

# 食塩中のミネラル類が醤油発酵微生物に与える影響(第1報)

バイオ応用室 鈴木 健  
食品醸造室 宮崎 浩子  
食品化学部 田中 正男  
東京農業大学短期大学部 館 博, 安藤 達彦

Effects of Included Minerals in Salt on Microorganisms during Soy-sauce Fermentation (I)  
Takeshi SUZUKI, Hiroko MIYAZAKI, Hiroshi TACHI<sup>1)</sup>, Tatsuhiko ANDO<sup>1)</sup> and Masao TANAKA

<sup>1)</sup>Tokyo University of Agriculture

カリウム塩を用いた醤油醸造と通常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た。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平板培養法で検討した。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、諸味の液状化が速く、早い時期から全窒素、グルタミン酸、アルコール等の成分は高い値を示した。

## 1. はじめに

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、マグネシウム等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、苦み等の食味に差が認められた<sup>1)</sup>。

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、通常塩化ナトリウムを用いた醤油と異なる発酵をした可能性が示唆された<sup>2)</sup>。

本研究では、100%カリウム塩を用いた醤油醸造と通常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、成分の変化や微生物の挙動が通常塩化ナトリウムを用いた醤油醸造とは異なり、全窒素やグルタミン酸などの成分が増加し、醸造微生物の挙動も異なることを明らかにした。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料

#### 2.1.1 醤油醸造に供した菌株

醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus*  
(ビオック社製)

醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii*  
(ビオック社製)

#### 2.1.2 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)

#### 2.1.3 試薬(醸造用)

塩化カリウム (試薬一級, 関東化学社製)

塩化ナトリウム (試薬一級, 大塚化学社製)

### 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リットルで仕込み、15°Cで30日間、その後20°Cで醸造した。仕込み塩水として23% (w/v) 塩化カリウム水溶液 (KCl区)及び23% (w/v) 塩化ナトリウム水溶液 (NaCl区)を使用した。醤油乳酸菌は仕込み時に $1.8 \times 10^6$ 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 $1.4 \times 10^5$ 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。

KCl区 ①乳酸菌・酵母添加区

②微生物無添加区

NaCl区 ③乳酸菌・酵母添加区

④微生物無添加区

## 2.3 成分分析

### 2.3.1 試料の調製

諸味300 mlを採取し、5000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<sup>3)</sup>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1 ml取り、これに分解促進剤 (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) 3.3 g, 濃硫酸7 ml, 過酸化水素水 (30 %) 5 ml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 (GC-9A 島津製作所社製) により分析した。

カラム: PorapaxQ φ3 mm×1 m

分析条件: Column temp. 160℃,  
Injection temp. 210℃

### 2.3.4 アミノ酸

試料1mlにLithium Citrate Buffer (pH 2.2) (日本電子社製) 5 mlを加え、200 mlにメスアップしたものを0.45 μmのフィルターでろ過し、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、試料の調製は一般生菌と同様に行った。使用した培地は、YM培地<sup>3)</sup>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を添加したものをを用いた。

### 2.5 官能評価

大学生の男女24名により5点法で味及び総合評価を行った。

## 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、KCl区はNaCl区に比べ5~12 % 高い全窒素値を示した。

#### 3.1.2 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、ロイシン等であった。図2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、1200 mg/dl以上に達した。

