

[J. Ferment. Technol., Vol. 50, No. 7, p. 481~485, 1972]

## 米麹の褐変に関する研究

(第5報) 褐変色素前駆物質 L-ドーパの酵素的生成

大場 俊輝, 原 昌道, 菅間誠之助, 村上 英也

(国税庁醸造試験所)

## Studies on the Browning of Rice-Koji

(V) Enzymatic Formation of L-Dopa as a Precursor of the Pigment of Browned Rice-Koji

Toshiteru Ohba, Shodo Hara, Seinosuke Sugama, and Hideya Murakami

(Research Institute of Brewing, Tax Administration Agency,  
Takinogawa, Kita-ku, Tokyo)

Most rice-*koji* for sake-brewing is white, but some, from certain strains of *Aspergillus oryzae*, turn brown during storage in the air. This browning is sometimes accelerated by wet conditions. Previously, the authors have reported the extraction and identification of L-dopa as a precursor of pigment in browned rice-*koji*.

This paper described the formation of L-dopa from L-tyrosine by an enzyme obtained from rice-*koji* prepared by a certain strain of *A. oryzae* which always produces brown *koji*. The enzymatic oxidation of L-dopa was studied spectrophotometrically. The reaction proceeded in three chromophoric phases: the first phase was the formation of red pigment; the second, an intermediate purple pigment; and the third, melanin formation. From these results, it was concluded that this enzyme is responsible for the browning of rice-*koji*.

## 緒論

米麹の褐変とは清酒醸造に使用される麹が暗褐色に変色する現象であり、特に麹を水に浸漬後空気に接触させた場合、褐変しやすくなり、10数時間後には黒く着色する。村上ら<sup>1,2)</sup>は清酒醸造に用いられる麹菌を酸素要求性の面から好気的生育型の菌と嫌気的生育型の菌とに分類し、前者の菌で製麹した米麹は褐変するが、後者の米麹は褐変しないことを認め、さらに、このような褐変性麹を用いて醸造すると、酒母、もろみおよび清酒の色が濃く、酒粕は黒粕になる<sup>3)</sup>と報告した。米麹の褐変色素前駆物質について、大脇、村上<sup>4)</sup>は麹および酒粕をアセトンで抽出し、ペーパークロマトグラフィーで検討した結果、三種の着色スポットを認め、中村ら<sup>5)</sup>は麹中にカテコール、ハイドロキノン

の存在を定性的に確認し有力な褐変色素前駆物質であるとしている。

一方、著者らは前報<sup>6)</sup>で褐変色素前駆物質として L-ドーパ (3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine) を褐変性米麹から分離、同定した。しかし、非褐変性麹をドーパ水溶液に浸漬しても褐変しないことから、褐変性麹菌によって特異に生成される酵素が米麹の褐変に関与しているものと推定した。また、麹浸出液の着色および麹の酸化酵素に関する研究から酵素が麹の褐変、黒粕の原因になっているとされている。<sup>7~9)</sup> 本報では、L-ドーパの酵素的生成ならびに褐変機構について検討した結果、米麹中に *Aspergillus oryzae* によって生産された酵素によりチロシンよりドーパが生成され、つぎに黒色色素メラニンに変化することを知ったので報告する。

## 実験方法

1. 使用菌株 実験に供した麹菌は醸造試験所保存菌株 (RIB) である褐変性麹菌 RIB 128 (ATCC 22788), 非褐変性麹菌 RIB 647 (ATCC 22787) を使用した。いずれも、市販もやしから分離したもので、分類上 *A. oryzae* series に属する。

2. 米麹 麹は精米歩合75%白米を使用し、蒸米表面に上記菌株を培養し常法により麹蓋法で製麹した。

3. 酵素液の調製法 製麹後ディープフリーザーで貯蔵した褐変性米麹または非褐変性米麹 400 g に5倍量の pH 7.0, 0.1M りん酸緩衝液を加え、室温にて30分振とう後、10,000 rpm, 20分間遠心分離し、得られた上澄液に硫安を80%飽和になるように加えて1~2日間5°Cで放置する。その後、15,000 rpm, 30分間遠心分離し、沈殿物を少量の蒸溜水に溶解し一夜蒸溜水で透析後、再び遠心分離して上澄液約 40mlを得、酵素液として使用した。

