本研究を行うに当り終始御指導を頂いた本研究室の大島康義教授に深く感謝すると共に、有益な御教示を頂いた福岡女子大の白川正治教授及び東北大の麻生教授に感謝する。

- (1) 中林：農化，27，813 (1953).
- (2) J. BONNER：Plant Biochemistry, 201~202 (1950).

Summary

The polyphenol oxidase activity of the acetone-prepared powder of apple fruit has been studied. The polyphenol oxidase peculiarly oxidates the *o*-diphenol compounds, i. e. chlorogenic acid, catechins, and catechol (Table 1), and is inhibited with thiourea, CO, and NaCl (Fig. 2). The inhibition with CO does not recover by the irradiation of light (Fig. 2). The peroxidase activity of this powder is not inhibited but accelerated with NaCl (Fig. 3).

For the purpose of the studies on the terminal oxidase of the respiration of apple fruit, the slice of fresh fruit has been used and the O₂ uptake and the CO₂ output have been determined (Fig. 4 and Table 2). The influences of some substances to the respiration quotient are as follows:

By the addition of polyphenol compounds to this slice, the O₂ uptake increases temporarily but soon after retraces the normal O₂ uptake, and the CO₂ output is not affected (Fig. 5). The *p*-nitrocompounds, i. e. *p*-nitrophenol and *p*-nitrocatechol which are peculiar inhibitor to the polyphenol oxidase, do not inhibit the respiration (Fig. 5). The inhibition by KCN is very remarkable and the inhibition by CO is recovered by the light (Fig. 6).

From these results, it is suggested that the terminal oxidase of the respiration of apple fruit is not polyphenol oxidase but cytochrome oxidase and the browning of apple fruit is owing to the oxidation of chlorogenic acid and catechins with polyphenol oxidase unrelatedly with the respiration of fruit.

糖蜜の酒精發酵に関する研究 (第 1 報)

糖蜜の非發酵性還元物質について

七字三郎，御園光信（工業技術院發酵研究所）

昭和 28 年 11 月 6 日 受 理

Studies on Alcohol Fermentation of Molasses. Part 1. Unfermented Reducing Substances in Molasses

By Saburo SHICHIJI and Mitunobu MISONO

(Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology)

緒 言

先に七字等⁽¹⁾は糖蜜の加熱による諸影響を試験し、2~3 kg 程度の加熱となると全糖の欠減を生ずるが、1 kg 前後までは多少なりとも増値し、且アルコール収率も上ること、並びに適宜の加圧は却つて糖蜜醗のスケール及び亜硫酸除去上に効果あること等を報告した。又小野、御園⁽²⁾も醗の pH 3.0~5.0 で常圧乃至 1 kg 60 分間、或いは pH 5.0 で 1.5~2 kg 30 分間の加熱では醗歩合は低下せずと報告している。ZERBAN⁽³⁾ も又糖蜜を酸処理して加熱した場合、還元力は糖無水物又は糖アミノ酸の縮合物の加水分解により醗性糖が増加する為増大するが、加熱時間が長くなると醗性糖の破壊の為還元力は減少してくるとしている。かくの如く加熱は醗性糖の増加或いは不醗性糖の減少に関係ありと推定される。

既に糖蜜の非醗性還元物質に関しては幾多の研究があり、内 PICTET, CHAVAN⁽⁴⁾、又 SCHLUBACH, BEHRE⁽⁵⁾ は *d*-fructose anhydrides は酸によつて緩かに加水分解されるのが特徴であると論じ、MATHEWS, JACKSON⁽⁶⁾ は *d*-fructose anhydrides から成立つ非醗性還元物質は稀酸処理によつて一部転化して *d*-fructose になるといつている。即ち 60° で塩酸加熱の場合還元力は約 10% 増加し、100°, 1 hr. では 7.4~14.3%, 4 hrs. では 28% まで増加するとしている。その他 ZERBAN⁽⁷⁾ は糖蜜中の非醗性物質と見られる melanoidin には一種類の型があるばかりでなく数種の異つた化合物の混合物であり、その中に酸加水分解により醗性糖を生ずる糖があると述べている。

