

# 味噌の香気成分としての含窒素および 含硫化合物と味噌酵母との関わり

(03680089)

平成3年度科学研究費補助金 (一般研究 C)

平成4年度科学研究費補助金 (一般研究 C継続)

平成5年度科学研究費補助金 (一般研究 C継続)

研究成果報告書

平成7年4月

研究代表者 石原和夫

(県立新潟女子短期大学)

(生活科学科食物栄養専攻助教授)

## は し が き

大豆を利用した日本古来の発酵調味料として味噌と醤油がある。醤油は今や世界の調味料と言われるが、味噌はその域までに達していない。その原因の一つとして香気の違いがあり、味噌の香気成分及びその生成メカニズムを解明することは重要な意義があると考え、種々検討し、報告してきた。

その結果、味噌の香気は、(1)原料に由来する香気成分、(2)原料の麹菌酵素の分解により生成される香気成分、(3)発酵微生物により生成される香気成分、(4)原料成分の化学的反応により生成される香気成分などから成立することが解り、更に、これら要因のうち、発酵微生物、特に耐塩性酵母の関与が不可欠であることなども解った。一方、化学的変化や反応により生じる香気成分には、アミノ酸と糖の反応により生じる含窒素化合物や含硫化合物などがある。これら両化合物は微量の存在ではあるが、感覚閾値が低く、特徴ある香気を有することから、重要な化合物群である。味噌原料中にタンパク質が格段に多いことから、含窒素化合物や含硫化合物の化学的な生成やこれら両化合物と味噌酵母との関わりあいなどを検討することは、味噌の香気生成メカニズムの解明を更に発展させることになると考え本研究を行なった。

### 研究組織

研究代表者： 石原 和夫 (県立新潟女子短期大学生活科学科食物栄養専攻助教授)

研究分担者： 本間 伸夫 (県立新潟女子短期大学生活科学科食物栄養専攻教授)

研究分担者： 内山 武夫 (新潟大学農学部教授)

## 研究経費

平成3年度	1800千円
平成4年度	200千円
平成5年度	100千円
計	2100千円

## 研究発表

## (1) 学会誌

- ア、発表者名： Kazuo Ishihara and Nobuo Honma  
 テーマ名： A Novel Device for the Headspace Trapping  
 of Volatiles: Studies with a Model Solu-  
 tion  
 学会誌名： Journal of Food Composition and Analysis  
 巻： 5  
 ページ： 139-145  
 年月日： 1992
- ロ、発表者名： 石原和夫・本間伸夫・内山武夫  
 テーマ名： 耐塩性酵母による揮発性含硫化合物の生成と減少  
 学会誌名： 日本生物工学会誌  
 「投稿中」

## (2) 口頭発表

- 発表者名： 石原和夫・本間伸夫・内山武夫  
 テーマ名： 香気成分としての含硫及び含窒素化合物に対する  
 味噌酵母の関与  
 学会名： 日本醸造学会  
 年月日： 平成4年9月11日

## 研究成果

### 1. 揮発性成分の捕集装置の組立とその分析法の確立

まず本研究を遂行するにあたって、揮発性成分の捕集装置の組立とその分析法の確立が必要であった。

揮発性成分の分析法には、試料から揮発する成分を直接分析する headspace volatiles(HSV)法、試料の減圧蒸留により揮発性成分を水とともに捕集する方法や、試料中の揮発性成分を有機溶媒で抽出する方法などがある。このうち HSV法で得られた揮発性成分は、人の嗅覚に作用する香気組成と極めて類似するので、官能検査との関連および香気成分の定量を目的とした場合、HSV法は他の方法よりもすぐれた方法である。しかし、HSV法は一般に濃度が低く、特にシリンジを用いる直接採取方法では捕集量が限られるため濃縮する必要があり、そのため著者ら独自の香気捕集装置を組み立てた。捕集剤として Tenax TA (2,6-diphenyl-*p*-phenyleneoxide polymer) を使用して、耐塩性酵母の培養液を始めとして、液状食品や水懸濁物とした食品の香気を定量的に分析するため、まずモデル溶液を用い、量的に再現精度の高い香気捕集条件について検討し報告した。<sup>1)</sup>

#### (1) 実験材料および方法

##### ア 試料溶液

実験に使用した揮発性化合物の種類と濃度を Table 1 に示した。なお、2,3-キシレノールは内部標準物質として選んだ化合物である。実験にはこれら化合物を ADVANTEC 東洋(株)製の Automatic water distillation apparatus で採取した高純水に溶解させ試料溶液とした。

##### イ headspace volatiles(HSV)の捕集

HSV捕集のため Fig.1 の装置を製作した。試料溶液 100mL (食塩 0 ~ 30g 含) を 250mL 容量のガス洗浄瓶(試料容器)に入れ、その試料容器に耐熱ガラス製ガス捕集管(Tenax TA管: 60~80 mesh の Tenax TA 100~300mg 含, 4mm i.d. X 17cm) を装備し、45°C の恒温槽中に設

Table 1. Volatile compounds solution.

GC peak no. <sup>a</sup>	Compound	$\mu\text{g}/100\text{ mL}$
1	Ethyl acetate	49
2	Ethanol	47
3	1-Propanol	57
4	2-Methyl-1-propanol	56
5	1-Butanol	51
6	3-Methyl-1-butanol	57
7	1-Hexanol	53
8	Benzyl alcohol	60
9	2-Phenylethanol	53
10	2,3-Xylenol	250

<sup>a</sup>Number refers to Fig. 2 and Fig. 4.

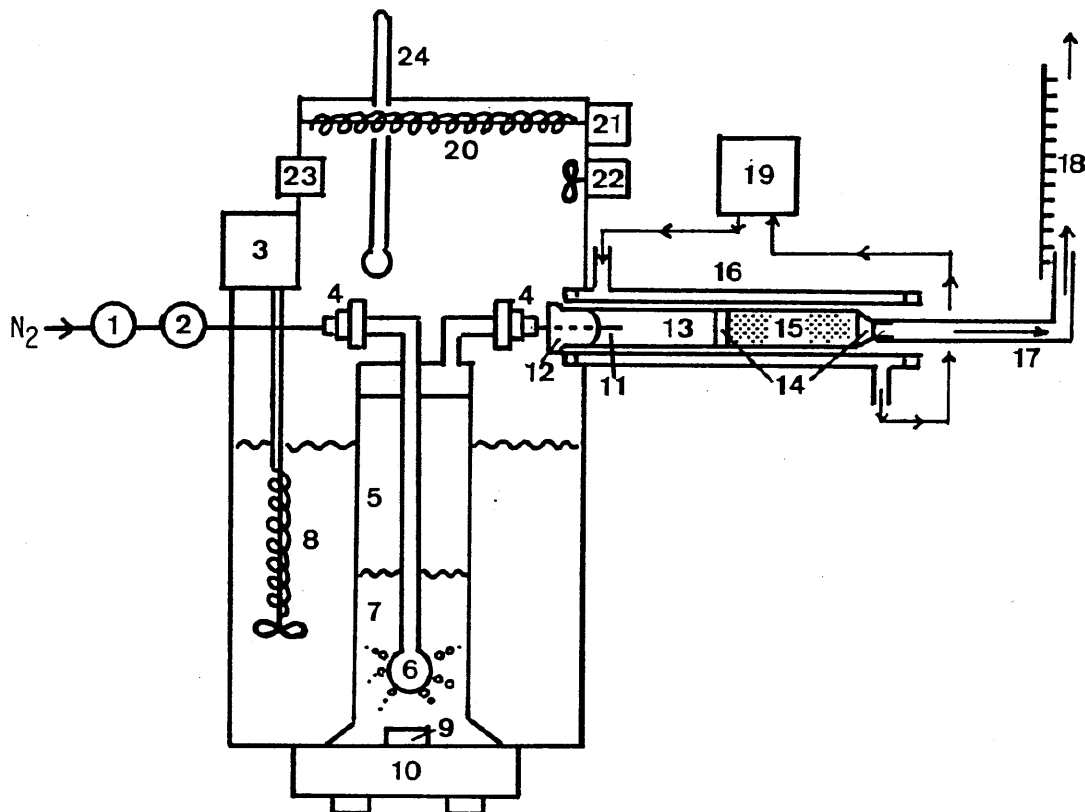


Fig. 1. Headspace volatiles trapping apparatus.

1, reducing valve; 2, needle valve; 3, automatic temperature regulator; 4, connector for different diameters; 5, gas washing bottle; 6, ball filter; 7, sample solution; 8, water bath made of plastic sheet; 9, magnetic stirring bar; 10, magnetic stirrer; 11, stainless side port needle; 12, GC injection rubber plug; 13, trapping column; 14, quartz wool; 15, Tenax TA; 16, glass heating tube; 17, rubber tubing; 18, flow meter; 19, constant temperature water circulator; 20, heating cable; 21, thermo-regulator; 22, air circulator; 23, rubber stopper; 24, thermometer.

置した。Tenax TA管を一定温度に保持するため恒温水を循環させたガラス製外套管(Fig.1 no.16)でTenax TA管部を包んだ。また、試料容器上端部も一定温度に保つため、ヒーティングケーブル付きの箱型の蓋で覆い、更に短時間のうちに所定の温度に到達するように、ゴム栓口(Fig.1 no.23)よりヘアードライヤーを使用して温風を送った。続いて、マグネチックスタラーを用いて試料溶液を攪拌しながら高純度窒素ガス(純度99.999%)1.5~4.5L(50mL/min)を通気することにより、試料溶液中のHSVを捕集した。以上のごとく、この装置の使用により、試料溶液部と試料容器上端部及びTenax TA管部の三箇所温度調節が可能になった。

#### ウ ガスクロマトグラフィー(GC)

GCはPEG 20Mに相当するShimadzu fused silica capillary column(CBP20-M25-025)を用いて、島津GC-4CPFにより行なった。Tenax TAに捕集されたHSVのGCカラムへの注入には捕集管加熱炉を備えた加熱導入装置(島津FLS-1)を用いた。また、ガスクロマトグラム及びピーク面積は島津クロマトパックC-R1Bを用いて、自動的に処理させ、積分感度 $1\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ を面積1 digitとして示した。その他の条件についてはFig.2に示した。HSV捕集及びGCは1実験につき、4回( $n=4$ )繰り返し、各化合物のピーク面積を推計学的処理により、変動係数 $CV = s/x \times 100$  ( $s$ :標準偏差,  $x$ :平均値)を求め、その再現精度を調べた。なお、HSV化合物のGC-MSによる同定は同一条件で行った標準物質のMSデータとの比較及び文献値をもとに行なった。

