

醤油醸造に向く微生物の選抜と醤油の試作

食品科 袴田雅俊 松野正幸 油上 保*
静岡県産醤油株式会社 鈴木邦明

Selection of microorganisms suitable for soy sauce brewing and trial production of soy sauce

Masatoshi HAKAMATA, Masayuki MATSUNO, Tamotsu YUGAMI and Kuniaki SUZUKI

Moromi (mash) was sampled at a soy sauce brewing company in Shizuoka prefecture, and yeast was isolated. Further, 13 strains of yeast were selected using salt tolerance, film-forming characteristics, and alcohol production ability as indicators. Trial production of soy sauce was performed with selected yeast strains, and the components were analyzed. There was a difference in the content of 4-hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF), an aroma component known to be important for soy sauce.

Strains with a gradual pH decrease rate were selected from types of lactic acid bacteria that do not produce histamine or tyramine, with 10 strains being obtained out of 62 strains. A trial production of soy sauce brewing was conducted on an actual production scale using the selected lactic acid bacteria. Due to the improvement of the equipment at the production site and cleaning operation, in combination with the addition of lactic acid bacteria, the number of tanks capable of reducing histamine or tyramine gradually increased.

Keywords : soy sauce, yeast, lactic acid bacteria

キーワード : 醤油、酵母、乳酸菌

1 はじめに

近年、醤油業界では醤油醸造時に生じるヒスタミンおよびチラミンを低減する対策を進めている^{1, 2)}。ヒスタミンおよびチラミンは醤油醸造で重要となる耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* の一部の株により作られるため、低減化対策として現場の徹底した洗浄による蔵付き乳酸菌の除去と、ヒスタミンおよびチラミンを生成しない *T. halophilus* の添加が必要となる¹⁾。我々は、以前にヒスタミンおよびチラミン非産生の醤油乳酸菌を選抜して、洗浄したタンクに選抜乳酸菌を添加することによりヒスタミンおよびチラミンを低減化できたことを報告した³⁾。その際に、①洗浄により蔵付き酵母も失われてしまう、②乳酸菌の添加量が多いと醤油の品質に問題が生じる、③ヒスタミンおよびチラミンが継続して低減できるかわからないという問題が生じた。

そこで、今回は現場から醤油酵母を単離、選抜し、その酵母を用いた醤油の試作を行い、香味の良い醤油を製造できる酵母の取得を試みた。また、醤油の品質に悪影響を与えないヒスタミンおよびチラミン非産生の乳酸菌を選抜した。さらに製造現場の継続的な洗浄

と乳酸菌添加を行い、長期的なヒスタミンおよびチラミン量の変遷を調べたので報告する。

なお、本研究は、静岡県新成長戦略研究「食の都しずおかの微生物を用いた新しい発酵食品ビジネスの創出」の中の一課題として取り組んだ。

2 方法

2.1 酵母の単離および選抜

(1) 試料および酵母の単離と単離酵母の同定

県内の醤油企業 5 社から全31種類の醤油もろみを、滅菌済み50mLチューブに採取した。採取したもろみは実験室に持ち帰り、デイスポートザブルループを用いて5%NaClを含むYPD寒天培地平板に塗抹した。5%NaCl含有YPD寒天培地の組成を表1に示す。塗抹後、シャーレを倒置して30℃で1週間培養した。

生じたコロニーを再度5%NaCl含有YPD寒天培地平板に画線塗抹して酵母を単離した。単離した菌株は、5%NaCl含有YPD液体培地(表1)を用いて30℃で1週間培養し、10%グリセロールを含む保存液として-80℃で保存するとともに、MALDI-TOFMS分析又

*) 現 企画調整部

は遺伝子解析を外部機関に依頼して菌種を同定した。

(2) 耐塩性試験

単離した菌株について、1白金耳量を10%NaCl含有YPD液体培地（表1）5mLで培養した。30℃で1週間静置培養を行い、培地に濁りが生じたものを発育が良好な耐塩性株として選抜した。

