

# 酒かすを活用したブルーチーズの呈味成分と香気成分の解析

田中 彰, 八十川大輔, 川上 誠

## Chemical Analysis of the Taste and Flavor Components of Blue Cheese Ripened with Sake Cake.

Akira Tanaka, Daisuke Yasokawa and Makoto Kawakami

There are a variety of cheeses that use some food materials for flavoring. In this study, we investigated the behavior of the taste and flavor components of blue cheese ripened with sake cake. The blue cheese, ripened for 2 months, was coated with sake cake and then, ripened for an additional 8 weeks at 10 °C. The pH and the concentration of ammonia decreased in the blue cheese during the ripening, while malic acid, succinic acid, glucose, and some flavor components, such as esters and alcohols, increased. These results suggested that the diffusion of the taste and flavor components between the sake cake and blue cheese characterizes the product.

**KEY-WORDS** : sake cake, blue cheese, organic acids, free sugars, flavor components

**キーワード** : 酒かす, ブルーチーズ, 有機酸, 遊離糖, 香気成分

日本国内のナチュラルチーズの消費量は平成20年の約133千トンから、平成29年には約208千トンまで増加し<sup>1)</sup>, その消費量は年々増加しつつある。このうち、国内産のナチュラルチーズの生産量は約23千トンであるが、北海道産は約21千トンであり<sup>2)</sup>, 国内産のナチュラルチーズの約91.0%を占め、主要な生産地となっている。北海道におけるナチュラルチーズ製造は、大手乳業会社に加え、約140ものチーズ工房があり<sup>3)</sup>, こだわりの原料や製造方法など各工房で特色あるナチュラルチーズ製造が行われている。近年、チーズに他の食材を組み合わせることで風味に特長を持たせた製品も多く見られ、(有)伊勢ファーム(旭川市)で商品化した酒かすブルーチーズもその1つである。酒かすブルーチーズは、既存製品のブルーチーズの表面を酒かすで覆って熟成させたブルーチーズである。我々は、呈味成分や香気成分の解析により、酒かすブルーチーズに含まれる風味の特長を明らかにしてきたが<sup>4)</sup>,

酒かすによる熟成期間中における呈味成分などの詳しい挙動は把握していない。酒かすは清酒の醸造副産物であり、米由来の成分と麹菌や酵母の菌体成分、これらの菌が生産した代謝産物等が含まれ、栄養成分や呈味成分、香気成分などが豊富に含まれている。酒かすによる熟成期間中には酒かすに含まれるこれらの成分が、ブルーチーズの風味の形成に大きく寄与することが期待される。本研究では、酒かすブルーチーズの熟成期間中における呈味成分と香気成分の挙動を把握し、酒かすブルーチーズの風味成分の形成について若干の知見を得たので報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

試験に使用したブルーチーズは(有)伊勢ファームのチーズ工房で製造したブルーチーズ(成型後、約2ヶ月熟成)を用い、酒かす(高砂酒造株式会社製造、旭川市)との

事業名: 受託研究

課題名: 酒かすブルーチーズの熟成に関する研究

組み合わせの異なる以下の3つの試験区を設けた。対照区は製造したブルーチーズをそのまま用いた。酒かす区は、冷凍保管した酒かすを解凍してブルーチーズ表面に塗布した。加熱酒かす区は酒かすを解凍後、2分間沸騰水中で加熱処理した後、同様にブルーチーズ表面に塗布した。各試験区のブルーチーズを10℃(±2℃)の熟成庫で8週間保存し、経時的に分析サンプルとしてブルーチーズを採取した。酒かす区と加熱酒かす区は表面に塗布した酒かすを取り除き、分析サンプルとした。

なお、各試験区のチーズは3反復して製造し、試験に供した。

## 2. 試料の前処理

採取したサンプルをナイフで細かく切り、フードプロセッサーにて均質化した。均質化した試料は直ちに分析に供した。直ちに分析できない場合は、-30℃で冷凍保存し、分析の都度、解凍して使用した。

## 3. 水分の測定<sup>5)</sup>

均質化した試料を予め重量を測定したプラスチックフィルムに約3g精秤した。精秤した試料をフィルム中で薄く延ばし、乾燥庫内で105℃、4時間静置した。乾燥後、デシケーターに移して約1時間放冷し、プラスチックフィルムごと重量を測定した。

## 4. pHの測定<sup>6)</sup>

均質化した試料をフードプロセッサーの容器に約3g精秤し、予め60℃に加熱した蒸留水を27mL加えた。フードプロセッサーで約30秒間均質化した後、放冷し、表面に浮いた油脂の層を除き、乳濁液の層を測定用の希釈液とした。測定には簡易型のpH計(LAQUA twin pHメータAS-712堀場製作所)を用いた。

