アナログアミノ酸耐性酵母による香気成分生成能と醤油の試醸

久寿米木一裕・出永直樹・吉田秀恵

(ヤマエ食品工業株式会社)

平成9年2月21日受理

Aroma Formation by *Shoyu* Yeast Mutants Resistant to Amino Acid Analogues

Kazuhiro KUSUMEGI, Naoki IDENAGA, Hidetugu YOSHIDA

(Yamae Shokuhin Co. Ltd., 3646 Nishimachi, Miyakonojo-shi, Miyazaki 885 Japan)

To improve top note of *shoyu* (soy sauce) flavor, we investigated mechanisms of larger production of aroma components by *Zygosaccharomyces rouxii* mutants resistant to amino acid analogues and examined *shoyu* making by them. Three mutants were obtained by 2 or 3 step treatments with etidium bromide and growth on the media containing amino acid analogues. The mutants, grown in the *Shoyu*-medium containing 0.17% total nitrogen, 10% NaCl, and 10% glucose, formed 1.7 to 2.1 times as high concentration of isoamyl alcohol as the parental strain. But, when grown in the same medium with 1.0% total nitrogen, they formed 30% to 40% lower concentrations of aroma components. In either medium grown with the parental strain or its mutants, acetate esters of higher alcohols were not detected. And the mutants, especially strain RBMK-212, showed smaller amounts of amino acid uptake than the parental strain. We think that strain RBMK-212 would be released from feed-back inhibition or repression in amino acid biosynthetic pathway, resulting in formation of a large quantity of higher alcohols comparing with the parental strain. In a *Shoyu* making experiment, each *kiage-shoyu* (raw soy sauce) made by using the 3 mutants individually, was found to contain higher concentrations of 5 higher alcohols than that by the parental strain. *Kiage-shoyu* made by strain RBMK-212 contained the highest concentrations (22 mg per 1 isobutyl, 45 isoamyl and 14.8 β -phenethyl alcohols), and its flavor was evaluated preferable in the sensory test.

Key words : アナログ耐性酵母, 高級アルコール生成能, 醤油

緒 言

醤油の香気成分として数百種の存在が認められる¹⁾中で、発酵過程において主として微生物の作用によって生成される一群の香気成分は醤油の風味形成に重要な役割を果たしている。特に、耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* によって生成される高級アルコール類は醤油の特徴香を表わす香気成分とは言えないが、その香り立ちに寄与する重要な成分であると考えられ

る。

さて、アナログアミノ酸耐性を利用した醸造酵母の香気改良に関する研究は清酒関連を中心に既に報告^{2,3)}があり、*Z. rouxii* においても味噌、醤油への有効利用が示唆されてきた^{4~8)}。著者らは先に、複数のアナログアミノ酸に対する耐性変異株を取得し、これを用いて味噌を試醸し⁹⁾、複数の高級アルコールの生成量が高く、香気に特徴のある味噌を作出した。しかし、これらの変異株のアナログ耐性機構およびその香

Table 1 Amino acid analogues used for obtaining mutants

Parental strain, *Zygosaccharomyces rouxii* RB-1 was treated stepwisely with ethidium bromide, and aquired prorerities of resistance to amino acid analogue. Strain RBMK-11 and RBMK-32 were selected after the second step treatment. Strain RBMK-212 was selected after the third step treatment.

Mutant strain	Amino acid Analogues		
	First step treatment	Second step treatment	Third step treatment
RBMK-11	L-canavanin(300mg/l) plus 5, 5, 5-trifluoro- DL-leucine(300mg/l)	5, 5, 5-trifluoro- DL-leucine(800mg/l)	
RBMK-212	L-canavanine(400mg/l)	5, 5, 5-trifluoro- DL-leucine(400mg/l)	p-fluoro-DL-phenylalanine (500mg/l)
RBMK-32	5, 5, 5-trifluoro- DL-leucine(400mg/l)	p-fluoro-DL-phenylalanine (500mg/l)	

気生成能に及ぼす培地のグルコース、窒素およびアミノ酸の濃度などの影響については未検討である。そこで、本研究においては、取得した変異株の香気生成特性を調べ、醤油醸造試験により、変異株の醸造特性について調べるとともに醤油の香気改善について検討した。

