

## 醤油もろみ中の乳酸菌の分離と特性評価

齋藤悠衣<sup>1</sup>・田中友紀子・濱田英介

### The Characterization of Lactic Acid Producing Bacteria Isolated from Fermented Unrefined Soy Sauce

Yui SAITO<sup>1</sup>, Yukiko TANAKA and Eisuke HAMADA

(Received October 3, 2011)

**Abstract** The lactic acid fermentation is a important biological reaction for soy sauce production. The concentration of lactic acid in the fermented unrefined soy sauce, *moromi*, that was produced by traditional soy sauce maker, was 13167mg/l at 7 months aging. From this fermented unrefined soy source, two strains of lactic acid producing bacteria were isolated. These bacteria were classified and identified as *Enterococcus* sp. by some biochemical and 16S-rDNA sequencing methods. Since they multiplied well in MRS medium which included 15% of NaCl, these bacteria were regarded as halophiles. They multiplied and produced 2640 mg/l of lactic acid in soybean broth which was byproduct in soy sauce and soy paste manufacture.

**Keywords** [Lactic acid bacteria, Soy sauce, Unrefined soy sauce, *Enterococcus*, Soybean broth ]

#### 1 序論

日本古来の発酵食品である味噌・醤油製造の熟成過程では、麹菌や耐塩性の乳酸菌、酵母などの微生物が大きな役割を担っている。その中でも乳酸菌は糖類の発酵性、乳酸の生酸力、アミノ酸代謝、有機酸代謝、生育特性などが株ごとによって異なり多様性があるとされている。

大規模な味噌・醤油生産企業では既知の乳酸菌や酵母を添加し製麹や発酵・熟成、温度、湿度などは全て機械で管理されているが、少数の中小企業では製造場所(蔵)に自然に生育する微生物の働きを利用した伝統的な製造法が今もなお続けられている。その熟成過程に関わる微生物とその作用期間および微生物組成の変化は複雑で現在でも十分明らかにされていない。

一方、味噌や醤油などの大豆を原料とする食品産業では年間約 62 万 t の大豆が使用されており、その製造工程では多量の廃液(大豆煮汁)が発生する。大豆由来成分にはコレステロールや血圧の低下作用など具体的な機能や効果が多数報告されており大豆から抽出、精製されたそれらの成分は健康補助食品や機能性食品として広く活用されている<sup>1)</sup>。大豆の煮汁中には大豆に含まれる水溶性のたんぱく質やビフィダス菌の増殖を促進するオリゴ糖などの有用成分が多く含まれているため、食品リサイクルの観点からこれらの成分を分離し活用する試みが検討されてきた<sup>2)</sup>。この大豆煮汁は、一部家畜の飼料として利用されているが特有の豆臭を持ち多量の有機物を含んでいるため腐敗しやすく、ほとんどが産業排水として処理されているのが現状である。またこの煮汁は高い COD 値を示し、環境への影響や排水

1. サントリープロダクツ株式会社

1. SUNTORY PRODUCTS Co. LTD

処理施設での高負荷運転が余儀なくされている。

そこで筆者らは味噌・醤油製造に関わる乳酸菌の働きに着目し、大豆煮汁を基質とした乳酸生成により大豆煮汁の腐敗を防止し大豆煮汁の広汎な有効利用を検討することにした。本研究は、大豆煮汁中でも乳酸発酵を行う新規な乳酸菌を得るため、同じく大豆を原料とした醤油もろみから乳酸生成細菌を単離し、その特性評価を行うことを目的とした。

## 2 実験方法

### 2.1 試料

#### 2.1.1 醤油もろみ

宮崎県日南市の富士安味噌醤油醸造元から、平成20年12月(採取時、仕込み後12ヶ月)、平成21年3月(同9ヶ月)、5月(同7ヶ月)に仕込んだ醤油もろみを採取した。以下これらを12ヶ月もろみ、9ヶ月もろみ、7ヶ月もろみとした。

