

味噌中の糖類に就いて* (第2報) 遊離糖の検索並に定量

本間 伸夫・明田川 太七郎 (新潟県農村工業指導所)

著者等¹⁾は前報に於て味噌中の炭水化物——主として多糖類に就てその構成単糖類を検索した。しかし全炭水化物の80%近くが還元性の単糖類或は寡糖類として存在し熟成の進み具合や製品の品質に最も関連の深い成分の一つである。特にこれら糖類より微生物の作用で二次的に生産される物質の質及び量は製品の香味に影響する所が多い。又味噌の色に深く関係するのも単糖類等の低分子炭水化物とされている。

前報にて遊離糖に就て軽く触れたが、これら遊離糖の種類、性質、含有量等を検討する為ペーパークロマトグラフィー及び SOMOGYI 法を併用して実験を行った。

実 験

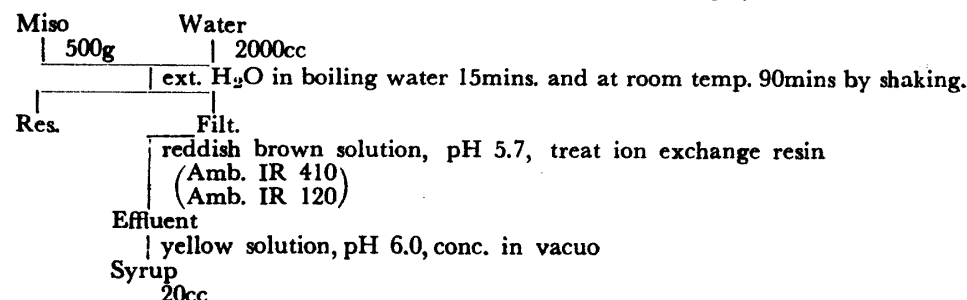
1. ペーパークロマトグラフィーに依る遊離糖の検索

(a) クロマトグラフ操作: 前報に準ずるが別に *n*-BuOH, Piridine, H₂O (3:2:1.5)²⁾ を展開剤として用いた。

(b) 供試味噌: 前報と同一

(c) サンプル溶液の調製及びペーパークロマトグラフィー: クロマト用サンプル溶液の調製は第1表の如くである。脱塩の為強酸性、強塩基性イオン交換樹脂層を通過させたが、糖の分解転化或は寡糖類の加水分解が起こる可能性がある。

Table 1. Preparation of the sample solution for chromatography



サンプル液0.01ccを原点にスポットし多重展開で得たクロマトグラムを第1図に示す。

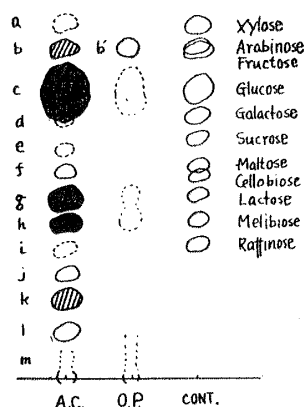


Fig. 1. Paper chromatogram of free sugars in miso
Solvent BuOH, MeOH, H₂O (4:1:1.5) × 4

展開剤 BuOH-Pyridine でもほとんど同様のクロマトグラムを与えた。第1図に於いてRf値の大きいスポットより順にa(0.69), b(0.61), c(0.54), d(0.49), e(0.41), f(0.38), g(0.33), h(0.28), i(0.24), j(0.19), k(0.16), l(0.09), 及びmとする。呈色剤ACにてaは桃, bは桃色と黄赤褐色の重なった様な色調を示す, c, d, 及びeは褐, fは赤褐, g, hは褐, iが黄褐, jは赤褐, kが褐, l, mは赤褐色であった。これらのうちc, g, h及びkの呈色が強かった。呈色剤opの場合にはbが帯黄緑色のケトース特有反応を示すがc, g, hは灰色じみた黄色の弱い呈色が認められた。