実 験 方 法

1. 供試菌株

自社保存菌株である耐塩性酵母 *Z. rouxii* RB-1 株から取得したアナログアミノ酸耐性株 RBMK⁹⁾ を供試した (Table 1)。

2. 供試培地および培養方法

仕込後 4 週間経過の工場の醤油諸味から採取した液汁 (総窒素 1.68%, 食塩 17.3%, グルコース 9.0%) に必要に応じて食塩およびグルコースを補てんして調製した醤油培地 A (I, II) および B (I, II) (pH 5.3 に調整後, 95°C—15 分殺菌) を用いた。その成分値を Table 2 に、また培地 A (II), B (II) のアミノ酸分析値を Table 3 にそれぞれ示した。また、培地 A (II) にアミノ酸としてロイシン, パリン, フェニルアラニンおよびチロシンをそれぞれ単独で 10 mM 添加した培地 (以下, アミノ酸添加培地) を

Table 2 Components of the *shoyu* medium A (I), A(II) and B(I), B(II)

These *shoyu* media composed of liquid part of the 29th day *shoyu moromi* added with glucose and/or NaCl, if necessary.

Component	A		B	
	(I)	(II)	(I)	(II)
Total nitrogen(%)	0.17	0.17	1.01	1.01
NaCl(%)	10.0	10.0	10.2	10.2
Glucose(%)	2.0	10.0	5.4	10.0

用いて、アナログ耐性株の変異の様子を検討した。培養は 300 ml 容三角フラスコにある培地 200 ml に酵母を 1 白金耳接種後, 30°C—10 日間静置する方法によった。

3. 香気成分分析

培養液に内部標準としてノルマルアミルアルコールを 100 mg/ℓ 添加した後, 酢酸メチルによって香気成分を抽出¹⁰⁾した。ついで, 抽出液 2 μℓ をキャピラリーガスクロマトグラフィー (島津 GC-17A, カラム J & W 製 DB-WAX, 30 m×0.32 mm, 膜厚 0.5 μm) により, 昇温法 (初期温度 50°C—5 分保持, 5°C/分, 最終温度 220°C), キャリアガス He 1.7 ml/分, メイ

Table 3 Free amino acids contents of *shoyu* medium A(II) and *shoyu* B(II)

Amino acid	mg/l	
	Medium A(II)	Medium B(II)
A s p	5 3 6	3 0 3 2
T h r	3 8 5	1 8 2 8
S e r	4 1 0	2 2 3 4
G l u	9 7 0	4 4 4 6
G l y	2 2 4	1 1 5 5
A l a	3 5 4	2 0 0 3
V a l	3 9 9	2 1 6 1
M e t	1 0 3	7 5 8
I l e	3 9 2	2 1 4 5
L e u	6 0 0	3 2 9 4
T y r	2 5 3	1 3 4 5
P h e	4 6 0	2 5 5 1
L y s	4 6 6	2 4 1 1
H i s	1 9 1	8 7 2
A r g	5 5 8	2 7 0 4
P r o	3 8 0	2 2 3 1
NH ₃	1 4 6	8 4 5
Total	6 8 2 7	3 6 0 1 5

クアッパガス He 40 ml/分, スプリット比 1/10, 空気および水素ガス圧力約 0.5 kg/cm², 検出器 (FID) 温度 240°C の条件により香気成分を定量した。

4. アミノ酸分析

培養液を除菌濾過後, ニンヒドリン発色法によりアミノ酸分析装置(アト-MLC 203)を用いて測定した。スタンダードは 5 nM 濃度のアミノ酸混合標準液(和光純薬, H 型)を用いて作成し, 被検試料 1 ml を注入した。

5. 醤油の試験醸造

生産現場の醤油麹(脱脂大豆:α化小麦≒5:5, 3日麹) 2 kg に 30%塩水 2.6 l, 水 0.8 l を加えて諸味にして約 5 l を常法¹¹⁾に従って約 6 カ月間発酵熟成させた。酵母は諸味の pH が 5.3 に低下した時点で諸味 1 ml 当たり約 2×10^5 個添加した。熟成後の生醤油の一般成分および香気成分を分析するとともに, 社内の専門パネルにより醤油の香りについて官能検査を行った。醤油の一般分析はしょうゆ試験法¹²⁾によった。

