

清酒醸造の数種試料における核酸成分の分布と消長

毛利 威 徳 ・ 橋 田 度

DISTRIBUTIONS AND CHANGES OF NUCLEIC ACID RELATED SUBSTANCES IN SAKE-BREWING

Takenori Mouri, Wataru Hashida

In the process of Sake-brewing it is supposed that the substances of the nucleic acid group which are originally contained in rice (material) are subject to change, such as incorporation into microbial cells or decomposition by microbial enzymes. Samples taken at several different processes of Koji-making, Moto (yeast culture)-making, and Moromi (main fermentation), were extracted with cold perchloric acid. The amounts of nucleoside and nucleotide were determined employing column chromatography and 5'-nucleotidase assay. Phosphates of acid-soluble, RNA and total fractions were determined by Schmidt-Thannhauser's method.

Purine (hypoxanthine etc.) and pyrimidine (uracil etc.) bases, and nucleoside polyphosphate (ADP, ATP) were frequently found during the brewing process. A moderate amount of nucleotide was also found during the same process, and the amount of 3'-nucleotide was larger than that of 5'-nucleotide, in samples of Koji, Moto, and main fermentation. In the course of main-fermentation, RNA from rice decreased with the increase of inorganic phosphate, but amount of acid-soluble phosphate remained unchanged. Crude enzyme extracts of Koji as well as *Aspergillus*- or yeast-growing broth, decomposed yeast RNA and produced 3'-nucleotides which are seldom found in fishmeat or vegetables. Adenylic acid deaminase activity was found in Koji-extract. These observations may serve to explain the origins of 3'-nucleotides and hypoxanthine in samples of Sake. It seemed that the distribution of the nucleic acid group in brewed products such as Sake might differ from those in other foodstuffs.

* 本研究は大阪大学工学部醸酵工学教室教授寺本四郎先生との協同研究である。ご懇切な御助言、御協力を賜ったことに深謝いたします。

醸酵工学43巻12号 P.922 (1965) 所載

脚注：本報においてはつぎの略号を使用する。

5'-AMP : adenosine-5'-monophosphate (5'-adenylic acid)

5'-CMP : cytidine-5'-monophosphate (5'-cytidylic acid)

5'-UMP : uridine-5'-monophosphate (5'-uridylic acid)

5'-IMP : inosine-5'-monophosphate (5'-inosinic acid)

5'-GMP : guanosine-5'-monophosphate (5'-guanylic acid)

RNA : ribonucleic acid

RNase : ribonuclease

DNA : deoxyribonucleic acid

DNase : deoxyribonuclease

ADP : adenosine diphosphate

PDase : Phosphodiesterase

ATP : adenosine triphosphate

PMase : phosphomonoesterase

結 言

これまで筆者らは農産、水産食品での核酸成分の分布を検討してきた¹⁻³⁾が醸造食品では微生物の作用を受けて分布のパターンにもまた特徴があるのではないかと考えられる。清酒の醸造過程では原料米に由来する核酸成分が製麹、酒母、醪の工程において、あるいは醸造微生物菌体の合成に使われたり、あるいは微生物の酵素系によって変化を受けて、清酒および粕の成分になると考えられる。すでに米や清酒中の核酸成分の分布については森⁴⁾、猿野⁵⁾、麴菌の酵素系については国中ら⁶⁾の報告はあるが、醸造過程を通して核酸成分の分布を総合的に扱った報告はまだ見られない。本報においては醸造工程中の種々の試料について高分子核酸からモノヌクレオチド、ヌクレオシド、核酸塩基にいたるまで種々の成分がどのように分布しているかを調べた。なお、ヒポキサンチンの存在とその前駆体のイノシン酸、アデニル酸の消長、また3'-ヌクレオチドの存在についても検討した。

実 験 の 部

1. 供 試 薬 品

Nucleoside polyphosphate 類、ヌクレオシド類、核酸塩基類は市販品を使用した。5'-あるいは3'-ヌクレオチダーゼは武田薬品工業株式会社より提供されたものを使用した。2'-、3'-ヌクレオチドはRNAアルカリ分解物を使用した。また、RNAは酵母RNA(キリンビール(株)製)を使用した。

2. 試 料 調 整 法

醸造過程の試料は豊沢酒造、金盃酒造の現場より採取されたもので試料100gをホモジナイズして冷時過塩素酸で抽出し、活性炭処理後、濃縮して分析試料とした。清酒については減圧濃縮してアルコールを除いた後に同様の処理を行なった。米の場合、10% HClO_4 で冷時浸漬した後、ホモジナイズした。

3. 分 析 方 法

総3'-あるいは5'-ヌクレオチド量は中島ら⁷⁾の酵素法によった。すなわち、3'-あるいは5'-ヌクレオチダーゼを作用させ、遊離する磷酸量を定量した。個々のヌクレオチドの組成は、Dowex 1×8を用うるカラムクロマトグラフィーによった。方法は前報¹⁻³⁾に準ずる。醪9日目の画分同定のために径2cm、長さ30cmのカラムを用いた。カラムからの溶出位置が、260m μ の吸収をPeakとするフラクションを集め濃縮し同定した。また、核酸塩基の組成の定

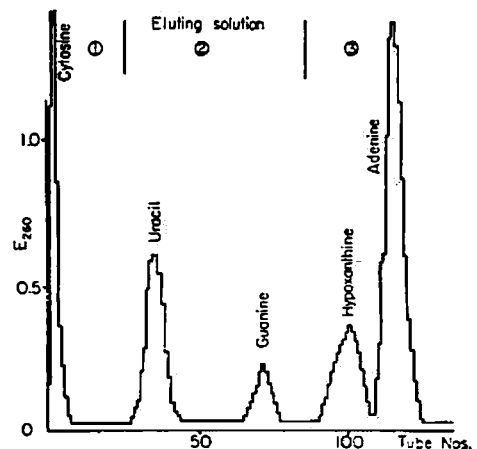


Fig. 1 Chromatogram of authentic bases.

