

醸造酢からの脂溶性成分の分離および逆相 HPLC による 構成脂肪酸の分析

藤森正宏, 増田 勉, 柚木恵太*, 柏川法隆*,
塚本義則, 伊藤精亮*, 大西正男*[§]

ミツカングループ本社品質環境室
*帯広畜産大学生物資源科学科

Reversed Phase HPLC Analysis of Component Fatty Acids in Lipophilic Components Extracted from Vinegar

Masahiro Fujimori, Tutomu Masuda, Keita Yunoki*, Noritaka Kasikawa*,
Yoshinori Tsukamoto, Seisuke Ito* and Masao Ohnishi*[§]

Quality Assurance & Environmental Affairs Division, Mizkan Group Co. Ltd.,
2-6 Nakamura-cho, Handa-shi, Aichi 475-8585

*Department of Bioresource Science, Obihiro University of Agriculture
and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro-shi, Hokkaido 080-8555

We extracted lipophilic components from four vinegar varieties (7 samples), examined their characteristics by silica gel thin-layer chromatography, and analyzed component fatty acids as *p*-nitrophenacyl derivatives using reversed phase HPLC. The amount of chloroform-methanol extracts (1 to 8 mg/100 ml vinegar) was highest in rice vinegar (brown rice), followed by rice vinegar (polished rice), cider vinegar (apple juice), and grain vinegar (wheat, sake lees, polished rice, corn, and alcohol). The primary lipid classes from raw materials for vinegar were hardly found in these lipophilic components. Nine fatty acids with carbon numbers from 16 to 22 were recognized; palmitic acid (32% to 43%), stearic acid (8% to 18%), oleic acid (16% to 36%), and linoleic acid (5% to 16%) being predominant. Rice and grain vinegars were found to have similar fatty acid composition. The total fatty acid concentrations in vinegars ranged from 58 to 194 nmol/100 ml, having individual characteristic fatty acid profiles. Palmitoleic acid, probably derived from yeast, scarcely differed among the vinegar samples in its content. Cider vinegar from U.S.A. was shown to contain much more palmitic and oleic acids than those of all domestic cider vinegars.

(Received Feb. 9, 2005; Accepted Jun. 20, 2005)

食酢は醸造酢と合成酢に大別されるが、このうち醸造酢は、穀類や果汁などの糖質をアルコール発酵させ、更にこれを酢酸発酵させるか、あるいはこれらの糖質にアルコールを加えて酢酸発酵させて製造する。今日、醸造酢の主要な原料は、米、小麦、コーン、大麦、清酒醸造の副産物の酒かす、リンゴ果汁、ブドウ果汁および糖蜜などをアルコール発酵させて得られたアルコールである。近年の消費者嗜好の多様化と食品の国際流通の拡大に伴い、醸造酢の種類も極めて豊富になっている¹⁾。

食酢の成分に関する研究は数多く行われているが²⁾、脂溶性成分、とくに高級脂肪酸を含む脂質成分を対象とした研究はほとんど見られない。その理由として、食酢中の脂

質は微量であるため、品質との関係で注目されなかったためと考えられる。また、食酢中の微量の脂肪酸を簡便、且つ高精度に分析する方法が一般化されていないことも要因のひとつであろう。醸造酢中の脂溶性成分には、主に原料に由来するものと、醸造過程で生成するものがある。また、それらは各製造段階で量的および質的に変動することが予想される。著者らは、新たな食酢の品質評価法の開発を目的に、脂質の主要な構成成分の脂肪酸を効率よく分析する方法を検討した。

食品中の脂肪酸分析では、脂質成分を抽出・分離した後、酸あるいはアルカリで加水分解し、メチルエステルに転換してからガスクロマトグラフィー (GC) で測定する方法が汎用されている。また、試料をケン化し、遊離脂肪酸を調製後、シラン誘導体としてステロールと合わせて GC 分析する手法もブドウマストなどで応用されている³⁾。し

〒475-8585 愛知県半田市市中村町

* 〒080-8555 北海道帯広市稲田町

[§] 連絡先 (Corresponding author), mohnishi@obihiro.ac.jp

かし、水素炎検出器 (FID) を用いる GC では、脂肪酸以外の夾雑成分のピークも検出されることから、正確な組成分析には、GC-MS での確認が不可欠となる。一方、GC 分析の代わりに、脂肪酸をフェナシル誘導体や 2-ニトロフェニルヒドラジン誘導体などに転換した後、逆相 HPLC で分析する手法が多く報告されている^{4)~6)}。この手法は、カルボン酸に特異的に反応する UV 発色基を導入して検出するもので、GC 法に比べて脂肪酸への特異性と分析感度が向上する利点がある⁷⁾。

本報では、脂肪酸を *p*-ニトロフェナシル誘導体⁸⁾⁹⁾ として逆相 HPLC で分析する条件を検討した。ここで得られた知見をもとに、市販の醸造酢中に含まれる脂溶性成分の性状、とくに脂肪酸成分の特徴を調べたので報告する。

