Crude Powder (g)	Crystal (g)	d. p.	綜 括
5.59.....0.5113			Gibberellin 生産のタンク培養に於ては通氣量を毎
5.91.....0.2195.....0.0111		(242~4°)	分培養液と同量とした場合の方が半量とした場合より
6.24.....0.1021			粗 gibberellin 粉末の収量が多く、菌株 G-4 を用い
6.47.....0.0751.....0.0087		(198~9°)	た方が As 6-7 を用いた場合より好収量であつた。
6.64.....0.0840			

著者の試験した菌株に於て、静置法、振盪法、タンク培養法による gibberellin 生産量を比較すると静置法最もすぐれ、次いでタンク培養法、振盪法の順であるが、静置法ではガラス製フラスコを使用し、後 2 者は 18-8 メタルが存在するためと考えられる。

なおタンク培養法では生産される gibberellin 量は徒長試験の結果 8 γ /cc に相当する。後日菌株の変種、培養基組成の改良により更に好収量を得ることを期待するものである。

終に稲馬電苗病菌を御分与された、京都大学農学部、東北大学農学部、宇都宮大学農学部植物病理学教室、北陸農業試験場病理学研究室、長尾研究所に厚く感謝の意を表する。なお本実験は文部省科学及試験研究費によつたものである事を附記する。

- (1) 藪田, 住木, 宇野 : 農化, 15, 1209 (1939).
- (2) 藪田, 住木, 片山, 本山 : 農化, 16, 1157 (1940).
- (3) S. C. HARVEY and V. HIGBY : Arch. Biochem., 30, 14 (1951).

Summary

Two strains of *Gibberella fujikuroi*, i.e., G-4 and As 6-7 were selected for the production of gibberellin in the submerged culture from twenty strains through the shaken culture method with or without the test pieces of metals. It was found that the amount of gibberellin produced was smaller in presence of even the stainless steel 18-8 than in the absence.

Submerged cultures were carried out with these strains in 150 l tank made of stainless steel 18-8. As the result, the production of gibberellin was nearly estimated to be corresponding to 8 μ g of the pure gibberellin A per 1 cc of the culture medium by the bioassay method. The chemical changes during each fermentation were shown in Figures 5~7.

醬油香氣成分に関する研究 (第 12 報)

生醬油の香氣成分 (その 1)

横 塚 保 (野田産業科学研究所)

昭和 28 年 4 月 14 日 受理

Studies on Flavorous Substances in Soy. Part 12. Flavorous Substances in Raw Soy.

By Tamotsu YOKOTSUKA (Noda Industrial Science Laboratory)

緒 言

筆者は前報迄に火香を含めた醬油香氣成分を求めて、醬油粕の水蒸気蒸溜液の有する香氣成分を明かにして来た。この方法により試料を多量に蒐集して従来未知の醬油香氣の幾つかの主要系列を明かにする事が出来たが、この方法では難揮発性物質の捕捉は困難であり、又加熱による或る程度の分解は避けられなかつた。之等の不備を補い、醗酵のみに由来する香氣成分を追求する目的から、生醬油の溶剤抽出物に含有する香氣成分を探索する事としたが、本報に於ては ether 抽出物の Al_2O_3 -liquid-chromatography を行い、主要溜分の分解物として粕の水蒸気蒸溜物中に証明した 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene (4-ethyl-guaiacol)⁽¹⁾ 及びその証明が不充分であつた vanillic acid⁽²⁾ 並びに粕の中からは分離しなかつた p-hydroxy-phenylethyl alcohol (tyrosol) その他不明の phenol 物質 $C_8H_9O_3$ 等を分離して、醬油芳香の少くとも 1 つの中心が phenol 性物質である事を証明した。此の中で vanillic acid は香氣の強い部分には関係が少いが、醬油の有する最も強い螢光成分として意義のある事が解つた。

