

これによれば Acid Protease System の産生は Amylase のそれに大體平行し生成速度がやゝこれより早い様な傾向にある。併し Alkaline Protease System は30時間目頃(仕舞仕事)に一旦減少し再び産生が行われる様である。この事が米麴の如くいわば菌にとっては生育途上のものを利用する場合 Alkaline Protease System の力價が操・原料等によつて大きく影響される原因ではないかと思われる。

結 言

米麴 Protease の力價測定法を設定しこれに基き種々実験を行つた結果、大要次の如き結果を得た。

1) 米麴 Protease の浸出には Alkaline Protease System は pH 7.5の M/10 Phosphate Buffer, Acid Protease System は pH 3.0の M/10 Lactate Buffer を各々米麴 10g に對し100ccを用い振盪1時間浸出す事が適當である。

2) 通常の米麴の protease は Acid Protease System が主體であり且菌株により著しい差をあらわさない。

3) 同一菌株に於ても麴製造原料により兩 Protease 系の比率が異り特に Alkaline Protease System は糠成分によつてその産生を著しく増加する様である。

4) 米麴製麴中に Alkaline Protease System は一旦減少し仕舞仕事後再産生する傾向があり、これが同 Protease 系の力價の菌株によるふれの大きい原因と考えられる。

終りに臨み種々御助言御指導を賜つた阪大照井教授、奥貫教授、萩原文二氏及び三重大松島助教授に深甚なる謝意を表す。又本稿の発表を許可された山邑酒造株式会社社長山邑太左衛門氏、御校閲を頂いた下田研究所長及び実験に協力を賜つた國定則行氏に厚く感謝する。

(第6回大阪醸造學會にて口演)

文 献

- 1) 蔭山：本誌，**33**，53 (1955)。 2) 松島：本誌，**31**，367, 387, 389, 446, (1953); **32**，14, 58 (1954), 農化，**28**，711 (1954)。 3) 蔭山，國定：本誌，**33**，28 (1955)。 4) 島田，杉田，水本：本誌，**32**，68 (1954)。 5) 吉田：農化，**28**，66 (1954)。 6) DWORSCHACK R.G.: Arch. Biochem. Biophysic. **41**, 48 (1952)。 7) 伊藤：醸學，**4**，394 (1927), **7**，85 (1930)。 8) 蔭山，杉田：本誌，**32**，65 (1953)。

(昭和 29, 10, 28 受理)

清酒醸造とビタミンB群の関係

(第3報) 清酒醸造過程におけるフィチン及びイノシトールの効果と消長

福 井 三 郎 (姫路工大應用化學教室, 京大工業化學教室)

谷 喜 雄・岸 部 忠 信 (KK谷酒造本店, 京大工業化學教室)

[I] 緒 言

清酒醸造において、原料米中に存在するフィチンの役割については、古く黒野氏等¹⁾²⁾により醱酵促進効果のある事が發表され、醱酵助成劑としてフィチンが實用化されるに至つた。

麴菌中にはフィターゼがあるのでフィチンは恐らくイノシトール(In)と無機磷化合物とに分解されるであろうと容易に想像され、森氏等³⁾の清酒醸造における磷成分の形態に関する研究成果は此の推定を裏書きするものである。然し乍ら現在に至る迄、酵母増殖に重要な影響を持つ In の清酒醸造における役割に關して研究が行われていない爲に、フィチンの作用機構、In への變化等に関する知見は未だ不充分であると考えられる。

清酒醸造における In の重要性については、著者等は既に清酒酵母が増殖時に PA (パントテン酸)を必要とするが他に In 等を補足因子として要求する事を認め⁴⁾、次にアルコール存在時の清酒酵母増殖促進因子として PA, In, Bi 等が役立つ事が井上、高岡兩氏⁵⁾及び著者等⁶⁾により觀察された。

本報においては、先ずフィチンは其儘では無効であつて、In と無機磷化合物に分解されて始めて増殖効果を示す事を證明した。

(114)

(福井, 谷, 岸部) 清酒醸造とビタミンB群の関係 (第3報)

次に製麴に際し米中の結合型 In は遊離型 In に變化してゆく事は森氏等³⁾の鱗形態の研究の結果と一致するが、生成した In は更に消費分解されてゆく事を発見した。酒母及び醪でも此の傾向は一層著しい事を認めた。次報⁷⁾で述べる如く清酒酵母及び麴菌が豫じめ培地に添加してある In を消費する現象と関連するものと思われる。此等の事實より清酒醸造中 In 濃度が酵母の必要量以下に低下する場合の起る事も豫想され、フィチン使用の効果も此に由來するのではないかと考えられる。

