

## ポーラログラフに依る醱酵生成物の研究 (第二報)

## ケトン酸に就て

農學博士 志方 益三

農學士 庄司 謙次郎

(昭和三年四月十七日受理)

## (1) 緒 論

ポーラログラフに依る醱酵生成物の研究に就ては既に第一報<sup>(1)</sup>に於て清酒、醬油、葡萄酒、ビールに就き多数の被還元性物質の存在を認め其内脂肪族アルデヒド、フルフロール、芳香族アルデヒドは之れを検出し得る事を示したり而も猶未定の被還元性化合物少からざるを以て醱酵に際して生成せられ得べき被還元性物質に就て當該方法に依り還元壓を測定し其検出並びに定量の一助と爲さんと欲す本報に於てはケトン酸との關係を考慮せん爲

$\alpha$ -Ketonsäure として Brenztraubensäure (焦性葡萄糖)

$\beta$ -Ketonsäure として Acetessigsäureäthyl (アセト醋酸エチル)

$\gamma$ -Ketonsäure として Laevulinsäure (レヴリン酸)

の還元壓測定結果並びに醱酵生成物中の未定被還元性化合物との關係を考察せん

とす

(2) Brenztraubensäure  $\text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{COOH}$ 

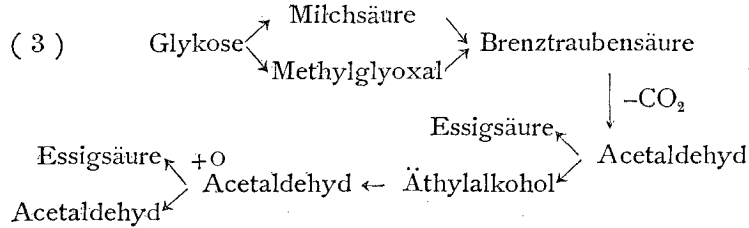
Brenztraubensäure が醱酵生産物に存在し得べき事は既に論證せられし所なり

顧るに酵母に依る糖類のアルコール醱酵の際に其中間生成物として Acetaldehyd が存在する事は衆知の事實にして更に黴類若くはバクテリアも糖類を分解しアセトアルデヒドを生産し種子の發芽に際しても亦同化合物の存する事を證明せられたり而して Neuberg<sup>(2)</sup> は Carboxylase は次式の如く  $\alpha$ -Ketonsäure 及其同族體を分解して炭酸瓦斯とアルデヒドを生ずる事を見出したり



之に依り糖類分解の過程は次式(3)に示す如く解せられ焦性葡萄糖はアセト

アルデヒド及び酒精の母體なりと見做さるゝに至れり



又蛋白質分解に就て Neubauer の所説に従へば脱アミノ作用に依り先づケトン酸を生じ更にアルデヒド、アルコールを生ずる事明かなり其他アセトン醱酵、酪酸醱酵、ブチルアルコール醱酵等に於てもアルデヒドの前程物質はケトン酸なりと稱せらるかくケトン酸は醱酵過程に於て極めて重要なは言を俟たす

實驗に用ひたる焦性葡萄糖は Kahlbaum 製にして亞硫酸様の刺戟臭を有し稍褐色を呈す本實驗の測定はポーラログラフを以て行ひ電流計は第一報の場合と同じく Hartmann und Braun 製の感度  $6.25 \cdot 10^{-7}$  Amp の半期一秒のものを使用し測定温度  $20^\circ \pm 1^\circ \text{C}$  なり

第一表 焦性葡萄糖 (1n.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  の十倍稀釋液に於て)

