[農化 第 37 卷, 第 10 号, p.563~568, 1963]

醤油香味成分に関する研究 (第 23 報)*

 α -ジケトン化合物 (その 3)

浅尾 保夫, 横 塚 保 (野田醤油株式会社中央研究所)

昭和 38 年 3 月 15 日 受 理

緒 論

著者らは前報⁽¹⁾において, 新しい系統的検索法を用い, 醤油製品中の揮発性 α -ジケトン系列化合物 (以下 V. D. と略す) として, ジアセチルの外に, 同系列のアセチルプロピオニール, アセチルブチリールの存在を証明し, 酸分解アミノ酸液の如き醤油類似品にはジアセチルが存在するのみで, 後の 2 種の成分を欠くことも併せ証明して, 醸造醤油の香気的複雑性の一端を示した。

本報においては醸造醤油中のこれら V. D. の生成機構につきその先駆物質的成分を中心として検討した結果を報告する。

実 験 並 び に 結 果

I. 醤油醸造過程における V. D. の生成

1. 醤油醸造過程における T. V. D. の変化 仕込月数 1 より 12 までの純醗酵性諸味液汁 (丸大豆, 丸小麦仕込) 及び仕込月数 12 の熟成諸味液汁を 80° にて 5 時間加熱せる火入醤油を試料とし, その 400 ml を 48 時間エーテル抽出し, 抽出部のエーテルを精溜塔を付して注意して溜去し, 1 N-NaOH にて中和後, 水蒸気蒸溜して溜液 100 ml をとり, その 5 ml につき前報⁽¹⁾の Prill-Hammer 法の変法, 福光, 山田らの方法により総揮発性 α -ジケトン量 (T. V. D.) を定量した。

第 1 図に結果の 1 例を示したが, 本実験は同一仕込のものを経過を追って定量したものでなく, その上諸味の醗酵状態は, 仕込時期, その他に影響されるので, T. V. D. の量的変化が必ずしもこれと一致するとは限らないが, この結果だけでも定性的に醤油中の T. V. D. がまず諸味の醗酵により約 0.05~0.1 mg % に達し, 火入により約 0.2~0.3 mg % に増加することが明らかとなった。

2. 熟成諸味液汁及び火入醤油の T. V. D. の内容 仕込月数 12 の熟成諸味液汁及び火入醤油のおのおの 2 l ずつを前項と同様に処理して T. V. D. 区分を得, 前報⁽¹⁾の Dowex-1, 塩酸塩型のイオン交換樹脂クロマトグ

ラフィーにより V. D. 組成を定量した。

第 2 図にその結果を示したが, 熟成諸味液汁 (生醤油) 中の V. D. はジアセチル, アセチルプロピオニール及び少量の不明物質より成り, これらは火入製成過程において著しく増加し, さらに火入醤油ではアセチルブチリールの生成が認められる。

なおジアセチルの前に流出するピークは本反応において, やや紫色がかった色を示し, メチルグリオキサール及びグリオキサールらしい。

3. 醤油微生物群と V. D. の生成並びに

* Studies on the Flavorous Substances in Soy Sauce. Part XXIII. α -Diketone Compounds in Soy Sauce. (3)

By Yasuo ASAO and Tamotsu YOKOTSUKA (Research Institute of Noda Soy Sauce Co., Ltd.)

第 2 図 総揮発性 α -ジケトン量 (T.V.D.) 変化の内容
Dowex-1, X-8, Cl 型, 10×120 mm

含む食塩水 70 ml 中に投入し、良く混合しつつ 1 週間 30° に保ち、その後無菌テスト（液汁一定量を無菌的に麹汁培地に接種し、培養 48 時間後混濁しないものを合格とする）を行ない、無菌諸味を調製した。

(ii) 醤油乳酸菌及び醤油酵母の接種：醤油乳酸菌は 0.5% polypeptone, 0.3% beef エキス, 0.3% yeast エキス, 1.0% glucose, 0.5% K_2HPO_4 , 7.0% NaCl, pH 7.0 の培地に前培養し、また醤油酵母は 15% NaCl 含有麹汁培地, pH 5.0 の培地に前培養し、前記無菌

