清酒酒母の窒素成分の生因 (第 7 報)

米蛋白質と米澱粉の相互作用について (2)

竹内五男, 島田 潔, 中村精二
(キッコーマン醤油株式会社中央研究所)

昭和 42 年 10 月 11 日 受 理

The Formation of Nitrogenous Compounds
in Moto Mash (Starter) of Sake
Part VII. Interaction between Protein and Starch of Rice (2)

By Itsuo TAKEUCHI, Kiyoshi SHIMADA and Seiji NAKAMURA
Central Research Institute of Kikkoman Shoyu and Co., Ltd.

This paper deals with an application of colloid titration (5) to rice protein, rice starch and mixture of them, to obtain a knowledge about the properties in terms of the electric charge of these polymers.

The colloid titration curves of rice protein and rice starch indicated that positive charge of rice protein was observed at pH values lower than 6.5 whereas negative charge higher than this value, and that weak negative charge of rice starch was observed in the pH range from 1 to 12.

Though a stoichiometric combination between rice protein and rice starch by the opposite electric charge of these polymer ions, by the colloid titration of mixture of them, could not be confirmed directly, yet a possibility of the combination could not be denied. Compared the results of the colloid titration with the results in the previous paper (1), however, the interaction which was found by the viscometric method (1) was explained as the force between rice protein and rice starch by their opposite electrostatic potential, that gave an effect to the dimension of molecules of them (1) at pH 3.0. The same occurrence was expected in other pH range lower than pH 6.5.

(Received October 11, 1967)

緒 言

著者らは前報⁽¹⁾で、米蛋白質と米澱粉、 α -カゼインと米澱粉のような、相互間に化学的結合の可能性が少ないものの間に、酸性で分子のデメンジョンが長くなるような相互作用が存在することを見出し、両者の高分子電解質的な性質から、これが解離に基づいた静電ポテンシャルによるものであろうとの推論を行なった。しかし米蛋白質については僅かに pH 3 または 10 の 2 点のみを確かめ得たに過ぎず、その他の pH に関しては、米蛋白質が pH 3~10 の間でほとんど溶解しないために、この方法による検討が不可能であった。

このような相互作用が酒母経過に何らかの影響を与えているとしたならば、相互作用の検討は酒母が経過する

pH (pH 3.5~6) について行なわなければならない、また前述の静電気に関する推論も確認する必要がある。しかしこのためには次のような困難が伴った。すなわち。

- (1) 米蛋白質の溶解度の関係から、きわめて稀薄な液によっても測定可能な方法を選択する必要があった。
- (2) 電圧をかけ、電流を通ずるような強い外力を加えることは回避したかった。すなわち相互作用を結合と解するとき、イ) この結合は極めて弱いと考えられるので(後述)、外力によって結合が乱される可能性が考えられた。ロ) 米蛋白質は極めて会合しやすい性質^(1,3)があり、また変性に関しては未だ何の知見も得ていないために、このような方法は回避したかった。事実、比較的高い濃度が得られる pH 2.5,

3.0 において, 予備的に試みた電気泳動では, 通電すると沈澱が生じて測定不能であった。

(3) (相互作用を結合と解するとき) 結合物を単離することは極めて困難と考えられた。すなわち, 米蛋白質と米澱粉はともに高分子電解質的な挙動を示すことが認められたが⁽¹⁾, 強電解質とは考えにくく, 仮に両者間に静電ポテンシャルによる結合が起こったとしても非常に弱いものと推定される。事実, pH 3 で両者を混合しても, コロイド滴定⁽⁵⁾における標準電解コロイド間におけるような絮状沈澱はほとんど生じない。このような結合物は仮に存在するとしても, 分離操作中に結合が破れる危険性が高いと考えられる。

(4) 酒母におけるような, 濃厚で不均一な系においては, きわめて弱い力によっても種々の影響の起こり得ることは前報⁽⁴⁾でも明らかである。このような弱い力の検討には, できるだけ系を乱さないような方法が望ましいと考えられた。

