

醤油油の利用に関する研究

第一報 醤油油成分の検索

小瀬古 茂樹*・升井 洋至**・小宮 孝志

Studies on Utilization of Shoyu Oils

—Qualitative and Quantitative Determinations of Components of Shoyu Oils—

Shigeki KOSEKO, Hironori MASUI and Takashi KOMIYA

I. 緒 言

醤油油は¹⁾、古くから、灯火用として使用されていたが、明治時代初期より石油にとってかわられた。もともと醤油油は、醸造過程の大豆、小麦に含有される油脂に由来するが、醸造過程中にその性質は大豆油とは異なるものに変化する。丸大豆を多く使用した時代は重要な副産物であったが、現在のように脱脂大豆が主原料となつてからは、その生産量も少なく商品価値さえなくなろうとしている。又その着色と臭気のため粗悪セッケン、粉セッケンの原料としかならない。機械油としては、切削油等に使用されているが、酸価が高いために金属を腐蝕する等の欠点がある。このように、醤油油に関しては種々の研究²⁻⁴⁾がなされている。特に、味噌あるいは醤油調味の熟成過程において生成されるリパーゼの作用により大豆油中のトリグリセリドがグリセリンと脂肪酸に分解されると同時に脂肪酸の一部は醗酵中に生産されるエタノールと縮合（逆合成）して脂肪酸エチルが生成される。最近、木村ら⁵⁾により味噌中の脂肪酸エチルが発ガン性と密接な関係にある変異原性発現を抑制し、その中でもリノレン酸エチルが最も高い作用を示すことを見出した。このように醤油油は今後食品や医薬品など多岐にわたる再利用法が開待されるので、本実験は、その手始めとして醤油油成分の検索を行ったので報告する次第である。

II. 実験材料および実験方法

1. 試料および試薬

醤油油試料：本実験に用いた醤油油はサンジルス醸造(K.K.)の昭和60年度産のもので、醤油圧搾工程より分離され、ドラム缶に収納されているものから採取したものである。醤油調味は熟成期間1, 2, 3, 5ヶ月のものを使用した。試薬：脂肪酸標準品として用いたパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、更にオレイン酸エチルおよびリノール酸エチル等はすべて市販の特級品を用いた。その他の実験に用いた試薬もすべて特級品を用いた。

2. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

シリカゲル TLC プレートは 5×20 cm および 20×20 cm のガラス板にシリカレイヤー G-10 (半井化学 K.K. 製) を 0.25 mm の厚さに調製し、風乾後、110°C で1時間加熱活性化したものを使用した。展開溶媒はヘキサン・エーテル・酢酸 (90:10:1 v/v/v) で、検出は 50% 硫酸水溶液を噴霧後、110°C の加熱により行った。

3. カラムクロマトグラフィー

カラムの調製はカラムクロマトグラフィー用シリカゲル (半井化学 K.K. 製) 100 g をヘキサンに懸濁し、2.2×31 cm のガラス製カラムに充填し行った。次いで醤油油 1 g を定量的にカラムに注入し、ヘキサン、ヘキサン・エーテル (95:5 v/v) の順に溶媒を流し、フラクションコレクターにより 10 g づつ分画した。各フラクション

昭和60年10月15日 受理

* 現在サンジルス醸造 K.K.

** 本学大学院学生

を濃縮乾燥してそれらの重量を測定した。

醤油油に含まれる有害物質のセファデックス LH-20 のカラムクロマトグラフィーの条件は次のようである。クロロホルムに懸濁したセファデックス LH-20 のゲルをガラス製カラムに 1.8×22 cm となるように充填した。preparative TLC により醤油油から分離した F_4 区分 55.4 mg を定量的にカラムに注入し、クロロホルム、クロロホルム・メタノール (10:1, 9:1 および 8:1 v/v) を順に流し、フラクションコレクターにより 14 g づつ分画して、紫外部吸収 (λ 300 nm) と可視部吸収 (λ 400 nm) により検出した。

4. ガスクロマトグラフィー (GC)

ガスクロマトグラフィーは Yanaco G-180 型の装置を用いた。カラムの調製は、Celite 545 (AW-DMCS) の 80-100 mesh (20% Polydiethylene glycol Succinate (DEGS) をコーティングしたものを) 3 mm×3 m のステンレスカラムに充填して行った。GC の条件は、キャリアーガス、 N_2 (22.5 ml/min); カラム温度 180°C; 検出器 FID による。

5. ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC-MS)

