

味噌香気成分の探索

味噌の香気成分の分離同定の研究成果はこれまでも幾つか報告されているが、常に気になるのは、これらの分離同定された成分が生味噌あるいは加温した味噌汁のそれと同じであるかという疑問である。著者は幾つかの手法を比較し、非加熱のカラム吸着法によって従来の手法で見られなかった重要な香気成分を見出した。まだ研究は継続中であるが、これまでの成果を中心に解説していただいた。

菅原悦子

1. はじめに

味噌の香気については多くの研究¹⁻⁴⁾があり、1987年本間⁵⁾が本誌に200種に近い化合物の存在を報告した。しかし、味噌に検出された香気成分はほとんどすべてが他の食品にみだされておられ、味噌独特の特徴を示す香気成分は認められていない。また、これら多種類の香気成分の中でも味噌の香気への寄与の高い成分も特定できていない。本間は味噌独特の特徴を持つ化合物は存在するのか、あるいは多種類のポピュラーな成分が混じりあって味噌の香気を形成していると言い切れるかが今後の課題であると述べている。これに比較して、味噌と並ぶ日本の伝統的な大豆発酵食品である醤油の香気成分についてはその特有香気成分(Character Impact Compound)も明らかにされるなど詳細で多様な研究⁶⁻⁸⁾がなされている。味噌にとって香りは醤油と同様、その品質に重要な価値を持つにも関わらず、醤油に比較して香気解明がなかなか進まない。この理由を考えてみると、醤油は均一の水溶液であって比較的香気成分の捕集も簡単であるのに対し、味噌は半固形状であり、固体やコロイド成分による香気物質の吸着などがある。このような味噌の性状が香気成分研究上の問題点となっている。そこで我々はそれを克服し、味噌の香気成分研究に適した分離濃縮方法について検討し、その一部については既に報告した⁹⁾。本稿ではその研究をもとに味噌の香気濃縮物の調製方法、即ち、分離濃縮方法に焦点を絞り、その方法を用いた際の味噌香気成分の分析結果とともに解説する。一般的な食品香気成分の分析については本誌に小林の解説¹⁰⁾があり、以下の方法の香気研究に占める位置についてはその文献を参照されたい。

2. 味噌の香気物質研究上の問題点

香気物質の研究では微量しか存在しない成分をいかに

効率よく、しかももとの食品の香気を変化させずに取り出すかが課題である。ところが、味噌は水分の比較的多い半固形状で、水を加えるとコロイド状となる。そのため、微量の香気成分はコロイド成分への吸着などにより取り出すことは極めて困難である。さらに日常、煮過ぎたり、煮返しをした味噌汁は風味が悪くおいしくないという経験は誰もが持っていると思われるが、このように味噌懸濁液は加熱すると容易に香気に変化する。これは香気濃縮物を調製する段階でなんらかの加熱操作があると香気に変化してしまうということを意味している。これらが味噌の香気解明を遅らせていた主な原因と考えられる。従って味噌の香気を研究するには、これら香気物質研究上の問題点を克服した分離濃縮方法の確立が重要な課題である。

また、味噌は原料の大豆、米、麦の処理加工、原料配合、熟成管理(加熱、添加物、製造期間)などによって多くの種類があり香気特性も多岐にわたっている。このような種類による香気の違いを適正に再現できること、つまり、できる限りもとの香気そのままを取り出すことが特に味噌の香気全般を解明する上では重要な課題である。従って、それぞれの分離濃縮方法で得られた香気濃縮物の香気再現性について官能検査等を実施して比較することも必要である。

3. 味噌香気成分の分離濃縮方法の比較

香気成分の分離濃縮方法は目的によっていくつかあるが、味噌の香気研究の場合には先に述べたような問題点があるのでこれらを考慮して、以下に述べる連続水蒸気蒸留抽出法、減圧水蒸気蒸留法、ポーラスポリマーを用いたカラム濃縮法の3法をとりあげ比較することにした。

これらの調製方法により得られた香気濃縮物はもちろんもとの香気特性は持っているが、それぞれ多少異なっ

Search for Aroma Components of Miso
Etsuko SUGAWARA (Faculty of Education, Iwate University)

