

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4報) 酵母の核酸系成分と関連酵素系について

毛利 威徳・**足立 有・**柏原 純

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

(IV) Changes of Nucleic Acid Related Substances and the Related Degrading Enzymes in Sake Yeast.

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

The previous reports described the nucleic acid related substances and their degrading enzymes in the process of the sake brewing. The present report deals with the nucleic acid related substances and their degrading enzymes, and behaviors of these enzymes in the culture filtrate of sake yeast and washed cells suspended in a buffers solution. The results obtained were as follows :

- 1) The 260m μ absorbing materials and RNase activity in the culture broth were increased gradually in the logarithmic phase of the growth of yeast.
- 2) This RNase produced four mononucleotides during the degradation of yeast RNA.
- 3) Ethyl alcohol and calcium chloride promoted the excretion of the 260m μ absorbing materials from the washed cells in the buffer solution.
- 4) Glucose promoted the leakage of RNase and PMase from the washed cells in the buffer solution.

緒 言

清酒酵母による核酸系成分の分泌はすでに樋口ら^{1,2)} Okamotoら³⁾ が述べており 麦酒酵母についても樋口ら^{1,2)}は生菌懸濁液, 破損菌体からの核酸系成分また Leeら⁴⁾はその分泌に対するブドウ糖などの影響を報告し, その外 Nakao ら⁵⁾, 渡辺ら⁶⁾の研究もある。また酵母の核酸分解酵素についても Nakao ら⁷⁾, Takei ら⁸⁾の報告がある。

本研究では各種の清酒酵母を麹汁にて培養しその培養ろ液中, 生菌懸濁液中の核酸系成分と核酸分解酵素を検討し, 酒母, 醪との関連につき考察を加えた。

* 醸酵工学47巻7号416 (1969) 所載

** 福寿酒造株式会社

実験方法

1. 核酸分解酵素系

A. 培養方法 協会6号酵母, 当社山麩酒母より分離した野生酵母を酵素活性が強くあらわれるので麴汁(ボーリング14.7)に28°C, 48時間静置培養した。

B. 試料の調整

a. 培養ろ液 上記の方法で培養したろ液を試料とした,

b. 分泌液 上記の方法で培養した後菌体を集め2度冷蒸溜水で洗浄し乾燥菌体として100mgになるように1/10M 酸酢緩衝液(pH 4.0) 25ml に懸濁しトルオールを加え25°C, 16時間静置後遠心分離し上澄液を試料とした。

C. 酵素活性の測定 前報⁹⁾と同様須原ら¹⁰⁾の方法に準じたが, 活性と反応時間は直線関係にあったので培養ろ液のRNase活性, PMase活性測定の場合共に反応時間は1時間, 分泌液の場合RNase活性は2時間, PMase活性は1時間にそれぞれ延長した。またFig. 1に示すように粗酵素液量と酵素活性は0.1~0.5mlの範囲では直線関係にあることを認めたので測定は上記の範囲にて行なった。

2. 核酸系成分の定量分泌率および菌体内RNA分解率はNakaoら⁵⁾の方法に準じた。核酸系成分の分画は前報⁹⁾に準じた。

3. その他

A. 供試薬品 スクレオチド類は武田薬品KKより恵与されたものでヌクレオシド類, 核酸塩基類は市販品を使用した。RNAは酵母RNA(シグマ社)を使用した。PNPP(*p*-nitrophenyl phosphoric acid), BPNPP(Bis-*p*-nitrophenyl phosphoric acid)は市販品を用いた。

B. 一般分析は国税庁所定分析法によった。またTTC重層法は秋山ら¹¹⁾の方法により, 培養液の酵母の増殖量は井上ら¹²⁾の方法によって測定した。

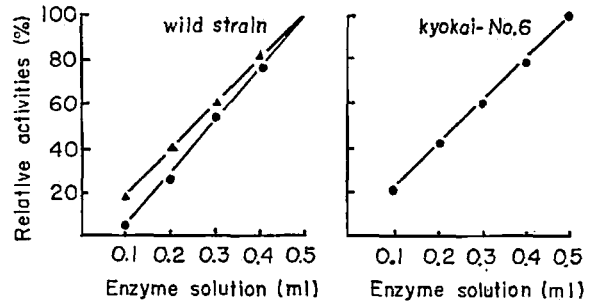


Fig. 1. Relationship between RNase and PMase activities and volume of culture filtrate in reaction mixture.

