清酒酒母の窒素成分の生因 (第 1 報)*

米蛋白質の二, 三の性質

竹内五男, 島田 潔, 中村精二 (野田醤油株式会社中央研究所)

昭和 39 年 8 月 10 日 受 理

緒 言

生醗系酒母のアミノ酸の生因に関しては, 杉山⁽¹⁾が詳細な研究を報告して以来, その後の各氏⁽²⁻⁴⁾によってすぐれた研究が行われてきた. この結果, 酵素化学的, 微生物学的, 応用開発分野に目ざましい発展をみることができ, 幾つかの改良醗が実際の成果をあげるに至った. しかし生因の解明には未だ何かが不足しているのではないかという憾が多少残っており, 最近布川⁽⁵⁾がこの問題に関して再び言及した疑問について著者らも首肯し得るところである.

これまでの研究は, 醗経過に伴う窒素成分の推移を, 醗中の蛋白分解酵素群との均一系における関係としてとらえようとするものであって, ここに何か不満を感じさせる原因があるのではないかと思われるのである.

抽出した米蛋白質をとかした液は, pH 3~7 の範囲で不均一な白濁したものである. そこで著者らは, 米蛋白質の基礎的な多少の性質を知ることを目的とし, 抽出米蛋白質と蛋白質分解酵素を使用して, 酒母の窒素成分生因に関する予備的な研究を行い, 米蛋白質に関する二, 三の性質を知ることができたので以下報告する.

実 験 方 法

(1) 米蛋白質の調製 市販の精白特撰米を一度水洗して 30° で風乾してから乳鉢で砕き, 35 メッシュのフルイを通る細粉とした白米から, 田村ら⁽⁶⁾の方法に従って同法を参考したものを白米グルテリン区分とした. また抽出精製にして, 白米粉に 10 倍量の 0.05 N 水酸化ナトリウム液を加えて抽出, 1 N 乳酸で pH 4.5 にして生ずる沈殿を 1 夜流水透析後, 再び溶解, 沈殿を繰返し, 最後に沈殿をできるだけ少量の 0.05 N 水酸化ナトリウ

ムに溶解してから凍結乾燥したものを米蛋白質区分 (または粗蛋白) とした.

(2) 米蛋白質の調製

白米グルテリン基質: 白米グルテリン区分を適当量秤量して 0.1 N 水酸化ナトリウムに溶解し室温 (18~23°) でこれに 0.1 N 乳酸を加え, 攪拌を続けながら所要 pH に調整し, その後約 2 時間攪拌を続けた後基質として使用した.

米蛋白基質: 白米蛋白質区分を適当量秤量して 0.05~2.0 N の各段階の濃度の水酸化ナトリウム液に溶解し, これに対応する各濃度の 0.05~2.0 N 乳酸をそれぞれ加えて所要 pH に調整し, 後約 2 時間攪拌を続けた後基質とした. この方法では, 酸, アルカリの低濃度の部分では pH 4 以下, または pH 10 以上の範囲の pH を得にくいので, 第 1 図のように広い pH 領域にわたるものについては, 白米蛋白質区分を 0.05 N 水酸化ナトリウムで溶解した後, 1 N 水酸化ナトリウムおよび 1 N 乳酸で pH を調整し, この場合に限りイオン強度を無視した. また凍結乾燥した白米蛋白質には当然アルカリが混入しているために, これをアルカリ溶解する場合には, あらかじめ適当量の水を加えて溶解してからアルカリ濃度を滴定し, その結果所要アルカリ濃度になるように補正してから, 所要濃度の水酸化ナトリウム液を所要量添加した.

熱変性米蛋白基質: 白米蛋白質区分ををできるだけ少量の 0.05 N 水酸化ナトリウム液で溶解し, これを流水 2 日, 蒸留水 1 日透析すると多量の蛋白が沈殿する. これを遠心して沈殿を集め, 軽く水を切ってそのまま無圧で 1 時間オートクレーブした. これを米蛋白基質の場合と同様にして基質を調製した.

以上の基質液は pH 2.5~6.0 の範囲で緩衝性を示したので緩衝液を加えず, またその他の pH における場合も, 多少緩衝性が認められたので緩衝液の添加を行わなかった. イオン強度は酸・アルカリの濃度から算出した.

* The Formation of Nitrogenous Compounds in Moto Mash (Starter) of Saké. Part I. On the Some Properties of Rice Protein.
By Itsuo TAKEUCHI, Kiyoshi SHIMADA and Seiji NAKAMURA (Central Research Institute of Noda Shōyu and Co. Ltd.)

