清酒醸造におけるアミノ酸の生成

(第2報) 発酵によるアミノ酸の増減

岩野君夫*・飯塚尚彦・斎藤和夫・布川弥太郎

(国税庁醸造試験所・*東京国税局鑑定官室)

昭和 55 年 10 月 25 日受理

Production of Amino Acids in Sake Moromi-mash. II. Decrease and Increase of Amino Acids by Yeast Fermentation

Kimio IWANO, Naohiko IIZUKA, Kazuo SAITO and Yataro NUNOKAWA
(National Research Institute of Brewing)

Sake moromi-mashes were incubated with various combinations of α -amylase, glucoamylase, acid protease, and carboxypeptidase. In general, both total-N and amino acids were decreased by the yeast fermentation. However, amino acids were liberated from yeast cells, when the amino acid liberation from steamed rice was minor in the absence of acid carboxypeptidase. From the production and consumption patterns of each amino acids in sake moromi-mash, amino acids were classified into 4 groups. Group I was that mainly liberated from steamed rice and consumed by yeast; they were arginine, leucine, lysine, phenylalanine, isoleucine, methionine, and aspartic acid. Group II was cystine which was mainly liberated from yeast. Group III was that liberated from both origins; they were alanine, glycine, and proline. Group IV was that liberated from both origins but consumed by yeast in the case of large liberation from steamed rice; they were glutamic acid, threonine, tyrosine, histidine, valine, and serine.

緒 言

前報¹⁾において蒸米からの米麴酵素作用によるアミノ酸の生成につき検討を加えた。その結果、アミノ酸生成に直接関与する酵素は酸性カルボキシペプチダーゼ (Acpase) であることを確認した。またその生成は0次反応で進み、ある範囲内では酵素量にほぼ比例することが知られた。

清酒もろみにおけるアミノ酸の生成源としては、蒸米のほかに米麴および酵母を考えなければならない。殊に酵母については、その解糖系からのアミノ酸生成、菌体増殖のためのとり込み、また菌体外への放出など種々の作用が考えられ、かなり複雑であることが予想される。

そこで本報では、純粋な α -アミラーゼ (AAase)、グルコアミラーゼ (GAase)、酸性プロテアーゼ (APase)、ACPase の4つの酵素を組合わせて清酒もろみを仕込

み、蒸米溶解系と発酵系におけるアミノ酸生成状況をしらべ、清酒もろみのアミノ酸生成に対し酵母のもつ役割を解析することにした。その結果、清酒もろみ中のアミノ酸生成には、蒸米(および米麴)からの生成、酵母による生成、更には酵母による消費の3つを組合わせて考えた場合、大きく4つのパターンに類別されることが知られた。

実 験 方 法

1. 酵素標品 前報¹⁾と同じものを用いた。
2. 酵素の組合わせ 各種酵素の組合わせは第1表のとおりであった。蒸米の溶解のみの溶解系 (No. 1~4) と、これに酵母を添加発酵させた発酵系 (No. 5~8) の計8組を同時に仕込んだ。
3. 仕込み方法 ビーカーに白米 20g 相当の蒸米をとり、これに酵素溶液 30 ml、仕込加工水²⁾ (KH_2PO_4

第1表 各種酵素の組合せと酵素使用量 (U/g rice)

仕込 No.	AAase	GAase	APase	ACPase
溶解系 1	250	50	0	0
2	250	50	1000	0
3	250	50	0	1000
4	250	50	1000	1000
発酵系 5	250	50	0	0
6	250	50	1000	0
7	250	50	0	1000
8	250	50	1000	1000

3.9 g, NaCl 0.75 g, 乳酸 18 ml/300 ml) 1.5 ml を加えて仕込んだ。溶解系の場合はトルエン 1 ml を浮かせ、発酵系の場合は YM 培地で前培養した協会 701 号酵母サスペンションを 1 ml 加えた。これらはサランラップで密封し、虫ピンで中央にピンホールをあけた。仕込み温度は 15°C とし、所定時間経過ごとにもろみを 2 ml づつ採取し、遠心分離して上液を分析に供した。

4. 分析 エタノールはガスクロマトグラフィーにより行なった。すなわち、試料またはエタノール標準液 (5~25%) 100 μ l に内部標準液 (10% アセトン) 100 μ l および水 10 ml を加えて混合し、その 1.5 μ l を日立 163 型ガスクロマトグラフに注入した。操作条件は次のとおりであった。デテクター：FID, カラム：PEG 1000 15%/ガスポート A (3 mm ϕ $\times$ 2 m), キャリアガス：N₂ (30 ml/min), 注入温度：200°C, カラム温度 100°C, デテクター温度：100°C。