第1表 各分離濃縮方法による味噌香气成分の比較^{a)}

化 合 物	SDE法E	SDE法D	減圧法	カラム法
脂肪族アルコール				
ethanol	+	+	+	+
1-propanol	3.16	-	0.08	-
2-methyl-1-propanol	6.39	0.84	1.31	0.43
1-butanol	7.24	1.02	3.99	0.71
3-methyl-1-butanol	18.91	4.22	4.98	1.74
1-pentanol	-	0.04	-	-
1-hexanol	0.10	-	-	-
2-heptanol	-	-	-	+
3-octanol	0.04	-	-	-
脂肪族アルデヒド				
2-methylbutanal	+	+	+	-
3-methylbutanal	+	+	-	0.08
myrtenal*	-	-	-	+
脂肪族ケトン				
2-methyl-3-pentanone	-	-	-	0.35
3-hydroxy-2-butanone	-	-	-	+
脂肪族エチルエステル				
ethyl acetate	0.95	-	-	+
ethyl propanoate	+	-	-	+
ethyl butanoate	+	-	-	+
ethyl hexanoate	0.02	0.21	-	+
ethyl octanoate	0.19	0.03	-	0.08
ethyl tetradecanoate	0.57	0.50	0.20	+
ethyl pentadecanoate	0.34	0.05	0.03	-
ethyl hexadecanoate	7.03	0.21	1.68	2.63
ethyl octadecanoate	-	+	+	+
ethyl (Z)-9-octadecenoate	+	6.01	0.99	2.27
ethyl (Z, Z)-9, 12-octadecadienoate	9.45	8.12	1.57	3.41
ethyl (Z, Z, Z)-9, 12, 15-octadecatrienoate	11.22	0.87	-	+
その他のエステル				
butyl acetate	0.63	-	-	+
2-methylpropyl acetate	+	-	-	+
2-methylbutyl acetate	+	0.16	-	-
1-hexyl acetate	-	-	-	0.03
methyl 2-methylpropanoate	+	0.03	-	-
methyl hexadecanoate	-	0.21	-	-
カルボン酸				
acetic acid	0.28	-	-	0.08
3-methylpropanoic acid	-	-	-	0.02
pentanoic acid	-	-	-	0.20
hexanoic acid	-	-	-	0.24
芳香族化合物				
2-phenyl-1-ethanol	2.06	0.40	0.77	1.09
benzaldehyde	0.22	0.11	0.35	-
phenylacetaldehyde	+	0.04	0.07	-
2-phenyl-2-butenal	0.18	0.24	0.20	+
methyl phenyl ketone	-	-	-	+
ethyl benzoate	7.43	3.10	0.44	+
ethyl phenylacetate	0.15	0.05	0.04	+
2-phenylethyl acetate	0.15	0.06	0.06	-
phenol	-	-	0.05	-
benzoic acid	-	-	-	0.13

化 合 物	SDE 法E	SDE 法D	減 圧 法	カラム法
フラン化合物				
furfuryl alcohol	0.01	—	—	0.06
furfural	1.39	0.59	0.05	+
5-methyl-2-furfural	0.28	0.19	0.04	—
acetylfuran	0.04	—	—	—
2-ethyl-3-hydroxyfuran*	0.12	—	—	—
含窒素あるいは含硫化化合物				
2-acetylpyrrole	0.26	0.11	—	0.12
4-hydroxypyrimidine*	+	—	—	—
3-methylthiopropanol	0.14	+	—	0.04
2-ethoxythiazol*	0.11	0.01	0.07	+
その他				
maltol	—	—	—	2.14
2,5-dimethyl-4-hydroxy-3 (2H)-furanone	—	—	—	0.11
3-methyl-2 (5H)-furanone*	—	—	—	0.04
undecane	—	—	—	+
naphthalene	—	—	—	+
2-methyl-1-octene*	—	+	—	—

a) : 生味噌中の ppm.

