

57

助成番号 0057

耐塩性酵母によるみそ特有香氣成分HEMF (4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone)の形成機構

助成研究者：菅原 悦子 (岩手大学 教育学部)
 共同研究者：桜井 米吉 (岩手大学)

醤油の特香成分とされていたHEMFは赤色辛口系米味噌の特有香氣成分としても同定され、近年は強い抗酸化性を持ち、胃がんの発生を抑制したり、放射線被害を予防する等、優れた生理作用のあることも報告されている。味噌のHEMFは、醤油と同様に熟成過程で酵母が関与して生産される香氣成分であることを明らかにし、酵母によるHEMFの形成機構を解明を試みた。炭素源や窒素源の種類をかえた液体培地で耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* を培養し、培地には炭素源としてはリボースに代表される五炭糖が必要であり、窒素源としてはアラニン、セリンやグルタミン酸のようなアミノ酸でも形成されることを確認した。しかし、このとき、リボースとアミノ酸は同時に加熱殺菌される必要のあることを明らかにし、味噌のHEMFは熟成中にアミノカルボニル反応によって生成される前駆物質に酵母がアセトアルデヒド様の化合物を提供することによって形成される可能性が高いと考えている。

本研究では味噌醤油で特に多量のHEMFが形成される理由の解明を目的とした。はじめに、耐塩性酵母 *Z. rouxii* をリボースとグリシンを含む加圧殺菌培地で培養し、その際同時に添加する食塩量を変えることによって、HEMF形成へ及ぼす培地中の食塩の影響を明らかにした。その結果、*Z. rouxii* の生育には食塩を含まない培地でも、15%の高濃度であっても影響は少なかったが、*Z. rouxii* のHEMFを形成する能力には影響があり、特に食塩を含まない場合に形成量が低下することが明らかとなった。次に、同様の培地でアルコール発酵力の旺盛な *S. cerevisiae* と、耐塩性で醤油の後熟酵母として用いられる *C. versatilis* の培養実験を行い、HEMF形成への酵母の種類の影響を検討した。*S. cerevisiae* も増殖ができればHEMFを形成できるが、その能力は *Z. rouxii* より低いと判断された。*C. versatilis* では、生育は食塩の影響をうけにくく、HEMFを形成する条件としては食塩濃度10%の培地がやや適していると判断された。しかしながら、HEMFの形成量は *Z. rouxii* を上回る可能性は低いと考えられた。このように、3種類の酵母はともにHEMFの前駆物質を含む培地で培養すると一定量のHEMFを形成することが判明した。形成量は酵母の種類に依存し、味噌醤油の主発酵酵母である *Z. rouxii* が適した性質を備えていると判断された。食塩は酵母の増殖速度をコントロールする環境因子となっており、*Z. rouxii* では食塩がHEMF形成に必要なアセトアルデヒド様化合物の生産をコントロールしていると考えられた。

2 2

助成番号 0057

耐塩性酵母によるみそ特有香氣成分HEMF (4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone) の形成機構

助成研究者：菅原 悦子 (岩手大学 教育学部)

共同研究者：桜井 米吉 (岩手大学)

1. 研究目的

味噌にとって、香りはその品質を左右する重要な因子であるにも関わらず、醤油と比較してなかなか解明が進まなかった。その理由には、第1に、味噌は水分が比較的多い半固形状で水を加えるとコロイド状となり、均一な水溶液である醤油と比較して微量な香氣成分の抽出がかなり困難であったこと、第2には、味噌は加熱すると香りが変化するので、香氣成分の抽出には加熱操作が用いられなかったことがあげられる。そこで、各種の香氣濃縮物調製方法を比較し、ポーラスポリマーを用いたカラム濃縮法が味噌本来の香氣をよく再現し、味噌の重要な香氣成分も抽出でき、最も優れていることを報告した¹⁾。この方法を用いて、市販されている味噌の約80%を占めている赤色辛口系米味噌の香氣成分を分析し、初めてHEMF (4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone) を同定した²⁾。HEMFは強く甘い香氣を持ち、濃度によって醤油様の芳香を強く感じる醤油の特香成分 (Character Impact Compound) とされ、その水溶液中の香りの閾値は0.04ppb以下と低いと報告されている。Fig. 1にHEMFの化学構造を示したが、水溶液中では互変異性体の形で存在し、その割合は(A):(B)=3:2であると報告されている³⁾。そこで、HEMF含量の少ない味噌懸濁液にこの化合物を添加し、無添加のものと官能検査で比較し、味噌様の香氣が強くなっていることを確認した²⁾。さらに、全国味噌鑑評会に出品された米味噌34点を試料とし、カラム濃縮法で調製された香氣濃縮物を分析し、算出された各香氣成分の濃度と検査員による官能検査スコアの相関を求め、1%以下の危険率で有意にHEMFの濃度が高いと官能評価も高くなるという結果を得た⁴⁾。また、多種類の味噌の香氣成分分析結果から、HEMFは特に発酵熟成型味噌の特有香氣成分であることを明らかにした⁵⁾。近年、HEMFはチーズ⁶⁾ やビール⁷⁾ から少量検出されたと報告されている。一方、HEMFは強い抗酸化性を持ち、胃がんの発生を抑制したり、放射線被害を予防する等、香氣成分としての役割に加えて優れた生理作用のあることが報告され⁸⁾、味噌の食品機能研究では注目される成分のひとつとなっている。

HEMFは、醤油において酵母の生成物であることが横塚らによって明らかにされており³⁾、同様に味噌においても熟成過程で酵母が関与して生産される香氣成分であることを明らかにした^{9,10)}。さらに、1991年、佐々木らはHEMFは酵母によりペントース・リン酸経路の中

