

財団法人福岡県産業・科学技術振興財団

産学官共同研究開発事業

研究成果報告書

高血圧予防、改善に適した 次世代型無塩調味料の開発

(平成17年度～平成18年度)



目 次

【研究総括】

高血圧予防、改善に適した次世代型無塩調味料の開発	1
九州大学大学院農学研究院 准教授 松井 利郎	

【研究報告】

1. 無塩調味料中の血圧低下ペプチドの同定とその作用機構の解明	3
九州大学大学院農学研究院	
2. 無塩調味料中のペプチド生産性の最適化	7
福岡県醤油醸造協同組合	
3. 無塩調味液の風味改善と保全性の向上	15
九州大学大学院農学研究院	
4. 無塩調味料を用いた食品の開発	25
福岡県醤油醸造協同組合 江崎グリコ株式会社	

【成果実績】	39
--------	---------

研究総括

九州大学大学院農学研究院 准教授 松井 利郎

1 研究開発の背景および目的

高血圧症等の metabolic syndrome (MS) 患者にとって食塩の過剰摂取は禁忌である。そこで、独自シーズである無塩醤油様調味料を MS 患者用として展開するため、調味料中の血圧低下成分とその作用機構を明示し、科学的根拠に基づく次世代型調味料を創製する。さらに、風味改良、保存性向上を目的として、無塩でありながら醤油風味に富む新規調味料並びに病者用加工食品を開発する。

2 研究開発体制

代表：九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門食品分析学研究室 松井利郎

共同研究機関：九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門食品製造工学研究室 下田満哉

共同研究機関：福岡県醤油醸造協同組合 担当者：野田義治

共同研究機関：江崎グリコ株式会社 担当者：白石浩荘

3 研究成果の概要

3-1 無塩調味料の抗高血圧作用の発現性とその機構解明

無塩醤油様調味料 (HFS) の抗高血圧作用を明らかにすることを目的として、HFS 製造過程で新たに生じる低分子ペプチドの工程管理用新規アッセイシステムを構築した。

3-2 無塩調味料の風味改善に関する研究開発

無塩醤油様調味料(HFS)の嗜好上の問題点として、1) 苦味ペプチドに起因する特有の苦味を呈すること、2) 醤油の風味を想起させる醤油フレーバーが不足（あるいは欠如）していることが挙げられた。1) に対しては、苦味抑制作用を有するとして報告例のある食品成分を添加することによる苦味の隠蔽を試みた。その結果、2 mM のリジンあるいは 400 mg/kg のレシチンを添加することにより、HFS の苦味を官能的に抑制（隠蔽）することができた。さらに、清酒酵母および醤油酵母による発酵プロセスにおいて苦味ペプチドは完全に酵素分解されたことから、無塩醤油様発酵調味液においては苦味問題は完全に解決された。2) においては、先ず市販濃い口醤油の香気成分分析を行い、醤油の特徴香成分を明らかにした。次に、非発酵タイプの HFS の香気成分分析を行った。この結果、HFS では揮発性有機酸類、アセトフェノン類を除いて顕著に香気成分の濃度が低いことが判明した。この結果を受けて、2 種類の清酒酵母、2 種類の醤油酵母による発酵タイプの HFS の製造を行った。その結果、オリーゼによる製麴と清酒酵母 901 の組み合わせによりほぼ満足のいく無塩醤油様発酵調味液を製造することができた。

3-3 風味特性に優れた無塩調味料の開発に関する検討

全麴法又は減麴法（原料処理条件：2atm・10 分，減麴率 50%）での製造によって、醤油

様の調味料を開発することができた。また、サプリメント等への展開を考えた場合、ペプチド含量が高くなる減麴法（原料処理条件：200℃・10分、減麴率30-50%）での製造が妥当と考えられた。また、さらに、以上の試醸によって、減塩の食事療法を行っている腎不全患者などに醤油様の無塩調味液を活用したせんべいと柿の種を開発し、平成18年1月に提供を開始した。

4 研究成果の市場性・優位性

高齢化に伴って、今後無塩調味液の重要性・必要性はますます増大するものと考えられるが、問題は嗜好性の向上と摂取効果に対する科学的エビデンスを提示することである。本研究で開発してきた製品は相当レベルまで風味を向上させることに成功した。したがって、市場での優位性と社会的インパクトは極めて高いと考える。

5 今後の具体的な計画

本研究を通して、血圧低下作用を担うであろう低分子ペプチドが有意に生産されることを明らかにした。そこで今後は、その生理作用（抗高血圧作用）の実証とその調節機構解明、さらには関与物質の生理作用を明示し、特許化を図る必要があると考える。他方、塩味を強くイメージさせる香気成分、腸管吸収ペプチドの産生量をマーカーとして、無塩でありながらより醤油風味を強化した調味液の製造と加工調味料、加工食品への展開を検討する。

6 研究成果の波及効果

今回のプロジェクトは地域醸造業の技術力アップに大いに貢献した。また、新たな健康食品として福岡県ブランドの形成が重要となる。なお、本研究で開発された無塩醤油様調味料は、既存の特別用途食品として認可されている減塩醤油（食塩濃度7%前後）をはるかに上回る機能性と展開性を秘めており、市場へのインパクトは極めて大きいと考える。

7 今後の課題と取り組み

既存醤油に匹敵する風味を発現させるには、麴及び酵母の組み合わせ試醸に加えて、マーカーとなる風味関与成分による客観的品質評価を行うことが重要となる。また、抗高血圧作用の発現を軸とした本調味料の特許化を図るには、関与物質の特定化と調節機構の明確化が必要となる。従って、これら視点をもとにさらに本プロジェクトチーム内で検討を行い、特許申請後、別途のファンド申請、学会活動等を介した広報活動、販売を促進していく予定である。

第1章 無塩調味料中の血圧低下ペプチドの同定と

その作用機構の解明

九州大学大学院農学研究院 准教授 松井 利郎

1—1 無塩調味料中の血圧低下ペプチドの同定とその作用機構の解明

無塩醤油様調味料（以下、HFS とする）は、静菌作用を勘案して食塩代替したエタノール存在下での新たな調味料である。このため、大豆タンパク質の発酵により生じる各種のペプチド体が派生する。一般に、低分子ペプチドは血圧低下作用を発現することが臨床的に実証されているため、本検討では、無塩であるとの機能特性に加え、派生するペプチドの迅速同定と生理作用を明らかにすることによって積極的な高血圧予防機能を明らかにすることを目指した。

1—2 プロジェクト全体における本研究開発部分の位置づけ

高血圧予防効果における無塩であることの機能性は揺るぎないが、さらに本開発を行うことによって、積極的な高血圧改善作用が見込める。すなわち、調味料としての風味機能（官能性）を向上させるための第2章以降の検討に対して、本開発部分は生体調節性の解明を主体としており、両者の融合によってより食機能が賦与された調味料開発を図ることができる。

1—3 目的と目標

無塩醤油様調味料の製造過程で産生される低分子ペプチドを把握するための新たなアッセイシステムを構築する。

1—4 研究成果

1—4—1 新規ダブルカラムスイッチング HPLC 法の確立

カラムスイッチング法は生体試料に対して多用されており、Aspirin、finasteride、dimiracetam などの薬剤投与後の代謝動態の迅速把握に威力を発揮している^{1-1,2)}。しかしながら、従来のスイッチング法は対象物質が1種類に限定されており、無塩醤油調味料のように類似の低分子ペプチド代謝物が多数存在する試料では、その適用は困難であると考えられる。また、低分子ペプチドを対象とするため、抗体の作製、交叉反応性の点で ELISA 法の適用は不可能であると考えられる。そこで、本研究で目指すマーカーペプチド類の一斉・迅速分析を達成し、発酵条件の最適化並びに製品の品質評価を簡便に行うには、新たなアッセイシステムを構築する必要があると考えられる。そこで、本研究では、2つのスイッチングバルブを2.0 ml 容のサンプルループで直結し、4つの独立した流路設定を可能とする新たなアッセイシステム（ダブルカラムスイッチング逆相 HPLC 法）の構築を試みた（図 1-1）。

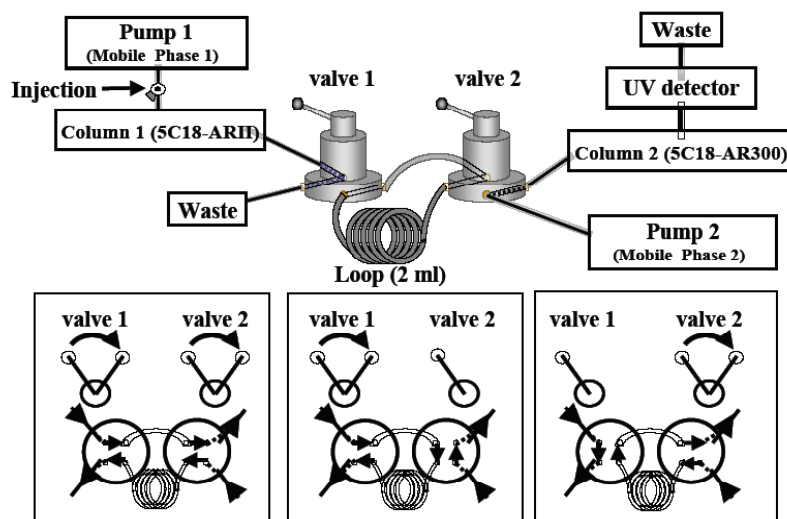


図 1-1 ダブルカラムスイッチング HPLC 法によるペプチド定量システムの構築

風味面での工程管理用のマーカーペプチドとして、構造が類似した 3 種ペプチド (Ile-Phe, Phe-Ile, Ala-Phe) を選定し、本システムでの一斉検出を検討した。なお、第一カラムとしてナカライテスク社製 Cosmosil 5C18 ARII カラム ($\phi 4.6 \times 250$ mm)、第二カラムとして Cosmosil 5C18 AR300 ($\phi 4.6 \times 250$ mm) を用いた。まず、C1 カラムの溶出条件を 5-35 % アセトニトリル (65 min)、流速; 0.8 ml/min (35 °C) に設定し、各ペプチドの溶出時間を島津紫外可視分光光度検出器 SPD-10AV (220 nm) により測定した。その結果、3 回の繰り返し測定による溶出時間は Ala-Phe: 9.58 ± 0.01 min, Phe-Ile: 29.13 ± 0.19 min, Ile-Phe: 32.46 ± 0.05 min であり、いずれのペプチドについても溶出時間の日内変動は 1% 以下、日間変動 0.5% 以下と極めて高い再現性を示した。そこで、この溶出時間をもとにカラムスイッチング時間を設定し、スイッチング時間を溶出時間の前後 1.0 分、すなわち 2 分間とした。次に、溶離液; 20% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸 for Ala-Phe, 30% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸 for Phe-Ile, Ile-Phe (isocratic)、流速; 0.8 ml/min として、ハートカットした各溶出画分 (2 分間) を C2 カラムに移行・分離させた結果、ある程度のピーク分離が認められたが、バルブ切り替えによる圧力ピーク直後に溶出することから、十分な分離を得るにはさらなる溶出条件の検討が必要であると考えられた。

逆相 HPLC 法によるペプチド分離にはそのイオン化を抑え、疎水性を増大させることが有効であることを当研究室ではすでに明らかにしている¹⁻³⁾。そこで、イオン対試薬として 1-オクタンスルホン酸ナトリウム (SOS) を適用し、C2 カラムでのさらなる分離条件でのさらなる分離条件の検討を試みた。その結果、図 1-2 に示したように、10 mM SOS を含む 27% (Ala-Phe) or 32% (Phe-Ile, Ile-Phe) アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸の条件ではほぼ完全なマーカーペプチドの分離が達成された。無塩醤油調味料を実サンプルとして本アッセイ法を適用した結果、図 1-3 に示したように、十分な分離を得ることができた。なお、7 回の繰り返し測定による変動係数は 5.9% 以下であった。以上の条件をもとに各ペプチドの定量を行ったところ、Ala-Phe は HFS 中に 0.37 ± 0.04 mg/g-HFS、Phe-Ile: 15.3 ± 4 mg/g-HFS、Ile-Phe: 3.2 ± 2.9 mg/g-HFS であった。