実 験 結 果

1. 培地中のグルコースおよび総アミノ酸の濃度と香気成分生成能

親株 RB-1 および変異株 RBMK による香気成分としての高級アルコール生成能に及ぼすグルコースおよびアミノ酸濃度の影響を調べた (Table 4)。醤油培地 A (I) では一般に高級アルコール生成量レベルは低かったが, イソアミルアルコールに関してはすべての変異株が親株を上まわり, 約 1.1~1.4 倍の生成量を示した。アミノ酸含量の高い醤油培地 B (I) での高級アルコール生成は培地 A (I) に比べ全体的に高まり, 特に変異耐 RBMK-11 におけるイソブチルおよびイソアミルの各高級アルコールは顕著であった。ただ, 培地 B (I) でのグルコース濃度が培地 A (I) に比べ若干高いため, グルコースを基質とするアミノ酸合成経路からの高級アルコール生成の影響が考えられた。そこで, 培地 A (I) および B (I) にグルコースを補てんした培地 A (II) および B (II) における高級アルコール生成能を比較した結果, 培地 A (II) におけるエタノールおよび高級アルコール生成量は培地 A (I) に比べ顕著に高まった。特に, 変異株 RBMK-212, RBMK-32 のイソアミルアルコール生成量は親株の 1.7~2.1 倍に高まった。また, BMK-212 のイソブチルアルコールは親株の 1.5 倍の高生産性を示すなど, グルコース添加による変異株の高級アルコール生産性は親株以上に上昇した。しかし, 親株および変異株のグルコース添加培地における高級アルコール高生産性は, アミノ酸含量の高い培地 B (II) において低下した。すなわち, イソアミルアルコール生成量に関しては, 変異株が親株の 1.5~1.8 倍量を維持していたが, その他の高級アルコール生成能に関しては, RBMK-212 のイソブチルアルコールを除けば, 変異株と親株の間にはほとんど差異は認められなかった。また, β-フェネチルアルコール生成能に関しては変異株全般に顕著な改善は認められなかった。このように, 酵母, 特に変異株の高級アルコール生成能は培地のグルコース, アミノ酸の濃度によって著しく異なった。親株および変異株による高級アルコールの酢酸エステル生成能を調べた。酢酸 β-フェネチルについてのみ結果 (Table 4) を示したが, イソブチル, イソアミル及び β-フェネチルの各高級

Table 4 Influences of glucose and total amino acid concentrations on the production of aroma components by the yeasts

The yeasts were cultured statically in the *shoyu* medium for 10 days at 30°C.

Abbreviations : RB-1, parental strain ; RBMK-11, 212, 32, mutant strains ; n-PrOH, 1-Propanol ; i-BuOH, 2-Methyl-1-propanol ; n-BuOH, 1-Butanol ; i-AmOH, 3-Methyl-1-butanol ; β -PheOH, 2-Phenylethanol ; β -PheOAc, 2-Phenylethyl acetate

Medium	Yeast strain	Ethanol produced (W/V%)	Aroma components (mg/l)					
			n-PrOH	i-BuOH	n-BuOH	i-AmOH	β -PheOH	β -PheOAc
A(I)	RB-1	0.6	3.6	12.7	0	35.4	36.6	0
	RBMK-11	0.6	3.1	8.8	0	40.2	36.8	0
	RBMK-212	0.6	3.3	10.9	0	48.1	37.6	0
	RBMK-32	0.6	3.7	11.2	0	49.6	36.9	0
B(I)	RB-1	1.1	5.5	14.4	0	41.5	41.5	0
	RBMK-11	1.1	6.0	16.6	0	76.1	49.6	0
	RBMK-212	1.1	4.4	13.6	0	58.6	43.9	0
	RBMK-32	1.1	4.6	11.8	0	57.2	42.2	0
A(II)	RB-1	3.6	11.9	62.6	0	141.2	73.1	0
	RBMK-11	3.8	13.8	75.0	0	219.0	87.6	0
	RBMK-212	3.9	11.0	94.9	0	300.2	71.9	0
	RBMK-32	4.0	12.5	72.5	0	246.4	98.3	0
B(II)	RB-1	3.2	7.8	26.6	0	91.6	55.1	0
	RBMK-11	2.7	8.7	27.8	0	161.8	81.1	0
	RBMK-212	2.7	8.9	42.3	0	151.4	50.5	0
	RBMK-32	3.0	9.0	27.2	0	139.5	57.9	0

Table 5 Decreased amounts of amino acid in the medium after fermentation

Total* : Sum of the 16 kinds of amino and ammonia shown in Table 3.

