

奈良県内の醤油蔵の蔵付微生物の単離とその特性

都築 正男^{*1)}

Isolation and Characterization of Proprietary Microorganism from Soy-sauce Manufacturers in Nara

TSUDUKI Masao^{*1)}

奈良県内では醤油メーカー13社が諸味の醸造を行っており、その多くが小規模で伝統的な醸造方法によって醤油を製造している。醤油の仕込みには、麹菌だけでなく乳酸菌や酵母が作用している。麹菌が主に味に寄与するのに対し、乳酸菌は香味や色、酵母は主に香りに寄与するとされている。中小の醤油メーカーでは麹菌以外の微生物は、醤油蔵独自の蔵付きのものが発酵に関与していることが多い。各メーカーの醤油の個性や特徴は、香气成分を産生する蔵付微生物によって産み出されていることから、本研究では、醤油の発酵に関わる酵母と乳酸菌を単離し、この中から優良な菌株を選抜した。

1. 緒言

醤油は日本の食文化のなかで欠かせない調味料の一つである。その醸造は、大豆と小麦に種麹を混ぜ、製麹した豆麹と塩水を混合し、発酵、熟成した後、压榨、火入れの工程を経て製品となる。醸造工程中の発酵を行う微生物は、麹菌がよく知られている。麹菌は主に *Aspergillus sojae* や *Aspergillus oryzae* が用いられ、これらが分泌するプロテアーゼにより大豆のタンパク質がアミノ酸に分解され、旨味をつくりだす。この他に、乳酸菌や酵母も醤油諸味の発酵に加わっている。乳酸菌は耐塩性の *Tetragenococcus halophilus* が知られている。この乳酸菌は24%の食塩濃度でも生育可能¹⁾であり、発酵の初期に現れ、諸味のpHを低下させて雑菌の増殖を抑える。さらに、*T. halophilus* の中にはアミノ酸の中のアスパラギン酸を脱炭酸してアラニンに変換する菌株やアルギニンをオルニチンもしくはシトルリンに変換する菌株が知られている²⁾。このように乳酸発酵と麹菌の酵素のほどよいバランスによって、香味、色、窒素利用率が適切な醤油ができる。酵母は諸味中で働く時期により、主発酵酵母と後熟酵母に大別される。前者は *Zygosaccharomyces rouxii* であり、後者は *Candida etchellsii* や *Candida versatilis* であるとされている。醤油には約300種類の香气成分があると言われていたが、*Z. rouxii* は甘いカラメル様の香りを持つ香气成分4-ヒドロキシ-2(or5)-エチル-5(or2)-メチル-3(2H)-フラノン (HEMF) を生成する。HEMFは香气成分としてだけでなく、抗酸化作用や抗ガン作用などの機能性成分としても知られるようになってきた³⁾⁻⁶⁾。また後熟酵母はフェノール系の香气成分を生成し、醤油の味の幅や押味、熟成香を付与する。*C. etchellsii* は4-ビニルグアイヤコール (4-VG) と4-ビニルフェノール (4-VP)

を生成し、*C. versatilis* は4-エチルグアイヤコール (4-EG) や4-エチルフェノール (4-EP) を生成する。醤油諸味中でこれら複数の微生物が複雑に働くことにより、醤油独特の旨味と香り、色などが生じる。

国内には、大手醤油メーカー以外にも各地に中小の醤油メーカーが存在している。このような中小メーカーは戦中、戦後間もない頃の原料不足等で伝統的な製法の醤油醸造が困難になった時期を乗り越えた。ところが大手メーカーの醤油がスーパーなどで安価に販売されるようになり、早急に近代化を図るために国の資金支援と協業化、近代化を推進する「中小企業近代化促進法」で指定業種になったことから、各都道府県で協同組合が作られて、協業工場で仕込みから压榨までを行うようになった。しかし奈良県では、協業化が行われなかったために各メーカーが独自で醤油の仕込みを行っている。中小メーカーでは種麹菌以外の微生物を諸味に添加することは少なく、このために各メーカーの醤油蔵に棲み着いている微生物が働くことで、それぞれのメーカーの独特の醤油となっている。このように各メーカーが、特徴ある醤油を製造しているが、木桶やコンクリート製の発酵槽の老朽化のために、新しい発酵槽へ切り替えるメーカーがあるものの、従来の木桶やコンクリート製の発酵容器を新たに得られにくい状況であり、蔵付微生物が途絶える可能性も考えられる。

本研究では、奈良県醤油工業組合の協力を得て、加盟している19社(採取時は20社)のうち、醤油諸味の醸造を行っている13社の諸味から乳酸菌および酵母の単離・同定を行うとともに、得られた菌株の香气成分などの分析を行い、その特徴を明らかにした。また、菌株間の比較を行い、各社の醤油の特徴の基礎データとし、さらに優良系統を見いだした。

