

報 文

味淋の変色現象に就て II. 味淋中のカーボニル化合物とその生成に就て

大亦正次郎・上野照雄・中川 泰 (大阪府立大学農学部農芸化学教室)

我々は前報¹⁾に於て味淋の貯蔵中に起る変色現象が一種の非酵素的褐変反応で空気と光の存在がその褐変化を酸化的に促進せしめ、成分的にはカーボニル化合物が関与している事を明らかにした。このカーボニル化合物の内容並びにその生成機構に就ては従来より研究もなく不明であつた。依つて本報では既報の方法²⁾に基きカーボニル化合物の内容を調べ、その生成機構の一つとして Stretcher Degradation の存在する事を推定し得たので以下に報告する。

実 験 の 部

1. 試料並びに実験方法

試料味淋の仕込配合は前報¹⁾記載の通りである。

カーボニル化合物の分離と紫外吸収の測定: カーボニル化合物を 2,4-dinitrophenylhydrazone (略 2,4-DNPhs) にして Column-chromatography にて分離する方法は既報²⁾の如くであるが本報ではカーボニル化合物を含む液として味淋の20時間エーテル抽出液を用いた(抽出割合は味淋300ccをエーテル約300ccで抽出す)。又、吸着剤として Alumina·Fuller's earth 混合物(1:1)を用い紫外部の測定は BECKMAN Spectrophotometer に依つた。液層の厚さ10mm, 試料は適当に稀釈し95%酒精溶液で測定した。

味淋中のアミノ酸の検出法: 味淋中のアミノ酸を水銀塩法³⁾即ち10% NaOH で塩基性となし25%醋酸水銀液を加えて水銀塩として沈澱せしめ、この沈澱を水中でH₂Sの吹込に依り分解してアミノ酸の劃分を濾別し、これを減圧濃縮後95% EtOH を同量加え生成した沈澱をアミノ酸検出試料とした。アミノ酸の検出法は2次元の paper chromatography⁴⁾に依つたが展開剤としてアンモニヤ性 phenol 液(1% Amm. 水 6l. 5g 中に 660g の phenol を溶解す)及び n-butanol-methanol 混液(35% methanol, 35%含水 butanol=1:1)を用い発色剤として ninhydrin の0.1% butanol 液を用いた。使用濾紙は東洋濾紙No. 50である。

味淋中の Diacetyl 及び Acetoin の定量法: (下田⁵⁾) 味淋25ccに水10ccを添加, Na₂CO₃ にて pH7.0 となし CO₂ gas 気流中で徐々に蒸餾し、この餾液に水 5 cc を添加25ccとなしこれを原液とした。原液 2 cc に 1% NH₂OH·HCl 1cc, 3% Urea 1cc, H₂SO₄·H₃PO₄ 混液(1:3) 2 cc を加え湯浴(100°C)で45分間加熱後冷却し発生した色を470m μ で測定して検量曲線に依つて定量す。Acetoin の定量は Diacetyl 蒸餾残液に50% FeCl₃ 液10 cc (FeSO₄ 約 3g を含む), 25% H₂SO₄ 5cc, 水10ccを添加蒸餾しこの餾液に就き470m μ に於ける optical density の測定より Acetoin の量を定量す。

furfural の検出: 既報⁶⁾の方法に依る。

2. 味淋中のカーボニル化合物に就て

味淋に関しては濁濁現象に就ては従来より多くの研究があるが着色現象及びその原因となる成分に就ては殆んど研究されていない。この事は従来味淋の色調に就て関心が払われていない為めと考えられる。然し近年、味淋、清酒等全て淡色が好まれる結果その色調の変化にも注意が払われるに至つた。味淋と清酒ではその原料は殆んど同一(糯米と粳米の差はあるが)であるが製法上、味淋は仕込後は純酵素作用、清酒は酵母、黴の関与する併行複醱酵である事は既に認められた所である。従つてその製品中に存する諸成分中糖類、アミノ酸以外の部分に於て可成の差があるものと考えられる。然し貯蔵中に色が濃化する事は両者の場合同一であるがその程度は肉眼的には味淋は濃く清酒は薄い。この現象は従来の説に従えば両者中の糖類とアミノ酸の反応に依る melanoidin 色素の生成で説明出来るものとも考えられるが、我々の行いつつある醤油の色に関する研究より糖とアミノ酸以外の化合物例えばカーボニル化合物, furfural, Reductone 等の関与も考えられる。この中、カーボニル化合物の関係に就ては一部前報で報じた所であるが、その内容は不明であつた。依つて1年貯蔵、2年貯蔵の味淋製品に就きエーテル抽出に依りカーボニル化合物を含む劃分を得、前述の方法に依りカーボニル化合物を 2,4-DNPhs