(3) 産膜性試験

醤油醸造において、産膜性酵母は醤油の香りを悪くするとされている⁴⁾ことから、醤油もろみを模した培地（以下、「もろみ様培地」）に接種して産膜性を持たない株を選抜した。もろみ様培地の調製方法は図1に示す。

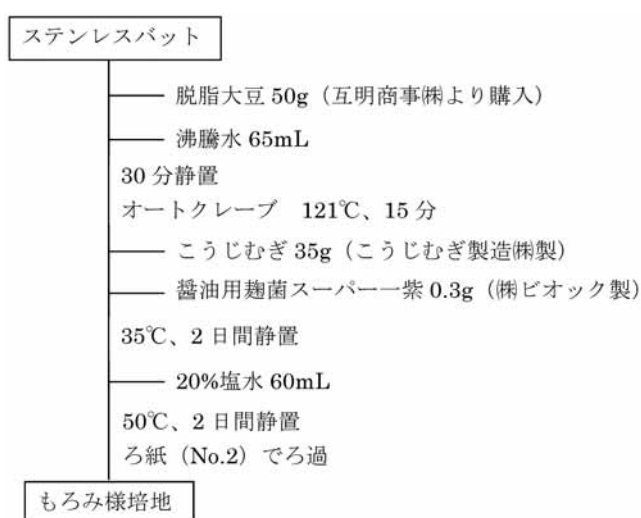


図1 もろみ様培地の調製方法

(4) アルコール生成能試験

耐塩性かつ非産膜性の酵母については、2.1(2)で得られた培養液中のエタノール濃度をガスクロマトグラフ質量分析法により分析した。分析条件を表2に示す。生成したエタノール量をもとに、発酵力の強い株を選抜した。

2.2 酵母および醤油評価の指標となる香気成分の分析

酵母の選抜や醤油の評価において、香気成分に着目した指標を設定するためのガスクロマトグラフ質量分析を行った。試料には、スーパーマーケットで市販されている醤油を使用した。分析装置は、2.1(4)と同じものを用い、Dynamic Head Space (DHS) 分析およびFull Evaporated DHS (FEDHS) 分析を行った。分析条件を表3に示す。

同時ににおい嗅ぎ (GC-O) 分析を行い、香りの強い成分を推定した。

2.3 酵母添加条件の検討と醤油試作試験

酵母の添加量を検討するために、乳酸発酵後半の醤油もろみ200gに市販の醤油用酵母を 1.0×10^4 、 1.0×10^6 、 1.0×10^8 個/（もろみ1g）となるように接種し、2.1(4)と同様の方法でエタノール生成量を測定した。

次に、選抜した酵母の性質を調べるために、乳酸発酵後半の醤油もろみ200gに選抜した酵母を $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 個/（もろみ1g）となるように接種して

表1 YPD寒天培地の組成

成分	製造元および等級	重量(g) (培地1Lあたり)		
		5% NaCl含有 YPD寒天培地	5% NaCl含有 YPD液体培地	10% NaCl含有 YPD液体培地
酵母エキス	日本BD(株)	5	5	5
ハイポリペプトンN	日本製薬(株)	5	5	5
グルコース	和光純薬(株) 特級	20	20	20
KH ₂ PO ₄	和光純薬(株) 特級	1	1	1
MgSO ₄ ・7H ₂ O	和光純薬(株) 特級	0.5	0.5	0.5
NaCl	和光純薬(株) 特級	50	50	100
寒天	和光純薬(株) 細菌培地用	20	—	—

表2 エタノール分析条件

使用機器	GC9870/5975MSD (Agilent)					
	MP2 (Gerstel)					
カラム	DB-5MS (60 m×0.25 I.d., 0.25 mm thickness)					
オープン温度	時間(min)	0	1	5	6.7	10
	温度(℃)	40	40	80	250	250
サンプル量	1mL					

30℃で4か月間発酵した。試作した醤油については、アミノ酸分析および香気成分分析を行った。アミノ酸分析は高速液体クロマトグラフ分析法により行った。HPLC (LC-9A) ((株)島津製作所製)を用い、OPA試薬によるポストカラム法で分析した。香気成分分析は2.2と同様の方法で行った。

