

# バイオリアクターによる醤油製造法の研究

## 第2報 麹分解液による醸造条件の検討

小瀬古茂樹\*・久松 眞・山田 哲也

三重大学生物資源学部食品化学研究室, \*サンジルス醸造株式会社

## Studies on Soy-sauce Production by Bioreactor

### Part 2 Studies on Fermentation Condition with Koji hydrolyzate

Shigeki KOSEKO\*, Makoto HISAMATSU and Tetsuya YAMADA

Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, 514,  
Japan, \*Sanjirushi Corporation

#### Summary

Soy sauce production from Koji-hydrolyzate by a bioreactor system was studied. The bioreactor system was constructed from three glass columns (the volume of each column was 1L) with a water jacket, and each column was equipped with a honeycomb ceramic on which *Pediococcus halophilus*, *Zygosaccharomyces rouxii* or *Candida versatilis*, respectively, was previously fixed.

As the results of operation of single-column bioreactors under the condition of holding reaction time between 30 h and 100 h, 0.9% (w/v) of lactic acid was produced through the column of *P. halophilus*, 1.9% ethanol and 20 ppm 2-phenylethanol through the column of *Z. rouxii* and 1.8% ethanol and 2.4 ppm 4-ethylguaiaicol through the column of *C. versatilis*. The aeration rate was determined as 0.088 vvm to the column of *Z. rouxii* and 0.10 vvm to the column of *C. versatilis*, respectively, from the result of alcohol fermentation.

During the operation period, the wash-out cell number from the bioreactor was stable ( $10^7 - 10^8$  cell/ml).

Operation of the bioreactor system constructed from the three column was continually performed over two months and gave good results in both the production of alcohol and the aroma, even though the quality of the soy sauce was not excellent.

The above results show that this bioreactor system can shorten the period of the soy sauce fermentation from 6 months to 2 weeks (one week for preparation of Koji-hydrolyzate, and one week for fermentation).

**Key words:** Soy sauce, Bioreactor, 2-phenylethanol, 4-ethylguaiaicol

#### 緒 言

近年、バイオリアクターの利用により反応の連続化、

酵素、微生物の反復利用、自動制御の簡便化、反応時間の短縮等の利点から、醤油、ビール、ワイン、食酢等の食品製造へのバイオリアクターの研究<sup>1-3)</sup>、実用化が活発に行われている。特に醤油醸造に於いては、発酵、熟成まで6カ月の長期間を要するためバイオリアクターの

利用は、効果的であると考えられた。従来の醤油製造工程<sup>4)</sup>は、製麴、仕込、製の三段階からなっている。製麴は、蒸煮した脱脂大豆と炒煎小麦に *Aspergillus soja* または、*Aspergillus oryza* の胞子を混合し2日間培養する。仕込は諸味を作る為、高濃度食塩水と麴とを混合し麴菌酵素による加水分解を受けさせ、タンパク質はアミノ酸、低分子ペプチドに、デンプンはグルコースに分解させる。そして乳酸菌 *Pediococcus halophilus* 等による乳酸発酵、主発酵酵母と呼ばれる *Zygosaccharomyces rouxii*、後発酵酵母と呼ばれる *Candida versatilis* 等による発酵、熟成が行われる。製成は熟成諸味を圧搾、濾過後成分調整する。これを加熱殺菌し、おり引きした醤油を得ることを製成という。この従来の製造法では諸味の発酵、熟成工程に醸造期間の大部分（6カ月間）が占められている。この工程に微生物を固定化したバイオリアクターを利用することにより大幅な醸造期間の短縮が期待され、また、使用する微生物が3種類と少ないため発酵のコントロールが容易になると考えられた。本研究では、前報<sup>5)</sup>と同様にセラミックハニカムを固定化担体とするバイオリアクターを利用して醤油様調味液製造法について検討した。第一段階として醤油麴分解液を用いて乳酸菌 (*Pediococcus halophilus*) 固定化バイオリアクターによる乳酸発酵を行い、次に第二段階として得られた発酵液を酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida versatilis*) 固定化バイオリアクターによるアルコール発酵を行い、各々の連続運転による発酵経過、発酵条件の検討及び発酵調味液の製造を試みた。尚、バイオリアクターによる醤油の製造法で得られた発酵液は、現行の日本農林規格 (JAS) の醤油の定義にある熟成工程が殆ど行われていないため醤油の規格に適合しない可能性がある。従って、ここで得られた発酵液を敢えて醤油様調味液と呼ぶこととした。

## 実験方法

### 1. 麴分解液の調製

麴は、サンジシ醸造株式会社の第一製麴工場で作られた麴を使用した。麴2kgに食塩水を2倍量加え最終食塩濃度が10%となるように調整し、この諸味を43°C、4日間攪はん分解した。分解諸味は、圧搾と遠心分離 (8000 rpm, 20 min) により固液分離を行い、上澄み液は

さらに80°C、達温処理し低温室で3日間おり下げを行った。この分解液は、さらに遠心分離 (8000 rpm, 20 min) により“おり”を除去し、この上澄み液を食塩濃度12.0~12.5%に調整後、麴分解液として用いた。

### 2. バイオリアクターの構成及び菌体の固定化

前報<sup>5)</sup>で使用したバイオリアクターの他に直径40mm、高さ1mの円筒型ガラスカラムにセラミックハニカムを充填したリアクターを用いた。また使用した菌株は、耐塩性乳酸菌 *Pediococcus halophilus*、耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida versatilis* の三種類を使用し各々をリアクターに固定化した。固定化方法は前報<sup>4)</sup>に準拠した。

