[農化 第 35 卷, 第 11 号, p.1009~1013, 1961]

醸造用大麦の蛋白質に関する研究 (第 1 報)*

二条大麦中の蛋白の形態

片岡 純一郎 (麒麟麦酒株式会社研究所)

昭和 36 年 2 月 15 日 受理

緒 言

麦酒の品質を左右する種々の物理化学的性質, 例えば濁濁の生成, 泡立, 泡持といったものに麦酒中の蛋白質及びその崩壊生成物が関与していることは古くから知られている。これら麦酒中の N 化合物は, 勿論途中の工程での影響も受けるが, 本質的には原料大麦中の蛋白質を始めとする N 化合物に由来するものである。従って大麦蛋白と麦芽乃至は麦酒蛋白との関聯を明らかにするため数多くの研究がなされてきたが, なお未解決の問題が多残されているのが現状である。

大麦蛋白を始めて系統的に研究したのは Osborne⁽¹⁾ であり, 各種の溶剤に対する溶解性の差から所謂アルブミン, グロブリン, ホルデイン, グルテリンの概念を確立した。その後 Bishop^(2~4) は大麦及び麦芽中のこれら蛋白質の定量的抽出法を研究, 品種による差, 更に製麦工程中の変化を定量的に観察した。これとは別に Schjerning⁽⁵⁾, Myrbäck⁽⁶⁾ は種々の重金属塩を使って, また Lundin, Schröderheim^(7,8) はタンニン酸及び隣モリブデン酸を使ってそれぞれ大麦及び麦芽中の可溶性蛋白を分別沈澱する方法を提案した。Schjerning 等によって提案された重金属塩による複雑な沈澱法で分けられた蛋白質の分割区分は一義的に定義される蛋白質区分ではなく, 殊に十分な信頼性を以て再現されないのが今日では殆んど用いられていない⁽⁹⁾。僅かに Lundin によって提案された方法が Lundin fraction という名称で, 分析的な目的に使用されているにすぎない。結局一般には Osborne の分割方法が採用され, 今日に至っている。

一方, 本邦産大麦の蛋白質に関しては古くは中村⁽¹⁰⁾により品種間の差異, 高橋^(11,12)により発芽過程での変化が観察されたが, その後余り多くの研究はなされていない。これら欧米或いは本邦での研究の大部分は大麦ないしは麦芽の粒全体を使用してなされたものである。大麦粒には穀皮と胚乳との間に形態的に区別しうるいくつかの層 (Pericarp, Testa, Perisperm, Aleurone 層) が存在するが, これらを一括して便宜上外層と呼ぶことにする。大麦粒の部位による蛋白構成の差異に関しては Rose⁽¹³⁾ がワイヤー・ブラシ・ミルを使用して大麦及び麦芽の穀皮, 胚, 胚乳を分離し, それぞれの部位での蛋白分布の比較を行っているが, 穀皮, 胚乳間の外層と胚乳とは完全には分離されていない。また Danielsson⁽¹⁴⁾ はカミソリの刃を使用して大麦から胚を切り取り, 胚と胚以外の部位でのグロブリン構成を超遠心像から比較している。いずれにせよ, その生理機能からいって穀皮, 外層, 胚, 胚乳での蛋白構成に差のあることは充分想像しうるどころであり, また蛋白調製の際の妨害物質であるポリフェノール類を多量に含む穀皮部分をできるだけ除去することは望ましい。

そこで著者は精米用搗精機を使用し, 精白度から大麦穀粒をいくつかの区分に分けた。これらの区分中で蛋白形態に関する差の最も著しいと推定される N 含量最大の糠区分と精白区分とを選び, Bishop^(2~4) の大麦中の蛋白形態測定法に若干の修正ないしは補足を加えてこれら 2 区分における各種蛋白の分布を観察した。さらに塩類溶液可溶蛋白調製の際の分離手段の影響を見るため, 抽出ないしは透析過程での蛋白の分離状況を濾過, 遠心分離等から観察した。同時にまた, 脱塩水透析によって分割された可溶部及び沈澱部の熱凝固性を検討し, 大麦の場合にはいわゆるアルブミン, グロブリンに対する純水溶液中での溶解性からの定義と熱凝固性からの定義が全く両立し得ないこと, 並びに熱凝固性から分けた 2 区分が低温透析中に変動することがあることを知った。

実 験 方 法

(1) 大麦試料の調製 大麦を精米用搗精機により精白, 精白過程で生じた糠をその精白度からいくつかの区分に分け, 最後に殆んど胚乳部のみからなる精白大麦を得た。Union⁽¹⁵⁾ によれば蛋白抽出を完全に行うために

* Studies of Barley Proteins. Part I. Distribution and Some Properties of Proteins in the Grain of the Two-rowed Barley.

