⁴⁾. Previously, the whey protein, α -lactalbumin (α -La), and β -lactoglobulin (β -Lg) were shown to degrade the baking quality in their native state⁵⁾. Furthermore, by heat treatment, whey proteins and κ -casein (κ -CN) form a complex via a disulfide bond (SS bond). This removes the factors that have a negative effect on baking quality⁵⁾. In addition, it became clear that although a fraction of gliadin becomes water-soluble by the action of β -Lg, this solubilization is suppressed when β -Lg forms a complex with κ -CN⁶⁾. Thus, it was presumed that the bread degradation was caused by water-

solubilization of gliadin.

In this study, the gliadin that is solubilized by the action of β -Lg. Novel findings regarding the effect of water solubilization of gliadin on the baking quality.

Materials and Experimental Methods

1. Materials

The milk source was obtained from Holstein, raised on Fuji farms of Tokyo University of Agriculture. Milk fat was removed using a cream separator with heating conditions at 40°C to prepare unheated skimmed milk before use in the study. Bread flour (Camelia; Nisshin Flour Milling, Tokyo, Japan) was used as the flour source.

2. Demarcation of milk protein

β -Lg was purified based on the method described by ASCHAFEBURG *et al.*⁷⁾. κ -CN was purified based on the method described by IGARASHI *et al.*^{8),9)}. Samples were then prepared by freeze-dehydration (RLE II-205; Kyowa Vacuum Engineering, Tokyo, Japan).

3. Demarcation of gliadin

Based on the method described by HERBERT *et*

al.^{10),11)}, 0.1M phosphate buffer was added (pH7.6, 0.4M sodium chloride was included). After removing albumin and globulin by washing, gliadin was demarcated using a five-fold amount of 70% ethanol solution. Thereafter, it was dialyzed with water, centrifuged ($6,000 \times g$, 20min, 20°C), and then the precipitate was freeze-dehydrated to obtain samples.

4. Analysis of the solubility behavior of gliadin

β -Lg solution (5mg/ml) dissolved in 0.1M phosphate-buffered solution (pH7.0) and the heated mixture of β -Lg and κ -CN (10mg/ml, 5mg each) was added to 5g of gliadin and kneaded. Subsequently, the solubility behavior of gliadin was analyzed according to the modified method described by FANCES *et al.*¹²⁾. Next, 5ml of deionized water was added to the mixture of gliadin and milk protein. After dispersion in a homogenizer (Phycotron; Microtech, Tokyo, Japan) the supernatant was obtained (soluble demarcation, S1) by centrifugation (3,500rpm, 20min, room temperature). In addition, 50mM Tris hydrochloric acid buffer solution (pH7.8, S2) was added to the precipitate, and the same procedure was followed, in order to sequentially obtain the following soluble demarcations: 50% propanol solution (S3), 0.1M acetic acid solution (S4) and 1% SDS solution (S5). Each demarcation was analyzed using a 12.5% SDS-PAGE (Me+), and gliadin was detected by western blotting using anti-gliadin from mouse CE-3 (Cat. No. CHO13; Cosmo Bio, Tokyo, Japan) for the primary antibody of gliadin, and anti-mouse IgG HRP-linked whole antibody from sheep (Cat. No. NA931; GE Healthcare-Japan, Tokyo, Japan) for the secondary antibody.

5. Analysis of N-terminal amino acid sequence

After SDS-PAGE, the gel was transferred to a PVDF membrane by semi-dry blotting. Subsequently, the desired protein bands were cut out and sequenced (PPSQ-21; Shimadzu, Kyoto, Japan).

6. Analysis of intermolecular interaction between β -Lg and each gliadin (α , β , γ , ω)

Each gliadin (α , β , γ , ω) was demarcated using CM-Sepharose Fast Flow ($\phi 2.2\text{cm} \times 11\text{cm}$), which was equilibrated in 10mM glycine acetate buffer (pH4.6, containing 3M urea) according to the method described by KATHRYN *et al.*¹³⁾. Thereafter 1mg of each demarcated gliadin (α , β , γ , ω) was dissolved in 1ml of 70% ethanol, and it was absorbed onto a PVDF membrane. Subsequently, PVDF membrane was soaked in 10ml of β -Lg solution (10mg of protein), and the bound β -Lg was detected by far-

western blotting using anti-bovine beta-lactoglobulin from rabbit (Cat. No. A10-125A; Bethyl Laboratories, Montgomery, AL) as the primary antibody, and anti-rabbit IgG HRP-linked whole antibody from donkey (Cat. No. NA934; GE Healthcare-Japan) as the secondary antibody. κ -CN and the heated mixture of β -Lg and κ -CN were also tested in the same method using anti-bovine casein from sheep (Cat. No. K01336S; Meridian Life Science, Oxford, UK) for the primary antibody, and HRP-linked anti-sheep IgG from rabbit (Cat. No. SC2770; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) for the secondary antibody.

7. Evaluation of baking quality

Gliadin, which accounts for 3% of the wheat flour, was added to the dough and bread was then made. Next 200g of dough was prepared according to the method described by KIKUCHI *et al.*⁵⁾. After molding, dough was fermented (38°C, RH 85%, for 60min) and baked (200°C for 20min). After the bread was rested at room temperature to cool for 1 h, its loaf volume (cm^3/g) was measured in a 3D volumeter (WinVM 2100; ASTEX, Tokyo, Japan). Subsequently, bread was sliced to 20mm thick slices, the compressive load (N) at the center of the bread was measured using a compression tester (Series 5564, Instron, Norwood MA) with a cylindrical plunger of 23mm a diameter; the compressive load (N) at 50% compression was measured for determining the crumb hardness.

8. Evaluations of wheat dough properties

Physical properties of the dough kneading were measured using Dougraph (ATTO, Tokyo, Japan). The relative amount of each dough component was determined in the same way as for the baking test. The dough was kneaded for 10min, setting the circulating cooling thermostat at 20°C. A mixing curve was obtained by averaging the chart of the power consumption (w) every 20s.

In addition, the volume of the dough, which was fermented in the cylinder (27°C, RH75%) for 4h, was measured every 30min, and the gas retention ability of the dough based on the volume growth rate (%) was evaluated.

Results and Discussion

1. Changes in the solubility behavior of gliadin

Gliadin within the milk protein was demarcated at each stage (i.e., following treatment with water, buffer, propanol, acetic acid and SDS), and changes in the solubility behavior of the gliadin were

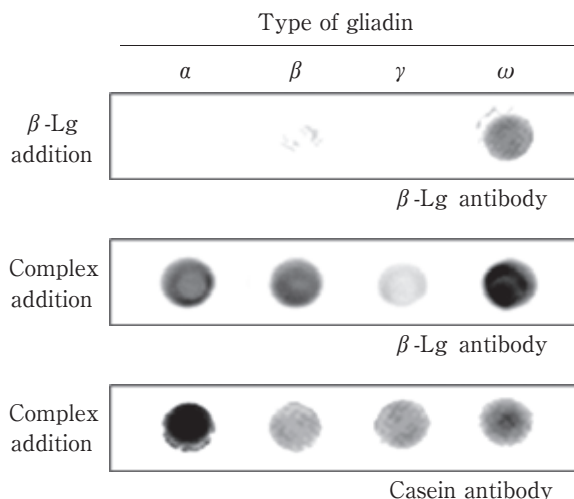


Fig. 4 Interaction analysis of β -lactoglobulin and κ -casein for each gliadin by the modified method of far-western blotting

β -Lg was incubated with individual gliadins and β -Lg antibody was added to probe for interaction. In the Complex of β -Lg and κ -CN, either β -Lg antibody or casein antibody.

water-soluble. Furthermore, in the heating complexes with β -Lg of κ -CN, desorption and water solubilization of ω -gliadin was inhibited, because κ -

CN interacted with gliadin.

3. Effects of desorption of ω -gliadin on baking quality

Based on the foregoing results, it is likely that the β -Lg-dependent degradation of the baking quality was caused by desorption of ω -gliadin. To test this, gliadin, from which the ω -gliadin was removed by interaction with β -Lg, was added to wheat flour dough, and analyzed the effect on baking quality was analyzed. As a result, when the quality of the bread with the addition of untreated gliadin was set to 100, the values for bread loaf volume and crumb hardness were 94.3 ± 4.9 ($\pm$ SD), and 115.6 ± 10.2 , respectively (Table 1). The bulge was not sufficient and the crumb was hard; thus, the baking quality was compromised.

4. Effects of desorption of ω -gliadin on the physical properties of wheat flour dough

The mixing characteristics of wheat flour dough were then measured using Dougraph. This revealed that after immediately kneading, the electric energy (w) of dough containing ω -gliadin-deficient gliadin was lower than that of dough prepared with

Table 1 The baking quality of bread with the addition of gliadin

	Untreated-gliadin Addition	β -Lg treated-gliadin (ω -gliadin desorbed) Addition
Loaf volume (%)	100 ± 2.0	$94.3 \pm 4.9^*$
Hardness of crumb (%)	100 ± 6.9	$115.6 \pm 10.2^*$

A comparison of the loaf volume and crumb hardness of bread made from dough with untreated gliadin or β -Lg treated-gliadin, which lacks the ω -gliadin. The values for untreated gliadin addition were set at 100, and experiments were repeated 4 times. Asterisks indicate values significantly different from those of untreated gliadin addition ($p < 0.05$)

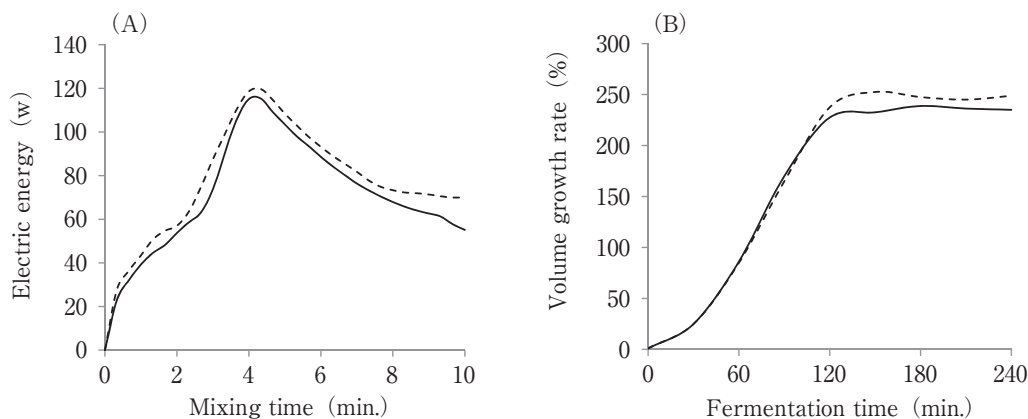


Fig. 5 Mixing curve of wheat dough with the addition of gliadin which ω -gliadin was desorbed, along with the volume growth rate at fermentation

(A) The mixing curb of dough. (B) The volume growth rate of fermented dough. -----, untreated gliadin addition; —, ω -gliadin elimination gliadin addition

untreated gliadin (Fig. 5A).