(3) 酵素 酸性における米蛋白質分解には, *Aspergillus saitoi* の酸性プロテアーゼ〔至適 pH 2.5~3.0, 活性 0.940 (pH 3.0, 0.5 mg/ml) Folin-蔭山法⁽⁷⁾, 盛進製薬製, モルシン T-60〕を使用し, また, 中性付近における米蛋白質分解に関しては, pH 6 付近で十分に活性のある *Streptomyces griseus* の中性プロテアーゼ〔至適 pH 6.0~8.0, 活性 1,240 (pH 6.0, 0.5 mg/ml) Folin-蔭山法, 科研化学製, プロナーゼ AF〕を使用した。

(4) 酵素による米蛋白質の分解 蛋白濃度 0.2~0.3%, イオン強度 $\mu=0.2$ における pH 3.00 のほぼ透明な米蛋白溶液, pH 3.75 および pH 6.00 の白濁した米蛋白白濁液を基質として, 基質 8 ml に対して適当な濃度の酵素液を 1 ml 添加して 40° で作用させ, 作用終了後 2 M 三塩化酢酸を 1 ml 加えて終濃度 0.2 M で 37° に 30 分間放置して酵素作用停止, 除蛋白した。米蛋白質の加水分解率は Lowry 法⁽⁸⁾による全窒素量に対する三塩化酢酸可溶区分の百分率で表示した。

(5) 米蛋白質の溶解率 それぞれの条件で調製した米蛋白基質をスピコン L 型超遠心機で 25,000 r.p.m., 1 時間遠心し, 上澄の窒素量を全窒素量で除した百分率を以て蛋白溶解率とした。測定は Lowry 法によった。

(6) 米蛋白質の窒素成分溶解率 (4) の方法で酵素を作用させた液を, 除蛋白剤を加えることなく直ちに 0° 付近まで氷冷し, pH を調整するなどの処理を行い, (5) と同様に超遠心して上澄をとり, 窒素の百分率として表示した。

実験結果

(1) 米蛋白質の溶解

室温 (18~23°) において, pH を変化させた場合の米蛋白質の溶解例を第 1 図に示す。この結果はイオン強度を無視して行ったもので, 実験方法からするとイオン強度 $\mu=0.1$ 以下の状態と考えられたが, pH 3 以下, または pH 10 以上で 80~100% 溶解する可能性を示し, また溶解率の極小が pH 5 付近にあることを示している。また, pH とイオン強度を共に変化させた場合の溶解曲線を第 2 図に示す。 $\mu=0.1\sim4.0$ の範囲で溶解が増加する。この場合にも pH 3 ではほぼ 100% が溶解する傾向がみられ, 実際, 供試液もほぼ透明であった。これ以外の pH では, 供試液はすべて白濁状態にあった。また溶解の極小は, μ が増加するに従って pH 5 付近から多小酸性側に傾く傾向にあるとも見受けられたが確実では

第 1 図 種々の pH における米蛋白質の溶解率

ない。第 3 図は蛋白濃度約 0.3%, $\mu=0.2$ における米蛋白 (粗蛋白), 白米グルテリン, 熱変性蛋白の溶解を示したものである。ここでも pH 3 で 100% 近くの溶解がみられ, また溶解の極小は pH 5 付近にある。白米グルテリンの pH 3 における溶解率はやや低くなっているが, これは抽出操作途中における変性が影響したためとも考えられる。

第 2 図 種々のイオン強度における米蛋白質の溶解率

以上いずれの場合にも, 測定値に多少バラツキが認められたが, これは操作を室温で行ったための浮動, 蛋白濃度の振れその他の実験条件に多少の振れがあったためと思われる。しかし操作中 pH 3 の場合には液がほとんどすべてほぼ透明になるところから, この pH ではほぼ完

第 3 図 米蛋白質の溶解率

○—○ 粗蛋白 ⊗—⊗ 熱変性粗蛋白
●—● 米グルテリン

第 1 表 米蛋白質の溶解率

	溶解率	TCA 可溶分
未変性米蛋白質	3.9%	1.5%
熱変性米蛋白質	37.3%	17.6%

蛋白濃度約 0.2%, $\mu=0.2$, pH 5.00

率が非常に高いので, pH 5.00 における超遠心上澄を三塩化酢酸で分別した結果を第 1 表に示す. 米蛋白は熱分解を受けて, 見かけの溶解が増加したことを示している.

