

# バイオリアクターによる醤油製造法の研究

## 第三報 無殺菌諸味の連続発酵条件の検討

小瀬古茂樹・久松 眞・松永 正好\*・山田 哲也

三重大大学生物資源学部, \*サンジルシ醸造株式会社

## Studies on Soy-Sauce Production by Bioreactor

### Part 3 Continuous Soy-Sauce Fermentation with Unsterilized Soy-Sauce-Moromi Mash

Shigeki KOSEKO, Makoto HISAMATSU, Masayoshi MATSUNAGA\*  
and Tetsuya YAMADA

Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Bioresources, Mie University

\*San-Jirushi Corporation

#### Abstract

We studied the bioreactor systems for soy sauce production from unsterilized soy-sauce-moromi-mash suspension. MIC (Microbe Immobilized Ceramics) reactor with immobilized *Zygosaccharomyces rouxii* produced 2.0% ethanol and 38 ppm 2-phenylethanol at 30 hour residence time. That reactor immobilized with *Candida versatilis* produced 2.0% ethanol and 3.7 ppm 4-ethylguaiacol at 48 hour residence time. MIC reactor were ensured enough fluidity of feed solution by aerating at 0.08 vvm. Ethanol fermentation was 2.5 time (*Z. rouxii*) and 4 time (*C. versatilis*) more efficient at Hight to Diameter ratio (H/D) of 25 than at H/D of 8.8. Unsterilized soy-sauce-moromi was fermented in the open system bioreactors immobilized with *Z. rouxii* or *C. versatilis*, and a blend of the both fermentation products showed good score in evaluation of flavor and taste.

**Key words:** soy-sauce · soy-sauce-moromi · bioreactor

#### 緒 言

バイオリアクター装置（醤油乳酸菌や醤油酵母をアルギン酸カルシウム<sup>1-4)</sup>、又はセラミックス<sup>5,6)</sup>に固定化したカラム）を使用する醤油の製造は、発酵熟成期間の短縮と発酵制御の精密化を可能とするため、醤油原料を

酵素分解し、ろ過して得られた清澄液をこの装置を使用して発酵させる方法である。私たちが、原料麹を低食塩濃度で高温酵素分解処理後、ろ過して得られた清澄液を、既報とは異なるセラミックス担体を含むバイオリアクターシステムに供給し、醤油様調味液が短期間で得られることを報告した<sup>7,8)</sup>。しかしながら、この調味液の風味は市販の醤油のものよりかなり劣ることから、本醸造醤油と同等の品質を得るためには、醤油諸味の十分な酵

素分解と、その清澄液の加熱殺菌工程で生じる異臭の生成を抑制することが必要であると考えた。さらには、できるだけ従来の製造工程に近づけたバイオリクターシステムの構築を検討する必要がある。ところで、堀津ら<sup>5,6)</sup>が報告したように除菌のため限外ろ過操作を行うと、清澄液を加熱殺菌しないで使用できるが、このろ過装置は非常に高価であり、ろ過効率も悪い。従って実験室の規模で実施されるもので、実用的ではない。

伝統的な醤油醸造方法は、開放系でありながら醤油酵母、又は醤油乳酸菌以外の微生物汚染は問題となっていない。このことから、バイオリクター系に於ても初期に酵母濃度が十分に高ければ汚染は問題とならない可能性が高い。また、伝統的な醤油醸造方法は複合的な発酵法であることから、醸造中に麹菌体が自己消化し、その分解成分が醤油の呈味に微妙に影響していることも考えられる。従って、発酵前に醤油諸味中の全固形分を除去することは麹菌体を除去することになり、醤油の呈味に影響する可能性が十分考えられる。

本研究では、加熱による殺菌工程や限外ろ過による除菌工程を含まず、しかも固形分を含有する原液でも運転可能なバイオリクターシステムの開発を行い、無殺菌の醤油諸味から醤油の製造方法を検討した。

