麴汁及び清酒中の二糖類 (第 5 報)*

Kojibiose の 分 離 確 認

(非酸酵性糖に関する研究 第 19 報)

松 田 和 雄 (東北大学農学部農芸化学科)

昭和 34 年 1 月 31 日 受 理

麴汁中に kojibiose の存在することはペーパークロマトグラフィー (PPC) により最初から認められていたが^(1,2), 麴汁中の他の α -結合型の二糖類 α, α -トレハロース, α, β -トレハロース, サケビオース, マルトース及びイソマルトースがすべて結晶状のアセチル化物として分離確認されたのに, この糖だけは仲々分離確認出来なかった. その後, この糖は佐藤等⁽³⁾によりハイドロールから α - 及び β -octaacetate の結晶として分離され, 又著者⁽⁴⁾も同時に化学的合成によりこの糖のアセチル化物を結晶として得た.

一方 Bailey 等⁽⁵⁾はラクトースとシュクロース又はラクトースとセロビオースに *Betacoccus arabinosaseous* (Birmingham strain) を作用させて得た三糖類の部分的加水分解により得た糖が 1,2- α 結合を有することを証明し, 又 Haq 等⁽⁶⁾は著者とは別の方法で化学的合成を行ったが結晶性の誘導体は得ていない.

柴崎等⁽⁷⁾は最近 Bailey 等の方法を追試し, *Betacoccus arabinosaseous* の代りに *Leuconostoc mesenteroides* を用いてラクトースとシュクロースから三糖類を作り, 分解方法を改良してアセチル化物の結晶を好収量で得るのに成功した.

著者は今回分離方法を再検討し, 麴汁中から最後に残された α -結合二糖類 kojibiose をアセチル化物の結晶として分離するのに成功したので報告する.

尚この糖の諸性質は既に前記報告において検討されているが, 著者もこの糖の性質を再検討し, 若干新しい事実も認めたので併せて報告する.

実 験 之 部

[1] 麴汁中から Kojibiose の分離

(1) **Magnesol : Celite chromatography** による分離 : 既報⁽⁸⁾で行った麴汁中の糖を活性炭カラムで分別した際得られたイソマルトースと kojibiose を含む区分 (5% エタノール溶出部の最初の部分) 2.3 g を常法に従ってアセチル化を行い, 4.0 g の粗アセチル化物を得た. 熱エタノールに溶解, β -isomaltose octaacetate の結晶を少量接種して数日室温に放置すると結晶が析出した. 1 回再結後の m. p. 143~144°, β -isomaltose octaacetate の純品と混融して融点降下しない.

母液を濃縮すると 2.4 g のシラップ状物質が得られた. これを 20 ml のベンゼンに溶解, 10 ml 宛 190×35 mm の Magnesol : Celite (5 : 1) のカラム上に注加, 1000 ml の benzene : *t*-butanol (100 : 1) で展開を行った. アルカリ性 KMnO_4 で呈色させるとカラムの上部から 4~14 cm の間に zone が検出され, アセトンで溶出後溶剤を除くと 1.3 g (2 回分) のシラップ状物質が得られ, エタノールから結晶させると約 0.3 g の結晶が得られた. エタノールから 1 回再結すると m. p. 144°, β -isomaltose octaacetate と混融して融点降下しない.

カラムからの流出液を集め, 水洗濃縮すると 0.5 g (2 回分) のシラップ状物質が得られ, 熱エタノールに溶解放置すると約 0.3 g の結晶が得られた. エタノールから 1 回再結すると m. p. 117°, 合成により得た β -kojibiose octaacetate と混融しても融点降下しない.

(2) **Borate buffer** を用いる活性炭クロマトによる分別 : Barker 等⁽⁹⁾によると活性炭カラムで糖を分別する際 borate が存在すると非常に鋭敏に分離が行われると言われ, ionophoresis (以下 PIP と略す)⁽¹⁰⁾の結果から考えても 1,6-結合のイソマルトースと 1,2-結合の kojibiose とは普通の活性炭クロマトの場合より一層容易に分別が行われる事が予想される. 佐藤等⁽³⁾はこの方法でハイドロール中から kojibiose を分離するのに成功

