

大豆発酵食品と清酒の香気組成の比較

菅原悦子*

(1993年6月30日受理)

緒言

著者が味噌の香気成分として初めて同定したHEMF (4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone) は、最も一般的な赤色辛口系米味噌への添加実験によりその重要性が確認された^{1),2)}。さらに、米味噌中の多種類の香気成分の濃度と官能評価の統計的な解析からも、HEMFの濃度が香りの品質評価に正の相関があり³⁾、HEMFは米味噌の極めて重要な香気成分であることが判明した。

一方、HEMFは発酵熟成型味噌に特徴的な香気成分で、発酵熟成中に酵母の活動によって形成されることも示唆された。そこで、米味噌の原料となっている米麴や蒸煮大豆及び米味噌熟成中の各段階の試料から香気濃縮物を調製し、HEMFの米味噌熟成期間中の形成と経時的変化を検討したところ、HEMFは蒸煮大豆、米麴及び仕込直後には全く検出されないが、仕込後30日後には2.31ppm程度に増加し、米味噌の発酵・熟成中に形成されることが確認された⁴⁾。また、米味噌の仕込時に味噌用酵母*Zygosaccharomyces. rouxii*を添加した米味噌と添加しない米味噌の熟成中のHEMF形成量、エタノール形成量と酵母の菌数を対比し、酵母によるHEMF形成の条件についても検討した。その結果、酵母*Z. rouxii*によるHEMF形成には酵母の増殖と酵母増殖の環境が影響し、米味噌のような高濃度の還元糖と食塩がある場合にはPHが5.6以下になった時に始まると推測された⁵⁾。

1991年、Sasakiらは酵母によるHEMFの生合成に関する論文を発表し、味噌や醤油の製造に共通して使用される、*Zygosaccharomyces*属はもちろん、他の*Candida*属や*Saccharomyces*属などの酵母も発酵条件によってはHEMFを生合成することを確認している^{6),7)}。

日本古来の伝統的な醸造酒である清酒は、蒸煮した精白米を米麴の酵素で糖化しながら、同時に清酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*によるアルコール発酵を営ませ、もろみをろ過したもの⁸⁾で、大豆を用いてはいないが、酵母を用いてエタノールや香気成分を形成する点で、その発酵過程は味噌や醤油と類似している。清酒中の香気成分に関しては多数の報告⁹⁾⁻¹²⁾があり、多種多様のアルコール類やエステル類が存在することが知られているが、まだ発見されていない香気成分も数多くあるものと考えられている¹¹⁾。そこで、本研究では清酒の香気組成をHEMFの有無を中心に、大豆発酵食品と比較することによって明らかにし、清酒の製造条件と*Saccharomyces*属によるHEMF形成の関連について考察した。

* 岩手大学教育学部

実験方法

1. 試料

清酒は盛岡市内の酒造所で平成3年度に精米歩合60%のササニシキで醸造した純米酒で、火入れ前のものを試料として提供いただいた。

2. 香気濃縮物の調製

清酒中の各香気成分の濃度を定量するため、精製したTenax GC 0.5gを充填した内径1cmのガラスカラムに清酒200mlを流し、香気成分を吸着させた。これをエーテル50mlで脱着し、内部標準物質としてn-decyl alcoholを添加し、脱水後、濃縮して香気濃縮物を得た。同様の実験は3回繰り返して行った。

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

表1 清酒から得られた香気濃縮物の分画

Fr.	Solvent Pentane:Ether	Vol. ml	香気特性
1	100 : 0	150	アルコール様, 果実様
2	90 : 10	150	清酒様
3	80 : 20	150	弱い甘い香り
4	50 : 50	150	化粧品様
5	0 : 100	150	カラメル様の甘い香り

3. 香気濃縮物の分離同定

清酒から得られた香気濃縮物及び、その分画された香気濃縮物はGC及びGC-MSによって分析した。各香気成分の濃度は内部標準物質とのピーク面積の比から、3回の分析結果の平均値として求めた。香気成分の同定は文献値のマスペクトルデータ及び標準物質とのGCの保持時間の一致によった。詳細な分析条件は表2に示したとおりである。

表2 カラム濃縮法によって得られた清酒香気濃縮物のGC及びGC-MS分析の条件

GC分析条件

Model : SHIMAZU GC-14A

Column : FS-WCOT, DB-WAX (0.25mm×30m)

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

Carrier Gas : He, 0.8ml/min

Inj. Temp. : 200℃
 Detector : FID, 200℃
 GC-MS分析条件
 GC part
 Model : HITACHI G3000
 Column : FS-WCOT, Supelcowax 10 (0.25mm×30m)
 Oven Temp. : 40℃ (5 min hold) → 3℃/min → 200℃
 Carrier Gas : He, 0.8ml/min
 Inj. Temp. : 200℃
 MS part
 Model : HITACHI M-2000
 Ionization Voltage : 70eV
 Computer part
 Model : HITACHI M-0201 system

