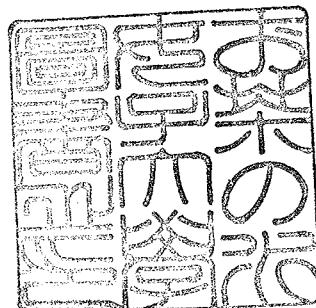


377.5
015
034

ホ
26

大豆加工中の香氣形成に関する

食品化学的研究



菅原悦子

目次

第Ⅰ章 序論	7
第1節 大豆の食品としての価値	7
第2節 大豆の加工と微生物	10
第3節 大豆加工利用上の問題点と本研究の目的と意義	12
第Ⅱ章 未熟大豆（枝豆）の香気特性	14
第1節 緒言	14
第2節 未熟大豆（枝豆）の特徴的な香気成分とその成熟に伴う変化	14
1 実験方法	15
1) 試料および香気濃縮物の調製	15
2) 香気濃縮物の分離、同定	15
2 結果及び考察	19
1) 収穫期による香気成分の変化	19
2) 枝豆特有香の分析	26
3) 枝豆香気成分の形成機構	28
第3節 未熟大豆（枝豆）の冷凍保存に伴う香気成分の変化	34
1 実験方法	34
1) 試料	34
2) 枝豆の官能検査	35
3) 香気濃縮物の調製	35
4) 香気濃縮物の分析、同定	35
2 結果及び考察	37
1) 官能検査による冷凍枝豆のブランチング効果の判定	37
2) 冷凍保存による枝豆香気の変化	37
第4節 要約	41
第Ⅲ章 大豆の加熱による不快臭の消長と加熱香気の形成	43
第1節 緒言	43
第2節 大豆の煮熟による不快臭の消長と加熱香気の形成	43
1 実験方法	44

1) 試料及び香気濃縮物の調製	44
2) 香気濃縮物の分析	44
2 結果と考察	44
第3節 蒸煮大豆の香気組成と大豆サポニンの影響	55
1 実験方法	57
1) 試料	57
2) 蒸煮大豆からSDE法による香気濃縮物の調製	57
3) 蒸煮大豆からのカラム濃縮法による香気濃縮物の調製	58
4) maltolの回収実験	58
5) 大豆サポニンからのmaltol生成の確認	59
6) 香気成分及びmaltolの分離・同定	59
2 結果及び考察	59
1) 蒸煮大豆の香気組成	59
2) 香気濃縮物調製方法によるmaltol回収率の比較	64
3) 蒸煮大豆の主要香気成分maltolの生成と大豆サポニン	64
第4節 要約	67
第IV章 納豆の香気形成	69
第1節 緒言	69
第2節 納豆の香気組成	73
1 実験方法	73
1) 試料	73
2) 香気濃縮物の調製	74
3) ヘッドスペース分析	74
4) 香気成分の分離、同定	74
2 結果及び考察	74
1) 納豆の香気組成	74
2) 納豆のヘッドスペース分析	82
3) 納豆の香氣と大豆不快臭の関係	84
第3節 納豆菌によるピラジン化合物生成のための培地組成の検討	84
1 実験方法	85
1) 培養条件	85

2) 香気濃縮物の調製と香気成分の分離同定	85
2 結果及び考察	87
第4節 大豆煮熟培地での納豆菌によるピラジン化合物生成に対する アミノ酸添加の影響	91
1 実験方法	91
1) 培養条件	91
2) 納豆菌の生育状況の判定方法	91
3) 香気濃縮物の調製と香気成分の分離同定	93
2 結果及び考察	93
第5節 合成培地での納豆菌によるピラジン化合物生成に対する アミノ酸添加の影響	94
1 実験方法	96
1) 培養方法	96
2) 納豆菌の生育状況の判定方法	96
3) 香気濃縮物の調製	96
4) 香気成分の分離、同定	96
2 結果及び考察	98
1) 培地窒素源の変化と菌の増殖	98
2) S D E 法とカラム濃縮法によるピラジン化合物濃度 の比較	98
3) 培地組成の違いによるピラジン化合物生成量の比較	101
第6節 要約	104
第V章 各種味噌の香気特性と香気形成	106
第1節 緒言	106
第2節 味噌の種類と製造方法	108
第3節 味噌の香気成分検索方法の検討	113
1 実験方法	114
1) 試料	114
2) 香気濃縮物の調製	114
3) 香気濃縮物の官能検査	115
4) 香気成分の分離・同定	115

2 結果及び考察	115
1) 香気濃縮物の官能検査、及び香気濃縮物の収量	115
2) 分離濃縮方法による同定成分、香気特性の比較	117
第4節 各種味噌のヘッドスペース分析	124
1 実験方法	125
1) 試料	125
2) 各種味噌のヘッドスペース分析	125
3) パターン類似率	125
2 結果及び考察	129
1) 各種味噌のヘッドスペースの香気組成	129
2) ヘッドスペース分析による各種味噌のパターン類似率	129
第5節 各種味噌と醤油の香気組成の比較	134
1 実験方法	134
1) 試料	134
2) カラム濃縮法による香気濃縮物の調製、 及び香気成分の分離同定	135
3) パターン類似率	136
2 結果及び考察	136
1) カラム濃縮法での各種味噌の香気組成の比較	136
2) カラム濃縮法での各種味噌と醤油の ガスクロマトグラムのパターン類似率	146
第6節 要約	148
 第VI章 味噌の香気成分と官能評価の解析	151
第1節 緒言	151
第2節 味噌の嗜好と香気成分の関係	152
1 実験方法	152
1) 試料	152
2) 香気濃縮物の調製	152
3) 香気成分の分離・同定	154
4) 官能検査	154
2 結果及び考察	155

1) 味噌の香りの嗜好傾向	155
2) 味噌の香りの嗜好と香氣成分の関係	157
第3節 重回帰分析による米味噌（赤色辛口系）の香氣成分と官能評価の解析	163
1 実験方法	164
1) 試料	164
2) 香氣成分の調製及び香氣成分の分離・同定	164
3) 統計的手法	164
2 結果および考察	165
1) 香氣成分と官能評価の相関	165
2) 重回帰分析による解析	168
第4節 判別分析による米味噌（赤色辛口系）の香氣成分と官能評価の解析	168
1 実験方法	173
1) 試料	173
2) 香氣濃縮物の調製及び香氣成分の分離・同定	173
3) 統計的手法	173
2 結果及び考察	175
2) ランクわけへの香氣成分の影響	175
3) 判別分析によるクラスわけと香氣成分の解析	179
第5節 要約	186
 第VII章 米味噌（赤色辛口系）熟成中の香氣形成とHEMF(4-Hdroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone)	188
第1節 緒言	188
第2節 HEMFの米味噌への添加による重要性の確認	189
1 実験方法	189
1) Tenax GCを用いたカラム濃縮法でのHEMFの回収実験	189
2) 米味噌懸濁液へのHEMFの添加実験	190
2 結果及び考察	190
1) カラム濃縮法でのHEMFの回収率	190
2) 米味噌懸濁液へのHEMFの添加実験	190

第3節 米味噌（赤色辛口系）熟成中の香気成分の形成	191
1 実験方法	192
1) 試料	192
2) 香気濃縮物の調製及び香気成分の分離・同定	192
2 結果及び考察	192
1) HEMF 及び他の甘いカラメル様香気成分の熟成中の変化	192
2) 熟成期間に増加した米味噌の香気成分	195
第4節 米味噌熟成中のHEMFの生成と酵母	198
1 実験方法	199
1) 試料	199
2) 酵母の測定	199
3) 味噌一般成分の分析及び香気濃縮物の調製と分析	199
2 結果及び考察	200
第5節 大豆発酵食品と清酒の香気組成の比較	202
1 実験方法	204
1) 試料	204
2) 香気濃縮物の調製	204
3) 香気濃縮物の分離同定	204
2 結果及び考察	206
1) 清酒香気成分としてのHEMFの確認	206
2) 清酒と大豆発酵食品の香気組成の比較	209
第6節 要約	210
第VII章 総括	212
英文要旨	218
引用文献	226
謝辞	231

第 1 節 大豆の食品としての価値

大豆の学名は現在、Glycine max, (L.) Merrillで統一されている。植物分類学上は被子植物門、双子葉植物綱、離便花亜綱、バラ目、マメ科に属している。世界のマメ科植物は600属、13,000種にもおよび、イネ科について重要な有用植物である。現在、食用とされている大豆は、栽培種で、Glycine属のSoja亜属に属し、祖先は野生ツルマメ (G. soja Sieb. et Zucc.) であるといわれている¹⁾。大豆の原産地は育種学的には、満州—シベリア説が有力であったが、Fig. I-1に示したような中国華南起源説も出され、一般に認められるルーツは現在でも特定されていない²⁾。日本への大豆の伝ばん経路についても明確にはなっていないが、弥生時代に水稻とともに、あるいは少し遅れて主として、朝鮮半島を経て大陸から伝わったと考えられている。

大豆の食品としての特徴は栄養学的にみると、Table I-1³⁾に示したように、タンパク質と脂質の含量が他の植物性食品に比較して多いことである。品種や栽培条件によって異なるが、タンパク質は約35%、脂質は約20%である。

大豆に最も多く含まれている、タンパク質の栄養価はそれを構成しているアミノ酸の組成によって決まる。大豆は植物性の主食となる米や小麦などの食品に少ないリジンに富み、これらの不足のアミノ酸を補うことによって、動物性食品のタンパク質に匹敵する栄養価を示す。大豆と米を組み合わせた日本の伝統的な食事は、日本人が動物性食品の少ない食事をしながらもタンパク栄養において極度の不足状態に陥らないことに大いに貢献した。一方、世界的視野で食糧問題を考えると、人口の増大に伴うタンパク質資源の確保が重要な課題である。この問題の解決には植物性タンパク質、特に大豆の有効な利用が不可欠である。

大豆脂質を構成する主な脂肪酸は不飽和のオレイン酸、リノール酸であり、特にリノール酸が50%以上を占めている。また、大豆油1g中ビタミンEが約2mg含まれており、大豆はビタミンEの給源としても優れている。

大豆には約25%の糖質が含まれているが、でんぶんはほとんどなく、ショ糖、スクキオース、ラフィノースなどのオリゴ糖が主な成分である。これらは以前は腸

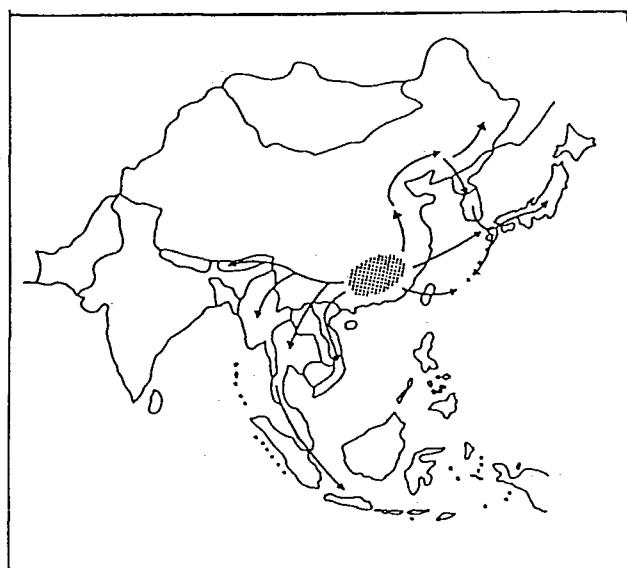


Fig. I-1 大豆の起源地とその伝播ルート（中国華南説）²

Table I - 1 大豆の成分組成³⁾

食品名	可 食 部 100 g あたり												食塩 相当量	糖 率					
	エ ネ ル ギ 1	水 分	タ ン パ ク 質	脂 質	炭水化物			無機質	ビタミン										
					糖 質	纖 維	灰 分		カル シウ ム	リ ン	鉄	ナ トリ ウ ム	カリ ウ ム	A レ チ ロ チ ノ ール カ 力	A 効 力	B ₁	B ₂	ナイ ア シン	C
		kcal	kJ		g				mg			μg	IU	mg		g	%		
日本産	417	1,745	12.5	35.3	19.0	23.7	4.5	5.0	240	580	9.4	1	1,900	0.12	0.83	0.30	2.2	0	0
米国産	433	1,812	11.7	33.0	21.7	24.6	4.2	4.8	230	480	8.6	1	1,800	0.8	0.88	0.30	2.1	0	0
中国産	422	1,766	12.5	32.8	19.5	26.2	4.6	4.4	170	460	8.9	1	1,800	0.15	0.84	0.30	2.2	0	0

備考 黒大豆(黒豆)、青大豆を含む。

内ガス発生因子としてきらわれていたが、近年は腸内のビフィズス菌の増殖を促進するとして注目されている。そのほかに、大豆には灰分が4-5%、ビタミンB₁が0.83mg%，B₂が0.30mg%含まれている。

大豆はこのように栄養学的に極めて優れた食品であるが、数種の有害物質も含んでいる。トリプシンインヒビターはタンパク質をアミノ酸に分解する消化酵素の阻害物質で、すい臓肥大の原因物質でもある。大豆のレクチンであるヘマグルチニンは血球凝集を起こす物質である。さらに、大豆には溶血物質が含まれている。従来はサポニンが原因物質と考えられていたが、最近の詳細な研究ではサポニン以外に、より高い溶血活性のあることが明らかにされつつある。そのほかにもアレルゲン物質や、金属結合物質などの有害物質が含まれている⁴⁾。

しかし、日本では大豆を多様な副食品に加工して、有害物質を取り除き、良質のタンパク質源として、しかもおいしく食べる工夫をし、大豆の利用価値を一層高めている。

第2節 大豆の加工と微生物

大豆は発芽し、開花した後、登熟過程を経て完熟種子となる一年生植物である。大豆はFig. 1-2に示したように多種類の食品に加工され、利用されている⁵⁾。大豆の発芽植物を食品としたのがモヤシであり、未熟種子を食品としたものが枝豆である。大部分の大豆腐食品は完熟種子を用いる。完熟種子を用いた大豆加工食品には豆腐に代表されるような浸漬大豆を磨碎することによって得られる呉（ご）から作られるものがある。呉に加水して絞ることによって豆乳とおからが得られる。豆乳をとろ火でにると表面に湯葉ができる。豆乳から、きぬごし豆腐、もめん豆腐が作られ、さらに堅めのもめん豆腐から、油揚げ類、がんもどき、凍豆腐が作られる。また、菓子などの重要な素材となっているきな粉は、炒り豆を粉末したものである。一方、蒸煮した大豆から、納豆、味噌などの大豆発酵食品が作られている。

大豆発酵食品は、蒸煮した大豆を主原料にし、食塩は用いず、納豆菌などの細菌やかびを用いて発酵させた「納豆群」と、食塩を加え、麹かびなどを用いて発

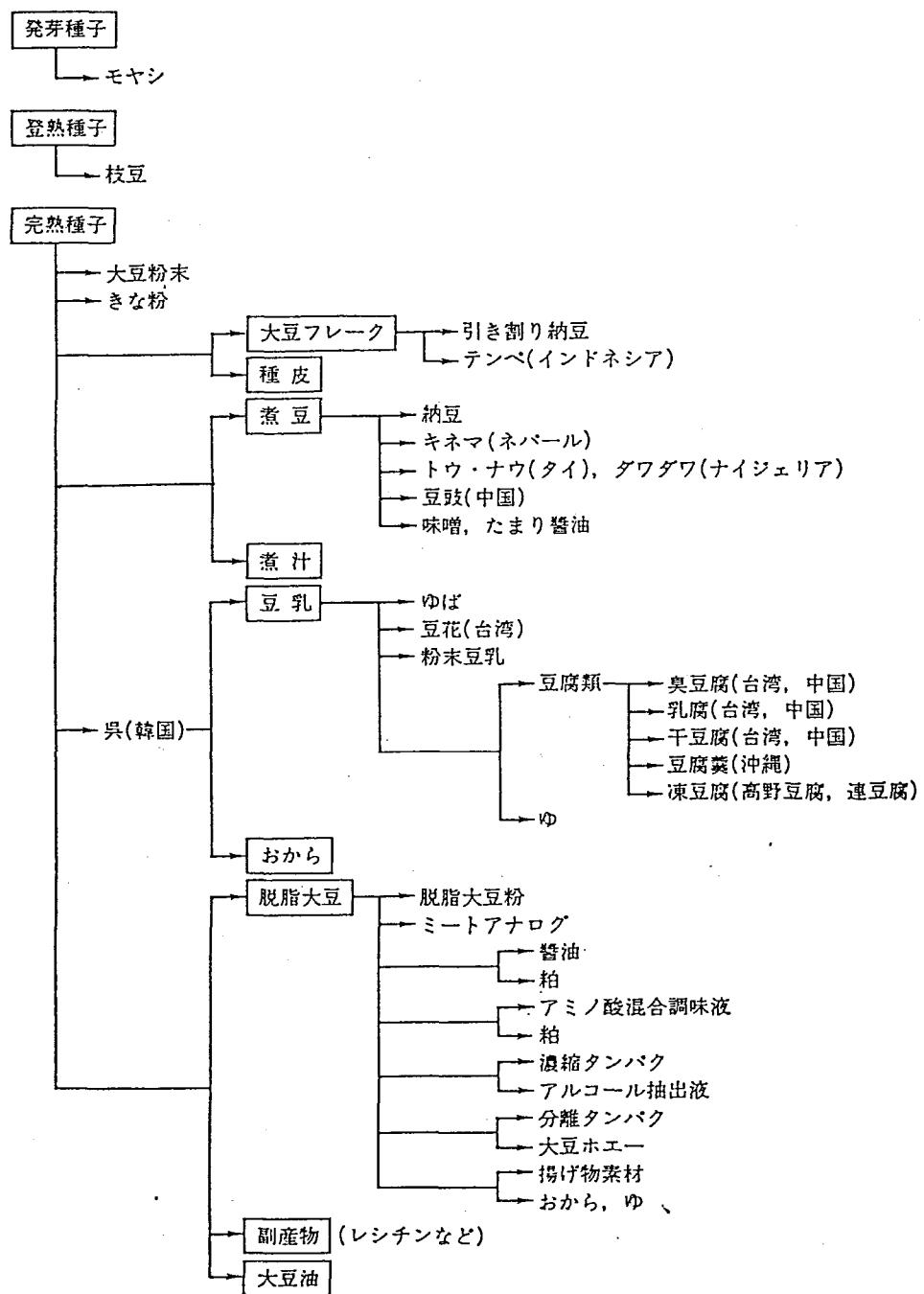


Fig. I-2 大豆から生まれる食品

酵させた味噌・醤油の「味噌群」の大きく二つに区分される。これら両区分は同一起源のものではなく、納豆群は照葉樹林地帯に共通する文化の産物、味噌群は中国河北文化の産物と考えられている。日本の味噌、醤油は中国の醤に由来し、大豆と麹かびを用いてつくられた豆醤から味噌が生まれ、醤油へと変化していったといわれている⁶⁾。

一般に、食品の発酵に関与する微生物は、かび、酵母、細菌に分類される⁷⁾。酵母による発酵はパンやワインにも用いられており、世界的であるが、かびや細菌による発酵は中国を中心とする東アジア文化圏のものである。納豆、醤油、味噌の大発酵食品は日本の食文化をよく特徴づけており、日本人ほど食生活に微生物を巧みに取り入れてきた民族は少ない。微生物の中でも麹かびがもたらした味噌、醤油は日本の食文化を世界から完全に独立させる役割を果たしている⁸⁾。

第3節 大豆加工利用上の問題点と本研究の目的と意義

米、麦、トウモロコシが主食としての文化圏を形成しているにもかかわらず、第1節で述べたように優れた食品である大豆は未だに副食の域を出ていない。その原因是、主食の食品に比較して高度な加工技術、特にトリプシンインヒビターなどのような生理活性を持つ有害物質の失活や、飲食後に感じる不快味の除去、大豆の持つ不快臭、いわゆる大豆臭の除去などの加工技術が要求されることにある。有害物質は従来の伝統的な大豆加工においては、加熱による失活や除去の工程があり、あまり問題とならない。不快味については基礎的研究が始まり、色々な成果が発表されつつある。

大豆の不快臭、いわゆる大豆臭に関しては多数の研究⁹⁾⁻¹⁴⁾があり、多くの揮発性成分が検出されているが、未だに十分解明されたとはいえない。大豆の不快臭は大豆種子中に多量に含まれるO₂添加酵素(lipoxygenase)が大豆油の構成不飽和脂肪酸を酸化することによって形成された酸化生産物と、この酸化生産物がさらに開裂酵素(hydroperoxide lyase)によって分解され、生成したアルデヒド、アルコール、フラン、ケトンなどから構成されている。その代表的な成分はhexanal、(Z)-3-hexenal、1-hexanolで、大豆の不快臭の中でも特に青臭さの主な

原因物質である。大豆不快臭には、さらにいわゆる豆臭や油の戻り臭をもつ 1-octen-3-ol や 2-pentylfuran の寄与も大きいことが知られている。

大豆種子には 3 種の lipoxygenase (L-1, L-2, L-3) が存在し、それぞれ最適 pH、基質特異性、および熱安定性などが明らかにされている。いずれの酵素も大豆加工工程で、不快臭の発生に関与しているが、特に L-2, L-3 の影響が大きいことが明らかにされ、最近これらの酵素のない大豆の育種改良が成功した^{15), 16)}。今後、不快臭の少ない大豆の普及が期待されるが、現在はその実用化の検討段階にある。

一方、酵素による大豆油の酸化や不快臭の発生を抑えるためには、主として加熱処理による不活性化が行われてきた。また、生成した不快臭は蒸煮や有機溶媒による抽出、さらにはアルデヒド分解酵素による分解や赤外線照射処理などによる除去が試みられてきた。しかし、完全な不快臭の除去方法は確立されていない。

日本では大豆を様々に加工し、大豆不快臭が感じられないだけではなく、より嗜好性の高い香りを付与することによっておいしく食べる工夫がなされてきた。従って、日本の伝統的な大豆食品の香気の組成を明らかにし、その香気が形成される諸条件を検討することは、大豆の不快臭の除去方法、マスキング方法を確立し、大豆の有効利用を行う上で重要な示唆をあたえる。

本研究では、煮熟または蒸煮した大豆を主原料にし、微生物を用いて発酵させた日本の伝統的な大豆発酵食品に焦点をあてた。発酵食品の香りは原料とした大豆や米、麦などの香り、それを蒸煮したときに加熱によって形成される香り、さらに発酵の過程で微生物が関与して形成される香りなどから構成されており、他の食品に比較して、非常に複雑である。そこで、初めにこれら大豆食品の香気成分の組成を化学的分析によって明らかにすることを試みた。そのうえで、大豆の加熱や発酵等の加工における大豆不快臭の消長について検討し、これら食品において大豆不快臭が感じられない理由の解明を試みた。さらに、より優れた嗜好性の高い香気が形成された要因について、特に微生物の働きに着目して探求した。

また、本研究をとおして、多種類の大豆食品を生み出し、これを伝承してきた日本の食文化の優れた点を再認識し、大豆食品を今後の食生活にさらに積極的に取り入れていくことに貢献したい。

第Ⅱ章 未熟大豆（枝豆）の香気特性

第1節 緒言

枝豆は大豆の未熟種子をそのまま食用としたもので、通常は軽くゆでただけで食用とされている。枝豆という名前は未熟種子を枝につけたまま塩ゆでにしたことに由来する。枝豆はタンパク質のほかに、完熟大豆にはないビタミンAも豊富で優れた食品であるが、一貫性のある食品学的研究は皆無に等しい。

一方、東北地方では、通称ずんだといって枝豆をゆでて莢と薄皮を取り除き、すり鉢でよくすり潰し、水を少々加えてやわらかにし、砂糖と塩で味をととのえた緑色のあんを、つきたて餅やなすなどをからめて食べる郷土料理があり、特に枝豆を珍重し、食べる機会も多い。東北地方の大豆や枝豆に関する食習の特徴を明らかにする調査¹⁷⁾において、枝豆のおいしさの要因について回答を求めたところ、東北地方では他の地域に比較して「香り」という回答割合が高かった。枝豆を好んで食べる東北地方では、味はもちろん香りもおいしさにとって重要なことが判明した。

枝豆の好ましさはこのように大豆とは異なる独特の風味によるが、枝豆の香気に関する研究は全くなされていない。そこで、本章では枝豆の香気特性をほぼ香気組成の全体が判明している完熟大豆と比較し、枝豆特有香と大豆不快臭との関係を明らかにすることを試みた。さらに、枝豆を冷凍保存した際の風味劣化の原因解明を行い、大豆不快臭の基本的性質の解明を試みた。

第2節 未熟大豆（枝豆）の特徴的な香気成分とその成熟に伴う変化¹⁸⁾

枝豆として最適な状態から、成熟して大豆になる各段階において試料を採取し、各試料から香気濃縮物を調製した。これら香気濃縮物をG C 及び G C - M S によって分析し、香気組成を明らかにし、成熟過程での大豆不快臭成分の形成を確認するとともに、枝豆の独特的香気に寄与する成分の解明を試みた。また、特に香気特性の優れた枝豆を試料として、より詳細に香気成分を検索し、枝豆特有香の

いっそうの解明を試みた。

1 実験方法

1) 試料および香気濃縮物の調製

枝豆が成熟して大豆になる過程での香気組成の変化を比較する試料Aには、岩手大学附属農場で栽培された南部白目を用いた。収穫日はTable II-1に示したとおりで、1983年9月と10月に3回である。枝豆最適期に収穫した試料をA-1、その約2週間後の試料をA-2、さらに2週間後の試料をA-3とした。それぞれ鞘つきで約6kgずつ収穫した。収穫後、直ちに1kgずつ5倍量の1%NaClを含む沸騰水中で1分間ブランチングして鞘と豆を分離した。豆700gは破碎することなく、3倍量の1%NaCl水溶液とともにLikens-Nickerson型の連続蒸留抽出装置（Simultaneous Distillation and Extraction, S D E法）¹⁹⁾で加熱還流させ、70mlのエーテルで3時間、連続的に香気成分を抽出した。エーテル抽出液は無水硫酸ナトリウムで一夜脱水後、常圧で、溶媒を留去し、さらに、窒素ガスを吹き込んで濃縮し、香気濃縮物（A）を得た。この操作を各収穫日ごとに3-4回繰り返した。

また、盛岡地方では「におい豆」といわれ、特に風味のよい枝豆が市販されるのでそれを購入して試料Bとした。この試料からは通常食べる状態に、より近づいた香気濃縮物を得ることを目的とし、ブランチングは試料Aと同様にしたが、その後は鞘つきのままで700gずつ、試料Aと同様にS D E法によって香気濃縮物を調製した。これを20回繰り返し、合計14kgの枝豆を処理した。ただし、抽出時間は1時間とし、加熱による変化が起きないように考慮した。

2) 香気濃縮物の分離、同定

試料Aの香気濃縮物はガスクロマトグラフ（G C）を用いて分析した。ピーク面積の百分率は島津クロマトパックC-R 2 Aインテグレーターにより溶媒を消去して計算した。さらに、G Cに直結したマススペクトロメーター（G C-M S）により化合物を推定した。最終的な化合物の同定は文献値のM Sデータ及び標準物質とのG Cによる保持時間の一致によった。分析機器及び分析条件はTable II-2に示したとおりである。

試料Bの香気濃縮物は分取用ガスクロマトグラフでFig. II-1に示したように、

Table II-1 枝豆の収穫日による香気濃縮物の収量と香気特性

試 料	A-1	A-2	A-3
収 穫 日	9月19日 (1983)	10月3日	10月17日
豆 の 状 態	枝豆として最適 豆は緑色	枝豆としては不適当 豆は緑と黄色が混在	枝豆としては不適當 豆は黄色で乾燥はしていない
香気濃縮物の収量 (mg/kg)	32.9	28.6	21.4
香 の 特 徴	枝豆様、さわやかな青葉様、甘いにおい	弱い枝豆様、さわやかさが減って煮豆様	煮豆様

Table II-2 枝豆（A）香氣濃縮物のG C 及びG C - M S 分析条件

G C 分析条件

Model: SHIMAZU GC-5A

Column : 3%PEG20M on Chromosorb W AW DMCS, 3mx3mm, Glass column

Oven temp.: 60°C (5min hold) → 3°C/min → 200°C

Carrier Gas:N₂

Inj. Temp.: 200°C

Detector:FID, 200°C

G C - M S 分析条件

G C part

Model: HITACHI 063

Column : 3%PEG20M on Chromosorb W AW DMCS, 3mx3mm, Glass column

Oven temp.: 60°C (5min hold) → 3°C/min → 200°C

Carrier Gas:He

Inj. Temp.: 200°C

M S part

Model: HITACHI RMU6M

Ionization Voltage: 70eV

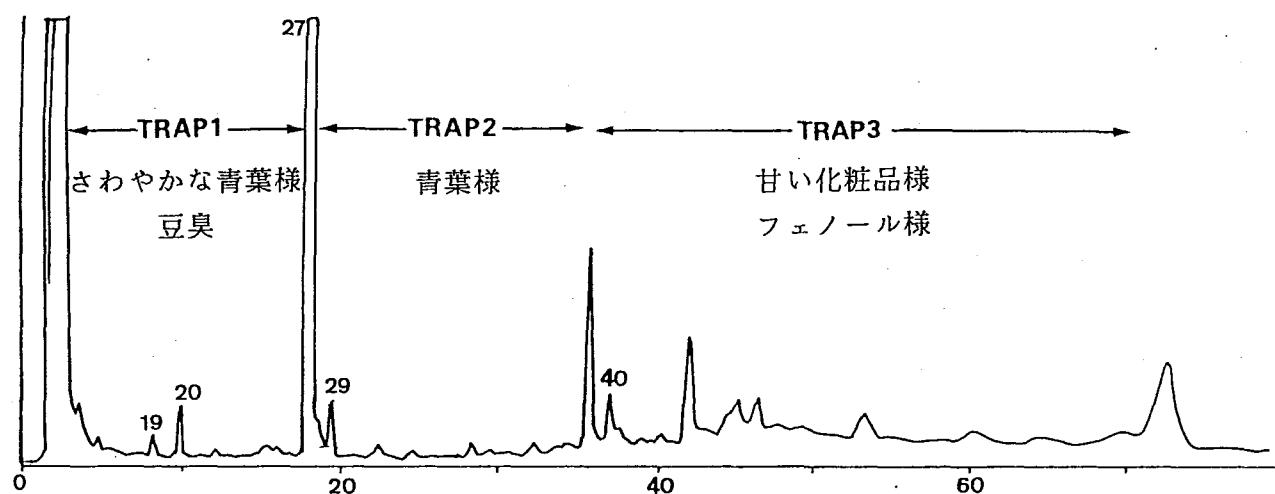


Fig. II-1 枝豆（B）の香気濃縮物のガスクロマトグラフィによる分画

3区分に分画分取した。GC分取条件は、Table II-3に示した。分取した香気濃縮物は試料Aと同様の条件(Table II-2)でGC及びGC-MS分析を行い、香気成分を同定した。さらに試料B中の特有成分として含硫化合物を想定し、キャピラリーカラムによる炎イオン化検出器(FID)と炎光光度検出器(FPD)を用いたガスクロマトグラフィーによる同時分析を行った。FID-FPD同時分析の条件はTable II-4に示したとおりである。ピーク面積の計算は、島津クロマトパックCR-1Bインテグレーターにより、試料Aと同様に計算した。さらにGC-MS分析により化合物の推定を行った。分析条件はTable II-4に示したとおりである。

2 結果及び考察

1) 収穫期による枝豆の香気成分の変化

各収穫期で採集した豆の状態及び香気濃縮物の収量とその特徴をTable II-1にまとめた。各香気濃縮物は、収穫日が遅くなるにつれて枝豆特有のさわやかな青葉様の香りが少なくなり、煮豆様に変化した。精油成分の収量はA-1は32.9mgであったが、徐々に減少し、A-3では21.4mgとなった。A-1、A-2、A-3のガスクロマトグラムをFig. II-2に示し、同一成分は同じピークナンバーとした。ピークNo.27がA-1、A-2、A-3に共通して検出され、しかも主要な成分であった。また、ピークNo.40はA-1でのみ検出され、A-2、A-3では検出できなかった。

枝豆の香気成分として同定された化合物をTable II-5に示した。ピークナンバーはFig. II-2と一致している。最も多量にしかもA-1、A-2、A-3に共通して存在していたピークNo.27は標準物質とのGCによる保持時間及びマススペクトルの一一致により、1-octen-3-olと同定された。A-1でのみ検出されたピークNo.40は同様にcis-jasmoneと同定された。

枝豆の香気濃縮物中に検出され、大豆臭、青臭さの原因物質¹³⁾である1-octen-3-ol、1-hexanol、hexanalの構造とマススペクトルデータをFig. II-3に、特徴的な香気を持ち、成熟とともに減少が著しく、枝豆の香気に寄与すると推察される成分として、1-pentanol、cis-jasmone、(Z)-3-hexenyl acetate、(Z)-3-hexen-1-ol、2-heptanone、linaloolをFig. II-4に示した。さらに、香気濃縮物の収量と

Table II-3 枝豆（B）香気濃縮物のG C分取条件

Model: HITACHI 063

Column: 10%PEG20M on Gas Chrom Q, 2mx8mm, Stainless steel column

Oven temp.: 60°C (5min hold) → 3°C/min → 200°C

Carrier Gas: N₂

Inj. Temp.: 200°C

Detector: FID, 200°C

Table II-4 枝豆（B）香氣濃縮物のFID-FPD同時分析の条件

FID-FPD同時分析の条件

Model: SHIMAZU GC-7A

Column: FS-WCOT PEG20M 35mx0.25mm

Oven temp.: 60°C (5min hold) → 3°C/min → 180°C

Carrier Gas: N₂, 1.6ml/min

Inj. Temp.: 200°C

Split rate: 25:1

Detector: FID, FPD, 200°C

GC-MS分析条件

GC part

Model: HITACHI 063

Column: FS-WCOT PEG20M 35mx0.25mm

Oven temp.: 60°C (5min hold) → 3°C/min → 180°C

Carrier Gas: He

Inj. Temp.: 200°C

MS part

Model: HITACHI 50GC

Ionization Voltage: 20eV

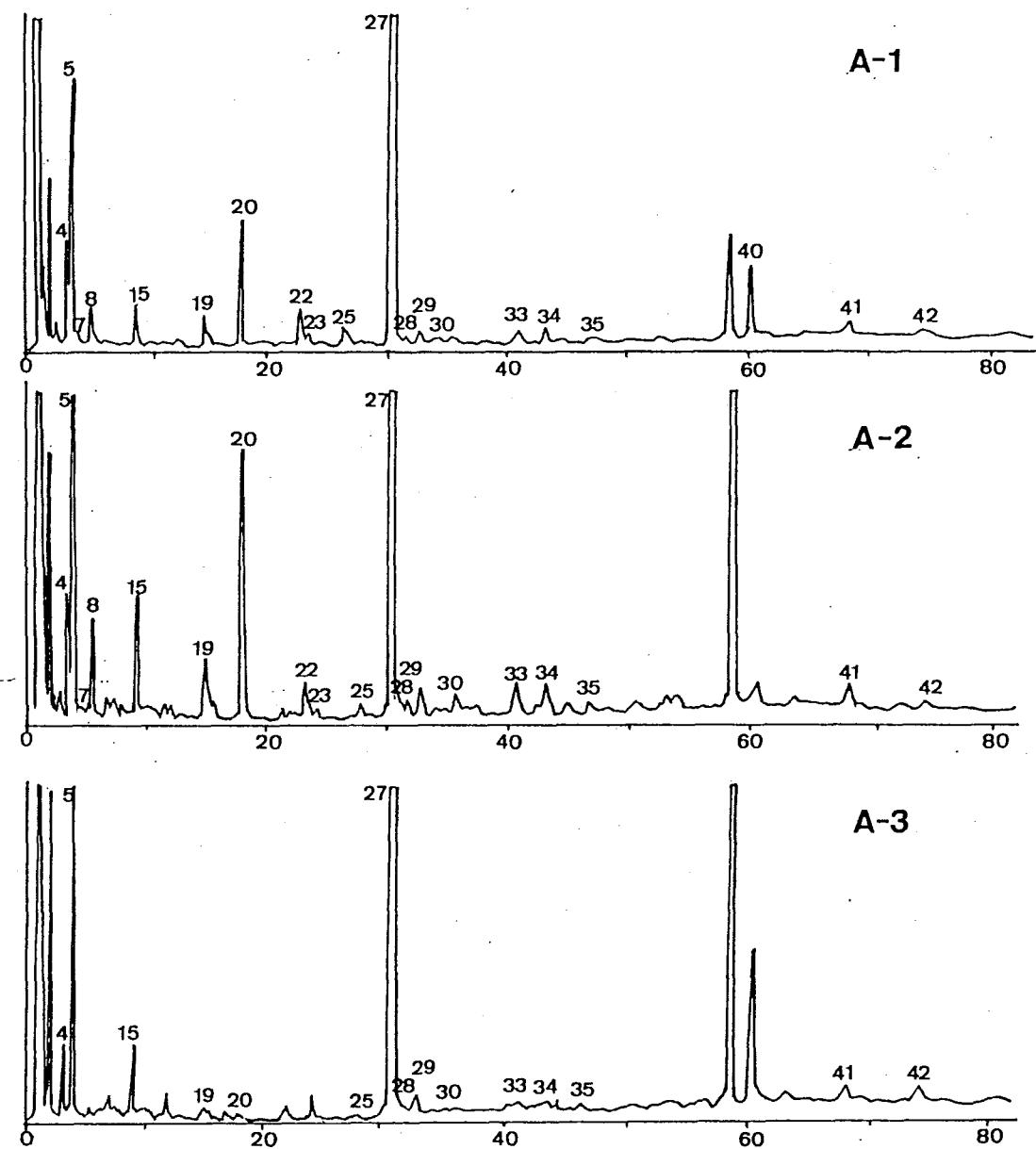
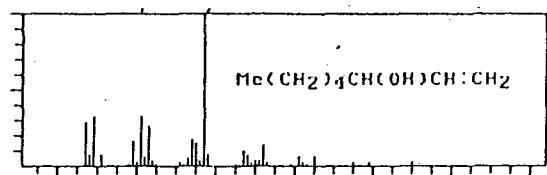


Fig. II-2 枝豆 (A) の各登熟段階での香気濃縮物のガスクロマトグラムの比較

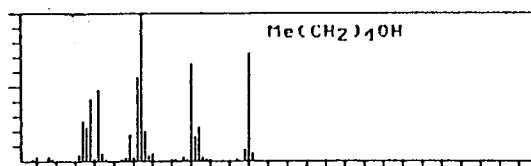
Table II-5 枝豆 (A) から同定された香氣成分

Peak No.	Rt(min)	Compounds	Peak area (%)			Soy beans
			A-1	A-2	A-3	
4	3.9	Ethyl acetate	4.06	1.76	0.77	-
5	4.6	Ethanol	9.77	7.12	4.54	+
7	5.8	3-Methyl-2-butanone	0.21	0.33	-	-
8	6.2	Benzene	1.34	1.85	0.09	-
15	9.9	Hexanal	1.90	2.66	1.10	+
19	14.8	2-Heptanone	1.77	2.00	0.09	+
20	17.7	1-Pentanol	8.40	8.28	0.18	+
22	22.4	(Z)-3-Hexenyl acetate	2.14	1.16	-	-
23	24.0	1-Hexanol	0.14	0.34	0.51	+
25	26.0	(Z)-3-Hexen-1-ol	2.04	0.37	0.13	+
27	30.1	1-Octen-3-ol	37.77	34.96	56.24	+
28	31.2	Furfural	0.66	0.57	tr.	+
29	32.3	Benzaldehyde	0.90	0.95	0.43	+
30	35.3	Linalool	0.45	0.68	0.08	-
33	40.4	Phenylacetaldehyde	0.51	1.22	0.16	+
34	42.7	Furylalcohol	0.88	0.93	0.23	+
35	46.1	Naphthalene	~ 0.09	0.35	0.03	-
40	59.7	cis-Jasmone	6.79	-	-	-
42	73.7	Indole	0.55	0.89	0.61	-

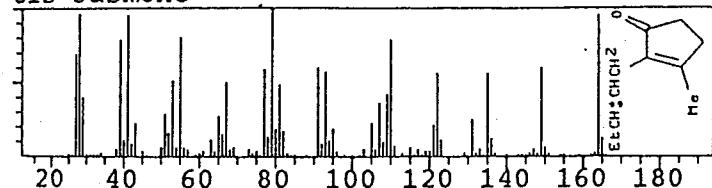
1-Octen-3-ol



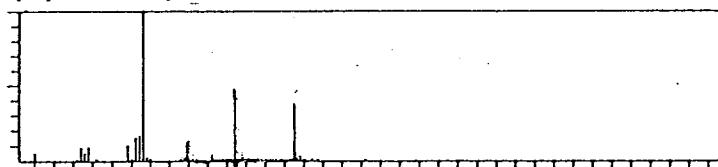
1-Pentanol



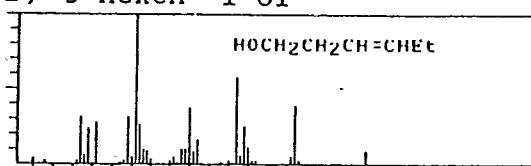
cis-Jasmone



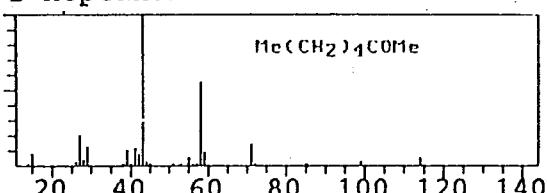
(Z)-3-Hexenyl acetate



(Z)-3-Hexen-1-ol



2-Heptanone



Linalool

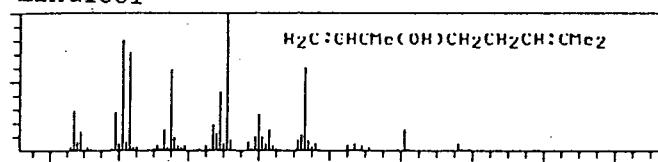


Fig. II-4 枝豆の香気に寄与すると推察される成分の構造とマススペクトルデータ

G C によるピーク面積の比から、これらの香気成分の枝豆中の濃度を算出して Fig. II - 5 に示し、成熟に伴う濃度の変化を比較検討した。1, 2, 3は A - 1, A - 2, A - 3 に対応しており、4は第 III 章で述べる完熟大豆を一夜浸漬し、その後同様に S D E 法で香気成分を捕集した煮熟大豆の値である。完熟大豆(4)の香気成分濃度は乾燥大豆に対する比として示されているので、枝豆の重量当たりで比較する場合、その水分含量より約 1/2 にする必要がある。

A - 1, A - 2, A - 3 に共通して主要成分であった 1-octen-3-ol はマッシュルームフレーバーとも呼ばれ、土臭いにおいて、大豆臭の一因とされている成分である。1-octen-3-ol は大豆の未熟状態である枝豆でも約 12mg/kg 存在し、その後成熟し、完熟大豆になる過程でも常に一定濃度存在することが判明した。閾値も 0.5-1.0 ppm と報告されており¹⁰⁾、枝豆での豆臭への寄与は極めて高いと判断される。1-hexanol も大豆臭、青葉臭の代表的な成分であり、枝豆中に 0.05mg/kg 存在した。完熟大豆の 1-hexanol の含量は 2.95mg/kg であり、枝豆との比較にはその約 1/2 の 1.5mg/kg の値が適切である。これによると、枝豆での 1-hexanol の濃度は完熟大豆よりかなり低いことが判明した。hexanal も大豆臭、青葉臭の代表的な成分で、閾値も 0.32 ppm と報告され¹³⁾、枝豆においても 0.6mg/kg 存在しており、枝豆の青臭さに寄与していると想定される。しかし、この成分の濃度は完熟大豆での 1.78mg/kg の約 1/2 である 0.8mg/kg と比較すると大差はなかった。1-hexanol と hexanal の濃度の差異が枝豆と完熟大豆での大豆臭、青臭さの相違の一つと考えられる。

枝豆の香気成分として存在し、成熟とともに減少が著しい成分の中で、特にジャスミン様の香氣を有している cis-jasmone は、枝豆の最適期には 2.23mg/kg も検出されるが、収穫期が遅れると全く検出できなくなることから、枝豆の香氣に寄与する重要な化合物と判断された。さらに、1-pentanol、(Z)-3-hexenyl acetate、(Z)-3-hexen-1-ol、2-heptanone、linalool が成熟に伴い減少し、完熟大豆では検出できないことから、枝豆香氣に寄与していると判断された。

以上の結果から、枝豆の香氣はいわゆる大豆に共通する大豆臭、青臭さに cis-jasmone、(Z)-3-hexenyl acetate 等の花様の香りやさわかな青葉様の香りが加わって形成されていることが判明した。

2) 枝豆特有香の分析

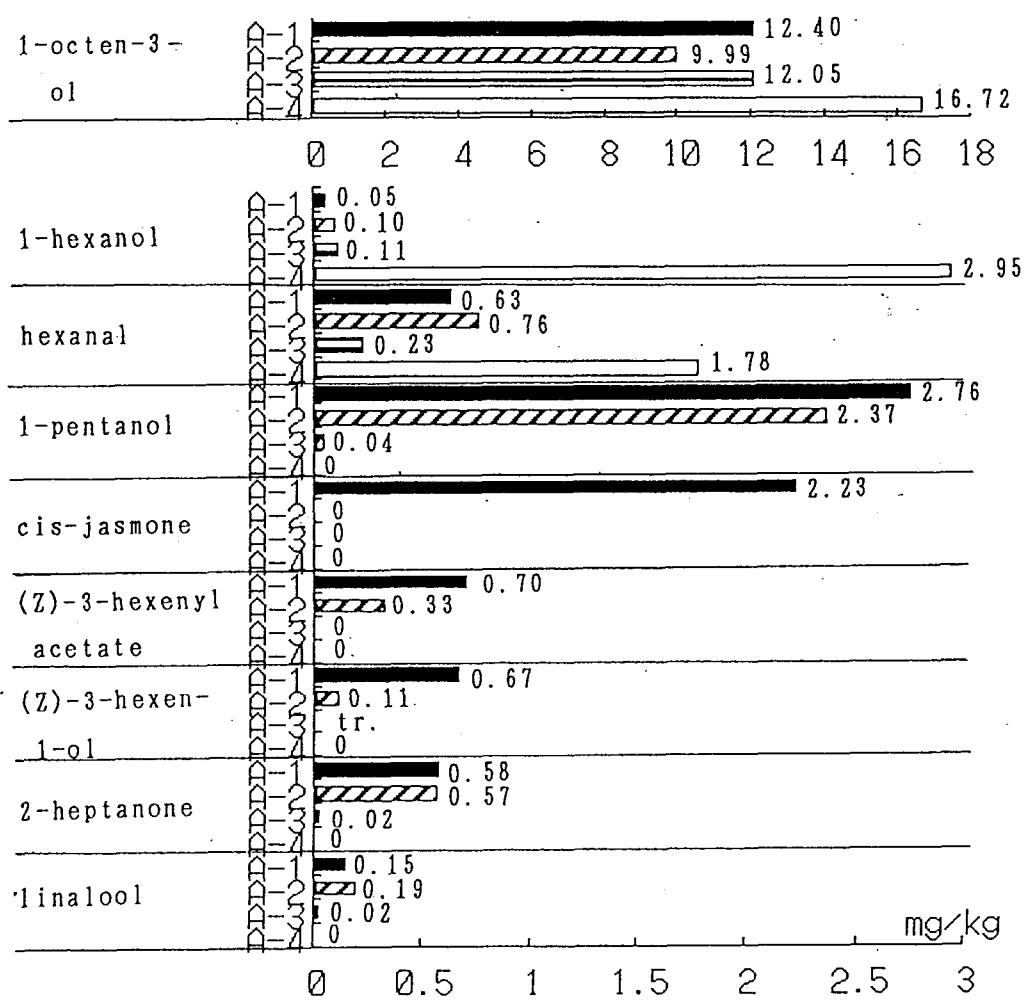


Fig. II-5 枝豆香気濃縮物中の枝豆特有成分の濃度の比較

A-1:枝豆として最適な状態、A-2:緑と黄色の豆が混在した状態、
 A-3:乾燥していない黄色の豆の状態、A-4:完熟した大豆
 (p16, Table II-1参照)

試料Bから得られた香気濃縮物（B）は枝豆香気の特徴をよく再現していた。これを分取用ガスクロマトグラフで分画後、キャピラリーカラムによる分析を行って、詳細に検討した。その結果、枝豆の揮発性成分は119種以上存在することが判明し、このうち26種の化合物をマススペクトルと標準物質の保持時間の一致により同定し、19種の化合物を推定した（Table. II-6）。また、FID-FPD同時分析の結果はFig. II-6に示したとおりで、含硫化合物として保持時間29.5分に1ピーグを検出し、それはマススペクトルの解析と標準物質とのGCによる保持時間の一致によりdimethyl sulfoxideと同定された。試料Aと共に化合物は17種あり、あわせて28種を枝豆の香気成分として新たに同定した。

大豆不快臭に関する化合物として試料Bで新たに同定された成分は2-pentylfuranと(E)-2-hexenalであり、これら成分の構造とマスデータをFig. II-7に示した。2-pentylfuranは油のもどり臭の原因物質といわれ、リノール酸や α -リノレイン酸の自動酸化により生成し、閾値は2ppmと報告されている¹⁴⁾。(E)-2-hexenalは、青葉様の大豆臭を持ち、閾値が0.11ppmと報告されている¹⁴⁾。これら成分の同定により、完熟大豆で検出された大豆不快臭に関する化合物は試料A、Bからもすべて検出された。大豆の未熟状態である枝豆でも大豆臭、青葉臭を持つ全ての成分はすでに存在することが明かとなった。

枝豆の香気を特徴づけている成分では、cis-jasmoneが試料Aと同様に試料Bからも検出され、この化合物の寄与がより明かとなった。他に試料Aで枝豆の香気への寄与が考えられた化合物は試料Bでもすべて同定された。

3) 枝豆香気成分の形成機構

枝豆は完熟大豆とほぼ共通する香気成分を持ち、豆らしい香気を基礎とし、先に述べたcis-jasmoneをはじめとする、数種の特徴的な香気成分が加わって、完熟大豆とは違った、さわやかな香気特性を形成していることが判明した。

そこで、これら枝豆中に検出された主な香気成分の形成機構について検討し、Fig. II-8に示した。完熟大豆と共にいわゆる青葉様の大豆臭成分は、完熟大豆中では脂質から酵素的に生成することが知られており¹²⁾⁻¹⁴⁾、枝豆においても同じ経路で生成されると判断される。即ち、枝豆中の脂質は脂質加水分解酵素(lipolitic acyl hydrolase)によって、加水分解されて、リノール酸や α -リノレイン酸を生じる。これらの不飽和脂肪酸が大豆臭成分の前駆物質となる。

Table II-6 枝豆 (B) から同定された香氣成分

Peak No.	Rt(min)	Compounds	Peak area (%)	Evidences	Soy beans
6	3.2	Butanal	tr.	MS	-
7	3.2	2-Butanone	tr.	MS	-
8	3.3	Pentanal	tr.	MS, Rt	+
11	4.1	3-Methyl-2-butanone	4.1	MS	-
16	5.3	(E)-2-Butenal	tr.	MS	-
16'	5.4	Benzene	tr.	MS, Rt	+
17	5.6	2, 3-Pentadione	0.4	MS, Rt	-
17'	5.8	Toluene	tr.	MS, Rt	-
18	6.2	Hexanal	3.1	MS, Rt	+
20	7.2	(E)-Methylpropenyl ketone	0.2	MS	-
21	7.6	2-Methyl-2-butenal	tr.	MS	-
22	7.7	Xylene	tr.	MS, Rt	+
27	9.1	Pyridine	2.8	MS, Rt	+
28	9.7	2-Heptanone	0.2	MS, Rt	+
32	10.8	(E)-2-Hexenal	0.1	MS, Rt	+
35	11.7	2-Pentylfuran	tr.	MS, Rt	+
36	12.2	1-Pentanol	10.6	MS, Rt	+
40	13.9	Ethylcyclopropane	0.2	MS	-
41	14.3	2, 3-Dimethyl-2-hexene	tr.	MS	-
42	15.0	Octa-4-en-3-one	0.3	MS	-
45	16.1	(Z)-3-Hexenyl acetate	4.3	MS, Rt	-
50	17.9	1-Hexanol	0.2	MS, Rt	+
51	18.6	Diethylbenzene	tr.	MS	-
52	19.0	Trimethylthiazole	tr.	MS	-
54	19.7	(Z)-3-Hexen-1-ol	3.6	MS, Rt	+
59	22.4	3-Octanol	0.5	MS	+
61	24.5	1-Octen-3-ol	28.9	MS, Rt	+
63	26.3	Benzaldehyde	3.4	MS, Rt	+
64	26.7	Furfural	tr.	MS, Rt	+
66	28.0	Linalool	0.2	MS, Rt	-
69	29.5	Dimethylsulfoxide	1.3	MS, Rt	-
78	35.8	Phenylacetaldehyde	0.2	MS, Rt	+
79	36.3	Acetophenone	0.5	MS, Rt	-
81	37.3	Furfurylalcohol	0.6	MS, Rt	+
85	38.8	Ethylbenzaldehyde	tr.	MS	-
92	40.4	Naphthalene	0.2	MS, Rt	+
95	46.6	(E, E)-2, 4-Decadienal	0.2	MS	+
96	47.3	Damacenone	tr.	MS, Rt	+
97	48.2	Methylnaphthalene	tr.	MS	-
105	54.3	cis-Jasmone	1.2	MS, Rt	-
105'	54.8	α -Cedrene	tr.	MS	-
106	55.1	Maltol	3.0	MS,	-
117	68.8	2-Methoxy-4-vinylphenol	0.8	MS	+
118	82.8	2, 3-Dihydrobenzofuran	0.1	MS	-
119	84.2	Indole	0.1	MS, Rt	-

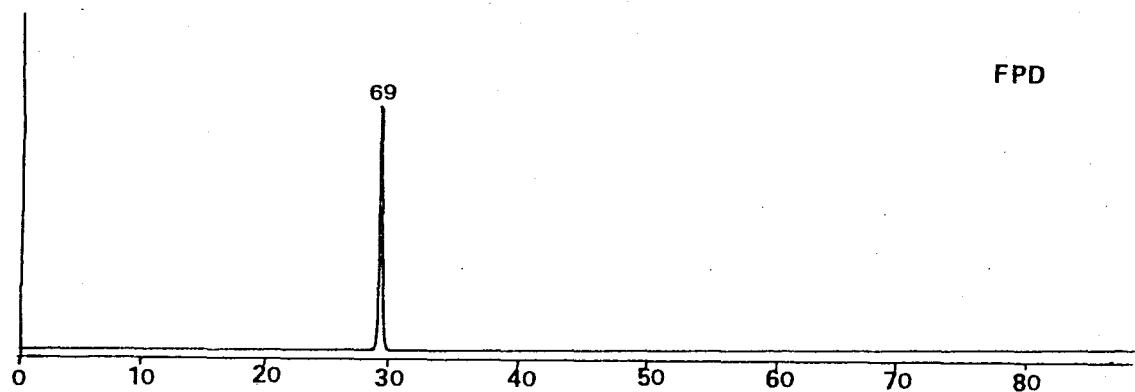
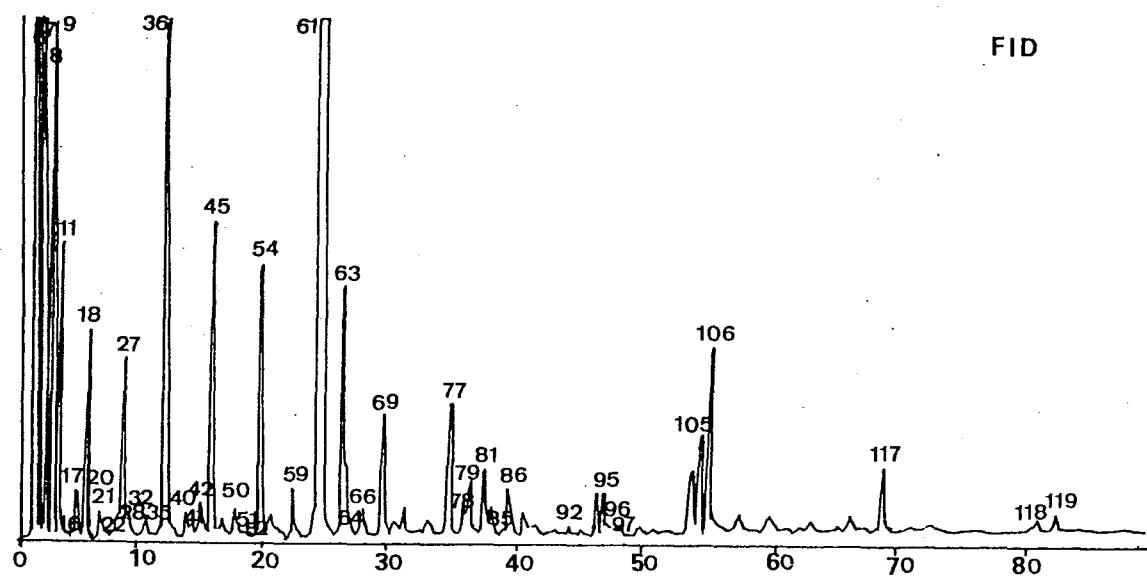