(2) 米蛋白質の酵素による分解

蛋白濃度約 0.2%, $\mu=0.2$, pH 3.00 のほぼ透明な米

第 4 図 プロテアーゼによる

分解 (1)

pH 3.00, $\mu=0.2$

酵素濃度 0.2% 対基質

第 5 図 プロテアーゼによる

分解 (2)

- pH 3.75, $\mu=0.2$
 酵素濃度 5% 対基質
 ●—● pH 6.00, $\mu=0.2$
 酵素濃度 2% 対基質

全に溶解するものと考えられる.

また, 熱変性蛋白の溶解

蛋白基質に微量の酸性プロテアーゼを加えて作用させると (液内酵素濃度 $4 \times 10^{-4}\%$, 基質対酵素重量比約 100:2) 第 4 図に示す曲線を書いて順次分解し, 20 時間後には加水分解率約 88% に達する. これに対して pH を異にした白濁した米

蛋白基質に酵素を作用させると, 第 5 図に示すような屈折点 (intersection) が生ずる. すなわち $\mu=0.2$, pH 3.75 (溶解率約 30%) に前述の約 25 倍量の酸性プロテアーゼ (液内酵素濃度 $1.25 \times 10^{-2}\%$, 基質対酵素重量比約 100:5) を作用させた場合も, $\mu=0.2$, pH 6.0 (溶解率約 10%) に前述の約 10 倍量の中性プロテアーゼ (液内酵素濃度 $0.4 \times 10^{-2}\%$, 基質対酵素重量比約 100:2) を作用させた場合においても, 添加酵素量に比べて加水分解速度は遅く, しかも特徴のある屈折点が認められる.

pH 3.00 より上の pH 領域で米蛋白基質が白濁状態にある時, 何らかの要因がその分解速度に影響を与えてこのような屈折点を生ずるのではないかと考えられる. この要因として pH 変化に基づく酵素の作用特性の変化, 米蛋白構造の影響, または米蛋白基質の分散状態の影響等が考えられるので, まず pH 変化に基づく米蛋白構造の変化を知るための一つの手掛りとしてその紫外吸収をしらべた. すなわち $\mu=0.2$ で各 pH に調整した米蛋白基質を 25,000 r. p. m., 1 時間遠心した上澄の紫外吸収をしらべたのが第 6 図である. pH 3.00 における吸収の極大 276 m μ , 極小 254 m μ が pH 6.00 では極大 258 m μ , 極小 241 m μ と pH が上昇するに従って短波長側にシ

第 6 図 種々の pH における米蛋白質の紫外吸収 (溶液区分)

25,000 r. p. m., 1 hr, supernatant

- (1) pH 3.00 (2) pH 3.50 (3) pH 3.75
 (4) pH 4.00 (5) pH 4.80 (6) pH 6.00

第 7 図 種々の pH における米蛋白質の紫外吸収
(沈殿抽出区分)

25,000 r. p. m., 1 hr, ppt を McIlvaine 緩衝液で抽出。
(1)~(6) は第 6 図と同じ。

第 8 図 プロテアーゼによる分解 (3)
(透明な溶液区分)

$\mu=0.2$
○—○ pH 3.00 ●—● pH 3.75
□—□ pH 6.00

第 9 図 遠心した米蛋白質

$\mu=0.4$, pH 3.75
(イ) control
(ロ) 5,000 r. p. m., 30 min. 遠心
(ハ) 25,000 r. p. m., 1 hr. 遠心

フトすることが認められる。また、遠心して分離した沈殿をそれぞれに対応する pH のマッキルヴェイン緩衝液で抽出し、25,000 r. p. m., 1 時間遠心した上澄について紫外吸収をしらべたものを第 7 図に示す。蛋白濃度関係で余りははっきりした結果は得られなかったが、第 6 図と同じ傾向を示すことが認められる。

また、pH 変化に基づく酵素作用特性の変化と、米蛋白質基質の分散状態の影響を知る手掛りとして次の実験を行った。すなわち $\mu=0.2$ において pH 3.75 および pH 6.00 の米蛋白質基質を 25,000 r. p. m., 1 時間遠心すると透明な液が得られる。この液 10 ml に対し酸性プロテアーゼ (1 mg/ml), 中性プロテアーゼ (1 mg/ml) を 1 ml 加えて作用させた結果を第 8 図に示す。なお、pH 3.00 の基質は遠心しない。ほぼ透明な米蛋白質基質を使用し、これに酸性プロテアーゼを 1 ml 作用させた。ここでは屈折点は認められなかった。