By Jun' ichiro KATAOKA (The Research Laboratories of Kirin Brewery Co., Ltd.)

第1表 精白各区分の全-N含量

精白度	N% (乾物中)	外観
0~90%の間の糠	0.77	ほとんど穀皮
90~83% "	1.73	穀皮及び外層
83~76% "	2.43	外層、胚に最も富む
76~66% "	2.13	外層及び胚乳部
66%の精白大麦	1.14	ほとんど胚乳部
原大麦*	1.39	—

* 34年産二条大麦を34年9月精白

冷 5% NaCl 抽出： 試料 10 g を冷 5% NaCl 50 ml で 6 回、冷脱塩水 50 ml で 1 回それぞれ 15 分ずつ低温で攪拌抽出し、これらの抽出液を合して 5% NaCl 可溶Nとした。さらに再度冷脱塩水 50 ml で抽出洗滌してから次の溶剤による抽出に移った。

冷 70% アルコール抽出： 5% NaCl 抽出残渣を冷 70 容量%のエタノール或いはメタノール 50 ml で 6 回それぞれ 30 分ずつ低温で攪拌抽出した。引続き熱アルコールで抽出する場合はそのまま、稀アルカリで抽出する場合にはアルコールを除くため冷脱塩水 50 ml で 3 回抽出洗滌を行った。

冷 N/10 CH₃COOH 抽出： 5% NaCl 抽出残渣を冷 N/10 CH₃COOH 50 ml で 6 回それぞれ 15 分ずつ低温で攪拌抽出した。次いで冷脱塩水 50 ml で 3 回抽出洗滌を行ってから次の抽出に移った。

熱 70% アルコール抽出： 冷アルコールないしは冷稀 CH₃COOH 抽出残渣を 70 容量%のエタノール或いはメタノール 50 ml で 6 回それぞれ 30 分ずつ還流冷却器を附して（5 分間隔で激しく振盪）抽出した。抽出温度はエタノールの場合は 70°、メタノールの場合は 60°。冷脱塩水 50 ml で 3 回抽出洗滌してから次の稀アルカリ抽出に移った。

0.2% NaOH 抽出： アルコール抽出残渣を 0.2% NaOH 80 ml で 7 回夫々 20 分宛室温(20°)で攪拌抽出した。

なお、冷抽出の抽出剤の温度は 2°、低温室の温度は 0~2° であった。抽出液の分離は普通の遠心分離機を使用し、抽出剤が NaCl、CH₃COOH、NaOH 溶液の場合には約 1200 G、15~20 分、アルコール溶液の場合には同じく 5 分遠心分離し、完全に透明な液をうるための特別な操作は行わなかった。後述のように濾過補助剤、高速遠心分離等を使用するならば恐らく塩溶液可溶Nに関しては若干低い値が得られるであろう。

(3) 蛋白-N 及び熱凝固-N の測定 塩溶液可溶N中の蛋白-N 及び熱凝固-N は Bishop の方法⁽³⁾に準じた。すなわち、前者は N/10 NaOH であらかじめアルカリ性となした抽出液に約 pH 8 となるまで N/10 CuSO₄ を添加した際沈澱するNであり、或る種のポリペプチッド及びアミノ酸も含まれる⁽²⁾。後者は pH 4.6 で 82°、20 分間加熱した際沈澱するNでアルブミン態Nと従来考えられていた。従って両者の値の差がグロブリン態Nの大概を示すものとされている。

結果並びに考察

0° に 3 か月間保存した前述の精白試料のうち精白度 83~76% の糠 (N が最大の区分) 及び精白度 66% の精白大麦を種々の溶剤を以て抽出、そのN分布を測定し第2表の如き結果が得られた。供試糠部は精白大麦の約 2 倍のN含量を有することから、殆んど外層及び胚から成るものと思われる⁽¹⁷⁾。抽出は表中の左方の抽出剤から右方の抽出剤へと表中の順序に従って行った。なお、抽出剤がアルコールの場合のカッコ内の数字はエタノールの代りにメタノールを使用した場合の値である。

