清酒の蛋白混濁に関する研究 (第 1 報)*

酵素による清酒の蛋白混濁の沈停について

山田正一, 秋山裕一, 清水 敦, 藤井竜二, 原田雅之 (国税庁醸造試験所)

昭和 31 年 8 月 6 日 受理

緒 言

火入れした清酒が貯蔵され秋となると薄く曇りの来る現象は以前から時々見られたものであるが、近年清酒もろみに多量の酒精を添加し、清酒の増産が計られるようになってからこの現象は俄かに増加し、庫内は勿論、壺詰出荷後の清酒にもしばしば見られ、酒造家を困らせる事となった。穀類醸造製品の混濁については麦酒⁽¹⁾及び味淋⁽²⁾でかなりの研究がなされており、ビールでは色々の説があるが、大麦蛋白質 (β -グロブリン等) の分解物とタンニンとの complex と云われ、味淋ではオリゼニンの分解物であると報告されているが、いずれも十分解明されたわけではない。清酒の混濁物質については最近市川、井上等⁽³⁾により糖類を含んだ蛋白質で米蛋白からのみでなく酵母や麹菌々体成分も関係している事が明かにされた。この清酒の混濁は細微⁽³⁾の為に濾過によっては清澄困難で従来の滓下げ剤による混濁物質の吸着濾過法によると滓が多過ぎる場合や除去困難の場合もある。昭和 28 年井上等⁽⁴⁾は細菌蛋白分解酵素製剤スピターゼ F (秋晴という) を混濁清酒に使用すると石当り 20~200 g の添加で 2~4 日間に混濁物質を凝集沈下させ、清澄清酒を得る事を見出した。この発見はビールでも未だ認められていない事で、混濁物質の検討に大きな手がかりとなるものである。

筆者等はこの酵素による混濁物質の凝集作用を利用し清酒の混濁物質を究明せんとし、これを追試するに清酒の性質によりその効果がまちまちで不結果に終る事もあった。当醸造試験所に約 50 年前、安藤福三郎技師が麴菌から製したジアスターゼ粉末があり、たまたま筆者の一人山田がこれを使用するとこの種の蛋白混濁のいずれもが沈下するのを認め、然もこの量は 1 石当り 0.9~2.7 g の少量で有効であったので、麹菌並に各種の糸状菌或は酵素製剤にも必ずその作用があろうと考え比較検討した所、所謂蛋白分解酵素には大体この作用があり、中でもジアスターゼが著効あったので多くの麹菌より優良菌の選択を行い、培養条件及び清酒の蛋白混濁を凝集沈停せしめる酵素について二、三の検討を行ったのでここに報告する。

本研究に於ける混濁清酒中の混濁物質の酵素による凝集沈降の現象は井上等による新発見であるが、筆者等はこのような混濁物質の凝集沈降現象に対して「沈停」なる言葉を用い、これに関与する麹菌の生産する酵素を一応「沈停酵素」と仮称する事にして本文中に用いた。

実 験 の 部

1. 各種酵素剤の清酒の蛋白混濁沈停力の比較

酵素液調製 各種酵素製剤或は常法により造った麴菌の 50 倍水抽出液を酵素液とする。

沈停力試験法 蛋白混濁清酒 (当所醸造清酒) 100 cc を 200 cc 容壺に入れ、これに酵素液 0.1, 0.25 及び 0.5 cc を加える。この酵素量は清酒に対し 0.002, 0.005 及び 0.01% に当り、清酒 1 石当りに換算すると 3.6, 9 及び 18 g となる。混和後室温に放置して毎日観察すると、混濁は一見溶解する事なしに一種の凝集をおこして器底に沈停し上澄は非常に澄明な「さえ」のよい清酒となる。この沈停に要する時間は早い場合は翌日、遅い場合は 10~20 日間を要した。これ等の効力を約 20 種の清酒について試験した結果を一括すると第 1 表の通りである。

