

## 報 文

## ブランデーの香味成分について (第2報)

## フーゼル油成分の Paper Chromatography による検索

村 木 弘 行 (山梨大学工学部醸酵研究所)

## 緒 言

前報<sup>1)</sup>に於いて粕ブランデーからフーゼル油分を分離捕集し、同時にこれから遊離酸をイオン交換によつて分取した。これらの試料について先ず主なアルコール、遊離酸、エステル等の成分を予知するため Paper chromatography による検索を行つたのでその結果を報告する。

## 実 験 方 法

## I. 試料

前報<sup>1)</sup>に記したように、フーゼル油の採取に当り油状に水と分離する部分(フーゼル油1—F1)と共に、その残渣の水からエーテル抽出によつてフーゼル油2(F2)を得た。この両者は各成分の量的比率に於ては恐らく相当に異り、従つて各成分に対する検出の難易は必ずしも同一でないと思われるので、両者を別個に Paper chromatography の試料とした。

遊離酸のための試料としてはフーゼル油からイオン交換によつて分取した酸を用い、アルコール及びエステルに対する試料としては脱酸後のフーゼル油を用いた。

## II. アルコール類の Paper chromatography

A. ザントゲン酸法<sup>2)</sup>

試料を少量の二硫化炭素及び苛性カリと振つて、アルコールをこれと対応するザントゲン酸カリに導き、これを2%苛性カリ水溶液を飽和せしめたn-ブタノールで展開する。濾紙は東洋 No. 52, 42cm × 2.5—4.0cm (以下の実験に共通)、室温に於て上昇法で行つた。発色は GROTE 試薬<sup>3)</sup>により、黄色のスポットとして検出されるが、この時2%窒化ナトリウムを重ねて噴霧するとスポットの黄色はそのままに地色を紫色に呈色せしめるので鮮明な Chromatogram が得られる。

## B. 酸化法

ザントゲン酸法はアミルまでの低級アルコールの分離に適する。ヘキシル以上の高級アルコールを検出するために次の方法を試みた。試料を20倍量の20%苛性ソーダと共に還流冷却器を附して油浴上で煮沸、鹼化し、次いで蒸溜してアルコールを溜出せしめる。溜液を10%硫酸を含む10%重クロム酸カリと共に還流冷却器を附して数時間煮沸、酸化してアルコールから酸を生成せしめる。生成酸はエーテルで抽出し、遊離酸として後述の方法で展開する。但し酸化によつて対応する酸となるのは第1級アルコールのみであつて、2級、3級のアルコールは炭素数の少い酸を生ずる。従つて酸に於ける結果を直ちにアルコールにあてはめることは出来ないが、もしカブロン酸以上の高級酸が検出された場合には、何等かのヘキシル以上の高級アルコールの存在を示すことになる。

## III. 遊離酸の Paper chromatography

A. BROWN 及び HALL の方法<sup>4,5)</sup>

溶媒としてn-ブタノール：エタノール：3Nアンモニア水(4：1：5)の混合上層を用い、上昇法で展開した。発色は0.04%の B.T.B. によつた。C<sub>6</sub>以下の低級酸の分離に適する。なお原法では酸のNa塩を供試しているが、本実験ではイオン交換によつてNaを除き、アンモニア水で中和したNH<sub>4</sub>塩を供試した。NH<sub>4</sub>塩はカチオンのスポットを生じないことに利点がある。

B. 逆相法<sup>6)</sup>

酸のNH<sub>4</sub>塩を供試し、固定相として自動車用揮発油の沸点130—160°Cの溜分を用い、移動相としてメタノール：前記溜分(4：1)の混液を用いて下降法で展開した。C<sub>12</sub>以上の高級酸の分離に適する。発色は0.04%

(294)

(村木) ブランデーの香味成分について (第2報)

## B.T.B.

## IV. エステルの検索法

エステルを構成する酸成分について次の方法を併用して分離確認を試みた。

A. ヒドラジッド法<sup>7)</sup>

ヒドラジンヒドラートとの加熱によりエステルをその構成酸のヒドラジッドに誘導, 供試する。展開溶媒はイソアミルアルコール:ルチデン:水 (10:2:1) を用い, 上昇法で展開した。発色は10%アンモニア性硝酸銀を飽和せしめたn-ブタノールを噴霧し乾燥器中で軽く加熱する。