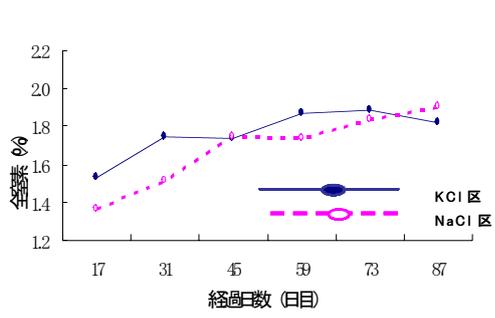
アスパラギン酸、バリン、ロイシン等のアミノ酸も同様の傾向を示した。

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。

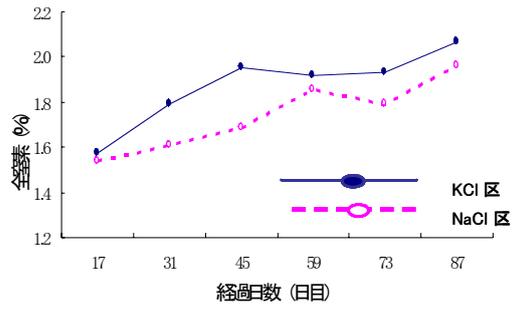
逆にグルタミンは、図3に示すようにグルタミナーゼによるグルタミン酸への変換やピログルタミン酸への変化で200~300 mg/dl減少した。減少したグルタミンの大部分は、旨味成分であるグルタミン酸へ変換されたと考えられた。このことから、塩化カリウムはグルタミン酸の増加に寄与したと推察された。

#### 3.1.3 アルコール

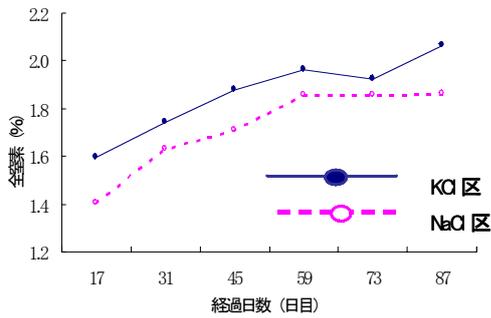
図4に、諸味中におけるアルコールの経時変化の結果を示した。アルコールは、KCl区では、各区とも31~45日目にかけて急激にアルコールが増加し、最高で約3.5 %に達して、73日目以降では、減少に転じた。これに対し、NaCl区ではKCl区に比べアルコールの増加が遅く、酵母添加区でも約50日目から増加し始め、100日目