The volume growth rate during fermentation was then determined. Changes began about 120min after fermentation was initiated, and the volume increase rate of dough with the addition of ω -gliadin-deficient gliadin was low and the gas retention of the dough decreased (Fig. 5B).

It became clear that ω -gliadin is desorbed from gliadin aggregates, the formation of the dough becomes poor and the gas retention of the dough is reduced. This causes the degradation of the baking quality.

The relationship between ω -gliadin and baking quality should thus be studied in detail in future studies in order to improve bread quality.

References

- 1) TANAKA, Y. and MATSUMOTO, H.: Science of bread II : Science of bread materials (Korin, Tokyo), p.55 (1992)
- 2) LARSON, B. L., JENNESS, R., GEDDES, W. F. and COULTER, S. T.: An evaluation of the methods used for determining the baking quality of nonfat dry milk solids, *Cereal Chem.*, **28**, 351~370 (1951)
- 3) VOLPE, T. and ZABIK, M. E.: A whey protein contributing to loaf volume depression, *Cereal Chem.*, **52**, 188~197 (1975)
- 4) HARPER, W. J. and ZADOW, J. G.: Heat induced changes in whey protein concentrates as related to bread manufacture, *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **19**, 229~237 (1984)
- 5) KIKUCHI, C., OKA, D., UENO, H., SHIOTA, M., NOGUCHI, T. and TAKANO, K.: Effect of heat-denaturation of milk protein on the baking quality of milk, *Food Preservation Sci.*, **38**, 211~215 (2012)
- 6) OKA, D., KIKUCHI, C., SHIONO, K., UCHIDA, T., NOGUCHI, T. and TAKANO, K.: Effect of the molecular interaction between wheat proteins and β -lactoglobulin on wheat-flour dough formation, *Food Preservation Sci.*, **39**, 87~91 (2013)
- 7) ASCHAFFENBURG, R. and DREWRY, J.: Improved method for the preparation of crystalline β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin from cow's milk, *J. Biochem.*, **65**, 273~277 (1957)
- 8) IGARASHI, Y.: An improved procedure for the preliminary fractionation of milk proteins, *Int. Dairy J.*, **5**, 305~310 (1995)
- 9) IGARASHI, Y.: Separation of caseins by chemical procedures, *Int. Dairy J.*, **9**, 377~378 (1999)
- 10) HERBERT, W., ANNELIESE, M., WERNER, S. and HANS, D. B.: High - performance liquid chromatography of gliadins from different wheat varieties: Amino acid composition and N-terminal amino acid sequence of components, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **185**, 371~378 (1987)
- 11) HERBERT, W., KARL, J. M. and PETER, K.: Studies on the protein composition and baking quality of einkorn lines, *Eur. Food. Res. Technol.*, **229**, 523~532 (2009)
- 12) FRANCES, M. D., RONALD, C., ROCIO, L. and WILLIAM, H. V.: Sequential extraction and quantitative recovery of gliadins, glutenin, and other proteins from small samples of wheat flour, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1575~1584 (2005)
- 13) KATHRYN, A. C.: The fractionation and purification of gliadins by hydrophobic interaction chromatography, *J. Sci. Food Agr.*, **30**, 185~196 (1979)
- 14) PATNE, P. I., HOLT, M. N., JARVIS, M. G. and JACKSON, E. A.: Two-Dimensional fractionation of the endosperm proteins of bread wheat (*Triticum aestivum*): Biochemical and genetic studies, *Cereal Chem.*, **62**, 319~326 (1985)
- 15) SHEWRY, P. R., MIFLIN, B. J., ELLEN, J. L. and KASARDA, D. D.: The preparation and characterization of an aggregated gliadin fraction from wheat, *J. Experimental Botany*, **34**, 1403~1410 (1983)
- 16) FUTTERMAN, S. and HELLER, J.: The enhancement of fluorescence and the decreased susceptibility to enzymatic oxidation of retinol complexed with bovine serum albumin, β -lactoglobulin and the retinol-binding protein of human plasma, *J. Biol. Chem.*, **247**, 5168~5172 (1972)

β-ラクトグロブリンとグリアジンの 分子間相互作用が製パン性に与える影響

岡 大貴^{*1}・菊池千尋^{*2}・塩野弘二^{*2}

野口智弘^{*1§}・高野克己^{*2}

* 1 東京農業大学応用生物科学部食品加工技術センター

(〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)

* 2 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

(〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)

本研究では、脱脂粉乳中のβ-Lgの作用により水溶化するグリアジンの特定を行い、β-Lgによる製パン性低下の要因について検討を行った。その結果、β-Lgは各グリアジンのうち最も親水性であるω-グリアジンと特異的に相互作用し、グリアジン会合体から同グリアジンが脱離し水溶化することを明らかにした。一方、加熱脱脂乳による製パン性の回復要因は、β-Lgがκ-CNと加熱複合体を形成することで、κ-CNの各グリアジンとの強い親和性によりω-グリアジンへの特異性が打ち消され、ω-グリアジンの脱離が抑制されるためと推察した。さらに、ω-グリアジンを脱離させたグリアジンを小麦粉生地添加到すると、生地形成が不良となり、膨らまない硬いパンになったことから、脱脂粉乳の製パン性低下は、β-Lgの作用によりグリアジン会合体からω-グリアジンが脱離することで惹起されることを明らかにした。

(平成25年2月21日受付, 平成25年8月8日受理)

ニンジン個体あるいは組織が異なる切片の 微生物密度に対する電解水処理の効果

阿部一博^{*1§}・阿知波信夫^{*2}

^{*1} 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

^{*2} ホシザキ電機(株)

Effects of Electrolyzed Acidic Water on the Microorganisms on Sections and Different Tissue of Carrot

ABE Kazuhiro^{*1§} and ACHIWA Nobuo^{*2}

^{*1} Graduate School of Agriculture and Biological Science, Osaka Prefecture University,
1-1 Gakuen-Cho Naka-ku, Sakai, Osaka, 599-8531 Japan

^{*2} Specialized Engineering Department, HOSHIZAKI ELECTRIC CO., LTD.,
3-16 Minamiyakata, Sakae, Toyoake, Aichi, 470-1194 Japan

This study examined the influence of carrot disinfection with electrolyzed acidic water (EAW) on the distribution of microorganisms on each tissue, the changes in microorganisms distribution during storage, and effective disinfection methods using carrot sections. When carrots were disinfected by dipping in EAW, total viable bacterial counts (TVBC) in the cortical layer as well as in the phloem and xylem decreased. During storage, the TVBC in each part of the carrot increased; however the increase was delayed in disinfected carrots. The highest disinfection effect on carrot sections prepared from the cortical layer, phloem, and xylem was observed with sodium hypochlorite solution, followed by EAW, and then purified water. Substitution of air in the intercellular spaces of the phloem and xylem with EAW enhanced this disinfection effect, resulting in a significant reduction of in TVBC in the xylem section. This substitution also increased CO₂ production.

(Received Dec. 13, 2012 ; Accepted Apr. 25, 2013)

Key words : carrot, tissue, section, microorganism, disinfection, substitution

ニンジン, 組織, 切片, 微生物, 殺菌, 置換処理

果実・野菜の品質劣化には生理・化学的变化のみならず、微生物が深く関与しており、貯蔵中の温度・湿度や環境ガス制御あるいはオゾン・オゾン水や次亜塩素酸ナトリウムならびに電解水処理等が微生物的衛生管理技術^{1)~6)}として実用面で適用されて、品質保持が図られている。筆者らも、強酸性電解水（以下では電解水と記述^{7),8)}やストリーマ放電技術⁹⁾による、果実・野菜の流通過程における微生物制御に関する研究を行っているが、果実・野菜には外部のみならず内部組織にも微生物が存在するので完全な殺菌方法は確立されていない。

ニンジンは、主な可食部が根部であり、土壤に接しているために、栽培条件によって微生物密度が大きく異なり¹⁰⁾、外部のみならず個体内部にも多くの微生物が存在

する^{4),5),10)}が、調理・加工のみならず微生物による汚染が生じやすいカット野菜として利用されることが多い。カットニンジンでは、切片の形状が異なると腐敗速度に差異が生じ、木部は師部よりも微生物密度が低い、師部より腐敗しやすい^{11),12)}。筆者らは、師部は木部よりも生理活性が高く、癒傷組織であるカルス形成速度も速いことが、腐敗速度が異なる理由であると報告¹³⁾しており、各組織は生物学・組織学的あるいは食材として異なった特性を有している。

電解水による殺菌処理時に超高速振動を併用することによって電解水が微生物に接しやすくなり、ミツバ¹⁴⁾やカットキャベツ¹⁵⁾では殺菌効果が高まり、カットキャベツ¹⁵⁾では、切片への電解水の浸透が殺菌効果を高めるこ

^{*1} 〒599-8531 大阪府堺市中区学園町1-1

§ Corresponding author, E-mail: abe@plant.osakafu-u.ac.jp

^{*2} 〒470-1194 愛知県豊明市栄町南館3-16

とを報告しており、ニンジン切片においても電解水を組織に浸透することによって微生物密度を低下させる可能性がある。

しかし、ニンジン個体への電解水による殺菌処理が各組織内の微生物に及ぼす影響を詳細に調べた報告はなく、各組織から調製したニンジン切片に対する殺菌効果を調べた報告もない。

本報では、ニンジン個体への電解水处理が各組織の微生物分布に及ぼす影響を明らかにすると共にニンジン切片を材料として効果的な殺菌方法を調べた。

実験材料および実験方法

1. 実験材料と切片の調製

(1) 実験材料 大阪府立大学附属農場で慣行栽培された収穫直後のニンジンを手洗して、供試材料とした。

(2) 材料の使用部位 ニンジンは植物組織学的に特徴ある組織を有しているため、Fig. 1に示した表層部、師部、維管束、木部の各組織を実験に使用した。

(3) 切片の調製

切片Ⅰ；直径10mmのコルクボーラーを個体の表層に直角に貫入して円柱の組織を取り出し、円柱から厚さ1mmのディスクを調製した。最外層のディスクを皮層部切片、それに次ぐ2枚目から維管束外面までのディスクを師部切片、維管束部のディスクを維管束切片、維管束内面から中心部までのディスクを木部切片とした。

切片Ⅱ；組織密度 (Table 1) を測定するために、師部と木部から1cm×1cm×1cmの立方体の切片を調製して、生鮮重と乾燥重を秤量した。

2. 貯蔵方法

洗浄あるいは殺菌処理したニンジンの水分を拭き取り、軽く乾燥させてから、6本を有孔ポリエチレン (30cm×40cm, 厚さ0.03mm) で包装して、20℃で貯蔵した。両区