### (2) 実験結果および考察

#### ア HSVのガスクロマトグラム

試料溶液100mL(食塩10g含)を試料容器に入れ、恒温槽温度を $45^{\circ}\text{C}$ に調節し、試料容器上端部およびTenax TA管部の温度は無調節の室温(約 $20^{\circ}\text{C}$ )とした。ついで試料溶液中に高純度窒素ガスを50mL/minの流速で30分間通気し、試料溶液中のHSVをTenax TA 200mgに捕集した。加熱導入装置を使用して、Tenax TA管を $240^{\circ}\text{C}$ に加熱し、窒素ガスを65.7mL/minの流速で30秒間通気することにより、Tenax TAに捕集され

たHSVをGCカラムへ注入した。これらの条件下で得られたガスクロマトグラムが Fig.2 である。試料容器上端部及びTenax TA管部温度は試料溶液部よりも約25℃低いため、両部には試料溶液由来のかなりの水蒸気凝縮が認められた。凝縮水はそのまま加熱導入装置でGCカラムへ注入されることになる。このガスクロマトグラムでは、親水性化合物のエタノールのピークは小さく、ベンジルアルコール及び2-フェニルエタノールのピークは認められなかった。また、2,3-キシレノールのピークも小さく、しかも4回繰り返し実験のうち、2回は検出されなかった。

#### イ HSV捕集のための温度条件

試料溶液部を45℃の一定温度に保持し、試料溶液上端部及びTenax TA管部の温度を、室温（約20℃）、45℃及び50℃の三段階について検討した。各揮発性化合物のピーク面積の変動係数と平均値及びHSV捕集条件を Table 2 に示した。ベンジルアルコールと2-フェニルエタノールのピークは室温では認められなかったが、45℃または50℃に保持することにより、ピークの出現を認めた。室温の場合、試料溶液上端部及びTenax TA管部の温度が試料溶液部よりも低いため、両化合物が試料容器上端部に凝縮したと考えられる。これら温度条件のうち、香氣捕集装置の三部を45℃に統一した場合、ピーク面積の変動が比較的小さく、また、この温度条件下ではTenax TA管部における試料溶液由来の水蒸気凝縮はほとんど認められなかったもので、最適条件とした。これに対して、試料容器上端部50℃、Tenax TA管部45℃と温度差をつけた場合、ピーク面積の変動は小さかったが、Tenax TA管部への水蒸気凝縮が認められた。また、両部を50℃に統一した場合、水蒸気の凝縮は認められなかったものの、ピーク面積が比較的小さく出現した。これは、Tenax TA管部の温度を高く保持すると、Tenax TAに一担捕集された化合物のTenax TAからの離脱の割合が高くなるのではないかと考えた。なお、Shimoda, M.ら<sup>2)</sup>もエアバス（試料容器上端部及びTenax TA管部に相当）の温度を45℃以上にすると低沸点成分の回収率が低下すると報告している。この装置の各部の温度を個別に容易に調節



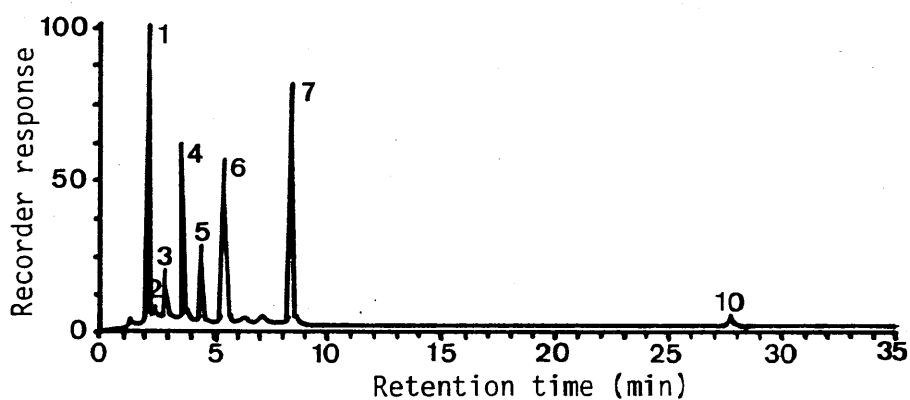


Fig. 2. Gas chromatogram of HSV of volatile compounds solution.

column, 25 m $\times$ 0.2 mm i.d. CBP20-M25-025 correspond to PEG 20M, programmed from 60°C to 200°C at 4°C/min; nitrogen carrier gas, 1mL/min flow rate, 50:1 split ratio; injector and detector(FID), maintained at 250°C. Peak number refer to Table 1. HSV collection conditions refer to A in Table 2.

Table 2. Comparison of statistical results for the reproducibility of GC analysis for headspace volatiles (HSV) collected under four different temperature conditions.

Compound	A		B		C		D	
	$\bar{d} \times 10^4$	CV <sup>e</sup>	$\times 10^4$	CV	$\times 10^4$	CV	$\times 10^4$	CV
	S <sup>a</sup> : 45°C, U <sup>b</sup> : Ca. 20°C, T <sup>c</sup> : Ca. 20°C.		S: 45°C, U: 45°C, T: 45°C.		S: 45°C, U: 50°C, T: 45°C.		S: 45°C, U: 50°C, T: 50°C.	
Ethyl acetate	7.76	10	10.39	9.1	10.31	9.8	6.54	18
Ethanol	0.10	40	0.43	40	0.87	107	1.05	94
1-Propanol	1.25	15	0.46	5.5	0.45	11	0.31	23
2-Methyl-1-propanol	4.11	14	3.97	18	4.12	16	2.38	16
1-Butanol	2.14	11	2.71	7.9	2.92	9.1	2.06	21
3-Methyl-1-butanol	5.00	7.7	6.62	4.6	7.21	9.6	6.47	29
1-Hexanol	5.14	8.4	6.74	5.5	7.28	6.9	6.34	23
Benzyl alcohol	0.00	—	0.03	68	0.04	29	0.05	78
2-Phenylethanol	0.00	—	0.02	94	0.01	115	0.02	131
2,3-Xylenol	0.20	16	1.37	52	0.94	15	1.06	62

<sup>a, b, c</sup>The keys of S, U and T indicate the temperature of sample solution, upper part of sample vessel and Tenax TA tube, respectively.

<sup>d</sup>Average GC peak area. <sup>e</sup>Coefficient of variation for 4 runs.

HSV collection conditions except the temperature: Tenax TA, 200 mg; the collection time, 0.5 h at 50 mL/min high-purity N<sub>2</sub> flow rate; NaCl, 10 g/100 mL; HSV transfer time from Tenax TA to GC at 240°C, 0.5 min at 65.7 mL/min N<sub>2</sub> flow rate.

できることは、低沸点化合物あるいは高沸点化合物に焦点を合わせての検討も可能にすると考えられる。試料溶液由来の水はGC及びGC-MS分析にとって有害であり、一般には香気成分を吸着させたTenax管をGCに接続する前に、Tenax管中の水除去のためあらかじめ窒素ガスあるいはヘリウムガスの通気を行っている。そこで、Tenax TAへの水の捕集程度を調べるため、試料溶液を食塩無添加の高純水100mLに替え、試料溶液のHSV捕集と同じく、香気捕集装置の各部の温度を45°Cに統一し、高純水由来のHSVをTenax TAに捕集させた。GCの結果、16の小さなピークが認められ、それをFig.3に示した。ただし、Fig.3の感度はFig.2の二倍の感度で示してある。GC-MSの結果、 $m/z$ 18(100%)、 $m/z$ 17(10%)のイオンをもつ水のピークが認められた。EPIMS<sup>3)</sup>によれば水のMSデータは $m/z$ 18(100%)、 $m/z$ 17(21%)と報告されている。MS分析での総イオン量に対する水ピークのイオン量の割合は2.87%であった。本法では前述のごとく、 $m/z$ が1質量差のものまで識別できたので、この程度の水の存在はGC-MSにとって支障ないと考えた。

#### ウ HSVの捕集時間

試料溶液中に高純度窒素ガスを50mL/minの流速で0.5時間、1時間および1.5時間通気することにより捕集した各揮発性化合物のピーク面積平均値と変動係数の結果をTable 3に示した。エタノールを除く化合物の変動係数が比較的小さく、且つ、高沸点化合物の捕集量が比較的大きかったHSV捕集1時間を最適とした。HSV捕集時間が長くなるにつれイソamilアルコール以上の高沸点化合物のピーク面積が大きくなることからHSV捕集0.5時間では時間不足であり、また、最適としたHSV捕集1時間でも高沸点化合物の捕集が平衡に達していないと考えられる。逆に、HSV捕集0.5時間以上ではイソブタノール以下の低沸点化合物のピーク面積が小さくなることが認められた。これはこれら化合物がTenax TAに一旦捕集された後離脱されたためと考えられる。このことは、前述の試料溶液由来の水除去のため窒素ガスやHeガスをあらかじめ通気することにより、HSV特に低沸点化合物のTenax TAからの離脱を促すことを示唆している。そこで、本法ではTenax TAへの水の捕集量の少

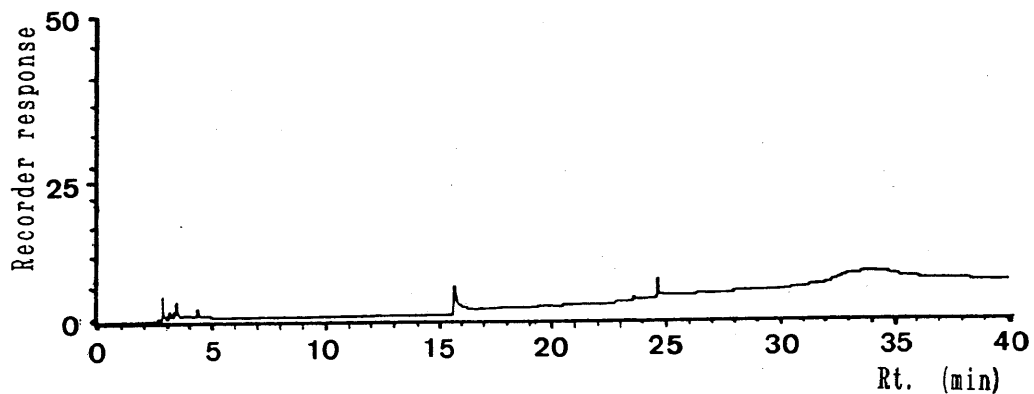


Fig. 3. Gas chromatogram of HSV of distilled pure water.

See GC conditions except for column temperature in Fig. 2.  
After the column temperature was held for 5 min at 60°C, it was  
programmed from 60 to 200°C at 5°C per min and held.  
HSV collection conditions refer to A in Table 5.

