

醤油麴酵素消化液と各種酵母による発酵液の調製

加藤 熙・鬼頭幸男・田中敏夫[※]

バイオリアクターによる醤油製造法については、久保¹⁾、堀津^{2),-4)}、山田^{5), 6)}、岩崎^{7), 8)}をはじめ数多くの報告があり、白醤油⁹⁾、溜醤油¹⁰⁾、あるいは発酵調味料¹¹⁾への利用についても報告されている。これらの例は、醤油麴、小麦、大豆の酵素消化液を材料として、セラミックスや多糖類ゲルに固定化した微生物によって発酵させるもので、醤油速醸法^{12), 13)}と同様に、醤油麴などの酵素消化と微生物による発酵の2工程を分離したことが従来の醸造法と異なっている。

一方、醤油醸造での酵母・乳酸菌の強化についても松本ら¹³⁾、稲森ら¹⁴⁾、高橋¹⁵⁾、門脇¹⁶⁾など、古くから数多くの成果が報告されているが、とくに速醸法やバイオリアクターによる製品の香味改善には、酵母の選択が重要な因子であり、また、酵母による醤油麴消化液の発酵は新しい風味の発酵調味料の開発を期待させる。

本報では、醤油麴消化液での各種酵母によるエタノール生成量の比較検討と、醤油酵母とアルコール酵母との細胞融合株の調製を試み、若干の知見を得たので、これらの結果について報告する。

実 験 方 法

1. 醤油麴の調製

撒水率120%の脱脂大豆を、水蒸気圧1.8kg/cm²で4分間蒸煮し、これに炒り小麦を加えて3日麴とし、麴消化液の調製に供した。麴Aは脱脂大豆と炒り小麦の比率が55:45で、全窒素(TN)4.67%、麴Bは60:40でTN5.67%であった。

2. 麴消化液の調製

ジャーフェーマンター(株いわしや澤田健蔵商店MB型)で4 l容ジャー(200mmφ)を用いて、麴消化液を調製した。麴消化液Aについては、第1表のように、麴A 300 gに対し、食塩12 g(1%相当量)、水道水1,200 ml(試験により、600 mlずつ2回分割添加)、セルラーゼ1.5~3 g添加反応後、プロテアーゼ1.5~3 gを添加し50℃または55℃で24~48時間、200rpmで攪拌しながら酵素消化を行った。麴消化液Bについては、第2表のように、麴B 600 gに食塩15 g、水道水1,200 ml、セルラーゼ5~6 g添

※ハレルヤ製菓(株)

醤油麴酵素消化液と各種酵母による発酵液の調製

加反応後、プロテアーゼ 5～6 g を添加して 50℃ または 55℃ で 24～72 時間、200rpm で攪拌しながら酵素消化を行った。なお、セルラーゼ製剤は、アマノ AP 3 (30,000unit/g)、プロテアーゼ製剤は、アマノ A を使用した。

第 1 表 全窒素約 1% の麴 A 消化液の調製条件

No.	醤油麴	食塩	水	セルラーゼ	反応	水	プロテアーゼ	反応
1.	300g	12g	600ml	3g	15℃, 22hrs	600ml	3g	50℃, 24hrs
2.	300	12	600	3	10 24	600	3	50 24
3.	300	12	1,200	1.5			1.5	50 48
4.	300	12	600	1.5	10 6	600	1.5	55 24
5.	300	12	1,200	3	10 24		3	50 48

第 2 表 全窒素約 2% の麴 B 消化液の調製条件

No.	醤油麴	食塩	水	セルラーゼ	反応	プロテアーゼ	反応
1.	600g	15g	1,200ml	5g	10℃, 19hrs	5g	50℃, 48hrs
2.	600	15	1,200	6	10 19	5	50 48
3.	600	15	1,200	6		6	50 48
4.	600	15	1,200	6		5	55 48
5.	600	15	1,200	6		5	50 72

各消化処理液は 500ml 容の蓋付き遠沈管に採取し、冷凍高速遠心機（久保田 KR 200A 型）でローター RA-7 を用いて、5℃、7,000rpm、5 分間遠心分離し、上澄液と残渣とに分けてそれぞれを秤量した。この操作を繰り返して得た上澄液は一つに合わせて、麴 A から TN 約 1%、麴 B から TN 約 2% の麴消化液とした。

