味噌中の脂肪酸エチル生成に対する温度条件ならびに リパーゼ活性の影響

片桐 充昭*・清水 純夫*

Effect of Lipase Activity and Aging Temperature on Formation of Ethyl Fatty Acids in Miso

KATAGIRI Mitsuaki* and SHIMIZU Sumio*

*Department of Domestic Science, Iida Women's College
610 Matsuoshirota, Iida-shi, Nagano, 395*

The "koji" for manufacturing "miso" showed 15.8U/g lipase activity, and an initial "miso" freshly prepared was showed 7.0U/g. Variation of lipase activity in the course of the "miso" aging was found to be negligible. Increase of ethanol content with aging of "miso" fermentation was examined by gas chromatography. At the first stage of fermentation, no ethanol was found, while 1.5% of ethanol was found at 30°C after 15days, and 2.5% after 30 days fermentation. The ratios of ethylesters of fatty acid to total fatty acids varied as follows: the ratio of about 10.5% after 15 days fermentation at 30°C was found, and rose up to about 25.7% after 30 days, while the ratio for 15 days at 20°C showed only 5.2%, and for the 30days at 20°C, 10.4% of esters were found. By the additional lipase on the standard miso manufacturing, the content of ethylesters of fatty acids showed a remarkable increase in comparison with no lipase "miso" fermentation. The ratio of the esters to total fatty acids was found to be about 45%.

(Received Feb. 7, 1994)

味噌中の脂肪酸エチル生成については、味噌の重要な香味成分の一つとして研究が行われてきた^{1), 2)}。近年になり、その抗変異原活性などを含む生理作用が注目され、それらに関するいくつかの報告が見られる。特にリノール酸エチルについては脂質代謝改善剤として、高血圧症、肥満症などに有効性が認められ、高脂血症治療剤として販売されている^{3)~5)}。

筆者らは先に各種の市販味噌、納豆などの大豆加工品中の各種脂肪酸エチルの含量について、既報⁶⁾の簡便で精度のよい定量法を用いて、詳細な分別定量を行い、すでに報告した^{6)~8)}。

本報では、生理的活性が認められている脂肪酸エチル含有量の高い味噌の製造を目的として、その生成量に対

するエチルアルコール濃度、リパーゼ活性量、熟成温度条件の影響ならびに脂肪酸選択性について検討を行い、さらにリノレン酸エチル含有量の高い味噌の試験を行ったので報告する。

実験方法

1. 供試味噌

味噌は常法により蒸煮大豆59に味噌用米麴（窪田味噌醤油(株) 21、種水 8、塩化ナトリウム12の重量比でよく混和したものを標準（試料A）とし、これにリパーゼおよびリノレン酸添加ならびに米麴量を増加したものなど、計5種類の仕込を行った。なお、供試した味噌の配合組成は Table 1 に、また、常法により分析した各試

* 飯田女子短期大学家政学科（〒395 長野県飯田市松尾代田610）

Table 1 Blending and contents (ratio) of various materials and lipase activity in the experimental miso (w/w)

Experimental miso	Bioled soybean	Rice koji	Salt	Water	Linolenic acid	Lipase activity units/g
A	59	21	12	8	0	8.3
A-1**	59	21	12	8	0	41.5
A-2**	59	21	12	8	0	83.0
B	44	32	12	12	0	12.6
C	58	21	12	8	1	8.3

* Lipase activity of rice koji : 15.8u/g

**Additional activity of extracted lipase from rice koji : A-1 / A = 5 times,
A-2 / A = 10 times.**Table 2** Contents of various materials in the experimental miso (%)

Experimental miso**	Water	Protein	Lipids	Carbohydrates		Salt
				Fiber	N.F.E.*	
A	50.4	10.6	5.5	1.3	20.2	12.0
A-1	50.2	10.6	5.5	1.3	20.4	12.0
A-2	50.3	10.6	5.5	1.3	20.3	12.0
B	49.5	8.8	4.4	1.0	24.3	12.0
C	49.4	10.6	6.5	1.3	20.2	12.0

