

スプロボロミセス赤色酵母に関する研究(第10報)

血糖降下作用と静黙作用(その3)

山崎何恵・里村幸男・山本武彦(九州大學農學部農藝化學教室資源微生物學研究室)

昭和25年7月28日受理

Studies on *Sporobolomyces* Red Yeast

Report 10. Antidiabetic Action and Fungistatic Action (Part 3)

By Izue YAMASAKI, Yukio SATOMURA and Takehiko YAMAMOTO

(Lab. of Zymology and Industrial Fermentation, Dep. of Agr. Chem., Kyushu University)

スプロボロミセス赤色酵母の血糖降下作用性成分と非滲出性の静黙作用性成分とは、共に培養初期に於ては培養液中には認められず、本來菌體の構成成分として存在するものであらうと考えられるが、菌體を酒精にて抽出する場合、或は長期の培養により菌體が自己消化する場合等には常に兩成分は隨伴して存在する⁽¹⁾ことが認められた。しかし夫れ等各の有效成分につき抽出の諸條件を再吟味した所、兩成分を明らかに別個の區分に分別することが出來たので、それらの性質に就て若干検討した。

實驗の部

I. 血糖降下作用性區分と静黙作用性區分との分別 蔗糖5, 照内ペプトン0.5, KNO_3 0.1, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% (水道水) からなる半合成培養液 100cc 宛を 500cc 容綿栓三角フラスコに容れ常壓常法にて殺菌した後、同組成の培養液に1週間静置培養した赤色酵母 *Sporobolomyces ruberrimus* を良く振つて懸濁せしめたもの 0.5cc 宛 (乾燥菌體として 5mg 相當) を分注接種、23°で静置培養し、培養約2週間後の新鮮菌體、或はそれを 35°で通氣乾燥せる乾燥菌體を使用するが、又は培養期間が 30~40 日以上經過し、菌體の自己消化が充分進んだ時期の培養濁液を用い、Table 1 に示す如く抽出及び分別の操作を行つた。

Table 1. Extraction and Separation of Bio-active Fraction

Red yeast (fresh or dry) or its old culture solution	
EtOH ext.	in room temp.
Soluble part	Insoluble part
concentration and ether extraction	
Water sol. part	Ether sol. part
(hypoglycaemia producing action : strong fungistatic action : weak)	dry up and dissolve in EtOH
Et OH soln.	Insol. part
dry up and dissolve in ether	Sterol?
Ether soln.	
wash with NaHCO_3	
dry up	
Oily subst.	
(Fungistatic action : strong hypoglycaemia producing action: negative)	

これに 10 倍量の 94% 溫アルコールを加えて溶解し、氷室(0~4°)に1夜放置すると白色の結晶性物質が析出する。この析出物は SALKOWSKI 反応及び LIEBERMAN 反応等が極めて顯著であつて、sterol がその

即ち新鮮菌體の場合は4倍量の 94% アルコールを、乾燥菌體の場合には5倍量の 80% アルコールを添加浸漬し、時々攪拌し乍ら室温(22°)で24時間抽出した。尙培養濁液の場合は豫め減壓下(35°)に原培養液の $\frac{1}{10}$ 量まで濃縮したものにつき、新鮮菌體の場合と同様に處理した。而して菌體を用いた場合抽出が十分なる程抽出液は赤味を呈した。これらの抽出液を減壓下(35°)に濃縮してアルコールを除去すると、全體が乳濁液となりその表面に赤色の油状物質が浮上する。之に等容のエーテルを加え分液抽出を繰返し、エーテル溶液は更に水で洗滌し水溶液は合して減壓下に濃縮して 1cc を乾燥菌體の 1g 或は培養液の 100cc 相當に至らしめ、濾過した後、家兎の血糖に及ぼす影響を検した。その結果本水溶區分は明らかに強力な血糖降下作用を有したが静黙力は弱く、試験培地に 20% 量添加した場合に於ても、黒かびに對し 30~40% の繁殖阻害を示すに過ぎなかつた。

これに反しエーテル可溶部の方はエーテルを追出せば本赤色酵母特有の香氣を有する赤褐色の油状物が得

主成分であると考えられるが、これを濾別したアルコール溶液は赤褐色の液であつて、水に滴下すれば乳濁状に分散し、極めて強力な静黙作用を示した。又この区分よりアルコールを追出し、油状物を再びチーテルに溶解し1%重曹水にて洗滌して酸性物質を除けば更に静黙力が増加した。一方重曹洗滌液は静黙作用は弱い。尙これを冷所に放置すると總状の白色結晶を析出するが、このものの性質については現在の處不明である。

