

冷蔵中における糸引き納豆のにおいの変化

誌名	日本食品科学工学会誌 : Nippon shokuhin kagaku kogaku kaishi = Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology
ISSN	1341027X
著者名	田中,直義 木村,小百合 木内,幹 鈴木,あゆ野 村松,芳多子 三星,沙織
発行元	日本食品科学工学会
巻/号	59巻4号
掲載ページ	p. 167-174
発行年月	2012年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



冷蔵中における糸引き納豆のにおいの変化

田中直義^{1*}, 木村小百合¹, 木内 幹², 鈴木あゆ野²,
村松芳多子³, 三星沙織⁴

¹ 共立女子短期大学生生活科学科

² 共立女子大学家政学部

³ 新潟県立大学人間生活学部

⁴ 愛国学園短期大学家政科

Changes in Aroma of Itohiki-Natto during Refrigeration

Tadayoshi Tanaka^{1*}, Saori Kimura¹, Kan Kiuchi², Ayuno Suzuki²,
Kanao Muramatsu³ and Saori Mitsuboshi⁴

¹ Department of the Science of Living, Kyoritsu Women's Junior College,
2-2-1, Hitotsubashi, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8437

² Faculty of Home Economics, Kyoritsu Women's University, 2-2-1, Hitotsubashi, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8437

³ Faculty of Human Life Studies, University of Niigata Prefecture, 471,
Ebigase, Higashi-ku, Niigata, Niigata 950-8680

⁴ Department of Domestic Science, Aikoku Gakuen Junior College,
5-7-1, Nishikoiwa, Edogawa-ku, Tokyo 133-8585

The changes in aroma compounds in itohiki-natto (a Japanese food made from fermented soybeans) during refrigeration were examined by the following methods because the smell was known to change under refrigeration. Itohiki-natto samples were stored in a refrigerator for a week and then aroma compounds were extracted by the simultaneous steam distillation extraction method, concentrated, analyzed by gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry. Several low-molecular-weight fatty acid esters, pyrazines, and low-molecular-weight fatty acids were detected as the main aroma compounds. After a week of refrigeration, the aroma associated with the low-molecular-weight fatty acid esters tended to weaken, the aroma associated with pyrazines and low-molecular-weight fatty acids tended to become stronger. The main aroma compounds of itohiki-natto manufactured in the laboratory were extracted by solid-phase microextraction, and analyzed by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. The aroma compounds derived from soybeans and low-molecular-weight fatty acid esters produced during fermentation decreased, and the aroma compounds derived from the pyrazines and low-molecular-weight fatty acids produced during the fermentation increased as the period of refrigeration was lengthened. (Received Sep. 5, 2011; Accepted Dec. 17, 2011)

Keywords : itohiki-natto, odor changes, aroma compounds, refrigeration, GC and GCMS

キーワード : 糸引き納豆, におい変化, におい物質, 冷蔵, GC と GCMS

糸引き納豆は品質の変化が早く生鮮飲食品並みの消費期限が設けられている。一般的に糸引き納豆（以下、納豆）は、蒸煮大豆に納豆菌を接種して醗酵させた後に、1日間冷蔵してから出荷され、低温に保たれた状態で流通されている。冷蔵する理由として、納豆菌の増殖を停止させると同時に、脱アミノ反応によるアンモニアの生成を抑制すること、低温で熟成させることにより品質を安定化させるこ

とがあげられている¹⁾。また、購入された納豆は各家庭において冷蔵庫中で保存されているが、保存日数の経過によりにおい変化することはよく知られているところである。

納豆から発散する揮発性物質およびにおい物質としては市販納豆などから多くの物質が検出されており、それらは原料である大豆由来の物質、納豆菌が産生する物質、納豆菌によって産生された物質がさらに反応して生成する物質など多種類である^{2)~9)}。市販納豆のにおいは製造者により異なっているが、それは各製品により主要なにおい物質の存在比率が異なっているところに原因がある¹⁰⁾¹¹⁾。また、臭い物質の一部は消費者に忌避される場合があるとい

¹ 〒101-8437 東京都千代田区一ツ橋 2-2-1

² 〒101-8437 東京都千代田区一ツ橋 2-2-1

³ 〒950-8680 新潟県新潟市東区海老ヶ瀬 471

⁴ 〒133-8585 東京都江戸川区西小岩 5-7-1

* 連絡先 (Corresponding author), tanaka@kyoritsu-wu.ac.jp

うことで、生成を抑制する納豆菌の開発も行われ、商品化されている¹²⁾。

本論文では、納豆冷蔵中におけるにおいの変化を推測するために、購入直後および冷蔵庫中で保存した市販納豆に存在する主要なにおい物質を連続水蒸気蒸留抽出により抽出後、ガスクロマトグラフ (以下, GC) およびガスクロマトグラフ・マススペクトロメーター (以下, GCMS) により同定・比較すると共に、におい物質を微量固相抽出法 (SPME 法) により抽出後, GC により分析し, 醗酵直後から冷蔵日数の経過によるにおい物質の変化を比較した結果について報告する。

