

味噌の香気成分と耐塩性酵母との関連に
関する基礎的研究

石原和夫

1996年9月

味噌の香気成分と耐塩性酵母との関連に
関する基礎的研究

Studies on the Relationship between the Volatile Flavor Components in
Miso and the Salt-Tolerant Yeasts.

石原和夫

Kazuo ISHIHARA

1996年9月

目 次

	頁
緒 論	1
第 1 章 耐塩性酵母の培養法及び揮発性成分分析法の確立	4
第 1 節 緒言	4
第 2 節 耐塩性酵母とその培養期間の設定	4
2-1 実験材料及び方法	4
2-1-1 供試菌株	4
2-1-2 培地及び培養方法	5
2-1-3 香気の官能評価、生育度及びpHの測定	5
2-1-4 一般成分量の測定	5
2-1-5 揮発性成分の捕集とその定量法	7
2-2 実験結果及び考察	8
2-2-1 香気の官能評価	8
2-2-2 生育曲線、グルコース及び窒素の消費率の変化	8
2-2-3 揮発性成分量の変化	10
第 3 節 耐塩性酵母の培養容器の改良	13
第 4 節 揮発性成分の捕集装置の組立とその分析法の確立	15
4-1 実験材料及び方法	15
4-1-1 試料溶液	15
4-1-2 HSV(headspace volatiles)の捕集	16
4-1-3 ガスクロマトグラフィー (GC)	17
4-2 実験結果及び考察	18
4-2-1 HSVのガスクロマトグラム	18
4-2-2 HSV捕集のための温度条件	19
4-2-3 HSVの捕集時間	21
4-2-4 捕集HSVのGCカラムへの注入条件	23
4-2-5 HSV捕集に対する食塩添加の影響	25
4-2-6 Tenax TA量	25

第5節	要約	29
5-1	培養期間の設定と培養容器の改良	29
5-2	揮発性成分捕集法の確立	30
第2章	耐塩性酵母の生成する揮発性成分	32
第1節	緒言	32
第2節	実験材料及び方法	32
2-1	供試酵母	32
2-2	培地及び培養方法	32
2-3	グルコース、エタノール及び褐変度の測定	35
2-4	揮発性成分の捕集	35
2-5	ガスクロマトグラフィー (GC)	35
2-6	ガスクロマトグラフィー・質量分析 (GC-MS)	36
第3節	実験結果及び考察	36
3-1	酵母培養液中のグルコースの消費率及び官能評価	36
3-2	揮発性成分	38
第4節	要約	45
第3章	耐塩性酵母による揮発性含硫化合物の生成と減少	48
第1節	緒言	48
第2節	18種アミノ酸培地及び酵母培養液中の揮発性含硫化合物に 対する酵母の関与	48
2-1	実験材料及び方法	48
2-1-1	供試酵母	48
2-1-2	培地及び培養方法	49
2-1-3	揮発性成分の捕集	49
2-1-4	ガスクロマトグラフィー (GC)	49
2-1-5	ガスクロマトグラフィー・質量分析 (GC-MS)	50
2-2	実験結果及び考察	50
2-2-1	酵母培養液中のグルコースの消費率	50

2 - 2 - 2	揮発性含硫化合物	51
第3節	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	53
3 - 1	実験結果及び考察	54
3 - 1 - 1	揮発性含硫化合物	54
第4節	要約	60
第4章	耐塩性酵母の生成する揮発性有機酸	62
第1節	緒言	62
第2節	18種類アミノ酸混合物を窒素源とする培地を使用した場合	62
2 - 1	実験材料及び方法	62
2 - 1 - 1	供試酵母	62
2 - 1 - 2	培地及び培養方法	63
2 - 1 - 3	揮発性酸の分離とそのブチルエステル化	63
2 - 1 - 4	揮発性酸ブチルエステルのガスクロマト グラフィー(GC)及びガスクロマトグラフィー 質量分析(GC-MS)	65
2 - 1 - 5	生育度、pH及び培養液成分の測定	65
2 - 2	実験結果及び考察	66
2 - 2 - 1	培養液中の成分量の比較	66
2 - 2 - 2	揮発性酸の同定	68
第3節	各アミノ酸を単一窒素源とする培地を使用した場合	75
3 - 1	実験材料及び方法	75
3 - 2	実験結果及び考察	75
3 - 2 - 1	培養液中の成分量の比較	75
3 - 2 - 2	揮発性酸の同定	77
第4節	要約	82
第5章	味噌の揮発性含硫化合物及び揮発性有機酸に対する耐塩性 酵母の関与	85

第1節	緒言	85
第2節	味噌の香気とヘッドガス成分	85
2-1	実験材料及び方法	85
2-1-1	未熟成無菌味噌、無菌味噌及び普通味噌の製造	85
2-1-2	生菌数測定及び耐塩性酵母群の種の同定	86
2-1-3	一般分量、不揮発性分量及び表面色の測定	86
2-1-4	揮発性分量の測定	86
2-1-5	ヘッドガス成分の分析	87
2-1-6	香気についての官能検査法	89
2-2	実験結果及び考察	89
2-2-1	供試味噌の微生物—特に耐塩性酵母	89
2-2-2	香気についての官能検査	92
2-2-3	一般分量、不揮発性分量及び表面色の比較	93
2-2-4	揮発性分量の比較	95
2-2-5	ヘッドガス成分の比較	97
第3節	味噌の揮発性含硫化合物	102
3-1	実験材料及び方法	102
3-1-1	供試味噌	102
3-1-2	味噌の揮発性含硫化合物の分析	103
3-1-3	ガスクロマトグラフィー・質量分析(GC-MS)	103
3-2	実験結果及び考察	104
3-2-1	味噌の揮発性含硫化合物	104
第4節	味噌の揮発性酸	108
4-1	実験材料及び方法	108
4-1-1	供試味噌	108
4-1-2	揮発性酸の分析	108
4-2	実験結果及び考察	109
4-2-1	味噌中の揮発性酸の同定	109
第5節	要約	112
5-1	味噌の香気成分	112

5 - 2	味噌の揮発性含硫化合物	113
5 - 3	味噌の揮発性酸	113
第 6 章	総括及び結論	115
引用文献		123
本研究に関する参考論文等		136
謝辞		140
A b s t r a c t		141

結 論

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。味噌は大別すると、原料の麴の種類からは、米麴味噌（例としては信州、越後味噌）、豆麴味噌（八丁味噌）、麦麴味噌（田舎味噌）に分類される。また、味の面からは、麴歩合と食塩量によって、甘味噌（西京味噌）、甘辛味噌（相白味噌）、辛味噌（信州、越後味噌）に、更に、色からは白味噌（西京味噌）、淡色味噌（信州味噌）、赤味噌（越後、仙台味噌）に分けられる。このうち85%近くを占めるのが米麴味噌である。その米麴味噌（以下、味噌）は蒸煮大豆と蒸米に麴菌を増殖させた米麴及び食塩を原料とし、発酵・熟成して製造する。この発酵・熟成の過程で、麴菌由来の酵素のほかに、酵母や乳酸菌などの発酵微生物が関与して味噌特有の風味が醸成される。なお、味噌熟成に関与する酵母や乳酸菌は、味噌という高濃度食塩含有培地に生育可能な耐塩性のあるものに限られる。一方、醤油は通常、加熱処理した脱脂大豆と小麦で製麴し、食塩を加えて、その熟成に味噌と同じ種類の耐塩性酵母や乳酸菌が関与して出来上がる。

味噌の全国工業出荷量は、昭和48年（1973）の58万トンをピークに年々減る傾向にあり、その一方で市場は寡占化が次第に進行している。味噌製造の寡占化は味噌の品質を画一的にするおそれがあり、そして、画一化された味噌の品質が、消費減少の新たな一因になると考えられる。味噌の消費減少に歯止めをかけ、少しでもその消費を回復させるには、差別化された品質の味噌や高品質の味噌造りが要求される。また、近年、明らかにされつつある、味噌の抗腫瘍性や血圧調節機能のほか、抗酸化性、乳化性、香気吸着性等の種々の機能性を前面に押し出すことや、更に、醤油のごとく世界の調味料の域までに発展させることなどが考えられる。

醤油は平成5年度では世界60ヶ国に輸出され、輸出高も22億円となったが（しょうゆ輸出実績 1994）、味噌の輸出は38ヶ国で、その輸出高は8億円であり（味噌輸出通関実績 1994）、醤油の域までに達していない。その原因として、醤油は液体、味噌は半固体という大きな違いの他に、香気の違いがあげられる。醤油の香気は万人に受け入れられる傾向にあるが、味噌の香気はその強い個性

故に、好悪両面を持ち合わせている。そこで、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（本間ら 1970； 本間と石原 1977a； 本間と石原 1978a、1978b； 本間と石原 1979； 本間と石原 1987a； 本間と石原 1989）。

その結果、味噌の香気は、(1)大豆や米などの原料に由来する香気成分、(2)*Aspergillus oryzae*の麴菌酵素による原料の分解により生成される香気成分、(3)耐塩性酵母や耐塩性乳酸菌などの発酵微生物により生成される香気成分、(4)原料成分の熟成中及び加熱処理に伴って化学的反応により生成される香気成分などから成りたっていることが解り、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味噌の香気付与あるいは矯正に不可欠であることなども解った。しかし、その耐塩性酵母の香気付与のメカニズムはいまだ詳細には解明されていない。

耐塩性酵母による味噌香気付与のメカニズム究明の方法としては、味噌仕込時に酵母を添加し熟成された味噌の香気を研究する方法がある（安平と望月 1969a）。更に、麴菌のみが味噌の熟成に関与する、いわゆる無菌醸造味噌と麴菌の他に発酵微生物がその熟成に関与する普通醸造味噌との比較による研究方法などがある（本間と今井 1965a； 本間と石原 1978a、1978b； 本間 1982； 望月 1962）。しかしながら、これらの方法では原料よりの麴菌酵素や酵母以外の微生物による香気生成や、非生物的化学反応によって香気が生じられるため解析を複雑にしている。そこで、著者はこれらの方法に加えて合成培地の使用などにより耐塩性酵母の香気付与のメカニズムの究明も必要と考え、種々検討を加えてきた（石原ら 1970； 石原と本間 1983； 石原と本間 1985a； 石原ら 1985b； 石原ら 1995）。なお、合成培地使用による、耐塩性酵母の香気生成に関する研究は、アルコール類（安平ら 1968）、有機酸類（森ら 1980）及び含硫化合物のメチオノール（AOKI and UCHIDA 1991； 林部ら 1970）等に関する報告はあるが、いまだ系統的な研究はみあたらない。

本研究においては、食品香気を構成する揮発性成分の分析法を確立するとともに（ISHIHARA and HONMA 1992）、味噌の原料配合をもとに案出した合成培地を使用して、合成培地の加熱処理や耐塩性酵母により生成されたり減少された

りする揮発性成分について分析した。すなわち、合成培地における揮発性成分の消長に対する耐塩性酵母の役割について検討した。揮発性成分としては、主に、食品香気の好悪両面に著しい影響を及ぼす揮発性含硫化合物と揮発性有機酸を対象とした。更に、耐塩性酵母や乳酸菌等の発酵微生物を関与させないで、麹菌のみで製造した、いわゆる無菌醸造味噌をはじめとして、種々の味噌中の香気成分を分析することによって、味噌の香気成分と耐塩性酵母との関連について究明した。

以下、これらの結果について詳細に論述する。

第1章 耐塩性酵母の培養法及び揮発性成分分析法の確立

第1節 緒言

味噌の原料は清酒などのアルコール発酵飲料と異なり、大豆と米のほかにか
なりの食塩が使用されることに特徴がある。そこで、耐塩性酵母が食塩存在下
で生成する揮発性成分の究明にあたり、まず、培養期間の検討が必要であった。
なぜならば、耐塩性酵母は10~20%の食塩存在下ではその生育がかなり遅く、
更に、耐塩性酵母の菌株間にその生育の違いが認められるためである。

また、耐塩性酵母培養液や味噌中の揮発性成分の分析にはガスクロマトグラ
フィーやマススペクトロメトリーなどが利用される。そのためには試料の前処
理、特に揮発性成分濃縮物の調製が必要であった。揮発性成分濃縮物の調製法
としては、ポーラスポリマー吸着剤による吸着法や減圧蒸留法などがあり、こ
れらの実験法の検討も必要であった。そこで、本章では耐塩性酵母の培養法と
揮発性成分分析法の確立を行った。

第2節 耐塩性酵母とその培養期間の設定

耐塩性酵母の生成する揮発性成分の究明にあたり、ある1時点を取り上げて
論ずる場合、菌株間の生育度の違いなど考慮せずに培養期間を決定するには問
題がある。そこで耐塩性酵母により生成される主なる揮発性成分量の経時変化
を調べ、最適な培養期間を求めた。

2-1 実験材料及び方法

2-1-1 供試菌株

実験には、味噌熟成の主要酵母で、赤色辛口米味噌より分離された *Zygosac-*
charomyces rouxii S84 (以下、*Z. rouxii* S84) (松本と今井1973) と *Can-*
didia versatilis D-5 (以下、*C. versatilis* D-5) (今井と松本 1975a、197
5b) の2株を用いた。いずれも0~12%の食塩存在下で良く生育し、24%の食塩

存在下でも生育可能な耐塩性酵母であり、新潟県食品研究所より分譲していただいた。

なお、*Zygosaccharomyces rouxii* は味噌熟成の全期間にわたり常駐し、増殖する主酵母であり、発酵型の味噌の香味形成には不可欠とされている。一方、*Candida versatilis* は長期熟成の後期にみられ、後熟型酵母と呼ばれ、アルコール発酵の他に、味噌や醤油の特徴香の一つである4-ethylguaiacol等を生成する(海老根 1994)。また、*Zygosaccharomyces rouxii* と *Candida versatilis* は、味噌と同様、醤油熟成の主酵母であり、後熟型酵母でもある。

2-1-2 培地及び培養方法

保存培地、前培養培地、本培養培地の組成をTable 1-1に示した。

前培養はガラス製遠沈管を利用し、保存培養したものより数白金耳接種し、30℃で3日間静置培養した。前培養したのものから無菌的遠心分離により菌体のみを捕集し、滅菌12.5%食塩水で2回洗浄し、この食塩水1mlに生菌数約 5×10^7 になるように懸濁させた。本培養培地調製にあたっては加熱滅菌時におけるアミノ・カルボニル反応などの影響をさけるため、グルコース溶液とその他の成分溶液を別々に120℃で10分間高压滅菌した。そして、接種時1lの三角フラスコに酵母懸濁液と本培養培地が600mlになるように調整した。なお、酵母の接種菌数は600ml当り 3×10^8 とした。培養は30℃で1日、3日、5日、7日、10日の各期間、そして*C. versatilis* D-5に関しては、更に15日間と20日間静置培養を行った。

2-1-3 香気の官能評価、生育度及びpHの測定

各期間培養後、培養に伴う揮発水分量を補充し、香気(立ちばな)の官能評価を行った。生育度はエルマ光電比色計を使用し、660nmにおける吸光度(OD)で示した。ただし、対照として無接種培地を用いた。pHは培養液について直接pHメーター(日立堀場製)で測定した。

2-1-4 一般成分量の測定

培養液を3,500rpmで10分間遠心分離し、その上澄液についてグルコース量はフェノール-硫酸法(DUBOISら 1956)、全窒素量はケルダール法で測定した。

Table 1-1. Composition of media.^a (//)

For stock culture ^b		Glucose	20g	Biotin	2 μ g
Glucose	50g			Ca-pantothenate	0.4mg
Raw soy sauce	100ml	18 Amino acids ^c	0.4g	Inositol	2.0mg
NaCl	83g	(as N)		Nicotinamide	0.4mg
Agar	22g			<i>P</i> -Aminobenzoic acid	0.2mg
pH 5.3				Thiamin HCl	0.4mg
				Riboflavin	0.2mg
				Pyridoxine HCl	0.4mg
For preculture ^b					
Glucose	50g	KH ₂ PO ₄	2g		
Raw soy sauce	100ml	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1g		
NaCl	125g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g		
		FeSO ₄ · 7H ₂ O	10mg	NaCl	125g
		MnSO ₄ · 7H ₂ O	10mg		
		ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10mg		
				pH 4.5	

^a The medium for *S. cerevisiae* contained no sodium chloride.

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

^c The mixture of 18 amino acids was prepared according to the amino acid composition of soybeans. Glucose/N (C/N) =50.

The amino acid composition of soybean (domestic) was quoted from "The standard tables of food composition in Japan and amino acid composition of foods" (Resources Council, Science and Technology Agency, Japan, 1966).

18 amino acids: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Phe, Tyr, Try, Cys · Cys, Met, Pro, Glu, Asp, His, Arg, Lys.

また、無接種培地のグルコース量と全窒素量を測定し、それをもとにグルコース及び窒素の消費率を求めた。

2-1-5 揮発性成分の捕集とその定量法

YAMANISHIら(1970)に準じて組み立てた減圧蒸留装置(Fig. 1-1)を用いて、培養液中の揮発性成分を水とともに蒸留し、水溶液として捕集した。

まず、減圧蒸留装置左のフリーザーでメタノールを冷却し、それを循環ポンプでトラップAの槽へ送り、トラップAを冷却するとともにコンデンサーも冷却する。トラップBとCは右のフリーザーで -80°C まで冷却しておく。留液の調製は培養液200mlをpH 2あるいはpH 7に調整しFig. 1-1のコルベンに入れ、10mm-Hg以下で培養液が乾固するまで減圧蒸留を行った。更に、乾固された残渣に少量の蒸留水を添加し懸濁液とした後、減圧蒸留を繰り返す、留液を合わせ250 mlの定容とした。なお、留液はほとんどトラップAに捕集され、トラップBには少量の水結、トラップCには極めてわずかな水結が認められた。トラップBとCの水結を解凍後、留液をすべて合わせて分析に供した。

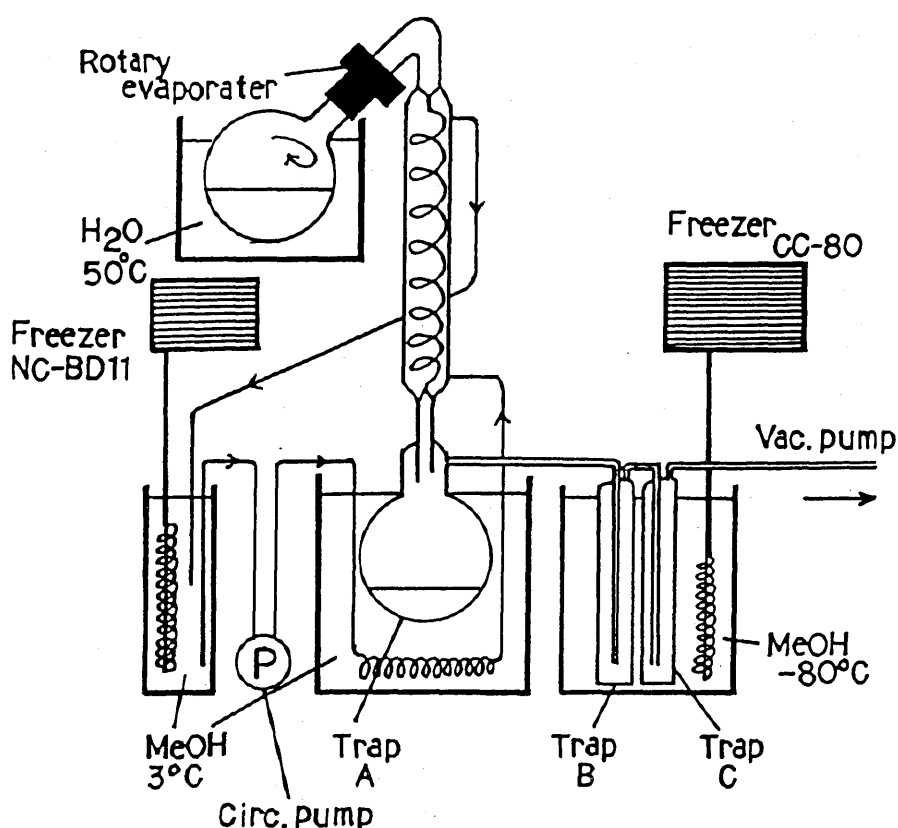


Fig. 1-1. Apparatus for isolation of volatiles.

総アルコールは $\text{Ce}(\text{NO}_3)_4 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3$ を用いる比色法（船久保 1967）で測定し ethanol として示し、フーゼル油はバニリン-硫酸法（日本分析化学会編 1971）により 3-methylbutanol として求めた。総アルデヒドは 3-methyl-2-benzothiazolinehydrazone として比色法（SAWICKIら 1961）により測定し、ethanal として求めた。ethanal 自身も *p*-Hydroxybiphenyl を用いる比色法（DAWESら 1971）により定量した。揮発性有機酸はアルカリ滴定法で酢酸として求めた。

2-2 実験結果及び考察

2-2-1 香気の官能評価

Z. rouxii S84 と *C. versatilis* D-5 の培養液の香気を比較したところ、前者にはさわやかな、軽い清酒様香気と甘い果実様香気が認められ、後者には重い感じの清酒様香気と弱い醤油様の香気が認められた。両菌株とも培養期間の経過に伴い香気は強くなり、培養初期に認められたさわやかさと軽い感じが減り、重い感じの香気に変化した。また、培養終期にはエタノール様の刺激臭や自己消化様の臭気も認められた。なお、両菌株の留液についても香気を官能評価したところ、培養液を pH 2 に調整し得られた留液の香気はほぼ培養液の香気を再現していたが、pH 7 に調整し得られた留液からは土臭さやアルカリ臭が認められた。このことから、耐塩性酵母の培養液の香気において酸性物質やエステル類の重要性が考えられた。

2-2-2 生育曲線、グルコース及び窒素の消費率の変化

Z. rouxii S84 と *C. versatilis* D-5 の生育曲線と培養経過に伴うグルコース及び窒素の消費率の変化を Fig. 1-2 に示した。

この図の生育曲線からは *Z. rouxii* S84 の生育誘導期が認められないが、誘導期は非常に短いものと考えられる。*Z. rouxii* S84 の生育は 1 日目～3 日目の生育が急速であり、7 日目を最高に 10 日目には減少した。このことから 7 日目以降に自己消化の進行があると考えた。一方、*C. versatilis* D-5 の生育は *Z. rouxii* S84 の生育に比べかなり遅く、*Z. rouxii* S84 の 5 日目の生育度に達したのは 20 日目であった。また、*C. versatilis* D-5 には 1 日間の生育誘導期が認められ、

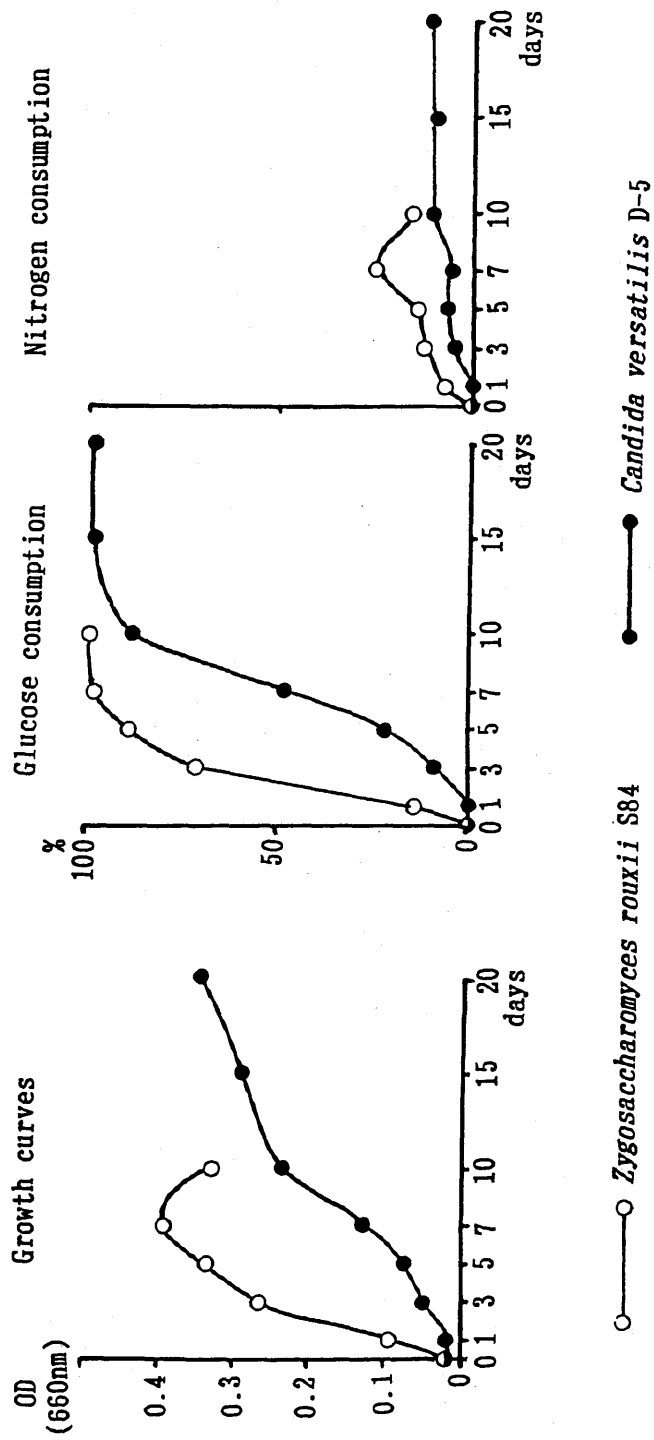


Fig. 1-2. Growth curves and changes of consumption of glucose and nitrogen in media during incubation of the salt-tolerant yeasts.

対数期の生育も *Z. rouxii* S84に比べゆるやかであったが、7日目から10日目にかけて比較的急速な生育が認められた。

両菌株の培養経過に伴うグルコースの消費率の変化は、ほとんど生育度の増加傾向に対応していた。すなわち、*Z. rouxii* S84のグルコースの消費は7日目まで急速に行われ、7日目に97.5%、10日目には98.8%の消費率を示した。また、グルコースの40%近くは1日目～3日目の間に消費され、急速な生育が認められた期間に一致した。*C. versatilis* D-5のグルコース消費は、生育と同様、*Z. rouxii* S84に比べかなり遅いことが認められた。*C. versatilis* D-5の7日目及び10日目のグルコース消費率はそれぞれ48.5%、88.3%であり、グルコース消費率が98.5%に達するのは15日目であった。20日目のグルコース消費率は98.3%と15日目とほとんど変化なく、グルコースは15日間でほとんど消費しつくされたことが認められた。また、*C. versatilis* D-5の生育の1日目ではほとんどグルコースの消費がないことと、グルコース40%近くが7日目～10日目にかけて消費されたことは生育度の増加の傾向と一致した。一方、窒素の消費はグルコースの消費に比べ少なく、*Z. rouxii* S84が7日目に消費率24.9%に達したのが最高値であった。*Z. rouxii* S84の5日目～7日目にかけて比較的急速な窒素の消費が認められるものの、両菌株とも全期間を通じて、ゆるやかに窒素を消費した。窒素の消費傾向はおおむね生育曲線やグルコースの消費傾向に似ているが、対数期における急速な生育の増加やグルコースの消費に対応しての急速な窒素の消費は認められなかった。*Z. rouxii* S84の10日目の残存窒素量は7日目のそれよりも多く、このことは前述の7日目以降に自己消化の進行があるとしたことを支持しているように考えられる。

2-2-3 揮発性成分量の変化

前述のごとく、培養液をpH 2で調整し得られた留液がほぼ培養液の香気を再現していたので、この留液について揮発性成分の定量を行い、その変化をFig. 1-3に示した。

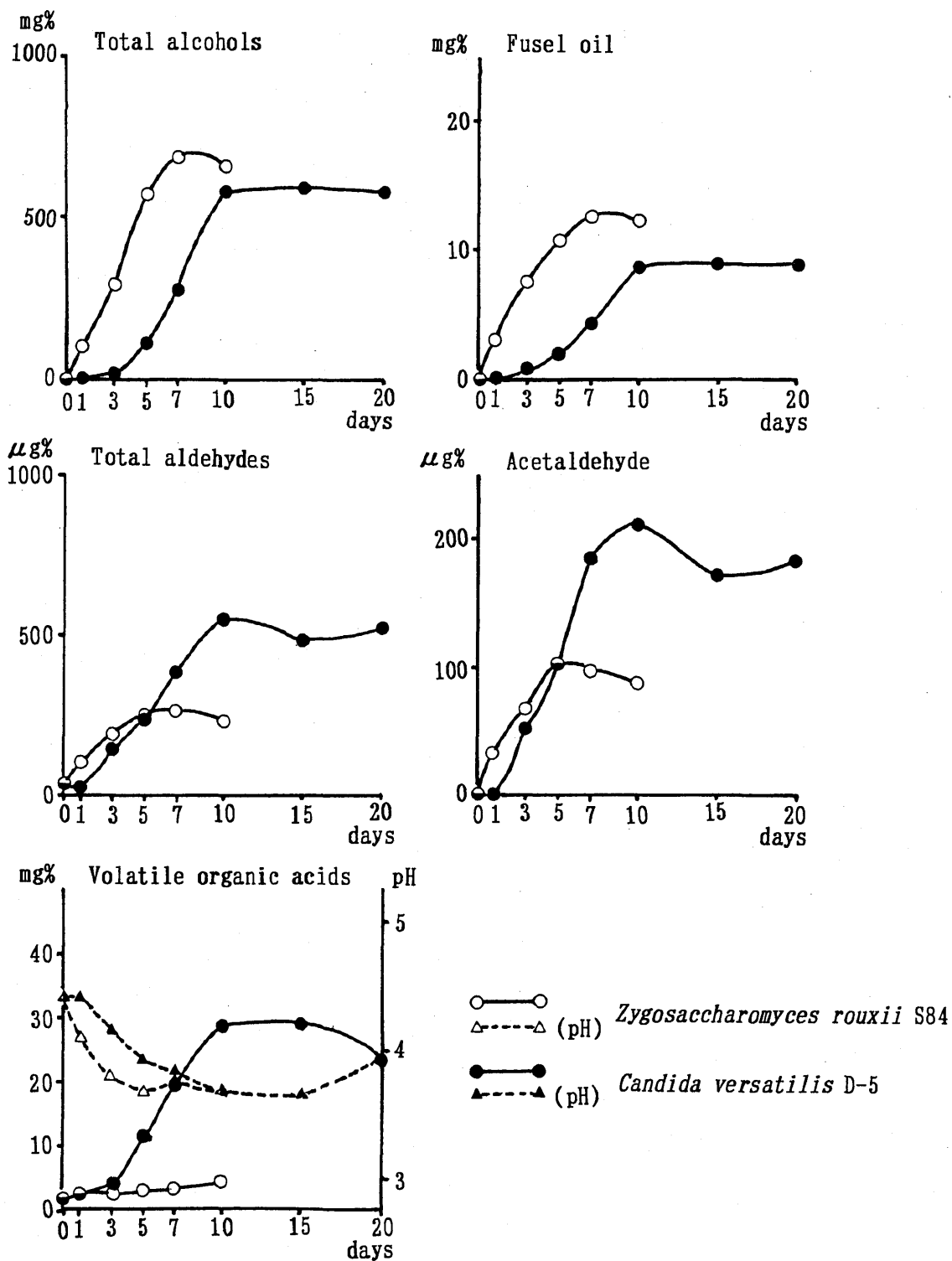


Fig. 1-3. Changes of various volatile components in cultured media during incubation of the salt-tolerant yeasts.

(1) 総アルコール及びフーゼル油

総アルコール及びフーゼル油の生成量の変化はほぼグルコースや窒素の消費の傾向に対応していた。すなわち、Z. rouxii S84の総アルコール及びフーゼル油の生成は1日目より認められ、両成分は更に5日目まで急速に増加し、7日目には最高量に達した。7日目はグルコース消費率が97.5%とグルコースがほとんど消費つくされた期間であり、且つ、窒素の消費率が最高に達した期間でもあった。グルコースの消費率は10日目まで更に1%近く伸びるが総アルコール量は逆に少し減少した。これはグルコースからアルコール以外の成分への変換や培養期間中の香気の飛散などが考えられる。しかし、香気の飛散に関しては、Z. rouxii S84より培養期間の長いC. versatilis D-5に両成分の減少がほとんど認められないことから検討を要する。また、10日目には窒素消費率が10%近くも低下するが、アミノ酸より生成されると考えられるフーゼル油の減少はわずかであった。C. versatilis D-5の総アルコール及びフーゼル油の生成速度はZ. rouxii S84に比べかなり遅く最高量に達したのは総アルコールが15日目、フーゼル油が20日目であり、これはグルコースや窒素の消費傾向に一致していた。また、量的には両成分ともZ. rouxii S84の方がC. versatilis D-5よりも多いことが認められた。最高値での総アルコール中のフーゼル油の占める割合は両菌株とも2%弱であった。

(2) 総アルデヒド及びethanal

総アルデヒドとethanalの生成量はともにC. versatilis D-5の方がZ. rouxii S84よりかなり多く、最高値での比較でほぼ2倍であることが認められた。これら両成分量の差が両菌株の香気の違いの一因になっていると考えられる。両成分の最高量に達する期間はZ. rouxii S84が5日目～7日目、C. versatilis D-5が10日目であり、これ以降わずかながら減少の傾向にあった。これら減少傾向はアルコール類に認められないことから飛散によるとは考えられず、アルコール類などへの変換が考えられる。また、これら最高量に達する期間は、グルコースの消費率やアルコール類の生成量が最高に達する日より2～5日間速いことが認められた。総アルデヒド中のethanalの占める割合を最高値で計算すると、両菌株ともかなり大きく約39%であった。

(3) 揮発性有機酸

C. versatilis D-5の揮発性有機酸の生成量は *Z. rouxii* S84のそれに比べかなり多く、最高値での比較でほぼ10倍であることが認められ、アルデヒド類と同じく両菌株の香気の差の一因になっていると考えた。前述の香気に対する酸性物質の重要性からも *C. versatilis* D-5の揮発性有機酸に関して更に詳細な検討を要すると考えられる。*C. versatilis* D-5の揮発性有機酸量はグルコースの消費率が最高に達する15日目が最高値であった。また、20日目には揮発性有機酸量の減少が認められるが、生育度は逆に増加していることから、ほとんど消費しつくされたグルコースに代わり炭素源として利用された可能性が考えられる。*C. versatilis* D-5の培養液のpH変化は揮発性有機酸の生成量に対応し、生成量が多くなればpHも低下した。一方、*Z. rouxii* S84の揮発性有機酸の生成量は *C. versatilis* D-5に比べわずかであり、培養経過に伴う顕著な増加も認められなかった。また、pHの変化も揮発性有機酸の生成量の変化に対応しなかった。

以上の結果から、耐塩性酵母の生成する香気について研究を進めるにあたり、培養期間を設定する場合、炭素源がほぼ消費しつくされた期間にすることが、使用菌株に対し一律に規定することよりもより妥当と考察した。ただし、各耐塩性酵母の生育度も含めた研究目的の場合には、当然、培養期間を一律に規定することも必要と考えられる。

第3節 耐塩性酵母の培養容器の改良

第2節で、耐塩性酵母の培養期間の設定について検討した。その際、耐塩性酵母の培養に伴い培養溶液の減少が認められ、その減少量分は実験条件を一定にするため、蒸留水で補った。第2節の結果から、耐塩性酵母の培養期間を炭素源がほぼ消費しつくされた期間にした場合、耐塩性酵母の菌株によってその培養期間が異なるため、それらの培養溶液の減少量分も異なることになる。また、培養溶液が減少するという事は、耐塩性酵母が生成した香気成分も減少していることが考えられる。この培養溶液の減少は、実験に使用した綿栓付きの三角フラスコに原因があり、培養期間に伴う培養溶液の減少を防止するには、培養容器の改良が必要であった。改良した培養容器をFig. 1-4に示した。

改良型培養容器は1Lの三角フラスコとシリコンゴム栓に長さ40cmの冷却管を付属させたものから成り立ち、冷却管は、更に、樹脂製の保温剤で包んだ。冷却管には、シャープ製の冷却水循環装置を用い、10°C以下の冷却水を循環させた。なお、培養のための加温は孵卵器に替え、恒温槽を用いた。

この改良型培養容器を使用することにより、培養期間が長期にわたっても、培養溶液の減少はほとんど認められなかった。ただ、この改良型培養容器を使用して、培養経過に伴う揮発性成分の飛散についても検討しなければならないが省略した。なぜならば、培養溶液の減少がほとんど認められなかったので、揮発性成分の飛散があってもごくわずかであろうと推察した。また、実際の味噌製造容器も完全密閉型ではないので、表題の研究を遂行するにあたって揮発性成分飛散の検討は必要ないと考えた。

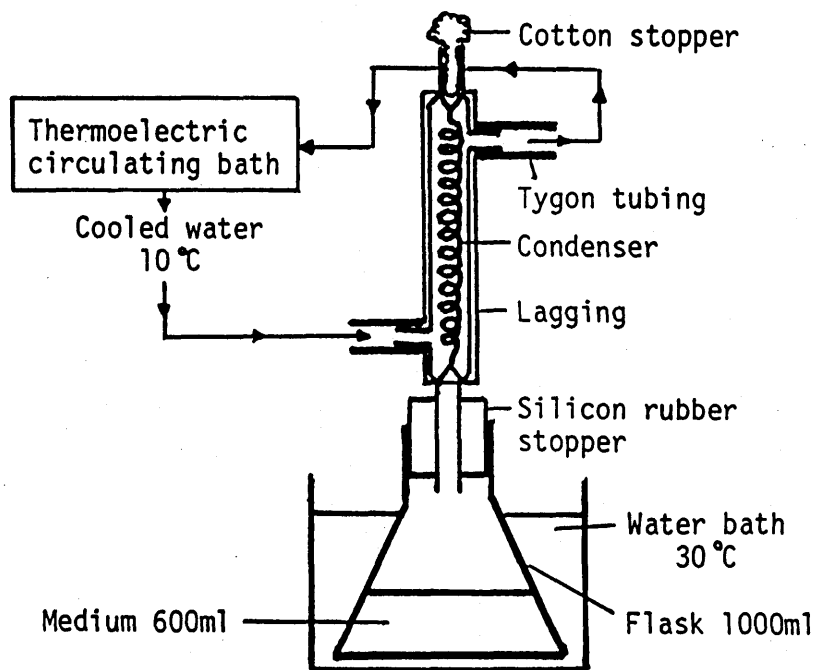


Fig. 1-4. Apparatus for culture of yeasts.

