

平成 28 年度  
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業  
戦略的基盤技術高度化支援事業

「高機能付加価値食品用の発酵技術を用いた  
新規バイオプリザベーション食品素材の開発」

研究開発成果等報告書

平成 28 年 5 月

担当局 東北経済産業局  
補助事業者 ヤマカノ醸造株式会社

## 目 次

### 第1章 研究開発の概要

- 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標
  - 1-1-1 研究開発の背景
  - 1-1-2 研究目的及び目標
- 1-2 研究体制
  - 1-2-1 実施体制
  - 1-2-2 研究者等氏名
- 1-3 成果概要
  - 1-3-1 発酵と配合による特性発揮課題への対応
  - 1-3-2 食品加工での活用課題への対応
- 1-4 当該研究開発の連絡窓口

### 第2章 本論

- 2-1 発酵と配合による特性発揮課題への対応
  - 2-1-1 保存性を発揮する最適発酵条件の確立
  - 2-1-2 乳化性等の機能性を発揮する最適発酵条件の確立
  - 2-1-3 無菌化及び酵素（プロテアーゼ）活性残存を両立させる加熱方法の確立
- 2-2 食品加工での活用課題への対応
  - 2-2-1 各種農林水畜産物加工品への活用方法の確立
  - 2-2-2 マーケティング

### 最終章 全体総括

## 第1章 研究開発の概要

### 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

#### 1-1-1 研究開発の背景

有用な生物資源として特許微生物である「白神こだま酵母」があり、本酵母の有する様々な特性の中で利用されている特性はその一部に過ぎない。活用されていない特性を引き出した製品開発が本事業であり本酵母の利用方法の高度化・多様化が進展する。消臭剤・保存剤・乳化剤・甘味剤・旨味剤・酸味剤等の個別の副資材の開発は、それぞれの専門メーカーにより開発が行われており、ユーザーサイド・消費者サイドの要望に答える形で、天然志向さらには動物性を排除する方向で進展しているが、消臭剤・保存剤・乳化剤・甘味剤・旨味剤・酸味剤の枠を超える開発は進んでいない。そこで、スーパー酵母「白神こだま酵母」の特性を引き出して、消臭剤・保存剤・乳化剤・甘味剤・旨味剤・酸味剤等機能を併せ持つ、植物性原料だけを使用し、且つ低塩である発酵調味料の開発を目標とした。

#### 1-1-2 研究目的及び目標

##### (1) 発酵と配合による特性発揮課題への対応

###### (1) - 1 保存性を発揮する最適発酵条件の確立

保存性を保つ最適なアルコール・pH・食塩の最適バランスの発酵物製造条件を確立する。

目標値 保存性：常温で30日又は4℃で90日

###### (1) - 2 乳化性等の保存性を発揮する最適発酵条件の確立

各種特性を最大限に引き出す乳化性分（レシチン）・旨味・機能性成分（ペプチド）・保存成分（有機酸）・粘性成分（澱粉分解物）濃度の最適発酵条件を確立する。

原料米麴由来のマルトオリゴ糖の澱粉分解物による粘性の制御方法を確立する。

目標値 乳化性分残存率：66%以上

###### (1) - 3 無菌化及び酵素（プロテアーゼ）活性残存を両立させる加熱方法の確立

無菌化加熱条件の最適化を確立するとともに、麴菌酵素、特にプロテアーゼ活性の残存率の高い無菌化加熱条件を確立する。

目標値 プロテアーゼ残存率：50%以上（加熱温度70℃、無菌）

##### (2) 食品加工での活用課題への対応

###### (2) - 1 各種農林水畜産物加工品への利用展開

各種農林水畜産物を原料とする発酵物を使用した、消臭性かつ保存性のある加工品の製造レシピ完成を目指す。併せてそれぞれの商品領域に応じた Patent Map を作成し、差別化要因の発掘、探索及び権利化を図り、開発調味料に応じた知財移転及び技術移転を視野に入れた知財戦略を構築する。

###### (2) - 2 マーケティング

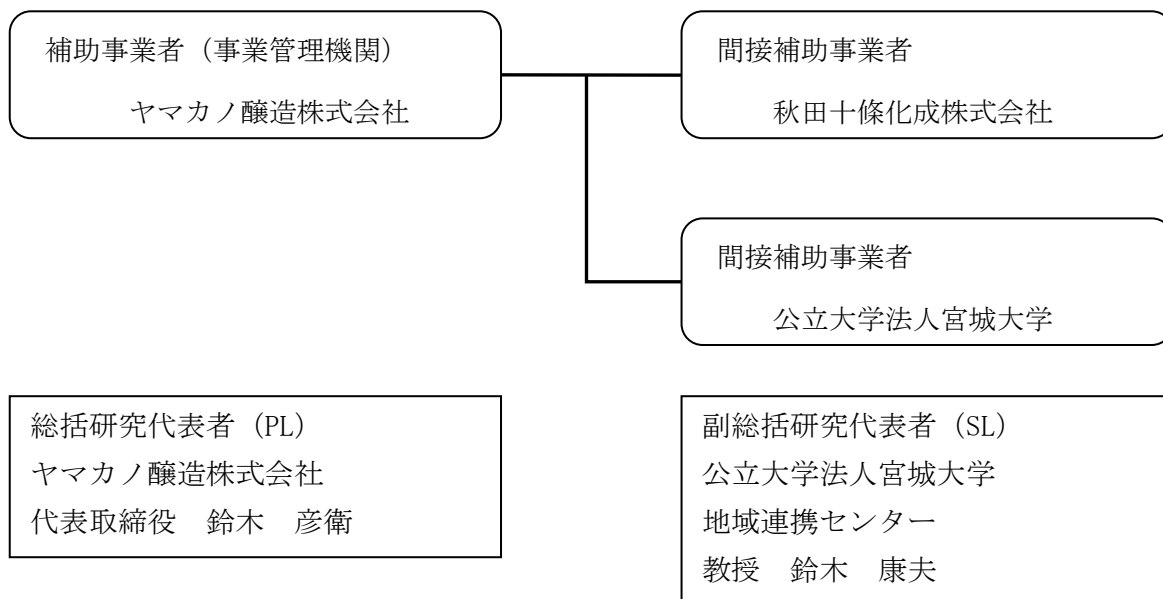
発酵液を使用した一般消費者向け自社製造ドレッシングのレシピ完成を目指す。ドレッシングの試作を通じて発酵調味料の味・香り・バランス評価を行う。

3年間の研究開発により、当初計画の製法とは異なる部分もあるが目標値を達成するとともにこの目標値を達成する効率的且つスケールアップ可能な製造条件を確立した。さらに、本製品を活用する食品加工企業が求める性状のものが製造可能となった。

また、開発した発酵調味料の特性、機能性をうまく活用できる商品を見出すため、県内の農水畜産系の製造事業所5社を選定し、各社が得意とする領域で試作を実施した。

## 1-2 研究体制

### 1-2-1 実施体制



### 1-2-2 研究者等氏名

#### (1) 研究員

ヤマカノ醸造株式会社

氏名	所属・役職	備考
鈴木彦衛	代表取締役	PL
佐藤和之	商品開発部 部長	
佐藤晴美	商品開発部 課長	
及川順子	商品開発部 課長	
鈴木仁	業務企画管理部 部長	
山崎聡	業務企画管理部 課長	
伊藤昌紀	業務企画管理部 係長	
斑目智	調味料製造部	

秋田十條化成株式会社

氏名	所属・役職	備考
把田 雅彦	企画開発部部长 兼 営業技術部部长	
加賀屋 明良	企画開発部課長	
高橋 和秀	品質・製品安全室主査 兼 企画開発部主査	
加藤 正樹	企画開発部 兼 営業技術部	