実験方法

1. 市販納豆

市販納豆は、都内の小売店で購入し、冷蔵庫中に4℃で1週間保存した。

2. 実験室規模の納豆製造および冷蔵

実験室で納豆を製造するための大豆はアメリカ産極小粒のマーブルを使用し、購入後は冷蔵庫中に保存した。納豆菌は (株)成瀬醗酵科学研究所から購入した。

冷蔵中におけるにおい物質の変化を測定するために使用した納豆を以下の方法で調製した。大豆を一夜水道水に浸漬した後、オートクレーブで121℃、1時間蒸煮した。納豆菌懸濁液を大豆1gあたり約5000個となるように接種し、ポリスチレン容器に50gずつ入れてポリエチレンフィルムを被せ、40℃で20時間保温することにより醗酵し、納豆を製造した¹³⁾。醗酵が終了した納豆は冷蔵庫中に4℃で所定の日数保存した。

3. 納豆の官能検査

市販納豆、実験室で製造した納豆、および冷蔵した納豆はそれぞれ官能検査を行った後に分析用に供した¹⁴⁾。

4. 試薬

2-アセチル-1-ピロリンは Buttery ら¹⁵⁾ の方法により合成し、分取GCにより精製した。他の試薬は、東京化成工業、または和光純薬工業から購入した製品をそのまま使用した。

5. 主要なにおい物質の同定

購入した直後の納豆、または購入後1週間冷蔵庫中に保存した市販納豆25gを2Lナスフラスコに入れ、蒸留水1Lを加えて、連続水蒸気蒸留抽出器を用いて揮発性物質をジエチルエーテル100mLへ2時間抽出した。その後再び同様の抽出を行い、合計50gの納豆から揮発性物質をジエチルエーテルへ抽出した。ジエチルエーテルに無水硫酸ナトリウムを添加して一夜放置した後、ろ過して硫酸ナトリウムを除去し、得られた揮発性物質を含むジエチルエーテル溶液を、室温で放置することにより3mLになるまで濃縮した。揮発性物質を含む濃縮ジエチルエーテル溶液をジエチルエーテルで、10倍、100倍と10の指数関数的に希釈し、これをにおい物質同定用の試料溶液とした。

検出器としてFIDを装着した島津製作所製GCであるGC-14BにDB-WAXカラム (内径0.53mm、長さ30m、膜厚1μm、アジレント社製) を接続し、キャリアーガスとしてヘリウムを35cm/秒流した。カラム出口をX字キャピラリーコネクターで、メイクアップ・ガスを加えながら2方向にヒューズドシリカチューブを用いて分岐し、1つをピーク検出のためにFIDへ導き、1つをGCオープンの外へにおい嗅ぎのために導いた。揮発性物質を含むジエチルエーテル試料溶液3.0μLをカラムへ全量注入し、GCオープンの外へ出したチューブの先端でにおいを嗅ぐことによりにおい物質を検出した。GCの温度条件は以下の通りとした。注入温度、250℃;カラム初期温度、50℃;昇温割合、毎分4℃。同一のカラムを日本電子製GCMSであるJMS-DX303に接続し、同一条件で分析することにより、におい物質の同定を行った。なお、マススペクトル測定は35-400amuの範囲を1秒間で走査し、電子衝撃法で得られたスペクトルを日本電子製コンピューターであるDAWINに保存してあるデータベースと比較してピークの同定を行った。さらに、リテンションインデックス (以下, RI) を標品と比較することにより同定を確実なものとした。一部のピークはメタンを反応ガスに用いて得られる化学イオン化マススペクトルから分子量を推定し、同定をより確実なものとした。GCで得られたにおい物質のピークはGCMSで得られたRIと比較して同定した。

6. 冷蔵中におけるにおい物質の分析

蒸煮大豆、醗酵終了直後の納豆、冷蔵日数1日間・2日間・4日間・8日間・16日間の納豆、それぞれ4.00-4.05gを7mLバイアルに採取し、100ppmのベンゾニトリル水溶液10μLを内部標準として加えた後、セプタムを被せて栓をした。バイアルにdivinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane SPMEファイバー (スベルコ製、以下、SPMEファイバーと略す) をセプタムを通過させてバイアル内部の気相に露出し、50℃の保温器中で60分間揮発性物質を抽出・濃縮した。抽出後のSPMEファイバーを島津製作所製GC-14Bの注入口へ挿入した。GCの条件は以下の通りとした:注入口温度、250℃;注入方法、スプリットレス (1分間);注入口インサート、内径0.75mm (スベルコ製);カラム、DB-WAX (内径0.25mm、長さ30m、膜厚0.25μm、アジレント社製);カラム温度、30℃に1分間保持した後、4℃/分の割合で昇温した¹⁰⁾。なお、試料1点に対して5回の分析を行い、それぞれのピーク面積値と内部標準であるベンゾニトリルのピーク面積値との比を求め、平均値と標準偏差値を計算した。同一のカラムを日本電子製GCMSに接続し、同一の条件で分析することにより、ピークの同定を行った。GCで得られたピークはGCMSで得られたピークのRIと比較することにより同定した。なお、内部標準として用いたベンゾニトリル水溶液は所定量をメスフラスコに入れ、水を加えた後に、超音波洗浄器を用いて15