これらの条件に対し, 寺山⁽⁶⁾の創始したコロイド滴定法は, 系に標準コロイドを添加するだけの温和な条件で行なうものであり, しかも極めて低濃度の試料によっても測定可能なため, 米蛋白質溶解度の最も低い pH 4~6 付近の測定にも適するという利点があるから, この方法を選択した。コロイド滴定法は正負コロイドイオン間のイオンの結合反応の当量点を, ある種の色素⁽⁶⁾による metachromasy^(6,7) を利用して知る方法であり, 結合と当量点の確認に関して, 寺山⁽⁶⁾はさらに電導度的測定によって裏づけている。本法を米蛋白質, 米澱粉に適用する場合の決定的な難点は, 両者相互による直接滴定⁽⁵⁾ができないことであり, 寺山⁽⁶⁾が蛋白質と澱粉について指摘したとおりである。このために, 両者間のコロイドイオンの結合を直接立証することができず, 止むを得ず間接滴定法⁽⁵⁾による考察を行なった。

本報では, 米蛋白質と米澱粉について, まず帯電状態をしらべ, 次に両者の混合物について検討した結果を報告する。

実験方法

1. 米澱粉液と米蛋白質液

米澱粉液と米蛋白質液は, 前報⁽¹⁾に従い, 0.2M の酸, 塩基を使用して調製した。酸としては, 塩酸および乳酸, その他酒石酸, クエン酸, コハク酸, グルコン酸を使用した。

2. ポリ燐酸

ポリ燐酸は武田薬品工業(株)製, 食品添加物ポリ燐酸 [カルゴン 2-B, ポリ燐酸ナトリウム 85%, メタ燐酸ナトリウム 12%, ピロ燐酸ナトリウム (無水) 3%] を使用した。

3. 試料濃度の測定

米澱粉は前報⁽¹⁾に従い, 米蛋白質は Lowry 法⁽⁹⁾によりチロシンとして表示した。

4. コロイド滴定法

コロイド滴定法は寺山⁽⁶⁾の間接滴定法に従った。標準正コロイドは, N-メチルキトザン (正晃化学薬品 (株) 製) およびキトザン塩酸塩 (寺山に従って調製), 標準負コロイドはポリビニールアルコール硫酸カリ (P.V.S-K) (和光純薬(株)製, および寺山に従って調製) を使用し, 指示薬はトルイジンブルー (メルク) を使用した。結果は試料重量当りの当量 (eq/g), すなわち次式,

$$\text{eq/g} = \frac{(\text{P.V.S-K の規定濃度})(\text{対照滴定値との差 } \Delta \text{cc})^{(6)}}{(\text{添加試料 } g \text{ 数})}$$

で表示した。また図中 + - の符号は試料のコロイドイオンとしての荷電の性質を示すものとした。

実験結果

1. 米澱粉のコロイド滴定

寺山⁽⁶⁾は, キトザン塩酸塩と市販カンシヨ澱粉を用い, 塩酸で pH 1.0~5.5 の範囲に調整した水溶液のコロイド滴定を行ない, pH 1.0 でごく弱い正荷電を示すほか, 全域で弱い負荷電を示すことを報告している。同時に澱粉には燐酸がエステル型になっていることを付言している。

米澱粉液を, 塩酸と水酸化ナトリウム (以後塩酸系と称する) で pH を調整し, キトザン塩酸塩で pH 1~6 の範囲を, N-メチルキトザンで pH 3~12 の範囲を, それぞれ間接滴定法によって滴定した結果を第 1 図に示す。pH 1 付近を除いた全域にわたって弱い負荷電を示すことが認められる。この滴定曲線において, pH 5 および 7 付近に彎曲点のあるところは, ポリ燐酸-N-メチルキトザン (塩酸系) のコロイド滴定曲線に酷似し, pH 7 および 11 付近の彎曲点は燐酸の酸-塩基滴定曲線に類似している。これを第 1, 2 図に示す。