(d) 非醱酵性糖の検索: (c)にて得られたシラップに倍量のCZA-PECK 培養液の無機物を添加殺菌後アルコール酵母(台研 No. 396)或はパン酵母(中越イースト)を接種30°Cで4日間保ち醱酵させた。醱酵液に醋酸鉛を加えて除蛋白し硫化水素ガス処理及びイオン交換樹脂処理を行つてから原容に戻しクロマト用サンプルとした。

(c)の場合と同様にして得られたクロマトグラムを第2図に示した。醱酵によつて消失したのはb'及びcスポットである。

* 味噌の成分に関する研究 (第2報)

(518)

(本間, 明田川) 味噌中の糖類に就いて (第2報)

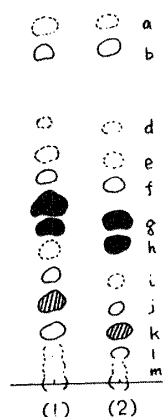


Fig. 2. Chromatogram of the unfermentable sugars in miso

- (1) Solvent BuOH-MeOH ($\times 4$)
 (2) Solvent BuOH-Pyridine ($\times 3$)

東洋濾紙 No. 52 に線状にスポットイングし溶剤 BuOH-MeOH にて 4 回展開分離しガイドにて各種の位置を決定、切りとり DENTTM の方法に従つて冷水にて抽出した。抽出時間は約 12 時間。抽出液を集め濃縮再びペーパーにて展開して一応の純粋性を検してから他は加水分解して各糖の構成糖をペーパークロマトにて検索した。各糖の構成糖は第 2 表に示す如くである。

Table 2. Sugars of the hydrolyzed each oligosaccharides

Sugar	Glucose	Galactose	DP*
c	+	—	2.00
f	+	—	2.00
g	卅	±	2.01
h	卅	卅	2.17
i	+	—	3.37
j	+	—	2.97
k	+	+	3.16
l	+	—	4.35
m	卅	—	—

* DP: Degree of polymelization

の重合度と直線関係がある事を示している。そして麻生等³⁾は更に詳しく各種の結合を有する glucose-polymer に就て検討した。この関係を用いて構成糖の種類、重合度、及び結合様式などを推定し得る可能性がある。

味噌中の遊離糖に就いて Rf 値より $\log \alpha'$ を求め重合度との関係を求めた。第 4 図に展開剤 BuOH-MeOH ($\times 4$) の場合の結果を示す。展開剤 BuOH-Pyridine の場合も同一の結果を得た。

第 4 図の結果によれば c, g, j 及び l がほぼ直線の中に入り同一系統の糖である。即ち c が glucose で g は isomaltose であるからこれらは 1,6- α -結合の glucose polymer の series であると思われる。よつて j, l は dextrantriose 及び dextrantetrose と呼ぶべき糖類に相当する。又 FRENCH の式より逆にある構造の寡糖の Rf 値を算定する事が出来る。第 3 表に 1,4- α -及び 1,6- β -結合を有する glucose polymer の測定 Rf 値と算出 Rf

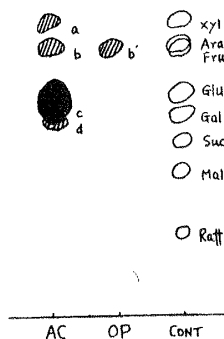


Fig. 3. Chromatogram of the hydrolyzed free sugars in miso
 Solvent n-BuOH-MeOH ($\times 3$)

(f) 寡糖類の構成単糖の検索: (e) の結果より (c) 及び (d) サンプルの c 以下のスポットは寡糖でありその構成単糖は xylose, arabinose, fructose, glucose, galactose に限られる事がわかつた。(c) サンプル溶液を 40 $\times$ 60cm の

成糖は第 2 表に示す如くである。

すべて glucose, galactose の両方或は glucose のみより成り他の糖 fructose, mannose, pentose は構成糖とならない。

(g) 寡糖類の重合度: (h) にて調製せる各寡糖の抽出液に就いて加水分解により SOMOGYI 法⁴⁾にて定量、重合度を測定した。滴定は N/300 Na₂S₂O₃ 溶液を用い、High alkalinity reagent によつた。測定の結果を第 2 表に示した。e, f, g, h は disaccharide, i, j, k は trisaccharide, l は tetrasaccharide である。