### 3. 醤油中揮発性成分の分析

醤油中揮発性フェノール成分 (2-phenylethanol, 4-ethylguaiacol, 4-ethylphenol) の定量及び揮発成分のパターン分析はガスクロマトグラフィーにより行った。

試料の調整 (酢酸メチル法<sup>6)</sup>) : スクリューキャップ付き試験管に食塩1g、醤油5ml、酢酸メチル2mlを加え、試験管振とう機に掛け10分間振とう抽出を行った。次に5°Cで遠心分離を行い、分離した酢酸メチル層を分取した。残る醤油層に酢酸メチル1mlを加え1回目と同様に振とう抽出、遠心分離を行い酢酸メチル層を分取した。この操作をさらに3回行い酢酸メチル層を集め、これに内部標準物質 2, 3, 5-トリメチルフェノール (2, 3, 5-trimethylphenol) を加え全量を10mlとしG.Cサンプルとした。G.C条件は以下に各々示した。

#### G.C条件

##### 1) Gas Chromatograph: YANAKO G-180

Sample: 2 $\mu$ l. Column: stainless column  $\phi$  3 mm  $\times$  3 m. Column packing: Thermon 3000 5%, Uniport HP. Inj temp: 300°C. Column Initial: 180°C. Carrier Gas (N<sub>2</sub>): 2.6 kg/cm<sup>2</sup>. Fuel Gas (H<sub>2</sub>): 0.6 kg/cm<sup>2</sup>. Air: 0.5 kg/cm<sup>2</sup>. Detector: FID.

##### 2) Gas Chromatograph: YANAKO G-3800

Sample: 1 $\mu$ l. Column: Quadrex "007" BONDED Fused Silica Capillary Column  $\phi$  0.25 mm  $\times$  25 m. Column packing: PEG 20M. Inj temp: 200°C. Column Initial: 50°C. Column Final: 200°C. Carrier Gas (He): 1.2 kg/cm<sup>2</sup>. Fuel Gas (H<sub>2</sub>):

0.6 kg/cm<sup>2</sup>. Air: 0.5 kg/cm<sup>2</sup>. Detector: FID.

4. 分析方法

バイオリアクター流出液中の酵母菌濃度, 糖, アルコール, 乳酸の定量及び一般分析は前報<sup>5)</sup>に準拠した。アミノ酸分析は, 日本分光のアミノ酸自動分析システムを使用した。検出方法は OPA (オルトフタルアルデヒド) による蛍光検出法で行った。有機酸分析は, 日本分光の有機酸分析システムを使用した。検出方法は pH 指示薬 BTB (プロモチモールブルー) を使用したポストカラム誘導体化法による検出法で行った。

5. 官能検査

官能検査は, 醤油醸造会社技術部員10名に依頼し, 3段階評価法により行った。

1: 良 2: 普通 3: 悪い

結 果

1. 滞留時間の影響

耐塩性乳酸菌 *P. halophilus* を固定化したバイオリアクターにおいて滞留時間30時間から115時間で乳酸発酵させた結果を Fig. 1 に示した。総乳酸生成量は0.83%から0.92% (w/v) となった。醤油麹分解液中の乳酸量

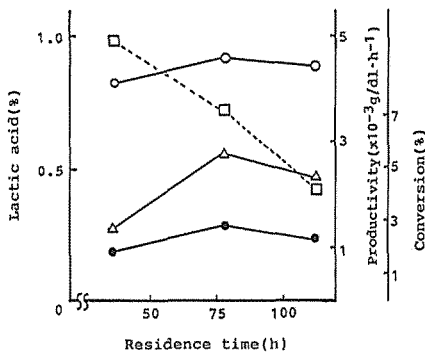


Fig. 1 Residence time effect of *Pediococcus halophilus* on lactic acid production.

Reactor: cylinder type (φ 40 mm×400 mm)  
Temp: 30°C  
○: total acid (w/v%).  
●: lactic acid by fermentation (w/v%).  
□: productivity (×10<sup>3</sup> g/dl·h<sup>-1</sup>).  
△: conversion (%).

を差し引いた実質の乳酸生成量は0.18%~0.28%となり, このときの反応率は2.7%~5.6%, 生成速度は0.049~0.021 g/dl·h であった。次に酵母 *Z. rouxii* を固定化したバイオリアクターを滞留時間34時間から91時間で運転したときの影響を Fig. 2 に示した。エタノール生成量は, 滞留時間40時間から66時間までは約1.9%と安定に発酵しそれ以上では徐々に生成量が増し91時間で最大2.15%生成した。又, グルコースのエタノールへの変換率は47%~53%, 生成速度は0.050~0.024 g/dl·h, 流出液中の酵母生菌数は10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> cell/ml であった。滞留時間34時間から82時間において *Z. rouxii* の特異香とされる2-フェニルエタノール (2-phenylethanol) の生成量は滞留時間52時間まで徐々に増加し, それ以降安定となり19.8 ppm~22.5 ppmの範囲であった。別に醤油醸造において後熟酵母と称される *C. versatilis* を固定化したバイオリアクターの滞留時間16時間から48時間までの発酵経過を Fig. 3 に示した。エタノールの生成量は滞留時間16時間から42時間の間で1.64%~1.84%と徐々に増加し以後安定であった。変換率は56%~60%, 生成速度は0.110~0.037 g/dl·h であった。流出液中の酵母生菌数は10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> cell/ml と安定であった。また, 滞留時間22時間から48時間での *C. versatilis* の特異香とされる