間生成物である炭素数7の化合物セドヘプツロース-7-リン酸を経て生合成されると報告した¹¹⁾。しかし、セドヘプツロース-リン酸からHEMFへの生合成経路については明らかにされていない。

一方、BLANKら¹²⁾はアラニンと五炭糖を加熱した際のアミノカルボニル反応によるHEMFの生成機構を提案し、HEMFはアミノカルボニル反応初期に生成した炭素数5の1-deoxydiketoseと、アラニンのストレッカー分解によって生成したアセトアルデヒドが結合し、環化、還元されて生成すると報告している。しかしながら、このような加熱によるHEMFの形成量は極めて少なく、味噌醤油で検出されるレベルには達しない。

著者らは酵母によるHEMFの形成機構を解明する目的で炭素源や窒素源の種類をかえた液体培地で耐塩性酵母*Zygosaccharomyces rouxii*を培養し、これら成分のHEMF形成に及ぼす影響を検討した。その結果、培地には炭素源としてはリボースに代表される五炭糖が必要であり、窒素源としてはアラニン、セリンやグルタミン酸のようなアミノ酸でも形成されることを確認した。しかし、このとき、リボースとアミノ酸は同時に加熱殺菌される必要のあることが明らかとなった¹³⁾。従って、味噌のHEMFは熟成中にアミノカルボニル反応によって生成される前駆物質に酵母が作用して形成される可能性が高いと考えられる。このとき、HEMFの前駆物質はBLANKらが提案した炭素数5の1-deoxydiketoseと同様の化合物であり、酵母はアセトアルデヒド様の化合物を提供する役割をはたしていると想定している。赤色辛口系米味噌の醸造において、清酒等の発酵食品に共通する香气成分が酵母の生育に適した条件で多量に生成するにもかかわらず、HEMFは高温の熟成温度で多く形成されるという結果も、この機構を支持する¹⁴⁾。また、林田ら¹⁵⁾は麦味噌では30℃以上の熟成温度でHEMFが顕著に生成されることや酵母によるHEMFの形成機構⁶⁾についても著者らと同様の提案をしている。

これらの結果はすべて耐塩性酵母*Z. rouxii* 061を用い、培地中の食塩濃度は10%とした場合に得られた。本研究では味噌醤油で特に多量のHEMFが形成される理由の解明を目的とし、特に培地中の食塩の役割と酵母の種類による相違を中心に検討した。耐塩性酵母*Z. rouxii*においては食塩濃度を通常より高い15%、低い5%及食塩を含まない場合を設定し、食塩濃度によるHEMF形成量への影響の解明を試みた。次に、*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida versatilis*の2種の異なる酵母を食塩濃度0%、10%の培地にそれぞれ添加、培養し、酵母の種類によるHEMF形成への影響とそのときの食塩の役割について検討した。

2.実験方法

2.1 供試菌株

本実験には3菌株「*Zygosaccharomyces rouxii* 061 (耐塩性酵母)、*Saccharomyces cerevisiae* sake K7、*Candida versatilis* (耐塩性酵母)」を用いた。*Z. rouxii* 061の菌株は仙台味噌より分離された菌株で宮城県味噌醤油工業共同組合から、*S. cerevisiae* sake K7

と*C.versatilis*は岩手県工業技術センターから、それぞれ分与して頂いた。

2.2 培養液の調製

2.2.1 種培養：*Z.rouxii*の食塩濃度5,10,15%及*C.versatilis*食塩濃度10%用の種培養は、生揚醤油10ml、グルコース10g、食塩10gを蒸留水で溶解し、合わせて100mlとした液体培地に保存菌株の斜面培養物を1~2白金耳程度植菌し、27℃で静置培養を行い、種培養物とした。*Z.rouxii*、*C.versatilis*の食塩を含まない培地、及*S.cerevisiae sake*用の種培養は、生揚醤油10ml、グルコース10gを蒸留水で溶解し、合わせて100mlとした液体培地に同様に植菌し、培養して、種培養物とした。培養期間は以下に示す通りである。

* 培養期間

- ① *Z.rouxii* 061 NaCl濃度 5、10、15%用—1週間 (27℃)
- ② *Z.rouxii* 061 NaCl濃度 0%用—3日間 (27℃)
- ③ *S.cerevisiae sake* K7—1日間 (27℃)、その後3日間冷暗所 (15℃)
- ④ *C.versatilis* NaCl濃度 0,10%用—10日間 (27℃)

2.2.2 本培養：Table 1に示した組成の液体培地を調製し、200ml三角フラスコに注入して120℃で15分間加圧殺菌し、そこに均一に振り混ぜた種培養物を駒込ピペットで1mlずつ植菌して、27℃で静置培養した。培養期間についてはそれぞれの菌株により、1~5週間とした。

2.3 酵母の生育状況の測定

2.3.1 菌数：菌数測定はThomaのヘマトメーターを用い、5回計測してその平均値から、培養液1ml当りの酵母数を計算により求めた。

2.3.2 グルコース残留量：菌数測定用の試料を採取した残りの培養液は3000rpm、15分間の遠心分離（高速冷却遠心分離機（HITACHI 18PR-52））を行い、この上澄液を用いて、DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)法により培地中の残留グルコース量を求めた。

