醤油諸味の醗酵に関する研究

(第4報) 醤油中の酵母生育阻害, 醗酵能増強成分の同定について

野田文雄*・逆井利夫*・横塚保*

Studies on Fermentation of Soysauce Mash

Part IV. Identification of soysauce components which had an inhibitory effect on growths and an enhancing effect on fermentation activities of soysauce-yeasts

FUMIO NODA*, TOSHIO SAKASAI* and TAMOTSU YOKOTSUKA*

Twelve functions were prepared from weak acid partition of ether extract of soysauce, and No. 9, 10 and 11 functions were shown to have an inhibitory effect on growths and an enhancing effect on fermentation activities of soysauce-yeasts.

The components found in No. 9 and 10 were identified as vanillin and the component in No. 11 was recognized to be guaiacol like compound.

(Received Jan. 29, 1975)

前報¹⁾にて、醤油のエーテル抽出物中、弱酸性区分に含有される成分が醤油酵母の生育阻害作用と醗酵能増強作用の主体をなすことを認めた。醤油諸味の醗酵増強に、これらの知見を積極的にとり入れるには、さらに詳細に成分と醤油酵母の関係を知る必要がある。そこで本報告では両作用の主体となる成分の同定を試みた。

実験方法

1. 醤油のエーテル抽出物 (E.E.) の調製および分画
既報²⁾の如く行なった。

2. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

TLCは原³⁾の方法によった。すなわちガラスプレート (20×20 cm) を用い、シリカゲルGIBS 24 g, 水 36 ml の混合で薄層をつくり、105°C で1時間乾燥後、弱酸性区分をスポットし、ベンゼン/ジオキサン/氷酢酸 (90 : 25 : 4) で展開した。この展開剤は単純なフェノールおよび近縁化合物の分離に適したもので、 R_f 値の再現性はよく誤差範囲は ± 0.02 ⁴⁾ といわれている。

3. ペーパークロマトグラフィー

展開は久米⁵⁾の方法に準じて行なった。

i. 濾紙

東洋濾紙 No. 50, 5×40 cm

ii. 展開溶媒

a. ベンゼン/エタノール/2-ブタノール/*N*-アンモニア (30 : 30 : 30 : 10)

b. ブタノール/水/エタノール/28% アンモニア (10 : 20 : 0.5 : 0.5)⁶⁾

c. 1.5 *N* アンモニア飽和ブタノール⁷⁾

d. 2-プロパノール/28% アンモニア/水 (8 : 1 : 1)⁸⁾

e. 水飽和ブタノール⁹⁾

iii. 発色剤

a. ジアゾ化ベンジジン¹⁰⁾

b. 塩化第二鉄溶液¹¹⁾

c. ジアゾ化スルファニル酸と水酸化ナトリウム

d. 5% 硫酸第二鉄と 0.5% 赤血塩液

e. 0.005% 2,4-ジニトロフェニールヒドラジン塩酸液

4. 紫外吸収スペクトル

日立 323 型自記分光光度計を用いて測定した。

5. 赤外吸収スペクトル

日立 EPI-G 3 型回析格子赤外分光光度計を用いて測定した。

6. 質量分析

日立 RMU-7M 型質量分析計を用いて測定した。

* キッコーマン醤油株式会社中央研究所 (千葉県野田市野田 399 番地)

Central Research Laboratories, Kikkoman Shoyu Co., Ltd. 399 Noda, Noda-shi, Chiba-ken.

7. 融点

柳本製ミクロ融点測定装置を用いて測定した。

8. 抗酵母性物質の検索

前記の TLC で弱酸性区分を展開して 12 の区分に分画し、各区分のシリカゲルをかきとり、このエーテル抽出液を円筒-平板法 (cylinder-plate method)¹²⁻¹⁷⁾ によって試験した。すなわち、前報¹⁾ の如く融解した合成培地に醤油主醗酵酵母 *S. rouxii* (ATCC 13356), 醤油後熟酵母 *Torulopsis versatilis* (ATCC 20191), 醤油産膜酵母 *S. rouxii* var. *halomembranis* を各々接種して寒天平板を作り、表面にステンレス製円筒を静置し、この中にエーテル抽出分画液を 50 μ l 入れ、30°C で 48 時間培養した後、抑制帯の大きさから分画区分の酵母に対する影響を判定した。

