

〔醸酵工学 第63巻 第4号 279-287. 1985〕

味噌酵母の生成する揮発性有機酸*

石原 和夫・本間 伸夫・小笠原長宏**

県立新潟女子短期大学食物科, **新潟大学農学部農芸化学科

Volatile organic acids formation by salt-tolerant *miso* yeasts. KAZUO ISHIHARA, NOBUO HONMA, and NAGAIRO OGASAWARA (*Niigata Women's College, Ebigase 471, Niigata 950*; ***Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University, Igarashi 2no-cho, Niigata 950-21, Japan*) *Hakkokogaku* 63: 279-287. 1985.

By using a synthetic medium the volatile organic acids formed by salt-tolerant *miso* yeasts and *saké* yeast were studied. As the test yeasts, *Zygosaccharomyces rouxii* S84, *Candida versatilis* D-5, and *Candida etchellsii* F-8, all salt-tolerant and isolated from red salty *kome miso*, and *Saccharomyces cerevisiae* RIB 6002 (Kyokai no. 7), a salt-sensitive *saké* yeast, were employed. These yeasts were stationarily cultured at 30°C until they consumed nearly all the glucose, the carbon source. Identification of the volatile acids in the distillates of culture solutions under reduced pressure at pH 2 was done by GLC and GC-MS after converting them to *n*-butyl esters.

We found that acetic, propionic, isobutyric, *n*-butyric, 2-methylbutanoic, and isovaleric acids were formed by all test yeasts. In addition, the formation of 2-oxo-3-methylbutanoic, 2-oxo-3-methylpentanoic, 2-oxo-4-methylpentanoic, 2-hydroxy-3-methylbutanoic, and 2-hydroxy-4-methylpentanoic acids were observed from both strains of *C. versatilis* D-5 and *C. etchellsii* F-8. Formation of 2-hydroxy-3-methylpentanoic acid was also inferred. It was also found that benzoic and phenylacetic acids were formed by *C. versatilis* D-5 and *n*-hexanoic, *n*-octanoic, and *n*-decanoic acids by *S. cerevisiae* RIB 6002.

The amount of volatile acids formed was measured as acetic acid in the distillates of culture solutions by alkaline titration, and it decreased in the order of *C. versatilis* D-5 (27.0 mg/100 ml), *C. etchellsii* F-8 (11.7 mg/100 ml), *Z. rouxii* S84 (2.5 mg/100 ml), and *S. cerevisiae* RIB 6002 (1.6 mg/100 ml). Among the volatile acids, acetic acid was the largest in quantity (about 26-76%), and the other main volatile acids were isobutyric, 2-methylbutanoic, and isovaleric acids.

微生物として麹菌のみを利用し、他の発酵微生物を関与させないで醸造する、いわゆる無菌味噌の案出¹⁻³⁾は、味噌熟成に関与する麹菌以外の発酵微生物の役割の解明を可能にし、多くの成果が得られた。その結果、味噌の熟成過程において味噌らしい香気付与あるいは矯正に耐塩性の味噌酵母の存在が不可欠であることがわかった。^{4,5)}しかし、その味噌酵母の香気付与のメカニズムは、いまだ詳細には解明されていない。

味噌酵母による香気付与のメカニズム究明の方法としては、仕込み時に味噌酵母を添加し、熟成させた味

噌の香気を研究する方法⁶⁾や、無菌味噌と普通味噌との比較による研究の方法^{4,5,7,8)}などがある。しかしながら、これらの方法では原料よりの麹菌酵素や味噌酵母以外の微生物、また非酵素的化学反応により香気が生じられるため解析を複雑にしている。そこで、これらの方法に加えて、合成培地の使用により味噌酵母自身がどのような香気成分を生成し、それがどのように味噌香気成分に移行するかの解明も必要と考えられる。合成培地の使用による味噌酵母の生成する香気成分の研究には、アルコール類⁹⁾や、有機酸類¹⁰⁾の報告があるが、いまだ系統的な研究は見あたらない。

味噌の熟成過程において、味噌酵母は味噌香味成分としての酸性物質の生成にあまり関与しない¹¹⁾とされ

* 味噌酵母の生成する香気成分に関する研究(第1報)
Studies on aroma components formation by salt-tolerant *miso* yeasts (I)

ているが、合成培地を使用して味噌酵母培養液の香気を官能的に調べたところ、培養液を pH 2 に調整し、得られた減圧蒸留液の香気はほぼ培養液の香気を再現したが、pH 7 に調整し得られた留液からは土臭さやアルカリ臭が認められた。¹²⁾ このことから、味噌酵母培養液の香気において酸性物質の重要性が考えられたので、本報では味噌酵母の生成する揮発性酸について検討し、その結果を報告する。

実験方法

供試酵母 耐塩性の味噌酵母として赤色辛口味噌より分離された *Zygosaccharomyces rouxii* S 84¹³⁾ (以下, *Z. rouxii*), *Candida versatilis* D-5¹⁴⁾ (以下, *C. versatilis*), *Candida etchellsii* F-8¹⁴⁾ (以下, *C. etchellsii*) の3株と非耐塩性である清酒酵母の *Saccharomyces cerevisiae* RIB 6002 (協会7号) (以下, *S. cerevisiae*) を使用した。