* : MS のみで推定された化合物。

SDE 法E : エーテルによる連続水蒸気蒸留抽出法。

減圧法 : 減圧水蒸気蒸留法。

SDE 法D : ジクロロメタンによる連続水蒸気蒸留抽出法。

カラム法 : ポーラスポリマーを用いたカラム濃縮法。

GC : 島津 GC-14 A 型ガスクロマトグラフ。検出器 : FID, カラム : 化学結合型シリカキャピラリーカラム

DB-WAX (φ 0.25 mm×30 m, 0.25 μm film), オープン温度 : 40°C (5min hold)→200°C(3°C/min), キャリヤガス : He, カラム内流速 0.8 ml/min, ピーク面積計算は島津クロマトパック C-R 2 A によった。

GC-MS : HITACHI G 3000 ガスクロマトグラフ直結 HITACHI M-2000 マススペクトロメーター。イオン化電圧 : 70 eV, カラム : 化学結合型シリカキャピラリーカラム Supelco wax 10 (φ 0.25 mm×30 m, 0.25 μm film), オープン温度 : 40°C (5min hold)→200°C (3°C/min), MS データ処理 : HITACHI M-0201 形システム。

ている。そこでこれらの香気特性が定性的にどのような化合物で説明できるか、または各成分の定量的な組成の相違で説明されるのかを考察することによって、それぞれの分離濃縮方法の相違がより明確になる。一般に香気濃縮物はガスクロマトグラフィ (GC) 及び GC-マススペクトロメトリー (MS) 分析を行って、その中に存在する香気成分を同定または推定する。また、香気濃縮物を調製する際、内部標準物質を添加することによってそのガスクロマトグラム上のピーク面積との比から各香気成分の含量を定量することができる。味噌の香気濃縮物もこのような方法で分析した。その結果、同定または推定された化合物を官能基別に分類し、また各成分の定量値は生味噌の重量に対する濃度を ppm 単位で計算して第 1 表に示した。第 1 表をもとに味噌の香気研究における各分離濃縮方法の特徴を考察することができる。

試料とする味噌は香気が強感じられるほうが分析しやすい。また、試料にするためには防湧剤としてエタノールが添加されていると香気成分は効率よく捕集することができないということもあり、製造方法等が明確に把握できなければならない。そこで一般的な米味噌で、香

気が比較的強く感じられる仙台味噌を製造会社 (仙台味噌株式会社) より直接提供していただいて使用した。仙台味噌との対照として岩大味噌 (岩手大附属農場で生産された、一部豆麴を用いた特殊な米味噌) を用いた。岩大味噌は仙台味噌よりも香気は弱い一部豆麴が入っているということで香気の特徴もかなり異なっており、この 2 種類を供試試料とすることによって、それぞれの分離濃縮方法の相違がより明確になると考えられる。本稿では仙台味噌の分析結果のみでも十分、分離濃縮方法の比較はできるので岩大味噌の分析結果は省略した。

(1) 連続水蒸気蒸留抽出法

現在、香気成分の分離抽出方法として広く利用されているのは連続水蒸気蒸留抽出法 (以下 SDE 法と略す) である。少量の抽出溶媒で効率よく香気成分を抽出できるという利点があり、現段階では最も優れた方法の一つといわれている。しかしながら、この方法では従来より行われている水蒸気蒸留法と同様に操作中に加熱香気の生成が避けられない。さらには、水あるいは糖をはじめとする共存成分に対して親和性の高い成分の回収が十分とはいえず、特に含アルコール試料には適応不可能であ

り、界面活性剤の存在も操作を困難にするといわれている¹¹⁾。我々が味噌の香気成分の研究に用いた SDE 装置は Likens-Nickerson 型と呼ばれるものであり、これに、味噌に蒸留水を加えた 20% の懸濁液を入れ、常圧下試料フラスコ内 98~99°C で 3 時間抽出した。抽出溶媒にはエーテルとジクロロメタンを用いて比較した。各抽出液に各成分の定量を目的として内部標準物質を加え、無水硫酸ナトリウムで脱水後、常圧にて蒸留濃縮し香気濃縮物を調製した。

得られた香気濃縮物はどちらも味噌様の香気を持っていたがエーテル抽出のほうが香りが強いことがわかった。また、加熱による香気の変化も感じられた。

SDE 法で得られた香気濃縮物の GC および GC-MS 分析の結果から、この方法での量的な主要成分は低級の脂肪族アルコール類、芳香族のアルコール、アルデヒド、エステル類であることがわかった。また、加熱香気の代表的な成分である、フラン化合物が 4 種と 2-Acetylpyrrole が同定され、蒸留中に加熱香気が生じたのではないかと推定された。