分間以上振盪した後、定容にし、直ちに使用した。ベンゾニトリルは水に対する溶解性がそれほど大きくない¹⁶⁾ので、10, 100, 1000 ppmの水溶液、1 μ L, 2 μ L, 3 μ LをそれぞれGCへ全量注入し、重量とピーク面積値との関係から100 ppmの濃度であれば未飽和であることをあらかじめ確認した。

実験結果および考察

1. 実験室で製造した納豆の性状と冷蔵中の変化

実験室規模で製造した醗酵直後の納豆は官能検査の結果良品と判断でき、においについてはアンモニア臭を感じることはなかった。4℃の冷蔵庫中で1日間保存したところ、市販製品と同等の良品と判断できる性状を示した¹⁾。冷蔵日数が増えた後も、アンモニア臭を感じることはなかったが、ナッツ臭が強くなったように感じられた。色調は冷蔵日数が長くなるに従って、褐色が濃くなり、粘りはやや弱くなり、糸引きも弱くなった。なお、納豆を製造する際、保温器中で醗酵日数を2および3日間と延長したところ、アンモニア臭を感じるようになった。

2. 主要なにおい物質

食品のにおい物質を抽出しGCで分析する方法はいくつかある。におい物質を有機溶媒で抽出する方法は比較的簡便であり、抽出液が得られることで繰り返しの分析が可能であるという利点を有するが、溶媒の種類によりにおい物質の抽出割合の異なる場合が¹⁷⁾、濃縮液をGCへ注入するとGCおよびカラムを汚染する場合がある。SPME法により抽出する方法は簡便であるが、測定の度に毎回抽出する必要があることと、分析対象物質の注入量を段階的に変化させることが原理的に不可能であるという特徴を持つ¹⁸⁾。また、Texanなどの吸着剤を用いてにおい物質を濃縮する方法はSPME法よりにおい物質の濃縮度を高くすることは可能であるが、測定の度に毎回の抽出・濃縮が必要であることと、分析対象物質の注入量を段階的に変化させることが不可能である¹⁹⁾²⁰⁾。そこで本報告では、まず食品からにおい物質を抽出する方法として広く使用されている連続水蒸気蒸留抽出^{21)~23)}によりにおい物質のエーテル濃縮液を作成した後に、エーテル濃縮液を指数関数的に希釈した溶液をGCにおい嗅ぎ法で測定する Aroma Extract Dilution Analysis (以下、AEDA)法により、納豆の主要なにおい物質を検索した。

購入した直後の納豆、および1週間冷蔵庫中に保存した市販納豆からにおい物質を連続水蒸気蒸留抽出器を用いてエーテルに抽出したが、試料である納豆、添加する水の体積、および試料を入れるナスフラスコの容量は、それぞれ25 g, 1 L, 2 Lが試みた範囲内では適当であった。納豆の重量を増加させたり、水の体積を減少させると、試料を入れたナスフラスコ内容物が沸騰している際に発生する泡が消え難くなるために抽出装置全体に広がってしまい、臭い

物質を抽出することができなかった。

連続水蒸気蒸留抽出器で抽出したにおい物質を含むエーテル溶液を3 mLに濃縮した後、2または4の指数関数的に希釈してGCへ注入し、カラムの出口でにおいを官能的に検出するAEDA法を複数回数試みた。しかし、納豆メーカーが異なるとそれぞれの結果が異なり、また購入する試料ごとに結果のバラツキが大きく一定の値を得ることが困難であった。すなわち、同一メーカーの同一ブランド製品であっても差異が大きく、製造日が異なると特定のおい物質においてにおいの感じられる希釈倍率の異なる場合があったのみでなく、購入直後と冷蔵後の結果が逆転する場合もあった。その原因は、原料である大豆の品種、品質、保存状態、および製造時における醗酵時間、醗酵温度、醗酵室内の給排気条件などに微妙な差異が存在する結果であろうと考えられる²⁴⁾。

そこで、連続水蒸気蒸留抽出で得られた濃縮液を10の指数関数的に希釈した溶液をGCへ注入して主要な臭い物質を検索した。複数回数行った結果の一例をTableに示したが、試料によってはにおいが検出できなくなる希釈率の異なる場合が、購入直後と1週間の冷蔵を行った後の希釈率が逆転する場合があった。Tableには10000倍まで希釈した結果を示したが、100000倍に希釈するとにおいを検出することができなくなった。GCMSで同定したところ全てが既に報告された物質であった^{25)~48)~10)}。納豆が発散するにおい物質は、原料である大豆に由来する物質、醗酵中に生成する物質、醗酵後の冷蔵中に生成する物質に分けることができる。大豆中に存在する臭い物質としては、ヘキサナール、1-ヘキセノール、1-オクテン-3-オール、2-ヘキセナール、2-ペンチルフラン、2-アセチル-1-ピロリンなどが^{5)25)~27)}報告されており、本報告における分析でもそれらの中のいくつかを希釈率の低いエーテル濃縮液からにおい物質として検出することができ、これらの物質は納豆のにおいに大きく関わっていないことが確認できた。Tableに示した物質の中で、2,3-ブタンジオン(ジアセチル)、3-ヒドロキシ-2-ブタノン(アセトイン)、2,5-ジメチルピラジン、トリメチルピラジン、2-メチルプロパン酸(イソ酪酸)、2-メチル酪酸、3-メチル酪酸(イソ吉草酸)はこれまで納豆醗酵時に生成するにおい物質として報告されている。この内、ピラジン類は微生物の代謝産物であるアシロインとアンモニアから非酵素的に生成することが報告されている^{28)~31)}。また、低分子脂肪酸は醗酵の過程で生成されるアミノ酸の脱アミノ反応により生成し、それらは納豆のにおいに大きく寄与していることが報告されており、これら低分子脂肪酸を生成しない納豆菌株を用いた製品も開発されている¹²⁾。しかし、エタノール、イソ酪酸エチルおよび2-メチル酪酸エチルなどの低分子脂肪酸エステル類および酢酸は、醗酵室内および市販納豆中から検出されているが^{4)8)~10)}主要な臭い物質として未だ報告されていない。こ

