

醤油の香味成分 HEMF

日本の醸造醤油の最も特徴づける香味成分は、このフラノン類の一種 HEMF である。この香味成分は最近、発がん抑制効果があることが認められた。香味成分「HEMF」研究の第一人者の筆者に詳しく解説いただいた。

布村 伸 武

1. はじめに

醤油の香りは日本人にとって非常に食欲をそそるにおいである。その香りの正体を探る試みは古くから多くの研究者によってなされ、現在まで約 300 種の香味成分が知られている¹⁾。それらの成分のほとんどは多くの食品に共通に存在するものであるが、醤油独特の成分として HEMF と呼ばれる成分が見出された。醤油は塩辛いというイメージがあるが、醤油のにおいをよく嗅いでみると、鼻の奥に感じられるどこか甘い香りがあることがわかる。HEMF 単品のにおいを嗅いでみると、醤油の甘い香りは HEMF に起因していると思われる。実際に HEMF をエタノールに溶解してそれを噴霧すると醤油様の甘い香りがする。また、HEMF は醤油中に 50~250 ppm と多量に存在し、香味成分としては特異な存在である。さらに、その後の研究で HEMF には発がん抑制効果などのいくつかの機能性があることがわかってきた。醤油の香りに大きく寄与する成分が機能性をも有していた。以下に、HEMF を中心に醤油の代表的な香味成分についての知見を述べ、HEMF の機能性についても紹介する。

2. 香味成分の生成

日本では、醤油は日本農林規格 (JAS) によって、こいくち、うすくち、たまり、さいしこみ、しろの 5 つに分類されている。その中で最も普及しているのはこいくち醤油で 8 割以上を占める。また、その製造方式により「本醸造方式」、「混合醸造方式」、「混合方式」の 3 種類に分けられる。8 割以上の醤油は伝統的

な製法である「本醸造方式」でつくられている。その「本醸造方式」のこいくち醤油 (以下、醸造醤油と略) は次のようにしてつくられる。まず原料である大豆と小麦を別々に熱処理した後、種麹と混ぜ培養して麹 (こうじ) をつくる。次に麹に食塩水を混ぜ諸味 (もろみ) にして発酵、熟成させ、その諸味を压榨して生醤油を取り出す。最後に火入れ (加熱) をして製品ができ上がる。醤油づくりで働く微生物は 3 種類で、第一の微生物は麹菌である。麹菌は麹をつくる際に多くの酵素を生産する。その酵素により、原料の蛋白質はペプチドやアミノ酸に、でんぷんはブドウ糖などの糖分に分解される。次に働く微生物は諸味中の乳酸菌で、麹菌酵素により分解された成分を乳酸などの別の成分に変換し、醤油の味に深みを与える。そして第三の微生物である酵母は諸味中で、糖分やアミノ酸からアルコールやいろいろな香味成分をつくり出す。このように醤油の味や香りは主に微生物によりつくられる。

前述のように醸造醤油の香味成分として現在まで約 300 種の成分が知られており¹⁾、その多くは醸造過程でつくられる。醤油の香りの形成という面から見ると、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部分がつくられる。つまり、製麹の良否や麹菌種の違いなどにより最終的にでき上がる香りがこの段階ですでに異なってくる。次に、諸味工程、すなわち成分溶出期、乳酸発酵期、酵母発酵期、熟成期を経る最も期間の長い工程であるが、その諸味中で耐塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* や耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* の代謝により多くの香味成分が生成する。特に酵母発酵

Flavor Components of Soy Sauce, HEMF

Nobutake NUNOMURA (Quality Control Department, Kikkoman Corporation.)

が醤油の香りに及ぼす影響は大きく、醤油らしい華やかな香りやバランスは酵母発酵によるところが大きい。諸味で最も重要な過程であるこの酵母発酵は、アルコール発酵と呼ばれるくらい旺盛にエタノールを生成する。また同時にエステル、有機酸、アルコール化合物、アルデヒド、フラノン類など、香りや味に大きく影響を与える香味成分を生成する。醸造醤油の特徴的な香りを呈する香味成分 4-Hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2 H)-furanone^{2,3)} (以下、HEMF と略) はこの酵母発酵で生成する代表的な成分である⁴⁾。諸味の熟成期では、主に化学反応により香味成分が生成する。最後の火入れ工程では、醤油が高温で保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 (ひが) と呼ばれる香りが大量に生成する。次に製造工程で生成する代表的な香味成分についてその知見を紹介する。

3. 麴の香味成分

Aspergillus oryzae または *A. sojae* でつくられた醤油麴から、66 種の香味成分が見出されている⁵⁾。その中で、1-オクテン-3-オール、フェニルアセトアルデヒド、2-メチル-5-ビニルフェノール、フェニル酢酸の 4 成分が麴の香りの特徴づけていると考えられるが、特に 1-オクテン-3-オールとフェニルアセトアルデヒドは、それぞれ水中の閾値が 1 ppb⁶⁾、4 ppb⁶⁾ と活性が高く、存在量も大きいので、麴の香りへの貢献度は大きいものと考えられる。1-オクテン-3-オールは「まつたけ」(*Armillaria Matsutake*) を連想させるきのこ臭がする化合物である。フェニルアセトアルデヒドはヒヤシンスやライラックの香りをもつ。フェニル酢酸ははちみつ様の香りを呈する。

