

醤油酵母による香味成分 (HEMF) の生成とその環境因子

わが国の醤油の最も特徴的なことは香りの豊富さにあると言っても過言でないであろう。中でも酵母が造る香味成分 (HEMF) は日本の醸造醤油の特徴を示すものである。

筆者らは一連の研究の中で、諸味の発酵工程で様々な環境因子が耐塩性酵母と HEMF 生成にどのような影響を与えているのか明らかにしている。醸造に携わる技術者の参考になるであろう。

柳沼 淳夫, 布村 伸武

1. 醤油の香味成分

醤油中の香味成分の分析は 100 年以上前から始まっている。今では、日本の醸造醤油の香味成分として約 300 種類の化合物が知られている。

醤油の香味成分の生成は、次のように説明できる。まず製麹工程で、原料に由来する成分と麹菌の代謝生産物により、醤油の香味成分の骨格的な成分が形成される。つまり、製麹の良否や麹菌種の違いなどにより最終的に出来上がる香りがこの段階で、すでに異なってくる。

次は、麹と食塩水を混合した諸味の工程である。成分溶出期、乳酸発酵期、酵母発酵期、熟成期と段階を経る最も期間の長い工程である。耐塩性乳酸菌、耐塩性酵母の代謝により多くの香味成分が生成する。特に酵母発酵が醤油の香りに及ぼす影響は大きい。酵母発酵することにより諸味が醤油の香りになる。醤油らしい華やかな香りの量やバランスは、酵母発酵によるところが大きい。諸味の熟成期は、化学反応により香味成分が生成する段階である。

最後に火入れ工程である。醤油が高温で維持されることにより、急速に醤油中の成分の化学反応が進み、火香と呼ばれる複数の香味が大量に生成する。

醤油製造において、最も重要な点は昔から「一麹、二摺、三火入れ」と言われているが、醤油の香りだけ

に着目しても、まったく同様のことが当てはまることがわかる。すなわち、醤油らしい香りが豊富な醤油をつくるのが、本来の醤油製造において、最も重要視されていたと言っても過言ではないのではないだろうか。熟練者が、醤油製造工程ごとの香りで、微生物や製造管理の状態を判断できるのは、各段階での香りの違いを認識しているためである。

これら香味成分の含有量や成分バランスは、おいしさに大きく影響し、品質の良否に関わる重要な要素のひとつである。また、香りによって味の感じ方も異なると言われている。

2. HEMF

酵母発酵により華やかな醤油らしい香りが付加される。それらの成分中に 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (以下 HEMF) が含まれている¹⁾。

HEMF は、甘いケーキ様の強烈な香りである。醤油や諸味が皮膚につくと水洗いしても香りが取れにくい、その皮膚に残存した甘い香りが HEMF の香りである。

酵母が大量に生成するエタノールと混合することで醤油様の香りと認識される。つまり、HEMF は醤油の特徴香味成分である。日本の醸造醤油に多量に含まれている。多くのカラメル様の甘い香りは、メイラー

ド反応によって生成されるが、HEMF は酵母によって生成されることも特徴的である²⁾。

また官能検査の結果では、醤油中に HEMF が多く含まれるほど好まれる傾向にあることがわかっている³⁾。

さらに HEMF の機能性として、香りのマスキング効果や塩味緩和効果が確認されている⁴⁾。また、本誌でも数回取り上げられているように抗酸化作用、抗腫瘍作用の効果についても最近注目されている^{5,6)}。

醤油における HEMF の生成に関する研究は、香味成分の分析や比較⁷⁾、HEMF の生成メカニズムの解明²⁾、酵母による生成量の違い⁸⁾ などについての報告がある。

ここでは、実際の諸味中で様々な環境因子が醤油酵母と HEMF 生成にどのような影響を与えているかを紹介する⁹⁾。

3. HEMF の生成とその前駆体物質

HEMF の前駆体は D-xylulose 5-phosphate と言われており、麹菌によって製麹時に生成されることが報告されている¹⁰⁾。

主成分が異なる培地を準備し、HEMF の生成の違いを次のような方法で確認した。

酵母によって生成される香味成分を確認するため、滅菌、除菌した液体培地を用いた。使用培地はポリペプトンを主原料とした YPD 培地 (酵母エキス 1.0 %、ポリペプトン 2.0 %、グルコース 1.0 %、食塩 10.0 %)、大豆由来のソイトンを主原料とした YSD 培地 (酵母エキス 1.0 %、ソイトン 2.0 %、グルコース

