高沸点カルボニル化合物, 不飽和フェノールカルボン酸類などが分離, 同定され, なかでも α -ケト酸エステル類は, 清酒香気成分の最も顕著な基礎香気の一つとして, 従来吟醸香といわれた香気成分であることが明らかになった。

また活性炭吸着に特別の選択性を見出せないことは既に知られた事実であるが, 以後の報告に示すように, 活性炭脱着香気成分よりイソアミルアルコールを主とする高級アルコール類, エステル類, 高沸点カルボニル化合物, フェノールカルボン酸類など諸種の未知微量成分を見出したが, なかでも特に清酒香気成分として新たに分離, 固定したロイシン酸エチル, 乳酸エチルなどの α -オキシ酸エステル類は, 前の α -ケト酸エステル類とともに, 最も顕著な清酒基礎香気成分の一つと考えられるなど, 上記両吸着法によって原酒中の微量成分を極めて能率よく濃縮, 捕集できた。

なお本報告は昭和 35 年 11 月, 本会西日本支部例会で発表した。

多量の原料清酒を快く供与下さった旧日本酒類株式会社平山副社長, 小林研究部長をはじめ役員室の皆様へ感謝いたします。また途中の諸操作で野白芳明, 向井静夫の両氏に種々御協力いただいた。実験に協力いただいた佐々木喜代, 別府正久の両氏とともに厚く感謝いたします。

(1) 飯田茂次: 日醸協, 54, 543 (1959).

(4) E. A. Adams, E. L. Holes: B. P., 450308 (June 13, 1936)

(2) 山本 淳: 本誌, 29, 838 (1955).

(3) 山本 淳: 合技報, No. 20, 915 (1960).

(5) 浅尾保夫, 横塚 保: 本誌, 32, 617 (1958).

[農化 第 35 卷, 第 7 号, p. 619~623, 1961]

清酒香気成分に関する研究 (第 2 報)*

α -オキシカルボン酸類の分離, 同定

山 本 淳 (協和醸酵工業株式会社熊本工場研究室)

昭和 35 年 11 月 24 日 受 理

緒 論

活性炭脱着中性区分, 高沸点溜分の主成分である β -フェニルエチルアルコール (β -P. E. A.) 区分に夾雑する微量成分として, 幾つかのエステル類が存在し, その一つが同アルコール酢酸エステルであり, このような微量のエステル類が同区分の自然感附与に重要な因子となっていることは既に報告⁽¹⁾したが, さらに残る不明のエステル類を明らかにするために, 同区分の加水分解によって得た生成酸を減圧分溜により揮発酸と不揮発酸に分ち, 不揮発酸区分はペーパー分離を行い, 5つの酸区分に分った。そのおのおのの赤外吸収スペクトル (I. R.) の測定結果, R_F 小なる順から No. 1, No. 3, No. 4 は脂肪族オキシ酸と推定され, さらにペーパークロマトグラフィー (P. C.), ガスクロマトグラフィー (G. C.) で検した結果 No. 1 は乳酸, No. 3 はロイシン酸, No. 4 は不明オキシ酸, No. 2 はサリチル酸, イソバレリアン酸の混合物であることが判った。

このうちロイシン酸エステルは清酒香気成分として新たに見出したもので, 合成酒などに添加して清酒様芳香の附与に著効を有し, 特に他種香気と併用して香緩衝作用とでも名づけるべき, 自然感附与に著しい効果を示す。すなわちロイシン代謝中間生成物と考えられる同エステルは清酒香気成分として最も重要な基礎香気成分の一つであることが明らかになった。

実 験 の 部

1. エステル類構成酸成分の単離 活性炭脱着中性区分の主成分である β -P. E. A. 区分 5.6 g を 5% NaOH 20 ml と封管中で 4 時間煮沸, 加水分解して得た約 0.1 g の加水分解生成酸を減圧分溜に附し, $\sim 100^\circ/20$ mm (Bath) で溜出する揮発酸と残溜不揮発酸に分った。このようにして得た不揮発酸区分約 0.06 g を東洋濾紙 No. 50 上に附し, 1.5 N- NH_3 飽和 n -ブタノールで 1 夜展開したのち, B. P. B. でその発色を検して, 第 1 表に示す

