清酒の劣化の測定へのチオバルビツール酸 (TBA)

反応の利用 (第1報)

清酒と TBA との反応による赤色色素の生成,
及び TBA 反応に与える清酒の貯蔵条件の影響

野村佳司・木曾邦明

(独立行政法人酒類総合研究所)

平成 14 年 11 月 14 日受理

The Use of 2-Thiobarbituric Acid Reaction in the Measurement of Sake Staling (Part 1)
Formation of red pigment in thiobarbituric acid reaction of sake and the effects of storage
of sake on the thiobarbituric acid reactivity.

Yoshitsugu NOMURA, Kuniaki KISO

(National Research Institute of Brewing

3-7-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 739-0046, Japan)

A 2-Thiobarbituric acid (TBA) reaction is widely used to measure the degree of lipid peroxidation such as in salmon oil, soybean oil, and liver homogenate. We attempted to measure the staling of sake by using a TBA reaction.

Visible spectra of the reaction mixture of sake stored at high temperatures with a TBA reagent were more highly colored than that of sake in cool storage. A red pigment, which was similar to product of the TBA reaction with malonaldehyde, was isolated from the reaction mixture of sake stored at high temperatures with a TBA reagent by HPLC. The quantity of red pigment can be measured by absorbance at 530 nm of the reaction mixture. The red pigment increased with storage time, and temperature of the sake. This suggests that a TBA reaction can be used to measure the staling of sake.

Key words : TBA 反応, 清酒の劣化, 高温貯蔵

緒 言

TBA (2-チオバルビツール酸) 反応は、脂質含有物を高温・酸性条件下におくことにより過酸化脂質から遊離する TBA 反応性物質 (マロンジアルデヒド等) が、TBA 2 分子と縮合して赤色色素を生成し¹⁾, その赤色色素を定量し脂質の過酸化度を測定するものであり²⁾, 古くから魚油・ダイズ油などの食用油の劣化 (過酸化) の程度を測定する分析法に利用されてきた。また最近では医学方面でラット肝などの過酸化の程

度を測定する手法として、細胞ホモジネートに対する分析法も開発されている³⁾。醸造方面では焼酎乙類の油臭等と関連する指標として広く使われており⁴⁾, ビールの劣化の程度を計る測定法としても研究が試みられている⁵⁾。

筆者等は清酒を高温で強制的に劣化させることによる、清酒と TBA を反応させた反応液の吸収スペクトルの変化、530 nm 付近に吸収極大をつくる色素の分離、TBA 反応液の吸光度と生成される色素量との相関、TBA 反応液の吸光度の経時変化、清酒の貯蔵時

間・貯蔵温度の TBA 反応に与える影響について検討した。

実験方法

1. TBA 液の調整

TBA 液は、50%エタノール液に 2-チオバルビツール酸 (和光純薬) を 0.5% 加え 30 分間スターラーで攪拌して調整した。又、TBA 液は実験を行うごとに新しく調整した。

2. TMP 標準液の調整

TEP (テトラエトキシプロパン) はマロンジアルデヒドの前駆体であり、酸性条件においてマロンジアルデヒドとして反応する¹⁾。TMP (テトラメトキシプロパン) も同様に反応するので標準液として使用した³⁾⁶⁾。蒸留水に溶かし、濃度は 33 μ M にした。

3. TBA 反応

清酒 5 ml に TBA 液 1 ml を加え、70°C で反応させ、反応時間の終了後水冷した。

4. 酸化防止剤添加試験

水酢酸にジブチルヒドロキシトルエン (BHT) を 0.6% 及び 1.2% 溶かし、その溶液 0.1 ml を清酒 4.9 ml に添加し、TBA 液 1 ml を加えて 70°C で反応させ、反応時間の終了後水冷した。その後クロロホルムを 3 ml 加えて振とうし、3000 rpm で 10 分間遠心分離し、水層の吸光度 (530 nm) を測定した。

5. 吸光度及び吸収スペクトルの測定

UV-2550 (島津製作所) を用い、10 mm 石英セルで、冷却した反応液の 530 nm の吸光度、または 380 nm から 600 nm の吸収スペクトルを蒸留水を対照に測定した。

