

生もとづくりが日本酒の品質に及ぼす影響

(生もとづくりでは日本酒のペプチド量が多くなる)

古来伝承の技法である生もとづくりが日本酒の品質上重要であることが、当社総合研究所副所長溝口博士により酵母のアルコール耐性の面から、すでに学術的に実証されています。さらにこのたび、同じく当社総合研究所の家村らのグループにより、生もとづくりでは日本酒の旨味と関連の深いペプチド量が多くなること、そしてその原因が生もとに多く含まれるアミノ酸にあることが、科学的に証明されました。以下、家村博士(京都大学農学博士)の博士論文から、その一部をご紹介します。

第 1 節 速醸もとにおいてアミノ酸が少ない原因

清酒醸造における代表的な酒母（もと）は速醸もとと生もとであり、いずれのもとも仕込む際に、米麴と蒸米と仕込み水が一定の比率で混合される。速醸もとを仕込む際には、短期間に酵母を培養するため、さらに乳酸と酵母が添加される。従って速醸もとでは仕込み初期から pH3.6 前後の酸性条件下で、麴の酵素により蒸米が消化される。このようにして製造される速醸もとでは、米から多量の窒素成分が溶出するにもかかわらずアミノ酸の生成量はきわめて少ないことが知られている。¹⁾本節では、何故速醸もとではアミノ酸の生成量が少ないのか、その原因について検討を行った。²⁾

実験方法

速醸もとと無菌速醸もと 速醸もとは、酒造工場において常法により実用スケールで製造した。また速醸もとにおける酵母によるアミノ酸の取込量を推定するため、同じ原料を用いて無菌の速醸もとを実験室スケールで製造した。微生物の増殖を防ぐため、原料 1 kg（白米換算）に対し 4 g のアジ化ナトリウムを添加して無菌の速醸もとを製造した。

アミノ酸とペプチド濃度の測定方法 5 ml の試料に対して 5% のトリクロロ酢酸 5 ml を添加後、ろ過により沈殿を除去し、得られた上清のアミノ酸とペプチドを測定した。遊離アミノ酸濃度はアミノ酸自動分析装置（日立）で測定した。ペプチド濃度は酸分解法により測定した。すなわち、試料を加水分解管（Pierce Co., Ltd.）に入れ、6 N HCl を加え、脱気し、110 °C で 20 h 加水分解した後アミノ酸自動分析装置で分析した。ペプチド濃度は酸分解前後におけるアミノ酸濃度の差から求めた。

米麴から酸性カルボキシペプチダーゼおよび酸性プロテアーゼの精製 酸性カルボキシペプチダーゼ活性（ACP）および酸性プロテアーゼ（AP）活性は国税庁所定分析法³⁾により測定した。麴菌 *Aspergillus oryzae* RIB128 と、精米歩合 70% の「山田錦」より調製した蒸米より米麴を製造し、三上ら⁴⁾の方法により ACP を、五味ら⁵⁾の方法により AP をそれぞれ精製した。

速醸もとからペプチドの分画 仕込み 3 日目の速醸もとを遠心分離し、酵素を失活さ

せるため上清を 60℃、10 min 加熱した後、酢酸セルロース膜 (pore size 1.0 μm、Advantec Toyo Co. Ltd.) でろ過した。ろ液から陽イオン交換樹脂 (SP-TOYOPERL, Tosoh Co., Ltd.) を用いてペプチドを分画し、凍結保存した。

蒸米から米蛋白の調製 精米歩合 60% の「山田錦」から蒸米を調製し、乾燥、粉碎した後、市販の α-アミラーゼで消化してデンプンを除去する操作を 2 回繰り返すことにより米蛋白を調製した。

米蛋白のトリプシン消化物の調製 米蛋白 (1 g) をトリプシン溶液 (0.1%) に懸濁し、pH 8.0、37℃ で 4 時間反応させた。得られたペプチド溶液をメンブランフィルター (pore size 0.45 μm) でろ過後、分画分子量 30,000 の限外ろ過膜を用いてろ過し、さらにろ液を凍結乾燥し、米蛋白のトリプシン消化物を調製した。

ペプチドの分子量分布の測定 Superdex Peptide HR10/30 カラム (Pharmacia Co. Ltd.) を用いるゲルろ過クロマトグラフィーによりペプチドの分子量分布を測定した。

ペプチドの平均鎖長の測定 ペプチドの平均鎖長は TNBS (2,4,6-trinitrobenzene-sulfonic acid) 法⁶⁾ により測定した。

$$\text{ペプチドの平均鎖長} = (a-b)/(c-b)$$

a: 酸加水分解後のアミノ酸濃度 (mM)

b: 酸加水分解前のアミノ酸 (遊離アミノ酸) 濃度 (mM)

c: TNBS 法⁶⁾ により測定した N 末端のアミノ基濃度 (mM)

結果と考察

速醸もと上清の ACP 活性とペプチド濃度 速醸もとの上清には強い ACP 活性と多量のペプチドが存在するにもかかわらず、アミノ酸の生成量は少なかった (Fig. 1)。²⁾ 何故これらのペプチドが米麹の ACP により素早く分解されないのかを明らかにするため、速醸もとのペプチドの諸性質について検討した。実験に用いた速醸もとの「湧き付き」は仕込み後 7 日目であった。「湧き付き」は酵母の増殖と発酵が急激に活発になる時期である。湧き付き以前においては、通常速醸もとと無菌速醸もとと比較して、アミノ酸濃度に差が認められなかったが、「湧き付き」後においては、アミノ酸濃度に顕著な差が認められた (Fig. 1)。この結果から、「湧き付き」以前においては、酵母によって利用されたアミノ酸量がもとに含まれるアミノ酸濃度に比較して、無視できる程度であることが分かった。そ

ここで、本研究では「湧き付き」以前のもとについて検討した。

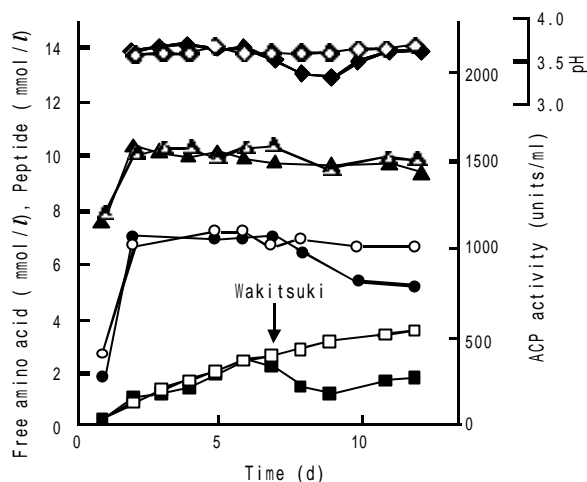


FIG. 1. Courses of pH (◇, ○), ACP activity (▲, ●), peptide content (△, ○), and free amino acid content (□, ●) in *sokujo-moto* with yeast (solid symbols), or in microorganism-free *sokujo-moto* (open symbols). The free amino acid content was assayed using an amino acid analyzer (Hitachi Co. Ltd.). The peptide content was determined from the difference in amino acid content between before and after acid hydrolysis. The *wakitsuki* of this *sokujo-moto* was determined to be on the 7th day of mashing. *Wakitsuki* is the time when the multiplication of the yeast and the fermentation increase dramatically.

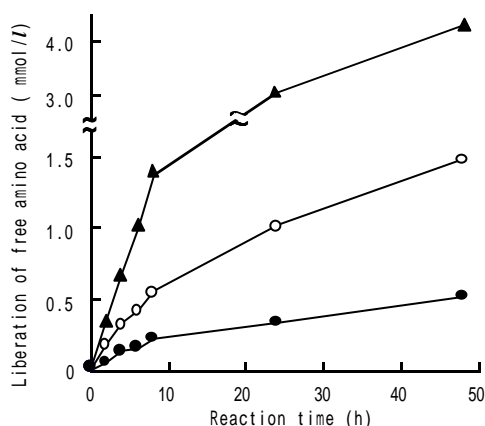


FIG. 2. Hydrolysis of the peptides fractionated from *sokujo-moto* by the ACP of rice-koji. The peptides fractionated from *sokujo-moto* were subjected to hydrolysis by the ACP and the amount of free amino acids liberated was measured (▲). The tryptic digest of rice protein (○) and Cbz-Glu-Tyr (●) were subjected to hydrolysis as control. Each substrates (20 mg) were dissolved in 9 ml of sodium lactate buffer (100 mM, pH 3.6), and hydrolyzed at 15 °C by 20,000 units of ACP purified from rice-koji.