実験方法

1. 供試試料および標準物質

醸造酢は全て市販品を用いた。純米酢 (原材料; 米), 純玄米酢 (原材料; 玄米), 穀物酢 (原材料; 小麦, 酒かす, 米, コーンおよびアルコール), 純リンゴ酢 (原材料; リンゴ果汁) の国内産は販売者 ミツカンのもを使用した。純リンゴ酢については、国内産 2 銘柄および米国産 1 銘柄 (原材料; リンゴ果汁) も試料とした。

市販サラダ油に奇数炭素数 (15, 17 および 19) の飽和酸 (シグマ社製, 純度 99% 以上) を添加し, 脂肪酸 *p*-ニトロフェナシル誘導体の標準物質を調製した。また, パルミトオレイン酸 (16:1) は清酒酵母 (協会 7 号) から脂質を抽出して調製した。

2. 脂溶性成分の抽出と定量

醸造酢 500 ml をロータリーエバポレーターを用いて 50°C 以下で濃縮した。濃縮液 (15 ml) に蒸留水を加えて 45 ml とし, これにメタノール 115 ml とクロロホルム 55 ml を加えて 10 分間激しく攪拌した。30 分間放置後, 適量のクロロホルムと蒸留水を加え, 全容を Bligh-Dyer の比率 [クロロホルム-メタノール-水 (1:1:0.9, v/v)] で分配した¹⁰⁾。清澄された下層を分取した後, 上層に等量のクロロホルムを加えて激しく攪拌してから放置した。分離された下層のクロロホルム層を合わせ, その 1/4 容の蒸留水を用いて 2 回水洗した。水洗後の下層を濃縮乾固し, 脂溶性成分とした。

別法として, 純リンゴ酢についてはロータリーエバポレーターを用いて乾固させ, これにクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) を加えて脂質成分を溶解し, その後, Folch の分配割合 [クロロホルム-メタノール-水 (8:4:3, v/v)]¹¹⁾ で水洗して脂溶性成分とした。

清酒酵母の脂質の抽出は, 菌体を乳鉢で破碎後, 5 倍容のクロロホルム-メタノール (2:1, v/v) で行った¹²⁾。

3. ケイ酸薄層クロマトグラフィー (TLC)

展開溶媒として, A; ヘキサン-ジエチルエーテル-酢酸

(80:20:1, v/v), B; 同 (80:30:1, v/v), C; ヘキサン-ジエチルエーテル (90:10, v/v), および D; クロロホルム-メタノール-水 (65:16:2, v/v) を用いた。スポットの検出は, ヨウ素蒸気, プリムリン試薬, 50% 硫酸試薬, アンスロン試薬などを使用した。

4. 遊離脂肪酸の調製

奇数炭素数の脂肪酸を含む市販サラダ油にメタノール性 5% 塩化水素を加え, 95°C で 3 時間加熱分解した。放冷後, 数滴の蒸留水を添加してからヘキサンで 3 回抽出し, 水洗してから窒素気流下で濃縮乾固した。これを展開溶媒 C で TLC に供し, 脂肪酸メチルエステル画分を分取した。これからヘキサン-ジエチルエーテル (1:1, v/v) を用いて脂肪酸メチルエステルを抽出し, 濃縮乾固後の残渣をメタノールに溶解してから 1/9 容の 3N NaOH を加えて 100°C で 1 時間ケン化した。放冷後, 6N HCl を用いて反応液を酸性とし, ヘキサンで 3 回抽出して遊離脂肪酸を得た。

醸造酢から調製した脂溶性成分中の脂肪酸を定量する場合は, 内部標準としてヘプタデカン酸 (17:0) (50 nmol) を添加し, 上記条件でそのままケン化して, 酸性溶液としてからヘキサンで遊離脂肪酸を抽出した。

5. 脂肪酸の *p*-ニトロフェナシル誘導体の調製

N-エチルジイソプロピルアミン 7 μ l を含む乾燥ジメチルホルムアミド 1 ml に 5 mg の α -ブromo-*p*-ニトロアセトフェノンを混合した反応試薬を用い, 脂肪酸 *p*-ニトロフェナシル誘導体を調製した⁹⁾。即ち, 完全脱水した遊離脂肪酸画分に上記試薬を 100 μ l 加え, 65°C で 20 分間保持した。反応液をクロマトディスク 13N (0.2 μ m, ジーエルサイエンス製) でろ過し, 窒素気流下で濃縮乾固した後, 残渣をメタノール-アセトニトリル-水 (80:10:10, v/v) に溶解して HPLC に供した⁹⁾。

6. HPLC 分析

脂肪酸の *p*-ニトロフェナシル誘導体を以下の条件で逆相 HPLC に供した。

分析機器, 島津 LC-5A 型液体クロマトグラフ: 検出器, 島津 SPD-2A 型紫外分光検出器 (254 nm で使用); 記録計, 島津 C-R6 型クロマトパック: カラム, Superspher 100 RP-18 (メルク製, 250 mm \times 4 mm ID): カラム温度, 40°C: 移動相組成, メタノール-アセトニトリル-水 (80:10:10, v/v): 移動相の流速, 1 ml/min。

なお, 各試料は少なくとも 4 回の分析を行い, そのうち 2 回の分析は一定量の脂溶性成分に内部標準を添加して実施した。脂肪酸の組成値 (mol%) は, 上記 4 回の分析の平均で, 絶対量 (nmol/試料 100 ml) は 2 回の測定値の平均である。