第4節 揮発性成分の捕集装置の組立とその分析法の確立

本研究を遂行するにあたって、培養法の検討とともに揮発性成分の捕集装置の組立とその分析法の検討が必要であった。

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(以下、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(第2節参照)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、捕集剤として Tenax GC (2,6-diphenyl-*p*-phenyleneoxide polymer) などを用いる濃縮方法が多数報告されている (AISHIMA 1982; BARNESら 1981; BOYKOら 1978; IOFFEら 1984; KUOら 1977; LEAHYとREINECCIUS 1984; OLAFSDOTTIRら 1985; SHIMODAら 1984; TSUGITAら 1979)。本節では、著者独自の揮発性成分捕集装置を組み立て、Tenax GCより高純度の Tenax TA を使用して、モデル試料溶液を用い、量的に再現精度の高い香気捕集条件を確立した。

4-1 実験材料及び方法

4-1-1 試料溶液

実験に使用した試料溶液中の揮発性化合物の種類と濃度を Table 1-2 に示した。なお、揮発性化合物として、アルコール類を主体に選んだが、これは、耐塩性酵母の主な作用がアルコール発酵であることに基づいた。また、2,3-xyleneol 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 を用い、蒸留水をイオン交換樹脂及びメンブランフィルターを通して採取した蒸留純水(以下、高純水)に溶解させ試料溶液とした。

Table 1-2. Volatile compounds solution.

GC peak no. ^a	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

^aNumber refers to Fig. 1-6 and Fig. 1-8.

4 - 1 - 2 HSV(headspace volatiles)の捕集

HSV捕集のためFig. 1-5の装置を製作した。

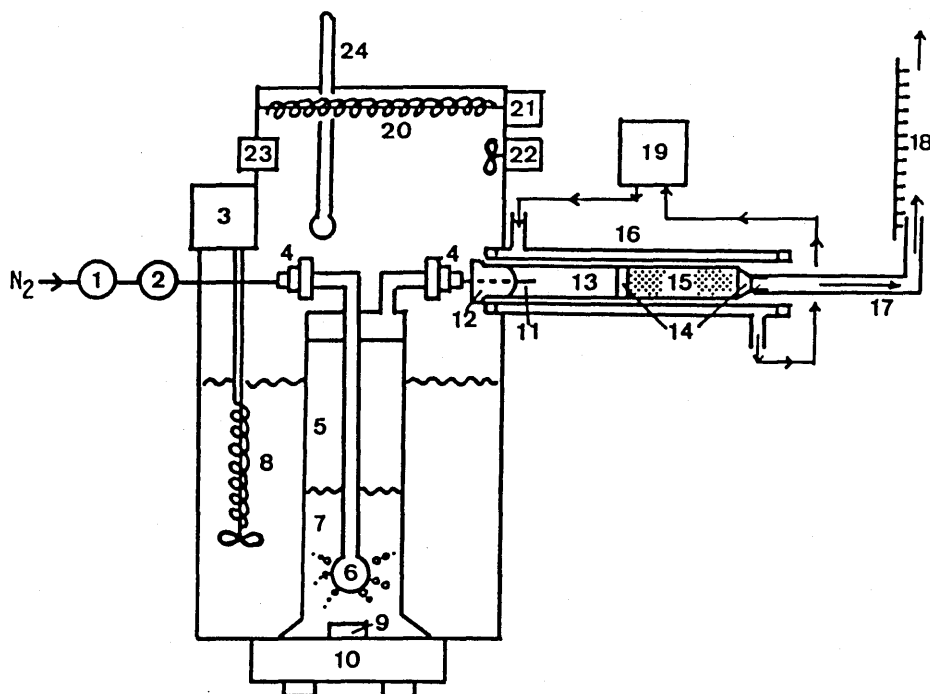


Fig. 1-5. Headspace volatiles trapping apparatus.

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.

試料溶液100ml (食塩 0~30g 含) を250ml容量のガス洗淨瓶 (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. 1-5 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. 1-5 no.23) よりヘアー 드라이ヤーを使用して温風を送った。続いて、マグネチックスタ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%) 1.5~4.5 l (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管部の三箇所の温度調節が可能になった。

4-1-3 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 (検出器: 水素炎イオン化ディテクタ; FID) により行った。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 $\mu V \cdot sec$ を面積1 digitとして示した。その他の条件についてはFig. 1-6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統計学的処理により、変動係数 $CV = s / \bar{x} \times 100$ (s: 標準偏差, \bar{x} : 平均値) を求め、その再現精度を調べた。なお、HSV化合物のガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (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 (The Mass Spectrometry Data Centre 1983) をもとに行った。GC-MS分析条件は、第2章に記述した条件に準じた。

4-2 実験結果及び考察

4-2-1 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°Cに調節し、試料容器上端部及びTenax TA管部の温度は無調節の室温(約20°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°Cに加熱し、窒素ガスをTenax TA管経由で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. 1-6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°C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ethanolのピークは小さく、ピークno.8のbenzyl alcohol及びピークno.9の2-phenylethanolのピークは認められなかった。また、2,3-xyleneol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。

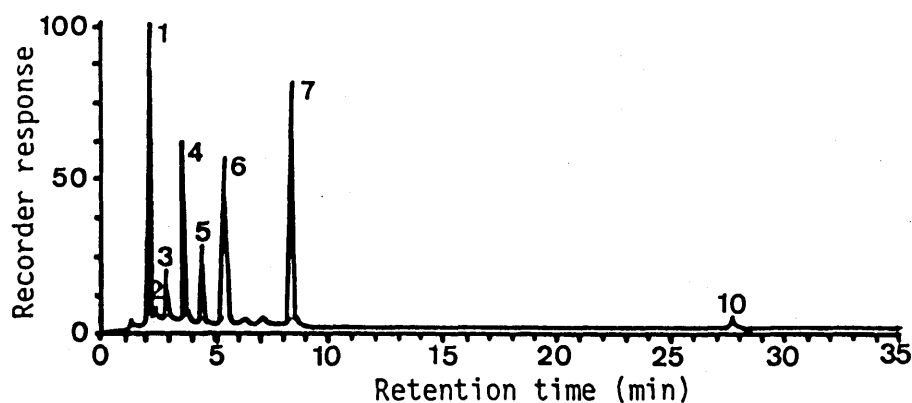


Fig. 1-6. Gas chromatogram of headspace volatiles (HSV) collected from the sample solution.

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

Column temp.: 60°C-(4°C/min)-200°C.

Detector: flame ionization detector (FID), 250°C.

Carrier gas: N₂, 1mL/min. Split ratio: 1:50.

HSV collection conditions refer to A in Table 1-3.

Peak no.:

1: ethyl acetate, 2: ethanol, 3: 1-propanol, 4: 2-methyl-1-propanol,

5: 1-butanol, 6: 3-methyl-1-butanol, 7: 1-hexanol, 10: 2,3-xyleneol.

4-2-2 HSV捕集のための温度条件

試料溶液部を45°C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°C）、45°C及び50°C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 1-3に示した。

benzyl alcoholと2-phenylethanolのピークは室温では認められなかったが、45°Cまたは50°C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、香気捕集装置の三部を45°C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。一方、試料容器上端部50°C、Tenax TA管部45°C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°C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ら（1984）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°C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(He)の通気を行っている（AISHIMA 1982； BARNESら 1981； BOYKOら 1978； KUOら 1977； OLAFSDOTTIRら 1985； 箴島 1988； SHIMODAら 1984）。それによって、BOYKOら（1978）は、55°Cで、窒素ガスを30ml/minの流速で通気しながら20分間の水除去を行うと低沸点化合物の損失が認められたと言っている。このことは、Tenax管中の水除去のための操作が省略できれば望ましいことを示唆している。

Table 1-3. 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	
	$\bar{X},^d \times 10^4$	CV ^e	$\bar{X}, \times 10^4$	CV	$\bar{X}, \times 10^4$	CV	$\bar{X}, \times 10^4$	CV
	S ^a : 45°C, U ^b : Ca. 20°C, T ^c : 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

^{a, b, c}The keys of S, U and T indicate the temperature of sample solution, upper part of sample vessel and Tenax TA tube, respectively.

^dAverage GC peak area. ^eCoefficient 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 N₂ 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 N₂ flow rate.

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、試料溶液の場合と同様、揮発性成分捕集装置の各部の温度を45℃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. 1-7に示した。ただし、Fig. 1-7の感度はFig. 1-6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。The Mass Spectrometry Data Centre (1983)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2.9%であった。本法では、このように水が存在しても、 m/z が18と17のごとく、1質量差まで正確に識別できたので、この程度の水の存在はGC-MSにとって支障ないと考えた。

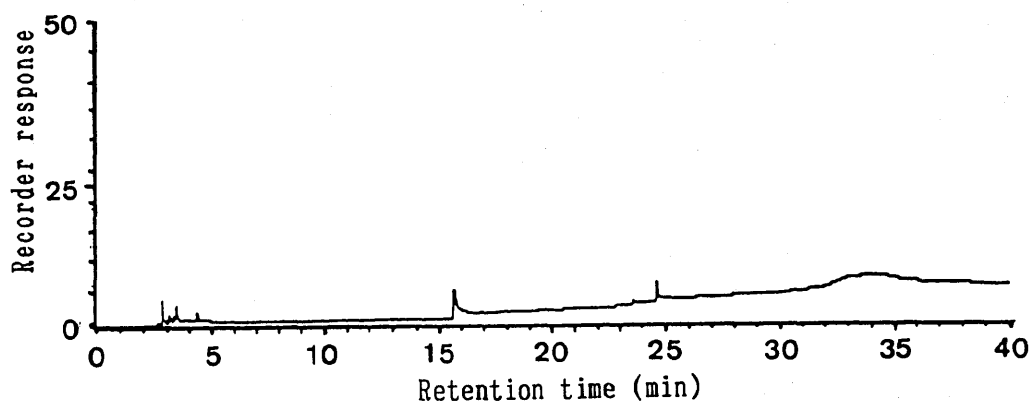


Fig. 1-7. Gas chromatogram of headspace volatiles (HSV) collected from distilled pure water.

See GC conditions except for the column temperature in Fig. 1-6.
After the column temperature was held for 5 min at 60°C, it was programmed from 60°C to 200°C at 5°C per min and held for 7 min.
HSV collection conditions refer to A in Table 1-6.

4-2-3 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時間及び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 1-4に示した。

Table 1-4. Comparison of statistical results for the reproducibility of GC analysis for headspace volatiles (HSV) collected for 0.5,^a 1, and 1.5 h at a 50 mL/min high-purity N₂ flow rate.

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

^aThe data of 0.5 h collection time refer to B in Table 1-3.

^bAverage GC peak area. ^cCoefficient 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 1-3; NaCl, 10 g/100 mL; HSV transfer time from Tenax TA to GC at 240°C, 0.5 min at 65.7mL/min N₂ flow rate.

HSV捕集時間を1時間にした場合、他の捕集時間に比べ、揮発性化合物捕集の変動が比較的小さく、且つ、高沸点化合物の捕集量が比較的大きかったので、最適捕集時間とした。HSV捕集時間が長くなるにつれ3-methyl-1-butanol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、0.5時間のHSV捕集時間では時間不足であり、逆に、0.5時間以上では2-methyl-1-propanol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。LEAHYとREINECCIUS (1984) は HEWLETT PACKARD社 (アメリカ) のPurge and Trap Sample Collection System を用いた実験で、窒素ガス通気時間を30分から1時間にするとアルコールやエステルはTenax管に捕集されずに通過する傾向があるが、その通過量はわずかであったと報告している。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、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への水の捕集量が少なかったため、水除去のためのプロセスを省略した。1.5時間のHSV捕集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、このことが原因でbenzyl alcohol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。

4-2-4 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、窒素ガスをTenax TA管経由で送気し、Tenax TAに捕集された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。その結果をTable 1-5に示した。

Table 1-5. 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 N₂ flow rate.

Compound	A			B		C	
	0.5 min			1 min		2 min	
	$\bar{X},^a \times 10^4$	CV ^b		$\bar{X}, \times 10^4$	CV	$\bar{X}, \times 10^4$	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

^aAverage GC peak area. ^bCoefficient 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 1-3; the collection time, 1 h at 50 mL/min high-purity N₂ flow rate; NaCl, 10 g/100 mL.

4-2-5 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 1-6に示した。

ethyl acetateとethanol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-phenylethanolと2,3-xyleneolではそれぞれ2.1倍、2.4倍捕集率が高まり、他の化合物では捕集率が1.7~1.9倍増加し、食塩影響の大なることを認めた。なお、ethanolや1-propanol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、やや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(KUOら 1977)。また、benzyl alcoholや2-phenylethanolのピーク面積値の小さいのも、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(TSUGITAら 1979)。このように揮発性成分捕集に対する食塩濃度の影響が大きいので、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る。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。

4-2-6 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。ethanolを除く、ethyl acetateから3-methyl-1-butanol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、1-hexanolより高沸点の化合物に関してはTenax TA量の影響は認められなかった。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(Table 1-6、Table 1-7)。

Table 1-6. 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 ^b		$\bar{x}, \times 10^4$	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	

^aAverage GC peak area. ^bCoefficient 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 1-3; the collection time, 1 h at 50 mL/min high-purity N₂ flow rate;

HSV transfer time from Tenax TA to GC at 240°C, 2 min at 65.7 mL/min N₂ flow rate.

Table 1-7. Comparison of statistical results for the reproducibility of GC analysis for headspace volatiles (HSV) collected by three different quantities of Tenax TA^a.

Compound	A			B		
	Tenax TA 100 mg		CV ^c	Tenax TA 300 mg		CV
	$\bar{x}, ^b \times 10^4$			$\bar{x}, \times 10^4$		
Ethyl acetate	1.18	4.8	11.95	16		
Ethanol	0.03	65	0.05	27		
1-Propanol	0.43	7.5	1.35	3.1		
2-Methyl-1-propanol	3.54	9.2	14.13	4.2		
1-Butanol	3.64	6.7	13.94	2.7		
3-Methyl-1-butanol	27.00	4.0	42.65	6.2		
1-Hexanol	51.29	1.8	52.08	6.3		
Benzyl alcohol	0.84	13	0.74	18		
2-Phenylethanol	1.19	17	1.11	25		
2,3-Xylenol	34.28	3.5	31.30	9.3		

^aThe data of Tenax TA quantity of 200 mg refer to C in Table 1-6.

^bAverage GC peak area. ^cCoefficient of variation for 4 runs.

HSV collection conditions except Tenax TA quantity:

the temperature condition, S:45°C, I:45°C, T:45°C, the keys refer to Table 1-3; the collection time, 1 h at 50 mL/min high-purity N₂ flow rate; NaCl, 30 g/100 mL; HSV transfer time from Tenax TA to GC at 240°C, 2 min at 65.7 mL/min N₂ flow rate.

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はつぎのごとくであった。(1) 香気捕集装置の各部の温度を試料溶液部の温度である45°C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°C、窒素ガスをTenax TA管経由で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、ethanol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. 1-8に示した。

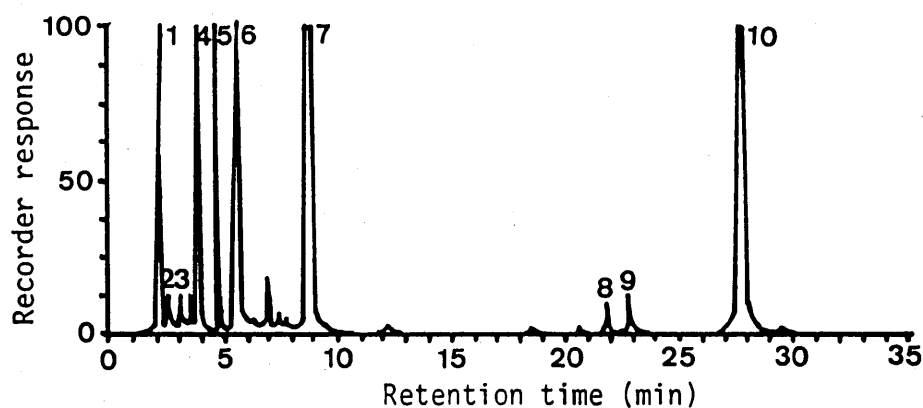


Fig. 1-8. Gas chromatogram of headspace volatiles (HSV) collected from the sample solution under the optimal conditions.

HSV collection conditions refer to C in Table 1-6.

See GC conditions in Fig. 1-6.

Peak no.:

1: ethyl acetate, 2: ethanol, 3: 1-propanol, 4: 2-methyl-1-propanol,
5: 1-butanol, 6: 3-methyl-1-butanol, 7: 1-hexanol, 8: benzyl alcohol,
9: 2-phenylethanol, 10: 2,3-xyleneol.

第5節 要約

5-1 培養期間の設定と培養容器の改良

赤色辛口米味噌より分離された耐塩性酵母の *Zygosaccharomyces rouxii* S84 (*Z. rouxii* S84)と *Candida versatilis* D-5 (*C. versatilis* D-5)の培養経過に伴う生育とグルコース及び窒素の消費について調べた。更に、培養液香気の官能評価と揮発性成分量の変化について検討し、最適な培養期間の設定を行った。

(1) *Z. rouxii* S84は1日目から3日目にかけて急速に生育し、7日目に生育度が最高に達した。*C. versatilis* D-5は7日目から10日目にかけて比較的急速な生育が認められるものの、生育の速度は*Z. rouxii* S84よりかなり遅く、20日目まで徐々に生育しつづけた。最終的には*Z. rouxii* S84の生育度にほぼ近づいた。グルコース及び窒素の消費率の変化はほとんど生育曲線に対応し、*Z. rouxii* S84と*C. versatilis* D-5のグルコース消費率はそれぞれ7日目と15日目に98%近くに達した。窒素の消費に関してはグルコースのように急速な消費は認められなかったが、生育の増加にほぼ対応していた。

(2) 培養液香気の官能評価の結果、*Z. rouxii* S84にはさわやかな、軽い清酒様香気と甘い果実様香気が認められ、*C. versatilis* D-5には重い感じの清酒様香気と弱い醤油様および漬物様の香気が認められた。両菌株とも培養期間に伴い香気が強くなり、次第に重い感じの香気に変化した。また、培養後期にはエタノール様の刺激臭や自己消化様の臭気も認められた。なお、培養液をpH 2に調整し得られた留液の方がpH 7で得られた留液よりも培養液の香気を再現していたので、酸性物質およびエステル類の培養液の香気に対する重要性を考察した。

(3) 揮発性成分は培養液をpH 2に調整し、減圧蒸留により水とともに捕集した。定量を試みたのは総アルコール、フーゼル油、総アルデヒド、ethanal及び揮発性有機酸で、これら成分量の培養経過に伴う変化はグルコースや窒素の消費傾向にほぼ対応していた。すなわち、グルコースや窒素の消費率が最高に達した期間が揮発性成分量も最も多い傾向にあった。ただ、アルデヒド類は他

の成分に比べ、やや早い期間で最高値に達した。

以上のことから、耐塩性酵母の生成する香気について研究を進めるにあたり、培養期間を設定する場合、炭素源がほぼ消費しつくされた期間にすることが、使用菌株に対し一律に規定するよりもより妥当と考えた。

なお、耐塩性酵母の培養期間を炭素源がほぼ消費しつくされた期間にした場合、耐塩性酵母の菌株によってその培養期間が異なるため、培養容器の綿栓口からの培養溶液の減少量も異なることになる。また、培養溶液が減少するということは、耐塩性酵母が生成した香気成分も減少していることが考えられる。そこで、1ℓの三角フラスコの綿栓に替えてシリコンゴム栓を用い、長さ40cmの保温剤で包んだ冷却管を付属させた培養容器を作製した。そして、培養のための加温は孵卵器に替え、恒温槽を用いた。この改良型培養容器を使用することにより、培養期間が長期にわたっても、培養溶液の減少はほとんど認められなかった。

5-2 揮発性成分捕集法の確立

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揮発性成分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、ethyl acetate、8種類のアルコール及び2,3-xyleneol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) 香気捕集装置の各部の温度を試料溶液部の温度である45°C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°C、窒素ガスをTenax TA管経由で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、ethanol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、この揮発性成分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、両部にお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、従来法で行われていたところの、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。

第2章 耐塩性酵母の生成する揮発性成分

第1節 緒言

味噌は、大豆、米、食塩を原料として、麹菌のほかに、耐塩性の酵母や乳酸菌などの発酵微生物が関与して醸造される。一方、日本の伝統的なアルコール発酵飲料である清酒の発酵には、米を原料として、麹菌、非耐塩性の酵母や乳酸菌などが関与する。この味噌と清酒を原料成分から比較した場合、味噌は高濃度のタンパク質を含有する大豆を主原料とするため、耐塩性酵母などが生息し、活動する場合はタンパク質、すなわち、窒素含有量が格段に高く、しかも、かなりの食塩を含む培養基となる。本章では、味噌の原料配合より案出した窒素含有量の高い合成培地を使用して、合成培地の加熱殺菌や耐塩性酵母及びその対照酵母としての清酒酵母によって生成される総揮発性成分について検討した。

第2節 実験材料及び方法

2-1 供試酵母

耐塩性酵母として第1章・第2節で使用した *Zygosaccharomyces rouxii* S84 (以下、*Z. rouxii* S84) と *Candida versatilis* D-5 (以下、*C. versatilis* D-5) の他に、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。

2-2 培地及び培養方法

保存培地、前培養培地、本培養培地の組成をTable 2-1に示した。ただし、非耐塩性である *S. cerevisiae* も供試したので、*S. cerevisiae* の保存培地及び前培養培地は米麹汁 (Ballg. 10°) とし、更に本培養培地にはTable 2-1に示した組成のうち食塩無添加のものも用いた。

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、第1章・第2節では大豆アミノ酸組成に基づいて調製したが、本章では7割麴米味噌を参考にした。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、大豆及び精白米の18種類アミノ酸の種類 (Table 2-1) とその組成量は改訂日本食品アミノ酸組成表 (科学技術庁資源調査会・資源調査所編 1986) に基づいた。グルコース量と窒素量は、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 (1966) の方法に準じて決定した。すなわち、味噌原料の浸漬・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、それぞれグルコース量と総窒素量に換算した。その結果、グルコース量と総窒素量は15.6%と1.86%となった。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0.937%に減じた。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。なお、このグルコース量と窒素量の算出方法を味噌以外の発酵食品に適用したところ、グルコース量と総窒素量の比 (glucose/N) は、清酒 (精白歩合50%) 90、ビール150、ワイン1200となり、これに対し、味噌と醤油はそれぞれ8と9であった。このことから、味噌や醤油の場はアルコール発酵飲料に比べ、格段に窒素量の多いことが明らかとなった。

合成培地を120℃、10分間加熱殺菌し、モデル培地とした。なお、第1章・第2節では実験結果の解析をより容易にするため、アミノ・カルボニル反応が起こらないようにグルコースとアミノ酸類を別々に加熱殺菌した。一方、実際の味噌製造では味噌原材料中の糖質とタンパク質を分離することなく加熱処理し、且つ、味噌熟成を行っている。本章ではこのことを考慮し、培地組成成分を一括して加熱殺菌した。

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600mlになるように調製し混合した。酵母の接種菌数は600ml当り 5×10^7 とし、30℃の温浴中で炭素源であるグルコースの消費の伸び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、第1章・第3節で記述した10℃の水を循環させた冷却管（40cm）を、三角フラスコの上部に付属させた。

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。

2-3 グルコース、エタノール及び褐変度の測定

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（福井 1969）。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（1969b）の方法。褐変度はNAMIKIとHAYASHI（1975）によって報告された方法で測定した。

2-4 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、第1章・第4節で記述したheadspace volatiles（以下、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 μ g/0.1ml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 17cm）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包んだ。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、試料瓶上端部及びTenax TA管部は、すべて45℃に保持した。

2-5 ガスクロマトグラフィー（GC）

揮発性成分のGCは島津GC-4CPF（検出器：水素炎イオン化ディテクタ；FID）を用いて行った。注入部と検出器の温度は共に250℃とした。カラムはPEG 20Mに相当するShimadzu fused silica capillary column（CBP20-M25-025, 0.2mm

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。キャリアーガスとして窒素を用い、1分間当たり1mlの流速で、スピリット比は1:50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) を用い、加熱炉温度240°Cとし、キャリアーガス流路をTenax TA管経由に切り替えた後、窒素ガスを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回繰り返す、定量には島津クロマトパックC-R5Aを用いた。

2-6 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-60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-(5 min)-60°C-(5°C/min)-200°C、注入部温度250°C、キャリアーガス (He) 流速1ml/min、スピリット比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とし、キャリアーガス流路をTenax TA管経由に切り替えた後、Heガスを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 (M. C. ten NOEVER de BRAUWら 1979; The Mass Spectrometry Data Centre 1983) 及び標準物質のGCのRetention timeをもとに行った。

第3節 実験結果及び考察

3-1 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消費の伸びがほぼ停止し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 2-2に示した。

Table 2-2. Analytical results of cultured media.

Strains	NaCl (%)	Incubation period(d)	Glucose consumption(%)	Browning dilution x OD(420nm)	Ethanol mg/100ml	GC(FID) ^a Total area (x10 ⁴) ^b
Noninoculation	12.5	18	0 ^c	19.9	0	76
<i>Z. rouxii</i>	12.5	18	14.8	21.6	763	926
<i>C. versatilis</i>	12.5	18	1.7	22.2	7	380
Noninoculation	0	15	0 ^c	18.1	0	92
<i>Z. rouxii</i>	0	18	77.7	17.8	1913	1016
<i>C. versatilis</i>	0	18	10.4	17.8	183	559
<i>S. cerevisiae</i>	0	15	99.8	9.5	2533	1875

^a Detection by flame ionization detector.

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

^c It was assumed that glucose was not consumed in the noninoculated media.

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。一方、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* D-5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。そして、*S. cerevisiae* の生成エタノール量と総揮発性分量を示すGCのピーク総面積値はともに最大であった。

各試料の香気を4人のパネルメンバーで調べてみると、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、パネルメンバー全員が好ましくない香気と答えた。*Z. rouxii* S84培養液の香気は、酵母無接種培地で認められた好まし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新たに認められ、また、すっきりした感じも与えた。*C. versatilis* D-5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、それに甘酸っさも加わり、耐塩性酵母の生成香気に比べ特異的であった。

3-2 揮発性成分

酵母無接種培地及び酵母培養液中で、加熱殺菌、30℃の温浴中での保持及び酵母の培養によって生成された揮発性成分のガスクロマトグラムをFig. 2-1とFig. 2-2に示した。なお、Fig. 2-2はGCとGC-MS分析により同定されたピークの揮発性成分を示すガスクロマトグラムで、ピーク総面積値が最も大きかった *S. cerevisiae* の結果を代表させた。また、同定された揮発性成分の定量及びGC-MS分析の結果をTable 2-3に示した。

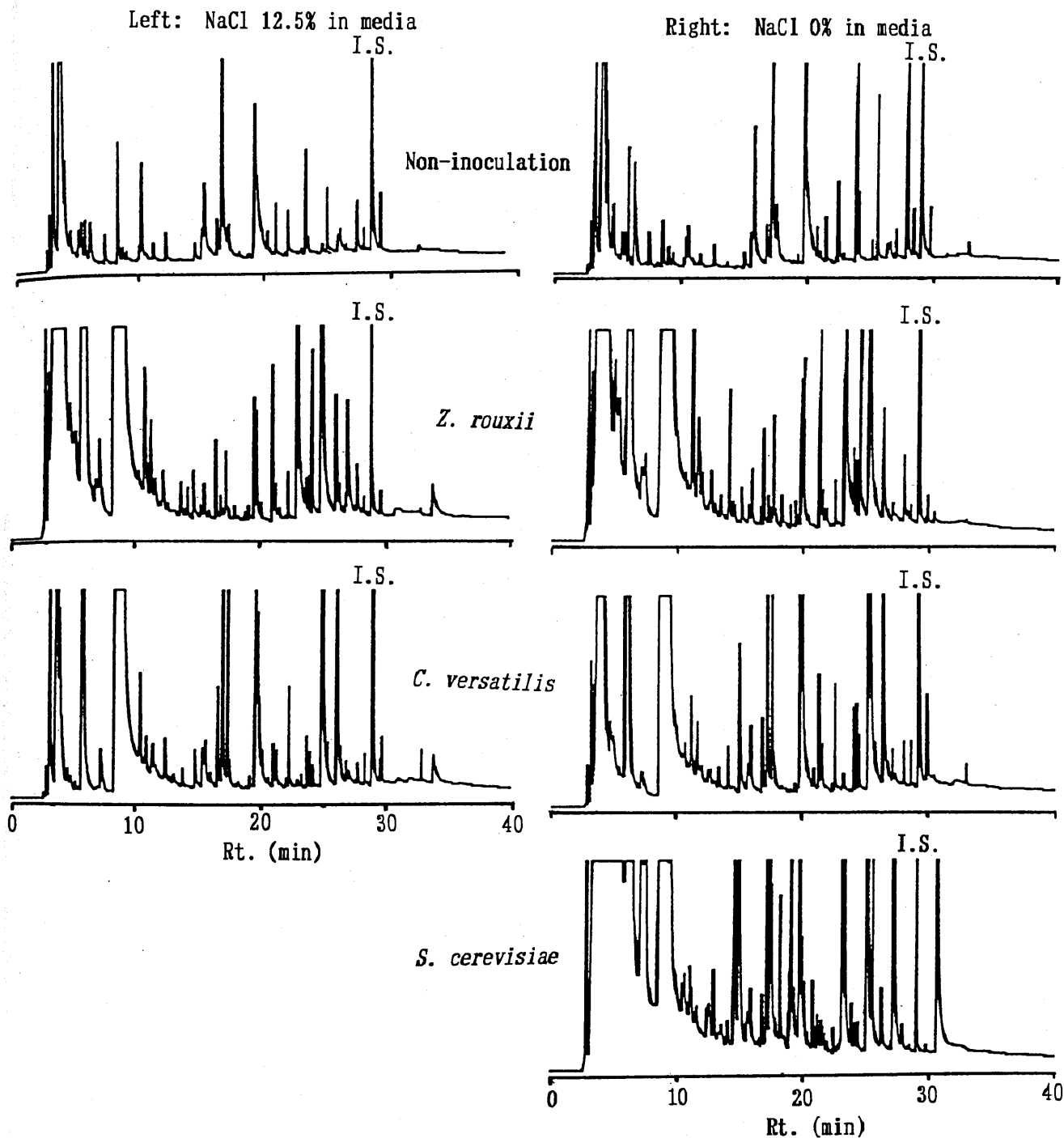


Fig. 2-1. Gas chromatograms of volatile compounds in cultured media.

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 ionization detector (FID), 250°C.

Carrier gas: N₂, 1mL/min. Split ratio: 1:50.

I.S.: Peak of 2,3-xyleneol as internal standard.

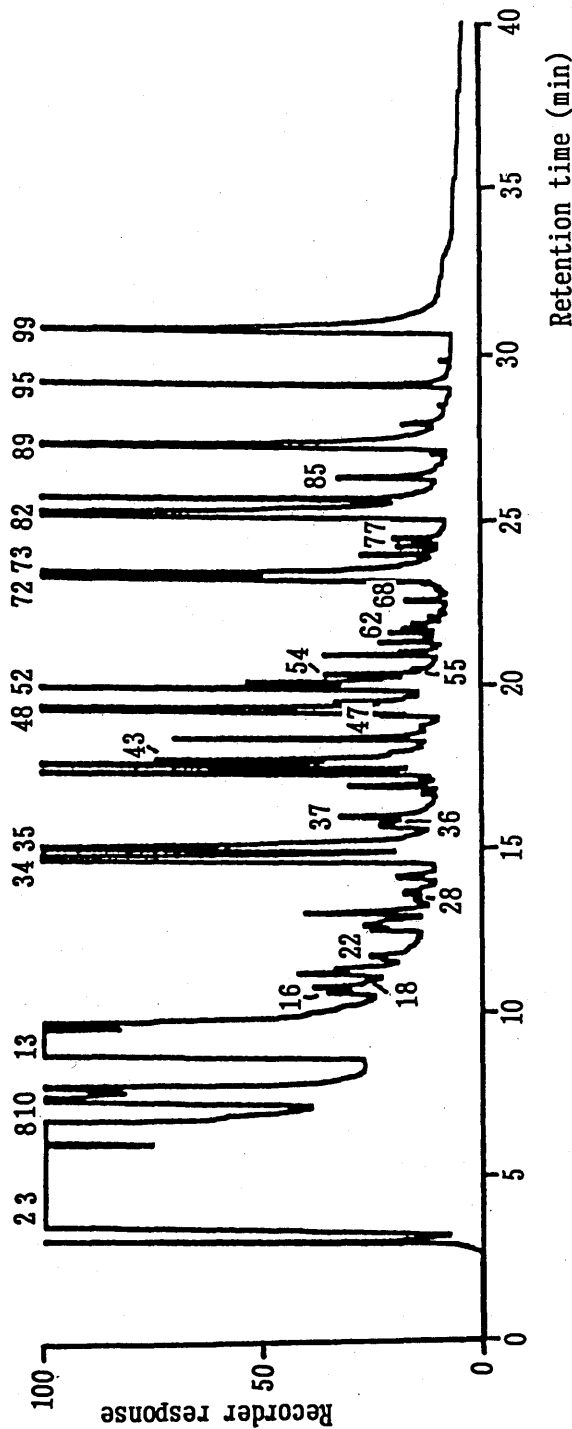


Fig. 2-2. Gas chromatogram of volatile compounds identified in cultured medium of *S. cerevisiae*.

The column, the column temp., the detector and the carrier gas referred to Fig. 2-1.

- Compounds: 2: ethanal, 2-methylpropanal, methanol etc. 3: 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, ethanol, 1-propanol etc. 8: 2-methyl-1-propanol, dimethyl disulfide etc. 10: isopentyl acetate, 1-butanol etc. 13: 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, ethyl hexanoate etc. 16: 2-methylpyrazine etc. 18: 3-hydroxy-2-butanone etc. 22: ethyl lactate etc. 28: dimethyl trisulfide etc. 34: ethyl octanoate etc. 35: acetic acid 36: methional etc. 37: furfural 43: 2-methylpropionic acid 47: 3-(methylthio)propyl acetate etc. 48: ethyl decanoate 52: 3-methylbutanoic acid, 2-methylbutanoic acid 54: phenylacetaldehyde 55: ethyl benzoate etc. 62: methionol etc. 68: ethyl phenylacetate etc. 72: ethyl dodecanoate, 2-phenylethyl acetate etc. 73: *n*-hexanoic acid etc. 77: benzylalcohol 82: 2-phenylethanol etc. 85: 2-acetylpyrrole etc. 89: *n*-octanoic acid etc. 95: 2,3-xylenol (internal standard) 99: *n*-decanoic acid

Table 2-3 Identified volatile components in cultured media

Peak no.	Rt ^b (min)	Compound	Peak area / 2,3-xyleneol ^a peak area x 100						
			NaCl 12.5% in media			NaCl 0% in media			
			Control	<i>Z. rouxii</i>	<i>C. versatilis</i>	Control	<i>Z. rouxii</i>	<i>C. versatilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
2	3.48	ethanal	101	110	39.1	133	141	10.7	394x10 ¹
		2-methylpropanal	+ ^c	+	+	+	+	+	+
		methanol	- ^d	+	+	-	+	+	+
		unknown	+	+	+	+	+	+	+
3	3.87	2-methylbutanal	850	129x10 ²	432	10x10 ²	171x10 ²	24x10 ²	121x10 ³
		3-methylbutanal	+	+	+	+	+	+	+
		ethanol	-	+	+	-	+	+	+
		1-propanol	-	+	+	-	+	+	+
		unknown	+	+	+	+	+	+	+
8	6.31	2-methyl-1-propanol	6.8	345	345	18.9	482	214	928
		dimethyl disulfide	-	+	+	-	+	+	+
		unknown	+	+	+	+	+	+	+
10	7.16	isopentyl acetate	0.5	6.7	7.6	0.9	10.4	5.0	192
		1-butanol	-	+	+	-	+	+	+
		unknown	+	+	+	+	+	+	+
13	8.95	3-methyl-1-butanol	2.5	147x10 ²	51x10 ²	3.0	141x10 ²	52x10 ²	154x10 ²
		2-methyl-1-butanol	-	+	+	-	+	+	+
		ethyl hexanoate	-	-	-	-	-	-	+
		unknown	+	+	+	+	+	+	+
16	10.36	2-methylpyrazine	0.3	0.1	0.5	2.7	0.2	0.3	13.2
		unknown	+	+	+	+	+	+	+
18	10.67	3-hydroxy-2-butanone	12.6	0.9	0	0.9	0.7	0.5	4.3
		unknown	-	+	-	-	+	+	+
			+	+	-	+	+	+	+

^a Internal standard. ^b Retention time in cultured media of *S. cerevisiae*. ^c Detection by GC-MS analysis.