米麹の ACP による、速醸もとより分画したペプチドの分解 イオン交換カラムクロマトグラフィーにより速醸もとの上清からペプチドを分画した。得られた速醸もとのペプチドと、米蛋白のトリプシン消化物、および合成ペプチド(Cbz-Glu-Tyr)に米麹から精製した ACP を作用させ、各基質から生成したアミノ酸の経時変化を Fig. 2 に示した。その結果、

速醸もとより分画したペプチドの分解速度は遅いことが分かった。速醸もとより分画したペプチドから生成したアミノ酸量は、Cbz-Glu-Tyr から生成する量の約 1/8 で、またトリプシン消化物から生成する量の約 1/3 であった。

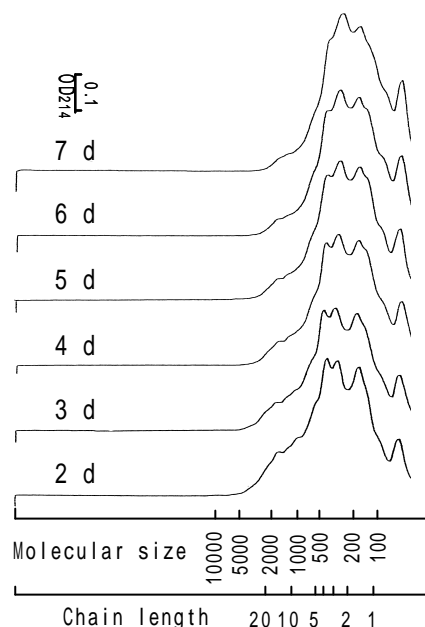


FIG. 3. Molecular size distribution of the peptides in *sokujo-moto*. Gel filtration chromatography on a Superdex Peptide HR 10/30 column (Pharmacia Co. Ltd.) was performed to ascertain the molecular size distribution of the peptides. *Sokujo-moto* was centrifuged, and the supernatant was filtered through a membrane filter (pore size 0.45 μm , Advantec Toyo Co. Ltd.). 25 μl of the filtrate was charged onto the column. Sodium acetate buffer (20 mM, pH 5.0) containing 0.2 M NaCl was used as the eluent. The molecular sizes were estimated by reference to those of the following standard peptides: cytochrome C, 12,400; aprotinin, 6,500; (Gly)₆, 360; (Gly)₃, 189; Gly, 75. The chain lengths of the peptides were estimated from the mean molecular size of the amino acids comprising the peptides in *sokujo-moto*, 125.

速醸もとのペプチドの分子量分布 ゲルろ過クロマトグラフィーにより、速醸もとのペプチドの分子量分布を測定した(Fig. 3)。その結果、速醸もとのペプチドは主に分子量 200~400 の分子量であることがわかった。速醸もとの仕込み後 2 日目においては、分子量 500~5,000 の、やや大きいペプチドも見られたが(Fig. 3)、これらのペプチドはその後減少し、7 日目にはほとんど検出されなくなった。この間、分子量 200~400 のペプチドは増加し(Fig. 3)、しかも遊離アミノ酸の生成量は少なかった(Fig. 1)。これらの結果から速醸もとの小分子ペプチド(分子量 200~400)は、米麴の ACP によって分解されにくいと推定した。また速醸もとのペプチドの平均鎖長を TNBS 法⁶⁾により測定した結果、Fig. 4 に示すように、速醸もとのペプチドの平均鎖長は 2 日目に 4.5 で、その後徐々に減少したが、7 日目になっても 2.8 より減少しなかった。これらの結果から、速醸もとのペプチドは、

主に低分子のペプチドからなることが明らかになった。

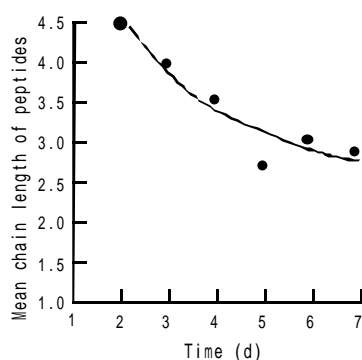


FIG. 4. Course of the mean chain length of the peptides in *sokujo-moto*. The mean chain length of the peptides in *sokujo-moto* was assayed by the TNBS method (6).

合成ペプチドに対する、米麹の ACP の加水分解作用 米麹から ACP を精製し、合成ペプチドに対する加水分解作用を調べた。結果は Table 1 に示すように、ノナペプチド (Bradykinin) やデカペプチド (Angiotensin)、あるいは -アミノ位を Cbz 基で置換したペプチド (Cbz-Glu-Tyr、Cbz-Ala-Glu) などは分解したが、ジペプチドやトリペプチドなどの小分子ペプチドは分解しなかった。また 13 残基のアミノ酸からなるペプチド Arg-Arg-Leu-Ile-Glu-Asp-Ala-Glu-Tyr-Ala-Ala-Arg-Gly に作用させたところ、Table 2 に示すように、米麹の ACP はペプチド鎖の C 末端側から分解し、アミノ酸を遊離したが、最後のトリペプチド (Arg-Arg-Leu) は分解しなかった。中台⁷⁻¹⁰⁾は *Aspergillus oryzae* 460 の液体培養液から精製した ACP はジペプチドやトリペプチドを分解しにくいことを報告している。一島¹¹⁾も *Aspergillus saitoi* R-3813 から精製した ACP がジペプチドやトリペプチドを分解しにくいことを報告している。本研究の結果から、清酒醸造で使用される米麹の ACP もジペプチドやトリペプチドを分解しにくいことが示唆された。

TABLE 1. Liberation of amino acid from various synthetic peptides by ACP purified from rice-koji, at 15 °C, pH 3.6 after 24 h

Peptides (450 μM)	Amino acid liberated (μM)
Gly-Gly	0
Gly-Leu	0
Gly-Phe	0
Glu-Glu	0
His-Leu	0
Gly-Gly-Gly	0
Leu-Gly-Gly	0
Bradykinin (RPPGFSPFR)	271
Angiotensin (DRVYIHPFHL)	290
Cbz-Glu-Tyr	346
Cbz-Ala-Glu	146

TABLE 2. Liberation of amino acids from the peptide, Arg¹-Arg²-Leu³-Ile⁴-Glu⁵-Asp⁶-Ala⁷-Glu⁸-Tyr⁹-Ala¹⁰-Ala¹¹-Arg¹²-Gly¹³, by ACP purified from rice-koji, at 15 °C, pH 3.6

		Reaction time				
		6 h	24 h	48 h	72 h	96 h
C-terminal ↓	Gly ¹³	26	67	92	104	100
	Arg ¹²	18	56	78	84	85
	Ala ¹¹	(8)	(52)	(89)	(93)	(102)
	Ala ¹⁰	(8)	(52)	(89)	(93)	(102)
	Tyr ⁹	6	47	60	91	109
	Glu ⁸	(4)	(32)	(73)	(82)	(84)
	Ala ⁷	(8)	(52)	(89)	(93)	(102)
	Asp ⁶	6	49	87	93	99
	Glu ⁵	(4)	(32)	(73)	(82)	(84)
	Ile ⁴	0	17	49	45	52
	Leu ³	0	0	0	0	0
Arg ²	0	0	0	0	0	
N-terminal	Arg ¹	0	0	0	0	0

The concentration of Gly¹³ after 96 h was assumed to be 100, and the relative values are indicated.

Alanine and glutamic acid comprise three or two residues in the peptide chain, so the concentrations of these amino acids liberated from the peptide were divided by the number of their residues and indicated in ().

Arginine liberated from the peptide was presumed to be Arg¹², since Leu³ was not liberated at all, on the other hand, Ala, Tyr⁹, Glu and Asp⁶ were liberated in significant quantities.

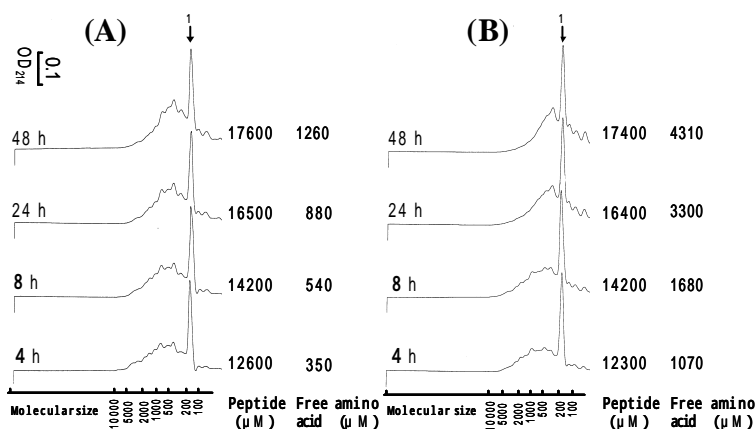


FIG. 5. Liberation of peptides and free amino acids from rice protein at 15 °C, pH 3.6, by the AP and ACP purified from rice-koji. Rice protein (500 mg) was suspended in sodium lactate buffer (100 mM, pH 3.6, 100 ml) containing 600 units/ml of AP and 17 units/ml of ACP (Fig. 5A), or 600 units/ml of AP and 1,600 units/ml of ACP (Fig. 5B). (The enzyme activity levels of AP and ACP in the supernatant of *sokujo-moto* are approximately 600 units/ml and 1,600 units/ml, respectively.) The reaction mixture was incubated at 15 °C for 48 h, centrifuged at 18,000 × g for 10 min, and gel filtration chromatography on a Superdex Peptide HR 10/30 column (Pharmacia Co. Ltd.) was performed to ascertain the molecular size distribution of the peptides liberated into the supernatant. Their molecular sizes were estimated as the legend of Fig. 3. Arrow 1 indicates sodium lactate contained in the reaction mixture. Free amino acid content was assayed using an amino acid analyzer (Hitachi Co. Ltd.), and the peptide content was determined from the difference in amino acid content between before and after acid hydrolysis.