* Studies on the Disaccharides in Koji Extract and Saké. Part V. Isolation and Identification of Kojibiose. (Studies on the Unfermentable Sugars. Part XIX)

By Kazuo MATSUDA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University)

第1表 Borate buffer 活性炭クロマトによる糖の分別

Fract. No.	溶 出 剤 (EtOH %)	PPC	収量 (g)
1	0	—	
2	0	グルコース	0.5
3~4	0	イソマルトース	2.8
5~8	1.0	"	
9	1.5	—	
10~12	"	kojibiose	2.0
13~16	2.0	"	
17~20	2.5	"	

ルコースのスポットが検出された。

上記の試料を borate buffer 溶液 (硼酸 7.45 g と NaOH 4.00 g を 1 l の水に溶解, pH 10.0) に溶解して活性炭 100 g と同量の Celite を混合, 径 4.5 cm の硝子管に充填したカラム上に注加し borate buffer で溶出を行った。溶出剤は 2 l 毎に 0~2.5% になる様にエタノールを添加し, 溶出液は 500 ml 宛集め Amberlite IR-120 で脱アルカリ後減圧下に濃縮, メタノールを加えて繰返し蒸溜して硼酸をメチルエステルとして除去した。各区分を PPC で検討した結果は第1表の通りである。

Kojibiose の区分 (10~20) を集めアセチル化して 2.3 g の粗アセチル化物を得た。エタノールから直接結晶化を試みたが成功しなかったため, Magnesol : Celite による分別を行った。即ちアセチル化物を 20 ml のベンゼンに溶解 180×35 mm の Magnesol : Celite カラム上に 10 ml 宛注加し, 1000 ml の benzene : *t*-butanol (100 : 1) で展開を行った。アルカリ性 KMnO_4 で呈色させると 2 個の zone が検出された。

下部の zone (11~18 cm) を切り取りアセトンで溶出すると 0.8 g (2 回分) のシラップ状物質が得られ, エタノールに溶解放置すると少量の結晶が得られた。収量 60 mg。エタノールから 1 回再結すると m. p. 166°, 合成により得られた α -kojibiose octaacetate と混融して融点降下しない。結晶母液を濃縮し 5 ml のベンゼンに溶解 200×23 mm の Magnesol : Celite カラムを用い 500 ml の展開剤で展開, アルカリ性 KMnO_4 で呈色させても zone はカラム上に検出されなかった。流出液を集め水洗濃縮エタノールに溶解, 室温に数日放置すると結晶が析出した。収量 128 mg。エタノールから 1 回再結すると m. p. 117°, 合成により得られた β -kojibiose octaacetate と混融して融点降下しない。

最初のカラムの上部の zone (1.5~4.0 cm) からは 0.4 g のシラップが得られ, エタノールから結晶化を試みたが成功しなかった。常法に従い 0.5 N NaOCH_3 メタノール溶液 4 ml を加え脱アセチルして PPC で検討した所, aniline hydrogen phthalate 試薬 (以下 AHP と略す) では発色せず, 銀試薬でトレハロースに近い位置に弱いスポットが現われ, 恐らく α , β -トレハロースと思われるが結晶しなかったため確認は出来なかった。

〔2〕 Kojibiose の諸性質

(1) Kojibiose 遊離糖の調製 : β -Kojibiose octaacetate 0.8 g を常法に従い, 10 ml の 0.05 N NaOCH_3 メタノール溶液に溶解, 1 晩氷室内に放置して脱アセチルし, 水で稀釈後イオン交換樹脂で脱塩, 減圧下に濃縮しメタノールで処理後再び濃縮して白色粉末 0.4 g を得た。エタノールから結晶化を試みたが, 未だ成功していない。常法に従い水溶液として $[\alpha]_D$ を測定した。 $[\alpha]_D^{17} = +136$ (equil : c 1.3; H_2O), 文献値 (+133⁽⁵⁾, +136⁽³⁾, +140^(3,6)) とよく一致する。

(2) PPC 及び PIP : 既に度々検討されているが, 純品に就て再検討した。AHP 試薬では美しい独特の紅色に呈色し, グルコースを比較体とした R_g 値は 0.74 付近 (ピリジン : ブタノール : 水 = 4 : 6 : 3, 上昇法 1 回) であった。Haq 等⁽⁶⁾も指摘している様に triphenyltetrazolium chloride 試薬 (TTC) ではトレハロース, ソフォロース同様呈色しない。この事実は 1,2-結合の構造推定の一つの有力な手掛りである。

