

バイオテクノロジーの応用による製造合理化に関する研究

—黄麹菌のフェノール化合物に関する研究—

漆 原 栄 治*

1. 緒 言

醤油の香味には各種のフェノール化合物が関与している。とりわけ4-Ethylguaiacol及び4-ethyl-phenol等の化合物が醤油香気的重要な成分である。これらのフェノール化合物は、醤油原料の一つである小麦及び麹菌の産出するFerulic acid及びp - Coumaric acid等のフェノール酸に由来していることが明かにされている^{1)~4)}。しかし、醤油製麹時に施用する種麹や出麹期に形成される麹菌分生子のフェノール化合物についての調査・研究はなされていない。

今回、醤油香味の改良の一端として、黄麹菌分生子中のフェノール化合物なかでもフェノール酸の高感度多成分同時分析法の検討と化合物の検索を行った。

2. 試験方法

2.1 試 料

黄麹菌分生子としてA社製の醤油用種麹を供試料とした。

2.2 試 薬

フェノール酸としてCaffeic acid, Cinnamic acid, p - Coumaric acid, Ferulic acid, Gallic acid, Gentisic acid, p-Hydroxybenzoic acid, Protocatechuric acid, Salicylic acid, Sinapic acid, Syringic acid, Vanillic acidの12成分及び関連化合物としてBenzoic acidの計13成分を分析対象物質とした。これらの化合物は東京化成工業(株)製の試薬を購入し標準品とした。

2.3 装 置

高速液体クロマトグラフ(HPLC): (株)島津製作所製のLC-10AD型ポンプ及びオートインジェクタ, カラム恒温槽, システムコントローラはいずれもLC-10Aシリーズ。検出器: MILIPORE社製の991J型フォトダイオードアレイ検出器。データ処理装置: 日本電気(株)製のPC-9801DR型パーソナルコンピュータ。

2.4 HPLC条件

Brad Murphy⁵⁾の方法に準じた。カラム: μ Bondapak C_{18} 3.9mm i.d $\times$ 300mm (MILIPORE社製)。カラム温度: 40°C。流速: 1.0ml/min。移動相: A液, n-ブタノール・メタノール・酢酸・水(1:5:2:92)。B液, n-ブタノール・メタノール・酢酸・水(2.5:12.5:2:83)。A, B両液とも 1.8×10^{-2} モル濃度の酢酸アンモニウムを含む。A液を10分間送液した後, B液を20分間で100%に達する直線グラジエントを行う。注入量: 通常20 μ l。データ処理: 波長200から349nm間の3次元データを取り込み, 多波長クロマトグラフ及び

*食品発酵部

ラム及び紫外外部吸収スペクトルの解析。

2.5 標準溶液の調整

化合物別に100mgをメタノール100mlに溶かし、各溶液の1mlを合わせ減圧下で約100 μ lまで濃縮する。この濃縮液をHPLC移動相A液で希釈し100ml中に各成分 1mgを含む混合標準液を調整する。また、必要に応じて単成分標準液も同様に調整した。これらの標準液は適宜希釈した後、HPLC分析に供した。

2.6 試験溶液の調整

種麹5 gを精秤しSeoら⁶⁾方法に準じた。カートリッジカラム(SEP・PAK C_{18} MILIPORE社製)にて精製したフェノール酸画分は減圧下で濃縮後、HPLCの移動相B液を加え全量2mlとし、HPLC供試液とした。

3. 試験結果及び考察

3.1 HPLCによるフェノール酸の分離状況

使用した装置がBrad Murphyら⁵⁾と異なる以外は同じ条件で分析し、図1 (各成分100ng)のクロマトグラムを得た。化合物の溶出順位をBrad Murphyらのデータと比較すると、ピーク1~4の順位は同じであるが、その後の順位をBrad Murphyらは7.5.6.8.10.9.11.12.13としており溶出順位に違いが見られた。本研究では各ピークについて紫外外部吸収スペクトルをモニターし化合物の同定には正確を期しているが、溶出順位の相違の原因を明らかにすることが出来なかった。