9. 酵母の増殖、活性測定

増殖は濁度-細胞曲線より求め、活性は麴法、液体法ともに前報の方法により、また呼吸能も前報¹⁾ の如く自動測定装置クーロメーターによった。

実験結果

1. 弱酸性区分の分画と抗酵母性

弱酸性区分のエーテル抽出液を TLC にて展開し、5% 塩化第二鉄溶液で発色させた結果は Fig. 1 に示すとおりで、特徴的な呈色から 12 の区分に分画できた。この各分画区分のシリカゲルを発色操作前にかきとり、エーテルにて再抽出後、円筒-平板法によって抗酵母性を調べた。*S. rouxii* の場合、Fig. 2 の如く、分画区分 No. 1~8 には生育阻止は認められなかったが、No. 9~12 で

Fig. 1. Thin layer chromatography of weak acids partition on silica gel
Developing: benzene/dioxane/acetic acid (90:25:4)
Detecting: 5% ferric chloride solution.

は No. 10 が最も大きい生育抑制帯を示し、次いで No. 11, 9, 12 の順に大きい生育抑制帯を示した。*Torulopsis versatilis* について、分画区分 No. 9~12 の影響を調べた結果は Fig. 3 に示す如くで、*S. rouxii* の場合と同じく、No. 10 が最も大きな生育抑制帯を示し、次いで No. 11, 9, 12 の順となった。*S. rouxii* var. *halomembranis* の場合は Fig. 4 の如くで、*S. rouxii*, *Torulopsis versatilis* の結果とほぼ一致したが、若干生育抑制帯は小さかった。これは産膜性である本株は他の 2 株に比して醤油成分に対してより強い耐性があるためであろう。このように、いずれの菌株についても、分画区

Fig. 2. Effect of 12 parts in TLC of weak acids partition on *Saccharomyces rouxii*

Fig. 3. Effect of No. 9, 10, 11 and 12 parts in TLC of weak acids partition on *Torulopsis versatilis*

分 No. 9, 10, 11 の含有成分が生育阻害の主体をなしていることが示された。なかでも No. 10 の含有成分の作用が最も大であった。次に *S. rouxii* について分画区分 No. 10 の影響をさらに詳しく観察した。Fig. 5 は *S. rouxii* を 30°C で 48 時間培養した時の写真で、発育抑制帯の最外円部位に菌濃度の高い部分を認めた。これは分画区分 No. 10 の成分がある濃度存在する場合、全く存在しない時よりも *S. rouxii* の生育がより旺盛となることを示すものと思われる。

2. 分画区分 No. 10 の酵母に対する影響

合成培地および No. 10 区分よりエーテル抽出し、フェノール量として 50, 100 ppm なる様添加した合成培地各 100 ml に *S. rouxii* を 10^5 セル/ml 宛接種し、クローメーターにかけた。Table 1 に培養 24 時間後の消費酸素量、菌体量、消費糖量、生成アルコール量、また消費糖量分の生成アルコール量を示した。前報¹⁾における E.E. の如く、No. 10 成分は酵母の酸素吸収を抑制し、菌体量、消費糖量、生成アルコール量を減少させ

た。ただし、消費糖に対する生成アルコール量は No. 10 成分添加によって上昇した。このことは E.E. の効果と一致するもので、No. 10 成分は酵母の呼吸系を阻害し、増殖を抑制するが、他方でアルコール醗酵能を増強する事を示すものと考えられた。次に *S. rouxii* を合成培地と、合成培地 + No. 10 成分 100 ppm とで各々培養し、対数増殖後期に集菌し活性試験を行なった結果を Table 2 に示した。この結果においても、No. 10 成分添加培養酵母が無添加よりも発生炭酸ガス量が多く、また生成アルコール量も大となり、No. 10 成分が酵母の増殖抑制成分である一方、醗酵能増強成分であることが示された。

3. No. 9, 10, 11 区分の同定

弱酸性区分を TLC にて展開し、No. 9, 10, 11 に相当する部分のシリカゲルをかきとり、エーテルにて再抽出し同じ展開剤にて再展開した。その結果、Fig. 6 に示す如く、No. 9, 10 区分は R_f 値 0.70 を、No. 11 は R_f 値 0.83 を主体とする成分であった。この両 R_f 値のシリカゲルをかきとり、エーテルにて再抽出後、結晶

Fig. 4. Effect of No. 9, 10, 11 parts in TLC of weak acids partition on *Saccharomyces rouxii* var. *halomembranis*

Fig. 5. Effect of No. 10 part in TLC of weak acids partition on *Saccharomyces rouxii*