* Non-fibrous carbohydrates

**Refer to Table 1

料の一般成分を Table 2 に示した。

2. 味噌の熟成条件

仕込終了味噌は、30℃、20℃暗所および5℃暗所に静置し、測定時（15日および30日）に均一に混合したのち一部を採取し分析に供した。

3. 供試米麴のリパーゼ活性

米麴5gに約5倍量の緩衝液（McIlvaine 緩衝液，pH 7.0）を加え、ホモジナイザーで均一化した後30mlにメスアップし、濾液についてリパーゼ活性を測定し、米麴1.0g当たりの単位を求めた。

リパーゼ活性の測定は、仲の方法⁹⁾を基準に、味噌および麴の弱いリパーゼ活性の測定のために、リパーゼの抽出および反応時間を多少変更した。すなわち、基質のオリーブ油10mlに2% Polyvinyl Alcohol (PVA) 溶液30mlを加えて乳化し、この基質溶液5mlに緩衝液2.0mlと酵素液3.0mlを加え、よく混合して30℃の恒温槽に入れ、12時間反応させた。アセトン・エタノール混液（1:1）10mlを加え反応を停止させ、これに0.05N水酸化ナトリウム10mlおよび指示薬としてフェノールフタレインを加え、窒素気流下で、0.05N塩酸溶液で滴定（ $T_{12}ml$ ）した。別に空試験として、基質溶液5mlと緩衝液2.0mlをとり、これにアセトン・エタノール混液10mlおよび酵素液3.0mlを加え、本試験と同様に滴定した

（ T_0ml ）。一般にリパーゼ活性の基準は1分間当たり1μmolの脂肪酸を遊離する活性を1単位とするが、本実験では試料のリパーゼ活性が極めて低いため1時間当たり1μmolの脂肪酸遊離を便宜上1単位とした。

リパーゼ活性 unit/g = $\{(T_0 - T_{12}) / 0.6\} \times f \times n$

T_0 : 空試験滴定値ml

T_{12} : 本試験滴定値ml

f : 0.05N HCl 規定度係数

0.6 : 単位換算係数

n : 酵素の希釈倍数

4. 脂肪酸エテルの測定

さきに報告した方法⁶⁾に準じて行った。すなわち、味噌20gを0.02N水酸化ナトリウム溶液100mlに懸濁し、ホモジナイズした。これに飽和塩化ナトリウム溶液50mlを加え、さらに0.2N水酸化リトリウム溶液にてpH 12.0に調整した後エチルエーテルで脂質を抽出し、これをGLC試料とし、下記条件で分析した。

全脂肪酸については、試料10gを凍結乾燥し、クロロフォルム：メタノール＝2：1混液（CM混液）で脂質を抽出し、この抽出物を常法に従って三フッ化ホウ素による直接エステル化法を用いてメチル化し、次のGLCの条件により分析した。

カラム：5%DEGS, Uniport HP 80-100 mesh 3mm

Table 3 Production of ethanol and ethylester of fatty-acids during fermentation in miso

Experimental miso*	Ethanol (ml/100 g)				Ethylester of fatty-acids (mg/100 g) (%)			
	15days		30days		15days		30days	
	20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C
A	1.19	1.70	1.56	2.26	180 (5.2)	364 (10.5)	361 (10.4)	888 (25.7)
A-1	1.06	1.74	1.60	2.26	271 (7.9)	526 (15.2)	521 (15.1)	1294 (37.5)
A-2	1.22	1.71	1.81	2.96	512 (14.8)	718 (20.8)	711 (20.6)	1564 (45.3)
B	1.44	1.95	1.81	2.24	130 (4.7)	277 (10.0)	286 (10.4)	851 (30.8)
C	0.89	1.87	1.72	2.12	294 (6.6)	452 (10.1)	456 (10.2)	1475 (33.1)

*refer to Table 1

(%) : ethylester ratio of fatty acids (ethylester/total fatty acids $\times$ 100)

× 3 m ガラスカラム

検出器 : FID, キャリヤーガス : N₂, 流量 : 35 ml/min,

カラム温度 : 120-185°C (3°C/min)

5. 米麴からの粗リパーゼ溶液の調製¹⁰⁾

米麴100 g に水500 ml を加え, ホモジナイザーで均一化したのち, 濾紙 (TOYO-No. 2) でろ過し, この抽出液に対して0.6飽和となるよう硫酸アンモニウムを添加して冷暗所に一夜静置し, 塩析され沈殿を濾別した。これを少量の水に溶解して, 流水透析によって硫酸アンモニウムを除去し粗リパーゼ溶液を調製した。