B. ヒドロキサム酸法<sup>8)</sup>

ヒドロキシルアミンとの反応によりヒドロキサム酸を生成せしめて供試する。n-ブタノール:ベンゼン (1:1) を溶媒として上昇法で展開し, 発色は10%塩化第二鉄エタノール溶液を用いた。

## C. 鹼化法

試料は脱酸してあるため, これをそのまま供試しても酸のスポットは検出されない。従つて試料を鹼化した後に見出される酸はエステルより生成したものと考えられる。試料を20倍量の20%苛性ソーダと共に還流冷却器を附して数時間煮沸鹼化し, 蒸溜してアルコールを駆出し, 残渣を硫酸酸性でエーテル抽出し, 抽出物をアンモニアで中和して供試する。方法は前項の遊離酸に準ずる。

## 実験結果及び考察

## I. アルコール

ブランデー (乃至ブドウ酒) 中のアルコール類については, 古く ORDONNEAU<sup>9)</sup>, MORIN<sup>10)</sup> 以来若干の報告があり, メチル, エチル他にプロピル, ブチル, アミルの各アルコールが最も通常の成分として知られている。本報のザントゲン酸法<sup>2)</sup>の結果に於ても第1表に示す通り, 標品との並行展開, 混合展開によりエチル, プロピル, ブチル, アミルの各アルコールが確認されて居り, 至つて当然の結果といえる。メチルは低沸点部に集つてフーゼル油中には見出されない。エチルは分溜によつて分離しきれずに残存したものと及びエチルエステルの分解によつて生じたものと思われる。またプロピル以上の高級アルコールは数種の異性体を持つのでその分別が問題である。最近の報告<sup>11)</sup>ではプロピルについてはノルマル (1-propanol), ブチルについてはノルマル (1-butanol), イソ (2-methyl-1-propanol) の他に sec-ブチル (2-butanol), アミルについてはノルマル (1-pentanol), イソ (3-methyl-1-butanol) 及び活性アミル (2-methyl-1-butanol) が報告されているが, イソプロピルの有無はなお明確でなく<sup>12-15)</sup>, またブチルの異性体について, 少量のイソに対し特異的に大量のノルマルの存在を報告した例があり<sup>9,16)</sup>, その当否が問題とされている。これらの異性体の分離検出については Paper chromatography では満足な結果は得ることが出来なかつた。この点に関しては後報にゆずりたい。

ヘキシル以上の高級アルコールについては MORIN<sup>10)</sup> はヘキシル, ヘプチルを, TROST<sup>17)</sup> はイソヘキシル, ヘプチルを, WEBB 等<sup>11)</sup> はn-ヘキシルを, また HENNIG 等<sup>18,19)</sup> はブランデーではないがブドウ酒のペンタン抽出物を加水分解してn-ヘプチル, sec-ノニルを推定している。本報に於ける酸化法の結果は, バレリアン酸以下の酸は当然検出されているが, これと共に F1, F2 とも微量ながらカプロン酸に相当するスポットが得られた。C<sub>7</sub> 以上の酸は検出されなかつた。酸に於ける結果を直ちにアルコールに当てはめることは出来ないが, 少なくとも何等かのC<sub>6</sub>以上のアルコールの存在がこれから推定される。特に第1級アルコールの範囲内ではカプロン酸は直ちにヘキシルアルコールを意味するものであり, 従来の報告例と考えあわせてヘキシルアルコールの存在の可能性が強いのではないかとと思われる。

またザントゲン酸法によるF2の Rf 0.06のスポットは恐らくグリコールの存在を示すものではないかと思われ, 2,3-butylene glycol の標品を用いて類似 Rf のスポットを得ることが出来る。

## I. 遊離酸

BROWN-HALL 法<sup>4,5)</sup>で展開した結果は第2表に示す通りで, 蟻酸及び醋酸, プロピオン酸, 酪酸, バレリア

第1表 ザントゲン酸法<sup>2)</sup>によるフーゼル油アルコールの Rf

	Standard	Detected	
		F1	F2
			0.06
Ethyl	0.23	0.21	0.22
Propyl	0.34	0.33	0.34
Butyl	0.44	0.43	0.44
Amyl	0.64	0.64	0.64

