4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-
3(2 H)-furanone (HEMF) 生成への
麦味噌の麴歩合の影響と
天地返しによる HEMF の強化

林田安生, 西村賢了, J. コリン スローター*
(熊本県工業技術センター, *国際醸造蒸留酒センター)

平成 10 年 7 月 27 日受理

Effect of Koji-buai on 4-Hydroxy-2(or 5)-
ethyl-5(or 2) methyl 3(2 H)-furanone
(HEMF) Production in Mugi-miso,
and Enhancement of HEMF
by the *Tenchi kaeshi* Process

Yasuo HAYASHIDA, Kenryo NISHIMURA
and J. Colin SLAUGHTER*

(Kumamoto Industrial Research Institute,
3-11-38 Higashi-machi Kumamoto-shi
Kumamoto 862-0901,

*The International Centre for Brewing
and Distilling, Heriot Watt University,
Riccarton Edinburgh EH14 1AS, UK)

Koji buai, a traditional unit relating to the ratio of barley and soy beans in the raw material, affected the production of 4 hydroxyl-2 (or 5) ethyl 5 (or 2) methyl 3 (2 H) furanone (HEMF) in aged mugi miso. Reducing the koji buai from 20 to 10 resulted in a shorter aging period for optimal production, from more than 3 weeks at 30°C and 2 weeks at 37°C to 1 week at 30°C followed by week at 37°C.

In bench scale miso production, yeast activation by the traditional "tenchi kaeshi" process, in which miso is dug up and turned in the first week for koji buai 10 and in the third week for 20, enhanced HEMF concentration in the final products.

Key words: 麦味噌, 麴歩合, HEMF

は じ め に

4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 H)-furanone(HDMF)及び, 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2 H)-furanone (HEMF) は, 甘いカラメル様の香気を持つ化合物で, 醤油¹⁾²⁾, 味噌³⁾⁴⁾, チーズ⁵⁾, ビール⁶⁾などの多くの発酵食品から分離されている。そして, その官能いき値は 0.12 mg/kg (HDMF), 0.02 mg/kg (HEMF) と低く⁷⁾, これらの食品の香気に大きく寄与していると考えられる。また, 近年の研究で, これらの化合物の抗腫瘍性⁸⁾⁹⁾などが明らかにされ, 機能性物質としても注目されるようになってきた。

平成 7 年熊本県味噌鑑評会に出品された淡色系麦味噌 13 点を分析したところ, HEMF (平均 7.4 mg/kg) が HDMF (平均 1.5 mg/kg) より高い濃度で含まれていた³⁾。また, その官能いき値からも, HEMF は麦味噌の香気により大きな影響を与えていると思われる。

我々は, これまでの研究で, 熟成させた麦味噌におけるフラノン化合物の生成挙動から, 発酵食品における当化合物の生成機構を提案した¹⁰⁾。これによれば, 発酵食品の熟成過程でペントースから生成するメイラード反応中間体が酵母によって変換されて, HEMF が生成する。

味噌はその種類や製品によって様々な麴歩合で製造されている。しかし, この組成変化の HEMF 生成への影響は知られていない。

そこで, 本報では, 麴歩合 10 で調製した麦味噌の熟成と酵母の発酵による HEMF 生成を研究し, 前報¹⁰⁾で示した麴歩合 20 の場合と比較して, 麴歩合と HEMF の生成について検討した。また, この結果に基づいて, 天地返しによる酵母の活性化と HEMF の増強を試みたので報告する。

実 験 方 法

1. 微生物およびその培養

Zygosaccharomyces rouxii MH-1 (熊本県工業技術センター所有) を使用して, 全ての発酵試験を行った。

菌体は, 1 白金耳量を, 醤油生揚げ培地 10 ml に植菌し, 30°C で 1 夜, 振とう培養した。培養液は菌数を測定した後, 発酵試験に供した。

2. 醤油生揚培地の調製

前報¹⁰⁾に従って行った。

3. 麦味噌の調製

常法に従い、麴歩合 10 または 20、塩分 10%w/w、水分 45%w/w で調製した。1 仕込み当たりの重量は、麴歩合 10 における味噌の熟成と HEMF の生成試験については 1 kg、麦味噌の中間プラント試験については 40 kg とした。