細菌蛋白分解酵素剤スピターゼ F は結晶も沈停作用をなすが、粗抽出液は有効な場合は相当強力である。ジアスターゼ粉末は更に強力で、麹菌の中にもスピターゼ F に匹敵するもののある事が知られ、麹菌が清酒の蛋白混濁沈停剤として有効なる事がわかった。

尚この蛋白混濁沈停作用は黒麹プロテアーゼ、ペプシンも相当強く、トリプシン、マルツジアスターゼ、青黴麴、麴自体に多少の効力が見られ、パパイン、フィシンには沈停作用が見られなかった。これらの酵素は加熱

* Studies on "Protein Turbidity" in Saké. Part I. On the Flocculation of Protein Turbidity by Enzymes.

By Masakazu YAMADA, Hiroichi AKIYAMA, Atsushi SHIMIZU, Ryuji FUJII and Masayuki HARADA (Brewing Experimental Station, Tax Administration Agency)

第 1 表 各種酵素剤及び麴麴の沈停力の比較

	酵素量 (g/石)	備 考
麴ジスターゼ粉末*	0.9~9.0	試験清酒に対しすべて有効
三共タカジスターゼ	10~20	"
スピターゼ F	6.3~25.2	沈停しない場合も見られた
麴 麴	18~36	試験清酒に対しすべて有効
黒麴プロテアーゼ粉末	5	"
ベ プ シ ン	5	"
ト リ プ シ ン	5~10	沈停しない場合もある
パ パ イ ン	5~10	沈停作用ない

* 安藤技師の製したもの。

第 2 表 菌 株 の 選 択

沈停力	菌 株 (種類及び菌株数)	摘 要
A 群	黄麴菌 9	清酒 1 石当り酵素液 1 合 12 日間に沈停
B "	" 30 青黴 2	" 2.5 合 "
C "	" 14 " 2	" 5 合 "
D "	" 4 " 3	" 5 合沈停しない
	リゾプス 1, モナスクス 1, アブシジア 1	

すると第 2 表の如く, A 群は麴菌のみで *Asp. oryzae* G, I, K, KB, S 4-14, S 4-15, S 4-18, *Shikenjo* No. 68 及び 70 である。青黴は B 群以下で, 他の菌類には作用を認めなかった。

3. 培養条件の検討及びアミラーゼ, プロテアーゼとの関連性

培養条件によって微生物の生育及び酵素の生産が非常に相違する事はよく知られている。清酒の蛋白混濁の沈停作用をする麴菌酵素は今後の研究にまつ次第であるが, 各種プロテアーゼにその作用がある事は前記した如くである。黴のプロテアーゼの生産に適する培地は米<糠<大豆粕=麴の順序であるとの報告⁽⁶⁾があるので, 前記麴菌 9 株について, 次の 4 種の培地について沈停力と共にアミラーゼ及びプロテアーゼ力を測定し, 培養条件及び最良の菌株を選択すると共に沈停作用と両酵素との関連性を検討した。

a. 培地の調整: (1) 麴, (2) 麴+赤糠等量混合物, (3) 麴+脱脂大豆粕等量混合物, (4) 白米(2割精白)。

(1)~(3) は前記同様, (4) は製麴後乾燥粉末として 0.5 g を 1% NaCl 液 10 cc で浸出し之を用いた。

b. アミラーゼの測定: 岡崎の方法⁽⁶⁾に準じ, 30°, 30 分後の生成糖量を Lehmann-Schoorl 法により N/10 Na₂S₂O₃ の滴定量にて示した。

c. プロテアーゼの測定: 麴菌麴麴のプロテアーゼは主として最適 pH 8~9 であるが⁽⁷⁾, 清酒の pH が 4.2 附近で後述する如く沈停作用は pH 4.2~5.0 附近が最適である故に pH 4.5 にて酵素作用を行った。

