異なる溶媒を用いた流木木酢液燻臭成分の比較と変異原性

宮川雄太[§], 徳江千代子*, 椎原康史**, 宮川富三雄

株式会社 JP ハイテック 茅ヶ崎研究所

* 東京農業大学応用生物科学部栄養科学科

** 群馬大学医学部保健科学科

Comparison of the Smoke Flavor Extraction
and Mutagenicity Test in Driftwood Vinegar
using Different Extracting Solvents

Yuta Miyakawa[§], Chiyoko Tokue*,
Yasufumi Shihara** and Fumio Miyagawa

JP Hytec Co., Ltd., chigasaki Laboratory,
328-3 Amanuma, Chigasaki-shi,
Kanagawa, 253-0004, Japan

* Tokyo University of Agriculture, Faculty of
Applied Bioscience, department of Nutrition,
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo, 156-8502

** Gunma University, school of Medicine,
school of Health science, 3-39-15, Showa-mach,
Maebashi-shi, Gunma, 371-8514, Japan

Smoke flavor were extracted from wood vinegar prepared from driftwood by using hexane, diethyl ether, and hexane — ether mixture, respectively. In addition, mutagenicity test was conducted against *Escherichia coli* WP2 *uvrA*, *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535, and TA1537. The hexane extract and hexane — ether mixture extract didn't contain organic acids, formaldehyde, methanol, and contained mainly phenols. The diethyl ether extract contained organic acids, furans, ketones, phenols, formaldehyde and methanol. As a result of the mutagenicity test, the hexane — ether mixture extract didn't show an increase in the number of revertant colonies against any of the bacteria.

(Received May 31, 2004 ; Accepted Dec. 13, 2004)

木酢液は木炭を製造する際、発生する煙を冷却した赤褐色の水溶液である。古くから食品の保存性を高めるため燻製食品（ハム、ソーセージ等）の製造に利用されてきた。

今までに樹木種別から製造された木酢液の燻臭成分については多数報告がなされている^{1)~8)}。それらの木酢液は200種類~500種類の成分を含有し^{1)~3)}、特有の燻臭を有している。

現在、木酢液は食品衛生法により製造用剤^{9)~11)}としての

利用が許可されている。

しかし、木酢液は天然物の取扱いを受けているため、使用基準及び成分規格は定められていない¹²⁾。

さらに木酢液にはホルムアルデヒド、メタノールが含有されているため、そのままでは食品に利用することは不適切である。

著者らは前報¹³⁾で廃棄物として処理されてきた流木の有効利用を目的に流木から木酢液を製造し、ベンゼンを用いた溶媒抽出法により、流木木酢液からホルムアルデヒド、メタノール、有機酸類を除去した燻臭成分抽出法を確立し、その燻臭成分と抗酸化性の関係について報告した。

そこで今回は流木木酢液から異なる溶媒を用いて抽出した燻臭成分の違いを比較すると共にホルムアルデヒド、メタノールの有無を確認し、*Escherichia coli* WP2 *uvrA*, *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA1535, TA1537それぞれに対する変異原性試験を実施した。

1. 実験方法

(1) 材料

前報¹³⁾と同様に製造した流木木酢液を用いた。尚、流木木酢液中からは1, 2, 5, 6, -ジベンゾアントラセン, 3, 4-ベンツピレン及びヒ素, 亜鉛は検出されなかった。(財団法人日本食品分析センターに分析依頼; 分析試験報告書 第101072312-001, 002号, 第101010738-001号)

(2) 流木木酢液からの抽出法

流木木酢液からの溶媒抽出法は①n-ヘキサン, ②ヘキサン・エーテル混合液 (1:1), ③ジエチルエーテルそれぞれの溶媒を用いて前報¹³⁾と同様に抽出し、減圧濃縮し、溶媒を完全に除去した抽出物を試料として用いた。尚、試薬のn-ヘキサン, ジエチルエーテルは特級(和光純薬製)である。

