

[J. Ferment. Technol., Vol. 48, No. 1, p. 22~28, 1970]

酵母のメチオニン代謝

(I) メチオノールの生成

林部 正也・河東田茂義・大和田 拓
吉田 弘・片寄 篤子・寺島 豊明

(山形大学農学部応用微生物学研究室)

Methionine Metabolism in Yeast

(I) Methionol Formation

Masaya Hayashibe, Shigeyoshi Katoda, Hiraki Owada,
Hiroshi Yoshida, Atsuko Katayose and Toyoaki Terashima(Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture,
Yamagata University, Tsuruoka-shi, Yamagata Prefecture)

γ -Methylmercaptopropyl alcohol (methionol), which has been considered as one of the flavor substances of Shoyu (soy sauce), was produced in a culture medium containing not only the yeast strains useful for Shoyu fermentation but other yeast strains when the medium contained methionine as the sole source of nitrogen (Table 1). Crystal $HgCl_2$ salt was isolated from the culture medium and identified as methionol (Fig. 2). The growth of yeast in a medium containing DL-methionine was slower and seemingly more adaptive than that in a medium containing casamino acid (Figs. 3, 4). As the results of some studies on the effect of subculture conditions (Fig. 5) and experiments with washed cell suspensions (Fig. 6), it was found that these yeast strains possessed a methionine utilizing system constitutively but that the slower growth was due to an inferior ability of the methionine utilization. The effects of aeration (Fig. 4), types of sugar, sugar concentrations, the proportion of sugar to methionine (Table 2), the temperature, and the initial pH on the culture were examined.

緒 言

γ -メチルメルカプトプロピルアルコールは、1936年赤堀によって、醤油香気成分の一つとして、醤油諸味より分離され、メチオノールと命名され、さらに合成によってその構造が確認された¹⁾。赤堀は希釈された状態においては、醤油に芳醇な香気を与え、醤油独特の香気成分であると述べ²⁾、一方、小幡らは醤油の悪臭の一原因をなすと指摘した³⁾。

メチオノールの生成経路について、赤堀らはフーゼル油生成と類似経路により、諸味中に含まれるメチオ

ニンより生成するであろうと推定したが⁴⁾、詳細な経路については報告をみない。近時フーゼル油の生成経路に関しては著しく研究が進み、対応するアミノ酸のみならず、アミノ酸生成の中間物質より生成する経路のあることも示されている⁵⁾。

著者らは、醤油醸造過程におけるメチオノール生成の動態を把握するとともに、その生成経路についても知見を得る目的で、酵母によるメチオノール生成について検討した。本報においては、醤油酵母を含む各種酵母のメチオノール生成能を検索し、2, 3の生成条件を検討した結果を述べる。

実験方法

1. 供試菌株 Table 1 に示した多くの酵母菌株を供試した。

2. 培地および培養方法 1 l 中に次の成分を含む合成培地を pH 5 に調整して供試した。グルコース 10 g, 窒素源, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.35 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.19 g, KCl 0.11 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg, thiamine-HCl 1 mg, pyridoxine-HCl 1 mg, nicotinic acid 1 mg, inositol 1 mg, Ca pantothenate 1 mg, biotin 0.01 mg, 窒素源としては前培養培地には, 主としてカザミノ酸 4 g, 本培養培地には, カザミノ酸 4 g または DL-メチオニン 3.2 g を用いた。保存培養より 1 白金耳を前培養培地に接種し, 30°C, 24 hr 静置培養したのち集菌洗浄し, 10^4 cells/ml となるように本培養培地に接種し, 30°C で, 静置または振とう培養を行なった。

3. 生菌懸濁液によるメチオノール生成 つぎに示す組成の反応液を 2~3 hr インキュベートし, 遠心上澄液についてメチオノールを定量した。グルコース 1,000 μ moles, L-メチオニン 100 μ moles, 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 ml, cells 200 mg wet wt., total vol. 8 ml. 細胞は振とう培養により取得し, 飢餓細胞は上記反応液より L-メチオニンを除いたもので, 1 hr インキュベートしたのち, 遠心洗浄して調製した。

