

清酒醸造工程中の核酸系成分および関連酵素系について*

(第2報) 清酒麴の核酸分解酵素の性質について

毛利 威徳・足立 有**・柏原 純**

Nucleic Acid Related Substances and Nucleic Acid Degrading Enzymes in Sake-brewing

(II) Characteristics of Nucleic Acid Degrading Enzymes of Sake-Koji

Takenori Mouri Tamotsu Adachi, and** Jun Kashihara**

In the previous report we reported the distributions and changes of nucleic acid related substances and their degrading enzymes in the process of Koji making. In this report we will mention about the characteristics of the nucleic acid degrading enzyme.

The homogenate of Koji was extracted with water at 5°C for one hour. For this extraction water was the most suitable solvent. Of this crude enzyme solution, the following properties were revealed.

1. The optimal pH was in the range of 4.0~5.0 for RNase, 3.0~4.0 for PDase and 4.0~5.0 for PMase.
2. The optimal temperature of RNase was in the range of 50~60°C, and those of PDase and PMase were in the range of 45~50°C.
3. Heat stability for the RNase activity was reduced to about 50% by heating at 100°C for 10min, the PDase activity remained at a level of 40% at 60°C for 10min, and PMase was inactivated by heating at 60°C for 10min.
4. Inhibition by metal ions was disclosed; Cu⁺⁺ and Zn⁺⁺ inhibited the activity of RNase, and NaF and Na₂HPO₄ inhibited the PDase and PMase activities.
5. In the digestion of yeast RNA by an crude enzyme solution of Koji, it was found that 3'-GMP was the main product among other derivatives. ATP was decomposed into 5'-AMP and 5'-IMP by the enzyme solution, and then 5'-AMP was redecoposed into 5'-IMP and hypoxanthine.

緒 言

前報¹⁾において清酒麴製造工程中の核酸系成分および関連酵素活性の経時的变化を報告したが、それらの核酸系成分の分解または合成経路を明らかにするためには関連酵素系の性質を知ることが重要と考えられる。

食品中の核酸関連酵素系については戸田²⁾、小杉ら³⁾の報告があり、微生物の生産する核酸関連

* 醸酵工学46巻1号15 (1968) 所載

** 福寿酒造株式会社

酵素については緒方⁴⁾、猿野⁵⁾、五十嵐⁶⁾ Eaves⁷⁾の報告があり、醸造微生物の関与する食品では国中⁸⁾の醤油麹、毛利ら⁹⁾の清酒麹についての報告がある。本報告では清酒麹の核酸分解酵素の性質を検討し核酸系成分の分解に関与するかについて考察した。

実 験 方 法

- 1) 試料の調製 第1報¹⁾と同様にして掛麹の出麹後のものから均一に試料を採取した。
- 2) 酵素活性の測定 第1報と同様須原ら¹⁰⁾の方法に準じて RNase 活性, PDase 活性および PMase 活性を測定した。
- 3) 核酸関連物質の分画 第1報と同様に中島ら⁹⁾の方法により Dowex 1 × 8 を用いるカラムクロマトグラフィーによった。
- 4) 蛋白質の定量 Folin Ciocalteu 呈色法¹¹⁾によった。
- 5) リン酸の定量 Fiske Subbarow 法¹²⁾で測定した。
- 6) 供試薬品 第1報と同じものを用いた。

実 験 結 果

A) 予備実験

1) 粗酵素液抽出方法の吟味 麹から採取した試料を 5°C で 2 倍量の水, 0.2% 食塩水, または 1/20M Tris buffer (pH 7.0) とともに磨砕して 1 時間抽出し, ろ液を粗酵素液としてその活性を比較した。その結果は Table 1 に示すように各抽出液ともに大差ないことが認められるとともに, 第 2 回目の抽出液にはほとんど活性が認められなかったので, 試料の 2 倍量の水で抽出したろ液を粗酵素液とすることにした。

Table 1 Comparison of solvents for enzyme extraction.

