

醤油中の耐塩性酵母の増殖促進物質に関する研究 (第3報)

増殖促進物質としてミオイノシトールの分離同定

加藤 熙・好井久雄¹・並木満夫²

耐塩性酵母の増殖に対する各種成分の効果を検討した結果、既報^{1)・2)}のように、醤油は酵母エキスなど天然培養基成分に比べて優れた増殖促進効果を有しており、その促進効果は、醤油中の中性成分に起因すると考えられた。引続き醤油の分画を行い、各分画ならびに関連物質の増殖促進効果を検討した結果、醤油中の増殖促進物質がミオイノシトールであることを確認した。これらの結果について報告する。

実験方法

1. 醤油の分画

当所試験10水仕込溜醤油（全窒素2.53%，食塩18.4%）について、第1図に示す方法で分画を行った。

100mlの溜醤油は、湯浴上でペースト状に濃縮して無水硫酸ナトリウム50gを混合したのち、ソックスレー固体抽出器を用いて95%メチルアルコールで24時間抽出した。抽出液は、減圧乾固して溶媒除去後、約100mlの水溶液として、Dowex 50 X-16, X-1 および Amberlite IRA410 の3種イオン交換樹脂カラム（各々約700ml, 内径60mm）により連続的に処理し、流出液（中性区分）を集めて減圧濃縮した。

この濃縮液に約50倍容のアセトンを添加し、一夜冷蔵後遠心分離して得た沈澱をエチルエーテルで洗浄した。アセトン沈澱物は、50%メチルアルコール水溶液約3mlに加熱溶解したのち、一夜冷蔵して析出する結晶を濾別（MG1）、母液と結晶洗浄液（無水エチルアルコール）とを合して減圧乾固後、同様の操作で結晶を析出（MG2）させた。

以上の分画を、醤油100mlずつについて数回繰り返して行い、各分画は10mlの水溶液としたのち、増殖促進効果の測定に供した。

2. 増殖促進効果の測定

基本培地組成は、第1表の通りで、この2倍濃度液5mlに各分画0.1ml（醤油1mlに相当）を添加し、水を加えて10mlとしたのち、115℃、10分間加熱殺菌した。

別に30℃、2日間前培養した *Zygosaccharomyces rouxii* (*Z. rouxii*) の洗浄菌体懸濁液を 10^3 /ml 以下のレベルになるように接種して、30℃、7日間培養した。各培養液の5倍希釈液について660nmにおける吸光度を日立製作所製FPW-4型光電光度計によって測定し、菌体増殖度（以下、増殖度）とした。

第1表 基本培地1ℓ当たりの組成

グルコース	50 g
食塩	50 g
カザミノ酸 (Vitamin free)	0.035% (TN)
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g
ビオチン	2 μg
ミオイノシトール	2 mg
パントテン酸カルシウム	400 μg
ニコチン酸アミド	400 μg
ピリドキシン塩酸塩	400 μg
チアミン塩酸塩	400 μg
パラアミノ安息香酸	200 μg
リボフラビン	200 μg
クエン酸緩衝液*	25 ml