フェノール化合物の生成においても製麴は重要な工程である。小麦のグリコシドやリグニンから、焙炒によりバニリンやフェルラ酸、バニリン酸が生成し、製麴中に麴菌により、フェルラ酸の一部はバニリンとバニリン酸に、*p*-クマル酸は 4-ヒドロキシ安息香酸にそれぞれ代謝される。このフェノール区分の主成分はフェルラ酸である^{7,8)}。そして諸味中で、フェルラ酸と *p*-クマル酸は、*Candida* 属酵母により 4-エチルグアヤコール (4-Ethylguaiaicol, 以下 4 EG と略) と 4-エチルフェノールにそれぞれ変換される。これらの化合物は醤油の香りに大きな影響を与える成分として

知られており、香味成分の正確な定量分析と官能検査に基づいた統計解析により、4 EG の含量には最適濃度が存在することが知られている^{9,10)}。

また、3-Methoxy-2-methyl-4 H-pyran-4-one (Maltol methyl ether, MME と略) という成分が醤油中から見出されている³⁾ が、この MME は *A. sojae* の醤油に多く *A. oryzae* の醤油には検出されないかあるいは少ない成分である¹¹⁾。この MME は製麴中に生成する。したがって、醤油中の MME を測定することにより、使用した麴菌が *A. oryzae* か *A. sojae* かをある程度知ることが可能である。しかし、精製した合成品の MME は無臭であるので麴あるいは醤油全体の香気への寄与はないものと考えられる。また筆者らの知見によると、*A. oryzae* と *A. sojae* の差という観点からみれば、前述の麴中の 1-オクテン-3-オールも *A. sojae* に多く *A. oryzae* には少ない。*A. sojae* の麴は *A. oryzae* にはないきのこ臭が感じられることから、1-オクテン-3-オールは、*A. oryzae* 麴と *A. sojae* 麴の香りの差を表す主な要因の一つと考えられる。

ところで、製麴中に *Bacillus* のようなバクテリアが多く増殖すると、バクテリアは、アンモニアやイソ吉草酸 (Isovaleric acid) などの醤油にとって好ましくない香味成分を多量に生産し、最終製品の醤油にまでも影響を与えることになる。したがって、香りの面からみても製麴中のバクテリア増殖は極力低く抑える必要がある。

4. 諸味の香味成分

麴は食塩水と混合され、仕込みタンクと呼ばれる容器に移される。この麴と食塩水の混合されたものを「諸味」(もろみ) という。諸味中の食塩濃度はおよそ 16~19% のいずれかの濃度に調整される。16% より低い濃度では発酵・熟成に好ましくない雑菌が繁殖し、23% を越えると肝心の乳酸菌や酵母が生育しなくなる。諸味の段階では、麴原料の分解、乳酸発酵、酵母発酵が起き、その後熟成段階に入る。香りの面からみると、醤油らしい香りは酵母発酵で醸し出される。実際、醤油の香味成分のほとんどは酵母発酵で生産される。

まず、諸味発酵の初期では、麴菌酵素による麴原料の分解と溶出が起こる。すなわち、製麴で生産されたプロテアーゼやペプチダーゼなどの酵素により蛋白質は低分子のペプチドやアミノ酸に分解され、でんぷん

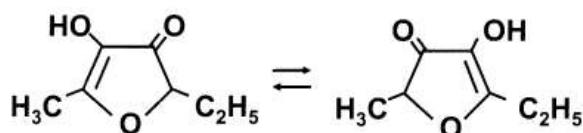
はアミラーゼにより糖化され糖分が液汁中に溶出してくる。そしてこれらの低分子化された成分を源資として、耐塩性乳酸菌による発酵、次いで耐塩性酵母による発酵が起こる。乳酸発酵により乳酸、クエン酸や酢酸などが生成し、そのため当初中性付近であった諸味の pH が下がり、その環境に適した耐塩性酵母による発酵が始まることになる。

前述のように、この酵母発酵でエタノール、エステル、有機酸、アルコール化合物、アルデヒド、HEMF などが生成し醤油らしい諸味ができてくる。この時働く酵母は主に *Z. rouxii* であるが、*Candida* 属酵母が働くこともある。この *Candida* 属酵母が働くと、前述の 4 EG というフェノール化合物を生産し、醤油の香りに少なからず影響を与える。

熟成段階の諸味では、ときどき産膜性酵母が働き、諸味表面に白い膜をつくる。同時にイソ酪酸 (Isobutyric acid) などの不快臭を呈する成分を生成し、多いときには最終の醤油の香りにも影響する。熟成中はこの産膜性酵母が増殖しないように管理することが、品質上大変重要である。

5. HEMF の性質

前述のようにフラノン類の HEMF は日本の醸造醤油の特徴香味成分として同定された^{2,3)}。構造を第 1 図に示す。HEMF は *Z. rouxii* でも *Candida* 属でも生産され、ペントース・リン酸代謝経路を通してつくられることが示されている⁴⁾。さらに、HEMF の前駆物質は D-Xylulose 5-phosphate であることがわかり、醤油製造における生成経路については、大豆と小麦がまず加水分解され、次に麹菌により生産された酵素で D-Xylulose 5-phosphate が溶出し、醤油酵母によりそれが HEMF に変換されるものと考えられている¹²⁾。



4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone

第 1 図 HEMF の構造

HEMF 自体は甘いケーキ様の香りがするが、エタノールに溶解した状態では醤油様の芳香を呈する。また、水中の閾値は 0.04 ppb 以下¹³⁾ で醤油中の濃度はおよそ 50~250 ppm である。濃度を 200 ppm とすると、Odor Unit (濃度/閾値) は約 5,000,000 となる。全香味成分に対する相対的 Odor Unit は 75% 以上になる。このような事実と香りの性質から HEMF は醤油の特徴香味成分であると考えられている。さらに、HEMF には塩味緩和効果があり¹⁴⁾、香りだけでなく味にも影響を与えている。