培地および培養方法 使用した培地の組成を Table 1 に示した。ただし、非耐塩性である *S. cerevisiae* の保存培地および前培養培地は米麴汁 (Ballg. 10°) とし、さらに本培養培地には Table 1 に示した組成のうち食塩無添加のものをを用いた。

前培養は保存培養菌体を数白金耳接種し、30°C で3日間静置培養した。前培養菌体を遠心分離し、滅菌12.5%食塩水 (*S. cerevisiae* には滅菌生理食塩水) で洗浄後、酵母懸濁液を調製した。本培養培地は炭素源としてグルコース、窒素源としては、大豆のアミノ酸

組成¹⁵⁾に基づいて18種類のアミノ酸混合物を使用した。ただし、シスチンとチロシンは溶解度が小さいため過飽和の状態になった。本培養培地調製にあたっては、滅菌時におけるアミノ・カルボニル反応の影響をさけるため、グルコース溶液とその他の成分溶液を別々に120°C で10分間高圧滅菌した。そして、接種時 1 l の三角フラスコに、酵母懸濁液と本培養培地が 600 ml になるように調整し混合した。酵母の接種菌数は 600 ml 当たり 3×10^8 とし、30°C で炭素源であるグルコースがほぼ消費しつくされた時期まで静置培養を行った。なお、この培養期間の設定は、既報¹²⁾の結果によった。

揮発性酸の分離とそのブチルエステル化 各培養液 6 l 中の揮発性成分を、Fig. 1 に示した装置を用いて捕集した。装置 A は -5°C、B と C は -80°C に冷却し、培養液を 10N H₂SO₄ で pH 2 に調整後、ロータリーエバポレーターに接続したフラスコに入れ、10 mmHg 以下で培養液が乾固するまで減圧蒸留を行った。さらに少量の蒸留水を加えて減圧蒸留を繰り返した。なお、留液はほとんど A に捕集され、B には少量の氷結、C には極めてわずかな氷結が認められた。B と C の氷結を解凍後、A の留液と合わせて揮発性酸分析のための試料溶液とした。

揮発性酸の分画方法を Fig. 2 に示し、得られた揮発性酸のアンモニウム塩は山下ら¹⁶⁾の方法で *n*-ブチルエステル化した。

揮発性酸ブチルエステルのガスクロマトグラフィー (GLC) およびガスクロマトグラフィー・質量分析

Table 1. Composition of media.^a

(/l)

For stock culture ^b					
Glucose	50 g	Glucose	20 g	Biotin	0.002 mg
Raw soy sauce	100 ml	18 Amino acids ^c	as N 0.4 g	Ca-pantothenate	0.4 mg
NaCl	83 g			Inositol	2.0 mg
Agar	22 g	KH ₂ PO ₄	2 g	Nicotinamide	0.4 mg
pH 5.3		CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1 g	<i>p</i> -Aminobenzoic acid	0.2 mg
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g	Pyridoxine HCl	0.4 mg
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg	Thiamin HCl	0.4 mg
		MnSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg	Riboflavin	0.2 mg
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg	NaCl	125 g
For preculture ^b				pH 4.5	
Glucose	50 g				
Raw soy sauce	100 ml				
NaCl	125 g				
pH 4.5					

^a The medium for *S. cerevisiae* contained no sodium chloride.

^b Rice *koji* extract (Ballg. 10°) was used as stock and preculture media for *S. cerevisiae*.

^c The mixture of 18 amino acids was prepared according to the amino acid composition of soy-beans.¹⁵⁾

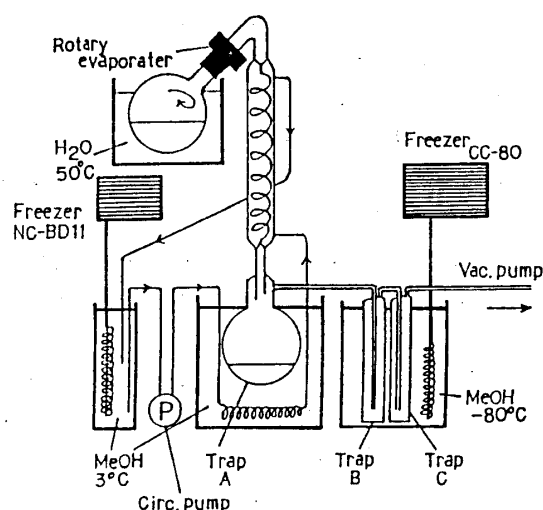


Fig. 1. Apparatus for distillation of fermented broth.

(GC-MS) GLC は 20% Silicone DC-550, 1.5% Silicone OV-17, 5% PEG-20M-P の 3 種類のパックドカラムと PEG-20M のキャピラリーカラムによって行った。装置は島津 GC-4APF を使用した。その他の操作条件は各実験結果において示した。各ピークに相当する化合物の推定は標準物質の R_t との比較、標準物質の添加試験により行った。また、ピーク面積はインテグレーター (Disc Co. 263-D) により求め、Disc integrator unit で示した。

