	b. p. /6mm	(n) _D ¹⁸	d ₄ ¹⁸	(R) _L
sesquiterpene	98°C	1.5195	0.9432	65.7
sesquiterpenalcohol	105	1.5086	0.9553	

By the application of KELLER's chromatostrip method an orange hydrocarbome and cadalene were isolated from their dehydrogenated products. The orange hydrocarbon is not identical in its ultraviolet spectrum with cadalene or azulene.

醬油香氣成分に関する研究 (第 10 報)

高沸点部の香氣成分 (その 5) Phenol 性香氣成分の Precursor

横 塚 保 (野田産業科学研究所)

昭和 27 年 12 月 8 日 受理

Studies on Flavorous Substances in Soy. Part 10. Flavors with High Boiling Fraction (5). Precursors of Phenolic Flavorous Substances.

By Tamotsu YOKOTSUKA (Noda Industrial Science Laboratory)

緒 論

醬油粕の水蒸気蒸溜液の中で bp. 185~325° (略号 O, P, Q)⁽¹⁾の溜分は収量は少いが香氣は強く、いくつかの物質を含有するが、割温蒸溜によつて分けた上記の三溜分はそれぞれの組成に相違があるのみで含有物質の種類は大体同じである事が判明し、更に之を Al₂O₃ の chromatography や、割温蒸溜によつて含有物質の単離を試みたが成功しなかつたので、化学的性質により分離する事とした。かくして前報に於ては、遊離 phenol と含硫化合物に就て報告したが、本報に於てはその中性部に含有する諸物質を追求した。

実験結果の概要

Alkali 処理により遊離酸性物質を除き、次で HgCl₂ 複塩として大部分の含硫化合物を除いた中性部を、alkali により加水分解する時は、acid として acetic acid, isovaleric acid, *n*-caproic acid, benzoic acid, phenol として vanillic acid ethyl ester, 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene (前報に於て遊離phenol として構造を証明した物質)⁽²⁾ 及び構造不明の 2 種類以上の phenol 性物質、更に phenolic acid として vanillic acid (3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid) 等が分離される。之等の物質の証明方法は acid に就ては各の結晶誘導体の元素分析と paper chromatography を併用し、phenol 類に就ては前報及び後報の結果等に基づき、主として paper chromatography 法により確認した。以上の結果より、次の諸物質の何等かの中性的結合が中性部を構成する。

この中で acetic acid, vanillic acid ethyl ester, 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene, vanillic acid, benzoic acid 等は比較的軽度の加水分解で分解されて来る。一方中性部の KMnO_4 酸化に際しては、加水分解も行われて acetic acid, vanillic acid, benzoic acid, vanillic acid ethyl ester, 構造不明の phenol 性物質等が生じ、isovaleric acid, *n*-caproic acid 等は生じない。以上の結果より比較的分解し易い phenol ester の形成に関与する物質は、acetic acid, vanillic acid, benzoic acid, vanillic acid ethyl ester,

1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene 等である事が解る。これらの中性物質は醤油製造過程の火入操作に於て、当然一部は加水分解を受け、分離した上記の phenol 類は醤油火香の有力な要素となるものと信ずる。又上記の中性部の alkali 加水分解物の酸性部の中には以上とは別に極めて微量の $C_{28}H_{56}O$ (mp. 126.5~127°) なる物質が存在し、呈色反応等から sterol 類と考えられるが、香気に対する関係は不明である。中性部の中には極めて難鹼化性の物質も存在し、特異の強い香気を有するがその詳細は別報に譲る。

実 験 及 び 考 察

I. 中性部の比較的軽度の加水分解生成物 前報の如くして遊離酸性物質と含硫化合物を除いた中性部を alkali 加水分解する時は、何れも isovaleric acid, *n*-caproic acid, benzoic acid 等を分離するが、初に用いた試料の沸点の差によりこれらの組成が異なる。比較的低沸点の溜分よりは isovaleric acid が多く、高沸点のものでは *n*-caproic acid 及び benzoic acid が多く次の如き結果を得た。