量法は Cohn¹⁰⁾ の方法に準じた。すなわち、Dowex 1×2 を使用しカラムの調整、試料の添加法は Cohn 法に準じた。そのクロマトグラムは Fig. 1 のごとくである。展開液組成は Table 1-a のごとくで、その塩基の回収率は Table 1-b のごとく満足なものであった。RNA など核酸成分の分画は Schmidt-Thannhauser 法¹¹⁾ によった。

Table 1-a. Composition of eluting solution.

Solution		
1. distilled water including sample solution	200ml	3. 0.2M NH ₄ OH 0.1M NH ₄ Cl } 400ml
2. 0.2M NH ₄ OH 0.05M NH ₄ Cl }	1000ml	

Table 1-b. Recoveries of bases by ion-exchange column chromatography.

	Distribution of UV ₂₆₀	% Recovery
Cytosine	27.8	101.3
Uridine	40.1	97.2
Guanine	17.0	91.3
Hypoxanthine	62.0	95.4
Adenine	94.7	99.7

4. RNase 活性, Adenylic deaminase 活性の測定法

RNase の活性は杉本⁸⁾ らの濾紙ディスク法によって検定した。adenylic deaminase は Kalcker⁹⁾ の方法により 250m μ の吸光度と 260m μ の吸光度の比によって測定した。

使用した菌種と培地は下記のごとくである。

a) 酵母11種 (大阪大学醗酵工学教室保存), 麹菌7種 (大阪大学醗酵工学教室保存)

b) 培地⁸⁾

酵母培地

Glucose	5(%)	(NH ₄) ₂ SO ₄	1(%)
K ₂ HPO ₄	0.1	KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.03	Yeast extract	1
CaCO ₃	0.2	Corn steep liquor	0.5

(pH 7.0)

麹菌培地

Glucose	5%	Peptone	0.5%
K ₂ HPO ₄	0.05%	KH ₂ PO ₄	0.05%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.04%	CaCl ₂	0.04%
Corn steep liquor	0.5%	(pH 6.0)	

実験結果

1. 清酒, 酒造米についての分析法の吟味

清酒, 酒造米はアルコール, デンプンが含まれるので, その影響をみるために過塩素酸抽出液を基本として個々の5'-ヌクレオチド5種の回収率を求めた. 清酒 100ml に水あるいは5'-ヌクレオチド標品5種を加えたものを試料とし, また酒造米 50g に水あるいは5'-ヌクレオチドを添加し試料とした, 両者をまったく同様にしてカラムクロマトグラフィーを行ない, そのクロマトグラムを比較した. その結果は Fig. 2, Fig. 3 のごとくで5'-ヌクレオチドの部分を重ねると添加した標準5'-ヌクレオチドはそれぞれ 260m μ の吸収の増加(黒色部分)となって示されている.

この場合, 抽出およびクロマトグラフィーを通じてそれぞれの回収率はいずれも 91~97% の回収率で満足なものと思われる.

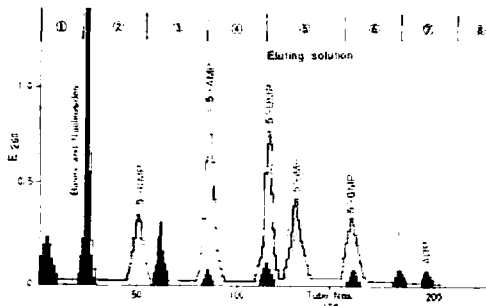


Fig. 2 Chromatogram of perchloric acid-extracted solution of rice. A pattern of authentic 5'-nucleotides is put upon that of rice.

■ Pattern of rice
 □ Pattern of authentic 5'-nucleotides

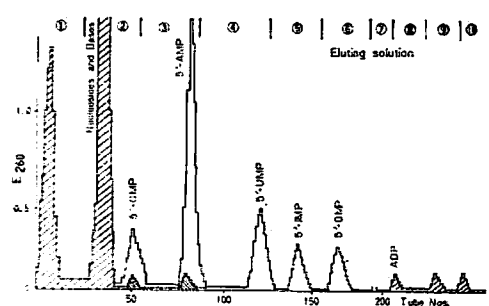


Fig. 3 Chromatogram of perchloric acid-extracted solution of Sake. A pattern of authentic 5'-nucleotides is put upon that of Sake.

■ Pattern of Sake
 □ Pattern of authentic 5'-nucleotides

2. 清酒醪抽出液画分の同定

醪 9 日目試料 500g を過塩素酸抽出し 1000 ml として, その紫外外部吸収曲線を描くと 260 m μ に peak を示し, 核酸系物質の存在が考えられる.

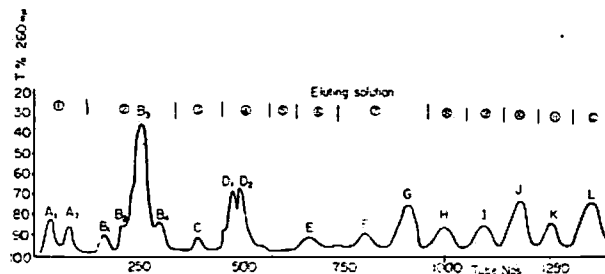


Fig. 4 Chromatogram of perchloric acid-extract of Moromi (main Mash), a large scale column.

