



高粱糖を原料とするビタミンB₁剤の製造に関する
研究：

第2報 各種糸状菌の高梁糖タンニンに対する脱タン
ニン作用及び酵母培養について

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2012-11-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 細井, 敬三, 井爪, 清一 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.32150/00000522

高粱糠を原料とするビタミン B₁ 剤の製造に関する研究第 2 報 各種糸状菌の高粱糠タンニンに対する
脱タンニン作用及び酵母培養について

細井敬三・井爪清一

北海道学芸大学岩見沢分校

Keizo HOSOI, Seiichi IZUME : Studies on the production of vitamin
B₁ preparation, using Kaoliang polishings as raw materials
Report 2. On the action of detanning of various fungi to the
tannins of Kaoliang polishings and the cultivation of yeasts

培養基中の多量のタンニンの存在が或る種のかび類の正常生活機能の發揮に対して抑制的に作用することは周知のことである。だが或る種の糸状菌例えば *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium glaucum* 及び *Penicillium sp.* 等はタンニンを多量 (10%) に含有する培養基中でもよく生育する¹⁻⁸⁾。*Asp. niger* はタンナーゼ^{3, 4)}を有する以外没食子酸を分解する酵素³⁾をも有する。*Asp. luchuensis Inui*^{5, 6)} はガロタンニンを分解するタンナーゼがあるが、M. Nierenstein⁶⁾ は *Asp. luchuensis Inui* のタンナーゼについて次のように報告している。即ちカテクタンニンに対するタンナーゼとガロタンニンに対するそれとは異り、タンニンの種類によつてそれに対応するタンナーゼがあり、*Asp. luchuensis Inui* はカテクタンニンとガロタンニンに対してそれぞれ作用する2種の異つたタンナーゼを有すると、タンナーゼの産生に関する栄養条件の影響についての L. Knudson⁷⁾ の報告によれば、*Asp. niger* 及び *Penicillium sp.* はタンニン酸及び没食子酸を含まない培養基中で生育する時はタンナーゼを含まないが、蔗糖 10% を含有する培養液にタンニン酸を加え、且つその添加量を増大すると共に、これら微生物によつて産生するタンナーゼの量が増加する。又タンナーゼ産生に対してタンニン酸は没食子酸よりも効果的である。*Asp. niger* は *Penicillium sp.* に比して単位重量についてタンナーゼの産生が多いし、その作用も強力である。Rippel等⁸⁾ は *Penicillium*, *Citromyces*, *Aspergillus* 等はタンニンを炭素源として利用しうるかび類であり、タンナーゼの産生はタンニンの存在の時のみおきると報告している。Stapp 等⁹⁾ は *Aspergillus* 及び *Penicillium* の数種にはタンニン分解の性質があると指摘している。以上述べた研究報告は、タンナーゼを豊富に産生し且つタンニン含有の培養基中でも殆んど正常に生活機能を営むかび類は、*Aspergillus* 及び *Penicillium* 等であることを指摘している。

Aspergillus 属でも種によつて生活諸条件の相違のためにタンナーゼの産生量とその作用の強さが異るし、アミラーゼについても亦同様のことがいえる。有機体内の酵素の量と質をその生活諸条件の変化によつて変えうるという考えは特に重要である。このことは動物ではイ・ペ・パブロフによつて、植物ではア・エヌ・パツハとア・イ・オパーリンによつて証明された¹⁰⁾。

著者等の要求する点はタンニンに対する適応性を有するのみならず、同時にアミラーゼを豊富に

有するかび類の探索及びこのかびの利用である。高粱糠を原料とするために原料中のタンニンが微生物の生物学的、特に生化学的機能に悪条件を与える。このためにタンニンを比較的に多量分解すると同時に、原料中の澱粉を糖化して酵母培養のための栄養素になしうる作用を有する微生物の探索が、高粱糠を原料とする *B₁* 剤製造上解決すべき問題である。従つて著者等は以上の考えに基いて上記の性質を有する糸状菌の探索に関する諸実験を実施して若干の成績を得たので、ここにその研究成績を報告する。

実験及び考察

1. 各種糸状菌の高粱糠タンニンに対する脱タンニン試験

実験 1. *Asp. niger* 及び *Asp. oryzae* を用いて高粱糠麴を製し、この製麴過程中高粱糠タンニンの分解程度を測定した。

高粱糠麴の製造。(1)原料高粱糠、そのタンニン含量は 2.34% であつた。(2)使用菌種名 *Asp. niger* 及び *Asp. oryzae*。高粱麴汁を培養基とする寒天斜面培養。(3)製麴法、高粱糠 800g に水道水 400cc を加え、118°C で 30 分間蒸した後 2 分し 615g 宛を麴ぶたに採り、精白粟を培養基とする種麴を移殖し、約 30°C に置き、第 6 日目に出現とした。高粱糠麴の重量は *Asp. oryzae* では 510g、*Asp. niger* では 502g であつた。高粱糠麴のタンニンを KMnO_4 酸化法で定量し、高粱糠麴及び原料高粱糠に対するタンニン含量を求めた。得た結果を第 1 表に示す。