Table 3. Comparison of statistical results for the reproducibility of GC analysis for headspace volatiles (HSV) collected for 0.5,<sup>a</sup> 1, and 1.5 h at a 50 mL/min high-purity N<sub>2</sub> flow rate.

Compound	A			B		
	1 h			1.5 h		
	$\bar{x} \times 10^4$	CV <sup>c</sup>		$\bar{x} \times 10^4$	CV	
Ethyl acetate	6.78	24		2.38	28	
Ethanol	0.85	100		0.29	114	
1-Propanol	0.44	16		0.40	16	
2-Methyl-1-propanol	3.42	12		2.86	12	
1-Butanol	3.71	15		2.96	8.6	
3-Methyl-1-butanol	13.49	10		17.83	8.1	
1-Hexanol	13.65	13		21.71	11	
Benzyl alcohol	0.18	14		0.28	69	
2-Phenylethanol	0.10	23		0.15	99	
2,3-Xylenol	3.83	11		3.37	82	

<sup>a</sup>The data of 0.5 h collection time refer to B in Table 2.

<sup>b</sup>Average GC peak area. <sup>c</sup>Coefficient of variation for 4 runs.

HSV collection conditions except the collection time: Tenax TA, 200 mg; the temperature condition, S:45°C,U:45°C,T:45°C, the keys refer to Table 2; NaCl, 10 g/100 mL; HSV transfer time from Tenax TA to GC at 240°C, 0.5 min at 65.7mL/min N<sub>2</sub> flow rate.

なさからも考慮して、水除去のためのプロセスを省略した。HSV捕集1.5時間では高純度窒素ガス通気口のボールフィルター中に試料溶液由来の食塩の結晶が生じ始めた。それに伴い高純度窒素ガスの流速が乱れ始めたため、このことが原因でベンジルアルコール以上の高沸点化合物の変動係数が大きくなったと考えられる。なお、高純度窒素ガス通気口のボールフィルターを内径4mmのガラス管に替えるならば、1.5時間以上のHSV捕集も可能であった。

HSV捕集時間に関するこれらの結果は、HSV捕集時間をある一定時間に設定し、低、中、高沸点化合物で構成される食品香気各成分の絶対量を一度に定量することの難しさを示唆している。このため食品香気各成分の絶対量を定量するような場合には各成分に対する最適な捕集時間の設定が必要になると考えられ、今後の検討課題である。

#### エ 捕集HSVのGCカラムへの注入条件

加熱導入装置の加熱炉にTenax TA管を組み込んでGC注入口へ接続し、Tenax TA管に窒素ガス(65.7mL/min)を送気することにより捕集HSVをGCカラムへ注入した。その注入時間、0.5、1、及び2分間の三段階について、加熱炉温度240℃で検討した結果、ピーク面積変動が小さかったのは、注入時間を2分間にした場合であった(Table 4)。

#### オ HSV捕集に対する食塩添加の影響

試料中の目的成分を抽出する際、食塩などの塩析剤を加えて、その抽出率を高めることが一般に行われるが、HSV法における食塩濃度に関する詳細なデータは見あたらない。その食塩濃度(0~30g/100mL)のピーク面積変動に及ぼす影響を検討し、その結果をTable 5に示した。酢酸エチルとエタノールを除く各化合物は溶液中の食塩濃度が高くなるにつれ、確実にその捕集率も高くなった。食塩濃度20%と30%の場合を比較すると、食塩10%増えることにより、沸点の高い2-フェニルエタノールと2,3-キシレノールではそれぞれ2.1倍、2.4倍近く捕集率が高まり、他の化合物では捕集率が約1.7~1.9倍増加し、食塩影響の大なることを認めた。このことは、食塩含有量の異なる試料では、あらかじめ試料中の食塩を定量のうえ、一定濃度に調整する必要があり、

Table 4. Comparison of statistical results for the reproducibility of GC analysis for headspace volatiles (HSV) transferred from Tenax TA to GC column at 240°C for 0.5, 1 and 2 min at 65.7 mL/min N<sub>2</sub> flow rate.

Compound	A		B		C	
	0.5 min		1 min		2 min	
	<sup>a</sup> , × 10 <sup>4</sup>	CV <sup>b</sup>	, × 10 <sup>4</sup>	CV	, × 10 <sup>4</sup>	CV
Ethyl acetate	6.79	24	6.28	23	7.31	5.5
Ethanol	0.85	100	0.12	153	0.04	76
1-Propanol	0.44	16	0.36	11	0.38	6.5
2-Methyl-1-propanol	3.42	12	3.18	7.7	3.26	4.3
1-Butanol	3.71	15	2.80	12	3.06	3.5
3-Methyl-1-butanol	13.49	10	10.43	9.3	10.50	5.7
1-Hexanol	13.65	13	11.90	9.4	11.45	6.5
Benzyl alcohol	0.18	14	0.20	31	0.13	15
2-Phenylethanol	0.10	23	0.15	33	0.12	6.7
2,3-Xylenol	3.83	11	4.43	16	4.12	6.9

<sup>a</sup>Average GC peak area. <sup>b</sup>Coefficient of variation for 4 runs. HSV collection conditions except HSV transfer time from Tenax TA to GC: Tenax TA, 200 mg; the temperature condition, S:45°C, U:45°C, T:45°C, the keys refer to Table 2; the collection time, 1 h at 50 mL/min high-purity N<sub>2</sub> flow rate; NaCl, 10 g/100 mL.

Table 5. Comparison of statistical results for the reproducibility of GC analysis for headspace volatiles (HSV) collected from three different NaCl concentration solutions.

Compound	A		B		C	
	NaCl 0 g/100 mL		NaCl 20 g/100 mL		NaCl 30 g/100 mL	
	$\bar{x} \times 10^4$	CV <sup>b</sup>	$\bar{x} \times 10^4$	CV	$\bar{x} \times 10^4$	CV
Ethyl acetate	5.12	14	5.98	13	5.11	15
Ethanol	0.17	101	0.09	62	0.28	81
1-Propanol	0.26	14	0.54	17	0.94	1.9
2-Methyl-1-propanol	1.83	13	5.16	17	8.79	5.0
1-Butanol	1.77	14	5.12	17	9.20	4.7
3-Methyl-1-butanol	5.52	11	22.03	12	40.83	2.8
1-Hexanol	5.17	8.7	28.93	7.3	52.56	3.6
Benzyl alcohol	0.07	22	0.42	13	0.74	6.6
2-Phenylethanol	0.05	61	0.51	14	1.06	11
2,3-Xylenol	1.97	15	15.16	12	36.57	6.1

<sup>a</sup>Average GC peak area. <sup>b</sup>Coefficient of variation for 4 runs. HSV collection conditions except NaCl concentration: Tenax TA, 200 mg; the temperature condition, S:45°C, U:45°C, T:45°C, the keys refer to Table 2; the collection time, 1 h at 50 mL/min high-purity N<sub>2</sub> flow rate; HSV transfer time from Tenax TA to GC at 240°C, 2 min at 65.7 mL/min N<sub>2</sub> flow rate.



更に飽和に近い30%程度の食塩濃度は香り立ちを促進し、HSVの平衡化も速めると考えられる。

#### カ Tenax TA量

Tenax TA量を100mg, 200mg, 及び300mgに替えて, 各化合物のピーク面積変動に与える影響を検討した。エタノールを除く, 酢酸エチルからイソアミルアルコールに至る低, 中沸点化合物はTenax TA量の増加と共にそのピーク面積も増加したが, ヘキサノールより高沸点の化合物に関してはTenax TA量の影響はあまり認められなかった。一方, Tenax TA量とピーク面積変動との関連性は認められなかったが, 供試した揮発性化合物全般にわたり比較的変動の小さかったのが, Tenax TA量が200mgの場合であった。以上の実験で得られた試料溶液のHSVをTenax TAに捕集するための最適条件下での, エタノールを除く化合物のGCピーク面積の変動係数は1.9~15%であった。また, そのガスクロマトグラムをFig.4に示した。なお, エタノールやプロパノールなどの低級アルコール類及びベンジルアルコールや2-フェニルエタノールなどのピーク面積値の小さいのは, これら化合物の極性に起因して, やゝ疎水的表面構造を持つTenax TAへの吸着が非常に小さいためであり, また, これら化合物と水との会合により, 蒸気圧が小さくなるためと考えられる。

#### (3) 要約

酵母培養液の揮発性成分や食品香気の定量的分析にTenax TA捕集法を応用するため, 試料溶液部, 試料容器上端部及びTenax TA管部の三箇所の温度調節が容易に出来る香氣捕集装置を組み立て, モデル溶液を用いて量的に再現精度の高い headspace volatiles (HSV)捕集条件を求めた。試料として, 酢酸エチル, 8種類のアルコール及び2,3-キシレノールからなる水溶液を用いた。試料溶液のHSVをTenax TAに捕集するための最適条件はつぎのごとくであった。1, 香氣捕集装置の各部の温度を試料溶液部の温度である45℃に統一した。2, HSVの捕集は窒素ガス流速50ml/minで1時間行った。3, 捕集HSVのGCへの注入は, 加熱導入装置を使用して, 加熱炉温度240℃, 窒素ガス流速65.7ml/minで

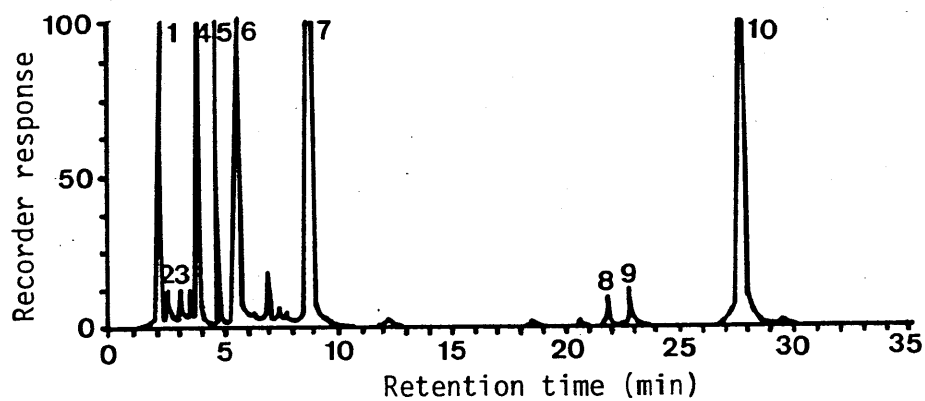


Fig. 4. Gas chromatogram of HSV collected from volatile compounds solution under the optimum conditions for collecting HSV.

See GC conditions in Fig. 2. Peak number refer to Table 1.  
HSV collection conditions refer to C in Table 5.