Fig. II-6 枝豆（B）の香気濃縮物のFID-FPD同時分析

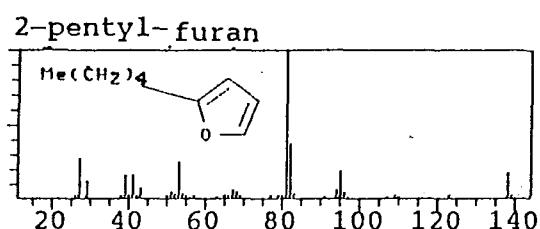
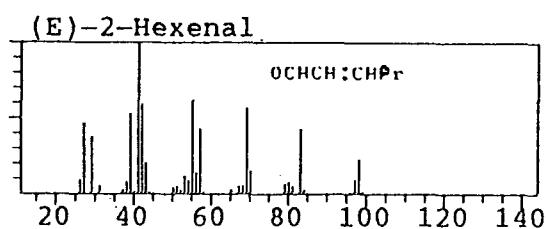


Fig. II-7 試料Bで新たに同定された大豆不快臭成分
の構造とマススペクトルデータ

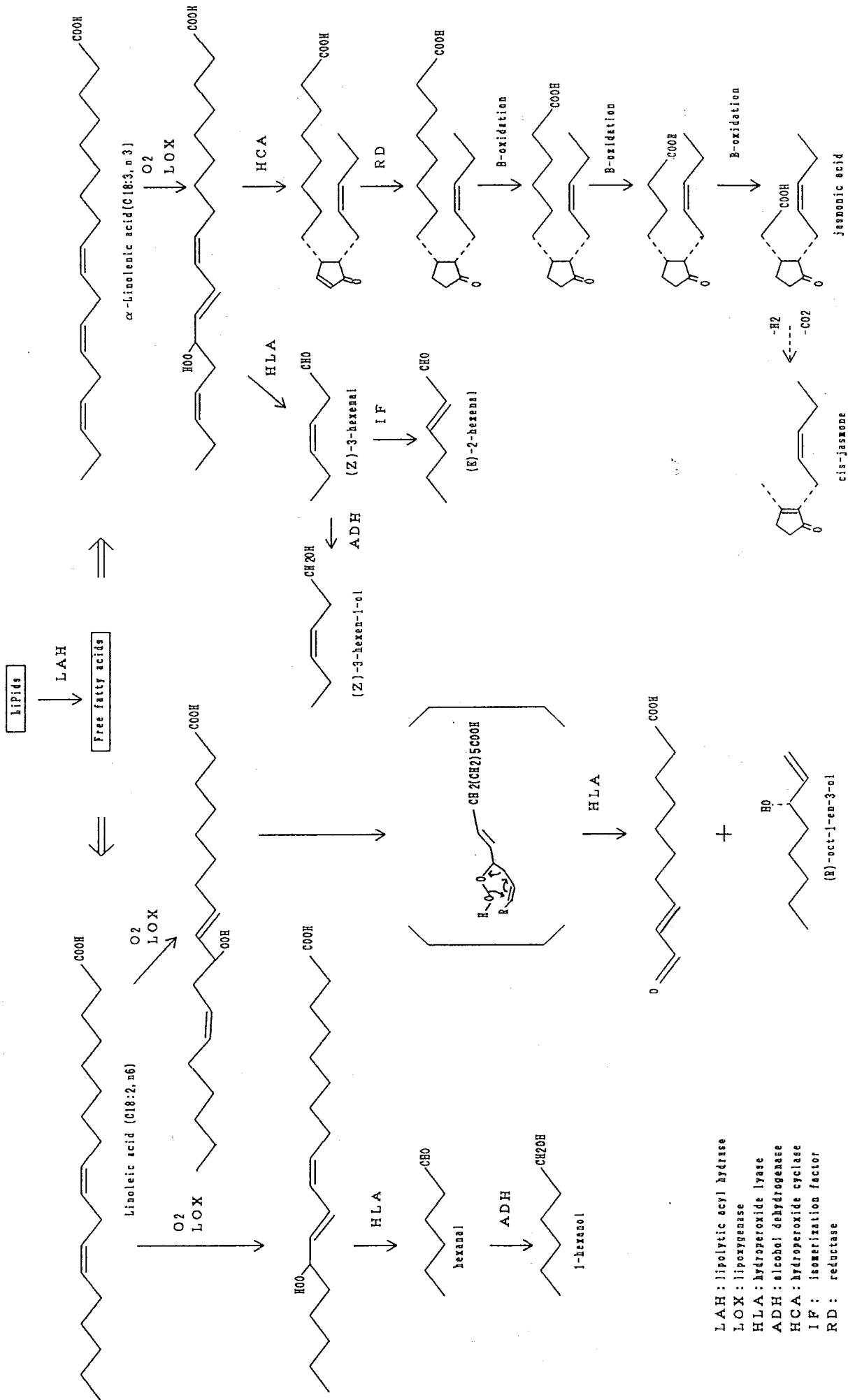


Fig. II-8 豆豆香氣成分の形成機構

リノール酸はO₂添加酵素(lipoxygenase)の働きで、13-(S)-ヒドロペルオキシドとなる。大豆のO₂添加酵素は13位の炭素に立体選択的にO₂を添加することが報告されている²⁰⁾。次に開裂酵素(hydroperoxide lyase)が13-(S)-ヒドロペルオキシドの12、13位の炭素-炭素結合を立体選択的に開裂し、hexanalが形成される。さらに、hexanalはアルコール脱水素酵素(alcohol dehydrogenase)によって1-hexanolに還元される。枝豆では完熟大豆に比較して1-hexanolの濃度がかなり低いことが判明しており、アルコール脱水素酵素の活性が成熟段階で異なることが示唆された。

また、1-octen-3-olはマッシュルームアルコールとして知られており、土臭い香気を持ち、大豆を水に浸漬したときに酵素反応により形成されると報告されている¹³⁾。また、マッシュルームではリノール酸から10-(S)-ヒドロペルオキシドを経由して形成されることが確認されている。Groschらは、開裂酵素が立体選択的に酸素原子が導入されたペルオキシドを認識し、13位の炭素を不斉化すると想定しており、これが1-octen-3-olの天然型が(R)となる理由であると報告している²¹⁾。枝豆においてもマッシュルームと同様に、リノール酸から10-(S)-ヒドロペルオキシドが形成され、開裂酵素によって開裂し、(R)型の1-octen-3-olが形成されていると想定される。

α -リノレイン酸もO₂添加酵素の働きで、13-(S)-ヒドロペルオキシドとなる。このヒドロペルオキシドもC₁₂-C₁₃開裂酵素によって開裂され、(Z)-3-hexenalが形成される。茶葉緑体中の(Z)-3-hexenalの一部はかなり早い時間で(E)-2-hexenalに異性化するといわれている。この反応は異性化酵素(isomerase)の他に、熱処理等の異性化因子(isomerization factor)によって非酵素的にも起こることが確認されている²²⁾。また、(Z)-3-hexenalはアルコール脱水素酵素によって還元され、(Z)-3-hexen-1-olになる。これらの反応が枝豆でも同様に起きて(E)-2-hexenal、(Z)-3-hexen-1-olが形成されていると想定される。

一方、枝豆特有香として重要な役割を持つcis-jasmoneも α -リノレイン酸から酵素的に生成されると推測される。これはVickらが数種の植物において、 α -リノレイン酸からjasmonic acidが合成されると報告していることに基づく。この報告によると、 α -リノレイン酸からO₂添加酵素の働きで、形成された13-(S)-ヒドロペルオキシドはヒドロペルオキシド環化酵素(hydroperoxide cyclase)の作

用で 12-oxo-cis, cis-10, 15-phytodienoic acid (12-oxo-PDA) となる。次に、12-oxo-PDA の環の二重結合が飽和され、その後、 β -酸化によって環についた側鎖から 6 つの炭素が脱離して、jasmonic acid が形成されるとしている²³⁾。さらに、彼らはこの経路は一般の植物にもみられる代謝かもしくないと述べている。枝豆においてもおそらくこの経路で jasmonic acid が形成され、その後、脱炭酸や脱水素が起きて、cis-jasmone になると考えられる。前駆物質となる α -リノレン酸は完熟大豆、枝豆両者に存在しており、完熟大豆で cis-jasmone が検出できない理由はこの経路に関わる酵素の活性が成熟に伴って低くなるためと考えられる。

枝豆において検出された主な香気成分はリノール酸や α -リノレン酸を前駆物質とし、主に酵素的に形成されることが示唆された。また、枝豆の成熟に伴って、香気形成に関わる酵素の活性が変化していることが示唆され、完熟大豆での大豆不快臭の形成を理解する上でも興味深い結果であった。

第 3 節 未熟大豆（枝豆）の冷凍保存に伴う香気成分の変化

枝豆は、季節によっては生で入手できるが、その期間は比較的短い。冷凍枝豆は広く市販されているが、枝豆栽培農家や一般家庭においても地場産の枝豆を出回り時期に適切な方法で冷凍保存することは経済的な面やおいしさの点から重要な課題である。

枝豆の冷凍保存ではその風味の低下が問題となる。そこで、第 3 節では収穫直後の枝豆とこれをプランチング後冷凍した試料、及びプランチングしないで冷凍した試料の香気成分を分析し、官能検査も行って、冷凍保存による枝豆の香気成分の変化とプランチングの効果について検討した。この結果から、枝豆の冷凍保存による風味の低下のメカニズムについて考察し、完熟大豆での不快臭の形成との関係を明らかにした。

1 実験方法

1) 試料

枝豆（品種名：スズユタカ）は 1990 年 9 月、収穫直後のものを直接農家より、7

Kgを購入し、以下の3種の試料とした。

試料A：収穫直後の試料

試料B：プランチング後、冷凍した試料

(31の水(5倍量)に1%の食塩を加え、沸騰後、600gの枝豆を投入し、再沸騰後30秒間のプランチングした。その後、急冷して、家庭用のフリージングパックに600gずつ詰め、家庭用の冷凍冷蔵庫(-20°C)で3ヶ月間、冷凍保存した。)

試料C：プランチングをしないで冷凍した試料

(家庭用のフリージングパックに600gずつ入れ、家庭用の冷凍冷蔵庫(-20°C)で3ヶ月間、冷凍保存した。)

2) 枝豆の官能検査

試料Bと試料Cについて家政学研究室の学生16名をパネルとして官能検査を実施した。パネルには、ゆでた直後の2種類の試料を提供した。パネルは試料を試食しながら香り、味について同時に、非常によい+2、よい+1、ふつう0、わるい-1、非常に悪い-2とする評点法で、評価した。結果はS A S統計パッケージを用いて一元配置の分散分析を行い、2種の試料の官能的な有意差の検定を行った。

3) 香気濃縮物の調製

枝豆香気成分の抽出はS D E法を用いて行った。すなわち、31の3つ口フラスコに枝豆(鞘付)600gと蒸留水1800ml、食塩18g(蒸留水の1%)を入れ、マントルヒーターで約100°Cで加熱した。溶媒フラスコには70mlのエーテルを入れ、約40°Cのウォーターバスであったため、還流させた。抽出時間は香気濃縮物の収量をあげながら加熱による変化をできるだけ避けるために1時間とした。エーテル抽出液に内部標準物質としてn-デシルアルコールを加え、無水硫酸ナトリウムで脱水後、常圧下、40°Cにて濃縮し、香気濃縮物を得た。これをG CとG C-M S分析の試料とした。

4) 香気濃縮物の分析、同定

香気濃縮物はTable II-7に示した条件でG CおよびG C-M S分析を行った。化合物の同定は文献値のマススペクトルデータおよび標準物質とのG Cの保持時間の一一致によった。ピーク面積は島津クロマトパックC-R 6 Aインテグレーターを用いて計算し、内部標準物質との面積比から枝豆中のppmで算出した。

Table. II-7 収穫直後と冷凍枝豆のG C及びG C-M S分析条件

G C 分析条件

Model: SHIMAZU GC-14A

Column : FS-WCOT, Supelcowax 10 (0.25mmx30m, 0.25 m film)

Oven temp. : 40°C (5min hold) → 3°C/min → 200°C

Carrier Gas: He, 0.8ml/min

Inj. Temp. : 200°C

Detector: FID, 200°C

G C-M S 分析条件

G C part

Model: HITACHI G3000

Column : FS-WCOT, Supelcowax 10 (0.25mmx30m, 0.25 m film)

Oven temp. : 40°C (5min hold) → 3°C/min → 200°C

Carrier Gas: He, 0.8ml/min

Inj. Temp. : 200°C

M S part

Model: HITACHI M-2000

Ionization Voltage: 70eV

Computer part

Model: HITACHI M-0201 system

2 結果及び考察

1) 官能検査による冷凍枝豆のブランチング効果の判定

試料BとCの香り、味について、評点法(Scoring method)による官能検査を実施し、これを一元配置の分散分析で解析し、結果をTable. II-8に示した。

香りに関しては試料Cの評価の合計点は-7、Bは4であり、この時の分散比 F_0 は5.99であった。F分布表より、試料間差の自由度1、誤差の自由度30の時、5%以下の危険率点のF値は4.71であり、 F_0 がFより大きかったので、試料Bが5%以下の危険率で、有意に評価が高いと判断された。従って、ブランチングして冷凍保存した枝豆は香りの評価が高く、ブランチングは枝豆の香気を変化させないうえで効果的であることが判明した。

味については試料Cの評価の合計点は-6、Bは3であり、Bの評価が高い傾向があった。しかし、この時、分散比 F_0 は2.69で、5%以下の危険率点のF値4.71より小さく、有意差は認められなかった。

2) 冷凍保存による枝豆香気の変化

試料A、B、CからSDE法により得られた香気濃縮物のガスクロマトグラムを比較すると試料AとBは酷似していた。試料Cでは、試料A、Bにおいて比較的小さなピークであったが増加の著しい成分が4種あった。Fig. II-9に試料A、BとCのガスクロマトグラムを示し、特にCで増加の著しい成分をa、b、c、dと明示した。試料A、B、CのGC-MS分析で、同定または推定された香気成分は第2節のTable II-6に示した成分と同じで、新しく同定された成分はなかった。

試料Cにおいて、著しく増加が認められた成分は標準物質とのGCの保持時間とマススペクトルの一一致により、ピークa:hexanal、ピークb:(E)-2-hexenal、ピークc:1-hexanol、ピークd:1-octen-3-olと同定され、これらは全てFig. II-3、Fig. II-7に示した大豆不快臭を持つ化合物¹⁴⁾であった。そこで、試料A、B、Cでのこれら大豆不快臭の濃度の比較をFig. II-10に示した。試料AとBではこれら大豆不快臭成分の濃度に大きな違いが認められなかった。しかし、試料Cではhexanalは試料A、Bの4-5倍の0.97ppm、1-octen-3-olは2-4倍の濃度の4.83ppmとなっていた。また、試料A、Bでは極めて少量しか検出されなかつた(E)-2-hexenal、1-hexanolが1.18ppm、1.28ppmとかなり高くなっていた。これら成分の閾値は0.1-1ppmの範囲にあり、試料Cでは大豆不快臭が強く感じられると想定さ

Table. II - 8 評点法による冷凍枝豆の官能評価と分散分析

官能評価結果

	種類／判定数	+2	+1	0	-1	-2	合計点	平均点
香	B	1	3	11	1	0	4	0.25
	C	0	3	4	8	1	-7	-0.44
味	B	1	6	4	5	0	3	0.19
	C	0	4	3	8	1	-6	-0.38

分散分析表

	要因	平方和(S)	自由度(F)	分散(V)	分散比(F_0)
香	全体	22.72	31		
	試料間差	3.78	1	3.78	5.99*
	誤差	18.94	30	0.63	
味	全体	30.72	31		
	試料間差	3.78	1	2.53	2.69
	誤差	28.19	30	0.94	

*:5%以下の危険率で有意差あり。

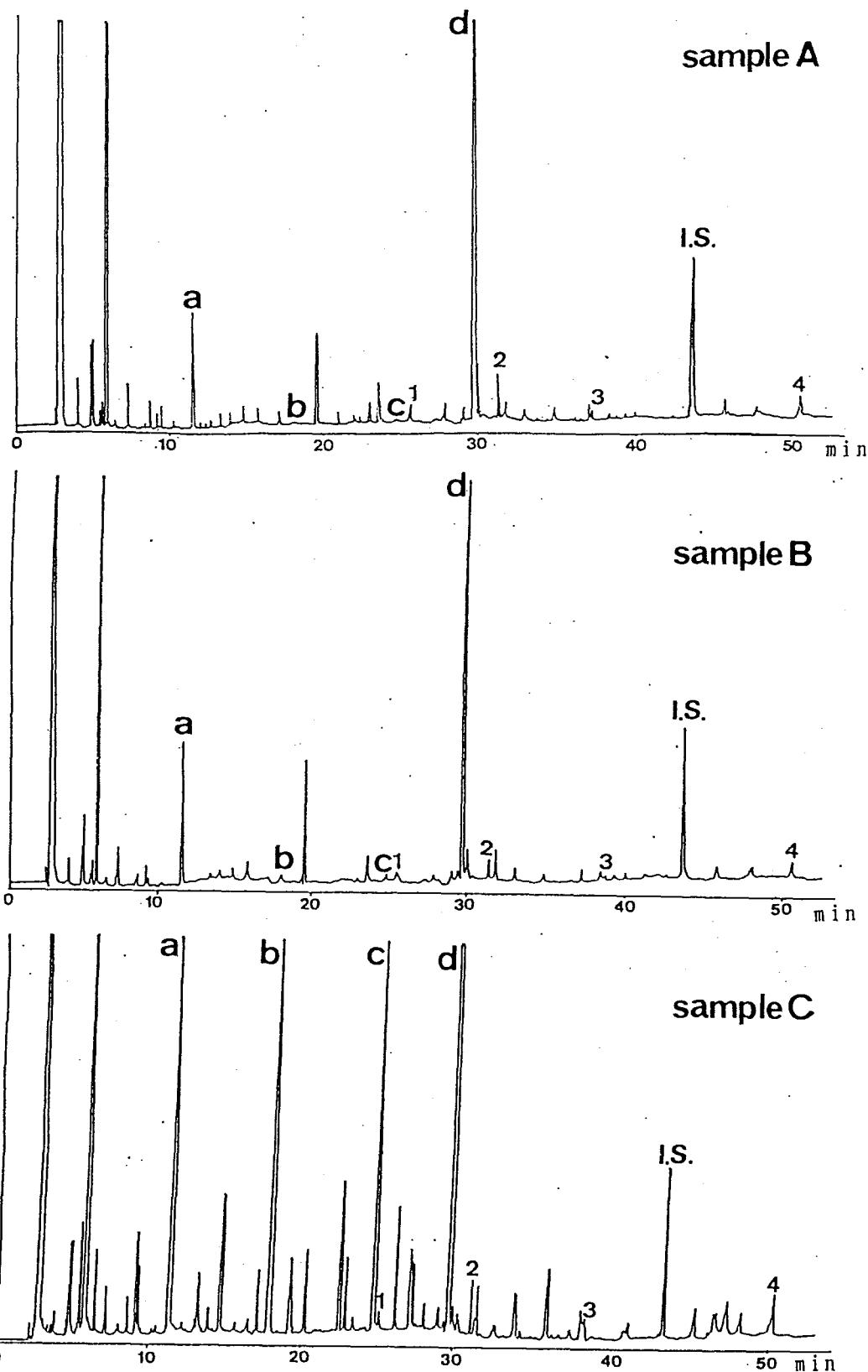


Fig. II-9 冷凍枝豆の香氣濃縮物のガスクロマトグラム

A: green soybeans immediately following harvesting.
 B: green soybeans blanched and then refrigerated for 3 months.
 C: green soybeans refrigerated without blanching for 3 months.
 a: hexanal, b: (E)-2-hexenal, c: 1-hexanol, d: 1-octen-3-ol, 1: (Z)-3-hexenyl acetate, 2: linalool, 3: acetophenone, 4: cis-jasmone,
 I. S.: internal standard.

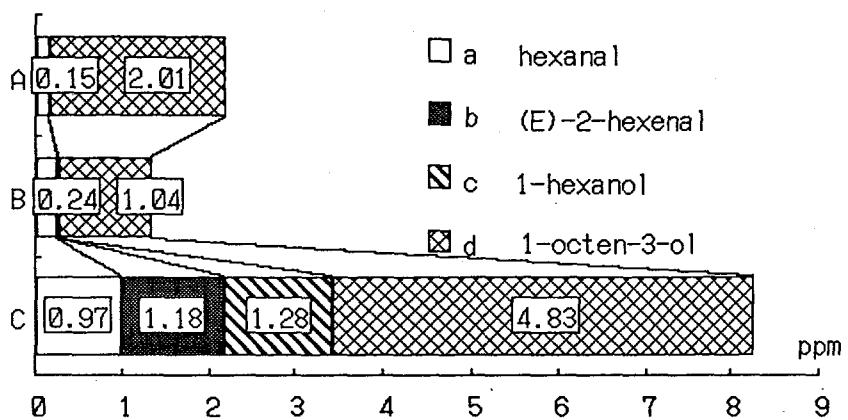


Fig. II-10 枝豆及び冷凍枝豆に含まれる大豆不快臭成分の濃度比較

れた。

第2節で述べたように、hexanal、1-octen-3-ol、(E)-2-hexenal、1-hexanolはともにリノール酸や α -リノレイン酸から酵素的に形成されることが確認されている。試料Bではブランチングによってこれらの反応に関わるO₂添加酵素や開裂酵素等が失活するために、大豆不快臭成分の生成が少なく、収穫直後のものと濃度として大きな差はなかった。ブランチングしなかった試料Cではこれら酵素の活性は-20°Cの冷凍条件でも失われず、3カ月間の冷凍保存中に枝豆の不飽和脂肪酸を酸化、開裂し、大豆不快臭の成分が生成したと推測される。試料Cでは生成した大豆不快臭成分が、枝豆本来の香りを損ね、官能評価も有意に低かったと考えられる。枝豆を冷凍保存する際のブランチングは特に香りを維持するのに効果的であることが判明した。枝豆の冷凍保存による風味の低下のメカニズムは、完熟大豆での大豆不快臭の形成と共通であり、大豆不快臭の基本的な理解を深めるうえで重要な結果であった。

第4節 要約

未熟種子を食品とした枝豆が完熟大豆になる過程での香気成分の変化を分析し、枝豆の独特の好ましい香気を明らかにするとともに、成熟にともなう大豆不快臭の形成を確認した。試料には収穫直後の枝豆と市販品を用い、SDE法で香気濃縮物を得、これをGC、GC-MS分析した。その結果、枝豆の香気成分として47成分を同定または推定した。未熟な大豆である枝豆からも完熟大豆と同様に、大豆不快臭の原因物質といわれる1-hexanol、hexanal、(E)-2-hexenal、1-octen-3-ol、2-pentylfuranが共通して同定された。これに加えて、完熟大豆には検出されなかったcis-jasmone、(Z)-3-hexenyl acetate、linalool、acetophenoneが同定された。これらの香気成分がさわやかな青葉様の香気や花様で甘い香りを付与し、枝豆特有の香気が形成されていることが判明した。特に、cis-jasmoneは枝豆には相当量存在するにもかかわらず、収穫が遅れると全く検出できなくなることから、枝豆香気の最も重要な成分であることが明かとなった。また、枝豆において検出された、cis-jasmoneをはじめとする主な香気成分はリノール酸や α -リノレイン酸を前駆物質とし、主に酵素的に形成されることが示唆された。さらに、

枝豆の成熟に伴って、香氣形成に関わる酵素の活性が変化していることが示唆され、完熟大豆での大豆不快臭の形成を理解する上でも興味深い結果であった。

次に収穫直後と、これをプランチングをした後に3ヶ月間家庭用の冷凍庫で冷凍保存をした枝豆、生のまま冷凍した枝豆を試料とし、枝豆の冷凍保存による香氣の劣化と、冷凍保存の際のプランチング効果について明らかにした。枝豆の香氣濃縮物はSDE法によって調製し、GC及びGC-MS分析をして香氣成分の分離同定を行い、内部標準法によって各成分の濃度を測定した。収穫直後の枝豆とプランチングして3ヶ月冷凍保存をした枝豆から検出された香氣成分や各成分の濃度に大きな差はなかったが、プランチングしないで冷凍保存した枝豆では大豆不快臭の原因物質であるhexanal、(E)-2-hexenal、1-hexanol、1-octen-3-olの生成が著しかった。また、評点法による官能検査の結果からも、特に香りに関しては5%の危険率で有意にプランチングしない枝豆の評価が低かった。これは長期間の冷凍により、枝豆中の脂質から脂肪酸酸化酵素や開裂酵素等の作用で、大豆不快臭成分が生成したためと推測される。従って、枝豆の冷凍保存でのプランチングは枝豆本来の香り保持に効果的であることが判明した。

枝豆香氣の成熟や冷凍保存による変化の過程から、大豆不快臭の基本的な性質やその形成のメカニズムが鮮明になった。

第Ⅲ章 大豆の加熱による不快臭の消長と加熱香気の形成

第1節 緒言

大豆の生臭さ、青臭さに代表される好ましくない特有の香気、いわゆる、大豆不快臭は大豆を加工利用する際の重大な欠点になっている^{9) - 14)}。日本の伝統的な大豆食品は完熟大豆を浸漬後、煮熟あるいは蒸煮して使用する場合が多く、この過程で大豆不快臭は減少あるいは除去されると言われているが、各香気成分の消長は詳しくわかっていない。

そこで、第2節では、各種食品の加熱香気研究において広く用いられ、よい成果をあげているSDE法で、大豆の煮熟による不快臭の消長とその過程で形成される香気成分を経時的に検討した。

さらに、第3節では、味噌や醤油、納豆の原料となる蒸煮大豆の香気組成を検討し、蒸煮大豆がそれぞれの食品に加工された際の香気成分の変化を知る基礎資料とした。香気濃縮物の調製方法としては第2節で用いたSDE法に加えて、ポーラスポリマーを用いるカラム濃縮法（カラム濃縮法）²⁴⁾でも検討することにした。カラム濃縮法は香気成分の抽出段階で加熱操作がなく、共存成分の影響も受けにくく、水溶液中の香気成分を効率よく回収できる。従って、第V章以降で述べるように、味噌のように加熱による香気の変化が著しい食品を対象とする場合は、カラム濃縮法は非常に効果的であると推察され、本節で用いることにした。

第2節 大豆の煮熟による不快臭の消長と加熱香気の形成^{25), 26)}

水に浸漬した完熟大豆からSDE法を用い、抽出溶媒を抽出時間ごとに取り替えることによって香気抽出物を調製し、大豆不快臭に関与する成分の煮熟による経時的な消長を検討した。これにより、伝統的な大豆食品の加工過程の煮熟による大豆不快臭の減少あるいは除去の実態を明らかにすることができる。さらに、煮熟中に形成される香気成分も明らかにし、煮熟大豆特有の香ばしいにおいに寄

与する成分の解明も試みた。

1 実験方法

1) 試料及び香気濃縮物の調製

実験に用いた大豆は中国産の輸入大豆である。この大豆300gを1.2lの蒸留水に15時間、室温で浸漬させた。この全量からSDE法を用い、50mlのエーテルで香気成分を抽出した。この時、抽出時間を0~3時間（以後は3時間加熱と略す）、3~5.5時間（以後は5.5時間加熱と略す）、5.5~8時間（以後は8時間加熱と略す）と時間ごとに受器のエーテルを取り替えることによって3種類の香気抽出物を得た。総量で4.5kgの大東を処理した。エーテル抽出物は無水硫酸ナトリウムで一夜、脱水し、常圧でエーテルを留去して、香気濃縮物とした。

2) 香気濃縮物の分析

得られた香気濃縮物には加熱によって形成される特有成分として含硫化合物の存在が想定されるので、FIDとFPDによる同時分析が行われた。ピーク面積は島津クロマトパックC-R1Bインテグレーターによって計算された。さらにGC-MS分析により化合物の推定を行った。最終的な同定は文献値または標準物質のマスデータの一致と標準物質のGCによる保持時間の一致によった。分析条件はTable III-1に示したとおりである。

2 結果と考察

煮熟大豆から得られた香気濃縮物の収量と香気の特徴をTable III-2に示した。大豆を3時間加熱して得られた香気濃縮物の収量は3.1mg/100gで最も高く、大豆不快臭、特に青臭さが強く感じられた。5.5時間加熱と8時間加熱の香気濃縮物の収量はどちらも0.6mg/100gと3時間加熱より、かなり低く、香気の特徴は青臭さがかなり弱くなっているものの、大豆不快臭は依然とかわらず残っており、これに煮豆特有の甘く、こうばしい香気が加わっていた。

8時間加熱の香気濃縮物はTable III-2に示したように含硫化合物の存在を連想させる香気であったので、含硫化合物を特異的に検出できるFPDとFIDによる同時分析を行った。その結果、3時間加熱では含硫化合物は検出されなかつたが、5.5時間加熱と8時間加熱では5種の含硫化合物が検出され、両者のFPDのガス

Table III-1 大豆煮熟臭成分のFID-FPD同時分析及び
GC-MS分析条件

FID-FPD同時分析の条件

Model: SHIMAZU GC-7A

Column: GLASS-WCOT PEG20M 35mx0.25mm

Oven temp.: 60°C → 2°C/min → 180°C

Carrier Gas: N₂, 0.8ml/min

Inj. Temp.: 200°C

Split rate: 30:1

Detector: FID, FPD, 200°C

GC-MS分析条件

GC part

Model: HITACHI 063

Column: GLASS-WCOT PEG20M 35mx0.25mm

Oven temp.: 60°C → 2°C/min → 200°C

Carrier Gas: He

Inj. Temp.: 200°C

MS part

Model: HITACHI 50GC

Ionization Voltage: 20eV

Table III-2 煮熟大豆から得られた香気濃縮物の収量と
香気の特徴

		Yield (mg/100 g)	Odor description
I. Soybean odor concentrates			
0~3 hr cooking	3.1	Soybean-like, greenish	
3~5.5 hr cooking	0.6	Cooked soybean-like (sweet)	
5.5~8 hr cooking	0.6	Cooked soybean-like specific to S-compds.	

クロマトグラムはほぼ同じパターンであった。Fig. III-1には大豆の3時間、5.5時間、8時間加熱のFID分析と、8時間加熱のFPD分析のガスクロマトグラムを示した。Fig. III-1によると、加熱時間が長くなると減少する成分と、新しく形成され、増加する成分があることが判明した。また、8時間加熱のFPD分析のガスクロマトグラムから、新しく形成され增加している成分はほぼ含硫化合物であることが示唆された。

さらに、得られた香気濃縮物をGC-MS分析した。この結果、大豆の煮熟臭成分として、68種の化合物が同定または推定され、これをTable III-3に示した。3時間加熱の香気濃縮物で検出された成分は、アルキルアルコールやカルボニル化合物、芳香族化合物が主体であるのに対し、5.5時間、8時間加熱ではこれらが検出されなくなり、それにかわって含窒素化合物や含硫化合物の検出数が増加していた。

同定された化合物の中から、ガスクロマトグラム上の主要な成分と大豆不快臭の原因物質をa～g、加熱により新しく形成され、FPD分析によって含硫化合物であることが判明している成分をA～Eとし、Fig. III-1に示すとともに、これらの成分名と、ガスクロマトグラムのピーク面積と香気濃縮物の収量を基にして計算された各成分の濃度(mg/大豆1kg)をTable III-4に示した。

Table III-4をもとに、大豆不快臭の経時的変化について考察した。3時間加熱では、主要な成分は大豆不快臭に寄与する、hexanal(ピークa)、3-methyl-1-butanol(ピークd)、1-hexanol(ピークe)、1-octen-3-ol(ピークf)と同定された。3時間加熱で検出され、大豆不快臭に寄与する成分のうち、hexanal(ピークa)と(E)-hexenal(ピークb)、3-methyl-1-butanol(ピークd)が5.5時間加熱では検出できなくなった。また、1-hexanol(ピークe)は3時間加熱では2.95mg/kgであったが、5.5時間加熱では0.11mg/kgに減少し、8時間後には検出できなくなった。

これに対し、1-octen-3-ol(ピークf)は3時間加熱では16.72mg/kgと最も濃度が高かったが、5.5時間加熱では0.80mg/kgに激減し、その後は8時間加熱でも0.53mg/kg存在した。また、油のもどり臭の原因物質である2-pentylfuranは3時間加熱で0.08mg/kg、5.5時間では0.05mg/kg、8時間では0.03mg/kgであった。

以上の結果から、hexanal、(E)-2-hexenal、1-hexanolのように大豆不快臭の中

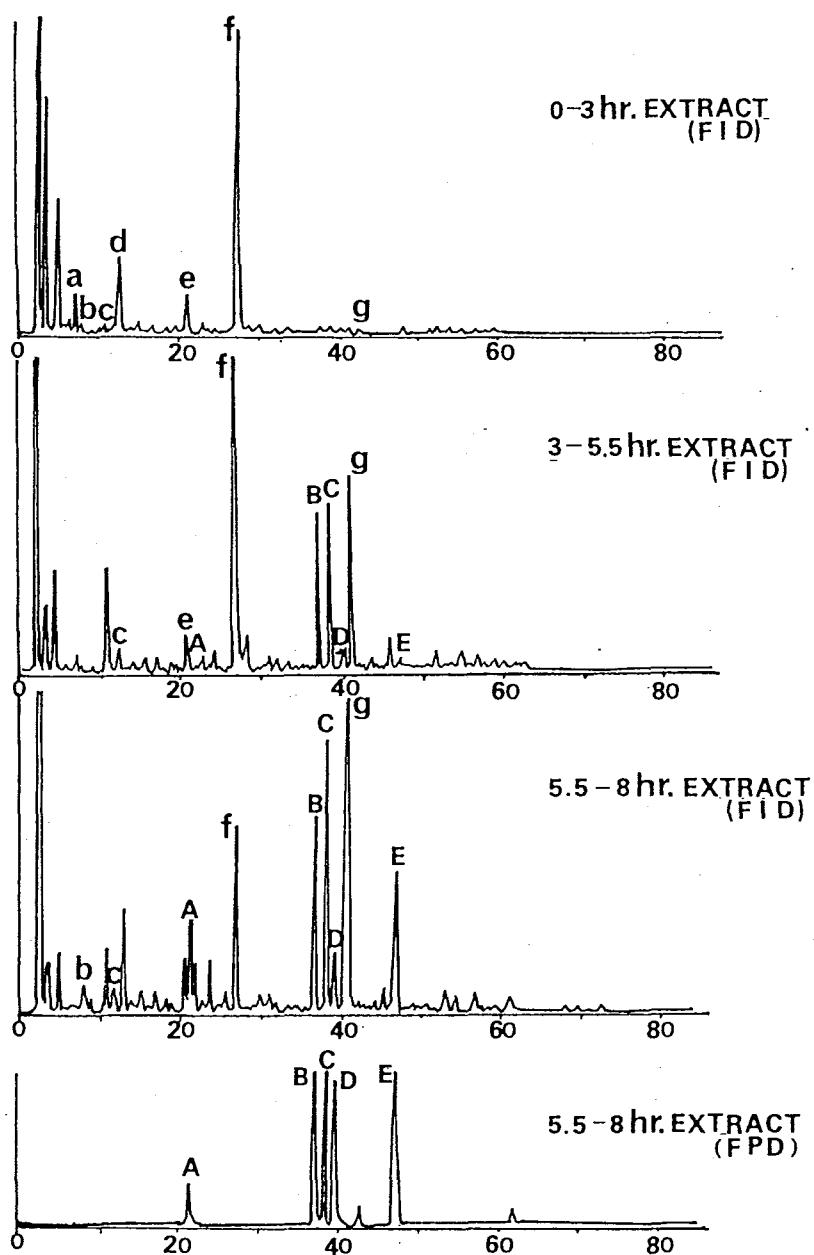


Fig. III-1 大豆の3時間、5.5時間、8時間加熱のFID分析と、
8時間加熱のFPD分析のガスクロマトグラム

Table III-3 大豆の煮熟臭成分として同定または推定された化合物

	3 hr. cooking	5.5 hr. cooking	8 hr. cooking
A, Alkyl alcohol			
1. Ethanol	+	+	+
2. 1-Propanol	+	-	-
3. 2-Methyl-1-propanol*	+	-	-
4. 3-Methyl-1-butanol	+	-	-
5. 1-Pentanol	+	+	-
6. 2-Methylpentan-1-ol*	+	-	-
7. 1-Hexanol	+	+	-
8. 3-Octanol	+	+	-
9. 3-Hexen-1-ol*	+	-	-
10. 1-Octen-3-ol	+	+	+
B, Carbonyl compounds			
1. 1-Pentanal	+	+	+
2. 1-Hexanal	+	-	-
3. (E)-2-Hexenal	+	-	-
4. 1-Heptanal	+	-	-
5. 4-Methylhex-2-enal*	+	-	-
6. <i>trans, trans</i> -Deca-2, 4-dienal*	+	-	-
7. 1-Penten-3-one*	+	-	-
8. 3-Penten-2-one*	+	-	-
9. 3-Methyl-3-buten-2-one*	-	+	-
10. 2-Heptanone	+	+	-
11. 3-Octanone*	+	+	+
12. 3-Hydroxy-2-butanone*	+	-	-
C, Aromatic compounds			
1. Xylene	-	+	-
2. Trimethyl benzene*	+	-	-
3. n-Propyl benzene*	+	+	+
4. n-Butyl benzene*	+	+	+
5. n-Pentyl benzene*	+	+	-
6. n-Hexyl benzene*	+	+	+
7. n-Heptyl benzene*	+	+	-
8. n-Octyl benzene*	+	-	-
9. Benzyl alcohol	+	+	+
10. Phenylethyl alcohol	+	+	+
11. 2,5-Dimethyl phenol	+	+	+
12. Guaiacol	+	+	+
13. Benzaldehyde	+	+	+
14. Phenylacetaldehyde	+	-	-
15. Phenylethyl formiate	+	-	-
16. Dichlorobenzene	+	+	-

D, Furan compounds				
1. 2-Pentylfuran	+	+	+	
2. 2-Furyl methyl ketone	+	-	-	
3. 2-Furfural	+	-	-	
4. 2-Methyl-5-isopropylfuran*	+	-	-	
5. Furfuryl alcohol	+	+	+	
E, Pyrazine, Pyridine and Pyrrole compounds				
1. 2-Methylpyrazine	-	+	+	
2. 2,5-Dimethylpyrazine	+	+	+	
3. 2,3-Dimethylpyrazine	-	-	+	
4. 2-Acetylpyrazine*	-	+	-	
5. Pyridine	+	+	+	
6. Methylpyridine*	-	-	+	
7. Dimethylpyridine*	-	-	+	
8. 2-Methyl-5-ethylpyridine*	-	-	+	
9. 2-Methylpyrrole*	-	-	+	
F, Sulfur containing compounds				
1. 2,3-Dimethylthiophene*	-	-	+	
2. 2-Butylthiophene*	-	+	+	
3. 2,3,4-Trimethylthiophene*	-	-	+	
4. 4-Ethyl-2-methylthiazole*	-	+	+	
5. 4-Ethyl-2-methyl-5-propylthiazole*	-	-	+	
6. 4-Butyl-2,5-dimethylthiazole*	-	-	+	
7. 2-Acetylthiazole*	-	+	+	
8. <i>trans</i> -3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane	-	+	+	
9. <i>cis</i> -3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane	-	+	+	
10. 2, 6-Dimethyl-1, 3-dithiin	-	+	+	
11. Thialdine	-	+	+	
G, Other compounds				
1. 1,3-Octadiene*	+	+	+	
2. 1,4-Dioxane*	+	+	+	
3. 2,3,4-Trimethyloxazole*	-	-	+	
4. Damacenone*	+	+	+	
5. Naphtalene	+	+	+	

* : Identified by MS only

Table III-4 大豆煮熟臭に寄与する成分の加熱時間による濃度の比較

Peaks	Compound	0~3 hr (mg/kg)	3~5.5 hr (mg/kg)	5.5~8 hr (mg/kg)
a	Hexanal	1.78	—	—
b	(E)-2-Hexenal	0.07	—	0.02
c	2-Pentylfuran	0.08	0.05	0.03
d	3-Methyl-1-butanol	5.51	—	—
e	1-Hexanol	2.95	0.11	—
f	1-Octen-3-ol	16.72	0.80	0.53
g	Furfuryl alcohol	0.19	0.59	0.85
A	4-Ethyl-2-methylthiazole	—	0.01	0.21
B	<i>trans</i> -3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane	—	0.58	0.69
C	<i>cis</i> -3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane	—	0.61	0.90
D	2,6-Dimethyl-1,3-dithiin	—	0.05	0.19
E	Thialdine	—	0.10	0.89

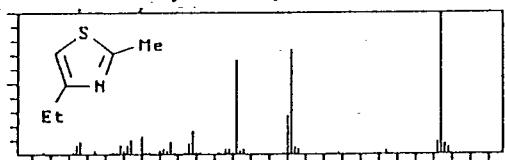
でも青臭さに寄与している成分は加熱の過程で明らかに減少あるいは消滅しており、煮熟によってある程度除去されることが明かとなった。しかしながら、大豆不快臭の中でも油の酸化臭の原因物質と報告されている 2-pentylfuran や土臭さの 1-octen-3-ol は、大豆を 8 時間加熱しても減少傾向はみられるものの、完全に消滅することはなかった。これらの化合物は比較的熱に安定で、煮熟による完全な除去は困難であると判断された。

3 時間加熱では 0.19 mg/kg と少量であった、 furfuryl alcohol (ピーク g) は 5.5 時間後には 0.59 mg/kg 、 8 時間後には 0.85 mg/kg と徐々に増加し、加熱により形成されていることが判明した。

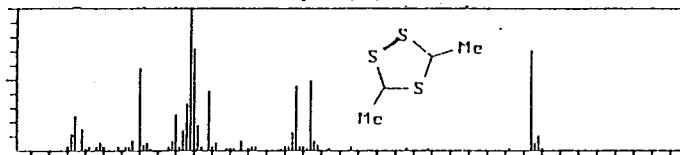
3 時間加熱では検出されなかつたが、経時的に増加が著しい成分は Table III - 4 に示したような 5 種の含硫化合物 (ピーク A ~ E) と同定された。これらの含硫化合物の構造とマススペクトルデータを Fig. III - 2 に示した。5 種の含硫化合物の中で、特に trans または cis - 3,5-dimethyl-1,2,4-trithiolane (ピーク B, C) と thialdine (ピーク E) の増加が顕著であった。3 時間加熱では全く検出されなかつた trans または cis - 3,5-dimethyl-1,2,4-trithiolane は、 5.5 時間加熱では 0.58 、 0.61 mg/kg となり、 8 時間加熱では 0.69 mg/kg 、 0.90 mg/kg と増加した。これらの成分は牛肉²⁷⁾、²⁸⁾、羊肉²⁹⁾、鶏肉³⁰⁾、えびの加熱香氣成分であり、閾値も 10 ppb と報告されている³¹⁾。さらに、 thialdine (ピーク E) は 5.5 時間加熱では 0.10 mg/kg であったが、 8 時間加熱では 0.89 mg/kg に増加した。この成分の閾値は 100 ppb で、低濃度ではローストビーフの香氣を持つ成分であると報告されている³²⁾。他の 2 種の含硫化合物もミートフレバーに寄与することが知られている。

一般に、これらの含硫化合物はアミノ酸の分解による NH₃ 、含硫アミノ酸由來の H₂S などと、メイラード反応によって生成した比較的簡単な化合物から、Fig. III - 3 に示した経路で形成される³³⁾。大豆にはタンパク質が豊富に含まれており、煮熟によって溶出したアミノ酸が前駆体となり、同様の経路で、生成したと推察された。従って、煮熟した大豆の香ばしいにおいには、加熱によって多量に形成された、動物性の肉や魚介類と共通する、いわゆるミートフレバーを持つ含硫化合物が寄与していると判断された。

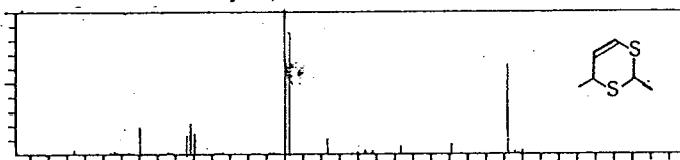
A 4-Ethyl-2-methylthiazole



B *trans*-3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane
C *cis*-3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane



D 2,6-Dimethyl-1,3-dithiin



E Thialidine

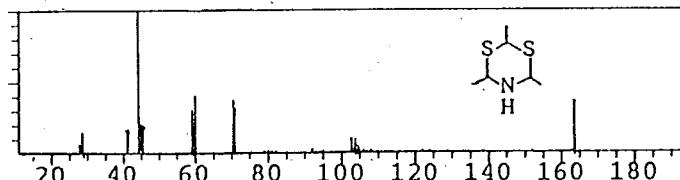


Fig. III-2 大豆の煮熟により形成された含硫化合物の構造とマススペクトルデータ

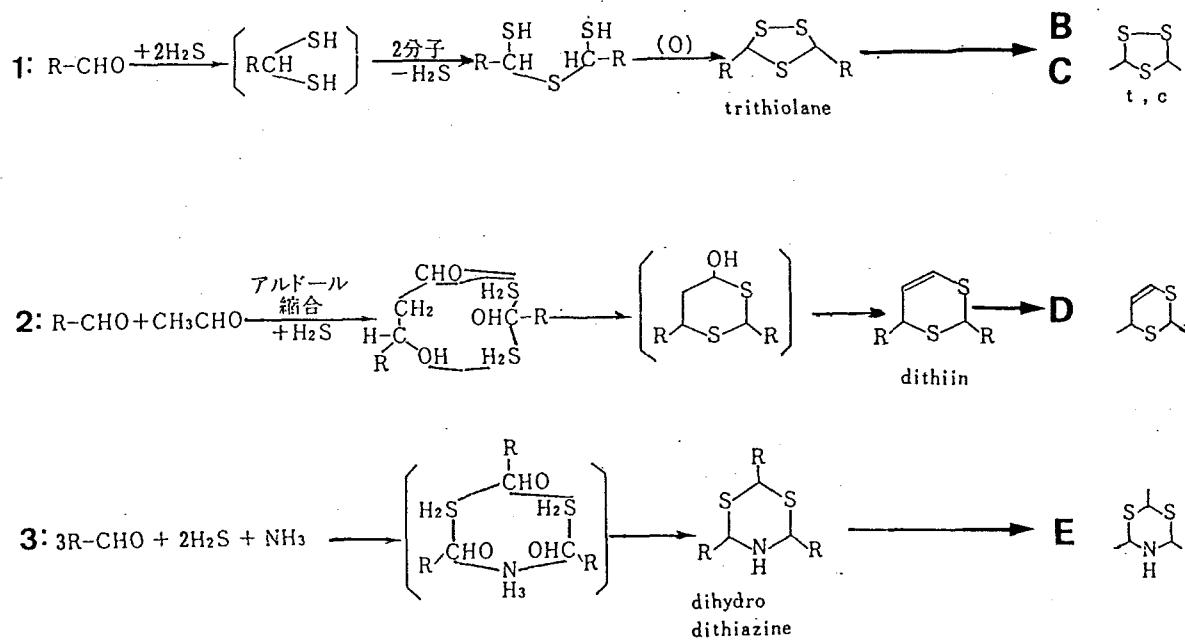


Fig. III-3 大豆中の含硫煮熟成分の形成機構

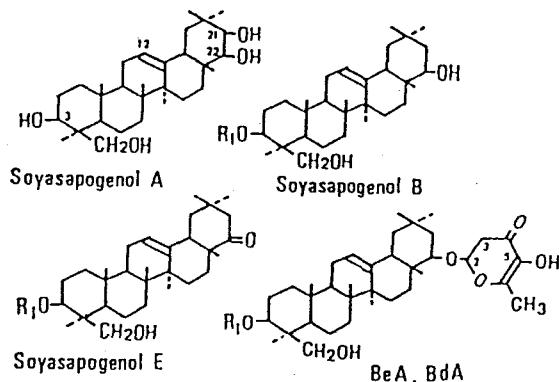
第3節 蒸煮大豆の香気形成と大豆サポニンの影響

味噌や醤油、納豆等の原料として用いられる大豆は水に浸漬後、蒸煮される場合も多い。そこで本節では蒸煮された大豆を試料とし、その香気組成を明らかにして、味噌や醤油、納豆に加工した際の大豆不快臭の変化と加工による香気形成を知る基礎資料とすることにした。

ところで、第2節で煮熟大豆からの香気濃縮物の調製方法として用いられたSDE法は少量の抽出溶媒で効率よく香気成分を抽出できるという利点があり、現段階では最も優れた方法の一つである。しかし、SDE法では水あるいは水溶液中の共存成分に対して親和性の高い成分の回収が悪く、また、抽出段階で本来の食品には存在しない加熱香気が形成される可能性もある²⁴⁾。そこで本節では香気成分の抽出段階で加熱操作がなく、共存成分の影響も受けにくく、水溶液中の香気成分を効率よく回収できるポーラスボリマーを用いるカラム濃縮法（カラム濃縮法）を用いて蒸煮大豆の香気組成を検討することにした。この方法は水中に微量溶解している香気成分をそのままポーラスボリマーに吸着させ、適当な溶媒で脱着させるもので、煮熟大豆からSDE法では抽出されなかった、新しい成分を検出できる可能性もある。また、今後、味噌のように加熱による香気の変化が著しい食品を研究対象とする場合は、抽出段階で加熱操作がないカラム濃縮法は非常に効果的であると推察される。

ところで、本節において、蒸煮大豆の主要な香気成分として、カラム濃縮法ではmaltol(3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one)が同定された。しかし、第2節でのSDE法による大豆煮熟臭成分や、本節のSDE法での蒸煮大豆の香気成分の分析では、maltolは全く検出されなかった。そこで、香気濃縮物の調製方法の違いによるmaltol回収率の比較を行った。

一方、近年、大豆の不快味の原因物質であるサポニンの新しい構造が発表され、グループBサポニンとして、Fig. III-4に示した、Ba、Bb、Bb'、Bc、Bd、Be、BdAおよびBeAが単離された。BaとBbのアグリコンはSoyasapogenol Bであった。BdとBeのアグリコンはSoyasapogenol Eであり、糖鎖組成は、BdはBaと、BeはBbと同じであった。また、Soyasapogenol Eは不安定で容易にSoyasapogenol Bに変化した。従って、BdはBaに、BeはBbに容易に変化することが報告されていた³⁴⁾。



Aglycone	R ₁
Ba	B
Bb	B
Bb'	B
Bc	B
Bd	E
Be	E
BdA	
BeA	

Fig. III-4 グループBサポニンの種類と構造

次に、BdAとBeAの構造が報告され、これらはBdとBeのアグリコンであるSoyasapogenol Eの22位の炭素にDDMP(2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one)が結合していた。これは言い替えればmaltolがアセタール型に結合した構造ということになる。さらにBdAとBeAは非常に不安定で、抽出及び精製過程をとおして容易に分解し、BdAからBaとBdに、BeAからBbとBeに変化することが明かにされた。これらの結果より、真正グループBサポニンはBdAおよびBeAのようにDDMPが22位の炭素に結合した構造であることが判明した^{35), 36)}。

ところで、BdAとBeAのDDMPはアグリコンから加水分解して脱離し、脱水するとmaltolになると推定される。一方、maltolはカラム濃縮法で蒸煮大豆より調製された香気濃縮物の主要香気成分であり、maltolは真正グループBサポニンの加熱分解により、生成する可能性も想定された。そこで、サポニンBeAを加熱し、生成する成分を確認し、グループBサポニンの蒸煮大豆の香気形成への影響についてもあわせて検討した。

1 実験方法

1) 試料

蒸煮大豆：蒸煮大豆は仙台味噌（仙台味噌株式会社製）を製造する際に使用されているものである。大豆は日本国産であり、約8時間水に浸漬後、加圧蒸煮缶で0.5-0.7kg/cm²(112-115°C)で約30分間蒸煮したものである。

グループBサポニン：サポニンBeAは、工藤らによって以下のようにして得られたものである³⁵⁾。大豆の胚軸1kgを室温で30分間、41の50%のエタノール水溶液に浸漬し、これをろ過した。このろ液をODSカラム(YMC Co., ODS-A 60-60/30, 5x74cm)に、50%メタノール溶液、続いて80%メタノール溶液とともに流し、15gずつ分取した。BeAの画分を集めてメタノールを40°C以下で減圧濃縮し、サポニンBeA画分が260mg得られた。サポニンBeA画分100mgを50%メタノールに溶解させ、Sephadex LH-20カラム(5x74cm)で、50%メタノールを流して、分画した。サポニンBeA区分を40°C以下で減圧濃縮して精製したサポニンBeA40mgを得た。

2) 蒸煮大豆からSDE法による香気濃縮物の調製

31の3つ口フラスコに蒸煮大豆600gと蒸留水1800ml、食塩18g(蒸留水の1%)を入れ、マントルヒーターで約100°Cに加熱した。溶媒フラスコには70mlのエーテル

を入れ、約40°Cのウォーターバスであたため、還流させた。抽出時間は香気濃縮物の収量をあげながら加熱による変化をできるだけ避けるために3時間とした。エーテル抽出液に内部標準物質としてエーテルで0.2mg/mlに調製したBHTを1.0ml添加し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、常圧にて蒸留濃縮し、香気濃縮物とした。これをGCとGC-MS分析の試料とした。

3) 蒸煮大豆からのカラム濃縮法による香気濃縮物の調製

(1) カラムの調製

ポーラスポリマー樹脂としてPorapak Q (an ethylbenzene-divinylbenzene copolymer、50-80メッシュ、表面積550-750m²/g) を用い、エチルエーテルで10時間、ソックスレー抽出装置で精製した。精製した樹脂はメタノールで置換し、メタノール中で保存した³⁷⁾。樹脂をガラスカラムに3g充填し(内径1cm×高さ11cm)、メタノールを水に置換した後、試料を流した。

(2) 試料の調製と香気成分の吸着及び脱着

蒸煮大豆60gに蒸留水240mlを加え、ブレンダーで3分間粉碎し、懸濁液を調製した。その後、5°C、3000rpmで15分間、遠心分離し、上澄液を得、蒸煮大豆の水抽出物を調製した。これを上記カラムに1ml/minの流速で流し、香気成分を吸着剤に吸着させた。吸着された香気成分は100mlのエーテルを1ml/minで流し、溶出させた。エーテル溶出液には内部標準物質としてエーテルで0.2mg/mlに調製したBHTを1.0ml添加し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、常圧にて蒸留濃縮し香気濃縮物とした。

4) maltolの回収実験

SDE法ではmaltolの50ppm水溶液2000mlを試料とし、抽出溶媒としてエーテルあるいはジクロルメタン各70mlを用いて、3時間抽出した。各抽出液に内部標準物質としてBHT加え、無水硫酸ナトリウムで脱水後、常圧にて蒸留濃縮し香気濃縮物とした。抽出溶媒をエーテルとした場合をSDE-E、ジクロルメタンをSDE-Dとする。カラム濃縮法では、maltolの50ppmに調製された水溶液300mlを、Porapak Qを3g充填したガラスカラムに(内径1cm×高さ11cm)に1ml/minの流速で流し、maltolを吸着剤に吸着させた。このカラムに100mlのエーテルを1ml/minで流し、maltolを溶出させた。エーテル溶出液には内部標準物質を添加し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、常圧にて蒸留濃縮した。各調製方法による実験は3

