

海洋由来乳酸菌を用いた発酵甘酒の開発

食品科 袴田雅俊*、堀池隼雄、浅沼俊倫**、松野正幸、長房秀幸
東海大学 菅沼早紀***
高嶋酒造株式会社 高嶋一孝

Development of amazake fermented with marine-derived lactic acid bacteria

HAKAMATA Masatoshi, HORIIKE Hayao, ASANUMA Toshimichi, MATSUNO Masayuki,
NAGAFUSA Hideyuki, SUGANUMA Saki and TAKASHIMA Kazutaka

With the aim of making amazake refreshing and easy to drink even in summer, we worked on the development of fermented amazake using lactic acid bacteria isolated from the ocean. In order to produce amazake at a sake brewery, alcohol-sensitive lactic acid bacteria were selected as strains that would not affect the brewing of sake. Furthermore, from the selected lactic acid bacteria, the Is105 and Is117 strains (both *Lactiplantibacillus plantarum*) were selected as lactic acid bacteria for amazake, which lowered the pH of amazake well and had no unpleasant taste. Furthermore, characteristic components were found in the Is105 and Is117 strains, and similar lactic acid bacteria of the Is315, Is332, and Is363 strains were acquired using these components as indicators. Fermented amazake prototyped in a collaborative research project with the company using the Is332 strain had a distinct acidity due to the increase in lactic acid and acetic acid. There was no increase or decrease in B vitamins, but there was an increase in γ -aminobutyric acid (GABA) which is known to be functional.

keywords : Lactic acid bacteria, amazake

夏場でもすっきりと飲みやすい甘酒を目指して、海洋資源から単離した乳酸菌を使用した発酵甘酒の開発に取り組んだ。酒造会社において甘酒を製造するために、日本酒の醸造に影響を及ぼさない株として、アルコール感受性の乳酸菌を選抜した。この選抜株の中から、甘酒のpHをよく下げ、雑味がないIs105株、Is117株（いずれも *Lactiplantibacillus plantarum*）を甘酒用乳酸菌として選択した。さらに、Is105株、Is117株に特徴的な成分を見出し、その成分を指標として、同類の乳酸菌Is315株、Is332株、Is363株を取得した。Is332株を用いて共同研究企業で試作した発酵甘酒は、乳酸や酢酸が増加することではっきりとした酸味を有していた。ビタミンB群の増減は見られなかったが、機能性が知られている γ アミノ酪酸（GABA）が増加していた。

キーワード：乳酸菌、甘酒

1 はじめに

甘酒には米麹から作られる麹甘酒と酒粕を利用して作られる酒粕甘酒がある。麹甘酒は、千年以上前の記述にも見られる日本の伝統的な発酵食品であり、江戸時代には現在の製法で作られていた

飲料である¹⁾。近年では飲む点滴と言われ、豊富な栄養素が注目されたことから消費量が増加している。

本県ではマリンバイオ産業の振興を進めており、海洋からの微生物の収集とライブラリーの作成、

* 現 沼津工業技術支援センター バイオ科 ** 現 工業技術研究所 企画調整部

*** 現 東海大学海洋学部 卒業

および発酵食品の開発に取り組んできた。その中のひとつとして、甘酒の消費量が落ち込む夏場でもすっきりと飲みやすい甘酒をめざし、乳酸菌発酵の麹甘酒を開発した。本報告では、甘酒用乳酸菌の選抜と発酵甘酒の成分分析の結果について報告する。

2 方法

2.1 使用した微生物

研究に用いた乳酸菌は、工業技術研究所にて海洋資源から単離した菌株を利用した（菌株の識別番号としてIsのあとに通し番号をつけて区別している）。菌株はグリセロールストックとして-80℃で保存しており、使用時にMRS寒天培地に塗抹した。