2分間通気した。4, 試料溶液への30%の食塩添加はHSV量を増大させ、特に高沸点化合物の捕集に効果があった。5, Tenax TA量は200mgとした。この結果, エタノールを除く化合物のGCピーク面積の変動係数は1.9~15%であった。

また, この香気捕集装置の特徴として, 試料容器上端部及び Tenax TA管部の温度を試料溶液部と同じか, 少し高めに設定することにより, 両部に於ける試料溶液由来の水蒸気凝縮が防止でき, 且つ, Tenax TAへの水の捕集量は少なくGC-MS分析に支障がなかった。この結果, GC及びGC-MS分析時に, Tenax TAに捕集された水除去のための窒素ガス通気プロセスが省略できた。

#### (4) 文献

- 1) Ishihara, K., Honma, N. : J. Food Compos. Anal., 5, 139-145 (1992).
- 2) Shimoda, M., Wada, K., Osajima, Y. : Nippon Shokuhin Kagaku Gakkaishi, 31, 805-809 (1984).
- 3) The Mass Spectrometry Data Centre : Eight Peak Index of Mass Spectra, Essential Data from 66,720 Mass Spectra, 3rd ed., The Royal Society of Chemistry, The University, Nottingham, NG7 2RD, UK (1983).

## 2. 18種アミノ酸培地及び酵母培養液中の揮発性窒素及び含硫化合物に対する酵母の関与

本報では、味噌の原料配合より案出したグルコースと18種アミノ酸及び食塩からなる合成培地を使用して、合成培地及び酵母培養液中の揮発性窒素及び含硫化合物と酵母との関係について検討した。

### (1) 実験方法

#### ア 供試酵母

耐塩性味噌酵母として赤色辛口味噌より分離された *Zygosaccharomyces rouxii* S84 (以下, *Z. rouxii*), *Candida versatilis* D-5 (以下, *C. versatilis*) 及び対照として、非耐塩性である清酒酵母の *Saccharomyces cerevisiae* RIB 6002 (協会7号) (以下, *S. cerevisiae*) を使用した。<sup>1)</sup>

#### イ 培地および培養方法

使用した培地の組成をTable 1に示した。ただし、非耐塩性である *S. cerevisiae* の保存培地および前培養培地は米麴汁 (Ballg. 10°) とし、更に本培養培地にはTable 1に示した組成のうち食塩無添加のものを用いた。

前培養は保存培養菌体を数白金耳接種し、30℃で3日間静置培養した。前培養菌体を遠心分離し、滅菌12.5%食塩水 (*S. cerevisiae* には滅菌生理食塩水) で洗浄後、酵母懸濁液を調製した。

本培養培地は炭素源としてグルコース、窒素源としては、7割麴米味噌、すなわち大豆：精白米 (100:70) のアミノ酸組成量に基づいて18種類のアミノ酸混合物を使用した。なお、グルコース量と窒素量は、清酒などに比べ高濃度のタンパク質を含有する味噌の場を再現するため、中野<sup>2)</sup>の方法に準じて、味噌仕込原料の浸漬・蒸煮・製麴などに伴う吸水、損失などを考慮のうえ、原料より由来する糖質 (すべてデンプンとみなす) とタンパク質をグルコース量と総窒素量に換算し決定した。その結果、グルコース量と総窒素量は15.64%と1.86%となっ

Table 1. Composition of media.<sup>a</sup> (//)

For stock culture <sup>b</sup>		Glucose	150g	Biotin	0.002mg
Glucose	50g			Ca-pantothenate	0.4mg
Raw soy sauce	100ml	18 Amino acids <sup>c</sup>	9.375g	Inositol	2.0mg
NaCl	83g	( as N )		Nicotinamide	0.4mg
Agar	22g			p-Aminobenzoic acid	0.2mg
pH 5.3				Thiamin HCl	0.4mg
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g	Riboflavin	0.2mg
		CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.1g	Pyridoxine HCl	0.4mg
		MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5g		
		FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10mg	NaCl	0 or 125g
		MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10mg		
		ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10mg	pH 4.5	
For preculture <sup>b</sup>					
Glucose	50g				
Raw soy sauce	100ml				
NaCl	125g				
pH 4.5					

<sup>a</sup> The medium for *S. cerevisiae* contained no sodium chloride.

<sup>b</sup> Rice *koji* extract (Ballg. 10°) was used as stock and preculture media for *S. cerevisiae*.

<sup>c</sup> The mixture of 18 amino acids was prepared according to the amino acid composition of red salty *koji* *miso* (soybeans: *koji*=100:70). Glucose/N (C/N) =16.

た。最終的にはグルコース量を15%にし、総窒素量はアミノ酸の溶解度を考慮して0.9375%とした。ただし、シスチンとチロシンは溶解度がより小さいため過飽和の状態になった。この培地を120℃、10分間加熱殺菌し、モデル培地とした。

酵母接種時、1ℓの三角フラスコに、酵母懸濁液と本培養培地が600 mlになるように調製し混合した。酵母の接種菌数は600ml当り $5 \times 10^7$ とし、30℃の温浴中で炭素源であるグルコースの消費がほぼ停止するまで静置培養を行った。なお、この培養期間の間に生成揮発性成分の飛散を抑制するため、1ℓの三角フラスコの上部に10℃の水を循環させた冷却管(40cm)を付属させた。

酵母培養液の対照として、酵母無接種培地(合成培地そのもの)も調製し、酵母接種培地と同じ30℃の温浴中で保持した。

#### ウ グルコース、エタノールおよび褐変度の測定

酵母無接種培地及び酵母培養液中のグルコース量、エタノール量及び褐変度はそれぞれ次の方法で測定した。グルコース量は glucose oxidase と peroxidaseを用いる酵素法<sup>3)</sup>。エタノール量はガスクロマトグラフィーによる安平と望月<sup>4)</sup>の方法。褐変度は Namiki, M.と Hayashi, T.<sup>5)</sup>によって報告された方法で測定した。

#### エ 揮発性成分の捕集

酵母無接種培地及び培養液中の揮発性成分の捕集には、前述のヘッドスペースガス(HSV)捕集装置を用いた。すなわち、酵母無接種培地50ml又は酵母培養液50ml、内部標準物質としての2,3-キシレノール $0.05 \mu\text{g}/0.1\text{ml}$ 水、シリコーン消泡剤(0.02ml)及び食塩(最終濃度:30%)を含む試料溶液100mlを250ml容量のガス洗気瓶(試料瓶)に入れ、その試料瓶に揮発性成分捕集剤としてのTenax TA 200mgを含むTenax TA管(4 mm i.d. x 17 cm)を連結した。試料瓶を恒温槽に設置し、Tenax TA管は恒温水を循環させたガラス外套管でおおった。更に、試料瓶は加熱ヒーターを備えた蓋でおおった。

試料中の揮発性成分をTenax TAに捕集するため、試料を攪拌しながら超高純度窒素ガス(純度:99.999%)を1分間当り50mlの流速で1時

間通気した。

供試試料部，試料瓶上端部および Tenax TA管部は，すべて45°Cに調節した。

#### オ ガスクロマトグラフィー (GC)

GCは揮発性含窒素化合物には島津GC-14A (検出器: FTD)，揮発性含硫化合物には島津GC-8A (検出器: FPD) を用いて行った。注入部と検出器の温度は共に250°Cとした。カラムは PEG 20M に相当する Shimadzu fused silica capillary column (CBP20-M25-025, 0.2 mm i.d. x 25 m) を使用し，カラム温度は60°Cで5分間保った後，1分間当たり5°Cの昇温で60°Cから200°Cまでとし，更に200°Cで7分間保った。島津GC-14A (検出器: FTD) にはキャリアガスとしてヘリウムを用い，1分間当たり1.6mlの流速で，スピリット比は1:28。また，島津GC-8A (検出器: FPD) にはキャリアガスとして窒素を用い，1分間当たり3mlの流速で，スピリット比は1:9.5であった。

Tenax TA に捕集された試料中の揮発性成分は加熱導入装置 (島津FLS-3) 用い，加熱炉温度240°C，ヘリウムガス及び窒素ガス流速はそれぞれ47.1, 31.6ml/minで6分間送気し，GCへ注入した。

試料中の揮発性成分の捕集及びGCは1試料につき，2回繰り返し，定量には島津クロマトパックC-R5Aを用いた。また，Retention index すなわち，Kovats Indexを自動的に算出するため，杉沢等<sup>6)</sup>のBAICプログラムを同クロマトパックに組み込んだ。

FTD及びFPD検出器での分析の他に，各GCのFID monitor及び島津GC-4CPF (検出器: FID) も使用した。島津GC-4CPFでのキャリアガスは1分間当たり1mlの流速で，スピリット比は1:50であった。その他の分析条件は上記に準じた。

#### カ ガスクロマトグラフィー - 質量分析 (GC-MS)

GC-MSはHitachi M-5201ガスクロマトグラフとHitachi M-6マススペクトロメーターを連結したものにより，イオン化電圧20eV，イオン源温度180°Cの条件で行った。カラムはGC分析に使用したCBP20-M25-025を用い，カラム温度60°C-(5min)-60°C-(5°C/min)-200°C，注入部温度

250°C, キャリヤーガス (He) 流速1ml/min, スプリット比1:3.4であった。

Tenax TAに捕集された試料中の揮発性成分のGCへの注入は, 加熱導入装置 (ガスクロ工業 (株) 製) を用い, 加熱炉温度250°C, Heガス流速4.4ml/minで8分間送気した。

なお, 試料中の揮発性成分の同定は同一条件で行った標準物質のGC-MSデータ, MSスペクトルの文献値<sup>7,8)</sup>及び標準物質の Retention timeとKovats Indexをもとに行った。

## (2) 実験結果および考察

### ア 酵母培養液中のグルコースの消費率及び官能評価

酵母培養液中のグルコースの消費に変化が認められなくなった期間を培養期間とした。その結果, 耐塩性酵母では18日間, 清酒酵母では15日間であった。なお, 対照としての酵母無接種培地の30°Cでの保持は, 食塩添加の場合, 18日間, 食塩無添加の場合, 15日間とした。これら酵母無接種培地を基準にして, 酵母培養液中のグルコース消費率, 褐変度及び生成エタノールの測定結果をTable 2に示した。培地中のグルコース及び窒素量が高濃度にもかかわらず, 清酒酵母の *S. cerevisiae* はグルコースをほぼ100%消費した。これに対して, 耐塩性酵母のグルコース消費率はかなり低く, 特に, 食塩添加培地での *C. versatilis* のグルコース消費率は約2%であった。

*S. cerevisiae* 培養液の褐変度は酵母無接種培地及び耐塩性酵母培養液の約半分であり, 褐変物質の減少に対する *S. cerevisiae* の関与が認められた。

エタノール及びガスクロマトグラムの総ピーク面積値 (検出器: FID) はグルコースの消費に対応していた。すなわち, グルコースの消費の大きかった *S. cerevisiae* がエタノール及び総ピーク面積値ともに最大であった。

各試料の香気を4人のパネルで調べてみると, 酵母無接種培地では, 焦げ臭や甘酸っぱい臭いが認められ, パネル全員好ましくない香気と答えた。 *Z. rouxii* 培養液の香気は酵母無接種培地で認められた好まし



Table 2. Analytical results of cultured media.