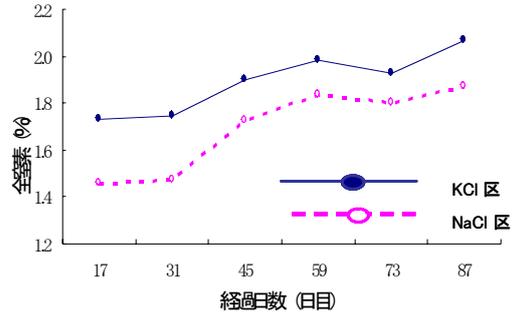
乳酸菌・酵母添加区



酵母添加区

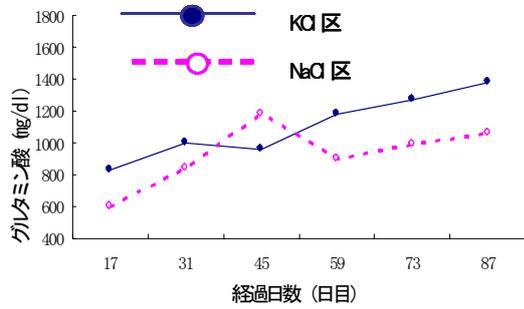


乳酸菌添加区

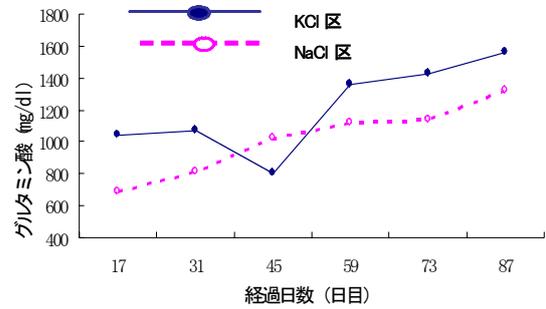


無添加区

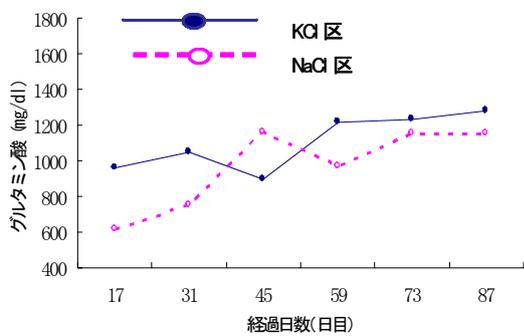
図1 全窒素の経時変化



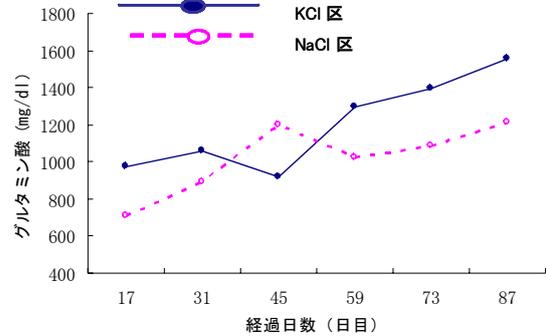
乳酸菌・酵母添加区



酵母添加区

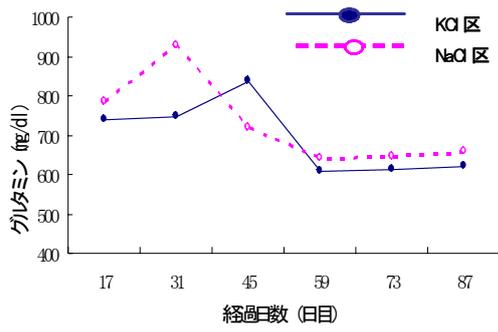


乳酸菌添加区

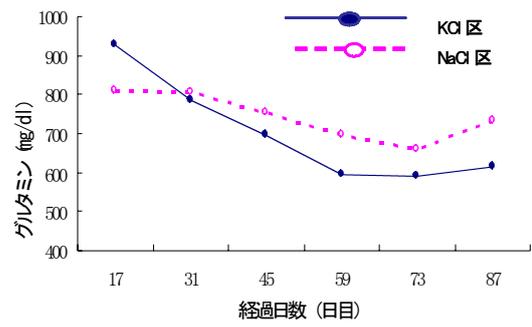


無添加区

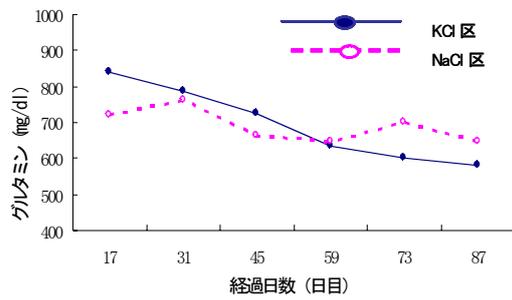
図2 グルタミン酸の経時変化