4. 褐変色素前駆物質 L-ドーパの同定

A. 酸性活性アルミナカラムクロマトグラフィーによる褐変前駆物質の分離 L-チロシンに酵素液を作用させ L-ドーパ生成の有無を検討した。酵素反応は米麹の褐変最適条件<sup>10)</sup>である pH 6, 40°C で行なった。褐変性米麹から得た酵素液 1 ml と 0.1M, pH 6.0 のりん酸緩衝液に 0.05% の濃度に L-チロシンを溶解した溶液 10ml の作用混液を 40本のモノー型試験管に入れ、40°Cの恒温槽において、1 分間 120 回往復振とうし、15分間反応させた。反応液約 400ml を沪過後、沪液を 50°C以下でロータリーエバポレーターを使用し、約 30 ml に減圧濃縮した。この濃縮液にメルク社製酸性活性アルミナ 10 g を加えてスターーラーで攪拌しながら、3 N アンモニア水溶液で pH 8.5 にし、約 5 分間攪拌し酵素反応生成物をアルミナに吸着させた。その後上澄液をすてアルミナを内径 20mm のカラムにつめ、蒸溜水で洗滌後、0.3N 酢酸で溶出し、10 g ずつ分取した。検出方法は Arnow<sup>11)</sup> の方法によった。

B. Dowex 50-X8 陽イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーによる褐変前駆物質の精製 酸性活性アルミナカラムクロマトグラフィーにおける 0.3N 酢酸溶出区分をロータリーエバポレーターで約 20ml に減圧濃縮し、この濃縮液を内径 20 mm, 高さ 80 mm の Dowex 50-X8 (H<sup>+</sup>) 陽イオン交換樹脂カラムに吸着させ、蒸溜水で十分洗滌後 1 N 塩酸で吸着部分を溶出し、10 g ずつ分取した。検出方法は Folin 反応によった。

C. ベンゾイル誘導体 (3, 4-di-O-benzoyl-N-benzoyl-L-

dopa ethyl ester) の合成 Dowex カラムクロマトグラフィーにおける 1 N 塩酸溶出区分をロータリーエバポレーターにより 50°C 以下で濃縮乾固する。その後、前報<sup>6)</sup>と同じ方法によりベンゾイル誘導体を合成した。

5. L-ドーパの酵素的酸化 0.01% L-ドーパ水溶液 1ml, pH 6.0, 0.1 M りん酸緩衝液 3.5 ml, 褐変性麹から得た酵素液 0.5 ml をモノー型試験管に入れ、40°Cにて往復振とう反応を行ない経時的に日立 EPS 型自記分光光度計を用いて紫外部ならびに可視部の吸収スペクトルの変化を追跡した。対照のセルには基質を除き蒸溜水を加えたものを使用した。

6. 米麹褐変度の比較 RIB 647 菌で製麹した非褐変性米麹ならびに白米を蒸留水、L-チロシン水溶液 L-ドーパ水溶液に浸漬後沪過し、残渣に褐変性麹から

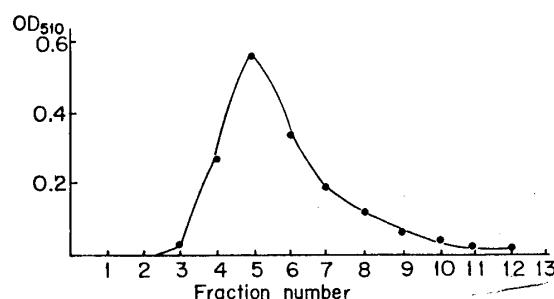


Fig. 1. Separation of a precursor of the browned substance by alumina column chromatography.  
Flow rate: 1 ml/min. Fraction volume: 10 ml.  
After addition of Arnow's reagent, the color density in each fraction was photometrically measured at 510 m $\mu$ .

