報 文

[Nippon Nôgeikagaku Kaishi Vol. 53, No. 5, pp. 135~141, 1979]

中性およびアルカリ性小麦粉生地の種類々酵素活性について

寺田正樹, 南 純司, 山本武彦*

(日清食品株式会社総合研究所, *大阪市立大学理学部)

昭和 53 年 8 月 8 日 受 理

Activities of Several Enzymes in Neutral and Alkaline Doughs

Masaki TERADA, Junichi MINAMI and Takehiko YAMAMOTO*

General Research Laboratory, Nissin Food Products Co., Ltd.,

Ritto-cho, Shiga 525, Japan

*Faculty of Science, Osaka City University, Osaka 558, Japan

Using an extract or suspension of wheat flour (Dark Hard Winter), various enzymes were assayed under neutral or alkaline conditions. Besides amylases, proteolytic enzymes, peroxidase and lipoxidase, the following enzymes were detected with activities shown below (One unit of activity was the enzyme amount that degraded 1 μ mole of substrate or produced 1 μ mole of reaction product in every min at 30~40°C. The activity unit was expressed per 1g of flour.): α -D-galactosidase, 1.0; β -D-galactosidase, 0.02; β -D-glucosidase, 0.8; phosphatase, 2.5; lipoamide dehydrogenase, 0.5 at pH 5.8. Esterase activity was about 6.0 at both pH values of 5.8 and 9.5. Glutamic acid dehydrogenase and S-alkylcysteine lyase were 0.4 and 1.1, respectively, at pH 9.5.

The characteristic properties of dough made by use of a dilute saline and alkaline solutions, respectively, were discussed in connection with the flour enzymes which were active at neutral and alkaline sides. Also, wheat flour was suggested to be a good source of some of the enzymes examined, because the soluble protein of flour in 0.1% NaCl solution is around only 1.5% of flour.

(Received August 8, 1978)

緒 言

著者らはさきに、稀薄食塩水を捏り水とした小麦粉生地とかん水溶液を捏り水としたそれ (pH 9.5) とでは、生地の物性⁽¹⁾のみならず蛋白質の会合状態⁽²⁾も著しく異なることについて報告した。一方、生地の物性にはベントザンをはじめとして種々の多糖類が重要な役割を演じていることも知られており^(3~6)、これらの多糖類の分解は、生地の抗張力や伸長度の顕著な減少をきたすことも報告されている^(7~11)。また Daniels らは生地物性の発現機構として脂質と蛋白質の共役酸化説⁽¹²⁾、Neukom らはフェルラ酸のキレート説^(13,14)を提出しているが、それらの説は生地中の esterase⁽²⁷⁾、lipoxidase^(28~30)、per-

oxidase^(31,32)などの酵素活性と関係があると思われるが、なお究明されねばならない問題である。

小麦粉は発芽能を有する種実を粉碎したもので、したがって種々の酵素の存在が考えられる。もちろん、それらの酵素の作用は当然 pH によって強く影響される。したがって上述小麦粉生地の pH による差は、あるいは酵素と関係があるかも知れないと考えられた。本研究では、小麦粉に単に食塩水を添加した場合 (pH 5.8) とかん水を添加した場合 (pH 9.5) とで、いかなる酵素がどれだけの活性で認められるのかについてまず検討した。

その結果、pH 5.8 付近では種々の加水分解酵素や 2,3 の酸化還元酵素、例えば、lipoamide dehydrogenase などがそれぞれかなりの酵素活性をもって認められた