3. 窒素溶解利用率の算出

麴 A 及び麴 B から調製した各麴消化液について、TN、NaCl を日本醤油分析法に準じて分析し、次の計算式¹⁸⁾により窒素溶解利用率を算出した。

計算による液汁量 (ml) = 食塩使用量 (g) × (100 / 消化液の食塩%)

溶解窒素量 (g) = 計算液汁量 (ml) × (液汁の TN% / 100)

使用した麴の窒素量 = 麴使用量 (g) × (麴の TN% / 100)

窒素溶解利用率 = 溶解窒素量 (g) / 使用した麴の窒素量 (g)

4. 酵母の培養

麴消化液 A 及び B にグルコースを 10% 添加し pH 5.0 とした培地（麴 A 及び麴 B 培地）を 5 ml ずつ試験管に分注、別に前培養した酵母菌体を接種して 30℃ 5 日間培養した。試験に用いた酵母は、第 3 表に

示すように、ワイン酵母9菌株、産膜酵母5菌株、清酒酵母4菌株、焼酎酵母2菌株、醤油酵母7菌株、計27菌株である。

第3表 使用した酵母菌株

No.	記号	菌株名
1	S-73	<i>Saccharomyces oviformis</i>
2	S-68	<i>Saccharomyces fermentati</i>
3	W-38	<i>Saccharomyces bayanus</i>
4	W-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5	OC-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
6	IAM-4043	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
7	K-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
8		Montrashet Yamanashi
9	O-69	<i>Candida parapsilopsis var intermedia</i>
10	K-16	<i>Pichia membranaefaciens</i>
11	1-2-1	<i>Hansenula anomala</i>
12	E-20-1	<i>Hansenula subpelliculosa</i>
13	4B	<i>Hansenula</i> sp.
14	協会7号	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
15	協会9号	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
16	協会10号	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
17	6-4-C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
18	H-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
19	SC	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
20	T-396	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
21	IFO-0510	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
22	B	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
23		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
24	NH	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
25	Kojiya	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
26	IFO-0652	<i>Candida versatilis</i>
27		<i>Candida etchellsii</i>

また、300ml三角フラスコに10%グルコースの麴A及び麴B培地を100ml分注し、酵母接種後30℃で11日間培養中5日後に10%グルコースを追加して添加、3、5、7、11日後の培養液2mlを採取してエタノール生成量の測定に供した。

醤油酵母のエタノール生成量と食塩濃度との関係については、食塩濃度を0、5、10、15%の4段階とした10%グルコースの麴A及び麴B培地100mlを300ml三角フラスコ分注し、30℃7日間培養後、エタノール生成量の測定に供した。

前培養及び対照の培地として、YPD培地及びMG培地を使用した。YPD培地は、粉末酵母エキス5g、ポリペプトン10g、グルコース40g（実験により重量を適宜変更）、KH₂PO₄5g、MgSO₄

・ $7\text{H}_2\text{O}_2$ 2g を水道水に溶解して 1l とし、 pH を 5.4 に調整した。また、 MG 培地は、生引き溜を希釈して $\text{TN}0.2\%$ とし、食塩 5% または 10% 、グルコース 5% または 10% とし、 pH を 5.4 に調整した。

5. 培養液の分析

培養液のグルコース、エタノールは、高速液体クロマトグラフ（島津製 LC-3A 型）により分析した。培養液は、遠心分離して菌体を除去した後、蒸留水で $5\sim 50$ 倍に希釈し、ミリポアフィルターで濾過したもの $10\mu\text{l}$ を注入した。標準溶液として、グルコース 0.5% 及びエタノール 2% を含む水溶液を使用し、カラムは、シマズゲル SCR-101N 、移動相は蒸留水で $0.5\sim 1.0\text{ml}/\text{min}$ 、 $10\text{kg}/\text{cm}^3\sim 20\text{kg}/\text{cm}^3$ で、温度は 60°C 以下とした。また、圧力、流量の変化防止のため、 $2.1\phi\times(0.5\sim 1)\text{m}$ のダイパックスカラムを連結した。検出器には、示差屈折計（ RID-2A 型）を使用した。