2.3.3 NaClの定量：Mohr法（クロム酸イオンを指示薬とする銀滴定）により、培地中のNaCl量を求めた。

2.3.4 pHの測定：試料のpH測定はガラス電極pHメーターを使用して行った。

2.4 香気濃縮物の調製及び香気成分の分離・同定

酵母培養液を遠心分離した後の上澄液80mlを香気成分の同定と定量に用いた。精製したTenax TA3.5 gを充填した内径1cmのガラスカラムに上澄液を流速0.5ml/minで流して、香気成分をTenax TAに吸着させた。試料を全て流出させた後、蒸留水25mlを流し、その後、エーテル40mlを流速0.5ml/minで流して香気成分を脱着させた。エーテル溶出液は無水硫酸ナトリウムで一晩冷暗所にて脱水し、内部標準物質としてn-decyl alcoholを加え、常圧下、40℃にて蒸留濃縮し、香気成分濃縮物を調製した。

得られた香気濃縮物はガスクロマトグラフ（GC）,及びGCに直結したマススペクトロメーター（GCMS）を用いて分析した。各香気成分の濃度はGC分析の結果をもとに内部標準物

質とのピーク面積比から、試料とした培養液の重量に対するppmで算出した。化合物の同定は、標準物質とのマススペクトルデータ及びGCの保持時間の一致によった。分析条件は、次の通りである。

【GC】 GC : Shimadzu GC-14A CHROMATOGRAPH, Recorder : Shimadzu C-R4A CHROMATOPAC, Column : Fused Silica Capillary Column [INNOWax, 60m×0.25mm (i.d), 0.15 μm df], Column Temp. : 40°C 5min hold, 40°C-200°C (3°C/min), Carrier Gas : He [flow 0.8ml/min], Detector : FID,FPD, Detector Temp. : FID210°C,FPD230°C, Injection Temp. : 210°C.

【GC-MS】 GC : Hewlett Packard 5890 SERIES II, Column : Fused Silica Capillary Column [INNOWax, 60m×0.25mm (i.d), 0.15 μm df], Column Temp. : 40°C 5min hold, 40°C-200°C (3°C/min), Carrier Gas : He [flow 0.8ml/min], Injection Temp. : 210°C, MS : Hewlett Packard 5972 SERIES, Connect Temp& Ion Source Temp. :240°C, Ionization Voltage : 70eV, データ処理装置 : HPG 1034CJ MSケミステーション.

2.5 HEMF回収検量線による試料中のHEMF濃度の確定

試料中のHEMF濃度はHEMFの標準物質を用いて作成した検量線を用いて算出した。

3.結果及考察

3.1 *Zygosaccharomyces rouxii* 061のHEMF形成量に対する培地中の食塩濃度の影響

酵母*Zygosaccharomyces rouxii*は飽和に近い高濃度の食塩を含む環境で生育できる特殊な酵母であり、我が国では味噌、醤油の製造に用いられ、アルコール発酵やパン製造に用いられる*Saccharomyces*属とは類別されている。また、本研究に用いた*Z. rouxii* 061株は同属酵母の中でも味噌の醸造に用いられるとHEMFを多く生成することが報告されている¹⁸⁾。本研究では従来の食塩濃度10%に加えて高濃度の15%培地と、より低濃度の5%培地、及食塩を含まない培地で酵母を培養し、食塩濃度のHEMF形成量への影響を明らかにすることを試みた。

はじめに、食塩濃度10%の5週間の培養結果について、酵母の生育状況はTable 2に、香気濃縮物をGC、GC-MS分析して同定された香気成分の一覧をTable 3に、ガスクロマトグラムをFig. 2に示した。また、食塩濃度0,5,15%培養の酵母の生育状況をTable 4に示した。さらに、同定された香気成分の中から、特にHEMFの濃度はHEMFの検量線を用いて算出し、各培養物中の5週間のHEMF濃度の変動結果をFig. 3に示した。

食塩濃度10%と0,5,15%の5週間培養の結果、試料中の食塩濃度はすべての試料で週を追うごとにやや高くなる傾向がみられ、水分が蒸発して濃縮が起こったと考えられたが大きな差はなかったので、10%の結果のみをTable 2に示した。

食塩濃度10%と15%の培養期間中のpHは加圧殺菌後、植菌せずに保存した場合、及び培養期間が長くなるにつれて徐々に低下した点では同じ傾向であったが、15%が一貫して高

い値を示した。菌数は15%では10%よりも培養期間中ほぼ一貫して少ない値となった。グルコース残留量は培養後1週目と2週目で大きく減少し、その後徐々に減少を続けた点でどちらの濃度にも同じ傾向であったが、15%では一貫して残留量が多かった。以上より、15%では10%に比べると菌数の増殖も遅く、栄養源としてのグルコースの消費も活発に行われず、有機酸の生成量も少なく、pHが高く、酵母の生育状況としては10%よりは良好ではなかったが、大きな差ではないと考えられた。

Table 4で示された食塩濃度5%と0%の酵母の生育状況から、菌数については両濃度では大きな差はなく1週目で 10^8 cell/mlのレベルに達していたが、10%に比べるとその数は少なかった。グルコース残留量は培養後1週目と2週目で大きく減少し、その後ほぼ一定の値を示しており、両試料に差はみられなかった。pHについては5%では培養期間が長くなるにつれて低下し、酵母が活発に働き、有機酸の生成量が増加したと考えられた。これらの結果から *Z. rouxii* の生育は食塩濃度が低い場合にやや良好であるが、大きな影響はほとんどないと判断された。