Method of extraction	Units	Units		Activity units enzyme solution
		dry (g) material	Specific activity (mg)protein	
RNase				
Distilled water	1925	55.0	2.8	17.5
0.2% NaCl	1100	31.4	1.1	11.0
1/20M Tris buffer (pH 7.0)	1600	45.7	4.0	16.0
PDase				
Distilled water	6600	188.6	9.6	60.0
0.2% NaCl	5800	165.7	5.6	58.0
1/20M Tris buffer (pH 7.0)	6800	194.3	17.0	68.8
PMase				
Distilled water	20900	597.1	30.4	190.0
0.2% NaCl	24000	685.7	23.1	240.0
1/20M Tris buffer (pH 7.0)	12800	365.7	32.1	128.0

2) 酵素活性測定のための粗酵素液量の検討
粗酵素液量を 0.1ml から 0.5ml の範囲で酵素活性を測定し、粗酵素液量と酵素活性が正比例する範囲を求めた。結果は Fig. 1 に示すように RNase, PDase, PMase ともに 0.1~0.5 ml の粗酵素液 (麴の場合は抽出液を RNase についてはそのまま, PDase, の時は 5 倍希釈したものを粗酵素液とした) を用いる範囲では酵素活性と粗酵素液量が正比例することが認められたので酵素活性の測定にはこの範囲の粗酵素液量を用いることにした。

B) 粗酵素液の諸性質の検討

1) 最適 pH 粗酵素液の酵素活性の最適 pH を知るため、pH 3.0~7.0 には酢酸緩衝液、pH 7.0~10.0 には Tris buffer を用いて 37°C で酵素活性の変化を測定した結果 Fig.2 に示すように RNase 活性は pH 4.0~5.0, PDase 活性は pH 3.0~4.0, PMase 活性は pH 4.0~5.0 の範囲内に最適 pH があることが認められた。また、5'-AMP, 3'-AMP を基質としたときの pH の影響を知るため反応後に遊離するリン酸を測定して最適 pH を求めた結果 Fig.3 のように、いずれも pH

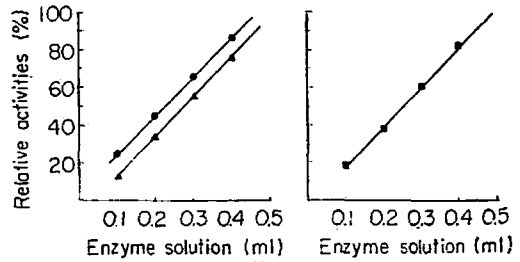


Fig. 1. Relationship between activity and volume of crude extract.

●—● RNase ■—■ PDase
▲—▲ PMase

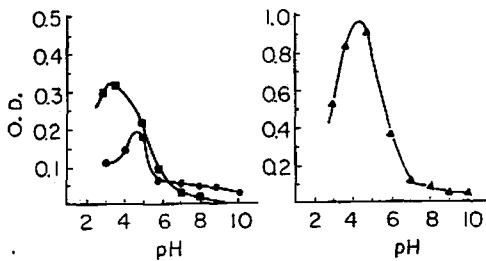


Fig. 2. Effect of pH on enzymatic activities.

●—● RNase ▲—▲ PMase
■—■ PDase

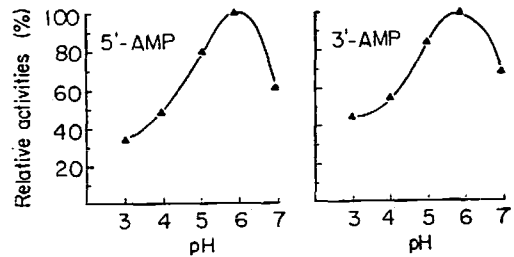


Fig. 3. Hydrolyzing activities of crude Koji extract with 5'-AMP and 3'-AMP as substrates.

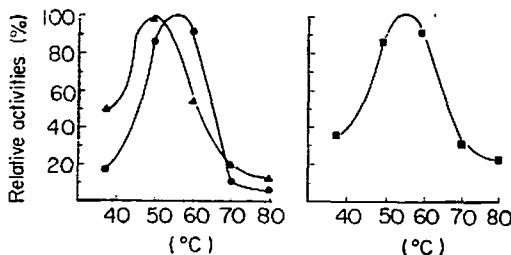


Fig. 4. Effect of temperature on enzymatic activities.

●—● RNase ■—■ PDase
▲—▲ PMase

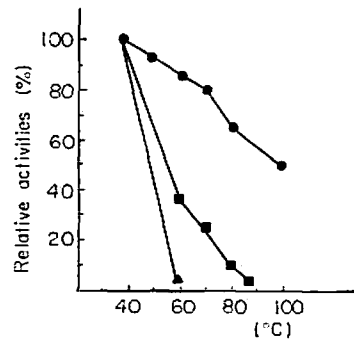


Fig. 5. Heat stability of enzymes.

