

固相マイクロ抽出法を用いた加熱による味噌汁の ヘッドスペース成分変化の解析

菅原悦子, 保坂由貴子

(岩手大学教育学部)

原稿受付平成20年7月14日; 原稿受理平成21年1月10日

Solid-phase Microextraction Analysis of the Headspace Volatiles from Heated Miso Soup

Etsuko SUGAWARA and Yukiko HOSAKA

Faculty of Education, Iwate University, Morioka, Iwate 020-8550

The deterioration in aroma of miso soup by heating was evaluated by analyzing the change in headspace volatiles by the solid-phase microextraction method. The number of flavor components detected by gas chromatography-olfactometry increased when the miso suspension was heated to 80°C, more than 3 times the number at room temperature. However, about 40% of these volatiles could not be detected after heating at 80°C for 3 min. 3-Methyl-1-butanol, one of the main flavor components of miso soup, was greatly decreased at the initial stage of heating. Methional contributed to the aroma degradation, being newly formed and increased by heating at 80°C. 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone (HEMF), which is an important flavor component of miso soup, was decomposed by heating at 80°C, with 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione being identified as the HEMF degradation products.

(Received July 14, 2008; Accepted in revised form January 10, 2009)

Keywords: solid-phase microextraction 固相マイクロ抽出法, miso soup 味噌汁, aroma compound 香気成分, cooked flavor 加熱香気.

1. 緒言

第1報¹⁾では、味噌汁の加熱による香気変化の現象を「食品のための匂い評価用語」を用いて、より具体的、客観的に表現することを試みた。さらに、未加熱および加熱した味噌懸濁液から得られた香気濃縮物をGC-O分析し、AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis)法を用い、FD (Flavor Dilution)-ファクターを求めて各香気成分の加熱による味噌懸濁液への寄与度の変化を明らかにした。その結果、加熱による味噌汁の香気劣化は感知できる香気成分数の減少、未加熱で最も重要な「甘い」香気の4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone (HEMF)の揮発と分解、不快な香気成分の新たな形成、特にmethionalの形成に起因すると推察され、「食品のための匂い評価用語」を用いた官能的評価と機器分析の結果はよく一致した。しかし、前報¹⁾では、加熱味噌懸濁液

の調製条件は実際の調理条件とは大きく乖離しており、特に味噌汁のヘッドスペース (Headspace, HS)を構成する低沸点の化合物は試料調製中にすでに揮発している可能性が高かった。従って、これら成分と香気変化の関連については未だに不明な点が多い。

本研究では前報¹⁾での結果を、実際の調理や我々が食べる場面により近い条件で、特に味噌汁の低沸点成分の変化に焦点をあて検証することを目的とした。これら目的達成のために、本研究にはHS分析を導入することにした。HS分析はヒトが嗅ぐに最も近い条件で香気成分を分析できる方法として有効である。また、本研究ではHS分析法の中から、複雑な装置や操作、溶媒を使用せず、簡単、迅速に試料の抽出・濃縮が行え、オレンジジュースなどのフルーツ飲料²⁾、清酒³⁾、炊飯米⁴⁾など食品の香気成分研究に広く用いられ、よい成果が報告されている固相マイクロ抽出

(Solid-phase Microextraction, SPME) 法を選択した。真部⁵⁾は味噌のにおいと嗜好の関係を明らかにするため、HS-SPME 法を用いて4種の味噌の香り成分を分析し、比較した。しかし、各香り成分の同定や定量は行っていない。本研究では加熱による味噌汁の低沸点成分の変化を明らかにするという目的のため、最適な実験条件の検討⁶⁾を行い導入した。

2. 実験方法

(1) 試料

試料には前報¹⁾と同じ市販を目的に醸造された赤系辛口米味噌を用いた。国産大豆(品種名「ムラユタカ」)、国産破碎精米、食塩、耐塩性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* (商品名「まろい088」)を原料とし、これらを麹歩合6.2(大豆:米=10:6.2)、塩分12.9%の割合で配合し、発酵管理は仕込み後16℃にて20日間、30℃にて70日間、16℃にて30日間順次行った。前報¹⁾では2種類の赤系辛口米味噌を用いたが、両試料の香り成分組成に大きな差はなかったため、本研究では1種類とした。

(2) SPME 分析用試料の調製

1) 味噌懸濁液

味噌5gに蒸留水20mlを添加し、20%味噌懸濁液を調製した。同液15mlを20mlガラスバイアルに入れ、セプタムとアルミニウムキャップで密閉して未加熱味噌懸濁液(以下試料Aとする)とした。さらに、20%味噌懸濁液15mlをバイアルに入れ、80℃の湯浴で3、10、30分間開放加熱を行った後、セプタムとアルミニウムキャップで密閉して加熱味噌懸濁液(以下それぞれ試料B1、B2、B3とする)を調製した。