次に、HEMFの形成量を比較すると、10%では1週目で93ppmであったのに対し、15%では60ppmとその約6割でしかなかった。しかし2週目には15%は120ppmと、10%の112ppmとほぼ同じ値となり、3週目以降は食塩濃度による差はないと判断された。一方、5%でもHEMF形成は3週目にピークを迎え、4、5週目でほぼ一定となった。また、培養期間中約50ppm~130ppmとなっており、10%や15%と大きな差はなかった。しかし、食塩を含まない培地では2週目でピークを迎え、3、4週目では低下し、形成量は培養期間中約50~90ppmで、5,10,15%に比べて少なかった。以上より、*Z. rouxii* の生育には食塩を含まない培地でも、15%の高濃度であっても支障はなかったが、*Z. rouxii* のHEMFを形成する能力には食塩が影響を与え、特に食塩を含まない場合に形成量が低下することが明らかとなった。

3.2 *Saccharomyces cerevisiae*のHEMF形成量への培地中の食塩濃度の影響

これまで本研究に用いられた酵母は、いずれも *Z. rouxii* であった。それは *Z. rouxii* が味噌や醤油の醸造に用いられる酵母であり、酵母によるHEMF形成には食塩が重要な役割を果たすと想定していたためである。しかし、リボース・グリシン系の加熱殺菌された培地での *Z. rouxii* の培養実験では、食塩を含まない培地でもHEMF形成量は約90ppmであった。従って、培養条件が整うと耐塩性の酵母以外でもHEMFを形成する可能性があるかと想定された。そこで、*Saccharomyces cerevisiae* sake K7を食塩を含まない培地及び、食塩濃度10%の培地で培養実験を行い、酵母の種類によるHEMF形成量を比較するとともに、培地中の食塩濃度の影響をさらに明らかにすることを試みた。*S. cerevisiae* は *Z. rouxii* とは異なり、食塩を含む環境では生育できない性質を持つアルコール発酵力の強い酵母で、清酒の醸造に利用されている。

S. cerevisiae の食塩を含まない培地では、菌数は1週目で 10^8 cell/mlまで増殖し、その後3週目まで大きな変化がなく、pHについても1週目でかなり低下し、グルコース残留量も3週目

に14%まで減少した。*S.cerevisiae*は1週目から激しく増殖し、栄養源としてのグルコースを消費していたと考えられる。食塩濃度10%の培地では、3週目では菌数は30に近い値を示し、グルコース残留量の減少も見られず、*S.cerevisiae*は食塩を含んだ培地では生育が困難であった。Fig. 4に示されたHEMF形成の変動から、食塩を含まない培地では2~3週目でピークを迎え、その後は次第に減少する傾向が見られたが、最大形成時でも*Z.rouxii*の食塩を含まない培地とほぼ同量であった。食塩濃度10%の培地ではきわめて少量のHEMFが形成されていたにすぎなかった。以上より、*S.cerevisiae*のHEMF形成も菌の増殖と関連はあるが、*S.cerevisiae*のHEMFを形成する能力は*Z.rouxii*とは異なると判断された。

3.3 *Candida versatilis*のHEMF形成量への培地中の食塩濃度の影響

*C.versatilis*は*Z.rouxii*と同じく、耐塩性であり、醤油の後熟酵母として用いられている。また、*C.versatilis*は本研究に用いた他の2つの酵母に比べて菌の細胞が小さく、その増殖は非常に遅いと報告されている。*C.versatilis*の生育状況についての結果をTable 6に示した。*C.versatilis*の菌数は食塩の有無に関わらず、1週目までは*Z.rouxii*や*S.cerevisiae*よりやや少なかったが2週目に同程度にまで増加し、3週目にはさらに増加し、その後一定となった。グルコース残留量も食塩の有無に関わらず、1週目ではほとんど減少が見られないが、2週目からは急激な減少がみられ、pHも2週目から低下しはじめた。*C.versatilis*は2週目頃から酵母が活発に増殖し、活動しはじめたと考えられる。pH、菌数、グルコース残留量の変動は食塩濃度10%の培地が食塩を含まない培地よりもやや緩やかであり、*C.versatilis*の生育は食塩を含まない培地でやや良いと判断された。しかし、*S.cerevisiae*とは明らかに異なり、食塩の影響をうけにくかった。

HEMFの形成量は*C.versatilis*においても培養期間が長くなるにつれて増加する傾向を示し、3週目までは食塩濃度の影響もほとんど受けなかった。その後、5weeksでは食塩濃度10%の培地では以前と増加傾向があったが、食塩を含まない培地では多少減少していた。従って、*C.versatilis*の生育は食塩の影響をうけにくい、HEMFを形成する条件としては食塩濃度10%の培地が適していると判断された。また、*C.versatilis*は増殖速度が遅いので、5週間以上の長期培養でもHEMFの形成量が多くなるが、最大でも約60ppmであり、*Z.rouxii*の形成量を上回る可能性は低いと考えられた。

4 今後の課題

本研究に用いた3種類の酵母の培養結果の中から、HEMF形成量の多い条件(食塩濃度10%培地での*Z.rouxii*、食塩を含まない培地での*S.cerevisiae*、食塩濃度10%培地での*C.versatilis*)を選び、Fig. 6にその比較を示した。3種類の酵母ともに、リポースとグリシンを加熱して得られるHEMFの前駆物質を含む培地中で培養すると一定量のHEMFを形成することが判明した。形成量は酵母の種類に依存し、味噌醤油の主発酵酵母である*Z.rouxii*がHEMF形成には適した性質を備えていると判断された。食塩は酵母の増殖速度をコント