7. GC 分析

脂肪酸メチルエステルの分析は, 島津 GC-4C 型ガスクロマトグラフ (検出器, FID) を用い, 10% DEGS を充填した 200 cm のガラスカラムで行った¹²⁾。

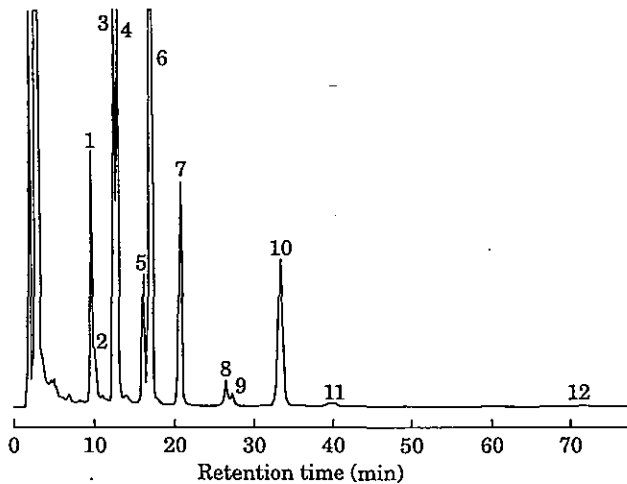


Fig. 1 Reversed phase HPLC of fatty acid *p*-nitrophenacyl derivatives

Chromatographic conditions: Superspher 100 RP-18 (4 × 250 mm), mobile phase; methanol-acetonitrile-H₂O (80:10:10, v/v), column temperature; 40°C, UV detection at 254 nm, flow rate of 1 ml/min. Fatty acid derivatives were prepared from commercial vegetable oil including standard fatty acids with odd-carbon numbers {pentadecanoic acid (15:0), heptadecanoic acid (17:0) and nonadecanoic acid (19:0)}.

1, linolenic acid (18:3); 2, myristic acid (14:0); 3, linoleic acid (18:2); 4, pentadecanoic acid (15:0); 5, palmitic acid (16:0); 6, oleic acid (18:1); 7, heptadecanoic acid (17:0); 8, stearic acid (18:0); 9, icosenoic acid (20:1); 10, nonadecanoic acid (19:0); 11, icosanoic acid (20:0); 12, docosanoic acid (22:0).

結 果

1. 醸造酢中の脂溶性成分の含量および性状

純米酢、純玄米酢および穀物酢の濃縮物を、それぞれクロロホルム-メタノール-水系で抽出し、クロロホルム層に移行した脂溶性成分(脂質)量を測定した。その結果、各醸造酢 100 ml 当たりのそれぞれは 5.7 mg, 7.9 mg および 0.8 mg であった。

これらの脂質成分を展開溶媒 B でケイ酸 TLC に供したところ、原料の米やコーンに主要な脂質成分のトリアシルグリセロール¹³⁾¹⁴⁾は極めて微量で、多くの場合検出されなかった。主なスポットは、共通して、原点物質および 4-デスマチルステロールよりも *R_f* 値が低く、50% 硫酸試薬に対して濃紺色系を呈する成分であった。また、標準の遊離脂肪酸と *R_f* 値が一致する微量のスポットが認められた。原点物質を分離するため、展開溶媒 D で展開したところ、原点から前線にかけて軽いテーリングを呈したが、それぞれ少なくとも 5 つのスポットが確認された。しかし、これらはいずれもライムギなどから調製されたリン脂質や糖脂質の *R_f* 値¹²⁾¹⁵⁾との比較、あるいは呈色反応からは脂質クラスを判定できなかった。主要なスポットとして、*R_f* 値

が標準のモノグリコシルジアシルグリセロールに近似した成分が全ての醸造酢中に見出された。これは硫酸試薬に対して紺色を呈したことから、ステロール由来の過酸化されたテルペノイド系成分と推定された。

2. 標準 *p*-ニトロフェナシル誘導体の逆相 HPLC

脂肪酸成分の分離条件を検討するために、市販のサラダ油に標準の奇数脂肪酸を添加し、脂肪酸誘導体として逆相 HPLC に供した結果を Fig. 1 に示す。各ピークの判定は、個々の標準脂肪酸の保持時間との比較および同一の試料から調製された脂肪酸メチルエステルの GC 分析の結果を参考にして行った。その結果、炭素数 15 から 22 までの 6 種類の飽和酸およびリノレン酸 (18:3)、リノール酸 (18:2)、オレイン酸 (18:1)、イコサモノエン酸 (20:1) の不飽和酸が重複しないで分離された。ピーク 1 (18:3) の直後にテーリング気味に検出される成分(ピーク 2)は、サラダ油中の微量のミリスチン酸 (14:0) と推定された⁹⁾。なお、カラム温度の条件を室温と 40°C で比較すると、室温ではピーク 3 (18:2) とペンタデカン酸 (15:0) (ピーク 4) との分離が良好であったが、パルミチン酸 (16:0) (ピーク 5) とピーク 6 (18:1)、ならびにステアリン酸 (18:0) とイコサモノエン酸 (20:1) との分離が不完全となった。

