ノ ー ト

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi*
Vol. 58, No. 5, pp. 487~490, 1984]

醤油乳酸菌 *Pediococcus halophilus* の還元力と醤油諸味の酸化還元電位について

神戸千幸, 内田金治
(キッコーマン醸造科学研究所)

昭和 59 年 1 月 6 日 受 理

Reducing Activity of Soy *Pediococci*
(*Pediococcus halophilus*) and Oxidation-
Reduction Potentials of Soy Sauce Mash

Chiuyuki KANBE and Kinji UCHIDA
Soy Sauce Research Laboratories, Kikkoman
Corp., Noda 278

Changes in oxidation-reduction potentials (rH) of soy sauce mash (moromi) were investigated during lactic acid fermentation, in relation to the darkening phenomenon of the mash. A number of soy *pediococci* were examined for color-lightening ability in moromi-juice medium. The ability differed significantly among strains. Through brewing experiments, the color-lightening strains were shown to lower the rH of moromi and to maintain it under 6.0 during the working period. However, the color-darkening strains did not significantly lower the rH of moromi compared with the control, but kept it around 9.0 even during maximal growth. All strains were classified according to reducing activity, but did not differ much in other characteristics, such as sugar fermentation and decomposition of amino acids. In conclusion, the reducing activity of soy *pediococci* differed largely among strains, and the oxidation-reduction potentials of fermented soy sauce mash were strongly affected by the strain employed.

(Received January 6, 1984)

醤油醸造では 17~18% の食塩存在下に、麹菌 (*Aspergillus sojae* または *Asp. oryzae*) の諸酵素によるタンパクおよびデンプンの分解, 耐塩性乳酸菌 (*Pediococcus halophilus*) による乳酸発酵, 耐塩性酵母 (*Saccharomyces rouxii*, *Torulopsis* 属菌, その他) によるア

ルコール発酵と香気成分の生成が順次行われる。

諸味中における乳酸菌あるいは酵母の代謝には酸化還元反応も少なからず含まれており, 諸味の発酵過程を酸化還元電位 (Eh, rH) の面から検討してみることも重要である。最近, 相羽は醤油諸味の熟成に伴う Eh の変化を測定し, Eh が低くなるほど乳酸発酵が盛んで pH の低い諸味となることを報告している⁽¹⁾。

今回, 著者らは乳酸菌の酸化還元的性質と醤油醸造との関係を明らかにし, これを諸味管理に役立てる目的で, 諸味から分離した多数の醤油乳酸菌の還元力について調べた。その結果, 醤油乳酸菌は同じ通性嫌気性乳酸菌である *P. halophilus* に属しながら, 菌株により諸味中における酸化還元的挙動が著しく異なることを認めたので報告する。

実 験 方 法

1. 試料 酸化還元電位測定用の試料は, 当社工場において脱脂大豆と小麦より製麹した麴を, 食塩濃度が 17% (w/v) になるように実験室規模で仕込んだ諸味を用いた。

2. rH の測定 電位測定は東亜電波製 HM-18 ET 型 pH メーターに電位測定用電極 PC-115 を装着して室温で行い, 電極を挿入した試料容器をゆるやかに動かしながら最低電位 (mV) を記録した。測定時の諸味温度から Eh を求め, 別に測定した諸味 pH から rH を算出した⁽²⁾。なお, 高純度 N₂ ガス置換下に測定できるよう試作したミカエリス槽も試用したが, 諸味の rH 測定においては本装置使用の有無による電位の差は認められなかった。

3. 使用乳酸菌 基準株として *P. halophilus* type strain (Mees 株, KCRL 7129) のほか, 当研究所保存株を用いた。また, 当社工場の諸味より前報⁽³⁾に従い多数の菌株を分離して供試した。

4. MJ 培地 仕込後約 3 週間を経過した乳酸菌増殖前の醤油諸味より液汁を採取し, 食塩濃度 15% (w/v), pH 6.0 になるように蒸留水とカ性ソーダで調整する。このものをスタンダードスーパーセルで濾過した後, さらにミリポアフィルター (0.22 μm) で無菌濾過して得た天然培地。

5. MJ 培地の着色度の測定 培養液を遠心 (20,000 rpm, 15 分) して得た上澄液を蒸留水で適宜希釈後, 550 nm の吸光度をギルフォード分光光度計 Stasar III

(セル長 10 mm) にて測定した。

結果と考察

1. MJ 培地での培養試験 MJ 培地中で醬油乳酸菌を培養した場合、菌株により MJ 培地の色の濃淡に著しい差異が現れることが経験的に知られていた。このことを再確認し、この差が乳酸菌のいかなる性質によるものかを明らかにするため、保存株および新たに諸味より分離した約 500 株について MJ 培地での培養を行った。培養初発菌数をそろえるため各菌株を YPG 培地⁽⁴⁾で 3 日間予備培養し、綿栓したワッセルマン試験管 (15×105 mm) に分注した MJ 培地 (5 ml) に予備培養液 50 μ l を接種して、30°C、4 日間、静置培養を行い着色の程度を観察した。

