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

田中直義[§], 山内智子, 勝股理恵*, 木内 幹*

共立女子短期大学生活科学科

* 共立女子大学家政学部

Comparison of Volatile Components in Commercial Itohiki-Natto by Solid-phase Microextraction and Gas Chromatography

Tadayoshi Tanaka[§], Tomoko Yamauchi, Rie Katsumata* and Kan Kiuchi*

Department of the Science of Living, Kyoritsu Women's Junior College,
2-2-1, Hitotsubashi, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8433

* Faculty of Home Economics, Kyoritsu Women's University,
2-2-1, Hitotsubashi, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8433

The volatile component in commercial itohiki-natto was extracted with divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane solid-phase microextraction fiber at 50°C for 60 min, and injected by gas chromatograph (GC) or gas chromatograph mass spectrometer (column: DB-WAX (0.25 mm ID, 30 m long, 0.25 µm film thickness)). Each peak was identified by comparing the mass spectrum and the retention indices with the mass spectrum data bases and the retention indices of authentic compounds, respectively. Twelve alcohols, 20 ketones, 12 fatty acids, 12 nitrogen compounds, 10 hydrocarbons, 8 esters, 3 phenols, 2 frans, 1 aldehyde, 1 pyrane, 1 oxazole, and ammonia, and total 83 compounds were identified. The quantitative comparison was carried out by addition of an internal standard of 2-heptanol (100 ppm aq, 10.0 µl) into the vial, and it was done by the gas chromatograph equipped with FID. By comparing the peak area between major odor compounds and internal standard, the concentration was obtained. The abundance of the volatile components is greatly different between each product. Especially, in the product using Natto-bacteria mutant which does not produce the low molecular branched fatty acid, there were small content of isobutyric acid, 2-methylbutyric acid and isovaleric acid. These measurement result agreed with the odor difference.

(Received Sep. 12, 2002 ; Accepted Feb. 27, 2003)

東および東南アジアの各地には、大豆に納豆菌 *Bacillus subtilis* (*natto*) を繁殖させて製造する各種の発酵食品が存在する。大豆はアミノ酸バランスにすぐれている食品であるが、消化性が良くないという性質を持っている。しかし、発酵させることによりその欠点を除くことができるため、各地で種々の発酵食品が作られている。糸引き納豆はそれらの一種であり、日本では発酵終了直後の大豆をそのまま食べるが、他の地域では食塩および香辛料などを加えてさらに熟成させ、調味料として利用している民族が多い。

糸引き納豆は独特の臭いを持つためにこれに対する好みは二分されている。特に西日本では食べる人が少なく、臭

いの弱い納豆の開発が納豆製造業界から求められている。一部の企業においては、近年遺伝子工学の技術により短鎖分岐脂肪酸を生成しない納豆菌株を作り¹⁾、これを利用した製品を実用化している。著者らも臭いの弱い納豆を作る菌株を選択し、実用化に向けていくつかの試みを行っている²⁾³⁾。

納豆の臭い物質についてはこれまでにいくつかの報告がなされており、アンモニア、ジアセチル、アセトイン、ピラジン類、低分子脂肪酸類が同定されている^{4)~7)}。しかしそれらの物質を製品間で定量比較した報告は認められない。微量固相抽出 (SPME) は揮発性物質を簡便に抽出してガスクロマトグラフ (GC) カラムへ注入する近年開発された方法で、不揮発性の液層をフューズドシリカファイバーに塗布した特殊な SPME ファイバーに揮発性物質を吸着濃縮させ、GC へ注入する方法である^{8)~10)}。ここでは SPME と GC およびガスクロマトグラフ・マススペクト

〒101-8433 東京都千代田区一ツ橋 2-2-1

* 〒101-8433 東京都千代田区一ツ橋 2-2-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), tanaka@nl.kyoritsu-wu.ac.jp

ロメーター (GCMS) により、市販納豆から発散する揮発性物質を定量比較した結果について報告する。

方 法

1. 試料と試薬

使用した 6 種類 (試料 A~F) の糸引き納豆は東京都内のスーパーマーケットで購入した。試料 A は比較的小規模な企業の製品、試料 B と C は同一の製造業者から異なる名称で販売されている製品である。そのうち C はビール酵母を納豆菌に添加することにより、臭いをまろやかにすることができているとされている。D と E も同一の製造業者から異なる名称で販売されている製品であり、E は臭いの穏やかな製品とされている。F は最大の納豆メーカーの製品である。また、北アメリカ産極小粒品種大豆であるマール (2000 年産) に、成瀬発酵研究所より購入した納豆菌を大豆 1 粒あたり納豆菌が約 1000 個となるように接種し、通常の保温器中で 40℃、20 時間発酵させた後、4℃の冷蔵庫中で 3 日間熟成させたものを用いた (試料 G)。

