醤油麴の高温消化条件の検討

村松俊輔・佐野芳仁・武田与光・兎東保之*

(武田食糧<株>, *山梨大学工学部化学生物工学科)

平成3年1月24日受理

Studies on the Conditions of High-temperature Autodigestion of Soy Sauce Koji Materials

Shunsuke MURAMATSU, Yoshihito SANO, Tomomitsu TAKEDA
and Yasuyuki UZUKA*

(Takeda Shokuryo Co., Ltd., 9-30 Saiwai-cho, Kofu-shi, Yamanashi 400,

* Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty
of Engineering, Yamanashi University, 3-11, 4 Chome,
Takeda, Kofu-shi, Yamanashi 400)

Autodigestion of soy-sauce koji was carried out in solutions of low saline concentration at higher temperature such as 55°C, and the production of glutamic acid as taste substance, and reducing sugar as the fermentation substrate, was examined.

1) In the case of koji autodigestion without addition of NaCl, the amount of total nitrogen in soluble fraction increased rapidly in the first 24 hours and attained to the highest level within 2 or 3 days.

2) The solubilization rate of total nitrogen was decreased by the presence of NaCl even in low concentrations such as 0.5%~2%.

3) The amount of glutamic acid solubilized was influenced by both autodigestion temperature and concentration of NaCl.

4) For the solubilization of glutamic acid, the absence of NaCl and temperature range of 45~55°C were the best autodigestion conditions. Under these conditions, glutamic acid/total nitrogen ratio attained to 0.867, the value being close to the expected highest value of 0.885.

5) In the cases of salt concentration of 10% and 17%, pH was maintained around the optimum pH for amylase, and large amounts of reducing sugar were solubilized. On the other hand, in the cases of salt concentration of 0% and 5%, smaller amounts of reducing sugar were solubilized since pH was higher or lower than the optimum pH for amylase.

Key words : 醤油麴・高温消化・食塩濃度

緒 言

現在、広く行われている濃口醤油の本醸造法では¹⁾、蒸煮した大豆(脱脂加工大豆等も含む)と炒煎割砕した小麦を原料とした麴に約23%の食塩水を混合し、タンクに仕込み諸味とする。諸味は30°C前後に温醸管理されながら、麴の自己消化すなわち加水分解と、その分解生成物に微生物が作用して新しい物質を作りだす発酵とが複合的に進行する。この過程は日本酒製造における並行複発酵に類似する。この方式では、最初の3カ月で主として乳酸発酵とアルコール発酵がこの順序で進行し、

それに続く熟成にさらに3カ月以上を要し、合計6カ月以上もの長期間をかけて熟成諸味が造られている。

諸味の中で自然に進行するこの並行複発酵形式を人為的に加水分解過程と発酵過程に分割し、さらに発酵過程を乳酸発酵、主発酵酵母および後熟酵母の発酵などに細分する試みがバイオリアクターを使用する形で行われている^{2~4)}。この試みの主たる目的は、並行して進行するいくつかの物質変換過程を管理する難しさを避けて、個々の独立した管理工程へと単純化するところにある。

醤油用麴の自己消化過程を取り扱った報告^{5~8)}、あるいは特許では^{9~12)}、比較的濃厚な食塩水に麴を浸漬し、

品温を 35℃～55℃ に保って自己消化を促進させている。

本研究では食塩濃度を低濃度側に移したときにみられる分解特性，なかでも醤油のうま味の主成分であるグルタミン酸の生成量と，乳酸発酵とアルコール発酵の基質になる還元糖の生成量に注目して，高温において麹の自己消化を行った。

実験方法

1. 製麹条件

麹の原料配合比率は脱脂加工大豆と小麦を等重量とした。製麹は常法に従って原料を蒸煮，あるいは炒煎割碎し，種麹と混合してから円盤型自動製麹装置（永田醸造機械製）を使い，28 cm 盛込厚で3日間行った。

2. 消化条件

内容量約 13 l のポリバケツに 12 水仕込み，すなわち，麹 4 kg に対して水または食塩水 6.6 l で，あるいは 11 水仕込み，すなわち，6.0 l を加え，消化液の終濃度塩分が 0%，0.5%，1%，2%，5%，10%，17% になるように調整した食塩水で仕込んだ。蓋をして 1～12 日間，45℃ から 60℃ の恒温条件に保持し，必要な分析を行って原料の消化状態を経時的に観察した。