公立大学法人宮城大学

氏名	所属・役職	備考
鈴木 康夫	地域連携センター 教授	SL

(2) 管理員

ヤマカノ醸造株式会社

氏名	所属・役職	備考
泉 卓哉	総務部 部長	

(3) アドバイザー

秋田県総合食品研究センター

氏名	所属・役職	備考
高橋 慶太郎	白神こだま酵母研究室 主任研究員	

1-3 成果概要

1-3-1 発酵と配合による特性発揮課題への対応

保存性を発揮する最適発酵条件の確立

豆乳発酵液仕込み時の発酵熱のコントロールについて、新規に導入した冷却用熱交換器を用いて発酵温度の最適化を図り、小スケールで確立した最適発酵温度経過と同一となる品温管理手法を確立した。また、さらなる保存性の向上のため、常温で30日以上・冷蔵で90日以上の長期保存について試験を継続した。具体的には微生物汚染試験とともに色調・風味試験を実施した。さらに、豆乳発酵調味料を用いた各種加工品の試作製造技術開発において一部の川下企業より改善が求められている米麴の粒を解消するため、新規に導入するカッターミキサーを用いてスムージー化し課題解決を図った。

乳化性等の機能性を発揮する最適発酵条件の確立

原料大豆由来の乳化成分（レシチン）・ペプチド・有機酸成分・澱粉分解物組成：大豆乳化成分であるレシチン（リン脂質）・ペプチド・マルトオリゴ糖・各種有機酸の麴菌酵素と酵母による代謝過程の解析を実施し、発酵終了物の各種特性を最大限に引き出す分解・発酵条件を確立した。これまで取得したデータを元に、豆乳発酵調味液中に含まれるペプチドの解析及び、発酵調味液の乳化性について検討

した。

### 無菌化及び酵素（プロテアーゼ）活性残存を両立させる加熱方法の確立

豆乳発酵物の無菌化加熱条件下で酵素活性を失わない担子菌（キノコ類）耐熱性プロテアーゼを配合することによりコントロールされたプロテアーゼ活性残存発酵物の加熱条件・配合比率等の製造法を確立した。また、保存中のプロテアーゼ活性の経時変化を調査した。プロテアーゼ測定については、測定機器がないため外注した。

## 1-3-2 食品加工での活用課題への対応

### 各種農林水畜産物加工品の活用方法の確立

開発資材（調味液）の特性・機能を引き出せる商品分野（領域）として、①水産加工品②畜産加工品③珍味④乳製品を選定し、各々について特許Mapを作成し、開発資材（調味液）の位置づけ、妥当性を調べた。

その結果、開発資材（調味液）の特性・機能のうち、①低塩化（保存性）と②消臭・風味・旨味補強、食感改善機能に可能性を見出した。特に、水産加工品の中、練り製品の場合は無臭マスキング効果、水産加工品の中、水産珍味製品・塩辛の場合は低塩保存性及び生魚臭マスキング効果、畜産加工品の中、ハム製品の場合は保湿性及び食感改良効果、乳製品の中、パニール（ナチュラルチーズ）の場合は呈味付与及び低塩保存性効果について、従来特許での技術動向がある中、開発資材（調味液）の比較優位性を見出すことができた。当該研究により体得した技術と、展開（参入領域）方向についてMTマトリックスに基づく技術展開（参入領域探索）を検討した。

### マーケティング

自社製造ドレッシングの試作を重ね、1品のレシピを完成した。完成したドレッシングについて、8種の従来品と Alpha M.O.S 測定を実施した。その結果、豆乳発酵調味液ドレッシングは「塩味」はやや控えめであるが旨味、苦味、旨味コク、酸味、雑味等の各軸とも平均的で、色々な味わいのドレッシングの中で、「バランスがとれた味わい」とされた。東京会場の展示会に2回出展し、商品化展開の方向性を明らかにした。展示会1回目は研究会企業と共同で開発した試作品の商品領域を展示し、アンケート評価等の手段を通じて消費者の反応を獲得した。2回目は、それぞれの商品領域についての独自性（味香りの分析を含め）に磨きをかけ、コアコンピタンスを決めた形で発信した。また食品展示会出展に際しアンケート及び聞き取り調査を実施した。更に、各種農林水畜産物加工品への利用展開で行うそれぞれの商品開発に沿った製造技術確立を目指した。

## 1-4 当該研究開発の連絡窓口

ヤマカノ醸造株式会社 商品開発部

部長 佐藤 和之

TEL 0220-52-2511 FAX 0220-52-2515

E-mail [kaihatu@yamakano.co.jp](mailto:kaihatu@yamakano.co.jp)

## 第2章 本論

### 2-1 発酵と配合による特性発揮課題への対応

#### 2-1-1 保存性を発揮する最適発酵条件の確立

##### 発酵熱のコントロール

ラボスケールでの発酵経過では発酵時間と発酵温度は最適化が達成されたが、スケールアップにより新たに問題化した過剰な発酵熱の発生により、最適な発酵温度経過を採ることが不可能となった。そのため、パイロットスケールでの試作において新規に冷却用熱交換器を導入し、先に最適化した温度経過となるように試作を行ったところ、ラボスケールと同様な発酵経過を採ることが可能となった。今後のプラント設計においてもこのような発酵温度コントロールが必要であることが確認された。

##### 発泡抑制

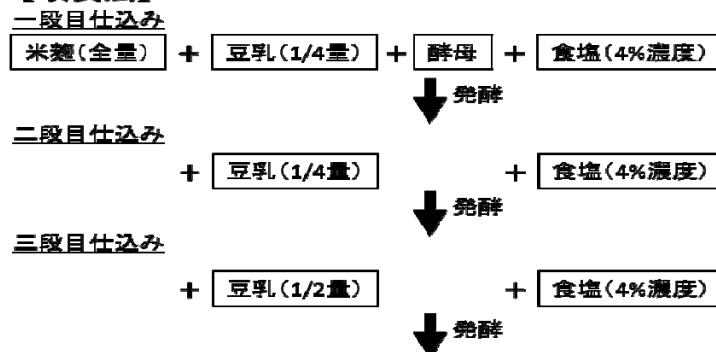
発酵により炭酸ガスが発生するが、原料である豆乳から発生する泡は微細で且つ破泡し難い。発酵後期では、生成したエチルアルコールの消泡性や有機酸による豆乳タンパク質の部分凝固により破泡は促進されるが、発酵初期はこれらによる破泡が期待できないため消泡に多大な労力を要する。また、旺盛な発泡により発酵タンク中の発酵液の液量は大幅に制限される。このことは、実プラントにおいて過剰な容積のタンクが必要となる。初期発泡を抑制することは、プラント設計に必要であるため発泡抑制の検討を進めた。初期発泡を抑制するためには初発食塩濃度を高めるなどして初期発酵を抑制すればよいが、初期発酵を抑制すると酵母の有機酸生成が抑えられ保存性に影響を及ぼす。このように発泡抑制と発酵液の品質は背反することから、発酵液の品質を保持する手法を維持しながら発泡抑制の検討を行った。

従来の仕込みは、使用原料を全て一度に仕込む一段仕込みであったが、下図のように三段仕込みにすることにより発泡抑制しながら従来と同一の保存性を示す発酵液の製造が可能となった。主たる発酵基質は米麴であるが、図のように一段目に米麴を全量仕込み、食塩濃度を一定に保ちながら豆乳を三段に分けて仕込むことにより発酵タンクの発酵液の割合を増大させることが達成できた。改良工程の発酵終了物の品質は、従来の発酵液と同一であった。