その結果、同じ醬油乳酸菌でも菌株により MJ 培地の着色の程度に明らかな差異が認められた。約 500 株の醬油乳酸菌のうち最も淡色化の程度が顕著な 5 株 (No. 23, 34, 51, 1547, RP-8) と逆に濃色化が著しい 5 株 (No. 24, 65, 220, 325, 901) を選択し以下の実験に供した。なお、基準株の Mees 株は MJ 培地での生育が微弱であった。

次に、上記 10 株を MJ 培地で 7 日間培養したときの着色の経時的变化を Fig. 1 に示した。Fig. 1 から明らかなように、乳酸菌を接種しなかったコントロール区は着色の進行が速く、7 日目には初発の色の 2 倍以上に達した。また濃色株接種区もコントロールに比較するとその程度はかなり緩慢になるものの、やはり直線的な増色が認められた。一方、淡色株接種区では菌の生育が旺盛な 2～4 日目にかけて逆に脱色され、培養 4 日目には初発よりも約 15% 淡色化した。培養 7 日目における生成乳酸量は 0.9～1.2% (w/v)、pH は 4.5～4.6 と乳酸発酵の程度では菌株による差は認められなかった。このときの MJ 培地の色はコントロールを 100 とすると、濃色株接種区の平均が 69、淡色株接種区の平均が 44 となり、諸味液汁の増色はいずれの菌株の生育によってもかなり抑制はされるものの、その程度は菌株によって大幅に異なることが確認された。

2. 代表株 10 株の生理的諸性質について まず上記 10 株について前報⁽³⁾に従って分類学的試験を行った結果、すべて *P. halophilus* に属するものと判断された。次いで、内田の方法⁽⁵⁾に従って 6 種の糖類からの生酸性を調べた。また、アミノ酸ならびに有機酸の分解能につ

Fig. 1. Difference in Coloration of MJ-Medium Cultures Owing to the Strain Inoculated. Five ml of MJ-medium in a test tube (15×105 mm) inoculated with each strain was incubated at 30°C stationarily. The color was expressed as the absorbance at 550 nm. * Mean absorbance in each group. Percentages to the non-inoculated control was given in parenthesis.

いても調べ Table I に示した。Table I からわかるように、糖類発酵性では、MJ 培地を淡色化する 5 株あるいは濃色化する 5 株にそれぞれ共通する特徴は認められず、とくに MJ 培地の濃淡の差がキシロース、アラビノースなど諸味中に存在する褐変しやすい糖の消費能の差に基づくものではないことが明らかである。またアスパラギン酸の分解能は No. 34 株に、アルギニンの分解能は RP-8, No. 24, 65, 220, 901 に認められ、淡色化能とアミノ酸分解能との相関は認められなかった。一方、クエン酸分解は濃色株群がすべて強い分解活性を有しているのに対し、淡色株群は No. 23, 34, RP-8 の 3 株には分解活性が全く認められず、No. 51, 1547 株にはわずかな分解活性は認められたものの、その程度は弱いものであった。MJ 培地の淡色化能とクエン酸分解能との間には何らかの関係があることも予想される。

3. 代表株 10 株の諸味 rH 経過パターン 上記代表 10 株を用い実験室規模での仕込試験を行った。YPG

Table I. Some Physiological Properties of the Selected Ten Strains of Soy *Pediococci*

Strain	Fermtn. of carbohydrate ^a						Decomposition of amino acid ^b		Decomposition of organic acid ^c	
	A	L	B	S	M	X	Asp	Arg	Mal.	Cit.
23	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
34	+	—	+	+	—	—	+	—	—	—
51	—	—	—	—	+	—	—	—	+	± ^d
1547	—	—	—	—	+	—	—	—	+	±
RP-8	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—
24	+	—	—	—	—	—	—	+	+	++
65	—	+	+	—	—	—	—	+	+	++
220	—	+	+	—	—	—	—	+	+	++
325	+	—	+	—	—	—	—	—	+	++
901	—	—	+	—	—	—	—	+	+	++

^a A, denotes arabinose; L, lactose; B, melibiose; S, sorbitol; M, mannitol and X, xylose; respectively.

^b Asp represents aspartic acid and Arg arginine, respectively.

^c Mal. represents malic acid and Cit. citric acid, respectively.

^d ± denotes slightly positive.

