

氏 名	すえ ざわ やす ひこ 末 澤 保 彦
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2647 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	耐塩性酵母 <i>Candida versatilis</i> の味噌・醤油醸造への寄与と赤色色素産生株の特性に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 大 東 肇 教 授 村 田 幸 作 教 授 北 畠 直 文

論 文 内 容 の 要 旨

味噌や醤油の主要な香気成分はエタノールをはじめとするアルコール類、揮発性フェノール類、フラノン類などであるが、特に醤油については、1~2 ppm の揮発性フェノールの一種である 4-エチルグアヤコール (4-EG) の存在がそのフレーバーを最適なものにすることが明らかにされている。4-EG は耐塩性酵母 *Candida versatilis* などが生み出し、それはフェルラ酸 (FA) からの変換が推定されているが、その他の醸造関連微生物の関与や変換経路の詳細については明らかになっていない。本研究では、4-EG などの香気成分を増強した醸造食品の開発を目的として、FA 変換能を有する耐塩性酵母群の遺伝子配列決定法による同定や 4-EG の生成経路の解明を行うなど、醸造関連 FA 変換微生物群の生物学的・生化学的特性を検討した。また、*C. versatilis* の中で、赤色色素を産生する一株 (JCM 5958 株) に注目し、新規な特徴的赤色色素の生産条件や実用化へ向けた種々の特性を詳細に調べた。その主たる内容は以下のように要約される。

味噌・醤油醸造に関与する耐塩性酵母の同定と、それら酵母群による香気成分 4-EG の生成経路の解明

1. 耐塩性酵母の部分塩基配列による分類・同定

26S リボソーム RNA 遺伝子の D1D2 領域の塩基配列 (26S rDNA 配列) ならびに ITS1, 5.8S リボソーム RNA 遺伝子および ITS2 の塩基配列 (ITS 配列) 決定法により、主に FA 変換能を有する耐塩性酵母の同定とタイピングを行った。*C. versatilis* に分類されていた 19 株は、26S rDNA 配列の相同性が 99% 以上であることから *C. versatilis* と同定されることを確かめ、また、ITS 配列からは相同性が 99.8% と 98.8% の 2 つのグループにタイピングできた。一方、*C. etchellsii* と分類されていた 11 株は、26S rDNA 配列の相同性が 99% 以上であることから、確かに *C. etchellsii* と同定され、また、ITS 配列の相同性が 100% であることから、単一グループにタイピングできた。*Pichia guilliermondii* と分類されていた 7 株は、26S rDNA 配列および ITS 配列から *C. guilliermondii* 2 株と *C. fermentati* 5 株の 2 種に分類・再同定された。

2. FA から 4-EG への変換経路の解明および関連微生物群の 4-EG 生成への関与

HPLC 分析により、味噌・醤油諸味中では、FA は、4-ビニルグアヤコール (4-VG) を経て、4-EG へ変換されることをはじめて明らかにした。さらに、味噌・醤油醸造関連微生物 19 種について FA 変換能を検討し、① FA を 4-EG まで変換する微生物群 (Type 1)、② 4-VG を 4-EG に変換する微生物群 (Type 2)、③ FA を 4-VG までのみ変換する微生物群 (Type 3)、④ FA 変換能のない微生物群 (Type 4)、の 4 群に分類できた。この結果から、味噌・醤油中の特徴香 4-EG は、醸造工程中に存在する 4-VG 産生微生物 (Type 1 と Type 3) により FA から 4-VG に変換され、次いで、4-VG が主に *C. versatilis* (Type 1 と Type 2) や *C. fermentati* によりさらに変換を受け、産生されることをはじめて明確にした。また、*C. versatilis* が味噌・醤油の特徴香生成に特に重要な役割を担っている酵母であることも指摘できた。

赤色色素産生耐塩性酵母 *Candida versatilis* JCM 5958 およびその生産する赤色色素の特性、ならびに本酵母の利用法の検討

1. 赤色色素の産生条件および機能性の検討

上記耐塩性酵母の中から特徴ある赤色色素を産生する 2 種の酵母株を分離した。本酵母株は既知であり、従来その生理学

的特性から *C. rhodohalophila* と同定されていたが、化学分類法や先の部分塩基配列決定法から、*C. versatilis* に分類できることを明確にした。次いで、その一つ、JCM 5958株の赤色色素産生条件を詳細に検討した結果、本株は、15% NaCl 存在下で、鉄を含む新規な水溶性赤色色素（ロドハロフィリン：rhodohalophilin と命名）を著量産生することを明らかにした。さらに、ロドハロフィリンの生理的特性を種々検討した結果、本色素は高い活性酸素消去能（SOD 活性：約12万 unit / g）を有する機能性色素であり、ラットを用いた単回経口投与毒性試験および細菌を用いた復帰突然変異試験結果から、食品成分として安全なものであることを示した。

2. 味噌・醤油醸造などへの利用

上記 *Candida versatilis* JCM 5958株の醸造食品への利用をめざして味噌・醤油醸造試験を行い、本酵母の単独添加により、従来の酵母添加と同等以上の香気を有する味噌・醤油が製造できることを確認した。また、本株は、従来のビール酵母に匹敵する栄養価をもち、食経験があること、および、上記のように急性毒性がないことをも考え合わせ、食品製造微生物として有用な酵母と評価できた。

論文審査の結果の要旨

食品の官能評価において、呈味は当然として、フレーバーなどの香気特性は重要である。そのため香気の改善・制御は食品製造において重要な管理ポイントとなる。特に醸造食品においては、微生物発酵によりほとんどの香気成分が生成されており、豊かな香気で特徴づけられる商品の開発のためには、主要な香気成分の究明とともに、関与する微生物の特定や香気成分生成機構の解明、さらには適正な香気制御法の開発が必要である。本論文では、味噌や醤油の特徴香生成に関与する耐塩性酵母群の同定や香気成分生成機構の解析を行い、次いで、赤色色素産生関連酵母の特性や実用性を追究した。成果として評価すべき点は以下のとおりである。

1. 味噌や醤油の醸造に関与する5種の耐塩性酵母群について、部分塩基配列決定法により、それぞれを正確に同定・タイプングした。この結果は味噌や醤油製造に新たな知見をもたらすものである。

2. 味噌・醤油の特徴香として知られている4-エチルグアヤコール（4-EG）が、高濃度食塩存在下、フェルラ酸（FA）から4-ビニルグアヤコール（4-VG）を経て生じることをはじめて明らかにした。また、この変換過程を担う微生物群を4つのタイプに整理・分類した成果は、発酵管理上有益なものとして高く評価できる。さらに、4-EG産生耐塩性酵母として、*Candida versatilis* 以外に *C. fermentati* を見いだしたことは興味深い事実である。

3. 種々の耐塩性酵母の中から新規赤色色素を生成する酵母2種を分離し、それらが旧来の *C. rhodohalophila* ではなく、*C. versatilis* に分類されることを明確にした。また、そのうちの一株（JCM 5958）に関する色素の最大産生条件や機能性・安全性の検討結果、さらには実際の醸造試験における成績などは、本酵母の実用化に期待を抱かせる成果として高く評価される。

以上のように、本論文は、味噌・醤油の特徴香を担う耐塩性酵母群に焦点を当て、それらの正確な同定・分類や香気成分生成経路の解明、さらには特徴的赤色色素産生株 *C. versatilis* JCM 5958の実用性を検討したもので、その成果は食品醸造学や食品微生物学の発展に貢献するとともに、実際の醸造産業に寄与するものと期待される。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成19年2月8日、論文ならびにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。