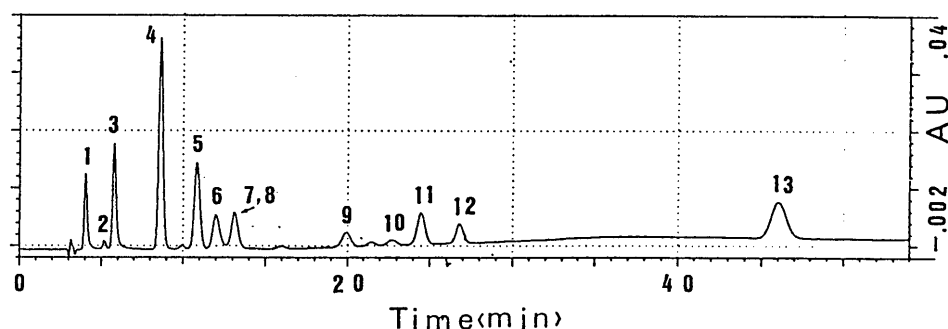


図1 混合標準液のHPLCクロマトグラム

1.Gallic acid 2.Gentisic acid 3.Protocatechuic acid 4.p-rlydro_xybenzoic acid 5.Vanillic acid 6.Caffeic acid 7.Salicylic acid 8.Syringic acid 9.p-Coumaric acid 10.Benzoic acid 11.Ferulic acid 12.Sinapic acid 13.Cinnamic acid

3.2 フォトダイオードアレイ検出器による高感度多成分同時分析法

Brad Murphyら⁵⁾紫外外部検出器を用い単波長254nmでフェノール酸の測定を行っている。この波長は多数の化合物を幅広く捉える点で最も適した波長であるが、高感度多成分同時分析には各化合物に適した検出波長を選択することが望ましい。このため、多波長同時測定が可能なフォトダイオードアレイ検出器を用い、254nmを含む多波長値の選定及び各化合物の検出波長の最適化を検討した。その結果、

表1 (各成分20ng)に示した6波長を採用することで、254nm測定時に比しほとんどの化合物において検出感度の向上が見られ、特にBenzoic acid, p-Coumaric acid, Gentisic acid及びSalicylic acidにおいて著しい。このことから、当該検出器がフェノール酸の高感度多成分同時分析に有効な手段であることが分かった。

表1 波長設定と感度比較

	ピーク番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	保持時間(min)	4.02	5.19	5.78	8.61	10.83	11.99	13.13	13.13	19.95	22.74	24.46	26.81	46.06
単波長時の	波長(nm)	254												
ピーク面積	面積(A)(10 ⁻⁴ *AU*min)	6.02	0.59	10.2	24.2	12.1	5.37	0.74	5.67	3.01	1.56	6.44	3.39	14.0
多波長時の	波長(nm)	270	320	260	254	260	320	233	270	310	233	320	320	270
ピーク面積	面積(B)(10 ⁻⁴ *AU*min)	9.84	5.55	10.8	24.2	13.1	15.5	8.40	11.0	24.0	13.5	18.1	14.6	27.8
感 度 比	(A/B)	1.6	9.4	1.05	1.00	1.08	2.89	11.4	1.94	7.97	8.65	2.81	4.31	1.98

3.3 黄麴菌分生子のフェノール酸

分生子試験溶液をHPLCで分析した結果、図2のクロマトグラム上のピーク1、2の保持時間(Rt)は13.13, 24.52minで、各ピークの紫外吸収スペクトルを図3 (注入量: 40μl)に示した。これらの結果を標準品より得たデータと照合し、ピーク1をSyringic acid、ピーク2をFerulic acidと同一化することが出来た。他の一部のピークも標準品のRtと一致したが、その吸収スペクトルが異なるため成分の同一化に至らなかった。分生子から検出されたSyringic acid及びFerulic acid量は1.30, 0.33μg/g (乾物)であった。

分生子における当該化合物の存在形態については、Seoの分析法⁶⁾に準じて水酸化ナトリウムによる加水分解を行っており、遊離体或いは結合体かを解明するに至らなかった。

