

漬物の発酵に由来する香りの研究（第 2 報）

岩佐 悟* 七字 育子* 吉浦 貴紀*

1. はじめに

漬物用乳酸菌 HS-1（図 1，以下 HS-1 とする）をスターターとして使用することで菌相を固定し，その他の発酵条件を管理することによる漬物の香りの制御技術開発と，制御する香気成分の選定を行うことを目標として研究を行っている。昨年度は，菌相を固定する漬物製造条件の検討，官能評価用語の選定，ヘッドスペースガスクロマトグラフィー質量分析計（以下，GC/MS とする）による漬物香気成分の分析条件の検討，及び各温度条件における香気成分の変化の測定を行った。

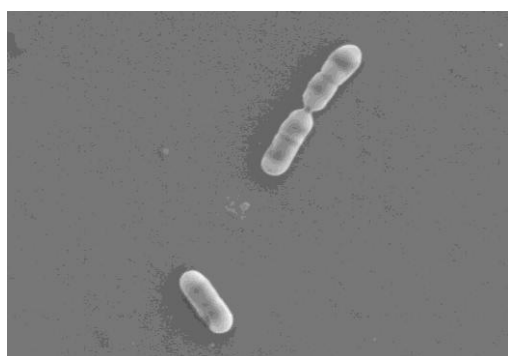


図 1 当センターでキムチから分離した HS-1

2. 目的

本年度は，以下の目的で研究を行った。

1. GC/MS による漬物揮発成分の検出数の向上
2. 発酵条件の違いによる揮発成分変化のデータ収集
3. GC-Olfactometry（以下，GC-O とする）による揮発成分の評価

3. 実験方法

3.1 GC/MS による漬物揮発成分の検出数の向上

既報¹⁾における分析条件では，漬物から 37 成分の揮発成分を検出することができた。しかし，発酵による香りの変化への関与が考えられている²⁾低級脂肪酸を検出出来なかった。そこで，低級脂肪酸などの酸性成分を安定して測定できるカラム（InertCap Pure-WAX ジーエルサイエンス(株)）に変更して検討を行った。

3.2 発酵条件の違いによる揮発成分変化のデータ収集

昨年度決定した基本製造条件を元に，発酵温度，糖添加の有無，塩分，乳酸菌添加の有無を変えた複数の漬物を製造した（表 1）。GC/MS による揮発成分の測定を行い，各製造条件の違いによる揮発成分生産量の

違いに関するデータ収集を行った。

基本製造条件

- ①白菜を 4 つ割りにした後，葉の隙間まで水で洗う。
- ②白菜 10kg に対し食塩 3kg，酢酸 50ml，水 10L を加えて 4 時間下漬け（間に 1 回手入れ）
- ③流水で 30 分脱塩（内 4 回水換え）
- ④下漬け白菜に食塩 1%，酢酸ナトリウム 0.5%，酵母エキス 0.1%，及び乳酸菌 HS-1 を 10^5 CFU 以上になるように添加して恒温機で発酵させる

表 1 漬物製造条件

| 試作 No. | 温度 | 塩分 | 糖 | 酵母エキス | HS-1 |
|--------|------|----|----|-------|------|
| ① | 10°C | 1% | 無し | 0.1% | 添加 |
| ② | 20°C | 1% | 無し | 0.1% | 添加 |
| ③ | 30°C | 1% | 無し | 0.1% | 添加 |
| ④ | 10°C | 1% | 無し | 0.1% | 無し |
| ⑤ | 20°C | 1% | 無し | 0.1% | 無し |
| ⑥ | 30°C | 1% | 無し | 0.1% | 無し |
| ⑦ | 10°C | 1% | 2% | 0.1% | 添加 |
| ⑧ | 20°C | 1% | 2% | 0.1% | 添加 |
| ⑨ | 30°C | 1% | 2% | 0.1% | 添加 |
| ⑩ | 10°C | 3% | 無し | 0.1% | 添加 |
| ⑪ | 20°C | 3% | 無し | 0.1% | 添加 |
| ⑫ | 30°C | 3% | 無し | 0.1% | 添加 |