4. 生育量 日立光電光度計 EPO-B 型を用い, $\text{OD}_{660\text{nm}}$ として表示した。

5. メチオノール定量 Horn⁶⁾ によるニトロプルシッドナトリウムを用いる方法により, DL-メチオニンについて作製した標準曲線から, 分子吸光を同一とみなしてメチオノールの μ moles 数を求めた。培地中のメチオノールは, Dowex 50 \times 8 H 型カラム (1 \times 5 cm) により残存メチオニンと分別した (Fig. 1)。

6. 還元糖定量 ジニトロサリチル酸法⁷⁾ による。

ラム (1 \times 5 cm) を通過させてメチオニンを吸着させ, 水洗いのち, 2N HCl でメチオニンを溶出した。1 例を Fig. 1 に示す。培養液を水蒸気蒸留して得たメチオノール含有液および培地中のメチオニンについて同様の操作を行なった場合の回収率は, それぞれ 102.1%, 101.2% であった。

2. 酵母によるメチオノール生成 醤油酵母を中心とし, 多くの酵母菌株について, メチオニンを単独窒素源とし, 食塩無添加培地で培養した場合の生育とメチオノール生成を検索した。結果の一部を Table 1 に示す。メチオノール生成率は添加した DL-メチオニンに対する百分率で示した。多くの属種にわたる多数の酵母によって, メチオニンが利用され, その結果としてメチオノールが蓄積した。醤油諸味中に存在する酵母については, 主醸酵母 *Saccharomyces rouxii*, 後熟酵母 *Torulopsis versatilis*, *T. etchellsii* などについても, またわれわれが醤油諸味中より, 茂木らの方法⁸⁾ によって分離した酵母群についてもメチオノールの蓄積が認められた。後熟酵母 *T. versatilis* は,

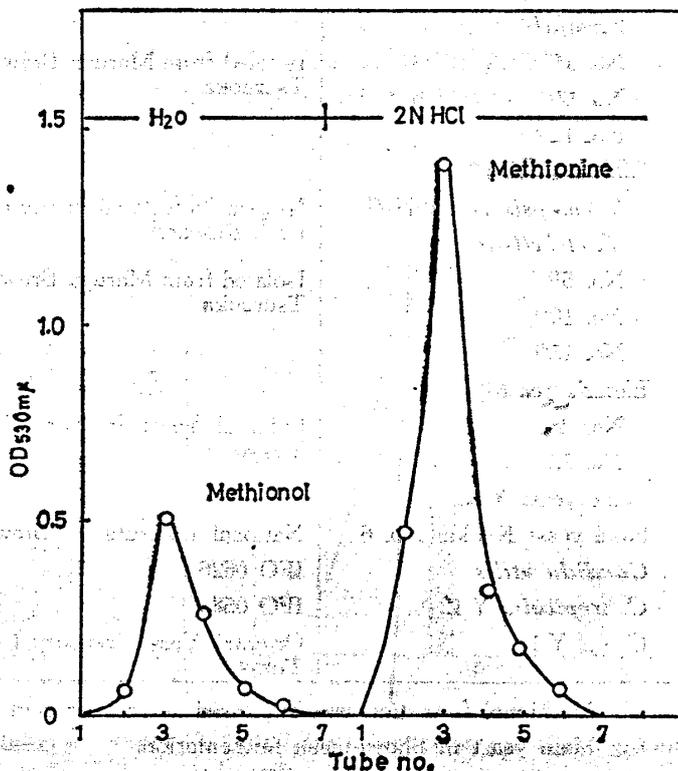


Fig. 1. Separation of methionol from methionine by Dowex 50 column.

Centrifuged culture fluid was charged on a Dowex 50 \times 8 (200-400 mesh) column (1 \times 5 cm). The column was washed with deionized water collecting each 5 ml effluent and determined by the method applying sodium nitroprusside⁶⁾. Then, methionine was eluted with 2N HCl and treated as above.