番號	溶 液	陽極補正電位 (ボルト)	實測還元壓(ボルト)				飽和曲線高さ(アムペア)			
			I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	0.1% or $1.463 \cdot 10^{-1}$ mol	+0.052	-0.293	-0.364	-0.480	out	$0.6 \cdot 10^{-7}$	$5.6 \cdot 10^{-7}$	out	—
2	0.1% " "	+0.052	-0.300	-0.366	-0.491	"	$0.6 \cdot 10^{-7}$	$6.0 \cdot 10^{-7}$	out	—
3	0.01 " $\cdot 10^{-2}$ "	+0.052	no	-0.418	-0.653	"	—	$0.6 \cdot 10^{-7}$	out	—
4	0.005 " $0.732 \cdot 10^{-2}$ "	+0.048	no	no	-0.726	-1.406	—	—	$58.2 \cdot 10^{-7}$	out
5	0.001 " $1.463 \cdot 10^{-3}$ "	+0.050	no	no	-0.734	-1.400	—	—	$0.9 \cdot 10^{-7}$	$2.5 \cdot 10^{-7}$

第二表 焦性葡萄糖 (中性鹽溶液に於て)

番號	溶 液	陽極補正電位 (ボルト)	實測還元壓(ボルト)				飽和曲線高さ(アムペア)			
			I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	0.1% or $1.463 \cdot 10^{-1}$ mol in 0.1n NaCl	+0.050	-0.298	-0.363	-0.498	out	$0.6 \cdot 10^{-7}$	$5.0 \cdot 10^{-7}$	out	—
2	0.01 " $\cdot 10^{-2}$ " "	+0.049	no	-0.393	-0.659	"	—	$0.9 \cdot 10^{-7}$	out	—
3	0.005% or $0.732 \cdot 10^{-2}$ " "	+0.045	no	no	-0.729	-1.383	—	—	$51.3 \cdot 10^{-7}$	out
4	0.001% or $1.463 \cdot 10^{-3}$ " "	+0.060	no	no	-0.753	-1.453	—	—	$0.9 \cdot 10^{-7}$	$5.3 \cdot 10^{-7}$
5	0.01 " $\cdot 10^{-2}$ in 0.1n KCl	+0.052	no	-0.413	-0.648	out	—	$0.6 \cdot 10^{-7}$	out	—

6	0.005 or $0.732 \cdot 10^{-2}$ in 0.1n KCl	+0.051	no	-0.431	-0.731	-1.545	—	tracc	$49.4 \cdot 10^{-7}$	—
7	0.01 " $1.463 \cdot 10^{-2}$ in 0.1n LiCl	+0.050	no	-0.415	-0.648	out	—	$0.6 \cdot 10^{-7}$	out	—
8	0.005 " $0.732 \cdot 10^{-2}$ " "	+0.042	no	no	-0.728	-1.404	—	$0.6 \cdot 10^{-7}$	$25.3 \cdot 10^{-7}$	$18.1 \cdot 10^{-7}$

第三表 焦性葡萄糖 (酸溶液に於て)

番 號	溶 液	陽極補 正電位 (ボルト)	實測還元壓(ボルト)				飽和曲線高さ(アムペア)			
			I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	0.1% or $1.463 \cdot 10^{-1}$ mol in 0.01n HCl	+0.102	-0.253	-0.323	-0.483	out	$1.2 \cdot 10^{-7}$	$6.2 \cdot 10^{-7}$	out	—
2	0.01 " $0 \cdot 10^{-2}$ "	+0.100	no	-0.365	-0.543	out	—	$0.6 \cdot 10^{-7}$	$48.8 \cdot 10^{-7}$	—

第一表、第二表、第三表は鹽化アンモニヤ溶液、中性鹽溶液、酸溶液中に於ける還元壓測定結果にして四段の波を示すも III が最も著しく焦性葡萄糖の還元依るものと認む IV は解離せる水素イオンの析出に依るものなり

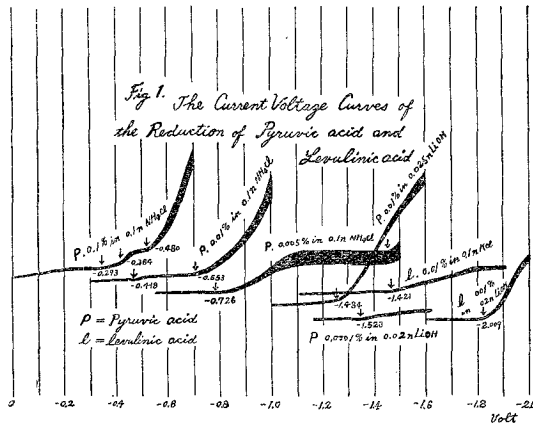
第四表 焦性葡萄糖 (アルカリ性溶液に於て)

