- A. Kallman : *Brauerei, Wissensch. Beil.*, 11, 66 (1958).
 (6) J. Montreuil, R. Scriban, S. Mullet : *Brauerei*, 14, 64 (1959).
 (7) I. C. MacWilliam, A. W. Phillips : *Chem. & Ind.*, 364 (1959).
 (8) 逸見文雄, 友枝幹夫 : 本誌, 19, 381 (1943).
 (9) 実験農芸化学, 上巻, 朝倉書店, p. 116 (1960).
 (10) 実験農芸化学, 上巻, 朝倉書店, p. 121 (1960).
 (11) M. Somogyi : *J. Biol. Chem.*, 160, 61 (1945).

〔農化 第35巻, 第11号, p. 1078~1082, 1961〕

麦 酒 の 研 究 (第2報)*

麦酒中のグルコ二糖類について

麻生 清, 渡辺敏幸 (東北大学農学部農芸化学科)

昭和36年5月9日受理

著者等は先に⁽¹⁾日本4社(銘柄:アサヒゴールド, サッポロ, キリン, タカラ), ドイツ2社(銘柄:Dortmunder Actien (DA), Löwenbräu München (LM))及びフィリッピン1社(San Miguel (SM))の麦酒の一般分析, 糖の濾紙クロマトグラフィー(PPC)及びPPC法による各糖の分離定量を行なった結果を報告したが, その糖組成をみるに二糖類区分ではグルコ二糖類が殆んどであって, そのうち a) マルトースは殆んど認められずニゲロース, コージビオースの認められるもの(KN型…アサヒゴールド, サッポロ, DA及びSM)と b) マルトースが多くニゲロースが少量でコージビオースの殆んど認められないもの(M型…キリン, タカラ及びLM)の2つの型に大別されることがわかった。

麦酒中のグルコ二糖類についてはGjertson⁽²⁾は活性炭カラムクロマトグラフィー(Carbon CC)で下面醱酵麦酒中の糖を分別し, PPCで糖組成をしらべマルトース及びイソマルトースを認めている。Stöckli^(3,4)はスイスの麦酒についてPPCによりマルトース及びイソマルトースを認めている。Montreuil等⁽⁵⁾は6種の異なった型の麦酒について透析を行ない, 透析された区分からPPCによりマルトース, イソマルトース, 構造未定のX₁, X₂(R_Fからみてニゲロース及びコージビオースに相当する)を認め, これらをPPC法により定量を行なっている。MacWilliam等⁽⁶⁾は*Saccharomyces cerevisiae* (National Collection of Yeast Cultures No. 447)を用いてつくった麦酒中にニゲロースの存在を認め, セルロースカラムで分別し, ツラノオサザンを作って確認している。

そこで著者等は麦酒中のグルコ二糖類をさらに詳細に検討する目的でKN型及びM型の麦酒をCarbon CCで分別した二糖類の区分についてPPC及び濾紙電気泳動(PI)により検索した結果, α -結合を有する4種のグルコ二糖類コージビオース, ニゲロース, マルトース及びイソマルトースの存在することを認め, これらを結晶状に分離確認するため, KN型麦酒の二糖類区分をpH 10の硼酸緩衝液を用いるCarbon CCや, アセチル化後マグネソール-セライト-カラムクロマトグラフィー(Magnesol-Celite CC)による分別を行ない, またM型麦酒の二糖類区分はアセチル化後Magnesol-Celite CCによる分別を行い, コージビオースは遊離糖及び α -オクタアセテートとして, その他のニゲロース, マルトース及びイソマルトースの3糖は β -オクタアセテートとして結晶状に分離することができたのでここに報告する。

実 験 の 部

1. Carbon CCによる麦酒の糖類の分別 KN型麦酒20本及びM型麦酒6本をそれぞれ減圧濃縮しKN型麦酒は2 lとし, M型麦酒は0.5 lとしたものにそれぞれ2倍量の95%エタノールを加え, その濾液を減圧濃縮しAmberlite IR-120及びIRA-410で処理してKN型麦酒は1 lに, M型麦酒は0.5 lに減圧濃縮し(KN型麦酒:全糖 130.54 g/l (グルコースとして), M型麦酒:全糖 49.59 g/0.5 l (グルコースとして)), N/10苛性ソーダ液でpH 6.2に中和した。

* Studies on Beer. Part II. Gluco-bioses in Beer.

