Bacillus 属細菌による水ようかんの離水

内藤 茂三^{*1,†}・松永 大吾^{*2}

(^{*1}愛知県食品工業技術センター, ^{*2}愛知工業大学)

(受付 平成13年7月5日)

(受理 平成14年9月28日)

Syneresis of Mizu-yokan (Soft Bean Jam Jelly) by *Bacillus* spp.

Shigezo NAITO^{*1,†} and Daigo MATSUNAGA^{*2}

(^{*1}Food Research Institute, Aichi Prefectural Government,
Nishi-ku, Nagoya 451-0083; [†]Corresponding author)

(^{*2}Aichi Institute of Technology, Yagusa-cho, Toyoda 451-0356)

Physicochemical and microbiological investigation for syneresis of Mizu-yokan (Soft bean jam) revealed the conversion of saccharide in the components by a specific bacteria, *Bacillus subtilis* etc.; Mizu-yokan with syneresis over 30% was accompanied by the increases of glucose, fructose, maltose and maltotriose, and the formation of levan from sucrose in the components. These phenomena were also observed in the Mizu-yokan-inoculated cells of *Bacillus* spp. isolated from the spoiled samples, or in jam added to culture broth from which bacterial cells had been excluded by membrane filter, suggesting that the marked syneresis of Mizu-yokan derives from the action of *Bacillus* spp., bacteria in the raw materials.

Key words: Syneresis, Mizu-yokan (Soft bean jam), Sucrose, Levan, *Bacillus subtilis*

緒 言

ようかんには練りようかんとうようかんのほかに蒸しようかんがある。練りようかんはあん、しょ糖、寒天をよく溶かし込んで十分時間をかけて水分25%前後まで炊き上げ、練り上げるものである。これに対して水ようかんはしょ糖液に生あんを加えて加熱し、あらかじめ溶解させた寒天液を添加後沸騰させて短時間で煮詰め上げ、水分50%前後としたものである。高水分のため水ようかんを保存すると、水が表面ににじみでて水滴となる。これは寒天が収縮して包含していた遊離水を押し出してくるためである。湯殺菌水ようかんでは正常製品でも離水が必ず生じており、離水率は3~5%であるが、肉眼的には全く変化が認められない。しかし、離水率が20%以上になると肉眼的にも変化が認められ、この際、必ず*Bacillus*属細菌が検出されることおよび無殺菌水ようかんや加熱不良水ようかんのように微生物が残存しているおそれがある場合、離水率が30%以上になることが経験的に知られていた。著者の一人は、水ようかんの微生物変敗について、変敗原因菌の分離・同定、さら

にその分離菌、あんなどを含む原材料、製造工程のオゾン処理について検討を行ってきた^{9,10)}。ここでは変敗水ようかんで最もよく認められる*Bacillus*属細菌とそれらによる離水現象について検討したので報告する。

材料および方法

1. 供試試料および菌株

愛知県下の水ようかん製造会社3社(A, B, C)が製造した小倉、練および抹茶の湯殺菌水ようかんを用いた。微生物の分離には離水率20%以上のものを用いた。以下離水率20%以上の水ようかんを離水水ようかんとし、離水率5%以下の水ようかんを正常水ようかんとした。供試標準菌株として*Bacillus subtilis* IFO 3007, *B. licheniformis* IFO 12107, *B. stearothermophilus* ATCC 12980を用いた。

2. 水ようかんの製造および試験方法

試作水ようかんの基本配合は小豆生あん200g、しょ糖200g、粉末寒天2.5g、水250g、食塩0.6gを用いて製造し、仕上量は560g、水分含量52%とした。なお、しょ糖量を変化させる場合は適宜仕上量を変化させた。試作方法は寒天に水50gを加えて膨潤させておき、小豆生あんにしょ糖、食塩および残りの水を加え、混合しながら約15分間煮沸させた。これにあらかじめ使用

[†] 連絡先

^{*1} ☎451-0083 名古屋市中区新福寺町2-1-1

^{*2} ☎470-0356 豊田市八草町八千草

水の一部で溶解しておいた寒天液を加えて所定の重量まで煮詰めた後、その 67 g を上部直径 6.5 cm、下部直径 5.5 cm、高さ 2.0 cm のカップに充填し、密封した。これを容器ごと沸騰水中で 30 分間加熱し、流水中で冷却後製品とした。保存試験は、30℃ の恒温器内で 2 週間行った。分離した *Bacillus* 属細菌の栄養細胞の接種やその粗酵素を添加して人工的な変敗水ようかんを試作する場合は、正常水ようかんの加熱後凝固する前に滅菌注射器で 1 カップ当たりそれぞれ 1 ml を接種および添加し、その穴を滅菌ゴム板で塞いだ。