Strains	NaCl (%)	Incubation period(d)	Glucose consumption(%)	Browning dilution x OD(420nm)	Ethanol mg/100ml	GC(FID) <sup>a</sup> Total area (x10 <sup>5</sup> ) <sup>b</sup>
Noninoculation	12.5	18	0 <sup>c</sup>	19.945	0	7.63
<i>Z. rouxii</i>	12.5	18	14.78	21.590	763.3	92.60
<i>C. versatilis</i>	12.5	18	1.74	22.185	6.7	37.97
Noninoculation	0	15	0 <sup>c</sup>	18.075	0	9.15
<i>Z. rouxii</i>	0	18	77.74	17.825	1913.0	101.57
<i>C. versatilis</i>	0	18	10.43	17.780	183.0	55.87
<i>S. cerevisiae</i>	0	15	99.76	9.455	2533.0	187.53

<sup>a</sup> Detection by flame ionization detector.

<sup>b</sup> The area of each peak on gas chromatograms were measured with a Shimadzu Chromatopac C-R5A integrator.

<sup>c</sup> It was assumed that glucose was not consumed in the noninoculated media.

くない臭いがかなり改善された。高級アルコール臭や果実様香気が新たに認められ、また、すっきりした感じも与えた。*C. versatilis*では酵母無接種培地臭が穏やかになり、香気の改善も認められるが、他の酵母に比べ香気は弱かった。また、このものは酵母無接種培地の残り香も認められた。*S. cerevisiae*では清酒様香気が強く、それに甘酸っぱさも加わり、味噌酵母の生成香気に比べ特異的であった。

#### イ 揮発性含窒素化合物

酵母無接種培地及び酵母培養液の両者に共通して同定された揮発性含窒素化合物は、pyrazineや炭素数1~2の側鎖を持つピラジン類及びacetylpyrroleなどであった (Fig. 1, Table 3)。これら化合物のうち、pyrazine及びピラジン類は味噌酵母により減少する傾向にあるが、味噌酵母により新たに生成される揮発性含窒素化合物はほとんど認められなかった。なお、供試酵母のうち、清酒酵母による揮発性含窒素化合物の減少が大きい傾向にあることが認められた。

#### ウ 揮発性含硫化合物

酵母の無接種培地及び培養液中の揮発性含硫化合物のガスクロマトグラムをFig.2に示した。また、同定された化合物の定量結果をTable 4に示した。

酵母無接種培地及び酵母培養液の両者に共通して同定された揮発性含硫化合物は、dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-(methylthio)propionaldehyde (methional)であった。更に、酵母培養液ではこれら化合物に加え、3-(methylthio)propyl acetate, 3-(methylthio)-1-propanol (methionol)の生成が認められた。酵母培養液中のdimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, methionalの含有量は、無接種培地での含有量の0.6~85.1%に減少した。培養液中でのこれら化合物の減少率は、供試酵母のうち、*Z. rouxii*で大きく、特に、糖の消費率が低く、生育がかなり悪い、食塩含有培養液中でこれらの化合物を55.2~99.4%消滅させた。

dimethyl disulfide と dimethyl trisulfideの急激な減少は、Williams, R. S. と Gracey, D. E. F.<sup>9)</sup> が Canadian beersの熟成

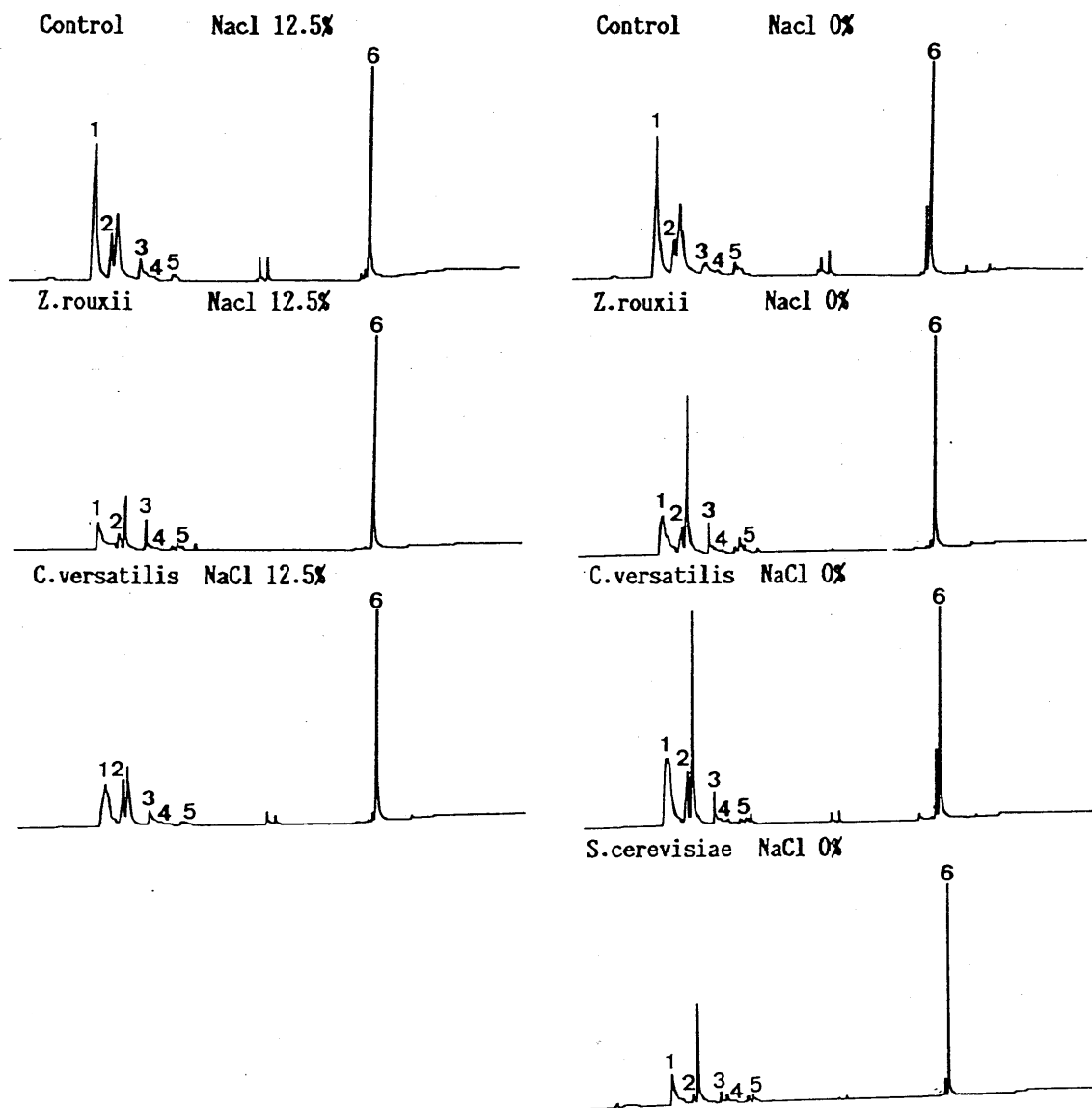


Fig. 1. Gas chromatograms of volatile nitrogen-containing compounds in cultured media.

Column: Shimadzu fused silica capillary column (CBP20-M25-025), CBP20 corresponding to polyethylene glycol 20M, 0.2mm i.d. x 25m.

Column temp.: 60°C-5min-60°C-(5°C/min)-200°C-7min-200°C.

Detector: flame thermionic detector (FTD), 250°C.

Control: noninoculated media.

N compounds: 1, pyrazine; 2, 2-methylpyrazine; 3, 2,5-dimethylpyrazine;  
 4, 2,6-dimethylpyrazine; 5, 2,3-dimethylpyrazine;  
 6, acetylpyrrole.



