

優良醤油酵母の育種

- 試験管レベル下でのHEMF生成条件の検討 -

漆原栄台

1. 緒言

わが国の伝統食品の一つである醤油は、日本の食卓に欠くことの出来ぬ総合調味料となっている。また、Soy sauce として諸国へ普及・浸透している。

このような消費動向にあって、県内醤油メーカーの多くが諸米の仕込みは天然醸造方式を採っている。このため、年ごより製品の良し悪しの差が大きくなり、安定した高品質の醤油を醸造することが難しい。

醤油の品質を左右する要素の一つに香りがある。この香りの成分¹⁾²⁾は現在までに300種類ほど明らかになっている。これらの成分の中には、醤油独特に生育する酵母の作用で生成する成分も少なくない。NUNOMURA³⁾は多数の香り成分の中から醤油の特有成分として4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone(以下HEMF)の存在を、SASAKI⁴⁾は酵母によりHEMFが生成することを明らかにした。また、木原⁵⁾は全国醤油商會の上位入賞品と下位品とを比べ、HEMF濃度が高い傾向にあるとしている。さらに、HEMFの生理活性の面から見ると、当成分は血をよわらげる作用の他に、PARIZAR⁶⁾⁷⁾は市販醤油そのものに抗腫瘍活性を認め、その活性成分の一つはHEMFと同一とした。

本研究は、HEMFに富み香味のまろやかで発酵時の伸びが良く、品質の良い醤油を安定して生産するために必要と思われるHEMF高生産酵母の育種について検討する。

本稿では、県内醤油メーカーから市販されている醤油中のHEMF濃度を調べるとともに、HEMF高生産酵母をスクリーニングする際に必要と思われる培養条件を見出すため、数種の夜本培地における酵母のHEMF生成量を検討したので報告する。

2. 試験方法

2.1 試薬

特に説明のないものは、市販の試薬純級を用いた。

2.2 県産醤油のHEMF分析試料の調製

県内醤油メーカーの本醸造農工醤油(特級)を対象に、製造日から30日以内に分析を試みた。小型試験管(外径:15mm、高さ:105mm)に醤油2mlを採り、NaCl250mgを溶かし、内部標準物質としてn-ペンタノール1,000ppmエタノール溶液20 μ l、酢酸メチル2mlを加え、ジェネレーター式ホモナイザー(IKA製ULTRA-TURRAX)で2分間撹拌した後、遠心分離(4,500rpm、10、5分間)し、酢酸メチル層をガスクロマトグラフ供試液とした。

2.3 酵母菌によるHEMF生成試験

1) 供試培地の調製

A) 液本培地: 麦芽エキス(Difco製)2%、ペプトン(Difco製)0.1%、ブドウ糖2%、NaCl17%、pH5.5。

B) 液本培地: カガミノ酸(Difco製)0.4%、酵母エキス(Difco製)0.2%、ぶどう糖3%、KH₂PO₄0.1%、MgSO₄·7H₂O0.05%、CaCl₂·2H₂O0.01%、NaCl17%、pH5.5。

C) 液本培地: 麦芽エキス0.3%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.3%、ブドウ糖1%、NaCl17%、pH5.5。

* 液本培地: ブドウ糖を6%にし、他はC培地と同じ。

有糖級及びアミノ酸耐性夜本培地: D) 培地は有糖級及びアミノ酸を耐性とした。

2) 培養方法

小型試験管ごより培地4mlを分注し、オートクレーブ滅菌(但し、有糖級及びアミノ酸耐性培地は0.45 μ mメンブレンフィルターによる除菌処理を行った後、C寒天培地であらかじめ試験管表面に培養した供試菌を白金耳で移し、28、12日間の静置培養を行った。

振とう培養法は、25ml三角フラスコにD培地を8ml分注し、オートクレーブ滅菌後、前法と同様に供試菌を移し、28、12日間、80rpmの速度で回転振とう培養を行った。

3) 供試酵母菌株

Zygosaccharomyces rouxii IFO0495、IFO0505、IFO0510、IFO0513及びび当センター保菌株H1、H2、H3、H4、H5、H6を供試菌とした。