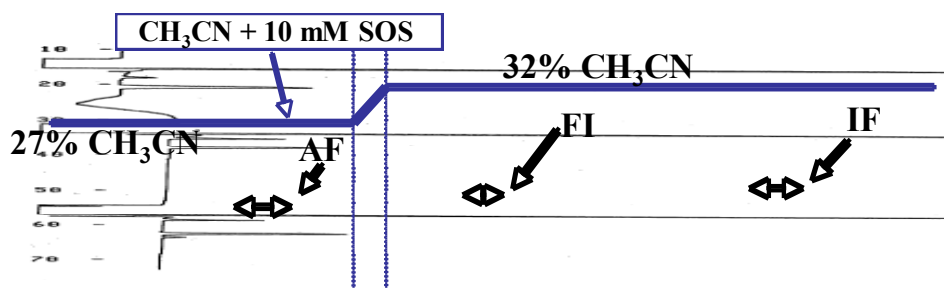


図 1-2 第 2 カラムでの最適化溶出条件でのスイッチング HPLC クロマトグラム

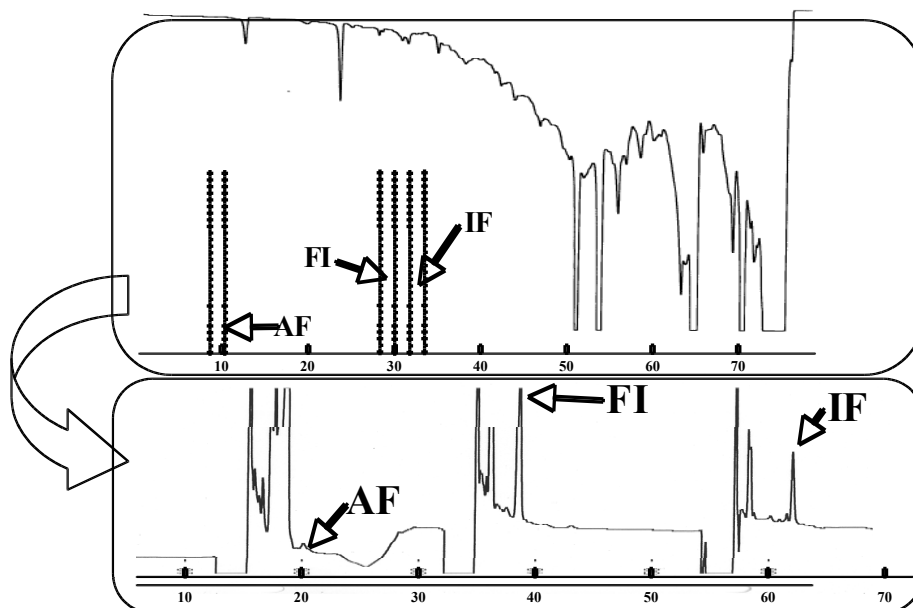


図 1-3 無塩醤油調味液のダブルカラムスイッチング HPLC 法

以上、本研究で新たに構築したダブルカラムスイッチング HPLC 法は目的とする複数のペプチド定量の一斉分析と品質管理を行う上での迅速性（70 分以内）に優れたアッセイ法であることが明示された。

1—5 研究成果の波及効果

今回、本プロジェクトによって、無鉛醤油様調味料中には新たに腸管吸収可能な低分子ペプチドが産生されることが判明した。また、このような低分子ペプチドを一斉分析可能なシステムを構築できたことより、無鉛醤油洋調味料の工程管理・品質管理を行う上でその意義は大きいと考える。

1—6 今後の課題と取組

本成果で得られた知見をもとに、今後は抗高血圧作用、作用機構などの解明を行う必要がある。

参考文献・引用文献

- 1-1) McMahon, G.P., Kelly, M.T., 1998. Determination of aspirin and salicylic acid in human plasma by column switching liquid chromatography using on-line solid-phase extraction. *Anal. Chem.* 70, 409-414.
- 1-2) Takano, T., Hata, S., 1996. High-performance liquid chromatographic determination of einasteride in human plasma using direct injection with column switching. *J. Chromatogr. B.*, 676, 141-146.
- 1-3) Matsui, T., Tamaya, K., Kawasaki, T., Osajima, Y., 1999. Determination of angiotensin metabolites in human plasma by fluorimetric high-performance liquid chromatography using a heart-cut column-switching technique. *J. Chromatogr.B*, 729, 89-95.

第2章 無塩調味料中のペプチド生産性の最適化

福岡県醤油醸造協同組合

専務理事 野田義治

技術部 部長代理 植木達朗

技術部 川野文男

2-1 原料処理条件と減麴率に関する研究開発

醤油醸造において、原料である脱脂加工大豆を高温(165℃)・短時間(25sec以内)蒸煮すると高い原料窒素利用率(醤油全窒素/原料全窒素)が得られることが知られている³⁻¹⁾。一方、本研究チームは、大豆タンパク質を乾式加熱変性もしくは湿式加熱変性で過変性に加熱処理することでペプチド画分が増加する事を見出した「平成16年度ふくおかIST産学官共同研究開発事業育成試験」。そこで、原料処理条件と処理した脱脂加工大豆の消化率及び分解率(アミノ態窒素/全窒素)の関係を明らかにし、効率良くペプチド画分を産生する条件を検討する。更に、醤油は原料の全てを麴とする全麴仕込法で醸造されるが、同育成試験において、原料の一部を醤油麴として、残りを麴にせず仕込む減麴仕込が全麴仕込に比べペプチド画分が多い傾向にあることを認めた。そこで、先に設定する原料処理条件で処理した脱脂加工大豆を用いた減麴仕込を行い、無塩醤油様調味料のペプチド画分増強のための醸造条件を設定する。

2-2 プロジェクト全体における本研究開発部分の位置づけ

本プロジェクトでは、高血圧予防・改善を訴求した機能性調味料の開発を行っている。本開発品の機能性成分は血圧調節機能を有するペプチドと考えられるが、本研究開発ではこのペプチドを含むペプチド画分の増強方法について検討する。

2-3 目的と目標

無塩醤油様調味料のペプチド画分(血圧低下作用)強化のための原料処理・減麴条件の最適化を行う。

2-4 研究成果

2-4-1 実験材料と方法

麴菌：麴菌は、福岡県醤油醸造協同組合保存の *Aspergillus oryzae* K2-4 株と HG 株を用いた。

醤油麴：福岡県醤油醸造協同組合の製造ラインより醤油麴を採取して実験に用いた。即ち、小麦は、流動焙煎装置 RX-2000((株)フジワラテクノアート)又はスーパーロースター((株)永田醸造機械)にて焙煎処理しハンマーミルにて割砕し割砕小麦とした。脱脂大豆は、連続蒸煮缶((株)山崎鉄工所)にて蒸煮し蒸煮大豆とした。原料処理前の小麦と脱脂大豆で重量等量に割砕小麦と蒸煮大豆を混和し、大型円盤製麴装置((株)永田醸造機械)に盛込み約40時間通風製麴し醤油麴を得た。なお、種麴(麴菌孢子)は蒸煮大豆と混和する前の

割砕小麦に予め分散させた。

蒸煮大豆及び乾熱処理大豆：減麴仕込試験を行う場合の非麴化大豆原料の原料処理は次のように行った。1.0atm・60分、1.0atm・120分、1.6atm・30分、1.6atm・60分の湿式加熱処理（蒸煮）はオートクレーブ(ヤマト化学(株))、2.0atm・5分、2.0atm・10分は連続蒸煮缶にて行った。160℃・30分、200℃・10分、400℃・2分、500℃・2分の乾式加熱処理は、定温乾燥機(ヤマト化学(株))にて行った。

小仕込試験：小仕込試験の原料配合は表2-1に示す。仕込量は元1L、仕込量は12水とし、諸味品温は20℃とした。また、減麴率は30%と50%とした。

表2-1 小仕込試験原料配合

減麴率 (%)	原料配合 (g)			仕込水量 (mL)	仕込水 アルコール濃度 (%)	小麦： 脱脂大豆
	醤油麴	小麦	大豆			
0	750	—	—	1,200	20	1：1
30	525	100	100	1,200	20	1：1
50	375	166	166	1,200	20	1：1

分析方法：各原料処理条件で湿式加熱又は乾式加熱処理した脱脂大豆は、必要に応じて減圧乾固させ小型粉碎機で粉碎し分析用サンプルとした。脱脂大豆サンプルのN性はしょうゆ試験法に従って測定した²⁾。消化率は次の通り測定した。脱脂大豆サンプル 1g、0.5M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 10mL、プロテアーゼ酵素剤液 2.4mL、滅菌水 10mL、トルエン 1mL を混合し 37℃で7日間恒温した。恒温後、10分間煮沸し脱イオン水にて50mLに定容し東洋濾紙 No.2 で濾過した。濾過液 30mL に 1.2M TCA 溶液 15mL を加え東洋濾紙 No.5C で濾過した。濾過液 10mL の全窒素分 (A) と脱脂大豆サンプルの全窒素分 (B) より次式に従って消化率を算出した。なお、用いたプロテアーゼ酵素剤液は、エイチビーアイ(株)製のオリエンターゼ 5N(力価 50,000 PU) 1g を 1/500M 酢酸カルシウム溶液に溶解し 100mL に定容して用いた。

$$\text{消化率 (\%)} = \frac{\text{濾過液 (50mL) の総 TN}}{\text{粉末 (1g) の総 TN}} \times 100 = \frac{B \times (30 + 15) / 10 \times 30 / 50}{A \times 1 / 100} \times 100$$

所定の期間恒温した諸味を東洋濾紙 No.2 で濾過し得られた濾過液を分析用サンプルとした。諸味濾過液サンプルの食塩分、全窒素分、アミノ態窒素分、直接還元糖量、pH、標準色は、しょうゆ試験法に従って測定した³⁻²⁾。アルコール分は、内部標準物質として n-プロピルアルコールを用いガスクロマトグラフィーにて測定した。グルタミン酸量は、「ヤマサ グルタミン酸測定キット」を用いて測定した。分解率は、全窒素分に対するアミノ態窒素分の百分率として求めた。

2-4-2 実験結果

原料処理条件の検討：無塩醤油様調味液のペプチドは、製麹中に麹菌が生産したプロテアーゼによって大豆蛋白質が分解され生じる。16年度産学官共同研究開発事業育成試験の結果、大豆蛋白質を乾式加熱変性もしくは湿式加熱変性のいずれかで、過変性に加熱処理することでペプチド画分が増強できる事を認めた。そこで、異なる加熱条件で処理した脱脂大豆の分解率を検討することとした。醤油醸造では、蛋白質の変性が不十分な場合、麹菌プロテアーゼによって限定的にしか分解されなかった限定分解蛋白質が製品へと移行し調理時に濁りを発生させることがある(N性)。加熱条件の設定に際しては、このN性と大豆蛋白質の消化率(被分解性)及びペプチド画分量の多少の目安として分解率(アミノ態窒素/全窒素)を指標とした。

試験した湿式加熱条件では、1.0atm・60分、1.0atm・120分、1.6atm・30分、1.6atm・60分、2.0atm・5分の各条件でN性を示すことなく原料処理することができた(表2-1)。乾式加熱条件では、160℃・30分、200℃・10分、200℃・15分の各条件でN性を示すことなく原料処理することができた(表2-2)。次に、これらの条件で処理した脱脂大豆の消化率を試験した。その結果、湿式加熱処理では1.0atm・60分、乾熱処理では200℃・10分で、醤油醸造の処理条件(2.0atm, 5分)に比べ分解率が低くなる事を認めた。しかし、同時に無塩醤油様調味液の歩留まりの指標である消化率も低下した。そこで、これらの加熱条件に加え、醤油醸造現場の連続蒸煮缶にて2.0atm・10分で処理する条件を原料処理条件として設定し減麹仕込を行う事とした(表2-3)。

表2-1 異なる条件で湿式加熱処理した脱脂加工大豆のN性

加熱圧力(atm)	加熱時間(分)			
	10	30	60	120
1.0			—	—
1.6		—	—	
2.0	—			

表2-2 異なる条件で乾式加熱処理した脱脂加工大豆のN性

加熱温度(℃)	加熱時間(分)				
	2	4	10	15	30
160				+	—
200	+	+	—	—	
300	+	— (やや炭化)			
400	+(やや炭化)				
500	— (炭化)				