著者等は糖蜜の加熱による糖への影響を追求したく、主として JACKSON, MATHEWS⁽⁸⁾ 及び ZERBAN⁽⁹⁾等の方法を参考として、非醱酵性還元物質を測定し、加熱条件により醱酵性糖の増加、消長並びにその糖種類の測定により、これらの原因を調べたので報告することとした。

実 験 の 部

1. 糖蜜の非醱酵性糖定量法の決定 糖蜜の非醱酵性還元物質の定量については ZERBAN⁽⁹⁾ が詳細に検討し報告しているが、筆者等は ZERBAN の方法を適当と考え、酵母として A, 乾燥酵母, B. *Sac. formocensis*, C. *baker's yeast* (FLEISHMAN) の 3 種について醱酵力を比較し、その使用を決定することにした。

実験 1. Zerban 法の使用酵母選択 ZERBAN 法は 8~12% 濃度の糖蜜に *baker's yeast* を大量添加し、醱酵終了後これに中性醋酸鉛を添加し、鉛を蔭酸加里で divert せるものについてその還元力を測る。実験方法：供試酵母量は培地 50 cc に対し B, C はそれぞれ 4%, A は 2g, 5g とした。培地糖蜜 (全糖 10.120%) に対する供試酵母による醱酵終了後、中性醋酸鉛 20% 溶液 10 cc を加え、蛋白質を沈澱せしめ 100 cc の一定量とし、濾過後蔭酸加里 0.3 g を添加し、鉛を濾別した濾液について semi-BERTRAND 法で還元力を測定比較した。実験成績：非醱酵性還元物質の測定値 (glucose %) は 2g 使用の場合 (A) 0.8188, (B) 0.8172, (C) 0.8208 となり、(A) の 5g 使用の場合は 0.8172 であった。

考 察 糖蜜の非醱酵性還元物質測定に ZERBAN 法適用上、使用する酵母は入手し易く使用便宜な乾燥酵母で満足出来ることが分つた。即ち供試 3 種酵母間に殆んど差がなく且乾燥酵母の量も 2, 5g いずれでも差がないので、爾後の実験はすべて対価 4% (2g) の乾燥酵母で行うことにした。

2. 糖蜜の加熱による非醱酵性還元物質への影響 加熱の各種条件により含有非醱酵性還元物質の影響を ZERBAN 法により次の実験に於いて試験した。

実験 2 糖蜜の加熱による非醱酵性還元物質への影響 実験方法及び成績等は一括して次に示す。

	試料全糖	加 熱 条 件	糖 測 定 法	成績掲示
常圧加熱	10.365	50, 80, 100°—0.5, 1, 2, 3, 4, 6 h.	ZERBAN 法	Fig. 1
加圧加熱	9.152	1 kg—10, 30, 60 min. 2 kg—10, 20, 30 min.	//	Fig. 2

(常圧加熱は湯浴中逆流冷却器付, 加圧加熱はオートクレーブ中)

Fig. 1. Decrease of Unfermented Reducing Sugar by Heating of Molasses (low heating).

a : heating at 50°
b : " 80°
c : " 100°

Fig. 2. Decrease of Unfermented Reducing Sugar by Heating of Molasses (high heating)

a : heating at 1 kg
b : " 2 "

考 察 1) 供試糖蜜は比較的低加熱でも無加熱に比して、非醱酵性還元物質対全糖の比率は減少を示し、80°, 2 hrs. で 0.35%, 100°, 2~3 hrs. で 0.35~0.5% の如く、又 100°, 6 hrs. の如き長時間加熱での例でも 0.7% 程度の減少を示し、これが醱酵性糖に転化したものと考えられる。然し長時間加熱の際には前糖値自体の分解が考えられるが、この点七字等⁽¹⁾ が先に述べた如く、1 kg 加圧短時間程度では全糖値は増加しても減