本脂肪酸誘導体の安定性を調べる目的で、この誘導体を冷蔵庫で保存し、経時的にサンプリングした。これを逆相 HPLC に供し、主要な脂肪酸量の変動を調べたところ、22 日間の保存ではほぼ一定の値を示した(データ非掲載)。

3. 純玄米酢の脂溶性成分から調製した脂肪酸 *p*-ニトロフェナシル誘導体の分析

純玄米酢には、比較的多くの脂溶性成分が含まれていた。そこで、この脂溶性成分を用い、ケン化後、そのままアルカリ性の状態でヘキサン抽出したもの(不ケン化物)、ならびに分解後、反応液を酸性にしてからヘキサン抽出したもの(不ケン化物+遊離脂肪酸)を、それぞれ誘導体処理をして展開溶媒 A でケイ酸 TLC に供した。その結果、共通して、少なくとも 4 種類のスポットが検出された。標準の脂肪酸 *p*-ニトロフェナシル誘導体に相当する成分 (*R_f*: 0.5) は、酸性条件下でヘキサン抽出をした場合のみを検出された。この脂肪酸誘導体調製物をそのまま逆相 HPLC に供した結果を Fig. 2 (a) に示す。Fig. 2 (b) は、ケイ酸 TLC で脂肪酸誘導体 (*R_f*: 0.5) を分離精製後、逆相 HPLC に供したクロマトグラムである。両者のクロマトパターンは本質的な違いが見られなかったことから、共存する分解物質などを除去することなく、そのまま *p*-ニトロフェナシル誘導体化して分析に供することが可能であった。なお、*p*-ニトロフェナシル誘導体化試薬のみを 60°C で 15 分間反応させた空試験では、脂肪酸のピークは全く検出されなかった。また、この脂溶性成分をケン化し、アルカリ条件下でヘキサン抽出して内部標準のヘプタデカン酸 (17:0) を添加すると、このピークだけが検出された。

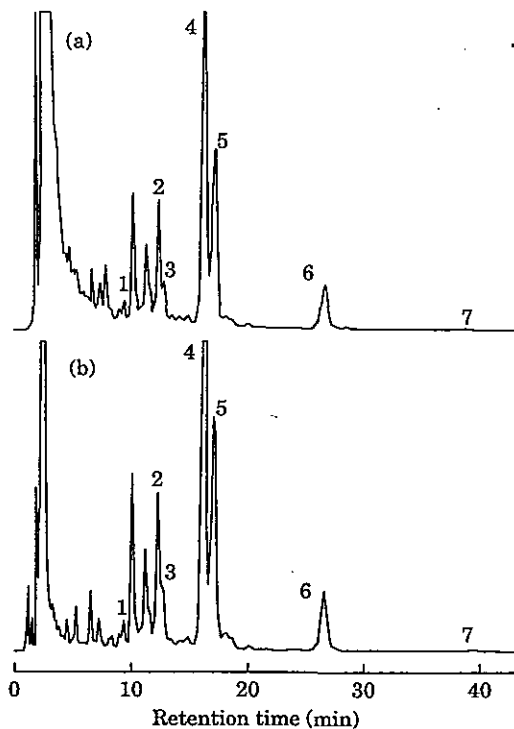


Fig. 2 Reversed phase HPLC analyses of fatty acid components in rice vinegar (ingredient: brown rice)

(a) Before purification of the derivatives of fatty acids by TLC.

(b) After purification of the derivatives of fatty acids by TLC.

1, linolenic acid (18:3); 2, linoleic acid (18:2); 3, palmitoleic acid (16:1); 4, palmitic acid (16:0); 5, oleic acid (18:1); 6, stearic acid (18:0); 7, icosaonic acid (20:0).

純玄米酢の構成脂肪酸として、ピーク 1 (18:3)、ピーク 2 (18:2)、パルミトオレイン酸 (16:1) (ピーク 3)、ピーク 4 (16:0)、ピーク 5 (18:1)、ピーク 6 (18:0) およびアラキジン酸 (20:0) (ピーク 7) が検出された。その他、保持時間からノナデカン酸 (19:0) およびベヘン酸 (22:0) と推定される微量のピーク (Fig. 2 には非掲載) も検出された。なお、清酒酵母から抽出された $C_{16:1}$ 酸について別に逆相 HPLC 分析に供したところ、標準の $C_{15:0}$ 酸と保持時間が近接していたことから、両成分が混在している可能性が考えられた。また、 $C_{18:2}$ 酸よりも早く溶出されるピーク群のうち、 $C_{18:3}$ 酸を除く他のピークについては判定することはできなかった。

4. 純米酢、純玄米酢および穀物酢中の構成脂肪酸

純米酢、純玄米酢および穀物酢中の脂溶性成分量、総脂肪酸量ならびに脂肪酸組成値を Table 1 に、これらの構成脂肪酸量を Fig. 3 に示す。

(1) 脂溶性成分量と総脂肪酸量

脂溶性成分 (クロロホルム-メタノール混合液による抽

Table 1 Fatty acid composition of rice vinegars and grain vinegar analyzed by reversed HPLC (mol%)¹⁾