Table I. Assay Methods of Enzymes in Wheat Flour*

Enzyme	Incubation mixture	Temp. (°C)	Analysis
Amylase			
dextrinizing	1.0% Potato starch paste, 10 ml ; enzyme, 1.0 ml	40	Photometry of iodinic reaction (660 nm)
saccharifying	Same as above	40	Determination of reducing sugar as glucose, μ mole (Shaffer-Somogyi method ⁽¹⁵⁾)
Hydrolase of guaran			
α -D-Galactosidase (β -D-Galactosidase)	0.5% Guaran, 10 ml ; enzyme, 10 ml 2.5 mM <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-galacto- (β) side, 3.0 ml ; enzyme, 1.0 ml	35 35	Reduction of viscosity (Ostwald viscometer) Photometry of <i>p</i> -nitrophenol released, μ mole (400 nm)
Proteinase			
protein depolymerization	2.5% Hemoglobin, 75 ml ; wheat flour, 15 g	40	Determination of solubilized protein (Lowry's method) in 3.0% CCl_3COOH -soluble fraction ⁽¹⁶⁾
liberation of amino groups	Same as above	40	Determination of amino groups (ninhydrin method), leucine equivalent, μ mole
β -D-Glucosidase	2.5 mM <i>p</i> -Nitrophenyl- β -D-glucoside, 3.0 ml ; enzyme, 1.0 ml	35	Photometry of <i>p</i> -nitrophenol released, μ mole (400 nm)
Esterase	0.5 mM α -Naphthyl acetate, 3.0 ml ; enzyme, 0.5 ml	35	Determination of α -naphthol, μ mole (diazoblue method ⁽¹⁷⁾)
Phosphatase	3.33 mM <i>p</i> -Nitrophenyl phosphate, 12 ml ; enzyme, 4 ml	35	Photometry of <i>p</i> -nitrophenol released, μ mole (400 nm)
Peroxidase	10 mM H_2O_2 containing 0.01% <i>o</i> -dianisidine, 3.0 ml ; enzyme, 0.5 ml	30	Photometry of oxidized dianisidine, μ mole (500 nm)
Lipoxidase	0.25% Linoleic acid, 10 ml ; enzyme, 2.0 ml	30	Photometry of diene linkage formed (234 nm)
Glutamic acid dehydrogenase	59 mM Sodium glutamate containing 0.5 mM NAD, 42.5 ml ; enzyme, 2.5 ml	35	Determination of α -ketoglutaric acid, μ mole (Shimizu method ⁽¹⁸⁾) : photometry of NADH (340 nm)
S-Alkylcysteine lyase	15 mM Djenkolic acid, 20 ml ; enzyme, 5.0 ml	35	Determination of pyruvic acid, μ mole (Friedmann <i>et al.</i> ⁽¹⁹⁾)
Lipoamide dehydrogenase	3 mM DL-Thioctoamide containing 0.25 mM NADH, 16 ml ; enzyme, 4.0 ml	35	Determination of SH group, μ mole (Ellmann method ⁽²⁰⁾) : photometry of decrease of NADH (340 nm)

* Enzyme activity was shown by illustrating the time course of reaction products or decrease of substrates indicated.

が、pH 9.5 ではそれらの酵素の多くはほとんど活性を示さなかった。一方、pH 5.8 付近で全く認められないのに、pH 9.5 で glutamic acid dehydrogenase や S-alkylcysteine lyase がかなりの活性で認められ、それらについて考察した。

実験方法

1. 原料小麦粉 米国産 Dark Hard Winter 種より製造し、6~10 カ月、4.5°C に保存した小麦粉を使用した。同小麦粉の総炭水化物は 69.1%，粗蛋白質は 10.4%，湿グルテンは 29.0%，灰分は 0.43%，脂質は 0.96%，水分は 14.0% であった。

2. 酵素液の調製 とくに断わらない限り、小麦粉

に 5~200 倍容の 0.1 M NaCl を含む pH 5.8 の 0.1 M リン酸緩衝液、または 0.1 M NaCl と 0.025 M K_2CO_3 を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 9.5) を加え、それらの懸濁液またはその上清を酵素液とした。それらの取扱い条件はそれぞれの酵素の測定法の項に記す。なお小麦粉の懸濁による pH 変化はわずかで (5 倍容、pH 9.5 の場合で約 0.2)、酵素反応時の pH には影響はなかった。

3. 酵素の測定 主として小麦粉について慣習的に行われている方法で測定した。しかし、酵素活性は国際単位で示すことにした。ただし、数種の酵素については国際単位による表示が困難なため、酵素反応による基質あるいは生成物の変化量を、かなりのインキュベーション時間に亘って示すことにした。酵素の測定条件を