第 1 表

菌種名	タンニン含量 (%)		製麴中タンニン分解率%
	高粱糠麴に対する含量	原料高粱糠に対する含量	
<i>Asp. oryzae</i>	1.58	1.26	46.15
<i>Asp. niger</i>	1.49	1.17	50.00

高粱糠麴のタンニン含量は見掛上原料高粱糠に対するタンニン含量よりも多くなつている。原料高粱糠のタンニン含量は 2.34% であつたから、製麴中微生物のタンナーゼによつて高粱糠のタンニンは約半分分解された。*Asp. niger* の方が *Asp. oryzae* よりも高粱糠タンニンの分解作用がいくらか強い。

実験 2. 精白粟に等量の高粱糠を混和したものを原料として各種糸状菌を植え、各種菌のアミラーゼ及びタンナーゼの酵素作用力を比較した。製麴には糸状菌 5 種を 1 組とし同時に製麴した。*Asp. oryzae* を比較の基準として各組においた。

(1) 原料 精白粟、高粱糠。原料の水分、澱粉価及びタンニン含量は第 2 表の如くであつた。

第 2 表 製麴原料の分析表 (%)

種 類	水 分	澱 粉 価	タ ニ ニ ン
精 白 粟	13.80	73.01	0
高 粱 糠	15.08	43.56	2.73

(2) 使用菌種 本実験に使用した菌種は 25 で第 3 表に示す通りであつた。

(3) 製麴法 浸漬粟 13.3g (粟 10g に相当する) 及び高粱糠 10g に水道水 5cc を加え、混和し綿栓三角ビンに容れ、3 日間間断殺菌した。この処理後種植し、30°C で培養した。

(4) 糖化 三角ビンの麴に約 60°C の水 100cc を加え、pH=5.0 となし、60°C の恒温槽内で 17 時間糖化させた後、煮沸し濾過した。残渣は 80—100°C の熱湯にて洗滌した。濾液と洗液を合一

高粱糠を原料とするビタミン B₁ 剤の製造に関する研究

第 3 表 使用菌種

番号	菌種名	備考	番号	菌種名	備考
1	<i>Aspergillus oryzae</i>	みそこうじ	14	<i>Rhizopus pēka I</i>	
2	"	しょうゆこうじ	15	<i>Rhizopus kainanto</i>	
3	"	日配 A	16	<i>Rhizopus delemar</i>	
4	"	" P	17	<i>Rhizopus javanicus</i>	
5	"		18	<i>Mucor javanicus</i>	
6	"	理研	19	<i>Mucor rouxii</i>	
7	"	さけこうじ	20	<i>Monascus ankā</i>	
8	"	甘酒こうじ	21	<i>Monascus purpureus</i>	
9	"	"	22	<i>Aspergillus japonicus</i>	
10	<i>Aspergillus awamori</i>		23	<i>Rhizopus tritici</i>	
11	<i>Aspergillus niger</i>		24	<i>Rhizopus tonkinensis</i>	
12	<i>Rhizopus batatas</i>		25	<i>Aspergillus oryzae</i>	
13	<i>Rhizopus chinensis</i>				

し、水を加えて一定量となした。

(5) 分析 麴の水分、タンニン及び澱分価、糖化液のタンニン、糖化残渣の乾物量と澱粉価を測定した。澱粉価定量はベルトラン氏法を、タンニン定量は KMnO₄ 酸化法を用いた。麴及び糖化液について分析して得た結果を第 4 表に示す。原料高粱糠と粟の水分はそれぞれ 15.08% 及び 13.80% で、タンニン含量は 2.73% (乾物量に対しては 3.21%) 及び 0 であった。

第 4 表

	菌番号	麴水分 %	麴(乾物量)中 タンニン含量 %	製麴及び糖化過 程中における脱 タンニン率 %	脱タンニン率 (補正值) %
第 1 組	1	41.70	0.51	69.78	70.51
	2	40.56	0.69	76.51	77.31
	3	40.08	0.88	65.26	65.94
	4	42.02	0.71	57.32	57.92
	18	42.47	0.83	49.03	49.54
第 2 組	3	40.18	0.99	57.60	65.94
	12	40.59	1.31	56.42	64.59
	13	36.95	0.99	61.49	70.39
	14	43.32	1.17	47.55	54.44
	15	41.25	1.15	37.35	42.76
第 3 組	3	40.19	1.00	67.82	65.94
	5	39.96	0.83	75.26	73.18
	10	44.24	0.54	80.03	77.81
	11	39.64	1.18	89.07	86.60
	22	40.71	1.01	86.17	83.78
第 4 組	3	35.98	0.52	71.10	65.94
	6	37.89	0.48	81.10	75.21
	7	36.31	0.36	82.34	76.36
	8	35.73	0.48	76.70	71.13
	9	35.99	0.33	80.33	74.50

