

味噌酵母の HEMF 生産性と育種*

小浜 恵子**、米倉 裕一***、菊地 智恵子****、大畑 素子****、*****、菅原 悦子****

味噌、醤油中の重要な香り成分である HEMF (4-Hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone) 生成に対する耐塩性酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) の役割に着目し、炭素数 2 の化合物としてアセトアルデヒドを添加したところ、HEMF 生成速度の上昇がみられた。また、センター保有の *Z. rouxii* についてモデル培地での HEMF 生産性を調べ、実際の味噌醸造を行ったところ、現在頒布している RM-3 が最もバランスがとれていた。一方、RM-10 は特徴的な華やかな香りを示した。グルコース調節能やピルビン酸の資化能が変化した変異酵母は、エタノールおよび HEMF 生産性が向上した。

キーワード：HEMF、味噌酵母

Formation of HEMF (4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone) by Yeast and Improvement of Productivity

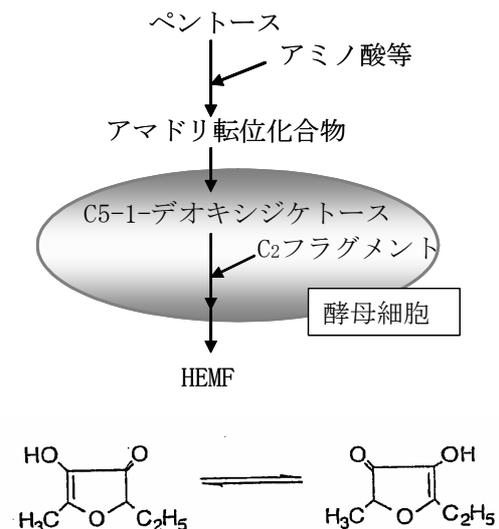
KOHAMA Keiko, YONEKURA Yuichi, KIKUCHI Chieko, OHATA Motoko and SUGAWARA Etsuko

4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone(HEMF) is a characteristic flavor component of *miso* and *soyuu*. We investigated biosyntheses of HEMF by yeast(*Zygosaccharomyces rouxii*). HEMF production rate was increased by acetaldehyde addition. HEMF productivity in the model medium or *miso* by yeasts were examined, RM-3 was most suitable for brewing. On the other hand, RM-10 had many kinds of aroma. Ethanol and HEMF productivity improved by mutation yeast that changes glucose regulation or consuming pyruvic acid.

key words : HEMF, yeast

1 緒 言

味噌の香りは、その品質を左右する大きな要素の 1 つである。味噌の香り成分は 200 種類以上から構成されるといわれており、特に HEMF (4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone) は、甘い香気を有する成分で、官能評価との相関が報告されている。味噌や醤油における HEMF の生成は、ペントースーリン酸経路で生じる、炭素数 7 の化合物、セドヘプツロース 7-リン酸を前駆体とすると報告されている¹⁾。一方、菅原らは、HEMF の生成には、メイラード反応生成物が必要であり、ペントース (リボースなど) および各種アミノ酸やアンモニウム塩、特にアラニンやセリンを添加し、酵母 (*Z. rouxii*) の存在下で、極めて多量の HEMF が生成することを明らかにした²⁾。林田らも同様の報告をしている³⁾。われわれは、HEMF はメイラード反応によって生成する前駆体 (C₅-1-デオキシジケトース) に、酵母が供与源となる炭素数 2 の化合物 (C₂ フラグメント) が結合して、酵母の酵素反応により形成される可能性が高いと考えている (図 1)。本報告ではこの仮説に基づき、炭素数 2 の化合物としてアセトアルデヒドを、メイラード反応



生成物を含むモデル培地に添加した場合の HEMF 生成について初めに検討した。また、センターの保有する味噌酵母の HEMF 生成量についてモデル培地で検討し、さらに