試薬は東京化成工業、和光純薬および Aldrich 社の製品をそのまま用いた。

2. SPME ファイバーによる抽出条件の検討

7 ml バイアルに納豆を入れてセプタムをかぶせ、穴あきキャップをしてから SPME ファイバー (Supelco 社) をそれぞれ挿入して気相に暴露させ、所定温度で放置することにより揮発性物質を抽出した。SPME ファイバーは次の 8 種を用いて比較した。

polydimethylsiloxane (膜厚 7 μ m) (以下 PDMSa と省略する)

polydimethylsiloxane (膜厚 30 μ m) (以下 PDMSb と省略する)

polydimethylsiloxane (膜厚 100 μ m) (以下 PDMSc と省略する)

polydimethylsiloxane/divinylbenzene (膜厚 65 μ m) (以下 PDMS/DVB と省略する)

polyacrylate (膜厚 85 μ m) (以下 PAC と省略する)

carboxen/polydimethylsiloxane (膜厚 65 μ m) (以下 CAR/PDMS と省略する)

divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (膜厚 50/30 μ m) (以下 DVB/CAR/PDMS と省略する)

carbowax/polydimethylsiloxane (膜厚 65 μ m) (以下 WAX/PDMS と省略する)

抽出後の SPME ファイバーは FID を検出器とする島津製作所製 GC-14A ガスクロマトグラフの注入口に挿入した。抽出条件を検討する際の GC の条件は以下の通りとした。注入口温度：250℃、注入部インサート：内径 0.75 mm (Supelco 社)、注入方法：スプリットレス (1 分間)、カラム：DB-WAX (内径 0.25 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μ m、J&W 社)、カラム温度：50℃で 1 分間保持した後、毎分

4℃の割合で昇温させた。クロマトグラムはウォーターズ社製データステーション 805 で記録し、解析した。

3. 揮発性物質の同定

ピークの同定は日本電子製 JMS-DX303 型の GCMS にデータ解析用コンピューターである日本電子製 JMA-DA5000 を接続したものを使用して行った。GC の条件は SPME ファイバーによる抽出条件の検討と同一であるが、カラム温度は 30℃から昇温を開始した。出現したピークの同定は、得られた電子衝撃化マススペクトルとデータベースに保存されているマススペクトルとを比較すること、標品のリテンションインデックス (以下 RI と省略する) とを比較することにより行った。さらに一部のピークについては、イソブタンを反応ガスとする化学イオン化マススペクトルにより分子量を推定し、同定の確実性を高めた。

4. 揮発性物質の濃度比較

バイアルに内部標準として 100 ppm の 2-ヘプタノール水溶液 10.0 μ l を試料である納豆とともに入れ、所定の条件で SPME ファイバーにより抽出した。GC は揮発性物質同定と同一の条件で行い、内部標準のピーク面積値と比較した。ピークの同定はピークの RI と揮発性物質を GCMS で同定した際の RI とを比較することにより行った。

ジアセチル、ピラジン、2-メチルピラジン、アセトイン、2,5-ジメチルピラジン、2,3,5-トリメチルピラジン、イソ酪酸、2-メチル吉草酸、および内部標準である 2-ヘプタノール標品のそれぞれを 10 ppm、100 ppm となるようにバイアルへ納豆とともに入れ、所定時間、所定温度で SPME ファイバーで抽出した後、GC へ注入した。得られたそれぞれのピーク面積値から標品無添加のピーク面積値を減じた値と、2-ヘプタノールのピーク面積値とを比較することにより、内部標準に対するそれぞれのピーク面積値の比を求めた。各試料を分析した際のピーク面積値と内部標準のピーク面積値とを比較した値と、標品それぞれのピーク面積値と内部標準のピーク面積値とを比較した値より、試料中の濃度を求めた。

結 果

1. SPME ファイバーによる抽出条件の選択

(1) SPME ファイバーの選択

それぞれの GC に出現したピークの数とピークの高さを比較したところ、次のようであった。PDMSa、PDMSb、PDMSc はいずれもほぼ同じ数のピークが出現したが、PDMSc においてリテンションタイム (RT) の短い物質はピークが高くなる傾向であった。しかし、いずれのピークも DVB/CAR/PDMS に比べると低かった (Fig. 1)。PDMS/DVB、PAC、WAX/PDMS はいずれも一部のピーク高は PDMSc より大きかったが、DVB/CAR/PDMS に比べるとほとんどのピークは低かった。CAR/PDMS は

RT の短いピークの一部は DVB/CAR/PDMS より高かったが、RT が長くなると全体的にピークは低くなった。以上の結果から、PVB/CAR/PDMS が最も適していると判断した。