表 2-3 異なる条件で加熱処理した脱脂加工大豆の消化率と分解率

	加熱処理条件	消化率 (%)	分解率 (%)
湿式加熱	1.0atm, 60 分	86.6	15.6
	1.0atm, 120 分	85.1	18.1
	1.6atm, 30 分	89.2	20.4
	1.6atm, 60 分	90.2	17.7
	2.0atm, 10 分	91.8	18.4
乾式加熱	160℃, 30 分	89.4	19.3
	200℃, 10 分	74.7	13.5

減麴法による小仕込試験：一般的に醤油醸造では、原料として用いる脱脂加工大豆と小麦の全てを麴として仕込む全麴法で製造される。醤油では大豆蛋白質を効率良くアミノ酸に変換する必要があるため、それに十分量の麴菌プロテアーゼを確保しなければならない。この観点で、醤油醸造が全麴法で行われることは合理的といえる。一方、ここでは大豆蛋白質の分解産物であるペプチドの増強を目的としている。従って、大豆蛋白質に対する麴菌プロテアーゼ量を下げる必要があると考えられた。そこで、原料の一部を非麴化原料として仕込む減麴法による小仕込試験を行った。なお、試験に用いる麴は醤油醸造の常法に従って製造されたものを用いた。一方、麴としない原料（非麴化原料）の脱脂加工大豆については、先に設定した原料処理条件（湿式加熱処理：1.0atm・60 分、2.0atm・10 分、乾式加熱処理：200℃・10 分）でそれぞれ処理したものを仕込んだ。小麦については醤油醸造の常法に従って原料処理した。

小仕込試験は、表 2-1 の仕込配合に従って仕込んだ。仕込水のアルコール濃度を 20%とし 20℃で恒温したが、いずれの諸味も 2 ヶ月間酸敗することなく最終 pH は約 6.0 であった（図 2-1、図 2-2）。対照である全麴仕込の分解率が約 65%であるのに対して 50%減麴仕込では、1.0atm・60 分、2.0atm・10 分、200℃・10 分の分解率はそれぞれ 58.5、59.2、62.0%であり、いずれも分解率の低下を認めた。また、脱脂加工大豆を乾式加熱処理した無塩調味液は苦味を感じ、湿式加熱処理したものでも分解率が 58.5%になると僅かに苦味を感じた（表 2-3）。よって、無塩醤油様調味液の原料処理条件としては 2.0atm、10 分、減麴率は 50%程度が適当と判断した。なお、苦味を感じる試験区ではペプチド画分を多く含む可能性が有りサプリメント等への応用が期待される。なお、各小仕込諸味のマーカーペプチド含有量は、第 1 章にて論述したカラムスイッチング HPLC 法により明らかにした（表 2-4）。

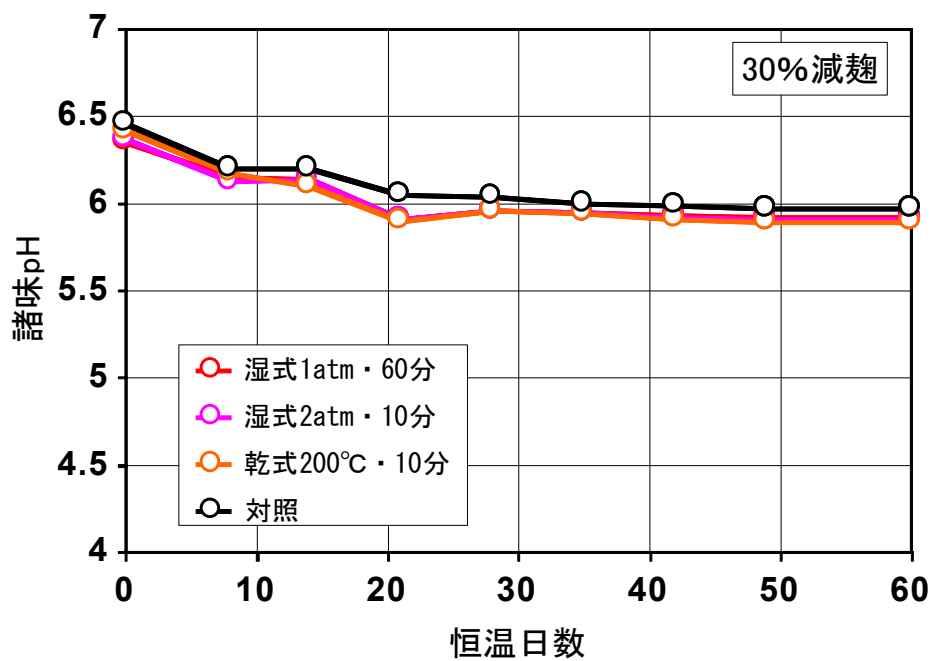


図 2 - 1 減麴率 30% の小仕込試験諸味の pH 推移

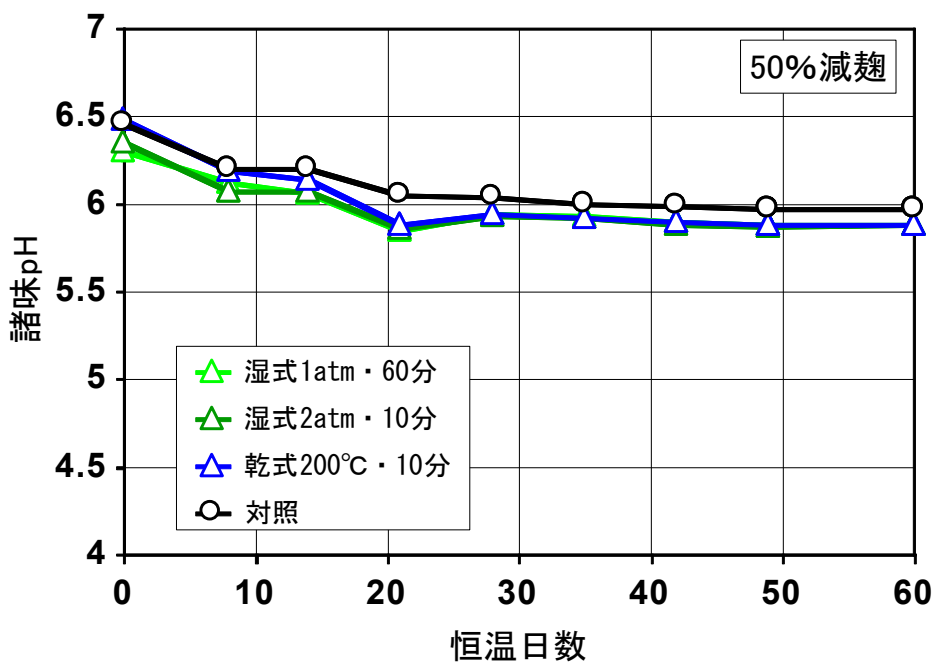


図 2 - 2 減麴率 50% の小仕込試験諸味の pH 推移

表 2-4 減麴仕込無塩醤油様調味液の一般分析値

	全麴	30%減麴			50%減麴		
		1atm 60 分	2atm 10 分	200℃ 10 分	1atm 60 分	2atm 10 分	200℃ 10 分
食塩分 (%)	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
アルコール (%)	9.5	11.1	10.8	10.7	9.70	9.13	11.5
全窒素 (%)	1.90	1.94	2.01	1.89	1.83	1.92	1.83
直接還元糖 (%)	10.0	10.0	10.5	10.7	11.1	11.2	10.5
グルタミン酸／全窒素 (mg%)	863	871	866	868	842	807	792
分解率 (%)	64.7	64.2	62.9	64.0	58.5	62.0	59.2
pH	5.98	5.93	5.92	5.90	5.89	5.88	5.88
色	19	20	19	18	21	20	19
苦味 (官能評価)	無	無	無	弱	微弱	無	有
Ala-Phe (%)	0.50	0.10	0.08	0.44	1.18	0.32	1, 15
Phe-Ile (%)	1.12	1.11	1.47	1.18	0.97	1.11	0.86
Ile-Phe (%)	0.72	0.57	0.70	0.46	0.72	0.70	0.25
合計 (%)	2.34	1.78	2.25	2.08	2.87	2.13	2.26

< 0.1 : 0.1% 以下

減麴法による発酵型無塩醤油様調味液の小仕込試験：設定した減麴条件にて発酵型無塩醤油様調味液の小仕込試験を行った。即ち、減麴条件は非麴化原料処理条件 2.0atm, 10 分、減麴率 50%とした。また、これら 50%減麴試験諸味の発酵条件は、麴菌 *A. oryzae*、酵母 *S. cerevisiae* (10⁶/g 諸味添加)、仕込温度 15℃、仕込 pH5.5 とした。また、対象として従来の無発酵型全麴仕込の諸味を同時に仕込んだ。

全麴仕込及び 50%減麴仕込の諸味とも pH5.3 以上で推移し 2 ヶ月間酸敗することなく醸造できた (図 2-3)。なお、50%減麴仕込でアルコール発酵を促進するために初発の pH を乳酸により 5.5 とした。減麴仕込は、減麴によって原料蛋白質に対するプロテアーゼの総活性を相対的に低下させると共に、非麴化原料 (脱脂加工大豆) の蛋白質を過度に変性させてペプチド画分を増強する事を目的とし、前述の減麴条件でその目的は達成されていた。しかし、表 2-5 に示すとおり、全麴仕込及び 50%減麴仕込の無塩醤油様調味液の分解率は、それぞれ 60.4%と 60.8%で大差なかった。発酵型無塩調味液の諸味品温は、表 2-4 の減麴仕込に比べ高めに設定しているため、プロテアーゼによる分解が促進されて分解率に差異を生じなかったのかもしれない。

本章では、無塩醤油様調味液の機能の増強を目的にペプチド画分の増強を目標として製造方法を検討した。一方、第 4 章では官能的な品質改善のために発酵型の無塩醤油様調味料の製造方法を検討した。本小仕込試験は、両者の製造方法を併せてペプチド強化型で且つ発酵型の無塩醤油様調味料の調製を試みたが、指標としている分解率が対照区に対して相対的な低下が認められず、両者を両立した無塩醤油様調味料の調製に至らなかった。なお、ペプチド画分を増強させるためには、本章の製造条件で調整した調味液を任意にブレ

ンドすることも出来る。

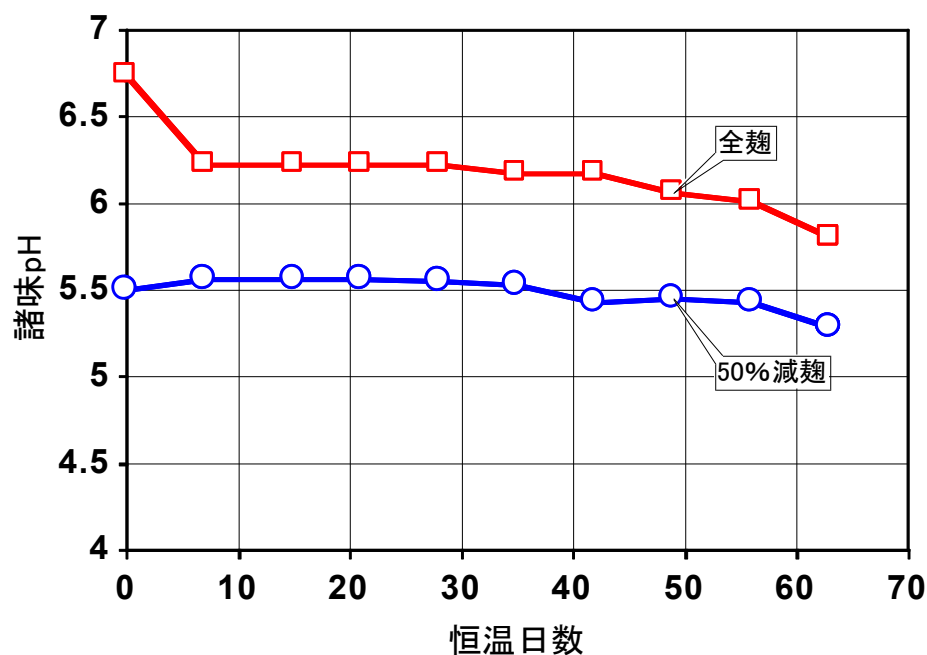


図 2－3 減麴率 50%の発酵型無塩醤油様調味液諸味の pH 推移

表 2－5 減麴仕込した発酵型無塩醤油様調味液の一般分析値

	全麴	50%減麴
食塩分 (%)	< 0.1	< 0.1
アルコール (%)	10.70	9.80
全窒素 (%)	2.02	1.81
直接還元糖 (%)	7.55	7.25
グルタミン酸／全窒素 (mg%)	847	923
分解率 (%)	60.4	60.8
pH	5.90	5.39
色	23	33
推定アルコール発酵量 (%)	0	1.0
苦味 (官能評価)	無	無