*1) バイオ・食品グループ

2. 実験方法

2.1 酵母および乳酸菌の分離

2.1.1 使用培地^{7),8)}

主発酵酵母用培地は、グルコース 2.5%、酵母エキス 0.5%、リン酸二水素カリウム 0.5%、塩化ナトリウム 10%、生揚げ醤油 5%、寒天 2.0%、pH4.8 に調製した。後熟酵母用培地は、マルトース 3.0%、カザミノ酸 0.4%、酵母エキス 0.2%、塩化ナトリウム 18%、リン酸二水素カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム・7水和物 0.05%、塩化カルシウム 0.01%、寒天 2.0%、pH4.8 に調製した。酵母増殖用培地は、生揚げ醤油 20%、グルコース 5%、塩化ナトリウム 10%、pH4.8 に調製した。耐塩性乳酸菌用培地はグルコース 2%、酵母エキス 1%、ペプトン 1%、リン酸二水素カリウム 1.8%、塩化ナトリウム 10%、アジ化ナトリウム 10 ppm、シクロヘキシミド 10 ppm、寒天 2.0%、pH7.5 に調製した。

2.1.2 分離源

平成26年7月に奈良県内13社の醤油諸味および諸味が入った木桶やタンクを置いてある木造建物の梁の拭き取り物を採取し、これらを酵母の分離源とした。採取を行った諸味は仕込み開始から2~5ヶ月経過したものを採取した。

2.1.2 酵母の集積培養および選抜

採取した諸味試料は寒天を除いた主発酵酵母用培地および、後熟酵母用培地に少量加え、30°Cで集積培養を行った。酵母の生育が見られた集積培養液は、生理食塩水で適宜希釈して主発酵酵母用培地および後熟酵母用培地に塗布し、30°Cで培養した。梁の拭き取り物は、生理食塩水で適宜希釈して主発酵酵母用培地および後熟酵母用培地に塗布し、30°Cで培養した。培養後、寒天培地に生じたコロニーのうち、コロニーの表面が皺状にならない(産膜を形成しない)菌株を選択し、新たな平板培地にレプリカを作成した。

2.1.3 乳酸菌の選抜

採取した諸味試料を生理食塩水で適宜希釈して耐塩性乳酸菌用培地に塗布し、30°Cで培養した。培養後、10%塩化ナトリウム、10 ppmアジ化ナトリウム、10 ppmシクロヘキシミドを加えたBCP加プレートカウントアガール「ニッセイ」(日水製薬(株)製)に生じたコロニーのうち、酵母ではない大きさの小さなコロニーを選択し、新たな平板培地にレプリカを作成した。

2.2 酵母および乳酸菌の種の同定

2.2.1 酵母の同定キットによる種の同定

酵母様真菌同定キットID32C API(シスメックス・バイオメリユー(株)製)を用いて同定を行った。酵母菌体をサスペンションメディアウム2 mLに懸濁し、ID32C API Cメディアウムに250 μL添加した。この懸濁液をIP32C APIプレートに接種し、30°C、48時間培養後プレート上の31種類の炭素源の資化性パターンからapiwebTM([https://apiweb.](https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin)

[biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin](https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin))により種を推定した。

2.2.2 酵母の遺伝子解析による種の同定

真菌の種の推定に用いられる28S rDNAのD1/D2領域の塩基配列を用いた。PCRの鋳型は、50 μLの0.25% SDS溶液に寒天培地からかき取ったコロニーを加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、-80°Cで10分間凍結し、70°Cで融解したものを14000 rpmで1分間遠心分離し、その上清を用いた。プライマーはNL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA G-3')およびNL4(5'-GGTCCGTGTTCAAGACG G-3')を用い、PCRを行った⁹⁾。PCRの反応液は、Ex TaqTM(タカラバイオ(株)製)を0.5 μL、10×Ex Taq bufferを2.5 μL、dNTP Mixture(2.5 mM each)を2.5 μL、プライマー(10 μM)を2.5 μL、Triton X100を2.5 μL、鋳型DNAを1 μL加え、滅菌水で20 μLに調製した。Veriti Thermal Cycler(サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)製)を用いて、94°C、3分間でDNAの変性を行った後、94°Cで30秒(変性)、52°Cで30秒(アニーリング)、72°Cで1分(伸長)を25サイクル行った。ExoSAP-IT(サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)製)で1本鎖DNAの消化と余分なdNTPsを不活性化したものを鋳型とした。ユーロフィンジェノミクス(株)の受託DNAシーケンスサービスを利用して塩基配列を解析した。得られた塩基配列はBlast(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)により相同性検索を行い、酵母の種の同定を行った。