By Kiyoshi ASO and Toshiyuki WATANABE (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University)

第 1 図 Carbon CC による KN 型麦酒の糖の溶出状態

第 2 図 Carbon CC による M 型麦酒の糖の溶出状態

55×12.5cm の硝子円筒に活性炭 (武田白鷺印精製品) 800 g と同量のセライト (No. 545) を混合して充填したものに上記糖液を注加し、常法に従い KN 型麦酒は水 (201), 2.5% (201), 5% (201), 10% (241), 15% (321), 20% (241), 25% (201), 30% (401) 及び 50% エタノール (521), 合計 252 l で溶出を行なった。また M 型麦酒は水 (201), 2.5% (121), 5% (241), 10% (281), 15% (241), 20% (241), 25% (281), 30% (461) 及び 50% エタノール (381), 合計 244 l で溶出を行なった。溶出液は 2 l 毎に分取し、減圧下に約 10 ml に濃縮し PPC でその糖組成をしらべた結果の中 10% エタノール溶出部までのをまとめると第 1 図及び第 2 図の通りである。

展開剤としてピリジン-ブタノール-水 (4:6:3) を用いて上昇法 3 回展開を行ない、発色試薬アニリン-ハイドロジエン-フタレート (AHP) で呈色した。なお PPC の際は標準の各種糖類を並行及び混合して展開した。第 1 図及び第 2 図の結果からみると 10% エタノール区分までで、KN 型 15, M 型で 14 のスポットが認められた。

また溶出状態をみると前報の如く単糖類としてリボース、キシロース、アラビノース、グルコース及びガラクトース等が認められ、これらの糖は KN 型では水及び 2.5% エタノール区分前半までで、M 型では水及び 2.5% エタ

ノール区分で溶出される。またグルコ二糖類については KN 型ではイソマルトース及びコージビオースが 2.5% から 5% エタノール区分の前半にかけて、ニゲロースは 5% エタノールで、少量のマルトースは 5% 及び 10% エタノール前半で溶出される。M 型ではイソマルトースが 5% エタノール区分、多量のマルトースが 5% から 10% にかけて、また少量のニゲロースも 5% から 10% エタノール区分で溶出される。

2. コージビオース及びイソマルトース区分の硼酸緩衝液存在下での Carbon CC による糖の分別 上記のように KN 型麦酒にはコージビオースが存在するがコージビオースとイソマルトースは普通の Carbon CC ではどちらも 2.5~5% エタノール区分で溶出され、分別が難かしいので pH 10 の硼酸緩衝液を使用した Carbon CC を行なってコージビオースとイソマルトースの分離を試みた。

40×5cm の硝子円筒に活性炭 80 g と同量のセライトを混合して充填し、上部から KN 型麦酒 20 本からのコージビオース及びイソマルトースを含む区分 (No. 16~21, 2.5% 後半から 5% エタノール前半溶出部) 7.8 g を糖濃度が 10% になるように pH 10 の硼酸緩衝液 (硼酸 7.45 g/l, NaOH 4.00 g/l) に溶かしたものを注ぎ込み、常法に従い、上記硼酸緩衝液を含む 0% (4 l), 0.5% (4 l), 1.0% (4 l), 1.5% (4 l) 及び 2.0% エタノール

第 1 表 硼酸緩衝液存在下の Carbon CC によるコージビオース及び
イソマルトース区分の分別

フラクション No.	溶出量 (1)	溶出剤硼酸緩衝液中 の EtOH 濃度 (%)	PPC	収量 (g)
1	0.5	硼酸緩衝液 0	—	—
2~4	1.5	" "	イソマルトース	2.2
5~8	2.0	" "	イソマルトース	2.3
9~13	2.5	" 0.5	イソマルトース	0.5
14~15	1.0	" "	イソマルトース + コージビオース	0.1
16	0.5	" "	コージビオース	0.1
17~24	4.0	" 1.0	コージビオース	0.9
25~31	3.5	" 1.5	コージビオース	0.5
32	0.5	" "	—	—
33~38	3.0	" 2.0	—	—

上昇法 1 回展開, 発色試薬は AHP を使用した。なお PPC の際は標準の糖を並行及び混合して展開した。収量は各区分のシラップを熱メタノールに溶解して不溶物を除き、濾液を減圧濃縮し真空デシケーター中で乾燥して白色粉末として秤量した。