^d Non-detection by GC-MS analysis.

Table 2-3 - Continued 1

Peak no.	Rt ^b (min)	Compound	Peak area / 2,3-xylenol ^a peak area x 100						
			NaCl 12.5% in media			NaCl 0% in media			
			Control	<i>Z. rouxii</i>	<i>C. versatilis</i>	Control	<i>Z. rouxii</i>	<i>C. versatilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
22	11.54	ethyl lactate	3.1	8.3	3.0	1.8	25.0	4.8	8.9
		unknown	- ^d	+	+	-	+	+	+
28	13.20	dimethyl trisulfide	+ ^c	+	+	+	+	+	+
		unknown	0.1	0.6	1.2	0.1	6.2	1.9	6.3
34	14.43	ethyl octanoate	+	+	+	+	+	+	+
		unknown	0	6.0	0	0	0.7	0	710
35	14.73	acetic acid	-	+	-	-	+	-	-
		methional	0	14.7	4.7	3.6	13.4	20.1	265
		unknown	-	+	+	± ^e	+	+	+
36	15.45	furfural	3.4	1.5	6.5	3.0	3.2	3.9	32.3
		2-methylpropanoic acid	+	+	+	+	+	+	+
		3-(methylthio)propyl acetate	-	+	-	-	+	+	+
37	15.74	ethyl decanoate	5.7	5.8	8.2	11.3	8.4	6.2	36.8
		3-methylbutanoic acid	+	+	+	+	+	+	+
		2-methylbutanoic acid	+	+	+	+	+	+	+
43	17.44	phenylacetaldehyde	2.9	10.6	17.1	2.9	16.5	40.1	96.9
		ethyl benzoate	+	+	+	+	+	+	+
		unknown	0.2	1.1	0.4	0.5	4.2	0.4	8.7
47	18.81	ethyl decanoate	-	+	-	-	+	+	+
		3-methylbutanoic acid	+	+	+	+	+	+	+
		2-methylbutanoic acid	0	0	0	0	0	0	892
48	19.05	phenylacetaldehyde	-	-	-	-	-	-	-
		ethyl benzoate	25.9	19.6	61.3	39.9	32.2	81.5	136
		unknown	+	+	+	+	+	+	+
52	19.64	ethyl benzoate	+	+	+	+	+	+	+
		unknown	18.0	20.3	26.9	20.1	36.0	33.3	26.5
54	20.09	ethyl benzoate	+	+	+	+	+	+	+
		unknown	5.3	2.0	5.8	7.7	0.3	1.2	9.5
55	20.22	ethyl benzoate	-	+	+	-	+	+	+
		unknown	+	+	+	+	+	+	+

^a Internal standard. ^b Retention time in cultured media of *S. cerevisiae*. ^c Detection by GC-MS analysis.

^d Non-detection by GC-MS analysis. ^e Indistinctness by GC-MS analysis.

Table 2-3 - Continued 2

Peak no.	Rt ^b (min)	Compound	Peak area / 2,3-xylenol ^a peak area x 100									
			NaCl 12.5% in media		NaCl 0% in media		Control		Z. rouxii		S. cerevisiae	
			Z. rouxii	C. versatilis	Control	Z. rouxii	C. versatilis	S. cerevisiae	S. cerevisiae			
62	21.38	methionol unknown	2.6 - ^d	23.2 +	3.8 +	3.2 -	34.4 +	4.2 +	10.1 +			
68	22.36	ethyl phenylacetate unknown	6.2 +	6.5 +	8.2 +	12.3 -	7.8 +	7.8 +	9.8 +			
72	23.03	ethyl dodecanoate 2-phenylethyl acetate unknown	0.6 -	517 +	0.9 -	0.7 -	805 -	0.6 -	536 +			
73	23.15	n-hexanoic acid unknown	0.3 +	0 -	0.3 +	0.3 +	0 -	0.5 -	284 +			
77	24.24	benzylalcohol	0 -	18.9 +	3.0 +	0 -	86.4 +	4.9 +	9.3 +			
82	24.93	2-phenylethanol unknown	0.3 +	684 +	111 +	0.2 -	616 +	292 +	107x10 ¹ +			
85	26.08	2-acetylpyrrole unknown	0.2 +	27.2 +	52.0 +	0.1 +	29.6 +	74.8 +	31.4 +			
89	27.05	n-octanoic acid unknown	0.6 -	31.2 -	0 -	0.7 -	3.7 -	0 -	743 +			
95	28.89	2,3-xylenol ^a	100 +	100 +	100 +	100 +	100 +	100 +	100 +			
99	30.51	n-decanoic acid	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -	0 -	358 +			

^a Internal standard. ^b Retention time in cultured media of *S. cerevisiae*. ^c Detection by GC-MS analysis.

^d Non-detection by GC-MS analysis.

GC分析により、供試試料から81~102種類のピークが得られ、供試試料のうち、食塩0%の酵母無接種培地でもっともピーク数が多かった。これは、培地の加熱殺菌とその後の30℃の温浴中での保持によって、培地成分のアミノ・カルボニル反応などの化学的反応により生成されたものと考えられる。このことは、味噌の原材料の加熱処理や熟成期間中に、同様のことが起こりうることを示唆している。

GC及びGC-MS分析によって、同定された揮発性化合物は39種類であり、その内訳はつぎのごとくであった。アルコール類(9種)、エステル類(9種)、アルデヒド類(5種)、ケトン類(1種)、有機酸類(7種)、フラン類(1種)、ピラジン類(1種)、含窒素複素環化合物(1種)、含硫化合物(5種)。

なお、GC分析の結果、複数の揮発性化合物からなるピークが多く、また、酵母無接種培地を中心として、未同定の揮発性化合物も多かった。そこで、このHSV法による分析に加え、各揮発性化合物群を分画する方法や、GC分析においては目的の揮発性化合物群に適した検出器、例えば、揮発性含硫化合物にはフレイムホトメトリックディテクタ (FPD) を使用するなどの必要性を認めた。

同定された揮発性化合物のうち、量的にもっとも多かったのが、ethanol、3-methyl-1-butanol、2-methyl-1-butanol、2-phenylethanol等を主体とするアルコール類であり、これらアルコール類はいずれも酵母培養液中でその生成が認められた。また、これらアルコール類は味噌や醤油及び清酒の揮発性成分でもあり(日本醸造協会編 1977)、味噌中での耐塩性酵母によるこれらアルコール類の生成に関しては第5章で述べる。一方、合成培地を使用しての耐塩性酵母によるこれらアルコール類の生成に関しては、既に安平ら(1968)によって報告されている。

アルデヒド類として、ethanal、2-methylpropanal、2-methylbutanal、3-methylbutanal、phenylacetaldehyde等が酵母無接種培地及び酵母培養液中で同定されたが、ethanalを除く他のアルデヒド類の生成には耐塩性酵母の関与は小さいと推察され(石原と本間 1985a)、また、量的には酵母無接種培地中で比較的多いことから、主に、培地組成中のグルコースとアミノ酸類によるアミノ・カルボニル反応によって生成されたものと考えられる(HURRELL 1982)。

揮発性含硫化合物として、酵母無接種培地及び酵母培養液中でdimethyl disulfide、dimethyl trisulfide、3-(methylthio)propionaldehyde (methional) が同定され、更に、酵母培養液中ではこれらに加え、3-(methylthio)propyl acetate、3-(methylthio)-1-propanol (methionol)の生成が認められた。耐塩性酵母によるmethionolの生成は林部ら(1970)やAOKIとUCHIDA(1991)によって既に報告されたが、3-(methylthio)propyl acetateの生成に関する報告はみあたらない。また、これらのうち、dimethyl disulfide、methional、methionolは味噌の香気成分として報告されているが(本間 1987b)、dimethyl trisulfideと3-(methylthio)propyl acetateに関しての報告はみあたらない。味噌中の揮発性含硫化合物の存在は微量であるが、その特徴ある香気故に、好悪両面に関わる重要な化合物群である。その揮発性含硫化合物と耐塩性酵母との関わり及びこれら化合物の起源については、第3章において詳細に論述する。

揮発性有機酸として、acetic acidが全供試菌株により生成されることを認めた。また、2-methylpropanoic acid、2-methylbutanoic acid、3-methylbutanoic acid等の分岐有機酸が酵母無接種培地及び酵母培養液中で同定された。更に、供試菌株の中でグルコース消費量の少なかった*C. versatilis* D-5がこれら分岐有機酸を比較的多く生成することも認められた。一方、*S. cerevisiae*では、耐塩性酵母では検出されなかった*n*-hexanoic acid、*n*-octanoic acid、*n*-decanoic acidとこれらのエステル及びethyl dodecanoate等の生成が認められ、これら化合物の生成に対する耐塩性酵母と清酒酵母との差異として興味もたれた。これら揮発性有機酸に関しては、本章でのHSV法による分析に加え、揮発性有機酸類を分画する方法を用いて詳細に検討し、第4章で論述する。

第4節 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る揮発性成分について検討した。なお、合成培地中のグルコース量の総窒素量に対する比を16とし、窒素含有割合の高い培地を調製した。供試菌として、赤色辛口米味噌より分離された耐塩性酵母の*Zygosaccharomyces rouxii* S84 (*Z. rouxii* S84)、*Can-*

didia versatilis D-5 (*C. versatilis* D-5) 及び非耐塩性の清酒酵母・*Saccharomyces cerevisiae* RIB 6002 (協会7号) (*S. cerevisiae*) が用いられた。これら酵母は炭素源であるグルコースの消費の伸びがほぼ停止するまで、30℃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成分の同定は、揮発性成分を headspace volatile (HSV) 捕集装置を用いて Tenax TA に吸着させた後、GC 及び GC-MS 分析で行った。

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* は培養期間15日間でグルコースをほぼ100%消費した。一方、耐塩性酵母の培養期間18日間におけるグルコース消費率はかなり低かった(1.7~77.7%)。特に、*C. versatilis* D-5の食塩添加培地でのグルコース消費率が最低の1.7%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。そして、*S. cerevisiae* の生成エタノール量と総揮発性成分量を示すGCのピーク総面積値はともに最大であった。

各試料の官能評価の結果、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* S84培養液の香気は、酵母無接種培地で認められた好ましくない臭いがかなり改善された。更に、高級アルコール臭や果実様香気新たに認められ、また、すっきりした感じも与えた。*C. versatilis* D-5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、それに甘酸っさも加わり、耐塩性酵母の生成香気に比べ特異的であった。

GC分析により、供試試料から81~102種類のピークが得られ、供試試料のうち、食塩0%の酵母無接種培地でもっともピーク数が多かった。これは、培地の加熱殺菌とその後の30℃の温浴中での保持によって、培地成分のアミノ・カルボニル反応などの化学的反応により生成されたものと考えた。そして、味噌の原材料の加熱処理や熟成期間中に、同様のことが起こり得ることを推察した。

GC及びGC-MS分析によって、同定された揮発性化合物は39種類であり、その内訳はつぎのごとくであった。アルコール類(9種)、エステル類(9種)、アルデヒ

ド類(5種)、ケトン類(1種)、有機酸類(7種)、フラン類(1種)、ピラジン類(1種)、含窒素複素環化合物(1種)、含硫化合物(5種)。

同定された揮発性化合物のうち、量的にもっとも多かったのが、ethanol、3-methyl-1-butanol、2-methyl-1-butanol、2-phenylethanol等を主体とするアルコール類であり、これらアルコール類はいずれも酵母培養液中でその生成が認められた。アルデヒド類として、ethanal、2-methylpropanal、2-methylbutanal、3-methylbutanal、phenylacetaldehyde等が酵母無接種培地及び酵母培養液中で同定され、これらは主に、培地組成中のグルコースとアミノ酸類によるアミノ・カルボニル反応によって生成されたものと考察した。dimethyl disulfide、dimethyl trisulfide、3-(methylthio)propionaldehyde (methionol)等の揮発性含硫化合物が、酵母無接種培地及び酵母培養液中で同定され、更に、酵母培養液中ではこれらに加え、3-(methylthio)propyl acetate、3-(methylthio)-1-propanol (methionol)の生成が認められた。揮発性有機酸として、acetic acidが全供試菌株により生成された。また、2-methylpropanoic acid、2-methylbutanoic acid、3-methylbutanoic acid等の分岐有機酸が酵母無接種培地及び酵母培養液中で同定された。更に、供試菌株の中でグルコース消費量の少なかった *C. versatilis* D-5がこれら分岐有機酸を比較的多く生成することも認めた。一方、*S. cerevisiae*では、耐塩性酵母では検出されなかった *n*-hexanoic acid、*n*-octanoic acid、*n*-decanoic acidとこれらのエステル及びethyl dodecanoate等の生成が認められ、これら化合物の生成に対する耐塩性酵母と清酒酵母との差異に興味もたれた。

本章で論述した揮発性成分のうち、揮発性含硫化合物と揮発性有機酸に関しては更に詳細に検討し、それぞれ、第3章と第4章で論述する。

第3章 耐塩性酵母による揮発性含硫化合物の生成と減少

第1節 緒言

味噌香気成分のうち、揮発性含硫化合物は味噌中では微量の存在ではあるが（本間 1987b）、一般に感覚閾値が低く、特徴ある香気を有することから味噌の品質に重要な役割を果たすと考えられる。第2章では、GC分析のFID検出器（水素炎イオン化ディテクタ）を使用して、耐塩性酵母の生成する揮発性成分としての含硫化合物について述べた。本章では、GC分析のFID検出器を含硫化合物検出用のFPD検出器（フレイムホトメトリックディテクタ）に替え、揮発性含硫化合物と耐塩性酵母との関わりについて検討したところ新しい知見が得られた。その結果について論述する。

第2節 18種アミノ酸培地及び酵母培養液中の揮発性含硫化合物に対する酵母の関与

本節では、第2章で調製したグルコースと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硫化合物と酵母との関係について検討した。

2-1 実験材料及び方法

第2章で調製した試料を供試したので、実験材料及び方法については、ガスクロマトグラフィーを除いて要点のみ記述した。

2-1-1 供試酵母

耐塩性酵母として赤色辛口米味噌より分離された *Zygosaccharomyces rouxii* S84（以下、*Z. rouxii* S84）、*Candida versatilis* D-5（以下、*C. versatilis* D-5）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。

2-1-2 培地及び培養方法

使用した培地組成は第2章のTable 2-1に示した。すなわち、本培養培地は窒素源として18種アミノ酸混合物を用い、グルコース15%、総窒素量0.937%、食塩12.5%、その他無機質、ビタミン類からなる。ただし、非耐塩性である *S. cerevisiae* も供試したので、食塩無添加の本培養培地も使用した。これらの培地を120°C、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600mlになるように調製し混合した。酵母の接種菌数は600ml当り 5×10^7 とし、30°Cの温浴中で炭素源であるグルコースの消費の伸びがほぼ停止するまで静置培養を行った。なお、この培養期間中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°C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°Cの温浴中で保持した。

2-1-3 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headspace volatiles (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中の揮発性成分をTenax TA 200mgに捕集するため、試料溶液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、試料瓶上端部及びTenax TA管部は、すべて45°Cに保持した。

2-1-4 ガスクロマトグラフィー（GC）

GCは揮発性含硫化合物検出用の島津GC-8A（検出器：フレイムホトメトリックディテクタ；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 (CBP 20-M25-025、0.2mm i.d. x 25m) 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。キャリアー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）を用い、加熱炉温度240°Cとし、キャリアーガス流路をTenax TA管経由に切り替えした後、窒素ガスを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回繰り返す、定量には島津クロマトパックC-R5Aを用いた。また、Retention index（Kovats Index）を自動的に算出するため、杉沢ら（1988）のBASICプログラムを同クロマトパックに組み込んだ。更に、FPD検出器での分析の他に、GCのFID monitorも使用した。

2-1-5 ガスクロマトグラフィー・質量分析（GC-MS）

GC-MSは第2章で詳述した。第2章の試料と本節の試料が同一なので、第2章でのGC-MSの結果をもとに揮発性含硫化合物の同定を行った。

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（M. C. ten NOEVER de BRAUWら 1979； The Mass Spectrometry Data Centre 1983）及び標準物質のGCのRetention timeとKovats Indexをもとに行った。

2-2 実験結果及び考察

2-2-1 酵母培養液中のグルコースの消費率

耐塩性酵母の培養期間は18日間、清酒酵母では15日間とし、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。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。一方、耐塩性酵母のグルコース消費率はかなり低く、食塩添加培地での*Z. rouxii* S84と*C. versatilis* D-5のグルコース消費率はそれぞれ14.8%、1.7%、食塩無添加培地では*Z. rouxii* S84が77.7%、*C. versatilis* D-5が10.4%であった。

これらグルコースの消費率をはじめとして、培養液の褐変度、生成エタノール量、ガスクロマトグラムピーク総面積値（検出器：FID）を第2章のTable 2-2に示した。また、各試料の官能評価の結果も第2章に記述した。

2-2-2 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. 3-1に示した。また、同定された化合物の定量結果をTable 3-1に示した。

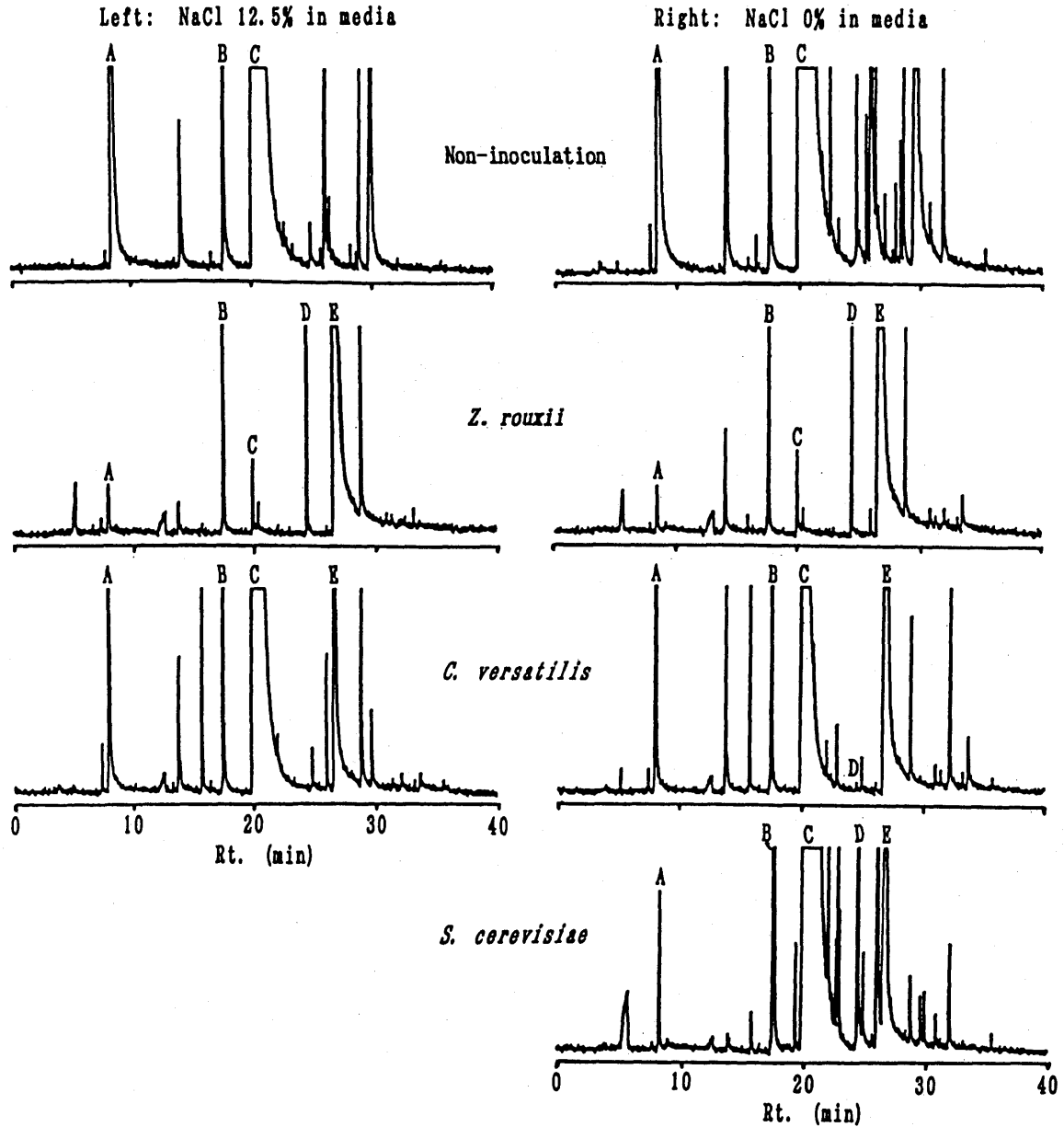


Fig. 3-1. Gas chromatograms of volatile sulfur-containing compounds in cultured media.

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 3-1. Volatile sulfur-containing compounds in cultured media. (ng/100ml)^a

Peak ^b	Compound	K. Index ^c	NaCl 12.5% in media		NaCl 0% in media		Identification			
			Control ^d <i>Z. rouxii</i>		Control ^d <i>C. versatilis</i>		GC ^e	GC ^f		
			<i>Z. rouxii</i>	<i>C. versatilis</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>C. versatilis</i>	(FID)	MS		
A	dimethyl disulfide	1067	438x10 ¹ (100.0) ^h	118x10 ¹ (26.9)	297x10 ¹ (100.0)	35 (1.2)	259 (8.7)	51 (1.7)	+ ^g	+
B	dimethyl trisulfide	1388	860 (100.0)	615 (71.5)	780 (100.0)	360 (46.2)	660 (84.6)	608 (77.9)	+	+
C	3-(methylthio)propion aldehyde (methional)	1468	670x10 ³ (100.0)	570x10 ³ (85.1)	772x10 ³ (100.0)	7x10 ³ (0.9)	377x10 ³ (48.8)	128x10 ³ (16.6)	+	+
D	3-(methylthio)propyl acetate ¹	1643	0	283x10 ¹	0	310x10 ¹	16x10 ¹	890x10 ¹	+	+
E	3-(methylthio)-1-propanol (methionol)	1741	0	108x10 ⁴	367x10 ³	117x10 ⁴	855x10 ³	493x10 ³	+	+

^a Detection by flame photometric detector. ^b See Fig. 3-1. ^c 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. ^d Noninoculated media. ^e Detection by flame ionization detector. ^f Identification carried out by comparing mass spectra with those of the authentic compounds and the reference spectra (M. C. ten NOEVER de BRAUN *et al* 1979; The Mass Spectrometry Data Centre 1983). ^g Positive identification. ^h (): relative values. ¹ Newly identified.

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。なお、これら5化合物は第2章でGC分析のFID検出器でも同定された。dimethyl disulfide、dimethyl trisulfide、methionalは、供試酵母間に程度の差はあるものの、全ての酵母培養液中で減少した。これら化合物の減少率は、供試酵母のうち、*Z. rouxii* S84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* S84はこれらの化合物を55.2~99.4%消滅させた。

dimethyl disulfide と dimethyl trisulfideの急激な減少は、WILLIAMSとGRACEY (1982) がCanadian beersの熟成過程でも認め、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methional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* S84の培養液中で最も高かった。また、生育の最も悪い*C. versatilis* D-5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。

第3節 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無接種培地及び培養液中に同定された揮発性含硫化合物の起源について検討するため、単一アミノ酸を窒素源とする合成培地を使用した。単一アミノ酸として、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（中性アミノ酸）、ロイシン（分岐アミノ酸）、トレオニン（オキシアミノ酸）、フェニルアラニン（芳香族アミノ酸）、グルタミン酸（酸性アミノ酸）及びアルギニン（塩基性アミノ酸）の8種類のアミノ酸を供試した。ただし、単一アミノ酸を窒素源にした場合、生育がかなり遅くなるのではないかと考えられたので、18種アミノ酸混合物を窒素源にした培地組成（第2章 Table 2-1）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0.937%から0.04%に変更した。そして、*Z. rouxii* S84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第2節の18種アミノ酸混合物を窒素源にした場合に準じた。

3-1 実験結果及び考察

3-1-1 揮発性含硫化合物

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* S84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. 3-2に示した。なお、これらアミノ酸以外のガスクロマトグラムは、フェニルアラニンの結果とほぼ同じであったので省略した。そして、同定された揮発性含硫化合物の構造式をTable 3-2に示し、定量結果はTable 3-3にまとめた。また、GC-MS分析の結果得られたマスキロマトグラムの例をFig. 3-3に示した。

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* S84の培養によりかなり改善された。なお、*Z. rouxii* S84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、97.2%と53.4%であり、他は71.6-99.9%であった。

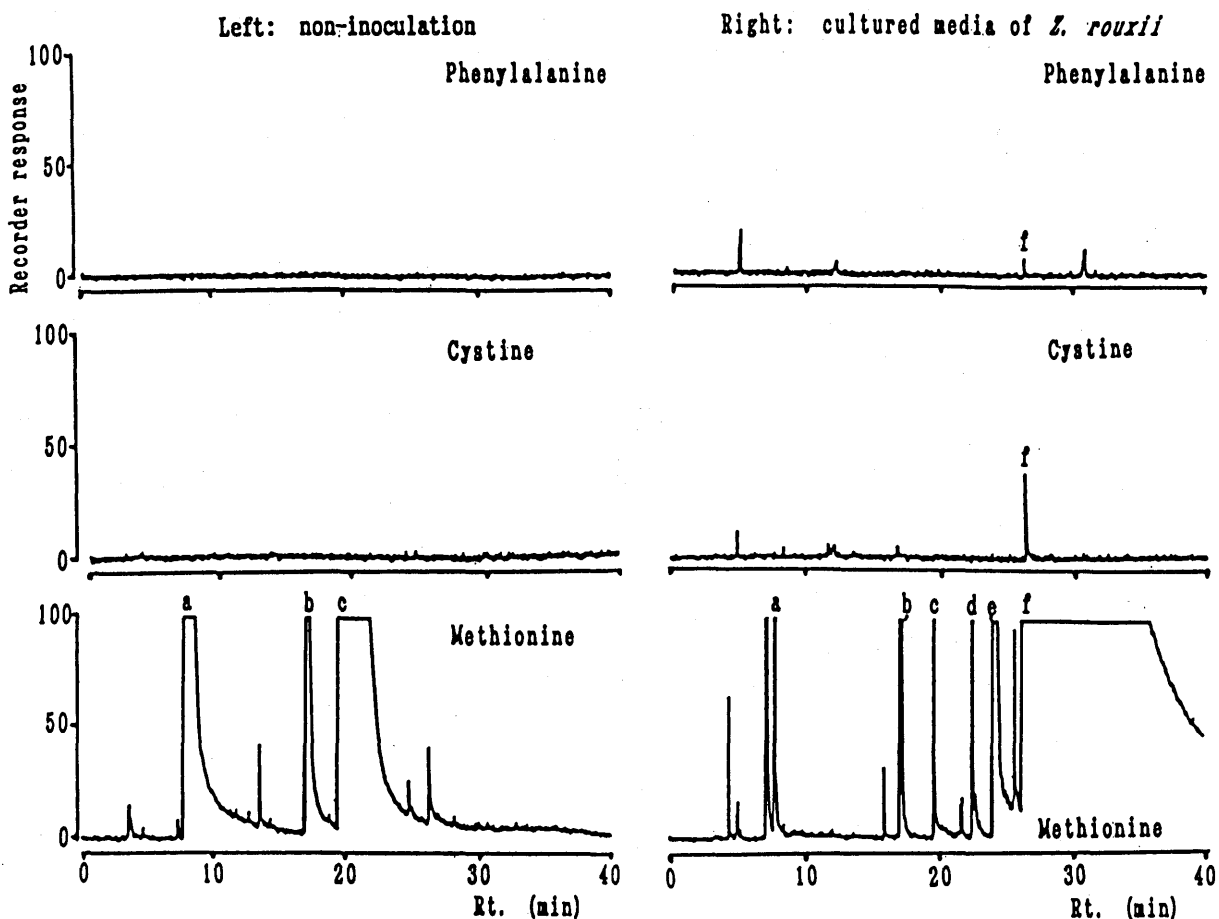


Fig. 3-2. Typical gas chromatograms of volatile sulfur-containing compounds formed and reduced by *Z. rouxii* in various amino acids media.

The column, the column temp., and the detector referred to Fig. 3-1.

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

Table 3-2. Structural formulas of volatile sulfur-containing compounds.

a: Dimethyl disulfide	$\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$
b: Dimethyl trisulfide	$\text{CH}_3\text{-S-S-S-CH}_3$
c: 3-(Methylthio)propionaldehyde (Methional)	$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$
d: Ethyl 3-(Methylthio)propanoate	$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-CH}_2\text{-CH}_3$
e: 3-(Methylthio)propyl acetate	$\text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$
f: 3-(Methylthio)-1-propanol (Methionol)	$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$

Table 3-3. Volatile sulfur-containing compounds in cultured media in which various amino acids were used as a source of nitrogen.^a
($\mu\text{g}/100\text{ml}$)

Nitrogen	<i>Z. rouxii</i> ^b	dimethyl disulfide	dimethyl trisulfide	methionol	ethyl 3-(methylthio) propanoate ^c	3-(methylthio)propyl acetate	methionol
Methionine	N ^d	2.8	1.9	1.2x10 ³	— ^f	—	—
Cystine	I ^e	0.4	0.4	30	3.6	54.1	22.8x10 ³
Phenylalanine	N	—	—	—	—	—	—
	I	—	—	—	—	—	5.2
	N	—	—	—	—	—	—
	I	—	—	—	—	—	0.6
Alanine	N	—	—	—	—	—	—
	I	—	—	—	—	—	—
Leucine	N	—	—	—	—	—	—
	I	—	—	—	—	—	0.4
Threonine	N	—	—	—	—	—	—
	I	—	—	—	—	—	—
Glutamic acid	N	—	—	—	—	—	—
	I	—	—	—	—	—	0.8
Arginine	N	—	—	—	—	—	—
	I	—	—	—	—	—	0.2

^a The concentration of glucose, nitrogen and sodium chloride in media were 2%, 0.04% and 12.5% respectively.

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

^f Negative detection.

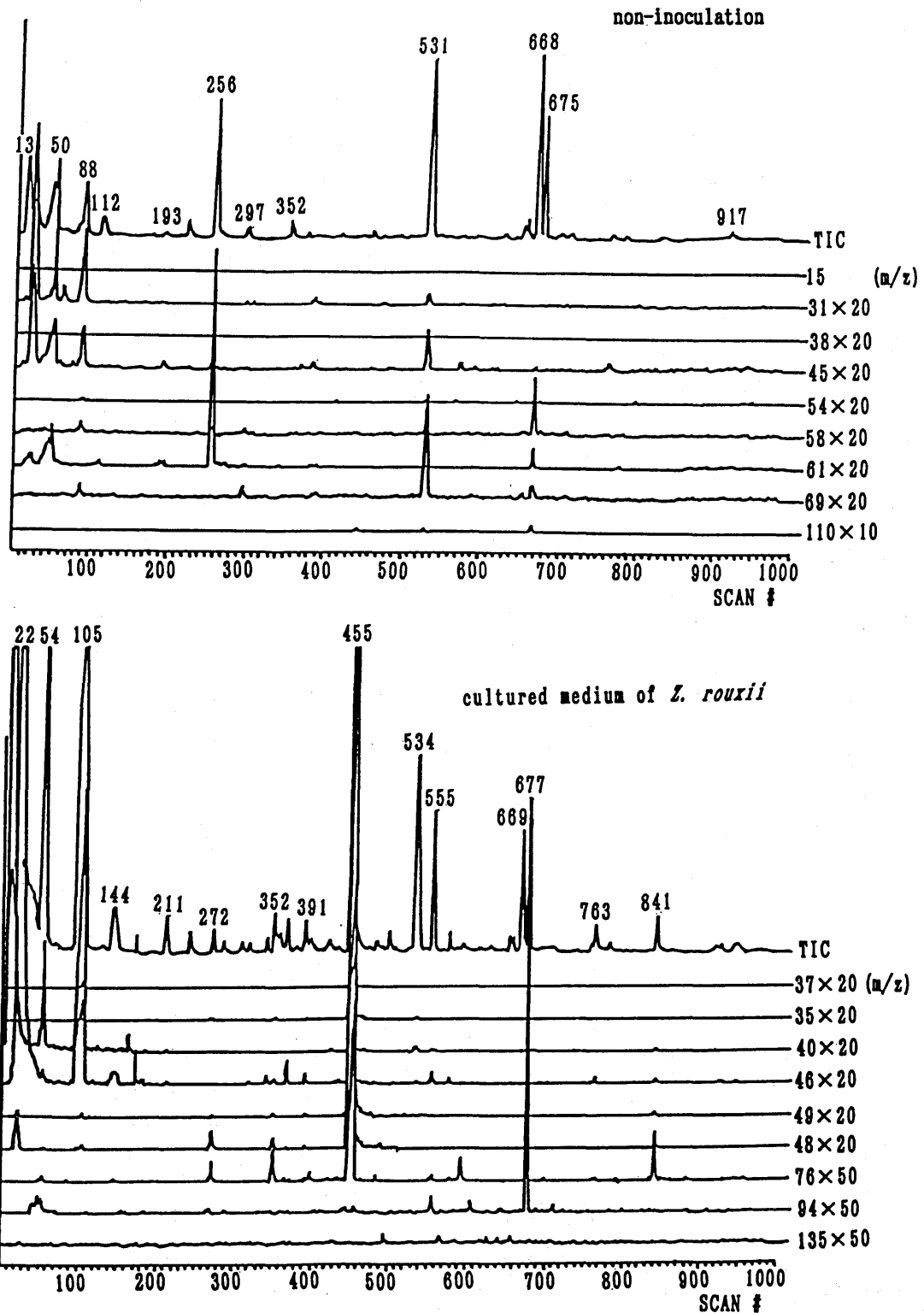


Fig. 3-3. Typical mass chromatograms of volatile compounds formed and reduced by *Z. rouxii* in medium containing methionine as the sole nitrogen source.

- Top: Scan #: 50, dimethyl disulfide; 193, dimethyl trisulfide; 256, methional; 675, 2,3-xyleneol(internal standard).
- Bottom: Scan #: 22, ethanol; 49, dimethyl disulfide; 54, 2-methyl-1-propanol; 105, 3-methyl-1-butanol; 214, dimethyl trisulfide; 272, methional; 352, ethyl 3-(methylthio)propanoate; 391, 3-(methylthio)propyl acetate; 455, methionol; 555, 2-phenylethanol; 677, 2,3-xyleneol(internal standard).