< 0.1 : 0.1% 以下

2－5 今後の課題と取組み

目標としている「高血圧予防・改善に適した次世代型調味料」の製法としては官能的側面から、全麴法又は減麴法（原料処理条件：2atm・10 分，減麴率 50%）での製造が妥当と考えられた。一方、サプリメント等へ展開する場合は、1 回の摂取量（経口量）に限度があるためペプチドの含有量が高くなる減麴法（原料処理条件：200℃・10 分，減麴率 30-50%）

での製造が妥当と考えられた。また、必要に応じて、これらを食品素材としてブレンドすることも出来る。このように、本研究開発によって血圧低下ペプチドの必要量と官能的特長(苦味)などを考慮して最終製品の設計を行い、それに有利な製造方法を選択することが出来るようになった。今後は、最終製品の展開について検討していきたい。

参考文献・引用文献

2-1) 増補 醤油の化学と技術：析倉辰六郎編，財団法人日本醸造協会，p58（1994）

2-2) しょうゆ試験法：しょうゆ試験法編集委員会，財団法人日本醤油研究所（1985）

第3章 無塩調味液の風味改善と安全性の向上

九州大学大学院農学研究院 教授 下田 満哉

3-1 無塩調味料の風味改善に関する研究開発

醤油特有の風味は、世界でも類を見ない独特の発酵形態、すなわち、高濃度(約 17%)食塩環境下での、麹、乳酸菌及び酵母による逐次発酵により醸し出される。その香りは非常に複雑であるが、醤油を基本調味料として我々が受け入れている理由はその特有の風味にあることは間違いない。本プロジェクトの中心課題である無塩調味料の市場価値を高めるためには、無塩発酵プロセスにおいて醤油様風味を如何に醸成させるかにかかっているとわざるを得ない。本研究開発では、先ず、市販濃い口醤油の香気成分と無塩調味料の香気成分パターンを比較し、問題点を明確にすること、次に無塩調味料の風味改善をその発酵プロセスの最適化により実現させるという戦略をとった。

3-2 プロジェクト全体における本研究開発部分の位置づけ

高血圧予防効果における無塩であることの機能性はもとより、本調味料中には血圧低下作用を有する各種のペプチドが含まれていることから、ここで開発する無塩調味料は健康志向食品(Better for you)であることはいうまでもない。しかしながら、市場価値を高めるためにはその風味を改善する必要性が認められた。本開発研究は無塩調味料の醸造プロセスを詳細に検討することにより、風味の向改善を実現しようとするものである。すなわち、生体調節に関わる機能性と十分な嗜好性を付与することにより、市場価値の高い独創的な調味料開発を図ることができる。

3-3 目的と目標

無塩醤油様調味料(HFS)の嗜好上の問題点として、1) 苦味ペプチドに起因する特有の苦味を呈すること、2) 醤油の風味を想起させる醤油フレーバーが不足(あるいは欠如)していることが挙げられる。1) に対しては、苦味抑制作用を有するとして報告例のある食品成分を添加することによる苦味の隠蔽を試みる。さらに、発酵プロセスを追加することによって苦味の低減化を試みる。2) においては、先ず市販濃い口醤油の香気成分分析を行い、醤油の特徴香成分を明らかにする。次に、非発酵タイプの HFS の香気成分分析を行い、非発酵タイプの HFS の香りの欠点を分析化学的に明示する。HFS の風味の欠点を改善するために、2 種類の清酒酵母、2 種類の醤油酵母による発酵プロセスを追加し風味改善に及ぼす発酵の効果を明らかにする。

3-4 研究成果

3-4-1 HFS の苦味軽減に関する研究開発

非発酵タイプの HFS は知覚されるレベルで苦味が認められた。これはタンパク質の不完全分解に起因する苦味ペプチドの味である。この苦味を隠蔽するために L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-リジン、レシチンを添加した。これらの物質は何れも苦味低減作用を有す

ることが報告されている。HFS への添加濃度はアミノ酸（L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-リジン）では、いずれも 2 mM 添加とした。界面活性作用を有する複合脂質（リン脂質）であるレシチンは HFS 1 kg 当たり 400mg の添加とした。

官能検査 1：2 点識別法（パネリスト 12 名）により、苦味の強度を判定したところ、L-リジンとレシチンに有意な苦味抑制効果が認められた。

さらに、HFS の嗜好性を高めることを目的として、クエン酸による酸味の付与、本プロジェクトの趣旨とは必ずしも一致しないが微量の食塩の添加効果も調査したところ、クエン酸では 0.2～0.6%の添加で、食塩は 0.4～1.2%の添加で嗜好性は有意に高められることが明らかとなった。

以上のように、非発酵 HFS の苦味は L-リジンあるいはレシチンの添加により、ほとんど問題とならないレベルまで低減化することができたが、本プロジェクトの 2 年目で開発された発酵 HFS において苦味は著しく軽減されており、苦味低減を目的とする処理は何ら必要とされなかった。本プロジェクトを通して HFS の苦味対策は抜本的に解決することができた。

3－4－2 市販濃い口醤油の香気成分分析

本プロジェクトで研究開発を目指しているのは無塩調味料であるが、我が国の消費者は基本調味料として醤油様風味になれているのが現状である。本製品においても醤油様風味の付与が最も重要な命題となった。そこで先ず、市販濃い口醤油中の香気成分の一斉分析を行った。醤油香気成分の濃縮は、官能的に優れたニオイ濃縮物を調製するために我々が既に設定して報告している芳香族系の多孔質吸着剤であるポラパック Q を用いる直接カラム濃縮法により行った。濃縮操作の概要は図 3－1 に示したとおりである。

図 3－1 醤油香気成分の固相抽出

・サンプル

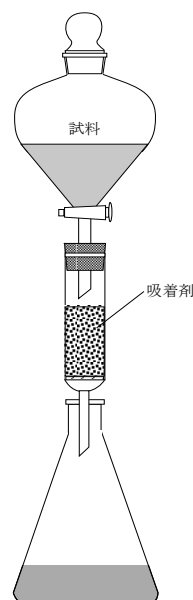
（市販醤油、無塩醤油（発酵）、無塩醤油（非発酵））

・吸着剤

ポラパック Q 30ml

・操作

- 1) ポラパックQカラムに試料100mlを流し、
香気成分を吸着
- 2) 脱イオン水(50ml)でカラムを洗浄
- 3) ジエチルエーテル(70ml)を用いて香気成分を溶出
- 4) 内標準(シクロヘキサノール1.0mg)添加
- 5) エーテル抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥
- 6) エーテル溶液を100 μ lまで濃縮
- 7) GC分析



得られたガスクロマトグラムを図 3－2 に示す。

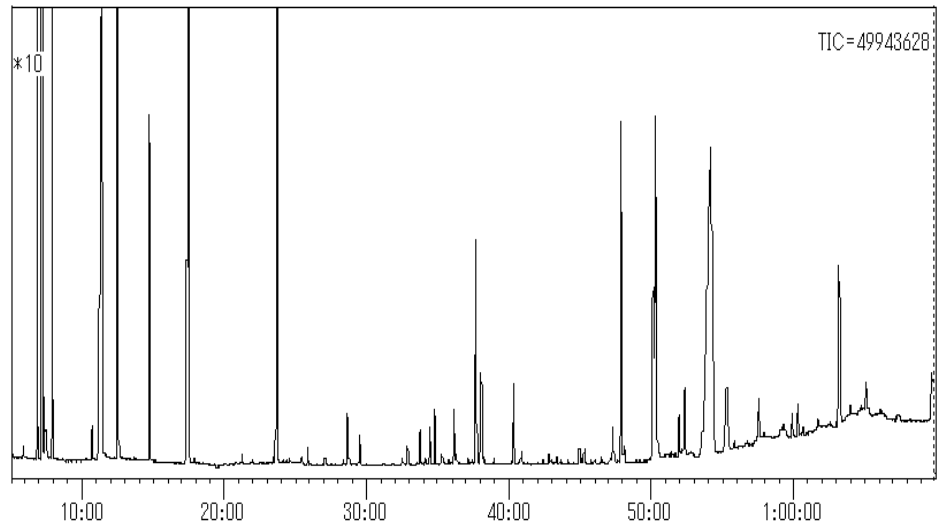


図 3－2 醤油香気濃縮物のガスクロマトグラム

キャピラリーカラム: DB-WAX (0.25 mm i.d. x 60 m)
カラム温度: 50 → 230°C (3°C/min)
試料調製: Porapak Qを用いた吸着濃縮法

本ニオイ濃縮物をガスクロマトグラフ直結質量分析計に供したところ、醤油中の揮発性成分としてアルコール類 25 種、ケトン類 15 種、アルデヒド類 4 種、エステル類 19 種、フラン及びフラノン類 11 種、フェノール類 7 種、有機酸類 15 種、ピラジン類 7 種、ピリジン類 3 種、ピロール類 2 種、含留化合物 2 種、炭化水素類 4 種、その他の化合物 4 種、合計 118 種の化合物のマスペクトル及び保持指標が標準物質と一致したので、これらの化合物を同定することができた（表 3－1）。

表 3－1 醤油中の揮発性成分

・Alcohols	25
・Ketones	15
・Aldehydes	4
・Esters	19
・Furans & Furanones	11
・Phenols	7
・Acids	15
・Pyrazines	7
・Pyridines	3
・Pyrroles	2
・Sulfer-containing	2
・Hydrocarbons	4
・Miscellaneous	4
Total	118

未同定の微小ピークも含めて図 3－2 のガスクロマトグラム上のピークのニオイ嗅ぎを行った。本法を GC-Olfactometry (GC-ニオイ嗅ぎ法) と呼ぶ。GC-Olfactometry により官能的に検出された化合物名とそのニオイ特性を表 3－2 に示している。o-methoxyphenol

(クレゾール臭)、2,6-dimethoxyphenol (クレゾール臭)、4-ethylphenol (醤油ラーメンの匂い)、2-methoxy-4-vinylphenol (甘い匂い)、4-hydroxy-2(5)-ethyl-5(2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF) (甘い匂い) は醤油香気に重要な役割を果たしていると考えられた。

表 3-2 GC ニオイ嗅ぎの結果

GC-Olfactometryにより検出される匂い成分

KI	Compound	Odor Attribute
1055	2-methyl-3-butanol-2-ol	甘い、青臭い
1123	iso-butanol	青臭い
1233	3-methyl-1-butanol	青臭い、すっぱい
1323	3-hydroxy-2-butanol	ナッツ様、香ばしい
1336	2,5-dimethylpyrazine	香ばしい
1374	2,3-dimethylpyrazine	ナッツ様、香ばしい
1432	Ethyl hydroxyacetate	香ばしい、青臭い
1479	Acetic acid	酢酸臭
1490	unknown	香ばしい、青臭い
1604	unknown	ポップコーン、腐敗臭
1657	Butyric acid	悪臭
1695	2-thiamethanol	納豆
1750	methanol	ボタト、すっぱい
1891	o-methoxyphenol	クレゾール臭
2000	2-acetyl pyrrole	甘い、糖の匂い
2050	4-ethyl-2-methoxyphenol	甘い、ウスターソース
2058	2-methyl pyrrole	汗くさい、ウスターソース、甘い
2081	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (furanol)	汗くさい、フルーティ、甘い
2155	4-hydroxy-2(5)-ethyl-5(2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF)	甘い、フルーティ
2210	4-ethyl phenol	醤油ラーメン
2225	unknown	苦い、お醤油
2236	2-methoxy-4-vinyl phenol	甘い
2304	2,5-dimethoxyphenol	クレゾール臭、甘い