2.2 アルコール感受性試験

濃度10%となるようにエタノールを添加したMRS液体培地200 μLを96wellプレートに分注した。前培養した乳酸菌培養液2 μLを添加して30℃で24時間培養した後、吸光マイクロプレートリーダーInfinite®F50 (TECAN社製) を用いて650 nmの吸光度にて濁度を測定した。

2.3 選抜乳酸菌を用いた甘酒の試作と評価

使用する乳酸菌は、MRS寒天培地で培養したコロニーをディスポーザブルループでとり、5 mLのMRS培地に接種して30℃で24時間培養した。培養後、8,000 rpmで5分間遠心分離をして上清を除去した。さらに滅菌生理食塩水1 mLで菌体を懸濁し、8,000 rpmで5分間の遠心分離後、上清を捨てることで菌体を洗浄した。この操作をもう一度繰り返し、最後に滅菌生理食塩水1 mLで菌体懸濁液を調製した。

共同研究企業である高嶋酒造(株)で市販している甘酒「白隠正宗」を用い、甘酒100 mLに乳酸菌懸濁液1 mLを添加し、30℃で24時間発酵した。

試作した甘酒について、pH、乳酸量、香气成分を測定した。乳酸はUHPLCを用いて表1に示す条件で測定した。香气成分はGC-MSを利用して表2に示す条件で測定した。また、食品科職員及び共同研究企業職員で味と香りを評価し、意見交換をした。

表 1 UHPLCによる乳酸の測定条件

区分	内容
装置	UHPLC : Acquity UPLC (Waters 社製)
カラム	Acquity HSST3 (2.1x100 mm, 1.8 μm) (Waters 社製)
溶離液	A 20 mM NaH ₂ PO ₄ B 60 % acetonitrile
流速	0.4 ml/min
カラム温度	40℃
注入量	2 μl
検出波長	UV 210 nm

表 2 GC-MSによる香气成分分析条件

区分	内容
本体	(GC) 7890A・(MS) 5975C (アジレント・テクノロジー(株)製)
カラム	DB-5ms (アジレント・テクノロジー(株)製) (長さ 60 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm)
カラムオープン昇温条件	40℃ (2分) → 8℃/min で昇温 → 250℃ (2分) 合計 30分

2.4 代謝成分を指標とした乳酸菌の選抜試験

優れた甘酒用乳酸菌を特定の試料から探索できるようにする目的で、UHPLC-TOFMSを利用して甘酒用乳酸菌に特徴的な成分を探索した。UHPLC-TOFMSの分析条件を表3に示す。さらに、探索した指標をもとに、海水から新たに取得した乳酸菌92株について甘酒用乳酸菌を選抜した。

表 3 UHPLC-TOFMSによる成分分析条件

区分	内容
装置	UHPLC-TOFMS : Acquity UPLC-LCTpremierXE (Waters 社製)
カラム	Acquity HSST3 (2.1x100 mm, 1.8 μm) (Waters 社製)
溶離液	A 0.1 % formic acid B 0.1 % formic acid / アセトニトリル
流速	0.3 mL/min
グラジエント	時間 (min) %A %B 0 100 0 0.5 100 0 11 20 80
カラム温度	40℃
イオン源	ESI (POS/NEG)
Scan 範囲	50-1500 m/z
分離モード	TOF w-mode
キャピラリ	POS 3000 V NEG 2800 V
コーン電圧	POS 30 V NEG 50 V
温度	Desolvation 400 °C Corn 120 °C
ガス流量	Desolvation 800 ml/min. Corn 800 ml/min.
RockMS	Leucine Enkephaline

2.5 甘酒の成分分析

甘酒用乳酸菌として選抜したIs332株を用いて、共同研究企業にて、製造規模で試作を実施した。この発酵甘酒の試作品について、アミノ酸、有機酸、ビタミンB群の成分分析を行った。

2.5.1 アミノ酸分析

甘酒試料 2 mL にエタノール 4 mL を加えてボルテックスミキサーでよく混合した。4℃で15分間静置後、1,700×gで15分間遠心分離を行った。この上清を、10 mLメスフラスコに1 mLとり、移動相で用いるクエン酸リチウム溶液で10 mLにメスアップした。0.22 μm フィルターでろ過した後、HPLC（ポストカラム法）にて表4の条件で分析を実施した。