醤油の香味抽出物を化学的に分別すると、醤油らしい芳香が水溶性の弱酸性区分に集まってくる³⁾。そして、その区分には、HEMF や 4-Hydroxy-5-methyl-3 (2 H)-furanone¹⁵⁾ (以下、mono-methyl の意で HMMF と略)、4-Hydroxy-2, 5-dimethyl-3 (2 H)-furanone³⁾ (以下、HDMF と略)、3-Hydroxy-2-methyl-4 H-pyran-4-one (Maltol, マルトール)¹⁶⁾ などのエノール性水酸基をもつカラメル様香気を呈する化合物が多く含まれている。したがって、これらのカラメル様香気を呈する化合物が醤油の香りに大きく貢献しているものと考えられる。HMMF と HDMF は HEMF の同族化合物であるが、醤油製造では全く違う生成由来である。HEMF は前述のように酵母により生合成されるが、HMMF と HDMF は褐変反応により、例えば D-Fructose, L-Rhamnose からそれぞれ生成することが知られている。

HEMF は醤油中で比較的安定であるが、アルカリ側や空気にさらされると不安定であることが知られている^{17,18,19)}。塩基性条件下で、HEMF は無臭の 4, 4, 5-Trihydroxy-2-ethyl (or methyl)-5-methyl (or ethyl)-3-tetrahydrofuranone に変換される。また、HEMF が酸化されると、2-Oxobutanoic acid や 2-Oxopropanoic acid などの α -ケト酸、プロピオンアルデヒドやアセトアルデヒドなどのアルデヒド、プロピオン酸や酢酸などの有機酸に分解し、 α -ケト酸はさらに熱により二酸化炭素となって揮散する。

6. HEMF の生成

1) HEMF の前駆物質

実際の諸味中で、醤油酵母と HEMF の生成に影響を与える様々な環境因子が知られている^{20,21)}。前述の

ように、HEMF の前駆物質は D-Xylulose 5-phosphate と考えられており、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¹²⁾。このことを確認するために、主成分が異なる液体培地を用いて酵母を培養し、香味成分の生成を比較した²⁰⁾。

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 *Z. rouxii* NY-1 を用いた。YPD 培地で培養した酵母を遠心分離 (3,000 rpm, 5 分) で集菌し、試験培地中に $10^7 \sim 8$ c. f. u./ml になるように懸濁した。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-ペンタノールを用いて、ガスクロマトグラフィーで定量分析¹⁾を行った。

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。第 1 表に示したすべての成分は、麹消化液を用いたもので最も多く生成し、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、醤油製造における HEMF の前駆物質は、麹菌によってつくられていることが示唆される。

一方、HEMF の生成に関して、ペントースとアミノ酸のみの水溶液を調製し、加熱してメイラード反応を進行させ、これに YPD 培地を加えた後、酵母を発酵させて HEMF を生成させた報告がある²²⁾。糖にリボースを、アミノ酸にグルタミン酸ナトリウムを用いた時の HEMF 生成量は約 21 ppm であった。そして、生成経路として、メイラード前期反応により生成する 1-デオキシケトースとストレッカー分解で生じたアセトアルデヒドとが結合して、それが酸化還元されて HEMF が生成するとしている。酵母はその生成経路の触媒の役割を果たしているという報告である²³⁾。

醤油の醸造過程における HEMF の生成を考える場合、諸味の初期段階に HEMF がほとんど検出されないことや醤油中の多量の HEMF 含量を考慮すると、製麹中に前駆物質が生成し、その後の酵母発酵により HEMF が生成する考える方が妥当である。いずれにしても HEMF の生成に酵母の関与が不可欠であることは確かである。

2) 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少なく、空気を送り込まなければ嫌気的な状態である。そこで、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検討した²⁰⁾。HEMF の生成について確認できるように、培地は麹消化液を用いた。事前に培養した酵母を $10^7 \sim 8$ c. f. u./ml 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。HMF の生成経過を第 2 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に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。したがって、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、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 3 図に示す。より 1 に近いバランスを示したほうが、醬