以上の硼酸緩衝液による Carbon CC でコージビオースとイソマルトースを分別することができたので、これらの糖の結晶化を試みた。

3. コージビオースの分離 上記のコージビオース区分 (No. 17~24) を集めて減圧濃縮してシラップとしたものを熱メタノールに溶解して不溶物を除き、濾液を再び減圧濃縮し真空デシケーター中で乾燥すると白色の粉末を得る。収量 0.9 g。

白色粉末 0.9 g を約 3 ml のメタノールに溶かし、先に得た α -コージビオース (m. p. 187~188°)⁽⁷⁾ の結晶母を種として加え、1 夜放置すると柱状の α -コージビオースの結晶が得られた。収量 0.67 g, これをメタノールから再結すると m. p. 186~187°, α -コージビオースの純品 (m. p. 187°) と混融しても融点降下を示さなかった。

またコージビオース 0.2 g をビリジン 1.3 g, 無水酢酸 1 g の混合液中でアセチル化を行ない、 α -コージビオースオクタアセテートの結晶を得た。収量 0.26 g, エタノールから再結し m. p. 166°, α -コージビオース-オクタアセテートの純品 (m. p. 166°) と混融しても融点降下を示さなかった。

4. イソマルトースの分離 上記のイソマルトース区分 (No. 5~8) を集め減圧濃縮してシラップとしたものを熱メタノールに溶かして不溶物を除き、濾液を再び減圧濃縮し真空デシケーター中で乾燥すると白色の粉末を得る。収量 2.3 g。

粉末 2.1 g に無水酢酸ソーダ 1.3 g, 無水酢酸 10.5 ml を加え常法に従ってアセチル化を行ないシラップ状のアセテート 3.5 g を得る。これを約倍量の熱エタノールに溶かして放置したが結晶を生じなかったので, Magnesol-Celite CC による分離を行なった。粗アセテート 1.5 g を 10 ml のベンゼンに溶解し 30×4 cm の Magnesol-Celite (5:1) カラムに注加し, 1 l のベンゼン及び第 3 級ブタノール (100:1) の混液で展開を行ない, 展開終了後カラムを管から押し出しアルカリ性 KMnO_4 (0.1 g KMnO_4 , 1 g NaOH を 10 ml の水に溶解) で呈色アルと 2 つの帯が現われるが中央部の方が呈色が強かった。

上の帯 (カラムの上部から 3.5~6.1 cm) をアセトンで溶出し溶剤を除くと 0.2 g のシラップ状物質が得られ, 熱エタノールを加えて放置したが結晶は出ず, カラムの中央部の帯 (6.1~11 cm) をアセトンで溶出し溶剤を除くと 0.4 g のシラップ状物質が得られ, 熱エタノールを加えて放置すると柱状の結晶が得られた。収量 22 mg, エタノールから再結を行うと m. p. 144~145°, β -イソマルトース-オクタアセテートの純品 (m. p. 145°) と混融しても融点は降下せず, ただし結晶の収量は少なかった。

その他の帯をアセトンで溶出し溶剤を除くと 0.4 g のシラップ状物質が得られ, 熱エタノールを加えて放置したが結晶は出ず, またカラムから流出した展開剤を水洗, 濃縮すると 0.1 g のシラップ状物質が得られ熱エタノールを加えて放置したが結晶は得られなかった。

5. マルトースの分離 M 型麦酒を Carbon CC で分別した二糖類の区分中 PPC で見てマルトース及び少量のニゲロースの認められる区分 (No. 27~30) を集めて減圧下に濃縮してシラップとしたものを熱メタノール

ル (3 l) で溶出を行なった。溶出液は 500 ml 毎に分取し, Amberlite IR-120 を通してアルカリを除き約 20 ml に減圧濃縮し, これにメタノールを加えて蒸留を繰返しながら硼酸を除去した濃縮液につきその糖組成を PPC でしらべた結果をまとめると第 1 表のようになる。展開剤としてビリジン-ブタノール-水 (4:6:3) を用いて

に溶解して不溶物を除き、濾液を再び減圧下に濃縮して真空デシケーター中で乾燥すると白色の粉末を得る。収量 2.8 g.