米麹の AP と ACP による、米蛋白から低分子ペプチドの生成 速醸もとの低分子ペプチドが米麹の AP の作用により生成されるのかどうかを明らかにするため、米麹から精製した AP(600 units/ml)を用い、15 ℃、pH 3.6 で 48 h 米蛋白を消化した。その結果 Fig.5A に示すように米麹の AP は主に分子量 300~600 のペプチドを生成した。低レベルの ACP 活性(17 units/ml、速醸もと上清に含まれる活性の約 1/100)が反応液中に検出されたが、遊離のアミノ酸の生成量はペプチドの生成量の約 1/10 であった(Fig. 5A)。従って分子量 300~600 のペプチドは主に AP の作用により米蛋白から生成すると推定した。次に AP(600 units/ml)と ACP(1,600 units/ml)を同時に米蛋白に作用させると、主に分子量 200~400 の低分子のペプチドが生成し、またこのときの遊離のアミノ酸の生成量はペプチドの生成量の 1/4 以下であった(Fig. 5B)。これらの結果から、速醸もとでは、AP が米蛋白から分子量 300~600 のペプチドを生成し、さらに ACP がこれらのペプチドのうち比較的分子量の大きいペプチドを低分子のペプチドに分解し、その結果主に分子量 200~400 の低分子のペプチドが生成すると推定した。

要約

速醸もとの上清には、強い酸性カルボキシペプチダーゼ(ACP)活性と、多量のペプチドが存在した。しかしながら遊離のアミノ酸の生成量は少なかった。何故これらのペプチドが ACP によって分解されにくいのか、その理由を明らかにするために速醸もとに含まれるペプチドの性質について検討を行った。イオン交換カラムクロマトグラフィーにより速醸もとよりペプチドを分画して ACP を作用させたところ、このペプチドは米麹の ACP によって分解を受けにくかった。ゲルろ過クロマトグラフィーにより速醸もとのペプチドの分子量分布を調べたところ、分子量は約 200~400、またペプチドの鎖長は約 2~3 であり、低分子のペプチドが主成分であった。米麹から ACP を精製し種々の合成ペプチドに作用させたところ、米麹の ACP はジペプチドやトリペプチドなどの低分子のペプチドを分解しにくいことが判った。また米麹より酸性プロテアーゼ(AP)を精製し、酸性条件下(速醸もとと同じ pH 3.6)で 15 ℃、48 時間、米蛋白に作用させたところ、分子量約 300~600 以上のペプチドが主に生成し、AP と ACP を同時に作用させると分子量約 200~400 のペプチドが生成した。以上の結果から、速醸もとでは米蛋白から主に麹菌の AP の作用により低分子の

ペプチドが生成し、一方麹菌の ACP はジペプチドやトリペプチドなどの低分子ペプチドを分解しにくい性質を持つため、アミノ酸の生成速度が遅いと推定した。

文献

- 1) 秋山裕一：農化, 31, 913(1957).
- 2) Iemura, Y., Yamada, T., Takahashi, T., Furukawa, K., and Hara, S.: J. Biosci. Bioeng., 88, 276(1999).
- 3) 国税庁所定分析法注解委員会編：第4回改正国税庁所定分析法注解, p148(1993).
- 4) 三上重明, 三浦 治, 渡辺高年, 渡辺健一, 岩野君夫, 椎木 敏, 島田豊明, 布川弥太郎：醗酵工学, 65, 37(1987).
- 5) Gomi, K., Arikawa, K., Kamiya, N., Kitamoto, K., and Kumagai, C.: Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1095(1993).
- 6) Silvestre, M., Hamon, M., and Yvon, M.: J. Agric. Food Chem., 42, 2778(1994).
- 7) Nakadai, T., Nasuno, S., and Iguchi, N.: Agr. Biol. Chem., 36, 1343(1972).
- 8) Nakadai, T., Nasuno, S., and Iguchi, N.: Agr. Biol. Chem., 36, 1473(1972).
- 9) Nakadai, T., Nasuno, S., and Iguchi, N.: Agr. Biol. Chem., 36, 1481(1972).
- 10) Nakadai, T., Nasuno, S., and Iguchi, N.: Agr. Biol. Chem., 37, 1237(1973).
- 11) Ichishima, E.: Biochim. Biophys. Acta, 258, 274(1972).

第2節 生もとにおけるアミノ酸の増加原因

生もとでは、速醸もと¹⁾と異なり、もとを酸性条件に導くために伝統的手法に従い乳酸菌による自然醗酵が利用される。生もとの仕込み後1-6日目、いわゆる打瀬期間、もとのpHは6.0付近であるが、その後乳酸菌の働きにより、pHは徐々に低下する。そしてこのとき、多量の遊離アミノ酸(速醸もとの約3倍)が生成することが知られている。秋山²⁻⁴⁾は生もとでは打瀬期間に蒸米から水不溶、乳酸可溶性のTCA不溶性窒素化合物が生成し、この窒素化合物が多量のアミノ酸の生成と関連すると推定した。近年筆者は、⁵⁾生もとの仕込み後7-10日目に多量のTCA不溶性蛋白が生もとの上清中に溶出することを見出した。このTCA不溶性蛋白の生成は、SDS-PAGE⁶⁾あるいはTSKgel G2000swxl(Tosoh Co.)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより確認した。また、この蛋白は生もとで特異的に現れる蛋白であり、速醸もとや清酒醪では全く認められなかった。本節では、この蛋白とアミノ酸の生成との関係、およびこの蛋白の生成条件について検討を行った。⁵⁾

実験方法

生もと 生もとは、酒造工場において伝統的手法により実用スケールで製造した。

遊離アミノ酸、TCA可溶性ペプチドおよびTCA不溶性蛋白の定量 5 mlの試料に対して5%のトリクロロ酢酸5 mlを添加後、ろ過により沈殿を除去し、得られた上清の遊離アミノ酸とTCA可溶性ペプチドを以下のように測定した。遊離アミノ酸濃度はアミノ酸自動分析装置(日立)で測定した。ペプチド濃度は酸分解法により測定した。すなわち、試料を加水分解管(Pierce Co., Ltd.)に入れ、6 N HClを加え、脱気し、110 °Cで20 h加水分解した後アミノ酸自動分析装置で分析した。TCA可溶性ペプチド濃度は酸分解前後におけるアミノ酸濃度の差から求めた。TCA不溶性蛋白は、トリクロロ酢酸5 mlを添加する前と後における、ろ液の窒素量の差から求めた。

ペプチドおよび蛋白の分子量分布の測定 TSKgel G2000swxl(Tosoh Co.)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより、ペプチドおよび蛋白の分子量分布を測定した。

生もと上清からTCA不溶性蛋白の分画 仕込み後9日目の生もと100 mlを18,000 × g、15分間、遠心分離し、酵素を失活させるため得られた上清を60 °Cで10分間加熱した。加熱した上清を酢酸セルロースフィルター(pore size 1.0 μm)でろ過後、40%飽和の硫

安で沈殿分画した。得られた沈殿を 50 ml の、25% グルコースを含む 20 mM 乳酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)に溶解させ、同じ緩衝液で透析した。

米麹から粗酵素の調製 精米歩合 70% の「山田錦」から調製した蒸米と麹菌 RIB128 を用い、常法により米麹を調製した。米麹 1 kg から、0.5% NaCl を含む 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)により粗酵素を抽出した。20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)に対して透析後、分画分子量 10,000 の限外ろ過膜(Amicon Co.)により 50 ml まで濃縮した。

米麹から抽出した粗酵素による、生もと上清から分画した TCA 不溶性蛋白の消化試験

生もと上清から分画した TCA 不溶性蛋白 (25% グルコースを含む 20 mM 乳酸ナトリウム緩衝液(pH 4.0)に溶解させた 0.5 mg-N/ml 溶液) に、米麹から抽出した粗酵素(ACP として 1,600 units/ml)を 15 、4 日間作用させた。反応後、反応液の遊離アミノ酸、TCA 可溶性ペプチドおよび TCA 不溶性蛋白を定量した。

米蛋白の消化試験 0.1 g の米蛋白を 5 ml の 100 mM 乳酸緩衝液 (pH 3.5-6.0、グルコース濃度 0~50%) に懸濁し、1 ml の粗酵素液を加え、37 、20 h、振とうさせながら消化した。反応後ろ紙(Advantec, No. 5C)でろ過し、SDS-PAGE⁶⁾による分析、あるいは遊離アミノ酸、TCA 可溶性ペプチドおよび TCA 不溶性蛋白濃度の分析に供した。またろ液のペプチドおよび蛋白の分子量分布を測定するため、TSKgel G2000swxI を用いたゲルろ過クロマトグラフィーを行った。