少することはないので、50°, 80°, 100° の 2 hrs 程度では全糖値は不変と考えてよいようであるが、なお次の実験 3 に於いて詳しく検討したい。

2) 加圧加熱の場合は 1 kg, 10 min. の如き短時加熱でも又 1 kg, 30 min. でも 1.2%, 2 kg, 30 min. では 1.9% の如く非醱酵性還元物質対全糖の比率は減少を示した。而も全糖値への影響は実験 2 と同様と考えられるが、加熱条件の高くなつた場合については次項に於て検討する。

3. 糖蜜の加熱による非醱酵性還元物質と全糖値への影響 前実験に於て加熱条件の高い際に非醱酵性還元物質が著しい減少を示したが、かかる場合は全糖値の減少も見込まれるのでこの間の関係を明らかにせねばならない。著者等は前実験同様の加熱条件下で糖蜜の全糖値並びに非醱酵性還元物質の消長を同時に測定し、両者の増減の結果として醱酵性糖増減への影響を試験した。

実験 3 糖蜜の加熱による非醱酵性還元物質及び全糖への影響 A. 変性糖蜜 (全糖 8.90%) 並に B. 未変性糖蜜 (全糖 12.28%) より調整した 2 種の糖蜜醪 150 cc について還流冷却下油浴中 100° にて 10, 30, 60, 120, 180 min. の各時間に亘り加熱せるものについて、前実験と同様に非醱酵性還元物質並に常法による全糖値

Table 1. Effects of Heating on Unfermented Reducing Sugar and Total Sugar of Molasses.

	Heating	T.S. %	T.S. dec- reased %	U.F.S. %	U.F.S. de- creased %	increase of F.S. %
Denatured Molasses A.	0(Cont.)	8.90	—	0.7028	—	—
	10min.	9.90	0	0.7024	0.0004	0.0004
	30	8.868	0.032	0.6624	0.0404	0.0084
	60	8.849	0.051	0.6020	0.1008	0.0498
	120	8.813	0.087	0.5756	0.1272	0.0402
	180	8.715	0.185	0.5668	0.1360	0.0490
Undenatured Molasses B.	0(Cont.)	12.280	—	0.6840	—	—
	10min.	12.280	0	0.6762	0.0078	0.0078
	30	12.252	0.0280	0.6448	0.0392	0.0112
	60	12.250	0.0300	0.6264	0.0576	0.0276
	120	12.247	0.0330	0.6264	0.0576	0.0246
	180	12.238	0.0420	0.6064	0.0776	0.0356

T.S.—Total sugar, U.F.S.—Unfermented reducing sugar, F.S.—Fermentable sugar

をそれぞれ測定した。

実験成績：一括して Table 1 に示す。

考 察 ZERBAN の報告では pH 0.2 で糖蜜を加水分解した際 100° 5 min., 80° 15 min., 60° 60 min. のものが全糖値の最高を示し、以下漸減するとしている。本実験では供試 A 糖蜜の pH 5.25 (pH メーターによる), B 糖蜜の pH 6.2 の如くやや高位のものであるが、Table

1 の示す如く全糖値は加熱条件に応じて少量ながら減少を示した。然し加熱 10, 30, 60 min までは非醱酵性還元物質の減少が全糖減少より多量であり、120 min よりは逐次減量し、180 min ではこの関係が逆となり全糖減少の方が多量となつた。しかるに B 糖蜜の場合は酸度低い為加熱 10 min より 180 min まで醱酵性糖の減少率は常に全糖減少値より多くなっている。以上の結果より A 糖蜜では加熱時間 60 min が差引醱酵性糖の増加を示しており、B 糖蜜では 180 min に至つてもなお醱酵性糖が加水分解により増加しているという事がわかつた。

4. 糖蜜加熱の際の Glucose と Fructose の消長 以上の実験から糖蜜加熱の影響として加熱条件によつては非醱酵性還元物質の減少となり、結果的に醱酵性糖の増加するということが認められた。著者等はかかる条件下に増加生成された醱酵性糖についてその種類、量比等に関し検討することとした。