共に6包装を貯蔵し、適宜、一般生菌数 (以下、生菌数) の測定に使用した。

なお、本報では処理後の貯蔵温度を20℃としたが、果実・野菜を低温で貯蔵しても短期間であれば生菌数は増加しないので、微生物が増加しやすい温度域での効果を調べた。

3. 処理方法

(1) 殺菌方法 殺菌方法として、2方法を設定し、対照区は使用時に加熱滅菌した純水による処理とした。

電解水区；下記の電解水で処理。

次亜塩素酸ナトリウム区；次亜塩素酸ナトリウム (有効塩素濃度200mg/kg) で処理。

対照区；純水で処理。

電解水は、強酸性電解水 (ホシザキ電機製電解水生成装置ROX-20TA, pH2.7以下, 有効塩素濃度30mg/kg) を使用した。

処理時間は、3区共に30秒とした。

(2) 置換処理 切片内の気相と液層の置換は、電解水あるいは純水で行った。

置換処理は、吸引濾過ビン (100ml) に各30mlの純水あるいは電解水を入れた後に、それぞれに各15個の切片Ⅰを浸漬し、容器上部の空気を脱気後に減圧状態を常圧に戻すことによって行った。減圧中は、切片の細胞間隙等に由来する気泡が生じるが、気泡が生じなくなるまで脱気を行い、常圧に戻した時点で切片が水浸状になったことから、切片の細胞間隙の気相が液相に置換されたものとした。

(3) 測定

1) 測定部位：切断面 (Fig. 1) の生菌数の分布を調べた実験では、ニンジン個体を鋭利な包丁で切断して、切断面表層部の組織 (1mm) の生菌数を測定した。

切片あるいは個体内の生菌数を測定した実験では、上記の切片Ⅰを使用した。

二酸化炭素排出量を測定した実験は、上記の切片Ⅰを使用した。

2) 測定方法

生菌数；供試材料を滅菌したガラス板上で細かく切り、試料を滅菌済みのポリ袋に約1g入れた。袋ごとに重量を正確に測定し、試料の9倍量の滅菌水を加えて、ストマッカー (オルガノ社, 80バイオマスタ) で60秒間破碎し、試料と滅菌水が均一に混ざるようにした。破碎後の混濁液を1ml採り、滅菌水9mlを加えて、試料を希釈した。この操作を連続的にを行い、試料を段階希釈した。希釈後の試料を滅菌シャーレに1mlずつ注ぎ、滅菌した標準寒天培地を流し込んで試料と培地がよく混ざるように穏やかに攪拌後に静置した。培地が固まった後に、シャーレを反転して30℃で48時間培養した。その後、寒天培地内に出現した1平板あたりのコロニー数を数えて、生体重1gあたりの生菌数を対数値 ($\log_{10}$ CFU/g) で示した。

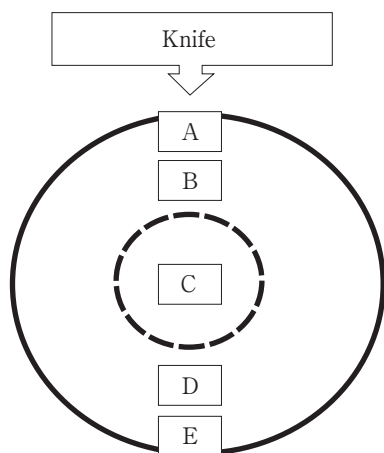


Fig. 1 Tissue of carrot for measurement of total viable bacterial counts (TVBC)

A and E: Cortical layer, B and D: Phloem, C: Xylem.

----- : Vascular bundle.

なお、置換処理を行った実験では、処理によって細胞間隙の気相は純水か電解水に置換され、切片が重くなるので、置換処理前の秤量値を基準に生菌数を計算した。

二酸化炭素排出量：秤量した切片 I（15個）を50ml容積のガラス容器に密閉し、静置（20℃）した。保持1時間後に、容器内の気相を攪拌後に注射器で採取し、ガスクロマトグラム機器を用いて濃度を測定した。二酸化炭素排出量は、ニンジンの生重量1kgあたりの生成量として表した。

両項目は3反復で測定を行い、データは平均値を示した。

結果および考察

1. ニンジン個体に対する殺菌処理効果

（1）外 観 ニンジン個体を純水で洗浄あるいは電解水で殺菌処理を行ったが、外観の変化は全くみられなかった。

（2）切断面の微生物密度 洗浄あるいは殺菌したニンジン個体を滅菌したガラス板の上に置き、滅菌したステンレスナイフで切断し、切断面から1mmの厚さで各組織（Fig.1）を取り出し、生菌数を測定した結果をFig.2に示した。

生菌数が最も多かったのは、皮相部（AとE）であり、次いで多かったのは師部（BとD）で、最も少なかったのは木部（C）であった。各部位とも純水による洗浄によって生菌数はわずかに減少したが、電解水処理によって明らかに減少した。

BとDは、同じ個体内の師部組織であるが、DよりBの方が生菌数は多かった。これは、切断時に生菌数が多い

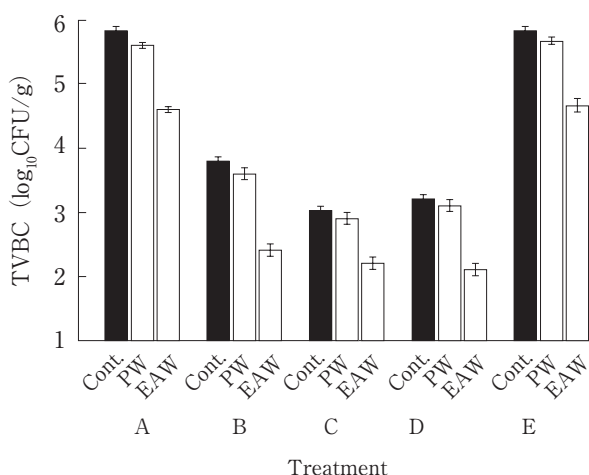


Fig. 2 Total viable bacterial counts (TVBC) on the cut surface of carrot after dipping in purified water (PW) or disinfection with electrolyzed acidic water (EAW)

Cont.: no treatment, A-E: Same sections as in Fig.1. Values are the means of three replicates and bars represent S.E.

Aに触れたナイフによって皮相部の微生物が切断面に塗布されたためである。

生物個体の微生物密度が異なる組織から試料を取り出す場合には、切断処理による微生物の移動を避けなければならない。他の組織からの微生物の移動を最小限にするために、本報ではコルクボーラーで円柱の組織を取り出し、各組織のディスク（切片 I）を調製して以下の測定を行った。

（3）殺菌効果ならびに貯蔵に伴う生菌数の変化 一般的にはニンジン洗浄してから貯蔵・流通するので、純水による洗浄あるいは電解水で殺菌処理したニンジン個体の貯蔵中の生菌数の変化をFig.3に示した。

処理直後では、3部位共に殺菌処理（○，△，□）によって生菌数は減少し、生菌数が最も多い皮相部での減少が最も顕著であった。

貯蔵に伴って3部位の生菌数は増加したが、電解水で処理した個体における増加が純水で洗浄した個体での増加より遅れた。

電解水で殺菌処理を行っても貯蔵に伴って生菌数が増加したが、これは、電解水は残留性がないためである。しかし、貯蔵前に生菌数を減少させることによって、貯蔵中の生菌数の増加は、洗浄しただけのニンジンにおける増加より遅れたことから、初発の微生物密度を低下させることの重要性は明らかである。

2. 殺菌処理がニンジン切片の生菌数ならびに二酸化炭素排出量に及ぼす影響

カット野菜では、微生物密度のみが腐敗速度に影響を及ぼすのではないが、野菜や果実は切断前でも内部に微生物が存在しており¹⁰⁾、切断することによって微生物が増殖して腐敗に至るので、組織内部の微生物制御が重要なことである。

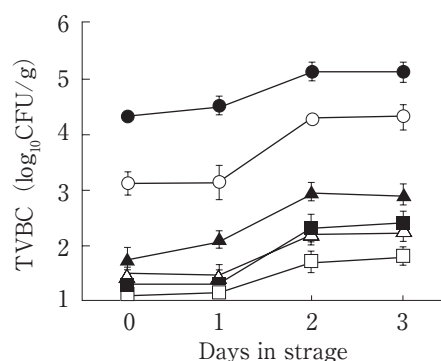


Fig. 3 Effects of dipping in purified water (PW) or disinfection with electrolyzed acidic water (EAW) on total viable bacterial counts (TVBC) in carrot and the changes in TVBC during storage at 20℃

Cortical layer: ●—PW, ○—EAW, Phloem: ▲—PW, △—EAW, Xylem: ■—PW, □—EAW.

Values are means of three replicates and bars represent S.E.

(1) 殺菌剤の浸漬処理が切片の生菌数に及ぼす影響

切片Ⅰを純水への浸漬あるいは電解水や次亜塩素酸ナトリウム水溶液に浸漬することによる殺菌処理を施したが、外観の変化は全く認められなかった。

殺菌処理した切片Ⅰの生菌数をFig. 4に示した。

皮層部切片 (A)、師部切片 (B)、ならびに木部切片 (C) 共に純水の浸漬によって生菌数はわずかに減少した。両殺菌処理によって生菌数は明らかに減少したが、3部位共に電解水による殺菌効果より、次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌効果が高かった。

泉⁴⁾は、弱酸性電解水 (有効塩素濃度50ppm) と次亜塩素酸ナトリウム (同200ppm) で3分間殺菌処理を行った場合には、カットホウレンソウあるいはニンジンスライスやジャガイモダイスに対する殺菌効果は同じであるが、キュウリスライスでは弱酸性電解水による殺菌処理より次亜塩素酸ナトリウムの殺菌効果が高いと報告しており、小関¹⁶⁾は、カット野菜への電解水の処理時間が長い場合には、次亜塩素酸ナトリウムと同等の殺菌効果を示すと報告している。本報においても次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌効果が電解水より高かったが、次亜塩素酸ナトリウムは残留しやすく、千切りキャベツ¹⁷⁾では殺菌処理によってトリハロメタンを発生する等の問題がある。

(2) 殺菌剤の置換処理が切片の生菌数ならびに二酸化炭素排出量に及ぼす影響 ミツバの葉身と純水との懸濁液に電解水を添加すると懸濁液の微生物が死滅すること¹⁴⁾や超音波振動との併用で電解水の殺菌効果が高まることを報告^{14), 15)}しており、ニンジンにおいても電解水が微生物と接触するように処理すれば殺菌効果が上がると思われたので、電解水を組織内の気相と置換した場合の生菌数と二酸化炭素排出量を測定した。