Medium	Yeast strain	mg/l					
		Amino acid					Total *
		Val	Leu	Tyr	Phe	Arg	
A(II)	RB-1	123	273	106	195	67	1625
	RBMK-11	147	326	117	216	31	1601
	RBMK-212	131	275	108	196	23	1456
	RBMK-32	139	314	106	220	56	1598
B(II)	RB-1	114	212	-77	-219	-247	-172
	RBMK-11	142	154	-158	-324	0	-236
	RBMK-212	85	164	4	90	20	768
	RBMK-32	142	153	24	138	13	667

Fig.1 Influences of amino acid on the productivity of aroma components

Yeasts were cultured statically in *shoyu* medium A(II) added with 10 mM each of L-leucine(A), L-valine(B), L-phenylalanine(C) or L-tyrosine(D) for 10 days at 30°C. Abbreviations: The same as shown in Table 4.

Symbols: □, RB-1; ▨, RBMK-11; ▩, RBMK-212; ■, RBMK-32

アルコールの酢酸エステルはいずれの発酵液においても検出されなかった。

2. 発酵前後における培地中のアミノ酸含量比較

培地 A (II) および B (II) のアミノ酸含量の発酵後における減少量を Table 5 に示した。培地 A (II) における総アミノ酸減少量は親株が変異株よりやや多く、変異株 RBMK-212 は最も少なかった。トリフルオロロイシン、フルオロフェニルアラニンそれぞれアナログアミノ酸とするロイシン、フェニルアラニンの減少量は RBMK-11, RBMK-32 が他の菌株に比べやや多かった。バリンについては変異株が親株を、また、アルギニンについては親株が変異株をそ

れぞれ若干上まわる減少量を示した。

一方、培地 B (II) におけるアミノ酸減少量は培地 A (II) の場合とは著しく異なり、全体的に顕著に低下し、親株や RBMK-11 では発酵液中の総アミノ酸量は発酵前に比べ増大した。変異株におけるロイシンの、また RBMK-212 におけるバリンのそれぞれの減少量は少なく、親株や RBMK-11 における発酵液のフェニルアラニン、チロシンおよびアルギニン含量は発酵前に比べ増大する傾向を示した。

3. アミノ酸添加培地における香気成分生成能

アミノ酸添加培地における高級アルコール生成能を調べた (Fig.1)。ロイシンを添加した場合の RBMK のイソアミルアルコール生成能は顕著に高く、バリン添加では RBMK-212 におけるイソブチルおよびイソアミルの各高級アルコール生成能が高く、他の菌株を上まわった。フェニルアラニンおよびチロシン添加による β -フェネチルアルコールの生成能には変異株と親株の間に顕著な差異はなく、チロシン添加による β -フェネチルアルコール生成能への影響は認められなかった。アミノ酸添加培地における RBMK-212 のイソブチルおよびイソアミルの各高級アルコール生成能は、ロイシン添加の場合を除けば、変異株中最も高かった。

4. 醤油試醸試験結果

6 カ月熟成後の生揚醤油の一般成分値を Table 6 に示した。全窒素, pH, 色において試験区によって若干の差があり、親株および RBMK-11 はやや酸発酵が不足していることがうかがえたが、エタノール発酵 (Table 7) はほぼ同等のレベルにあることを認めた。熟成 3 カ月目の高級アルコール生成は RBMK-212 が顕著に高く、イソブチル、イソアミルおよび β -フェネチルの各高級アルコールは親株のそれぞれ 1.9, 3.7, 2.4 倍量に達した。また、他の変異株についてもイソアミル、 β -フェネチルの各高級アルコールの生成が高まった。6 カ月熟成醤油では、全般的に高級アルコール含量の減少傾向を認め、エタノールとともに蒸発による飛散があると推測された。しかし、RBMK-212 のイソブチル、イソアミルおよび β -フェネチルの各高級アルコール量は親株のそれぞれ 1.6, 3, 1.9 倍を保ち、RBMK-11 のイソアミルアルコールも親株の 2.3 倍量を示した。また、RBMK-32 についても RBMK-11 同様親株より高い高級アルコール生成