その内容 諸味醸酵時の V.D. の生成に関与せる微生物群を検索する目的で、坂口⁽²⁾の方法に準じて無菌諸味を造り、これに醤油乳酸菌 (*Pediococcus sojae*) 及び醤油酵母 (*Saccharomyces rouxii*) を無菌的に接種して培養し、それぞれの諸味中に生成せる V.D. の内容につき検討した。

(i) 無菌諸味の調製：脱脂大豆にその重量の 130% の水を加え、1 時間放置後無圧で 20 分、ついで 15 lbs で 30 分蒸煮し、冷却後その 50 g に対して 30 g の割砕小麦を加え、あらかじめ綿殺殺菌せる容量 500 ml の広口コルベン中に収容する。再び 15 lbs にて 30 分殺菌し、放冷後、これに麹培地に純粋培養せる醤油麹菌 (*Aspergillus sojae*) 一定量を接種し、3 日間培養して無菌麹を作り、これを無菌的に容量 300 ml の広口壺中の純食塩量 20 g を

含有麹汁培地, pH 5.0 の培地に前培養し、前記無菌諸味に無菌的に接種した。

(iii) 生成 V.D. の検索：前記の方法にて同量の原料を用い、添加食塩量によりほぼ同濃度に規正せる次の 4 種の試料（すなわち原料を蒸煮処理し、これを一定量の食塩水にて抽出せる試料、麹菌を蒸煮原料に接種し無菌麹を造り、無菌諸味として仕込み、 30° , 2 か月経過後搾汁せる試料、無菌諸味に乳酸菌のみを接種し、 30° , 2 か月経過後搾汁せる試料、及び無菌諸味に酵母のみを接種し、 30° , 2 か月経過後搾汁せる試料）をそれぞれ調製し、各試料につき食塩濃度 10% になるように水分補正をした液、それぞれ 2 l ずつを得て、これをそのまま水蒸気蒸溜し、溜液 1 l をとり、以下既報⁽¹⁾記載の方法に従い V.D. をジオキシム誘導体として Dowex-1, X-8, 塩酸塩型イオン交換樹脂により分離定量した。

(iv) 結果：第 3 図は前述の 4 種の試料につき、同一条件で検索した V.D. の内容である。

蒸煮処理原料では、メチルグリオキザール及びジアセチルが少量生成するにとどまり、麹菌関与の状態ではさらにジアセチルが増加し、アセチルプロピオニールが痕跡程度に検出される。

さらに乳酸菌接種後は余り影響を受けないが、酵母添加後醸酵によりジアセチルが約 2 倍に増加し、アセチルプロピオニールの生成も顕著になっている。この結果は醤油醸造過程において、諸味の醸酵時に生成す

第 3 図 醤油主要微生物群と α -ジケトンの生成
Dowex-1, X-8, Cl 型, 10×120 mm
0.005 M H_3BO_3

第 1 表 揮発性 α -ジケトン(V.D.)生成に及ぼす還元糖含有量の影響

試料 生醤油	還元糖(%)		T. V. D. (mg%)*	
	火入前	火入後	火入前	火入後
A	3.24	2.97	0.107	0.428
B	2.50	2.34	0.121	0.386
C	2.08	1.96	0.167	0.335

* ジアセチル換算

る V. D. が醤油酵母の作用で最も大きく影響を受けることを示す。

II. 醤油中の V. D. 生成先駆物質

1. V. D. 生成に及ぼす単糖類の影響

(i) 火入醤油の V. D. 値に及ぼす生醤油還元糖含有量の影響 : 還元糖含有量の異った天然醸造の生醤油を試料とし, その 400 ml を 80° にて 5 時間加熱火入し, それぞれの還元糖含有量は Bertrand 法により, また T. V. D. は I と同じ方法で定量した。