対象糖蜜：— A. 変性蜜。B. 未変性蜜。C. 長期保存変性蜜。

実験方法：— 下記の如く主として JACKSON-MATHEWS⁽⁸⁾ 法により、同時に ZERBAN-ERB⁽⁹⁾ 法を参考とした。

全糖及び直糖の定量は LANE-EYNON⁽¹⁰⁾ 法により、fructose の定量は前記 JACKSON-MATHEWS 法による。即ち試薬 I ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 25.3 g を水 1 l に溶解) の 5 cc に試薬 II (K_2CO_3 312.5 g と KHCO_3 125.0 g を水 1 l に溶解) の 20 cc を採り、検糖液として醱酵前のものは 40 倍稀釈液の 10 cc を、醱酵後のものは 20 倍液 10 cc を加え 55° 75 min 加温後、酸化銅を定量算出する。

本法に於いて sucrose の還元力は $\text{mg Cu} = 3.32 S - 0.315 S^2 + 0.27$ (S は 20 cc 溶液の sucrose g 数) より、10% 濃度の糖蜜中に半量在るものとしても $\text{mg Cu} = 3.27$ の如き僅少となり、一応無視することとした。又 maltose が存在するとしても、その含量は対未変性蜜 (全糖 12.30%) で 0.258%, 対変性蜜 (全糖 12.72%) で 0.317% という如く僅少であつたので、これも一応本試験では無視することとした (測定は乾燥酵母と Sac. *Praecisus* 使用による)。

実験 4 糖蜜加熱による Glucose, Fructose の消長 実験方法及び成績等は一括して次に示す。

	全 糖	加 熱 条 件	測 定 法	成 績
A 比 島 産 変 性 蜜	12.62	100°-0, 30, 60 min.	J-M 法, Z-E 法	Table 2, A, Fig. 3 A, Table 3
B // 未 変 性 蜜	13.09	// //	J-M 法	Table 2, B, Fig. 3 B.
C // 長 期 保 存 変 性 蜜	9.25	100°-0, 1, 2, 3, 5 hrs.	J-M 法	Table 2, C, Fig. 3 C.

(変性蜜は硫酸 1%, 硫酸 0.5% 各対原糖蜜添加のもの。長期保存は約 5 年間。)

Table 2. Decrease of Unfermented Reducing Sugar and Increase of Fructose and Glucose in Molasses by Heating (by JACKSON-MATHEWS Method).

Heating	Sample	l mg/ 100cc	T 25 cc	T x l	Fr. %	D.S. kg/100cc	Fr. mg /100cc	Gk. mg /100cc	T.S. glucose %
A. Denatured Molasses	0 (Cont.)	b. F.	3,020	43.1	65.08	47.82	5,788	2,766	12.49
		a. F.	600	31.3	93.90	72.24	804	580	
		diff.	—	—	—	—	4,984	2,186	
	30 min.	b. F.	3,384	38.5	65.14	48.02	6,486	3,113	12.49
		a. F.	556	32.9	93.53	71.88	766	549	
		diff.	—	—	—	—	5,720	2,564	
	60 //	b. F.	3,640	36.5	65.77	48.56	6,820	3,307	12.45
		a. F.	533	34.9	93.07	71.48	722	515	
		diff.	—	—	—	—	6,098	2,792	
B. Undenatured Molasses	0 (Cont.)	b. F.	3,136	41.7	65.38	48.12	5,978	2,875	12.92
		a. F.	588	32.8	96.48	74.31	796	591	
		diff.	—	—	—	—	5,182	2,284	
	30 min.	b. F.	3,136	41.5	65.81	48.46	6,086	2,945	12.89
		a. F.	544	35.0	95.34	73.10	721	527	
		diff.	—	—	—	—	5,365	2,418	
	60 //	b. F.	3,136	41.4	65.82	48.47	6,087	2,952	12.82
		a. F.	511	37.7	96.32	74.06	670	495	
		diff.	—	—	—	—	5,417	2,457	
C. Long stored Molasses	0 (Cont.)	b. F.	2,454	29.6	72.52	54.46	4,206	2,290	9.652
		a. F.	551	25.8	71.10	53.38	969	517	
		diff.	—	—	—	—	3,337	1,773	
	1 hr.	b. F.	2,617	27.6	72.22	54.23	4,508	2,445	9.536
		a. F.	354	84.0	60.31	44.04	729	320	
		diff.	—	—	—	—	3,779	2,125	
	5 //	b. F.	3,363	21.3	71.71	53.93	5,847	3,153	9.412
		a. F.	304	88.5	58.52	42.41	645	273	
		diff.	—	—	—	—	5,202	2,882	