## 5. 遊離アミノ酸の測定<sup>7)</sup>

4.で調製した希釈液を測定に用いた。希釈液0.1mLをエッペンチューブに取り、蒸留水を0.9mL、2%(w/v)スルホサリチル酸水溶液を1.0mL加え、30分間静置した。静置後、遠心分離(3000rpm, 10分)し、上清を0.22μmのフィルターでろ過し、測定に供した。遊離アミノ酸の測定には日立アミノ酸分析計(L-8900日立ハイテクフィールディング)を用いた。分析カラムには陽イオン交換型樹脂を用い、生体型アミノ酸分析法にて41成分の分離定量を行った。

## 6. 有機酸の測定<sup>7)</sup>

4.で調製した希釈液を測定に用いた。希釈液を0.45μmのフィルターでろ過し、有機酸分析に供した。分析にはポストカラムpH緩衝化電気伝導度検出法による高速液体クロマトグラフ(Prominence有機酸分析システム, 島津

製作所)を用いて測定した。

## 7. 遊離糖の測定<sup>8)</sup>

4.で調製した希釈液を測定に用いた。希釈液を0.45μmのフィルターでろ過し、遊離糖分析に供した。分析には蒸発光散乱検出による高速液体クロマトグラフ(SHIMADZU LC-Solution, 島津製作所)を用いて測定した。

## 8. 揮発性成分の測定<sup>7)</sup>

2.で均質化した試料を揮発性成分測定用の20mL容量のバイアル瓶に約0.5g採取した。内部標準試薬として100μg/mLシクロヘキサノール水溶液50μLを加え、スパーテルで混合して密封した。試料を封入したバイアルを40℃で20分間予備加熱した後に固相マイクロ抽出ファイバー(SPMEファイバー:50/30μm StableFlex DVB/Carboxen<sup>TM</sup>/PDMS)で、揮発性成分を40℃で30分間抽出し、GC/MSに供して分析を行った。GC/MS分析はGCMS-QP2010(島津製作所)で行った。カラムはDB-WAX(30m×0.25mm I.D., 膜厚0.25μm, J&W Scientific)を用い、注入口温度は250℃、カラム温度は35℃を5分間保持し、その後185℃まで3℃/minで昇温して分析を行った。検出された各成分はマススペクトルデータベース(NIST)との比較により同定した。

## 実験結果

### 1. 水分

各試験区の熟成期間中における水分の変化を図1に示した。熟成開始前の水分は39.4%であり、対照区では4週目で39.3%、8週目で39.0%であるのに対し、酒かす区では4週目で39.0%、8週目で38.1%、加熱酒かす区では4週目で38.8%、8週目で38.6%であった。各試験区とも熟成開始前と比べわずかに水分が減少していたが、大きな違いは認められなかった。また、それぞれの熟成期間において、対照区と比べて酒かすを使用した試験区で水分が