	菌番号	麩水分 %	麩(乾物量)中 タンニン含量 %	製麩及び糖化過 程中における脱 タンニン率 %	脱タンニン率 (補正值) %
第 5 組	3	39.35	0.95	67.25	65.94
	16	46.02	1.74	3.67	3.60
	17	47.66	2.25	30.64	30.04
	19	42.80	1.62	47.34	46.42
	20	40.11	1.17	34.46	33.79
第 6 組	21	41.08	1.36	71.90	71.20
	3	42.94	0.70	66.59	65.94
	23	51.47	1.81	74.96	74.23
	24	48.32	1.02	76.24	75.49
	25	44.52	0.77	65.32	64.68

第4表からわかるように、製麩及び糖化の全過程における基準菌種 *Asp. oryzae* (番号3) の脱タンニン率は6組の中1組を除いて大きい変動はなかつた。従つて基準菌種 *Asp. oryzae* の製麩及び糖化の全過程における脱タンニン率の平均値を求め、各組における各菌種の脱タンニン率を算出して比較した。第4表の脱タンニン率の大なるものから序列を附ければ第5表のようになる。

第5表 各種糸状菌の脱タンニン作用の強さ

序列	菌番号	菌 種 名	序列	菌番号	菌 種 名
1	11	<i>Asp. niger</i>	14	13	<i>Rhizopus chinensis</i>
2	22	<i>Asp. japonicus Saito</i>	15	3	<i>Asp. oryzae</i>
3	10	<i>Asp. awamori</i>	16	25	"
4	2	<i>Asp. oryzae</i>	17	12	<i>Rhizopus batatas</i>
5	7	"	18	4	<i>Asp. oryzae</i>
6	24	<i>Rhizopus tonkinensis</i>	19	14	<i>Rhizopus pēka I</i>
7	6	<i>Asp. oryzae</i>	20	18	<i>Mucor javanicus</i>
8	9	"	21	19	<i>Mucor rouxii</i>
9	23	<i>Rhizopus tritici</i>	22	15	<i>Rhizopus kainanto</i>
10	5	<i>Asp. oryzae</i>	23	20	<i>Monascus ankā</i>
11	21	<i>Monascus purpureus</i>	24	17	<i>Rhizopus javanicus</i>
12	18	<i>Mucor javanicus.</i>	25	16	<i>Rhizopus delemar</i>
13	1	<i>Asp. oryzae</i>			

第5表の順位は厳密なものではないが、各糸状菌のタンナーゼ作用力の強さの順位を大体示している。*Asp. niger*, *Asp. japonicus Saito*, *Asp. awamori*, 2, 3 の *Asp. oryzae* は他の糸状菌に比してタンナーゼの作用が強かつた。特に *Asp. niger* が比較的タンナーゼに富むという結果は諸研究者の成績とよく一致した。

2. 酵母培養

高粱糠麩の製法。高粱糠7分、小麦ふすま3分、水道水5分を混和し、90分間蒸した後 *Asp. oryzae* (菌番号3) の精白粟種麩を移植し、24—28°C で3日間置いて作った麩を70°C以下の熱風で5時間乾燥した。

麩汁の調製。上記の高粱糠麩300gに水道水1.5lを加え、60°Cで約16時間糖化した後、殺

菌し、濾過し、濾液に卵白を加えて清澄させた。この麴汁を毎回 1 時間蒸気にて 3 日間間断殺菌して酵母培養液に供した。

酵母培養、培養液 950cc に種酵母 50cc を加え、30°C にて 18.5—20 時間通気培養した、通気量は培養液 1 l に対して 0.05 立方呎/分であつた。比較として培養液 950cc に硫安 3.8g を添加し、他は同条件にて酵母を培養した。

分析、培養液の還元糖をペルトラン氏法、N をケールダール氏法、タンニン を KMnO₄ 酸化法、ビタミン B₁ をプレブルダ氏法を用いて定量した。

酵母培養後培養液を遠心分離し、酵母を生理的食塩水にて洗滌し、秤量し、更に 60—70°C にて乾燥し、ビタミン B₁ を定量した。ビタミン B₁ 定量には乾燥酵母 0.3g を採り、塩酸性 (pH=1.8) にてペプシン 0.2g を加え、37°C にて 24 時間放置し、次に pH=4.5 となし、ジアスターゼ 0.5g を加え、37°C にて 24 時間放置した後水を加えて 40cc とした。次に濾過し、濾液 20cc を採り、酸性白土 0.2g を加え、ビタミン B₁ を吸着させた後、プレブルダ氏法により B₁ を定量した。得た結果を第 6 表に示す。