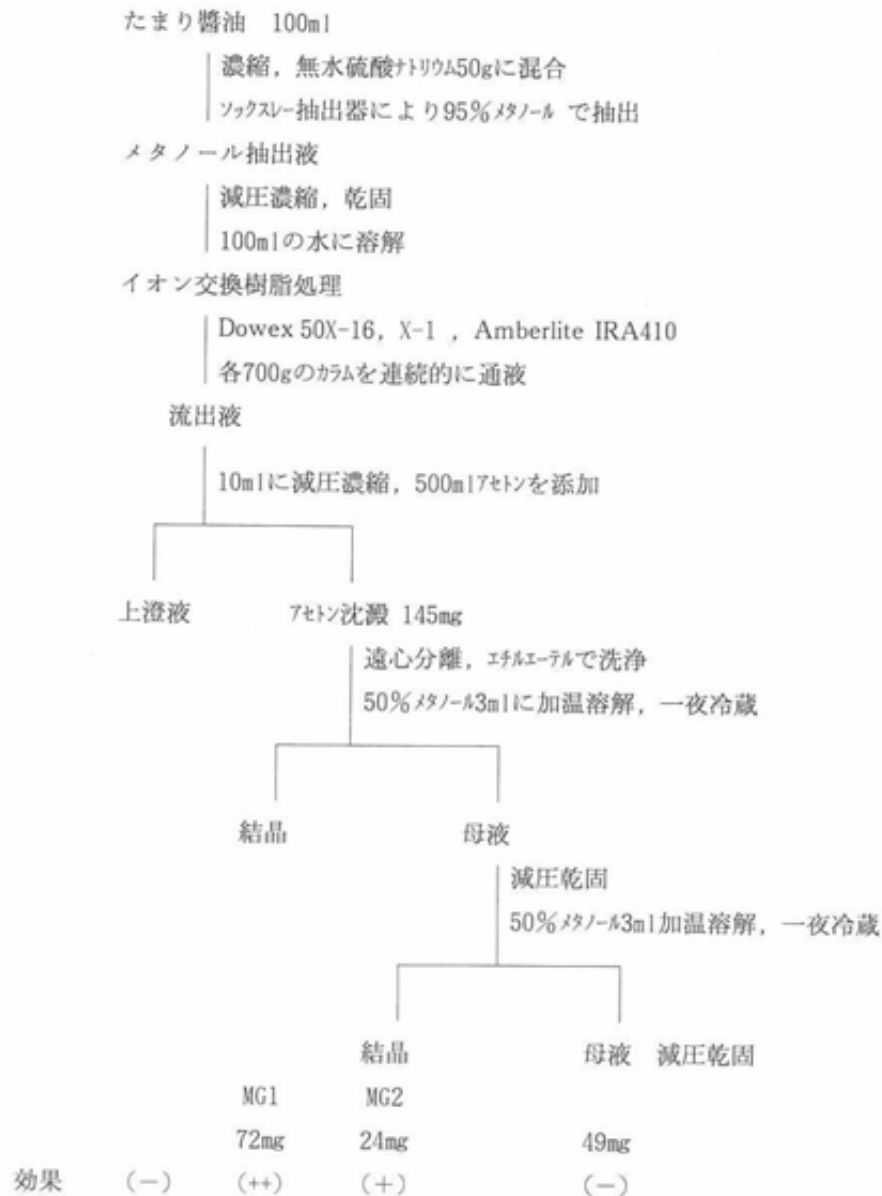
pH 5.4

*クエン酸緩衝液：クエン酸カリウム100gとクエン酸25gを水に溶解して1ℓとする。

3. 関連物質の効果の測定

有機塩基 8種類（アデニン、グアニン、ウラシル、キサンチン、チミン、シトシン、イノシン、キサントシン）は100μg/10ml、ロイコボリン、ペタイン、クレアチン、オロチン酸の4種類は40μg/10ml、ビタミンB₁₂は2μg/10ml、D-キシロース、L-アラビノース、L-ラムノース、D-リボース、D-ガラクトース、D-マンノース、D-フラクトース、トレハロース、セロビオース、ラクトース、メリビオース、ラフィノース、スタキオース、デキストラン、イヌリン、ペクチン、グリコーゲン、サリシン、可溶性澱粉、ソルビトール、マニトール、ガラクトクロン酸、エチル-α-D-グルコシドの23種類は2mg

1 東京農業大学醸造学科、 2 名古屋大学農学部



第1図 たまり醤油の分画

10mlを，それぞれ基本培地に添加して，前項と同様に増殖促進効果を測定した。

4. アセトン沈澱物の加水分解および灰化

アセトン沈澱物 2mgを 1N塩酸 5mlに溶解し熱水中で1時間加熱した加水分解液は，減圧乾固して塩酸を除去し 2mlの水に溶解した。また，アセトン沈澱物 2mgをろつぽにとり，500℃，1時間加熱後熱水で溶解した。加水分解液および灰化物熱水抽出液は，それぞれ，100mlの基本培地に添加して増殖度の測定に供した。

5. 濾紙クロマトグラフィー

アセトン沈澱物から再結晶法によって得た MG1 および MG2 は，それぞれ，10mgを 1mlの水に溶解し，5 μ l について濾紙クロマトグラフィーを行った。東洋濾紙 Na50 で，ブチルアルコール：酢酸：水 (4：1：2) およびイソプロピルアルコール：アンモニア：水 (7：1：2) により展開し，アンモニア性硝酸銀液で発色させた。

また，展開後の濾紙を風乾したのち，原点から 2cm 毎に切取り，メチルアルコール 8ml 中にいれて加熱抽

出した。各区分のメタノール抽出液は、減圧乾固したのち、基本培地 5 ml を加えて増殖度の測定に供した。10 mg/ml の結晶水溶液 5 μ l についてバイオオートグラフィーを行ったので、増殖度は 50 μ g / 5 ml すなわち 10 mg / l の濃度で測定されたことになる。

6. アセチル化とアセチル基の脱離

MG1, MG2 およびミオイノシトールの各 100 mg に酢酸ナトリウム 500 mg を混合し、無水酢酸 5 ml を添加して沸騰水中で還流冷却器を付して 2 時間加熱後、冷水 25 ml を加えて攪はんして冷蔵した。析出したアセチル化物結晶を濾別、水洗して、エチルアルコール 3 ml に加温溶解したのち、冷蔵して再結晶させた。

MG1 のアセチル化物については、アセチル基の脱離を行った。即ち、アセチル化物 50 mg を無水メチルアルコール 5 ml に加温溶解し、0.1 N Na-methylate 1.5 ml を添加、還流冷却器を付して 5 分間煮沸させた後、減圧乾固して 2 ml の水に溶解、これにエチルアルコール 2 ml を加えて冷蔵し、MG1 を析出させた。