1.0 %、食塩 10.0 %)、および麹消化液を用いた。麹消化液とは、脱脂加工大豆と小麦を等量用いて製麹した麹に食塩水を混合し、食塩濃度を 8 % に調整した後、42°C で 2 日間分解、その後、食塩濃度を調整しフィルター除菌を行った液体培地である。

酵母は諸味中から分離された *Zygosaccharomyces rouxii* NY-1 を用いた。まず YPD 培地で培養した酵母を遠心分離 (3000 rpm, 5 分) で集菌し、培養液中に $10^7 \sim 8 \times 10^7$ c.f.u./ml になるよう懸濁した。培養温度 30°C、培養時間 3 日間、嫌気条件下で酵母が沈まないように緩やかに攪拌しながら培養を行った。香味成分分析は、酢酸メチル抽出法により香味成分を抽出し、内部標準物質に 1-Pentanol を用いて、ガスクロマトグラフィーで定量分析を行った⁷⁾。

組成の異なる培地によって香味生成にどのような違いが生じたかを第 1 表に示す。

表に示したすべての成分で、麹消化液を用いたものが最も多く生成し、他の 2 つは類似した結果となった。ここでは、生成量ではなく、成分生成の有無に注目していただきたい。HDMF はソイトン培地でも生成したが、HEMF、HMMF は麹消化液でしか生成しなかった。この結果からも HEMF の前駆体は、麹菌によってつくられていることがわかる。

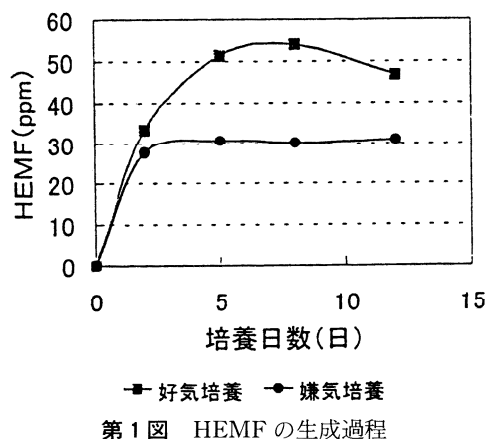
一方、糖とアミノ酸のメイラード反応により、HEMF の前駆耐物質ができるという知見も最近報告されており、興味深い。

いずれにしても HEMF の生成に酵母の関与が不可欠なのは確かである。

第 1 表 生成香味成分量の培地による違い

培地	麹消化液	Polypeptone	Soytone
Isobutyl alcohol	49.1	17.4	17.8
n-Butyl alcohol	8.5	5.2	1.4
Isoamyl alcohol	90.6	33.5	38.4
meso-2,3-Butanediol	101.5	29.2	28.8
threo-2,3-butanediol	155.2	32.1	30.9
Methionol	42.3	8.5	4.4
2-Phenylethanol	60.8	32.8	40.1
HDMF	18.9	0.0	15.2
HEMF	36.7	0.0	0.0
HMMF	69.7	0.0	0.0

単位: ppm



第1図 HEMFの生成過程

4. 酵母による香味成分の生成と酸素の影響

醤油諸味中の溶存酸素は、諸味表面を除くと極めて低く、空気を送り込まなければ嫌気的な状態である。諸味中で酵母が香味成分を生成するとき、酸素の有無がどのように影響するかを確認した。その際、HEMFの生成についても確認できるように培地は、麴消化液を用いて行った。事前に培養した酵母を 10^{7-8} c.f.u./ml添加になるように培地に添加し、30°Cで好気培養と嫌気培養を行った。そのときに生成したそれぞれの香味成分を測定した。

HEMFの生成経過を第1図に示す。嫌気培養では、酵母がエタノール発酵によりエネルギーを獲得するため、エタノールを多く生成する。そのため、好気培養より早く酵母が死滅したと考えられる。従って、このような実験系で嫌気的な培養を行うと3日目以降では、

