

Table IV 火入前後の變化 (60°C, 40 min)

Sake	unknown Keto-a. meter	α -Ketoglutaric a. micro-mol	pyruvic a. micro-mol
火入前	0.85	0.230	4.90
火入後	0.88	0.232	4.90

ピルビン酸に比較して α -ケトグルタル酸は
少なく大體 $\frac{1}{10}$ であつた。

なお火入しても減少又は増加は見ら
れなかつた。

VI 清酒中の未知ケト酸に就て

優良酒の Keto acids の定量中 Rf 0.92 の點に未知ケト酸らしき spot を得たが、これに就いて検討した結果を報告する。

CAVALLINI 等²⁾もこの spot らしきものを血液及び尿中に検出しているが、Keto-acid ではなく、他の carbonyl 化合物ではないかと報告している。

この未知の spot は清酒中に時に α -ケトグルタル酸より多く検出され、相當に多く含有されていると思われる。著者等は次の實驗結果からケト酸の一つである事を確認し、更にピルビン酸の縮合によつて生成したものであらうと推定した。

- ① Hydrazones の solvent 溶液は高定酸度を有し、且つアルカリ溶液からは solvent で抽出出来ない。
- ② この Hydrazone の Rf は carbonyl 化合物の hydrazones の Rf より常に小さい。
- ③ Hydrazone は醋酸エテルから再結出来るが、アルコール水からは會合して再結出来ない。
- ④ ピルビン酸の Standard 溶液も長時間放置すると同一物質 (Rf一致する) を生成する。
- ⑤ NaOH, AgNO₃ でピルビン酸をやゝ急に酸化するとこの物質を生成する。

VII 結 語

著者等は清酒中の Keto-acid を定量せんとし、SELIGSON 等の方法を改良し、有効な solvent クロロホルム-醋酸エテル及び鹽析劑 Na₂SO₄ を選擇し、solvent の使用量を少くし、分析操作を簡單にし、定量範圍を原法の 8 倍に廣げた。更に除蛋白、hydrazones の安定性に就いて検討を加え、その結果清酒について 95% の回收率を得、この方法によつて清酒中のピルビン酸及び α -ケトグルタル酸を定量し、優良酒に多く、並酒に少ない事を明かにした。更に Rf 0.92 の點に未知の Keto-acid を検出し、これはピルビン酸の縮合に依つて生成したものであるかと推定した。

(昭和29年6月全國合成清酒技術者大會に於て發表)

文 献

- 1) 大高: 合成清酒協會々報, No.10 (26.7).
 - 2) CAVALLINI, D., FRONTALI, N. and TASEHI, G.: Nature 163, 568 (1949); 164, 792 (1949).
 - 3) SELIGSON, D., and SHAPIRO, B.: Anal Chem., 24, 754 (1952).
- (昭和29, 8, 30受理)

清酒中の有機酸の研究 (第5報)

酒母及び清酒醪中の Keto-acids の消長並びに Pyruvic acid の異性體に就いて

川 端 修 一・川 野 義 男 (東洋醸造株式会社)

I. 酒母中の Keto-acids の消長

第4報¹⁾に次いで酒母及び清酒醪中の Keto acids の經過分析を行つた。速醸酒母の外米、内地米の經過を Fig. I 及び Fig. II に示す。

外米は内地米に比較してピルビン酸は一般に少いが大體同様な消長を示し、ピルビン酸は酵母添加後「フクレ」から「湧」にかけて急激に増加し「休」「分」と減少する。この間ピルビン酸は0.1%以上に達し乳酸を除いては最も多い酸である事を示す。

更に宮地氏²⁾の報告によると速醸酒母の酸化還元電位は「フクレ」まで上昇し、「フクレ」から低下し「湧」にて最低を示し、次第に上昇するのであるがこの經過曲線はピルビン酸の消長と殆んど逆となり、ピルビン酸の濃度を考えると相當に關係あると思われる。

著者等は多くの速醸酒母の乳酸の消長を試べた結果、乳酸は「フクレ」を最低として僅かづゝ増加している、

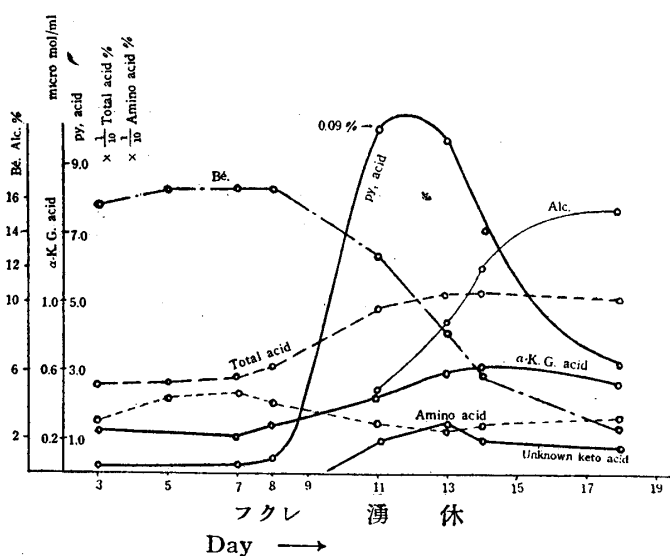


Fig I 酒母中の Keto-Acids の消長 (外米)