2) Methionine 添加モデル溶液と methionine 添加味噌懸濁液

Methionine 添加モデル緩衝液(試料C1)は前報¹⁾と同じpH5.0の緩衝液100mlにmethionine 1.13gを添加した。蒸留水100mlに同量のmethionineを添加したmethionine 添加モデル水溶液(試料C2)も調製した。Methionine 添加量は改訂日本食品アミノ酸組成表に記載されている赤系辛口米味噌中のmethionine重量を基礎とし、10%味噌懸濁液に含まれる濃度の100倍とした。また、溶媒を20%味噌懸濁液とし、methionineを同量添加したmethionine 添加味噌懸濁液(試料C3)、methionine 添加量を試料C3の1/10である0.113gとしたmethionine 添加味噌懸濁液(試料C4)も調製した。調製後、それぞれ

の試料液15mlを20mlガラスバイアルに入れ、セプタムとアルミニウムキャップで密閉して使用した。

3) HEMF 添加味噌懸濁液と HEMF 添加モデル溶液

HEMF 添加味噌懸濁液(試料D1)は、100ppmのHEMFを添加した蒸留水で20%味噌懸濁液を調製し、同味噌懸濁液15mlをバイアルに入れ、セプタムとアルミニウムキャップで密閉して調製した。HEMF 添加モデル溶液(試料D2)はmethionine 添加モデル緩衝液と同じpH5.0の緩衝液にHEMFを50ppmとなるように添加して調製し、同液15mlを20mlガラスバイアルに入れ、セプタムとアルミニウムキャップで密閉した。さらに、同液15mlをバイアルに入れ、80℃の湯浴で3、10、30分間開放加熱を行った後、セプタムとアルミニウムキャップで密閉し、それぞれ試料D3、D4、D5とした。

(3) 各試料からの HSV (Headspace Volatiles) の抽出

1) ファイバーの選択

市販されているHS-SPME分析用の4種類のファイバー、PDMS (Polydimethylsiloxane)、CAR (Carboxen)/PDMS、DVB (Divinyl-benzene)/PDMS、Stable Flex DVB/CAR/PDMSを用い、室温(約20℃)および80℃で10分間の平衡時間をおいた後、セプタムにSPMEユニットを貫通させてHSにファイバーを露出し、30分間抽出を行い、加熱脱着後、もとの香気の再現性、およびGC分析結果の比較を行った。

2) 平衡時間および抽出時間

平衡時間の最適条件を決定するため、室温で平衡時間を設けず直接、または平衡時間として10分、あるいは30分経過後セプタムにSPMEユニットを貫通させてHSにCAR/PDMSファイバーを露出し、30分間HSVの抽出を行った。同様に、バイアルを80℃の湯浴にいれ、平衡時間10分あるいは30分経過後30分間抽出を行った。さらに抽出時間の最適条件を決定するため、室温で30分間の平衡時間をおいた後、セプタムにSPMEユニットを貫通させてHSにファイバーを露出し、15分、30分、60分間それぞれHSVの抽出を行い、比較した。

3) 抽出温度

試料は室温または80℃の湯浴で10分間の平衡時間をおいた後、セプタムにSPMEユニットを貫通させてHSにCAR/PDMSファイバーを露出し、それぞれの温度で30分間抽出を行った。室温抽出を試料A1、

80℃抽出を試料 A 2 とする。試料 B 1~B 3, 試料 C 1~C 4 および試料 D 1, D 3, D 4, D 5 は 80℃で 10 分間の平衡時間をおいた後, 同様に 80℃で 30 分間抽出を行った。試料 D 2 は室温で 10 分間の平衡時間をおいた後, 室温で 30 分間抽出を行った。

(4) HSV 全体の香調の確認と GC-O 分析

各条件で各試料の HSV を吸着させた SPME ユニットを 230℃に加熱した炉に挿入し, ファイバーを 5 分間露出させ, 香氣成分を加熱脱着させた。脱着した香氣成分が炉の中に停留しないように窒素ガスを 40 ml/min で流しながらにおいを嗅ぎ, HSV 全体の香調を確認した。さらに, 同様に各条件で HSV を吸着させた SPME ユニットを GC の注入口セプタムに貫通させ, 230℃に設定された GC 注入口内でファイバーを 5 分間露出することにより香氣成分を加熱脱着させ, その後は前報¹⁾と同条件で GC-O 分析を行い, 個々の成分の香調を確認した。