Table The main aroma compounds in ether extract from itohiki-natto

Peak No.	Compound Name	Aroma Character	Identification	RI of Authentic	Sample	RI of Experiment	Maximum Dilution Rate
1	methyl 2-methylpropanoate	fruity	MS, RI*	933	A** B	933 933	$\times 10^1$ $\times 10^0$
2	ethanol	alcoholic	MS, RI	955	A B	962 965	$\times 10^4$ $\times 10^4$
3	ethyl 2-methylpropanoate	fruity	MS, RI	982	A B	987 987	$\times 10^2$ $\times 10^0$
4	2,3-butanedione	butter like	MS, RI	997	A B	1001 998	$\times 10^3$ $\times 10^2$
5	methyl 3-methylbutanoate	fruity	MS, RI	1030	A B	1027 ND	$\times 10^0$ —
6	thiophene	meaty & sulfur like	MS, RI	1034	A B	1038 1038	$\times 10^1$ $\times 10^0$
7	ethyl 2-methylbutanoate	fruity	MS, RI	1068	A B	1067 1067	$\times 10^1$ $\times 10^4$
8	ethyl 3-methylbutanoate	fruity	MS, RI	1081	A B	1091 ND	$\times 10^1$ —
9	hexanal	green grassy	MS, RI	1095	A B	1096 ND	$\times 10^0$ —
10	heptanal	green	MS, RI	1203	A B	1207 1207	$\times 10^0$ $\times 10^1$
11	(+)-limonene	citrus like	MS, RI	1211	A B	1210 1211	$\times 10^0$ $\times 10^0$
12	propylbenzene	oily, dusty	MS, RI	1223	A B	1223 1221	$\times 10^1$ $\times 10^1$
13	2-hexenal	citrus like	MS, RI	1234	A B	1234 1233	$\times 10^1$ $\times 10^0$
14	3-hydroxy-2-butanone	yoghurt like	MS, RI	1313	A B	1315 1312	$\times 10^0$ $\times 10^1$
15	2,5-dimethylpyrazine	nutty	MS, RI	1358	A B	1356 1357	$\times 10^0$ $\times 10^3$
16	trimethylpyrazine	nutty	MS, RI	1426	A B	1426 1424	$\times 10^4$ $\times 10^1$
17	1-octen-3-ol	earthy, mushroom like	MS, RI	1470	A B	1456 1462	$\times 10^1$ $\times 10^0$
18	acetic acid	vinegar like	MS, RI	1473	A B	1479 1474	$\times 10^4$ $\times 10^2$
19	diallyl disulfide	rice bran like	MS, RI	1505	A B	1508 1510	$\times 10^0$ $\times 10^0$
20	benzaldehyde	soybean like	MS, RI	1548	A B	1538 ND	$\times 10^1$ —
21	2-methylpropanoic acid	cheese like	MS, RI	1593	A B	1596 1595	$\times 10^1$ $\times 10^2$
22	2-furanmethanol	flower like	MS, RI	1684	A B	1684 1682	$\times 10^3$ $\times 10^1$
23	2- or/and 3-methylbutanoic acid	cheese like	MS, RI	1694	A B	1695 1696	$\times 10^1$ $\times 10^3$
24	2-methylpentanoic acid	cheese like, earthy	MS, RI	1790	A B	1794 1794	$\times 10^1$ $\times 10^1$