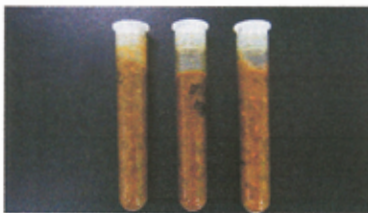


図1 左から12、9、7ヶ月もろみ

#### 2.1.2 大豆煮汁

大豆煮汁は宮崎県都城市の早川しょうゆみそ株式会社より入手した。味噌醤油製造工程で煮熟釜より排出された大豆煮汁を冷却後、冷凍保存したものを解凍し使用した。

### 2.2 醤油もろみの特性

#### 2.2.1 乳酸濃度測定

醤油もろみ中の乳酸濃度はもろみが1/100の濃度となるよう蒸留水で希釈し乳酸測定キット(RQflex、MERCK社製)によって測定した。

#### 2.2.2 醤油もろみ中のアミノ酸の測定

アミノ酸の定量はHPLC(島津製作所)によって行った。カラムはアミノ酸分析用光学分割カラム(MC10 GELCRS-10W 三菱化学)を使用した。分析条件はアミノ酸の種類によって表1のようにした。指標品のアミノ酸はセリン(Ser)、プロリン(Pro)、バリン(Val)、グルタミン(Glu)、イソロイシン(Ileu)、ロイシン(Leu)(いずれも関東化学株式会社製)を用いた。溶離液として0.1、1.0、2.0mol/l濃度の硫酸銅水溶液を使用した。

表1 各種アミノ酸の分離条件

アミノ酸	分離液 CuSO <sub>4</sub> (mM)	流速(mL/min)
Ser	0.1	0.5
Pro	1.0	1.0
Val	1.0	1.0
Glu	2.0	1.0
Ileu	2.0	0.5
Leu	2.0	1.0

### 2.3 醤油もろみ中の乳酸菌の分離

固体平板のMRS培地および当MRS培地にNaCl濃度6.5%(w/v)にした高塩性MRS培地を調製した。これに醤油もろみを添加し、35℃で1週間、嫌氣的に培養した。それぞれの培地で増殖したコロニーを新しい固体平板培地に画線する作業を繰り返して単離株を得た。

また、単離株の乳酸生成能を知るため、MRS培地および高塩性MRS培地に炭酸カルシウム(CaCO<sub>3</sub>)を1%(w/v)濃度となるよう添加しオートクレーブで121℃、1.2kg/cm<sup>2</sup>、20分間滅菌後、平板培地を調製した。これに単離株を接種して35℃で1週間嫌気培養した。培養後、コロニー周辺にクリアゾーン生成の有無を確認した。

### 2.4 乳酸生成指標株の培養

指標菌として *Lactobacillus brevis* NBRC3345、*Lb. plantarum* NBRC15891、*Enterococcus faecalis* NBRC100480、*Tetragenococcus halophilus* NBRC100498を用いた。指標菌は復水液で培養後、液体のMRS培地に接種し、35℃で嫌氣的に静置培養した。次いでこれらの指標菌のうち *Lb. brevis* NBRC3345、*Lb. plantarum* NBRC15891、*Ent. faecalis* NBRC100480は固体平板のMRS培地で培養し、*T. halophilus* NBRC100498は高塩性MRS培地で培養した。各培地で増殖を確認後、4~6℃で保存した。

### 2.5 培養液中における乳酸生成量の測定

MRS培地および高塩性MRS培地に単離株をそれぞれニードルで接種した。これらを35℃で1週間嫌氣的に培養した。次いで培養液1mlを1/100の濃度となるよう蒸留水で希釈し乳酸測定キット(RQflex、MERCK社製)により乳酸濃度を測定した。また4株の指標菌においても同様の操作を行った。

### 2.6 単離株の増殖特性

#### 2.6.1 温度依存性

単離株のうち、高い乳酸生成が確認された 2 株を MRS 液体培地で前培養した。その培養液 1ml を新たに調製した同培地 10ml にそれぞれ接種し、20、35、40℃ の各温度で培養し、経時的に培養液の OD(660 nm) を測定した。OD の測定は吸光度計(ANA-7 東京光電社)を用いた。

### 2.6.2 塩濃度依存性

単離株のうち、高い乳酸生成が確認された 2 株を MRS 液体培地で前培養し、その培養液 1ml を塩濃度が 0、3、6.5、15% となるように調製した MRS 液体培地または高塩性 MRS 液体培地に接種し、35℃ で 1 週間培養した。培養液の OD(660nm) を吸光度計で測定した。

### 2.7 グラム染色および形態観察

グラム染色はフェイバーG「ニッスイ」(日水製薬)を用いた。スライドガラスに単離株を固定させ、クリスタルバイオレットおよびルゴール液で染色を行い、水洗後、95%エタノールで脱色した。水洗後、サフランインで染色し、水洗・風乾させ、光学顕微鏡(BX50F4、オリンパス)で観察した。グラム染色の対照として *E.coli* および *B.subtilis* を用いた。

