

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5145508号  
(P5145508)

(45) 発行日 平成25年2月20日 (2013.2.20)

(24) 登録日 平成24年12月7日 (2012.12.7)

(51) Int. Cl. F 1  
**C 1 2 N** 1/16 (2006.01) C 1 2 N 1/16 G  
**A 2 3 L** 1/238 (2006.01) A 2 3 L 1/238 Z  
**A 2 3 L** 1/202 (2006.01) A 2 3 L 1/202 1 0 3

請求項の数 3 (全 7 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2007-151585 (P2007-151585)                  (22) 出願日 平成19年6月7日 (2007.6.7)                  (65) 公開番号 特開2008-301759 (P2008-301759A)                  (43) 公開日 平成20年12月18日 (2008.12.18)                  審査請求日 平成22年3月24日 (2010.3.24)</p> <p>特許法第30条第1項適用 平成18年12月9日鹿児島大学において開催された社団法人日本生物工学会九州支部主催「第13回日本生物工学会九州支部大会」で発表</p> <p>微生物の受託番号 IPOD FERM P-21301</p>	<p>(73) 特許権者 591155242                  鹿児島県                  鹿児島県鹿児島市鴨池新町10番1号</p> <p>(73) 特許権者 507187927                  鹿児島県醤油醸造協同組合                  鹿児島県霧島市隼人町真孝浜田上2170番地1</p> <p>(72) 発明者 安藤 義則                  鹿児島県霧島市隼人町小田1445番地1                  鹿児島県工業技術センター内</p> <p>(72) 発明者 亀澤 浩幸                  鹿児島県霧島市隼人町小田1445番地1                  鹿児島県工業技術センター内</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低温発酵性酵母

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ジゴサッカロミセスロキシー (Zygosaccharomyces rouxii) に属し、温度10~20、pH5.5~7.0及び食塩分14~25 (w/v) %の醤油発酵試験で、仕込みから20~50日経過後に、アルコール分が2.0~3.0 (v/v) %であり、全窒素分が1.0~2.0 (w/v) %であり、色度が40~60番である生揚げを生産できる低温発酵性酵母K8 (受託番号FERM P-21301)。

【請求項2】

請求項1に記載の低温発酵性酵母を用いる発酵飲食品の製造方法。

【請求項3】

請求項1に記載の低温発酵性酵母を用いる醤油の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、醤油醸造において、低温かつ高pHの条件であっても増殖、アルコール発酵が旺盛なジゴサッカロミセスロキシー (Zygosaccharomyces rouxii) に属する酵母、及び当該酵母を使用する発酵飲食品の製造方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

醤油醸造では、仕込み直後のもろみを低温に維持する必要がある。これは、乳酸菌によ

る有機酸生成を抑え、もろみのpHを高くすることにより、プロテアーゼ活性を維持、すなわち醤油らしい旨味を引き出すためである。従来の醤油酵母は、仕込み直後の低温かつ高pHのもろみ環境では増殖、アルコール発酵能がきわめて低い。そのため、タンパク質の分解がおおむね終了する仕込み後約30日ごろにもろみを加温し、酵母を添加してアルコール発酵を行う。しかし、醤油の着色は高温、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。特に、醤油らしい香味を保ち、淡い色が特徴である淡口醤油では商品価値の低下を招いていた。

#### 【0003】

醤油の淡色化については次に示すような検討がなされている。

特開2001-61437号公報「再仕込み醤油の製造法」では、再仕込み醤油の製造において、もろみ品温を仕込み時から熟成終了まで一貫して15～23℃に保持し、かつ低温発酵性酵母を添加することにより、淡麗で、醤油特有の芳醇な香りを濃厚に有する再仕込み醤油を得た。

10

また、特開平10-179083号公報「濃厚醤油の製造法」では、低温での生育能に優れた耐塩性乳酸菌を添加することで、コクのあるうま味を有する本醸造淡色醤油が安定した品質で製造できた。

さらに、特開2006-212023号公報「淡色濃厚低塩醤油の製造方法」では、醤油をNF膜で脱色処理し、さらにNF膜で濃縮することにより、淡色・濃厚・低塩である醤油を得た。