2.2.3 乳酸菌の遺伝子解析による種の同定¹⁰⁾

細菌の種の推定に用いられる16S rDNAの塩基配列を用いた。PCRの鋳型は、乳酸菌を耐塩性乳酸菌用液体培地で培養した培養液を1/100に水で希釈したものを使用した。これを鋳型としてPCRで増幅した。プライマーは27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')および1406R(5'-ACGGCGGTGTGTAC-3')を使用した。PCR反応液はKODTM(東洋紡(株)製)を0.4 μL、10×KOD bufferを2 μL、dNTP Mixture(2.5 mM each)を2 μL、塩化マグネシウム0.8 μL、プライマー(20 μM)を0.6 μL、鋳型DNAを2 μL、蒸留水を加え、滅菌水で20 μLに調製した。Veriti Thermal Cyclerを用いて、94°C、3分間でDNAの変性を行った後、94°Cで15秒(変性)、45°Cで35秒(アニーリング)、68°Cで2分(伸長)を35サイクル行った。ExoSAP-ITで精製したものをシーケンス用試料とし、ユーロフィンジェノミクス(株)のDNA受託サービスを利用して塩基配列を解析した。得られた塩基配列はBlast(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)により相同性検索を行い、乳酸菌の種の同定を行った。

2.3 酵母および乳酸菌の生理学的性質

2.3.1 主発酵酵母の産生する香気成分^{11)~13)}

*Z. rouxii*が産生するHEMFの定量を行った。酵母増殖用

培地で培養した *Z. rouxii* を、 $OD_{600}=0.025$ になるように、HEMF 生成培地 (7.5%グルコース, 1.5%グリシン, 3.0%リボース, 0.1%リン酸二水素カリウム, 0.24%硫酸マグネシウム, 0.5%酵母エキス, pH6.0) 4mL に添加し、30°C, 48 時間培養した。培養後の上清を等量の酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層 0.5mL を乾固後、0.5mL のアセトンで溶解したものをガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP2010Ultra (島津製作所(株)製) で定量した。分析条件は次に示すとおりである。カラム：アジレントテクノロジー(株)製 HP-INNOWAX (Length 60 m, 0.250 mmID, Film 0.25 μ m), 気化室：230°C, MS インターフェイス：230°C, イオン源：200°C, カラムオープン：0-5 min.:40°C, 5-45 min.:40-200°C, 45-55 min.:200°C, キャリアガス：ヘリウム, スプリットレス, カラム流速：0.8mL/min., サンプルング：液打ち, 内部標準：10 ppm 1-ペンタノール, モード：シングルイオンモード。

2.3.2 後熟酵母の産生する香氣成分^{14),15)}

C. etchellsii が生成する 4-VG, 4-VP および、*C. versatilis* が生成する 4-EG, 4-EP を定量した。酵母増殖用培地で培養した *C. etchellsii*, *C. versatilis* を、 $OD_{600}=0.025$ になるように、50 ppm フェルラ酸を添加した酵母増殖用培地 (*C. etchellsii*), 50 ppm 4-VG を添加した酵母増殖用培地 (*C. versatilis*), 50 ppm 4-VP を添加した酵母増殖用培地 (*C. versatilis*) それぞれ 4 mL に加えた。30°C, 48 時間培養後の上清に等量のアセトニトリルを加え、よく攪拌し、アセトニトリル層を高速液体クロマトグラフ LCMS-2010EV (島津製作所(株)製) で分析した。分析条件は次に示すとおりである。カラム：Inertsil ODS-3 (粒子径 5 μ m, 4.6×250 mm), 検出器：UV 220 nm, 流速：1 mL/min., 溶離液：水/アセトニトリル=50:50, カラム温度：25°C。

2.3.3 酵母の糖質化性

酵母様真菌同定キット ID32C API (シスメックス・ピオメリユー(株)製) に接種した菌体が資化する 31 種類の炭素源 (ガラクトース (GAL), シクロヘキシミド (ACT), スクロース (SAC), N-アセチルグルコサミン (NAG), 乳酸 (LAT), L-アラビノース (ARA), D-セロビオース (CEL), ラフィノース (RAF), D-マルトース (MAL), トレハロース (TRE), 2-ケトグルコン酸カルシウム (2KG), α -メチル- α -D-グルコシド (MDG), マンニトール (MAN), ラクトース (LAC), イノシトール (INO), D-ソルビトール (SOR), D-キシロース (XYL), D-リボース (RIB), グリセリン (GLY), L-ラムノース (RHA), パラチノース (PLE), エリスリトール (ERY), D-メリビオース (MEL), グルクロン酸ナトリウム (GRT), D-メレチトース (MLZ), グルコン酸カリウム (GNT), レブリン酸 (LVT), グルコース (GLU), L-ソルボース (SBE), D-グルコサミン塩酸塩 (GLN)) について調べた。