表4 HPLCによるアミノ酸分析条件

区分	内容							
装置	LC-20AD 一式 (株式会社島津製作所製) (LC-20AD×2台、DGU-20A3、FCV-11AL、LC-10ADVP×2台、DGU-14A、SIL-20AC、CTO-20A、RF-10AXL、CBM-20A)							
カラム	Shim-pack AMINO-Li (株式会社島津製作所製)							
溶離液	アミノ酸分析用移動相キット Li 型 A液、B液、C液 (株式会社島津製作所製)							
反応液	アミノ酸分析用反応液キット OPA 試薬 (株式会社島津製作所製)							
流速	0.6 mL/min							
グラジエント	時間 (min)	%A	%B	%C	時間 (min)	%A	%B	%C
	0.00	100	0	0	86.01	56	44	0
	16.00	100	0	0	105.00	49	51	0
	18.00	99	1	0	105.01	39	61	0
	22.50	99	1	0	109.00	32	68	0
	22.51	96	4	0	109.01	0	100	0
	50.00	94	6	0	137.70	0	100	0
	50.01	91	9	0	137.71	0	0	100
	64.00	91	9	0	142.70	100	0	0
	79.00	66	34	0	160.00	100	0	0
	86.00	66	34	0				
カラム温度	39℃							
検出波長	Ex 348 nm、Em 450 nm							
試料注入量	5 μL							

2.5.2 有機酸分析

甘酒500 μLをイオン交換水9.5 mLで希釈した。2,000×gで5分間遠心分離後、上清を0.22 μm フィルターでろ過をし、HPLCにて表5の条件で分析を実施した。

表5 HPLCによる有機酸分析条件

区分	内容
装置	LC-10ADVP (株式会社島津製作所製) 一式 (LC-10ADVP×2台、DGU-14A、SIL-10ADVP、CTO-10ACVP、SPD-10AV、SCL-10AVP)
カラム	Shodex RSpak KC-811 (株式会社レゾナック・ホールディングス製)
溶離液	4.8 mM HClO ₄ 溶液
流速	0.8 mL/min
反応液	プロモチモールブルー溶液
カラム温度	60℃
検出波長	440 nm
試料注入量	20 μL

2.5.3 ビタミンB群分析

分析はビタミンB₂、ナイアシン（ニコチン酸相当量）、ビタミンB₆、葉酸について実施し、(一財)食品分析開発センターSUNATECに依頼した。

3 結果および考察

3.1 甘酒用乳酸菌の選抜試験

今回の甘酒開発は、日本酒製造企業と共同で行った。日本酒の醸造において、火落ち菌と呼ばれる乳酸菌は日本酒の品質を低下させる。火落ち菌はアルコール耐性があることが知られている²⁾ことから、アルコール存在下で増殖しない乳酸菌を選抜した。海洋由来の60株について10%のアルコールを添加したMRS培地で培養した結果、アルコール存在下で増殖しにくい13株を選抜した(図1)。

選抜した13株を用いて発酵甘酒を試作し、pHと乳酸量を測定した結果を表6に示す。また、外部にて16SrDNA解析を実施して明らかになった菌株の属種を表6にあわせて記載する。Is46株、Is58株、Is59株で発酵した甘酒はpHの低下が鈍かった一方、Is105株、Is117株ではpHが大きく下がった。乳酸量を調べた結果、乳酸が多いほどpHが下がっていることが確認できた。実際に口にしてみると、pHの低下が鈍かったIs46株、Is58株、Is59株で発酵した甘酒は、発酵前の甘酒と違いがわからなかった。Is264株、Is266株で発酵した甘酒には、不快臭が感じられた。共同研究企業との相談の結果、雑味が出ず、はっきりとした酸味が付与できるIs105株、Is117株を甘酒用乳酸菌として選抜した。