(a) 溜分 IIH 2 (bp. 185° ca.)⁽²⁾ の 3.5 g を 2% NaOH 溶液で洗つてから 2% NaOH 溶液 100 cc で 100° の湯浴上で 1.5 時間加熱して分解し、常法により次の 3 部に分つ。中性部 1.50 g (42%), phenol 部 (重曹水難溶部) 0.19 g (5.4%), 酸部 (重曹水可溶部) 0.90 g (26%)。此の酸部 0.1 g の Na-salt を等量の *p*-phenylphenacyl bromide と alcohol 中で 2 時間煮沸し常法により分割結晶を行い確実に融点の一定なるもの 2 種を得た。

{ mp. 74~76° (殆んど大部分)
{ mp. 165~166.5° (僅量)

前者を元素分析し、 $C_9H_{10}O_2$ を得た。

$C_9H_8C_6H_4COCH_2OCC_4H_9$ mp. 74~76° (Lit. 76°)

Theoret. C 77.03 %, H 6.75 %. Analyt. C 76.64 %, H 6.44 %.

仍つて isovaleric acid の *p*-phenylphenacyl ester (mp. 75~76°) と混融した処、全く融点の降下を見ず isovaleric acid なる事を証明した。

mp. 165~166.5° の物質は前報⁽³⁾の結果より、benzoic acid の *p*-phenylphenacyl ester (Lit., mp. 167°) である。

(b) 溜分 IIH 3 (bp. 200° ca.)⁽²⁾ の 3.6 g に就き (a) と全く同様に処理し次の区分に分けた。中性部 1.69 g (47%), phenol 部 0.54 g (15%), 酸部 1.44 g (40%)。

(a) の場合と異り、酸部は見かけ上殆んど固化する。之を減圧にて油状部を去り、固体を tone plate で乾燥してから温水より反復再結し、mp. 119.5°~120° の板状結晶 40 mg を得。混融の結果 benzoic acid (mp. 122~123°) なる事を確認した。

油状部の Cu-salt は殆んど全部易水溶性であるから、その Cu-salt 水溶液を濾過し、濾液を H_2SO_4 酸性にして ether 抽出したものを常法により *p*-phenylphenacyl ester に導き、好収量で mp. 64~65° に止る結晶を得る。此の元素分析と混融試験の結果より *n*-caproic acid-*p*-phenylphenacyl ester なる事を証明した。

$C_6H_5C_6H_4COCH_2OOC(CH_2)_4CH_3$ mp. 64~65° (Lit., mp. 65°)

Theoret. C 77.38 %, H 7.15 %. Analyt. C 77.39 %, H 7.38 %.

II. 比較的軽度の加水分解生成酸性物質の paper chromatography による確認 溜分 P の 1.0 g と溜分 Q の 3.0 g を混じ 10° ca. に約 1 週間放置し析出する結晶を濾別し 0.2 g を得る。該結晶は methanol, ethanol 等より再結晶すれば mp. 62° に止り混融試験の結果 palmitic acid (Lit. mp. 62°) なる事を確認した。以上の濾液を 20% KOH 性 methanol で湯浴上に 1 時間沸騰せしむ。反応液は数分にして深赤色に変化する。之を 24 時間室温に放置すれば多量の結晶が析出するが、之を濾別し酸性にして再結晶すれば palmitic acid が殆んど大部分である。palmitic acid の K-salt を除去した濾液は methanol を溜去し、ether 抽出により中性部 (a) を除く。中性部得量 3.0 g ca. 中性部を除いた残液は H_2SO_4 酸性にて ether 抽出し此の酸性物質の混合液 (b) に就いて paper chromatography を行い Fig. 1 の A, B の結果を得る。即ち展開剤として (butanol 10 + alcohol 1 + 水 2 + NH_4OH 0.5) を用い、acid の試薬として (BPB の 0.05% + citric acid 0.2%) 水溶液を用い、phenol の試薬として $Fe_2(SO_4)_3$ 10% 水溶液及び赤血塩 0.5% 水溶液を重ねて噴霧し、同じ