本報では、低濃度・短時間処理が可能であり、次亜塩素酸ナトリウムより残留性が低い電解水を使用した。

1) 殺菌処理効果: 処理した切片の生菌数をFig. 5に示した

師部切片 (A) ならびに木部切片 (B) 共に純水を置換 (PW-S) しても生菌数はほとんど減少しなかったが、電解水を置換 (EAW-S) することによって生菌数は減少し、置換による殺菌効果が高まったのは師部切片より木部切片で顕著であった。

組織が異なると置換による殺菌効果に差異が生じた理由を明らかにするためにニンジンから切片Ⅱを調製して重量を調べ、結果をTable 1に示した。

1 cm³の新鮮重が、師部組織は1.32 gで、木部組織は1.12 gであったことや乾物重が0.26 gと0.13 gであったことから、木部組織は師部組織よりも水分含量が多く、組織内の気相も多いことが明らかとなった。また、置換処理中の切片からの気泡が、師部切片より木部切片で多かったことから木部切片の気相が師部切片より多いことが明らかである。この気相が電解水に置換されて、切片内

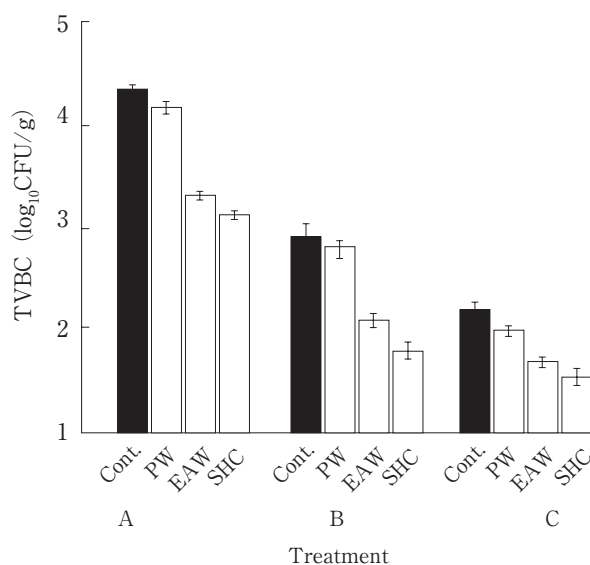


Fig. 4 Effects of dipping in purified water (PW) or disinfection with electrolyzed acidic water (EAW) or sodium hypochlorite solution (SHC) on total viable bacterial counts (TVBC) in sections of carrot

Cont.: no treatment.

A: Cortical layer, B: Phloem, C: Xylem.

Values are means of three replicates and bars represent S.E.

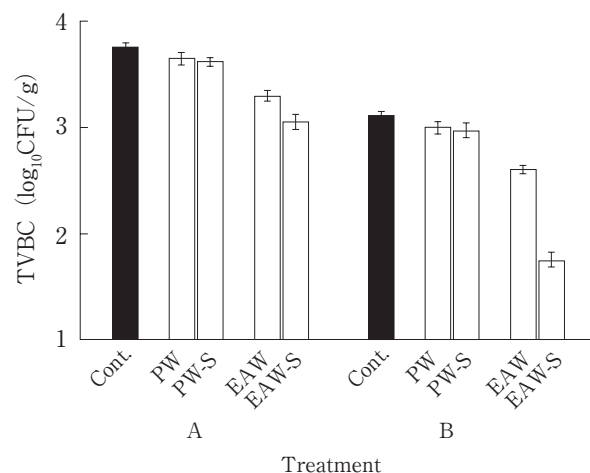


Fig. 5 Effects of dipping in purified water (PW) or disinfection with electrolyzed acidic water (EAW) on total viable bacterial counts (TVBC) in sections of carrot

Cont.: no treatment.

A: Phloem, B: Xylem.

S: Substitution of air in the intercellular space with PW or EAW.

Values are means of three replicates and bars represent S.E.

Table 1 Weight of carrot sections (1 cm × 1 cm × 1 cm)

	Phloem	Xylem
Fresh weight	1.315 ± 0.025 (100)	1.155 ± 0.025 (100)
Dry matter	0.257 ± 0.005 (19.5)	0.126 ± 0.005 (10.9)

Values (g) are means of 10 replicates ± S.E. (%)

で電解水が殺菌効果を示したために木部切片における殺菌効果が高かったと考えている。

CONWAYら¹⁸⁾は、リンゴやジャガイモ個体にCa塩を取り込ませると貯蔵中の硬度が維持され、微生物制御にも効果があると報告し、IZUMIらはカットニンジン¹⁹⁾とカットブッキーニ²⁰⁾をCa塩溶液に浸漬処理することによって貯蔵中の硬さが保持され、微生物の繁殖を抑制すると報告している。その理由として、Caイオンが細胞壁あるいは細胞膜を安定させて強固にし、硬さの保持と微生物の進入に対する抵抗性を高めたと報告している。これらの報告はCaイオンによる間接的な殺菌効果であり、本報の場合は、電解水の直接作用による殺菌効果であると考えられる。

2) 二酸化炭素排出量：Caは、植物の細胞壁や中葉の構成成分なので植物組織が取り込んでも生理活性を高める影響は少ないと思われるが、本報では、塩素を含む電解水を細胞間隙に取り込ませたので、生理活性に影響を及ぼす可能性が考えられた。

殺菌や置換処理を行った切片の二酸化炭素排出量を調べて、結果をTable 2に示した。

無処理の師部切片の二酸化炭素排出量が、木部切片より多いのは、既報の結果¹³⁾と一致する。

純水処理では、浸漬のみであれば両切片共に二酸化炭素排出量の増加はわずかであったが、置換処理によって師部切片が35%の増加を示し、木部切片が48%の増加であった。

電解水処理では、浸漬することによって、師部切片では二酸化炭素排出量が15%の増加で、木部切片では22%の増加であった。電解水の置換処理では、二酸化炭素排出量が顕著に多くなり、師部切片では77%の増加を示し、木部切片では92%の増加であった。

果実・野菜が、切断や衝撃等の物理的ストレス、化学物質等の化学的ストレス、環境温度の変動によるストレス、環境ガスの変化によるストレス等を受けると呼吸量が増加することは、既知の事実である²¹⁾。

Table 2 Influence of dipping or substitution using purified water (PW) or electrolyzed acidic water (EAW) on respiration rate (CO₂ production) of carrot sections at 20°C

	Phloem	Xylem
No treatment	44.1 ± 2.2 (100)	36.9 ± 1.8 (100)
Treatment		
Dip		
PW	45.3 ± 2.3 (103)	37.8 ± 3.1 (102)
EAW	59.4 ± 2.2 (135)	54.5 ± 2.9 (148)
Substitution		
PW	50.5 ± 3.1 (115)	44.9 ± 1.7 (122)
EAW	78.2 ± 3.0 (177)	71.0 ± 2.2 (192)

Values (mg · kg⁻¹ · h⁻¹) are means of 3 replicates ± S.E. (%)

殺菌処理として電解水に切片を浸漬すると二酸化炭素排出量が増加し、殺菌効果を高めるための置換処理によって更に二酸化炭素排出量が増加したが、純水による置換処理によっても二酸化炭素排出量が増加したことから、二酸化炭素排出量の増加は細胞間隙の置換処理に対するストレス応答反応と考えられる。

二酸化炭素排出量が増加することは、切片の生理活性が高まったためであり品質劣化につながるため、殺菌処理後は生理活性を抑制するために低温管理等が必要である。低温管理は生理活性を抑制するのみならず、組織内の微生物の活動も抑制するので、相乗的な品質保持効果が期待できる。

要 約

本報では、ニンジン個体への電解水処理が各組織の微生物分布に及ぼす影響と貯蔵中の変化を明らかにすると共に切片を使用して効果的な殺菌方法を検討した。

電解水への浸漬処理でニンジンを殺菌すると、表層部のみならず師部や木部の生菌数が減少した。貯蔵に伴って各部位で生菌数が増加したが、殺菌処理したニンジンにおける増加が遅れた。

表層部と師部ならびに木部から調製したニンジン切片への殺菌効果は、純水<電解水<次亜塩素酸ナトリウムであった。師部と木部の切片の細胞間隙の気相を電解水で置換すると殺菌効果が高まり、木部切片における生菌数の減少が顕著であった。置換処理は殺菌効果が高まったが、二酸化炭素排出量も増加した。

謝 辞 本報の遂行にあたり、御協力頂いた永田祐理氏ならびに微生物の測定方法とデータの解析に関して多大な御協力・御助言を頂いた大阪府立環境農林水産総合研究所草刈眞一博士に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) 宮尾茂雄：加工用原料野菜の除菌技術，日食保科誌，**24**，267～280（1998）
- 2) 西村喜之・金谷隆文・大久保典昭・岡田和久・花田圭司：新しい展開に入ったオゾン水の利用技術，日食工誌，**2**，103～113（2001）
- 3) 名塚英一・川本伸一：野菜・果実の加工品における衛生管理，日食微誌，**23**，129～136（2006）
- 4) 泉 秀実：カット野菜の品質特性と微生物的安全性，日食保蔵誌，**27**，145～156（2001）
- 5) 泉 秀実：野菜の衛生管理法と微生物管理技術，園学研，**4**，1～6（2005）
- 6) 泉 秀実：カット野菜の安全性と微生物制御技術，日食微誌，**26**，60～67（2009）
- 7) 阿知波信夫：電解水の利用による食品素材の品質向上と微生物的安全性確保に関する研究，日食保蔵誌，**32**，91～99（2006）

- 8) 阿部一博：カット青果物の生理・化学的特性と流通技術に関する研究, 日食保蔵誌, **32**, 283~290 (2006)
- 9) 阿部一博・大霜清典・嘉悦佳子・島 昭二・岡井康二・西浜幸夫・西岡克浩・中嶋洋登：青果物保存中の品質保持と微生物抑制に対するストリーマ放電技術の効果に関する研究, 日本食品保蔵科学会 (北海道) 発表要旨, p. 39 (2011)
- 10) 阿部一博・阿知波信夫・安藤 愛・島 昭二・草刈 眞一：栽培・流通条件が異なるニンジンの組織別にみた微生物数, 日食保蔵誌, **30**, 277~280 (2004)
- 11) 阿部一博・岩田 隆・吉村公一：カットニンジンの生理・化学的变化に関する研究 (第1報) カットニンジンの外観ならびに生理的变化に及ぼす切断方向の影響, 日食工誌, **40**, 101~106 (1993)
- 12) ABE, K., YOSHIMURA, K., TAKAHASHI, T. and CHACHIN, K. : Effects of cutting direction on the changes of microorganisms and pectic substances during holding (Studies on physiological and chemical changes of partially processed carrot - Part IV), *J. Japan. Soc. Cold Preserva. Food.*, **22**, 159~163 (1996)
- 13) 阿部一博・柳井正暁・吉村公一・古川 一・茶珍和雄：組織ならびに切断方向が異なるニンジン切片の生理特性とカルス形成速度の差異, 日食科工誌, **44**, 213~218 (1997)
- 14) 阿部一博・嘉悦佳子・阿知波信夫：強酸性電解水と超高速振動の併用によるミツバの微生物制御, 日食保蔵誌, **38**, 329~334 (2012)
- 15) 阿部一博・嘉悦佳子・阿知波信夫：異なる形状のカットキャベツの微生物密度に対する強酸性電解水と超高速振動の併用処理効果, ベジタリアン・リサーチ, **13**, 5~8 (2012)
- 16) 小関成樹・伊藤和彦：強酸性電解水を用いたカット野菜の殺菌 (第1報), 日食工誌, **47**, 722~726 (2000)
- 17) ACHIWA, N., KATAYOSE M. and ABE, K. : Efficacy of electrolyzed acidic water for fresh-cut cabbage disinfection and quality maintenance, *J. Japan. Soc. Cold Preserva. Food.*, **30**, 281~288 (2004)
- 18) CONWAY, W.S., SAMS, C.E., MCGUIRE, R.G. and KELMAN, A. : Calcium treatment of apples and potatoes to reduce postharvest decay, *Plant dis.*, **76**, 329~334 (1992)
- 19) IZUMI, H. and WATADA, A.E. : Calcium treatments affect storage quality of shredded carrot, *J. Food Sci.*, **59**, 106~109 (1994)
- 20) IZUMI, H. and WATADA, A.E. : Calcium treatments to maintain quality of zucchini squash slices, *J. Food Sci.*, **60**, 708~793 (1995)
- 21) 緒方邦安：青果保蔵汎論 (建帛社, 東京), pp. 34~56 (1977)
- (平成24年12月13日受付, 平成25年4月25日受理)