GC-MS 装置は、日立製作所製 M-80 B 型を用いた。カラム条件: カラムは Carbowax 20 M を充填した Fused Silica Column 0.25 mm×50 m, キャリヤーガス He; カラム温度 60-200°C; 昇温速度は 3°C/min とした。MS 条件は、試料部および検出器温度 240°C, イオン化電圧 70 eV, イオン源温度 160°C とした。

6. 脂肪酸エテルの定量

II, 4 で述べた GC 条件で醤油油中の脂肪酸エテルの定量を次のように行った。脂肪酸エテルとしてオレイン酸エテルを用いてその検量線を作成した。即ち, 10, 20, 30, 50 μ g/ml の濃度のオレイン酸エテルのクロロホルム溶液に各々内部標準として 12.65 mg/ml の濃度のジベンジル (幸井化学 K.K. 製, 特級) を混合したものを試料とした。検量線は縦軸に、面積比 S_1/S_0 (S_1 はガスクロマトグラムにおけるオレイン酸エテルのピーク面積で、 S_0 はジベンジルのピーク面積)、横軸にオレイン酸エテルの濃度をとった。この検量線は相関係数

0.99 で極めて良い直線性を示した。この検量線を用いて醤油油中の脂肪酸エテルの定量を行った。即ち, 47.16 mg/ml 濃度の醤油油クロロホルム溶液に 12.65 mg/ml 濃度のジベンジルが混合した試料を GC にかけた。ガスクロマトグラムにおける各脂肪酸エテルのピーク面積を S とし、内部標準のピーク面積を S_0 とし、面積比 S/S_0 を求め、検量線より各々のピークの濃度を求めた。パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸等のエテルエステルの濃度はオレイン酸エテルのピーク面積とそれらのピーク面積の比より算出した。なおオレイン酸エテルの純度は 86.6% であった。

III. 結果および考察

1. TLC による醤油油成分の分析

Fig. 1 に示すように、醤油油とその比較としてリノール酸エテル、リノール酸および大豆油のシリカゲル TLC を行った。その結果、TLC 上に約 8 つのスポットが検出された。標品との比較により 3 のスポットはリノール酸エテルと、5 のスポットは大豆油のトリグリセリド区分と、6 のスポットはリノール酸とそれぞれ R_f 値が一致した。1 と 6 のスポットの成分の確認を行うため、preparative TLC を行い、1-3 区分を F_1 , 4, 5 区

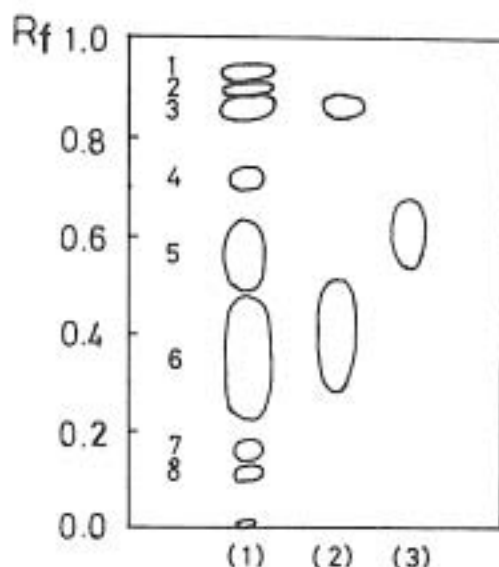


Fig. 1. Thin-layer Chromatogram of Shoyu Oil.
(1) Shoyu Oil, (2) Ethyl linolate + Linoleic acid
(3) Soy bean Oil.
Solvent: Hexane-Ether-Acetic acid (90:10:1 v/v/v) Coloring reagent: 50% H_2SO_4 .

分を F_2 , 6 区分を F_3 , 7-原点区分を F_4 として各区分の分離を行った。 F_1 および F_3 については GC による分析を行った。 F_4 は稠密した重合物質であると考えたのでセファデックス LH-20 によるゲルクロマトグラフィーを行った。

2. 醤油油成分のカラムクロマトグラフィーによる分離

醤油油のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った結果、Fig. 2 に示すように、大きく4つの区分に分離された。それぞれ溶出順に P_1 , P_2 , P_3 および P_4 とした。各々のピークは TLC により P_1 は脂肪酸エテル, P_2 は脂肪酸エテルとトリグリセリド, P_3 は脂肪酸画分であった。各々の画分の含有率は P_1 画分で33.0%, P_2 画分で13.3%, P_3 画分で4.6%で総回収率は91.0%であった。