試料を acid と phenol の両面より検索すれば, acid, phenol, 或いは phenolic acid に応じ何れが一方或いは両方にそれぞれ cobalt blue (acid の場合) 及び Prussian blue (phenol の場合) の spot が得られ, 又 $-\text{COOH}$ を持たぬ phenol は酸の試薬により黄色に出る傾向がある. 同一濾紙上 (東洋濾紙 No. 52) に control として acetic acid, butyric acid, isovaleric acid, *n*-caproic acid, benzoic acid, vanillic acid, vanillic acid ethyl ester, acetovanillon (3-methoxy-4-hydroxy-acetophenon), isoacetovanillon (3-

Fig. 1. Paper chromatograms of acidic and phenolic substances got by hydrolysis or oxidation of neutral fraction of the steam-distillate of Soy-cake (bp. $185\sim 325^\circ\text{C}$).

Ascending method, temperature: 20°C , after 6 hours. Solvent: (butanol 10 + H_2O 2 + ethanol 1 + NH_4OH 35 % in H_2O 0.5), Reagent for acids: (BPB 0.5% + citric acid 0.2%) in H_2O , Reagent for phenols: $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$ 10% in H_2O and $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.5% in H_2O .

Color of spots: cobalt blue (acids) or Prussian blue (phenols), but by reagent for acids, phenols which have no COOH radical have the tendency to take yellow color (marked with $\square$), the coloration degree of blue spots: $\square$ weak, ▨ middle, $\blacksquare$ intense. A, C, E, G, I: by reagent for acids, B, D, F, H, K: by reagent for phenols.

Cu-salt が難水溶性のもの (d) 0.10 g と, 易水溶性のもの (e) 0.09 g とに分つ. 之等に就いて前と同様に paper chromatography を行つた結果は Fig. 1 の CDEFGH である. 即ち重曹水不溶の phenol 部より 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene, vanillic acid ethyl ester の他に isoacetovanillon 相当及び不明の 1 個の phenol の spot を認め, 重曹水可溶にして Cu-salt が難水溶性のものからは acetic acid, benzoic acid, acetovanillon 相当, isoacetovanillon 相当, vanillic acid, vanillic acid ethyl ester の他に vanillic acid のすぐ上に不明物質の spot を認め, 更に重曹水可溶にして, Cu-salt が易水溶性のものからは vanillic acid, isoacetovanillon 相当, acetic acid, benzoic acid, isovaleric acid, *n*-caproic acid の他に不明 phenol として 2 つの spot を認めた.

III. 比較的難鹼化性部の加水分解生成物 20% KOH methanol で 1 時間煮沸する事により鹼化されな

いに残つた中性部 (II の a) を同様の方法を以て更に 5 時間煮沸し, II と同様に処理し次の諸区分に別けた. hydroxy-4-methoxy-acetophenon), 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene 等を置いた結果, control と全く同一の R_F 値として, vanillic acid, acetic acid, benzoic acid, acetovanillon, isoacetovanillon, vanillic acid ethyl ester, 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene, isovaleric acid, *n*-caproic acid の他に不明の phenol の 2 種の spot を得た. 此の中, 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene は前報に於て遊離 phenol の一つとして構造を証明した処であるからその ester の存在も当然であり, vanillic acid は此の場合 acid としても phenol としても control と同一場所に spot を現わし, 且つ之は後報で生醤油の抽出物よりその ester の加水分解物として確実に証明する処であるから, その ester と共にその存在は確実と言える. 又 acetic acid は後述の KMnO_4 酸化物より加水分解物として証明し, isovaleric acid, *n*-caproic acid, benzoic acid は前節に於て存在を確認した処である. 然し acetovanillon 及び isoacetovanillon は control と同一 R_F 値を得たのみであるから更に確実な化学的確認を必要とする.

