

発表番号 45 (0547)

食塩中のミネラル類が醤油発酵微生物に与える影響

田中 正男 (千葉県産業支援技術研究所)
 舘 博 (東京農業大学短期大学部)
 安藤 達彦 (東京農業大学短期大学部)
 鈴木 健 (千葉県産業支援技術研究所)
 宮崎 浩子 (千葉県産業支援技術研究所)

食生活における食塩摂取量の減少を目的とした食品の開発が進められ、その中には、ナトリウム塩の割合を低下させ、カリウム、マグネシウムなどのミネラル分を増加させた食品がある。

塩化ナトリウム 50 % を塩化カリウムに置き換えて醤油の試醸を行い、通常の醤油と比較したところ、食味や成分値に違いがあった。この原因として、カリウム塩が醤油発酵微生物の生育や増殖に影響を与え、通常の食塩を用いた醤油と異なる発酵をした可能性が示唆された。

本研究では、100 % カリウム塩を用いた醤油醸造と通常の塩化ナトリウムを用いた醤油醸造を行い、醸造過程に関与する微生物の挙動と成分の変化を経時的に調査し、それらに対するカリウム塩の影響を明らかにするとともに、醸造諸味中の微生物相の消長を従来の平板培養法と T-RFLP 法 (Terminal restriction fragment length polymorphism; 制限酵素末端断片長解析) で検討した。その結果、カリウム塩を用いた醸造では、ナトリウム塩醸造に比べて、諸味の液状化が早く、早い時期から全窒素、グルタミン酸、アルコールなどの成分は高い値を示した。

一方、一般生菌数は醸造過程の経過と共に減少したが、塩類の違いによる変化は認められなかった。酵母生菌数は醸造前半では、塩類の違いによる差は認められなかったが、醸造後半ではナトリウム塩仕込みでやや高

い傾向を示した。

また、醸造時の微生物の挙動を T-RFLP 法で解析し、原核生物の 16S-rRNA 遺伝子領域の T-RFLP 解析により *Tetragenococcus halophilus* , 麴由来の *Bacillus subtilis* を主とする 6 種類以上の細菌種が存在し、真核生物では rRNA ITS 遺伝子領域の T-RFLP 解析により *Zygosaccharomyces rouxii* , 麴由来の *Aspergillus oryzae* を主とする 6 種類以上の真核生物が存在していた。

醤油醸造で重要な乳酸菌 *T.halophilus* は、制限酵素 *Xba I* , *Hinf I* 及び *Hae III* で 123 bp、醤油酵母 *Z.rouxii* は、制限酵素 *Sma I* 及び *Dra I* で 186 bp の切断断片を示すことから、これらの菌種の量を示す蛍光強度を調べた結果、カリウム塩で仕込んだ諸味ではナトリウム塩諸味に比べ *Thalophilus* の急激な増加と減少が認められた。これに対し *Z.rouxii* の動向は差が無かった。

以上のことから、カリウム塩での醤油醸造は、ナトリウム塩を用いた通常の醤油醸造時とは異なる発酵過程を示しており、その要因として、カリウム塩とナトリウム塩では酵素の活性が異なり、カリウム塩では、酵素の活性が高く、麴の溶解が早く、微生物菌相に影響していると推察される。特にその影響は醤油乳酸菌を含む原核微生物に対して強く働くことが示された。

助成番号 0547

食塩中のミネラル類が醤油発酵微生物に与える影響

田中 正男 (千葉県産業支援技術研究所)
 舘 博 (東京農業大学短期大学部)
 安藤 達彦 (東京農業大学短期大学部)
 鈴木 健 (千葉県産業支援技術研究所)
 宮崎 浩子 (千葉県産業支援技術研究所)

1. 研究目的

近年、食生活における食塩摂取量の減少を目的とした食品の開発が進められている。その中には、ナトリウム塩の割合を低下させ、カリウム、マグネシウムなどのミネラル分を増加させたミネラル調整塩を用いた食品がある。