3. 微生物の分離・同定・計数

微生物の分離には、試料を殺菌済み生理食塩水に加えて、無菌的にミキシング後、その一部を標準寒天培地（日水製菓(株)製）上に塗抹し、30℃、3 日間培養して寒天平板上に出現したコロニーの形状および顕微鏡での観察結果を勘案して単一コロニーを釣菌し、30℃ で培養し、以下の実験に用いた。分離菌株の同定は「改訂版微生物の分離と同定」^[3] と「Bergey's Manual of Systematic Bacteriology」^[18] に従って行った。なお、*Bacillus* 属細菌の菌数は、試料水ようかんを 95℃、10 分間加熱後上記寒天培地に塗抹し、培養後出現したコロニーの細菌菌体が桿菌でカタラーゼ反応陽性、かつ芽胞を形成するグラム陽性菌を *Bacillus* 属細菌として計数した。

4. 供試菌株の細胞懸濁液および菌体外酵素液の調製

分離菌株をしょ糖 3%、酵母エキス 1%、ポリペプトン 0.5% 含有液体培地 200 ml に接種し、30℃、2 日間 1,000 rpm、ロータリーシェイカー（トーマス科学機器(株)製、TAL-RS12 型）で培養を行った後、培養液を 1,500×g、4℃ で 10 分間遠心分離を行った。この際、沈殿物を冷却した滅菌脱イオン水で 3 回洗浄した後、適量の同イオン水に懸濁したものを細胞懸濁液 (1.0×10^8 CFU/ml) とした。さらに上澄液をメンブランフィルター（ポアサイズ 0.45 μ m、ミリポア(株)製）でろ過したものを粗酵素液とした。なお、この粗酵素液を 100 ml 容三角フラスコに 20 ml 入れて 95℃、30 分間加熱失活させたものを加熱粗酵素液とした。

5. 糖類の分析

水ようかんの糖類の分析は次のように行った。水ようかんに 10 倍量の脱イオン水を添加してホモゲナイズ後、そのホモゲナイズ液をメスシリンダーに 10 分間放置して不溶物を沈殿させた。この沈殿部分を東洋ろ紙 No. 2 で除去後、ろ液からさらにタンパク質を除去するために酢酸鉛飽和溶液（結晶酢酸鉛 $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ （関東化学(株)製、特級）を滴下・混合して沈殿させた。これを再び同様のろ紙でろ過後、過剰の鉛を除去するためにろ液にシュウ酸ナトリウム（関東化学(株)製、特級）粉末を少量入れ、シュウ酸鉛を沈殿させた。生じた沈殿を同様のろ紙でろ過したものを分析用試料とした。なお、離水液も同様に処理して試料とした。なお、試料糖質として、しょ糖、グルコース、フラクトース、マルトース、

マルトトリオース（いずれもナカライテスク(株)製）を用いた。

糖類の分析は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC、日本分光(株)製、OL-2 型）により 2 つの方法で行った（ポンプ：PU-980、検出器：830-RI 示差屈折計）。方法 1：カラムは Shodex Ionpak S-802 (8.0 mm×500 mm i.d.)（昭和電工(株)製）を用い、移動相はイオン交換水を溶媒として流速 1.0 ml/min、カラム温度 80℃ で展開した。この場合の最小検出感度は試料ピーク S/ノイズピーク $N=10$ の場合、しょ糖 0.380 mg/ml、グルコース 0.205 mg/ml、フラクトース 0.330 mg/ml であった。また小倉水ようかん 5g にしょ糖、グルコースおよびフラクトース 200 mg 添加した場合の回収率はそれぞれ 92.3%、93.2% および 92.5% であった。方法 2：カラムは Finepak SIL NH2-5 (4.6 mm×250 mm i.d.)（昭和電工(株)製）を用いてアセトニトリル：水=80：20 から 60：40 を移動相として、流速 0.7 ml/min、カラム温度 40℃ で行った。この場合の最小検出感度は保持時間により異なったが平均して $S/N=10$ の場合、しょ糖 0.390 mg/ml、グルコース 0.230 mg/ml、フラクトース 0.375 mg/ml であった。また小倉水ようかん 5g にしょ糖、グルコースおよびフラクトース 200 mg 添加した場合の回収率はそれぞれ 91.5%、92.4% および 90.5% であった。