6. 細胞融合

供試菌株から、醤油酵母 1 菌株（ $\text{Na}21$ ）とアルコール酵母 4 菌株（ $\text{Na}2$ 、 $\text{Na}4$ 、 $\text{Na}17$ 、 $\text{Na}20$ ）を選び、細胞融合による育種を試みた。これら醤油酵母及びアルコール酵母は、 MG 培地及び YPD 培地で、 30°C で 24 時間培養後、 $3,000\text{rpm}$ で遠心分離した菌体を生理食塩水で 3 回洗浄し、メルカプトエタノール 0.2% を含む 0.06MEDTA-2Na 水溶液で 30°C 、 10 分間処理した。

得られた菌体は、さらに $\text{M}/15$ 磷酸緩衝液（ $\text{pH}7.5$ ）で 1 回洗浄後 4ml 緩衝液に懸濁し、 $\text{Zymolyase}100\text{T}$ 溶液（ $0.15\text{mg}/\text{ml}$ ）を 1ml 添加、 25°C で 1 時間保持してプロトプラストを得た。これを $3,000\text{rpm}$ で遠心分離して、磷酸緩衝液で 5 回洗浄後、磷酸緩衝液に懸濁した。

醤油酵母のプロトプラスト懸濁液 1ml に各アルコール酵母のプロトプラスト懸濁液 1ml ずつを混合し、それぞれ、 50mM CaCl_2 を含む $30\% \text{PEG}6000$ 水溶液で 20°C 、 20 分間処理した後、 0.2% メルカプトエタノールを含む 0.06M KCl 水溶液で洗浄し、再生用培地に植え付けた。再生用培地の組成は、 0.8M ソルビトール、グルコース 40g 、寒天 30g を含む YPD 培地で、この寒天平板培地上にプロトプラストを塗抹し、 0.8M ソルビトールを含むゼラチン（ 30% ）を重層平板とし、 30°C で 5 日間培養して生育したコロニーを、 MG 寒天培地にレプリカし 30°C で 5 日間培養して耐塩性菌の選択分離を行った。発生したコロニーを釣菌し、 10% グルコース及び食塩を含む MG 培地で 30°C で 5 日間培養し培養液のグルコース、エタノールを分析した。

実験結果及び考察

1. 醤油麴消化液の調製

麴 A 消化液の上澄液は、第 4 表のように、1 回で約 $1,200\text{g}$ 、5 回の繰り返しで $6,032\text{g}$ を得た。麴に水を加えると水を吸収して固まった状態になるが、セルラーゼ添加後 10°C に約 30 分保持すると軟化して流動性を増し¹⁹⁾ 攪拌が容易になった。所定量の水を 1 回で用いる方が 2 回に分けるよりも高い窒素溶解利用率になるが、酵素剤の添加量による差異の方が大きな影響を及ぼした。

次に麴Bから、5回の繰り返して6,149gの上澄液を得た。麴Aの場合と同じく、プロテアーゼ処理後の上澄液量及び窒素溶解利用率は、第5表に示すように、セルラーゼ添加後10℃で保持した方が高くなった。液汁量は、プロテアーゼ処理時の反応温度が高い方が、また反応時間が長い方が増加したが、セルラーゼ添加後の低温処理との併用効果の方が大であった。

麴A及びBの各5回の処理分を合わせた結果、麴消化液Aの組成は、全窒素約0.9%、ホルモール窒素約0.5%、食塩約1%、直糖約2%、麴消化液Bの組成は全窒素約2.0%、ホルモール窒素約1.1%、食塩1.2%、直糖2.5%となった。

第4表 麴A消化液の組成

No.	上澄液	遠心残渣	T N	F N	N a C l	D S	p H	液汁量	窒素溶解利用率
1.	1,199 g	268 g	0.98%	0.54%	0.99%	2.76%	4.3	1,212ml	84.8%
2.	1,227	289	0.89	0.51	0.97	2.44	4.3	1,237	78.6
3.	1,196	273	0.86	0.41	0.95	1.30	3.9	1,263	77.5
4.	1,144	343	0.82	0.39	0.95	1.39	4.1	1,263	73.9
5.	1,266	262	0.86	0.47	0.89	2.01	4.2	1,348	82.7