Fatty acid	Rice vinegar ²⁾	Rice vinegar ³⁾ (Brown rice)	Grain vinegar ⁴⁾
16:0	38.2±2.5	35.4±3.4	42.8±1.2
16:1	10.1±1.0	5.7±0.6	10.9±0.6
18:0	12.6±1.3	7.9±1.6	13.2±2.1
18:1	20.5±1.4	28.9±3.1	15.7±0.7
18:2	8.0±0.6	15.5±2.1	8.9±0.3
18:3	7.8±2.3	5.3±1.4	6.4±0.6
19:0	0.4±0.4	0.5±0.2	0.3±1.0
20:0	1.5±1.5	0.5±0.1	1.0±0.1
22:0	0.9±0.6	0.3±0.1	0.8±0.0
Total acyle (nmol/100 ml)	99	194	55
Extracts ⁵⁾ (mg/100 ml)	5.7	7.9	0.8

¹⁾ Average of 4 trials. ²⁾ Ingredient: polished rice.

³⁾ Ingredient: brown rice.

⁴⁾ Ingredient: wheat, sake lees, rice, corn, and alcohol.

⁵⁾ Yield of extracts with chloroform-methanol mixture.

出物) 量と総脂肪酸量は、いずれも純玄米酢が最も多く、次いで純米酢、穀物酢の順であった。

(2) 脂肪酸組成

炭素数は 16 から 22 までの 9 種類の脂肪酸が確認ないし推定された。最も多い脂肪酸は、3 試料とも共通して $C_{16:0}$ 酸 (35%~43%)、次いで $C_{18:1}$ 酸 (16%~29%) であった。その次に多い脂肪酸は、純米酢と穀物酢では $C_{18:0}$ 酸 (13%) であったが、純玄米酢では $C_{18:2}$ 酸 (16%) であった。奇数酸と $C_{16:1}$ 酸は主として発酵微生物由来^{16)~22)} と推定され、このうち $C_{16:1}$ 酸は酵母の主要な脂肪酸^{16)~18)} ですべての試料中に検出 (6%~11%) された。なお、微量の $C_{20:0}$ 酸や $C_{22:0}$ 酸が米種実中に存在することが知られている²³⁾。

(3) 構成脂肪酸量

構成脂肪酸の含量は、純玄米酢が際立って多かった。とくに、 $C_{18:2}$ 酸量は特異的で、純玄米酢 100 ml 中に 30 nmol 検出されたが、純米酢と穀物酢中ではそれぞれ 8 および 5 nmol であった。純米酢の構成脂肪酸量は、穀物酢に比して総じて高かったが、両者の脂肪酸群のパターンは概ね類似していた。

発酵微生物由来と推定される $C_{16:1}$ 酸量は純米酢と純玄米酢ではほぼ同じであったが (それぞれ 10 および 11 nmol/100 ml)、エチルアルコールを原料に併用した穀物酢ではこの約 1/2 量であった。

5. 純リンゴ酢中の構成脂肪酸

リンゴ酢は、ブドウ酢について代表的な醸造酢で、世界の多くの国々で製造されている。国内産 3 銘柄 (試料 A, B および C) と米国产 1 銘柄 (試料 D) の脂溶性成分量、総脂

脂肪酸量ならびに脂肪酸組成を Table 2 に、これらの構成脂肪酸量を Fig. 4 に示す。

(1) 脂溶性成分量と総脂肪酸量

米国産は国内産に比べ、脂溶性成分量が 1.3~3.3 倍、総脂肪酸量が 1.7~2.4 倍多かった。試料 B は、国内産の中で最も脂溶性成分量が少なかった。

(2) 脂肪酸組成

炭素数 16 から 22 までの 9 種類の脂肪酸が確認ないし推定された。これら 4 試料は、いずれも原料のリンゴ果汁をアルコール発酵させ、引き続き酢酸発酵させたものである。主要な脂肪酸の組成値は相互に類似し、多い順から

$C_{16:0}$ 酸 (32%~37%)、 $C_{18:1}$ 酸 (27%~36%)、 $C_{18:0}$ 酸 (12%~18%) であった。

(3) 構成脂肪酸量

構成脂肪酸の含有量は、米国産が特に多く、国内産とは異なっていた。とくに、100 ml 当たり $C_{16:0}$ 酸量 (国内産 20~28 nmol, 米国産 48 nmol)、 $C_{18:1}$ 酸量 (国内産 16~29 nmol, 米国産 39 nmol) および $C_{18:0}$ 酸量 (国内産 7~15 nmol, 米国産 23 nmol) の差が大きかった。 $C_{16:1}$ 酸の含量は、国内産 3 試料が 3~5 nmol であり、米国産は 7 nmol であった。