6. エチルアルコールの定量

味噌0.5 g に水を加えてウルトラホモジナイザー (IKA-WERK 社製) で均一化したのち50 ml にし, これをろ過して, 濾液をそのまま次の条件でGLCにより分析した。

カラム : 5% PEG 6000 Uniport HP 80-100mesh 3 mm × 3 m のガラスカラム,

検出器 : FID

キャリヤーガス : N₂, 流量35 ml/min,

カラム温度 : 75°C-120°C (3°C/min,)

結果および考察

1. 味噌用米麴のリパーゼ活性

味噌熟成により脂肪酸エチルが生成することから, これに関連すると考えられる米麴仲のリパーゼ活性を測定した。

麴 g 当たりのリパーゼ活性は39.5 mnit/g であった。なお, 試料Aについて仕込時, 熟成15日, 熟成30日目の味噌中のリパーゼ活性を測定したがリパーゼは十分にその活性を持続し, 熟成中の脂質分解ならびに脂肪酸エチルの生成に関与するものと考えられた。また, その水分, タンパク質, 食塩などを Table 2 に示した。

2. 味噌中のエタノール濃度

熟成にともなう脂肪酸エチルの生成にはリパーゼ活性と共にアシル基受与体であるエタノールの生成が大きく影響することが考えられる。そこで, 熟成中におけるエタノール量を分析した結果を Table 3 に示した。エタノールの生成は熟成の進行とともに増加し, 30°C で30日経過後のエタノール生成量は試料により多量の差が見られたが2.12-2.96 ml / 100 g であった。

3. 熟成にともなう脂肪酸エチルの生成について

味噌中での脂肪酸エチル生成はリパーゼの作用によりトリグリセリドが分解され, 生成した遊離脂肪酸がエタノールに転移する。すなわちエステル交換反応によって進行し, 熟成とともに徐々に生成されと考えられる。

1) リパーゼ活性量の影響 試料味噌A, A-1, A-2, B, Cの仕込時のリパーゼ活性量を Table 1 に示した。また, その味噌を20°C および30°C で熟成, 15日目, 30日目の脂肪酸エチル合計量を Table 3 に示した。その結果, 30°C 熟成ではリパーゼ活性が高いほど早期 (15日目) に脂肪酸エチルの生成が進行した。対照区の30°C, 30日間の熟成の場合にはエチルエステル化率 (脂肪酸エチル/全脂肪酸 $\times$ 100) は25.7%を示した。一方, 米麴リパーゼを添加し, 対照区の約10倍のリパーゼ活性を示すA-2区ではエステル化率は熟成15日目で20.8%を, 熟成30日目では45.3%を示した。

前報⁷⁾において米味噌では熟成によってそのエステル化率は50%近くまで高まること, エチルアルコールを多く含有する米味噌などには遊離脂肪酸含量は微量で, 大部分エステル型で存在することを報告した。このことから30日熟成では味噌としての熟成途中と考えられる。本実験結果では, リパーゼ活性が高いほど, また熟成期間が長いほど脂肪酸エチル生成量は高い傾向にあった。

2) エタノール濃度の影響 味噌熟成 (A-C区) 中のエタノールの含有量を Table 3 に示した。同一区

Table 4 Ethylester of fatty-acids in fermentation of miso

experintal miso*	contents of ethyl-fatty acids (aging 30days : mg/100)											
	aging temp. 20°C						aging temp. 30°C					
	C:16	C:18	C:18-1	C:18-2	C:18-3	Total	C:16	C:18	C:18-1	C:18-2	C:18-3	Total
A	26	10	44	198	83	361	120	16	251	392	109	888
A-1	37	13	74	276	121	521	210	39	270	570	205	1294
A-2	81	14	122	371	123	711	192	40	261	826	245	1564
B	19	7	49	150	61	286	104	16	241	380	110	851
C	19	8	26	75	98	456	144	17	174	456	684	1475

ethyl-palmitate C : 16, ethyl-stearate C : 18, ethyl-oleate C : 18-1, ethyl-linoleate C : 18-2, ethyl-linolenate C : 18-3,