3-4-3 無塩醤油様調味料の香気成分分析

本プロジェクトで試作した HFS を用いて同様の方法で香気成分分析を行った。図 3-3 に HFS のニオイ濃縮物のガスクロマトグラムを示す。比較のために濃い口醤油のクロマトグラムも示している。クロマトグラム中の is は内標準(internal standard; シクロヘキサノール 10 mg/kg) のピークを示している。両クロマトグラムを比較すると明らかなように、HFS は香気成分が著しく乏しいことがわかる。

表 3-3 は主要なアルコール類について濃い口醤油と HFS を比較したものである。これから明らかなように、アルコール類は両者に大きな違いは認められなかった。1-octen-3-ol は松茸様の風味を有する化合物であるがこれは HFS でのみ検出された。3-oxo- α -ionol は枯れ葉様のニオイを呈する化合物であるがこれも HFS に特異的であった。花のようなニオイとされている Phenylethyl alcohol は両者から検出されたが、その濃度は濃い口醤油の方が高かった。以上のことから、アルコール類は両試料において重要なニオイ化合物であると考えられるが、醤油特有の塩味を連想させるようなニオイには関与していないと考えられる。

表3－3 主要なAlcohol類の比較

化合物	濃い口醤油(μ g/L)	HFS(μ g/L)
isobutanol	6761	131
3-methyl-1-butanol	8062	1059
1-octen-3-ol	----	226
2,3-butanediol	635	515
Phenylethyl alcohol	3876	952
3-oxo- α -ionol	----	437

表3－4はケトン類について比較したものである。3-butyl-1,2,4-cyclopentanetrioneは濃い口醤油に特異的に含まれているのに対して、1-(2,4-dimethylphenol)-ethanoneはHFSの方に多量含まれていた。ケトン類のニオイ特性などを考え合わせると、このグループの化合物が醤油の香気成分として官能的な重要性をもっているとは言い難い。

表3－4 主要なKetone類の比較

化合物	濃い口醤油(μ g/L)	HFS(μ g/L)
2-pentanone	16	9
ethylacetophenone	126	678
3-butyl-1,2,4-cyclopentanetrione	2941	----
2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	670	253
3,5-dimethylacetophenone	425	712
1-(2,4-dimethylphenol)-ethanone	126	1343

表3－5はエステル類、表3－6は揮発性有機酸類、表3－7はピラジン類を比較したものであるが、いずれも醤油の香気成分として特に重要であるとは考え難い。

表3－8は含硫化合物を比較している。この中で methionol 含量は濃い口醤油で顕著に高いことが判明した。さらにこの化合物はある程度醤油様のニオイを呈することから、HFSの品質指標として重要な化合物であると考えられる。

表 3－5 主要なEster類の比較

化合物	濃い口醤油 (μ g/L)	HFS (μ g/L)
Methyl lactate	7	-----
Propyl 2-hydroxypropanoate	7316	538
Methyl 2-oxo-hexanoate	289	40
Ethyl succinate	2755	149
Ethyl phenylacetate	-----	30

表 3－6 主要なAcid類の比較

化合物	濃い口醤油 (μ g/L)	HFS (μ g/L)
Acetic acid	4431	2451
Butanoic acid	74	30
4-hydroxybutanoic acid	62	25
3-Methylbutanoic acid	tr	358
4-Methylpentanoic acid	35	61
Phenylacetic acid	1044	1903

表 3－7 主要なPyrazine類の比較

化合物	濃い口醤油(μ g/L)	HFS(μ g/L)
Methylpyrazine	16	5
2,5-dimethylpyrazine	5	----
2,6-dimethylpyrazine	33	32
2-Ethyl-6-methylpyrazine	10	5
trimethylpyrazine	tr	-----
tetramethylpyrazine	1	-----

表 3－8 主要な含硫化合物比較

化合物	濃い口醤油(μ g/L)	HFS(μ g/L)
2-Methylthiophene	28	34
3-Methyl-thiazolidine	136	----
Methionol	1274	28

表 3－9 主要なフェノール化合物比較

化合物	濃い口醤油(μ g/L)	HFS(μ g/L)
O-Methoxyphenol	39	18
4-Ethyl-2-methoxyphenol	347	79
2-Methoxy-4-vinylphenol	699	4933

表 3－9 はフェノール類を比較している。ここに挙げている化合物は何れも醤油に不可欠なスモーキーなニオイを呈することから重要と考えられる。特に、2-methoxy-4-vinylphenol は HFS に高濃度含まれていることから本化合物のニオイの寄与は重要と考えた。このことについては、再度述べる。

表 3－10 はフラノン類を比較したものである。これらのうち、HEMF は醤油の甘い匂いに寄与する化合物として最重要であると言われている。我々は醤油の塩味風味に本化合物の関連化合物が寄与していると考えているが、残念ながらその証拠を明らかにすることはできなかった。ただし、HEMF 濃度が醤油中で 6000 μ g/kg 以上と他の香気成分に較べて最も高いこと、HFS で本化合物が検出されなかったことなどを考え合わせると、HEMF の重要性は殊更である。

表 3-10 主要なFuranone類の比較

化合物	濃い口醤油(μ g/L)	HFS(μ g/L)
3-Methyl-2(5H)-furanone	25	-----
2(5H)-furanone	14	-----
Furaneol	925	151
HEMF	6161	-----

HEMF; 4-hydroxy-2(5)-ethyl-5(2)-methyl-3(2H)-furanone

以上要約すると、濃い口醤油と HFS の風味の違いは、アルコール類、ケトン類、エステル類、揮発性有機酸類、ピラジン類に起因するのではなく、methionol と HEMF の決定的な欠如に起因すると考えるべきであろう。とりわけ、HFS における HEMF の欠如は本製品の醤油風味の欠如に直接関係すると考える。一方、フェノール類は HFS 中にも相当量含まれていたために、HFS の風味に締まりとパンチを与えるのに役立っていると考えられる。

3-4-4 発酵プロセスによる風味の改善

3-4-3 で述べたように、HFS は香気成分の濃度が低く、HEMF のような醤油の特徴香気成分を含まなかったことから、無塩調味料の醸造プロセスを改変することにより風味の改善を試みた。表 3-11 に示すように、麴菌としてオリゼとソーヤの 2 菌株により麴を調製し、その後清酒酵母 901 による発酵あるいは醤油酵母 S32 による発酵プロセスを追加した。各組み合わせで製造された発酵 HFS は、表 3-11 に示すような風味特性を示した。我々の官能検査では、サンプル番号 1 のオリゼと清酒酵母 901 の組み合わせにより製造された発酵 HFS が最も優れた風味を呈することが判明した。

表 3-11 無塩醤油のニオイに及ぼす種麴と酵母の影響

	種麴	酵母	官能評価
1	オリゼ	清酒酵母 901	醤油様のニオイあり、雑臭なし、パンチが強い、塩味感あり
2	オリゼ	醤油酵母 S32	サンプル1に比べやや弱い、僅かに雑臭あり
3	ソーヤ	清酒酵母 901	醤油様のニオイはあるが弱い、特有のキノコ臭有り、雑臭あり
4	ソーヤ	醤油酵母 S32	醤油様のニオイはあるが弱い、特有のキノコ臭有り、雑臭あり

表 3－12 に主要香気成分の各種発酵 HFS 中の濃度を示している。使用された微生物によって特徴的な香気成分が生成していることが示された。例えば、ソーヤで麴を作製した場合には特徴的な 1-octen-3-ol（キノコ風味）、3-methylbutanoic acid（ツンツンしたニオイ）、maltol（甘いニオイ）が多量生成した。オリーゼを使用すると ethyl isonicotinate, 4-vinylguaiaicol, coumaran の生成が増大した。諸味の発酵プロセスで使用される醤油酵母 S 3 2 と清酒酵母 9 0 1 でも枚両な違いが認められた。すなわち、清酒酵母を使用すると 2-methylpropanol, 2-propylfuran の濃度が高くなる。官能的には表 3－11 に示すように、オリーゼと清酒酵母 9 0 1 の組み合わせが最も優れた風味を生成させたが、香気成分レベルではこれを裏付ける予とはできなかった。何れの微生物の組み合わせにおいても醤油の特徴香成分である HEMF の生成は極めて微量であった。

表 3－12 無塩醤油中の主要な香気成分（使用微生物との関連）

PN	compound	Soya-901	Soya-S32	Orizae-901	Orizae-S32
1	2-methylpropanol	1.04	0.67	1.56	0.47
2	2-propylfuran	4.84	1.53	14.1	1.52
3	3-methylbutanol	8.90	7.35	9.92	5.53
4	unknown	2.34	0.25	5.79	0.17
5	Cyclohexanol (IS)	10	10	10	10
6	1-octen-3-ol	0.89	1.28	0.05	0.05
7	3-methylbutanoic acid	1.15	1.07	0.47	0.41
8	methionol	0.54	0.44	0.39	0.46
9	Ethyl isonicotinate	0.49	0.56	0.91	1.54
10	unknown	2.26	0.16	0.40	0.08
11	antioxidant	1.32	3.42	1.30	1.65
12	phenethylalcohol	3.38	4.51	5.09	4.90
13	maltol	4.95	5.36	1.19	1.73
14	HEMF	0.58	1.79	0.53	1.59
15	5,6-dimethyl-1,4-dioxin	1.67	3.82	0.84	1.34
16	4-vinylguaiaicol	4.41	7.10	8.86	15.3
17	2-methoxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	0.62	2.58	0.68	1.28
18	coumaran	0.37	0.82	0.92	2.39

(mg/kg)

3－5 研究成果の波及効果

今回開発された無塩醤油様調味料は使用微生物の選抜並びに発酵プロセスの最適化により、醤油により近い風味とすることができた。少なくとも、その風味にはまったく欠陥は認められないレベルに至った。さらに、タンパク質の酵素分解で生じる苦味ペプチドの生成を完全に抑制することに成功した。本製品は特殊用途、例えば食塩摂取量を厳しく制限されている腎臓病患者向けの基本調味料としての利用が期待される。

3－6 今後の課題と取組

醤油風味の醸成には高濃度食塩環境下での発酵プロセスが必須であると考えられたので、醤油様風味を有する減塩、低塩あるいは無塩の基本調味料の製造には通常の本醸造醤油の完全脱塩処理に関する研究に取り組みたい。あるいは、本醸造醤油の塩味風味に寄与する成分を特定し、この香気成分の無塩調味料への利用を促進するための研究にも現在取り組んでいる。

参考文献・引用文献

- 3-1) 下田満哉、平野好司、箴島 豊: ポーラスポリマーカラムによる食品香気成分の濃縮、
分析化学、**36**, 792 ~ 798(1987).
- 3-2) 中台忠信: 醤油の香りと味、香料、No. 200, 69 ~ 80(1998).
- 3-3) Nunomura, N., Sasaki, M., Asao, Y. and Yokotsuka, T.: Identification of Volatile
Components in Shoyu (Soy Sauce) by Gas Chromatography-Mass Spectrometry,
Agric. Biol. Chem., **40**, 485 ~ 490(1976).
- 3-4) Nunomura, N., Sasaki, M., Asao, Y. and Yokotsuka, T.: Isolation and Identification
of 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone, as a Flavor Component
in Shpyu (Soy Sauce), *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 491 ~ 495(1976).
- 3-5) Nunomura, N., Sasaki, M. and Yokotsuka, T.: Shoyu (Soy Sauce) Flavor
Components: Acidic Fractions and the Characteristic Flavor Component, *Agric.
Biol. Chem.*, **44**, 339 ~ 351(1980).
- 3-6) Sasaki, M., Nunomura, N. and Matsudo, T.: Biosynthesis of
4-Hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone by Yeasts, *J. Agric. Food
Chem.*, **39**, 934 ~ 938(1991).

