本報告は昭和 35 年 11 月, 本会西日本支部例会で発表した. 元素分析を依頼した熊本薬学部分析化学教室の田中先生に感謝致します. なお $C_4 \sim C_8$ の異性体を含むケト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す.

(1) S. Bergström, G. Aulin-Erdtman, B. Rolander, E. Stenhagen, S. Östling: <i>Acta Chem. Scand.</i> , 6, 1157 (1952); <i>C. A.</i> 47, 8645 (1953).	(2) 山本 淳: 本誌, 35, 619 (1961).
	(3) D. Cavallini, N. Frontali, G. Toshi: <i>Nature</i> , 163, 856 (1949), 164, 792 (1949).

[農化 第 35 巻, 第 8 号, p.715~719, 1961]

清酒香気成分に関する研究 (第 4 報)*

フェルラ酸, バニリン酸, バニリンの分離, 同定

山本 淳, 佐々木喜代, 猿野琳次郎 (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

活性炭脱着酸性区分をエステル化, 生成エステルを CaCl_2 で処理して得た揮発性オキシ酸区分よりフェルラ酸, バニリン酸を, またエステル化未反応酸区分よりバニリンを分離, 同定できた.

このように清酒中より新たに見出した 3 成分の合成酒添加試験を行った結果, フェルラ酸およびそのエチルエステルは 2~3 mg/l を添加すると明らかに辛味が附与せられ, 同酸が清酒辛味成分の一つであることを知った. またバニリンの芳香についてはよく知られているが, これを合成酒に 1 mg/l 添加すると顕著な菓子様芳香が附与せられ不可である. これに前に報告⁽¹⁾した β -フェニルエチルアルコール酢酸エステルを 0.5 mg/l 添加すると, 今までの菓子様芳香が即座に醸造物様香気に変じることを知り, 香気成分間の感覚的相互作用の顕著な一例として興味深い結果を得た.

また分離フェルラ酸の収量が同時に得たバニリン酸, バニリンに比し遙かに多いことより, 後者の生因がフェルラ酸の二次代謝に基くことが考えられ, これを確かめるため麴エタノール抽出液を処理して得たフェノール酸区分のペーパークロマトグラフィー (PC) によりフェルラ酸のみを検出, 確認できたがバニリン酸を見出すことはできなかった. また同時にシリンガ酸, 没食子酸等リグニン骨核物質も確認できなかったことより, 麴中のフェルラ酸の生因を確かめる目的で, 原料米を粉碎, 緩徐な条件で酸糖化した糖化液中より, 前と同様フェノール酸区分を分別, その PC の結果フェルラ酸を検出, 確認できた. このことより米中のフェルラ酸がリグニン構成物質として考えるより, 配糖体等のごとく酸分解により容易に分解し得る前駆物質を考える方が妥当である等の興味深い結果が得られた.

実 験 の 部

1. 活性炭脱着酸区分の分別 活性炭脱着アルコール溜去残渣エーテル抽出液を 10% Na_2CO_3 で処理して酸性区分約 30 g の多量を得たが, これを PC にて検した結果, 大部分がサリチル酸であることを知った. この故に同区分に無水エタノール 100 ml 濃硫酸 2 ml を加え, 8 時間加熱, 還流したのち, 重曹粉末を加え生成エステルの分解を防ぎながら減圧濃縮, 残渣をエーテルに溶解, 10% Na_2CO_3 と振って生成エステルと未反応酸を分った. すなわちこのような緩徐な条件では他のカルボン酸に比しサリチル酸はエステル化され難いので, その大部分を未反応酸として分離できる. 次にエーテルを溜去して得た生成エステル約 3 g をリグロイン 50 ml に溶解, 無水 CaCl_2 粉末 15 g を加え, 1 夜放置したのち濾別, 濾別結晶は石油エーテルで充分洗滌したのち氷水 200 g 中に投入, 生成附加化合物を分解, 遊離したオキシ酸エステルをエーテルで抽出, 無水芒硝で脱水後エー

* The Flavors of Saké. Part IV. Separation and Identification of Ferulic Acid, Vanillic Acid and Vanilline.

By Atsushi YAMAMOTO, Kiyo SASAKI and Rinjiro SARUNO (Kumamoto Research Laboratory, Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)

テルを溜去して得た約 2 g の残留物を減圧分溜に附し, $\sim 180^\circ/2\text{ mm}$ (Bath) で溜出する揮発性オキシ酸エステルと残留不揮発性エステルを分った. ついで両者共に 50 ml の 3% KOH-メタノールを加え, 4 時間加熱, 還流して加水分解後, 減圧濃縮, 残渣を少量の水に溶解, 硫酸微酸性としたのちエーテルで生成オキシ酸を抽出した.