##### 【従来法】



##### 【改良法】



## 保存性向上

保存性の向上のため長期保存について試験を継続した。これまでの保存試験では微生物による汚染以外では、色の褐変化は目標とする保存期間では抑制が可能であることが確認されていたので、微生物汚染に関して保存試験を実施した。発酵終了後の加熱により残存する酵母は完全に死滅したが、耐熱性芽胞菌は100個/g以上残存した。その後90日間のこの残存芽胞菌の菌数は徐々に減少し、60日目以降検出されなかった。このことは、耐熱性芽胞菌は豆乳発酵液中では活動できず且つアルコールや低pHのストレスを受けて徐々に死滅することを示しており、保存には影響を与えないと考えられた。しかしながら、この豆乳発酵液を食品加工に使用する場合、各種ストレスの強度が低下するため加工食品において再活動する可能性がある。この耐熱性芽胞菌は原料とした米麴由来と考えられることから、原料米麴の品質をより高める必要がある。

## スムージー化

この豆乳発酵液を活用する食品加工企業より改善が求められている豆乳発酵液に残存する原料である米麴の粒を解消するため、新規に導入したカッターミキサーを用いてスムージー化の検討を行った。発酵終了後の豆乳発酵液は、酵母により溶存酸素は完全に消費されて残存しない。また、発酵により生成した炭酸ガスは発酵後の加熱により飛散して残存しない。従って、通常の発酵加熱後の豆乳発酵液には溶存する気体は殆ど存在しない。溶存気体、特に溶存酸素は製品保存中に酸化を引き起こし、保存性を低下させる。そのためカッターミキサーによるスムージー化は出来るだけ酸素の溶け込みを防止しその後の加熱によりスムージー化中に溶け込んだ気体を除去する必要がある。このような環境下でのカッターミキサーによるスムージー化の処理条件検討を進めた。その結果、液量・処理時間・処理温度等の各種パラメーターの最適化が達成された。但し上記のように、処理中の溶け込み気体をゼロにすることは不可能であるので、スムージー化後の加熱殺菌条件特に加熱時間を長く採る必要があると考えられた。

### 2-1-2 乳化性等の機能性を発揮する最適発酵条件の確立

#### 乳化成分の検討

これまでの試験結果から、発酵調味液にはリン脂質が含まれていなかった。分析化学的に乳化性を評価することができなかつたため、実際に本調味液と油を混合し乳化性を検討した。

表 1.1 の材料をミキサーで混合し、冷蔵庫(4℃)で保存した。20日間保存した試料を50℃の乾燥機にて2時間放置した。油が分離するかどうか観察した。

また、44日間保存後、条件①と③について各条件で遠心分離し、油が分離するか調査した。

表 1.1. 混合割合

条件	調味液 (g)	豆乳 (g)	サラダ油 (g)
①	50		100
②	25	25	100
③		50	100



遠心分離せずに保存した場合は、どの条件でも調製直後と変わらず、油の分離は認められなかった。

遠心分離した時の結果を表 1.2 に示す。発酵調味液とサラダ油混合試料（表 1.1 条件①）は 1、000 rpm、20 分間以上、または 2、000 rpm 以上、10 分間の条件で油が分離した。一方、豆乳を用いた混合試料（表 1.1 条件③）は 2、000 rpm、20 分間以上、または 3、000 rpm 以上、10 分間以上の条件で油が分離した。このことから、発酵調味液は豆乳と比較して乳化性が弱かった。

表 1.2. 発酵調味液とサラダ油混合試料（表 1.1 条件①）の遠心分離による油の分離

	1、000 rpm	2、000 rpm	3、000 rpm
10 min	○ (○)	× (○)	× (×)
20 min	× (○)	× (×)	× (×)
30 min	× (○)	試験せず	× (×)

○→油が分離しなかった    ×→油が分離した    括弧内は表 1.1 条件③

発酵調味液は豆乳と比較すると乳化性が弱かったが、実用性（静置）では問題ないと判断した。発酵調味液の乳化性にはリン脂質以外の物質（糖脂質などの脂質か？）が関与していると考えられる。

### 発酵調味液中のペプチド解析

大豆タンパク質由来のペプチドには血圧を正常にする効果など機能性をもったものが存在する。本発酵調味液も、麴や白神こだま酵母のプロテアーゼによる大豆タンパク質の分解物であるため、機能性ペプチドが存在する可能性がある。そこで、調味液中のペプチド同定を行った。

試料として前急後緩型（25℃程度の室温で発酵）、60 日間以上発酵品を用いた。調味液 200 g と水 800 ml を混合し、105℃、30 分間オートクレーブにて抽出した。これをろ紙（No. 1）で吸引ろ過した。さらにこのろ液をろ紙（No. 1）で吸引ろ過した。得られたろ液をろ紙（No. 5C）で吸引ろ過し、液量 1 L に調製した。

陽イオン交換クロマトグラフィによる精製のため、TOYOPERL GigaCap S-650 S をカラム（25 mm×190 mm）に充填した。試料注入前に 0.1 M HCl 500 ml→水 500 ml→0.1 M NaOH 500 ml→水 500 ml→0.1 M HCl 500 ml→水 1 L の順で流しカラムを活性化させた。

精製については、試料 200 ml をカラムに注入し、水 100 ml で容器を洗い、これもカラムに注入した。その後、水 1 L でカラムを洗浄した。0.05～0.25 M NH<sub>3</sub> 750 ml（150 ml 毎に 0.05 M ずつ濃度を上げた）で溶出し、50 ml ずつ分取した。陽イオン交換クロマトグラフィによる精製は 2 回実施した。分離状況は TLC（TLC Silica gel 60 F254、メルク、展開溶媒はブタノール：酢酸：水＝4：1：2 混液、検出はニンヒドリン試薬）にて確認した。単一スポットのフラクションは、R. f. 値が同じスポットとなっているフラクションを混合した（Frc. 4、Frc. 6～8）。Frc. 4 および Frc. 6～8 は水温 60℃でエバポレーター濃縮し、水で 25 ml に調製した。

陽イオン交換クロマトグラフィにて得られた Frc. 4 と Frc. 6～8 について、HPLC を用いてさらに精製を行った。装置は島津製作所製の HPLC（送液ユニット：LC-20AD、脱気ユニット：DGU20A<sub>3R</sub>、オートサンプラ：SIL-20A<sub>CHT</sub>、カラムオープン：CTO-20A、フォトダイオードアレイ検出器：SPD-M20A）を用いた。

試料は、試料 1.6 ml とアセトニトリル 0.4 ml を混合し、0.45  $\mu$ m フィルターでろ過した。カラムは本カラムとして PEGASIL ODS SP100 (6 mm $\times$ 250 mm)、ガードカラムとして PEGASIL ODS SP100 (6 mm $\times$ 30 mm)、溶離液は水：アセトニトリル：TFA=800：200：1 を用いた。流速は 1.0 ml/min、試料注入量は 10  $\mu$ l、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C で、220 nm と 280 nm の吸光度でモニタリングしながら目的のピークを分取した。

陽イオン交換クロマトグラフィにて得られた Frc. 4 と Frc. 6~8 について、日立ハイテクノロジー製の L-2000 シリーズを用いてアミノ酸分析を行った。また、Frc. 4 については HPLC にて精製したものも分析した。

ペプチドの加水分解は試料 2 ml と 36% 塩酸 2 ml を混合し、110 $^{\circ}$ C、22 時間加水分解後、塩酸を除去した。

分析試料の調製は、加水分解前の試料は原液を供し、加水分解後の試料は 0.02 M 塩酸で溶解し、2 ml に調製したものを供した。それぞれ、0.45  $\mu$ m フィルターでろ過後、分析を実施した。

ペプチド構成アミノ酸の算出は、以下の式を用いて算出した。

$$\text{遊離アミノ酸 } (\mu\text{M}) = \text{加水分解前アミノ酸 } (\mu\text{M})$$

$$\text{構成アミノ酸 } (\mu\text{M}) = \text{加水分解後アミノ酸 } (\mu\text{M}) - \text{加水分解前アミノ酸 } (\mu\text{M})$$