●—● RNase ▲—▲ PMase

実験結果

1. 酵母培養ろ液中の核酸分解酵素と核酸系成分

A. 酵母培養ろ液中の核酸分解酵素活性

a. 協会酵母と野生酵母の比較 酵母菌株による核酸分解酵素活性の相違を知るため協会6号, 協会7号, および当社の山麩酒母, 醪, 酒蔵の空气中, 酒粕から分離した酵母7種類を麴汁で28°C,

24時間静置培養した。培養ろ液の酵素活性を比較し、またそれらのTTC染色を調べた結果は Table 1 に示した。

Table 1. RNase and PMase activities of culture filtrates of yeasts.

	Reduction of TTC	RNase (pH 4.0)	PDase (pH 3.0)	PMase (pH 3.0)
Kyokai No.6	Red	+	-	-
Kyokai No.7	Red	+	-	-
Yeasts from Yamahai moto	Pink	+++	-	++
Yeasts from moromi (1)	Pink	++	-	+
Yeasts from moromi (2)	Pink	++	-	++
Yeasts from sake brewing room	White	+	-	+
Yeasts from sake-cake	Pink	+++	-	++

- None + Slightly ++ Moderately +++ Significantly

各酵母共に PDase 活性は認められなかった。PMase 活性は TTC 染色 red の酵母 (協会6号、協会7号) には見いだされず、その他の野生酵母と見られる TTC 染色 Pink, white の酵母には見いだされた。以上の結果より酵母菌株として協会6号酵母と当社山廃酒母から分離した野生酵母とについて検討を進める。

b. 培養経過中の変化 麴汁培地に対する接種量としては野生酵母では培養液 1 ml に対して 1.5×10^6 、協会6号ではろ液中の RNase 活性が弱いので 2.3×10^7 を用い培養ろ液中の核酸分解酵素活性などの培養経過中における変化をしらべた。結果は Fig. 2 に示した野生酵母の RNase, PMase 協会6号酵母の RNase 共に

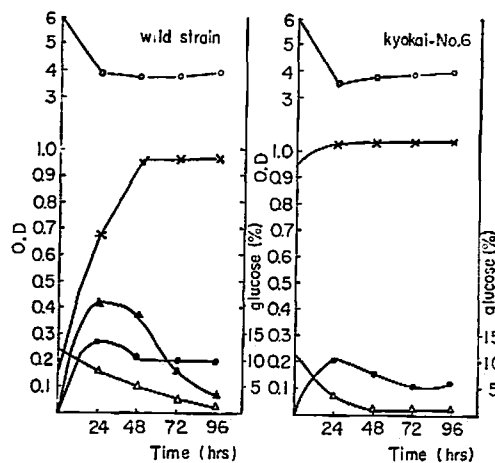


Fig. 2. Changes in RNase and PMase activities during the growth of yeasts.

—○— pH —△— Glucose —×— Growth
—●— RNase —▲— PMase

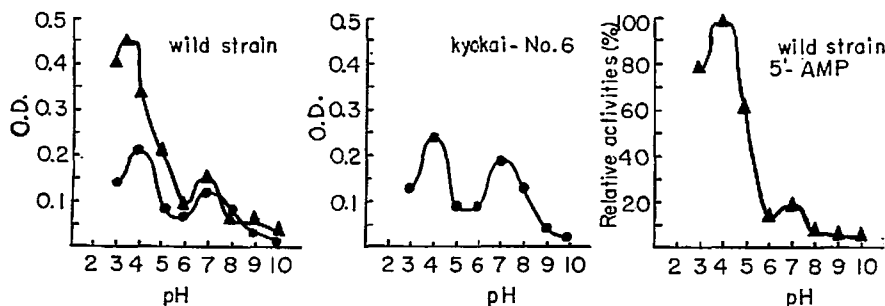


Fig. 3. Effect of pH on enzymatic activities of culture filtrate.