## 実験方法

### 1. 担体材料

Fig. 1 に示した様に板状の形をした Microbe Immobil-

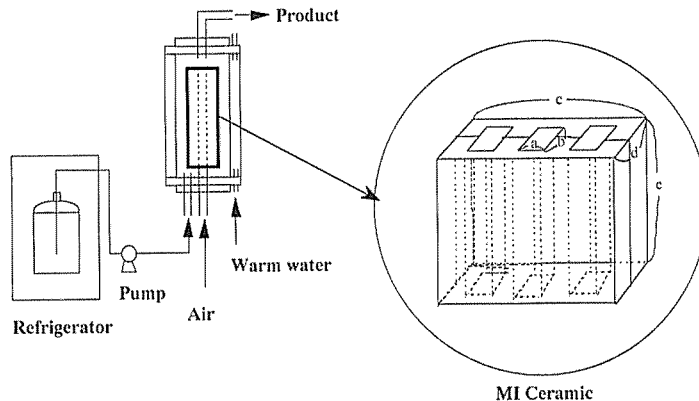


Fig. 1. Schematic diagram of the reactor system.

a: 0.46 cm, b: 0.92 cm, c: 3.5 cm, d: 2.0 cm, e: 30 cm in H/D 8.8 reactor and 90 cm in H/D 25 reactor.

ized Ceramics (MIC) は、日本ガイシ(株)より提供された。この MIC は、酸処理 (2N HCl に一時間浸漬) し、次にアルカリ処理 (2N NaOH に一時間浸漬) 後水洗を行い使用した。

### 2. 使用菌株と培地

菌株は、耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* と *Candida versatilis* の 2 種類を使用した。各酵母は 10% 生揚げ醤油、7% グルコース及び 8.5% 食塩を含む醤油合成培地 (pH 5.0) で 30°C 72 時間振とう培養した。

### 3. バイオリクターの構築及び醤油酵母の固定化

バイオリクターの構成は、Fig. 1 に示した。発酵原液は殺菌処理をしないため 5°C に冷蔵し、カラムジャケットには 30°C の温水を循環した。除菌空気と冷蔵した無殺菌の発酵原液はカラム下部から送り、エアリフト型リアクターとして使用した。2 種のジャケット付き円筒型ガラスカラムは、直径 (D) 4 cm、高さ (H) 35 cm、実容積 400 ml (H/D 8.8) と直径 (D) 4 cm、高さ (H) 100 cm、実容積 1 l (H/D 25) を使用した。装填方法は、カラムを 75% エタノールで殺菌処理後、殺菌水で洗浄した。これに加熱殺菌処理を行った MIC を装填した。このときの担体の装填量は H/D 8.8 のカラムには 100 g、H/D 25 のカラムには 300 g であった。三個の溝をもつ MIC は、通気による諸味の循環を促すため中央の穴 (0.46×0.92 cm) を通気溝として利用した。酵母を含む醤油合成培地を 25 ml/h で送液し、一日静置後除菌空気

を 0.13~0.15 vvm で通気して 4 日間培養し酵母の固定を行った。

#### 4. 発酵原液の調製方法

蒸煮大豆とばい煎小麦 (60:40, w/w) に *Aspergillus sojae* を主とする麹菌を接種して作った醤油麹に食塩濃度が10%になるよう食塩水を加えた醤油諸味は、45°C で48時間、次に 55°C で48時間の 2 段階昇温で麹の酵素により分解した。分解した醤油諸味は、圧搾用ろ布で不溶物だけをろ過したもの (発酵原液 1) と、その醤油諸味を小麦の皮だけを取り除く目的で20メッシュふるいでろ過したもの (発酵原液 2) とに調製した。発酵原液 1 と 2 の食塩濃度は13%に、糖濃度はグルコースを添加して8.5%に、また、pH は乳酸で pH 5.0 に調製した。