上澄液 1000ml ($UV_{260}=1200$, UV_{260} とは $260m\mu$ の吸収量と液量 ml 数との積) を大型カラム ($2 \times 40cm$) を通過させた。そのクロマトグラムは Fig. 4 のごとくで画分が12個 (AからLまで) 得られた。

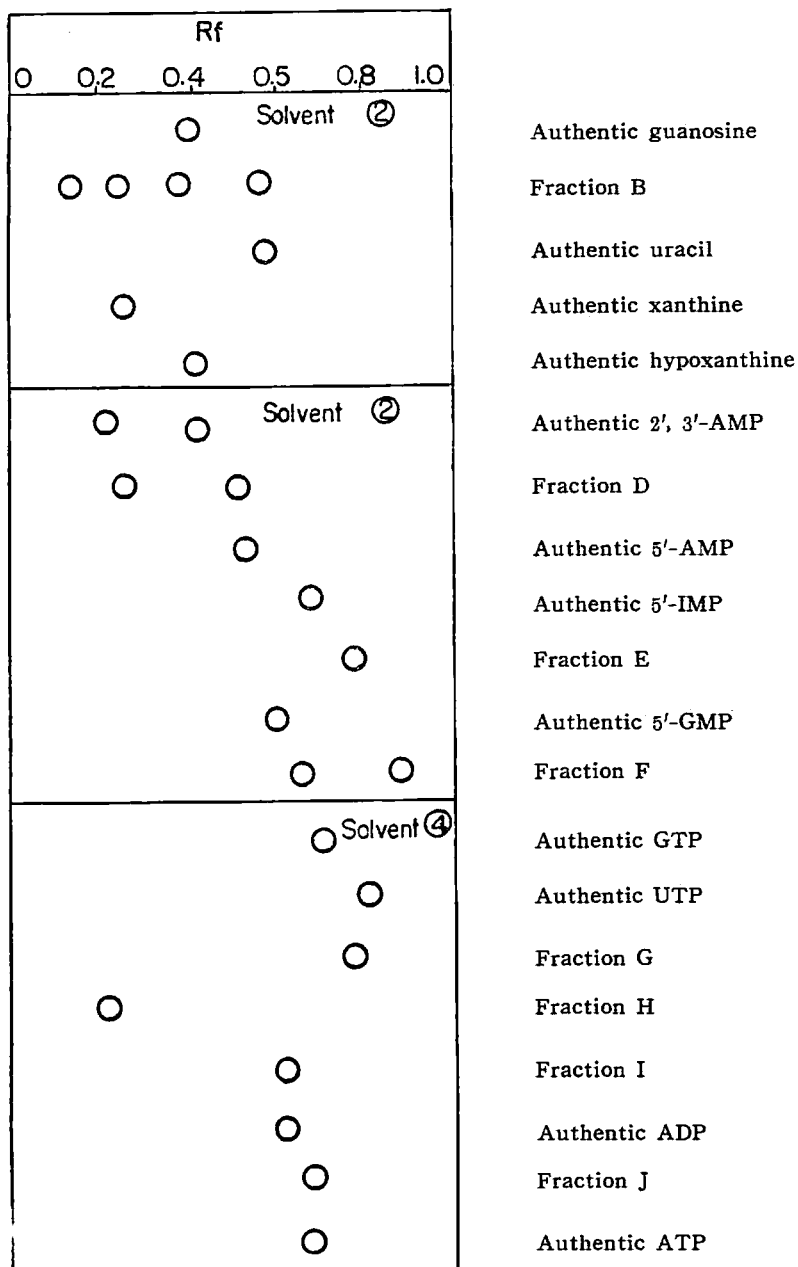


Fig. 5 Identification of Moromi (main Mash) fraction by paper chromatography.
 Solvent 2; n-propanol: conc. ammonium: water. (60:30:10)
 Solvent 4; saturated ammonium sulfate: 1M sodium acetate: isopropanol.
 (80:20:2)

画分 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J について紫外外部吸収測定, 薄層クロマトグラフィー, 濾紙電気泳動および Fig. 5 のごとくペーパークロマトグラフィー〔溶媒は前報参照¹⁾〕を行なった。画分 B は塩基, ヌクレオシドの混合物であり, xanthine, adenine, hypoxanthine の存在を認めた。また, 画分 D₁ は 3'-AMP, D₂ は 2'-AMP, また画分 E は 5'-あるいは 3'-IMP と思われる。画分 F は 3'-GMP, 画分 I は ADP, 画分 J は ATP と同定した。

その他 A, G, H, K, L の画分については今後検討したい。

3. 清酒醸造工程中の核酸成分の分画

清酒醸造工程中の核酸成分の分布は Schmidt-Thannhauser¹⁾ 法により分析した。その結果は Table 2 のごとくである。Table 2 に示すとおり 醗工程では醗酵が進むにつれ RNA 磷が減少し, 無機磷が増加していることが認められ, 醗 9 日目に酸可溶性磷が増加していた。RNA 磷の減少と無機磷の増加は醸造工程の全般にわたって言えるのではないかと思われる。また, 一般的に酸可溶性磷が少ないことは醸造工程中に phosphatase などの作用によりすみやかに無機磷になってしまうためと思われる。

Table 2. Changes of nucleic acid components (phosphate fractions) in some samples of Saké-brewing processes.