2.3.4 乳酸菌のカタラーゼ試験

耐塩性乳酸菌用液体培地で培養した培養液を 3500 rpm, 5 分間遠心分離し、培地を除き、菌体に 3%過酸化水素水を 1 mL 加えて、発泡するか否かを観察した¹⁶⁾。

2.3.5 乳酸菌の産生する有機酸

耐塩性乳酸菌用液体培地で 48 時間培養した培養上清を適宜希釈し、フィルターろ過したものを試料として用いた。キャピラリー電気泳動装置 G1602A (アジレントテクノロジー(株)製) を使用して分析した。泳動条件は次のとおりに行った。カラム：アジレントテクノロジー(株)製 fused-silica (75 μ mID, 75cm), 泳動バッファー：アジレントテクノロジー(株)製 Organic Acid Buffer for CE pH 5.6, 印加電圧：-25 kv, 温度：20°C, 波長：350 nm, ref 200 nm, 注入量：2 sec./50 mmBar, キャピラリー温度：20°C。

2.3.6 乳酸菌のヒスタミン産生性

T. halophilus にはヒスタミン生成する菌株知られており、アレルゲン性の有無を確認するためにヒスタミンの生成能を確認した。MRS培地+0.5%ヒスチジン, 10%食塩 (pH6.5) で30°C, 15静置培養し、その培養上清をチェックカラーヒスタミン (キッコーマンバイオケミファ(株)製) を用いて分析した^{17),18)}。

3. 結果及び考察

3.1 酵母の分離と同定

採取した県内 13 社の諸味および梁の拭き取り物から 373 菌株の酵母を分離した。この中からコロニーの外見の異なる 80 菌株の酵母について ID32C アピを用いて種の同定を試みたところ、*Zygosaccharomyces sp.* が 42 菌株、*Candida famata* が 6 菌株、*Candida colliculosa* が 6 菌株、*Candida holmi* が 3 菌株、*Candida pelliculosa*, *Cryptococcus humicola*, *Cryptococcus laurentii* がそれぞれ 2 菌株、*Candida silvicola*, *Candida parapsilosis*, *Candida valida*, *Geotrichum capitatum*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Schwanniomyces etchellsii* がそれぞれ 1 菌株であることが推定され、推定不能であったものが 11 菌株であった。同定確率が低い菌株や同定出来なかった菌株が多数あったため、同じ醤油メーカーの酵母で ID32C アピで同一のプロファイルであった菌株を除いた 74 菌株について遺伝子配列による同定を行った。28S rDNA D1/D2 配列を PCR で増幅し、その塩基配列を用いて公開されている既知の配列との相同性を比較した。その結果、*Z. rouxii* が 19 菌株、*C. etchellsii* が 15 菌株、*C. versatilis* が 17 菌株、*Debaryomyces hansenii* が 11 菌株、*Candida glucosophila* が 9 菌株、*Candida parapsilosis* が 2 菌株、*Pichia triangularis* が 1 菌株であった (表 1)。また、13 社中 4 社からは主発酵酵母は分離されず、4 社からは後熟酵母が分離されなかった。これらは、採取した諸味の時期で諸味中に存在する酵母の種類が異なることで得られなかった酵母がある醤油メーカーがあった一方、多くは産膜酵母以外の酵母が少な

かった諸味であった。

表1 奈良県内醤油会社から単離した酵母・乳酸菌

酵母	菌株番号
<i>Z. rouxii</i>	1-6, 1-8, 1-11, 1-12, 1-17, 1-18, 1-23, 1-25, 2-1, 2-9, 2-10, 2-12, 2-13, 2-16, 2-22, 2-27, 2-31, 2-32, 2-39
<i>C. etchellsii</i>	1-2, 1-3, 1-4, 1-9, 1-15, 1-22, 1-32, 1-33, 2-5, 2-6, 2-15, 2-18, 2-21, 2-26, 2-37
<i>C. versatilis</i>	1-10, 1-14, 1-19, 1-24, 1-26, 1-27, 1-28, 1-29, 1-30, 2-14, 2-23, 2-24, 2-25, 2-28, 2-34, 2-36, 2-40
<i>D. hansenii</i>	1-1, 1-7, 1-13, 1-31, 2-2, 2-11, 2-21, 2-29, 2-30, 2-33, 2-35
<i>C. glucosophila</i>	1-5, 2-3, 2-4, 2-7, 2-8, 2-17, 2-19, 2-20, 2-28
<i>C. parapsilosis</i>	1-20, 1-21
<i>P. triangularis</i>	1-16