3.3 GC-O による揮発成分の評価

GC/MS 分析では漬物に含まれる揮発成分の種類，量を測定することが出来るが，個々の成分がどのようなにおいをどの程度有しているかの情報を得ることはできない。

そこで，GC のカラム出口を MS と，におい嗅ぎポートの 2 か所に分岐し，におい嗅ぎ出口で分離した成分の匂いを直接嗅ぐ GC-O 分析（図 2）により，検出された各ピークのおいの特徴を評価した。評価は，既報¹⁾により選定したパネル 3 名で評価を行い，2 名以上が香りを感じた時間に存在するピークを探索し，MS による同定を行った。



図 2 におい嗅ぎ機能付 HS-GC/MS

4 結果及び考察

4.1 GC/MS による漬物揮発成分の検出数の向上

InertCap Pure-WAX を使用した分析を行った所、既報で検出された成分に加え、低級脂肪酸類、Dimethyl trisulfide など、より多くの成分が検出できたため、本研究に向いていると考えられた。そこで、InertCap Pure-WAX を使用した分析法の確立を行うこととした。まず、バイアル加熱温度の検討を行った。50℃、60℃、70℃抽出で平衡時間 10 分と設定し分析を行った。60℃、70℃抽出では、ピークエリア合計値が増加する一方で、エタノール及び酢酸のピークが広がり、2,3-Butanedione のピークと重なってしまうことから不適と判断した。次に、平衡時間、抽出回数の検討を行った。50℃抽出で平衡を 5 分、10 分、20 分、抽出回数を 1 回、3 回、5 回、5 回抽出を 2 セット（あいだに 5 分平衡）行ったものについて 3 回ずつ分析を行った。ピークエリア及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（データ未掲載）。その結果、50℃抽出で平衡時間 10 分、5 回抽出を 2 セット（あいだに 5 分平衡）したもののピークエリア合計値が最も大きく、相対標準偏差も小さかった。抽出回数を 5 回以上に増加させることでピークエリアがさらに増加すると思われるが、これ以上抽出回数を増やすと、オートサンプラーでの稼働が困難になるため、この方法を採用することとした。

4.2 発酵条件の違いによる揮発成分変化のデータ収集

表 2 の条件で表 1 の漬物を分析した(図 3)。ピーク数の最も多かった試作 No. ③では、70 のピークが検出された(表 3)。発酵条件ごとの各成分のピーク面積値を比較すると、いくつかの成分に傾向がみられた。2,3-Butanedione (Diacetyl) は、HS-1 を添加することで増加し、かつ低温で発酵させると多く生産した。Hexanal 及び 2,4-Heptadienal, (E,E)- は発酵温度が高いほど、かつ砂糖を添加すると生産量が増えた。Dimethyl trisulfide は低温で多く、HS-1 を添加すると減少した(図 4)。

表 2 ヘッドスペース GC/MS 分析条件

| | |
|-----------|---|
| 装置 | S-trapHS 付き JMS-Q1050GC (日本電子株) |
| サンプリングモード | Trap mode |
| バイアルサイズ | 22ml |
| 試料量 | 1g (ミキサーで粉碎) |
| サンプリング温度 | 50℃ |
| 平衡温度・抽出回数 | 10 分平衡後 5 回抽出し、再度 5 分平衡後、5 回抽出 |
| トラップ管 | GL Trap1 (TENAX) |
| ドライパージ時間 | 2.5 分 |
| クライオ時間 | - 90℃ 3 分 |
| カラム | InertCap Pure-WAX (60m x 0.25mm (d.f. 0.50 μm)) |
| 昇温条件 | 40℃ (3min) → 10℃/min → 250℃ (15min) |
| カラム流量 | 2ml/min |
| イオン化エネルギー | 70eV |
| イオン源温度 | 200℃ |
| GCTIF 温度 | 210℃ |
| SCAN 範囲 | m/z29-350 |
| GC-O の流量比 | MS : におい嗅ぎ = 2 : 8 |

