味噌の熟成過程と脂質成分の変化

発酵食品の脂質に関する研究 (第1報)

吉田 弘美, 梶本 五郎

神戸学院大学栄養学部

Changes in Lipid Components during Miso Making Studies on the Lipids of Fermented Foodstuffs (Part 1)

Hiromi Yoshida, Goroh Kajimoto

College of Nutrition, University of Kobe Gakuin, Tarumi-ku, Kobe

J. Jap. Soc. Food and Nutr., 25 (5), 415~421 (1972)

Changes in lipid components, fatty acid composition and total tocopherol content during miso making were studied. Lipid components were determined by thin-layer chromatography and their fatty acid compositions by gas chromatography. Total tocopherol contents were determined by bathophenanthroline- FeCl_3 -orthophosphoric acid procedure after saponification. The results obtained were as follows:

(1) Chemical characteristics of extractable lipids remarkably changed during miso aging process as long as for 70 days after mashing, but remained with little change thereafter except with peroxide value.

(2) Total tocopherol contents were decreased in cooking process of soybean seeds, but not decreased during miso aging.

(3) Triglycerides continued to get hydrolyzed for 50 days, while free fatty acids constantly increased during miso aging.

(4) During miso aging, the $\text{C}_{18:2}$ decreased in the triglyceride fractions but relatively increased in the diglyceride and monoglyceride fractions, notably after 50 days.

(5) The extractable lipids of 70 and 150 days samples, which apparently showed, browning, were fractionated into three components (F-1, F-2 and F-3) by means of silicic acid column chromatography. F-2 and F-3 components showed antioxidative action with A. O. M test at 63°C.

(Received February 16, 1972)

発酵食品に関する研究は古く、多くの報告がある。その主なものはアルコール飲料、味噌、醤油などで代表される醸造食品と、パン、乳酸飲料、ヨーグルト、チーズなどで代表される、いわゆる、発酵食品とに区別されている。近年、脂質に関する研究が急速に進展し、これら発酵食品の分野においても脂質の占める意義、変質問題などが重視されるようになってきた。ことに、食品中の脂質は応々、物性、風味、呈味等と関連することが多いが、今まで、脂質は糖、アミノ酸などに比べて含有量が少なく無視されてきた。しかし、食品中の脂質は応々、これらの含有成分と関連し、風味、香に関係しているものと思われる。そこで、発酵食品中の脂質の悪化が

品質、風味にどのように関係しているかを検討しようと考え、まず、味噌の熟成過程での脂質成分の変化について検討した。味噌の熟成過程とたん白質^{1,2)}、有機酸³⁾、糖類⁴⁾、の変化に関する研究は多いが、脂質については少なく、ことに、味噌熟成過程における脂質の性状、脂質組成、構成脂肪酸、トコフェロール (Toc.) 含量などの相互変化についてはみあたらないので実験を行なった。

実験方法

1. 試料の調製

試料は麴歩合 6 割の仕込み味噌を経日的に採取して分

析した。原料配合ならびに処理方法は望月らの方法¹⁾により実施した。前年収穫の乾燥大豆(品種, 奥原)を一夜浸漬し, 5倍量の水で, 0.8 kg/cm^2 , 30分処理した煮熟大豆 13 kg と常法どおり製麴した米麴 3 kg および並塩 2 kg を小型ミンチで十分磨砕混合をくり返して仕込み味噌を調製し, ポリエチレン製容器に密封して 30°C のフ卵器に貯蔵した。

2. 味噌より脂質の抽出

抽出方法および抽出溶媒につき種々, 検討した結果, 以下の方法が最も良いことがわかった。すなわち, 味噌 1 に対して無水硫酸ナトリウム 3 の割合で均一に混合し, あらかじめ, 脱水したものにエチルエーテル・メタノール (1/2, V/V) 混液 5 倍量で 35°C 以下で振とう抽出を 3 回くり返した。抽出液はすべて合一し, 希薄塩類溶液で水洗して水溶性物質を除去した。エーテル層(境界の fluff 層を含める)を取り出し, 無水硫酸ナトリウムで溶媒を除去して総脂質とした。