表2 主発酵酵母 *Z. rouxii* の糖の資化性

	GAL	RAF	MAL	SOR	GLY	PLE	MAN	GLU
1-6	-	-	-	+	+	-	-	+
1-8	-	-	+	+	+	-	+	+
1-11	+	-	+	+	+	+	+	+
1-12	+	-	-	+	+	-	+	+
1-17	+	-	+	+	+	-	+	+
1-18	+	-	+	+	+	+	+	+
1-23	+	-	-	-	+	-	+	+
1-25	+	-	+	+	+	-	+	+
2-1	-	-	-	+	+	-	+	+
2-9	+	-	+	+	+	-	-	+
2-10	+	-	+	+	+	-	+	+
2-12	+	-	-	+	+	-	+	+
2-13	-	-	-	-	-	-	-	+
2-16	-	-	-	+	+	-	+	+
2-22	-	-	-	+	+	-	+	+
2-27	+	-	+	-	+	+	+	+
2-31	+	+	+	+	+	+	+	+
2-32	-	-	-	-	+	-	-	+
2-39	+	-	-	+	+	-	+	+

+: 資化性有, -: 資化性無

全ての菌株で資化されなかった炭素源は表記略

3.2 乳酸菌の分離と同定

採取した県内13社の諸味から132菌株の酵母を分離した。これらから独立した16菌株を選び、API50CHLを用いて種

の同定を試みようとしたが、このキットではうまく生育しなかったため同定出来なかった。そこで、遺伝子配列による同定を行った。16S rDNAをPCRで増幅し、その塩基配列を用いて公開されている既知の配列との相同性を比較した。その結果、16菌株は全て *T. halophilus* であった。

3.3 主発酵酵母 *Z. rouxii* の生理学的性質

3.3.1 糖資化性

主発酵酵母 *Z. rouxii* の糖資化性を表2に示す。全ての菌株でグルコースを資化した。また、大多数はガラクトース、D-マルトース、D-ソルビトール、グリセリン、マンニトールを資化した。ラフィノース、パラチノースは一部の菌株のみが資化した。

3.3.2 HEMFの産生能

分離した19菌株の *Z. rouxii* のHEMFの産生量を表3と図1に示した。HEMF産生能は *Z. rouxii* の菌株によって差が見られ、1-6株が最も多く産生し、23.15 ppmのHEMFを産生した。また、同じ醤油会社由来の2-10株が次いで多く、19.70 ppmのHEMFを産生した。このことからこの醤油会社の醤油は、甘い香りが強い醤油になっていることが伺える。

表3 主発酵酵母 *Z. rouxii* のHEMF産生量

菌株番号	1-6	1-8	1-11	1-12	1-17
HEMF(ppm)	23.15	10.6	15.59	10.69	16.25
菌株番号	1-18	1-23	1-25	2-1	2-9
HEMF(ppm)	13.95	14.46	18.88	7.61	10.41
菌株番号	2-10	2-12	2-13	2-16	2-22
HEMF(ppm)	19.7	10.41	10.43	6.41	8.76
菌株番号	2-27	2-31	2-32	2-39	
HEMF(ppm)	6.66	8.95	8.93	9.55	

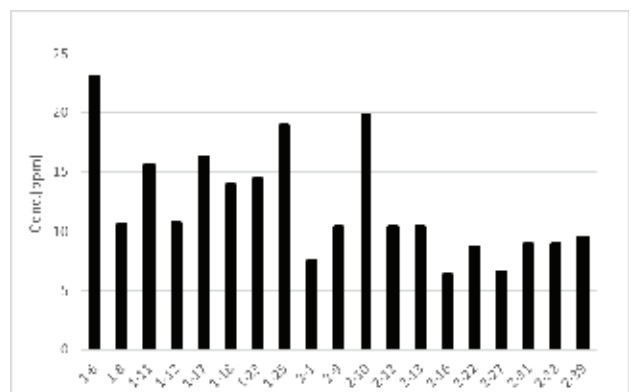


図1 主発酵酵母 *Z. rouxii* のHEMF産生量の比較

奈良県内の醤油蔵の蔵付微生物の単離とその特性

一方、2-16 株、2-27 株は 6ppm 強であり、HEMF の産生量が少ない。2-16 株が単離された醤油会社に関しては、10 ppm 以上の HEMF を産生する酵母もあるので、醤油自体は HEMF の香りはそれほど弱くはない可能性がある。一方、2-27 株が単離された醤油会社の醤油は HEMF の香りは少ない醤油である可能性がある。