第4章 無塩調味料を用いた食品の開発

福岡県醤油醸造協同組合	専務理事	野田義治
技術部	部長代理	植木達朗
技術部		川野文男

江崎グリコ株式会社	中央研究所	マネージャー	白石浩荘
	中央研究所		福田真一

4-1 発酵型無塩醤油様調味料及びこれを活用した食品に関する研究開発

醤油醸造では2種の麹菌（*Aspergillus oryzae*, *A. sojae*）が用いられており、それぞれ、特徴的な香気を有する。更に、耐塩性乳酸菌による乳酸発酵と耐塩性酵母によるアルコール発酵を経て複雑な醤油の香りが醸し出される。特に、アルコール発酵はエステル類、アルコール類、アルデヒド化合物、フラノン類など香味に大きく影響する⁴⁻¹⁾。既存品の無塩醤油様調味液は醤油麹をアルコール存在下で分解・熟成させたものであり、食塩による酵素の活性阻害が無いため旨味成分のグルタミン酸に代表されるアミノ酸が豊富で有るが、発酵過程で産生する醤油様発酵香気に乏しい。そこで、本研究の予備試験として、発酵過程を組入れた無塩醤油様調味液の試醸を行ったところ風味改善の可能性が示された「平成16年度ふくおかIST産学官共同研究開発事業育成試験」。本研究ではこの発酵型無塩醤油様調味料製造のための実用工場規模で実施可能な醸造条件（仕込水アルコール濃度、酵母菌種、品温経過）を検討し、これを活用し食品（製品）を試作する。

4-2 プロジェクト全体における本研究開発部分の位置づけ

本プロジェクトでは、高血圧予防・改善を訴求した機能性調味料の開発を行っている。この中で本研究開発では、本開発品に既存品に比べ調味料としてより醤油らしい風味を実生産可能な方法で付与し、発酵型の無塩醤油様調味液の実用化を行う。更に、試醸した発酵型無塩醤油様調味料を活用した食品（製品）として常温流通が可能な“無塩醤油様調味液”や病者用の“せんべい”と“柿の種”を開発する。

4-3 目的と目標

無塩醤油様調味料の風味改善のために最適な発酵・火入条件を設定し、発酵型無塩醤油様調味料を試醸する。これを用いて無菌充填した個包装（使い切り）タイプの“無塩醤油様調味液”及び病者用の“せんべい”と“柿の種”を試作する

4-4 研究成果

4-4-1 実験材料と方法

酵母：酵母は福岡県醤油醸造協同組合保存の *Zygosaccharomyces rouxii* と *Saccharomyces cerevisiae* を用いた。酵母の培養は、無塩醤油様調味料 5.5%とグルコース 5%からなる培地（TN 1.7, pH 5.2）にて 30℃・3日間振盪培養した。

醤油麴：第2章と同様に福岡県醤油醸造協同組合の製造ラインより醤油麴を採取して実験に用いた。

小仕込試験：表4-1に小仕込試験及びパイロットスケールの試醸の仕込量と配合を示す。

表4-1 小仕込試験原料配合

	仕込量 (元 L)	醤油麴 (kg)	仕込水量 (L)	仕込水 アルコール濃度(%)	小麦： 脱脂大豆
無発酵型 (従来品)	1	0.75	1.2	0-20	1:1
発酵型 (<i>S.cerevisiae</i>)	1	0.75	1.2	10	1:1
	10	7.5	12	10	1:1
	500	375.0	600	10	1:1
発酵型 (<i>Z.rouxii</i>)	1	0.75	1.2	12	1:1
	10	7.5	12	12	1:1

発酵試験：無塩醤油様調味料を減圧蒸留しアルコールを除いた上で全窒素分 1.7%とし直接還元糖量をグルコースで 10%に調整した培地 200mL を 300mL 容三角フラスコに入れ、硫酸トラップ付きガラス管を装着した。これに生菌数が 10^6 又は 10^7 となるように酵母培養液を接種し 20℃で恒温した。恒温期間中の重量減少量を二酸化炭素発生量として示した。

官能評価方法：日本醤油技術センター認定の JAS 官能評価員の資格を持つパネル 4 名で官能評価を行った。評価は香りと味を総合的に 3 段階（“優”を 1 点、“可”を 2 点、“劣”を 3 点）しその平均点を求め示した。

分析方法：所定の期間恒温した諸味を東洋濾紙 No.2 で濾過し得られた濾過液を分析用サンプルとした。諸味濾過液サンプルの食塩分、全窒素分、アミノ態窒素分、直接還元糖量、pH、標準色は、しょうゆ試験法に従って測定した⁴⁻²⁾。また、窒素利用率も諸味と 30%食塩水を等量混合後、しょうゆ試験法に従って測定した⁴⁻²⁾。アルコール分は、内部標準物質として n-プロピルアルコールを用いガスクロマトグラフィーにて測定した。グルタミン酸量は、「ヤマサ グルタミン酸測定キット」を用いて測定した。分解率は、全窒素分に対するアミノ態窒素分の百分率として求めた。有機酸は、ポストカラム pH 緩衝化学電気伝導度検出法にて分析した。サンプルは精製水にて 20 倍に希釈し濾過液 5 μ L を HPLC に供した。分析条件は次の通りである。

検出器：電気伝導度検出器

カラム：SHIMADZU Shim-pack SCR-101H 7.9mm×30cm

カラムオープン温度：43℃

移動相：p-トルエンスルホン酸 951mg を 1L 精製水にて定容

緩衝液：p-トルエンスルホン酸 951mg、EDTA 29mg、Bis-Tris 4、185mg を 1L 精製水にて定容
流速：0.8mL/min

アミノ酸は PTC-アミノ酸ラベル化法にて測定した。サンプルは 100 倍に希釈し、その濾過液 100 μ L、1M トリエチルアミン 100 μ L、0.1M フェニルイソチオシアネート 50 μ L を混和後 1 時間放置した。混和液と N-ヘキサセン 400 μ L を攪拌し静置後、下層（アセトニトリル層）2 μ L を HPLC に供した。なお、1M トリエチルアミンはトリエチルアミン 1.4mL をアセトニトリル 1mL と、0.1M フェニルイソチオシアネートはフェニルイソチオシアネート 150 μ L をアセトニトリル 10mL と混和しそれぞれ調製した。HPLC の測定条件は次の通りである。

検出器：紫外部分光検出器（254nm, 0.64aufs）

カラム：SHIMADZU STR-ODS-II 6.0mm $\times$ 15cm

カラムオープン温度：40℃

移動相：A 液 10mM リン酸緩衝液，B 液 アセトニトリル

移動相グラジエント：A / B = 95 / 5 $\Rightarrow$ 65 / 35 （20 分間直線グラジエント）

65 / 35 $\Rightarrow$ 20 / 80 （0.01 分間）

20 / 80 $\Rightarrow$ 20 / 80 （5 分間）

20 / 80 $\Rightarrow$ 95 / 5 （0.01 分間）

95 / 5 $\Rightarrow$ 95 / 5 （10 分間）

流速：1.0 mL/min

4-4-2 研究成果

発酵型無塩調味液の仕込条件及び諸味管理の検討：既存の無塩醤油様調味液では、仕込水のアルコール濃度を 20%、仕込温度を 20℃としている。この条件であれば、無塩醤油様調味液諸味は酸敗することなく原料タンパク質を分解・熟成させる事が出来る。しかし、諸味に酵母を添加しアルコール発酵させる場合、仕込水のアルコール濃度が高すぎると添加した酵母が発酵せず、アルコール濃度が低すぎると酵母によるアルコール発酵と細菌による有機酸の生産が同時に進み、条件によっては酸敗する可能性がある。従って、新規に開発する発酵型無塩調味液の仕込水のアルコール濃度は、仕込初期に細菌の増殖を抑制し、且つ酵母によるアルコール発酵を完全に阻害しない濃度を設定する必要がある。そこで、異なるアルコール濃度の仕込水で仕込んだ諸味の pH 推移及び *S. cerevisiae* と *Z. rouxii* のアルコール発酵能の差異を確認することとした。

恒温温度 15℃で仕込水のアルコール濃度を 6%以下の試験諸味は 2 週間以内に酸敗したが、8%では約 3 週間 pH が保持され、12%以上では 2 ヶ月間酸敗を認めなかった(図 4-1)。一方、恒温温度 20℃では、仕込水のアルコール濃度 8%の試験諸味であっても 2 週間以内に酸敗した。しかし、12%以上であれば 2 ヶ月間酸敗を認めなかった(図 4-2)。以上の結果から、恒温温度 15℃の場合は仕込水のアルコール濃度を 8, 10, 12%、恒温温度 20℃の場合は仕込水のアルコール濃度を 12, 14, 18%として酵母を用いて発酵型無塩醤油様調味

液の小仕込試験を行う事とした。

S. cerevisiae を用いた場合、恒温温度 15℃ではアルコール濃度 8%であっても約 3 週間酸敗しなかった。一方、恒温温度 20℃ではアルコール濃度 12-18%であれば酸敗はしなかったが、アルコール発酵が微弱か弱く十分に発酵香を付与することはできなかった(図 4-3)。*Z. rouxii* を用いた場合、恒温温度 15℃では、アルコール濃度 10-12%で約 3 週間酸敗しなかった。一方、恒温温度 20℃ではアルコール濃度 14-18%であれば酸敗はしなかったが、アルコール発酵せず発酵香を付与することはできなかった(図 4-4)。また、恒温温度 15℃の図 4-1、図 4-3、図 4-4 のアルコール濃度 8%では酸敗の有無にバラツキが有り安定していない。

次に、*S. cerevisiae* と *Z. rouxii* の発酵能を比較した。*Z. rouxii* は *S. cerevisiae* に比べ発酵速度が遅く酸敗のリスクが高いことがわかる。そこで、一般的な酵母添加量である 10^6 とその 10 倍の 10^7 添加を比較したところ、*Z. rouxii* であっても仕込時に 10^7 添加すれば、*S. cerevisiae* とほぼ同じ発酵速度が得られることが示唆された(図 4-5)。そこで、発酵型無塩醤油様調味液の仕込・諸味管理条件を次の通りに決定した。即ち、仕込水のアルコール濃度、酵母添加量と恒温温度は、*S. cerevisiae* を用いる場合は 10%・15℃・ 10^6 添加、*Z. rouxii* を用いる場合は 12%・15℃・ 10^7 添加とした。更に、仕込後約 3 週間でアルコール発酵が収束した時点で防酸敗のため諸味にアルコールを 10%になるように添加し熟成させることとした。

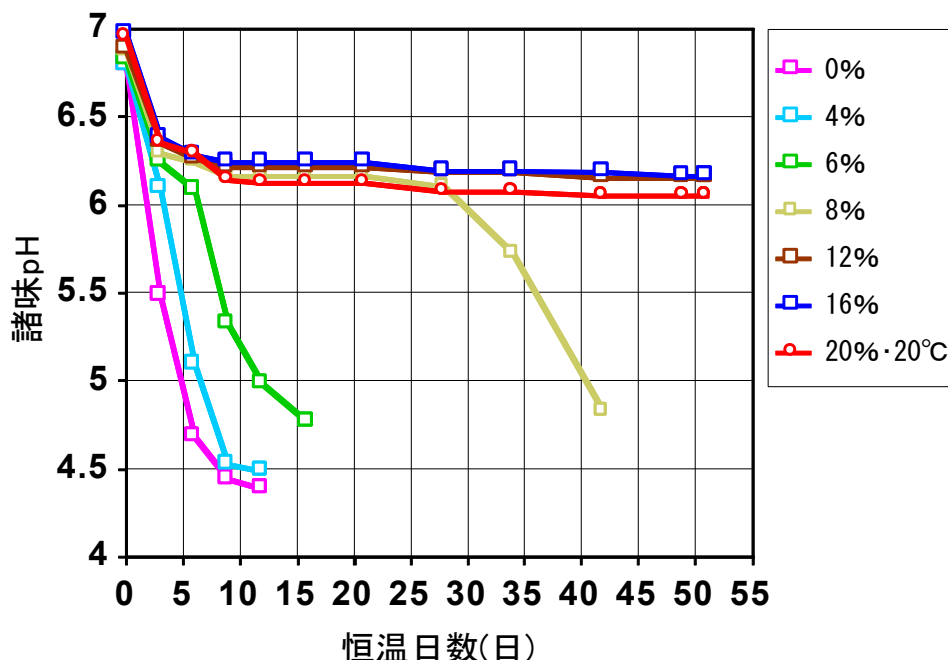


図 4-1 異なるアルコール濃度の仕込水で仕込んだ諸味の pH 推移
麴 750g+仕込水 (アルコール濃度 0, 4, 6, 8, 12, 16, 20%) 1.2L
恒温温度: 15℃