* The Flavors of Saké. Part II. Separation and Identification of Hydroxy Carbonic Acid.
By Atsushi YAMAMOTO (Kumamoto Research Laboratory, Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)

第 1 表 β -P. E. A. 区分加水分解不揮発酸の P. C.

No.	1	2	3	4	5
R_F	0.09	0.37	0.47	0.68	0.93
B. P. B.	+	+	+	+	±
発色範囲 (mm)	±14	10	10	25	16

東洋濾紙 No. 50, 1.5 N- NH_3 飽和 n -ブタノール, 一夜上昇展開 B. P. B. 発色

5 成分を得た.

この結果にしたがい, 前の不揮発酸区分を東洋濾紙 No. 50 上に帯状に附し, 同溶媒で一夜展開後, 第 1 表に示す各 R_F および発色範囲に従い, 分離 5 成分を切抜き, 細切後 10% Na_2CO_3 水溶液で繰返し抽出, 抽出液はこれを合し, 内容物がシロップ状となるまで減圧濃縮, 残渣は注意深く硫酸微酸性となし, 遊離酸をエーテルで反覆抽出, 抽出エーテル液はこれを合し, 無水芒硝で

脱水後エーテルを溜去して 5 つの不揮発酸成分を単離した.

2. 単離酸成分の赤外分光分析 このようにして得た 5 つの単離酸成分はいずれも数 mg ないし多いものでも約 10mg 程度で, さらに精製, おおのこの構造を決定することは非常に困難である. このためまずその赤外吸収スペクトル (I. R.) により構造の推定を行った. すなわち得られた試料がいずれも粘調な液状であったので, KRS 5 セル板に直接薄膜として挟んだものを島津製 I. R. 型自記赤外分光光度計で測定したが, この結果 No. 1, No. 3, No. 4 はいずれも $-\text{CH}_2$, $-\text{C}=\text{O}$ の吸収のほか 3450, 3180 cm^{-1} 附近に会合型 $-\text{OH}$, 1140 cm^{-1} 附近に第 2 級 $-\text{OH}$ の吸収が見られ, いずれも脂肪族オキシ酸と推定される. この結果に基づいてロイシンより合成したロイシン酸と No. 3 の I. R. を比較した結果は第 1 図に示すごとくで, オキシ酸特有の $-\text{OH}$ 基に基づく吸収については両者よく一致している. また No. 2 は $-\text{OH}$ による吸収のほか 1645, 1488 cm^{-1} のベンゼン核吸収, 840, 790, 760, 715 cm^{-1} のベンゼン核隣接 2 H の弱い吸収が見られ, 混合物と推定される. No. 5 酸は $-\text{OH}$ の吸収を示さず, 普通脂肪酸と推定された.

第 1 図 β -P. E. A. 区分加水分解不揮発酸 No. 3 およびロイシン酸の I. R.

— 不揮発酸ペーパー分離 No. 3 $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$

3. オキシ酸のペーパークロマトグラフィーによる確認および同定 以上の結果, 単離成分のうち 3 成分が明らかに脂肪族オキシ酸と推定されるが, これを確め, 同時に各オキシ酸を明らかにする目的で P. C. により各成分の同定を行った.

