

小麦粉中の醱酵阻害因子

根 来 秀 夫

小麦粉中に醱酵作用を阻害する因子の存在することが **Lecourt**¹⁾により報告されて以来、多くの報告がみられる。

Balls など^{2,3)}は小麦粉の石油エーテル抽出物から、醱酵阻害作用を示す蛋白様の物質を結晶状に分離し、これを **purothionin** と名づけた。佐藤など⁴⁾は小麦粉の水抽出液がパン酵母の醱酵作用を阻害することを認め、阻害因子の本態は、ペプチド結合を含む物質であろうと推定している。また野瀬など⁵⁾は、蔗糖と酵母細胞の混合液に、小麦粉水抽出液の透析内液を加えると、醱酵力の低下と共に、酵母細胞の凝集、損傷、および死滅が認められることを報告している。この場合に、細胞から、260nmに極大吸収を示す物質の溶離されることが知られた。

佐藤など⁴⁾は、パン酵母の細胞を小麦粉水抽出液と共に **incubate** するときは、大量の磷が細胞外に溶離されること、しかしながら、醱酵培地中に **MgSO₄** や **NaCl** を共存させると、醱酵の阻害も磷の漏洩も著しく抑制されることを認めた。岡田など^{6,7)}は、小麦粉の希硫酸抽出液より、ビール酵母を死滅させる作用をもつ高分子ペプチドを分離し、その物質の酵母細胞に対する作用機構について研究した。

以上のように、小麦粉中の醱酵阻害因子については、多数の報告がみられるが、水溶性の阻害因子は未だ十分純化されておらず、従ってその化学的性状や阻害機構に関しては不明の点が多い。そこで著者は、小麦粉の水抽出液より醱酵阻害因子の分別精製を試み、得られた標品について、理化学的性状と醱酵阻害機構について若干の検討を加えた。

実験材料及び方法

1. 小麦粉抽出液の調製法

小麦粉に対して3倍量の水を加えて、室温で10分攪拌した後、その懸濁液を10,000rpmで5分間遠心分離する。上澄を純水に対して透析し、透析内液に水を加えて、小麦粉：水=1：4になるように調製する。かくして得られた抽出液を、以下小麦粉抽出液（1：4）と略称する。

2. 醗酵力測定法

圧搾酵母2g、20%蔗糖液15mlおよび水15ml（あるいは阻害因子液8ml＋水7ml）の混合物を、マイセル醗酵管を付した50mlエルレンマイヤーフラスコに入れ、30℃にincubateし、経時的にCO₂発生量を追跡した。供試酵母はオリエンタルイーストおよびオリエンタルドライイーストである。チマーゼ活性測定法は本文に記載した通りである。なお、醗酵阻害率は次式により算定した。

$$\text{醗酵阻害率(\%)} = 100 - \frac{\text{阻害因子添加の場合、2時間に発生したCO}_2\text{量(g)}}{\text{阻害因子無添加の場合、2時間に発生したCO}_2\text{量(g)}} \times 100$$

3. 蛋白質の定量

蛋白質は日立分光光度計101型を用い、280nmにおける吸光度より算定した。標準蛋白質として、結晶牛血清アルブミンを用いた。

4. 多糖類の定量

多糖類はフェノール-硫酸法⁸⁾により測定し、日立分光光度計101型を用い、480nmにおける吸光度より算定した。標準として、グルコースを用いた。

5. チマーゼの調製法

粉末チマーゼはAlbertなど⁹⁾の方法により、また、液体チマーゼは次の方法により調製した。粉末チマーゼに3倍量のM/50酢酸緩衝液（pH4.5）を加え、30℃に2時間incubate後、10,000rpmで10分間遠心分離する。上澄を液体チマーゼとして試験に供した。

実験結果ならびに考察

1. 小麦粉の品種と阻害効果

小麦粉の種類によって、阻害効果に差異のあることが知られている。著者は、本阻害因子の分離に適当な材料を選定するために、種々の市販小麦粉の水抽出液について、阻害度を比較した。

小麦粉中には、醗酵阻害因子のほかに、促進因子も含まれていること、後者は透析により排除し得ることが知られているが、著者も同様な事実を確認したので、以下の実験においては、小麦粉水抽出液の透析内液を用いた。

Table 1の結果より、醗酵阻害因子は多くの小麦粉中に、かなり普遍的に含まれていることが推察されるが、小麦粉の品種によって、阻害効果にかなり顕著な差異が認められる。

Table 1. Inhibitory effects of aqueous extracts of wheat flours on fermentation.