3. 試料脂質の化学試験

酸価 (A.V.), 過酸化価物 (P.O.V) およびヨウ素価 (I.V) は基準油脂分析試験法⁵⁾により, カルボニル価 (CO.V) は熊沢法⁶⁾によって測定した。

4. 総脂質成分の分画定量

総脂質成分の分画定量は薄層クロマトグラフィー (TLC) より行なった。すなわち, メルク社製の Kieselgel 50 g に再蒸溜水 70 ml を加え, 気泡ができぬように混合したものを東洋科学社製のアプリケーションに流し込み, 厚さ 0.25 mm , $20\times 20\text{ cm}$ の薄層プレート 10 枚を製作した。室温で一夜放置後 110°C の乾燥器内で 3 時間乾燥し, 室温まで冷却後, 使用時まで乾燥箱に保存した。

総脂質約 200 mg を精秤し, クロロホルムを少量加えて, 溶解させたものを, 先に製作した薄層プレート 10 枚に原点から 1.5 cm の位置に直線状にスポットした。展開溶媒として, 石油エーテル・エチルエーテル・酢酸 (70/30/1, V/V/V) で 15 cm 展開し, 溶媒が飛散してからヨウ素気流下におき, 標準品と一致する各分離バンドをチェックした。

ドラフト内でヨウ素を除去し, 各分離バンドをミクロスパテールで剥離して, エチルエーテルで加温下で 3 回抽出をくり返し, 抽出液は 3-G-3 のガラスフィルターを使用して濾過し, エチルエーテルを除去後, 重量を測定して各分離バンドの割合を求めた。なお, 薄層プレートから各成分の回収率は予備実験より, すべて 93% として算出した。

5. 分画脂質のガスクロマトグラフィー

薄層クロマトプレートから分取した各脂質成分は常法どおり, N/2 KOH アルコール溶液でケン化処理し, 脂肪酸を調製した。3%硫酸メタノール溶液でメチルエス

テルとし, 以下の条件でガスクロマトグラフィーを行なった。

柳本昇温ガスクロマトグラフィー G8, column 3 m , 15% PEGS, 70~80 mesh, column temp. 190°C , exhaust temp. 250°C , carrier gas He, carrier flow 12 cc/min. , 1.0 kg/cm^2 , chart speed 5 mm/min. 各脂肪酸組成は半値幅法面積百分率法で求めた。

6. 総 Toc. の定量

ケン化中の Toc. の分解を防ぐため, 総脂質 1 g に対して, 5%ピロガロールアルコール溶液 10 ml を加えて溶解させ, 60% KOH 溶液を加えてケン化し, 精製エチルエーテルで不ケン化物を抽出した。エチルエーテルを除去し, ベンゼン 2 ml を加えて, 完全に溶解した。

このベンゼン溶液 0.05 ml を用いてバソフエナントロリン法⁷⁾により $534\text{ m}\mu$ で比色定量した。総 Toc. 量は, あらかじめ, 作成した標準曲線より, 抽出脂質 100 g に対する mg 量で示した。ケン化物は希塩酸で中和し, 脂肪酸を得た。4. と同方法でガスクロマトグラフィーを行ない脂肪酸組成を求めた。

7. 抽出脂質の酸化防止性試験

味噌熟成中に著しく褐変をきたした 70 日目と 150 日目の抽出脂質について, ケイ酸カラムクロマトグラフィーを行ない, クロロホルム, 10%メタノール・クロロホルム, メタノールで順次溶出させ, その各溶出物を新鮮大豆油 20 ml に 0.1%になるよう添加混合し, 蔵持科学の A.O.M. 装置を用い, 63°C , 2.2 ml/本/min. の割合で空気を吹き込み自動酸化させ, 酸化曲線を求めた。