(5) GC および GC-MS 分析

GC 分析および GC-MS 分析においても, GC-O 分析と同様の条件で HSV を加熱脱着させた。GC 分析は同一の試料で 3 回以上繰り返し, ピークエリアの合計値および主要香氣成分のピークエリアの平均値, 標準偏差, 相対標準偏差を求めた。GC-MS 分析では GC 保持時間およびマススペクトルの標準物質または文献値との一致により化合物の同定を行った。詳細な分析条件は前報¹⁾とほぼ同じであるが, GC 分析のオープン温度プログラムは図 1 に示したとおりに, 注入口の温度も 230℃に変更した。

(6) ヘッドスペース中の 3-methyl-1-butanol, 2-phenylethanol および methional の定量

3-Methyl-1-butanol (関東化学製) と 2-phenylethanol (関東化学製) は 1 ppm から 5 ppm まで, methional (Aldrich Chemical 製) は 0.1 ppm から 5 ppm までそれぞれ蒸留水で 4 段階に濃度を調整した。20 ml バイアルに各溶液 15 ml を秤量し, セプタムとアルミニウムキャップで密閉し, 80℃で 10 分間の平衡時間をおいた後, HS に CAR/PDMS ファイバーを露出し, 30 分間抽出を行った。その後, GC 分析を行い, ガスクロマトグラムのピークエリアをもとに検量線を作成し, 得られた回帰式を用いて 3-methyl-1-butanol, 2-phenylethanol, methional の濃度を算出した。

(7) Methional 添加味噌懸濁液の調製と官能検査

20%味噌懸濁液に methional を 1 ppm となるように添加し, methional 添加味噌懸濁液を調製した。こ

れと無添加の 20%味噌懸濁液を 50 ml ずつ湯呑みにそそぎ, 一定温度を保つように冷蔵庫に 1 時間保存した後, 岩手大学教育学部家政科学生 9 名に提供し, オルトナースルなにおいについて, 3 点比較法で検査した。

3. 結果および考察

(1) HS-SPME 法の確立

初めにオートサンプラーを用いた Static Headspace Gas 分析を行ったが, 温度条件等の変更を繰り返しても, 発酵食品特有の ethanol がピークエリア合計値の 80%以上を占め, 目的とする低沸点部の微量成分はほとんど検出することができなかった。そこで, SPME 法の導入を目的として, 使用するファイバーの選択を試みた。SPME ファイバーの選択は GC 分析におけるキャピラリーカラムの選択に類似しており, 分析対象物質をより効率よく抽出, 濃縮するために重要である。DVB/PDMS, Stable Flex DVB/CAR/PDMS, CAR/PDMS の 3 種のファイバーでは抽出温度による香氣成分の抽出量や抽出数の変化を確認することができた。特に CAR/PDMS は目的とする多量の低沸点化合物の検出が可能で, 本研究に最も適するファイバーであると判断された。

次に CAR/PDMS を用い, 平衡および抽出時間を検討した。室温抽出, 80℃抽出で平衡時間なし, 10 分, 30 分と設定し, 抽出時間 30 分で 3 回繰り返し分析を行い, 量的主要成分のピークエリアおよびピークエリア合計値について 3 回の平均値, 標準偏差, 相対標準偏差を求めた。その結果, 両抽出温度で平衡時間がない場合には再現性が悪く, 平衡時間 10 分, 30 分に大差はなかった。抽出時間は室温で 15 分, 30 分, 60 分と設定して同様に 3 回の分析を行い, 同様に処理したところ, 量的主要成分のピークエリアおよびピークエリア合計値はほぼ抽出時間の経過に伴って増加することが判明した。しかし, 増加率は時間経過と直線的な関係ではなく, 試料 (液相), HS (気相), ファイバー (固相) の 3 相間の最終的な分配平衡に近づくにつれて減少し, 抽出時間 60 分は効果的ではなかった。また, 15 分では再現性に問題があった。以上より, 平衡時間は 10 分, 抽出時間は 30 分が適切であると判断した。