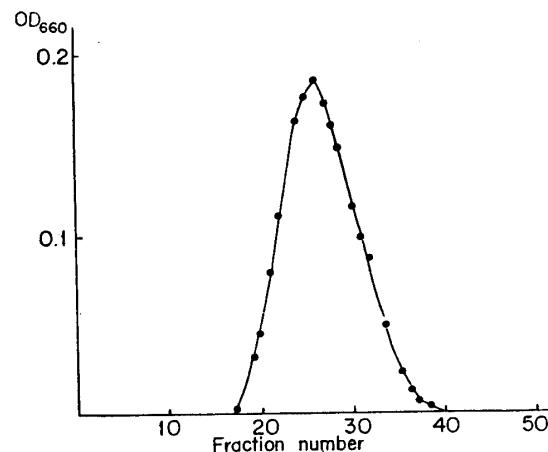


Fig. 2. Purification of a precursor of the browned substance by Dowex 50-X8 (H<sup>+</sup> form).  
Flow rate: 1 ml/min. Fraction volume: 10 ml.  
After addition of Folin-Ciocalteu's reagent, the color density in each fraction was photometrically measured at 660 m $\mu$ .

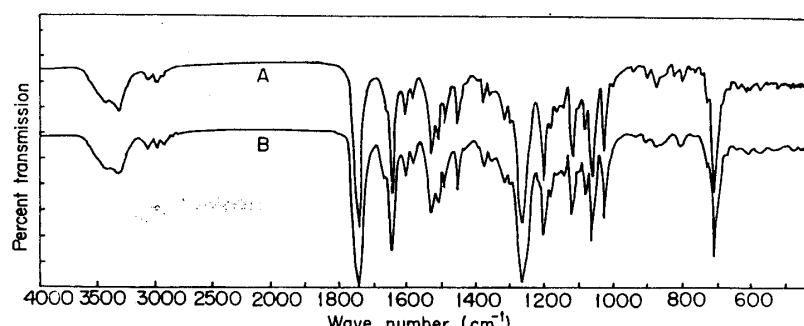


Fig. 3. IR spectra of 3,4-O-benzoyl-N-benzoyl-L-dopa ethyl ester (KBr disks).  
A: Authentic. B: Isolated.

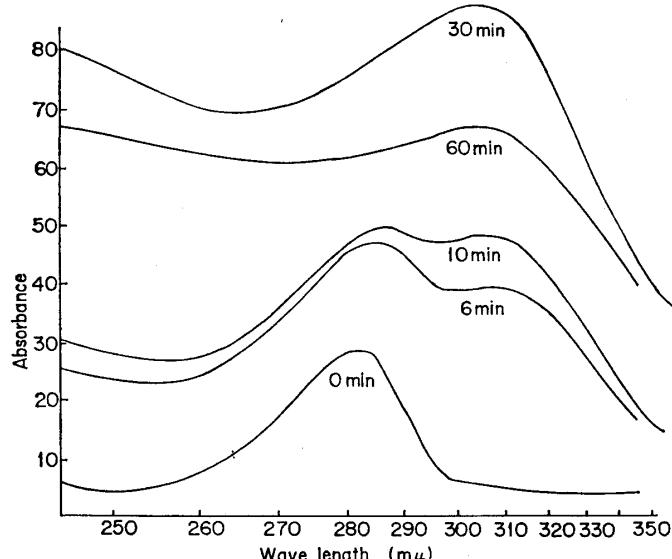


Fig. 4. Spectroscopic study of the action of the enzyme on L-dopa (1).

The time course of the absorbance was observed after mixing the enzyme with L-dopa. The absorbance of 5.0 ml of reaction mixture, containing 0.5 ml of enzyme solution was measured in a 1.0 cm quartz spectrophotometer cell (control); for the time course measurements, the 5.0 ml reaction mixture contained 0.5 ml of enzyme solution and 1 ml of 0.01% L-dopa.