米蛋白から TCA 不溶性蛋白を溶出させる酵素の精製 米蛋白から TCA 不溶性蛋白を溶出させる酵素の活性測定は以下のように行った。0.1 g の米蛋白を 5 ml の 100 mM 乳酸緩衝液 (pH 4.5、グルコース濃度 25%) に懸濁し、1 ml の粗酵素液を加え、37 、20 h、振とうさせながら反応をおこなった。反応後ろ紙(Advantec, No. 5C)でろ過し、Coomassie brilliant blue 染色法⁷⁾により、米蛋白からろ液中に溶出した TCA 不溶性蛋白量を測定した。米麹から抽出した粗酵素を DEAE-Toyoperl (Tosoh Co.)カラムによるイオン交換クロマトグラフィー、続いて Sephacryl S-200(Pharmacia Co.)カラムを用いるゲルろ過クロマトグラフィー、最後に Butyl-Toyoperl (Tosoh Co.)カラムを用いる疎水クロマトグラフィーにより精製し、SDS-PAGE⁶⁾において単一の酵素を得た。

結果

生もとにおける TCA 不溶性蛋白と遊離アミノ酸の生成 生もとの仕込み 1-6 日目、い

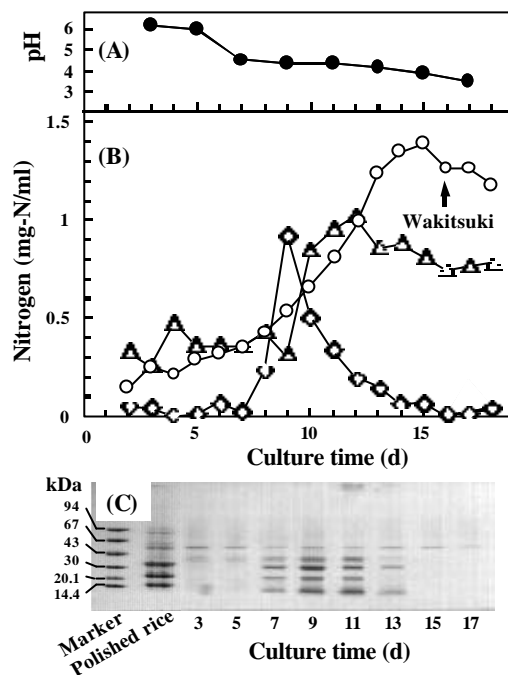


FIG. 1. Courses of pH, content of free amino acids and content of peptides in the supernatant of *kimoto*. (A) pH. (B) Content of free amino acids (○), TCA-soluble peptides (△) and TCA-insoluble peptides (◇). (C) SDS-PAGE analysis of the supernatant. *Wakitsuki* is the point in time when the multiplication of yeast and the fermentation by yeast become marked.

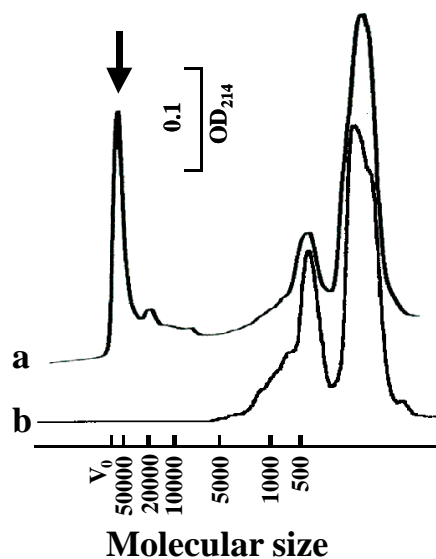


FIG. 2. Molecular size distribution of peptides in the supernatant of *kimoto* (a) and *sokujo-moto* (b). Gel filtration chromatography using TSKgel G2000swxl (Tosoh Co.) packed in a 7.8 mm I.D. × 30 cm column was performed to ascertain the molecular size distribution of peptides. *Kimoto* (on the 9th day of mashing) and *sokujo-moto* (on the 3rd day of mashing) were centrifuged, and the supernatants were filtered with a membrane filter (pore size 0.45 μm , Advantec Toyo Co. Ltd.). Twenty five μl of the filtrate was charged onto the column and 45% acetonitrile containing 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) was used as the eluent. Arrow indicates the main peak of TCA-insoluble peptides. Their molecular sizes were estimated on the bases of those of the following standard peptides: bovine serum albumin, 67,000; chymotrypsinogen A, 25,000; ribonuclease A, 13,700; aprotinin, 6500; bradykinin, 1060; and (Gly)₆, 360.

わゆる打瀬期間、もとの pH は 6.0 付近であった(Fig. 1A)。7-10 日目、もとの pH は徐々に 4.5 まで低下し、そのとき多量の TCA 不溶性蛋白が生もとの上清に溶出した(Fig. 1B)。この TCA 不溶性蛋白は Fig. 1C に示すように、SDS-PAGE において 5 つの蛋白(12、21、31、38 および 55 kDa)からなっていた。また TSKgel G2000swxl を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにおいて、分子量 10,000 以上の高分子蛋白が多量に検出された(Fig. 2)。これらの蛋白のうち 4 つの蛋白 (Fig. 1C に示した SDS-PAGE で見られる蛋白のうち 12、21、31 および 38 kDa の 4 つの蛋白) は、生もとで特異的に現れる蛋白であり、速醸もとや清酒醪では全く見られなかった。これらの 4 つの蛋白は 10 日目以後、徐々に消滅し(Fig. 1C)、それと同時に多量の遊離アミノ酸が生成した(Fig. 1B)。以上の現象から、生もとの 7-10 日目に多量に溶出する TCA 不溶性蛋白が、多量のアミノ酸の生成と関係する可能性が考えられた。

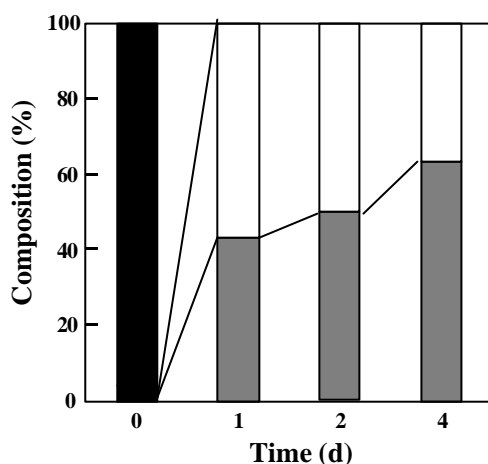


FIG. 3. Digestion test of TCA-insoluble peptides fractionated from the supernatant of *kimoto* with crude enzyme extracted from rice-koji. A solution of TCA-insoluble peptides fractionated from the supernatant of *kimoto* (0.5 mg-nitrogen/ml solution dissolved in 20 mM sodium lactate buffer, pH 4.0, containing 25% glucose) was incubated with crude enzyme extracted from rice-koji (1600 units/ml as ACP) at 15°C for 4 d. The reaction mixture was analyzed for the contents of TCA-insoluble peptides, TCA-soluble peptides and free amino acids. The course of the composition (%) of TCA-insoluble peptides (■), TCA-soluble peptides (□) and free amino acids (■) is indicated.

米麹の粗酵素による、生もと上清から分画した TCA 不溶性蛋白から遊離アミノ酸の生成

9 日目の生もと上清から分画した TCA 不溶性蛋白に、米麹から抽出した粗酵素を作用させたところ、Fig. 3 に示すように多量の遊離アミノ酸が生成した。TCA 不溶性蛋白は、その 60% が遊離アミノ酸に加水分解され、40% が TCA 可溶性ペプチドに低分子化された。この比率は生もとの 15 日目 (湧き付き前) のそれとほぼ一致した。以上の結果から、生もと上清に生成する TCA 不溶性蛋白が多量のアミノ酸の生成と関連すると推定した。

米蛋白から TCA 不溶性蛋白が溶出する反応条件

実験方法で述べた方法により、pH 4.5

で米蛋白の消化試験を行った。麴の酵素と 25% のグルコースが存在するとき、9 日目の生もと上清に見られる蛋白 (Fig. 4, lane 2) と同じ蛋白が反応る液中に検出された (Fig. 4, lane 3)。しかし、反応液中にグルコースが存在しないときはその蛋白は現れなかった (Fig. 4, lane 4)。一方、グルコースが存在しても、米麴の酵素が存在しないとその蛋白は現れなかった (Fig. 4, lane 5)。以上の結果から、米蛋白から TCA 不溶性蛋白が溶出するには、25% のグルコースの存在下で米麴の酵素が作用する必要があることが判明した。

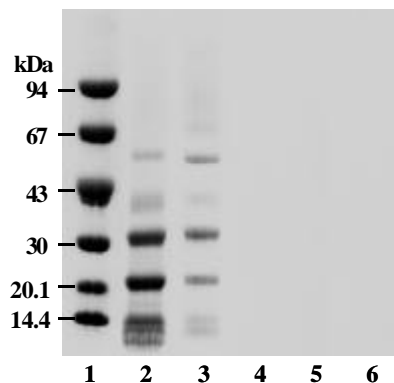


FIG. 4. Digestion test of rice protein. Rice protein (0.1 g) and 5 ml of 100 mM sodium lactate buffer (pH 4.5) were incubated with 1.0 ml of crude enzyme extracted from rice-koji, in the absence or presence of glucose (25%), at 37°C for 20 h with shaking. The reaction mixture was filtered with filter paper (Advantec, no. 5C). The filtrate was analyzed by SDS-PAGE. Lanes: 1, molecular size marker; 2, supernatant of *kimoto* on the 9th day of mashing; 3, in the presence of glucose (25%) with enzyme; 4, in the absence of glucose with enzyme; 5, in the presence of glucose (25%) without enzyme; 6, in the absence of glucose without enzyme.