ン酸, カプロン酸, 及び  $C_7$  以上の高級酸を示すスポットが得られた。蟻酸と醋酸とは重複したスポットを与えて明確には分離しないが, いずれも既にブランデーの最も通常の成分として知られて居り, またエステルとして共に検出されている点から考えて, いずれも存在するものと考えてよいと思われる。酪酸以上の高級酸については異性体の分別が問題となる。BROWN<sup>4)</sup> は Paper chromatography により60時間の展開を行つてノルマル及びイソの酪酸及びバレリアン酸を分離しているが, 本実験に於ては満足すべき分離定性は得られなかつたのでこの点は後報にゆづりたい。

$C_7$  以上の酸は BROWN-HALL 法<sup>4,5)</sup>では分離出来なかつたのでこの点を逆相法<sup>6)</sup>で検討した結果, 殆んど全部の酸が  $C_{10}$  以下として Rf 0.76~0.84 の間に集中した。従つて  $C_7$  以上の酸として見出されたものは  $C_7$ ~ $C_{10}$  の間にあるものと思われる。 $C_7$ ~ $C_{10}$  の間については逆相法でも分離出来ず, 他の方法が必要である。逆相法ではわずかにラウリン酸 (Rf 0.67) 及びパルミチン酸 (Rf 0.54) に相当するスポットが得られたが, スポット自身の明確さもまた分離度も良好ではなく, 確認というには難がある。

ここに検出された酸の中で, スポットの大きさ, 呈色度等から推定したところでは醋酸 (及び蟻酸) が最も多量で, 酪酸, カプロン酸,  $C_7$ ~ $C_{10}$  の酸がこれに次ぎ, プロピオン酸が最も少い。

#### II. エステル

エステルの定性はこれを酸成分とアルコール成分とに分けて行うのが通常である。従つてエステルと遊離アルコール, 或いはエステルとエステルとの混合物について, 2種以上の酸, アルコールが検出された場合はその組合せの判定が困難である。故に個々のエステルを正しく確認するためにはこれを単離することが必要であつて, 本実験のようにフーゼル油そのままを試料とする Paper chromatography では完全なエステルの定性は望み難い。従つてここでは主としてエステルを構成する酸成分のみに限定せざるを得なかつた。但しエタノールよりも低沸点のエステルはフーゼル油の分離後に生成しない限り含まれる筈のないこと, またフーゼル油の分離操作中に試料の保存及び反復蒸溜によつてエステルの生成或いは分解が起つている可能性のあることは考慮の必要があろう。

結果は第3表に示した通りであつて, F1からは蟻酸, 醋酸の他に著量のカプロン酸以上の高級酸が見出され, F2には一般に僅かではあるが蟻酸よりバレリアン酸に至る酸が見出されたが, この中プロピオン酸についてはやや疑問がある。またF1に於ける鹼化法の試料を逆相法<sup>6)</sup>で検討するとラウリン酸, パルミチン酸相当のスポットを得るが, 分離度悪く, またスポット自体明確さを欠いた。

WEBB 等<sup>11)</sup>の報告したエステルは酸成分として酪酸, カプロン酸, カプリル酸, カプリン酸, ラウリン酸,

第2表 BROWN-HALL 法<sup>4,5)</sup>による  
フーゼル油遊離酸の Rf

	Standard	Detected	
		F1	F2
Formic	0.20	0.20	0.20
Acetic	0.20	0.20	0.20
Propionic	0.33		0.32
Butyric	0.43	0.42	0.42
Valeric	0.55	0.56	0.55
Caproic	0.66	0.67	0.67
> $C_7$	0.77	0.77	0.75

第3表 フーゼル油中のエステル構成酸の Rf

	Hydrazides			Hydroxamates			Free Acids		
	Standard	Detected		Standard	Detected		Standard	Detected	
		F1	F2		F1	F2		F1	F2
Formic	0.09	0.09	0.10	0.15	0.10	0.10	0.20	0.20	0.18
Acetic	0.16	0.16	0.16	0.25	0.25	0.25	0.20	0.20	0.18
Propionic	0.35						0.33		0.33
Butyric	0.54		0.55	0.66		0.68	0.43		0.43
Valeric	0.73		0.71				0.55		0.55
Caproic	0.79	0.79		0.85~0.92	0.82~0.94		0.66	0.66	
> $C_7$	0.85~0.92	0.91		0.85~0.92	0.82~0.94		0.77	0.77	

(296)

(村木) ブランデーの香味成分について (第2報)

