食酢香味成分に関する研究 (第 1 報)

中 性 区 分

有馬 啓, 山口玄示*, 田村学造

(東京大学農学部, *株式会社中基酢店中基生化学研究所)

昭和 42 年 7 月 6 日 受 理

Studies on Flavor Components of Rice Vinegar

Part I. Neutral Fraction

By Kei ARIMA, Genji YAMAGUCHI* and Gakuzo TAMURA

Faculty of Agriculture, University of Tokyo,

*Nakano Biological and Chemical Institute of Nakano Vinegar Co., Ltd.

By extraction of rice vinegar with a mixture of ether and *n*-pentane (2:1), an aroma-concentrate was obtained in which at least fifty-one components could be detected by means of gas chromatography by comparing their retention times with those of known compounds and thin-layer chromatography.

Alcohols positively identified were ethanol, isobutyl alcohol, *n*-butyl alcohol, isoamyl alcohol, active-amyl alcohol, tetrahydrofurfuryl alcohol, 2,3-buteneglycol, phenol, *o*-cresol, β -phenethyl alcohol and *o*-nitrophenol. Carbonyl compounds positively identified were acetaldehyde, acetone, diacetyl, acetoin, furfural, phenylacetaldehyde, *p*-oxybenzaldehyde and vanillin. Esters positively identified were ethyl acetate, isobutyl acetate, isoamyl acetate, ethyl lactate, β -phenethyl acetate, ethyl caprate and *p*-hydroxybenzoic butylester. Other twenty-five components detected were not yet identified.

The rice vinegar has comparatively large number of volatile components comparing with other brewing materials. This can be attributed to the nature of the fermentable carbohydrate materials in rice used for production of the alcohol, subsequently used for vinegar manufacture. It appears that diacetyl and acetoin are the most important odor in rice vinegar.

(Received July 6, 1967)

緒 言

食酢は酒類と同様、非常に古い歴史を有している。西洋では紀元前 15 世紀のころから果実を原料として作られたようである。東洋では紀元前 6 世紀ころから穀類を原料として作られている。わが国では 4 世紀のころ、酒の醸造法と相前後して中国大陆から伝来している。このように食酢の発祥地は各地にあったが、ヨーロッパで独立した工業となったのは 14~15 世紀のころである。わが国では江戸時代に食酢醸造業が確立されたようである。

食酢には穀類を原料とした米酢、粕酢、麦芽酢、果実を原料としたりんご酢、ぶどう酢、だいたい酢、レモン酢があり、その他に酒精酢、蒸留酢、合成酢等がある。

醸造物中の香味成分の検索は相当古くから行なわれている。清酒、醤油、ブランディー、ウイスキー、ビール、ぶどう酒等についてはかなり詳細に行なわれている。一方、食酢については過去 100 年の間において化学的、微生物学的な性質がかなり明らかになってきた。アルコール醸酵に続いて酢酸醸酵が行われるため、醸造酢中には非常に多くの香味成分があるものと推定される。しかし食酢独特の香味はほとんど知られていない。

前川⁽¹⁾らは醸造食酢から酸性物質、中性物質 20 種類を分離同定している。Suomalainen⁽²⁾らは果実酢をエーテル：ノルマルペンタン (2:1) の混合溶媒で抽出を行ない 8 成分を確認している。また、前川⁽³⁾らは米酢からフェノール酸類として、パラ-オキシ安息香酸、パラ-オ

キシフェニルエタノール, パラ-オキシフェニル酢酸, パラ-オキシフェニル乳酸, フェニル乳酸を確認している。Kahn⁽⁴⁾ らはキャピラリーカラムを使用し, 濃縮操作なしに, りんご酢からアルコール類, エステル類, 酸類 16 成分を同定している。Aurand⁽⁵⁾ らはりんご酢, ぶどう酢中の水分を無水硫酸ソーダで完全脱水し, 70° で香氣成分をガス状にし分析し, カルボニル類, エステル類, アルコール類, 25 成分を分離同定している。Cesari⁽⁶⁾ らはアセトイン, ダイアセチルが果実酢中 10 mg/l 含まれていると述べている。