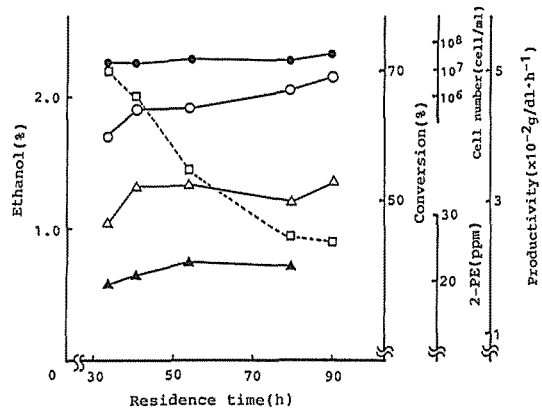


Fig. 2 Residence time effect of *Zygosaccharomyces rouxii* on alcohol production and aroma formation.

Reactor: cylinder type (φ 40 mm×400 mm)  
Air flow rate: 0.074~0.086 vvm  
Temp: 30°C  
○: alcohol concn (w/v%). △: conversion (%).  
▲: 2 phenylethanol concn (ppm).  
●: viable cell (cell/ml).  
□: productivity (×10<sup>-2</sup> g/dl·h<sup>-1</sup>).

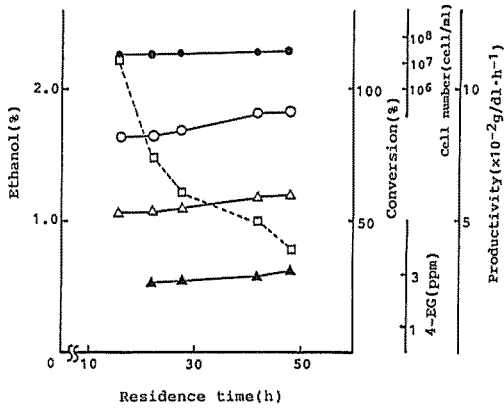


Fig. 3 Residence time effect of *Candida versatilis* on alcohol production and aroma formation.

Reactor: cylinder type ( $\phi$  40 mm  $\times$  400 mm)  
Air flow rate: 0.098~0.121 vvm  
Temp: 28°C

- : alcohol concn (w/v%).
- △: conversion (%).
- ▲: 4-ethylguaicol concn (ppm).
- : viable cell (cell/ml).
- : productivity ( $\times 10^{-2}$  g/dl·h<sup>-1</sup>).

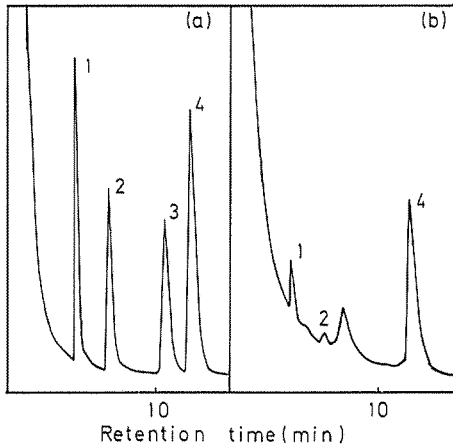


Fig. 4 Gas chromatogram of aroma component.

A: standard. B: commercial soy sauce.  
chromatographic conditions.

column: stainless column  $\phi$  3 mm  $\times$  3 m.  
column packing: Thermon 3000 5% Uniport HP.  
inj temp: 300°C. oven temp: 180°C.  
carrier gas (N<sub>2</sub>): 2.6 kg/cm<sup>2</sup>. detector: FID.

peak 1: 2-phenylethanol, peak 2: 4-ethylguaicol, peak 3: 4-ethylphenol, peak 4: ISTD (2, 3, 5-trimethylphenol).

4-エチルグアヤコール (4-ethylguaicol) の生成量は 2.4 ppm~3.2 ppm であった。2-フェニルエタノール, 4-エチルグアヤコールの分離定量のクロマトグラムは Fig. 4 に示した。次に各々のバイオリアクターにおいて滞留時間による有機酸量の変化を Fig. 5 (a) (b) (c) に示した。(a) の *P. halophilus* の固定化バイオリアクターでは乳酸の増加以外に、滞留時間30時間から50時間においてピログルタミン酸が少し増加した。(b) *Z. rouxii* のバイオリアクターではクエン酸が徐々に増加し、(c) *C. versatilis* のバイオリアクターでは有機酸量は一定であった。

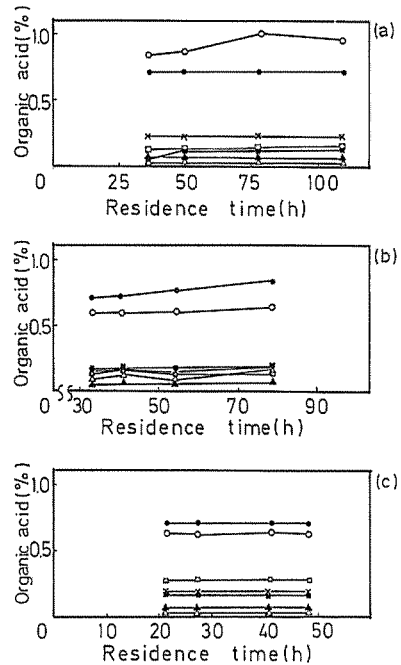


Fig. 5 Fractuation of organic acids during operation proces.