Samples	Total-phosphorus μmol/g	Inorganic-phosphorus μmol/g	Acid-soluble phosphorus μmol/g	RNA-phosphorus μmol/g
Rice (Yamadanishiki)	17.1			
Rice (harvested in California)	24.6			
Rice-Koji	14.2	3.46	0.873	3.29
Sokujo-Moto	9.98	2.38	0.70	2.68
Moromi (main mash) 2 days aged	9.80	0.51	0.71	3.27
Moromi (main mash) 9 days aged	9.50	1.51	1.37	2.91
Moromi (main mash) 16 days aged	8.43	4.19	0.74	1.49
Brewed Sake	3.1	2.92	—	—
Sake-Kasu (lees)	30.6	21.45	1.31	3.26

4. 清酒醸造工程中のヌクレオチド分布

清酒醸造工程中のカラムクロマトグラムの一例を示すと Fig. 6, 7, 8, 9 のごとくで, また塩基ヌクレオシド画分の再クロマトグラムは Fig. 10, 11, 12, 13 のごとくである。その結果は, Table 3-a, Table 3-b のごとくである。

醗 9 日目以外はヌクレオチド, ヌクレオシドポリホスフェートは少なく塩基が主体であった。醗 9 日目は ADP, ATP が著しく大であった。また, 塩基, ヌクレオシドはウラシル系と hypoxanthine が大であった。このことより IMP の生成も考えられるが, そのうち 3'-IMP が主体であると思われる。しかし, ヌクレオチドとしての蓄積は少ないと思われる。モノヌクレオチドでは 3'-ヌクレオチドが主体と考えられるので, 総 5'-または 3'-ヌクレオチド量を測定した。

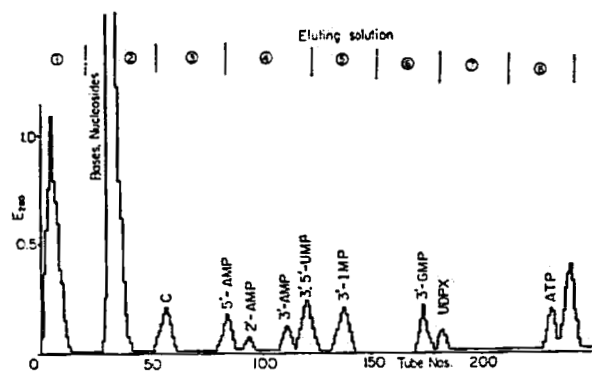


Fig. 6. Chromatogram of perchloric acid-extract of Rice-Koji.

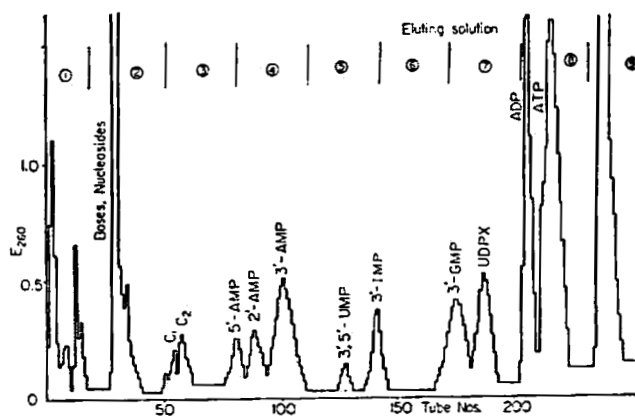


Fig. 7. Chromatogram of perchloric acid-extract of Moromi (main Mash) after 9 days fermentation.

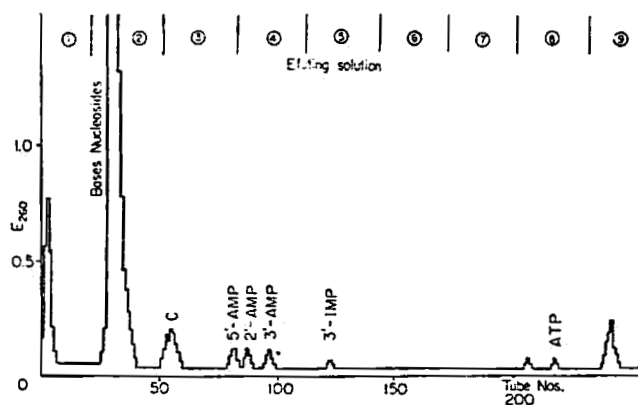


Fig. 8. Chromatogram of perchloric acid-extract of brewed-Sake.

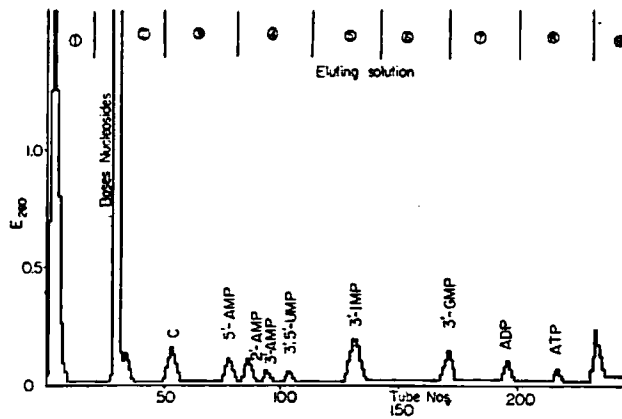


Fig. 9 Chromatogram of perchloric acid-extract of Sake-kasu. (lees)

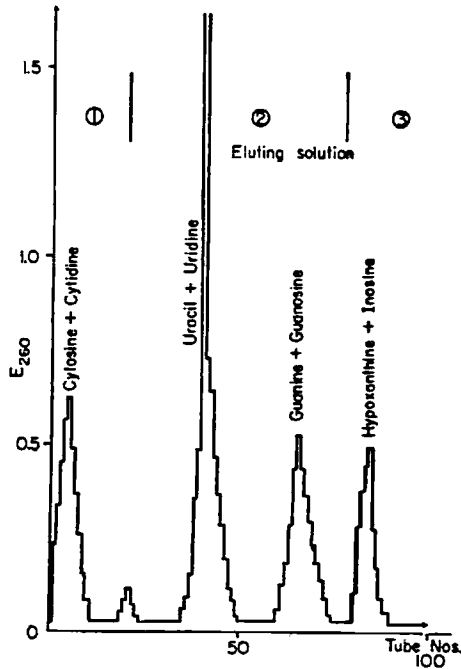


Fig. 10 Chromatogram of base and nucleoside of Rice-Koji.

