細菌 β -アミラーゼの生澱粉に対する作用

三吉新介*, 東原昌孝**, 岡田茂孝**

(昭和 61 年 1 月 8 日受理)

Action of Bacterial β -Amylase on Raw Starch

Shinsuke MIYOSHI*, Masataka HIGASHIHARA** and Shigetaka OKADA**

* Central Research Laboratories, Showa Sangyo. Co., Ltd.

(2-20-2, Hinode, Funabashi 273, Japan)

** Osaka Municipal Technical Research Institute

(1-6-50, Morinomiya, Joto-ku, Osaka 536, Japan)

The differences in the action on raw starch of the bacterial β -amylase of strain No. 2718 isolated from soil and soy-bean β -amylase were studied.

The bacterial β -amylase showed good adsorption and higher digestibility of raw starch but the soy-bean enzyme not so much.

The effects of temperature on raw starch digestion by the two β -amylases were as follows; the bacterial β -amylase easily hydrolyzed raw starch below its gelatinization temperature. On the other hand, soy-bean β -amylase hardly hydrolyzed raw starch below its gelatinization temperature.

The hydrolysis of raw starch by bacterial β -amylase was enhanced by pre-treatment of the starch with warm water.

1. 緒 言

澱粉に作用するアミラーゼの中で、 β -アミラーゼは最近まで高等植物にのみ分布している¹⁾と信じられていた。しかし、1971 年著者らが *Bacillus megaterium* に属する 1 細菌が β -アミラーゼを生産することを発表^{2,3)}して以来、*B. cereus* var. *mycoides*^{4,5)}, *Pseudomonas*⁴⁾, *Streptomyces*⁴⁾, *B. polymyxa*⁶⁾ などの微生物にも β -アミラーゼを生産することが報告されてきた。

微生物の生産する β -アミラーゼは、いずれもその構造中に SH 基を含み、PCMB などの SH 阻害剤によって阻害されるほか、澱粉に対する分解率、生成糖等では高等植物 β -アミラーゼと類似しているが^{2,4)}、生澱粉には細菌 β -アミラーゼのほうがよく作用することが明らかにされている⁷⁾。

著者らは細菌 β -アミラーゼの利用を目的として、生澱粉に対する作用について再検討を行ったところ、わずかに加熱処理を行った生澱粉に対し、細菌 β -アミラーゼは対象として高等植物起源の代表として用いた大豆 β -アミラーゼに比して、著しくよく作用する事実を見出した。この性質は、今後の細菌 β -アミラーゼ利用の端緒となると考えられるので報告する。

2. 実験材料と方法

1) 細菌 β -アミラーゼ標品の調製

1% 可溶性澱粉、1% ポリペプトン、1% カツオ肉エキス、0.5% KH_2PO_4 、0.5% NaCl を含む pH 7 の液体培地に、別報⁸⁾の方法でスクリーニングした細菌 3 株 (No. 2718, No. 4536, No. 4576) をそれぞれ植菌し、27°C、4 日間振とう培養した。培養後、遠心分離 (12,000×g, 30 分) して除菌した上澄液 10 l に、0.75 飽和になるよう硫酸アンモニウムを加え塩析し、塩析物を 1.3 mM 2-メルカプトエタノール (2-ME) を含む少量の 20 mM

* 昭和産業佛総合研究所 (273 船橋市日の出 2-20-2)

** 大阪市立工業研究所 (536 大阪市城東区森之宮 1-6-50)

酢酸緩衝液 (pH 6.0) を用い溶解し, Visking tube を用い同組成の緩衝液で透析した. この透析内液を 1.3 mM 2-ME を含む 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) を用い平衡化した SP-Sephadex C-50 カラム (2.8×30 cm) に負荷した. 同組成の緩衝液で洗浄後, 1.3 mM 2-ME を含む 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) を用い, 緩衝液の濃度を gradient に上昇させながら溶出し, フラクシオンコレクターにより 5 ml ずつ分画, 採取した. この分画液の β -アミラーゼ活性画分を集め, 限外濾過 (分画分子量 10,000) によって濃縮後, 1.3 mM 2-ME を含む 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) で透析し, 使用酵素液とした.