実験結果および考察

1. 抽出脂質の性状と Toc. 含量の変化

味噌熟成過程における経時的な抽出脂質の性状の変化は Fig. 1, 総 Toc. 含量の変化は Fig. 2 に示した。

P.O.V は味噌調製初期に激しい変動を示すが, 70 日目から急激した。CO.V は P.O.V とは反対の傾向を示した。すなわち, P.O.V が最小になる 20 日目に最も高くなり (CO.V : 37 meq/kg), その後, 急減しほぼ一定となった。CO.V に比べて P.O.V が比較的小さい値を示すのは混在する水分含量が常に約 45% もあるため, PO の生成よりも加水分解が先行するものと思われる。

I.V は時間の経過とともに, わずかに減少し, A.V は 20 日目から 70 日目まで急増し, その後は一定となった。

味噌の場合には, 仕込み大豆中の水分, 酵素および麴の微生物等の作用により, 頻繁に加水分解が起こり, その結果, 遊離脂肪酸が蓄積され, A.V が高くなったのであろう。

一方, 総 Toc. は大豆原料油中に約 $300\text{ mg\%}$ 存在するが, 煮熟により約 $130\text{ mg\%}$ に減少し, 味噌熟成中はわ

Fig. 1. Changes of chemical characteristics in total lipids during miso making.

Fig. 2. Changes of total tocopherol contents during miso making.

ずかに減少するだけであつた。Toc. は比較的水分量が多い場合、二量体を生成することが報告されている⁹⁾。また、生成した二量体が Tocol の各誘導体と同程度、もしくは、それ以上の酸化防止性を有することも報告されている⁹⁾。

あるいは、味噌熟成時においてもこのような現象が起こっているため、脂質の変質が著しく少ないとも考えられる。なお Toc. の二量体の研究については別報とした。

2. 総脂質成分の変化

熟成過程における脂質成分の変化は Fig. 3, これらの成分の含有割合は Table 1, 各グリセリド間の変化は Fig. 4 に、それぞれ示した。

味噌仕込み直後からトリグリセリドが急減し、遊離脂肪酸が増加した。初期のころはジグリセリド、モノグリセリドもわずかに増加した。50日目以後は各グリセ

Fig. 3. Thin-layer chromatogram of total lipids during miso making

HC : Hydrocarbon, TG : Triglyceride, DG : Diglyceride, FFA : Free fatty acid, S : Sterol, MG : Monoglyceride, PS : Polar substance, I : Standard mixture, II : Soybean oil, III : Koji oil. Developed with petroleum ether-diethyl ether-acetic acid (70/30/1). Visualized with iodine vapor.

リド間にはほとんど変化なく、わずかに遊離脂肪酸が増加する程度であつた。仕込み直後に極性物質が高くなっているのは、煮熟大豆から混入してきたカロチノイド、サポニンなどの色素や麹中の色素と褐変物の生成による影響とも考えられる。

これらの極性物質は時間の経過とともに減少するのに対して、炭化水素が20日目に増加しているのは脂質の変質に伴うためか、あるいは、これらの色素が分解した結果とも考えられる。

Table 1. Changes of total lipid compositions during miso making (%)

Lipids class	Storage period (days)								
	0	5	10	20	35	50	70	100	150
Hydrocarbons	tr	0.9	3.1	7.4	5.7	3.4	2.0	2.4	1.9
Triglycerides	71.8	63.2	64.8	53.6	48.1	59.3	55.1	58.0	51.3
Diglycerides	5.6	1.5	4.0	6.4	9.8	5.6	5.8	4.2	4.3
Monoglycerides	3.0	8.9	0.6	2.2	8.7	2.7	1.5	1.2	2.1
Free fatty acids	5.6	9.1	12.6	15.0	18.2	20.7	23.3	24.6	28.2
Sterols	1.0	1.2	2.0	1.8	1.3	1.7	3.1	2.2	2.6
Polar substances	10.3	12.3	10.4	12.0	8.2	6.4	7.8	6.8	7.5
Unknown	2.7	2.9	2.5	1.6	tr	tr	1.5	1.6	2.1

* tr: trace

Fig. 4. Changes of glyceride compositions and free fatty acids during miso making.