シークワシャー (*Citrus depressa* Hayata) 搾汁残渣を原料とした有用成分の酢抽出：ノビレチン，シネフリンに着目して

宮城 一 菜^{*1§}・新垣江梨子^{*2}・照屋 亮^{*3}
和田 浩 二^{*4}・太田 英 明^{*5}・広瀬 直 人^{*3}

* 1 琉球大学教育学部

* 2 沖縄総合農産加工 (株)

* 3 沖縄県農業研究センター

* 4 琉球大学農学部

* 5 中村学園大学栄養科学部

Extraction of Nobiletin and Synephrine from the Waste Peels of Shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata) by Using Vinegar

MIYAGI Kazuna^{*1§}, ARAKAKI Eriko^{*2}, TERUYA Ryo^{*3},
WADA Koji^{*4}, OHTA Hideaki^{*5} and HIROSE Naoto^{*3}

* 1 Department of Education University of the Ryukyus, 1, Senbaru, Nishihara-cho, Okinawa 903-0213

* 2 Okinawa Sogo Nosan Kako K.K., 459-1, Taira, Higashi Village, Kunigami-gun, Okinawa 905-1205

* 3 Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, 820, Makabe, Itoman-shi, Okinawa 901-0336

* 4 Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, 1, Senbaru, Nishihara-cho, Okinawa 903-0213

* 5 Department of Nutritional Sciences, Nakamura Gakuen University 5-7-1, Befu, Jyonan-ku, Fukuoka 814-0198

We extracted and studied nobiletin and synephrine from the waste peels of Shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata) by using vinegar. Following examination of extraction using several kinds of solvents, nobiletin quantities were seen to be higher for 5% acetic acid than those for other solvents were. Quantities of synephrine were similar following extraction using all types of solvents. Extracted quantities of synephrine were lower when solvent concentration was low, whereas nobiletin quantities were higher when solvent concentration was high. Moreover, addition of sucrose, at a concentration of 4.8~16.7% in a solvent showed no change in the extracted amount of synephrine, while nobiletin quantities increased after addition of 4.8% sucrose.

(Received Mar. 18, 2013 ; Accepted Jul. 17, 2013)

Key words : Shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata), waste peels, nobiletin, synephrine, vinegar extract

シークワシャー (*Citrus depressa* Hayata), 搾汁残渣, ノビレチン, シネフリン, 酢抽出物

シークワシャー (カンキツ用語集名改訂第2版, 学名: *Citrus daeprssa* Hayata)¹⁾とは, 沖縄現地ではシークワサーと呼称され, 奄美, 沖縄, 台湾に分布し, カンキツ分類学の田中の分類²⁾によれば, 後生カンキツ亜属ミカン区ミカン亜区小果亜類の広葉品類に属する小形の高酸味カンキツである。シークワシャーは日本に自生

するカンキツのひとつであり, 実生の得やすさや接木の親和性, 接木後の特性等から, 台木として活用されている³⁾。

近年, シークワシャー果皮に機能性成分であるノビレチン^{4),5)}やシネフリン⁶⁾が多く含まれることが明らかにされている。シークワシャー果皮に含まれるポリメトキシ

* 1 〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原1番地

§ Corresponding author, E-mail: k_miyagi@edu.u-ryukyu.ac.jp

* 2 〒905-1205 沖縄県国頭郡東村字平良459-1

* 3 〒901-0336 沖縄県糸満市真壁820番地

* 4 〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原1番地

* 5 〒814-0198 福岡県福岡市城南区別府5-7-1

フラボン類 (PMFs) の主要成分であるノビレチンには、発ガン抑制^{7), 8)}やガンの転移抑制⁹⁾, 脳機能改善¹⁰⁾, ラットを用いた実験的肝障害の抑制¹¹⁾が認められており, 疾病予防・改善効果が期待されている。また, シネフリンは, フェネチルアミンの一種であり, アドレナリンと同様に交感神経作動薬としての生理機能を有する。痩身剤に利用されるダイダイ (*C. aurantium* var. *daidai*) 未成熟果からのエキスにはシネフリンやオクトパミン等のカテコールアミン類が含まれ, 脂肪組織での脂肪分解を促進^{12), 13)}するため, その摂取による体重減少の可能性が予想される¹⁴⁾。また, ヒト介入試験において, シネフリンとフラバノン配糖体 (ナリンギン, ヘスペリジン) を同時に摂取した際に, 血圧等に影響を与えず, カロリー消費を促進したという報告がある¹⁵⁾。

このような生理機能成分が豊富に含有されるシークワシャーは, 健康志向や沖縄ブーム等の相乗効果を背景に消費者から注目され, 生産量は平成15年の1,670 t から, 平成21年には3,139 t まで急増した¹⁶⁾。シークワシャー全収量の7~8割は加工向けで, その大部分はジュース用となる。シークワシャーの主要産地である大宜味村では, 平成19年度の生産量2,000 t のうち, 8~10月に収穫された調理用が40 t (2%), 10~12月に収穫された加工用途が1,200~1,400 t (60~70%), 12~2月に収穫された生食用が400 t (20%) となっている¹⁷⁾。

シークワシャーのジュース加工における搾汁効率は50%程度であり, その搾汁過程で, 果皮を含む加工副産物 (以降, 搾汁残渣) が大量に排出されている。前述のノビレチンやシネフリンのような有用成分は果皮に多く含有されることから, 有用成分を著量に含む搾汁残渣の用途開発が求められている。

食酢は, 塩の次に古い調味料といわれており, 食品の貯蔵効果の役割を担っている。食酢は料理の味を引き立てるだけでなく, 食欲増進や疲労回復などに利用されてきた。すなわち, 食酢の生理機能に関して研究がなされるようになり, 食酢の長期摂取が中等症高血圧者, 正常高血圧者, 軽症高血圧者に対して, 血圧を低下させること¹⁸⁾, 境界域および軽度高コレステロール血症者の血清総コレステロール値を低下させることが確認されている¹⁹⁾。また, 食事とともに, 食酢を含む飲料またはワカメの酢の物を摂取することにより, 食後の血糖上昇を抑制させることが報告されている²⁰⁾。

本報では, 調味料原料として直接利用が可能で, かつ, 微生物的リスクが低いなど小規模加工への展開が容易である食酢に着目し, 有用成分であるノビレチンとシネフリンを含む搾汁残渣から食酢による抽出効率を検討した。また, 食品で最も重要な「美味しさ」という視点を保ちながら, 飲用用途の利用を想定し, 食酢の種類, 濃度およびシヨ糖の添加についても併せて検討した。

実験方法

1. 試料

大宜味村で2010年7月下旬に収穫されたシークワシャー果実 (系統名 ‘大宜味クガニ’) を用いて, 沖縄総合農産加工場 (沖縄県東村) で搾汁された残渣を同一ロットから採取した。搾汁残渣を, 砥石を装着した湿式微粉碎機 (スーパーマスコロイダー: MKZA10-20J, 砥石 MKE10-45 #K, いずれも増幸産業 (株)) により平均回転数2,000 rpmで磨砕処理を行い, ペースト化した。マスコロイダー処理した果皮ペーストを凍結乾燥機 (東京理化器械 (株) 製, FDU-2100) にて凍結乾燥し, ミル (岩谷産業 (株) 製, IFM-600) で粉碎した粉末を試験に供した。また, 抽出前処理の検討では, 凍結乾燥処理に代えて恒温湿度乾燥機 (エスベック (株) 製, EX-111) で25℃・7時間の冷風乾燥処理を行った。

2. 溶媒

抽出溶媒には, 食酢として市販のリンゴ酢, 穀物酢, および特濃酢 (いずれも (株) ミツカングループ本社製) を使用した。また, 酢酸およびエタノールは和光純薬工業 (株) の特級試薬を用いた。

3. 酢抽出の検討

(1) 抽出溶媒の選定 穀物酢, リンゴ酢, 5%酢酸溶液, 70%エタノール, および蒸留水200 gに乾燥処理した試料10 gを浸漬して密封し, 常温室内暗所にて4週間静置した。

(2) 抽出溶媒濃度の検討 各濃度の穀物酢 (酸度2.1%, 4.2%および8.4%) を抽出溶媒として200 gを用い, 乾燥試料10 gを浸漬した。

(3) シヨ糖添加の検討 穀物酢200 gに対してシヨ糖を10, 20, 40, および100 g (それぞれ4.8, 9.1, 16.7および33.3%となる) 添加して抽出溶媒を調製し, 乾燥試料10 gを浸漬した。

4. 測定項目

PMFs分析: 標準品ノビレチンをメタノール/DMSO (1/1) で溶解し, 0.5 mg/mlの標準溶液とした。酢抽出液3.0 mlにエタノール7.0 mlを添加攪拌後, 超音波抽出 (30 min) を行った。遠心分離 (5,000 rpm, 15 min) 後, 上清をフィルター (アドバンテック東洋 (株) 製, 0.45 μ m) で濾過し, HPLC分析に供した。HPLC条件は以下のとおりである。

カラム: Cadenza CD-C18, 3 μ m (ϕ 3.0×100 mm)

移動相: 60%メタノール-10 mMリン酸

流速: 0.45 ml/min

カラム温度: 40℃

注入量: 5 μ l

検出波長: 340 nm

シネフリン分析⁶⁾: シネフリン標準品 (シグマアルドリッチジャパン製) を移動相で溶解し, 0.2 mg/mlの標準溶液とした。酢抽出液をフィルター濾過 (Advantec,