GC-MS はデータ処理用のコンピューター (Hitachi

002B-8DK) を付属した Hitachi M-5201 と Hitachi M-60 を連結したものにより、電子衝撃イオン化法 (EI 法) で行った。カラムは 3% Silicone DC-550 のパックドカラムと PEG-20M のキャピラリーカラムを使用した。3% Silicone DC-550 を充てんしたガラスカラムは内径 3 mm×2 m で、カラム温度 80°C→210°C (5°C/min), キャリヤーガス (He) 0.4 kg/cm², 注入部温度 225°C, インターフェイス 235°C の条件で行った。一方, PEG-20M のキャピラリーカラムはガラス製 SCOT カラムで、操作条件は実験結果において示した。質量分析は両カラムともイオン化電圧 20 eV, イオン源温度 180°C で行い、同定は同一条件で行った標準物質のスペクトルとの比較によって行った。

生育度, pH および培養液成分の測定 各供試菌株の培養期間が異なるので、培地の減少量 (600 ml 当たり 2-5 ml) にも差が認められた。そこで、培地量の減少をもたらす主な原因は水分の揮発と考え、培養後揮発水分量を補充して一定量とし、分析用試料溶液とした。生育度は 660 nm における液層の長さ 10 mm の吸光度で示し、pH は直接 pH メーターで測定した。つぎに試料溶液を 3,500 rpm で 10 分間遠心分離し、得られた上澄液についてグルコース量はフェノールー硫酸法、全窒素量はケルダール法で測定した。また、試料溶液を 10N H₂SO₄ で pH 2 に調整し、Fig. 1 に示した装置で蒸留液を得、その留液中の総アルコール

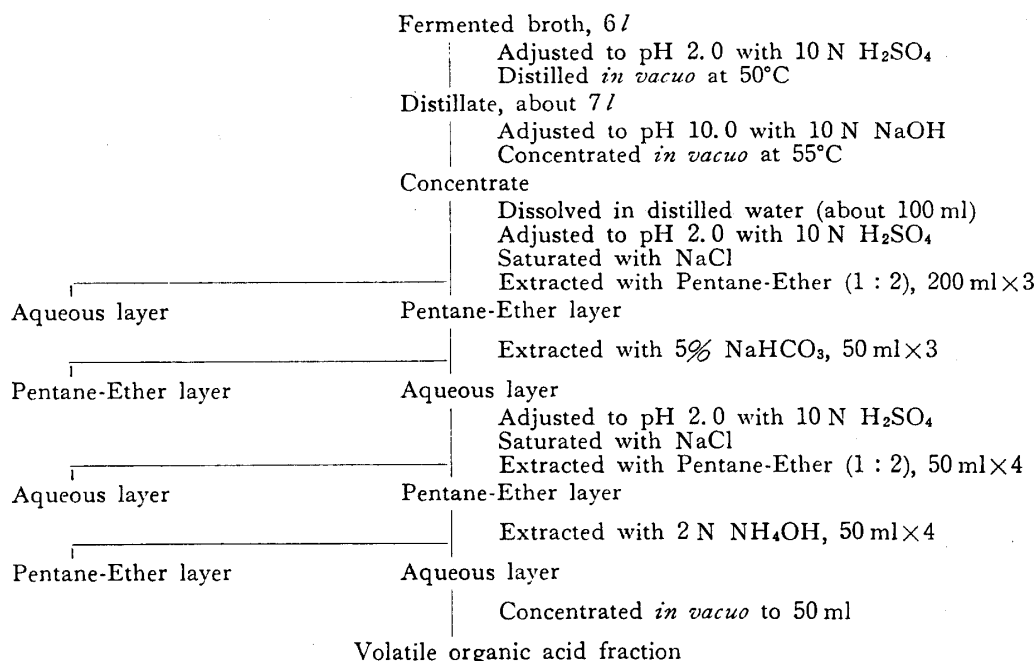


Fig. 2. Scheme of preparation for fractionation of volatile organic acids.

は硝酸セリウム・アンモニウムを用いる比色法¹⁷⁾で測定し、エタノールとして示した。留液中の揮発性酸はアルカリ滴定法で酸量を求め、酢酸として算出した。総有機酸は試料溶液中の菌体を遠心分離および東洋ろ紙 no. 101 で除去後、10N H₂SO₄ で pH 2 に調整し、液・液連続抽出器を使用して 50°C で96時間エーテル抽出を行った。なお、受器には 0.1N NaOH 80 ml を入れ、すべての有機酸を捕捉し、逆滴定法により総有機酸量を求め、コハク酸として算出した。

実験結果および考察

培養液中の成分量の比較 炭素源を消費しつくした時期での培養液成分を Table 2 に示した。味噌熟成の主要酵母である *Z. rouxii* と後熟型酵母である *C. versatilis*, *C. etchellsii* の培養期間にはほとんど差がなく、12日間で培地組成の2%を占めるグルコースをほぼ完全に消費しつくした。これに対し、非耐塩性のため培地に食塩無添加の清酒酵母 *S. cerevisiae* は、4日間で培地中のグルコースのほぼすべてと総窒素の40%近くを消費した。味噌酵母の窒素消費率は *S. cerevisiae* のそれよりも低く、また生育度も低かった。揮発性アルコール量は最高が *S. cerevisiae* であり、味噌酵母では *Candida* 属が *Z. rouxii* よりも多い傾向にあったが、既報¹²⁾の結果では逆であったことからほとんど差がないものと考えられる。揮発性アルコール生成のために消費されたグルコース量を、豊沢ら¹⁸⁾の換算係数を用いて算出したところ、*S. cerevisiae* は89%、味噌酵母は64~74%を占め、消費されたグルコースの主たる行方であることが認められた。