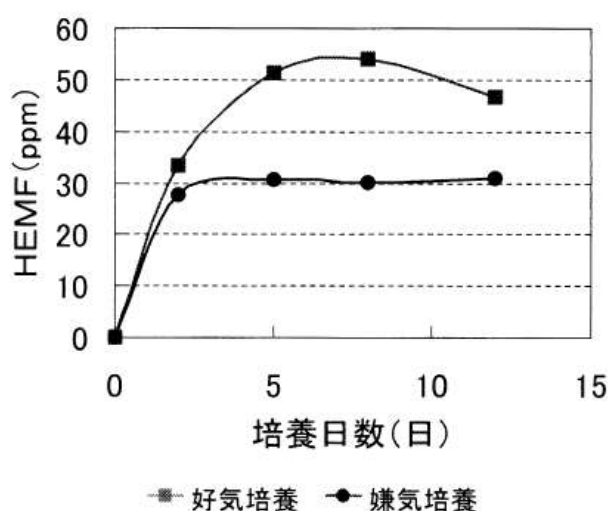
第 1 表 生成香味成分量の培地による違い

香味成分	単位: ppm		
	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

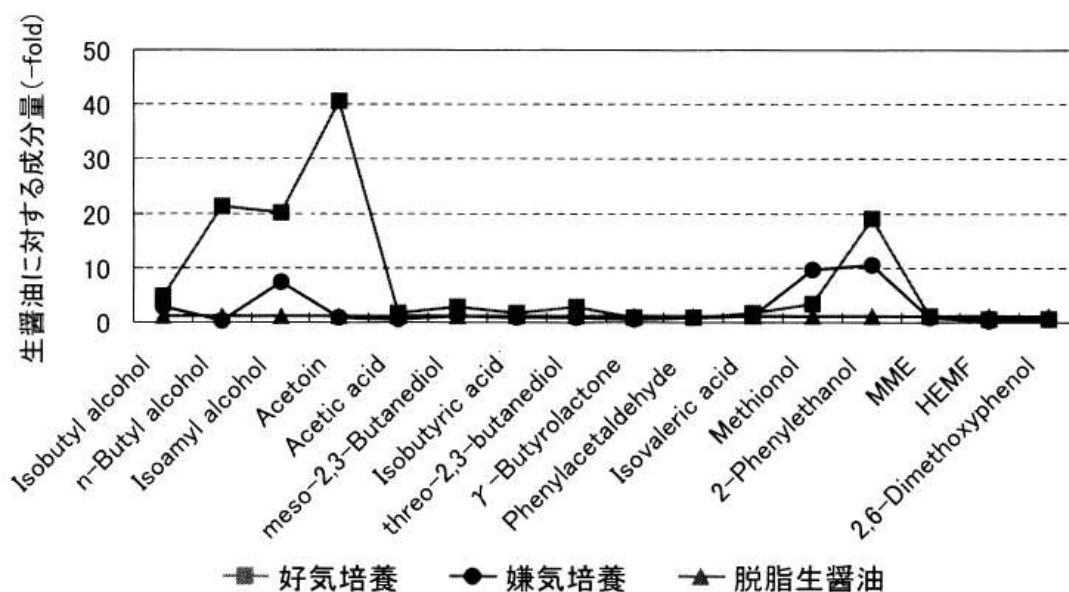
油香味生成のための実験系として適している。香気のバランスを生醤油と比較すると嫌気培養のほうがより醤油に近いバランスになる。ごく小規模で行う実験系は、嫌気条件下で行うことがより実際の醤油醸造に即した条件になるといえる。以上のことから、以下に示す試験結果は、麴消化液を用いて嫌氣的に培養した結果である。

3) 諸味の製造条件の違いによる影響

諸味製造で変更できる因子には、食塩濃度、窒素源濃度、炭素源濃度、pH 等がある。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



第2図 HEMFの生成経過



第3図 好気培養と嫌気培養における生成香味成分量の比較

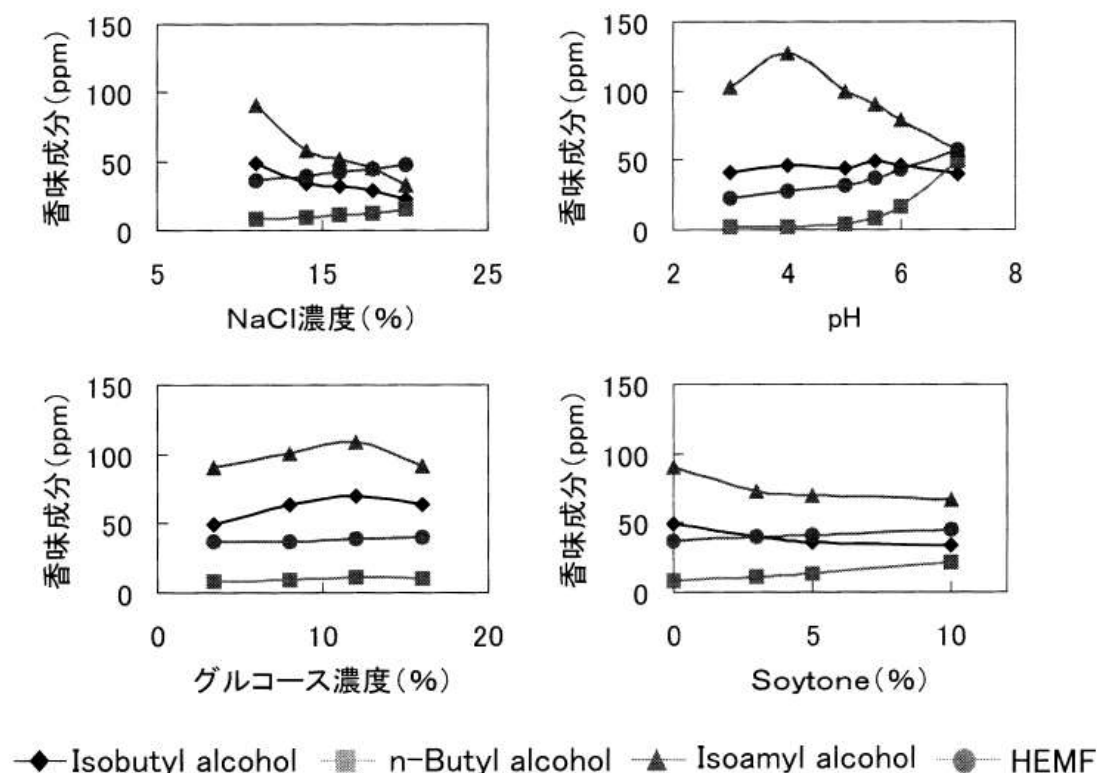
べた²⁰⁾。検討因子とその条件を第2表に示す。各条件で酵母を培養し、生成した香味成分を分析した。そのうち、特に重要と考えられる4成分の生成量を第4図に示す。各因子のHEMF生成量に注目すると、食塩濃度、窒素源濃度、pHが高くなるほど生成量は増加した。食塩濃度が高くなるほどHEMFの生成量が増加することは、以前に報告²⁴⁾された結果と一致している。

ここで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、pH 7ではpH 5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-ブチルアルコールの生成量は、全ての