実験並びに考察

1. **Chromatography 用試料の作製** 生醤油(丸小麦, 丸大豆にて仕込んだ純醸酵生醤油) 1 l を ether 200 cc で振盪機上に 30 分間振盪抽出を 2 回回復して得られた ether 液 2 l を注意して約 300 cc に濃縮してから, Ba(OH)₂ 飽和水溶液で振つて遊離酸性物質を除き(この生醤油の遊離酸性物質に就ては別報に譲る)その濾液に petroleum ether (bp. 40~50°) 約 200 cc を加えれば白色沈澱を生ずる。之を濾過し, 多量の熱 ethanol より再結晶して mp. 320° ca. (decomp.) の針状結晶約 0.1 g を得て, 元素分析の結果 C₁₀H₂₀O なる実験式を得た。

Calcd. for C₁₀H₂₀O : C 76.92, H 12.82. Found : C 76.98, H 12.67.

この物質は昇華性及び香氣は無く, 醤油香氣に対する関係は全く不明である。この沈澱の濾液は極めて強い良質の醤油香を有するが之をそのまま次の試料とする。

2. **Al₂O₃-liquid chromatography による香氣成分の分離** 上記の試料を直径 1.5 cm, 長さ 15 cm の Al₂O₃ (Blockmann 製) 塔を流下せしむれば, 流出液は殆んど香氣がない。吸着塔は, 最上部の約 0.5 cm が褐色を呈する以外に色彩的に明瞭な band はない。然し螢光燈により塔の上半は紫色系, 下半は緑色系の螢光を示す。之を ether, ether+ethanol (1:1), 1% H₂SO₄ 水溶液, 水, 1% NaOH 水溶液等で順次に溶出せしめ, 各種の溶剤に於て溶出液が完全に無色となるに及んで次の溶剤に変え, 同一種溶剤の溶出液は約 30 cc 毎に受器を変え, 最後に香氣及び溶液の色の同程度のものを合して分類を簡素化し, 次いで H₂SO₄ 水溶液溶出液はそのまま, NaOH 水溶液溶出液は H₂SO₄ 酸性としてからそれぞれ ether 抽出を行い Table 1 の如き結果を得た。即ち香氣的には ether 溶出部が強く, 就中 E3, E4 が最も強く且つ良質である。(ether+ethanol) で溶出される部分(溜分 EA)は香氣は良質であるが強さ及び収量が低く, 1% H₂SO₄ 溶出部(溜分 S)は香氣

Table 1. Liquid-chromatography of Ether Extract of Raw-Soy.

Sign	Developer	Color of developed sol.	Degree of flavor	Fluorescence	Yield (g)
E1	ether	pale yellow	+	+	0.12
E2		yellow	+	+	
E3		yellow	+	+	
E4		pale yellow	+	+	
EA1	ether + ethanol (1:1)	pale yellow	+	+	0.01
EA2		yellow	+	+	
EA3		orange	+	+	
EA4		pale yellow	+	+	
S1	developed by aq. 1% H ₂ SO ₄ , then extracted by ether.	pale yellow	+	+	trace
S2		red	+	+	
S3		yellow	+	+	
S4		pale yellow	+	+	
N1	developed by aq. 1% NaOH, then acidified and extracted by ether.	pale yellow	+	+	trace
N2		orange	+	+	
N3		yellow	+	+	

は弱いが以上とは別種の芳香を有し, 1% NaOH 溶出部は溜分 S に類似する。而して全溜分共に若干の螢光を有するが就中 S2 が圧倒的に強い。以上の香氣は殆んど全部が alkali により容易に崩壊する。本表は数次の実験の中から代表的な 1 例を挙げたに過ぎず, 実際には 1 回の chromatography に用いた生醤油の量は 5 l, 10 l, 20 l, 40 l と逐次量を増したが, 5 l に就て行つた本実験が成分の分離に関しては最も良好の結果を示した。