(h) Rf と構造との関係: FRENCH⁵⁾等は分配係数より導かれる函数の対数 $\log \alpha'$ ($=\log Rf/(1-Rf)$) は同一系統の寡糖類

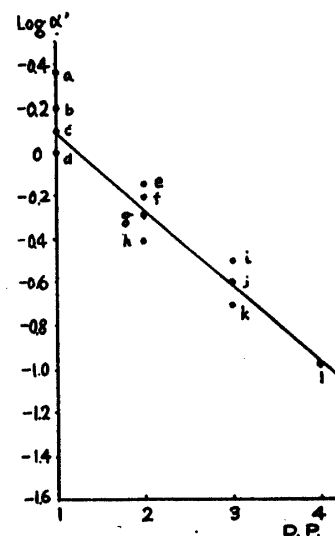


Fig. 4. Relationship between Rf value and DP of the oligosaccharides in miso
 Solvent: n-BuOH-MeOH ($\times 4$)

値を示す。この結果によれば i スポットは panose, j が dextrantriose, l が 6- α -isomaltotriosyl-D-glucose に相当する事がわかる。

(考 察)

以上の実験結果より味噌中に存在する遊離糖について次の様に推定した。(第1図参照)

a スポット: Rf 値と呈色(桃色)より xylose であり, 呈色が弱くその量は少ないものと思われる。

b スポット: この位置には arabinose, fructose 及び mannose が相当する。呈色が桃色を示すから arabinose が存在するのであろう。又呈色剤 OP にて黄緑色を呈するから fructose も存在する。mannose は二次元展開で始めてその存否が明かとなる。Phenol-H₂O, *n*-BuOH-MeOH の二次元法で検索しても mannose のスポットは明確に認め

る事は出来なかつた。恐らく存在しても微量のものであろう。

c スポット: 酵母により醗酵し Rf 値より glucose であり量的に最も多い。

d スポット: glucose の直下にある為多量にスポットティングする時は glucose のスポットにかくれて検出する事が不能である。量的には極めて少い。

e スポット: 重合度 2, 構成糖が glucose のみであり非醗酵性糖である。呈色は褐色で後述するか如く米麴の非醗酵性糖との比較により麻生等⁷⁾の sakebiose, 富金原等⁸⁾の x 糖に相当するものと思われる。sakebiose は麻生等⁹⁾によれば 1,3- α -結合を有する diglucoside と推定されて居る。

f スポット: 重合度 2, 構成糖が glucose のみであり非醗酵性糖である。呈色は赤褐色で e スポットよりその呈色の具合が弱い。米麴や清酒の非醗酵性糖との比較により麻生等⁷⁾の kojibiose, 富金原等⁹⁾の x' 糖に相当するものと思われる。kojibiose は麻生等¹⁰⁾により 1,2- α -結合を有する diglucoside と推定されている。純粋の maltose はこの f スポットと e スポットとの中間に位するが, これに相当するスポットは存在しないから清酒や米麴に認められていない様に^{8) 11)}味噌中にも maltose は存在しない事となる。これら e 及び f スポットが夫々 sakebiose 及び kojibiose であれば原料の米麴に由来するものであろう。

g スポット: 重合度 2, 構成糖が glucose のみの非醗酵性糖である。米麴より分離した isomaltose と Rf 値及び呈色がよく一致する。呈色の強さは glucose に続きかなり強い。麻生等⁶⁾によれば 1,6- α -結合を有する gluco-biose は現在迄知られた gluco-biose のうち最も Rf 値の低いものである。よつて isomaltose より Rf 値の低い普通に認められる gluco-biose は存在しないと考えられる。