(3) 有機酸類の分析

前報¹³⁾と同様に行なった。

(4) ホルムアルデヒド, メタノールの分析

前報¹³⁾と同様に行なった。

(5) 総フェノール量の測定

流木木酢液ヘキサン抽出物, 流木木酢液ヘキサン・エーテル混合抽出物, 流木木酢液ジエチルエーテル抽出物それぞれに50% (v/v) エタノール溶液100 mlを加えて溶解したものをFolin-Denis法¹⁴⁾により総フェノール量を測定した。総フェノール量は標準物質としてフェノール(特級, 和光純薬)を用いて換算した。

(6) 燻臭成分の分析及び同定

前報¹³⁾と同様に行なった。

(7) 変異原性試験

i) 試料の調製

流木木酢液ヘキサン・エーテル混合抽出物(0.27 g)に少量の99.5% エタノールを加えて溶解し、蒸留水で100 mlに調製した。さらに、この試料溶液を採取し、ジメチルス

〒253-0004 神奈川県茅ヶ崎市甘沼328-3

* 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

** 〒371-8514 群馬県前橋市昭和町3-39-15

[§] 連絡先 (Corresponding author), Yuuta_Miyagawa@jphytec.co.jp

ルホキシド (以下 DMSO と略す) を加えて、濃度が 50 mg/ml になるように調整したものの試料とした。試験は 6 段階に希釈した濃度とした。尚、エタノール溶液が試験菌に及ぼす影響を行った結果、生育阻害は認められなかった。

ii) 指示菌と変異原物質

指示菌は *Escherichia coli* WP2 *uvrA* (東京大学医科学研究所) (以下 *E. coli* WP2 *uvrA* と略す), *Salmonella typhimurium* (以下 *S. typhimurium* と略す) TA100, TA98, TA1535, TA1537 (Bruce N. Ames) それぞれを用いた。変異原物質については 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (国立薬品食品衛生研究所), *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ナカラitekス製), 9-Aminoacridine (アルドリッチ製), 2-Aminoanthracene (和光純薬製) をそれぞれ用いた。

iii) 試験方法

試験方法は Ames 法のプレインキュベーション法 (S9 mix 添加及び無添加)¹⁵⁾ により試験を行なった。

S9Mix はコファクターミックス (NADH, NADPH, G-6-P などの混合品) の入ったセット (キッコーマン製) を用いて調製した。

流木木酢液ヘキササン・エーテル混合抽出液 (DMSO 溶解) 0.1 ml を滅菌小試験管に入れ、代謝活性化をする場合には S9Mix を 0.5 ml, 代謝活性化しない場合には Na-リン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.4) 0.5 ml を加え、37°C で 10 時間旋回培養した菌懸濁液を 0.1 ml 加え、37°C の恒温槽中で 20 分間プレインキュベーションした。これにトップアガー (0.6% Bacto agar, 0.5% NaCl) 2 ml を加えて混合し、最小グルコース寒天平板培地 (オリエンタル酵素工業) に一様に広げて固化させ、37°C の恒温器中で 48 時間培養した。溶媒対照はプレート を 3 枚、試料添加はプレート を 2 枚それぞれ用いて、復帰突然変異により出現したコロニーをコロニーカウンター OL-502A (吉川工業製) で計測し、溶媒

対照の自然復帰コロニー数が 1.5 倍～2 倍までを擬陽性とし、2 倍以上を陽性とした。

2. 実験結果及び考察

(1) 化学組成の比較

流木木酢液ヘキササン抽出物、流木木酢液ヘキササン・エーテル混合抽出物、流木木酢液ジエチルエーテル抽出物及び溶媒抽出後の残渣の化学組成を Table 1 に示した。

流木木酢液ヘキササン抽出物中の酪酸、プロピオン酸、酢酸、ギ酸それぞれの含有量は 0.01% 以下であった。総フェノール量は 670 ppm が含有され、3 種類のうち最も低い含有量であった。ホルムアルデヒド及びメタノールの含有量はいずれも 5 ppm 以下であったため検出されなかった。

