醤油香味成分に関する研究 (第 27 報)

トルラ属酵母による 4 EG 付香と品質評価

横塚 保, 浅尾保夫, 逆井利夫
(キッコーマン醤油株式会社中央研究所)

昭和 42 年 3 月 8 日 受 理

Studies of the Flavorous Substances in Shōyu Part XXVII. The Production of 4-Ethylguaiacol During Shōyu Fermentation, and Its Role for Shōyu Flavor

By Tamotsu YOKOTSUKA*, Yasuo ASAO and Toshio SAKASAI
Central Research Institute of Kikkoman Shōyu Co., Ltd.;
*Noda Institute for Scientific Research

4-Ethylguaiacol, one of the important flavorful components in shōyu, was microbiologically produced by *Torulopsis* species of halophilic yeast added during the process of shōyu fermentation. This component, however, was not produced in the mash fermented by *Saccharomyces rouxii*. It was cleared that the proportion of living cells of these two kinds of yeast grown in the mashes had the greatest effect on the amount of the component produced. On the other hand, numbers of shōyu having different content of *p*-ethylguaiacol, majorly including the ones on the market, were organoleptically compared with each other, and it was concluded that the concentration of 1.0 to 3.0 p.p.m. of the component gave the good results for the flavor of shōyu. (Received March 8, 1967)

I. 緒 言

著者らは, 早くから醤油香味成分としての 4-エチルグアヤコール (4 EG) の重要度を指摘してきたが⁽¹⁻⁴⁾, 前報⁽⁵⁾において, 該物質および同系列の 4-エチルフェノール (4 EP) がそれぞれ醤油麹成分, フェルラ酸, および *p*-クマル酸を基質として, トルラ属の酵母の醗酵過程で顕著に生成することを明らかにした。

また, この活性が同菌種に特異的なものであり, 醤油諸味の主醗酵を司る *Saccharomyces rouxii* をはじめとして, その他の種属の主な醤油酵母にはその活性のないことを証明し, この成分系がトルラ属の酵母の醗酵過程における付香活性の程度を知る上に格好な成分系であることを指摘した。

従来, トルラ属の酵母は醤油諸味の後熟期に活躍する酵母として知られており, 旧来方法すなわち醗酵期間の長い天然醗酵では当然その付香性が期待できるわけであるが, 近時醤油の醗酵法はその合理化により, あるいは醗酵期間が短縮され, あるいはその一部が半化学的製

品 (新式醤油) および化学的製品 (二次アミノ酸液) によりおき換えられる等, かなり変化していることが考えられるので, 必ずしもこの醗酵過程におけるトルラ属の酵母の付香活性が同一であるとは言えなくなってきたるように考えられる。

本報においては, このトルラ属の酵母による付香活性を有する製品の品質について, とくにその香味における意義を明確にする目的からその活性を検知し得る成分系のうち, その確認に有利であり, しかもそれ自体香味活性の点で重要な意味を有する 4 EG 含有量と品質評価との関係につき検討した。

II. 実験方法

1. 菌株ならびに醗酵母料の製造

4 EG 付香のための菌株としては, 既報⁽⁶⁾において著者が香味生成の点で優良株として検索分離し, *Torulopsis versatilis* (T) と同定した菌株を使用し, 比較対照試料調製のため, および醤油諸味の醗酵を促進せしめる菌株としては, 同じく検索菌株のうち *Saccharomyces*

rouxii (S) に属することが確認された菌株を使用した。

前者の T 酵母は既報の醗酵能による分類において醗酵速度はやや緩慢ではあるが最終醗酵率は良好な III 型に属し、後者の S 酵母は醗酵速度速く良好な醗酵率を示す I 型に属する菌株である。

この 2 種の菌株の醤油諸味醗酵のための母料は次のようにして調製した。すなわち、まず麴汁寒天斜面に保存した酵母を食塩 15% 含有麴汁培地に 1 白金耳接種し、30° にて S 酵母は 3 日間、T 酵母は 5 日間それぞれ試験管培養し、それぞれの 1 ml を内容 500 ml の振盪フラスコに予め調製せる生醤油培地 60 ml に接種し、同じく 30° にて 24 時間乃至 36 時間振盪培養して母料製造のための種培養液を調製した。

生醤油培地 (pH 5.0)

生 醬 油	100 ml	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.5 g
グルコース	70 g	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0.1 g
食 塩	83 g	酵母エキス	1.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g	水を加えて全量を 1 l とする	