このうち揮発性オキシ酸区分を東洋濾紙 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 2537 Å の紫外燈で検すると R_F 0.14 に極めて弱い吸収, 0.18 に顕著な螢光スポットが存在し, このほか 0.4, 0.7 にそれぞれ螢光, 吸収が見られる. さらに 1% フェノール-5% FeCl_3 のオキシ酸発色試薬により, 各スポットともそれぞれ特有のフェノール酸発色を示す.

この結果に従い, 上記揮発性オキシ酸区分を濾紙上, 帯状に附して前と同様条件で展開した後, 紫外燈で検し分離帯を切抜き, 細切後 10% Na_2CO_3 で抽出, 抽出液は減圧濃縮, 残渣を硫酸微酸性とした後遊離した生成酸をエーテルで抽出, 芒硝を加えて脱水後エーテルを溜去してそれぞれ R_F 0.14 の吸収部分より約 10 mg, 0.18 の螢光部分より約 0.2 g, 0.7 の吸収部分より約 0.1 g の分離オキシ酸の粗結晶を得た.

2. フェルラ酸, バニリン酸の同定 このうち R_F 0.18 の螢光部分より得た粗結晶は素焼板上で附着粘質物を除いたのち, 熱水より 3 回再結晶して美しい白色, 絹糸状結晶を得た. この結晶を PC で検して R_F 0.18 に顕著な螢光を発する 1 スポットを認めるのみで, 他に混存物を認めず単一物結晶であることを確め得た. 次に同結晶の融点, 元素分析を行った結果は第 1 表に示す如くで, 別に Vorsatz⁽²⁾ の方法に従いバニリンおよびマロ

第 1 表 R_F 0.184 の螢光オキシ酸の諸性質

R_F 0.184 の螢光オキシ酸結晶		
m. p.	167.0°	168.0°
元素分析 {	C 61.79%	61.85%
	H 5.24%	5.19%
紫外吸収極大	271 mμ	271 mμ

両者混融して融点降下を認めず.

ン酸より合成したフェルラ酸の理論値とよく一致し, 両者混融して m. p. 168° で融点降下を認めず, 分離結晶が酒中より新たに見出したフェルラ酸であることは確実である. さらにこの結果を確かめるために両者島津製 IR 型自記赤外分光光度計で流動パラフィンと共に測定した赤外吸収スペクトルは第 1 図の如くで, 3289 cm^{-1} の会合型 -OH; 1684 cm^{-1} の -C=O; 1661, 812 cm^{-1} の C=C; 1618, 1600, 1513 cm^{-1} の芳香核; 1429, 1269 cm^{-1} のカルボン酸の 2 量体の面内 -OH 振動; 1404, 1319, 1199 cm^{-1} のフェノール性 -OH; 1284, 1171 cm^{-1} の -OCH₃; 986, 942, 910 cm^{-1} のカルボン酸 2 量体面外 -OH 振動; 849, 802 cm^{-1} の隣接 2 H の吸収等細部に至るまで両者の吸収は完全に一致し, 分離結晶がフェルラ酸であることが確実に証明できた.

第 1 図 分別結晶およびフェルラ酸の IR

第 2 表 フェルラ酸, パニリン酸分離結晶のペーパークロマトグラム

	分離フェルラ酸結晶	フェルラ酸標品	分離パニリン酸結晶	パニリン酸結晶
2537 Å 紫外燈	螢 光	螢 光	吸 収	吸 収
B. P. B.	濃 藍 色	濃 藍 色	濃 藍 色	濃 藍 色
1% フェノール -5% FeCl ₃	黒 褐 色	黒 褐 色	濃 黄 褐 色	濃 黄 褐 色
5% Fe ₂ (SO ₄) ₃ -0.1% 赤血塩	濃藍→濃藍+濃褐	濃藍→濃藍+濃褐	濃藍で変化なし	濃藍で変化なし
	0.38	0.38	0.29	0.29

東洋濾紙 No. 50, 1.5 N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノール, 3 回反覆上昇, R_F は最終上昇線に対して。