●—● RNase ■—■ PDase
▲—▲ PMase

5.0~6.0の間にあることを認めた。

2) 最適温度 粗酵素液の反応最適温度を最適 pH において求めた結果は Fig. 4 に示すように RNase, PDase はともに 50~60°C の間が最適で, PMase については 45~55°C の間に最適温度が認められた。なお PMase 活性の測定には PNPP が 60°C で分解する恐れがあるため 0.01M-5'-GMP を基質として用いて遊離するリン酸量を定量した。

3) 熱安定性 粗酵素液を最適 pH において10分間加温処理した後, 急冷して残存酵素活性を測定した結果 Fig. 5 のように, RNase は 100°C でも約 50%の活性が残っていた。PDase は 60°C で40%以下となり, 85°C で活性をほとんど失った。PMase はさらに不安定で 60°C で活性をほとんど失った。

4) 金属イオンなどの影響 粗酵素液に各種金属塩, EDTA を加えて酵素活性に及ぼす影響を調べた結果は Table 2 に示したように RNase は Cu^{++} , Zn^{++} に阻害され, 他方 PDase と PMase 活性は EDTA によりいくらか賦活され, NaF, Na_2HPO_4 によって阻害された。

Table 2 Influence of metal ions for enzyme activity of crude Koji extract. (Relative activities)

Enzymes	RNase		PDase		PMase	
	$1.25 \times 10^{-2}\text{M}$	$2.5 \times 10^{-2}\text{M}$	$4.5 \times 10^{-3}\text{M}$	$9.0 \times 10^{-3}\text{M}$	$4.5 \times 10^{-3}\text{M}$	$9.0 \times 10^{-3}\text{M}$
Control	100	100	100	100	100	100
MgCl_2	88	86	80	96	102	126
CaCl_2	96	90	118	132	104	102
CoSO_4	88	90	—	—	—	—
CuSO_4	31	31	70	38	54	—
ZnSO_4	31	31	74	78	78	93
MnSO_4	90	90	—	—	—	—
NaF	101	100	42	22	39	27
Na_2HPO_4	90	88	3	0	33	26
EDTA	105	100	140	136	134	130
Na-citrate	96	90	130	124	118	102

5) 各種の基質に対する作用

a) 酵母 RNA を基質とした場合酵母 RNA の4%水溶液 1.0ml と, 1 M acetat buffer (pH 5.0) 1.0ml, 蒸留水 2.0ml よりなる反応基質に, 粗酵素液 3.0ml と弗化ソーダを反応時に 10^{-2}M になるように添加して 37°C 18時間反応せしめたのち, 60%過塩素酸 8.0ml を加えて停止し, 活性炭処理後, 濃縮して生成したヌクレオチドをカラムクロマトグラフィーで分画, ペーパークロマトグラフィー¹⁴⁾, カルバゾール反応¹⁵⁾で確認した。結果は Fig. 6 に示したように, おもに 3'-GMP を生成することが認められた。

b) ATP を基質とした場合 ATP (40mg/5ml) 水溶液 5.0ml に 1 M acetat buffer (pH 5.0) 1.0ml, 蒸留水 2.0ml および粗酵素液 2.5ml を加えて37°C で 1 h 反応せしめたのち60%過塩素酸 0.5ml を加えて停止し, 活性炭処理後, 濃縮してカラムクロマトグラフィーで分画した結果は Fig. 7 に示すように ADP をへて 5'-AMP, 5'-IMP を主体として生成することを認めた。

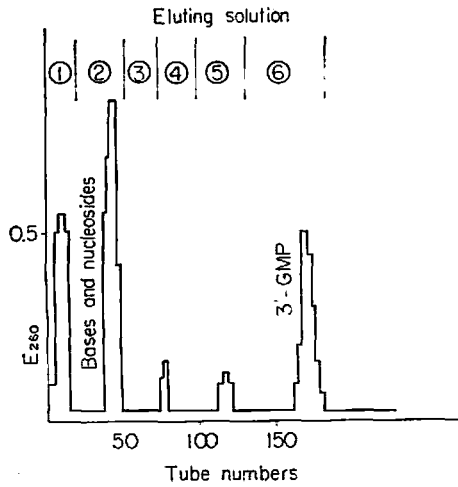


Fig. 6. Digestion yields of yeast RNA by the crude Koji extract.

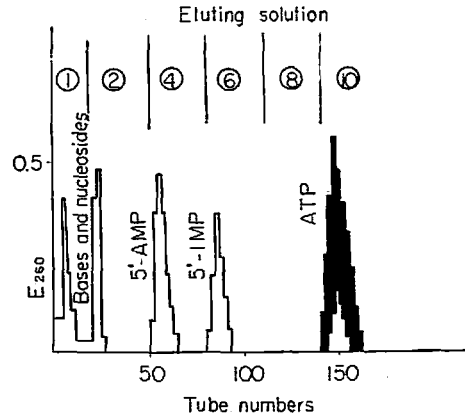


Fig. 7. Digestion yields of ATP by the crude koji extract.