次に内容 20 l のジャーフェーマンターを使用し、これに前記組成の生醤油培地 10 l を調製し、115°, 20 分間の滅菌処理をし、冷却後その 5% 量の前記種培養液を接種し、攪拌回転数 160~180 r. p. m., 通気量 5 l/min, 培養温度 30° の各条件下に培養して母料を製造した。この母料における生菌数は、その 1 ml 当り T 酵母は約 10 億、S 酵母は約 1 億に達し、それぞれ活性の強い母料を製造することができた。

2. 試験醗造

小規模の試験は元 0.3 kl 仕込で行ない、さらに元約 10 kl の実際の仕込規模に近いものについても行なった。方法としては通常の方法で仕込んだ諸味に、前項で調製した 2 種の酵母の醗酵母料を添加量、添加比率、および添加時期等を変えて添加して醗酵せしめ、生液汁を調製し、必要に応じてその一部を通常の方法で火入製成して製品を調製した。

元 0.3 kl の仕込における実施例を示すと、まず脱脂大豆約 90 kg に 130% 撒水して 1 時間放置後、13 lb にて約 40 分間蒸煮し放冷後、これに約 120 kg の小麦より調製せる割砕煎小麦を混合し、常法により種麴を撒布し製麴してから 25% 食塩水 333 l とともに仕込み、仕込後 10 日前後から約 2 カ月間諸味の品温を 28~30° に保ち、醗酵状態を円滑ならしめ、約 6 カ月間醸造してから圧搾し生液汁を調製した。

3. 分 析 法

i) 一般成分：基準醤油分析法⁽⁷⁾に従った。

ii) 4 EG：既報⁽⁶⁾のジアゾ誘導体としての分離検索法における薄層クロマトグラム (T. L. C.) の 4 EG 誘導体相当区分を薄層板よりかきとり、イソプロピルアルコールにて溶出し、アルカリ性下の特徴的紫色の呈色を光電比色計により比色定量した。すなわち、まず試料 100 ml をエーテルにて 48 時間連続抽出し、抽出部を分液漏斗に移し、少量の飽和重曹溶液と振盪してその強酸性部を除去し、残部の溶媒を溜去してから 10 ml の蒸溜水に転容し水蒸気蒸溜して溜液 200 ml をとり、これに 1 N 苛性ソーダ溶液 10 ml を加え、氷水中 5° 以下に冷却しておく。別に 0.7 g の *p*-ニトロアニリンを濃塩酸 3.2 ml および蒸溜水 10 ml に溶解、5° 以下に冷却、これに 1 N 亜硝酸ソーダ冷溶液 10 ml を加え、蒸溜水にて全量を 50 ml に満たして 0.1 N ジアゾ化試薬を調製し、その 2 ml を前記試料の冷アルカリ性溶液に加え 15~30 分間反応せしめた。次に反応液に少量の 50% 磷酸を加えて微弱酸性 (pH 6.0~7.0) とした後、全量を分液漏斗に移して再びエーテル 100 ml にて振盪抽出し、抽出部を脱水芒硝にて乾燥後濃縮し、その全量を予め常法により調製せる厚さ 0.25~0.5 mm の Kieselgel G 薄層板 (200×200 mm) の一端に幅約 10×40 mm の帯状に吸着せしめ、10% 酢酸ブチル含有モノクロルベンゼンを展開溶媒として展開してから、検出される 4 EG 誘導体区分を薄層板よりかきとり、試験管に移し、これに 95% イソプロピルアルコール 10 ml を加え抽出濾過し、濾液に 1 N 苛性ソーダ溶液 1~2 滴を加え、特徴的紫色

第 1 図 4 EG ジアゾ誘導体の吸光曲線

第4図 4 EG の検量線

の呈色を確認してから、その呈色液を厚さ 10 mm のセルにてその最大吸収波長 560 mμ において、光電比色計により比色定量した。

第1図には呈色液の最大吸収波長を、第2図には既報⁽¹⁾における合成試料を用いて作成した 4 EG の検量線を示した。

4. 品質評価

香味を主体とする官能検査により品質の評価を行なった。官能検査は主として当研究所の醤油製品の唸味試験に熟達せる者で構成した研究パネルが担当し、検査法としては採点法および三点試験法を試料の構成、ならびに検査目的に応じてそれぞれ適用した。

III. 実験結果

1. 回収試験による 4 EG 分析法の検討

本報において使用した 4 EG 分析法の回収試験を行なった。すなわち 4 EG の検出されない醤油生液汁に、合成的に得た 4 EG 標品を濃度を変えて添加し、分析して回収率を求めた。その結果は第1表に示したごとくで、濃度の低い 0.5 p.p.m. 以下の回収