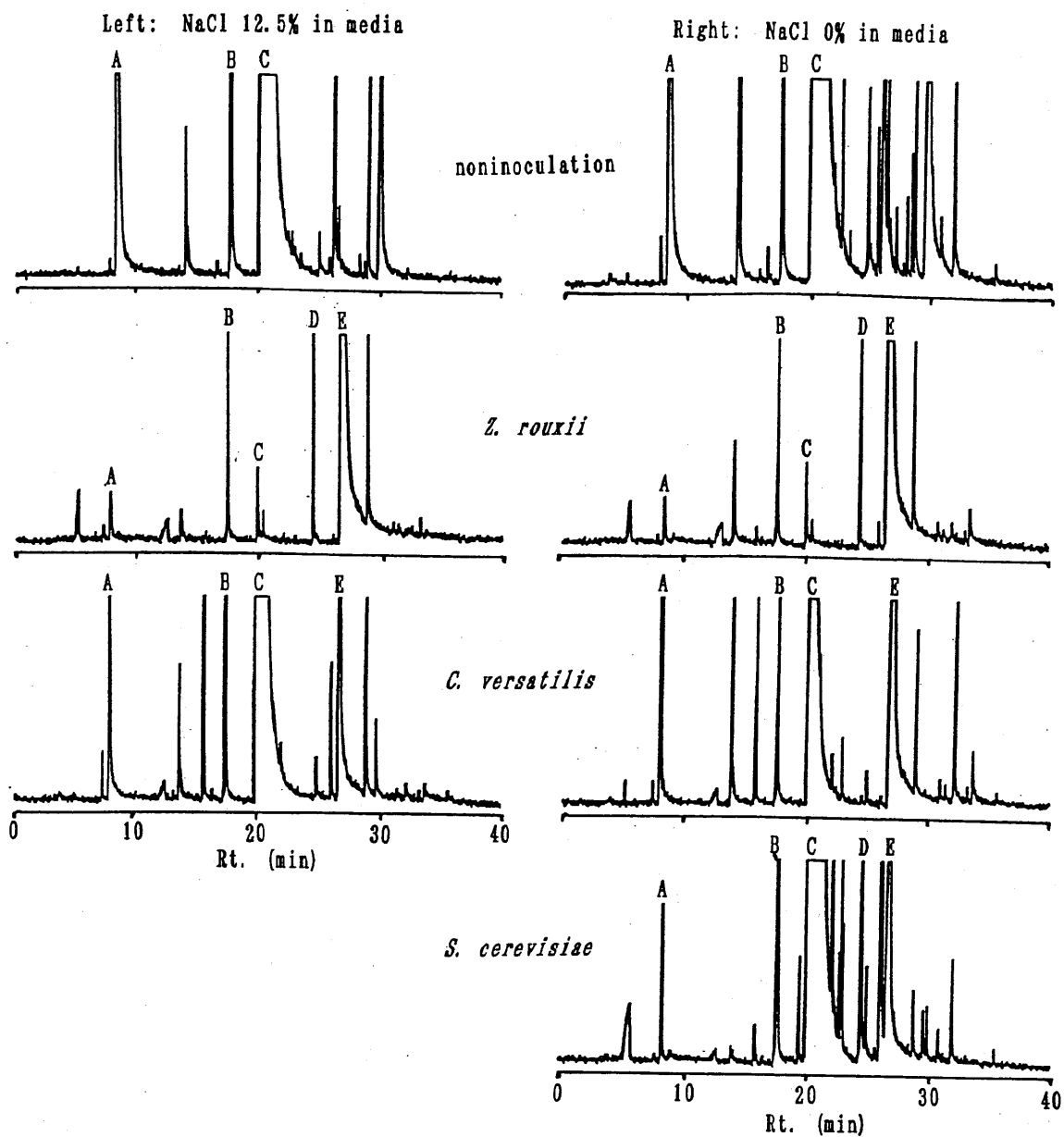


Fig. 2. Gas chromatograms of volatile sulfur-containing compounds in cultured media.

Column: Shimadzu fused silica capillary column (CBP20-M25-025), CBP20 corresponding to polyethylene glycol 20M, 0.2mm i.d. x 25m.

Column temp.: 60°C-5min-60°C-(5°C/min)-200°C-7min-200°C.

Detector: flame photometric detector (FPD), 250°C.

S compounds: A, dimethyl disulfide; B, dimethyl trisulfide; C, methional;  
D, 3-(methylthio)propyl acetate; E, methionol.

Table 4. Volatile sulfur-containing compounds in cultured media. (ng/100ml)<sup>a</sup>

Peak <sup>b</sup>	Compound	K. Index <sup>c</sup>	NaCl 12.5% in media		NaCl 0% in media		Identification				
			Control <sup>d</sup> <i>Z. rouxii</i>		Control <sup>d</sup> <i>C. versatilis</i>		GC <sup>e</sup>	GC <sup>f</sup>			
			<i>Z. rouxii</i>	<i>C. versatilis</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>C. versatilis</i>	(FID)	MS			
A	dimethyl disulfide	1067	4380 (100.0) <sup>b</sup>	25 (0.6)	1180 (26.9)	2970 (100.0)	35 (1.2)	259 (8.7)	51 (1.7)	+ <sup>s</sup>	+
B	dimethyl trisulfide	1388	860 (100.0)	385 (44.8)	615 (71.5)	780 (100.0)	360 (46.2)	660 (84.6)	608 (77.9)	+	+
C	3-(methylthio)propion aldehyde (methional)	1468	670x10 <sup>3</sup> (100.0)	5x10 <sup>3</sup> (0.7)	570x10 <sup>3</sup> (85.1)	772x10 <sup>3</sup> (100.0)	7x10 <sup>3</sup> (0.9)	377x10 <sup>3</sup> (48.8)	128x10 <sup>3</sup> (16.6)	+	+
D	3-(methylthio)propyl acetate <sup>1</sup>	1643	0	2825	0	0	3100	155	8900	+	+
E	3-(methylthio)-1-propanol (methionol)	1741	0	1084x10 <sup>3</sup>	367x10 <sup>3</sup>	0	1172x10 <sup>3</sup>	855x10 <sup>3</sup>	493x10 <sup>3</sup>	+	+

<sup>a</sup> Detection by flame photometric detector. <sup>b</sup> See Fig. 1. <sup>c</sup> Kovats index values on CBP20-M25-025 silica capillary column. Identification carried out by comparing retention times and Kovats index with those of the authentic compounds. <sup>d</sup> Noninoculated media. <sup>e</sup> Detection by flame ionization detector. <sup>f</sup> Identification carried out by comparing mass spectra with those of the authentic compounds and the reference spectra.<sup>15,16</sup>  
<sup>s</sup> Positive identification. <sup>b</sup> ( ): relative values. <sup>1</sup> Newly identified.

過程でも認め、その原因を「酵母の資化作用によると考えられるが、まだ、解明されていない」と報告した。酵母培養液中でのこれら両化合物と methionol 減少の原因も、酵母によって資化されたのか、あるいは他の化合物へ変換されたのかは興味ある問題である。methionol は酵母無接種培地では同定されず、明らかに酵母によって生成され、その生成量は *Z. rouxii* の培養液中で最も高かった。また、生育の最も悪い *C. versatilis* 培養液（食塩非含有）での methionol 生成量も *S. cerevisiae* のそれよりも多く、methionol 生成能に対する耐塩性酵母と清酒酵母の違いが推察された。3-(methylthio)propyl acetate も methionol 同様酵母によって生成され、その生成量は *S. cerevisiae* 培養液中で最も多かった。

### (3) 要約

味噌原料配合より案出したグルコースと18種アミノ酸及び食塩からなる合成培地を使用して、耐塩性酵母と清酒酵母によって生成されたり、減少されたりする揮発性含窒素及び含硫化合物について検討した。

供試菌として、赤辛米味噌より分離された耐塩性酵母の *Zygosaccharomyces rouxii* S84, *Candida versatilis* D-5 及び非耐塩性の *Saccharomyces cerevisiae* RIB 6002 (Kyokai no. 7) が用いられた。これらの酵母は炭素源であるグルコースの消費が停止するまで、30°C で静置培養された。酵母無接種培地及び培養液中の揮発性含窒素及び含硫化合物の同定は、これらの化合物をヘッドスペースガス捕集装置を用いて Tenax TA に吸着させた後、GC 及び GC-MS 分析で行なった。

酵母無接種培地及び酵母培養液の両者に共通して同定された揮発性含窒素化合物は、pyrazine や炭素数1~2の側鎖を持つピラジン類及び acetylpyrrole などであった。これら化合物のうち、pyrazine 及びピラジン類は味噌酵母により減少する傾向にあるが、味噌酵母により新たに生成される揮発性含窒素化合物はほとんど認められなかった。なお、供試酵母のうち、清酒酵母による揮発性含窒素化合物の減少が大きい傾向にあることが認められた。

一方、酵母無接種培地及び酵母培養液の両者に共通して同定された

揮発性含硫化合物は, dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-(methylthio)propionaldehyde (methional)であった。更に, 酵母培養液ではこれら化合物に加え, 3-(methylthio)propyl acetate, 3-(methylthio)-1-propanol (methionol)の生成が認められた。酵母培養液中のdimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, methionalの含有量は, 無接種培地での含有量の0.6~85.1%に減少した。培養液中でのこれら化合物の減少率は, 供試酵母のうち, Z. rouxiiで大きかった。特に, 食塩含有培養液中で, グルコースの消費率が低く, 生育がかなり悪いにもかかわらず, Z. rouxiiはこれらの化合物を55.2~99.4%消滅させた。

これらの結果をふまえて, 以下揮発性含硫化合物を中心に研究をすすめた。

#### (4) 文献

- 1) 石原和夫, 本間伸夫, 小笠原長弘 : 醗酵工学, 63, 279-287 (1985).
- 2) 中野雅弘 : 醸協, 61, 136-139 (1966).
- 3) 福井作蔵 : 生物化学実験法 (還元糖の定量), (瓜谷郁三, 志村憲助, 中村道德, 船津勝), p. 139-140, 東京大学出版会, 東京 (1969).
- 4) 安平仁美, 望月 努 : 信州味噌研報, 10, 17-18 (1969).
- 5) Namiki, M., Hayashi, T. : J. Agric. Food Chem., 23, 487-491 (1975).
- 6) 杉沢 博, 田村啓敏, 中原一晃 : 日食工誌, 35, 709-712 (1988).
- 7) M. C. ten Noever de Brauw, J. Bouwman, A. C. Tas, miss G. F. La Vos : Compilation of Mass Spectra of Volatile Compounds in Food, Central Institute for Nutrition and Food Research-TNO p.o. box 360, 3700 AJ Zeist the Netherlands (1979).
- 8) The Mass Spectrometry Data Centre : Eight Peak Index of



Mass Spectra, Essential Data from 66,720 Mass Spectra,  
3rd ed., The Royal Society of Chemistry, The University,  
Nottingham, NG7 2RD, UK (1983).

- 9) Williams, R. S., Gracey, D. E. F. : J. Am. Soc. Brew.  
Chem., 40, 71-74 (1982).

### 3. 単一アミノ酸培地及び酵母培養液中の揮発性含硫化合物と耐塩性酵母との関係

18種アミノ酸混合物を窒素源にした合成培地中で、揮発性含窒素化合物と揮発性含硫化合物のうち、特に揮発性含硫化合物の生成と減少に対する耐塩性酵母の強い関与が認められた。その18種アミノ酸混合物を窒素源にした酵母の無接種培地及び培養液中に検出された揮発性含硫化合物の起源について検討するため、18種アミノ酸混合物をシスチン、メチオニンの含硫アミノ酸の他に、アミノ酸の構造をもとに選んだ、アラニン、ロイシン、トレオニン、フェニルアラニン、グルタミン酸及びアルギニンの各単一アミノ酸に代えて実験を行った。ただし、18種アミノ酸混合物を窒素源にした培地組成のうち、グルコース量を15%から2%へ、各アミノ酸の総窒素量を0.9375%から0.04%に変更し、*Z. rouxii* についてのみ、30℃で10日間培養した。なお、培地には食塩12.5%含み、培養方法を始めとする実験方法は18種アミノ酸混合物を窒素源にした場合に準じた。

#### (1) 実験結果および考察

##### ア 揮発性含硫化合物

含硫アミノ酸以外の結果がほぼ同じと認められたので、メチオニン、シスチン、フェニルアラニンの各アミノ酸を窒素源とした *Z. rouxii* の無接種培地と培養液中の揮発性含硫化合物のガスクロマトグラムを Fig. 1 に示した。また、使用した培地中の揮発性含硫化合物の定量結果は Table 1 にまとめた。

培地の加熱殺菌による着色と加熱臭はほとんど認められなかった。ただし、シスチン及びメチオニンを窒素源とする培地では非嗜好的な香気が認められるが、それは *Z. rouxii* の培養によりかなり改善された。なお、*Z. rouxii* によるグルコースの消費率は、メチオニンとシスチンを窒素源にした場合、それぞれ、97.22%と53.39%であり、他は71.56-99.88%であった。