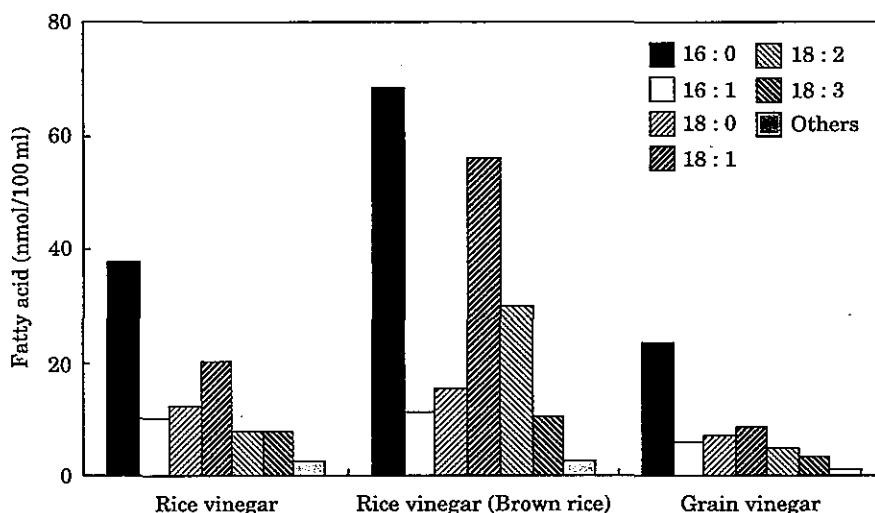


Fig. 3 Concentrations of fatty acid components in rice vinegars (ingredient: polished rice and brown rice) and grain vinegar determined by reversed phase HPLC

Others contain the fatty acids of nonadecanoic acid (19:0), icosanoic acid (20:0) and docosanoic acid (22:0).

Table 2 Fatty acid composition of cider vinegars analyzed by reversed phase HPLC (mol%)¹⁾

Fatty acid	Domestic			U. S. A.
	A ²⁾	B ²⁾	C ²⁾	D ²⁾
16:0	37.2±1.0	31.8±2.0	34.0±1.2	34.2±1.4
16:1	8.2±0.9	7.2±0.1	3.2±0.2	4.9±0.9
18:0	11.7±1.8	15.8±1.0	17.9±0.0	16.2±2.1
18:1	26.9±2.2	32.3±1.7	36.0±1.9	27.6±1.9
18:2	7.6±0.3	6.1±0.3	5.0±0.3	8.8±0.3
18:3	7.5±0.7	5.6±0.8	2.8±0.2	5.5±1.4
19:0	0.2±0.1	0.6±0.2	0.4±0.2	0.1±0.1
20:0	0.5±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1	2.2±0.1
22:0	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.5±0.1
Total acyls (nmol/100 ml)	58	61	82	141
Extracts ³⁾ (mg/100 ml)	2.8	1.1	2.4	3.6

¹⁾ Average of 4 trials. ²⁾ Ingredient: apple juice.

³⁾ Yield of extracts with chloroform-methanol mixture.

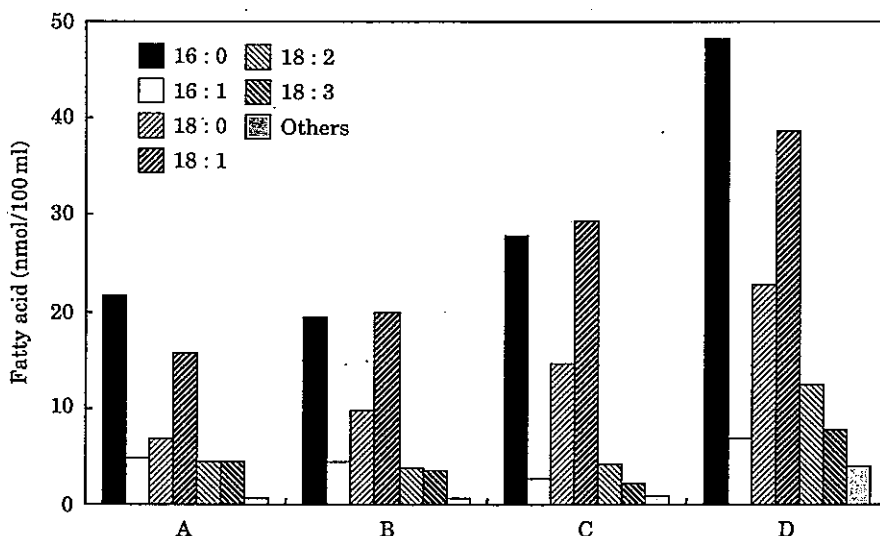


Fig. 4 Concentrations of fatty acid components in cider vinegars analyzed by reversed phase HPLC

A, B and C : vinegar plants of domestic. D : a vinegar plant of U.S.A.

Others contain the fatty acids of nonadecanoic acid (19 : 0), icosanoic acid (20 : 0) and docosanoic acid (22 : 0).