前述の揮発性含硫化合物のすべてが窒素源メチオニンの *Z. rouxii* S84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* S84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。メチオニン以外の窒素源では、シスチン、フェニルアラニン、グルタミン酸及びアルギニンの *Z. rouxii* S84培養液中で微量のmethionolのみが認められた。

WAINWRIGHT (1971) 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ら(1969)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 (1971) 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* S84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と UCHIDA (1991) は、*Zygosaccharomyces rouxii* MA^R1 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* S84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、FUJIMAKIら (1969) 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* S84の無接種培地では、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 (1970) 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* S84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* S84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 (NYKANENとSUOMALAINEN 1983) 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*などがその熟成に関与する醤油 (NUNOMURAら 1984) の香気成分としても報告されている。しかしながら、*Zygosaccharomyces 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 (本間 1987b)。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 (熊谷と菅

原 1994)、生醤油の加熱でdimethyl sulfide、dimethyl disulfide、methionolなどが増加することから(NUNOMURAとSASAKI 1992)、味噌や醤油を使用する際の加熱調理の際、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。また、著者らも生醤油の加熱でmethionolの増加することを確認している(ISHIHARA *et al.* 印刷中)。これらのことから、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(菅原ら 1992)や醤油(森ら 1983)の重要な香り成分の一つであり、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。

第4節 要約

味噌原料配合より案出したグルコースと18種アミノ酸混合物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硫化合物について検討した。供試菌として、赤色辛口米味噌より分離された耐塩性酵母の *Zygosaccharomyces rouxii* S84 (*Z. rouxii* S84)、*Candida versatilis* D-5 (*C. versatilis* D-5) 及び非耐塩性の *Saccharomyces cerevisiae* RIB 6002 (協会7号) (*S. cerevisiae*) が用いられた。これら酵母は炭素源であるグルコースの消費の伸びがほぼ停止するまで、30℃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硫化合物の同定は、これらの化合物をheadspace volatiles (HSV)捕集装置を用いてTenax TAに吸着させた後、GC(検出器:FPD)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。dimethyl disulfide、dimethyl trisulfide、methionalは、供試酵母間に程度の差はあるものの、全ての酵母培養液中で減少した。これら化合物の減少率は、供試酵母のうち、*Z. rouxii* S84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* S84はこれらの化合物を55.2~99.4%消滅させた。

このように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。そこで、それらの揮発性含硫化合物の起源について検討するため、シスチン、メチオニンの含硫アミノ酸の他に、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アミノ酸を単一窒素源として、*Z. rouxii* S84についてのみ実験を行った。

18種アミノ酸混合物を窒素源にした場合に認められた揮発性含硫化合物のすべてが、窒素源メチオニンの *Z. rouxii* S84無接種培地及び／あるいは培養液中で同定された。更に、前述の揮発性含硫化合物に加え、*Z. rouxii* S84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* S84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。

以上のごとく、本章では、耐塩性酵母と揮発性含硫化合物の生成と減少に対する深い関わりについて論述した。

第4章 耐塩性酵母の生成する揮発性有機酸

第1節 緒言

味噌の熟成過程において、耐塩性酵母は味噌香気成分としての酸性物質の生成にあまり関与しないとされている(好井 1966)。しかし、第1章・第2節において合成培地を使用して耐塩性酵母培養液の香気を官能的に調べたところ、培養液をpH 2に調整し、得られた減圧蒸留液の香気はほぼ培養液の香気を再現したが、pH 7に調整し得られた留液からは土臭さやアルカリ臭が認められた。これらのことから、耐塩性酵母培養液の香気において酸性物質の重要性が考えられた。また、第2章で耐塩性酵母の生成する総揮発性成分について検討した際、耐塩性酵母の対照株として使用した清酒酵母が、耐塩性酵母と異なり、*n*-hexanoic acid、*n*-octanoic acid、*n*-decanoic acid及びこれらのエステル類などを生成することが判明した。本章ではこれらのことをふまえ、第2章、第3章で実験法として使用したheadspace volatiles (HSV)法に替え、総揮発性成分から揮発性有機酸画分を分画する方法を用いて、耐塩性酵母の生成する揮発性有機酸(以下、揮発性酸)について検討した。

第2節 18種類アミノ酸混合物を窒素源とする培地を使用した場合

2-1 実験材料及び方法

2-1-1 供試酵母

耐塩性酵母として第1章から使用してきた *Zygosaccharomyces rouxii* S84 (以下、*Z. rouxii* S84)、*Candida versatilis* D-5 (以下、*C. versatilis* D-5)に加え、両株と同じく赤色辛口米味噌より分離された *Candida etchellsii* F-8 (以下、*C. etchellsii* F-8) (今井と松本 1975a、1975b)も供試した。また、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*)も使用した。なお、*C. etchellsii* F-8は *C. versatilis* D-5と同様、味噌熟成の後期にみられ、後熟型酵母

と呼ばれる。

2-1-2 培地及び培養方法

第2章、第3章で使用した合成培地はグルコース及び窒素量が多く、しかも、その比は16でかなり窒素含有割合の高い培地であった。その結果、耐塩性酵母の生育が悪く、本節ではその生育を考慮して、第1章・第2節で使用した培地 (Table 1-1) を用い、培養方法も準じた。すなわち、本培養培地は炭素源としてグルコース2%、窒素源としては、大豆のアミノ酸組成 (科学技術庁資源調査会編 1966) に基づいて18種類のアミノ酸混合物 (総窒素量として0.04%) を使用した。ただし、シスチンとチロシンは溶解度が小さいため過飽和の状態になった。グルコース量と総窒素量の比 (glucose/N) は50に相当する。本培養培地調製にあたっては、加熱滅菌時におけるアミノ・カルボニル反応の影響をさけ、考察を容易にするため、グルコース溶液とその他の成分溶液を別々に120°Cで10分間高圧滅菌した。そして、接種時1lの三角フラスコに、酵母懸濁液と本培養培地が600mlになるように調整し混合した。酵母の接種菌数は600ml当り 3×10^8 とし、30°Cで炭素源であるグルコースがほぼ消費しつくされた時期まで静置培養を行った。なお、この培養期間の設定は、第1章・第2節の結果によった。

2-1-3 揮発性酸の分離とそのブチルエステル化

揮発性酸の分析にあたって、その分画とエステル化が必要であった。そこで、第1章・第2節のFig. 1-1に示した減圧蒸留装置を用いて、各酵母培養液6l中の揮発性成分を水溶液として捕集した。

揮発性酸の分画方法をFig. 4-1に示し、得られた揮発性酸のアンモニウム塩は山下ら (1973) の方法でn-ブチルエステル化した。

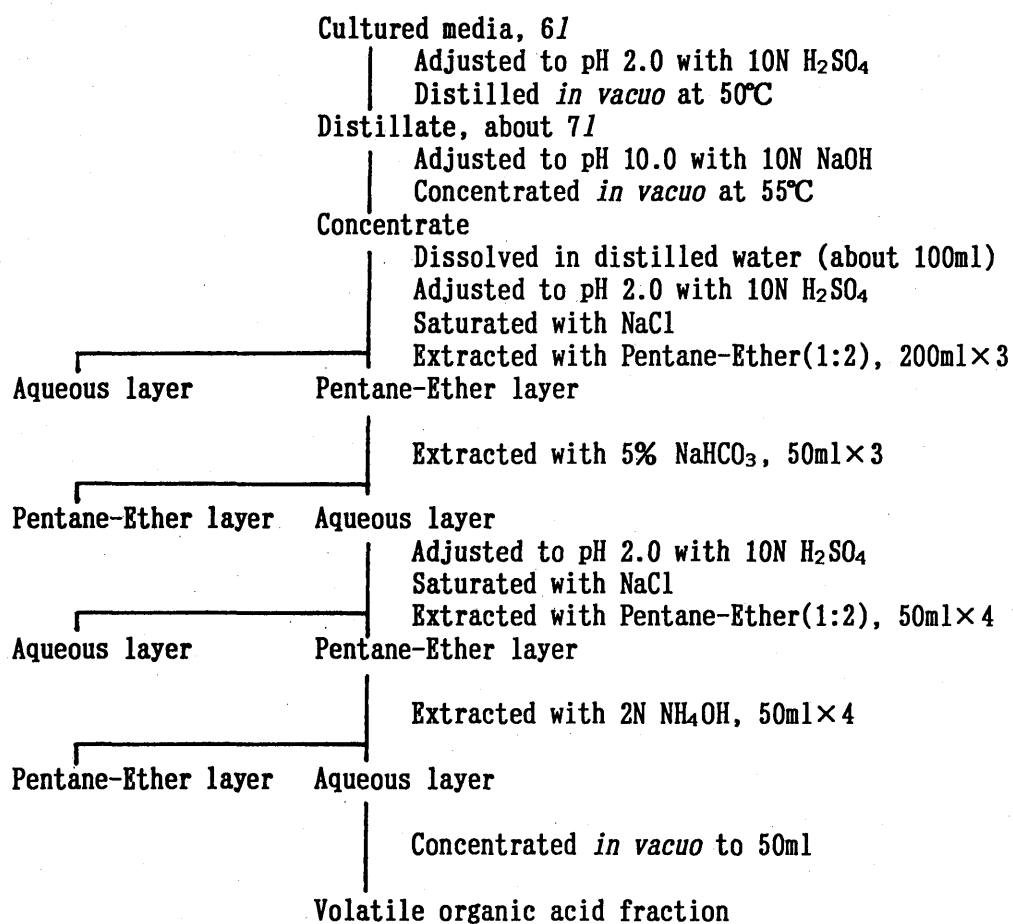


Fig. 4-1. Scheme of preparation for fractionation of volatile organic acids.

2-1-4 揮発性酸ブチルエステルのガスクロマトグラフィー(GC)及びガスクロマトグラフィー・質量分析(GC-MS)

GCは20% Silicone DC-550、1.5% Silicone OV-17、5% PEG-20M-Pの3種類のパックドカラムとPEG-20Mのキャピラリーカラムによって行った。装置は水素炎イオン化検出器(FID)を備えた島津GC-4APFを使用した。その他の操作条件は各実験結果において示した。各ピークに相当する化合物の推定は標準物質のRtとの比較、標準物質の添加試験により行った。また、ピーク面積はインテグレーター(Disc Co.263-D)により求め、Disc integrater unitで示した。GC-MSはデータ処理用のコンピューター(Hitachi 002B 8DK)を付属したHitachi M-5201とHitachi M-60を連結したものにより、電子衝撃イオン化法(EI法)で行った。カラムは3% Silicone DC-550のパックドカラムとPEG-20Mのキャピラリーカラムを使用した。3% Silicone DC-550を充てんしたガラスカラムは内径3mm×2mで、カラム温度80°C→(5°C/min)→210°C、キャリアーガス(He) 0.4Kg/cm³、注入部温度225°C、インターフェイス235°Cの条件で行った。一方、PEG-20Mのキャピラリーカラムはガラス製SCOTカラムで、操作条件は実験結果において示した。質量分析は両カラムともイオン化電圧20eV、イオン源温度180°Cで行い、同定は同一条件で行った標準物質のスペクトルとの比較によった。

2-1-5 生育度、pH及び培養液成分の測定

第1章・第2節に準じて、生育度は660nmにおける液層の長さ10mmの吸光度で示し、pHは直接pHメーターで測定した。つぎに試料溶液を3,500rpmで10分間遠心分離し、得られた上澄液についてグルコース量はフェノール-硫酸法、全窒素量はケルダール法で測定した。また、試料溶液を10N H₂SO₄でpH 2に調整し、減圧蒸留装置で蒸留液を得、その留液中の総アルコールは硝酸セリウム・アンモニウムを用いる比色法(船久保 1967)で測定し、エタノールとして示した。留液中の揮発性酸はアルカリ滴定法で酸量を求め、酢酸として算出した。総有機酸は試料溶液中の菌体を遠心分離及び東洋ろ紙no.101で除去後、10N H₂SO₄でpH 2に調整し、液・液連続抽出器を使用して50°Cで96時間エーテル抽出を行った。なお、受器には0.1N NaOH 80mlを入れ、すべての有機酸を捕捉し、逆滴定法により総有機酸量を求め、コハク酸として算出した。

2-2 実験結果及び考察

2-2-1 培養液中の成分量の比較

炭素源を消費しつくした時期での培養液成分をTable 4-1に示した。

Table 4-1. Analytical results of cultured media.

	Strain			
	<i>Z. rouxii</i> S84	<i>C. versatilis</i> D-5	<i>C. etchellsii</i> F-8	<i>S. cerevisiae</i>
Period of fermentation (d)	11	12	12	4
Glucose consumption (%)	98.8	98.4	99.4	99.4
Nitrogen consumption (%)	16.3	9.3	16.3	38.9
OD (660nm, 10mm)	0.36	0.22	0.38	0.85
pH	3.59	3.61	3.94	4.40
Volatile alcohols as ethanol (mg/100ml)	646	714	753	904
Total organic acids as succinic acid (mg/100ml)	54.4	48.7	19.5	9.8
Volatile organic acids as acetic acid (mg/100ml)	2.5	27.0	11.7	1.6
VOA*×100/TOA**	4.6	55.4	60.0	16.3

*Volatile organic acids; **Total organic acids

味噌熟成の主要酵母である *Z. rouxii* S84 と後熟型酵母である *C. versatilis* D-5、*C. etchellsii* F-8 の培養期間にはほとんど差がなく、12日間で培地組成の2%を占めるグルコースをほぼ完全に消費しつくした。これに対し、食塩無添加培地の清酒酵母 *S. cerevisiae* は4日間で培地中のグルコースのほぼすべてと総窒素量の40%近くを消費した。耐塩性酵母の窒素消費率は *S. cerevisiae* のそれよりも低く、また生育度も低かった。揮発性アルコール量は最高が *S. cerevisiae* であり、耐塩性酵母では *Candida* 属の生成量が *Z. rouxii* S84 のそれよりも多かった。しかし、第1章・第2節の結果では、*Z. rouxii* S84 のアルコール生成量が *C. versatilis* D-5 の生成量よりも多かったことから、耐塩性酵母間のアルコール生成量にはほとんど差がないものと考えられる。揮発性アルコール生成のために消費されたグルコース量を、豊沢ら (1960) の換算係数を用いて算出したところ、*S. cerevisiae* は89%、耐塩性酵母は64~74%を占め、消費されたグルコースの主たる行方はアルコールであることが認められた。

S. cerevisiae の pH 4.40 は培養初発時とほとんど変化がなく、有機酸量も供試菌中最低であった。一方、約1のpH低下が認められた *Z. rouxii* S84 と *C. versatilis* D-5 の有機酸量は *C. etchellsii* F-8 のそれよりも多く、しかもこの両菌株の有機酸量をアルコールと同様にコハク酸としてグルコースへ換算したところ、両菌株はそれぞれ培養によって消費されたグルコースの約4%を占めていた。

培養液100ml中の揮発性酸量を酢酸として示すと、*C. versatilis* D-5 が27.0 mg、*C. etchellsii* F-8 が11.7mg、*Z. rouxii* S84 が2.5mg、*S. cerevisiae* が1.6mgで、*C. versatilis* D-5 の揮発性酸量は *Z. rouxii* S84 の約11倍量であった。*C. versatilis* D-5 の揮発性酸量をグルコースへ換算したところ、培養期間中に消費されたグルコースの約2%に相当した。また、*Candida* 属の生成する揮発性酸量は総有機酸量の60%近く占めたが、*Z. rouxii* S84 では約5%であった。このことから、*Z. rouxii* S84 により生成される有機酸の大部分が不揮発性酸であると考えられる。なお、第2章の結果では、*S. cerevisiae* の生成揮発性酸量は耐塩性酵母のそれに比べ比較的多く、本節の結果と異なった。この違いは、第2章と本節における耐塩性酵母の生育度に原因があると考えられる。なぜならば、第2章で使用した合成培地はグルコース及び窒素量が多く、その結果、耐

塩性酵母の生育が悪かった。そこで、本章ではその生育を考慮した合成培地を使用したため、結果として、耐塩性酵母と *S. cerevisiae* のグルコースの消費には差がなく、耐塩性酵母の生育もかなり改善された。

各培養液の香気を調べたところ、*Z. rouxii* S84ではアルコール発酵臭の他に、つんとした刺激臭と果実様のエステル香が認められた。*C. versatilis* D-5ではアルコール発酵臭、エステル香の他に強い刺激臭と弱い醤油様及び漬物様の香気が認められ、*C. etchellsii* F-8ではアルコール発酵臭と刺激臭及び弱い不快臭が認められた。*S. cerevisiae*では清酒様香気の外に強い刺激臭と弱い硫黄化合物様のにおいが認められた。

2-2-2 揮発性酸の同定

揮発性酸ブチルエステルのガスクロマトグラムをFig. 4-2、4-3に示し、各ピークの推定、ピーク面積の比率をTable 4-2にまとめて示した。

ガスクロマトグラムのピーク総面積値の大きさは、*C. versatilis* D-5、*C. etchellsii* F-8、*Z. rouxii* S84、*S. cerevisiae*の順であり、アルカリ滴定によって求められた揮発性酸量の順序に一致した。全供試菌株に共通して、acetic、propionic、isobutyric、*n*-butyric acidの生成が認められた。ブチルエステルのGCによる分離には20% Silicone DC-550が適しているが、枝わかれした位置異性体の分離には不適當であった。これに対してPEG-20Mではpropionic、isobutyric acidの位置にブチルエステル化時に使用した試薬のブタノールのピークが検出される欠点はあるものの、2-methylbutanoicと3-methylbutanoic acid (以下、isovaleric acid) を分離することができた。これら両酸は全供試菌株により生成が確認された。全供試菌株により生成が確認された炭素数2~5の直鎖及び分岐した6種類の揮発性酸は味噌の有機酸 (本間と石原 1981; 日本醸造協会編 1977; 柴崎と後藤 1964; 豊島と上田 1959a、1959b; 豊島ら 1961)、あるいは味噌の香気成分 (本間 1982; 伊藤ら 1971; 岩淵と柴崎 1973; 安平と望月 1977) として既に報告され、なかでも2-methylbutanoic acidは本間 (1982) により味噌の香気成分として初めて報告された。また、2-methylbutanoic acidを除く5化合物は清酒の有機酸 (日本醸造協会編 1977) として報告されており、2-methylbutanoic acidに関しても

*S. cerevisiae*で生成が認められたので清酒中の存在が示唆される。

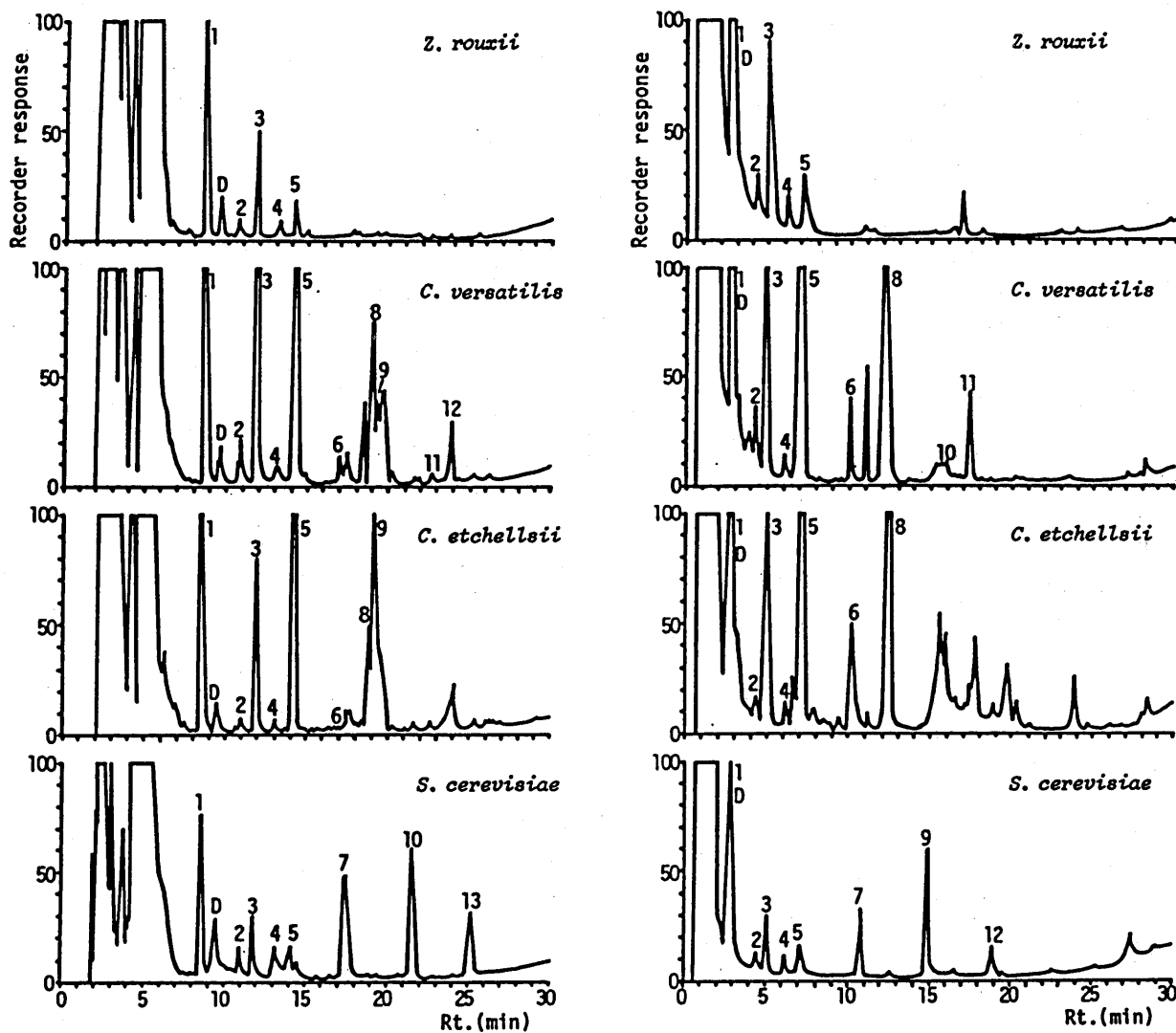


Fig. 4-2. Gas chromatograms of *n*-butyl esters of volatile organic acids in cultured media.

Column: Left: 20% Silicone DC-550, 3mm i.d.×3m, Stainless steel.

Right: 1.5% Silicone OV-17, 3mm i.d.×2m, Glass.

Column temp.: 60°C-(6°C/min)-240°C. Carrier gas: N₂, 50ml/min.

Injection temp.: 270°C. Detector: FID, 300°C.

D: Peak of dibutyl ether.

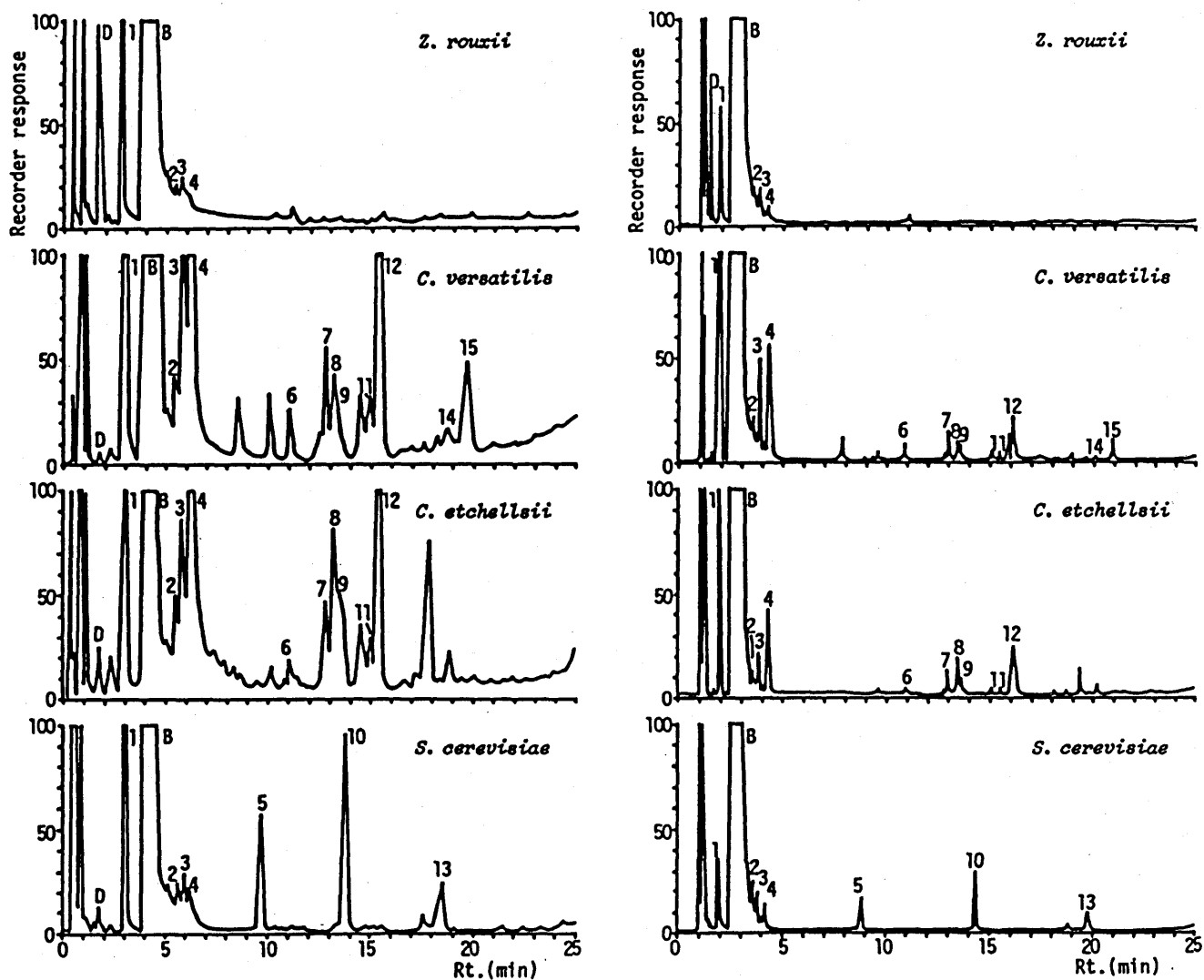


Fig. 4-3. Gas chromatograms of *n*-butyl esters of volatile organic acids in cultured media.

Left: Column: 5% PEG-20M-P, 3mm i.d.×2m, Glass.

Column temp.: 60°C-(6°C/min)-210°C. Carrier gas: N₂, 50ml/min.

Injection temp.: 270°C. Detector: FID, 300°C.

Right: Column: PEG-20M, 0.3mm i.d.×20m, Glass SCOT.

Column temp.: 60°C-(5min)-60°C-(5°C/min)-170°C.

Carrier gas: N₂, 1.1ml/min. Scavenger gas: N₂, 36.6ml/min.

Split ratio: 1/33. Injection temp.: 270°C. Detector: FID, 300°C.

D: Peak of dibutyl ether. B: Peak of *n*-butyl alcohol etc.

Table 4-2. Volatile organic acids in cultured media.

Peak no.		Compound(<i>n</i> -butyl ester)	GC-MS	Peak area % ^e on 20% Silicone DC-550			
DC ^a OV ^b PEG(1) ^c PEG(2) ^d	1			2	3	4	5
1	1	Acetate	+	76.11	68.12	25.95	46.93
2	2	Propionate	+	2.26	0.72	0.29	1.84
3	3	Isobutyrate	+	12.85	6.90	8.06	11.48
4	4	<i>n</i> -Butyrate	+	1.59	0.32	0.34	1.26
5	5	2-Methylbutanoate	+	5.50	10.34	32.38	4.82
5	6	Isovalerate	+				
6	6	2-Oxo-3-methylbutanoate	+				
6	9	2-Hydroxy-3-methylbutanoate	+		0.66	0.29	
7	7	<i>n</i> -Hexanoate	+				7.45
8	8	2-Oxo-3-methylpentanoate	+		3.30	4.94	
8	8	2-Oxo-4-methylpentanoate	+				
9	9	2-Hydroxy-3-methylpentanoate ^e	+		2.35	14.30	
9	12	2-Hydroxy-4-methylpentanoate	+				
10	10	<i>n</i> -Octanoate	+				18.04
11	14	Benzoate	+		0.09		
12	15	Phenylacetate	+		1.06		
13	13	<i>n</i> -Decanoate	+	1.69	6.14	13.45	4.20
		unknown					3.98
Total area ^h			2964	13002	4775		1907

^a on 20% Silicone DC-550. see Fig. 4-2(left). ^b on 1.5% Silicone OV-17. see Fig. 4-2(right).

^c on 5% PEG-20M-P. see Fig. 4-3(left).

^d on PEG-20M Glass SCOT. see Fig. 4-3(right).

^e relative area % to total area except solvent and dibutyl ether.

^f positive to authentic compound. ^g tentatively identified. ^h Disc integrater unit.

C. versatilis D-5、*C. etchellsii* F-8の両菌株からは2-oxo-3-methylbutanoic、2-oxo-3-methylpentanoic、2-oxo-4-methylpentanoic acidのオキシ酸と2-hydroxy-3-methylbutanoic、2-hydroxy-4-methylpentanoic acidのヒドロキシ酸の生成を認めた。これら化合物のマススペクトルは標準物質のそれに一致した。また、Fig. 4-3において、2-oxo-3-methylpentanoateのピークが2-oxo-4-methylpentanoateのピークの直前にある位置関係から、標準物質の入手ができなかったが、2-hydroxy-4-methylpentanoateの直前にあるピークを2-hydroxy-3-methylpentanoateと推定し、この化合物のGC-MSの結果も Fig. 4-4に示した。そのマススペクトルは2-hydroxy-4-methylpentanoateのそれに類似していた。また、この化合物は次節で*Z. rouxii* S84と*C. versatilis* D-5により、窒素源をイソロイシン単独にした場合に生成されることを確認している。2-hydroxy-3-methylpentanoic acidを除くオキシ酸とヒドロキシ酸のメチル、あるいはエチルエステルのマススペクトルデータに関しては既に報告されている (The Mass Spectrometry Data Centre 1983) が、ブチルエステルとしてのデータは見当たらず、ここにはじめて報告した。

2-oxo-4-methylpentanoic acidは生大豆のフレーバー成分 (藤巻と荒井 1976) として報告されているが、大豆を原料とする味噌中には、この化合物を含めいずれのオキシ酸もヒドロキシ酸もその存在は報告されていない。また、味噌と同じく大豆を原料とし、同種の耐塩性酵母がその熟成に関与する醤油中にも、これら化合物の存在は報告されていない。しかし、本研究で*Candida*属からこれら化合物の生成が認められたことは、味噌、醤油中での存在が示唆される。また、次節で窒素源に分岐アミノ酸のバリン、ロイシン、イソロイシンを単独に用いた場合、*Candida*属のみに限らず*Z. rouxii* S84によっても、これら分岐オキシ酸とヒドロキシ酸の生成を認めている。一方、清酒では2-oxo-3-methylbutanoic、2-oxo-4-methylpentanoic、2-hydroxy-3-methylbutanoic、2-hydroxy-4-methylpentanoic acidのいずれもエチルエステルではあるが、清酒の重要な香気成分として報告されている (山本 1961a、1961b)。しかし、本研究では清酒酵母*S. cerevisiae*によるこれら化合物の生成は認められなかった。清酒のこれら化合物のうち、2-hydroxy-4-methylpentanoic acidは*Aspergillus oryzae*によって生成され、清酒酵母自身はそのエチルエステル化のみに関

与していると報告されている（鈴木ら 1982； 植村 1939）。これに対し、本研究での 2-hydroxy-4-methylpentanoic acidは *Candida*属自身により生成が認められたので、酵母菌種間の差異として興味ある結果である。なお、分岐オキソ酸に関しては、パン酵母による生成の報告がある（SUOMALAINENとKERANEN 1967）。

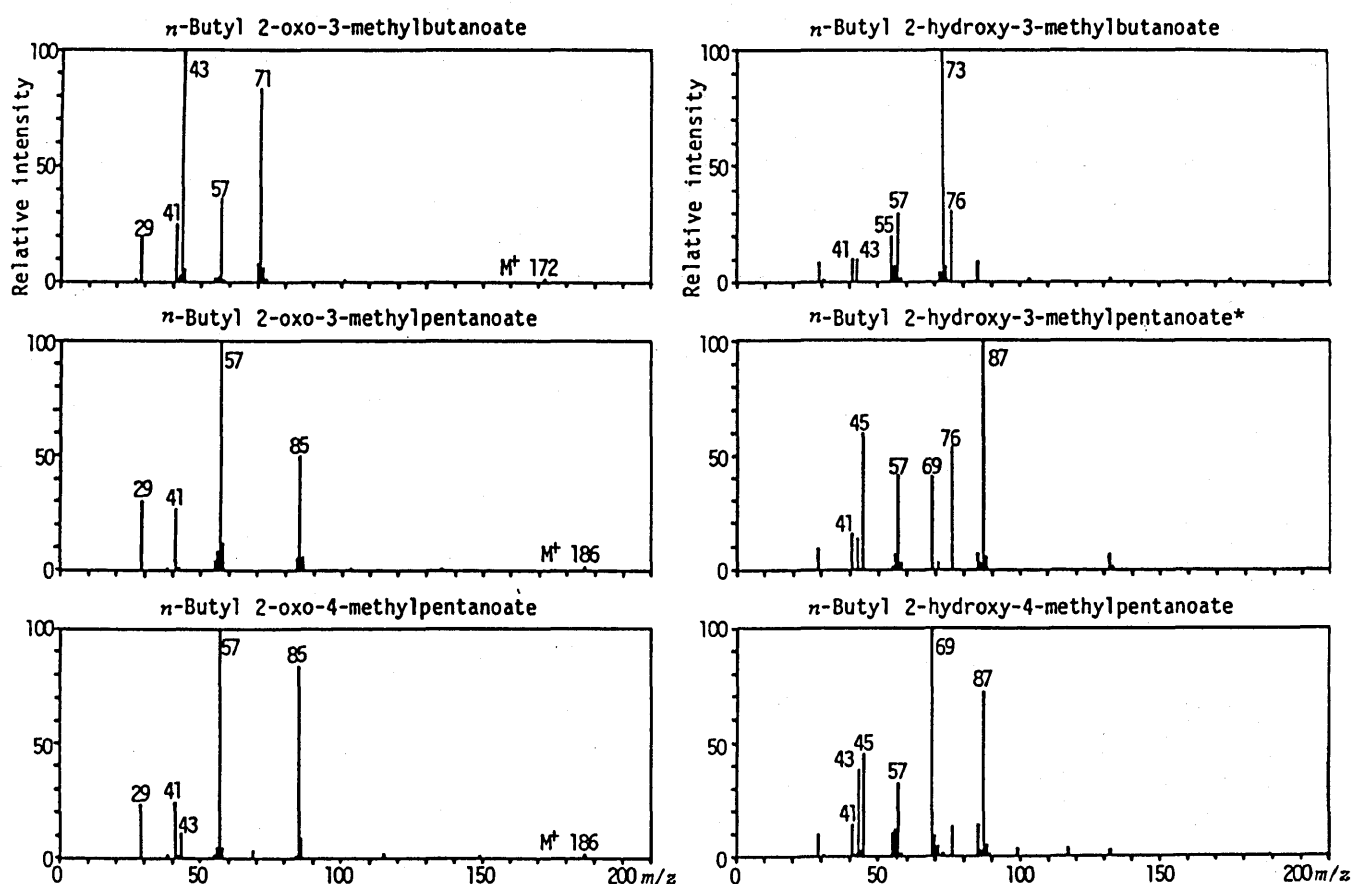


Fig. 4-4. Mass spectra of oxo carboxylic acids and hydroxy carboxylic acids identified in cultured media.

GC-MS-COM: Instrument: Hitachi M-5201-Hitachi M-60-Hitachi 002B・8DK.

Conditions:

Column: PEG-20M, 0.3mm i.d.×20m, Glass SCOT.

Column temp.: 60°C-(3°C/min)-170°C. Injection temp.: 250°C.

Interface temp.: 220°C. Carrier gas: He, 0.4kg/cm².

Split ratio: 1/20. Ionization: EI.

Ionization electron energy: 20eV. Ion source temp.: 180°C.

*Tentatively identified.

*S. cerevisiae*からは耐塩性酵母で検出されなかった *n*-hexanoic、*n*-octanoic、*n*-decanoic acidの生成が認められ、なかでも *n*-octanoic acidの生成割合はacetic acidについで高かった。この *n*-octanoic acidの生成割合の高いことと、これら揮発性酸が耐塩性酵母で検出されなかったことは、第2章の結果と同じであった。更に、*C. versatilis* D-5によりbenzoic、phenylacetic acidの生成も認められた。両化合物は既に味噌香気成分（本間 1982；日本醸造協会編 1977）として報告されており、また、benzoic acidとphenylacetic acidはそれぞれ、醤油産膜性酵母（今原と中浜 1968）や *Sccharomyces rouxii* (YUASAら 1976) によるフェニルアラニンの代謝産物としても報告されている。著者もまた、次節でフェニルアラニンを単独窒素源にした場合、*Z. rouxii* S84と *C. versatilis* D-5によりbenzoic acidとphenylacetic acidが生成されることを認めている。

供試酵母により生成が確認された揮発性酸の大部分がacetic acidで約26%～76%を占め、ついで量的に多かったのが、isobutyric、2-methylbutanoic、isovaleric acidなどであった。松本と今井（1974）は本研究に供試した *Z. rouxii* S84と同系統の *Z. rouxii* S96、*Z. rouxii* Y712を使用して、味噌への添加実験を行い、acetic acidの増加を認めている。

以上の結果から、合成培地を使用して耐塩性酵母により、味噌香気成分である炭素数2～5の直鎖及び分岐した揮発性酸、更にbenzoic acidとphenylacetic acidの生成が認められたので、味噌中でのこれらの揮発性酸の生成に対する耐塩性酵母の関与が推察された。また、味噌の後熟型酵母の *Candida*属により炭素数5、6の分岐オキソ酸やヒドロキシ酸の生成が認められたことは、味噌主要酵母である *Z. rouxii* S84や非耐塩性酵母である清酒酵母との大きな差異であった。

第3節 各アミノ酸を単一窒素源とする培地を使用した場合

3-1 実験材料及び方法

本節では、第2節で同定された揮発性酸のうち、主に、分岐オキシ酸とヒドロキシ酸及び芳香族有機酸の起源を検討するため、分岐アミノ酸としてバリン、ロイシン、イソロイシン及び芳香族アミノ酸としてフェニルアラニンの各アミノ酸を単一窒素源にして実験を行った。供試菌株としては、*Z. rouxii* S84と*C. versatilis* D-5の2菌株に限定した。これら以外の実験条件については、窒素濃度(0.04%)も含め、すべて第2節に準じた。

3-2 実験結果及び考察

3-2-1 培養液中の成分量の比較

炭素源であるグルコースを消費しつくした時期での培養液成分をTable 4-3に示した。

Table 4-3. Analytical results of cultured media in which various amino acids were used as a source of nitrogen.