S. cerevisiae の pH 4.40 は培養初発時とはほとんど変

化がなく、有機酸量も供試菌株中最低であった。これに対し、約1の pH 低下が認められた *Z. rouxii* と *C. versatilis* の有機酸量は *C. etchellsii* のそれよりも多く、しかもこの両菌株の有機酸量をアルコールと同様にコハク酸としてグルコースへ換算したところ、両菌株はそれぞれ培養によって消費されたグルコースの約4%を占めていた。培養液 100 ml 中の揮発性酸量は酢酸として *C. versatilis* が 27.0 mg, *C. etchellsii* が 11.7 mg, *Z. rouxii* が 2.5 mg, *S. cerevisiae* が 1.6 mg で、*C. versatilis* の揮発性酸量は *Z. rouxii* の約11倍量であった。*C. versatilis* の揮発性酸量をグルコースへ換算したところ、培養期間中に消費されたグルコースの約2%に相当した。また、*Candida* 属の生成する揮発性酸量は総有機酸量の60%近くを占めたが、*Z. rouxii* では約5%であった。このことから、*Z. rouxii* により生成される有機酸の大部分が不揮発性酸であると考えられる。

各培養液の香気を調べたところ、*Z. rouxii* ではアルコール発酵臭の他に、つんとした刺激臭と果実様のエステル香が認められた。*C. versatilis* ではアルコール発酵臭、エステル香の他に強い刺激臭と弱い醤油様および漬物様の香気が認められ、*C. etchellsii* ではアルコール発酵臭と刺激臭および弱い不快臭が認められた。*S. cerevisiae* では清酒様香気の外に強い刺激臭と弱い硫黄化合物様のにおいが認められた。

揮発性酸の同定 揮発性酸ブチルエステルのガスクロマトグラムを Fig. 3, 4 に示し、各ピークの推定、ピーク面積の比率を Table 3 にまとめて示した。ピーク総面積の大きさは *C. versatilis*, *C. etchellsii*, *Z. rouxii*, *S. cerevisiae* の順であり、アルカリ滴定による

Table 2. Analytical results of fermented broth.

	Strain			
	<i>Z. rouxii</i>	<i>C. versatilis</i>	<i>C. etchellsii</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Period of fermentation (d)	11	12	12	4
Glucose consumption (%)	98.8	98.4	99.4	99.4
Nitrogen consumption (%)	16.3	9.3	16.3	38.9
OD (660 nm, 10 mm)	0.36	0.22	0.38	0.85
pH	3.59	3.61	3.94	4.40
Volatile alcohols as ethanol (mg/100 ml)	646	714	753	904
Total organic acids as succinic acid (mg/100 ml)	54.4	48.7	19.5	9.8
Volatile organic acids as acetic acid (mg/100 ml)	2.5	27.0	11.7	1.6
VOA*×100/TOA**	4.6	55.4	60.0	16.3

*Volatile organic acids; **Total organic acids

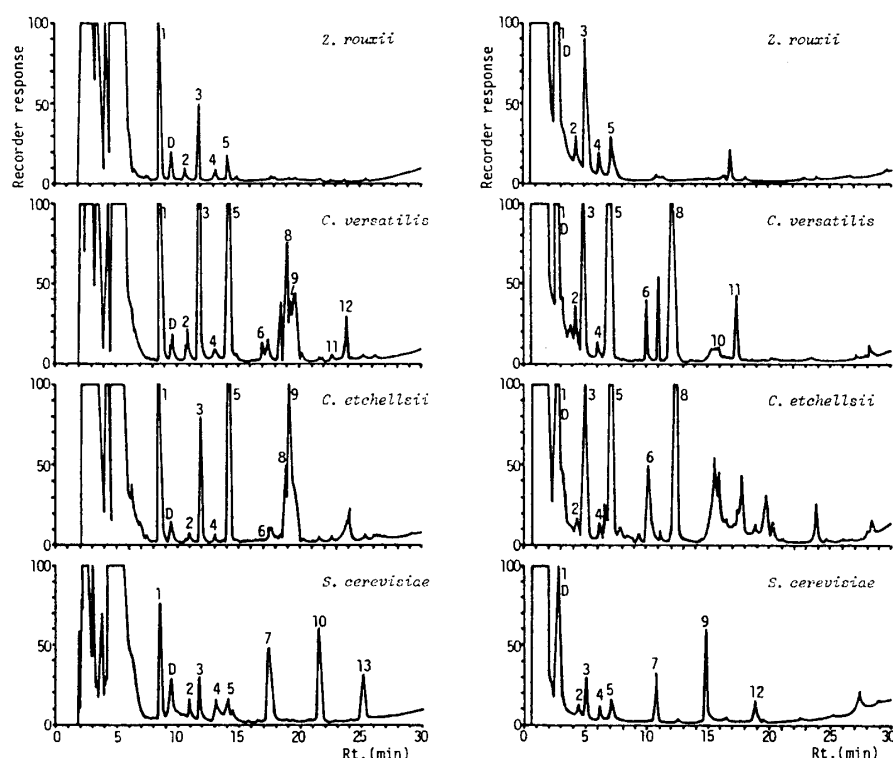


Fig. 3. Gas chromatograms of *n*-butyl esters of volatile organic acids in fermented broth.