回繰り返して行った。詳細な実験条件は蒸煮大豆の香気濃縮物の調製方法と同じである。

5) 大豆サポニンからのmaltol生成の確認

真正グループBサポニンは非常に不安定で、pHによっても安定性が異なると想定されている。大豆を蒸煮した際の蒸煮液のpHは約6.4であるので、サポニンBeA 20mgをpH6.4のClark-Lubs緩衝液100mlに溶解させることによって、試料を調製した。この溶液を精製したPorapak Q吸着剤3gを充填したカラムに流し、溶液中の成分を吸着させた。これにエーテル100mlを流し、溶出物を濃縮した。詳細な条件は蒸煮大豆の場合と同様である。また、同じ濃度のBeA溶液を6時間加熱還流させた。この溶液もPorapak Q吸着剤3gを充填したカラムに流し、溶液中の分解生成物を吸着させ、以下同様に処理し、濃縮物を得た。

6) 香気成分及びmaltolの分離・同定

得られた香気濃縮物、maltolの回収物、及び、サポニン分解物はGCおよびGC-MSを用いて分析した。ピーク面積計算は島津クロマトパックC-R2Aによった。化合物の同定は文献値のマススペクトルデータおよび標準物質とのGCの保持時間の一致によった。詳細な分析条件をTable III-5に示したとおりである。

2 結果及び考察

1) 蒸煮大豆の香気組成

蒸煮大豆よりカラム濃縮法とSDE法で得られた香気濃縮物のガスクロマトグラムをFig III-5に示した。これらの香気濃縮物のGC-MS分析の結果、Table III-6に示したような成分が同定された。

hexanal(ピークNo.8)、1-hexanol(ピークNo.20)、1-octen-3-ol(ピークNo.27)、2-pentylfuran(ピークNo.16)の大不快臭に寄与する成分はカラム濃縮法、SDE法両法において検出され、蒸煮によってもこれらの成分を完全に除去することはできないことが判明した。

SDE法で蒸煮大豆から同定された成分は第2節で煮熟大豆から検出された成分と共通していた。これに対し、カラム濃縮法では煮熟大豆からSDE法で検出された成分の他に新しく17種の成分が同定された。

Table III-6に基づいて、蒸煮大豆からカラム濃縮法とSDE法で得られた香気濃

Table III-5 蒸煮大豆から得られた香気濃縮物の分析条件

GC 分析条件

Model: SHIMADZU GC-14A

Column : FS-WCOT, DB-WAX(0.25mmx30m, 0.25 m film)

Oven temp. : 40°C (5min hold) → 3°C/min → 200°C

Carrier Gas: He, 0.8ml/min

Inj. Temp. : 200°C

Detector:FID, 200°C

GC-MS 分析条件

GC part

Model: HITACHI G3000

Column : FS-WCOT, Supelcowax 10(0.25mmx30m, 0.25 m film)

Oven temp. : 40°C (5min hold) → 3°C/min → 200°C

Carrier Gas: He, 0.8ml/min

Inj. Temp. : 200°C

MS part

Model: HITACHI M-2000

Ionization Voltage: 70eV

Computer part

Model: HITACHI M-0201 system

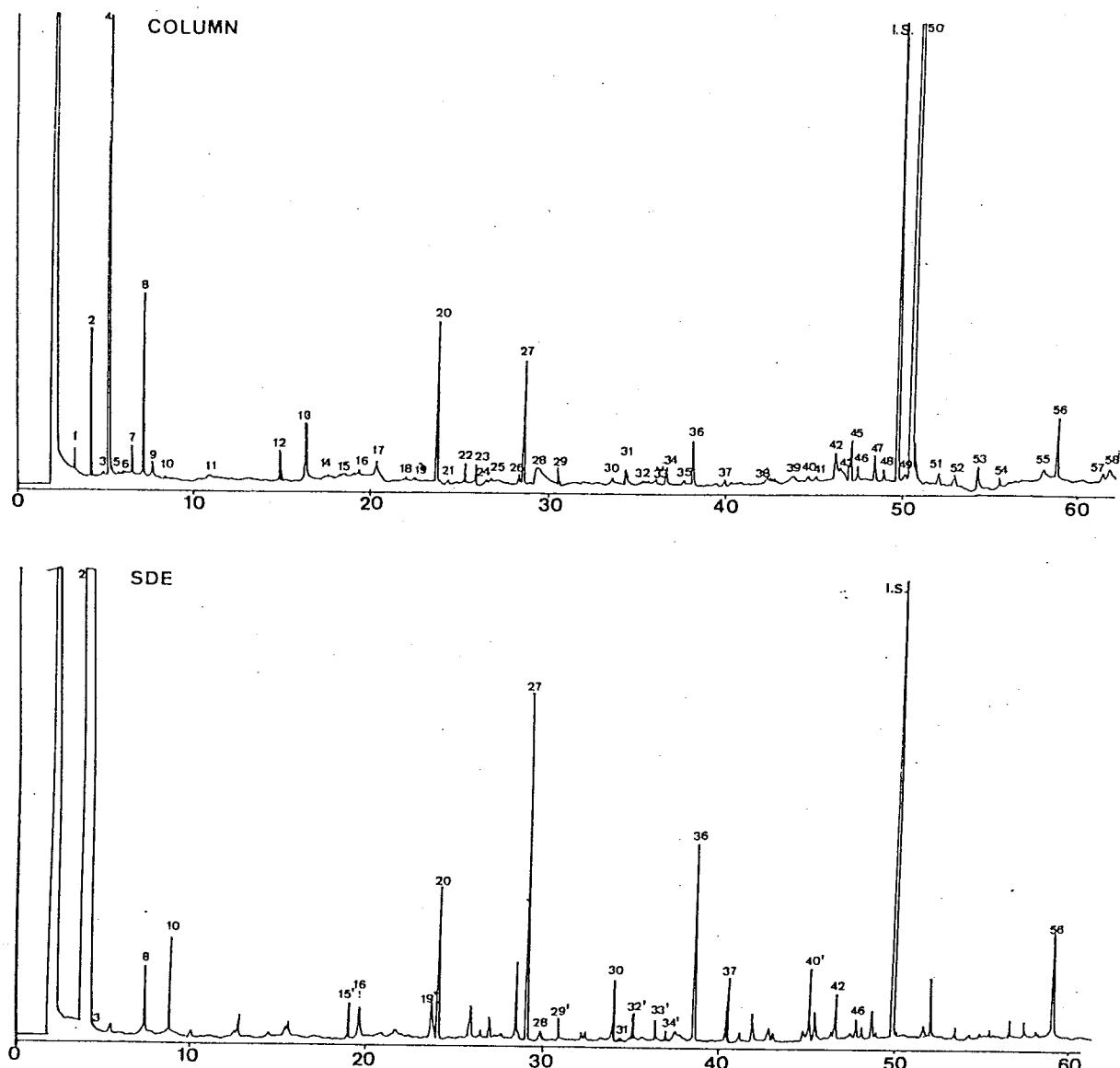


Fig. III-5 カラム濃縮法と S D E 法による蒸煮大豆香気濃縮物のガスクロマトグラム
COLUMN : カラム濃縮法、SDE : S D E 法、I. S. : 内部標準物質。

Table III-6 蒸煮大豆の香気成分として同定された化合物

Peak No.	化合物名	カラム (ppm)	SDE (ppm)
aliphatic alcohols			
2	ethanol	0.15	11.05
13	1-pentanol	0.04	-
20	1-hexanol	0.24	0.26
23	3-octanol	0.02	-
27	1-octen-3-ol	0.17	0.41
carbonyl and acid compounds			
28	acetic acid	0.20	+
31	isobutyric acid	0.04	+
32	butanoic acid	0.01	-
43	hexanoic acid	0.01	-
3	2-methylbutanal	0.01	-
8	hexanal	0.19	0.07
11	2,4-decadienal	+	-
4	2,3-pentandione	0.87	-
aromatic compounds			
42	2-methoxyphenol	0.05	0.10
58	2,6-dimethoxyphenol	0.02	-
56	2-methoxy-4-vinylphenol	0.41	0.51
46	benzyl alcohol	0.03	0.05
48	2-phenylethanol	0.02	-
30	benzaldehyde	0.01	0.25
35	phenylacetaldehyde	+	-
7	toluene	0.05	-
29	dichlorobenzene	0.01	-
3	benzene	-	0.03
furans			
16	2-pentylfuran	+	0.08
36	furfuryl alcohol	0.07	0.18
33	methyl-2-furoate	0.01	0.06
29'	furfural	-	0.06
32'	5-methyl-2-furfural	-	0.10
furanones, pyrones			
52	HMMF*1	0.01	-
54	HDMF *2	0.03	-
50	malto1	2.98	-
57	DMDP *3	0.01	-
34	r-butyrolactone	0.02	-

nitrogen-containing compounds

10	pyridine	+	0.20
49	acethylpyrrole	0.01	-
37	2-acethylthiazole	0.01	0.25
15'	2-methylpyrazine	-	0.14
19'	2,5-dimethylpyrazine	-	0.20
34'	2-acetylpyrazine	-	0.04

others

40'	damacenone	-	0.18
-----	------------	---	------

+ : trace

*1 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone

*2 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone

*3 3,5-dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydro-4H-pyran-4-one

縮物において同定された成分を比較すると、当然のことながら、共通する成分が多かった。しかし、甘いカラメル様の香氣を持つ、加熱香氣の代表的な成分であるmalto1（ピークNo. 50）はSDE法では検出されなかったが、カラム濃縮法では2.98 ppmと量的な主要成分であった。また、閾値が0.04 ppbと低く、強いカラメル様のにおいをもつと報告されている4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone（HDMF）³⁸⁾（ピークNo. 54）もカラム濃縮法でのみ同定された。malto1とHDMFの構造とマススペクトルデータをFig. III-6に示した。malto1もHDMFとともに、Fig. III-7に示したように、単糖からメイラード反応によって形成される³⁹⁾。蒸煮大豆中でもこのような経路で形成され、蒸煮大豆の甘い香氣に寄与していると判断された。

2) 香気濃縮物調製方法によるmalto1回収率の比較

蒸煮大豆の香気濃縮物から、SDE法ではmalto1が検出されなかったが、カラム濃縮法ではmalto1が量的主要成分であった。そこで、malto1は香気濃縮物の調製方法の違いで回収率が異なるのか、あるいは、malto1は大豆の煮熟、蒸煮等の加熱条件等で生成量に大きな差があるのかを確認する必要がある。そこで、malto1の香気濃縮物調製方法による回収率の比較を行った。回収率は内部標準物質とのGCによるピーク面積の比から算出した。

各香気濃縮物調製方法によるmalto1回収率は、カラム濃縮法で48.0%、SDE法エーテル抽出で0.1%以下、SDE法ジクロロメタン抽出で0.1%であった。malto1は水に1.2%溶解し、水の温度が上昇すると溶解度もかなり上昇する³⁹⁾。malto1は揮発性成分の中では水との親和力が強く、SDE法のような蒸留法では抽出されにくいと結論づけられる。

これにより、malto1は蒸煮大豆の香気成分として存在することが明かになった。香気濃縮物の調製方法によって抽出される成分に差が生じることがあり、実際の蒸煮大豆により近い香気特性を持っている香気濃縮物が得られる方法を用いて、香気組成を明らかにすることが重要である。

3) 蒸煮大豆の主要香気成分malto1の生成と大豆サポニン

malto1が蒸煮大豆の香気成分として存在することは明かにされたが、さらにその生成経路に興味がもたれた。一般的には、Fig. III-7に示したような単糖からメイラード反応によって形成されるが、大豆サポニンが前駆物質となる可能性も示

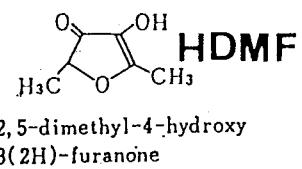
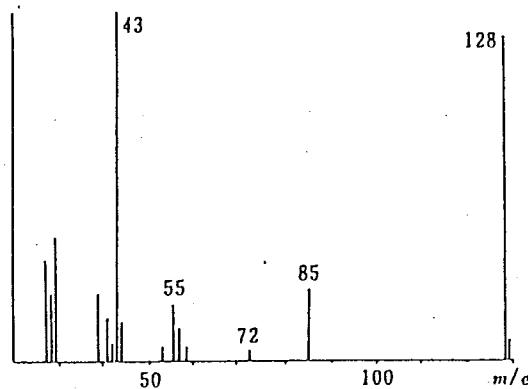
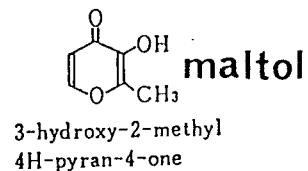
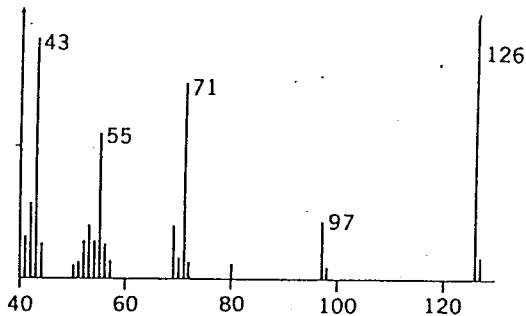


Fig. III-6 maltolとHDMFの構造とマススペクトルデータ

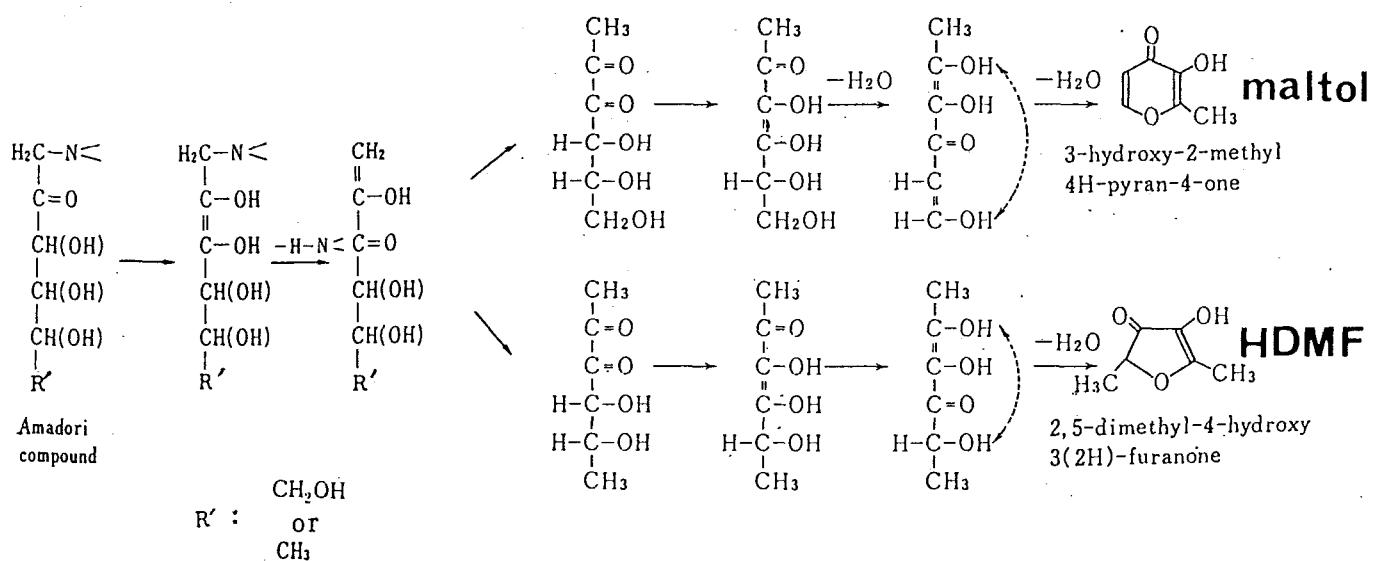
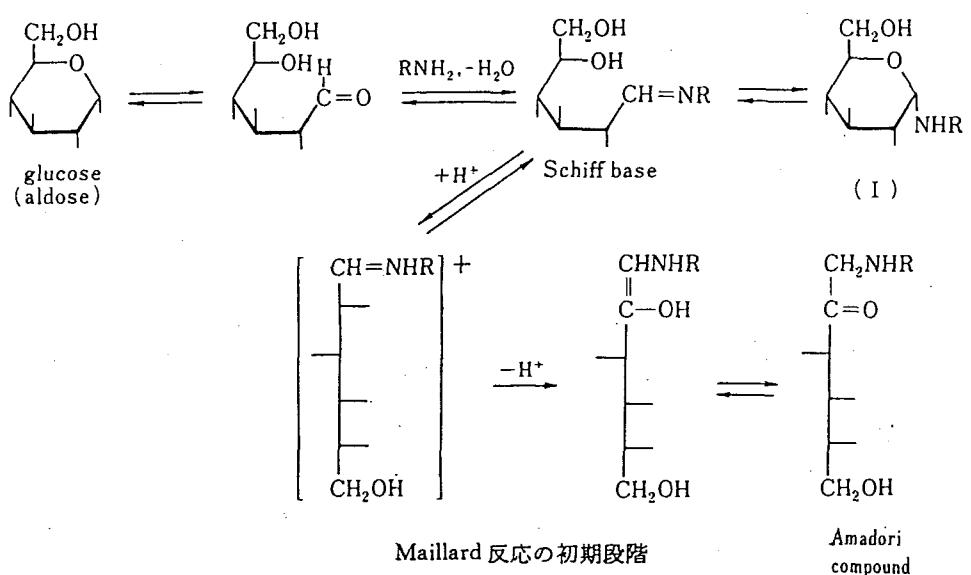


Fig. III-7 大豆煮熟中の単糖からのmaltol, HDMFの形成機構

唆された。

そこで、初めに未加熱のサポニンBeA溶液からカラム濃縮法で得られた濃縮物をGC、及びGC-M S分析した。その結果、ピークは1つも検出されず、ポーラスポリマーに吸着された成分はないことが判明した。これに対し、加熱したサポニンBeA溶液の濃縮物からはmalto1のピークのみが検出された。内部標準物質とのGCによるピーク面積の比と、先に求めたmalto1の回収率から、サポニンBeAは55.4%が分解したことが示唆された。従って、蒸煮大豆の主要香氣成分として同定されたmalto1はグループBサポニンの加熱分解によっても生成すると結論づけられる。しかし、大豆中のグループBサポニンの濃度等、現段階では不明な点も多く、蒸煮大豆に検出されたmalto1の前駆物質には大豆中の糖とグループBサポニンの2つの可能性があるが、その占める割合については今後の検討課題である。

第4節 要約

伝統的な大豆食品は完熟大豆を浸漬後、煮熟あるいは蒸煮して使用する場合が多い。そこで、大豆を煮熟あるいは蒸煮した際の大豆不快臭の消長と加熱による香氣形成について検討した。大豆を蒸留水に浸漬後、S D E法で香氣濃縮物を経時に調製し、これをGC、GC-M S分析して比較した。大豆煮熟成分として同定あるいは推定された化合物は68種であった。これら化合物のうち、青臭さの原因物質であるhexanal、(E)-2-hexenal、1-hexanolは煮熟することにより、減少または消失したが、2-pentylfuran、1-octen-3-olは8時間加熱しても、消失せず、存在していた。加熱によって急激に増加した成分は動物性の肉や魚介類の加熱香氣として知られているtransまたはcis-3,5-dimethyl-1,2,4-trithiolane, thialdineなどの含硫化合物であった。煮熟した大豆の香ばしいにおいには、加熱によって大量に形成されたこれら含硫化合物が関与している。

次に、大豆を味噌や醤油、納豆に加工したときの香氣の変化を知る基礎資料とするため、原料となる蒸煮大豆から、ポーラスポリマーを用いて香氣成分を吸着し、エーテルで脱着する方法（カラム濃縮法）で香氣濃縮物を調製するとともに、S D E法でも香氣濃縮物を調製して、その香氣組成を比較検討した。その結果、

カラム濃縮法では煮熟大豆から S D E 法で検出された成分に加えて新しく 17 種の成分が同定された。大豆不快臭に寄与する成分は蒸煮大豆からも検出され、蒸煮によってもこれらの成分を完全に除去することはできないことが判明した。また、甘いカラメル様の香氣を持つ、加熱香氣の代表的な成分である maltol がカラム濃縮法では量的な主要成分であった。maltol は S D E 法では検出できなかつたので、各香氣濃縮物調製方法による maltol 回収率を求め、比較したところ、カラム濃縮法は 48.0%、S D E 法は約 0.1% であった。従って maltol は S D E 法では抽出されなかつたと判断された。

また、大豆の不快味の原因物質であるサポニンの B グループ BeA、BdA の新しく発表された構造は、アグリコンの C-22 位に DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) が結合している。DDMP はアグリコンから加水分解して脱離し、脱水すると maltol になると推定される。そこで、グループ B サポニン BeA の水溶液を加熱し、カラム濃縮法で生成成分を回収し、分析したところ、maltol が確認された。よって、蒸煮大豆に検出された maltol の前駆物質には大豆中の糖とグループ B サポニンの 2 つの可能性があることが示唆されたが、その占める割合は今後の課題である。

第IV章 納豆の香氣形成

第1節 緒言

納豆には糸引納豆と塩納豆（浜納豆など）があるが、通常納豆といえば糸引納豆を指す。納豆は蒸煮大豆を納豆菌の発酵作用によって熟成させたもので曳糸性の強い粘質物を多量に作り、独特の風味を持つ日本の伝統的な大豆発酵食品である。納豆は地域性の強い食品で東北や関東、北海道での消費は多く、関西地方では極めて少なかったが、最近では、全国的に生産と消費が広がりつつある。これは人の移動が活発になったこと、コールドチェインや冷蔵庫の普及によって保存期間が伸びたことや、健康食としてのイメージが貢献しているものと思われる。

納豆は一般にはFig. IV-1⁴⁰⁾のように、原料大豆を浸漬後、蒸煮し、これに納豆菌を接種し、35-40°Cで約18時間の発酵を経て生産される。この間に納豆菌は増殖し、それにともない、いろいろな酵素を大量に生産する。大豆の成分はこれら酵素の働きによって、大きな変化を受ける。その中でも大豆タンパク質は納豆菌のプロテアーゼによって極めて短時間で分解される。その結果、Table IV-1に示したように水溶性窒素とアミノ態窒素が増加する⁴¹⁾。このように納豆菌が大豆の組織を分解し、タンパク質の消化を進めているため、栄養的にも納豆の消化性は向上している。また、納豆のうま味はこのようにして分解されたグルタミン酸を中心とするアミノ酸による。生大豆、蒸煮大豆、納豆での各種アミノ酸の平均遊離率はTable IV-2に示したとおりであり⁴²⁾、特に、発酵熟成過程でのアミノ酸遊離率が高い。また、納豆のうま味に深く寄与しているグルタミン酸の遊離率は11%で全アミノ酸の平均遊離率と同じで、特に高い訳ではない。このように、納豆の発酵、熟成に関わる微生物は納豆菌のみで、味噌、醤油の発酵には麹かびや乳酸菌類、酵母類など数々の微生物が関与しているのに比較して、単純である。

納豆菌によるタンパク質分解でアミノ酸が生成する発酵過程で、同時に、納豆らしい風味も形成される。また、発酵の後半になり、過熟になるとアミノ酸がさらに分解してアンモニアが生産される。納豆の不快な香氣の主体はこのア

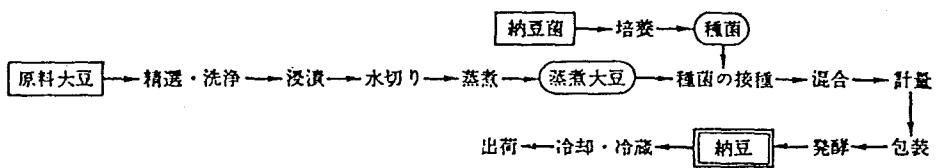


Fig. IV-1 納豆の製造工程

Table IV-1 納豆製造中の窒素化合物の変化

Hours	% in dry matter				% in total nitrogen		
	Total-N	Soluble-N	Amino-N	NH ₃ -N	Soluble-N	Amino-N	NH ₃ -N
0	7.36	1.26	0.07	0.02	17.1	0.95	0.27
4	7.45	1.26	0.07	0.02	16.9	0.94	0.27
6	7.45	2.72	0.17	0.02	36.5	2.28	0.27
8	7.29	3.22	0.20	0.03	44.2	2.74	0.41
10	7.28	3.42	0.35	0.09	47.0	4.81	1.24
12	7.55	3.78	0.43	0.15	50.1	5.70	1.99
14	7.51	3.86	0.54	0.16	51.4	7.19	2.13
16	7.41	3.99	0.60	0.16	53.8	8.10	2.16
18	7.23	4.13	0.60	0.20	57.1	8.30	2.77

Table IV-2 納豆製造中のアミノ酸遊離率の変化

Amino Acids	Raw Soybean	Steamed Soybean	Fermented Products	
			8hr	16hr
Glycine	0.12	0.50	2.1	9.7
Alanine	0.65	1.2	9.8	24
Valine	0.53	0.80	6.5	16
Isoleucine	0.36	0.67	5.4	13
Leucine	0.37	0.71	6.5	18
Aspartic acid	0.36	0.48	0.9	2.2
Glutamic acid	0.65	0.64	4.4	11
Lysine	0.40	0.42	2.6	7.7
Arginine	0.58	1.2	8.5	10
Histidine	1.1	1.4	6.6	14
Phenylalanine	0.45	0.89	3.8	10
Tyrosine	0.27	0.62	2.7	6.5
Proline	0.71	0.86	1.2	4.5
Tryptophan	4.2	5.6	11	22
Methionine	1.0	1.6	2.3	10
Cystine	0.10	0.30	1.5	5.1
Serine	1.7	0.36	1.4	3.7
Threonine	0.63	1.2	7.9	26

ンモニアであり、アンモニアの発生率で品質の劣化状態が判断されている。また、製品中には生きた納豆菌が大量に生存しているので低温に保持しないと、同じようにアンモニアが生成して風味が低下する。

納豆の香気研究は主に商品としての風味の低下に関することが中心で、納豆の好ましい特有香気についての研究は少なく、詳細についてはまだ、よくわかっていない^{43)~46)}。一方、納豆ではその特有香のため、大豆の不快臭である豆臭、青臭さが感じられない。そこで本章では納豆特有のことうばしいにおいの原因物質を、原料となる煮熟大豆や蒸煮大豆の香気組成と比較することによって検索し、納豆で大豆不快臭が感じられない理由についても考察した。さらに、納豆の特有香気成分としてピラジン化合物に着目し、納豆菌によるピラジン化合物生成機構の解明も試みた。これによって、大豆の不快臭の除去あるいはマスクに役立つ情報が得られると推察される。

第2節 納豆の香気組成^{25), 26)}

納豆は煮熟大豆と同様の形状を持っているにもかかわらず、煮熟大豆の香気とは全く異なる特有の香気を持っており、大豆不快臭は感じられない。小菅らは納豆の香気成分としてtetramethylpyrazineを単離し、報告したが⁴⁴⁾、納豆の香気の全貌については不明である。そこで、実際に、大豆を一夜浸漬後、煮熟して、納豆菌を接種し、納豆を製造した。その過程での納豆の特有香気の形成を確認するとともに、製造した納豆や市販されている納豆も用いて、納豆の特有香気成分を検索した。さらにこの結果をもとに、納豆において大豆不快臭が感じられない理由について考察した。

1 実験方法

1) 試料

大豆は中国産の輸入品である。納豆はこの大豆から製造した。即ち、大豆300gを1.2lの蒸留水に15時間室温で浸漬させ、8時間煮熟した。これに0.06gの粉末納豆菌（成瀬発酵化学研究所製）を接種し、37℃の恒温器で15時間、イン

キュベートした。その結果、650gの納豆を得、これを自家製納豆として実験に用いた。さらに、比較のために市販の納豆も試料とした。

2) 香気濃縮物の調製

自家製納豆及び市販納豆はそれぞれ650gに蒸留水850mlを加えた。この時pHは8.2であった。この全量からSDE法で、50mlのエーテルを用い、香気成分を3時間連続的に抽出した。総量で9.75kgの納豆を処理し、無水硫酸ナトリウムで一夜脱水後、濃縮して香気濃縮物を得た。

3) ヘッドスペース分析

納豆のヘッドスペース分析にはFig. IV-2に示したような、Tugitaらによって報告されたTenax GCによるトラップシステムを用いた^{47), 48)}。納豆330gをフラスコにいれ、これに40°Cの湯浴上で窒素ガスを30ml/minの速度で1時間通気した。フラスコの出口をTenax GCを充填した捕集管につなぎ、納豆のヘッドスペースを濃縮、捕集した。その後、サンプルの入ったフラスコを取り除き、さらに室温で30分間同じ流速で窒素ガスを通気して、トラップ管内の水分をバージした。Tenax GCに吸着された揮発性成分はキャリヤーガスの通気下200°Cで加熱脱着させると同時に、直接GCあるいはGC-MSのインジェクション部分に注入した。

4) 香気成分の分離、同定

得られた香気濃縮物、ヘッドスペースは、FIDとFPDによる同時分析を行った。ピーク面積は島津クロマトパックC-R1Bインテグレーターによつて計算した。さらにGC-MS分析により化合物の推定を行つた。最終的な同定は文献値または標準物質のマスデータの一致と標準物質のGCによる保持時間の一致によつた。GC分析用カラムはPEG20M系のFS-WCOTを用い、MSはEI法である。詳細な分析条件はTable III-1に示したとおりである。

2 結果及び考察

1) 納豆の香気組成

得られた香気濃縮物は自家製、市販品ともに納豆独特の香気が強かったが、収量では自家製が1.8mg/100g、市販品は7.6mg/100gと大きな差があった。

また、香気濃縮物には煮熟大豆と共に存在する含硫化合物の存在が想定されたの

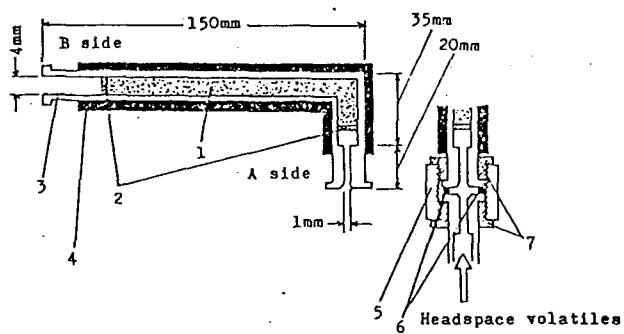


Fig. IV-2 納豆のヘッドスペーストラップシステム

1, Tenax GC; 2, glass wool; 3, pyrex glass tube;
4, heater and thermocouple; 5, stainless nut; 6, teflon
O-ring; 7, teflon socket.

で、GCによるFIDとFPD同時分析を行った。Fig. IV-3に自家製納豆と市販納豆から得られた香氣濃縮物のFID分析のガスクロマトグラムと自家製納豆のFPD分析のガスクロマトグラムを示した。GC-MS分析の結果、24成分をマススペクトルと保持時間の一致により同定し、34成分をマススペクトルの一致により推定した。これらの成分名をTable IV-3に示したが、自家製、市販品とともにほぼ共通した成分より構成されていることが判明した。

また、TCDを装着したガスクロマトグラフィの出口で臭いかぎによる官能検査をし、納豆の香気に寄与していると想定されたピークを1-9、FPD分析で含硫化合物であることが判明したピークをA-Eとし、Fig. IV-3に示した。さらに、各成分の量的関係を知るために、各成分の濃度をガスクロマトグラムのピーク面積と香氣濃縮物の収量を基に納豆1kgに対するmg量で計算し、Table IV-4に示した。

納豆の香気に寄与していると想定されたピーク1-9はすべてピラジン化合物と同定された。これらピラジン化合物の構造とマススペクトルデータをFig. IV-4に示した。Table IV-4に示したように、最も濃度が高かったピラジン化合物は2,5-dimethylpyrazineで、自家製納豆で4.41mg/kg、市販納豆で6.35mg/kgであった。この化合物はポテトチップス様の香気を持ち、閾値はオイル中で2ppm、水溶液中で1ppmと報告されており⁴⁹⁾、納豆の香気に寄与していると判断された。また、これら同定された多くのピラジン化合物は市販品での濃度が自家製納豆より高く、そのため市販品の納豆様の香気が強かったと判断された。

ピラジン化合物は、一般に食品を加熱、蒸煮、焙焼したときに生じる、本来はその食品に含まれていないこうばしい特有の香氣を構成する重要な成分である。また、ピラジン化合物はメイラード反応の代表的な生成物であり、ストレッカーフィルター分解を通じて生成されるアミノレダクトンの2分子が脱水縮合し、生成したジヒドロピラジンが酸化されて生成すると報告されている⁵⁰⁾。しかしながら、納豆で同定されたピラジン化合物は、第III章第2節で述べたように大豆を煮熟した際には極めて少量しか検出されなかったことから、納豆の発酵過程で形成されたと判断された。

含硫化合物であることが判明したピークA-Eは、Table III-4に示した、大豆を煮熟したときに同定された成分である4-ethyl-2-methylthiazole(ピークA)、

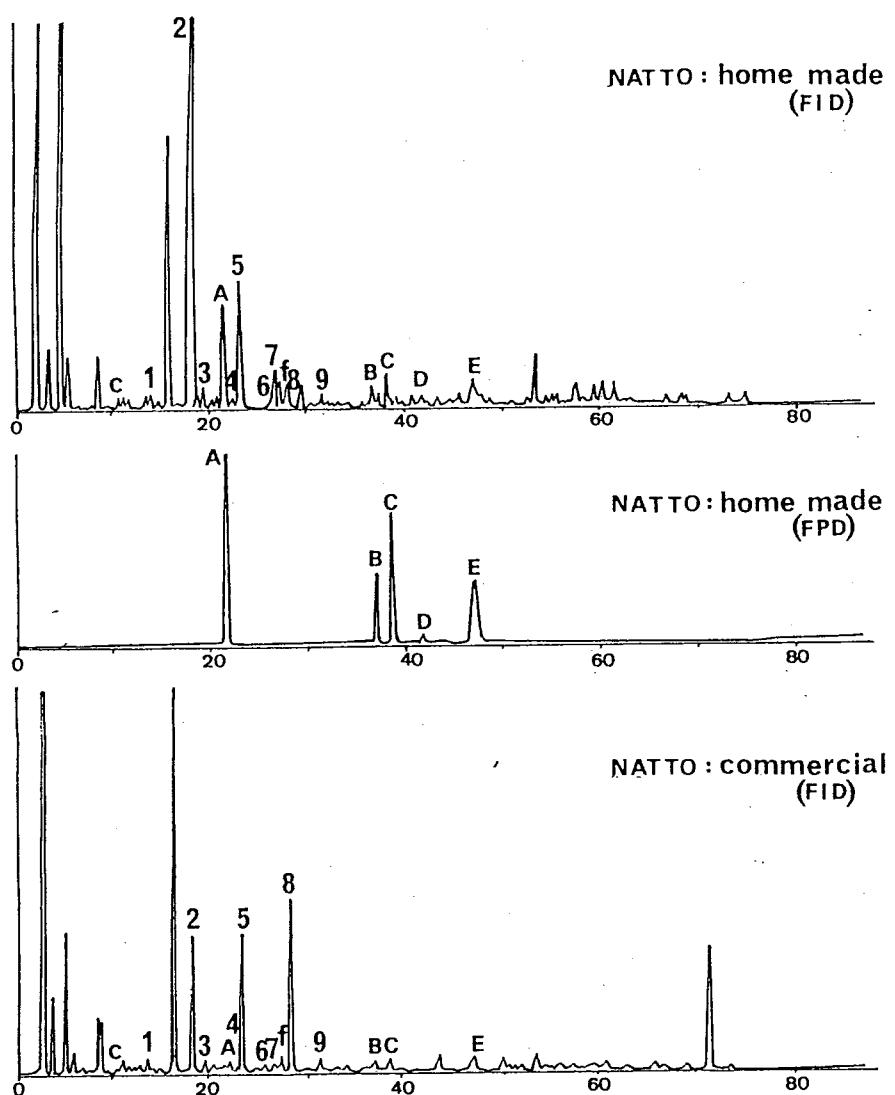


Fig. IV-3 納豆の香氣濃縮物の F I D - F P D 同時分析

Table IV-3 納豆の香氣成分として同定された化合物

	home made	commercial
A, Alkyl alcohol		
1. Ethanol	+	+
2. 1-Propanol	+	+
3. 1-Octen-3-ol	+	+
B, Carbonyl compounds		
1. Butan-2-one*	-	+
2. Pentan-2-one*	-	+
3. 3-Methyl-2-butanone*	+	-
4. 2-Heptanone	+	+
5. 3-Heptanone*	+	-
6. 3-Hexanone*	+	-
7. 2-Octanone*	+	-
8. 3-Octanone*	+	-
9. 3-Nonanone*	+	-
10. Ethyl butanoate*	-	+
11. Methyl isobutanoate*	-	+
12. Acetic acid	+	-
C, Aromatic compounds		
1. Toluene	+	+
2. Ethyl benzene*	-	+
3. Benzaldehyde	+	+
4. Benzyl ethyl ketone*	+	-
5. Acetophenone	+	-
6. Guaiacol	+	+
7. Phenylethyl alcohol	+	-
8. Methylphenyl acetate*	+	+
9. Ethylphenyl acetate*	+	-
10. Phenylethyl formate*	+	-
D, Furan compounds		
1. 2-Pentylfuran	+	+
2. 2-Furfural	+	-
3. Furfuryl alcohol	+	+
E, Pyrazine, pyridine and pyrrole compounds		
1. 2-Methylpyrazine	+	+
2. 2, 5-Dimethylpyrazine	+	+
3. 2, 3-Dimethylpyrazine	+	+
4. 2-Ethyl-6-methylpyrazine	+	+
5. 2, 3, 6-Trimethylpyrazine	+	+
6. 2-Ethyl-3, 5-dimethylpyrazine	+	+
7. 2-Ethyl-3, 6-dimethylpyrazine	+	+
8. Tetramethylpyrazine	+	+
9. 2-Ethyl-3, 5, 6-trimethylpyrazine*	+	+
10. 2-Methyl-6, 7-dihydro-5H-cyclopentapyrazine*	+	+
11. 2, 3-Dimethyl-6, 7-dihydro-5H-cyclopentapyrazine*	+	+
12. Pyridine	+	+
13. 2-Methylpyrrole*	-	+
14. Pyrimidine*	-	+

F. Sulfur containing compounds

1. 4-Ethyl-2-methylthiazole*	+	+
2. 4-Ethyl-2,5-dimethylthiazole*	+	+
3. 2,4-Dimethyl-5-isopropylthiazole*	+	-
4. 2-Acetylthiazole*	+	-
5. 2-Formylmethylthiazole*	+	-
6. Benzothiazole*	+	-
7. <i>trans</i> -3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane	+	+
8. <i>cis</i> -3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane	+	+
9. Thialdine	+	+

G. Other compounds

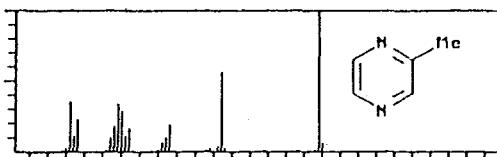
1. Diacetyl	+	+
2. 2,3,4-Trimethyloxazole*	+	+
3. 2,4,5-Trimethyl-3-oxazoline*	+	+
4. Napthalene	+	-
5. N-Isobutyl acetamide*	+	-
6. N-2-Methylbutyl acetamide*	+	-
7. N-3-Methylbutyl acetamide*	+	-

* : Identified by MS only

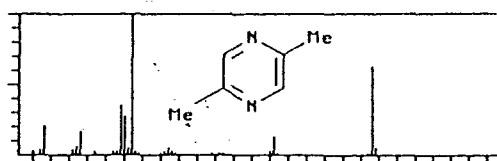
Table IV-4 納豆の香気に寄与する成分の濃度の比較

Peaks	Compound	Natto (mg/kg)	
		Home-made	Commercial
1	2-Methylpyrazine	0.05	0.12
2	2,5-Dimethylpyrazine	4.41	6.35
3	2,3-Dimethylpyrazine	0.15	0.55
4	2-Ethyl-6-methylpyrazine	0.02	0.05
5	2,3,5-Trimethylpyrazine	1.09	7.20
6	2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine	0.29	0.13
7	2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazine	Trace	0.12
8	Tetramethylpyrazine	0.14	9.30
9	2-Ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine	Trace	0.25
A	4-Ethyl-2-methylthiazole	0.88	0.05
B	<i>trans</i> -3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane	0.21	0.18
C	<i>cis</i> -3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane	0.25	0.65
E	Thialdine	0.70	1.17

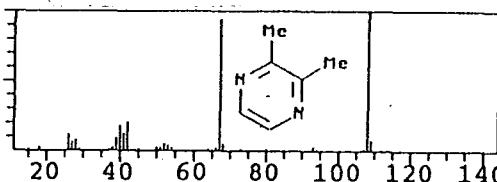
1. 2-Methylpyrazine



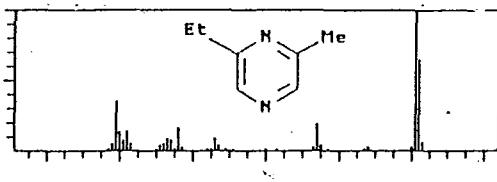
2. 2,5-Dimethylpyrazine



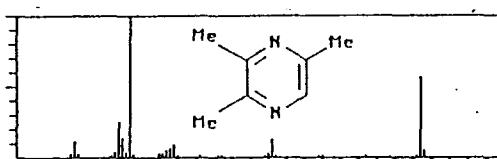
3. 2,3-Dimethylpyrazine



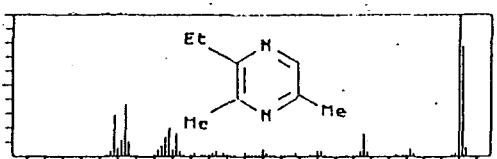
4. 2-Ethyl-6-methylpyrazine



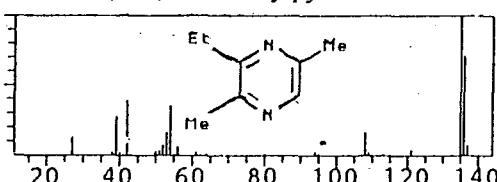
5. 2,3,6-Trimethylpyrazine



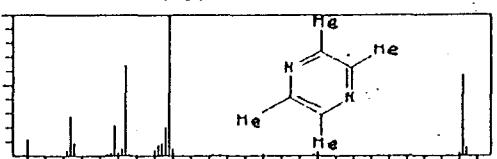
6. 2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine



7. 2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazine



8. Tetramethylpyrazine



9. 2-Ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine

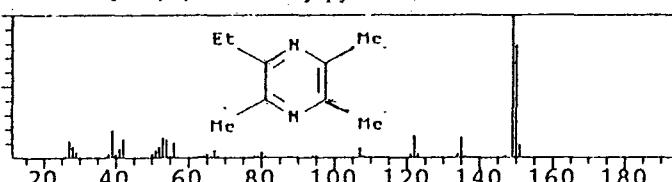


Fig. IV-4 納豆から検出されたピラジン化合物の構造とマススペクトルデータ

cisまたはtrans-3,5-dimethyl-1,2,4-trithiolane(ピークB、C)、thialdine(ピークE)と一致していた。これらピークA～Eの自家製品及び市販品の濃度は成分によって異なっていた。市販納豆を製造する場合、通常、大豆は高圧釜で短時間加熱される。よってこれら含硫化合物の濃度は大豆を煮熟する方法の違いによって変化すると推測された。

これらの結果から、納豆の香気は発酵の過程で形成されたピラジン化合物と、大豆を煮熟した際に生成し、煮熟大豆の香気に寄与している含硫化合物によって特徴づけられることが判明した。

2) 納豆のヘッドスペース分析

SDE法で調製された香気濃縮物からは小菅らが報告したtetramethyl-pyrazine⁴⁴⁾の他にも多数のピラジン化合物が検出された。SDE法では、100°Cで3時間加熱蒸留し、香気濃縮物を調製した。その間にピラジン化合物が生成する可能性もある。そこで納豆のヘッドスペース分析も行い、ピラジン化合物が納豆に本来、存在する成分であることの確認を試みた。

納豆のヘッドスペースのガスクロマトグラムをFig. IV-5に示した。ピークナンバーはFig. IV-3と対応している。SDE法によって調製された納豆の香気濃縮物中に検出されたほとんど全てのピラジン化合物がヘッドスペース中にも主要な成分として存在した。納豆のヘッドスペースは40°C、1時間で捕集されており、この間にピラジン化合物が生成する可能性はほとんどない。従って、納豆の主要香気成分であるピラジン化合物は、加熱条件下の香気捕集過程で形成されたものではなく、納豆菌の働きによって発酵中に生産されたことがより明確となった。

LiardonとLedermannがアルキルピラジンはAspergillus oryzaeによってFermented soya cake中に生産されるが、GuadagniらやKoehlerらによって測定されたピラジン化合物の閾値^{49), 51)}を考慮すると、ピラジン化合物の寄与は非常に限られていると報告している⁵²⁾。これに対して納豆菌のピラジン化合物の生成能力はAsp. oryzaeに比較してかなり高いと推測され、納豆中のピラジン化合物の濃度は2,5-dimethylpyrazineで、4-7mg/kgで納豆の香気に十分寄与する濃度であった。高温加熱でのメイラード反応で生成するピラジン化合物が、発酵という穏やかな条件で、納豆菌の働きによって生産されることが判明し、そ

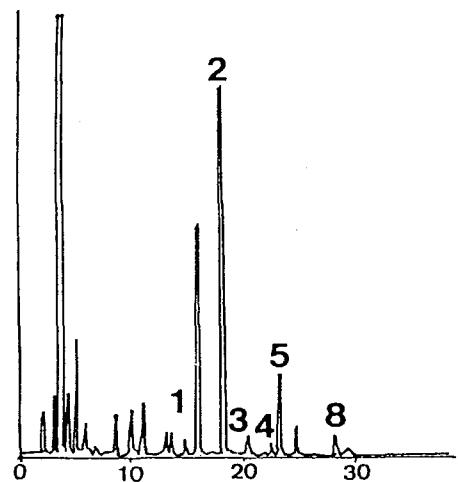


Fig. IV-5 納豆のヘッドスペース分析の
ガスクロマトグラム

の形成経路に興味が持たれた。

3) 納豆の香氣と大豆不快臭の関係

第Ⅲ章第2節で述べた大豆を煮熟した際の大豆不快臭の変化と、同じ大豆を煮熟して製造した自家製納豆の香氣成分の組成から、納豆において官能的に大豆不快臭が感じられない理由について考察した。

大豆の青臭さに寄与しているhexanal, (E)-2-hexenalは大豆の3時間加熱では 1.78mg/kg と 0.07mg/kg であったが、5.5時間加熱では検出できなくなった。 1-hexanol は3時間加熱では 2.95mg/kg であったが、5.5時間加熱で 0.11mg/kg になり、8時間加熱では検出できなくなった。さらに、これら大豆の青臭さに寄与している成分は、納豆には存在しなかった。これに対して、大豆不快臭の中でも油の酸化臭の原因物質と報告されている2-pentylfuran(ピークc)やマッシュルームフレーバーとも呼ばれ、土臭いにおいの1-octen-3-ol(ピークf)は、大豆を8時間加熱してもそれぞれ 0.03mg/kg 、 0.53mg/kg 存在し、納豆においても検出された。

一方、大豆を煮熟した際に生成された含硫化合物は納豆の香氣成分の中にも共通して同定された。ピラジン化合物は煮熟大豆中には検出されなかつたが、納豆の香氣成分として多量に存在していた。

以上の結果から、大豆は加熱されることによって低分子の青臭さに関与している成分が減少し、含硫化合物が生成する。さらに、納豆に加工される段階で発酵により数種のピラジン化合物が形成される。特に、納豆の香氣を特徴づけているピラジン化合物が納豆中に典型的な豆臭の成分が存在するにも関わらず、これを感じさせないようなマスキング効果を示していると結論づけられた。

第3節 納豆菌によるピラジン化合物生成のための培地組成の検討⁵³⁾

第2節では、納豆の特有香氣成分であるピラジン化合物は、納豆の製造過程で納豆菌が関与して生成されることが示唆された。微生物によるピラジン化合物の生成に関しては、KosugeらがBacillus subtilis及びBacillus nattoの培養物からtetramethylpyrazineをピクレートして単離した⁵⁴⁾のを初めとし、

その他のアルキルピラジン類やアルコキシラピラジン類の生成も報告されている⁵⁵⁾。そこで、本節では納豆菌によるピラジン化合物の生成機構を探るために、納豆菌を納豆より、単純な系である液体で培養することを計画し、そのための培地組成の検討を試みた。

1 実験方法

1) 培養条件

納豆菌培養に最適と考えられる大豆煮熟液を基本培地として使用することにした。即ち、大豆（南部白目）100gを水洗し、室温で一夜1Lの水に浸漬し、この浸漬液を用いて2時間大豆を煮熟した。この間の蒸発による減少分は加水により補充した。ついで固体物をガーゼで濾別し、濾液を1Lとして培地とした。これをA培地とする。培養は500mLの三角フラスコに培地を100mLずつ分注し、殺菌後、斜面培養した納豆菌（高橋2号）を植菌し、40℃の定温器で行った。

さらに、大豆の煮熟条件を納豆製造時に近づけるために、加圧下（1kg/cm²、約120℃）1時間加熱し、この条件で得られた大豆煮熟液も培地（これをB培地とする。）とした。以下はA培地と同様に培養した。またこのB培地を基本とし、Table IV-5に示したように、炭素源としてグルコース(Glc)を1%、窒素源としてグルタミン酸ナトリウム(MSG)を1%、両者をともに1%ずつ添加した3種の培地でも同様に納豆菌を培養した。

炭素源や窒素源の添加をより鋭敏に観測することを目的として菌体の増殖が比較的良好で、しかも培地中のピラジン化合物の生成が無視しうると考えてよいA培地に、糖として1%グルコース、窒素化合物として1%MSGまたは0.5%尿素を加えて調製した培地（これをC培地とする。）でも同様に培養を行った。

2) 香気濃縮物の調製と香気成分の分離同定

培養物1LからSDE法により、エーテル50mLで3時間、におい成分を抽出した。エーテルを脱水し、濃縮してにおい濃縮物とした。これをGC及びGC-MS分析した。ピラジン化合物の同定は文献値のマススペクトルデータおよび標準物質とのGCの保持時間の一一致によった。ピーク面積は島津クロマトパックC-R3Aインテグレーターを用いて計算した。培養物中のピラジン化合物の濃度は、におい濃縮物の収量とクロマトパックによって計算されたピーク面

Table IV-5 大豆煮熟培地 (A, B) での納豆菌によるピラジン化合物の生成

A Media (cooked extraction, 100°C)		B Media (Autoclaved extraction, 120°C)					
	Medium	Culturated Medium	Medium	Culturated Medium	Culturated Medium Added 1%Glc	Culturated Medium Added 1%MSG	Culturated Medium Added 1%Glc, 1%MSG
MP	-	-	(+)	+	-	+	+
DMP	-	(+)	(+)	++	+	++	+++
TrMP	-	(+)	-	++	+	++	+++
TeMP	-	-	-	-	-	-	+
EMP	-	-	-	-	-	+	-

MP:2-methylpyrazine, DMP:2,5-dimethylpyrazine, TrMP:trimethylpyrazine, TeMP:tetramethyl-pyrazine, EMP:ethylmethylpyrazine, Glc:glucose, MSG:monosodium Glutamate.

-:not detected, (+):10 μg/l medium, +:10-50 μg/l medium, ++:50-100 μg/l medium, +++:100-200 μg/l medium.

積から培養物 1 l 中の μ g量で算出した。詳細な分析条件は Table IV-6 に示したとおりである。

2 結果及び考察

A 培地での培養は 2 日間行った。菌体の増殖はほぼ順調で、培養物のにおいも納豆を連想させるものであった。しかし、この培地から得られたにおい濃縮物の分析結果は Table IV-5 に示したとおりで、検出されたピラジン化合物は 2-methylpyrazine と 2,5-dimethylpyrazine の 2 種であり、ともに、 10μ g/1 以下でほとんど無視できる程度であった。

B 培地では菌体の増殖は A 培地よりよくなり、においもより好ましい納豆の香気に近づき、その強さも増大した。分析の結果、2,5-dimethylpyrazine と trimethylpyrazine がそれぞれ $50-100 \mu$ g/1 検出された。B 培地に 1% のグルコースのみを添加した場合は、培養初期に生成すると考えられる酸性物質のため、培地 pH の低下が著しく、菌体の増殖が不良であった。同定されたピラジン化合物は無添加培地と同様に 2,5-dimethylpyrazine と trimethylpyrazine であったが、濃度はそれぞれ $10-50 \mu$ g/1 で、無添加培地よりはるかに少なかった。また、その全揮発性物質の 80% 以上を acetone が占めていた。小菅らは acetone は tetramethylpyrazine の前駆体であると主張している^{5,6)}が、その説を採用するなら、B 培地に 1% のグルコースのみを添加した場合には、納豆菌によるピラジン合成は、その前段階で止まっていると想定され、ピラジンの生合成を考えうえで興味深い結果であった。

B 培地に 1% MSG のみ添加した場合では、B 培地のみの場合より、ピラジン臭が多少強く、アンモニア様のにおいも感じられた。分析の結果、ethylmethylpyrazine が $10-50 \mu$ g/1 検出されたが、他は B 培地の場合と大差なかった。

B 培地にグルコースと MSG を共に 1% ずつ添加して培養した場合には、菌体の増殖は最も良好で、においも新鮮な納豆の香気に近いものであった。分析の結果、2,5-dimethylpyrazine と trimethylpyrazine が $100-200 \mu$ g/1 に増加し、新たに tetramethylpyrazine が $10-50 \mu$ g/1 検出された。

以上の結果から、大豆煮熟培地のうち、B 培地は加圧加熱して調製されたため、微生物利用可能態の糖及び窒素化合物が増加し、菌体の増殖およびピラジ

Table IV-6 納豆菌液体培養物から得られた香気濃縮物の G C 及び
G C - M S 分析の条件

G C 分析条件

Model: SHIMAZU GC-8A

Column: 3% SP 1000 on Chromosorb W AW DMCS, 3mx3mm, Glass column

Oven temp.: 60°C → 3°C/min → 180°C

Carrier Gas: N₂

Inj. Temp.: 200°C

Detector: FID, 200°C

G C - M S 分析条件

G C part

Model: HITACHI 063

Column: SP 1000 on Chromosorb W AW DMCS, 3mx3mm, Glass column

Oven temp.: 60°C → 3°C/min → 180°C

Carrier Gas: He

Inj. Temp.: 200°C

M S part

Model: HITACHI RMU6MG

Ionization Voltage: 70eV

ン化合物の生成をある程度満足させるものであった。また、この培地に炭素源や、窒素源をさらに添加することによってピラジン化合物の生成は多少促進されると結論できよう。

次に炭素源や窒素源の添加をより鋭敏に観測することを目的として、菌体の増殖が比較的良好で、しかも培地中のピラジン化合物の生成が無視しうると考えてよい A 培地に、炭素源として 1% グルコース、窒素源として 1% MSG または 0.5% 尿素を加えて調製した、C 培地でも同様に培養を行い、結果は Table IV - 7 に示した。

C 培地で 1% グルコースのみの添加培養では、B 培地に 1% グルコースのみを添加した場合と同様に増殖不良で、 $16 \mu\text{g}/1$ の trimethylpyrazine と $10 \mu\text{g}/1$ の tetramethylpyrazine の生成を認めたにすぎなかった。1% MSG のみの添加では 2, 5-dimethylpyrazine が $70 \mu\text{g}/1$ と最も多く、trimethylpyrazine と 2, 3-dimethylpyrazine が $33 \mu\text{g}/1$ と $27 \mu\text{g}/1$ でこれにつぎ、その他 3 種のピラジン化合物が検出された。1% グルコースと 1% MSG を同時に添加した場合には、においがすぐれ、生成したピラジン化合物の濃度は、2, 5-dimethylpyrazine が $126 \mu\text{g}/1$ と最も多く、ついで trimethylpyrazine が $115 \mu\text{g}/1$ 、2, 3-dimethylpyrazine と tetramethylpyrazine がともに $47 \mu\text{g}/1$ で、全体として高かった。また、同定されたピラジン化合物の種類も 7 種で最も多様であった。尿素のみの添加では菌体の増殖は良好であったが、生成したピラジン化合物は 4 種で、濃度はともに $10-20 \mu\text{g}/1$ と極めて貧弱であった。以上の結果から、MSG と尿素は菌体の栄養素としては大差ないが、ピラジン化合物生成の原料としては差異が認められた。

従って、納豆製造中におけるピラジン化合物の生成機構を探ることを目的とした、納豆菌の液体培養を行うための培地組成としては、大豆煮熟液に 1% グルコースと 1% MSG を同時に添加した場合がより適していると考えられた。以下、この培地を基本にしてさらに納豆菌によるピラジン化合物生成の検討を進めることとした。

Table IV-7 グルコースとアミノ酸を添加した大豆煮熟培地 (C) での納豆菌によるピラジン化合物の生成

Pyrazines	Culture Media				
	BM	BM+Glc	BM+MSG	BM+Glc, MSG	BM+Urea
MP	—	—	14	21	—
2, 5-DMP	24	—	70	126	15
2, 3-DMP	—	—	27	47	11
2, 6-DMP	—	—	—	24	—
TrMP	12	16	33	115	12
TeMP	—	10	9	47	13
3, 5-DE-2-MP	—	—	21	23	—

Unit : $\mu\text{g/l}$ of medium.

