

# 長期保存中に植物性発酵エキスに生じた混濁の構成成分解析

川口 友彰\*1 田崎 麻理奈\*1 坂口 優紀\*2 井元 樹里\*2

## Analysis of Constituents of Haze Developed in Fermented Vegetable and Fruit Extract during Prolonged Storage

Tomoaki Kawaguchi, Marina Tasaki, Yuki Sakaguchi and Juri Imoto

野菜や果物を発酵させて製造する植物性発酵エキスは、緑茶等の茶飲料やビール、ワイン等の発酵飲料と同様、稀にはあるものの長期保存中に混濁が発生することがある。混濁が発生した植物性発酵エキスは全量回収・廃棄処分されており、商品信頼性及び収益性低下につながる課題であることから、混濁原因の解明が求められる。そこで本研究では、微生物学的混濁及び非生物学的混濁それぞれの観点から、植物性発酵エキスの混濁原因及び混濁構成成分を調べた。その結果、混濁が生じた植物性発酵エキス中に顕著な微生物の増加は認められず、微生物学的混濁である可能性は低いことがわかった。また、成分分析・呈色試験、溶解性試験の結果、混濁物は主に多糖類及びタンパク質から構成されており、混濁形成にタンパク質が関与していることが示唆された。

### 1 はじめに

緑茶や紅茶、烏龍茶等の茶飲料、ビール、ワイン、果汁飲料等の各種容器詰飲料は、多くの場合、清澄であることが求められる。一方、これらの飲料では、製造直後や長期保存中に混濁を生じる場合があることが知られている。混濁には微生物の混入に起因する微生物学的混濁と、飲料成分の凝集等に起因する非生物学的混濁とがあり、適切な条件で製造された場合、非生物学的混濁が主な発生要因となる<sup>1)</sup>。

非生物学的混濁の身近な例として、緑茶や紅茶、烏龍茶等の茶飲料で生じる「クリームダウン」という白濁化現象がある。これは、茶浸出液において液中のカフェインとタンニンが結合・析出して白濁する現象で、冷却により白濁形成が促進される<sup>2)</sup>。家庭においても、お茶を淹れてすみやかに冷やした際に観察することができる。ビールにおける非生物学的混濁の発生要因としては、麦芽由来タンパク質と麦芽及びホップ由来ポリフェノールの結合が原因となるもの、デキストリン等の炭水化物が原因となるもの、タンパク質と多糖によるもの、金属が触媒となり生じるもの等、混濁に関わる原因物質や混濁発生機構は多岐にわたることが知られている<sup>1, 3)</sup>。このように飲料ごとに混濁要因が異なることに加え、茶葉や麦芽等の原材料植物中に存在する混濁原因物質の種類と含有量にロット間のばらつきがあるため、製造した飲料で常に混濁が生じるわけではなく、混濁条件が揃った特定ロットでのみ生じる

こともあり、原因解析や混濁対策をより困難としている。このような混濁が製品に生じた場合、外観を損なう上、微生物の混入（腐敗）と誤認されるなどの点で消費者や販売者からの苦情対象となることから、混濁発生は飲料製造者の大きな問題となっている。

暁酵素産業（株）では、野菜を中心に果物等数十種類の原材料に酵母及び糖を添加することで、原材料成分を浸透圧により抽出し、熟成発酵させた植物性発酵エキスを製造している。製造後、長期保存中にエキス中に混濁が生じることが稀にあり、混濁原因が不明であったため、全量廃棄処分としていた。そのため、混濁発生は収益性及び商品信頼性の低下につながる課題であり、その原因解明が求められていた。そこで本研究では、植物性発酵エキス保存中に生じる混濁原因解明を目的とし、混濁物の構成成分解析を行った。

### 2 研究、実験方法

#### 2-1 試料

暁酵素産業（株）から提供された表1に示す試料を使用した。

表1 試料

試料名	瓶詰日	混濁確認	保存条件
2021 混濁品	2021. 4. 21	2021. 5. 24	常温未開封
2019 混濁品	2019. 3. 26	2019. 6. 07	常温未開封
2019 混濁前冷凍品	2019. 3. 26	—	少量分注冷凍
通常品	2021. 5. 24	—	常温未開封

\*1 生物食品研究所

\*2 暁酵素産業（株）

2019混濁前冷凍品は、2019混濁品と同一ロットの植物性発酵エキスであり、瓶詰後に一部冷凍保存していたものである。

## 2-2 微生物検査

一般生菌数は、リン酸緩衝生理食塩水で希釈した試料1mLを標準寒天培地に混釈し、35℃で48時間培養後、出現コロニー数から試料1 mLあたりの生菌数を測定した。乳酸菌は、ペトリフィルム（スリーエムジャパン（株））を用いて測定した。真菌数は、試料0.1 mLを塗抹したクロラムフェニコール加ポテトデキストロース寒天培地を25℃で72時間培養し測定した。

