β-アミラーゼの生澱粉分解

東原昌孝*, 三吉新介**, 岡田茂孝***

Action of β-Amylase on Raw Starch

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

* Osaka Municipal Technical Research Institute
(1-6-50, Morinomiya, Joto-ku, Osaka 536, Japan)

** Central Research Laboratory, Showa Sangyo Co., Ltd.
(2-20-2, Hinode, Funabashi 273, Japan)

*** Biological Chemistry Laboratory, Ezaki Guriko Co., Ltd.
(4-6-5, Utajima, Nishiyodogawa-ku, Osaka 555, Japan)

Action of bacterial β-amylase of three strains isolated from soils on raw starches were studied in comparison with β-amylase of soy-bean. Three bacterial β-amylases have been strongly adsorbed on raw starch granules and digest it. On the other hand, soy-bean β-amylase is adsorbed on raw starch imperceptibly, but digests it a little.

The β-amylase of a strain *Bacillus* sp. No. 2718 has a strong activity to digest raw starch.

The effects of temperature on raw starches digestion of corn, wheat by No. 2718 β-amylase and soy-bean enzyme were as follows; 1) The bacterial β-amylase easily digested every raw starch below its gelatinization temperature but soy-bean β-amylase digested it a little. 2) Raw starch digestion by No. 2718 β-amylase is accelerated by heating.

Starch granules digested by No. 2718 β-amylase and soy-bean enzyme were observed by scanning electron microscopy.

1. はじめに

アミラーゼによる生澱粉分解については、当アミラーゼシンポジウムにおいても数多く取り上げられてきた¹⁻¹³⁾。このなかで、α-アミラーゼおよびグルコアミラーゼによる生澱粉分解については、かなり詳細な検討が行われてきたが、β-アミラーゼによる生澱粉分解については、わずかに上田らによる報告の一部⁴⁾があるにすぎない。

著者らは、1971年に *Bacillus megaterium* に属する 1 菌株の生産するアミラーゼが、高等植物 β-アミラー

ゼとまったく同様な作用機作で澱粉を分解し、生成糖も β-マルトースであることなどを報告し、微生物にも β-アミラーゼ生産菌の存在することを初めて指摘した^{14,15)}。その後、いくつかの大学、試験研究機関において、微生物 β-アミラーゼに関する研究が行われた¹⁶⁻¹⁹⁾。しかし、酵素の生産性の低いこともあって、いまだ産業利用には至っていない。

微生物 β-アミラーゼは澱粉に対する作用機作において、高等植物 β-アミラーゼと同様であったが、作用最適 pH がやや中性付近にあること、等電点がアルカリ側にある点で異なっていた。その後、Hoshino らは、*B. megaterium*, *B. polymyxa* の β-アミラーゼが生澱粉によく吸着するのに対し、高等植物 β-アミラーゼはまったく吸着しないこと、また生澱粉吸着細菌 β-アミラーゼは固定化酵素として溶性澱粉に元の酵素と同様に作用することを報告している¹⁶⁾。一方、Ueda らは細菌 β-

* 大阪市立工業研究所 (536 大阪市城東区森之宮 1-6-50)

** 昭和産業(株)総合研究所 (273 船橋市日の出 2-20-2)

*** 江崎グリコ(株)生物化学研究所 (555 大阪市西淀川区歌島 4-6-5)

Fig. 1. Optimum temperature and heat stability.²¹⁾
●, optimum temperature; ○, heat stability.

Fig. 2. Digestion of raw starch with β-amylase.
H, 8.2 cm; M, magnet; D, 4.4 cm; B, bath;
S, stirrer coated with Teflon.

アミラーゼが生澱粉をよく分解するのに対し、高等植物 β-アミラーゼは分解性が低いことを報告している²⁰⁾。しかし、その後詳細な検討は行われていなかった。

著者らは、細菌 β-アミラーゼが高等植物 β-アミラーゼに比べて生澱粉に対して作用性の高いことに注目し、この性質を生かした利用を目標として、再び β-アミラーゼ生産菌の検索を行った。その結果、生澱粉に比較的良好に作用する β-アミラーゼを得ることができたので酵素の精製や生澱粉への作用について一部報告した^{21,22)}。細菌 β-アミラーゼはいずれも生澱粉によく吸着し、見

Fig. 3. Digestion of raw corn starch at different temperature for 5 min with β-amylases.
○, No. 2718; ●, soy-bean.