3. 諸味成分の測定方法

全窒素，滴定酸度 I，pH，直接還元糖，食塩，色はしょうゆ試験法によった¹³⁾。

グルタミン酸と乳酸の定量はペーリンガー・マンハイム山之内(株)の食品分析用試薬（F キット）を用いる酵素法によった。

実験結果

1. 麹の自己消化に及ぼす食塩濃度の影響

消化液の食塩終濃度が 0，5，10，17% の4段階となる 12 水仕込みの実験区を作り，45℃ で 12 日間消化を行った。

Fig. 1-A に示したように全窒素の溶出は食塩濃度が低いほど速かった。食塩濃度 0% 区は4日間の消化で全窒素の溶出がほとんど終了しており，頂点の8日までの間にはわずかに増えたにすぎない。12 日間の消化では逆に減少が見られた。食塩 5% 区は加温日数の増加に伴って全窒素は徐々に上昇した。食塩 10% 区は消化期間 4 日から 8 日にかけて明らかに増大したが，それからはほぼ一定値を保った。食塩 17% 区は 4 日から 8 日にかけて全窒素量は著しく増大し，12 日にかけてもなお相当な上昇がみられた。しかし 12 日間消化を行ったものの全窒素量は食塩濃度が低い区に比べて明らかに低かった。

Fig. 1-B にはグルタミン酸の溶出経過を示した。食塩濃度が低いほど溶出量が多く，経時的増大が少ないところに特徴があった。

Fig. 1-C は還元糖量の変化を示した，食塩濃度が高い

Fig. 1 Effect of salt concentration on autodigestion of soy sauce *koji* materials.

4 kg of soy sauce *koji* added with 6.6 l of water or NaCl solution was autodigested at 45℃ for 12 days under the final salt concentration of 0, 5, 10 and 17%, respectively.

○ : 0% NaCl, ● : 5% NaCl, △ : 10% NaCl, ▲ : 17% NaCl

ほど溶出量が大きく、食塩 0% 区、5% 区の溶出は 8 日の消化で停止した。17% 区は 12 日になっても上昇傾向を示した。

Fig. 1-D は消化液中の酸量（主として乳酸）を表す滴定酸度 I を示した。還元糖量とは反対に、食塩濃度が低いほど値が大きかった。経時の変化は食塩 0% 区ではほとんどないが、5% 区では徐々に増大して、10% 区、17% 区では明らかな増大を示した。

実験区によって異なっていた酸量の大小は消化中の諸味の pH (Fig. 1-E) にもよく反映されており、酸量の多い 0%、5% 区の pH が低かった。

2. 食塩無添加下における消化温度の影響

前項の実験では、食塩 0% 区で醤油取引上の基準¹⁴⁾になる全窒素と、うま味の主体となるグルタミン酸の溶出量が 4 日間の消化でほぼ最大に達していた。この事実を踏まえて、本項では食塩を全く添加しない条件下で、温度を変化させたときの麴の消化過程を比較的短時間内に限定して比較検討した。なお、消化温度の設定は腐酸¹⁵⁾の恐れを考慮し、米麴を消化して甘酒^{16,17)}をつくる 55°C を参考にして 45°C から 60°C の間の 4 区とした。汲水は 12 水で行った。

全窒素量は Fig. 2-A に示したように、60°C 区では可溶化するものの大部分が消化 1 日で溶出しており、2 日で頂点に達していた。45°C 区、50°C 区および 55°C 区は日数の経過に伴って全窒素溶出は増大する傾向にあったが、実験した範囲では 60°C 区よりも低かった。

Fig. 2-B にグルタミン酸量の変化を示した。全体として溶出量は比較的低温の方が多かった。どの区も日数経過とともに上昇する傾向を示した。

還元糖量の変化を Fig. 2-C に示した。温度の高い区で多く、温度の低い区が少なかった。

滴定酸度 I の変化を Fig. 2-D に示した。消化温度が 45°C と 50°C 区では消化 1 日ですでに高くなり、著量の酸の生成を示している。なかでも 45°C 区は 3 日で 30 ml を越しており、2 日から 3 日にかけてもなお増大傾向を示している。一方、55°C と 60°C 区は酸の生成が少なく、消化 3 日で 10 ml 以下であった。

Fig. 2-E には pH の変化を示した。45°C、50°C で低く、滴定酸度 I の大きい区と一致した。55°C、60°C 区では消化期間 1 日が最も高く徐々に低下した。

3. 消化に及ぼす汲水の影響

全窒素量が多い高温消化液を得ることを目的として、消化温度を 50°C と 55°C に限定し、汲水を 11 水と 12 水にした組み合わせで検討した。食塩濃度は 0% に統一した。50°C 区では分解初期（4 および 9 時間）にも消化液を採取して分析した。

Fig. 3-A に示した通り 11 水仕込みの 50°C と 55°C との間にはあまり全窒素量の差がなかった。12 水仕込みでは、50°C よりも 55°C の全窒素量が常に高かった。汲水の 11 水と 12 水とでは明らかに差があって、常に 11 水区の方が高かった。

Fig. 3-B にグルタミン酸量を示した。50°C-11 水区が

Fig. 2 Effect of temperature on autodigestion of soy sauce *koji* materials.