加水分解後のアミノ酸の値が加水分解前よりも小さい場合は、ペプチド構成アミノ酸は 0 とした。

精製状況の確認は HPLC (装置は HPLC による精製と同じ) を用いて、GPC モードと逆相モードによる分析を行った。

GPC モードについて、試料は、試料 1 ml とアセトニトリル 1 ml を混合し、0.45  $\mu$ m フィルターでろ過した。カラムは分析カラムとして Ohpak SB-802.5 HQ (8.0 mm $\times$ 300 mm)、ガードカラムとして Ohpak SB-G (6.0 mm $\times$ 50 mm)、溶離液はアセトニトリル：水：TFA=500：500：1 を用いた。流速は 0.6 ml/min、試料注入量は 10  $\mu$ l、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、検出は 220 nm と 280 nm の吸光度の測定で分析を行った。

逆相モードについて、試料は、試料 1.6 ml とアセトニトリル 0.4 ml を混合し、0.45  $\mu$ m フィルターでろ過した。カラムは分析カラムとして PEGASIL ODS SP100 (6 mm $\times$ 250 mm)、ガードカラムとして PEGASIL ODS SP100 (6 mm $\times$ 30 mm)、溶離液は水：アセトニトリル：TFA=800：200：1 を用いた。流速は 1.0 ml/min、試料注入量は 10  $\mu$ l、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C、検出は 220 nm と 280 nm の吸光度の測定で分析を行った。

HPLC にて精製した試料についてペプチドシーケンスによるアミノ酸配列解析を株式会社ニッピに依頼した。

結果は下記のとおりである。

#### ①Frc. 4

陽イオン交換クロマトグラフィによる精製で得たフラクションの GPC モードによる HPLC 分析を図 2.1、逆相モードによる分析を図 2.2 に示す。GPC モードによる分析の結果、このフラクションの主たる物質は分子量約 200 だった。逆相モードによる分析で、Frc. 4 は UV 280 nm の吸収があり、トリプトファンおよびチロシンと比較してみたが一致しなかった。

HPLC による精製で得た試料の逆相モードによる HPLC 分析結果を図 2.3 に示す。精製前よりも不純物と考えられるピークが少なくなった。

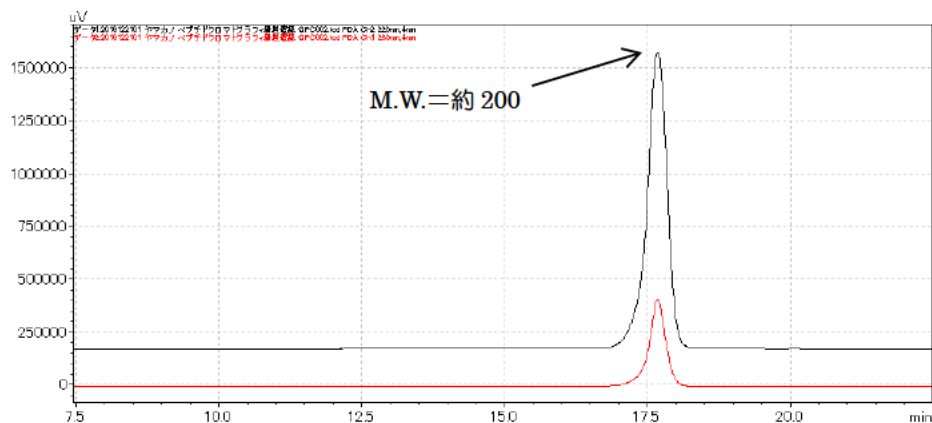


図 2.1. 陽イオン交換クロマトグラフィにより得た Frc. 4 のクロマトグラム (GPC モード)  
 黒 : Frc. 4 (UV 220 nm) 赤 : Frc. 4 (UV 280 nm)

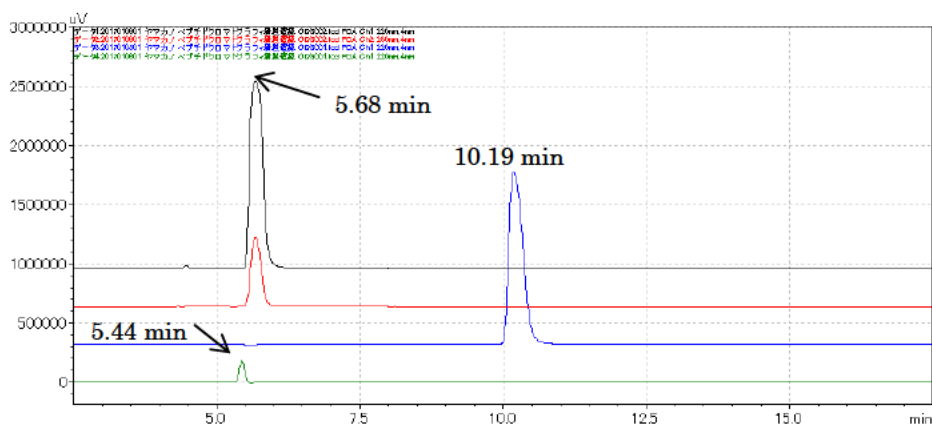


図 2.2. 陽イオン交換クロマトグラフィにより得た Frc. 4 のクロマトグラム (逆相モード)  
 黒 : Frc. 4 (UV 220 nm) 赤 : Frc. 4 (UV 280 nm)  
 青 : 0.4 mg/ml Trp (UV 220 nm) 緑 : 0.04 mg/ml Tyr (UV 220 nm)

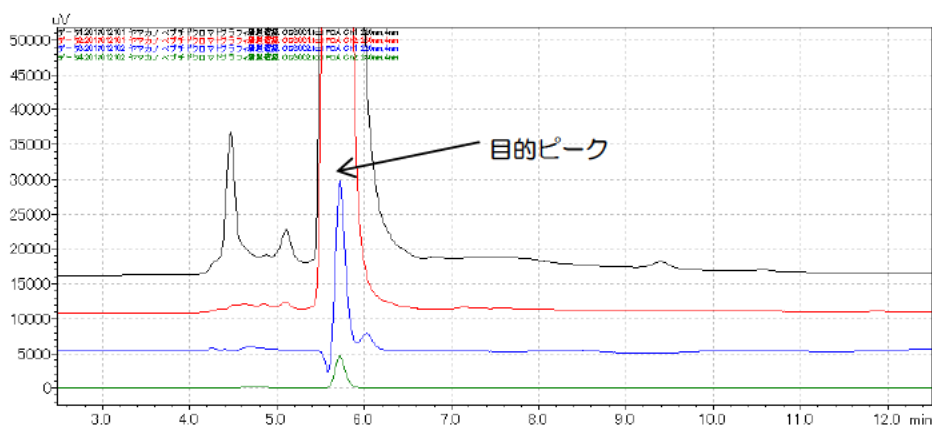


図 2.3. Frc. 4 の HPLC による精製で得た試料のクロマトグラム (逆相モード)  
 黒 : 精製前 (UV 220 nm) 赤 : 精製前 (UV 280 nm)  
 青 : 精製後 (UV 220 nm) 緑 : 精製後 (UV 280 nm)

②Frc. 6~8

陽イオン交換クロマトグラフィによる精製で得たフラクションの GPC モードによる HPLC 分析を図 2.4、逆相モードによる分析を図 2.5 に示す。GPC モードによる分析の結果、このフラクションの主たる物質は分子量 800~900 だった。GPC および逆相モードによる分析で、Frc. 6~8 は UV 280 nm の吸収が小さかった。