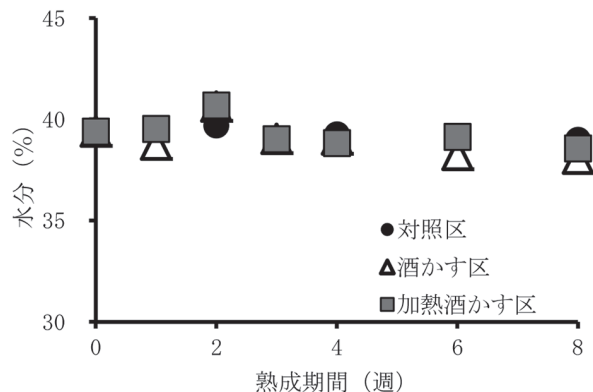


図1 熟成期間中の水分の変化

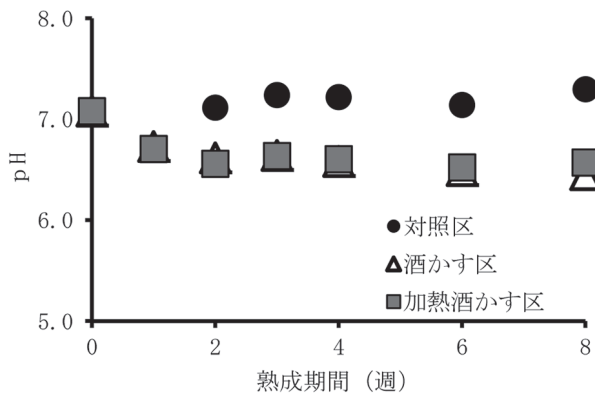


図2 熟成期間中のpHの変化

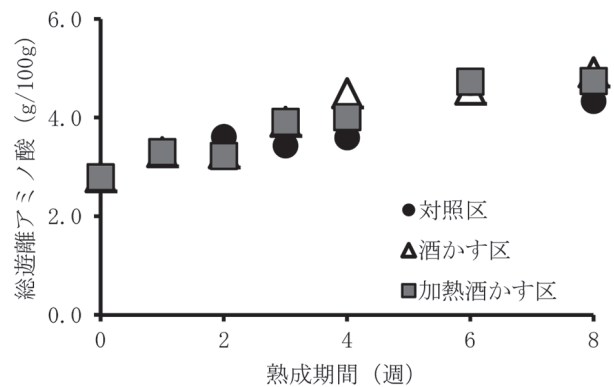


図3 熟成期間中の総遊離アミノ酸の変化

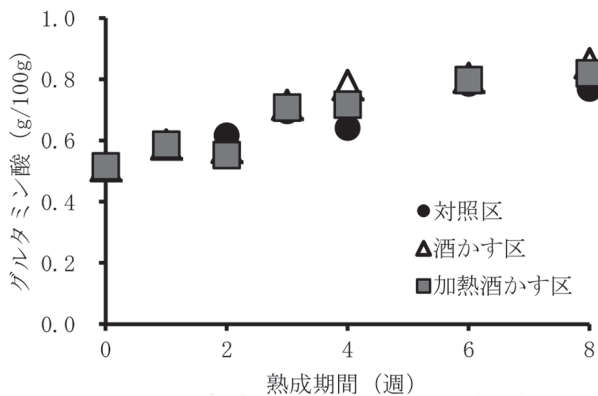


図4 熟成期間中のグルタミン酸の変化

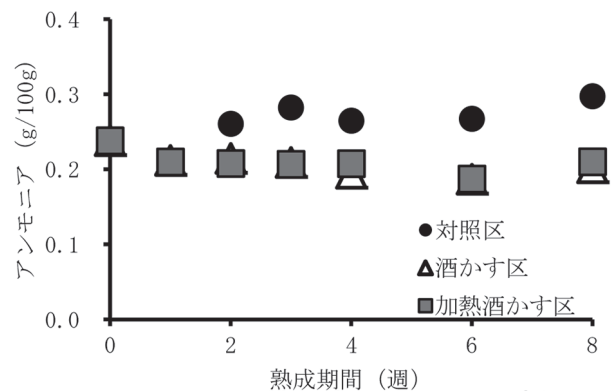


図5 熟成期間中のアンモニアの変化

少ない傾向にあったが、大きな違いは認められなかった。

## 2. pH

各試験区の熟成期間中におけるpHの変化を図2に示した。熟成開始前のpHは7.1であり、対照区では4週目で7.2、8週目で7.3と上昇していた。一方、酒かす区、加熱酒かす試験区では1週目で両試験区とも6.7に低下しており、4週目で6.6、8週目で酒かす区が6.5、加熱酒かす区が6.6であった。酒かすを使用した試験区は対照区に比べてpHが低下していた。

## 3. 遊離アミノ酸

各試験区の熟成期間中における総遊離アミノ酸含有量を図3に示した。各試験区ともに遊離アミノ酸は熟成期間中に増加し、熟成開始前は2.79 g/100 gに対し、対照区は6週間後に4.70 g/100 g、酒かす区、加熱酒かす区は8週間後にそれぞれ4.92 g/100 g、4.75 g/100 gであった。遊離アミノ酸組成は各試験区とも熟成期間をとおして違いは見られず、グルタミン酸が最も多く、約16%を占めていた。各試験区の熟成期間中におけるグルタミン酸含有量を図4に示した。グルタミン酸も同様に各試験区ともに増加し、

熟成開始前は0.52 g/100 gに対し、対照区は6週間後に0.79 g/100 g、酒かす区、加熱酒かす区は8週間後にそれぞれ0.85 g/100 g、0.82 g/100 gであった。各熟成期間では試験区による遊離アミノ酸含有量、グルタミン酸含有量に違いは見られなかった。各試験区の熟成期間中におけるアンモニア含有量を図5に示した。アンモニア含有量は熟成開始前が0.24 g/100 gに対し、対照区は8週後に0.30 g/100 gに増加したが、酒かす区、加熱酒かす区では、1週後に両者とも0.21 g/100 gに低下し、8週間までほとんど変化しなかった。酒かすを使用した試験区は対照区に比べてアンモニア含有量が低下していた。

## 4. 有機酸

各試験区の熟成期間中における総有機酸含有量を図6に示した。熟成開始前の有機酸含有量は762 mg/100 gであった。対照区では3週間後に478 mg/100 gと減少し、その後、6週間後に465 mg/100 gと含有量の増減は見られなかった。酒かす区と、加熱酒かす区では、1週間後にそれぞれ、881 mg/100 g、872 mg/100 gとやや増加し、その後、8週間後は760 mg/100 g、682 mg/100 gと減少し