4 kg of soy sauce *koji* added with 6.6 l of water was autodigested for 3 days at various temperature.

○ : 45°C, ● : 50°C, △ : 55°C, ▲ : 60°C

Fig. 3 Effect of water volume added on autodigestion of soy sauce *koji* materials.

4 kg of soy sauce *koji* added with 6.0l (open symbols) or 6.6l (closed symbols) of water was autodigested at 50°C (○, ●) or 55°C (△, ▲) for 5 days, respectively.

最も高く、次いで 55°C-11 水区であった。12 水区では 50°C, 55°C とともに 11 水区より低かった。

還元糖量の変化を Fig. 3-C に示す。55°C 区は 11 水, 12 水ともに比較的高い濃度で還元糖が溶出し, 11 水区では 6% を越えた。50°C 区では 11 水と 12 水の間に明瞭な差を示さなかった。

Fig. 3-D は滴定酸度 I の変化を示している。50°C 区の 11 水, 12 水ともに消化 1 日で 20 ml 以上の酸量を示し, 55°C 区は 2 日まで 5 ml 以下であったが, 3 日に増加をはじめ 5 日まで増大した。

Fig. 3-E に pH の変化を示した。50°C 区の pH は消化 1 日で低下するのに対し, 55°C 区は 3 日から酸の量に応じて徐々に低下した。

4. 高温消化での低濃度食塩の影響

前項までの実験で 55°C で吸水量を少なくして麹を自己消化させると, 全窒素および還元糖の溶出量が高く, また 2 日以内の消化なら食塩無添加でも滴定酸度 I 量が少ないことがわかった。これらの事実をよりどころにして, 本項では食塩濃度 2% 以下で 11 水仕込みを行った際の麹の分解特性を調べた。なお, 調査項目に色も加えた。

Fig. 4-A に示したように, 食塩が 2% 以下の濃度で存在しても全窒素の溶出が遅くなった。また, Fig. 4-B に示したように食塩がたとえ少量でも存在するとグルタミン酸の溶出は増加が続くものの全体に少なくなった。

Fig. 4-C に示したように還元糖量は食塩 0.5% の区

Fig. 4 Effect of low salt concentration on autodigestion of soy sauce *koji* materials.

4 kg of soy sauce *koji* added with 6.0l of NaCl solution of various concentrations was autodigested at 55°C for 2 days.
○: 0% NaCl, ●: 0.5% NaCl, △: 1% NaCl, ▲: 2% NaCl

で最も高く, それ以上の食塩が存在した区や 0% 区よりも溶出量が上回った。

色濃度は Fig. 4-D に示した。食塩 0% 区は番号が小

さくなって色の濃化が進みやすいことを示しており、低濃度でも食塩が存在すると濃化の進みは少なくなった。

考 察

消化時間が短い4時間と9時間の測定結果から、高温条件下での全窒素の溶出は、はじめの24時間以内に急速に進行することがわかった。醤油麹におけるタンパク質の分解はアルカリプロテアーゼと中性および酸性プロテアーゼが協同して作用するといわれている¹⁸⁾。麹の自己消化液は初期のpHが6.3付近であるから、おおむね全プロテアーゼ活性が発現でき、分解初期に全窒素が急速に溶出した現象を説明できると考える。

食塩無添加の下では2日ないし3日間の消化で全窒素の溶出は最大に達する。ところが、0.5~2%と食塩がわずかでも存在すると、その溶出速度は低下した。食塩によってプロテアーゼ活性の阻害が起きたと推定される¹⁹⁾。食塩濃度17%で45°Cの自己消化では、全窒素溶出は12日間を経過しても終了していなかった。分解液のpHは12日までは徐々に低下しており、多量の食塩と、このpH低下の双方がプロテアーゼ活性発現を緩慢にしたのであろう。ただし、全窒素溶出曲線は上昇傾向を示しているから、タンパク質を可溶化させるプロテイナーゼ活性は残存していると考えられる。

醤油のうま味の主成分といわれるグルタミン酸の溶出は、消化温度と食塩濃度の双方の影響を強く受けた。比較的低温がグルタミン酸の溶出に適しており、55°Cでは分解液中の食塩濃度が低濃度でもその溶出に著しい影響を与えることを示している。