Column: Left: 20% Silicone DC-550, 3 mm i. d. \times 3 m, Stainless steel.

Right: 1.5% Silicone OV-17, 3 mm i. d. \times 2 m, Glass.

Column temp.: 60°C-(6°C/min)-240°C. Carrier gas: N₂, 50 ml/min.

Injection temp.: 270°C. Detector: HFID, 300°C.

D: Peak of dibutyl ether.

揮発性酸量の傾向に一致した。全供試菌株に共通して、acetic, propionic, isobutyric, *n*-butyric acid の生成が認められた。ブチルエステルの GLC には 20% Silicone DC-550 が適している¹⁶⁾が、枝わかれ位置異性体の分離には不適当であった。これに対して PEG-20M では propionic, isobutyric acid の位置にブチルエステル化時に使用した試薬のブタノールのピークが検出される欠点はあるものの、2-methylbutanoic と 3-methylbutanoic acid (以下, isovaleric acid) を分離することができた。これら両酸は全供試菌株により生成されることを認めた。全供試菌株により生成が確認された炭素数 2～5 の直鎖および枝わかれの 6 種類の揮発性酸は味噌の有機酸¹⁹⁻²³⁾、あるいは味噌の香気成分^{8,24-26)}として既に報告され、なかでも 2-methylbutanoic acid は本間⁸⁾により味噌の香気成分として初めて報告された。また、2-methylbutanoic acid を除く 5 化合物は清酒の有機酸²³⁾として報告されており、2-methylbutanoic acid に関しても *S. cerevisiae* で生成が認められたので清酒中の存在が示唆される。*C. versatilis*,

C. etchellsii の両菌株からは 2-oxo-3-methylbutanoic, 2-oxo-3-methylpentanoic, 2-oxo-4-methylpentanoic acid のオキソ酸と 2-hydroxy-3-methylbutanoic, 2-hydroxy-4-methylpentanoic (leucinic) acid のヒドロキシ酸の生成を認めた。これらオキソ酸とヒドロキシ酸の GC-MS の結果を Fig. 5 に示した。これら化合物のマススペクトルは標準物質のそれに一致した。また、Fig. 4 において、2-oxo-3-methylpentanoate のピークが 2-oxo-4-methylpentanoate のピークの直前にある位置関係から、標準物質の入手はできなかったが、2-hydroxy-4-methylpentanoate の直前にあるピークを 2-hydroxy-3-methylpentanoate と推定し、この化合物の GC-MS の結果も Fig. 5 に示した。そのマススペクトルは 2-hydroxy-4-methylpentanoate のそれに類似していた。また、この化合物は *Z. rouxii* と *C. versatilis* により、窒素源をイソロイシン単独にした場合に生成されることを確認している。²⁷⁾ 2-hydroxy-3-methylpentanoic acid を除くオキソ酸とヒドロキシ酸のメチル、あるいはエチルエステルのマススペクトルデータ

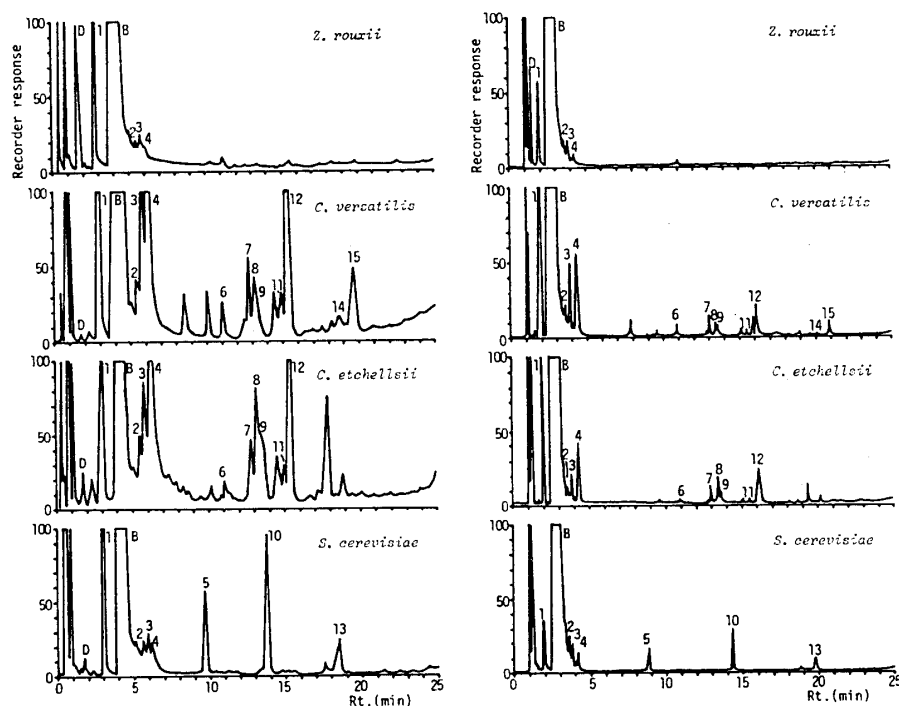


Fig. 4. Gas chromatograms of *n*-butyl esters of volatile organic acids in fermented broth.

Left: Column: 5% PEG-20M-P, 3 mm i. d. \times 2 m, Glass.

Column temp.: 60°C-(6°C/min)-210°C. Carrier gas: N₂, 50 ml/min.