N-メチルキトザンを用い, 乳酸と水酸化ナトリウムで pH を調整した米澱粉 (以後乳酸系と称する) のコロイド滴定曲線は, 第 1 図と多少異なったが, 全域で弱い負荷電を示すことは同様であった。これを第 3 図に示す。

第1図 米澱粉のコロイド滴定曲線 (1)
(塩酸系)

○—○ 米澱粉-N-メチルキトザン
●—● 米澱粉-キトザン塩酸塩
----- リン酸-酸塩基滴定曲線

第2図 ポリリン酸のコロイド滴定曲線

○—○ ポリリン酸-N-メチルキトザン
----- 米澱粉-N-メチルキトザン

第3図 米澱粉のコロイド滴定曲線 (2)
(乳酸系)

第4図 米蛋白質のコロイド滴定曲線 (1)
(乳酸系)

2. 米蛋白質のコロイド滴定

N-メチルキトザンを標準正コロイドとし、間接滴定法によって米蛋白質を乳酸系溶媒中で滴定した結果を第4図に示す。寺山^(6,7)は種々の粗製、精製および結晶蛋白質のコロイド滴定を行ない、それぞれ両性解離型曲線を示すことを述べている。米蛋白質の場合も同様に、pH 6.5 付近で横軸 (荷電が零の点) を切る両性電解コロイ

第5図(イ) 米蛋白質のコロイド滴定曲線 (1)
(クエン酸系)

----- 乳酸系

第5図(ロ) 米蛋白質のコロイド滴定曲線 (3)
(コハク酸系)

----- 乳酸系

第 5 図(ハ) 米蛋白質のコロイド滴定曲線 (4)
(塩酸系)
----- 乳酸系

第 5 図(ニ) 米蛋白質のコロイド滴定曲線 (5)
(酒石酸系)
----- 乳酸系

第 5 図(ホ) 米蛋白質のコロイド滴定曲線 (6)
(グルコン酸系)
----- 乳酸系

ドの性質を示すことが認められた。曲線が横軸を切る点
は、コロイド滴定による等電点といわれるものであるが、
これが酸塩基滴定における等電点と多くの場合異なるこ
とについて、寺山⁽⁵⁾のイオン交換反応に関する説明以外
に明確な説明は与えられていない。米蛋白質の等電点は
pH 4~7 の間で諸説があり、またその溶解性は pH 5 付
近で最小になる⁽²⁾など、明らかではない。しかしコロイ
ド滴定の結果によれば米蛋白質は pH 6.5 を中心として、
酸性側では正の、塩基性側では負の荷電を有していると
いい得る。速醸酒母で試みられたことのある各種の酸を
使用した溶媒中では、グルコン酸以外の系で乳酸系と同
様の結果が得られた。これを第 5 図(イ)~(ホ)に示す。

3. 米蛋白質と米澱粉の混合物のコロイド滴定

(イ) 米蛋白質-米澱粉混合比のコロイド滴定におよ
ぼす影響： 2 種の試料から成立する複合コロイドの間

第 6 図 米蛋白質-米澱粉混合物のコロイド
滴定曲線 (1) (乳酸系)

○—○ 測定値 米澱粉濃度 1.62×10^{-2} g/ml
●—● 計算値

接滴定は寺山⁽⁶⁾が卵アルブミン等数種の例について、それぞれ混合比を変えて試みている。その結果、各成分よりの加成的計算値と測定値が一致するときは、両コロイド間にコロイドイオンの結合以外の複雑な結合は進行しなかったものとしている。これに準じて、米蛋白質と米澱粉の場合も、混合比を変えて検討を行なった。すなわち、一定量の米澱粉 (1.62×10^{-2} g/ml) に米蛋白質の量を変え ($1 \sim 150 \times 10^{-6}$ g/ml), pH 3, 4, 5 付近においてそれぞれ添加し、各 pH における各成分濃度よりの加成的計算値と測定値を比較した。この結果を第 6 図に示す。計算、測定両値が一致する米蛋白質の濃度範囲は pH によって異なるが、いずれの場合も低濃度 ($20 \sim 30 \times 10^{-6}$ g/ml) で比較的一致した。そこでこの程度の米蛋白質濃度で、米蛋白質 (チロシンとして) 1 に対し米澱粉 800 程度の混合比になるように調製して、以後の実験を行なうこととした。

