

醤油用低温発酵性酵母の育種開発

安藤義則*, 狩行勲**, 亀澤浩幸*, 下野かおり*, 高峯和則***, 日高修**

Breeding of Psychrotrophic Yeast for Brewing Soy Sauce

Yoshinori ANDO, Isao KARIGYO, Hiroyuki KAMESAWA, Kaori SHIMONO,
Kazunori TAKAMINE and Osamu HIDAKA

醤油醸造では、発酵初期のプロテアーゼ活性を維持するため、もろみ温度を低温に保持する。この間、酵母を添加しても発酵が行われなため、醸造期間が長期化し過度に着色が進む一因となっている。そこで、淡口醤油における醸造期間の短縮及び淡色化を目的として、醤油もろみ等から低温発酵性酵母を分離し試験醸造を行った。その結果、醤油もろみ初期の低温かつ高pH (pH5.5~6.0) 条件下において増殖、発酵能に優れた新規な酵母を分離した。本酵母を使用することで、淡口醤油における醸造期間の短縮及び淡色化が可能となった。

Keyword : 醤油, 酵母, スクリーニング, 淡色化, 低温発酵

1. 緒言

淡口醤油は、醤油らしい風味を保ちながらも食品素材本来の色を活かす淡い色に特徴がある。色の淡さは商品価値の一つであり、消費者が淡口醤油を購入するにあたってはその判断基準になっている。醤油の着色は、醸造工程や火入れ工程におけるアミノカルボニル反応によって進み、醸造工程においては特にもろみ温度、糖濃度、pH、醸造期間に支配されていることが知られている¹⁾²⁾。

醤油の淡色化については、麹菌のキシラン分解活性を低下させた変異株を用いてもろみ中のペントース溶出量を少なくし、アミノカルボニル反応を抑制する方法³⁾や、低温条件下で良好な生育を示す乳酸菌を用いてもろみを低温、低pHに維持することで醸造中のアミノカルボニル反応を抑制する方法⁴⁾などが提案されている。

一方、醤油醸造では、仕込み初期のもろみを低温にする必要がある。これは、乳酸菌による有機酸生成を抑え、もろみのpH低下を防ぐことでプロテアーゼ活性を維持し、醤油らしい旨味を引き出すためである⁵⁾。従来の醤油酵母は、仕込み初期の低温かつ高pH (5.5~6.0) のもろみ環境では増殖、発酵能がきわめて低いため⁶⁾仕込み後約30日頃からもろみを加温し酵母の発酵を促す。しかし、アミノカルボニル反応は高温、高糖濃度、醸造期間の長期化により促進するため、これら一連のもろみ管理により、醤油が過度に着色してしまう。

そこで本報では、醤油もろみ初期の低温かつ高pH条件下においても旺盛に増殖・発酵する酵母を育種し利用するこ

とで、淡口醤油における醸造期間の短縮及び淡色化が可能になると考え、低温発酵性酵母の分離を行った。また、得られた酵母を用いて試験醸造を行い、その効果についても検討した。

2. 実験方法

2.1 酵母の分離源

鹿児島県醤油醸造協同組合（以下 醤油組合）及び鹿児島県内味噌醤油工場から醤油もろみ、味噌など約60サンプルを収集し低温発酵性酵母の分離源とした。

2.2 分離方法

各分離源を表1の集積培養用培地に添加し、15℃で集積培養を行った。この集積培養を、1週間毎に新たな集積培養液へ添加することで、振とう培養にて1回、次いで静置培養にて2回行った。次に、*Candida*属等の後熟酵母を排除するため、奥沢らの方法⁷⁾に従い、得られた集積培養液を表2のオルトバニリン添加培地に適量塗抹し、30℃で3日間培養した。良好な生育を示したコロニーを表3の高pH培養液に接種し、15℃において静置培養した後、生育が良好であった酵母を低温発酵性酵母として選別した。

表1 集積培養用培地

ブドウ糖	50 g/l
塩化ナトリウム	83 g/l
醤油	100 ml/l
クロラムフェニコール	100 mg/l
	pH 6.0

* 食品工業部

** 鹿児島県醤油醸造協同組合

*** 食品工業部（現 鹿児島大学農学部）

表2 オルトバニリン添加培地

ブドウ糖	30 g/l
カザミノ酸	4 g/l
酵母エキス	2 g/l
リン酸二水素カリウム	1 g/l
硫酸マグネシウム7水和物	0.5 g/l
塩化カルシウム2水和物	0.1 g/l
塩化ナトリウム	180 g/l
オルトバニリン	6 mg/l
寒天	20 g/l
	pH4.8