* 基盤的・先導的技術研究開発事業 **** 岩手大学教育学部
** 食品技術部 ***** お茶の水女子大学大学院
*** 醸造技術部

実際の味噌中での香气成分生成をみた。また、HEMF は味噌中で酵母が増殖した後、アルコール等を生成する段階で生じることから、解糖系のグルコース調節能やピルビン酸の資化能が変化した酵母では HEMF 生成量が変化する可能性が高いと考え、育種を行ったので報告する。

2 実験方法

2-1 使用酵母

酵母はセンター保有の耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* 4 株 (MS-52、MS-53、RM-10、RM-3) を用いた。

2-2 アセトアルデヒドの添加と HEMF 生成量

醤油培地 (醤油 10ml、グルコース 5g、NaCl 10g、蒸留水 100ml、pH5.2) 50ml に酵母 RM-3 を植菌し、27°C で 3 日間静置培養した。培養菌体を遠心して回収し、20mM Tris-HCl bufer (pH7.4、85mM NaCl、1mM MgSO₄・7H₂O) で洗浄した後、モデル培地 M1 (グルコース 7.5g、リボース 2.5g、グリシン 1.0g、NaCl10.0g、KH₂PO₄1.0g、MgSO₄・7H₂O 0.5g、蒸留水 100ml、pH5.2、120°C、15 分加熱滅菌) またはアセトアルデヒドを 0.05% 添加した M1 培地 50ml に菌数 10⁸cells/ml となるように添加し、27°C でインキュベート後、3 時間および 6 時間後の HEMF 生成量を測定した。なお、アセトアルデヒドの添加量は酵母の生育を阻害しない濃度である。

2-3 保有酵母の HEMF 生産量の測定

供試酵母を 2-2 と同様に醤油培地に植菌し 3 日間、培養後に M1 培地に菌数 10⁸cells/ml となるように添加し、27°C で 1 週間および 2 週間静置した時の HEMF 生成量を測定した。

2-4 HEMF の測定

HEMF ほか香气成分の回収は、ポーラスポリマー樹脂、Tenax TA を充填したカラムに香气成分を吸着させ、エーテルで溶出する菅原らの方法⁴⁾により実施した。測定は GC (Shimadzu 製 GC-14A) で行った。

2-5 味噌製造試験および分析

味噌は麹歩合 10 割とし、仕込み目標は、食塩分 11.5%、対水食塩濃度 21% とした。仕込みは普通の米味噌仕込み法で行った。酵母は初発菌数が物料 1g 当たり 10⁵ あるいは 10³ となるように添加し、30°C で 3 ヶ月発酵させた。基準味噌分析法⁵⁾に従い、還元糖、エタノール、pH、Y 値の分析を行った。味噌中の香气成分分析は菅原らの方法⁴⁾で実施した。

2-5 変異酵母の取得

酵母 RM-3 を液体培地 N1 (yeast nitrogen base 0.67g、グルコース 2g、NaCl 5g、蒸留水 100ml、pH5.2) で 27°C、3 日間静置培養し、10% NaCl で洗浄後、唯一炭素源としてピルビン酸を含む培地 (yeast nitrogen base 0.67g、ピルビン酸 1g、NaCl 5g、蒸留水 100ml、寒天 1.5g、pH5.2) にプレーティングし、27°C、1 週間後に生育の良いコロニーを釣菌した。また、グルコースのアナログである 2-デオキシグルコースを含みガラクトースを炭素源とした

選択培地 (yeast nitrogen base 0.67g、ガラクトース 0.5g、2-デオキシグルコース 0.03g、NaCl 5g、蒸留水 100ml、寒天 1.5g、pH5.2) にも同様にプレーティングし、生育したコロニーを釣菌した。選択した変異株は、2-2 と同様に醤油培地で前培養後、モデル培地 M1 に菌体を添加し、27°C、72 時間インキュベート後の HEMF 生成量とエタノール生成量を測定した。