塩化ナトリウム 50%を塩化カリウムに置き換えたミネラル調整塩を用いて醤油の試醸を行い、並塩を用いて試醸した醤油と比較したところ、苦みなどの食味に差が認められた¹⁾。また、エタノール、ホルモール窒素、グルタミン酸等の成分分析値に違いがあった。この原因として、カリウム塩が醤油発酵微生物の生育・増殖に影響を与え、通常の食塩を用いた醤油と異なる発酵をした可能性が示唆された²⁾。

本研究では、100%カリウム塩を用いた醤油醸造と通常のカリウム塩を用いた醤油醸造を行い、醸造過程に関与する微生物の挙動と成分の変化を経時的に調査し、それらに対するカリウム塩の影響を明らかにすることを目的とした。

その結果、カリウム塩を用いた醤油醸造諸味中では、微生物の挙動や成分の変化が通常の醤油醸造とは異なる発酵過程を示すことを明らかにできたので、ここに報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

2.1.1.1 醤油醸造に供した菌株

醤油乳酸菌 *Pediococcus halophilus* (株式会社ビオック製)

醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* (株式会社ビオック製)

2.1.1.2 菌相分布解析のための基準菌株

Zygosaccharomyces rouxii (NRIC 0046, NRIC 1408, NRIC 1812T)

Candida etchellsii (NRIC 0424, NRIC 1784T, NRIC 1788)

Tetragenococcus halophilus (NRIC 0098T, NRIC 1519, NRIC 1632)

2.1.2 試薬

塩化ナトリウム(試薬一級、大塚化学製)

塩化カリウム(試薬一級、関東化学製)

2.2 仕込み試験

常法により製麹した醤油麹5リットルを塩水6リットルに仕込み、15℃で30日間、その後20℃で醸造した。仕込み塩水として23%(w/v)塩化ナトリウム水溶液及び23%(w/v)塩化カリウム水溶液を使用した。醤油乳酸菌は仕込み時に 1.8×10^6 個/gになるように諸味に添加し、醤油酵母は仕込み後1ヵ月目に 1.4×10^5 個/gになるように諸味に添加した。

試験区は以下の4区を設定した。

- ①塩化カリウム塩水、乳酸菌及び酵母添加区(以下 KCl 乳酸菌酵母区と表記する)
- ②塩化カリウム塩水、微生物無添加区(以下 KCl 微生物無添加区と表記する)
- ③塩化ナトリウム塩水、乳酸菌及び酵母添加区(以下 NaCl 乳酸菌酵母区と表記する)
- ④塩化ナトリウム塩水、微生物無添加区(以下 NaCl 微生物無添加区と表記する)

2.3 成分分析

2.3.1 試料の調製

諸味300mlを採取し、5,000回転15分間遠心分離し、上澄み液をADVANTEC No. 2ろ紙でろ過し、ろ液を各成分の分析に使用した。各成分の分析方法は、しょうゆ分析法³⁾に準じた。

試料の採取は、仕込み日を1日目とし、17日目以降14日ごとに行った。

2.3.2 全窒素

試料を1ml取り、これに分解促進剤(K_2SO_4 、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$)3.3g、濃硫酸7ml、過酸化水素水(30%)5mlを加え、420℃で90分間加熱処理した。測定にはケルダール窒素分析装置1035ケルテックオート(teacator社製)

を使用した。

2. 3. 3 アルコール

試料 1 ml に 2% アセトン 1 ml を内部標準として加え、蒸留水を用いて 10 ml にしたものを FID ガスクロマトグラフ (島津 GC-9A) により分析した。