表6 選抜した乳酸菌の種類と試作した甘酒のpH及び乳酸濃度

菌株番号	分離源	同定結果	pH	乳酸濃度 (% W/V)	香味の評価
未添加	—	—	5.4	—	—
Is 46	カジメ	<i>Ligilactobacillus animals</i>	4.8	0.043	△
Is 58	マクサ	<i>Weissella muntiaci</i>	5.0	0.045	△
Is 59	マクサ	<i>Weissella muntiaci</i>	5.2	0.052	△
Is 62	マクサ	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4.0	0.248	△
Is 105	ヒラミレ	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3.4	0.710	◎
Is 117	タンパノリ	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	3.5	0.735	◎
Is 146	千本松海水	<i>Enterococcus mundtii</i>	4.6	0.100	△
Is 147	千本松海水	<i>Enterococcus mundtii</i>	4.6	0.110	△
Is 264	沼津海水	<i>Enterococcus hirae</i>	4.6	0.222	×
Is 266	沼津海水	<i>Enterococcus hirae</i>	4.4	0.236	×
Is 273	沼津海水	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	4.0	0.445	○
Is 282	沼津海水	<i>Enterococcus hirae</i>	4.4	0.257	△
Is 303	沼津海水	<i>Enterococcus faecium</i>	4.6	0.267	△

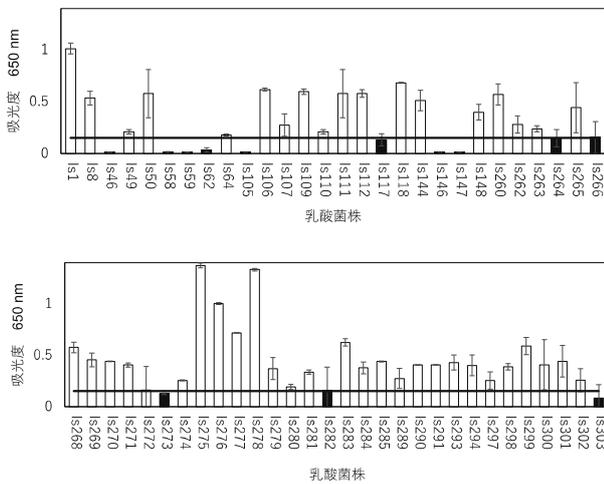


図1 10%アルコール存在下での乳酸菌増殖性評価

3.2 試作甘酒の香り成分分析

Is105株、Is117株で発酵した甘酒の特徴を知るために、結果および考察3.1にて試作した13種類の甘酒について、GC-MSによる香り成分分析を実施した。主成分分析の結果から、Is105株、Is117株で発酵した甘酒は、他の11種類の甘酒とは傾向が異なっていることが明らかとなった。特徴的な香り成分を図2に示す。3-Methylbut-3-en-1-ol、Tridecan-2-oneは果物様の香りがするとされており、2-Undecanoneは柑橘様の香りを持つ成分であることから、発酵甘酒に感じられるフルーティな香りにこれらの香り成分が関与していることが示唆された。また、ブルーチーズ様の香りである2-Heptanoneも増加しており、発酵食品様の香りを付与していると考えられた。