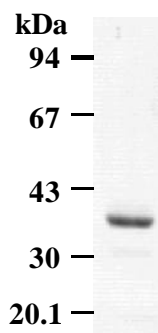


FIG. 5. SDS-PAGE analysis of purified enzyme liberating TCA-insoluble peptides from rice protein.

米蛋白から TCA 不溶性蛋白を溶出させる酵素の精製

Aspergillus oryzae RIB128 を

用いて調製した 1 kg の米麴より、米蛋白から TCA 不溶性蛋白を溶出させる酵素を精製した。精製酵素の分子量は SDS-PAGE において 36 kDa であり (Fig. 5)、*Aspergillus oryzae* の酸

性プロテアーゼの分子量と一致した。⁸⁾さらに、本酵素の精製過程において米蛋白から TCA 不溶性蛋白を溶出させる酵素の活性が見られるときは必ず酸性プロテアーゼ活性が認められ、しかも精製酵素は強い酸性プロテアーゼ活性を持っていた。以上の結果から、米蛋白から TCA 不溶性蛋白を溶出させる酵素は麹菌の酸性プロテアーゼであると推定した。以下の実験は、ここで精製した酵素を用いて行った。

米蛋白から TCA 不溶性蛋白の溶出に及ぼすグルコース濃度の影響 pH 4.5、酵素濃度 600 units/ml (酸性プロテアーゼとして) の条件下で、米蛋白から TCA 不溶性蛋白の溶出に及ぼすグルコース濃度の影響を検討した。グルコース濃度が 20% 以上のとき、多量の TCA 不溶性蛋白が反応液上清中に溶出した (Fig. 6A)。またこのとき TSKgel G2000swxl を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにおいて、分子量 10,000 以上の高分子蛋白が検出された (Fig. 6B)。これらの結果から TCA 不溶性蛋白の溶出には 20% 以上のグルコースが必要であることが明らかになった。マルトースとソルビトールにも、グルコースと同様の効果が認められたことから (Fig. 7)、他の糖類にもグルコースと同様の効果があることが示唆された。

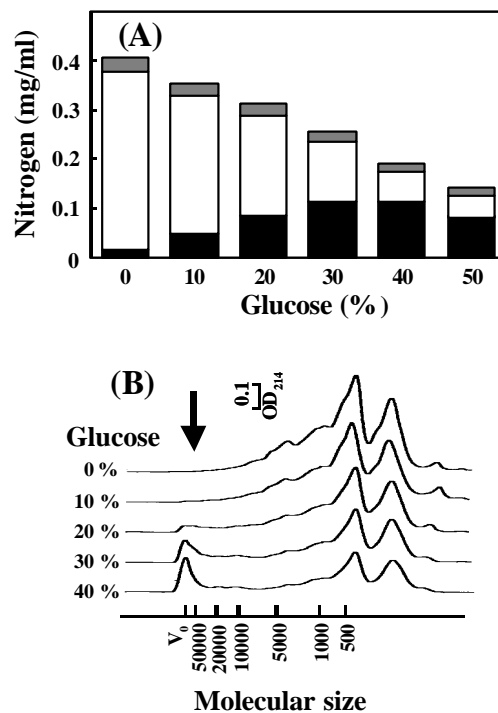


FIG. 6. Effects of concentration of glucose on the liberation of TCA-insoluble peptides from rice protein. (A) Amounts of TCA-insoluble peptides (■), TCA-soluble peptides (□) and free amino acids (▒) liberated from rice protein. (B) Molecular size distribution of peptides. Rice protein (0.1 g), 5 ml of 100 mM sodium lactate buffer (pH 4.5), and 1.0 ml of purified enzyme (3600 units/ml as AP) were incubated with glucose (0-50%), at 37°C for 20 h with shaking. The reaction mixture was filtered with filter paper (Advantec, no. 5C). The filtrate was determined for the contents of TCA-insoluble peptides, TCA-soluble peptides and free amino acids. The molecular size distribution of peptides in the filtrate was assayed by gel filtration chromatography as described in the legend of FIG. 2. Arrow indicates the main peak of TCA-insoluble peptides.

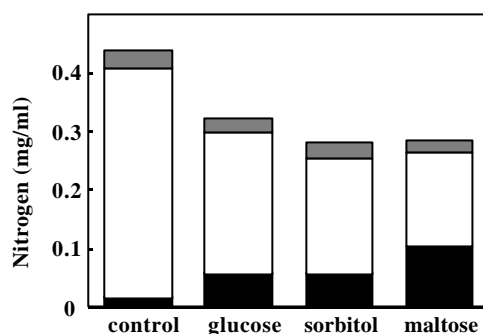


FIG. 7. Effects of sugars on the liberation of TCA-insoluble peptides from rice protein. Rice protein (0.1 g), 5 ml of 100 mM sodium lactate buffer (pH 4.5), and 1.0 ml of purified enzyme (3600 units/ml as AP) were incubated with 1 M of sugars, at 37°C for 20 h with shaking. The reaction mixture was filtered with filter paper (Advantec, no. 5C). The filtrate was determined for the contents of TCA-insoluble peptides (■), TCA-soluble peptides (□) and free amino acids (▒).

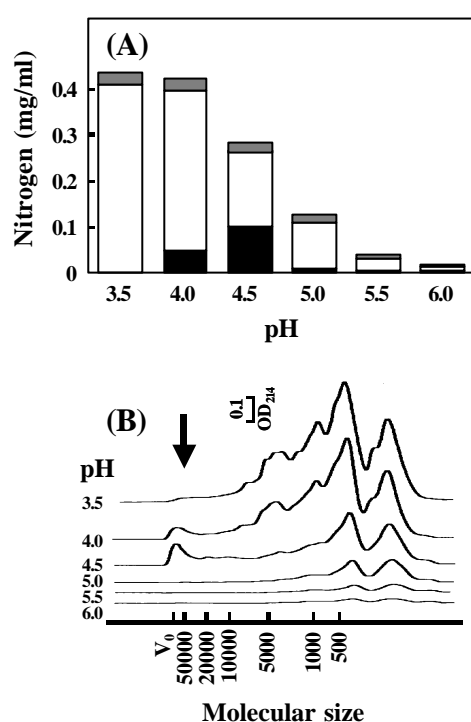


FIG. 8. Effects of pH on the liberation of TCA-insoluble peptides from rice protein. (A) Amounts of TCA-insoluble peptides (■), TCA-soluble peptides (□) and free amino acids (▒) liberated from rice protein. (B) Molecular size distribution of peptides. Rice protein (0.1 g) and sodium lactate buffer (pH 3.5-6.0, 100 mM, 5 ml) were incubated with 1.0 ml of purified enzyme (3600 units/ml as AP) in the presence of glucose (25%) at 37°C for 20 h with shaking. The reaction mixture was filtered with filter paper (Advantec, no. 5C). The filtrate was analyzed as described in the legend of FIG. 6.