以上の酸性混合物質 (b) を更に次の如く分ける. 即ち先ず重曹水不溶部 (phenol 部) 0.09 g (c) を分ち, 重曹水可溶部は

- (f) 中性部 (不鹼化部) 0.10 g
 (g) 重曹水不溶の酸性部 (phenol 部) 0.80 g
 (h) 重曹水可溶, Cu-salt 難水溶部 0.03 g
 (i) 重曹水可溶, Cu-salt 易水溶部 0.09 g

これらに就き前と同様に paper chromatography を行つた結果の詳細は省略するが, II の場合と比較した時の顕著な差異は, acetic acid, vanillic acid, hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene が極めて微量に存在するに反し, acetovanillon 及び isoacetovanillon と同一の R_F を示した phenol が非常に多く, 之等の ester が前記の phenol ester に比し解離し難い事を示している. 然し isovaleric acid, *n*-caproic acid, benzoic acid 等の差異は不明瞭で, この場合も多量に認められ, 之等の ester が前回の加水分解の程度では多量に残つていた事を示した.

IV. 中性部の KMnO_4 酸化 中性部を 2% KMnO_4 水溶液を以て室温にて 6 時間に亘り攪拌して酸化し, その酸性部を分ち, これに就て前記と同様の方法で paper chromatography を試み Fig. 1 の J. K の結果を得た. これを要約すれば極めて明瞭な spot として, acetic acid, benzoic acid, vanillic acid ethyl ester, oxalic acid, 不明の phenol 物質が, 而して若干不確実であるが, veratric acid が認められ, isovaleric acid, *n*-caproic acid, 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene は全く認められなかつた. 以上の結果は酸化と同時に軽易な加水分解が行われた事を示している. 而して合成品に就て

が認められ, 此の程度の酸化では通常の ester 結合は解離を受けないから vanillic acid ethyl ester は次の如くして出現したものと考える.

以上により分解し易い phenolester の形成に関与する物質は 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene, vanillic acid ethyl ester, acetic acid, benzoic acid 等である.

Benzoic acid の出る R_F の場所は acid としても phenol としても呈色し且つ此の部分のみが強い芳香を有し不明 phenol の存在を示した. 酸化生成物の酸性部は固状部と液状部に分ち, 固状部に就き分割結晶と分割昇華により, benzoic acid と oxalic acid を確実に証明したが, vanillic acid に就ては mp. 178° (Lit. 207°) の昇華性の微量の結晶を得て, 不純な該物質と判断するに止つた. 液状部は常法により *p*-phenylphenacyl ester に導き, mp. 108° の雲母状晶を得, 分析値に若干誤差があつたが融点その他より acetic acid の誘導体と考えた.

$\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{COCH}_2\text{OOCCH}_3$: mp. 108° (Lit. 111°)

Theoret. C% : 75.55, H% : 5.55. Analyt. C% : 74.77, H% : 5.17

中性部の酸化に際し, 50% 含水 acetone 中で粉末 KMnO_4 を以て行ふか, 或は 3~5% KMnO_4 水溶液を以て 70~80° に加熱して行ふ時は, 著量の oxalic acid と benzoic acid を得た.

V. 中性部の加水分解生成物中の微量の難溶性酸性物質 前記の中性部の alkali 加水分解生成物の酸性部の中には常に微量の極めて難溶性の結晶が得られる. 1 例を挙げれば, 試料 190 mg から此の結晶の得量は 8.6 mg に過ぎない. これは当初より光沢結晶として出現し, 通例の有機溶媒に極めて難溶で, 辛うじて ligloin (bp. 120° ca.) より 1 回再結晶を行つたが, 再結晶前後の融点は変りなく, 鋭敏に 126.5~127° を示す. S. N を含まず, 昇華性なく, FeCl_3 反応 (-), 重曹水不溶, 1% NaOH 水可溶, 二重結合はない. 元素分析結果は次の如く $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}$ の実験式を与える.