HPLC による精製で得た試料の逆相モードによる HPLC 分析結果を図 2.6 に示す。精製前よりも不純物と考えられるピークが少なくなった。

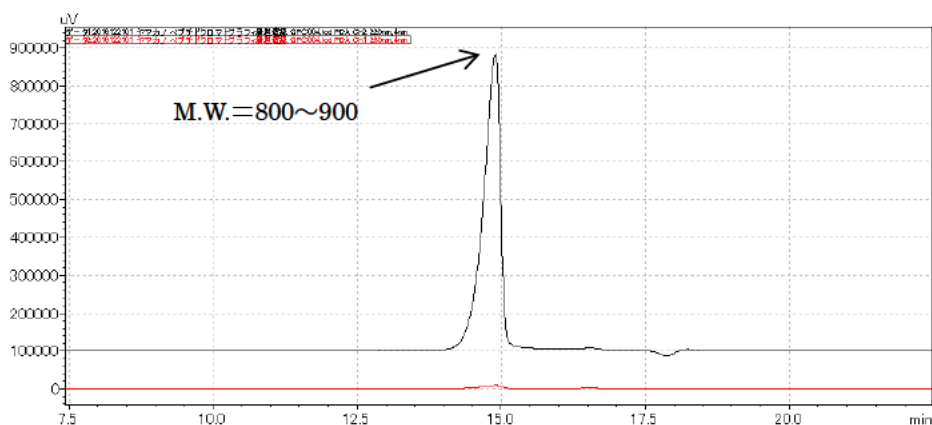


図 2.4. 陽イオン交換クロマトグラフィにより得た  
Frc. 6~8 のクロマトグラム (GPC モード)  
黒 : Frc. 6~8 (UV 220 nm) 赤 : Frc. 6~8 (UV 280 nm)

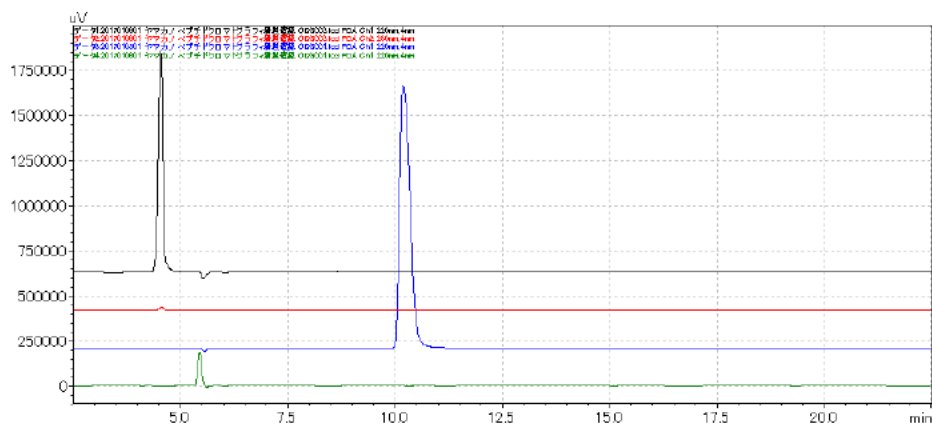


図 2.5. 陽イオン交換クロマトグラフィにより得た Frc. 6~8 のクロマトグラム (逆相モード)  
黒 : Frc. 6~8 (UV 220 nm) 赤 : Frc. 6~8 (UV 280 nm)  
青 : 0.4 mg/ml Trp (UV 220 nm) 緑 : 0.04 mg/ml Tyr (UV 220 nm)

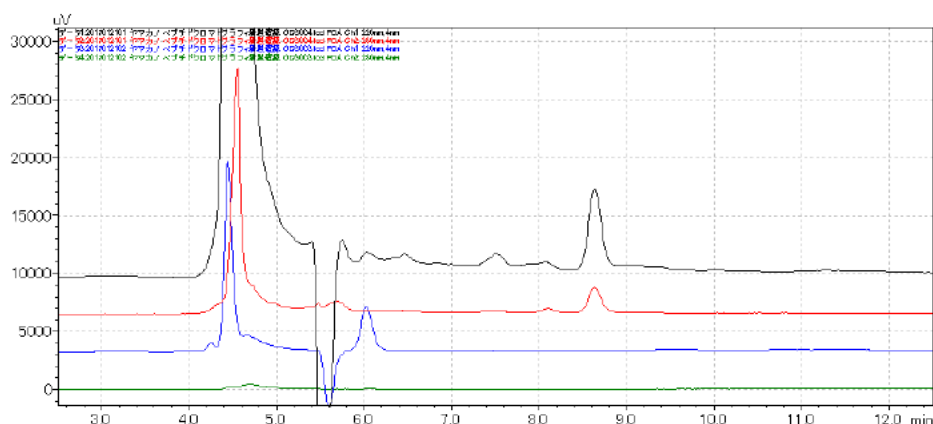


図 2.6. Frc. 6~8 の HPLC による精製で得た試料のクロマトグラム (逆相モード)

黒：精製前 (UV 220 nm) 赤：精製前 (UV 280 nm)

青：精製後 (UV 220 nm) 緑：精製後 (UV 280 nm)

陽イオン交換クロマトグラフィによる精製で得た Frc. 4 のアミノ酸分析結果を表 2.1、Frc. 6~8 の結果を表 2.2 に示す。Frc. 4 および Frc. 6~8 では構成アミノ酸が複数検出されたことから、主たる物質以外に不純物が含まれていると考えられた。また、HPLC による精製で得た Frc. 4 は、Glu が構成アミノ酸として検出されたが、精製前の試料では検出されなかったことから誤差と考えた。

表 2.1. Frc. 4 のアミノ酸分析結果

	分解後 ( $\mu\text{M}$ )	分解前 ( $\mu\text{M}$ )	構成 ( $\mu\text{M}$ )
Asp	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Thr	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Ser	0.0 (0.0)	0.0 (0.1)	0.0 (0.0)
Glu	0.0 (4.0)	0.6 (3.4)	0.0 (0.6)
Pro	273.3 (0.0)	0.0 (0.0)	273.3 (0.0)
Gly	195.1 (2.2)	0.0 (0.0)	195.1 (2.2)
Ala	545.0 (1.2)	0.1 (0.0)	544.8 (1.2)
Cys	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Val	150.2 (0.6)	1.0 (0.1)	149.2 (0.5)
Met	26.4 (0.0)	0.0 (0.1)	26.4 (0.0)
Ile	111.7 (0.2)	0.0 (0.0)	111.7 (0.2)
Leu	186.7 (0.0)	0.0 (0.0)	186.7 (0.0)
Tyr	3.7 (0.0)	6.8 (0.0)	0.0 (0.0)
Phe	86.8 (0.0)	0.0 (0.0)	86.8 (0.0)
Orn	23.2 (1.4)	2.5 (0.0)	20.7 (1.4)
Lys	202.8 (0.0)	23.3 (0.0)	179.5 (0.0)
His	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Arg	12.6 (0.0)	2.1 (0.0)	10.5 (0.0)

※括弧内は HPLC にて精製した試料

表 2.2. Frc. 6~8 のアミノ酸分析結果

	分解後 ( $\mu\text{M}$ )	分解前 ( $\mu\text{M}$ )	構成 ( $\mu\text{M}$ )
Asp	0.0	0.0	0.0
Thr	0.0	0.0	0.0
Ser	0.0	0.2	0.0
Glu	0.0	2.7	0.0
Pro	0.0	0.0	0.0
Gly	27.7	0.0	27.7
Ala	59.8	0.1	59.7
Cys	0.0	0.0	0.0
Val	19.5	1.1	18.5
Met	0.2	0.0	0.2
Ile	10.9	0.0	10.9
Leu	49.6	0.0	49.6
Tyr	13.3	0.0	13.3
Phe	38.8	8.1	30.7
Orn	2.6	0.3	2.3
Lys	58.0	3.7	54.2
His	0.0	0.0	0.0
Arg	9.6	6.6	3.1