ヘキササン抽出後の残渣にプロピオン酸が 0.12%, 酢酸が 1.93%, ギ酸が 0.08%, 総フェノール量が 2320 ppm, ホルムアルデヒドが 350 ppm, メタノールが 1400 ppm それぞれ残存していた。

流木木酢液ヘキササン・エーテル混合抽出物中の酪酸、プロピオン酸、酢酸、ギ酸それぞれの含有量は 0.01% 以下であった。総フェノール量は 1890 ppm が含有されていた。ホルムアルデヒド及びメタノールの含有量はいずれも 5 ppm 以下であった。

ヘキササン・エーテル混合液抽出後の残渣にプロピオン酸が 0.05%, 酢酸が 1.45%, ギ酸が 0.07%, 総フェノール量が 1100 ppm, ホルムアルデヒドが 320 ppm, メタノールが 1300 ppm それぞれ残存していた。

流木木酢液ジエチルエーテル抽出物中の有機酸類のうち酪酸が 0.02%, プロピオン酸が 0.08%, 酢酸が 0.79%, ギ酸が 0.02%, 総フェノール量が 2340 ppm それぞれ含有され、流木木酢液から大部分回収することができた。

しかし、流木木酢液ジエチルエーテル抽出物中にホルムアルデヒドが 7 ppm, メタノールが 8 ppm それぞれ含有されており、前報¹³⁾と同様に抽出溶媒を完全に除去してもホルムアルデヒド、メタノールはジエチルエーテル抽出物か

Table 1 Chemical characteristics of smoke flavor extract of driftwood vinegar

Sample	Organic acids (%)				Phenol compound (ppm)	Formaldehyde (ppm)	Methanol (ppm)
	Butyric	Propionic	Acetic	Formic			
Wood vinegar	0.02	0.13	2.17	0.10	3730	510	1900
n-Hexane							
Extraction	— ^{*1}	—	—	—	670	— ^{*2}	— ^{*2}
Residue	—	0.12	1.93	0.08	2320	350	1400
Hexane-ether mixture							
Extraction	—	—	—	—	1890	—	—
Residue	—	0.05	1.45	0.07	1100	320	1300
Diethyl ether							
Extraction	0.02	0.08	0.79	0.02	2340	7	8
Residue	—	0.02	0.65	0.03	650	310	1100

^{*1}, Not detected (<0.01%); ^{*2}, Not detected (<5 ppm)

Fig. 1 Gas Chromatogram of smoke flavor extract of driftwood vinegar

①, n-Hexane extraction ; ②, Hexane-ether mixture extraction ; ③, Diethyl ether extraction.

GC Condition : Shimadzu GC-1700 (FID), Column ; CBP-Hicap (Shimadzu, I.D. 0.22 mm×L 25 m), column temp ; 60℃~200℃ (5℃/min), inject temp ; 230℃, detect temp ; 230℃, carrier gas ; N₂, split ; 1 : 20.