第 1 表はその 1 例を示したものであるが, 一般に還元糖含有量の大きい生醤油ほど, その火入加熱後の T. V. D. 値が高く出る傾向が認められた。

(ii) 火入醤油 V. D. 値に及ぼす生醤油含有還元糖の種類の影響 : 吉野⁽³⁾らにより醤油中の単糖類として知られているグルコース, ガラクトース, キシロース, アラビノースの 4 つの単糖類を, 経過月数 12 の天然醸造生醤油 400 ml に 2% ずつ別々に溶解し, 80° にて 5 時間加熱火入し, 前と同様に還元糖及び T. V. D. を定量して第 4 図の結果を得た。すなわち醤油火入時の減少率の大小に依り六炭糖添加時よりも五

第 4 図 揮発性 α -ジケトン (V.D.) 生成に及ぼす単糖類の影響

△ アラビノース ● キシロース × ガラクトース
□ グルコース ○ 対照

炭糖を添加したときの V. D. の生成がより大きい。

(iii) 還元糖の変化に伴い生成する V. D. の内容 : 経過月数 12 の天然醸造生醤油 2 l をエーテル抽出し, そのエーテル不溶部にキシロースを 2% になるように加え, 80° , 5 時間火入加熱し, I. 2. の方法により V. D. 生成の内容につき検討を加え第 5 図の結果を得た。

エーテル不溶部を用いた目的は, 逆にそのエーテル可溶部の及ぼす影響を確かめることができ, また一般にエーテル可溶部を除去すると還元糖の変化率が大きくなる現象を利用せんとしたものである。

第 5 図 還元糖類の減少に伴い生成する V. D. の内容

(A) 無添加 (生醤油エーテル不溶部)
 80° , 5 hrs 火入後
(B) キシロース 2% 添加
 80° , 5 hrs 火入後

この結果よりキシロース添加の場合に増加する V. D. はグリオキザールであり, その他著量のメチルグリオキザールあるいはジアセチルが生成することが認められた。

2. V. D. 生成先駆物質としてのアセトイン系化合物

(i) 醤油中のアセトイン系化合物 : 経過月数 12 の天然醸造生醤油 10 l を 48 時間エーテル抽出し, 抽出部の低沸点部を減圧下 ($70^{\circ}/20$ mmHg) に溜去し, 残部を水蒸気蒸溜して溜液 200 ml をとり, これに重曹を飽和した後再び 48 時間エーテルにて抽出し, 抽出部のエーテルを溜去してから, 残部をシリカゲルに吸着させた。カラムはあらかじめ 100 mesh の珪酸 (Mallinckrodt 製) 100 g に蒸溜水 60 ml を加え乳鉢で良く混和してから, 四塩化炭素による湿式法にて径 30 mm のクレマト管に約 400 mm の高さに充填した。この頂点に試料を置き, 四塩化炭素にて展開, 溶離を開始し, ついで四塩化炭素, クロロホルムの等量混合液にて溶離を続け溶離液はフラクションコレクターにて 10 ml ずつ分取した。分取した試料溶液には蒸溜水 10 ml を加え, 沸騰浴上で溶剤を駆逐して転溶し, M. Hooreman⁽⁴⁾ の方法に従いアセトイ

第6図 醤油中のアセトイン系化合物
D: 稀釈倍数

P2 区分よりはアセチルプロピオニールができ、先駆物質としてはアセトイン系化合物のアセチルエチルカルビノールとプロピオニールメチルカルビノールが考えられる。

また P3 及び P4 区分より生成した V.D. はジアセチルであったが、量的な点から考えて P4 区分の先駆物質はすでに山田⁽⁶⁾によって報告されているアセトインと考えられる。

(ii) 醤油中におけるアセチルエチルカルビノールの同定

(イ) P2 区分の過ヨウ素酸酸化生成物; P2 区分にはアセチルエチルカルビノール (AEC) またはプロピオニールメチルカルビノール (PMC) の存在が推定されたが、次式に示す如くこの2種の化合物はその過ヨウ素酸酸化によって与えるアルデヒドにより区別することができる。

すなわち P2 区分の蒸留水転溶試料 10 ml に 0.54 M HIO₄ 溶液 4 ml を加え、2時間室温に放置した後、反応液に窒素ガスを通じ、生成アルデヒドを 0.3% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの 2N-塩酸溶液中に導き、生成する沈澱を濾取、蒸留水にて洗滌してから Meigh⁽⁶⁾ の方法によるペーパークロマトグラフィーでプロピオンアルデヒドと同一 R_F 値を示すスポットを得た。