第一回目として HPLC により精製した Frc. 4 と Frc. 6~8 について分析依頼をしたが、アミノ酸が検出されずに、解析に至らなかった。これは、試料中のペプチド含量が低いと考え、第二回目として濃度を上げた Frc. 4 を分析依頼したがこちらも解析に至らなかった。

大豆の酵素分解物には、生活習慣病（高血圧、高脂血症等）予防に関する生理活性ペプチドの存在が報告されている。豆乳をスーパー酵母（白神こだま酵母）と麹で発酵させた豆乳発酵調味液にも、大豆酵素分解物と同様の生理活性ペプチドが生成していると考えられる。

分子量約 200 の物質に関し、構成アミノ酸及び UV 吸収の有無について調査したところ、構成アミノ酸は Gly、Ala、Val、Ile が検出され、UV 吸収を示していた。当社のアミノ酸分析システムでは Trp の検出はできないが、このペプチドと考えられる物質には UV 吸収がある事を考慮すると、Trp が含有されていると考えられる。文献から上記ペプチドと推定される物質は、血圧降下作用を示す ACE 阻害ペプチドとして報告されている「Val-Ala-Trp」の可能性が高く、アミノ酸配列解析を外部機関に依頼したが、解析には至らなかった。その原因は現段階では不明（分析試料中に妨害物質が含有していたか？）だが、構成アミノ酸と UV 吸収の特徴から、本調味液には大豆由来の ACE 阻害ペプチドである「Val-Ala-Trp」が含有されていると推察される。

「Val-Ala-Trp」の分子量は 374 である。GPC モードによる HPLC 分析では、Frc. 4 の物質は分子量が約 200 を示していたが、カラムの浸透限界である可能性があるため、正確な値ではないと考えられる。よって、真の分子量が 374 でも分析値では約 200 と示された可能性がある。

この ACE 阻害ペプチドが含有されていれば、異味・異臭のマスクング以外に、健康に即した調味料としても拡販ができるのではないかと期待できる。

### 2-1-3 無菌化及び酵素（プロテアーゼ）活性残存を両立させる加熱方法の確立

豆乳発酵液の無菌化加熱条件下で酵素活性を失わない担子菌（キノコ類）耐熱性プロテアーゼを配合することによりコントロールされたプロテアーゼ活性残存発酵液の加熱条件・配合比率等の製造法を確立した。また、保存中のプロテアーゼ活性の経時変化を調査した。さらに、製品の保存性の指標となる滴定酸度の分析を実施し品質基準となる酸度を確立した。

#### 配合担子菌の選抜

発酵後に残存する米麴由来のプロテアーゼは、活性が目標値より低く且つ変動幅が大きく、食品加工企業が活用するプロテアーゼとしては不適と判断されたので、他の食品素材からのプロテアーゼを活用することとした。活用プロテアーゼとして必須の要件は耐熱性を有していることである。食品加工用素材は微生物的に安全であることが求められている。豆乳発酵液は、その低pHや高アルコール濃度のため最終的に加熱により無菌化が容易に達成できる。そのため、無菌且つプロテアーゼ活性を有することはこの製品の食品素材としての活用にとって大きなアドバンテージとなる。また、豆乳発酵液は上述のように微生物にとって過酷な性状を有していることから、従来の加熱殺菌条件より穏和な加熱により無菌化が可能である。種々の調査の結果、担子菌（キノコ類）が耐熱性プロテアーゼ活性を有することが判明した。担子菌自体は微生物であるがこの殺菌は容易であることから、プロテアーゼの耐熱性・色調・コスト等から配合するキノコ類の選抜を実施した。加熱試験に供したキノコ類は、エノキ・マイタケ・白マイタケ・シイタケ・エリンギ・ホンシメジである。その結果、白マイタケが豆乳発酵液中でのプロテアーゼの加熱による失活が低くまた豆乳発酵液の色調に影響がなく且つコスト的にも使用可能であった。このことから配合する担子菌としては白マイタケを選抜した。

#### 白マイタケ配合の加熱試験

豆乳発酵液10に対して重量比で1の白マイタケを混ぜ、ミキサーで十分に混合粉砕したものを供試試料として65℃～85℃で10分間の加熱処理を行い冷却48時間～72時間後の残存微生物を測定した。その結果を下表に示した。

表 白マイタケ配合豆乳発酵液の10分間加熱処理後の菌数（1回目）

10分 Keep	一般生菌数用培地	真菌用培地
加熱前	$1.0 \times 10^2$	$10^1$ 個未満
65℃	$2.5 \times 10^2$	$10^1$ 個未満
70℃	$1.0 \times 10^2$	$10^1$ 個未満
75℃	$9.5 \times 10^2$	$10^1$ 個未満
80℃	$1.5 \times 10^1$	$10^1$ 個未満
85℃	$0 \times 10^1$ 個未満	$10^1$ 個未満

表 白マイタケ配合豆乳発酵液の10分間加熱処理後の菌数（2回目）

10分 keep	冷却 48 時間後		冷却 72 時間後	
	一般生菌数用培地	真菌用培地	一般生菌数用培地	真菌用培地
初発	0	0	$1.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^1$
加熱前	$2.0 \times 10^2$	$6 \times 10^0$	$2.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^1$
65℃	$1 \times 10^1$	0	$1.2 \times 10^1$	0
70℃	$1.5 \times 10^1$	0	$1.6 \times 10^1$	0
75℃	$2 \times 10^1$	0	$2 \times 10^1$	0
80℃	$7 \times 10^0$	0	$8.5 \times 10^0$	0
85℃	$0.5 \times 10^1$	0	$0.5 \times 10^1$	0

1回目及び2回目とも、各々の加熱温度10分間保持では残存菌数は大きな差異は観察されなかった。そこで同一温度達温での同様な試験を実施した。その結果を下表に示した。

表 白マイタケ配合豆乳発酵液の達温加熱処理後の菌数

達温	一般生菌数用培地	真菌用培地
加熱前	$1.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$
65℃	$2.0 \times 10^2$	$2.1 \times 10^2$
70℃	$1.5 \times 10^2$	$1.8 \times 10^2$
75℃	$2.0 \times 10^2$	$1.2 \times 10^2$
80℃	$1.4 \times 10^2$	$1.1 \times 10^2$
85℃	$1.0 \times 10^1$	$4.0 \times 10^1$

10分間加熱処理試験と同様、達温加熱処理でも残存菌数で温度による大きな差異は認められなかった。プロテアーゼ活性の残存は加熱処理条件が穏和なほど高いと予測されるため65℃加熱処理に関してさらに検討を進めた。

65℃達温及び10分間保持の重量比10%白マイタケ配合の加熱豆乳発酵液を調製し、常温1ヶ月及び2ヶ月保存の試料の微生物を分析した。その結果を下表に示した。

尚、豆乳発酵液は初発菌数が一般生菌及び酵母とも100個/gに調製したものを使用した。

表 白マイタケ配合豆乳発酵液の65℃処理後の菌数（1ヶ月目）

	48 時間後		72 時間後	
	一般生菌数用培地	真菌用培地	一般生菌数用培地	真菌用培地
65℃達温①	$2.0 \times 10^1$	0	$2.0 \times 10^1$	0
65℃達温②	$2.0 \times 10^1$	0	$2.0 \times 10^1$	0
65℃10分①	$1.0 \times 10^0$	0	$1.0 \times 10^0$	0
65℃10分②	$1.0 \times 10^1$	0	$1.0 \times 10^1$	0