(174)

(大亦, 上野, 中川) 味淋の変色現象に就て

Table 1. Characteristics of isolated 2,4-DNPhs

Sample	Fraction	Distance from the top on the column (mm)	Color on the column	λ_{max} (m μ)	Identified compound	Remarks
I	1	0~5	Orange	300, 390	(H.M.F.)	Sample is reserved in brown-bottle for 2 years at room temp. D.C. of sample is 4.290, color of original 2,4-DNPhs mixt. is reddish brown.
	2	6~7	Pink	390	(Crotonaldehyde)	
	3	10~13	Yellow	370		
	4	15~20	Pink	365		
	5	25~28	Pale yellow green	335		
	6	30~38	Pale brown	255, 350	(Diacetyl)	
	7	40~55	Brown	255, 365		
	8	60~65	Brown	355		
	9	80~160	Brown	355		
	10	190~210	Brown	355		
II	1	0~2	Orange	—		Storage time is 2 years in non-colored bottle at room temp. D.C. of sample is 8.595. Color of original 2,4-DNPhs mixt. is brownish orange.
	2	4~7	Yellow	260, 380		
	3	15~17	Yellow	380	(Crotonaldehyde)	
	4	20~23	Yellow-green	340		
	5	24~27	Yellow	360		
	6	35~45	Pale yellow brown	370		
	7	50~60	Pale orange	360		
	8	90~120	Dark yellow	360	(Acetaldehyde)	
	9	130~170	Pale yellow	255, 350	(Diacetyl)	
III	1	0~2	Orange	390	(H.M.F.)	Storage time is 1 year in non-colored bottle at room temp. Color of 2,4-DNPhs is brownish orange.
	2	5~15	Yellow orange	330	(Crotonaldehyde)	
	3	16~20	Yellow orange	360		
	4	30~60	Pale brown	360	(Acetaldehyde)	
	5	100~120	Dark brown	255, 350	(Diacetyl)	

となし Column chromatography にて分離後、その紫外吸収曲線を Beckman spectrophotometer に依り測定して Table 1 及び Fig. 1 (I, II, III) の如き結果を得た。この結果より大略以下の事が判明する。即ち、

(1) 味淋中のカーボニル化合物の 2,4-DNPhs の数は貯蔵年数及び貯蔵条件に依り影響を受ける様である。即ち 1 年貯蔵品では 5, 2 年貯蔵品では 9~10, 更に褐色瓶と無色瓶貯蔵では数が僅か異っており、着色の濃厚な方が数が多い。以上のことより貯蔵中のカーボニル化合物の生成が推察され、この点に就ては後記の如くである。この傾向は上槽直後の試料が入手出来れば更に確かめられるので今後検討の予定である。

(2) 分離された 2,4-DNPhs は 10% Na_2CO_3 に対する溶解度よりケト酸の 2,4-DNPhs を含まないと考えられる。更にその吸収曲線の形及び λ_{max} の値より原化合物の構造を推察するに、 λ_{max} の範囲が 335~390 m μ であり、大部分が 335~370 m μ にあるので ROBERT-Green⁷⁾, BRAUDE and JONES⁸⁾ の研究結果と対比すると大部分は二重結合を有しない化合物で、370~390 m μ 範囲のものが二重結合を有するカーボニル化合物と考えられる。確認又は推定される化合物中、前者に属するものとして Acetaldehyde⁹⁾, Diacetyl¹⁰⁾, 後者に属するものとして Crotonaldehyde⁸⁾, H.M.F.¹¹⁾ で他のものは未知物質である。以上の中 Diacetyl, H.M.F. は後記の如く定量された。