h スポット: 重合度 2, 構成糖は glucose 及び galactose で非醗酵性糖である。既知の gluco-biose で isomaltose より Rf 値の低い糖は存在しないからこの Rf 値を示す糖は gluco-biose とは考えられない。第3表の結果によれば maltotriose の Rf 値が比較的類似して居る。maltotriose は澱粉の加水分解で生ずる可能性が大きく, 又 h スポットの重合度 2.17 という少々過大な数値は恐らく glucose と galactose よりなる disaccharide-と maltotriose の混合物であることを意味するものであろう。しかし加水分解物の glucose と galactose のペーパークロマトグラフに於ける呈色の程度はほぼ同一であり, 重合度 2.17 という数字が示して居る様に h スポットの大部分は glucose と galactose より成る disaccharide と思われる。

glucose と galactose よりなる disaccharide で現在迄知られているのは lactose と melibiose 位のものである。このうち前者は植物界に認められなく, Rf 値が大体 isomaltose 辺に相当するから h スポットには相当しない。melibiose は Rf 値が又呈色がよく h スポットと一値する。melibiose は raffinose の醗酵により生ずる比較的醗酵されにくい糖であり, 米麴の β -*h*-fructosidase の作用によつても raffinose より生ずる。味噌原料たる大豆中には川村¹²⁾によれば 0.95% の raffinose が存在すると報告されて居り, 味噌中に遊離糖として melibiose が raffinose より麴, 酵母, 細菌等によつて熟成中に生成する可能性が充分ある。以上の事実より h スポットの大部分は melibiose と思われるかと推定した。

Table 3. Theoretical and experimental Rf values of gluco-triose and tetrose

Sugars	DP	Rf value	
		Theoretical	experimental
Maltotriose	3	0.26	—
Panose	3	0.23	0.24 (i)
Isomaltotriose	3	0.18	0.19 (j)
Maltotetrose	4	0.16	—
6- α -Isomaltotriosyl-D-glucose	4	0.08	0.09 (l)
4- α -Isomaltotriosyl-D-glucose	4	0.13	—

Solvent: *n*-BuOH, MeOH, H₂O (4: 1: 1.5)

(520)

(本間, 明田川) 味噌中の糖類に就いて (第2報)

i スポット: 重合度3, 構成糖は glucose のみの oligosaccharide で非醗酵性糖である. 清酒中の¹¹⁾, 麴中¹¹⁾の panose の存在は認められて居るがこれらの中の panose との比較により, 又 FRENCH 等の $\log \alpha'$ より逆に計算した Rf 値との比較 (第3表) により i スポットが panose と推定した. 但し重合度が少々大きく出て居るのは他の糖が混在して居る可能性のある事を示して居るものであろう.

j スポット: 重合度3, 構成糖は glucose のみであり, 米麴¹¹⁾や清酒¹¹⁾中の dextrantriose の Rf 値とよく一致する. 又 panose と同様に $\log \alpha'$ より推定した結果では1,6- α -結合2ヶ有する gluco-triose の Rf 値とよく一致する. よつて非醗酵性の dextrantriose に相当すると推測した.

k スポット: 重合度3, 構成糖は glucose と galactose である. ペーパークロマトにより構成糖を調べる場合両糖の呈色の強さは galactose が強かつた. 既知の糖で glucose のみよりなる trisaccharide の Rf 値は dextrantriose が最低である. よつてそれより Rf 値の小さい k スポットは gluco-triose とは考えられない. 混在の考えられるものは gluco-tetraose である. glucose と galactose よりなる trisaccharide で既知の糖は manninotriose のみである. この糖は glucose 1 分子, galactose 2 分子よりなる stachyose を醗酵させた場合残存する糖である. この stachyose は大豆中にかなり多量 (3.2%¹²⁾) 存在する. 大豆の遊離糖に酵母を接種醗酵させた残糖の manninotriose 相当スポットの Rf 値と k スポットの Rf 値はよく一致し, 呈色も類似して居る. よつて k スポットは大豆中の stachyose が熟成中麴, 酵母, 細菌等の働きで生じた manninotriose と推定される.

l スポット: 重合度4, 構成糖 glucose のみより成る. Rf 値の推定により 6- α -isomaltotriacetyl-D-glucose, 即ち1,6- α -結合3ヶ有する tetraose であろう. l スポット位の Rf 値では相当すると考えられる dextrin は数多く存在するから, これは最も可能性ある推定以上は出ない.

m スポット: 種々の Rf 値を示す dextrin 類である.