#### 5. 分析方法

食塩濃度は醤油試験分析法<sup>9)</sup>に準拠した。還元糖量は Somogyi-Nelson 法<sup>10)</sup>、エタノール濃度<sup>7)</sup>は30% sorbitol を充填したステンレスカラム (3 mm I.D×3 m) を使用してガスクロマトグラフィーで定量した。芳香成分<sup>11)</sup>の定量は、PEG 20M で被覆された Bonded-Fused Silica

Capillary Column (0.53 mm I.D×25 m) を使用してガスクロマトグラフィーで行った。

#### 6. 官能試験

発酵液の官能による評価は、醸造技術者 9 名による 3 点評価法で行った。優、良、可の 3 段階評価とし各々 3 点、2 点、1 点とし発酵液を評価した。

### 実験結果

#### 1. 発酵生産物に及ぼす滞留時間の影響

*Z. rouxii* はエタノールと 2-フェニルエタノールなどの芳香成分を、*C. versatilis* はエタノールと 4-エチルゲアヤコールなどのフェノール成分を生産する。これらは醤油の味や香の重要な成分である。これらの酵母が生産するエタノール濃度と、醤油の特徴的な香の 2-フェニルエタノール量及び 4-エチルゲアヤコール量を Fig. 2A, B に示した。

*Z. rouxii* を固定化した H/D 25 の MIC を含むリアクターの場合 (Fig. 2A), エタノール濃度は、滞留時間 (実容積を時間あたりの発酵原液の送液量で除した値)

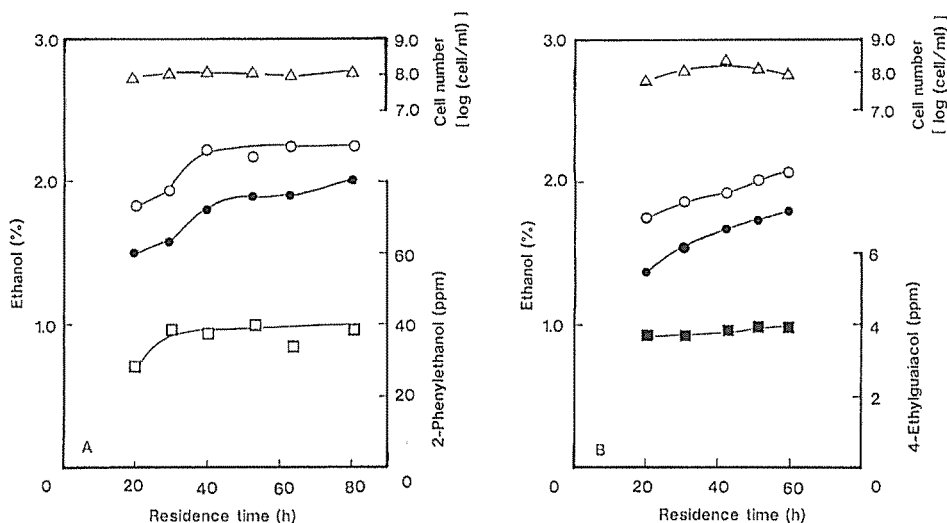


Fig. 2. Effect of residence time on the formation of ethanol and 2-phenylethanol by immobilized *Z. rouxii* (A), and of ethanol and 4-ethylguaiacol by immobilized *C. versatilis* (B). (○): Ethanol concentration (%), (△): Cell numbers [log (cell/ml)], (□): 2-phenylethanol (ppm) and (■): 4-ethylguaiacol (ppm) in H/D 25 reactor. (●): Ethanol concentration (%) in H/D 8.8 reactor. The medium used was the soy-sauce filtrate (pH 5.0) containing 13% of NaCl as described in Materials and Methods. The bioreactors were kept at 30°C and aerated at 0.08 vvm.