3.4 後熟酵母 *C. etchellsii* の生理学的性質

3.4.1 糖資化性

後熟酵母 *C. etchellsii* の糖資化性を表 4 に示す。菌株によりばらつきが大きく、半数以上の菌株では D-ソルビトールを資化した。また、約半数はグルコースを、半数弱がグリセリン、マンニトールを資化した。乳酸、ラフィノース、2-ケトグルコン酸カルシウム、 α -メチル- α -D-グルコシド、イノシトール、グルコン酸カリウム、レブリン酸、L-ソルボースはいずれの菌株も資化できなかった。

3.4.2 4-VG・4-VP の産生能

分離した 15 菌株の後熟酵母 *C. etchellsii* の 4-VG および 4-VP の産生量を表 5 と図 2 に示した。4-VP については今回の試験では産生する菌株はなかった。また 4-VG も産生するものは 7 菌株で、8 菌株はいずれの香り成分も検出できなかった。最も多くの 4-VG を産生する菌株は 2-18 株で 6.2 ppm の 4-VG を産生した。また同じメーカーの 2-15 株もほぼ同等の 5.9ppm 産生した。

表 5 後熟酵母 *C. etchellsii* の 4-VP・4-VG 産生量

	4-VP(ppm)	4-VG(ppm)
1-2	0.0	0.0
1-3	0.0	0.0
1-4	0.0	3.8
1-9	0.0	0.0
1-15	0.0	0.0
1-22	0.0	0.0
1-32	0.0	0.0
1-33	0.0	0.0
2-5	0.0	5.2
2-6	0.0	5.1
2-15	0.0	5.9
2-18	0.0	6.2
2-21	0.0	0.0
2-26	0.0	4.8
2-37	0.0	4.5

図 2 後熟酵母 *C. etchellsii* の 4-VG の産生量の比較

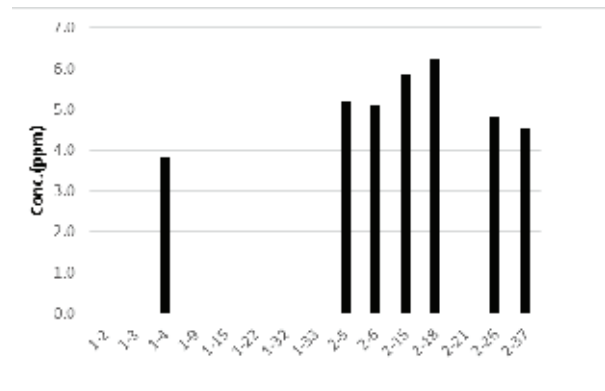


表 4 後熟酵母 *C. etchellsii* の糖の資化性

	GAL	ACT	SAC	NAG	ARA	CEL	MAL	TRE	SOR	XTL	RIB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	GRT	MLZ	MAN	LAC	GLU	GLN
1-2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
1-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
1-9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
1-15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1-22	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
1-32	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
1-33	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-6	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
2-15	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2-18	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-21	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2-26	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-37	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

+ : 資化性有, - : 資化性無

全ての菌株で資化されなかった炭素源は表記略

3.5 後熟酵母 *C. versatilis* の生理学的性質

3.5.1 糖資化性

後熟酵母 *C. versatilis* の糖資化性を表6に示す。菌株によりばらつきが大きく、半数以上の菌株ではガラクトース、D-ソルビトール、グルコースを資化した。また、約半数はD-スクロース、グリセリンを、半数弱がD-セロビオース、トレハロース、2-ケトグルコン酸カルシウム、グルコン酸カリウム、マンニトールを資化した。

表6 後熟酵母 *C. versatilis* の糖の資化性

	GAL	ACT	SAC	LAT	ARA	GEL	RAF	MAL
1-10	+	-	-	-	-	-	-	-
1-14	-	-	-	-	-	-	+	-
1-19	-	-	-	-	-	-	-	+
1-24	-	-	-	-	-	-	-	-
1-26	+	-	+	-	-	-	-	-
1-27	+	-	+	+	-	+	-	-
1-28	+	-	+	+	-	+	-	-
1-29	+	-	+	+	-	+	-	-
1-30	+	-	+	-	-	-	-	-
2-14	-	-	-	-	-	-	-	-
2-23	-	-	+	-	-	-	-	-
2-24	-	-	-	-	-	-	-	-
2-25	-	-	-	-	-	-	-	-
2-34	+	+	+	-	-	+	-	+
2-36	+	-	-	-	-	-	-	-
2-38	+	-	-	-	-	+	-	-
2-40	+	-	+	+	+	+	+	+