Wheat flour	Rate of inhibition	%
Eagle (Nihon Seifun Co., Ltd.)	73.4	
Heart (")	56.3	
Supercamellia (Nisshin Seifun Co., Ltd.)	65.6	
Flower (")	34.5	

2. 阻害因子の精製

前述の実験で最も強力な阻害を示した小麦粉（イーグル、日本製粉製品）の水抽出液より、阻害因子の分別精製を試みた。予備実験の結果、本阻害因子は硫酸アンモニウムによって塩析され、エチルアルコールによって沈殿することが認められたので、Fig. 1に示すような方法で、その分離を試みた。

Aqueous extract of wheat flour (1 : 3)	900 ml
	added ammonium sulfate up to 70% saturation
Precipitate	
	dissolved in 150ml of water and filtered
Filtrate	
	dialyzed against water
Dialyzed solution	250 ml
	added with 750 ml of ethyl alcohol
	at 0 °C and centrifuged
Precipitate	
	added with 10 g of Hyflosupercel
	and dried at room temperature
Inhibitor	11.8123 g

Fig. 1. Fractionation of the inhibitor with ammonium sulfate and ethyl alcohol.

本精製標品の阻害効果を原抽出液と比較した一例を示せば、Table 2 の如くである。なおこの実験において、精製阻害因子溶液の濃度及び添加量は、対照として使用した原小麦粉抽出液の量に対応するように、厳密に規制した。

この結果、本精製標品はもとの抽出液の阻害効果をほぼ完全に保有することが認められ、この方法により、極めて好収率で阻害因子を分別採取し得ることが明らかとなった。

Table 2. Effect of the inhibitor on the fermentation by baker's yeast.

Inhibitor	Rate of inhibition %
Aqueous extract of Eagle (1 : 4)	62.7
The purified inhibitor solution (78.7mg/ml)	54.6

阻害因子をさらにSephadex G-50のゲル濾過により精製した。その一例を示せばFig. 2の如くであり、阻害因子と蛋白区分のピークは、ほぼ完全に一致している。

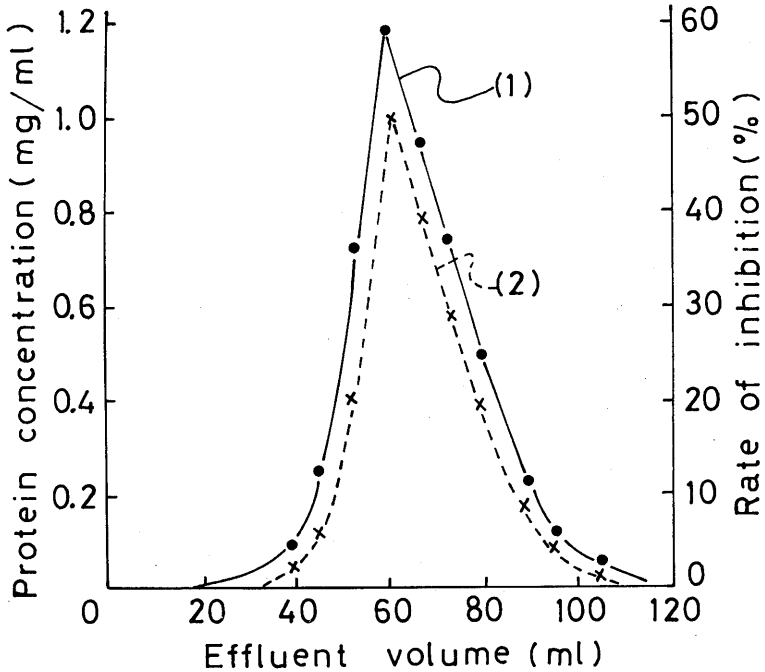


Fig. 2. Gel filtration of the inhibitor through Sephadex G-50. The inhibitor solution (0.34 g / 30ml H₂O) was applied to a column of Sephadex G-50 (2.2×41cm) swollen with water. The flow rate was controlled to 20ml per hour. The inhibitory effects of each fractions (4 ml) and the concentration of proteins were determined under standard conditions.