### 2.8 16S rDNA 解析

16S rDNA 解析は、テクノスルガ・ラボ株式会社(静岡県清水市)に依頼した。解析は 16S rDNA のうち約 500bp の部分配列で、プライマーは同社独自のもの(9F、926R)とされているが配列は公表されていない。解析条件は DNA 抽出を DNA 抽出キット(IstaGene Matrix、BIO RAD)とビーズビーターを用い、PCR は PrimeSTAR HS DNA Polymerase(タカラバイオ)を使用した。シーケンサーは DNA シーケンサー(AIB PRISM3130 xl Genetic Analyzer System、Applied Biosystems)を使用した。相同性検索および簡易分子系統解析は DNA 解析ソフトアポロン 2.0 DB-BA5.0(テクノスルガ・ラボ)および国際塩基配列データベース(GenBank/DDBJ/EMBL)から行われた。

### 2.9 カタラーゼ試験

単離株をニードルを用いて空のシャーレに取り、3%過酸化水素水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を 1ml 注ぎ 2~3 分間観察した。発泡が生じないものはカタラーゼ陰性(-)、発泡が生じたものはカタラーゼ陽性(+)と判別した。

### 2.10 単離株の大豆煮汁への適応性

大豆煮汁を 10ml ずつ試験管に分注し、オートクレーブで 121℃、15 分間滅菌しこれを培地とした。本

培地には他の化合物の添加は行わなかった。冷却した本培地に醤油もろみからの単離株をそれぞれニードルで接種した。これらを 35℃ で 1 週間嫌氣的に培養した。培養液を 1ml とり 1/100 の濃度となるよう希釈し乳酸測定キットによって培地中の乳酸濃度を測定した。また 4 株の指標菌においても同様の操作を行った。

## 3 結果および考察

### 3.1 醤油もろみの特性

#### 3.1.1 もろみ中の乳酸

3 種類のもろみ中の乳酸濃度は、熟成期間が長くなるほど乳酸濃度が減少していることが確認された(表 2)。乳酸菌が好気条件下におかれた場合、数種類の乳酸菌において酢酸生成量が増大し、乳酸生成量の低下が認められている<sup>3~6)</sup>。しかし、醤油もろみの熟成過程では、仕込み樽の表面のみが空気に触れており内部は嫌氣的になる。通常乳酸菌を嫌気条件下で培養すると、乳酸脱水素酵素の作用によりピルビン酸のほとんどは乳酸に変換される<sup>7)</sup>。そのため、熟成初期の醤油もろみ中の乳酸濃度は低くなり熟成過程が進むほど乳酸濃度は高くなるはずである。今回、熟成期間が長くなるほど乳酸濃度が減少してい

表 2 もろみ中の乳酸濃度

試料	乳酸濃度[mg/l]
12ヶ月もろみ	1447.0
9ヶ月もろみ	11733.0
7ヶ月もろみ	13167.0

たのは、他の微生物によって乳酸が利用されていたことが考えられる。しかしこの点は今後の検討課題である。

#### 3.1.2 醤油もろみ中のアミノ酸

3 種類の醤油もろみから L-セリン、L-バリン、L-アスパラギン酸の 3 種類の遊離アミノ酸が検出された(表 3)。その中でも、L-アスパラギン酸は 5.0mg/l 以上と多く含まれていた。大豆加工食品等の場合、そのタンパク質組成中にはアスパラギン酸が特に多く含まれるとされる<sup>8)</sup>。また、発酵食品においても発酵が進行するにつれてプロテアーゼが働き原料である大豆中のタンパク質が加水分解されて遊離アミノ酸が生成されることも報告されている<sup>9)</sup>。従って、仕込み期間が長いもろみほど麹菌によって生成され

表 3 醤油もろみ中のアミノ酸含有量[mg/l]