3. 溜分 E1 E1 から多量の針状結晶

晶が析出したので濾過し, 沸騰 ethanol より再結晶すれば前項で述べた mp. 320° ca. の物質であつた。此の濾液を 1% NaOH 水溶液で振り水溶部を酸性にして ether 抽出したものを酸として paper chromatography を行つた結果 acetic acid のみを認めた。然し遊離の酸は初に除いてあるから, この acetic acid は解離し易い ester の分解物と考えるべきである。

4. 溜分 E2 から多量の結晶が出たが, 融点が非常に低く何物とも判明しなかつた。E2 に 5% NaOH 水溶液を室温に於て作用せしむれば約 5 分後に香氣は一変する。之を H₂SO₄ 酸性にすれば初とは全く異つた phenol 的醤油香を示す。仍つて再び alkali 性とし, 若干加温して充分加水分解せしめ, 再び酸性部をとりその ether 溶液を直径 2 cm, 長さ 10 cm の Al₂O₃ 塔を流下吸着せしめ, 吸着塔を ether にて溶出し 9 溜分に分てば, 初の第 3 溜分迄は FeCl₃ 反応 (+) で, 就中第 2 溜分は最も強く褐赤色を呈し(conc. H₂SO₄ + vanillin)では深赤色を呈し, 香氣もこの溜分が最も強い。これを第 10 報⁽²⁾の方法即ち (butanol 10 + ethanol 1 + H₂O 2 + Conc. aq. NH₄OH 0.5) を展開剤として上昇法にて paper chromatography を行い, 赤血塩 0.5% 水溶液及び Fe₂(SO₄)₃ 10% 水溶液にて発色せしめ, phenol の検索を行つた結果, 該物質は粕の水蒸気蒸溜物中に確実に証明した⁽¹⁾1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene (R_F = 0.94~0.96) である事が証明された。

第 4 溜分以下は何れも黄色の蠟様物質で, 95°/17 mm で殆んど全部蒸溜してから methanol より反復結晶を

行い mp. 60~61° の雲母状晶を得て、元素分析の結晶より palmitic acid である事が判明した。

$C_{15}H_{31}COOH$ mp. 60~61° (Lit. 62°) Calcd.: C 75.19, H 12.32, Found: C 75.0, H 12.50.

加水分解物として著量の、以上の 2 物質の他は認められないから溜分 E2 の成分としては 1-palmitoxy-2-methoxy-4-ethylbenzene の存在の可能性もあるが、前報迄の粕の場合の証明に鑑みて上記の溜分は 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene の phenol ester と ethyl palmitate との混合物と考えるのが妥当である。

5. 溜分 E3 (i) 香氣は E2 に類似するが更に強く全溜分中最も良質である。5% NaOH 水溶液を加うれば E2 に比較し一層容易に溶解し香氣は消失する。此の 1 部をとり酸性にしても再び初の香氣は戻らないから、試料は phenol ではなく phenol ester と考へべきである。之にほぼ等量の ethanol を添加し、湯浴上に数分加温すれば液は深赤色となり (1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene の存在を示す) 30 分加温後 ether 抽出して中性部を除く。中性部は殆んど固化し微量であるが快香を有する。

(ii) 加水分解酸性部は極めて強い火入醤油香を示し、之のみで醤油芳香の大半を示すと言つても過言ではない。此の 1 部をとり水飽和 butanol に conc. NH_4OH 水溶液 1% を添加した溶液中に於て前法に準じて paper chromatography を行えば、合成品を control として、1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene ($R_F=0.98$) と *p*-hydroxy-phenylethyl alcohol (tyrosol) ($R_F=0.88$) の他に微量ではあるが明瞭な $R_F=0.49$ なる不明の phenol 物質を認め、酸としては acetic acid と benzoic acid 附近に不明瞭な spot を認めた。