(3) 味淋カーボニル化合物の内容と貯蔵年数の関係に就て考察するに、貯蔵時間が大になり着色濃厚化したものでは Acetaldehyde が消失して Crotonaldehyde の存在が認められる(試料 I)。Diacetyl は何れの試料にも認められるが、これは恐らく米麴に由来すると考えられ、後記の如く褐変反応に於て極めて重要な意義を有するものである。更に、他の未知物質に就てもその本体が判明すれば重要性は明確になり、その生成機構も推定し得るも現在はすべて不明である。恐らく酸化的に重合したカーボニル化合物も含まれると考えられる。

Fig. 1 Absorption spectra of 2,4-DNPhs of Mirin carbonyl compounds

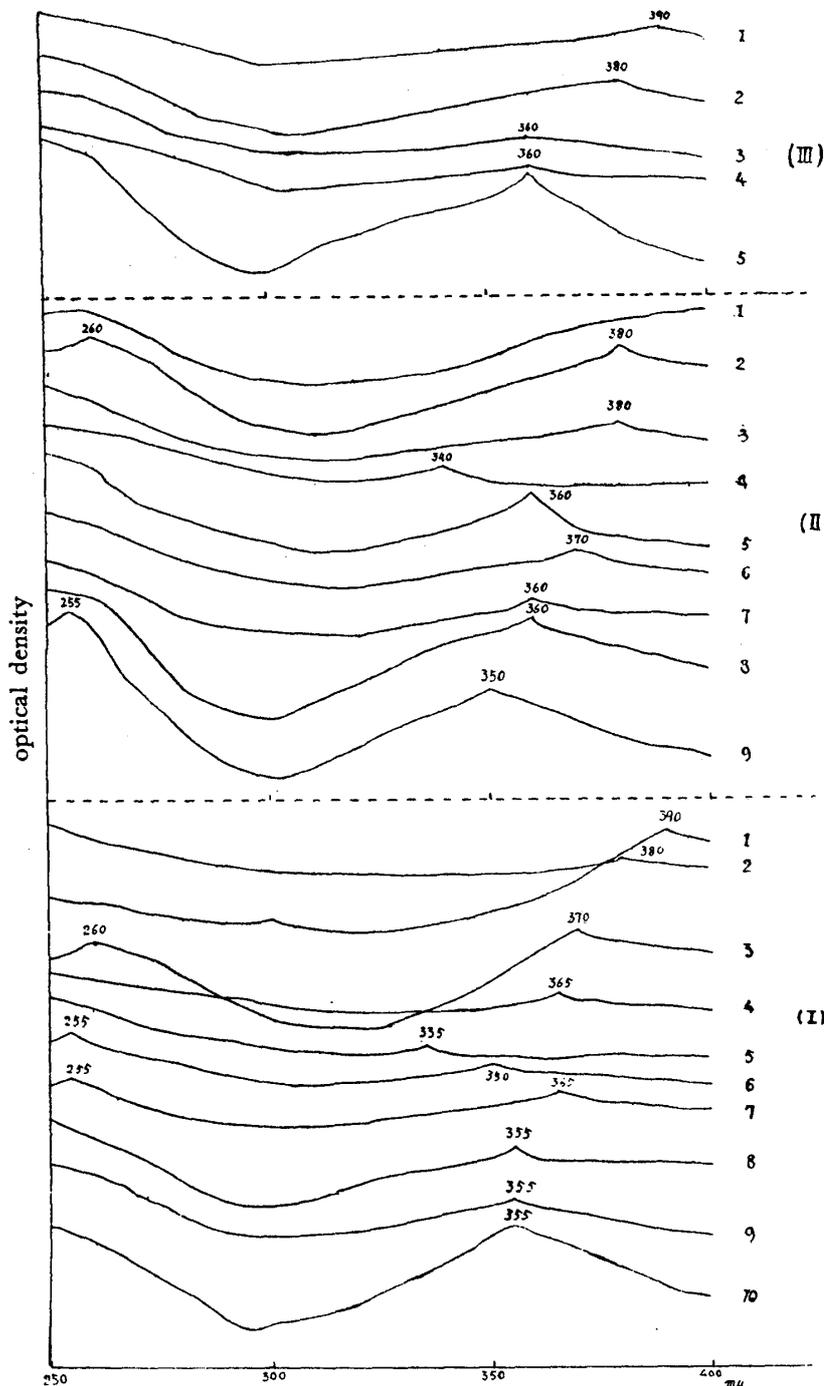


Table 2. 2,4-DNPhs Fraction of Mirin produced during 3 months storage.

Fraction	Distance from the top on the column (mm)	Color on the column	λ _{max} (mμ)
1	0~20	Orange	275
2	22~25	Orange	—
3	30~35	Pale Yellow	325
4	150~200	Yellow Brown	270, 350~355, 365

3. 味淋の貯蔵中に生成するカーボニル化合物

既知の如く味淋製造には米麴を使用している。従つて城, 下田¹²⁾の研究結果より明らかな如く麴菌に依る Diacetyl, Acetoin の如きカーボニル化合物の生成も考えられ前者に就ては前節の実験でその存在が認められている。