カラム: PorapaxQ ϕ 3 mm \times 1 m

分析条件: Column temp. 160°C Injection temp. 210°C

2. 3. 4 アミノ酸

試料 1 ml に JEOL Amino Acid Analyzer 4th Lithium Citrate Buffer (pH 2.83) (日本電子製) 5 ml を加え、200 ml にメスアップしたものを 0.45 μ m のフィルター (DISMID-13HP ADVANTEC 社製) でろ過し、自動アミノ酸分析装置 (JLC500/V 日本電子社製) を用い、分析した。

2. 4 微生物試験

2. 4. 1 一般生菌数

一般生菌数の測定は、仕込んだ諸味を 7 日ごとに採取したものを用いた。試料は、諸味 5 g を採取し 10% 塩化ナトリウム溶液を用いて 50 ml にメスアップした後、激しく懸濁した。この懸濁液の一部を 10% 塩化ナトリウム溶液で適宜希釈し、培地に植菌し平板培養法により菌数測定を行った。使用した培地は、パールコア一般生菌培地 (栄研化学社製) に 10% NaCl を添加したものを用いた。

2. 4. 2 酵母生菌数

酵母生菌数の測定は、試料の調整は一般生菌と同様に行った。使用した培地は、YM 培地³⁾ に 10% NaCl、クロラムフェニコール 50 mg/l、プロピオン酸 Na 2 g/l を添加したものを用いた。

2. 4. 3 菌相分布

T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism; 制限酵素末端断片長解析)⁴⁾ による菌相解析のために、各試験区より諸味 1 g を 7 日ごとに採取した。DNA の抽出は、諸味 1 g を 10 ml の 10% NaCl 水溶液で希釈し不織布でろ過した液を回収し、遠心分離により集菌した。集菌した菌体を 400 μ l の TE で再けん濁して DNA の抽出を行った。DNA の抽出精製は、プロテアーゼ K 処理 + フェノール・クロロホルム抽出により行った。

原核生物菌相分布解析には、16S-rRNA 遺伝子増幅用ユニバーサルプライマー 530F (5'GGGTTGCMGCCGCGG3') プライマーに BECKMAN-COULTER Dye (D4) 蛍光ラベルしたものと、ラベルしていない 1100R プライマー (5'GGGTTGCGCTCGTTG3') を使用した。

また、真核生物菌相分布解析には、rRNA 遺伝子 ITS 領域増幅用ユニバーサルプライマー ITS5 (5'

GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG3') に BECKMAN-COULTER Dye (D4) 蛍光ラベルしたものと、ラベルしていない ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') を使用し、PCR により遺伝子を増幅しフラグメント解析を行った。

PCR の増幅条件は、BECKMAN-COULTER CEQ Fragment Analysis System マニュアルに従って行い、20 サイクルの増幅を行った。

増幅された PCR 産物をエタノール沈殿によって精製し、制限酵素処理に用いた。原核生物菌相分布解析には、制限酵素 *Xba* I, *Hinf* I 及び *Hae* III を同時に使用した。真核生物菌相分布解析には、制限酵素 *Sma* I 及び *Dra* I を同時に使用し、フラグメント化した。

制限酵素処理した試料 1 μ l と BECKMAN-COULTER フラグメントスタンダード 600 を 0.4 μ l とホルムアミド溶液 40 μ l を混合し、BECKMAN-COULTER CEQ-8000 DNA シーケンサーによりフラグメント解析を行った。フラグメント解析では、蛍光末端からフラグメントの長さは、微生物菌種を示し、その蛍光強度はアニールしたプライマー量を示し、微生物菌数と相関する。

3. 結果及び考察

3. 1 分析結果

3. 1. 1 全窒素

図 1 に、諸味中における全窒素の経時変化の結果を示した。いずれの区も、日数の経過とともに全窒素は増加し、調査期間を通じ KCl 区は NaCl 区に比べ 5~12% 高い全窒素を示した。

3. 1. 2 アルコール

図 2 に、諸味中におけるアルコールの経時変化の結果を示した。アルコールについては、KCl 区では、31~45 日目にかけて急激に増加したが、73 日目以降では、減少に転じた。これに対し、NaCl 区では KCl 区に比べアルコールの増加が遅く、45~73 日目から増加が認められた。