表3 高pH培養液

ブドウ糖	30 g/l
カザミノ酸	4 g/l
酵母エキス	2 g/l
リン酸二水素カリウム	1 g/l
硫酸マグネシウム7水和物	0.5 g/l
塩化カルシウム2水和物	0.1 g/l
塩化ナトリウム	180 g/l
	pH 6.0

2.3 小仕込み試験

2 L容のプラスチック容器を用い、醤油組合にて常法により製造した淡口醤油麹537gと24%食塩水1000mlを混合し、直後に酵母を 1×10^6 /gの酵母数となるよう添加した。もろみの温度は15 一定とした。仕込み後30日及び60日経過した時点のもろみを分析し、各酵母の増殖能及び発酵能を評価した。

2.4 50 L 規模製造試験

60 L容のプラスチック容器を用い、醤油組合にて常法により製造した淡口醤油麹18kgと24%食塩水34 Lを混合し、直後に酵母を 1×10^5 /gの酵母数となるよう添加した。もろみの温度は13~20 とした。経時的にもろみを分析し、各酵母の増殖能及び発酵能を評価した。

2.5 糖類発酵性及び資化性試験

「酵母の分類同定法⁸⁾」に準拠して行った。すなわち発酵性は、供試糖2%，酵母エキス0.45%，ペプトン0.75%からなる培養液に酵母菌体の懸濁液を接種し、30 で2週間培養した後、ガス発生の有無をダーラム発酵管を用いて観察した。資化性は供試糖0.5%，Yeast nitrogen base 0.67%からなる培養液に酵母菌体の懸濁液を接種し、30 で4週間培養した後、生育の有無を観察した。

2.6 実規模製造試験

醤油組合の製造設備にて試験醸造を行った。すなわち、常法により製造した淡口醤油麹6,000kgと24%食塩水13,000Lを混合し、仕込み1ヶ月後に酵母を 1×10^5 /gの酵母数となるよう添加した。温度管理は、通常行うもろみの加温を行わず、概ね15 内外で推移させた。経時的にもろみを分析し、各酵母の増殖能及び発酵能を評価した。

2.7 分析方法

アルコール分、酵母数の分析は、「しょうゆ試験法」(財団法人 日本醤油研究所 しょうゆ試験法編集委員会編)に準拠して測定した。また、ブドウ糖濃度は、示差屈折検出器による高速液体クロマトグラフ(日本分光(株))で測定した。着色度は、分光光度計にて450nmの吸光度を測定し、着色度 = $\log(OD_{450})$ として算出した。

官能試験は、もろみをNo. 2 濾紙にてろ過したろ液について、JASきき味検査員3名がその品質について評価した。

3. 結果及び考察

3.1 低温発酵性酵母の分離

鹿児島県醤油醸造協同組合及び鹿児島県内味噌醤油工場から醤油もろみ、生醤油、味噌等を約60サンプル収集し低温発酵性酵母の分離を行った。その結果、13株の低温発酵性酵母を分離した。

3.2 小仕込み試験

分離酵母13株及び既存酵母である醤油組合保有のS32株を用いて、低温条件下における小仕込み試験を行った。仕込み後30日目と60日目に、もろみの酵母数、アルコール分、ブドウ糖濃度を測定した。結果を図1~3に示す。酵母数については、既存酵母が30日目で 0.5×10^7 /g、60日目で 0.6×10^7 /gであったのに対し、分離酵母は総じて高い値を示し、特にk15株は30日目で 4.0×10^7 /gと旺盛に増殖した。アルコール分については、既存酵母が30日目で0.2vol%，60日目で0.9vol%であったのに対し、分離酵母は30日目で1.0~2.4vol%、60日目で2.8~3.6vol%と旺盛に発酵した。ブドウ糖濃度については、既存酵母が30日目で5.7g/100ml、60日目で5.6g/100mlであったのに対し、分離酵母は30日目で2.0~4.1g/100ml、60日目で0.5~1.2g/100mlと速やかに消費した。このことから、分離酵母した13株は醤油もろみ仕込み初期の低温かつ高pHの条件であっても、非常に優れた増殖、発酵能を示すことがわかった。

次に、官能評価の結果を表4に示す。既存酵母では発酵不良のため、原料に由来する「麹臭」の指摘があったのに対し、分離酵母の多くは「発酵香」、「果実香」など酵母の発酵に由来するコメントがあり、評価は概ね良好であった。

