白米に吸着した α -アミラーゼの酵素作用

椎木 敏・土橋潤二・水野鉄治・島田豊明・布川弥太郎*

(国税庁醸造試験所, * 大関酒造株式会社)

昭和 58 年 1 月 25 日受理

Enzymic Action of α -Amylase Adsorbed by White Rice

Satoshi SHINOKI, Junji TSUCHIHASHI, Tetsuji MIZUMO Toyoaki SHIMADA, and Yataro NUNOKAWA

(National Research Institute of Brewing,
2-6-30, Takinogawa, Kita-ku, Tokyo)

緒 言

清酒もろみ中で米麴 α -アミラーゼが基質である蒸米に吸着されることは数多くの研究によって知られている。

前報において^{1,2)}、蒸米の α -アミラーゼ吸着性と溶解の間には逆相関のあることを認め、溶解液中に α -アミラーゼが認められない場合でも、蒸米はきわめて少量ではあるが溶解されていることも報告した。

この現象は、蒸米に吸着された α -アミラーゼが活性を保持しながらも、基質と接触することが制限されるため、液中に遊離している α -アミラーゼよりも酵素作用が弱くなるためと考えられる。

本報では、米粉に吸着された α -アミラーゼ (タカアミラーゼ A) を調整し、吸着状態の α -アミラーゼの酵素作用ならびに吸着部位と活性部位の異なることを確認するために、 α 米やデンプン等の粒度、分子量の異なる基質に対する吸着 α -アミラーゼの酵素作用を検討した。その結果、米粉に吸着された α -アミラーゼは α 米やデンプンにも作用しうることを認めるとともに分子量が小さくなるに従い作用しやすくなることを認めたので報告する。

実 験 方 法

1. α -アミラーゼ吸着米の調整

精米歩合 75% の白米を前報²⁾ に従って調製した粒度 30~60 メッシュの米粉 10 g に対して、 α -アミラーゼ (EC 3.2.1.1) を 50,000 units 又は 2,500 units 含んだ

pH 4.5, 20 mM の乳酸緩衝液 20 ml を加え、攪拌したのち、5° で一夜吸着させた。以後の操作は第 1 図に示すように行った。米粉の表面に付着している α -アミラーゼを除去したのち凍結乾燥 (これを吸着米と略称) した。吸着米の α -アミラーゼは、吸着米 A で 1,000 units/g, 吸着米 B で 120 units/g であった。

2. 使用酵素

Aspergillus oryzae 起源の結晶 α -アミラーゼ (タカアミラーゼ A) を用いた。

3. 基質

吸着米によって溶解又は分解される基質として、 α

第 2 図 α -アミラーゼ吸着米の調整法

米、デンプン、アミロース及びマルトペンタオースを用いた。

α 米は精米歩合 75% の白米を蒸きようし、アルコールで脱水し α 化を行った。 α 米の粉碎は前報³⁾に従い、穀粒粉碎器を用いて行った。

デンプンは可溶性デンプン（メルク）及びさつまいもデンプン（和光純薬）を用いた。

アミロースは平均グルコース鎖長 50 のアミロース A（メルク）と 17 のアミロース B（林原）を用いた。

マルトペンタオースはキッコーマン(株)の原田倫夫氏よりいただいたものを使用した。

4. α 米の溶解方法

α 米粉 1g に対して吸着米 A を 100 mg と pH 4.0, 20 mM の乳酸緩衝液 10 ml を加え、15° で静置又は振とうした。米粉から α -アミラーゼを遊離させる場合には、乳酸緩衝液に 0.1 M の食塩を加えた。以下の実験で食塩を加える場合は 0.1 M を緩衝液に加えた。

5. デンプン及びアミロースの分解方法

1% のデンプン又はアミロースを含んだ pH 5.0, 20 mM 酢酸緩衝液 10 ml に対して吸着米 B を 100 mg 加え、40°, 120 分間振とうした。反応終了後、沸とう水中に 10 分間浸したのち、冷却し遠心分離 (3,000 ppm, 20 分) によって吸着米を分離した。

6. マルトペンタオースの分解方法

2% マルトペンタオースを含む pH 5.0, 20 mM 酢酸緩衝液 3 ml に吸着米 B を 50 mg 加え、40° で 20 分間反応させた。反応終了後、沸とう水中に 10 分間浸したのち、冷却し遠心分離 (3,000 rpm, 20 分) によって吸着米を分離した。

7. 可溶性デンプンの分解方法

1% 可溶性デンプンを含んだ pH 5.0, 20 mM 酢酸緩衝液 10 ml に対して吸着米 B を 200 mg 加え、40° で振とうした。反応終了後、沸とう水中に 10 分間浸したのち、冷却し遠心分離によって吸着米を分離した。 α -アミラーゼの測定には反応終了直後の反応上澄液を用いた。