These were calculated from JACKSON-MATHEWS Table.

b. F.-before Fermt. a. F.-after F., diff.-difference, l-apparent fructose, T-titers for 25 cc, Fr-Fructose, Gl-glucose, D.S.-direct reducing sugar, T.S.-Total reducing sugar.

Table 3. Effect of Heating on Fructose and Glucose in Molasses (ZERBAN-ERB Method).

Heating	Sample	R ₁ mg/100 cc	R ₂ "	Fr. "	Gl. "	D.S. "
0 (Cont.)	b. F.	3,020	5,631	2,773	3,012	4,987
	a. F.	600	764	583	215	
	diff.	—	—	2,190	2,797	
30 min.	b. F.	3,384	6,276	3,115	3,339	5,689
	a. F.	556	734	538	227	
	diff.	—	—	2,577	3,112	
60 //	b. F.	3,640	6,617	3,367	3,447	6,088
	a. F.	533	692	516	205	
	diff.	—	—	2,846	3,242	

R₁-apparent fructose by JACKSON-MATHEWS method, R₂-direct reducing sugar (glucose) by LANE-EYNON method.

a-ratio of glucose by LANE method. R₁=0.0806 Gl, R₂=Gl+aFr

考 察 1) 糖蜜加熱の際の液中 glucose, fructose の消長を試験した結果, Table 2 A に示す如く, 変性糖蜜では含有される酸の影響を強く受けて二糖類が転化して glucose, fructose の生成されていることは明瞭である. 併しながらこの両者の量的には fructose が glucose に比し常に増加していることが分つた. この関係は同種糖蜜についての ZERBAN-ERB 法による成績 (Table 3) に於いても全く同一であつた.

2) 未変性糖蜜について同目的の実験成績 (Table 2. B) では, 加熱分解による直接還元糖の増加は変性糖蜜に比して少いが, 直接還元糖増加分は殆んど fructose であることが分つた.

3) 変性後長時日を経た保存糖蜜について行つた結果 (Table 2. C), 非醱酵性還元物質が多量に存することが認められ, その加熱せるものの fructose 遊離率は更に著しい。このことは貯蔵により増加した非醱酵性還元物質は, 加熱によつて醱酵性糖に還元し得るものが多いことを示すものと云える。以上で糖蜜を加熱した場合, 直糖の増加すること, その内 fructose の増率は常に高く且主なるものであることなどが分つた。

4) 糖蜜中に存する raffinose の稀酸分解による fructose が, この際の fructose 増加の因に関係することも考えられるが, 実験 1 に示す通り *Sac. formocensis* 並びに乾燥酵母を使用の際に非醱酵性還元物質の量が変わらず, 又 *Sac. formocensis* が, affrose を醱酵することが分つているので, この影響は小さいものと考え。故に fructose は他の非醱酵性還元性物質から生成されているものと考察したい。

5. 醱酵終了醱酵糖の加水分解による

glucose, fructose の消長 醱酵終了の糖蜜醪についてその残全糖と論ぜられているものの中には, 二次的な糖分解処理によつて更に醱酵性糖が生成することを推定出来るので, ここでは熟成醪の塩酸加水分解によつて得られた残糖液について前報に準じ生成糖種及び量を検討することとした。

実験 5 糖蜜熟成醪の加水分解による残糖の消長 実験方法: 糖蜜(全糖 7.25%) の常法による醱酵終了の熟成醪に対し更に乾燥酵母を 5% 添加し, 24 hrs. 30° に放置した後, 酵母を遠心分離して醱酵終了の醪とする。この 125 cc につき塩酸をもつて pH 1.8 として油浴中 1 hr. 還流冷却器を附して加熱せるものを, 苛性曹達で中和し pH 4.2 とし, これを 250 cc にうすめて試料とする。これに対し対照としては前記熟成醪の未加水分解のものを当てた。