以上のことから、官能評価の良好であった分離酵母6株(表4 評価欄の 印)を選別し以降の試験に供した。

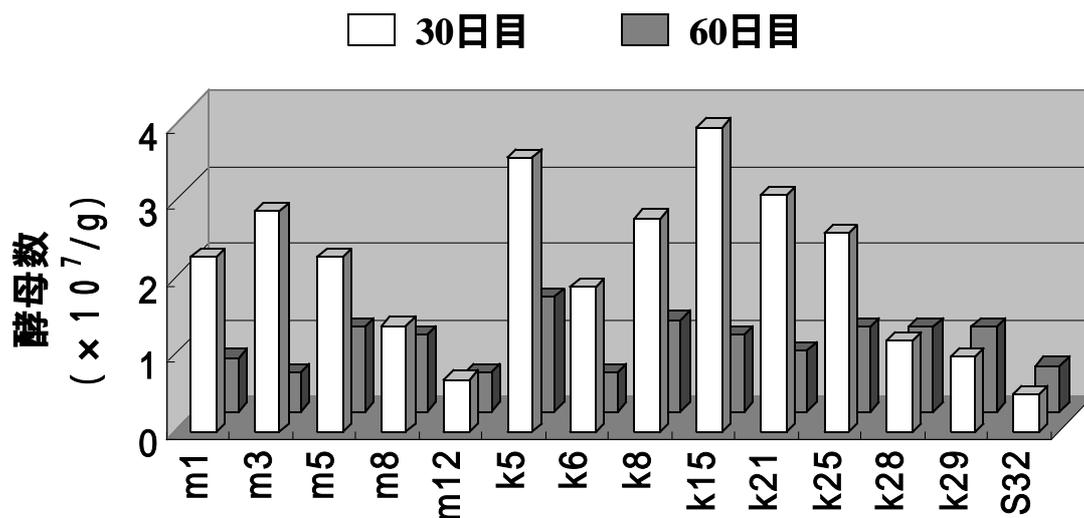


図1 小仕込み試験における酵母数

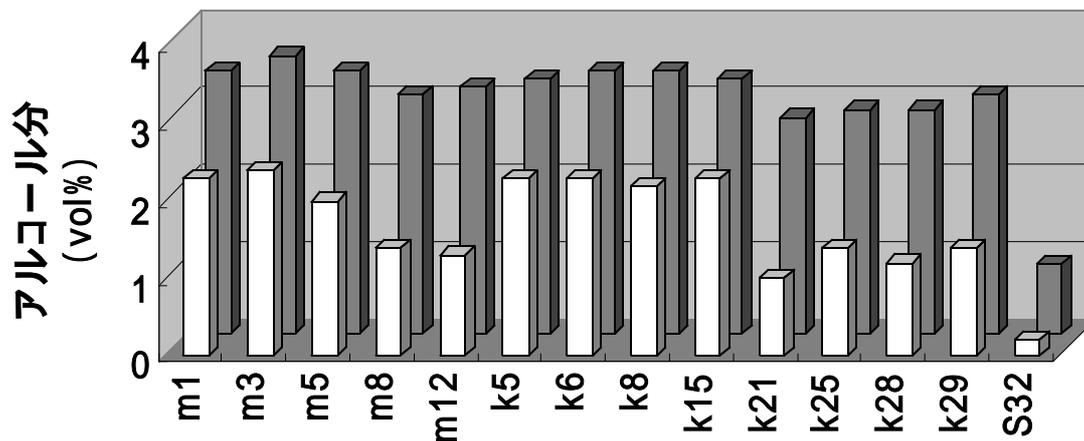


図2 小仕込み試験におけるアルコール分

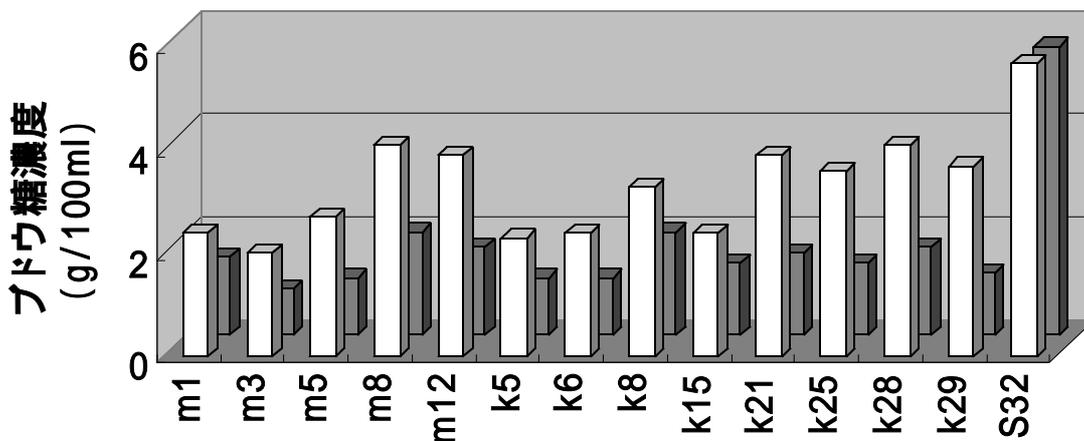


図3 小仕込み試験におけるブドウ糖濃度

表4 小仕込みにおける官能試験

菌株名	コメント	評価	菌株名	コメント	評価
m1	重い	×	k8	発酵香, きれい	
m3	発酵香		k15	発酵香, さわやか	
m5	酸化臭, ヒネ香	×	k21	麴臭	×
m8	果実香		k25	麴臭	×
m12	酸化臭, 重い	×	k28	発酵香, 芳醇	
k5	麴臭, 刺激臭	×	k29	発酵香, きれい	
k6	発酵香, クセ有り	×	S32	麴臭	×

3.3 50 L 規模製造試験

小仕込み試験にて官能評価の良好であった分離酵母6株を用いスケールアップを目的とした, 50 L 規模の製造試験を行った。経時的にもろみを採取し, アルコール分, 酵母数を測定した。まず, 酵母数の推移を図4に示す。既存酵母は28日目で $0.3 \times 10^7/g$ と増殖が緩慢であったのに対し, 分離酵母は順調に増殖し, 特にk29株は $1.7 \times 10^7/g$ と旺盛な増殖を示した。次に, アルコール分の推移を図5に示す。既存酵母は, 28日目で0.5vol%と発酵が遅れたのに対し, 分離酵母のほとんどが1.5vol%を超えており旺盛に発酵した。