II. 血糖降下作用性成分の諸性質 前述の如くして菌體或いは長期培養液の酒精抽出液より血糖降下作用性成分と静黙作用性成分とを分別することが出来るが、更に今一つの方法として新鮮菌體を稀鹽酸液に浸漬し時時攪拌し乍ら3~4時間pH 2.6~2.8に保ち、その後そのまま20°に約16時間放置(pH 3.4)し、即ち酸性に於て自己消化させる場合には血糖降下作用性成分は充分浸出せらるゝに反し、静黙作用性成分は殆ど浸出せられないことが分つた。斯く抽出方法を夫々異なる各区分の血糖降下作用力はFig. 1の如くであるが、何れもpHを4.6~6.0になる如く調節し、其の1ccが乾燥菌體1g相當量になる如く減壓濃縮したものを家兎體重1kg當り1ccの割合にて皮下注射し、比較した。其の結果は新鮮菌體を酒精抽出した場合も、酸性にて自己消化せしめた場合も有效成分は同程度に浸出せられているようと考えられるが、培養液より抽出した場合にはやや作用力が劣るようである。

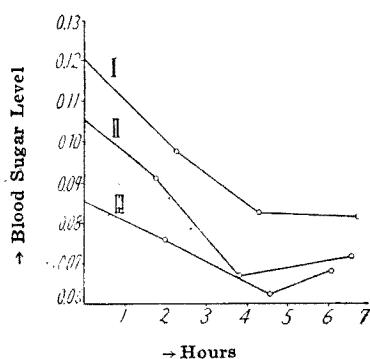


Fig. 1 Hypoglycaemia Producing Effect of the Extract from Red-yeast-cell
 I Concentrate from Autolyze in Acidic Zone of Fresh Yeast
 (♂ Rabbit No. 10)
 II Concentrate from Alcohol Extract of Fresh Yeast
 (♂ Rabbit No. 11)
 III Concentrate from Old Culture Solution (♂ Rabbit No. 5)

培養液中に血糖降下作用性成分の產生される例は或種の細菌に就ては知られているが⁽²⁾、酵母に關しては未だその例がないようである。麥酒酵母或はパン酵母の酸性に於ける自己消化液が血糖降下作用力を有することは既に KAUFMAN⁽³⁾、鎮目氏⁽⁴⁾等も報告している處であり、その點は當赤色酵母も同様であるが、併しその作用力は遙に強い。尙現在迄に知り得た當赤色酵母の血糖降下作用性成分に就ての二、三の知見は、(1) 90%濃度以上の酒精に可溶であるがアセトンには溶解せず、又アセトンにて處理すれば不活性となる、(2) 加熱により沈澱を生じないが效力は消失する、(3) アルカリに不安定である、(4) インシュリンより遙かに效力持続性を有し、ショックは認められない、(5) アドレナリン、アロキサン等による人工過血糖或は食餌性過血糖に明らかに拮抗する等であるが恐らく矢張りインシュリン様の活性蛋白であろうと考えられる。尙近時米國に於ては糖尿病患者に對し基本食餌中に多量の酵母を攝取せしめているが⁽⁵⁾、ビタミン補給源としての意味が主であり直接血糖降下に影響するとは考えられない。然るに當赤色酵母は菌體其體の經口投與により明らかに血糖降下作用が認められると言う點⁽⁶⁾は極めて注目すべき事實である。

III. 静黙作用性成分の諸性質 前述の如く一度エーテルに溶解せしめ、重曹水で洗滌し、ステリン類を除去して精製を行つた赤褐色油状の物質は乾燥菌體に對し約4%，培養液からは原培養液量に對し約0.01%の收量で得られる。此油状物質をアルコールに各種濃度に溶解した後、黒かびの試験培地に夫々0.25cc宛添加し、黒かびの胞子懸濁液0.5cc宛を分注接種して、30°で72時間培養し、後菌蓋を分離、恒量に達するまで乾燥して対照との菌體重量を比較し、繁殖阻止率を算出した結果はTable 2の如くであつた。

即ち當赤色酵母の油状物質は1/10,000~1/50,000の濃度に於て殆んど完全に黒かびの繁殖を阻止する。而してその際黒かびは僅かにガラス壁に沿う液面の部分と、

Table 2. Fungistatic Effect of Concentrate from Cell or Culture Solution

	Conc. in med.	Inhibition coeff. for growth of black Asp.
Oily subst. obtained from red yeast	1:10000 1:50000	93.0 68.8
Oily subst. obtained from culture solution	1:10000 1:50000	92.7 89.9
<i>p</i> -Oxy-butyl-benzoate	1:10000 1:25000 1:50000	100.0 95.1 39.4
Castor oil	1: 1000	36.0
Inhibition coeff. = mycelial weight (Control- Exp./Control) × 100.		
Medium: Cane sugar 8.4, NH_4NO_3 0.6, KH_2PO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15%, FeCl_3 trace 25cc in 100cc-Er. flask.		