$C_{28}H_{56}O$: mp. 126.5~127°.

Theoret. C% : 82.26, H% : 13.82. Analyt. C% : 82.52, H% : 13.64.

本物質は難溶性のため微弱ながら, Tschugajeff 反応, Salkowski 反応等の sterol 類の呈色反応⁽⁴⁾を示すから, 植物種子油の成分として知られている sitosterol の類縁物質と想像する. 然し本物質はそのままでも加熱しても何等香気を発しないから, 香氣的には関係の薄い物質であると考え.

結 論

(1) 醤油粕の水蒸気蒸溜液の中の bp. 185°~325° の溜分の中性部に含まれる物質を, alkali 加水分解及び $KMnO_4$ 酸化生成物より追求した.

(2) 加水分解の結果, acetic acid, isovaleric acid, *n*-caproic acid, benzoic acid, vanillic acid, 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene, vanillic acid ethyl ester, acetovanillon (不確実), isoacetovanillon (不確実), その他不明の phenol 物質等が得られるから, 中性部の成分としてはこれらの acid と alcohol 類との間の ester 及びこれらの phenol と acid との間の phenol ester が大部分を占めるものと考え.

(3) 比較的軽度の加水分解及び $KMnO_4$ 酸化の結果より, 解離し易い phenol ester として次の 4 種の物質の存在が考えられる.

而して isovaleric acid, *n*-caproic acid, benzoic acid その他の phenol 等は更に安定な ester 及び phenol ester 等を形成しているものと考え.

(4) 生醤油の火入に際しても上記の加水分解は必然的に起つて, 以上の如き分解物は所謂醤油火香の重要な要素を為すものと思われる.

(5) 中性部の加水分解物の酸性物質の中に, 以上とは別に微量の $C_{28}H_{56}O$ (mp. 126.5~127°) なる hydrosterol 類似物質が得られた.

本研究は東京大学住木諭介教授の御懇篤なる御指導を中心とし, 併せて坂口謹一郎教授, 朝井勇宣教授の御指導も恭しくしている. 元素分析は科研微量分析室の古橋, 武藤両氏の労を煩わし, 合成に就ては住木研究室の田村三郎助教授の御指導を賜わり, 又住木研究室の諸賢より多くの御助言を頂戴した. 又野田産研所長茂木正利博士を初めとし, 野田醤油株式会社の皆様より何かと御便宜を賜わり, 実験に当つては同室の滝本清氏の御協力に負う所が多かつた. 之等の皆様に対し, 茲に改めて衷心より御礼申し上げる次第である. 尙本研究はその費用の一部を昭和 27 年度文部省試験科学研究費によるものなる事を感謝する.

(昭和 27 年 11 月 22 日農化会東京支部講演会に於て講演した)

(1) 著者 : 農化, 23, 203 (1949).

(3) 著者 : 農化, 25, 446 (1952).

(2) " : 農化, 27, 276 (1953).

(4) 宮道悦男 : 動植物成分, 123 頁.

Summary

The flavourous substances in the steam distillate of Soy-cake, (bp 185~325°) were investigated by means of hydrolysis and oxidation.

Acetic acid, benzoic acid, isovaleric acid, *n*-caproic acid, vanillic acid, vanillic acid ethyl-ester, 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene, acetovanillon (uncertain), isoacetovanillon (uncertain) and two more unknown phenolic substances were obtained as the decomposed products of hydrolysis. Of those substances, acetic acid, benzoic acid, vanillic acid, vanillic acid ethyl ester, 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene were obtained by considerably light hydrolysis, and these were proved in the oxidized products of the neutral fraction by means of $KMnO_4$ at room temperature and in this case isovaleric acid or *n*-caproic acid were not obtained. So it comes to this conclusion that the flavourous substances in the

sample are the esters and phenol esters of these acidic or phenolic substances and as the easily decomposable phenol esters the following four substances are considerable :

Penicillin 生産菌の変異に関する研究 (第 11 報)

Pen. chrysogenum Q 176 の黄色色素消失変異の遺傳生化学的研究 (其の 1)

有馬 啓, 駒形和男, 中村秀雄 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 27 年 12 月 25 日 受理

Studies on Variations of Penicillin producing Molds. Part 11. Biochemical
Genetical Studies on the Yellow Pigments Losing Mutation of *Pen. chrysogenum* Q 176
to Pigmentless Sultant Q 176 ARIMA et OGASAWARA.