## 2-3 分析

試料の水分活性は電気抵抗式水分活性測定器 LabSwift-aw（Novasina社製）、pHはガラス電極式pHメータLAQUA F-71（（株）堀場製作所）、有機酸は有機酸分析システム（Prominence、（株）島津製作所）を用いて測定した。なお、混濁試料については加熱溶解後、フィルター濾過し、有機酸分析に供した。混濁粒子中の構成成分及びそれらの分布については、スライドガラス上で混濁品遠心沈殿物に染色液<sup>3)</sup>を滴下し顕微鏡で観察した。その他の成分分析、呈色試験、溶解性試験、白濁形成試験は結果と考察に記載の方法により実施した。

## 3 結果と考察

### 3-1 微生物学的混濁の評価

植物性発酵エキスに生じた混濁が微生物学的混濁であるかを調べるため、微生物検査（一般生菌、乳酸菌及び真菌）を行った（表2）。その結果、一般生菌、乳酸菌及び真菌いずれも検出限界以下であった。

表2 微生物検査結果（CFU/mL）

試料名	一般生菌	乳酸菌	真菌
2021 混濁品	<30	<30	<100
2019 混濁品	<30	<30	<100
2019 混濁前冷凍品	<30	<30	<100
通常品	<30	<30	<100

水分活性、pH、有機酸分析結果を表3に示す。水分活性及びpHについては、混濁の有無で顕著な差は認められなかった。同様に、有機酸（乳酸、酢酸、リン

酸）についても、非混濁試料（2019混濁前冷凍品、通常品）の濃度と比べ、微生物の活動に伴って生じる増加は認められなかった。

表3 pH、水分活性、有機酸分析

試料名	水分活性	pH	乳酸 (g/L)	酢酸 (g/L)	リン酸 (g/L)
2021 混濁品	0.898	3.16	2.63	5.35	0.17
2019 混濁品	0.887	3.17	1.97	3.68	0.17
2019 混濁前冷凍品	0.892	3.18	1.95	3.72	0.22
通常品	0.893	2.93	3.91	5.93	0.19

一般細菌が増殖可能である水分活性の下限は0.90、pHは4.2程度である。そのためこれらの微生物は、植物性発酵エキス中で増殖困難と考えられる。一方、一般的なカビが増殖可能である水分活性の下限は0.80、酵母は0.88、pHは2前後であることから増殖可能な溶液条件にあると考えられた。

以上の結果から、植物性発酵エキス中では、一般細菌は増殖困難である一方、真菌類が増殖可能と考えられるものの、混濁試料中にこれらの微生物の増殖は認められなかったことから、微生物学的混濁である可能性は低いと考えられた。

### 3-2 非生物学的混濁の評価

植物性発酵エキスに生じた混濁の構成成分を調べるため、2021混濁品から遠心分離により回収した混濁物を洗浄後、凍結乾燥し、成分分析を行った（表4）。その結果、混濁物は主に糖類とタンパク質から構成されることがわかった。

表4 2021混濁品の混濁物構成成分分析

成分	含有量 (%)	測定方法
全糖量	81.4	フェノール硫酸法
タンパク質	8.5	BCA法
総ポリフェノール	N. D.	Folin-Ciocalteu法
水分	10.8	乾燥減量法
N. D. : 未検出		

染色試薬により構成成分を調べた結果（表5及び図1）も、表4の結果と一致して、タンパク質と糖類の存在を示すものであった。また、混濁物中の被染色成分の分布から、多糖類や澱粉は部分的に存在する一方、

タンパク質は混濁物全体に存在しており、混濁形成にタンパク質が重要な役割を果たしていることが示唆された。

表5 呈色試験

判定対象	判定基準	2021混濁品 遠心沈殿物	2019混濁品 遠心沈殿物
タンパク質	紫～青紫	(+) 	(+) 
木化組織 (リグニン)	赤紫	(-) 	(-) 
デンプン質	紫～黒	(-) 	(-) 
植物繊維 (セルロース)	褐色～黒色	(+) 	(-) 

遠心沈殿物をスライドガラスに塗布・乾固後、異物鑑定団（ビジョンバイオ）の各判定試薬を滴下した

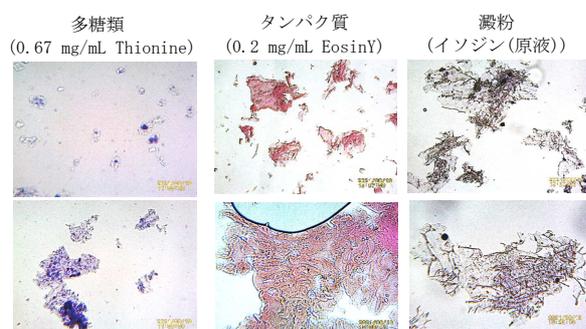


図1 呈色試験（顕微観察）

（試料：2019混濁品遠心沈殿物の凍結乾燥物）

次に、混濁物の溶解性<sup>4)</sup>を調べた結果を表6に示す。混濁物は、50 %エタノール、10 %塩酸に対して溶解せず、0.1 N水酸化ナトリウム、8 M尿素に溶解したことから、混濁の主な要因はタンパク質であると考えられ、呈色試験の結果を支持するものであった。