Mixtures of 4.0% yeast RNA (or 1mM PNPP or 0.01M 5'-AMP), 1M acetate buffer or 1 M Tris buffer of the pH as indicated and culture filtrate were incubated at 37°C.

●—● RNase ▲—▲ PMase

ろ液中の活性は24時間目から48時間目の間に強く以後減少した。

B. 酵母培養ろ液の酵素的諸性質

野生酵母の培養ろ液の RNase, PMase および 協会 6号酵母の RNase について酵素的諸性質を検討した。

a. 最適 pH 培養ろ液の酵素活性の最適 pH は Fig. 3 に示す。野生酵母, 協会 6号共に酵母 RNA を基質とした時の RNase 活性は pH 3.0 と pH 7.0 に認められ, 野生酵母の PNPP を基質とした時の PMase 活性は pH 3.0 と pH 7.0 に, また 5'-AMP を基質とした時の最適 pH は pH 4.0 と pH 7.0 に認められた。

b. 最適温度 培養ろ液の酵素活性の最適温度を最適 pH において測定した結果は Fig. 4 に示した。RNase の最適温度は 55°C 付近, PMase では 40°C 付近に認められた。なお PMase 活性測定には PNPP が 60°C で分解する恐れがあるため, 0.01 M 5'-AMP を基質として遊離するリン酸を定量した。

c. 熱安定性 培養ろ液を最適 pH において各温度に10分間処理後急冷し残存活性を測定した結果は Fig. 5 に示した。RNase は 100°C でもかなり活性が残っていたが PMase は 60°C でほとんど失活した。

d. 金属イオンなどの影響 培養ろ液の酵素活性に及ぼす金属イオンなどの影響を 37°C, 最適 pH において測定した結果を Table 2 に示した。RNase は Cu^{++} , Zn^{++} に阻害され PMase は NaF , Na_2HPO_4 によって阻害された。

e. 各種基質に対する作用 酵母 RNA を基質とした場合の反応生成物は Fig. 6 に示すように, 野生酵母, 協会 6号酵母共に GMP, CMP, AMP, UMP を生成することが認められた。塩

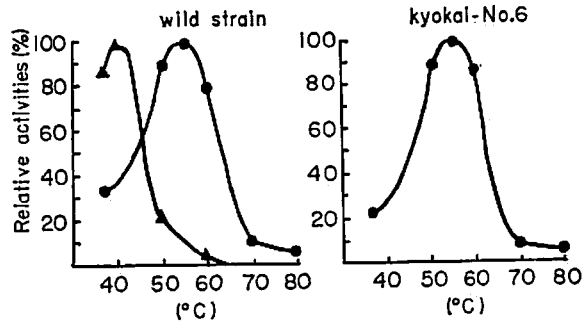


Fig. 4. Effect of temperature on enzymatic activities of culture filtrate.

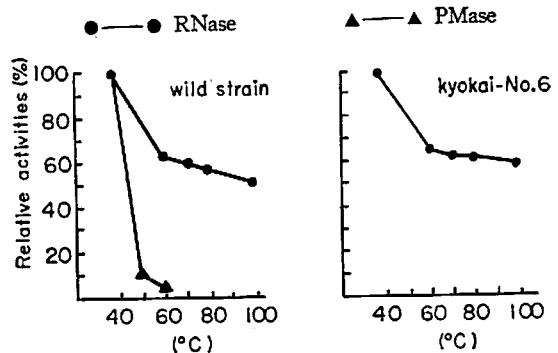


Fig. 5. Enzymatic heat stability of culture filtrate reacted for 10 minutes at various temperature as indicated.

