

研究論文

熟成期間と耐塩性酵母が及ぼす白醤油品質への影響

間野博信*1、筒井亜香音*1、小野奈津子*1、近藤徹弥*2

Effect of Brewing Period and Salt-Tolerant Yeast on Shiro-shoyu Quality

Hironobu MANO*1, Akane TSUTSUI*1, Natsuko ONO*1 and Tetsuya KONDO*2

Food Research Center*1*2

愛知県産白醤油の品質の安定化や向上、新規用途開発を最終目的とし、醸造特性の解明に取り組んだ。白醤油の一番汁は従来、3ヶ月程度熟成させるが、熟成8週品と12週品は成分値や官能が同等であり、2ヶ月程度の熟成で問題ないことが示唆された。また、一番汁では麹菌由来の α -アミラーゼ活性が維持されており、新規用途開発に利用できることが示唆された。白醤油諸味で耐塩性酵母が旺盛に増殖すると、直接還元糖が減少し、アルコール臭や濁りが生じた。耐塩性酵母の増殖を抑制することで品質の安定化や向上が可能であると考えられた。

1. はじめに

醤油は日本農林規格(JAS)により濃口、淡口、溜、再仕込み、白の5種類に分類される。白醤油は愛知県発祥と言われており、琥珀色で甘みが強く、独特の麴香や甘酒香を有する。素材の特性を活かした料理の調味料として重宝され、吸い物や茶碗蒸しなどに利用されてきた。しかし、近年は他の醤油と同様、出荷量が減少傾向にあり、消費拡大が求められている。本研究の最終目的は愛知県産白醤油の消費拡大を目指し、品質の安定化や向上、新規用途開発を実現することである。

醤油の原料は大豆、小麦、食塩である。全国的に普及している濃口醤油は大豆と小麦を1:1で使用するのに対し、白醤油は小麦を9割以上使用する。また、濃口醤油は諸味を仕込んだ後、定期的に攪拌し、半年から1年間熟成させるのに対し、白醤油は諸味の攪拌を行わず、熟成期間も3ヶ月程度と短い。さらに白醤油を回収した後、諸味残渣にもう一度、食塩水を加え2回目の醸造を行う。1回目に回収した液を一番汁、2回目に回収した液を二番汁と呼び、これらをブレンドして製品化される。このように、白醤油醸造には他の醤油に見られない特徴的な工程も多く、品質の安定化や向上に取り組むには基礎データが不足しているのが現状である。そこで、本研究では①熟成に伴う成分の推移、②麹菌由来酵素の残存活性、③白醤油醸造における耐塩性酵母の影響の3点について調査し、白醤油品質の安定化や向上、新規用途開発に資する知見の蓄積に取り組んだ。

2. 実験方法

2.1 麴および諸味の調製

ステンレス製の角型ザル(135×135×46mm、12メッシュ)に小麦(ウェスタンホワイト、精麦率93%)200gを量り採った。これを10個用意した。また、同じ型のザルに炒り大豆120gを量り採った。これらを水に浸漬し、小麦の重量が1.4倍になったところで取り出した。炒り大豆も同じタイミングで取り出した。均質化のため1時間静置した後、110℃で20分間蒸煮した。以降の操作は雑菌汚染に注意して実施した。蒸煮大豆は速やかに重量を測定し、冷凍保存した。測定した蒸煮大豆の重量から、あらかじめ常圧加熱乾燥法¹⁾(130℃、2時間)で測定した炒り大豆の乾燥重量を差し引き、蒸煮大豆の水分を算出した。蒸煮小麦は放冷した後、種麴(ビオック、白醤油用)38mgを混合し、乾熱滅菌したステンレス製大型バット(330×195×85mm、蓋つき、太線アミ入り)に入れた。10個すべてのザルについて同様に種付けし、5つの大型バットに2つずつ入れた。通気のため、蓋とバットの間には滅菌した割箸を挟み、30℃の自然対流式恒温槽(いすゞ製作所、FR-15BS)に移し、培養を開始した。麹菌の分散、酸素供給、放冷を行うため、18時間後と24時間後に麴を混合した。42時間後、麴を取り出し、すべてを合わせて混合した。麴3gを量り採り、赤外線水分計(ケット科学研究所、FD-600)を用いて、105℃、60分の条件で水分を測定した。残りの麴は仕込む日まで冷凍保存した。

作製した麴と蒸煮大豆に食塩水を混合し、諸味を調製した。蒸煮大豆は原料小麦と炒り大豆の使用量の比が95:5となるように加えた。また、麴と蒸煮大豆の水分

*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 *2 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室(現保蔵包装技術室)