このためには分離オキシ酸の適当な発色試薬を必要とするが, 乳酸の溶液内呈色反応として検出に用いられる 1% フェノール, 5% FeCl_3 水溶液のスプレイによって満足すべき結果を得た. すなわち同試薬により, ペーパー上のオキシ酸スポットのみは鮮黄色ないし淡橙赤色を呈し, その濃度および $-\text{OH}$ 基の位置により色調の変化はあるがいずれも鮮やかに発色し, 普通脂肪酸は全然発色しない. なおオキシ酸の種類によって呈色が経時的に変化するものもあり, 例えば乳酸はスプレイ直後は鮮黄色に発色するが, 2~3 時間後には退色して淡黄色の地に反対に白色スポットとして見出される. また α -オキシ酸と β -オキシ酸等, $-\text{OH}$ 基の位置による発色の相違は α -オキシ n -酪酸および β -オキシ n -酪酸の一例について調べたにすぎないが, α -オキシ酸は黄橙色ないし橙赤色

第 2 図 β-P.E.A. 区分加水分解不揮発酸および各種オキシ酸の P.C.

東洋濾紙 No. 50, 1.5N-NH₃ 飽和 n-ブタノール, 一夜上昇展開
発色: 1% フェノール-5% FeCl₃

第 2 表 β-P.E.A. 区分加水分解不揮発酸および各種オキシ酸の
ペーパークロマトグラム

酸 成 分	R _F	B. P. B.	1% フェノール -5% FeCl ₃	I. R.	考 察
No. 1	0.10	+	鮮黄→白色	オキシ酸	乳酸と一致
2	0.36	+	薄 紫 色	混 合 物	サリチル酸+イソ バレリアン酸
3	0.46	+	淡 赤 橙 色	オキシ酸	イシン酸と一致
4	0.73	+	淡 赤 橙 色	オキシ酸	~C ₁₀ のオキシ酸?
5	0.89	±	—	脂 肪 酸	不 明
CH ₃ CHCOOH OH	0.10		鮮黄→白色		
CH ₃ CH ₂ CHCOOH OH	0.18		黄 橙 色		
CH ₃ CHCH ₂ COOH OH	0.16		黄 褐 色		
CH ₃ CHCH ₂ CHCOOH OH	0.46		赤 橙 色		

東洋濾紙 No. 50, 1.5N-NH₃ 飽和 n-ブタノール, 一夜上昇展開, B. P. B. および 5% フェノール-5% FeCl₃
これはその R_F よりイソバレリアン酸の混在が推定される。

l-ロイシン酸の合成 (ヴァンスライク法変法による)

滴下ポート, 遮断攪拌器, 発生 N₂ 導出口 (出口は水中に投じて発生 N₂ の観察に便ならしめる) を附した 200 ml 3 ロフラスコに l-ロイシン 2.6 g, 水 100 ml, conc HCl 2.5 ml を加え, 湯煎中 60° に保ちながら NaNO₂ 1.8 g を水 30 ml に溶解した溶液を滴加する。N₂ の発生を見なくなってなお 30 分同温度に加熱したのち, Na₂CO₃ で中和, 減圧濃縮, 内容物がシラップ状となったのち注意深く 30% H₂SO₄ を滴加して過剰の NaNO₂ を分解, 生成ロイシン酸をエーテルで抽出, 抽出エーテル液は芒硝で脱水後, エーテルを溜去して得た残留物を小フラスコ中で減圧蒸溜 b. p. 110°/2 mm の溜分を集める。収量はほとんど定量的。

に, β-オキシ酸は淡褐色に発色する。また発色限界濃度はロイシン酸について検した結果, スポットテストで 0.5 γ で明瞭な橙赤色の発色が認められ, また各種オキシ酸の P.C. の検出に用いて, ごく微量で鮮やかに呈色し, 充分満足すべきものである。なお同発色試薬はケト酸, あるいはフェノール酸類によっても発色を見るが, ケト酸類は紫→退色, サリチル酸は鮮紫色, p-オキシフェニル酢酸は黄色, フェルラ酸は黒褐色, バニリン酸は黄褐色などフェノール酸の種類および側鎖の 2 重結合の有無などにより個々の発色を示し, 脂肪族オキシ酸類とはその呈色の色調を異にするので, これら種々のオキシ酸, フェノール酸の同定に用いて信頼し得る呈色試薬といえる。なおフェニル酢酸, 安息香酸などの芳香族側鎖カルボン酸によって淡赤橙色の発色を見る。