* Mass spectrum & retention index

** A : Just after purchase. B : After 1 week storage

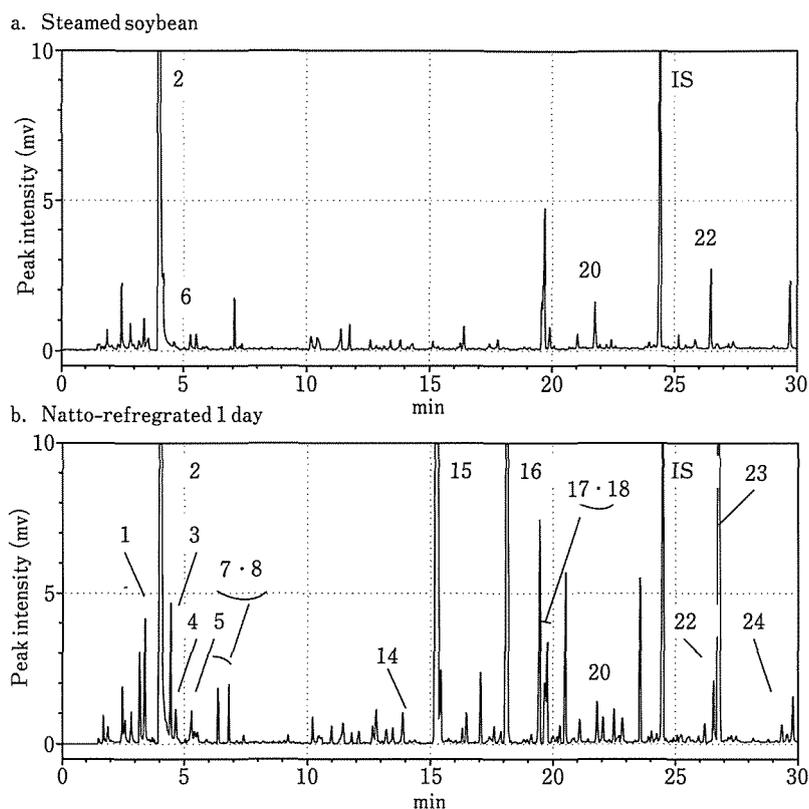


Fig. 1 Gas chromatogram of volatiles emitted from steamed soybean and itohiki-natto

a, steamed soybean; b, itohiki-natto (1 day refrigerated).

Extraction conditions: SPME fiber, divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (50 μ m/30 μ m); temperature, 50°C; time, 60 min.

Gas chromatograph conditions: Column, DB-WAX (0.25 mm ID, 30 m long, 0.25 μ m film thickness); carrier, He (35 cm³/sec); injection temperature, 250°C; injection mode, splitless (sampling time: 1 min); inletliner, 0.75 mm; detector, FID; initial temperature, 30°C (hold time: 1 min); program rate; 4°C/min.

れは、におい物質の抽出濃縮方法が連続水蒸気蒸留ではなく、Texanを用いたヘッドスペース法などの分析用試料調整法の違いによるものと推測できる。Tableに示した以外の臭い物質としては、酪酸エチル、プロピオン酸ブチル、ピラジン、2-メチルピラジン、2-アセチル-1-ピロリン、2-フルフラール、テトラメチルピラジン、酪酸、吉草酸、1-オクテン-3-オンなどが購入直後の納豆の一部から得られた希釈率の低いエーテル溶液から検出された。なお、使用したDB-WAXカラムでは、2-メチル酪酸と3-メチル酪酸はピークが重複するために分別できなかった¹¹⁾。

3. 冷蔵中におけるにおい物質の変化

本研究においては、冷蔵中におけるにおい物質の増減をSPME法による抽出濃縮とGCによる測定で検討した。SPME法は簡便な操作により揮発性物質を抽出濃縮し、GCへ注入する方法として近年広く応用されている。揮発性物質の濃縮には直径0.1 mmのフューズドシリカ棒の表面に吸着剤を塗布してあるSPMEファイバーを用いるが、吸着剤の種類により吸着特性が異なるので、分析する目的物質によりファイバーの種類を選択する必要がある。著

者らは市販されている数種のファイバーを比較した結果、divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane SPMEファイバーが納豆の揮発性物質を分析するために最も適していることをすでに見出しており¹⁰⁾、本分析においてもこのSPMEファイバーを用いてにおい物質の変化を検討した。

蒸煮大豆、醗酵終了直後の納豆、冷蔵日数の異なる納豆、それぞれから揮発性物質をSPMEファイバーにより抽出濃縮し、GCで分析して得られたクロマトグラフの一例をFig.1に示した。蒸煮大豆(Fig.1a)と納豆(Fig.1b)とではクロマトグラフに大きな違いが見られたが、GCMSで同定したところ全てがこれまでに報告されていた物質であった^{2)~4)8)~10)}。このうち、主要な臭い物質のピーク面積値と内部標準のピーク面積値との比の一例をFig.2に示した。また、納豆を複数回数製造して揮発性物質を測定したところ、それぞれの結果の間でもバラツキがみられた。

納豆から発散するにおい物質の中で大豆中に存在する臭い物質としては、ヘキサナール、1-ヘキセノール、1-オクテン-3-オール、2-ヘキセナール、2-ペンチルフラン、2-アセチル-1-ピロリンなどが^{5)25)~27)}報告されており、本報告におい