実験結果

1. 培養液中のメチオノールの定量 培養液中に生成蓄積したメチオノールと残存するメチオニンを分別するために, 遠心した培養液を Dowex 50 \times 8 H型カ

今井ら⁹⁾の報告と多少異なり, カザミノ酸, メチオニン
を窒素源とした供試培地においても, またこれに 0.1
%酵母エキスを添加した培地においても生育を認めず,
5% 食塩添加培地において生育をみた. *T. etchellsii*
は食塩無添加培地にも生育したが, 食塩添加時に生育
が良好となり, 0.1% 酵母エキス添加でさらに良好な
生育を示した. *T. versatilis* においては, 生育を示

さないにもかかわらず, 菌接種後数日で官能的にメチ
オノール生成を認めえた. メチオノール蓄積量には菌
株によって著しい差異が認められ, 極端な場合, メチ
オノールの生成が認められない場合もあった. 食塩存
在下では, 小幡らの指摘するように, 官能試験による
臭に差異が若干認められた¹⁰⁾.

Table 1. Methionine utilization and methionol formation by various yeast strains.

Pre-cultured yeast was inoculated to give the initial concentration of 10^4 cells/ml in a synthetic medium containing DL-methionine as sole source of nitrogen. Cultures were carried out at 30°C for a period of indicated time. Methionol was determined by the method described by Horn *et al.*⁶⁾ with the effluent which was obtained by passing the culture filtrate through Dowex 50 column as shown in Fig. 1.

Strain	Source	Culture time (days)	Growth (OD _{660nm})	Methionol formed (%) ^{a)}
Shoyu yeast ^{b)}				
No. 1007	Japan Shoyu Research Institute	6	0.59	2.8
No. 4016		5	0.54	15.7
<i>Zygosaccharomyces major</i> ^{d)}		6	0.65	5.8
<i>Z. soja</i> ^{d)}		5	0.67	0
No. 1 ^{e)}	Isolated from Maruya Brewery, Tsuruoka	6	0.61	18.0
No. 6 ^{e)}		6	0.63	23.1
No. 12 ^{e)}		6	0.66	4.7
Ripening yeast ^{e)}				
<i>Torulopsis versatilis</i> ^{f)}	Niigata Prefectural Institute for Food Research	9	—	+
<i>T. etchellsii</i> ^{f)}		9	0.20	2.7
No. 5 ^{e)}	Isolated from Maruya Brewery, Tsuruoka	6	0.71	10.5
No. 10 ^{e)}		6	0.57	2.4
No. 15 ^{e)}		6	0.44	15.3
Baker's yeast				
No. 28	Oriental Yeast Industry Co., Tokyo	3	0.67	12.5
No. 35		3	0.45	15.3
Wine yeast Y 35		3	0.40	17.8
Saké yeast Kyokai No. 6	National Institute for Brewing	3	0.55	14.0
<i>Candida utilis</i>	IFO 0626	3	0.13	3.2
<i>C. tropicalis</i> Y 12	IFO 0589	3	0.39	15.3
<i>C. sp.</i> Y 13	Oriental Yeast Industry Co., Tokyo	3	0.70	19.9

a) Methionol formation was expressed as the per cent of added DL-methionine.

b) Main yeast in Shoyu-mash fermentation.

c) These yeasts play an important role in the ripening stage of Shoyu-mash fermentation.

d) These names were based upon a customary usage.

e) These yeasts were isolated from Shoyu-mashes by the method described by Mogi *et al.*⁸⁾ based on the ability of utilization of maltose.

f) *T. versatilis* did not grow in the medium indicated in the text containing either DL-methionine or casamino acid as nitrogen source even when 0.1% of yeast extract was added to the medium. The growth of this strain was supported in the presence of NaCl and yeast extract. The growth of *T. etchellsii* was also better in the medium containing NaCl and yeast extract.