つぎに R_F 0.14 の吸収部分より得た約 10 mg の粗結晶は PC で検した結果, なお不純物の混在を認めたので再び前と同様ペーパー分離を行ったが, 分離を完全ならしめるため同一溶媒で 3 回繰返し上昇展開を行ったのち, 予め附したパニリン酸と同位置に吸収を示す吸収帯を切抜き, 前と同様に処理して分離結晶約 1 mg を得た。これを前に得たフェルラ酸結晶とともに東洋濾紙 No. 50 上に附し, 1.5 N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノールで 3 回上昇せしめた結果は第 2 表に示すごとくで, R_F , 紫外燈発色, 1% フェノール-5% FeCl₃ のオキニ酸発色, 5% Fe₂(SO₄)₃-0.1% 赤血塩のフェノール発色共に同時に附した標品パニリン酸, フェルラ酸とそれぞれ完全に一致し, 特にオキニ酸発色試薬により黄褐色発色を示すパニリン酸は同じく黒褐色呈色のフェルラ酸と容易に識別できるもので, 紫外燈発色の結果と共にその判別に有力な根拠となり得る。これらの結果分別結晶がパニリン酸であることが同定できた。

3. パニリンの分離, 同定 活性炭脱着酸区分のエステル化で分った未反応酸区分は濃縮, 硫酸微酸性となし, エーテルで抽出, 抽出エーテル液は約 1/5 まで濃縮, 重曹飽和水で遊離酸を除いたのちエーテルを溜去して得た弱酸性区分は顕著なパニリン様芳香を有する。これを PC で検し, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬をスプレイすると, 同時に附した標品パニリンと R_F , 発色ともに完全に一致するスポットを見出し, パニリンの存在が明らかになったので, 混存する他のカルボニル成分を除くため前と同様ペーパー分離を行い, 約 2 mg の分別結晶を得た。これを東洋濾紙 No. 50 に附し, 1.5 N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノールで 3 回上昇展開した結果は第 3 表に示す如くで, 紫外燈吸収, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬による発色の色調, R_F が同時に附した

第 3 表 パニリン区分分離結晶およびそのセミカルバゾンのペーパークロマトグラム

	分離パニリン結晶	パニリン標品
2537 Å 紫 外 燈	吸 収	吸 収
2,4-ジニトロフェニル ヒドラジン試薬	橙赤色	橙赤色
セミカルバゾン Fe ₂ (SO ₄) ₃ -赤血塩	鮮青色	鮮青色
	0.12	0.12

東洋濾紙 No. 50, 1.5 N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノール, 3 回上昇, R_F は最終上昇線に対して

分離パニリン結晶セミカルバゾンの元素分析

実測値: C 51.95, H 5.54, N 20.17%
計算値: C 51.65, H 5.26, N 20.19%

パニリン標品と完全に一致し, 前に得た分別結晶がパニリンであることは確実である。つぎに分別結晶の残り全量にセミカルバジド 0.02 g, 酢酸カリ 0.02 g, 水 1 ml を加え 50° で数分間加熱, 放冷後生成物をエーテルで抽出, 未反応パニリンを除き, さらに水層に 2% KOH を滴加して強アルカリ性としたのち, エーテルで過剰のセミカルバジドを除き, 再び硫酸微酸性としたのち減圧濃縮, シラップ状の内容物を熱エタノールで抽出してセミカルバゾンの粗結晶を得た。これを熱エタノールから再結晶して得た精製結晶について行った元素分析および同様にしてパニリン標品より得たセミカルバゾンと共に 1.5 N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノールで展開したのち, Fe₂(SO₄)₃-赤血塩で発色せしめた PC の結果は第 3 表に示す如くで, 両者共に良く一致し, これらの結果前に得た分別結晶がパニリンであることが同定できた。

4. 麴および米粉中よりフェルラ酸の検出 上述の如く活性炭脱着酸区分よりフェルラ酸, パニリン酸, パニリンを分離, 同定したが, このうちフェルラ酸の収量が他に比して特に多いことは顕著な事実である。もちろん試料の捕集過程で吸着法によったことを考慮すると, 前の三者の収量がそのまま清酒中の存在比とはいえないが, 活性炭吸着が特別の選択性を有しないことを考慮すると, 三者の量比に大きな変化は考えられない。また特にパニリン酸の収量が少いこと, フェルラ酸は容易に酸化されてパニリンを副生すること (稀薄 KMnO₄ による酸化で生成パニリンを検出する方法はフェルラ酸検出法の一つとなっている) 等より, パニリン酸, パニリンがフェルラ酸の二次代謝でできることが推定される。これはフェルラ酸以外の二重結合を有する不飽和酸の酸化に