(2) 試料量の比較

バイアルに入れる試料の量は一般的に多い方がより良い結果が得られとされているので、2.5 g または 4.0 g の納豆をバイアルに入れてクロマトグラム中のいくつかのピーク面積を比較した。その結果、いずれのピークも試料 4.0 g の場合の面積値がそれぞれ 1.6 ないし 5.0 倍と大きくなったので、以下の分析では試料量を 4.0 g とした (Fig. 2)。

(3) 抽出温度の条件

抽出時の温度はバイアルをヒーティングブロックで 40, 50°C に加熱し、室温の場合と比較した。なお、50°C 以上で加熱すると大豆臭が官能的に強く感じられるようになったため、本研究では 50°C 以下の条件で比較した。クロマトグラム中のいくつかのピーク面積を比較した結果、一部のピークは 40°C の面積値が最大になったが、ほとんどのピークは室温、40°C、50°C の順に面積値が大きくなった (Fig. 3) ので、以下の分析では加熱温度を 50°C とした。

Fig. 1 Comparison of SPME fiber

Extraction conditions

SPME fiber :

A ; polydimethylsiloxane (100 μ m).

B ; divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxan (50 μ m/30 μ m)

temperature : room temp.

time : 30 min.

GC conditions :

column ; DB-WAX (0.25 mm ID, 30 m long, 0.25 μ m film thickness), initial temperature ; 50°C (hold time ; 1 min), program rate ; 4°C/min, injection temperature ; 250°C, injection mode ; splitless, inlet liner ; 0.75 mm ID, detector ; FID.

(4) 抽出時間の条件

抽出時間は 15, 30, 60, 120 分について比較した (Fig. 4)。その結果、一部のピークにおいて面積値が 60 分で小さくなるものがあったが、ほとんどのピークにおいては時間を長くするにしたがって面積値は大きくなり、60 分と 120 分では大きな差が生じなくなった。このことより、抽出時間を 60 分間とした。

以上の結果より、以後の同定および濃度の比較分析は、7 ml バイアルに 4.0 g の納豆を入れ、DVB/CAR/PDMS ファイバーを気相に挿入し、50°C で 60 分間の抽出を行った。なお、同一条件についての繰り返し分析によるピーク面積値のバラツキは 20% 以下であった。

2. 市販納豆から発散する揮発性物質の同定

GCMS によりアルコール 12 種、ケトン 20 種、有機酸 12 種、窒素化合物 12 種、炭化水素 10 種、エステル 8 種、フェノール 3 種、フラン 2 種、アルデヒド 1 種、ピラン 1 種、オキサゾール 1 種、アンモニアの合計 83 種を同定することができたが、同定できなかったピークも存在した。同定するまでにはいたらなかった中で、電子衝撃化マスペクトルと化学イオン化マスペクトルより RI 1869, 1883 は分子量 212 の、RI 1978 は分子量 226 の 2-アルカノンであることが推定できた。 (Fig. 5, Table 1)。

3. 市販納豆から発散する揮発性物質濃度の比較

GCMS による揮発性物質の同定と同一の条件で、GC による検出を FID で行って得られたピーク的面積値を内部標準物質のピーク面積値と比較した結果を Table 1 に示した。また、納豆の主要な臭い物質とされている 8 種の揮発性物質と内部標準物質とした 2-ヘプタノールのピーク面積値の比を Table 2 に、各試料中におけるそれらの濃度

Fig. 2 Effect of sample weight

Extraction conditions

SPME fiber : divinylbenzene / carboxen / polydimethylsiloxan (50 μ m/30 μ m)

temperature : room temp.

time : 30 min.

を Table 3 に示した。アセトインについては、試料に添加しても添加した濃度に比例してピーク面積値が増加せず、むしろ減少する結果となったため、定量値を求めることはできなかった。

試料 A では、ジアセチル (peak no-11), 2,5-ジメチルピラジン (peak no-41), 2,3,5-トリメチルピラジン (peak no-54), イソ酪酸 (peak no-73) が比較的少なく、

官能的にも比較的穏やかな臭いが感じられた。B と C を比較すると C はイソ酪酸エチル (peak no-9), アセトイン (peak no-39), 2-エチル-5 or 6-メチルピラジン (peak no-51), 2,3,5-トリメチルピラジン (peak no-54), ブタンジオール (peak no-74) が多く, B はイソ酪酸 (peak no-73) が多かった。C は官能的に臭いが穏やかであるように感じられたことは、イソ酪酸の差によるものであろう。D

Fig. 3 Effect of sampling temperature

Curves are as follows : (A) RT 2.01 min ; (B) 6.00 min ; (C) 11.09 min ; (D) 13.69 min ; (E) 18.86 min ; (F) 22.01 min ; (G) 24.95 min.

Extraction conditions

SPME fiber : divinylbenzene / carboxen / polydimethylsiloxan (50 μm/30 μm)
time : 30 min.