【特許文献1】特開2001-61437号公報

20

【特許文献2】特開平10-179083号公報

【特許文献3】特開2006-212023号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

#### 【0004】

しかしながら、従来の技術では、淡色であっても酵母による発酵が不十分なため、醤油らしい香味、特に酵母による発酵香やアルコール香を有した醤油はなかった。また、従来の醤油酵母は、仕込み直後の低温かつ高pHのもろみ環境では増殖、発酵能がきわめて低いため、仕込み直後に酵母を添加しても発酵せず、醸造期間が長期化するといった製造上の課題があった。さらに、樹脂や膜を用いて醤油を脱色する方法は、それらの処理が香味成分のバランスにも影響し、醤油が淡色であっても処理前と比べると官能的にも劣ってしまうという課題があった。

30

#### 【0005】

本発明者らは、醤油醸造において、もろみが低温かつ高pHであっても速やかに醸造され、淡色かつ発酵香豊かな醤油の製造並びに醤油の短期醸造を可能とする新規な酵母を提供することを目的とする。また、本発明者らは当該酵母を用いた発酵飲食品又は醤油の製造方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

本発明者らは、醤油もろみ仕込み直後の低温かつ高pHの条件であっても、旺盛に増殖、発酵する酵母を育種し醤油醸造に使用することにより、淡色かつ発酵香豊かな醤油の製造並びに醤油の短期醸造が可能になると考え、鋭意検討した結果、本発明を完成するに至った。

40

すなわち、本発明は、

ジゴサッカロミセスロキシー (*Zygosaccharomyces rouxii*) に属し、温度10～20℃、pH5.5～7.0及び食塩分14～25 (w/v) %の醤油発酵試験で、仕込みから20～50日経過後に、アルコール分が2.0～3.0 (v/v) %であり、全窒素分が1.0～2.0 (w/v) %であり、色度が40～60番である生揚げを生産できる低温発酵性酵母に関する。

また、当該低温発酵性酵母を用いた発酵飲食品又は醤油の製造方法に関する。

50

## 【0007】

本発明において、食塩分、色度、アルコール分、全窒素分、酵母生菌数の分析は、「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)によって行う。

本発明において、醤油発酵試験とは低温発酵性酵母を選別するための試験である。そのもろみは、醤油麹容量1に対し、適宜調製した食塩水の容量1~1.5の組成である。

本発明において、発酵飲食品とは、製造工程に微生物を用いることを特徴とするすべての飲料、食品をいう。

本発明において、醤油とは、日本農林規格で定義する、「しょうゆ」をいう。

本発明において、生揚げとは、日本農林規格で定義する、「発酵させ、及び熟成させた醤油もろみを圧搾して得られた状態のままの液体」をいう。

10

## 【0008】

本発明の、ジゴサッカロミセスロキシー (*Zygosaccharomyces rouxii*) に属する低温発酵性酵母は、温度10~20、pH5.5~7.0及び食塩分1.4~2.5(w/v)%の醤油発酵試験で、仕込みから20~50日経過後に、アルコール分が2.0~3.0(v/v)%であり、全窒素分が1.0~2.0(w/v)%であり、色度が40~60番である生揚げを生産できる性質を持つ。これら酵母のうち、低温発酵性酵母K8を独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターへ寄託した。受託日は平成19年6月1日、受託番号はFERM P-21301である。

本発明は、前述の低温発酵性酵母を使用する発酵飲食品の製造方法である。

20

本発明は、前述の低温発酵性酵母を使用する醤油の製造方法である。

## 【発明の効果】

## 【0009】

本発明の低温発酵性酵母を用いると、酵母による醤油らしいアルコール発酵香を有し、かつ色の淡い醤油の製造が可能となる。また、醤油もろみの仕込み直後から酵母によるアルコール発酵が可能となるため、醤油の著しい短期醸造が可能となる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。

醤油もろみ仕込み直後の低温かつ高pHの条件であっても、旺盛に発酵する酵母(以下、低温発酵性酵母)は以下の手法により分離できる。

30

分離源は、純粋培養酵母並びに発酵飲食品及びそのもろみから分離した酵母群を使用できる。分離源とする純粋培養酵母としては、エタノールを生成できる酵母すべてを用いることができ、特に耐塩性に優れているジゴサッカロミセスロキシー (*Zygosaccharomyces rouxii*) に属する酵母が好ましい。また、分離源とする発酵飲食品及びそのもろみとしては、その製造工程に微生物を利用する飲料又は食品であれば何でも良いが、特に醤油や味噌などの含塩発酵飲食品が好ましい。