(ロ) 米蛋白質-米澱粉混合物のコロイド滴定：乳酸

第 7 図 米蛋白質-米澱粉混合物のコロイド滴定曲線 (2) (乳酸系)
○—○ 測定値 ●—● 計算値

第 8 図 米蛋白質-米澱粉混合物のコロイド滴定曲線 (3) (塩酸系)
○—○ 測定値 ●—● 計算値

系および塩酸系溶媒中で米蛋白質と米澱粉を混合し、それぞれ pH 3~10, pH 3~8 の範囲で間接滴定を行ない、各成分からの加成的計算値と測定値とを比較した。結果を第 7, 8 図に示す。両値はよい一致を示している。

考 察

1. ある pH 範囲における米蛋白質と米澱粉の帯電状態

コロイド滴定法は“正負相反する高分子電解質イオン間において、その荷電に関して量論的結合が起こる^(5,8)”ことを基礎とした方法である。また寺山^(5,7)は、蛋白質、澱粉とともに、高分子電解質としての解離に基づくコロイド滴定が可能であることを実証している。これに従えば、本実験における米蛋白質は pH 6.5 付近を中心として、酸性側で正の、塩基性側では負の荷電を有することが認められ、米澱粉は広い pH 範囲で極く弱い負の荷電を有することが認められた。これは、前報^(1,10)における米蛋白質と米澱粉の荷電に関する推論と矛盾しない結果である。また米蛋白質について、粘度法⁽¹⁾では測定不能であった高分子電解質に関する知見を、コロイド滴定法によって荷電の状態として知り得たものである。

2. 複合コロイドのコロイド滴定と試料間コロイドイオンの結合

寺山⁽⁶⁾は複合コロイドの間接滴定において、各成分よりする加成的計算値と測定値とが一致するときは、正常なコロイドイオンの結合以外の複雑な結合が進行していないとし、一致しないときは、試料相互間に何らかの特殊な結合が行なわれたとしている。一致する例としてはゼラチンまたは卵アルブミンと酵母核酸ソーダ、一致しない例としては破傷風毒素-破傷風抗毒素、ゼラチンまたは卵アルブミンとセルロース硫酸カリのそれぞれの複合コロイドの例を挙げ、一致しない場合の理由として特殊な結合、ある種のイオン交換反応、その他の二次的の反応に関する推論を示している。

米蛋白質と米澱粉の混合液のコロイド滴定において、米蛋白質濃度の高い範囲で成分よりの加成的計算値と測定値が一致せず、低い範囲で比較的一致した (第 6 図)。また一致する範囲の濃度と混合比によって調製した混合液においては、広い pH 範囲で加成的計算値と測定値とが一致した (第 7, 8 図)。一致しない場合、どのような複雑な結合反応が進行したものか、その有無および種類について推論以外に知り得ないのであるが、一致する場合には正常なコロイドイオン間結合以外の結合反応は起

こっていないとすることができる。

コロイド滴定の結果によれば、米蛋白質と米澱粉の荷電が互に異符号となるのは pH 6.5 付近から下の酸性域である。ここで米蛋白質-米澱粉混合液が、加成的計算値と測定値の一致を示すことは (第 7, 8 図), 標準コロイドと試料 (米蛋白質と米澱粉) 間のコロイドイオンのな量論的結合が起こったことを意味するが、両試料間にこのような結合が存在するかどうかについては、何の手掛りをも与えることにはならない。しかし、仮りに両試料間にコロイドイオンの結合が実際に存在する場合は、コロイド滴定法によれば、やはり第 7, 8 図と同じ結果を与えるであろう。