結果及び考察

1. 清酒香気成分としてのHEMFの確認

清酒より得られた香気濃縮物のガスクロマトグラムを図に示した。検出されたピークは50種あった。

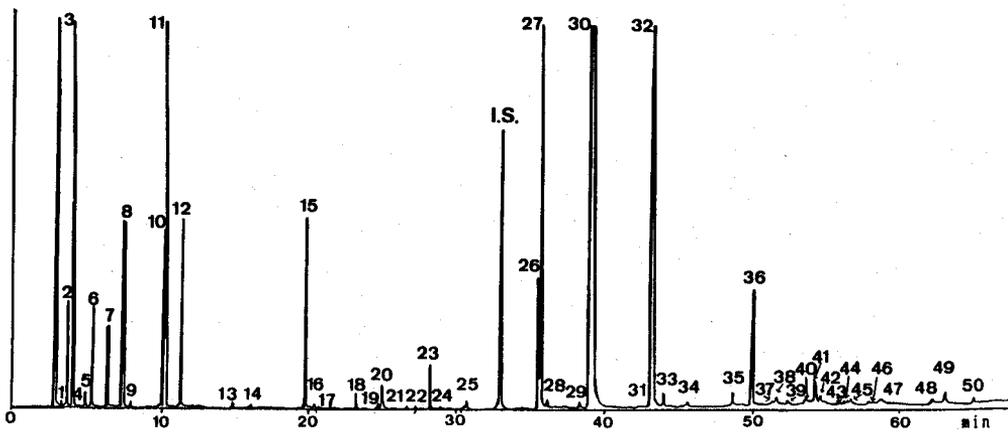


図 清酒から得られた香気濃縮物のガスクロマトグラム
 (I. S. : 内部標準物質)

また、シリカゲルカラムクロマトグラフィによる分画のために、2400mlの清酒をカラム濃縮法で処理して、0.24gの香気濃縮物を得た。収率は0.01%であった。この香気濃縮物は表1に示したように分画された。分画後の香気濃縮物も詳細に分析して、清酒の香気成分の同定を行った。その結果、37成分を同定、または推定し、表3に示した。表3に示したピーク番号は図に対応している。

表3 清酒の香気成分として同定された化合物

Peak No.	Compound	ppm	Peak No.	Compound	ppm
A. aliphatic alcohols			octadecatrienoate		
3	ethanol	10.23	7	3-methyl-1-butyl acetate	0.78
5	1-propanol	0.06	C. carbonyl compounds		
8	1-butanol	0.78	16	acetic acid	+
6	2-methyl-1-propanol	0.30	19	propanoic acid	+
10	2-methyl-1-butanol	0.73	28	hexanoic acid	0.02
11	3-methyl-1-butanol	2.79	32	octanoic acid	19.84
14	1-hexanol	+	37	decanoic acid	+
17	1-heptanol	+	43	dodecanoic acid	+
20	L-2,3-butanediol	0.14	9	2-heptanone	0.02
21	meso-2,3-butanediol	+	13	3-hydroxy-2-butanone	+
22	1,2-propanediol	+	24	γ -butyrolactone	+
B. esters			D. aromatic compounds		
1	ethyl formate	0.03	18	benzaldehyde	0.11
2	ethyl acetate	0.33	27	2-phenyl-1-ethyl acetate	11.58
4	ethyl propanoate	+	30	2-phenyl-1-ethanol	80.63
12	ethyl hexanoate	0.82	36	2-methoxy-4-vinylphenol	2.56
15	ethyl octanoate	0.85	E. other compound		
23	ethyl decanoate	0.17	25	5-ethoxythiazole*	0.06
26	ethyl 4-hydroxybutanoate	0.59	+ : trace		
29	ethyl dodecanoate	+	* : マススペクトルの一致により推定された化合物		
38	ethyl octadecanoate	0.02			
44	ethyl (Z)-9-octadecenoate	+			
47	ethyl (Z,Z)-9,12-octadecadienoate	+			
48	ethyl (Z,Z,Z)-9,12,15-	+			

シリカゲルカラムクロマトグラフィで分画された香気濃縮物はGC-MS分析の際、HEMFの特徴的なフラグメントイオンである142⁺によるマスフラグメントグラフィも行って詳細に検索されたが、清酒香気成分としてHEMFの存在を確認することはできなかった。

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

清酒と味噌、醤油の醸造条件の大きな違いは塩分濃度にある。味噌の食塩濃度は約13%、醤油は約17%とどちらも高濃度であるのに対し、清酒には食塩が存在せず、これがHEMF形成が行われない原因の一つと考えられる。また、味噌や醤油では熟成中に大豆タクパク質が分解されて各種のアミノ酸が生成する。清酒においても蒸し米のタンパク質からアミノ酸が生成するが、その量は味噌や醤油に比較してかなり少量である。従って、清酒の酵母はいわゆる高糖、低窒素濃度の栄養状態にあり、これもHEMF形成に影響を与えているものと考えられる。さらに、当然のことながら清酒のエタノール濃度は最終的には20%にもなるのに対し、味噌醤油