表 白マイタケ配合豆乳発酵液の65℃処理後の菌数（2ヶ月目）

	48 時間後		72 時間後	
	一般生菌数用培地	真菌用培地	一般生菌数用培地	真菌用培地
65℃達温①	1.5×10 <sup>1</sup>	0	2.0×10 <sup>1</sup>	0
65℃達温②	1.0×10 <sup>0</sup>	0	2.0×10 <sup>1</sup>	0
65℃10分①	1.0×10 <sup>1</sup>	0	1.0×10 <sup>1</sup>	0
65℃10分②	3.0×10 <sup>0</sup>	0	3.0×10 <sup>0</sup>	0

何れの試験区でも酵母は検出されず、また一般生菌も増加は観察されなかった。さらに、常温保存により一般生菌数はこれまでの保存試験同様減少していた。これらのことから、白マイタケ配合豆乳発酵液の加熱殺菌は65℃で十分であり、スケールアップした際は温度分布むらから10分保持が良いと判断された。

さらに、65℃処理後及びその後の保存中のプロテアーゼ活性を測定したところ下表の結果が得られた。

表 白マイタケ配合豆乳発酵液の加熱処理によるプロテアーゼ変化

	プロテアーゼ力価 (U/g)		
	pH3.0	pH6.0	pH7.5
65℃達温処理後	0	5	20
65℃10分保持処理後	1	4	15
65℃達温処理後1ヶ月常温保存	1	4	12
65℃達温処理後1ヶ月4℃保存	0	6	13
65℃達温処理後2ヶ月常温保存	0	4	11
65℃達温処理後2ヶ月4℃保存	1	6	12

食品加工で有用な弱酸性～中性付近のマイタケ由来のプロテアーゼ活性は、65℃加熱処理によっても十分な活性を保持し、その活性は常温保存でも加工に必要な十分な力価を有することが確認された。

このことより、豆乳発酵液を食品加工企業で活用する際に加工でプロテアーゼを作用させる場合、白マイタケを配合することにより、従来のように添加物としてのプロテアーゼ酵素剤を使用することなく、プロテアーゼ活性含有の天然物由来の食品原料として豆乳発酵液を使用することが可能となり、豆乳発酵液の活用の広がりが期待される。

### 滴定酸度の品質基準の確立

本開発の豆乳発酵液の保存性は、配合する食塩濃度・酵母が生成するエチルアルコール濃度及び酵母が生成する有機酸と豆乳タンパク質の分解物であるアミノ酸による低pHが保存性の源となっている。食塩濃度とエチルアルコール濃度は配合割合から規定されるが、pHは発酵度合い及び酵素分解度合いにより変動する。発酵と分解の程度により変動することは、この豆乳発酵液を活用する食品加工にとって大きな問題となる。そこで、pH面での基準化の指標として、実際のpHより重要であるpH緩衝能

の基準化を進めた。pH緩衝能としての分析値としては滴定酸度が有効且つ容易であることから滴定酸度の基準化を目指した。

これまでの試験仕込みした豆乳発酵液の分析結果を表に示した。

表 豆乳発酵液の滴定酸度分析結果

	酸度Ⅰ	酸度Ⅱ	総酸度
H28 5/26 仕込み	6.32	3.72	10.04
H28 1/25 仕込み	6.78	4.18	10.96
H27 7/10 仕込み	7.98	4.56	12.54
H27 8/20 仕込み	8.92	4.44	13.36
H27 10/21 仕込み	8.13	4.56	12.69
H28 11/17 仕込み①	7.30	4.05	11.35
H28 11/17 仕込み②	7.25	4.12	11.37
H28 11/17 仕込み 20	7.26	4.17	11.43
H28 11/17 仕込み 170	7.09	4.05	11.14
H28 11/17 仕込み① <sup>レ</sup>	7.29	4.03	11.32
H28 11/17 仕込み② <sup>レ</sup>	7.30	4.01	11.31

滴定酸度は値が大きいほどpH緩衝能が強い。豆乳発酵液を活用する加工食品製造においてこのpH緩衝能が大きいほど豆乳発酵液の保存性の影響が大きくなる。そのため表より可能な限り大きな数値を基準値として設定することとした。結果、内部基準値として酸度Ⅰ；6.5以上、酸度Ⅱ；4.0以上、総酸度；10.5以上と定めた。このことにより、豆乳発酵液の主たる機能の一つである保存性が食品加工製造現場でも保証されることになった。

## 2-2 食品加工での活用課題への対応

### 2-2-1 各種農林水畜産物加工品への活用方法への確立

#### 豆乳発酵調味料を用いた試作開発

県内の農水畜産企業5者との利用研究会を立ち上げ、綿密な情報交換とともに各社分担して試作・分析・解析を行い、商品化を目指して個別打合せを実施した。

その結果、今後(イ)無添加蒲鉾(ロ)表皮が乾燥し難い(食感)畜肉ハム(ハ)旨味増強機能発揮商品(ホヤ(消臭)、パニール(ナチュラルチーズの風味強化)、塩辛)(ニ)低塩保存機能発揮商品(塩辛、志津川タコ卵巣カラスミ珍味)に的を絞り、それぞれのベネフィットを最大限に発揮させる調味液製造条件の最適化を図る方向性が導かれた。

①水産系②畜肉系③乳製品系④珍味系の事業者(顧客)を選定し、それぞれが得意とする領域で試作(共同)を実施した。

#### 特許 Map 作成による競合・供給先の分析

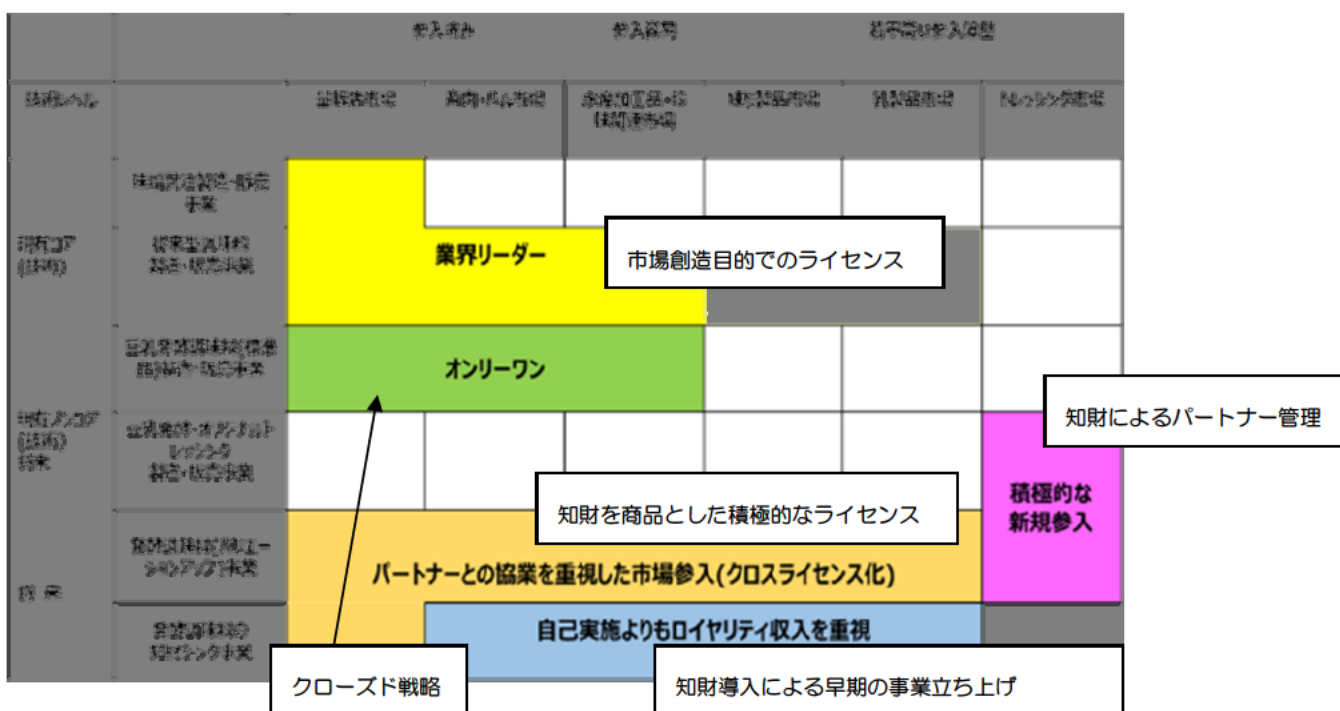
開発資材(調味液)の特性・機能を引き出せる商品分野(領域)として、①水産加工品②畜産加工品③珍