- (1) Concentration of protein
- (2) Inhibitory effect

Fig. 3 は阻害因子のピークの区分について、紫外外部吸収スペクトルをみた一例であり、280 nm に極大吸収をもち、蛋白質とよく似たパターンを示す。

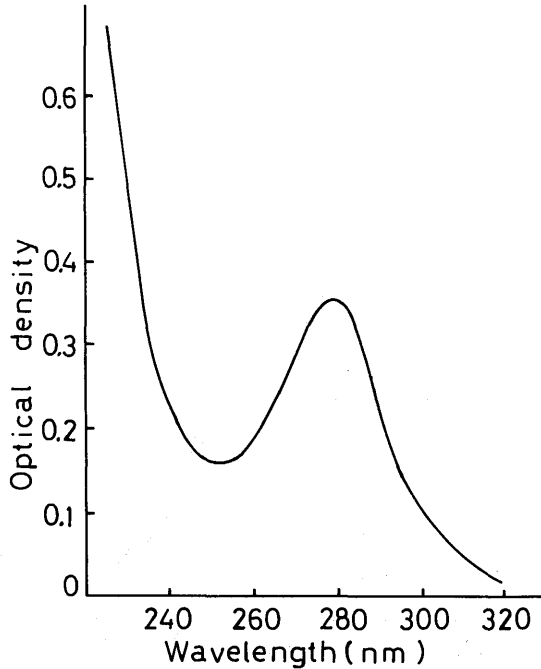


Fig. 3. Absorption spectrum of the purified inhibitor.

このような諸事実より、この醗酵阻害因子は蛋白様の物質であろうと推定される。

3. 阻害因子の熱安定性

佐藤など⁴⁾によれば、小麦粉水抽出液の醗酵阻害作用は、100℃、10分間の加熱で消失するといわれる。そこで著者は、精製阻害因子の耐熱性について検討した。阻害因子液は、78.8mg/8mlの濃度〔小麦粉抽出液(1:4)8mlに対応する〕になるように規制した。

この阻害因子溶液を40、60、80および100℃の各温度にそれぞれ10分間処理した後、未処理因子と阻害効果を比較した結果はTable 3の如くであり、処理

温度が高くなるに従って、阻害効果の低下がみられる。しかしながら、100℃、10分間の加熱によっても、なお幾分阻害作用を保有していることから、この阻害因子は本来加熱に対して抵抗性の強いものか、あるいは不安定な因子のほかに、耐熱性因子を夾雑している可能性が考えられる。

Table 3. Stability of the inhibitor to heat.

Inhibitor	Rate of inhibition %
Untreated	63.2
Heated at 40℃ for 10min	60.5
Heated at 60℃ for 10 min	37.8
Heated at 80℃ for 10 min	30.8
Heated at 100℃ for 10 min	22.5

4. pHと安定性

阻害因子のpHと安定性の関係を吟味した。その一例を示せば Table 4 の如くであり、本因子はアルカリ側では比較的安定であるが、pH 3 以下の酸性側では不安定で、30℃、60分間処理することによって、顕著に失活することが明らかとなった。

Table 4. Stability of the factor to pH.

Inhibitor	Rate of inhibition %
Untreated	53.6
Treated at pH 2.4	21.0
Treated at pH 3.2	28.4
Treated at pH 4.5	35.8
Treated at pH 5.0	41.0
Treated at pH 6.0	45.2
Treated at pH 7.0	51.5
Treated at pH 8.0	52.0
Treated at pH 9.0	52.4

A mixture of 3 ml of the inhibitor solution (1.57 g / 30ml H₂O) and 3 ml of buffer solution of various pH was incubated at 30°C for 60 min, then dialyzed against water. The dialyzed solution was filled up to 8 ml by adding water. The inhibitory effect of the solution (4 ml) was examined comparing with the untreated inhibitor solution.

pH 2 - 8 -----McIlvaine buffer

pH 9 -----Glycocoll-NaOH buffer

5. 阻害因子のProtease の処理

上述のように、この阻害因子は硫酸アンモニウムによって塩析され、75%エチルアルコールで沈殿し、加熱または酸処理によって失活する。さらにこの因子は、Sephadex G-50のゲル濾過で、蛋白区分とほぼ同様な挙動を示し、また280nmに極大吸収をもつ。