(2) HSV の全体的な香りの評価

試料 A 1, A 2, 試料 B 1~B 3 の HSV を平衡時間 10 分, 抽出時間 30 分で CAR/PDMS に吸着させ, そ

の後全体を加熱脱着して、それぞれの HSV 香気の特徴を確認し、未加熱、または加熱により味噌汁本来の香気に変化していない試料、および加熱により香気に変化した試料の特定を試みた。試料 A 1 (室温抽出) では発酵食品に共通する新鮮なアルコールのにおいを感知したが、全体の香気が非常に弱かった。試料 A 2 (80℃抽出) では、質的には試料 A 1 (室温抽出) に近いが強い香気を持ち、一方、「すっぱい」「重い」などのいわゆる「加熱しすぎ」の香気は感知されなかった。従って、試料 A 1 (室温抽出) を未加熱、試料 A 2 (80℃抽出) は加熱による香気変化がなくにおいが強く感じられる状態とすることにした。また、試料 B 1 (80℃3分加熱) は通常私たちが味噌汁を食べる時に感じるにおいにもっとも近く、試料 B 2 (80℃10分加熱) は試料 B 1 (80℃3分加熱) と同様の味噌汁らしいにおいでも感知でき、一方で「加熱しすぎ」の不快なおいには少ないが、全体的に香りが弱かった。試料 B 3 (80℃30分加熱) は、試料 B 2 (80℃10分加熱) と比較すると全体的においが単調で、「加熱しすぎ」の不快なおいになっていた。よって、試料 B 2, B 3 は「加熱しすぎ」で香気に変化した試料とすることにした。

(3) GC-O 分析による感知できた香気成分数の加熱による変動

図 1 に試料 A 1 (室温抽出), A 2 (80℃抽出) のガスクロマトグラムを示した。両者を比較したところ、抽出温度の上昇によって検出できるピーク数や全体的なピークエリアの増加が確認された。さらに、試料 A 1, A 2, B 1~B 3 を GC-O 分析し、各香気成分の香気の特徴を確認した。GC-O 分析により、感知できたにおい数は試料 A 1 (室温抽出) で 12 種、試料 A 2 (80℃抽出) で 41 種であった。両者に共通して感知できたにおいは 11 種、80℃抽出により感じられなくなったにおいは 1 種、80℃抽出により感じられるようになったにおいは 30 種であった。一方、試料 B 1 (80℃3分加熱) で感知できたにおい数は 26 種、試料 B 2 (80℃10分加熱) では 26 種、試料 B 3 (80℃30分加熱) では 27 種であった。試料 A 1 (室温抽出) と A 2 (80℃抽出) の比較により、80℃に加熱することによって感知できるにおい数が 3 倍以上に増加することが判明した。しかし、加熱によって HS 中に多量に揮発した香気成分は開放加熱によって揮発し、試料 B 1 (80℃3分加熱) では試料 A 2 (80℃抽出) の約 40% の成分が感知できなくなった。また、試料 B 2 (80℃10

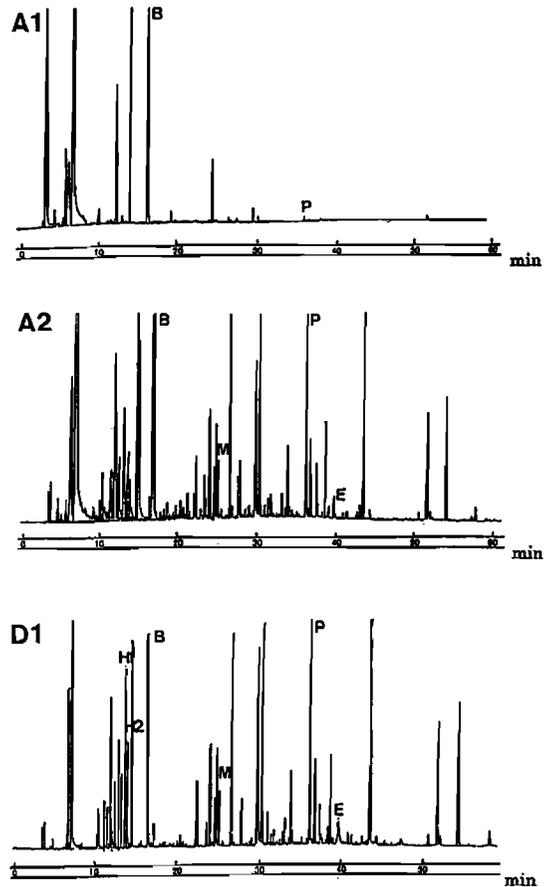


図 1. 味噌懸濁液と HEMF 添加味噌懸濁液の HSV のガスクロマトグラム

Column: HP-INNOWax (30 m × 0.25 mm i.d.), Oven temp.: 40℃→3℃/min→200℃. A 1: 味噌懸濁液室温抽出, A 2: 味噌懸濁液 80℃抽出, D 1: HEMF 添加味噌懸濁液 80℃抽出. B: 3-Methyl-1-butanol, P: 2-Phenylethanol, M: Methional, E: 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone, H 1: 2,3-Hexanedione, H 2: 3,4-Hexanedione.