Table I にまとめて示す。

結 果

1. Amylase

小麦粉の糊精化力および澱粉糖化力をそれぞれ Fig. 1, 2 に示す。すなわち、pH 5.8 ではある程度の糊精化力がみられた（計算上、小麦粉 1g は前述条件で糊化馬鈴薯澱粉 1g のヨウ素呈色を約 20 分で半減することになった）。しかし青色度は反応当初の 15 分間で 60% 以上減少したが、それ以後の減少はわずかで少なくとも 1 時間のインキュベーションでは青色は消失しなかった。小麦粉のみをインキュベーションした上清については、上述条件によるヨウ素呈色はほとんど認められなかった。軽度に発芽した小麦を原料として製造した小麦粉について同様の実験を行ったところ、基質馬鈴薯澱粉のヨウ素反応は速やかに消失した。したがって本実験に供した小麦粉の示したヨウ素呈色の変化は真の α -amylase によ

るとは言いがたい。むしろ次に述べる糖化 amylase, 主として β -amylase によると考えられる。なお小麦粉の糊精化力は pH 9.5 ではほとんど認められなかった。

澱粉糖化力は pH 5.8 でかなり強く、その活性は小麦粉 1g 当り毎分 30 μ モルグルコース相当還元糖を生成した。反応液についてペーパークロマトグラフィーを行った結果、生成糖はマルトースと、少量のマルトトリオースと、微量のグルコースが認められた。すなわち β -amylase 以外に、微量のある種の glucosidase の存在が推察される。pH 9.5 では糖化力は反応の当初にかなり明確に認められたが、その後は認められなくなった。なお、小麦粉のみ（10% 懸濁液）を pH 5.8 および pH 9.5 で 40°C に保った場合の還元糖生成を測定した結果は、Fig. 3 で pH 5.8 では小麦粉は 1g 当り 1 分間に 0.33 μ モルのグルコース相当還元糖を生成した。しかしこの活性は上述の馬鈴薯澱粉を加えた場合の 1/100 にすぎなかった。小麦粉のみを pH 5.8 でインキュベ

Fig. 1. Amylase (Dextrinizing) Activity. —○—, pH 5.8; —●—, pH 9.5.

Fig. 2. Amylase (Saccharifying) Activity. —○—, pH 5.8; —●—, pH 9.5.

Fig. 3. Formation of Reducing Sugar on Incubation of Flour Slurry Alone. —○—, pH 5.8; —●—, pH 9.5.

Fig. 4. Guarán Hydrolysing Activity. * η_{sp} at time zero/ η_{sp} at time t. —○—, pH 5.8; —●—, pH 9.5.

ョンした場合に認められる生成糖もマルトースが最も多く、これに次いで種々のオリゴデキストリンと微量のグルコースが認められた。

2. グアーガム分解力

グアーガムを基質として使用したのは β -1,4 マンノシド結合分解力⁽²⁶⁾があるか否かを知るためであって、粘度低下力で測定した結果を Fig. 4 に示す。pH 5.8 では明らかに粘度の低下が認められた。小麦粉 1g は pH 5.8, 40°C で 22 mg のグアーガムの粘度を 10 分間で半減した。

すなわち小麦粉には、グアーガムを endowise に分解する酵素が存在すると考えられる。ただし、その活性は pH 9.5 では全く示されなかった。

3. α -Galactosidase, β -galactosidase, β -glucosidase

α -, β -Galactosidase および β -glucosidase について検討した結果、それらの活性は pH 5.8 で認められ、小麦粉 1g 当り α -galactosidase 活性（初期反応で測定、1 分間に 1 μ モルを分解する酵素力を 1 単位とする）は 1.0, β -galactosidase は 0.02, また β -glucosidase 活性は 0.8 と測定された。ただし、それらの活性は pH 9.5 では認められなかった。

4. Esterase 活性

小麦粉はかなり強力な esterase 活性を示した。pH 5.8 では初期反応から計算し、小麦粉 1g 当り 1 分間に 6 μ モルを分解した。なおこの esterase は pH 9.5 でも認められた。 α -ナフチル酢酸は pH 9.5 でも少しずつ分解するので、この自然分解値はもちろん、対照として差し引いた。小麦粉の lipase 活性も当然検討すべきであったが、納得できるよい反応条件が設定できず検討しなかった。