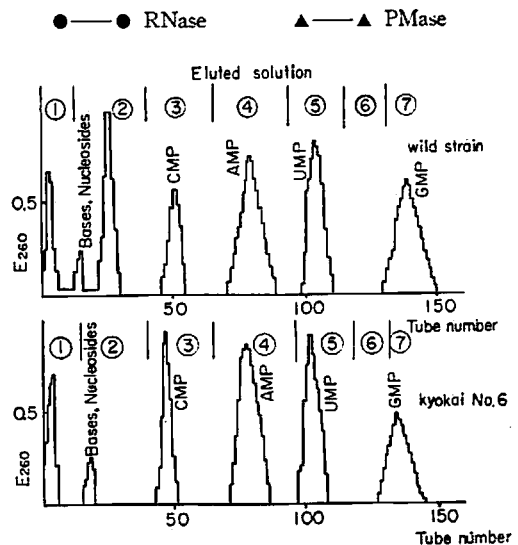


Fig. 6. Digestion products of enzymes in culture filtrate with yeast RNA as substrate. Mixture of 1.0ml of 4% RNA, 1.0ml acetate buffer (pH 4.0) and 4.0ml of culture filtrate were incubated at 37°C for 18 hours.

Table 2. Influence of metal ions on enzyme activities of culture filtrate. Mixtures were incubated in the most suitable pH at 37°C (Relative activities)

Enzymes	Wild strain				Kyokai No. 6	
	RNase		PMase		RNase	
	1.25×10 ⁻² M	2.5×10 ⁻² M	4.5×10 ⁻³ M	9.0×10 ⁻³ M	4.5×10 ⁻³ M	9.0×10 ⁻³ M
Control	100	100	100	100	100	100
MgCl ₂	93	83	122	123	81	87
CaCl ₂	79	76	111	129	94	94
CoSO ₄	107	86	—	—	97	100
CuSO ₄	24	17	—	—	23	13
ZnSO ₄	17	17	49	43	52	32
MnSO ₄	100	83	—	—	100	103
NaF	120	114	16	14	119	126
Na ₂ HPO ₄	127	107	31	21	113	123
EDTA	117	86	109	110	100	71
Na-citrate	89	86	94	82	84	74

— Not examined

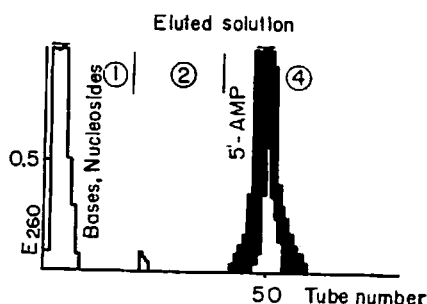


Fig. 7. Digestion products by enzymes in culture filtrate with 5'-AMP as substrate. Mixtures of 5.0 ml of 5'-AMP (10mg/10ml) 1.0 ml of acetate buffer (pH 4.0) and 2.5 ml of culture filtrate were incubated at 37°C for 18 hours.

■ before incubation □ after incubation

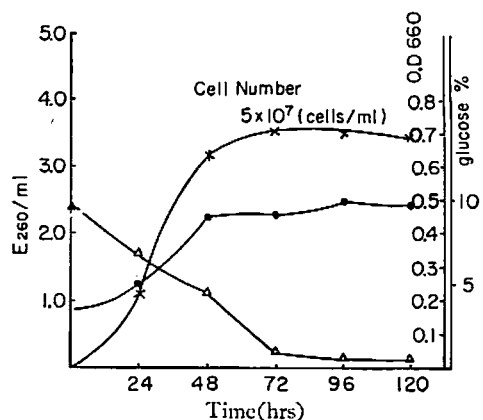


Fig. 8. Changes in 260 mμ-absorbing materials during the growth of yeasts.

—●— 260 mμ-absorbing materials
—△— Glucose —×— Growth

基ヌクレオシド区分である②の方に野生酵母の方が多いのはPMase活性の存在によるものと思われる。5'-AMPを基質として、野生酵母培養ろ液を37°C、18時間作用させた場合の反応生成物はFig. 7に示すように塩基、ヌクレオシドであった。