30時間で2.0%に達し、2-フェニルエタノール量は、滞留時間30時間で38 ppm 生産された。H/D 8.8 のリアクターの場合、エタノール濃度は同じ滞留時間で1.7%に達した。

*C. versatilis* を固定化した H/D 25 の MIC を含むリアクターの場合 (Fig. 2B), エタノール濃度が、滞留時間48時間で2.0%に達し、4-エチルグアヤコール量は滞留時間48時間で3.7 ppm 生産された。H/D 8.8 のリアクターの場合、エタノール濃度は同じ滞留時間で1.7%に達した。

## 2. 発酵生産物に及ぼす通気量の影響

MIC の中央部に通気溝を設け、除菌空気をカラム下部から微量送りこむリアクターを作成することにより高粘性を有する無殺菌の醤油諸味液 (発酵原液 2) がリアクター内を効率よく循環出来るかどうかの予備的検討を行った。発酵原液 1 を滞留時間30時間の流速で *Z. rouxii* リアクターに、また滞留時間48時間の流速で *C. versatilis* リアクターに送液し、通気量を変化させて発酵試験を行った。*Z. rouxii* を固定化した H/D 25 の MIC を含むリアクターの場合 (Fig. 3A), エタノール濃度は通気

量 0.06 vvm から 0.08 vvm の間で2.2%に達したが、0.08 vvm 以上ではリアクター内が好気的環境になりエタノール濃度は減少した。2-フェニルエタノール量は、通気量 0.04 vvm から 0.10 vvm の間で 34 から 38 ppm 生産された。

*C. versatilis* を固定化した H/D 25 の MIC を含むリアクターの場合 (Fig. 3B), エタノール濃度は 0.04 vvm から 0.08 vvm の間で1.9%に達した。4-エチルグアヤコール量は、通気量 0.04 vvm から 0.10 vvm の間で3.0 から 3.3 ppm 生産された。固定化リアクターの遊離酵母濃度は、通気量に関係なく *Z. rouxii* リアクターではおよそ  $1 \times 10^8$  cell/ml であり、*C. versatilis* リアクターではおよそ  $8 \times 10^7$  cell/ml と一定であった。

## 3. 高さの異なる MIC リアクターの運転性能

高さの異なる MIC を含むリアクターに発酵原液 1 を送液し滞留時間を変えて発酵試験を行った。発酵液のエタノール濃度とエタノール生産性の関係は Fig. 4 に示したが、両者の間には負の相関が認められた。*Z. rouxii* を固定化したリアクターの場合 (Fig. 4A), エタノール濃度 2%時のエタノールの生産性は、H/D 8.8 のリアク