呈味成分に関しては古川⁽⁷⁾ らが不揮発性有機酸について報告している。塩基性物質については斎藤⁽⁸⁾ らがアンモニア, トリプタミン, チラミン, エチルアミン, メチルアミン, ヒスタミン, プトレシン, カダペリン等を報告している。

静置醱酵と通気醱酵では香氣の点で差が生ずるのみならず, 味の面でもかなり大きな差が生ずることが知られている。

実験方法

試料としては, 充分熟性させた酒粕をアルコール抽出し, このものにアルコールを添加し酢酸醱酵させた粕酢(酢酸 5%) を用いた。蒸留法, 抽出法, 吸着法の 3 法を組合せ, 余すところなく系統的に分画, 分析できるよう, 大高⁽⁹⁾ らの方法を用い 6 区分に分けた。食酢をそのまま蒸留すれば揮発性酸性区分が, 炭酸水素ナトリウムで中和後蒸留すれば揮発性中性区分が, 塩基性にし蒸留すれば揮発性塩基性区分が得られる。不揮発性区分は弱酸性樹脂アンバーライト IRC-50, 強酸性樹脂アンバーライト IR-120 に塩基性物質を吸着させ, 続いて濾液を弱塩基性樹脂デュオライト A-6 に通し酸性物質を吸着させ, それぞれ不揮発性塩基性区分, 不揮発性酸性区分を得る。両樹脂を通りぬけた区分が不揮発性中性区分である (Table I)。

本報では熱による変化をできるだけさけるため, 一気にエーテル: ノルマルペンタン (2: 1) で抽出を行ない揮発性, 不揮発性の中性区分について実験を行なった。すなわちまず粕酢 100 l を炭酸水素ナトリウム 10 kg で中和した (pH 7~8)。このものをエーテル: ノルマルペンタン (2: 1) 100 l で抽出した。粕酢 5 l を溶剤 2.5 l で 2 回のおおの 30 分ずつ振盪抽出した。この操作を 20

TABLE I. SCHEMATIC DIAGRAM OF FRACTIONATION OF VINEGAR

回くり返し 100 l の粕酢を処理した。揮発性物質が逃げるのをおさえるため精留塔をつけ溶剤を 38~40° で除去し, 100 ml の黄色液体を得た。溶剤は亜硫酸ソーダ法で精製した。ここに得た黄色液体をさらに減圧蒸留し, 5 区分に分けた。40°, 760 mmHg の区分 (1) を 90.2 ml, 40°, 100 mmHg の区分 (2) を 7.6 ml, 40°, 5 mmHg の区分 (3) を 1.3 ml, 40°, 0.5 mmHg の区分 (4) を 0.3 ml, 高沸点および不揮発性残渣の区分 (5) を 0.6 ml 得た。区分 (1) は溶剤臭が強く, 区分 (2) は無色アルコール臭, 区分 (3) は無色エステル臭, 区分 (4) は無色不快臭を有する。区分 (5) は褐色粘稠で刺激的な香味を有している (Table II)。

ガスクロマトグラフは島津製作所の GC-1 B 型, 水素炎検出器を使用した。充填剤は低沸点区分にはポリエチレングリコール 1000, ジオクチルフタレート, トリエ

TABLE II. SEPARATION OF NEUTRAL FRACTION OF VINEGAR

Vinegar 100 l (acetic acid 5%)		
Neutralization with sodium bicarbonate 10 kg (pH 7~8)		
Extraction with ether: n-pentane (2: 1) 100 l		
Dehydration with sodium sulfate 3 kg		
Removal of solvent (38~40°C)		
100 ml (yellow liquid)		
Distillation		
Fraction	(1)	(40°C, 760 mmHg) 90.2 ml
	(2)	(40°C, 100 mmHg) 7.6 ml
	(3)	(40°C, 5 mmHg) 1.3 ml
	(4)	(40°C, 0.5 mmHg) 0.3 ml
	(5)	(high boiling and non-volatile components) 0.6 ml