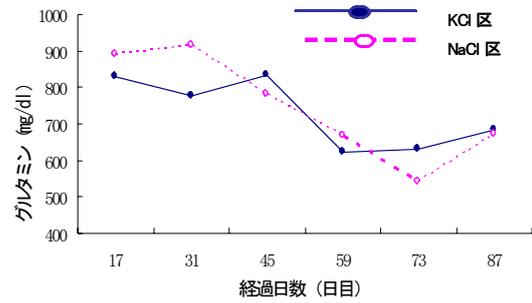
乳酸菌・酵母添加区



酵母添加区

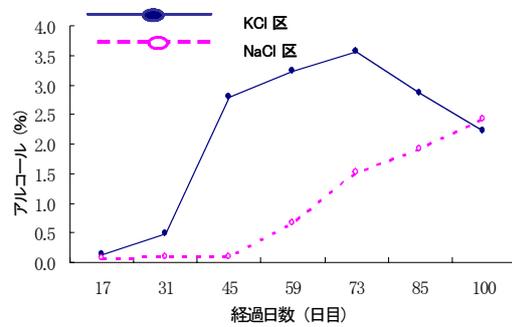


乳酸菌添加区

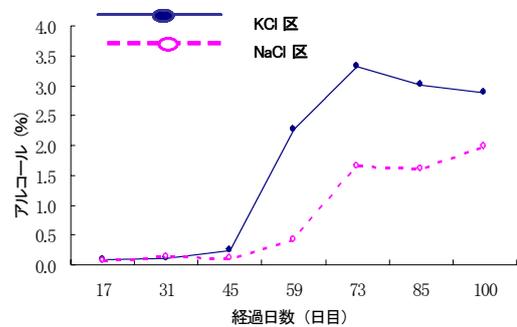


無添加区

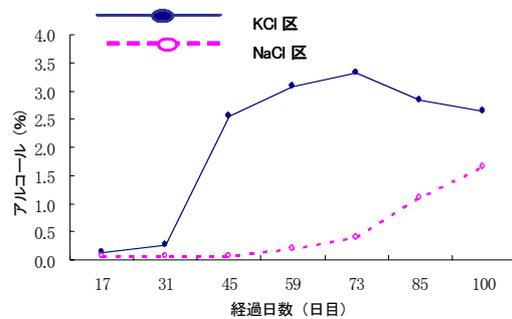
図3 グルタミンの経時変化



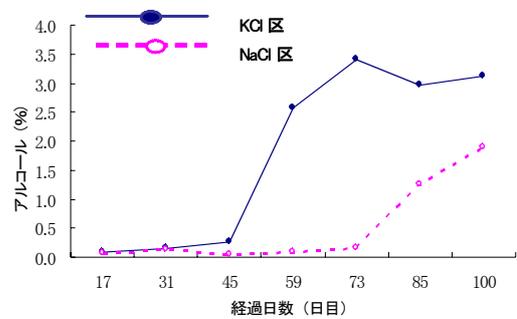
乳酸菌・酵母添加区



酵母添加区



乳酸菌添加区



無添加区

図4 アルコールの経時変化

でも約2.0 % 程度でまだ増加していた。

KCl区は、デンプンの分解による糖の供給が醸造初期から豊富で、酵母によりアルコール急速に生産されて、アルコール含量が早い段階で最高値に達し、それ以後、糖が減少してアルコールの生産が停止して、75日目以降は揮散して、減少したと推察された。