米蛋白から TCA 不溶性蛋白の溶出に及ぼす pH の影響 グルコース濃度 25%、酵素濃度 600 units/ml (酸性プロテアーゼとして) の条件下で、米蛋白から TCA 不溶性蛋白の溶出に及ぼす pH の影響を検討した (Fig. 8A)。TCA 不溶性蛋白は pH 4.5 付近の限られた pH 条件下においてのみ米蛋白から生成し、速醸もととほぼ同じ pH 3.5 では全く生成しないことが分かった。生成したペプチドおよび蛋白の分子量分布を見るため TSKgel G2000swxl を用

いたゲルろ過クロマトグラフィーを行った(Fig. 8B)。その結果 pH 4.5 においては分子量 10,000 以上の蛋白が多量に生成したが、速醸もととほぼ同じ pH 3.5 では全く生成しなかった。

考察

生もとの 7-10 日目、もとの pH が 4.5 前後まで低下したとき、多量の TCA 不溶性蛋白がもとの上清に溶出した。この TCA 不溶性蛋白は、SDS-PAGE において 5 つの蛋白(12、21、31、38 および 55 kDa)からなっていた。これらの蛋白のうち 4 つの蛋白(12、21、31 および 38 kDa)は、生もとで特異的に現れる蛋白であり、速醸もとや清酒醪では全く見られなかった。米麹の酵素により、この蛋白から多量の遊離アミノ酸が生成すること、またこの蛋白は、20% 以上の濃度のグルコースの存在下で限られた pH 条件(pH 4.5 前後)のもとで、米麹の酵素作用により、米蛋白から生成することが分かった。さらにこの酵素を米麹から精製した結果、麹の酸性プロテアーゼであると推定した。

米の貯蔵蛋白は、胚乳細胞の 2 種類のプロテインボディ、PB および PB に集積されている。⁹⁾ 米のプロラミンは 10、13 および 16 kDa の 3 種のポリペプチドからなり、全て PB に集積されている。¹⁰⁾ また米のグルテリンは、22~23 kDa と、37~39 kD の 2 種のポリペプチドとして PB に集積されている。¹¹⁾ 一方、生もとの上清に溶出した蛋白のうち 3 つの蛋白(12、21 および 38 kDa) は米のプロテインボディのポリペプチドとほぼ同じ分子量を示した。従って生もとでは、米蛋白のポリペプチドが米麹の酸性プロテアーゼにより部分的に切断され、その結果 TCA 不溶性の蛋白としてもとの上清に溶出すると推定した。さらに、生もとでは以下のようにして高濃度のアミノ酸が生成すると推定した。すなわち、生もと 1~6 日目の打瀬期間においては、酒母の pH は 6.0 前後であり酸性プロテアーゼは活性化していない。しかし米デンプンの溶解は進み高濃度のグルコースが生成する。7~10 日目に乳酸菌の働きにより生もとの pH は 4.5 前後まで低下する。このとき、米麹の酸性プロテアーゼが徐々に活性化される。しかし高濃度のグルコースによる影響により酸性プロテアーゼの活性化が不十分であるために、米蛋白から低分子ペプチドへ速やかな分解が起こらず、TCA 不溶性の蛋白が生成する。その結果、この蛋白が酸性カルボキシペプチダーゼの作用を受けて遊離のアミノ酸が多量に生成すると推定した。一方速醸もとでは、前節で述べたように、育成当初から麹菌の酸性プロテアーゼの至適 pH 条件であり、米蛋白は低

分子ペプチドへ速やかに分解され、生成した低分子ペプチドは麹菌の酸性カルボキシペプチダーゼの作用を受けにくいため、遊離アミノ酸が生もとの3分の1程度しか生成しないと推定した。¹⁾

要約

仕込み後7~10日目の生もとの上清中に、多量のTCA不溶性蛋白が溶出することを見出した。これらのTCA不溶性蛋白は、SDS-PAGEによる分析の結果、12、21、31、38および55 kDaの5つの蛋白からなっていた。また、TSKgel G2000swxlカラム(東ソー)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーの結果、分子量10,000以上の高分子蛋白が多量に認められた。これらの蛋白のうち12、21、31、および38 kDaの4つの蛋白は生もとに特異的に現れる蛋白であり、速醸もとや、清酒醪では全く認められなかった。この蛋白を生もとの上清より分画して麹の酵素を作用させたところ、多量の遊離のアミノ酸を生成したことから、この蛋白は生もとにおける多量のアミノ酸の生成と関連があると推定した。米蛋白から、このTCA不溶性蛋白を反応液上清に溶出させるには、麹の酵素が必要であった。米蛋白からこの蛋白を反応液上清に溶出させる酵素を米麹から精製したところ、麹の酸性プロテアーゼと同一の酵素であると推定した。また、米蛋白から、この蛋白を反応液上清に溶出させるには、反応液中に高濃度(約20%以上)のグルコースの存在が必須であった。さらにこのTCA不溶性蛋白は、pH4.5前後の限られたpH条件下においてのみ、米蛋白より反応液上清に溶出することが判明した。

文献

- 1) Iemura, Y., Yamada, T., Takahashi, T., Furukawa, K., and Hara, S.: J. Biosci. Bioeng., 88, 276(1999).
- 2) 秋山裕一: 農化, 31, 913(1957).
- 3) 秋山裕一: 農化, 32, 355(1958).
- 4) 秋山裕一: 農化, 32, 526(1958).
- 5) Iemura, Y., Takahashi, T., Yamada, T., Furukawa, K., and Hara, S.: J. Biosci. Bioeng., 88, 531(1999).

- 6) Laemmli, U. K.: *Nature*, 227, 680 (1970).
- 7) Bradford, M.: *Anal. Biochem.*, 72, 248(1976).
- 8) Gomi, K., Arikawa, K., Kamiya, N., Kitamoto, K., and Kumagai, C.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1095(1993).
- 9) Tanaka, K., Sugimoto, T., Ogawa, M., and Kasai, Z.: *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1633 (1980).
- 10) Hibino, T., Kidzu, K., Masumura, T., Ohtsuki, K., Tanaka, K., Kawabata, M., and Fujii, S.: *Agric. Biol. Chem.*, 53, 513(1989).
- 11) Yamagata, H., Tanaka, K., and Kasai, Z.: *Agric. Biol. Chem.*, 46, 321(1982).

第 3 節 酒母の種類が清酒のペプチド量に及ぼす影響

日本酒には遊離のアミノ酸だけでなく多量のペプチドが含まれており、¹⁾日本酒の旨味に重要な役割を果たしていることが知られている。²⁾また近年、日本酒に含まれるペプチドから多くの生理活性物質、例えばアンジオテンシン 変換酵素阻害ペプチドやプロリルエンドペプチダーゼ阻害ペプチドなどが発見され、日本酒のペプチドが持つ機能が注目されている。³⁻⁵⁾本章では、生もと⁶⁾を用いて製造した清酒醪と速醸もと⁷⁾を用いて製造した清酒醪を比較したところ、生もとで製造した醪のペプチド量は、速醸もとを用いて製造した醪のペプチド量より多かったことから、その原因について検討を行った。⁸⁾

実験方法

使用酵母および酒母、醪の製造方法 酵母は当社の研究室で分離された *Saccharomyces cerevisiae* Km601 株を使用した。生もとと速醸もとは酒造工場で常法により実用スケールで製造した。清酒醪は、これらの酒母を用い、総米 1 kg の実験室スケールで製造した。醪の仕込み配合は Table 1 に示した。また、酵母による影響を除いてアミノ酸やペプチドの生成量を見るため、以下の方法で無菌醪の仕込みを行った。生もとおよび速醸もと各 133 ml を 18,000 × g、15 分間遠心分離して酵母を取り除き、得られた上清に、微生物の増殖を防ぐため 4 g のアジ化ナトリウムを加え、これを酒母に代えて醪の仕込みを行った。以後の操作は Table 1 に従い、常法により行った。

Table 1. Proportion of materials for sake mashing

	<i>moto</i> ^a	<i>soe</i>	<i>naka</i>	<i>tome</i>
Rice (g)	70	140	280	510
for steaming	47	101	218	406
for koji	23	39	62	104
Water (ml)	70	133	336	811

^a *moto* (*kimoto* and *sokujo-moto*) were made on an industrial scale in our factory following the conventional procedure. The temperature of mash was 15°C at *soe* and *naka*, and 9°C at *tome*.

アミノ酸およびペプチド濃度の測定 アミノ酸およびペプチド濃度は、第 1 節で述べた方法により測定した。⁷⁾

アミノ酸とペプチド量の比が異なる培地による酵母の培養 Wickerham の最小培地⁹⁾の窒素源を、アミノ酸混合液もしくは米タンパクから調製したペプチドで置き換え、酵母を培養した。アミノ酸混合液は清酒に含まれるアミノ酸のアミノ酸組成を基に調製した (Table 2)。米タンパクからのペプチドの調製は次のような方法で行った。まず、第 1 節で述べた方法により蒸米から米タンパクを調製し、⁷⁾ 得られた米タンパク 1 g に、米麹から精製した酸性プロテアーゼ⁷⁾ 45,000 units を作用させペプチドを調製した。得られたペプチド試料のアミノ酸組成を Table 2 に示した。なお得られたペプチド試料には若干量の遊離アミノ酸が含まれていた。

Table 2. Amino acid composition of the amino acid mixture and the peptide preparation from rice protein

	Amino acid mixture	Peptide preparation from rice protein	
	Free amino acid mole %	Free amino acid	Peptide mole %
Asx	10.7	0.6	11.5
Thr	3.8	0.0	4.5
Ser	7.0	0.0	7.6
Glx	15.6	0.1	16.7
Pro	5.9	0.0	5.5
Gly	8.6	0.3	10.2
Ala	8.3	0.3	6.7
Cys	0.7	0.0	0.9
Val	5.6	0.0	5.9
Met	1.3	0.0	1.2
Ile	2.6	0.0	2.6
Leu	7.2	0.0	5.5
Tyr	3.5	0.0	3.8
Phe	4.2	0.0	3.3
Lys	4.3	1.9	1.8
His	2.3	0.0	1.1
Arg	8.5	6.0	2.1
Total	100	9.2	90.8