3. 1. 3 アミノ酸

試料中の主要なアミノ酸は、グルタミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、バリン、ロイシンなどであった。図 3 に諸味中におけるグルタミン酸の経時変化の結果を示した。

グルタミン酸は、いずれの区も日数の経過とともに増加し、1,200 mg/dl 以上に達した。アスパラギン酸、バリン、ロイシンなどのアミノ酸も同様の傾向を示した (data not shown)。

また、KCl 区は NaCl 区に比べ、アミノ酸濃度が高く推移した。これは、KCl 区ではたんぱく質の分解が NaCl 区よ

り早く進んでいるためと考えられた。

なお、pHは仕込み後から徐々に低下し、いずれの区も59日目以降5.3~5.4で推移した。

3.2 微生物試験結果

3.2.1 一般生菌数

図4に、一般生菌数の経時変化の結果を示した。一般生菌数は、日数の経過とともに 10^9 個/gから 10^4 個/g

に減少した。また、KCl区とNaCl区を比較すると、42日目まではKCl区がNaCl区に比べやや多かったが、50日目以降ではほとんど差が無かった。

3.2.3 菌相分布解析結果

原核生物では16S-rRNA遺伝子領域のT-RFLP解析結果から、醤油諸味中には*T. halophilus*、麴由来の*Bacillus subtilis*を主とする6種類以上の細菌種が存在し