BM : Basal medium (cooked extraction of soybeans).

3, 5-DE-2-MP, 3, 5-Diethyl-2-methylpyrazine; DMP, dimethylpyrazine, other MPs are as Table IV-5
Glc, glucose ;MSG, monosodium glutamate.

第4節 大豆煮熟培地での納豆菌によるピラジン化合物生成に対するアミノ酸添加の影響^{5,7)}

納豆の発酵熟成過程で、Table IV-2に示したようにアミノ酸が多く遊離する。これは、納豆菌が生産した酵素によって加熱された大豆のタンパク質が分解され、アミノ酸が生成したことを示している。一方、納豆らしい風味もこの発酵過程で同時に、形成される。従って、納豆菌によるピラジン化合物の形成には遊離したアミノ酸が関与していると推察される。そこで、第4節では、第3節で納豆菌の液体培養に適していることが明らかになった、大豆煮熟液に1%グルコースと1%MSGを同時に添加した培地を基本にし、各種のアミノ酸をMSGと入れ換えて添加し、納豆菌を培養した。そして、培養物中に生成されたピラジン化合物の種類と収量について比較検討し、納豆菌のピラジン化合物生成に対するアミノ酸の影響を考察した。

1 実験方法

1) 培養条件

納豆菌培養ための培地は菌体の増殖が比較的良好で、しかも培地中のピラジン化合物の生成が無視できる大豆煮熟液を基本培地とした。即ち、大豆（南部白目）180gを水洗し、室温で一夜1.8lの水に浸漬し、この浸漬液を用いて2時間を煮熟した。大豆煮熟中の蒸発による減少分は加水により補充した。ついで固体物をガーゼで濾別し、濾液を1.8lとし、これに窒素源としてTable IV-8に示した14種のアミノ酸を、窒素量として1%相当量になるように添加した。また、予備発酵の際、しばしば、培地のpHが酸性側に傾く傾向があった。そこで納豆菌の発酵による条件を整えるために0.2Mのリン酸塩でpHを7.35に調製した。また、アミノ酸とのメイラード反応を避けるために、10%のグルコース溶液は別に殺菌した。殺菌された10%グルコース溶液10mlと、殺菌されたアミノ酸を添加した大豆煮熟培地90mlを無菌的に500mlの三角フラスコに分注し、培地を調製した。これを大豆煮熟培地とする。大豆煮熟培地に斜面培養した納豆菌（高橋2号）を植菌し、40°Cの定温器で2～3日間培養を行った。

2) 納豆菌の生育状況の判定方法

Table IV-8 各種アミノ酸添加培地での納豆菌の生育状況と
ピラジン化合物の生成量

Amino acid	Growth	Pyrazine formed (ppm of broth)
Ala	■■	1.58
Val	卅	1.59
Leu	卅	1.43
Ile	卅	0.51
Ser	卅	4.78
Thr	卅	36.58
Met	卅	0.18
Phe	廿	0.67
Trp	廿	0.16
Asp	卅	1.24
Glu	卅	1.02
Lys	+	0.31
Arg	卅	0.15
Pro	卅	2.32
None	+	0.04

Note + : Poor growth, 廿 : Moderate growth,
卅 : Better growth, ■■ : The best growth

通常、菌の生育状況は菌体を遠心分離してその重量を計測するが、納豆菌の場合には培養液の粘度が高く、効率よく、正確に菌体を分離することができなかった。そこで、納豆菌の生育状況は培養液面の菌膜の厚さを観察して4段階に区別することにした。Table IV-8に示したように、-は納豆菌の増殖が全く認められない状態、+は納豆菌の生育は認められるが菌膜の形成が認められない状態、++は薄い菌膜が部分的に張った状態、+++は薄い菌膜が全面にはった状態、++++は全面に膜がはって膜の表面に細かい、ちりめん状のしわがみえる状態とした。

3) 香気濃縮物の調製と香気成分の分離同定

培養物11からSDE法で、エーテル50mlを用いて3時間、におい成分を連続的に抽出した。エーテル抽出物を脱水し、濃縮してにおい濃縮物とし、これをGC-MS分析した。ピラジン化合物の同定は文献値のマススペクトルデータおよび標準物質とのGCの保持時間の一一致によった。また、ピラジン化合物の濃度を求めるために、培養物のエーテル抽出物を10mlに濃縮し、これに内部標準物質として0.3mg/mlの濃度に調節したBHT(2,6-di-tert-butyl-4-methyl-phenol)のエーテル溶液を正確に0.5ml添加し、さらに液量が0.1mlになるまで濃縮して、におい濃縮物を調製した。この濃縮物をGCによって分析し、ピーク面積は島津クロマトパックC-R3Aインテグレーターを用いて計算した。ピラジン化合物の濃度は内部標準物質との面積比から、培養物中のppmで算出した。詳細な分析条件はTable IV-6に示したとおりである。

2 結果及び考察

ほとんどすべての種類のアミノ酸は培地に添加されると、Table IV-8に示したように菌体の生育を促進することが判明した。特に、L-アラニン、L-セリン、L-メチオニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-プロリンの添加培地では最も良い菌の増殖がみられた。L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-スレオニン、L-アルギニンは次に増殖のよい培地であったが、L-トリプトファン、L-フェニルアラニンの添加培地では発育はよくなかった。L-リジン添加培地のように納豆菌の増殖が非常に悪い場合には、培養物中に形成された総ピラジン化合物の濃度も低いが、一定の増殖が観察される場合には、菌の増殖と形

成されたピラジン化合物の濃度は必ずしも一致しなかった。

各アミノ酸添加培養物中に形成されたピラジン化合物の濃度をTable IV-9に示した。L-スレオニン添加培地では菌の増殖は+++で中程度であったが、9種のピラジン化合物が検出され、それらを合計した総ピラジン化合物の濃度は36ppm以上と最も高かった。また、この時、各種ピラジン化合物中に最も多く含まれていたのは2,5-dimethylpyrazineで、30.5ppmであった。次にピラジン化合物が多く形成された培地はL-セリン添加培地で、約5ppmであった。この培地ではtrimethylpyrazineとtetramethylpyrazineがそれぞれ1.4ppmと2.7ppmで主要成分であった。他のアミノ酸添加培養物では総ピラジン化合物の濃度は3ppm以下であった。また、L-メチオニン添加培地では菌の増殖は最も良い++++であったにも関わらず、総ピラジン化合物の濃度は0.1ppmとかなり低かった。

L-スレオニンやL-セリンのようにヒドロキシアミノ酸添加の場合に、ピラジン化合物の生成量は多かった。これらのアミノ酸は酵素的に脱カルボキシル化してこれに対応するエナミノールを形成し、これらが同じ化合物あるいは他のカルボニル化合物と酵素的あるいは化学的に反応してピラジン化合物が形成されると考えられた^{58), 59)}。

他のアミノ酸の場合にも多様な種類のピラジン化合物が観察されたが、添加されたアミノ酸との関係で特徴的な傾向は認められなかった。これは添加されたグルコースとアミノ酸が納豆菌によって、より複雑に代謝されたことによると考えられた。

第5節 合成培地での納豆菌によるピラジン化合物生成に対するアミノ酸添加の影響⁶⁰⁾

本節では培地組成をより明瞭な合成培地とし、各種のアミノ酸を添加して納豆菌を培養し、納豆菌のピラジン化合物生成に対するアミノ酸の影響をより明確にすることを試みた。また、第4節までは、香気濃縮物の調製にSDE法を用いていたが、本節では、抽出の際全く加熱条件のはいらないポーラスボリマーを用いるカラム濃縮法も併用して詳細に比較検討した。そして、この結果か

Table IV-9 各種アミノ酸添加培地で形成されたピラジン化合物の比較

Pyrazine		MP	2,3-DMP	2,5-DMP	TrMP	TeMP	EMP	DEMP	DEP	EDMP	MPP	Total P
Amino Acid												
Ala*	0.08	0.15	0.09	0.67	0.46	—	0.05	0.05	—	0.01	1.58	
Val	0.04	0.15	0.14	0.62	0.46	0.05	0.05	0.04	0.01	—	1.59	
Leu*	0.08	—	1.01	0.19	—	0.13	—	—	—	—	1.43	
Ile	0.04	—	0.20	0.16	0.05	0.02	0.01	—	0.01	—	0.51	
Ser	0.23	0.14	0.19	1.37	2.68	0.01	0.04	0.01	0.08	—	4.78	
Thr	0.22	—	30.50	3.53	0.10	0.12	0.12	0.09	1.36	0.50	36.58	
Met	0.05	—	0.06	0.03	0.01	0.01	0.07	—	—	—	0.18	
Phe*	0.03	0.06	0.46	0.06	—	0.03	—	—	—	0.01	0.67	
Trp	—	—	0.10	0.02	—	—	0.01	—	0.01	—	0.16	
Asp	0.16	0.08	0.16	0.55	0.25	—	0.01	—	—	—	1.24	
Glu*	0.07	0.10	0.48	0.23	0.04	—	0.02	0.00	—	0.04	1.02	
Lys	0.03	0.07	0.13	0.05	—	—	0.01	—	—	—	0.31	
Arg*	0.01	0.04	0.04	0.03	0.00	—	—	—	—	—	0.15	
Pro	0.23	0.29	0.49	0.92	0.22	0.07	0.04	0.02	0.01	—	2.32	
None	—	—	0.04	—	—	—	—	—	—	—	0.04	

a : As ppm of culture broth, * : 2 days incubation, the others 3 days incubation

MP=2-methylpyrazine, DMP=Dimethylpyrazine, TrMP=Trimethylpyrazine, TeMP=Tetramethylpyrazine, EMP=3-Ethyl-5 or 6-methylpyrazine, DEMP=3,5-Diethyl-2-methylpyrazine, DEP=2,6-Diethylpyrazine, EDMP=2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazine, MPP=2-Methyl-5-propenylpyrazine, — : Not detected

ら、納豆菌によるピラジン化合物の形成機構の解明を試みた。

1 実験方法

1) 培養方法

合成培地の組成は藤井^{6,7)}が納豆菌の粘質物の生成に関する研究に用いたものを改変して調製した。すなわち、 KH_2PO_4 1.36gと $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 32.2g、 NaCl 0.5gを900mlの水道水に溶解し、窒素源としてTable IV-10に示した14種のアミノ酸と2種のアンモニウム塩及び尿素を用い、窒素量として1%相当量になるように添加した溶液をAとし、10本の500mlの三角フラスコに90mlずつ分注した。また、水道水100mlにグルコース20g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、ビオチン1mgを溶解した溶液をBとし、10本の試験管に10mlずつ分注した。A、Bを別々に殺菌後、無菌的にAにBを混合し培地とした。培養はこの培地に斜面培養した納豆菌（高橋2号菌）を植菌し、40°C、通常4～5日間とした。ただし、納豆菌の増殖が悪い時は10日間まで培養を試みた。菌の生育がよかつた培地では3回の繰り返し培養を行い、ピラジン化合物の生成量はそれらの平均値で算出した。

2) 納豆菌の生育状況の判定

納豆菌の生育状況は、第3節と同様に培養液面の菌膜の厚さを観察して判定した。

3) 香気濃縮物の調製

(1) S D E法

各培養液（納豆菌体を含む）1000mlからS D E法により、エーテル50mlで3時間連続的ににおい成分を抽出した。続いて第3節と同様に処理して香気濃縮物を得た。

(2) カラム濃縮法

各培養物300mlを5000rpmで10分間、5°Cで冷却遠心し、大部分の菌体を除去した。この上澄液を試料とし、精製したPorapak Q吸着剤(3g)を充填したカラム（内径1cm×高さ11cm）に1分間に1mlの流速で流し、香気成分を吸着させた^{3,7)}。エーテル100mlでにおい成分を溶出させ、エーテル溶出液はS D E法とともに処理して香気濃縮物とした。これをカラム濃縮法とする。

4) 香気成分の分離、同定

Table IV-10 合成培地での納豆菌の増殖状況と生成フレーバー

Amino acid and others	Growth	Incubation (days)	Flavor	Final pH
Ala	#	5	pyrazine-like, acid	6.85
Val	#	4~5	acid	6.70
Leu	+	10	acid	—
Ile	#	5	natto-like	6.70
Ser	#	5~6	pyrazine-like, acid	7.25
Thr	#	5~7	natto-like, acid	6.90
Met	+	10	Japanese radish-like	—
Phe	+	10	acid	—
Trp	—	10	—	—
Asp	#	4	pyrazine-like, acid	7.10
Glu	#	4	pyrazine-like, acid	6.85
Lys	—	10	—	—
Arg	#	4	acid	6.55
Pro	#	4	popcorn-like	6.70
Am cit.	#	5	pyrazine-like, ammonia	6.60
Am ac.	+	10	—	6.54
Urea	—	10	—	9.20

Note — : no growth, + : poor growth, # : moderate growth, ## : better growth,
 Am cit. : diammonium citrate, Am ac. : ammonium acetate.

得られたにおい濃縮物は G C および G C - M S を用いて分析した。ピラジン化合物の同定は文献値のマススペクトルデータおよび標準物質との G C の保持時間の一致によった。得られたにおい濃縮物には第 3 節と同様に内部標準物質として B H T を添加した。各成分のピーク面積は島津クロマトパック C - R 2 A によって計算し、内部標準物質とのピーク面積の比から、ピラジン化合物の濃度を培養物中の ppm で算出した。詳細な分析条件は Table IV - 11 に示したところである。

2 結果及び考察

1) 培地窒素源の変化と菌の増殖

培地の窒素源を変えた時の納豆菌の増殖状況は Table IV - 10 に示したとおりであり、L-アラニン、L-バリン、L-イソロイシン、L-セリン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-アルギニン、L-プロリン、クエン酸二アンモニウム添加培地では培養 1 日で液面に菌膜がはり、増殖は良好であった。即ち、L-グルタミン酸、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-プロリンなどの代謝上、L-グルタミン酸と密接な関係をもつアミノ酸の添加培養の場合に菌の増殖は良好であった。次いで L-スレオニンがよく、2-3 日で菌膜が形成された。そこで L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-アルギニン、L-プロリン、クエン酸二アンモニウム塩を添加した場合は 4 日間培養、L-アラニン、L-バリン、L-イソロイシン、L-セリン、L-スレオニンは 5-6 日間培養後、ピラジン化合物を抽出することにした。

その他のアミノ酸添加培地では 10 日以上培養しないと生育しないものや全く増殖のみられないものもあった。第 4 節においても、納豆菌の増殖が非常に悪い場合には、培養物中に形成された総ピラジン化合物の濃度も低かったので、これらの培地ではピラジン化合物の生成はきわめて少ないと結論づけ、ピラジン化合物の濃度を測定するための培養は行わなかった。

2) S D E 法とカラム濃縮法によるピラジン化合物の濃度の比較

S D E 法とカラム濃縮法でのピラジン化合物の濃度の比較を Table IV - 12 に示した。S D E 法では培養物を抽出段階で 3 時間加熱しており、ピラジン化合物が二次的に生成している可能性がある。そこで、抽出段階で加熱操作のないカラム

Table IV-11 納豆菌の合成液体培養物の香気濃縮物の G C 及び
G C - M S 分析の条件

G C 分析条件

Model: SHIMAZU GC-5A

Column : FS-WCOT, PEG20M(0.25mmx50m, 0.25 m film)

Oven temp. : 60°C → 3°C/min → 200°C

Carrier Gas:N₂, 1.6ml/min

Inj. Temp. : 200°C

Detector:FID, 200°C

G C-M S 分析条件

G C part

Model: HITACHI G3000

Column : FS-WCOT, Supelcowax 10(0.25mmx50m, 0.25 m film)

Oven temp. : 60°C → 3°C/min → 200°C

Carrier Gas:He, 1.6ml/min

Inj. Temp. : 200°C

M S part

Model: HITACHIM-2000

Ionization Voltage: 70eV

Computer part

Model: HITACHI M-0201 system

Table IV-12 培養物中のピラジン化合物生成量の比較

Pyrazine		MP	2,3-DMP	2,5-DMP	TrMP	TeMP	DEP	DEMP	MPP	Total P
Amino	Acid									
Ala	N	0.10	0.01	0.06	3.63	13.72	0.15	0.09	—	17.75
	P	—	0.33	1.07	1.37	4.98	—	0.06	—	7.81
Val	N	0.27	0.06	0.13	0.66	0.45	0.02	0.17	—	1.76
	P	—	—	0.20	0.01	0.01	—	—	—	0.22
Ile	N	0.13	0.03	0.13	0.06	0.02	—	—	—	0.37
	P	0.01	—	0.04	—	—	—	—	—	0.05
Ser	N	0.05	0.06	0.01	4.81	51.13	0.34	0.01	—	56.42
	P	—	+	3.76	33.36	211.33	—	1.98	7.64	258.06
Thr	N	0.34	1.35	0.46	0.77	0.14	0.04	0.01	—	3.10
Asp	N	0.02	0.01	0.09	2.25	7.46	0.08	0.06	—	10.00
Glu	N	0.13	0.11	0.02	2.04	3.36	0.07	0.05	—	5.78
	P	0.05	—	0.30	0.97	5.66	—	0.38	—	7.35
Arg	N	0.10	—	—	0.03	—	—	—	—	0.13
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Pro	N	0.14	0.06	0.05	0.13	0.08	—	—	—	0.45
	P	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Am Cit.	N	0.08	0.02	0.04	2.79	14.94	0.24	0.32	—	18.43
None	N	+	+	+	+	+	—	—	—	0.01

a): As ppm of culture broth, None : Chemically Defined Liquid Medium added L-Serine without inoculation.

MP=2-Methylpyrazine, DMP=Dimethylpyrazine, TrMP=Trimethylpyrazine, TeMP=Tetramethylpyrazine, DEMP=Diethyl-2-methylpyrazine, DEP=2,6-Diethylpyrazine, EDMP=2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazine, MPP=2-Methyl-5-propenylpyrazine.

Am Cit. : Ammonium citrate dibasic.

N: SDE (Method of extraction by Likens-Nickersons apparatus).

P : Method of absorption by Porapak Q.

ム濃縮法も併用して、ピラジン化合物の濃度を比較した。その結果、二法で計算されたピラジン化合物の濃度は、多くのアミノ酸添加の場合には大差はなかった。従って、納豆菌培養物のSDE法では抽出段階でピラジン化合物が二次的に生成する可能性はほとんどないと判断した。

一方、L-セリン及びL-グルタミン酸添加ではカラム濃縮法での濃度が高く、特にL-セリン添加ではカラム濃縮法がSDE法の4倍以上になっていた。カラム濃縮法では抽出過程で加熱操作はなく、二次的にピラジン化合物が生成する可能性は全くない。また、直接、培養物からピラジン化合物を抽出していくことになり、濃度が高くなったものと考えられる。しかし、カラム濃縮法でのピラジン化合物濃度がSDE法より常に高いという結果でもなからずから、これについては再検討する必要がある。

3) 培地組成の違いによるピラジン化合物生成量の比較

各培養物のピラジン化合物の濃度の比較は各種アミノ酸添加のデータの揃っているSDE法の結果を中心に考察する。Table IV-11、12に示したように、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸の添加培地では、菌の増殖もよく、ピラジン化合物の濃度も5.78ppm、10.0ppmと高かった。L-プロリン、L-アルギニンでは菌の増殖はよかつたが、ピラジン化合物の濃度は0.45ppm、0.13ppmと極めて低かった。L-セリン、L-アラニンでは菌の増殖はあまり良好ではなかつたにもかかわらず、ピラジン化合物の濃度は56.42ppm、17.75ppmとかなり高かった。菌の増殖とピラジン化合物の生成量には相関がみられず、菌の代謝経路上、菌体の増殖に関与しやすいアミノ酸とピラジン化合物の生成経路に関与しやすいアミノ酸とがあることが示唆された。

最も多量のピラジン化合物が生成された培地はL-セリンを添加した培地で総ピラジン化合物量は56.42ppmで、そのうち51.13ppmがtetramethylpyrazineであった。次に、多量に生成したグループはL-アラニン17.75ppm、L-アスパラギン酸10.00ppm、L-グルタミン酸5.78ppmで、クエン酸二アンモニウムも18.43ppmでこのグループと同じレベルであった。クエン酸二アンモニウムが直接ピラジン化合物になるのか、アミノ酸に変換後、ピラジン化合物になるのかは不明であるが、ピラジン化合物の生成経路に関与しやすいことが判明した。このグループではL-セリンと同様、ピラジン化合物生成量の大部分がtetra-

methylpyrazineであった。従って、ピラジン化合物の全生成量が多ければ tetramethylpyrazineが多く生成されることが明かとなった。

また、tetramethylpyrazine以外に、7種のピラジン化合物を同定したが、添加したアミノ酸の構造に関連して、特徴的な側鎖を持ったピラジン化合物は同定できなかった。これは、アミノ酸から直接ピラジン化合物が生成される可能性は薄く、ある程度分解され、簡単な中間体となった後に生成されることを意味している。

微生物によるピラジン化合物の生成機構解明の研究で、Demainら⁶²⁾はイソロイシン・バリン代謝経路の一酵素が欠損した Corynebacterium glutamicum のミュータントを用いて、tetramethylpyrazineを5日間で3g/l 生産させた。この時、Fig. IV-6に示したように、ピルビン酸からアセト乳酸を経てアセトイントが生成され、2分子のアセトイントと2分子のアンモニアからtetramethylpyrazineが生成されていると報告している。L-アラニン、L-セリン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸は構造上、比較的容易にピルビン酸になり得、クエン酸もTCAサイクルを構成する有機酸である。よってこれらの添加培地で大量に tetramethylpyrazineが生成された結果は、Demainら⁶²⁾の報告した経路を裏付けるものと考えられる。

また、アセトイントないし関連物質が存在する場合にはメイラード反応で化学的にピラジン化合物が生成することが知られている。Rizzi⁵⁹⁾はアセトイントとアンモニウムアセテートからpH6.88、22°C、17.5時間という条件で tetramethylpyrazineが相当量生成したことを報告している。

以上より、加熱された大豆から納豆になる過程で、納豆菌がピラジン化合物を形成する経路を考察する。納豆菌は発酵熟成過程で大豆のタンパク質を分解し、大量のアミノ酸を遊離させる。しかし、遊離したアミノ酸から直接ピラジン化合物が形成される可能性は低く、納豆菌は糖やアミノ酸をさらに分解し、大量のアセトイントないしはその関連物質や、アンモニアを形成する。これらがピラジン化合物の前駆物質となり、主に穏やかな条件でのメイラード反応で化学的にピラジン化合物が形成される可能性が高い。しかし、納豆菌が関与して最終段階まで酵素的にピラジン化合物が生成する可能性は全くないとは言い切れず、先に述べた以外の生成経路も含めて更に検討する必要がある。

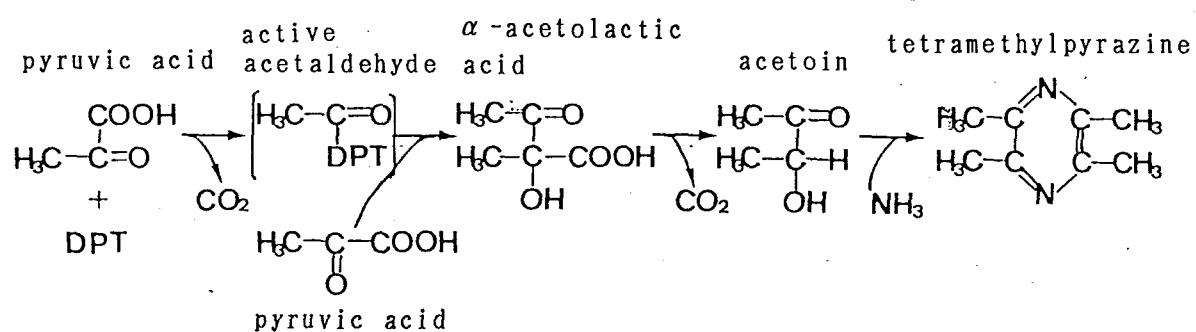


Fig. IV-6 微生物によるtetramethylpyrazine形成機構

DPT:diphosphothiamine (ピルビン酸デカルボキシラーゼの補酵素)

第6節 要約

納豆は食塩を用いずに、煮熟大豆を納豆菌によって発酵させた食品であり、独特の香気を持ち、大豆の不快臭を感じさせない。そこで、納豆の香気形成への納豆菌の関与と納豆製造過程での大豆不快臭の消長について検討した。煮熟大豆から製造した自家製納豆と市販品から、SDE法を用い香気濃縮物を調製し、GC及びGC-MS分析した。その結果、納豆の香気成分として58種を同定あるいは推定した。これら化合物のうち、大豆の青臭さの原因物質であるhexanal、(E)-2-hexenal、1-hexanolは納豆では検出されなかつたが、2-pentylfuran、1-octen-3-olは納豆に加工されてもその存在が確認された。また、納豆では大豆を煮熟した時に生成する含硫化合物が共通して検出され、さらに多種類のピラジン化合物が同定された。ピラジン化合物は納豆製造中に納豆菌が関与して生成され、納豆の香気に大きく寄与し、納豆で豆臭を感じさせない、マスキング効果を果たしていると判断された。

納豆製造中におけるピラジン化合物の生成機構を探ることを目的として、納豆菌の、納豆より単純な系である液体培養を行うための培地組成の検討を試みた。納豆菌液体培養の培地組成としては、大豆煮熟液に1%グルコースと1%MSGを同時に添加した場合がより適しており、この培地を基本にして納豆菌によるピラジン化合物生成の検討を進めた。窒素源として種々のアミノ酸を含む大豆煮熟培地で納豆菌を培養して、ピラジン化合物生成に対するアミノ酸添加の影響について検討した。培養物からSDE法でにおい濃縮物を調製し、これをGC及びGC-MS分析してピラジン化合物を検出し、その濃度を測定した。添加アミノ酸の中でL-スレオニンが最高のピラジン化合物生成を示し、同じヒドロキシアミノ酸のL-セリンがこれに次ぐ収量であった。L-スレオニン培養では2,5-dimethylpyrazineが主要成分であったのに対して、L-セリン培養ではtetramethylpyrazineとtrimethylpyrazineが主要成分であった。次に培地組成をより明瞭な合成培地とし、窒素源として数種のアミノ酸をそれぞれ添加して納豆菌を培養して、ピラジン化合物生成に対するアミノ酸の影響について同様の方法で、さらに検討した。菌の代謝上、グルタミン酸と関連の深いアミノ酸である、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-アルギニン、L-アラニ

ロリンは最もよい納豆菌の増殖を示したが、培地内に生成したピラジン化合物の濃度は菌の増殖と必ずしも一致しなかった。ピラジン化合物生成量の多かった培地はL-セリン、L-アスパラギン酸、L-アラニン、クエン酸二アンモニウムであり、全ピラジン量は約10ppm、あるいはそれ以上で、そのほとんどがtetramethylpyrazineであった。また、添加したアミノ酸に対応するような特徴的な側鎖を持つピラジン化合物は確認されなかった。従って、納豆菌は糖やアミノ酸をさらに分解し、大量のアセトインないしはその関連物質や、アンモニアを形成し、ピラジン化合物はこれらを前駆物質として、主にメイラード反応で化学的に形成される可能性が高いと判断された。

第V章 各種味噌の香気特性と香氣形成

第1節 緒言

味噌は鎌倉時代に味噌汁として常食されるようになって以来、米とともに日本の食文化にとって極めて重要な位置を占めてきた。日本の味噌、醤油は中国の醤や、鼓に由来するといわれ、これが朝鮮半島を経由して日本に伝来し、わが国独自の味噌が生まれた⁶³⁾。中国の醤や、鼓が日本に伝来して以来、1300年以上が経過し、この期間に各地方の原料事情、気候風土、あるいは食習慣から極めて多種類の味噌が生み出されてきた。現在使われている味噌の「噌」という文字は日本で創造されたものであり、味噌以外の用法はなく、これは味噌が日本独自の食品であることを意味している⁶⁴⁾。近年、食生活が洋風化するとともに、健康に対する関心も非常に強くなり、その過程で起きた減塩運動の影響で味噌の需要は激減した。そして、味噌汁を食べる習慣も消滅してしまうのではないかと推測された時期もあった。しかし、日本型食生活の有効性が見直され、米食との取り合わせで味噌汁が注目されている。また、最近味噌の生体調節機能も報告されており、味噌の食品としての価値が見直されつつある⁶⁵⁾。

味噌は高濃度の食塩の存在下で大豆、米、麦の成分が麹かびによって加水分解を受けて、高分子成分が低分子成分にかわる工程と、酵母や乳酸菌の発酵によって発酵生成物を生成する工程を経過して製造されている。また、味噌は原料の大豆、米、麦の処理加工、原料配合、熟成管理（加熱、添加物、製造期間）などによって多くの種類がある⁶⁴⁾。そこで、第2節では味噌と言う食品の全貌を理解するために、味噌の種類と、味噌の香氣形成に深く関与する製造方法について解説した。

ところで、味噌や、日本を代表するもう一つの大豆発酵食品である醤油のおいしさは上記のような工程で形成されたうま味と特有の香りにある。また、味噌、醤油は調味料として用いられることが多い。調味料は食品の風味にアクセントをつけ、食欲をうながすもので、味とともに香りが重要である。

醤油の香氣に関する研究の歴史は古く、多くの研究者によって多種類の香氣成分が検出された。特に1973年以降、横塚らによって詳細で多様な研究がなされ、

醤油の香気特性の解明は飛躍的に進歩した^{66), 67)}。本醸造醤油中で確認された香気成分は焙焼香、花香、果実香、肉の香り、各種酒や酢等の香りを持ち、種類も267種と非常に多く、醤油香の組成は極めて複雑である。さらに醤油の特香成分(Character Impact compound)として4-hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone(HEMF)が確認された。醤油香はHEMFが基本をなし、さらに4-ethyl-2-methoxyphenol(4-ethylguaiacol)や3-methylthiopropanol(methionol)の特徴的な香気成分も重要な役割をはたし、これに先に述べた多くの成分が調和して形成されている⁶⁸⁾。

一方、味噌の香気に関する研究も多くあり^{69) - 72)}、近年本間⁷³⁾により約200種の成分が検出された。しかし、味噌に検出された香気成分はほとんどすべてが他の食品に見いだされており、味噌独特の特徴を示す香気成分は認められていなかった。また、これら多種の香気成分の中から味噌香気への寄与の高い成分も特定できていなかった。本間は味噌独特の特徴を持つ化合物は存在するのか、あるいは多種類の一般的な香気成分が混じりあって味噌の香気が形成されているといきれるかが今後の課題であると述べていた。

このように、醤油に比較してかなり遅れている、味噌の香気特性の解明を進めるために、第3節では味噌の香気成分研究に適した分離濃縮方法の検討を試みた。香気成分の分離抽出方法として広く利用されているSDE法¹⁹⁾、加熱の影響の少ない減圧蒸留法、加熱操作がなく、水溶液中の香気成分を効率よく回収できるポーラスポリマーを用いるカラム濃縮法^{24), 37), 74)}の3法により香気濃縮物を調製し、これらをGC及びGC-MS分析することによって比較検討した。さらに、第4節では、ヘッドスペース分析法の味噌香気解明への適応の是非も検討した。

第5節では、第3節で味噌の香気研究に適していると判断されたポーラスポリマーを用いたカラム濃縮法を用いて、典型的な米味噌、麦味噌、豆味噌の香気組成の解明を試みた。

これらの結果から、味噌の特有香気成分の特定を試みた。さらに、原料や製造方法の味噌香気形成への影響について検討し、香気成分の前駆物質や香気形成への微生物の関与について考察した。そして、味噌では大豆臭が感じられないだけではなく、より優れた、嗜好性の高い香気が形成される要因を明確にした。

第2節 味噌の種類と製造方法

味噌の原料は大豆、米、麦、及び食塩であるが、その中で不可欠なものは大豆と食塩である。味噌を食品学的に定義すると、これら原料を吸水後蒸煮して、全部または一部に麹かびAspergillus oryzaeを接種し、いわゆる麹にし、これらに食塩と水を加えて容器に入れ、さらに多種類の酵母や乳酸菌によって発酵熟成させた半固体状のものということになろう⁶⁴⁾。味噌には地方色豊かな多くの種類があるが、一般的には原料によって米味噌、麦味噌、豆味噌に分けられる。これらの名称は味噌を作る際に不可欠な麹の原料の名称を冠して呼ぶことになっている。Table V-1に味噌の一般的な分類と主な銘柄、産地などを示した⁶⁴⁾。米味噌と麦味噌はさらに、味（甘、甘口、辛）、色の濃淡（白、淡色、赤）によって区別される。工業的に生産されている味噌の約80%は米味噌であり、麦味噌は11%、豆味噌は9%である。

醤油は原料の全部を麹にするが、米味噌や麦味噌では大豆に対する麹や塩の割合が味噌の種別によって異なるため、多種類の味噌ができる。原料の重量を大豆（S）、米（R）、麦（B）、食塩（N）とし、大豆に対する米（麦）の比率： $R / S \times 10$ （または $B / S \times 10$ ）を麹歩合、米（麦）に対する食塩の比率： $N / R \times 10$ （または $N / B \times 10$ ）を塩切歩合という。Table V-2に米味噌と麦味噌の種別と原料配合比を示す⁶⁴⁾。

米甘味噌は麹歩合が最も高く通常15以上で、逆に食塩含量は5-7%と少ない。米甘味噌では米麹中のでんぶんが自己消化して糖分となり、多糖少塩型の味噌となる。米甘口味噌は麹歩合が8-20でかなり甘味があり、食塩含量は7-12%と多くなる。米辛味噌の麹歩合はだいたい12以下で食塩は11-13%である。麦味噌の麹歩合は10-30と一般に米味噌より高く、食塩は9-12%である。豆味噌は米や麦は使用せず、原料大豆の全量を麹とし、食塩含量は10-12%である。

米味噌、麦味噌、豆味噌はFig. V-1のような、製麹、大豆処理、混合仕込み、発酵熟成、調製の工程で生産される⁶⁴⁾。

味噌には麹かび、乳酸菌、酵母などの微生物が存在し、発酵、熟成に深く関与している。麹かびは種麹としてAsp. oryzaeの成熟胞子の乾燥したものを用いる。麹をつくるときは開放系であるため、麹かび以外の微生物も多く存在する。しか

Table V-1 味噌の分類および主な銘柄、産地

原料による分類	味・色による区分		食塩(%)	主な銘柄もしくは産地
米味噌	甘	白 赤	5~7 5~7	白味噌, 西京味噌, 府中味噌, 讀岐味噌 江戸甘味噌
	甘口	淡色 赤	7~11 10~12	相白味噌(静岡), 中甘味噌 中味噌(瀬戸内海沿岸), 御膳味噌(徳島)
	辛	淡色 赤	11~13 12~13	信州味噌, 白辛味噌 仙台味噌, 佐渡味噌, 越後味噌, 津軽味噌, 北海道味噌, 秋田味噌, 加賀味噌
麦味噌	淡色系 赤系		9~11 11~12	九州, 中国, 四国 九州, 埼玉, 栃木
豆味噌	辛	赤	10~12	八丁味噌, 名古屋味噌, 三州味噌, 二分半味噌

注) 色による区分で白はクリームに近い色, 淡色は淡黄色ないし山吹色, 赤は赤茶色ないし赤褐色を指す。

Table V-2 味噌の種別と原料配合比

種 別		麹 步 合	塩 切 歩 合	食 塩 (%)
米味噌	甘	白 赤	20~30 12~20	1.0~1.5 2.8
	甘口	淡色	8~15	2.3~4.0
		赤	10~20	2~4
	辛	淡色	5~12	4.0~7.8
		赤	5~12	5.3~9.0
麦味噌	淡 色 系 赤 系	15~30 10~15	2~4 3~5	9~11 11~12

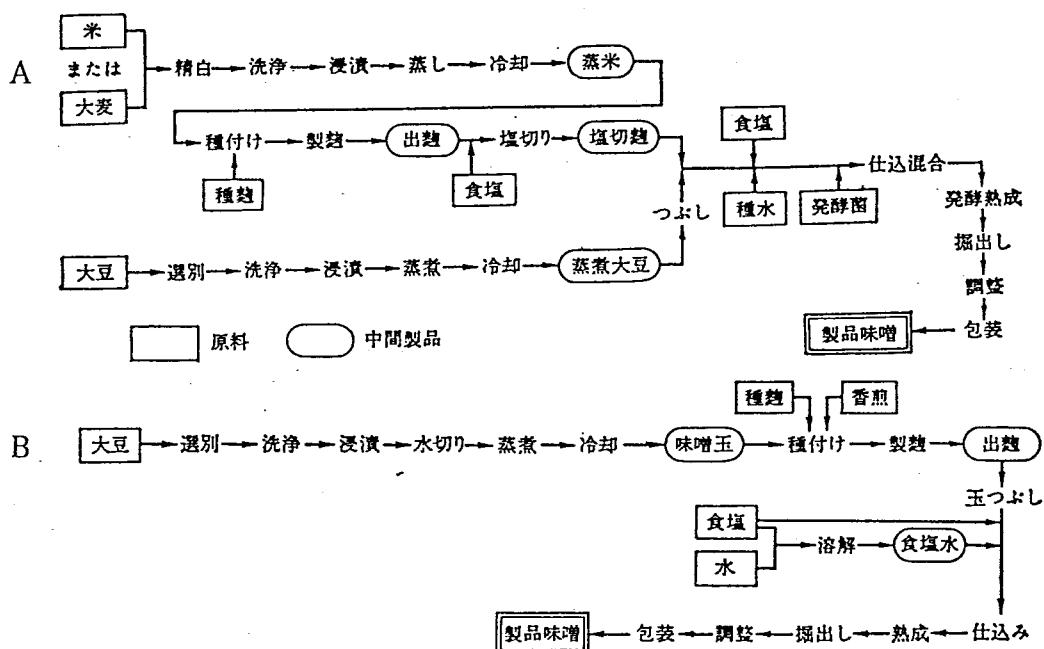


Fig. V-1 米味噌・麦味噌（A）、豆味噌（B）の製造工程

し、大部分は耐塩性に乏しいのすぐに消滅してしまう。味噌中の主要な乳酸菌は耐塩性の Pediococcus halophilus である。乳酸菌は乳酸や酢酸を生成するので味噌の pH は低下し、雑菌の汚染防止に役立っている。しかし、pH が 5.3 程度になると増殖力は弱まり、消滅する。乳酸菌の生育が衰えると酵母の発育が旺盛になる。味噌中の主要な酵母は耐塩性の Zygosaccharomyces rouxii と Candida versatilis、Candida etchellsii である。Zygosaccharomyces rouxii はアルコールの主発酵に関与する酵母で、Candida 属は後熟発酵まで活動する⁷⁵⁾。このように味噌では耐塩性、pH 低下などの環境の変化によって開放系の容器でも有害菌は死滅し、醸造に有用な乳酸菌や酵母のみが増殖するよう巧みなバランスで発酵が進行する。

味噌は Table V-1 や Table V-2 に示したように、原料とその配合割合によって分類されているが、原料の種類、麹と塩の割合は熟成に大きく影響し、さらに、発酵中の温度も加わって熟成パターンが異なってくる。味噌の熟成は麹による酵素分解工程と、乳酸菌や酵母による発酵工程からなっており、熟成パターンも分解型、発酵型およびそれらの中間型の大きく 3 つに分かれている。

分解型熟成の代表は米甘味噌であるが、麹の量を多くし、酵素の分解作用を主にして発酵は行わない。この場合は仕込直後の温度を 55°C の高温に保ち、酵素作用が有意な条件とする。酵素作用の適温はアミラーゼが 55-60°C、プロテアーゼが 45-50°C なので、この中間の温度で 2 つの酵素作用の活性を利用している。55°C では乳酸菌や酵母は死滅するか、著しく衰弱するので発酵はほとんどみられない。分解型の熟成期間は、酵素作用が高温で比較的短時間に完了するので、極めて短く、5-20 日である。

一般的な味噌が属している発酵型熟成は、麹かびの酵素による加水分解と乳酸菌や酵母による発酵の両方によって進められる。米味噌の中で甘口赤味噌や辛口淡色味噌は、仕込の温度がいくぶん高く、仕込後の乳酸菌や酵母の増殖は発酵型に比較して、微弱なので分解型と発酵型の中間型の熟成になる。発酵型熟成は高温にしないので酵素の分解作用に時間がかかり、発酵も長くかかるので、熟成期間は長く、3-12カ月を要する。

一方豆味噌は発酵熟成型よりさらに長期の熟成期間を必要とするが、乳酸菌や酵母の発酵作用は米辛口味噌にみられるように旺盛ではないので中間型熟成タイプにいれられる。これは米、麦のようなデンプンから生成する糖分がないので、

糖分を栄養源にする乳酸菌や酵母の発酵が弱いためと考えられている。

第3節 味噌の香気成分検索方法の検討^{76) - 78)}

味噌にとって香りは醤油同様、その品質を左右する重要な要因であるにも関わらず、解明がなかなか進まなかった。その大きな理由には、醤油は均一の水溶液であるのに対し、味噌は水分の比較的多い半固形状であるという性状の違いがあげられる。均一の水溶系からの香気成分捕集は比較的簡単であるが、味噌は水を加えるとコロイド状となり、微量の香気成分はコロイド成分へ吸着し、抽出は極めて困難になる。さらに味噌汁は日常煮すぎたり、煮返した際に風味の低下が著しい。これは香気濃縮物を調製する段階でなんらかの加熱操作があると本来の香気が全く損なわれることを意味している。従って、味噌の香気を研究するには、これらの香気成分研究上の問題点を克服した分離濃縮方法の確立が重要な課題であった。

そこで、本節では香気成分の分離抽出方法として広く利用されている S D E 法¹⁹⁾、加熱の影響の少ない減圧蒸留法、加熱操作がなく、水溶液中の香気成分を効率よく回収できるポーラスボリマーを用いるカラム濃縮法^{24)、37)、74)}の3法により香気濃縮物を調製し、比較検討した。

S D E 法は少量の抽出溶媒で効率よく香気成分を抽出できるという利点があり、現段階では最も優れた香気濃縮物調製方法の一つといわれている。しかしながら、この方法では従来より行われている水蒸気蒸留法と同様に加熱香気の形成は避けられない。さらに、水あるいは糖をはじめとする共存成分に対して親和性の高い香気成分の回収が十分とはいがたく、これは、本論文第Ⅲ章第3節の蒸煮大豆の香気組成の検討の際に述べたとおりである。

S D E 法での欠点と考えられる加熱による香気への影響を少なくするために減圧下での水蒸気蒸留法、即ち減圧蒸留法についても検討した。この方法では多量の水留出溶液から微量の香気成分を抽出しなければならない。そのため、多量の有機溶媒を用いなければならなく、操作時間も長いという欠点がある。しかしながら、味噌の香気濃縮物調製には加熱の影響が少ないということは大きな利点で

ある。

カラム濃縮法は香気濃縮物の調製段階で加熱操作がなく、加熱による香気への影響が全くない。これは味噌の香気研究にとって極めて重要な利点である。また、水などの共存成分の影響も受けにくく、しかも操作が簡単で特殊な装置を必要としないという利点も持っている。また、本論文第Ⅲ章、第Ⅳ章の蒸煮大豆や納豆香気の分離同定にその有効性が認められたことから、他の方法との比較において特に重要な方法として注目して検討を行った。

試料には第2節で述べた各種味噌の中から、赤色辛口系米味噌を用いることにした。工業的に生産されている味噌の約80%は米味噌であり、味噌といえば米味噌である場合が多い。また、防湧剤としてエタノールが添加されている場合には香気成分を効率よく捕集することができず、試料とする味噌については製造方法等を明確に把握する必要がある。そこで最も一般的な米味噌で、比較的香気が強く、製造方法等も明確である、仙台味噌を試料とすることにした。

各調製方法で得られた香気濃縮物は官能検査によって、試料味噌の香気の再現性を比較した。次いで各香気濃縮物をGC及びGC-M S分析して、香気成分を同定または推定すると共に、検出された成分数とその濃度を比較し、味噌の香気成分研究に適した分離濃縮方法を明らかにした。

1 実験方法

1) 試料

試料とした仙台味噌（仙台味噌株式会社製）は、日本産の大豆と米を原料とし、米麹70%と食塩12%を添加した天然醸造品で熟成期間は18カ月である。

2) 香気濃縮物の調製

(1) S D E 法

味噌360gに蒸留水（脱イオン水を蒸留精製した水）1440mlを加えた20%の懸濁液を試料とした。これをLikens-Nickerson型連続蒸留抽出装置により、常圧下試料フラスコ内98-99°Cで3時間抽出した。抽出溶媒としてエーテルあるいはジクロルメタン各70mlを用いた。各抽出液に内部標準物質として、0.2mg/mlに調製したBHT(2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol)のエーテル溶液1.0mlを加え、無水硫酸ナトリウムで脱水後、常圧にて蒸留濃縮し香気濃縮物とした。抽出溶媒をエーテ

ルとした場合を S D E - E 法、ジクロルメタンを S D E - D 法とする。

(2) 減圧蒸留法 (V E 法)

味噌 100g に蒸留水 400ml を加えた 20% 懸濁液を試料とした。これをロータリーエバポレーターで、40°C の湯浴上 43mmHg の減圧下で蒸留を行い、留出液は氷一食塩で冷却したトラップ管で捕集した。塩析後香気成分をエーテル 50ml で 4 回抽出した。エーテル抽出液を合わせ、S D E 法と同様に処理して香気濃縮物を得た。これを V E 法とする。

(3) カラム濃縮法 (P A 法)

味噌 60g に蒸留水 240ml を加え 20% 懸濁液を調製後、5°C、3000 rpm で 15 分間、遠心分離した。この上澄液を精製した Porapak Q 吸着剤 3g を充填したガラスカラム（内径 1cm × 高さ 11cm）に 1ml/min の流速で流し、香気成分を吸着剤に吸着させた。吸着された香気成分は 100ml のエーテルを 1ml/min で流し、溶出させた。エーテル溶出液は S D E 法と同様に処理して香気濃縮物を得た。これを P A 法とする。

各調製方法による実験は 3 回繰り返して行った。

3) 香気濃縮物の官能検査

試料から 4 法で得られた香気濃縮物について食物学研究室のパネル 7 名による官能検査を実施した。試料とした味噌と 4 種の香気濃縮物をパネルに提示し、試料の香気特性に最も近い香気濃縮物を 1 位とし、最も似ていないものを 4 位とする順位法を実施した。結果はクレーマーの検定により有意差を判定した。

4) 香気成分の分離・同定

得られた香気濃縮物は G C および G C - M S を用いて分析した。ピーク面積計算は島津クロマトパック C - R 2 A によった。各成分の濃度は内部標準物質とのピーク面積比から算出した。化合物の同定は文献値のマススペクトルデータおよび標準物質との G C の保持時間の一一致によった。G C 分析用カラムは PEG20M 系の FS-WCOT を用い、M S は E I 法でデータ処理は全てコンピューターによった。詳細な分析条件を Table V - 3 に示す。

2 結果及び考察

1) 香気濃縮物の官能検査、及び香気濃縮物の収量

試料より 4 法で得られた香気濃縮物の順位法による官能検査の結果を Table V -

Table V-3 異なる調製法によって得られた味噌香気濃縮物の G C
及び G C - M S 分析の条件

G C 分析条件

Model: SHIMAZU GC-14A

Column : FS-WCOT, PEG20M(0.25mmx35m, 0.25 m film)

Oven temp. : 60°C (5min hold) → 4°C/min → 200°C

Carrier Gas: He, 0.8ml/min

Inj. Temp. : 200°C

Detector: FID, 200°C

G C-M S 分析条件

G C part

Model: HITACHI G3000

Column : FS-WCOT, Supelcowax 10(0.25mmx50m, 0.25 m film)

Oven temp. : 40°C (5min hold) → 3°C/min → 200°C

Carrier Gas: He, 0.8ml/min

Inj. Temp. : 200°C

M S part

Model: HITACHI M-2000

Ionization Voltage: 70eV

Computer part

Model: HITACHI M-0201 system

4に示した。これより、P A法が他の方法よりも5%の危険率で有意に元の香氣に近いことが判明した。

また、試料から各分離濃縮方法で得られた香氣濃縮物の収量は生味噌100g当たり、P A法が95mgで最も高く、以下S D E - E法15mg、S D E - D法11mg、V E法12mgであった。香氣濃縮物の収率は蒸留法のS D EとV Eでは大差なく、P A法で高かった。

味噌香氣の再現性や香氣濃縮物の収率からは、P A法が他の方法より優れないと判断された。

2) 分離濃縮方法による同定成分と香氣特性の比較

試料から各分離濃縮方法で得られた香氣濃縮物のG C分析の結果、S D E - E法、S D E - D法、V E法のガスクロマトグラムはよく類似し、P A法が多少異なっていた。そこで、P A法とS D E - D法のG Cパターンを比較して、Fig. V - 2に示した。Fig. V - 2ではG C - M S分析で同じ成分と判断されたピークは同じ番号とした。

4種の異なる分離濃縮法で得られた香氣濃縮物をG C - M S分析した結果、同定または推定された化合物を官能基別にまとめ、さらに各化合物の濃度は内部標準物質とのピーク面積比から算出して、Table V - 5に示した。

蒸留法のS D EとV Eでは同定または推定された成分はほとんどが共通し、各香氣成分の濃度も大差なかった。P A法は抽出の際加熱操作がなく、揮発成分の蒸留を行わない点で他の2法とは異なる。そのため、P Aでは同定された香氣成分も他の方法によるものと大きな相違があり、各成分の濃度も一般的に高かった。

S D E - E、S D E - D、V Eの各方法と共に通する化合物36種に加えて、P A法においてのみ15種の成分が同定された。そのうち4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone(HEMF)、4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3(2H)-furanone(HDMF)、2-heptanol、2-methyl-3-pentanone、1-hexyl acetateの5種は味噌から初めて同定された。

味噌の香氣成分として初めて同定されたHEMFは甘いカラメル様の強烈な香りを持ち、閾値は0.04ppbよりも低いと報告されている³⁸⁾。また、HEMFはNunomuraらによって本醸造醤油中に初めて同定された化合物で、濃度によっては醤油の芳香を強く感じる、本醸造醤油の特徴香を示す物質(Character Impact

Table V-4 各調製法で得られた味噌香気濃縮物の官能検査

Sample	PA	SDE-E	SDE-D	VE
Rank sum	11	15	16	28
Determining significance	*			**

$t=4$ (samples), $n=7$ (panelists).

* Significance at the 5% level.