ロールする環境因子となっており、*Z.rouxii*では食塩がHEMFを形成しやすい条件をととのえる役割をはたしていると考えられた。

味噌のHEMFは熟成中にアミノカルボニル反応によって生成される前駆物質に酵母が作用して形成される可能性が高いと考えられる。このとき、酵母はアセトアルデヒド様の化合物を提供する役割をはたしていると想定している。酵母は増殖しながらアルコール発酵を行っており、その過程でアセトアルデヒド様の化合物を生産していると考えられる。*Z.rouxii*ではその生産を食塩がコントロールしており、アミノカルボニル反応で形成される前駆物質と酵母が生産するアセトアルデヒド様の化合物のバランスが良好でHEMFが形成されやすい条件が整っていると考えられる。今後は、リボースとグリシンを加熱することで形成されるHEMFの前駆物質を抽出し、その化学構造を明らかにし、アセトアルデヒドとのモデル反応でHEMFが形成されるか確認を試みたい。また、酵母が提供するであろうアセトアルデヒド様化合物が生産されやすい培養条件についてさらに検討を加えていきたいと考えている。

本研究をすすめるあたりご援助いただいたソルトサイエンス研究助成財団に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) 菅原悦子,伊東哲雄,小田切敏,久保田紀久枝,小林彰夫:農化,64,171(1990).
- 2) 菅原悦子:日食工誌,38,491(1991).
- 3) 横塚保,佐々木正興,布村伸武,浅尾保夫:醸協,7,516,717(1980).
- 4) SUGAWARAE, SAIGAS, and KOBAYASHIJA.:Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi,41,844(1994).
- 5) 菅原悦子,米倉裕一:食科工誌,45,323(1998).
- 6) PREININGER, M.andGROSCH, W. :Levensm. Wiss Technol.,27,237(1994).
- 7) SAKUMAS,KOBAYASHI,K,TAYAMA,T. andYOKOYAMA,H.:J. Am. Soc Brew. Chem.,54,37(1996).
- 8) 海老根英雄:味噌の科学と技術,43,339(1995).
- 9) 菅原悦子:日食工誌,38,1093(1991).
- 10) SUGAWARA, E.and SAKURAI, Y. : Biosci. Biotech. Biochem.,58,1134(1994).
- 11) SASAKI,M. ,NUNOMURA,N. and MATSUDO,T.:J. Agric. Food Chem.,39,934(1991).
- 12) BLANK,I. and FAY,L.B.:J. Agric. Food Chem.,44,531(1996).
- 13) SUGAWARA, E. and SAKURAI, Y. : Biosci. Biotech. Biochem.,63,749(1999).
- 14) 賀来由夏,菅原悦子,高橋 清:食科工誌,47,919(2000).
- 15) 林田安生,西村賢了,J.コリン ロースター:醸協,93,730(1998).

- 16) 林田安生,西村賢了,J.コリンロースター:醸協,94,77(1999).
- 17) 林田安生,西村賢了,栗山博,J.コリンロースター:醤研,25,237(1999).
- 18) 高橋清:醸協,92,241(1997).

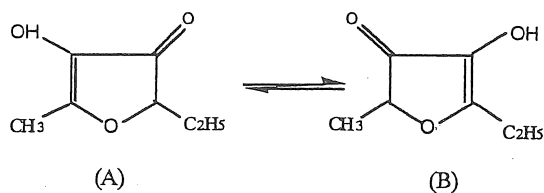


Fig. 1. HEMF [4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone]

Table 1. Composition of the Media Used for HEMF Production

Glucose		7.5g
Glycine		1.0g
Ribose		2.5g
NaCl	0 or 5.0 or 10.0 or 15.0g	
KH ₂ PO ₄		1.0g
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.5g
Yeast extract		0.5g
Water	Total	100ml

Table 2. Changes in the Media Components Containing 10% NaCl Stored or Fermented by *Z.rouxii*.

	pH	No. of Cells (x10 ⁸ /ml)	glucose (mg/ml)	NaCl (mg/ml)
M	4.78	-	-	-
SM-3W	4.25	-	80.2	109.4
SM-5W	3.98	-	78.4	112.5
1week	4.50	2.4	51.1	107.3
2weeks	4.32	2.3	17.7	107.5
3weeks	4.14	2.7	12.4	113.0
4weeks	4.13	2.6	9.1	113.2
5weeks	4.00	3.0	8.4	117.4

M:Medium before yeast cultivation

SM-3W:Medium stored for 3 weeks

SM-5W:Medium stored for 5 weeks

Table 3. The Aroma Components identified in the Media Stored or Fermented by *Z.rouxii*.