(2) 減圧水蒸気蒸留法

(1) の欠点と考えられる加熱による香気への影響を少なくするために減圧下での水蒸気蒸留法（以下減圧法と略す）が広く行われている。この方法では多量の水留溶液から微量の香気成分を抽出しなければならない。そのため、多量の有機溶媒を用いなければならない、操作時間も長いという欠点がある。しかしながら、味噌の香気濃縮物の調製には加熱の影響が少ないということは大きな利点と考えられるので、この方法でも香気濃縮物を調製した。即ち、味噌に蒸留水を加えた 20% 懸濁液を試料として、これをロータリーエバポレーターで回転しながら、40°C の湯浴上 43 mmHg の減圧下で蒸留を行い、留出液は氷-食塩で冷却したトラップ管で捕集した。塩析後香気成分をエーテルで抽出した。エーテル抽出液を常法どおり処理し香気濃縮物を得た。得られた香気濃縮物は味噌様の香気は持っていたが、特有のしつこさのない軽いにおいであった。

GC 及び GC-MS による分析結果から、検出された成分には SDE 法と大きな差はないことがわかった。また、検出された成分のほとんどが定量的に SDE 法より低く、特に高沸点部の成分が低いことが特徴的であった。得られた香気濃縮物のにおいが軽くしつこさがないという結果を裏付けていた。一般にこの方法では高沸点部の香気成分の回収はあまりよくないが、低沸点部の回収は優れている。味噌の香り立ち、いわゆるトップノートに関与する成分の回収が SDE 法よりよいのではないかと期待していたが、このような結果になった。その原

因の一つは蒸留液の冷却方法にあると考えられ、これは液体窒素等の強力な冷媒を用いることによって改良される。この方法では SDE 法で検出されたフラン化合物や 2-Acetylpyrrole の加熱香気の代表的な成分は不検出あるいは、検出されても定量的に低く、加熱による影響は SDE 法よりは少ないと考えられる。

(3) カラム濃縮法

加熱操作がなく、水溶液中の香気成分を回収できる方法としてポーラスポリマーを用いるカラム濃縮法（以下カラム法と略す）がある。この方法では共存成分の影響を受けにくく、しかも操作が簡単で特殊な装置を必要としないなどの利点をもっている¹¹⁾。市販のポーラスポリマーは極性、構造を含めて多種多様であるが、通常香気成分の濃縮にはガスクロマトグラフィー用の充填剤として知られる Porapak Q や Tenax GC が用いられている。両者とも香気成分の捕集においてその吸着性には大きな差は認められないが、前者のほうが表面積が 30~40 倍大きいので、処理能力が高いという報告¹²⁾もある。これらポーラスポリマーは前処理として精製を十分行い、これらポリマー由来の不純物が香気濃縮物中に検出されないように注意を払うことも重要である。味噌の香気濃縮物調製においては加熱による影響が全くないということは大きな利点である。そこで以下のようにして味噌香気濃縮物を調製した。味噌に蒸留水を加え 20% 懸濁液を調製後、冷却遠心分離した。この上澄液を試料とし、精製した Porapak Q 吸着剤を充填したガラスカラム（内径 1 cm×高さ 11 cm）に 1 ml/min の流速で流し、香気成分を吸着剤に吸着させた。吸着された香気成分はエーテルで溶出させ、常法どおり処理して香気濃縮物を得た。この香気濃縮物は最も味噌のにおいに近かった。

カラム法は揮発成分の蒸留を行わない点で他の 2 法とは異なるため、GC 及び GC-MS 分析で検出された成分に大きな相違があった。この方法でのみ検出された成分は仙台味噌で 15 種あり、さらに HDMF (2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3 (2H)-furanone) を含む 5 種の成分を味噌から初めて同定することができた。一方、量的主要成分は SDE 法や減圧法では全く検出されない Maltol であった。そこで SDE 法とカラム法で Maltol の回収率を比較した。即ち、SDE 法では Maltol, 225 mg を蒸留水 1,517 ml に添加した溶液を味噌懸濁液の場合と同様に処理した。カラム法では Maltol, 27.5 mg を蒸留水 272.5 ml に添加し、同様に処理した。その結果、カラム法の回収率は 48.0% であるのに対し SDE 法は 0.1% であり、両方法に大きな開きがあることが判明した。また、SDE 法では不検出であった低級の脂肪