C. 酵母培養ろ液中の核酸系成分 核酸系成分を含まない次のような培地（ブドウ糖 100g, カザミノ酸 5g, パントテン酸カルシウム 1mg, ビタミンB₁ 1mg, ビオチン10γ, イノシトール 5mg, KH₂PO₄ 1.1g, KCl 850mg, MgSO₄ 250mg, FeCl₃ 50mg, MnSO₄ 50mg, K₂C₆H₅O₇ · H₂O 2.5g, C₆H₅O₇ · H₂O 0.5g/l) に協会6号酵母を培養液 1ml に対して 4 × 10⁴ 接種し 28°C で静置培養し、260mμ吸収物質の変化を測定した結果はFig. 8に示した。酵母の増殖中にこれらの成分は増加し以後あまり大きな変化は見られなかった。

2. 酵母生菌懸濁液中に分泌された核酸系成分と核酸分解酵素系

A. 核酸系成分の分泌に影響する条件

a. 菌体の老若と緩衝液の違いおよび pH の影響 培養時間を変えて調製した酵母生菌体懸濁液を酢酸緩衝液, クエン酸緩衝液, トリス緩衝液に 37°C, 3 時間懸濁し分泌率, 菌体内 RNA 分解率をそれぞれ測定した結果は Fig. 9 に示した. 培養時間の長い老菌体の力が分泌が多くまた酢酸緩衝液よりクエン酸緩衝液の方が分泌しやすく樋口ら¹⁾の結果と一致した. 両酵母ともに酸性より中性の方が多く分泌される傾向を認めた.

b. 温度の影響 協会 6 号酵母を麴汁に 40 時間培養後酢酸緩衝液中に 5, 15, 25, 37°C のそれぞれの温度で 3 時間懸濁し分泌率, 菌体内 RNA 分解率をそれぞれ測定した結果は Fig. 10 に示した. 25°C 以上では分泌率, RNA 分解率ともに多くなることが認められた.

c. 各種試薬とその濃度の影響 麴汁に野生酵母 96 時間培養した菌体および協会 6 号酵母 61 時間培養した菌体を酢酸緩衝液 (pH 4.0) と酒精, 亜硝酸ナトリウム, リン酸 2 ナトリウム塩, 塩化カルシウム, カザミノ酸, ブドウ糖の各溶液に 37°C に 3 時間, 15°C に 24 時間それぞれ懸濁し遠心分離後上澄液の 260m μ の吸光値を培養菌体を加えないものを対照に測定し蒸留水を懸濁液とした時の吸光値を 100% として比較した結果は Fig. 11(a), (b) に示した. 100% に相当する乾燥菌体 mg 当りの分泌量は野生酵母では 37°C および 15°C の場合それぞれ 0.104 μ mole, 0.056 μ mole で協会 6 号では 37°C および 15°C の場合それぞれ 0.082 μ mole, 0.032 μ mole であった. 野生酵母, 協会 6 号酵母ともに酒精濃度の増加とともに著しく分泌は促進された. また塩化カルシウム, リン酸塩によっても若干促進された.