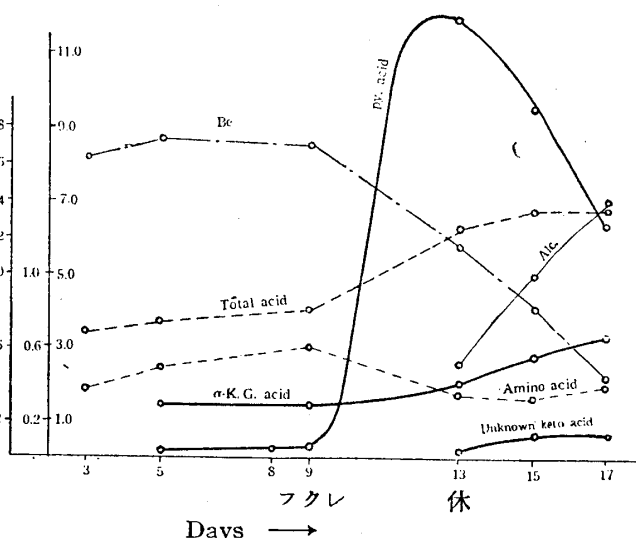
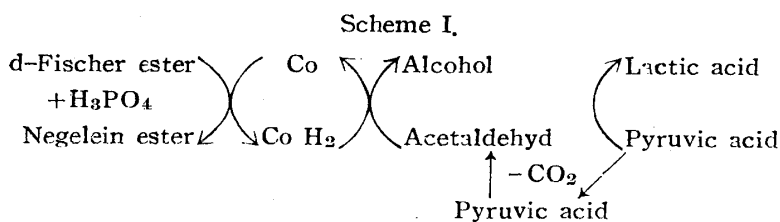


Fig II 酒母中の Keto-Acids の消長 (内地米)
Total acid は Lactic acid として, Amino acid はホルモール法に依りグリココールとして示した

「フクレ」から酸化還元電位が下る事と考え合せるとピルビン酸が乳酸に還元され得ると思われ、更にfreeの磷酸は「フクレ」1日前で最高を示し「湧」まで減少する。



此等の結果から酒母に於いて最も主な反応系の一つとして Scheme I の存在が考えられる。この系を化学的に見ると多量の乳酸が存在すれば(宮地氏に依れば乳酸が酒母中に多い程一般に電位は高い)。乳酸の生成は抑制されピルビン酸を集積する。従つてピルビン酸は脱炭酸されてアセトアルデヒドから酒精に還元される一方解糖作用が抑制されると推定される。

酒母に乳酸を加える利点として雑菌の繁殖防止、酵母の増殖等が報告³⁾⁴⁾されているが、pH、酵母の増殖等の点では乳酸に限定されるものではないと思われる。著者等は上記の結果から乳酸を添加する理由として雑菌の繁殖防止及び、酒母の糖化と醗酵のバランスを取る最適の酸であろうと推定した。

次に α -ケトグルタル酸はやはり「フクレ」から上昇するが最高値はピルビン酸より遅れ、なお外米の場合はやゝ経過が早い。

未知のケト酸¹⁾は外米に多い結果を得た。

I. 清酒醗中の Keto-acids の消長

清酒醗中のケト酸の消長を Fig. III, Fig. IV に示す。

3日目から多量のピルビン酸を生産し、13日頃から減少している。酸化還元電位は3日目頃から減少し13~15日目で最低を示し、再び上昇しているが醗でもピルビン酸の経過と関係あると思われる。