このような新発色剤を用い, 先に得た不揮発酸区分および既知試料について行った P.C. の結果は第 2 図, 第 2 表に示すごとくで, 前の I. R. の結果を参照して, No. 1 は乳酸, No. 3 はロイシン酸と断定され, No. 4

は R_F, オキシ酸発色, I. R. より C₈~C₁₀ のオキシ酸と推定される。また No. 2 は R_F, オキシ酸発色紫色の呈色よりサリチル酸と推定され, また同区分のオキシ酸発色スポットと B. P. B. 発色のスポットを比較して, R_F をほとんど等しくしてより大きな B. P. B. の脂肪酸発色が認められるが,

第3図 β -P.E.A. 区分加水分解生成不揮発酸エチルエステルの G.C.

試料: 約 0.01 ml, カラム: Silicon D.C. 550 3 m
キャリアガス: H_2 , 120 ml/min., カラム温度: 178.0°

第4図 混合既知試料の G.C.

設定条件: 第2図に同じ

なお同酸エチルエステルは常法に従い, HCl -無水エタノールと8時間還流してエステル化したのち, b. p. 59°/2 mm の溜分を集めた。収量ほとんど定量的。

4. ガスクロマトグラフィーによる同定 以上不揮発酸区分の I. R., P. C. による同定の結果, 清酒香氣成分として新たに見出したロイシン酸などのオキシ酸の存在が証明できたが, さらにこの結果を確かめるために不揮発酸区分約 0.01 g を $SOCl_2$, 無水エタノールで処理して得た同区分エチルエステルを, 島津製 G. C. 1 A 型ガスクロマトグラフィーで検した結果は第3図に示すごとくで, 別に合成した乳酸エチル, ロイシン酸エチル, サリチル酸エチル, No. 4 酸エチルエステルの混合物を同様条件で行った第4図の G. C. と比較して P_1 は乳酸エチル, P_2 はロイシン酸エチル, P_4 はサリチル酸エチル, P_5 は No. 4 酸エチルエステルと retention volume が完全に一致し, 先に得た I. R., P. C. の結果が確実に証明できた。

結果および考察

上述のごとく活性炭脱着中性区分より得た β -P.E. A. 区分を加水分解, その不揮発酸区分をペーパー分離して得た5つの酸成分の I. R., P. C., G. C. による分析の結果, 乳酸, ロイシン酸, サリチル酸の存在が明らかになり, また $C_8 \sim C_{10}$ の不明オキシ酸, イソバレリアン酸の存在が推定された。このうちロイシン酸は *Asp. oryzae* によるロイシン代謝生産物として既に植村^(2,3) が報告しているが, 清酒中より同酸エステルを見出したのは初めてである。

ロイシン酸はそれ自体温和な香りを有するが, 同エチルエステルを合成酒に添加して, その効果を検した結果 1 mg/l で清酒感の著しい増強が見られ, また同エステルの最も顕著な香効果は, つぎの実験で示され

る香り緩衝作用である。すなわち清酒香氣成分中最も多量に見出されるイソアミルアルコールを合成酒に 50 mg/l (これでも清酒中のイソアミルアルコール含有量に比しなお少量である) 添加すると, もちろん顕著なフーゼル油臭を感じるが, これにロイシン酸エチル 1 mg/l を添加すると, とたんにそれは清酒様芳香に変じ, なんらの不自然感を認められないばかりか, 香, 味ともに著しい品質の向上が見られる。これは同エステルが他種香氣に対し著しい香り緩衝作用を呈することを示すとともに, 清酒香氣成分として最も多量に存在し, 重要な因子となっているイソアミルアルコールを合成酒香氣として利用できなかったのは, このようなオキシ酸エステル類が重要な因子となっていることを知らなかったことによると考えられ, 今後清酒香氣成分の実用化に際し, 重要な意義を有するものと信ずる。