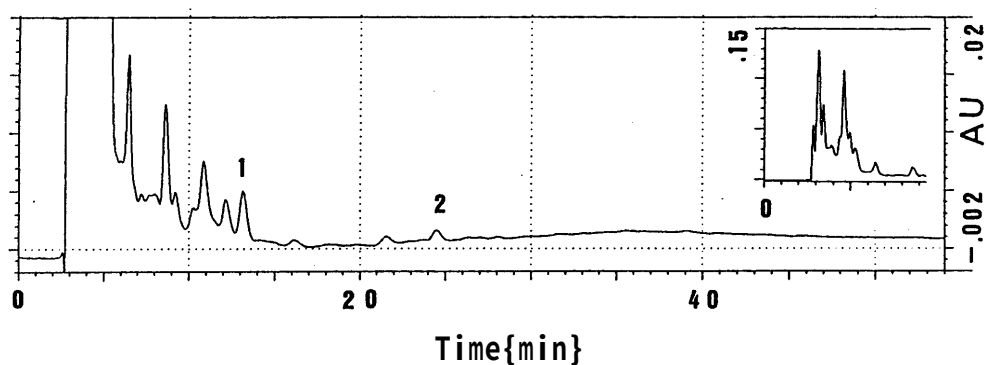


図2 分生子試験液のHPLCクロマトグラム

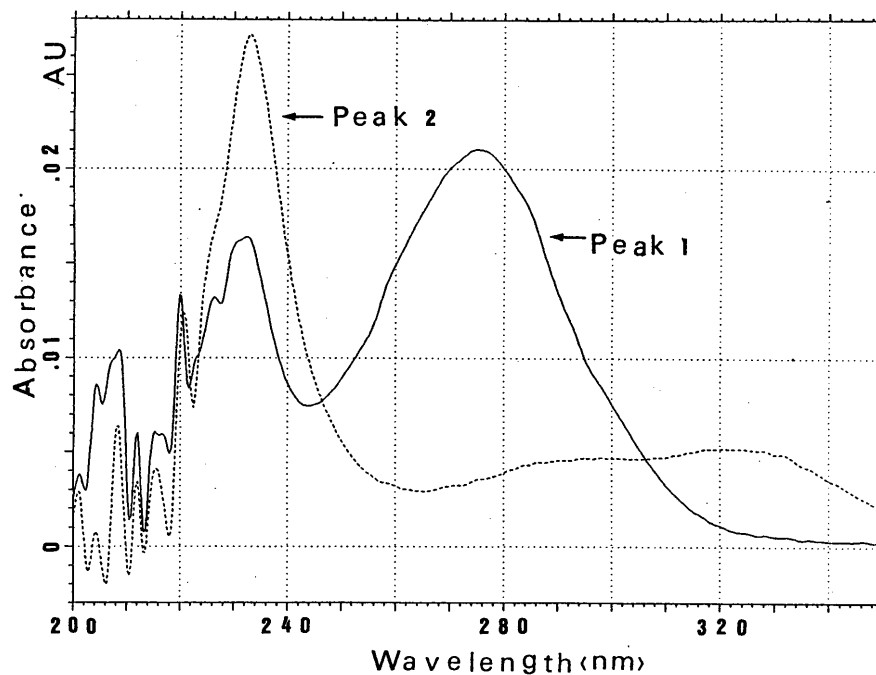


図3 図2におけるピーク1、2の紫外吸収スペクトル

4. 要 約

- 1) HPLCによるフェノール酸の溶出順位が既知データと相違していた。
- 2) HPLCによるフェノール酸の高感度多成分同時分析及び化合物の同定には、フォトダイオードアレイ検出器が有効である。
- 3) 黄麹菌分生子からSyringic acid, Ferulic acidが検出された。

参考文献

- 1) 横塚 保:農化,27,276,549 (1953)
- 2) 横塚 保:同上,41, 9 (1967)
- 3) 浅尾保夫,逆井利夫,横塚 保:同上,41,434 (1967)
- 4) 浅尾保夫,横塚 保:同上,32,617,622 (1958)
- 5) BradMurphy.J.,Stutie.C.A.:Anal.Biochm.70,220 (1978)
- 6) Seo. A., Morr. C. V. : J. Agric. Food Chem.32,530 (1984)