Table 2 Smoke Flavor extract of driftwood vinegar

Peak No	Compound	Peak area % ^{*1}			Identification
		①	②	③	
1	2-Cyclopentene-1-one	—	0.0008	0.0140	MS, <i>t_R</i>
2	2-Furaldehyde	—	0.0007	0.4300	MS, <i>t_R</i>
3	2-Acetylfuran	—	0.0012	0.0072	MS, <i>t_R</i>
4	3-Methyl-2-cyclopenten-1-one	0.0015	0.0101	0.0168	MS, <i>t_R</i>
5	5-Methylfurfural	0.0014	0.0006	0.0102	MS, <i>t_R</i>
6	γ -Butyrolactone	0.0013	0.0049	0.0091	MS, <i>t_R</i>
7	Cyclotene	0.0039	0.0338	0.0536	MS, <i>t_R</i>
8	Guaiaicol	0.0103	0.0138	0.0210	MS, <i>t_R</i>
9	Creosol	0.0093	0.0113	0.0136	MS, <i>t_R</i>
10	Maltol	0.0010	0.0100	0.0189	MS, <i>t_R</i>
11	<i>o</i> -Cresol	0.0024	0.0039	0.0053	MS, <i>t_R</i>
12	Phenol	0.0048	0.0407	0.0584	MS, <i>t_R</i>
13	4-Ethylguaiaicol	0.0018	0.0018	0.0021	MS, <i>t_R</i>
14	2-Formylpyrrol	—	0.0005	0.0008	MS, <i>t_R</i>
15	<i>m</i> -Cresol	0.0031	0.0066	0.0082	MS, <i>t_R</i>
16	<i>p</i> -Cresol	0.0029	0.0061	0.0070	MS, <i>t_R</i>
17	2,6-Dimethoxyphenol	0.0226	0.0354	0.0387	MS, <i>t_R</i>
18	2,6-Dimethoxy-4-methylphenol	0.0025	0.0021	0.0042	MS, <i>t_R</i>
19	4-Allyl-2,6-dimethoxyphenol	— ^{*2}	—	Trace	MS, <i>t_R</i>
20	Vanillin	—	0.0009	0.0052	MS, <i>t_R</i>
21	Acetovanillone	—	0.0019	0.0022	MS, <i>t_R</i>
22	Syringaldehyde	—	0.0014	0.0035	MS
23	Acetosyringone	—	0.0011	0.0027	MS

①, n-Hexane extraction ; ②, Hexane-ether mixture extraction ; ③, Diethyl ether extraction ; ^{*1}, Solvent peak is included ; ^{*2} Not detected (<0.0005%).

ら完全に除去することはできなかった。

(2) 煙臭成分の比較

流木木酢液ヘキサシ抽出物、流木木酢液ヘキサシ・エーテル混合抽出物、流木木酢液ジエチルエーテル抽出物それぞれのガスクロマトグラムを Fig. 1 に、煙臭成分を Table 2 にそれぞれ示した。

流木木酢液ヘキサシ抽出物の主な煙臭成分はフェノール、グアヤコールや 3-メチル-2-シクロペンテン-1-オン、シクロテンや 5-メチルフフルアルが認められ、合計 14 種の成分が確認された。

しかし 3-メチル-2-シクロペンテン-1-オン、シクロテンや 5-メチルフフルアルが僅かに認められたもののその他のケトン類やフラン類は認められず、さらにバニリン、アセトバニロン、シリングアルデヒド、アセトシリンゴンは認められなかった。

流木木酢液ヘキサシ・エーテル混合抽出物の主な煙臭成分は 2-シクロペンテン-1-オン、シクロテンなどのケトン類や 2-フルアルアルデヒド、2-アセチルフランなどのフラン類やフェノール、グアヤコールなどのフェノール類が認められ、計 22 種の成分が確認された。

しかし、4-アリル-2, 6-ジメトキシフェノールは認められなかった。

流木木酢液ジエチルエーテル抽出物の主な煙臭成分は 2-シクロペンテン-1-オン、シクロテンなどのケトン類や 2-フルアルアルデヒド、2-アセチルフランなどのフラン類やフェノール、グアヤコール、4-エチルグアヤコールなどのフェノール類が認められ、合計 23 種の成分が確認され、3 種類の試料のうち最も多くの成分を含有していた。

しかし、流木木酢液から煙臭成分を抽出する際、ジエチルエーテルのみを用いると煙臭成分と一緒にホルムアルデヒド、メタノールも抽出され、溶媒を完全に除去しても抽出物中にホルムアルデヒド、メタノールが残存してしまう。

煙臭成分の含有量の差は抽出溶媒の極性によるもの¹⁶⁾や水相と溶媒相の分配定数¹⁷⁾などによるものと考えられる。

尚、抽出溶剤として用いた n-ヘキサシ、ジエチルエーテルそれぞれは食品衛生法により使用が認められている¹⁸⁾¹⁹⁾。

(3) 流木木酢液抽出物の変異原性

流木木酢液ヘキサシ・エーテル混合抽出液 (DMSO 溶解) を用いて *E. coli* WP2 *uvrA*, *S. typhimurium* TA100, TA98, TA1535, TA1537 それぞれに対する変異原性試験を行った。その結果を Table 3 に示した。