Fig. 4. Digestion of raw wheat starch at different temperature for 5 min with β-amylases.
○, No. 2718; ●, soy-bean.

かけ上耐熱性の高いものほど吸着性が高いことが判明した。また、大豆 β-アミラーゼに比して耐熱性の劣るいずれの細菌 β-アミラーゼも、澱粉の糊化開始温度以下においてもよく反応するのに対し、大豆 β-アミラーゼは澱粉の糊化開始温度付近に至って初めて反応することが判明した。さらに、No. 2718 β-アミラーゼは温水処理した生澱粉に対し大豆 β-アミラーゼよりも著しい反応性を示した。

本シンポジウムでは、さらに実的な利用を目指して生澱粉の分解の研究を行ったので報告する。

2. 使用酵素および使用生澱粉

1) 使用酵素

使用細菌 β-アミラーゼは各地の土壌より既報の方法^{14,21)}で分離した β-アミラーゼ生産菌中 No. 2718, No. 4536, No. 4576 株の生産するそれぞれの部分精製酵素標品の生澱粉吸着性、分解性の結果²²⁾より、もっとも

Fig. 5. Time courses of digestion of raw corn starch with β -amylases.

Reaction temperature increased between 30 and 80°C. ○, No. 2718; ●, soy-bean; ---, temperature.

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

Reaction conditions are as same in Fig. 5. ○, No. 2718; ●, soy-bean; ---, temperature.

吸着、分解性の優れていた No. 2718 株の生産する β -アミラーゼを既報の方法²¹⁾で精製した標品を使用した。高等植物 β -アミラーゼの代表として用いた大豆 β -アミラーゼは、低温脱脂大豆より既報の方法²²⁾で精製した標品を使用した。Fig. 1 には使用した酵素の耐熱性の比較を示した。

2) 使用澱粉

コーンスターチは敷島スターチ(株)より恵与されたものを、小麦澱粉は和光純薬(株)製の市販品を使用した。

Fig. 7. Effect of temperature of pre-treatment on digestion of raw corn starch with β -amylases.

Raw corn starch was pre-treated at 60, 65, 67, 70°C for 60 min and then reacted at 60°C. ○, No. 2718; ●, soy-bean.

3. β -アミラーゼによる生澱粉分解

1) β -アミラーゼの生澱粉分解における温度の影響

Fig. 2 の反応組成、容器を用いて、反応液を各温度で 2 分間ブレインキュベート後、酵素液を添加し、5 分間反応を行い生成マルトース量を測定したのが Fig. 3 および Fig. 4 である。生コーンスターチに対して No. 2718 β -アミラーゼは糊化開始温度よりかなり低い温度においてすでに反応しているのに対し、先に報告した結果²²⁾の場合と同様に大豆 β -アミラーゼは糊化開始温度付近からマルトース生成が起こった。また、No. 2718 β -アミラーゼは生コーンスターチが糊化したと思われる 70°C を超える反応温度においては反応は低下し、No. 2718 β -アミラーゼは生澱粉存在下で熱に対し安定であり、生澱粉によって保護されているものと思われた。生小麦澱粉に対して同様の実験を行った結果が Fig. 4 であり、生コーンスターチと同様の傾向がみられた。

2) 連続的昇温における β -アミラーゼによる生澱粉分解

食品を加熱調理する場合には、品温が連続的に上昇し、その間に β -アミラーゼは生澱粉に対し作用し、分解しているものと考えられる。そこで、 β -アミラーゼを含む生澱粉懸濁液を連続的に 30°C から 80°C まで昇温させ、その際に生成するマルトース量を経時的に測定した。

生コーンスターチを使用した場合 (Fig. 5) においても、生小麦澱粉を用いた場合 (Fig. 6) も、No. 2718 β -アミラーゼは低い温度からマルトースの生成が始まり、

Fig. 8

Fig. 8. Scanning electron photomicrographs (SEM) of corn starch granules, with β -amylases attack.

