

漬物中の有機酸に関する研究

〈カラムクロマトグラフィー, 及びペーパークロマトグラフィーによる各種漬物の有機酸組成について〉

友松和子*・田尻尚士*・松本熊市*

Studies on Organic acid in Japanese-Pickles.

〈On the composition of organic acid in various Japanese
-pickles determined by column and paper chromatography〉

Kazuko TOMOMATSU Takashi TAJIRI and Kumaichi MATSUMOTO

Synopsis

Determination of organic acid in Japanese-pickles.

Many kind of vegetable pickles are made in Japan. People in this country are fond of the product very much. It is rather custom to eat pickles with every meal in the city or in the rural district.

The taste of those were determined almost functionally but analysis of taste in chemical way were very important.

In this report, the writer tried to determine organic acids in pickles produced during the fermentations of them.

The material of pickles were bought in usual market and analysed by the way of column-chromatography with silicagel, and also used paper chromatography.

Result of this experiment showed lactic acid contained the largest amount and followed by acetic, citric, formic, malic and glutamic acid respectively.

In general the taste of pickles largely due to the organic acid in it, also the materials of vegetable used were largely related to the taste of pickles.

I 緒 言

漬物は古くから日本に伝わり、毎日の食膳に欠くことのできない嗜好食品として、又保存食品として利用されてきた食品の1つである。この漬物は主原料の蔬菜類等に 食塩、米糠、酒粕、酢、麴その他の調味料、香辛料を加えて漬け込み、熟成、発酵させたもので、一種独特な風味を持つ。

漬物が好まれる原因は、それが持つ個々の特有な風味であるが、この風味は 原料と漬床との共鳴的で複雑な熟成途中の微生物の働きによるものが多いと伝えられており、特に微生物の生産する各種の有機酸が、風味の形成に大きな影響を与えていると思われる。^{1) 2)}

今まで漬物の一般成分については かなりの研究報告³⁾がなされているが、風味を提供する成分については、それが単純でないためにあまり明らかにされていない。そこで本実験では 漬物の一般成分の分析と、風味形成の主成分であると思われる各種有機酸について、カラムクロマトグラフィーと、ペーパークロマトグラフィーによって追求してみた。

II 実 験 方 法

〈研究材料〉

研究材料は、いずれも市販されている漬物を購入して試料とした。

- A：キウリのヌカミソ浅漬
- B：ナスのヌカミソ浅漬
- C：タカナ塩漬
- D：本漬タクアン（塩辛口）
- E：浅漬タクアン

〈一般分析法〉

試料はいずれも細刻し、均一化した後、分析試料に供した。

水分は常圧加熱法により、105°C~110°Cでの蒸発減量により測定した。pH、酸度、糖分、食塩は、試料より抽出液を求めたのち、下記の方法で測定した。

(1) 試料抽出液

試料50.0gに水を加え、ホモジナイザーで10分間粉碎後、濾過、洗浄した後、全量を500mlに調整したものである。

pH：pHメーターで測定。

酸度：pHメーターを用いて、抽出液50mlをpH7まで中和するのに要する0.015N-NaOH溶液のml数で測定。

糖分：ベルトラン法により、グルコースとして測定。

食塩：硝酸銀滴定法で測定。

〈有機酸含有量の測定〉

(1) 試料の調整

試料200.0gに50mlの水を加え、ミキサーで10分間粉碎後、200mlの水を用いてビーカーに移し、2 : 1 H₂SO₄でpH2.0に下げて12時間常温放置した。その後吸引濾過し、1回100mlの水で3回洗浄し、濾液、洗液を4N NaOH溶液でpH7.6まで中和した。次いでこの溶液を約150mlになるまで加熱温度30°Cで減圧濃縮した。濃縮後、約3倍容の96%エチルアルコールを添加し、爽雑物を析出させ濾過により除去した。濾液中のエタノールは減圧蒸留して駆逐し、得られた液を強酸性樹脂 Amberlite IR120のカラムに通じて有機酸を遊離型とし、次いで強塩基性樹脂 Amberlite IR 45のカラムに通じてこれに吸着させた。充分水洗してから、2% NaOH溶液を用いて有機酸を溶離させ、水洗した。過剰のアルカリを除去する為、溶離させた液を、さらに Amberlite IR120のカラムに通じた後、溶液をpH7.6に調整して減圧濃縮した。濃縮液は2 : 1 H₂SO₄でpH2.0としてから10mlに調整した。

(2) カラムクロマトグラフィー

有機酸の定量は、上田等³⁾⁴⁾⁵⁾のシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーにより測定した。溶剤には、クロロホルム (Ch) とn-ブタノール (Bh) の混液を、次の様な混合割合と使用量で用いた。