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%, グルコース 3.4%, pH 5.5



第4図 各因子の香味成分への影響

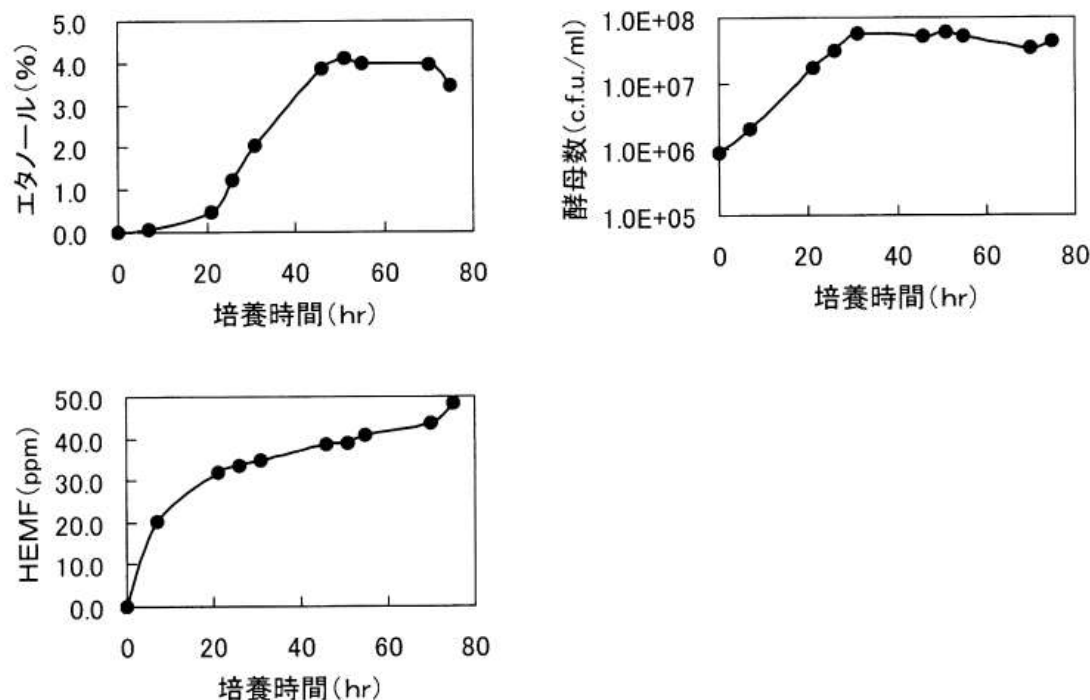
因子において HEMF と同様の傾向を示したことも興味深い。一方、イソブチルアルコールとイソアミルアルコールは HEMF とは逆の傾向を示した。培地中のグルコース量については、HEMF 生成量への影響は少ないと考えられる。これらの結果を見ると、HEMF 生成量が増加する条件は酵母にとって容易には増殖しにくい環境であることがわかる。

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。乳酸発酵の良否がその後の酵母発酵に影響を与えることがわかっているが、酵母による香味生成にも少なからず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には HEMF が多く含まれていることが経験的に知られている。そこで、乳酸発酵が酵母による HEMF の生成にどのように影響するかを調査した²⁰⁾。試験区として、麴消化液とそれに乳酸を適当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の4種類を用いた。培地の pH の影響を避けるため、酵母培養を開始する前にそれぞれの試験区を水酸化ナトリウム水溶液で pH 5.5 に調整した。その結果、3 日間の嫌気培養後のエタノールと HEMF の生成量には差がなく、諸味中の HEMF 生成に関し

ては、乳酸発酵そのものというよりは、乳酸発酵による pH 低下の程度がその後の酵母による HEMF の生成量に影響することがわかった。

4) 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 の生成に何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結果²⁰⁾を第5図に示す。酵母を麴消化液培地に 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¹⁸⁾とも一致する結果となった。これまでに、



第5図 酵母増殖時期と HEMF 生成

HEMF の生成とペントース・リン酸経路の関連性が報告⁴⁾されており、この結果からも 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る。

7. HEMF の製造方法

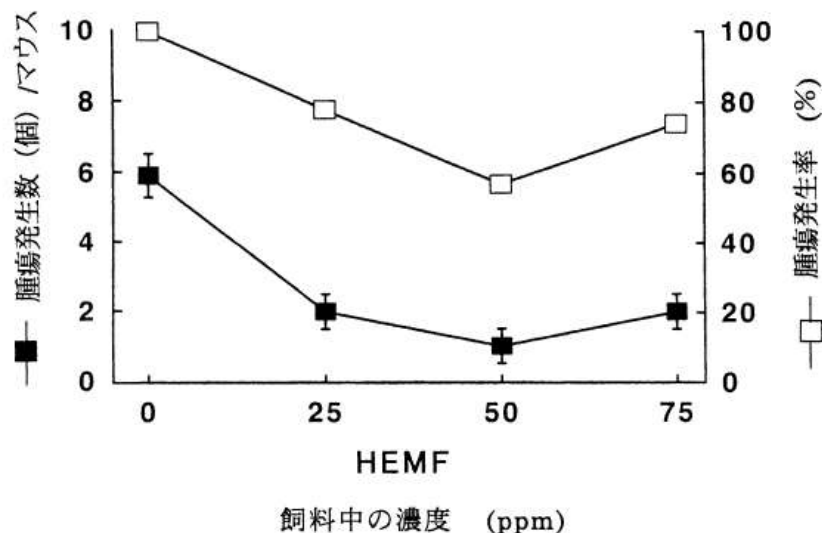
最近、400 ppm 以上という高濃度の HEMF の製造方法に関する知見が示されている²⁵⁾。この方法では、麴消化液、糖及びアミノ酸の混合液を加熱処理する工程と、その加熱処理液を含む培養液に酵母を接種して培養する工程を含んでいる。また、好氣的に培養した場合、不精臭として知られているイソ酪酸や納豆臭のイソ吉草酸が多く生成するので、それを低減するために嫌気発酵法を採用している。糖に D-リボース、アミノ酸にグルタミン酸ナトリウムを用いた例では HEMF が約 890 ppm、D-キシロースとグルタミン酸ナトリウムを用いた例では HEMF が最大で約 550 ppm 生成した。さらに、吸着剤を充填したカラムを用いて濃縮することにより、2,000 ppm 以上の HEMF を含有する香味剤を製造できることを示している。