A: control, corn starch granules, B: attacked by No. 2718 β -amylase (reaction time, 30 min), C: attacked by No. 2718 β -amylase (reaction time, 60 min), D: attacked by No. 2718 β -amylase (reaction time, 240 min), E: attacked by No. 2718 β -amylase (reaction time, 240 min), F: attacked by No. 2718 β -amylase (reaction time, 240 min), G: attacked by soy-bean β -amylase (reaction time, 240 min), preincubated at 65°C for 60 min (H), and then reaction with No. 2718 β -amylase carried out at 60°C for 10 min (I), preincubated at 67°C for 60 min (J), and then reaction with No. 2718 β -amylase carried out at 60°C for 10 min (K), preincubated at 70°C for 60 min (L), and then reaction with No. 2718 β -amylase carried out at 60°C for 10 min (M).

温度の上昇とともに急速に分解が進んだ。これに対し、大豆 β -アミラーゼは反応開始温度もやや高く、温度が上昇してもマルトース生成はそれほど増加しなかった。

このように、食品の加熱調理において β -アミラーゼを使用する場合、No. 2718 β -アミラーゼは大豆 β -アミラーゼに比して効率よく生澱粉を分解するものと思われ、実用面において有利な点であろうと考えられた。

3) 澱粉の糊化開始温度付近における前処理の β -アミラーゼ分解への影響

生コーンスターチ懸濁液を 60, 65, 67, 70°C の各温度において 60 分間 プレインキュベート後、60°C において 10 分間回転撹拌し、酵素液を 50 U/澱粉 g 加え、60°C で反応を行った。その結果が Fig. 7 であり、60°C 処理においてはコーンスターチ粒子は表面もそれほど糊化していないものと思われ、大豆 β -アミラーゼはほとんど作用していないが、65°C 以上の温度においては大豆 β -アミラーゼによっても分解が進み澱粉の糊化がかなり起こっているものと思われた。

すでに、Fuwa らは各種澱粉粒の α -アミラーゼ分解性の差は、澱粉粒をアルカリで完全糊化すると消失することをみており²³⁾、加熱によって澱粉粒分解の差が小さくなるのも、澱粉粒の表面の糊化が原因であろうと思われた。

4. β -アミラーゼ分解を受けた澱粉粒子の走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察

生澱粉の SEM による観察は、酵素による生澱粉分解の懸濁液の一部を採り、遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) して上澄液の生成還元糖を測定した残渣を 2 倍量の純水で洗浄後、凍結乾燥し、それを両面テープを付けた試料台に振りかけ、イオンスパッタリングを用いて約 100~200 Å の厚さで金蒸着を行った。

α -アミラーゼによる生澱粉分解の SEM を用いた観察は、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼの場合についてはすでに報告がかなりされている。

細菌 β -アミラーゼによるコーンスターチ粒の分解の場合に、分解が進むと粒の表面に多数の穴を生じ、さらに反応が進行すると粒の内部の層状構造が観察された (Fig. 8 A~F)。この結果は、不破らが細菌液化型 α -アミラーゼ (BLA)、パンクレアチン、耐熱性液化型 α -アミラーゼを用いて行った結果³⁾ とよく一致するものであった。分解率約 30 % 以上になると、澱粉粒が崩壊していくことも観察された (Fig. 8 E)。

生コーンスターチ懸濁液を 60, 65, 67, 70°C で、それぞれ 60 分間 プレインキュベートを行うと、60°C 処理に

おいては、光学顕微鏡観察の結果では、粒はやや膨潤しているものの、粒の形態は保っている。しかし、65°C 以上の処理によると粒の形態も変化し、膨潤後糊化がかなり進んでいることが考えられ、Fig. 7 の大豆 β -アミラーゼによる分解の結果が糊化度を示しているものと思われた。そのため、各温度で 60 分間 プレインキュベートしたのち、 β -アミラーゼ処理を行った澱粉粒の SEM 観察では、65°C 以上においては元の粒の形態はほとんど留めていず (Fig. 8 H~M)、糊化した澱粉粒に対して反応したのと類似しているものと考えられた。