4) 培養夜中のHEMF分析試料の調製

培養液2mlを採取し、前法の2.1と同様に処理した。

5) 培養夜中のエタノール測定

しょう油除去のガスクロマトグラフィー法⁸⁾に準拠した。

2.4.1.1) 装置及び分析条件

1) 装置及び分析条件

1.1) ガスクロマトグラフ

ガスクロマトグラフGC-9A、データ処理装置CR4A(いずれも島津製作所製)を用いた。注入口温度200、水素炎イオン化検出器230、メイクアップガスN₂ガス40ml/min、試料注入方式スプリットレス、サンプリング時間1.5min、試料注入量1 μ l、FFAPキャピラリーカラム(カドレックス社製・化学結合型、内径0.25mm、長さ50m、膜厚0.25 μ m、カラムヘッド圧2.1Kg/cm²、昇温40から230(10min保持まで3 μ /min、カラムヘッド圧2.1Kg/cm²(Heガス))、HR-20Mキャピラリーカラム(信和化学製・化学結合型、内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25 μ m、昇温40から220(10min保持まで4 μ /min、カラムヘッド圧1.25Kg/cm²(Heガス))。

1.2) 検量線及び定量法

内部標準法によった。すなわち、HEMFの2~100ppm範囲で濃度を変え、且つ内部標準物質が10ppmとなるよう調製した酢酸メチル溶液2 μ lより1 μ lをガスクロマトグラフへ注入し、得られた濃度比、面積比をプロットした検量線に基づき供試夜中のHEMF濃度を求めた。

1.3) ガスクロマトグラフ質量分析計

GCMS-9100MK(島津製作所製)でガスクロマトグラフはGC-14である。FFAPキャピラリーカラムをパケット流路へ接続し使用した。数種の分析条件は前述のイ)と同じであるが、カラムヘッド圧2.0Kg/cm²、ジェットセパレート温度220、イオン源温度220、イオン化電圧70eV(EI法)、加圧電圧3KV。

3. 結果及び考察

3.1 ガスクロマトグラフによるHEMF分析の最適化

HEMFに関する異性体の化学構造が研究者により異なっており、NUNOMURA³⁾は4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanoneの混合物であるとし、最良品として木原⁹⁾はHEMFは4

Hydroxy-2-ethyl-5-methyl-3(2H)-furanoneのみであり、あと一つの異性体は3,4-Dihydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methylfuranと報告している。いずれにしても2種類の異性体が存在することはおそらくと思われる。本稿では取りあえずNUNOMURAらの研究結果を採用し考察を行った。

まず2種類のカラムを用いてHEMFのピーク形状を比較検討したところ、HR-20Mのクロマトグラムでは異性体由来と思われる2つのピークが存在し、その分離状態は不完全でピーク間に盛り上がりが見られた。他方のFFAPにおいては、ピーク形状は良好な単一ピークを示しピークの面積を容易に求める。このことから、HEMF分析用カラムとしてFFAPキャピラリーカラムを採用することにした。

次に、カラムにより分離されたHEMFを検出する装置として、質量分析計、水素炎イオン化検出器及び原子発光検出器等を列挙することが出来るが、HEMFの異性体については前述のような未解決点があり、また高純度の各異性体の標準品が入手困難であるため、感度面において化学構造由来の影響を受けない原子発光検出器による炭素原子等の測定法を採用するのが最良と思われる。しかし、当センターに当該検出器を装備したガスクロマトグラフが無いため水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフィ法によりHEMFを測定した。

3.2 県産醤油中のHEMF濃度

県内醤油メーカー約20社の中から7社について調査した結果を表1に示した。醤油中のHEMF濃度は最

表1 県産醤油中のHEMF量

メーカー名	濃度(ppm)
A社	20.1
B社	20.5
C社	31.9
D社	52.1
E社	51.4
F社	36.4
G社	40.6
平均	36.1

低値が20.1ppm、最高値が52.1ppmの範囲であり、約2.5倍の差が見られた。このような差が生じる要因として、醤油醸造における諸工程、醸造工程後の貯蔵管理、火入れ工程等がメーカーごとに異なっており、これらの違いが濃度差に影響したものと考えられるが今後詳細に検討する必要があると思われる。