0.45 μm) 後, HPLC分析に供した。HPLC条件は以下のとおりである。

カラム: Develosil ODS-5, 5 μm ($\phi 4.6 \times 250$ mm)

移動相: アセトニトリル/ H_2O (2/98) - 10 mM

リン酸

流 速: 0.8 ml/min

カラム温度: 35 $^{\circ}\text{C}$

注入量: 5 μl

検出波長: 223 nm

HPLC分析に使用した装置はすべて (株) 島津製作所製のLC-20シリーズを用いた。また, HPLCの分析値は, 平均値 ($n = 3$) で示した。

結果および考察

1. 抽出前処理の検討

試料の抽出前処理として, 凍結乾燥, 冷風乾燥および未処理 (未乾燥) の果皮ペーストを用い, リンゴ酢にて4週間浸漬を行った。その結果, 最もノビレチン, シネフリン抽出含量が多かったのは, 4週目では凍結乾燥処理区でノビレチン34.7 mg/100 ml, シネフリン22.1 mg/100 mlであった。未乾燥区ではノビレチン10.1 mg/100 ml, シネフリン7.9 mg/100 ml, 冷風乾燥区ではノビレチン11.6 mg/100 ml, シネフリン7.6 mg/100 mlで, 凍結乾燥処理区と比較して抽出量が約1/3倍に減少した。これは, 凍結乾燥処理を行うことで, 間隙水として存在する水が凍結後氷から昇華するため, 多孔質²¹⁾となった空洞に溶媒が入りやすくなり, 結果として抽出効率が上がったのではないかと推察された。この結果より, 以降の試験では凍結乾燥処理した果皮ペーストを供試した。

2. 抽出溶媒の選定

ノビレチン抽出量は, 穀物酢, リンゴ酢, 70%エタノールでは1週目から4週目まで7 mg/100 ml前後とほぼ同値で推移したが, 5%酢酸溶液は全浸漬期間を通して13.5~15.1 mg/100 mlと他の溶媒よりも2倍程度の高値を示した。穀物酢とリンゴ酢の酸度はそれぞれ4.2%と

5.0%であり, 5%酢酸溶液と同程度であることから, 食酢に含有される酢酸以外の物質やpHがノビレチンの抽出効率に影響を及ぼしていることが推測される。実用レベルでは抽出効率の差が利益に大きく影響するため, 詳細な検討が必要である。一方, シネフリンは各溶媒間において有意な差異はみられず, 1週目以降では10 mg/100 ml前後となった (Fig. 1)。なお, 蒸留水を用いた場合には, 浸漬1週目で腐敗した。シークワシャー搾汁残渣を抽出する溶媒は, 一般的に入手し易く安価なほうが好ましく, 食品としての用途を考慮すると, イメージの良い穀物酢とリンゴ酢の2つに絞られるが, 今回の検討で穀物酢とリンゴ酢に目立った差はみられなかったため, 安価な穀物酢を以降は用いることとした。

3. 溶媒濃度の検討

穀物酢 (酸度4.2%) およびその0.5倍希釈液 (酸度2.1%), 酸度が穀物酢の2倍である特濃酢 (酸度8.4%) を使用し, 有用成分抽出量を比較した。その結果, ノビレチンは酸度が高くなるほど抽出量が多く, 抽出量が平衡に達したと考えられる2~4週目の平均値で, 酸度8.4%では4.2%の1.26倍, 2.1%の1.18倍となった。一方, シネフリンは, 抽出量に顕著な差異はみられなかった (Fig. 2)。これらの結果より, 酸度が高くなると, 有用成分の抽出量も高くなる傾向にあるものの, 食品素材としての利用を考慮すると, 酸度が低いほうが配合割合を高くすることが可能となり, 機能性を生かすという観点からは, 穀物酢 (酸度4.2%) が有効と推察された。

4. ショ糖添加の検討

穀物酢にショ糖を4.8~33.3%濃度になるように添加して抽出を行ったところ, ノビレチンはショ糖添加4.8%で最も抽出量が多くなった (Fig. 3)。前項と同様に2~4週目のノビレチン抽出量を比較すると, 無添加 (6.2 mg/100 ml) に対して4.8%添加 (10.0 mg/100 ml) では1.61倍, 9.1%添加 (8.4 mg/100 ml) では1.35倍, 16.7%添加 (7.2 mg/100 ml) では1.15倍となった。一方, シネフリンでは, 各試験区間に顕著な差異は検出されなかつ

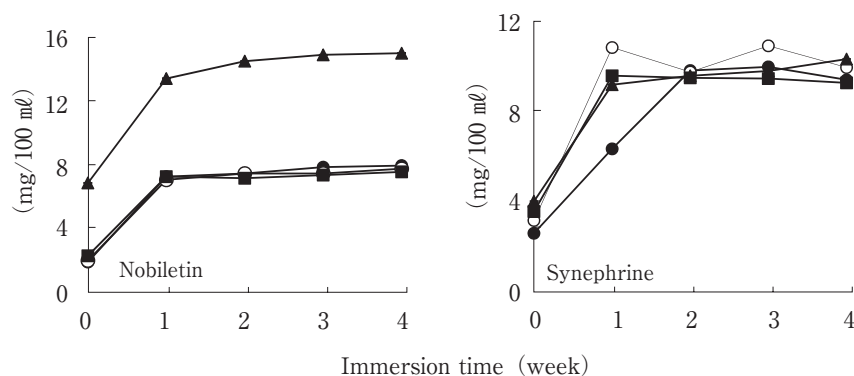


Fig. 1 Extraction rates of extraction solvents and effective components

● Apple vinegar, ○ Cereal vinegar, ▲ 5% acetic acid, ■ 70% ethanol

Freeze-dried peels (10 g) were immersed in 200 g of a solvent.

Reported values are expressed as mean ($n = 3$).

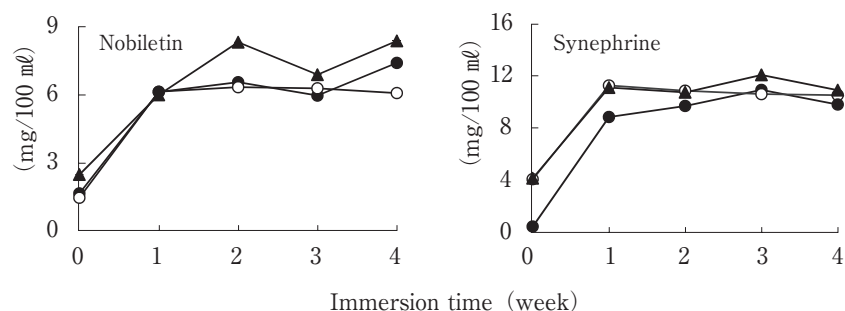


Fig. 2 Acidity of extraction solvents and extraction rates of effective components

● 2.1% acidity, ○ 4.2% acidity, ▲ 8.4% acidity

Freeze-dried peels (10 g) were immersed in 200 g of cereal vinegar.

Reported values are expressed as mean (n=3).

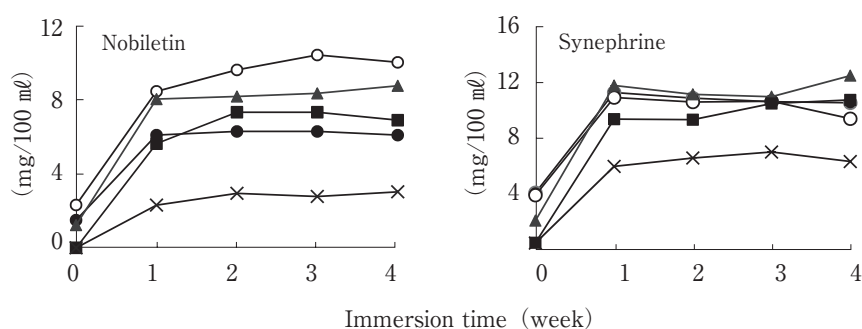


Fig. 3 Concentrations of sucrose and extraction rates of effective components

● Control, ○ 10 g (4.8% sucrose), ▲ 20 g (9.1% sucrose), ■ 40 g (16.7% sucrose), × 100 g (33.3% sucrose)

Freeze-dried peels (10 g) were immersed in 200 g of cereal vinegar.

Reported values are expressed as mean (n=3).

た。また、33.3%添加では、いずれの場合においても無添加より抽出量が少なくなった。飲用酢としての展開を考慮すると食味向上のうえでショ糖の添加は欠かせないものである。ショ糖20%以下の添加なら食味に大きな影響はないことから、酢抽出においてはショ糖の添加によって有用成分の抽出効率が上がるため、ショ糖の添加は有効かと推測された。甘味は美味しさに大きく影響することから、官能的側面の検討を加える必要がある。

現在、シークワシャー加工用途の大部分をジュースが占めている。シークワシャーブーム時である2005年の後藤ら²²⁾によるインターネットを利用した調査があり、さらにブーム後の2009年には山城ら²³⁾が同様の調査を行って、ニーズの変化と新たな利用意向の解析を行っている。加工用途の主力である100%ジュースは、2005年、2009年のいずれも「今後利用してみたいシークワシャー関連商品」の上位に位置しているが、2005年の1位から2009年には5位と順位を落としている。これに対して、「ポン酢調味料」や「ドレッシング」が2005年の3位、4位から2009年には1位、2位と順位を上げている。

本報告において、未利用資源であるシークワシャー搾汁残渣を穀物酢に浸漬することで、ノビレチンやシネフ

リンなどの有用成分を含有した「シークワシャー酢」製造の可能性を示した。今後、新たな消費ニーズである「調味料」「ドレッシング」に利用可能な酢抽出法について開発を進めると共に、食酢の特性をも利用した、多様な食品機能性を有する新規な食品素材として、研究を進めていきたい。

要 約

ノビレチンやシネフリン等の生理機能性成分を豊富に含むシークワシャー搾汁残渣の有効利用を目的とし、食酢を用いた有用成分抽出について検討した。

ノビレチンは5%酢酸溶液でよく抽出され、穀物酢、リンゴ酢、70%エタノールによる抽出量は同程度であった。シネフリンは、いずれの溶媒でも大きな差異はみられなかった。溶媒濃度が低いとシネフリン抽出量が少なく、溶媒濃度が高いとノビレチンの抽出量が多くなる傾向がみられた。また、ショ糖を4.8%添加することで、ノビレチンの抽出量が多くなった。