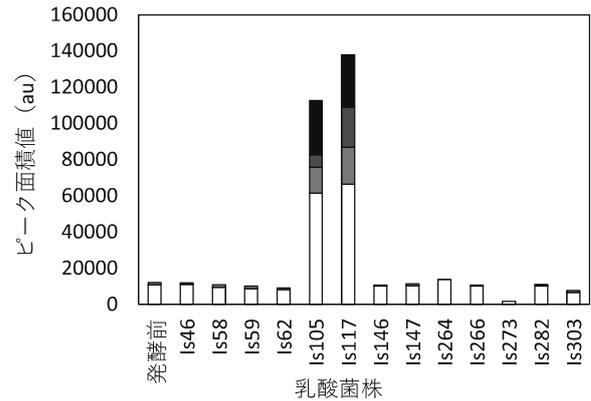


図2 乳酸菌Is105株、Is117株を用いた発酵甘酒で増加した香り成分

2-Heptanone、 Tridecan-2-one、
2-Undecanone、 3-Methylbut-3-en-1-ol

3.3 特徴成分を指標とした乳酸菌の取得

選抜したIs105株、Is117株は海藻から単離した乳酸菌であった。商品開発にあたり、共同研究企業近くの海水から同様の乳酸菌単離を試みた。乳酸菌を取得するにあたり、Is105株とIs117株に特徴的な成分をUHPLC-TOFMSにて分析した。およそ2,000ピークを検出し、主成分分析を実施することで、Is105株、Is117株で顕著に増加したピークAと、顕著に減少したピークBが得られた(図3)。このピークAとピークBについては同定には至っていない。次に、新たに県東部の海水から乳酸菌90株を単離して甘酒を発酵し、ピークAとピークBについて成分を分析したところ、ピークAが増加し、ピークBが減少する3株(Is315株、Is332株、Is363株)を得た(図4)。この3株について10%アルコール存在下での増殖試験を実施したところ、基準とした濁度を3株ともに下回り、増殖が抑制された(図5)。