## 【0011】

純粋培養酵母又は酵母群は分離前に変異処理を行っても差し支えない。変異処理としては、紫外線、X線、 $\gamma$ 線などの放射線の照射、化学的変異誘発剤、例えば亜硝酸、エチルメタンスルホネート、N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニシン、アクリジン色素誘導体を接触させる方法がある。

40

## 【0012】

純粋培養酵母又は酵母群を生揚げ培養液に接種し、10~20の温度条件にて1週間の集積培養を行う。この生揚げ培養液の組成は、例えば、ブドウ糖50g/l、生揚げ100ml/l、クロラムフェニコール100mg/l、pH5.5~7.0であり、塩化ナトリウムは最終濃度50~250g/lとなるよう調製する。

生揚げ培養液の塩化ナトリウム濃度が50g/l未満では、耐塩性酵母以外の雑多な酵母が繁殖し、低温発酵性酵母の選択増殖はできない。また、250g/lを越えると酵母が生育できないか生育が非常に遅くなり、培養期間が著しく長くなる。pHは5.5~7

50

・ 0 の範囲でなければ、低温発酵性酵母の選択増殖はできない。培養温度は 10 未満では、酵母が生育できないか生育が非常に遅くなり、培養期間が著しく長くなる。また、20 を越えると、低温発酵性以外の酵母も生育し、低温発酵性酵母の選択増殖はできない。

この集積培養を、振とう培養又は静置培養にて 3 ~ 5 回繰り返して行う。集積培養を繰り返す方法は、培養後の集積培養液を新たな培養液に 1 / 100 ~ 1 / 1000 量接種することにより行う。

#### 【0013】

次に、ジゴサッカロミセスロキシー (*Zygosaccharomyces rouxii*) 以外の酵母を排除するため、最終的に得られた集積培養液を耐塩性酵母培地に塗抹し 30 にて 3 日間培養する。耐塩性酵母培地の組成は、例えば、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、オルソパニリン 6 ~ 12 mg / l、寒天 20 g / l、pH 4.8 である。

10

#### 【0014】

次に、良好な生育を示すコロニーを単離し、上記耐塩性酵母培地にて数回継代培養を行い、高 pH 培養液に接種し 15 ~ 20 にて静置培養した後、増殖性に優れた酵母を選別する。増殖性に優れた酵母を選別する方法は、例えば一定時間培養後に培養液の吸光度 (OD<sub>660nm</sub>) の値を測定し、値の大きい酵母を選別することにより行う。高 pH 培養液の組成は、例えば、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 140 ~ 250 g / l 好ましくは 160 ~ 200 g / l、pH 5.5 ~ 7.0 である。

20

塩化ナトリウムの濃度により酵母の増殖可能な pH 及び温度は変動する。従って、塩化ナトリウムの濃度が 140 ~ 250 g / l の範囲でなければ、塩化ナトリウム濃度の高い醤油もろみにおける、低温、高 pH 条件の酵母増殖能を正しく評価できない。

#### 【0015】

次に、選別した酵母について醤油もろみにおける発酵能を指標に、酵母をさらに選別する。すなわち、10% 食塩含有 YPD 培地などの適当な合成培地又は麹汁培地に酵母を培養し、この酵母培養液、醤油麹、食塩水を混合しもろみを仕込む。そのもろみは、醤油麹の容量 1 に対し、適宜調製した食塩水の容量 1 ~ 1.5 の組成である。酵母培養液のもろみへの添加は、仕込みと同時にを行い、その量はもろみ仕込み時点で酵母生菌数  $1 \times 10^4$  ~  $10^7$  / ml 好ましくは、 $1 \times 10^5$  ~  $10^6$  / ml である。このとき、もろみの食塩分は 14 ~ 25 (w/v) %、pH は 5.5 ~ 7.0 となる。

30

#### 【0016】

このもろみを温度 10 ~ 20、好ましくは 13 ~ 17 となるよう制御し、20 ~ 50 日間、好ましくは 25 ~ 35 日間発酵させる。もろみ温度が 10 未満となると、低温発酵性酵母といえども増殖が著しく遅くなる。また、20 を越えると低温発酵性酵母以外の酵母も増殖し選別ができない。