	TRE	2KG	MDG	SOR	XTL	RIB	GLY	RHA
1-10	-	-	-	+	-	-	-	-
1-14	-	+	-	-	-	-	-	-
1-19	-	-	-	+	-	-	+	-
1-24	-	-	-	-	-	-	-	-
1-26	-	-	-	+	-	-	+	-
1-27	+	-	-	+	-	-	+	-
1-28	+	-	-	+	+	+	+	-
1-29	+	+	-	+	-	+	+	-
1-30	+	+	-	-	-	-	+	-
2-14	-	-	-	+	-	-	-	-
2-23	-	-	-	-	-	-	-	-
2-24	-	-	-	-	-	-	-	-
2-25	-	-	-	-	-	-	-	-
2-34	+	+	-	+	-	+	+	-
2-36	-	-	-	-	-	-	-	-
2-38	+	-	-	+	-	-	+	-
2-40	+	+	+	+	+	+	+	+

	PLE	ERY	MEL	GRT	GNT	MAN	LAC	INO	GLU
1-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-14	-	-	-	-	-	-	-	+	-
1-19	-	-	-	-	-	+	-	-	+
1-24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-26	-	-	-	-	+	-	-	-	+
1-27	-	-	-	-	+	+	-	-	+
1-28	-	-	+	-	+	+	-	-	+
1-29	-	-	-	-	+	+	-	-	+
1-30	-	-	-	-	-	+	-	-	+
2-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-24	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2-25	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2-34	-	-	-	-	-	+	+	-	+
2-36	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2-38	-	-	-	-	-	+	-	-	+
2-40	+	+	+	+	+	+	-	+	+

+: 資化性有, -: 資化性無

全ての菌株で資化されなかった炭素源は表記略

N-アセチルグルコサミン, D-メレチトース, レブリン酸, L-ソルボース, D-グルコサミン塩酸塩はいずれの菌株も資化できなかった。

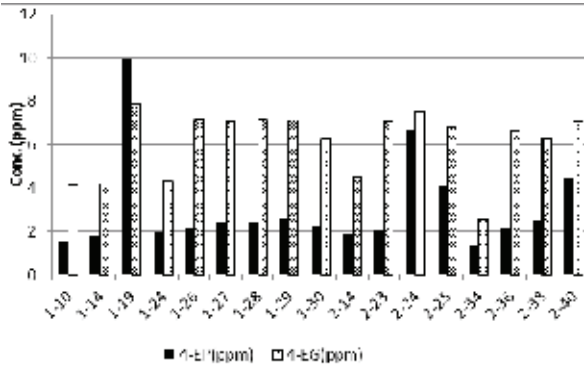
3.5.2 4-EG・4-EPの産生能

分離した17菌株の後熟酵母 *C. versatilis* の4-EGおよび4-EPの産生量を表7と図3に示した。

表7 後熟酵母 *C. versatilis* の4-EP・4-EG産生量

	4-EP(ppm)	4-EG(ppm)
1-10	1.5	4.2
1-14	1.8	4.2
1-19	10.0	7.9
1-24	1.9	4.3
1-26	2.1	7.2
1-27	2.4	7.0
1-28	2.5	7.2
1-29	2.6	7.1
1-30	2.3	6.2
2-14	1.9	4.5
2-23	2.1	7.1
2-24	6.6	7.5
2-25	4.1	6.8
2-34	1.3	2.6
2-36	2.2	6.7
2-38	2.5	6.3
2-40	4.4	7.0

図3 後熟酵母 *C. versatilis* の 4-EP・4-EG の産生量の比較



4-EP, 4-EG ともに L-19 株が最も多く産生し、それぞれ 10.0 ppm, 7.9 ppm であった。また最も少ない産生量であったのは L-34 株で 4-EP が 1.3 ppm, 4-EG が 2.6 ppm であった。

多くの酵母では 4-EP の産生能が低く、3 ppm 未満の濃度であった。また、一部を除いて、4-EG は 4-EP の 2~3 倍の生成量であった。L-19 株、L-24 株は 4-EP, 4EG の生成量が多い後熟酵母であるので、熟成香が強い醤油である可能性がある。

3.6 耐塩性乳酸菌 *T. halophilus* の生理学的性質

分離した 16 菌株の *T. halophilus* のカタラーゼ試験では全ての菌株で発泡が見られず、陰性であった。また、ヒスタミン産生性についても全ての菌株で陰性であったので、アレルギーとならないものと考えられた。

表 8 *T. halophilus* が産生する有機酸 (ppm)