3 結果および考察

3-1 アセトアルデヒドの添加効果

図 2 にモデル培地 M1 および M1 にアセトアルデヒドを加えた培地に酵母 RM-3 を 10⁸/ml となるよう添加した場合の HEMF 生成量を示した。アセトアルデヒドの添加で明らかに HEMF の生成速度が上昇した。アセトアルデヒド無添加でも 24 時間後には、グルコースを消費し、同レベルの HEMF 量を生成する (データ未発表)。また、酵母を加えない同条件下ではアセトアルデヒドが存在しても HEMF 生成がみられないことから、HEMF 生成には、炭素数 2 の化合物の供与が必要であり、酵母がグルコースを消費し、炭素数 2 の化合物の供与とその後の生成を進める役割を果たすと推察された。

3-2 センター保有酵母のモデル培地での HEMF 生産量

保有酵母の M1 培地での HEMF 生成量を表 1 に示した。現在、センターで味噌醸造に使用し、頒布もしている RM-3 の生成量が最も高く、次いで MS-52 であった。また、RM-10 は香りが華やかで他と異なっていたことから、この 3 株を選び、味噌の試醸を行った。

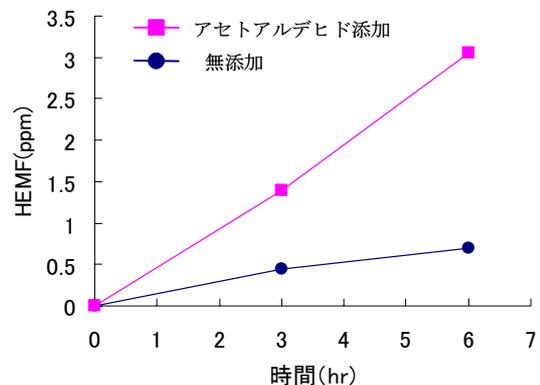


図 2 モデル培地へのアセトアルデヒド添加と HEMF 生成量

表 1 モデル培地での HEMF 生成量

酵母	HEMF 生成量 (ppm)	
	1week	2week
MS-52	18.9	31.2
MS-53	17.2	24.4
RM-10	16.0	23.3
RM-3	29.1	66.9

3-3 センター保有酵母での味噌試醸造

表 2 に醸造 2 ヶ月後の成分値と HEMF などの香气成分量を示した。RM-3 は酵母添加量を $10^3/g$ と減らしたのも試醸した。2 ヶ月後には 10^5 オーダーまで増殖していたが、エタノールの生成量も低く、味噌らしい香味に欠けていた。また、MS-52 は発酵が進みエタノールも生成したものの香气に欠けた。RM-10 は、アルコール香 3-methyl-1-butanol も高く、M1 培地での特徴有る香りを再現したが、今回の試験醸造では香りバランスに欠けると思われた。3 ヶ月後の RM-10 の香气成分を測定したところ、HEMF は 7ppm まで増大し、アルコール香 3-methyl-1-butanol は 15ppm に達し、RM-3 の約 5 倍となった。バラ様香として感じられる 2-phenyl-1-ethanol も RM-3 と同等に達した。RM-10 は他の酵母に比べてゆるやかにエタノールを生成し、香气成分は他の酵母に比べて多くなる傾向にある。醸造条件などにより、特徴有る使用が可能かもしれない。今回の試験醸造では、RM-3 が最もバランスのとれた香气生成と発酵経過を示し、以下の育種には RM-3 を使用した。

3-4 変異株の HEMF およびエタノール生産量

3-1 の結果から、HEMF の生成にはメイラード反応生成物を前駆体とし、アセトアルデヒド様の炭素数 2 の化合物を酵母が提供し、生成される可能性が高い。実際の味噌中でもメイラード反応が進行し、酵母が増殖、アルコール生成がみられる時期に HEMF 生成がみられる。そこで、糖質の資化性やグルコース調節の変異した酵母は HEMF 生成能が高くなる可能性が高いと考え、RM-3 を親株として変異株を取得した。ピルビン酸資化能が増大した酵母は 2 株取得した。その出現率は $1/10^8$ であった。