得た酵素液を作用させ、米麹の褐変度<sup>12)</sup>を褐変性米麹の褐変度と比較した。

### 実験結果

**1. L-ドーパの酵素的生成** L-チロシンに褐変性米麹から得た酵素液を作用させ、その反応液を濃縮後アルミナカラムクロマトグラフィーで褐変色素前駆物質を分離した結果を Fig. 1 に、さらに Dowex カラムクロマトグラフィーで精製した結果を Fig. 2 に示した。精製後ベンゾイル誘導体を合成し、再結晶後、白色針状結晶 31 mg を得た。mp は 168~169°C で L-ドーパから合成した誘導体と一致し、混融による融点降下は認められなかった。ir スペクトルを Fig. 3 に示した。なお、非褐変性米麹から得た酵素液を使用し、同様な操作を行なったが、アルミナカラムクロマトグラフィーにおける酢酸溶出区分中には褐変前駆物質は存在しなかった。この結果、褐変色素前駆物質である L-ドーパは褐変性麹中に存在する酵素により L-チロシンから生成されることがわかった。

**2. L-ドーパの酵素的酸化** 褐変性麹から得た酵素液を使用し、L-ドーパの酵素的酸化を分光光学的に検討した結果を Fig. 4, 5 に示した。L-ドーパの 282 mμ の極大吸収は反応時間の経過につれて減少し、

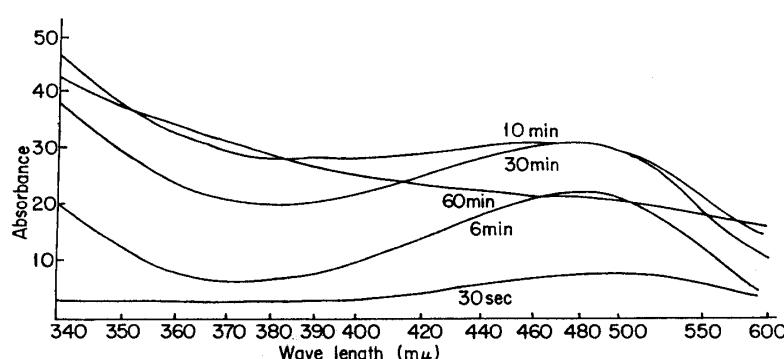


Fig. 5. Spectroscopic study of the action of the enzyme on L-dopa (2). Experimental conditions were the same as in Fig. 4.

Table 1. Comparison of degree of browning.

	Control	Added enzyme
Rice-koji from RIB 128	++	-
Rice-koji from RIB 647	-	++
Polished rice steeped in L-tyrosine or L-dopa soln.	-	++

Polished rice or rice-koji from RIB 647 was steeped in distilled water and L-tyrosine solution or L-dopa solution. After being filtered, the enzyme solution extracted from rice-koji made by strain RIB 128 was added to their residues.

Strain RIB 128 (ATCC 22788) always produces brown pigment.

Strain RIB647 (ATCC 22787) does not produce brown pigment under any culture conditions.

Signs: -; white, +; grey, ++; pale brown, +; brown, ++; dark brown, +++; black.

反応開始 30 分後の極大吸収は  $305\text{m}\mu$ ,  $480\text{m}\mu$  に移り紅色の化合物が生成され, 60 分後には  $305\text{m}\mu$  の吸収は次第に減少し,  $480\text{m}\mu$  の吸収は消滅した。以後反応液は時間の経過とともに紫色を経て黒色となり, 紫外部から可視部にかけて全吸収を示し, 最後に反応液中に黒色塊状沈殿を生じた。

**3. 褐変度の比較** 非褐変性麹ならびに白米を蒸溜水, チロシン水溶液, ドーパ水溶液に浸漬後, 残渣に褐変性麹から得た酵素液を作用させ, 褐変度を比較した結果を Table 1 に示した。酵素液を作用させない对照は白色の状態であったが, 作用させた試料は黒色となり, その色調は褐変性米麹の褐変の色調に類似していた。

### 考 察

微生物の関与するチロシンよりドーパの生成について, Kumagai ら<sup>13)</sup>の *Escherichia intermedia* の生産するチロシン・フェノール・リアーゼ, Sih ら<sup>14)</sup>の *Gliocladium* などのカビ類がアミノ基をホルミル化, カルボベンゾキシ化または t-アブトキシカルボニル化した L-チロシンを水酸化して, のちに酸で加水分解することによる L-ドーパの生成が知られているが, 著者らは前報<sup>6)</sup>において, *A. oryzae* を蒸米に繁殖させた米麹から L-ドーパを分離し, *A. oryzae* によりドーパが生成されることを認めた。本実験において, 褐変性米麹から得られた酵素液はチロシンならびにドーパに対して酵素活性を示し, L-チロシンから褐変色素前駆物質である L-ドーパを生成することから, 本酵素が米麹の褐変に関与しているものと考えられる。