第5表 麴B消化液の組成

No.	上澄液	遠心残渣	T N	F N	N a C l	D S	p H	液汁量	窒素溶解利用率
1.	1,236 g	521 g	2.10%	1.21%	1.21%	2.0 %	4.8	1,240ml	76.5%
2.	1,252	496	2.02	1.21	1.16	2.0	4.8	1,293	73.6
3.	1,215	533	1.96	1.10	1.26	2.0	4.6	1,190	68.6
4.	1,154	524	1.96	1.02	1.21	3.0	4.7	1,240	71.4
5.	1,292	521	1.89	0.99	1.15	2.85	4.7	1,304	72.4

醤油の酵素剤仕込については、竹田らなど多くの報告^{20) - 24)}があり、これらの試験での結果は、本報告で得られた窒素溶解利用率とはほぼ同じレベルである。醤油仕込では過剰発酵によりエタノールが4%以上になるとプロテアーゼ活性を阻害して窒素利用率や分解率が低下すること²⁵⁾もあるが、本報告では、醤油麴消化液を発酵原液としているので、発酵による窒素溶解利用率の低下はないと考えられる。

2. 各種酵母による醤油麴酵素液の発酵

YPD培地、麴A及び麴Bの消化液の培地（麴A培地及び麴B培地と呼ぶ）における各酵母の生育度及びエタノール生成量を第6表に示す。

菌株No.10及びNo.19の2菌株は、YPD培地でもエタノール生成量が低く、他の菌株の1/10以下となった。また、*Z. rouxii*の1菌株（No.25）と*C. ethellsii*（No.27）は、YPD培地で他株の1/2以下であった。各培養液の香気は、いずれも、それほど良好ではなかった。

醬油麴酵素消化液と各種酵母による発酵液の調製

第6表 各酵母によるアルコール発酵液（グルコース10%）

	YPG 培地			麴 A 培地			麴 B 培地		
	菌体量 O.D.	グルコース 残量 %	エタノール 生成量 %	菌体量 O.D.	グルコース 残量 %	エタノール 生成量 %	菌体量 O.D.	グルコース 残量 %	エタノール 生成量 %
1 S-73	0.66	—	4.234 ◎	0.90	0.146	3.952 ◎	0.95	0.108	2.128 ◎
2 S-68	0.95	—	3.988 ◎	0.82	0.152	3.274 ○	0.78	0.202	3.574 ○
3 W-38	0.68	—	3.908 ○	0.78	0.164	3.946 ○	0.95	0.158	4.254 ◎
4 W-3	0.83	—	3.696 ◎	0.84	0.138	4.071 ○	0.63	0.208	3.514 ◎
5 OC-2	0.72	—	3.942 ◎	0.78	0.158	4.152 ○	0.63	0.228	2.960 ○
6 IAM-4043	0.79	—	3.898 ◎	0.72	0.158	3.330 △	0.59	0.112	2.306 △
7 K-3	0.70	—	4.110 ◎	0.75	0.156	3.646 ○	0.86	0.182	3.482 ○
8 Montraset	0.97	—	3.912 ◎	0.88	0.142	3.746 ○	0.70	0.238	3.390 ○
9 O-69	0.21	2.492	3.152 ○	1.10	0.128	1.216 △	0.86	0.171	2.216 △
10 K-16	0.39	8.138	0.062 ×	1.20	1.870	0.516 ×	1.10	3.226	1.884 △
11 1-2-1	0.90	—	3.202 ◎	1.38	0.184	0.508 ◎	1.50	0.104	0.196 △
12 E20-1	0.80	—	3.990 ◎	1.10	2.044	0.850 ◎	1.30	0.248	0.418 ○
13 Hansenula 4B	0.57	—	2.624 ◎	1.15	0.198	1.646 ○	1.14	0.272	0.506 ○
14 協会7号	0.96	—	3.822 ◎	0.96	0.162	2.796 ○	0.67	0.144	2.476 ○
15 協会9号	0.98	0.054	3.864 ◎	0.96	0.134	2.868 ○	0.72	0.234	2.318 ○
16 協会10号	0.95	—	3.830 ◎	0.88	0.146	3.382 ○	0.68	0.169	3.362 ○
17 6-4-C	1.04	—	4.034 ◎	1.08	0.134	3.474 ◎	0.72	0.214	2.594 ◎
18 H-1	1.05	—	4.172 ○	0.91	0.082	3.564 ○	0.66	0.168	2.738 ○
19 S. carlsbergensis	0.20	9.954	0.356 ○	0.80	5.376	0.318 ○	1.05	0.232	1.336 ○
20 T-396	0.88	0.146	4.598 ◎	0.82	0.138	4.052 ○	0.64	0.238	3.032 ○
21 Z. rouzii IFO 0510	0.74	—	3.816 ○	0.78	0.136	3.224 ○	1.15	0.182	2.798 ◎
22 Z. rouzii B	0.84	0.266	3.926 ○	0.82	0.138	3.528 ○	1.10	2.394	1.296 △
23 Z. rouzii	0.59	0.218	3.910 ○	0.69	0.230	3.244 ◎	1.06	0.892	2.510 ◎
24 Z. rouzii NH	0.64	—	3.748 ○	0.82	0.110	2.868 ○	1.08	1.564	1.464 ○
25 Z. rouzii Kojiya	0.45	5.352	1.816 ○	1.08	0.592	2.886 ○	1.40	0.222	2.074 ○
26 C. versatilis	0.86	0.086	3.826 ◎	0.97	0.188	4.058 ◎	1.28	0.096	1.810 ◎
27 C. etchellsii	0.74	6.732	1.174 ○	1.40	4.246	0.298 △	1.18	0.236	1.768 ○