** Significance at the 1% level.

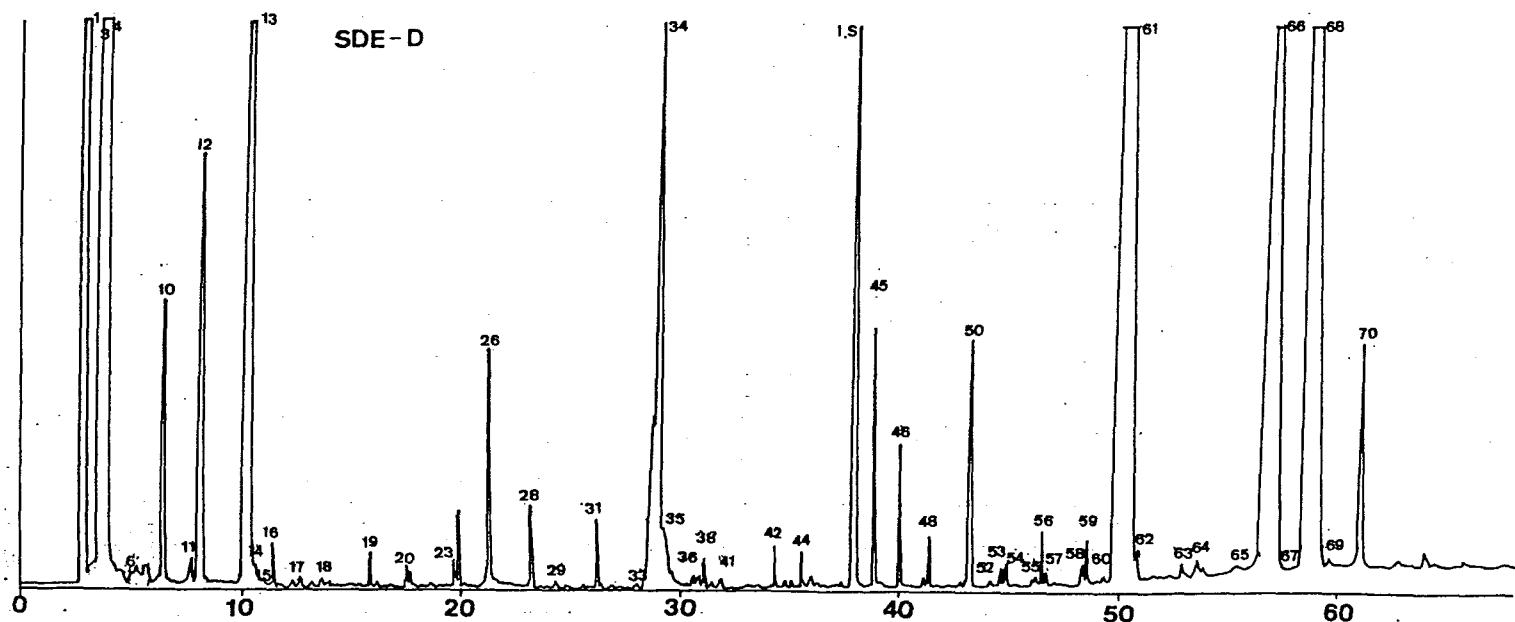
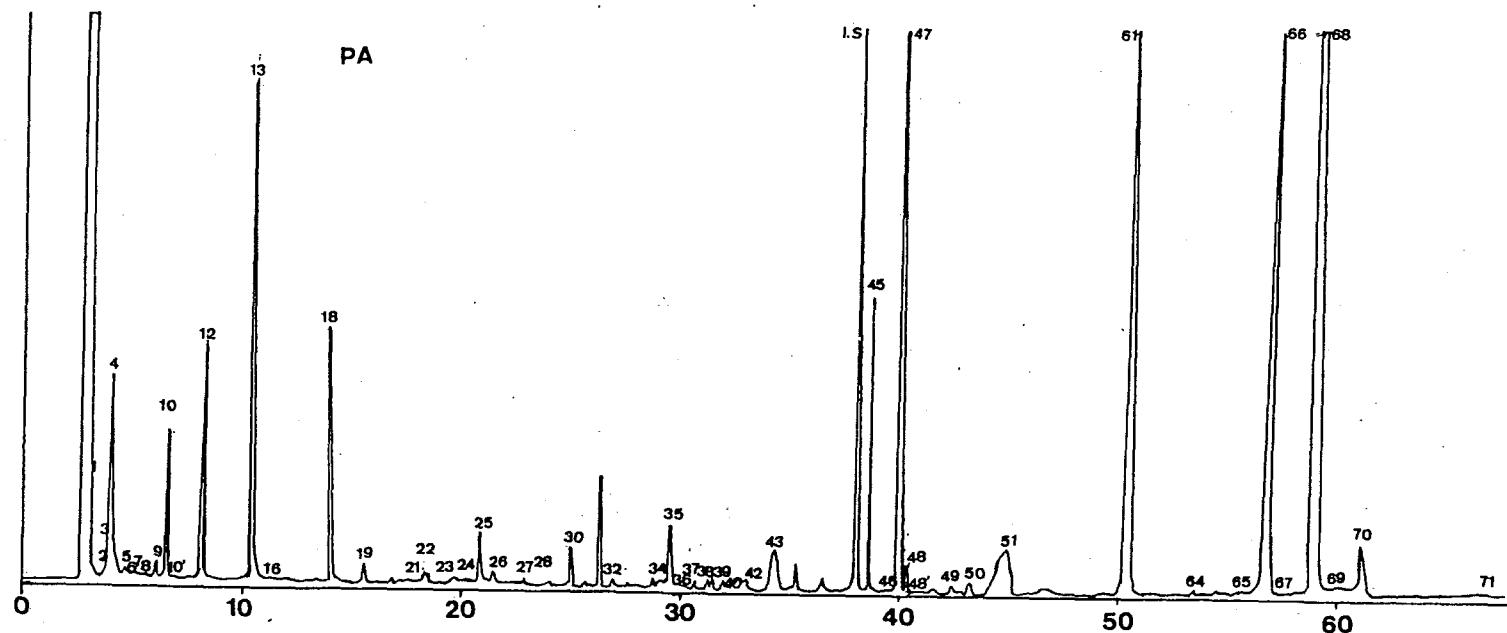


Fig. V-2 S D E - D 法と P A 法によって得られた味噌香気濃縮物のガスクロマトグラム

Table V-5 各分離濃縮法による味噌香気成分の比較^{a)}

Peak No.	化 合 物	SDE 法 E	SDE 法 D	V E 法	P A 法
脂肪族アルコール					
4	ethanol	**	**	**	**
	1-propanol	3.16	—	0.08	—
10	2-methyl-1-propanol	6.39	0.84	1.31	0.43
12	1-butanol	7.24	1.02	3.99	0.71
13	3-methyl-1-butanol	18.91	4.22	4.98	1.74
17	1-pentanol	—	0.04	—	—
	1-hexanol	0.10	—	—	—
22	2-heptanol	—	—	—	+
	3-octanol	0.04	—	—	—
脂肪族アルデヒド					
3	2-methylbutanal	**	**	**	—
4	3-methylbutanal	**	**	—	0.08
48'	myrtenal*	—	—	—	+
脂肪族ケトン					
9	2-methyl-3-pentanone	—	—	—	0.35
21	3-hydroxy-2-butanone	—	—	—	+
脂肪族エチルエステル					
2	ethyl acetate	0.95	—	—	+
5	ethyl propanoate	+	—	—	+
7	ethyl butanoate	+	—	—	+
16	ethyl hexanoate	0.02	0.21	—	+
23	ethyl octanoate	0.19	0.03	—	0.08
50	ethyl tetradecanoate	0.57	0.50	0.20	+
56	ethyl pentadecanoate	0.34	0.05	0.03	—
61	ethyl hexadecanoate	7.03	0.21	1.68	2.63
65	ethyl octadecanoate	—	+	+	+
66	ethyl (Z)-9-octadecenoate	+	6.01	0.99	2.27
68	ethyl (Z, Z)-9, 12-octadecadienoate	9.45	8.12	1.57	3.41
70	ethyl (Z, Z, Z)-9, 12, 15-octadecatrienoate	11.22	0.87	—	+
その他のエステル					
8	butyl acetate	0.63	—	—	+
6	2-methylpropyl acetate	+	—	—	+
11	2-methylbutyl acetate	+	0.16	—	—
27	1-hexyl acetate	—	—	—	0.03
6'	methyl 2-methylpropanoate	+	0.03	—	—
59	methyl hexadecanoate	—	0.21	—	—
カルボン酸					
24	acetic acid	0.28	—	—	0.08
28	3-methylpropanoic acid	—	—	—	0.02
32	pentanoic acid	—	—	—	0.20
43	hexanoic acid	—	—	—	0.24
芳香族化合物					
45	2-phenyl-1-ethanol	2.06	0.40	0.77	1.09
35	benzaldehyde	0.22	0.11	0.35	—
33	phenylacetaldehyde	+	0.04	0.07	—
46	2-phenyl-2-butenal	0.18	0.24	0.20	+
39	methyl phenyl ketone	—	—	—	+
34	ethyl benzoate	7.43	3.10	0.44	+
42	ethyl phenylacetate	0.15	0.05	0.04	+
44	2-phenylethyl acetate	0.15	0.06	0.06	—
	phenol	—	—	0.05	—
71	benzoic acid	—	—	—	0.13

Peak No.	化 合 物	SDE 法 E	SDE 法 D	V E 法	P A 法
フラン化合物					
30	furfuryl alcohol	0.01	—	—	0.06
26	furfural	1.39	0.59	0.05	+
31	5-methyl-2-furfural	0.28	0.19	0.04	—
	acetyl furan	0.04	—	—	—
	2-ethyl-3-hydroxyfuran*	0.12	—	—	—
含窒素あるいは含硫化合物					
48	2-acetylpyrrole	0.26	0.11	—	0.12
	4-hydroxypyrimidine*	+	—	—	—
38	3-methylthiopropanol	0.14	+	—	0.04
36	2-ethoxythiazol*	0.11	0.01	0.07	+
その他					
47	maltol	—	—	—	2.14
49	2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone (HDMF)	—	—	—	0.11
51	4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF)	—	—	—	1.27
37	3-methyl-2(5H)-furanone*	—	—	—	0.04
10'	undecane	—	—	—	+
40	naphthalene	—	—	—	+
	2-methyl-1-octene*	—	+	—	—

a) : 生味増中の ppm.

* : MS のみで推定された化合物。** : GC で分離せず、定量できなかった。

SDE 法 E : エーテルによる連続水蒸気蒸留抽出法。 V E 法 : 減圧水蒸気蒸留法。

SDE 法 D : ジクロルメタンによる連続水蒸気蒸留抽出法。

P A 法 : ポーラスボリマーを用いたカラム濃縮法。

Compound) の本体とされ、醤油では酵母によって生産される特殊な化合物であり、他の食品には検出されていないと報告されていた⁷⁹⁾。HEMFの構造とマススペクトルデータをFig. V-3に示す。

また、HDMFも閾値が0.04ppbと低く、強いカラメル様のにおいを持つと報告され³⁸⁾、本論文第III章第3節において蒸煮大豆の香気成分としても同定された。HEMF、HDMFは味噌の香氣にとって非常に重要な成分であると考えられる。特に、HEMFは味噌中の濃度が1.27ppmと、HDMFの0.11ppmに比較して高く、味噌香氣への寄与もかなり高いと判断された。

また、PA法ではmalto1が味噌中2.14ppmで量的に主要な香気成分のひとつであった。malto1も甘いカラメル様の香氣を持っており、味噌の香氣に寄与すると考えられる。しかし、この成分もSDE、VE法では全く検出されなかった。第III章第3節で述べたように、PA法で調製された蒸煮大豆より得られた香氣濃縮物の主要香気成分もmalto1であり、蒸煮大豆中の濃度は2.98ppmであった。また、この時、malto1の回収率は、PA法は48.0%であるのに対しSDE法では約0.1%であることも確認されている。従って、malto1は主に味噌の原料となる大豆を蒸煮した際に生成したものと推察された。

PA法で得られた香氣濃縮物が特に特徴的な甘いにおいが強い理由は、他の2法では検出されなかったHEMF、HDMFとmalto1がそれぞれ1.27ppm、0.11ppm、2.14ppm存在したことによると判断された。

一方、SDE法では加熱香氣の代表的な成分であるフラン化合物が4種とacetylpyrroleが同定された。VE法でもSDE法より少量であったが、これらほとんどの成分が検出された。これに対して抽出の際加熱操作のないPA法ではこれら加熱香氣成分の検出数も少なく、検出された成分の濃度も低かった。従ってSDE法においては蒸留中に一部加熱香氣が生成したと判断され、PA法では加熱による香氣形成がない点でも優れていると判断された。

また、SDE法においては、量的な主要成分は低級脂肪族アルコール類と芳香族のアルコール、アルデヒド、エステルであったが、PA法ではこれら化合物は不検出または低い値を示した。低級脂肪族アルコール類、芳香族化合物はSDE法の操作中に生じたとは考えにくく、これら成分の回収に関してはSDE法がPA法より有効であった。

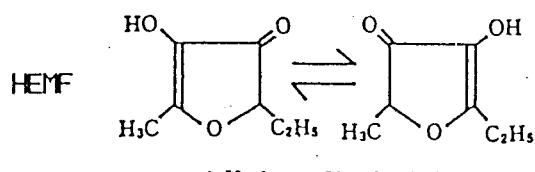
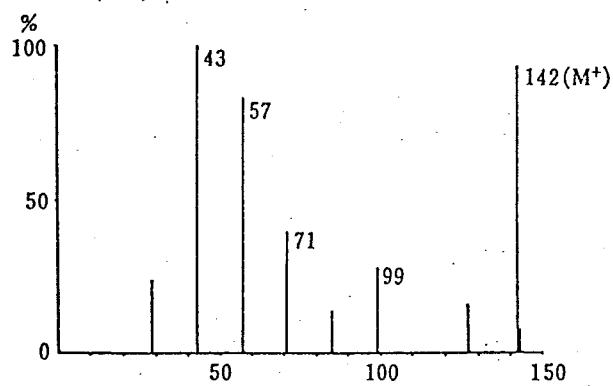


Fig. V-3 HEMF の構造とマススペクトルデータ

下田らは市販のビールの香気成分の濃縮にポーラスポリマーを用いたカラム濃縮法と減圧連続蒸留抽出法を比較し、前者が酸性及びフェノール性画分、塩基性画分の回収に優れ、任意に選ばれたピークの再現性も良かったと報告している⁷⁴⁾。味噌の香気捕集においてもほぼ同様な結果であった。

P A 法で得られた香気濃縮物は他の方法より、試料とした味噌の香気特性に近く、収率も高かった。また、P A 法では味噌の香氣にとって重要な役割を果たすと考えられる H E M F 等の成分を効率よく、濃縮できること、さらに、加温することなく香気成分を回収できるため、加熱香氣の生成がなく、加熱による香氣の変化がないことなどが判明し、味噌の香氣成分研究には P A 法が最も有効であると判断された。しかし、S D E 法では低級脂肪族アルコール類、芳香族化合物等の回収率が P A 法より優れており、両法を併用して多面的に解析するとより効果的であると結論づけられた。

第4節 各種味噌のヘッドスペース分析

第3節では味噌の香氣をできるだけ変化させずに、味噌本来の香氣を捕集し、味噌の特徴的な香氣組成を解明するためにはカラム濃縮法が有効であることを明らかにした。しかしながら、実際に消費者が味噌を食する場合は生味噌ではなく、ほとんどが味噌汁としてである。味噌汁の場合には生味噌とひきたってくる香りの成分が違うことを考慮にいれることも重要である。従って、味噌香氣の全体を解明するには、味噌汁を食べる時により近い状態での香氣特性の解明も必要で、それにはヘッドスペース分析法⁸⁰⁾⁻⁸²⁾が有効であると推察される。

一般にヘッドスペース分析法の長所には、私達が食品について感じるにおいの組成に最も近いこと、方法が比較的簡単で、多種類の試料を分析しやすいことなどがあげられる。しかしながら、1回に処理できる試料の量に限度があり、検出できる香氣成分は比較的濃度が高い成分に限られる。また、高沸点の成分はヘッドスペース中には捕集されにくく、全く検出できない場合もある。これらの長所、短所を勘案しつつ、本節では、味噌全体の香氣解明への一つの方法として、ヘッドスペース分析法適応の是非を検討した。

1 実験方法

1) 試料

実験に用いられた味噌は、すべて1991年11月全国味噌鑑評会で優秀賞となった製品で、これを中央味噌研究所から提供していただいた。試料は米味噌として、赤色辛口系（KOME1と略す。）、淡色辛口系（KOME2と略す。）、甘味噌（AMAと略す。）の3種、麦味噌赤色系（MUGIと略す。）1種、豆味噌（MAMEと略す。）1種の合計5種である。

2) 各種味噌のヘッドスペース分析

各種味噌3gに蒸留水27mlを加え、味噌懸濁液を調製した。この懸濁液に直接、内部標準物質としてn-decyl alcoholを44.0ppmになるように添加した。Fig. V-4に示した装置を用い、70°Cの湯浴上、30ml/minで10分間、この味噌懸濁液に窒素ガスを流し、Tenax TA 90mgを充填したガラス管に香気成分を吸着、捕集、濃縮させた。その後、室温で30分間窒素ガスを流し、Tenax TA管に吸着された水分をページした。このTenax TA管をFig. V-5に示したクロンパック社製（オランダ）PTI-システムにいれ、熱脱着し、脱着された成分は冷却トラップ管（液体窒素で冷却）で濃縮した後、直接キャピラリーカラムに導入して分析した。詳細な分析条件はTable V-6に示した。

3) パターン類似率

各種味噌間のガスクロマクグラムのパターン類似率を求めた。GC分析の結果得られたn本のピークに対する測定値を数値群としてとらえ、これを0を原点とするn次元空間の位置ベクトルの成分として考えると、サンプル間のパターン類似率は次の式により求めることができる。

$$S_{(A, B)} = \cos \theta = \frac{(\vec{OA}, \vec{OB})}{|\vec{OA}| |\vec{OB}|} = \frac{\sum_{i=1}^n a_i b_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n a_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n b_i^2}}$$

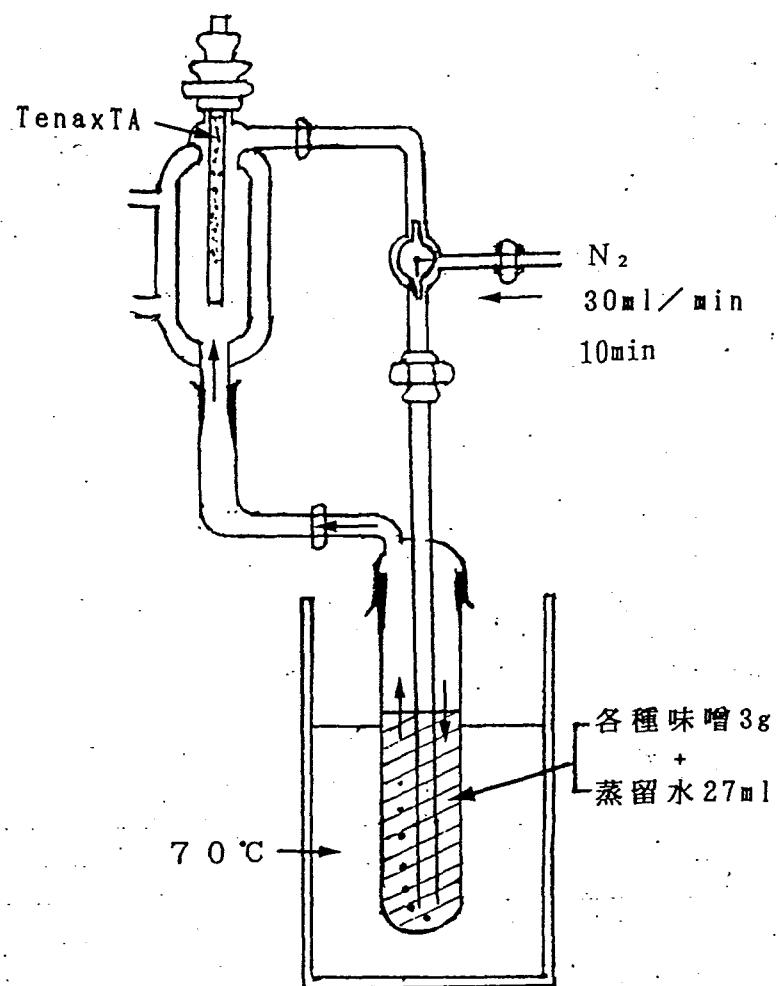


Fig. V-4 味噌のヘッドスペース捕集装置

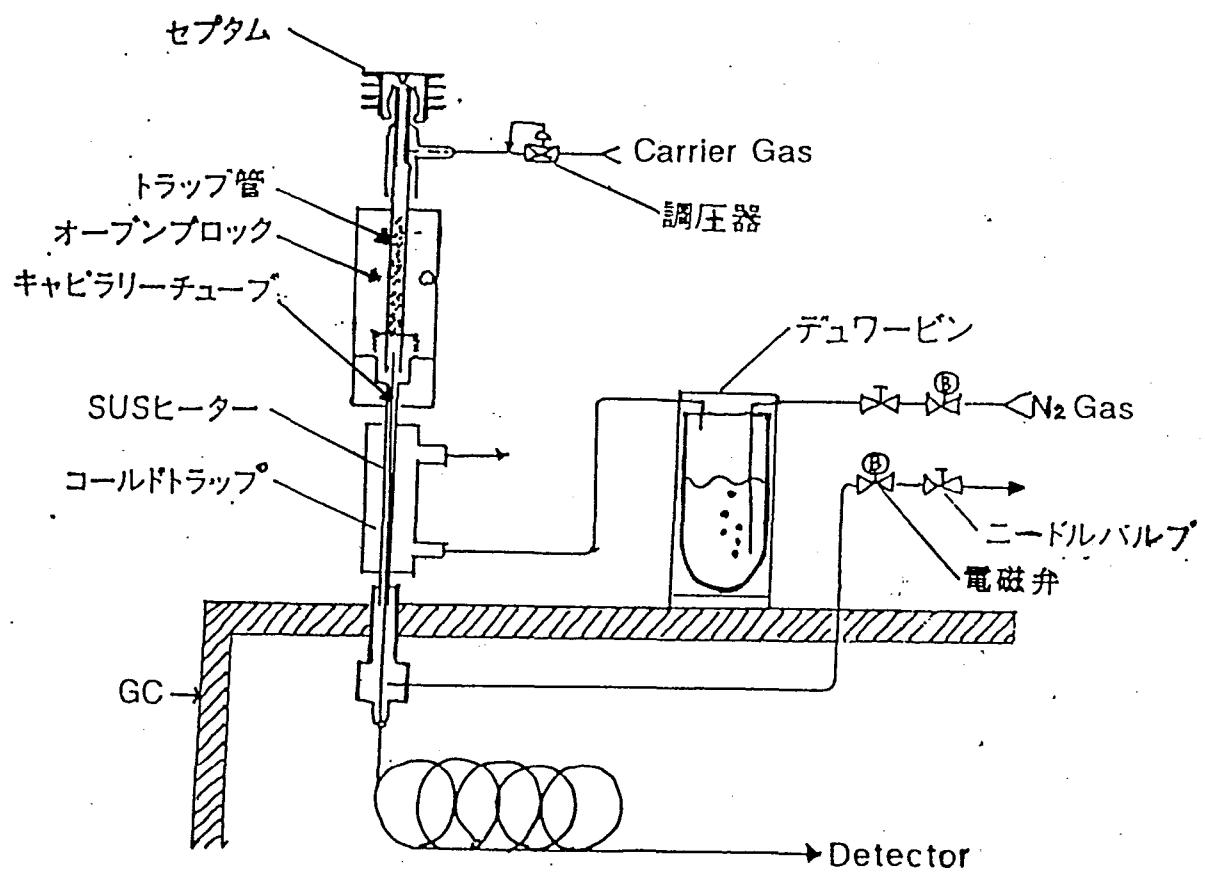


Fig. V-5 味噌のヘッドスペース分析装置

Table V-6 味噌のヘッドスペース分析条件

Model : HITACHI G-3000

Column : FS-WCOT CP-WAX 52CB 50m×0.25mm I.D. (df=0.2μm)

Oven temp. : 40°C (10min hold) → 3°C/min → 180°C

Carrier Gas:He, 1.2ml/min

Injector:TCT Chrompack

Cold Trap Material CP-Sil 5CB 0.32mm I.D. (df=1.2μm)

Cryofocussing:-130°C

Precool time:2min

Desorption time:7min

Desorption flow:10ml/min

Desorption temp:200°C

Injection temp.:200°C

Injection time:10min

Detector:FID, 200°C

数値群パターンAとBが一致する場合は、ベクトル \overrightarrow{OA} と \overrightarrow{OB} との方向が一致するので $\theta = 0^\circ$ となり、 $S(A, B) = \cos 0^\circ = 1$ となる。また、AとBとが共通の成分を全く含まない時は $\theta = 90^\circ$ 、 $S(A, B) = \cos 90^\circ = 0$ となる。従って、パターン類似率は1から0までの数字となり、パターンが似ているほど1に近い数字となる。

2 結果及び考察

1) 各種味噌のヘッドスペースの香気組成

各種味噌のヘッドスペース分析のガスクロマトグラムをFig. V-6に示した。5種の味噌から検出された成分は94種あり、このうち58種の成分を同定または推定した。同定または推定された化合物は官能基別にまとめ、さらに各化合物の濃度は内部標準物質とのピーク面積比から算出して、Table V-7に示した。ピーク番号はFig. V-6に対応している。これら検出された香気成分は5種の味噌でほとんどが共通し、その濃度も同程度で、各種味噌のヘッドスペースは極めて類似した組成になっていることが示唆された。

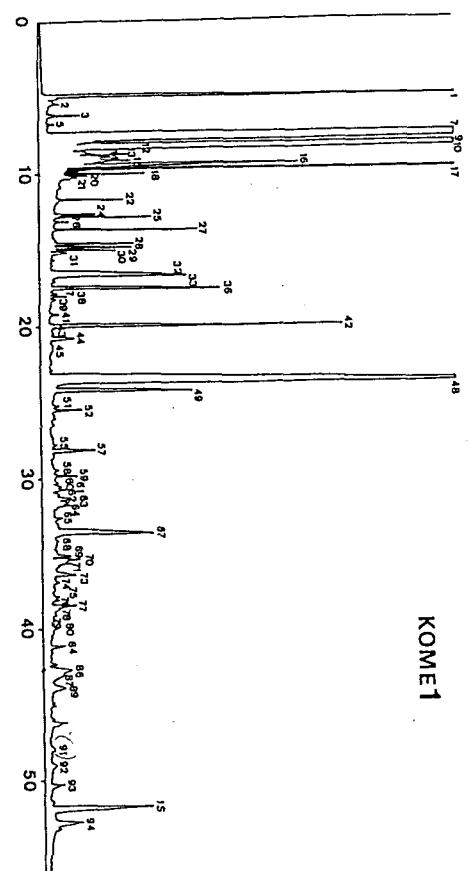
一方、第3節において、味噌の特有香気成分として同定されたHEMF等、比較的高沸点の化合物は検出されなかった。ヘッドスペース分析では、味噌の香気を特徴づけるような多くの成分が検出できないので、各種味噌の官能的な香気特性の差異を化学的な分析結果をもとに説明することは困難であると判断された。

2) ヘッドスペース分析による各種味噌のパターン類似率

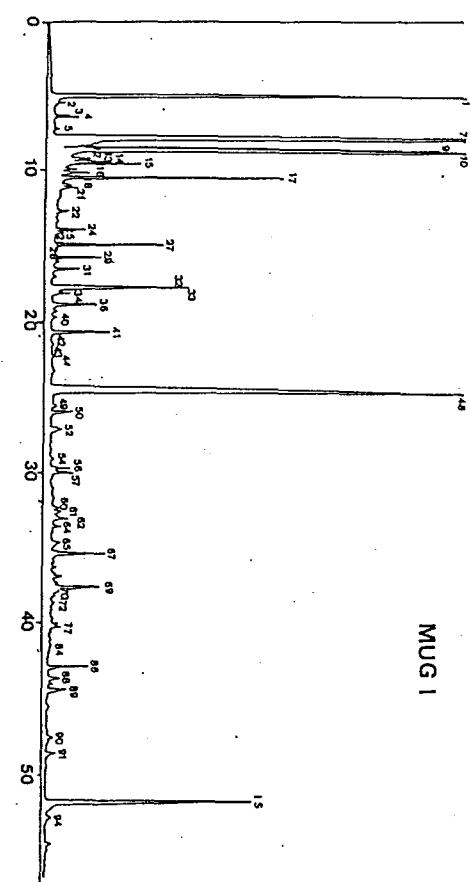
食品の香気特性を明らかにするには、化学的に寄与の高い成分を特定する方法と、検出された香気成分の濃度を数値群として統計的に処理し、全体のパターンとして比較する方法がある。各種味噌の香気のヘッドスペース分析では、検出された香気成分やその濃度が極めて類似しており、化学的に寄与の高い成分を特定し、各種味噌の官能的な香気特性の差異を説明することは困難であった。そこで、GCパターン類似率を求め、各種味噌のヘッドスペースの類似度を知り、香気特性を全体像として把握し、官能的な感覚との関係を明らかにすることを試みた。

94種の香気成分の内部標準法によって得られた5回の平均濃度を数値群として、各種味噌のパターン類似率を求め、Table V-8に示した。最も一般的な赤色辛口系米味噌KOME1を中心に各種味噌との類似率をみると、最も高かったのはMUGIで

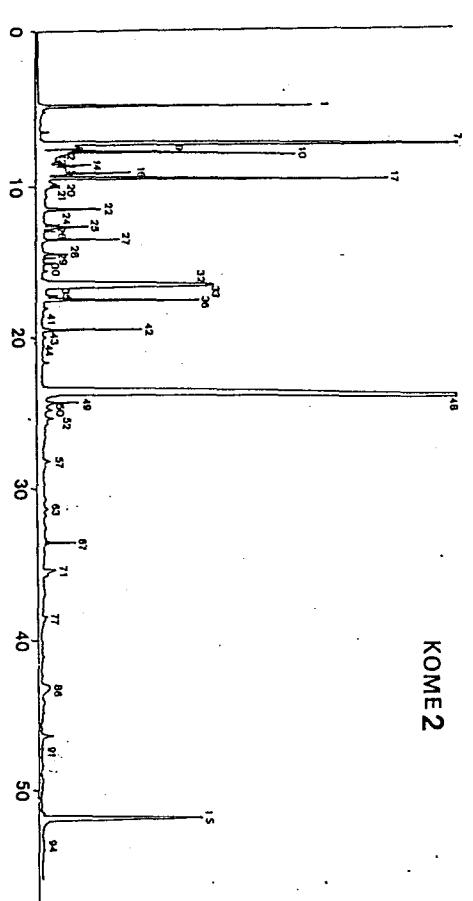
KOME1



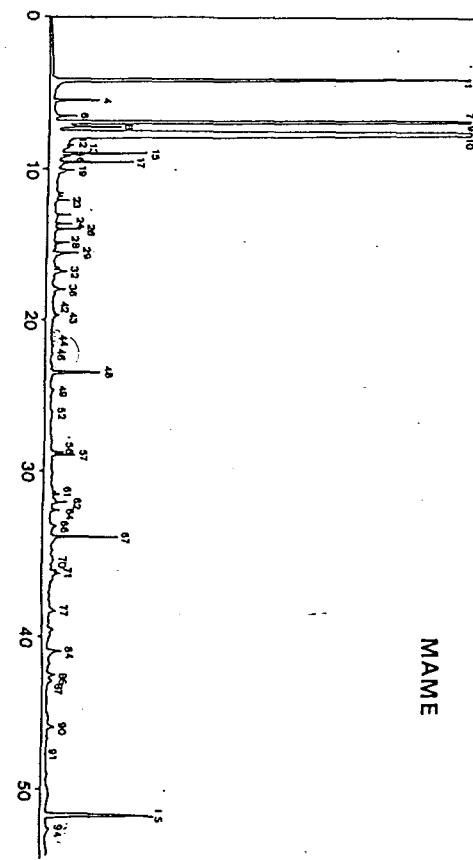
MUG I



KOME2



MAME



AMA

Fig. V-6 各種味噌のヘッドスペース分析のガスクロマトグラム

Table V-7 各種味噌のヘッドスペース成分として検出された化合物

Peak No.	Compounds	KOME1	KOME2	MUGI	MAME	AMA ppm
A. Aliphatic Alcohols						
12	ethanol	11.89	0.53	3.17	1.17	9.97
36	2-methyl-1-propanol	12.27	10.56	4.09	4.89	1.44
49	2-pentanol			0.07		
42	1-butanol	24.35	3.94	0.12	0.71	0.37
48	3-methylbutanol	124.26	122.81	70.29	17.84	4.77
54	2-heptyl-1-ol*	+	0.14	0.24		0.30
55	1,5-octadiene-3-ol*	0.63	0.17		0.78	0.92
57	1-hexanol	2.65	1.53	1.35	3.52	
71	1-octen-3-ol	3.50	1.70	9.08	5.92	2.87
77	2-ethyl-1-hexanol*	3.39	0.18	2.36	0.63	
B. Aliphatic Esters						
7	ethyl acetate	609.09	169.45	359.56	358.26	168.07
15	'isopropenyl acetate*					+
16	ethyl propionate	14.04	3.11	2.18	2.92	0.24
17	ethyl 2-methylpropionate	43.72	15.04	17.54	15.41	0.57
27	ethyl butyrate	10.52	3.42	8.45		0.21
29	ethyl 2-methylbutyrate	5.87	0.41	2.90		0.04
44	ethyl 2-butenoate	1.98	0.30	0.11		
50	ethyl 3-methylpentanoate	12.37	0.48	1.68	0.73	1.32
53	ethyl hex-3-enoate*					1.89
72	'ethyl sorbate*					0.06
81	ethyl sorbate*					0.27
83	ethyl sorbate*					13.85
22	isobutyl acetate	6.70	2.44	0.98		
32	butyl acetate	24.23	25.15	23.81	4.10	1.48
41	3-methylbutyl acetate	0.48	0.12	3.93	2.12	0.06
C. Carbonyl and Acid Compounds						
1	2-methylpropanal	66.80	19.67	51.78	44.75	15.55
9	2-methylbutanal	264.49	8.23	24.61	588.88	1.38
10	3-methylbutanal			42.15		6.15
4	1-butanal			0.34	2.88	0.07
19	1-pentanal				7.55	
25	2-butenal	6.00	1.70	2.38		0.96
33	1-hexanal	24.23	25.15	23.81	4.10	1.48
45	2-methyl-2-butenal*				0.76	
15	2,4-hexandienal*	11.36	0.67	5.55	15.75	
8	2-butanone				10.83	+
44	4-methyl-2-hexanone*	+	0.23	3.94	1.38	0.03
52	3-octanone			1.39		0.32
61	6-methyl-3-heptanone*				1.46	0.16
28	2,3-pentandione	4.92	1.04	0.12	2.99	0.04
45	3-methylcyclopentandione*	0.51				
70	acetic acid	14.42	4.12	9.88	15.93	4.37
D. Furans						
4	2-methylfuran*				5.79	
72	furfural			1.71		0.24

E. Aromatic Compounds

13 benzene	11.89	0.53	3.17	1.17	9.97
26 toluene	2.02	0.32	0.50	0.74	0.19
52 styrene	0.78	0.38	+	0.39	0.05
84 benzaldehyde	0.83	0.35	0.82	2.39	0.10
90 phenylacetaldehyde			1.47	2.66	
87 methylbenzoate				0.77	
91 ethyl benzoate	2.68	1.97	1.48	0.96	0.70
94 2-phenyl-2-propanol*	0.18	0.31	0.52	0.31	0.09

F. Others

23 thiophene				3.62	
46 pyridin			0.32		0.08
19 chloroform					0.04
14 2,2,4-trimethyldioxolane*	4.55	1.83	2.17		
20 2,4,5-trimethyldioxolane*	7.29		1.39		
24 1,1-diethoxy-2-methyl-	2.02	0.18			
propane*					
25 1,3-dimethoxypropene*	3.55	1.04	0.18	3.97	0.04
38 1,1-diethoxy-2-methyl-	0.93				
butane*					

*:tentatively identified

Table V-8 各種味噌のヘッドスペース分析の
ガスクロマトグラムパターン類似率

	KOME1	KOME2	MIGI	MAME
KOME2	0.86			
MUGI	0.97	0.90		
MAME	0.81	0.48	0.66	
AMA	0.90	0.81	0.96	0.53

0.97、次はAMAで0.90、KOME2は0.85、最も低かったMAMEとでも0.81であり、全体的に極めて高かった。豆味噌のヘッドスペースは多少他の味噌のヘッドスペースと異なる組成であるが、それ以外の各種味噌のヘッドスペースは極めて類似した組成になっていることがパターン類似率からも示唆された。

実際に各種味噌の香気を官能的に比較すると、米味噌と麦味噌は香気の質的な特徴はかなり共通していたが、豆味噌には異質な香気が感じられた。質的にならぬ類似している米味噌、麦味噌においても、香気の強度には差があり、甘味噌は最も香気が弱く、ついで、淡色辛口系であり、麦味噌は赤色辛口系米味噌と同程度の香気の強さであった。

パターン類似率では、各香気成分の種類とその濃度から香気特性全体を把握するための指標が示される。従って、赤色辛口系米味噌と香気の質的な特徴と強さの両面が官能的に類似していた麦味噌が最も高い類似率となり、香気の質的な特徴が異なっていた豆味噌が最も低くなつたと判断された。

第5節 各種味噌と醤油の香気組成の比較

第4節において、ヘッドスペース分析では各種味噌の官能的な香気特性の差異を化学的に寄与している成分を特定することによって説明することは困難であることが判明した。そこで、第3節において味噌の香気成分研究に最も適していることが判明したカラム濃縮法によって香気濃縮物を調製し、各種味噌の香気の特徴を比較検討した。また、第4節までの研究により、醤油と味噌で検出された香気成分は極めて共通していることが示唆された。醤油は原料や醸造に用いられる微生物が味噌と酷似しており、香気組成も共通するのは当然であろう。そこで、味噌と同じカラム濃縮法により、醤油の香気濃縮物も調製し、分析した。そして、醤油の特有香気成分と言われている化合物に特に注目して、各種味噌と醤油の香気組成の類似点と相違点を明確にすることを試みた。

1 実験方法

1) 試料

実験には第4節と同じ5種の味噌（KOME1：赤色辛口系米味噌、KOME2：淡色辛口系米味噌、MUGI：麦味噌、AMA：米甘味噌、MAME：豆味噌）を用いた。

醤油は本醸造濃口醤油（仙台味噌醤油株式会社製のジョウセン純正醤油：SHOYU）を用いた。

2) カラム濃縮法による香気濃縮物の調製、及び香気成分の分離同定

各味噌40gに蒸留水160mlを加え、味噌懸濁液を調製する。これを5°C、3000rpmで15分間、遠心分離し、上澄液を得る。この水抽出物をTenax GC、0.5gを充填したカラムに流し、エーテル50mlで脱着する方法（カラム濃縮法）で香気濃縮物を調製した。内部標準物質としてn-decyl alcoholをエーテル溶出液に添加した。詳細は第3節と同様である。醤油の香気濃縮物の調製には、醤油20gに蒸留水180mlを加え、味噌と同等の塩分濃度にした水溶液を試料とし、実験操作は味噌の場合と同様である。

本実験では味噌の香気成分をカラム濃縮する時に用いるポーラスポリマーはPorapak QからTenax GC (60-80メッシュ、a polymer based on 2,6-diphenyl-p-phenylene oxide、表面積 19m²/g)に変更した。鷲野らはかつお節水だし汁の香気成分の研究で上記2種のポーラスポリマー樹脂の比較をし、両者に個々の香気成分の吸着に関して質的量的な差はほとんどなく、ともに効率よく香気成分を捕集することができると報告している³⁷⁾。そこでこの報告に基づき、2種のポーラスポリマーを精製し、味噌の香気濃縮物を調製して比較した。得られた味噌の香気濃縮物は官能的に全く同様の香気特性を持っていた。また、これらの香気濃縮物を同様に分析したところ、そのガスクロマトグラムもほぼ同じであった。しかしながら、同じ精製条件ではTenax GCを用いる方法が、ポーラスポリマーからの不純物が検出されにくく、精製が確実に行われ得るという点でより優れていると判断され、本節で用いられた。

得られた香気濃縮物はGC及びGC-MS分析を行った。ピーク面積計算は島津クロマトパック C-R 6 Aによった。各成分の濃度は内部標準物質とのピーク面積比から算出した。化合物の同定は文献値のマススペクトルデータおよび標準物質とのGCの保持時間の一一致によった。GC分析用カラムはPEG20M系のFS-WCOTを用い、MSはE I法で、データ処理は全てコンピューターによった。詳細な分析条件は、第3節と同じでTable V-3に示したとおりである。

3) パターン類似率

G C 分析の結果、得られた n 本のピークに対する測定値を数値群としてとらえ、これを 0 を原点とする n 次元空間の位置ベクトルの成分として、第 4 節で示した式により、各種味噌と醤油のガスクロマトグラムのパターン類似率を求めた。詳細は第 4 節と同様である。

2 結果及び考察

1) カラム濃縮法での各種味噌の香気成分の比較

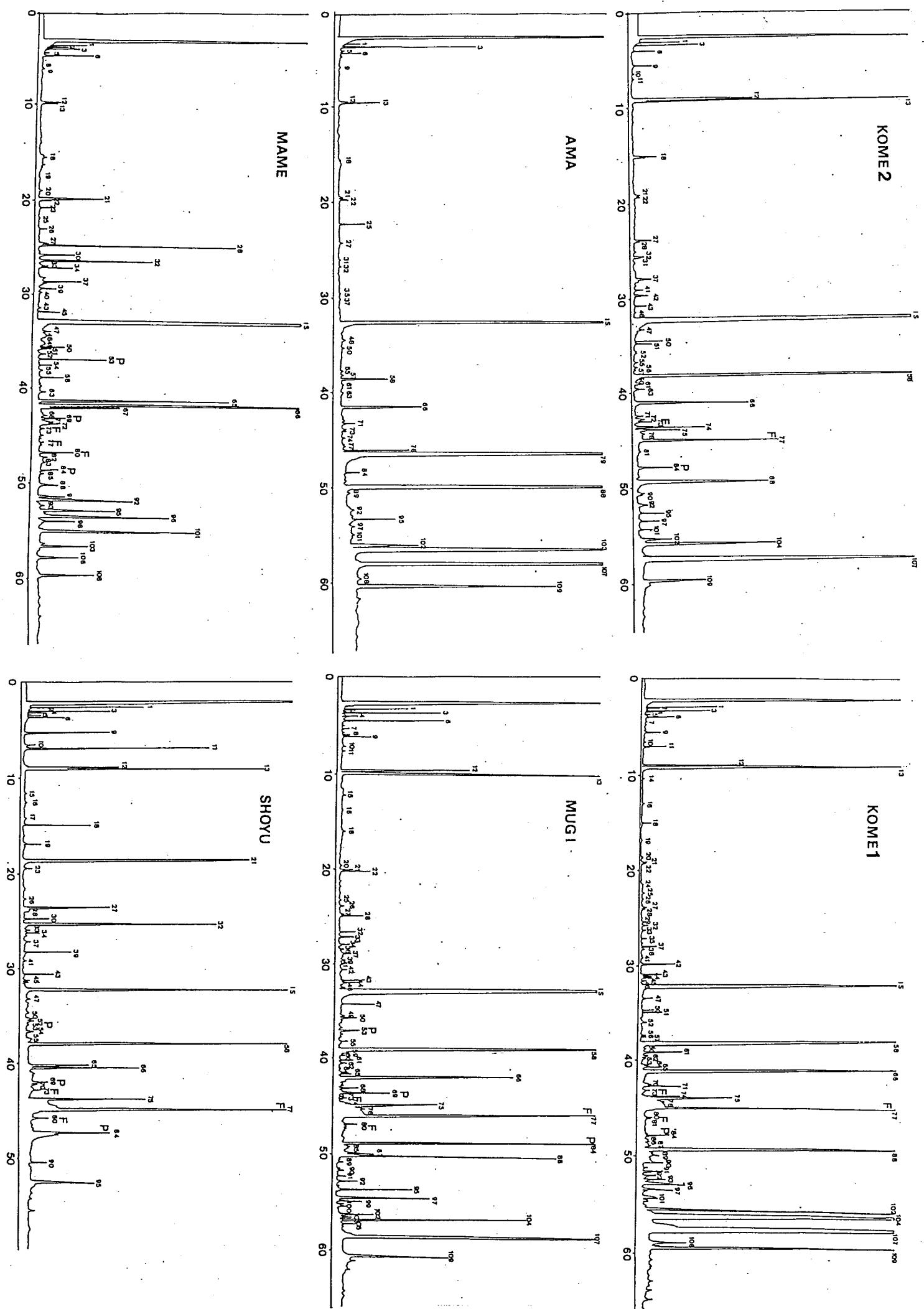
カラム濃縮法で得られた各種味噌及び醤油の香気濃縮物の G C 分析の結果を、Fig. V-7 に示した。マススペクトルと標準物質との G C の保持時間の一致から同じ化合物と判断された成分は同じピークナンバーとした。5種の味噌及び醤油から、104種の成分が検出され、HEMF を含めて 68 種の香気成分が同定あるいは推定された。同定または推定された化合物は官能基別にまとめ、さらに各化合物の濃度は内部標準物質とのピーク面積比から算出して、Table V-9 に示した。

本節で用いた赤色辛口系米味噌 KOME1 は長野県産であり、信州味噌に属する。第 3 節で試料とした仙台味噌も代表的な赤色辛口系米味噌で、その香気の分析結果は Table V-5 に示したとおりであり、両味噌で検出された香気成分はほとんどが共通していた。

各種味噌の香気組成を最も一般的な赤色辛口系米味噌 KOME1を中心とし、Table V-9 の化合物の分類に従って比較し、多数検出された成分の中から、化学的に寄与の高い成分を明かにすることを試みた。

低級脂肪族アルコールは 6 種が同定された。KOME1、KOME2、MUGI では 6 種の成分が共通して検出され、濃度も同程度であった。AMA と MAME では検出された成分の多くは共通していたが、全体的に濃度が低かった。SHOYU では 1-hexanol が検出されない以外は KOME1、KOME2、MUGI と共通した成分が検出された。

低級脂肪酸のエステルでは KOME1 と KOME2、MUGI、SHOYU はほとんどの成分が共通して検出され、濃度も同程度であった。AMA からは新しく 2,4-hexadienoic acid のエチルエステルが同定された。2,4-hexadienoic acid は米甘味噌では酵母での発酵を抑制するために添加されており、これが熟成中に発酵で生じた ethanol と反応し、エチルエステルが生成したと考えられる。また、MAME からは低級脂肪酸のエ



FIR. V-7 各種味噌と醤油のカラム濃縮法によって得られた香気濃縮物のがスクロマトグラム

Tabel V - 9 各種味噌と醤油から検出された香気成分

No.	COMPOUND	KOME1	KOME2	MUGI	MAME	AMA	SHOYU ppm
A.Aliphatic alcohols							
9	methyl-1-propanol	0.20	0.22	0.34	0.02	0.05	0.62
11	1-butanol	0.24	0.03	0.02			0.59
12	2-methyl-1-butanol	1.24	0.82	1.70	0.45		0.01
13	3-methyl-1-butanol	3.99	3.62	4.33	0.18	0.17	1.75
18	1-hexanol	0.13	0.13	0.03	0.09	0.03	
22	1-octen-3-ol	0.27	0.10	0.39	0.10	0.15	
	3-heptyn-1-ol*					0.03	
27	L-2,3-butandiol	0.08	+		0.30		1.50
32	meso-2,3-butandiol	0.18	0.08	0.17	0.38		2.86
B.Esters							
10	3-methylbutyl acetate	0.03	0.02	0.02			0.01
7	ethyl 3-methylpentanoate	+	+	+		+	0.01
35	2,4-hexadienoic acid ethyl ester					0.34	
45	ethyl octanoate	0.08	+	+			0.01
42	butanedioic acid diethyl ester*	0.42	0.11	0.06		0.02	
	methyl 2-ethylhexanoate*					0.04	
73	ethyl tetradecanoate	0.46	0.32			0.05	
83	methyl octadecanoate		+				
88	ethyl hexadecanoate	28.29	2.46	2.26	0.32	15.18	0.68
95	ethyl nonadecanoate		0.21	0.77		1.74	
102	ethyl octadecanoate	4.50	0.40	0.34			
104	ethyl (Z)-9-octa- decanoate	24.72	2.33	1.87	0.91	2.21	
107	ethyl (Z,Z)-9,12-octa- decadienoate	88.80	6.13	10.07	0.58	18.59	
109	ethyl (Z,Z,Z)-9,12,15- octadecatrienoate	12.64	0.73	5.21		6.24	
C.Carbonyl and Acid compounds							
16	3-hydroxy-2-butanone	+	0.13	+	0.06	0.76	0.01
21	acetic acid	+	+	+	0.11		0.37
28	2-methylpropanoic acid	0.02	0.03	0.02	0.03		0.01
79	2,4-hexadienoic acid					1.57	
D.Aromatic compounds							
53	2-methoxyphenol			0.29	0.60		0.04
69	4-ethyl-2-methoxyphenol			0.23	0.25		0.17
82	4-ethyl phenol			0.08	0.18		0.01
84	2-methoxy-4-vinylphenol	0.35	0.19	9.98	0.17	0.30	2.48
90	2,6-dimethoxyphenol	0.21	+		0.32		2.59
26	benzaldehyde	0.23	0.09	0.26	0.93	0.11	0.03
37	phenylaldehyde	+	+		0.18	2.66	0.10
61	2-phenyl-2-butenal	0.45	0.05	0.15			
	4-methyl benzaldehyde*	1.84	0.18	1.07	0.57	0.16	
54	benzylalchol		+		0.16		0.01

No.	COMPOUND	KOME1	KOME2	MUGI	MAME	AMA	SHOYU
58	2-phenyl-1-lethanol	11.68	10.17	9.14	0.24	1.06	2.95
38	ethyl benzoate	0.01	0.08	0.03		0.03	
47	2-phenylethyl acetate ethyl o-hydroxyphenyl actate*	20.14	0.28	0.18 0.11		0.11	
	actosyringone*			0.19			
	4-phenylpridone*			0.07	0.32		
101	benzoic acid			0.18	1.78		0.01
108	phenylacetic acid			0.31	0.54		
E. Furans							
29	5-methyl-2-furfural	0.03					
39	furfurylalcohol	+	+	+	0.03		0.13
F. Nitrogen containing compounds							
65	acetyl pyrrole	0.22	0.03	0.19	1.70		0.06
G. Sulfur containing compounds							
26	3-methylthiopropanal	0.11	+	+	0.41		
43	3-methylthiopropanol	0.22	0.10	0.34	0.27	+	0.30
H. Pyrones, Furanones							
66	maltol	4.16	0.46	2.87	6.15	1.39	6.96
91	DMDP*			0.07	0.82		0.10
71	HDMF	0.03	+	0.07	0.20	+	0.05
77	HEMF	6.42	0.75	7.22	+	+	5.47
80	HMF			0.16	0.34		1.51

*:tentatively identified

DMDP:3,5-dihydroxy-6-methyl-2,5-dihydro-4H-pyran-4-one

HDMF:4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone

HEMF:4-hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone

HMF:4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone

ステルは検出されなかった。

高級脂肪酸のエチルエステルは7種同定された。これらはKOME1、KOME2、MUGI、AMAに共通して検出され、特に、KOME1での濃度が高かった。MAMEでは3種検出され、濃度も比較的低かった。SHOYUでは1種のみ、しかも味噌に比較して極めて少量しか検出されなかった。SHOYUでは一般に脱脂大豆が原料として用いられており、そのためにこれら成分はほとんど検出されないと考えられる。また、SHOYUではもろみをろ過、圧搾後、得られた生揚醤油を清澄用タンクに集めて数日間静置し、上層の醤油油と下層にたまるおりを除去する製造過程がある。従って、原料に丸大豆等が用いられた場合でも、この工程で、高級脂肪酸のエチルエステルは油層に移行し、検出されにくくと判断された。

カルボニル化合物では、AMAにおいてのみ2,4-hexdienoic acid(ピークNo.79)が1.57ppmであったのが特徴的であった。

芳香族化合物では、KOME1、KOME2、AMAの3種の米味噌においては7-10種が検出され、濃度もほぼ同じであるのに対し、MUGI、MAME、SHOYUでは検出数も13-15種と多く、濃度も高かった。特に、2-methoxyphenol(ピークNo.53), 4-ethyl-2-methoxyphenol(4-ethylguaiacol, ピークNo.69)、4-ethylphenol(ピークNo.82)のフェノール化合物は米味噌では検出されず、MUGI、MAME、SHOYUにおいてのみ同定された。そこで、2-methoxyphenol、4-ethyl-2-methoxyphenol、4-ethylphenolに注目して、Fig. V-7のガスクロマトグラム上にPマークとつけ、さらに濃度の比較をFig. V-8に示した。

醤油では、これらフェノール化合物は小麦のリグニンが製麴中に変化を受けて生じたフェルラ酸やp-クマリン酸が前駆物質になり、Candida属酵母(C. versatilisとC. etchellsii)によってアルコール発酵と同時に形成されることが判明しており、その形成経路をFig. V-9に示した^{6,7)}。味噌にもCandida属酵母(C. versatilisとC. etchellsii)が存在する^{7,8)}。また、これらの香氣成分の前駆物質となるリグニンは小麦や大豆の種皮や胚芽部に特に多く存在していることが知られている。麦味噌では原料に小麦が含まれており、醤油と同様の経路でフェノール化合物が生成されたと推定される。豆味噌は米や麦は使用せず大豆のみを原料としているが、大豆には麦味噌と同程度のリグニンがあり、同様に生成されたと考えられる。これに対し、米味噌には精白された米が用いられており、前駆物質

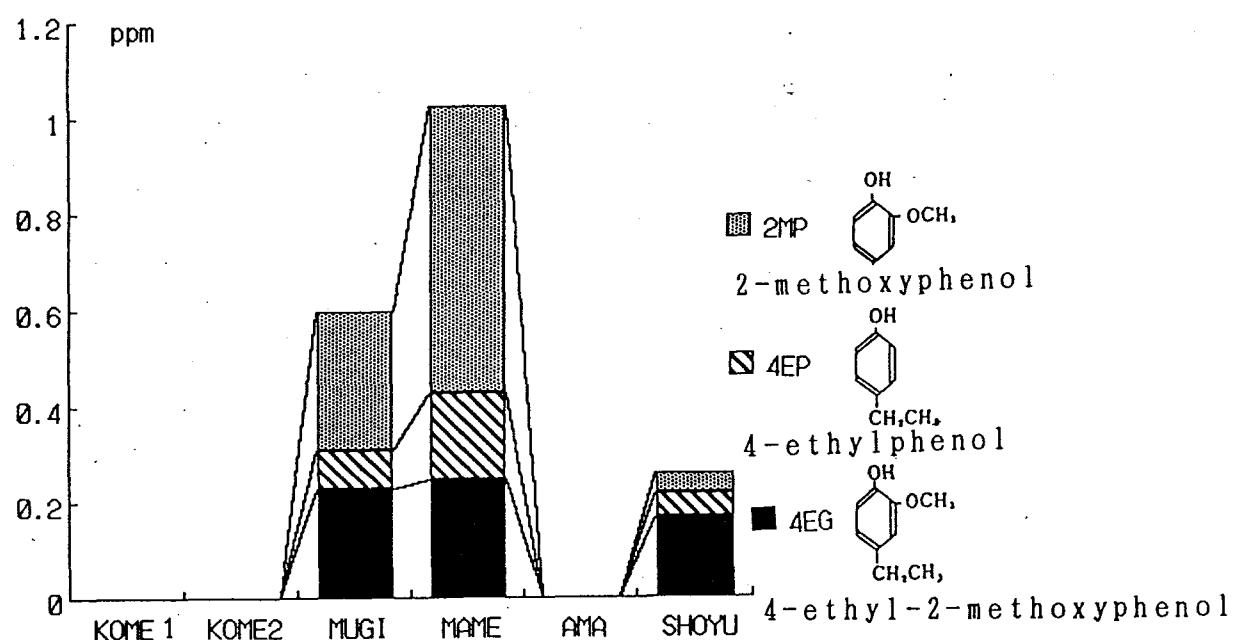


Fig. V-8 各種味噌から検出されたフェノール化合物の濃度の比較

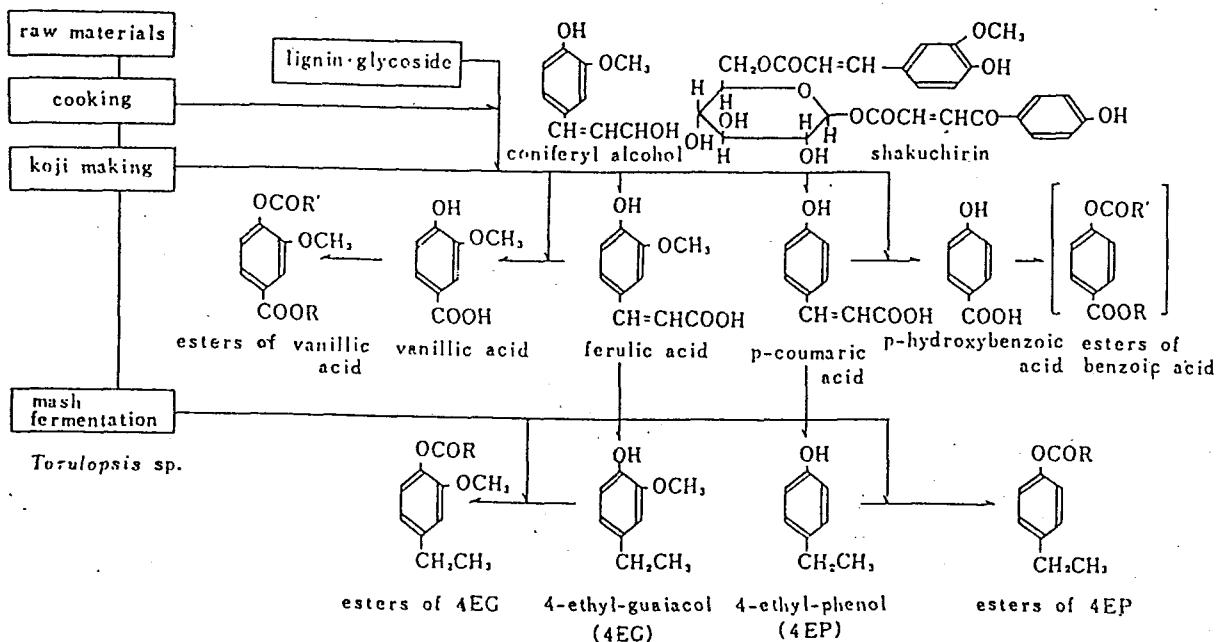


Fig. V-9 醬油醸造中のアルキルフェノール化合物の形成経路

となるリグニンが少なく、フェノール化合物は検出されなかつたと推察される。従つて、これらのフェノール化合物は豆味噌、麦味噌、醤油を特徴づける成分であると考えられる。

特に、4-ethyl-2-methoxyphenolは、醤油の特香成分の一つとされ、閾値も1.3 ppbと低く、醤油中に1-3 ppm含まれると品質的に明確な優位性があるといわれている。4-ethyl-2-methoxyphenolは米味噌には全く検出されず、麦味噌では0.23 ppm、豆味噌では0.25 ppm含まれており、米味噌と麦味噌、豆味噌、醤油の香気の特徴を明確する重要な成分であると判断された。

フラン化合物、含窒素化合物は米甘味噌では他の味噌より検出数も濃度も低かったが、他の4種においては検出数、濃度ともほぼ同じであった。

含硫化合物では醤油の特有香氣成分の一つであり、閾値も0.3 ppbと低い3-methylthiopropanol（ピークNo. 43）^{6,7)}がAMAでは痕跡程度で少なかつたが他の味噌、醤油で共通して検出された。その濃度も0.10-0.30 ppmと同程度であり、これは味噌と醤油に共通する成分であることが判明した。また、不快臭を示す3-methylthiopropanal（ピークNo. 26）はMAMEに最も多く0.41 ppm検出された。KOMEでも0.11 ppm検出されたがそれ以外の味噌では痕跡程度であり、醤油では検出されなかつた。3-methylthiopropanalの閾値も2 ppbであり、この成分がMAMEで不快臭が強い要因の一つになっていると推察された。