一方、NaCl区は、酵素分解による糖の生成が遅く、ゆっくりしたアルコール生成となり、醸造100日目以降も増加していた。

これらの傾向は、酵母添加の有無にかかわらず同じ傾向で、KCl区で酵母を加えない場合、アルコール発生の時期が2週間程度遅くなった。

### 3.1.4 pH

pHの経時変化については、図5に示す。仕込み当初の2週間目の測定で各試験区ともpHは5.6~5.7であったが徐々に低下した。

乳酸菌を添加しない場合には、KCl区では、5.4~5.5までしか低下しないが、NaCl区では

乳酸菌を添加しなくても5.2~5.3まで低下した。乳酸菌を加えた場合には、KCl区でも5.2~5.3まで低下した。

このことから、KClのみで醸造する場合には、乳酸菌を加える必要があると推察された。

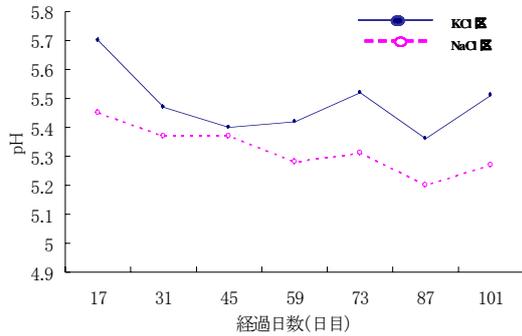
## 3.2 微生物試験結果

### 3.2.1 一般生菌数

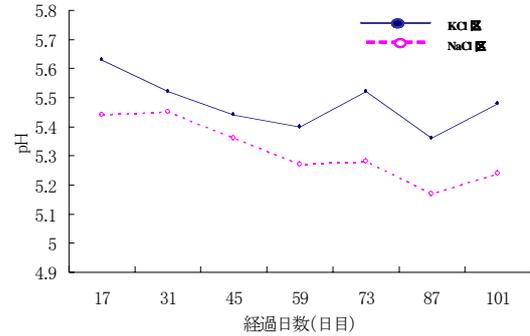
図6に、一般生菌数の経時変化の結果を示した。一般生菌数は、日数の経過とともに $10^9$ 個/gから $10^4$ 個/gに減少した。

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。乳酸菌添加区では、仕込み当初に*T. halophilus*を $10^6$ 個/gを添加しているために仕込み8日目頃に若干の生菌数の増加が見られた。

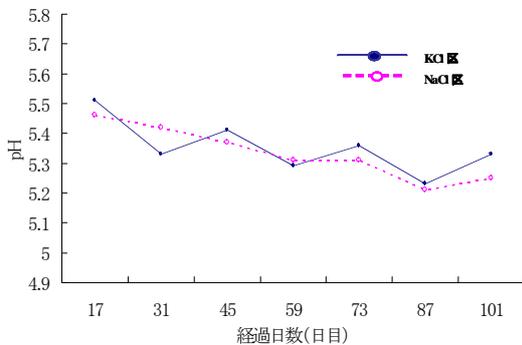
また、酸生産菌についてもBCP加寒天プレート培地にて菌数を測定したが、一般生菌数とほぼ同じであった。