(iii) 加水分解酸性部より *p*-hydroxy-phenylethyl alcohol の分離: 加水分解酸性部を NH_4OH 水溶液にて中和し $Cu(OH)_2$ を作用せしむれば綠色化し Cu -salt の生成を見る。これを ether 抽出し Cu -salt を作らぬ phenol 部を分離する。この phenol 部の得量は 6.5 mg で芳香と螢光を有し全部結晶化する。之を 95~100°/17 mm にて減圧昇華し tone plate にて乾燥してから dil. methanol より反復再結晶し mp. 89.5~90.5° の針状晶 (monoclinic) を得る。之は次の諸性質を示す

a. 元素分析により $C_8H_{10}O_2$ なる実験式を与える。Calc. for $C_8H_{10}O_2$ C 69.53, H 7.30, Found C 69.65, H 7.49.

b. RAST 法 (Camphor 使用) により分子量を測定すれば $M=139.3$ を与えるから分子式は $C_8H_{10}O_2$ ($M=136$) である。

c. 試料と tyrosol (mp. 88~90°) (tyrosine から醗酵法⁽³⁾ により合成す) との等量を混融すれば混融点 88~90° を示し、融点降下は全くない。

e. Diazonium 反応を強く現すから、試料は OH 基に対し para 位或は ortho 位が空いている。而してその色は紅紫褐色であるから phenol 基 (褐色系) の他に alcohol 基 (紫色系) が存在する。

f. 微かに芳香と螢光を有するが、之は再結晶により逐次減少したものであるので恐らく極めて微量の不純物に基因するものとする。

以上により試料は確実に既に湯川⁽⁴⁾ が生醤油から分離した *p*-hydroxy-phenylethyl alcohol (tyrosol) であるが (同氏はこの物質の benzoate の mp. 111° なる事と phenol の呈色反応から本構造を推定した) 上記の諸結果より本物質の大部分が ester 状をなしている事はほぼ確実である。

(iv) 加水分解酸性部より得られた Cu -salt は水溶部と難水溶部に分け、前者より著量の acetic acid、後者より微量の palmitic acid を検出した。

以上を要約すれば、全溜分中で香氣の強い溜分 E3 の加水分解物より phenol として著量の 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene と *p*-hydroxy-phenylethyl alcohol 及び酸として acetic acid, palmitic acid 並びに benzoic acid (不確実) を認めた。故に E3 の成分は以上の phenol 及び phenol alcohol と、acetic acid, palmitic acid (benzoic acid) の何れかとの ester 結合物質であると断定出来る。然しここでも又 palmitic acid は前報迄の結果より見て ethyl palmitate と考へるべきかも知れない。而して上記の加水分解物が原物質よりも強い醤油香を有する事は、一方之等が加水分解し易い事より見ても、醤油火香の 1 つの発生経路を示すものと思われる。

6. 溜分 E4 E4 も E3 と殆んど同程度の強い香氣を有する。この物質を 100°/17 mm にて減圧昇華すれば約 1/5 量の結晶を混じた蠟様物質を得る。Tone plate で油分を除いたものを dil. methanol より再結晶す

れば mp. 58~59° に殆んど止る。この結晶は FeCl_3 反応 (卅) 赤橙色、螢光 (卅) 青紫色でかなり強い快香を有するが何物とも判明しないので室温に 3 カ月放置した結果、結晶上に全く形の異つた結晶が昇華析出し明かに分解したので methanol より再結晶した処、 FeCl_3 反応の全くない mp. 123° の物質を得て、元素分析及び paper chromatography より benzoic acid である事が判明した。Calcd. for $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$: C 68.85, H 5.00. Found: C 68.93, H 5.90.