7. 薄層クロマトグラフィー

MG1, MG2 およびミオイノシトールの水溶液 (10 mg/ml) について、メチルアルコール：アセトン：水 (4 : 5 : 1)、ブチルアルコール：アセトン：水 (4 : 5 : 1) を、また各アセチル化物のアセトン溶液について、ヘキサン：アセトン (3 : 1)、ベンゼン：メチルアルコール (10 : 1) を展開溶媒として、Merck 製シリカゲル G による薄層クロマトグラフィーを行った。いずれも 50% 硫酸を噴霧したのち加熱して発色させ、また東芝製 F13-L 型蛍光検査灯によって蛍光の有無を確認した。

8. 元素分析、融点測定および分光分析

MG1, MG2, それらのアセチル化物は、アブデルハルデンによる乾燥後、Pregle 法によって炭水素元素分析を、Dumas 法によって窒素元素分析を行った。融点は、柳本製作所製マイクロ融点測定装置により測定した。

イオン交換処理液は 100 倍希釈液として、アセトン沈澱物や MG1 などの結晶は、1 mg / 5 ml の水溶液として、日立製作所製 EPS-2U 型自記分光光度計により紫外外部吸収スペクトルを測定した。また、MG1, ミオイノシトール、それらのアセチル化物は、1 mg を臭化カリウム 200 mg に混合し、錠剤法により日本分光製 IR-5B 型赤外分光光度計を使用して赤外部吸収スペクトルを測定した。

実験結果および考察

1. イオン交換樹脂処理液の効果

前報²⁾で報告したように、第 1 図の分画の中で、イオン交換樹脂処理後の流出液（中性区分）が原溜醬油と同じ増殖促進効果を有した。この流出液は、無色透明で、pH 7.0、全窒素 0.12% で、210 nm および 270 nm に極大吸収を示した。糖類の他にペプチドあるいは有機塩基の混在が考えられたので、関連物質の増殖促進効果を *Z.rouxii* について測定した。

松田ら³⁾は、酵母の生育に対する DNA, RNA の効果について、また CHARALAMPOUS ら⁴⁾, MATSUYAMA⁵⁾は、シトシン、ウラシル、グアニンなど有機塩基の効果について報告しているが、第 2 表に示すように、アデニンなど 8 種類の有機塩基は、大西の試験結果⁶⁾と同様、本菌に対する増殖促進効果を有しなかった。また、酵母に対する生理活性が認められているロイコボリン、ベタイン、クレアチン、ビタミン B₁₂、オロチン酸も、本菌に対しては増殖促進効果を有しなかった。以上のことから、食塩存在下における本菌の生育には、他の成分が必要であることがわかった。

第 2 表 有機塩基、ビタミン類の効果

	添加量*1	効果*2
アデニン	10 mg / l	—
グアニン	10 mg / l	—
ウラシル	10 mg / l	—
キサンチン	10 mg / l	—
チミン	10 mg / l	—
シトシン	10 mg / l	—
イノシン	10 mg / l	—
キサントシン	10 mg / l	—
ロイコボリン	4 mg / l	±
ベタイン	4 mg / l	—
クレアチン	4 mg / l	±
ビタミン B ₁₂	0.2 mg / l	—
オロチン酸	4 mg / l	±

*1 基本培地への添加量

*2 *Z.rouxii* を 30℃, 7 日間培養し、基本培地での増殖度との差を示す。

2. アセトン沈澱物の効果

中性区分にアセトンを添加して冷蔵することによって（第 1 図）、溜醬油 100 ml から 145 mg の白色粉末を分離した。第 3 表に示すように、アセトン可溶部は増殖促進効果を有せず、溜醬油中の有効成分はアセトン沈

澱物に移行したと考えられた。

白色粉末は、培地 1 ℓ 当り 20mg の添加で溜醤油とはほぼ同じ効果を示し、培地の加熱殺菌前後に添加しても効果に差は認められなかった。塩酸による加水分解によっても効果は低下しなかったが、ろつぽ中で加熱すると白煙を生じて燃焼して炭化し、500℃ 加熱後に灰化物は残存せず、ろつぽの熱水洗浄液も効果を示さなかった。

第3表 アセトン処理物の効果

	添加量	増殖度 ^{*1}
対照 (基本培地)	—	0.2656
アセトン沈澱	20mg/ℓ	0.482
アセトン可溶物	20mg/ℓ	0.310
オートクレーブ処理	20mg/ℓ	0.482
灰化物	20mg/ℓ	0.2596
加水分解物	20mg/ℓ	0.456

^{*1} 660nmにおける吸光度

従って、アセトン沈澱物中の有効成分は、有機物であり、酸に安定で、単独あるいはエステル結合をした有機化合物として含有され、培地中の他成分との化学反応生成物によって効果を示すものではないことが知られた。