Table 1. Effects of No. 10 on growth of *S. rouxii*

Conc. of No. 10 part (ppm)	Oxygen (g/100 ml)	R.S. (g/100 ml)	Alc. (g/100 ml)	Alc./R.S.	Cell yield (dry, mg/ml)
0	3.50	7.50	1.90	0.253	7.2
50	0.90	3.90	1.50	0.384	3.6
100	0.24	2.25	1.01	0.449	1.8

Table 2. Effects of addition of No. 10 into preincubation on fermentation of Soysauce medium (A) and Koji medium (B)

Medium	Addition for preincubation	CO ₂ evolved (g/3 days)	CO ₂ evolved (g/6 days)	R.S. (%)	Alc. (%)
A	No. 10 0 ppm	2.20	4.99	3.20	2.10
	No. 10 100 ppm	3.70	6.95	3.05	2.90
B	No. 10 0 ppm	1.80	3.38	4.25	2.00
	No. 10 100 ppm	2.72	4.90	4.00	2.70

Table 3. Comparison of properties of the isolated compound with vanillin

Compound	Melting point	Diaz reagent	Ferric chloride	Hidrazin reagent	Rf in TLC			Rf in PC			
					a	b	c	d	e	f	g
A	81°C	orange	blue	red	0.70	0.64	0.60	0.45	0.44	0.54	0.80
B	80°C	orange	blue	red	0.71	0.64	0.61	0.45	0.45	0.55	0.81

A: vanillin, B: isolated compound from No. 9 and No. 10 Developing solvents

a: benzene/dioxane/acetic acid (90:25:4), b: benzene/methanol/acetic acid (90:16:8), c: benzene/ethanol/2 butanol/ammonia (30:30:30:10), d: butanol/H₂O/ethanol/28% ammonia (10:20:0.5:0.5), e: butanol saturated with 1.5N ammonia, f: 2-propanol/28% ammonia/H₂O (8:1:1), g: butanol saturated with H₂O.

Fig. 6. Chromatogram of No. 9, 10 and 11
Developing: benzene/dioxane/acetic acid (90:25:4)

化を試みた。その結果、R_f 値 0.70 なる区分から白色の針状結晶を得たが R_f 値 0.83 区分からは結晶を得ることが出来なかった。R_f 値 0.70 区分より得た結晶の諸性質は Table 3 の如くで、標品のバニリンと一致した。Fig. 7 は紫外吸収スペクトル、Fig. 8 は赤外吸収スペクトルであるが、これらも標品のバニリンと一致した。Fig. 9 は分離物質のマスペクトルで、親ピーク (m/e) は 152.14 を示し、元素組成は C₈H₇O₃ となった。また混融試験にても融点降下が認められなかったことにより、この分離物質をバニリンと同定した。R_f 値

Fig. 7. UV-Spectra of vanillin and isolated compounds

0.83 なる成分は結晶化できなかったが、抽出液の紫外部吸収スペクトルは Fig. 10 の如くで、グアヤコールの標品に一致する事、また展開剤ベンゼン/ジオキサン/氷酢酸 (90:25:4)、ベンゼン/メタノール/氷酢酸 (90:16:8) による TLC の R_f 値が 0.83, 0.72 となり、グアヤコール標品の R_f 値 0.83, 0.72⁴⁾ に一致することにより、グアヤコールと推定した。

考 察

バニリンの存在はすでに醤油麹¹⁸⁾、米麹⁷⁾、麦麹¹⁹⁾、醤油^{20,21)}などで認められており、その生因についても詳しく考察され、香気成分としての重要性が指摘されている。同じく、グアヤコールも横塚⁵⁾、床司^{20,22)}によって

Fig. 8. IR-Spectra of vanillin and isolated compound (KBr disk)

Fig. 9. Mass Spectrum of isolated compound

Fig. 10. UV-Spectra of guaiacol and isolated compound

醤油香気成分としての重要性が指摘されている。醤油成分の白カビ (*Zygosacch. japonicus* および *salsus*) に対する発育阻止については、著者の1人横塚が詳細な報告^{6,28,24)}をしているが、これらの報告の中で醤油中で抗醤油白カビ物質が多数存在し、そのなかで 1-hydroxy-2-methoxy-4-ethyl-benzene, *n*-caproic acid が最も強力で、等量水希釈醤油中で 0.02% で発育を阻止し、また、この様な抗カビ性物質が醤油の火入によって増加したと述べている。また上野²⁶⁾は脱脂大豆塩酸分解液の *Zygosacch. major* に対する増殖醗酵阻害性につき試験し、分解液より分離確認された諸物質中、pH 5.0 における阻害性は、フルフラール、バニリン>バニリン酸>酪酸>