分加熱), B 3 (80℃30分加熱) で、感知できるにおい数やにおいの質に大きな変化は観察されなかった。以上から、加熱の初期に感知できる香気成分数が大きく減少することが判明した。

(4) 3-Methyl-1-butanol と 2-phenylethanol およびピークエリア合計値の加熱による変動

試料 A 1, A 2, B 1~B 3 を GC および GC-MS 分析し、香気成分を同定するとともに、ピークエリア合計値および味噌の量的主要香気成分であり、低沸点部アルコール類の代表で、ethanol とともにアルコール

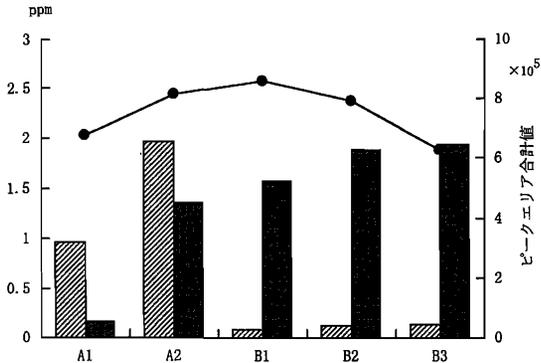


図2. ヘッドスペース中の 3-methyl-1-butanol と 2-phenylethanol の濃度およびピークエリアの合計値の加熱による変動

A 1 : 室温抽出, A 2 : 80℃抽出, B 1 : 80℃ 3分加熱後 80℃抽出, B 2 : 80℃10分加熱後 80℃抽出, B 3 : 80℃30分加熱後 80℃抽出。● : ピークエリアの合計値, ▨ : 3-methyl-1-butanol の濃度, ■ : 2-phenylethanol の濃度。

様の新鮮な香りに寄与する重要な成分として 3-methyl-1-butanol, 同じく量的主要香気成分で中高沸点部に属する代表的成分としてバラ様の香気をもちはなやかな香りに寄与する 2-phenylethanol の HS 中の変動を比較し, 図 2 に示した。両成分の濃度は検量線から回帰式を求め算出した。ピークエリア合計値は 80℃に加熱することによって増加し, 3 分間の開放加熱後も大きな変化はなかったが, 加熱時間が 10 分以上と長くなると減少することが判明した。

3-Methyl-1-butanol の濃度は試料 A 1 (室温抽出) では 0.96 ppm で, 試料 A 2 (80℃抽出) では約 2 倍の 1.96 ppm に増加したが, 試料 B 1 (80℃ 3分加熱) では 0.08 ppm でほとんどが揮発し, 消失した。これに対し, 2-phenylethanol の濃度は試料 A 2 (80℃抽出) で 1.35 ppm, 試料 B 1 (80℃ 3分加熱) で 1.57 ppm と開放加熱による影響をほとんど受けなかった。

(5) Methional の加熱による変動

前報¹⁾においては加熱による味噌汁の香気変化への寄与度が高いと判断された methional は, HS-SPME 法による GC-O 分析でも「硫黄くさい, 加熱したじゃがいも様」と評価された。試料 A 1, A 2, B 1~B 3 の methional 濃度を回帰式から算出し, 図 3 に示した。Methional は試料 A 1 (室温抽出) では検出されなかったが試料 A 2 (80℃抽出) では 0.13 ppm 検出され, 試料 B 1 (80℃ 3分加熱), B 2 (80℃10分加熱) で 0.05 ppm と一旦減少するが, 試料 B 3 (80℃30分加

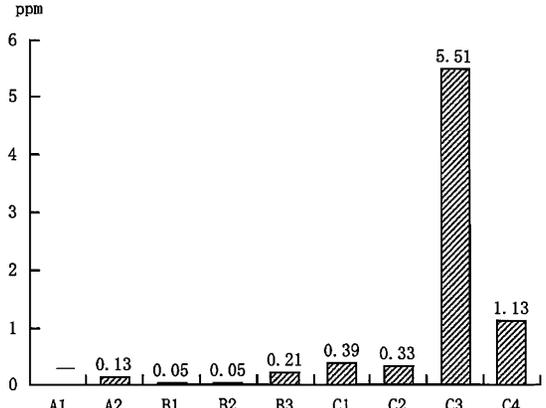


図3. 加熱による methional 添加溶液のヘッドスペース中の methional 変動

A 1, A 2, B 1, B 2, B 3 : 図 2 参照, C 1 : 1.13% methional 添加モデル緩衝液 80℃抽出, C 2 : 1.13% methional 添加モデル水溶液 80℃抽出, C 3 : 1.13% methional 添加味噌懸濁液 80℃抽出, C 4 : 0.113% methional 添加味噌懸濁液 80℃抽出。