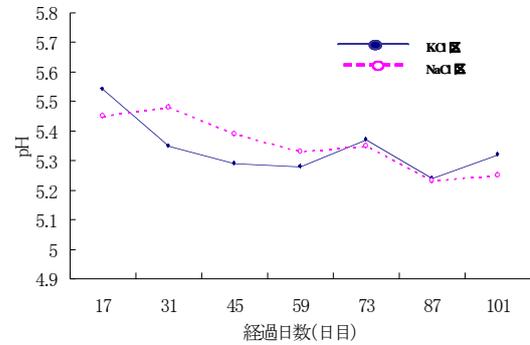
乳酸菌・酵母添加区



酵母添加区

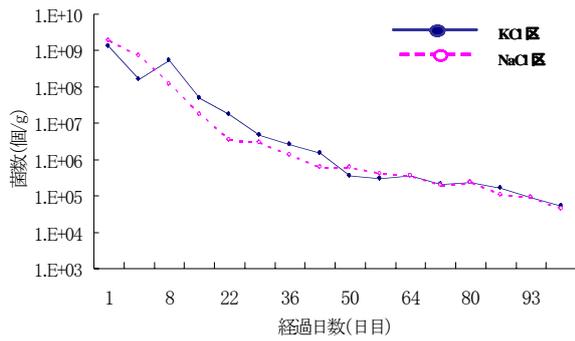


乳酸菌添加区

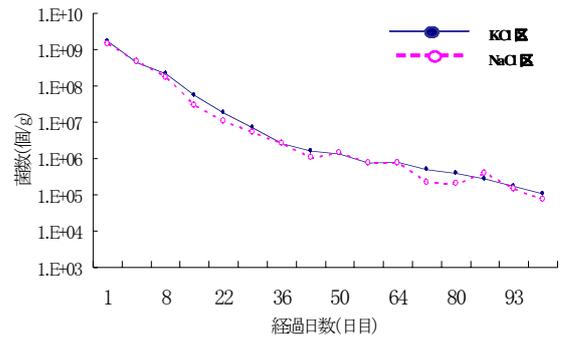


無添加区

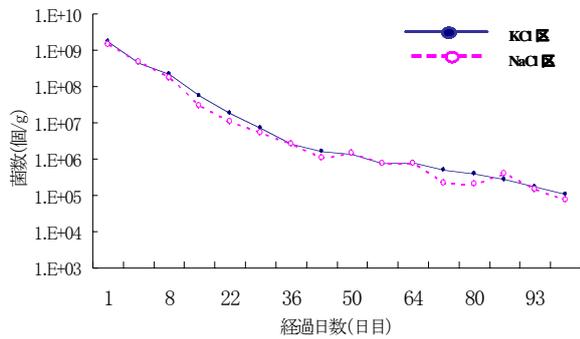
図5 pHの経時変化



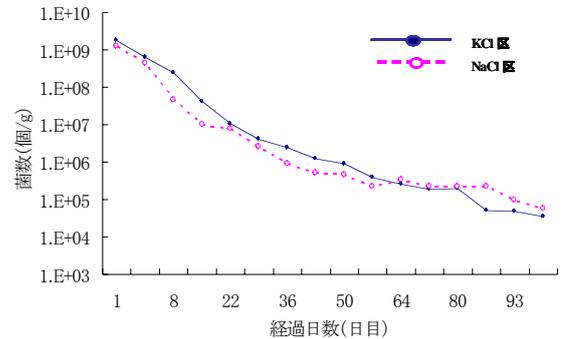
乳酸菌・酵母添加区



酵母添加区



乳酸菌添加区



無添加区

図6 一般生菌数の経時変化

### 3.2.2 酵母菌数

図7に、酵母の経時変化の結果を示した。

微生物の添加は、乳酸菌については、仕込み当初に1ml当たり $10^6$ 個、酵母はpHが5.4程度に下がった30日時点で $10^5$ 個を添加した。

酵母については仕込み初期は $10^4$ 個/gであり、その後 $10^6$ 個/gまで増加し、36日目から50日目にかけて減少に転じた。pH5.4まで低下した時点では、酵母も増加しており、酵母添加による酵母数の顕著な増加は、見られなかった。醸造後期には、KCl区もNaCl区でも乳酸菌を添加した区では酵母数の減少傾向を示した。それに対し、乳酸菌を添加しない区では酵母数の減少は緩やかであった。仕込み初期から64日目までの推移ではKCl区でもNaCl区でも大きな差は認められなかったが、64日目以降はNaCl区の方が菌数が多い傾向にあった。

酵母菌数は、アルコールの増加に伴って減少しているように観察された。その理由として、

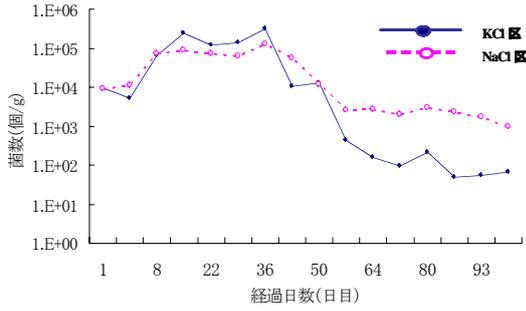
アルコール増加に伴うグルコースの減少等が考えられた。

### 3.2.3 糸状菌数

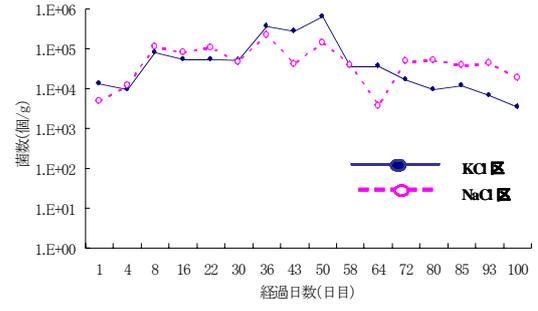
図8に糸状菌数の経時変化を示した。KCl仕込みで乳酸菌・酵母添加区では、45日目にはアルコール濃度が約3%に達し、同時に糸状菌数も急激に減少した。KCl仕込みの場合には、酵母や乳酸菌の添加にかかわらず、45日から73日目にはアルコール濃度は、3.5%に達し、糸状菌数は、急激に減少した。