- (1) Ch : Bu = 100 : 0 → 100ml
- (2) Ch : Bu = 95 : 5 → 100ml
- (3) Ch : Bu = 90 : 10 → 100ml
- (4) Ch : Bu = 85 : 15 → 100ml
- (5) Ch : Bu = 80 : 20 → 100ml
- (6) Ch : Bu = 75 : 25 → 100ml
- (8) Ch : Bu = 70 : 30 → 150ml
- (8) Ch : Bu = 60 : 40 → 150ml
- (9) Ch : Bu = 50 : 50 → 200ml

溶出液は、2ml/90秒の速度で流出させ、5mlずつ分注し水を加えてよく混合した後、フェノールレッドを指示薬として、0.015N-NaOH溶液で滴定した。

なお本法では乳酸、コハク酸の分離が不可能な為、両者を乳酸として取扱った。

(3) 有機酸の同定

各区分の有機酸の同定は、主としてペーパークロマトグラフィーによった。しかし揮発性酸のペーパークロマトグラフィーは方法が困難な為、ギ酸は甘コウ生成法⁶⁾、酢酸は酢酸エチル香発

生法⁶⁾で行った。

不揮発性酸は、相当区分の滴定液を減圧濃縮してから、Amberlite IR120のカラムに通じて遊離型とし、さらに濃縮して試料とした。

ペーパークロマトグラフィーに用いた沱紙は、東洋沱紙No.50を使用した。展開溶媒は、n-ブタノール：ギ酸：水=4：1.5：1、の割合に混合して2、3日放置した後、2層に分離し、上層を用いた。展開時間は15~16時間、展開距離は30cm、温度は室温で展開させた。スポットの検出は、沱紙を風乾して完全に溶媒を除去した後、0.1%ブロムフェノールブルーのアルコール溶液を噴霧器にて付着させると、有機酸の存在によって、紫青色の地色が黄色となる。

なお、いずれの場合も同時に対照として、純粋の有機酸試薬を用いてRfを求めた。

III 実験結果および考察

各種漬物についての一般分析測定結果は、Table 1 に示す通りとなった。

Table 1. Result of analysis

Sample	pH	Acid value (ml)	Salt (%)	Reducing sugar (%)	Moisture (%)
A	5.10	3.02	2.21	1.48	93.5
B	4.42	6.74	2.74	2.79	92.4
C	4.15	41.27	5.21	0.22	83.8
D	4.40	31.96	8.95	5.73	80.9
E	5.37	4.82	6.04	4.37	88.5

Notic : * pH of extract
 ** Required amount of 0.015 N-NaOH neutralize of sample (=5g)
 Sample A : Pickles of cucumber.
 B : Pickles of egg-plant.
 C : Pickles of leaf mustard.
 D : Pungent yellow pickle
 E : Fresh radish preserved with salt and malt.

各種漬物の有機酸組成と、含有量の測定結果は下記のごとくである。なお、5種類の漬物の有機酸組成と、含有量を相互比較する目的でTable 2.にまとめて表示した。

キウリ浅漬 (Sample A) Fig 1. Table 3. ナス浅漬 (Sample B) Fig 2. Table 4. タカナ塩漬 (Sample C) Fig 3. Table 5. 本漬タクアン (Sample D) Fig 4. Table 6. 浅漬タクアン (Sample E) Fig 5. Table 7.

Table 2. Organic acid content in various pickles.

Sample	Acetic acid	Formic acid	Lactic acid*	Pyroglutamic acid	Glycolic acid	Malic acid	Citric acid
A	6.1	10.1	27.2	50.6	—	78.1	5.8
B	29.8	3.8	102.0	—	—	11.5	4.2
C	31.9	3.5	437.0	—	—	—	21.0
D	86.6	17.9	352.6	—	2.1	4.0	16.5
E	20.4	24.2	84.6	28.4	1.1	9.6	30.1

Notic : * Succinic acid is included in Lactic acid

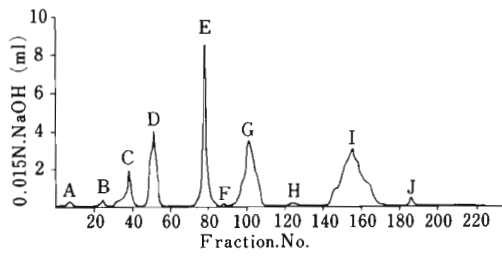


Fig 1 Chromatogram of Organic acid (Sample A)

Table 3. Identification test of Organic acid and quantity of Organic acid. (Sample A)