この両者につき ZERBAN-ERB 法により直接還元糖, fructose 系, glucose 系の還元物質を測定して熟成醪の加水分解による増加影響を試験した。実験成績: Table 4 及び Fig. 3. D に示す通り。

Table 4. Effects of Heating on Residual Sugar of fermented Molasses Mash by hydration.*

Heating	Sample	R ₁ mg/100cc	R ₂ "	Fr. "	Gl. "	D-S. "
0 (cont.)	b. F.	148.0	202.8	143.15	60.23	203.38
	c. F.	146.0	197.2	141.47	56.31	197.78
	diff.	—	—	1.68	3.92	5.60
100°~1 hr.	b. F.	182.4	232.2	177.97	55.01	232.98
	a. F.	129.1	173.2	125.20	48.51	173.71
	diff.	—	—	52.77	6.50	59.27

* by ZERBAN-ERB Method.

相当している。即ち対照の熟成醪の直接還元糖 203.38 mg に対し, その加水分解後のものは直接還元糖で 26.39 %, fructose で 25.12% の増加を示したことになる。以上の如く糖蜜熟成醪に於てもその残糖を加水分解することにより fructose が生成されることが明らかとなり, 逆に熟成醪の残糖には fructose と結合した非醱酵性還元物質が多量存在することを知らることが出来る。

6. 糖蜜の加熱処理による酒精醱酵への影響

著者等は先に糖蜜は前処理的に適当な加熱によりその醱酵成績を収率的に僅かでも向上し得ることを予報⁽¹⁾した。上記の諸実験によつて 糖蜜は適度の加熱により, その中

Fig. 3. Decrease of Unfermentable Reducing Sugars and Increase of Fructose and Glucose in Molasses by Heating.

A-denatured Molasses, B-Undenatured M., C-long stored M., D-fermentation residue of M., Fr.-Fructose, Gl.-Glucose, T.-Total Sugar.

Increase of Fermentable sugar
 Fermentable sugar
 Unfermented reducing substances

の非醱酵性還元物質を減少せしめ醱酵性糖を増加し得ることを糖種の測定より確めることが出来たので、かかる糖が実際酒精醱酵の経過にあたり醱酵成績即ち alcohol 収率の向上に対応的に影響をあたえるや否やを試験することにした。

実験 6 糖蜜の加熱処理による酒精醱酵試験 実験方法：全糖 11.08% (無加熱時) の糖蜜液 125 cc につき 1 kg 30 min., 100° 2 hrs 加熱したものを冷却後 250 cc としその 200 cc についてマイスル法による CO₂ 減を、又醱酵終了後の酒精度数(ピクノメーターより)を求めた。実験成績：Table 5 の 1 及び 2 に示す通り。

Table 5. Effects of Heating on Alc.-Fermentation of Molasses.

(1. Fermentation CO ₂)							
Heating	17 hr.	25	41	49	65	73	
0 (Cont.)	2.84	5.57	8.85	10.24	10.90	10.95	
100°-2 hr.	2.41	5.84	9.44	10.69	11.07	11.09	
1 kg-30 min.	2.41	5.76	9.28	10.55	11.00	11.04	
(2. Fermented Mash)							
Heating	T.S.%*	pH*	Res.S%	alc.%	pH	S.U.%	F.R%
0 (Cont.)	11.08	4.8	0.798	5.94	3.8	92.78	83.31
100°-2 hr.	11.12	//	0.695	6.17	//	93.75	86.17
1 kg-30 min.	11.39	//	0.746	6.31	//	93.45	86.08

* -before fermentation, T.S-total sugar, S.U.-Sugar utilised, F.R-fermntn. ratio.