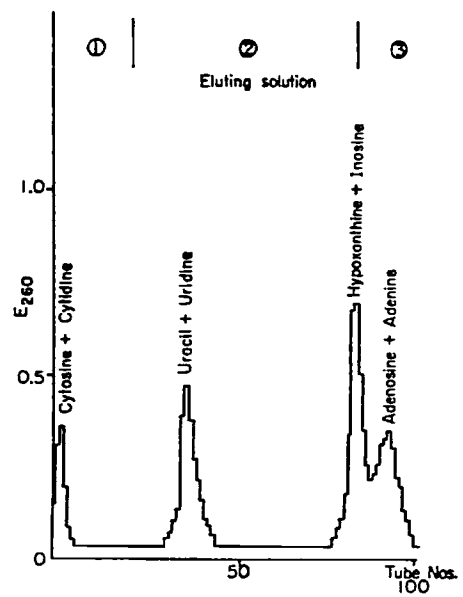


Fig. 11 Chromatogram of base and nucleoside of Moromi. (main mash)

総 5'-ヌクレオチド， 総 3'-ヌクレオチドを測定した結果は Table 4 のごとくである。この結果で 3'-ヌクレオチドが全般的に多いことがわかった。

5'-ヌクレオチドは 酒粕に少し含まれていた。このように醸造工程では従来一般食品で認められている核酸成分の分布や代謝とは異なった特徴あるパターンを示していると考えられるので、その点について検討した。すなわち、醸造過程では RNase および adenylic deaminase の活動が考

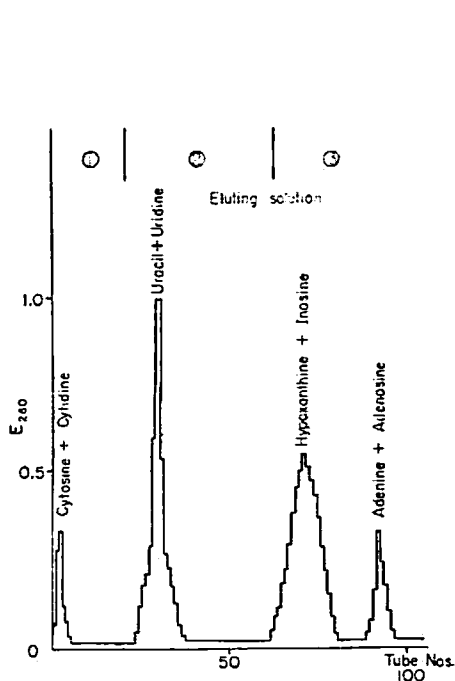


Fig. 12 Chromatogram of base and nucleoside of brewed-Sake.

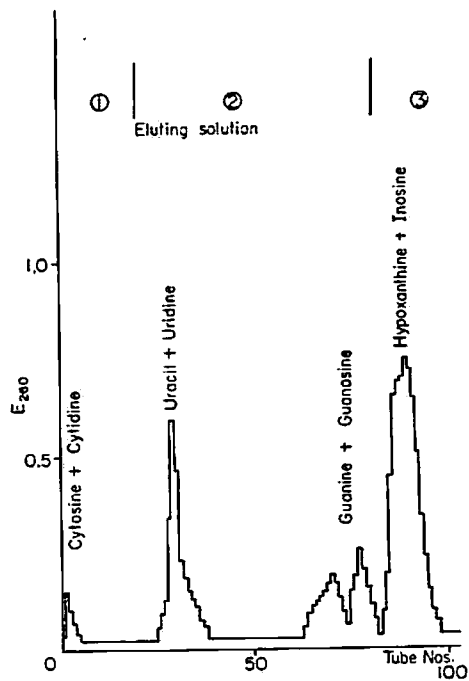


Fig. 13 Chromatogram of base and nucleoside of Sake-Kasu. (lees)

Table 3-a. Amounts of nucleotides and related substances in some samples of Sake-brewing process.

Samples		Fraction	Fraction	Fraction	5'-AMP	2'-and	5'-UMP	3'-or	3'-or	UDP	ADP	ATP
		A	B**	C		3'-AMP	5'-UMP	5'-IMP	5'-GMP			
Rice	Distribution of UV ₂₆₀ * μmol/100g	4.2	17.8	1.3	2.0 0.98		3.1 1.69		2.9 1.70	4.6	10.1	
Rice-Koji (No. 1)	Distribution of UV ₂₆₀ μmol/100g	29.0	11.6	1.0	0.4 1.11	1.0 2.51	0.5 1.86	1.2 6.54	1.0 4.59		1.3 3.02	1.2 3.96
Rice-Koji (No. 2)	Distribution of UV ₂₆₀ μmol/100g	15.4	33.4	3.1	2.9 2.58	9.7 3.68	3.2 5.35	3.2 7.95	2.8 3.24	1.7	3.1	5.8
Yamahai-Moto (1day aged)	Distribution of UV ₂₆₀ μmol/100g	9.0	47.2	2.7	1.5 1.14	3.5 2.96		1.2 2.13		3.5	trace	3.8
Yamahai-Moto (3days aged)	Distribution of UV ₂₆₀ μmol/100g	5.6	35.0	2.5	1.2 1.11	1.7 1.64	1.0 1.30	1.4 1.26		2.5	1.6	4.1
Yamahai-Moto (8days aged)	Distribution of UV ₂₆₀ μmol/100g	11.5	35.8	4.5	1.3 1.56	5.0 4.45		1.3 1.95		3.7	trace	2.5
Sokujo-Moto (No. 1) (11days aged)	Distribution of UV ₂₆₀ μmol/100g	5.5	17.0	3.9	1.8 1.38	1.2 0.93		1.1 1.94	6.2 5.82		6.0 4.66	5.3 4.14
Sokujo-Moto (No. 2) (19days aged)	Distribution of UV ₂₆₀ μmol/100g	5.8	24.1	1.7	1.1 0.82	1.2 0.94		1.2 1.38	0.8 0.72		1.7 1.30	1.7 1.40

* % of absorbancy at 260mμ of each fraction to a total absorbancy of the sample which was applied on column.