番 號	溶 液	陽極補 正電位 (ボルト)	實測還元壓(ボルト)				飽和曲線 高さ(ア ムペア)
			I	II	III	IV	
1	0.1% or $1.463 \cdot 10^{-1}$ mol in 0.02n NaOH	-0.172	no	no	-1.305	no	out
2	0.01 " " $\cdot 10^{-2}$ "	-0.174	"	"	-1.457	"	"
3	0.005 " $0.732 \cdot 10^{-2}$ "	-0.174	"	"	-1.482	"	"
4	0.0001 " $1.463 \cdot 10^{-3}$ "	-0.165	"	"	-1.523	"	$6.0 \cdot 10^{-7}$
5	0.1 " " $\cdot 10^{-1}$ " 0.02n LiOH	-0.204	"	"	-1.304	"	out
6	0.01 " " $\cdot 10^{-2}$ " 0.025n "	-0.180	"	"	-1.434	"	"
7	0.005 " $0.732 \cdot 10^{-2}$ " 0.058n "	-0.178	"	"	-1.455	"	"
8	0.0001 " $1.463 \cdot 10^{-4}$ " 0.02n "	-0.134	"	"	-1.526	"	$3.1 \cdot 10^{-7}$

第四表は焦性葡萄糖を 1n. NaOH, LiOH にて中和し更に一定量のアルカリを加へて測定せり之に依つて見るにアルカリ性溶液に於てはケトン酸の還元壓は理論數より遅ると認めらる之或はイオン化したる焦性葡萄糖の方が解離せざる酸分子より還元せられ難きに依るに非らざるや猶研究の必要あり但アルカリ性溶液の方が同一濃度に於て飽和曲線著明にして 0.001%迄焦性葡萄糖の検出可能なるは特記す可き事項なりとす(第一圖参照)

(3) 清酒及醬油中の焦性葡萄糖

上掲の焦性葡萄糖の還元壓測定結果を第一報に示したる清酒及醬油蒸溜殘液中の還元壓と比較するに清酒に於て(第一報第七表)“III”の位置 -0.5— -0.7 Volt



に出づる物質醬油に於て(第一報第十表)“II”の位置の物質に相當するを以て真空蒸溜を以て確めんと試みたり

清酒は月桂冠、醬油は龜甲萬印市販の壘詰を用ひ醬油 100c.c. を取りて真空蒸溜を行ひ最後に約 10mm. 壓の沸騰湯浴にて加温しつゝ蒸溜し内容物の乾燥する時は數回純水を毛細管より通じ溜出液約

100 c.c. を得たり清酒は 200 c.c. を以て同様に處理せり

第五表 醬油及清酒真空蒸溜々出液

番 號	溶 液	陽極補正電位 (ボルト)	實測還元壓(ボルト)		摘 要
			I	II	
醬 油	1 供試品 20 c.c. 1n. NH <sub>4</sub> Cl 5 " 純 水 25 "	+0.058		-1.386	25—30 mm. 溫 浴 100°C
	2 " 25 " " 5 " " 20 "	+0.052		-1.314	10 mm. 溫 浴 80°C
	3 " 25 " " 5 " " 20 "	+0.059		-1.245	10 mm. 溫 浴 100°C
	4 " 2.5 " " 5 " " 42.5 "	+0.062		-1.403	"
	5 0.1n LiOH 5 " " 40 "	-0.114		no	"
清 酒	6 供試品 90 " 1n. NH <sub>4</sub> Cl 10 "	+0.050	-1.015	-1.350	"