を考慮し、すべての試験区で諸味の食塩濃度が 14%、麴固形分が 26%、水分が 60%となるように調製した。

2.2 熟成に伴う成分および残存酵素活性の推移

5L 容ガラス瓶(石塚硝子、貯蔵びん A 型 7 号)に諸味約 5kg を調製し、25°C で醸造した。醸造開始直後、3 日後、1 週間後、2 週間後、以降 2 週間おきに 12 週まで一番汁の諸味液汁を 35mL ずつ採取した。12 週間後、諸味全量をザルで漉して固液分離した。固形分を 5L 容ガラス瓶に戻し、1 回目の仕込みで用いた食塩水と同濃度の食塩水を半量加え、25°C で 2 回目の醸造を開始した。2 回目の醸造開始直後、1 週間後、2 週間後、以降 2 週間おきに 12 週まで二番汁の諸味液汁を 35mL ずつ採取した。採取した諸味液汁はろ紙(ADVANTEC、No.2、以下同様)でろ過し、しょうゆ試験法²⁾に準じて直接還元糖を、マクロ改良ケルダール法¹⁾により全窒素を分析した。熟成 4 週、8 週、12 週の一発汁、醸造開始直後、熟成 4 週、8 週、12 週の二番汁のろ液の α -アミラーゼ活性と全プロテアーゼ活性を以下の手順で測定した。ろ液 5mL を長さ 120mm に切断した透析用セルロースチューブ(東京硝子器機、20/32)に入れ、蒸留水 5L に浸し、一晚透析した。透析後の液を回収し、蒸留水を加えて 25mL に定容した。これを酵素溶液とした。酵素溶液の α -アミラーゼ活性を、 α -アミラーゼ測定キット(キッコーマンバイオケミファ)を用いて測定した。また、全プロテアーゼ活性をしょうゆ試験法²⁾に準じて測定した。ただし、反応時間は 60 分とした。さらに、仕込みに用いた麴の α -アミラーゼ活性と全プロテアーゼ活性を以下の手順で測定した。200mL 容三角フラスコに麴 10g と 0.5%食塩水 50mL を量り採り、20°C、140rpm の条件で 2 時間振とうし、酵素を抽出した。これをろ紙でろ過したものを酵素溶液とし、上記と同様に酵素活性を測定した。

2.3 熟成期間が及ぼす風味への影響

気体遮断袋(生産日本社、ラミジップ BY-14)に諸味約 1200g を調製した。これを 2 つ用意し、25°C で醸造した。8 週間後と 12 週間後に 1 つずつ取り出し、ザルで固形分をこして白醤油(一番汁)を回収した。ろ紙でろ過した後、-20°C で保存した。こうして用意した一番汁の熟成 8 週品と 12 週品の風味の違いを識別できるか調査するため、官能評価を行った。当センターの関係者 20 名をパネリストとし、1 対 2 比較法³⁾により行った。

2.4 耐塩性酵母の分離と同定

愛知県内のメーカーより入手した白醤油の諸味から耐塩性酵母を分離した。培地には食塩を 10w/v%、クロラムフェニコールを 0.01w/v%添加した YPD 培地(pH 4.8)を用い、7 日間培養した後、生じたコロニーから分

離した。分離菌株は第十八改正日本薬局⁴⁾に従い、同定した。ITS1-5.8S rDNA-ITS2-28S rDNA (partial) 領域を PCR により増幅して塩基配列を決定し、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST program を利用して最類似菌株を検索した。

2.5 諸味中の耐塩性酵母の挙動と白醤油品質への影響

200mL 容メジウム瓶に諸味約 200g を調製し、超音波をかけながら 6 分間減圧し、脱気した。その後、速やかに 2.4 で分離した耐塩性酵母の培養液を 10²cfu/g となるように接種し、シリコ栓で蓋をした。これを各菌株 7 本ずつ用意した。このうち、6 本はアネロパック・ケンキ(三菱ガス化学)とともに W チェック付スタンディングパウチ袋(三菱ガス化学)に入れ、25°C、嫌気条件下で醸造した。残りの 1 本は 25°C、好気条件下で醸造した。嫌気条件下で醸造した 6 本は 2 週間おきに 1 本取り出し、耐塩性酵母数を測定した。12 週間醸造した最後の 1 本は耐塩性酵母数を測定した後、ザルで固形分をこして白醤油を回収した。好気条件下で醸造した 1 本は 2 週間おきに諸味液汁を 2mL 採取し、耐塩性酵母数を測定した。採取後は 25°C に戻し、12 週間醸造を続けた後、白醤油を回収した。また、同様に諸味を調製して脱気した後、酵母を接種せずに 25°C、嫌気条件下で 12 週間醸造し、白醤油を回収した。これをコントロールとした。耐塩性酵母数は食塩を 20w/v%、クロラムフェニコールを 0.01w/v%添加した YM 培地(pH 4.8)を用い、7 日間培養後に計数した。回収した白醤油はろ紙でろ過した後、しょうゆ試験法²⁾に準じて直接還元糖を分析した。また、簡易アルコール分析器アルコメイト AL-3(理研計器)を用いてアルコール濃度を分析した。