Table 3 Mutagenicity testing of hexane-ether mixture extract of driftwood vinegar

Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of colonies/plate									
	TA100		TA1535		WP2 <i>uvrA</i>		TA98		TA1537	
	-S9Mix	+S9Mix	-S9Mix	+S9Mix	-S9Mix	+S9Mix	-S9Mix	+S9Mix	-S9Mix	+S9Mix
0	103	102	6	12	13	22	17	32	5	12
313	98	111	6	11	20	16	14	25	4	13
625	103	109	6	9	19	25	18	29	4	9
1250	88	113	5	9	15	23	14	38	4	12
2500	99	115	8	11	19	22	15	28	5	10
5000	104	112	5	4	19	21	13	27	4	11
Positive control ($\mu\text{g}/\text{plate}$)										
AF-2	0.01	1145	— ^{*1}	—	159	—	—	—	—	—
	0.1	—	—	—	—	—	312	—	—	—
ENNG	5	—	8894	—	—	—	—	—	—	—
9-AA	0	—	—	—	—	—	—	—	—	1776
2-AA	0.5	—	—	—	—	—	—	225	—	—
	1	—	634	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	120	—	—	—	—	—	120
	10	—	—	—	—	1175	—	—	—	—

AF-2, 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; ENNG, *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine; 9-AA, 9-Aminoacridine; 2-AA, 2-Aminoanthracene.

Values are means of two plates except the control values, which are means of three plates.

^{*1}, Not tested.

塩基置換型の *S. typhimurium* TA100, TA1535, *E. coli* WP2 *uvrA* (S9 添加及び無添加) それぞれに対して, 流木木酢液ヘキサン・エーテル混合抽出物は 313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ~ 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の間で陰性対照に比べて増加しなかった。

フレームシフト型の TA98, TA1537 (S9 添加及び無添加) それぞれに対しても流木木酢液ヘキサン・エーテル混合抽出物は 313 $\mu\text{g}/\text{plate}$ ~ 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の間で陰性対象に比べて増加しなかった。生育阻害も認められなかった。

一方, 陽性対照物質はいずれの菌株において陰性対照の 2 倍以上の復帰突然変異コロニー数を誘発した。

木酢液の変異原性に関する報告を見てみると, 桜由来木酢液は *S. typhimurium* TA98 に対して復帰変異コロニー数は認められなかったが, *S. typhimurium* TA100 (S9 添加及び無添加) に対し, 陰性対照に比べて復帰変異コロニー数が増加した。しかし, 復帰変異コロニー数から考えて木酢液の変異原性はそれほど高くないと報告している²⁰⁾。

また 16 種の加工食品用木酢液は *S. typhimurium* TA98 に対して変異原性を示さなかったが, *S. typhimurium* TA100 (S9Mix 添加及び無添加の場合) に対して 7 種の木酢液に変異原性が認められ, 9 種の木酢液は変異原性が認められなかったと報告している²¹⁾。

さらに市販品くん液及び手作りくん液からのジエチルエーテル抽出物は *S. typhimurium* TA98 に対して変異原性は認められず, *S. typhimurium* TA100 に対して変異原性を示したと報告している²³⁾。

このように今までに報告された木酢液は塩基置換形に対

して変異原性を示している。

著者らが抽出した流木木酢液ヘキサン・エーテル抽出物は塩基置換形およびフレームシフト形に対して変異原性を示さなかった。このことから木酢液そのものよりも木酢液燻臭成分抽出物のほうが利用するにあたり, 安全性が高いと思われる。

3. 要 約

流木木酢液から異なる溶媒を用いて抽出した燻臭成分の違いとホルムアルデヒド, メタノールの有無を比較し, *E. coli* WP2 *uvrA*, *S. typhimurium* 4 菌株に対する変異原性試験を実施した。

流木木酢液ヘキサン抽出物, 流木木酢液ヘキサン・エーテル混合抽出物それぞれはメタノール, ホルムアルデヒド, 有機酸類を含有せず, 主な燻臭成分はフェノール類であった。流木木酢液ジエチルエーテル抽出物はホルムアルデヒド, メタノール, 有機酸類が含有され, 主な燻臭成分はフラン類, ケトン類, フェノール類であった。