グルコースとフラクトースは F・キット（グルコース/フラクトース；ベーリンガー・マンハイム山之内製菓(株)製）を用いる酵素法でそれぞれ分別定量した。

しょ糖はしょ糖含量 0.1~0.5% になるように希釈した糖液 50 ml を 300 ml 容三角フラスコにとり 25% 塩酸 5 ml を加え、65℃ の湯浴に 15 分間処理した後冷却し、10% 水酸化ナトリウム溶液で中和した^[11]。これを 500 ml 容のメスフラスコに移し、標線まで加水、一定量としたものについて酵素法で求めた。

全糖量はフェノール硫酸法^[21]で、還元糖量は Somogyi-Nelson 法^[21]で求めた。Brix はデジタル屈折計（(株)アタゴ製、RX-1000）を用いて試料品温 20℃ で測定した。水分は海砂法^[3]、水分活性は、水分活性測定装置（Nova Sina 社製、JEL-20 型）を用いて 25℃ の恒温器中で測定した。

ケトース、還元糖の検出はペーパクロマトグラフィー（PPC）により行った。東洋ろ紙 No. 50 (18×20 cm) を使用し、1-ブタノール-ピリジン-水 (6:4:3, v/v/v) を展開溶媒として用い、上昇法により 2 重展開を行った。ケトースの検出はフロログルシンによる方法^[11]、還元糖の検出はアルカリ性硝酸銀による浸漬法^[11]により行った。糖類の確認のために薄層クロマトグラフィーを行った。シリカゲル G を担体とし、展開溶媒はアセトン-*N*-ブタノール-水=5:4:1 を用い、発色は濃硫酸を噴霧後加熱した。糖類の旋光度は高速自動旋光計（SEPA-200、(株)堀場製作所製）を用いて、25℃ で測定した。

糖類の赤外吸収スペクトルは測定試料 1 mg を臭化カリウム 200 mg に混合し、錠剤法により赤外分光光度計（日本分光(株)製、IR-5B）で測定した。また、糖類の混融試験はマイクロ融点測定装置（(株)島津製作所製、MN-2 型）によって行った。

6. 高分子糖類の調製⁵⁾

しょ糖 10%，酵母エキス 1% を含む培地を 0.1 M リン酸緩衝液で pH 7.0 に調整後加圧加熱滅菌したもの 10 ml を透析チューブ内に入れて分離菌株 (*B. subtilis* No. 1 菌株) を 1 白菌耳接種した。このチューブをあらかじめ加圧加熱滅菌した 0.25% ポリペプトン 2 l の液に無菌的につるして、30℃、7 日間培養した。培養終了後チューブ内の培養液に脱イオン水を 100 ml 添加した後、遠心分離 (1,500×g, 4℃, 10 分間) を行った。その上澄液にアセトンを加えて生じた沈殿物に 10 ml の脱イオン水を添加し、さらに 2 倍量のクロロホルム、*n*-アミルアルコールを加えて振とうし、前記と同様の条件で遠心分離した。その水層部を採り凍結乾燥して高分子糖類画分とした。この高分子糖類のアセチル化は Lyne らの方法⁷⁾に従い、供試高分子糖類 1 g を水 2 g に溶解し、ピリジン 20 ml を加え、氷水中で冷却しつつ無水酢酸 20 ml を滴下した。これを室温で一晩放置した後、氷水中に注入し沈殿物を得た。これをアセチル化高分子糖類とした。イヌリンの場合も同様にして行った。

7. 水ようかんの離水率およびゼリー強度の測定

離水率は次式にて算出した。

離水率 = (製品重量 - ようかん部重量) × 100 / 製品重量

ゼリー強度の測定は万能引張圧縮試験機 (Datally 社製 401-DCS-100) により圧縮速度 100 mm/min, チャート速度 1,000 mm/min, ロードセクター 100, Gage25 (フルスケール 1 kg), プランジャー (円筒形) 直径 10 mm の条件で測定した。