Fig. 4 Effect of sampling time

Curves are as follows : (A) RT 2.01 min ; (B) 6.00 min ; (C) 11.09 min ; (D) 13.69 min ; (E) 18.86 min ; (F) 22.01 min ; (G) 24.95 min.

Extraction conditions

SPME fiber : divinylbenzene / carboxen / polydimethylsiloxan (50 μm/30 μm)
temperature : 50°C

Fig. 5 Total ion chromatogram of commercial Itohiki-natto

Extraction conditions

SPME fiber : divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxan (50 μm/30 μm)
temperature : 50°C
time : 60 min.

GC conditions :

column ; DB-WAX (0.25 mm ID, 30 m long, 0.25 μm film thickness), initial temperature ; 30°C (hold time ; 1 min), program rate ; 4°C/min, injection temperature ; 250°C, injection mode ; splitless, inlet liner ; 0.75 mm ID.

Mass conditions :

scan time ; 1 sec, mass range ; 15-500 amu.

Table 1 Volatile components from commercial itohiki-Natto

Peak No	Retn No	Indx* ¹	Ident* ⁴	Compound name	Peak ratio* ⁷						
		Exp* ²	Auth* ³		A	B	C	D	E	F	G
1	<800			unidentified	0.32	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.11
2	811	816	MS&RI*5	acetone	2.16	0.85	1.51	0.56	0.74	0.66	0.42
3	825	822	MS&RI	acetic acid ethyl ester	0.02	<0.01	0.10	<0.01	<0.01	0.04	0.04
4	901	899	MS&RI	2-butanone	0.46	0.14	<0.01	0.63	0.52	0.78	0.31
5	905	903	MS&RI	methanol	0.46	0.29	0.24	0.04	0.13	0.11	0.05
6	922	921	MS&RI	isobutyric acid methyl ester	<0.01	<0.01	<0.01	0.08	0.04	0.08	<0.01
7	927	925	MS&RI	3-methyl-2-butanone	0.03	0.01	0.02	<0.01	<0.01	<0.01	0.04
8	934	934	MS&RI	ethanol	0.76	0.13	0.38	0.70	0.63	3.59	4.78
9	964	963	MS&RI	isobutyric acid ethyl ester	0.10	0.12	0.86	0.97	1.23	0.02	0.06
10	975	975	MS&RI	2-pentanone	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.12	0.04
11	980	977	MS&RI	diacetyl	0.04	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.24	0.06
12	1008	1006	MS&RI	4-methyl-2-pentanone	0.13	0.06	0.08	0.24	0.52	0.22	0.40
13	1010	1009	MS&RI	2-methylbutanoic acid methyl ester	0.03	<0.01	0.05	<0.01	<0.01	0.06	0.06
14	1021	1018	MS&RI	isovaleric acid methyl ester	0.02	0.39	0.36	0.81	0.68	0.07	<0.01
15	1037	1034	MS&RI	toluene	0.05	<0.01	<0.01	<0.01	0.05	0.14	0.17
16	1055	1050	MS&RI	2-methylbutanoic acid ethyl ester	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.04	0.10
17	1088	1077	MS&RI	2-hexanone	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
18	1106		MS*6	ammonia	—	—	—	—	—	—	—
19	1122	1122	MS&RI	ethylbenzene	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
20	1129	1129	MS&RI	p-xylene	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
21	1135	1134	MS&RI	m-xylene	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
22	1146	1141	MS&RI	5-methyl-2-hexanone	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
23	1172	1168	MS&RI	1-methylethylbenzene	<0.01	<0.01	<0.01	0.06	<0.01	0.04	<0.01
24	1181	1178	MS&RI	o-xylene	<0.01	0.02	<0.01	0.06	0.04	0.30	0.03
25	1184	1179	MS&RI	2-heptanone	0.38	0.16	0.40	0.37	0.69	0.40	0.40
26	1188	1190	MS&RI	pyridine	0.20	<0.01	0.18	<0.01	0.03	<0.01	0.26
27	1204	1200	MS&RI	2,4,5-trimethyloxazole	0.07	<0.01	<0.01	0.06	0.06	0.07	0.09
28	1206	1194	MS&RI	propylbenzene	<0.01	<0.01	<0.01	0.04	0.08	<0.01	<0.01