3. F_4 のゲルクロマトグラフィーによる分離

F_4 抽出物のセファデックス LH-20 のゲルクロマトグラフィーを行い、紫外線吸収 (λ 300 nm) および可視部吸収 (λ 400 nm) の検出を行った結果、Fig. 3 に示すようなクロマトグラムが得られ、3つの主要成分 F_{4a} , F_{4b} および F_{4c} に分離された。その内で F_{4a} が主成分であり、特に醤油油の抗酸化性との関係を検討しているため次に報告する予定である。

4. 醤油油成分の GC による分析

醤油油を preparative TLC により脂肪酸エテル区分 F_1 と脂肪酸区分 F_3 をかき取りにより分離し、それぞれエテル抽出した。 F_1 および F_3 抽出物は GC 分析を行った。 F_1 はそのまま GC にかけた結果、Fig. 4 のようなクロマトグラムが得られ、5つの主要ピーク (1, 2, 3, 4 および 5) が得られた。更にこれらのピークの成分を確認するために、GC-MS にかけたところ、Figs. 6-10 に示すようなマススペクトルが得られた。その結果、ピーク 1, 2, 3, 4 および 5 の親イオン m/z はそれぞれ 284, 312, 310, 308 および 306 で、それらの親イオンから C_2H_5O がとんだ開裂イオン $M-45$ がそれぞれ 239, 267, 265, 263 および 261 で現れた。従ってピーク 1, 2, 3, 4 および 5 はそれぞれパルミチン酸エテル, ステアリン酸エテル, オレイン酸エテル, リノール酸エテルおよびリノレン酸エテルであると判定した。更に醤油油中の脂肪酸エテルの含有率の組成割合を GC により求めた結果、その含有率は52.0%と非常に高い値を示し、パルミチン酸エテル, ステアリン酸エテル, オレイン酸エテル, リノール酸エテルおよびリノレン酸エテルの組成割合はそれぞれ16.3%, 2.5%, 17.4%, 58.0%および5.8%であった。次に F_3 抽出物についてジアゾメタンでメチル化し、GC にかけたところ、Fig. 5 に示すように5つの主要ピークが得られ、標品の保持時間との比較により、1, 2, 3, 4 および 5 はパルミチン酸, ステアリ

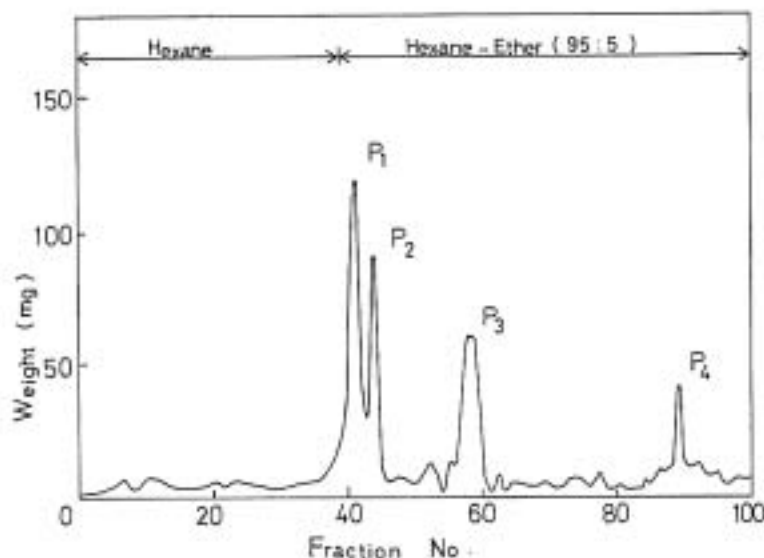


Fig. 2. Column Chromatogram of Shoyu Oil.