$\mu=0.4$, pH 3.75 の白濁した米蛋白質基質を 5,000 r. p. m., 30 分, 25,000 r. p. m., 1 時間と順次遠心すると、第 9 図に示すような白濁原液、半透明な乳白液、透明な溶液が得られる。これに前記同様、酸性プロテアーゼを作用させた結果を第 10 図 [(イ)~(ハ)] に示す。透明な基質では認められなかった屈折点が、乳白または白濁した基質で認められる。

pH 3.00 および pH 3.75 において酸性プロテアーゼを作用させると、米蛋白質の 80% までは比較的分解され易いことが認められたが、pH 6.00 においては酸性プロテアーゼに比べて中性プロテアーゼの酵素活性が大にもかわらず分解速度が遅い。そこで第 5 図と同様の条件で酵素を初発の 1/2 量補添する添加実験と、大量の酵素を作用させる実験 (液内酵素濃度 $6.3 \times 10^{-2} \%$, 基質対酵素重量比約 100:63) およびこれにも初発の 1/2 量の酵素を途中で補添する実験を行った結果を第 11 図, 第 12 図に示す。

pH 6.00 の米蛋白質基質はやや分解しにくくなっている傾向が認められ、蛋白の解離等の構造の影響, あるいは溶解率が 10% と極めて低い分散状態の影響等が考慮されるが、それにしても大量の酵素を使用する時は、その

第 10 図 (イ) 白濁基質の分解
 $\mu=0.4$, pH 3.75

第 10 図 (ロ) 乳白基質の分解
 $\mu=0.4$, pH 3.74

第 10 図 (ハ) 透明基質の分解
 $\mu=0.4$, pH 3.75

第 11 図 プロテアーゼによる分解
(4)

↓ 酵素添加
 $\mu=0.2$, pH 6.00

第 12 図 プロテアーゼによる分解
(5)

↓ 酵素添加
 $\mu=0.2$, pH 6.00
酵素濃度: 63% 対基質

第 13 図 米蛋白質溶解におよぼす
プロテアーゼ接触の影響

●—● 米蛋白 0.1%, 4hr.
●—● " 0.1%, 6hr.
●—● " 0.1%, 24hr.
○—○ " 1.0%, 0hr.
○—○ " 1.0%, 2hr.
○—○ " 1.0%, 24hr.

80% 付近までは比較的容易に分解されることが認められた。

(3) 米蛋白質溶解に対するプロテアーゼの影響

先に秋山⁽⁸⁾は、中性付近で長くプロテアーゼに接触した米蛋白質は、乳酸酸性で溶け易くなるということを報告し、このものを特に“アミノ酸母物質”と名づけている。そこで、プロテアーゼに接触した米蛋白質が、このような特性を獲得するかどうかについて実験を行った。

$\mu=0.2$, pH 6.00 に調整した 0.1% および 1.0% の白濁した米蛋白質に、きわめて微量の中性プロテアーゼ (液内酵素濃度 2.2×10^{-5} %, この液内酵素濃度では 0.5 % 米蛋白質を pH 6.00, 40° で 1 時間に約 2% を分

解するのみである) を添加して接触させ、適時採取して 1 N 乳酸を加えてそれぞれ pH 5.00, 3.75 に調整し、この窒素成分の溶解率をしらべた。この結果を第 13 図に示す。接触時間の長いものほど溶解率の増加が認められるが、溶解窒素成分の測定値には溶解蛋白および分解生成物が混在しているので、溶解率の経時的増加は加水分解が進展して分解生成物が増加したことを意味するものと考えられる。これに対して pH 6.00 で米蛋白が酵素に接触後、乳酸を加えてこの pH より酸性にした場合、溶解率が増加するということは認められず、極小を pH 5 付近に有する米蛋白溶解曲線に類似した曲線が得られたに過ぎなかった。

考 察

米蛋白質の溶解率は、イオン強度が上昇するに従って増加する傾向が認められ、またパラツキはあるが pH 3 以下および pH 10 以上でほとんどが溶解する可能性がある。実際 pH 3.00 に試料を調製するとはほぼ透明な均一な溶液が得られる。

また、米蛋白質は pH 3~6 の範囲で分解の難易は認められるが、酵素によってその 80% 付近までは比較的容易に加水分解された。紫外吸収曲線によると米蛋白質の溶解部分は pH 3 から 6 に変化する間に短波長側にシフトする現象がみられる。これは米蛋白質の解離等の構造に関する変化とも考えられ、これが分解速度の遅速に影響したものと思われるが、pH 3.00 と 3.75 および pH 6.00 の場合に酵素起源と pH を異にするので断定はできない。