** mixture of uracil, hypoxanthine etc.

Table 3-b. Amounts of nucleotides and related substances in some samples of Sake-brewing process.

Samples		Fraction A	Fraction B**	Fraction C	5'-AMP	2'-and 3'-AMP	5'-UMP	3'-or 5'-IMP	3'-or 5'-GMP	UDP	ADP	ATP
Moromi (No. 1) (2 days aged)	Distribution of UV ₂₆₀ * μmol/100g	7.2	10.7	4.5	1.1 0.84	3.3 3.69	trace	1.3 1.88	9.3 7.77		7.0 4.94	8.6 5.24
Moromi (No. 1) (9 days aged)	Distribution of UV ₂₆₀ μmol/100g	6.4	11.4	4.2	2.7 3.44	11.4 14.75	0.92 1.67	3.54 9.26	11.8 17.17	3.5	18.0 23.08	2.7 3.38
Moromi (No. 1) (16 days aged)	Distribution of UV ₂₆₀ μmol/100g	5.5	17.5	4.7	2.2 1.17	4.8 2.80		1.7 3.47	8.1 9.01		9.5 9.40	12.6 12.45
Moromi (No. 2) (16 days aged)	Distribution of UV ₂₆₀ μmol/100g	6.6	29.1	2.7	1.2 0.90	1.5 1.36		3.6 4.95	3.7 2.31		4.8	18.3
Sake (No. 1) (immediately after separation)	Distribution of UV ₂₆₀ μmol/100g	10.7	23.1	2.7	1.2 2.81	trace		trace	trace		0.63 0.28	trace
Sake (No. 2) (immediately after separation)	Distribution of UV ₂₆₀ μmol/100g	19.2	22.8	3.5	0.7 0.64	1.3 1.17		trace	trace		1.20	trace
Sake-Kasu (No. 1) (lees)	Distribution of UV ₂₆₀ μmol/100g	8.0	11.7	2.7	0.8 1.14	1.5 2.07	0.7 1.33	2.0 6.47	1.6 3.17	trace	1.9 2.66	trace
Sake-Kasu (No. 2) (lees)	Distribution of UV ₂₆₀ μmol/100g	3.5	24.3	2.0	trace	trace	trace	0.7 3.80	1.7 4.05	0.8	2.0	9.5

* % of absorbancy at 260mμ of each fraction to a total absorbancy of the sample which was applied on column.

** mixture of uracil, hypoxanthine etc.

Table 4. Distributions of nucleotides in some samples of Sake-brewing processes.

Samples	UV ₂₆₀ /100g	5'-Nucleotide μmol/100g	3'-Nucleotide μmol/100g
Rice (Yamadanishiki)	1.38	trace	2.65
Rice (produced in California)	2.19	trace	3.14
Rice-Koji	3.40	2.72	14.82
Sokujo Moto	1.10	0.84	7.62
Moromi (main mash) 2days aged	0.98	0.80	9.52
Moromi (main mash) 9days aged	1.84	2.40	12.36
Moromi (main mash) 16days aged	1.41	2.35	7.20
Brewed-Sake	0.66	trace	trace
Sake-Kasu (lees)	2.00	4.77	9.34

えられるので、醸造に関与する麹菌および酵母について、それらの作用を有するか否か、また生成したヌクレオチドが 5'-型か 3'-型かについて検討した。

5. RNaseのscreening

麹菌 (*Asp. oryzae*) と酵母について RNase の screening を濾紙ディスク法によって行なった結果は Table 5 のごとくである。いずれも上記の培地で 7 日間振盪培養した培養液を粗酵素液として行なった結果で、いずれの菌株も pH 4.0 において強い酵素力を持っていると思われる。

Table 5. Ribonuclease activities of culture filtrates of *Asp. oryzae* or yeast.

	pH of reaction buffer		
	4	6	8
Blank	‡‡‡	—	—
<i>Asp. oryzae</i> No. 5159*	‡‡‡	—	—
" No. 5139	‡‡‡	—	—
" No. 5149	‡‡‡	+	+
" No. 5044	‡‡‡	—	—
" No. 5138	‡‡‡	—	+
" No. 5142	‡‡‡	—	—
" T	‡‡‡	+	—
" H-1	‡‡‡	—	—
" H-2	‡‡‡	—	—
<i>Sacch. cerevisiae</i> No. 7036	‡‡	—	+
" No. 7037	‡‡‡	+	—
" H-1	‡‡	+	—
" H-2	‡‡‡	+	—
<i>Zygosacch. sake</i> No. 6219	‡‡‡	+	—
Hakken No. 1	‡‡‡	+	—
Rasse No. 12	‡‡	+	—

— : none + : slightly ‡‡ : moderately ‡‡‡ : significantly

* cf. List of Cultures(1959), published by Dept. of Fermentation Technology, Osaka University

Table 6. Degradation of yeast RNA and formation of 3'-or 5'-nucleotide by Koji extract or *Asp. oryzae* culture filtrate.