窒素源がシスチン、フェニルアラニン、グルタミン酸及びアルギニ

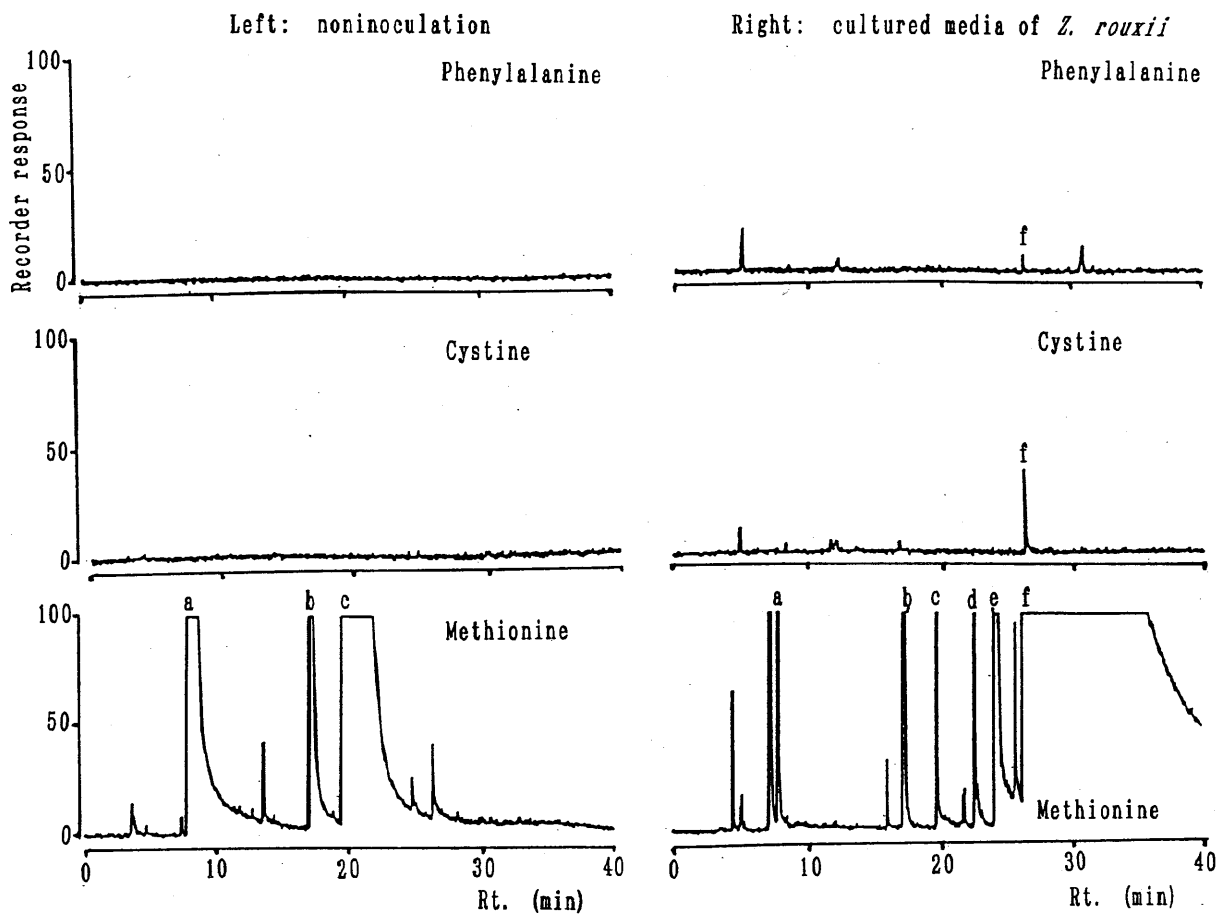


Fig. 1. Typical gas chromatograms of volatile sulfur-containing compounds formed and reduced by *Z. rouxii* in various amino acids media.

The column, the column temp., and the detector referred to Fig. 2.

S compounds: a, dimethyl disulfide; b, dimethyl trisulfide; c, methional;  
 d, ethyl 3-(methylthio)propanoate; e, 3-(methylthio)propyl acetate;  
 f, methionol.

Table 1. Volatile sulfur-containing compounds in cultured media in which various amino acids were used as a source of nitrogen.<sup>a</sup>  
( $\mu\text{g}/100\text{ml}$ )

Nitrogen	<i>Z. rouxi</i> <sup>b</sup>	dimethyl disulfide	dimethyl trisulfide	methionial	ethyl 3-(methylthio) propanoate <sup>c</sup>	3-(methylthio)propyl acetate	methionol
Methionine	N <sup>d</sup>	2.83	1.94	1150	— <sup>f</sup>	—	—
Cystine	I <sup>e</sup>	0.43	0.42	30	3.64	54.10	22.8x10 <sup>3</sup>
Phenylalanine	N	—	—	—	—	—	—
Alanine	I	—	—	—	—	—	5.20
Leucine	N	—	—	—	—	—	—
Threonine	I	—	—	—	—	—	0.56
Glutamic acid	N	—	—	—	—	—	—
Arginine	I	—	—	—	—	—	—
	N	—	—	—	—	—	0.80
	I	—	—	—	—	—	—
	N	—	—	—	—	—	0.42
	I	—	—	—	—	—	—
	N	—	—	—	—	—	—
	I	—	—	—	—	—	—
	N	—	—	—	—	—	—
	I	—	—	—	—	—	—
	N	—	—	—	—	—	—
	I	—	—	—	—	—	—
	N	—	—	—	—	—	—
	I	—	—	—	—	—	—

<sup>a</sup> The concentration of glucose, nitrogen and sodium chloride in media were 2%, 0.04% and 12.5% respectively.

<sup>b</sup> Cultivation in media at 30°C for 10 d. <sup>c</sup> Newly identified. Kovats index (1575). <sup>d</sup> Noninoculation. <sup>e</sup> Inoculation.

<sup>f</sup> Negative detection.

ンの *Z. rouxii* 培養液中で微量の methionol 生成が認められる以外は、この methionol も含めた前述の揮発性含硫化合物全てが窒素源メチオニンの *Z. rouxii* 無接種培地及び／あるいは培養液中で同定された。更に、これら化合物に加え、*Z. rouxii* の培養液中で ethyl 3-(methylthio)-propanoate が同定された。この化合物が窒素源 18 アミノ酸混合物中で同定されなかったのは、培地中のメチオニン量の違いが一因ではないかと考えられる。すなわち、培地 100ml につき、18 種アミノ酸混合物中のメチオニン量は 110mg、メチオニン単一培地では 426mg で、前者の 3.9 倍である。

Wainwright, T.<sup>1)</sup> はビール中の非嗜好性含硫化合物の研究で、メチオニンがカルボニル化合物との加熱、銅などの金属イオンによる触媒作用、日光の作用、sulphite との反応等により化学的に分解されて、methional, methanethiol 及び methyl sulfides が生じると報告した。methional に関しては、Fujimaki, M.<sup>2)</sup> らによってもメチオニンの熱分解で生じることが報告されている。著者らの結果からも、酵母無接種培地に認められた dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide 及び methional は培地の加熱殺菌や、更に、その加熱殺菌培地を酵母培養液の対照として酵母無接種のまま、30°C で一定期間保持する間に化学的に生成されたものと考えられる。ただし、Wainwright, T.<sup>1)</sup> は methanethiol が酵母によってメチオニンから生成される結果をもとに、methional 及び methyl sulfides も酵母によって生成される可能性があるとして、methionine → 2-oxo-4-(methylthio)butanoic acid → methional → methanethiol, dimethyl sulfide, dimethyl disulfide の経路も示した。そして、著者らはこのようにメチオニンより化学的に生成されたと考えられる dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide 及び methional が酵母によって減少されることを明らかにしたが、そのメカニズムについての解明は今後の課題と考えている。

methionol はメチオニン以外のアミノ酸培地からも *Z. rouxii* により生成されることが認められたが、量的にはメチオニンを窒素源にした培養液中で圧倒的に多かった。メチオニンからの methionol 生成経路は、

酵母による Ehrlich 経路と考えられる。そして、窒素源がメチオニン以外の場合は、酵母のアミノ酸合成経路でメチオニンが合成された後、あるいは、既に酵母細胞内に蓄積されていたアミノ酸プール中のメチオニンから methionol が生成されるのではないかと推察される。一方、Aoki, T. と Uchida, K.<sup>3)</sup> は、*Zygosaccharomyces rouxii* MA<sup>R1</sup> の ethionine 抵抗性変異株の methionol 生成に関する研究で、この変異株の methionol 高生産はメチオニンの蓄積がなくても生じることから、この methionol 生成は Ehrlich 経路によらないことを指摘した。更に、単一窒素源としてグルタミン酸やプロリンを使用した培地でも同じように methionol が生成されることを報告した。このことから、著者らのメチオニン以外の培地で *Z. rouxii* によって生成される methionol は両者によって指摘された生成経路による可能性も考えられる。また、Fuji maki, M.<sup>2)</sup> らはシスチンの熱分解でメチオニンが生成されることを報告したが、シスチンを窒素源にした *Z. rouxii* 無接種培地では、揮発性含硫化合物の生成は認められなかった。なお、メチオニンを単一窒素源としての methionol の生成に関しては、林部ら<sup>4)</sup> が醤油酵母や清酒酵母を含む種々の酵母を使用して研究し、酵母の種と株によって methionol 生成量の異なる結果を報告した。林部らの使用酵母のうち、最高の methionol 生成量を示したのは、Shoyu yeast No.6 であり、培地中のメチオニン量に対して 23.1% であった。これに対して著者らが使用した *Z. rouxii* の methionol 生成量は 5.4% であった。

ethyl 3-(methylthio)propanoate と 3-(methylthio)propyl acetate もメチオニンを単一窒素源とする *Z. rouxii* 培養液中で同定された。両化合物はビール、ワイン、蒸留酒などの酒類<sup>5)</sup>の香気成分として、更に、後者は味噌と同じ耐塩性酵母の *Zygosaccharomyces rouxii* や *Candida versatilis* などとその熟成に関与する醤油<sup>6)</sup>の香気成分としても報告されている。しかしながら、*Z. rouxii* による両化合物の生成についての報告は見あたらない。

以上の研究で同定された揮発性含硫化合物のうち、dimethyl disulfide, methional, methionol が味噌の香気成分として報告されてい