5. Phosphatase

pH 5.8 では小麦粉 1g 当り毎分 2.5 μ モルのリン酸モノエステルを分解した。小麦粉中の可溶蛋白は小麦粉 1g 当り 10 mg 前後であることから考えると、phosphatase はかなりの濃度に存在するのではないかと考えられる⁽³³⁾。なお pH 9.5 では、phosphatase 活性は認められなかった。

6. Proteinase

Proteinase 活性としてヘモグロビンを基質とし、トリクロル酢酸可溶化力およびアミノ基生成力を測定した結果は、Fig. 5 で proteinase 活性は微弱であった。小

麦粉 1g と 0.12g のヘモグロビンを pH 5.8, 40°C で 1 時間インキュベーションしてもトリクロル酢酸可溶の総蛋白はわずか 1.25 mg で、proteinase 活性は決して強いとはいえない。一方、アミノ基生成力は同条件で 2 ~ 3 μ モルであった。一般の proteinase の示す蛋白のトリクロル酢酸可溶化力とアミノ基生成力との比から考えると、小麦粉の場合はアミノ基生成が相対的に大であり、いわゆるペプチダーゼによる蛋白の分解が主ではないかと思われる。しかし pH 9.5 の場合も、pH 5.8 に近い proteinase 活性を長時間に亘って示した。なお、小麦粉のみ（10% 懸濁液）を pH 5.8 および pH 9.5 で 40°C に保ったときのアミノ基の生成を測定した結果、アミノ基生成は pH 9.5 でも pH 5.8 とほぼ同程度に認められた。ただしその活性は微弱であった。

7. Peroxidase

pH 5.8 における活性は概略、小麦粉 1g 当り 12.8 μ モル/分と測定された。しかし pH 9.5 では活性は認められなかった。

8. Lipoxidase

この場合も pH 5.8 では約 10.7 の活性が認められた。しかし pH 9.5 ではその活性は認められなかった。

9. Glutamic acid dehydrogenase

pH 9.5 では小麦粉 1g 当り毎分約 0.4 μ モルの α -ケトグルタル酸を生成した。NADH の生成も当然認められたが両者は並行せず、反応の初期においても α -ケ

Fig. 5. Proteinase Activity. ○, pH 5.8; ●, pH 9.5; solid line, activity to solubilize hemoglobin into 3% CCl_3COOH ; broken line, activity to release amino groups from hemoglobin.

Fig. 6. Glutamic Acid Dehydrogenase Activity. ○, pH 5.8; ●, pH 9.5; solid line, α -ketoglutaric acid; broken line, NADH.

Fig. 7. S-Alkylcysteine Lyase Activity. —○—, pH 5.8; —●—, pH 9.5.

トグルタル酸に比べて、少し少なかった (Fig. 6)。小麦粉のみの懸濁液は pH 5.8, pH 9.5 いずれにおいても NAD を還元しなかった。したがって、NAD は glutamic acid dehydrogenase の補酵素となったことは明らかである。

10. S-Alkylcysteine lyase

Fig. 7 に示すように、glutamic acid dehydrogenase と同様に pH 9.5 において活性がみられた。活性は小麦粉 1g 当り (毎分) 1.1 μ モルのピルビン酸を生成し、かなり強力と思われた。pH 5.8 では基質の非酵素的分解がわずかに認められただけで、酵素による分解は認められなかった。

11. Lipoamide dehydrogenase

チオクトアミドの還元に伴う SH 基の生成と NADH

Fig. 8. Lipoamide Dehydrogenase Activity. ○, pH 5.8; ●, pH 9.5; solid line, SH group; broken line, NADH.

の減少で追跡した結果は Fig. 8 で、pH 5.8 で SH 基の生成および 340 nm における吸光度の減少が明瞭に認められた。両者はほぼ並行し、dehydrogenase 活性は小麦粉 1g 当り約 0.5 μ モル/分と計算された。しかし本実験条件下では反応当初の 10 分で、すでに SH 基、NAD とともに極大値に達し、のちはおそらく別反応の併発のためか、それらの反応生成物は漸減した。

考 察

中性およびアルカリ性で活性な小麦粉中の酵素の検討法としては、小麦粉をあらかじめ中性およびアルカリ性溶液で抽出し、それらを酵素として中性およびアルカリ性で反応せしめるのが一応合理的と考えられるが、その場合は、それぞれの pH における酵素の安定性の試験とも重複する結果になるので、材料および方法で述べたように、本研究では可及的に反応時の pH の差のみに注目して実験した。