このような諸事実より、この阻害因子は蛋白質かまたはポリペプチドであろうと推察される。佐藤ら⁴⁾は、小麦粉抽出液の阻害作用がpapain処理によって消失することを認めている。そこで著者は、精製阻害因子をpronaseで処理し、その影響を検した。実験結果の一例を示せば Table 5の如くであり、阻害作用はpronaseで処理することによって、ほとんど完全に失なわれることが明らかとなった。従って、本阻害因子の本態は蛋白様の物質であることはほぼ確実と思われる。

Table 5. Pronase treatment of the inhibitor.

Inhibitor	Rate of inhibition %
Untreated	48.8
Treated with Pronase	11.7

A mixture of 5 ml of the inhibitor solution (19.7mg/ml water) and 5 ml of 0.1% Pronase solution (or water) was incubated at 30°C for 15 hr. The samples (8 ml) of each inhibitor solutions were taken and their inhibitory effects were examined under standard conditions.

6. 蔗糖濃度と阻害率との関係

醱酵液中の蔗糖濃度を10~40%とし、蔗糖濃度と阻害率との関係を吟味した。その結果はTable 6 の如くなり、糖濃度の増大に伴ない阻害率も大となることが知られた。

Table 6. Relation between the inhibitory effect and sucrose concentration.

Concentration of sucrose in the medium %	Rate of inhibition %
10	45.9
20	59.7
30	68.6
40	69.5

Fermentation test was carried out under standard conditions modified by varying the sucrose concentration in the fermentation medium.

7. ドライイーストの醱酵作用に対する阻害因子の影響

佐藤ら⁴⁾、野瀬ら⁵⁾によれば、パン酵母を小麦粉水抽出液に懸濁して、短時間 incubate すると、その細胞が損傷を受けるといわれる。醱酵力の低下も、この細胞構造の破壊に伴ない膜透過性の変化に起因する可能性も考えられる。そこで、著者は圧搾酵母とは、細胞構造および細胞膜透過性を異にすると考えられるドライイーストを用いて、精製阻害因子の影響を検した。

Table 7 に示す如く、細胞と阻害因子の相対比を等しくした場合には、圧搾酵母およびドライイースト両者の醱酵力の低下は、ほぼ等しい値を示す。

Table 7. Effect of the inhibitor on the fermentation by pressed yeast and dry yeast.

Yeast	Inhibitor solution	Rate of inhibition %
Pressed yeast (2 g)	78.7mg/ml	65.6
Dry yeast (0.75 g)	78.7mg/ml	67.5

従って、この因子による醱酵阻害は単なる酵母細胞の膜透過性の変化に基づくものではなく、より本質的に、酵母の生理的機能が何等かの損傷を受けたためと考えるのが妥当であろう。

8. チマーゼ活性に及ぼす阻害因子の影響

本阻害因子のチマーゼ活性に対する挙動は、醱酵阻害機構を解明する上に重要な問題と考えられるので、この点を追究した。

その一例を示せばTable 8 の如くであり、本精製標品はチマーゼ活性に対しては何等の阻害を示さず、かえって幾分促進する傾向がみられる。従って、本因子はアルコール醱酵酵素系のいかなる過程をも阻害しないことが明らかである。

Table 8. Effect of the inhibitor on zymase activity.

No.	Relative fermentation activity %
(1)	100
(2)	115
(3)	100
(4)	120

Fermentation tests were carried out under standard conditions modified by varying the fermentation media as follows.