TABLE III. RETENTION TIMES (MIN.) OF NEUTRAL COMPONENTS OF VINEGAR

Peak No.	P. E. G. 1000 225 cm	D. O. P. 150 cm	T. E. A. 150 cm
	C. T. 60°C, N ₂ 10 ml (3) fraction	C. T. 60°C, N ₂ 10 ml (3) fraction	C. T. 60°C, N ₂ 10 ml (3) fraction
1. Acetaldehyde	4.4	2.2	5.2
2.	5.6		
3.	5.8		
4. Acetone	8.0	5.4	5.4
5.	9.2		
6. Ethyl acetate	12.1	10.8	5.3
7.	17.1		
8. Ethanol	19.8	5.2	28.8
	C. T. 75°C, N ₂ 10 ml (3) fraction	C. T. 75°C, N ₂ 10 ml (3) fraction	
9. Diacetyl	13.7	6.9	
10. Isobutyl acetate	16.4	23.6	
11.	18.8		
12.	21.0		
13. Isobutyl alcohol	29.2	13.2	
	C. T. 95°C, N ₂ 30 ml (4) fraction	C. T. 90°C, N ₂ 30 ml (4) fraction	C. T. 90°C, N ₂ 30 ml (4) fraction
14. Isoamyl acetate	6.1	11.8	2.3
15. <i>n</i> -Butyl alcohol	7.2	4.0	8.1
16. Isoamyl alcohol	10.3	7.2	10.6
17. Active-amyl alcohol	10.3	7.2	10.0
18.	11.9		
19.	13.3		
20. Acetoin	17.6		19.0
	C. T. 120°C, N ₂ 30 ml (4) fraction	C. T. 120°C, N ₂ 30 ml (4) fraction	
21. Ethyllactate	9.9	5.2	
22.	11.6		
23.	13.3		
24. Furfural	16.8	7.2	
25. Tetrahydrofurfuryl alcohol	23.0		
	(5) fraction	(5) fraction	
26.	14.8		
27.	29.0		
28. 2,3-Butyleneglycol	34.6		
29. Phenylacetaldehyde	41.3	26.7	
30.	48.0		
31.	71.8		
32.	87.8		
	P. E. G. 6000 150 cm	S. D. C.-550 150 cm	S. E.-30 150 cm
	C. T. 140°C, N ₂ 10 ml (5) fraction	C. T. 185°C, N ₂ 30 ml (5) fraction	C. T. 160°C, N ₂ 10 ml (5) fraction
33. Phenol	11.3	12.6	
34. <i>o</i> -Cresol	17.0	12.4	
	C. T. 200°C, N ₂ 30 ml (5) fraction		
35. β -Phenethyl alcohol	2.8	9.5	
36. <i>o</i> -Nitrophenol	3.4	7.8	
37.	4.4		
38. β -Phenethyl acetate	4.5	7.0	
39. Ethylcaprate	5.8	3.6	
40. <i>p</i> -Oxybenzaldehyde	7.7		4.1
41. Vanilin	9.9		3.2
42.	12.7		
43.	15.7		
44.	17.4		
45.	19.3		
46.	24.8		
47. <i>p</i> -Hydroxybenzoic butylester	32.0	30.6	
48.	42.1		
49.	53.4		
50.	79.0		
51.	103.2		

タノールアミンを、高沸点区分はポリエチレングライコール 6000, シリコン DC-550, メチルシリコン 30 を使用した。

結果および考察

区分 (1)~(5) の保持時間, およびガスクロマトグラムは, Table III, Fig. 1~6 のとおりである。イソアミルアルコール, 活性アミルアルコールは充填剤ポリエチレングライコール 1000 では分離同定できないが, トリエタノールアミンでは分離可能である。

アルコール類として 11 種類, エステル類として 7 種類, カルボニル化合物類として 8 種類の化合物をそれぞれ分離確認した。残り 25 種類の化合物は未同定である。少なくとも 51 種類の化合物が含まれていることを確認した。これらのうち, 強い芳香を有するものはダイアセチル, 酢酸イソブチル, 酢酸イソアミル, アセトイン, 酢酸エチル, フルフラール, フェニルアセトアルデヒド, β -フェネチルアセテイト, パニリンの 9 種類の化合物である。