	Increase of UV ₂₆₀	5'-Nucleotide $\mu\text{mol/ml}$	3'-Nucleotide $\mu\text{mol/ml}$
Blank*	0	0	0
Culture filtrate of			
<i>Asp. oryzae</i> No. 5159**	33.7	0.018	0.676
" No. 5139	41.2	0.067	0.456
" No. 5149	18.7	0.007	0.312
" No. 5044	40.2	0.027	0.704
" No. 5138	42.2	0	0.295
" No. 5142	12.2	0	0.273
" T	5.8	0	0.356
Koji extract of			
<i>Asp. oryza</i> H-1	25.7	trace	0.607
" No. 5149	58.7	trace	0.838
Mixed culture of usual Sake brewing	15.2	trace	0.203

* Uninoculated culture broth

** cf. List of Cultures(1959), published by Dept. of Fermentation Technology, Osaka University

2~3種の麹菌培養液、すなわち粗酵素液をRNA（酵母製）に作用させてpH 4.0付近で生成する3'-または5'-ヌクレオチドを測定した結果はTable 6である。

このように主体は3'-ヌクレオチドであったが、清酒工程中には3'-ヌクレオチドに分解するヌクレアーゼ、またphosphodiesteraseが存在すると思われる。

6. 麹菌のAdenylic deaminase 活性について

清酒中にIMPの存在が猿野ら⁵⁾によって報告されているが、それらが3'-AMPあるいは5'-AMPに由来するの否かを確認するために、初めに麹菌の振盪培養液により検討した。結果はTable 7のごとくである。

Table 7. Adenylic deaminase activities of culture filtrate of *Aspergillus* and yeast.

Strains	Absorption ratio, after reaction (Ex. of 250m μ /Ex. of 260m μ)	
	Substrate	
	5'-AMP	3'-AMP
Blank*	0.80	0.98
<i>Asp. oryza</i> No. 5159**	0.85	0.80
" No. 5139	0.79	0.87
" No. 5149	0.83	0.86
" No. 5044	0.83	0.89
" No. 5138	0.76	0.85
" No. 5142	0.76	0.79
" T	0.79	0.80
" H-1	0.79	0.88
" H-2	0.74	0.93
Blank*	0.85	0.85
<i>Sacch. cerevisiae</i> "Jokyo No. 6"	0.80	0.88
" "Jokyo No. 7"	0.81	0.62
" H-1	0.83	0.68
" H-2	0.79	0.88
<i>Zygosacch. sake</i> No. 6219	0.81	0.83
"Hakken No. 1"	0.78	0.67
"Rasse No. 12"	0.83	0.82

* Uninoculated culture broth

** cf. List of Cultures(1959), published by Dept. of Fermentation Technology, Osaka University

反応液はAMP 0.05% 溶液 1ml, 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 1ml, 粗酵素液 1ml, 37°C 1時間の条件で測定した。反応終了後の液の250m μ の吸光度と260m μ の吸光度の比率をとった時にBlankの比率より高くなった場合をdeaminase活性があるとするのであるが、振盪培養ではadenylic deaminase活性は見出せなかった。しかし、ある種の培地を使用することによりdeaminase活性を見出すことができると思われる。

つぎに麹菌について固型培地（米麹）で行なった結果はTable 8のごとくである。2倍量の水

Table 8. Adenylic deaminase activities of Koji extract.

Species of <i>Asp. oryzae</i>	Preparation of extract	Absorption ratio, after reaction (Ex. of 250m μ /Ex. of 260m μ)			
		Substrate			
		5'-AMP	3'-AMP	Adenosine	Adenine
Blank*		0.83	0.82	0.84	0.77
<i>Asp. oryzae</i> H-1	Room temperature,** immediately	0.92	0.86	0.90	0.77
<i>Asp. oryzae</i> H-1	Incubation at 0°C for 24hrs***	1.09	0.94	1.06	0.78
<i>Asp. oryzae</i> No. 5149	Room temperature, immediately	1.13	0.97	1.05	0.78
<i>Asp. oryzae</i> No. 5149	Incubation at 0°C for 24hrs	0.97	0.89	1.22	0.77
Mixture culture for usual making Koji	Room temperature, immediately	0.88	1.09	0.93	0.77

Reaction mixture: Substrate 0.05% solution 1ml, 0.2M acetate buffer(pH 5.0) 1ml, crude extract(enzyme solution) 1ml. Reaction at 37°C, for 1 hr.

* Heat inactivated Koji-extract

Asp. oryzae was grown on rice, and this Koji was homogenized with water and extracted.

** Koji was homogenized and extracted at room temperature without incubation.

*** Koji was incubated at 0°C for 24hr with water, then homogenized and extracted.

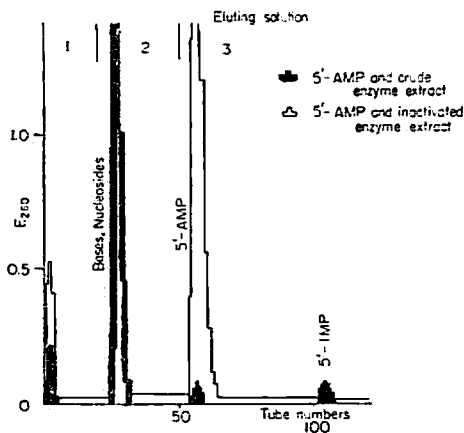


Fig. 14 Chromatogram of 5'-AMP reacted by crude enzyme extract from rice-Koji.