粉末 2.8 g に無水酢酸ソーダ 1.7 g, 無水酢酸 14 ml を加え、常法に従ってアセチル化を行ない、シラップ状のアセテート 5.4 g を得る。これを約倍量の熱エタノールに溶解して放置すると細長い柱状の結晶が得られた。収量 3.24 g, エタノールから再結すると m. p. 159~160°, β -マルトース-オクタアセテートの純品 (m. p. 159°) と混融しても融点降下を示さなかった。

6. ニゲロースの分離 β -マルトース-オクタアセテートの結晶をとった母液からニゲロースを分別するため Magnesol-Celite CC を行った。母液を減圧濃縮してシラップ状物質 1.5 g を得、これを 10 ml のベンゼンに溶解し 30×4 cm の Magnesol-Celite (5:1) カラム上に注加し、1 l のベンゼン及び第 3 級ブタノール (100:1) の混液で展開を行なう。展開終了後カラムを管から押し出アルカリ性 KMnO_4 で呈色すると 3 つの帯が現われる。

上の帯 (上部から 1.3~5.2 cm) をアセトンで溶出し溶剤を除くと 0.3 g のシラップ状物質が得られ、熱エタノールを加えて放置するとゼリー状の微細な結晶が析出した。収量 97 mg, エタノールから 2 回再結すると m. p. 150°, β -ニゲロースオクタアセテートの純品 (m. p. 150°) と混融しても融点降下を示さなかった。

中の帯 (上部から 10.5~14.5 cm) を同様に処理して 0.3 g のシラップを得たが結晶せず、また下の帯 (上部から 14.5~18.8 cm) を同様に処理し 0.4 g のシラップが得られ、熱エタノールを加えて放置すると細長い柱状の結晶が得られた。収量 10 mg, m. p. 159°, 混融試験の結果 β -マルトース-オクタアセテートであった。カラムから流出した展開剤を水洗濃縮すると 0.1 g のシラップ状物質が得られ、熱エタノールを加えて放置したが結晶は得られなかった。

考 察

以上のように麦酒中のグルコ二糖類としてコージビオース、ニゲロース、マルトース及びイソマルトースを遊離又はアセテートとして結晶状に分離確認することができたが、これらの糖類ははじめから原料である麦芽の構成成分に由来するものか、或いは糖化の過程でできるものか、それとも麦芽中の酵素によって糖の転移がおこっているのか、或いは使用酵母の違いによるのかなど種々の成因が考えられるが、これらのことについては今後検討したいと思っている。

なお *Saccharomyces cerevisiae* によるマルトース及びグルコースからのオリゴ糖の生成については Gunja 等⁽⁸⁾ がイソマルトース、パノース、マルトリオース等を認めているが、コージビオース及びニゲロースは認めていない。

また柴崎等⁽⁹⁾は *Schizosaccharomyces pombe* によるマルトースからの生成オリゴ糖をしらべ、コージビオース、ニゲロース、イソマルトース、パノース及びイソマルトリオースを認めているが、*Saccharomyces cerevisiae* による糖転移でコージビオース及びニゲロースが生成するという報告は見当たらない。

要 約

KN 型及び M 型麦酒の糖類を Carbon CC で分別し、KN 型麦酒の二糖類区分を更に pH 10 の硼酸緩衝液を用いた Carbon CC でコージビオースとイソマルトースを分別し、コージビオースは遊離糖及びアセテートとしてイソマルトース区分はアセチル化後 Magnesol-Celite CC により分別を行ない、イソマルトースをアセテートとして結晶状に分離確認した。

また M 型麦酒のマルトース区分 (少量のニゲロースを含む) をアセチル化し、マルトースをアセテートとして結晶状に分離し、その母液から Magnesol-Celite CC により分別してニゲロースをアセテートとして分離確認した。

(昭和 36 年 4 月 2 日, 日本農芸化学会大会で講演)

(1) 麻生 清, 渡辺敏幸, 佐々木浩, 元村佳恵 : 本誌, 35, 1073 (1961).	(4) A. Stöckli : <i>ibid.</i> , 67, 62 (1956).
(2) P. G. Gjertson : <i>Proc. Eur. Brew. Conv., Baden-Baden</i> . 37 (1955).	(5) J. Montreuil, R. Scriban, S. Mullet : <i>Brauererei</i> , 14, 64 (1959).
(3) A. Stöckli : <i>Schweiz. Brau-Runds</i> , 67, 1 (1956).	(6) I. C. MacWilliam, A. W. Phillips : <i>Chem. & Ind.</i> , 364 (1959).
	(7) 山内文男, 麻生 清 : <i>Nature</i> , 189, 753

- (1961).
(8) Z. H. Gunja, D. J. Manners : *J. Inst. Brew.*, 66, 409 (1960).