Peak	Fraction No.	Rf	Known Organic acid		0.015N:NaOH (ml)	Organic acid (mg 100g)
			Rf	Organic acid		
A	6~10	—	—	—	0.38	—
B	22~28	—	—	—	0.94	—
C	29~44	—	—	Acetic acid	6.79	6.1
D	45~57	—	—	Formic acid	15.28	10.1
E	69~86	0.65	0.67	Lactic acid	20.13	27.2
			0.74	0.74	Succinic acid	—
F	87~90	—	—	—	0.42	—
G	91~110	0.52	0.53	Pyroglutamic acid	26.15	50.6
H	120~130	—	—	—	1.26	—
I	142~169	0.44	0.45	Malic acid	38.83	78.1
J	180~189	0.36	0.37	Citric acid	1.84	5.8

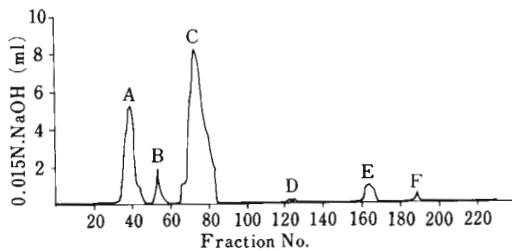


Fig 2 Chromatogram of Organic acid (Sample B)

Table 4. Identification test of Organic acid and quantity of Organic acid (Sample B)

Peak	Fraction No.	Rf	Known Organic acid		0.015N:NaOH (ml)	Organic acid (mg 100g)
			Rf	Organic acid		
A	30~48	—	—	Acetic acid	33.03	29.8
B	49~60	—	—	Formic acid	5.52	3.8
C	65~86	0.66	0.67	Lactic acid	75.47	102.0
			0.73	0.73	Succinic acid	—
D	121~129	—	—	—	1.38	—
E	160~169	0.45	0.44	Malic acid	5.73	11.5
F	186~191	0.35	0.36	Citric acid	1.33	4.2

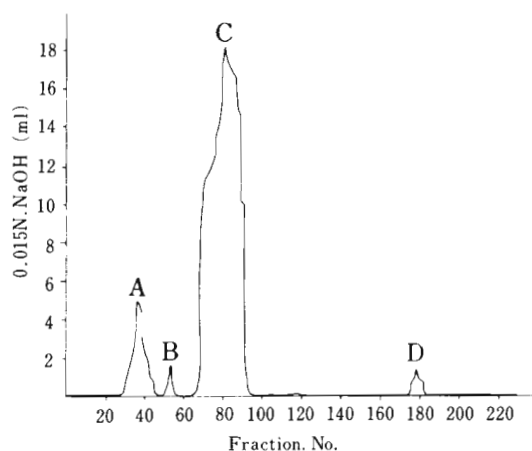


Fig 3 Chromatogram of Organic acid (Sample C)

Table 5. Identification test of Organic acid and quantity of Organic acid (Sample C)

Peak	Fraction No.	Rf	Known Organic acid		0.015N-NaOH (ml)	Organic acid (mg/100g)
			Rf	Organic acid		
A	28~47	—	—	Acetic acid	35.47	31.9
B	48~58	—	—	Formic acid	5.09	3.5
C	66~94	0.67	0.68	Lactic acid	323.43	437.0
		0.72	0.73	Succinic acid		
D	175~185	0.36	0.35	Citric acid	6.65	21.0

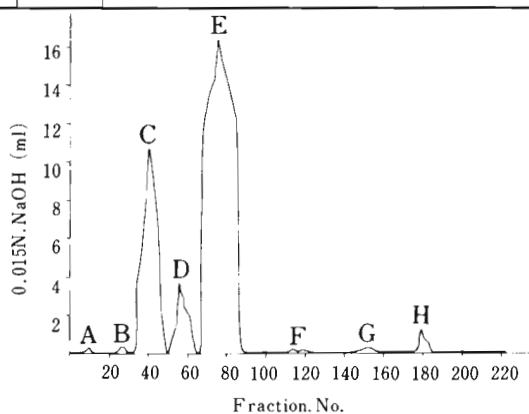


Fig 4 Chromatogram of Organic acid (Sample D)

Table 6. Identification test of Organic acid and quantity of Organic acid (Sample D)