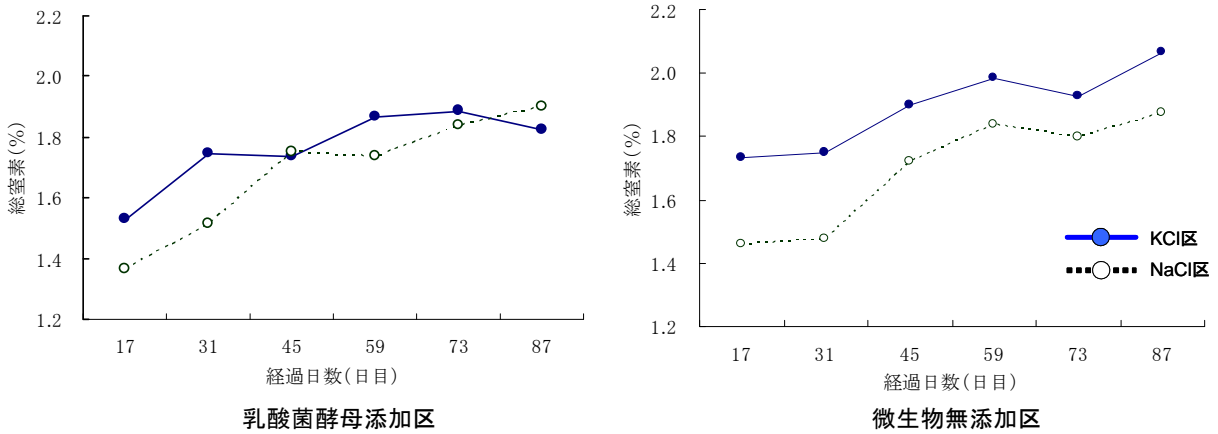


図1 全窒素の経時変化

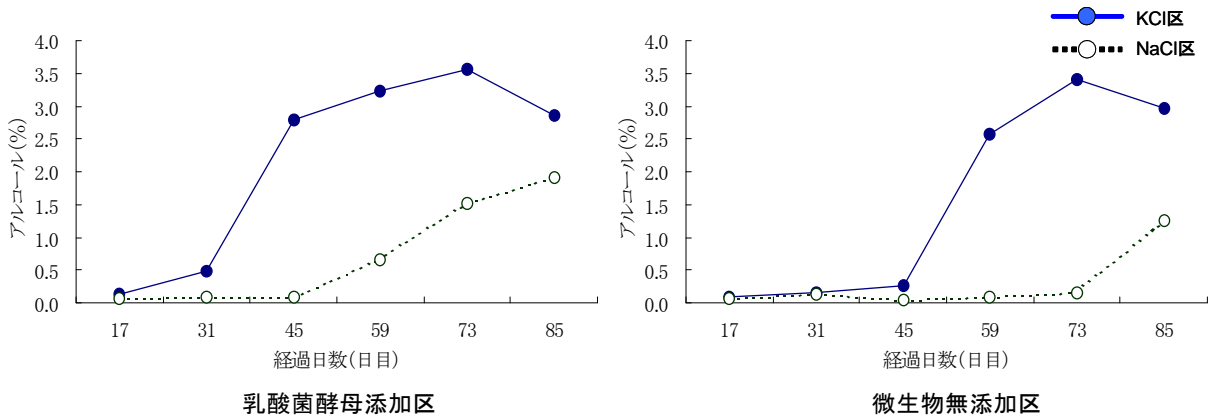


図2 アルコールの経時変化

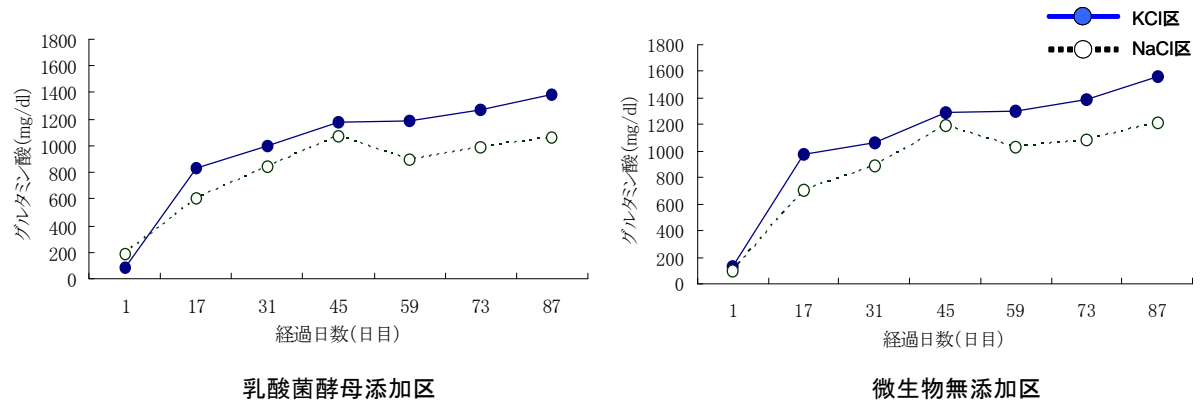


図3 グルタミン酸の経時変化

ていることがわかった。今回の調査条件では、醤油乳酸菌である *T. halophilus* は 123 bp のフラグメントとして検出された。断片化したフラグメントの蛍光強度は、ピーク高を添加したフラグメントスタンダード 600 の蛍光強度で割った値を蛍光強度比率として表し、この経時変化を調査した(図 6)。

その結果、発酵初期では KCl 区 NaCl 区とも大きな差は見られなかったが、KCl 区は乳酸菌酵母添加区では 36 日目に、微生物無添加区では 64 日目に急激な上昇を示し、その後急激に減少した。これに対し、NaCl 区では比較的緩やかに変化した。

真核生物では、rRNA ITS 遺伝子領域の T-RFLP 解析結果から、醤油諸味中には、*Z. rouxii*、麴由来の *Aspergillus oryzae* を主とする 6 種類以上の真核微生物が存在していることがわかった。

今回の調査条件では、醤油酵母である *Z. rouxii* は 186 bp のフラグメントとして検出された。図 7 に、このフラグメントの蛍光強度比率の経時変化を示した。その結果、微生物無添加区では、NaCl 区に比べ KCl 区の蛍光強度比率がやや高く推移したが、乳酸菌酵母添加区では明確な差は認められなかった。また、乳酸菌酵母添加区においても微生物無添加区においても、KCl 醤油諸味と NaCl 醤油諸味の経時的変化パターンは同様の傾向を示した。