第2表 主な環境因子と試験条件

主な環境因子	試験項目	試験範囲
食塩濃度	食塩 (NaCl)	11～20 %
炭素源	グルコース	3.4～16 %
pH	pH (初発)	3～7
窒素源	ソイトン添加量	0～10 %

基準培地：NaCl 11 %, Glu 3.4 %, pH 5.5

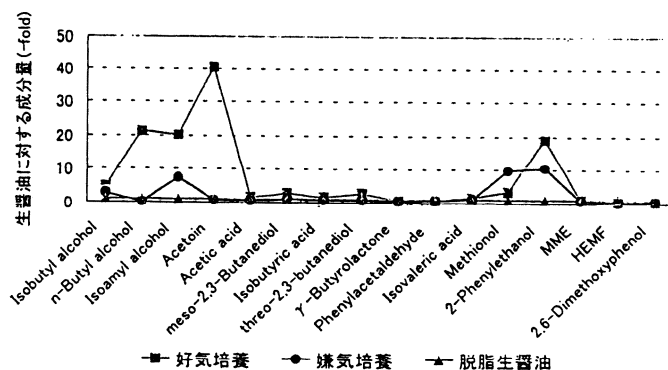
酵母代謝による香味成分の生成はほとんどないであろうと考えられる。

培養3日目の培養液を、脱脂加工大豆を用いた濃口生醤油の香りを1として成分量を比較したものを第2図に示す。より1に近いバランスを示したほうが、醤油香味生成のための実験系として適している。香氣のバランスを生醤油と比較すると嫌気培養のほうがより醤油に近いバランスになる。極小規模で行う実験系は、嫌気条件下で行うことがより実際の醤油醸造に即した条件になるといえる。

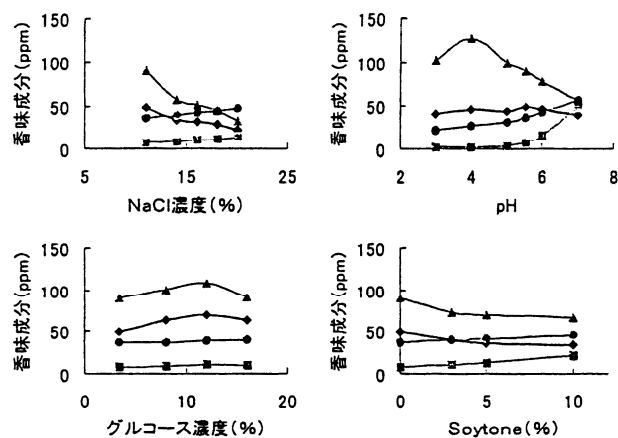
以上のことから以降、培地は麴消化液を用い、嫌気的に実施した試験結果を紹介する。

5. 諸味レシピの違いによる影響

醤油を製造する上でレシピは容易に変更できる。原料配合比、汲水、食塩濃度、諸味の温度管理等に伴うpH変化などが挙げられる。すなわち諸味レシピ上で変更できる因子には、食塩濃度、窒素濃度、炭素濃度、pHがある。これらの違いが醤油酵母の香味成分生成にどのような影響があるかを調べた。検討因子とその条件を第2表に示す。

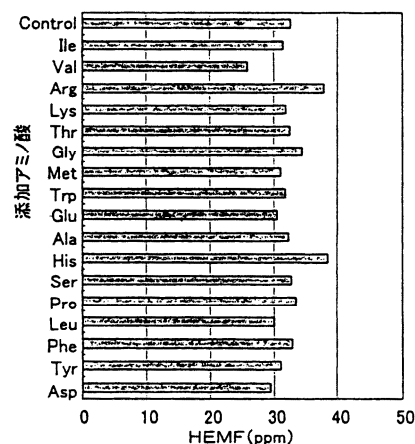


第2図 好気培養と嫌気培養における生成香味成分量の比較



◆ Isobutyl alcohol ■ Butyl alcohol ▲ Isoamyl alcohol ● HEMF

第3図 各因子の香味成分への影響



第4図 HEMF成分へのアミノ酸の影響

各条件で酵母を培養し、生成した香味成分を分析した。そのうち、特に重要と考えられる4成分の生成量を第3図に示す。各因子のHEMF生成量に注目すると、食塩濃度、窒素濃度、pHが高くなるほど生成量は増加した。食塩濃度が高くなるほどHEMFの生成量が増加することについては、すでに報告¹¹⁾されており、結果が一致している。