3. 各種糖類の効果

アセトン沈澱物は、やや甘味を有する無臭の白色粉末で、ニンヒドリン反応陰性、アンスロン反応およびフェノール硫酸反応陽性で、元素分析の結果は、窒素 0%，炭素 39.67%，水素 6.70%，酸素 53.63% (計算値) であり、(C₇H₂O)_n と一致するので炭水化物と考えられた。

川崎ら⁷⁾は、*Lactobacillus fermenti* の増殖が、グルコースに対して D-キシロースまたは D-リボースを補足することによって、促進されることを認めている。*Z.rouxii* の糖資化性については、大西⁸⁾の報告があるが、グルコースに対する補足効果は試験されていない。

アセトン沈澱物の効果が、基本培地中のグルコースに対する他の糖類の補足に起因することも考えられたので、第4表に示す糖類の補足効果を試験した。表から明らかなように、本菌の場合は *Lactobacillus* と異なり、単糖類等の補足効果は認められなかった。このことから、醤油中の有効成分は炭水化物であるが、グルコースと単糖類等との協同作用によって効果を発現するものではないことが知られた。

第4表 各種糖類の補足効果

糖 類	効果	糖 類	効果
D-キシロース	—	スタキオース	—
L-アラビノース	—	デキストラン	—
L-ラムノース	—	デキストリン	—
D-リボース	—	イヌリン	—
D-ガラクトース	—	ペクチン	±
D-マンノース	—	グリコーゲン	—
D-フラクトース	—	サリシン	—
トレハロース	—	ソルブススターチ	—
セロビオース	—	ソルビトール	—
ラクトース	—	マニトール	—
メリビオース	—	ガラクトキロン酸	—
ラフィノース	—	エチル-α-D-グルコシド	—

添加量：200 mg/ℓ

基本培地における *Z.rouxii* の増殖度との差

4. 有効成分の単離

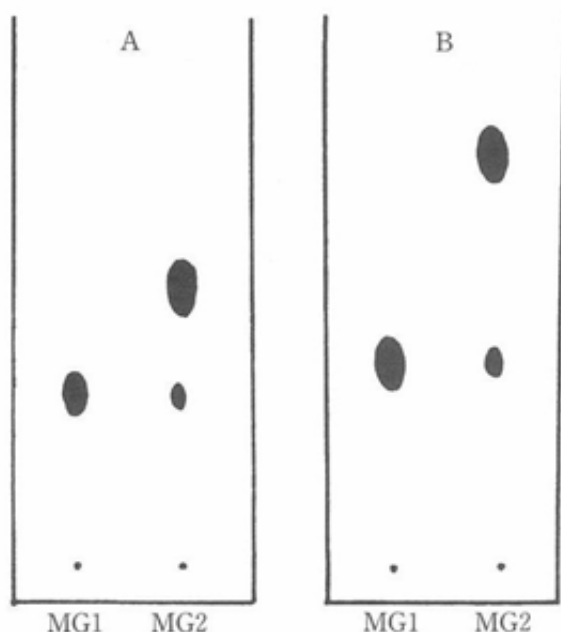
溜醤油 100ml から得たアセトン沈澱物は、再結晶によって MG1 (72mg), MG2 (24mg), 母液残さ (49mg) の 3 分画に分けられた。これら 3 分画の本菌に対する増殖促進効果を測定した結果、第5表に示すように、MG1 は 1 ℓ 当り 10mg 以上の添加で、MG2 は 40mg の添加で増殖度は最大となったが、母液残さは 40mg 添加でも効果を示さなかった。アセトン沈澱物中の有効成分は、含水メチルアルコールによる再結晶によって分別できることがわかった。

第5表 MG1 及び MG2 の効果

添加量	5	10	20	40 mg/ℓ	
MG 1	0.382	0.495	0.495	0.495	^{*1}
MG 2	0.314	0.332	0.387	0.495	^{*1}
母液乾固物	0.314	0.314	0.313	0.314	^{*1}

^{*1} *Z.rouxii* の増殖度：30℃ 7 日培養後の吸光度 (660nm)
融点：MG1 224℃, MG2 165℃

第2図は2種類の溶媒による濾紙クロマトグラムで、MG1 は単一のスポット I (Rf 値は溶媒 A で 0.17, 溶媒 B で 0.24) であり、MG2 はスポット I と同じ Rf 値のスポットの他に、スポット II (溶媒 A で 0.28, 溶媒 B で 0.48) を示した。MG1, MG2 のバイオオートグラフィーの結果 (第3図)、2種類の溶媒のいずれにおいてもスポット I の部分に効果が認められ、スポット II の部分には効果が認められなかった。従って、溜醤油中の有効成分は MG1 であり、MG2 の効果も同一成分によるもので他成分の混在によって効果が約 1/4 に低下したものと考えられた。



第2図 濾紙クロマトグラム
東洋濾紙 No.50アンモニア性硝酸銀溶液で発色
展開溶媒
A ブタノール：酢酸：水(4：1：2)
B イソプロパノール：アンモニア：水(7：1：2)

