

味噌、醤油、日本酒中のコウジ酸に関する調査結果

国立医薬品食品衛生研究所 食品部

村山 三徳
近藤 一成
松田 りえ子
合田 幸広
米谷 民雄

平成14年10月18日

調査目的

安全性試験結果により新たな知見が得られたコウジ酸について、食品中における含有実態の調査を行い、もって今後の規格基準策定の検討に資する。

I 文献調査

村上：日本醸造協会雑誌 66, 859 (1971)

・コウジ酸は、一般に焼酎、泡盛製造用の株を除き麴菌の 86 % に認められる。

北村、安平：信州味噌研究所報告 34, 61 (1993)

・長野県下 40 みそ工場からの 122 株の麴菌のうち、87 株からコウジ酸が検出された。(検定培地の色の変化により評価)

発酵食品中の蛍光成分に関する研究第 6 報

真鍋、進士ら (農水食総研、日本醤油研究所)

日本醤油研究所雑誌 10, 146 (1984)

・しょう油及び麴菌中のコウジ酸の HPLC 分析法 検出限界試料中 1ppm, 絶対量 100ng
麴菌を培養すると、3 - 4 日目からコウジ酸の酸性が認められ、14 日頃まで増加した後減少する。

発酵食品中の蛍光成分に関する研究第 7 報

進士、真鍋ら (同上)

日本醤油研究所雑誌 10, 151 (1984)

・麴菌の *A. oryzae* 原株調査 (コウジ酸を産生するもの)

醤油用 1 株 / 12 株 + について製麴 (3 日麴) すると 175ppm

清酒用 3 株 / 13 株 + について製麴 (2 日麴) すると 1.6ppm

みそ用 12 株 / 17 株 + について製麴 (2 日麴) すると < 0.1ppm

しろこうじ用 3 株 / 5 株 + について製麴 (2 日麴) すると 3ppm

・添加したコウジ酸の醤油の醤油醸造中の分解

製麴 800 g にコウジ酸 1 g を添加、3 L のガロンビンに汲水 13 水で仕込み、180 日間発酵させた。コウジ酸を添加しても発酵は正常に進行した。添加後 10 日で 30 % が分解し、20 日に 50 % 分解、70 日に 70 % 分解、150 日には 100 % が分解した。通常の発酵期間は約 180 日であり、最終製品に残存する可能性は少ない。

分解の原因は、光・水素イオン濃度・温度の影響は考えにくいことから、微生物及び酵素によるものと推定されている。

・市販の醤油のコウジ酸分析

18 検体全て不検出であった。

II 味噌及び醤油中のコウジ酸含有量の実態調査

1. 検体

世田谷区内スーパーで購入した。すべて別メーカーである。

味噌 製造年月日 96/8/31 ~ 10/14

醤油 使用期限 98/3 及び 97/12

試料	表示 (色)	生産地	特筆すべき記述
味噌A	米味噌 (赤)	長野	完熟味噌 無添加
味噌B	米味噌 (白)	長野	特醸
味噌C	米味噌 (赤)	宮城	無農薬
味噌D	米味噌 (白)	富山	越中白こうじ
味噌E	麦味噌 (白)	大分	大麦みそ
味噌F	米味噌 (赤)	長野	有機農法
味噌G	豆味噌 (赤)	愛知	八丁味噌
味噌H	米味噌 (白)	広島	ソルビン酸 次亜塩素酸 V B2
味噌I	米味噌 (赤)	長野	京懐石
味噌J	米味噌 (赤)	長野	
味噌K	米味噌 (赤)	愛知	純正こうじ
醤油L	こいくち	千葉	本醸造 (脱脂加工大豆、大豆、小麦)
醤油M	こいくち	三重	本醸造 (大豆、小麦)

2. 分析法

食品添加物安全性再評価等の試験検査「食品中食品添加物の規格基準及び試験法の設定」食品中のコウジ酸分析法によった。

HPLC 条件

分離カラム : Tosoh TSK-gel 80TS (4.6 x 250 mm)

移動相 : 0.1% propionic acid - 0.05 N HClO₄

測定波長 : 270 nm

検出限界 : 0.1 ppm

コウジ酸の HPLC による検出限界は、0.1 ppm であったが、13 検体中 7 検体において、コウジ酸ピークの近傍に妨害ピークが認められた。

妨害ピークは、保持時間、UV スペクトルがコウジ酸とは異なる成分であったが、クロマトグラム上でコウジ酸と分別測定することができなかつたため、妨害ピークが認められた検体については、結果に妨害ピークと記し、そのピークをコウジ酸として換算した値を示した。