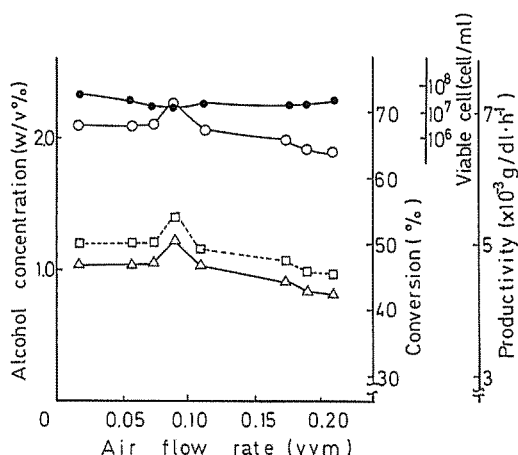
(a) *P. halophilus* (b) *Z. rouxii* (c) *C. versatilis*.

- : citric acid.
- : lactic acid.
- : acetic acid.
- △: formic acid.
- ▲: succinic acid.
- : pyroglutamic acid.
- ×: malic acid.

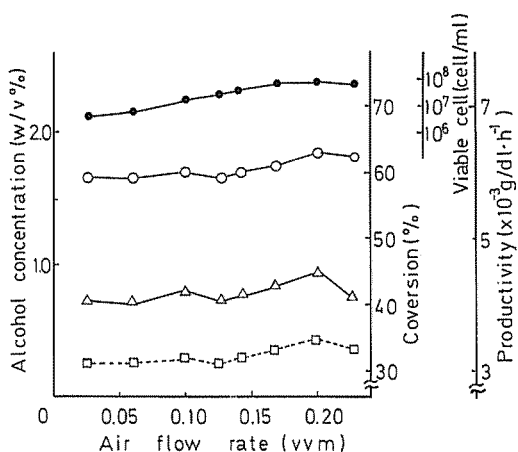
## 2. 通気量の影響

酵母 *Z. rouxii* を固定化したバイオリアクターにおいて滞留時間を一定とし通気量を 0.017 vvm~0.210 vvm と変化させた時の通気量による影響を Fig. 6 に示した。流出液中の酵母生菌数は通気量が多くなるに連れ減少し、

0.074 vvm 以降は  $2 \times 10^7$  cell/ml と比較的安定であった。又、通気量が 0.074 vvm~0.088 vvm の時エタノール生成量が 2.1% から 2.26% へと増加した。従って通気量は



**Fig. 6** Effect of aeration on alcohol product by *Z. rouxii*.  
 Reactor: cylinder type ( $\phi$  40 mm $\times$ 400 mm)  
 Residence time: 41.67 h  
 Temp: 30°C  
 ○: alcohol concn (w/v%). △: conversion (%).  
 ●: viable cell (cell/ml).  
 □: productivity ( $\times 10^{-3}$  g/dl $\cdot$ h $^{-1}$ ).

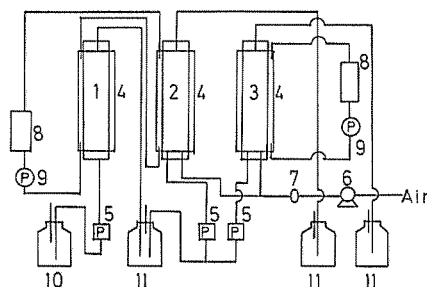


**Fig. 7** Effect of aeration on alcohol product by *C. versatilis*.  
 Reactor: cylinder type ( $\phi$  40 mm $\times$ 400 mm)  
 Residence time: 43.03 h  
 Temp: 28°C  
 ○: alcohol concn (w/v%). △: conversion (%).  
 ●: viable cell (cell/ml).  
 □: productivity ( $\times 10^{-3}$  g/dl $\cdot$ h $^{-1}$ ).

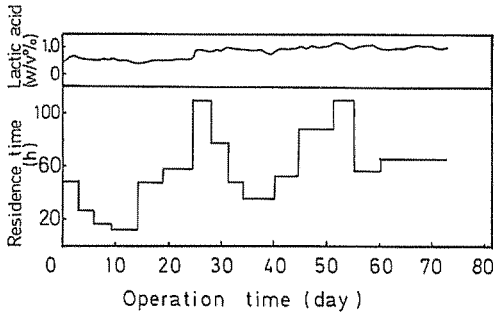
0.08 vvm で行うこととした。同様に *C. versatilis* の固定化バイオリアクターでの通気量の影響を調べた結果を Fig. 7 に示した。通気量は 0.025 vvm~0.228 vvm まで変化させた。エタノール生成量は通気量の増加に伴い増加し、流出液中の酵母生菌数も徐々に増加した。しかし酵母のアルコール発酵と通気量との関係は負の相関にある事から *Z. rouxii* 同様に通気量は、以後 0.088 vvm で行うこととした。又、0.200 vvm 以上では気泡によるリアクター内液の排出が生じた。