アルコール類としてエタノール, イソブチルアルコール, ノルマルブチルアルコール, イソアミルアルコール, 活性アミルアルコール, テトラヒドロフルフリルアルコール, 2,3-ブチレングライコール, フェノール, オルトクレゾール, β -フェネチルアルコール, オルト-ニトロフェノールの 11 種類の化合物を確認した。高級アルコール類はビールの香气成分中, 最も重要な区分と考えられており, フーゼル油の主成分である。フーゼル油はビール中 39~323 p. p. m., りんご酒中に 98 p. p. m. 程度含まれている。イソアミルアルコールは醸造酢中には確認されるが, 蒸留酢中では確認されていない^(10~12)。

カルボニル化合物類としてアセトアルデヒド, アセトン, ダイアセチル, アセトイン, フルフラール, フェニルアセトアルデヒド, パラ-オキシベンツアルデヒド, パニリンの 8 種類の化合物を確認した。ダイアセチルはりんご酢, ぶどう酢では 10 p. p. m. 程度含まれるが, 蒸留酢では非常に少量である。ダイアセチルは食酢の香气成分に重要な役割をはたしている。ビール中では, ダイアセチルは 0.5 p. p. m. 以上で好ましくなく, オフフレーバーであると報告されている。しかし, 日常の食品中ダイアセチルは 0.01~0.20 p. p. m. では好ましい香りであるといわれ

Fig. 1. Chromatogram of Fraction 3 on P.E.G. 1000 at 60°C, N₂ 10 ml.

Fig. 2. Chromatogram of Fraction 3 on P.E.G. 1000 at 75°C, N₂ 10 ml.

Fig. 3. Chromatogram of Fraction 4 on P.E.G. 1000 at 95°C, N₂ 30 ml.

Fig. 4. Chromatogram of Fraction 4 (---) and Fraction 5 (—) on P.E.G. 1000 at 120°C, N₂ 30 ml.

Fig. 5. Chromatogram of Fraction 5 on P.E.G. 6000 at 140°C, N₂ 10 ml.

Fig. 6. Chromatogram of Fraction 5 on P.E.G. 6000 at 200°C, N₂ 30 ml.

ている^(10,11)。食酢芳香成分を酸性区分、塩基性区分を除いて中性区分からのみ論ずることはできないが、ダイアセチル、アセトイン、2,3-ブチレンジライコール、ジアセチルメチルカルビノール、アセチルブタンジオール系統の香りが中心であると思われる。他の醸造物にくらべ粕酢ではダイアセチルが 4 p.p.m., アセトインが 100 p.p.m. で両者の割合が 20 数倍アセトインに傾いているのは強いダイアセチルレダクターゼがあるものと思われる。

エステル類として酢酸エチル、酢酸イソブチル、酢酸イソアミル、乳酸エチル、β-フェネチルアセテイト、カプリン酸エチル、パラ-オキシ安息香酸ブチルの 7 種類の化合物を確認した。エステルは香气成分としてよく知られている。食酢は 2 段階の醱酵（アルコール醱酵、酢酸醱酵）が行なわれるからエステルが香气成分の大きな部分を占めることは驚くこともない。大量のエチルアルコールと酢酸があるため酢酸エチルが大量にあることは当然である。蒸留酢（酢酸 10%）ではエステル含量（酢酸エチルとして）が 60 日間の貯蔵中に 200 mg/l から 1,500 mg/l に増加する。最初の 30 日間でエステル類の多くは形成されるようである。蒸留酢と醸造酢の主な成

がいは、高級アルコール類とエステル類の含量によっているようである⁽¹⁸⁾。

これらアルコール類、カルボニル化合物類、エステル類のうちこれまでに果実酢でも、粕酢でも報告されていなかった化合物はテトラヒドロフルフリルアルコール、2,3-ブチレンジライコール、フェノール、オルト-クレゾール、オルト-ニトロフェノール、フルフラール、フェニルアセトアルデヒド、パラ-オキシベンツアルデヒド、カプリン酸エチル、パラ-オキシ安息香酸ブチルエステルの 10 種類の化合物である。