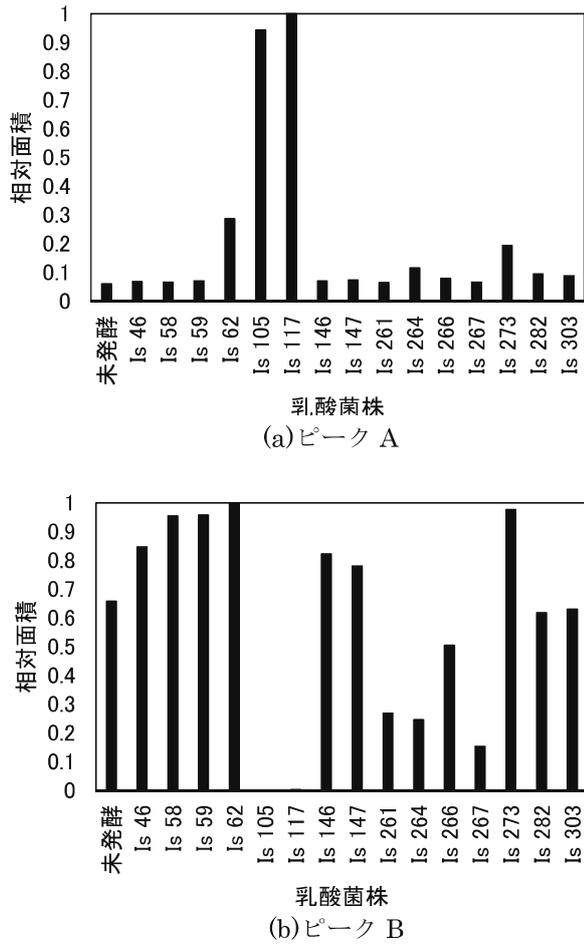


図3 甘酒用乳酸菌Is105株とIs117株に特徴的なピークの探索

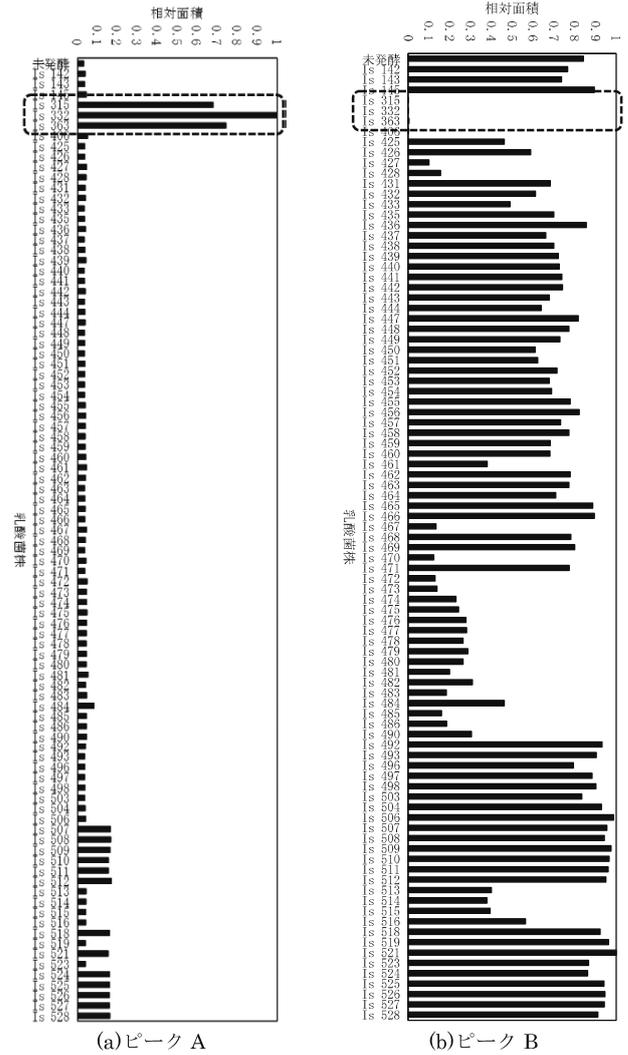


図4 ピークAおよびピークBによる乳酸菌の選抜

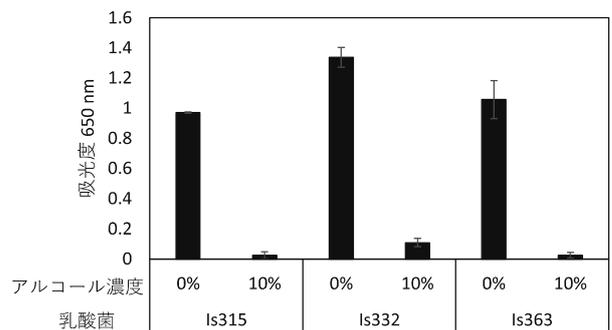


図5 選抜乳酸菌の10%アルコール添加培地での増殖抑制

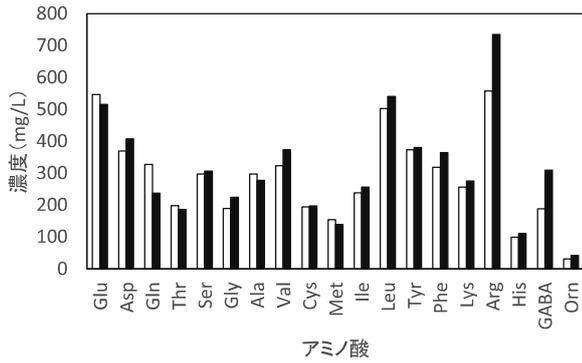


図 6 甘酒中のアミノ酸含量

□甘酒（発酵前） ■発酵甘酒（乳酸菌Is332株使用）

3.4 製造規模で試作した甘酒の評価

共同研究企業にて製造ラインを利用した発酵甘酒の試作試験を行った。乳酸菌には、復帰突然変異試験とラット単回経口投与毒性試験の結果から安全性を確かめたIs332株を用いた。できあがった発酵甘酒について、成分分析を実施した。アミノ酸分析の結果、γアミノ酪酸（GABA）が増加していた。GABAはグルタミン酸脱炭酸酵素によりグルタミン酸から合成される。血圧低下作用やストレス軽減作用が知られている^{3,4)}。