3.3 数種の発酵培地における酵母のHEMF生成量

各種の培養条件下での測定結果を表2, 3, 4, 5にまとめた。培地A, B, C, 有機酸及びアミノ酸添加培地及びD培地について培養及び振とう培養について検討した。いずれの培養区もHEMF生成量は検出限界値である2ppm以下であった。このため、ガスクロマ

表2 培地の種類とHEMF生成量

供試菌	培地の種類(単位ppm)		
	A	B	C
IFO 0495	<2.0	<2.0	<2.0
IFO 0505	<2.0	<2.0	<2.0
IFO 0510	<2.0	<2.0	<2.0
IFO 0513	<2.0	<2.0	<2.0
H1	<2.0	<2.0	<2.0
H2	<2.0	<2.0	<2.0
H3	<2.0	<2.0	<2.0
H4	<2.0	<2.0	<2.0
H5	<2.0	<2.0	<2.0

表3 有機酸添加培地とHEMF生成量

有機酸名	添加量(g)	供試菌(単位ppm)			
		IFO-0495	IFO-0505	IFO-0510	IFO-0513
L-乳酸	7	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-リンゴ酸	5	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
クエン酸	5	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
コハク酸	5	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
ピレピン酸	5	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-酒石酸	5	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
マロン酸	5	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
α-ケトグルタル酸	5	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-ヒドロキサミン酸	5	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0

表4 アミノ酸添加培地とHEMF生成量

アミノ酸名	添加量 (g)	供試菌 (単位ppm)			
		IFO-0495	IFO-0505	IFO-0510	IFO-0513
L-グルタミン酸	10	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-アスパラギン酸	5	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-ロイシン	5	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-イソロイシン	3	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-アラニン	4	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-バリン	4	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-セリン	3	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-プロリン	3	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-フェニルアラニン	3	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-リジン	3	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-スレオニン	2	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-グリシン	2	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-アルギニン	2	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-メチオニン	1	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-ヒスチジン	1	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-チロシン	0.4	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0
L-トリプトファン	0.01	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0

- 2) 横塚 保, 佐々木正興, 布村伸武, 浅尾保夫: 醸造, 75, 717(1980)
- 3) NNUNOMURA, MSASAKI and YASAO: Agr. Biol. Chem., 40, 491(1976)
- 4) MSASAKI, NNUNOMURA and TIMATSUDA: J. Agric. Food Chem., 39, 934 (1991).
- 5) 木原 清: 醬研 14, 147(1988)
- 6) H. BENJAMIN, J. STORKSON and A. NAGAHARA: Cancer Res., 51, 2940(1991)
- 7) A. NAGAHARA, H. BENJAMIN, J. STORKSON, K. SANG, W. LIU and W. PARIZA: Cancer Res., 52, 1754 (1992)
- 8) しょう菇鑑定法: (財)日本醤油研究所編 201(1985)
- 9) 木原 清, 大谷 肇, 益田勝吉, 榊原二作: 醬研, 20, 7(1994)

表5 培養方法とHEMF生成量

供試菌	D培地 (単位ppm)	
	静置培養 (7日生成量%)	振とう培養
IFO 0495	<2.0 (0.73)	<2.0
IFO 0505	<2.0 (0.72)	<2.0
IFO 0510	<2.0 (0.63)	<2.0
IFO 0513	<2.0 (0.80)	<2.0

トグラフ質量分析計によるSIM(m/z=142)法で、表5の静置培養液について分析したところ、供試菌の4株、いずれも極く少量のHEMFを生成しており、酵母菌自体のHEMF生産力は微弱であることが分かった。

以上の結果から、HEMFをある程度量で生産させ、HEMF高生産酵母のスクリーニングに適した培養組成を構築するには、SASAKI⁴⁾らが報告したリブローズ5-リ

ン酸等のリン酸化エステル糖をHEMF前駆物質として培養に添加する基礎研究を今後実施する必要があると思われる。

4. 要約

県内醤油メーカー全社の調査でなく、本報告農工醤油特級のHEMF濃度は最高値が52.1ppmであった。

HEMF高生産酵母をスクリーニングするための培地を構築したが、試験に供した培養液中に極く微量のHEMFを検出した程度であった。

文献

- 1) 横塚 保, 佐々木正興, 布村伸武, 浅尾保夫: 醸造, 75, 516(1980)