Strain	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> S84				<i>Candida versatilis</i> D-5			
	L-Val	L-Leu	L-Ile	L-Phe	L-Val	L-Leu	L-Ile	L-Phe
Nitrogen source								
Period of fermentation (day)	11	11	11	12	24	24	50	50
Glucose consumption (%)	99.3	99.1	99.1	99.0	99.2	99.3	98.9	96.1
Nitrogen consumption (%)	24.0	17.9	22.4	17.9	12.7	13.0	15.9	9.8
OD (660nm, 10mm)	0.40	0.38	0.37	0.34	0.17	0.20	0.24	0.21
pH	3.52	3.39	3.40	3.39	3.39	3.49	3.50	3.59
Volatile alcohols								
as ethanol (mg/dl)	627	735	759	739	372	261	270	346
Total organic acids								
as succinic acid (mg/dl)	42.4	48.4	48.3	37.6	46.4	38.1	39.5	37.4
Volatile organic acids								
as acetic acid (mg/dl)	5.0	2.7	2.8	4.4	38.3	32.5	28.6	23.9
VOA*x100/TOA**	11.7	5.6	5.7	11.6	82.5	85.4	72.5	63.9

*Volatile organic acids

**Total organic acids

糖消費率は供試酵母及び窒素源の間にはほとんど差が認められず2%を占めるグルコースをほぼ完全に消費しつくした。しかし、そのグルコースを消費しつくすには、*C. versatilis* D-5の方が*Z. rouxii* S84に比べ2~4倍長い期間が必要であった。

窒素消費率は窒素源の間には差は認められないが、*Z. rouxii* S84のそれは*C. versatilis* D-5に比べ1.4~1.9倍高く、生育度も同じ傾向にあった。

揮発性アルコールの生成量は、前節で18種類アミノ酸混合物を窒素源にした場合、*Z. rouxii* S84と*C. versatilis* D-5の間にはほとんど差は認められなかった。しかし、単一アミノ酸を窒素源にしたところ、その窒素源の違いに関わりなく、*Z. rouxii* S84の揮発性アルコール生成量は*C. versatilis* D-5のその2~3倍量であった。なお、揮発性アルコール生成のために消費されたグルコース量を、豊沢ら(1960)の換算係数を用いて算出したところ、*Z. rouxii* S84は62~75%、*C. versatilis* D-5は26~37%と見積もられた。

一方、*C. versatilis* D-5の生成揮発性酸量は*Z. rouxii* S84のその5~12倍量であった。*C. versatilis* D-5の揮発性酸量をグルコースへ換算したところ、培養期間中に消費されたグルコースの2~3%に相当した。また、総有機酸量中の揮発性酸量は、窒素源の違いにかかわらず、*C. versatilis* D-5で60~80%を占めたが、*Z. rouxii* S84では5~11%であった。総有機酸量に関しては供試酵母間に差がないので、*Z. rouxii* S84が生成する有機酸の大部分が不揮発性酸であると考えられる。これらの有機酸生成量に関する結果は、前節で18種類アミノ酸混合物を窒素源にした場合とほぼ同じであった。

各培養液の香気を調べたところ、*Z. rouxii* S84では用いた窒素源由来と考えられる高級アルコール臭が強く認められた。また、つんとした刺激臭や果実様のエステル香も認められた。一方、*C. versatilis* D-5では*Z. rouxii* S84と同様、高級アルコール臭や刺激臭も認められるが、果実様香気が主体を占めた。なお、前節で18種類のアミノ酸混合物を窒素源にした場合、*C. versatilis* D-5で弱い醤油様及び漬物様香気が認められたが本実験では認められなかった。このことは、本実験で使用した窒素源以外のアミノ酸からの醤油様及び漬物様香気の生成が推定された。

3-2-2 揮発性酸の同定

揮発性酸のブチルエステルのガスクロマトグラムをFig. 4-5、4-6に示した。また、同定または推定された揮発性酸の定量結果をTable 4-4に示した。ただし、標準化合物の入手ができなかった2-hydroxy-3-methylpentanoic acidの定量値は、その定量にあたって、メチル基の枝分かれ位置だけが異なる2-hydroxy-4-methylpentanoic acidを利用したので参考値とした。また、同定または推定された揮発性酸の構造式をTable 4-5にまとめた。

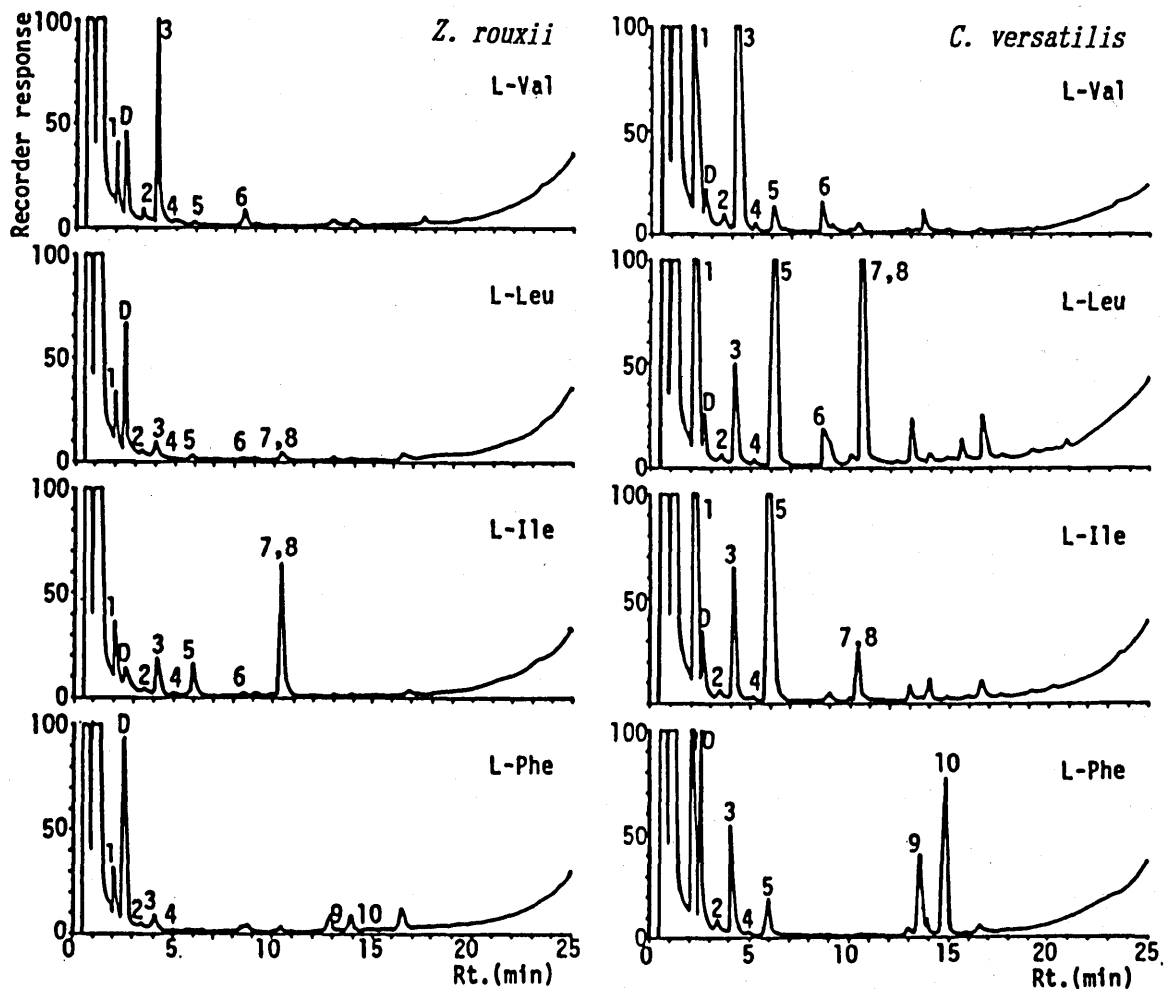


Fig. 4-5. Gas chromatograms of *n*-butyl esters of volatile organic acids in cultured media in which various amino acids were used as a source of nitrogen.

Column: 3% Silicone DC-550, 3mm i.d.×2m, Glass. Column temp.: 60°C-(6°C/min)-210°C.
 Carrier gas: N₂, 50ml/min. Injection temp.: 270°C. Detector: FID, 300°C.
 Peak no.: See Table 4-4. D: Peak of dibutyl ether.

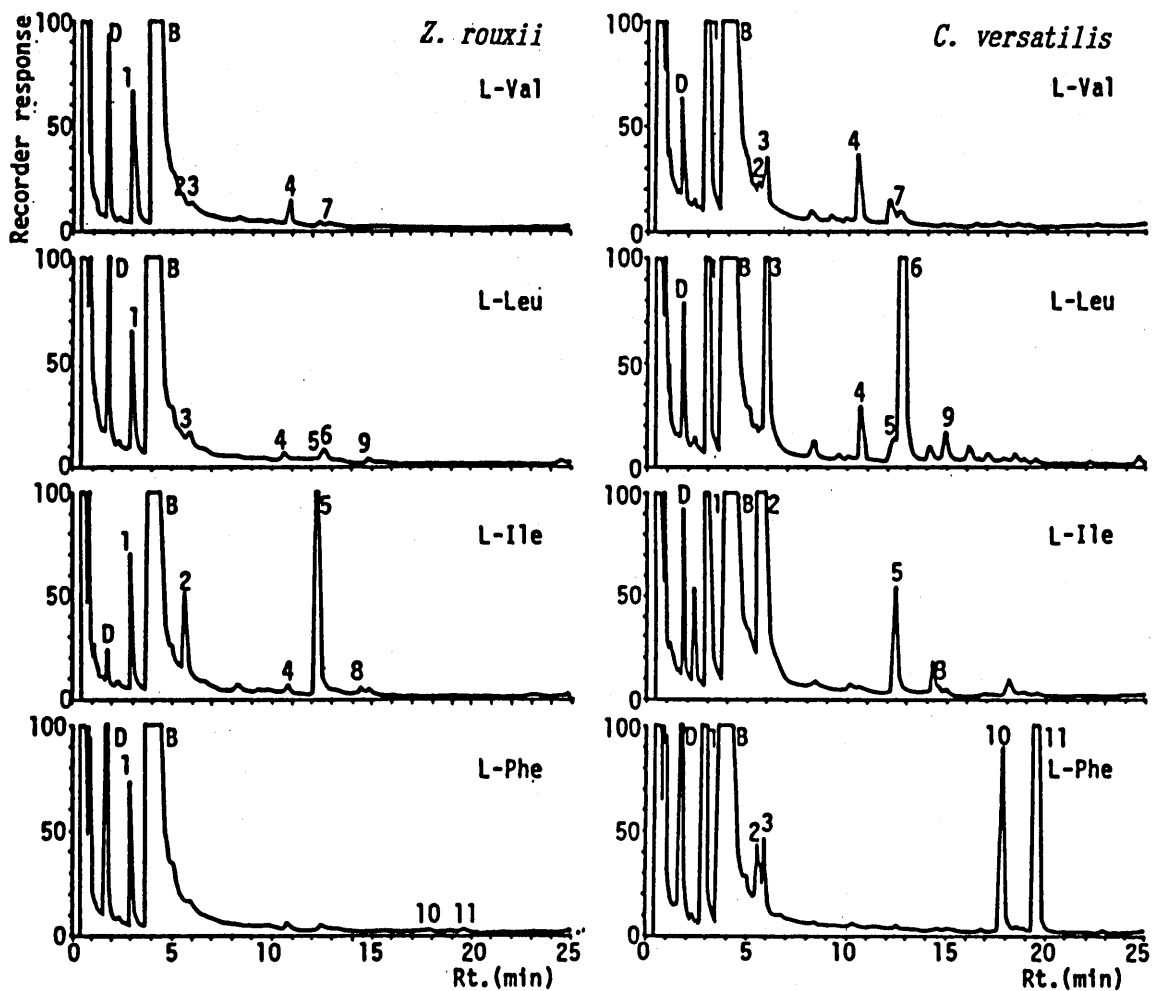


Fig. 4-6. Gas chromatograms of *n*-butyl esters of volatile organic acids in cultured media in which various amino acids were used as a source of nitrogen.

Column: 5% PEG-20M-P, 3mm i.d.×2m, Glass. Column temp.: 60°C-(6°C/min)-210°C.

Carrier gas: N₂, 50ml/min. Injection temp.: 270°C. Detector: FID, 300°C.

Peak no.: See Table 4-4. D: Peak of dibutyl ether. B: Peak of *n*-butyl alcohol etc.

Table 4-4. Volatile organic acids in cultured media in which various amino acids were used as a source of nitrogen.

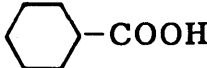
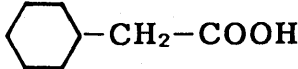
3% DC-550 Peak no. (min)	5% PEG-20M-P Peak Rt no. (min)	Compound (acid)	GC-MS	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> S84			<i>Candida versatilis</i> D-5						
				L-Val	L-Leu	L-Ile	L-Val	L-Leu	L-Ile	L-Phe			
				μg/dl			μg/dl						
1	2.1	1	3.0	Acetic	+	175	117	156	166	1935	2628	3368	2731
						(16.4)*	(46.3)	(17.0)	(69.8)	(43.8)	(40.0)	(41.6)	(64.8)
2	3.5	B		Propionic	+	28	7	8	12	24	15	20	25
						(2.6)	(2.8)	(0.9)	(5.0)	(0.5)	(0.2)	(0.3)	(0.6)
3	4.2	B		Isobutyric	+	782	48	124	48	2218	369	470	408
						(73.4)	(19.0)	(13.5)	(20.2)	(50.2)	(5.6)	(5.8)	(9.7)
4	5.1	B		n-Butyric	+	3	4	4	2	9	9	9	2
						(0.3)	(1.6)	(0.4)	(0.8)	(0.2)	(0.1)	(0.1)	(0.1)
5	6.0	2	5.6	2-Methylbutanoic	+	4		145		10		4033	72
						(0.4)		(15.7)		(0.2)		(49.8)	(1.7)
5	6.0	3	5.9	Isovaleric	+	5	16			42	1315		88
						(0.5)	(6.3)			(1.0)	(20.0)		(2.1)
6	8.6	4	10.7	2-Oxo-3-methylbutanoic	+	56	12	16		136	122		
						(5.3)	(4.7)	(1.7)		(3.1)	(1.9)		
6	8.6	7	12.8	2-Hydroxy-3-methylbutanoic	+	13				42			
						(1.2)				(1.0)			
7	10.5	5	12.3	2-Oxo-3-methylpentanoic	+		2	431		27	178		
							(0.8)	(46.8)		(0.4)	(2.2)		
7	10.5	6	12.7	2-Oxo-4-methylpentanoic	+		33			1989			
							(13.0)			(30.2)			
8	10.5	8	14.6	2-Hydroxy-3-methylpentanoic**				37***				24***	
								(4.0)				(0.3)	
8	10.5	9	15.0	2-Hydroxy-4-methylpentanoic	+		14			103			
							(5.5)			(1.6)			
9	13.5	10	17.9	Benzoic	+				6				263
									(2.5)				(6.2)
10	14.8	11	19.6	Phenylacetic	+				4				624
									(1.7)				(14.8)
Sum						1066	253	921	238	4416	6577	8102	4213
						(100.1)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.1)	(100.0)

* () Relative amount (%).

** Tentative identification.

*** Reference value. This compound was determined by GC analysis using 2-Hydroxy-4-methylpentanoic acid as the standard compound.

Table 4-5. Structural formulas of volatile organic acids.

1: Acetic acid	$\text{CH}_3\text{-COOH}$
2: Propionic acid	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$
3: Isobutyric acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
4: <i>n</i> -Butyric acid	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
5: 2-Methylbutanoic acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
6: Isovaleric acid (3-Methylbutanoic acid)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
7: 2-Oxo-3-methylbutanoic acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-CO-COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
8: 2-Hydroxy-3-methylbutanoic acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-CH-COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{OH} \end{array}$
9: 2-Oxo-3-methylpentanoic acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-CO-COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
10: 2-Oxo-4-methylpentanoic acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-CH}_2\text{-CO-COOH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
11: 2-Hydroxy-3-methylpentanoic acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-CH-COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{OH} \end{array}$
12: 2-Hydroxy-4-methylpentanoic acid	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-CH}_2\text{-CH-COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{OH} \end{array}$
13: Benzoic acid	
14: Phenylacetic acid	
15: <i>n</i> -Hexanoic acid	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
16: <i>n</i> -Octanoic acid	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$
17: <i>n</i> -Decanoic acid	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$

使用した窒素源の種類にかかわらず、*Z. rouxii* S84と*C. versatilis* D-5の両株によって生成が認められた揮発性酸は、acetic、propionic、isobutyric、*n*-butyric acidであった。2-methylbutanoicと3-methylbutanoic acid (isovaleric acid) はバリンを窒素源にした場合、両菌株により生成された。また、ロイシン及びイソロイシンを窒素源にした場合、それぞれisovaleic acid、2-methylbutanoic acidの生成が認められた。更に、フェニルアラニンも窒素源にした場合にも、*C. versatilis* D-5はこれら両酸を生成した。*C. versatilis* D-5によるイソロイシンからの2-methylbutanoic、ロイシンからのisovaleric acidの生成量が大きく、味噌香気成分中のこれら両酸は*Candida versatilis*により味噌原料中の大豆や米のイソロイシン及びロイシンからの生成が示唆される。

バリンを窒素源にした場合、両供試菌株により2-oxo-3-methylbutanoic、2-hydroxy-3-methylbutanoic acidの生成が認められた。また、ロイシンを窒素源にした場合、2-oxo-3-methylbutanoic、2-oxo-3-methylpentanoic、2-oxo-4-methylpentanoic、2-hydroxy-4-methylpentanoic acidの生成が認められたが、これらオキソ酸とヒドロキシ酸のうちで主体を占めたのが2-oxo-4-methylpentanoic acidであった。イソロイシンを窒素源にした場合、2-oxo-3-methylpentanoic acidの生成を認め、マススペクトルの結果から、2-hydroxy-3-methylpentanoic acidの生成を推定した。2-oxo-3-methylpentanoic acidは*Z. rouxii* S84がイソロイシンを窒素源にして生成し同定された揮発性酸のうち生成量が一番多く、46.8%も占めた。一方、*C. versatilis* D-5では2-oxo-3-methylpentanoic acidの生成量は2.2%であり、*C. versatilis* D-5の生成揮発性酸のうち生成量が一番多かったのが2-methylbutanoic acid (49.8%)であったので、両菌株の違いがここに認められた。また、*Z. rouxii* S84ではイソロイシンを窒素源にした場合、2-oxo-3-methylbutanoic acidの生成も認められた。これらオキソ酸とヒドロキシ酸が*C. versatilis* D-5のみならず*Z. rouxii* S84によっても生成されたことは、前節の結果と大きく異なった。なぜならば、前節で18種アミノ酸混合物を窒素源にした場合、これらオキソ酸とヒドロキシ酸の生成は*Z. rouxii* S84では認められなかった。これは、窒素量を前節と同じく0.4g/lにしたまゝ、各アミノ酸を単一窒素源にしたため、各アミノ酸の絶対量

が増え、その結果、*Z. rouxii* S84のピルビン酸から α -アセト乳酸への経路が阻害されたと推察される。すなわち、培地中に充分添加された分岐アミノ酸により、いわゆる negative feedback inhibition が起こり、これらオキシ酸とヒドロキシ酸が生成されたと考えられる。そして、前述の揮発性アルコールの生成量増加にも結び付いたのではないかと推定される（吉沢 1975）。これらオキシ酸とヒドロキシ酸のマススペクトルは前節と同じく標準物質のマススペクトルに一致した。なお、標準物質の入手ができなかった2-hydroxy-3-methylpentanoateに関しては、その構造式を考慮するとイソロイシンが起源であることが推定され、実際にイソロイシンを窒素源にして生成されていること、また、そのマススペクトルが2-hydroxy-4-methylpentanoateと類似していることから、この化合物と推定した。

フェニルアラニンを窒素源にした場合、両菌株により benzoic、phenylacetic acid の生成が認められた。

これらの結果から、耐塩性酵母により生成が認められた揮発性酸の起源が推定できた。

第4節 要約

合成培地を使用して、耐塩性酵母及び清酒酵母により生成される揮発性酸について検討した。

合成培地はグルコース（2%）、大豆のアミノ酸組成に基づく18種類のアミノ酸混合物（窒素として0.04%）、食塩（12.5%）、ビタミン8種類、無機塩6種類、pH 4.5よりなり、供試酵母として赤色辛口米味噌より分離された耐塩性の *Z. rouxii* S84、*C. versatilis* D-5、*C. etchellsii* F-8の3株を使用した。また、これら耐塩性酵母に加え、非耐塩性の清酒酵母 *S. cerevisiae* RIB 6002（協会7号）も用い、前述の培地組成のうち食塩を含まない培地についても検討した。これらの酵母が、炭素源であるグルコースをほぼ完全に消費しつくす時期まで30℃で静置培養を行った。培養液はpH 2で減圧蒸留を行い、得られた蒸留液はpH 10で濃縮後、常法により揮発性酸画分を調整した。揮発性酸の同定は揮発性酸の *n*-ブチルエステル化したものについて、GC及びGC-MSにより行った。

その結果、供試酵母に共通して生成が認められた揮発性酸は、acetic、propionic、isobutyric、*n*-butyric、2-methylbutanoic、3-methylbutanoic(isovaleric) acidであった。更に *C. versatilis* D-5、*C. etchellsii* F-8の両株からは2-oxo-3-methylbutanoic、2-oxo-3-methylpentanoic、2-oxo-4-methylpentanoic、2-hydroxy-3-methylbutanoic、2-hydroxy-4-methylpentanoic acidの生成を認めた。また、2-hydroxy-3-methylpentanoic acidの生成も推定した。更に、*C. versatilis* D-5により benzoic acidと phenylacetic acid、清酒酵母により *n*-hexanoic、*n*-octanoic、*n*-decanoic acidの生成も認められた。

揮発性酸量は培養液の減圧蒸留液についてアルカリ滴定により培養液100ml中の酢酸として求めたが、それは *C. versatilis* D-5が27.0mg、*C. etchellsii* F-8が11.7mg、*Z. rouxii* S84が2.5mg、清酒酵母が1.6mgであった。*C. versatilis* D-5の揮発性酸量は酢酸として培養期間中に消費されたグルコースの約2%に相当した。揮発性酸の大部分がacetic acidで約26~76%を占め、ついで量的に多かったのが、isobutyric、2-methylbutanoic、isovaleric acidなどであった。

以上の結果から、味噌の香気成分として報告されている炭素数2~5の直鎖及び分岐した揮発性酸やbenzoic、phenylacetic acidの生成に対する耐塩性酵母群の関与を考察した。また、炭素数5、6の分岐オキソ酸やヒドロキシ酸、benzoic、phenylacetic acid、炭素数6、8、10の直鎖の揮発性酸などの生成に対して、供試酵母間の差異を認めた。

つぎに、上記で耐塩性酵母により生成が認められた分岐オキソ酸やヒドロキシ酸及び芳香族有機酸の起源を考察するため、バリン、ロイシン、イソロイシン、及びフェニルアラニンの各アミノ酸を単一窒素源とする合成培地を用いて検討した。供試酵母として、*Z. rouxii* S84と *C. versatilis* D-5を用いた。他の実験条件については、18種類アミノ酸混合物を窒素源にした場合に準じた。

両菌株の各窒素源の培養液に共通して、acetic、propionic、isobutyric、*n*-butyric acidsの生成が認められた。その他、両菌株に共通して、ロイシン及びイソロイシン培養液より、それぞれisovaleric acid、2-methylbutanoic acidの生成が認められ、更に、バリンの培養液からは炭素数5、ロイシン及びイソロイシンの培養液からは炭素数6の分岐オキソ酸やヒドロキシ酸の生成を認

めた。また、フェニルアラニンの培養液からはbenzoic acidやphenylacetic acidの生成が認められた。*C. versatilis* D-5による揮発性酸の生成量は一部を除き、*Z. rouxii* S84 のそれよりも多いことが認められた。また、両菌株の各窒素源の培養液に共通して多かったのが acetic acidであり、その他、バリン培地からのisobutyric acid、ロイシン培地からの2-oxo-4-methyl-pentanoic acidやisovaleric acid、更に、イソロイシン培地からの2-methyl-butanoic acidなどが量的に多かった。

これらの結果から、耐塩性酵母により生成が認められた揮発性酸の起源が推定できた。

第5章 味噌の揮発性含硫化合物及び揮発性有機酸に対する耐塩性酵母の関与

第1節 緒言

第3章、第4章の合成培地を使用した実験で、揮発性含硫化合物及び揮発性有機酸の生成に対する耐塩性酵母の重要な役割を明らかにした。本章では種々の味噌を用いて、味噌香気成分の分析を行い、味噌中に含まれる揮発性含硫化合物や揮発性有機酸の生成に対する耐塩性酵母の役割について検討した。

第2節 味噌の香気とヘッドガス成分

揮発性含硫化合物や揮発性有機酸（以下、揮発性酸）を含む味噌香気成分の生成に対する耐塩性酵母の関わりを解明するため、まず、麹菌以外の微生物が熟成に関与しないいわゆる無菌醸造味噌（以下、無菌味噌）と麹菌の他に耐塩性酵母や耐塩性乳酸菌がその熟成に関与する普通醸造味噌（以下、普通味噌）を製造し、これら味噌の香気とヘッドガス成分について比較検討した。

なお、本章でのヘッドガスとは、静置された味噌懸濁液のヘッドガスを意味し、第1章～第4章で、試料中に窒素ガスを吹き込むことによって得られた headspace volatiles (HSV)とは異なる。

2-1 実験材料及び方法

2-1-1 未熟成無菌味噌、無菌味噌及び普通味噌の製造

無菌味噌 (aseptic *miso*) とは麹菌由来の酵素は存在するが、生菌としての耐塩性酵母や耐塩性乳酸菌などの発酵微生物が存在しない味噌のことである。ただし、微生物として麹菌が関与しているので、完全な無菌ではなく便宜的な呼称である。その無菌味噌は本間と今井 (1965b) によって案出された方法に準じて温醸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 (conventional *miso*) 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。また、これら味噌は熟成後、密閉ガラス容器に移し替え-15℃で分析まで保存した。なお、無菌味噌を仕込混合直後、直ちに密閉ガラス容器に入れ-15℃で分析まで保存したものを未熟成無菌味噌（unmaturated aseptic *miso*、以下、仕込み直後味噌）とした。

2-1-2 生菌数測定及び耐塩性酵母群の種の同定

生菌数は本間と今井（1965c）が使用した分別培地を用いて、10菌群にわけて測定した。耐塩性酵母群については茂木ら（1968）の方法により、アルコール発酵性 *Zygosaccharomyces* 属酵母群、後熟型 *Candida* 属酵母群、雑酵母群の3群にわけて生菌数を求めた。更に耐塩性酵母群分別用平板培地上のコロニーから、任意に分離した酵母について、糖発酵性、糖及び硝酸塩資化性テストを行い、Lodder（1970）、飯塚と後藤（1973）に従って菌種を同定し、その存在頻度も求めた。

2-1-3 一般成分量、不揮発性成分量及び表面色の測定

成分の分析は主として基準法（全国味噌技術会 1968）によった。ただし glycerol は NEISH（1971）の方法に従って定量し、不揮発性有機酸は水抽出物を pH 2 となし、液・液連続抽出器でもって200時間エーテルで抽出した。その抽出物を真空デシケーター中で減圧乾燥させた後、水にて一定容とし、更に沸騰水中で10時間加熱して lactide を加水分解してからアルカリ滴定を行って乳酸量として表示した。また、その一部をとって BAKER と SUMMERSON（1941）の方法で乳酸量を求めた。表面色は、東京電色製 TR-1000 測色計により測定し、CIE 表色法で表示した。

2-1-4 揮発性成分量の測定

揮発性成分のうち、Table 5-6 の成分1、3、4、5、11、12の分析は、第1章・第2節の Fig. 1-1 に示した減圧蒸留装置を用いて水とともに蒸留して得られる留液について行った。分析方法は Table 5-6 に示した。留液の調製は、味噌300g を塩化ナトリウム150g、水200ml とともに磨碎し Fig. 1-1 のコルベンに入れ、

10mmHg以下で減圧蒸留を味噌が乾固するまで行った。更に2回繰り返し、留液を合わせ1Lの定容とした。普通味噌の場合、トラップAにはやや重い味噌らしい香気を有する留液が、トラップBには蒸留酒様の芳香を有する留液が少量得られた。トラップCで得られる留液は極めてわずかであり、その香気はBのものと同一であった。留液をすべて合わせて分析に供したが、その留液の香気はほぼ味噌の香気を再現していた。

他の成分については、ethanolは安平と望月(1969b)の方法で、エステル類は味噌の懸濁液を炭酸カルシウムで中和後、常圧水蒸気蒸留し得られた留液からhexaneで振とう抽出し、有機層についてhydroxylamine-塩化鉄(III)比色法(GODDUら 1955)で、高級脂肪酸エステルはmethanol-chloroform(1:2)抽出物について薄層クロマトグラフィー・ガスクロマトグラフィーの組み合わせで、揮発性酸は味噌懸濁液をそのまま(遊離)あるいはpH 2において(遊離及び結合)常圧水蒸気蒸留して得られる留液についてアルカリ滴定法で、揮発性塩基の総量は微量拡散分析法・アルカリ滴定法(石坂 1969)により、総カルボニルは既報(本間ら 1973a)に従って2,4-dinitrophenyl-hydrazoneとして比色法により定量した。

2-1-5 ヘッドガス成分の分析

味噌のヘッドガスは先に報告(本間ら 1973b)した方法に準じて、Fig. 5-1に示す装置を用いて調製し、その成分をガスクロマトグラフィー(GC)により分析した。なお、本節でのヘッドガス成分分析法は、第1章・第4節で記述したheadspace volatiles(HSV)法と異なり、ヘッドガス成分捕集のための窒素ガスは使用しないで、試料から揮発する成分をガスタイトシリンジ(Precision Sampling Co.)を用いて直接採取する方法である。

GC装置は島津GC-4APF、水素炎イオン化検出器(FID)、キャリアーガス(窒素)50ml/min、注入部温度200°C、検出器温度250°Cとし、カラム条件は各実験結果において示した。ピーク面積はインテグレーター(Disc Co.)により求め、disc integrater unitで示した。ヘッドガスの分析には、MOSHONASとLUND(1971)の方法を改善した方法(本間ら 1974)によるサンプル濃縮法を用いた。すなわち、冷却装置(Cryocool-60)で-60°Cに冷却したCelite 545充てん

の内径3mm、長さ15cmのU字形ステンレスカラムを分析用カラムの前に連結し、そのU字形ステンレスカラムにガスタイトシリンジでもってヘッドガス60mlを注入して吸着させた後、このカラムを200℃に加熱して香気成分を揮発させ分析用カラムに導いた。各ピークに相当する化合物の同定は、標準物質のRetention timeとの比較及び添加テスト、各種試薬によるシリンジ反応（HOFFとFEIT 1964）による官能基の推定、ほう酸補助カラム（IKEDAら 1964）によるアルコール化合物の推定などによった。また分析用カラムと検出器の間に分流比1:3（検出側に1/4）のスプリットをつけ、分離してくる各ピーク成分の香気を嗅ぎ化合物同定の一助とするとともに、各成分の味噌香気に対する役割も検討した。

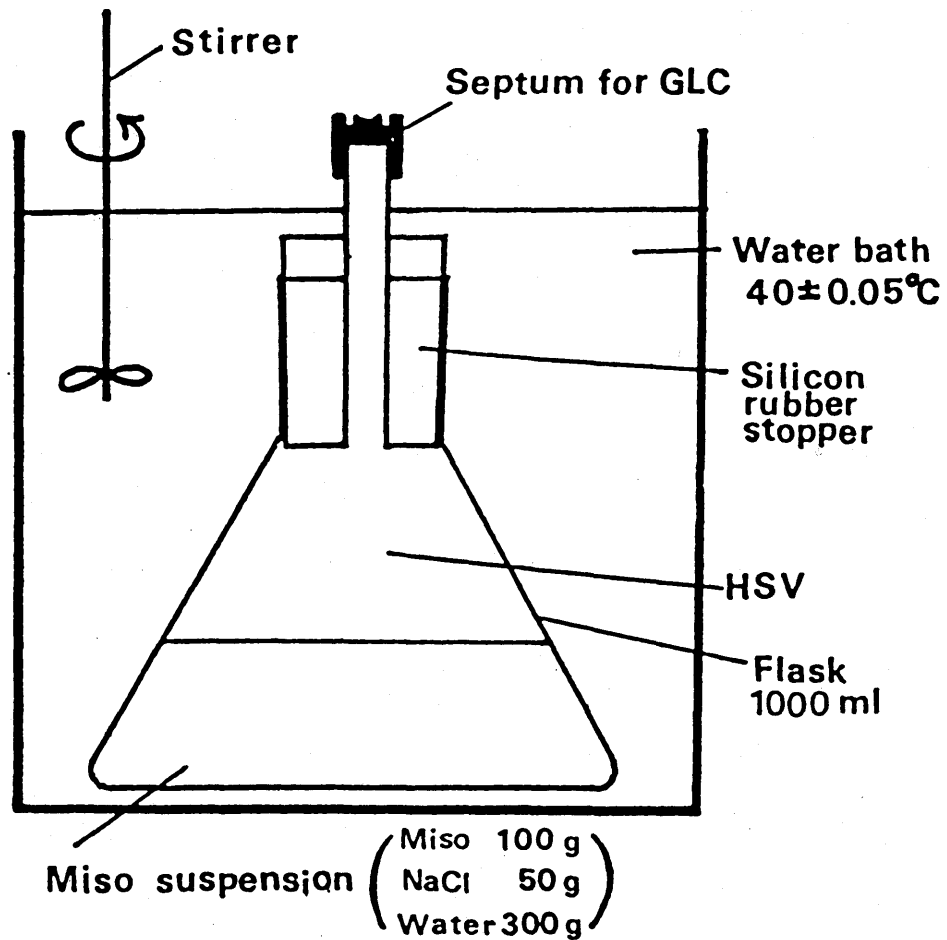


Fig. 5-1. Apparatus for preparation of headspace volatile (HSV).

2-1-6 香気についての官能検査法

パネルは本学食物科学生39名及び食品学、調理学の教官6名。無菌味噌及び普通味噌を7.7g/100mlの味噌汁とし50°Cに保ってその香気（立ちばな）を3点識別法、3点嗜好法によって比較し、更にプロフィールも求めた。なお両味噌の味噌汁の色は差が無く、外観による識別は全く不可能であった。

2-2 実験結果及び考察

2-2-1 供試味噌の微生物—特に耐塩性酵母

無菌味噌ではその全熟成期間を通じて、麹菌を除く微生物は検出されなかった。対照となる普通味噌中の各微生物群の生菌数の変化をFig. 5-2に示した。赤色辛口米味噌における微生物分布の変化の一般的傾向（好井ら 1976）とよく類似しており、普通味噌は正常な発酵熟成が行われたことを示している。

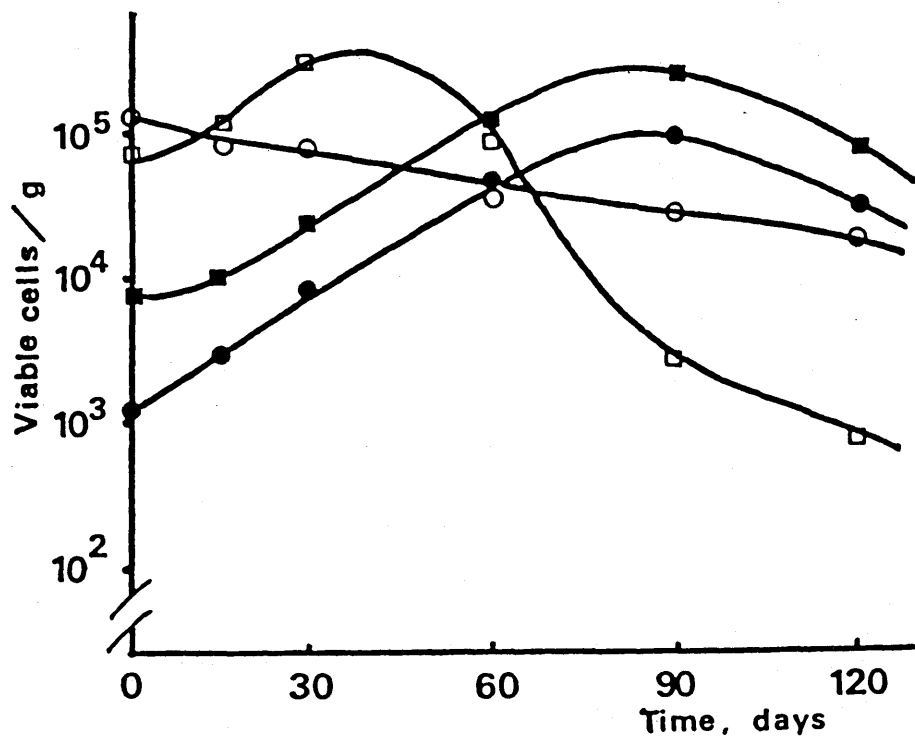


Fig. 5-2. Changes of viable cells of microorganisms in *miso* during the conventional maturation process with warming.