アミノ酸	12ヶ月もろみ	9ヶ月もろみ	7ヶ月もろみ
L-Ser	0	21.0	0
L-Val	0	15.1	11.4
L-Asp	10.7	5.0	6.2

た酵素(プロテアーゼ)の働きを受け遊離 L-アスパラギン酸が生成されたと考えられる。

### 3.2 醤油製造に関わる微生物の単離

12ヶ月もろみから5株、9ヶ月もろみから3株、7ヶ月もろみから4株、計12株の微生物が単離された。表4に各菌株の単離培地を示した。醤油もろみから単離した12株のうち7株(SYa-1、-2、SYb-1、-2、SYc-1、-2、-3)はMRS培地で増殖し、5株(SYa-3、-4、-5、SYb-3、SYc-4)は高塩性MRS培地で増殖した。醤油もろみは塩濃度が約15%(W/V)あり、一般細菌用培

表 4 株名および単離培地

株番号	醤油もろみ仕込み時期	培地
SYa-1	平成20年12月	MRS
SYa-2	同上	MRS
SYa-3	同上	高塩性MRS
SYa-4	同上	高塩性MRS
SYa-5	同上	高塩性MRS
SYb-1	平成21年3月	MRS
SYb-2	同上	MRS
SYb-3	同上	高塩性MRS
SYc-1	平成21年5月	MRS
SYc-2	同上	MRS
SYc-3	同上	MRS
SYc-4	同上	高塩性MRS

地の塩濃度が0.5%(W/V)であることに比べると非常に塩濃度が高い。今回分離した株がこのような高濃度食塩存在下で生育する乳酸菌である場合、これらは高度好塩性の乳酸菌である可能性がある<sup>7)</sup>。また、炭酸カルシウムを1%(w/v)添加した培地上のコロニーを観察した。単離株が乳酸菌の場合、生成された乳酸により炭酸カルシウムが溶かされ、コロニーの周辺にクリアゾーンを形成する。明瞭なクリアゾーンを形成したSYb-1、SYb-2については乳酸菌あるいは炭酸カルシウムを溶解する他の酸生成菌であることが考えられた。MRS平板培地に接種した単離株によるクリアゾーン形成を図2に示した。

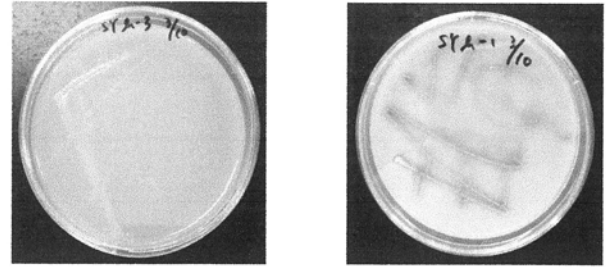


図 2 単離株によるクリアゾーンの形成(右)

### 3.3 単離菌株の乳酸生成

液体MRS培地および液体高塩性MRS培地での培養液中の乳酸濃度を表5に示した。単離株12株のうち、乳酸の生成が確認されたのは8株(SYa-3、-4、SYb-1、-2、-3、SYc-1、-2、-3)で、その乳酸濃度は60.0~23680.0mg/lであった。その8株の中でも特に多くの乳酸を生成したSYb-1およびSYb-2は、指標株で最も乳酸生成量の多かった*Lb. brevis* NBRC3345の12810.0mg/lと同等またはその2倍量であった。MRS培地は乳酸菌が生育するために必要な栄養成分を含んでいるため、顕著な乳酸生成がみられたSYb-1およびSYb-2は乳酸菌によく認められる栄養要求性を示したと考えられる。

表 5 培養液中における乳酸生成

株名	乳酸量 [mg/l]
<i>Lb. brevis</i> NBRC3345	12810.0
<i>Lb. plantarum</i> NBRC15891	80.0
<i>Ent. faecalis</i> NBRC100480	150.0
<i>T. halophilus</i> NBRC100498	750.0
SYa-3	120.0
SYa-4	60.0
SYb-1	12680.0
SYb-2	23680.0
SYb-3	100.0
SYc-1	780.0
SYc-2	670.0
SYc-3	610.0

### 3.4 単離菌株の増殖特性

#### 3.4.1 SYb-1、SYb-2の温度依存性

SYb-1、SYb-2とも培養温度30℃で最も良く生育することが確認された(図3)。30℃で培養した場合、SYb-1は培養開始後5日目で定常期に達し、最終ODは1.1であった。また、SYb-2は培養開始後2日目に定常期に達したが、最終ODはSYb-1の10分の1程度であった。また、表5の培養液中における乳酸生