有機酸の測定結果について図7に示す。乳酸菌による発酵のため、乳酸が著しく増加した。酢酸は2.5倍程度増加し、コハク酸も1.6倍程度増加した。一方で、クエン酸は減少した。これまでにTCA回路が不完全な *Lactiplantibacillus plantarum* でコハク酸が蓄積する可能性が報告されていることから⁵⁾、今回使用した乳酸菌の代謝経路においてもコハク酸の代謝が弱く蓄積している可能性が考えられた。

麹甘酒にビタミンB群が含まれていることや、乳酸菌発酵によりビタミンB群の量が変化することが報告されていることから^{6,7)}、ビタミンB2、ナイアシン（ニコチン酸相当量）、ビタミンB6、葉酸の4成分について分析を依頼した。表7に示したように、今回の発酵甘酒ではビタミンB2は検出限界以下であった。ナイアシン、ビタミンB6、葉酸については発酵前後での変化は見られなかった。

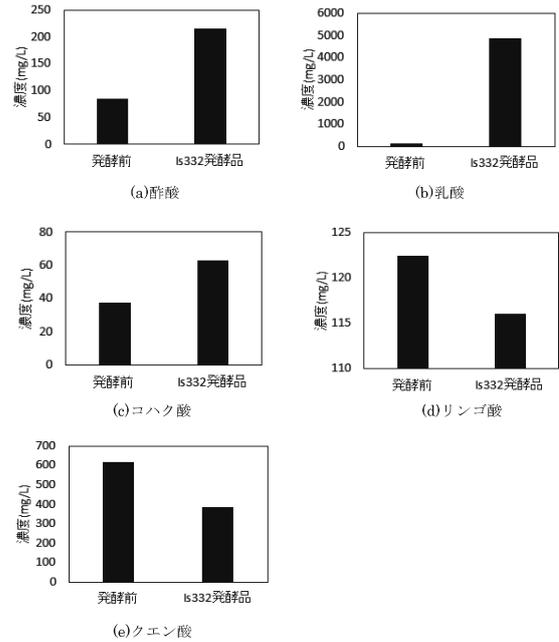


図 7 甘酒の乳酸菌発酵における各有機酸の濃度変化

表 7 乳酸菌発酵前後の甘酒中のビタミンB群

成分	甘酒（発酵前）	発酵甘酒（Is332 株使用）
ビタミン B2	N.D.	N.D.
ナイアシン	0.16 mg/100g	0.17 mg/100g
ビタミン B6	0.021 mg/100g	0.019 mg/100g
葉酸	6 μg/100g	5 μg/100g

4 まとめ

甘酒用乳酸菌としてIs105、Is117、Is315、Is332、Is363の5株を選抜した。いずれも *Lactiplantibacillus plantarum* であり、10%アルコール存在下では増殖が抑制された。これらの株による発酵甘酒は、雑味がなく酸味が強くフルーティな香りが付与された。

参考文献

- 1) 倉橋敦：美味しいだけじゃない我が国の伝統甘味飲料「麹甘酒」. 日本家政学会誌, 74 (2), 101-106 (2023).
- 2) Koji S. et al. : Sake and Beer Spoilage Lactic acid bacteria. Journal of the Institute of Brewing, 114 (3), 209-223 (2008).
- 3) 吉川弥里 他：GABAの血圧降下作用に対す

- る系統的レビューおよびメタアナリシス。就実大学薬学雑誌, 7, 1-9 (2020).
- 4) 藤林真美 他: GABA経口摂取による自律神経活動の活性化。日本栄養・食糧学会誌, 61 (3), 129-133 (2008).
- 5) 佐藤英一 他: 代謝改変を利用した *Lactobacillus plantarum* によるコハク酸生産。日本食品保蔵科学会誌, 34 (2), 59-64 (2008).
- 6) 倉橋敦 他: 麴甘酒に含まれる成分について。日本醸造協会誌, 112 (10), 668-674 (2017).
- 7) Yoshifumi O. et al.: Metabolite profile of koji amazake and its lactic acid fermentation product by *Lactobacillus sakei* UONUMA. Journal of Bioscience and Bioengineering, 124 (2), 173-183 (2017).