4. アルコール及び pH 測定

前報¹⁰⁾に従って行った。

5. HEMF 分析

前報¹⁰⁾に従って行った。

結果及び考察

1. 熟成麦味噌の酵母発酵による HEMF 生成 (麴歩合 10)

麴歩合 10 で調製し 15°C、20°C、30°C、37°C で熟成

させた麦味噌 (1 仕込み当たり 1 kg) に、酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* MH 1 を 1×10^6 cells/g になるように加えて、30°C で 2 週間発酵させた。熟成期間は、0 (Initial), 1, 2, 3, 4 週間とした。

熟成させた麦味噌及び熟成の後に酵母によって発酵させた麦味噌のエタノール濃度及び pH の変化を Table 1 に示す。

エタノールは熟成のみの麦味噌からは検出できなかったが、発酵させた麦味噌からは 0.83~1.69%w/w の濃度で検出され、酵母発酵が旺盛に行われたことを示していた。麦味噌の pH は 5~6 であったが、熟成期間が長いものや、酵母で発酵を行わせたものは低い pH を示す傾向があった。これは、熟成中の発酵分解による遊離アミノ酸の生成や、微生物による有機酸生成によると思われる。

HEMF は、熟成のみの麦味噌からは検出できなかったが、酵母で発酵させた麦味噌からは、全ての試料

Table 1 Ethanol concentration and pH of aged *mugi miso* and *mugi-miso* fermented after aging

Aging temperature	Aging period	Aged		Fermented after aging	
		Ethanol w/w %	pH	Ethanol w/w %	pH
	Initial	nd	5.95	1.47	5.49
15°C	1 week	nd	5.81	1.37	5.53
	2 weeks	nd	5.87	1.31	5.72
	3 weeks	nd	5.85	1.56	5.44
	4 weeks	nd	5.98	1.63	5.38
20°C	1 week	nd	5.79	1.69	5.45
	2 weeks	nd	5.85	1.21	5.70
	3 weeks	nd	5.75	1.60	5.30
	4 weeks	nd	5.73	1.23	5.37
30°C	1 week	nd	5.61	1.58	5.43
	2 weeks	nd	5.38	1.18	5.51
	3 weeks	nd	5.41	1.00	5.19
	4 weeks	nd	5.39	1.04	5.25
37°C	1 week	nd	5.51	1.56	5.37
	2 weeks	nd	5.41	0.83	5.43
	3 weeks	nd	5.25	1.19	5.02
	4 weeks	nd	5.14	1.36	5.00

Zygosaccharomyces rouxii MH 1 (Kumamoto Industrial Research Institute collection) was inoculated at 1×10^6 cells/g into mugi miso which had been aged at 15°C, 20°C, 30°C and 37°C for 1, 2, 3 and 4 weeks. These samples were incubated at 30°C for a further 2 weeks for yeast fermentation.

nd*: not detectable.

から検出された。Fig.1 に、味噌の熟成期間と、熟成後の発酵によって生成した HEMF の濃度を示す。

発酵させた麦味噌において、15℃、20℃で熟成させた麦味噌と 30℃、37℃で熟成させたものでは生成挙動が大きく異なった。

30℃及び 37℃で熟成させた場合、熟成 1 週間目の味噌で最も高い濃度の HEMF を生成し、その後は熟成が長くなるにつれて、生成量は減少した。その増減は、熟成温度が高い程顕著であった。

15℃及び 20℃で熟成させた場合、1 週間目に増加し、その後はほぼ一定の値を示した。

2. 麦味噌の中間プラント仕込み試験

麴歩合 10 及び 20 で調製した麦味噌 (1 仕込み当たり 40 kg) に、 1×10^5 cells/g になるように酵母を添加し、30℃で 5 週間熟成発酵を行わせた。天地返しは、それぞれの麴歩合で HEMF 生成量が多くなる熟成期間に合わせて、仕込み 1 週間目 (麴歩合 10) 及び 3 週間目 (麴歩合 20) に行った。比較のため、天地返しを行わなかった麦味噌、酵母を添加せず天地返しも行わなかった麦味噌も作成した。