熱) では 0.21 ppm まで増加した。Methional の閾値は 0.2 ppb と報告されており⁷⁾, 加熱による味噌汁の香気劣化に明らかに寄与することが確認された。

試料 A 1, A 2 と試料 B 1~B 3 から, methional に加えて 8 種類のアルデヒド化合物 (3-methyl-1-butanol, 2-butenal, furfural, 5-methyl-2-furfural, hexanal, 2-hexenal, 2-heptenal, nonanal) が同定され, 開放加熱時間の延長によりこれら成分は増加することが確認された。特に, GC-O 分析において「くさい, むせるような, 発酵臭」と評価された 3-methyl-1-butanol やアーモンド様の香気をもつ furfural⁸⁾ の増加が著しいことが確認された。3-Methyl-1-butanol は味噌には比較的多く存在する脂肪族アルデヒドであり, 加熱により著しく増加することがすでに報告されている⁹⁾ さらに, hexanal, 2-hexenal, 2-heptenal は同じ SPME 法による植物油の劣化度判定試験において, 植物油の保存中に自動酸化によって発現する香気劣化への寄与の高い化合物であると報告されている¹⁰⁾。味噌汁中でも加熱酸化によって生成し, 味噌汁の香気変化に寄与していると考えられた。

以上, ピークエリア合計値および 3-methyl-1-butanol, 2-phenylethanol, methional の加熱による濃度の変動から, 味噌懸濁液は 80℃に加熱されることによって感知できる成分が多くなり, においを強く感じられるようになるが, 80℃の開放加熱によって,

ethanolとともに新鮮な香りに寄与し、低沸点部アルコール類の代表である 3-methyl-1-butanol が極めて短時間に減少し、香気のパランスが大きく変化することを確認した。また、「不快なおい」をもつ methional をはじめとするアルデヒド類が加熱直後から増加した。従って、味噌懸濁液は加熱されることによって、相対的に「不快なおい」になると判断された。

(6) Methionine 添加モデル溶液と methionine 添加味噌懸濁液の加熱による methional の生成

前報¹⁾で methional は methionol からの生成物ではないことが判明し、methional の生成経路は不明であった。一方、methional は methionine を前駆物質としてアミノカルボニル反応に伴うストレッカー分解によって生成されることが報告されている¹¹⁾。そこで、methionine 添加モデル溶液と methionine 添加味噌懸濁液を 80℃に加熱し、GC、GC-O 分析による HS 中の methional の確認と濃度を算出し、結果を図 3 に示した。試料 C1 (methionine 添加緩衝液)、C2 (methionine 添加水溶液) には、10%味噌懸濁液に含まれる 100 倍量の methionine を添加したにもかかわらず methional の生成量は最大でも 0.39 ppm と少量であったが、加熱したじゃがいも様の不快臭は強く感じられた。一方、試料 C3 (methionine 添加味噌懸濁液) では、試料 C1 (methionine 添加緩衝液) の約 14 倍の 5.51 ppm、methionine 添加量を 1/10 とした試料 C4 (methionine 添加味噌懸濁液) からも 1.13 ppm と約 3 倍確認された。従って、加熱により味噌懸濁液中に増加する methional は methionine を前駆物質としたアミノカルボニル反応生成物である可能性が高く、味噌懸濁液には米麹由来のブドウ糖をはじめとする糖類が多量に存在するために、この反応が促進されると考えられる。また、検出された methional は不安定で反応性に富むため、さらに二次的に分解し、不快臭をもつ methanethiol と 2-propenal となることが報告されているが¹¹⁾、これらは高揮発性成分であるため、本研究では検出されなかった。

(7) Methional 添加味噌懸濁液の官能検査

試料 A2 (80℃抽出) の HS 中の methional は 0.13 ppm、10%味噌懸濁液に含まれる methionine 濃度の 10 倍量を添加した試料 C4 の HS 中の methional は 1.13 ppm であった。そこで、HS 中の methional 濃度が 0.1-1 ppm の範囲で、加熱した味噌汁を再現できると考え、1.0 ppm の methional を味噌懸濁液へ直接添加した。Methional 添加および無添加の味噌懸濁液

のオルトナーサルなにおいについて、3点比較法による官能検査を実施したところ、パネル全員が両者を識別することができ、methional 添加味噌懸濁液は「むかつくる」「硫黄くさい」「じゃがいもや大根の入った味噌汁のにおい」「鼻に残る刺激臭」のような不快臭と評価された。よって methional が一定量以上味噌懸濁液に存在すると香気劣化の原因となることが官能検査からも明らかとなった。