この結果より P2 区分中のアセトイン系化合物として AEC が推定された。

(ロ) アセチルエチルカルビノールの合成; 次式に従って合成した。

合成物は Semicarbazone 誘導体として目的物であることを確認した。

C₆H₁₃N₃O₂ として 分析値: C 45.53, H 7.79, N 26.00%

計算値: C 45.30, H 8.20, N 26.40%

(ハ) ガスクロマトグラフィーによる同定; コタキ GB-11 型装置により P2 区分より得られた試料及び先に合成せる AEC を Silicone DC 550 カラムにかけ、第7図の如きクロマトグラムを得た。矢印のピークが AEC

ン系化合物を定量して第6図の結果を得た。

検出された4つのピークの中、最初に流出せるピーク(P1)はそのまま蒸溜しても V.D. 反応を与えることから、試料調製時に遊離した V.D. であることは明らかで、塩化第二鉄による酸化で生成したものではない。他の3つのピーク, P1, P2, P3 が一応アセトイン系化合物と考えられる。

各区分の塩化第二鉄酸化で得られた V.D. を前報⁽¹⁾の V.D. 確認法により検討したところ、

第 7 図 ガスクロマトグラフィー
による AEC の同定
Silicone DC 550 He, 10 ml/min
temp: 150° ↓ AEC ピーク

のピークで、合成試料には若干の不純物のピークが、また試料には溶剤、四塩化炭素の主ピークの他に若干のピークが見られるが、良く一致したクロマトグラムが得られた。

混合試料における AEC 相当ピークも完全に一つのピークとなり、分離試料は AEC であることが確かめられた。

3. V.D. 生成先駆物質としての弱酸性成分： 既報⁽¹⁰⁾の $C_7H_{12}O_8$ が稀硫酸により、アセチルブチリールを与えることはすでに報告したが、アセトイン系化合物の V.D. 移行反応である酸性下の塩化第二鉄酸化によると、さらに高収量を与えることが明らかとなったので、この反応を利用し、既報⁽¹⁾の方法に従い経過月数 12 の熟成生醤油 10 l を処理して $C_7H_{12}O_8$ 含有弱酸性区分 1a を調製し、これを硫酸酸性下に塩化第二鉄により酸化し、V.D. に変えてから水蒸気蒸溜し、溜液を I. 2 の方法により処理して、生成 V.D. の内容を検討し第 8 図の結果を得た。この区分における先駆物質はメチルグリオキサール、ジアセチル及びアセチルブチリールを生成することを示している。この区分においては、アセチルプロピオニールの先駆物質はほとんど検出することができなかった。

さらにこの V.D. 生成先駆物質含有弱酸性区分を 2 (i) と同様にシリカゲルクロマトグラフィーにより、ベンゼンを溶離液に用いて分離し第 9 図の結果を得たが、P1 区分からは既報⁽¹⁰⁾の $C_7H_{12}O_8$ が結晶として析出し、この成分がアセチルブチリールを与えることより、その先駆物質であることを再確認することができた。なお、P3 区分はジアセチルを与え、P2, P4 区分はメチルグリオキサールを与えたが、前述の $C_7H_{12}O_8$ 成分析出区分以外からはアセチルブチリールを与えるピークは検出されなかった。先の P2, P3, P4 区分中の先駆物質の構造は不明である。

結 果 の 考 察

(1) 醤油醸造過程において、揮発性 α -ジケトン (V.D.) はまず諸味の醗酵により約 0.05~0.1 mg% に達し、火入処理で約 3 倍、すなわち 0.2~0.3 mg% に達する。その組成はジアセチル 10 (0.2 mg%) に対し、ア

第 8 図 弱酸性区分 I より生成する揮発性 α -ジケトン (V.D.)