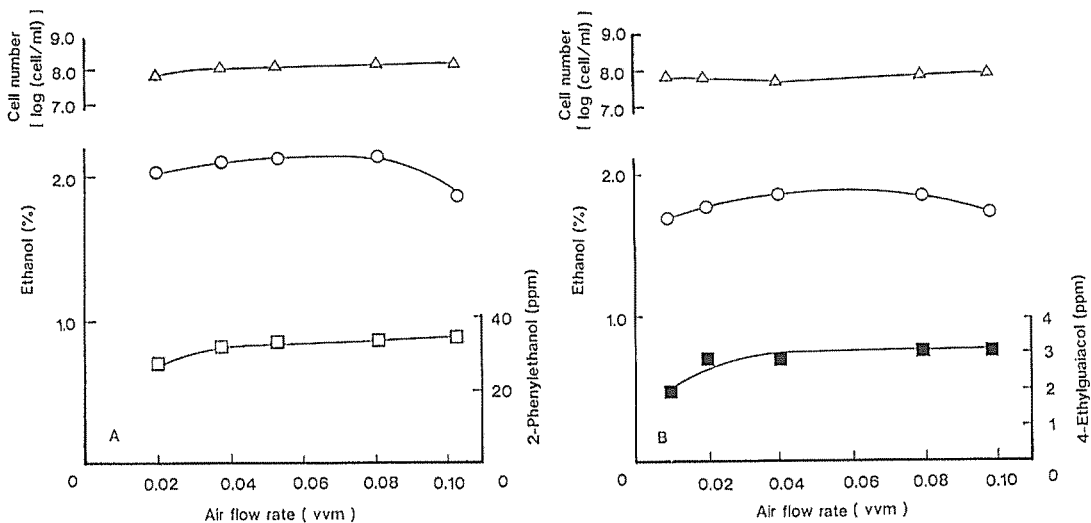


Fig. 3. Effect of air-flow-rate on the formations of ethanol and 2-phenylethanol fermentation by immobilized *Z. rouxii* (A), and of ethanol and 4-ethylguaiacol by immobilized *C. versatilis* (B).

(○): Ethanol concentration (%), (△): Cell numbers [log (cell/ml)],

(□): 2-phenylethanol (ppm) and (■): 4-ethylguaiacol (ppm).

The bioreactors (H/D 25) immobilized *Z. rouxii* and immobilized *C. versatilis* were kept at 30°C and at the residence time of 30 hour and 48 hour, respectively.

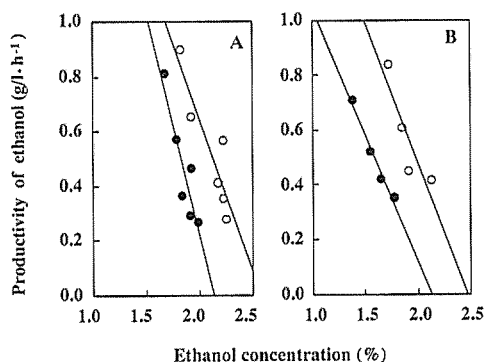


Fig. 4. Relations between ethanol concentration and productivity of ethanol on the bioreactor with MIC immobilized *Z. rouxii* (A) and *C. versatilis* (B). (○): Ethanol concentration (%) in H/D 25 reactor, (●): Ethanol concentration (%) in H/D 8.8 reactor. The condition of bioreactor was described in Fig. 2. The bioreactor was kept at 30°C and aerated at 0.08 vvm.

ターでは  $0.27 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$  であり、H/D 25 のリアクターでは  $0.67 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$  であったことより、後者は前者の2.5倍の生産性を示した。

一方、*C. versatilis* を固定化した場合 (Fig. 4B)、エタノール濃度 2% 時のエタノールの生産性は、H/D 8.8 のリアクターでは  $0.12 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$  であり、H/D 25 のリアクターでは  $0.48 \text{ g/l}\cdot\text{h}^{-1}$  であった。この場合、後者は前者の4倍の生産性を示した。

#### 4. 諸味発酵液の官能試験

通気量を 0.08 vvm としたとき、下部からの空気浮上を利用して粘性の高い醤油諸味発酵原液がリアクター内を十分に循環することを認めた。そこで *Z. rouxii* を固定化した H/D 25 の MIC を含むリアクターには滞留時間 30 時間の流速で、一方、*C. versatilis* を固定化した H/D 25 の MIC を含むリアクターには滞留時間 48 時間の流速で醤油諸味発酵原液を送液し、およそ一ヶ月間連続発酵試験を行った。両酵母固定化リアクターの発酵液中のエタノール濃度は約 2% であった。その発酵液は圧搾ろ過後、各々の発酵液を 4-エチルグアヤコールの量が最適値<sup>12)</sup> とされる 1 から 3 ppm になるよう等量ずつ混合し火入れ処理 (80°C 達温) 後官能試験に供した。官能試験の結果、調合した醤油様調味液は、除菌清澄液の