味噌での添加回収率 (味噌 10 g に 1 mg 添加 = 100ppm) は、91 % であった。

3. 結果

下表に示したとおり、味噌1検体、醤油1検体からコウジ酸 1.0ppm が検出された。味噌4検体からは検出されず、味噌6検体、醤油1検体からは妨害ピークが認められたが、妨害ピークがコウジ酸であると仮定しても、その濃度は 1ppm 未満であった。

試料	コウジ酸含量 (ppm)
味噌 A	検出限界以下
味噌 B	1.0
味噌 C	検出限界以下
味噌 D	検出限界以下
味噌 E	妨害ピーク (コウジ酸として 0.65ppm 以下)
味噌 F	妨害ピーク (コウジ酸として 0.35ppm 以下)
味噌 G	妨害ピーク (コウジ酸として 0.85ppm 以下)
味噌 H	検出限界以下
味噌 I	妨害ピーク (コウジ酸として 0.35ppm 以下)
味噌 J	妨害ピーク (コウジ酸として 0.35ppm 以下)
味噌 K	妨害ピーク (コウジ酸として 0.35ppm 以下)
醤油 L	1.0
醤油 M	妨害ピーク (コウジ酸として 0.20ppm 以下)

Ⅲ 日本酒中コウジ酸の含有量実態調査

1. 検体

東京都世田谷区内において市販されていた、下記の日本酒を購入した。

検体（製造年月）	原料	アルコール分（度）
清酒 1 (2002.8)	米・米こうじ 醸造アルコール	15-16
清酒 2 (2002.4)	米・米こうじ 醸造アルコール	15-16
清酒 3 (2002.5)	米・米こうじ 醸造アルコール	15-16
清酒 4 (2002.1)	米・米こうじ 醸造アルコール	15-16
純米酒 1 (2002.8)	米・米こうじ	8-9
純米酒 2 (2001.11)	米・米こうじ	14-15
純米酒 3 (2002.5)	米・米こうじ	15-16
純米酒 4 (2002.5)	米・米こうじ	15-16
吟醸酒 1 (2002.8)	米・米こうじ 醸造アルコール	14-15

2. 分析法

検体を水で2倍に希釈し、その20 µlにつきHPLCにより分析を行った。コウジ酸のピークエリアを求めて、絶対検量線法により定量を行った。

HPLC条件

高速液体クロマトグラフ装置：Waters 2690 Separations Module

フォトダイオードアレイ検出器：Waters 966 PDA Detector

定量用測定波長：270 nm

分離カラム：Shiseido CAPCELL PAK C18 UG 120 (粒径 5 µm, 4.6 mm i.d. × 250 mm)

分離カラム温度：40 °C

移動相：メタノール-0.05%トリフルオロ酢酸 (3:97)

移動相流速：1.0 ml/min

検出限界：0.1 mg/L

日本酒中のコウジ酸の定量範囲は0.1-10 mg/L、添加回収試験の結果は、1 mg/L添加のとき平均回収率98.0%および相対標準偏差8.76% (n=3)、10 mg/L添加のとき平均回収率106.5%および相対標準偏差1.45% (n=3)であった。

3. 結果

市販の日本酒9検体からは、いずれもコウジ酸は検出されなかった。

検体	コウジ酸含有量 (mg/L)
清酒 1	検出限界以下
清酒 2	検出限界以下
清酒 3	検出限界以下
清酒 4	検出限界以下
純米酒 1	検出限界以下
純米酒 2	検出限界以下
純米酒 3	検出限界以下
純米酒 4	検出限界以下
吟醸酒 1	検出限界以下

別添11-1
(追加)

味噌、醤油、日本酒中のコウジ酸に関する調査結果 (追加)

国立医薬品食品衛生研究所 食品部

村山 三徳
近藤 一成
松田 りえ子
合田 幸広
米谷 民雄

平成14年11月5日

味噌及び醤油中のコウジ酸含有量の実態調査追加

1. 検体

世田谷区内スーパーでしょう油5検体、みそ10検体を購入した。

味噌 賞味期限 2003/3 ~ 2003/5

醤油 賞味期限 2003/1 ~ 2004/2

試料	表示 (色)	生産地	特筆すべき記述
味噌1	豆味噌	愛知	八丁味噌
味噌2	米味噌	宮城	仙台味噌
味噌3	米味噌	長野	天然生醸造・白粒
味噌4	米味噌	京都	西京白味噌
味噌5	麦味噌	大分	特醸
醤油1	こいくち	千葉	本醸造特選丸大豆
醤油2	こいくち	千葉	本醸造
醤油3	こいくち	千葉	本醸造特選
醤油4	うすくち	兵庫	本醸造
醤油5	しろしょうゆ	愛知	白しょう油特級