No.	Zymase	Inhibitor	M KH_2PO_4	20% Sucrose	H_2O	M/5 Acetate buffer (pH5.0)	Ammonium acetate
(1)	Powder 1 g	0	3 ml	15ml	11ml	1ml	50mg
(2)	"	78.8mg/8ml H_2O	3 ml	15ml	3ml	1ml	50mg
(3)	Liquid 3ml	0	3 ml	15ml	8ml	1ml	50mg
(4)	"	78.8mg/8ml H_2O	3 ml	15ml	0	1ml	50mg

9. 阻害因子処理によるパン酵母の醗酵能低下

前述の諸事実より、パン酵母の醗酵力の阻害は、生細胞の損傷に起因するものと思われたので、生細胞を予め阻害因子で処理したものについて、その醗酵力を未処理細胞と比較した。その結果はFig. 4に示す如くである。醗酵の過程に阻害因子を共存せしめなくても、ただ単に生細胞を阻害因子で前処理することによって、顕著な醗酵力の低下がみられる。

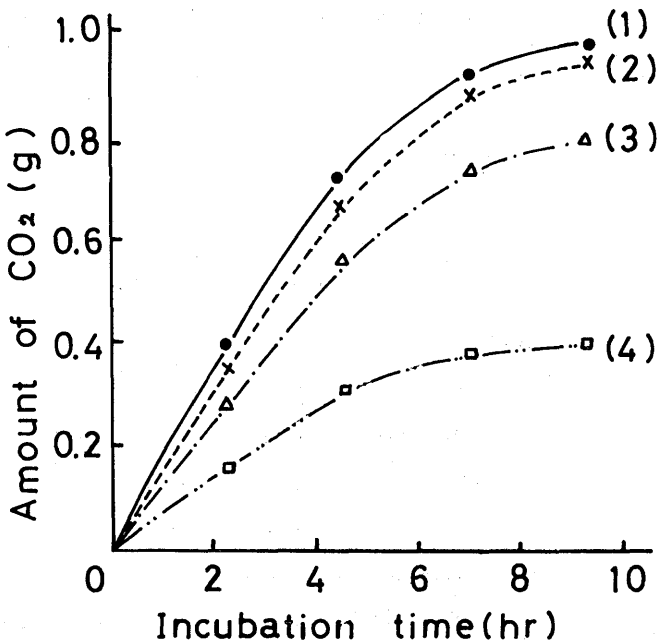


Fig. 4 . Repression of the fermentation activity of baker's yeast
by treating with the inhibitor.

The following systems (1 - 4) were respectively incubated at 30°C for 60 min. The each cells were collected by centrifugation, washed with water and suspended in water (0.7 g cells/15ml water)
The fermentation activities of each cells were determined under standard conditions without the inhibitor.

- (1) Baker's yeast 4 g + H₂O 15ml
- (2) Baker's yeast 4 g + the inhibitor solution (79mg/15mlH₂O)
- (3) Baker's yeast 4 g + the inhibitor solution (158mg/15mlH₂O)
- (4) Baker's yeast 4 g + the inhibitor solution (316mg/15mlH₂O)

Table 9 は、この前処理に伴う細胞損傷の程度を、メチレンブルー染色法で測定した一例であり、生細胞を本因子と短時間接触させるだけで、かなり顕著な死滅のおこることが観察された。

Table 9 . Death of native yeast cells by the inhibitor solution.

Cells	Death rate %
1	12
2	12
3	78
4	85
5	95

- (1) Untreated cells
- (2) Pressed yeast cells (20 g) + H₂O (60ml)
- (3) Pressed yeast cells (20 g) + inhibitor solution (60ml)
- (4) Pressed yeast cells (20 g) + 0.3%BC *solution (60ml)
- (5) Pressed yeast cells (20 g) + toluene (5 ml)

*BC: Alkyldimethylbenzylammonium chloride

The cells were respectively treated at 30°C for 2 hours.

著者はさきに、カチオン性の界面活性剤が、酵母細胞を死滅せしめ、かつ細胞内成分を溶離せしめることを認めたが、^{10,11)}このような界面活性剤の機能は、本阻害因子の性質と極めてよく類似している。しかしながら、前者が圧搾酵母を液化する作用が強いに反して、後者はかかる作用を全く有しないことから、両者が酵母細胞をattackする様式はかなり異なるものと考えられる。

10. 阻害因子の作用に及ぼす食塩または硫酸マグネシウムの影響

佐藤ら⁴⁾によれば、小麦粉水抽出液の阻害作用は、醗酵培地中に少量の食塩を添加することによって、ほとんど完全に消失するといわれる。著者も精製阻害因子を用いた実験において、同様な事実を確認したので、前述の細胞前処理の過程で食塩を添加し、その効果を検した。即ち、Fig. 5に記載した条件で細胞を予め阻害因子液と共にincubateした後、細胞を集め、阻害因子が完全になくなるまで水洗し、洗浄細胞を0.7 g/15ml H₂Oの濃度になるように懸濁し、この懸濁液に20%蔗糖液15mlを加えて醗酵試験を行なった。その結果はFig. 5の通りであり、細胞を前処理する過程に食塩が共存すると、阻害因子による細胞の損傷は、ほぼ完全に防止されることが明らかとなった。