29	1214	1210	MS&RI	pyrazine	0.03	<0.01	0.02	0.08	<0.01	<0.01	<0.01
30	1217	1211	MS&RI	3-methyl-1-butanol	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.15	<0.01
31	1231	1231	MS&RI	2-pentylfuran	0.05	0.10	<0.01	0.04	0.08	0.20	0.05
32	1237	1236	MS&RI	6-methyl-2-heptanone	0.19	0.08	0.08	<0.01	<0.01	0.06	0.09
33	1247	1243	MS&RI	3-hydroxy-3-methyl-2-butanone	0.12	0.11	0.10	0.71	<0.01	0.45	<0.01
34	1252	1252	MS&RI	styrene	<0.01	0.02	<0.01	0.18	0.79	0.22	<0.01
35	1253	1252	MS&RI	3-octanone	0.12	0.08	0.69	0.11	0.12	0.06	0.16
36	1256		MS	5-methyl-2-heptanone	0.33	0.02	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
37	1264	1264	MS&RI	2-methylpyrazine	0.08	0.02	0.08	<0.01	0.15	<0.01	0.06
38	1273			unidentified	<0.01	0.08	<0.01	<0.01	<0.01	0.42	<0.01
39	1282	1282	MS&RI	acetoin	8.08	3.56	31.84	6.33	2.36	0.04	0.03
40	1295	1296	MS&RI	1-hydroxy-2-propanone	0.03	0.01	0.07	0.06	0.09	>0.01	0.03
41	1318	1321	MS&RI	2,5-dimethylpyrazine	10.25	10.08	7.95	46.83	63.59	38.33	25.26
42	1324			unidentified	<0.01	0.59	<0.01	0.08	0.27	0.13	<0.01
43	—	1326	—	2-heptanol(Internal Standard)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
44	1327	1327	MS&RI	2,6-dimethylpyrazine	0.20	0.04	0.16	0.08	0.04	0.11	0.16
45	1349			unidentified	<0.01	0.06	0.29	1.62	<0.01	0.44	<0.01
46	1356			unidentified	<0.01	0.04	0.52	0.04	<0.01	<0.01	<0.01
47	1358	1359	MS&RI	1-hexanol	0.67	0.19	0.80	0.82	1.06	0.24	0.40
48	1375		MS	4-(acetyloxy)-2-butanone	0.19	<0.01	0.09	0.11	0.27	0.11	0.03
49	1381	1379	MS&RI	6-methyl-2-heptanol	<0.01	<0.01	0.09	0.26	0.10	0.08	<0.01
50	1388	1388	MS&RI	2-nonanone	0.09	0.06	<0.01	<0.01	<0.01	0.12	0.05
51	1392		MS	2-ethyl-5 or 6-methylpyrazine	0.07	<0.01	0.06	0.08	0.27	<0.01	0.07
52	1395	1394	MS&RI	5-methyl-2-heptanol	1.88	0.00	2.12	5.65	0.02	6.87	0.03
53	1403			unidentified	0.03	2.82	<0.01	<0.01	0.18	<0.01	0.07
54	1404	1405	MS&RI	2,3,5-trimethylpyrazine	0.04	<0.01	0.02	0.04	14.75	>0.01	1.51
55	1429		MS	6-methyl-7-octen-2-one	0.10	0.02	<0.01	<0.01	<0.01	0.79	<0.01
56	1442		MS	3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	0.23	0.22	0.24	1.02	<0.01	0.41	<0.01
57	1451	1451	MS&RI	acetic acid	0.41	1.22	0.18	0.50	1.71	<0.01	0.23
58	1456	1455	MS&RI	1-octen-3-ol	<0.01	0.00	0.26	0.37	1.00	<0.01	0.15
59	1458			unidentified	<0.01	<0.01	0.06	0.15	0.44	0.07	0.47
60	1464			unidentified	0.09	0.04	0.10	0.27	0.07	0.40	<0.01
61	1471			unidentified	<0.01	<0.01	<0.01	0.26	0.13	<0.01	<0.01
62	1478	1478	MS&RI	2,3,5,6-tetramethylpyrazine	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.97	0.04	0.04
63	1489		MS	2-methyl-5 or 6-vinylpyrazine	0.04	0.24	0.07	0.04	0.04	0.08	0.04
64	1496	1495	MS&RI	2-ethyl-1-hexanol	<0.01	<0.01	<0.01	0.33	<0.01	0.07	0.05
65	1518			unidentified	<0.01	0.10	0.07	0.06	0.39	0.46	0.06
66	1519	1518	MS&RI	benzaldehyde	0.25	<0.01	0.07	0.43	0.06	0.11	0.05
67	1523			unidentified	0.10	0.43	0.07	0.03	0.21	0.08	0.15
68	1535		MS	2-methyl-5-(1-propenyl)-pyrazine	<0.01	0.03	<0.01	<0.01	<0.01	0.08	<0.01
69	1537	1540	MS&RI	propionic acid	<0.01	>0.01	<0.01	0.19	0.14	0.26	<0.01
70	1539		MS	2-methyl-6-(1-propenyl)-pyrazine	0.04	0.02	<0.01	<0.01	0.15	0.09	0.06