前述の小仕込み試験の結果と異なり, k29株の増殖, 発酵能が他の分離酵母より優れていた。これは, 小仕込み試験のもろみ温度が15一定であったのに対し, 50 L 規模の試験では15~20と高めであり, k29株の増殖, 発酵に適した温度帯が他の分離酵母より高いためであると考えられる。いずれにしても, 分離酵母6株は既存酵母より低温発酵能に優れていた。

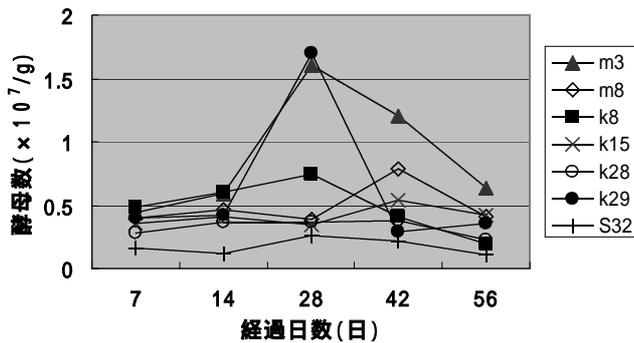


図4 50L製造試験における酵母数

醤油組合の冬期仕込みでは, 発酵終了の目安アルコール分である1.5vol%に達するまでに4ヶ月を要し, その時点での着色度は約0.4である。分離酵母を用いることで, もろみ温度15の低温条件下であっても約1ヶ月で発酵を終了させることができる。この時点での着色度は約0.12であり, 極めて色が淡く酵母による発酵香が豊かな醤油を製造できると考えられる。

3.4 分離酵母の同定試験

分離酵母の分類学的位置を明確にするために糖類の発酵性及び資化性試験を行った。結果を表5に示す。分離酵母はグルコース, ガラクトース, マルトース, シュークロースを資化し, さらにグルコース, マルトースを発酵した。ラクトースは資化, 発酵しなかった。また, 菌株の形状は球形の細胞で, 大きさは5~7 μmであった。これらの性質と形状は, 醤油組合で使用しているS32株と一致した。このことから, 分離酵母6株は全て醤油醸造において主発酵酵母と呼ばれる*Zygosaccharomyces rouxii*と同定された。