考 察

本研究では、醸造酢中の脂溶性成分の抽出にクロロホルム-メタノール-水系の溶媒で抽出する方法と、クロロホルム-メタノール混液で抽出する二法を試みたが、脂溶性成分の量や脂肪酸組成に本質的な違いは認められなかった。

醸造酢中の脂肪酸分析を、常法に従って脂肪酸メチルエステルを調製し、パックドカラムでGC分析を行ったところ、夾雑物の影響で判定できないピークが度々見られた。そこで、脂肪酸をp-ニトロフェナシル誘導体とし、逆相HPLCで高感度で分析する条件を検討した。その結果、100 mlの試料から得られた脂溶性成分中に100.nmol程度の脂肪酸が含有されていれば、極めてシャープなピークで再現性の良いデータが得られることが判った。

逆相HPLCは、試料中の脂肪酸量が微量である場合に適した分析法の一つであるが、課題として以下の二点を上げておきたい。第一に、C18:3酸の定量値の精度についてである。玄米中のC18:3酸の割合は、一般に2%前後(13)(14)(23)であるが、純玄米酢と純米酢中には5~8%検出されている。同じ不安定な多価不飽和脂肪酸のC18:2酸の割合は、原料に比べて減少していたことから、C18:3酸18:3のピークには夾雑成分が混入し、実際よりも高い値を示している可能性が考えられた。移動相のメタノールとアセトニトリルの比率を変えると、不飽和酸の溶出パターンが変動するので、移動相の組成比を変化させ、詳しく検討する必要がある。また、C18:3酸が溶出される前後に数種の未同定ピーク(Fig. 2)が検出された。これらはいずれの醸造酢においても脂肪酸誘導体処理後に検出されたことから、カルボ

キシル基を有する物質と判断される。今回の分析では、これらのピークは全て除外して脂肪酸組成を算出した。第二は、イソクラティックなHPLCでは、C22:0酸が検出されるまでに70分を要した点である。これは、グラジエントで溶出させる条件を見出せば分析時間の短縮は可能であろう(24)。

醸造酢中の脂溶性成分の由来は、原材料のほかに発酵微生物により生成された(14)~(22)、その量的および質的な変動は原材料の種類やその使用量ならびに発酵微生物の貢献度で大きく異なるが、製造工程で起きる種々の物理化学的な要因も考慮する必要がある。このように、醸造酢中の脂肪酸成分は様々な要因によって変動することが考えられるので、本研究では各脂肪酸の相対割合(組成値)と含量(脂肪酸量, nmol/100 ml)を分析して供試した醸造酢の脂肪酸成分における特徴を検討した。

脂溶性成分量は、多い順から純玄米酢、純米酢、純リンゴ酢および穀物酢で、この量は概ね総脂肪酸量に比例していた。これらの構成脂肪酸としては、いずれも炭素数16~22までの9種類の存在が確認ないし推定された。

脂肪酸の組成値をもとに各醸造酢間の類似性を調べたところ(Table 1と2)、顕著に多い脂肪酸は共通してC16:0酸とC18:1酸であった。次に多い脂肪酸として、C18:0酸の構成比率が高いものと、C18:2酸が多いものとに大別され、前者は純米酢、純リンゴ酢および穀物酢、後者は純玄米酢であった。C18:0酸は穀粒など植物組織の脂質には通常数%しか存在していないが(12)~(14)、醸造酢中には高い割合(8~17%)で検出された。一方、C18:2酸は原材料の米、コーンおよびリンゴ果汁の主要な脂肪酸(13)~(15)の一つでありなが

ら、穀物酢および純リンゴ酢中にはわずか(5~9%)であった。この理由を明らかにするため、各醸造段階における脂肪酸の変化について分析を進めている。しかし、純米酢と純玄米酢については、それぞれ8%と15%と異なる割合のC_{18:2}酸が検出され、原料米の性状の違い(精米度)などを反映したものと考えられる。

また、同じリンゴ酢でも国内産3銘柄と米国産1銘柄との間では脂溶性成分および脂肪酸含量には大きな違いが見られたことから、使用した原料の違いだけでなく製造方法の違いにより醸造酢中の脂質成分は大きく変動するものと推測される。

脂溶性成分を構成する脂質クラスとしては遊離脂肪酸と微量のトリアシルグリセロールの存在が確認されたが、他の主要な成分については未詳である。今回、量的には少ないものの試料間で特徴的な脂肪酸組成および含量が観察されたことから、醸造酢の品質を評価する上で脂質の存在形態を解明することも重要な研究課題となろう。今後、脂溶性成分の種類と構造についても詳細な分析を進めていく予定である。

要 約

醸造酢(4品種, 7品)から脂溶性成分を抽出し、その性状を検討すると共に構成脂肪酸をp-ニトロフェナシル誘導体として逆相HPLCで分析した。

- ① 供試した醸造酢中のクロロホルム-メタノール抽出物は、醸造酢100ml当たり1~8mgで、純玄米酢、純米酢、純リンゴ酢および穀物酢の順で多く含まれていた。これらの脂溶性成分には、原材料中の主要な脂質クラスはほとんど検出されなかった。
- ② 構成脂肪酸として、炭素数16~22までの9種類の存在が認められ、そのうち主なものはパルミチン酸(16:0)(32%~43%)、ステアリン酸(18:0)(8%~18%)、オレイン酸(18:1)(16%~36%)およびリノール酸(18:2)(5%~16%)であった。純米酢および穀物酢の脂肪酸組成(mol%)は互いに類似していたが、純玄米酢はそれらとは異なっていた。
- ③ 醸造酢100ml当たりの総脂肪酸量は58~194nmolの範囲であった。醸造酢中の個々の脂肪酸量を比較すると、各醸造酢固有の脂肪酸パターンを示した。
- ④ 一般に、原料に由来する脂肪酸[パルミチン酸(16:0)、オレイン酸(18:1)など]の含量は、醸造酢の品種間で差が認められた。一方、発酵微生物に由来すると考えられるパルミトオレイン酸(16:1)の含量には品種間で大きな違いは見られなかった。
- ⑤ 純リンゴ酢の総脂肪酸量は、米国産の方がいずれの国産銘柄のものよりも多く、パルミチン酸(16:0)とオレイン酸(18:1)の含量も米国産の方が多かった。