6. 励起、蛍光スペクトルの測定

分光蛍光光度計には RF-1500 (島津製作所) を用いた。

7. 色素の分離

色素は HPLC を用いて分離した。

装置にはポンプは LC-10 AD, カラムオープン は CTO-10 A, 検出器 (UV 計) は SPD-10 A (全て島津製作所) を用いた。

カラムは YMC A-303 ODS, カラム温度は 30°C, 移動相は 0.04 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) - メタノール (6:4 v/v) で、流速 0.8 ml/min, UV 計の検出波長は 532 nm, 試料 10 μ l である (小杉らの分析条件によ

る⁷⁾)。

結果

1. 高温貯蔵と TBA 反応

同一ロットの清酒をインキュベーターで 60°C で 6 日間の高温貯蔵したものと、2°C で冷蔵貯蔵したものを用意した。それぞれに TBA 液を加えて 60 分間 TBA 反応させたもの、TBA 液を加えずに 50% エタノール液のみ加えて同様に処理したものについて、スペクトルを測定した (Fig. 1)。

TBA 液を加えた反応液は、50% エタノール液のみを加えた反応液に比べ、高温貯蔵した清酒と冷蔵貯蔵した清酒ともに測定領域全体に着色の増加が見られた。このことより清酒中に、TBA と反応して着色物質 (色素) を生成する成分が含まれていることがわかった。また、高温貯蔵した清酒と TBA 液の反応液 (Fig. 1 中の A) は、冷蔵貯蔵清酒と TBA 液の反応液 (Fig. 1 中の C) に比べ測定領域全体でかなりの着

Fig. 1. Typical visible spectra of TBA sake reaction products by heating at 70°C for 60 min. A=sake stored at 60°C for 6 days+TBA reagent, B=sake stored at 60°C for 6 days+reagent solvent (50% ethanol soln.), C=fresh sake (stored at 2°C)+TBA reagent, D=fresh sake (stored at 2°C)+reagent solvent (50% ethanol soln.).

色の増加がみられた。このことは、清酒を高温で貯蔵することにより、TBA と反応して着色物質を生成する成分が増加することを示す。特に、高温貯蔵した清酒と TBA 液との反応液については 530 nm 付近に顕著なピークが見られた。

以上の事実は、TBA 反応が過酸化脂質に由来する成分以外の物質にも感応していることを示している。これらの物質の吸光により、530 nm 付近のバックグラウンドが高くなるため、過酸化脂質に由来する吸光度を押し上げて高くしている可能性がある。

2. HPLC による色素の分離

HPLC を用いて 530 nm 付近の顕著なピークを形成する色素の分離を試みた。試料は 60°C で 6 日間貯蔵した清酒を 40 分間 TBA 反応させた反応液で、HPLC の UV 計の出力 (検出波長 532 nm) は Fig. 2 のとおりである。保持時間 9.3 分付近に大きな単一のピークが現れた。TMP 標準液についても同様に TBA 反応をさせ HPLC で分離したところ、清酒を TBA 反応させたものと同じ保持時間に大きな単一のピークが確認できた (データは省略)。

清酒及び TMP 標準液由来の大きな単一のピークを、フラクションコレクターで分取して、可視領域の吸収スペクトルを測定した (Fig. 3)。清酒の反応液から分離したピークと TMP 標準液の反応液から分離したピークのスペクトルの形は同一であった。

また、分取した色素について八木らの条件⁷⁾で蛍光光度計で励起スペクトル及び蛍光スペクトルを測定した。励起スペクトルの測定については、蛍光波長 565 nm を用いたところ、清酒由来の色素は最大励起波長は 535 nm、TMP 標準液由来の赤色色素は 533 nm で

Fig. 2. HPLC chromatogram of reaction mixture of sake stored at 60°C for 6 days with 0.5% TBA in 50% ethanol. The reaction mixture was heated at 70°C for 40 min.

あった。蛍光スペクトルの測定については、励起波長 515 nm を用いたところ、清酒由来の色素の最大蛍光波長は 549 nm、TMP 標準液由来の赤色色素は 547 nm であり、ほぼ一致した。

3. 吸光度と赤色色素量との関係

異なる 4 点の清酒について、40 分間 TBA 反応をさせた。その反応液の 530 nm の吸光度を測定するとともに、反応液を HPLC で分離して赤色色素のピークの面積を測定した (Fig. 4)。相関係数は $r=0.9900$ とほぼ直線関係で相関していた。このことは、反応液の 530 nm の吸光度を測定することにより、反応液の赤色色素量が推定できることを意味している。