By K. ARIMA, K. KOMAGATA and H. NAKAMURA (Dept. Agr. Chem., Univ. of Tokyo)

緒 言 著者は *Pen. chrysogenum* Q 176 の人工突然変異株の Pigmentless sultant を分離し、その菌学的及び工業的利用に就き報告⁽¹⁾したが、本 mutation に於いて変異消失する黄色色素の種類、化学構造又消失の機構は不明であつた。近年発展し来つた *Neurospora*⁽²⁾ の biochemical genetics に於ける BEADLE 一派の one gene one enzyme 説は、生体内合成の各 step に関与する特定 enzyme は、それぞれ特定の one gene に依り支配されているとする。依つて本変異は one gene (or one step) mutation と考えられるから one gene mutation により、何種類もの、而も互に構造上全く関連のない色素が、同時に変異消失することは本説に矛盾する。従つて、本変異の遺傳生化学的研究には、消失せる色素の種類を決定し、それら色素の構造類似性を求め、更に各色素共通の precursor を Pigmentless sultant 培養液中に求め、この precursor の合成又はその前段階物質合成に関与する enzyme を支配する特定の gene が mutation を起したと、推定することは自然であり、且つかかる現象が見出されれば、本 mutation は penicillin の工業的応用の面よりのみならず遺傳生化学的の面よりも誠に興味深い。 *Penicillium* 属の生産する黄色色素は、1932 年 RAISTRICK⁽³⁾ の chrysogenin があり、penicillin 工業発展の初期に、精製過程に於ける夾雑物又抗菌性の一部をなすとして研究せられ、STODOL⁽⁴⁾(1945年)は *P. notatum* より penitric acid (構造不明)を、CRAM⁽⁵⁾(1948年)は clinical penicillin より sorbicillin (構造決定)を分離した小田⁽⁶⁾(1949年)は当時工業生産に用いられていた本邦産 *P. notatum* 178 より penitric acid を分離した。本実験に於ては、変異消失せる黄色色素の種類を決定、両色素の分離、precursor の探索、両色素の構造の類似性より、本変異の遺傳生化学的意義につき二三の知見を得た。本報に於ては黄色色素生産の条件、及びその paper chromatography の条件に就て述べる。

実験 1) 黄色色素の生産条件 *Pen. chryso.* Q 176 株の penicillin 生産条件に対する詳細な研究はあるが、一般にかび類の色素生産に対しては無く、且つペニシリン工業に対する基礎データとして価値ありと考えられたので、定性的に全黄色色素を Pulfrich photometer の吸光係数を以て測定し、色素生産に対する各種培養条件を検べた。

測定法： 培養液を濾過、蒸溜水にて 10 倍稀釈、厚さ 1 cm のキューベット、filter No. 9 (紫色)、対称は蒸溜水層を用い、吸光係数 (E) より原培養液の吸光係数を差し引き、培地に生産された色素量を示す。培養は総べて 2 本宛行つた。

使用菌株： *Pen. chrysogenum* Q 176, Wis. 一部に本菌の各 mutant を用う。

培養方法： 振盪培養は 500 cc 肩付フラスコ中培地 100 cc、振幅 5~7 cm, 130 r.p.m. $25 \pm 1^\circ$, 殺菌条件は 120° , 30 分、培養 5 日目；表面培養はルービン中培地 200 cc、他は同前、培養 7 日目。

検討した条件は、炭水化物源、窒素源、培地の C/N 率、無機塩類、培地の種類、培地の initial pH、培養温