2.4 乳酸菌の選抜、添加条件の検討

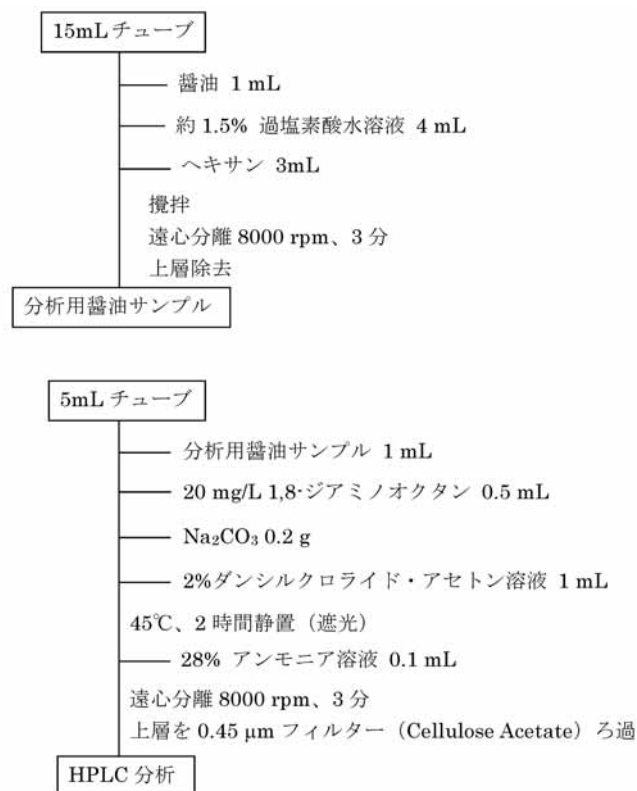
選抜には、これまでに既に当研究所で単離していたヒスタミンおよびチラミン非産生菌62株を用いた。5% NaClを添加したトリプトンソーヤブイヨン培地 (OXOID社製) で30℃、7日間この乳酸菌を培養した。醤油もろみの急激なpH低下を避ける目的から、培養5日目にpH5.5以上で、7日目にpHが十分低下している株を選抜した。

添加条件の検討では、麴320gと塩水180gを混ぜ合わせてもろみを調製し、そこに乳酸菌を 1.0×10^3 、 1.0×10^4 、 1.0×10^5 、 1.0×10^6 個/ (もろみ1g) となるように添加して、pHを測定した。

2.5 長期的なヒスタミンおよびチラミンの動向調査

工場において、継続的に配管と醤油醸造用タンクを洗浄し、選抜した乳酸菌を用いて醤油を醸造した。乳酸発酵が終わった段階の醤油もろみをNo. 2のろ紙でろ過し、ヒスタミンおよびチラミン量を測定した。測定は試料を図2に示すように処理し、表4に示す条件にて高速液体クロマトグラフ分析法により行った。

測定サンプルは、ヒスタミンおよびチラミン非産生乳酸菌添加を開始する以前の旧来法で醸造した醤油7サンプル、ヒスタミンおよびチラミン非産生乳酸菌添加による平成28年9月～12月仕込み分の22サンプル、



試薬はいずれも和光純薬工業㈱の特級試薬を使用

図2 ヒスタミン・チラミンの分析方法

表3 香気成分分析条件

使用機器	GC9870/5975MSD (Agilent)				
	MP2 (Gerstel)				
カラム	DB-5MS (30 m×0.25 I.d., 0.25 mm thickness)				
オープン温度	時間 (min)	0		42	60
	温度 (°C)	40	5°C/minで昇温	250	250
サンプル	DHS法: 1mL、FEDHS法: 100μLをバイアルに入れ、ヘリウムを40℃で20分間通気し、テナックス管に捕集				

表4 ヒスタミンおよびチラミン測定条件

使用機器	HPLC Prominence (株)島津製作所							
カラム	InertSustain C18 (粒子径5μm、内径4.6mm×長さ250mm)							
カラム温度	40℃							
検出波長	254 nm							
サンプル注入量	20 μL							
移動相流量	1 mL/min							
移動相	時間 (min)	0	4	8	35	38	42	52
	A: 水 (%)	65	55	40	25	10	65	65
	B: アセトニトリル (%)	35	45	60	75	90	35	35