第 3 表 各種麴による沈停力とアミラーゼ及びプロテアーゼとの関係

菌 株	数				数+米糠等量混合				数+大豆粕等量混合				米				
	沈停 日数	酵素量 cc	アミラ ーゼ	プロテ アーゼ	沈停 日数	酵素量 cc	アミラ ーゼ	プロテ アーゼ	沈停 日数	酵素量 cc	アミラ ーゼ	プロテ アーゼ	沈停 日数	酵素量 cc	アミラ ーゼ	プロテ アーゼ	
<i>Asp. oryzae</i>																	
G	10	0.1	1.90	0.45	10	0.1	2.75	0.45	9	0.1	1.75	0.40	—*	0.5	3.65	0.05	
I	10	0.1	1.80	0.40	9	0.1	2.95	0.50	9	0.1	1.90	0.40	—	0.5	4.50	0.05	
K	9	0.25	0.90	0.30	9	0.1	2.10	0.50	8	0.25	0.90	0.15	—	0.5	0.90	0.00	
KB	8	0.1	2.40	0.55	9	0.1	3.15	0.50	10	0.1	1.85	0.40	—	0.5	5.60	0.15	
S 4-14	9	0.25	5.80	0.35	9	0.25	6.55	0.25	10	0.1	4.45	0.45	—	0.5	9.50	0.10	
S 4-15	6	0.5	2.95	0.30	10	0.5	2.05	0.10	7	0.5	2.05	0.10	—	0.5	8.65	0.10	
S 4-18	9	0.25	6.10	0.35	8	0.5	3.70	0.15	7	0.5	3.00	0.30	—	0.5	8.85	0.00	
Shikenjo	68	9	0.5	3.05	0.25	10	0.5	2.05	0.10	8	0.25	2.25	0.30	—	0.5	7.90	0.05
"	70	10	0.5	2.55	0.15	10	0.5	2.95	0.20	9	0.5	2.00	0.15	—	0.5	7.45	0.10

* (—): 12 日以内で沈停せず

第 4 表 沈停力とアミラーゼ力及びプロテアーゼ力との関係

酵 素 量		沈停力	アミラーゼ		プロテアーゼ	
cc/100cc	合/石		N/10 Na ₂ S ₂ O ₃ cc	N/10 NaOH cc		
0.1	1	A	1.75~2.95	0.55~0.4		
0.25	2.5	B	0.90~6.55	0.35~0.15		
0.5	5	C	2.00~3.70	0.30~0.10		
0.5	5	D	3.65~9.50	0.15~0.00		

沈停力の群別は第 2 表による。

後添加すれば凝集沈停作用を全く示さない事等から, この混濁物質の凝集沈停作用は酵素作用によるものと考えられる。

2. 蛋白混濁沈停力の強力な菌株の選択

培養法: 常法により麴麴を造り, 前記通り沈停力を比較した。

使用菌株: *Aspergillus* 属 56 株, *Penicillium* 7 株, *Rhizopus*, *Monascus*, *Ab-sidia* 各 1 株, 計 66 株。

結果: 各菌株の沈停力を比較するに酵素液 0.1 cc で 12 日間以内に沈停したものを A 群, 0.1 cc では 12 日間に沈停せず 0.25 cc では沈停したもの B 群, 0.5 cc を C 群, 0.5 cc でも沈停しないものを D 群と

4% ゼラチン液 (pH 4.5 に N/10 HCl にて調整) 10 cc, Mc Ilvaine buffer (pH 4.5) 5 cc, 蒸留水 3 cc, 酵素液 2 cc を加え, 37°, 20 時間後その 10 cc をフォルモール法により N/10 NaOH 滴定値にて表示した。

結果は第 3 表の如く各菌株の沈停力及びプロテアーゼ力価は米を除いた他の培地については大差なく、菌株による相違が明かに見られた。米麴はアミラーゼは相当強いがプロテアーゼは弱く沈停力は殆んど認められなかった(米麴は同じ菌株の穀麴より 50 倍以上弱い)。上記 9 株の培養結果より *Asp. oryzae* KB が最も良い結果を示した。