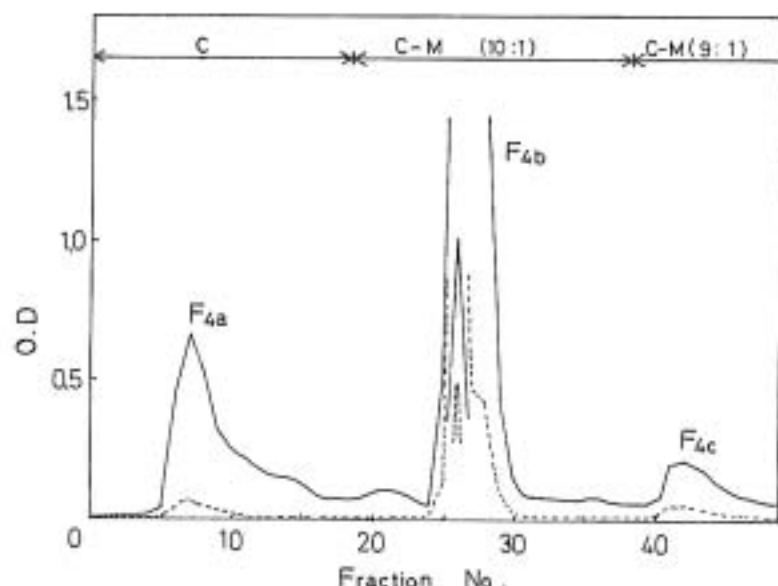


Fig. 3. Gel-filtration Chromatogram of F_4 .
 Detection — UV (λ 300 nm). - - - V (λ 400 nm).
 Solvent, C: Chloroform. M: Methanol.

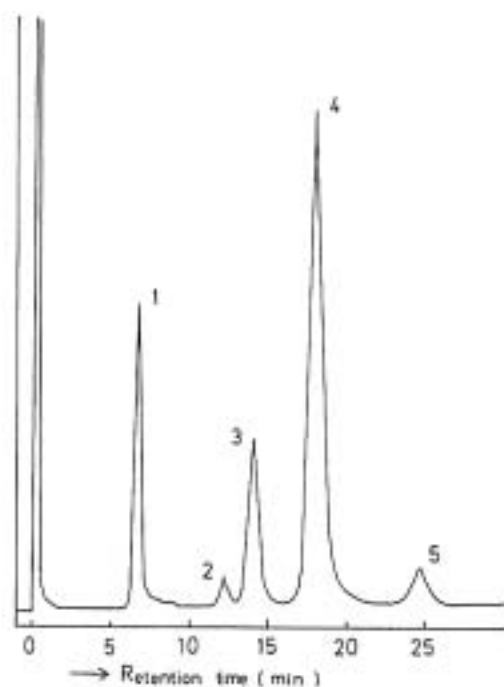


Fig. 4. Gas Chromatogram of F_1 .
 Column: 20% Polydiethylene Glycol Succinate on
 Celite 545. Column temp.: 180°C. Carrier gas:
 N_2 (22.5 ml/min). Detector: FID.

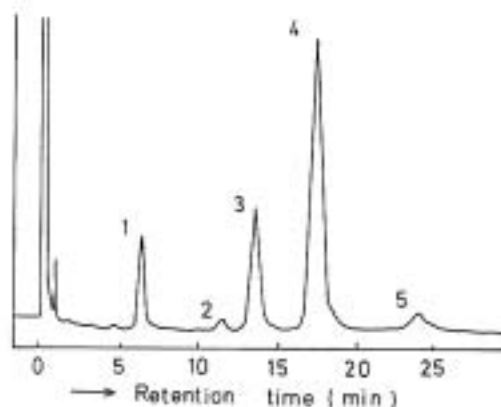


Fig. 5. Gas Chromatogram of F_1 -Methyl Ester.

ン酸、オレイン酸、リノール酸およびリノレン酸のメチルエステルとそれぞれ一致した。又それらの組成割合はそれぞれ9.4%、2.4%、22.1%、59.4%および6.7%であった。

5. 熟成に伴う醤油諸味中の脂肪酸エテルの消長

醤油諸味の仕込みに始まり熟成の期間が増すにつれて脂肪酸エテルの組成割合がどのように変化するかをGCにより測定した。その結果はFig. 11に示す通りである。即ち、諸味を仕込んで1ヶ月目の飽和脂肪酸エテルであ

るパルミチン酸エチルおよびステアリン酸エチルの組成割合はそれぞれ20.7%と2.4%であった。熟成期間が進むにつれてその割合は徐々に増加し、5ヶ月目でそれぞれ33.3%と4.0%となり、特にパルミチン酸エチルの組成割合の著しい増加がみられた。一方、不飽和脂肪酸エチルであるオレイン酸エチル、リノール酸エチルおよびリノレン酸エチルの組成割合は1ヶ月目ではそれぞれ

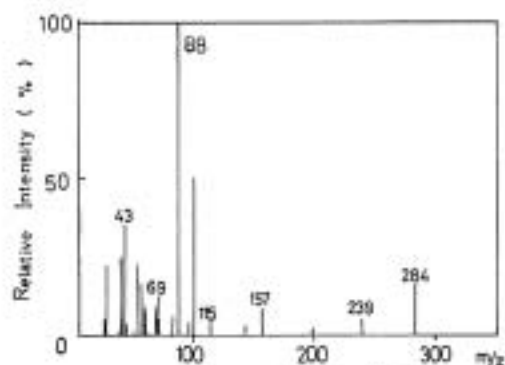


Fig. 6. Mass Spectrum of P₁.