3. 実験結果及び考察

3.1 熟成に伴う成分および残存酵素活性の推移

醤油は JAS 規格で等級が定められており、白醤油では全窒素、直接還元糖、無塩可溶性固形分、色度の規格値がそれぞれ設けられている。本研究では白醤油の品質を評価する上で重要な成分である直接還元糖と全窒素について、熟成に伴う推移を調査した。結果を図 1 に示す。一番汁の直接還元糖は熟成 2 週でほぼ上限に達した。全窒素は 4 週まで大きく増加した後、微増を続けた。一方、二番汁では直接還元糖、全窒素ともに熟成 2 週でほぼ上限に達した。次に、直接還元糖や全窒素が同程度であった一番汁の熟成 8 週品と 12 週品について、風味の違いを識別できるか調査するため、官能評価を行った。その結果、有意差は認められなかった($p < 0.05$)。以上の結果から、一般的に一番汁は 3 ヶ月程度熟成させるが、2 ヶ月程度でも問題ないことが示唆された。また、二番汁は

2週間程度で問題ないことが示唆された。ただし、本研究で行った官能評価は白醤油をそのまま供試した。調味料である白醤油はその使用方法によって、官能評価の結果が異なる可能性があり、留意が必要である。

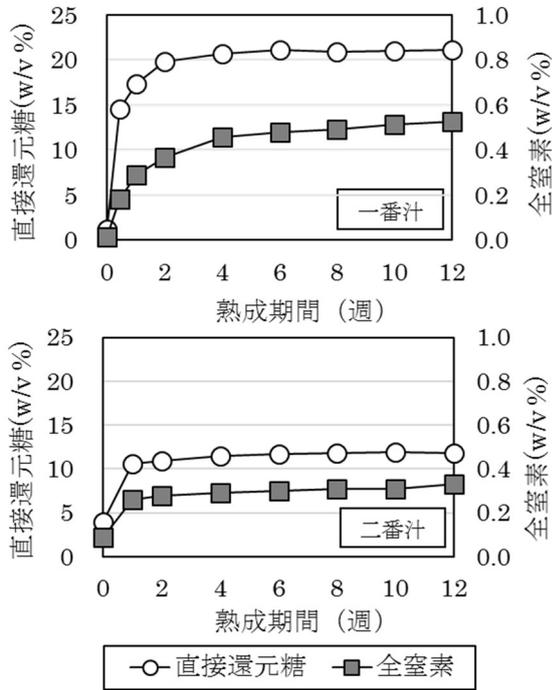


図1 熟成に伴う直接還元糖と全窒素の推移

塩麴は一時、全国的なブームとなり、現在では新たな調味料として浸透しつつある。塩麴が注目された理由の一つに酵素の働きがある。麴菌由来の酵素が残存し、食材に対して様々な調理効果を及ぼすことが期待されている⁵⁾。白醤油は琥珀色の色調が特徴であり、褐変を防ぐため、火入れを行わず製品化される。そのため、麴菌由来の酵素が残存しており、商品 PR や新規用途開発に利用できると考えた。そこで、白醤油の残存酵素活性に関する基礎データの採取を目的とし、熟成に伴う α -アミラーゼ活性および全プロテアーゼ活性の推移を調査した。その結果を図2に示す。なお、一番汁の醸造開始直