- : Yeast.
- : Halotolerant yeast.
- : Aerobic halotolerant bacteria.
- : Anaerobic halotolerant bacteria.

熟成味噌中の微生物分布を検討した結果をTable 5-1に示した。無菌味噌はすべての菌群において生菌数はゼロであり、普通味噌の細菌群のうち孢子形成細菌は好気性菌のみが認められ、他の3群は存在しなかった。普通味噌に用いた種味噌は本間と今井（1965c）が使用した味噌と同一起源であるので、主要な細菌々種は *Bacillus subtilis*、*Micrococcus varians* 及び *Pediococcus halophilus* と考えられる。耐塩性酵母についてはアルコール発酵性 *Zygosaccharomyces* 属酵母が圧倒的に多く、Table 5-2の結果からこの菌群の主要菌種は *Zygosaccharomyces rouxii* であり、醤油もろみに見出された *Zygosaccharomyces acidifaciens* (ONISHI 1957) と synonym である *Zygosaccharomyces bacilli* の存在も認められた。後熟型 *Candida* 属酵母群もかなり存在し、*Candida versatilis*、*Candida etchellsii* が 3~4:1 の比率で分離される。今井と松本（1975a、1975b）はこの両菌種の味噌における存在、生育条件を検討し、その応用（松本と今井 1977）を報告している。味噌の香気成分の1つとして 4-ethylguaiacol が見出されている（本間と石原 1976）ので、醤油（浅尾ら 1967）の場合と同じくこの後熟型 *Candida* 酵母群は長期熟成型味噌において複雑な香味を形成するに役立っているものと考えられる。試料がかなり熟成しているためか、仕込み初期に多く存在すると考えられるいわゆる雑酵母の存在割合は低かった。

Table 5-1. Microflora in the matured *miso*.

Type of microorganism	Viable cells/g <i>miso</i>	
	(A)*	(B)**
A Aerobic bacteria	0	4.5x10 ⁵
A' Aerobic spore-forming bacteria	0	4.9x10 ³
B Aerobic halotolerant bacteria	0	3.0x10 ⁴
B' Aerobic halotolerant spore-forming bacteria	0	0
C Anaerobic bacteria	0	7.2x10 ³
C' Anaerobic spore-forming bacteria	0	0
D Anaerobic halotolerant bacteria	0	8.5x10 ²
D' Anaerobic halotolerant spore-forming bacteria	0	0
G Yeasts	0	4.9x10 ⁴
H Halotolerant yeasts	0	8.8x10 ³
H-1 <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> etc.		6.6x10 ³
H-2 <i>Candida versatilis</i> etc.		1.8x10 ³
H-3 Miscellaneous yeasts		0.4x10 ³

* *Miso* made by aseptic process. ** *Miso* made by conventional process.

Table 5-2. Fermentation test, assimilation of carbon sources and KNO₃ by halotolerant yeasts isolated from *miso* made by conventional process.

Isolation media*	Fermentation**			Assimilation**							Species	No. of species (%)	
	Gl	Ga	Su	Mal	La	Gl	Ga	Su	Mal	La			KNO ₃
H-1	+	-	-	±, +	-	+	+	+	+	-	-	<i>Z. rouxii</i>	20 (66.7)
	+	+	±	+	±	+	+	+	+	+	+	<i>C. versatilis</i>	5 (16.7)
	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>C. etchellsii</i>	2 (6.7)
	+	-	-	-	-	+	+	±	-	-	-	<i>Z. bailii</i>	2 (6.7)
	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	±	?	1 (3.3)
H-2	+	+	+, -	+	±	+	+	+, ±	+	+, ±	+	<i>C. versatilis</i>	7 (70.0)
	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>C. etchellsii</i>	2 (20.0)
	+	+	-	+	-	+	+	±	+	-	+	?	1 (10.0)
H-3	+	+	+, -	+	±	+	+	+, ±	+	+, ±	+	<i>C. versatilis</i>	15 (75.0)
	+	+	-	+	-	+	+	+, ±	+	-	+	<i>C. etchellsii</i>	4 (20.0)
	+	+	-	±	-	+	+	±	+	-	+	?	1 (5.0)

* H-1, glucose-casamino acid medium; H-2, maltose-casamino acid medium; and H-3, maltose-KNO₃ medium.

** Abbreviation: glucose, Gl; galactose, Ga; sucrose, Su; maltose, Mal; and lactose, La.

2-2-2 香気についての官能検査

結果をTable 5-3に示した。無菌味噌は普通味噌に対しその香気の差は著しく、完全に識別されている。嗜好テストの結果は、無菌味噌よりも普通味噌が好まれることを示しているが、学生の場合には無菌味噌を好む集団も有意に存在していることを示している。予想外の結果であるが、嗜好の変化を知る上で興味ある結果である。

プロフィールについては次のごとき表現が多かった。無菌味噌を好むパネルメンバーは無菌味噌について、その香気が甘い、まろやか、ソフトであるとし、普通味噌の香気については刺戟的であると表現した。普通味噌を好むメンバーは無菌味噌について、味噌らしくなくて好ましくない、大豆の匂いがあるとし、普通味噌については、味噌らしくて好ましい、発酵の香気があるとした。また無菌味噌については香気が低く、普通味噌が高いことは、無菌味噌を好むメンバー及び普通味噌を好むメンバー共通に指摘された。このプロフィールの詳細については別途報告した(本間と石原 1979)。

Table 5-3. Sensory tests of the aroma of *miso*-soup.

Triangle test		Panel (number of members)	
		Students(39)	Teachers(6)
Discrimination	Correct answer	39	6
	P	<0.001	<0.001
Preference	Prefer(A)*	13	1
	P	<0.01	>0.05
	Prefer(B)**	26	5
	P	<0.001	<0.01

* *Miso* made by aseptic process.

** *Miso* made by conventional process.

2-2-3 一般成分量、不揮発性成分量及び表面色の比較

一般成分量をTable 5-4に示した。この数値を仕込み直後味噌と比較すると、無菌味噌ではほとんど差がないが、普通味噌では著しく変化しており、特に炭水化物の減少が著しい。この結果から、無菌的熟成による成分の欠減はほとんどないが、微生物が活動している通常の熟成においては主として炭水化物の減少による欠減があり、それに応じて他成分の相対的増加が認められる。減少が糖質にだけ起こると仮定した場合、普通味噌における欠減は計算上約3.5%となる。また、脂肪はこの相対的増加以上の増加が認められ、脂質以外のエーテル可溶性物質の蓄積が考えられる。

Table 5-4. Components of *miso*.

Component	<i>Miso</i>		
	Aseptic (%)	Conventional (%)	Unmaturated aseptic (%)
Water	49.02	50.78	49.62
Protein	11.56	12.14	11.40
Carbohydrate			
saccharide	18.74	15.16	18.15
fiber	1.50	1.64	1.72
Fat	5.06	6.12	5.25
Ash	14.12	14.16	13.86

不揮発性成分量及び表面色の比較の結果をTable 5-5に示した。pH、酸度2、窒素成分、表面色にはほとんど差がない。普通味噌の酸度1は小さいが、この酸度1に關与する遊離リン酸（松木ら 1968）が酵母等によってリン酸エステル化されるのが一因と考えられる。普通味噌では低分子の糖類が少なく、逆にglycerolと乳酸などの有機酸類が多くなっており、更に次表に示すごとく、アルコール類、エステル類が多くなっていることから、普通味噌では炭水化物を基質として、アルコール発酵や有機酸発酵が行われていることが認められる。glycerolは麹菌lipaseによって原料の脂質から生成されるものの他に、普通味噌ではその倍量が蓄積されており、耐塩性酵母による生成（大西 1967）のためと考えられる。

Table 5-5. Non-volatile components and color of maturated *miso*.

Component	<i>Miso</i>	
	(A)*	(B)**
pH	4.96	4.95
Acidity 1 (0.1N NaOH, ml)	16.58	14.40
Acidity 2 (0.1N NaOH, ml)	11.14	11.75
Nitrogen		
total (TN, %)	2.02	2.12
soluble (SN, %)	1.32	1.34
formol (FN, %)	0.41	0.42
100xSN/TN	65.32	63.21
100xFN/TN	20.30	19.81
Sugar as glucose		
total (TS, %)	18.74	14.74
soluble (SS, %)	17.40	12.70
reducing (RS, %)	17.00	12.30
insoluble (%)	1.34	1.40
100xSS/TS	92.85	86.30
100xRS/TS	90.72	83.45
Glycerol (%)	0.354	1.140
Non-volatile organic acid as lactic acid		
total (TA, %)	0.424	0.558
lactic acid (LA, %)	0.014	0.088
100xLA/TA	3.30	15.77
Surface color		
Y (%)	18.9	18.9
x	0.433	0.430
y	0.405	0.406

* *Miso* made by aseptic process. ** *Miso* made by conventional process.

2-2-4 揮発性成分量の比較

結果をTable 5-6に示した。供試した3種類の味噌に著しい差が認められる。仕込み直後味噌と無菌味噌との差は、発酵微生物が関与しない状態での熟成によって生成した揮発性成分量である。すなわち、主として麹菌諸酵素の作用によって生成した化合物間の非生物的化学反応によって生成した成分を示すものである。この他、たんぱく質などの高分子化合物に吸着されていた揮発性成分が、高分子化合物の分解により吸着より解放（本間ら 1977b）されて加わるものと考えられる。普通味噌と仕込み直後味噌との差は発酵微生物が関与した状態での熟成により生成した揮発性成分量を示し、普通味噌と無菌味噌との差は、そのうち特に発酵微生物が関与した部分を抜き出したものである。各成分量の大部分は、普通味噌>無菌味噌>仕込み直後味噌の順であるが、ethanalを除くカルボニル量は無菌味噌>普通味噌>仕込み直後味噌の順であり、発酵微生物による生成の抑制または他成分への変化が考えられる。普通味噌と無菌味噌の差の大きな成分は発酵によって生成したものであり、アルコール類、エステル類、フェノール類及びethanalがこれに属する。特に、普通味噌のethanolと脂肪酸エステルは高濃度である。無菌味噌と仕込み直後味噌の差の大きな成分は、カルボニル類、アルデヒド類、フェノール類、揮発性酸、揮発性塩基である。アルデヒド類は主としてアミノ酸のStrecker分解により生成し、これに脂肪酸の分解によるものと、更に、原料中にすでに存在していたものが吸着より解放されて加わるものと考えられる。フェノール類のうち4-amino-antipyrine試薬陽性の化合物は、フェノール性水酸基のパラ位にアルキルまたはアリル基を持たない構造である必要があるので、広範囲の化合物が陽性のFolin・Ciocalteu試薬による定量値よりはるかに少ない。無菌味噌の揮発性酸は脂肪酸の分解により生成したものと吸着よりの解放が考えられる。普通味噌の揮発性酸は、無菌味噌に比して5mg%程度多いことが認められたが、アルコール類、エステル類、フェノール類及びethanal等に比べ、発酵による生成は多くなかった。無菌味噌と普通味噌の揮発性塩基は、たんぱく質の加水分解に伴って生成するアンモニアが主体であり、両者の差の少ないことから、発酵微生物による揮発性塩基の生成は少ない。

Table 5-6. Volatile components of *miso*.

Component	Analytical method	<i>Miso</i> *		
		(A) mg%	(B) mg%	(C) mg%
1. Alcohols as ethanol	Ce(NO ₃) ₄ NH ₄ NO ₃ ¹⁾	<1	860	<1
2. Ethanol	GLC ²⁾	0.9	840.0	0.6
3. Fusel oil as 3-methylbutanol	Vanilin-H ₂ SO ₄ ³⁾	0.38	7.14	0.14
4. Phenols as phenol	Folin-Ciocalteu's ⁴⁾	0.386	0.676	0.057
5. Phenols as phenol	4-Amino-antipyrine ⁵⁾	0.006	0.020	0.001
6. Esters as ethyl acetate	NH ₂ OH-FeCl ⁶⁾	0.30	8.37	0.10
7. Esters of fatty acid	TLC-GLC	198	2023	76
8. Volatile aids as acetic acid total free	Steam distillation and titration	33.8 11.6	38.4 12.8	17.1 4.0
9. Volatile bases as NH ₃ -N	Microdiffusion and titraton ⁷⁾	62.70	66.35	24.06
10. Carbonyls as 3-methylbutanal	2,4-DNP ^{**8)}	0.821	0.547	0.160
11. Aldehydes as ethanal	MBTH ^{***9)}	0.588	0.546	0.264
12. Ethanal	<i>p</i> -Hydroxybiphenyl ¹⁰⁾	0.098	0.300	0.065

* (A): Aseptic *miso*, (B): Conventional *miso*, (C): Unmaturated aseptic *miso*. ** 2,4-DNP: 2,4-dinitrophenylhydrazine.

*** MBTH: 3-methyl-2-benzothiazolinehydrazone.

Reference: 1) FUNAKUBO 1967; 2) YASUHIRA and MOCHIZUKI 1969; 3) NIPPON BUNSEIKIKAGAKU KAI 1971; 4) MILLER 1959; 5) LACOSTE *et al.* 1959;

6) GODDU *et al.* 1955; 7) ISHIZAKA 1969; 8) HONMA *et al.* 1973a; 9) SAWICKI *et al.* 1961; 10) DAWES *et al.* 1971.

2-2-5 ヘッドガス成分の比較

ヘッドガスのガスクロマトグラムをFig. 5-3に、各ピークの同定、香気特性、ピーク面積などをまとめてTable 5-7、5-8、5-9に示した。

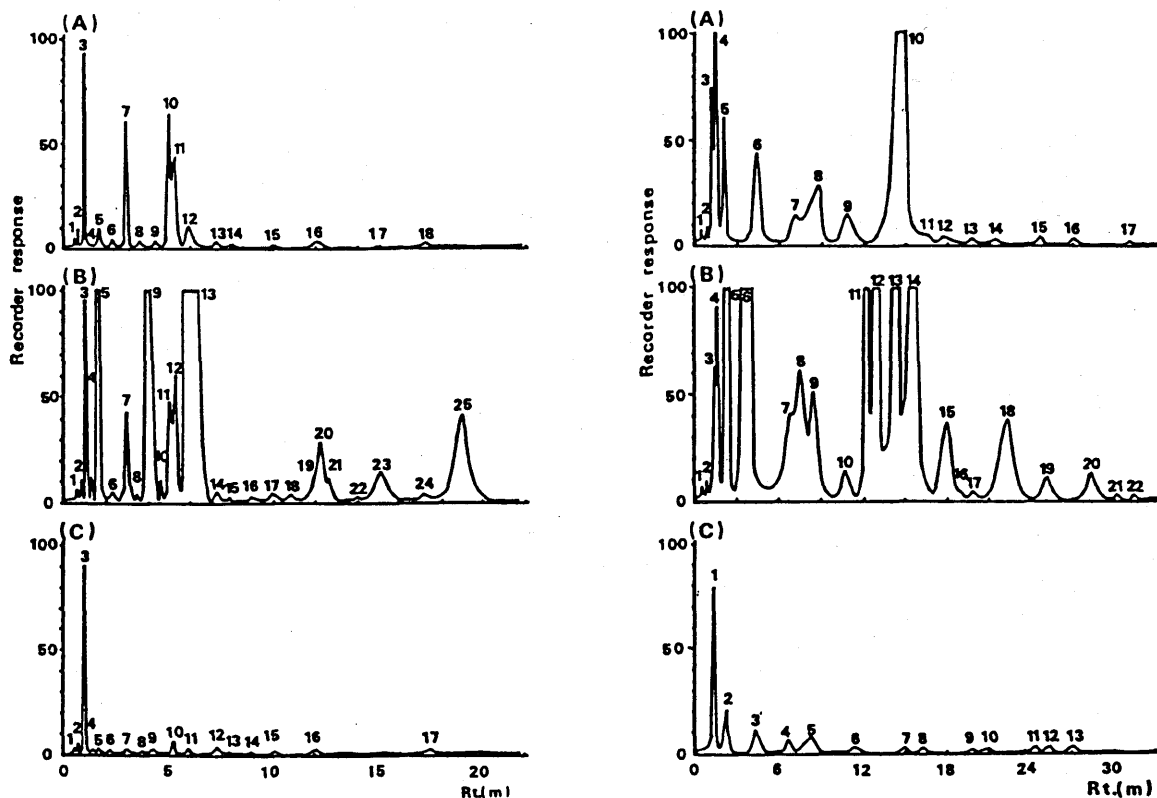


Fig. 5-3. Gas chromatograms of headspace volatile components of *miso*-suspensions.

Left: Column: PEG-1000, 3mm i.d. x 3m, Stainless steel.

Column temp.: 60°C-(2°C/min)-100°C.

Condensing column: Celite 545, 3mm i.d. x 15cm, -60°C.

Detector: flame ionization detector (FID).

Sample, (A): Aseptic *miso*, (B): Conventional *miso*, (C): Unmaturated aseptic *miso*.

Peak no.: See Table 5-7, 5-8, 5-9.

Right: Column: Tenax GC, 3mm i.d. x 1m, Stainless steel.

Column temp.: 60°C-(4°C/min)-200°C.

Condensing column: Celite 545, 3mm i.d. x 15cm, -60°C.

Detector: flame ionization detector (FID).

Sample, (A): Aseptic *miso*, (B): Conventional *miso*, (C): Unmaturated aseptic *miso*.

Peak no.: See Table 5-7, 5-8, 5-9.

Table 5-7. Aroma compounds in head space volatile on aseptic *miso*.

Peak* no.	Rt (m)	Functional** group	Character of aroma	Compound	Area of Peak	Peak*** no.
1	0.5	RH			±	
2	0.6	RH			±	
3	1.0	RH		Hexane	26	9
4	1.3				±	
5	1.7	RCOR'	Acetaldehyde-like	Ethanal	9	5
6	2.3	RH		Octane	2	12
7	2.9	RCOR'	Aldehyde-like	{ Propanal 2-Methylpropanal }	54	7
8	3.5				2	8
9	4.3	RCOR'		Butanal	2	9
10	5.0	ROH, RCOR'	Aldehyde-like	{ Methanol 2-Methylbutanal 3-Methylbutanal }	78	4 10 10
11	5.3					
12	6.0	ROH	Alcohol-like	Ethanol	5	6
13	7.2	RCOR'		Pentanal	2	11
14	8.0					
15	10.0	ROH		1-Propanol		
16	12.1	RH, RCOR'	Aldehyde-like	{ Undecanal Hexanal }	2	16 14
17	15.1				±	
18	17.2			Heptanal	1	15
(Sum)					(183)	

* See Fig. 5-3. ** By syringe reactions and an auxiliary boric acid column.

*** See Fig. 5-4.

Table 5-8. Aroma compounds in head space volatile on conventional *miso*.

Peak* no.	Rt (m)	Functional** group	Character of aroma	Compound	Area of Peak	Peak*** no.
1	0.5	RH			±	
2	0.6	RH			±	
3	1.0	RH		Hexane	25	10
4	1.3				2	
5	1.6	RCOR'	Acetaldehyde-like	Ethanal	73	5
6	2.3	RH		Octane	2	15
7	3.0	RCOR'	{ Aldehyde-like Ester-like	{ Propanal 2-Methylpropanal Ethyl formate	30	7 9 8
8	3.5				±	
9	4.0	RCOOR' RCOR'	Ethyl acetate-like	{ Ethyl acetate Butanal	475	11 10
10	4.6				2	
11	5.0	ROH, RCOR'	Aldehyde-like	{ Methanol 2-Methylbutanal 3-Methylbutanal	72	4 13 13
12	5.3					
13	6.0	ROH	Alcohol-like	Ethanol	15348	6
14	7.4	RCOR'		Pentanal	2	14
15	7.9		Ester-like	Isobutyl acetate	1	15
16	9.0	RCOOR'	Ester-like	Ethyl butyrate	2	16
17	10.0	ROH		1-Propanol	2	8
18	10.8		Ester-like	Ethyl isovalerate	1	19
19	12.0	RH, RCOR'		{ Undecane Hexanal	38	20
20	12.3					
21	12.7	ROH	Fusel oil-like	2-methylpropanol		12
22	14.0		Ester-like	Isopentyl acetate		18
23	15.2	ROH	Fusel oil-like	1-Butanol	±	10
24	17.2	RCOR'		Heptanal	28	19
25	19.0	ROH	{ Fusel oil-like Ester-like	{ 2-Methylbutanol 3-Methylbutanol Ethyl hexanoate	52	14 14 20
				(Sum)	(16156)	

* See Fig. 5-3. ** By syringe reactions and an auxiliary boric acid column.

*** See Fig. 5-4.

Table 5-9. Aroma compounds in head space volatile on unmatrated aseptic *miso*.

Peak* no.	Rt (m)	Functional** group	Character of aroma	Compound	Area of Peak	Peak*** no.
1	0.5	RH			±	
2	0.6	RH			±	
3	1.0	RH		Hexane	16	6
4	1.3				±	
5	1.7	RCOR'		Ethanal	1	2
6	2.2	RH		Octane	±	
7	3.0	RCOR'	Aldehyde-like	{ Propanal 2-Methylpropanal }	1	4 5
8	3.6				±	
9	4.2	RCOR'		Butanal	1	6
10	5.2	ROH, RCOR'	Aldehyde-like	{ Methanol 2-Methylbutanal 3-Methylbutanal }	2	1 7 7
11	6.0	ROH		Ethanal	1	3
12	6.0	RCOR'	Aldehyde-like	Pentanal	2	8
13	7.9				±	
14	8.9				±	
15	10.0	ROH		1-Propanol	1	
16	12.2	RH, RCOR'	Aldehyde-like	{ Undecane Hexanal }	1	13 10
17	17.5	RCOR'		Heptanal	1	12
				(Sum)	(27)	

* See Fig. 5-3. ** By syringe reactions and an auxiliary boric acid column.

*** See Fig. 5-4.

ピーク総面積は普通味噌>無菌味噌>仕込み直後味噌の順であり、圧倒的に多量に含まれる普通味噌のethanolのピーク面積を除いた場合でも、普通味噌>無菌味噌>仕込み直後味噌の順であった。この結果は、普通味噌が無菌味噌よりも香気が強いという官能検査の結果と一致する。

ヘッドガス成分は主として低沸点化合物よりなり、炭素数6程度までの脂肪族アルコールとカルボニル、脂肪酸エステルなどが主として検出される。これらヘッドガス中に存在の推定された化合物の大部分はすでに報告（日本醸造協会編 1971）されている。

これら化合物のうち、無菌的熟成により増加する化合物はethanal及び2-methylpropanal、2- (and/or 3-) methylbutanalなどのアルデヒドであり、褐変反応に伴って、味噌の中に高濃度に存在するアミノ酸からStrecker分解により生成したものと考えられる。アルコール類、エステル類は無菌的熟成によっては全然増加していない。発酵微生物が関与する熟成においては、前記ethanalと分岐アルデヒドの他に、各種アルコール、エステルが増加している。アルコールとしては圧倒的多量のethanolの他に、フーゼル油を構成する1-butanol、2-methylpropanol、2- (and/or 3-) methylbutanolなど高級アルコールが量的に多い。高級アルコール類は、味噌の中に高濃度に存在するアミノ酸から酵母の作用によって主としてEhrlich経路（清酒酵母研究会 1972）を経て生成したものと考えられるが、更に検討を必要とする。これら高級アルコール類は独得の香気を有しており、味噌の香気に重要な働きを果たしている（安平ら 1973）。エステル類としては、ethyl acetateがかなりの量存在しており、その他ethyl formate、ethyl butyrate、ethyl hexanoate、isopentyl acetateなどのacetate類、ethyl ester類の生成が認められる。これらエステル類は、一般に香気が強いので、味噌の香気において重要な役割を果たしているものと考えられる。Table 5-6で普通味噌に高級脂肪酸エステルがかなりの量存在していることを示したが、ヘッドガス中には揮発性の関係で認めることができなかった。なお、揮発性含硫化合物や揮発性酸に関しては、本節の実験では検出できなかった。しかし、これら化合物群は味噌の香気成分として既に報告（日本醸造協会編 1977）されているので、本実験ではヘッドガス中での濃度が低いため、検出されなかったと考えた。

以上のごとく、無菌味噌のヘッドガス中にはアルコール類、エステル類がほとんどなく、大部分が原料由来またはStrecker分解により生成したカルボニル類であり、芳香とはいえない難い香気となっている。しかし、Table 5-3に示したごとく、逆に無菌味噌を好むパネルメンバーが有意に存在するほどであるから、無菌味噌の香気化合物は味噌の香気形成にかなりの役割を果たしており、これをベースとして発酵微生物の生成したアルコール類、エステル類、フェノール類などの香気化合物が加わって味噌の香気が完成するものと考えた。

第3節 味噌の揮発性含硫化合物

3-1 実験材料及び方法

3-1-1 供試味噌

第2節で製造した仕込み直後味噌、無菌味噌及び普通味噌の3種類の他に、(社)中央味噌研究所(東京)提供の白甘味噌、江戸味噌及び山田醸造(株)(新潟県豊栄市)製造の温醸した越後味噌と天然熟成の越後味噌を供試した。

白甘味噌は米麴を多く用い、発酵香が少なく色調の淡い甘味噌である。白甘味噌の熟成は、仕込み混合時に加熱殺菌などで酵母の増殖を防止し、麴菌の酵素で甘味と旨味を醸成する。江戸味噌は江戸甘味噌ともいい、京都の西京白味噌とともに米の甘味噌の代表的な銘柄である。白甘味噌と異なり茶褐色あるいは赤褐色を呈し、とろりとした甘味を有する。白甘味噌と江戸味噌はいずれもその熟成に酵母がほとんど関与していないと判断される味噌である。

一方、越後味噌は米味噌の赤色辛口味噌に分類され、耐塩性の酵母や乳酸菌などがその熟成に関与し、発酵香が強く、赤褐色を呈した塩分の多い味噌である。なお、温醸の越後味噌(以下、越後温醸味噌)は、第1章～第4章の実験に供試してきた *Z. rouxii* S84と同じ系統に分類される *Zygosaccharomyces rouxii* S96(以下、*Z. rouxii* S96)(松本と今井 1973、1974)を味噌原材料1g当たり 10^6 添加し、 $32^{\circ}\text{C}\sim 33^{\circ}\text{C}$ で3ヶ月間、また、天然醸造の越後味噌(以下、越後天然味噌)は温醸味噌と同じく *Z. rouxii* S96を $10^6/\text{g}$ を添加のうえ、自然の環境下で約1年間発酵・熟成させたものである。

3-1-2 味噌の揮発性含硫化合物の分析

第2節で、味噌懸濁液のヘッドガス60mlを用いて、味噌香気成分の分析を行ったが、揮発性含硫化合物は検出されなかった。これは、ヘッドガス量が少ないためと考え、第1章・第4節で確立した窒素ガスを用いるheadspace volatiles (HSV) 法に替えた。しかし、味噌懸濁液中の味噌濃度を30%以上になると、味噌の粘性のためHSV法による揮発性成分の捕集量に変動が認められた。そのため、HSV法の前処理として味噌懸濁液の減圧蒸留を行った。すなわち、供試味噌200gに食塩100gと高純水200mlを加え、ホモゲナイザーを使用して5分間、攪拌・混合し味噌懸濁液を調製した。その後、味噌中の揮発性成分の遺失がないように第1章・第2節Fig. 1-1の減圧蒸留装置を用いて、味噌懸濁液が乾固するまで減圧蒸留を行った。更に、100mlの高純水を加えて減圧蒸留を繰り返した後、蒸留液は500mlの一定量にした。各減圧蒸留液中の揮発性含硫化合物の分析は、ガスクロマトグラフィー・質量分析を除いて、第3章の耐塩性酵母培養液の場合に準じた。すなわち、150mlの減圧蒸留液を用い、HSV法で減圧蒸留液中の揮発性成分をTenax TAに捕集した後、揮発性含硫化合物検出用の島津GC-8A (検出器：FPD) を用いてガスクロマトグラフィー (GC) を行った。

3-1-3 ガスクロマトグラフィー・質量分析(GC-MS)

GC-MSは、第2章～第4章まではHitachi M-5201ガスクロマトグラフとHitachi M-60マススペクトロメーターを連結したものによって行ったが、本章では日本電子製のJMS-SX102Aを使用して、イオン化電圧70eV、イオン源温度180℃の条件で行った。カラムはJ&W Scientific社のDB-WAX (0.32mm i.d. x 30m) を用い、カラム温度60℃-(5min)-60℃-(5℃/min)-200℃、注入部温度250℃、キャリアーガス (He) 流速は1ml/min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℃とし、キャリアーガス流路をTenax TA管経由に切り替えた後、Heガスを5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、GC-MS装置に付属したMass library (public/NIST) spectra、MSスペクトルの文献値 (M. C. ten NOEVER de BRAUWら 1979; The Mass Spectrometry Data

Centre 1983) 及び標準物質のGCのRetention timeをもとに行った。

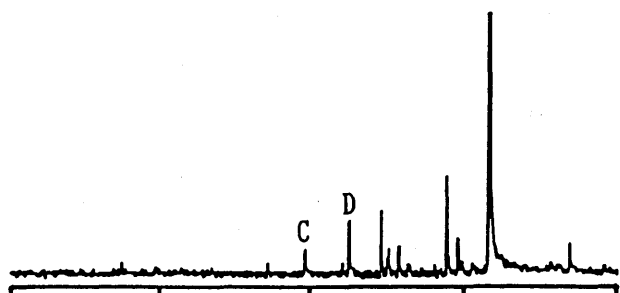
3-2 実験結果及び考察

3-2-1 味噌の揮発性含硫化合物

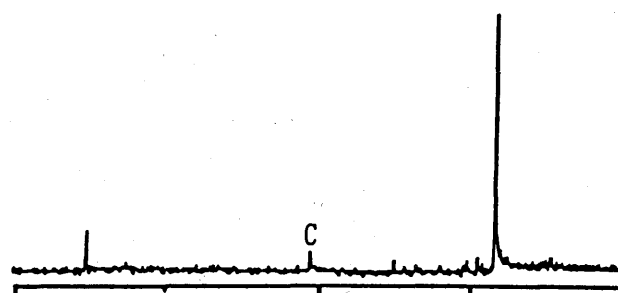
第3章で味噌原料配合より案出したグルコースと18種アミノ酸混合物または各種アミノ酸単独と食塩からなる合成培地を使用して、耐塩性酵母によって生成されたり、減少されたりする揮発性含硫化合物について詳述した。その結果、酵母無接種培地や酵母培養液中で同定された揮発性含硫化合物は、dimethyl disulfide、dimethyl trisulfide、3-(methylthio)propionaldehyde (methional)、ethyl 3-(methylthio)propanoate、3-(methylthio)propyl acetate、3-(methylthio)-1-propanol (methionol)等であった。これら化合物の味噌中での存在結果をFig. 5-4及びTable 5-10に示した。

大豆加熱処理物と麴及び食塩の混合物である仕込み直後味噌では、微量のmethionolとethyl 3-(methylthio)propanoateの生成が認められた。このmethionolは原料の加熱処理により生成され、また、ethyl 3-(methylthio)propanoateは麴に由来するものと考えられる。この仕込み直後味噌を麴菌のみで熟成させた、いわゆる無菌味噌では、dimethyl disulfide、dimethyl trisulfide、methionol及びethyl 3-(methylthio)propanoateの生成が認められた。ethyl 3-(methylthio)propanoateは仕込み直後味噌の場合と同様、麴に由来するものと推察されるが、dimethyl disulfide、dimethyl trisulfide、methionol、は第3章で考察したごとく、無菌味噌の熟成期間中にStrecker分解などにより化学的に味噌中のメチオニンから生成されたものと考えられる。そして、これら3化合物は、無菌味噌に比べ耐塩性酵母がその熟成に関与している普通味噌中で少ない傾向にあったが、第3章の耐塩性酵母培養液での結果のごとく急激な減少は認められなかった。これら化合物は不快臭を呈するので、少しでも減少されることは望ましいと考えられる。また、味噌懸濁液の加熱でmethionolが生成されたり(熊谷と菅原 1994)、生醤油の加熱でdimethyl sulfide、dimethyl disulfide、methionolなどが増加することから(NUNOMURAとSASAKI 1992)、味噌や醤油を使用する際の加熱調理の際、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ので、味噌や醤油中の存在量の少ないことが望まれる。

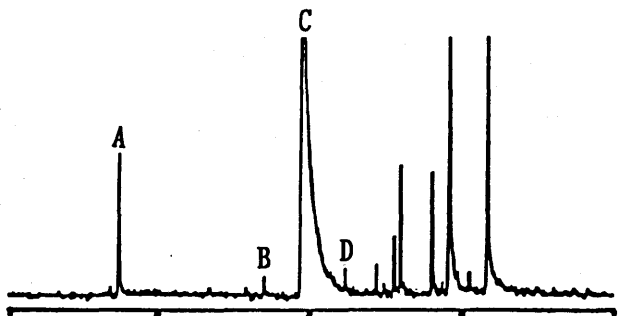
Unmaturated aseptic *miso*



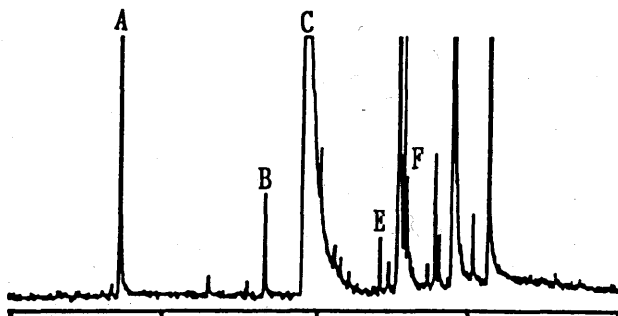
Sweet white *miso*



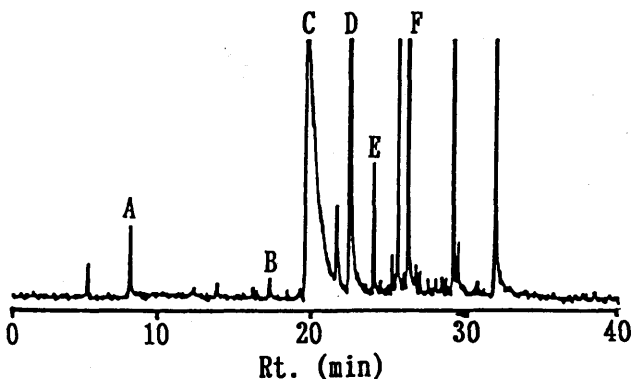
Aseptic *miso*



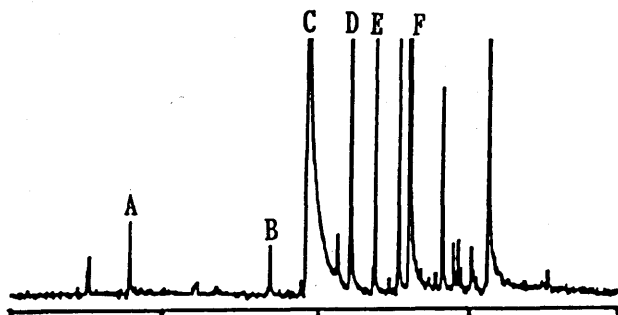
Edo *miso*



Conventional *miso*



Echigo *miso* (warmed-brewing)



Echigo *miso* (natural fermentation)

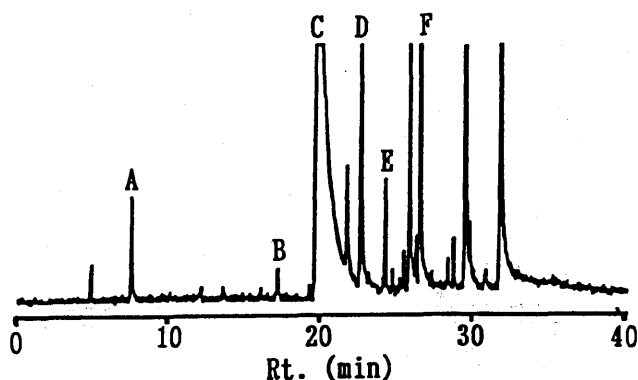


Fig. 5-4. Gas chromatograms of volatile sulfur-containing compounds in various *miso*.