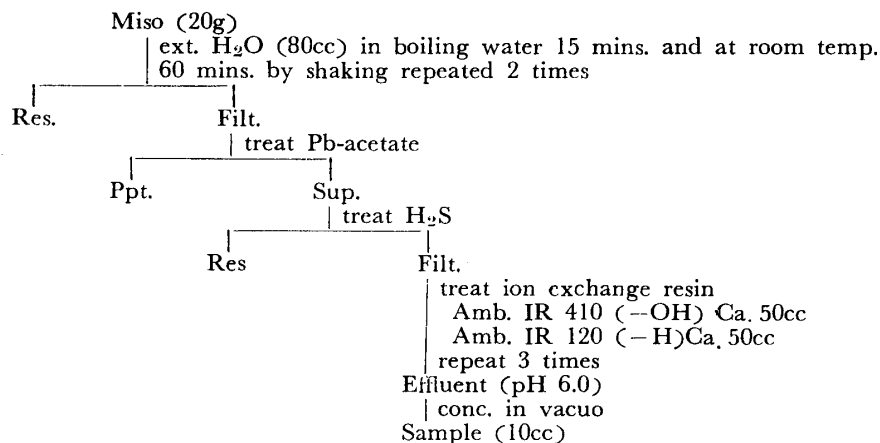
2. ペーパークロマトグラフィーに依る遊離糖の定量

清酒中の遊離糖の定量はペーパークロマトを用いて為されている^{13) 9) 14)}. 味噌や醤油に就いての定量は未だ為されて居ない. これらの調味料には食塩, 蛋白質等が極めて多くペーパークロマトによる定量はかなり困難が予測される.

糖の混合溶液をペーパークロマト法にて展開抽出し定量する方法に就いてはかなりの研究が見られる. DIMLER等¹⁵⁾の anthrone 試薬による比色法, FLOOD¹⁶⁾の SOMOGYI 試薬による滴定法, HAWTHORN¹⁷⁾や HIRST¹⁸⁾等の沃垂沃素酸法, HIRST¹⁹⁾の過沃素酸酸化法等がある. 麻生等¹³⁾は DENT²⁰⁾の方法でペーパーより抽出FLOODの方法に従つて SOMOGYI 法で清酒中の糖を定量しているので著者等はこの方法を参考とした.

(a) サンプルの調製: 味噌抽出液中には多量の食塩, 蛋白質, アミノ酸, 有機酸等が存在し, そのまゝでは定量に供する事が出来ない. よつて第4表の如き操作によつた. 但しこの操作の為のロスが大きくなり特にイオン交換樹脂処理でかなりの損失を来すものと考えられる. 特に強酸性, 強アルカリ性のイオン交換樹脂の使用は好ましくないが中性塩の分解除去の為には避けられない.

Table 4. Preparation of the sugar mixture for chromatographic determination



(b) クロマトグラフの調製: 濾紙は東洋濾紙製 No. 52 (40×40cm), 展開剤は *n*-BuOH, MeOH, H₂O (4:

1:1.5)を用い22°で4回多重展開を行つた。この展開剤の場合全体の Rf 値は必ずしも高くはないが, oligosaccharide のクロマト上の分布が良く, 溶媒前線が直線的で乾燥の早い利点がある。先に得たサンプル溶液を濾紙の下端より5cmの距離に0.25cm 間隔に10点0.002cc宛計0.02ccずつスポットした。但し guide として1点0.005cc別にスポットした。尚量が少なくこの guide で検出されない糖は定性的に検索した場合を参考にして相当位置を切り取つた。

(c) クロマトグラフより抽出: guide にて決定された範囲を切りとり長方形のガラス板に濾紙を挟み蒸留水を浸透滴下させ抽出した。抽出時間は DIMLER¹³⁾等の報告を参考にし, 又麻生等¹⁴⁾の方法を考慮に入れ室温で10時間抽出を行つた。同時に blank を濾紙について行う為サンプルをつけずに展開し各糖の相当位置を切りとり同様抽出を行つた。