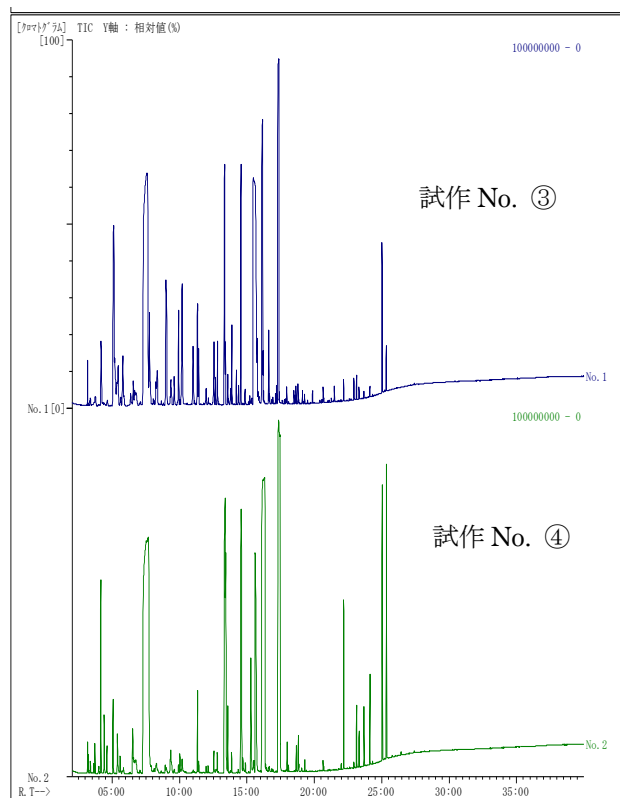


図 3 漬物揮発性成分のクロマトグラム

表3 検出されたピークの推定成分*

| Peak No. | Components | Peak No. | Components |
|----------|-----------------------------|----------|---|
| 1 | Carbon dioxide | 36 | 2-Hexenal |
| 2 | Carbonyl sulfide | 37 | 1-Pentanol |
| 3 | Pentane | 38 | Methyl cyanide |
| 4 | n-Hexane | 39 | Butyl isothiocyanato- |
| 5 | Ethyl ether | 40 | Acetoin |
| 6 | Methanethiol | 41 | 2-Penten-1-ol, (E)- |
| 7 | Acetaldehyde | 42 | 2-Penten-1-ol, (Z)- |
| 8 | Carbon disulfide | 43 | Propanoic acid, 2-hydroxy-, ethyl ester |
| 9 | Dimethyl sulfide | 44 | 1-Hexanol |
| 10 | Propanal | 45 | 5-Cyano-1-pentene |
| 11 | Acetone | 46 | Allyl isothiocyanate |
| 12 | Acetic acid, methyl ester | 47 | 3-Hexen-1-ol, (Z)- |
| 13 | 2-Propenal | 48 | Dimethyl trisulfide |
| 14 | Butanal | 49 | Acetic acid |
| 15 | Ethyl Acetate | 50 | 3-Butenyl isothiocyanato- |
| 16 | Methyl Alcohol | 51 | n-Pentyl isothiocyanate |
| 17 | 1-Butene, 2-(chloromethyl)- | 52 | 2,4-Heptadienal, (E,E)- |
| 18 | Ethanol | 53 | 不明 |
| 19 | Nitric acid, ethyl ester | 54 | 2,6-Nonadienal, (E,Z)- |
| 20 | 2,3-Butanedione | 55 | Hexyl isothiocyanato- |
| 21 | Pentanal | 56 | Butanoic acid |
| 22 | Acetonitrile | 57 | Butanoic acid, 3-methyl- |
| 23 | 1-Pentene, 5-chloro- | 58 | Heptyl isothiocyanato- |
| 24 | 1-Penten-3-one | 59 | 3-Methylhexyl isothiocyanate |
| 25 | 1-Propanol | 60 | Pentanoic acid |
| 26 | 2,3-Pentanedione | 61 | Hexanoic acid |
| 27 | Cyclopentane, methyl- | 62 | Geraniol |
| 28 | Disulfide, dimethyl | 63 | Phenylethyl Alcohol |
| 29 | Hexanal | 64 | Pentanenitrile, 5-(methylthio)- |
| 30 | 2-Pentenal, (E)- | 65 | Octanoic acid |
| 31 | 1-Butanol | 66 | Benzenepropanenitrile |
| 32 | 1-Penten-3-ol | 67 | Heptanoic acid, 7-(butylthio)- |
| 33 | 4-Heptenal | 68 | 1H-Cyclopenta[c]thiophene, hexahydro-, cis- |
| 34 | Isopropyl isothiocyanate | 69 | Phenylethyl isothiocyanate |
| 35 | 1-Butanol, 3-methyl- | 70 | 不明 |