8. HEMF の発がん抑制効果

HEMF についてはその抗酸化性から抗腫瘍効果が

研究され、その効果が証明されている²⁶⁾。まず、本醸造濃口醤油の発がん抑制効果について、たばこの煙の成分で発がん物質であるベンゾ [a] ピレン (以下、BP と略) によりマウス前胃に誘発されるがんに対して調査した。BP をマウスに強制経口投与 (1 回/週、4 週間) する 2 週間前から濃口醤油を飼料に添加 (0 ~ 30%) して与えると、無添加の場合に比べ有意に腫瘍発生数が減少し、20% 添加群に最も大きな抑制効果が見られた²⁷⁾。さらに、醤油の酢酸エチル抽出画分には醤油に比べ抗酸化活性が 150 倍以上濃縮されていることがわかり、次に、その酢酸エチル抽出区分について、醤油と同様に BP によりマウス前胃に誘発されるがんに対して調べた²⁸⁾。BP を投与した後で、飼料に酢酸エチル抽出画分 (0 ~ 30%) を添加してマウスに 16 週間与えたところ、前胃の腫瘍発生数、発生率は濃度依存的に減少し、30% 添加群の腫瘍発生率は約 52% まで減少した。

抗酸化性を示す酢酸エチル抽出画分には、HEMF が含まれていることがわかり、HEMF は、重量当たりではビタミン C 溶液を上回る抗酸化活性を示した。HEMF についても酢酸エチル抽出画分と同様の BP を用いたマウス発がん抑制試験を行うと、HEMF 25 ppm 添加群で前胃がんに対し有意に腫瘍発生数、発



第6図 BPに誘発された前胃の腫瘍に対するHEMFの発がん抑制効果
発生数の表示はM±SE (n=25-27匹/群)

生率が減少し、50 ppm 投与群ではさらに抑制されて腫瘍発生率は約60%まで減少した。この結果を第6図に示す。

さらに、HEMFに構造類似の醤油香味成分であるHDMF、HMMF、マルトール、シクロテンの抗酸化性も調べた。フラノン類に活性が見られ、その強さは重量当たりでは1%ビタミンC溶液とほぼ同程度であったが、類似構造のマルトールやシクロテンにはその活性はほとんど見られなかった²⁹⁾。

活性酸素は、がんや老化などを引き起こす原因といわれている。抗酸化物質である4-Hydroxy-3(2H)-furanone類の水酸化ラジカルに対する捕捉効果を調べると、HEMF>HMMF>HDMFの順に反応直後から濃度依存的にラジカルを捕捉した。HEMFを用いて一重項酸素捕捉能を調べると、一重項酸素捕捉物質として知られているメチオニンと比べると、一重項酸素との反応速度は、メチオニンでは2.5mMであったがHEMFは0.2mMであった。これは、HEMFのほうがより少ない量で同じ量の一重項酸素を捕捉することを意味し、HEMFのほうが一重項酸素を約10倍捕捉しやすいことがわかった²⁹⁾。

発がんプロモーター(がん化促進物質)である12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート(以下、TPAと略)で人の白血球を刺激すると過酸化水素が発生するが、HEMF、HDMF、HMMFのフラノン類はこの過酸化水素の発生も抑制した。HDMF

は90μMで約90%抑制し、ついでHEMF、HMMFの順で抑制した。これらの実験から、フラノン類は水酸化ラジカル、一重項酸素、過酸化水素などの活性酸素を捕捉する能力があることがわかった。また、化学的な実験系のみでなく、人の白血球を用いてもフラノン類は抗酸化作用を示し、生体内でもその効果が期待される。HEMFなどのフラノン類はプロモーション段階(がん化促進段階)で発がんを抑制する発がんプロモーション抑制剤としての作用が期待されている。

HDMFとHMMFについてもHEMFと同様に、BP誘発マウス前胃がんの抑制効果を試験したところ、HDMF投与群では25 ppmから有意に腫瘍発生数が減少し、50 ppm投与から有意に腫瘍発生率が減少した。HMMF投与群では、50及び75 ppm投与群に有意な腫瘍発生数の減少が見られたが、発生率の減少はなかった²⁹⁾。マウスを用いた実験では、発がん物質(BP)に暴露した後に試料を与えているので、HEMF、HDMF、HMMFの発がん抑制効果は、イニシエーション(遺伝子の損傷)の段階ではなく、プロモーション(がん化促進)の段階と考えられる。このことは発がんプロモーターであるTPAを用いた実験結果からも支持される。

9. HEMFの抗白内障効果

HEMFについてはその抗白内障効果についても検討された³⁰⁾。ガラクトースを用いる*in vitro*系と白内

障自然発症ラットを用いる *in vivo* 系で試験した。*in vitro* 系では、ラットのレンズ部分を摘出し、高濃度のガラクトースを含んだ培地で、4-Hydroxy-3 (2 H)-furanone 類を添加して培養を行い、7 日後に白濁度を測定した。対照の白濁に対して、HEMF と HDMF は 1 mg/ml で有意に白濁の度合いを減少させた。*in vivo* 系では、7 週齢の白内障自然発症ラットを用いてフラノン類の 1 % 溶液を 1 日 3 回、3 週間点眼した。実験 21 日後には対照群の 56 % が白内障と診断されたが、フラノン類投与群ではレンズの濁りが遅延され HEMF 群では 44 %、HDMF 群では 21 % と減少した。この効果はフラノン類の抗酸化活性によるものと考えられている。

