酵母発酵による沢庵臭の低減法

江戸初期の禅僧沢庵和尚が発明したとされる沢庵漬は、どんなに食文化が進んでも日本人の食生活には欠かせない格別の食べ物である。暖房の効いた電車内で、あの特有の臭いがどこからともなく漂ってきたときには、すぐに鼻をつまみたくもなるが、一方である種の郷愁を覚えるのも事実である。筆者は、この沢庵臭を低減する方法に取り組み、最終的に酵母の利用により沢庵臭の少ない現代向きの漬物に加工する技術を確立されたもので、その経緯を解説していただいた。消臭メカニズムも極めて明解である。

西脇 俊和

1. はじめに

沢庵は、1985年では約25万トンの出荷量があったが、消費者の嗜好の変化に伴い年々減少し、2005年には約7万3千トンと3割程度に激減した⁽¹⁾。その原因は、切るのが面倒、噛むのに硬い、黄色の着色が嫌いなどが挙げられるが、沢庵の独特な臭い、いわゆる沢庵臭も敬遠されている一因である。

沢庵臭はダイコンを塩漬けする過程で発生するが、それはダイコン中で生成される辛味成分に起因する⁽²⁻⁴⁾。ダイコン中にはイソチオシアネートの配糖体が存在し、組織の破壊と同時に、共存するアスコルビン酸の活性化によりミロシナーゼ (EC 3. 2. 3. 1) 反応が進行し⁽⁵⁾、イソチオシアネートが生成する⁽⁶⁾。これがさらに非酵素的に分解され、臭気成分のメチルメルカプタンが生成する。さらに、メチルメルカプタンが酸化するとジメチルジスルフィド、ジメチルトリスルフィドが生成される⁽³⁾。これらが独特な風味を形成し、沢庵臭として認識される。なお、メチルメルカプタンやジメチルジスルフィドなどの揮発性硫黄化合物は、代表的な悪臭成分であり、口臭などの主要成分と言われている⁽⁷⁻¹¹⁾。

元来、沢庵は高食塩濃度で長期間漬け込まれ、その間、原料ダイコンや糠床に由来する有用な乳酸菌や酵母の作用によって良好な風味が付与され製造される。

ところが近年、低塩化、漬け込み期間の短縮化に対応すべく製造方法が合理化され、事実上、調味漬けに変化し、微生物は排除する対策が取られてきた。

こうした背景で、著者ら⁽¹²⁾は、現状の合理化された沢庵製造工程で、酵母発酵を利用することにより、塩漬けダイコンから沢庵臭を除去する技術を考案した。さらに、本技術を漬物製造現場へ導入して安定生産を図るために、1トン規模の汎用機を用いて工場規模での実証試験を行ったので紹介する。

2. 臭気成分の分析

臭気成分は、ダイナミックヘッドスペース法で濃縮し、におい嗅ぎGC法で分析・評価した (第1図)。この方法は、におい成分をガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GCMS) により分離・同定し、分離された個々の成分のにおいと強度は実際ににおい嗅ぎで評価するため、オフフレーバー成分あるいは特徴香成分の分析に適した方法である。試料はナス型フラスコに一定量入れ、加温しながら窒素ガスをパージし、捕集管 (テナックス TA 100 mg 充填, ジーエルサイエンス社製) ににおい成分を捕集した。捕集したにおい成分は、熱脱着 (Thermal Desorption Cold Trap, TCT) インジェクター (CP 4010, ジーエルサイエンス製) でにおいかぎシステム (ODO II, SGE 製) を装備した GCMS (GCMS-QP 5050 A, 島津製作所

Deodorizing Activity of Yeast Fermentation Against Volatile Compounds of Pickled Radish
Toshikazu NISHIWAKI (Niigata Agricultural Research Institute, Food Research Center)

第1図 臭気成分の解析

製)に導入した。各装置の条件は以下のとおりとした。

(1) TCT インジェクター

①装置：CP 4010 (ジーエルサイエンス製)

②トラップ温度：-100°C

③脱着温度：200°C

④脱着流量：10 ml / 分

⑤インジェクション温度：200°C

(2) GCMS

①装置：GCMS QP 5050 A (島津製作所製)