### 3. 醤油麹分解液の連続発酵

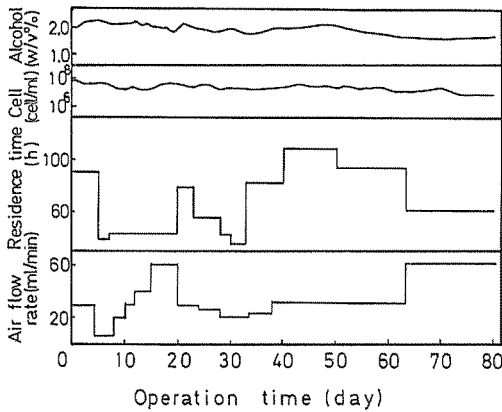
麹分解液を殺菌後、稼働容量 1 L の 3 本のバイオリアクターを使用して約 80 日間連続発酵を行った。発酵液のフローは最初に乳酸発酵させ、この発酵液を 2 種の酵母のカラムに並列に送液し発酵させた。Fig. 8 にそのシステムを示した。*P. halophilus* を固定化させたバイオリアクターは Fig. 9 に示した。30°C で連続運転し滞留時間 40 時間から 110 時間において、乳酸は 8 g/l~1.2 g/l 生産された。*Z. rouxii* の固定化バイオリアクターでの経過は Fig. 10 に示した。滞留時間 40 時間~110 時間で連続運転したときアルコールは平均 1.9% 得られ、流出菌体量は  $1 \times 10^7$ ~ $5 \times 10^7$  cell/ml であり、*C. versatilis* の固定化バイオリアクターは、Fig. 11 に示す様に滞留時間 20 時間~110 時間で運転したときアルコールは平均 1.8%、流出菌体量は平均  $2 \times 10^7$  cell/ml であった。



**Fig. 8** Schematic diagram of the reactor system.  
 1: ceramic honeycomb reactor with immobilized *P. halophilus*. 2: ceramic honeycomb reactor with immobilized *Z. rouxii*. 3: ceramic honeycomb reactor with immobilized *C. versatilis*. 4: water jacket. 5: peristaltic pump. 6: air compressor. 7: airfilter. 8: warm water pool. 9: pump. 10: Koji hydrolyzate stock vessel. 11: harvest tank.



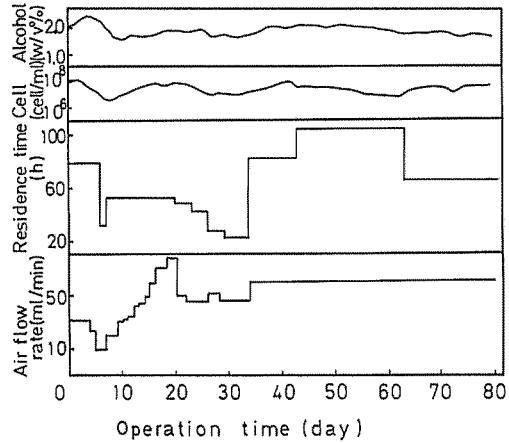
**Fig. 9** Effect of Koji hydrolyzate flow rate on lactic acid production by *P. halophilus*  
 Reactor: cylinder type ( $\phi$  40 mm  $\times$  400 mm).  
 Temp: 30°C



**Fig. 10** Effect of Koji hydrolyzate flow rate on alcohol production by *Z. rouxii*.  
 Reactor: cylinder type ( $\phi$  40 mm  $\times$  400 mm).  
 Temp: 30°C

4. 発酵液の分析

80日に及ぶ連続発酵中の経過分析を Table. 1 に示した。15日、22日の全窒素、ホルモール態窒素が不安定なのは、発酵液中におりの析出が見られたことより発酵原液の分解不十分による調製不良であったと考えられた。30日以後は発酵液の全窒素、ホルモール態窒素、酸度1、酸度2は安定であり、乳酸は0.3%~0.4%得られ、アルコールは1.6%~2.0%得られた。又、市販醤油と発酵液とを比較すると食塩濃度が異なる以外に色調が2倍近く異なった。他の成分については市販醤油と類似していた。アミノ酸組成は、Table. 2 に示した。発酵液は市販醤油に比べセリンは 135 mg/dl、リジンは 85 mg/dl、プロリンは 80 mg/dl と少なく、逆にアルギニンは 100 mg/dl 多



**Fig. 11** Effect of Koji hydrolyzate flow rate on alcohol production by *C. versatilis*.  
 Reactor: cylinder type ( $\phi$  40 mm  $\times$  400 mm).  
 Temp: 28°C

く含まれていた。呈味成分であるグルタミン酸は 645~695 mg/dl とほぼ同じであった。成分組成 (%) も同様の傾向を示している。同様に有機酸組成について Table. 3 に示した。また、市販醤油と発酵液の有機酸のクロマトグラムを Fig. 12 に示した。発酵液は、市販醤油に比べクエン酸約 3.4 g/l、ピログルタミン酸約 5 g/l 少なかった。次に発酵液の芳香成分のパターンを Fig. 13. 14. 15 に示した。発酵液 C と Z のクロマトグラムはほぼ同様のパターンを示しているが、市販醤油のそれと比較すると最初から12分迄と20分から32分迄の間でパターンがかなり異なっている。

考 察

醤油醸造工程においては、醤油諸味の発酵と熟成工程におよそ6か月間を必要としている。そこで醤油製造の合理化、それに伴うランニングコストの低下、発酵制御を容易に行う事などを目的とし固定化バイオリアクターによる醤油の製造法について検討した。しかし、本方法では、日本農林規格の醤油の定義にある『熟成』は行っていないので醤油様調味液と呼ぶ事とした。固定化担体は、セラミックハニカムを使用した。そして固定化酵母増殖のために通気するが、そのとき気泡による閉塞をなくするためにセラミックハニカムの中心部に穴を開け通気を促進し、同時に気泡によるリアクター内液の対流を

Table 1 Analytical results of fermentation product of Koji-hydrolyzate by the triple compound bioreactor system.