実験結果

1. 水ようかんの離水性状と *Bacillus* 属細菌数

離水率 20% 以上の湯殺菌水ようかんの離水状況と *Bacillus* 属の菌数を測定した結果を Table 1 に示した。抹茶水ようかんは離水率 35~45% と高く、ついで小倉水ようかんが 30~40% であったが、練水ようかんは 20~35% であった。正常な水ようかんはいずれも Brix 42~52% であったが離水の発生により Brix 40~49% に低下した。また、いずれの水ようかんも離水部分は Brix 42~48% であった。なお今回供試した水ようかんは Brix の約 80% が全糖量に相当した。正常な水ようかんの水分は 43~54% であったが、離水により低下して 36~47%、ゼリー強度は 410~515 g/cm² から 714~1025 g/cm² に著しく増加し、硬くなった。

湯殺菌水ようかんの *Bacillus* 属細菌数はいずれも 300 CFU/ml 以下であったが離水した水ようかんでは $1.1 \times 10^5 \sim 3.6 \times 10^6$ CFU/ml が検出された。なお離水にかかわらず、いずれの水ようかんも製造直後とほぼ同じ pH である 6.10~6.25 の範囲にあった。

2. 離水水ようかんの糖構成比の変化

離水水ようかんは容器内で縮み現象を生じていた。水分 43~54% の水ようかんでは糖の構成比の変化に由来する浸透圧の変化が予測された。離水水ようかんとは正常な水ようかんの糖の構成比を調べた。離水したいずれの水ようかんともしょ糖が著しく減少し、グルコース、フラクトース、マルトース、マルトトリオースおよび高分子糖類の存在が認められた。A 社製の離水率 40% の小倉水ようかん、離水率 35% の練水ようかん、離水率 45% の抹茶水ようかんの糖の組成比を比較した結果が Table 2 である。いずれの水ようかんも離水によりしょ糖が正常品の 98.5~99% から 7.0~10.5% と著しく減少し、グルコースが正常品の 0.2~0.5% から 40.3~45.7%、高分子糖類が正常品の 0.5~0.6% から 14.8~20.0% と増加していた。離水液の糖の構成比は水ようか

Table 1. Syneresis of Mizu-yokan (Soft bean jam)

Kind of Mizu-yokan	Moisture (%)		Rate of syneresis (%)		Brix (%)		Jelly extention (g/cm ²)		Cells of <i>Bacillus</i> spp. (CFU/ml)	
	a**	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Ogura (A)*	54	52	3	40	50	48	510	980	300>	2.1×10^6
Neri (A)	47	44	5	35	48	46	479	885	300>	1.8×10^6
Matcha (A)	45	43	3	45	46	44	505	1025	300>	3.6×10^6
Ogura (B)	48	45	5	37	48	46	495	912	300>	3.8×10^5
Neri (B)	46	43	4	26	45	43	410	743	300>	2.7×10^5
Matcha (B)	45	41	3	43	42	40	515	989	300>	2.9×10^5
Ogura (C)	50	47	5	30	52	49	468	830	300>	5.5×10^5
Neri (C)	46	44	3	20	46	45	470	714	300>	1.1×10^5
Matcha (C)	43	41	5	35	45	44	494	920	300>	8.0×10^5

*A, B, C: Mizu-yokan manufacturer, **a: Normal Mizu-yokan, b: Mizu-yokan with syneresis Ogura Mizu-yokan: Soft azuki-bean jam, Neri Mizuyokan: Soft ootebo-bean jam with coloring agent, Matcha Mizuyokan: Soft ootebo-bean jam with green tea

Table 2. Saccharide composition of Mizu-yokan with syneresis produced in A factory

Saccharide	Ogura		Neri		Matcha	
	a	b	a	b	a	b
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Glucose	0.4	45.7	0.5	40.3	0.2	45.0
Fructose	0.3	17.5	0.4	16.7	0.2	15.0
Sucrose	98.8	8.5	98.5	10.5	99.0	7.0
Maltose	0.0	7.0	0.0	6.0	0.0	6.5
Maltotriose	0.0	3.5	0.0	3.0	0.0	3.5
Polysaccharide	0.5	14.8	0.6	20.0	0.6	18.0
Unkown	0.0	3.0	0.0	3.5	0.0	5.0

a: Normal Mizu-yokan, b: Mizu-yokan with syneresis

Rate of syneresis: Ogura Mizu-yokan 40%, Neri Mizu-yokan 35%, Matcha Mizu-yokan 45%