2) 大豆 β -アミラーゼの調製

低度変性脱脂大豆 (昭和産業 (株) 製, 産業豆) 1 kg を 10 倍量の 60°C 温水に 30 分間浸漬後室温に戻し, 遠心分離して得た上澄液に pH 4.3 になるようリン酸を加え 10 分間放置後, 沈殿した夾雑タンパク質を遠心除去した. この上澄液を凍結乾燥し, 得られた粉末 (220 g) に 1.3 mM 2-ME を含む少量の 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解した. 同組成の緩衝液で透析後, 透析内液を 1.3 mM 2-ME を含む 20 mM トリス-マレイト-苛性ソーダ緩衝液 (pH 7.8) で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラム (2.8×30 cm) に負荷し, β -アミラーゼを吸着させた. 同組成の緩衝液で洗浄後, 0~1 M NaCl を含む緩衝液で濃度を gradient に上昇させて溶出し, フラクシオンコレクターにより 5 ml ずつ分画, 採取した. β -アミラーゼ活性画分を集め, 細菌 β -アミラーゼの場合と同様の濃縮, 透析を行い, 使用酵素液とした.

3) 酵素活性測定法

20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) を含む 1% 溶性澱粉液 5 ml に酵素液 1 ml を加え, 40°C で反応させ, Fehling-

Lehmann-Schoorl (変) 法⁹⁾ で生成還元糖を測定し, 1 分間にマルトースとして $1 \mu\text{mole}$ の還元糖を生成させる酵素力を 1 単位 (U) とした.

4) 熱安定性および作用最適温度

熱安定性は, 酵素液を 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0), 5 mM システイン存在下において 40~70°C の各温度で 15 分間処理し, 冷却後残存活性を測定し, 未処理の酵素活性に対する相対値で示した.

作用最適温度は, 40~70°C の各温度で活性測定と同一組成の酵素反応を 15 分間行い, その結果を相対値で示した.

5) 生澱粉分解反応

澱粉はコーンスターチ (敷島スターチ (株) 製), コムギ澱粉, 馬鈴薯澱粉, 甘藷澱粉 (いずれも和光純薬工業 (株) 製) を使用し, 生澱粉 200 mg, 1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 0.5 ml に脱イオン水を加え 9.5 ml とし, Fig. 1 の反応器¹⁰⁾ に入れ, 所定温度で毎分 300 回転で攪拌しながら 2 分間ブレインキュベート後, 酵素液 (20 U/ml) 0.5 ml を加え反応させ, 生成還元糖を Somogyi-Nelson 法¹¹⁾, Somogyi 法¹²⁾, Fehling-Lehmann-Schoorl (変) 法⁹⁾ により測定した.

6) 生澱粉への β -アミラーゼの吸着

生澱粉分解反応と同一組成の反応液を 30°C, 30 分間攪拌した後, 遠心分離 (4°C, 3,000 rpm, 10 分間) した上澄液の酵素活性を測定し, これを非吸着活性 (B), 攪拌前の活性 (A) との差を吸着活性 (A-B) とし, 吸着率 $(A-B)/A \times 100(\%)$ で示した.

7) 走査型電子顕微鏡による酵素反応生澱粉粒の観察

60°C で 2 分間熱処理したコーンスターチを 40°C で 60 分間酵素反応せしめ, 澱粉懸濁液を試料台に付け自然乾燥した後, JEOL JEE 4B (日本電子 (株) 製) を用いて金蒸着した. 走査型電子顕微鏡は, JEOL JSM-T300 を用い, 電圧 15 kV で撮影した.

3. 結 果

1) 部分精製細菌 β -アミラーゼの作用最適温度および熱安定性

部分精製細菌 β -アミラーゼ 3 種と大豆 β -アミラーゼの pH 6.0 における作用最適温度および 15 分間各温度で処理した熱安定性を Fig. 2 に示した.