一方、NaCl仕込み区でのアルコール濃度は、乳酸菌・酵母添加区で45日目から上昇し始め100日目で約3%となった。これを境に糸状菌数は急激に減少した。その他のNaCl仕込み区では、アルコール濃度は、ゆるやかに上昇し、100日目でも2%以下であった。そのため、糸状菌数もゆっくりと減少した。

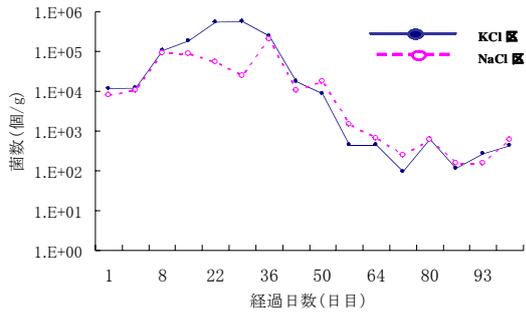
このことは、アルコール濃度が高くなれば糸状菌数が減少すると推定された。



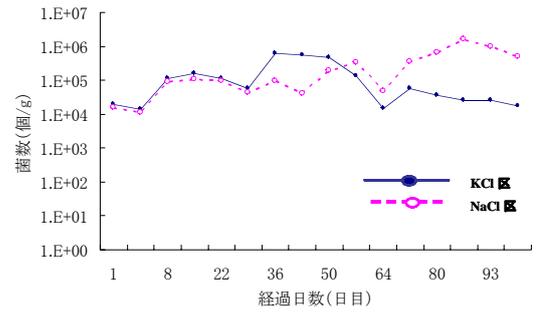
乳酸菌・酵母添加区



酵母添加区

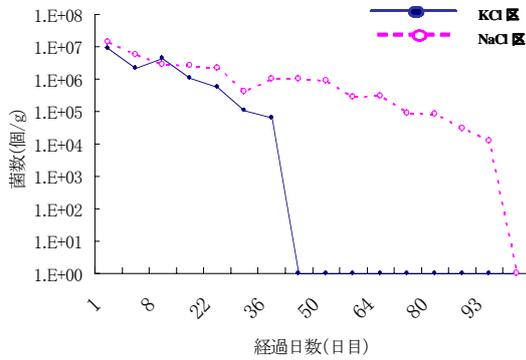


乳酸菌添加区

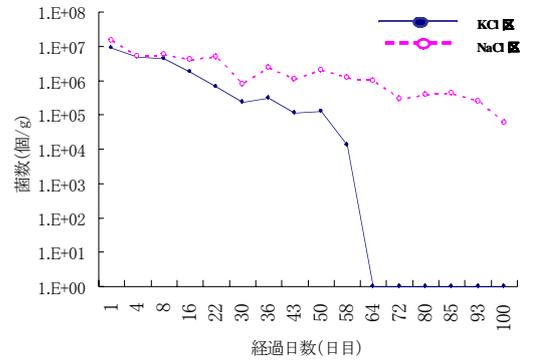


無添加区

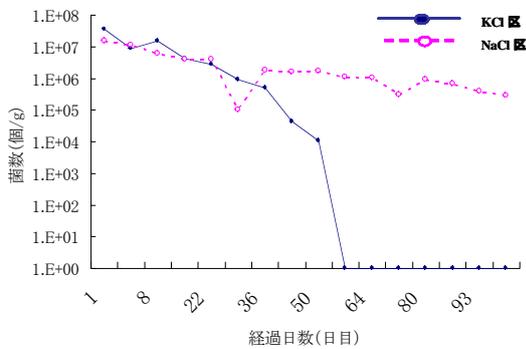
図7 酵母の経時変化



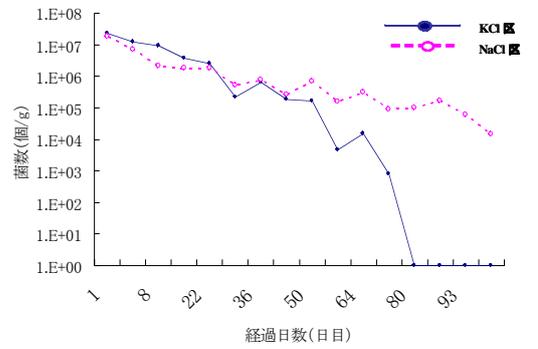
乳酸菌・酵母添加区



酵母添加区



乳酸菌添加区



無添加区

図8 糸状菌の経時変化

なお、ここで測定している糸状菌数は生菌ではなく、孢子として存在していると推定された。

### 3.3 官能評価

仕込み塩水中のカリウム塩0%、25%、50%、75%、100%での醸造も行い、その製品の官能評価を大学生24名による5点法(評点1が最高点)で3反復審査により評価した。