味④乳製品を選定し、各々について特許 Map を作成し、開発資材(調味液)の位置づけ、妥当性を調べた。その結果、開発資材(調味液)の特性・機能のうち、①低塩化(保存性)と②消臭・風味・旨味補強、食感改善機能に可能性を見出した。

特に、水産加工品の中、練り製品の場合は無臭マスキング効果、水産加工品の中、水産珍味製品・塩辛の場合は低塩保存性及び生魚臭マスキング効果、畜産加工品の中、ハム製品の場合は保湿性及び食感改良効果、乳製品の中、パニール(ナチュラルチーズ)の場合は呈味付与及び低塩保存性効果について、従来特許での技術動向がある中、開発資材(調味液)の比較優位性を見出すことができた。

### MT マトリックスに基づく技術展開(参入領域探索)検討

当該研究により得られた技術と、展開(参入領域)方向について検討し、以下の方向を得た。



## 2-2-2 マーケティング

### 食品展示会への出展

当該開発資材(調味液)の味・香りのバランス評価を試み、開発資材について単品モデルを決定した。東京会場の展示会に2回出展し、商品化展開の方向性を明らかにした。展示会1回目は共同で試作開発した商品領域を展示しアンケート評価等の手段を通じて消費者の反応を獲得した。2回目は、それぞれの商品領域についての独自性(味香りの分析を含め)に磨きをかけ、コアコンピタンスを決めた形で発信した。また食品展示会出展に際しアンケート及び聞き取り調査を実施した。

更に、アンケート結果を参考にしながら各種農林水畜産物加工品への利用展開で行うそれぞれの商品開発に沿った製造技術確立を目指した。

## 自社ドレッシングの開発

BtoC向け自社ドレッシング試作を行い、最終的に1商品のレシピが完成した。このドレッシングで当該開発資材（豆乳発酵調味料）味、香り、バランス評価を実施した。結果、総じてバランスが取れた味わいであること、ジャンルにとらわれない万能ドレッシングとして位置づけられること、豆乳発酵調味料を加えることで「酸味」「旨味」バランスが取れた味わいになる、との評価を得た。

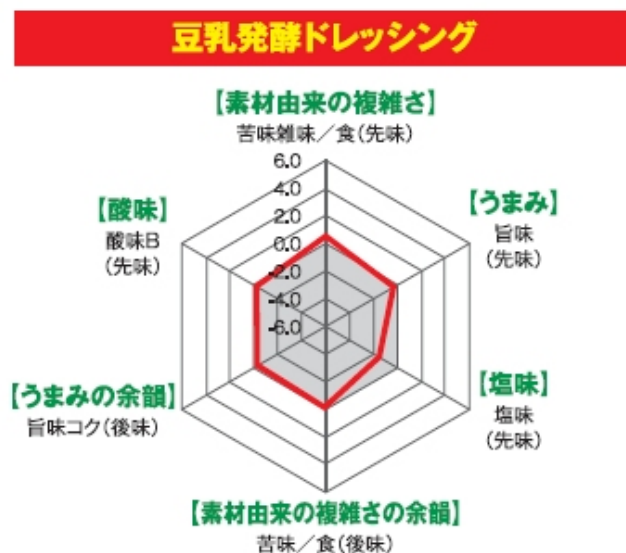
2回の展示会出展を通じての来場者アンケートより、94%の方から「美味しい」と高評価を受けた。同アンケートより、来場者は「豆乳、発酵、酵母、添加物フリー、低塩」というキーワードに興味をもった方が多くいることが分かった。

ドレッシング以外にもチーズや練り製品の開発で成果を得たこともあり、バランス評価及び展示会出展で得た情報を活用しながら、BtoC向け商品のみならず、BtoB向け商品の開発や各種農林水畜産物への活用方法の確立に大きな期待が持てる。

## 開発調味液の従来品との差別化要素の調査

開発調味液の代表として豆乳発酵調味液ドレッシングについて、8種の従来品とAlpha M.O.S測定を実施した。その結果、豆乳発酵調味液ドレッシングは「塩味」はやや控えめであるが旨味、苦味、旨味コク、酸味、雑味等の各軸とも平均的で、色々な味わいのドレッシングの中で、「バランスがとれた味わい」とされた。

### 豆乳発酵調味料を使用したドレッシングの味わい分析



測定：株式会社味香り戦略研究所

## 最終章 全体総括

本研究開発品の最大の特性である保存性を発揮する最適発酵条件の検討では、初年度モデル発酵液を用いて最高の保存性を示すアルコール濃度・pH・食塩濃度の最適バランスを確立した。次年度はモデル発酵液で確立したアルコール濃度・pH・食塩濃度となる原料の豆乳・米麴・酵母・塩の最適配合比率と発酵温度・発酵期間・発酵容器の最適発酵条件を確立し、この製造条件で試作した豆乳発酵液について汚染微生物添加による保存試験を実施し目標である、常温で30日又は4℃で90日の保存性を有することを確認した。さらに、pHに関しては下げたい場合は発酵パターンを前急後緩型、あまり下げたくない場合は前緩型を採ることで対応可能であった。最終年度は、スケールアップで大きな問題であった発酵温度のコントロールと発酵初期の旺盛な発泡を抑制する仕込み方法を確立した。さらに、川下企業から要望の多いスムージー化を達成した。

本研究開発品は、上記の低塩保存料としての機能の他、消臭剤・旨味剤・酸味料・乳化剤・増粘剤・健康機能付与物質・酵素剤・無菌調味料として使用可能な特性を有しており、本研究開発品を食品加工に活用する場合、従来使用していた各種添加物の配合が不要となる。その特性を最大限に発揮する各種成分の分析を実施し、その存在量と機能の保持を確認し、これら機能の目標を達成した。但し、酵素剤としての機能、特に川下企業から求められるタンパク質分解酵素活性の保持は達成できなかったため、必要な際には当初の配合に動物由来以外の天然物（キノコ）の配合を新たに加えることで解決した。本研究開発品は食品加工において高配合であればあるほど各種特性を十分に発揮する。しかしながら対象加工食品の一部で高配合により本研究開発品の独特の風味が目立つ場合があった。各種特性を保持しながらのこの風味の低減化が、今後の研究課題として残った。

当該事業により、今後の事業展開として豆乳発酵技術を「事業展開の基本」に置き、その優位性である保存性・健康(減塩)志向性・安全性(無添加)、食感改善調味料の「滲み出し領域」に進出するべきであることが示唆された。大きな事業効果である。

すなわち、伝統的な味噌醤油メーカーならではのオンリーワン企業を目指し、新分野参入を狙うべく経営課題を起点に知財戦略を遂行することが求められる。

事業効果として得られた「滲み出し市場」のターゲットとして、畜肉ハム業界、乳製品(チーズ等)業界、水産加工品業界、珍味業界等製品等であり、これら本来の「旨味」を引き出す調味料、原料由来物質のマスキング調味料として位置づけられるような今後の技術開発がさらに求められよう。

また既に知財を保有する企業とのアライアンスは、依頼元の事業機会を掴むための時間短縮に繋がり、やはり必須構成要素としての「保存性」「健康性(減塩)」「食感改善」の新技术は不可欠であると判断される。