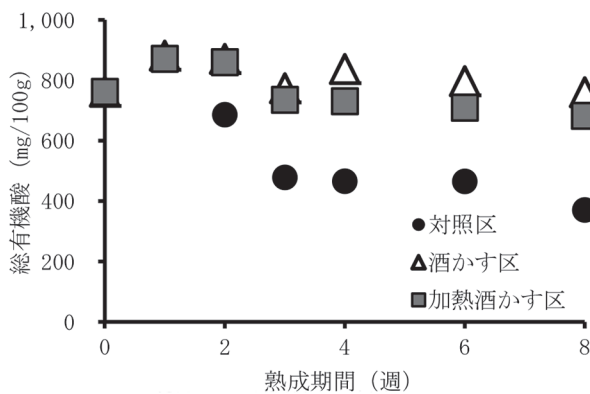


図6 熟成期間中の総有機酸の変化

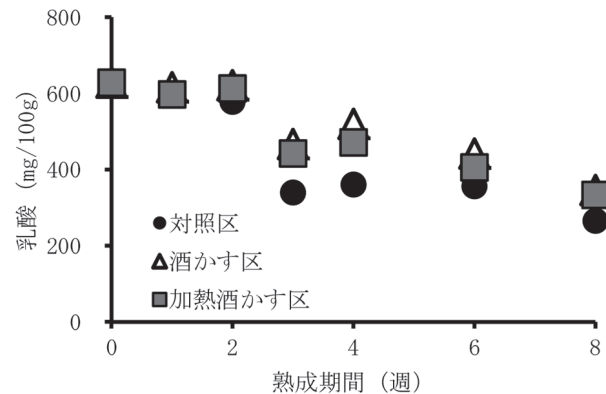


図7 熟成期間中の乳酸の変化

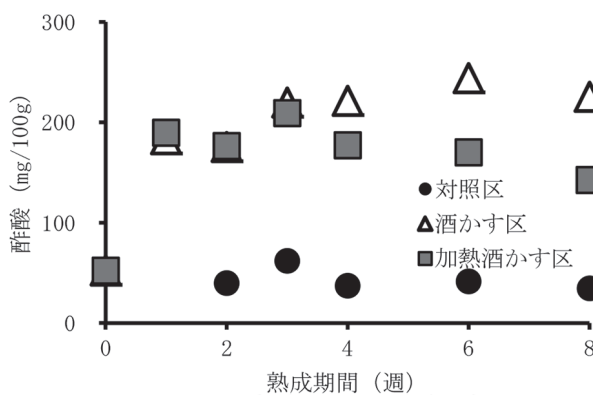


図8 熟成期間中の酢酸の変化

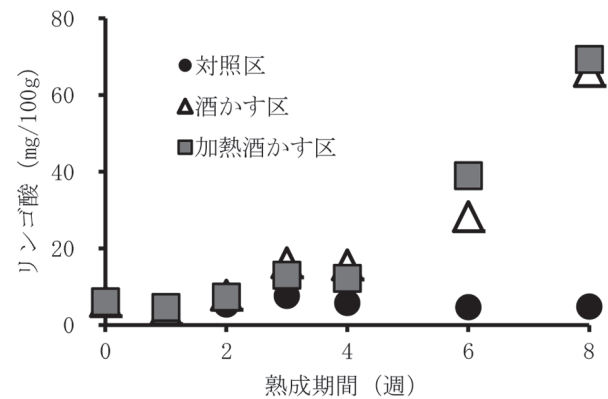


図9 熟成期間中のリンゴ酸の変化

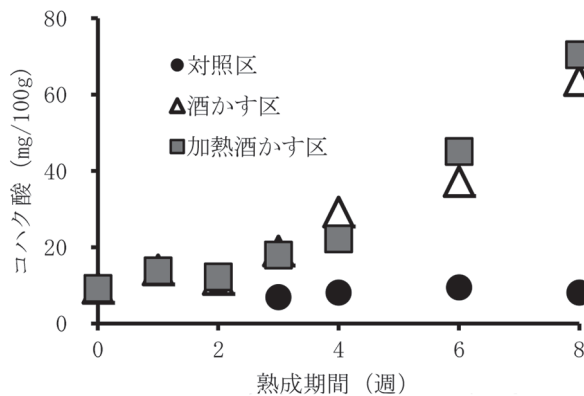


図10 熟成期間中のコハク酸の変化

たものの、対照区と比べて含有量は多かった。各試験区の熟成期間中における乳酸、酢酸、リンゴ酸、コハク酸の含有量を図7～10に示した。有機酸の組成を見ると、最も含有量が多い有機酸は乳酸であり、熟成開始前は628mg/100gであり、全有機酸含有量に占める割合は82.4%であった。乳酸含有量は各試験区とも2週間後までは変化は見られなかったが、その後は減少し、8週間後は対照区が266mg/100g、酒かす区が347mg/100g、加熱酒かす区が333mg/100gであり、組成もそれぞれ71.9%、