沈停力とアミラーゼ及びプロテアーゼ力との関連性について第 3 表の結果を酵素量と沈停日数とから前項の如く 4 群に分けると第 4 表の如くプロテアーゼ力価の大なるもの程早く沈停し、アミラーゼ力価には全く関連性がない。以上の諸事実より清酒の蛋白混濁沈停作用には所謂蛋白分解酵素に属する酵素が関与する事は明かである。

ここに選出した優良菌株による酵素製剤を“クラリン S”と称して広く清酒の蛋白混濁酒の清澄剤として使用し(清酒 1 石当り約 5 g) 成果を挙げつつある。

4. 麹ジラスターゼ中の沈停作用の検討

前記安藤技師が製造した麹ジラスターゼ粉末(TD と略す)について沈停作用の最適 pH 及び温度、並びに安定性、酵素量と沈停日数との関係を検討した。

A. 酵素量と沈停日数との関係 0.25% TD 溶液を混濁清酒 10 cc に 0.05 cc より 0.05 cc 間隔に 1.00 cc 迄加え、沈停日数を調べた。第 1 図に示す如く沈停日数(T)の逆数をグラフ上に求めると T' 線の如くはほぼ直線となる。これより酵素量(X)と沈停日数(T)の間には $X \cdot T = k$ の関係が見出され、 k は酒により及び酵素力の強弱によって定まる恒数である。従って使用試験酒を同一とし、酵素量を一定とすれば酵素力は $1/T = T'$ で表示し得る。

第 1 図 酵素量と沈停速度との関係

B. 最適 pH 混濁清酒を N/10 HCl 及び NaOH にて各 pH に調整しておき、この 10 cc に対し 0.25% TD 液 0.1 cc を加え(4.5 g/石)、30° に保ち沈停日数を観察した。第 5 表 I の如く原酒 pH 4.4 から 5.2 が最適で pH 4 以下或は 7 以上になると 10 日以上を要し、pH 7 以上にすると酵素を加えなくても自然沈降する。

C. 最適温度 第 5 表 II の如く各種温度に保ち実験すると 30° が最適で、50° では失活し、20° 以下になると沈停迄にやや長時間を要する。

D. pH-安定性 0.25% TD 液に Mc Ilvain buffer を等量加え、40° 1 時間処理、これを 10 cc 清酒に対し 0.2 cc 加え 30° に保つ。第 5 表 III の如く pH 5~7 の間は安定で pH 3 以下に

第 5 表 ジラスターゼ(安藤)中の沈停酵素の検討

I. 最適 pH			II. 最適温度			III. pH 安定性			IV. 温度に対する安定性		
pH	沈停 日数	酵素力 T'	温度	沈停 日数	酵素力 T'	pH	沈停 日数	酵素力 T'	温度	沈停 日数	酵素力 T'
3.3	—	<1	5	7 ² / ₃	1.3	1.3	—	<1	25	2 ² / ₃	3.7
4.1	2 ² / ₃	3.7	10	6	1.7	2.2	—	<1	30	2 ² / ₃	3.7
5.2	1 ² / ₃	6	20	3 ² / ₃	2.7	3.3	—	<1	40	2 ² / ₃	3.7
5.8	2	5	30	2	5.0	4.3	4	2.5	50	4 ² / ₃	2.1
7.4	—	<1	40	2 ² / ₃	3.7	5.0	2 ² / ₃	3.7	60	—	<1
対称 4.4	1 ² / ₃	6	50	—	<1	6.0	2 ² / ₃	3.7	70	—	<1
			60	—	<1	7.0	2 ² / ₃	3.7			
						7.7	3 ² / ₃	2.7			
						8.8	6	1.7			