Table 3. Fungistatic Effect to Various Microorganisms

	Cont.	Exp.	Dilution of red yeast's oily substance	
<i>Aspergillus Usamii</i>	100	7		液中に沈降せる微量の菌絲とが認められるに過ぎない。尙油状物質として比較の爲、ヒマシ油を添加したものは1/1,000の濃度に於ても僅かに36%の阻止率しか認められなかつた。又パラオキシ安息香酸ブチルエステルと比較すれば
<i>Aspergillus oryzae</i>	100	9		1/50,000の濃度に於ては明らかに繁殖阻止率は優つてゐる。
<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	75	1:10000	次に各種微生物に對する影響を試験した結果はTable 3に示す。
<i>Rhizopus javanicus</i> TAKEDA	100	78		即ち黴類に就ては黒かびの場合と同じ條件の下に接種後3日間
<i>Mucor plumbeus</i> BONORDEN	100	50		30°にて培養し、その菌體量を求める對照と比較した。酵母類はBall. 8°の麹汁を培養液とし、細菌類はブイヨン又は麹汁をアンモニヤにて中和したものを用い結核菌はSAUTONの培地を使用した。而して酵母類は30°にて3日間培養、 <i>Staphylococ. aureus</i> は37°にて18時間、 <i>Bact. coli</i> は同溫度で30時間、 <i>Bac. natto</i> 及びRetting bact.は30°で2日間培養した後、何れも肉眼的觀察により其繁殖の度合を標記した。即ち液面全部を皮膜が覆い褶曲を生成せるの卅、皮膜が液面全部を覆うのみのもの卅、皮膜が液面の約1/2を覆うもの十、皮膜が液面の約1/3以下のもの十、硝子壁に沿う部分に僅に産膜の認められるもの一、(<i>Staphylococ. aureus</i> は混濁度)とした。結核菌は培養液上にコルク切片を浮べ、それに接種し37°で16日間培養し表面に菌の小島が形成されかゝつた時可検液を添加し、その後26日間同溫度に保つた。而してその後對照は著しく繁殖を示したにも拘らず、赤色酵母の油状物を1/5,000濃度に添加したものは全く繁殖を認められなかつた。
Alcohol yeast Rasse XII	卅	卅		
Beer yeast	卅	卅		
<i>Debaryomyces membranefaciens</i>	卅	卅		
<i>Willia anomala</i> Fh-2	卅	卅	1: 5000	
<i>Zygosaccharomyces Barkeri</i>	卅	十		
<i>Mycoderma chevalieri</i>	卅	十		
<i>Oidium lactis</i>	卅	十		
<i>Mycotorula</i> sp.	卅	十		
Retting bacteria choma	卅	十		
<i>Bacillus natto</i>	卅	十		
<i>Bacterium coli</i>	卅	卅	1: 5000	
<i>Staphylococcus aureus</i>	卅	卅		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	卅	十		
<i>Typeus gallinaceus</i>	卅	十		

Table 4. Adsorption of Fungistatic Principle by Kaolin and Mycel

	Mycelial weight g.	Ratio	Inhibition coeff.
Control	0.469	100	0
Added oily subst. 1:10000	0.042	8.9	91.1
After shaking with Kaolin. The same media as the above	0.220	46.9	53.1
After shaking with dry mycel of black Asp. The same media as the above	0.452	96.2	3.8

これ等の結果より當赤色酵母の產生する抗菌性物質は產膜性の黴、酵母並に細菌に對しては有效であるが多少とも醣酵性能のある微生物に對しては效力がないことが分る。尙奥貴氏が薔薇色 *Torula* の抗菌性物質に就て報じている種々なる特性は、當赤色酵母の油状物質の場合と多くの類似性を有し、被吸着能に就てもTable 4に示す如く絲状菌の菌體或いはカオリンに良く吸着される。

即ちTable 2の場合と同じ條件の下に黒かびを被検菌とし油状物質を1/10,000濃度に添加したものと、それに0.5%量(0.125g)のカオリン又は水洗乾燥せ

る黒かび菌體を加え23°で2時間振盪後濾過した濾液とに、黒かび胞子を接種し52時間培養後得られた菌體量及び繁殖阻止率を比較すれば、繁殖阻止物質が黒かび菌體には殆んど完全に吸着せられ、又カオリンにも約半量は吸着せられていることが分る。其外酵母の醣酵性能に對しては全く影響を認められず、かび類に對する繁殖阻止作用は發芽後の幼菌絲に特に著しいと見られる點等、當赤色酵母がトルラ類とは著しく分類上の位置を異にする拘らず其靜黴作用性物質は恐らく *Rhodotorula* のそれと類似した物質であらうと考えられる。