3. メチオノールの同定 パン酵母 No. 28, No. 35, *Candida tropicalis* Y12 の 3 株を, メチオニン含有培地に 30°C, 72 hr 静置培養し, その培養液より, 赤堀の方法に準じて Fig. 2 のように処理し, メチオノールを昇汞複塩として結晶に得た⁹⁾. 融点は, No. 28 127°C, No. 35 127°C, Y12 124°C, Y12+

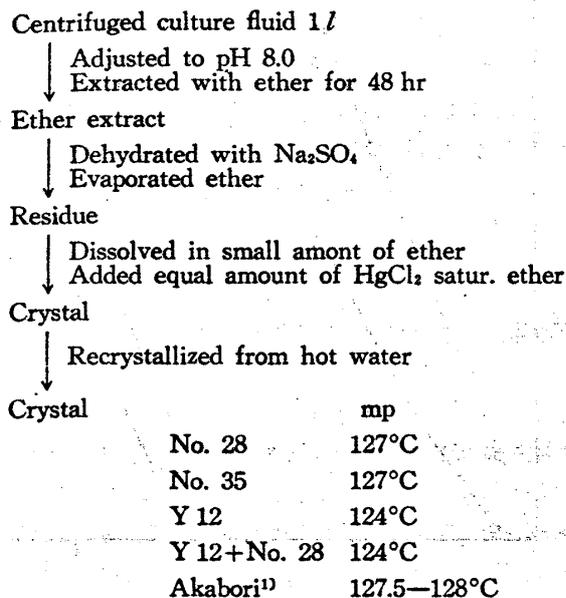


Fig. 2. Isolation of methionol from culture fluid.

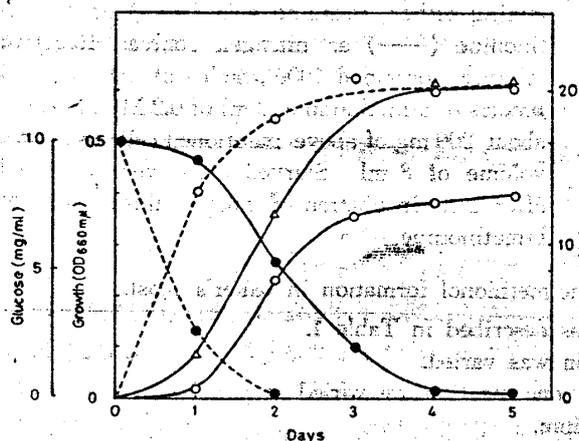


Fig. 3. Course of methionol formation in baker's yeast.

Baker's yeast strain No. 28 was cultured statically at 30°C in the medium containing either casamino acid (---) or DL-methionine (—) as nitrogen source.

- growth; ● glucose consumption;
- △ methionol formation.

No. 28 124°C であった。(赤堀記載 127.5—128°C). 融点も一致し, また IR スペクトルの結果からもメチオノールと同定された. なお *C. sp.* Y13 株については, 前記方法による定量値はメチオノールの多量生成を示したが, Fig. 2 の操作で結晶としては得られず, また培養液の臭から判断してもメチオノール以外の物質が生成しているものと思われる.

4. メチオノール生成の培養経過 メチオニン, カザミノ酸をそれぞれ単独窒素源とした培地 (メチオニン培地, カザミノ酸培地) での培養経過を比較した. Fig. 3, 4 に示されるように, メチオニン培地での生育は, 静置培養においても, 振とう培養においても, カザミノ酸培地にくらべて生育開始が遅れ, かつまた生育速度, 生育量のいずれも低かった. 糖消費もメチオニン培地では遅れがみられたが, メチオノール生成は生育とほぼ並行して行なわれた. 振とう培養の場合のメチオノール生成量は, 静置培養に比較して, 一般フーゼル油生成の場合と同じく高かった⁹⁾. つぎに, 前培養培地として, カザミノ酸・メチオニン培地の両者を用い, それぞれカザミノ酸・メチオニン培地の両者について本培養を行なった. 結果を Fig. 5 に示す. この場合にも Fig. 3, 4 の場合と全く同様の経過で生育が行なわれ, 前培養の効果を認めなかった.