②分析カラム：DB-WAX (0.25 mm×30 m, 膜厚 0.25 μm, アジレント製)

③カラムオープン温度：35°C (5 分) ~ (10°C / 分) ~ 250°C

④キャリアガス：ヘリウム (定圧 120 kPa)

⑤イオン化電圧：70 eV

3. 酵母によるメチルメルカプタン臭の低減

ダイコンから発生する沢庵臭は上述のとおり、揮発性硫黄化合物のメチルメルカプタンから派生する成分であることから、培地にメチルメルカプタン (ナトリウム塩, 東京化成工業製) を 2 mM になるように添加し, これを沢庵のモデルとした。そこに酵母を 10^6 CFU/ml 接種して培養するとともに吸光度 (660 nm) を経時的に測定し増殖程度とした。また, 酵母接種後 24 時間経過した培養液のにおいを官能評価した。酵母は, 漬物中に頻出する耐塩性酵母のうち, 当センターの保有する味噌醸造用酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* S 96⁽¹³⁾ と非耐塩性酵母のうち, 特徴的な香気を期待してワイン醸造用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* OC 2 を供試した。培養条件は次のとおりとした。装置：振盪温度勾配培養装置 (バイオフィトレ

コーダー TN-2612, アドバンテック製), 振盪速度：30 rpm, 培養液：*Z. rouxii* S 96; グルコース (5~25 %), 10% 生醤油を含む水溶液 (pH 5.0), *S. cerevisiae* OC 2; 5% グルコースを含む YM 培地, 培養温度：*Z. rouxii* S 96; 30°C, *S. cerevisiae* OC 2; 10~40°C。

(1) *Z. rouxii* S 96 によるにおいの低減

Z. rouxii S 96 の生育程度とにおいの低減化の関係を明らかにするために, メチルメルカプタンを添加してグルコース濃度を違えた培養液で培養し, 培養後のにおいを官能評価した (第2図, 第1表)。これまでに, *Z. rouxii* の生育に及ぼす培地中グルコース濃度の影響については, 食塩 20% 存在下ではグルコース濃度 10% 前後が最もよいと報告⁽¹⁴⁾ されている。しかし, 本試験で行った食塩濃度が 2% 以下の条件では, *Z. rouxii* S 96 の生育はグルコース濃度 20% までは, グルコース濃度が高いほど早く旺盛で, 25% では生育が抑制された。発酵後のにおいもグルコース濃度が高いほど少なく, 20% グルコース濃度で培養したものににおいがほとんど感じられなくなった。すなわち, 酵母の生育とにおい低減化は連動し, 旺盛に生育するとにおいの低減化ができることがわかった。また, 食塩の代わりに糖類の添加量を高めて脱水する「糖絞り」と言われる製法のダイコンについても, *Z. rouxii* S 96 の利用でにおいの低減化が期待される。

(2) *S. cerevisiae* OC 2 による匂いの低減

S. cerevisiae OC 2 の利用においても, *Z. rouxii* S 96 と同様に旺盛な生育がにおいの低減化に寄与するかどうかを検討した。

結果は図示しないが, 初発菌数を変えて振盪培養したところ, 10^6 CFU/ml 接種した場合, 約 8 時間で

第2図 グルコース濃度による *Z. rouxii* S 96 の増殖に及ぼす影響

培養装置：振盪温度勾配培養装置(TN-2612, アドバンテック製), 培地：2mM メチルメルカプタンナトリウム及び10%生醤油を含む水溶液 (pH 5.0), 初発菌数： 10^6 CFU/ml, 振盪速度：30 rpm, グルコース濃度：◎；5%, ◇；10%, △；15%, ○；20%, ▽；25%

第1表 *Z. rouxii* S 96 による発酵後の培養液のにおい

グルコース濃度 (%)	24 時間後のにおい
5	におう
10	におう
15	わずかににおう
20	ほとんどにおわない
25	ほとんどにおわない

培養条件は第2図参照

10^8 CFU/ml に達し、その時、においもほとんど感じられなかった。 10^5 CFU/ml 接種では、 10^8 CFU/ml に達するまでに約 24 時間を要した。実際の漬物製造現場では、接種する酵母は既存の微生物との生存競争になるため、酵母の接種菌数を多くし、速やかに増殖させることが必要となる。二次汚染を排除しながら沢庵臭を除去するためには、 10^6 CFU/ml 以上接種することが必要であると判断した。