これらの麦味噌に含まれる HEMF 量をエタノール濃度及び pH と共に、Table 2 に示す。試料は仕込み麦味噌の中央部から採取した。

酵母を添加しなかった麦味噌からは、エタノールおよび HEMF は検出できなかった。

酵母を添加した麦味噌では、エタノールが 1%w/w

以上生成していた。また、天地返しを行った麦味噌では、行わなかったものの 2.0 倍 (麴歩合 10) 及び 1.4 倍 (麴歩合 20) のエタノールを含んでおり、天地返しによって酵母の活性化が行われたことを示していた。

HEMF については、天地返しを行った麦味噌に 21 ~ 36 mg/kg 含まれていた。その量は天地返ししていない麦味噌のそれぞれ 2.2 倍 (麴歩合 10) 及び 1.7 倍 (麴歩合 20) であり、いずれも酵母の活性化によるエタノールの増加率より高い値を示した。

Fig.1 TEMF production in aged *mugi-miso* which was fermented by yeast

Samples of *mugi-miso* were prepared as described in the legend to Table 1. Symbols in this figure indicate aging temperatures of 15°C (●), 20°C (■), 30°C (▲) and 37°C (◆).

Table 2 Ethanol, pH and HEMF in *mugi-miso*

<i>Koji-buai</i>	Conditions	Ethanol w/w %	pH	HEMF mg/kg
10	No yeast added*	nd****	5.88	nd
	Yeast added**	1.21	5.79	9.57
	Yeast added and "Tenchi-kaeshi"****	2.39	5.64	21.36
20	No yeast added	nd	5.43	nd
	Yeast added	1.12	5.44	21.47
	Yeast added and "Tenchi-kaeshi"	1.56	5.33	36.16

Mugi-miso samples with a raw material ratio of barley 1 : soy beans 1 (*Koji-buai* 10) and 2 : 1 (20) by weight were incubated at 30°C for 5 weeks.

No yeast added* : yeast was not added to the sample.

Yeast added** : *Zygosaccharomyces rouxii* MH 1 was inoculated at 1×10^5 cells/g into the initial sample.

Yeast added and "Tenchi Kaeshi"**** : Yeast was inoculated as above and the sample was dug up and turned at the end of the first week (*Koji buai* 10) and the third week (20) as the traditional "Tenchi kaeshi" process.

nd**** : not detectable.

考 察

味噌の発酵に十分な量の酵母を添加し、これを好条件で速やかに発酵させたとき、HEMF の生成量は、熟成温度や期間によって大きく影響を受けた。これは、熟成中に生成する HEMF 前駆体の量が、酵母発酵による HEMF 生成量を律していることを示している。

この考えに基づけば、HEMF 前駆体は、30°C 以上の熟成温度で顕著に生成し、その濃度は熟成と共に増加し、その後減少していく。

麴歩合 10 の麦味噌では、30°C 及び 37°C のいずれの熟成温度でも、前駆体の量が最も多くなるのは、熟成 1 週間目であった。前報の結果¹⁰⁾によると、麴歩合 20 では、熟成温度 30°C で 3 週間目以降、37°C で 2 週間目に、前駆体の量が最大になった。これらのことから、麴歩合 20 から 10 への変化により、前駆体の生成挙動が影響を受け、そのピークが熟成の早い時期にずれることが分かった。また、そのピークの形が、この麴歩合の低下によりシャープになる傾向が見られた。

大豆は、味噌・醤油のフラノン化合物生成に不可欠な原料である。麦麴ペーストを酵母で発酵させると、アルコールは生成するがフラノン化合物はほとんど生成しない³⁾。麴歩合によって、この大豆の量及び麴に含まれる分解酵素の比率が変化するが、このことが、前駆体の生成挙動に影響していると考えられる。