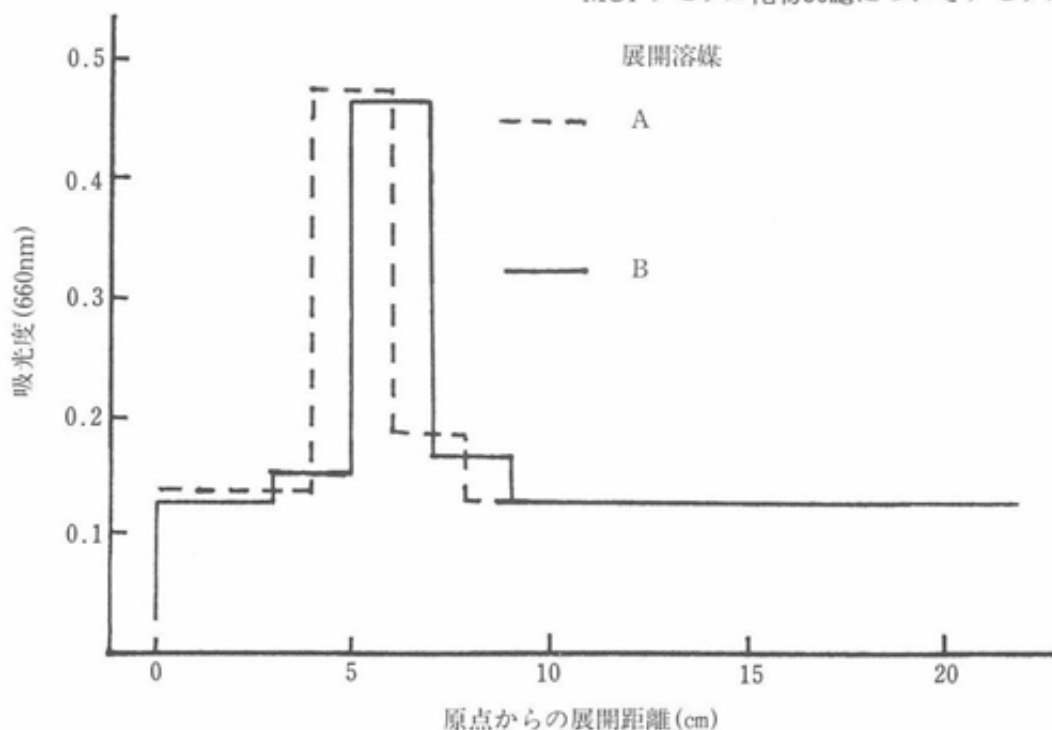
一方、MG1の融点は、224℃でミオイノシトールと一致した。MG2の融点は165℃であったが、これは糖類の混在によって融点降下を生じたためと考えられた。溜醤油からの分画操作を繰り返して得たアセトン沈澱物約1.5gをMG1およびMG2に分け、それぞれについて含水メチルアルコールによる再結晶を3回繰り返した後、次項5.の実験に供した。

5. ミオイノシトールの確認

MG1およびMG2の薄層クロマトグラムは第4図の通りで、MG1は2種類の溶媒で単一スポットとなり、Rf値(溶媒Aで0.04, 溶媒Bで0.31)はいずれもミオイノシトールと一致した。またMG2も、濾紙クロマトグラム(第2図)と同じく、MG1と同じ成分を含有していた。

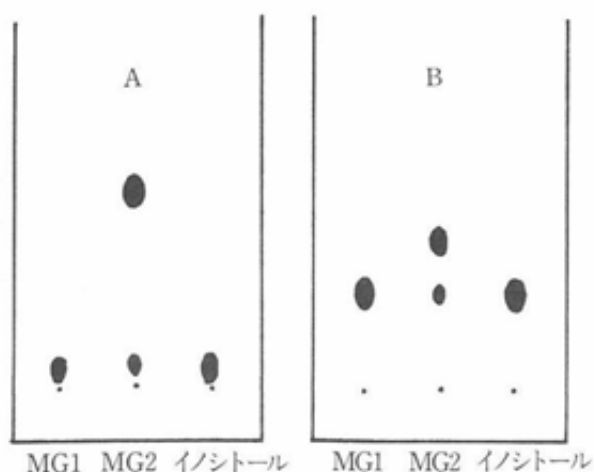
MG1およびMG2の各100mgから、アセチル化物として154mgおよび132mg(再結晶1回目の収量)を得た。アセチル化物の薄層クロマトグラムは第5図の通りで、MG1は2種類の溶媒で単一のスポットとなり、MG2も同一Rf値のスポットを有し、Rf値(溶媒Aで0.04, 溶媒Bで0.35)はミオイノシトールアセテートと一致した。