【報告】

平成29年1月～6月仕込み分の23サンプル、平成29年7月～10月仕込み分の11サンプルについて測定した。

3 結果および考察

3.1 酵母の単離、選抜、同定

酵母候補株は全140株単離した。単離した140株は、*Zygosaccharomyces rouxii*が58株、*Bucillus*属菌が23株、その他*Debaryomyces*属菌、*Candida pelliculosa*、*Pichia farinosa*、*Staphylococcus carnosus*等が含まれていた。なお、同定できなかったものが48株あった。

この140株のうち、耐塩性を示した株が112株得られ、

さらに非産膜性の株を81株得た。その中から、エタノール生成量が0.3%以上の株を選び、13株を醤油醸造に向く菌株として選抜した（図3）。選抜した株の内訳は、12株が *Zygosaccharomyces rouxii*、1株が *Debaryomyces*属菌であった。

3.2 酵母および醤油評価の指標となる香気成分の分析

GC-O分析とGC-MS分析の結果を表5に示す。香りの強い成分を推測したところ、表5に示す15成分を検出した。

300以上あるとされる醤油香気成分⁵⁾から香りの強いものを選ぶことができた。

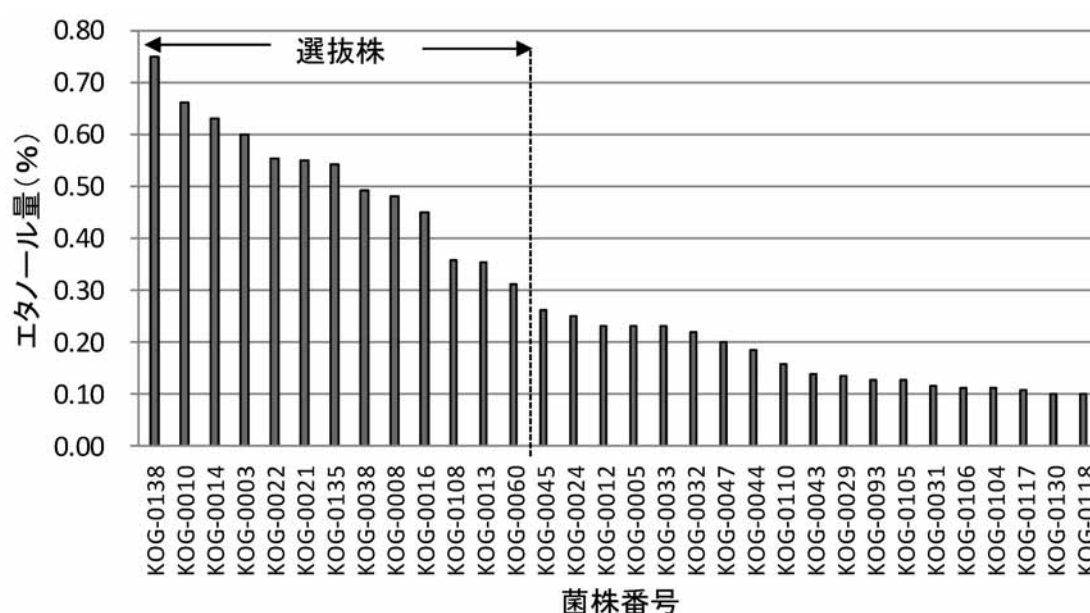


図3 酵母のエタノール生成

全81株中エタノール生成量が0.10%以上の株を記載した。

表5 GC-O分析およびGC-MS分析の結果

DHS	FEDHS	RT (min)	強度	成分名	香調
○	—	6.58	2	酢酸エチル	甘い、アルコール
○	○	8.30	1	アセトイン	香ばしい、うまみを感じさせる
○	○	8.96	2	イソアミルアルコール	甘い、ポテト
○	○	9.28	3	イソ酪酸エチル	果実、サイダー
△	—	11.25	2	(2-メチル酪酸エチル)	果実、サイダー
○	○	11.75	3	(フルフルアルコール)	ピーナッツ
○	○	12.60	2	(3-メチルチオプロパナール)	香ばしい、パンのよう
△	○	13.92	2	メチオノール	カビ臭い、乳酸菌様
△	○	15.18	2	フェニルアセトアルデヒド	菊花
—	○	15.55	2	2-アセチルピロール	古い木材、腐葉土
△	○	15.89	3	4-Hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF)	醤油様、香ばしい
△	○	16.30	1	フェニルエチルアルコール	花
△	○	17.25	3	(安息香酸エチルエステル)	ピーナッツ