んとほぼ同じであった。

3. *Bacillus* 属細菌による水ようかんの離水

著者の一人は、水ようかんの膨張、離水およびネット生成現象をレトルト製品、湯殺菌製品のいずれにも認め、それらから *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. circulans* および *B. stearothermophilus* を検出している⁹⁾。これは水ようかんの Brix が 40~50% であるため、この Brix 濃度で生育可能な上記の菌が検出されたものと考えられる⁹⁾。そこで再度、前項で用いた A 社製の離水率が 40% で水分含量 52% の小倉水ようかん、35% で水分含量 44% の練水ようかん、45% で水分含量 43% の抹茶水ようかんから *Bacillus* 属細菌の分離・同定を行った。標準寒天平板培地上に生じたコロニーの形状およびその細胞の顕微鏡観察結果から判断し、各水ようかんよりそれぞれ 3 タイプの *Bacillus* 属細菌、小倉水ようかんでは数が最も多い No. 1 とその 1/1,000 近い No. 2, No. 3 を、練り水ようかんならびに抹茶水ようかんからそれぞれ最も数の多い No. 4 と No. 7 を、さらにその 1/1,000 以下の No. 5 および 6, あるいは No. 8 および 9 を分離した。これらの各水ようかんの中で最も多く検出された No. 1, No. 4, No. 7 の同定試験結果は Table 3 に示すように、これらの 3 菌株はすべて *B. subtilis* と判定した。同様に他の分離菌株を同定した結果、No. 2, No. 5, No. 8 は *B. licheniformis*, No. 3, No. 6, No. 9 は *B. stearothermophilus* であった。著者の一人はこれらの *Bacillus* 属細菌は水ようかんの原材料および製造工程における汚染菌であることを明らかにしている⁹⁾。製造工程において *Bacillus* 属細菌に汚染された水ようかんでは加熱処理を行ってもこれらの一部がなお生存し、保存中に増殖して水ようかんの離水を生成させるとともに包装容器内での縮み現象に関与していると考えられる。離水水ようかんから分離した上記 9 菌株の *Bacillus* 属細菌の細胞懸濁液 1 ml (1.0×10^8 CFU/ml) を、試作した水ようかんに接種して 30℃ で 2 週間培養した場合に認められる離水生成の結果を Table 4 に示した。いずれの菌株の場合にも離水は生成したが *Bacillus* 属菌株により離水率に顕著な差異が認められ

た。すなわち離水率 30% 以上を示した水ようかんは No. 1, No. 4, No. 7 で *B. subtilis* 菌体を接種したものであった。

4. 離水に及ぼす糖および微生物の影響

離水の生成割合が使用した糖により大きく異なり、しょ糖を使用した水ようかんの場合、多量の離水が生じることを認めた。そこで今回、離水に及ぼす糖原料の影響を観察するため、しょ糖、グルコース、フラクトースおよびマルトースを 30% 濃度でそれぞれ別個に使用した小倉水ようかんを試作した。すなわち No. 1. 分離株細胞液 1 ml (1.0×10^8 CFU/1 ml) を小倉水ようかん 1 カップ (67 g) 当たり接種して離水生成に及ぼす糖の影響を検討した結果を Table 5 に示した。しょ糖を用いた場合は対照が 5% であったのに対し 35% と離水率は高くなった。グルコース、フラクトース、マルトースを使用した場合は、いずれも細菌細胞の接種の有無にかかわらず離水率は 3~7% で大きく変わらなかった。他方、しょ糖使用量を 0~50% に変化させて上記と同条件で分離 No. 1 株の細胞液接種、粗酵素液、またはその加熱粗酵素液を添加して水ようかんを試作した。30℃, 2 週間保存後の離水生成状況を測定した結果を Fig. 1 に示した。対照と加熱粗酵素液の場合はしょ糖濃度を 10~50% に増加しても離水率は 3~8% と低く、分離株細胞液接種または粗酵素液を添加したものはしょ糖含量が増加するほど離水率が高まり、しょ糖含量が 50% のときには離水率はそれぞれ 45, 40% となった。このときのしょ糖の変化を測定した結果、いずれのしょ糖濃度も分離株細胞液接種または粗酵素液の添加により著しく減少し、その減少率は 85~94% であった。また対照または加熱した粗酵素液を添加した場合の減少率は 15~30% であった。