■ before incubation ▤ after incubation

c) 5'-AMP を基質とした場合 粗酵素液を 5'-AMP に作用せしめたときの素果は Fig. 8 に示したように 5'-IMP およびヒポキサンチンを生成することをペーパークロマトグラフィー¹⁴⁾により認めた。

考 察

清酒麴から抽出した粗酵素液の核酸分解酵素活性の性質について検討したものであるが、麴菌の RNA 分解酵素については江上¹⁶⁾、高橋¹⁷⁾がタカザアスターゼ、国中⁹⁾が麴菌と醬油麴につき報告しており、これらと清酒麴 RNase を比較すると最適 pH、最適温度、耐熱性は類似し、Cu⁺⁺、Zn⁺⁺ による阻害も国中の報告と一致する。しかし国中らの報告では RNase 活性が NaF によって阻害され、本報では NaF によって PDase、PMase は阻害されても RNase は阻害されない結果を得た。その原因として国中らは RNase 活性を反応後に生成するリン酸によって測定しているためと考えられる。すなわち本報では RNase 定量法としては、反応後に残った RNA を沈澱試薬により除き、生成した塩基、ヌクレオシドおよびヌクレオチドを一括に含めて紫外外部吸収より定量しているので PDase、PMase に対する NaF の阻害は

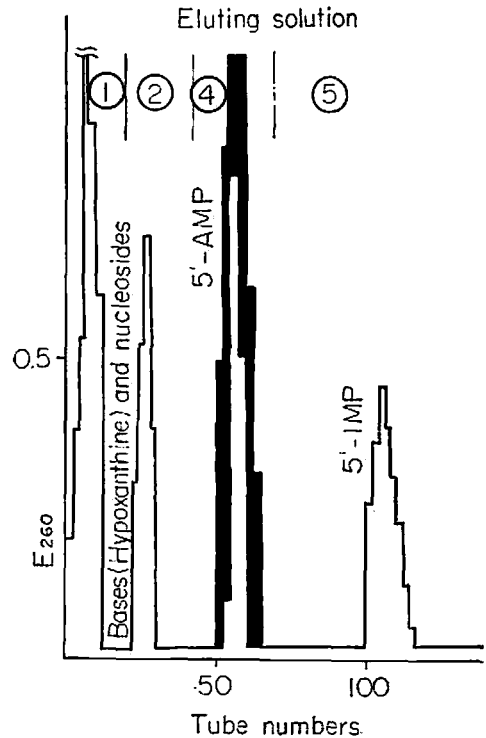


Fig. 8. Digestion yields of 5'-AMP by the crude koji extract.

■ before incubation ▤ after incubation

当然認められるが RNase に対する阻害としてほとんど現われていない結果を得ている。

つぎに酵母 RNA の分解生成物についてみると江上¹⁶⁾はタカヂアスターゼの酸性 RNase は 3'-ヌクレオチドを生成するとし、猿野⁵⁾は 3' 2'-ヌクレオチドを生成し 5'-ヌクレオチドを生成しないと述べたが、その後中尾、緒方⁴⁾は *aspquercinus* の RNase が pH 3.0~8.5 で 3', pH 6.0~9.2 で 5' のヌクレオチドを生成すると述べ、*Rhodotorula glutinis*¹⁸⁾ が培養時間によって 3' または 5' のヌクレオチドを生成すると報じ、猿野¹⁹⁾は *Monascus* 属が 3'-ヌクレオチドを生成する酵素と 5'-ヌクレオチドを生成する酵素をもっていると述べている。

本実験においても麴はアルカリ性では 5' を生成するかもしれないが酸性では主として 3'-ヌクレオチドを生成した。また、しいたけ子実体¹⁷⁾のごとく pH 4.5 でも pH 8.0 でも 3'-ヌクレオチドを生成しない RNase も報告されている。

さらに分解生成物の 3'-ヌクレオチドの種類は清酒醸造のごとく酸性の状態では 4 種のヌクレオチドは認められず主として 3'-GMP を認め、須原らが *Acrocylindrium* sp. MM. 21, において RNase II として見出した RNase とよく類似している。以上の結果は国中、江上らの結果とあまり違わなかった。

麴の PDase 活性は、しいたけ子実体の PDase 活性と最適温度についてはほぼ一致するが、最適 pH が異なり、刀根ら²¹⁾は *Phomacucurbitacearum* の PDase を RNA からモノヌクレオチドを生成する酵素活性として表現しているため、その中に RNase 作用をも含み、PDase と RNase との区別が明らかでないので比較しにくい。