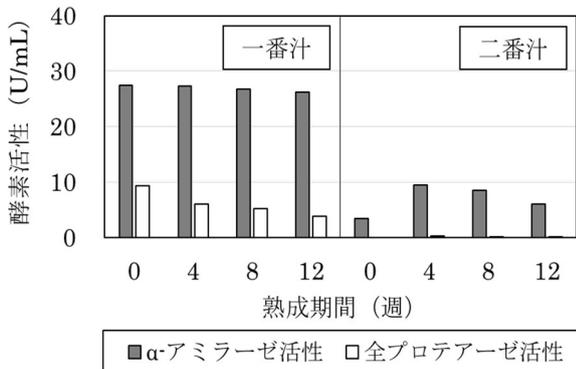


図2 熟成に伴う酵素活性の推移

後(0週)の酵素活性は麴の酵素活性と仕込み配合から算出した値を示した。全プロテアーゼ活性は一番汁では熟成とともに低下し、二番汁ではほとんど残存していなかった。 α -アミラーゼ活性は一番汁では安定しており、二番汁では低下する傾向が見られた。固液分離した一番汁を25°Cで6ヶ月間保存した後、同様に α -アミラーゼ活性を測定したところ、活性は維持されていた(データ省略)。一番汁の α -アミラーゼ活性は安定しており、商品 PR や新規用途開発に利用できることが示唆された。

3.2 耐塩性酵母の分離と同定

愛知県内のメーカーより入手した白醤油の諸味から耐塩性酵母の分離を試みた。培養後のプレートには3タイプの形状のコロニーが形成された。各タイプのコロニーから1株ずつ分離した。この3株の同定を試みたところ、決定した塩基配列はそれぞれ *Zygosaccharomyces rouxii*、*Candida versatilis*、*Candida glucosophila* の塩基配列と100%一致した。*Z. rouxii*と*C. versatilis*はそれぞれ主発酵酵母、後熟酵母と呼ばれ、濃口醤油では香りの形成に寄与することが知られている。しかし、白醤油醸造における影響は明らかになっていない。また、*C. glucosophila*は耐糖性酵母として知られており⁶⁾、筆者の知る限り、醤油から検出されたという報告はない。そこで、これらの耐塩性酵母を接種して試験醸造を行い、白醤油諸味での挙動や品質への影響を調査した。

3.3 諸味中の耐塩性酵母の挙動と白醤油品質への影響

熟成に伴う酵母数の推移を図3に示す。好気条件で醸造した区分はいずれの菌株も旺盛に増殖し、 $10^7 \sim 10^8$ cfu/g オーダーに達した。熟成4週目以降、*Z. rouxii*と*C. versatilis*は減少に転じたが、*C. glucosophila*は高止まりした。嫌気条件で醸造した区分では*C. versatilis*と*C. glucosophila*は初発からほとんど変化しなかったが、*Z. rouxii*はゆっくりと増殖を続け、12週目には 4.8×10^5 cfu/gに達した。

12週間後に回収した白醤油の直接還元糖およびアルコール濃度を表1に示す。好気条件で醸造した区分はいずれの菌株もコントロールに比べて直接還元糖が減少し、アルコールが検出された。旺盛に増殖した酵母によって糖が資化され、アルコールが生成されたと考えられる。一方、嫌気条件で醸造した区分は、醸造中に増殖が見られなかった*C. versatilis*と*C. glucosophila*では直接還元糖の減少やアルコールの生成は生じなかった。醸造中、微増を続けた*Z. rouxii*では直接還元糖が0.9%減少し、アルコールが0.3%検出された。耐塩性酵母が旺盛に増殖すると、直接還元糖が資化され、アルコールが生成されることがわかった。官能評価の実施には至らなかったが、好気条件で醸造した区分ではアルコール臭が発生し、

白醤油本来の麴香や甘酒香とは異質の香りとなった。また、菌体による濁りが生じ、ろ過工程の効率悪化を招く可能性が考えられた。以上の結果から、耐塩性酵母の増殖を抑制することで、品質の安定化や向上、ろ過効率の悪化防止が可能になると考えられる。耐塩性酵母の対策として、まずは製造ラインの洗浄を十分に行い、初発菌数を低減することが重要である。次に、適切な諸味管理

が重要である。本研究によって耐塩性酵母の生育には酸素が大きな影響を及ぼしていることがわかった。製造現場における醤油諸味の内部は仕込み後、麴菌の呼吸などにより急速に溶存酸素が減少し、嫌気状態になることが知られている⁷⁾。しかし、酸素と接する諸味上部では酵母が生育しやすい。仕込み後、速やかに諸味上部をビニールシートで覆って酸素との接触を防ぎ、さらに重石を乗せて麴を塩水に浸すことで耐塩性酵母の増殖を抑制できると考えられる。上述したように、一番汁の熟成 8 週品と 12 週品は同等品質であると考えられる。嫌気条件でも増殖する *Z. rouxii* のリスク低減に、熟成期間の短縮化は有効であると考えられる。ただし、本研究で供試した耐塩性酵母は *Z. rouxii*、*C. versatilis*、*C. glucosophila* に属する各 1 株のみであり、同種の別株や他種の耐塩性酵母についても調査が必要と考えられる。