図9のとおり、味及び総合評価について官能評価を行った結果、味についてはNaCl 100%で

は、良い評点となっており、KCl 25% (NaCl 75%) までは多くの方が良い評価をした。

総合評価でも、KCl 25% (NaCl 75%) までは、NaCl 100%と同じく良い評価をしていた。

これらの官能評価の結果から、少なくとも25%まではカリウム塩で代替しても、商品化可能と考えられた。

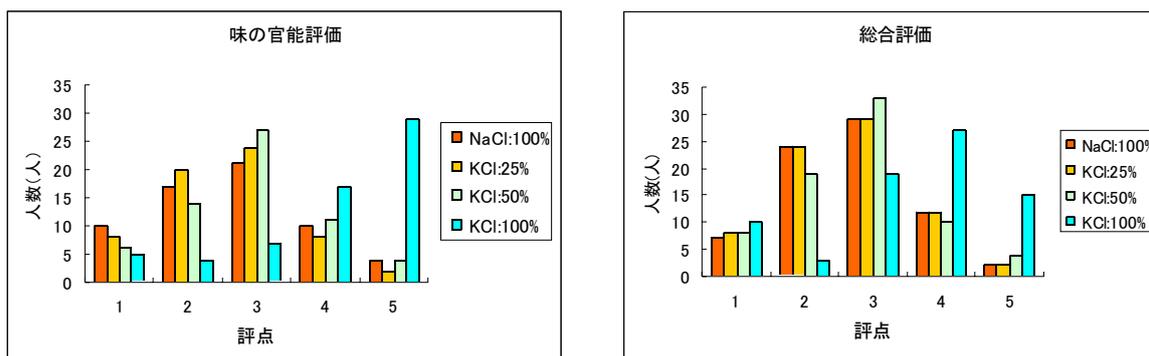


図9 官能評価

### 4. まとめ

- 1) KCl区がNaCl区に較べて、全窒素・グルタミン酸・アルコール量が多かった。
- 2) KCl区とNaCl区では、一般生菌・酵母・酸生菌の微生物菌数に大きな差は認められなかった。
- 3) 諸味の性状について、KCl区は溶解(液状化)が速かった。
- 4) これらの原因として、KClがNaClより酵素活性高いために、諸味の溶解が早く、成分値も多いと推定された。
- 5) カリウム塩で代替した減塩醤油、低塩醤油の製造が通常の醸造法で可能と思われた。

### 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いたします。

なお、本研究は財団法人ソルト・サイエンス研究財団平成17年度助成研究(助成番号0547)により実施したもので、関係各位に厚く御礼申し上げます。

### 参考文献

- 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