酸がカラム法では3種検出された。SDE法では水あるいは水溶液中の共存成分に対して親和性の高い成分の回収が悪いといわれている¹⁴⁾。カラム法ではこのような影響が少ないために Maltol や低級の脂肪酸の回収が優れていたと考えられる。

カラム法では操作中に加熱や、加温することがないので加熱香氣成分は検出数も少なく、あっても極めて少量であった。この方法は加熱による香氣成分の生成がないという点で優れている。

SDE法で量的主要成分であった低級脂肪族アルコール類と芳香族のアルコール、アルデヒド、エステルはカラム法では不検出または定量的に低い値を示した。これら低級脂肪族アルコール類、芳香族化合物はSDE法の操作中に生じたとは考えにくく、味噌香氣成分として存在しており、これら成分の回収に関してはSDE法より劣っていることがわかった。これは味噌懸濁液中のたんぱく質がこれら香氣成分のポーラスポリマーへの吸着を阻害しているためではないかと考えられる。

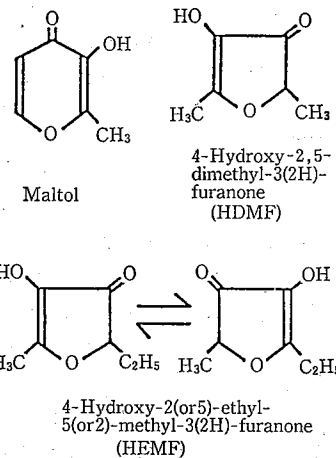
下田ら¹⁵⁾は市販のビールの香氣成分の濃縮にポーラスポリマーカラム法と減圧連続蒸留抽出法を比較し、前者が酸性およびフェノール性画分、塩基性画分の回収に優れ、任意に選ばれたピークの再現性もよかったと報告している。味噌の香氣濃縮においてもほぼ同様な結果であった。

4. 味噌香氣濃縮物の収率と官能検査による再現性の比較

香氣成分は食品中極めて少量しか存在しないので、いかに効率よく取り出すことができたかということは実験操作上重要なことである。これは香氣濃縮物の収率を比較することによってほぼ把握することができる。さらに、もとの香氣を変化させずに取り出すことができたということも味噌の香氣の全貌を明らかにする上で必要である。これは官能検査による味噌の香氣の再現性の比較から判断できる。このような結果も味噌香氣成分の研究に適した方法を総合的に判断する際の要因になる。

上記の方法で得られた香氣濃縮物の収率はカラム法が最も高く95 mg/生味噌100 g、以下SDE法のエーテル抽出15 mg/100 g、SDE法のジクロルメタン抽出11 mg/100 g、減圧法12 mg/100 gであった。SDE法と減圧法では香氣濃縮物の収率において差はなく、カラム法は揮発成分の蒸留を行わないので香氣濃縮物の収率も高く、効率がよいことがわかった。

仙台味噌から得られた4種の香氣濃縮物について、もとの味噌の香氣特性に最も近い香氣濃縮物を1位とする順位法での官能検査を実施し、香氣の再現性を比較し



第1図 味噌で同定された甘い香氣成分

た。クレーマーの検定により有意差を判定したところ、カラム法が他の方法よりも5%の危険率で有意にもとの香氣に近いことが判明した。味噌香氣の再現性でもカラム法が優れていることが、全体を比較する官能検査でも明らかとなった。

5. 味噌香氣成分としてのHEMFの単離

以上種々の点から総合的に判断すると、カラム法が味噌の香氣成分研究には非常に有効であると考えられる。しかし、SDE法が回収率が優れている香氣成分も多くあり、併用して多面的に解析すると、より効果的であることが判明した。そこでカラム法とSDE法を併用して種々の味噌の香氣成分の組成の違いを明らかにし、さらに同じ味噌について嗜好検査も実施することによって嗜好を高めるのに重要な香氣成分を特定することができると考えた。そこで米味噌2点と特殊な米味噌1点、豆味噌1点を試料として比較検討し、その結果については現在投稿中¹⁴⁾である。この時、味噌にとって甘い香氣は好ましさの重要な要素であり、これにはMaltolやHDMF(第1図)が寄与するのではないかとということが明らかとなった。しかし、Maltolは試料としたすべての味噌に共通して同定され、ともに量的な主要成分で好まれた味噌に特に多くはなかった。HDMFも共通して同定され、しかも極めて少量であった。従って味噌の甘い香氣に寄与する成分は他にも存在すると考えられた。そこで味噌の好ましい香りに重要な役割を持つ甘い香氣成分を明らかにするために、カラム法を用いてさらに詳細に検討した。その結果、新たにHEMF(4-Hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone)を同定することができた¹⁵⁾。先に述べたMaltolやHDMFとともに第1図にその構造式を示した。HEMFは強く甘い香