ピロン、フラノン化合物では、maltol（ピークNo. 66）、HEMF（ピークNo. 77）、HDMF（ピークNo. 73）、HMF（4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone, ピークNo. 80）が同定された。HMFは本節において初めて味噌の香氣成分として同定された。これらの成分はともに、甘いカラメル様の香氣を持ち、味噌香氣への寄与が高いと想定されるので、その濃度を比較し、Fig. V-10に示した。また、3種のフラノン化合物について、Fig. V-7のガスクロマトグラム上にFマークをつけ、明示した。

maltolは5種に共通して、しかも6.15-0.46 ppmと相当量検出された。これは第Ⅲ章第3節で述べたように、大豆を蒸煮した際に生成することが確認されており、各種味噌に共通し、味噌の甘い香氣のベースを構成する成分である。淡色辛口系米味噌ではmaltolが他の味噌に比較して0.46 ppmと最も少量であった。これは、味噌用大豆は通常、加圧蒸煮釜で0.5-0.7 kg/cm²で30分前後蒸すのに対し、淡色味噌

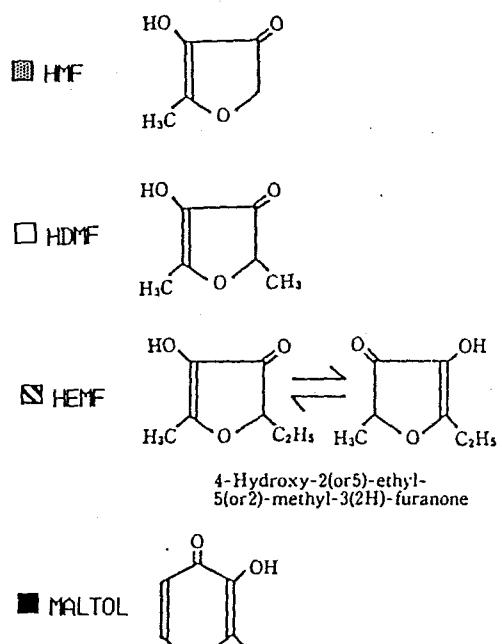
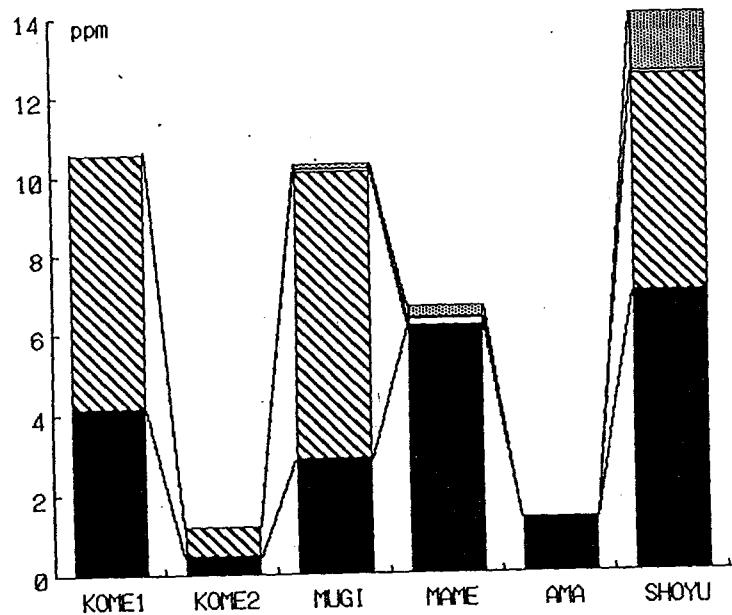


Fig. V-10 各種味噌から検出された甘いカラメル様香気を持つ成分の濃度の比較

を製造する場合には着色を嫌うため、加圧蒸煮釜で大豆に4倍程度の水を加えて蒸気を吹き込み $0.5\text{--}0.7\text{kg/cm}^2$ で20-30分煮るという大豆の加熱条件の違いによると考えられる。

H D M F は、濃度は低いが、各種味噌に共通して同定された。これも大豆を煮熟した際に生成することを確認している。H M F は、醤油では火いれの際に生成することが確認されている。この成分は米味噌からは検出されず、MUGIとMAMEから、0.16ppmと0.34ppm検出された。しかし、醤油で特に1.52ppmと多く存在することから、醤油を特徴づける成分の一つと考えられる。

第3節において味噌の香氣成分として初めて同定されたH E M F は米味噌、麦味噌、醤油で共通して同定されたが、甘味噌、豆味噌では痕跡程度しか検出されなかつた。H E M F は、醤油では醤油の主発酵酵母であるZygosaccharomyces rouxiiによって生成されることが確認されている。味噌中の主要な酵母もZ. rouxiiであり、味噌で同定されたH E M F も醤油と同様にこの酵母によって生成されていると推測される。ところで、味噌の熟成パターンは分解型、発酵型およびそれの中間型の大きく3つに分かれている。米甘味噌は分解型熟成の代表であり、麹の量を多くし、酵素の分解作用を主にして発酵は行わない。よって酵母Z. rouxiiの増殖はほとんどなく、H E M F はほとんど生成されなかつたと考えられる。豆味噌は米、麦のようなデンプンから生成する糖分がないので、糖分を栄養源にする乳酸菌や酵母の発酵が弱いため、中間型熟成タイプにいれられる。豆味噌ではH E M F の前駆体となりうる糖も少なく、酵母Z. rouxiiによる発酵も弱いためにH E M F はほとんど生成されなかつたと考えられる。

赤色辛口系米味噌や麦味噌では麹かびの酵素による加水分解と乳酸菌や酵母による発酵の両方によって熟成が進められる。従って、酵母Z. rouxiiの増殖力も旺盛であり、H E M F 生成に最も適した条件であったと判断される。米味噌の中でも淡色辛口系は、仕込の温度が幾分高く、仕込後の乳酸菌や酵母の活動は発酵型に比較して、微弱なので分解型と発酵型の中間型の熟成になる。そのため淡色辛口系米味噌では、発酵型熟成に属している赤色辛口系米味噌や麦味噌より、酵母Z. rouxiiの増殖力が弱く、H E M F の生成量も少なかつたと考えられる。よって、H E M F は発酵型熟成味噌の特徴的な香氣成分であり、味噌においても醤油同様、酵母Z. rouxiiの活動によって形成されることが示唆された。

以上の結果より、各種味噌、醤油の原料と製造工程から、これらの香気の特徴を最もよく説明できる成分は H E M F と 4-ethyl-2-methoxyphenol であり、その組み合わせと濃度が香気特性を大きく左右すると判断された。

2) カラム濃縮法での各種味噌と醤油のガスクロマトグラムのパターン類似率

各種味噌と醤油の香気特性の全体像を知り、全体像としての類似度を把握するために、内部標準物質とのピーク面積の比から算出された、各香気成分の平均濃度を数値群として統計的に処理し、各種味噌と醤油のパターン類似率を求め、

Table V-10に示した。

ヘッドスペース分析法でのパターン類似率が Table V-8 に示したように 0.97-0.48 であったのに比較して、カラム濃縮法では全体的に低く、0.76-0.14 の間であった。これはカラム濃縮法ではヘッドスペース分析よりも、それぞれの味噌や醤油を特徴づける成分も検出されているためであろう。

また、最も一般的な赤色辛口系米味噌 KOME1 を中心に各種味噌との類似率を検討すると、最も類似率が高かったのは KOME2 で 0.65、次が MUGI で 0.64 であり、MAME とは 0.17 で最も低かった。この結果は、第 4 節でも述べたように、赤色辛口系米味噌の香気の質的な特徴は淡色辛口系に最も類似しており、ついで麦味噌、甘味噌であり、香気の強さでは赤色辛口系米味噌と麦味噌が同程度で、淡色辛口系が多少弱く、甘味噌が最も弱く、豆味噌には米味噌、麦味噌とは異質な香気が感じられたという、各種味噌の官能特性とも一致していた。

従って、各種味噌の香気特性の全体像を明らかにするうえでも、カラム濃縮法がヘッドスペース分析法より有効であると判断された。

比較のために醤油と各種味噌についてもパターン類似率を求めた。味噌として最も一般的である赤色辛口系米味噌と醤油の類似率は 0.09 と極めて低かった。醤油と最も類似率が高かったのは同じ麦を原料として含む麦味噌で 0.45 であった。しかし、麦味噌と各種味噌間の類似率は KOME1 とは 0.64、KOME2 とは 0.76、AMA とは 0.56 と、MAME 以外では醤油との類似率より高かった。従って、豆味噌以外では各種味噌間での香気組成が醤油との香気組成より類似していることが示唆された。味噌と醤油では共通して検出される香気成分は多いが、全体として濃度にはかなり差があると判断された。

Tabel V -10 各種味噌と醤油の香氣濃縮物の
ガスクロマトグラムパターン類似率

	KOME1	KOME2	MUGI	MAME	AMA
KOME2	0.65				
MUGI	0.64	0.76			
MAME	0.16	0.14	0.25		
AMA	0.60	0.53	0.56	0.15	
SHOYU	0.09	0.32	0.45	0.17	0.06

第6節 要約

味噌は、特徴的な香りを持たない大豆、米、麦などの穀類から、麹かびのもつ種々の酵素を十分に活用させ、さらに酵母、乳酸菌などの他の微生物も協同させることによって製造された加塩大豆発酵食品である。そのため、香気組成は非常に複雑である。味噌は醤油同様、味とともに香りが重要な食品であり、香気に関する研究も多数ある。しかしながら、均質な系の水溶液である醤油と異なり、複雑な不均質系である味噌の香気に関しては、分析技術上の問題点も含めて不明な点が多い。また、味噌には種類も多く、香気特性も多岐にわたっているため、問題は一層複雑である。そこで、初めに味噌の香気研究に適した分離濃縮方法を明らかにするために、最も一般的な米味噌を試料とし、SDE法で抽出溶媒をエーテルとジクロルメタンの2種を用いる方法、減圧蒸留法、カラム濃縮法の4法の比較を行った。得られた香気濃縮物について、味噌香気の再現性を官能検査で比較すると、カラム濃縮法が最も優れていた。また、GC、GC-MSにより香気成分を分離、同定するとともに、特徴的な成分について濃度の比較を行った。カラム濃縮法では、4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone(HEMF)を含む5種の成分が味噌から初めて同定された。HEMFは甘いキャラメル様の強烈な香りを持ち、閾値は4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3(2H)-furanone(HDMF)の0.04ppbよりも低く、濃度によっては醤油の芳香を強く感じる、本醸造醤油の特徴香を示す物質(Character Impact Compound)の本体とされており、米味噌にとっても非常に重要な香気成分のひとつであると考えられた。また他の2法では検出されなかったmaltolが量的な主要成分となっており、カラム濃縮法で得られた香気濃縮物の成分組成は他の方法とは相違点が多くあった。味噌の香気研究にはもとの香気の再現性がよく、加熱による香気の変化がなく、しかも水あるいは水溶液中の共存成分の影響が少なく、味噌の香気にとって重要と考えられる成分が検出できる、ポーラスポリマーを用いたカラム濃縮法が最も優れているが、低級脂肪族アルコール、芳香族化合物の回収率の高いSDE法を併用するとさらに有効であることが判明した。

一方、実際に消費者が食する場合はほとんどが味噌汁としてであり、味噌香気の全体を解明するには、味噌汁を食べる時により近い状態での香気特性の解明も

必要である。そこで、最も典型的な米味噌、麦味噌、豆味噌の香氣特性をヘッドスペース分析法で検討した。その結果、検出された香氣成分はほとんどが共通しており、その濃度も同程度で、各種味噌のヘッドスペースは極めて類似した組成になっていた。よって、ヘッドスペース分析では化学的に寄与の高い成分を特定し、各種味噌の官能的な香氣特性の差異を説明することは困難であった。そこで、GCパターン類似率を求めることによって、各種味噌のヘッドスペースの類似度を知り、香氣特性を全体像として把握し、官能的な感覚との関係を明らかにすることを試みた。各種味噌間のパターン類似率も全体的に高かった。最も一般的な赤色辛口系米味噌と最も高い類似率を示した味噌は、香氣の質的な特徴と強さの両面が官能的にもよく類似していた麦味噌であった。また、香氣の質的な特徴が異なっていた豆味噌が最も類似率が低くなかった。

次に味噌の香氣成分研究に最も適していることが判明したカラム濃縮法によって香氣濃縮物を調製し、各種味噌の香氣の特徴を比較検討した。また、同じカラム濃縮法により、醤油の香氣濃縮物も調製し、醤油の特有香氣成分と言われている化合物に特に注目して、味噌と醤油の香氣組成の類似点と相違点についても検討した。

米味噌の香氣成分としても極めて重要であると考えられるHEMFの濃度は、米味噌でも発酵型熟成に属している赤色辛口系と麦味噌、醤油でほぼ同程度であったが、中間型熟成の淡色辛口系米味噌はその約1/10で、中間型熟成の豆味噌と分解型熟成の代表である米甘味噌では痕跡程度であった。従って、HEMFは発酵型熟成味噌の特徴的な香氣成分であり、味噌においても醤油同様、酵母*Z. rouxii*の活動によって形成されることが示唆された。醤油の特香成分の一つとされ、醤油中に1-3ppm含まれると品質的に明確な優位性があるといわれている4-ethyl-2-methoxyphenolは、米味噌では検出されず、麦味噌と豆味噌と醤油で同定されたことから、米味噌と豆味噌、麦味噌、醤油の香氣を判別するのに重要な成分であると推定された。各種味噌、醤油の原料と製造工程から、これらの香氣の特徴を最もよく説明できる香氣成分はHEMFと4-ethyl-2-methoxy-phenolであり、その組み合わせと濃度が香氣特性を大きく左右すると判断された。

各種味噌と醤油の香氣特性の全体像を知るために、各種味噌と醤油のガスクロマトグラムのパターン類似率を求めた。最も一般的な赤色辛口系米味噌を中心に

各種味噌との類似率を検討すると、最も類似率が高かったのは淡色系米味噌で、次が麦味噌であり、豆味噌とは最も低かった。この結果は、各種味噌の官能特性とも良く一致し、カラム濃縮法は香気特性の全体像を把握する方法としても有効であると判断された。また、最も一般的な味噌である、赤色辛口系米味噌と醤油の類似率は極めて低く、赤色辛口系米味噌と醤油では共通して検出される香気成分は多いが、全体として濃度にはかなり差があることが示唆された。

第VI章 味噌の香気成分と官能評価の解析

第1節 緒言

食品香気の評価には香気成分の濃度はもちろん、香気成分の質的な要素や匂いの強さ、閾値も深く関与している。現在のところ、人間の嗅覚より、食品香気を総合的に判断できる感度の良い分析機器は開発されていない。従って、食品香気を評価するには、人間による官能評価が重要な意味を持っている。

ところで、味噌には多くの種類があり、香気特性も多岐にわたっているため、味噌香気の評価の基準には不明確な点が多い。生産者側では製造に関わる専門家を中心に全国味噌鑑評会などにおいて、官能検査を実施し、各種味噌の好ましい香りとする評価の基準を整理しつつある。しかしながら、一般消費者の味噌の香気に対する嗜好傾向については検討されたことがない。そこで第2節では、一般消費者を対象に、香気特性の異なる4点の味噌について官能検査を実施し、彼らの味噌の香りの嗜好傾向と評価の観点を明らかにした。また、カラム濃縮法とSDE法を併用して、同じ試料の香気組成の差異を詳細に比較検討し、官能評価に影響を与える重要な香気成分の特定を試みた。

一方、分析機器の発達により、一つの食品から100種以上に及ぶ香気成分が検出され、その濃度も容易に測定できるようになった。そこで、さまざまな品質の食品の香気成分を分析し、得られた多種類の成分の濃度とその食品の人間による官能評価特性を、コンピューターを用いて統計的に処理し、匂いという複雑で主観的な判断を客観的な数値で表現する試みが行われている。この方法は醤油⁸³⁾⁻⁸⁶⁾やコーヒー^{87)、88)}などの香気の評価や品質管理に導入され、よい結果が得られている。

そこで、最も一般的な赤色辛口系米味噌で、多数の異なる品質のものから、香気濃縮物を調製し、その分析結果から算出された各香気成分の濃度と、専門家による官能評価点の統計的解析から、味噌香気の官能評価に深く関与する成分を特定するとともに、香気の品質評価を客観的に表現することを試みた。これらの研究により、味噌香気の官能評価と香気成分の関係を明らかにし、より好ましい香気を持った味噌の製造にも寄与したい。

第2節 味噌の嗜好と香気成分の関係⁸⁹⁾

一般消費者の味噌の香りに対する嗜好傾向と評価の観点を明らかにするために、女子学生をパネルとして、香気特性の異なる2点の米味噌、一部豆麹を用いた特殊な米味噌、豆味噌（特徴的な香氣のねさしみそ）について官能検査を実施した。パネルは4点の試料から、最も好ましいとした味噌と最も好ましくない味噌を選定し、その選定理由を明らかにすることによって、各種味噌を評価した。この時、試料とした味噌は生の状態に加えて、味噌汁でも同様の官能検査を実施した。一般に味噌は味噌汁として食されることが多く、生味噌と味噌汁では引き立ってくる香気が異なると想定される。そこで、両状態での官能検査結果から、その差異を明確にすることも試みた。

また、同じ試料味噌の香気組成を、第V章で味噌の香気研究に適していると判断されたカラム濃縮法とSDE法を併用して、詳細に検討した。各種味噌に対する嗜好傾向や評価の観点と、香気組成の検討結果から、味噌香気の評価に関与する重要な成分の特定を試みた。特に、第V章において味噌の香気成分として初めて同定され、味噌香気への寄与が高いと想定されたHEMFや4-ethyl-2-methoxyphenol、3-methylthiopropanol等の成分に注目し、これら成分の実際の官能特性に対する影響について検討した。

1 実験方法

1) 試料

試料とした4種の味噌の略名と原料配合と製造法の概略等をTable VI-1に示した。KOME-AとKOME-Bは赤色辛口系米味噌であり質的にはかなり似た香気特性を持っているがKOME-BはKOME-Aより香気が強く、甘くはなやかな傾向であった。KOME-Cは米麹を主にし、さらに原料大豆の一部も麹にして使用した特殊な米味噌で、熟成は分解が中心で、発酵工程は微弱であり、香気特性もKOME-A、KOME-Bとはかなり異なる。MAMEは特有な香気の豆味噌である。

2) 香気濃縮物の調製

(1) SDE法

各種味噌360gに蒸留水1440mlを加えた20%の懸濁液を試料とし、これをSDE装

Table VI-1 試料味噌の原料配合と製造方法及び色調

	KOME-A	KOME-B	KOME-C	MAME
分類	米みそ 赤色辛口系	米みそ 赤色辛口系	特殊な米みそ*	豆みそ
(产地)	(盛岡)	(仙台)	(岩手大附属農場)	(ねさしみそ、徳島)
使用原料	不明	国内産大豆・米	農場産大豆・米	徳島県産大豆
麹の種類・麹歩合	米麹・7	米麹・7	米と大豆の麹*・5	豆麹**
熟成期間・方法	不明	18カ月・天然醸造	8カ月・天然醸造	2年半～3年半・天然醸造
みその食塩含量(%)	11	12	12	16
製品の色調***				
$Y(\%)$	10.6	8.9	7.3	5.2
x	0.41	0.41	0.40	0.38

* 米の80%は米麹とする。残り20%の米と蒸煮大豆の20%を混合し、種麹を深加して米と大豆の混合麹を作る。以上2種の麹と残り80%の蒸煮大豆と食塩を混合して仕込む。** みそだまに自然発生したカビで *Aspergillus* 属は少なく、*Mucor* 属が主体と推定。*** MINOLTA CR-200 で測定。

置により、香気成分を抽出した。抽出中の香気成分の変化を抑えるために抽出時間は1時間とした。抽出溶媒としてエーテル70mlを用い、抽出液に内部標準物質を添加し、濃縮して、香気濃縮物を得た。詳細な条件は第V章第3節と同様である。

(2) カラム濃縮法

各種味噌60gに蒸留水240mlを加え20%懸濁液を調製後、5°C、3000rpmで15分間、遠心分離した。この上澄液を精製したPorapak Q吸着剤3gを充填したガラスカラム（内径1cm×高さ11cm）に1ml/minの流速で流し、香気成分を吸着剤に吸着させた。吸着された香気成分は100mlのエーテルを1ml/minで流し、溶出させた。その後は第V章第3節と同様に処理して香気濃縮物を得た。

3) 香気成分の分離・同定

GCおよびGC-MSを用いて香気濃縮物を分析した。化合物の同定は文献値のマススペクトルデータおよび標準物質とのGCの保持時間の一致によった。推定とはマススペクトルデータは一致しているが標準物質等により確認はできなかったことを意味している。ピーク面積計算は島津クロマトパックC-R2Aによった。各成分の濃度は内部標準物質とのピーク面積比から算出した。GC分析用カラムはPEG20M系のFS-WCOTを用い、MSはE I法でデータ処理は全てコンピューターによった。詳細な分析条件は第V章第3節と同じでTable V-3に示したとおりである。

4) 官能検査

パネルは家政科2-4年の女子学生(19-23才)32名である。パネルの出身県は岩手20名、青森4名、秋田3名、福島2名、栃木2名、宮城1名であった。生味噌の香りについては各味噌50gをガラス製の小ボールに入れ、直接においをかぎ、最も好ましい香りの味噌を1位とし、順次2、3、4位とする順位法で評価した。この際、最も好ましいと評価した味噌と最も好ましくないと評価した味噌についてその理由を記述式で解答させた。味噌汁の香りについても生味噌と同じ内容で官能検査を実施した。試料は1人分100mlとし、1%の塩分濃度になるように生味噌の重量を計量し、これに熱湯を注入して調製した。味噌汁の香りは温度による影響があることを考慮し、試料は70°Cにしてパネルに提供した。試料味噌間の嗜好の有意差はクレーマーの検定によって検討した。

2 結果及び考察

1) 味噌の香りの嗜好傾向

順位法による味噌の官能検査の結果をTable VI-2に示した。生味噌の香りではKOME-Aが好まれ、MAMEは好まれなかった。味噌汁とした場合にはKOME-AとKOME-Bが好まれ、MAMEは好まれなかった。生味噌と味噌汁の評価はほぼ同じ傾向を示すが、味噌汁の場合にはKOME-Bの評価が高くなるなど、両評価が完全に一致するとは限らないことが判明した。味噌の香りの評価は全国味噌鑑評会などにおいて基準の整理が行われているが、これは生味噌が対象である。実際に消費者が食する場合はほとんどが味噌汁としてであり、今回の結果からも官能検査は味噌汁においても行われるべきであろう。しかし、実際には官能検査では温度が重要な問題で多数のパネルでの実施は困難である。味噌汁の場合には生味噌とひきたつてくる香りの成分が違うことを考慮にいれて評価の観点を整理する必要がある。

味噌の種類で官能検査の結果を集約すると、米味噌（KOME-A、KOME-B）が好まれ、豆味噌（MAME）は好まれず、特殊な米味噌（KOME-C）はその中間であった。そこでパネルがそれぞれの味噌を最も好ましいあるいは最も好ましくないと評価した時の解答理由を検討した。

生味噌では米味噌を26名（81%）のパネルが最も好ましいと評価した。米味噌を好ましいとした理由はTable VI-3に示したとおりで、共通する点と相違のみられる点があった。米味噌を最も好ましいとしたパネルが共通して解答した、最も多かった理由は「甘い香りが好ましい」であった。KOME-A、KOME-Bあわせてこの理由の解答者は10名（31%）であり、米味噌にとって甘い香りが好ましさの重要な因子であることが判明した。次に多かった、共通する解答理由は「食べ慣れている香り」でKOME-A、KOME-Bあわせて9名（28%）であった。パネルは岩手県出身者が20名（63%）と最も多く、東北六県出身者で全体の94%を占めていた。よってパネルは日常米味噌を食べていると判断され、食べ慣れている香りを持つKOME-AまたはKOME-Bが好まれた。

次に、KOME-A、KOME-Bの両者の好ましいとする理由の相違点を検討した。KOME-Aを最も好ましいとした者は17名（53%）、KOME-Bを最も好ましいとした者は9名（28%）で、どちらも米味噌であるにもかかわらず、KOME-AはKOME-Bよりも好まれた。Table VI-3に示したようにKOME-Aを1位にした者のうち11名が「香りがまろやか、

Table VI-2 味噌の香りの嗜好に関する官能検査（順位法）

	KOME-A	KOME-B	KOME-C	MAME
生みそ	55*	70	91	104*
みそ汁	52*	59*	87	122*

n=32, t=4の時、水準値62-98、*危険率1%で有意

Table VI-3 米味噌を最も好ましいとした理由

好ましい理由	米味噌		名(%)
	KOME-A	KOME-B	
強すぎず、 まろやかな香り	11	0	11(34)
甘い香り	7	3	10(31)
食べ慣れている香り	7	2	9(28)
みそらしい香り	0	5	5(16)
その他	1	2	3(9)
1位とした者	17	9	26(81)

強すぎない、調和されていて好ましい」と答え、最も多かったのに対し、KOME-Bではこのような解答は1名もなかった。さらにKOME-Bを1位とした者のうち5名は「みそらしい香りがよい」と答えた。KOME-Aを最も好ましいとした者が多かったのは強烈な香りは好まないという香りのソフト嗜好の現れであり、また、パネルが20才前後の女子大生であったことも一因であると推察される。しかし、KOME-Bを最も好ましいとし、香りの強い味噌を好むグループも明らかに存在し、米味噌の香りの強さに対しては二方向の嗜好性があった。

2) 味噌の香りの嗜好と香気成分の関係

Fig. VI-1にカラム濃縮法で得られた各種味噌のガスクロマトグラムを示した。

KOME-AにはKOME-Bの高沸点部に検出された高級脂肪酸のエチルエステルが少量しか検出されていないが、低沸点から中沸点部のGCパターンはよく類似していた。しかし、KOME-CやMAMEはKOME-AやKOME-Bでは検出されないピークもあり、KOME-AやKOME-Bとは異なるGCパターンであった。また、GC及びGC-MS分析によって同定または推定された香気成分をTable VI-4に示した。HEMFも含め、あわせて97成分が同定または推定されたが、これらはすでに本間⁷³⁾及び第V章第3節で報告された化合物であった。

官能検査によって明らかにされた味噌香氣の嗜好傾向と、試料とした味噌から検出された香気成分の種類と濃度の関係について、Table VI-4をもとに考察した。

初めに米味噌であるKOME-AとKOME-Bが好まれた重要な要因である甘い香りに寄与する香気成分について検討した。KOME-AとKOME-Bに共通して検出され、甘いキャラメル様の香氣を持つ成分はHEMF、HDMF、maltolであった。maltolは味噌の重量に対して、好まれなかつたMAMEで5.68ppm、KOME-Cでも10.91ppmであり、好まれたKOME-Aの5.51ppm、KOME-Bの2.14ppmと同等あるいはそれ以上の濃度であった。また、HDMFの濃度は4種の味噌とともに極めて低かった。従って、KOME-Aで3.64ppm、KOME-Bで1.27ppm存在し、KOME-CとMAMEではほとんど検出されなかつたHEMFが米味噌に共通する甘い香りに最も寄与し、米味噌の好ましさにとって重要な香気成分であると判断された。

米味噌である、KOME-AまたはKOME-Bの大きな相違点は香りの強さにあった。そこで香りの強さに関与すると推定される、揮発性が高く、それぞれ特有の香氣を持っている低級脂肪族アルコール類、低級脂肪族エステル類に着目して比較した。

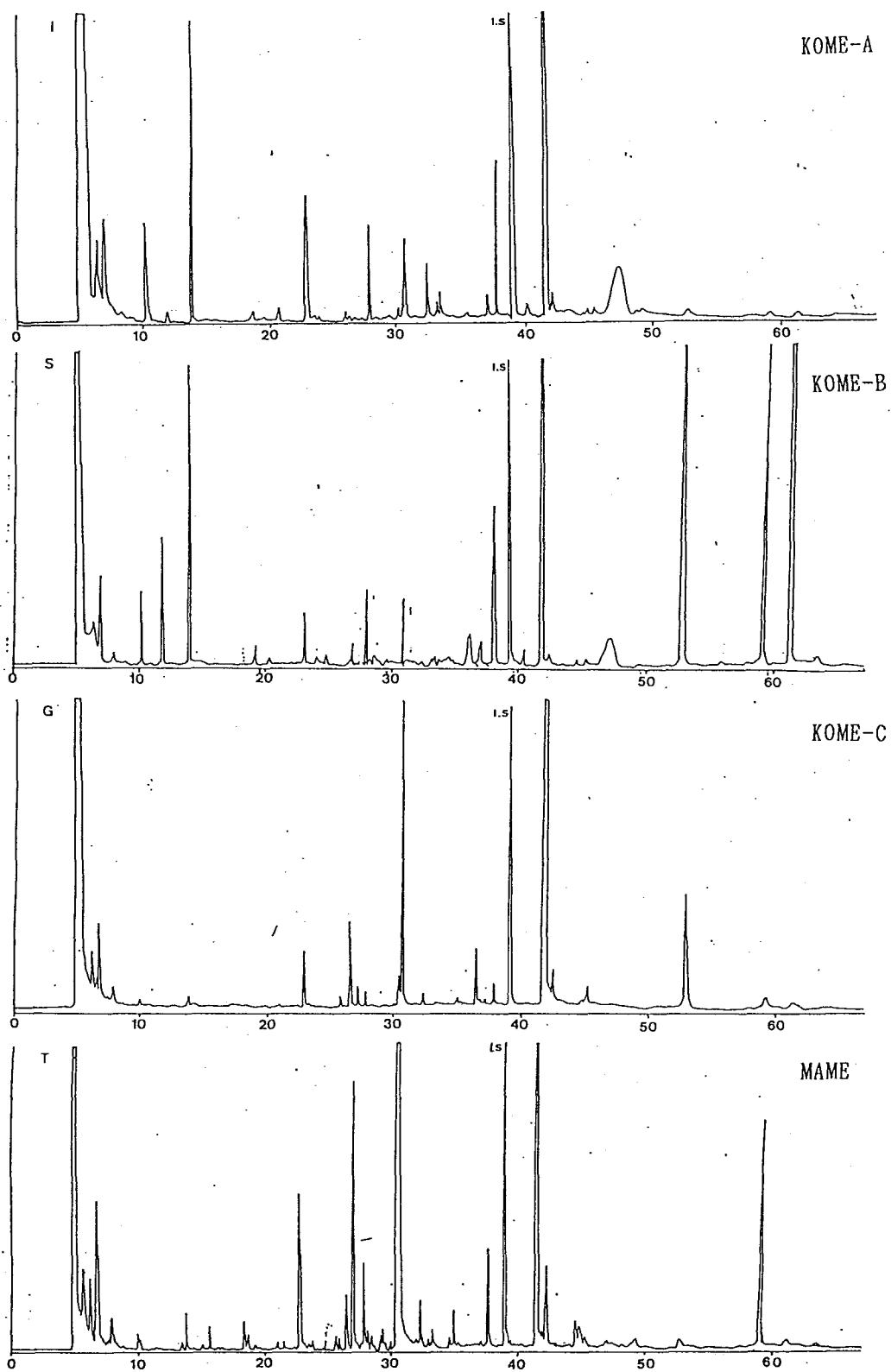


Fig. VI-1 カラム濃縮法によって得られた味噌の香気濃縮物のガスクロマトグラム

Table VI-4 カラム濃縮法によって得られた味噌の香気濃縮物から検出された香気成分

	み				そ			
	KOME-A		KOME-B		KOME-C		MAME	
	P	S	P	S	P	S	P	S
Aliphatic alcohols								
Ethanol	※	※	※	※	※	※	※	※
1-Propanol	-	-	-	0.34	-	+	-	-
2-Methyl-1-propanol	0.79	-	0.43	4.12	0.04	+	0.03	+
1-Butanol	0.13	-	0.71	4.97	-	+	-	-
3-Methyl-1-butanol	2.62	0.09	1.74	12.11	0.12	+	0.22	0.01
1-Pentanol	-	-	-	+	+	0.04	-	-
1-Hexanol	-	-	-	0.06	-	+	-	-
2-Heptanol	-	-	+	-	-	-	-	-
3-Octanol	-	-	-	0.02	-	-	-	-
1-Octen-3-ol	-	+	-	-	-	-	-	+
Aliphatic aldehydes								
Butanal	-	-	-	-	-	-	-	+
(E)-2-Butenal**	-	-	-	+	-	-	-	-
2-Methylbutanal	-	-	-	+	-	-	-	-
3-Methylbutanal	0.37	-	0.08	+	0.09	0.33	0.02	0.10
(E)-2-Pentenal	-	-	-	-	-	+	-	-
Hexanal	-	-	-	-	-	0.02	-	-
2,4-Decadienal	-	-	-	-	-	+	-	-
Myrtenal**	-	-	+	-	-	-	0.32	-
Aliphatic ketones								
2-Pentanone	-	-	-	-	+	-	-	-
3-Pentanone**	-	-	-	-	-	-	0.01	-
2-Methyl-3-pentanone	+	-	-	-	+	-	0.07	-
3-Hydroxy-2-butanone	+	-	+	-	-	-	-	-
6-Hydroxy-2-hexanone**	-	-	-	-	-	-	+	-
2,3-Butanedione	-	-	-	-	+	-	-	-
Aliphatic ester								
Ethyl acetate	+	-	+	+	+	+	+	-
Ethyl propanoate	+	-	+	+	-	-	-	+
Ethyl butanoate	-	-	+	+	-	-	-	+
Ethyl hexanoate	-	+	+	+	-	-	-	+
Ethyl octanoate	-	-	0.08	0.08	-	0.02	-	-
Butyl acetate	-	-	+	0.46	-	-	-	-
2-Methylpropyl acetate	+	-	+	-	-	-	-	-
2-Methylbutyl acetate	-	-	-	+	-	+	-	-
1-Hexyl acetate	-	-	0.03	-	-	-	-	-
Methyl 2-methyl-1-propanoate**	-	-	-	+	-	-	-	-
Ethyl tetradecanoate	+	0.01	+	0.16	+	0.02	-	0.01
Ethyl pentadecanoate	-	-	-	+	-	+	-	-
Ethyl hexadecanoate	+	0.75	2.63	1.99	0.46	0.02	+	0.30
Ethyl octadecanoate	+	+	+	+	+	+	+	+
Ethyl (Z)-9-octadecenoate	+	+	2.27	+	+	+	1.24	+
Ethyl (Z,Z)-9,12-octadecadienoate	+	+	3.41	0.86	+	+	+	+
Ethyl (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoate	+	+	+	1.12	+	+	+	+
Methyl hexadecanoate	-	-	+	-	+	-	-	+

	KOME-A		KOME-B		KOME-C		MAME	
	P	S	P	S	P	S	P	S
Aliphatic acids								
Acetic acid	0.02	—	0.08	0.06	0.81	+	1.58	—
Propanoic acid	—	—	—	—	—	—	0.40	—
Butanoic acid	—	—	—	—	—	—	0.06	—
2-Methylpropanoic acid	—	—	0.02	—	0.22	—	1.95	—
3-Methylbutanoic acid	—	—	—	—	4.30	+	23.07	+
2-Methyl-2-butenoic acid	—	—	—	—	0.93	—	—	—
Pentanoic acid	—	—	0.20	—	—	—	—	—
Hexanoic acid	—	—	0.24	—	—	—	—	—
Aromatic compounds								
Benzyl alcohol	—	+	—	—	—	+	—	0.04
2-Phenyl-1-ethanol	0.96	0.06	1.09	1.18	—	+	—	0.01
Benzaldehyde	—	0.01	—	0.12	0.09	0.02	0.15	0.07
Phenylacetaldehyde	—	0.06	—	+	+	0.34	—	0.09
2-Phenyl-2-butenal	—	0.02	+	0.02	+	0.01	0.06	+
Methyl phenyl ketone	—	—	+	—	—	—	—	—
Ethyl benzoate	+	+	+	2.32	+	+	—	0.12
Ethylphenyl acetate	—	0.02	+	0.06	—	+	—	0.01
2-Phenylethyl acetate	—	0.03	—	0.07	—	+	—	—
Vinylphenyl ether**	—	—	—	—	—	—	0.09	—
Phenol	—	—	—	+	—	—	0.01	+
4-Ethylphenol	—	—	—	—	—	—	+	—
4-Methoxyphenol	—	0.01	—	—	+	+	—	0.01
4-Ethylguaiacol	—	—	—	—	—	—	—	+
2-Methoxy-4-vinylphenol	+	0.01	—	—	+	—	0.05	0.04
Benzoic acid	—	—	0.13	—	+	—	0.02	—
Phenylacetic acid	—	—	—	—	—	—	+	—
Furans								
Furfuryl alcohol	0.41	+	0.06	0.01	—	0.01	0.31	0.03
Furfural	—	0.04	+	0.32	+	0.53	—	0.02
5-Methyl-2-furfural	—	0.04	+	0.07	+	0.02	—	0.01
Acetyl furan	—	0.02	—	+	—	0.01	—	—
2-Ethyl-3-hydroxyfuran**	—	+	—	0.03	—	+	—	0.01
2-Vinylbenzofuran**	—	+	—	—	—	—	—	0.01
Nitrogen and/or sulfur compounds								
Pyridine	—	—	—	—	—	0.01	+	+
Methylpyrazine	—	—	—	—	—	—	+	+
2,5-Dimethylpyrazine	—	—	—	—	+	—	0.16	0.01
2,6-Dimethylpyrazine	—	—	—	—	—	—	0.05	—
Trimethylpyrazine	—	—	—	—	—	—	0.01	0.06
2-Ethyl-6-methylpyrazine	—	—	—	—	—	—	—	+
Tetramethylpyrazine	—	—	—	—	—	—	+	—
2,5-Dimethyl-3-ethylpyrazine	—	—	—	—	+	—	—	—
2-Acetylpyrrole	0.02	0.06	0.12	0.06	—	0.02	0.06	0.02
4-Hydroxypyrimidine**	—	—	—	+	—	—	—	—
3-Methylthiopropanal	0.06	+	—	—	—	+	0.06	0.01
3-Methylthiopropanol	—	—	0.04	0.08	—	—	—	+
2-Ethoxythiazole**	—	+	+	0.05	0.05	+	0.07	—
Indole	—	—	—	—	—	—	—	0.01

	み		そ					
	KOME-A		KOME-B		KOME-C		MAME	
	P	S	P	S	P	S	P	S
Others								
Maltol	5.51	-	2.14	-	10.91	-	5.68	-
4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF)	0.03	-	0.11	-	0.07	-	0.02	-
4-Hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF)	3.64	-	1.27	-	+	-	0.04	-
3-Methyl-2(5H)-furanone**	0.33	-	0.04	-	-	-	-	-
4-Butanolide	-	-	-	-	+	-	0.01	-
Undecane	-	-	+	-	-	-	0.01	-
Dodecane	-	-	-	-	-	-	+	-
Tetradecane	-	-	-	-	-	-	+	-
Naphthalene	-	-	+	-	-	-	-	-

P:カラム濃縮法、S:SDE法

+: 0.01 ppm 未満で検出, -: 未検出, ※: GC で抽出溶媒と分離せず,

定量できなかった。* 内部標準物質との GC によるピーク面積比からみそに対する ppm で算出した。** 推定された香気成分

低級脂肪族アルコール類はKOME-Aでは5種(ethanol, 2-methyl-1-propanol, 1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 1-octen-3-ol)、KOME-Bでは9種(ethanol, 1-propanol, 2-methyl-1-propanol, 1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 2-heptanol, 3-octanol)が検出され、低級脂肪族エステル類はKOME-Aでは4種(ethyl acetate, ethyl propanoate, ethyl hexanoate, 2-methylpropyl acetate)、KOME-Bでは10種(ethyl acetate, ethyl propanoate, ethyl butanoate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, butyl acetate, 2-methylpropyl acetate, 2-methylbutyl acetate, 1-hexyl acetate, methyl 2-methyl-1-propanoate)が検出された。このようにKOME-BではKOME-Aより両化合物とも多種類検出され、それらの濃度も高かったので、KOME-BはKOME-Aに比較して香りが強かったと推測された。さらに、醤油様の特徴的な香気を持ち、閾値もかなり低く0.3ppbと報告されている⁶⁷⁾3-methylthiopropanolがKOME-Aでは検出されなかつたがKOME-Bでは0.04ppm(SDE法)、あるいは0.08ppm(カラム濃縮法)存在した。KOME-BがKOME-Aに比較してこの成分の濃度が高かったことも香気が強かった要因の一つであろう。

KOME-CはTable VI-1に示したように特殊な米味噌である。米味噌であるKOME-A、KOME-Bが好まれたのに対し、KOME-Cの評価は低かった。KOME-Cの香気成分をKOME-A、KOME-Bと比較すると、米味噌の好ましさの重要な要因とされる甘い香りに最も寄与すると判断されたHEMFが痕跡程度しか検出されなかつた。これはKOME-Cの熟成が分解が中心であるため、酵母が増殖せずHEMFは生産されなかつたためと推察される。他の香気成分はほとんどがKOME-A、KOME-Bと共に通して検出されており、Gは特に甘い香りが弱く、評価が低かったと判断された。

Table VI-2に示したように最も好まれなかつた味噌はMAMEで、特に味噌汁での評価が低かった。生味噌では11名(34%)が好ましくない理由として「刺激臭、酸臭が強い、不潔臭、カビ臭、ぬかみそ臭」などと解答した。このようなにおいの原因物質は主に揮発酸であり、Table VI-4から、MAMEではacetic acid、propionic acid、butanoic acid、2-methylpropionic acid、3-methylbutanoic acidの5種が同定された。特に3-methylbutanoic acidの濃度は23.07ppmであり、閾値の1.42ppmよりかなり高く、また、好まれた米味噌の濃度よりも著しく高かつた。従ってMAMEは揮発酸による酸臭があり、好まれなかつたと判断される。また生味噌の場

合、「こげくさい、納豆臭、チョコレート様のにおいがあり、味噌には異質な香りで好ましくない」とするパネルが4名あった。これはMAMEから検出された6種のピラジン化合物 (methylpyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,6-dimethyl-pyrazine, trimethylpyrazine, 2-ethyl-6-methylpyrazine, tetramethylpyrazine) が関与していると推測された。ピラジン化合物は加熱香気の代表的な成分で、本論文第IV章で述べたように納豆の香氣成分としても同定されている。一方、ピラジン化合物はすでに味噌の香氣濃縮物の塩基性画分から12種同定されており⁹⁰⁾、味噌の香りのベースになっていると考えられている。しかし、MAMEでは塩基性部に分画しなくても検出できたことから、ピラジン化合物の濃度は他の味噌より高く、MAMEを特徴づける成分であるといえよう。また、今回パネルは東北出身者がほとんどであり豆味噌の食経験がなかったため、これらの香氣は味噌には異質であると評価したと結論づけられる。

第V章で麦味噌、豆味噌の特徴的な香氣成分の一つとされた4-ethyl-2-methoxyphenolはMAMEにおいてのみ検出され、第V章と同様の結果であった。しかし、その濃度は痕跡程度であり、MAMEの香氣特性への影響については明確にできなかった。その他に、試料とした4点の味噌から共通して検出された香氣成分には高級脂肪酸のエチルエステル、芳香族のアルコール、アルデヒド、ケトン、エステル及びフラン化合物があり、これらは味噌の香氣のベースになっていると判断された。

第3節 重回帰分析による米味噌（赤色辛口系）の香氣成分と官能評価の解析

味噌は同じ種類であっても、様々な品質のものが製造される。そこで、最も一般的な赤色辛口系で、味噌製造に関わる専門家によって、香りについて官能評価された、多数の異なる品質の米味噌を試料とし、第V章第5節で述べたように、味噌の香氣特性の全体像を明らかにするうえでも有効であると判断されたカラム濃縮法で香氣濃縮物を調製した。これをGC及び、GC-MS分析し、算出された各香氣成分の濃度と官能評価の統計的な解析を行うことによって、香りの品質に深く関与する香氣成分を特定することを試みた。さらに、重回帰分析を用いて、

各香気成分の濃度の差異に基づいた米味噌の香りの品質を予測する方法の確立についても検討した。

1 実験方法

1) 試料

実験試料には全国味噌鑑評会(1990年, 11月)に出品された赤色辛口系米味噌34点を用いた。出品された味噌は色、香り、味、組成、総合評価について全国味噌鑑評会で従来から行われている格付け法で審査されている。即ち、上位の品質のものを1、中位を2、劣っているものを3とし、出品された味噌ひとつひとつについて、12名（または10名）の審査員が評価点数をつける。12名の審査員で審査された区分は一番よい点と悪い点が1個ずつ削除され、合計されて評価点数とされた。よって最も評価の高い味噌は10点となり、劣っている味噌は30点となる。統計処理にはこの方法で評価された項目の中から香りに関する点数を用いた⁹¹⁾。

試料は官能評価と各香気成分間の関係をよく把握するために、以下のように設定した。即ち、味噌の評価点は10から26であったので、この間の各評価点数の味噌から2点ずつ無作為に抽出した。従って、試料の平均評価点数は18、標準偏差は4.97であった。

2) 香気成分の調製及び香気成分の分離・同定

味噌の香気濃縮物はカラム濃縮法で調製した。即ち34種の米味噌、それぞれ40gに蒸留水160mlを加え懸濁液とした。これを5°C、3000rpmで15分間遠心分離し、上澄液を得た。これを精製したTenax GC 0.6gを充填したガラスカラムに流し、第V章第4節と同様に処理して香気濃縮物を得た。同じ味噌について3回同様の実験を繰り返して行った。得られた香気濃縮物はGC、及びGC-MSを用いて分析した。化合物の同定は文献値のマススペクトルデータおよび標準物質とのGCの保持時間の一一致によった。ピーク面積計算は島津クロマトパックC-R 6 Aによった。GC分析用カラムはPEG20M系のFS-WCOTを用い、MSはEI法で、データ処理は全てコンピューターによった。詳細な分析条件は第V章第3節と同じでTable V-3に示したとおりである。

3) 統計的手法

各香気成分の濃度は内部標準物質(*n*-decyl alcohol)とのピーク面積比から、

味噌の重量に対する ppm で計算された。各香気成分の濃度と官能評価点について相関を求め、さらに逐次変数選択法による重回帰分析を行った。なお、これらの統計処理はすべて S A S 統計パッケージを用いて行った。

2 結果および考察

1) 香気成分と官能評価の相関

34種の米味噌から得られた香気濃縮物の一般的なガスクロマトグラムを Fig. VI-2 に示した。34種間の G C パターンは各ピークの大きさに差はあるが、第 V 章や本章第 2 節で試料とした赤色辛口系米味噌とも、全体としてかなり類似していた。

G C 分析の結果、多くの試料で 101 ピークが検出された。これら 101 種の香気成分の濃度と官能評価点の相関を求め、5%以下の危険率で有意に相関の高かった香気成分と、その平均濃度を Table VI-5 に示した。1%以下の危険率で有意に相関の高かった成分は 4 種あり、その中で最も香りの評価を高めていると判断された成分は H E M F であった。H E M F の濃度が増加すると米味噌の評価が高くなるという結果であり、米味噌の香気に対する H E M F の重要性が多数の試料から得られた分析結果の統計処理からも支持されることになる。

一方、最も香りの評価を低下させていると示唆された成分は maltol であった。maltol は甘いカラメル様の香気を持っているにも関わらず、その濃度の増加とともに官能評価を低下させるという結果であった。これは、味噌の製造過程で、maltol と全く同じ挙動を示す、不快な香気を持つ閾値の低い成分の存在も想定されるが、香りの評価を低下させる指標として maltol の濃度が有効であるということを示唆している。

また、maltol は第 III 章第 3 節で述べたように、大豆を煮熟した際に、マイラード反応により生成する可能性が高く、他に、大豆の不味成分である真正グループ B サポニンの分解により、生成されることも判明している。一方、工藤ら^{9,2)}は、同じように全国味噌鑑評会に出品された辛口米味噌に含まれる、サポニン BeA が分解した形である、Bb を測定し、その含量と官能検査の評点との相関分析を行った。その結果、サポニン Bb 含量が高いほど香りに対する官能評価が低い傾向があると報告している。これらの結果から、味噌製造過程での大豆サポニンの挙動と maltol の生成の関係についての検討が、米味噌の香りの品質向上に何らかの示唆

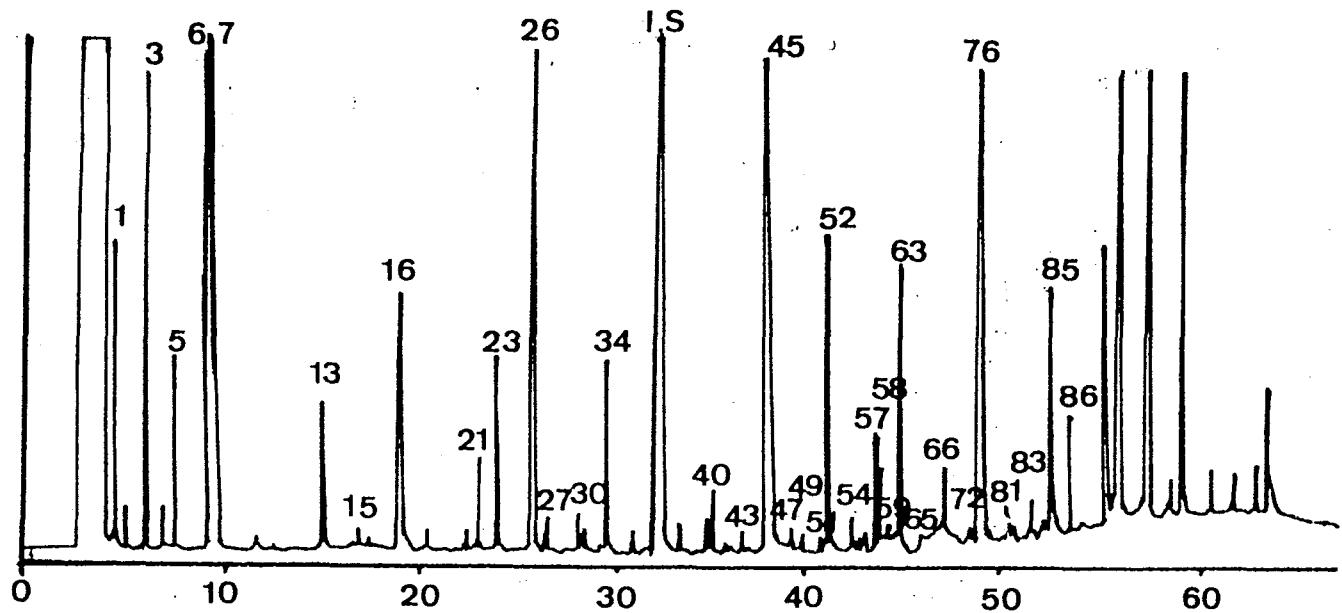


Fig. VI-2 米味噌から得られた香氣濃縮物のガスクロマトグラムと重回帰分析に用いられたピーク

Table VI-5 米味噌の官能評価と香気成分の濃度において相関の高い成分

Peak No.	Corr.	Compound	Mean concentration
63	-0.53**	HEMF	1.85±1.74
55	-0.45**	HDMF	0.07±0.06
82	-0.42*		0.22±0.19
75	-0.42*		0.05±0.05
		1)	
34	-0.41*	5-ethoxythiazole	0.33±0.38
58	-0.40*		0.53±0.50
3	-0.40*	2-methyl-1-propanol	0.43±0.39
		1)	
56	-0.40*	DMP	0.10±0.08
45	-0.39*	2-phenyl-1-ethanol	6.77±6.05
7	-0.38*	3-methyl-1-butanol	4.50±4.01
6	-0.37*	2-methyl-1-butanol	1.01±0.81
36	-0.37*	methionol	0.05±0.04
5	-0.35*	1-butanol	0.24±0.44
23	-0.35*	L-2,3-butandiol	0.92±1.08
74	-0.34*		0.01±0.02
52	0.71**	malton	3.67±3.02
17	0.47**	acetic acid	0.10±0.10
32	0.43*	ethyl benzoate	0.01±0.02
79	0.38*		0.23±0.44
38	0.36*	ethylphenyl acetate	0.02±0.03

1)

:tentatively identified.