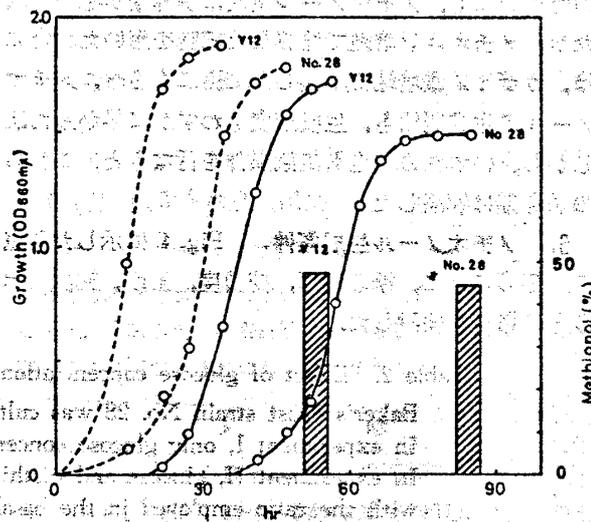


Fig. 4. Methionol formation in shaking culture of yeast.

Baker's yeast strain No. 28 and *C. tropicalis* Y12 were cultured with shaking. Symbols were same as in Fig. 3. The hatched columns indicate the methionol formation at indicated time.

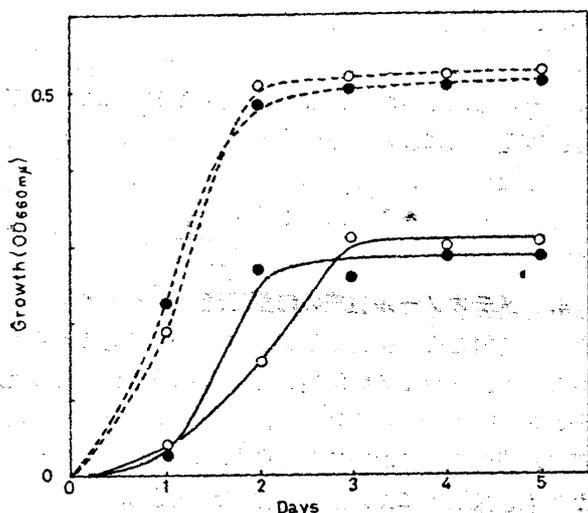


Fig. 5. Influence of subculture on the growth of baker's yeast in the medium containing methionine as nitrogen source. Growth in the medium containing casamino acid (---) or DL-methionine (—) as nitrogen source. Subcultures were performed in casamino acid (●) or DL-methionine (○) containing medium.

5. 生菌懸濁液によるメチオノール生成 カザミノ酸・メチオニン培地で振とう培養した細胞によるメチオノール生成を Fig. 6 に示す。いずれの細胞を用いた場合にも、メチオノール生成に誘導期が認められたが、メチオニン培地で培養した細胞を用いた場合には、カザミノ酸培地で培養した細胞にくらべ、メチオノールの生成開始も、生成速度もわずかに早かった。しかし、いずれの細胞も飢餓操作を行なうと、これらの誘導期は解消した。

6. メチオノール生成条件 Fig. 4 に示した通気の影響のほか、糖の種類、糖濃度、温度、初発 pH などの影響を検討した。

C. tropicalis Y 12, パン酵母 No. 35 について糖の種類の影響を検索した。いずれの菌株についても、グルコース、フラクトース、マンノース、シュクロースは同程度に利用された。パン酵母はマルトース、ガラクトースをもよく利用し、メチオノール生成量も比較的高かった。Y 12 ではマルトース、ガラクトース