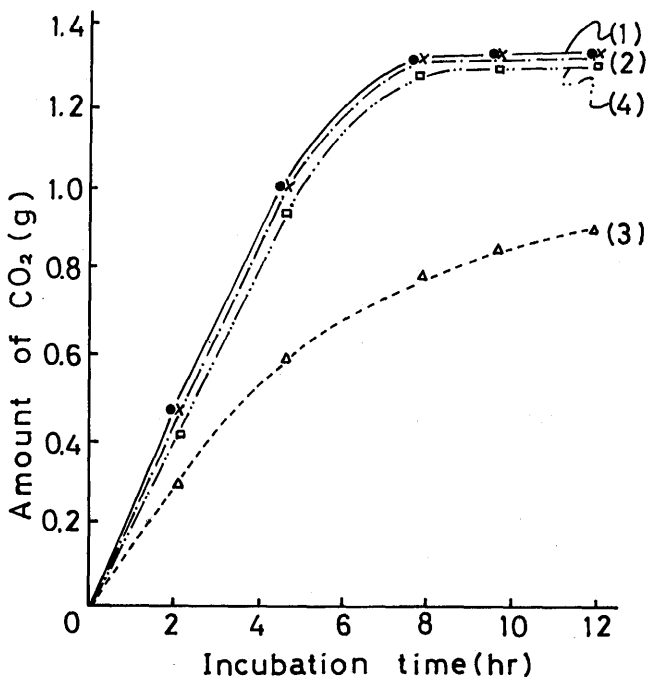


Fig. 5 Repression of the inhibitor activity by sodium chloride.

The following systems (1 - 4) were respectively incubated at 30°C for 60 min. The cells were collected by centrifugation, washed with water and suspended in water (0.7 g cells/15ml water). The fermentation activities of each cells were determined under standard conditions without the inhibitor.

- (1) Baker's yeast 4 g + H₂O 20ml
- (2) Baker's yeast 4 g + 4 % NaCl 10ml + H₂O 10ml
- (3) Baker's yeast 4 g + the inhibitor solution (158mg/10ml H₂O) + H₂O 10ml
- (4) Baker's yeast 4 g + the inhibitor solution (158mg/10ml H₂O) + 4 % NaCl 10ml

また、阻害因子処理に伴なう細胞内蛋白、糖類、ヌクレオチド様物質の漏洩も、食塩または硫酸マグネシウムの添加により、著しく抑制されることが認められた。その一例を示せばTable 10の如くである。

Table 10 Repressive effect of sodium chloride or magnesium sulfate on the inhibitor activity.

No.	Optical density at 260 nm	Optical density at 280 nm	Concentration of polysaccharide (mg/ml)
(1)	0.110	0.063	0.27
(2)	0.115	0.067	0.22
(3)	0.103	0.055	0.22
(4)	0.210	0.149	1.75
(5)	0.135	0.100	0.95
(6)	0.128	0.095	0.95

The following systems (1 - 6) were respectively incubated at 30°C for 24 hours and centrifuged at 10,000rpm. Optical density at 260 nm and 280 nm were determined with the supernatants diluted 50 times with water.

- (1) Cell suspension * + H₂O 25ml
- (2) Cell suspension + 20%NaCl 5 ml + H₂O 20ml
- (3) Cell suspension + M/10 MgSO₄ 5 ml + H₂O 20ml
- (4) Cell suspension + inhibitor solution** + H₂O 15ml
- (5) Cell suspension + inhibitor solution + 20%NaCl 5 ml + H₂O 10ml
- (6) Cell suspension + inhibitor solution + M/10 MgSO₄ 5 ml + H₂O 10ml