PMase についてはマッシュルーム²²⁾アスパラガス、スイートコーン²³⁾についての報告もあるが、いずれも ATP, ADP より 5'-AMP を生成するときの最適 pH が麴と一致しない。また、しいたけ子実体の PMase は ATP から 5'-IMP を生成しないが、麴の粗酵素液は ATP に作用させると 5'-AMP のほかに 5'-IMP を生成する点で異なる。国中²⁴⁾は麴の PMase が 3' のアデニール酸、グアニール酸、シチジール酸、ウリヂール酸を脱リン酸するとし、5', 2', については検討していないが、本報で 5'-AMP, ヒポキサンチンを生成することを確かめたので、製麴工程中に核酸成分²¹⁾として麴 RNase による 3'-ヌクレオチドのほかに 5'-ヌクレオチドが含まれることも肯定できるし、酵母 RNA を分解する一連の酵素系が存在するものと思われる。

要 約

- 1) 清酒麴の核酸分解酵素の性質を調べ、つぎの結果を得た。
- 2) 粗酵素液の抽出方法を吟味し、麴試料の 2 倍量の水とともに 5°C で磨砕して 1 時間抽出したる液は粗酵素液として使用できる。
- 3) 粗酵素液の最適 pH は RNase 活性は 4.0~5.0, PDase 活性は 3.0~4.0, PMase 活性は 4.0~5.0 の範囲にあり、また 5'-AMP, 3'-AMP を基質としたとき、活性の至適 pH は 5.0~6.0 の範囲にあることを認めた。

4) RNase, PDase 活性の最適温度はともに 50°~60°C, PMase のそれは 45°~55°C の間にあることを知った。

5) 熱安定性については RNase では 100°C 10分処理で、なお約 50%の活性が残るが、PDase は 60°C 10分で 40%以下となり、85°C 10分ではほとんど失活した。PMase はさらに不安定で 60°C 10分でほとんど失活するのを認めた。

6) RNase 活性は Cu^{++} Zn^{++} により阻害され、PDase, PMase は EDTA によりいくらか活性化され、NaF, Na_2HPO_4 に阻害された。

7) 酵母 RNA を基質として作用せしめた場合ヌクレオチドとしては 3'-GMP を主体として生成する。また ATP を基質とすると 5'-AMP, 5'-IMP を主体として生成し、5'-AMP を基質としたときは 5'-IMP とヒポキサンチンを生成した。

終りに臨み本研究の御校閲を賜った阪大寺本教授、照井教授に、御援助を戴きました東洋食品研究所々長稲本常務理事、東洋食品短期大学志賀学長に深謝致します。また灘五郷酒造組合の研究設備を使用させて頂きました。なお本研究の発表をお許し頂いた社長安福武之助氏に深謝致します。

文 献

- 1) 足立：醸酵工誌, 46, 6 (1968).
- 2) 戸田：栄養と食糧, 18, 60 (1965).
- 3) 小杉：日本農芸化学会昭和39年度大会講演要旨集 164頁.
- 4) Ogata: *Agr. Biol. Chem.*, 27, 291 (1963).
- 5) 猿野：醸酵工誌, 33, 74 (1955).
- 6) Igarashi: *Agr. Biol. Chem.*, 26, 218 (1962).
- 7) Eaves, G. N.: *J. Bacteriol.*, 85, 273 (1963).
- 8) 国中：農化, 28, 282 (1954).
- 9) 毛利：醸酵工誌, 43, 922 (1965).
- 10) 須原・大村：酵素化学シンポジウム, 16, 115 (1964).
- 11) 中島：農化, 35, 797 (1961).
- 12) Folin, O., Ciocalteu, V.: *J. Biol. Chem.*, LXXIII, 627 (1927).
- 13) Fiske, C. H., Subbarow, Y.: *J. Biol. Chem.*, LXXI, 375 (1925).
- 14) 橋田：醸酵工誌, 41, 420 (1963).
- 15) Dische, Z., Landsberg, E.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 24, 193 (1957).
- 16) 江上：日本化学, 87, 909 (1966).
- 17) Takahashi: *J. Biochem.*, 49, 1 (1961).
- 18) Nakao: *Agr. Biol. Chem.* 27, 499 (1963).
- 19) 猿野：醸酵工誌, 42, 475 (1964).
- 20) 毛利：醸酵工誌, 44, No. 5, 248 (1966).
- 21) 刀根： *Amino Acid and Nucleic Acid*. 10, 135 (1964).
- 22) 毛利：醸酵工誌, 43, 344 (1965).
- 23) 毛利：醸酵工誌, 44, No 5, 237 (1966).
- 24) 国中：農化, 29, 801 (1955).