プロピオン酸>ヒドロキノン>酢酸>レブリン酸、シリンガ酸、プロトカテキェ酸>ギ酸の順で、酸分解液の難醗酵性は多量に含まれるギ酸、酢酸、レブリン酸等の有機酸および高濃度の食塩によって特徴づけられ、さらに量的には少ないが阻害の強いアルデヒド、フェノール等により阻害は強化されると説明している。さらに上野²⁶⁾は酸分解液の醤油酵母に対する醗酵阻害を除去する方法について研究を進め、前処理として分解原料よりの炭水化物の除去が極めて有効な事を見出している。この様にバニリン、グアヤコールは醤油香気的重要な成分とされる一方、酵母の生育阻害成分ともみなされ、また酵母の醗酵能増強成分でもあることを本報告で明らかにした。醤油酵母に対するバニリン、グアヤコールのこれらの作用の機構については、さらに詳細な検討を要する。

要 約

(1) 醤油エーテル抽出物中、弱酸性区分に含有される成分が醤油酵母の生育阻害作用と醗酵能増強作用の主体をなす事を認めたので、これを TLC にて 12 の区分に分画し、そのうち、No. 9, 10, 11 に含有される成分が該作用をなす事を認めた。

(2) No. 9, 10 に含有される成分はバニリンと同定し、No. 11 に含有される成分はグアヤコール様物質である事を認めた。

本稿を終るにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました東京教育大学名誉教授、東京農薬大学教授、小原哲二郎博士に深謝致します。また同定にあたり種々御教示をいただきました当研究所、佐々木正興、湯浅克己、布村伸武の3氏、実験に協力された萩原昭雄氏、宮野由紀子嬢ならびに発表を許可された本社役員各位に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 野田文雄, 逆井利夫, 横塚 保: 食品工誌, **22**, 530 (1975).
- 2) 逆井利夫・野田文雄・横塚 保: 食品工誌, **22**, 474 (1975).
- 3) 原 昭二: 薄層クロマトグラフィー (南江堂) p. 5 (1964).
- 4) PASTUSKA, G. and PETROWITZ, H. J.: *Chem-Ztg.*, **86**, 311 (1962).
- 5) 久米 譲: 農化, **37**, 196, 201 (1963).
- 6) 横塚 保: 農化, **27**, 276 (1953).
- 7) 山本 淳・佐々木喜代: 農化, **35**, 715 (1961).
- 8) ANWAR, M. H.: *Anal. Chem.*, **35**, 1974 (1963).
- 9) OBATA, Y. and SENBA, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 340 (1963).
- 10) DEFERRAN, J. O. and MUCHNIK, R.: *J. Chromatog.*, **9**, 283 (1962).
- 11) SOLOWAY, S. and WILEU, S. H.: *Anal. Chem.*, **24**, 979 (1952).
- 12) MASUYAMA, G.: *J. Antibiotics.*, **1**, 209 (1947).
- 13) WOODMAN, H. E.: *J. Path. Bact.*, **58**, 75 (1946).
- 14) HEATHEY, N. G.: *Biochem. J.*, **38**, 61 (1944).
- 15) FOSTER, J. H. and WOODRUFF, H. B.: *J. Bacteriol.*, **47**, 43 (1944).
- 16) SCHMIDT, F. H. MOYER, B. J.: *J. Bacteriol.*, **47**, 199 (1944).
- 17) REILLY, H. C. and WAKSMAN, S. A.: *J. Bacteriol.*, **49**, 585 (1945).
- 18) 浅尾保夫・横塚 保: 農化, **32**, 662 (1958).
- 19) 栗林義宏: 食品工誌, **14**, 549 (1967).
- 20) 床司謙次郎: 理研彙報, **15**, 166 (1936).
- 21) 横塚 保: 農化, **28**, 114 (1954).
- 22) 床司謙次郎: 理研彙報, **14**, 827 (1935).
- 23) 横塚 保: 農化, **25**, 446 (1952).
- 24) 横塚 保: 農化, **28**, 114 (1954).
- 25) 上野喬宏: 農化, **35**, 1184 (1962).
- 26) 上野喬宏: 農化, **35**, 1193 (1962).

(昭和50年1月29日受理)