*各ピークの質量数とNISTライブラリとの照合による

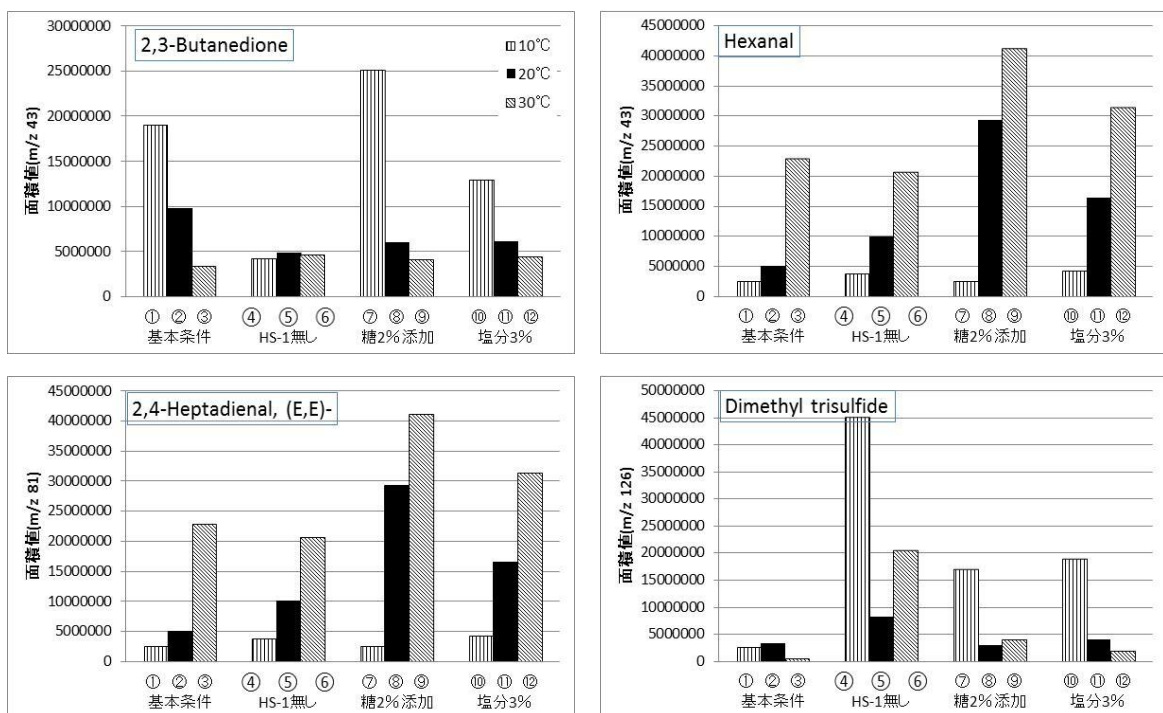


図4 発酵条件ごとの揮発成分のピーク面積値の変化

4.3 GC-0による揮発成分の評価

4.2で温度の違いが揮発成分量の変化への寄与が大きかったため、表1の試作No.①, ②, ③, 及び乳酸菌を添加していない⑥について、表2の条件でGC-0分析を行った。20個のピークから香りが認められた。これらの成分のMSによる推定成分と、表現されたものを表4に示す。同一成分でも複数の表現方法があった。これは、濃度によって同じ成分でも香りの質が変わるためと考えられた。

ヘッドスペース分析はヒトが嗅ぐに近い条件で香氣成分を分析できる手法³⁾であるが、分析感度を向上させるために通常食べる条件よりも高温(50℃)で加熱し、かつトラップ管による濃縮を行っている。同一成分であっても、漬物を嗅いで感じるにおいと、GC-0で表現されたにおいが一致しないことも考えられる。今後、これらについて詳細に検討していく必要がある。

表4 推定成分とにおいの表現

| 推定成分* | 表現されたにおい |
|----------------------------|-------------|
| Methanethiol | 硫黄系、漬物 |
| Acetaldehyde | すっとした, 爽やか |
| Ethanol | アルコール臭 |
| 2,3-Butanedione (Diacetyl) | 不快臭, ジアセチル臭 |
| 1-Penten-3-one | 焦げ臭, 溶媒 |
| 2,3-Pentanedione | チーズ様, 香料 |
| Acetoin | 溶媒, 蒸れた |
| Hexanal | 青臭い, 葉 |
| 5-Cyano-1-pentene | 重い |
| Allyl Isothiocyanate | カラシ |
| cis-2-Penten-1-ol | キノコ, 海藻 |
| cis-3-Hexen-1-ol | すぐき, 海苔, 樹脂 |