第2表 糠部及び精白部中のNの分布

試料	全-N 含量 (N% : 乾物中)	Nの分布 (全-N 含量を 100 とした場合の 100 分率)							実験 番号
		冷 5% NaCl 抽出			冷 N/10 CH ₃ COOH 抽出	冷70%エタ ノール抽出 (メタノール)	熱70%エタ ノール抽出 (メタノール)	0.2% NaOH 抽出	
		全-N	蛋白-N	熱凝固-N				不溶 残渣	
精白度83~76% の間の糠部 (N 含量最大)	2.43	44	—	—	—	2	—	46	I
		44	29	18	—	2	22	13	II
精白度66%の精 白部	1.14	37	31	8	—	16	13	29	III
		36	—	—	—	(14)	(7)	38	IV
		35	—	—	89	—	4	16	V

糠部と精白部とを比較するとすべての N 形態に亘って特徴的な差異が見られる (実験 II, III). すなわち, 塩溶液可溶の全-N は糠部の方が上回っているが, その差は主として CuSO_4 では沈澱しない低級な N に帰因する. 高級な N については糠部では熱凝固し易いアルブミン型のものが比較的多いのに対し, 精白部では熱凝固しにくいグロブリン型のものが多い. アルコール可溶 N いわゆるホルデインは低温では完全に抽出されないことは古くから知られていたが^(2,18), 抽出温度の差による影響は両部で著しく差がある. 糠部では低温で抽出される N は全ホルデインの 1/10 にも達しないのに精白部では 1/2 以上が抽出される. このように大麦粒の部位によって, 熱両アルコールで抽出される N 量が顕著に相違することは大麦ホルデインには抽出温度から少くとも 2 種類の型が存在することを示すものである.

Smith⁽¹⁹⁾ によると大豆の水溶性蛋白についてはあるが, 75° でのエタノールによる変性は濃度 70 重量%の時最大となる. 大麦, 大豆の相違はあるにしても 70% 熱エタノール抽出により残存蛋白であるグルテリンが相当に変性を受けることが想像される. そこで糠部について冷エタノール抽出後, 直ちにアルカリ抽出を行い (冷エタノールに抽出されないホルデインはこの区分に併せて抽出されるはずである), 不溶残渣を測定したところ (実験 I), 実験 II に比して著しく減少した. すなわちこの差が熱エタノールによる糠部のグルテリンの変性量を示すものと考えられる. 一方, 精白部については実験 III~V にいずれも熱アルコール抽出を行ったにも拘らず, 不溶残渣は糠部に比して遙かに少い. このことは精白部中には熱エタノール変性を受け易いグルテリンが少いことを示すものである. さらにエタノールとメタノールの抽出力, 変性力の差を見るため精白部について実験 IV を行った. メタノール抽出力は熱時において特に低い, 不溶残渣はほぼ等しいから変性力には大差が無いものと思われる.

ホルデインの抽出剤としてしばしば使用される稀酢酸の抽出範囲を精白部について観察したところ (実験 V), 若干のアルコール可溶 N が残存する反面, 半量近くのグルテリンが同時に抽出されることを知った. 従ってホルデイン調製に当っては抽出剤がアルコールであるか, 稀酸であるかによって異った組成のものが得られる可能性に注意しなければならない.

別に塩溶液に可溶な N の形態を若干詳細に観察する目的でやや多量の試料を使って 5% NaCl による低温抽出を行った. 試料は 32 年産二条大麦を 33 年 7 月精米用搗精機により精白, 得られた糠及び精白大麦を 8° に保存,

第 3 表 精白部の塩溶液可溶-N の形態^{*1}

2~5 か月間に亘って実験に供した。精白部として精白度 40%, N 含量 1.25% (乾物中) の精白大麦 50 g を冷 5% NaCl 200 ml で 7 回抽出, 糠部として精白度 85~71%, N 含量 3.00% (乾物中) の糠 50 g を冷 5% NaCl 200 ml で 3 回抽出し, 第 3 表, 第 4 表に示すような順序に従って N の分布を追跡した。第 3 表, 第 4 表中の数字はいずれも塩溶液可溶-N 量を 100 とした場合の 100 分率をもって示した。精白大麦にあっては蛋白粒子の分散状態をセライト濾過, 高速遠心分離から観察することを主目的としたので 5% NaCl の抽出液を普通に遠心分離, 吸引濾過したものを出発点とした。糠部にあっては透析によって分離された沈澱及び上澄の熱に対する凝固性を観察することを主目的としたので抽出後濃縮し, さらに高速遠心分離によって得られた完全に透明な溶液を出発点とした。