5. 離水水ようかんより分離した *B. subtilis* No. 1 株の生産する高分子糖類

以上の結果より、*Bacillus* 属細菌によるしょ糖の分解・縮合反応が起きていると考えられる。そこで最も水ようかんの離水に関与していると考えられる分離 *B. subtilis* No. 1 株の粗酵素液を用いて高分子糖類の生成

Table 3. Characteristics of *Bacillus* spp. isolated from Mizu-yokan with syneresis

	Strain No. of isolates			<i>B. subtilis</i> IFO 3007
	1	4	7	
Cell shape				
shape	Rod	Rod	Rod	Rod
length (μm)	0.8	0.8	0.8	0.8
Gram reaction	+	+	+	+
Spore formation	+	+	+	+
shape	E	E	E	E
position	Center	Center	Center	Center
swelling at sporulation	—	—	—	—
Motility	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Anaerobic growth	—	—	—	—
Voges-Proskauer broth	+	+	+	+
pH in Voges-Proskauer broth	5.5	5.3	5.6	5.5
Hydrolysis of casein	+	+	+	+
gelatin	+	+	+	+
starch	+	+	+	+
Utilization of citrate	+	+	+	+
propionate	—	—	—	—
Formation of indole	—	—	—	—
Egg-Yolk lecithinase	—	—	—	—
Nitrate reduced to nitrite	+	+	+	+
Growth at pH 6.8 nutrient broth	+	+	+	+
pH 5.7 nutrient broth	+	+	+	+
Growth in 7% NaCl	+	+	+	+
Growth at 10°C	—	—	—	—
30°C	+	+	+	+
50°C	+	+	+	+
55°C	—	—	—	—
Acid from D-glucose	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+
D-xylose	+	+	+	+
D-mannitol	+	+	+	+
Gas from glucose	—	—	—	—

+: Positive, —: Negative, E: Ellipsoidal

Table 4. Syneresis of Ogura Mizu-yokan inoculated cells of each strain of *Bacillus* spp. isolated from Mizu-yokan with syneresis

Strain No. of isolates (Identified name)	Rate of syneresis (%)	
	Mizu-yokan	Mizu-yokan inoculaed <i>Bacillus</i> cells
No. 1 (<i>B. subtilis</i>)	5	40
No. 2 (<i>B. licheniformis</i>)	3	20
No. 3 (<i>B. stearothermophilus</i>)	5	23
No. 4 (<i>B. subtilis</i>)	4	45
No. 5 (<i>B. licheniformis</i>)	5	22
No. 6 (<i>B. stearothermophilus</i>)	3	25
No. 7 (<i>B. subtilis</i>)	5	38
No. 8 (<i>B. licheniformis</i>)	3	20
No. 9 (<i>B. stearothermophilus</i>)	4	23

One ml (1.0×10^8 CFU / ml) of each strain isolated from Mizu-yokan with syneresis was inoculated to 67 g of pasteurized Ogura Mizu-yokan in a cup and the rates of syneresis were estimated after incubation at 30°C for 14 days.

について検討した。透析チューブ内で生成した高分子糖類を材料および方法の項で記した方法で調製・同定を行った。凍結乾燥品は無色透明で、還元性はなく冷水に易溶で、65% エタノールに不溶であった。これらの高分子糖類を 0.1 N 硫酸、60°C で 60 分間加水分解後に薄層

クロマトグラフィーを行うといずれも原点のスポットは消失し、単一のスポットのみが認められた。この高分子糖類の加水分解液も還元糖をフラクトースとして測定すると分解に用いた高分子糖類とほぼ等しい重量のフラクトースが検出された。加水分解液のセリワノフ反応¹⁵⁾は

Table 5. Effect of saccharide of Ogura Mizu-yokan on syneresis by *B. subtilis* No. 1

Saccharide	Rate of syneresis (%)	
	Mizu-yokan	Mizu-yokan inoculated <i>B. subtilis</i> No. 1 cells
None	3	4
Sucrose	5	40
Glucose	3	7
Fructose	5	6
Maltose	4	7

One ml (1.0×10^8 CFU/ml) of cell suspension of *B. subtilis* No. 1 isolated from the Ogura Mizu-yokan with syneresis was inoculated to Ogura Mizu-yokan containing 30% of each saccharide and the rates of syneresis were estimated after incubation at 30°C for 14 days.