発酵液と比べ呈味において改善され、市販醤油に近い風味を有することが醸造技術者 9 名による官能試験で判定された。

#### 考 察

直径が同じ高さことなるリアクターを同じ滞留時間となるように発酵原液を送り発酵させた場合、線速度はカラム長に依存するため H/D 25 リアクターの線速度は、H/D 8.8 リアクターのおよそ 2.5 倍の速度になる。そのためカラム内での液液交換が H/D 8.8 リアクターよりも円滑に進み、固定化酵母と新鮮な発酵原液との接触面積が増大し、H/D 25 リアクターの方が高いエタノール生産性を示したと考えられる。さらに、H/D 25 のリアクターの方が H/D 8.8 のリアクターよりも充填されたセラミックスの表面積が大きいため固定化酵母の総数が多くなった。そのため発酵原液と酵母の接触面積が多くなり、H/D 比の高いリアクターの方が高いエタノール生産性を得たと考えられる。

MIC を装填した H/D 25 の *Z. rouxii* 固定化リアクターと *C. versatilis* 固定化リアクターで発酵された醤油諸味の発酵液を圧搾し調合した醤油様調味液は、除菌清澄液の発酵液を調合した醤油様調味液と比べ、呈味において改善され、市販醤油に近い風味を有することが醸造技術者 9 名による官能試験で判定された。

以上より、MIC を装填したエアリフト型バイオリアクターシステムを用いれば高粘性を有する無殺菌の醤油諸味液の連続発酵が可能であることが分かった。すなわち醤油諸味を圧搾後、除菌ろ過し、得られた清澄液を発酵原液として使用する方法<sup>5,6)</sup> に比べ無殺菌の醤油諸味を発酵原液として使用する方法は、時間短縮、経費節減及び発酵制御を可能とすることから、より実用度の高い方法と考えられる。

#### 文 献

- 1) OSAKI, K., OKAMOTO, Y., AKAO, T., NAGATA, S. and TANAKA, H.: Fermentation of Soy Sauce with Immobilized Whole Cells. *J. Food Sci.*, 50: 1289-1292 (1985).
- 2) HAMADA, T., ISHIYAMA, T. and MOTAI, H.: Continuous Fermentation of Soy Sauce by Immobilized

- Cells of *Zygosaccharomyces rouxii* in an Airlift Reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**: 346-350 (1989).
- 3) HAMADA, T., SUGISHITA, M. and MOTAI, H.: Continuous Production of 4-Ethylguaiacol by Immobilized Cells of Salt-Tolerant *Candida versatilis* in an Airlift Reactor. *J. Ferment. Bioeng.*, **69**: 166-169 (1990).
- 4) HAMADA, T., SUGISHITA, M. and MOTAI, H.: Contribution of Immobilized and Free Cells of Salt-Tolerant *Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida versatilis* to the Production of Ethanol and 4-Ethylguaiacol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**: 624-628 (1990).
- 5) HORITSU, H., MASEDA, Y. and KAWAI, K.: A New Process for Soy Sauce Fermentation by Immobilized Yeasts. *Agric. Biol. Chem.*, **54**(2): 295-300 (1990).
- 6) HORITSU, H., WANG, M. Y. and KAWAI, K.: A Modified Process for Soy Sauce Fermentation by Immobilized Yeasts. *Agric. Biol. Chem.*, **55**(1): 269-271 (1991).
- 7) 山田哲也, 小瀬古茂樹, 坪内一夫, 久松 眞: バイオリアクターによる醤油製造法の研究 第一報. 三重大学生物資源学部紀要, **2**: 71-79 (1989).
- 8) 小瀬古茂樹, 久松 眞, 山田哲也: バイオリアクターによる醤油製造法の研究 第二報. 三重大学生物資源学部紀要, **4**: 187-196 (1990).
- 9) 広瀬義成: しょうゆ試験法, (日本醤油研究所, 東京), p. 22 (1988).
- 10) SOMOGYI, M.: Note on Sugar Determination. *J. Biol. Chem.*, **195**: 19-23 (1952).
- 11) 横塚 保, 佐々木正興, 布村信彦, 浅尾保夫: 醤油の香り. 日本醸造協会誌, **75**: 717 (1980).
- 12) 濱田孝司, 茂田井宏: 日本醸造協会誌, **84**: 83 (1989).