外米は内地米のピルビン酸より一般に少いが更に13日目頃から急激に減少している。この事は前報¹⁾に報告した清酒の品質とピルビン酸の含有量を説明するものと思われる。

α -ケトグルタル酸は僅かに上昇しているが内地米は少く、外米は多い。

この経過で内地米醗のピルビン酸の最高濃度は0.0704%で、この時の総酸の1/3以上となる。

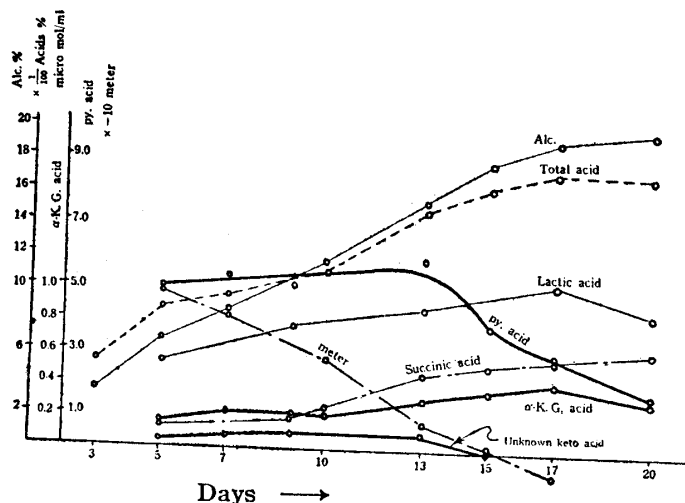


Fig III 清酒醪中の Keto-Acids の消長 (外米)

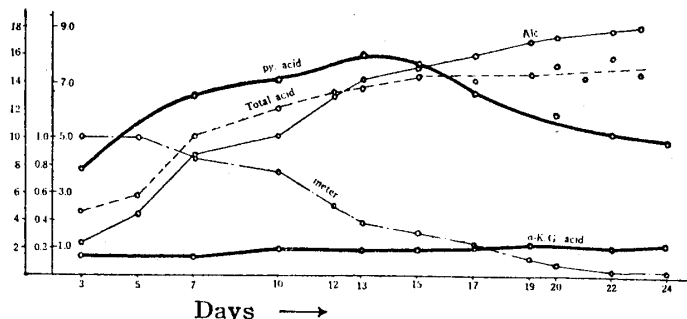


Fig IV 清酒醪中の Keto-Acids の消長 (内地米)

II. Pyruvic acid の異性體に就いて

CAVALLINI⁵⁾ はピルビン酸の 2,4Dinitrophenyl hydrazone はその paper chromatography で 2 點を與える事を報告し、次で 1952 年 SELIGSON 等⁶⁾ もこれを認め、これは hydrazone 生成時の isomer であると推定しピルビン酸の値として Total を定量した。更に ISHERWOOD⁷⁾ は 1954 年これに就いて $C=N$ による Cis, trans であると推定しピルビン酸と 2,4Dinitrophenyl hydrazone との反應條件でその比率を變える事を明らかにしている。

著者等はこの研究が殆んど終つてから、ISHERWOOD の報告を入手したのであるが、ピルビン酸の hydrazone には cis, trans が存在する事を確認し、ピルビン酸自身に、ケト型、エノール型が存在する事を推定したので此に報告する。

A ヒドラゾンの cis, trans の確認

ピルビン酸を hydrazone となし、paper chromatography で展開し、上部の isomer A、下部の isomer B を別々に抽出し、HCl 酸性となし、ピルビン酸を free にし、24hrs 後再び hydrazone として展開した。isomer A 及び B はそれぞれ A、B の 2 點を得た。

次に isomer B (A より常に多い) のみを抽出し hydrazone を分解する事なくクロロホルムに移し、紫外線を 6 hrs 照射し paper chromatography で展開した結果多量の isomer A と少量の isomer B を得た。紫外線照射で cis, trans の轉位が行われたものと思われる。

次にピルビン酸 2 種 (武田, 東京化成) 清酒 5 種に就て isomer A 及び B を定量した結果 isomer B は 93~95% を得た。この條件では殆んど一定した比率で cis, trans を生成すると思われる。

B ピルビン酸のケト型 エノール型の推定.

ピルビン酸を Br 化し α -ブロムケトンとなしエノールを検出し、更に定量した結果ピルビン酸の標準液⁸⁾ では滴定酸度に對し 4.8% を得た。更に清酒中にもエノール型を検出した。

F. W. PENISON⁹⁾ は 1952 年特殊な paper chromatography でピルビン酸を展開し、2 點を認め更に硫酸處理で 1 點を消失する事を報告した。

著者等もイソプロパノール、第 3 ブタノール、ベンジアルコール、水、(1:1:3:1) 2% 蟻酸の solvent とフェノール-水でそれぞれ 2 點 (前者 Rf 0.52, 0.37) を得た。更にこの 2 點をそれぞれ抽出し、2,4-Dinitrophenyl hydrazone として展開した結果、2 點はそれぞれ全く同じピルビン酸の hydrazone A 及び B を生成した。更に $FeCl_3$ を加え加熱すると眞紅色を呈す。かかる點からピルビン酸にはケト、エノールが存在すると推定した。ピルビン酸の hydrazone A、B の比率は反應條件を直接變えるより、ピルビン酸の前處理に依り大きい變化が見られる。ピルビン酸を硫酸處理したものは isomer A を減少し、Br 化してエノールを固定したものはその A を殆んど消失していた。更にピルビン酸を Zn-HCl で還元すれば isomer A は減少し、アンモニヤ性硝酸銀で酸化すれば isomer B が減少していた。更にピルビン酸をアンモニヤ性硝酸銀で酸化し、醋酸以外の生成物を數