71	1547	1544	MS&RI	[R,R]-2,3-butanediol	< 0.01	0.05	< 0.01	< 0.01	0.14	< 0.01	0.05
72	1551			unidentified	4.43	0.28	7.69	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.03
73	1571	1570	MS&RI	isobutyric acid	0.35	1.00	0.21	1.74	0.06	1.50	0.87
74	1584	1581	MS&RI	[S,S]-2,3-butanediol	0.88	0.14	0.73	< 0.01	0.04	0.08	< 0.01
75	1621	1617	MS&RI	2-octen-1-ol	0.07	0.03	< 0.01	0.13	0.14	0.04	< 0.01
76	1637			unidentified	0.03	0.03	0.03	0.99	0.05	0.18	0.03
77	1657			unidentified	0.03	0.04	0.01	0.02	< 0.01	0.29	0.01
78	1665	1664	MS&RI	2-furanmethanol	0.27	0.18	1.39	0.09	1.36	9.90	0.40
79	1671			unidentified	0.20	< 0.01	< 0.01	< 0.01	9.82	< 0.01	0.26
80	1674			unidentified	1.22	2.01	0.75	< 0.01	< 0.01	0.08	7.13
81	1720		MS	1,2,4,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-naphthalene	0.02	0.01	0.02	0.08	0.05	< 0.01	< 0.01
82	1732	1733	MS&RI	naphthalene	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.08	< 0.01	< 0.01	< 0.01
83	1741	1741	MS&RI	valeric acid	< 0.01	< 0.01	< 0.01	5.81	< 0.01	0.19	< 0.01
84	1752			unidentified	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.68	< 0.01
85	1763		MS	6,10-dimethyl-2-undecanone	0.01	0.03	0.80	0.19	6.57	0.09	0.14
86	1766	1764	MS&RI	2-ethylbutanoic acid	1.89	2.04	0.07	< 0.01	0.05	0.04	< 0.01
87	1796			unidentified	0.09	0.10	0.07	1.03	1.03	0.27	0.09
88	1811			unidentified	0.54	0.26	0.32	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.09
89	1843			unidentified	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.11	0.13	< 0.01
90	1850	1849	MS&RI	hexanoic acid	< 0.01	< 0.01	< 0.01	1.03	< 0.01	0.88	0.12
91	1854	1851	MS&RI	2-methylbutenoic acid	0.05	0.04	0.03	0.10	0.68	0.19	< 0.01
92	1862	1861	MS&RI	2-methoxyphenol	0.67	0.12	0.51	0.28	0.25	0.15	0.31
93	1869			unidentified	0.06	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.23	< 0.01
94	1881	1879	MS&RI	benzenemethanol	0.13	< 0.01	0.04	< 0.01	0.22	< 0.01	< 0.01
95	1917	1916	MS&RI	benzeneethanol	0.03	0.03	0.16	0.05	0.15	0.09	0.20
96	1921		MS	4-methylhexanoic acid	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.21	0.07	< 0.01
97	1958		MS	heptanoic acid	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.51	0.05	0.37	< 0.01
98	1961			unidentified	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.28	< 0.01	1.20	< 0.01
99	1964			unidentified	0.15	0.02	0.26	1.01	0.19	< 0.01	0.07
100	1974		MS	3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one	0.54	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.31	1.22
101	1978			unidentified	< 0.01	0.29	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
102	1985			unidentified	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.42	1.44	< 0.01	< 0.01
103	2009	2007	MS&RI	phenol	< 0.01	0.02	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
104	2023	2023	MS&RI	2-pentandecanone	0.15	0.10	0.21	0.05	0.46	0.05	0.25
105	2064	2065	MS&RI	octanoic acid	1.56	1.03	0.08	4.83	8.49	5.72	< 0.01
106	2172	2173	MS&RI	nonanoic acid	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.14	0.04	0.07	< 0.01
107	2182			unidentified	0.11	< 0.01	0.05	< 0.01	0.15	0.30	< 0.01
108	2198	2188	MS&RI	thymol	< 0.01	0.03	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.11
109	2279	2278	MS&RI	decanoic acid	< 0.01	0.02	0.02	0.04	< 0.01	< 0.01	< 0.01
110	2374		MS	phthalic acid diethyl ester	< 0.01	< 0.01	0.02	0.13	0.07	0.11	< 0.01
111	>2500		MS	phthalic acid dibutyl ester	0.07	0.05	0.08	0.09	0.16	< 0.01	0.07

*1 : retention index

*2 : experimental

*3 : authentic

*4 : identification

*5 : identified by mass spectrum and retention index

*6 : identified by mass spectrum only

*7 : (peak area)/(peak area of 2-heptanol)

Table 2 The ratio of each peak area and internal standard peak area

Compound	Ratio
diacetyl	0.065
pyrazine	0.14
2-methylpyrazine	0.34
acetoin	—
2,5-dimethylpyrazin	0.40
2,3,5-trimethylpyrazine	1.5
isobutyric acid	0.045
2-methylbutyric acid	0.13
2-heptanol (IS)	1.00