45.7%、48.8%と減少した。酒かすによる熟成期間中に酢酸、リンゴ酸、コハク酸が増加していた。酢酸の含有量は熟成開始前では52mg/100gであり、対照区では8週間後に35mg/100gと減少した。一方、酒かす区と加熱酒かす区では1週間後にそれぞれ、183mg/100g、190mg/100gと熟成開始前より大きく増加した。その後、加熱酒かす区では8週間後に143mg/100gと減少したが、酒かす区では6週間後に244mg/100gと増加した。また、リンゴ酸とコハク酸は熟成開始前がそれぞれ、6mg/100g、9mg/100gであり、対照区では8週間後ではそれぞれ、5mg/100g、8mg/100gとほとんど増減が見られなかったのに対し、酒かす区と加熱酒かす区では3週間後から増加し、8週間後には、それぞれリンゴ酸が66mg/100gと69mg/100g、コハク酸が64mg/100gと71mg/100gに増加していた。

### 5. 遊離糖

各試験区において、熟成期間中に検出された遊離糖はグルコースが主成分であり、他にエチル- $\alpha$ -グルコシド( $\alpha$ -EG)が含まれていた。各試験区の熟成期間中におけるグルコース、 $\alpha$ -EGの含有量を図11、12に示した。熟成開始前の試料には遊離糖が含まれず、また、対照区も