次に生育に最適な培養温度を検討した。その結果、培養温度が 30°C までは、温度の上昇に伴って増殖速度が上昇した。 35°C 以上では 30°C で培養したものと比較して増殖が抑制された。よって、 30°C が *S. cerevisiae* OC 2 の増殖速度が最高となる温度であった (第3図)。

また、振盪培養法と静置培養法による生育を比較した (第3図)。酵母の生育が最高に達し、メチルメルカプタン臭の除去が図られるのに要した時間は、前者が約 40 時間、後者は約 18 時間であった。すなわち、振盪して生育を促進することで短時間に沢庵臭を除去できることが示唆された。

(3) 酵母発酵による培地中のメチルメルカプタンの変化

メチルメルカプタン (ナトリウム塩) を添加した培養液に、*S. cerevisiae* OC 2 を接種し 30°C 18 時間培養させたものと、酵母を接種しないものとのにおい成分を GCMS で分析し比較した (第4図)。酵母非接種の培養液のにおい成分は、添加したメチルメルカプタンがほとんど消失し、かわりにジメチルジスルフィド、

第3図 培養方法及び温度が *S. cerevisiae* OC 2 の増殖に及ぼす影響

培養装置, 初発菌数, 振盪速度は第2図参照, 培地：2mM メチルメルカプタンナトリウム及び5%グルコースを含むYM培地, 培養温度：◎； 10°C , ◇； 20°C , ▽； 25°C , ○； 30°C , △； 35°C , □； 40°C

第4図 *S. cerevisiae* OC 2 接種の有無による培地におい成分の比較
24 時間振盪後の培養液臭気のマスキングマトグラム、培養条件は第3図参照

ジメチルトリスルフィドが検出され、培養液は強いにおいを感じた。

一方、酵母を接種し発酵させた培養液のにおい成分は、非接種の培養液のにおい成分と比較してジメチルジスルフィド、ジメチルトリスルフィドが低減し、非接種の培養液では検出されなかった S-メチルチオアセートが強い強度で検出された。S-メチルチオアセートのピークのスニッフィングでは、野菜を煮たようなにおいが弱く感じられたが、発酵培養液自体はメチルメルカプタンのにおいがほとんど感じられなかった。なお、*Z. rouxii* S 96 を接種した場合も同様な変化が認められた。

次に温度を違えて 18 時間培養したときのおい成分の比較を行った (第5図)。10°C で培養したときは、30°C で培養したものと比較して、ジメチルジスルフィド、ジメチルトリスルフィドが強い強度で検出され、においが強く感じられた。また、S-メチルチオアセートも検出された。

(4) 酵母細胞抽出物によるメチルメルカプタンの変化

一般的な消臭のメカニズムとして、①芳香成分によるマスキング、②吸着作用による物理的消臭、③酸化、還元反応などを利用した化学的消臭、④酵素反応を用いた生物的消臭などが挙げられる。

そこで、酵母の細胞抽出物を調製してメチルメルカプタンのにおい低減の機作を検討する試験を行った。*S. cerevisiae* OC 2 を YM 培地に 10⁸ CFU/ml まで増

殖させ、得られた菌体を超音波破砕機で処理し、その遠心上清を酵母細胞抽出液とした。

酵母細胞抽出液にメチルメルカプタン (ナトリウム塩) を添加し、30°C でインキュベートしてにおい成分を GCMS で分析すると、S-メチルチオアセートが検出された。酵母細胞抽出液を沸騰水中で加熱処理した後、同様の操作を行うと S-メチルチオアセートのピークが低減した。一方、メチルメルカプタンを含む MES 緩衝液にアセチル CoA を添加して同様にインキュベートしたところ、S-メチルチオアセートが検出された (第6図)。