4. TBA 反応時間と吸光度の関係

60°C での高温貯蔵日数を 0 日、2 日、4 日、6 日とした清酒について、80 分間 TBA 反応させ、530 nm の吸光度の変化を Fig. 5 に示す。反応時間が 80 分間では TBA 反応は終結せずに、530 nm の吸光度は直線的に増加した。また、その吸光度は貯蔵日数に比例して増加した。

一方、6 日間 60°C 貯蔵清酒、冷蔵貯蔵清酒および実験に使用した清酒と同じグルコース濃度 (0.76%) で同じアルコール分 (16.7%) のグルコース溶液について、14 時間まで TBA 反応させた結果を Fig. 6 に示す。高温貯蔵清酒は 14 時間まで直線的に吸光度が増加し、TBA 反応は終結しなかった。冷蔵貯蔵清酒は最初の 5 時間程度の誘導期間を経過後、徐々に吸光度が増加し、最終的には高温貯蔵清酒ほどではないが、かなりの大きな値になった。グルコース溶液について

Fig. 3. Typical visible spectra of red pigment isolated by HPLC from TBA reaction products with (A) sake, (B) TMP (precursor of malonaldehyde).

Fig. 4. Relationship between absorbance at 530nm of the reaction mixtures and area of red pigment of the reaction mixtures detected at 532nm by uv-detector of HPLC. The reaction mixtures were composed of sake and 0.5% TBA in 50% ethanol, and heated at 70°C for 40 min.

Fig. 5. Time courses of absorbance at 530nm of reaction mixtures of sake stored for 6 days at 60°C (●), sake stored for 4 days at 60°C (■), sake stored for 2 days at 60°C (▲), sake stored at 2°C (◆), with 0.5% TBA in 50% ethanol. The reaction mixtures were instantly heated at 70°C for the indicated time.

は、10 時間を超してからわずかに発色する程度であり、グルコースの影響はほとんど無視できる程度であることがわかった。

5. TBA 反応に対する酸化防止剤の効果

前記 5 項の実験で TBA 反応が終結しないのは、反応中に脂質の過酸化が進むためではないかと思われた

ので、反応中に脂質の過酸化が進まないようにするために BHT（ブチルヒドロキシルエー）の添加実験を行った。60°C で 6 日間貯蔵した清酒について、反応系全体で 0%、0.01%、0.02% になるように BHT 液を添加し、80 分間 TBA 反応させた (Fig. 7)。その結果、BHT を添加した試料と無添加試料との間に差

Fig. 6. Time courses of absorbance at 530 nm of reaction mixture of sake stored for 6 days at 60°C(●), sake stored at 2°C(▲), 0.76% glucose in 16.7% ethanol(■), with 0.5% TBA in 50% ethanol. The reaction mixtures were instantly heated at 70°C for the indicated time.

Fig. 7. Effect of BHT concentration of reaction mixtures of sake stored for 6 days at 60°C with 0.5% TBA in 50% ethanol, on absorbance at 530 nm of the reaction mixture heated at 70°C for the indicated time. ●=absent, ■=0.01%, ▲=0.02%.

が見られなかったので、BHT の効果がないことが確認された。

6. 長期貯蔵実験

今回の実験は 60°C という高温で貯蔵した清酒を用いてきたが、実際の清酒の貯蔵条件に近い 20°C, 30°C, 40°C, 50°C の各温度で長時間の貯蔵実験を行っ

た (Fig. 8)。分析は 0 日, 10 日, 20 日, 30 日, 40 日目に行い, TBA 反応時間は 40 分とした。各温度とも 40 日までばらつきはあるものの、直線的に吸光度は増加し、貯蔵温度が高いほど吸光度の増加速度が増大する傾向を示した。また、その増加は緩やかなカーブであるが、直線に近似してアレニウス・プロット

Fig. 8. Time courses of absorbance at 530 nm of TBA reaction mixtures for sake subjected to varying lengths of storage at 50°C (●), at 40°C (■), at 30°C (▲), at 20°C (◆), with 0.5% TBA in 50% ethanol. The reaction mixtures were instantly heated at 70°C for 40 min.

Fig. 9. Arrhenius plot of the increase in absorbance at 530 nm of TBA reaction mixtures of sake with 0.5% TBA in 50% ethanol. The reaction mixtures were instantly heated at 70°C for 40 min. The absolute value of the rate constant of the increase in TBA reactivity of sake was plotted against reciprocals of the absolute temperature of storage.