成量が、SYb-2 は 23,680.0mg/l であることから SYb-2 は少ない菌体数で多くの乳酸を生成していることが示された。

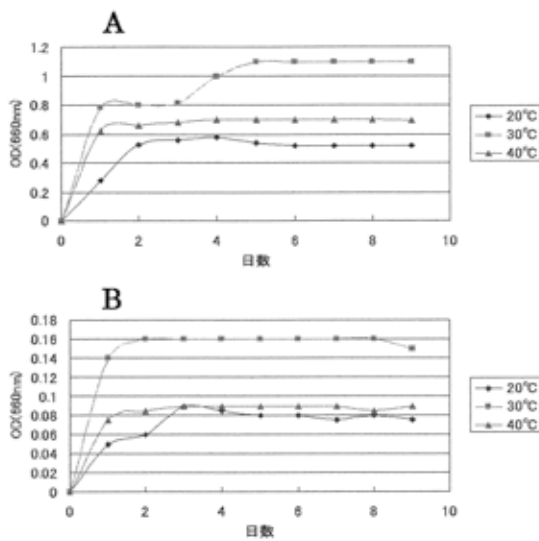


図3 培養温度と増殖(A:SYb-1、B:SYb-2)

### 3.4.2 SYb-1、SYb-2の塩濃度依存性

SYb-1は塩濃度0%(NaClの添加なし)で最もよく増殖した。これに対し、SYb-2は塩濃度3%で最もよく増殖し、塩濃度0%での増殖量は極めて少なかった(図4)。両株とも塩濃度3%では、培養開始後7ないし8日目に最大ODが1に達した。しかしながら、両

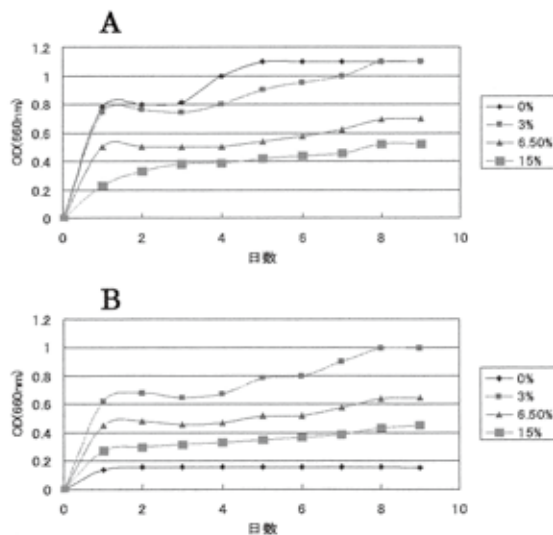


図4 培地塩濃度と増殖(A:SYb-1、B:SYb-2)

株とも醤油もろみとほぼ同じ塩濃度15%という環境下でも顕著な増殖が見られたことから、これらは高度高塩性の細菌と考えられた。いずれの株も培養開始後1日目に対数増殖期を迎え、2日目以降の増殖は緩やかであった。

### 3.5 形態観察

簡易形態観察の結果、SYb-1、SYb-2 両株ともグラム染色陽性、0.8-0.9×0.9-1.0μmの卵円球菌で、MRS平板培地上でのコロニーは乳白色を呈した(図5.aおよびb)。

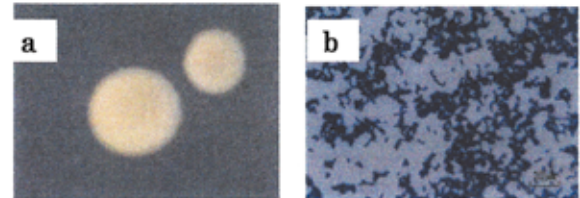


図5 SYb-1のコロニー(a)とグラム染色像(b)

### 3.6 カタラーゼ試験

単離した12株のうち、カタラーゼ陰性を示したのは5株(SYa-2、SYb-1、-2、SYc-2、-3)であった。カタラーゼは過酸化水素水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を水と酸素に分解する酵素で、TCA回路でエネルギー代謝を行う好気微生物全般が持っていると考えられる。したがって、カタラーゼ反応陽性は好気性微生物であり、カタラーゼ陰性はTCA回路を持たずEMP経路やその他の嫌気代謝経路によってエネルギーを獲得する嫌気性微生物または発酵性微生物であることを示す。乳酸菌は一般的にカタラーゼ陰性菌なので、SYa-2、SYb-1、SYb-2、SYc-2、SYc-3は嫌気性微生物と考えられる。