前報⁽¹⁾によれば、蛋白質 (米蛋白質と α -カゼイン) と米澱粉間に、粘度に関して pH の高い範囲で相互作用が認められず (米蛋白質では pH 10, α -カゼインでは pH 6), 酸性で相互作用が認められた (米蛋白質, α -カゼインともに pH 3)。この結果、蛋白質の等電点を中心とした上下域で相互作用が変化し、両溶質荷電が互に異符号になったときに相互作用が起こるものであろうとの推論を行なった。

以上を約言すれば次のとおりである。

(1) 粘度法によれば、pH 3.0 において米蛋白質と米澱粉間に分子のデメンジョンが長くなるような相互作用が認められ、これは両溶質間に異符号荷電による引き合う力が作用するためとの推論が成立した。

(2) コロイド滴定法によれば、pH 3.0 における異符号荷電のコロイドイオンの結合は、標準コロイドと試料 (米蛋白質および米澱粉) 間に確かに進行したことが認められたが、試料間 (米蛋白質と米澱粉) でも結合が起こる可能性を否定するものではない。

この結果、pH 3.0 において、米蛋白質と米澱粉間にはコロイドイオンの結合とは断じ得ないにしても、分子のデメンジョンに影響を与える程度の異符号荷電による引き合う力が作用しているといえる。また互に異符号荷電となる範囲では、同様な相互作用が存在するのではないかと推定される。

要 約

コロイド滴定法によって検討した結果、次のことが判明した。

(1) 米澱粉は pH 1~12 の範囲で弱く負に荷電を有していた。また米蛋白質は pH 6.5 付近を中心として、酸性側では正に、塩基性側では負に荷電していた。

(2) 米蛋白質と米澱粉の混合液のコロイド滴定によれば、両者間にコロイドイオンの結合が進行する可能性を否定するものではなかった。

(3) pH 3.0 における粘度法の結果⁽¹⁾と対照することにより、pH 3.0 においては、異符号荷電による引力が分子のデメンジョンに影響を与えていると結論した。またこのような相互作用が、pH 3.0 以外の酸性域 (米蛋白質と米澱粉が異符号荷電となる範囲) で起こり得るのではないかと推論した。

本報告を終了するにあたり、終始御指導と御鞭撻を賜った東京大学坂口謹一郎名誉教授、御懇篤なる御指導と本稿の御校閲を賜った東京大学古賀正三教授に謹んで感謝の意を表する。また、試薬ならびに実験について御助言を賜った国税庁醸造試験所秋山裕一博士、御高配を賜った本社取締役茂木正利博士、中央研究所長横塚 保博士、発表を許可された取締役各位に深謝する。

本報告の概要は昭和 40 年 10 月、日本農芸化学会関東支部大会で講演した。

- (1) 竹内五男, 島田 潔, 中村精二: 農化, **41**, 260 (1967).
- (2) 竹内五男, 島田 潔, 中村精二: 農化, **39**, 59 (1965).
- (3) H. Mitsuda, K. Yasumoto, K. Murakami, T. Kusano and H. Kishida: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 293 (1967).
- (4) 竹内五男, 島田 潔, 中村精二: 農化, **42**, 33, 40 (1968).
- (5) 寺山 宏: 化学の研究 (山崎一雄・江上不二夫編), 朝倉書店, 第 1 集, 1948, p. 75; 第 4 集, 1949, p. 31; 現代膠質学の展望 (鮫島実三郎編), 学術図書出版, 第 1 集, 1948, p. 1; *J. Polymer Sci.*, **8**, 243 (1952).
- (6) 寺山 宏: 化学の領域, **2**(3), 85 (1948).
- (7) P. Ehrlich: *Arch. mikroskop. Anat. Entwickl.*, **1877**, p. 13.
- (8) 寺山 宏: 日化, **78**(9), 1261 (昭 32).
- (9) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. Lewisfarr and R. T. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- (10) 竹内五男, 島田 潔: 農化, **39**, 89 (1965).