R.t	Compound	M	SM-3W	SM-5W	1week	2weeks	3weeks	4weeks	5weeks
4.3	ethyl acetate	0.21	0.38	0.10	0.26	0.34	0.43	0.15	0.09
5.0	ethanol	0.32	1.10	0.14	1.28	0.93	1.74	1.08	0.83
5.8	benzene	0.05	0.03	0.01	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01
7.6	1-propanol				0.07	0.06	0.08	0.08	0.05
9.4	2-methyl-1-propanol		0.11	0.08	6.05	2.60	2.43	2.29	1.04
11.6	1-butanol	0.01	0.01	0.02	0.07	0.07	0.95	0.12	0.09
14.7	3-methyl-1-butanol		0.28	0.35	26.04	20.33	13.63	7.30	2.86
16.5	3-methyl-3-buten-1-ol				0.02	0.03	0.03	0.03	0.02
17.1	methylpyrazine	0.04	0.03	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	
17.8		0.03	0.01		0.06	0.04	0.04	0.05	0.02
18.2	3-hydroxy-2-butanone	0.02	0.02	0.03	0.06	0.02	0.04	0.04	0.05
19.1	cyclopentanol				0.01	0.01	0.02	0.01	0.01
21.2					0.02	0.03	0.10	0.15	0.18
22.7	3-ethoxy-1-propanol				0.09	0.13	0.21	0.37	0.50
24.2	2-hydroxybutanoic acid,ethyl ester	0.01				0.01	0.01	0.01	0.02
26.5	acetic acid	0.09	0.22	0.03	0.09	0.17	0.24	0.12	0.13
27.1	2-furancarboxaldehyde	6.05	1.01	1.31	0.01	0.05	0.22	0.51	0.82
27.2		0.16	0.08	0.06					
28.9	1-(2-furanyl)-ethanone	0.11	0.09	0.08	0.09	0.05	0.06	0.06	0.06
29.4	3-hydroxybutanoic acid,ethyl ester	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03	0.03
30.3	1-(acetyloxy)-2-butanone		0.01	0.01		0.01	0.01	0.05	
30.5	propanoic acid	0.01	0.01	0.01	0.01	0.14	0.05	0.08	0.06
31.7	2-methylpropanoic acid	0.15	0.39	0.03	0.17	0.16	0.32	0.41	0.48
33.1		0.14			0.02	0.03	0.04	0.02	0.03
33.5		0.02	0.02	0.02	0.04	0.06	0.06	0.06	0.07
34.3	dihydro-2(3H)-furanone	0.19	0.49	0.03	0.22	0.21	0.41	0.37	0.40
34.7	butanoic acid	0.03	0.01		0.02	0.01	0.01	0.01	
35.9	2-furanmethanol	0.57	0.50	0.84	2.50	1.89	3.53	4.80	7.59
36.1	3-methylbutanoic acid	0.20	0.37	0.29	0.37	0.70	1.57	1.78	1.98
36.8			0.05	0.03					
38.3		0.08	0.03	0.05	0.08	0.06	0.04	0.04	0.05
38.5			0.10	0.10					
38.9			0.01	0.01	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03
39.8	n-decyl alcohol(internal standard)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
41.1	3,5-dimethylcyclopentane-1,2-dione	0.01	0.02	0.01	0.02	0.03	0.06	0.06	0.06
41.6			0.04	0.03	0.17	0.56	0.78	0.72	0.71
41.9	2-phenylethyl acetate		0.01	0.01	0.09	0.07	0.10	0.07	0.06
43.1	hexanoic acid		0.02	0.02	0.06	0.05	0.07	0.05	0.04
44.3	benzenemethanol		0.01	0.02	0.04	0.04	0.07	0.05	0.05
45.6	benzeneethanol	0.09	0.02	0.15	3.32	6.56	8.52	8.00	8.68
47.9	acetylpyrrole	0.56	0.59	0.52	0.66	0.58	0.67	0.60	0.65
48.9		0.02	0.03	0.01			0.03	0.03	0.02
50.1	HDMF	0.19	0.12	0.04	0.29	0.23	0.40	0.31	0.27
52.3	HEMF			0.15	15.44	19.68	27.58	20.33	19.68
53.1	HMF	4.12	1.42	0.06	3.71	1.32	2.35	1.15	0.61
55.5			0.01	0.01	0.02	0.03	0.12	0.13	0.15
58.1		0.38	0.19	0.03	0.32	0.14	0.33	0.28	0.25
58.8	DMP	0.02	0.05	0.03	0.16	0.12	0.21	0.35	0.38
59.3		0.06	0.03	0.02		0.03	0.10		0.06
60.0			0.06	0.01	0.05	0.31	0.26	0.12	0.32
60.4			0.17	0.08	0.04	0.49	0.43	0.36	0.49
61.6			0.07	0.01	0.02	0.03	0.06	0.04	0.07
62.0			0.02			0.04	0.17	0.18	0.26
62.8						0.09	0.28	0.03	0.04
63.9		0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.13	0.05	0.05
64.4		0.03	0.04	0.02	0.04	0.03	0.09	0.05	0.49
64.9		0.01	0.02	0.01	0.03	0.06	0.07	0.03	0.03
65.9		0.01	0.01		0.05	0.02	0.83	0.01	0.03
66.2					0.12	0.03	0.05		0.02
68.2			0.04	0.01	0.01	0.02	0.05	0.03	0.07
68.9				0.01			0.04	0.01	0.03
70.1	benzoic acid		0.08	0.05	0.19	0.92	1.55	1.34	1.42
71.6			0.01	0.02	0.06	0.06	0.06	0.06	0.11

M, SM-3W, SM-5W: See Table 2

Table 4. Changes in the Media Components Fermented by *Z.rouxii*

NaCl %	15			5			0		
	pH	cells	glucose	pH	cells	glucose	pH	cells	glucose
1week	4.80	1.8	66.7	4.19	1.4	38.2	4.34	1.7	38.3
2weeks	4.57	2.2	30.8	3.87	1.6	18.7	4.06	2.0	20.2
3weeks	4.42	2.2	16.9	4.01	1.8	14.4	4.13	2.0	18.8
4weeks	4.37	2.2	24.3	4.13	2.0	17.3	4.18	1.9	16.4
5weeks	4.31	2.2	17.8	3.65	2.2	17.2	-	-	-

cells:No. of cells $\times 10^8$ /ml, glucose:mg/ml, -:not analyzed.

Table 5. Changes in the Media Components Fermented by *S.serevisiae*

NaCl %	10			0		
	pH	cells	glucose	pH	cells	glucose
2days	-	-	-	4.39	1.4	39.6
1week	4.76	0.07	67.6	4.30	1.8	18.4
2weeks	4.71	0.07	67.1	4.20	2.0	17.8
3weeks	4.25	+	72.5	4.15	2.2	13.8
4weeks	-	-	-	4.22	1.9	20.5
5weeks	-	-	-	4.21	2.2	19.9

cells:No. of cells $\times 10^8$ /ml, glucose:mg/ml,

- : not analyzed, +:trace.