2) 各種細菌 β -アミラーゼの生澱粉への作用

3 種の細菌 β -アミラーゼおよび大豆 β -アミラーゼをそれぞれ 30°C において生コーンスターチに作用させ (10 U/200 mg), 経時的に生成する還元糖を定量すると

Fig. 1. Apparatus for enzyme reaction.

H, 8.2 cm; M, Magnet; D, 4.4 cm; B, Bath; S, Stirrer coated with Teflon.

Fig. 2. Optimum temperature and heat stability of four β -amylases.

●, activity at pH 6.0; ○, activity remained after incubation for 15 min at pH 6.0.

Fig. 3 のようになった。すなわち、細菌 β -アミラーゼはいずれの場合も大豆 β -アミラーゼよりも高い作用性を示し、反応時間に比例して直線的に還元糖を生成することが認められた。この際生成する還元糖はマルトースのみであった。なお、各細菌 β -アミラーゼの間に差があるのは、それぞれの酵素間で安定性を異にするためか、本質的に作用性に差があるのかは明らかでない。

次に澱粉を含む反応系と含まない反応系について、酵素液を加えた後 30℃、30 分間 Fig. 1 の反応容器中で攪拌した後遠心分離し、生澱粉への β -アミラーゼの吸着性について検討した結果を Table 1 に示す。細菌 β -アミラーゼは、いずれも生コーンスターチに対し 70% 以上の吸着率を示したが、大豆 β -アミラーゼはほとんど吸着しなかった。

3) 各種温度における細菌および大豆 β -アミラーゼの生澱粉への作用

吸着率および耐熱性も優れていた No. 2718 株の β -アミラーゼおよび大豆 β -アミラーゼを可溶性澱粉に対する活性を同一にして、40、50、60、70℃において生コーンスターチに作用し、経時的に還元糖生成をみた結果は Fig. 4 のようであった。とくに、60℃までの温度の場合、大豆 β -アミラーゼはほとんど生コーンスターチに作用せず、大豆 β -アミラーゼに比して耐熱性の劣る細

Fig. 3. Digestion of raw corn starch with four β -amylases at 30℃.

○, No. 2718; △, No. 4536; □, No. 4576; ●, soy-bean.

Table 1. Adsorption of β -amylase on raw corn starch at 30℃.

Enzyme source	No. 2718	No. 4576	No. 4536	Soy-bean
Adsorption ratio (%)	87.7	79.7	77.4	0.3

Detail at text.

菌 β -アミラーゼは、コーンスターチの糊化開始温度 (62℃)¹³⁾以下においても、温度の上昇とともに反応速度を増大させた。70℃になると、細菌 β -アミラーゼのみでなく大豆 β -アミラーゼも作用したが、約 30 分後には両酵素ともに熱による失活のため反応は停止した。

4) 温水処理生コーンスターチに対する細菌および大豆 β -アミラーゼの作用

糊化開始温度以下の反応温度において、生澱粉は、細菌 β -アミラーゼによって著しく作用を受けることが明らかになったので、生コーンスターチを 3 種の条件で熱処理し、温水処理澱粉に対する両 β -アミラーゼの作用を比較検討した。

Fig. 5 は酵素を加えない反応系を 65℃に加温し、2 分後 40℃まで冷却および 55℃、30 分加温後 40℃まで冷却したそれぞれの反応系に β -アミラーゼを加え、攪拌反応してその生成糖を測定したものである。このような前処理を行っても、大豆 β -アミラーゼの反応性はそれほど変化しなかったが、細菌 β -アミラーゼの反応性は増大することが判明した。

また酵素を加えない反応系を 40℃、2 分間前処理した後、40℃で酵素を反応させた結果を Fig. 5 の中に示したが、この場合も細菌 β -アミラーゼの作用性は増大したが、大豆 β -アミラーゼの作用には大きな変化はなか

Fig. 4. Time courses of digestion of raw corn starch with β -amylases at various temperatures.