(d) 抽出液の定量: 抽出液5ccに就いて SOMOGYI¹⁵⁾の High alkalinity reagent を用いて N/300 Na₂S₂O₃ で加水分解せず直接還元力を測定した。滴定には大型の試験管で小型の攪拌機を用いた。tetrose 以上の糖は一旦加水分解してから定量した。又サンプル溶液を同量ペーパーにスポットし展開せず抽出しその全還元力を測定し, 更にその加水分解物量即ち全糖を測定した。mono, di 及び trisaccharide の量は還元力と重合度より算出した。

マイクロピペットの検定の為, 各濃度の純粋糖液 (glucose 及び maltose) を一定量ピペットにて濾紙片につけ前記条件で水抽出を行い定量を行つた。回収率97.5~102.0%を得た。

測定結果は第5表の如くである。この表に於いて味噌中の含有量は次の様にして算定した。本定量に用いたクロマト用サンプル溶液に就いて供試味噌の直接還元糖を計算すると glucose として5.0%となる。しかし供試味噌の還元糖は6.5% (前報第2表) であるので各糖量を補正 ($\times 6.5/5.0 = 1.3$) して算出した。但し各還元糖の loss の割合は同一なるものと仮定した。

本定量結果によればこれら monosaccharide や oligosaccharide のうち glucose が71.4% (全糖に対して40.4%) で大部分を占める。次いで isomaltose が7.3%, melibiose が4.6%, mannino-triose が3.8% 等である。

原料配合割合, 熟成方法等で当然これらの数値はかわつて来ると考えられる。例えば大豆から由来すると思われる melibiose や manninotriose は赤味噌系が多く, 白味噌では全体の還元糖は多くなるがこれらの糖はかへつて少くなるものと考えられる。しかし味噌の遊離糖の各々を正確に測定する事は極めてむづかしい事と思われる。

要 約

1. 味噌中の遊離糖に就てペーパークロマトグラフィーにて検索した。その結果単糖類として arabinose, xylose, glucose, fructose, galactose の存在を認めた。又 oligosaccharide として構成糖, 重合度, Rf 値等より sakebiose, kojibiose, isomaltose, melibiose, panose, dextrantriose, manninotriose 等の存在を推定した。

2. 遊離糖に就いてペーパークロマトグラフィーと SOMOGYI 法で各糖を定量した。glucose 最も多く味噌中5.3%, 次いで isomaltose 0.5%, melibiose 0.3%, manninotriose 0.3% が多い方であつた。

最後に御指導及び御校閲を頂いた恩師新潟大学倉沢教授及び貞沢所長に深謝致します。

(本報告は農産加工技術研究連絡協議会—1955, 2—に紹介済み)

Table 5. Sugar analysis of miso

Sugar	* 1	* 2	* 3
Xylose	0.06	0.16	2.16
Arabinose & fructose	0.08	0.20	2.70
Glucose & galactose	2.04	5.30	71.43
Sakebiose & kojibiose	0.04	0.10	1.35
Isomaltose	0.21	0.54	7.28
Melibiose	0.13	0.34	4.58
Panose	0.03	0.08	1.08
Dextrantriose	0.06	0.16	2.16
Manninotriose	0.11	0.28	3.77
Dextrins	0.10	0.26	3.50
Σ	2.86	7.42	100.01
Total reducing sugar	2.54*1		
Total sugar	3.03*1		