第 6 表

No.	酵 母 種 類	酵母収量 g	乾燥酵母中 ビタミンB ₁ r/g	備 考
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Rasse II	19.52	64.0	
2	" "	18.77	28.6	硫安添加
3	" "	15.81	27.1	
4	" Rasse XII	19.03	30.6	硫安添加
5	" "	17.05	33.7	
6	<i>Torulopsis utilis</i>	19.78	—	硫安添加
7	" "	16.39	—	
8	<i>Torulopsis fermentati</i>	13.20	31.2	硫安添加
9	" "	12.80	24.5	
10	<i>Saccharomyces mandshuricus</i> Forma I	20.76	23.4	硫安添加
11	" "	22.62	22.4	

培養前の培養液の還元糖含量 (麦芽糖として) は 100cc 中約 2g となるように調節した。培養後の培養液中の糖量 (麦芽糖として) は 100cc 中 0.6—0.8g で、糖消費率は 60—70% であり良好ではなかつた。培養液の最初の pH を 4.8—5.0 に調節したが、培養終期の pH は *Torulopsis fermentati* では最初と殆んど変らなかつたが、Rasse II, *Saccharomyces mandshuricus* では 0.1—0.2 だけ、Rasse XII, *Torulopsis utilis* では 0.5 或はそれ以上減少した。

培養液の最初のタンニン含量は 100cc 中 0.020—0.025g であつたが、培養終期では約半分に減少した。死滅菌はいずれの場合でも殆んどなかつた。*Saccharomyces mandshuricus* が最も収量多く、次に Rasse XII, *Torulopsis utilis*, Rasse II で、*Torulopsis fermentati* の収量が最小であつた。本実験では硫安の酵母収量に及ぼす効果は期待できなかつた。

製麴に用いた *Asp. oryzae* (菌番号 3) はタンナーゼがあまり豊富でなく、高粱糠の澱粉を糖化するアミラーゼ作用も強くなかつた。酵母培養試験は各種糸状菌の高粱糠タンニンに対する脱タンニン試験の前に実施したので、*Asp. oryzae* (菌番号 3) を用いたのである。

各種糸状菌の高粱糠タンニンに対する脱タンニン試験及び著者の他の実験的研究によつて、脱タンニン作用及び糖化力が共に強い糸状菌は *Asp. awamori* であることが証明された。麴法による高粱糠を原料とするビタミン B₁ 剤の製造に用いる糸状菌は *Asp. awamori* であると考えられ

る。本実験は麴法による高粱糠を原料とするビタミン B₁ 剤の製造の可能性と見通しを与える。

総 括

1. 25 種の糸状菌 (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Monascus*, *Mucor*) を選び、高粱糠タンニンに対する脱タンニン作用を比較した。

タンナーゼ作用の強い菌種は *Asp. niger*, *Asp. japonicus* Saito, *Asp. awamori*, 2, 3 の品種の *Asp. oryzae* であつた。

2. 高粱糠麴を用いて培養液を調製し、これを用いて5種の酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* Rasse II, *Saccharomyces cerevisiae* Rasse XII, *Torulopsis utilis*, *Torulopsis fermentati*, *Saccharomyces mandshuricus* n. sp. *Forma I*) の培養試験を行つた。

3. 麴法による高粱糠を原料とするビタミン B₁ 剤 (酵母剤) の製造は実験的に充分可能であり、見通しを有する。

文 献

1. D. Dalvi : *J. Indian Inst. Sci.*, 13A (1931), 173.
2. L. Knudson : *J. Biol. Chem.* 14, (1913), 159.
3. W. N. Nicolson, M. Nierenstein, J. C. Pool, N. V. Price : *Biochem. J.*, 25, (1931), 752.
4. K. Freudenberg, F. Blümmel, T. Frank : *Z. physiol. Chem.*, 164, (1927), 262.
5. D. Rhind, F. E. Smith : *Biochem J.*, 16, (1922), 1.
6. M. Nierenstein : *Biochem J.*, 16, (1922), 514.
7. L. Knudson : *J. Biol. Chem.*, 14, (1913), 185.
8. A. Rippel, J. Keseling : *Arch. Mikrobiol.*, 1, (1931), 60.
9. C. Stapp, H. Bortel : *Zentr. Bakt. Parasitenk*, 2Abt., 93, (1935), 45.
10. ペイ・ズパルスキー, イ・イ・イワノフ, エス・エル・マルダシエフ : 生物化学 (ロシア文) 1954年.