2. 分析法

食品添加物安全性再評価等の試験検査「食品中食品添加物の規格基準及び試験法の設定」
食品中のコウジ酸分析法による

HPLC条件

フォトダイオードアレイ検出器：Waters 966 PDA Detector

定量用測定波長：270 nm

分離カラム：Shiseido CAPCELL PAK C18 UG 120 (粒径 5 µm, 4.6 mm i.d. × 250 mm)

分離カラム温度：40 °C

移動相：メタノール-0.05%トリフルオロ酢酸 (3:97)

移動相流速：1.0 ml/min

検出限界：0.1 mg/L

みそ・しょう油中のコウジ酸の定量範囲は 0.1-10 mg/L、添加回収試験の結果は、みそは 2 mg/L 添加のとき 2%、しょう油では 2.5 mg/L 添加のとき 110%であった。

コウジ酸の HPLC による検出限界は、0.1 ppm であったが、みそ 5 検体中 1 検体において、コウジ酸ピークの近傍に妨害ピークが認められ、他の 3 検体は前にあるピークの後半が重なっていた。味噌 1 検体に見られた妨害ピークは、UV スペクトルがコウジ酸とは異なるが、クロマトグラム上でコウジ酸と分別測定することができなかった。この妨害ピークはコウジ酸 0.2ppm 程度の面積であるため、この影響を考慮してコウジ酸の定量下限は

0.5ppmとした。

しょう油では、5検体中2検体において、コウジ酸ピークの近傍に妨害ピークが観測された。これらの妨害物は保持時間が0.2分程度早くまたUVスペクトルもコウジ酸とは異なっていたが比較的強度が大きく微量のコウジ酸の正確な定量を妨害する可能性があったため、定量下限は味噌と同じく0.5 ppmとした。

3. 結果

味噌1検体からコウジ酸0.5ppmが検出された。

試料	コウジ酸含量(ppm)
味噌1	妨害ピーク (スペクトルが一致しない)
味噌2	定量限界以下
味噌3	定量限界以下
味噌4	定量限界以下
味噌5	0.5ppm
しょう油1	定量限界以下
しょう油2	定量限界以下
しょう油3	定量限界以下 (近傍に妨害ピーク有り)
しょう油4	定量限界以下
しょう油5	定量限界以下 (近傍に妨害ピーク有り)

味噌、醤油、日本酒中のコウジ酸に関する調査結果（速報）

日本食品分析センター

1. 検 体

1) 味噌

No.	品 名	製造会社 又は 販売会社	生産地	特筆すべき記述
1	米みそ	A社	長野	だし入り
2	米みそ	B社	長野	無添加
3	米みそ	C社	兵庫	有機熟成こうじ
4	米みそ	D社	長野	有機栽培
5	米みそ	E社	長野	無添加
6	調合みそ	C社	愛知	無添加生
7	米みそ	F社	長野	塩ひかえめ
8	米みそ	G社	長野	無添加
9	調合みそ	H社	広島	無添加
10	米みそ	I社	長野	無添加
11	米みそ	A社	長野	低塩
12	米みそ	J社	長野	低塩
13	調合みそ	J社	長野	だし入り
14	豆みそ	K社	愛知	
15	米みそ	L社	富山	
16	米みそ	J社	長野	無添加
17	米みそ	E社	長野	だし入り
18	調合みそ	L社	広島	無添加, 無農薬
19	調合みそ	M社	大分	だし入り
20	麦味噌	N社	大分	無添加
21	米みそ	D社	長野	無添加
22	麦味噌	O社	宮崎	塩分ひかえめ
23	米みそ	P社	広島	白みそ
24	米みそ	A社	長野	白みそ
25	調合みそ	Q社	愛知	八丁みそ・赤だし