(8) HEMF 添加味噌懸濁液と HEMF 添加モデル溶液における HEMF の分解

前報¹⁾における AEDA 法の FD-ファクターから、HEMF は未加熱懸濁液の甘い香気に大きく寄与するが、加熱によってその寄与度が低下すること、さらに HEMF の濃度は、未加熱懸濁液では 24 ppm であったが加熱後 9 ppm となり約 62%減少することが判明し、揮発に加えて、分解し新たな成分が形成される可能性もあることが示唆された。一方、HS-SPME 法では HEMF は少量しか検出できず、その濃度の変動は解明できないが、HEMF 分解生成物はより低沸点な成分であり、同定や変動の解明は可能であると考えた。よって、その変動をより明確にするため、HEMF 添加味噌懸濁液と HEMF 添加モデル溶液を調製した。図 1 に試料 D1 (100 ppm HEMF 添加味噌懸濁液 80℃抽出) のガスクロマトグラムを示した。試料 A2 (HEMF 無添加味噌懸濁液 80℃抽出) と比較すると、試料 D1 では HEMF 分解生成物と推定される 2 種の大きなピークが検出され、GC-MS 分析、および標準品とのリテンションタイムの一致により、2,3-hexanedione、3,4-hexanedione と同定された。一方、試料 A2 (80℃抽出)、試料 B1 (80℃3分加熱) からも少量の 2,3-hexanedione が確認された。また、GC-O 分析で 2,3-hexanedione は「すっぱい、生ゴミ」のような不快臭として感知され、3,4-hexanedione は特徴的な香気が弱かった。2,3-Hexanedione は清酒や酢において一定量以上含まれると特有のツワリ香を生じる成分で¹²⁾あると報告されている。

試料 D2 (50 ppm HEMF 添加モデル溶液室温抽出)、試料 D3 (50 ppm HEMF 添加モデル溶液 80℃3分加熱後 80℃抽出)、D4 (50 ppm HEMF 添加モデル溶液 80℃10分加熱後 80℃抽出)、D5 (50 ppm HEMF 添加モデル溶液 80℃30分加熱後 80℃抽出) から検出された 2,3-hexanedione と 3,4-hexanedione のピークエリアの合計値と、検出された全体のピークエリア合計値の変動を図 4 に示した。試料 D2 では 2,3-

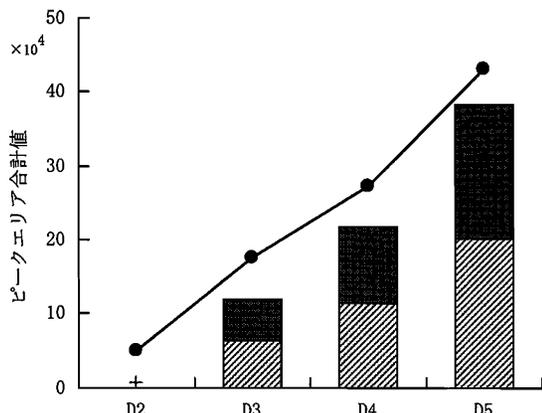


図4. 加熱によるHEMF添加モデル溶液のピークエリア合計値および生成した3,4-hexanedioneと2,3-hexanedioneのピークエリアの変化

D2: 室温抽出, D3: 80℃3分加熱後80℃抽出, D4: 80℃10分加熱後80℃抽出, D5: 80℃30分加熱後80℃抽出. +: trace, ●: ピークエリアの合計値, ▨: 3,4-hexanedioneのピークエリア, ■: 2,3-hexanedioneのピークエリア.

hexanedioneと3,4-hexanedioneはきわめて少量しか検出されなかったが、試料D3～D5ではピークエリア合計値の増加は2,3-hexanedioneと3,4-hexanedioneのピークエリア増加と一致し、HEMFは加熱時間が長くなるにつれて分解し、多量の2,3-hexanedioneと3,4-hexanedioneを生成することが示唆された。一方、HEMFと類似の構造をもつ4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF)のpH 5.1, 0.05 mol水溶液を160℃30分加熱した場合、一次分解物として生成したacetaldehydeとhydroxyacetoneからアルドール縮合して2,3-pentanedioneが生成すると報告されている¹³⁾。HDMFの加熱分解による2,3-pentanedioneの生成経路を参考にすると、HEMFの加熱分解による2,3-hexanedioneと3,4-hexanedioneの生成は、前者がpropanalと1-hydroxy-2-propanoneを中間体とし、後者がacetaldehydeと1-hydroxy-2-butanoneを中間体とし、それぞれ縮合すると推定されたが、本研究ではこれら中間成分は確認できなかった。HEMFは互変異性体であり、HDMFと比較すると、かなり複雑に分解し、生成する分解物も多種類になると考えられ、両成分の生成経路についてもさらに検討する必要がある。また、2,3-hexanedioneや3,4-hexanedioneの閾値や生成量を明らかにし、味噌汁の加熱による香気劣化への寄与をより明確にする必要がある。