45°Cで長時間にわたって自己消化した場合でも、グルタミン酸溶出量は食塩濃度が低いほど高かった。全窒素溶出量が45°C、8日間の消化で食塩濃度0%、5%、10%ではほぼ同一であったのに対し、同じ条件下におけるグルタミン酸溶出量は明確な差異を示していた。したがって、グルタミン酸の溶出に関する酵素はタンパク質を分解可溶化するプロテイナーゼとは機能が異なるペプチダーゼとグルタミナーゼであろう。ペプチダーゼの最適pHは5.0~8.0、最適温度は40~60°Cとされている¹⁸⁾。また、グルタミナーゼは最適pHが中性付近で温度は40~45°Cが最適とされている²⁰⁾。本研究では全窒素溶出の最適温度は60°Cであったのに対し、グルタミン酸溶出の最適温度は45~50°Cであった。グルタミン酸溶出の最適温度とグルタミナーゼの最適温度が一致し、その温度範囲はペプチダーゼの最適温度に含まれていた。ここからもプロテイナーゼ作用が直接グルタミン酸を溶出させるわけではないと考えられる。

醤油原料中から可溶化される全窒素量と、そこに大過

剰のグルタミナーゼが作用して溶出される最大グルタミン酸量の比率は0.885といわれている²¹⁾。食塩無添加の下で45°C、8日間の消化のその比率は0.845、55°C、2日の比率は0.867であった。したがって、食塩無添加の下ではプロテイナーゼによって可溶化された全窒素に含まれるグルタミンの大部分からグルタミン酸が遊離された計算となる。

醤油では高温、低pH下のグルタミンおよびグルタミン酸のピロ化が問題とされる²²⁾。本報告では酵素法でグルタミン酸の定量法を行った。最近、著者らが液体クロマトグラフィーで追試した食塩無添加の同種の実験では分析チャートにグルタミン酸の大きいピークが現われるがピログルタミン酸に相当するピークは極めて小さかった。これは、食塩無添加の下ではグルタミンのグルタミン酸への酵素的変換が速やかに行われ、グルタミンのピロ化が少ない結果と考えられる。

0%と5%区で還元糖溶出量が低い原因は、溶解した糖が酸の生成に消費されたのに加えて、酸生成に伴うpHの低下でアミラーゼが阻害されたからと考えられる。一方、10%区と17%区では消化8日から12日にかけても還元糖溶出量の増大が続いた。pHが適当であるならば、酵素活性は長時間にわたって維持されることを示している。

45°C区では糖はすみやかに酸へ変換した。この酸の主要部分を成すと考えられる乳酸量を測定したところ、滴定酸度Iが高い45°C区の3日間の消化のものは3.2%であったのに対し、滴定酸度Iが低い60°C区の3日のものは0.03%であった。乳酸は通常グルコース1分子から解糖系を経て2分子が生成される。ここで、45°C、3日の消化液中に存在していた糖は2.4%であったから、乳酸に変換された糖まで含めた全生成糖量は5.6%であった計算になる。同様の計算を60°C区でも行くと、全生成糖量は4.2%となる。この実験の製麹に使用した小麦量と汲水量は標準的な醤油醸造法に近似している。この原料割合で製造された標準的な醤油生揚げには還元糖が3%、アルコール1.8%、乳酸0.8%が含まれているとして、全生成糖量を計算すると7.4%程度になり、本実験で得られた結果を上回っている。一方で、消化時の食塩濃度が高いと還元糖生成量が8%を上回った。

醤油原料中のでん粉を麹の酵素を使って糖化するには、分解液のpHが麹菌のアミラーゼの最適pH4.9~5.2と一致するのが望ましい²³⁾。しかし、食塩無添加で乳酸生成の少ない55°C、60°Cの処理では消化液pHが5.8~6.1の範囲にとどまっていたし、酸生成の多い45°C、50°Cの処理ではpHが4.5以下にまで低下して

いた。乳酸生成による pH の低下ははじめの 1 日以内に起こっており、アミラーゼが有効に働く期間もその範囲であったとするのが妥当だと考える。

我々の経験では高濃度の食塩を未消化諸味液に溶解すると pH を中性よりも低めへと誘導する効果がある。この pH 低下作用が麹に由来するアミラーゼの最適 pH へと近づけて、糖の溶出を促進していると考えれば還元糖に関する結果全体を説明できる。

また、55℃、60℃ の両区で pH が徐々に低下した。両区で滴定酸度 I が徐々に増大しているのに加えて、グルタミン酸も経時的に増大した。この 2 種類の酸の増大が消化液の緩慢な pH 低下を誘導しているであろう。