〔I〕 実験方法

(1) 酵母増殖試験

供試菌株は協會7號酵母、培地は第1報⁴⁾で用いた基本培地(糖濃度5%, N源は硫酸)に PA, Bi, B₁ を添加してあるもので、必要に応じて KH₂PO₄ 量を trace とし、或いは In を添加した。培養法は従来通り接種菌数を最終培地1cc當り4,000個として30°Cで表面積を廣くして静置培養した。

(2) ビタミン定量法

In, PA 及び Bi 定量法は何れも著者等の *Sacch. carlsbergensis* による同時定量法⁸⁾によつた。

(3) 使用したフィチン及びその加水分解法

供試フィチンは松下氏⁹⁾の方法により米糠より製造した。このフィチンを In 定量の常法通り加水分解した結果、1g 中に In 115mg を含有していた。

使用に際してはフィチン200mgを少量の HCl で溶かし NaOH で中和後水で100ccとした溶液を用いた。

フィチンの酸による加水分解は In 定量法の条件通り、フィチン1gを18% HCl 100cc中で8 hrs. 加熱し、HCl を減壓で驅逐後、残つた HCl を NaOH で中和し水を以て100ccとした。

麴菌體によるフィチンの分解は、豫じめ Pfeffer 液に培養して得た *Asp. oryzae* 菌體(壓搾物 15g)とフィチン20mgを水100cc中に懸濁させ pH 5.0で30°C, 24hrs. 接觸させた。本条件でのフィチンの麴菌 フィターゼによる分解度は、上記接觸物中の In 量 400r から、對照として麴菌體同量を水 100cc中30°C, 24hrs. 放置したものの In 量 50r を差引いて算出した。即ちフィチン20mgより In 350r が生じた譯であつて、本条件ではフィチン1gより In 17.5mg が遊離された事になる。酸分解に比し In 生成率は極めて低いが、實際の場合は遊離する In が消費されてゆくものとすれば、平衡がずれてフィチンの分解が更に進行してゆくものであろう (Table 1(B)等のデータ参照)。

〔II〕 フィチン及びその分解産物の清酒酵母増殖促進効果

清酒酵母増殖に對するフィチン及びその分解産物である In と磷酸鹽の効果を検討する目的で、

(1) In を欠如し P 源としての KH₂PO₄ 量を trace とした培地に、100cc當り夫々 KH₂PO₄ 量 20mg, フィチン 20mg, フィチン酸水解物 20mg, In 3 mg 又は In+KH₂PO₄ を添加した時の効果。

(2) In 欠如, KH₂PO₄ 含有 (100cc中 KH₂PO₄ 量 55mg) 培地に更に上記諸物質を夫々添加した時の効果を調べた。結果を Fig. 1 及び Fig. 2 に示す。

以上の實驗より、PA 及び磷酸鹽があれば In は既に第1報⁴⁾で認めた如く清酒酵母増殖効果を示すが、フィチンは其儘では無効であつて、加水分解されて始めて有効となつた。

なお本實驗では In+KH₂PO₄ よりもフィチン酸分解物の効力が若干高かつた。使用したフィチン酸分解物はフィチン20mgより製造したもので、In 2.3mg, P として約 4 mg 含有していた。故に In 3 mg+KH₂PO₄ 20mg (Pとして約 4 mg)を添加試験したので使用した In 及び P 量は大体同様の筈であるが、此の差の原因は明らかでない。フィチン中の Ca, Mg 等の鹽類又は混入する少量の NaCl の影響によるのかもしれない。