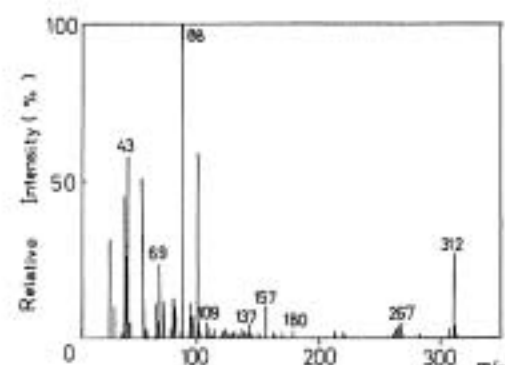


Fig. 7. Mass Spectrum of P₂.

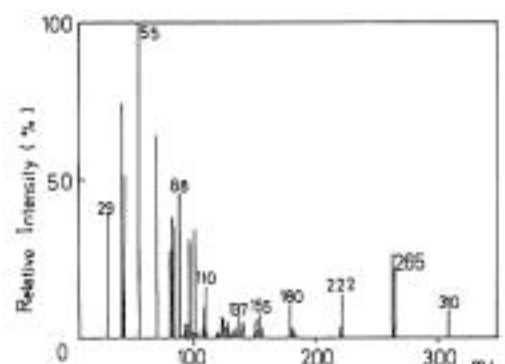


Fig. 8. Mass Spectrum of P₃.

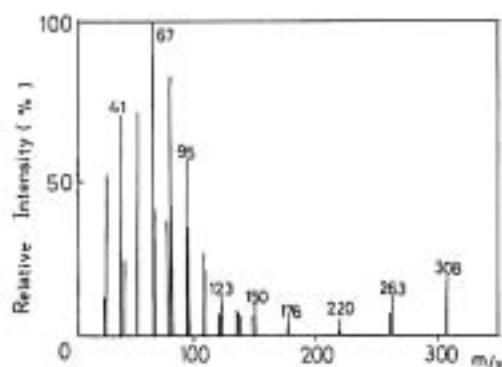


Fig. 9. Mass Spectrum of P₄.

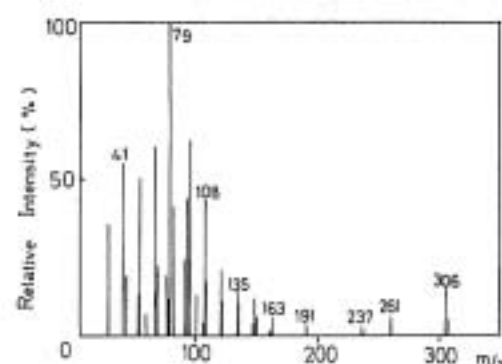


Fig. 10. Mass Spectrum of P₅.

15.0%、56.4%および5.8%であった。しかしながら、不飽和脂肪酸エチルの組成割合は飽和脂肪酸の場合とは逆にそれらの組成割合はいずれも徐々に減少し、5ヶ月目でそれぞれ11.6%、46.4%および4.7%となった。以上の結果を考察すると、醤油調味の仕込みが始まって1ヶ月の熟成で調味のリパーゼ活性が増加し、同時に醗酵によるエタノール生成の増加がみられるので、調味油分中のトリグリセリドのリパーゼによる分解により脂肪酸が生成され、続いてリパーゼによる脂肪酸とエタノールとの縮合(逆合成)がなされる。その際、調味の熟成初期過程ではリパーゼ活性の増大に伴い飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸は共にエタノールとの縮合によりエチルエステルを生成し増加するが⁶⁾、熟成1ヶ月以上になると、おそらく不飽和脂肪酸の方が飽和脂肪酸よりもリパーゼによる逆合成のエチルエステル生成速度がわずかに速くなるのでないかと考えられる。

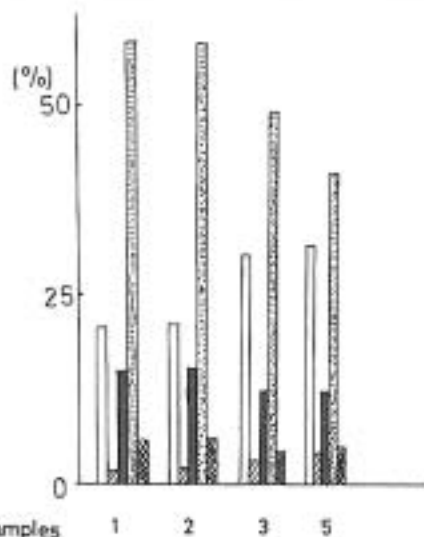


Fig. 11. Changes of Composition of Fatty acid Ethyl ester in Shoyu-moromi by Aging.