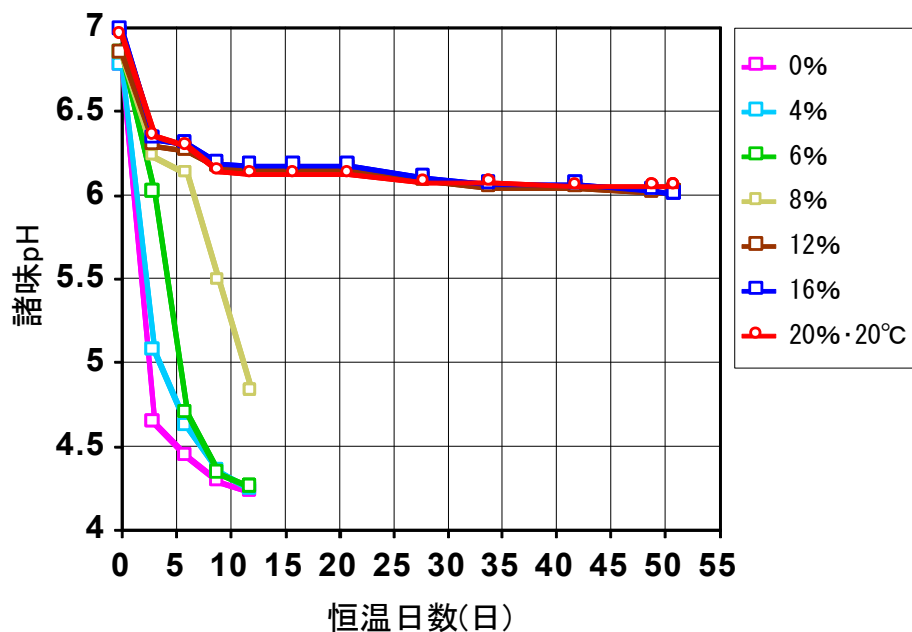


図 4－2 異なるアルコール濃度の仕込水で仕込んだ諸味の p H 推移
 麴 750g+仕込水（アルコール濃度 0, 4, 6, 8, 12, 16, 20%） 1. 2L
 恒温温度：20℃

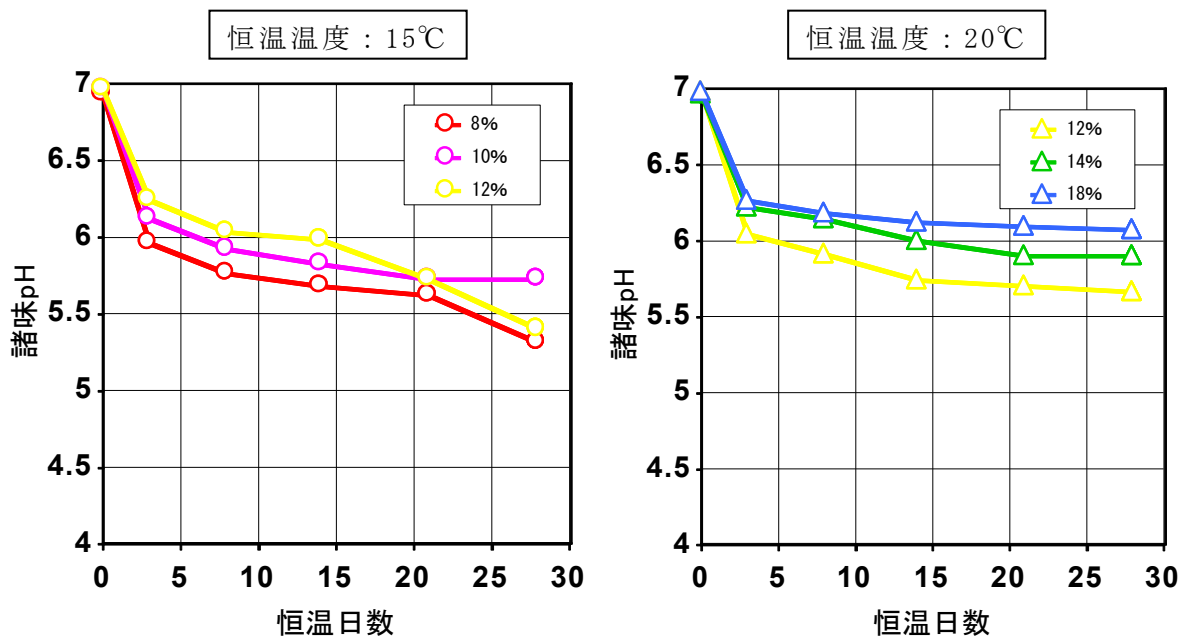


図 4－3 *S. cerevisiae* を用いた発酵型無塩諸味の p H 推移
 酵母添加量： 2×10^6 /g 諸味相当添加
 恒温温度：15℃ 麴 750g+仕込水（アルコール濃度 8, 10, 12%） 1. 2L
 恒温温度：20℃ 麴 750g+仕込水（アルコール濃度 12, 14, 18%） 1. 2L

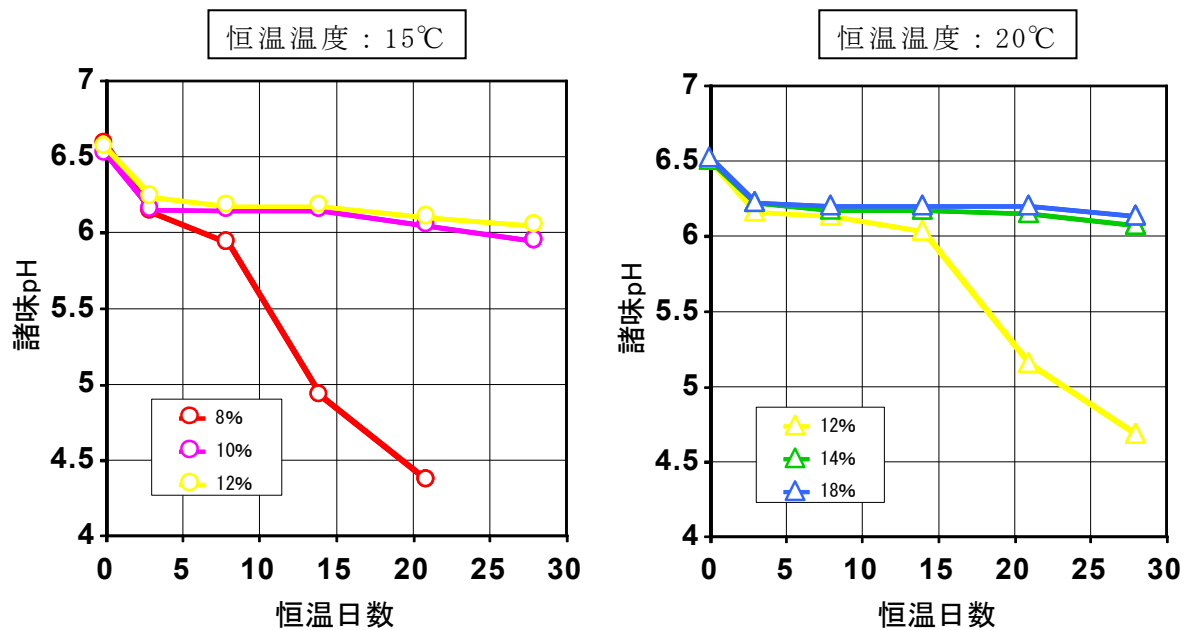


図4-4 *Z. rouxii* を用いた発酵型無塩諸味の pH 推移
 酵母添加量： 2×10^6 /g 諸味相当添加
 恒温温度：15°C 麴 750g+仕込水（アルコール濃度 8, 10, 12%）1.2L
 恒温温度：20°C 麴 750g+仕込水（アルコール濃度 12, 14, 18%）1.2L

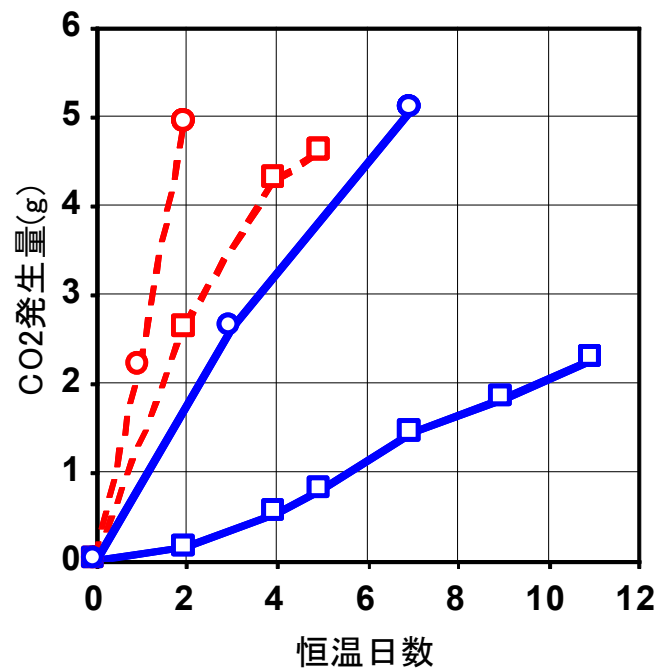


図4-5 *S. cerevisiae* と *Z. rouxii* の無塩醤油様調味液環境下での発酵曲線
 ○：*S. cerevisiae* 2×10^7 , □：*S. cerevisiae* 4×10^6 ,
 ○：*Z. rouxii* 2×10^7 , □：*Z. rouxii* 4×10^6

決定した仕込・諸味管理条件にて元 10L（諸味容量約 20L）で仕込試験を行った。試験諸味の pH 推移を図 4-6 に示す。図の通り 2 ヶ月間の発酵熟成の期間中、諸味の pH は 5.5 以上で保たれ酸敗することなく発酵型無塩醤油様調味液を醸造することができた。

各小仕込諸味の濾過液は、いずれも食塩が 0.1%以下であった。一方、旨味成分の 1 つであるグルタミン酸の含有量は 800-900mg%と醤油と比べ高い値を示し、旨味に富んだ発酵型無塩調味液を調製することができた(表 4-2)。有機酸組成は、発酵型無塩醤油様調味液はアルコールの水溶液で仕込むため乳酸発酵が微弱で乳酸量が 30-100mg/dL と醤油(800-1000mg/dL)に比べ低い値であり、乳酸菌によるクエン酸の消費も少ないため 300mg/dL 以上のクエン酸が残存していた。更に、p-グルタミン酸量が 40-140mg/dL と少なく、原料蛋白質からプロテアーゼの作用によって遊離したグルタミンが麹菌グルタミナーゼによりグルタミン酸へ効率的に変換されたものと考えられた(表 4-3)。アミノ酸は、グルタミン酸に次いでアスパラギン酸が多く、ロイシン，セリン，プロリンがこれに続く。総アミノ酸量は、いずれの各小仕込諸味濾過液も 6000mg/dL 以上であった(表 4-4)。