△	△	18.68	2	(4-エチルグアイアコール)	中濃ソース
—	△	20.13	2	(4-オクタノン)	甘い、蜂蜜

DHS : Dynamic head space法、FEDHS : Full evaporated DHS法

検出強度が強いものは○、検出強度が弱いものは△、検出されなかったものは—で表示

RT : Retention time

強度 : GC-O分析をした際に弱く感じたものを1、強く感じたものを3として3段階で表示

成分名 : 括弧で表示した成分は、一致率が低かった成分

3.3 酵母添加条件の検討と醤油試作試験

酵母添加量の検討の結果は、図4に示す。それぞれの試料で酵母を添加して7日ほどはエタノール生成が見られなかったが、14日目には1～1.6%程度のエタノール生成が観察された。エタノール生成開始時期には、菌数の影響は見られなかったが、添加菌数が多いほど、14日目のエタノール生成量は多かった。また、21日目以降は、添加菌数によるエタノール生成量に有意な差は見られなかった。一方、酵母を添加していないもろみについても少量のエタノール生成が見られた。これは、乳酸発酵途中のもろみに野生の酵母が生息し、その酵母による発酵によるものと考えられた。醤油醸造の現場では、初期になるべく多くのエタノール生成を期待するとのことから、酵母の添加条件は、もろみ1gに対して $10^6 \sim 10^8$ 個とした。

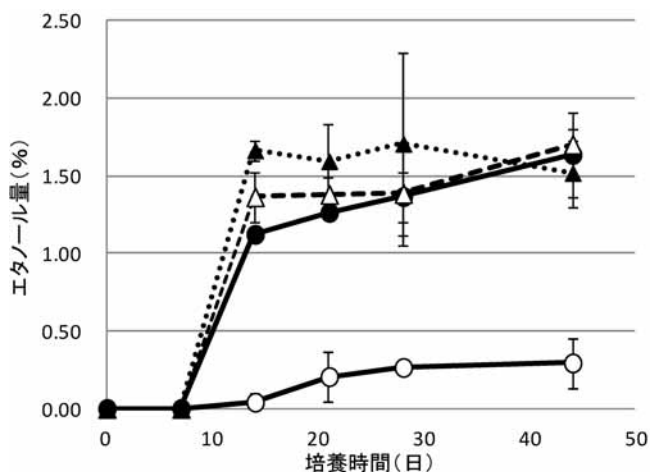


図4 酵母添加によるエタノール生成

○：酵母無添加、●：酵母 1.0×10^4 個/（もろみ1g）添加
△：酵母 1.0×10^6 個/（もろみ1g）添加、▲：酵母 1.0×10^8 個/（もろみ1g）添加
エラーバーは標準偏差 n=3
14日目については、○、●、△、▲のそれぞれの間に
 $p < 0.05$ で有意差有り

次に、選抜した13株の酵母を用いて醤油を試作した。アミノ酸と香気成分を分析し、各成分を比較したところ、アミノ酸ではグルタミン酸が、香気成分では4-Hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF)について含有量の違いが見られた（図5、6）。HEMFは醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* がD-Xylose 5-phosphateを代謝して生成されることが報告されており⁶⁾、選抜した酵母の中ではKOG-0138株がHEMF生産能力の高い菌株と考えられた。