酵母のアミノ酸取り込み能およびペプチド取り込み能の測定 酵母のアミノ酸取り込み能およびペプチド取り込み能は、北本ら¹⁰⁾の方法を一部改変した方法により測定した。酵母の培養液から遠心分離により酵母を回収し、蒸留水で洗浄後、菌体濃度が 2×10^7 になるよう蒸留水中に酵母を懸濁した。この酵母懸濁液に、pH 5.6 の 50 mM 乳酸ナトリウム緩衝液 200 μ l と 20% グルコース 100 μ l を加え、30 $^{\circ}$ C で 30 分間振とうしながら前反応を行った。その後、200 μ l のアミノ酸混合液もしくはペプチド溶液を加え、30 $^{\circ}$ C で 10 分間振と

うしながら反応を行った。反応終了後反応液を 18,000 × g、15 分間遠心分離した後、上清のアミノ酸およびペプチドをアミノ酸自動分析装置あるいは TNBS(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid)法¹¹⁾により測定した。酵母のアミノ酸取り込み能およびペプチド取り込み能は、反応により減少した培地のアミノ酸あるいはペプチド量から求めた。

結果と考察

生もとおよび速醸もとを用いて製造した清酒醪の遊離アミノ酸濃度とペプチド濃度、生もとと速醸もとを用いて清酒醪を仕込み、醪中の遊離アミノ酸濃度とペプチド濃度の経時変化をそれぞれ Fig. 1(A)に示した。なお、Table 3 に示すように、本実験に用いた生もとの遊離アミノ酸濃度は速醸もとの約 4 倍であり、一方、ペプチド濃度は速醸もとより少なかった。添え仕込み直後、生もとを用いて仕込んだ清酒醪の遊離アミノ酸濃度は、速醸もとを用いて仕込んだ清酒醪の約 3 倍であったが、その後アミノ酸は急速に消費され、留め仕込みの時点では速醸もとのアミノ酸濃度とほぼ同じレベルになった。一方、添え仕込み直後、生もとを用いて仕込んだ清酒醪のペプチド濃度は速醸もとを用いて仕込んだ清酒醪よりも少なかったが、留め仕込みの時点およびそれ以降は、逆に生もとを用いて仕込んだ清酒醪のペプチド濃度は速醸もとを用いて仕込んだ清酒醪よりも多くなった。このような現象は工場内の実用スケールの醪においても認められた。そこで本章では、生もとと速醸もとでアミノ酸濃度に著しい差があるにもかかわらず、何故主醪では差が見られなくなるのか、また生もとの方が速醸もとに比べてペプチド濃度が低いにもかかわらず、何故留め仕込みの時点では生もとで仕込んだ醪の方が速醸もとで仕込んだ醪よりもペプチド濃度が高くなるのか、その原因について検討を行った。

Table 3. Amino acid content and peptide content in seed mashes, *kimoto* and *sokujo-moto*.

Seed mash ^a	Amino acid (mM)	Peptide (mM)
<i>kimoto</i>	54	43
<i>sokujo-moto</i>	13	67

^a Seed mashes (*kimoto* and *sokujo-moto*) were made on industrial scale in our factory following the conventional procedure. The amino acid content was assayed on amino acid analyzer (Hitachi Co., Ltd.), and the peptide content was determined by the acid hydrolysis method.

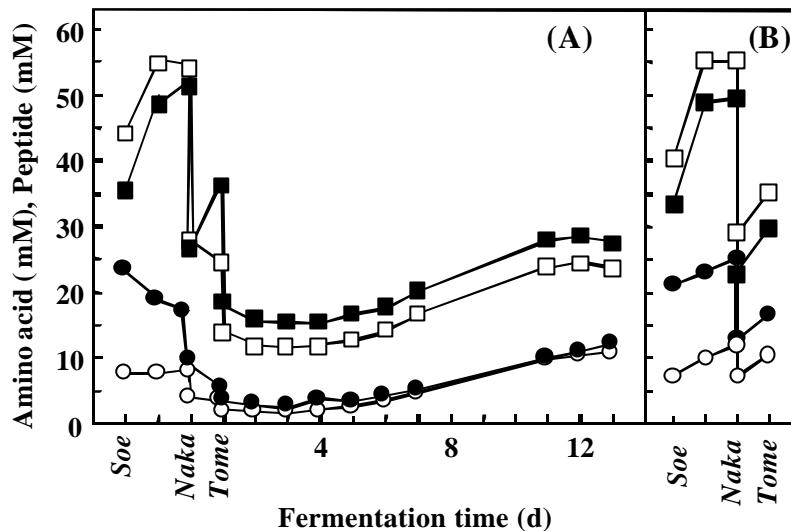


FIG. 1. Time courses of amino acid content (,) and peptide content (,) in the main mash (A), and in the microorganism-free main mash (B), seeded with *kimoto* (solid symbols) or with *sokujo-moto* (open symbols). For producing microorganism-free main mash, *kimoto* and *sokujo-moto* (133 g, respectively) were centrifuged at $18,000 \times g$ for 15 min to remove yeast cells. Each supernatant was supplemented with 4 g of sodium azide in order to arrest the growth of microorganisms, and was used in place of seed mashes. Other operations were carried out according to Table 1. The amino acid content was assayed using an amino acid analyzer (Hitachi Co. Ltd.), and the peptide content was determined by the acid hydrolysis method.

まず、これらの現象が酵母によるアミノ酸やペプチドの取り込みによって生じるのかどうかを見るため、生もとと速醸もとを用いて無菌の清酒醪を調製した。結果は Fig. 1(B) に示すように、2種類の酒母でみられるアミノ酸濃度の違いは、留め仕込みの時点でも認められた。また、生もとより調製した清酒醪のペプチド濃度は、留め仕込みの時点でも速醸もとより調製した清酒醪より、少なかった。従って、Fig. 1(A)で見られた現象は、酵母によるアミノ酸やペプチドの取り込みによって生じた可能性が示唆された。

培地の遊離アミノ酸濃度が、酵母によるペプチドの取り込みに及ぼす影響 Wickerham の最小培地の窒素源を、2~27 mMのアミノ酸混合液(それぞれ1 mMのGly-Leuを含む)で置き換えた培地10 mlに、 10^7 個の酵母を添加し、15℃で96時間培養した。Fig. 2に、培地のアミノ酸濃度とペプチド(Gly-Leu)濃度の経時変化を示した。培地のアミノ酸濃度が高い場合(10 mMおよび27 mM)、多量のアミノ酸が酵母により取り込まれたが、ペプチド(Gly-Leu)の取り込みは比較的少なかった。一方、培地のアミノ酸濃度が低い場合(2 mM)は、アミノ酸は急速に消費され、ペプチド(Gly-Leu)の取り込みは最も活発になった。この結果から、培地のアミノ酸濃度が十分に高い時は、酵母はアミノ酸を優先的に取り込むが、アミノ酸濃度が十分でないときは活発にペプチドを取り込むことが示唆された。

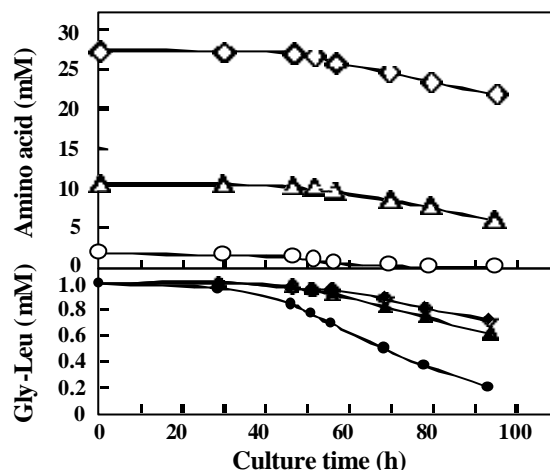


FIG. 2. Time courses of amino acid concentration (open symbols) and Gly-Leu concentration (solid symbols) in the culture medium. Yeast cells (10^7) were inoculated to 10 ml of Wickerham's minimal medium (9) with the nitrogen source replaced with 2 mM (,), 10 mM (,), or 27 mM (,) of amino acid mixture (Table 2) containing 1 mM of Gly-Leu. The culture was carried out at 15°C for 96 h.