Day lapsed	Sample location	Total nitrogen (w/v%)	pH	Acidity 1	Acidity 2	Formol nitrogen (w/v%)	Sodium chloride (w/v%)	Residual glucose (w/v%)	Alcohol (w/v%)	Lactic acid (w/v%)	Exis	Color
15	F	1.60	4.98	NM	NM	0.82	11.23	8.56	0.05	0.22	NM	NM
	P	1.51	4.88	NM	NM	0.80	11.46	6.18	0.06	0.51	NM	NM
	Z	1.55	4.91	NM	NM	0.78	11.27	2.60	1.88	0.52	NM	NM
	C	1.42	4.90	NM	NM	0.75	11.27	5.41	1.35	0.45	NM	NM
22	P	1.65	5.03	10.27	10.56	0.92	12.09	4.30	0.04	0.60	NM	NM
	Z	1.41	4.92	9.60	9.95	0.69	12.44	1.90	2.21	0.58	NM	NM
	C	1.45	4.88	10.17	9.16	0.74	12.81	1.42	1.91	0.55	NM	NM
	F	1.73	5.02	10.55	11.42	0.84	11.62	5.68	0.07	0.56	20.98	7
30	P	1.64	5.04	10.53	11.04	0.93	11.77	5.19	0.06	0.85	21.03	7
	Z	1.64	4.97	11.09	11.19	0.85	12.80	2.03	1.90	0.89	18.40	11×2
	C	1.66	4.92	11.58	10.88	0.86	12.67	2.20	1.72	0.88	18.73	7×2
	P	1.69	4.98	10.99	11.40	0.88	11.86	5.53	0.02	0.85	20.94	3
46	Z	1.65	4.97	11.23	11.50	0.83	12.28	1.25	1.88	0.93	18.72	7×2
	C	1.62	4.94	11.56	11.62	0.85	12.20	1.25	1.93	0.81	18.40	3×2
	P	1.70	4.98	11.03	11.78	0.89	11.84	4.97	0.01	0.86	21.16	3
	Z	1.68	4.97	10.87	11.50	0.89	12.39	1.51	2.00	0.96	19.01	7×2
63	C	1.69	4.91	12.02	11.76	0.89	12.44	1.21	1.89	0.82	18.36	3×2
	P	1.71	5.00	11.09	12.10	0.87	11.91	4.84	0.01	0.91	20.89	3
	Z	1.69	4.98	11.15	11.49	0.90	12.53	1.46	1.64	0.87	18.67	7×2
	C	1.71	4.90	12.53	11.90	0.88	12.36	1.25	1.68	0.81	18.62	3×2
74	P	1.69	4.99	10.73	11.71	0.88	11.87	5.23	0.03	0.88	20.93	3
	Z	1.69	4.93	11.02	11.50	0.88	12.53	1.42	1.68	0.91	18.27	7×2
	C	1.71	4.94	11.90	11.71	0.88	12.05	1.63	1.60	0.73	18.75	3×2
	(Final products)											
Control	Z	1.68	4.86	10.93	10.30	0.89	12.02	1.68	1.62	0.66	18.98	7×2
	C	1.69	4.88	10.15	11.02	0.89	12.16	2.42	1.65	0.68	18.84	7×2
Control		1.54	4.73	11.96	9.69	0.76	16.50	2.07	2.38	0.74	18.30	7

NM: Not measured.

Control: Commercial soy sauce.

F: Feed soln. P: *P. halophilus*. Z: *Z. rouxii*. C: *C. versatilis*.

Table. 2 Analysis of Amimo Acid of the fermentation product.

Amino Acid	Z		C		Control	
	mg/100 ml	%	mg/100 ml	%	mg/100 ml	%
ASP	469.16	12.35	470.84	12.52	407.76	10.16
THR	180.25	4.74	180.64	4.80	182.53	4.55
SER	109.31	2.88	108.20	2.88	245.51	6.12
GLU	644.71	16.96	646.39	17.19	694.76	17.31
PRO	161.21	4.24	165.18	4.39	242.25	6.03
GLY	116.02	3.05	136.68	3.63	131.40	3.27
ALA	212.29	5.59	210.23	5.59	237.98	5.93
CYS	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
VAL	256.40	6.75	248.27	6.60	252.97	6.30
MET	113.46	2.99	87.67	2.33	114.75	2.86
ILE	233.61	6.15	225.55	6.00	236.58	5.89
LEU	358.10	9.42	346.08	9.20	363.22	9.05
TYR	86.65	2.28	70.38	1.87	74.33	1.85
PHE	200.51	5.28	196.36	5.22	206.67	5.15
HIS	135.74	3.57	137.66	3.66	142.30	3.54
TRP	23.56	0.62	24.91	0.66	17.61	0.44
LYS	165.25	4.35	166.65	4.43	250.06	6.23
NH <sub>4</sub>	32.28	0.85	39.42	1.05	21.60	0.54
ARG	301.86	7.94	299.59	7.97	192.15	4.79
Total	3800.37	100.00	3760.64	100.00	4014.43	100.00

Z: *Z. rouxii*.C: *C. versatilis*.