8. 分析方法

α -アミラーゼ及び全糖は前報¹⁾に従って分析した。還元糖はレーン氏逆滴定法、ヨウ素デンプン反応の測定は国税庁所定分析法注解⁴⁾に準じて分析した。マルトペンタオースはウォーターズ社の ALC/GAC 201 型高速液体クロマトグラフ装置によって分析した。

実験結果

1. 吸着米の蒸米に対する酵素作用

米粉に吸着された α -アミラーゼの蒸米に対する酵素作用をしらべる目的で、種々の粒度の α 米を用いて α 米

第2図 α 米の粒度と溶解量

第3図 α 米溶解の経時変化

の溶解量をしらべた。溶解は実験方法に従い、20 時間静置及び振とう反応を行った。その結果、溶解量を全糖で示したのが第2図である。

各粒度の溶解量は粒度が小さくなるほど増加したが、この程度の粒度ではそれほど多くはなかった。粒度をさらに小さくすれば溶解されやすくなると考えられる。振とうした場合、静置よりもわずかながら溶解量が増加した。粒度 30~60 メッシュの α 米粉に 0.1 M の食塩を加え、米から α -アミラーゼを遊離させた反応系では、溶解量が著しく増加した。反応系に食塩を加えると液中に α -アミラーゼが認められるが、食塩を加えない反応系では液中に α -アミラーゼを全く認めなかった。

次に粒度 30~60 メッシュの α 米粉を用いて、吸着米の α 米粉に対する酵素作用に及ぼす食塩添加の影響を経時的に検討した。その結果、第3図に示したように、食塩添加系の溶解量は 10 時間で最大に達したが、食塩無添加系では反応時間とともに溶解量は増加するが、その量は食塩添加系の約 1/6 にすぎなかった。

2. 吸着米による可溶性デンプンの分解

吸着米による可溶性デンプンの分解作用に及ぼす食塩添加の影響を実験方法 6 に従って、ヨウ素デンプン反応によって検討した。食塩添加系では無添加系のものに比較して、可溶性デンプンはすみやかに分解された。反応液の呈色度から、酵素反応に関与した α -アミラーゼ力

第4図 吸着米による可溶性デンプンの分解

第1表 吸着米によるデンプンの分解

基 質	食 塩 添 加	生成還元糖 (mg)	分解比 ³⁾ (%)
さつまいもデンプン	+	24.3	18.5
	-	4.5	
アミロース A ¹⁾	+	23.4	37.6
	-	8.8	
アミロース B ²⁾	+	27.3	63.4
	-	17.3	

1) アミロースAの平均グルコース鎖長 50

2) アミロースBの平均グルコース鎖長 17

3) 分解比は食塩添加系の生成還元糖に対する食塩無添加系の生成還元糖の百分率で示した。

第2表 吸着米によるマルトペンタオースの分解

食塩添加	分解 マルトペンタ オース ¹⁾ (mg/ml)	分 解 率 (%)	分 解 比 ²⁾ (%)
+	11.2	56.0	
-	8.5	42.5	75.9

1) 初発のマルトペンタオース 20 mg/ml から高速液体クロマトグラフィーによって測定した残存マルトペンタオースを差引いたもの。

2) 分解比は食塩添加系の分解率に対する食塩無添加系の分解率の百分率で示した。

価の比は、食塩無添加系の場合、食塩添加系の約 1/4 であることがわかった。液中の α -アミラーゼは、食塩添加系で 23 units 存在していたが、無添加系では全く認められなかった。

3. 吸着米によるアミロース等の分解

米粉に吸着された α -アミラーゼが、少量ながら α 米又は可溶性デンプン^{5,6)} を分解することから、 α -アミラーゼの吸着部位と活性部位は異なるものと考えられる。このことを確認するため、分子量の異なる基質を用いて、食塩添加の有無による分解率の差を実験方法 4 及び 5 に従って検討した。その結果を第 1 表及び第 2 表に示した。

第 1 表はデンプン及びアミロースを基質としたものの結果である。食塩を添加した反応系と無添加の反応系の分解比は、分子量の大きいさつまいもデンプンで 18.5% と小さく、分子量の小さいアミロース B では 63.4% と大きく、吸着されたままの α -アミラーゼでも分子量

の小さい基質にはよく作用することがわかった。

第 2 表はマルトペンタオースに対する吸着米の作用をしらべた結果である。初めに添加した 20 mg のうち、未分解のマルトペンタオースは食塩添加系で 8.8 mg、無添加系で 11.5 mg であった。その分解率は 56.0% 及び 42.5% で、分解比は 75.9% であった。