また、2-デオキシグルコース存在下でガラクトースを炭素源として生育できる酵母は $1/10^7$ の頻度で取得し、生育良好な 11 株を選択した。これら 13 株のモデル培地 M1 での HEMF およびエタノール生成量を図 3 に示す。取得した変異株は、親株である RM-3 よりも、すべてエタノール生産性が上昇した。HEMF 生産量は 5 株を除き同等以上であった。これらのうち、ピルビン酸資化能が増大した株の 1 つはエタノール生産性が親株の 2 倍であり、HEMF 生成量も最も高かった。

現在、この変異株を使用した味噌を試醸造中であり、結果が良好であれば、県内企業へ頒布していきたい。また、HEMF の生成機構については岩手大学で検討を継続しており、酵素の関与や、生成する HEMF のエチル基の炭素 2 つはグルコースから供与されることが明らかになりつつある（データ未発表）。これらの解明が進めば、さらに香气成分への応用が可能であり、期待したい。

表 2 試醸味噌の分析 (2 ヶ月後)

	MS-52	RM-10	RM-3 (10^3)	RM-3 (10^5)
エタノール (%)	0.53	0.18	0.08	0.41
還元糖 (mg/ml)	20.5	21.8	20.7	21.4
pH	5.3	5.3	5.3	5.2
色差 Y 値 (%)	13.4	12.6	9.8	10.4
香气成分 (ppm)				
HEMF	1.9	3.7	1.1	4.2
3-methyl-1-butanol	1.4	4.8	3.2	2.8
2-phenyl-1-ethanol	1.7	0.5	4.0	5.7

*RM-3 は菌数 10^3 、 10^5 cells/g、他は 10^6 cells/g 添加

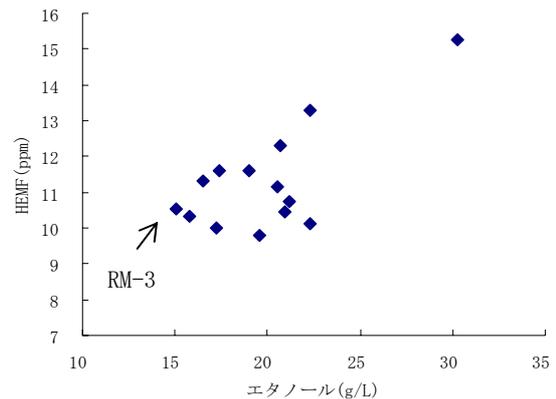


図 3 変異株の HEMF 生成量

4 結 言

味噌、醤油中の重要な香气成分である HEMF 生成への耐塩性酵母の役割に着目し、メイラード反応生成物を含むモデル培地に酵母を加え、炭素数 2 の化合物としてアセトアルデヒドを添加したところ、HEMF 生成速度の上昇がみられた。また、センター保有の耐塩性酵母 *Z. rouxii* についてモデル培地での HEMF 生産性を調べ、実際の味噌醸造を行ったところ、現在頒布している RM-3 が最もバランスがとれていた。一方、RM-10 は特徴的な華やかな香りを示した。また、解糖系のグルコース調節能やピルビン酸の資化能の増大を指標として取得した変異酵母は、すべて親株である RM-3 よりも高いエタノール生成量を示し、HEMF 生成量も半分以上が親株より高かった。エタノールおよび HEMF 生成量の最も高かった変異株について実際の味噌での試験醸造を継続している。

文 献

- 1) Sasaki M., Nunomura N., Matsudo T.: J. Agric. Food Chem., **39**, 934-938 (1991)
- 2) Sugawara E. and Sakurai Y.: Biosci. Biotechnol. Biochem., **63**, 749-752 (1999)
- 3) 林田 安生, 西村 賢了, J. コリンスローター: 醸協 **93**, 730-738 (1998)
- 4) 菅原 悦子: 日食工誌, **38**, 491-493 (1991)
- 5) 全国味噌技術会編: 基準味噌分析法 (全国味噌技術会) (1998)