では2-5%であり、これも酵母の生育環境に影響を与えているものと推察される。このような種々の醸造条件の差異を明確にすることによって酵母によるHEMF形成の条件がより鮮明になると考えられる。

2. 清酒の特徴的な香気成分

清酒の品質を左右する重要な因子に香りがある。近年は吟醸酒などの需要も増加し、香りが一層注目されている。通常、清酒の香気成分の分離濃縮には溶媒抽出法、ヘッドスペース法が用いられてきたが、清酒に含まれる多量のエタノールが多種類の香気成分の分析を困難にしていた。そこで、本研究には味噌の香気成分の分離濃縮による成果をあげているポーラスポリマーを用いたカラム濃縮法¹³⁾を用い、清酒の香気組成を検討した。この方法ではエタノールの抽出が極力抑えられ、特に低沸点成分の分析が効果的に行われることも示されている¹²⁾。

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

さらに、発酵中に酵母によって生成され、貯蔵中に分解して桃様の芳香を示す γ -butyrolactoneに変化することが判明している、ethyl 4-hydroxybutanoateも同定された。この成分は味噌や醤油では検出されていない。

また、果実様の芳香を持つ低級脂肪酸のエチルエステルのethyl hexanoate (カプロン酸エチル)、ethyl octanoate (カプリル酸エチル)は味噌や醤油では痕跡程度しか検出されていないが、0.82ppm、0.85ppmであった。その他の同定された多くの香気成分は味噌や醤油と共通する成分であった。以上より、2-phenyl-1-ethanol、2-phenyl-1-ethyl acetate、ethyl 4-hydroxybutanoate及び低級脂肪酸のエチルエステルであるethyl hexanoate、ethyl octanoateは大豆発酵食品とは異なる清酒に特徴的な香気成分であると判断された。

要 約

HEMFは、味噌や醤油の製造に共通して使用される、酵母*Zygosaccharomyces*属はもちろん、*Candida*属や*Saccharomyces*属などによっても発酵条件によって生合成されることが報告された。そこで味噌や醤油と同様に麹かびを用い、*Saccharomyces*属の酵母による発酵をへて製造される清酒の香気の特徴をHEMFの有無を中心に検討した。清酒の香気濃縮物はカラム濃縮法によって調製し、これを分析するとともに、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画やGC-MS分析にはマスフラグメントグラフィも行って詳細にHEMFを検索したが、清酒香気成分としての存在は確認できなかった。清酒の香気成分として濃度も高く、特徴的な成分は2-phenyl-1-ethanol、2-phenyl-1-ethyl acetate、ethyl 4-hydroxybutanoate、低級脂肪酸のエチルエステルであるethyl hexanoate、ethyl octanoateであった。これらは味噌や醤油の大豆発酵食品では検出されないか、または少量しか検出されておらず、大豆発酵食品とは異なる清酒の香気の特徴づける成分であった。

終わりに臨み、試料をご提供下さいました株式会社あさ開、並びに、同社生産部佐藤智博氏に感謝いたします。さらに本研究に対し、ご指導ご助言賜りますとともに、本稿をご校閲下さいました岩手大学農学部櫻井米吉教授に感謝いたします。また、本研究にご協力下さいました日戸久美子さん、佐藤敏枝さんに感謝します。

参考文献

- 1) 菅原悦子：家政誌，**43**，635 (1992)。
- 2) 菅原悦子：日食工誌，**38**，491 (1991)。
- 3) 菅原悦子，雑賀優，小林彰夫：日食工誌，**39**，1098 (1992)。
- 4) 菅原悦子：日食工誌，**38**，1093 (1991)。
- 5) Sugawara, E., Hashimoto, S., Sakurai, K. and Kobayashi, A. : *Biosci. Biotech. Biochem.* 投稿中。
- 6) Sasaki, M. Nunomura, N., and Mori, N. : *Proc. Annu. Meet. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 130 (1984)。
- 7) Sasaki, M., Nunomura, N. and Matsudo, T. : *J. Agric. Food Chem.*, **39**，934 (1991)。
- 8) 中村欽一：清酒，野白喜久雄他編，醸造の事典，朝倉書店，1988，pp204-222。
- 9) 吉沢 淑：醸協，**75**，451 (1980)。
- 10) 布川弥太郎，高橋康次郎：新版醸造成分一覽，日本醸造協会編，日本醸造協会，pp51-57 (1977)。
- 11) 秋田 修，蓮尾徹夫，原 昌道，吉沢 淑：発酵工学，**66**，149 (1988)。
- 12) 橋本宏司，下田満哉，箆島 豊：日食工誌，**67**，685 (1993)。
- 13) 菅原悦子，伊東哲雄，小田切敏，久保田紀久枝，小林彰夫：農化，**64**，171 (1990)。