ミリスチン酸, パルミチン酸を含んでいるが, 量的にはカプリル酸, カプリン酸が最も多かつたようである。本実験に於てもF1のカプロン酸及びC<sub>7</sub>以上の酸が最も著明のスポットを与えた。またカプロン酸, カプリル酸, カプリン酸等のエチルエステルはブランデーに比較的類似した香を持つものとして知られて居り, 官能的な面からこれらエステル存在は予想されるところである。

ここに見出されたエステルが, もしフーゼル油の保存中に生成されたものでなく, 最初からブランデー中に存在したものとすれば, 当然エタノールよりも高沸点でなければならず, 従つて蟻酸, 醋酸については恐らくブチル以上の高級アルコールとのエステルであることが考えられる。

次に鹼化法の試料調製に当り, 試料の鹼化後に蒸溜駆出したアルコール区分は, 当然遊離のアルコールとエステルのアルコールとの混合物であるが, 一応これについてザントゲン酸法<sup>2)</sup>で検討した。その結果メチルよりアミルに至る各アルコールが見出されたが, この中メチルアルコールは遊離としては検出されないものであるから, 当然エステルの鹼化により生成したものであり, しかも沸点から考えてフーゼル油中に含まれるためには, 恐らく酪酸以上の高級酸とのエステルでなければならぬと思われる。

#### IV. 粕ブランデーと本格ブランデーとの比較

以上の実験結果は粕ブランデーを試料として得られたものであるが, 粕ブランデーの香味はブドウ酒を原料とする本格ブランデーとは大分異り, 特異の粕臭を持つものである。そこで一応本格ブランデーについて同様の方法により, そのフーゼル油成分の検出比較を試みた。

試料として用いた本格ブランデーは昭和26及び27年度に本研究所に於て試醸したもので, 原料ブドウ果は甲州種, 酒母はOC-2, 原酒の仕込には亜硫酸を用いず, 蒸溜は銅製300l容ポットスチルで2回蒸溜を行つた。常法による一般分析値は次の如くである。

使用量	3.1l	エステル (醋酸エチルとして)	1.305g/l
アルコール	53.3vol%	アルデヒド (アセトアルデヒドとして)	0.262 //
酸 (醋酸として)	0.597g/l	フーゼル油	2.40 //

試料の処理は粕ブランデーの場合と全く同様に, 分溜によつて本格ブランデーの快香を持つフーゼル油計5gを分離捕集し, これからイオン交換によつて遊離酸を分取し, これらを供試料としてアルコール, 遊離酸, エステルに関する検索を試みた。

結果として得られる Chromatogram は粕ブランデーの場合と大体類似して居り, 定性的には全く相違は認められない。但しスポットの大きさや或いは呈色度等から推定した量的関係については多少の相違がある。例えば, アルコールについては本格ブランデーは比較的顕著なプロピルのスポットを与え, 遊離酸については粕ブランデーに於ては酪酸, カプロン酸が特に著明である。エステルは醋酸以外は一般に粕ブランデーの方が多きように思われ, 特にカプロン酸が著しい。しかしこのような成分の量的比率は個々のブランデーの性格によつても多少変動するべきものであり, ここに得られた結果を直ちに粕ブランデーと本格ブランデーの差と考えることは出来ない。むしろ Paper chromatography に検出される通常成分に関する限り, 両者は類似していると考えた方が適当であらう。

#### 総 括

(1) 粕ブランデーフーゼル油中のアルコール, 遊離酸, 及びエステルについて Paper chromatography による予備的検索を行い, 次の結果を得た。

アルコール: エチル, プロピル, ブチル, アミルの各アルコール。メチルは低沸点部に集積してフーゼル油中には見出されない。高級アルコール異性体の十分な分離は困難であつた。

遊離酸: 蟻酸, 醋酸, プロピオン酸, 酪酸, バレリアン酸, カプロン酸, 及び不確実なものとしてラウリン酸, パルミチン酸。またC<sub>7</sub>~C<sub>10</sub>の間の酸が見出されたが分離定性出来なかつた。高級酸の異性体の分離も満足すべき結果が得られなかつた。

エステル: 酸成分として蟻酸, 醋酸, 酪酸, バレリアン酸, カプロン酸, C<sub>7</sub>~C<sub>10</sub>の間の酸, 及び不確実なものとしてプロピオン酸, ラウリン酸, パルミチン酸。アルコール成分は遊離のアルコールと分別困難であるが, 遊離で見出されないメチルが検出されたのでこれは明らかにエステル構成成分と認められる。