文 献

- 1) 北原覚雄：アミラーゼシンポジウム，**6**，5 (1971)。
- 2) 中村道徳，桐淵滋雄：アミラーゼシンポジウム，**9**，11 (1974)。
- 3) 不破英次：アミラーゼシンポジウム，**9**，23 (1974)。
- 4) 上田誠之助：アミラーゼシンポジウム，**11**，124 (1977)。
- 5) 溝上恭平，小崎道雄，北原覚雄：アミラーゼシンポジウム，**11**，132 (1977)。
- 6) 不破英次，杉本温美，高谷友久：アミラーゼシンポジウム，**12**，105 (1978)。
- 7) 檜作 進，竹田靖史，松林卓哉：アミラーゼシンポジウム，**12**，112 (1978)。
- 8) 前田 巖，自見信子，谷口 肇，中村道徳：アミラーゼシンポジウム，**12**，117 (1978)。
- 9) 不破英次：アミラーゼシンポジウム，**15**，99 (1981)。
- 10) 谷口 肇，鄭 萬在，丸山芳治，中村道徳：アミラーゼシンポジウム，**15**，107 (1981)。
- 11) 安部淳一，F. W. BERGMANN，小幡和哲，檜作進：アミラーゼシンポジウム，**18**，128 (1984)。
- 12) 貝沼圭二，石神 博，小林昭一：アミラーゼシンポジウム，**18**，136 (1984)。
- 13) 谷口 肇，丸山芳治：アミラーゼシンポジウム，**18**，142 (1984)。
- 14) 東原昌孝，岡田茂孝：アミラーゼシンポジウム，**6**，39 (1971)。
- 15) M. HIGASHIHARA and S. OKADA: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 1023 (1974)。
- 16) M. HOSHINO, Y. HIROSE, K. SANO and K. MITSUGI: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2415 (1975)。
- 17) R. SHINKE, H. NISHIRA and N. MUGIBAYASHI: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 665 (1974)。
- 18) Y. TAKASAKI: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1523 (1976)。
- 19) S. MURAO, K. OHYAMA and M. ARAI: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 719 (1979)。
- 20) S. UEDA and J. J. MARSHALL: *Stärke*, **32**, 122 (1980)。
- 21) 東原昌孝，三吉新介，岡田茂孝：科学と工業，**60**，91 (1986)。
- 22) 三吉新介，東原昌孝，岡田茂孝：澱粉科学，**33**，238

(1986).

- 23) H. FUWA, M. NAKAJIMA, A. HAMADA and D. V. GLOVER: *Cereal Chem.*, **54**, 230 (1977).

【質問】

福山大工 山本

生澱粉に対し作用し、しかも耐熱性大という点で大変興味がありますが、たとえば生澱粉 30 % くらいの slurry を用いて工業的にマルトースシラップを製造することが可能ですか。現行の方法と比べて processing 上のメリットがありますか。

【答】

生澱粉の濃度を高くし、それに伴って酵素濃度を上げた場合、生澱粉分解力が低下する傾向があります。したがって、マルトースシラップ製造にはかなりの工夫が必要と思われます。したがって、現行法と直接比較してメリットをみつけるのは難しいと思われます。

【質問】

食品総研 貝沼

1. 馬鈴薯澱粉の β -アミラーゼによる分解粒の電顕写真は、角ばった分解粒がたくさんみえましたが、リング状の浸蝕は起こりませんか。

2. 65, 75°C というような温度の前処理は実際のマル

トース生産を行う場合には、どのような装置が考えられますか。

【答】

1. 馬鈴薯澱粉粒分解の電顕写真については 1 回のみ行ったものであり、再度検討してみたいと思っています。

2. 細菌 β -アミラーゼによる生澱粉からのマルトース生産は、現在のところ考えておりませんので、装置についてはわかりません。

【質問】

京都府大農 鈴木

生澱粉に β -アミラーゼを作用させた場合、生澱粉の α -1,6 結合の切断の問題がありますが、この点に関してご教示ください。

【答】

生澱粉に β -アミラーゼを高濃度あるいは長時間作用させますと、分解率がマルトースとして 60 % 程度になりますが、それ以上は進みません。また、イソアミラーゼを併用しますと、さらに分解が進むことから β -アミラーゼによる生澱粉分解の場合、やはり α -1,6 結合付近で反応は停止するものと思われます。