Control: Commercial soy sauce.

mg/100 ml: Values are arranged to the total nitrogen of final product being the same level.

Table. 3 Analysis of organic acid in final products.

NAME	Z	C	Control
Citric acid	5.55	5.41	8.87
Malic acid	1.61	1.55	1.39
Succinic acid	0.55	0.44	0.54
Lactic acid	6.60	6.87	7.46
Formic acid	0.01	0.01	0.23
Acetic acid	1.17	1.30	1.60
Pyroglutamic acid	1.35	1.24	6.38

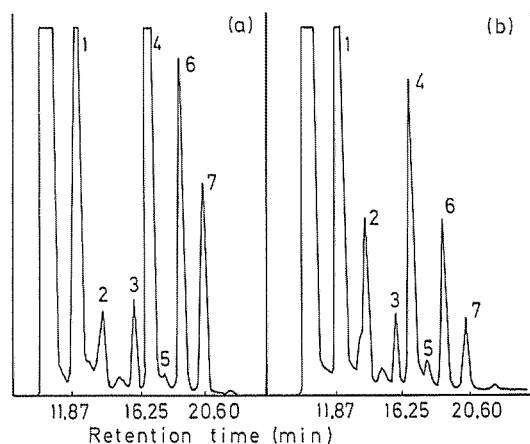
Organic acids are reported as g/L.

Z: *Z. rouxii*.C: *C. versatilis*.

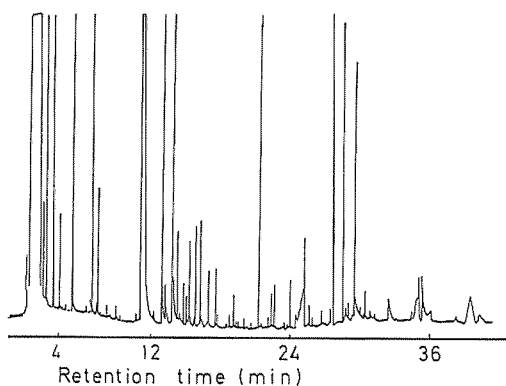
Control: Commercial soy sauce.

計った。これは、構造的にエアリフト型のリアクター<sup>3)</sup>に似ていると考えられる。次に三種の菌体を各々固定化したバイオリアクターを調製した。*Z. rouxii*, *C. versatilis* を各々固定化したバイオリアクターに *P. halophilus* の固定化バイオリアクターの発酵液を並列に供給した。2種の酵母バイオリアクターを直列につなぎ発酵液を供給することは、リアクター内で酵母の混合培養となる可能性が高く、この結果、両酵母の発酵への貢献度や条件の解析が困難となるため今回は採用しなかった。各々のバイオリアクターの滞留時間は、40時間～100時間で乳酸発酵とアルコール発酵を行った。乳酸発酵は滞留時間2日～3日間で乳酸0.8%～1.2%が得られた。アルコール発酵は滞留時間2日～4日間でアルコール1.6%～2%の発酵液が得られた。即ち、固定化バイオ



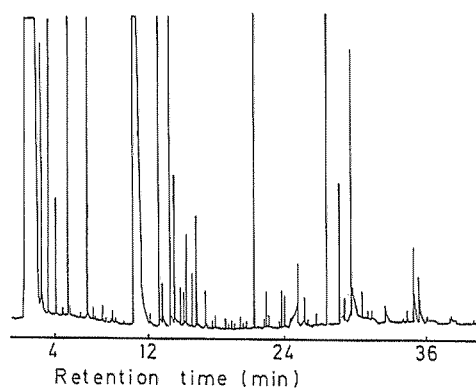


**Fig. 12** Chromatogram of organic acids component. (a) commercial soy sauce. (b) sample. chromatographic conditions (post-column methods). column: shodex C810P + C811. eluent: 0.003M HC10<sub>4</sub>, color reagent: 0.0002M BTB, 0.015M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.002M NaOH. oven temp: 60°C. flow rate: 1 ml/min. detector: UV445 nm. peak 1: citric acid, peak 2: malic acid, peak 3: succinic acid, peak 4: lactic acid, peak 5: formic acid, peak 6: acetic acid, peak 7: pyroglutamic acid.



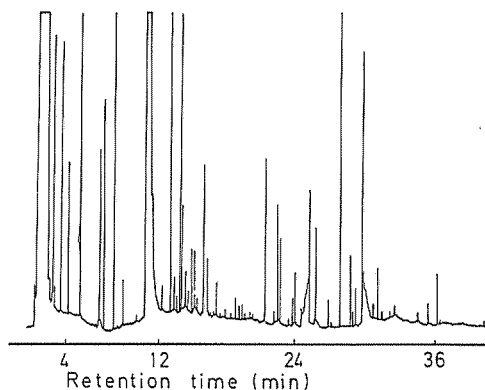
**Fig. 13** Gas chromatogram of aroma component in commercial soy sauce.

chromatographic conditions.  
column: Quadrex "007" BONDED Fused Silica Capillary Column  $\phi$  0.25 mm  $\times$  25 m. column packing: PEG 20M. inj temp: 200°C. column initial: 50°C. column final: 200°C. carrier gas (N<sub>2</sub>): 1.2 kg/cm<sup>2</sup>. detector: FID.



**Fig. 14** Gas chromatogram of aroma component in fermentation soln (Z).

chromatographic conditions.  
column: Quadrex "007" BONDED Fused Silica Capillary Column  $\phi$  0.25 mm  $\times$  25 m. column packing: PEG 20M. inj temp: 200°C. column initial: 50°C. column final: 200°C. carrier gas (N<sub>2</sub>): 1.2 kg/cm<sup>2</sup>. detector: FID.