Table 6 General analysis of *kiage-shoyu*

Each soy sauce was analyzed after 6 months fermentation. Color* : *shoyu* standard color numbers

Yeast strain	Total nitrogen(%)	NaCl(%)	pH	Color
RB-1	1.99	17.4	5.16	15
RBMK-11	2.04	17.3	5.14	11
RBMK-212	1.87	17.2	5.01	15
RBMK-32	1.93	17.1	4.88	15

Table 7 Analytical results of aroma components in *kiage-shoyu*

Abbreviations : The same as shown in Table 4.

<i>Shoyu moromi</i>		Ethanol produced %(w/v)	Aroma components (mg/l)				
Fermentation period(months)	Yeast strain		n-PrOH	i-BuOH	n-BuOH	i-AmOH	β -PheOH
3	RB-1	2.3	9.8	21.8	7.8	23.2	10.2
	RBMK-11	2.4	11.1	23.8	7.9	48.7	15.0
	RBMK-212	2.9	14.5	41.6	9.6	85.4	24.0
	RBMK-32	2.3	6.6	16.1	4.2	38.3	14.3
6	RB-1	1.9	6.2	13.3	5.1	14.9	7.8
	RBMK-11	2.0	8.7	17.0	5.9	34.7	12.0
	RBMK-212	2.4	8.3	22.0	5.3	45.0	14.8
	RBMK-32	2.4	9.5	17.9	6.3	36.8	12.8

能を認めた。醤油の試醸ではノルマルブチルアルコールの生成が認められ、醤油培地による発酵試験とは異なった。6カ月熟成醤油の官能検査において、香りの好ましきについて Friedman の順位検定法^{13,14)}を用いて比較検定した結果 (Table 8), RBMK-212 を供試した醤油が好まれ、他の醤油との間に 5% 危険率で有意差があることを認めた。香りに対するコメントとして、RBMK-212 では「すっきり」、「香り立ちあり」などがあり、変異株一般に「アルコール香が高い、香りが重い」などがあった。

考 察

酵母による高級アルコールの生成はグルコースからのアミノ酸生成経路に由来する場合とアミノ酸の直

接的菌体内取り込み (エールリッヒ回路) による場合が知られる。親株および変異株の 10% グルコース存在下におけるエタノールおよび高級アルコール生成能の顕著な増大は酵母の菌体数の増大によることが考えられる一方、変異株の高級アルコール生成能が菌株間の差はあるものの親株以上に高まる傾向を示していることから、変異株による高級アルコール生成能増大にはグルコースからのアミノ酸生成に基づく経路が親株以上に働いていることが推察される (Table 4)。しかし、親株および変異株の 10% グルコース存在下での高級アルコール生成能は窒素濃度 1% の高濃度アミノ酸含有培地ではかなり抑制されていると考えられることから、これらの酵母による高級アルコール生成系は基本的に培地中のアミノ酸により強いフィードバ

Table 8 Sensory evaluation of flavor in the *kiage-shoyu*

Sensory evaluation was done using the Friedman's ranking method for significance of differences in multiple comparison by 10 panelists. *: Significant at 1% level.

Strain	Preference	Comments
RB-1	30	Rather weak
RBMK-11	28	Enhanced, Alcoholic
RBMK-212	13*	Most enhanced Refreshed, Alcoholic
RBMK-32	29	Slightly heavy