30℃ 7日間培養 菌体増殖度：660nmのOD

培養液の香気 ◎：非常によい ○：よい △：普通 ×：よくない

産膜酵母3菌株（No.11, No.12, No.13）は、YPD培地では良好なエタノール生成量を示したが、麴培地では1/2以下に低下し、とくに麴B培地で最小となった。菌体増殖度は麴培地で増加し、他菌株とほぼ同じレベルであったが、エタノール生成は抑制された。いずれも、YPD培地ではエステル香を生じたが、麴B培地での香気は良好ではなかった。

以上の7菌株を除く20菌株は、YPD培地で良好なエタノール生成量を示し、①麴B培地では生成量がYPD培地の70%以下に低下するもの、②麴B培地でもかなり良好な生成量を示すもの、③麴A培地では低下するが、麴B培地で増加するもの、④TNの高いほど大となるもの、④麴A培地で生成量が大きくなるものの4つに大別できた。

ワイン酵母（No.1, No.6）、清酒酵母（No.14, No.15, No.17）、焼酎酵母（No.18）、醬油酵母（No.21~24）は、YPD培地に比べて麴A培地でもかなり良好なエタノール生成量を示したが、麴B培地ではYPD

培地の70%以下の生成量となった。また、No.1, No.17, No.21, No.23は、いずれも、麴B培地でも良好な香気を生じた。

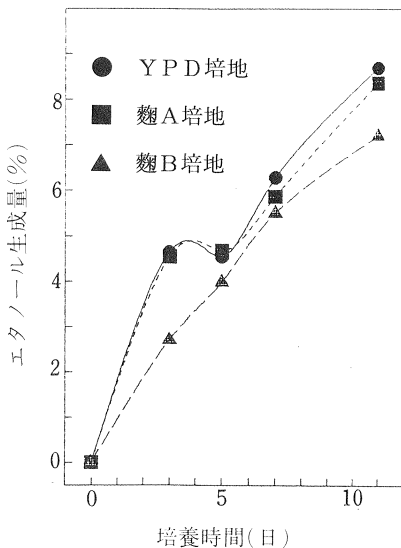
ワイン酵母 (No.7, No.8)、清酒酵母 (No.16)、焼酎酵母 (No.20) は、麴培地でやや低いエタノール生成量となるものの、麴B培地ではかなり良好な値を示した。また、ワイン酵母 (No.2, No.9) は、麴A培地では低下するが、麴B培地では麴A培地より大となった。

ワイン酵母 (No.3) のエタノール生成量は、麴培地の方がYPD培地よりも大となり、麴B培地で最大となり香気も良好であった。しかし、No.4, No.5 及びNo.26の3菌株は、麴A培地ではYPD培地よりも大となるが、麴B培地では低い値となった。No.4は、エタノール生成量が高く香気も良好であり、No.26は、麴B培地のエタノール生成量はYPD培地の1/2以下であったが、香気は良好であった。

ワイン酵母 (No.1, No.3, No.4) と清酒酵母 (No.17) は麴B培地で良好な香気を呈することから、醤油麴を原料とする発酵調味料の香気醸成に役立つものと考えられる。また、醤油の主発酵酵母 (No.21) とともに、後熟酵母 (No.26) も良好な香気を呈したことは、醤油の香気醸成に関する報告^{26) - 28)}と一致した。