*refef to Table 1

Table 5 Effect of fermented temperature on formation of ethyl fatty-acids in experimental miso (mg/100 g) (ratio)

Ethyl-fatty acids	Temperature (°C)		
	5	20	30
Palmitate (C : 16)	17 (4.9)	86 (11.0)	126 (12.2)
Stearate (C : 18)	9 (2.6)	23 (3.0)	32 (3.1)
Oleate (C : 18-1)	46 (13.2)	127 (16.3)	176 (17.0)
Linoleate (C : 18-2)	197 (56.6)	405 (51.9)	530 (51.0)
Linolenate (C : 18-3)	79 (22.7)	139 (17.8)	173 (16.7)
Total	348 (100.0)	780 (100.0)	1037 (100.0)

blending ratio of miso (boiled soybean : rice koji : water : solt=59 : 21 :

8 : 12), sterilized (120°C, 20min.), reaction period (10 days),

additive (lipase 300 units/100 g, ethanol 1.0%, salt 12%)

内のエタノール生成量は30°Cに比べ20°Cで少なくなったが、A-C区の区間差は小さかった。なお、仕込時には各区ともエタノールは検出されなかった。さらに、エタノール含量と脂肪酸エチル含量との関係を Talbe 3 から推定すると、エタノール含有量が高くなれば、脂肪酸エチル生成量が上昇するという比例的な関係は見られなかった。

3) 熟成温度の影響 味噌熟成中における脂肪酸エチル生成量に対する温度の影響については、試験した結果を Table 4 に示した。脂肪酸エチル生成量(合計量)は20°Cでは30°C熟成時の約75%であった。なお、20°C以上の温度では生成した各脂肪酸エチルの生成比率に大差はなく脂肪酸の選択性はなかった。

4) 熟成温度、エタノールおよび食塩濃度の影響(リパーゼ添加試験味噌の場合) 味噌熟成中における脂肪酸エチル生成量に対する温度、エタノール濃度および食塩濃度の影響ならびに脂肪酸エチル生成に対する脂肪酸の選択性を調べるため、滅菌した試料にリパーゼ、エタノールおよび食塩を添加してモデル実験を行った。まず、前記(Table 1)試験の試料Aに準じた原料配合

(蒸煮大豆:米麴:水=59:21:8)の試料を調製し、これを120°Cで20分間滅菌した。なお、リパーゼは米麴から抽出し、ほぼ試料Aと同様になるように300Units/試料100gを添加し、30°Cで10日間置き、生成した各脂肪酸エチルエステル量を測定した結果を Table 5, 6 に示した。脂肪酸エチル生成に対するエタノールおよび食塩濃度の影響について、試験した結果を Table 6 に示した。エタノール濃度に比例して脂肪酸エチル生成量は多くなり、エタノール濃度が低い(0.5%)場合にはリノレン酸エチルの生成比率が高かった。食塩濃度は18%になると脂肪酸エチル生成の減少がみられたが、12%までは大きな影響は認められなかった。

熟成温度およびエタノール濃度の脂肪酸エチル生成に対する試験結果(Table 5, 6)から、エチルエステル生成に対する各脂肪酸の選択性について考察すると、Table 5より、5°Cではパルミチン酸エチルの生成量が少なく、リノレン酸エチル生成量が多く差が認められた。さらにこの結果より、低温においても脂肪酸エチルの生成は少ないながらも進行することは自家製味噌のように、自然の温度(比較的低温度)で長期間(1~3

Table 6 Effects of the addition of ethanol and salt on formation of ethyl-fatty acids in miso

Ethy-fatty acids	Ethanol (%) *			Salt (%) **	
	0.5	1.0	6.0	12.0	18.0
palmitate (C : 16)	46 (8.1)	126 (12.2)	127 (12.9)	111 (12.1)	75 (11.8)
stearate (C : 18)	12 (2.1)	32 (3.1)	33 (3.3)	30 (3.2)	17 (2.9)
oleate (C : 18-1)	65 (11.5)	176 (17.0)	183 (18.6)	160 (17.3)	102 (16.1)
linoleate (C : 18-2)	305 (53.8)	530 (51.0)	493 (50.0)	471 (50.9)	333 (52.4)
linolenate (C : 18-3)	139 (24.5)	173 (16.7)	150 (15.2)	153 (16.5)	107 (16.8)
total	567 (100.0)	1037 (100.0)	986 (100.0)	925 (100.0)	634 (100.0)

blending ratio of miso (boiled soybean : rice koji : water : salt=59 : 21 : 8 : 12),
sterilized (120°C 20min.) reaction temperature and period (30°C, 10days)