試料を N/10 HCl 或は NaOH で各 pH に規制

なると失活するが、pH 8~9 では作用を残しているの、この TD の場合は中性或はアルカリ性プロテアーゼが、沈停に関与していると考えられる。

E. 温度に対する安定性 pH 5.0 TD 溶液を各温度で 15 分処理後 30° にて沈停作用を検討した。第 5 表 IV の如く、15 分間では 40° 迄は安定で、50° では半分を、60° では殆んど失活する。本酵素を火入れ中或はその前に投入して、火入れにより生成する清酒の混濁を凝集除去する事は現状の火入れ様式では出来ないが、急速に 40° 以下にすれば可能と考えられる。

5. 表面培養による蛋白混濁沈停酵素の生成について

表面培養法によれば本酵素の精製が容易ならんと考え *Asp. oryzae* KB を用い培養条件を検討した。

表面培養によるプロテアーゼの生産については Crewther 等⁽⁸⁾の無機塩による他には大島⁽⁹⁾によってペプトン或は蛋白態窒素が有効であると言う報告があるのみである。そこで C, N 源, pH 等を検討し, 表面培養でも強力な沈停作用を有する酵素が生産され, N 源及び pH によりその生産が非常に異なる事及びここに生産される酵素は麩細からの酵素と性質を異にする事が知られた。

培養法: フェルンバッハフラスコ (底径 15 cm) に 70 cc 培養液を入れ 30°, 5 日間培養する。

予備実験: Pfeffer, Henneberg, Hayduck, Raulin 等の各種培地を比較すると, N 源としてペプトンのみが有効で, アスパラギンや無機 N では全く作用がなかったので Henneberg 黴用培地を用い, ペプトン及び糖量を検討した。ペプトンは 0.25~2%, 蔗糖は 2.5~15% の間差が見られないので, ペプトンは 0.5%, 蔗糖は 5% とし培養日数を検討すると 3~5 日培養が良好だったので 5 日培養とした。即ち基本培地は蔗糖 5%, ペプトン 0.5%, KH_2PO_4 0.5%, MgSO_4 0.25% で CaCO_3 は添加しない。

第 6 表 培地の炭素源の比較

炭 素 源	濃度 %	最終 pH	沈停力日数
馬 鈴 薯 澱 粉	5	3.8	5
可 溶 性 澱 粉	5	3.5	6
蔗 糖	5	3.5	4
葡 萄 糖	5	3.5	5
麦 芽 糖	5	3.5	6
ガラクトース	5	3.5	7
乳 糖	5	6.0	11

(A) C 源の検討: 馬鈴薯澱粉, 可溶性澱粉, 蔗糖, 葡萄糖, 麦芽糖, ガラクトース及び乳糖について比較したが第 6 表の如く蔗糖及び葡萄糖がよく, 乳糖のみが pH 6 と高く沈停力も弱かった。

(B) N 源の検討: 第 7 表の如く各種の蛋白態 N, アミノ酸及び無機 N をペプトン 0.5% の N 量にほぼ等しくなるよう加え, アミノ酸は 10 cc 培地に 76×