**Fig. 15** Gas chromatogram of aroma component in fermentation soln (C).

chromatographic conditions.  
column: Quadrex "007" BONDED Fused Silica Capillary Column  $\phi$  0.25 mm  $\times$  25 m. column packing: PEG 20M. inj temp: 200°C. column initial: 50°C. column final: 200°C. carrier gas (N<sub>2</sub>): 1.2 kg/cm<sup>2</sup>. detector: FID.

リアクターによる醤油製造の発酵工程では、乳酸発酵とアルコール発酵の両発酵は4日～7日間で終了する。又、発酵原液の調製に必要とする7日間を考慮すると、発酵終了迄に11日～14日間かかり、およそ2週間て醤油様調味液が得られることになる。これは、従来の醤油の製造

期間に比べ製造期間が、1/13と極めて短縮された。

また、*Z. rouxii* は醤油の香气成分の生成に重要であるグルコースを発酵してエタノールを生成する他、特異香とされる2-フェニルエタノール、メチオノール、4-ヒドロキシメチルフラノン等を生成する。*C. versatilis* は醤油の特異香である4-エチルグアヤコールの様なフェノール類を生成するが、一般に醤油中に含まれる4-エチルグアヤコールの至適含量は1~3 ppmと言われている。Fig. 3から4-エチルグアヤコールは、滞留時間が22時間で2.6 ppm生成された。この事より2種のバイオリクターから得た*Z. rouxii* 発酵液と*C. versatilis* 発酵液とを調合する場合は、エタノール濃度と4-エチルグアヤコール濃度との量的な関係から混合比を考えなくてはならない。又、アルコール濃度と4-エチルグアヤコール濃度の生成速度と生成量を調節できれば*Z. rouxii* のバイオリクターと*C. versatilis* のバイオリクターからの発酵液を直接混合でき、調合の煩わしさが省略される。発酵液の成分は、酸度、乳酸、全窒素は市販の醤油と似ているが、食塩濃度が低いことが異なっている。しかし、これは発酵原液が低食塩濃度の麴分解液を使用したためである。又、色調が市販の醤油と比べ濃いのは発酵原液、及び発酵液を3回蒸気殺菌を行ったため、メイラード反応を促進し褐変化が進行したことによる。この結果、カラメル様の香気が強く残り、醤油とはやや異なる香味を示した。以上より、乳酸発酵、アルコール発酵については、ほぼ満足する結果と言えるが、風味については香气成分のバランスに難点があり、また麴分解液の収率等の問題などが今後の重要な課題と考えられる。バイオリクターの役割は、アルコール、香气成分の生成を介して発酵液の香りの醸成にあり、呈味成分に関しては発酵原液に依存する。前報<sup>5)</sup>のバイオリクターによるイワシ分解液の発酵液の様に、各種原料蛋白分解液により様々な味と香りの発酵調味液が得られる。又、密閉系であるため高濃度食塩による防腐効果を考慮する必要がなくなることより食塩濃度を自由に調製できる等の利点があるため新調味液の開発が期待できると考えられる。

## 要 約

*P. halophilus*, *Z. rouxii*, *C. versatilis* の3種類の固定化バイオリクターを各々滞留時間30時間から100時間前後で運転した場合に、*P. halophilus* の固定化バイオリクターでは総乳酸生成量は平均0.9% (w/v), *Z. rouxii* の場合ではアルコールは平均1.9%, 2-フェニルエタノールは20 ppm前後, *C. versatilis* の場合ではアルコールは平均1.8%, 4-エチルグアヤコールは滞留時間22時間で2.4 ppm得られた。流出菌体量は $10^7$  から $10^8$  cell/mlと安定していた。通気量は、*Z. rouxii* の場合0.088 vvm, *C. versatilis* の場合0.10 vvmでアルコール生成能が良好であった。2ヶ月半の連続運転期間中、乳酸発酵とアルコール発酵は満足行くものであった。

固定化バイオリクターによる醤油様調味液の製造法により従来、発酵、熟成工程に6ヶ月を要していたのが約1週間で発酵工程を終了し、発酵原液の調製に必要な日数を考慮すると、2週間という極めて短期間で醤油様調味液が得られた。

## 文 献

- 1) K. OSAKI, Y. OKAMOTO, T. AKAO, S. NAGATA, and H. TAKAMATSU. Fermentation of Soy Sauce with Immobilized Whole Cells, *J. Food. Sci.*, 50: 1289-1292 (1985).
- 2) 堀津浩章. 酵母固定化法を導入した新しい醤油製造方法. *Bio Industry*, 4(3): 198-206 (1987).
- 3) 濱田孝司, 石山 孝, 茂田井 宏. 固定化醤油酵母による連続発酵. 日本農芸化学会昭和63年度大会講演要旨集, 名古屋, p. 378 (1988)
- 4) 中野政弘. 発酵食品. 光琳書院, p. 58-77 (1972).
- 5) 山田哲也, 小瀬古茂樹, 坪内一夫, 久松 眞. 三重大学生物資源学部紀要, 2: 71-79 (1988).
- 6) 横塚 保, 佐々木正興, 布村伸竹, 浅尾保夫. 醤油の香り (1). 日本醸造協会誌, 75: 516-522 (1980).