Fig. 1. Effect of sucrose concentration on rate of syneresis of Mizu-yokan (Soft bean jam) inoculated cells of *B. subtilis* No. 1 strain isolated from Mizu-yokan with syneresis. Ogura Mizu-yokan (Soft azuku bean jam) were incubated with no addition of saccharide (○), the cells of *B. subtilis* No. 1 strain (△), cultural broth of *B. subtilis* No. 1 excluded the cells by membrane filter (□), and the heated cultural broth (●), respectively at 30°C for 14 days.

陽性でカルバゾール硫酸法²¹⁾によるウロン酸反応は陰性であった。ペーパークロマトグラフィーでの成分はフラクトースと *Rf* 値が一致するスポット以外は認められなかった。また分解物は、フラクトースの赤外部吸収スペクトル、混融試験の結果と一致し、この点からも構成成分はフラクトースのみと確認された。これらの高分子糖類とイヌリンをそれぞれアセチル化し、前後の赤外部吸収スペクトルを測定すると、両者は非常によく似た吸収曲線を示した。しかし両者をアセチル化し、その前後の旋光度を測定するといずれもアセチル化前は(−)の値であった。しかしアセチル化後は高分子糖類の旋光度は(+)の値に変化したが、イヌリンは(−)のままであった。以上のことより、これらの高分子糖類はフレイン型の構造をもつレバンであると判断された¹⁷⁾。また同様の方法でレバンは30%以上の離水率を示した水ようかんおよび離水液から検出された。

考 察

水ようかんの離水とは固形物と溶液に分離することを

いい、この現象はゲルの離水といわれるものである。離水は水ようかんのみならずジャム、ゼリー、クリーム、生あん、固形食品の缶詰などゲル状食品に一般に見られる。これはまた熱力学的には不安定なゲルから安定なゲルへの移行と考えられる¹⁶⁾。離水率20%以上の水ようかんの特徴は、本来、しょ糖が98.5~99%のものが7~10.5%と著しく少なく、グルコースが0.2~0.5%のものが40.3~45.7%と著しく多いことである。この原因は水ようかん中に残存する *Bacillus* 属細菌増殖に伴い生産される酵素によりしょ糖が変化したものと考えられる。しょ糖は水を吸収し、保水力が高いためしょ糖濃度の高い水ようかんほど離水は少ない。しょ糖の20°Cにおける溶解度は67.1%であるのに対しグルコースのそれは49.7%である⁴⁾。またしょ糖は過飽和の溶液を作りやすく¹⁴⁾、水ようかん中では水分子を砂糖分子の方に固定して吸水物質として働き、あんでんぶをα-でんぶんに保って老化による離水を防止している¹²⁾。また離水率20%以上の水ようかんの内部には高分子糖であるレバンが確認された。レバンはしょ糖とラフィノースから作られる細菌性多糖類として知られ¹⁷⁾、*B. subtilis*¹¹⁾、*B. polymyxa*⁸⁾などの液体培地においてその生成が報告されている。この場合炭素源としてはしょ糖が用いられ、菌体内外に生産される。また、水ようかん中の *Bacillus* 属細菌により生成されたレバンは水溶性で離水液中に溶解して水ようかんの水分を吸収し、さらに離水を進行させるものと考えられる。*B. subtilis* は、しょ糖からグルコースとレバンを生成するレバンスクラゼ¹⁹⁾のほか、あんに存在するでんぶんやその分解物としょ糖からマルトース、マルトリオースを生成するところからα-グルコシダーゼ²⁰⁾の酵素も同時に生産していると考えられる。レバンスクラゼはしょ糖を分解してβ-2,6結合の高分子フラクタンであるレバンを合成する酵素であるが、受容体としてフラクトース以外の糖の存在下、しょ糖に作用させると受容体分子のC1位の水酸基に選択的にフラクトシル基を転移させ、非還元性のヘテオリゴ糖を生産することが知られている^{2,6)}。本実験においても *B. subtilis* No. 1 株の接種やその粗酵素液の添加により20%以上の離水が生成するのは、いずれもしょ糖が含まれている系のみであり、また初発しょ糖含量が

高いほど離水率が高まった。

Hestrin ら⁵⁾が *B. subtilis* および *Aerobacter levanicum* について $(n+m)$ aldose-D-fructofuranoside + (n) H₂O → $(n+m)$ aldose + (n) D-fructose + levan の式を発表し、消費されたしょ糖は生成されたグルコース、フラクトースなどの還元糖とレバンの和に相当するとした。水ようかん中では *B. subtilis* No. 1 株などによりしょ糖からグルコース、フラクトースおよびレバンが生産されて蓄積され、しょ糖とグルコース、フラクトースおよびレバンの水分保持力の差異により離水が進行したものと思われる。