ガスクロマトグラフィーで確認した化合物を再確認し、さらにガスクロマトグラフィーでは分離同定できなかった化合物を確認するため、(1)～(5)を薄層クロマトグラフィーで分離同定を試みた。

試料をそのまま使用すると、アルコール類、エステル類、カルボニル化合物類が重なり確認できないため、カルボニル化合物類、アルコール類のそれぞれ誘導体として検出した。

カルボニル化合物類はそれぞれ 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの誘導体とし、シリカゲル G で分離同定を試みたが、ガスクロマトグラフィーで確認した以外の化合物を同定することはできなかった (Table IV)。

また、アルコール類はそれぞれ 3,5-ジニトロベンゾエイトの誘導体としシリカゲル G で分離同定をこころみしたが、カルボニル化合物類と同様、ガスクロマトグラフィーで確認した以外の化合物を同定することはできなかった。

TABLE IV. R_F VALUES FOR THE 2,4-DINITRO-PHENYLHYDRAZONES OF CARBONYL COMPOUNDS (SILICA GEL G)

Compound as 2,4-dinitrophenylhydrazone	R_F value in	
	Solvent A	Solvent B
Acetaldehyde (fract. 2)	6.2	2.7
Acetone (fract. 2)	6.3	2.6
Diacetyl (fract. 3)	5.2	1.2
Acetoin (fract. 4)	5.1	1.2
Furfural (fract. 4)	6.6	2.7
Phenylacetaldehyde (fract. 5)	7.4	4.4
p-Oxybenzaldehyde (fract. 5)	2.4	0.2
Vanillin (fract. 5)	2.8	0.4

Developing solvent :

A. Benzene-ethylacetate (20:1)

B. Benzene-petroleum ether (3:1)

TABLE V. R_F VALUES FOR THE 3,5-DINITRO-BENZOATES OF ALCOHOLS (SILICA GEL G)

Compound as 3,5-dinitrobenzoate	R_F value in	
	Solvent A	Solvent B
Ethanol (fract. 3)	4.0	4.2
Isobutyl alcohol (fract. 3)	5.5	4.6
<i>n</i> -Butyl alcohol (fract. 3)	5.5	4.6
Isoamyl alcohol (fract. 3)	6.0	4.8
Active-amyl alcohol (fract. 3)	6.0	4.5
Tetrahydrofurfuryl alcohol (fract. 4)	1.5	1.4
2,3-Butyleneglycol (fract. 5)	0.8	0.5
Phenol (fract. 5)	4.5	4.2
<i>o</i> -Cresol (fract. 5)	5.2	3.3
β -Phenethyl alcohol (fract. 5)	4.4	3.2
<i>o</i> -Nitrophenol (fract. 5)	1.8	1.2

Developing solvent :

A. Toluene-ethyl acetate (9:1)

B. Benzene-petroleum ether (1:1)

った (Table V).

量的関係は、アセトアルデヒド 0.003%, アセトン 0.001%, 酢酸エチル 0.030%, エタノール 0.500%, アセトイン 0.009% である。これらのものは量が多いため、前処理なしに食酢そのものをガスクロマトグラフに注入し分離確認できるから、相対面積比較法より求めた値である。しかし Fig. 7 に示した残りのピークは抽出、濃縮を行なっているから絶対的な量ではないが、ピーク面積より比較的な量を求めたものである。このうち量的に多い β -フェネチルアルコールは、絶対検量線法より

求めると 2 p.p.m. に相当する。これらのうち β -フェネチルアルコール以外ではパラ-オキシ安息香酸ブチルエステル、バニリン、未同定ピーク No. 2, No. 3 が比較的多い。

エステル生成は酵母の増殖と密接に関連している。一般に、酵母の増殖が阻害されるとエステルの生成は減少する。温度や通気もエステル生成に影響する重要な因子である。したがって、攪拌醱酵や連続醱酵などの新しい方法が取り入れられる場合には、エステルの生成を調節する必要があると考えられている⁽¹⁴⁾。