○, No. 2718; ●, soy-bean.

Fig. 5. Digestion of raw corn starch, pretreated at different temperature, with β -amylases.

○, No. 2718; ●, soy-bean.

Fig. 6. Time courses of digestion of raw wheat starch at various temperature with β -amylases.

○, No. 2718; ●, soy-bean.

Fig. 7. Digestion of raw wheat starch, pretreated at different temperature, with β -amylases.

○, No. 2718; ●, soy-bean.

った。

5) 温水処理コムギ澱粉への β -アミラーゼの作用

生コムギ澱粉を用いて 40, 50, 60, 70°C でそれぞれ反応させ、生成還元糖の経時的変化をみると Fig. 6 のようであり、50°C においては細菌 β -アミラーゼの場合反応が進行したが、大豆 β -アミラーゼは 40°C に比してもそれほど反応性が大きくなることは認められなかった。しかし、60°C においては細菌のみでなく大豆 β -アミラーゼの場合もある程度反応が進行した。細菌 β -アミラーゼの場合、60°C, 60 分間作用して到達した生成還元糖量 (マルトース換算) は分解率に換算して約 40% で、この澱粉を加熱糊化後 β -アミラーゼを作用させた時の分解率約 60% に近い値になった。70°C では Fig. 4 の場合と同様に、酵素の失活のため反応は途中で停止した。

コーンスターチの場合と同様に、コムギ澱粉を 60°C, 2 分間処理した後、両 β -アミラーゼを作用させた結果は Fig. 7 のようで、この条件で処理したコムギ澱粉に対する細菌および大豆 β -アミラーゼの作用には大きな差が認められた。また、40°C, 2 分間前処理した生コムギ澱粉の場合も、Fig. 7 のように細菌 β -アミラーゼのほうが大豆 β -アミラーゼに比してよく作用した。

4. 考 察

細菌の生産する β -アミラーゼの糊化澱粉への作用は、大豆 β -アミラーゼとほとんど同一であり、非還元性末端から作用して β -マルトースを遊離し、澱粉構造中の α -1, 6 グルコシド結合付近で反応は停止する。しかし、生澱粉への作用では、すでに上田らによって示されているように、明らかに相違が認められている⁷⁾。この相違をさらに詳細に検討すると、澱粉を完全糊化するのではなく、部分的に加熱処理した場合、大豆 β -アミラーゼ

Fig. 8. Scanning electron photomicrographs of native (a) and partially digested (3%) (b) corn starch granules.

は生澱粉に対する場合と作用のうえではほとんど差は認められないが、細菌 β -アミラーゼにより比較的良好に分解された。コーンスターチの場合、65°C, 2 分間または 55°C, 30 分間の温水処理により前記のような澱粉を作ることができた。このように調製した澱粉を光学顕微鏡で観察してみると、無処理の場合に比較して直径がわずかに大きく、少し膨潤しているが、形態的にはほとんど変化を受けていなかった。

Goto^{14,15)} らによれば、コーンスターチの糊化下限温度は 53~54°C で、糊化開始温度は 62°C, 糊化終了温度は 73~74°C と報告している。一方、竹田、檜作は糊化開始温度付近より急速に糊化は起こっていると報告しており¹⁶⁾、今回糊化開始温度より低い温度で生澱粉を処理したにもかかわらず、細菌 β -アミラーゼに対する感受性が増大していた。さらに、細菌 β -アミラーゼは大豆

Fig. 9. Digestion of various raw starches at 50°C for 60 min with β -amylases.

B, Bacterial No. 2718 β -amylase; S, soy-bean β -amylase.