よる各種アルデヒド類の生成にも関連する問題として、香氣成分の検索上重要な意義を有する故、これを確かめ、同時にフェルラ酸の生成過程を明らかにする目的で、まず原料米 2 kg より常法で製した 72 時間後の出麴を減圧乾燥、粉碎したのち 95% エタノール 2 l ずつ 5 回室温で抽出を行い、抽出エタノール液は減圧濃縮、残渣をクロロホルムで抽出、抽出液はクロロホルムを溜去、残渣を更にエーテルで抽出、抽出エーテル液を重曹飽和水と振って酸性区分を分ち、さらに硫酸微酸性としてエーテルで抽出、芒硝で脱水後エーテルを溜去して麴中の遊離酸区分約 0.1 g を得た。これに無水エタノール 10 ml, 濃硫酸 5 滴を加えて 8 時間加熱、還流、エステル化したのち重曹水で未反応酸を分ち、生成エステルのエーテル溶液を 2% KOH 水溶液 2 ml 宛数回振ってフェノール酸エステル区分を分ち、同区分はそのまま 4 時間加熱、加水分解を行ったのち減圧濃縮、残渣を硫酸微酸性となし、エーテルで抽出して目的とするフェノール酸区分極く少量を得た。これを東洋濾紙 No. 50 に附し、1.5 N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノールで 1 夜展開したのち紫外燈蛍光発色、オキシ酸発色を検した結果、*R_F* 0.18 のスポットが同時に附したフェルラ酸標品と完全に一致し、麴遊離酸区分中にフェルラ酸の存在を確認できた。このほか *R_F* 0.08, 0.04 にそれぞれオキシ酸発色を認められるが、同時に附したバニリン酸と一致するスポットは見出すことができない。すなわち同酸の存在は認めることができなかった。

このように清酒中のフェルラ酸が麴に由来することを知ったが、さらに同酸が米中のリグニン物質の分解によってできるものであれば、麴より抽出したフェノール酸区分にシリング酸、没食子酸等のリグニン骨核成分を同時に見出すべきであるが、これらに相当するフェノール酸成分は前の PC の結果確認することはできなかった。またリグニン物質は一般に緩徐な酸糖化等の条件では安定で、分解され難いが、もし原料米酸糖化液中よりフェルラ酸を確認できれば、従来考えられているように同酸の生因をタンニン類⁽⁹⁾、リグニン物質⁽⁴⁾等と考えるより配糖体の如き緩徐な酸糖化により容易に分解し得る前駆物質を考えた方がよい。これを確かめる目的で、前に製麴に使用した原料米を粉碎して得た米粉 2 kg に 1% 塩酸水 8 l を加え、沸騰水浴上で 20 時間加熱、加水分解を行ったのち生じたフミン質物質を濾別、濾液を減圧濃縮、残渣をクロロホルムで抽出、クロロホルムを溜去した残渣を更にエーテルで抽出、重曹飽和水で酸性区分を分ち、硫酸微酸性で遊離した加水分解生成酸区分をエーテルで抽出、芒硝で脱水後エーテルを溜去した残渣は無水エタノール、少量の濃硫酸とエステル化、生成エステルを 1% KOH で抽出してフェノール酸エステルを分ち加水分解、最後に原料米酸糖化液中のフェノール酸区分約 0.05 g を得た。これを前と同様条件で検した結果、*R_F* 0.16 に紫外燈吸収、オキシ酸発色鮮黄色の顕著なスポットを見出したが、フェルラ酸を確認することはできなかった。しかし同スポット上部に僅かにフェルラ酸特有の黒褐色の発色が認められたので、得られたフェノール酸区分をペーパー上帯状に附して、分離を完全ならし

第 4 表 麴エタノール抽出液、米粉酸糖化液中より抽出したフェノール酸区分のペーパークロマトグラム

麴フェノール酸区分	米粉酸糖化液フェノール酸区分(ペーパー分離試料)	フェルラ酸標品	バニリン酸標品
吸収 0.04 黒紫色			
吸収 0.08 黄色			
(紫 外 燈)			吸収 0.12 黄褐色
<i>R_F</i>			
(1% フェノール) (-5% FeCl ₃)	吸収 0.15 鮮黄色	弱蛍光 0.15 黒褐色	
弱蛍光 0.15 黒褐色	弱蛍光 0.16 黒褐色		
	吸収 0.26 褐色		

東洋濾紙 No. 50, 1.5 N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノール, 1 夜上昇展開