B. 核酸系成分の分画 協会 6 号酵母を麴汁に 60 時間静置培養した菌体を酢酸緩衝液 (pH 4.0)

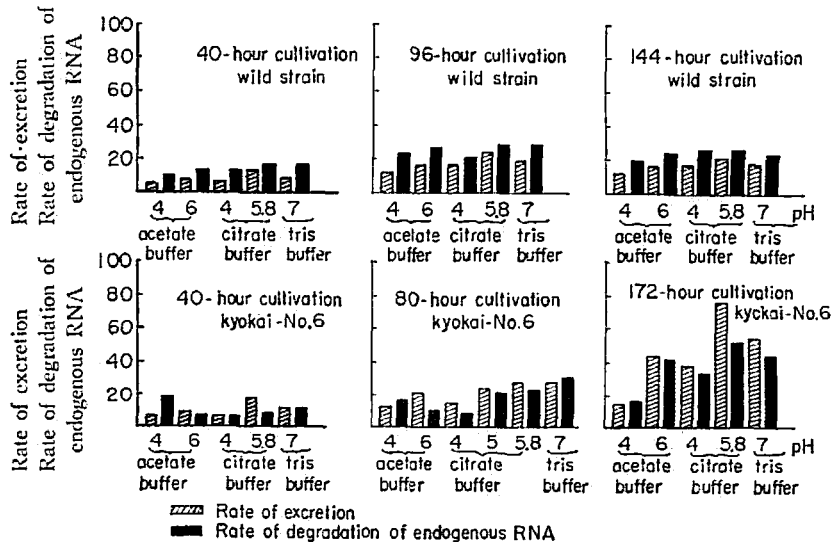


Fig. 9. Excretion of 260m μ -absorbing materials and degradation of endogenous RNA with yeast cells obtained from various phase of growth. Washed cells were suspended in 1M acetate buffer, citrate buffer, tris buffer respectively and incubated for 3 hours at 37°C.

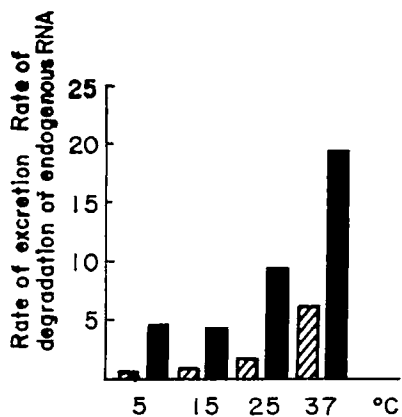


Fig. 10. Excretion of 260 m μ -absorbing materials and degradation of endogenous RNA by effect of temperature as indicated. Washed cells were suspended 1M acetate buffer (pH 4.0) and incubated 3 hours at various temperature.

▨ Rate of excretion.
 ■ Rate of degradation of endogenous of RNA.

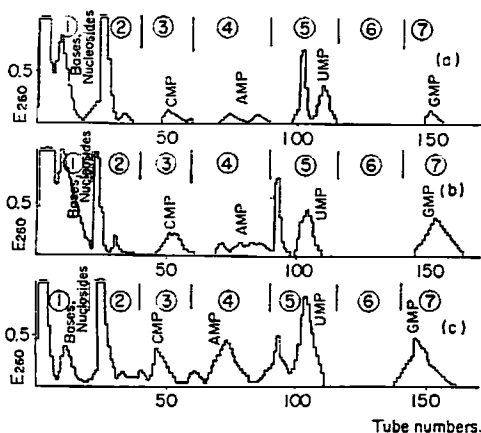


Fig. 12. Separations of nucleotides excreted from washed cells of Kyokai-No. 6.

- (a) Nucleotides excreted from washed cells (84mg dry weight) by an incubation in 1M acetate buffer (pH 4.0) at 37°C for 6 hours.
- (b) Nucleotides excreted from washed cells (84mg dry weight) by an incubation in 1M acetate buffer, CaCl₂, pH 4.0 at 37°C for 6 hours.
- (c) Nucleotides excreted from washed cells (24mg dry weight) by an incubation in 1M acetate buffer, alcohol, pH 4.0 at 37°C for 4 hours.

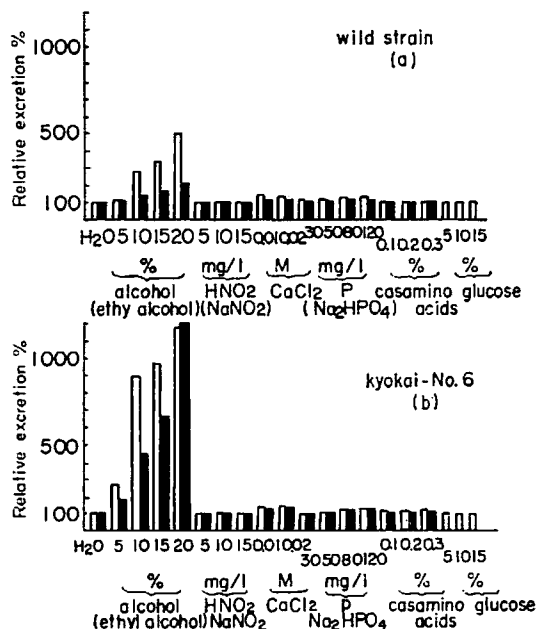


Fig. 11. Effect of various reagents on excretion. Washed cells suspended in 1M acetate buffer (pH 4.0) and incubated for 3 hours at 37°C or 24 hours at 15°C.