又此の濾液は初に無かつた強い醬油香を有し此の点よりも分解物である事が明かであるが、paper chromatography より 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene が確認されたので初に得られた物質は benzoic acid ではなく、粕の場合にその存在を推論した 1-benzoyloxy-2-methoxy-4-ethylbenzene (合成の結果本物質が上記と全く同様の mp. 58~59° を有する事を確認した) であると思われるが、再び結晶を得て元素分析するに到らない。

7. 溜分 EA1~EA4 Al_2O_3 の chromatogram を ether に次いで (ether+ethanol) (1:1) で溶出せしめた溜分は、前者と異り甘い快香であるが、やはり 5% NaOH 水溶液に溶解して香気を消失する。之を前項の様に軽度の加水分解をして得られた酸性部は milk 様の芳香を有し FeCl_3 反応は強く、溜分 E と異り紫色~紫橙色を示す phenol 性物質である。この酸性部を前法に準じ paper chromatography を行えば EA1 には僅かに 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene 相当の spot が残るが、EA3 には該物質は認められず、その他は何れにも著量の $R_F=0.139$ なる物質 (之は後に到り vanillic acid と判明す) が見られた。EA2 及び EA3 より数日後無色針状晶を析出し、溶液部は美麗な赤紫色色素を生じたので tone plate で油状部を除き結晶を 95°/17 mm で減圧昇華した結晶を methanol より 3 回再結晶し mp. 180~183°, FeCl_3 反応 (卅) 橙赤色の結晶を得たが、paper chromatography よりやや不純な vanillic acid と認めた。

8. 溜分 S2 次で 1% H_2SO_4 水溶液で溶出せしむれば S2 に於て溶出液は急激に赤色液になる。之を ether 抽出したものは弱い芳香を有する粘稠液で FeCl_3 反応 (卅) 褐赤色である。得量 0.03 g. 之を温水に溶解し多量の活性炭で処理し desiccator 内に 2 週間放置すれば逐次針晶を析出し、殆ど全部結晶化するに到る。之を前項の如く減圧昇華と再結晶法により精製すれば mp. 185~192° に殆んど止り、次の諸点から vanillic acid (3-methoxy-4-hydroxy-benzoic acid) (Lit. mp. 207°) に他ならぬ事が判明した。

(i) 元素分析値は $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ なる実験式を与える。Calcd. for $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$: C 57.14, H 4.86. Found: C 56.60, H 5.14.

(ii) RAST 法 (camphor) により分子量を測定すれば $M=169.7$ を定め得て、 $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ ($M=168$) なる分子式が得られた。

(iii) 前法に準じ酸と phenol の両面より paper chromatography を行えば、vanillic acid を control として 3 者全く同一の $R_F=0.116$ を示した。

(iv) 試料 (mp. 185~192°) と 合成 vanillic acid (mp. 205°) とのほぼ等量を混融すれば全く融点降下なく、混融点 200~203° を示す。

(v) 前記の赤血塩と硫酸鉄との反応の他に Diazonium 反応 (卅) 紫褐色、MILLON 反応 (卅) 黄色である等、試料は明かに phenol である。

(vi) BPB で青色を示し、重曹水を発泡し、容易に Na, NH_4 , Ag, Cu 等の塩を生ずる故、-OH 基の他に -COOH 基を有す。

(vii) 極めて強い緑色~紫色の螢光を有す。

(ix) 130~150°/17 mm で容易に昇華するが昇華したものは若干分解して融点が降下し、且つ弱い milk 様の香気を発す (之は合成 vanillic acid に就ても同様である)。

以上により溜分 S2 より得られたこの結晶物質は vanillic acid であるが、初に試料から遊離酸性物質は除いてあるから、ここに得られたものは操作の過程に於て分解を受けて生じたものと考えられる。又 Table 1 の如く S2 が全溜分中最も強い螢光を示すのは本物質に基因するものであるが、他方 S2 の香気は余り強くない点より見て本物質の香气的役割は余り大ではないと考える。