窒素化合物はすべて前報¹⁾の方法で分析した。

実験結果

1. 発酵経過

第1図にエタノールの生成速度を示してあるが、すべての発酵系において順調に発酵は進み、発酵日数 21 日で約 19~20% のエタノールが生成した。また全糖生成から判断して蒸米の溶解も順調に進み、すべての系において差異は認められなかった。

2. 全窒素および全アミノ酸の経時的変化

結果は第2図にまとめてある。蒸米の溶解系における全窒素は、APase の含まれていない ii) でもかなりの量が認められたが、その生成量は AAase と GAase のみの系 i) とほぼ同じであった。これに反し APase が含まれている iii) および iv) では2倍以上の生成があり、蒸米蛋白質の可溶性には APase が大きな役割をしていることが確認された。

蒸米の溶解反応におけるアミノ酸の生成は、ACPase の含まれている ii) と iv) でみられ、アミノ酸の生成には ACPase のみが関与していることが確認された。

発酵系においては蒸米の溶解系にくらべ全窒素は大きく低下し、酵母の菌体増殖のため消費されたものと考え

第1図 発酵経過

—全窒素 ---アミノ態窒素 ●溶解系 ○発酵系

第2図 全窒素およびアミノ態窒素の経時的変化

られる。もろみの後半、すなわち発酵終了後 21 日以降に全窒素の増加が観察されたが、これは死滅酵母からの生成^{3,4)}と考えられる。

発酵系におけるアミノ酸の変化をみると、ACPase が含まれていない i) と iii) でも相当量のアミノ酸が生成された。これらは酵母が生成したものと考えられる。ACPase が含まれている系 (ii, iv) では、蒸米溶解系に比べて約半分ぐらいの値に低下しており、これは酵母による消費と考えて良いであろう。この場合も、もろみ後半、死滅酵母からとみられる増加が認められた。

3. 各アミノ酸生成の経時的変化

アミノ酸の生成経過を、蒸米からの生成、酵母による生成と消費の面から大別すると、次の4つのパターンにまとめることができた。第1のパターンは主として蒸米から ACPase 作用により生成され、酵母による消費の大きいもので、これにはアスパラギン酸、メチオニン、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、リジン、アルギニンが属していた。第3図にはアスパラギン酸の生成パターンを示してある。第2のパターンは、主として酵母が生成するもので、シスチンがこれに属し、その生成パターンは第4図のとおりであった。第3のパターンは、第5図にアラニンの例を示したが、蒸米からの生

第3図 アスパラギン酸の生成経過

第4図 シスチンの生成経過

第5図 アラニンの生成経過

第6図 グルタミン酸の生成経過

成と酵母による生成が共にあるもので、酵母による消費が見られないものである。このグループにはアラニン、グリシン、プロリンが属していた。第4のパターンは、蒸米からの生成と酵母の生成が共にあるが、蒸米からの生成が多い場合は酵母が消費するものである。第6図には一例としてグルタミン酸の場合を示したが、このグループには他にスレオニン、チロシン、ヒスチジン、バリン、セリンが属していた。

4. 蒸米の溶解によるアミノ酸と発酵によるアミノ酸の組成の相違

前述のように発酵が伴った場合は酵母による生成や消費がおこるので、発酵系と蒸米溶解系とはアミノ酸組成にかなりの違いが生ずるものと考えられる。そこで、すべての酵素を含んだ蒸米溶解系（No.4）と発酵系（No.8）の21日目のものにおけるアミノ酸組成を比較してみた。結果は第2表にみるようであった。

これから明らかにように、全体としては蒸米から生成したアミノ酸量は1,523 mg/l に対し、発酵により790 mg/l と約半分も減少することが知られた。発酵により減少したアミノ酸としてはアルギニンが最も減少率が大きかった。その他アスパラギン酸、メチオニン、フェニ

第7表 溶解と発酵のアミノ酸組成の比較（%）

	溶解系	発酵系	発酵による増減
Aspartic acid	3.0	1.9	—
Threonine	7.3	8.4	±
Serine	1.5	1.8	±
Glutamic acid	7.4	10.9	+
Glycine	0.9	3.7	+
Alanine	3.5	11.7	卅
Cystine	0	2.5	+
Valine	5.0	4.8	±
Methionine	3.0	1.1	—
Isoleucine	4.7	2.9	—
Leucine	10.8	6.2	—
Tyrosine	6.7	4.7	—
Phenylalanine	6.7	4.6	—
Lysine	10.6	7.8	—
NH ₃	0.2	0.2	±
Histidine	2.2	2.2	±
Arginine	24.6	11.8	—
Proline	1.6	12.4	卅
Total	100%	100%	
アミノ酸総量 (mg/l)	1523	790	