この結果は、酵母生菌数試験の結果(図 5)とよく一致していた。

以上の結果から、KCl で仕込んだ醤油諸味と NaCl で仕込んだ醤油諸味の間には、全窒素、アルコール、アミノ酸等の成分の経時変化に差が認められ、異なる発酵経過をしていることがわかった。また、諸味の状態を観察したところ、KCl 区が NaCl 区に比べ諸味固形分の液状

化が進んでいることが確認され、成分分析の結果を裏付けていた。

これに対し、原核微生物である細菌類については、図 6 の T-RFLP 解析における *T. halophilus* に見られるように、KCl 区は NaCl 区に比べ細菌類の抑制が弱いものと推察され、菌相が急激に変化している可能性が考えられた。これに対し、図 7 の *Z. rouxii* にみられるように酵母類の微生物相の変化については、差は認められなかった。

また、仕込み時の微生物相に違いが無いにもかかわらず、経過日数に伴う成分変化に差が認められた。

この理由として考えられることは、①同一の菌であっても、KCl と NaCl で耐塩性が異なること、②醤油麴由来の酵素が KCl と NaCl 存在下での活性が異なることが示唆される。

4. まとめ

本研究では、カリウム塩を用いた醤油醸造における成分の変化と発酵に関与する微生物の挙動を明らかにするため、その発酵過程を塩化ナトリウムを用いた通常の醤油醸造と比較した。その結果、カリウム塩を用いた場合とナトリウム塩を用いた場合では、全窒素、アルコール、アミノ酸等の成分の経時変化に差が認められ、異なる発酵過程を経過していることがわかった。

また、カリウム塩を用いた場合では、ナトリウム塩を用いた場合に比べ原核微生物相の抑制が弱く、菌相が急激に変化している可能性が考えられる。これに対し、酵母類の真核微生物相の変化については、差は認められなかった。