しかし屈折点が生ずる要因としては、米蛋白質の構造の影響よりも米蛋白質が均一な溶液状態にあるか、または不均一な分散状態にあるかという点が影響するものと認められる。すなわち pH 3.00 における均一な基質、およびその他の pH における不均一な米蛋白質を超速遠心した上澄において、酵素による分解過程に屈折点を生じないが、乳白または白濁した基質においては屈折点を生ずることが挙げられる。これは溶けていない分散物の酵素による加水分解が遅いため、全体の分解速度に影響を与えているものと考えられる。この分散物は、溶解している米蛋白質と異なることは、紫外吸収の結果からも推定され、分解速度が遅いことは溶解していないという状態によるものと考えられる。

米蛋白質の不均一な分散系に酵素が作用して分解する過程を単に均一系への移行とみるならば、この経過は酵素による溶解促進効果（または解離促進効果）とみることができる。分散物の酵素による分解はこのような状態の米蛋白質に直接酵素が作用して分解されていくものか、あるいは微視的にみて溶解と分解の連続的な組合せによるものか今のところ不明である。しかし著者らの行ったミルクカゼインに pH 2.40~4.65 の範囲で *Aspergillus saitoi* の酸性プロテアーゼを作用させた未発表の実験によると、屈折点が生ずる現象に基質の溶解状態が影響するというのを暗示する結果を得ている。すなわちミルクカゼインの場合には透明な基質が分解されるに従って clotting 様の現象を起し、pH は変化しないのにもかかわらず乳白→白濁→沈降分離の状態をたどり、しかもこの変化点で屈折点が見われる。これは米蛋白質の場合と全

く逆であって、何らかの要因によって不溶物に変化する速度が全体の分解速度に影響を与えているものと思われる。この不溶物はもとの基質と構造を異にするものかどうかは不明であるが、少なくともこれを一旦アルカリ溶解してもとの pH にもどした場合の紫外吸収曲線は、最初の基質と全く一致する。このことは蛋白質の溶解状態ひいては分散物の場合に微視的にみて溶解するという速度が、分散物全体の分解速度に影響を与えるという考え方もできるのではなかろうか。

いずれにしても同一の pH にあった場合、溶解しているということは酵素による分解を容易にすることが認められる。

また、プロテアーゼに接触した米蛋白質が、乳酸酸性で溶け易くなるという現象は特に認められなかったが、米蛋白質は pH 5 より下の領域で溶解度を急増する性質があり、古くから米蛋白質の可溶化が問題であったということは⁽¹⁻⁶⁾、溶解した米蛋白質が未溶解の蛋白質に比べて酵素によって分解され易いという立場によったものと考えられる。

要 約

(1) 精白米蛋白質を抽出して、その溶解とプロテアーゼによる分解、紫外吸収をしらべた。

(2) 米蛋白質はプロテアーゼによって 80% までは容易に分解されることを認めた。

(3) 米蛋白質の不均一な懸濁液にプロテアーゼを作用させると、屈折点が見われることを認めた。

(4) 米蛋白質とプロテアーゼとを中性付近で接触させた場合、酸性で溶け易い性質に変化するという現象は見あたらなかった。

本報告を終了するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜った東京大学坂口謹一郎名誉教授、御助言と御鞭撻を賜った有馬 啓教授、池田庸之助教授、御高配を賜った当社取締役茂木正利博士、横塚 保博士、並びに貴重な試料の御分与と御教示いただいた吉田文彦博士、一島英治氏、越山育則氏、実験に御協力くださった戸辺恵子嬢、発表を許可された本社取締役各位に深甚なる感謝の意を表するしだいである。

(1) 杉山晋朔, 長橋 清 : 醸試報, **115**, 99 (1932, 昭 7)。

(2) 杉田 修, 国定則行, 蔭山公雄 : 醸工, **33**, 433 (1955) ; **34**, 1, 138 (1956)。

(3) 秋山裕一, 千野潤雄 : 本誌, **31**, 913 (1957) ;

- 32, 355, 526 (1958).
- (4) 布川弥太郎, 鈴木明治, 馬場国雄, 伊藤雄太郎,
西谷尚道 : 醸協, 53, 532 (1958); 54, 342
(1959); 布川弥太郎, 難波康之祐, 衣山陽三 :
本誌, 36, 879 (1962).
- (5) 布川弥太郎 : 醸協, 59, 25 (1964).
- (6) 田村真八郎, 剣持久仁子 : 本誌, 37, 278 (1963).
- (7) 蔭山公雄, 国定則行 : 醸工, 33, 28 (1955).
- (8) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. Lewis
farr., R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193,
265 (1951).
-