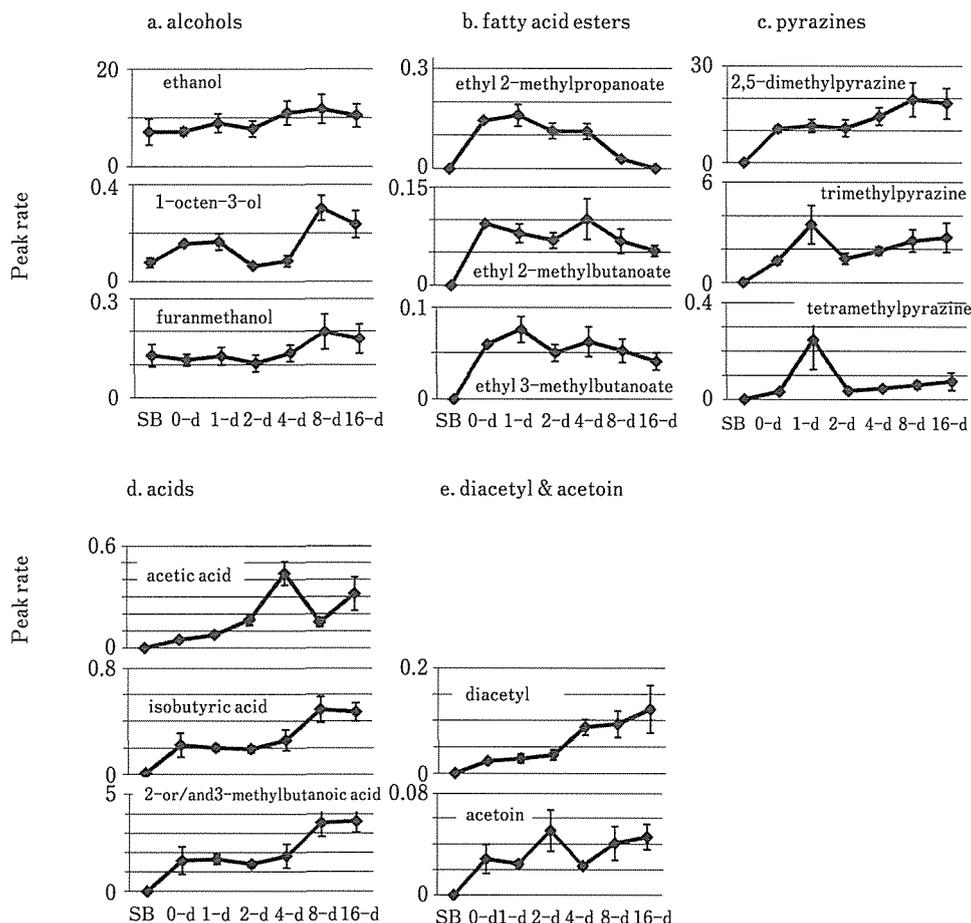


Fig. 2 The change of main aroma compounds

a, alcohols; b, low-molecular fatty acid esters; c, pyrazines; d, low-molecular fatty acid; e, diacetyl & acetoin. SB, steamed soybean; 0-d, after fermentation; 1-d, 1 day refrigerated; 2-d, 2 days refrigerated; 4-d, 4 days refrigerated; 8-d, 8 days refrigerated; 16-d, 16 days refrigerated. Peak rate : peak area/IS (benzonitrile) peak area.

る主要なおい物質の検出においてもそれらの中のいくつかを検出することができた。しかし、それらの物質はSPME法による分析で蒸煮大豆から検出されたが、納豆からはほとんど検出されなかった。フルフラールは蒸煮大豆および冷蔵日数の短い納豆からは検出できたが、冷蔵日数が長くなると減少する傾向にあった。これらの結果は主要なおい物質検出の結果とほぼ一致している。エタノールは蒸煮大豆から検出され、醗酵および冷蔵中に微増かほぼ一定の値であった (Fig. 2a)。これは大豆中に含まれているものがそのまま測定され、醗酵の段階でわずかに増加したものと考えられる。2-アセチル-1-ピロリン²⁷⁾は購入した直後の一部の納豆から得られたエーテル濃縮液を分析することよりカラム出口で官能的に検出でき、またマススペクトルで同定できたが、臭い閾値が非常に小さい²⁸⁾ためにSPMEファイバーで抽出・濃縮してもGCではピークとして検出できず、醗酵および冷蔵中における変化を追跡することができなかった。しかし、冷蔵庫中で1週間保存した納豆から連続水蒸気蒸留で得られたエーテル濃縮液からは

検出され難くなることが多かったことから、SPME法による分析からも納豆の主要なおい物質ではなく、冷蔵中に分解または揮発すると考えられる。大豆から由来するにおい物質の多くは醗酵の過程および冷蔵中に揮発または分解されて減少し、納豆のにおいに寄与する割合が小さくなる傾向にあると推測できる。

市販納豆および冷蔵庫で保存した市販納豆から数種の低分子脂肪酸のエステルが主要な臭い物質として検出され (Table)。SPME法による分析の結果それらは冷蔵中に減少することが明らかになった (Fig. 2b)。蒸煮大豆からこれらのエステル類が検出されなかったこと、醗酵大豆から少量のエタノールが検出された (Fig. 2a) ことから、これらの物質は醗酵の段階および冷蔵中に生成した低分子脂肪酸とエタノールとから生成したものの推測される。エステル類の多くは閾値が小さいこと²⁹⁾と、ピラジン類、低分子脂肪酸とは質的に全く異なる果実様の臭いを有すること、および主要なおい物質の分析結果においても一部のエステルは1週間冷蔵することにより検出される希釈率

が小さくなったことから、これらのエステル類は冷蔵によるにおいの変化に大きく関わっていると考えられる。

市販納豆および冷蔵庫で保存した市販納豆から数種のピラジン類が主要な臭い物質として検出され (Table), それらは SPME 法による分析の結果冷蔵中に増加することが明らかになった (Fig. 2c). ピラジン類は微生物の代謝産物であるアシロインとアンモニアから非酵素的に生成することが報告されている³⁰⁾⁻³³⁾. 本実験の分析結果においても、蒸煮大豆から検出されない 3-ヒドロキシ-2-ブタノン (アセトイン) が醗酵および醗酵後の冷蔵中に増加した (Fig. 2e) ことから、3-ヒドロキシ-2-ブタノンとアミノ酸の脱アミノ化反応により生成する官能的に検出できなかった微量のアンモニアとの反応により、ピラジン類が生成するものと推定できる⁷⁾. ピラジン類はにおい閾値はそれほど小さくないが、SPME 法による分析のピーク面積比に示されたように存在量が多く、冷蔵日数の増加に従って増加したことから、納豆が有するナッツ様のにおいを強める物質であると考えられる。