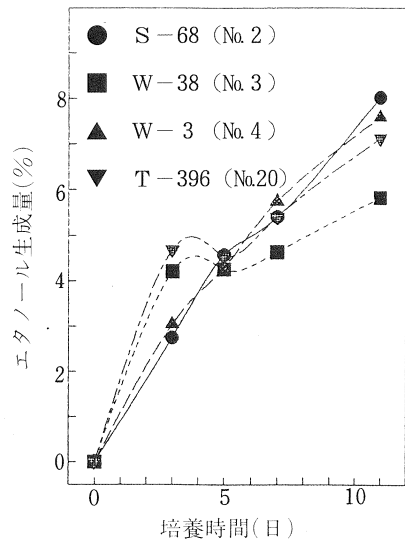
3. エタノール生成量の経時変化

麴B培地で良好なエタノール生成量を示したアルコール酵母5菌株 (No.2, No.3, No.4, No.17, No.20) について、YPD, 麴A及び麴B培地で30℃, 11日間培養中のエタノール生成量の経時変化を測定した。菌株No.17についての測定結果を第1図に示す。



第1図: エタノール生成量の経時変化 (No.17: 6-4-C) 30℃, 11日間培養

5日後に10%グルコース補足添加



第2図: エタノール生成量の経時変化 (麴B培地)

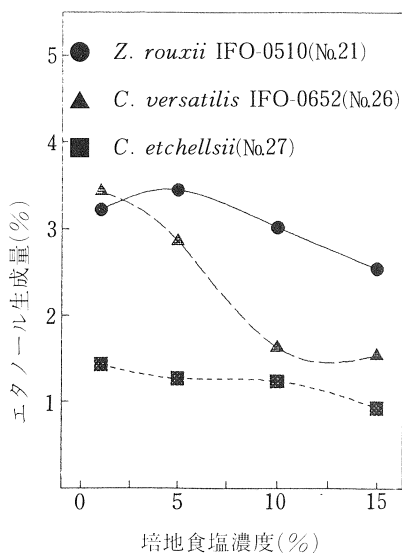
菌株No.17は、YPD及び麴A培地ではほぼ同様のエタノール生成量変化を示し、3日後にはグルコースを消費してエタノール濃度は4.6%で定常状態となった。5日後に10%グルコースを補足して培養を継続すると、わずかに速度は低下するもののエタノール生成量は増加し、11日後には8.7%となった。麴B培地では、エタノール生成速度はやや低下して5日後に3.9%、11日後に7.2%となった。麴B培地のグルコース濃度は、3日後3.5%、5日後も0.3%残存し、5日後に10%補足した後、11日後には1.7%となった。

他の4菌株の麴B培地におけるエタノール生成量の経時的变化を第2図に示す。No.2, No.4, No.20の3菌株は、No.17とほぼ同じグルコース消費とエタノール生成量を示した。一方、No.3はYPD培地では他株とほぼ同じ経時的变化を示したが、麴A及び麴B培地ではグルコース補足後のエタノール生成速度が低下し、11日後のエタノール生成量は6%以下の結果となった。しかし、これらの酵母がTN2%においても大きなエタノール生成量を示したことから、発酵調味料への利用が可能と考えられる。

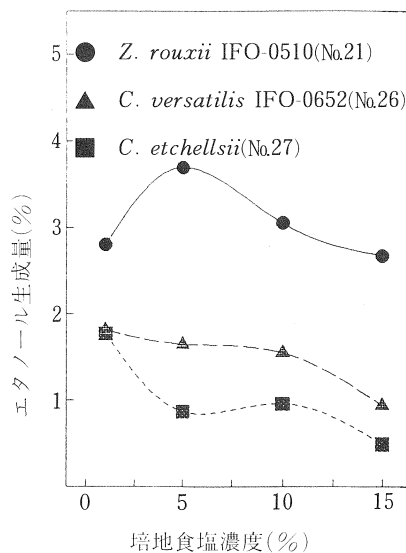
4. 醤油酵母のエタノール生成能と食塩濃度

醤油酵母3菌株 (No.21, No.26, No.27) のエタノール生成能への食塩濃度の影響は、麴A培地では第3図、麴B培地では第4図に示すとおりである。

醤油の主発酵酵母であるNo.21は、他の2菌株よりもエタノール生成量が大きく、食塩濃度が5%で最大値を示し、とくに麴B培地では食塩1%でのエタノール生成量は低下するが、10%、15%ではほぼ同じレベルであった。