本研究の一部は、県産農産加工品開発事業（沖縄県農林水産部）において実施した。

文 献

- 1) 国際柑橘学会日本支部編：カンキツ用語集（改訂第2版），pp.126～127（1999）
- 2) TANAKA, T. : Misunderstanding with regards Citrus classification and nomenclature, *Bull. Univ. Osaka, Pref. Ser. B.*, **21**, 139～145（1969）
- 3) 特産果樹情報提供事業検討委員編：特産果樹情報提供事業報告書（シイクワシャー），中央果実基金調査資料，No.173（財団法人中央果実生産出荷安定基金協会，東京），p.1（2000）
- 4) NOGATA, Y., SAKAMOTO, K., ISHII, T., YANO, M. and OHTA, H. : Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 178～192（2006）
- 5) OZAKI, K., ISHII, T., KOGA, N., NOGATA, Y., YANO, M. and OHTA, H. : Quantification of nobiletin and tangeretin in citrus by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Food Sci. Technol. Res.*, **12**, 284～289（2006）
- 6) MIYAGI, K., FUJISE, T., KOGA, N., WADA, K., YANO, M. and OHTA, H. : Synephrine in Shikuwasha (*Citrus depressa* Hayata) : Change during fruit development, and its distribution in citrus varieties, *Food Sci. Technol. Res.*, **15**, 389～394（2009）
- 7) MURAKAMI, A., NAKAMURA, Y., TORIKAI, K., TANAKA, T., KOSHIBA, T., KOSHIMIZU, K., KUWAHARA, S., TAKAHASHI, Y., OGAWA, K., YANO, M., TOKUDA, H., NISHINO, H., MIMAKI, Y., SASHIDA, Y., KITANAKA, S. and OHIGASHI, H. : Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice, *Cancer Research*, **60**, 5059～5066（2000）
- 8) KOHNO, H., YOSHITANI, S., TSUKIO, Y., MURAKAMI, A., KOSHIMIZU, K., YANO, M., TOKUDA, H., NISHINO, H., OHIGASHI, H. and TANAKA, T. : Dietary administration of citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats, *Life Sciences*, **69**, 901～913（2001）
- 9) MINAGAWA, A., OTANI, Y., KUBOTA, T., WADA, N., FURUKAWA, T., KUMAI, K., KAMEYAMA, K., OKADA, Y., SATO, T., ITO, A. and KITAJIMA, M. : The citrus flavonoid, nobiletin, inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma in SCID mice, *Jpn. J. Cancer Res.*, **92**, 1322～1328（2001）
- 10) ONOZUKA, H., NAKAJIMA, A., MATSUZAKI, K., SHIN, R. W., OGINO, K., SAIGUSA, D., TETSU, N., YOKOSUKA, A., SASHIDA, Y., MIMAKI, Y., YAMAKUNI, T. and OHIZUMI, Y. : Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and A β pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **326**, 739～744（2008）
- 11) AKACHI, T., SHIINA, Y., OHISHI, Y., KAWAGISHI, H., MORITA, T., MORI, M. and SUGIYAMA, K. : Hepatoprotective effects of Flavonoids from Shekwasha (*Citrus depressa*) against D-galactosamine-induced liver injury in rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **56**, 60～67（2010）
- 12) MORO, C. O. and BASILE, G. : Obesity and medicinal plants, *Fitoterapia*, **71**, S73～S82（2000）
- 13) TSUJITA, T. and TAKAKU, T. : Lipolysis induced by segment wall extract from Satsuma mandarin orange (*Citrus unshiu* Mark.), *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **53**, 547～551（2007）
- 14) FUGH, B. A. and MYERS, A. : *Citrus aurantium*, an ingredient of dietary supplement marketed for weight loss : Current status of clinical and basic research, *Exp. Biol. Med.*, **229**, 698～704（2004）
- 15) STOHS, S. J., PREUSS, H. G., KEITH, P. L., MILLER, H. and KAATS, G. R. : Effects of p-synephrine alone and in combination with selected bioflavonoids on resting metabolism, blood pressure, heart rate and self-reported mood changes, *Int. J. Med. Sci.*, **8**, 295～301（2011）
- 16) 沖縄県農林水産部：沖縄の農林水産業，p.23（2011）
- 17) 金城秀安：南西諸島の香酸カンキツ「シイクワシャー」について，柑橘研究，**17**，137～148（2007）
- 18) 梶本修身・大島芳文・多山賢二・平田 洋・西村 明・塚本義則：食酢配合飲料の正常高値血圧者および軽症高血圧者に対する降圧効果，健康・栄養食品研究，**6**，51～68（2003）
- 19) 伏見宗士・大島芳文・岸 幹也・西村 明・梶本修身・塚本義則：食酢飲料の血清総コレステロールに及ぼす影響および安全性の検討，健康・栄養食品研究，**8**，13～26（2005）
- 20) 稲毛寛子・佐藤由美・榊原章二・佐久間美幸・木村修一：健康な女性における食酢の食後血糖上昇抑制効果，日本臨床栄養学会誌，**27**，321～325（2006）
- 21) 荒木徹也・上西浩史：冷凍空調が地球を救う（後）—食のグローバル化と冷凍空調—，2. 冷凍食品の加工技術，2.3 凍結乾燥の技術動向，冷凍，**80**，13～18（2005）
- 22) 後藤一寿・相原貴之：シークワシャーの新製品開発コンセプト調査結果，九州沖縄農業研究センター総合研究部（編）九州沖縄農業経営研究資料第8号，pp.24～29（2006）
- 23) 山城 梢・恩田 聡・後藤一寿・相原貴之：シークワシャー消費ニーズの変化，沖縄農業研究会第49回大会要旨集，pp.15～16，沖縄（2010）
（平成25年3月18日受付，平成25年7月17日受理）

国産赤ワインにおける フェノール系オフフレーバーの発生頻度

恩田 匠^{*§}・小松 正和^{*}

^{*} 山梨県工業技術センター支所ワインセンター

Frequency of Phenolic Off-flavors in Red Wines Produced in Japan

ONDA Takumi^{*§} and KOMASTU Masakazu^{*}

^{*} Yamanashi Wine center, Yamanashi Industrial Technology Center,
2517 katsunuma, Katsunuma-cho, Kousyu-shi, Yamanashi 409-1316

Recently, the prevention of phenolic off-flavors (*phénolé*) has become the focus in red wine making. We investigated the frequency of *phénolé* in 386 samples of commercial red wines produced in Japan. Almost 80% of the samples contained *phénolé* at a concentration of 0.100 mg/ℓ. We think that most of the red wines produced in Japan are of high quality and contain minimal *phénolé*. The yeast strains belonging to the genus *Brettanomyces* were detected in some wine samples that contained high concentrations of *phénolé*. These wine samples also showed high pH values.

(Received May 21, 2013 ; Accepted Jul. 18, 2013)

Key words : red wine, flavor, phenole, contamination, *Brettanomyces*

赤ワイン, 香り, フェノレ, 微生物汚染, プレタノミセス

ワインには多様な香り物質が含まれ, その複雑な構成が製品の品質を大きく左右する。ブドウ果実や発酵に由来する健全で良好な香り物質が, 好ましいバランスでワインに含まれることが重要である。しかしながら, しばしば様々な原因, 特に醸造や保蔵上の過誤により, 様々なオフフレーバー (欠陥臭) がワインに付与されることがあり, 製品の品質低下や劣化が引き起こされることがある。したがって, ワイン製造では, このオフフレーバーの発生防止がきわめて重要である。

赤ワイン製造は, 白ワインと比べてより煩雑な工程を経て, 製品化されるまでに長期間を要する。特に, 果皮とともに発酵を行う「醸し発酵」工程や, アルコール発酵後の乳酸菌による「マロラクティック発酵」工程, さらに樽などを用いた貯蔵・熟成工程があり, 瓶詰め後に長期保蔵される期間も長いことから, 酸化や雑菌類の汚染などの劣化が生じる機会が多くなる。このことから, 従来の国産赤ワインでは, 産膜酵母や酢酸菌などの微生物汚染と酸化に伴う強いオフフレーバー (欠陥臭), すなわち酢酸エチル, アセトアルデヒド, 酢酸などが検出されることがしばしばあった。しかしながら, 近年ではこれらの強いオフフレーバーが高濃度で検出されるような, 著しく劣化したワインの頻度は少なくなってきた。

る。

一方で, 近年注目されるようになっている, 赤ワインのオフフレーバーに, 「フェノレ (*phénolé*)」^{1)~3)}と通称されるフェノール系のオフフレーバー⁴⁾がある。フェノレは, 古くはフランス・ボルドー地方の赤ワインに特徴的な香りと考えられ, 必ずしもオフフレーバーとして認識されてこなかった経緯がある。しかしながら近年になって, このフェノレの本体は, 主に赤ワインの貯蔵熟成・保蔵期間において, *Brettanomyces* (プレタノミセス) 属酵母が汚染することで, 同酵母から生成される 4-エチルフェノール (以下, 4-EP) と 4-エチルグアイアコール (以下, 4-EG) であることが判明した。これらは, 低濃度でもワインの良好な香りをマスキングし, 高濃度になると「馬小屋臭」, 「動物臭」, 「薬品臭」あるいは「燻製臭」とも表現される強い異臭となる, オフフレーバーであることが強く認識されるようになった。最近になって, 本邦のワイン審査会においても, このフェノレによる欠陥を指摘することが多くなり, 強く注意が払われるようになってきた。

この赤ワインのフェノレについての研究は, ボルドー大学を中心に進展^{1)~3)}してきた。本邦では, 篠原らによって, いくつかの基礎的な研究^{4)~6)}が行われ, その中で

^{*} 〒409-1316 山梨県甲州市勝沼町勝沼2517

[§] Corresponding author, E-mail: onda-wkk@pref.yamanashi.lg.jp

国産赤ワイン13点について4-EPの定量分析⁶⁾が行われたが、国産赤ワインとしてのフェノレの発生頻度を明らかにするには至っていない。そこで、本研究では、現状における、国産赤ワインのフェノレの発生頻度を明らかにすることを目的とした。

実験方法

1. 供試ワイン試料

供試赤ワイン試料として、2010年から2012年の間に、無作為に入手した市販国産赤ワイン386点を用いた。この供試赤ワインの内訳としては、原料ブドウで大別して、カベルネ・ソーヴィニヨンやメルロなどのいわゆる欧州系原料を主要品種とした、いわゆる「欧州系 (*Vitis vinifera* grape varieties)」153点、マスカット・ベリーAやブラック・クイーンなどの国内改良系や北米系を主要品種とした、「非欧州系 (non-*Vitis vinifera* grape varieties)」233点である。サンプルの醸造年は最も古いもので2002年、新しいもので2012年、2009年のものが最も多く、2010年が次に多かった。