このように清酒香氣成分として最も重要な基礎香氣の一つと考えられるオキシ酸エステル類は, アミノ酸代謝中間生成物のエステル化による反応系外脱離により生成したと考えられ, すでに湯川⁽⁴⁾ が古醬油中より α -オキシフェニル乳酸を検出, 報告しており, また最近では Whiting⁽⁵⁾ が, 2-メチル-2,3-ジヒドロオキシ酪酸を林檎酒中より検出, 報告している。しかし今のところ乳酸, ロイシン酸, No. 4 酸を除くオキシ酸類は分離した香氣成分試料より見いだすことができない。また各種オキシ酸類がアミノ酸代謝中間物のエステル化による反応系外分離によってできると考えると, その生成量は対応するアミノ酸代謝最終生成物である高級アルコール類の存

在量に比例することが容易に推定できるもので、清酒フーゼル油区分中イソアミルアルコールに比し、他の高級アルコール類の存在量がより少ないことを考慮すると、ロイシン酸以外のオキシ酸の検出、証明が非常に困難であることが理解できる。しかしそれらのオキシ酸エステル類の存在は当然推定できるもので、事実 α -オキシ n -酪酸エチル、 α -オキシイソバレリアン酸エチル等を合成して合成酒に添加した結果、いずれもロイシン酸と同様、自然感および清酒感附与に著効を有することを知ったが、これらの完全な分離、証明はさらに試料を得て行いたいと考えている。

なお本報告は昭和35年11月、本会西日本支部例会で講演、発表した。また $C_4 \sim C_8$ の異性体を含むオキシ酸類およびそのエステル類を酒類の品質向上を目的として添加することについては目下特許出願中のものである。

(1) 山本 淳：合技報, No. 20, 915 (1960).

(4) 湯川又夫：東化, 38, 358 (1917).

(2) 植村定治郎：本誌, 13, 1146 (1937).

(5) G. C. Whiting：Chem. and Ind., 1958, 720.

(3) 植村定治郎：本誌, 15, 353 (1939).

[農化 第35巻, 第7号, p.623~628, 1961]

花粉の生化学的研究(第1報)*

赤松花粉の糖質について

斗ヶ沢宣久, 勝又悌三, 岩動悠子, 高橋睦子 (岩手大学農学部農芸化学科)

昭和35年11月29日受理

植物の生殖単細胞としての花粉について生化学的研究を行うことは興味ある問題と思われる。殊に糖質は花粉の生長、呼吸などの代謝に使われ、また浸透圧を調節して花粉管の伸長を助けるなどその存在意義はきわめて大きい。このたび花粉の生化学的研究の一端として赤松花粉の糖質の検索を行った。

実験の部

1. 成熟過程における澱粉粒の消長 本学部滝沢演習林で採集した赤松 (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) 花粉を試料とし、その成熟過程における澱粉粒の消長を沃素反応 (沃素 0.3 g, 沃化カリ 1.5 g を蒸留水 100 ml に溶解し、この1滴をスライド上の花粉に落とし、カバーガラスをかけ顕鏡) で調べた。なお未熟花粉は葯から分離不可能のため、そのまま分析に供し、また完熟花粉は開葯時の花粉を葯のまま採集、風乾後軽くたたいて葯から落とし、80メッシュの篩を通し

1. 飛散約2週間前

3. 飛散直前

2. 飛散約1週間前

4. 飛散花粉

第1図 赤松花粉成熟過程における澱粉粒の消長

沃素-沃化カリ液処理後撮影 (×400)

* Biochemical Studies on Pollen. Part I. Sugar Substances of Pollen of *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.

By Yoshihisa TOGASAWA, Teizo KATSUMATA, Yuko ISURUGI and Mutsuko TAKAHASHI
(Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Iwate University)