MG1アセチル化物50mgについてアセチル基の脱離

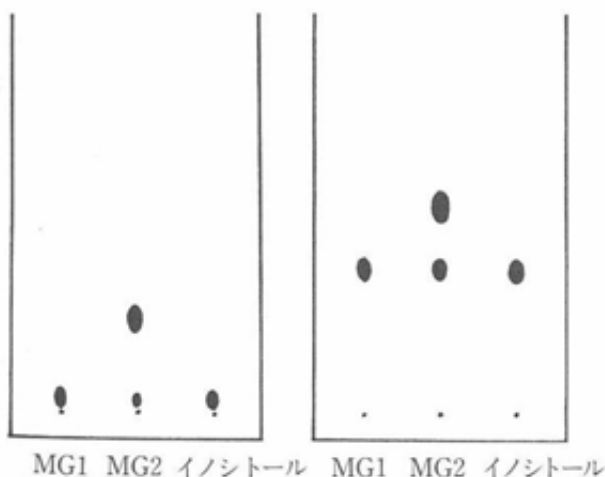


第3図 濾紙クロマトグラフィーによる分画のZ.rouxiiの増殖促進効果

東洋濾紙 No.50
展開溶媒 A ブタノール：酢酸：水(4：1：2)
B イソプロパノール：アンモニア：水(7：1：2)



第4図 シリカゲル薄層クロマトグラム
シリカゲル薄層Merck製シリカゲルG
展開溶媒 A メタノール：アセトン：水
(4：5：1)
B ブタノール：アセトン：水
(4：5：1)
50%硫酸水溶液を噴霧した後加熱して発色



第5図 アセチル化物の薄層クロマトグラム
シリカゲル薄層Merck製シリカゲルG
展開溶媒 A ヘキサン：アセトン(3：1)
B ベンゼン：メタノール(10：1)
50%硫酸水溶液を噴霧した後加熱して発色

を行った結果、約32mgの白色結晶を得た。この物質の薄層クロマトグラムは、第4図のMG1のものと一致し、また融点も224℃となった。MG1およびミオイノシトールと両者のアセチル化物は、第6表に示すように、ほぼ同じ元素分析値を示した。融点も同一値を示し、等量混合による混融試験でも融点降下は認められなかった。また、MG1は紫外外部吸収および旋光性を有しなかった。

赤外線吸収スペクトルは、第6図及び第7図に示すように、MG1とミオイノシトール、両者のアセチル化物は、それぞれ同一のものとなった。

以上の結果から、溜醬油中の*Z.rouxii*に対する増殖促進物質は、ミオイノシトールであることが確認された。

第6表 元素分析結果など

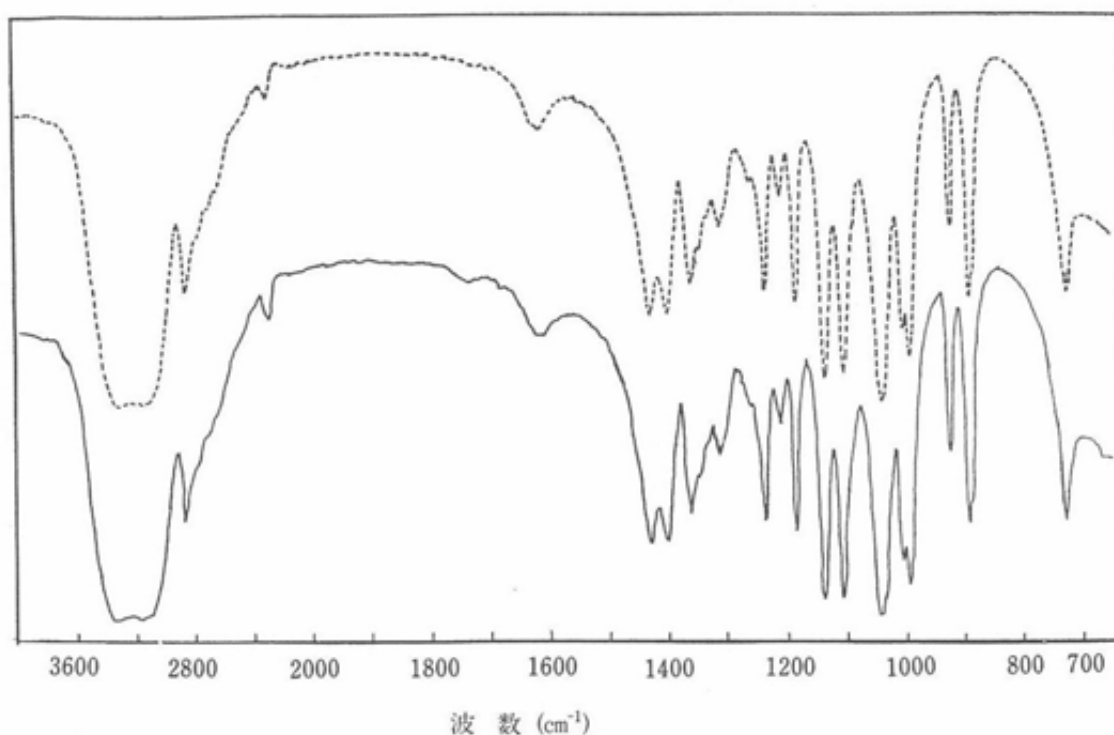
	MG1	ミオイノシトール	アセチル化物	
			MG1	ミオイノシトール
融点℃	224	224	192	192
C %	39.29	39.64	50.13	49.20
H %	6.75	6.72	5.63	5.37
O %	53.96	53.64	44.24	45.43
比旋光度	—	—		