天地返しは、味噌の熟成を均一に行うために成される伝統的な製造工程である。また、この工程により、酵母や乳酸菌に酸素及び栄養成分が供給され、微弱になっていたそれらの微生物による発酵が熟成発酵工程の途中で再活性化される。Table 2 の結果は、この活性化を HEMF 前駆体の濃度が高くなる時期に行うことによって、味噌の HEMF を増強することが可能であることを示していた。

しかし、仕込み量が多くなれば、熱の伝わりかたが遅くなるため、HEMF 増強のための天地返しの時期は、この実験結果より、遅くなることが予想される。工場規模での製造に当技術を利用するためには、このスケールアップによるズレを更に検討しなければならないだろう。特に、麴歩合が低くなれば、HEMF 前駆体濃度のピークがシャープになるため、HEMF 生成量が酵母の活性化時期の影響をより受けやすくなる。麴歩合 10 の酵母を添加し天地返しを行った麦味噌の

HEMF が、麴歩合 20 のものに比べて 10 mg/kg 以上低い値を示したのは、前駆体濃度の高い時期と酵母の発酵時期の重なりが、少なかったためかもしれない。

お わ り に

HEMF などのフラノン化合物は食品工業的に重要な物質であろう。その甘い香りは、多くの食品で好意的に感じられ、また、それらの化合物自身、その前駆体に伴って生成する多くのレダクトンは、食品の抗酸化性などの機能性に大きく寄与している。

この研究によって、前駆体濃度の経時変化が麦味噌の組成や製造・醸造条件に影響を受けることを明らかにしたが、このことは、フラノン化合物を含む多くの食品で当化合物群の濃度増強またはコントロール技術を開発できることを示しており、工業技術的に意義深い。

要 約

麴歩合 10 で調製し、30°C 及び 37°C で熟成した麦味噌における HEMF 前駆体濃度のピークはいずれも熟成 1 週間目に現れた。麴歩合 20 での結果と比較すると、麴歩合の低下により、そのピークが熟成の早い時期にずれることが分かった。麴歩合 10 及び 20 で調製し仕込み直後に酵母を添加した味噌を 30°C で熟成・発酵させ、HEMF 前駆体濃度が高くなる時期に天地返しを行って、酵母を活性化させたところ、高い濃度で HEMF (21.36~36.16 mg/kg) が生成し、天地返しが HEMF の増強に有効であることが分かった。

文 献

- 1) N. NUNOMURA, M. SASAKI, Y. ASAO and T. YOKOTSUKA: *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 491 (1976)
- 2) Y. HAYASHIDA, K. NISHIMURA and J. C. SLAUGHTER: *In. J Food Sci. Tech.*, **32**, 11 (1997)
- 3) Y. HAYASHIDA, K. NISHIMURA and J. C. SLAUGHTER: *J Sci. Food Agric.*, **78**, 88 (1998)
- 4) 菅原悦子: 日本食品工業学会誌, **38**, 491 (1991)
- 5) M. PREININGER and W. GROSCH: *Levensm. Wiss. Technol.*, **27**, 237 (1994)

- 6) S. SAKUMA, K. KOBATASHI, T. TAYAMA
and H. YOKOYAMA : *J. Am. Soc. Brew.
Chem.*, **54**, 37 (1996)
 - 7) I. BLANK and L. B. FAY : *J. Agric. Food
Chem.*, **44**, 531 (1996)
 - 8) A. NAGAHARA, H. BENHAMIN, J. STORK-
SON, J. KREWSON, K. SHENG, W. LIU
and M. W. PARIZA : *Cancer Research*, **52**,
1754 (1992)
 - 9) S. KATAOKA, W. LIU, K. ALBRIGHT, J.
STORKSON and M. PARIZA : *Food Chem.
Toxicol.*, **35**, 449 (1997)
 - 10) 林田安生, 西村賢了, J.C. スローター : 醸協,
93, 730 (1998)
-