精白大麦からの塩溶液可溶 N 中の蛋白-N 及び熱凝固-N に関しては前述の実験Ⅳと全く同様な傾向が得られた。1% セライト濾過によって透明な濾液が得られるが, 14% の N が除去される。これには完全に溶解していない蛋白粒子の機械的除去と溶存蛋白の吸着とが考えられるが, いずれにせよ Pool⁽¹⁶⁾ によって示された除去率よりは遙かに少なかった。セライトの蛋白吸着力を見るため濾液をさらに 5.5% セライトで濾過したところ, 6% の N が除去されたにすぎなかった。従って最初のセライト濾過で除去された N の大部分は蛋白粒子の機械的除去であって, 吸着はさほど多くないものと思われる。このセライト濾過で失われた N は殆んど蛋白-N であり, 特にこのうちで熱凝固-N として定量される区分である。故に熱凝固-N は抽出液の分離操作によって若干相違することに注意しなければならない。

出発時の溶液中の蛋白-N は 85% であり, 9 日間に亘る低温透析後残存した N は 80% あって, 蛋白分解酵素の作用が若干あることを考慮すると, CuSO₄ で沈澱する N の大部分が非透析性 N として透析内液に残存したものと見て差支えないであろう。事実, 透析内液を濾紙で吸引濾過して得られた濾液 (若干乳濁) は CuSO₄ で完全に沈澱する。このやや乳濁した濾液を高速遠心分離により完全に透明にすると全非透析性 N (80%) の 1/4 に相当する量がさらに沈澱分離される (例えば 5,000 G, 10' で上澄中の N は 39% となるから, 分離された N は 80%-39%=41% である)。すなわちかかる透析により全非透析性 N の約 1/2 が析出し (東洋ロシ No. 7 で分離される分が 1/4, 高速遠心分離で分離される分が 1/4), このうちの半量は普通の濾紙に阻止される程度の大きさの粒子となるが, 残りの半量はこれよりは微細で高速遠心分離乃至はセライト濾過を必要とする。グロブリンの透析の際の析出にはその種類によって難易のあることが知られているので⁽²⁰⁾, 析出粒子の大小によってそのグロ

第 4 表 糠部の塩溶液可溶-N の形態^{*1}

^{*1} 表中の数字は塩溶液可溶-N 量を 100 とした場合の百分率である。
^{*2} 最初の 2 日間は 0° の水道水を流しつつ透析, 以後の 6 日間は 0° の脱塩水を 1 日 1 回交換。

ブリン構成に差のあることは充分考えられることである。透明上澄中の約 1/3 が熱凝固-N で出発時の熱凝固-N に比して遙かに少く, 従って相当量の熱凝固-N が透析中に析出した区分に存在するはずである。セライトに残留した N を再度 5% NaCl で抽出した溶液中にも相当量の熱凝固-N が存在する。再度 5% NaCl で抽出されない N は, 透析中ないしはそれ以後の操作で変性不溶化したと思われるが, 0.2% NaOH により殆んど完全に溶解回収される。

糠部からの塩溶液可溶 N 中の蛋白-N 及び熱凝固-N に関しては濃縮, 高速遠心分離等の操作を経ているにも拘らず前述の実験Ⅱと全く同様な傾向が得られた。

8 日間の低温透析に際して失われた蛋白-N は精白大麦の場合よりも多い。恐らくこの区分の蛋白分解酵素力が精白大麦よりも大なるためと思われる。透析内液は高速遠心分離により完全に分離, 沈澱部は 5% NaCl に再溶解して上澄と共に蛋白-N, 熱凝固-N を求めた。糠部の場合でも透析中に約 1/2 量の N が析出し, 析出部の 1/4 が不溶性化した。非透析性 N のうち脱塩水及び 5% NaCl に可溶性 N はいずれも CuSO₄ で完全に

沈澱することを再確認した。透析上澄中の熱凝固-N はその全 N の 1/3 足らずであり、一方析出部の 5% NaCl 可溶 N 中の熱凝固-N はその全 N の 1/2 も占め、絶対量においても上回っている。すなわち、精白部と同じように糠部においてもアルブミン、グロブリンに対する脱塩水中での溶解性からの定義と熱に対する凝固性からの定義は全く一致しないことが明らかとなった。なお、糠部の場合では透析後の上澄及び析出部の熱凝固-N の合計は、たとえ透析中に失われた部分及び不溶性化した部分を全部熱凝固-N として加えても、出発時の量よりは相当に少い。逆に透析内液中の熱に安定な N 量は上澄及び 5% NaCl に可溶な析出部だけでも出発時の量よりは上回っている。従って透析中に酵素作用によって透析性となるものの外に、熱に安定な型に変化するものが存在するのではないかと思われる。