要 約

1. スポロボロミセス赤色酵母の菌體酒精抽出液又は長期の培養濾液より血糖降下作用性成分と靜黴作用性成分とを分別し、兩者は常に隨伴して產生されるものではあるが明らかに相異なる別個の物質なることを知つた。

2. 血糖降下作用性成分は菌體を酸性にて自己消化させる場合にも、酒精で抽出する場合と同様に浸出せられるが、其場合には酵母作用性成分は浸出せられない。酒精には其の 90% 濃度に於ても可溶であるがアセトンには不溶であり、其外二、三の性質よりインシュリン様の活性蛋白であろうと考えられた。

3. 酵母作用性成分はエーテル可溶の油状物質として得られ、多くの産膜性の微生物、酵母及び細菌には有效であるが、酵酇性能を有し液内繁殖性のものには無効であり、パラオキシ安息香酸エステルよりその作用はやゝ強いのではないかと考えられた。又其本態は *Rhodotorula* の抗菌性物質と良く類似するものであろうと考えられた。

本研究の費用は一部を文部省科学研究費に仰ぎ、一部は三共高峰研究所に仰いだ記して謝意を表する。

追記：最近奥貫氏等は紅色酵母 *Rhodotorula Suganii* の抗生物質についての研究に於て、オレイン酸が抗微生物乃至抗結核菌物質の主體であることを證明した。〔資料科学研究所彙報、第 17~18 號、第 1 部、118 (1950)〕

- (1) 山崎・里村・山本：農化、(8報、9報) (1950)
- (2) WINTER, SMITH : *Biochem. J.*, 17, 764 (1923)
- (3) KAUFMANN : *Zts. für deutsche Ges. exp. Med.*, 62, 739 (1928)
- (4) 鎮目淑夫：農化、13, 262 (1937)
- (5) DUNCUN : *Disease of Metabolism* (1947)
- (6) 山崎・里村・山本：昭 25.4 月、農化会講演發表
- (7) 奥貫一男 : *Jap. Jour. Bot.*, 5, 402 (1931)

Summary

- 1) It is shown that antidiabetic and fungistatic fractions are to be separated from each other from the the alcoholic extract of fresh or dry yeast, or of old culture solution of *Sporobolomyces* red yeast (*Sporobolomyces ruberrimus*).
- 2) Antidiabetic concentrate can be also obtained from the autolyzate in acidic zone (pH 2.6~2.8) of the red yeast. According to several properties, the antidiabetic principle seems to be an insulin-like, labile protein substance.
- 3) Fungistatic concentrate is obtained in the form of ether soluble oily substance. It is effective to most kinds of strictly aerobic, membranous fungi, yeasts and bacteria but indifferent to such fermentative microorganisms as *Bact. coli* and *Staphylococcus aureus*.

醤油香氣成分に関する研究(第4報) 醤油の火香(その3) アセタールの呈色反応

横 塚 保 (野田産業科学研究所)

昭和 25 年 7 月 11 日 受理

Studies on Flavorous Substances in Soy. Part 4. Flavors resulting from Heating.

3. Color Reactions of Acetals

By Tamotsu YOKOTSUKA (Noda Industrial Science Laboratory)

緒論 第2報、第3報に述べた如く、醤油粕の水蒸氣蒸溜により得られた $C_{10}H_{22}O_8$ 及び $C_6H_{12}O_2$ なる 2 つの香氣物質が夫々 α -hydroxy-isocapro aldehyde diethyl acetal 及び isovaleraldehyde diethyl acetal である事は、種々の化學反応より推定せられた處であるが、此の外に之等の示す各種の呈色反応(沈澱反応)が大いに興つて力があつた。即ち之等が acetal 結合- CH_2-O- を有する事は、此の基が各種 phenol 類及び α -、 β -naphthol と特殊の呈色及沈澱反応を示す事を、合成した各種 acetal 類に就て認めた後、検體に就ても殆ど同様の反応がある事を認めた事から、推定したのであつた。因に ether 中の acetal 類の識別に關して、ほゞ同様の呈色反応による方法が TSEOU, CHOW 兩氏により報告せられているが、⁽¹⁾筆者は兩氏よりも多種類の phenol により多種類の acetal を對稱とし、acetal の種類により、此の定性反応に差異の存する事及び此の反応を利用して或る程度 acetal と之に相應する aldehyde との識別が出来る事を明にした。