| Dimethyl trisulfide | くさい漬物, 硫黄系 |
| Acetic acid | 酸臭 |
| 3-Butenyl isothiocyanate | 油, 硫黄 |
| 不明ピーク | カラシ |
| 2,4-Heptadienal, (E,E)- | 異臭, 生臭い |
| Butanoic acid | 酸, 酢イカ |
| Heptyl isothiocyanate | 茎, 不快臭 |
| Hexanoic acid | 油揚げ |

*各ピークの質量数とNISTライブラリとの照合による

5. まとめ

- GC/MSによる漬物揮発成分の検出成分数の向上について検討し、37成分から70成分に向上した。
- 発酵条件の違いによる揮発成分変化のデータ収集を行ったところ、いくつかの成分に傾向がみられた。2,3-Butanedione(Diacetyl)は、HS-1を添加することで増加し、かつ低温で発酵させると多く生産した。Hexanal及び2,4-Heptadienal, (E,E)-は発酵温度が高いほど、かつ砂糖を添加すると生産量が増えた。Dimethyl trisulfideは低温で多く生産され、HS-1を添加すると減少した。

- GC-0による揮発成分の評価を行ったところ、20成分からにおいが感じられた。

6. 今後の課題

GC-0により香りの認められたピークについて、標品を用いた同定・定量を行う。次にこれら成分を漬物へ添加して官能評価を行うことで、漬物の香りへの寄与を調査する。

より多くの発酵条件を検討し、においの認められた成分の生産量を変化させる要素を明らかにすることで漬物の香りの制御技術を開発する。

7. 参考文献等

- 茨城県工業技術センター研究報告 vol41, 13 (2012)
- 宇田靖・井川浩良・石橋修・前田安彦: 日本食品工業学会誌, 31, 371(1984)
- 菅原悦子・保坂由貴子: 日本家政学会誌, 60, 54 (2009)
- 乳酸菌を用いた漬物の製造方法 特許 3091196