Table 3 Volatile contents from commercial itohiki-natto

Peak No	Compound name	Concentration (ppm*)						
		A	B	C	D	E	F	G
11	diacetyl	2.5	<0.62	<0.62	<0.62	<0.62	15	3.8
29	pyrazine	0.91	<0.29	0.60	2.2	<0.29	<0.29	<0.29
37	2-methylpyrazine	0.92	0.18	0.98	<0.12	1.8	<0.12	0.73
41	2,5-dimethylpyrazine	100	100	80	470	640	380	250
54	2,3,5-trimethylpyrazine	0.11	<0.03	0.06	0.11	39	<0.03	4.0
73	isobutyric acid	31	89	18	150	5.3	133	77
77	unidentified**	0.83	1.2	0.43	0.62	<0.31	9.0	<0.31

*; calculated from the ratio between each peak area value and peak area value of the internal standard (2-heptanol)

**; probably 2-methylbutyric acid and / or isovaleric acid

と E も同一の製造業者の製品でありながら、E は臭いの主成分である短鎖分岐脂肪酸のイソ酪酸、イソ吉草酸および 2-メチル酪酸を生成しない納豆菌を用いて製造された製品とされているもので、官能的にも臭いはブランドの異なる D と異なっていた。イソ吉草酸および 2-メチル酪酸の標品は本分析に用いたカラムにおいては RI がともに 1659 であるが、いずれの試料においても存在量が少なかったために GCMS で同定することができなかった。しかし GC で分析した結果、RI が 1657 の位置にピークが出現した (peak no-77) こと、試料 E において値が他の試料と比べて小さかったことから、このピークがイソ吉草酸および 2-メチル酪酸であり、試料 E においてはこの物質の存在量が少なく、新たな納豆菌を用いて製造した効果が現れているものと考えられる。F は他の製品と比べるとジアセチル (peak no-11)、イソ酪酸およびイソ吉草酸と予測できる物質 (peak no-77) は多いが、アセトイン (peak no-39)、2-メチルピラジン (peak no-37)、2,3,5-トリメチルピラジン (peak no-54) が少なかった。G は成瀬菌を用いて自作した試料であるが、2,3,5-トリメチルピラジン (peak no-54) が比較的多かった。

考 察

1. 揮発性物質の抽出

市販の糸引き納豆はそれぞれ官能的に臭いが異なっているが、臭い物質および揮発性物質について定量比較を行った報告はない。その理由の一つは揮発性物質を簡単に抽出濃縮し、GC へ注入する適当な方法が存在しなかったからであると考えられる。SPME は、細いフューズドシリカファイバー表面に塗布した不揮発性の液層に揮発性物質を吸着させ、GC の注入口へ挿入する方法⁸⁾⁹⁾あり、これまでは主に水系の試料についての報告が多くなされてきた^{11)~15)}が、固形の試料について用いた分析例は非常に少ない¹⁶⁾。本報告は、糸引き納豆のような水分を多量に含む固形試料から直接揮発性物質の抽出を試みた、最初のものと思われる。糸引き納豆の臭いを判定する際はこれまで官能検査を行ってきたが、簡便な方法でガスクロマトグラフ

へ揮発性物質を注入して定量分析することが可能であれば、臭いを定量比較することが可能となることから、SPME による方法を検討した。市販されている数種の SPME ファイバーはそれぞれ吸着特性が異なっている^{17)~19)}ため、本研究においてはまずファイバーの選択を行ない、さらに最適な抽出条件を求めた後に、同定と濃度比較を行った。

2. 揮発性物質の種類

GCMS により揮発性物質の同定を行ったところ、83 種の物質を確認することができた。これらのほとんどはこれまでに納豆関連食品、大豆または納豆室中の気相中から報告されている物質である^{4)5)10)20)~23)}が、脂肪酸である吉草酸、2-エチル酪酸、ヘキサノ酸、オクタン酸、デカン酸、および 2-ペンタデカノン、チモールはこの分析で初めて検出された物質である。しかし、アルデヒド類はベンズアルデヒド以外は検出されなかった。大豆および納豆室中の気相から数種のアルデヒドが検出されている²⁰⁾²¹⁾にもかかわらずこのような結果が得られた原因としては、使用した DVB/CAR/PDMS ファイバーの極性が中程度であり、アルデヒド類に対してもある程度の吸着能力を持つことから、今回の同定に使用した試料中の存在量が少なかったものと予測される。また、主要な臭い物質の一つである 2-メチル酪酸、イソ吉草酸¹⁾¹⁰⁾は検出されなかったが、使用したファイバーの極性、およびこれまでに納豆および大豆から検出されていなかった脂肪酸が検出されたことから、同定に用いた試料中の存在量が少なかったものと考えられる。2 種類のフタル酸エステルはこれまでに納豆および大豆から同定された報告はないので、納豆由来の物質ではなく環境汚染物質を検出したと考えられる。