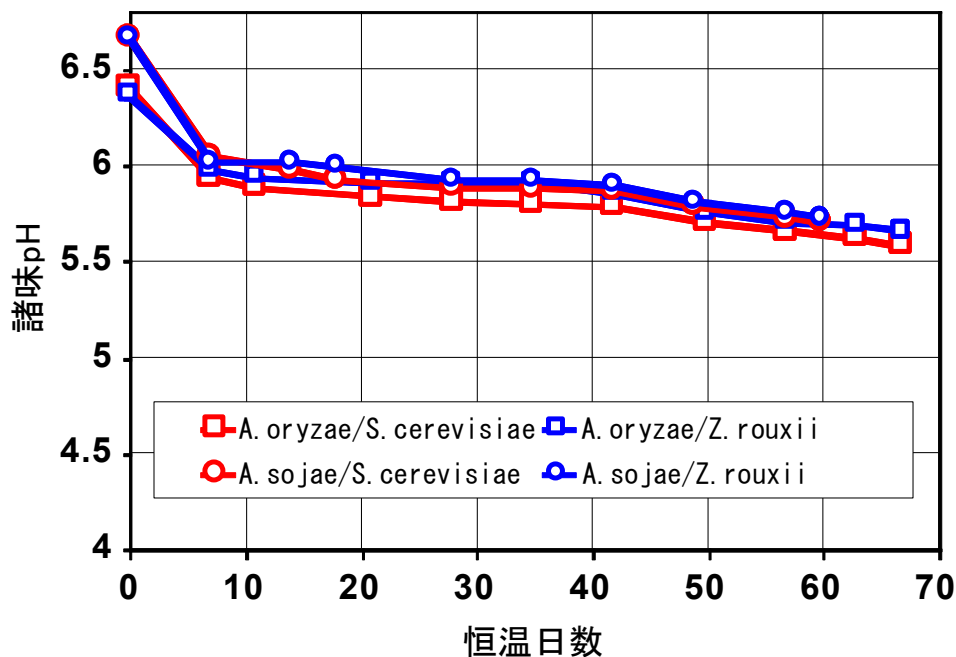


図 4 - 6 小仕込諸味の pH 推移

表 4 - 2 発酵型無塩醤油様調味料の成分分析値

麹菌	A. oryzae	A. oryzae	A. sojae	A. sojae
酵母	S. cerevisiae	Z. rouxii	S. cerevisiae	Z. rouxii
食塩 (%)	0.1 以下	0.1 以下	0.1 以下	0.1 以下
アルコール (%)	9.19	9.19	8.84	8.91
全窒素 (%)	1.99	1.98	1.93	1.99
直糖 (%)	6.75	7.47	6.45	7.27
グルタミン酸/全窒素 (mg%)	874	828	906	894
分解率 (%)	62.3	62.5	62.6	63.3
標準色	15	15	15	15
pH	5.64	5.68	5.78	5.82
推定発酵アルコール量 (%)	0.90	0.30	0.90	0.30

表 4－3 発酵型無塩醤油様調味料の有機酸組成

麹菌	A. oryzae	A. oryzae	A. sojae	A. sojae
酵母	S. cerevisiae	Z. rouxii	S. cerevisiae	Z. rouxii
クエン酸 (mg/dL)	327	338	343	364
リンゴ酸 (mg/dL)	115	211	145	101
乳酸 (mg/dL)	116	55	84	27
酢酸 (mg/dL)	208	163	288	190
p-グルタミン酸 (mg/dL)	138	97	42	46

表 4－4 発酵型無塩醤油様調味料のアミノ酸組成

麹菌	A. oryzae	A. oryzae	A. sojae	A. sojae
酵母	S. cerevisiae	Z. rouxii	S. cerevisiae	Z. rouxii
アスパラギン酸	910	905	963	949
グルタミン酸	1620	1570	1680	1640
セリン	444	426	427	420
グリシン	222	215	221	213
ヒスチジン	105	trace	trace	103
アルギニン	201	181	219	169
スレオニン	201	181	219	169
アラニン	311	300	342	328
プロリン	415	408	419	385
チロシン	trace	trace	trace	trace
バリン	352	338	361	343
メチオニン	94	82	86	82
シスチン	trace	trace	trace	trace
イソロイシン	341	331	362	346
ロイシン	462	446	479	450
フェニルアラニン	276	257	288	270
リジン	386	392	443	416
合計	6340	6032	6509	6283

単位：mg/dL

無塩調味液の火入条件の検討： 醤油醸造において火入工程は、①殺菌・酵素失活による品質の安定化、②色・香・味の調熟、③珪の除去を目的としている。特に色・香・味の調熟の観点に注目する。塩味は旨味や酸味をまとめ渋味や苦味をマスクする効果が有るが、本プロジェクトの調味料は原料として食塩を用いないため、このような塩味の効果が期待

できない。また、醤油に過度に火入を行うと香りに焦げ臭や青臭い臭が付き苦味を感じる場合がある。ここでは、無塩調味液に適度の火香を与え醤油らしさを付与する火入条件を検討した。火入した無塩調味液は香りと味を総合的に3段階（“優”を1点、“可”を2点、“劣”を3点）しその平均点を求めた。その結果、無塩醤油様調味料の60℃・60分次いで85℃・30分とする二段火入が最も評点が高く、無塩調味液の火入条件はこの条件に決定した(表4-5)。次に、同条件で表4-2の発酵型無塩醤油様調味液の火入れを行った。

火入れ調整した発酵型無塩醤油様調味液の分析値と官能評価結果を表4-6と表4-7に示す。火入れの際に、各無塩醤油様調味液のアルコール濃度は2.5%程度、全窒素分は醤油JAS規格で「特選」相当の1.70を目安に和水調整した。火入した発酵型無塩醤油様調味液は、それぞれ所望の窒素濃度に調整され、アルコール濃度、直接還元糖分は同規格の濃口本醸造醤油とほぼ同じ値であった。また、旨味成分の1つであるグルタミン酸量は、比較的高い値を示している（「特選」濃口本醸造醤油グルタミン酸／全窒素：600-700mg%）。一方、官能評価では、発酵過程のない従来品に比べ香味の点で補強されていた。また、従来品に感じられる原料臭は感じられなかった。

以上のように、無塩調味液のアルコール発酵のための醸造条件を設定して、火入条件を検討することによって、発酵過程のない従来品に比べ品質を向上させることができた。

表4-5 無塩醤油様調味料の火入条件と官能評価

火入条件	評点
85℃・達温	3.0
85℃・30分	3.0
85℃・60分	2.3
60℃・30分 ⇒ 85℃・達温	2.7
60℃・30分 ⇒ 85℃・30分	2.0
60℃・30分 ⇒ 85℃・60分	2.0
60℃・60分 ⇒ 85℃・達温	2.3
60℃・60分 ⇒ 85℃・30分	1.7
60℃・60分 ⇒ 85℃・60分	2.0

表4-6 発酵型無塩醤油様調味液生湯を用いた火入調味料の分析値

麹菌	A. oryzae	A. oryzae	A. sojae	A. sojae
酵母	S. cerevisiae	Z. rouxii	S. cerevisiae	Z. rouxii
食塩(%)	0.1以下	0.1以下	0.1以下	0.1以下
アルコール(%)	2.82	2.50	2.58	2.50
全窒素(%)	1.72	1.72	1.72	1.72
直接還元糖(%)	5.70	6.60	5.26	6.40
グルタミン酸/全窒素(mg%)	860	848	912	872
分解率(%)	65.6	63.9	65.1	65.6

標準色	11	11	15	14
pH	5.50	5.52	5.61	5.66

表 4-7 発酵型無塩調味液生湯を用いた火入調味料の官能評価

	試料		評価
	麹菌	酵母	
改良品	A. oryzae	S. cerevisiae	対照よりトップの香りが強くなる。 味の強さも少し出る。
		Z. rouxii	落ち着いた香りになり、醤油らしさが強くなる。 味がまろやかになる。後口に醤油らしが出る。
	A. sojae	S. cerevisiae	香りが出る。 味の強さが出る。
		Z. rouxii	香りが強くなる傾向がある。 A. oryzae/Z. rouxii よりまろやかだが後口に風味が出てくる。
従来品	無発酵・非火入		香りがおとなしく物足りない。原料臭が感じられる。 味が身薄い。

発酵型無塩調味液を利用した商品の開発：開発した発酵型無塩醤油様調味液を利用した商品として、“個包装（使い切りタイプ）の無塩醤油様調味料”と“せんべい・柿の種”を開発する。“個包装（使い切りタイプ）の無塩醤油様調味料”については、諸味容量 900L のスケールで試醸した発酵型無塩醤油様調味液の生湯を用いて火入・調整した“無塩醤油様調味料”を 20mL 容小袋に無菌充填し“個包装（使い切りタイプ）の無塩醤油様調味料” 18,000 袋を試作した。なお、試醸には醸造用微生物として麹菌 A. oryzae、酵母 S. cerevisiae を用いた。試醸した諸味の最終 pH は 5.38 となり、パイロットスケールの試醸においても約 2 ヶ月間の発酵・熟成期間中酸敗することなく醸造することができた。これを火入れ調整し醤油 JAS 規格「特選」相当の“個包装（使い切りタイプ）の無塩醤油様調味料”を試作した。この試作品は UHT 殺菌（137℃達温、F 値＝8）したものを無菌充填したものである。試作品の分析値と写真を表 4-8 と図 4-7 に示す。試作品の食塩分は 0.1% 以下であり赤みの強い明るい色沢を呈し、従来品に比べ醤油様の風味が付加されていた。また、殺菌及び無菌充填することによる風味の変化は少なく、包材臭が吸着するという問題もなかった。

発酵型無塩醤油様調味液の調理時の効果を調べるために、21 メニューの試作を行い、評価した。方法としては通常の濃口醤油を使って料理したもの、減塩醤油を使い食塩濃度を約半分にした料理、減塩醤油で作った料理に同量の発酵型無塩醤油様調味液を加えたものの 3 点を比較評価する形で行った。評価した結果、12 メニューにおいて減塩醤油単独で料理したもの比べ、発酵型無塩醤油様調味液を使用したものの評価が高かった。このことから、発酵型無塩醤油様調味液を使用することにより、塩分量を増やさず、料理をおいしくするメニューが多数あることがわかった。

また、無塩調味液の香気成分を分析した結果、醤油の特有香といわれている HEMF (4-hydroxy-2(5)-ethyl-5(2)-methyl-3(2H)-furanone) が含まれていないことがわかった（3 章参照）。そこでこの HEMF を 100ppm と 300ppm 添加し、官能評価を行った。その

結果、HEMF を 100ppm 程度添加することにより醤油らしい風味が付与されることがわかった。

表 4－8 試醸した発酵型無塩調味液生揚とその火入品の分析値

	発酵型無塩調味液	
	生揚	火入品(試作品)
食塩(%)	0.1 以下	0.1 以下
アルコール(%)	9.08	3.44
全窒素(%)	1.86	1.67
ブリックス(%)	28.5	23.3
標準色	19	16
pH	5.38	5.28



図 4－7 個包装（使い切りタイプ）の無塩醤油様調味料

無塩醤油様調味液を使用することにより、食塩分を増やすことなく醤油風味をつけた「たんぱく調整食品せんべい」(図 4-8)と「柿の種」(図 4-9)を研究開発し、平成 18 年 1 月より販売を開始した。これらの食品は減塩の食事療法を厳しく行っている慢性腎不全患者を主な対象者として提供しているものであり、100g 当りに含まれる食塩相当量はせんべいが 0.27g、柿の種が 0.25 g と極度に少なくしているため、無塩醤油様調味液を使用することにより醤油風味を出している。現在の商品には改良前の無塩醤油様調味液を使用しているため、改良した発酵型無塩醤油様調味液を使用したせんべいと柿の種を試作し、風味を評価した。評価の結果は、改良品を使用したもののほうが、現行品の嫌味な部分が減っており、若干風味が向上していたものの、大きな差はなかった。



図 4－8 発酵型無塩醤油様調味液を用いた醤油せんべい



図 4－9 発酵型無塩醤油様調味液を用いた柿の種

4－5 今後の課題と取組み

本プロジェクト研究において、無塩醤油様調味液の風味をかなり改善することが出来たが、醗酵条件の研究を進めることにより、さらに香りが通常の醤油に近づくように取組む予定である。無塩醤油様調味液の風味改良を行い、プロトタイプとして完成させた後には嗜好調査を行い、提供できるレベルにあるかどうかを判断したいと考えている。

また、無塩醤油様調味液は食塩が入っていないことから、通常の醤油とは味の感じ方が大きく異なるため、おいしく料理できる方法を開発するなどのソフト面の検討が必要であると考えている。このソフト面の検討と合わせてマーケティングに関する検討も進める予定である。無塩醤油様調味液のハードが完成した後には、無塩醤油様調味液を活用した加工食品の検討も行い、せんべいと柿の種の風味改良もこの検討の中で継続して行う予定である。

参考文献・引用文献

4-1) 布村伸武，佐々木正興：醬研，24，209（1998）

4-2) しょうゆ試験法：しょうゆ試験法編集委員会，財団法人日本醤油研究所（1985）

成果実績

1 口頭発表

なし

2 論文発表

スイッチング法に関する論文について、投稿準備中。その他は特許申請後に行う予定。

3 雑誌・新聞等掲載

なし

4 特許出願

現在、特許申請準備中

5 商品化

「たんぱく調整食品せんべい」と「柿の種」(図4-9)を研究開発し、平成18年1月より販売開始。

6 受賞等

なし