る<sup>7)</sup>。これらの化合物のうち、dimethyl disulfideと methionalは味噌原材料の加熱処理、熟成及び貯蔵中にメチオニンより化学的に生成されると考えられるが、これら化合物は不快臭を呈するので、酵母によって減少されることは望ましいと考えられる。更に、味噌懸濁液の加熱でmethionalが生成されたり<sup>8)</sup>、生醤油の加熱でdimethyl sulfide, dimethyl disulfide, methionalなどが増加することから<sup>9)</sup>、味噌や醤油を使用しての加熱調理の際、これら揮発性含硫化合物が再び増加することが推測される。このことから、味噌や醤油の熟成時に耐塩性酵母がこれら揮発性含硫化合物を減少させることは一層重要であると考えられる。

methionolは味噌<sup>10)</sup>や醤油<sup>11)</sup>の重要な香気成分の一つであり、更に、耐塩性酵母によって生成される揮発性含硫化合物の主体をなすことから、味噌熟成に関与する耐塩性酵母の役割として重要である。

## (2) 要約

18種アミノ酸混合物を窒素源にした酵母の無接種培地及び培養液中に検出された揮発性含硫化合物の起源について検討するため、18種アミノ酸混合物をシスチン、メチオニンの含硫アミノ酸の他に、アミノ酸の構造をもとに選んだ、アラニン、ロイシン、トレオニン、フェニルアラニン、グルタミン酸及びアルギニンの各単一アミノ酸に代え、供試菌として *Z. rouxii* についてのみ実験を行なった。

18種アミノ酸混合物を窒素源にした場合に認められた *Z. rouxii* による揮発性含硫化合物の生成と減少はメチオニンを単一窒素源とする無接種培地及び培養液中でも認められ、更に、前述の揮発性含硫化合物に加え、*Z. rouxii* による ethyl 3-(methylthio)propanoate の生成も認められた。また、methionol に関してはメチオニン以外のアミノ酸培地からも *Z. rouxii* により生成されることが認められたが、量的にはメチオニンを窒素源にした培養液中で圧倒的に多かった。

## (3) 文献

- 1) Wainwright, T. : Proc. Europ. Brew. Conv., 13th Congr., Estoril, 1971, p. 437-449, Elsevier, Amsterdam (1971).

- 2) Fujimaki, M., Kato, S., Kurata, T. : *Agr. Biol. Chem.*, 33, 1144-1151 (1969).
- 3) Aoki, T., Uchida, K. : *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2113-2116 (1991).
- 4) 林部正也, 河東田茂義, 大和田 拓, 吉田 弘, 片寄篤子, 寺島 豊明 : 醱酵工学, 48, 22-28 (1970)
- 5) Nykanen, L., Suomalainen, H. : *Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages*, p. 233-248, D.Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland/Boston, U.S.A./London, England (1983).
- 6) Nunomura, N., Sasaki, M., Yokotsuka, T. : *Agric. Biol. Chem.*, 48, 1753-1762 (1984).
- 7) 本間伸夫 : 醸協, 82, 480-488, 547-553 (1987).
- 8) 熊谷純子, 菅原悦子 : 日本食品工業学会大会要旨集, p. 63 (1994).
- 9) Nunomura, N., Sasaki, M. : *Off-Flavors in Food and Beverages*, (Charalambous, G.), p. 287-312 (1992), Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo (1992).
- 10) 菅原悦子, 雑賀 優, 小林彰夫 : 日食工誌, 39, 1098-1104 (1992).
- 11) 森 修三, 布村伸武, 佐々木正興 : 日本農芸化学会大会要旨集, p. 236 (1983).



#### 4. 味噌中の揮発性含硫化合物に対する味噌酵母の関与

味噌の香気成分としての揮発性含硫化合物と耐塩性酵母との関わりを、無菌味噌と普通味噌を使用して検討した。

##### (1) 実験方法

###### ア 無菌味噌及び普通味噌の製造

無菌味噌とは麹菌以外の微生物が熟成に関与しない味噌のことであり、便宜的な呼称である。その無菌味噌は既報<sup>1)</sup>に準じて温醸4ヶ月(30°C-20日, 36°C-20日, 30°C-40日, 20°C-40日)で製造した。普通味噌は種味噌として天然熟成味噌を仕込み時に5%添加し、熟成に酵母などの麹菌以外の微生物の関与を期待するものであり、他の製造条件は無菌味噌と全く同一にした。両味噌共、赤色辛口米味噌(米/大豆=0.6, 食塩13.2%)に分類される。

###### イ 味噌中の揮発性含硫化合物の分析

供試味噌50gに食塩25gと高純水75gを加え、ホモゲナイザーを使用して5分間、攪拌・混合したものを試料とした。なお、試料中の味噌含有割合は33.3%であり、これ以上味噌濃度を高めた場合試料の粘性が強くなり、HSV法による揮発性成分の捕集量に変動が認められた。

試料中の揮発性成分の分析は前述の合成培地を使用した場合に準じた。

##### (2) 実験結果及び考察

###### ア 無菌味噌及び普通味噌の性状

全熟成期間を通じて、無菌味噌では麹菌を除く微生物の生菌は検出されなかった。これに対して普通味噌では耐塩性酵母群の他に枯草菌や乳酸菌などと推定される細菌も検出された。耐塩性酵母については、*Zygosaccharomyces rouxii*が圧倒的に多く、更に後熟型酵母である*Candida*属酵母群もかなり存在した。無菌味噌の香気は甘く、まろやかな感じを与え、他に、原料大豆臭が残っていたが、普通味噌ではいわゆる味噌らしい発酵香が認められた。

## イ 味噌中の揮発性含硫化合物

味噌中の揮発性含硫化合物 ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) として, dimethyl disulfide (無菌味噌: 0.16, 普通味噌: 0.14), dimethyl trisulfide (無菌味噌: 0.17, 普通味噌: 0.10), methional (無菌味噌: 33, 普通味噌: 24), ethyl 3-(methylthio)propanoate (普通味噌: 2.4) methionol (普通味噌: 1.0) などが同定された。ethyl 3-(methylthio)propanoateとmethionolを除く化合物は, 無菌味噌に比べ普通味噌に少ない傾向が認められるものの, 耐塩性酵母群が熟成に関与した普通味噌中での急激な減少は認められなかった。普通味噌中に認められたethyl 3-(methylthio)propanoateとmethionolの生成は麹菌以外の微生物, 特に前述の結果から耐塩性酵母によるものと考えられる。なお, dimethyl trisulfide と ethyl 3-(methylthio)propanoate は味噌中ではじめて同定された。

普通味噌の熟成には, 耐塩性酵母群の他に乳酸菌等の細菌類も関与するので, 今後の課題として, 麹菌以外の微生物の存在しない無菌味噌に耐塩性酵母や, 前述の結果から揮発性含硫化合物の起源と考えられるメチオニンを添加することによって, 味噌中の揮発性含硫化合物と耐塩性酵母の関わりを明確に究明出来るのではないかと考えている。

また, 合成培地を使用した場合に認められた3-(methylthio)propyl acetateは無菌味噌及び普通味噌中にその存在が確認できなかった。この化合物は味噌中で微量に存在することも考えられるので, 揮発性成分捕集のために用いたHSV法に比べて, 多量の味噌を試料とすることができる減圧蒸留法や有機溶剤抽出法による検討も必要と考えている。

## (3) 文献

- 1) 本間伸夫, 今井誠一 : 醗酵工学, 43, 18-26 (1965).

## 5. 総括

味噌の香気成分の生成には、発酵微生物、特に耐塩性酵母の関与が不可欠である。一方、味噌香気成分としての揮発性含窒素化合物や含硫化合物は、味噌中では微量の存在ではあるが、感覚閾値が低く、特徴ある香気を有することから、重要な化合物群である。これら揮発性化合物と耐塩性酵母との関わりについて検討した。その研究成果はつぎのごとくであった。

- (1) 揮発性成分の捕集装置の組立とその分析法を確立し、Journal of Food Composition and Analysis (U.S.A)で報告した。
- (2) 味噌原料配合より案出したグルコースと18種アミノ酸混合物及び食塩からなる合成培地を使用して、合成培地及び酵母培養液中の揮発性含窒素及び含硫化合物と酵母との関わりについて検討した。

酵母無接種培地及び酵母培養液の両者に共通して同定された揮発性含窒素化合物は pyrazine, 炭素数1~2の側鎖を持つピラジン類及び acetylpyrrole などであった。これら化合物のうち、pyrazine及びピラジン類は味噌酵母により減少する傾向にあるが、味噌酵母により新たに生成される窒素化合物はほとんど認められなかった。一方、揮発性含硫化合物として、dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, 3-(methylthio)-propionaldehyde (methional)が同定された。更に、酵母培養液ではこれら化合物に加え、3-(methylthio)propyl acetate, 3-(methylthio)-1-propanol (methionol)の生成が認められた。酵母培養液中の dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, methionalの含有量は、無接種培地での含有量の0.6~85.1%に減少した。培養液中でのこれら化合物の減少率は、供試酵母のうち、Zygosaccharomyces rouxii S84 (Z. rouxii)で大きかった。特に、食塩含有培養液中で、グルコースの消費率が低く、生育がかなり悪いにもかかわらず、Z. rouxii はこれらの化合物を 55.2~99.4%消滅させた。

Z. rouxiiによるこれら揮発性含硫化合物の生成と減少はメチオニンを単一窒素源とする無接種培地及び培養液中でも認められ、更に、これら

化合物に加え、*Z. rouxii*による ethyl 3-(methylthio)propanoate の生成も認められた。

- (3) 麹菌のみが熟成に関与する、いわゆる無菌味噌と熟成に麹菌の他に、酵母や乳酸菌なども関与する普通味噌を使用して、これら味噌中の揮発性含硫化合物について分析した。無菌味噌及び普通味噌で認められた揮発性含硫化合物は dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide 及び methional であった。また、普通味噌ではこれら化合物に加え ethyl 3-(methylthio)propanoate と methionol も同定された。ethyl 3-(methylthio)propanoate と methionol 以外は、無菌味噌に比べ普通味噌に少ない傾向にあり、また、ethyl 3-(methylthio)propanoate と methionol が普通味噌にのみ認められたことは、これら化合物に対する味噌酵母群の関与が示唆された。なお、味噌中の揮発性含硫化合物として、dimethyl trisulfide と ethyl 3-(methylthio)propanoate がはじめて同定された。

本研究は文部省科学研究費補助金で遂行することができたことを付記し、謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり、供試菌株の分譲とご指導をいただいた前新潟県食品研究所長今井誠一、松本伊差尾の両氏ならびに標準化合物の提供とGC分析にご指導いただいた高田香料(株)馬野克己博士と稲畑香料(株)松倉十一博士に深謝致します。