β -アミラーゼより耐熱性で劣り、作用最適温度も低い (Fig. 2) にもかかわらず、生澱粉に対する作用性は、Fig. 4 にみられるようにいずれの反応温度においても高く、生澱粉に対する作用の面ですぐれていた。温水処理 (60°C, 2 分間) 後、細菌 β -アミラーゼを 40°C, 60 分間作用させたコーンスターチを走査型電子顕微鏡で観察すると、大部分の澱粉粒が酵素作用を受けた特有の穴を持っており (Fig. 8)、澱粉粒中の特定の粒のみが作用を受けやすくなったとは考え難い。

このような現象は、コーンスターチのほかコムギ澱粉、馬鈴薯澱粉、甘藷澱粉など試験した多くの澱粉粒に強弱の差はあっても、一様に認められた。また、各種生澱粉を 50°C, 60 分間酵素反応させたところ、細菌 β -アミラーゼは、大豆 β -アミラーゼに比べていずれの澱粉についても 3 倍以上の分解を示した (Fig. 9)。

溝上ら¹⁷⁾は、*Streptococcus bovis* の α -アミラーゼによる生澱粉分解は、澱粉粒子の細かいものに対するほどよく作用することを見ている。また、谷口ら¹⁸⁾は、*Bacillus circulans* の 1 菌株が生産する α -アミラーゼが他の α -アミラーゼに比して、サゴ、ナガイモ、馬鈴薯の各澱粉に対し比較的強い分解力を有するアミラーゼであることを見出している。今回、著者らが得た各種生澱粉に対する細菌 β -アミラーゼの作用性の差は、澱粉粒子の大小による差よりも、馬鈴薯澱粉のような糊化温度の低い澱粉によく作用することから、各澱粉の糊化温

度に関係しているものと思われた。この点についてはさらに詳細な検討を加えたい。

また、No. 2718 株以外の 2 種の細菌 β -アミラーゼを使用し、各温度における生澱粉の分解性および温水処理生澱粉の分解性を調べたところ、両 β -アミラーゼとも No. 2718 株 β -アミラーゼとほぼ同様な性質を示し、細菌 β -アミラーゼ一般に認められる性質と思われた。

本研究の遂行および発表に当り、心よく許可された昭和産業飼料中 稔当時総合研究所所長、町田芳章次長に対し謝意を表します。

文 献

- 1) J. A. THOMA, J. E. SPRADLIN and S. DYGERT: *The Enzyme*, Vol. 5, P. D. BOYER, ed., Academic Press, New York and London, p. 121 (1971).
- 2) 東原昌孝, 岡田茂孝: アミラーゼシンポジウムプロシーディングス, **6**, 39 (1971).
- 3) M. HIGASHIHARA and S. OKADA: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1023 (1974).
- 4) R. SHINKE, H. NISHIRA and N. MUGIBAYASHI: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 665 (1974).
- 5) Y. TAKASAKI: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1523 (1976).
- 6) S. MURAO, K. OHYAMA and M. ARAI: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 719 (1979).
- 7) S. UEDA and J. J. MARSHALL: *Stärke*, **32**, 122 (1980).
- 8) 東原昌孝, 三吉新介, 岡田茂孝: 科学と工業, **60**, 91 (1986).
- 9) JIS K7001-1976, p. 6.
- 10) M. IWAI, Y. TSUJISAKA and J. FUKUMOTO: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10**, 257 (1964).
- 11) M. SOMOGYI: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
- 12) P. A. SHAFFER and M. SOMOGYI: *J. Biol. Chem.*, **100**, 695 (1933).
- 13) 貝沼圭二: 「澱粉科学実験法」(鈴木繁男, 中村道徳編集), 朝倉書店, p. 146 (1979).
- 14) F. GOTO: *Stärke*, **21**, 267 (1969).
- 15) F. GOTO and Y. YOKOO: *Stärke*, **21**, 128 (1969).
- 16) 竹田千重乃, 檜作 進: 農化, **48**, 663 (1974).
- 17) 溝上恭平, 小崎道雄, 北原覚雄: 澱粉科学, **25**, 132 (1978).
- 18) 谷口 肇, 丸山芳治: 澱粉科学, **32**, 142 (1985).