市販納豆および冷蔵庫で保存した市販納豆から数種の低分子脂肪酸がにおい物質として検出され (Table), SPME 法による分析の結果それらは冷蔵中に増加することが明らかになった (Fig. 2d). 低分子脂肪酸は醗酵の過程で生成されるアミノ酸の脱アミノ反応により生成し、それらは納豆のにおいに大きく寄与していることが報告されており¹²⁾, 冷蔵中にこれらの物質が増加していたことは、本分析においても脱アミノ化反応が進行していたことを示しているものと考えられる。2-メチルプロパン酸と 2-メチル酪酸、3-メチル酪酸はともにチーズ様のにおいを持つこと、存在量が多いこと、におい閾値が比較的小さい物質であることから、主要なにおい物質の検索結果で示したように少量の変化であっても納豆のにおい変化に大きな影響を与えるものと考えられる。酢酸は 2-メチルプロパン酸とほぼ同量が検出された。酢酸のにおい閾値はそれほど小さくないが、主要なにおい物質の検索結果と冷蔵中に増加することから、納豆のにおい物質として無視できない存在であると推測できる。

以上の結果から、納豆の冷蔵中におけるにおいの変化は、原料である大豆から由来する物質と醗酵中に生成する低分子脂肪酸エステル類の減少、醗酵中および冷蔵中に生成するピラジン類と低分子脂肪酸の増加が作用する結果であると推測できる。

要 約

糸引き納豆は醗酵後の冷蔵中ににおいの変化がゆくことが知られており、品質の変化が早く生鮮食品並みの消費期限が設けられている。冷蔵中における主要なにおい物質の変化を以下の方法で検討した。

(1) 購入直後の市販納豆および 1 週間冷蔵庫中で保存し

た市販納豆から臭い物質を連続水蒸気蒸留抽出によりエーテルに抽出し、濃縮した。得られたエーテル濃縮液をガスクロマトグラフ-におい嗅ぎ法で分析したが、試料間の差異が大きかったのでエーテル濃縮液を 10 の指数関数的に希釈することにより、主要な臭い物質を検索した。その結果、主要なにおい物質として 2-メチルプロパン酸エチル、2-メチル酪酸エチル、3-メチル酪酸エチルなどの低分子脂肪酸エステル、2,5-ジメチルピラジン、トリメチルピラジンなどのピラジン類、酢酸、2-メチルプロパン酸、2- or/and 3-メチル酪酸などの低分子脂肪酸、およびエタノールが検出できた。1 週間冷蔵中で保存するとそれらの物質の中で、低分子脂肪酸エステルにおいては弱く、ピラジン類と低分子脂肪酸は強くなる傾向にあった。

(2) 醗酵終了直後および冷蔵日数の異なる納豆からにおい物質を SPME 法で抽出・濃縮し、ガスクロマトグラフで分析し、主要なにおい物質の変化を測定した。冷蔵日数が長くなるにつれて主要なにおい物質の中で、低分子脂肪酸エステルは減少、ピラジン類と酢酸以外の低分子脂肪酸は増加する傾向にあった。以上の結果から、冷蔵中のにおいの変化は、脂肪酸エステル類が減少し、ピラジン類および酢酸以外の低分子脂肪酸類が増加することによるものと推定した。

文 献

- 1) 渡辺杉夫, 納豆の製造・流通・保蔵, 「納豆の科学」, 木内幹, 永井利郎, 木村啓太郎編, (建帛社, 東京), pp. 31-41 (2008).
- 2) 小幡弥太郎, 俣野景典, 納豆香気に関する研究 (第 1 報) 揮発性物質の検索, 農化, **33**, 567-569 (1959).
- 3) 小幡弥太郎, 俣野景典, 納豆香気に関する研究 (第 2 報) 納豆製造中に於ける Diacetyl 量の変化について, 農化, **33**, 569-571 (1959).
- 4) 菅野彰重, 高松春樹, 高野伸子, 納豆菌が生産する市販納豆中の揮発性代謝産物の定量, 日食工誌, **31**, 587-595 (1984).
- 5) Sugawara, E., Ito, I., Odagiri, S., Kubota, K. and Kobayashi, A., Comparison of Compositions of Odor Components of Natto and Cooked Soybeans, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 311-317 (1985).
- 6) 伊藤哲雄, 菅原悦子, 桜井米吉, 武山進一, 内沢秀光, 小田切敏, 納豆菌によるピラジン類生成の培地組成について, 農化, **61**, 963-965 (1987).
- 7) 菅野悦子, 伊藤哲雄, 米倉裕一, 桜井米吉, 小田切敏, 合成培地での納豆菌によるピラジン化合物生成に対するアミノ酸 (添加) の影響, 日食工誌, **37**, 520-523 (1990).
- 8) 田中直義, 庄司善哉, 納豆室中に存在する揮発性物質のガスクロマトグラフ-マススペクトロメトリーによる分析, 日食工誌, **40**, 656-660 (1993).
- 9) Tanaka, T., Muramatsu, K., H-r Kim, Watanabe, W., Takeyasu, M., Kanai, K. and Kiuchi, K. Comparison of Volatile Compounds from Chungkuk-Jang and Itohiki-Natto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1440-1444 (1998).
- 10) 田中直義, 山内智子, 勝股理恵, 木内 幹, 微量固相抽出-ガスクロマトグラフィーによる市販糸引き納豆の揮発性成分の比較, 日本食品科学工学会誌, **50**, 278-285 (2003).
- 11) 田中直義, 山内智子, 村橋鮎美, 木内 幹, 高橋沙織: 新規