第 7 表 窒 素 源 の 影 響

N 源	濃度 %	生育状態	最終 pH	沈停力日数	プロテアーゼ力価	アミノ酸	最終 pH	沈停力日数	プロテアーゼ力価
無機窒素									
NaNO_3	1.0	卅	5.4	—	0.1	グリシン	5.0	—	0.05
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0	卅	1	—	0.0	L-アラニン	4.5	—	0.15
$(\text{NH}_4)\text{NO}_3$	0.5	卅	1	—	0.0	L-ゼリン	3.8	—	0.00
NH_4Cl	1.0	+	1	—	0.0	DL-バリン	3.6	18	0.10
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1.0	卅	1	—	0.0	L-ロイシン	4.0	7	0.25
$(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$	1.0	+	1	—	0.0	イソロイシン	4.0	8	0.20
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	1.0	卅	4.0	—	0.0	スレオニン	3.6	9	0.20
NH_4 -tartrate	1.0	卅	6.0	—	0.2	L-アスパラギン酸	4.0	—	0.10
NH_4 -acetate	1.0	卅	3.8	—	0.0	L-グルタミン酸	4.4	—	0.15
NH_4 -oxalate	1.0	卅	4.0	—	0.0	グルタミン酸 Na 塩	5.0	—	0.20
urea	0.5	卅	3.6	—	0.0	L-フェニルアラニン	3.6	6	0.25
蛋白態窒素						L-チロシン	3.8	11	0.10
大豆粕	1	卅	3.8	5	0.7	L-プロリン	4.0	—	0.20
玉蜀黍胚芽	1	卅	3.0	5	0.45	ヒドロキシ-L-プロリン	4.0	—	0.05
敷	3	卅	3.4	5	0.6	DL-トリプトファン	4.0	13	0.10
egg albumin	0.5	卅	4.8	9	0.4	L-ヒスチジン HCl H_2O	1.8	—	0.15
casein	0.5	卅	4.8	10	0.4	L-アルギニン HCl	2.4	18	0.10
gelatin	0.5	卅	3.6	6	0.3	L-ロイシン HCl	2.2	—	0.00
peptone	0.5	卅	3.4	3	0.55	L-シスチン HCl	2.0	—	0.00
						DL-メチオニン	3.0	7	0.15
						ペプトン	3.4	2	0.65
						アミノ酸混合物*	4.0	6	0.15

* ロイシンを主体とした中性アミノ酸混合物, 商品名 lencinine

10^{-6} M 添加した。

第 8 表 培地の pH の影響

I. 炭酸石灰の添加			II. 各種磷酸塩の影響		
CaCO_3 %	最終 pH	沈停力日数	磷酸塩種類	最終 pH	沈停力日数
0	3.6	5	KH_2PO_4	3.4	5
0.1	4.4	6	NaH_2PO_4	3.8	5
0.2	4.6	10	Na_2HPO_4	5.3	13
0.5	4.8	11	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1.0	—
1.0	5.0	12	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	2.4	5

磷酸塩濃度 M/25

蛋白態 N は早遅の差はあるがいずれも有効で, その中ペプトンが最も良い。無機 N はすべて無効で, アミノ酸中には有効なものとは無効のものがあつた。有効アミノ酸は中性附近に等電点をもつロイシン, イソロイシン, メチオニン, フェニルアラニン,

第 2 図 表面培養により生産されるプロテアーゼの pH 曲線

第 3 図 酸及びアルカリ処理による pH activity の変化

表面培養法による耐酸性プロテアーゼの生産がアミノ酸によって異なる事は、各アミノ酸により生成される酵素についての詳細な検討は行っていないが、酵素の生成機構に関連して興味深い問題であろう。

結 語

1. 清酒の蛋白混濁凝集沈停作用は各種の蛋白分解酵素に見られ、黄麹菌も強力に之を生産する。
2. 糸状菌中より蛋白混濁沈停力の優良なものを選択し、黄麹菌が最も強力で、その麴麴からの酵素剤は少量にて沈停作用強く実地に応用して成果を挙げている。
3. 蛋白混濁沈停作用とプロテアーゼ及びアミラーゼとの関連性及び麴麴ジアスターゼ(安藤)について本作用を検討し、この酵素剤による混濁物質の凝集反応は中性乃至アルカリ性プロテアーゼによりおこると考えられる。
4. *Asp. oryzae* KB の表面培養による沈停作用を有する酵素の生成条件を検討した。本酵素の生成には N 源が最も関係し、有機 N の中蛋白態はすべて有効、アミノ酸ではロイシン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、スレオニン、アルギニン及びバリンが有効で他のグリシン、アラニン、グルタミン酸等のアミノ酸は効果がなかった。
5. 培養液 pH は 3~5 の間が良く、 CaCO_3 や塩基性塩の添加は本酵素の生成を阻害する。
6. ペプトン培地より得られた沈停作用を有する酵素は pH 4 附近に作用極大を持つ耐酸性プロテアーゼの一種で、黄麹菌でも培養条件により酸性プロテアーゼが生産される。