文 献

- 1) 正井博之, 酢・新製品開発と現状, 醸協, 82, 617-622 (1987).
- 2) 伊藤 寛, 醸造成分・食酢(2), 醸協, 73, 453-460 (1978).
- 3) Cocito, C. and Delfini, C., Simultaneous determination by GC of free and combined fatty acids and sterols in grape musts and yeasts as silylated compounds, *Food Chem.*, 50, 297-305 (1994).
- 4) Borch, R.F., Separation of long chain fatty acids as phenacyl esters by high pressure liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 47, 2437-2439 (1975).
- 5) Durst, H.D., Milano, M. and Kikta, Jr. E.J., Connelley, S. A. and Grushka, E., Phenacyl esters of fatty acids via crown ether catalysts for enhanced ultraviolet detection in liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 47, 1797-1801 (1975).
- 6) Miwa, H. and Yamamoto, M., Rapid liquid chromatographic determination of fatty acids as 2-nitrophenylhydrazine derivatives, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem. Int.*, 79, 493-497 (1996).
- 7) Shukla, V.K., Recent advances in the high performance liquid chromatography of lipids, *Prog. Lipid Res.*, 27, 5-38 (1988).
- 8) Halgunset, J., Lund, E.W. and Sundé, A., Improved separation of biologically relevant C14-C20 fatty acids by reverse-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 237, 496-499 (1982).
- 9) Ohnishi, M. and Thompson, Jr. G.A., Biosynthesis of the unique *trans*- Δ^3 -hexadecenoic acid component of chloroplast phosphatidylglycerol: evidence concerning its site and mechanism of formation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 288, 591-599 (1991).
- 10) Bligh, E.G. and Dyer, W.J., A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-919 (1959).
- 11) Folch, J., Lee, M. and Sloane-Stanley, G.H., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509 (1957).
- 12) 間野康男, 大西正男, 佐藤晴彦, 中西 創, 前本政道, 伊藤精亮, 北海道産ライ麦の脂質クラス, 構成脂肪酸およびステロールの組成, *日食工誌*, 37, 338-345 (1990).
- 13) Nakamura, T., Ohnishi, M., Kojima, M., Mano, Y., Inazu, O. and Ito, S., Comparative analyses of fatty acid compositions in rice grain glycerolipids among three cultivars with different chilling susceptibilities, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 2309-2311 (1995).
- 14) Ohnishi, M., Yasui, Y., Mano, Y., Ito, S. and Fujino, Y., Fatty acid distribution and characterization of 1,2-diacylglycerol residues in glycerolipids from maize seeds, *Agric. Biol. Chem.*, 53, 565-567 (1989).
- 15) 田中宏幸, 大西正男, 藤野安彦, トウモロコシ種実中の糖脂質について, *農化*, 58, 17-24 (1984).
- 16) 石川雄章, 吉沢 淑, 清酒もろみにおける脂質の変化, *農化*, 50, 131-136 (1976).
- 17) Moss, C.W., Shinoda, T. and Samuels, J.W., Determination of cellular fatty acid compositions of various yeasts by gas-liquid chromatography, *J. Clin. Microbiol.*, 16, 1073-1079 (1982).
- 18) Jolly, N.P., Janse, B.J.H., van Rooyen, T.J. and Louw, J. H., Hybridization and typing of yeasts used in sparkling wine fermentation, *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 217-226 (1993).

- (1993).
- 19) 大西正男, 藤野安彦, 黄こうじかびのアシル系中性脂質クラスの化学的組成, 農化, 52, 525-531 (1978).
- 20) 藤野安彦, 伊藤精亮, 正井博之, 藤森正宏, 酢酸菌体の脂質成分に関する研究, 帯広畜産大学研究報告, 10, 917-925 (1978).
- 21) Yamada, Y., Nunoda, M., Ishikawa, T. and Tahara, Y., The cellular fatty acid composition in acetic acid bacteria, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 27, 405-417 (1981).
- 22) 後藤英嗣, 益子まゆみ, 大西正男, 塚本義則, 高酸性度および中酸性度食酢生産性の酢酸菌に含まれるリン脂質クラスの比較分析, 日本油化学会誌, 49, 349-356 (2000).
- 23) 平 宏和, 李 乘英, 韓国の日本型および日印交雑型うるち品種玄米の脂肪酸組成, 日食工誌, 35, 23-27 (1988).
- 24) Giroud, C. and Eichenberger, W., Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. incorporation of [¹⁴C] acetate, [¹⁴C] palmitate and [¹⁴C] oleate into different lipids and evidence for lipid-linked desaturation of fatty acids, *Plant Cell Physiol.*, 30, 121-128 (1989).
- (平成 17 年 2 月 9 日受付, 平成 17 年 6 月 20 日受理)