**P<0.01, *P<0.5

HEMF:4-hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone

HDMF:4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone

DMP:5,6-dihydro-4-methyl-2H-pyran-2-one

を与えると考えられる。

2) 重回帰分析による解析

34種の米味噌の各香気成分の濃度と官能評価点について重回帰分析を行うため、検出された101ピークから、再現性や濃度、香気の質等を考慮して33成分を選択した。Fig. VI-2でピーク番号の明示された成分が選択された成分である。この33成分の濃度と官能評価点に関して、遂次変数選択法による重回帰分析を行った。その結果をTable VI-6に示した。ステップ1で取り上げられた成分はピークNo. 52のmalto1で、この時、寄与率は50.9%であった。これはmalto1の濃度で全変動の50.9%が説明できるということを意味している。重回帰分析ではできるだけ少数の成分で精度の高い重回帰式が得られることが期待される。ステップ7での重相関係数は0.897、寄与率は80.4%とかなり高い結果が得られたので、変数の選択をステップ7で終了することにした。これは7成分の濃度の増減で官能評価の約80%が説明できることを意味している。Table VI-7に遂次変数選択法で選択された7成分間の相関係数を示した。最も高い相関係数でもピークNo. 57とピークNo. 66間の0.29で、7成分間の相関は低く、変数の選択は有効であると判断された。

次に選択された7成分とその偏回帰係数及びそれを基にした米味噌の香気の評価を予測する重回帰式を求め、これをTable VI-8に示した。また、実際の官能検査の点数と重回帰式を用いて計算された点数の関係をFig. VI-3に図示した。Fig. VI-3は実際の点数と予測された点数が非常によく一致していることを示していた。GC分析による7成分の濃度と、この重回帰式を用いることによって官能検査にかわって、米味噌の香気の評価が可能であることが示唆された。さらに、この結果の味噌香気の品質管理への適応について検討を重ねることが必要である。

第4節 判別分析による米味噌（赤色辛口系）の香気成分と官能評価の解析⁹³⁾

本節では第3節と同様に、味噌の製造に関わる専門家によって香りについて官能評価され、これをもとに3段階にランク分けされた48点の米味噌を試料とし、カラム濃縮法で香気濃縮物を調製した。この香気濃縮物のGC分析によって検出された各香気成分の濃度と官能評価の関係について、t検定や、判別分析を用い

Table VI-6 最大 R^2 改良法での逐時変数選択法の重回帰分析によって選択されたピーク

step	R	R^2	Peak No.
1	0.713	0.509	52
2	0.782	0.612	52 83
3	0.830	0.689	52 54 83
4	0.864	0.746	15 52 57 83
5	0.880	0.774	15 43 52 57 83
6	0.891	0.794	15 43 52 57 76 83
7	0.897	0.804	15 43 52 57 66 76 83
8	0.902	0.814	15 27 43 52 54 57 76 83
9	0.906	0.821	15 27 43 47 52 54 57 76 83
10	0.919	0.845	15 16 27 40 47 52 57 76 81 85
15	0.954	0.911	15 23 27 30 34 40 47 52 63 65 66 72 76 81 85

R: multiple correlation coefficient

R^2 : multiple coefficient of determination

Table VI-7 最大R²改良法での逐時変数選択法の重回帰分析によって
選択されたピーク間の相関

Peak No.	15	43	52	57	66	76
43	-0.04					
52	0.06	-0.21				
57	-0.10	0.24	0.25			
66	-0.17	0.06	0.14	0.29		
76	0.06	0.27	-0.20	-0.26	-0.18	
83	0.17	0.22	-0.20	0.23	-0.08	0.03

Table VI-8 スッテプ 7 での味噌の官能評価の重回帰式

Peak No.	compound	partial regression coefficient	F
15	3-hexenyl acetate	-3.890	7.30*
43	benzyl alcohol	1.989	5.08*
52	maltol	1.462	84.65**
57	ethyl tetradecanoate	-2.780	18.26**
66	2-methoxy-4-vinylphenol	0.023	1.32
76	ethyl hexadecanoate	-0.050	2.27
83		-0.729	6.47*
	intercept	17.226	

$R^2 = 0.804$

**p<0.01, *p<0.05.

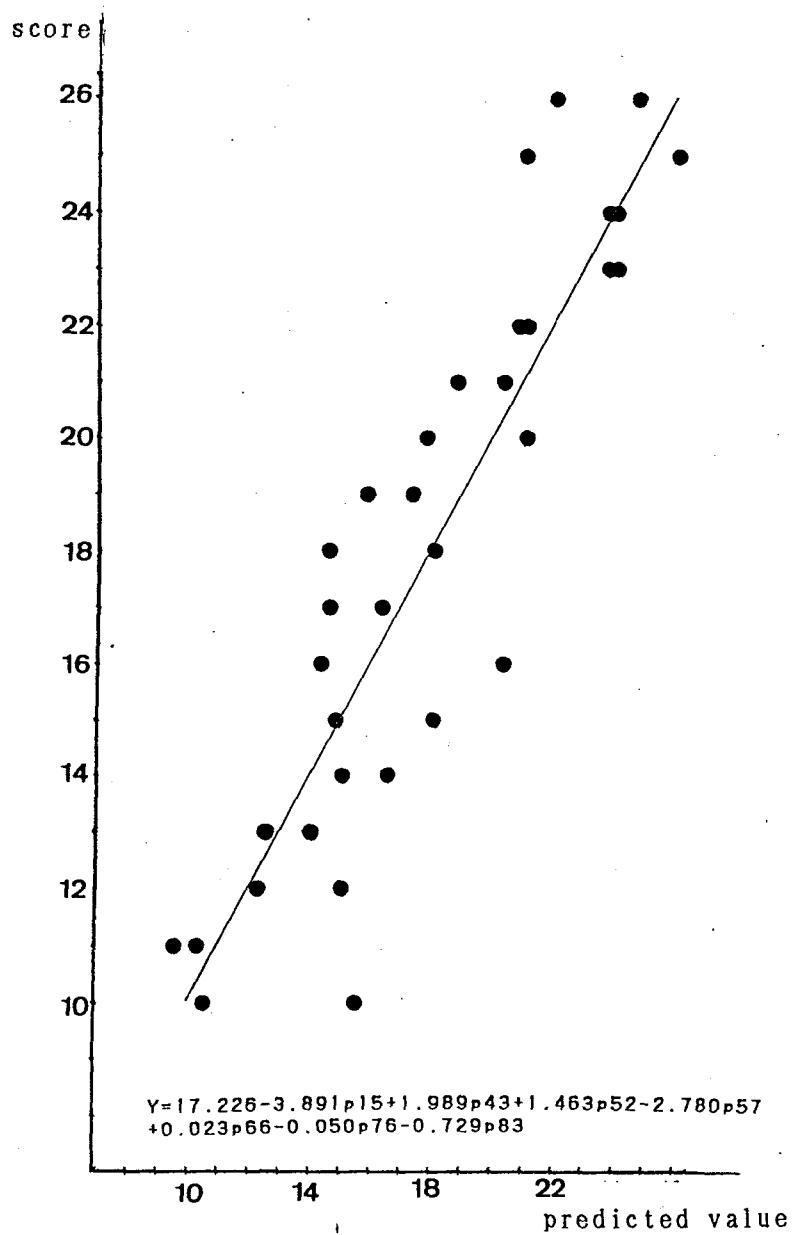


Fig. VI-3 米味噌の官能評価点と重回帰式によって
予測された評価点の関係

て解析し、米味噌がランクわけされる時に重要な役割を持つ香氣成分の解明を試みた。

1 実験方法

1) 試料

実験試料は全国味噌鑑評会（1989年、11月）に出品された米味噌（赤色辛口系）48点を中心味噌研究所から提供いただいた。出品された味噌は第3節に述べたような方法で審査されている。また、審査員の総合評価点数については10～12点を秀、13～18点を優、19～26点を良、27～30点を可としてランク分けを行う。ただし、本鑑評会では総合評価で可とされた味噌は全くなかった⁹⁴⁾。統計処理にはこのようにして評価された項目の中から、香りの点数を用い、総合評価のランクわけにならって香りについても評価点数を3段階にわけた。即ち、10～12点の評価の高い味噌をクラス1、13～18点の中位をクラス2、19～26点の評価の低い味噌をクラス3とした。そして、各クラスから平均的な点数の味噌を15～17点ずつ抽出し、あわせて48点を試料として用いることにした。Table VI-9に各クラスの試料数、評価点数の平均点を示した。

2) 香氣濃縮物の調製及び香氣成分の分離・同定

香氣濃縮物は第4節と同様にカラム濃縮法で調製した。即ち、48種の米味噌、それぞれ40gに蒸留水160mlを加え懸濁液とした。これを5°C、3000rpmで15分間遠心分離し、上澄液を得た。これを精製したTenax GC 0.6gを充填したガラスカラムに流し、同様に処理して香氣濃縮物を得た。同種の味噌について3回同じ実験を繰り返して行った。

得られた香氣濃縮物はGC、及びGC-MSを用いて分析した。化合物の同定は文献値のマススペクトルデータおよび標準物質とのGCの保持時間の一致によった。ピーク面積計算は島津クロマトパックC-R 6 Aによった。GC分析用カラムはPEG20M系のFS-WCOTを用い、MSはEI法でデータ処理は全てコンピューターによった。詳細な分析条件は第V章第3節と同じでTable V-3に示したとおりである。

3) 統計的手法

各香氣成分の濃度は内部標準物質(n-decyl alcohol)とのピーク面積比から、味

Table VI-9 各クラスの味噌の試料数、
官能評価点数の平均点

Class	n	Score ^b
1	17	11.4 ± 0.71
2	15	17.0 ± 0.00
3	16	22.8 ± 1.11
All	48	17.0 ± 4.83

^b: 10 (best) ~ 30 (worst)

噌の重量に対する ppm で計算された。クラス 1 と 2、クラス 1 と 3、クラス 2 と 3 において各香気成分の濃度について t 検定を行い、それぞれ有意差のある香気成分を検索した。また、クラス 1、2、3 に分類し、識別するために有効に働いている香気成分を検索するために、逐次変数選択法による判別分析を行った。さらにこの時、選択された変数を用いて正準判別分析を行った。なお、これらの統計処理はすべて SAS 統計パッケージを用いて行われた。

2 結果及び考察

1) ランクわけへの香気成分の影響

米味噌から得られた香気濃縮物の一般的なガスクロマトグラムを Fig. VI-4 に示した。48種間の GC パターンは各ピークの大きさに差は見られるが、全体としてかなり類似していた。多くの味噌から共通して検出されたピークは 92 種あった。その中で同定あるいは推定された成分は Fig. VI-4 の下に記載した。

クラス 1 と 2、クラス 1 と 3、クラス 2 と 3 の違いに影響を与える香気成分を明らかにするためにそれぞれの群で t 検定を行い、有意差のある成分を検索して Table VI-10 に示した。また、Table VI-11 にクラス 1 と 2、クラス 2 と 3 において有意差が認められた成分の各クラス平均濃度を示した。クラス 1 と 2 の群間に有意差が認められた成分は 5% 以下の危険率でも 2-phenyl-2-butenal のみであった。この成分は味噌においては第 VII 章第 3 節で述べるように熟成の後期に生成することが確認されており、クラス 1 と 2 は熟成の後期にその差が現れることもあると推察された。クラス 2 と 3 では 1% 以下の危険率で H E M F、3-methyl-thiopropanol、1-butanol、2-phenyl-1-ethanol と ピーク 40 で有意差が認められた。

H E M F の濃度はクラス 3 で明らかに低く、H E M F 濃度の低い味噌は香気の評価が低いことが判明した。しかし、クラス 1 と 2 では濃度に有意な差がないことから、H E M F はある一定量存在すればよく、H E M F の濃度と香気の評価は比例関係ではないことが示唆された。クラス 1 と クラス 3 では、クラス 2 と 3 の群間に有意差が認められた H E M F、3-methylthiopropanol、2-phenyl-1-ethanol、1-butanol に加えて、ethyl hexadecanoate、L-2,3-butandiol、ethyl tetradecanoate の各成分でも有意差が認められた。

以上のことから、全体としてはクラス 1 と 2 を構成している各香気成分の濃度

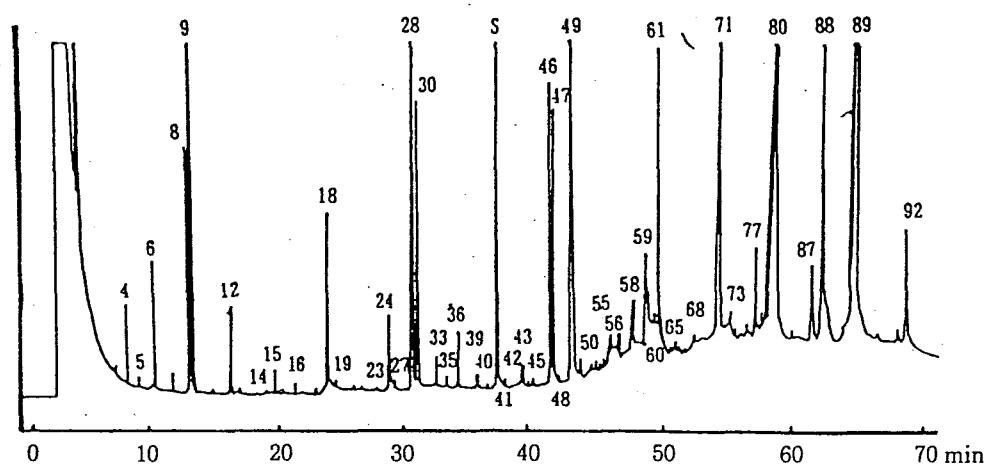


Fig. VI-4 米味噌から得られた香氣濃縮物のガスクロマトグラムと判別分析に用いられた ピーク

1: ethanol, 4: 2-methyl-1-propanol, 6: 1-butanol, 8: 2-methyl-1-butanol, 9: 3-methyl-1-butanol, 12: 3-hydroxy-2-butanone, 15: 1-hexanol, 18: 1-octen-3-ol, 19: acetic acid, 24: L-2,3-butandiol, 27: 5-methyl-2-furfural, 28: meso-2,3-butandiol, 33: phenylacetaldehyde, 35: ethyl benzoate, 36: 2-ethoxythiazole*, 39: methionol, 42: 2-phenylethyl acetate, 47: benzyl alcohol, 49: 2-phenyl-1-ethanol, 50: 2-phenyl-2-butenal, 55: acetylpyrrole, 56: maltol, 61: HEMF (4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2 H)-furanone), 65: methyl hexadecanoate, 68: 2-methoxy-4-vinylphenol, 71: ethyl hexadecanoate, 80: decanoic acid*, 87: ethyl octadecanoate, 88: ethyl (Z)-9-octadecenoate, 89: ethyl (Z, Z)-9, 12-octadecadienoate, 92: ethyl (Z, Z)-9, 12, 15-octadecatrienoate, S: internal standard.

*: tentatively identified.

Table VI-10 t 検定による各クラス間で濃度に
有意差が認められたピーク

Class	Peak	Compound	t ^b
1=2	50	2-phenyl-2-butenal	2.42*
2=3	61	HEMF	4.95**
	39	3-methylthiopropanol	3.77**
	6	1-butanol	3.11**
	49	2-phenyl-1-ethanol	3.05**
	40		2.78**
1=3	61	HEMF	5.73**
	39	3-methylthiopropanol	3.98**
	49	2-phenyl-1-ethanol	3.90**
	6	1-butanol	3.86**
	71	ethyl hexadecanoate	3.31**
	24	L-2, 3-butandiol	3.08**
	50	2-phenyl-2-butenal	2.99**
	59		2.87**

^b * : P < 0.05, ** : P < 0.01

Table VI-11 クラス1、2及びクラス2、3において有意差が認められた成分と
クラス平均濃度

Peak No.	Compound	<u>Mean concentration¹⁾</u>			
		Grand mean	Class1	Class2	Class3
50	2-phenyl-2-butenal	0.05±0.04	0.08±0.05	0.04±0.05	0.04±0.03
61	HEMF	1.88±1.26	2.44±1.07	2.43±1.17	0.72±0.07
39	3-methylthiopropanol	0.12±0.07	0.15±0.07	0.15±0.06	0.07±0.05
6	1-butanol	0.29±0.26	0.37±0.23	0.39±0.32	0.11±0.14
49	2-phenyl-1-ethanol	4.67±3.59	5.89±0.15	5.87±4.15	2.25±2.08
40		0.01±0.01	0.01±0.01	0.03±0.02	0.01±0.01

¹⁾: ppm in miso

の差に比較して、クラス2と3を構成している香気成分の濃度の差が大きいことが示唆された。また、各クラスで有意差が認められた成分は第VII章で述べるようすに熟成中に生成し、味噌様の香気生成に関与している成分とほぼ一致することが判明した。

2) 判別分析によるクラスわけと香気成分の解析

48種の米味噌について、クラス1、2、3への判別分析を行うために、味噌の香気成分として検出された92ピークから再現性や濃度、香気の質等を考慮して46ピークを選択した。Fig. VI-4においてナンバーが明示されたピークが、選択された46成分である。この46ピークの濃度を変数とし、遂次変数選択法による判別分析を行い、クラス1、2、3を識別するのに有効なピークを検討し、結果をTable VI-12に示した。ステップ1で選択されたピークはHEMFで、F値も他の成分に比較して高く、HEMFはクラス1、2、3の識別には最も有効な成分であることが判明した。ステップ2ではmeso-2,3-butandiol、ステップ3では2-phenyl-2-butenalがそれぞれ選択された。また、判別空間の分離の度合いを示す指標としてASCC(Average squared canonical correlation)を求めた。ASCCは判別空間の方向のすべてまたはほとんどが二つ以上のグループに明確に分かれていることを示していれば、1に近づく。この値がHEMFでは0.21であり、HEMFのみで全変動の21%が説明できることになり、この点からもHEMFのクラスわけへの寄与は高いといえる。

一方、3群の分類にはできるだけ少数の成分で、しかもできるだけ誤判別のないことが期待される。そこでASCCを求めたところ、ステップ14では0.76、ステップ20では0.85になった。これはそれぞれ全変動の76%、85%を説明しているということを示している。さらに、見かけの適中率を求めたところ、Table VI-12に示した14成分ですでに100%に達していた。13成分では見かけの適中率は97.9%となるため、変数の選択はステップ14で終了することにした。

次に遂次変数選択法による判別分析で選択された14成分を用いて正準判別分析を行い、各ピークの正準判別係数をTable VI-13に示した。標準化された正準判別係数から、第1正準判別係数ではピークNo.58、ピークNo.61、ピークNo.48、ピークNo.28が、第2ではピークNo.43、ピークNo.49、ピークNo.40が大きく関与していることが示された。もう一つの正準判別係数は素データをそのまま用いて判

Table VI-12 遂時変数選択法の判別分析で選択されたピーク

Step	Peak	Compound	R ²	F	ASCC ^{2b}
1	61	HEMF	0.43	16.62	0.21
2	28	meso-2, 3-butandiol	0.17	4.40	0.26
3	50	2-phenyl-2-butenal	0.16	4.14	0.34
4	40		0.19	4.95	0.42
5	8	2-methyl-1-butanol	0.13	2.93	0.45
6	80		0.18	4.33	0.49
7	43		0.14	3.11	0.53
8	48		0.14	3.13	0.56
9	89	ethyl (Z, Z)-9, 12-octadecadienoate	0.15	3.19	0.61
10	49	2-phenyl-1-ethanol	0.24	5.74	0.66
11	58		0.19	4.03	0.69
12	56	malton	0.20	4.24	0.72
13	41		0.20	4.10	0.74
14	68	2-methoxy-4-vinylphenol	0.17	3.15	0.76

^a : Maximum step was designated at 14^b : Average squared canonical correlation

Table VI-13 遂次変数選択法による判別分析で選択された 14 成分の
正準判別係数

Step	Peak	standardized		raw	
		Can 1	Can 2	Can 1	Can 2
1	61	1.15	0.34	0.91	0.27
2	28	1.03	-0.15	0.70	-0.10
3	50	-0.42	0.66	-9.99	15.58
4	40	0.17	-1.13	10.37	-67.82
5	8	-0.66	-0.54	-1.37	-1.12
6	80	-0.81	-0.02	-0.38	-0.01
7	43	0.43	-1.23	9.99	-28.49
8	48	-1.07	0.45	-26.69	11.31
9	89	-0.69	0.87	-0.02	0.03
10	49	0.60	1.21	0.17	0.34
11	58	1.30	0.11	5.41	0.45
12	56	0.94	-0.43	1.45	-0.67
13	41	-0.81	0.01	-33.07	0.16
14	68	0.49	-0.35	1.53	-1.07

Can 1 : first canonical coefficient

Can 2 : second canonical coefficient

別を行うための係数で、濃度の低いピークの係数が小さい傾向になっている。また、この時の固有値、正準相関係数等をTable VI-14に示した。これによると第1固有値の寄与率は72%、第2固有値は28%であった。

また、この時の正準判別変量の有意性を4種の多変量統計量(WINKS' LAMBDA、PILLAI'S TRACE、HOTELLING-LAWLEY TRACE、ROY'S GREATEST ROOT)を用いて検定した結果、すべてが有意となり、判別分析が有効であったことが示された。さらに、各クラスのマハラノビス距離を計算したところ、Table VI-15に示したように3群は有意に離れていることが判明した。

各群間の差異を視覚的に解釈するためにステップ14で計算された正準判別係数を用いて2次元平面にプロットし、Fig. VI-5に示した。これからも3群が明らかに識別されていることがわかる。さらに、Fig. VI-5からクラス1、2と3は第1正準判別係数のみで識別できるがクラス1、2、3を完全に識別するには第1正準判別係数と第2正準判別係数の両方を用いなければならないことが示唆された。また、マハラノビス距離もクラス1と2(3.86)に比較して、1と3(4.87)及び2と3(6.14)は離れており、クラス1と2の香気成分の濃度の違いに比較して、クラス1とクラス3、およびクラス2とクラス3の香気成分の濃度の違いが大きいことを示している。また、クラス1と3の距離をクラス2と3の距離よりも近づけた成分は、香気の質の点では審査員の判断に影響を与えていないと推論される。このような結果は香気成分の濃度をもとにした判別分析で解析したためと考えられるが、詳細については不明である。

以上の結果から、クラス1、2、3の3群は逐次変数選択法による判別分析で選択された14成分を用い、正準判別分析を行い、得られた正準判別係数によって識別することができると判断された。また、クラス1と2を構成している各香気成分の濃度の違いに比較して、クラス1とクラス3、およびクラス2とクラス3の香気成分の濃度の違いが大きいと考えられた。

Table VII-14 遂次変数選択法による判別分析で選択された
1~4成分での正準判別分析の固有値、正準相関係数

	Can 1	Can 2
Eigen value	5.54	2.13
Contribution (proportion)	0.72	0.28
Canonical correlation	0.92	0.83

Table VI-15 各クラス間のマハラノビス距離

Class	Distance	F ^D
1:2	3.86	5.32**
1:3	4.87	7.49**
2:3	6.14	13.31**

^D ** : p < 0.01

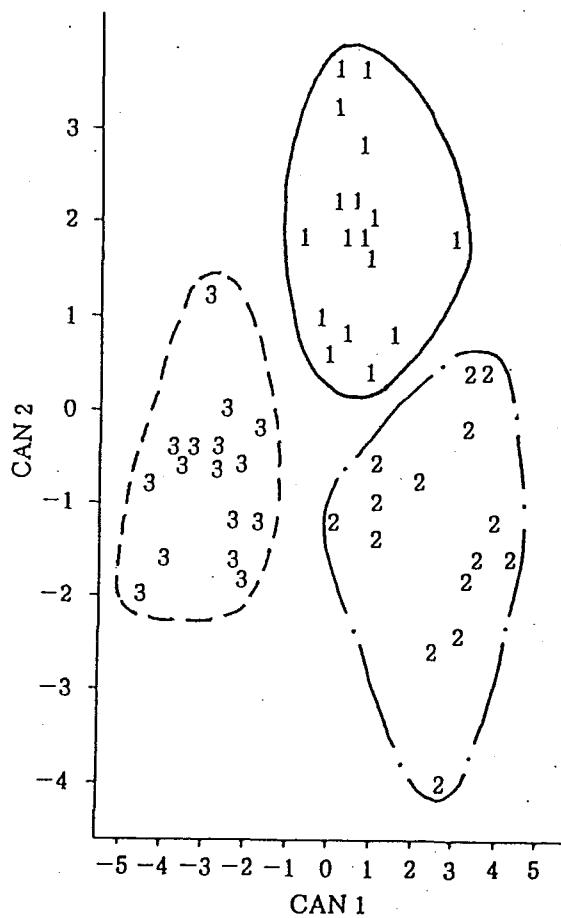


Fig. VI-5 遂次変数選択法による判別分析で選択された
14成分の正準判別係数を用いての各味噌の
2次元平面のプロット

第5節 要約

味噌香気の評価の基準を明らかにするために、一般消費者をパネルとして香気特性の異なる2点の米味噌、一部豆麹を用いた特殊な米味噌、豆味噌（特徴的な香気のねさしみそ）について官能検査を実施し、彼らの味噌の香りの嗜好傾向と評価の観点を検討した。さらに、カラム濃縮法とSDE法を用いて、同じ試料の香気組成を比較し、味噌香気の評価に関与する重要な成分の解明を試みた。その結果、米味噌では甘い香りは好ましさの重要な要素であり、これにHEMFが最も寄与していると判断された。さらに、米味噌では、香りのソフトなものを好ましいとするグループと、香りの強いものを好ましいとするグループがあり、この香りの強さには低級脂肪族のアルコール類やエステル類の種類や濃度及び3-methylthiopropanolの濃度が関与していた。豆味噌では揮発酸の濃度が高く、刺激臭、酸臭が強いという理由で好まれなかった。ピラジン化合物は豆味噌の特徴的な香気成分であったが、豆味噌の食経験のないパネルにとっては異質な香気と評価された。

また、味噌は同じ種類であっても、様々な品質のものが製造される。そこで、最も一般的な赤色辛口系米味噌の品質と香気成分の関係について、味噌製造に関わる専門家によって、香りについて官能評価された、異なる品質の多数の味噌を試料とし、各香気成分の濃度と官能評価点の統計的な解析を行うことによって考察した。

初めに、米味噌34点から、カラム濃縮法で香気濃縮物を調製し、これをGCとGC-MSによって分析した。GCで101のピークが検出され、これら成分の濃度と官能評価点について相関を求めたところ、特に高い相関を示した化合物はmaltolとHEMFで、maltolの濃度が増加すると官能評価は低下し、HEMFの濃度が増加すると米味噌の香気の官能評価は高くなることが判明した。濃度の高い33成分と官能評価点に関する逐次変数選択法による重回帰分析を行ったところ、ステップ1ではmaltolが選択され、そのとき決定係数は0.508であった。ステップ7で重相関係数は0.897、寄与率は80.4%となり、選択された7成分で官能評価の80%を説明することができた。官能検査の点数とステップ7での重回帰式によって予測された点数は非常によく一致し、この重回帰式は官能検査に応用できると

判断された。

さらに同じように香りについて官能評価され、これをもとに3段階にランクわけされた48点の米味噌を試料とし、カラム濃縮法で香氣濃縮物を調製した。この香氣濃縮物のG C分析によって検出された92成分の濃度と官能評価の関係について、初めにt検定で検討し、クラスわけに関与する香氣成分を明らかにした。米味噌の評価を高めると判断されたHEMFの濃度はクラス3で明らかに低く、クラス1と2では有意な差がないことから、HEMFはある一定の濃度、存在すればよいことが示唆された。次に濃度の高かった46成分を用いて、クラスわけに有効なピークを逐次変数選択法による判別分析で検討した。この時、ステップ1で選択されたピークはHEMFで、3クラスの識別には最も有効な成分であることが判明した。この方法で選択された14成分で全変動の76%が説明できることが判明した。この14成分を用いて正準判別分析を行い、得られた正準判別係数によって、クラス1、2、3の3群は完全に識別することができると判断された。また、クラス1と2を構成している各香氣成分の濃度の違いに比較して、クラス1とクラス3、およびクラス2とクラス3の香氣成分の濃度の違いが大きいと推察された。

一般消費者をパネルとした官能検査や、多数の米味噌から検出された香氣成分の濃度と官能検査の統計的な解析から、米味噌の香氣の評価にはHEMFが深く関与していることが明らかにされた。

第VII章 米味噌（赤色辛口系）熟成中の香気形成とHEMF

第1節 緒言

第VI章では、最も一般的な赤色辛口系米味噌（以後、本章では米味噌と略す。）には甘い香りは好ましさの重要な要素であり、それには、味噌の香気成分として初めて同定されたHEMFが寄与していること、また、米味噌中の多種類の香気成分濃度と官能評価の統計的な解析からも、HEMFの濃度が米味噌の品質に大きな影響を与えることが確認された。そこで、第2節ではHEMFのカラム濃縮法での回収率を求め、味噌中の正確な濃度を算出するとともに、HEMF濃度の低い米味噌に実際に、標品のHEMFを添加し、米味噌香気への寄与の再確認を試みた。

一方、第V章では、HEMFは赤色辛口系米味噌に代表される発酵熟成型味噌に特徴的な香気成分であり、味噌においても醤油同様、酵母の活動によって形成されることが示唆された。そこで第3節では、米味噌の原料となっている米麹や蒸煮大豆及び米味噌熟成中の各段階の試料から香気濃縮物を調製し、HEMFの熟成期間中の形成の確認と濃度の変化を明らかにした。

さらに第4節では、酵母Zygosaccharomyces rouxiiを添加した米味噌としないものの熟成中のHEMF形成量と酵母の菌数の変化を測定し、酵母によるHEMF形成の条件について考察した。

1991年、佐々木らは酵母によるHEMFの生合成に関する論文を発表し、味噌や醤油の製造に共通して使用される、Zygosaccharomyces属はもちろん、Candida属やSaccharomyces属なども発酵条件によってはHEMFを生合成することを確認した^{95)、96)}。ところで、日本古来の伝統的な醸造酒である清酒は、精白米を米麹の酵素で糖化しながら、同時に清酒酵母Saccharomyces cerevisiaeによるアルコール発酵を営ませ、もろみをろ過したもので⁹⁷⁾、大豆を用いてはいないが、発酵過程は味噌や醤油と類似している。そこで第5節では清酒の香気成分としてのHEMFの有無を検討し、さらに、清酒と大豆発酵食品の製造条件の比較から、酵母によるHEMF形成の条件について考察した。

ところで、1992年、HEMFはベンズピレン誘導体によるマウスの胃の腫瘍の

発生を抑制する効果のあることが報告され^{9,8)}、香気成分として以外にも重要な機能があるとして注目されてきている。これらの一連の研究により、酵母による H E M F の生成機構の解明を進め、味噌や醤油での H E M F の重要性をさらに明確にし、味噌や醤油の食品としての有効性を H E M F をとおして明らかにすることに貢献したい。

第2節 H E M F の米味噌への添加による重要性の確認^{7,7)}

米味噌の香氣にとって極めて重要な成分であることが判明した H E M F はカラム濃縮法においてのみ検出され、S D E 法では検出されないなど、香気濃縮物の調製方法によって回収率が異なることが、本論文第 V 章において示唆された。そこで、標品の H E M F 水溶液を調製し、この溶液からカラム濃縮法で H E M F を回収し、回収率を求めた。そして、求めた回収率から、実際の味噌中の H E M F 濃度を算出した。

さらに、H E M F 濃度のかなり低い米味噌に、実際に一定量の標品の H E M F を添加し、無添加のものと官能検査で比較した。これによって、H E M F を添加した時の米味噌香気への影響を明確にし、米味噌香気に対する H E M F の重要性を再確認したいと考えた。

1 実験方法

1) Tenax GCを用いたカラム濃縮法での H E M F の回収実験

H E M F の標品は長谷川香料株式会社より提供いただいた。

H E M F は蒸留水で 10.05 ppm に調製した。この H E M F 水溶液 200 ml を Tenax GC 0.6 g を充填したカラムに流し、H E M F を吸着させた。これをエーテルで脱着し、内部標準物質を添加し、脱水後、濃縮して濃縮物を得た。詳細は味噌の上澄液の処理と同様である。この操作を 5 回繰り返して行い、得られた濃縮物は G C によって分析した。G C 分析用カラムは PEG20M 系の FS-WCOT を用いた。ピーク面積計算は島津クロマトパック C-R 6 A によった。内部標準物質とのピーク面積の比から、H E M F の回収率を 5 回の分析結果の平均値として求めた。詳細な分析

条件はTable V-3に示したとおりである。

2) 米味噌懸濁液へのHEMFの添加実験

HEMFを添加した時の米味噌香気への影響を明確にする目的で行う検査であるので、試料とする米味噌はHEMFの濃度が極めて低いことが望ましい。第VI章までで、種々の米味噌のHEMF濃度をTenax GCによるカラム濃縮法で測定した結果では、0.05ppmが最も低かった。そこで、HEMFの添加実験には、HEMF濃度が0.05ppmと極めて低い米味噌を試料として用いることにした。

味噌懸濁液は塩分濃度が約1%になるように調製し(味噌60g、蒸留水720g)、100mlずつ三角フラスコに入れたものを7ヶ用意した。官能検査に用いるHEMFの添加量を決めるため、これにHEMF液を添加して、0、0.2、0.32、0.4、0.5、1.0、2.0ppmになるように調製し、事前にインフォーマル官能検査を行ったところ、0.2ppm添加以上で差が確認された。そこで、添加なしの味噌懸濁液と、HEMF液を0.2ppmになるように添加した味噌懸濁液の2種類で比較することとした。官能検査のパネルは、教育学部家政科と農学部農芸化学科の学生あわせて19名である。検査は、2種の味噌懸濁液のにおいをそれぞれかいで、味噌らしいにおいが強いものに1位をつける順位法で行った。

2 結果及び考察

1) カラム濃縮法でのHEMFの回収率

HEMFのTenax GCを用いたカラム濃縮法での平均回収率は9.8%であった。同じ方法で測定された、第V章第5節、Table V-9に示した各種味噌のHEMFの濃度をカラム濃縮法による回収率をもとに補正すると、赤色辛口系米味噌では65.5ppm、麦味噌では73.7ppmとなり、HEMFの閾値が0.04ppbよりも低いという報告を考え合わせると、味噌香気へのHEMFの寄与は極めて高い。淡色辛口系米味噌でもHEMFの濃度は7.7ppmとなるため、香気への影響もかなりあるものと判断される。豆味噌と米甘味噌に関してはHEMFの濃度を特定できなかったので、香気への寄与を明確にすることはできなかった。

2) 米味噌懸濁液へのHEMFの添加実験

HEMF濃度が0.05ppmとかなり低い米味噌を用いて、実際に味噌汁として食する時と同じ塩分約1%の懸濁液を調製し、これにHEMFを0.2ppmになるように添

加した。HEMF添加味噌懸濁液と無添加のものとで、味噌らしい香気の強さを順位法よって比較したところ、パネル19名中15名がHEMFを添加した味噌懸濁液が無添加のものより味噌らしい香気が強いと評価した。これはクレーマーの検定により1%以下の危険率で有意であった。HEMF濃度の低い米味噌にこれを添加すると味噌様の香気を強める効果があり、米味噌の香氣にとって重要な化合物であることが再確認された。第VI章では、官能検査で赤色辛口系米味噌にとって甘い香氣は好ましさの重要な要因であること、多数の米味噌の官能評価と香氣成分の濃度の統計的な解析からも、HEMFの濃度が高いほど、評価が高まることが確認されており、HEMF濃度の低い味噌への一定量のHEMF添加は香氣を改良するうえで効果的であると結論づけられる。一方、HEMFは強いカラメル様の甘い香氣を持っており、0.2ppm以上の添加では甘い香氣が強かった。従って、添加量が多すぎる場合には甘い香氣が強すぎて全体の香氣バランスが崩れることもありうることが示唆された。

第3節 米味噌（赤色辛口系）熟成中の香氣成分の形成⁹⁹⁾

第V章において、HEMFは赤色辛口系米味噌に代表される発酵熟成型味噌において検出され、分解型や中間型味噌では検出されても濃度は極めて低かった。従って、HEMFは味噌熟成中に、酵母の活動によって形成されることが示唆された。そこで本節では、仕込後約4ヶ月で製品となる温醸品（酵素分解や、発酵微生物の生育の好適温度を保って製造される製品）の米味噌を試料とし、HEMFの味噌熟成期間中の形成の確認と濃度の変化を明らかにした。即ち、米味噌の原料となる米麹や蒸煮大豆及び仕込直後から製品となる120日後までの各熟成段階の味噌から香氣濃縮物を調製し、比較検討した。

さらに、HEMFと同様に、甘いカラメル様の香氣を持つmaltolやHDMFについても熟成中の濃度の変化を検討し、HEMFとの生成経路の相違を明確にすることを試みた。また、HEMFに加えて、熟成期間中に生成し、増加する香氣成分も明らかにして、熟成中の味噌様香氣形成の全体像の解明を試みた。

1 実験方法

1) 試料

発酵熟成型の代表的な味噌として、赤色辛口系米味噌の仙台味噌（仙台味噌醤油社製）を選定し、熟成中の香気成分の変化を短期間で明確にするために温醸品を用いることにした。即ち、仕込直後の1990年4月3日から製品となる仕込後120日までに、30日間隔で5回採取して試料とした。原料の配合割合は第V章第3節と同じである。また、仕込に用いた蒸煮大豆と米麹も試料とした。なお、各段階の味噌について基準味噌分析法に従って一般成分の分析をし、品質を検査した。その結果をTable VII-1に示す。

2) 香気濃縮物の調製及び香気成分の分離・同定

香気濃縮物はカラム濃縮法で調製した。各段階の味噌及び蒸煮大豆、米麹それぞれ40gに蒸留水160ml加えて懸濁液とした。これを5°C、3000rpmで15分間、遠心分離し、上澄液を得た。これを精製したTenax GC 0.6gを充填したガラスカラムに流し、エーテルで脱着し、内部標準物質を添加し、脱水後、濃縮して香気濃縮物を得た。詳細は第V章第5節と同様である。

得られた香気濃縮物はGC、及びGC-MSを用いて分析した。ピーク面積計算は島津クロマトパック C-R 6 Aによった。各香気成分の濃度は内部標準物質とのピーク面積比から算出した。化合物の同定は文献値のマススペクトルデータおよび標準物質とのGCの保持時間の一致によった。GC分析用カラムはPEG20M系のFS-WCOTを用い、MSはEI法、データ処理は全てコンピューターによった。詳細な分析条件はTable V-3に示したとおりである。

2 結果及び考察

1) HEMF及び他の甘いカラメル様香気を持つ成分の熟成中の変化

仕込後120日の製品となった味噌から検出された甘いカラメル様の香気を持つ成分はフラノン化合物のHEMFとHDMF、及びmalto1の3成分であったが、蒸煮大豆からはさらにHMFが検出された。これら成分の仕込直後から製品になるまでの濃度の変化をTable VII-2に示した。

HEMFは原料の蒸煮大豆、米麹及び仕込直後には全く検出されなかつたが、30日後には2.31ppmまで増加し、60日後は2.33ppmとなり、熟成中に生成すること

Table VII-1 各熟成段階ごとの味噌の一般成分

Constituent	0 day	30 days	60 days	90 days	120 days
moisture (%)	44.3	44.7	44.9	44.6	45.0
NaCl (%)	12.8	13.1	13.1	13.2	13.3
T.N. (%)	1.91	1.89	1.92	1.97	1.97
W.S.N. (%)	0.97	1.21	1.27	1.36	1.37
F.N. (%)	0.313	0.452	0.455	0.441	0.447
T.S. (%)	19.7	18.6	16.2	16.2	15.4
R.S. (%)	15.9	15.0	13.7	14.0	14.0
Alcohol (mg/100 g)	104	339	460	569	443
Acid I (ml)	6.0	9.2	11.4	12.7	13.6
Acid II (ml)	7.9	10.2	11.1	12.4	13.1
PH	5.45	5.26	5.16	5.01	4.96

T.N. : Total nitrogen, W.S.N. : Water soluble nitrogen, F.N. : Formol nitrogen, T.S. : Total Sugar, R.S. : Reducing sugar

Table VII-2 味噌熟成中の甘いカラメル様の香気をもつ化合物の消長

compound	rice mold	cooked soybean	0 day	30 days	60 days	90 days	120 days
maltol	—	2.98	1.43	0.78	0.58	0.65	0.24
HMF	—	0.01	—	—	—	—	—
HDMF	—	0.03	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
HEMF	—	—	—	2.31	2.33	1.84	0.81

* : ppm in rice mold, cooked soybean and miso, respectively

HMF : 4-hydroxy-5-methyl-3 (2 H)-furanone

HDMF : 4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3 (2 H)-furanone

HEMF : 4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2 H)-furanone

tr. : trace

は明かであった。よって、HEMFは米味噌においても醤油同様、熟成中に酵母が関与して生産される香気成分であると判断された。ところでHEMFは60日後をピークに90日後には1.84ppmになり、120日後には0.81ppmとかなり減少した。TableVII-1に示したように味噌の一般成分の分析結果から、120日後の味噌はすでに熟成が進みすぎていた。米味噌中のHEMFは熟成が進みすぎると一部が分解する可能性もあると推測された。

これに対し、malto1とHMF、HDMFは蒸煮大豆から検出され、その後熟成に伴い、濃度が増加することはなかった。この結果から、malto1、HMF、HDMFは大豆を蒸煮した際に、主にメイラード反応によって生成し、第III章3節で述べたように蒸煮大豆の甘い香気に寄与し、味噌の香氣においても甘い香気のベースになっている成分であると判断された。malto1は熟成が進むにつれてむしろ減少しており、大豆を蒸煮した際に生成したものが残留し、熟成中に一部分解したと推測された。

以上、HEMFとmalto1の米味噌中の濃度は同レベルであるが、malto1は蒸煮大豆由来の成分であり、HEMFは酵母により生成され、生成経路は全く異なっている。また、第2節で述べたように、カラム濃縮法でのHEMFの回収率は9.8%であったので、HEMFは120日後のかなり減少した段階でも実際には約8.3ppm存在していることになる。HEMFの閾値は0.04ppb以下と報告されており、米味噌の香氣への寄与はこの段階でも極めて高い。このように閾値や、濃度、生成経路からHEMFの米味噌香氣への寄与は非常に高く、熟成中の味噌様の香氣形成に重要な役割を持つと結論づけられた。

2) 熟成期間に増加した米味噌の香気成分

HEMFに加えて、熟成中の味噌様の香氣形成に関与する成分を明らかにするために、米麹、蒸煮大豆及び仕込み直後には検出されなかつたが製品になるまでの期間に濃度の増加が認められた香気成分と、米麹、蒸煮大豆及び仕込み直後にも検出されたがその後の増加が著しい香気成分を整理してTableVII-3に示した。

熟成期間中に増加を示す多くの香気成分は仕込後30日ですでに検出され、その後90日までは増加傾向があった。しかし、120日後には減少する成分も多くみられた。この味噌の熟成過程はTableVII-1に示した一般成分の分析の結果から、90日の発酵状態が最も良く、120日後では発酵が終了し、味噌の品質は低下していると

Table VII-3 味噌熟成中に増加が著しい香氣成分*

Compound	rice mold	cooked soybean	0 day	30 days	60 days	90 days	120 days
Aliphatic alcohols							
1-butanol	—	—	—	0.22	0.18	0.36	0.17
2-methyl-1-propanol	—	—	—	0.24	0.24	0.58	0.23
2-methyl-1-butanol	—	—	0.22	0.77	0.95	2.86	2.09
3-methyl-1-butanol	—	—	1.09	2.37	2.62	6.99	4.76
Aromatic compounds							
2-phenyl-1-ethanol	0.02	0.02	0.37	2.29	4.53	8.18	6.62
2, 6-dimethoxyphenol	—	0.15	0.02	0.18	0.26	0.31	0.17
ethyl benzoate	—	—	—	0.01	0.03	0.15	0.10
2-phenyl-1-ethyl acetate	—	—	—	—	0.03	0.05	0.06
2-phenyl-2-butenal	—	—	—	—	—	0.04	0.04
Aliphatic ethyl ester							
hexadecanoate	0.71	—	0.16	1.21	3.28	2.31	1.02
octadecanoate	—	—	—	0.11	0.48	0.23	0.19
(Z)-9-octadecanoate	1.73	—	0.15	3.63	5.16	2.70	1.36
(Z, Z)-9, 12-octadeca-dienoate	1.13	—	0.30	2.61	6.77	4.37	1.98
(Z, Z, Z)-9, 12, 15-octa-decatrienoate	—	—	—	0.09	0.49	0.38	0.16
Others							
3-methylthiopropanol	—	—	—	0.25	0.17	0.34	0.19
5-methyl-2-furfural	—	—	—	—	—	0.10	0.03
2-ethoxythiazol**	—	—	—	—	—	0.03	0.03
HEMF	—	—	—	2.31	2.33	1.84	0.81

*: ppm in rice mold, cooked soybean and miso, respectively

**: tentatively identified

いう経過であり、香気成分も全体としてそれと同様に変化していることが判明した。よってこれらの香気成分は酵母の増殖が活発になると一斉に生成し始め、その後徐々に増加したが、発酵が終わり減少する成分もあったといえよう。

熟成中に生成し、増加した香気成分は脂肪族アルコール類4種、芳香族化合物5種、脂肪酸のエチルエステル5種、その他の化合物としては3-methylthio-propanol、5-methyl-2-furfural、HEMFであった。

脂肪族アルコールは1-butanol、2-methyl-1-propanol、2-methyl-1-butanol、3-methyl-1-butanolの4成分であった。これらは醸造食品に共通する発酵生産成分である¹⁰⁰⁾。安平は1-butanolの量が多いほど味噌の官能検査の結果も良かった⁷¹⁾と報告している。また、本論文第VI章第3節において、多種類の米味噌の香気成分の濃度と官能評価の統計的解析からも1-butanol、2-methyl-1-butanol、3-methyl-1-butanolの3成分は5%の危険率で有意に官能評価を高めることが判明している。従って、1-butanolを始めとするこれらのアルコールは味噌様の香気形成に寄与していると判断される。

芳香族化合物で特に増加が著しかった成分はバラ様の芳香を呈する成分としてよく知られている2-phenyl-1-ethanolであった。この成分は米麹、蒸煮大豆でも検出され、また多くの醸造食品においても発酵過程で酵母により生産され、増加することが知られている。次に増加した成分は2,6-dimethoxyphenolであった。この成分は醤油の特香成分の一つとされ、蒸煮大豆においても検出されたが、仕込後90日までには蒸煮大豆での濃度を超え、0.31ppmに達し、熟成とともに増加していた。しかし、醤油の特徴香のひとつとされ、同じフェノール化合物である4-ethyl-2-methoxyphenolと4-ethylphenolは熟成のどの段階からも検出することができなかった。この結果からも、本論文第V章第5節で述べたと同様に、4-ethyl-2-methoxyphenolと4-ethylphenolは米味噌と麦味噌、豆味噌の香気特性の差異を示す成分であることが確認された。

その他にethylbenzoate、2-phenyl-1-ethyl acetateの2種のエステルと2-phenyl-2-butenalに増加がみられた。前者の2成分はいずれも果実または花様の香気を有しており、味噌の香気に寄与する化合物である。2-phenyl-2-butenalは米糠より検出されている¹⁰¹⁾が、米味噌においては特に熟成の後期に生成することから後熟香になんらかの寄与があるものと考えられる。

脂肪酸エチルエステルではTable VII-3に示した5成分の増加が著しかった。これらの化合物は他に比べても濃度が非常に高く、ethyl (Z,Z)-9,12-octadecadienoateは60日後には6.77ppmにまで達した。これら成分は大豆由来の高級脂肪酸と発酵によって生成したエチルアルコールから生成する。高級脂肪酸のエチルエステルはこれ自体は特徴的な強い香気を持たないが、エステルに共通する芳香を持っており、他の香気の保留や引き立て等に役立つ重要な成分であると考えられる¹⁰²⁾。一般にエステルは主に酵母により生産され、菌種によりエステルの生産量や組成は異なり、酵母の増殖、発酵とエステル生成は並行し、発酵が終わると減少することがあると報告されている¹⁰³⁾。米味噌においても同様の傾向を示し、酵母の増殖が活発であった60日から90日後までは生産量が増し、その後徐々に減少した。

その他の化合物では、3-methylthiopropanolが仕込後30日に検出され、その後90日まで増加した。3-methylthiopropanolはやや香ばしく醤油様の香りを持ち、醤油の特徴香の一つであり、醤油では酵母によりメチオニンから形成されると報告されている⁶⁷⁾。3-methylthiopropanolもHEMFと同様、米味噌の熟成中に生成され、醤油と共通して存在する成分であり、米味噌の香気への寄与も高いと判断された。

第4節 米味噌熟成中のHEMF(4-Hdroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone)の生成と酵母

第3節において、米味噌の重要な香気成分であるHEMFは熟成中に形成され、酵母が形成に関与することが確認された。近年、味噌の醸造には酵母を添加することが一般的になっており、第3節で用いた試料も酵母を添加して製造された味噌であった。本節では、味噌を仕込む際に酵母を添加したものとしないものを調製し、仕込直後から製品の味噌となるまでの各段階のHEMFの濃度と酵母の菌数を測定した。また、第3節では、HEMFは仕込み直後には検出されなかったが、仕込後30日目の味噌ではすでに相当量検出された。そこで、本節では、0から30日間の変化を詳細に検討した。これにより、HEMF形成への酵母の関与をよ

り明確にし、米味噌における酵母によるHEMF形成の条件について考察した。

1 実験方法

1) 試料

試料とした味噌は蒸煮大豆16.7kg、米麹7.0kg、塩4.0kgで仕込まれた。仕込の際、この味噌1gあたり、 4×10^5 の酵母が添加された。この酵母はZygosaccharomyces rouxii S-96種で新潟県食品研究所から分与されたものである。比較のために酵母を添加しない味噌が同じ割合で調製された。酵母添加味噌と無添加味噌は、仕込み後、0日、7日、14日、21日、30日、60日、100日間熟成した後、HEMFの濃度と酵母の菌数の測定のために採取した。

2) 酵母の測定

味噌中の酵母の菌数を測定するための培地は以下のように調製した。2kgの米麹を70°C、3.3lの蒸留水に溶解させ、これを60°Cで8時間インキュベートし、ガーゼで濾過した。ろ液に10%HCl水溶液を15ml加え、5分間煮沸した。放冷後、このろ液の糖濃度を糖度計を用いて18%に、NaCl濃度を10%になるように蒸留水で調製した。さらにこの混合液のpHを5.0に調製し、1.2%の寒天を添加して、0.7kg/cm²の圧力で滅菌した。これに100units/mlになるようにペニシリン溶液を添加し、培地を調製した。ペニシリン溶液は1バイアル20万単位の粉末に、滅菌した10%NaCl希釀水を8ml加え、調製した。このペニシリン溶液を培地100mlあたり、0.4ml加えると100units/mlとなる。

各熟成段階の味噌を、10%NaClを含む滅菌水で適当に希釀する。0.5mlまたは1.0mlの味噌希釀液を培地に添加し、これを7日間28°Cで培養して、増殖した酵母のコロニーが計測された。

3) 味噌一般成分の分析及び香気濃縮物の調製と分析

各熟成段階の味噌の一般成分は基準味噌分析法に従って分析された。

味噌中のHEMF濃度の測定は第3節と同じである。即ち、各熟成段階の味噌それぞれ40gに蒸留水160ml加えて懸濁液とした。これを5°C、3000rpmで15分間、遠心分離し、上澄液を得た。これを精製したTenax GC 0.6gを充填したガラスカラムに流し、エーテルで脱着し、内部標準物質を添加し、脱水後、濃縮して香気濃縮物を得た。詳細は第V章第5節と同様である。

得られた香気濃縮物はGC、及びGC-MSを用いて分析した。ピーク面積計算は島津クロマトパックC-R6Aによった。HEMFの濃度は内部標準物質とのピーク面積比から算出した。GC分析用カラムはPEG20M系のFS-WCOTを用い、MSはE I法でデータ処理は全てコンピューターによった。詳細な分析条件はTable V-3に示したとおりである。

2 結果及び考察

Table VII-4には、酵母添加、酵母無添加の味噌の一般成分と、酵母の菌数、HEMFの濃度を示した。試料とした味噌は、本実験のために通常の仕込量よりも少量で調製したため、熟成の進行が通常より早く、仕込後100目ですでに発酵は終了していた。この熟成期間に、水分、NaCl濃度、水溶性窒素、ホルモール態窒素の数値は酵母添加味噌も無添加味噌も同じ割合で変化していた。

酵母添加味噌では、酵母の増殖ははじめから相当認められ、続いて明かなエタノール発酵が行われていた。初期から、酵母の増殖がみられたにもかかわらず、HEMFは検出できなかった。HEMFは酵母の増殖が最高に達した仕込み後14日目で検出され、その後、約2.4ppmまで徐々に增加了。

酵母無添加の味噌では、酵母の菌数は 10^3 レベルで低く、初期から14日目までは徐々に減少し、その間、アルコール発酵もみられず、還元糖が蓄積した。酵母の菌数の減少は、これらの酵母は耐塩性が弱く、米麹中に存在したものであることを示している。明かな酵母の増殖は21日目から始まり、ここから酵母はゆっくり増殖し、60日までに 10^6 レベルの最高の菌数に到達した。減少後、増殖した酵母は味噌を製造している工場に住み着いている酵母か、または米麹中の酵母が高濃度の還元糖と食塩という環境に適応したものと考えられる。HEMFは仕込後21日目で酵母の菌数は 2.2×10^3 cell/gであるにもかかわらず、検出され、その後3.1ppmまで急激に增加了。

酵母添加の味噌では、仕込後7日目で酵母の菌数が 1.6×10^6 cell/gであったにもかかわらず、HEMFは検出されず、仕込後14日目で初めて0.67ppm検出された。酵母無添加の味噌では、仕込後21日目で酵母の菌数は 2.2×10^3 cell/gでもHEMFは0.06ppm検出された。HEMFが検出されたときのpHはそれぞれ5.57と5.59であった。これらの結果から、酵母によるHEMF形成には酵母の増殖とあるいは酵

Table VII-4 酵母添加と無添加味噌の一般成分、酵母の増殖及びHEMFの濃度

	Mois.	NaCl	W.S.N.	F.N.	R.S.	Alco.	Aci. I	Aci. II	pH	yeast*	HEMF
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)		(ml)	(ml)		growth	(ppm)
A	0day	46.4	12.7	0.58	0.086	12.0	35	2.80	3.15	5.84	4.0x10 ⁵
	7days	45.8	12.6	0.74	0.178	15.3	69	4.80	5.50	5.67	1.6x10 ⁶
	14days	45.5	12.8	0.85	0.241	15.5	259	6.15	6.95	5.57	3.5x10 ⁶
	21days	45.3	12.7	0.87	0.275	14.6	253	6.45	7.20	5.55	2.6x10 ⁶
	30days	46.9	12.9	0.97	0.290	14.2	759	7.30	7.80	5.46	7.2x10 ⁶
	60days	47.8	13.1	1.09	0.350	11.8	1213	9.45	7.80	5.34	1.5x10 ⁶
	100days	48.2	13.0	1.12	0.364	11.9	1121	10.15	9.65	5.18	1.0x10 ⁴
N	0day	46.1	13.2	0.58	0.086	12.5	0	2.80	3.10	5.84	3.0x10 ³
	7days	45.6	12.4	0.74	0.184	15.0	0	4.06	5.60	5.69	4.0x10 ²
	14days	45.5	12.4	0.80	0.249	16.9	0	5.60	7.25	5.61	2.0x10 ²
	21days	45.2	12.5	0.85	0.287	17.0	17	6.10	7.15	5.59	2.2x10 ³
	30days	45.4	12.7	0.94	0.292	17.3	45	6.80	7.85	5.55	2.2x10 ⁵
	60days	45.2	12.6	1.06	0.344	16.3	242	9.60	10.10	5.29	2.0x10 ⁶
	100days	45.8	12.7	1.09	0.364	16.1	374	10.65	10.20	5.20	4.7x10 ⁵

A:Miso with addition of yeast, N:Miso without addition of yeast.

*:cells per gram of miso.

mois.:Moisture, W.S.N.:Water Soluble Nitrogen,

F.N.:Formol Titrated Nitrogen,

R.S.:Reducing sugar, Alco:Etanol (mg/100g),

Aci. I:Acid I (Titrated acidity to pH 7.0),

Aci. II:Acid II (Titrated acidity from pH 7.0 to pH 8.3).