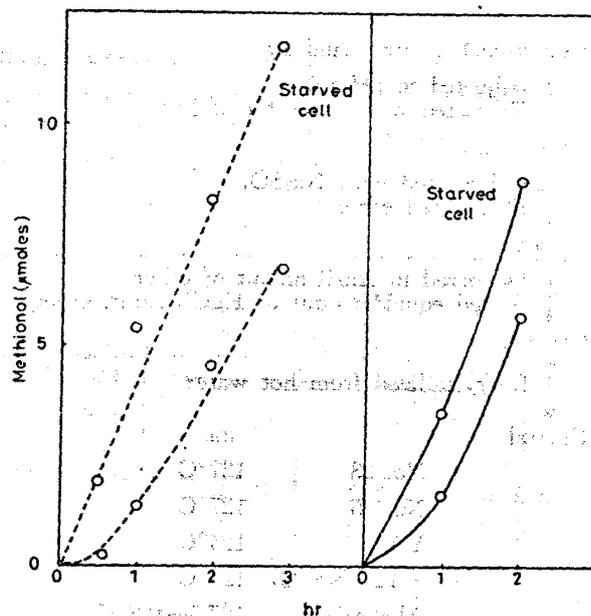


Fig. 6. Methionol formation by washed cell suspension of baker's yeast.

Baker's yeast strain No. 28 was cultured with shaking at 30°C for 24 hr in the medium containing either casamino acid (---) or DL-methionine (—) as nitrogen source. Reaction mixture contained 1000 μmoles of glucose, 100 μmoles of L-methionine, 2 ml of 0.2 M NaH₂PO₄, about 200 mg of above mentioned cells in a total volume of 8 ml. Starved cells were obtained after 1 hr incubation of above mixture except L-methionine.

Table 2. Effect of glucose concentration on the methionol formation in baker's yeast.

Baker's yeast strain No. 28 was cultured as described in Table 1.

In experiment I, only glucose concentration was varied.

In experiment II, glucose and methionine concentration was varied in parallel with the ratio employed in the basal medium.

Conc. of glucose (%)	Experiment I		Experiment II	
	Growth (OD _{660mμ})	Methionol (%) ^{a)}	Growth (OD _{660mμ})	Methionol (%) ^{a)}
0.5	0.18	9.0	0.19	3.4
1.0	0.24	14.3	0.27	15.2
2.0	0.36	19.4	0.48	29.9
3.0	0.36	22.6	0.49	30.1
4.0	0.51	22.1	0.52	30.0

a) Methionol formation was expressed as the per cent of added DL-methionine.

のほかキシロース, アラビノースも利用したが, メチオノール生成率は低かった。

上記両菌株について糖濃度の影響を検討した。糖濃度のみを変化させた場合, グルコース濃度 3% までは, メチオノール生成量が増加した。糖とメチオニンの添加比を基礎培地の添加比と同一になるようにして, 両者をともに増加させた場合も, ほぼ同様な傾向を示した。パン酵母について得られた結果を Table 2 に示す。

いずれの菌株についても, 培養温度が 25°C, 30°C, 35°C の場合, メチオノール生成量に大差はなく, 40°C では著しく生成量が低下した。初発 pH は 4, 5, 6 がメチオノール生成に好条件であった。

考 察

酵母によるメチオニン利用については多くの報告がある。まず, メチオニンを窒素源として利用して生育するほかに¹¹⁾, 増殖に対する阻害作用¹²⁾, 菌体内にメチオニンをとりこみ S-アデノシルメチオニンを蓄積すること¹³⁻¹⁵⁾, また窒素源として利用した場合細胞形に変化を与えることなど^{16, 17)}が述べられている。また微生物によるメチオニンの代謝生産物についても, 萩野ら¹⁸⁾は放線菌による γ -メチルメルカプトプロピルアミンの生成を報じ, 小幡らは酵母によるメチオノールの生成を推定した⁹⁾。後者の場合には官能試験のみで生成物の同定は行なわれていない。Table 1, Fig. 2 に示した結果は, 多くの酵母が窒素源としてメチオニンをよく利用できるほか, 菌株によっては, 培地にメチオノールを多量に蓄積することを示し, またメチオノール以外の生成物の存在の可能性をも示した。菌株によるメチオノール生成量の差異の原因については現在明らかにしていない。またメチオニンの利用は多くの酵母については L 型に限られ, D 型を利用できるものは少数に限られた。D 型の利用に関しては別報する。