本研究に使用した菌株の大部分は東大坂口研究室より分譲していただいたもので、結晶細菌プロテアーゼ及び黒麹菌プロテアーゼは長瀬産業株式会社及び野田産研吉田氏よりいただいたものでここに深謝いたします。

トリプトファンで、少しく効力がおちるがチロシン、スレオニン、アルギニン及びバリンで、その他グリシン、アラニン、グルタミン酸等 11 種のアミノ酸では効力を示さなかった。この場合沈停力はプロテアーゼ力価にほぼ比例し、培養後の培地の pH は大体 3.5~4.0 の間で各アミノ酸の間には差がない。

(C) 沈停酵素の生成と pH との関係 : 上記の如く本酵素の生成最適 pH は 3~5 の如くであるので、基本培地に CaCO_3 を種々加えて培養した所第 8 表の如く CaCO_3 の添加量が増加し、pH が上昇するにつれて酵素力価は低下した。又種々の磷酸塩を加えた場合にも同様に塩基性塩では力価が減じている。このように表面培養で生産される混濁沈停力を有する酵素は相当の酸性で生成されるものである。

(D) 表面培養法により生産される沈停酵素の検討 : ペプトンを N 源とした時の培養液についてゼラチンの分解 pH 曲線を検討し、第 2 図に示したが pH 9 に小さな作用極大があるが、pH 4~4.5 に opt. pH を有し、吉田の方法⁽⁷⁾による消去法を行うと作用曲線は第 3 図の如くなるが沈停力は pH 9 で消失し、pH 3 には原液と変化ない。このように表面培養法により得られた清酒の蛋白混濁沈停作用を有する酵素は pH 4 附近に作用極大をもつ耐酸性のプロテアーゼという事が出来、黄麹菌でも培養条件により耐酸性のプロテアーゼを生産する事が知られる。

考 察

清酒の蛋白混濁沈停現象は本文中に示した如く各種の蛋白分解酵素剤によりおこり、麹菌で中性~アルカリ性プロテアーゼでも酸性プロテアーゼでもよく、これを一括して沈停酵素と云うのは当を得ないが、牛乳の凝集作用にレンニンが最も強力である如く、蛋白混濁沈停作用にも最も適する酵素があるとも考えられ、この酵素及びその作用機作についての検討は続報する。

- (1) E. C. Barton-Wright : *Wallerstein Lab. Comm.*, 19, 127 (1956).
- (2) 杉山晋朔 : 醸試報, 130, 87 (1941).
- (3) 市川邦介, 井上幸男, 川崎 恒 : 醸協, 50, 292 (1955).
- (4) 井上幸男, 川崎 恒 : 醸協, 48, 431 (1953).
- (5) 大島幸吉 : 醸学, 1, 539 (大 13).
- (6) 岡崎 浩 : 本誌, 24, 88 (1950).
- (7) 吉田文彦 : 本誌, 28, 66 (1954).
- (8) Crewther et al. : *Australian J. Sci. Research*, 5, 42 (1952); 6, 410 (1953).
- (9) 大島幸吉 : *J. Coll. Agr. Hokkaido Univ.*, 19, 174 (1928).