□ 37°C
 ■ 15°C
 Incubation temperature

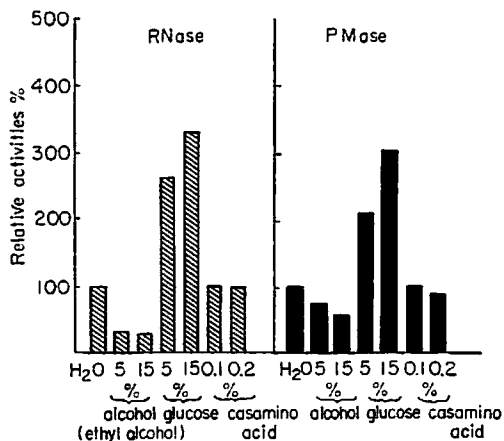


Fig. 13. RNase and PMase activities excreted from washed cells in the various reagents.

と、蒸留水、0.01M CaCl₂、15%酒精の各溶液に懸濁し 37°C に静置後遠心分離し上澄液の核酸系成分を分画した結果を Fig. 12 (a), (b), (c)に示した。蒸留水、塩化カルシウム溶液では塩基、ヌクレオシド区分が主体をなし、ヌクレオチドの生成は少なかったが、酒精では前者にくらべて塩基、ヌクレオシドの生成が少なく、ヌクレオチドの生成量が増加した。ヌクレオチドとしていずれの場合も CMP, AMP, UMP, GMP が認められた。

C. 核酸分解酵素系の分泌

a. 核酸分解酵素の分泌におよぼす懸濁液中の酒精 (5, 15%), ブドウ糖 (5, 15%) カザミノ酸 (0.1, 0.2%) の影響を測定するため蒸留水を加えた時を対照にして比較した結果を Fig. 13 に示した。清酒醸造工程中に認められる酒精濃度 (5, 15%) では RNase, PMase 両活性ともにやや減少した。ブドウ糖 (5, 15%) では促進される結果が得られたが、醸酵がともなった。

b. 分泌液の酵素的諸性質 酵母生菌体から懸濁液中に分泌された核酸分解酵素は活性が弱かったので、15%ブドウ糖液を懸濁液とした時の酵素液を用い、最適 pH と金属イオンなどの影響を検討するに止めた。

i) 最適 pH 結果は Fig. 14 に示した。RNase は pH 4.0 と 7.0 に、PMase は 4.0 に最適 pH を認めた。

ii) 金属イオンなどの影響 PMase のみ 金属イオンなどの影響を調べた結果は Fig. 15 に示した。NaF, Na₂HPO₄ によって阻害された。

考 察

TTC 染色 red を示す協会酵母 2 菌株は PMase 活性を認めることができなかったが、TTC 染料 pink または white を示す野生酵母は活性には差はあるけれどもいずれも PMase 活性を認めたことは興味がある。それ以外の点においては両菌株の間に大きな差を認めなかった。Nakao ら⁷⁾は *Rhodotorula glutinis* について pH 4.0 と pH 7.0 に至適 pH を持つ RNA-depolymerase I, II を見いだし PDase, PMase 活性は見いだされないことを述べている。これと清酒酵母の RNase の最適 pH は一致したが他の諸性質は比較できなかった。清酒麹 RNase と比較すると最適 pH は 4.0~5.0 に

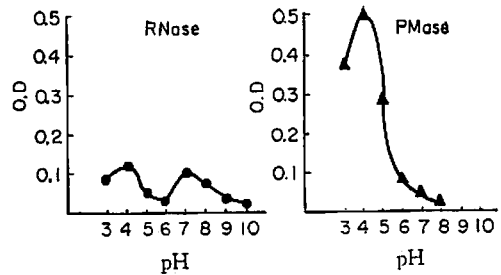


Fig. 14. Effect of pH on enzymatic activities of the excreted solution from washed cells.