考 察

蒸米に対する α -アミラーゼの酵素作用は、 α -アミラーゼが蒸米に吸着された状態ではきわめて弱くなるが、吸着された α -アミラーゼが全く蒸米を溶解しないわけではなく、わずかながら溶解することが認められている^{1,5)}。このことから、 α -アミラーゼの蒸米への吸着部位と活性部位は異なり、吸着された α -アミラーゼは活性を保持しながらも、基質と接触する機会が制限されるため、吸着されていない α -アミラーゼよりも酵素作用が弱くなるものと考えられる。

第 2 図に示したように、吸着米によって α 米を溶解する場合、 α -アミラーゼと接触する機会を多くするため、 α 米の粒度を小さくして振とう反応を行えば、 α -アミラーゼが液中に遊離していなくても、わずかではあるが溶解量の増加することが認められた。しかしながら、食塩を添加して α -アミラーゼを米粉から遊離させた場合に比較して約 1/6 の溶解量にすぎなかった。このことは、吸着米の α -アミラーゼは振とう反応によって吸着米と α 米粉の粒子間の接触機会が多くなっても、 α -アミラーゼ自体が自由に動けないため、基質を容易に分解することができないことを示している。三吉ら⁵⁾ も蒸米に吸着した α -アミラーゼは反応性が低下することを報告している。

可溶性デンプンに対する吸着米の酵素作用をしらべたところ、第 4 図に示したように α 米粉と同様に食塩無添加系に比較して、添加系では速やかに分解された。この場合、酵素反応に関与した α -アミラーゼ力価は、食塩添加系で 24 units、無添加系で 6 units であった。無添加系の力価は添加系の 25% で前報⁶⁾で示した 17% にほぼ近似していた。この結果から、吸着米の可溶性デンプンに対する酵素作用は α 米粉の場合よりも強く作用していることが認められた。しかも食塩無添加系では、液中に α -アミラーゼが全く遊離していなくても可溶性デンプンをわずかではあるが分解することから、前報⁶⁾でも考察したように、米粉に吸着された α -アミラーゼによって分解されたことが確認された。

米粉に吸着された α -アミラーゼが活性を保持しているとすれば、 α -アミラーゼ自体の動きが制限されていても、基質の分子量が小さければ酵素作用を受けやすくな

ると考えられる。第1表及び第2表から、反応液中に食塩を添加した系と無添加系の分解比はさつまいもデンプン 18.5%, アミロースA 37.6%, アミロースB 63.4% 及びマルトペンタオース 75.9% であり、分子量が小さくなるに従い大きくなることが認められた。この結果から、分子量が小さい場合は、 α -アミラーゼが米に吸着されていても、基質は容易に α -アミラーゼに接触できるため、食塩添加によって α -アミラーゼを遊離させた系と同じように、 α -アミラーゼの作用を受けやすくなったものと考えられる。さらに、米粉に吸着した α -アミラーゼが分子量の小さい基質に対してよく作用することから、 α -アミラーゼの吸着部位と活性部位の異なることが示唆される。

要 約

米粉に吸着された α -アミラーゼが活性を保持し、吸着部位と活性部位の異なっていることを確認するために種々検討した。

1. 米粉に吸着された α -アミラーゼ（吸着米）の α 米に対する溶解作用は α 米の粒度を小さく、しかも振とうすることによって、 α -アミラーゼと基質の接触する機会を多くするほど増大した。

2. 吸着米の α 米粉に対する溶解作用は、反応系に食塩を添加して α -アミラーゼを米粉から遊離させること

によって著しく増大した。

3. 可溶性デンプンの分解に関与した吸着米の α -アミラーゼは、食塩添加系 24 units, 食塩無添加系 6 units であり、後者は前者の 25% であった。

4. 米粉に吸着された α -アミラーゼの吸着部位と活性部位が異なっていることを確認するため、分子量の異なる基質を用いて酵素作用を行い、食塩添加系と無添加系の分解比を求めたところ、分子量の大きいもののほど分解比が小さく、分子量の小さいものは逆に分解比が大きくなった。この結果から米粉に吸着した α -アミラーゼは活性を有しており、かつ吸着部位と異なることが示唆された。

終りにマルトペンタオースをご恵下さいましたキッコーマン(株)の原田倫夫氏、本研究の御指導を賜わった前国税庁醸造試験所長 秋山裕一博士ならびに現所長 佐藤信博士に深謝いたします。

文 献

- 1) 椎木, 岩野, 布川: 醸酵工学 57 214 (1979)
- 2) 布川, 椎木: 醸酵工学 58 10 (1980)
- 3) 布川, 椎木, 小口: 醸協 75(4) 337 (1980)
- 4) 国税庁所定分析法注解 p.218 日本醸造協会 (1974)
- 5) 三吉, 照井: 醸工 51 305 (1973)
- 6) 椎木, 中野, 布川: 醸酵工学 57 342 (1979)