以上より、味噌に含まれているHEMFは加熱により分解し不快臭をもつ2,3-hexanedione等へ変化していることが示唆された。

4. 要 約

(1) 味噌懸濁液のHS-SPME分析には、CAR/PDMSファイバーを用い、平衡時間10分、抽出時間30分が最適であると判断された。

(2) 味噌懸濁液は80℃に加熱されることによって感知できる香気成分数が室温の3倍以上に増加することが判明した。しかし、これら香気成分は80℃加熱3分で約40%が感知できなくなった。

(3) 味噌の量的主要香気成分であり、新鮮な印象を与える低沸点の重要な成分3-methyl-1-butanolは加熱初期に大きく減少することが確認された。

(4) Methionalは未加熱味噌懸濁液では検出されなかったが、80℃加熱で同定され、加熱の継続で増加した。

(5) Methionine添加モデル溶液およびmethionine添加味噌懸濁液を80℃に加熱したところ、両系でmethionalが同定され、生成量は味噌懸濁液の場合が多かった。加熱により増加するmethionalはmethionineを前駆物質としたアミノ-カルボニル反応生成物である可能性が高く、味噌懸濁液には米麴由来のブドウ糖をはじめとする糖類が多量に存在するために、この反応が促進されると考えられる。

(6) 1 ppmのmethional添加味噌懸濁液は無添加味噌懸濁液と官能検査により明らかに識別され、不快なにおいをもつと評価された。

(7) HEMF添加味噌懸濁液を80℃に加熱したところ、HEMF分解物として2,3-hexanedioneと3,4-hexanedioneが同定され、GC-O分析により前者は不快臭として感知された。両成分は加熱時間が長くなると増加し、加熱による味噌汁の香気変化に影響を及ぼすことが示唆された。

終わりに臨み、本研究は文部科学省科学研究費の補助(課題番号12680123)を受けて行いました。深く感謝します。

引 用 文 献

- 菅原悦子, 保坂由貴子: 加熱による味噌汁の香気成分の変化, 家政誌, **60**, 453-459 (2009)
- Bazemore, R., Goodner, K., and Rouseff, R.: Volatiles

- from Unpasteurized and Excessively Heated Orange Juice Analyzed with Solid Phase Microextraction and GC-Olfactometry, *J. Food Sci.*, **64**, 800-803 (1999)
- 3) 宇都宮仁：ヘッドスペース固相マイクロ抽出法による清酒中の遊離脂肪酸高級アルコール・エステルの分析, *醸協*, **94**, 252-257 (1999)
 - 4) Grimm, C. C., Bergman, C., Delgado, J. T., and Bryant, R.: Screening for 2-Acetyl-1-pyrroline in the Headspace of Rice Using SPME/GC-MS, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 245-249 (2001)
 - 5) 真部真里子：においが嗜好に及ぼす影響—味噌の嗜好調査から—, *家政誌*, **57**, 21-29 (2006)
 - 6) Jia, M., Zhang, Q. H., and Min, D. B.: Optimization of Solid-Phase Microextraction Analysis for Headspace Flavor Compounds of Orange Juice, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 2744-2747 (1998)
 - 7) Guadagni, D. G., Buttery, R. G., and Turnbaugh, J. G.: Odor Thresholds and Similarity Ratings of Some Potato Chips Compounds, *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 1435-1444 (1972)
 - 8) 日本香料協会(編)：『香りの総合事典』, 朝倉書店, 東京, 243-244 (1999)
 - 9) 本間伸夫, 渋谷歌子, 石原和夫, 岡田玲子：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 (1973)
 - 10) Henryk, H. J., Malgorzata, O., Renata, Z.-W., and Erwin, W.: Headspace Solid-Phase Microextraction Use for Characterization of Volatile Compounds in Vegetable Oils of Different Sensory Quality, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2360-2367 (2000)
 - 11) 奥村丞司：メイラード反応とフレーバー生成, *醸協*, **88**, 178-187 (1993)
 - 12) 吉沢 淑：醸造飲食品とニオイ—清酒の高級アルコール・エステル, *醸協*, **75**, 451-457 (1980)
 - 13) Shu, C. K., Mookherjee, B. D., and Ho, C.-T.: Volatile Components of Thermal Degradation of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone, *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 446-448 (1985)