第3図：食塩濃度とエタノール生成量
(麴A培地)
30℃, 7日間培養



第4図：食塩濃度とエタノール生成量
(麴B培地)
30℃, 7日間培養

後発酵酵母である菌株No.26及びNo.27のエタノール生成量は、いずれも、麴A培地よりも麴B培地で低下し、とくに菌株No.26は、食塩1及び5%では麴A培地で菌株No.21とほぼ同じレベルであるのに、麴B培地ではNo.27と同じレベルにまで低下した。醤油諸味中における3種類の酵母のきっこう作用²⁶⁾は、エタノール発酵能と食塩濃度に関する本結果でも確認できた。

なお、菌株No.22, No.23, No.24, No.25についても同様の実験を行った結果、No.25を除く3菌株はNo.21とほぼ同程度のエタノール生成量を示したが、菌株No.25は麴B培地での食塩耐性がやや低かった。

5. 細胞融合株の調製

醤油酵母 (No.21) とアルコール酵母 (No. 2, No. 4, No.17, No.20) との組合せで細胞融合を行った。Zymolyase 100T処理後の懸濁液の検鏡結果では、各菌株ともに全細胞がプロトプラストとなった。2菌株のプロトプラストを混合してPEG 6000で処理した懸濁液の検鏡結果では、2個の細胞が融合した状態は観察されず、変形した約10個のプロトプラストが、凝集していた。

再生用培地で発生するコロニーが、1枚のシャーレで約20個になるように希釈して培養した。融合株を選択分離する遺伝的形質が明確にしてなかったため、MG寒天培地上に発生したコロニーから適宜釣菌して斜面培地に移植、保管するとともに、液体培地で培養後のエタノール生成量を測定した。

菌株No.21 (*Z. rouxii* IFO 0510) のエタノール生成量は、2.79%であるのに対して、No. 2 (S-68) との融合株では、30個のコロニーのうち3個のコロニーのエタノール生成量は、2.99%, 3.29%, 3.41%であった。同様にして、No. 4 (W-3) との融合株では3.49%, No.17 (6-4-C) では3.50%, 3.69%, No.20 (T-396) では3.68%, 3.44%などNo.21よりも大きなエタノール生成量を示すものが得られた。

醤油酵母とアルコール酵母との細胞融合については、西田ら³⁰⁾、山田ら³¹⁾などの試みがあり、本報告と同様の結果を得ている。各融合株は、MG寒天斜面培地で5回継代培養を繰り返し、各回の菌体のエタノール生成量を測定した結果、No.21が2.6%~2.8%、他の融合株が3.0%~3.4%であった。エタノール定量誤差を考慮しても、エタノール生成能は遺伝形質として固定されたと考えられる。このことから醤油酵母の細胞融合法による育種は有望な手段と考えられる。

要 約

低食塩の醤油麴消化液の利用や酵母の選択は、新しい風味の発酵調味料の開発に役立つものと考えられるので、醤油麴の消化試験と各種酵母についてのエタノール生成量の比較、ならびに細胞融合による改良を行った。

1. 醤油麴から食塩約1%, TN 1及び2%の消化液を調製した。セルラーゼ、プロテアーゼは各3g使用した方が高い窒素溶解利用率になった。セルラーゼ添加後10℃で約30分間経過すると流動性を増して攪拌が容易になり、窒素溶解利用率は標準以上の値となった。

2. 醤油麴消化液にグルコースを添加した培地で27種類の酵母を培養してエタノール生成量と香気を

比較した。ワイン酵母3菌株 (*S. fermentati* S-68, *S. bayanus* W-38, *S. cerevisiae* W-3), 清酒酵母1菌株 (*S. cerevisiae* 6-4-C) が全窒素約2%の麴培地でもエタノール生成量が高く, 良好な香気を呈した。これら酵母は, 醤油麴を原料とする発酵調味料の香気醸成に役立つものと考えられる。また, 醤油の主発酵酵母 (*Z. rouxii* IFO-0510) とともに, 後熟酵母 (*C. versatilis* IFO-0652) も良好な香気を呈した。