滴定酸度 I が増大すれば pH が明らかに低下する。この滴定酸度 I の増加は乳酸の増大によるのであるから、消化液中に 50℃ で活発に増殖し、55℃ でもなお増殖し得る高温耐性乳酸菌の存在を示している²⁴⁾。

色は食塩濃度が低いほど濃化が進んだ。食塩濃度が低いほど全窒素が高いという条件が作用して分解生成物であるアミノ酸と糖が反応して色素へ変換したと考えられる。

要 約

醤油麹の高温自己消化を低食塩濃度下で行わせ、醤油のうま味の主成分であるグルタミン酸と、発酵基質である還元糖の生成について検討した。

1) 食塩無添加の醤油麹の自己消化では全窒素がはじめの 24 時間で急速に増大し、2 日ないし 3 日以内に溶出量が最大に達した。

2) 0.5~2% 程度の低濃度食塩が存在しても全窒素の溶出速度は低下した。

3) グルタミン酸の溶出量は自己消化濃度と食塩濃度の双方の影響を受けた。

4) グルタミン酸溶出には食塩無添加で 45~55℃ 消化が最適であった。この条件下でグルタミン酸/全窒素比は 0.867 が得られ、期待される最大値 (0.885) に近かった。

5) 消化液の食塩濃度が 10%, 17% の場合は pH がアミラーゼの最適 pH 付近に維持されたので、還元糖は多く溶出した。一方、食塩 0%, 5% の場合は pH がアミラーゼの最適 pH より高く、あるいは低かったので還元糖は少ない溶出だった。

おわりに、本研究を行うにあたり積極的にご支援を賜った武田食糧(株)武田辰男会長、武田与信社長および

故市川芳男専務に深謝致します。また、本研究の報告を許可された同社役員各位に、また討論に参加して下さいった志村嘉久氏、小野賢一氏、二宮英夫氏、鮎沢武四氏に謝辞を呈します。

文 献

- 1) 門脇 清：醤油の科学と技術，栃倉 辰六郎編，p. 122，日本醸造協会 (1988)
- 2) 堀津浩章，若園紘志，今井健策，河野克典，小沢一広，平野賢一，河合啓一：日本農芸化学大会講演要旨集，p. 486 (1986)
- 3) 濱田孝司，石山 孝，茂田井 宏：農化，62，614 (1988)
- 4) 小瀬古茂樹，久松 真，山田 哲也：農化，64，430 (1990)
- 5) キッコーマン(株)，栗田工業(株)：実践バイオリアクター，食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合編，p. 223，食品化学新聞社 (1990)
- 6) 正田醤油(株)，オリエンタル酵母工業(株)，日清エンジニアリング(株)：実践バイオリアクター，食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合編，p. 242，食品化学新聞社 (1990)
- 7) サンビン(株)，天野製菓(株)，日本車輛製造(株)：実践バイオリアクター，食品産業バイオリアクターシステム技術研究組合編，p. 270，食品化学新聞社 (1990)
- 8) 野田義治，大場和徳，楠田秀喜，中野正路：醬研，15，177 (1989)
- 9) ヤマサ醤油(株)：特公 昭 60-6183
- 10) キッコーマン(株)：特公 昭 55-33624
- 11) キッコーマン(株)：特公 昭 49-39840
- 12) キッコーマン(株)：特公 昭 55-39308
- 13) しょうゆ試験法編集委員会編：しょうゆ試験法，日本醤油研究所 (1985)
- 14) 井口信義，水沼武二：醸造学，大塚 謙一編著，p. 240，養賢堂 (1985)
- 15) 永瀬一郎：調味科学，18，(5) 167 (1971)
- 16) 小泉武夫：麴カビと麴の話，p. 18，光琳 (1984)
- 17) 大内弘造：微生物学辞典，日本微生物学協会編，p. 28，技報堂出版 (1989)
- 18) 那須野精一，中台忠信：醬研，3，309 (1977)
- 19) 寺田 勝，林 和也，水沼武二，茂木孝也：調味科学，20，(2) 23 (1973)
- 20) 四方日出男，安井卓男，石上有造，大森邦英：醬研，4，(2) 48 (1978)
- 21) 中台忠信：麴学，村上英也編著，p. 336，日本醸造協会 (1986)
- 22) 門脇 清：醤油の科学と技術，栃倉辰六郎編，p. 137，日本醸造協会 (1988)
- 23) 長谷川忠男，相澤孝亮，片岡栄子：食品酵素分子学概論・下，p. 35，地人書館 (1975)
- 24) 宮路 憲二：応用菌学・下巻，p. 224，岩波書店 (1967)