第1表 4 EG の回収試験結果

試料 No.	4 EG 濃度 (p.p.m.)	4 EG 添加量 (γ)	吸光率 T (%)	吸光度 E_0	回収 4 EG (γ)	回収率 (%)
1	0.0	0	—	—	—	—
2	0.5	50	84.0	0.0754	34	68.0
3	1.0	100	63.0	0.2007	90	90.0
4	1.5	150	46.0	0.337	156	104.0
5	2.0	200	35.0	0.456	208	104.0

率は不良であるが、1 p.p.m. 以上では、本法により定量が可能であることが認められた。

2. 醸造過程における 4 EG の付香

まず小規模の元 0.3 kl 仕込の試験を次の 4 種の試験内容により実施した。

- S 酵母醗酵母料 6 l を仕込直後添加。
- T 酵母醗酵母料 6 l を仕込直後添加。
- S 酵母および T 酵母の母料 3 l ずつを仕込直後混合添加。
- (a) の仕込諸味において、S 酵母による醗酵末期 (40 日後) に T 酵母の母料 6 l 添加。

第3図に試験醗酵経過と 4 EG 生成の過程を示し、第2表にそれらの調製生液汁の一般成分および 4 EG の分析結果を示した。4 EG 生成能を有する T 酵母の母料添加の (b)~(d) の生液汁においては、いずれも 4 EG が付香され、予想どおり S 酵母単独添加の (a) の液汁においては 4 EG の付香は全く認めることができなかった。

また T 酵母の母料の添加時期については、仕込の初期

第3図 試験諸味の醗酵経過と 4 EG の生成
(a) ●, (b) ×, (c) ○, (d) △
—— 4 EG — - - アルコール (Alc.) 還元糖 (R-S)

第 2 表 試醸生醤油の分析結果

試料	食塩 (%)	総窒素 (%)	アミノ 態窒素 (%)	アンモニ ア態窒素 (%)	還元糖 (%)	アルコ ール (%)	総酸	pH	色沢	4 EG (p.p.m.)
(a)	17.80	1.644	0.731	0.249	2.60	2.52	1.84	5.20	430	0.0
(b)	17.80	1.635	0.713	0.267	2.89	2.49	2.29	4.80	400	3.0
(c)	17.90	1.635	0.754	0.247	2.52	2.63	1.89	5.15	400	3.0
(d)	17.70	1.614	0.774	0.248	2.42	2.75	1.89	5.10	400	1.3

ち、一般成分の分析値が比較的類似しており、しかも 4 EG 付香の点で対照的である (a) および (c) の液汁を第 3 表に示す。各種割合で混合

第 4 図 4 EG 生成酵母の添加時期と 4 EG の生成

○—○ 4 EG 生成 (酵母添加後 2 カ月後の分析)
 △—△ 4 EG 生成 (" 5 カ月後の分析)
 ●—● アルコール (Alc.) 生成 (代表例)
 ▲—▲ 還元糖 (R-S) 消費 (代表例)

に添加した (b) および (c) と S 酵母による醸酵末期に添加した (d) と比較した場合、前者の添加方法の方が 4 EG 付香程度が著しく、その付香活性への影響が認められた。そこで次にこの関係につき、実際の仕込の規模の試醸によりさらに検討した。すなわち、工場で実際に醸造されている経過日数の異った諸味のうち、未だ 4 EG の生成の認められない諸味を選び出し、それぞれに T 酵母の醸酵母料を元 kl 当り 4 l 添加し、添加後の 4 EG 生成につき検討した。

第 4 図に添加時期と 4 EG 生成量との関係を示したが、明らかに添加時期の付香程度への影響が認められ、4 EG 生成酵母を早い時期に添加するほど顕著な付香活性が認められた。

諸味主醸酵の初期での添加では、酵母添加後 2 カ月経過した状態で既にその活性が認められるのに対し、主醸酵後期以後での添加では、酵母添加後 5 カ月経過した状態でも、なおその活性を認めることができなかった。

3. 試醸製品の 4 EG 含有量と品質評価

前項で調製した元 0.3 kl 試醸の生液汁のう

し、そのままおよび火入調製した醤油製品につき官能検査を実施し、4 EG 含有量と品質評価との関係を求めた。

官能検査の方法としては、まず各種濃度の 4 EG 含有試料につき 3 点識別試験法により、4 EG を含有しない試料との識別の可否を求め、識別可能のパネルに対して試料に対する相対的品質評価を求めた。