6. MG1とミオイノシトールの効果の比較

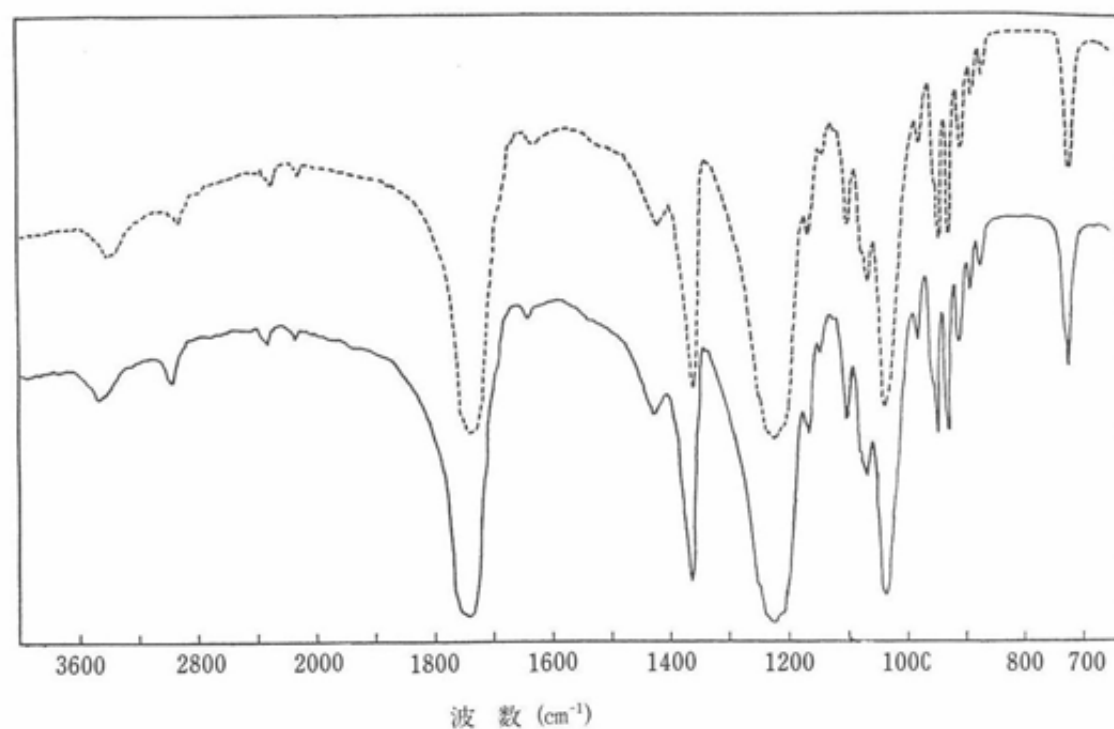
ミオイノシトールを除去した基本培地に対するMG1およびミオイノシトールの補足効果を比較した。第8図に示すように、両者間には差が認められず、いずれも添加量の増加に伴って増殖度はほぼ直線的に増加し、培地1ℓ当り10mgの添加で最大増殖度を示した。

溜醬油添加培地(1ℓ当り100ml添加、全窒素として0.2%)における増殖度は、ミオイノシトール無添加でも最大となり、MG1およびミオイノシトールの補足によって増加が認められなかった。溜醬油100mlの添加によって、*Z.rouxii*のミオイノシトール要求量が充足されたものと考えられる。