3. 構成脂肪酸組成の変化

各脂肪酸組成の変化は Table 2, グリセリドの脂肪酸組成は Table 3, 遊離脂肪酸組成は Table 4 にそれぞれ示した。

総脂質の脂肪酸組成は熟成の時間経過とともに、 $C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}$ がわずかに減少した。各グリセリドの場合、特徴的な組成を示した。すなわち、熟成とともにトリグリセリドは $C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}$ は減少し、 C_{16} 、 C_{18} は増加した。ジグリセリドは $C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}$ の増加傾向を示し、 C_{16} 、 C_{18} は減少した。モノグリセリドは $C_{18:2}$ が熟成終期に急増した。このことは、味噌の主成分である大豆油のグリセリド構造に基づくものと考えられる。

一般に植物油の場合、1,3の位置に飽和脂肪酸が多く、2の位置に不飽和脂肪酸が多いことはよく知られている^{10)~13)}。従って、味噌熟成中に

Table 2. Fatty acid compositions of total lipids during miso making (%)

Fatty acids	Storage period (days)								
	0	5	10	20	35	50	70	100	150
C_{12}	0.1	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
C_{14}	0.4	0.1	0.2	0.3	0.2	1.1	0.2	0.3	0.4
$C_{15}^?$	tr	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	tr	tr
C_{16}	13.3	14.0	15.9	14.9	15.3	14.3	13.8	12.3	13.5
$C_{16:1}$	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
$C_{16:2}$	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
$C_{17}^?$	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
C_{18}	2.6	3.1	2.2	2.7	2.4	3.2	3.6	2.8	2.7
$C_{18:1}$	20.9	19.4	18.5	20.1	21.6	20.1	21.7	22.2	24.6
$C_{18:2}$	54.0	54.8	54.7	54.2	51.8	53.8	52.2	53.3	50.3
$C_{18:3}$	7.5	7.0	7.2	6.3	6.4	5.8	6.4	6.2	6.1
C_{20}	1.1	1.4	0.2	1.2	2.0	1.8	1.9	2.0	2.3

* tr: trace

Table 3. Fatty acid compositions of glyceride during miso making (%)