なお、HEMFは、醤油香気の重要成分として報告⁷⁾

もされており、3.2の結果においても、醤油の評価指標として選抜した15種類の成分の中にも含まれていた。

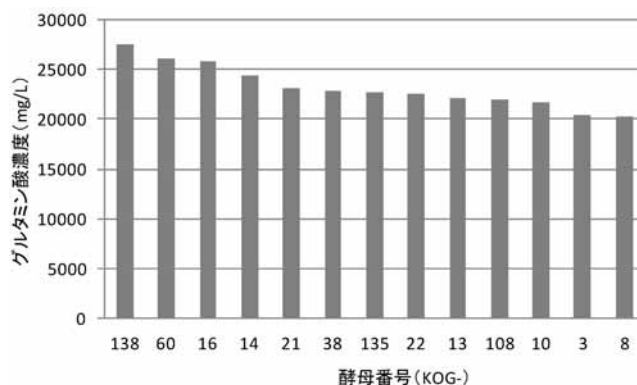


図5 選抜酵母による試作醤油中のグルタミン酸濃度

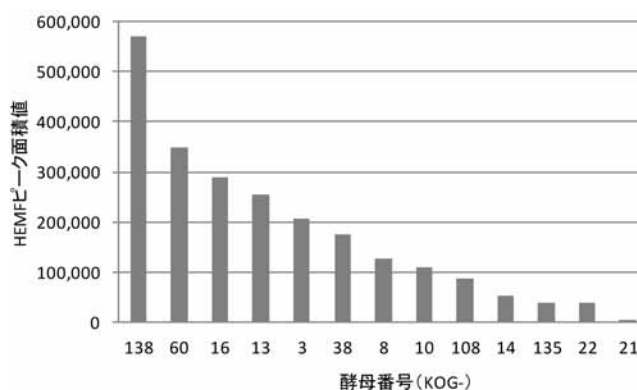


図6 選抜酵母による試作醤油中のHEMF量

3.4 乳酸菌の選抜、添加条件の検討

乳酸菌の選抜では、供試した62株中、培養5日目にpH5.5以上で、7日目にpHが十分低下している株は、10株あった。pH低下の代表的事例を図7に示す。乳酸菌を培地で1週間培養すると、初発pH7.0からpH5.0前後まで低下した。その途中経過を見てみると、図7の菌株KOG-0152やKOG-0161のように7日間かけて緩やかにpHが低下していくグループと、KOG-0181やKOG-0203のように培養初期に急激にpHが低下するグループの二つのグループに分かれた。もろみのpHが急激に低下すると、麹菌の生成した酵素の働きが弱くなってしまふことから、7日間かけて緩やかにpHが低下していく乳酸菌を選抜することとし、図8に示すKOG-0145、0152、0156、0161、0165、0166、0173、0183、0192、0200の10株を選抜した。

乳酸菌の添加条件の検討では、 1×10^3 個/（もろみ1g）でも十分な乳酸発酵が確認された（図9）。乳酸菌を多く添加すれば確実な乳酸発酵が期待できるが、乳酸菌が多すぎるともろみのpH低下が早まる恐れがあることから、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 個/（もろみ1g）の

乳酸菌を添加することとした。

3.5 長期的なヒスタミンおよびチラミンの動向調査

長期的なヒスタミンおよびチラミンの動向調査の結果を表6に示す。ヒスタミンは、対策前および対策直後では、半数近くの仕込みタンクの醤油で1,000ppmを超えていたが、対策が進むにつれて減少し、H29年7月～10月に仕込んだ醤油では四分の三を超えるタンクで400ppmを下回るようになってきた。同様にチラミンは、対策前では約四分の三のタンクで1,000ppmを超えていたが、対策が進むにつれて減少しており、H29年7月～10月に仕込んだ醤油では半数近いタンクで400ppm

を下回るようになった。

現場の装置を洗浄しやすくするための改造等の工夫もあり、ヒスタミンおよびチラミン量は共に低減してきている。しかし、現状では醤油を仕込むたびにヒスタミンやチラミン量が確実に低いとは言えず、安定した低減化が求められている。また、醤油醸造中の乳酸発酵が若干弱い傾向もみられている。今後は、乳酸菌培養設備を整え、乳酸菌添加量を品質の許容範囲内で増やすことで、安定した低減化を検討する予定である。