(5) 酵母による沢庵臭除去のメカニズム

上記の沢庵臭の主要成分であるメチルメルカプタンを培地に添加した試験から次の知見を得た。①酵母を接種し発酵させると沢庵臭が低減し、酵母の生育が旺盛なほど沢庵臭除去効果が高まった。②酵母発酵後のにおい成分は、メチルメルカプタン、ジメチルジスルフィド、ジメチルトリスルフィドが低減するとともに S-メチルチオアセートが生成した。③菌体抽出液にメチルメルカプタンを添加してインキュベートすると S-メチルチオアセートが生成するが、抽出液を加熱処理すると低減した。④メチルメルカプタンにアセチル CoA を添加すると S-メチルチオアセートが生成した。

なお、チーズから分離された酵母が、メチオニン代謝によって生じたメチルメルカプタンを細胞内に集積したアセチル CoA を利用して S-メチルチオアセー

第5図 *S. cerevisiae* OC 2 培養温度による培地におい成分の比較
24時間振盪後の培養液臭気のマスキロマトグラム, 培養条件は第3図参照

第6図 メチルメルカプタンの添加によって生成される S-メチルチオアセートのピーク強度の比較
各溶液にメチルメルカプタンナトリウムを添加して 30°C18時間経過後のマスキロマトグラム
↓はS-メチルチオアセートのピーク
1: 酵母細胞抽出液(非加熱処理), 2: 酵母細胞抽出液(加熱処理), 3: アセチルCoA水溶液

トを生合成するという報告⁽¹⁵⁻¹⁶⁾がある。このことから本実験においても、メチルメルカプタンは、*S. cerevisiae* OC 2 によって取り込まれ、アセチル CoA が基質となって S-メチルチオアセートに変換されることが推測された。その結果、沢庵臭の低減が図られものと予想された。これまでの研究と本研究から得られた結果を整理すると、沢庵臭の発生と酵母による低減化は第7図のように推定された。

4. 50 L 規模の小型装置による最適な沢庵臭除去条件の検討

(1) 酵母の選択

実験室レベルの試験では、*Z. rouxii* S 96, *S. cerevisiae* OC 2 のいずれもメチルメルカプタンのにおいの除去には有効であったが、*Z. rouxii* S 96 の場合、最適なグルコース濃度が 20% と高く、実際の生産で

第7図 沢庵臭の発生と酵母による低減化

は、培養廃液による環境負荷とコストが問題になると予想されたので、ここでは *S. cerevisiae* OC2 を用いて実施することとした。

(2) 小型酵母発酵調味装置による培養

本試験で用いた装置は、容量が約 50 L で、調味缶体の胴部が加熱・冷却可能な熱交換器プレートコイルで構成されており、缶体の回転に伴って攪拌する構造となっている（第8図）。本来は、密閉缶体の中で加

第8図 小型酵母発酵調味装置

熱・冷却，減圧，攪拌が可能な調理装置で，低温，短時間に調味液を食材に浸透させたり，濃縮したりする用途に用いられる。主に漬物や惣菜の試作に利用しているが，本試験では，小型酵母発酵調味装置として利用した。

沢庵の原料となるダイコンは，食塩濃度 12% で塩蔵したものを食塩濃度が 1% になるまで脱塩して，約 7 mm 厚に輪切りにしたものを使用した。この脱塩ダイコンと等重量の 10% グルコース溶液を漬物用容器（ポリエチレン製）に入れ，4℃ であらかじめ 1 日間漬けた。ダイコンを取り出し，水分を切った後，このダイコン 5 kg と培養液 1 kg を装置に投入した。これに *S. cerevisiae* OC2 を 10⁶ CFU/g となるように接種し，30℃ 15～24 時間回転させ，攪拌培養した。培養液は，酵母の生育に必要なとともにダイコンの調味成分でもあることから，漬物の調味に利用可能な資材を選択し，調味として適正な範囲で，酵母の生育が良好である使用量を予備試験で決定し，以下のとおりとした。グルコース 5%，アミノ酸液（アジジャンプクリスタル 2，全窒素 2%，食塩 20%，pH 5.0，新進製）10%，酵母エキス末（スーパーミーストパウダー，アサヒフードアンドヘルスケア製）0.25%，pH 5.0 に調整し