2) 醤油

No.	品名	製造会社 又は 販売会社	原材料名
1	こいくちしょうゆ	A	脱脂加工大豆, 大豆, 小麦, 食塩, アルコール
2	こいくちしょうゆ	B	小麦, 大豆, 米, 食塩
3	こいくちしょうゆ	C	脱脂加工大豆, 大豆, 小麦, 食塩, アルコール
4	こいくちしょうゆ	D	大豆, 小麦, 食塩
5	こいくちしょうゆ	E	大豆, 小麦, 食塩, アルコール
6	こいくちしょうゆ	C	有機大豆, 有機小麦, 食塩
7	こいくちしょうゆ	F	大豆, 小麦, 食塩, アルコール
8	こいくちしょうゆ	G	小麦, 大豆, 米, 食塩
9	こいくちしょうゆ	H	大豆, 小麦, 食塩
10	こいくちしょうゆ	I	大豆, 小麦, 食塩
11	こいくちしょうゆ	J	大豆, 脱脂加工大豆, 小麦, 食塩, アルコール,
12	こいくちしょうゆ	K	脱脂加工大豆, 大豆, 小麦, 食塩, 糖類, アル コール, カラメル色素
13	こいくちしょうゆ	L	大豆, 小麦, 食塩, アルコール
14	こいくちしょうゆ	M	大豆, 小麦, 食塩
15	こいくちしょうゆ	N	大豆, 小麦, 食塩
16	こいくちしょうゆ	O	脱脂加工大豆, 大豆, 小麦, 食塩
17	有機こいくちしょうゆ	P	有機大豆, 有機小麦, 食塩
18	うすくちしょうゆ	Q	大豆, 小麦, 食塩, アルコール
19	さいしこみしょうゆ	R	大豆, 脱脂加工大豆, 小麦, 原塩, アルコール
20	さいしこみしょうゆ	Q	大豆, 小麦, 食塩, アルコール
21	しろしょうゆ	J	小麦, 大豆, 食塩, アルコール, 調味料
22	しろしょうゆ	S	小麦, 大豆, 食塩, アルコール
23	たまりしょうゆ	T	脱脂加工大豆, 大豆, 小麦, 食塩, 糖類, 調味 料, カラメル色素
24	たまりしょうゆ	U	脱脂加工大豆, 小麦, 食塩, 甘味料, 保存料
25	たまりしょうゆ	V	脱脂加工大豆, 大豆, 小麦, 食塩, アルコール

3) 日本酒

No.	品名	製造会社 又は 販売会社	原材料名
1		A社	米・米麴・醸造アルコール
2		B社	米・米麴・醸造アルコール
3		C社	米・米麴
4		D社	米・米麴・醸造アルコール・糖類・酸味料
5		E社	米・米麴・醸造アルコール
6		E社	米・米麴・醸造アルコール
7		F社	米・米麴・醸造アルコール
8		G社	米・米麴・醸造アルコール
9		H社	米・米麴・醸造アルコール
10		I社	米・米麴・醸造アルコール
11		J社	米・米麴・醸造アルコール
12		K社	米・米麴
13		E社	米・米麴
14		L社	米・米麴
15		M社	米・米麴
16		A社	米・米麴
17		N社	米・米麴・醸造アルコール
18		L社	米・米麴・醸造アルコール
19		O社	米・米麴
20		L社	米・米麴・醸造アルコール

2. 試験方法

1) 試料液の調製

①みそ

試料約 10g を採取し、水 30ml を加えてホモジナイズした後、水を用いて 50ml 定容とした。この一部を分取し、遠心分離を行い、上清液 5ml をとり、9mol/l 硫酸 0.7ml、セライト 5g 及び無水硫酸ナトリウム 5g を加えた後、ジエチルエーテル 100ml を加え、20 分間振とうした。振とう液を遠心分離した後、ジエチルエーテル層を分取し、水層にジエチルエーテル 100ml ずつを加え、同様の操作を更に 3 回繰り返した。全ジエチルエーテル層を合わせ、減圧下で濃縮乾固した。得られた残留物に水 5ml を加えて溶解し、これを試料液とした。

②しょうゆ

しょうゆ 2g を採取し、9mol/l 硫酸 0.7ml を加え加えた後、ジエチルエーテル 100ml を加え、20 分間振とうした。ジエチルエーテル層を分取し、水層にジエチルエーテル 100ml ずつを加え、同様の操作を更に 2 回繰り返した。全ジエチルエーテル層を合わせ、減圧下で濃縮乾固した。得られた残留物に水 5ml を加えて溶解し、これを試料液とした。

③日本酒

日本酒に水を加え 2 倍希釈したものを試料液とした。

2) 高速液体クロマトグラフィーによる定量

コウジ酸の標準溶液及び試料液を高速液体クロマトグラフに注入し、標準溶液より作成した検量線より、試料液中のコウジ酸濃度を求め、これより試料中のコウジ酸濃度を算出した。

高速液体クロマトグラフ操作条件 (省略)

3. 試験結果

みそ 25 件、しょうゆ 25 件及び日本酒 20 件の全検体においてコウジ酸は検出されなかった。

なお、本試験における検出限界はみそ及びしょうゆが 0.5ppm、日本酒が 0.2ppm である。

以上