### 3.7 16S rDNA解析

16SrDNA部分塩基配列の結果から、相同性解析ソフトのアポロンDB-BA5.0およびGenBank、DDBJ、EMBLの細菌DNAデータベースに対する相同性検索の結果から、SYb-1およびSYb-2は*Enterococcus*属に含まれ、*Enterococcus faecalis*に近縁な*Enterococcus* sp.と推定された(図6)。

### 3.8 単離菌株の大豆煮汁への適応性

大豆煮汁に単離菌株および指標菌株を培養し、培養液中の乳酸量を測定した(表6)。単離株のうち大豆煮汁を基質として増殖できる菌株は5株であり、その乳酸量は0.09~2640.31mg/lであった。その中でもSYb-1とSYb-2はそれぞれ2640.3mg/l、661.2mg/lの乳酸を生成しており、この値は指標菌のうち最も乳酸を生成した*Lb. plantarum* NBRC15891の3402.9mg/lには劣るものの、他の指標菌株3株よりも高い乳酸量であった。SYb-1、SYb-2が大豆煮汁中で増殖したことから、大豆煮汁中には乳酸菌の生育に必要なとされるアミノ酸、ビタミン、無機質などの栄養成分が十分含まれていると言える。

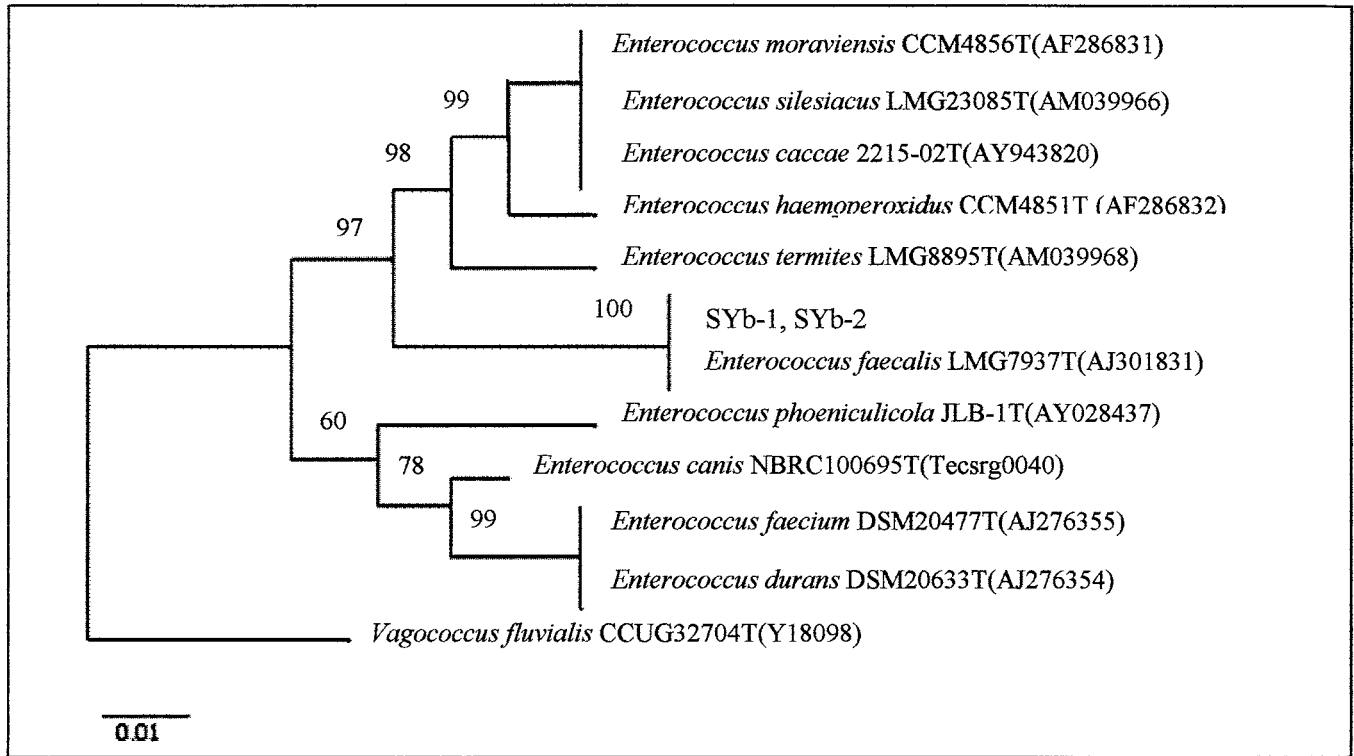


図 6 16S rDNA 解析による SYb-1、SYb-2 の系統分類

表 6 大豆煮汁中での乳酸生成量

株名	乳酸濃度 [mg/l]
<i>Lb. brevis</i> NBRC3345	584.1
<i>Lb. plantarum</i> NBRC15891	3402.9
<i>Ent. faecalis</i> NBRC100480	352.4
<i>T. halophilus</i> NBRC100498	323.5
SYa-2	0.5
SYa-3	0.1
SYb-1	2640.3
SYb-2	661.2
SYb-3	4.7

#### 4 結論

①仕込み時期が異なる 3 種類の醤油もろみから合計 12 株の単離株を得た。そのうち 7 株は MRS 培地で生育し、5 株は高塩性の培地で生育した。単離された 12 株のうち 8 株で乳酸の生成が確認され、その濃度は 60.0~23680.0mg/l であった。このうち 2 株 (SYb-1、-2) は MRS 培地で指標菌 *Lb. brevis* NBRC3345 と同等あるいは 2 倍の乳酸生成能が確認された。

②炭酸カルシウム溶解性、カタラーゼ試験、グラム

染色試験、16S-rDNA の塩基配列等から SYb-1、SYb-2 の 2 株はいずれも *Enterococcus faecalis* に近縁な *Enterococcus* sp. と推定された。しかし、SYb-1 と SYb-2 は温度依存性、塩濃度依存性、乳酸生成能が異なり、双方が近縁であっても亜種レベルでそれぞれ異なる細菌と考えられた。

③大豆煮汁における単離菌株の乳酸生成量の測定結果より、大豆煮汁を基質として増殖し乳酸発酵を行える株は 5 株であった。このうち SYb-1 と SYb-2 は他の単離株よりも大豆煮汁中で乳酸生成能が高く、特に SYb-1 は指標株 *Lb. plantarum* NBRC15891 に次いで高かった。また、指標株の中では *Lb. plantarum* NBRC15891 が大豆煮汁中での乳酸生成に適していることが確認された。