母生育の環境が影響し、味噌のような高濃度の還元糖と食塩がある場合にはpHが5.6以下になった時に始まると推測された。

1984年、Sasakiらは、醤油中のHEMFは醤油酵母によって生成されることを示唆し⁹⁵⁾、その後、1991年にはHEMFの酵母による生合成について報告した⁹⁶⁾。彼らは醤油麹から調製した基本培地に17%食塩と5%グルコースを添加し、pHを4.8に調製した後、各種の糖や糖のリン酸塩を添加して、醤油酵母を培養し、HEMFの前駆物質を検討した。その結果、D-ribulose 5-phosphate barium salt、D-xylulose 5-phosphate sodium saltとD-ribose 5-phosphate barium saltの混合物、D-sedoheptulose 7-phosphate barium saltのようなペントースリン酸回路の中間体となる化合物がHEMFの前駆物質として有効であることを確認し、Fig. VII-1に示したようにHEMFはペントースリン酸回路をとおして生成されることを報告した。味噌においても、Fig. VII-1に示された経路でHEMFが形成されると想定された。この際の酵母によるHEMF形成は前駆物質になりうる還元糖が蓄積し、pHが5.6以下になった時に始まると推測された。

第5節 大豆発酵食品と清酒の香気組成の比較

日本古来の伝統的な醸造酒である清酒の香気成分に関しては多数の報告¹⁰⁴⁾⁻¹⁰⁷⁾があり、多種多様のアルコール類やエステル類が存在することが知られているが、まだ発見されていない香気成分も数多くあるものと考えられている¹⁰⁶⁾。

一方、1991年、Sasakiらは酵母によるHEMFの生合成に関する論文を発表し、味噌や醤油の製造に共通して使用される、Zygosaccharomyces属はもちろん、他のCandida属やSaccharomyces属などの酵母も発酵条件によってはHEMFを生合成することを確認した⁹⁶⁾。ところで、清酒は蒸煮した精白米を米麹の酵素で糖化しながら、同時に清酒酵母Saccharomyces cerevisiaeによるアルコール発酵を営ませ、もろみをろ過したもの⁹⁷⁾で、大豆を用いてはいないが、酵母を用いてエタノールや香気成分を形成する点で、その発酵過程は味噌や醤油と類似している。そこで、本節では、初めに清酒の香気成分としてのHEMFの有無を検討した。

清酒の香気濃縮物の調製には、味噌の香気成分検索に有効であったカラム濃縮

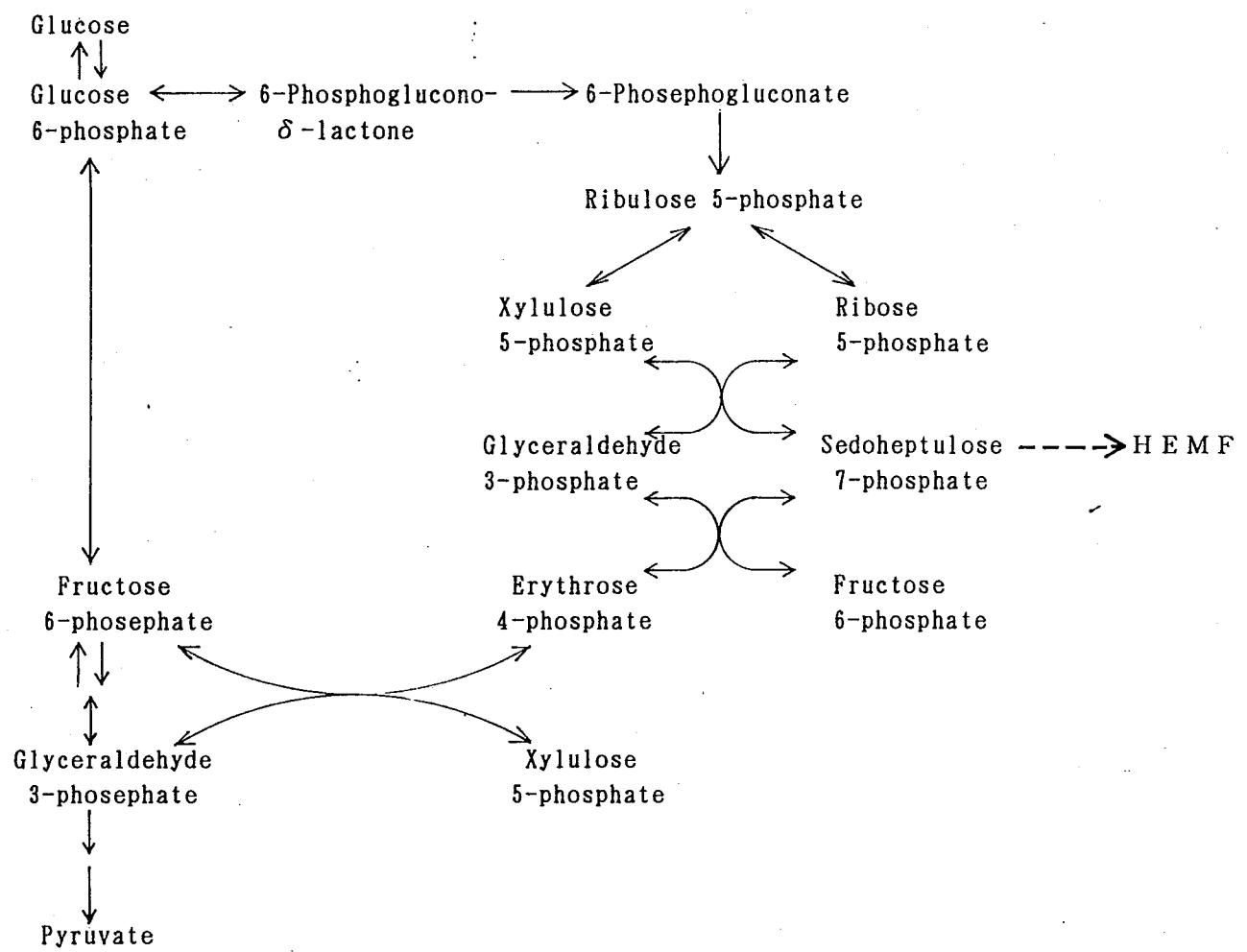


Fig. VII-1 ペントースリン酸回路と H E M F 形成

法を用いた。通常、清酒の香気成分の分離濃縮には溶媒抽出法、ヘッドスペース法が用いられてきたが、清酒に含まれる多量のエタノールが多種類の香気成分の分析を困難にしていた。カラム濃縮法ではエタノールの抽出が極力抑えられ、特に低沸点成分の分析が効果的に行われることが報告されている¹⁰⁷⁾。

このようにして調製された清酒の香気濃縮物を分析するとともに、シリカゲルカラムクロマトグラフィによる分画やマスクロ処理も行って詳細に H E M F を検索した。これによって、H E M F が味噌や醤油の大豆発酵食品の特有香気成分であることをより明確にすることを試みた。さらに、清酒と大豆発酵食品の製造条件を比較し、酵母による H E M F 形成のために必要な条件について考察した。

1 実験方法

1) 試料

清酒は岩手県盛岡市内の酒造所で、1991年に精米歩合60%のササニシキから醸造された純米酒で、火入れ前のものを試料として提供いただいた。

2) 香気濃縮物の調製

清酒の香気成分の濃度を測定するため、清酒200mlを精製したTenax GC 0.6gを充填した内径1cmのガラスカラムに流し、香気成分を吸着させた。エーテルで脱着し、内部標準物質を添加し、脱水後、濃縮して香気濃縮物を得た。詳細は第V章第5節と同様である。

さらに香気成分を詳細に検討するために、カラムクロマトグラフィによる分画を行った。清酒600mlをTenaxGC 1.5gを充填したカラムに流し、香気成分を吸着させ、エーテルで脱着させる方法で香気濃縮物を調製した。これを4回繰り返してあわせて2400mlの清酒を処理した。得られた香気濃縮物をシリカゲル（ワコーゲルC300）10gを充填したカラム（内径1cm×高さ26cm）に吸着させ、Table VII-5に示したような割合でペンタンとエーテルを流すことによって5つに分画した。これを常法に従って濃縮し、分画された香気濃縮物を得た。

3) 香気濃縮物の分離同定

清酒から得られた香気濃縮物及び、その分画された香気濃縮物はG C、及びG C-M Sを用いて分析した。ピーク面積計算は島津クロマトパック C-R 6 Aによった。各香気成分の濃度は内部標準物質とのピーク面積比から算出した。化合

Table VII-5 清酒から得られた香気濃縮物の分画

Fr.	Solvent Pentane:Ether	Vol.	香気特性
1	100:0	150	アルコール様、果実様
2	9:1	150	清酒様
3	8:2	150	弱いが甘い香り
4	1:1	150	化粧品様
5	0:100	150	カラメル様の甘い香り

物の同定は文献値のマススペクトルデータおよび標準物質とのGCの保持時間の一一致によった。GC分析用カラムはPEG20M系のFS-WCOTを用い、MSはEI法、データ処理は全てコンピューターによった。詳細な分析条件はTable V-3に示したとおりである。

2 結果及び考察

1) 清酒香気成分としてのHEMFの確認

清酒より得られた香気濃縮物のガスクロマトグラムをFig. VII-2に示した。検出されたピークは50種あった。また、シリカゲルカラムクロマトによる分画のために、2400mlの清酒を処理して、0.24gの香気濃縮物を得た。収率は0.01%であった。シリカゲルカラムクロマトによって分画された香気濃縮物も詳細に分析して、清酒の香気成分の同定を行い、30成分を同定、または推定し、Table VII-6に示した。Table VII-6に示したピークNo.はFig. VII-2に対応している。

シリカゲルカラムクロマトグラフィで分画された香気濃縮物のGC-MS分析の際には、HEMFの特徴的なマスフラグメントである 142^+ によるマスクロ処理も行って詳細に検査したが、清酒香気成分としてHEMFの存在を確認することはできなかった。従って、HEMFは味噌、醤油の大発酵食品の特有香気成分であることがより明確となった。

Sasakiら⁹⁵⁾は、醤油麹から調製された基本培地に17%の食塩と5%のグルコース、及び前駆物質となりうるD-ribulose 5-phosphate barium salt、D-xylulose 5-phosphate sodium saltとD-ribose 5-phosphate barium saltの混合物、D-sedoheptulose 7-phosphate barium saltをそれぞれ2%添加し、清酒の醸造に用いられる酵母Saccharomyces属を培養すると、同条件での味噌や醤油に用いられるZ. rouxiiの培養と約同濃度のHEMFが形成されることを確認し、HEMFの生成には酵母の種類よりは酵母の培養条件が大きく影響すると報告している。

そこで、清酒と味噌、醤油の醸造条件の相違点を明らかにし、酵母によるHEMF形成のための条件を考察した。両者の醸造条件の大きな違いは塩分濃度にある。味噌の食塩濃度は約13%、醤油は約17%とどちらもかなり高いのに対し、清酒には食塩が存在せず、これがHEMF形成が行われない原因の一つと考えられる。また、味噌や醤油では熟成中に大豆タンパク質が分解されて各種のアミノ酸が生

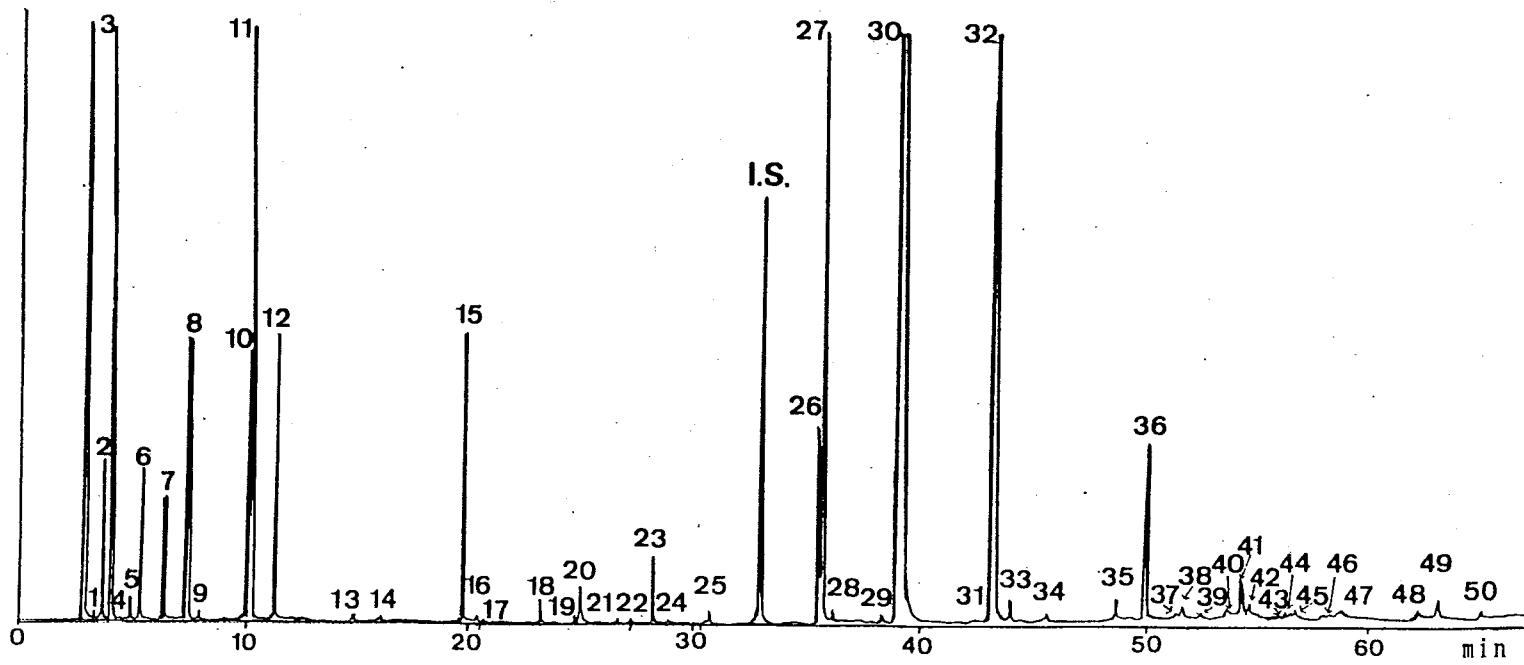


Fig. VII-2 清酒から得られた香氣濃縮物のガスクロマトグラム

Table VII-6 清酒の香気成分として同定された化合物

Peak No.	Compound	ppm
A. aliphatic alcohols		
3	ethanol	10.23
5	1-propanol	0.06
8	1-butanol	0.78
6	2-methyl-1-propanol	0.30
10	2-methyl-1-butanol	0.73
11	3-methyl-1-butanol	2.79
14	1-hexanol	+
17	1-heptanol	+
20	L-2, 3-butanediol	0.14
21	meso-2, 3-butanediol	+
22	1, 2-propanediol	+
B. esters		
1	ethyl formate	0.03
2	ethyl acetate	0.33
4	ethyl propanoate	+
12	ethyl hexanoate	0.82
15	ethyl octanoate	0.85
23	ethyl decanoate	0.17
26	ethyl 4-hydroxybutanoate	0.59
29	ethyl dodecanoate	+
38	ethyl octadecanoate	0.02
44	ethyl (Z)-9-octadecenoate	+
47	ethyl (Z, Z)-9, 12-octadeca dienoate	+
48	ethyl (Z, Z, Z)-9, 12, 15-octadecatrienoate	+
7	3-methyl-1-buthyl acetate	0.78
C. carbonyl compounds		
16	acetic acid	+
19	propanoic acid	+
28	hexanoic acid	0.02
32	octanoic acid	19.84
37	decanoic acid	+
43	dodecanoic acid	+
9	2-heptanone	0.02
13	3-hydroxy-2-butanone	+
24	r-butyrolactone	+
D. aromatic compounds		
18	benzaldehyde	0.11
27	2-phenyl-1-ethyl acetate	11.58
30	2-phenyl-1-ethanol	80.63
36	2-methoxy-4-vinylphenol	2.56
E. other compound		
25	5-ethoxythiazole*	0.06

+:trace

*:マススペクトルの一致により推定された化合物

成する。清酒においても蒸し米のタンパク質からアミノ酸が生成するが、その量は味噌や醤油に比較してかなり少量である。従って、清酒の酵母はいわゆる高糖、低窒素濃度の栄養状態にあり、これも H E M F 形成に影響を与えているものと推察される。さらに、当然のことながら清酒のエタノール濃度は最終的には 20%にもなるのに対し、味噌、醤油では 2-5%であり、これも酵母の生育環境に影響を与えているであろう。このような種々の醸造条件の差異の中で、どの条件が酵母による H E M F 形成に最も強い影響を与えるかを鮮明にすることによって、酵母による H E M F 形成機構をさらに明らかにすることができます。

2) 清酒と大豆発酵食品の香気組成の比較

清酒の香気成分として最も濃度の高かった成分はバラ様の芳香を呈する成分としてよく知られている 2-phenyl-1-ethanol であった。この成分は多くの醸造食品において発酵過程で酵母により生産され、増加することが知られている。しかし、この成分の味噌や醤油の大豆発酵食品での濃度は 1-10 ppm の範囲であり、清酒での濃度は 80.63 ppm とかなり高いことが判明した。また、バラやピーチ様の芳香成分として知られ、2-phenyl-1-ethanol の酢酸エステルである 2-phenyl-1-ethyl acetate の濃度も大豆発酵食品では痕跡程度しか検出されていないが、11.58 ppm と高かった。

さらに、発酵中に酵母によって生成され、貯蔵中に分解して桃様の芳香を示す *r*-butyrolactone に変化することが判明している、ethyl 4-hydroxybutyrate も同定された。この成分は味噌や醤油では検出されておらず、清酒に特徴的な成分であると推察された。また、果実様の芳香を持つ低級脂肪酸のエチルエステルの ethyl hexanoate、ethyl octanoate は味噌や醤油では痕跡程度しか検出されていないが、0.82 ppm、0.85 ppm であった。

その他の同定された多くの香気成分は味噌や醤油と共通する成分であった。

以上より、2-phenyl-1-ethanol、2-phenyl-1-ethyl acetate、ethyl 4-hydroxybutyrate 及び低級脂肪酸のエチルエステルである ethyl hexanoate、ethyl octanoate は大豆発酵食品よりかなり濃度が高く、清酒に特徴的な香気成分であると判断された。

第6節 要約

H E M F 濃度の低い米味噌へ実際に H E M F を添加し、無添加のものと官能検査で比較することによって、H E M F の米味噌香気への寄与を検討した。その結果、H E M F は味噌様香気を強める効果があり、極めて重要な香気成分であることが再確認された。

また、H E M F の味噌熟成期間中の形成や濃度の変化を、味噌の原料となる米麹と蒸煮大豆及び仕込直後から製品の味噌となる120日後までに30日間隔で5回、採取した試料を分析することによって検討した。H E M F は蒸煮大豆、米麹及び仕込直後には全く検出されなかつたが、30日後には2.31ppmになり、熟成中に形成されることが確認された。従ってH E M F は酵母が関与して生産され、味噌様の香気形成に重要な役割を持つと結論づけられた。熟成中に生成し、増加したH E M F 以外の香気成分は脂肪族アルコール4種、芳香族化合物5種、高級脂肪酸のエチルエステル5種と3-methylthiopropanol、5-methyl-2-furfuralであり、これらの成分も熟成中の味噌様の香気形成に関与していると判断された。

次に、味噌を仕込む際に酵母 Z. rouxii を添加したものとしないものを調製し、仕込直後から製品の味噌となるまでの各段階のH E M F の濃度の変化と酵母の増殖の関係について検討し、H E M F 形成への酵母の関与をより明確にすることを試みた。酵母添加の仕込後7日目の味噌は酵母の菌数が 1.6×10^6 cell/gであったにも関わらず、H E M F は検出されなかつた。酵母無添加の仕込後21日目の味噌では酵母の菌数は 2.2×10^3 cell/gでもH E M F は0.06ppm検出された。それぞれの味噌で、H E M F が形成された時のpHは5.57と5.59であった。これらの結果から、酵母 Z. rouxii によるH E M F 形成には酵母の増殖とあるいは酵母生育の環境が影響し、味噌のような高濃度の還元糖と食塩がある場合にはpHが5.6以下になった時に始まると推測された。

H E M F は味噌や醤油の製造に共通して使用される、酵母 Zygosaccharomyces 属はもちろん、Candida 属や Saccharomyces 属などによっても発酵条件によっては生合成されることが報告された。そこで味噌や醤油と同様に麹かびを用い、Saccharomyces 属の酵母による発酵をへて製造される清酒の香気の特徴を H E M F の有無を中心に検討した。清酒の香気濃縮物はカラム濃縮法によって調製し、こ

れを分析するとともに、シリカゲルカラムクロマトグラフィによる分画やマスクロ処理も行って詳細に H E M F を検策したが、清酒香氣成分としての存在は確認できず、H E M F は味噌や醤油の特有香氣成分であることがより鮮明となった。

第Ⅷ章 総括

日本では大豆を様々に加工し、大豆不快臭が感じられないだけではなく、より嗜好性の高い香りを付与することによっておいしく食べる工夫がなされてきた。そこで、本研究では日本で伝承されてきた各種大豆食品の香気成分の組成や、大豆の加熱、発酵等の加工における香気成分の変化を化学的分析によって明らかにすることを試みた。一連の研究によって、伝統的な大豆食品において、不快臭が感じられない理由を解明するとともに、より優れた嗜好性の高い香気が形成された要因について、特に微生物の働きに着目して探求した。

初めに、未熟種子を食品とした枝豆が完熟大豆になる過程での香気成分の変化を分析し、枝豆の独特の好ましい香氣を明らかにするとともに、成熟とともに大豆不快臭の形成を確認した。枝豆は完熟大豆とほぼ共通する香氣成分を持ち、豆らしい香氣を基礎とし、*cis-jasmone*をはじめとする、数種の特徴的な香氣成分が加わって、完熟大豆とは違った、さわやかな香氣特性を形成していることが判明した。また、大豆の未熟状態である枝豆でも大豆臭、青葉臭を持つ成分はすでに存在し、成熟に伴って*cis-jasmone*などの枝豆特有香氣成分が減少することが判明した。枝豆において検出された主な香氣成分はリノール酸や α -リノレイン酸を前駆物質とし、主に酵素的に形成されることが示唆された。また、枝豆の成熟に伴い、香氣形成に関わるこれらの酵素の活性が変化し、完熟大豆における大豆不快臭の形成につながることが示唆された。

次に、収穫直後の枝豆とこれを3ヶ月間冷凍保存したものの香氣組成を比較したところ、収穫直後の枝豆と、ブランチングして冷凍保存をした枝豆から検出された各香氣成分の濃度に大きな差はなかったが、ブランチングしないで冷凍保存した枝豆では大豆不快臭の原因物質の濃度が高く、香りに関する官能検査においても、有意に評価が低かった。これは枝豆中の脂質から脂肪酸酸化酵素や開裂酵素等の作用で、大豆不快臭成分が生成したためと推測される。従って、枝豆の冷凍保存でのブランチングは枝豆本来の香り保持に効果的であることが判明した。枝豆香氣の成熟や冷凍保存による変化の過程から、大豆不快臭の基本的な性質やその形成のメカニズムが鮮明になった。

伝統的な大豆食品は完熟大豆を浸漬後、煮熟あるいは蒸煮して使用する場合が

多い。そこで、大豆を煮熟あるいは蒸煮した際の大豆不快臭の消長と加熱による香氣形成を検討した。大豆不快臭の中でも、青臭さの原因物質である hexanal、(E)-2-hexenal、1-hexanolは煮熟することにより、著しく減少または消失したが、2-pentylfuran、1-octen-3-olは長時間加熱しても存在していた。加熱によって急激に増加した成分は動物性の肉や魚介類の加熱香氣として知られている cis または trans-3,5-dimethyl-1,2,4-trithiolane、thialidineなどの含硫化合物であった。煮熟した大豆の香ばしいにおいには、加熱によって大量に形成された含硫化合物が関与していた。

次に、大豆を味噌や醤油、納豆に加工したときの香氣の変化を知る基礎資料とするため、原料となる蒸煮大豆から、ポーラスポリマーを用いて香氣成分を吸着し、エーテルで脱着する方法で香氣濃縮物を調製（カラム濃縮法）するとともに、SDE法でも香氣濃縮物を調製して、その香氣組成を比較検討した。大豆不快臭に寄与する成分は蒸煮大豆からも検出され、蒸煮によってもこれらの成分を完全に除去することはできないことが判明した。カラム濃縮法では甘いキャラメル様の香氣を持つ、加熱香氣の代表的な成分である maltol (3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one) が量的な主要成分であった。各種の香氣濃縮物の調製方法による maltol の回収率はカラム濃縮法では 48.0% であるのに対し、他の方法では約 0.1% であったことから、maltol はカラム濃縮法以外の他の方法では抽出されにくいと判断された。

また、大豆の不快味の原因物質であるサポニン B グループの新しく発表された構造は、アグリコンの C-22 位に DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) が結合している。DDMP はアグリコンから加水分解して脱離すると maltol になると推定された。そこで、サポニン B グループの水溶液を加熱し、カラム濃縮法で生成成分を回収し、分析したところ、maltol が確認された。蒸煮大豆に検出された maltol の前駆物質には大豆中の糖とサポニンの 2 つの可能性があることが示唆された。

納豆は食塩を用いずに、煮熟大豆を納豆菌によって発酵させた食品であり、独特の香氣を持ち、大豆の不快臭を感じさせない。そこで、納豆製造過程での大豆不快臭の消長と納豆の香氣形成への納豆菌の関与について検討した。大豆の青臭さの原因物質は納豆では検出されなかったが、2-pentylfuran、1-octen-3-ol は納

豆に加工されてもその存在が確認された。また、納豆では大豆を煮熟した時に生成する含硫化合物と多種類のピラジン化合物が同定された。ピラジン化合物は納豆製造中に納豆菌が関与して生成され、納豆の香気に大きく寄与し、納豆で豆臭を感じさせない、マスキング効果をはたしていると判断された。

そこで、納豆製造中における、納豆菌によるピラジン化合物の形成機構を探ることを目的として、納豆菌を納豆より単純な系で、液体培養を行うための培地組成の検討した。その結果、大豆煮熟液に1%グルコースと1%MSGを同時に添加した場合がより適していることが判明した。この培地を基本にし、窒素源としてMSGにかえて種々のアミノ酸を添加して納豆菌を培養し、納豆菌によるピラジン化合物生成へアミノ酸の影響について検討を進めた。さらに、培地組成のより明瞭な合成培地でも同様の検討をしたが、どちらの場合でも、添加したアミノ酸に対応するような特徴的な側鎖を持つピラジン化合物は確認されなかった。従って、納豆菌は糖やアミノ酸をさらに分解し、大量のアセトイソイシナミドや、アンモニアを生成し、ピラジン化合物はこれらを前駆物質として、主にメイエラード反応で化学的に形成される可能性が高いと判断された。

味噌は、特徴的な香りを持たない大豆、米、麦などの穀類から、麹かびのもつ種々の酵素を十分に活用させ、さらに酵母、乳酸菌などの他の微生物も協同させることによって製造される。そのため、香気組成は納豆に比較しても非常に複雑である。味噌は味とともに香りが重要な食品であるが、水溶液の均一の系である醤油と異なり、複雑な不均質系である味噌の香気に関しては、分析技術上の問題点も含めて不明な点が多くかった。そこで、初めに最も一般的な赤色辛口系米味噌を試料とし、味噌の香気解明に適した分離濃縮方法の検討を行った。SDE法で抽出溶媒をエーテルとジクロルメタンの2種を用いる方法、減圧蒸留法、カラム濃縮法の4法で得られた香気濃縮物の香気の再現性を官能検査で比較すると、カラム濃縮法が最も優れていた。また、カラム濃縮法では、4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone(HEMF)を含む5種の成分が味噌から初めて同定された。HEMFは本醸造醤油中で初めて同定された化合物で甘いキャラメル様の強烈な香りを持ち、閾値は0.04ppbよりも低く、本醸造醤油の特徴香を示す物質(Character Impact Compound)とされ、醤油以外の食品では検出されていなかった。以上の結果から、味噌の香気研究には香気の再現性がよく、加熱による香

気の変化がなく、しかも水あるいは水溶液中の共存成分の影響が少なく、HEMFを初めとする味噌の重要な香氣成分を効率よく回収できるカラム濃縮法が最も優れていると判断された。

ところで、味噌は、実際に消費者が食する場合はほとんどが味噌汁としてである。そこで、ヘッドスペース分析を行って、実際に味噌汁として食べる時に感じる香氣により近い状態での、典型的な米味噌、麦味噌、豆味噌の香氣特性の解明を試みた。しかし、各種味噌のヘッドスペースは極めて類似した組成になっていた。従って、ヘッドスペース分析では化学的に寄与の高い成分を特定し、各種味噌の官能的な香氣特性の差異を説明することは困難であった。そこで、各種味噌の香氣特性をカラム濃縮法で検討し、さらに味噌と醤油の香氣組成の類似点と相違点の解明を試みた。味噌の香氣成分として極めて重要であると示唆されたHEMFの濃度は、発酵型熟成に属している赤色系辛口米味噌と麦味噌で高かった。従って、HEMFは発酵型熟成味噌の特徴的な香氣成分であり、醤油同様、酵母の活動によって形成されることが示唆された。さらに醤油の特香成分の一つとされ、醤油中に1-3ppm含まれると品質的に明確な優位性があるといわれている4-ethyl-2-methoxyphenolは、米味噌では検出されず、麦味噌と豆味噌で同定されたことから、豆味噌、麦味噌を特徴づける重要な成分であると判断された。各種味噌、醤油の原料と製造工程から、これらの香氣の特徴を最もよく説明できる成分はHEMFと4-ethyl-2-methoxy-phenolであり、その組み合わせと濃度が各種味噌と醤油の香氣特性を大きく左右すると判断された。

味噌香氣の評価の基準を明らかにするために、一般消費者をパネルとして香氣特性の異なる4点の味噌について官能検査を実施し、彼らの味噌の香りの嗜好傾向と評価の観点を検討した。さらに、これらの味噌の香氣組成を検討し、味噌香氣の評価に関する重要な成分を明らかにした。米味噌では甘い香りは好ましさの重要な要素であり、これにHEMFが最も寄与していると判断された。さらに、米味噌では、香りのソフトなものを好ましいとするグループと、香りの強いものを好ましいとするグループがあり、この香りの強さには低級脂肪族のアルコール類やそのエステル類及び3-methylthiopropanolの濃度が関与していた。豆味噌は刺激臭が強いという理由で好まれなかつたが、揮発酸の濃度が高いことが主な原因であった。

また、味噌は同じ種類であっても、様々な品質のものが製造される。そこで、最も一般的な赤色辛口系米味噌の品質と香気成分の関係について、味噌製造に関する専門家によって、香りについて官能評価された、異なる品質の多数の味噌を試料とし、各香気成分の濃度と官能評価点の統計的な解析を行うことによって考察した。

初めに、米味噌34点から得られた香気濃縮物をG C分析し、検出された101ピークの濃度と官能評価点について相関を求めた。特に高い相関を示した化合物はmalto1とHEMFで、malto1の濃度は増加すると官能評価が低下し、HEMFの濃度は増加すると官能評価が高くなることが判明した。さらに、遂次変数選択法による重回帰分析を行って、米味噌の香りの品質を予測する方法について検討したところ、ステップ7で選択された7成分で官能評価の80%を説明することができることが判明した。実際の官能評価点とステップ7での重回帰式によって予測された点数は非常によく一致し、この重回帰式は官能検査に応用できると判断された。

さらに香りについて官能評価によって3段階にランク分けされた48点の米味噌から香気濃縮物を得、G C分析した。検出された92成分の濃度とクラス分けの関係についてt検定で検討したところ、HEMFの濃度は低位のクラスで明らかに低く、高位と中位のクラスでは濃度に有意な差がなかった。従って、米味噌の評価を高めるHEMFはある一定の濃度、存在すればよいことが示唆された。次にクラスわけに有効なピークを遂次変数選択法による判別分析を行い、検討したところ、ステップ1ではHEMFが選択され、クラスの識別には最も有効な成分であることが判明した。また、この方法で選択された14成分で全変動の76%が説明でき、この14成分を用いて正準判別分析を行い、各成分の正準判別係数を求めた。これを用いることによって3クラスを完全に判別できることが判明した。

以上の結果から、HEMFは発酵型熟成味噌の重要な香気成分であり、香気の品質に大きな影響を与えることが統計的な解析からも判明した。そこで、実際にHEMF濃度の低い米味噌へ一定量のHEMFを添加し、無添加のものと官能検査で比較した。その結果、HEMFを添加すると味噌様の香氣を強める効果があり、米味噌の香気にとてHEMFは極めて重要な成分であることが再確認された。

次に H E M F の熟成期間中の形成や濃度の変化を、味噌の原料となる米麹と蒸煮大豆及び仕込直後から製品となる各段階の味噌を試料として検討した。H E M F は蒸煮大豆、米麹及び仕込直後には全く検出されず、熟成中に形成することが確認された。従って、H E M F は酵母が関与して生産され、味噌様の香氣形成に重要な役割を持つと結論づけられた。

そこで、H E M F 形成への酵母の関与について、味噌を仕込む際に酵母 Zygosaccharomyces rouxii を添加したものとしないものを調製し、仕込直後から製品になるまでの各段階の味噌熟成中の H E M F 濃度の変化と、酵母の増殖状態を測定することによって考察した。その結果、酵母 Z. rouxii による H E M F 形成には酵母の増殖とあるいは酵母生育の環境が影響し、味噌のような高濃度の還元糖と食塩がある場合には pH が 5.6 以下になった時に始まると推測された。

一方、H E M F は、味噌や醤油の製造に共通して使用される、酵母 Zygosaccharomyces 属はもちろん、Candida 属や Saccharomyces 属などによっても発酵条件では生合成されることが報告された。そこで味噌や醤油と同様に麹かびを用い、Saccharomyces 属の酵母による発酵をへて製造される清酒の香氣の特徴を H E M F の有無を中心に検討した。清酒の香氣濃縮物はシリカゲルカラムクロマトによる分画等も行って詳細に検策したが、清酒香氣成分としての H E M F の存在は確認できず、H E M F は味噌や醤油の大豆発酵食品の特有香氣成分であることがより鮮明になった。

以上の結果から、大豆を食品として有效地に利用するための短所である大豆不快臭の加工による変化が明かとなった。また、納豆、味噌、醤油の大豆発酵食品では、より好ましい香氣の形成に納豆菌、酵母等の微生物が重要な役割をはたしていることが確認された。大豆加工への微生物の効果的な利用が大豆の食品としての価値の向上に貢献すると結論づけられた。

Chemical Analysis of Aroma Components
Produced During the Processing of Soybeans

Soybeans have been widely utilized as a food material. However, the green-grassy and beany odors limit the development of new food items. A number of investigators have reported on the volatile flavor compounds identified in soybeans, and key compounds of the characteristic soybean flavor have been confirmed. But an effective procedure to eliminate the objectionable flavor of soybeans has not been established.

In our country, there are various kinds of traditional foods made from whole soybean and soybean protein, among which natto, miso (fermented soybean paste) and shoyu (soy sauce) are the more notable products because they are made through fermentation of cooked soybeans, and they do not have the characteristic soybean odor. It is expected that investigation of the aroma components of the foods produced from fermented soybeans will not only result in the identification of the characteristic aroma compounds, but will also suggest some effective method to eliminate or at least mask the unfavorable odor of soybeans.

(1) The characteristic aroma concentrate prepared from immature green soybeans (edamame) with the method of simultaneous distillation and extraction system (SDE) was analyzed by gas chromatography (GC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results were compared with those of ripe soybeans. Hexanal, 1-hexanol, (E)-2-hexenal, 1-octen-3-ol and 2-pentylfuran, responsible for the beany flavor in soybeans, were identified in green soybeans. Four components containing cis-jasmone that were not identified in ripe soybeans were identified in green soybeans, and moreover, cis-jasmone was not found in the aroma concentrate of green soybeans harvested at a late stage before they were mature. This suggests that cis-jasmone is one of the key compounds in the flavor of green soybeans.

The change of the characteristic odor of immature green soybeans during refrigeration was discussed. The odor concentrates were prepared with the SDE method from three groups. The first group was prepared immediately following harvesting. The second group was blanched and then refrigerated for 3 months. The third group was refrigerated for 3 months without being blanched. The concentrations of aroma components in green soybeans refrigerated after blanching were similar to those of the green soybeans immediately following harvesting. In the green soybeans refrigerated without blanching, the concentrations of 1-octen-3-ol, 1-hexanol, 1-hexanal and 2-pentylfuran contributing to the beany odor increased. In a sensory test, green soybeans refrigerated without blanching was evaluated as being inferior in flavor to those that had undergone blanching. These components possessing a beany odor were considered to be produced from lipid of green soybeans oxidized by lipoxygenase during an extended period of refrigeration.

(2) The odor concentrates obtained from soybeans with the SDE method cooked for 0-3, 3-5.5, and 5.5-8 hours were analyzed by GC and GC-MS. In the odor concentrates of the cooked soybeans, hexanal, (E)-2-hexenal, and 1-hexanol, which contribute to the green-grassy odor of soybeans, disappeared or decreased while the cooking was in progress. 2-pentylfuran and 1-octen-3-ol contributing to the beany odor remained even if the soybeans were cooked for 8 hours. The sulfur-containing compounds which were reported as the flavor components of cooked meat increased rapidly as the cooking continued further. This suggests that these sulfur-containing compounds contribute to the sweet and roasted flavor of the cooked soybeans which was not detected in the raw soybeans.

The odor concentrates were obtained from steamed soybeans used for production of miso by the methods of condensation with porous polymer column (PA) and SDE. The components contributing to the objectionable

flavor of soybeans were identified in the odor concentration of steamed soybeans. Maltol, with its sweet and caramel-like aroma, was identified in cooked soybeans as the main component by the PA method, although maltol was not detected in the concentrates prepared by the SDE method. The recovery of maltol by the PA method was 48.0%. The recovery of maltol by the SDE method was less than 0.1%. Maltol was confirmed to be a component of the aroma concentrate of the steamed soybeans.

The new chemical structure of the group B saponin (BeA) in soybeans was reported. The compound attached to the oxygen at C-22 of aglycone in Bb saponin was 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (DDMP). DDMP was considered to change into maltol when DDMP was hydrolyzed and eliminated from aglycone. The components formed during heating of the saponin BeA solution were concentrated with the PA method. In the condensate, maltol was identified. The precursors of maltol in steamed soybeans were considered to be both sugar and saponin.

(3) Natto, a traditional Japanese food product, was prepared from cooked soybeans by fermentation with Bacillus natto. In spite of the fact that natto retains the original bean shape, the odor is completely different from that of raw or cooked soybeans. The odor of cooked soybeans was compared to that of natto in order to clarify the effect of the fermentation on the odor. The odor concentrates were obtained from home-made and commercial natto with SDE and were analyzed by GC and GC-MS. 2-pentylfuran and 1-octen-3-ol, contributing to the beany odor, remained even when the soybeans were fermented into natto. In odor concentrates of natto, pyrazines and sulfur-containing compounds were important contributors to the characteristic odor of natto. As the beany odor was not detected in natto, it was concluded that the pyrazines and sulfur-containing compounds caused the characteristic odor of natto and mask the beany odor.

Pyrazines are generally thought to be generated by heating sugar

and amino compounds, but those in natto were apparently formed during natto preparation with Bacillus natto. When Bacillus natto was cultured in extracts of cooked soybeans (basal medium), a trace of pyrazines was produced through cell-propagation, which progressed moderately. A considerable quantity of pyrazines was produced in culture with a basal medium containing both 1% glucose and 1% sodium glutamate.

Commercial Bacillus natto was cultured in the basal liquid media and in the chemically defined liquid media, both of which contained various amino acids as the nitrogen source, and effects of amino acids on the formation of pyrazines were examined. In both media, pyrazines which have a characteristic side chain corresponding to the amino acid present in the media were not detected. This suggests that Bacillus natto decomposed amino acid and formed acetoin, the compounds relating to acetoin, and ammonia. The pyrazine compounds were thought to be produced from these components by amino-carbonyl reaction.

(5) Miso is fermented soybean paste with salt added. It is produced by Aspergillus oryzae, yeast, and lactic acid bacterium from soybeans and rice (or barley). The composition of aroma components in miso is more complicated than that in natto. The aroma is very important to the quality of miso. As miso is a complicated and heterogeneous system, the studies on the aroma of miso present many problems in terms of analytical techniques.

In previous investigations, aroma concentrates of miso have been prepared by the conventional methods of distillation and more than 200 compounds have been identified as the flavor components of miso. While these compounds have been identified in other foods, the characteristic compounds of miso have not been yet identified. The preparation methods used for extraction of aroma concentrated from miso--vacuum distillation (VE), SDE, and PA--were compared. The aroma concentrates extracted by PA had a strong, heavy and sweet miso-like aroma and closely resembled

the original aroma in sensory evaluations. The concentrates were analyzed by GC and GC-MS. The components identified by GC and GC-MS were almost the same via the SDE and VE methods, but PA results were different. Five components containing 4-hydroxy-2 (or 5)-ethyl-5 (or 2)-methyl-3 (2H)-furanone (HEMF) were identified by PA for the first time as aroma constituents of miso. HEMF, with an intense sweet aroma, is known as the characteristic aroma compound of shoyu, and has not been identified in other foods. HEMF is considered to be the most important flavor compound of miso, too. PA was considered to be an efficient method to study the aroma of miso.

In general, miso is eaten in soup. In consideration of the similarity of the head spaces of miso to the aroma of miso soup, the head spaces of the three kinds of miso, rice-miso (komemiso), barley-miso (mugimiso), and soybean-miso (mamemiso), were subjected to GC and GC-MS analysis. The analysis showed that the compositions of aroma components in head spaces were similar in these three kinds. It was therefore concluded that it was difficult to use the head space analysis to clarify the characteristic aroma of the three kinds of miso.

The compositions of aroma components in the three kinds of miso were clarified by comparison of the aroma concentrates prepared by the PA method. In addition, the influences on the aroma formation by the materials and the processing were discussed. The concentrations of HEMF were higher in red salty rice miso (sekishoku-karakuchikei komemiso) and barley miso (mugimiso) both belonging to the group of miso which is aged after fermentation. This suggests that HEMF was formed by action of yeast. 4-ethyl-2-methoxyphenol, which was one of the characteristic aroma components in shoyu, and which had been reported to definitely improve the qualities of aroma on the condensation of 1-3 ppm in shoyu, was not detected in rice-miso, but was identified in barley-miso and soybean-miso. Thus, 4-ethyl-2-methoxyphenol was found to be an

important aroma component of barley-miso and soybean-miso.

The aroma characteristics of various kinds of miso and shoyu with regard to materials and processing were explained by the combination and concentration of HEMF and 4-ethyl-2-methoxyphenol.

(6) A standard of sensory evaluation of aroma of miso has not been established because miso has many varieties, each having their own characteristic aroma. The sensory evaluation on the palatability of aroma in the four varieties of miso was carried out by a panel of female students. The aroma concentrates of the same samples were prepared by the PA and SDE methods and then subjected to GC and GC-MS analysis. The standard of the sensory evaluation on the palatability of aroma of miso was discussed on the basis of the results and the important components of aroma of miso were clarified. The sweet aroma was important for palatability of rice-miso. HEMF was thought to contribute to the sweet aroma of rice-miso. The acidic flavor in soybean-miso was evaluated as unfavorable. This suggests that the large quantity of volatile acids in the aroma concentrates of soybean-miso contributed to the acidic flavor.

The relationships between concentrations of aroma components and the sensory evaluation of rice-miso were analyzed by statistical analyses. Aroma concentrates were prepared by the PA method from 34 rice-miso samples which were exhibited at the National Miso Competition, and were evaluated by the sensory test. The concentrations of the 101 peaks detected by GC were used as variables for statistical analyses. Compounds having a higher correlation coefficient between the variables and sensory scores were maltol and HEMF. These results indicated that the increase of maltol concentration deteriorated sensory evaluation of the aroma of rice-miso, whereas HEMF contributed remarkably to improving sensory evaluation. 80% of the variability of sensory evaluation could be explained by seven peaks selected by the stepwise multiple

regression analysis of 34 major peaks. This suggests that the multiple regression model calculated at step 7 can be applied to the sensory evaluation of the aroma of rice-miso in the National Miso Competition.

Aroma concentrates of 48 rice-miso samples, which were exhibited at the National Miso Competition, and which were evaluated and classified into three classes by the sensory test, were prepared by the PA method. The concentrations of the 92 peaks detected by GC were used as variables for statistical analysis. The relationship between concentrations of 92 peaks and classification was determined by a t test. The concentration of HEMF was almost the same in superior and middle classes of miso, but was apparently lower in inferior classes. Using the stepwise discriminant analysis of 46 major peaks, HEMF also was selected by step 1 and evaluated as the most significant contributing compound in the classification. 76% of the variability could be explained by 14 peaks selected by the stepwise discriminant analysis. Using the 14 peaks as variables, all rice-miso were correctly classified into three classes by canonical discriminant analysis.

(7) When HEMF was added to miso suspension of lower HEMF concentration, this suspension was evaluated as having a stronger miso-like aroma by the sensory test. From the results of chemical and statistical analyses, HEMF was confirmed to contribute remarkably to sensory evaluation of rice-miso.

HEMF was considered to be produced by yeasts during miso aging. The production of HEMF by yeasts was discussed by comparison of the aroma concentrates obtained from rice-mold (kome kouji), cooked soybeans, and miso at each stage of aging, by the PA method. HEMF was not identified in rice-mold, cooked soybeans, or miso immediately after preparation. HEMF was identified in miso 30 days after preparation, and increased gradually. HEMF was confirmed to be produced by yeasts.

The relationship between the formation of HEMF and the growth of

yeasts in miso was investigated, comparing miso to which precultured-yeasts (Zygosaccharomyces rouxii) were added with miso to which they were not added. In yeast-added miso, HEMF was not detected by the 7th day after the preparation although the number of yeast cells was 1.6×10^6 cell/g. In miso without yeast, 0.06 ppm HEMF was detected when the number of yeast cells was 2.2×10^3 cell/g. The pH levels when HEMF was detected in these misos were 5.57 and 5.59 respectively. These results suggest that in miso containing a high concentration of reducing sugar and NaCl, HEMF was produced when the pH level fell to less than 5.6.

HEMF was reported to be produced by Candida and Saccharomyces in addition to Zygosaccharomyces used in fermentation of miso and shoyu. The aroma compounds of sake produced by Saccharomyces were analyzed in detail. HEMF was not detectable as the aroma component of sake. HEMF was considered to be the characteristic aroma component of the food produced from fermented soybeans of miso and shoyu.

These results suggest how the change of the unfavorable odor of soybeans occurs during processing. The palatable flavor in the food produced from fermented soybeans such as miso, shoyu, and natto were shown to be produced by microorganisms (yeasts and Bacillus natto). The effective uses of microorganism in the processing of soybeans were confirmed as contributing factors in the improvement of the unfavorable odor of soybeans.

引用文献

- 1). 大久保一良：大豆の科学、山内文男他編（朝倉書店）、p. 14 (1992).
- 2). 吉田集而：アジアの無塩発酵食品、相田浩他編（S T E P）、p. 167 (1985).
- 3). 科学技術庁資源調査会編：四訂日本食品標準成分表 (1982).
- 4). 大久保一良：大豆の科学、山内文男他編（朝倉書店）、p. 69-74 (1992).
- 5). 大久保一良：大豆の科学、山内文男他編（朝倉書店）、p. 77 (1992).
- 6). 中尾佐助：料理の起源、（日本放送出版協会）、p. 123 (1972).
- 7). 百瀬洋夫：醸造の事典、野白喜久雄他編（朝倉書店）、p. 15 (1988).
- 8). 小泉武夫：発酵と食の文化、小崎道雄他編（ドメス出版）、p. 99 (1986).
- 9). L. R. Mattick and D. B. Hand: J. Agric. Food Chem., 17, 15 (1969).
- 10). A. F. Badenhop and W. F. Wilkens: J. Am. Oil Chem. Soc., 46, 179 (1969).
- 11). W. F. Wilkens and F. M. Lin: J. Agric. Food Chem., 18, 333 (1970).
- 12). I. H. Qvist and E. C. F. von Sydow: J. Agric. Food Chem., 22, 1077 (1974).
- 13). D. J. Sessa and J. J. Rackis: J. Am. Oil Chem. Soc., 54, 468 (1977).
- 14). O. A. -L. Hsieh, A. -S. Huang and S. S. Chang: J. Food Sci., 47, 16 (1981).
- 15). 喜多村啓介：農業技術、45, 297 (1989).
- 16). M. Hajika, K. Igita and K. Kitamura: Japan. J. Breed., 41, 507 (1991).
- 17). 乙坂ひで、佐原昊、大森輝、菅原悦子、大出京子：研究助成の報告1、（味の素食の文化センター）、p. 3-7 (1991).
- 18). 菅原悦子、伊東哲雄、小田切敏、久保田紀久枝、小林彰夫：農化、62, 149 (1988).
- 19). G. B. Nickerson and S. T. Linkens: J. Chromatogr., 21, 1 (1966).
- 20). T. Matoba, H. Hidaka, K. Kitamura, N. Kaizuma and M. Kito: J. Agr. Food Chem., 33, 856 (1985).
- 21). M. Wurzenberger and W. Grosch: Biochem. Biophys. Acta., 795, 163 (1984).
- 22). A. Hatanaka, T. Kajiwara and J. Sekiya: Phytochemistry, 15, 1125 (1976).
- 23). B. A. Vick and D. C. Zimmerman: Plant Physiol., 75, 458 (1984).
- 24). 篠島豊：日食工誌、36, 609 (1989).
- 25). 菅原悦子：盛岡短大研究報告、35, 45 (1984).
- 26). E. Sugawara, T. Ito, S. Odagiri, K. Kubota and A. Kobayashi: Agric. Biol.

- Chem.、49、311 (1985).
- 27). C. Hirai、K. O. Herz、J. Pokorny and S. S. Chang: J. Food Sci.、38、393 (1972).
- 28). R. A. Wilson、C. J. Mussinan、I. Katzu and A. Sanderson: J. Agric. Food Chem.、21、873 (1973).
- 29). L. N. Nixon、W. Edomon、C. B. Johnson and E. J. Brich: J. Agric. Food Chem.、27、355 (1979).
- 30). R. J. Horvat: J. Agric. Food Chem.、24、953 (1976).
- 31). 久保田紀久枝、小林彰夫、山西貞: 農化、56、1049 (1982).
- 32). K. Kubota、A. Kobayashi and T. Yamanishi: Agric. Biol. Chem.、44、2677 (1980).
- 33). 小林彰夫、久保田紀久枝: 調理科学、22、156 (1989).
- 34). M. Shiraiwa、K. Harada and K. Okubo: Agric. Biol. Chem.、55、911 (1991).
- 35). S. Kudou、M. Tonomura、C. Tsukamoto、M. Simoyamada、T. Uchida and K. Okubo: Biosci. Biotech. Biochem.、56、142 (1992).
- 36). 工藤重光、打田悌治、大久保一良: 醸協、87、29 (1992)
- 37). 鶩野由紀、久保田紀久枝、小林彰夫: 家政誌、40、265 (1989).
- 38). L. Re、B. Maurer and G. Ohloff: Helv. Chim. Acta.、56、1883 (1973).
- 39). A. O. Pittet、P. Rittersbacher and R. Muralidhara: J. Agric. Food Chem.、18、929 (1970).
- 40). 太田輝夫: 醸造の事典、野白喜久雄他編(朝倉書店)、p. 528 (1988).
- 41). T. Ota: Report Food Institute、18、46 (1964).
- 42). 平春枝: 栄養と食糧、17、248 (1964).
- 43). 小幡弥太郎、俣野景典: 農化、33、567 596 (1959).
- 44). 小菅卓夫、神谷弘子、足立太手: 薬学雑誌、84、451 (1962).
- 45). 笠原賀代子: 栄養と食糧、31、171 (1978).
- 46). 菅野彰重、高松晴樹、高野伸子: 日食工誌、31、587 (1984).
- 47). T. Tugita、T. Imai、Y. Doi、T. Kurata and H. Kato: Agric. Biol. Chem.、43、1351 (1979).
- 48). Y. Doi、T. Tugita、T. Kurata and H. Kato: Agric. Biol. Chem.、44、1043 (1980).
- 49). D. G. Guadagni、R. G. Buttery and J. G. Turnbaugh: J. Sci. Food Agric.、23、

- 1435 (1972).
- 50). G. P. Rizzi: J. Agric. Food Chem.、20、1081 (1972).
- 51). P. E. Koehler, M. E. Mason and G. V. Odell: J. Food Sci.、36、816 (1971).
- 52). R. Liardon and S. Ledermann: Z. Lebensm. Forsch.、170、208 (1980).
- 53). 伊東哲雄、菅原悦子、櫻井米吉、武山進一、内澤秀光、小田切 敏: 農化、61、963 (1987).
- 54). T. Kosuge and H. Kamiyama: Nature、193、776 (1962).
- 55). A. Miller, R. A. Scanlan, J. S. Lee, L. M. Libbey and M. E. Morgan: Appl. Microbiol.、25、257 (1972).
- 56). 小菅卓夫、杉山清: 天然有機化合物討論会要旨集、21、191 (1978).
- 57). 伊東哲雄、菅原悦子、宮ノ原順一、櫻井米吉、小田切 敏: 日食工誌、36、762 (1989).
- 58). W. Balts and G. Bochmann: J. Agric. Food Chem.、35、340 (1987).
- 59). G. P. Rizzi: J. Agric. Food Chem.、36、34 (1988).
- 60). 菅原悦子、伊東哲雄、米倉裕一、櫻井米吉、小田切 敏: 日食工誌、37、520 (1990).
- 61). 藤井久雄: 農化、37、615 (1963).
- 62). A. L. Demain, M. Jackson and N. R. Trenner: J. Bacteriol.、94、323 (1967).
- 63). 柳田友道: バイオの源流、(学会出版センター)、p. 159-165 (1987).
- 64). 好井久雄: 醸造の事典、野白喜久雄他編(朝倉書店)、p. 441-459 (1988).
- 65). 海老根英雄: 醸協、85、70 (1990).
- 66). N. Nunomura, M. Sasaki and T. Yokotuka: Agric. Biol. Chem.、43、1361 (1979).
- 67). 横塚保、佐々木正興、布村伸武、浅尾保夫: 醸協、75、516 717 (1980).
- 68). 水沼武二: 醸造の事典、野白喜久雄他編(朝倉書店)、p. 398-434 (1988).
- 69). 本間伸夫、渋谷歌子、石原和夫、岡田玲子: 家政誌、24、259 (1973).
- 70). 岩淵せつ子、柴崎一雄: 日食工誌、20、48 (1973).
- 71). 安平仁美: 醸協、75、506 (1980).
- 72). 森 隆、木内 幹: 醸協、80、274 (1985).
- 73). 本間伸夫: 醸協、82、471 547 (1987).
- 74). 下田満哉、平野好司、篠島豊: 分化、36、792 (1987).
- 75). 今井誠一: 新潟食品研究所研究報告特別号、P40 (1984).

- 76). 菅原悦子、伊東哲雄、小田切敏、久保田紀久枝、小林彰夫：農化、64、171 (1990).
- 77). 菅原悦子：日食工誌、38、491 (1991).
- 78). 菅原悦子：醸協、86、411 (1991).
- 79). N.Nunomura、M.Sasaki、Y.Asao and T.Yokotuka: Agric.Biol.Chem.、40、491 (1976).
- 80). B.D.Kirk:Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy、Ailantic City (1987).
- 81). S.Nitz and E.Julich: Analysis of Volatiles、P.Schreier ed. (Walter de Gruyter & Co.、Berlin、New York)、p151 (1984).
- 82). 杉沢博、中本英喜、楊栄華、田村啓敏：日食工誌、39、726 (1992).
- 83). T.Aishima: J.Food Sci.、46、1562 (1982).
- 84). T.Aishima: J.Food Sci.、43、1935 (1979).
- 85). 相島鐵郎：化学と生物、20、460 (1982).
- 86). 相島鐵郎：農化、57、235 (1983).
- 87). K.Wada、S.Ohgama、M.Shinmoda and Y.Osajima: Agric. Biol. Chem.、51、1745 (1987).
- 88). 和田浩二、田中慶教、下田満哉、大釜清一、筈島豊：日食工誌、63、1485 1493 (1989).
- 89). 菅原悦子：家政誌、43、635 (1992).
- 90). Y.Mori、K.Kiuchi and H.Tabei: Agric.Biol.Chem.、47、1487 (1983).
- 91). 広木恵美子、藤波博子、島崎寿賀子、綾部浩太郎、海老根英雄：味噌の科学と技術、39、382 (1991).
- 92). 工藤重光、打田悌治、尾島聰、大久保一良、藤波博子、海老根英雄：日食工誌、37、786 (1990).
- 93). 菅原悦子、雜賀優、小林彰夫：日食工誌、39、1098 (1992).
- 94). 島崎寿賀子、藤波博子、広木恵美子、綾部浩太郎、海老根英雄：味噌の科学と技術、38、322 (1990).
- 95). M.Sasaki、N.Nunomura and N.Mori:Proc. Annu. Meet. Agric. Chem. Soc. Jpn.、130 (1984).
- 96). M.Sasaki、N.Nunomura and T.Matsudo: J.Agric.Food Chem.、39、934 (1991).

- 97). 中村欽一：醸造の事典、野白喜久雄他編（朝倉書店）、p. 204-222 (1988).
- 98). A. Nagahara, H. Benjamin, J. Storkson, J. Krewson, K. Sheng, W. Liu and M. W. Pariza: CANCER RESEARCH, 52, 1754 (1992).
- 99). 菅原悦子：日食工誌、38、1093 (1991).
- 100). 吉沢淑：醸協、61、481 485 (1966).
- 101). T. Tugita, T. Kurata and M. Fujimaki: Agric. Biol. Chem., 42, 643 (1978).
- 102). 吉沢淑：醸協、61、824 (1966).
- 103). 吉沢淑：醸協、61、629 (1966).
- 104). 吉沢淑：醸協、75、451 (1980).
- 105). 布川弥太郎、高橋康次郎：新版醸造成分一覧、日本醸造協会編（日本醸造協会）、p. 51-57 (1977).
- 106). 秋田修、蓮尾徹夫、原昌道、吉沢淑：発酵工学、66、149 (1988).
- 107). 橋本宏司、下田満哉、筈島豊：日食工誌、67、685 (1993).

謝辞

本研究の遂行にあたり、御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りましたお茶の水女子大学生活科学部小林彰夫教授に心から謝意を表します。また、御助言と御鞭撻を賜りました生活科学部久保田紀久枝助教授に深く感謝の意を表します。

本研究の実施にあたり、有益な御助言と御指導を賜りました岩手大学農学部、伊東哲雄教授、櫻井米吉教授、雜賀優助教授、小田切敏名誉教授、小野伴忠助教授、東北大学農学部大久保一良教授、岩手大学教育学部及川桂子教授、赤澤典子教授、岩手県立盛岡短期大学大森輝名誉教授に深く感謝いたします。

また、本研究に用いました試料を御提供いただきますとともに、本研究に御協力下さいました仙台味噌醤油株式会社ならびに同研究部、橋本俊二氏、遠藤勝氏、太子食品株式会社ならびに同研究部、斎藤修氏、株式会社あさ開ならびに同生産部佐藤智博氏に心から感謝いたします。

また、本研究に試料を御提供下さいますとともに有益な御助言を賜りました中央味噌研究所所長海老根英雄氏、新潟食品研究所松本伊左尾氏、今井誠一氏に深く感謝いたします。

本研究に御協力下さいました、岩手大学教育学部家政科卒業生、鷹木てる子さん、高橋解子さん、小松由美子さん、高橋美菜子さん、荒川薰子さん、大山陽子さん、熊谷尚子さん、藤根美由紀さん、佐藤敏枝さん、日戸久美子さん、大友志磨子さん、長田由喜子さん、熊谷純子さん、岩手大学農学部農芸化学科卒業生、武山進一さん、内沢秀光さん、宮の原順一さん、米倉裕一さんに感謝いたします。