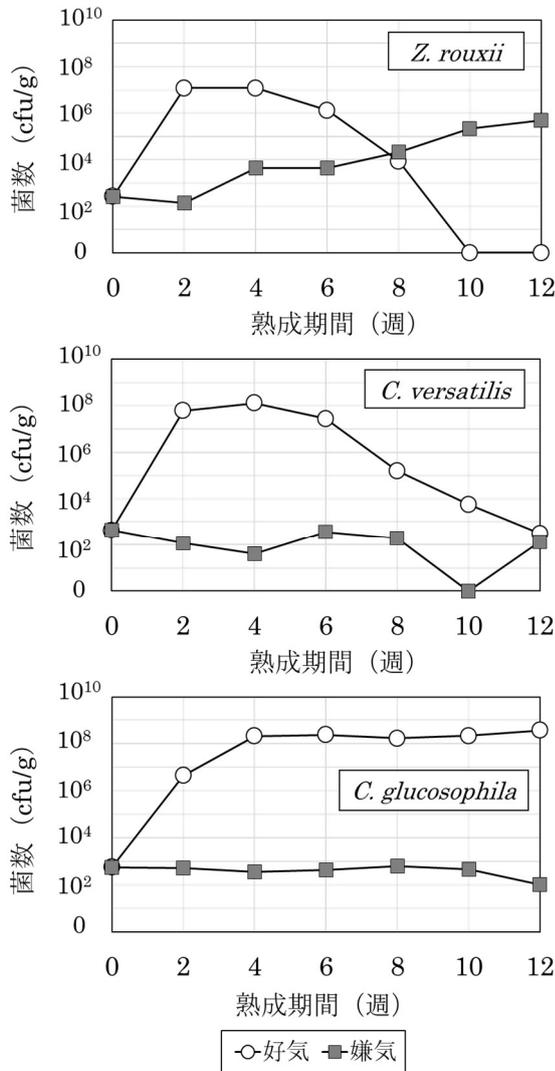


図 3 耐塩性酵母の熟成に伴う菌数の推移

表 1 酵母を接種して醸造した白醤油の直接還元糖およびアルコール濃度

接種菌株	醸造条件	直接還元糖 (w/v %)	アルコール (v/v %)
なし (コントロール)	嫌気	20.0	0.0
<i>Z. rouxii</i>	好気	10.4	3.6
	嫌気	19.1	0.3
<i>C. versatilis</i>	好気	12.5	3.0
	嫌気	20.3	0.0
<i>C. glucosophil</i>	好気	14.8	1.0
	嫌気	20.4	0.0

4. 結び

本研究の結果は、以下のとおりである。

- (1) 一番汁の直接還元糖は熟成 2 週、全窒素は熟成 4 週でほぼ上限に達した。熟成 8 週品と 12 週品は官能評価で有意差がなく、一番汁の熟成期間は 2 ヶ月程度で問題ないことが示唆された。また、二番汁は直接還元糖、全窒素ともに熟成 2 週でほぼ上限に達し、熟成期間は 2 週間程度で問題ないことが示唆された。
- (2) 一番汁の α-アミラーゼ活性は安定しており、商品 PR や新規用途開発に利用できることが示唆された。
- (3) 白醤油の諸味で耐塩性酵母が旺盛に増殖すると、直接還元糖が減少し、アルコール臭や濁りが生じた。耐塩性酵母の増殖を抑制することで、品質の安定化や向上が可能であると考えられる。

文献

- 1) 文部科学省 科学技術・学術政策局政策課資源室 監修, 安井明美, 中里孝史, 淵上賢一, 渡邊智子編: 日本食品標準成分表 2015 年版(七訂)分析マニュアル・解説(2016), 建帛社
- 2) 財団法人日本醤油研究所: しょうゆ試験法 (1985), 日本醤油研究所
- 3) 相島鐵郎: 日本食品科学工学会誌, **48**(5), 378(2001)
- 4) 第十八改正日本薬局方(令和 3 年 6 月 7 日 厚生労働省告示第 220 号), p. 2600.
- 5) 前橋健二, 大戸亜梨花, 山本達彦, 浅利妙峰, 柏木豊: 日本食品科学工学会誌, **62**(6), 290(2015)
- 6) K. Tokuoka, T. Ishitani, S. Goto, K. Komagata: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **33**, 1(1987)
- 7) 水沼武二: 日本醸造協会誌, **79**(11), 802(1984)