* Cell suspension : 1 g cells/25ml H₂O

**Inhibitor solution : 79mg inhibitor/10ml H₂O

実際のパン製造工程においては、doughに2%程度の食塩を配合するので、本阻害因子の存在は実用的見地からは、何等の支障を及ぼさないものと思われる。

要 約

小麦粉水抽出液はパン酵母の醗酵作用を阻害すること、その阻害率は小麦粉の品種により、かなり相異することが認められた。小麦粉の水抽出液から、透析、硫酸塩析、エチルアルコールによる分画沈殿、さらにSephadex G-50によるゲル濾過法によって、阻害因子を分離した。ゲル濾過において、阻害因子のピークと蛋白区分のピークは、ほとんど完全に一致している。また、精製阻害因子は、280 nmに極大吸収を示す。加熱によって阻害効果は低下するが、100℃、10分間の加熱処理においても、なお幾分阻害作用を保有している。アルカリ側では比較的安定であるが、pH3以下の酸性側では不安定であり、また、Pronaseで処理することによって失活する。

本因子は生細胞と場合とほぼ同程度にドライイーストの醗酵作用を阻害するが、チマーゼ活性に対しては、何等の阻害を示さない。醗酵培地中の糖濃度が40%までは、その増大に伴ない、醗酵阻害率も大なることが認められた。

压榨酵母の細胞を阻害因子液に懸濁して、30℃、60分間前処理するときは、醗酵力の顕著な低下がみられる。この際細胞の死滅と共に、細胞内蛋白質・糖類およびヌクレオチド様の物質が細胞から溶離する。しかしこの細胞を前処理する過程で、食塩または硫酸マグネシウムを共存せしめると、醗酵力の低下もまた細胞内成分の漏洩も著しく抑制されることが認められた。

終りに臨み、本実験の一部に協力された守田敏子、三谷妙子、梶真知子の諸嬢に厚く感謝する。本研究は、神戸女学院大学研究所研究助成金によった。記して感謝の意を表す。

引 用 文 献

- 1) Lecourt, R. : *Enzymes and their Role in Wheat Technology*, 342 (1946).
- 2) Balls, A.K., Hale, W.S., Harris, T.H. : *Cereal Chem.*, **19**, 279 (1942).
- 3) Balls, A.K., Harris, T.H. : *Cereal Chem.*, **21**, 74 (1944).
- 4) 佐藤友田郎、田中康夫 : イースト工業会技報 **27**, 47 (1961).
- 5) 野瀬芳夫、市川真琴 : 醸工誌 **46**, 915 (1968).
- 6) 岡田勉、吉栖 肇、寺島 豊 : 日本農芸化学会大会講演要旨集 P.26 (1967).
- 7) 岡田勉、大谷章子、吉栖 肇、妹尾四郎 : 日本農芸化学会大会講演要旨集 P. 345 (1973).
- 8) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. : *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 9) Albert, R., Buchner, E., Rapp, R. : *Ber. Deut. Chem. Ges.*, **35**, 2376 (1902).
- 10) 根来秀夫、平野幸夫、福本寿一郎 : 科学と工業 **35**, 423 (1961).
- 11) 根来秀夫、平野幸夫 : 科学と工業 **36**, 475 (1962).

Negoro, Hideo

Fermentation Inhibitor in Wheat Flour

Résumé

It was found that aqueous extracts of wheat flours showed inhibitory effects on fermentation by baker's yeast and the magnitude of their inhibition considerably varied owing to the different kinds of wheat flours. The inhibitor was fractionated with ammonium sulfate followed by precipitation with ethyl alcohol and further purified by gel filtration through Sephadex G-50. The peaks of the inhibitor and the protein fractions almost entirely overlapped each other.

The purified inhibitor gradually lost the activity by heat treatment, however retained a little inhibitory effect even after treatment at 100°C for 10 minutes. The inhibitor was stable in alkaline side, but labile at acidic region below pH 3.0, and destroyed by treating with Pronase. The purified preparation inhibited the fermentation by dry yeast as well as by the pressed yeast, but showed no inhibitory effect on zymase activity. It was also found that the fermentation activity of baker's yeast was markedly destroyed by incubating the cells with the inhibitor solution at 30°C for 60 minutes, accompanied by release of proteins, carbohydrates, nucleotide-like substances and death of some cells.

However, the repression of the fermentation activity of the cells, also the release of various substances, was considerably prevented provided sodium chloride or magnesium sulfate existed in the fermentation medium.