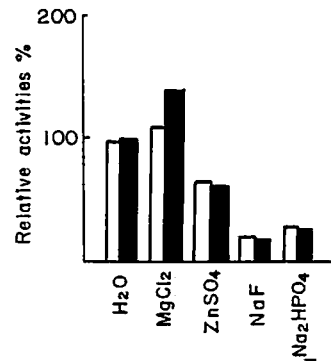


Fig. 15. Effects of metal ions, NaF and Na₂HPO₄ on PMase activity.

□ 4.5 × 10⁻³M ■ 9.0 × 10⁻³M

あり清酒酵母の RNase とやや異なるが最適温度、熱安定性および Cu^{++} , Zn^{++} に対する阻害は類似した。また RNA 分解物は清酒麴では GMP を主体としたが酵母では GMP をはじめ CMP, AMP, UMP が認められた。清酒麴の PMase の最適 pH は 4.0~5.0 にあり酵母の PMase とやや異なり 5'-AMP の分解生成物では清酒麴には IMP が見いだされたが清酒酵母では見いだされなかった。これらのことから、前報³⁾ に述べた酒母、醪のろ液による酵母 RNA 分解生成物として IMP が見いだされていることは清酒麴によるものであり、また GMP 以外に CMP, UMP, AMP もかなり多く見いだされていることは清酒酵母によるものであり、醪、醪における核酸関連物質の消長は両方の核酸系系によって支配されているものと考えられる。

生菌懸濁液への核酸系成分の分泌は酒精、塩化カルシウム、リン酸ソーダの存在とクエン酸緩衝液が有効でまた 25°C 以上の温度、老菌体の使用も分泌が多かった。これらの結果は樋口ら^{1,2)}, Lee ら⁴⁾, 渡辺ら⁶⁾の結果と類似した。酒精の存在が核酸系成分の分泌を促進することは特に清酒醸造の立場からは興味深いと考えられる。

酵素系の分泌にはブドウ糖が RNase, PMase の分泌を促進した。

ここで清酒醸造工程を通してみると、核酸分解酵素系は清酒麴と酵母に由来するものが主体をなし、核酸系成分は蒸米、麴に由来するものが関連酵素系の作用を受けて生成されるものと酵母の分泌によって放出されるのが清酒に移行するものと考えられる。

要 約

- 1) 協会酵母と野生酵母とは酵母 RNA 分解生成物が異なった。
- 2) 核酸系成分の分泌には酒精、塩化カルシウム、リン酸塩、温度、菌の種類と老若が影響したがとくに酒精において顕著であった。
- 3) 酵母の核酸分解酵素系は清酒麴のものやや酵素的諸性質を異にし分泌にはブドウ糖がこれを促進し酒精は阻害することが認められた。

以上の結果より清酒醸造工程中では酵母からも核酸系成分と核酸分解酵素が分泌されることを認めた。

終りに臨み本研究の御校閲を賜った阪大照井教授、御援助を戴きました東洋食品研究所々長高草木常務理事、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いたします。

文 献

- 1) 樋口・植村：農化, 33, 304 (1959).
- 2) 樋口・植村：農化, 34, 721 (1960).
- 3) Tochikura, T., Kuwahara, M., Yagi, S., Oka, moto, H., Tominaga, Y., Kano, T., Ogata, K.: *J. Ferment. Technol.*, 45, 511 (1967).
- 4) Lee T. C.: *J. Food. Science.*, 33, 124 (1968).
- 5) Nakao, Y., Imada, A., Wada, T., Ogata, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 28, 151 (1964).
- 6) 渡辺・大沢・山本：醸酵工誌, 46, 538 (1968).
- 7) Nakao, Y., Ogata, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 27, 499 (1963).
- 8) Takei: *Agr. Biol. Chem.*, 29, 1215 (1965).
- 9) 足立・柏原・毛利：醸酵工誌, 46, 6 (1968).
- 10) 須原・大村：酵素化学シンポジウム, 16, 115 (1964).
- 11) 古川・秋山：農化, 37, 398 (1963).
- 12) 井上・高岡・秦：醸酵工誌, 40, 602 (1962).
- 13) 足立・柏原・毛利：醸酵工誌, 46, 898 (1968).