Peak	Fraction No.	Rf	Known Organic acid		0.015N-NaOH (ml)	Organic acid (mg/100g)
			Rf	Organic acid		
A	7~12	—	—	—	0.87	—
B	24~30	—	—	—	2.07	—
C	32~50	—	—	Acetic acid	96.12	86.6
		—	—	Formic acid		
D	51~66	—	—	Lactic acid	25.89	17.9
		—	—	Succinic acid		
E	67~89	0.67	0.66	Lactic acid	260.95	352.6
		0.73	0.74	Succinic acid		
F	110~125	0.50	0.49	Glycolic acid	2.00	2.1
G	148~158	0.45	0.45	Malic acid	1.97	4.0
H	176~186	0.37	0.38	Citric acid	5.22	16.5

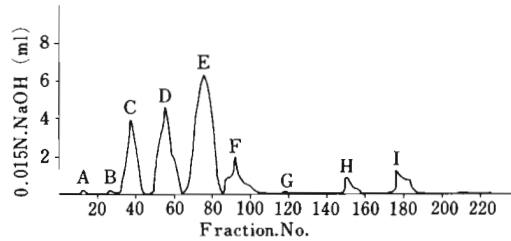


Fig 5 Chromatogram of Organic acid (Sample E)

Table 7. Identification test of Organic acid and quantity of Organic acid (Sample E)

Peak	Fraction No.	Rf	Known Organic acid		0.015N-NaOH (ml)	Organic acid (mg/100g)
			Rf	Organic acid		
A	9~14	—	—	—	0.62	—
B	24~29	—	—	—	0.83	—
C	30~48	—	—	Acetic acid	22.65	20.4
D	49~64	—	—	Formic acid	35.06	24.2
E	65~86	0.66	0.67	Lactic acid	62.63	84.6
			0.72	Succinic acid		
F	87~106	0.52	0.53	Pyroglutamic acid	14.66	28.4
G	117~125	0.49	0.49	Glycolic acid	1.00	1.1
H	148~161	0.43	0.44	Malic acid	4.77	9.6
I	175~192	0.37	0.37	Citric acid	9.56	30.1

Fig 1で示したキウリ浅漬 (Sample A) のカラムクロマトグラフィーによる、A~Jのピークについての有機酸同定と、含有量の測定結果は、Table 3に示した通りであるが、ピークA, B, F, Hは有機酸の同定ができなかった。ピークE, G, I, Jについては、ペーパークロマトグラフィーにより、それぞれ、乳酸、ピログルタミン酸、リンゴ酸、クエン酸が同定された。なおピークEには、乳酸とコハク酸が認められたが、両者を分別して滴定することができなかった為、乳酸として視り扱った。又ピークC, Dについては、それぞれ酢酸エチル香発生法、甘コウ生成法で酢酸、ギ酸を認めた。

なお残り4種類の漬物についても、同様に有機酸の同定を行ない、その結果をFig 1~Fig 5, Table 3~Table 7に示した。

Table 3に示したように、キウリ浅漬中最も多量に含有されていた有機酸は、リンゴ酸の78.1mg/100gで、含有量が最少は、酢酸の5.8mg/100gであった。リンゴ酢は、他の漬物の含有量に比較して、非常に多量含有されており、この漬物に見られる特異な点であった。この他酢酸、ギ酸、乳酸、ピログルタミン酸が含有されていたが、酢酸は他の漬物に比較すると、その含有量は $\frac{1}{3}$ 以

下の最少量で、乳酸も他の漬物に比較すると少量であった。

ナス浅漬 (Sample B) についての実験結果は、Fig 2 及び Table 4 に示した通りである。この漬物に含有される有機酸中、乳酸が最も多量で102.0mg/100g、少量だったのはギ酸で3.8mg/100g、クエン酸も他の漬物に比較すると少量であった。ナス浅漬にもキウリ浅漬と同様に、リンゴ酸が11.5mg/100g含有されていたが、キウリ浅漬と比較すれば含有量には大差がある。

タカナ塩漬 (Sample C) についての実験結果は、Fig 3 及び Table 5 に示した通りである。

このタカナ塩漬に含有される有機酸は、他の漬物に比較して種類が少なく、4種類 (コハク酸を除く) であった。そのうち最も多量に含有されていたのが乳酸で、437.0mg/100gと、全漬物中最多量を示した。後は酢酸が31.9mg/100g、クエン酸が21.0mg/100g、及びギ酸がわずか3.8mg/100g含有されているにすぎなかった。

タクアンは本漬タクアン (塩辛口) (Sample D) と、浅漬タクアン (Sample E) の2種類を試料としたが、その実験結果は Fig 4, Fig 5, Table 6, Table 7 に示した。