その結果は第 3 表に示したごとくで、4 EG 含有量と識別の関係については、火入醤油より生液汁の方が低含有量での識別が可能であること、および 4 EG 含有量 1 p.p.m. 以上の試料については、火入醤油においても 4 EG を含有しない試料との識別が可能であることが明らかに認められた。その香調の差については 4 EG を含有しない試料がどちらかと言えば軽やかな香調であるのに対し、4 EG 含有試料は香調が重厚であることが指摘され、生液汁、火入製品ともに同系統の試料についてはほぼ同様の活性として受けとられること、および 4 EG 含有試料の方が品質的に良好であると判定される傾向が明らかに認められた。なお分析結果より、4 EG 含有生液汁を火入した際、遊離の 4 EG が明らかに倍増することが認められた。

3. 市販醤油の 4 EG 含有量と品質評価

昭和 39, 40, 41 年の 3 年間、年 1 回全国各地の主な

第 3 表 試醸醤油中の 4 EG 含有量と品質評価

生 液 汁								
試料 No.	混合比率 (%)		4 EG (p.p.m.)	パネル (名)	三点識別試験		品質評価	
	(a)	(c)			識別 可能	判定	判定 (良)	判定 (劣)
1	100	0	0.0					
2	80	20	0.4	10	4	×	2	2
3	60	40	0.8	10	7	○	6	1
4	40	60	1.2	10	7	○	6	1
火入醤油								
1	100	0	0.0					
2	80	20	1.0	10	5	×	3	2
3	60	40	2.0	10	7	○	5	2
4	40	60	3.0	10	8	○	6	2

第5図 市販醤油における 4EG 含有量と品質評価
 □ 4EG (-)
 ■ 4EG (+) 0.5 p. p. m. <

銘柄の市販醤油 50~70 点を集め 4EG 含有量を分析し、品質評価との関係につき検討した。

品質評価は試料が多数であるため 5 段階の採点法 (5 点: 非常に良い, 4 点: 良い, 3 点: 普通, 2 点: やや劣る, 1 点: 劣る) を採用し, その得点数および推選法を併用してベスト 10 を選出した。第 5 図に 4EG の分析結果と品質評価結果との関係をまとめて示した。

まず試料構成としては 4EG の検出されない試料が多く全体の約 75% を占め, 残りの 25% の試料に 4EG が検出された。しかしベスト 10 への入選率は逆に 4EG 含有試料の方がはるかに高く, とくに 39 年度の試験結果では, ベスト 10 に入選した試料のうち 9 点の試料において 4EG が検出された。4EG 含有試料における 4EG 含有量は 0.5~1 p. p. m. の試料がそのほとんどを占め, 最もその含有量の高いものでも 2 p. p. m. 程度であった。

4. 新式醤油中の 4EG

醤油類似製品である新式醤油につき, 4EG の含有の有無について同様の分析操作により検討した。第 6 図にその揮発性フェノール成分 (S. V. P.) ジアゾ誘導体の薄層クロマトグラムを 4EG 含有醸造醤油, および既知 S. V. P. のそれと対比して示したが, 新式醤油において

第6図 新式醤油フェノール成分ジアゾ誘導体の T. L. C.

(a) 空試験 (b) チロソール (対照) (c) 4EG (対照) (d) 醸造醤油 (e) 新式醤油
 着色帯: PY 淡黄色 Y 黄色 YO 黄橙色 Br 褐色 OR 濃橙色 V 濃紫色

固定相: Kieselgel G (Merck)

溶媒: 10% 酢酸ブチル含有モノクロルベンゼン

は 4EG 誘導体相当の着色帯は全く検出されず, チロソールに相当する着色帯が著しく検出されたのみであった。

IV. 考 察

(1) 4EG 付香活性を有するトルラ属の酵母の中で, 特にその生成香味の点で選択した優良菌株 *Torulopsis versatilis* に属する 1 菌株を使用して, 4EG を含有せる醸造醤油を調製し, その付香活性の意義につき検討したが, これは良品質の製品におけるその活性の意義を明らかにせんとしたからに他ならない。

(2) この 4EG 生成酵母の醸造母料添加による試験醸造において, その添加時期により 4EG 付香活性に顕著な差異が認められ, しかも諸味の主醸酵との関係において添加時期が遅れるほど, その付香活性が弱まる一定の関係が明らかとなったが, この現象は主醸酵をつかさどる *Saccharomyces rouxii* と, 添加酵母との共棲におけるバランスが, それぞれの活性, 特に添加酵母の活性に多大の影響を及ぼしていることを示す。

従来, 醤油諸味の熟成過程における酵母の遷移に関して 4EG 生産性のトルラ属の酵母は, 古い諸味より主として分離されるところから後熟酵母としてとりあつかわれているが, 本報の結果より, その付香活性の発現のためには諸味仕込初期における分布が重要であるように思