Injection temp.: 270°C. Detector: HFID, 300°C.

Right: Column: PEG-20M, 0.3 mm i. d. \times 20 m, Glass SCOT.

Column temp.: 60°C-(5 min)-60°C-(5°C/min)-170°C.

Carrier gas: N₂, 1.1 ml/min. Scavenger gas: N₂, 36.6 ml/min.

Split ratio: 1/33. Injection temp.: 270°C.

Detector: HFID, 300°C.

D: Peak of dibutyl ether. B: Peak of *n*-butyl alcohol *et al.*

に関しては既に報告されている²⁸⁾が、ブチルエステルのデータは見当たらない。2-oxo-4-methylpentanoic acid は生大豆のフレーバー成分²⁹⁾として報告されているが、大豆を原料とする味噌中には、この化合物を含めいずれのオキシ酸もヒドロキシ酸もその存在は報告されていない。また、味噌と同じく大豆を原料とし、同種の耐塩性酵母がその熟成に関与する醤油中にも、これら化合物の存在は報告されていない。しかし、本研究で *Candida* 属からこれら化合物の生成が認められたことは、味噌、醤油中での存在が示唆される。また、窒素源に分歧アミノ酸のバリン、ロイシン、イソロイシンを単独に用いた場合、*Candida* 属のみに限らず *Z. rouxii* によっても、これら枝わかれのオキシ酸とヒドロキシ酸の生成を認めている。²⁷⁾ 一方、清酒では 2-oxo-3-methylbutanoic, 2-oxo-4-methylpentanoic, 2-hydroxy-3-methylbutanoic, 2-hydroxy-4-methylpentanoic acid のいずれもエチルエステルではあるが、清酒

の重要な香気成分として報告されている。³⁰⁾ しかし、本研究では清酒酵母 *S. cerevisiae* によるこれら化合物の生成は認められなかった。清酒のこれら化合物のうち、2-hydroxy-4-methylpentanoic acid は *Aspergillus oryzae* によって生成され、清酒酵母自身はそのエチルエステル化のみに関与していると報告されている。^{31,32)} これに対し、本研究での 2-hydroxy-4-methylpentanoic acid は *Candida* 属自身により生成が認められたので、酵母菌種間の差異として興味ある結果である。なお、枝わかれオキシ酸に関しては、パン酵母による生成の報告がある。³³⁾ *S. cerevisiae* からは味噌酵母で検出されなかった *n*-hexanoic, *n*-octanoic, *n*-decanoic acid の生成が認められ、なかでも *n*-octanoic acid の生成割合は acetic acid について高かった。さらに、*C. versatilis* により benzoic, phenylacetic acid の生成も認められた。両化合物は既に味噌香気成分^{8,23)}として報告されており、また、benzoic acid と

Table 3. Volatile organic acids in fermented broth.

Peak no.				Compound(<i>n</i> -butyl ester)	GC-MS	Peak area % ^e on 20% Silicone DC-550			
DC ^a	OV ^b	PEG(1) ^c	PEG(2) ^d			<i>Z. rouxii</i>	<i>C. versatilis</i>	<i>C. etchellsii</i>	<i>S. cerevisiae</i>
1	1	1	1	Acetate	+	76.11	68.12	25.95	46.93
2	2			Propionate	+	2.26	0.72	0.29	1.84
3	3			Isobutyrate	+	12.85	6.90	8.06	11.48
4	4	2	2	<i>n</i> -Butyrate	+	1.59	0.32	0.34	1.26
5	5	3	3	2-Methylbutanoate	+	5.50	10.34	32.38	4.82
5	5	4	4	Isovalerate	+				
6	6	6	6	2-Oxo-3-methylbutanoate	+		0.66	0.29	
6	6	9	9	2-Hydroxy-3-methylbutanoate	+				
7	7	5	5	<i>n</i> -Hexanoate	+				7.45
8	8	7	7	2-Oxo-3-methylpentanoate	+		3.30	4.94	
8	8	8	8	2-Oxo-4-methylpentanoate	+				
9	8	11	11	2-Hydroxy-3-methylpentanoate ^g			2.35	14.30	
9	8	12	12	2-Hydroxy-4-methylpentanoate	+				
10	9	10	10	<i>n</i> -Octanoate	+				18.04
11	10	14	14	Benzoate	+		0.09		
12	11	15	15	Phenylacetate	+		1.06		
13	12	13	13	<i>n</i> -Decanoate	+				4.20
				unknown		1.69	6.14	13.45	3.98
Total area ^h						2964	13002	4775	1907

^a on 20% Silicone DC-550. see Fig. 3(left).^b on 1.5% Silicone OV-17. see Fig. 3(right).^c on 5% PEG-20M-P. see Fig. 4(left).^d on PEG-20M Glass SCOT. see Fig. 4(right).^e relative area % to total area except solvent and dibutyl ether.^f positive to authentic compound.^g tentatively identified.^h Disc integrater unit.

phenylacetic acid はそれぞれ、醤油産膜性酵母³⁴⁾や *Saccharomyces rouxii*³⁵⁾ によるフェニルアラニンの代謝産物としても報告されている。著者もまた、フェニルアラニンを単独窒素源にした場合、*Z. rouxii* と *C. versatilis* により benzoic acid と phenylacetic acid が生成されることを認めている。²⁷⁾

