

### 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、<sup>1)</sup>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。<sup>2)</sup>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。<sup>3-5)</sup>本章では、生もと<sup>6)</sup>を用いて製造した清酒醪と速醸もと<sup>7)</sup>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。<sup>8)</sup>

#### 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> <sup>a</sup>	<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

<sup>a</sup> *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。<sup>7)</sup>

**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<sup>9)</sup>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、<sup>7)</sup> 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<sup>7)</sup> 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<sup>10)</sup>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  $2 \times 10^7$  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  $\mu$ l と 20% グルコース 100  $\mu$ l を加え、30 °C で 30 分間振とうしながら前反応を行った。その後、200  $\mu$ l のアミノ酸混合液もしくはペプチド溶液を加え、30 °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<sup>11)</sup>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 <sup>a</sup>	Amino acid (mM)	Peptide (mM)
<i>kimoto</i>	54	43
<i>sokujo-moto</i>	13	67

<sup>a</sup> 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.

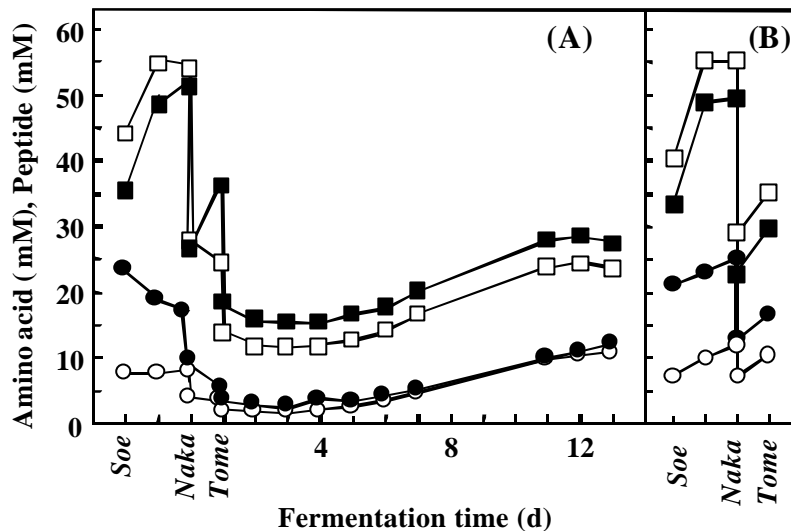


FIG. 1. Time courses of amino acid content ( , ) and peptide content ( , ) in the main mash (A), and in the microorganism-free main mash (B), seeded with *kimoto* (solid symbols) or with *sokujo-moto* (open symbols). For producing microorganism-free main mash, *kimoto* and *sokujo-moto* (133 g, respectively) 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。

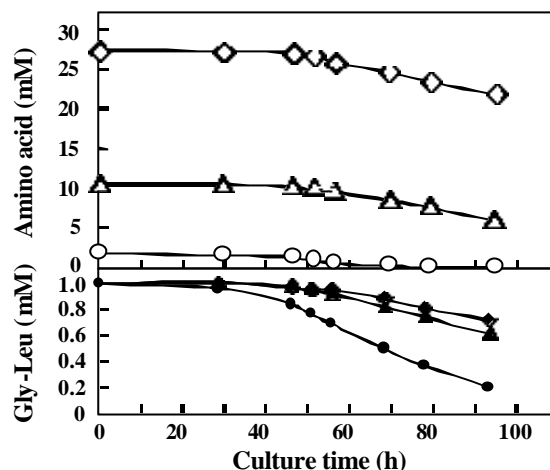


FIG. 2. Time courses of amino acid concentration (open symbols) and Gly-Leu concentration (solid symbols) in the culture medium. Yeast cells ( $10^7$ ) were inoculated to 10 ml of Wickerham's minimal medium (9) with the nitrogen source replaced with 2 mM (◇, △), 10 mM (○, ▲), or 27 mM (●) of amino acid 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<sup>12)</sup> は、*Saccharomyces cerevisiae* のジペプチド取り込み能が、 $\mu\text{mole}$  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<sup>13-15)</sup>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。

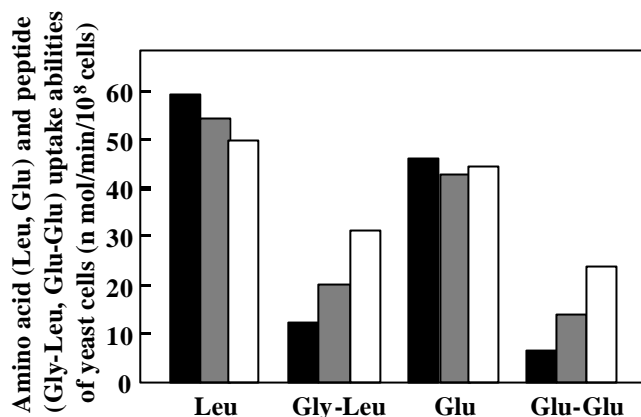


FIG. 3. Amino acid uptake and peptide uptake abilities of yeast cells. Yeast cells were cultured at 15°C for 96 h in Wickerham's minimal medium with the nitrogen source replaced with 26 mM of amino acid mixture, A (■), 7.8 mM of peptides prepared from rice protein, B (□), and the mixture of A and B at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