小麦粉は種実の粉碎物で、したがって種々の酵素が存在する。2, 3 のいわゆる glycosidase の存在も指摘されていたが⁽²⁶⁾、本研究でも明らかにそれらを定量できた。しかし amylase をはじめ多くの加水分解酵素は、pH 5.8 では活性がみられたが、pH 9.5、例えばかん水を添加した場合の pH ではそれら酵素の活性はほとんど認められなかった。peroxidase, lipoxidase, lipoamide dehydrogenase など pH 5.8 の試験でのみ認められた。ただ esterase は、pH 9.5 でも pH 5.8 におけると同程度の活性を示した。一方、glutamic acid dehy-

drogenase と S-alkylcysteine lyase は pH 5.8 では認められず pH 9.5 でのみ認められ、しかもかなりの活性を示した。

麺またはパンの生地の物性に強く関係する酵素として、まず amylase, proteinase が考えられ、そのため α -amylase や proteinase を添加した生地 の物性については多数の報告がある。pH 5.8 ではすでに述べたように、みかけ上若干の α -amylase 作用が認められ、また糖化力も認められた。一方アルカリ側では、それらの活性は全く認められなかった。なお pH 5.8 でのみみかけ上の α -amylase 作用は β -amylase によると考えられた。事実、小麦粉中の β -amylase 活性はかなり強力で、これについての研究は多い⁽²⁵⁾。したがって pH 5.8 および pH 9.5 の小麦粉生地の物性の差が澱粉の変化による差と仮定すると、 β -amylase が原因ということになる。しかし β -amylase は生澱粉にはほとんど作用しない(小麦粉中の損傷澱粉はある程度分解される。しかしその澱粉の量は少ない)。したがって小麦粉生地製造直後の pH の差による物性の差は澱粉の変化、あるいは β -amylase が原因ということは、まず考えられない。

一方 proteinase 活性測定の実験から proteinase が原因、すなわち製造直後の小麦粉生地の pH の差によって生地中の蛋白の変化(分解)が異なり、そのため物性が異なったとは、ある程度考えられるが、pH 5.8 と 9.5 の小麦粉生地の著しい物性の差のすべてを説明することはできない。

小麦粉生地の物性は小麦蛋白の SH, SS と著しく関係があるといわれている。また小麦粉中には、lipoic acid の存在も知られている^(21,22)。本実験で小麦粉中に lipoamide dehydrogenase が pH 5.8 でかなりの活性で認められた。したがって pH 5.8 の小麦粉生地中では、少なくとも存在する酸化型 lipoic acid の SS が同酵素によって還元され、SH が増加する。このように考えると、pH 5.8 の小麦粉生地はこの酵素の作用をうけつつある状態にあり、このことが pH 9.5 の小麦粉生地と物性的に異なる原因とも考えられる。また、小麦粉中には diphenyl disulfide-glutathione transhydrogenase は認められなかったが、Minoda *et al.* の方法⁽²⁴⁾によって検討すると、小麦粉中でも pH 5.8 におけるよりも pH 9.5 では非酵素的に SH-SS 交換反応を起こすことが認められた。したがって pH 9.5 では、小麦蛋白質の網目構造が発達し、生地が強靱になるようにも思われる。小麦粉

には S-alkylcysteine lyase が存在し、pH 9.5 でかなりの活性を示すことの事実は多分、本研究が最初の指摘と思われるが、マメ科植物に同酵素が存在することはすでに知られている⁽²³⁾。この酵素も網目構造の発達に関係するのではないかと思われる。もし小麦粉中に、ある種の豆に認められるシステイン SH がアルキル基と C-S 結合した化合物⁽³⁴⁾があるとすれば、アルカリ側ではこの酵素が作用して C-S 結合が切断され、SH 基を生じ、それが SH-SS 交換反応に関与するであろう。これらのことが、pH 5.8 および pH 9.5 の小麦粉生地の物性の差の主な原因と考えられる。