PIP では以前の報告⁽¹⁰⁾と同じく M_g 0.31 というイソマルトースに比べて低い値を示し, 1,2-結合の構造推定の一つの根拠となった。

(3) 還元力 : Bailey 等⁽⁵⁾は 1,2-結合の糖の特長の一つとして銅試薬に対し非常に還元力の低いことを挙げている。即ち 1,2-結合の糖 (kojibiose) は Schaffer-Hartmann 試薬によりグルコースの約 12% という非常に低い還元力を示し (普通の二糖類はグルコースの約 50%), この事実は佐藤等⁽⁸⁾も再確認している (6%)。

している。

イソマルトースと kojibiose の混合物 14.5 g をアセチル化して 25 g のアセチル化物を得た。エタノールから β -isomaltose octaacetate を結晶化させ濾別して濾液を濃縮して 13.8 g のシラップ状物質を得た。常法に従い 0.05 N NaOCH_3 メタノール溶液で脱アセチルすると 6.3 g の遊離糖が得られた。ペーパークロマト (以下 PPC と略す) で検討すると kojibiose, イソマルトースの他に脱アセチルの際一部分解したグ

又 Somogyi 試薬に対しては Haq 等⁽⁶⁾はグルコースの 2% 以下と言う値を挙げている。

この様な事実は 1,2- β 結合のソフォロースに就ても認めれており⁽¹¹⁾, 1,2-結合の一つの特性として考えられて来た。一方 Bailey 等⁽⁵⁾によると銅試薬以外の次亜沃素酸による方法ではこの糖も理論値と略々一致した還元力を示すということである。

著者は既報でも一寸触れたが⁽¹²⁾, この糖は通常の Fehling 溶液に対してはかなり顕著な還元力を示すことを定性的に認めたので, この糖の銅試薬に対する態度に疑問を抱き, Bertrand 法, Willstätter の次亜沃素酸法及び Somogyi 法の 3 つの異なった方法で還元力を測定した。即ち一定濃度の kojibiose 溶液についてそのまま及び 2.5% HCl によって加水分解した後につき前記 3 法で還元力を測定し, 前後の還元力の比を以てこの糖のグルコースに対する還元力とした。この様にして得られたこの糖のグルコースに対する還元力は第 2 表の通りである。

第 2 表 Kojibiose の還元力

方 法	還元力 (%) (グルコースに対する)	理論値 (%)	理論値に 対する %
Bertrand 法	50.15	52.6	95.3
Willstätter 法	40.14	52.6	76.3
Somogyi 法	2.67	52.6	5.0

即ち Somogyi 法によると Haq 等の報告⁽⁶⁾の通り極めて低い値しか示さないが, 同じ銅試薬でも Bertrand 法では他の二糖類と何等変りない還元力を示す。又次亜沃

素酸法である Willstätter 法では理論値よりかなり低い値を示している。Bailey 等⁽⁵⁾は次亜沃素酸に対しては略々理論値に近い還元力を示すと報告しているが, Willstätter 法の試薬とは異なった試薬を用いているのでこの点はもう少し検討しないと分らない。この様に試薬により極端な還元力の相異を示すのはどのような理由によるのか分らないが, 試薬の pH が相当関係して来るのではないかと想像している。

(4) オサゾン生成: 既報でも言及したが⁽¹²⁾, kojibiose と他の糖の混合物をフェニルヒドラジンと反応させ, 生じたオサゾンを濾別した濾液をベンズアルデヒドで処理, 脱塩濃縮して PPC で検討すると kojibiose のスポットが現われたのでこの糖はオサゾンを生成しないと考え, 1,2-結合の構造推定の一つの論拠とした。然るに最近の Bailey 等⁽⁵⁾の報告ではこの糖はフェニルヒドラジンと反応させると直接グルコサゾンを生成すると云われ, 又 1,2- β 結合のソフォロースについても同様な事実が認められている⁽¹¹⁾。