第五表に示す如く焦性葡萄糖の位置に還元曲線を見出されず但 -1.3 乃至 -1.4 ボルトの位置に大なる波を見る而して此波はアルカリ性溶液に於て消失するを以て水素イオン析出に依るものならんと考へらるかくの如く焦性葡萄糖は存在せざる如しと雖も該化合物は不安定なるものなれば蒸溜操作中變化するやの疑あり則ち蒸溜中に損失を來たすか或は分解するかを見んが爲め醬油 100 c.c. に焦性葡萄糖 5 c.c. を加へて上法の如く真空蒸溜をなしたり

第六表 焦性葡萄糖を醬油中に添加真空蒸溜々出液

番號	溶 液	陽極補 正電位 (ボルト)	實測還元壓(ボルト)		飽和曲線高さ(アムペア)	
			I	II	I	II
1	供試品 90 c.c. 1n.NH <sub>4</sub> Cl 10 c.c.	+0.057	-0.662	-1.328	trace	out
2	供試品 50 " 1n.NH <sub>4</sub> Cl 10 " 純 水 40 "	+0.053	-0.643	-1.370	"	"

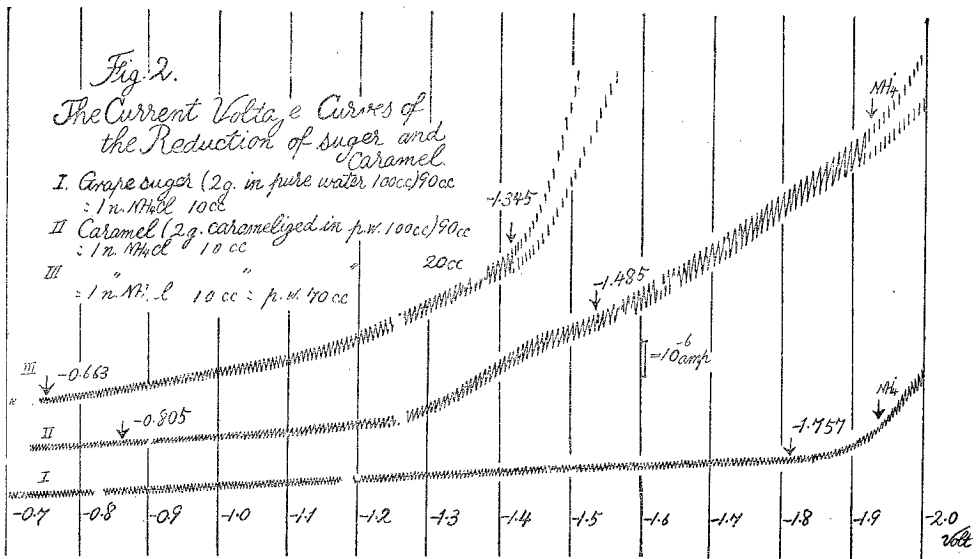
第六表に示す如く焦性葡萄糖は其痕跡を認められたるのみにて第一表の 0.005 %の  $58.2 \cdot 10^{-7}$  Amp 高さのものと比較する時は著しく其量少し故に假之少量の  $\alpha$ -Ketonsäure が清酒、醬油中にあるも上法の如き蒸溜法にては大部分の變化又は損失起るものと考へらるを以て上述實驗の結果を以て焦性葡萄糖は清酒、醬油中に存在せずと爲すは穩當ならず且普通蒸溜の際に於ては蒸溜時間長きもの程殘液中に焦性葡萄糖に相當する位置に多量の被還元性化合物を有するに依り次の如くキヤラメルに就きて實驗を行ひたり

葡萄糖は Merk 製 extra pure のもの 2g. を取りて直火にて焼き黒褐色を呈せしめたるものを純水を以て 100 c.c. となし實驗に供したり (第二圖参照)