第2表 小型酵母発酵調味装置による発酵時間とダイコンの品質

発酵時間 (時間)	酵母数 (CFU/ml)	官能評価
0	2.0×10^6	沢庵臭が強く感じられる
15	8.7×10^7	沢庵臭が若干感じられる
18	1.2×10^8	沢庵臭は感じられない
21	2.0×10^8	アルコール臭がやや強い
24	2.6×10^8	アルコール臭がかなり強い

装置にダイコン 5 kg と培養液 1 kg を投入して攪拌(回転)

初発菌数: 10^6 CFU/g, 発酵温度: 30°C

た。

(3) 適正な発酵時間の検討

発酵時間を変えてダイコンを処理したところ、15 時間処理では沢庵臭が若干感じられたが、18 時間処理では沢庵臭がほとんど感じられなくなった。発酵処理が 21 時間以上では、アルコール臭がやや強く感じられた(第2表)。よって、発酵時間は 18 時間が適当と判断した。

(4) 発酵処理がダイコンの物性に及ぼす影響

ダイコンの物性は、テンシプレスサーによる破断強度で評価したが、発酵処理前後でほとんど差が見られず、発酵による物性への影響はほとんどないと判断された(第9図)。

第9図 小型酵母発酵調味装置の処理によるダイコン硬度の影響

スライスダイコン(厚さ 7 mm) の $\phi 5$ mm 円筒型プランジャによる貫入抵抗値

発酵条件は第2表参照

5. 1 トン規模の酵母発酵調味装置による実用化試験

(1) 沢庵臭除去効果の検証

小型酵母発酵調味装置による試験結果を踏まえて、さらにスケールアップを図った。本試験で用いた 1 トン規模の酵母発酵調味装置は、容量が 1,200 L, 調味缶体の胴部は加熱・冷却が可能で水や蒸気を導通することにより温度を制御し、缶体内部の攪拌羽根を回転させて攪拌する構造のものを使用した(第10図)。

これは、ソース、タレ、佃煮、ジャム、餡など広く食品加工現場で採用されている汎用調味装置である。この装置に脱塩ダイコン 500 kg と培養液 100 kg を投入した。これに *S. cerevisiae* OC 2 を 10^6 CFU/g になるように接種し、攪拌羽根はダイコンに損傷を与えない程度の 4 回転/分とし、 30°C 18 時間培養を行った。調味液組成は上記小型酵母発酵培養装置を用いた試験と同様とした。

発酵前のおい成分は、メチルメルカプタン、ジメチルジスルフィド、ジメチルトリスルフィドが検出され、沢庵臭が強く感じられたが、発酵後は、前述のモデル実験の場合と同様にメチルメルカプタン、ジメチルジスルフィド、ジメチルトリスルフィドが低減し、その代わりに S-メチルチオアセテートが生成していることが確認され、沢庵臭がほとんど感じられなくなった(第11図)。

第10図 1 トン規模の酵母発酵調味装置

第 11 図 1 トン規模の酵母発酵調味装置による沢庵臭成分の変化
18 時間攪拌後のダイコン臭気のマスキロマトグラム
装置にダイコン 500 kg と調味液 100 kg を投入して攪拌
初発菌数： 10^6 CFU/g，発酵温度： 30°C

(2) 発酵処理後の *S. cerevisiae* OC 2 の殺菌

発酵処理後，漬液を清澄にするために新たな調味液に漬け換えるが，ダイコンに付着した生菌を持ち込まないように低減する必要がある。通常の製造工程（第 12 図）では，袋詰め後に加熱殺菌を行うため，この工程を経てもダイコンの物性に影響を及ぼさない *S. cerevisiae* OC 2 の低減条件（プレ殺菌）を検討した。その結果， 50°C 20 分程度加熱することにより，酵母数を $10^3 \sim 10^4$ CFU/g レベルまで低減させることが可能であった（第 3 表）。また，袋詰め後の殺菌工程を

経てもほとんどダイコンの物性に影響がなかった（図示せず）。

(3) 「沢庵臭のない沢庵」の評価

1 トン規模の酵母発酵調味装置で処理したダイコンを用いて試作した沢庵の試食会を新潟県内の漬物メーカー，関連商社ら 52 名で行い，匂い，食感，食味について求評した。その結果，「沢庵臭のない沢庵」は従来品と比較して，においては，約 80% のパネルが良いとし，食感についても約 80% が同等もしくは良いという評価を得た。呈味についても約 70% が同等もしくは良いと評価した。呈味で評価が分かれた要因は，発酵のために必要な調味料や発酵による酵母の生成成分によって，従来品と異なったことが挙げられた。