そこで今回純品を用いてもう一度この点を確認して見る為 Bailey 等の実験を追試して見た。

Kojibiose 50 mg, フェニルヒドラジン HCl 100 mg 及び酢酸ソーダ 150 mg を水 1 ml と共に沸とう湯浴中に 1 時間加熱し, 冷却後更に 1 晩氷室内に放置し生じた結晶を濾別した。収量 6 mg。エタノールから再結すると m. p. 203~204°, グルコサゾンの純品と混融して融点降下を示さなかった。濾液を既報⁽¹²⁾の様に処理して濃縮後 PPC で検討するとグルコース及び kojibiose のスポットが検出された。kojibiose は Bailey 等の言う様に確かに直接グルコサゾンを生成するが, その生成量は極めて少く, かなりの量の kojibiose が分解を受けずに残っていることが分った。

(5) 赤外線吸収スペクトルによる検討: Bailey 等はこの糖を赤外線吸収スペクトルで検討し, 840 cm^{-1} に α -結合特有の吸収帯を現わすことを述べている。

著者も東北大学非水溶液化学研究所に依頼してこの糖の遊離糖及び α -, β -アセチル化物の赤外線スペクトルをとって頂いた。第 1 図は之等のスペクトルである。

尚使用した装置は Perkin-Elmer 21 型で KBr disk 法で測定した。

遊離糖では Bailey 等の言う通り 840 cm^{-1} に α -結合の特性吸収が見られ, 又 1630 cm^{-1} 付近に C=O の吸収が見られるが, この事は遊離の kojibiose 中にアルデヒド型の糖の存在していることを示し, kojibiose の様な非結晶性の糖では種々の型 (ピラノーズ, フラノーズ, アルデヒド型) が平衡状態に存在しているのではないかと想像される。

アセチル化物のスペクトルでは α -結合の特性吸収 840 cm^{-1} は非常に弱く殆ど見られなくなっている。

又これ等のスペクトルからは 1,2- α 結合の特性吸収はどれであるかは分らなかった。

総 括

(1) 麴汁中から kojibiose を α - 及び β -octaacetate の結晶として分離確認した。

(2) Kojibiose の遊離糖を調整し, $[\alpha]_D$, PPC 及び PIP, 還元力, オサゾン生成, 赤外線吸収スペクトル等の検討を行った。

1. Kojibiose Prism NaCl, Resolution 927, Response 1:1, Gain 5.7, Suppression 3

2. α -Kojibiose octaacetate Prism NaCl, Resolution 927, Response 1:1, Gain 5.0, Speed 301—, Suppression 2 3. β -Kojibiose octaacetate Prism NaCl, Resolution 927, Response 1:1, Gain 5.0, Speed 301—, Suppression 2

第 1 図 コーじビオース遊離糖及びアセチル化合物の赤外線スペクトル図

(3) Somogyi 法によってはグルコースの 2.67% と言う非常に低い還元力しか示さないが, Willstätter 法では 40.14%, Bertrand 法では 50.15% で普通の二糖類と大差のない還元力を示した。

(4) 常法によりフェニルヒドラジン HCl と加熱するとグルコサゾンを生ずるが, 生成量は極めて少い。

(5) 赤外線吸収スペクトルでは α -結合特有の 840 cm^{-1} に吸収帯が現われた。

終りに御指導を頂き, 又御校閲を御願ひした麻生教授に深謝致します。又赤外線スペクトルを御願ひした東北大学非水溶液化学研究所の係りの方に併せて感謝の意を表します。

(本報告の要旨は昭和 33 年 12 月 8 日日本農芸化学会東北支部小集会で講演した。)

(1) 麻生 清, 柴崎一雄, 山内文男: 醸酵工, 30, 311 (1952).

(2) 松田和雄, 麻生 清: 同上, 31, 211(1952).

(3) 佐藤昭雄, 麻生 清: *Nature*, 180, 984

(1957).

(4) 松田和雄: 本誌, 33, 714 (1959); *Nature*, 180, 985 (1957).