*additional lipase activity (300units/100g), salt (12%)

**additional lipase activity (300units/100g), ethanol (1%)

年) 熟成する場合にも十分な脂肪酸エチルの生成が進行するものと推測された。また、エタノール濃度が高い場合には選択性が認められないが、エタノール濃度が低い場合にはリノレン酸エチルの生成量比率が他の脂肪酸エチル比率より高く、脂肪酸の不飽和度によって選択性に差異が生ずるのではないかと推測された。

5) リノレン酸エチル生成に対するリノレン酸添加の影響 高リノレン酸エチル含有味噌製造を目的に Table 1 の A 区 (対照) の組成の味噌にでリノレン酸を 1% 加え Table 1 の C 区として仕込み、その熟成を試みた。その結果を Table 4 に示した。脂肪酸エチルの生成量は、対照区 A と比較すると、リノレン酸エチル以外の生成量は近似した値であったのに対して、リノレン酸エチル含有量は 684mg/100g と、高い値を示し、リノレン酸添加によって高リノレン酸エチル含有味噌製造ができた。なお、この熟成条件で C 区のリノレン酸のエチルエステル化率は 18.4%、リノレン酸の場合は 19.5% を示し、リノレン酸添加によって脂肪酸組成を変えた場合にも各脂肪酸間のエチルエステル化率には大きな差は認められなかった。

本結果は、リノレン酸の添加またはリノレン酸含量高い原材料を用いることにより、強い抗変異原性を示すリノレン酸エチルが味噌中に高濃度に生成することを示すものであり、リノレン酸エチル含量の高い味噌を製造できることが示唆された。

要 約

1. 味噌用麹および味噌のリパーゼ活性を測定した。その結果、味噌用麹のリパーゼ活性は 15.8U/麹g、味噌は 6.7u/g であった。味噌熟成によるリパーゼ活性減少は少なかった。

2. 味噌の熟成にともなうエチルアルコール含量をガスクロマトグラフィー法によって定量した。その結果、仕込直後には検出されなかったが、30°C 熟成のとき 15 日目に平均 1.79% の生成がみられた。30 日目では平成 2.37% であった。

3. 対照区 (A) 味噌の総脂肪酸エチル含量は 20°C、30 日間熟成時 364mg/100g であり、30°C、30 日間熟成で 888mg/100g 程度まで上昇した。

4. 味噌仕込時にリパーゼを添加して熟成したところ、脂肪酸エチル生成量が増加し、全脂肪酸に対する比率は 45% 程度であった。

5. 味噌仕込時にリノレン酸を 1% 添加して熟成したところ、リノレン酸エチル生成量が増加した。

本実験に当たり、御指導賜りました東京農業大学、鴨居郁三教授ならびに長谷川忠男教授に厚く感謝いたします。また、味噌用米麹を御恵与いただきました窪田味噌醤油株式会社ならびにマルマン株式会社に御礼申し上げます。

文 献

- 1) 安平仁美, 糸賀啓治, 望月 務: 信州味噌研究所報告 13号, 19, (1972)
- 2) 大西郁男: 日食工誌, 29, 85 (1982)
- 3) 廣畑富雄: 植物とがん予防, CRC, 1, 155 (1992)
- 4) 岡崎 秀, 秋葉美智子, 本村修一: 日本農芸化学会 59 年大会講演集, 636, (1984)
- 5) 日本医薬情報センター編: 日本医薬品集, p.1243, 薬業時報社 (1988)
- 6) 片桐充昭, 清水純夫, 貝原弘道: 農化, 60, 385 (1986)

- 7) 片桐充昭, 清水純夫: 日食工誌, 33, 667 (1986) 10) 岩井美枝子: リパーゼーその基礎と応用, 115, 幸
8) 片桐充昭, 清水純夫, 貝原弘道, 片桐千代: 日食 書房 (1991)
工誌, 34, 305 (1987) (平成6年2月7日受理)
9) 仲恭寛: 油化学, 36, 119 (1987)
-