3. 揮発性物質の濃度比較

本報告においては、主要な臭い物質とされている 8 種の揮発性物質について濃度比較を試みた。このうち、アセトインは一定量の標品を添加する測定を行ったが、添加量に比例してピーク面積値が増加しなかった。アシロインはアンモニアと共存すると非酵素的にピラジン類に変化することが報告されている²³⁾ので、抽出の過程でこの反応が進ん

だものと予測できる。

本分析方法は、SPME ファイバーに対する揮発性物質の吸着特性がそれぞれ異なっている^{17)~19)} こと、GC の検出に用いた FID が物質により感度の異なることから、ピーク面積が大きい物質であっても存在量に反映されるものではなく、定量に際してはそれぞれの物質について定量感度の比を求める必要がある。しかし、操作が簡便であること、分析用試料の調製に必要とする時間が短いことなどから、それぞれの物質についての製品間の相違を比較する手段としてすぐれているといえる。同様に、発酵過程や製品の経時的、経日的変化を比較する手段としても、適していると考えられる。

要 約

市販納豆から発散する揮発性物質を poly-vinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane, SPME ファイバーにより 50℃, 1 時間抽出濃縮し, DB-WAX カラム (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μm) を用い, GC および GCMS で分析した。ピークの同定を GCMS により行ったところ, 主要な臭い物質を含む 83 種の物質を同定することができた。2-ヘプタノールを内部標準物質とする GC により主要な臭い物質の濃度を比較したところ, 製造業者間で濃度が大きく異なることが明らかになった。その中でも特に, 短鎖分岐脂肪酸を生産しない納豆菌株を用いて製造したとされる製品は, イソ酪酸, イソ吉草酸の存在量が他社製品より少なく, 官能的に感じられる臭いの違いと一致していた。

文 献

- 1) 竹村 浩, 安藤記子, 塚本義則, 食科工, **47**, 773 (2000).
- 2) 村松芳多子, 勝股理恵, 渡辺杉夫, 田中直義, 木内 幹, 食

- 科工, **48**, 277 (2001).
- 3) 村松芳多子, 勝股理恵, 渡辺杉夫, 田中直義, 木内 幹, 食科工, **48**, 287 (2001).
- 4) 小幡弥太郎, 俣野景典, 農化, **33**, 567 (1959).
- 5) 小幡弥太郎, 俣野景典, 農化, **33**, 569 (1959).
- 6) 菅野彰重, 高松春樹, 高野伸子, 日食工誌, **31**, 587 (1984).
- 7) Kosuge T., Zenda H., Tsuji K., Yamamoto T. and Narita H., *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 693 (1971).
- 8) Arthur C.L., and Pawliszyn J., *Anal. Chem.*, **62**, 2145 (1990).
- 9) Louch D., Motlagh S., and Pwaliszyn J., *Anal. Chem.*, **64**, 1187 (1992).
- 10) Tanaka T., Muramatsu K., Kim H-r., Watanabe T., Takeyasu M., Kanai Y., and Kiuchi K., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**, 1440 (1998).
- 11) Santos F.J., Galceran M.T., and Fraisse D., *J. Chromatog.*, **742**, 181 (1996).
- 12) Ulrich S., and Martens J., *J. Chromatog.*, **696**, 217 (1997).
- 13) Jelen H.H., Wlazly K., Wasowicz E., and Kaminski E., *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1469 (1998).
- 14) Bicchi C.P., Panero O.M., Pellegrino G.M., and Vanni A. C., *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4680 (1997).
- 15) Bartak P., and Cap L., *J. Chromatog.*, **767**, 171 (1997).
- 16) Pawliszyn J., *Solid Phase Microextraction*, (Wiley-VCH, New York), p. 158 (1997).
- 17) Liu Y., Shen Y., and Lee M.L., *Anal. Chem.*, **69**, 190 (1997).
- 18) Shirey R.E., *Solid Phase Microextraction*, ed. by Wercubski S.A.S., (Marcel Dekker), p. 59 (1999).
- 19) Pawliszyn J., *Solid Phase Microextraction*, (Wiley-VCH, New York), p. 97 (1997).
- 20) Doi Y., Tsugita T., Kurata T., and Kato H., *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1043 (1980).
- 21) 田中直義, 庄司善哉, 日食工誌, **40**, 656 (1993).
- 22) Sugawara E., Ito T., Odagiri S., Kubota K., and Kobayashi A., *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 311 (1985).
- 23) Rizzi G.P., *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 349 (1986).

(平成 14 年 9 月 12 日受付, 平成 15 年 2 月 27 日受理)