要 約

1. 20% 以上の離水を生じた水分含量 43~54% の湯殺菌水ようかんから、いずれも $1.1 \times 10^5 \sim 3.6 \times 10^6$ CFU/ml の *Bacillus* 属細菌が検出された。5% 以下の離水率のもの *Bacillus* 属細菌はいずれも 300 CFU/ml 以下であった。

2. 離水した湯殺菌水ようかんから *Bacillus* 属細菌の分離・同定を行った。分離数は圧倒的に *B. subtilis* が多く、次いで *B. licheniformis* と *B. stearothermophilus* であった。

3. 20% 以上の離水は *Bacillus* 属細菌の増殖により引き起こされた。すなわち同細菌が生産する酵素がしょ糖の分解や縮重合を引き起こしてグルコース、フラクトース、マルトース、マルトリオースおよびレバンを生産させ、しょ糖の抱水を解除したことによることが示唆された。

文 献

- Challinor, S. W., Haworth, W. N. and Hirst, E. L.: The constitution and chain lengths of levan. *J. Chem. Soc.*, 676-679 (1934).
- Feingold, D. S., Avigad, G. and Hestrin, S.: Enzymatic synthesis and reaction of a sucrose isomer α -D-galactopyranosyl- β -D-fructofuranoside. *J. Biol. Chem.*, **224**, 295-307 (1957).
- 長谷川武治編: 改訂版微生物の分離と同定. p. 99-153, 学会出版センター, 東京 (1985).
- 浜口栄次郎, 桜井芳人: シュガーハンドブック. p. 785, 朝倉書店, 東京 (1964).
- Hestrin, S., Aavineri-Shariro and Ashner, M.: The Enzymic production of levan. *Biochem. J.*, **37**, 450-456 (1943).
- Hestrin, S., Feingold, D. S. and Avigad, G.: Synthesis of sucrose and other β -D-fructofuranosyl aldoses by levansucrase. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6710 (1955).
- Lyne, R. R., Peat, S. and Stacey, M.: The constitution of certain levans formed by bacterial action. *J. Chem. Soc.*, 237-241 (1940).
- Murphy, D.: Structure of a levan produced by *Bacillus polymyxa*. *Can. J. Chem.*, **30**, 872-878 (1952).
- 内藤茂三: 水ようかんの微生物変敗とオゾン殺菌について. 包装研究, **8**(2), 15-29 (1988).
- 内藤茂三, 塚本 忠: 製あん工程の微生物菌数に及ぼすオゾン処理の影響. 愛知食品工試年報, **30**, 68-83 (1989).
- 永原太郎, 岩尾裕之, 久保彰治: 全訂食品分析法. p. 121-123, 柴田書店, 東京 (1991).
- 二国二郎, 不破英次, 辰巳ちえ: β -澱粉化に及ぼす蔗糖の影響. 農化, **23**, 90-91 (1949).
- 日本食品工業学会, 食品分析法編集委員会編: 食品分析法. p. 47, p. 102-103, p. 128-133, p. 241-246, 光琳, 東京 (1982).
- 日本女子大学食物学教室編: 調理科学. p. 13, 朝倉書店, 東京 (1974).
- 小原哲二郎: 食品分析ハンドブック. p. 192, 建白社 (1973).
- 理化学辞典第2版. p. 599, 岩波書店, 東京 (1955).
- 左右田徳郎, 江上不二夫: 多糖類化学. p. 189-679, 共立出版, 東京 (1955).
- Sneath, P. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Hort, J. G.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. p. 1105-1139, Williams and Wilkins Co., Baltimore, London, Los Angeles, Sydney (1986).
- Tanaka, T., Yamamoto, S., Oi, S. and Yamamoto, T.: Structures of heterooligosaccharides synthesized by levansucrase. *J. Biochem.*, **90**, 521-526 (1981).
- 千葉雅哉, 下村得治: α -グルコシダーゼの糖転移作用. 澱粉科学, **26**, 59-67 (1979).
- 瓜谷郁三, 駒野 徹, 志村憲助, 中村道徳, 船津 勝: 生物化学実験法 1, 還元糖の定量法. p. 9-11, p. 50-52, p. 60-64, p. 109-111, 学会出版センター, 東京 (1990).