供試酵母により生成が確認された揮発性酸の大部分が acetic acid で約26%~76%を占め、ついで量的に多かったのが, isobutyric, 2-methylbutanoic, isovaleric acid などであった。松本・今井³⁶⁾は本研究に供試した *Z. rouxii* と同系統の *Z. rouxii* S 96, *Z. rouxii* Y 712 を使用して、味噌への添加実験を行い, acetic acid の増加を認めている。

以上の結果から、合成培地を使用して味噌酵母により、味噌香気成分である炭素数2~5の直鎖および枝わかれの揮発性酸、さらに benzoic acid と phenylacetic acid の生成が認められたので、味噌中でのこれらの揮発性酸の生成に対する味噌酵母の関与が推察され

た。また、味噌後熟型酵母 *Candida* 属により炭素数5, 6の枝わかれオキソ酸やヒドロキシ酸の生成が認められたことは、味噌主要酵母である *Z. rouxii* や非耐塩性酵母である清酒酵母との大きな差異であった。

要 約

合成培地を使用して、耐塩性味噌酵母および清酒酵母により生成される揮発性酸について検討した。

合成培地はグルコース(2%), 大豆のアミノ酸組成に基づく18種類のアミノ酸混合物(窒素として0.04%), 食塩(12.5%), ビタミン類, 無機塩類, pH4.5よりなり、供試酵母として赤色辛口味噌より分離された耐塩性の *Z. rouxii* S 84, *C. versatilis* D-5, *C. etchellsii* F-8 の3株を使用した。また、非耐塩性の清酒酵母 *S. cerevisiae* RIB 6002(協会7号)を用い、前述の培地組成のうち食塩を含まない培地について検討した。これらの酵母が、炭素源であるグルコースをほぼ完全に消費しつくす時期まで 30°C で静置培養を行った。

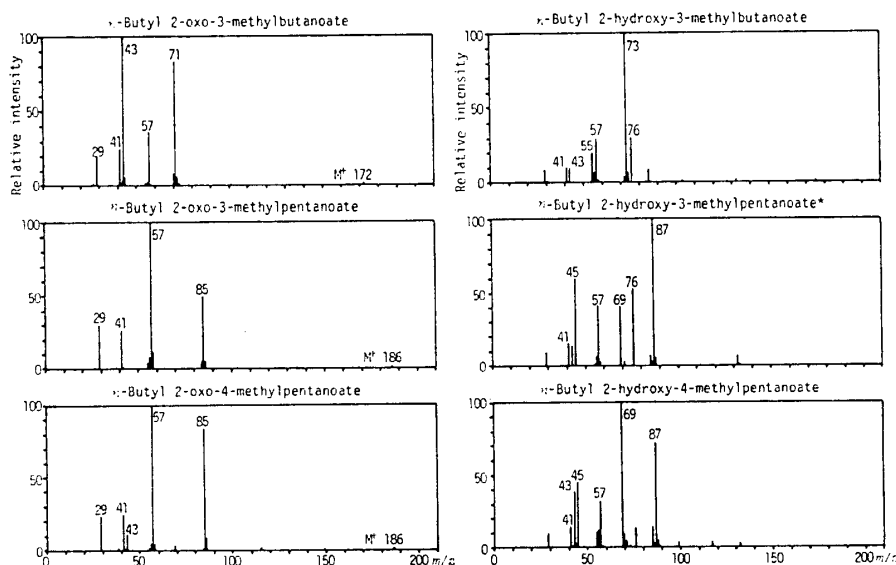


Fig. 5. Mass spectra of oxo carboxylic acids and hydroxy carboxylic acids identified in fermented broth.

GC-MS-COM: Instrument: Hitachi M-5201-Hitachi M-60-Hitachi 002B-8DK.

Conditions:

Column: PEG-20M, 0.3 mm i. d. \times 20 m, Glass SCOT.

Column temp.: 60°C-(3°C/min)-170°C. Injection temp.: 250°C.

Interface temp.: 220°C. Carrier gas: He, 0.4 kg/cm².

Split ratio: 1/20. Ionization: EI.

Ionization electron energy: 20 eV. Ion source temp.: 180°C.

* Tentatively identified.

培養液は pH 2 で減圧蒸留を行い、得られた蒸留液は pH 10 で濃縮後、常法により揮発性酸区分を調製した。揮発性酸の同定は揮発性酸の *n*-ブチルエステル化したものについて、ガスクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー・質量分析法により行った。

その結果、供試酵母に共通して生成が認められた揮発性酸は、acetic, propionic, isobutyric, *n*-butyric, 2-methylbutanoic, isovaleric acid であった。さらに、*C. versatilis* D-5, *C. etchellsii* F-8 の両株からは 2-oxo-3-methylbutanoic, 2-oxo-3-methylpentanoic, 2-oxo-4-methylpentanoic, 2-hydroxy-3-methylbutanoic, 2-hydroxy-4-methylpentanoic acid の生成を認めた。また、2-hydroxy-3-methylpentanoic acid の生成も推定した。さらに、*C. versatilis* D-5 により benzoic acid と phenylacetic acid, 清酒酵母により *n*-hexanoic, *n*-octanoic, *n*-decanoic acid の生成も認められた。