Fatty acids	Glyceride compositions	Storage period (days)								
		0	5	10	20	35	50	70	100	150
C ₁₂	TG	tr	0.2	0.2	tr	0.3	tr	0.9	0.3	0.2
	DG	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	MG	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
C ₁₄	TG	0.5	0.5	0.3	0.1	0.2	0.8	1.9	1.6	1.5
	DG	3.3	5.0	1.6	2.6	0.5	1.5	0.1	0.1	0.1
	MG	4.2	5.2	1.9	3.1	2.2	0.9	0.3	0.5	0.3
C ₁₅ ?	TG	0.1	0.1	0.3	tr	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1
	DG	3.0	1.0	0.3	1.4	0.2	0.9	tr	tr	tr
	MG	0.6	1.5	0.5	1.0	0.9	tr	tr	tr	tr
C ₁₆	TG	15.3	14.6	16.5	12.1	13.0	14.7	18.4	18.3	18.6
	DG	31.6	30.8	36.4	25.9	27.6	22.1	21.5	21.6	18.7
	MG	29.3	36.3	25.7	26.7	27.9	17.7	15.4	15.3	15.8
C _{16:1}	TG	0.9	2.0	1.4	tr	0.3	3.2	5.3	4.2	3.9
	DG	18.5	14.8	9.1	6.7	2.5	5.4	2.6	3.1	2.1
	MG	8.9	14.0	4.1	6.7	9.2	4.8	1.8	1.6	1.2
C _{16:2}	TG	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	DG	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
	MG	1.7	2.2	2.4	1.1	tr	1.1	1.2	1.3	1.5
C ₁₇ ?	TG	0.6	tr	1.6	0.3	0.5	4.7	1.7	1.8	1.6
	DG	2.6	1.7	0.7	3.0	1.8	1.6	0.6	0.5	0.8
	MG	2.3	0.7	3.2	5.7	5.2	2.7	0.8	0.3	0.5
C ₁₈	TG	2.3	3.0	2.7	3.1	3.1	8.8	8.5	8.2	8.1
	DG	5.5	6.1	2.2	8.7	8.1	4.0	3.2	2.6	3.9
	MG	8.2	9.5	6.5	8.7	18.3	4.6	2.3	4.2	3.2
C _{18:1}	TG	18.0	22.7	20.8	20.3	24.8	19.8	24.1	21.7	26.3
	DG	19.8	16.8	23.2	16.3	17.8	20.3	25.6	26.8	22.5
	MG	18.3	19.4	28.8	28.5	21.9	30.8	18.9	20.8	18.4
C _{18:2}	TG	54.6	51.9	51.0	56.9	51.8	42.2	33.8	37.1	34.8
	DG	15.7	19.8	27.7	30.2	38.0	37.0	41.8	42.0	45.6
	MG	20.3	10.8	16.2	13.1	13.4	33.8	53.3	52.3	52.3
C _{18:3}	TG	7.0	4.8	5.0	6.8	5.2	4.6	5.0	5.2	3.2
	DG	tr	4.0	2.5	5.2	3.4	5.4	4.6	3.3	6.0
	MG	6.1	0.4	10.7	4.7	1.0	3.6	6.0	3.7	6.8
C ₂₀	TG	0.4	0.2	0.2	0.4	0.6	1.0	0.8	1.4	1.0
	DG	0.1	tr	0.1	tr	0.1	tr	tr	tr	0.3
	MG	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr

* tr: trace

においてもランダムに加水分解されるのではなく、ある一定の酵素的作用によって加水分解されるため、ジグリセリド、モノグリセリド中の脂肪酸組成において不飽和脂肪酸の占める割合も多くなっている。このことは、加水分解で生成された遊離脂肪酸組成からも明らかである。熟

成の時間経過とともに、遊離脂肪酸中の C_{18:2} が減少し、C_{18:1}、C₁₈ が多いことから、酵素的な加水分解が考えられる。また、モノグリセリドの脂肪酸組成で C_{18:2} が多いのは、2 の位置に脂肪酸がエステル結合しているものが比較的多く残存するためであろう。

Table 4. Changes in free fatty acids during miso making (%)

Fatty acids	Storage period (days)								
	0	5	10	20	35	50	70	100	150
C ₁₂	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr
C ₁₄	1.4	1.5	1.5	1.1	0.8	1.0	0.5	1.6	1.8
C ₁₅ ?	tr	0.4	0.4	0.4	0.7	tr	tr	0.4	0.3
C ₁₆	26.8	30.5	27.9	24.9	19.9	26.3	25.7	23.8	25.6
C _{16:1}	3.5	5.5	1.7	1.9	6.3	3.9	1.5	2.3	4.0
C _{16:2}	0.4	0.1	tr	tr	1.5	0.9	0.3	0.6	0.5
C ₁₇ ?	0.2	0.7	0.9	0.3	1.6	0.9	tr	0.7	0.3
C ₁₈	4.8	5.2	3.3	2.7	7.9	3.1	7.3	6.4	5.8
C _{18:1}	16.3	12.8	13.1	12.5	16.9	18.0	19.0	18.8	17.3
C _{18:2}	41.8	38.0	45.9	49.0	35.8	38.0	37.4	37.2	32.9
C _{18:3}	4.6	4.6	5.3	7.2	6.2	5.7	6.2	5.6	6.3
C ₂₀	0.2	0.7	tr	tr	2.4	2.2	2.1	2.8	3.2

* tr: trace

Fig. 5. Antioxidative actions of fractioned components from extracted oils during miso making.