〔IV〕 清酒醸造時の In 濃度の變化

昭和 28 酒造年度において、製麴時、酒母(生醗)及び醪における In 量の變化を測定した結果の 1 例を Table 1~Table 3 に示す。

Table 1(A)に示した如く、製麴により In 量が減少して行き、製麴時間が長い程その傾向が大きい様に考えられる。

此の事實を更に確かめる爲に、實驗室内で製麴を行つた結果を Table 1(B)に示す。

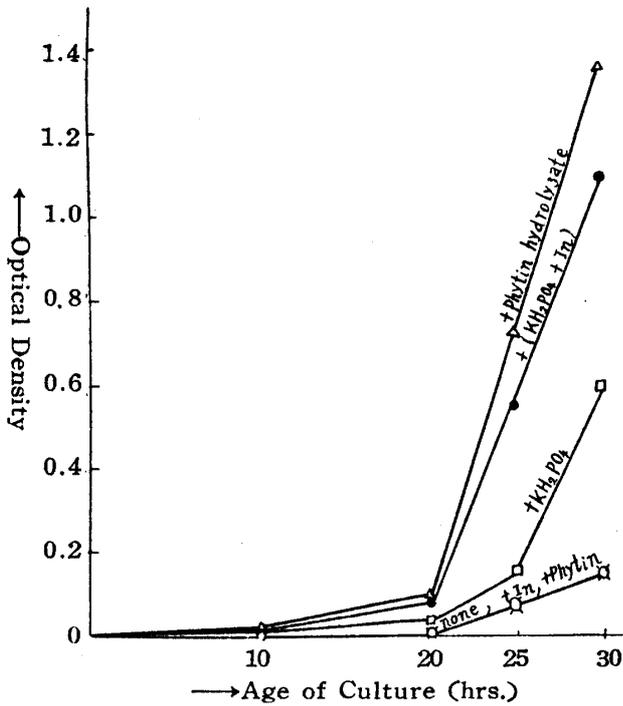


Fig. 1. Comparison of Effects of Phytin and Inositol in media(Inositol-free, KH_2PO_4 -trace)

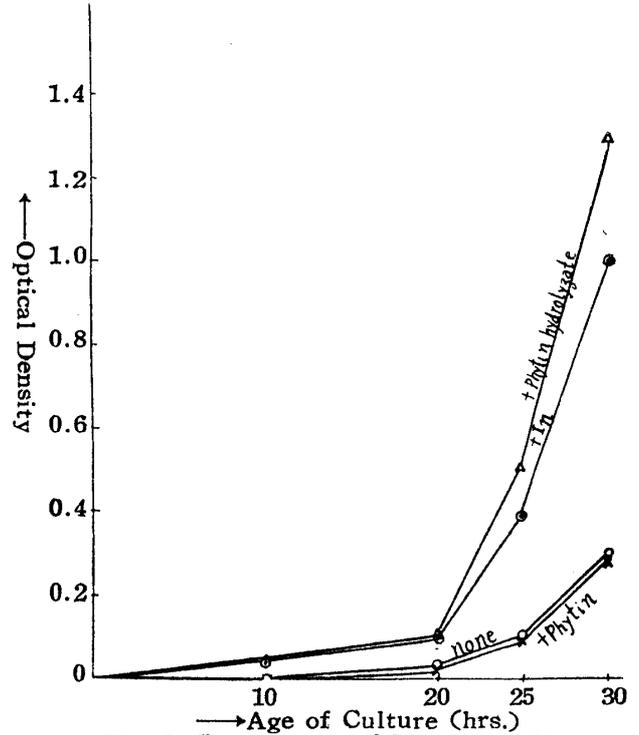


Fig. 2. Comparison of Effects of Phytin and Inositol in media(Inositol-free, contg. KH_2PO_4)

Table 1. (A) 製麴中の In の変化

試料	全 In 含量 (乾物 1g 中の r)	品 種	精白度 (%)	備 考
醗 味 米	450	山 田 錦	27.0	製麴時間
醗 麴	50	同 上	27.0	53hrs
並酒掛米(1)	530	廣 島 八 反	27.0	製麴時間
並酒麴(1)	155	同 上	27.0	50hrs
並酒掛米(2)	850	大 阪 雄 町	18.0	製麴時間
並酒麴(2)	600	同 上	23.0	42hrs

Table 1. (B) 製麴 (實驗室) 中の In の変化

試料	全 In 量 (r)	遊離 In 量 (r)	結合型 In 量 (r)	遊離 In / 全 In	備考及製麴時間
米	225	23	202	0.10	—
若 麴	89	20	69	0.22	3 日 目
老 麴	75	17	58	0.21	5 日 目, 胞子着生

即ち実験室内の実験結果からも製麴により In が減少する事を認めた.* なお全 In と遊離 In の消長を比較検討すれば、麴菌のフィターゼにより結合 In の一部が分解されて遊離 In が生成し、更にこれが消費分解されてゆくものと解釋される。

酒母及び醪においては Table 2~3 に示した如く、米及び麴中の結合型 In が液中へ遊離型 In として移行し、次第に消費分解されてゆく事が認められた.*

In がどの様に分解されるかは検討していないが、微生物による In 分解の例として細菌による In の C 源として

* その後の研究により製麴中の In 量は一旦増加した後減少することを認め、酒母においても一時増加した後減少する場合もあることを知った。(未発表)

(116)

(福井, 谷, 岸部) 清酒醸造とビタミンB群の関係 (第3報)