気を持ち、濃度によって醤油様の芳香を強く感じる醤油の特香成分 (Character Impact Compound) であり、他の醸造食品では検出されておらず、醤油では酵母によって生産される特殊な化合物であると報告されている⁹⁾。従って味噌においても酵母によって生産されている可能性は高く、味噌の香気にとっても極めて重要な役割を持つと考えられる。

HEMF 含量の少ない味噌懸濁液に HEMF を添加して無添加のものと官能検査をして比較することによって HEMF の味噌香気への寄与をより明確にすることができる。カラム法により種々の米味噌の HEMF の定量を進めているが、それによると 0.05 ppm から 3.35 ppm の範囲である¹⁰⁾。また、カラム法による HEMF の回収率は 9.8% であったので実際には 0.5 ppm から 34.2 ppm 存在すると推定される。そこで 0.05 ppm と最も HEMF 含量の少ない味噌 (実際には 0.5 ppm) を用いて塩分 1% の味噌懸濁液を 100 ml 調製し、それに 0.2 ppm の HEMF を添加し、無添加のものと味噌の香気について官能検査で比較した。その結果 19 名のパネルのうち 15 名が HEMF 添加の味噌懸濁液を味噌様の香気が強いと判断し、これは 1% の危険率で有意であった。これにより、HEMF の味噌香気への寄与がより明確になった。

7. おわりに

味噌の香気研究にはもとの香気の再現性がよく、加熱による香気の変化もなく、味噌の香気にとって重要と考えられる成分の回収にも優れているカラム法が最もよいと考えられる。このカラム法によって HEMF や HDMF が味噌から初めて同定され、味噌香気への寄与も明らかにすることができた。しかし、SDE 法が回収率で優れている香気成分も多くあり、併用して多面的に解析するとより効果的であると考えられる。

現在、カラム法により味噌の仕込直後から製品になる

までの HEMF の変化について検討し、HEMF が味噌熟成中に生成されることの確認を急いでいる。また、多種類の味噌の HEMF やその他の香気成分の分析データと官能検査データの関連についても多変量解析法を用いて検討中である。さらに HEMF と種々の香気成分の関係から味噌と醤油の香気の違いを明らかにしたいと考えている。

おわりに臨み、本稿を御校閲いただくとともに終始御丁寧アドバイスくださいましたお茶の水女子大学小林彰夫教授に深く感謝いたします。また、本稿をまとめる機会をお与え下さいました中央味噌研究所所長海老根英雄先生に深く感謝いたします。

(岩手大学教育学部)

文 献

- 1) 本間伸夫, 渋谷歌子, 石原和夫, 岡田玲子: 家政誌, 24, 259 (1973)
- 2) 岩淵せつ子, 柴崎一雄: 日食工誌, 20, 48 (1973)
- 3) 森 隆, 木内 幹: 醸協, 80, (4) 274 (1985)
- 4) 安平仁美: 醸協, 75, (6) 506 (1980)
- 5) 本間伸夫: 醸協, 82, (7) 471, 82, 547 (1987)
- 6) 横塚 保, 佐々木正興, 布村伸武, 浅尾保夫: 醸協, 75, (6) 516, 75, (9) 717 (1980)
- 7) 相島鐵郎: 化学と生物, 20, 460 (1982)
- 8) N. NUNOMURA, M. SASAKI and T. YOKOTSUKA: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1361 (1979)
- 9) 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)
- 10) 小林彰夫: 醸協, 85, (9) 630 (1990)
- 11) 箆島 豊: 日食工誌, 36, 609 (1989)
- 12) 鷲野由紀, 久保田紀久枝, 小林彰夫: 家政誌, 40, 265 (1989)
- 13) 下田満哉, 平野好司, 箆島 豊: 分化, 36, 792 (1987)
- 14) 菅原悦子: 家政誌投稿中
- 15) 菅原悦子: 日食工誌, 38, 491 (1991)
- 16) 菅原悦子: 未発表