要 約

二条大麦を精米用搗精機により精白、その精白度からいくつかの区分に分けた。糠部（穀皮と胚乳との間の層及び胚から成る）と精白部（殆んど胚乳からなる）中の N の分布を Bishop の方法で測定したところ、すべての N 形態について差異が見られた。塩溶液可溶 N は糠部分の方が多いが、その差は主として CuSO_4 で沈澱しない低級な N に原因する。高級な N については糠部では熱凝固し易いアルブミン型のものが比較的多いのに対し、精白部では逆であった。糠部では冷エタノールに抽出される N は全ホルデインの 1/10 にも達しないのに、精白部では 1/2 以上にも達することから、大麦ホルデインは抽出温度から少くとも 2 種類の型が存在することを推定した。さらに熱エタノールで変性を受けて不溶化するグルテリン量は糠部の方が遙かに多い。

別に精白部及び糠部の塩溶液可溶 N の透析上の挙動を観察した。8~9 日間の低温透析によって失われた蛋白-N は精白部よりは糠部の方が多い。恐らく糠部の方の蛋白分解酵素力が大なるためと思われる。精白部、糠部いずれも透析により非透析性 N の内約 1/2 が沈澱析出するが、上澄、沈澱いずれにも熱凝固し易い N としにくい N とがそれぞれ相当量ずつ存在する。すなわち、いわゆるアルブミン、グロブリンに対する脱塩水中での溶解性からの定義と熱に対する凝固性からの定義は全く一致しない。糠部にあっては透析後の熱凝固-N は出発時よりは遙かに少く、透析中酵素作用によって透析性となるものの外に熱に、安定な型に変化するものが存在するのではないかと思われる。

本研究に際して終始御指導下されました九大名誉教授奥田譲先生並びに当所所長梅田康生博士に深く感謝致します。また試料の精白をしていただいた上、種々有益な御助言をいただいた農林省食糧研究所谷達雄博士並びに柳瀬肇氏に厚く御礼申し上げます。最後に本研究の発表を御許可されました麒麟麦酒株式会社に感謝致します。

(本研究の要約は昭和 35 年 4 月の日本農芸化学会大会において講演した。)

(1) T. B. Osborne : <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> , 17, 539 (1895).	(11) 高橋栄治, 白浜 潔 : 本誌, 4, 288 (1928).
(2) L. R. Bishop : <i>J. Inst. Brewing</i> , 34, 101 (1928).	(12) 高橋栄治, 白浜 潔 : 本誌, 4, 683 (1928).
(3) L. R. Bishop : <i>ibid.</i> , 35, 316 (1929).	(13) R. C. Rose, J. A. Anderson : <i>Can. J. Research</i> , 14 C, 109 (1936).
(4) L. R. Bishop : <i>ibid.</i> , 35, 323 (1929).	(14) C. E. Danielsson : <i>Biochem. J.</i> , 44, 387 (1949).
(5) H. Schjerning : <i>Wochschr. Brau.</i> , 32, 41 (1915).	(15) E. Urion, G. Lejeune, V. Golovtchenko : <i>Bull. soc. chim. biol.</i> , 26, 221 (1944).
(6) M. Myrbäck, S. Myrbäck : <i>ibid.</i> , 48, 43 (1931).	(16) A. A. Pool, E. M. Shooter : <i>J. Sci. Food. Agric.</i> , 6, 524 (1955).
(7) H. Lundin, J. Schröderheim : <i>ibid.</i> , 48, 347, 357 (1931).	(17) W. Postel : <i>Brauerei, Wissenschaftliche Beilage</i> , 10, 79 (1957).
(8) Pawlowski-Doemens : "Die Brautechnischen Untersuchungsmethoden", p. 139 (1932), R. Oldenbourg.	(18) E. Urion, G. Lejeune, V. Golovtchenko : <i>Bull. soc. chim. biol.</i> , 26, 303 (1944).
(9) H. Lüers : "Die wissenschaftlichen Grundlagen von Malzerei und Brauerei", p. 21 (1950), Hans Carl.	(19) A. K. Smith, V. L. Johnsen, R. E. Derges : <i>Cereal. Chem.</i> , 28, 325 (1951).
(10) 中村幸彦 : 本誌, 3, 542 (1927).	(20) O. Quensel : "Untersuchungen über die Gerstenglobuline" (1942), Almqvist und Wiksells.