#### 謝辞

当研究を進めるにあたり多くの御助言や資料採取に御協力いただいた工藤哲三氏、水谷政美氏、高山清子氏 (宮崎県食品開発センター)、安藤英雄氏 (富士安味噌醤油醸造元)、および早川洋氏 (早川しょうゆみそ株式会社) に心から御礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) 松田茂樹: 発酵食品副生物の機能性成分と再資源化技術の開発, 日本食品保存科学会誌, **30**(3), 141-145(2004)
- 2) 村上恭子, 白石淳: 大豆煮汁廃液を用いたポリ- $\gamma$ -グルタミン酸の生産, 福岡女子大学人間環境学部紀要, **29**, 63-66(1998)
- 3) Kaneko, T. and Watanabe Y.: Enhancement of diacetyl production by a diacetyl-resistant mutant of citrate-positive *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 3022 and by aerobic conditions of growth, J. Dairy Sci., **73**, 291-298(1990)
- 4) Lucey, C.A. and S. Condon.: Active role of oxygen and NADH oxidase in growth and energy metabolism of *Leuconostoc*., J. Gen. Microbiol., **132**, 1789-1796 (1986)
- 5) Smart, J. B., and T. D. Thomas: Effect of oxygen on lactose metabolism in Lactic Streptococci, Appl. Environ. Microbiol., **53**, 533-541(1987)
- 6) Kaneko, T., Watanabe Y. and Suzuki H.: Differences between *Lactobacillus casei* ssp. *casei* 2206 and citrate-positive *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 3022 in the characteristics of diacetyl production, Appl. Environ. Microbiol., **57**, 3040-3042(1991)
- 7) 岡田早苗: 穀物類の発酵, 乳酸菌の科学と技術(乳酸菌研究集談会編), 学会出版センター, pp. 255-257(2003)
- 8) 大槻耕三, 久保山晶子, 遠藤英子, 佐藤健司, 中村孝志: 麴納豆(塩納豆, 浜納豆, 大徳寺納豆)に含まれる総アミノ酸および遊離アミノ酸の分析, 京都府立大学学術報告, **52**, 1-6 (2000)