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, ethyl 3-(methylthio)propanoate; E, 3-(methylthio)propyl acetate;
F, methionol.

Table 5-10. Volatile sulfur-containing compounds in various *miso*. ($\mu\text{g}/100\text{g}$)^a

Peak ^b	Compound	K. Index ^c	Unmaturated <i>miso</i>	Aseptic <i>miso</i>	Conventional <i>miso</i>	Sweet white <i>miso</i>	<i>Edo</i> <i>miso</i>	<i>Echigo miso</i> (warmed- brewing)	<i>Echigo miso</i> (natural fermentation)	Identification GC ^d (FID) MS
A	dimethyl disulfide	1067	— ^f	17x10 ⁻³	15x10 ⁻³	—	136x10 ⁻³	19x10 ⁻³	24x10 ⁻³	+ ^g
B	dimethyl trisulfide ^h	1388	—	27x10 ⁻³	18x10 ⁻³	—	157x10 ⁻³	62x10 ⁻³	34x10 ⁻³	+ +
C	3-(methylthio)propion aldehyde (methionol)	1468	0.6	178	150	0.5	318	230	327	+ +
D	ethyl 3-(methylthio) propanoate ^h	1575	16x10 ⁻²	8x10 ⁻²	3.2	—	—	1.7	2.1	+ +
E	3-(methylthio)propyl acetate	1643	—	—	1.0	—	0.4	2.0	1.0	+ +
F	3-(methylthio)-1-propanol (methionol)	1741	—	—	8.4	—	2.6	85	14.8	+ +

^a Detection by flame photometric detector. ^b See Fig. 5-4. ^c 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. ^d Detection by flame ionization detector.

^e Identification carried out by comparing mass spectra with those of the authentic compounds and the reference spectra (M. C. ten NOEVER de BRAUW *et al* 1979; The Mass Spectrometry Data Centre 1983). ^f Negative detection. ^g Positive identification. ^h Newly identified.

白甘味噌と江戸味噌は、無菌味噌と同様いずれもその熟成に麹菌以外の発酵微生物はほとんど関与しないと判断される味噌であるが、その白甘味噌では、微量のmethionalが検出されるもののdimethyl disulfide、dimethyl trisulfideの生成は認められなかった。白甘味噌に不快臭を呈するこれらの揮発性含硫化合物が少ないことは、色の淡いことと相まって、他の味噌に比べ加工適性に優れていると考えられる。この白甘味噌及び上記の仕込み直後味噌の結果から、麹菌はmethional、dimethyl disulfide、dimethyl trisulfideの生成にはほとんど関与しないものと考えられる。

一方、江戸味噌では、これら3化合物の量が供試味噌中最も多かった。白甘味噌と江戸味噌の表面色を比較してみると、それぞれのY%は、36.8、9.2で、江戸味噌の表面色は供試味噌中最も濃く、赤褐色～黒褐色を呈していた。この江戸味噌の表面色は、原料大豆の蒸煮や熟成に比較的高い温度が用いられることで呈してくるので、原料成分間の化学的反応も高く、これが一因で上記3化合物の量が多いのではないかと考えた。なお、仕込み直後及び無菌味噌で検出されたethyl 3-(methylthio)propanoateは、白甘味噌及び江戸味噌では検出されなかった。これは麹菌の違いによるのではないかと推察した。

江戸味噌に次いで表面色の濃い(Y%13.1)越後天然味噌中のmethional量は、江戸味噌とほぼ同じで、しかも越後温醸味噌の1.4倍量であった。これは越後天然味噌は越後温醸味噌に比べ、熟成期間が9ヶ月余り長く、この間にアミノ・カルボニル反応により表面色が濃くなり、且つ、メチオニンのStrecker分解によりmethionalが増加したものと考えた。

第3章で、耐塩性酵母によって生成される揮発性含硫化合物として、ethyl 3-(methylthio)propanoate、3-(methylthio)propyl acetate、methionolを認めた。これら3化合物は、普通味噌、越後温醸味噌及び越後天然味噌中の揮発性含硫化合物としても認められた。特に、methionolは味噌(菅原ら 1992)や醤油(森ら 1983)の重要な香気成分として報告されている化合物である。普通味噌、越後温醸味噌及び越後天然味噌はいずれもその熟成に麹菌や耐塩性酵母の他に耐塩性乳酸菌等が関与している。そのため、耐塩性乳酸菌等の細菌類のこれら3化合物の生成に対する検討も必要であるが、第3章の結果から、普通味噌、越後温醸味噌及び越後天然味噌中のこれら3化合物の生成には、少なくとも耐塩

性酵母の関与があるものと推察した。なお、江戸味噌中でも少量の3-(methylthio)propyl acetateやmethionolの生成が認められたので、微弱ながら発酵微生物の関与があるのではないかと推察した。そして、dimethyl trisulfideと ethyl 3-(methylthio)propanoateを味噌中ではじめて同定した。

第4節 味噌の揮発性酸

4-1 実験材料及び方法

4-1-1 供試味噌

第3節で揮発性含硫化合物の分析に供試した味噌のうち、越後温醸味噌を試料とした。なお、越後温醸味噌は仕込の際、耐塩性酵母の *Z. rouxii* S96を味噌原材料1g当たり 10^6 添加し、32℃～33℃で3ヶ月間熟成させたものである。

4-1-2 揮発性酸の分析

第3節の方法で味噌懸濁液を調製後、減圧蒸留を行い揮発性酸分析のための試料溶液とした。すなわち、供試味噌200gに食塩100gと高純水200mlを加え、ホモゲナイザーを使用して5分間、攪拌・混合し味噌懸濁液を調製した。この味噌懸濁液を10N H_2SO_4 でpH 2に調整後、味噌中の揮発性成分の遺失がないように第1章・第2節Fig. 1-1の減圧蒸留装置を用いて、味噌懸濁液が乾固するまで減圧蒸留を行い、更に、100mlの高純水を加えて減圧蒸留を繰り返した。この操作を再度繰り返し、400gの越後温醸味噌から約1lの蒸留液を調製した。

揮発性酸の分画とn-ブチルエステル化は第4章の方法に準じて行い、揮発性酸ブチルエステルのヘキサン溶液10mlを調製した。

揮発性酸ブチルエステルのガスクロマトグラフィー(GC)は第4章の方法に準じて行い、GC条件はFig. 5-5に示した。また、ガスクロマトグラフィー・質量分析(GC-MS)は第3節の方法に準じて行った。ただし、揮発性酸ブチルエステルのガスクロマトグラフへの注入は、GCおよびGC-MSともマイクロシリンジを用いて直接行った。また、GC-MS分析用のカラムはHEWLETT PACKARD社のHP-5 (0.32 mm i.d. x 30m)を使用した。

4-2 実験結果及び考察

4-2-1 味噌中の揮発性酸の同定

越後温醸味噌減圧蒸留液中の揮発性酸は、味噌懸濁液をpH 2に調整して得られたものなので、遊離型と結合型の両者を含むと考えられる。この揮発性酸量をアルカリ滴定法で求め、酢酸量として算出したところ、味噌100g中44.0mgであった。第2節の普通味噌の揮発性酸量と比較すると、約15%多かった。

揮発性酸ブチルエステルのガスクロマトグラムをFig. 5-5に示し、各ピークの同定及びピーク面積の比率をTable 5-11に示した。

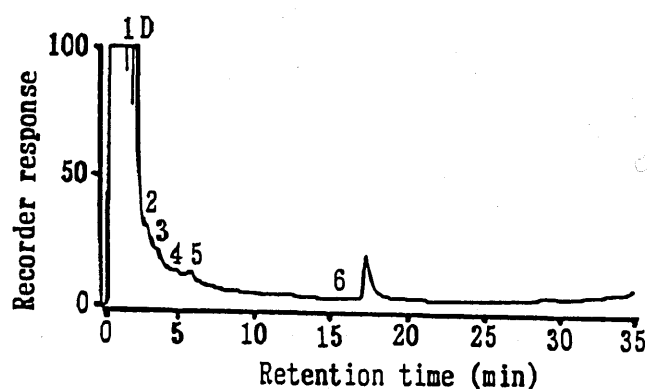


Fig. 5-5. Gas chromatogram of *n*-butyl esters of volatile organic acids in *Echigo* warmed-brewing *miso*.

Instrument: Shimadzu GC-4A PTF.

Column: 3% Silicone DC-550, 3mm i.d.×2m, Glass.

Column temp.: 60°C-(4°C/min)-200°C. Carrier gas: N₂, 50ml/min.

Injection temp.: 250°C. Detector: FID, 250°C.

Compounds: 1: *n*-butyl acetate. D: dibutyl ether.

2: *n*-butyl propionate. 3: *n*-butyl isobutyrate.

4: *n*-butyl *n*-butyrate. 5: *n*-butyl 2-methylbutanoate,
n-butyl isovalerate. 6: *n*-butyl benzoate.

Table 5-11. Volatile organic acids in *Echigo* warmed-brewing *miso*.

Peak no. ^a	Compound(<i>n</i> -butyl ester)	GC-MS ^b	Peak area % ^d
1	Acetate	+ ^c	81.36
2	Propionate	+	0.95
3	Isobutyrate	+	0.87
4	<i>n</i> -Butyrate	+	0.78
5	2-Methylbutanoate	+	} 2.60
5	Isovalerate	+	
6	Benzoate	+	+
	unknown		13.44

^a on 3% Silicone DC-550. See Fig. 5-5. ^b Identification carried out by comparing the mass library (public/NIST) spectra on JEOL LTD. JMS-SX102A and the reference spectra (M. C. ten NOEVER de BRAUW et al 1979; The Mass Spectrometry Data Centre 1983). ^c Positive identification. ^d Relative area % to total area except solvent and dibutyl ether on 3% Silicone DC-550.

越後温醸味噌の揮発性酸として、acetic、propionic、isobutyric、*n*-butyric、2-methylbutanoic、isovaleric、benzoic acid等が同定され、量的には、acetic acidが圧倒的に多く、約81%を占めた。これら揮発性酸は、第4章で耐塩性酵母によって生成されることを認め、また、味噌の有機酸（本間と石原 1981； 日本醸造協会編 1977； 柴崎と後藤 1964； 豊島と上田 1959a、1959b； 豊島ら 1961）、あるいは味噌の香気成分（本間 1982； 伊藤ら 1971； 岩淵と柴崎 1973； 安平と望月 1977）として既に報告されている化合物である。また、著者らはacetic acidに関して、*Z. rouxii* S84と*C. versatilis* D-5のそれぞれの単独添加味噌を調製し、無菌味噌と比較したところ、*Z. rouxii* S84添加味噌では45%、*C. versatilis* D-5添加味噌では80%増加することを確認している（本間と石原 1989）。

第4章では、耐塩性酵母の*C. versatilis* D-5、*C. etchellsii* F-8の両菌株から2-oxo-3-methylbutanoic、2-oxo-3-methylpentanoic、2-oxo-4-methylpentanoic acidのオキシ酸と2-hydroxy-3-methylbutanoic、2-hydroxy-3-methylpentanoic、2-hydroxy-4-methylpentanoic acidのヒドロキシ酸の生成さ

れることを推定または確認した。これら分岐オキシ酸とヒドロキシ酸のうち、2-oxo-4-methylpentanoic acidは生大豆のフレーバー成分（藤巻と荒井 1976）として報告されているが、大豆を原料とする味噌中には、この化合物を含めいづれのオキシ酸もヒドロキシ酸もその存在は報告されていない。そして、本節の実験でも、分岐オキシ酸やヒドロキシ酸の存在は確認できなかった。また、第4章では、*C. versatilis* D-5、*C. etchellsii* F-8の*Candida*属のみに限らず*Z. rouxii* S84によっても、これら分岐オキシ酸とヒドロキシ酸の生成されることを認めたが、量的には*Candida*属の生成量が格段に多かった。そして、供試した越後温醸味噌は、仕込みの際、*Z. rouxii* S96は添加されるものの後熟型の*Candida*属酵母は添加されていない。このことが一因で分岐オキシ酸やヒドロキシ酸が検出されないのではないかと考えた。つまり、味噌熟成期間中に自然に棲みつく*Candida*属では生菌数や活動量が少なく、分岐オキシ酸やヒドロキシ酸が生成されにくい、生成されたとしても極微量と考えられる。今井と松本（1975a）は、温醸味噌における*Candida*属の存在と生育条件を検討し、その生菌数は、 10^5 /g以下での範囲に分布し、しかも、供試味噌の40%は 10^2 /g以下であったと報告した。また、*Zygosaccharomyces rouxii*との比較で、*Zygosaccharomyces rouxii*より*Candida*属の存在頻度が低いことも報告した。味噌醸造においては、一般に*Candida*属の添加は行われないとされる。なぜならば、*Candida*属の添加の効果を得るためには、*Candida versatilis*を利用した場合、その添加量を*Zygosaccharomyces rouxii*よりも10倍以上多く添加する必要がある、また、*Candida versatilis*が添加された味噌は、従来の味噌にない、*Candida versatilis*特有の香味を持った製品になるためである（松本と今井 1977）。このことは、逆に、*Candida versatilis*を積極的に添加することで、著者らの*Candida*属が分岐オキシ酸やヒドロキシ酸を生成しやすいという結果や、また、これら化合物のエチルエステルが清酒の重要な香気成分として報告されている（山本 1961a、1961b）ことなどをふまえ、味噌の香味を多様化させることができるのではないかと考えられる。

第5節 要約

5-1 味噌の香気成分

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、耐塩性酵母や耐塩性乳酸菌等も関与する普通味噌及び加熱処理した原材料を混合した仕込み直後味噌を調製し、香気、揮発性成分量、静置した味噌懸濁液のヘッドガス中の香気化合物などを比較した。更に、普通味噌に存在する微生物、特に耐塩性酵母群について検索することにより、香気生成に対する麹菌酵素、非生物的化学反応、発酵微生物などの役割を検討した。

普通味噌に見られる微生物群は熟成中に正常に経過し、耐塩性酵母群の主要菌種は *Z. rouxii* であり、後熟型 *Candida* 属酵母として *C. versatilis*、*C. etchellsii* もかなり存在した。

香気の官能検査では無菌味噌と普通味噌は完全に識別され、普通味噌の方がより好まれたが、無菌味噌を好む集団も有意に存在した。揮発性成分量は大部分が普通味噌 > 無菌味噌 > 仕込み直後味噌の順であった。無菌味噌と仕込み直後味噌との差が特に大きいのは ethanal、2-methylpropanal、2- (and/or 3-) methylbutanal などのアルデヒド類であり、普通味噌と無菌味噌との差の大きいのはアルコール類、エステル類—特に脂肪酸エステル、フェノール類、ethanal であった。ヘッドガス分析によっても同一の傾向を認め、特に耐塩性酵母の作用によって生成したと考えられる種々の香気化合物が普通味噌にかなりの量が含有されていた。しかし、揮発性含硫化合物と揮発性酸に関しては、この実験では検出されなかった。これは、静置された味噌懸濁液のヘッドガス中ではこれら化合物は濃度的に低いためと考えた。以上のことから、無菌的熟成により生成した香気化合物に、酵母を中心とした発酵微生物の作用で生成した香気化合物が加わって味噌の香気が完成するものと考察した。

5-2 味噌の揮発性含硫化合物

仕込み直後味噌、無菌味噌及び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検討した。仕込み直後味噌で認められた揮発性含硫化合物はmethional及びethyl 3-(methylthio)propanoateであり、無菌味噌及び普通味噌ではこれら化合物に加え、dimethyl disulfide、dimethyl trisulfideも検出され、更に、普通味噌では3-(methylthio)propyl acetate及びmethionolも同定された。これら化合物のうち、methional、dimethyl disulfide、dimethyl trisulfideは、Strecker分解などの化学的反応により生成され、ethyl 3-(methylthio)propanoateは麴や酵母、3-(methylthio)propyl acetate及びmethionolは酵母の関与で生成されたと考察した。また、dimethyl disulfide、dimethyl trisulfide及びmethionalの3化合物は、無菌味噌に比べ普通味噌に少ない傾向にあり、これら化合物の減少に対する味噌酵母群の関与が示唆された。

無菌味噌と同様、麴菌以外の発酵微生物がほとんど熟成に関与しないと判断される白甘味噌や江戸味噌、更に、耐塩性酵母を添加して製造される越後温醸味噌及び越後天然味噌中の揮発性含硫化合物についても検討し、dimethyl disulfide、dimethyl trisulfide 及びmethionalは化学的に生成され、ethyl 3-(methylthio)propanoate、3-(methylthio)propyl acetate及びmethionolは耐塩性酵母の関与で生成されることを考察した。

なお、味噌の揮発性含硫化合物として、dimethyl trisulfide と ethyl 3-(methylthio)propanoate をはじめて同定した。

5-3 味噌の揮発性酸

越後温醸味噌の揮発性酸量をアルカリ滴定法で求め、酢酸量として算出したところ、味噌100g中44.0mgであった。揮発性酸として、acetic、propionic、isobutyric、*n*-butyric、2-methylbutanoic、isovaleric、benzoic acid等が同定され、量的には、acetic acidが圧倒的に多く、約81%を占めた。これら揮発性酸は、第4章で耐塩性酵母により生成されることを論述した。更に、第4章では耐塩性酵母、特に、*Candida*属によって、炭素数5、6の分岐オキソ酸やヒド

ロキシ酸が生成されることを報告したが、越後温醸味噌中では検出されなかった。これは、供試味噌中の *Candida* 属の生菌数や活動量が少なく、分岐オキシ酸やヒドロキシ酸が生成されにくいから、生成されたとしても極微量と考えた。

そして、これら分岐オキシ酸やヒドロキシ酸は、食品の香気成分として重要と考えられるので、*Zygosaccharomyces rouxii* と同様、*Candida* 属の味噌製造への積極的な利用を提案した。

第6章 総括及び結論

本論文は、味噌の香気成分、特に、揮発性含硫化合物と揮発性有機酸の生成に対する耐塩性酵母の関与に関する研究の成果をまとめたものであり、緒論並びに本編5章と総括・結論から構成されている。

緒論において、本研究を進めるに至った背景と目的について述べた。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、発酵微生物、特に耐塩性酵母の関与が味噌の香気付与あるいは矯正に不可欠であることが解った。しかし、その耐塩性酵母の香気付与のメカニズムはいまだ詳細には解明されていない。そこで、著者は食品香気を構成する揮発性成分の分析法を確立するとともに、味噌の原料配合をもとに案出した合成培地を使用して、合成培地の加熱処理や耐塩性酵母により生成されたり減少されたりする揮発性成分について分析した。すなわち、合成培地における揮発性成分の消長に対する耐塩性酵母の役割について検討した。揮発性成分としては、主に、食品香気の好悪両面に著しい影響を及ぼす揮発性含硫化合物と揮発性有機酸を対象とした。更に、耐塩性酵母や乳酸菌等の発酵微生物を関与させないで、麹菌のみで製造した、いわゆる無菌醸造味噌をはじめとして、種々の味噌中の香気成分を分析することによって、味噌の香気成分と耐塩性酵母との関連について究明し、以下の研究成果を得た。

第1章では、耐塩性酵母の培養法と揮発性成分分析法を確立した。味噌の原料は清酒などのアルコール発酵飲料と異なり、大豆や米のほかにかかりの食塩が使用されることに特徴がある。耐塩性酵母は10~20%の食塩存在下ではその生育がかなり遅く、更に、耐塩性酵母の菌株間にその生育の違いが認められるため、培養期間の検討が必要であった。そこで、合成培地を使用して、赤色辛口米味噌より分離された耐塩性酵母の *Zygosaccharomyces rouxii* S84 (*Z. rouxii* S84) と *Candida versatilis* D-5 (*C. versatilis* D-5) の培養経過に伴う生育と合成培地中のグルコース及び窒素の消費について調べた。更に、香気の

官能評価と揮発性成分量の変化について検討し、最適な培養期間の設定を行った。なお、*Zygosaccharomyces rouxii* は味噌熟成の全期間にわたり常駐し、増殖する主酵母であり、発酵型の味噌の香味形成には不可欠とされている。一方、*Candida versatilis* は長期熟成の後期にみられ、後熟型酵母と呼ばれ、アルコール発酵の他に、味噌や醤油の特徴香の一つである4-ethylguaiacol等を生成する。

総アルコール、フーゼル油、総アルデヒド、ethanal及び揮発性有機酸などの揮発性成分量の培養経過に伴う変化はグルコースや窒素の消費傾向にほぼ対応していた。すなわち、グルコースや窒素の消費率が最高に達した期間がこれら揮発性成分量も最も多い傾向にあった。この結果から、耐塩性酵母の培養期間は、炭素源であるグルコースがほぼ消費しつくされた期間、またはグルコース消費の伸びがほぼ停止した期間にすることが、使用菌株に対し一律に規定するよりもより妥当と考察した。なお、耐塩性酵母の培養期間を炭素源がほぼ消費しつくされた期間にした場合、耐塩性酵母の菌株によってその培養期間が異なる。その培養期間中の揮発性成分を含む培養溶液の減少を防止するため、培養器である1 $\frac{1}{2}$ 三角フラスコと綿栓の間に、長さ40cmの保温剤で包んだ冷却管を付属させた。この改良型培養容器を使用することにより、培養期間が長期にわたっても、培養溶液の減少はほとんど認められなかった。

一方、揮発性成分の分析にはガスクロマトグラフィー (GC) やガスクロマトグラフィー・質量分析 (GC-MS) などが利用される。そのためには試料の前処理、特に揮発性成分濃縮物の調製が必要であった。揮発性成分濃縮物の調製法としては、ポーラスポリマー吸着剤による吸着法や減圧蒸留法などがあり、これらの実験法について検討した。著者は、揮発性成分の定量的分析に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揮発性成分捕集装置を組み立てた。そして、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。耐塩性酵母の主なる作用がアルコール発酵なので、試料として、ethyl acetate、8種類のアルコール及び2,3-xyleneolからなる水溶液を用いた。そして、ethanolを除く化合物のGCピーク面積の変動係数が1.9~15%の範囲にある揮発性成分捕集条件を確立した。また、この揮発性成分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、両部にお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、従来法で行われていたところの、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。

味噌は高濃度のタンパク質を含有する大豆を主原料とするため、耐塩性酵母などが生息し、活動する場合はタンパク質、すなわち、窒素含有量が格段に高く、しかも、かなりの食塩を含む培養基となる。第2章では、味噌の原料配合より案出した窒素含有量の高い合成培地（グルコース量／窒素量が16）を使用して、合成培地の加熱殺菌や耐塩性酵母及びその対照酵母としての清酒酵母によって生成される総揮発性成分について検討した。これら酵母は炭素源であるグルコースの消費の伸びがほぼが停止するまで、30℃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成分の同定は、揮発性成分をheadspace volatiles (HSV)捕集装置を用いてTenax TAに吸着させた後、GC及びGC-MS分析で行った。

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* は培養期間15日間でグルコースをほぼ100%消費した。一方、耐塩性酵母の培養期間18日間におけるグルコース消費率はかなり低く（1.7～77.7%）、特に、*C. versatilis* D-5の食塩添加培地でのグルコース消費率は最低の1.7%であった。エタノール及びガスクロマトグラムのピーク総面積値はグルコースの消費に対応し、*S. cerevisiae* のエタノール及びピーク総面積値がともに最大であった。

各試料の官能評価の結果、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、パネルメンバー全員好ましくない香気と答えた。酵母培養液では、酵母無接種培地で認められた好ましくない臭いがかなり改善され、更に、高級アルコール臭、果実様香気、清酒様香気などが新たに認められた。

GC分析により、供試試料から81～102種類のピークが得られ、供試試料のうち、食塩0%の酵母無接種培地でもっともピーク数が多かった。これは、培地の加熱殺菌とその後の30℃の温浴中での保持によって、アミノ・カルボニル反応などの培地成分の化学的反応により生成されたものと考えた。これらピークのうち、同定された揮発性化合物は39種類であり、その内訳はつぎのごとくであった。

アルコール類(9種)、エステル類(9種)、アルデヒド類(5種)、ケトン類(1種)、有機酸類(7種)、フラン類(1種)、ピラジン類(1種)、含窒素複素環化合物(1種)、含硫化合物(5種)。

同定された揮発性化合物のうち、量的にもっとも多かったのが、ethanol、3-methyl-1-butanol、2-methyl-1-butanol、2-phenylethanol等を主体とするアルコール類であり、これらアルコール類はいずれも酵母培養液中でその生成が認められた。アルデヒド類として、ethanal、2-methylpropanal、2-methylbutanal、3-methylbutanal、phenylacetaldehyde等が酵母無接種培地及び酵母培養液中で同定され、これらは主に、培地組成中のグルコースとアミノ酸類によるアミノ・カルボニル反応に伴うStrecker分解などによって生成されたものと考察した。含硫化合物、有機酸類に関しては、それぞれ、第3章、第4章で詳細に検討した。

第3章では、味噌中では微量の存在ではあるが、一般に感覚閾値が低く、特徴ある香気を有することから、味噌の品質に重要な役割を果たすと考えられている揮発性含硫化合物と耐塩性酵母の関わりについて論述した。試料は第2章で使用したものをを用い、実験法も第2章に準じた。ただし、第3章のGC分析では、含硫化合物専用の検出器フレイムホトメトリックディテクタ(FPD)を用いた。

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。dimethyl disulfide、dimethyl trisulfide、methionalの含有量は、供試酵母間に程度の差はあるものの、全ての酵母培養液中で減少した。これら化合物の減少率は、供試酵母のうち、*Z. rouxii* S84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* S84はこれらの化合物を55.2~99.4%消滅させた。

このように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ので、これら揮発性含硫化合物の起源についても検討した。この場合、窒素源を18種アミノ酸混

合物から、含硫アミノ酸のメチオニンやシスチンをはじめとする8種類の単一アミノ酸に替え、供試菌としては *Z. rouxii* S84を用いた。その結果、メチオニンを窒素源にした場合、18種アミノ酸混合物の場合と同様、*Z. rouxii* S84による揮発性含硫化合物の生成と減少に対する強い関与が認められた。更に、前述の揮発性含硫化合物に加え、*Z. rouxii* S84による ethyl 3-(methylthio)propionate の新たな生成も認められた。なお、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* S84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。

第4章では、耐塩性酵母の生成する揮発性有機酸について検討した。

味噌の熟成過程において、耐塩性酵母は味噌香気成分としての酸性物質の生成にあまり関与しないとされている。しかし、第1章・第2節において合成培地を使用して耐塩性酵母培養液の香気を官能的に調べたところ、培養液を pH 2 に調整し、得られた減圧蒸留液の香気はほぼ培養液の香気を再現したが、pH 7 に調整し得られた留液からは土臭さやアルカリ臭が認められた。これらのことから、耐塩性酵母培養液の香気における酸性物質の重要性を考えた。なお、揮発性有機酸の分析は、培養液を pH 2 で減圧蒸留を行い、得られた蒸留液から常法により揮発性有機酸画分を調整し、揮発性有機酸の *n*-ブチルエステル化したものについて、GC及びGC-MSにより行った。また、供試菌株として、*Candida etchellsii* F-8 (*C. etchellsii* F-8) を追加した。この菌株は *C. versatilis* D-5 と同様の後熟型耐塩性酵母である。

供試酵母に共通して生成が認められた揮発性有機酸は、acetic、propionic、isobutyric、*n*-butyric、2-methylbutanoic、3-methylbutanoic(isovaleric) acidであった。更に *C. versatilis* D-5、*C. etchellsii* F-8の両株からは2-oxo-3-methylbutanoic、2-oxo-3-methylpentanoic、2-oxo-4-methylpentanoic、2-hydroxy-3-methylbutanoic、2-hydroxy-4-methylpentanoic acidの生成を認めた。また、2-hydroxy-3-methylpentanoic acidの生成も推定した。更に、*C. versatilis* D-5により benzoic acidと phenylacetic acid、清酒酵母により *n*-hexanoic、*n*-octanoic、*n*-decanoic acidの生成も認められた。

揮発性有機酸量は培養液の減圧蒸留液についてアルカリ滴定により培養液100ml中の酢酸として求めたが、それは *C. versatilis* D-5が27.0mg、*C. et-*

chellsii F-8が11.7mg、*Z. rouxii* S84が2.5mg、清酒酵母が1.6mgであった。

この *C. versatilis* D-5の生成揮発性有機酸量は、*Z. rouxii* S84及び清酒酵母の約11~17倍量に相当する。また、*C. versatilis* D-5の揮発性有機酸量は酢酸として培養期間中に消費されたグルコースの約2%に相当した。揮発性有機酸の大部分がacetic acidで約26~76%を占め、ついで量的に多かったのが、isobutyric、2-methylbutanoic、isovaleric acidなどであった。以上の結果から、味噌の香気成分として報告されている炭素数2~5の直鎖及び分岐した揮発性有機酸やbenzoic、phenylacetic acidの生成に対する耐塩性酵母群の関与を明らかにした。また、炭素数5、6の分岐オキシ酸やヒドロキシ酸、benzoic、phenylacetic acid、炭素数6、8、10の直鎖の揮発性有機酸などの生成に対して、供試酵母間の差異を認めた。更に、各種アミノ酸を単一窒素源とする培地を用いて、同定された揮発性有機酸の起源についても推定した。

第5章では、種々の味噌を用いて、味噌香気成分の分析を行うとともに、揮発性含硫化合物や揮発性有機酸の生成に対する耐塩性酵母の関わりについて検討した。

麹菌のみが熟成に関与する、いわゆる無菌味噌を製造した。更に、麹菌の他に、耐塩性酵母や耐塩性乳酸菌等も熟成に関与する普通味噌と加熱処理した原材料を混合しただけの仕込み直後味噌を調製した。そして、これら3種類の味噌中の香気、揮発性成分量及び静置された味噌懸濁液のヘッドガス中の香気化合物などを比較した。更に、普通味噌に存在する微生物、特に耐塩性酵母群について検索し、香気生成に対する麹菌酵素、非生物的化学反応、発酵微生物などの役割を検討した。

普通味噌に見られる微生物群は熟成中に正常に経過した。耐塩性酵母群の主要菌種は *Z. rouxii* であり、後熟型 *Candida* 属酵母として *C. versatilis*、*C. etchellsii* もかなり存在した。

香気の官能検査では無菌味噌と普通味噌は完全に識別され、普通味噌の方がより好まれたが、無菌味噌を好む集団も有意に存在した。揮発性成分量は大部分が普通味噌 > 無菌味噌 > 仕込み直後味噌の順であった。無菌味噌と仕込み直後味噌との差が特に大きい香気成分はethanal、2-methylpropanal、2- (and/or 3-) methylbutanalなどのアルデヒド類であり、普通味噌と無菌味噌との差

が大きい香気成分はアルコール類、エステル類—特に脂肪酸エステル、フェノール類、ethanalであった。ヘッドガス分析によっても同一の傾向を認め、特に耐塩性酵母の作用によって生成したと考えられる種々の香気化合物が普通味噌にかなりの量が含有されていた。しかし、揮発性含硫化合物と揮発性有機酸に関しては、この実験では検出されなかった。これは、静置された味噌懸濁液のヘッドガス中ではこれら化合物は濃度的に低いためと考えた。以上のことから、無菌的熟成により生成した香気化合物に、酵母を中心とした発酵微生物の作用で生成した香気化合物が加わって味噌の香気が完成するものと考察した。

味噌中の揮発性含硫化合物と揮発性有機酸に関して、第3章と第4章での実験方法に準じて、検討した。

仕込み直後味噌、無菌味噌及び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検討した。仕込み直後味噌で認められた揮発性含硫化合物はmethional及びethyl 3-(methylthio)propanoateであり、無菌味噌及び普通味噌ではこれら化合物に加え、dimethyl disulfide、dimethyl trisulfideも検出、更に、普通味噌では3-(methylthio)propyl acetate及びmethionolも同定された。これら化合物のうち、methional、dimethyl disulfide、dimethyl trisulfideは、Strecker分解などの化学的反応により生成され、ethyl 3-(methylthio)propanoateは麴や酵母、3-(methylthio)propyl acetate及びmethionolは酵母の関与で生成されると考察した。また、dimethyl disulfide、dimethyl trisulfide 及びmethionalの3化合物は、無菌味噌に比べ普通味噌に少ない傾向にあり、これら化合物の減少あるいは抑制に対する味噌酵母群の関与が示唆された。

無菌味噌と同様、麴菌以外の発酵微生物がほとんど熟成に関与しないと判断される白甘味噌や江戸味噌、更に、耐塩性酵母を添加して製造される越後温醸味噌及び越後天然味噌中の揮発性含硫化合物についても検討した。そして、dimethyl disulfide、dimethyl trisulfide 及びmethionalは化学的に生成され、ethyl 3-(methylthio)propanoate、3-(methylthio)propyl acetate及びmethionolは、主に耐塩性酵母の関与で生成されることなどを考察した。なお、味噌の揮発性含硫化合物として、dimethyl trisulfideとethyl 3-(methylthio)propanoateをはじめ同定した。

越後温醸味噌の揮発性有機酸量をアルカリ滴定法で求め、酢酸量として算出

したところ、味噌100g中44.0mgであった。揮発性有機酸として、acetic、propionic、isobutyric、*n*-butyric、2-methylbutanoic、isovaleric、benzoic acid等が同定され、量的には、acetic acidが圧倒的に多く、約81%を占めた。これら揮発性有機酸は、第4章で耐塩性酵母により生成されることを論述した。更に、第4章では耐塩性酵母、特に、*Candida*属によって、炭素数5、6の分岐オキソ酸やヒドロキシ酸が生成されることを論述したが、越後温醸味噌中では検出されなかった。これは、供試味噌中の*Candida*属の生菌数や活動量が少なく、分岐オキソ酸やヒドロキシ酸が生成されにくいのか、生成されたとしても極微量と考えた。また、これら化合物のエチルエステルが清酒の重要な香気成分とされていることから、味噌醸造において、*Candida*属の積極的利用により、味噌の香味を多様化させることができるのではないかと提案した。

味噌は大豆と米を原料とし、麹菌や耐塩性の酵母や乳酸菌などの発酵微生物の関与で造られる。その味噌は栄養、嗜好、機能面で種々の特性を備え、次世代に伝えなければならない日本の伝統的発酵調味料の一つである。しかし、近年の日本の食生活の多様化は、ご飯に味噌汁という形態を崩し味噌の消費を減少させた。これを打破するには、日本の伝統的発酵調味料の域から、醤油のごとく世界の調味料への発展や種々の加工用の味噌の開発が考えられる。そのためには、より嗜好性の高い香気を備えたものや、逆に、加工用には味噌臭さのない味噌等が要求される。これらのことをふまえ、著者は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。特に、味噌香気成分のうち、揮発性含硫化合物と揮発性有機酸の生成と減少に対する耐塩性酵母の関わりについて検討し本研究のまとめに至った。これらの研究成果が、味噌ひいては醤油などの大豆発酵食品の発展にいささかでも寄与できれば幸甚である。

引用文献

AISHIMA, T.(1982) Comparison of headspace and distillation techniques for soy sauce aroma in relation to analysis by silica capillary gas chromatography and sensory evaluation. *Agric. Biol. Chem.*, 46: 2759-2767.

AOKI, T., and UCHIDA, K.(1991) Enhanced formation of 3-(methylthio)-1-propanol in a salt-tolerant yeast, *Zygosaccharomyces rouxii*, due to deficiency of *S-Adenosylmethionine Synthase*. *Agric. Biol. Chem.*, 55: 2113-2116.

浅尾保夫・逆井利夫・横塚 保 (1967) 醤油香味成分に関する研究 (第26報) 醤油酵母による香味の生成 (その2). *農化* 41: 434-441.

BAKER, S. B., and SUMMERSON, W. H.(1941) The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.*, 138: 535-554.

BARNES, R. D., LAW, L. M. and MacLEOD, A. J.(1981) Comparison of some porous polymers as adsorbents for collection of odour samples and the application of the technique to an environmental malodour. *Analyst*. 106(April): 412-418.

BOYKO, A. L., MORGAN, M. E. and LIBBEY, L. M.(1978) Porous polymer trapping for GC/MS analysis of vegetable flavors. In *Analysis of Foods and Beverages, Headspace Techniques*, (G. CHARALAMBOUS, Ed.), pp. 57-79. Academic Press, Inc., New York.

DAWES, E. A., MCGILL, D. J., and MIDGLEY, M.(1971) Methods in Microbiology (NORRIS, J. R., and RIBBONS, D. W., Ed.) Vol.VIA, pp. 109, Academic Press, London · New York.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., and SMITH, F.(1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28: 350-356.

海老根英雄 (1994) 味噌醸造. 微生物利用事典 pp. 841-852. フジ・テクノシステム. 東京.