9. 溜分 S3 S2 と異なり香気が比較的強く、且つ FeCl_3 反応は (卅) で、而もその色調は前者と異なり

安定な暗緑色であるばかりでなく、同色の沈澱を生ずる。試料を methanol に溶かし $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ を加うれば直ちに著量の黄色沈澱 0.08 g を生じ、之を H_2SO_4 酸性で ether 抽出し dil. methanol 及び活性炭にて処理し mp. $250\sim 260^\circ(\text{decomp.})$ の若干不定形星形結晶 2.5 mg を得た。此の物質は水にも ethanol にも比較的難溶で $150^\circ/17\text{ mm}$ では昇華もしないが、ethanol 溶液は FeCl_3 により安定な強い暗緑色を呈し、その ether 溶液は紫緑色の螢光が強い。元素分析値は $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_3$ に一致する。Calcd. for $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_3$: C 64.00, H 4.03. Feund: C 63.74, H 4.28.

以上により本物質は ortho 2 個の phenol 系物質と想像され、S3 の香氣から香氣的にも相当重要な物質と考えられるが詳細は判明しない。

10. 溜分 N1~N3 最後に 1% NaOH 水溶液で溶出し、 H_2SO_4 酸性として ether にて抽出したものは収量は比較的多く、その中から vanillic acid の結晶以外に何物をも得ていないが、香氣は薄く重要とは思われない。

要 約

1. 全く加熱変化を受けぬ生醤油香氣成分を求めて、生醤油の溶剤抽出物の Al_2O_3 の liquid chromatography を行つた。

2. 香氣の最も佳良なる溜分の分解物として、1-hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene, *p*-hydroxy-phenylethyl alcohol, acetic acid, palmitic acid, benzoic acid が得られたから、醸造生醤油の有する芳香物質の少くとも 1 つの主体は、上記の諸物質間の解離し易い ester の中に存在する。

3. これらの加水分解物は原物質より遙かに強い醤油香を有するから、これらが生醤油火入の際に加水分解を受け phenol 性火香の発生に関与するものと推論する。

4. 粕の水蒸気蒸溜液中にその存在を推定した 1-benzoyloxy-2-methoxy-4-ethylbenzene (mp. $58\sim 59^\circ$) がほぼ確実に分離されたが最後の証明には到らない。

5. Vanillic acid が、比較的香氣は薄く、一方螢光の最も強い溜分の分解物として得られたので、之は前報迄に想像した程は香氣的に重要でないが、醸造醤油の有する螢光成分の中心をなす事が証明された。

6. 以上の他に、ortho 2 個の phenol と思われる $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_3$ (mp. $250\sim 260^\circ(\text{decomp.})$) や、何物とも判明しない $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}$ (mp. $320^\circ\text{ ca.}(\text{decomp.})$) が得られたが、之等の香氣に対する関係は不明である。

本研究は東京大学住木諭介教授の終始御懇篤なる御指導の下に進められている。又同時に坂口謙一郎教授、朝井勇宣教授、並びに野田産研所長茂木正利博士よりも不断の御指導を辱くした。元素分析は科学研究所微量分析室の労を煩わし、実験に当り同室の滝本清氏の御協力に負う処が多い。なお本研究は野田醤油株式会社の理解ある御援助とその費用の 1 部は昭和 27 年度文部省科学試験研究費に據るものである。(昭和 28 年 4 月、日本農芸化学大会にて発表)

(1) 著者 農化 27, 276 (1953).

(3) 中沢亮治著: 醸酵工業便覧, 331 頁(1949).

(2) 著者: 農化 27, 334 (1953).

(4) 湯川又夫: 東京化学会誌, 38, 358(1917).

Summary

The flavourous substances in raw-soy were investigated by Al_2O_3 -liquid chromatography. 1-Hydroxy-2-methoxy-4-ethylbenzene, *p*-hydroxy-phenylethyl alcohol, acetic acid, palmitic acid and benzoic acid were proved as the hydrolytic decomposition products of the fraction, of which flavor was strongest of all fractions.

Vanillic acid was isolated from an other fraction, of which fluorescence was strongest. Beside them, $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_3$ (mp. $250\sim 260^\circ$), $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}$ (mp. 320° ca.) were isolated, but their relation to the soy-flavor has not been known.