更に前節に於て認められた如く貯蔵中に 2,4-DNPhs の数が増加することよりカーボニル化合物の生成が推察されるが、これが麴菌の保有する Carboligase の作用に基く Acyloin 縮合の結果として生成するのか、非酵素的な味淋成分間の相互反応に基くかは簡単に決定し得ない所である。

然し一応貯蔵中に如何なるカーボニル化合物が生成するかが明らかになればこれらの点を判定するのに役立つものと考えられる。以上の目的で以下の如き実験を行つた。即ち最も着色の濃厚な 2 年貯蔵製品 (無色瓶保存) 300cc をエーテルにて 20 時間抽出して一応カーボニル化合物を除去し、残液 255 cc に純 EtOH 45cc を添加して原容に復し再び無色瓶にて 28°C にて放置保存した所 3 ヶ月後その液の色はエーテルにてカーボニル化合物を除去した直後の約 7.3 倍に濃化した。こゝに於て再びエーテル抽出し抽出液中のカーボニル化合物を 2,4-DNPhs として分離しその紫外吸収を測定し Table 2, Fig. 2 の如き結果を得た。

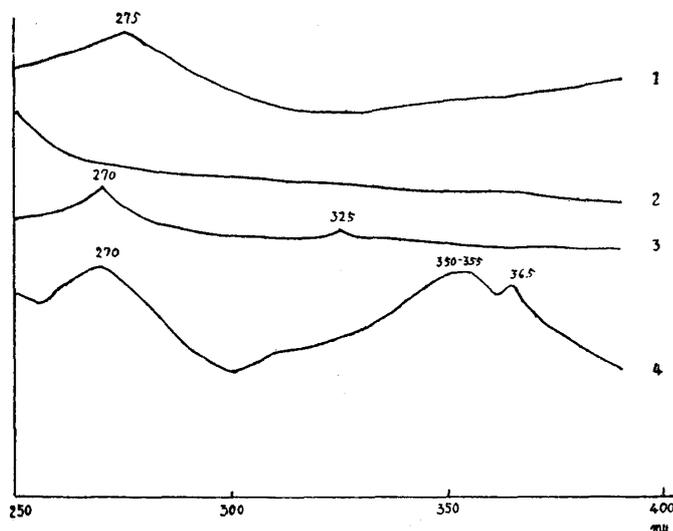
ここに生成した 2,4-DNPhs は 4 である。その内容に就ては何れも未知であるが Fig. 1 に比して Diacetyl, H.M.F, Acetaldehyde, Crotonaldehyde に相当する 2,4-DNPhs が認められない。このことより Dia-

(I) (II) (III)

(176)

(大赤, 上野, 中川) 味淋の変色現象に就て

Fig. 2 Absorption spectra of 2,4-DNPhs of Mirin produced during 3 months storage.