FUJIMAKI, M., KATO, S., and KURATA, T.(1969) Pyrolysis of sulfurcontaining amino acids. Agric. Biol. Chem., 33: 1144-1151.

藤巻正生・荒井綜一 (1976) ダイズ蛋白のフレーバー. 食の科学 29: 55-58.

福井作蔵 (1969) 生物化学実験法 (還元糖の定量), (瓜谷郁三・志村憲助・中村道徳・船津 勝編), pp. 139-140. 東京大学出版会. 東京.

船久保英一 (1967) 有機化合物確認法(I) pp. 149. 養賢堂. 東京.

GODDU, R. F., LeBLANC, N. F., and WRIGHT, C. W.(1955) Spectrophotometric determination of esters and anhydrides by hydroxamic acid reaction. Anal. Chem., 27: 1251-1255.

林部正也・河東田茂義・大和田 拓・吉田 弘・片寄篤子・寺島豊明 (1970) 酵母のメチオニン代謝 (I) メチオノールの生成. 醗酵工学 48: 22-28.

HOFF, J. E., and FEIT, E. D. (1964) New technique for functional group analysis in gas chromatography. Anal. Chem., 36: 1002-1008.

本間伸夫・今井誠一 (1965a) 大豆醃酵食品の微生物に関する研究 (第3報) 無菌味噌に添加された *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pediococcus* 属細菌群および耐塩性酵母群の消長および作用. 醃酵工学 43: 102-109.

本間伸夫・今井誠一 (1965b) 大豆醃酵食品の微生物に関する研究 (第1報) いわゆる無菌味噌の製造および普通味噌との比較. 醃酵工学 43: 18-26.

本間伸夫・今井誠一 (1965c) 大豆醃酵食品の微生物に関する研究 (第2報) 熟成赤辛味噌に存在する微生物の群別と細菌群の分類学的位置. 醃酵工学 43: 27-34.

本間伸夫・石原和夫・原沢久夫 (1970) みそ中のモノアルコール及びポリアルコールについて. 県立新潟女子短大紀要 7: 51-60.

本間伸夫・渋谷歌子・石原和夫・岡田玲子 (1973a) 未加熱および加熱みそ汁の揮発性カルボニル化合物について. 家政誌 24: 259-266.

本間伸夫・稲越徳子・渋谷歌子・石原和夫・岡田玲子 (1973b) 加熱によるみそ汁低沸点香氣成分の変化. 家政誌 24: 177-183.

本間伸夫・塩崎啓子・渋谷歌子・石原和夫 (1974) 加熱による煮干しだし汁低沸点香氣成分の変化. 家政誌 25: 355-361.

本間伸夫・石原和夫 (1976) みその香氣成分について (3) 揮発性フェノール. 日本醃酵工学会大会講演要旨集 pp. 13.

本間伸夫・石原和夫（1977a） みその揮発性ポリカルボニル化合物．醗酵工学 55： 36-43.

本間伸夫・佐藤恵美子・渋谷歌子・石原和夫（1977b） みそ水不溶性分画の香気吸着性について（その3）香気吸着に関与する成分．日本家政学会総会研究発表要旨集 pp. 54.

本間伸夫・石原和夫（1978a） 無菌醸造みその香気とヘッドガス成分．醗酵工学 56： 199-209.

本間伸夫・石原和夫（1978b） 無菌醸造みその脂質．醗酵工学 56： 768-775.

本間伸夫・石原和夫（1979） 無菌醸造みそ香気の官能検査．味噌の科学と技術 301： 17-21.

本間伸夫・石原和夫（1981） 無菌醸造みその有機酸．日本醗酵工学会大会講演要旨集 pp. 145.

本間伸夫（1982） 味噌のフレーバーとその生成機構．日本化学会第46秋季年会（含連合討論会）予稿集 pp. 1049-1050.

本間伸夫・石原和夫（1987a） GC-MS-COMによる味噌香気成分の分析．県立新潟女子短大紀要 24： 9-22.

本間伸夫（1987b） 味噌の香気と香気成分について（その1），（その2）．醸協 82： 480-488, 547-553.

本間伸夫・石原和夫（1989） 味噌の香気と微生物．日本醗酵工学会大会講演要旨集（シンポジウム） pp. 37.

HURRELL R. F.(1982) Food Flavours, Part A. Introduction, (MORTON, I. D. and MACLEOD, A. J., Ed.), Chapter VI Maillard Reaction in Flavour, pp. 399-437, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York.

飯塚 廣・後藤昭二 (1973) 酵母の分類同定法. 東京大学出版会. 東京.

IKEDA, R. M., SIMMONS D. E., and GROSSMAN J. D.(1964) Removal of alcohols from complex mixtures during gas chromatography. Anal. Chem., 36: 2188-2189.

今原廣次・中浜敏雄 (1968) 醤油の産膜性酵母に関する研究 (第8報) 香気成分について. 醸酵工学 46: 876-884.

今井誠一・松本伊左尾 (1975a) 赤辛みそにおける耐塩性 *Torulopsis* 群の分布と分離株の同定. 醸協 70: 413-415.

今井誠一・松本伊左尾 (1975b) *Torulopsis versatilis*と *Torulopsis ethellsii*の生育条件. 醸協 70: 893-898.

IOFFE, B. V., VITENBERG, A. G. and English translation by MAMANTOV, ILYA A.(1984) Analysis of water and aqueous solutions. Ch. 3. In Head-Space Analysis and Related Methods in Gas Chromatography, pp. 100-117. John Wiley & Sons, Inc., New York.

石原和夫・本間伸夫・原沢久夫 (1970) みそ主要発酵菌の生酸性について. 県立新潟女子短大紀要 7: 43-50.

石原和夫・本間伸夫 (1983) 耐塩性酵母の生成する揮発性分量と培養期間との関係. 県立新潟女子短大紀要 20: 105-112.

石原和夫・本間伸夫 (1985a) 味噌酵母 (*Saccharomyces rouxii* Y712) による揮発性カルボニル化合物の生成について. 県立新潟女子短大紀要 22: 81-89.

石原和夫・本間伸夫・小笠原長宏 (1985b) 味噌酵母の生成する揮発性有機酸. 醗酵工学 63: 279-287.

ISHIHARA, K. and HONMA, N. (1992) A novel device for the headspace trapping of volatiles: Studies with a model solution. Journal of Food Composition and Analysis 5: 139-145.

石原和夫・本間伸夫・内山武夫 (1995) 耐塩性酵母による揮発性含硫化合物の生成と減少. 生物工程 73: 463-472.

ISHIHARA, K., HONMA, N., MATSUMOTO, I., IMAI, S., NAKAZAWA, S. and IWAFUCHI, H. (1996) Comparison of volatile components in soy sauce (*Koikuchi shoyu*) produced by using *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (印刷中).

石坂音治 (1969) 微量拡散分析試験法 pp. 14-17. 南江堂. 東京.

伊藤 寛・海老根英雄・竹内康子 (1971) みその香気成分の研究 (第5報) 揮発酸のガスクロマトグラフィー. 味噌の科学と技術 208: 20-23.

岩渕せつ子・柴崎一雄 (1973) 味噌の香気成分に関する研究 (第2報) 中性および酸性成分の同定. 日食工誌 20: 48-53.

科学技術庁資源調査会編 (1966) 日本食品アミノ酸組成表 pp. 21. 大蔵省印刷局. 東京.

科学技術庁資源調査会・資源調査所編（1986） 改訂日本食品アミノ酸組成表。大蔵省印刷局。東京。

熊谷純子・菅原悦子（1994） みそ香気成分の加熱による変化。日本食品工業学会大会講演集 pp. 63.

KUO, P. P. K., CHIAN, E. S. K., DeWALLE, F. B. and KIM, J. H. (1977) Gas stripping, sorption, and thermal desorption procedures for pre-concentrating volatile polar water-soluble organics from water samples for analysis by gas chromatography. Anal. Chem., 49: 1023-1029.

LACOSTE, R. J., VENABLE, S. H., and STONE, J. C. (1959) Modified 4-aminoantipyrine colorimetric method for phenols. Application to an acrylic monomer. Anal. Chem., 31: 1246-1249.

LEAHY, M. M. and REINECCIUS, G. A. (1984) Comparison of methods for the isolation of volatile compounds from aqueous model systems. In Analysis of Volatiles, Methods and Applications, (P. SCHREIER, Ed.), pp. 19-47. Walter de Gruyter, Berlin, New York.

LODDER, J. (1970) The Yeast, a Taxonomic Study, North-Holland Publishing Co., Amsterdam · London.

松木和子・本藤 智・大内一朗・望月 務（1968） 味噌の滴定酸度の成分組成について。味噌技術 168: 4-8.

松本伊左尾・今井誠一（1973） みそ酵母 (*Sacch. rouxii*) の生育pH域と実用性。日食工誌 20: 513-518.

松本伊左尾・今井誠一（1974） 酵母による赤辛みその発酵促進（第2報）
Sacch. rouxii S96のみそへの添加. 醸協 69: 590-594.

松本伊左尾・今井誠一（1977） 耐塩性 *Torulopsis* 属酵母群の赤辛みそへの
利用. 醸協 72: 74-77.

M. C. ten NOEVER de BRAUW, J. BOUWMAN, A. C. TAS, and miss G. F.
LaVOS(1979) 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.

MILLER, G. L.(1959) Protein determination for large numbers of sam-
ples. Anal. Chem., 31: 964.

味噌輸出通関実績（1994） 全国味噌工業協同組合連合会（東京）提供.

望月 務（1962） 味噌の熟成に関する研究（第2報）味噌中に於ける酵母の
役割について. 醗酵工学 40: 21-26.

茂木恵太郎・茂木孝也（1968） 醤油諸味中の酵母の動態調査法. 農化
42: 466-470.

MOSHONAS, M. G., and LUND, E. D.(1971) A gas chromatographic proce-
dure for analysis of aqueous orange essence. J. Food Sci., 36: 105-
106.

森 修三・布村伸武・佐々木正興（1983） 醤油香気への4-Ethyl-2-metho-
xyphenolと3-(Methylthio)-1-propanolの効果について. 日本農芸化学会大会
講演要旨集 pp. 236.

森 隆・木内 幹・海老根英雄 (1980) *Torulopsis*属酵母の香気生成. 日本食品工業学会大会講演集 pp. 22.

中野政弘 (1966) 味噌製造の原則 (2) 伝統的技術の生み出す品質に関しての解析. 醸協 61: 136-139.

NAMIKI, M., and HAYASHI, T.(1975) Development of novel free radicals during the amino-carbonyl reaction of sugars. J. Agric. Food Chem., 23: 487-491.

NEISH, A. C.(1971) Methods in Microbiology (NORRIS, J. R., and RIBBONS, D. W., Ed.), Vol. VIA, pp. 80, Academic Press, London, New York.

日本分析化学会編 (1971) 分析化学便覧 pp. 1452. 丸善. 東京.

日本醸造協会編 (1977) 新版醸造成分一覽. 日本醸造協会. 東京.

NUNOMURA, N., SASAKI, M., and YOKOTSUKA, T.(1984) *Shoyu* (soy sauce) flavor components: Neutral Fraction. Agric. Biol. Chem., 48: 1753-1762.

NUNOMURA, N., and SASAKI, M.(1992) Japanese soy sauce flavor with emphasis on off-flavors. In Off-Flavors in Food and Beverages, (CHARALAMBOUS, G., Ed.), pp. 287-312, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo.

NYKANEN, L., and SUOMALAINEN, H.(1983) Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages, pp. 233-248, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland/Boston, U.S.A./London, England.

OLAFSDOTTIR, G., STEINKE, J. A. and LINDSAY, R. C. (1985) Quantitative performance of a simple Tenax-GC adsorption method for use in the analysis of aroma volatiles. *J. Food Sci.*, 50: 1431-1436.

ONISHI, H. (1957) Studies on osmophilic yeasts, Part III. Classification osmophilic soy and miso yeasts. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 21: 151-156.

大西 博 (1967) 酵母による多価アルコールの生産. *醸酵協会誌* 25: 495-506.

箴島 豊 (1988) ヘッドスペースガス分析法によるフレーバーの分析と評価. *最新食品フレーバー技術* pp. 302-325. 工業技術会. 東京.

SAWICKI, E., HAUSER, T. R., STANLEY, T. W., and ELBERT, W. (1961) The 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone test. Sensitive new methods for the detection, rapid estimation, and determination of aliphatic aldehydes. *Anal. Chem.*, 33: 93-96.

清酒酵母研究会 (1972) 清酒酵母の研究 pp. 148-153. 清酒酵母研究会. 東京.

柴崎一雄・後藤美代子 (1964) 仙台味噌の有機酸組成について. *醸協* 59: 509-513.

SHIMODA, M., WADA, K. and OSAJIMA, Y. (1984) Effect of temperature of headspace trapping apparatus on quantification of coffee volatiles. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 31: 805-809.

しょうゆ輸出実績 (1994) 大蔵省統計局資料, 新潟県醤油協同組合連合会
提供.

菅原悦子・雑賀 優・小林彰夫 (1992) みその香気成分と官能評価の解析.
日食工誌 39: 1098-1104.

杉沢 博・田村啓敏・中原一晃 (1988) ガスクロマトグラフィーにおける
保持指標の計算プログラム. 日食工誌 35: 709-712.

SUOMALAINEN, H., and KERANEN, A. J. A. (1967) Keto acids formed by
baker's yeast. J. Inst. Brew., 73: 477-484.

鈴木昌治・米山 平・小泉武夫 (1982) 清酒の香気増強に重要なロイシン
酸エチルの生成機構. 醗酵工学 60: 19-25.

The Mass Spectrometry Data Centre (1983) 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.

豊沢 誠・米崎治男・上田隆蔵・林田正典 (1960) 清酒醸造工業の原料利
用率に関する研究 (第9報) 有機酸生成のための炭水化物の損失. 醗酵工学
38: 342-350.

豊島治男・上田隆蔵 (1959a) 味噌の有機酸に関する研究 (第1報) 市販味
噌の有機酸組成. 醗酵工学 37: 431-435.

豊島治男・上田隆蔵 (1959b) 味噌の有機酸に関する研究 (第2報) 味噌の
種別による有機酸組成. 醗酵工学 37: 436-439.

豊島治男・上田隆蔵・望月 務 (1961) 味噌醸造過程の有機酸の変化. 信州味噌研報 3: 1-3.

TSUGITA, T., IMAI, T., DOI, Y., KURATA, T. and KATO, H. (1979) GC and GC-MS analysis of headspace volatiles by Tenax GC trapping techniques. Agric. Biol. Chem., 43: 1351-1354.

植村定次郎 (1939) 麹菌によるアミノ酸の分解に就て (第3報). 農化 15: 353-358.

WAINWRIGHT, T. (1971) Origin and control of undesirable sulphur compounds in beer. Proc. Europ. Brew. Conv., 13th Congr., Estoril, 1971, pp. 437-449, Elsevier, Amsterdam.

WILLIAMS, R. S., and GRACEY, D. E. F. (1982) Factors influencing the levels of polysulfides in beer. J. Am. Soc. Brew. Chem., 40: 71-74.

山本 淳 (1961a) 清酒香気成分に関する研究 (第2報) α -オキシカルボン酸類の分離、同定. 農化 35: 619-623.

山本 淳 (1961b) 清酒香気成分に関する研究 (第3報) α -ケトカルボン酸類の分離、同定. 農化 35: 711-715.

YAMANISHI, T., NOSE, M., and NAKATANI, Y. (1970) Studies on the flavor of green tea, Part VIII. Further investigation of flavor constituents in manufactured green tea. Agric. Biol. Chem., 34: 599-608.

山下市二・田村太郎・吉川誠次・鈴木重治 (1973) 揮発性および不揮発性有機酸のガスクロマトグラフィーによる同時定量のためのブチルエステル化. 分析化学 22: 1334-1341.

安平仁美・武井正泰・大内一朗・望月 努 (1968) 味噌熟成への酵母の利用 (第4報) 味噌の香りに関する研究 (1). 信州味噌研報 9: 25-30.

安平仁美・望月 務 (1969a) 味噌熟成への酵母の利用 (第5報) 味噌の香りに関する研究 (2). 信州味噌研報 10: 19-22.

安平仁美・望月 努 (1969b) ガスクロマトグラフィーによる味噌中のエタノールの定量法. 信州味噌研報 10: 17-18.

安平仁美・糸賀啓治・望月 務 (1973) 味噌熟成への酵母の利用 (第9報). 信州味噌研報 14: 33-34.

安平仁美・望月 務 (1977) みその香気成分に関する研究, みそ中の有機酸について. 信州味噌研報 18: 23-27.

好井久雄 (1966) 味噌醸造微生物の働き (II). 醸協 61: 883-887.

好井久雄・金子安之・山口和夫 (1976) 食品微生物学 pp. 176. 技報堂. 東京.

吉沢 淑 (1975) 醸造と香気物質の生成. 香料 112: 9-20.

YUASA, K., ISHIZUKA, K., KABURAKI, S., and SAKASAI, T. (1976) Metabolism of phenylalanine in the *Saccharomyces rouxii*. Agric. Biol. Chem., 40: 1679-1685.

全国味噌技術会 (1968) 改訂基準味噌分析法. 全国味噌技術会. 東京.

本研究に関する参考論文等

本研究に関する参考論文

1. 本間伸夫・石原和夫 (1978) 無菌醸造みその香気とヘッドガス成分.
醗酵工学 56: 199-209.
2. 石原和夫・本間伸夫・小笠原長宏 (1985) 味噌酵母の生成する揮発性有機酸. 醗酵工学 63: 279-287.
3. ISHIHARA, K. and HONMA, N(1992) A novel device for the headspace trapping of volatiles: Studies with a model solution. Journal of Food Composition and Analysis 5: 139-145.
(揮発性成分捕集装置の組立とモデル溶液中の揮発性成分捕集条件の検討)
4. 石原和夫・本間伸夫・内山武夫 (1995) 耐塩性酵母による揮発性含硫化合物の生成と減少. 生物工学 73: 463-472.
5. ISHIHARA, K., HONMA, N., MATSUMOTO, I., IMAI, S., NAKAZAWA, S. and IWAFUCHI, H.(1996) Comparison of volatile components in soy sauce (*Koikuchi shoyu*) produced by using *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (印刷中).
(*Aspergillus sojae* と *Aspergillus oryzae* を使用した濃口醤油の揮発性成分の比較)

その他の参考論文

1. 石原和夫・本間伸夫・原沢久夫 (1970) みそ主要発酵菌の生酸性について. 県立新潟女子短大紀要 7: 43-50.

2. 本間伸夫・石原和夫・原沢久夫 (1970) みそ中のモノアルコール及びポリアルコールについて. 県立新潟女子短大紀要 7: 51-60.
3. 本間伸夫・稲越徳子・渋谷歌子・石原和夫・岡田玲子 (1973) 加熱によるみそ汁低沸点香気成分の変化. 家政誌 24: 177-183.
4. 本間伸夫・渋谷歌子・石原和夫・岡田玲子 (1973) 未加熱および加熱みそ汁の揮発性カルボニル化合物について. 家政誌 24: 259-266.
5. 本間伸夫・塩崎啓子・渋谷歌子・石原和夫 (1974) 加熱による煮干しだし汁低沸点香気成分の変化. 家政誌 25: 355-361.
6. 本間伸夫・石原和夫 (1977) みその揮発性ポリカルボニル化合物. 醱酵工学 55: 36-43.
7. 本間伸夫・石原和夫 (1978) 無菌醸造みその脂質. 醱酵工学 56: 768-775.
8. 本間伸夫・石原和夫 (1979) 無菌醸造みそ香気の官能検査. 味噌の科学と技術 301: 17-21.
9. 本間伸夫・石原和夫 (1981) ガスクロマトグラフィーにおける揮発性有機化合物のTR値. 県立新潟女子短大紀要 18: 155-165.
10. 石原和夫・本間伸夫 (1983) 耐塩性酵母の生成する揮発性成分量と培養期間との関係. 県立新潟女子短大紀要 20: 105-112.
11. 石原和夫・本間伸夫 (1985) 味噌酵母 (*Saccharomyces rouxii* Y712) による揮発性カルボニル化合物の生成について. 県立新潟女子短大紀要 22: 81-89.

12. 本間伸夫・石原和夫 (1987) GC-MS-COMによる味噌香気成分の分析. 県立新潟女子短大紀要 24: 9-22.

学会発表講演

1. 石原和夫・本間伸夫 (1973) 大豆醗酵食品の微生物に関する研究 (第4報) 耐塩性酵母 (*S. rouxii*) による揮発性カルボニル化合物の生成. 日本醗酵工学会大会講演要旨集 pp. 39.
2. 本間伸夫・石原和夫 (1975) みその香気成分について (1) 揮発性ポリカルボニル. 日本醗酵工学会大会講演要旨集 pp. 217.
3. 石原和夫・本間伸夫 (1975) みその香気成分について (2) 無菌みそと普通みその香気成分および微生物. 日本醗酵工学会大会講演要旨集 pp. 218.
4. 本間伸夫・石原和夫 (1976) みその香気成分について (3) 揮発性フェノール. 日本醗酵工学会大会講演要旨集 pp. 13.
5. 本間伸夫・石原和夫 (1977) みその香気成分について (4) 無菌味噌と普通味噌の香気成分の比較. 日本醗酵工学会大会講演要旨集 pp. 264.
6. 石原和夫・本間伸夫 (1977) 大豆醗酵食品の微生物に関する研究 (第9報) 耐塩性酵母による揮発性カルボニル化合物の生成 (その2). 日本醗酵工学会大会講演要旨集 pp. 266.
10. 本間伸夫・佐藤恵美子・渋谷歌子・石原和夫 (1977) みそ水不溶性分画の香気吸着性について (その3) 香気吸着に関与する成分. 日本家政学会総会研究発表要旨集 pp. 54.

11. 本間伸夫・石原和夫（1981） 無菌醸造みその有機酸．日本醱酵工学会大会講演要旨集 pp. 145.
12. 石原和夫・本間伸夫（1981） 大豆醱酵食品の微生物に関する研究（第10報）耐塩性酵母の生成揮発性有機酸について．日本醱酵工学会大会講演要旨集 pp. 146.
13. 石原和夫・本間伸夫（1984） 味噌酵母の生成する揮発性有機酸について（その2）．日本醱酵工学会大会講演要旨集 pp. 49.
14. 石原和夫・本間伸夫・佐藤恵美子・渋谷歌子（1988） Tenax法による食品香気の定量的分析法の検討．日本食品工業学会大会講演集 pp. 22.
15. 本間伸夫・石原和夫（1988） 味噌の香り成分に関する研究（日本醸造協会技術賞授賞講演）．日本醸造学会大会講演要旨集 pp. 23.
16. 本間伸夫・石原和夫（1989） 味噌の香気と微生物．日本醱酵工学会大会講演要旨集（シンポジウム） pp. 37.
17. 石原和夫・本間伸夫・松本伊左尾・今井誠一・中沢信吉・岩渕 坦（1989） *Aspergillus sojae* と *Aspergillus oryzae* による醤油の試醸（第2報）濃口醤油の香気．日本醸造学会大会講演要旨集 pp. 9.
18. 石原和夫・本間伸夫・内山武夫（1992） 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．日本醸造学会大会講演要旨集 pp. 19.

謝 辞

本研究の遂行に当たり、長年にわたり懇切なる御指導、御協力を賜りました県立新潟女子短期大学・本間伸夫教授に衷心より感謝を申し上げます。

本論文は新潟大学農学部早川利郎教授の親切なる御指導のもとに取りまとめを行い、御校閲を仰いだものです。謹んで感謝を申し上げます。また、新潟大学農学部内山武夫教授、池田 武教授、星野 力教授、渡辺剛志教授、三ツ井敏明助教授の各先生には論文についての有益なる御助言と御教示を賜りました。更に、内山武夫教授にはGC-M S分析の御指導と御協力をいただきました。ここに記して深甚なる謝意を表します。

本研究に御助言と御鞭撻を賜りました、京都大学安本教傳教授、Dr. Kent K. Stewart (Virginia Polytechnic Institute and State University, U.S.A.)に感謝申し上げます。

本研究の遂行に当たり、実験材料の御提供と御助言、御鞭撻をいただきました、新潟県食品研究所・今井誠一前所長、松本伊左尾専門研究員、高田香料(株)技術部馬野克己博士、山田醸造(株)山田一弥社長、(社)中央味噌研究所に感謝致します。また、研究の遂行に御協力いただきました県立新潟女子短期大学・石川一春、生田香代、山田正子、坂内弘子の各氏に厚く御礼申し上げます。

本論文の作成に当たり、御鞭撻と御助力をいただきました県立新潟女子短期大学・島津光夫学長はじめ先輩、同僚の先生方に感謝致します。

最後に終始御指導と御鞭撻を賜り、本論文の完成を心待ちにして下さいました、元県立新潟女子短期大学教授故原沢久夫先生、新潟大学名誉教授故小笠原長宏先生に心より感謝申し上げます。

Studies on the Relationship between
the Volatile Flavor Components in
Miso and the Salt-Tolerant Yeasts.

K a z u o I S H I H A R A

The *miso* (soy paste) making process is time-consuming and consists of several steps such as steaming of raw materials, *koji* making, mixing with salt and ripening. Consequently, the aromatic components of *miso* are formed through these steps. The occurrence of several species of salt-tolerant yeasts have been demonstrated in the *miso* in the ripening period. From the standpoint of forming aroma of *miso*, the contribution of salt-tolerant yeasts is of great importance. However, it has not been clarified at what point these salt-tolerant yeasts take their share in the aroma formation of *miso*. Therefore, this investigation established analytic methods for volatile components which constitute the flavor of foods, and contrived the synthetic medium taking into consideration of the field of *miso*, and further examined the role played by yeasts on the existence of flavor components on the synthetic media. As flavor components, volatile sulfur-containing compounds and volatile organic acids were mainly taken up as objects, and further by the analysis of *miso*, the relationship between flavor components of *miso* and salt-tolerant yeasts was investigated.

1. Culture of salt-tolerant yeasts

The raw material of *miso* consists of soy bean, rice and salt. Because the soy bean contains a high density of protein, the field where salt-tolerant yeasts grow and act becomes the circumstance of remarkably high concentration of nitrogen. In consideration of the components of *miso*, we devised a synthetic

medium with 18 kinds of amino acids as nitrogen source, with the amount ratio of glucose (carbon source) to total nitrogen 16, and with 12.5% of salt. Because this medium of high density of nitrogen and salt is a very hard circumstance for the salt-tolerant yeasts, in the experiment, besides this synthetic medium, the synthetic medium of the amount ratio of 50:1 of glucose to total nitrogen and another medium without salt were also used.

Zygosaccharomyces rouxii S84 (*Z. rouxii* S84), *Candida versatilis* D-5 (*C. versatilis* D-5), and *Candida etchellsii* F-8 (*C. etchellsii* F-8) which are all salt-tolerant yeasts and isolated from red salty *kome miso*, and *Saccharomyces cerevisiae* RIB 6002 (*Kyokai* no. 7) (*S. cerevisiae*), a salt-sensitive *sake* yeast, were employed in this study. These yeasts were cultured in a stationary manner at 30 °C until they had consumed nearly all the glucose, the carbon source, since it was indicated that the volatile components formed by salt-tolerant yeasts tended to be the largest in amount at the period when the consumption of glucose reached the highest.

2. Collection of volatile components

The novel headspace volatile trapping apparatus consisting of a heated sample solution container, a heated upper part of the sample vessel, and a heated Tenax TA (2,6-diphenyl-*p*-phenyleneoxide polymer) tube for the collection of headspace volatiles from a model solution was made. Vapor from the sample solution was prevented from condensing on the interior surface of the sample vessel and the Tenax TA tube by maintaining the temperature of the heating parts at 45 °C, the same as that of the sample solution. Removal of the water collected on Tenax TA prior to gas chromatography (GC) was thus not required. Headspace volatiles were collected on the 200 mg of Tenax TA by passing high-purity nitrogen through the sample solution at a rate of 50 ml/min for 1 h. The model sample solution contained ethyl acetate, eight different

alcohols, and 2, 3-xyleneol. Data on the effect of sodium chloride concentration of the sample solution on the collection of headspace volatiles was presented. The coefficients of variation of the GC peak areas of the compounds except for ethanol ranged from 1.9 to 15%.

3. Formation of volatile components in synthetic media by salt-tolerant yeasts

The main volatile compounds in the sample solution were alcohols such as ethanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol and 2-phenylethanol etc. All of these compounds were formed in cultured yeast media. In addition to these alcohols, esters, volatile organic acids, volatile sulfur-containing compounds, aldehydes, ketones and pyrazines etc. were found both in the non-inoculated and cultured yeast media.

4. Formation and reduction of volatile sulfur-containing compounds in synthetic media by salt-tolerant yeasts

By using a synthetic medium containing 18 amino acids as a nitrogen source, volatile sulfur-containing compounds formed and reduced by salt-tolerant yeasts and *Sake* yeast were studied. As the test yeasts, *Z. rouxii* S84, *C. versatilis* D-5, and *S. cerevisiae* were employed. The volatile sulfur-containing compounds in the non-inoculated and cultured media were identified by GC and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) after they had been collected on a Tenax TA using an apparatus for trapping headspace volatiles. The volatile sulfur-containing compounds commonly found both in the non-inoculated and cultured yeast media were identified as dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide and 3-(methylthio)propionaldehyde (methional). Further, in the cultured yeast media, in addition to these compounds, the formation of 3-(methylthio)propyl acetate and 3-(methylthio)-1-propanol (methionol) was observed. The amounts of dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide and methional contained in the cultured

yeast media were found to decrease as little as 0.6–85.1% compared to those in the non-inoculated media. The rate of decrease of these compounds in the cultured media was greatest in *Z. rouxii* S84 among the tested yeasts. In particular, in the cultured medium containing salt, in spite of the fact that the consumption rate of glucose was low and it had poor development, *Z. rouxii* S84 eliminated these compounds by as much as 55.2–99.4%. The formation and reduction of these volatile sulfur-containing compounds by *Z. rouxii* S84 were also observed both in the non-inoculated and cultured media containing methionine as the sole nitrogen source. In addition to these compounds, ethyl 3-(methylthio)propanoate was formed by *Z. rouxii* S84.

5. Volatile organic acids formation by salt-tolerant yeasts

By using a synthetic medium the volatile organic acids formed by salt-tolerant yeasts and *sake* yeast were studied. As the test yeasts, *Z. rouxii* S84, *C. versatilis* D-5, *C. etchellsii* F-8 and *S. cerevisiae* were employed. Identification of the volatile acids in the distillates of culture media under reduced pressure at pH 2 was done by GC and GC-MS after converting them to *n*-butyl esters.

I found that acetic, propionic, isobutyric, *n*-butyric, 2-methylbutanoic, and isovaleric acids were formed by all test yeasts. In addition, the formation of 2-oxo-3-methylbutanoic, 2-oxo-3-methylpentanoic, 2-oxo-4-methylpentanoic, 2-hydroxy-3-methylbutanoic, and 2-hydroxy-4-methylpentanoic acids were observed from both strains of *C. versatilis* D-5 and *C. etchellsii* F-8. Formation of 2-hydroxy-3-methylpentanoic acid was also inferred. It was also found that benzoic and phenylacetic acids were formed by *C. versatilis* D-5 and *n*-hexanoic, *n*-octanoic, and *n*-decanoic acids by *S. cerevisiae*. These results indicated that there were some differences among yeasts tested for the formation of branched chain oxo and hydroxy acids with five and six carbon, benzoic acid, phenylacetic

acid and normal chain organic acids with six, eight and ten carbon.

The amount of volatile acids formed was measured as acetic acid in the distillates of culture media by alkaline titration, and it decreased in the order of *C. versatilis* D-5 (27.0 mg/100 ml), *C. etchellsii* F-8 (11.7 mg/100 ml), *Z. rouxii* S84 (2.5 mg/100 ml), and *S. cerevisiae* (1.6 mg/100 ml). The amount of volatile acids formed by *C. versatilis* D-5 was about 11 and 17 times higher than those formed by *Z. rouxii* S84 and *S. cerevisiae*, respectively. Among the volatile acids, acetic acid was the largest in quantity (about 26-76%), and the other main volatile acids were isobutyric, 2-methylbutanoic, and isovaleric acids.

6. Aroma and headspace volatile components of *miso* made by an aseptic process

To study the role of microorganisms in flavor production in the manufacture of *miso*, the aroma and flavor substances in *miso* made by an aseptic process were compared with those in *miso* made by the conventional process. In a triangle test, panel members could detect differences in aroma between the aseptic and conventional *misos*. The aroma of the aseptic *miso* was poorer and weaker than that of the conventional *miso*, and most of the panel preferred the latter. Aroma compounds in the headspace gas of *miso* were analyzed by GC.

Total contents of aromatic components calculating from the sum of GC peak areas were in the order of the conventional *miso*, the aseptic *miso* and the unmaturation aseptic *miso*. The main compounds in the headspace gas of the aseptic *miso* were aldehydes (2-methylpropanal, 2- and/or 3-methylbutanal), whereas those of the conventional *miso* were alcohols (ethanol, 1-butanol, 2-methylpropanol, 2- and/or 3-methylbutanol), esters (ethyl acetate, isobutyl acetate, isopentyl acetate, ethyl hexanoate), ethanal and the aldehydes cited above. The carbonyls except ethanal decreased in the order of the aseptic *miso*, the conventional *miso* and the unmaturation aseptic *miso*. It was suggested that the salt-tolerant microorganisms inhibited the formation of carbonyls, or

converted from carbonyls to the other compounds. Thus the alcohols, esters and ethanal in the conventional *miso* are thought to be produced fermentatively by salt-tolerant yeasts.

7. Volatile sulfur-containing compounds and volatile organic acids in *misos*

The volatile sulfur-containing compounds in the distillates of *misos* under reduced pressure were identified by GC and GC-MS after they had been collected on a Tenax TA using an apparatus for trapping headspace volatiles.

Methional and ethyl 3-(methylthio)propanoate were identified in the unmaturation aseptic *miso*. In addition, dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide were observed in both the matured aseptic *miso* and the conventional *miso*. Further, in the conventional *miso*, in addition to these compounds, 3-(methylthio)propyl acetate and methionol were also identified. Methional, dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide are considered to be formed chemically from methionine due to the chemical reactions such as Strecker degradation with amino-carbonyl reaction. It was also considered that these compounds were reduced or inhibited by salt-tolerant yeasts, because they tended to be less in the conventional *miso*.

On the other hand, it was suggested that ethyl 3-(methylthio)propanoate was formed by *koji* and/or salt-tolerant yeasts, and 3-(methylthio)propyl acetate and methionol by salt-tolerant yeasts, respectively.

Further, volatile sulfur-containing compounds in white sweet *miso* and *Edo miso* which are judged to be taken almost no part in ripening by microorganisms of fermentation except *koji* molds, as well as aseptic *miso*, and those in *Echigo* warmed-brewing *miso* and *Echigo* natural fermentation *miso* which are prepared with addition of *Zygosaccharomyces rouxii* were also examined. It was considered that dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide and methional are chemically produced, while ethyl 3-(methylthio)propanoate,

3-(methylthio)propyl acetate and methionol are formed mainly by salt-tolerant yeasts. Among these volatile sulfur-containing compounds, methional and methionol were the larger in quantity in *misos*. Methional had an offensive odor in *miso* and *shoyu* (soy sauce). It increased as *miso* and *shoyu* were ripened and heated. These suggest that it is desirable to reduce methional by salt-tolerant yeasts. On the other hand, methionol, the important compound of flavor of *miso* and *shoyu*, was the main compound in the sulfur-containing compounds formed by the salt-tolerant yeasts. It suggests that the salt-tolerant yeasts play an important role in the ripening of *miso* and *shoyu*. Dimethyl trisulfide and ethyl 3-(methylthio)propanoate were newly identified in *miso*.

Identification of the volatile acids in the distillates of *Echigo* warmed-brewing *miso* under reduced pressure at pH 2 was done by GC and GC-MS after converting them to *n*-butyl esters.

Acetic, propionic, isobutyric, *n*-butyric, 2-methylbutanoic, isovaleric and benzoic acids were identified as *miso* volatile organic acids. Among these compounds, acetic acid was the largest in quantity (about 81%). However, the branched chain oxo and hydroxy acids with five and six carbon formed by *C. versatilis* D-5 and *C. etchellsii* F-8 described above were not detected in *miso*. This was considered to be due to the fact that the viable cells of *Candida versatilis* are few and they are less active in the sample *miso*, which led to difficult formation of branched chain oxo and hydroxy acids, and even in their presence their amount is minute. These branched chain oxo and hydroxy acids with five and six carbon which are regarded to be the important flavor components have not been reported in *miso* and *shoyu*. Thus in the preparation of *miso*, it was considered that as well as *Zygosaccharomyces rouxii*, the active utilization of *Candida versatilis* might diversify the flavor of *miso*.

As a result of above fact, the role of salt-tolerant yeasts on the existence of both volatile sulfur-containing compounds and volatile organic acids was

clarified, and the formation mechanism of these flavor components in *miso* was proposed.