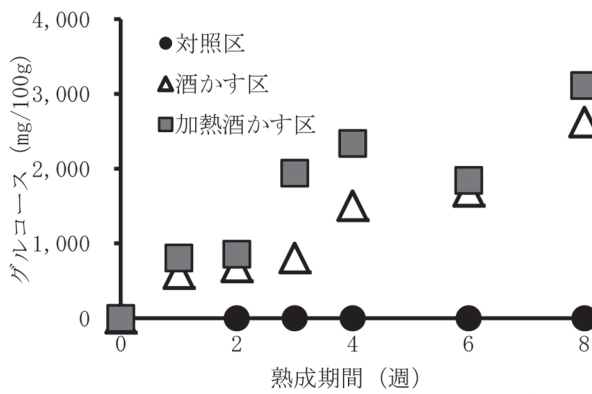


図11 熟成期間中のグルコースの変化

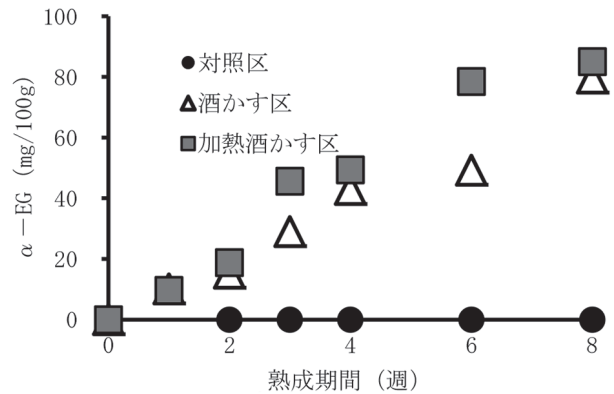


図12 熟成期間中のα-EGの変化

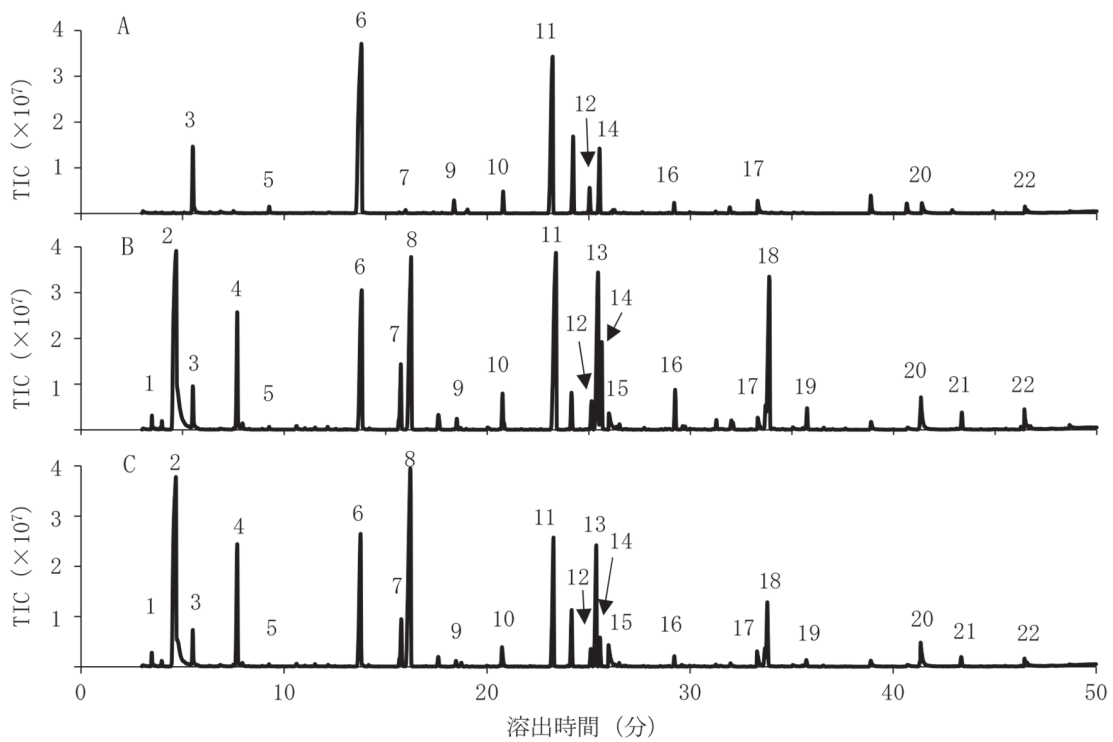


図13 各試験区の揮発性成分のTICクロマトグラム

A; 対照区 B; 酒かす区 C; 加熱酒かす区

表1 各試験区で検出された主な揮発性成分

化合物名	ピーク番号	化合物名	ピーク番号	化合物名	ピーク番号
アルコール		ケトン		エステル	
エタノール	2	アセトン	1	酪酸エチル	4
イソアミルアルコール	7	2-ペンタノン	3	カプロン酸エチル	8
2-ヘプタノール	10	2-ヘキサノン	5	カプリル酸エチル	13
2-ノナノール	16	2-ヘプタノン	6	カプリン酸エチル	18
酸		アセトイン	9	9-デセン酸エチル	19
酢酸	15	2-ノナノン	11	芳香族	
酪酸	17	8-ノネン-2-オン	14	4-メチルアニソール	12
カプロン酸	20			フェネチルコール	21
カプリル酸	22				



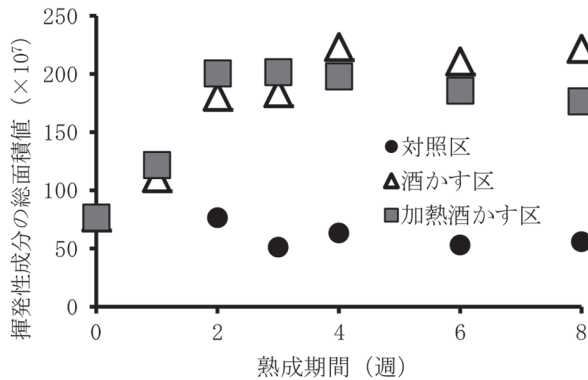


図14 熟成期間中の揮発性成分の変化

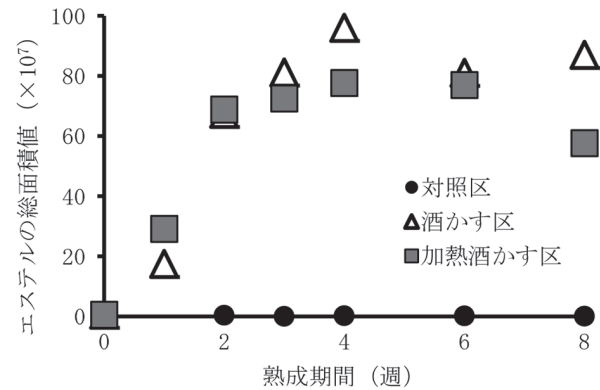


図15 熟成期間中のエステルの変化

8週間までの試験区において遊離糖は検出されなかった。一方、酒かす区と加熱酒かす区では、1週間後からグルコースが含有されており、酒かす区で597mg/100g、加熱酒かす区では807mg/100gであり、8週間後ではそれぞれ、2630mg/100g、3110mg/100gと増加していた。また、 $\alpha$ -EGもグルコースと同様に、酒かす区および加熱酒かす区ともに8週間後まで含有量が増加し、それぞれ80mg/100g、85mg/100gであった。

#### 6. 揮発性成分

熟成4週後における各試験区の総揮発性成分のGC/MSによるTICクロマトグラムを図13、TICクロマトグラムにより得られたピークのMSスペクトルから同定した化合物を表1に示した。対照区の揮発性成分は2-ヘプタノン、2-ノナンなどのケトンが主に検出された。酒かす区と加熱酒かす区はほぼ同じ成分が含まれ、ケトンに加えて、エタノール、イソアミルアルコールなどのアルコール、カブロン酸エチル、カプリル酸エチルなどのエステルなどが検出された。次に、各試験区の揮発性成分の熟成期間中の変化をTICクロマトグラムから得られた各成分のピーク面積値を用いて比較した。検出された成分の総和を総揮発性成分として図14に、エステルの総和を図15に示した。総揮発性成分は、対照区は熟成開始前が $7.7 \times 10^8$ から4週後に $6.3 \times 10^8$ 、8週後に $5.6 \times 10^8$ となり、減少傾向であったのに対して、酒かす区は2週間後に $1.8 \times 10^9$ 、加熱酒かす区は $2.0 \times 10^9$ と大きく増加した。その後、酒かす区は4週後に $2.2 \times 10^9$ に増加し8週後も同程度であったのに対し、加熱酒かす区は4週後も $2.0 \times 10^9$ とほとんど変化せず、8週後は $1.8 \times 10^9$ とわずかに減少していた。エステルは熟成開始前および対照区にはほとんど含まれていなかった。酒かす区は2週後に $6.7 \times 10^8$ 、4週後に $9.6 \times 10^8$ と増加し、8週後も $8.7 \times 10^8$ とあまり変化しなかったのに対して、加熱酒かす区は2週後に $6.9 \times 10^8$ と