(2) 同方法によつて本格ブランデーに対する検索を行い、2, 3の成分の量的相違を除いては粕ブランデーとの間に殆んど差を認めなかつた。

終りに終始御指導御鞭撻を戴いた国税庁醸造試験所長山田正一先生、東大坂口謹一郎、朝井勇宜両先生、本研究所有長六所文三先生、副所長多田靖次先生に厚く御礼申上げると共に本研究費の一部を太平醸造株式会社に仰いだことを記して謝意を表します。

#### 文 献

- 1) 本誌, 2) 刈米, 橋本, 木村: *Nature*, **168**, 511 (1951). 3) GROTE, I.W.: *J. Biol. Chem.*, **93**, 25 (1931). 4) BROWN, F.: *Biochem. J.*, **47**, 598 (1950). 5) BROWN, F., and HALL, L.P.: *Nature*, **166**, 66 (1950). 6) 井上, 野田: *農化*, **26**, 634 (1952). 7) 佐竹, 関: *化学の領域*, **4**, 557(1950). 8) 井上, 野田: *農化*, **23**, 294; 368 (1950); **24**, 291 (1951). 9) ORDONNEAU, Ch.: *Compt. rend.*, **102**, 217 (1886). 10) MORIN, E.-Ch.: *Compt. rend.*, **105**, 1019 (1887). 11) WEBB, A.D., KEPNER, R.E., and IKEDA, R.M.: *Anal. Chem.*, **24**, 1944 (1952). 12) BODENDORF, K.: *Z. Untersuch. Lebensm.*, **59**, 616 (1930). 13) FLANZY, M., and BANOS, M.: *Compt. rend.*, **206**, 218 (1938). 14) BUSCARONS UBEDA, F.: *Annales fis. y quim. Madrid*, **37**, 356; 371 (1941). 15) METRA, M., LESAGE, L., and DESCATOIRE, F.: *Ann. fals.*, **31**, 218 (1938). 16) CLAUDON, E., and MORIN, E.-Ch.: *Compt. rend.*, **104**, 1187 (1887). 17) TROST, F.: *Ann. Chim. applicata*, **25**, 660(1935). 18) HENNIG, K., and VILLFORTH, F.: *Vorratspflege u. Lebensm.-forsch.*, **5**, 181; 313 (1942). 19) HENNIG, K.: *Deut. Weinbau*, **22**, 311 (1943). (昭和32, 5, 10 受理)

## わさびの利用に関する研究 (第7報)

### わさびペルオキシダーゼの吸収スペクトルについて

小 島 操 (静岡薬科大学)

#### 緒 言

ペルオキシダーゼの単離精製については、WILLSTÄTTER & STOLL<sup>1)</sup>, THEORELL<sup>2)</sup>, KEILIN & HARTREE<sup>3)</sup>, JERMYN & THOMAS<sup>4)</sup>氏等が Horseradish の根茎から行い、KENTON & MANN<sup>5)</sup>氏は比較的簡単な方法で結晶化に成功している。我国では山崎氏<sup>6)</sup>は蕪から、森田氏<sup>7)</sup>は大根から、前記 KENTON & MANN の方法を適用して夫々結晶化し、種々の研究を行つている。之等の報告によれば、吸収スペクトル、電気泳動等から見て、少くとも2種の異つたペルオキシダーゼが存在している。

わさびのペルオキシダーゼの多種性についての報告は未だ見当たらない故、著者はわさびよりペルオキシダーゼの単離精製をこころみ、吸収スペクトルにより多種性を検討した結果1種のペルオキシダーゼを得たので報告する。

#### 実 験 の 部

##### 〔I〕 わさびペルオキシダーゼの単離精製

森田氏の Broad Bean Peroxidase の単離精製法<sup>8)</sup>に準拠して次の如く行つた。

試料……静岡県伊豆産わさび根茎を水洗した後、卸し金ですり卸したもの

単離精製法……前記森田氏の報文を参照して Fig. 1 の如く行つた。

実験方法……精製の各段階のものについて、前報<sup>9)</sup>と同様、近藤、森田の方法に準じて、ペルオキシダーゼ力を比色定量し、全液の酵素量をG.U.にて表わした。この場合反応液に用いる緩衝液は MCILVAINE pH 5.0を用いた。

吸収スペクトルは島津製 Model DU BECKMAN Spectrophotometer により、1cm Silica cell を用いて、紫外部近紫外部及び可視部のそれを測定した。

##### 〔II〕 精製ペルオキシダーゼ液の吸収スペクトル