めるため同一溶媒で 3 回展開を繰返したのち、紫外燈で検して同時に附したフェルラ酸と同一 *R_F* の弱い蛍光発色部を切り取り、細切後分離酸を抽出してごく微量の目的粗結晶を得た。これを東洋濾紙 No. 50 上に附し、1.5 N-NH₃ 飽和 *n*-ブタノールで 1 夜上昇展開を行った結果は第 4 表に示す如くで、紫外燈蛍光発色、フェノール-FeCl₃ のオキシ酸発色の *R_F*、色調共、同時に附して行ったフェルラ酸と完全に一致し、米粉酸糖化液中よりフェルラ酸を検出、確認することができた。しかしバニリン酸は見出すことができず、前のペーパー分離によって得た他の

フェノール酸は第 4 表の如くで、中でも特に収量の多かったフェルラ酸と R_F の極めて接近する不明酸結晶などについてはなお今後研究を進めたいと考えている。

結 果 お よ び 考 察

上述の如く活性炭脱着酸区分よりフェルラ酸、バニリン酸、バニリンを分離、同定し、清酒中にこれらの存在を新たに見出したが、フェルラ酸および同エチルエステルを 2~5 mg/l 合成酒に添加すると、明らかに辛味が附与される。またその存在量が多いことを考慮すると、同酸が清酒辛味の重要な因子となっていることが考えられる。

バニリンの顕著な芳香は言うまでもないが、これを 1 mg/l 合成酒に添加すると菓子様芳香が附与せられ酒として不可である。さらにこれに β -フェニルエチルアルコール酢酸エステル 0.5 mg/l を加えると、今までの菓子様香氣は直ちに醸造物様芳香に変ずる。このような両者の量比を種々変えて行った試験の結果、バニリン量の 1/10 量の同エステルが存在すると明らかに両者の香打消しの効果が現われるもので、このような稀薄溶液における両者の間の化学変化は考えられず、香氣成分間の感覚的な相互作用として、当然他種香氣についても同様の関係を有するものの存在が推定され、興味深い事実である。

またフェルラ酸の収量が同時に得たバニリン酸、バニリンより遙かに多いことより、これらがフェルラ酸の二次代謝によってできたと考えられ、これを確かめ同時にフェルラ酸の生因を明らかにする目的で、麴エタノール抽出液、原料米酸糖化液中よりそのフェノール酸区分を抽出、PC にて検した結果、いずれもフェルラ酸のみを確認できたが、バニリン酸、バニリンは検出することができなかった。これらの結果、前の推定が正しいものと考えられ、またフェルラ酸の生因が従来考えられていたように樹脂成分、或いはリグニン物質の分解によってできるとするよりも、米中で配糖体等緩徐な酸糖化により容易に分解し得るものと考えた方が妥当である。

本研究の大部分は昭和 35 年度大会で発表したもので、元素分析を依頼した熊大薬学部田中先生に感謝致します。また本研究を行うに当り当研究室別府正久君の御協力を戴いたことを感謝する。

(1) 山本 淳 : 合技報, No. 20, 915 (1960).	(3) G. Harris : <i>J. Inst. Brew.</i> , 62, 390 (1956).
(2) Vorsatz : <i>J. Prakt. Chem.</i> , (2), 145, 265 (1936).	(4) 浅尾保夫, 横塚 保 : 本誌, 32, 622 (1958).

[農化 第 35 巻, 第 8 号, p. 719~723, 1961]

ブチル細菌の蛋白分解性について*

酸性プロテアーゼの存在

内野不二, 伊藤 康**, 土井新次 (名古屋大学農学部農芸化学科)

昭和 35 年 12 月 15 日 受理

細菌の産生するプロテアーゼについては多くの研究があり、*Clostridium* 属菌についても主として病原性菌について多くの報告がある⁽¹⁻⁸⁾。著者等はすでにアセトン・ブタノール菌、東大 314 号菌の蛋白分解作用を調べ、作用至適 pH 5.5 の微酸性プロテイナーゼの存在を明らかにした⁽⁹⁾。その他の非病原性 *Clostridia* については未だ殆んど不明であることと、未だ細菌においては殆んど見だされていない酸性プロテアーゼの存在を予想して、著者等は新たに土壌等より分離したブチル細菌、若しくはこれに類縁の細菌について、それらの蛋白分解性の調査を試みた。その結果、それらの中には、すでに報告したアセトン・ブタノール菌の蛋白分解酵素と同様な作用至適 pH を有するものがあると同時に、細菌では現在までに殆んど報告されていない酸性プロテアーゼを産生する細菌の存在することを見出した。以下それらの結果について報告する。

* On the Proteolytic Activity of "Butyl" Bacteria. Occurrence of a New Acid-Protease.

By FUJI UCHINO, KÔ ITÔ and SHINJI DOI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Nagoya University)

** 現在、国税庁醸造試験所