植物種子中の高級脂肪酸脱水素酵素 (第 4 報)*

脱水素位置についての検討

福場博保, 山沢伸江, 光沢徳子 (お茶の水女子大学栄養化学教室)

昭和 31 年 7 月 30 日 受 理

既に第 1 報乃至第 3 報⁽¹⁾にて成熟中及び発芽時の大豆中にはミリスチン酸以上の高級飽和脂肪酸, オレイン酸, リノール酸等の不飽和脂肪酸及びオキシン高級脂肪酸に働く脱水素酵素の存在すること, 又更に本酵素が助酵素として DPN 又は TPN をとり diaphorase 系を通してメチレンブルー等を還元することを明かにした。

高級脂肪酸脱水素酵素による脱水素生成物については既に Lang⁽²⁾ はステアリン酸を基質として用い, 鼠肝臓より抽出した酵素及び助酵素としてアデニール酸を添加し, 脱水素作用を行なわせ, 脱水素生成物を抽出, オゾン酸化した後 2, 4-dinitrophenylhydrazine を加えて hydrazone を分離し, このものがアゼライン酸セミアルデハイト誘導体であることを確め, ステアリン酸より脱水素酵素の作用によって生じた不飽和化合物はオレイン酸である事を証明した。又 Schoenheimer 等はパルミチン酸よりはパルミトオレイン酸 ($C^{18:10}$ hexadecenoic acid) が生成される事を同様鼠臓器より抽出した酵素を用いて実験した。

我々は植物種子中に含まれている高級脂肪酸脱水素酵素によっても, 動物臓器の場合と同様の位置で脱水素反応が起るかどうかについて, シリカゲルを用いるクロマトグラフィーによって検討を行ったので報告する。

実 験 の 部

1. シリカゲルの調製 市販シリカゲルを用いた場合には結果が異なるので水ガラスより調製した。水ガラスを少量のメチルオレンジを含む蒸留水 (3 倍量) で稀め, 激しく攪拌しながら 10 N HCl を滴下する。始め沈澱を生ずるが次に粥状になり, 更に滴下を続けると液状になる。液がチモールブルーに対して酸性になった後滴下を止め, 2~3 時間ゆるく攪拌を続ける。次にゲル状沈澱物を吸引濾別し, 蒸留水で繰返して洗滌する。このものを N/5 HCl に懸濁させ, 室温で 2 日間放置してエージングする。最後に吸引濾過して沈澱物を集め, 洗滌液がメチルオレンジの色を失うまで繰返して洗滌した後 110° で乾燥し, デシケーター中に保存する。

2. クロマトグラフィー用溶媒 本実験にて二塩基性酸のクロマトグラフィーは Begemann⁽³⁾ の方法によって行った。本操作に用いる水層及びベンゾール層はエタノール 3, メタノール 4, 水 3, の混合液をベンゾール 10 と一緒によく振り, 1 日放置して得られる二層を分離して使用した。

3. 反応液より二塩基性酸の分離 前報と同様市販大豆を材料とし 20° にて 20 時間発芽させたものを乳鉢中で十分すりつぶした後 Sørensen の M/15 磷酸緩衝液 (pH 8.0) を豆の 2 倍重量加え, 海砂を用いてよく磨砕, 酵素を抽出する。磨砕物を先ずガーゼを用いて固形物を除き, 遠心分離して得られる上澄液を酵素液とする。なお本酵素液を用いパルミチン酸を基質とした時の脱色時間は第 1 表に示す通りである。1 l 容のナス型フラスコにゴム栓を施し, これにコックをつけて容器とし, この中に基質として各種脂肪酸のナトリウム塩溶液 (M/100) 500 ml, 水素受容体としてメチレンブルー (M/100) 50 ml, 酵素液 100 ml 及び磷酸緩衝液 200 ml を容れ, 真空ポンプを用いて排気し, 35° に約 40 時間放置し脱水素反応を営ませる。尚この間数回コックを開き内容物を

* Higher Fatty Acids Dehydrogenase in Plant Seeds. Part IV. Researches on the Dehydrogenated Position in Fatty Acids Molecule.

By Hiroyasu FUKUBA, Nobue YAMAZAWA and Tokuko MITSUZAWA (Lab. of Nutrition Chemistry, Ochanomizu University)