われる。

(3) 4 EG の付香で代表されるこのトルラ属の酵母の付香活性を有する試験製品が、その活性を有しない試験製品と比較して 4 EG 含量約 1~3 p. p. m. において明らかに識別され官能検査の結果でも良く判定されたが、この結果は醤油香味成分としての 4 EG の意義をより明確にするものと考えることができる。

(4) 4 EG 含有量と識別の関係については生液汁の方が火入製品より低含有量での識別が可能である傾向が定性的に認められたが、これは火入製品の火香を含めた香調の複雑性によるためと考えられる。

しかし、遊離の 4 EG は生液汁を火入することにより約 2 倍に増加することも同時に認められたので、同一試料における識別度はあまり差がなく、生液汁の官能検査の結果で、少なくともこの系の香味活性に関しては代表できるようにも思われる。また火入による遊離の 4 EG の増加は、既に著者らが既報⁽²⁾において指摘しているように、醸造過程において生成したフェノールエステル類の加水分解に起因するものと考えることができる。

(5) 全国各地の主要銘柄の市販醤油において、4 EG 含有製品は約 25% に過ぎず、残り 75% の製品には 4 EG が含有されていないことが認められたが、この結果は現在の市販製品の品質の一つの姿を示すものとして重要と考えられる。すなわちこの結果は醤油醸造法の合理化に伴い、我が国独特の製品として発達した大豆原料に小麦を加味して長期醸造される濃口醤油の香味の一つの特徴に、重大な変化が生じていることを示しているといえることができる。

品質評価と 4 EG 含有量との関係については、先の試験製品における結果と良く一致したが、39 年度における結果と比較し 40 年度、41 年度とその評価に多少の変化も認められ、4 EG を含有しない、どちらかといえば香調の軽やかな製品の増加に呼応した製造者および消費者の嗜好の変遷についても考慮する必要があるようにも思われる。

(6) 新式醤油には 4 EG を検出することができなかったが、その製造法と既に明らかにした 4 EG の生成機構と比較考慮すれば、この結果は当然のことと考えることができる。人為的に 4 EG の付香がなされていない時点においては 4 EG の検出がその製品の製造過程について、より天然醸造的であることを証明するようにも思われる。

(7) 著者らの経験によれば、化学合成した 4 EG、およびそのエステル類を醸造醤油に添加して香味を改良するよりも、本報告のごとく酵母の適正使用により 4 EG を生成せしめた試料の方が官能的に遙かに優っているように認められた。これは前者に伴いがちな不自然な合成臭による逆効果と、後者に伴う 4 EG 以外の 4 EP その他の総合された丸みのある香味の好影響等によるものと考えられる。

V. 要 約

(1) 生成香味の点で優良株として選択したトルラ属の酵母の 1 菌株を使用し、4 EG の付香された醸造醤油を調製した。

(2) その付香活性が、酵母の添加時期に著しく影響されることを明らかにした。

(3) 試験により調製した 4 EG 付香製品と、付香されていない製品とを官能検査により比較検討し、4 EG 含有量 1 p. p. m. 以上で明瞭な識別が可能であること、および約 1~3 p. p. m. の 4 EG 付香製品の品質の優位性を指摘した。

(4) 全国の主要銘柄の製品における 4 EG 含有量と品質評価との関係につき検討し、4 EG 含有製品は全体の約 25% に過ぎないこと、およびそれらの製品の品質の優位性を指摘した。

(5) 以上の結果より醤油香味成分としての 4 EG の意義につきその重要性を指摘し、若干の考察を加えた。

本稿の終りに臨み、本研究所に対し御懇篤な御指導を賜りました住木諭介、坂口謹一郎、両東大名誉教授に感謝いたします。また終始励ましの言葉をいただきましたキッコーマン醤油株式会社取締役茂木正利博士、ならびに本研究の発表を許可されましたキッコーマン醤油株式会社首脳部の方々に厚く御礼申し上げるとともに、実験に協力していただいた鹿島春海氏、田中輝男氏、金子行雄氏、斎間政子さん、さらに官能試験を担当していただいた当研究所パネル各位に対し深く感謝いたします。

(1) 横塚 保：本誌，27，276 (1953)。

(2) 横塚 保：本誌，27，334 (1953)。

(3) 横塚 保，住木諭介：特許 206436 号 (1954)。

(4) 横塚 保，住木諭介：特許 206437 号 (1954)。

(5) 浅尾保夫，逆井利夫，横塚 保：本誌，41，434 (1967)。

(6) 横塚 保，逆井利夫，浅尾保夫：本誌，41，428 (1967)。

(7) 日本醤油技術会編：基準醤油分析法 (1959)。