両者に共通して言えることは、他の有機酸に比較して、乳酸の含有量が最も多いことである。乳酸の含有量はそれぞれ352.6mg/100g、84.6mg/100g であって、漬け込み期間の長い本漬タクアンに多かった。又酢酸も本漬タクアンに多く、86.6mg/100gの含有量であった。逆に漬け込み期間の短い浅漬タクアンに多い有機酸としては、ギ酸、リンゴ酸、クエン酸があげられ、この浅漬タクアンに、28.4mg/100gも含有されているピログルタミン酸が、本漬タクアンには全く含有されていなかった。

以上、5種類の市販漬物に含有される、有機酸組成と含有量について述べた。

本実験では酢酸、ギ酸、乳酸、コハク酸、ピログルタミン酸、グリコール酸、リンゴ酸、クエン酸の8種類の有機酸を検出したが、乳酸とコハク酸の分離ができなかった為、定量的には7種類の有機酸にとどまった。漬物にはこの他マロン酸や α -ケトグルタル酸等が含有される場合もあると発表されている³⁾が、本実験では検出できなかった。

一般に食してみた時、酸味を強く感じる漬物ほど乳酸が多いこと、又漬け込み期間の短い漬物ほど、含有される各種の有機酸量の格差が少なく、期間の長い漬物ほど格差が大きいことが言える。一方キウリ浅漬に含有されていたピログルタミン酸であるが、これは旨味の成分であるグルタミン酸ナトリウムが、酸性漬け床で熟成されたり、実験中に強酸性で加熱をうけたりした為に、変化したものと思われる特異性があった。

又、漬け込み期間の異なる本漬タクアンと浅漬タクアンについてであるが、本漬タクアンに乳酸が多量に含有されることは、次の様な理由からもうなずける。つまり、漬け込み期間が長期に渡る場合、当然食塩を多量に使用する。乳酸菌には耐塩性と耐酸性の両者を持つものがあり、これら乳酸菌の働きにより乳酸を生産して、漬け床を酸性にするものと考えられる。漬物中に生棲する細菌類は、乳酸菌の様に耐塩性と耐酸性の両者を備えているものは少なく、どちらかが劣勢

になると繁殖が阻止される。しかし乳酸菌は依然として乳酸発酵を続けて乳酸を生産し、その乳酸が、食塩の脱水作用をうけた結果、半透性を失った蔬菜の細胞内に透過するのである。したがって、一般に漬け込み期間の長いものほど、乳酸の含有量が多くなると思われるのである。又、長期間漬けた本漬タクアンに、さわやかな酸味として、旨味に似た効果を与えるリンゴ酸の含有量が少ないのは、嗜好食品としてよりもむしろ、保存食品としての価値が大きいと思われる。次に本漬タクアンと、浅漬タクアンの酢酸含有量であるが、一般に酢酸を生産する酢酸菌は、好気性が強いうえに、食塩に対する抵抗力が弱く、食塩濃度の高い漬物には生棲し難く、食塩濃度の低い漬物に生棲して、酸敗の原因になると言われている⁷⁾。このことから考えると、本漬タクアンより、浅漬タクアンに多量含有されていて当然である。しかし本実験では、本漬タクアンの含有量の方がはるかに多く測定された。

以上の様なことから、漬物の材料の品種、品質、生鮮度、栄養状態、及び漬け込み期間等のちがいによる有機酸組成、及び有機酸含有量の格差等が、風味形成に複雑多様に影響するものと思われた。

IV 要 約

5種類の市販漬物について各種有機酸組成と含有量を、主としてシリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーと、ペーパークロマトグラフィーにより追求した。

キウリ浅漬にはリンゴ酸が78.1mg/100g含有されており、全漬物中最も多かった。その他ピログルタミン酸、乳酸、ギ酸、酢酸、クエン酸が含有されていた。

ナス浅漬に含有される有機酸では乳酸の102.0mg/100gが最多量で、次いで酢酸、リンゴ酸、クエン酸、ギ酸であった。

タカナ塩漬では乳酸が437.0mg/100g含有されており全漬物中最多量を示した。しかし有機酸の種類は最少で、乳酸の他酢酸、クエン酸、ギ酸の4種類であった。

タクアンは、漬け込み期間の異なる2種類を用いたが、本漬タクアン352.6mg/100g、浅漬タクアン86.6mg/100gといずれも乳酸が多く含まれていた。この他本漬タクアンには酢酸、ギ酸、クエン酸、リンゴ酸、グリコール酸が、又浅漬タクアンにもクエン酸、ピログルタミン酸、ギ酸、酢酸、グリコール酸の順で各種の有機酸が含有されていた。

V 文 献

- 1) 日本醸酵工学雑誌 Vol 29, P 4 (1951)
- 2) 栄養と食糧 Vol 11, P106 日本栄養士会 (1958)