ルアラニン、イソロイシン、ロイシン、リジン、チロシンがあった。逆に増加したアミノ酸としてはプロリン、アラニンが増加率が極めて大きく、その他グリシン、グルタミン酸、シスチンがあった。スレオニン、ヒスチジン、バリン、セリンは殆んど変化がなかった。

考 察

本報では ACPase による蒸米溶解系と酵母による発酵が伴った場合の発酵系におけるアミノ酸の生成量を比較検討することにより、清酒もろみ中における酵母からのアミノ酸の生成および酵母によるアミノ酸の消費をしらべた。すなわち、あるアミノ酸が、蒸米溶解系よりも発酵系において多く存在すれば、酵母による生成があったと考えられるし、少なければ、酵母によって消費されたと考えられる。

全窒素についてみれば、発酵によりすべての場合減少していることが知られた。全アミノ酸量についてみれば、

ACPase の存在するかないかで事情が変わり、ACPase が存在し蒸米からのアミノ酸生成が多い場合は、酵母により消費され、ACPase がなくアミノ酸生成がない場合は、酵母による生成がみられるようであった。ただし、個々のアミノ酸をみた場合、あるアミノ酸では酵母による生成がみられ、あるアミノ酸では消費がみられ、それも蒸米からの生成がある場合とない場合では逆転することもある、といったようになり複雑であった。

この蒸米からの生成と酵母による生成、消費を組合せて、もろみ中におけるアミノ酸の生成を整理して、4つのグループに大別することができた。第1のグループは、主として蒸米から生成され、酵母による消費が大きいもので、アルギニン、ロイシン、リジン、フェニルアラニン、イソロイシン、メチオニン、アスパラギン酸が属していた。第2は主として酵母から生成されるもので、シスチンがそうであった。第3は蒸米からも酵母からも生成されるもので、アラニン、グリシン、プロリンがそうであった。第4は第3と同じく蒸米からも酵母からも生成されるが、蒸米からの生成が多い場合は酵母が消費するもので、グルタミン酸、スレオニン、チロシン、ヒスチジン、バリン、セリンが属していた。

蒸米溶解系と発酵系の21日目のアミノ酸組成を比較した場合でも、これらの関係は明らかである。ただこの場合、絶対量では減少していても、組成としてみた場合は、グルタミン酸は増加し、スレオニンとヒスチジン、バリン、セリンでは殆んど変化がないということになった。しかしこれらの関係は必ずしも固定的なものでなく、次報でも述べるように、各グループに属するアミノ酸は多少移動する。

結局清酒もろみ終了時に酵母による生成がみられたと考えられるアミノ酸としては、アラニン、プロリン、グリシン、シスチンの4つがあげられにすぎない。これを第7図に示したアミノ酸生成系図⁵⁾について考えると、清酒もろみ中での酵母によるアミノ酸生成系としては、図中太黒矢印で示した系が動いているものと考えられる。しかしただ単なる表面上の収支計算だけでは、細胞レベルでの出し入れの経過は把握することができないわけで、そう簡単に結論づけるわけにはいかないであろう。この点に関しては目下更に詳細な検討を加えつつある。

要 約

純粋な α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロ

第7図 アミノ酸生成系図⁵⁾

テアーゼ、および酸性カルボキシペプチダーゼを種々組合わせて酵素液を作り、これに蒸米を投入しただけの溶解系と、これらを更に発酵させた発酵系のもろみについて、アミノ酸の生成を比較検討した。

全般的にみた場合、発酵により全窒素もアミノ酸も減少し、酵母によるとり込みが起ることが知られた。ただし、酸性カルボキシペプチダーゼが存在せずアミノ酸の生成のない系では、酵母による生成がみられた。

個々のアミノ酸生成状況を観察すると、主として蒸米から生成され、酵母により消費されるグループ（アルギニン、ロイシン、リジン、フェニルアラニン、イソロイシン、メチオニン、アスパラギン酸）、主として酵母により生成されるもの（シスチン）、両者により生成されるもの（アラニン、グリシン、プロリン）、両者により生成されるが、酵母は消費に廻る場合があるもの（グルタミン酸、スレオニン、チロシン、ヒスチジン、バリン、セリン）の4グループに大別された。

文 献

- 1) 布川弥太郎、飯塚尚彦、岩野君夫、斎藤和夫：醸協、
- 2) 岩野君夫、布川弥太郎：醸協、72, 78 (1977)
- 3) 田村学造、角田俊直、桐村二郎、宮沢 滋：農化、26, 480 (1952)
- 4) 山本 謙、新田啓一：醸協、58, 1067 (1963)
- 5) 橋谷義孝編：酵母学、p. 384, 岩波書店 (1967)