増加した後、4週後は $7.8 \times 10^8$ と大きな増加は見られず、8週後は $5.7 \times 10^8$ と減少していた。揮発性成分は各試験区において異なる挙動を示していた。

#### 考 察

酒かすブルーチーズは既存製品のブルーチーズとは異なる風味を持っており、この特長ある風味が酒かすに由来する可能性がある。酒かすがブルーチーズに風味を与える効果として2つのことを検討した。1つは日本酒製造に使用した麹菌などの微生物由来の酵素の働きにより、チーズ本体のたんぱく質や脂質が分解をより促進されて風味を向上させることが考えられた。もう1つは酒かす自体が持つ遊離アミノ酸やエチルエステルなどの風味成分がチーズに移行することで風味を向上させることが考えられた。そこで本研究では通常のブルーチーズ（対照区：酒かす不使用）、酒かす製造後、冷解凍のみの酒かすを使用したブルーチーズ（酒かす区）、冷解凍後の酒かすを加熱処理により酵素失活させて使用したブルーチーズ（加熱酒かす区）の3つの試験区により比較を行った。

チーズの旨味は遊離アミノ酸、グルタミン酸が指標とされる<sup>9~10)</sup>。本研究ではどの試験区においても、熟成開始後の時間経過とともに遊離アミノ酸、グルタミン酸は増加した。しかし、各試験区の間で含有量に違いは見られなかった。このことから、遊離アミノ酸、グルタミン酸の増加は、酒かすの酵素の働きや酒かすに含まれる遊離アミノ酸の移行によるものではなく、ブルーチーズ本体に含まれている酵素に起因していることが推察された。

一方、pHとアンモニア含有量は酒かすを使用した2つの試験区ともに熟成1週間後に低下し、対照区と違いが見られた。pHの上昇、アンモニアの増加は青カビの働きによるものと推察され<sup>11)</sup>、カビ系ナチュラルチーズ独特の風味を与えている。酒かすブルーチーズは酒かすでブ

ルーチーズの表面を覆い熟成させる。その際に、アンモニアが酒かすに移行し、アンモニア含有量が減少することでpHの低下につながっていることが考えられた。また、酒かすで表面を覆うことにより、カビの生育が抑えられ、アンモニアの生成が抑制されていることも考えられた。

各試験区のチーズには有機酸として、乳酸、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸などが含まれていた。乳酸はチーズ製造における乳酸菌の働きにより生成され、チーズ中に残存したと考えられる。本研究では、どの試験区においても熟成開始後の時間経過とともに減少していた。一方で、酢酸、リンゴ酸、コハク酸は、酒かすを使用した2つの試験区で増加していた。リンゴ酸とコハク酸は清酒酵母の代謝産物として生成されることが報告されている<sup>12)</sup>。リンゴ酸、コハク酸は使用した酒かす中にも含まれており、酒かすによる熟成期間中にブルーチーズへ移行したと推察された。酢酸はリンゴ酸やコハク酸の挙動と異なり、酒かすによる熟成開始後、急激に増加した。酒かす中の酢酸含有量は少なく、酒かすからの移動とは考えられなかった。酢酸はエタノールが分解されることで生成される。酒かすに含まれるエタノールからブルーチーズに含まれる酵素などにより代謝生成されたことが推察されたが、本研究の結果からは判然としなかった。

遊離糖は熟成開始前のブルーチーズには含有しておらず、対照区も熟成期間中をとおして含有していなかった。酒かすを使用した2つの試験区では、グルコースが含まれ、熟成期間中に増加した。酒かすに含まれる遊離糖は、グルコースの他に、イソマルトース、イソマルトトリオースなどの存在が報告されている<sup>13)</sup>。これらの糖は、米に含まれているでんぷんが麹により分解されることで生成される。グルコースの大部分は清酒酵母による解糖作用によりエタノールの合成に使われるが、一部は遊離糖として残存している。本研究で使用した酒かすにもグルコースが含まれており、酒かすからブルーチーズへ移行したと推察された。また、微量であるが、2つの酒かすを使用した試験区には、 $\alpha$ -EGが含まれていた。 $\alpha$ -EGは清酒やみりんなどに特異的に含まれていることが報告されており<sup>8, 14)</sup>、本試験で使用した酒かすにも $\alpha$ -EGが含まれており、酒かすから移行したと推察された。 $\alpha$ -EGは、保湿効果などの機能性を持つことが報告されている<sup>15)</sup>。酒かすブルーチーズ中の $\alpha$ -EG含有量は微量であったが、使用する酒かすの $\alpha$ -EG含有量を高めるなど、 $\alpha$ -EGによる機能性効果を生かした酒かすブルーチーズの製造の可能性が示された。