表6 混濁物の溶解性

溶媒	2021混濁品	2019混濁品
50 % EtOH	—	—
10 % HCl	—	—
0.1 N NaOH	+	+
8 M 尿素	+	+
熱水	+	+

（+は透明化，—は混濁を示す）

また、混濁物は熱水に溶解したが、室温放置することで再び混濁が生じることがわかった。図2は、再混濁化の温度依存性を調べた結果である。4 °C（■）では顕著な変化は認められなかったが、室温（▲）、45 °C（●）下で経時的な濁度（OD 550 nm）上昇を確認できた。なお、60 °C及び75 °Cでは、メイラード反応と考えられる褐変が生じ、再混濁化を評価することができなかった（データ未掲載）。以上の結果から、混濁形成は可逆反応であり、温度依存性を示すことがわかった。これらの性質は、タンパク質の変性・凝集とよく一致するものと考えられ、混濁形成の主要因がタンパク質であるとするこれまでの結果を支持するものであった。

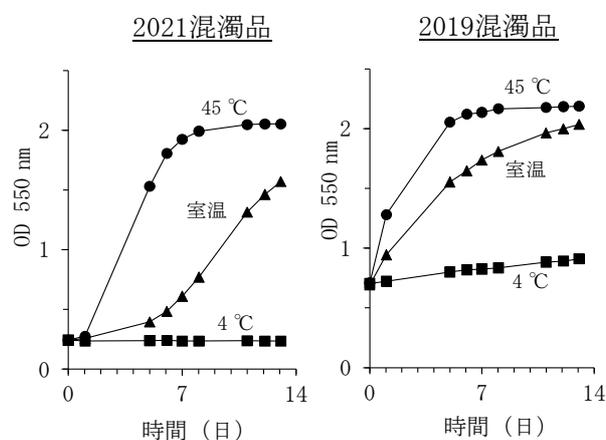


図2 混濁再形成の温度依存性

（試料：混濁品を湯煎で透明化したもの）

図2の結果は、45 °C保存により植物性発酵エキスの混濁性を短期間で評価できる可能性を示唆するものであった。一方、混濁品の加熱溶解物は、混濁形成の核となることが想定される混濁原因物質を含む凝集体が部分的に残存したことにより、再混濁化できた可能性がある。そのため、未混濁の植物性発酵エキスに対して、45 °C保存試験で混濁性を評価できるかを調べた（図3）。2019混濁前冷凍品は、試験開始当初は混濁がなく濁度も低値を示したが、保存開始8日後から濁度が上昇し、混濁が生じた。長期保存で混濁が生じなかった通常品では、顕著な濁度上昇・混濁は認められなかった。以上の結果から、45 °C保存試験により未混濁エキスの混濁化を加速し、混濁性を評価することができることがわかった。

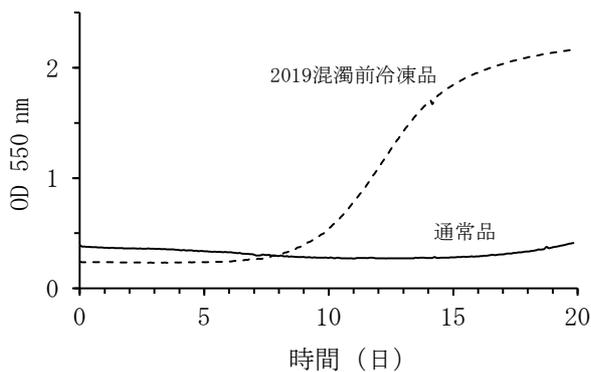


図3 45 °Cにおける未混濁試料の混濁形成  
(45 °C設定のプレートリーダーで2時間毎に測定)

なお、2022年1月から全ロットを対象に保存試験を実施した結果、室温保存、加速試験ともに混濁の発生は認められず、発生頻度が低い現象であることを確認している。

#### 4 まとめ

本研究の結果から、植物性発酵エキスの混濁にタンパク質が主に寄与していること、45 °C保存試験により混濁の発生を予測できることを明らかにすることができた。一方、原因物質の同定はできておらず、混濁発生の原因解明にはさらなる検討が必要である。

#### 5 文献

- 1) Y. Wang, L. Ye : Foods, 10, No.12, pp.3114 (2021)
- 2) 小菅充子 : 和洋女子大学紀要. 家政系編. 38, pp. 43-55 (1998)
- 3) E. Steiner, T. Becker, M. Gastl : Journal of the Institute of Brewing, 116, No. 4, pp. 360-368 (2010)
- 4) AWRI : Grapegrower and Winemaker, No. 620, p. 87 (2015)