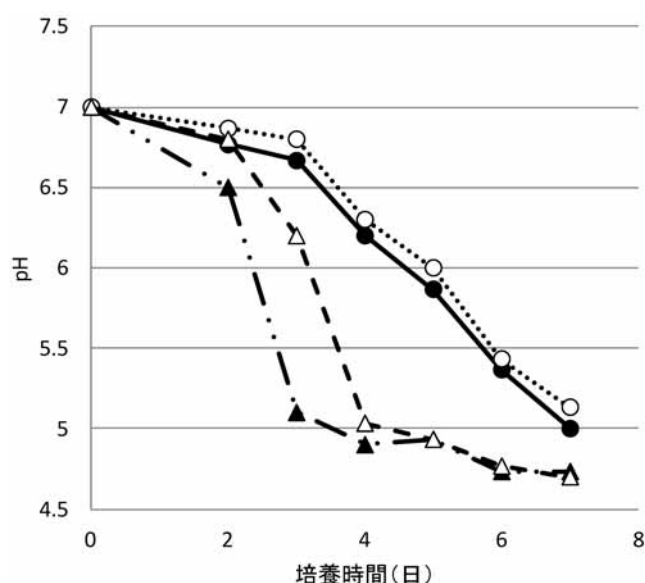


図7 乳酸菌培養による培地のpH変化

● : KOG-0152、○ : KOG-0161、▲ : KOG-0181、△ : KOG-0203

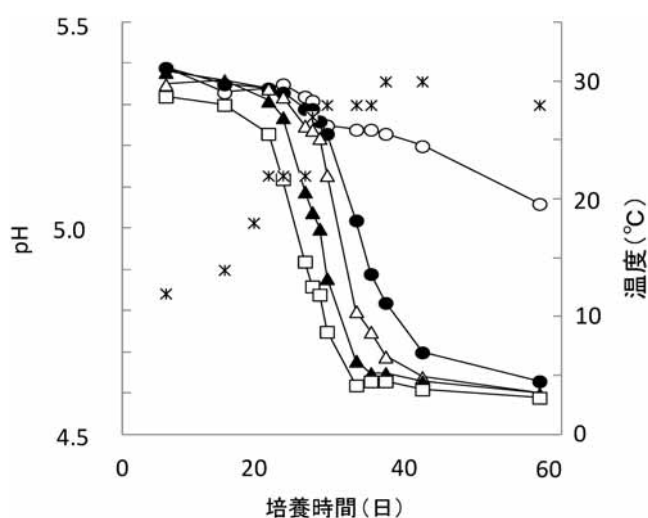


図9 乳酸菌の添加量によるpH変化の違い

○ : 乳酸菌未添加、● 乳酸菌 1.0×10^3 個/ (もろみ 1 g) 添加、△ : 乳酸菌 1.0×10^4 個/ (もろみ 1 g) 添加、▲ : 乳酸菌 1.0×10^5 個/ (もろみ 1 g) 添加、□ : 乳酸菌 1.0×10^6 個/ (もろみ 1 g) 添加
* : もろみの温度変化 (右軸)。もろみの温度は恒温槽で管理した。