また、参考として、市販のフランス・ボルドー産赤ワイン13点（価格5,000～9,000円台）についても同時に分析用試料として供試した。

2. フェノレの分析

供試赤ワイン中の4-EPおよび4-EGの定量分析は、液体クロマトグラフ質量分析 (UPLC-MS/MS) 法により、超高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析計システムを用いて実施した。すなわち、まず供試ワインについて、0.20 μ mのメンブランフィルターでろ過し、分析試料とした。次に、分析試料を、UPLC-MS/MS装置 (Acquity, Waters社製) を用いて、専用カラム (BEH C181.7 μ m, 2.1mm $\times$ 50mm, Waters社製) を装着した超高速液体クロマトグラフ (UPLC) で分離を行い、四重極型質量分析計 (MS/MS) で定量した。溶離液には、水-アセトニトリル混合溶液を用い、その溶出条件については、① 流速0.6ml/min., ② グラジエント (0 min. から95:5, 3 min. 後まで55:45, 3.1min. 後まで4 min. 後まで5:95, その後95:5) とした。

各種濃度に調整した標準液について、本法により分析し、ピーク面積から検量線を作成して、各フェノレ成分の定量を行った。標準液は、4成分の市販試薬 (4-EPと4-EG) および白ワインのフェノレとして問題となる4-ビニルフェノール、4-ビニルグアイアコールの2種を100%エタノールに各種の濃度で溶解した後、13%エタノール水溶液に調製したものをを用いた。

3. ワインの一般成分分析

ワインの亜硫酸濃度やpHなどの一般成分の分析は、国税庁所定分析法および常法によった。

4. 微生物分析

供試ワイン中の、フェノレの原因微生物である、*Brettanomyces*属酵母細胞の検出を、抗原抗体反応を用い

て特異的に検出する市販検査キット (Z-Wine Assay, Unitech Scientific LLC社製) を用いて行った。すなわち、供試ワイン1mlについて、遠心分離 (8,000rpm, 5分間) を行い、上清を取り除き、沈殿に、脱色液A 1mlを加え、よく混和した。この混和液を遠心分離して、上清を取り除く洗浄操作を繰り返した。得られた沈殿に、懸濁溶液Bを40 μ l 加え、よく混和した。Z-brettチップのウエル部分に5 μ l 添加した。このチップをシャーレに入れ、45℃で最低30分間乾燥させた。次に、ブロック/脱色液C 10mlをシャーレに入れ、チップを液体中に沈め、15分間放置した。ピペットで、ウエル部分の色素を洗い流した後、抗プレート液D 240 μ l と接合液F 240 μ l をシャーレに加え、混和後30分間放置した。シャーレから液体を除去し、緩衝液E 10mlを加え、結合液F 240 μ l を添加した。シャーレから液体を除去し、緩衝液Eを用いて、洗浄を繰り返した。反応液G-1 10mlと活性反応液G-2 0.1mlを混合した。この混合液をシャーレに加え、20分間放置し、シャーレから液体を除去した。チップを蒸留水で洗浄して、5分間風乾した。ウエル部分に現れるシグナル (紫色の染色スポット) の強度を、チップにあらかじめ設置されている標準シグナルと比較して、陰性か陽性 (菌濃度; 10⁴個/ml未満, 10⁴個/ml, 10⁵個/ml, 10⁶個/mlまたは10⁶個/ml超) を判断した。

実験結果および考察

4-EPと4-EGの閾値は、CHATONNET²⁾により、赤ワイン中においてそれぞれ単体では、0.605mg/l および0.110mg/l (水中ではそれぞれ0.130mg/l および0.025mg/l) と報告されている。また、4-EPと4-EGを赤ワイン中での典型的な存在比率²⁾である10:1で混合したときの閾値は、0.369mg/l であるとされている。

市販国産赤ワイン386点についての分析の結果、4-EPの平均値は0.098mg/l (標準偏差0.157) であり、最も高かったもので1.665mg/l であった (Table 1)。4-EGの平均値は0.023mg/l (標準偏差0.046) であり、最も高いもので0.337mg/l であった。いくつかの海外におけ

Table 1 Concentraions of phenolic off-flavors in the 386 of tested red wines produced in Japan

	4-ethyphenol (mg/l)	4-ethylguaicol (mg/l)
average	0.098	0.023
standard deviation	0.157	0.046
maximum	1.665	0.337
minimum ¹⁾	ND ²⁾	ND ²⁾

4-Vinylphenol and 4-vinylguaicol were not detected among most samples.

1) Limited detections were 0.005mg/l at 4-ethylphenol and at 0.010mg/l at 4-ethylguaicol, respectively.

2) ND; not detected.

る報告^{1)~3)}と同様に、国産赤ワインのフェノレの定量分析値においても、ワイン試料間で大きなバラツキがあることが分かった。白ワインで問題となるフェノレ（4-ビニルフェノール、4-ビニルグアイアコール）については、いずれのワイン試料からも、ほとんどトレース程度（0.020mg/ℓ付近）しか検出されなかった。このことは、4-EPと4-EG生成経路の前駆物質であるこれらの2つのフェノレが、赤ワインには残存しないとする知見¹⁾を裏付ける結果となった。

CHATONNETら²⁾の1992年に行われた初期の研究においては、フランス産赤ワイン83点の4-EPおよび4-EGの平均値は、それぞれ0.440mg/ℓ（標準偏差0.179, 最大値6.047mg/ℓ）および0.082mg/ℓ（標準偏差0.230, 最大値1.561mg/ℓ）であった。分析した赤ワインの約1/3が閾値以上の4-EPを含むことが報告されている。なお、今回の研究で、比較対象として、無作為に選抜したフランス・ボルドー産の市販赤ワイン13点について、同様に分析を行った結果、4-EPおよび4-EGの平均値は、それぞれ0.169mg/ℓ（標準偏差0.563, 最大値0.482mg/ℓ）および0.046mg/ℓ（標準偏差0.132, 最大値0.098mg/ℓ）であった。

今回の国産赤ワインの4-EPの定量分析結果についての、各品種グループ（欧州系と非欧州系）別の発生頻度の分布を、Fig.1に示した。欧州系と非欧州系ともに、全く健全な品質と言える0.100mg/ℓ未満のサンプルが、全体の82%を占めた。閾値を超えていると考えられる4-EPが0.400mg/ℓ以上の試料は、供試試料全体で13試料（3.9%）のみ存在した。以上のことから、大多数の国産赤ワインは、フェノレ汚染に関しては健全であることが明らかとなった。

欧州系と非欧州系の試料間での違いとしては、非欧州系の試料には、4-EPが0.500mg/ℓ以上の高いフェノレ濃度を示す試料が多く存在する傾向が認められた（Fig.1）。

*Brettanomyces*属酵母の検出キットを用いた解析の結果、（図表には示さないが）0.100mg/ℓ以上の4-EPが検出された試料（71点、全体の18%）からは、 10^4 個/ℓ以上～ 10^6 個/ℓ超の細胞が検出された。なお、フェノレが検出されなかった試料からも、全体の約10%の試料において低濃度の*Brettanomyces*属酵母細胞が検出され、今後の検討課題と考えられた。いずれにしても、*Brettanomyces*属酵母が国産赤ワイン製造において、一定の頻度で分布していることが確認された。なお、前述した4-EPが0.400mg/ℓ以上であった13試料については、 10^6 個/ℓあるいは 10^6 個/ℓ超の高い濃度の細胞が検出された。この13試料は、供試試料全体の平均pHが3.55のところ、pH 3.7～4.1と高い値を示した。

ワインのpHが高くなると、同じ遊離亜硫酸濃度であっても、殺菌効力をもつ分子状亜硫酸濃度が低くなることが分かっている。これらのワイン試料は、赤ワインの

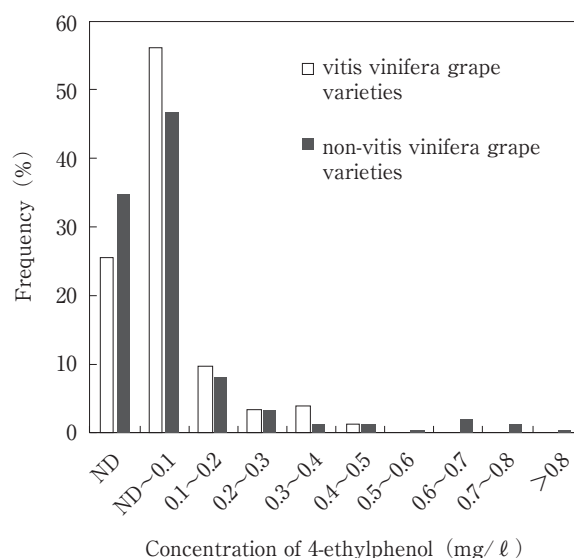


Fig.1 Frequencies of phenolic off-flavors in the tested red wines classified according to their concentrations of 4-ethylphenol

The 386 wine samples contained 153 samples belonging to *Vitis vinifera* grape varieties (white bar) and the remaining 233 to non-*Vitis vinifera* grape varieties (black bar).

貯蔵熟成あるいは保蔵期間中に、*Brettanomyces*属酵母が生育しやすかった可能性が考えられた。したがって、フェノレの発生防止には、亜硫酸管理とともにpHの管理が重要であることが示唆された。

要 約

国産赤ワインにおけるフェノール系オフフレーバー（フェノレ）汚染の現状把握を目的とした。現状の市販国産赤ワインには、その約80%がほとんどフェノレを含まないことが分かった。また、高い濃度でフェノレが検出されたワイン試料からは、高い濃度で*Brettanomyces*属酵母の細胞が検出された。フェノレ含量が高い試料のpHは高い値を示した。

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構研究成果展開事業研究成果最適展開支援プログラム（A-STEP; Adaptable and Seamless Technology Transfer Program through target-driven R&D）フィージビリティスタディ【FS】探索タイプ（Exploratory Research）における成果を含みます。

文 献

- 1) RIBÉREAU-GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A., DUBOURDIEU, D.: 8.4.1 Les phénols volatils responsables des certaines déviations olfactives de type <phénolé> des vins, Traité d'oenologie Tome 2-Chimie du vin. Stabilisation et traitements 5e édition, (Dunod, Paris), pp.307～324 (2004)

-
- 2) BOIDRON, J.N., CHARTONNET, P. and PONS, M.: Influence du bois sur certaines substances odorants des vins, *Connaiss Vigne Vin*, **22**, 275~294 (1988)
- 3) CHATONNET, P., DUBOURDIEU, D., BOIDRON, J.N. and PONS, M.: The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.*, **60**, 165~178 (1992)
- 4) 篠原 隆: ワインのフェノール性異臭の成因について, 日醸協誌, **96**, 182~188 (2001)
- 5) SHINOHARA, T., KUBODERA, S. and YANAGIDA, F.: Distribution of Phenolic Yeasts and Production of Phenolic Off-Flavors in Wine Fermentation, *J. Biosci. and Bioeng.*, **90**, 90~97 (2000)
- 6) 篠原 隆・中山賢一郎・三木健夫・柳田藤寿: ワインの芳香成分の解析及び品質について, 日本ブドウ・ワイン学会誌, **18**, 152~153 (2007)
(平成25年5月21日受付, 平成25年7月18日受理)
-