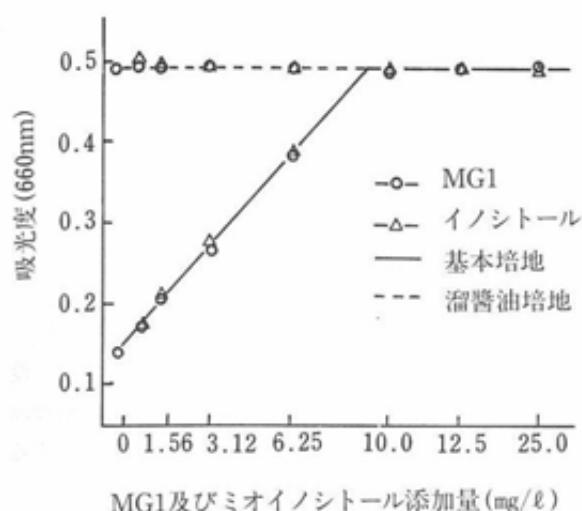
耐塩性酵母のミオイノシトール要求性については、大西⁹⁾、佐藤ら¹⁰⁾の報告があり、とくに食塩存在下でのミオイノシトールの生理的重要性が指摘されている。これらの研究では、培地1ℓ当り1～2mgの添加量でミオイノシトールの効果が論じられており、従って、本実験で使用した基本培地組成ではミオイノシトール添加量を1ℓ当り2mgとした。また、酵母の増殖促進物質として、糖蜜¹¹⁾、甜菜糖¹²⁾、ウイスキー蒸留廃液¹³⁾などからミオイノシトールが分離精製されている。溜醬油中の有効成分の分画に当たって、未知物質の分離精製を期待したが、*Z.rouxii*のミオイノシトール要求量が非常に大きく、基本培地への添加量では最大増殖度が得られず、溜醬油添加によってミオイノシトールが補足されて最大増殖度が得られたことが確認された。今後は耐塩性酵母に対するミオイノシトールの作用機作や溜醬油中でのミオイノシトール生成等について検討する必要がある。



第6図 MG1 及びミオイノシトールの赤外線吸収スペクトル
2mg/100mgKBr 錠剤
—— MG1 ミオイノシトール



第7図 アセチル化物の赤外線吸収スペクトル
2mg/100mgKBr 錠剤
—— MG1-アセテート ミオイノシトール-アセテート



第8図 MG1、ミオイノシトールの補足効果
基本培地：ミオイノシトール 2mg/ℓ 添加
溜醤油培地：TN 0.2%相当料添加

要 約

溜醤油中の *Zygosaccharomyces rouxii* に対する増殖促進物質の分画精製を行った結果、

- 溜醤油中の有効成分は、メチルアルコール抽出物をイオン交換樹脂処理した中性区分にアセトンを添加して得られる白色沈澱画分に移行した。アセトン沈澱物の効果は、灰化によって消滅するが、塩酸加水分解および殺菌のための加熱によっては低下しなかった。
- アセトン沈澱物は、ニンヒドリン反応陰性、アンスロン反応およびフェノール硫酸反応陽性で、元素分析の結果では $(C_6H_{12}O_6)_n$ と推定された。100mlの溜醤油から分画したアセトン沈澱物(収量145mg)について含水メチルアルコールによる再結晶を行い、1回目の結晶(MG1) 72mg、母液から得た2回目の結晶(MG2) 24mgと母液残さ49mgの3区分に分けた。MG1は培地1ℓに対して10mg、MG2は40mgの添加で最大増殖度を示したが、母液残さでは効果が認められなかった。
- 濾紙および薄層クロマトグラフィーの結果、MG1は単一成分からなり、MG2はMG1と同一成分の他に糖類が混在することが知られた。MG1およびそのアセチル化物のRf値は、ミオイノシトールおよびそのアセチル化物と一致した。

- MG1およびそのアセチル化物の融点、元素分析値、赤外線吸収スペクトルは、ミオイノシトールおよびそのアセチル化物と一致した。従って、溜醤油中の増殖促進物質はミオイノシトールであることが確認された。
- MG1およびミオイノシトールは、同じ増殖促進効果を有し、いずれも培地1ℓ当り10mg添加で溜醤油添加と同じ最大増殖度を示した。溜醤油添加培地にMG1およびミオイノシトールを添加しても増殖度は変わらなかった。以上のことから、溜醤油の効果がミオイノシトールの補足によることが確認された。

終わりに臨み、元素分析をして下さった名古屋大学農学部の元素分析室の方々に深謝する。

文 献

- 加藤 熙, 好井久雄: 醸工, 45, 191-196 (1967)
- 加藤 熙, 好井久雄: 同上, 45, 197-203 (1967)
- 松田哲郎, 近池威夫: 同上, 38, 68-70 (1960)
- CHARALAMPOUS F C, WAHL M, FERGUSON L: *J. Biol. Chem.*, 236, 2552-2556 (1961)
- MATSUYAMA A: *J. Agr. Chem. So. Japan*, 28, 299-304 (1954)
- OHNISHI H: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 21, 137-142 (1957)
- 川崎近太郎, 伊藤誉志男, 倉田軍一: ビタミン, 30, 255-288 (1964)
- OHNISHI H: *Agr. Biol. Chem.*, 25, 341-349 (1961)
- OHNISHI H: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 23, 351-358 (1959)
- 佐藤正弘, 植村定治郎: 農化, 30, 492-496 (1956)
- 佐山晃司, 仙波美博, 川本常美: 精糖技術研究会誌, 29, 20-27 (1980)
- 菅原 健, 瀬戸 剛, 及川善史, 藤田一郎: 同上, 38, 39-45 (1990)
- 藤川茂昭, 柿原克史, 奥村直司, 蓮尾徹夫, 斎藤和夫, 蓼沼 誠, 吉沢 淑: 醸協, 78, 385-389 (1983)