にて抽出し、その上澄液を粗酵素とした。その反応試験法は前述の振盪培養の時と同じである。固型培養では液内培養の場合と異なって 5'-AMP, 3'-AMP および adenosine を deamination する活性が見出された。しかし、adenine は deamination されなかったその反応液をカラムクロマトグラフィーで展開すると Fig. 14 となり、少量の 5'-IMP とイノシン、ヒポキサンチンの生成をみた。黒色部、白色部はおのおの反応後および反応前の 5'-AMP を示している。このことから米麹中には adenylic deaminase の存在が認められた。

考 察

以上の結果、中島⁷⁾、Cohn¹⁰⁾、Bergkvist¹²⁾ の記載によるイオン交換クロマトグラフィーで清酒醸造工程試料の 5'-ヌクレオチド、2'-、3'-ヌクレオチド、ヌクレオシドポリフォスフェート、ヌクレオシド、塩基の定量が可能と考えられる。

清酒の醸造過程では、原料米、麹菌体、酵母菌体などのリボ核酸が、醸造微生物の RNase または

phosphodiesterase の作用を受け分解されてヌクレオチドを生成し、さらに phosphomonoesterase (phosphatase) の作用を受けてヌクレオシド、核酸塩基に至ると考えられる。米あるいは菌体 RNA の分解の可能性は麹菌、酵母に相当強い RNase 活性のあることから裏付けされよう。ここで生成するヌクレオチドの磷酸結合位置が 5'-であるか、3'-であるかは、呈味性成分が 5'-ヌクレオチドに限るという観点から重要な問題であるが、酵素法による分析結果では 5'-よりも 3'-ヌクレオチドが多かった。一般の食品では 5'-ヌクレオチドがより多く見出されるのに、清酒に関連して 3'-ヌクレオチドが多く見出されたことは興味深い。この原因として緒方¹³⁾も指摘するように、微生物の菌種によって、また環境の pH によって 3'-ヌクレオチドを生成する可能性が多いからと考えられる。なお、これら酵素系の分布が菌体内か外かについて、たとえば酒粕の分析のときなど抽出法にも関連して検討の余地がある。米麹の酵素系については、国中⁶⁾が醤油麹で報告した例に準じて、なお検討したいと思う。猿野⁵⁾は清酒中に 5'-GMP の存在を認めている。私達の実験規模ではいずれも量が少ないために、GMP が 5'-、3'-、2'-のいずれの型であるかは確認できなかった。

米麹には adenylic deaminase 活性が見出されたが、これは清酒におけるヒポキサンチン、イノシン、IMP の存在を推定させる。醸造過程で AMP、アデノシンからそれぞれ対応する IMP、イノシンに deaminate され、結局はヒポキサンチンに至ると考えられる。猿野⁵⁾もヒポキサンチンの存在を認めた。AMP からヒポキサンチンに至る経過については、ヌクレオチド状態での蓄積が少ないために、IMP が 5'-の型であるか 3'-の型であるか確認はできなかった。

要 約

清酒醸造過程の試料では核酸塩基(ヒポキサンチン・ウラシル)、ヌクレオシドポリリン酸(ATP ADP)などの存在を認めた。また、3'-ヌクレオチドが比較的多く、5'-ヌクレオチドも若干見出された。Schmidt-Thannhauser 法で核酸成分を分画した結果、醗工程で RNA が減少するに伴って無機 P が増加するが、酸可溶性リンの消長はあまりなかった。また、粗酵素液で RNase 活性は強く、3'-ヌクレオチドの生成を行なうこと、アデニル酸デアミナーゼは固型物培地において活性のあることを見出した。

終りに臨み清酒試料をご提供いただきました豊沢酒造株式会社、金盃酒造株式会社、核酸分析のための酵素類、試薬類をご寄贈くださった武田薬品工業株式会社の皆様方に厚く感謝いたします。なお、分析に協力されました寺田潤子嬢に感謝します。

文 献

- 1) 橋田, 毛利, 志賀, 寺本: 醱酵工学, 41, 420 (1963)
橋田, 毛利, 志賀, 寺本: 醱酵工学, 42, 434 (1964)
- 2) 毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醱酵工学, 43, 35 (1965)
毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醱酵工学, 43, 335 (1965)
毛利, 橋田, 志賀, 寺本: 醱酵工学, 43, 344 (1965)
- 3) 毛利, 寺田, 橋田: 日本缶詰協会技術会第13回大会 (1964)
- 4) 森, 渡辺, 長谷川: 醱酵工学, 31, 419 (1953)
森, 渡辺, 高田: 醱酵工学, 32, 421 (1954)
森, 渡辺: 醱酵工学, 34, 530 (1956)
- 5) 猿野, 佐々木: 醱酵工学, 33, 474 (1955)
猿野, 阿野: 醱酵工学, 32, 253 (1954)
猿野: 醱酵工学, 35, 178 (1957)
猿野, 藤本: 合成酒酒造組合技術部会報, 26 (1961)
- 6) 国中: 農化, 29, 797 (1955) 国中: 農化, 29, 801 (1955)
国中: 農化, 30, 583 (1956)
国中: 農化, 30, 787 (1965)
- 7) 中島, 市川, 鎌田, 藤田: 農化, 35, 797 (1961)
中島, 市川, 鎌田, 藤田: 農化, 37, 558 (1963)
- 8) 杉本, 岩浅, 石山, 横塚: 農化, 36, 277 (1962)
杉本, 岩浅, 石山, 横塚: 農化, 38, 135 (1964)
- 9) Kalcker, H.M.: J. Biol. Chem., 167, 461 (1925)
- 10) Cohn, W.E.: J. Am. Chem. Soc., 12, 4273 (1950)
Cohn, W.E.: Methods of Biochemical Analysis, 1, 287 (1954)
- 11) Schmidt, G., Tannhauser, S.T.: J. Biol. Chem, 161, 83 (1945)
- 12) Bergkvist, R.: Acta. Chem. Scand, 12, 1549 (1958)
- 13) 緒方: Amino acid and Nucleic acid, No. 8, 1 (1963)