- (9) 柴崎 一雄, 麻生 清 : 醸酵工学, 32, 395 (1954).

〔農化 第 35 卷, 第 11 号, p.1082~1086, 1961〕

清酒香気成分に関する研究 (第7報)*

フェニル酢酸エチルおよびカプリル酸エチルの分離, 同定

山 本 淳 (協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 36 年 3 月 24 日 受 理

緒 論

メルカプタン類選択吸着樹脂として既に報告⁽¹⁾したハイドロキノ-ホルマリン (Hq-F) 樹脂が, その構造特性に基いて清酒中より特定成分を選択的に吸着し, 水蒸気蒸溜によって吸着成分を容易に離脱し得ること, また残り香気成分は予め香味液の精製に使用した活性炭を 95% 熱エタノールで反覆抽出して再活性化せしめた再生活性炭を用いて殆んど完全に吸着, 捕集し得ることを報告⁽²⁾した. このような吸着法を利用して清酒約 1 kl より捕集した香気成分の分離, 同定によって従来知られなかった α -オキシ酸エステル類, α -ケト酸エステル類, フェノールカルボン酸類, 高沸点アルデヒド類など諸種の化合物を新たに見出し, これらを合成酒に添加して検した結果, 清酒香気の構成および生成に関して従来憶測の域を出なかった諸知見を明らかにすることができた.

Hq-F 樹脂脱着捕集物は減圧分溜によってトラップ捕集物, 残渣を含む 9 画分に分ったが, このうち画分 No. 3 (b. p. 67.5/2 mm) 以上の高沸点溜分を合し, 予め混在するカルボニル化合物を除いた後, 1% 苛性カリ液で繰返し抽出して酸性成分を完全に分ち, 抽出区分より醸造物成分として初めて見出した p -オキシ桂皮酸を分離, 証明し得たことは既に報告した. このように酸性成分を完全に除去した残り高沸点中性区分はなお顕著な芳香を有し, 合成酒に 1.5 mg/l 添加すると明らかに品質の向上がみられる. つぎにその少量を採って常法に従い加水分解すると, 単に β -フェニルエチルアルコールのような香りに変じ, それまでの顕著な芳香は完全に消失する. この結果同区分の芳香成分の主体をなすものがエステルであることを知ったが, その分離, 検索によって清酒成分として新たに見出したフェニル酢酸エチルおよび既に粕取焼酎芳香成分の一つとして報告⁽³⁾されているカプリル酸エチルの存在を明らかにすることができたばかりでなく, サリチル酸エステルの存在が推定されるなど, 諸種の新知見を得たので, 以下これらについて報告する.

実 験 の 部

1. Hq-F 樹脂脱着高沸点中性区分加水分解生成酸の分別 Hq-F 樹脂脱着揮発性成分を減圧分溜により 9 画分に分ったが, このうち No. 3~No. 7 [b. p. 67.5~150/2 mm (浴温)] を合して得た約 6 g の試料を予め 25% 重亜硫酸ソーダ溶液と処理して混在するカルボニル化合物を分った後, 1% 苛性カリ液と繰返し振盪して酸性成分を完全に抽出, 除去した. 残り中性区分は 3% 苛性カリ-メタノール液 30 ml を加えて 4 時間加熱, 還流してエステル成分を加水分解し, 減圧下にメタノールを溜去した後残渣を少量の水に溶解, エーテルで繰返し抽出して中性成分を除き, 残った水層を硫酸微酸性とした後エーテルで抽出して加水分解生成酸成分を得た. このようにして得た酸成分をペーパークロマトグラフィーにて検した結果, サリチル酸の混在が認められるので, 常法に従いエステル化を行い, エステル化され難いサリチル酸の大部分を除去した後, 再び加水分解して, もはやサリチル酸を殆んど含まない加水分解生成酸約 0.2 g を得た.

その微量を東洋濾紙 No. 50 上に附し, 1.5 N-NH₃ 飽和 n -ブタノールで 1 夜展開した後, 紫外燈直接写真焼付, 1% フェノール-5% FeCl₃, 5% Fe₂(SO₄)₃-0.1% 赤血塩, B. P. B., 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬

* Studies on the Flavors of Saké. Part VII. Separation and Identification of Ethyl Phenylacetate and Ethyl Caprylate.

By Atsushi YAMAMOTO (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)