4. 味淋貯蔵中に於けるカーボニル化合物の生成機構

味淋貯蔵中にカーボニル化合物の生成する事は確認されたがその生成機構は不明である。然し一応麴菌に依る生成と味淋中のアミノ酸と既存の Sugar fission product間に起る STRECKER degradation が考えられる。前者に就ては麴菌の作用は最初約40% EtOH 液中で行われる為めその作用は主として酵素作用であり菌体の繁殖に伴う生理的分解作用でないと考えられる。酒精液中に於ける麴菌酵素に依るカーボニル化合物の生成に就ては現今不明で今後検討を要する事と思われるも前節の実験より Diacetyl の monohydrazone に相当する λ_{max} のない事より酒精液中での Diacetyl の如きカーボニル化合物の生成は起らないものと考えられる。後者に就ては味淋中には既に多数のアミノ酸と Diacetyl の如き dicarbonyl 化合物の存在が認められるので、これらの間の反応即ち STRECKER Degradation の起る可能性は極めて大である。この反応に就ては褐変反応には既に認められた事¹³⁾であり、本邦では野村¹⁴⁾が夏蜜柑果汁に於ける formaldehyde の生成とそれの関与する反応に就て報告している。然しこの反応の一方の対象になる糖の分解産物は醸造食品の場合極めてその種類が多いものと考えられる。本報では主として Diacetyl とアミノ酸の間に起る STRECKER degradation に就て実験を行った。

味淋中の Diacetyl 量は前記の方法で定量した結果 350 γ /100cc, Acetoin 量は 1510 γ /100cc (何れも 1年貯蔵

cetyl, H.M.F, Acetaldehyde は主として麴中で糸状菌の作用に依り生成すると想像される。又この結果と Fig. 1 (I, II) の結果より貯蔵年数の大なるに従い生成カーボニル化合物の多いことも明らかである。これらカーボニル化合物の生成機構並びに濃色の味淋が多くのカーボニル化合物を含む点は褐変反応上興味ある問題である。なお、味淋中に Furfural が存在すれば当然着色に関係する¹⁵⁾が前記の方法で検出した結果では Furfural は存在せず、H.M.F. が 5×10^{-5} vol. % 存することが認められた。従つて Furfural の影響に依る色の濃化は一応考慮しなくとも良い。又、Reductone に就ては酸化型のみしか認められぬが色に関する影響は大であるので別報で報告する予定である。

Table 3. Identified amino acids of mirin.
Rf value

Identified amino acid	Phenol-NH ₃		n-BuOH-MeOH		BuOH-AcCOOH-H ₂ O (1:4:1)	
	Literature ⁴⁾	Observed	Literature ⁴⁾	Observed	Literature ¹⁵⁾	Observed
Alanine	0.53	0.55	0.29	0.30	0.39	0.39
Aspartic acid	0.10	0.12	0.20	0.18		
Glutamic acid	0.25	0.25	0.27	0.25	0.32	0.34
Glycine	0.34	0.33	0.18	0.20	0.32	0.31
Histidine	0.64	0.64	0.17	0.18		
Lysine	0.51	0.51	0.11	0.11		
Phenylalanine	0.90	0.92			0.74	0.72
Proline	0.85	0.81	0.32	0.32		
Serine	0.25	0.22			0.28	0.29
Tyrosine	0.66	0.63			0.59	0.59
Valine	0.78	0.76			0.53	0.53