3. 前項のアルコール酵母は, YPD及び全窒素約1%の麴培地ではほぼ同じエタノール生成量を示し, 3日後のエタノール濃度は4.6%で定常状態となり, 5日後に10%グルコースを補足して培養を継続すると, 11日後には8.7%となった。次にTN約2%の麴培地では, エタノール生成速度はやや低下し5日後に3.9%, 11日後に7.2%となった。また, 醤油における主発酵酵母 (*Z. rouxii* IFO-0510) のエタノール生成量は, 食塩濃度が5%で最大値を示し, 10%, 15%ではやや低くなるがほぼ同じレベルであった。

4. 醤油酵母とアルコール酵母との組合せで細胞融合を行った結果, 醤油酵母よりも大きなエタノール生成量を示す耐塩性融合株が得られた。得られた菌株について継代培養を5回繰り返して, エタノール生成能が遺伝形質として固定されたことを確認した。細胞融合法による育種は有望な手段と考えられる。

終わりに, 醤油麴を提供していただいたイチビキ㈱第3工場に感謝します。

文 献

- 1) 久保克己: 長野工技セ報, 1, 83-85(1990)
- 2) HORITSU H, MASEDA Y, KAWAI K: *Agric. Biol. Chem.*, 54 (2), 295-300(1990)
- 3) 堀津浩章: *BioInd.*, 4 (3), 198-206(1987)
- 4) 堀津浩章: 日醸協, 83 (8), 524-531(1988)
- 5) 山田哲也: *Bull. Fac. Bio. Mie Univ.*, 4, 187-196(1991)
- 6) 山田哲也・久松真・小瀬古茂樹・坪内一夫: *Bull. Fac. Bio. Mie Univ.*, 2, 71-79(1989)
- 7) 岩崎賢一・佐々原浩幸: 醬研, 14 (4), 123-126(1988)
- 8) IWASAKI K, SASAHARA H, NAKAJIMA M: *Agric. Biol. Chem.*, 55 (9), 2201-2207 (1991)
- 9) 兼松善範: 日醸協, 85 (12), 842-850(1990)
- 10) 小沢一広: 食品と容器, 32 (12), 676-684(1991)
- 11) 大城ひとみ・佐伯敬道: 湊川女短大紀要, 23, 124-127(1990)
- 12) 三林忠衛: 特許広告, 昭57-39625(昭57.8.23)
- 13) 野田文雄: 特許広告, 昭57-53066(昭57.11.11)
- 14) 松本伊佐尾・今井誠一: 日醸協, 80 (4), 265-269(1985)

- 15) 高橋 清：茨城食試報, 23, 34-39(1980)
- 16) 稲森和男・宮内賢吉・内田一生・吉野 宏：醬研, 13 (2), 62-69(1987)
- 17) 門脇 清：日釀協, 80 (10), 707-709(1985)
- 18) 田中秀男：日釀協, 74 (12), 823-824(1979)
- 19) 中台忠信・相島鉄郎：農化, 57 (4), 307-311(1983)
- 20) 竹田良作・土屋徹明・谷川善弘：香川発酵食試報, 71, 19-24(1979)
- 21) 竹田良作・壺井明彦・谷川善弘：香川発酵食試報, 73, 14-22(1981)
- 22) 竹田良作：日釀協, 77 (9), 585-589(1982)
- 23) 大西武頼：醬研, 6 (3), 82-85(1980)
- 24) 草場英治：日釀協, 70 (11), 792-796(1975)
- 25) 横山 勉：醬研, 5 (2), 66-70(1979)
- 26) 野田義治・大場和徳・中野正路：醬研, 10 (4), 119-125(1984)
- 27) 奥沢洋平・板倉 徹・江口宇三夫：醬研, 8 (1), 21-27(1982)
- 28) 壺井明彦・武田良作：香川発酵食試報, 74, 11-16(1982)
- 29) 近藤君夫・桑原秀明・蟻川幸彦・米山 正・馬場 茂・宮崎忠雄：長野食工試報, 14, 73-75 (1986)
- 30) 西田豊彦・加藤富民雄・村田 晃：日釀協, 86 (5), 372-377(1991)
- 31) 山田哲也：*Bull Fac Bio. Mie Univ.*, 3, 71-78, 79-85(1990)