Acetobacter aceti, *Acetobacter acetosum*, *Acetobacter rancens*, *Acetobacter oxydans*, *Acetobacter orleanse*, *Acetobacter vini acetati* 等の菌が酢酸醱酵に関与しているが、工場における生産経験によれば培養条件が同一であれば、粕酢の場合にはりんご酢の場合などと異なり菌自体は香气にはあまり関係ないようである。酢酸醱酵において培地組成、培養方法 (静置醱酵、通気醱酵) が異なると香味ともに大きな差位を生じ、果実臭、肉桂臭等を生ずるものがある。

要 約

粕酢中よりガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーを使用し、少なくとも 51 種類の化合物を分離確認した。アルコール類としてエタノール、イソブチルアルコール、ノルマルブチルアルコール、イソアミルアルコール、活性アミルアルコール、テトラヒドロフルフリルアルコール、2,3-ブチレンジグリコール、フェノ

Fig. 7. Histogram Showing Comparative Concentration Levels of Neutral Components of Vinegar.

1. Acetaldehyde 0.003% 4. Acetone 0.001% 6. Ethyl acetate 0.030%
8. Ethanol 0.500% 20. Acetoin 0.009%

ール, オルト-クレゾール, β -フェネチルアルコール, オルト-ニトロフェノール, カルボニル化合物類としてアセトアルデヒド, アセトン, ダイアセチル, アセトイン, フルフラール, フェニルアセトアルデヒド, パラ-オキシベンツアルデヒド, パニリン, エステル類として酢酸エチル, 酢酸イソブチル, 酢酸イソアミル, 乳酸エチル, β -フェネチルアセテイト, カプリン酸エチル, *p*-オキシ安息香酸ブチルを確認したが, 残り 25 種類の化合物は未同定である。

以上の化合物中, 今までに果実酢でも粕酢でも報告されていない化合物は, テトラヒドロフルフリルアルコール, 2,3-ブチレンジアキコール, フェノール, オルト-クレゾール, オルト-ニトロフェノール, フルフラール, フェニルアセトアルデヒド, パラ-オキシベンツアルデヒド, カプリン酸エチル, パラ-オキシ安息香酸ブチルの 10 種類の化合物である。

食酢芳香成分を酸性区分, 塩基性区分を除いて中性区分のみから論ずることはできないが, ダイアセチル, アセトイン, 2,3-ブチレンジアキコール, ジアセチルメチルカルビノール, アセチルブタンジオール系統の香りが中心であると思われる。

本稿終了に当り御指導を賜った東京大学名誉教授坂

口謹一郎博士, ならびに本報告の発表を許可された株式会社中埜酢店社長中埜又左エ門氏に深甚なる謝意を表します。

本研究の概要は日本農芸化学会昭和 41 年度大会において講演した。

- (1) 前川一之, 児玉雅信: 日本農芸化学会大会発表 (1962).
- (2) H. Suomalainen, J. Kangasperi: *Z. Lebensm.-Forsch.*, **120**, 353 (1963).
- (3) K. Maekawa, M. Kodama: *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 436 (1964).
- (4) J. H. Kahn, G. B. Nickol, H. A. Conner: *J. Agr. Food Chem.*, **14**, 460 (1966).
- (5) L. W. Aurand, J. A. Singleton, T. A. Bell, J. L. Etchells: *J. Food Sci.*, **31**, 2 (1966).
- (6) A. Cesari, A. M. Cusmano, L. Boniforti: *Boll. Lab. Chim. Provinciali.*, **15**, 444 (1964).
- (7) 古川昌二, 竹内敏雄, 上田隆蔵: 醸工, **45**, 204 (1967).
- (8) 斎藤彦次郎: 大阪学芸大学紀要, **6**, 150 (1957).
- (9) Y. Ohtaka: *J. Sci. Res. Inst.*, **52**, 171 (1958).
- (10) R. Stevens: *J. Inst. Brewing*, **66**, 453 (1960).
- (11) J. R. Hudson, J. Stevens: *ibid.*, **66**, 471 (1960).
- (12) W. C. Lawrence: *Wallerstein Labs. Commun.*, **27**, 123 (1964).
- (13) E. Toth: *Z. Lebensm.-Forsch.*, **82**, 439 (1941).
- (14) K. Nordström: *Brewers Dig.*, **40**, 60 (1965).