各試験区の揮発性成分にケトンが含まれ、特に対照区で

は大部分を占めていた。ケトンはカビの働きにより生成され、ブルーチーズの香りの特長と考えられる<sup>10~11)</sup>。酒かす区、加熱酒かす区の揮発性成分に含まれているエステルは酒かすから移行していると考えられたが、熟成3週間後から酒かすの加熱の有無で含有量に差が見られた。エステルは酵母が産生する酵素により、有機酸とエタノールから生成される<sup>16~17)</sup>。加熱の有無で違いが見られたのは、加熱酒かす区では熟成期間中に酒かすに含まれていたエステルがチーズに移行するのみであるのに対して、酒かす区では、熟成期間中に酒かすの中で新たにエステルが合成され、チーズへ移行するエステルの量が多くなる可能性が示唆された。

## 要 約

酒かすによる熟成期間中のブルーチーズの呈味成分と揮発性成分の挙動を解析した結果、酒かすを使用することで、pHとアンモニア含有量を低下させ、酒かすに含まれるリンゴ酸やコハク酸、グルコースなどがブルーチーズへ移行することが明らかとなった。さらに、エステルやアルコールなどの揮発性成分も移行し、特にエステルは酒かす由来の酵素のはたらきにより増加する可能性が示された。この結果、酒かすによって熟成させたブルーチーズの風味成分の特長が示され、さらに熟成期間中の挙動が明らかとなったことから、風味の特長を十分に生かすための熟成期間の設定にも活用可能な知見が得られた。

本研究は旭川食品産業支援センターからの委託研究として実施した試験研究である。また、(有)伊勢ファームの伊勢昇平氏には、試験試料となるブルーチーズおよび酒かすブルーチーズ等の製造や提供等のご協力を賜った。ここに深甚なる感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) 農林水産省生産局畜産部牛乳乳製品課、平成29年度チーズの需給表 (2018)。
- 2) 農林水産省生産局畜産部牛乳乳製品課、牛乳乳製品統計 (2018)。
- 3) 北海道総合政策部、日EU・EPA交渉の大筋合意に伴う北海道における影響と必要な対策中間とりまとめ (2017)。
- 4) 平成28年度ビジネス創出連携事業「旭川産酒粕を使用した江丹別産アレンジブルーチーズの開発と販路拡大」報告書、((公財)北海道科学技術総合振興センター)、(2017)。

- 5) 五訂日本食品標準成分表 分析マニュアル, 科学技術庁資源調査会食品成分部会編, (社団法人資源調査会), 1-12 (1997).
- 6) 乳製品試験法・注解【改訂第2版】, 日本薬学会編, (金原出版, 東京), 302 (1999).
- 7) 田中彰, 八十川大輔, ホエイを活用した水産糠漬けの呈味成分と香気成分, 北海道立総合研究機構食品加工研究センター研究報告, (地独) 北海道立総合研究機構食品加工研究センター, 37-41 (2017).
- 8) 寺田英俊, 早川禎宏, 三上博久, 蒸発光散乱検出器の有効的な使い方, CHROMATOGRAPHY, 32, 3, 141-152 (2011).
- 9) チーズの科学, 齋藤忠夫著, (講談社, 東京), 150-168 (2016).
- 10) 白田志保, 石川清宏, おいしさへのアプローチ〜チーズにおけるアミノ酸とにおいの評価〜, におい・かおり環境学会誌, 44, 1, 38-45 (2013).
- 11) 川端史郎, 白カビチーズに特徴的な香り成分とその生成経路, *Milk Science*, 59, 3, 303-307 (2010).
- 12) 浅野忠男, 清酒酵母の有機酸生成に関する研究, 生物工学会誌, 85, 2, 63-68 (2007).
- 13) 中川良二, 濱岡直裕, 乳酸菌発酵酒粕を用いた生菌含有アルコール飲料, 日本醸造協会誌, 107, 8, 605-610 (2012).
- 14) 岡智, 清酒中のエチル $\alpha$ -D-グルコシド, 日本醸造協会誌, 72, 9, 631-635 (1977).
- 15) 坊垣隆之, 尾関健二, 保湿機能を有するエチル $\alpha$ -D-グルコシド高含有酒粕再発酵酒の製造, 生物工学会誌, 94, 10, 594-600 (2016).
- 16) 堤浩子, 清酒酵母の香気生成の研究, 生物工学, 89, 12, 717-719 (2011).
- 17) 秋田修, 小幡孝之, 清酒の香気設計, 化学と生物, 29, 9, 586-59 (1991).