流木木酢液ヘキサン・エーテル抽出物はいずれの菌株に対して復帰変異コロニー数は増加せず, 生育阻害も認められなかった。

文 献

- 1) Yasuhara, A. and Sugiura, G., Volatile compounds in Pyroligneous liquids from Karamatu and Chisima-sasa, *Agric. Biol. chem.*, **51**, 3049-3060 (1987).
- 2) 岸本定吉, 「炭・木酢液の利用」, (創林社 東京) pp. 248-249 (1997).

- 3) ゲン・ヴァン・チュエン, 木酢液の成分とその問題点, *New Food Industry*, **43**, 20-25 (2001).
- 4) 谷田貝光克, 雲林院源治, 太平辰郎, 炭化副産物に関する研究 (第 4 報) 木材学会誌, **34**, 184-188 (1988).
- 5) 城代 進, 矢野省一, 上原 徹, 木酢液の成分とその燻香, 木材学会誌, **51**, 555-563 (1989).
- 6) 植松広子, 藤原正道, 製材の残材より得られる木酢液の分析, 高知県工業技術センター研究報告, **23**, 37-42 (1992).
- 7) 谷田貝光克, 高橋利夫, マサコ・N・サキタ, 炭化副産物に関する研究, 木材学会誌, **32**, 467-471 (1986).
- 8) 谷田貝光克, 高橋利夫, マサコ・N・サキタ, 炭化副産物に関する研究 (第 2 法報), 木材学会誌, **32**, 626-631 (1986).
- 9) 「食品加工用 天然物便覧 第 9 版」, (食品と科学社 大阪), pp. 144 (1986).
- 10) 「食品衛生法改訂に伴う既存添加物名簿関係法令通知集」, 厚生労働省衛生局食品化学課編, (日本食品衛生協会, 東京), pp. 111 (1996).
- 11) 「食品添加物インデックス和名・英名・E No・検索便覧」, 日本輸入食品安全推進協会編 (中央法規出版, 東京), pp. 170 (2002).
- 12) 菰田太郎, 白石慶子, クン液中の有害成分について, 食衛誌, **5**, 336-340 (1964).
- 13) 宮川雄太, 宮川富三雄, 西山由隆, 村 清司, 徳江千代子, 流木木酢液ベンゼン抽出物の燻臭成分とその抗酸化性, 食料工学会誌, **50**, 530-538 (2002).
- 14) 石田 裕, 野菜の色の測定, 日調科誌, **26**, 378-384 (1993).
- 15) 「新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック」労働省化学物質調査課編, (中央労働災害防止協会, 東京) pp. 71-75 (1989).
- 16) 田中 治, 野副重男, 相見則郎, 永井正博「天然物化学」改訂 6 版 (南江堂 東京), pp. 15-16 (2002).
- 17) 中村 洋「分析試料前処理ハンドブック」(丸善, 東京), pp. 132-134 (2003).
- 18) 「第 7 版 食品添加物公定書 厚生省復刻版」(日本食品添加物協会, 東京) pp. 496, 512 (1999).
- 19) 「食品添加物インデックス和名・英名・E No・検索便覧」(日本輸入食品安全推進協会編, 東京) pp. 238, 270 (2002).
- 20) ゲン・ヴァン・チュエン, クン液の変異原性および抗変異原性について, *New Food Industry*, **32**, 27-31 (1990).
- 21) 堂ヶ崎知格, 渡辺和郎, 渡辺正太, クン液の突然変異原性に関する研究 (1), 麻布大学獣医学部研究報告, **4**, 69-76 (1983).
- 22) Nakama, A., Shimizu, M., Fujita, T., Kuroda, K. and Morita, S., Mutagenicity of Smoke Flavorings, *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **33**, 533-538 (1992).

(平成 16 年 5 月 31 日受付, 平成 16 年 12 月 13 日受理)