なお、極性物質は褐色を呈し、ニンヒドリン反応は陽性であり、TLC で遊離アミノ酸の存在が確認された。望月らの報告¹⁾によると味噌熟成過程において遊離アミノ酸が増加するといっている。おそらく、たん白質の加水分解によって生成されたアミノ酸とカルボニル化合物の褐変物がエーテル層に溶解してきたとも考えられる。

4. 酸化防止性

熟成70日目ならびに150日目の味噌の抽出液について、ケイ酸カラムクロマトグラフィーを行ない、クロロホルム、10%メタノール・クロロホルム、メタノールで溶出された各成分を F-1、F-2、F-3 とし、これら3成分の酸化防止性を調べた結果は Fig. 5 に示した。

F-1 は酸化促進作用を示したが、F-2、F-3 はいずれも酸化防止性を示した。F-1 は一部変質脂質が含まれているため、酸化促進性を示したものと考えられる。F-2、F-3 の両成分はニンヒドリン反応は陽性であり、ことに、F-3 はきわめて鋭敏であった。両成分を常法によりケン化処理し、ケン化物をメチルエステルとしてガスクロマトグラフィーを行なった結果、F-2 は各種の脂肪酸 (C₁₆, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}) と2個の未知成分が検出された。しかし、F-3 はこれらの脂肪酸は検出されなかった。従って、F-2 は味噌熟成中に生成した褐変物、F-3 はたん白質の加水分解によって生成したアミノ酸による酸化防止作用と思われる。

要 約

煮熟大豆、麴、食塩を13:3:2の割合で混合したものを30°Cで熟成させ、味噌の熟成過程と脂質成分の変化、構成脂肪酸組成、Toc. 含量、各グリセリドの割合とそれらの脂肪酸組成、褐変物の酸化防止性について調べた結果、

(1) 脂質は仕込み直後から35日目頃まで変化し、それ以後はほとんど変化しない。

(2) 構成脂肪酸組成は $C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}$ の割合が、わずかに減少する程度であった。

(3) Toc. 量は熟成過程中ほとんど変化しなかった。

(4) トリグリセリドの減少は著しく、これに伴い遊離脂肪酸の蓄積が多い。

(4) 褐変が比較的著しい抽出脂質の部分に油脂の変質促進を抑える物質が存在していた。

文 献

- 1) 望月 務, 六川功一, 本藤 智, 大内一郎, 松本

- 和子: 食品工誌, 15, 408, 414 (1968)
 2) 伊東清枝: 栄養と食糧, 23, 40 (1970)
 3) 豊島治男, 上田良三: 醸酵工学雑誌, 38, 230 (1960)
 4) 松下アヤコ: 農化, 44, 51 (1970)
 5) 日本油化学協会編: 基準油脂分析試験法, (1966) 朝倉書店 (東京)
 6) 熊沢 恒: 油化学, 14, 167 (1965)
 7) 津郷友吉, 山内邦男, 菅野長右衛門: 農化, 42, 367 (1968)
 8) Komoda, M. and Harada, I.: *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, 46, 18 (1969)
 9) 清野 肇, 渡辺昭一郎, 阿部芳郎: 油化学, 20, 218 (1971)
 10) 津田 滋: 油化学, 19, 572 (1970)
 11) Brockerhoff, H., Hoyle, R. J. and Wolmark, N.: *Biochim. Biophys. Acta*, 125, 55 (1966), 116, 67 (1966)
 12) Slakey, S. P. M. and Lands, W. E. M.: *Lipids*, 3, 30 (1968)
 13) Crhste, W. W. and Moore, J. H.: *Lipids*, 4, 345 (1969)

(昭和47年2月16日受理)