を作成した (Fig. 9)。3 点で直線関係となった。20°C の貯蔵実験では、吸光度の増加が分光光度計の最小目盛り内に収まったため、アレニウス・プロットには記載できなかった。Fig. 9 より得られた活性化エネルギーは 47.7 Kcal/mol であった。このことより、TBA

と反応する物質は貯蔵中に 1 個の律速段階で生成するものと考えられる。

考 察

1. TBA 反応の生成色素

清酒と TMP 標準液の反応液を比較すると、① HPLC で分離して得られた単一の大きなピークの保持時間が一致していること、② HPLC で分取した色素の可視領域のスペクトルがほぼ一致していること、③ HPLC で分取した色素は、八木らの条件⁶⁾で蛍光光度計で調べた結果、最大励起波長及び最大蛍光波長が一致していること、これら3つの根拠から、得られた色素は同一のものと推定された。また、清酒中には多価不飽和脂肪酸が微量ではあるが含まれているという報告もあり⁸⁾、従って清酒の TBA 反応は過酸化脂質の反応によることが考えられる。しかし、デオキシリボースなど過酸化脂質・TMP 以外にも TBA と反応し赤色色素を生成する物質もあると報告されており⁹⁾、BHT を添加しても反応が終結しないことを考えると、過酸化脂質以外の物質が反応している可能性も否定できないが、このことについては、今後さらに検討したい。

2. 清酒の劣化指標値

TBA 反応は清酒を対象とした場合、油脂等とは異なり反応は終結しなかった。しかし、Fig. 6 に示したとおり、赤色色素量は 80 分まで直線的に増加すること及び、赤色色素の増加速度が高温貯蔵時間にほぼ比例していることにより、同一の反応時間（反応時間は 80 分以内に必要がある。）での比較を行えば劣化の指標とすることができる。

また、反応時間を短縮するために沸騰湯煎中での反応も試みたが、冷蔵貯蔵清酒でも、反応中に劣化が進むため、吸光度が高温貯蔵酒とほとんど変わらなくなることから、沸騰湯煎中での反応は不適切であることがわかった。反応を 60°C でも行ってみたが、スペクトルを測定したところ、Fig. 1 の A と同様に 530 nm のピークの短波長側に吸光度の大きなだらかなピークが見られた（データは省略）。高温貯蔵酒と冷蔵貯

蔵酒の 530 nm の吸光度の差は 70°C の反応温度の方が大きいので、反応温度は 70°C で行うのが適当である。

いずれにせよ、高温での貯蔵時間が増加するほど、又貯蔵温度が高いほど赤色色素量は増加することは事実で、TBA 反応を吟醸酒・生系清酒などの”フレッシュ”を商品コンセプトにする清酒の劣化指標値として使用可能であることが判明した。

要 約

1. 清酒は高温で貯蔵することにより、TBA 反応による可視領域の着色が増加した。
2. 清酒と TBA との反応の結果、生成された色素は、過酸化脂質と TBA が反応することで生成されると報告されている赤色色素であると推定された。
3. 反応液の 530 nm の吸光度を測定することより、赤色色素量が推定できることがわかった。
4. 赤色色素量は、貯蔵温度が高く、貯蔵時間が長いほど増加した。

文 献

- 1) Russell O. Sinnhuber, T. C. Yu, & Te Chang Yu : Food Res., 23, 626-634 (1958)
- 2) 五十嵐脩, 島崎弘幸: 過酸化脂質・フリーラジカル実験法, 学会出版センター
- 3) K. Kikugawa, T. Kojima, & H. Kosugi. Free Rad. Res. Commun. : 8, 107-113 (1990)
- 4) 西谷尚道, 大内弘造, 佐藤 信: 醸造試験所報告, 155, 17 (1983)
- 5) J. H. Grigsby, & S. R. Palamand : J. ASBC, 34, 49-54 (1976)
- 6) 八木国夫: ビタミン, 49, 403-405 (1975)
- 7) H. Kosugi, & K. Kikugawa : J. Jpn. Oil Chem. Soc., 38, 224-230 (1989)
- 8) 吉沢淑, 石川雄章: 醸協, 71, 221 (1976)
- 9) B. Halliwell, Jhon M. & C. Guttridge : FEBS Letters, 128, 347-352 (1981)