ここではpHを変化させたグラフに注目すると、HEMF生成量の変化が他の因子と比較し、大きいことがわかる。酸性ではHEMF生成量が少なく、中性に近づくとその生成量は急激に増加し、pH7ではpH5の生成量の1.8倍にもなる。図には示していないが、その他の香味成分についてもpHの影響が大きい傾向にあった。HEMFだけに着目すればpHは中性に近いほうが、より多く生成されるということになる。

また、n-Butyl alcoholの生成量は、全ての因子においてHEMFと同様の傾向を示したことも興味深い。

一方Isobutyl alcoholとIsoamyl alcoholはHEMFとは逆の傾向を示した。培地中のグルコース量については、HEMF生成量への影響は少ないと考えられる。

これらの結果のように、HEMF生成量が増加したのは、酵母にとって容易に増殖しにくい環境であり、興味深い結果となった。

6. アミノ酸・有機酸の影響

醤油中には、多くの香味成分が含まれているが、成分によって官能に及ぼす閾値が大きく異なる。従って、微量であっても香味成分としての影響が大きいものが多い。HEMFは、通常の本醸造醤油に100 ppm程度の濃度で含まれているが、その閾値は0.04 ppb以下である。

香味成分と呼ばれる多くの物質は、微生物の二次代謝産物であり、培地中のアミノ酸や有機酸の量を変化させることで、香味成分の生成量が変化する可能性があると考えられる。

そこで、麹消化液に各種アミノ酸、有機酸を終濃度5 mg/mlになるように添加して、酵母培養したときの香味成分生成量を調べた。

添加したアミノ酸ごとのHEMF生成量を第4図に示す。ArgとHisを添加した培地では、HEMF生成量が他のアミノ酸添加区より多かった。HEMFの生成は、前述のようにpHの影響を大きく受ける。これらは、塩基性アミノ酸であり添加によってpHが上昇し、HEMF生成量が増加したものと考えられる。

Pheを添加したものは2-Phenylethanolの生成量が他より多く生成した。これは*Z. rouxii*がPheを代謝し2-Phenylethanolを生成したのと考えられた¹²⁾。

有機酸についても、乳酸、コハク酸、酢酸、リンゴ酸、クエン酸、ピルビン酸を終濃度5 mg/mlになる

ように添加して同様の試験を行ったが、注目される結果は得られなかった。

7. 窒素ガス・炭酸ガスの影響

極小規模の実験では、一般に好気的な条件になる。しかし実際の大型タンク中の諸味は、溶存酸素が極めて少なく嫌気的な状態である。また、発酵が開始すると微生物が生成する炭酸ガスが諸味中に飽和する。

そこで窒素ガスと炭酸ガスを用い、単なる嫌気状態と発酵中発生する炭酸ガスで満たされた状態をつくり、それぞれでの HEMF 生成への影響を調べた。

ガス通気量は 1/5 vvm で行った。その結果を第 5 図に示す。両試験区とも嫌気条件であるため、速やかにエタノールを生成した。培養開始時点から、実際の酵母発酵期の最大酵母数を添加しているため、培養 2 日目でエタノール濃度は約 4 % に達した。その後、生成したエタノールにより酵母が死滅していった。

エタノール生成及び酵母数の変化において、ガスの違いによる顕著な差はなかった。しかし、HEMF の生成には若干の違いが見られた。HEMF の生成曲線は類似していたが、炭酸ガスで置換したものは、窒素ガスで置換したものに比べ、HEMF の生成がやや遅れた。これは炭酸ガスが培地に溶け込んで pH を下げたことによると考えられ、嫌気条件下であれば、HEMF の生成に炭酸ガスの影響はないと考えられる。