ック阻害または抑制を受けていることが示唆される。したがって、変異株全般のイソアミルアルコールや RBMK-212 におけるイソブチルアルコールなどの各生成能の増大には、フィードバック阻害または抑制の解除が予想される (Table 4)。S. cerevisiae による菌体内へのアミノ酸取り込みでは、アミノ酸の違いによる取り込みの難易度¹⁵⁾、取り込み量や高級アルコール生成量が初発アミノ態窒素濃度の高まるにつれ低下する傾向にあること¹⁶⁾、が報告されている。窒素 0.17% の低濃度アミノ酸含有培地 A (II) において RBMK-11, RBMK-32 はロイシンやバリンの取り込み能が親株より高まっていると考えられ (Table 5)、このことが各菌株のイソアミル、イソブチルの各高級アルコールの生成能を高めていると推察される (Table 4), (Fig.1)。一方, RBMK-212 では培地 A (II) におけるロイシン取り込み能に親株と大差ないことが推察され (Table 5), イソアミルアルコール生成能の増大には既述したように、グルコースからのアミノ酸生合成に基づく経路が強く働いていることが予想される (Table 4), (Fig.1)。2% の窒素を含む醤油諸味において分解により溶出した高濃度のアミノ酸は酵母による高級アルコールの生合成に強い影響を及ぼしていることが考えられる。変異株を用いた醬

油の試醸結果においては、変異株の親株に対する高級アルコール生産性に醤油培地における成績以上のものを認め、特に RBMK-212 によるイソブチル、イソアミルなどの高級アルコール生産性に顕著なものを認め、アナログ耐性株の醤油醸造への利用の有為性が示された。醤油の官能検査においては、香りの嗜好性の評価が分かれる傾向にあったが、RBMK-212 を供試した醤油は複数の高級アルコールの生成量が多く、明りょうな香り立ちやすっきりした香気が評価されたものと考えられる。

要 約

アナログアミノ酸耐性変異株 RBMK (11, 212, 32) は窒素 0.17%, グルコース 10% を含む醤油培地において、親株 RB-1 よりイソアミルアルコールの高生産性を示した。しかし、イソアミルアルコールや他的高级アルコールの生成能は窒素 1%, グルコース 10% を含む醤油培地においてかなり低下した。変異株 RBMK-212 はアミノ酸生合成経路におけるフィードバック阻害または抑制が解除され、親株 RB-1 より多くの高級アルコールを生産したのと考えられた。

醤油諸味において、変異株 RBMK はイソアミル、イソブチルおよび β -フェネチルの各高級アルコールを親株以上に生産し、特にイソアミルアルコールの生産性は親株の 2 倍から 3 倍に達した。変異株 RBMK-212 は醤油中において 3 変異株中最も高いイソアミル、イソブチルおよび β -フェネチルの各高級アルコールの生産性を示し、醤油の風味に良い評価が得られた。

謝 辞

本研究において終止御指導賜りました宮崎大学農学部小川喜八郎教授、また懇切に御助言、御協力をいただきました宮崎県食品加工研究開発センター富山幸子様に対しましては心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) 佐々木正興, 森修三: 醸協, **86** (12), 913-922 (1991)
- 2) 後藤邦康: 醸協, **87** (11), 801-813 (1992)
- 3) 福田和郎: 醸協, **88** (1), 22-28 (1993)
- 4) 中村誠: 日食工誌, **37**, 981-983 (1990)

- 5) 青木光達, 内田金治: 平成元年度日本農芸化学会大会講演要旨集, P.245 (1988)
- 6) 吉川茂利, 近藤君夫, 蟻川幸彦, 桑原秀明, 小栗勇, 岡崎光雄: 平成2年度日本農芸化学会大会講演要旨集, P.125 (1990)
- 7) 吉川茂利, 小栗勇: 醸協, **87**, 780-787 (1992)
- 8) T. AOKI, K. UCHIDA: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 273-274 (1990)
- 9) 久寿米木一裕, 馬場雅幸, 吉田秀恵, 宮城盛安: 生物工学, **75**, 343-346 (1997)
- 10) 横塚保, 佐々木正興, 布村伸武, 浅尾保夫: 醸協, **75**, 717-728 (1980)
- 11) 枳倉辰六郎: 醤油の科学と技術, P.122, 日本醸造協会 (1988)
- 12) 日本醤油研究所編: しょうゆ試験法 (1985)
- 13) 日科技連官能検査委員会編: 官能検査ハンドブック, P.301-304, 日科技連出版社 (1973)
- 14) B.J. McDONALD, W.A. THOMPSON: *Biometrika*, **54**, 487-497 (1967)
- 15) 秋田修, 蓮尾徹夫, 大場俊輝: 醸協, **81**, 626-632 (1986)
- 16) 秋田修, 蓮尾徹夫, 大場俊輝, 宮野信之: 醸酵工学, **65**, 19-26 (1987)