発酵終了後の生揚げの色度、アルコール分、全窒素分を測定し、アルコール分を 2.0 ~ 3.0 (v/v) % 生産したものを、低温発酵性酵母として選別する。このとき、生揚げの色度は 40 ~ 60 番、全窒素分は 1.0 ~ 2.0 (w/v) % となる。

40

以下、実施例を示し本発明を説明するが、本発明の技術的範囲はこれによって何ら限定されることはない。

#### 【実施例 1】

#### 【0017】

発明者らは低温発酵性酵母を以下の方法により分離した。味噌醤油工場から収集した醤油もろみ、生揚げ、味噌などを、生揚げ培養液 (ブドウ糖 50 g / l、塩化ナトリウム 83 g / l、生揚げ 100 ml / l、クロラムフェニコール 100 mg / l、pH 6.0) に接種し、15 の温度条件にて 1 週間集積培養した。この集積培養を、振とう培養にて

50

1回、次いで静置培養にて2回行った。得られた培養液を耐塩性酵母培地（ブドウ糖30g/l、カザミノ酸4g/l、酵母エキス2g/l、リン酸二水素カリウム1g/l、硫酸マグネシウム7水和物0.5g/l、塩化カルシウム2水和物0.1g/l、塩化ナトリウム180g/l、オルソパニリン8mg/l、寒天20g/l、pH4.8）に塗抹し、30℃で3日間培養した。次に良好な生育を示したコロニーについて、上述耐塩性酵母培地にて2回継代培養を行い、高pH培養液（ブドウ糖30g/l、カザミノ酸4g/l、酵母エキス2g/l、リン酸二水素カリウム1g/l、硫酸マグネシウム7水和物0.5g/l、塩化カルシウム2水和物、塩化ナトリウム180g/l、pH6.0）に接種し、15℃において培養した後、培養液の吸光度（OD660nm）の値が大きかった酵母13株を選別した。

10

## 【0018】

選別した酵母について醤油醸造試験を実施した。すなわち、淡口醤油麹830ml、24（w/v）%食塩水1000mlの配合にて原料を混合し、直後に酵母を $1 \times 10^6 / \text{ml}$ の酵母生菌数となるよう添加した。このとき、もろみの食塩分は18（w/v）%、pHは6.0であった。また、もろみの温度は15℃一定とした。仕込みから30日経過後に、もろみの酵母生菌数、生揚げのアルコール分、色度、全窒素分、ブドウ糖濃度を測定した。ブドウ糖濃度は、高速液体クロマトグラフによる絶対検量線法により定量した。

## 【0019】

結果を表1に示した。醤油もろみ仕込み直後の低温かつ高pHの条件であっても旺盛に増殖、発酵し、仕込み後30日でアルコール分を2.0~3.0（v/v）%生産できる低温発酵性酵母を7株選別できた。選別した酵母を表1の評価欄の印で示した。また、低温発酵性酵母7株のもろみ中における酵母生菌数は $1.9 \sim 4.0 \times 10^7 / \text{ml}$ であり、得られた生揚げは、ブドウ糖濃度2.0~3.3（w/v）%、色度45番、全窒素分1.3（w/v）%であり、発酵香が豊かであった。これら低温発酵性酵母のうち、K8を独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターへ寄託した。受託日は平成19年6月1日、受託番号はFERM P-21301である。

20

以上のことから低温発酵性酵母は、醤油もろみ仕込み直後の低温かつ高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る。これにより、仕込み後わずか30日で醤油らしいアルコール発酵香を有し、かつ色の淡い生揚げを生産することができる。

30

## 【0020】

## （比較例1）

既存醤油用酵母であるジゴサッカロミセスロキシー（*Zygosaccharomyces rouxii*）に属する酵母S32を用いて、実施例1と同様の条件で醤油醸造試験を行った。仕込みから30日経過後における分析結果を表1に示す。S32は、もろみ中の酵母生菌数 $0.5 \times 10^7 / \text{ml}$ 、生揚げのブドウ糖濃度5.7（w/v）%、アルコール分0.3（v/v）%であり、著しく増殖、発酵が遅れていることがわかる。また、仕込み後120日まで発酵を継続しても、アルコール分が1.1（v/v）%であり、醤油らしい発酵香を有した生揚げを生産することはできなかつた。また、そのときの色度は32番であり、長期間の醸造により着色が過度に進んでしまった。