一方, Fig. 3, 4 に示した結果から, メチオニン利用が一見適応的に行なわれるように思われる。しかし, 前培養の組合せ実験 (Fig. 5), 生菌懸濁液による実験 (Fig. 6) の結果から, メチオニン培地で生育が劣るのは, その利用能力が低いことによると判断される。事実, メチオニンをアミノ供与体とするトランスアミナーゼが構成的に存在することを認めている (未発表)。

醤油醸造過程には, 大別して初期雑酵母, 中期醤油酵母, 後期熟成酵母が関与し, 複雑な経過をとることが指摘されている。Table 1 に示した結果は, 醤油酵母, 後熟酵母のいずれもが, メチオノール生成の可能

性をもつことを示唆する。しかし, 醸造過程のいずれの時期に, いずれの酵母がメチオノール生成に関与しているかは明らかではない。また, 主醸酵醤油酵母については, メチオノール生成能に著しい差異が認められたが, 実際の醤油の品質との関係も明らかでない。さらにまた, 高濃度の食塩存在下に行なわれる醸酵過程は, 香気の生成に関しても異なる様相を呈することが指摘されており¹⁰⁾, 高濃度食塩の影響を含め, 醤油醸造過程におけるメチオノール生成の動態については今後の課題である。

総 括

醤油の香気成分の 1 つとみなされる γ -メチルメルカプトプロピルアルコール (メチオノール) の酵母による生成を検討した。

1. メチオノールは, 醤油醸造過程において, 主醸酵・熟成過程に主要な役割を占める酵母を含め, 多くの酵母を, メチオニンを窒素源とする培地に培養した場合に, 著量に生成された。

2. 培養液より, メチオノールを昇汞複塩として分離・同定した。

3. メチオニンを窒素源とする培地での酵母の生育は, カザミノ酸を窒素源とする培地での生育にくらべて, 一見適応的であり, かつ生育速度もゆるやかであるが, 前培養条件の検討, 生菌懸濁液による実験によって, メチオニン利用系は構成的に存在し, メチオニン利用能が劣ることによって上記様相を呈することを示した。

4. メチオノール生成に及ぼす通気効果・糖の種類・糖濃度・窒素源濃度・温度・初発 pH の影響を検索した。

貴重な菌株を御恵与下さいました新潟県食品研究所今井誠一氏, 諸味の採取を御許可下さいました鶴岡市大山丸谷醸造場に深甚なる感謝の意を表します。

文 献

- 1) 赤堀, 金子: 日化, **57**, 832 (1936).
- 2) 赤堀, 金子: 日化, **58**, 236 (1937).
- 3) 小幡, 山西: 農化, **24**, 226 (1950/51).
- 4) 小幡, 山西: 農化, **24**, 334 (1950/51).
- 5) Webb, A. D., Ingraham, J. L.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **5**, 317 (1963).
- 6) Horn, M. J., Jones, D. B., Blum, A. E.: *J. Biol. Chem.*, **166**, 313 (1946).
- 7) Sumner, J. B.: *J. Biol. Chem.*, **47**, 5 (1921), **65**, 393 (1925).

- 8) 茂木, 茂木: 農化, **42**, 466 (1968).
- 9) 今井, 早坂: 農化44年大会要旨, p. 248.
- 10) 小幡, 坂村, 山西: 農化, **25**, 8 (1951/52).
- 11) Kuraishi, H.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **12**, 103 (1966).
- 12) Takahashi, T., Fujii, Y., Takahashi, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 73 (1967).
- 13) Schlenk, F., DePalma, R. E.: *J. Biol. Chem.*, **229**, 1037 (1957).
- 14) 倉石, 植村: *Amino Acids*, **4**, 95 (1961).
- 15) Takahashi, T., Fujii, Y., Takahashi, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 664 (1967).
- 16) SentheShanmuganathan, S., Nickerson, W. J.: *J. Gen. Microbiol.*, **27**, 437 (1962).
- 17) Brown, C. M., Hough, J. S.: *Nature*, **206**, 676 (1965).
- 18) Hagino, H., Nakayama, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 1367 (1967).

(昭 44. 8. 19 受付)