カリウム塩を用いた醤油醸造は、通常の醤油とは異なる発酵過程を示すことを明らかにした。

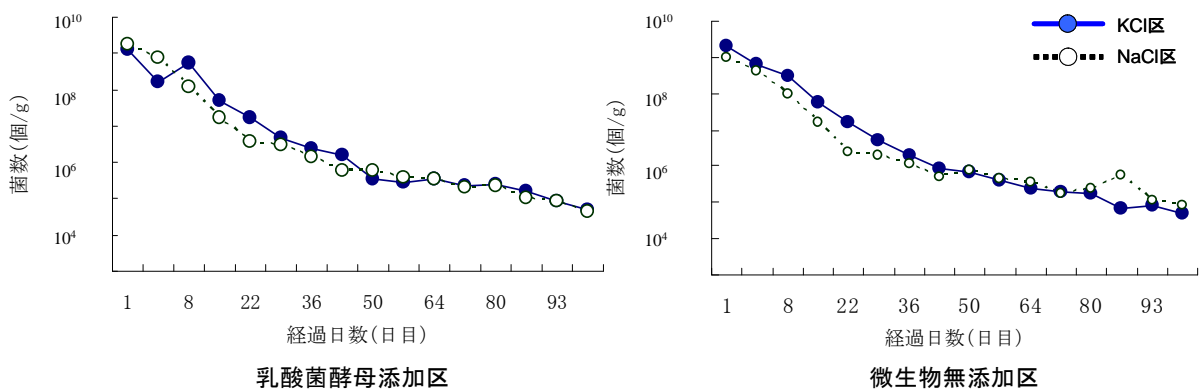


図 4 一般生菌の経時変化

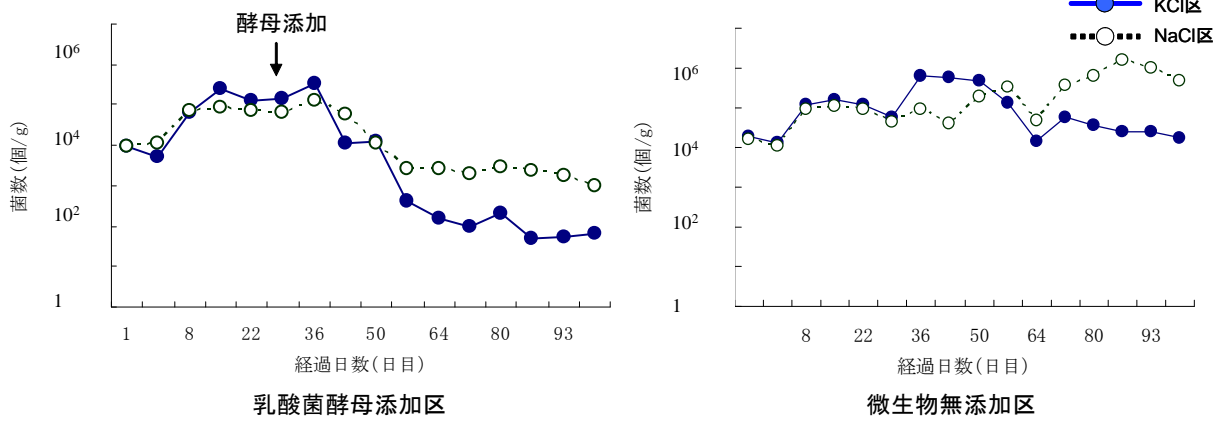


図 5 酵母の経時変化

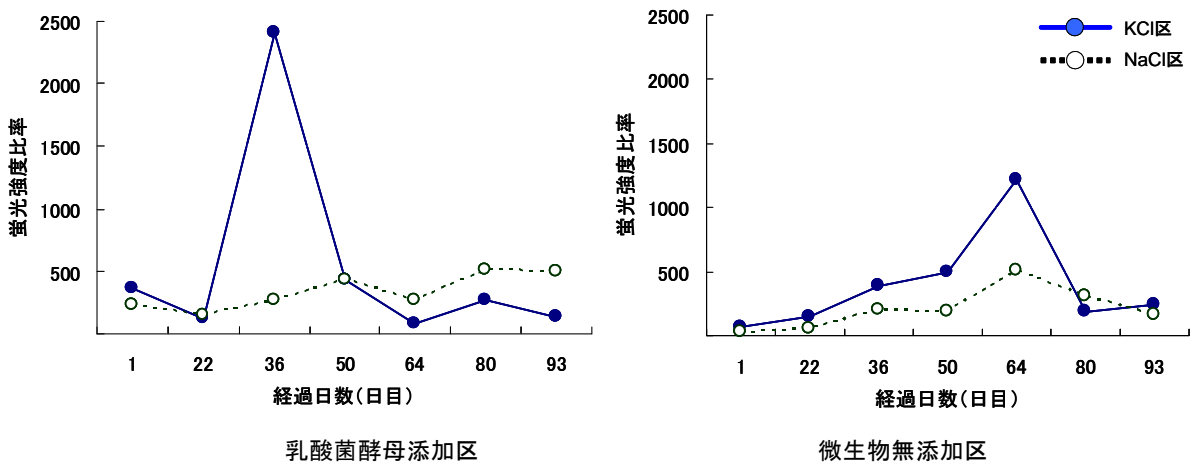


図 6 T-RFLPによる *T. halophilus* の経時変化

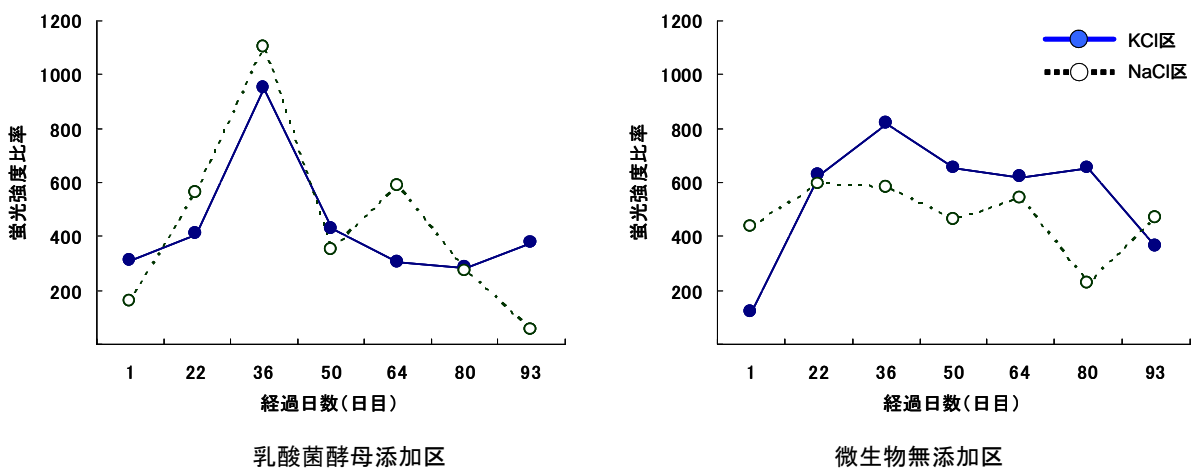


図 7 T-RFLPによる *Z. rouxii* の経時変化

謝 辞

本研究を行うに当たり多大なる御協力をいただいた株式会社ちば醤油専務取締役吉良菅二氏、品質管理課小坂直治氏に深く感謝の意を表す。

文 献

- 1) 舘博, 佐藤恭子, 太田徹, 安藤達彦:ミネラル調整塩を用いた醤油、味噌の試醸, 日本健康医学学会雑誌, **13**(3):74-75, 2004
- 2) 鈴木健, 宮崎浩子, 舘博, 安藤達彦:ミネラル調整塩

を用いた醤油の T-RFLP 法による細菌菌相調査, 日本健康医学学会雑誌, **13**(3):76-77, 2004

- 3) しょうゆ試験法編集委員会:しょうゆ試験法, 財団法人 日本醤油研究所, 1985
- 4) Clement, B.G., L.E. Kehl, K.L. DeBord, and C.L. Kitts., Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities., *J. Microb. Methods*, **31** (3):135-142., 1998

0547

Effects of included minerals in salt on microorganisms during Soy-sauce fermentation

Masao Tanaka, Tachi Hiroshi*, Tatsuhiko Ando*, Takeshi Suzuki and Hiroko Miyazaki
Chiba Industrial Technology Research Institute, Food and Chemistry Dept. and
* Junior College of Tokyo University of Agriculture,

Summary

This study aims at investigating the influence on soy-sauce moromi(mash) components and microflora, resulting from replacing sodium chloride with potassium chloride in soy-sauce fermentation.

The amount of the components changed in potassium chloride added brewing process in a different way from that in sodium chloride added brewing process. But difference in viable procaryotic cell counts and viable yeast cell counts was not found by standard plate-counting method.

In these two types of soy-sauce brewing, microorganisms were also analyzed by T-RFLP method (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). This showed that behavior of a soy-sauce lactic acid bacterium (*Tetragenococcus halophilus*) in potassium chloride added moromi was widely different from that in sodium chloride-added moromi, but difference in behavior of a soy-sauce yeast (*Zygosaccharomyece rouxii*) was not found.

Thus, it was shown that replacement of sodium chloride with potassium chloride resulted in the different fermentation process from that of normal soy-sauce brewing, and potassium chloride affected on prokaryotic organisms including soy-sauce lactic acid bacteria.