揮発性酸量は培養液の減圧蒸留液についてアルカリ滴定により培養液 100 ml 中の酢酸として求めたが、それは *C. versatilis* D-5 が 27.0 mg, *C. etchellsii* F-8 が 11.7 mg, *Z. rouxii* S 84 が 2.5 mg, 清酒酵母が 1.6 mg であった。*C. versatilis* D-5 の揮発性酸量は

酢酸として培養期間中に消費されたグルコースの約 2 % に相当した。揮発性酸の大部分が acetic acid で約 26%~76% を占め、ついで量的に多かったのが, isobutyric, 2-methylbutanoic, isovaleric acid などであった。

以上の結果から、味噌の香気成分として報告されている炭素数 2~5 の直鎖および枝わかれの揮発性酸や benzoic, phenylacetic acid の生成に対する耐塩性味噌酵母群の関与を考察した。また、炭素数 5, 6 の枝わかれのオキソ酸やヒドロキシ酸, benzoic, phenylacetic acid, 炭素数 6, 8, 10 の直鎖の揮発性酸などの生成に対して、供試酵母間の差異を認めた。

本研究の遂行にあたり、供試菌株の分譲とご指導をいただきました新潟県食品研究所・今井誠一、松本伊左尾の両氏ならびに終始ご指導をいただきました新潟大学農学部内山武夫助教授に深謝致します。

本報告の概要は日本醸酵学会大会(1981.11.大阪)にて発表した。

文 献

- 1) 本間伸夫：醸協, 57, 111 (1962).
- 2) 本間伸夫, 今井誠一：醸工, 43, 18 (1965).
- 3) 望月 務：醸工, 40, 16 (1962).
- 4) 望月 務：醸工, 40, 21 (1962).

- 5) 本間伸夫, 今井誠一: 醸工, **43**, 102 (1965).
- 6) 安平仁美, 望月 務: 信州味噌研報, **10**, 19 (1969).
- 7) 本間伸夫, 石原和夫: 醸酵工学, **56**, 199 (1978).
- 8) 本間伸夫: 日本化学会第46秋季年会 (含連合討論会) 予稿集 p. 1049 (1982).
- 9) 安平仁美, 武居正泰, 大内一朗, 望月 務: 信州味噌研報, **9**, 25 (1968).
- 10) 森 隆, 木内 幹, 海老根英雄: 日本食品工業学会大会要旨集, p. 22 (1980).
- 11) 好井久雄: 醸協, **61**, 883 (1966).
- 12) 石原和夫, 本間伸夫: 県立新潟女子短大紀, **20**, 105 (1983).
- 13) 松本伊左尾, 今井誠一: 日食工誌, **11**, 513 (1973).
- 14) 今井誠一, 松本伊左尾: 醸協, **70**, 413, 893 (1975).
- 15) 科学技術庁資源調査会編: 日本食品アミノ酸組成表, p. 21, 大蔵省印刷局, 東京 (1966).
- 16) 山下市二, 田村太郎, 吉川誠次, 鈴木重治: 分析化学, **22**, 1334 (1973).
- 17) 船久保英一: 有機化合物確認法 (I), p. 149, 養賢堂, 東京 (1967).
- 18) 豊沢 誠, 米崎治男, 上田隆蔵, 林田正典: 醸工, **38**, 342 (1960).
- 19) 豊島治男, 上田隆蔵: 醸工, **37**, 431, 436 (1959).
- 20) 豊島治男, 上田隆蔵, 望月 務: 信州味噌研報, **3**, 1 (1961).
- 21) 柴崎一雄, 後藤美代子: 醸協, **59**, 509 (1964).
- 22) 本間伸夫, 石原和夫: 日本醸酵工学会大会要旨集, p. 145 (1981).
- 23) 日本醸造協会編: 新版醸造成分一覽, 日本醸造協会, 東京 (1977).
- 24) 伊藤 寛, 海老根英雄, 竹内康子: 味噌の科学と技術, **208**, 20 (1971).
- 25) 岩渕せつ子, 柴崎一雄: 日食工誌, **20**, 48 (1973).
- 26) 安平仁美, 望月 務: 信州味噌研報, **18**, 23 (1977).
- 27) 石原和夫, 本間伸夫: 日本醸酵工学会大会要旨集, p. 49 (1984).
- 28) The Mass Spectrometry Data Centre, The Royal Society of Chemistry: *Eight Peak Index of Mass Spectra, Essential Data From 66720 Mass Spectra*, 3rd Ed., Vol. 1, Part 1, p. 139, The University, Nottingham, The Royal Society of Chemistry, NG 7 2RD, UK. (1983).
- 29) 藤巻正生, 荒井綜一: 食の科学, **29**, 56 (1976).
- 30) 山本 淳: 農化, **35**, 619, 711 (1961).
- 31) 植村定治郎: 農化, **15**, 353 (1939).
- 32) 鈴木昌治, 米山 平, 小泉武夫: 醸酵工学, **60**, 19 (1982).
- 33) Suomalainen, H., Keränen, A. J. A.: *J. Inst. Brew.*, **73**, 477 (1967).
- 34) 今原廣次, 中浜敏雄: 醸工, **46**, 876 (1968).
- 35) Yuasa, K., Ishizuka, K., Kaburaki, S., Sakasai, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1679 (1976).
- 36) 松本伊左尾, 今井誠一: 醸協, **69**, 590 (1974).

(昭60. 2. 27受付)