40

## 【実施例2】

## 【0021】

低温発酵性酵母K8を用いた醤油醸造試験を実施した。すなわち、淡口醤油麹26l、24（w/v）%食塩水34lの配合にて原料を混合し、直後に酵母を $1 \times 10^5 / \text{ml}$ の酵母生菌数となるよう添加した。このとき、もろみの食塩分は18（w/v）%、pHは6.0であった。また、もろみの温度は13~20℃とした。仕込みから28日経過後に、もろみの酵母生菌数、生揚げのアルコール分、色度、全窒素分を測定した。

その結果を表2に示した。低温発酵性酵母K8は、醤油もろみ仕込み直後の低温かつ高pHの条件であっても旺盛に増殖、発酵し、仕込み後28日で、もろみ中の酵母生菌数 $0.74 \times 10^7 / \text{ml}$ であり、得られた生揚げは、アルコール分2.0（v/v）%、色度

50

45番、全窒素分1.4(w/v)%であり、発酵香が豊かであった。

以上のことから低温発酵性酵母K8は、醤油もろみ仕込み直後の低温かつ高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る。これにより、仕込み後わずか28日で醤油らしいアルコール発酵香を有し、かつ色の淡い生揚げを生産することができる。

【0022】

(比較例2)

既存醤油用酵母であるジゴサッカロミセスロキシー (*Zygosaccharomyces rouxii*) に属する酵母S32を用いて、実施例2と同様の条件で醤油醸造試験を行った。仕込みから28日経過後における分析結果を表2に示す。S32は、もろみ中の酵母生菌数 $0.3 \times 10^7 / \text{ml}$ 、生揚げのアルコール分0.6(v/v)%であり、著しく増殖、発酵が遅れていることがわかる。

【0023】

【表1】

醤油醸造試験における分析結果

	菌株名	酵母生菌数	ブドウ糖	アルコール分	
		$\times 10^7 / \text{ml}$	(w/v)%	(v/v)%	評価
分離酵母	M1	2.3	2.4	2.3	○
	M3	2.9	2.0	2.4	○
	M5	2.3	2.7	2.0	○
	M8	1.4	4.1	1.4	×
	M12	0.7	3.9	1.3	×
	K5	3.6	2.3	2.3	○
	K6	1.9	2.4	2.3	○
	K8	2.8	3.3	2.2	○
	K15	4.0	2.4	2.3	○
	K21	3.1	3.9	1.0	×
	K25	2.6	3.6	1.4	×
	K28	1.2	4.1	1.2	×
	K29	1.0	3.6	1.4	×
既存酵母	S32	0.5	5.7	0.3	×

【0024】

【表2】

醤油醸造試験における分析結果

菌株名	酵母生菌数	アルコール分	
	$\times 10^7 / \text{ml}$	(v/v)%	評価
K8	0.74	2.0	○
S32	0.26	0.6	×

【産業上の利用可能性】

【0025】

本発明により、醤油もろみ仕込み直後の低温かつ高pHの条件であっても、旺盛に発酵する酵母を育種し醤油醸造に使用することにより、淡色かつ発酵香豊かな醤油の製造並びに醤油の短期醸造が可能になった。

## フロントページの続き

(72)発明者 下野 かおり

鹿児島県霧島市隼人町小田1445番地1 鹿児島県工業技術センター内

(72)発明者 日高 修

鹿児島県霧島市隼人町真孝浜田上2170番地1 鹿児島県醤油醸造協同組合内

(72)発明者 狩行 勲

鹿児島県霧島市隼人町真孝浜田上2170番地1 鹿児島県醤油醸造協同組合内

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 日本醤油研究所雑誌, 2003年, Vol. 29, No. 2, p. 53-59

日本醤油研究所雑誌, 2002年, Vol. 28, No. 3, p. 156-157

香川県産業技術センター研究報告, 2004年, Vol. 4, p. 86-87

鹿児島県工業技術センター研究報告, 2007年11月, Vol. 20, p. 5-9

鹿児島県工業技術センター研究成果発表会予稿集, 2007年11月30日, p. 10-11

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/16

A23L 1/202

A23L 1/238

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)