Mallinckrodt silicic acid (30×400 mm) Benzene

第 9 図 弱酸性区分 I における V.D. 生成先駆物質の分離

セチルプロピオニール 2 (0.04mg%), アセチルブチリール 0.5 (0.01mg%) である。これらの成分は 0.01mg で官能的に知覚できるから、いずれも香氣的に重要と考えられる。

(2) 醤油中に証明せる V.D. のうち、最も含有量の大きいジアセチルは、醤油醸造過程において酵素的に生成するアセチルメチルカルビノール (AMC) を経て酸化的に生成するものと、還元糖の加熱分解によって生成する非酵素的成因が考えられる。醤油火入過程においてジアセチルの生成が著しいのは、AMC の酸化と還元糖の加熱分解 (これは糖単独加熱の場合より醤油中の他の成分、たとえばアミノ酸類との反応等によりその生成率は遙かに大きくなる) が併行するためと考えられる。

(3) アセチルプロピオニール (AP) も、醤油火入中に多くなる。先駆物質 AEC は醤油諸味の醗酵過程において酵素的に生成し、酸化的に AP に移行するものと考えられる。

(4) アセチルブチリール (AB) は生醤油中にはほとんど存在せず、火入の時に生成するが、既報⁽¹⁰⁾の $C_7H_{12}O_5$ 成分が唯一の先駆物質と考えられ、次の (I) 式に示す如く変化する。また反応 (II) に従うアセチルプロピオニールの先駆物質と成り得る成分も一応考えられたが、分離、あるいは検出することができなかった。

この $C_7H_{12}O_5$ 成分を先駆物質としてアセチルブチリールが生成することは、新しい α -ジケトン系列化合物の生成機構を示すものとして意義がある。 $C_7H_{12}O_5$ 成分の生成機構はなお不明である。

要 約

(1) 醸造醤油からジアセチル、アセチルプロピオニール及びアセチルブチリールを確認した。その含有量からこれらの成分がいずれも醤油の香気に重要な影響を及ぼしていることを認めた。

(2) 醤油主要微生物群の中、醤油酵母 (*Saccharomyces rouxii*) が V.D. の生成に最も関与していることを認めた。

(3) 火入時に増加する V.D. の直接的先駆物質として還元糖を示し、変化率の大きい五炭糖からの生成が六炭糖より大であること、及びこの還元糖から生成する V.D. としてはジアセチルのみが生成するが、グリオキザール類の生成も明らかにした。

(4) 醤油中における V.D. 先駆物質としてのアセトイン系化合物を検索し、従来未知のアセチルプロピオニールの先駆物質、アセチルエチルカルビノールの存在を認めた。

(5) 醤油中におけるアセチルブチリールの先駆物質としてすでに $C_7H_{12}O_5$ 成分を証明し、その推定構造を提示したが、アセチルプロピオニールの先駆物質と推定されるこの系列の化合物が存在しないことを明らかにし、前項の結果と考え併せ、アセチルプロピオニールはジアセチルの酵素的生成と同じ機構で生成し、アセチルブチリールはこれと全く異った生成機構で生成することを明らかにした。

終りに臨み、本研究に対し終始励ましの言葉をいただいております野田醤油株式会社中央研究所長茂木正利博士並びに本研究の発表を許可されました野田醤油株式会社首脳部の方々に深く感謝するとともに、実験に協力されました同室の綿田知恵子さん、斉間政子さんに厚く御礼を申上げるしだいである。

(本報の主要部は昭和 37 年 4 月 29 日、日本農芸化学会大会において発表した。)

(1) 浅尾保夫, 横塚 保 : 本誌, 35, 1211(1961).	(6) D. F. Meigh : <i>Nature</i> , 170, 579 (1952).
(2) 坂口謙二 : <i>Report of Noda Institute for Scientific Research</i> , 3, 23 (1959).	(7) 吉川 清, 佐々木則文 : 有機化合物合成法, 第 2 集, p. 71 (1950).
(3) 吉野 宏 : 醸協, 46, 34, 109, 149 (1951).	(8) Dismroth : <i>Ber.</i> , 56, 1375 (1923).
(4) M. Hooreman : <i>Anal. Chem. Acta</i> , 3, 606 (1949).	(9) Weil-Malherbe : <i>Biochem. J.</i> , 32, 1033 (1938).
(5) 山田正一 : 本誌, 4, 1(1928) ; 5, 223(1929).	(10) 浅尾保夫, 横塚 保 : 本誌, 35, 831(1961).