	酒石酸	酢酸	乳酸	リン酸
L-1	3057.7	10436.1	55697.1	119775.5
L-2	4415.0	12105.3	59156.7	129797.5
L-3	4112.5	12096.6	62036.3	138088.0
L-4	4839.2	12107.1	52376.4	131052.0
L-5	4940.0	14060.1	56345.8	142736.5
L-6	5424.8	11860.7	48628.5	123431.2
L-7	3371.3	12409.2	53485.3	129452.0
L-8	5749.6	13677.4	56816.0	144046.0
L-9	5577.8	13897.3	61422.9	153375.5
L-10	5640.4	15068.4	61251.8	152733.5
L-11	2855.8	12968.2	63070.0	140087.5
L-12	4019.4	11999.6	50231.2	141857.5
L-13	5404.3	13528.2	55915.3	146672.0
L-14	3114.1	14272.3	72145.6	152991.0
L-15	4769.9	12846.5	45218.3	141086.5
L-16	3681.9	11656.3	45547.4	123859.0

有機酸の産生量を表 8 に示す。いずれの乳酸菌も酒石酸、

酢酸, 乳酸, リン酸が培地中に見られた。菌株間において、その産生量に桁数が異なるほどの大きな差は見られなかった。醤油の醸造において発酵初期に生成する乳酸によって諸味の腐敗防止に役立つことから乳酸に着目すると、最も多く産生する L-14 株は、最も少ない L-15 株の約 1.6 倍の乳酸量であった。

4. 結言

奈良県内で醸造を行っている 13 社全ての醤油メーカーから蔵付きの酵母および乳酸菌の単離を行った。一部のメーカーでは直接醤油の発酵に関係していない酵母しか得られなかったが、主発酵酵母 *Z. rouxii* が 19 菌株、後熟酵母 *C. etchellsii* が 15 菌株、*C. versatilis* が 17 菌株、耐塩性乳酸菌 *T. halophilus* が 16 菌株得られた。これらの微生物はそれぞれ特徴があり、各醤油メーカーの醤油の特徴の一端を示すものと考えられることから、各社の醤油の特徴把握に役立てるとともに、各醤油メーカーが保存株として利用を希望する場合には各メーカーで保存可能な方法の普及等の支援を行う予定である。

今回分離した酵母の中には、香気成分である HEMF や 4-VG, 4-EP, 4EG を多く産生する特徴的な酵母が得られた事から、関係機関や醤油メーカーと連携して種菌としての利用の可能性を探りたい。

謝辞

本研究を進めるにあたり、元奈良県醤油工業組合 松澤一幸氏に多大なるご支援を頂き、深謝します。また、13 社の醤油会社には試料提供にご協力頂き、深謝します。

参考文献

- 1) 田中昭光；生物工学(90), 6, 320-323, 2012
- 2) 阿部敬悦, 七谷圭；醤油の研究と技術(41), 2, 109-116, 2015
- 3) Nagahara, A., Bemjamin, H., Storkson, J., Krewson, J., Sheng, K., Liu, W., and Pazoza, M. W. ; Cancer Res., (52), 7, 1754-1756, 1992
- 4) Sasaki, T., Yanakoshi, J., Saito, M., Kasai, K., Matsudo, T., Koga, T., and Mori, K. ; Biosci. Biotechnol. Biochem., (62), 10, 1865-1869, 1998
- 5) Koga, T., Mori, K., and Matsudo, T. ; J. Agric. Food. Chem., (46), 3, 946-951, 1998
- 6) 田中広, 小松賢志, 海老根英雄, 田沢昭三；中央味噌研究所研究報告, (24), 122-124, 1997
- 7) 松澤一幸；Unpublished data, 1995
- 8) <http://www.higuchi-m.co.jp/product/product07.html>
- 9) Kurtzman, C. P., and Robnett, C. J. ; J. Clin. Microbiol., (35), 1216-1223, 1997
- 10) 鈴木チセ；平成 20 年度農林水産省補助事業（食料産業クラスター展開事業）食品機能性評価マニュアル集第 III 集, 41-48, (社) 日本食品科学工学会 2009

- 11) 漆原栄治；茨城県工業技術センター研究報告, (25), 43-45, 1997
- 12) 上原健二, 渡部潤, 赤尾健, 渡辺大輔, 茂木喜信, 下飯仁；醤油の研究と技術(41), 2, 141-150, 2015
- 13) 漆原栄治；日本醤油研究所雑誌, (25), 2, 23-26, 1999
- 14) 末澤保彦；日本農芸化学会誌, (69), 12, 1587-1598, 1995
- 15) Nicolini, G., Larcher, R., Bertoldi, D., Puecher, C. and Magno, F. ; *Vitis-J. Grapevine Res.*, (46), 4, 202-206, 2007
- 16) 小崎道夫, 内村泰, 岡田早苗；乳酸菌実験マニュアル, 41-43, 朝倉書店, 1992
- 17) 永瀬光俊, 會見忠則；(公財)ソルト・サイエンス研究財団助成研究報告書, 189-197, 2010
- 18) 遠藤路子, 中野陽, 本多美恵, 加藤愛, 小谷幸敏；鳥取県産業技術センター研究報告, (18), 7-11, 20