- 大豆醱酵食品に関する納豆菌についての基礎的研究 (第1報) 微量固相抽出法と二次元ガスクロマトグラフィーによる納豆中の2-メチル酪酸と3-メチル酪酸の分別定量, 共立女子大学総合文化研究所紀要第11号, 81-85 (2005).
- 12) 竹内 浩, 安藤記子, 塚本義則, 低鎖分岐脂肪酸非生産納豆菌の育種と低臭納豆への利用, 日本食品科学工学会誌, 47, 773-779 (2000).
- 13) 宮間浩一, 恒温器を用いる研究室規模の製造, 「納豆の研究法」, 永井利郎他編著, (恒星社厚生閣, 東京), pp.49-54 (2010).
- 14) 納豆試験法研究会編, 官能検査法, 「納豆試験法」, (光琳, 東京), pp.61-63. (1990).
- 15) Buttery, R.G., Ling, L.C., Juliano, B.O. and Turnbaugh J.G., Cooked Rice Aroma and 2-Acetyl-1-pyrroline. *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 823-826 (1983).
- 16) S. Budavari, et al. eds., "The Merck Index", 12th eds., Merck & Co., p. 184, (1996).
- 17) Sugisawa, H., Prerequisites for Sample Preparation in Flavor Analysis. In "Analysis of Volatiles", Schreier, P. Ed., Walter de Gruyter (Berlin, Germany), pp. 3-18 (1984).
- 18) Pawliszyn, L., Solid Phase Microextraction-Theory and Practice. Wiley-VCH, Inc., US, pp.11-41, (1997).
- 19) Elmor, J. S., Erbahadir, M. A. and Mottram, D. S., Comparison of Dynamic Headspace Concentration of Tenax with Solid Phase Microextraction for the Analysis of Aroma Volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 2638-2641 (1997).
- 20) Tsugita, T., Imai, T., Doi, Y., Kurata, K. and Kato, H., GC and GC-MS Analysis of Headspace Volatiles by Tenax GC Trapping Techniques. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1351-1354 (1979).
- 21) 菅原悦子, 味噌香气成分の探索, 醸協, **86**, 411-416 (1991).
- 22) Blanch G. P., Tabera J., Sanz J., Herraiz M., and Reglero G., Volatile Composition of Vinegars. Simultaneous Distillation-Extraction and Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1046-1049 (1992).
- 23) Chen, S-H., Huang, T-C., Ho, C-T. and Tsai, P-J., Extraction, Analysis, and Study on the Volatiles in Roselle Tea. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1101-1105 (1998).
- 24) 渡邊杉夫, 納豆製造法, 「納豆の研究法」, 永井利郎他編著, (恒星社厚生閣, 東京), pp.47-49, (2010).
- 25) Doi, Y., Tsugita, T., Kurata, T. and Kato, H., Changes of Headspace Components of Soybeans During Roasting. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1043-1047 (1980).
- 26) Whitefield, F. B. and Last, J. H., Vegetables. In "Volatile Compounds in Foods and Beverages", eds. Maarse, H., Marcel Dekker, pp.203-269, (1991).
- 27) 山上 敦, 馬野克己, 枝豆(茶豆)の香气成分, 日本食品科学工学会第52回大会講演要旨集, p.71, 札幌 (2005).
- 28) Grosch, W. and Schieberle, P., Bead. In "Volatile Compounds in Foods and Beverages", eds. H. Maarse, Marcel Dekker, pp. 41-77 (1991).
- 29) Shaw, P. E. Fruits II. In "Volatile Compounds in Foods and Beverages", eds. Maarse, H., Marcel Dekker, pp.305-327 (1991).
- 30) Shu, C-K., Pyrazine Formation from Amino Acids and Reducing Sugars, a Pathway Other than Strecker Degradation. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1515-1517 (1998).
- 31) Rizzi G. P., Formation of Pyrazines from Acyloin Precursors under Mild Conditions. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 349-352, (1988).
- 32) Baudron, S., Belin, J-M. and Voilley, A., Main Factors Affecting Headspace Analysis of Some Pyrazines Produced by Microorganisms. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 2176-2179 (1991).
- 33) Huang, T-C., Fu, H-Y. and Ho, C-T., Mechanistic Studies of Tetramethylpyrazine Formation under Weak Acidic Conditions and Hydrostatic Pressure. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 240-246, (1996).

(平成23年9月5日受付, 平成23年12月17日受理)