10. おわりに

日本の醸造醤油の特徴香味成分として同定された HEMF が、その構造に由来する抗酸化性から抗腫瘍効果が見出されるまでに至った。醤油の機能性がテレビ番組でも紹介されているが、醸造醤油の持つ機能性は計り知れない。ここで紹介した抗がん作用の他に、醤油の三次機能として、胃液分泌作用³¹⁾、殺菌作用^{32,33)}、抗酸化作用³⁴⁾、血圧降下作用^{35,36)} などが知られている。このように醸造醤油は多くの三次機能を持っているが、醤油は何と言っても二次機能であるおいしさで食するものであり、食べ物をおいしくするための補助的役割を演じるものである。日本の家庭における一人当たりの醤油の年間使用量（年間出荷量を日本の総人口で割ったもの）³⁷⁾ は、1973 年に 11.9 リットルであったが、2004 年には 7.5 リットルに減少した。1973 年に約 129 万キロリットルあった出荷量³⁷⁾ は、2002 年には 100 万キロリットルを割るまでに減少し、その減少傾向はまだ続いている。しかし、世界的に見ると醤油の総生産量は約 970 万キロリットルであり、3 ヶ月以内の短期醸造も含めた醸造醤油はその内 90 % 弱を占める。しかも醸造醤油は年々出荷量が伸びており、醤油が世界の食生活に徐々に浸透してきている。世界的に見れば醸造醤油の未来は明るい。日本でも、長年親しまれてきた醤油をもっと上手に用いれば、もっとおいしい食生活を送ることができるはずである。一方、醤油のメーカー側から見れば、消費者の嗜好動向を常に把握し、嗜好の先取りをした醤油の開発が必要である。技術陣としてはそのような醤油をいち早く

開発し、日本での醤油の使用量減少に何とか歯止めをかけたいものである。

＜キッコーマン株式会社＞

参 考 文 献

- 1) 布村伸武, 佐々木正興: 醬研, **24**, 209 (1998)
- 2) Nunomura, N., Sasaki, M., Asao, Y. and Yokotsuka, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 491 (1976)
- 3) Nunomura, N., Sasaki, M. and Yokotsuka, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 339 (1980)
- 4) Sasaki, M., Nunomura, N. and Matsudo, T.: *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 934 (1991)
- 5) 佐々木正興, 布村伸武: 農化大会要旨集 p. 236 (仙台) (1983)
- 6) Buttery, R. G., Turnbaugh, J. G. and Ling, L. C.: *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 1006 (1988)
- 7) 浅尾保夫, 横塚保: 農化, **32**, 617 (1958)
- 8) 浅尾保夫, 横塚保: 農化, **32**, 622 (1958)
- 9) 森修三, 布村伸武, 佐々木正興: 農化大会要旨集 p. 236 (仙台) (1983)
- 10) 佐々木正興, 森修三: 醸協, **86**, 913 (1991)
- 11) 野田義治, 大場和徳, 中野正路: 醬研, **14**, 11 (1988)
- 12) Sasaki, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 230 (1996)
- 13) Ohloff, G.: *Perfumer and Flavorist*, **3**, 11 (1978)
- 14) 横塚保, 布村伸武, 佐々木正興, 浅尾保夫: 特開, 昭 51-148072 (1976)
- 15) Nunomura, N., Sasaki, M. and Yokotsuka, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1361 (1979)
- 16) Nunomura, N., Sasaki, M., Asao, Y. and Yokotsuka, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 485 (1976)
- 17) Nunomura, N. and Sasaki, M.: *Legume-Based Fermented Foods* (Reddy, N. R. 編), pp. 5-46, Florida, CRC Press, Inc., 1986
- 18) Nunomura, N. and Sasaki, M.: *Off-Flavors in Foods and Beverages* (Charalambous, G. 編), pp. 287-312, Amsterdam, Elsevier Science Publishers B. V., 1992
- 19) 布村伸武, 佐々木正興, 浅尾保夫, 横塚保: 農化大会要旨集, p. 448 (東京) (1977)

- 20) 柳沼淳夫, 渡辺真知子, 布村伸武, 藤井三治: 醬研, **27**, 233 (2001)
- 21) 柳沼淳夫, 布村伸武: 醸協, **97**, 608 (2002)
- 22) Hayashida, Y. et al.: Biotechnology Letters, **21**, 505 (1999)
- 23) 林田安生: 醸協, **94**, 526 (1999)
- 24) Sasaki, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3273 (1996)
- 25) 春日正史, 渡辺真知子, 布村伸武, 佐々木正興: 特願 2002-226963, (2002)
- 26) 片岡茂博, 長原歩: 醸協, **95**, 336 (2000)
- 27) Benjamin, H., Storkson, J., Nagahara, A. and Pariza, M. W.: *Cancer Res.*, **51**, 2940 (1991)
- 28) Nagahara, A., Benjamin, H., Storkson, J., Krewson, J., Sheng, K., Liu, W. and Pariza, M. W.: *Cancer Res.*, **52**, 1754 (1992)
- 29) Kataoka, S., Liu, W., Albright, K., Storkson, J. and Pariza, M. W.: *Food Chem. Toxicol.*, **35**, 449 (1997)
- 30) Sasaki, T., Yamakoshi, J., Saito, M., Kasai, K., Matsudo, T., Koga, T. and Mori, K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1865 (1998)
- 31) 小島猛男: 臨床消化病, **2**, 728 (1954)
- 32) 清水利貞, 鈴木一良, 出川昭: 日食工誌, **9**, 198 (1962)
- 33) 増田進, 工藤由起子, 熊谷進: 醬研, **25**, 275 (1998)
- 34) 山口直彦, 横尾貞夫, 藤巻正生: 日食工誌, **26**, 71 (1979)
- 35) 梶本義衛: 食衛誌, **4**, 123 (1963)
- 36) 木下恵美子, 山越純, 菊地護: 醬研, **22**, 67 (1996)
- 37) 日本醤油協会他: 醤油の統計資料 平成 17 年版