Table 2. 酒母のInの變化
(試料1g中のInr數)

仕込後 日 數	狀 貌	In 量 (r)	
		酒母全體中全 In	液中遊離 In
直 後	—	188	trace
19	膨 れ	138	28
23	湧 付き	122	24
25	配 分	69	13
36	使用前	18	4

Table 3. 醪のInの變化 (試料1g中のr數)

In 量 (r) 操 作	試 料 (1)		試 料 (2)	
	醪全體中 全 In	液中 遊離 In	醪全體中 全 In	液中 遊離 In
留 添 直 後	230	8	323	1.12
留 後 7 日 目	113	21	94	19
湧 付 き	59	15	63	8
ア ル 添 前	30	7	13	3

の利用が報告され¹⁰⁾, その分解機構はケト體を経て酸化分解されるものと述べられている¹¹⁾. 外に鼠では In の 3, 4 位の結合が切れてブドウ糖となつた後利用されると云う報告もある¹²⁾.

〔V〕 考 察

フィチンは其儘では効果無く, 分解されて In と磷酸鹽になつて始めて有効となる事を認めた. 又製麴時及び酒母, 醪において原料中の結合型 In は遊離 In に變化後, 麴菌, 酵母等により消費される事を知つた.

In が製麴により減少する事は, 酵母増殖に關係ある他の B 群ビタミン, 即ち PA, Bi, B₁ 等が増加する事實に比し興味深いものがある. 例えば Bi, PA は製麴に際し次の如く増加した.

	Bi 量 (mr/g)	PA 量 (r/g)
蒸 米	5.6	3.5
麴	8.8	6.4

(數値は乾燥物中の値に換算)

第 1 報⁴⁾ において合成培地で試験した場合, 7 號酵母増殖に必要な In 濃度は 100r/tube 即ち 10r/cc 程度であつた.

醪, 醪における液中 In 濃度は大體此の濃度を満足している. 勿論合成培地を用い特定の條件で行つた實驗結果を, 複雑な清酒醸造の實際にあてはめる事は危険であるが, 通常酒母及び醪で酵母の増殖醱酵が盛に行われる時期には液中の In 濃度は大體必要

な水準にあるのであろう. 然し Table 1~3 に示した如く製麴及び酒母等において In が減少する爲に酒母及び醪の初期では液中の In 濃度が低く, フィチンが醱酵助成劑として應用されるのはかゝる事實に由來するものと考えられる.

〔VI〕 綜 括

(1) 醱酵助成劑として従來應用されているフィチンは其儘では酵母増殖促進作用が無く, イノシトール (In) と磷酸鹽に分解されて初めて有効となる.

(2) 清酒醸造において磷については報告があるが, In については研究が無い. 米中の結合型 In は製麴により遊離 In に變化後, 消費分解されて減少する. この事實はパントテン酸, ビオチン等の酵母増殖効果のある他のビタミンが製麴により増加するのに比し特異の現象である.

酒母及び醪でも, 原料中の結合型 In は液中へ遊離 In となつて移行後, 酵母等により消費されて減少してゆく.

(3) 酒母及び醪の In 濃度の消長を調べた. 先に合成培地を用いて認めた 7 號酵母増殖に充分な In 濃度は 10r/cc であつた.

勿論特定の實驗条件下得られた結果を, 複雑な清酒醸造に其儘適用出来ないであろうが, 酵母の増殖醱酵の盛期には酒母及び醪の液中 In 濃度は充分なのであろうと考えられる. 然し製麴, 酒母において In が減少する爲に, 次段階の酒母, 醪の初期に液中 In 濃度が必要量以下の場合があり, かゝる場合はフィチン使用の効果が発揮されるのであろう.

以上の實驗は恩師京大高田亮平教授の御指導, 御援助を賜つた. 又姫路工大助手坂本達雄氏には實驗の 1 部を熱心に協力して戴いた. 深く感謝の意を表する.