* 1 mg/0.02cc of sample for paper chromatography

* 2 % in miso

* 3 % in soluble sugar

(522) (安藤, 栗山, 赤見坂) 清酒と合成酒の判別法に就いて

文 献

- 1) 本間, 明田川: 本誌, **33**, 490 (1955). 2) JEANES, A. WISE, C. S. and DIMLER R. J.: *Anal. Chem.*, **23**, 415 (1951). 3) DENT C. E.: *Biochem. J.*, **41**, 240 (1947). 4) SOMGGYI M.: *J. Biol. Chem.*, **119**, 741 (1937). 5) FRENCH D. and WILD G. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2612 (1953). 6) 麻生, 山内: 本誌, **33**, 194 (1955). 7) 松田, 麻生: 本誌, **31**, 211 (1953). 8) 富金原, 村松: 農化, **26**, 583 (1952). 9) 松田, 麻生: 本誌, **32**, 498 (1954). 10) 麻生: 化学の領域, **8**, 81 (1954). 11) 麻生, 柴崎, 山内: 本誌, **30**, 311 (1952). 12) 川村: 農化, **28**, 851 (1954). 13) 麻生, 柴崎, 山内: 本誌, **32**, 47 (1954). 14) 穂積, 佐藤: 醸協, **45**, 24 (1950). 15) DIMLER, R. J. SCHAEFER, W. C. WISE, C. S. RIST C. E.: *Anal. Ceem.*, **24**, 1411 (1952). 16) FLOOD, A. E. HIRST, E. L. and TONES J. K. N.: *J. Chem. Soc.*, 1679 (1948). 17) HAWTHORNE J.: *Nature* **160**, 714 (1947). 18) HIRST, E. L. HOUGH, L. and JONES, J. K. N.: *J. Chem. Soc.*, 923 (1949). 19) HIRST, E. L. and JONES J. K. N.: *ibid.*, 1659 (1949). (昭和 30, 8, 3 受理)

清酒と合成酒の判別法に就いて〔清酒中の成分に関する研究(第2報)]*

安藤 智雄・栗山 一秀・赤見坂 聰 (大倉酒造研究室)

【緒 言】

清酒と合成酒の判別に関して、既に佐藤氏等¹⁾は先づ緩衝能の相異よりアルカリ添加後加熱した場合、その着色度に於て大きな差異を生ずることから両者を判別して居り、更に又同氏等²⁾は両者のアミノ態窒素の相異から、MILLON 氏反応及び Xanthoprotein 反応による判別にも成功して居る。

著者等は先づアルカリ添加後の着色による佐藤氏の判別法を再検討すると共に、新しく螢光度による方法及び、FOLIN-CIOCALTEU 試薬による Tyrosine 値から判別する法を試み、これらの方法でも清酒と合成酒を判別し得る事を確めたので報告する。

【実験及び考察】

(i) 試 料

実験には略全国的に集めた市販酒、清酒特級、清酒一級、清酒二級及び合成酒二級の計87点に就いて調査した。尚それら銘柄の一例を示すと次の如し。

清酒特級: 白鹿, 菊正宗, 白鶴, キンシ正宗, 月桂冠等。

清酒一級: 爛漫, 新政, 越の誉, 賀茂鶴, 花の露, 西海, 美少年, 沢の鶴, 日本盛, 忠勇等。

清酒二級: 玉竜, 男鶴, 雄星, 巴菊, 富士正宗等。

合成酒二級: 力正宗, 三楽, 千石, 利久, 英気, 千代田, 初日, 協和, 松竹梅等。

(ii) アルカリ添加後の着色による方法

佐藤氏の方法に準じたが、著者等が使用した光電比色計は島津製万能螢光々度計であつて、その Cubet の容量が約20ccである事、又試料を中和するに要する NaOH の量は当然異なるので中和後一定量に満たす方が良くと考えられる事等の理由から原報の方法を多少変更した。

即ち、試験酒20ccを採り、N/10 NaOH にて中和する。この際、別に指示薬を用い、中和に要する NaOH の量を予め決定してをき、実際の測定液には指示薬は誤差の原因となる為、添加せぬ様にする。中和後更に N/10 NaOH 4ccを添加し、その後全量を30ccに満たす。次いで沸騰水中に懸垂加熱10分、直ちに冷却し蒸溜水20ccを加えて稀釈、この液を光電光度計にて、フィルター-K 7 (波長430m μ)を用い、蒸溜水の吸光度を0として測定、着色度を吸光度Eにて表示した。

以上の方法により、上記試料87点に就いて測定した結果を Fig. 1 に示す。

即ち、清酒と合成酒の間に明確な相異が認められた。

* 前報の標題「清酒中の有機酸に関する研究」を「清酒中の成分に関する研究」と訂正する。
昭和30年10月大阪醸造学会にて発表