8. 乳酸発酵の影響

諸味中では、まず乳酸発酵が行われ、その後、酵母発酵となる。従って乳酸発酵の良否がその後の酵母発酵や酵母による香味生成に何らかの影響を与える可能性がある。

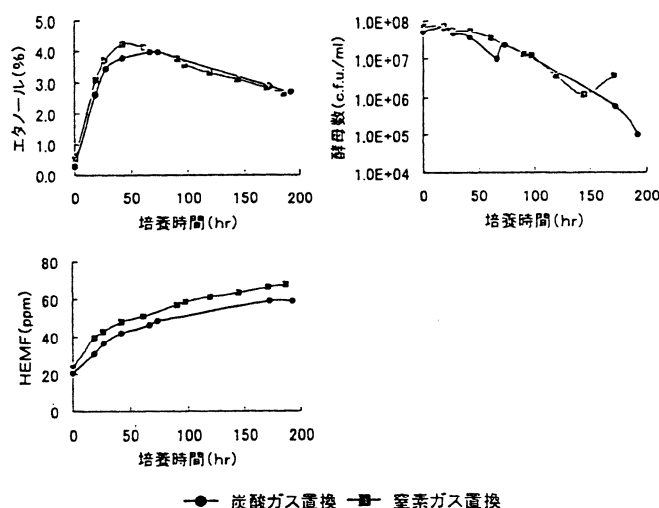
また乳酸発酵が微弱であった諸味は、HEMF が多く含まれていることが知られている。

そこで乳酸発酵と酵母による HEMF の生成の関係を明らかにすることを試みた。

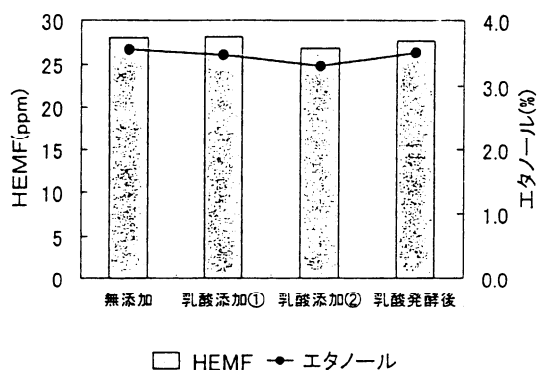
培地は、食塩濃度 10 % の麴消化液を用いた。試験区として、麴消化液とそれに乳酸を適量と過剰量添加したもの、麴消化液に乳酸菌を添加し乳酸発酵させ、その後乳酸菌をフィルターで除去したものを用いた。培地の pH の影響が大きいため、酵母培養を開始する前に、それぞれの試験区を NaOH 水溶液で、pH 5.5 に調整した。試験区とその培地中の乳酸量を第 3 表に示す。表に示した乳酸量は、培養開始前に酵素膜を用いて測定した値である。

第 3 表 乳酸発酵の影響
を検討するための
試験区

試験区	乳酸量
無添加	0 %
乳酸添加①	0.85 %
乳酸添加②	1.89 %
乳酸発酵後	0.85 %



第 5 図 嫌気・炭酸ガスの影響



第 6 図 乳酸酸酵と HEMF 生成量

3 日間の嫌気培養後のエタノールと HEMF の生成量を第 6 図に示す。当然、Ethyl lactate のような成分は、乳酸量に応じて変化するが、HEMF の生成量においては、培地中の乳酸量や乳酸発酵そのものが影響を与えることはなかった。つまり、乳酸発酵そのものの影響はなく、乳酸発酵による pH 低下が生成量に影響しているといえる。

9. 酵母増殖時期の違い

醤油醸造において醤油香味の付加，すなわち HEMF の生成ということに関し，醤油酵母の働きは不可欠である。では，酵母増殖時期，すなわちフェーズの違いにより，HEMF の生成になにか違いが生じるのだろうか。酵母の生育段階の違いと HEMF の生成経過を調べたものを第 7 図に示す。酵母を麹消化液

培地に 1×10^6 c.f.u./ml 添加し，培養中の酵母が沈まないように 60 rpm で攪拌しながら嫌氣的に培養を行った。その時の酵母数，エタノール，HEMF を経時的に測定した。