執筆者紹介 (順不同・敬称略)

布村伸武 <Nobutake NUNOMURA>

昭和 25 年 1 月 26 日生まれ<勤務先とその所在地>キッコーマン株式会社品質管理部, 〒278-8601 千葉県野田市野田 250<略歴>昭和 47 年 東京大学農学部農芸化学科卒業, 同年キッコーマン株式会社入社。中央研究所。昭和 61 年米国 Kikkoman Foods, Inc. 出向。平成 3 年研究本部。平成 7 年生産本部。現在に至る。<抱負>現在までしょうゆの醸造技術の開発に携わってきたが, しょうゆづくりの奥深さをひしひしと感じる。今後ともしょうゆと関係していきたいと思っている。<趣味>ゴルフ, 散歩など。

渡辺 聡 <Satoshi WATANABE>

昭和 37 年 9 月 20 日生まれ<勤務先とその所在地>新潟県農業総合研究所食品研究センター, 〒959-1381 新潟県加茂市新栄町 2 番 25 号<略歴>昭和 61 年新潟

大学農学部農芸化学科卒, 昭和 62 年新潟県環境保健部所属, 平成 9 年 4 月より新潟県農業総合研究所食品研究センター園芸特産食品科主任研究員醸造食品担当, 現在に至る。<抱負>如何なる調理でも美味しい味噌の探求<趣味>観葉植物, ネットオークション

太養寺真弓 <Mayumi TAIYOJI>

昭和 48 年 12 月 14 日生まれ<勤務先とその所在地>新潟県農業総合研究所食品研究センター, 〒959-1381 加茂市新栄町 2 番 25 号<略歴>平成 10 年新潟大学大学院自然科学研究科生体機能専攻修士課程修了, 同年新潟県農業総合研究所食品研究センター園芸特産食品科, 平成 17 年同食品工学科主任研究員, 現在に至る。<抱負>微生物・酵素を制御した, より良い(美味しい)食品づくり。<趣味>音楽鑑賞, ピリヤード

Partial translation of Reference document 1

English translation of FIG 5 on page 157 is as follows.

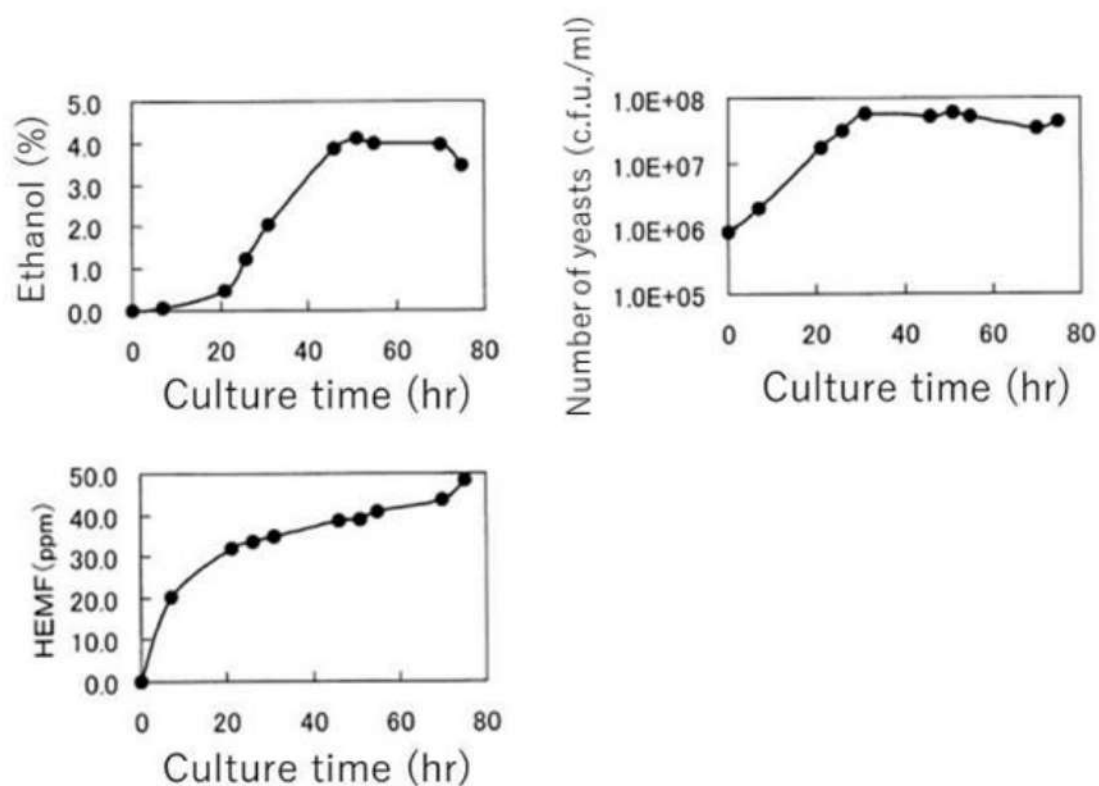


FIG. 5 Timing of yeast proliferation and HEMF production