(高田研究室報告第 431)

文 献

- 1) 黒野, 勝目, 杉山, 松下: 日醸協誌, 19, (9)8(1924); 20, (1)29, (2)10, (3)10, (1925); 21, (3)4, 5, (4)37, (5)23 (1926). 2) 杉山, 藤田: 日醸協誌, 22, (1)40, (2)35 (1927); 23, (1)54, (2)22 (1928). 3) 森等: 本誌, 31, 419, 429 (1953); 大阪醸造學會, 第 5 及び第 6 回大會講演 (1953年)

及び1954年10月). 4) 福井, 谷, 岸部: 本誌, **33**, 1 (1955) 5) 井上, 高岡: 大阪醸造學會第6回大會講演.
6) 福井, 谷, 岸部: 本誌, **33**, 59 (1955). 7) 福井, 谷, 岸部: 本誌, 投稿中. 8) 福井, 坂本, 谷: ビタミン, 印刷中; 大阪醸造學會第6回大會講演. 9) 松下: 日醸協誌, **19**, (12)23 (1924). 10) MAGASANIK, B.: J. Biol. Chem. **205**, 1007 (1953). 11) MAGASANIK, B.: J. Biol. Chem. **205**, 1019 (1953).
12) STETTEN, M.R., STETTEN, D. Jr.: J. Biol. Chem. **164**, 85 (1946). (昭和29, 11, 10 受理)

Glucopyranosidic Polymer の Paper Chromatography

(其の1) 化學構造と呈色反應との関連性について 非醱酵性糖に関する研究 (第13報)

麻生 清・山内文男・松田和雄 (東北大學農學部農産物利用研究室)

清酒及び麴汁の非醱酵性糖の研究から主として D-glucopyranosidic disaccharides (gluco-biose と略す)を對象に paper partition chromatography (PPC と略す) を數多く手掛けてきたのであるが, これら糖類の化學構造と spot の色調や Rf との相關性を整理してみたならば, gluco-biose や夫より重合度の高い glucose-polymer が PPC で簡易に推定し得ないだろうかと考へて本實驗を行つた次第である。

glucose-polymer の基本である gluco-biose は linkage の仕方で Table 1 の如く11種の異性體があり, 尙 1,1-linkage を除いた gluco-biose は α, β の兩型があるので總數19種の異性體が存在する事になり, 更に gluco-triose にいたると總數160種の異性體があり, gluco-tetraose 以上になると枝別れのものが出來てきて複雑多岐になり, 夥しい數の異性體が存在することになる。

gluco-biose は Table 1 の如く α, β と form の問題と 1,2- α -linkage の kojibiose の不確實さを除けば凡てが發見確定されているのであるが, gluco-triose 以上になると構造の判明しているものは誠に數少く, gluco-biose の様に天然に植物や微生物によつて生合成されるものか又は化學的に合成されるものか大いに興味ある事であつて, その未知の分野は廣く, 單に starch を例にとつて見ても今まで認められている glucose の結合様式 1,4-, 1,6-, 及び 1,3- α -結合や枝別れの仕方や重合度を考慮して組合せを計算すると如何に數多くの異性體があるか驚くべきものであり, 實際に天然の各種植物澱粉の化學構造を論ずる場合には上記の點を或る程度考慮する必要があると思われる。

尙上記した様に gluco-biose の異性體の總數は19種であるが, その中 $\alpha\beta$ 兩型のある糖については水溶液中 α, β 兩型が或る平衡状態に達し spot として呈色していると見られるので, α, β -兩型の點は除外し得る。本報では各種發色試薬による gluco-biose 類の spot の色調を調べた結果を報告し, 次報で Rf との相關性について報告する。

糖の發色試薬としては大部分は芳香族アミン類並びにフェノール類に酸を加えたものが使用されているが, この中後者は ketose に對して鋭敏であるが aldose には感度が鈍く, 前者は其の逆であつて本報では gluco-biose を對照としているので前者を取りあげ, その中 aniline hydrogen phthalate²⁶⁾, anisidine phosphate²⁷⁾, benzidine trichloroacetate²⁸⁾, aniline hydrochloride²⁹⁾ を使用し, 尙還元性のない trehalose には感度の強いアンモニア性硝酸銀³⁰⁾を用い, 更に JEANES 等の用いている 3,5-dinitro-salicylic acid³¹⁾ をつけ加えた。

實驗の部

標準糖液の調製 maltose, cellobiose は武田藥品特級, sakébiose, kojibiose は麴汁醱酵液から chromatography で分離したもの, gentiobiose は第8報³²⁾の如く調製し, isomaltose は Dr. ALLENE JEANES から, laminaribiose は Dr. BOURNE から, trehalose は食糧研究所の佐藤友太郎技官から分譲されたものを用い, sophorose は hydrol から carbon column 並びに PPC で多量に展開して切抜き抽出により調製し, Dr. F. CRAMER から送られた sophorose で同定した (詳細は後報する)。

各糖液は 1~2% にし, 一般に呈色度の鈍い maltose 並びに trehalose は 5% にし, 各々 5~10 μ l づつ spot した。尙 spot した糖量は maltose, trehalose は 250 γ , その他は 100~200 γ である。