(5) R. W. Bailey, S. A. Barker, E. J. Bourne,

- P. M. Grant, M. Stacey : *J. Chem. Soc.*, 1958, 1895.
- (6) S. Haq, W. J. Whelan : *Nature*, 178, 1221 (1956).
- (7) 柴崎一雄, 中村 清, 麻生 清 : 本誌, 33, 359 (1959); *Nature*, 182, 1303 (1958).
- (8) 松田和雄, 麻生 清 : 醸酵工, 32, 399 (1954).
- (9) S. A. Barker, E. J. Bourne, O. Theander : *J. Chem. Soc.*, 1955, 4276.
- (10) 麻生 清, 浜田茂穂 : 醸酵工, 33, 45 (1955).
- (11) J. Rabaté : *Bull. Soc. Chim.*, (5), 7, 565 (1940).
- (12) 松田和雄 : 本誌, 30, 119 (1956).

わさびに関する研究 (第5報)*

粉わさびについて (その1) 貯蔵中変質していわゆる“馬鹿になる”現象

長島善次, 内山正昭, 西岡茂美 (静岡大学農学部農芸化学教室)

昭和 34 年 2 月 7 日 受理

粉わさびとして市販されているものは、普通わさび大根 (西洋わさび) *Choclearia armoracia* の根茎を乾燥粉末としたもので、之に少量のからし粉、食用色素等が添加されている。

わさび大根の辛味主成分は、わさび・黒からしと同様 allylisothiocyanate である。之は一種のアグリコンであり、植物体中には配糖体シニグリンとして存在する⁽¹⁾。根茎を磨砕した際、或いはその乾燥粉末を水でといた際、酵素ミロシナーゼにより配糖体が分解を受けて辛味を生ずる点もわさび・黒からしと同様である。わさび大根は普通の畑地で容易に栽培され、収量も多く、従って普通のわさびに比べて価格も安い。粉わさびの原料として用いられる所以である。

さて、粉わさびに関する研究は今迄殆んど報告されていない。著者等は之につき二、三の実験を行い、多少興味ある知見を得たので報告する次第であるが、本報では貯蔵中の変質の問題について述べる。

からし粉や粉わさびが貯蔵中変質して、之に水を加えても辛味が生じなくなる現象、俗に「気が脱ける」とか「馬鹿になる」と称する現象は家庭などでも経験することであるが、之に関する研究の報告はあまり見当たらない。ただ、Weis-Fogh⁽²⁾は黒からし粉について、相対湿度が 60% 以下の状態では割合に安定であること、又、森⁽³⁾は粉わさびについて、それが如何なる機作によるか判らないが、ビタミン C の添加が変質を防ぐ効果のあることを述べている。

著者等は先ず変質に関する外的条件について明かにするため、わさび大根根茎乾燥粉末につき、その水分含量・貯蔵温度・貯蔵期間と変質との相互関係について検討した。

次いで、変質の現象が本質的に如何なるものであるかを検討した。粉わさび・黒からし等に水を加えて辛味を生ずるのは、この際、辛味の母体である配糖体シニグリンが酵素ミロシナーゼにより加水分解されて、辛味成分 allylisothiocyanate を生ずるからである。依って貯蔵中の変質の現象を二つの面にわけて考えられる。一つは貯蔵中のシニグリンの変化、減少であり、一つは酵素ミロシナーゼの不活性化である。実験の結果、変質は主としてミロシナーゼの不活性化によることを知った。然らばこの酵素の不活性化は如何なる機作によるものであろうか。阻害試験の結果、ミロシナーゼは *p*-chloromercuribenzoic acid (PCMB) の如き -SH 基阻害剤で阻害され、この阻害がシステイン等で回復する事等を見出し、ミロシナーゼはいわゆる SH 酵素の一種であることを知った。又一方、一旦変質した粉わさびをアスコルビン酸稀水溶液でといてやると、著しく辛味を生ずることを見出した。之等のことから変質の主原因であるミロシナーゼの不活性化は、その活性基 -SH 基が貯蔵中酸化されて -S-S- 結合をとるためであること、変質したものにアスコルビン酸等を加えて加水すると辛味を生ずるのは、-S-S- 結合が還元されてもとの -SH 基となり、酵素が再び活性をとりもどすためであることと推定する次第である。

尚、薬剤添加による変質の防止、粉わさびと黒からし粉との安定性の比較等も検討したので、併せ報告する。

* Studies on Wasabi. Part V. On "Powdered Wasabi". (1) Degeneration in Storing.

By Zenji NAGASHIMA, Masaaki UCHIYAMA and Shigemitsu NISHIOKA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Shizuoka)