Table 6. Changes in the Media Components Fermented by *C.versatilis*

NaCl %	10			0		
	pH	cells	glucose	pH	cells	glucose
1week	4.54	2.2	77.6	4.44	1.0	76.9
2weeks	4.51	5.7	23.3	4.18	1.2	7.3
3weeks	4.29	51.2	17.0	4.12	23.2	5.6
5weeks	4.14	52.0	15.8	4.07	21.2	3.9

cells:No. of cells $\times 10^8$ /ml, glucose:mg/ml.

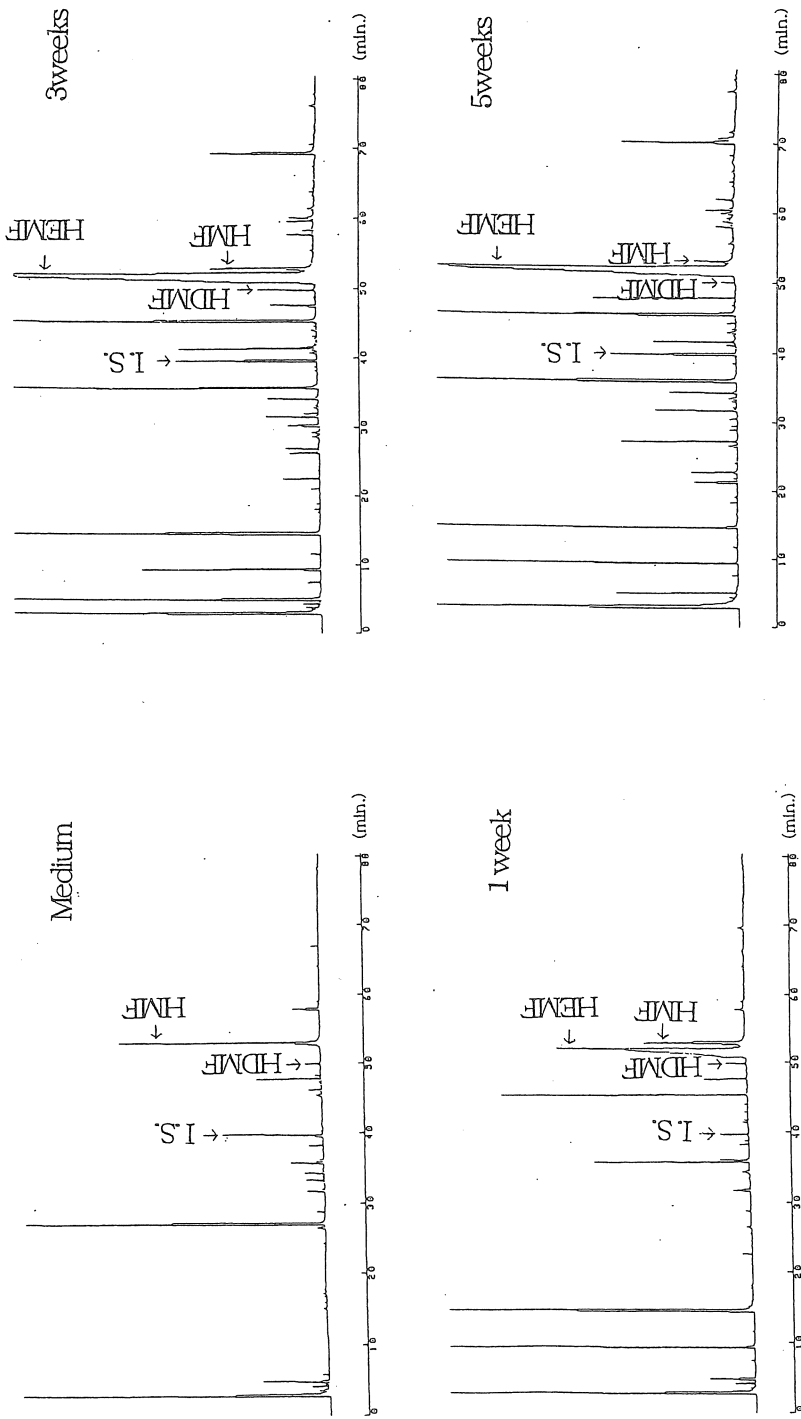


Fig. 2. Gas Chromatograms of Aroma Concentrations obtained from the Media Fermented by *Z. rouxii*.

I.S.: Internal Standard, HDMF: 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3 (2*H*)-furanone (HDMF)
HEMF: 4-Hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2*H*)-furanone,
HMF: 4-Hydroxy-2-methyl-3 (2*H*)-furanone.

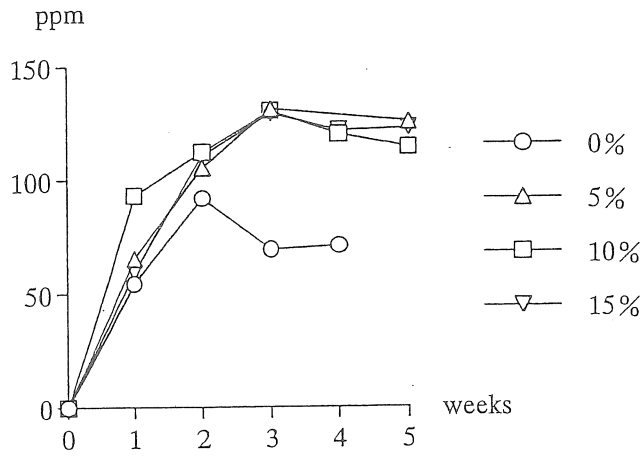


Fig.3. Effect of NaCl Concentration in the Media on the Formation of HEMF by *Z.rouxii*.