考 察 本実験に供した試料は各区分とも同じものであるにもかかわらず同一糖蜜に対し加熱せるものは全糖値の増加を示し、その酒精醱酵に於ける経過 (CO₂ 減) 並に醱酵終了後についても無加熱に比し醱酵速度及び醱酵歩合、糖消費歩合に於て良結果を得た。即ち原糖蜜は殺菌目的以外でも 100°, 1~2 hrs, 或は 1 kg~30 min. 程度の加熱処理は実際酒精醱酵の収率上にも好影響を与えることが示された。

要 約

糖蜜の加熱による糖への影響として、主として JACKSON-MATHEWS 及び ZERBAN の方法を参考として、非醱酵性還元物質を測定し加熱程度による醱酵性糖の増加並びにその糖の種類及び消長を試験した。

(1) 糖蜜の加熱によりその中の非醱酵性還元物質が減少することを ZERBAN 法の測定で明らかにした。加熱条件の高くなると共に、一方では全糖値の減少が伴うが、非醱酵性還元物質の減少率に比し結果的に醱酵性糖の増加となる。その条件は 100°, 2 hrs. 或は 1 kg, 30 min. 程度迄であるが、なお糖蜜の変性有無、貯蔵期間によつても大きく影響された。

(2) 糖蜜の加熱により、又醱酵液の塩酸加水分解により非醱酵性還元物質が減少する原因について、加熱度による糖蜜中の fructose 並に glucose の消長を JACKSON-MATHEWS 法により追究して、此の際の還元物質の増加は glucose よりも fructose の増量に主として因るものであることを知った。即ち糖蜜中の非醱酵性還元物質には fructose と結合しているものが多いということが推定され、これが加熱によつて比較的容易に遊離して結果的に醱酵性糖の増加となるものと思われる。

- (1) 七字, 大倉 : 発研報, 6, 169, (1951); 七字, 長谷川 : 発研報, 8, 32 (1953); 七字, 園田 : 発研報, 9, 56 (1953).
- (2) 小野, 御園 : 発研報, 5, 48 (1950).
- (3) ZERBAN F.W. : *Ind. Eng. chem.*, 39, 1597 (1947).
- (4) PICTET, A., CHAVANJ. J. : *Helv. Chim. Acta*, 9, 809 (1926).
- (5) SCHLUBACH, H. H., BEHRE, C. : *Ann.* 508, 16 (1933).
- (6) MATHEWS J. A., JACKSON R. F. : *Bur. Standards, J. Research*, 11, 619 (1933).
- (7) ZERBAN F. W. : *Ind. Eng. Chem.*, 41, 1401 (1949).
- (8) MATHEWS J. A., JACKSON R. F. : *Bur. Standards J. Reseach*, 8, 403 (1932).
- (9) ZERBAN F. W., ERB C. : *A.O.A. C.*, 30, 585 (1947); 31, 192 (1948).
- (10) LANE, J. H., EYNON, L. : *J. Soc. Chem. Ind.*, 42, 32 T (1923).

Summary

By measuring unfermented reducing substances (U. F. S.) according to the method of JACKSON and MATHEWS or ZERBAN and ERB, we have investigated the increase of fermentable sugar (F. S.) in molasses (M.) by heating treatment and its kind.

(1) When M. was heated, U. F. S. were decreased extremely. Besides the decreasing U. F. S., the amount of total sugar in M. also decreased by the decomposition of F. S. From an experiment on the relationship between the amount of total sugar and U. F. S. under the various length of time of heating M., the best condition for getting highest amount of F. S. was found as follows : about 2 hours at 100° or 30 minutes at 1 kg pressure. Moreover these are influenced by whether it was denatured or not and by the length of storing period.

(2) It was confirmed that the decrease in amount of U. F. S., when the original M. was heated or the fermentetion residues of M. mash were hydrolysed with hydrochloric acid, was caused by the increase of fructose rather than that of glucose. Therefore, it was considered that some of the U. F. S. in M. were mainly combined with fructose, and it was easily separated from them as F. S. by heating.

麹菌の Acetoin 系化合物生成に関する研究 (第 1 報)

選定麹菌の生産培養試験

下田忠次郎, 城 照 雄, 国定則行 (山邑酒造研究所)

昭和 28 年 11 月 13 日 受 理

Studies on Formation of Acetoin-Series Compounds by *Asp. oryzae*.