□: Ethyl Palmitate. ▨: Ethyl Stearate.
 ■: Ethyl Oleate. ▩: Ethyl Linoleate.
 ▩: Ethyl Linolenate.

Aging time of samples of 1, 2, 3, and 5 are 1, 2, 3, and 5 months, respectively.

要 旨

醤油油の利用を目的としてその成分の検索を行った結果、TLCより8つ以上のスポットが検出され、それらを F_1 , F_2 , F_3 および F_4 の区分に分離した。 F_2 区分は R_f 値の比較によりトリグリセリドが主成分であった。 F_1 はGCにより5つの主成分からなり、GC・MSによりそれらはパルミチン酸エチル、ステアリン酸エチル、

オレイン酸エチル、リノール酸エチルおよびリノレン酸エチルであることを確認した。又醤油油中の脂肪酸エチルの含有割合は52%とかなり高い値を示し、それらの組成割合はそれぞれ、16.3%, 2.5%, 17.4%, 58.0%および5.8%であった。 F_3 区分はメチル化してGCで調べた結果、 F_1 と同じ脂肪酸組成(C_{16} , C_{18} , C_{18}^{-1} , C_{18}^{-2} , C_{18}^{-3})でその組成割合はそれぞれ9.4%, 2.4%, 22.1%, 59.4%および6.7%であった。 F_4 区分はセファデックス LH-20のゲルクロマトグラフィーにより醤油油の褐色色素成分を形成するもので抗酸化性と関連するものと考えられる。熟成1ヶ月から5ヶ月間の醤油調味中の脂肪酸エチルの消長を見た結果、飽和脂肪酸エチルの組成割合が徐々に増加し、不飽和脂肪酸エチルの組成割合は徐々に減少した。

本研究の実施にあたりGC・MSの測定に御協力下さいました長谷川香料K.K. 川崎研究所の奥村恭司氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 梅田勇雄: 醤油, 三共出版, 1963.
- 2) KIUCHI, K., T. OHTA, T. ISHIMA, T. TAKABAYASHI and H. EBINE: Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 24, 21 (1977).
- 3) 望月 努: 醸造工学, 56, 630 (1978).
- 4) 大西邦男: 日食工誌, 29, 23 (1982).
- 5) 大西邦男: 日食工誌, 30, 26 (1983).
- 6) KIUCHI, K., T. OHTA and H. EBINE: Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 23, 455 (1976).
- 7) 岡崎 秀, 秋葉美智子, 木村修一: 日本農芸化学会講演要旨集, 1984, p. 636.

Summary

For the purpose of using Shoyu oil, its components were investigated. As a result, more than 8 spots were detected by TLC and they were separated into F_1 , F_2 , F_3 , and F_4 fractions on the basis of R_f value on TLC. The main components of F_2 fraction was determined to be triglyceride by R_f value on TLC.

F_1 fraction was found to be composed of five main components by GC. They were identified as ethyl palmitate, ethyl stearate, ethyl oleate, ethyl linolate, and ethyl linolenate by GC-MS.

The ratio of ethyl fatty acids in Shoyu oil was relatively high value, 52%, and their component ratios were 16.3%, 2.5%, 17.4%, 58.0%, and 5.8%, respectively.

By GC of F_2 methylester, F_2 has the same components of fatty acids (C_{16} , C_{18} , C_{18}^{-1} , C_{18}^{-2} , C_{18}^{-3}) as those of ethyl fatty acid of F_1 . Their ratios were 9.4%, 12.4%, 22.1%, 59.4%, and 6.7%, respectively. F_4 fraction may be considered to form brown colored materials of Shoyu oil by the gel-chromatography on Sephadex LH-20 and may be seen to be related to antioxidation of Shoyu oil.

Change of the component ratio of the ethyl fatty acid in Shoyu-moromi by aging for five months was examined.

As a result, the component ratio of saturated fatty acid ethyl ester increased slightly by aging, but that of unsaturated fatty acid ethyl ester decreased slightly.