培地で培養した乳酸菌培養液を仕込翌日に 1×10^5 /gの生菌数となるように諸味に添加し、仕込後2週間は 15°C 、その後 30°C にて経過させた。諸味 rH の経時変化を

Fig. 2. Time Course of rH in Test-Brewed Moromi Inoculated with the Light- or Dark-Coloring Soy *Pediococci*. 10^5 /g of each strain was inoculated at the start. Each batch was incubated at 15°C for earlier 2 weeks, then at 30°C . Yeast was not added. ●, No. 24, 65, 220, 325 and 901 strains. No detectable growth of soy *pediococcus* was observed in the control moromi.

Fig. 2 に示した。なお、コントロールとして乳酸菌無接種区をおいたが、当然のことながら本区には乳酸菌活動はまったく認められないことを確認した。また、個々の乳酸菌株による rH 変化の差を精度よくみることを目的としたため、酵母添加は行わなかった。Fig. 2 から明らかのように、濃色株はいずれも諸味の rH を急激に下げることなく $\text{rH} > 8.5$ で推移し、この rH 経過パターンは乳酸菌活動のまったく起っていないコントロール区のパターンとほぼ一致していた。一方、淡色株は諸味温度が上がり増殖が活発になるにつれて諸味の電位を 6 以下に低下させた。淡色株の場合は、個々の菌株によって最低電位あるいは低電位の持続期間が異なっており、とくに RP-8, 1547 株などは低電位を長く持続する株であった。以上の結果より、濃色株はいずれも諸味の rH を高く保ち、比較的酸化的状態で推移させ、反対に淡色株は例外なく諸味の rH を低下させ、より還元的な状態にすることが明らかとなった。

最近になって、醤油乳酸菌が多種多様であり⁽⁵⁾、諸味中での役割りも予想以上に多岐にわたっていることが明らかになってきた⁽⁶⁻⁸⁾。今回の結果から、醤油乳酸菌の果たす機能の一つに還元作用があるが、その能力も菌株間で大幅に異なっていることが見出された。MJ 培地で醤油乳酸菌を培養すると淡色株接種区では培地の脱色が観察されたが、これは乳酸菌の還元作用によるものと思われる。また、データには示さなかったが空気（酸素）の供給量を変えた MJ 培地での培養試験も実施し

た。その結果、MJ 培地を N_2 ガスで置換して酸素非存在下で培養した場合にも菌株間での色の差は認められたが、その程度は空气中綿栓培養時に比べ数分の一に減少した。さらに酸素の供給量を増すにつれて菌株間での濃淡の差も大きくなった。酸素による醤油の着色促進作用⁽⁹⁾はよく知られているが、淡色株による着色抑制効果が酸素存在下でより顕著であるという事実は、本菌の還元力が酸素による褐変を小さく抑えていることを示唆している。

また、淡色株が諸味に生育した場合、rH の急激な低下が認められたが、この還元力の成因については現在のところ明らかではない。*P. halophilus* は EMP 経路によってグルコースを代謝するホモ型乳酸球菌とされており、電子 (e^-) を与える系が triose phosphate 酸化系、 e^- を受けとる系が pyruvate/lactate 系という供与系と受容系が一つずつの単純系によってしかエネルギー代謝を行えないとすれば、余分な還元力が生成してくる余地はない。乳酸発酵期の醤油諸味には、グルコース以外にも各種の糖⁽¹⁰⁾、有機酸⁽³⁾等、種々の炭素源が著量含まれており、EMP 経路以外の側路あるいは有機酸代謝等によって還元力が生成されていることも考えられる。いずれにしても、菌株間の差と合わせて、本菌の還元力がいかなる酵素系より生じているかは、今後に残された問

題である。また、*Pediococcus* のほか *Streptococcus*, *Leuconostoc* を含むいわゆる乳酸球菌で同一種でありながら、菌株によって還元力に大幅な差があることを報告している例は、ほとんど知られていない。

終りにのぞみ、ご指導、ご鞭撻を賜りました当社、吉田文彦常務、水沼武二醸造科学研究所長、小沢善徳博士に深謝いたします。また、実験に協力された町田邦子嬢に感謝いたします。

- (1) 相羽富夫：日本醤油研究所雑誌，2，252(1976)。
- (2) 本江元吉：醸協誌，33，398 (1975)。
- (3) 神戸千幸，岩浅 孝，逆井利夫：農化，52，329 (1978)。
- (4) 神戸千幸，内田金治：農化，57，1211 (1983)。
- (5) K. Uchida : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 28, 215 (1982)。
- (6) 藤元秀雄：日本醤油研究所雑誌，8，260(1982)。
- (7) 内田金治，神戸千幸：日本農芸化学会昭和 55 年度大会講演要旨集，福岡 1980，p.163。
- (8) C. Kanbe, K. Uchida : *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2357 (1982)。
- (9) H. Hashiba : *J. Agric. Food Chem.*, 24, 70 (1976)。
- (10) 神戸千幸，牛島重臣，内田金治：食工誌，28，528 (1981)。