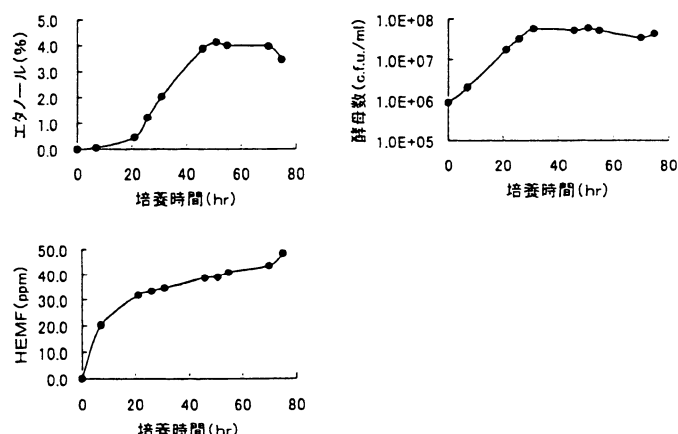
図からわかるように，酵母数が対数増殖期で 10^7 c.f.u./ml になるとエタノールを生成し始める。これは，諸味中での酵母発酵の状況と非常に類似している。その後，生成したエタノールにより酵母が緩やかに死滅した。

HEMF の生成量は，定常期に比べ，酵母数が少ない対数増殖期に急激に生成し，酵母数が最も多い定常期では緩やかに生成した。これは，諸味中で HEMF は酵母発酵と共に増加するという知見¹³⁾とも一致する結果となった。これまでに，HEMF の生成とペントースリン酸経路の関連性が報告²⁾されており，今回の結果からも HEMF 生成において酵母増殖時の代謝の関わりが強く示唆された。

10. おわりに

ここでは，実際に醤油を製造しているレベルで物を考え，醤油酵母と HEMF の生成に着目した試験結果をもとに説明した。

酵母の生成する香味成分に関与する環境因子を検討した結果，pH，食塩濃度が高いほど HEMF 生成量が多かった。これらは濃度によっては，酵母の生育を抑制する因子である。さらに，酵母の対数増殖期に菌体当りの HEMF 生成量が多いことが明らかになった。



第 7 図 酵母増殖時期と HEMF 生成

これらのことから、酵母の増殖期に生育を抑制するようなストレスを若干与え、急速に酵母を増殖させず、緩やかに増殖させることにより、HEMF等の香味成分の付加を促進できるのではないかと考えられる。またこれは醤油が醤油らしくなる大きな要素と考える。

先に述べたように、醤油香味の骨格を位置付けるのは、麹菌種によるところが大きい。しかし、同じ麹、同じ酵母を用いても、醤油醸造上のレシピを変えるだけで、香味成分の量やバランスが変化することが明らかになった。

食品は一般に味の良し悪しが問われるが、無意識に香りで判断している場合または香りが大きく影響している場合が多い。食品の香りを消費者の嗜好にあわせることは食品製造業者にとって大切なポイントである。とりわけ醸造食品の技術者が製品の色や味だけでなく、香りを重視していることは、品質を判断するのに最も有効でかつ瞬時に判断できる対象であるためと考えられる。

醸造物の香りを制御できる技術こそ、究極の醸造技術といえるのではないだろうか。

〈キッコーマン（株）〉

文 献

- 1) N. Nunomura, M. Sasaki, Y. Asao, T. Yokot-

suka : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 491 (1976)

- 2) M. Sasaki, N. Nunomura, T. Matsudo : *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 934 (1991)
3) 佐々木正興, 森修三 : 醸協, **86**, 913 (1991)
4) 横塚保, 布村伸武, 佐々木正興, 浅尾保夫 : 特開, 昭 51-148072 (1976)
5) 長原歩 : 醸協, **88**, 859 (1993)
6) 片岡茂博, 長原歩 : 醸協, **95**, 336 (2000)
7) 布村伸武, 佐々木正興 : 日本醤油研究所雑誌, **24**, 209 (1998)
8) 尾張かおる, 高橋光一, 渡辺隆幸 : 日本醤油研究所雑誌, **26**, 191 (2000)
9) 柳沼淳夫, 渡辺真知子, 布村伸武, 藤井三治 : 日本醤油研究所雑誌, **27**, 233 (2001)
10) M. Sasaki : *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 230 (1996)
11) M. Sasaki : *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3273 (1996)
12) T. Aoki, K. Uchida : *J. Agric. Food Chem.*, **55**(11), 2893 (1991)
13) N. Nunomura, M. Sasaki : Off-Flavors in Foods and Beverages, 287, Elsevier Science Publishers B. V. (1992)