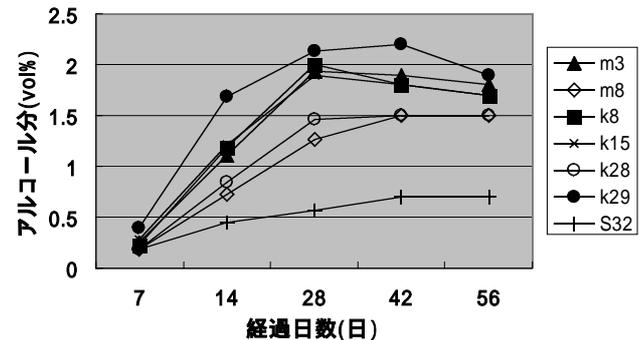


図5 50L製造試験におけるアルコール分

表5 糖類発酵性及び資化性試験

菌株名	資化性					発酵性				
	G	Ga	M	S	L	G	Ga	M	S	L
m3	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
m8	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
k8	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
k15	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
k28	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
k29	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
s32	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-

G:グルコース, Ga:ガラクトース, M:マルトース, S:シュークロース, L:ラクトース

3.5 実規模製造試験

醤油組合の製造設備にて実規模の試験醸造を行った。使用した酵母は分離酵母k8株及び既存酵母S32株である。経時的にもろみを採取し、酵母数、アルコール分を測定した。各酵母3回ずつ試験し、結果はその平均値を示した。まず、酵母数の推移を図6に示す。既存酵母は、80日目で $0.09 \times 10^7/g$ と増殖が緩慢であったのに対し、分離酵母は $0.4 \times 10^7/g$ と順調な増殖を示した。次に、アルコール分の推移を図7に示す。既存酵母は、80日目で0.8vol%と発酵が遅れたのに対し、分離酵母は1.5vol%を超えており旺盛に発酵した。

このことから、分離酵母は実規模においても十分実用に耐えうる低温発酵能を持つことが分かった。

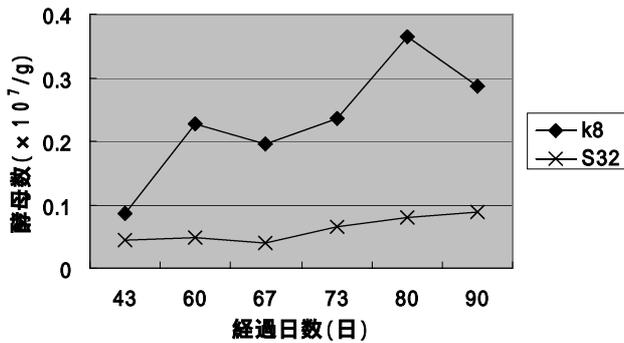


図6 実規模試験における酵母数

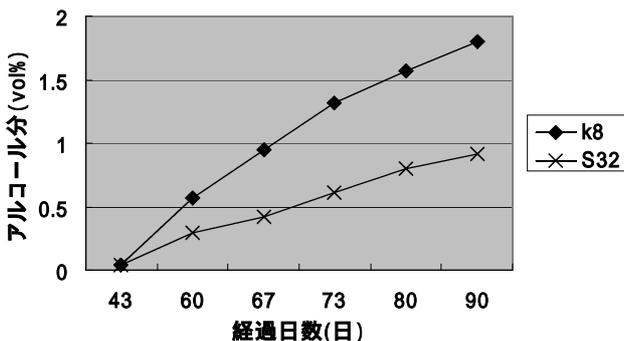


図7 実規模試験におけるアルコール分

4. 結 言

淡口醤油における醸造期間の短縮及び淡色化を目的として、醤油もろみや味噌などから低温発酵性酵母の分離を試みた。その結果、醤油もろみ仕込み初期の低温かつ高pHの条件であっても旺盛に増殖、発酵する酵母を分離した。これらの酵母を用いて各種規模にて試験醸造を実施したところ、分離酵母は既存酵母と比べ低温かつ高pHの条件下において増殖、発酵能に優れており、得られた醤油の官能評価も良好であった。

以上のことから、本低温発酵性酵母を使用することで、淡口醤油における醸造期間の短縮及び淡色化が可能となった。

参 考 文 献

- 1)木村功ら：醸協，87，566（1992）
- 2)板倉辰六郎：醤油の科学と技術，(財)日本醸造協会（1988）
- 3)橋場弘長ら：醬研，5，295（1979）
- 4)大河内俊秀ら：醬研，29，53（2003）
- 5)江口卯三夫：醬研，12，136（1986）
- 6)水沼武二：醸協，79，802（1984）
- 7)奥沢洋平ら：醬研，6，138（1980）
- 8)飯塚廣ら：酵母の分類同定法，(財)東京大学出版（1969）