Part 1. Production by a Selected *Asp. oryzae*.

By Chūjiro SHIMODA, Teruo SHIRO and Noriyuki KUNISADA

(The Yamamura Sake-Brewing Laboratory)

緒 言

微生物に依つて acetoin 系化合物 - diacetyl, acetylmethylcarbinol (aceton) 及び 2,3-butyleneglycol の生成せらるることは既に多くの学者に依つて研究された所である。又それらの生成機構に関しては、酵母に依り NEUBERG 一派に依つて闡明せられ acyloin 生成酵素 carboligase⁽¹⁾ の存在を提唱された。最近富安⁽²⁾, 赤堀⁽³⁾, 島津⁽⁴⁾, JUNI⁽⁵⁾ 等の研究がある。細菌に依つても又多くの研究⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾ がある。

著者等は麹菌に依つて acetoin 系化合物の生成試験を行い特に diacetyl の生成を証明し、進んで麹菌酵素に依つてこれら化合物の生成機構の研究を行いつつあり、本報に於ては先ず麹菌の生産培養試験を報告する。

実 験 の 部

A. 予 備 試 験

本実験に於て行つた acetoin 系化合物の確認試験及び定量法は次のとおりである。

I. Diacetyl の確認試験 醱酵液 25 cc を採り蒸留水 10 cc を加えて後 pH 7.0 に調整し CO₂ gas 中にて徐々に蒸溜して溜液約 20 cc を採り蒸留水を加えて 25 cc に充たした液について試験した。(1) 呈色反応: i) creatine 及び α -naphtol 添加に依る赤呈色⁽⁹⁾, ii) NH₂OH-acetate, acetone-K₂HPO₄, NH₄OH, KNa-tartrate 及び FeSO₄ 添加に依る深紅呈色⁽¹⁰⁾, iii) NH₂OH, urea, 及び H₂SO₄-H₃PO₄ 添加に依る黄呈色⁽¹¹⁾。(2) 沈澱反応: 醱酵液 1 l を中和した後減圧 (4 mm Hg) 50° にて蒸溜し溜液約 700 cc を採りそれについて試験した。i) NH₂OH·HCl 及び Na-acetate 添加反応に依る dimethylglyoxime の白色沈澱の生成, 水より再結晶 m. p. 234°. ii) 前試薬に NiCl₂ 添加反応に依る Ni 塩の赤色沈澱生成⁽¹²⁾。

II. Acetoin の確認試験 (1) 呈色反応: 前記 diacetyl 蒸溜残液に 50% FeCl₃ 30 cc-FeSO₄ 10 g 混合液 10 cc, 25% H₂SO₄ 5 cc 及び蒸留水 10 cc を加え加熱して徐々に蒸溜し, その溜液について diacetyl の呈色反応を行つた。(2) 沈澱反応: 前 diacetyl 沈澱反応のために製成した減圧蒸溜液について i) Fe 塩及び H₂SO₄ にて酸化して Ni-dimethylglyoxime の生成試験, ii) *p*-nitrophenylhydrazine 醋酸液添加反応に依る osazone の赤色沈澱の生成, pyridine 及び醋酸より再結晶 m. p. 328°。

III. 2,3-Butyleneglycol の確認試験

(1) 呈色反応: 前記 acetoin を蒸溜した残液に Br 及び Na-acetate を加え酸化⁽¹³⁾して得た液について diacetyl の呈色反応を試みた。(2) 沈澱反応: i) 同液について Ni-dimethylglyoxime の生成, ii) 醱酵液を減圧 (4 mm Hg) 蒸溜した溜液に phenylisocyanate を添加加熱して urethane の白色沈澱の生成, alcohol より再結晶 m. p. 201°。

IV. Diacetyl の定量法

前記 diacetyl 呈色反応に供試した蒸溜液 2 cc をとり、之に 1% NH₂OH·HCl 液 1 cc 及び 3% urea 溶液 1 cc 及び H₂SO₄ 1 : H₃PO₄ 3 の混合液 2 cc を加え boiling water bath 中にて 45 分間加熱した後冷却する。