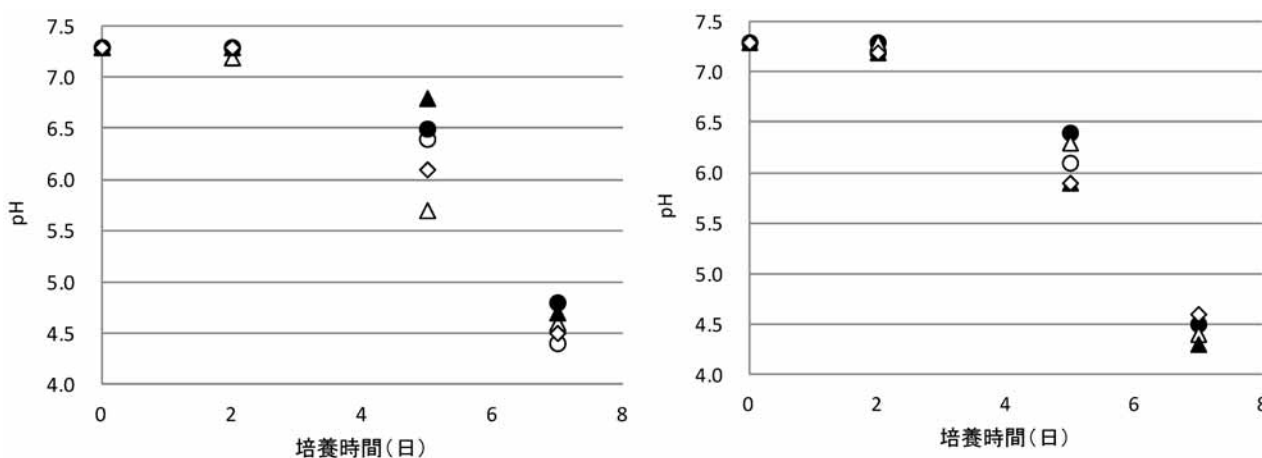


図8 選抜した乳酸菌のpH変化

選抜した乳酸菌10株のpH変化を5株ずつにわけて示す。

(左) ○ : KOG-0145、● KOG-0152、△ : KOG-0156、▲ : KOG-0161、◇ : KOG-0165

(右) ○ : KOG-0166、● KOG-0173、△ : KOG-0183、▲ : KOG-0192、◇ : KOG-0200

現状の醤油のヒスタミンやチラミン含有量でも、健康被害が生じる可能性は低い*が、引き続き対策を継続していくことでより良い商品の提供を目指していく。

4 まとめ

- ・県内の醤油もろみから酵母140株を単離し、13株を醤油醸造に有用な酵母として選抜した。
- ・選抜した13株の酵母を比較すると、醤油の香気成分の一つであるHEMFの生成量に違いが見られた。
- ・pH低下速度が緩やかな醤油乳酸菌を10株選抜した。
- ・現場の洗浄と有用乳酸菌の添加により、醤油中のヒスタミンとチラミンの含有量の低減化が進んだ。

参考文献

- 1) 田上秀男 他：醤油工場におけるアミン低減の検証. 醤油の研究と技術, 41(5), 327-338(2015).
- 2) 植木達朗 他：凝集性乳酸菌の利用による醤油

中の不揮発性アミン類の低減, 42 (2), 155-160 (2016).

- 3) 袴田雅俊 他：現場洗浄と乳酸菌添加による醤油中不揮発性アミンの低減. 醤油の研究と技術, 42 (1), 61-66 (2016).
- 4) 富田実 他：耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の生理特性 (2). 日本醸造協会誌, 92 (12), 853-859 (1997).
- 5) 内田一生：成分, 「醤油の科学と技術」, 新增補版 (公益財団法人日本醸造協会, 東京), 栃倉辰六郎 編著, pp. 285-288 (2012).
- 6) 柳沼淳夫 他：醤油酵母による香味成分 (HEMF) の生成とその環境因子. 日本醸造協会誌, 97 (9), 608-614 (2002).
- 7) 佐々木正興 他：醤油の香り立ち (Top Note) を構成する成分. 日本化学会誌, 1981 (5), 736-745 (1981).

表6 各仕込み時期におけるヒスタミン、チラミン濃度別タンク数

仕込み開始時期	分析サンプル(個)	タンク数(個)						
		濃度(ppm)	ND-200未満	200-400未満	400-600未満	600-800未満	800-1000未満	1000以上
平成28年前半	7	ヒスタミン	0	0	1	2	1	3
		チラミン	0	0	1	0	1	5
平成28年後半	22	ヒスタミン	4	3	2	1	1	11
		チラミン	5	1	2	4	3	7
平成29年前半	23	ヒスタミン	10	4	6	1	0	2
		チラミン	10	1	2	1	1	8
平成29年後半	11	ヒスタミン	4	4	1	0	0	2
		チラミン	3	3	1	1	1	2

* 厚生労働省：平成23年度農林水産省有害化学物質リスク管理基礎調査事業 第106回日本食品衛生学会学術講演会発表ポスター.
http://www.mhlw.go.jp/j/syoutan/seisaku/papers_posters/pdf/106th_eisei3.pdf (2018. 3. 26アクセス)