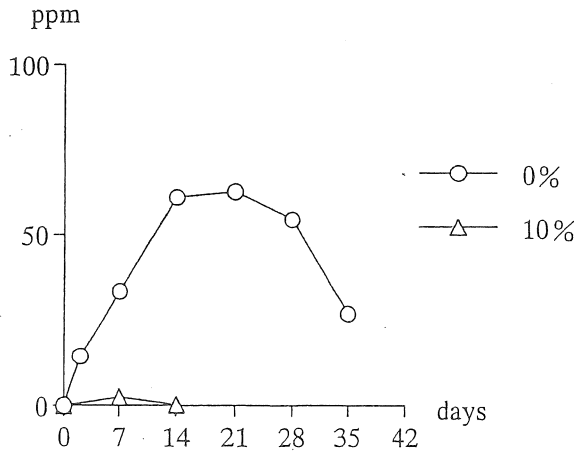


Fig.4. Effect of NaCl Concentration in the Media on the Formation of HEMF by *S.cerevisiae*.

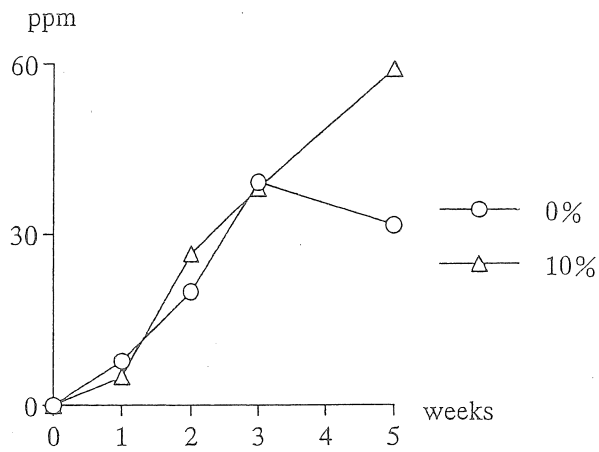


Fig.5. Effect of NaCl Concentration in the Media on the Formation of HEMF by *C.versatilis*.

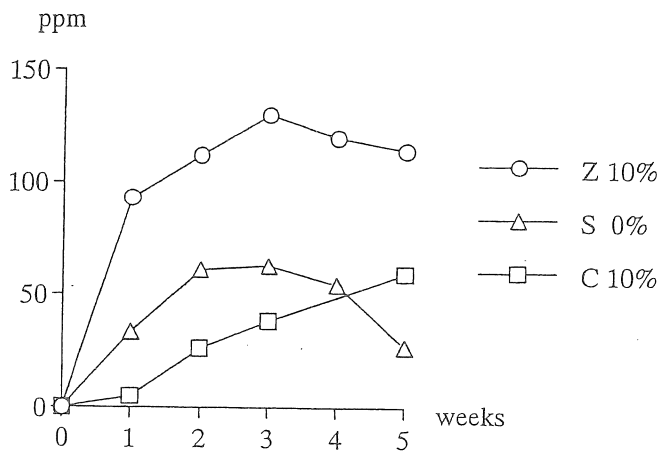


Fig.6. Comparison of the Formation of HEMF by Three Kinds of Yeast.

Z: *Z. rouxii*, S: *S. cerevisiae*, C: *C. versatilis*

Formation by Halophilic Yeast of the Aroma Component, HEMF [2 (or 5)-ethyl-5
(or 2)-methyl-4-hydroxy-3 (2H)-furanone] Specific to Miso

Etsuko SUGAWARA* , Yonekichi SAKURAI**

*Faculty of Education, Iwate University

**Faculty of Agriculture, Iwate University

Summary

4-Hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone(HEMF) which was first identified by the author as an aroma component of red salty rice miso (fermented soybean paste), has a strong, sweet cake-like aroma with a threshold value of less than 0.04ppb. It is a unique compound and is abundant in red salty rice miso and shoyu (soysauce). The authors have also found that HEMF was the most effective component in enhancing the aroma of red salty rice miso. On the other hand, HEMF is a strong antioxidant and exerted an anti-carcinogenic effect on benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia. HEMF was also found effective in preventing radiation hazard and has an important physiological function as well as being an aroma component.

The formation of HEMF by yeast was examined in an attempt to investigate its mechanism and involved factors. HEMF formation was promoted by yeast cultivation in a heat-sterilized medium which included glucose, ribose, and a nitrogenous compound such as an extract of shoyu koji, poly-peptone, casamino acid, or an amino acid (glutamic acid, threonine, serine, or alanine). It is suggested that HEMF was formed during the cultivation of yeast by using a precursor of HEMF which may have been produced by the amino-carbonyl reaction of pentose with amino acids during heating.

Halophilic yeast *Z.rouxii*, grown in a heat sterilized medium containing glucose, ribose and glycine with some nutritious inorganic salts bringing to amino-carbonyl compounds, forms appreciable amount of aroma compound HEMF in the medium. Yeast *S.cerevisiae* and halophilic yeast *C.versatilis*, grown in the same medium respectively, form smaller amount of aroma compound HEMF in the medium than *Z.rouxii* forms. The NaCl concentration in a medium had no effect on the amount of HEMF formed by *Z.rouxii*, but had effect on the rate of HEMF formation. These results were indicated probably that HEMF was formed from amino-carbonyl reaction product, and acetaldehyde or similar reactive substance to acetaldehyde formed by yeast.