なお、かん水を使用しない麺類には特有の粉臭や生臭が感じられるのに、それを使用する麺にはそれらが無いのは peroxidase, lipoxidase 活性が pH 9.5 では認められないことと関係し、興味ある問題と思われる。また小麦粉生地中の水溶性蛋白は 1.5% くらいにすぎないが、もし酵素が主に水溶性蛋白区分に存在するとすれば、小麦粉はいくつかの酵素に関しては比較的すぐれた酵素給源と見なされる。

- (1) M. Terada, J. Minami and T. Yamamoto : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 365 (1978).
- (1) M. Terada, J. Minami and T. Yamamoto : *ibid.*, **42**, 1397 (1978).
- (3) J. C. Baker, H. K. Parker and M. D. Mize : *Cereal Chem.*, **20**, 267 (1943).
- (4) R. W. Cawley : *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 834 (1964).
- (5) S. L. Jelaca and I. Hlynka : *ibid.*, **48**, 211 (1971).
- (6) S. L. Jelaca and I. Hlynka : *ibid.*, **49**, 489 (1972).
- (7) P. Meredith : *New Zealand J. Sci.*, **11**, 720 (1968).
- (8) M. M. Bean, P. M. Keagy, J. G. Fullington, F. T. Jones and D. K. Mecham : *Cereal Chem.*, **51**, 416 (1974).
- (9) M. M. Bean, C. C. Nimmo, J. G. Fullington, P. M. Keagy and D. K. Mecham : *ibid.*, **51**, 427 (1974).
- (10) M. V. Tracey : *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 607 (1964).
- (11) C. M. Mauritzen and P. R. Stewart : *Aust. J. Biol. Sci.*, **18**, 173 (1965).
- (12) N. W. Daniels, P. S. Wood, P. W. Russell-Eggitt and J. B. Coppock : *J. Sci. Food Agric.*, **20**, 129 (1969).
- (13) H. Neukom, T. Geissmann and T. J. Painter : *Baker's Dig.*, **41**, 52 (1967).

- (14) T. Geissmann and H. Neukom : *Lebensm. Wiss. Technol.*, **6**, 59 (1973).
- (15) P. A. Shaffer and M. Somogyi : *J. Biol. Chem.*, **100**, 695 (1933).
- (16) B. S. Miller : *Assoc. Official Agric. Chemist.*, **30**, 659 (1947).
- (17) M. M. Nachlas and A. M. Seligman : *J. Biol. Chem.*, **181**, 343 (1949).
- (18) T. Shimizu : *J. Biochem.*, **37**, 421 (1950).
- (19) T. E. Friedmann and G. E. Haugen : *J. Biol. Chem.*, **147**, 415 (1943).
- (20) G. L. Ellmann : *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 (1959).
- (21) L. Dahle and B. Sullivan : *Cereal Chem.*, **37**, 679 (1960).
- (22) B. Sullivan, L. K. Dahle and D. A. Peterson : *ibid.*, **38**, 463 (1961).
- (23) S. Schwimmer and A. Kjær : *Biochim. Biophys. Acta*, **42**, 316 (1960).
- (24) Y. Minoda, R. Kurane and K. Yamada : *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2511 (1973).
- (25) Y. Pomeranz : "Wheat-Chemistry and Technology," A. A. C. C., 1964, p. 464.
- (26) J. W. Lee and J. A. Ronalds : *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 199 (1972).
- (27) R. Cubadda and E. Quattrucci : *ibid.*, **25**, 417 (1974).
- (28) P. L. Guss, T. Richardson and M. A. Stahmann : *Cereal Chem.*, **44**, 607 (1967).
- (29) P. L. Guss, T. Richardson and M. A. Stahmann : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **45**, 272 (1968).
- (30) D. E. Walsh, V. L. Youngs and K. A. Gills : *Cereal Chem.*, **47**, 119 (1970).
- (31) G. R. Honold and M. A. Stahmann : *ibid.*, **45**, 99 (1968).
- (32) J. J. Evans and D. K. Mecham : *Cereal Sci. Today*, **16**, Abstr. (1971).
- (33) Y. Nagai and S. Funahashi : *Agric. Biol. Chem.*, **26**, 794 (1962) ; **27**, 619 (1963).
- (34) A. G. van Veen and A. J. Hyman : *Rec. Trav. Chim.*, **54**, 493 (1935).
-