本稿で採り上げた菌種以外の酵母でも沢庵臭の低減効果を確認しており，それぞれ異なるフレーバーをもつことから，特長を活かした商品が期待できる。

第 12 図 においを低減した沢庵の製造工程

第 3 表 *S. cerevisiae* OC 2 に対する加熱温度の影響

処理温度	処理時間 (分)					
	0	10	20	30	40	60
40°C	1.2×10^8	1.5×10^8	1.2×10^8	1.1×10^8	3.4×10^7	5.0×10^7
50°C	1.2×10^8	2.3×10^4	1.1×10^4	2.0×10^3	1.7×10^3	3.0×10^2
60°C	1.2×10^8	9.5×10^3	1.8×10^3	$< 1.0 \times 10^2$		

単位：CFU/g

1 トン規模の酵母発酵調味装置により発酵したダイコンを供試

発酵条件は第 11 図参照

6. おわりに

伝統的な発酵漬物の多くが、合理化のため調味漬けに変化してきており、本来の漬物らしい風味が不足している。また、伝統的な発酵漬物は原料等由来の微生物に依存した自然発酵であるため、その品質を安定化するのは難しい。しかし、スターターカルチャーを利用した漬物製造の例は未だ少ない。これまで「漬物」と「発酵」は切り離されてきたため、多くの漬物製造企業は発酵に必要な装置、設備をもたない。

本稿で紹介した方法は、漬物企業で実現できるように汎用機を用いた結果である。このように積極的に微生物の機能を活用し、高品質で風味豊かな発酵漬物の製造開発の一助になれば幸甚である。

本稿で紹介した研究は、主に平成15年度「ブランドニッポン」加工食品供給促進技術開発事業（農林水産省総合食料局）で、株式会社ヤマキ食品と当センターとの共同で行ったものである。

＜新潟県農業総合研究所 食品研究センター＞

参 考 文 献

- 1) 社団法人食品需給研究センター 平成18年度資料
- 2) A. Kjaer, J. Φ. Madsen, Y. Maeda, Y. Ozawa, and Y. Uda : *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1715-1721 (1978)
- 3) 江崎秀男, 小野崎博通 : 家政誌, 33(10), 513-520 (1982)
- 4) 金和子, 小林彰夫, 河村フジ子, 松本睦子 : 家政誌, 40(7), 603-608 (1989)
- 5) 長島善次, 内山正昭 : 農化, 33, 980 (1959)
- 6) P. Friis, and A. Kjaer : *Acta Chem. Scand.*, 20, 698 (1966)
- 7) 常田文彦, 石川正夫, 渋谷耕司, 興水正樹, 阿部龍二 : 農化, 58(6), 585-589 (1984)
- 8) N. Nakatani, K. Miura and T. Inagaki : *Agric. Biol. Chem.*, 53(5), 1375-1381 (1989)
- 9) 安田英之, 宇井美樹 : 農化, 66(10), 1475-1479 (1992)
- 10) 宇井美樹, 安田英之, 柴田柁樹, 丸山孝, 堀田博, 原利男, 安田環 : 食工誌, 38(12), 1098-1102 (1991)
- 11) 清水和正, 前田裕一, 大澤謙二, 志村進, 角田正健 : 食科工, 48(4), 238-245 (2001)
- 12) 西脇俊和, 吉水聡 : 特開 2004-049040
- 13) 今井誠一, 松本伊左尾 : 醸協, 69, 587 (1974)
- 14) 今井誠一, 松本伊左尾編 : 味噌技術読本 (新潟県味噌工業協同組合連合会, 新潟県味噌技術会), 105 (1990)
- 15) S. Helinck, H. E. Spinnler, S. Parayre, M. Dame-Cahagne, and P. Bonnarne : *FEMS Microbiology Letters*, 193, 237-241 (2000)
- 16) K. Arfi, H. E. Spinnler, R. Tache, and P. Bonnarne : *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 503-510 (2002)