(178) (橋田, 吉野, 森, 渡辺) 清酒醸造過程に於けるアミノ酸の消長に関する研究

通常 Diacetyl 相互の重合反応では着色物を作ることが多いが, この場合は反応液は肉眼的には着色しておらず, Fig. 3 及び Table 4 より認められる如く Acetaldehyde の生成及び CO₂ の生成があり更に Acetaldehyde の縮合生成物の Crotonaldehyde (380m μ) も認められない事より主として STRECKER degradation が起つているものと考えられる. 然し生成した反応物質(カーボニル化合物)の数が比較的多いことより反応生成物のカーボニル化合物間の重合生成物の存在も考えられる. 特にこの時生成するアミノ・ケトン化合物は褐変反応では極めて重要な役割を果すと考えられるが未確認である. 従来 STRECKER degradation はアミノ酸より単に炭素数 1 ケ少ないアルデヒドを作る簡単な反応の如く考えられているが事実は上の如く, その際生成したアルデヒド又はケトン間の重合反応が伴う様で多数のカーボニル化合物が混在し, これらが褐変反応の precursor として重要な役割を果している様に考えられる. 特に低温度で長時間の反応時に種々カーボニル化合物が生成する様である. なお, Diacetyl 相互間又は Diacetyl と amino 間の aldol 縮合に就ては HODGE¹³⁾, CASON¹⁶⁾の報告があるもこの実験ではそれに該当する化合物が生成しているか否か不明である. 更に Diacetyl とアミノ酸に依るピロール様化合物の生成¹⁷⁾も報ぜられているが, こゝでは認められない.

要 約

味淋中に存在するカーボニル化合物並びに貯蔵中に生成するカーボニル化合物を 2,4-DNPhs としてクロマト法にて分離し, その内容を分光学的に調べ, その生成機構に就て実験を行い以下の如き結果を得た.

1. 味淋中のカーボニル化合物は大部分飽和化合物で不飽和化合物は少い. 構造未知の化合物多く, 既知のものとしては Acetaldehyde, Crotonaldehyde, Diacetyl, H.M.F. 及び Acetoin のみ認められる. ケト酸は含まない.

2. 貯蔵中の変化に依りカーボニル化合物の数及び内容の変化が認められる.

3. 貯蔵中のカーボニル化合物生成機構として STRECKER degradation の起ることが確認される.

終りに御校閲を賜わつた京都大学片桐先生並びに実験試料を寄贈された明石醸造工業株式会社に対し厚くお礼申し上げます. なお, 報文の要旨は農芸化学会西日本支部大会(昭和30年11月5日)にて発表した.

文 献

- 1) 大亦, 上野, 中川: 本誌, **32**, 484 (1954). 2) 大亦, 上野, 中川: 農化, **29**, 165 (1955). 3) 赤堀: アミノ酸及び蛋白質(昭22, 共立出版社). 4) 橋爪, 三井: 食研報告, No. 14, 12 (1952). 5) 下田, 城, 国定: 農化, **28**, 223 (1954). 6) 大亦, 上野, 中川: 農化, **29**, 215 (1955). 7) ROBERT and GREEN: J. Am. Chem. Soc., **68**, 214 (1946). 8) BRAUDE and JONES: J. Chem. Soc., 498 (1948). 9) GILLAM et al: "An Introduction to Electronic Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry". 1954. Arnold, London. 10) DAVID and JOSLYN: Food Research, **18**, 390 (1953). 11) STADTMAN: J. Am. Chem. Soc., **70**, 3583 (1948). 12) 城, 下田: 農化, **29**, 317 (1955). 13) HODGE: J. Agr. and Food Chem., **1**, 926 (1953). 14) 野村: 本誌, **33**, 212 (1955). 15) 尾高: 農化, **24**, 366 (1951). 16) CASON: J. Am. Chem. Soc., **75**, 4300 (1953). 17) PEARCE and BRYCE: Ind. Eng. Chem., **1**, 210 (1947). 18) 佐竹: クロマトグラフ(昭27, 共立出版社). (昭和30, 12, 13 受理)

清酒醸造過程に於けるアミノ酸の消長に関する研究

(第1報) グルタミン酸量に就て

橋 田 度・吉 野 大 資 (大阪大学工学部醸造工学教室)

森 太 郎・渡 辺 和 夫 (KK本嘉納商店研究室)

緒 言

清酒の窒素成分に関して, 先づ高橋氏¹⁾は FISCHER のエステル法に依り数種のアミノ酸を検出定量した. 其後寺本氏²⁾は数種の沈澱剤によつて蛋白質の分解状態を追及し, 更に個々のアミノ酸に関しては黒野氏³⁾, 山田