食品の褐変機構として, アミノカルボニル反応により生成されるメラノイジンのような非酵素的褐変反応とチロシンからチロシナーゼによってドーパを経てメラニンを生成する酵素的褐変反応が詳細に研究されている。Mason<sup>15,16)</sup>はマッシュルームチロシナーゼをドーパに作用させてメラニンが酵素的に生成される反応を分光光学的に追跡した結果,  $282\text{m}\mu$  のドーパの極大吸収は酵素反応が進むにつれ次第に消え,  $305\text{m}\mu$  と  $480\text{m}\mu$  とに極大吸収を示す紅色の化合物ドーパクロームが新たに生成され, 次に紫色の化合物へと変わり, その後, 紫外部から可視部にかけて全吸収を示す黒色の色素ができるとしているが, 本実験における褐変性麹由来の酵素液をドーパに作用させた場合の吸収スペクトルのパターンの変化は Mason の結果と完全に一致した。

チロシンからドーパの生成, さらにドーパからメラニン色素形成, 米麹の褐変の再現性などから, 褐変性の麹中に生産されたある種の酵素が米麹の褐変の原因をなしていると考えられる。すなわち, 米麹中に存在するプロテアーゼの作用により米の蛋白質から遊離したチロシン<sup>17)</sup>に本酵素が作用し, ドーパが生成され, メラニン色素が生じ, 麹が褐変したり黒粕になるものと思われる。非褐変性米麹の場合は, 本酵素が全くないかあるいは極めて弱いためにチロシンからドーパが生成されず, ドーパを非褐変性麹に加えても褐変しないものと推定した。本酵素の性質については次報で報告する。

### 要 約

1. 米麹の褐変色素前駆物質である L-ドーパは褐変性の *Aspergillus oryzae* を培養した米麹中に生産される酵素によりチロシンから生成されることを認めた。
2. 本酵素をドーパに作用させ, 経時的に紫外部ならびに可視部の吸収スペクトルの変化を検討した結果, 褐変色素メラニンが生成された。
3. 米麹の褐変の再現性の結果から, 本酵素が米麹の褐変の原因であり, 非褐変性麹中には, 本酵素が全くないか弱いために米麹が褐変しないものと推定した。

### 文 献

- 1) 村上: 農化, 31, 715 (1957).
- 2) 村上, 大脇, 山本: 釀協, 59, 261 (1964).
- 3) 村上, 上野, 大井, 河合, 竹越, 村山, 吉沢: 釀協, 52, 56 (1957).

- 4) 大脇, 村上: 本誌, **44**, 775 (1966).  
 5) 中村, 蓼沼, 茂木, 吉江, 佐藤: 酸協, **64**, 1092 (1969).  
 6) Ohba, T., Murakami, H., Hara, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 674 (1971).  
 7) 伊藤, 佐々木, 千葉: 酸協, **54**, 814 (1959).  
 8) 村上, 河合: 酸協, **53**, 92 (1958).  
 9) 大塚, 吉沢, 原, 吉本, 大脇: 本誌, **43**, 881 (1965).  
 10) 大場, 村上, 原, 横関, 牧野, 江頭: 酸協, **64**, 1074 (1969).  
 11) Arnow, L.E.: *J. Biol. Chem.*, **118**, 531 (1937).  
 12) 村上, 鈴木, 大脇, 桑原: 酸試報, **137**, 12 (1965).  
 13) Kumagai, H., Matsui, H., Ohgishi, H., Yamada, H., Ueno, T., Fukami, H.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **34**, 266 (1969).  
 14) Sih, C. J., Foss, P., Rosazza, J., Lemberger, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 6204 (1969).  
 15) Mason, H.S.: *J. Biol. Chem.*, **168**, 433 (1947).  
 16) Mason, H.S.: *J. Biol. Chem.*, **172**, 83 (1948).  
 17) 布川: 酸協, **56**, 170, 271 (1961).

(昭 47.3.1 受付)