第七表 葡萄糖及焦化糖

番號	溶 液	陽極補 正電位 (ボルト)	實測還元壓(ボルト)		
			I	II	III
1	供試品 90c.c. (葡萄糖) 1n.NH <sub>4</sub> Cl 10 "	+0.059	no	no	-1.757
2	" 50 " ( " ) " 10 " 純 水 40 "	+0.059	no	no	-1.781
3	" 90 " (キヤラメル化) 1n.NH <sub>4</sub> Cl 10 "	+0.094	-0.663	-1.345	out
4	" 20 " (キヤラメル化) " 10 " 純 水 70 "	+0.057	-0.805	-1.485	"

第七表中番號 1 及 2 は葡萄糖 2g. を純水を以て 100 c.c. に満たしたるものを用ひ葡萄糖の還元壓を表はす番號 3 及び 4 は 2g. 葡萄糖をキヤラメル化したるものを純水を以て 100 c.c. に満たしたるものを用ひたり焦性葡萄糖に相當する位置 (I) 及他に (II) の位置の被還元性物質を見出せり而して (I) のものは焦性葡萄糖の還元曲線の如く極めて漸進的なり故に上記清酒殘液 "III", 醬油殘液 "II" に對しては焦性葡萄糖なりやカラメル成分なりや高沸點芳香族アルデヒドなりや目下決定し難き状態なり



(4) アセト酢酸 CH3COCH2COOH

著者等は次にアセト酢酸の還元壓を測定せり但アセト酢酸は遊離の状態に於ては不安定なるを以て安定な同酸のエステルを用ひたり遊離酸と同酸のエステルの還元壓に就て還元壓を比較したる文献は未だ之を見ざるも大なる差なきものと考えらる

實驗には Kahlbaum 製アセト酢酸エチルを用ひ透明快香を有する液體なり 1 c.c. を 15 c.c. の Äthylalkohol に溶解して 100 c.c. に満たしたるもの即ち 1%容量のものを用ひたり

第 八 表 (アセト酢酸エチル)

番號	溶 液	陽 極 補正電位 (ボルト)	實 測 還 元 壓 (ボルト)
1	0.1% or 0.7902 · 10 <sup>-1</sup> mol in 0.1n NH <sub>4</sub> Cl	+0.054	-1.519
2	0.01 " " · 10 <sup>-2</sup> "	+0.050	-1.627
3	0.001 " " · 10 <sup>-3</sup> "	+0.052	-1.740
4	0.1 " " · 10 <sup>-1</sup> in 0.1n NaCl	+0.050	-1.717
5	0.01 " " · 10 <sup>-2</sup> "	+0.052	-1.813
6	0.001 " " · 10 <sup>-3</sup> "	+0.052	不 明
7	0.1 " " · 10 <sup>-1</sup> in 0.1n LiCl	+0.037	-1.786

8	0.01	"	"	$\cdot 10^{-2}$	"	+0.038	-1.750
9	0.1	"	"	$\cdot 10^{-1}$	" KCl	+0.038	-1.739
10	0.01	"	"	$\cdot 10^{-2}$	" "	+0.050	-1.792

第八表はアセト醋酸エチルを  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{KCl}$  の電解質溶液に於て實測したるもの中性鹽溶液に於て 0.01%迄を測定し得 0.001%以下は其の各電解質のイオンと重なりて不明なり

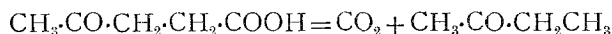
第九表 アセト醋酸エチル (アルカリ溶液に於て)

番號	溶	液	陽極補正電位 (ボルト)	實測還元壓 (ボルト)	
1	0.1% or	$0.7902 \cdot 10^{-1}$ mol in	0.1 n LiOH	-0.233	-1.906
2	0.1	" "	0.02n "	-0.182	-2.009
3	0.01	" "	$\cdot 10^{-2}$ 0.1n "	-0.213	-1.978
4	0.001	" "	$\cdot 10^{-3}$ " "	-0.184	-1.988

第九表に示すはアセト醋酸エチルをアルカリ性溶液に於て實測したるものにて 0.0001%以下は  $\text{Li}^+$  イオンと重なりて不明なり

(5) レヴリン酸  $\text{CH}_3\text{CO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$