(416)

(川端, 川野) 清酒中の有機酸の研究 (第5報)

種得たがこれに就ては後報に記す。

IV 結 語

酒母及び酒醪中の Keto-acids の消長を調べ酒母に於て主な反應系を推定し、乳酸の添加は主として雑菌の繁殖防止及び糖化と醱酵のバランスを取るものと推定した。次に醪に於てはピルビン酸が急激に減少するものには並酒が多く徐々に減少するものには優良酒が多い事を明らかにした。ピルビン酸の最高濃度は、酒母では 0.1% 以上、醪では 0.07% と高濃度を示した。

ピルビン酸の 2,4-Dinitrophenyl hydrazone に cis, trans が存在する事を明らかにし、ピルビン酸自体にケト, エノールの存在を認めた。

終りに種々御示教下された三樂の宮地氏に厚く御禮を述べ、なお本研究の発表を許可された白井社長に厚く感謝の意を表す。(昭和29年6月全国合成清酒技術者大会に於て発表)

文 献

- 1) 同第4報. 2) 宮地: "清酒の酸化還元電位に就て" 農化, 講演. 3) 鐵本: 農化, 12, 977 (1936).
4) 間瀬: イースト工業會研究報告, 6, 81 (1953). 5) CAVALLINI, D., FRONTALI, N., and TOSHI, G., : Nature 164, 792 (1949). 6) SELIGSON, D., & SHOPIRO, B., : Anal. Chem., 24, 754 (1952). 7) ISCHERWOOD, F. A., & CRUICKSHANK, D. H., : Nature 173, 121 (1954). 8) DENISON, F. W., & PHORES, E. F., : Anal. Chem. 24, 1628 (1952). (昭和29, 8, 30 受理)

Peptides と細菌の發育 (VI) *Lactobacillus delbrueckii* の榮養要求

PETERS V.J. and SNELL E.E.: J. Bact. 67, 69 (1954)

L. delbrueckii ATCC 9649 は D-alanine, L-alanine, L-threonine, L-tyrosine, L-valine, L-tryptophan, L-cystine, L-serine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-arginine, L-lysine, L-leucine, L-phenylalanine, L-histidine, pantothenic acid, nicotinic acid, riboflavin, pyridoxamine phosphate, hypoxanthine, uracil, K⁺, PO₄⁻, Mg⁺⁺, Na-acetate, oleic acid, thymidine 及び醱酵性糖を必須榮養素として要求する。

casein hydrolyzate は必須アミノ酸を供給するが、一種アミノ酸省略培地に於てそのアミノ酸源としての價値を比較するとき、部分分解物の方が完全分解物よりも活性である。特に部分分解物に含まれる serine, histidine などの peptide の發育促進性が認められる。

glycyl-L-tryptophan は16時間培養で 20μg/6ml 以上で發育を阻害し、又 glutathione (10~30μg/ml) も阻害をする。これらの毒性は casein の部分分解物又は酵母抽出液によつて reverse される。このやうな阻害的 peptide の存在と polypeptide 性抗生物質の作用機構を考え合わせると興味深い。(橋田)

E. coli 變種によるビタミンB₁₂の定量

JOHANSSON K.R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83, 448 (1953)

DAVIS and MINGIOLI [J. Bact. 60, 17 (1950)] によつてビタミンB₁₂定量に *E. coli* を使用することが始められた。本報では *E. coli* 113-3 を使用する濁濁法について種々の條件を検討している。

① *E. coli* 113-3 は methionine 及び B₁₂ に response する變種であり、methionine は B₁₂ 定量を妨害するが通常 methionine 量が 5 萬倍以下の時には無害である。② 表面積を大きくし且つ振盪する方が大なる發育を得る。しかし小試験管を用い静置することも可能でこの場合は B₁₂ が 2~20μg で對應曲線が描ける。③ cyanide は cobalamin に作用し耐熱性にする作用があるが過剰量は *E. coli* の發育を阻害する。④ thioglycolate, ascorbic acid などの還元劑は發育を阻害する。Na-thioglycolate は 5.0μg/ml 以下を加えると B₁₂ 類を安定にさせる。

Streptomyces 醱酵液濃縮物の B₁₂ 含量を定量しているが試料調整に於て KCN 1.0μg/ml 添加の上 autoclave するか又は滅菌濾過法を採用すれば *L. leichmannii* 法に匹敵する好結果を得られる。(橋田)