アミノ酸濃度とペプチド濃度の比が異なる培地で培養した酵母のペプチド取り込み能

Wickerham の最小培地の窒素源を、アミノ酸混合液で置き換えた培地 (A)、米タンパクから調製したペプチドで置き換えた培地 (B)、および A と B の 1 : 1 混合液で置き換えた培地で培養し、培地から酵母を回収後、酵母のアミノ酸 (Leu, Glu) 取り込み能およびペプチド (Gly-Leu, Glu-Glu) 取り込み能を測定した。結果は Fig. 3 に示すように、ペプチド (Gly-Leu, Glu-Glu) 取り込み能に顕著な差が認められた。酵母をペプチド培地で培養したときは酵母のペプチド (Gly-Leu, Glu-Glu) 取り込み能は高かったが、酵母をアミノ酸培地で培養したときは酵母のペプチド (Gly-Leu, Glu-Glu) 取り込み能は低かった。以上の結果から、酵母はアミノ酸濃度が高い培地で培養されると、ペプチド取り込み能が低くなると推定した。一方 Fig. 3 に示すように、酵母のアミノ酸 (Leu, Glu) 取り込み能はペプチド (Gly-Leu, Glu-Glu) 取り込み能より高かった。この結果から、生もとより調製した清酒醪のアミノ酸は、添え仕込みから留め仕込みの期間に酵母により取り込まれ、その結果 Fig. 1(A) のように留め仕込みの時点では、アミノ酸濃度が、速醸もとより調製した清酒醪のアミノ酸濃度と同等のレベルまで低下すると推定した。

Island ら¹²⁾は、*Saccharomyces cerevisiae* のジペプチド取り込み能が、 μmole オーダーのアミノ酸により誘導されることを報告している。本実験の結果、高濃度のアミノ酸 (少なくとも 10 mM 以上) は逆に酵母のペプチド取り込み能を抑制することが示唆された。従って、生もとより調製した清酒醪では、生もとより持ち込まれた高濃度のアミノ酸により、

酵母のペプチド取り込み能が抑えられ、その結果、生もとより調製した清酒醪のペプチド濃度が速醸もとより調製した清酒醪より高くなると推定した。

清酒醪における酵母によるペプチドの取り込み¹³⁻¹⁵⁾に関する研究は少なく、今後さらに詳細に検討する必要がある。

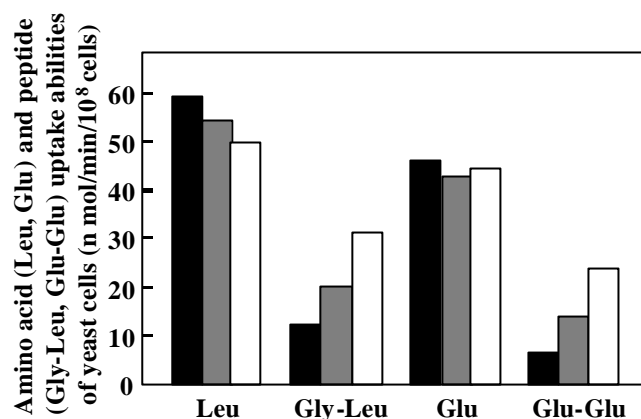


FIG. 3. Amino acid uptake and peptide uptake abilities of yeast cells. Yeast cells were cultured at 15°C for 96 h in Wickerham's minimal medium with the nitrogen source replaced with 26 mM of amino acid mixture, A (■), 7.8 mM of peptides prepared from rice protein, B (□), and the mixture of A and B at 1:1 (▒).

要約

生もとのペプチド量は速醸もとのペプチド量よりも少ないにもかかわらず、生もとで仕込んだ清酒醪のペプチド量は速醸もとで仕込んだ清酒醪のペプチド量よりも多かった。何故、2種類のもとにおけるペプチド量が主醪で逆転するのか、その理由を調べた。その結果、酵母のペプチド取り込み能が、生もとから持ち込まれた高濃度のアミノ酸によって抑制されるためであることが示唆された。

文献

- 1) 北本勝ひこ, 梶原勝之, 大場俊輝: 醸協, 77, 665(1982).
- 2) 田島 修, 富金原 孝: 醸協, 64, 739(1969).
- 3) Saito, Y., Wanezaki (Nakamura), K., Kawato, A., and Imayasu, S.: Biosci. Biotech. Biochem., 58, 812(1994).
- 4) Saito, Y., Wanezaki (Nakamura), K., Kawato, A., and Imayasu, S.: Biosci. Biotech.

- Biochem., 58, 1767(1994).
- 5) Saito, Y., Ohura, S., Kawato, A., and Suginami, K.: J. Agric. Food Chem., 45, 720(1997).
 - 6) Iemura, Y., Takahashi, T., Yamada, T., Furukawa, K., and Hara, S.: J. Biosci. Bioeng., 88, 531(1999).
 - 7) Iemura, Y., Takahashi, T., Yamada, T., Furukawa, K., and Hara, S.: J. Biosci. Bioeng., 88, 276(1999).
 - 8) Iemura, Y., Yamada, T., Takahashi, T., Furukawa, K., and Hara, S.: J. Biosci. Bioeng., 88, 679(1999).
 - 9) Wickerham, L. J.: Tech. Bull. No.1029, USDA (1951).
 - 10) 北本勝ひこ, 高橋康次郎, 戸塚 昭, 吉沢 淑: 醗酵工学, 63, 289(1985).
 - 11) Silvestre, M., Hamon, M., and Yvon, M.: J. Agric. Food Chem., 42, 2778(1994).
 - 12) Island, M., Naider, F., and Becker, J., M.: J. Bacteriol., 169, 2132(1987).
 - 13) Perry, J.M., Basrai, M.A., Steiner, H.Y., Naider, F., and Becker, J.M.: Mol. Cell. Biol., 14, 104(1994).
 - 14) Barnes, D., Lai, W., Breslav, M., Naider, F., and Becker, J.M.: Mol. Microbiol., 29, 297(1998).
 - 15) Byrd, C., Turner, G., C., and Varshavsky, A.: EMBO J., 17, 269(1998).

付記 各節のまとめ

第1節 速醸もとにおいてアミノ酸が少ない原因 速醸もとの上清には、強い酸性カルボキシペプチダーゼ（ACP）活性と、多量のペプチドが存在するにもかかわらず、遊離のアミノ酸の生成量は少なかった。何故これらのペプチドが ACP によって分解されにくいのか、その理由を明らかにするために速醸もとに含まれるペプチドの性質について検討を行った。

イオン交換カラムクロマトグラフィーにより速醸もとよりペプチドを分画して ACP を作用させたところ、このペプチドは米麹の ACP によって分解を受けにくかった。ゲルろ過クロマトグラフィーにより速醸もとのペプチドの分子量分布を調べたところ、分子量は約 200~400、またペプチドの鎖長は約 2~3 であり、低分子のペプチドが主成分であった。

米麹から ACP を精製し種々の合成ペプチドに作用させたところ、米麹の ACP はジペプチドやトリペプチドなどの低分子のペプチドを分解しにくいことが判った。また米麹より酸性プロテアーゼ（AP）を精製し、酸性条件下（速醸もとと同じ pH 3.6）で 15、48 時間、米蛋白に作用させたところ、分子量約 300~600 以上のペプチドが主に生成し、AP と ACP を同時に作用させると分子量約 200~400 のペプチドが生成した。

以上のように、速醸もとでは pH が低いために、麹菌の AP の作用により米蛋白から低分子のペプチドが生成し、しかも麹菌の ACP は低分子ペプチドを分解しにくい性質を持つため、アミノ酸の生成速度が遅いことを明らかにした。

第2節 生もとにおけるアミノ酸の増加原因 次に何故、生もとにおいては速醸もとの約 3 倍もの多くのアミノ酸が生成するのか検討した。その結果、生もとの仕込み後 7~10 日目において、蒸米蛋白から TCA 不溶性蛋白が多量に溶出することを見出した。この蛋白は、生もとに特異的に現れる蛋白であり、速醸もとや清酒醪では全く認められなかった。この蛋白を生もとの上清より分画して麹の酵素を作用させたところ多量の遊離のアミノ酸を生成したことから、この蛋白は生もとにおける多量のアミノ酸の生成と関連があると推定した。さらにこの蛋白が何故生もとにおいてのみ生成するのか、その生成機構について検討を行った。その結果、この TCA 不溶性蛋白を米蛋白から反応液上清に溶出させるには、麹の酵素が必要であった。この TCA 不溶性蛋白を米蛋白から反応液上清に溶出させる酵素を米麹から精製したところ、麹の酸性プロテアーゼと同一の酵素であると推定した。また、この TCA 不溶性蛋白を米蛋白から反応液上清に溶出させるには、反応液中に高濃度(約 20%)

以上)のグルコースの存在が必須であった。さらにこのTCA不溶性蛋白は、pH 4.5前後の限られたpH条件下においてのみ、米蛋白より反応液上清に溶出し、速醸もとのpHであるpH3.5では全く生成しないことが判明した。

第3節 酒母の種類が清酒のペプチド量に及ぼす影響 生もとと速醸もとにおけるアミノ酸量の違いが、主醪におけるアミノ酸量とペプチド量に及ぼす影響について検討を行ったところ、生もとで製造した清酒醪のペプチド量は、速醸もとを用いて製造した清酒醪のペプチド量より多いことを見出した。さらに、その原因について検討を行ったところ酵母のペプチド取り込み能が、生もとから持ち込まれた高濃度のアミノ酸によって抑制されるためであると推定した。