$\gamma$ -ケトン酸<sup>(3)</sup>も亦酵素によりて分解さるゝ事は黒野博士等の試験あり即ち 0.5%の遊離酸は分解されて炭酸瓦斯と Methyl ethylketon を生ずと云ふ



Hexose 及 Laevulose は稀硫酸或稀鹽酸と共に熱する時は容易に褐色の Laevulinsäure を作り醗酵中にも生ずるものゝ如きを以て該酸の還元壓を測定したり

(6) レヴリン酸の還元壓

レヴリン酸は Kahlbaum 製品粘稠の液體にして快香あり 1%容量のレヴリン酸を供試品となしたり

第十表 レヴリン酸

番號	溶	液	陽極補正電位 (ボルト)	實測還元壓 (ボルト)	
1	1% or	0.798 mol in	0.1 n $\text{NH}_4\text{Cl}$	+0.050	-1.358
2	0.1%	" "	$\cdot 10^{-1}$ " "	+0.048	-1.400
3	0.01	" "	$\cdot 10^{-2}$ " "	+0.050	-1.470
4	0.1	" "	$\cdot 10^{-1}$ " in 0.1 n KCl	+0.099	-1.353
5	0.01	" "	$\cdot 10^{-2}$ " "	+0.050	-1.421
6	0.01	" "	$\cdot 10^{-2}$ " " NaCl	+0.097	-1.478

第十表は $\text{NH}_4\text{Cl}$  中性鹽溶液に於て實測したのものにて  $\text{H}^+$  イオン析出と混同する如し

第十表 レヴリン酸 (アルカリ溶液に於て)

番號	溶 液	陽 極 補正電位 (ボルト)	實 測 還 元 壓 (ボルト)
1	0.1% or $0.798 \cdot 10^{-1}$ mol in 0.02n LiOH	-0.131	-1.981
2	0.01 " " $\cdot 10^{-2}$ " "	-0.133	-1.987
3	0.001 " " $\cdot 10^{-3}$ " "	-0.163	-2.009
4	0.0001 " " $\cdot 10^{-4}$ " 0.03n "	-0.148	-1.988

但しアルカリ性溶液に於ては第十一表に示す如く實測する事を得たり上記の結果に見るに  $\beta$ -並びに  $\gamma$ -ケトン酸に比して遙かに還元せられ難し

#### (7) 清酒及醬油中の $\beta$ -及 $\gamma$ -ケトン酸の有無

清酒及醬油を1立採りて數回純水を加へて蒸發しエーテルにて三回振りて移行したる有機酸類を  $\text{CaCO}_3$  及石灰水を以て中和し此液を蒸發乾燥し純アルコールにレヴリン酸を溶解せしめ還元壓を測定したるも  $\text{Li}^+$  イオンと重なるか存在せざるか明かにするを得ざりき

#### 要 旨

1. 焦性葡萄糖は著しく還元し易きもアセト醋酸及レヴリン酸は還元し難く且兩者殆ど類似の還元壓を有す
2. 清酒及醬油中にも其蒸溜殘液中に  $\alpha$ -ケトン酸に相當する位置に被還元性物質の存するを認められたるも糖類の焦化したるものも此の位置に相當する物質を與ふるを以て未だ其如何なる化合物なりやを決定し難し
3. アセト醋酸、レヴリン酸の微量はポーラログラフに依つて證明困難なるものゝ如し
4.  $\alpha, \beta, \gamma$  のケトン酸の還元壓測定に依り  $\alpha$ -ケトン酸を除きては -1.7 ボルトより陽なる被還元性物質は  $\beta$ - 及び  $\gamma$ -ケトン酸に非ざる事を證明し得たり

本研究に要したる經費の一部は之を學士院研究費補助に仰ぎたり謹んで感謝の意を表す

#### 引 用 文 献

- (1) 庄司謙次郎：本誌 第3巻 第36號 P. 1121—1140 (1927)
- (2) C. Neuberg：Biochem. Z. **71**, 1—103 (1915)
- (3) 黒野, 深井, 館野；本誌第1巻4號