

〔醸酵工学 第59巻 第1号 23-27. 1981〕

清酒醸造に関連する主要酵素の白米粉等への吸着*

椎木 敏・五味 勝也**・恩田 紀男・細野 長悦・布川弥太郎

国税庁醸造試験所

Adsorption of the main enzymes involved in *saké* fermentation onto pulverized white rice.* SHINOKI, S., K. GOMI, N. ONDA, C. HOSONO, and Y. NUNOKAWA (*National Research Institute of Brewing*, 2-6-30 Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114) *Hakkokogaku* 59 : 23-27. 1981.

Adsorption of α -amylase, glucoamylase, transglucosidase, acid protease, and acid carboxypeptidase, enzymes involved in *saké* fermentation, onto pulverized white rice and other cereal flours was examined.

Most of the α -amylase and acid protease and half of the acid carboxypeptidase and glucoamylase were adsorbed onto pulverized white rice, but transglucosidase was not. While α -amylase was adsorbed onto pulverized white rice and wheat flour, it was not adsorbed onto starches from white rice, wheat, and potato or onto buckwheat flour.

Pulverized white rice from which albumin, globulin and prolamin but not oryzenin had been removed adsorbed α -amylase, but that from which all proteins had been removed did not.

These results suggested that α -amylase was adsorbed onto the pulverized white rice through some of the protein in the rice, especially oryzenin.

前報¹⁻³⁾において、白米粉に対する α -アミラーゼの吸着をしらべ、 α -アミラーゼは白米粉によく吸着されることを認め、さらに白米から粉碎により生ずる粉末の粒度区分および白米の品種の違いによって、 α -アミラーゼの吸着率に差が生ずることを報告した。

本報では清酒醸造に関連する主要酵素、すなわち α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、トランスグルコシダーゼ、酸性プロテアーゼおよびカルボキシペプチダーゼの白米粉への吸着と α -アミラーゼの各種デンプンへの吸着をしらべた。その結果、 α -アミラーゼは白米粉に吸着するが、デンプンには吸着しないことを見出した。白米粉には α -アミラーゼや酸性プロテアーゼも吸着した。

α -アミラーゼや酸性プロテアーゼが白米粉に吸着するのは、米タンパク質を介して行われる可能性が強

いので、白米粉の脱タンパクによって得た脱タンパク米粉カラムを用いて、 α -アミラーゼと酸性プロテアーゼの吸着を検討した。その結果、 α -アミラーゼの白米粉への吸着は、米タンパク質とくにオリゼニンが関与していると推測した。

実験方法

使用酵素 米麹粗酵素は常法によって製麹した *Aspergillus oryzae* の米麹から 0.5% 食塩を含む 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で抽出し、さらにアルコール沈でんを行ったのち、減圧乾燥した。米麹 1 kg から 2.6 g の粗酵素を得た。この粗酵素を使用時 1% 溶液とした。1%粗酵素液の各種酵素力価は Table 1 のとおりである。

これらの粗酵素に対する比較のため、結晶または精製酵素として次のものを用いた。 α -アミラーゼは *A. oryzae* 起源の結晶 (タカアミラーゼ A) を用いた。グルコアミラーゼは *Rizopus niveus* 起源の結晶 (生

* 清酒もろみにおける蒸し米の溶解機構 (第5報)
Mechanism of rice digestion in *saké moromi*-
mash (V)

** 現在、関東信越国税局鑑定官室

Table 1. Activities of crude enzymes extracted from rice-*koji*.

Enzyme	Activity (units/ml)
α -Amylase	2150
Glucoamylase	801
Transglucosidase	1375
Acid protease	5928
Acid carboxypeptidase	13000

Crude enzyme was prepared by lyophilizing rice-*koji* extract, 2.6 g of crude enzyme being obtained from 1 kg of rice-*koji*, and this was used in 1% solution for assay.

化学工業社製)を用いた。酸性プロテアーゼ⁹⁾は *A. oryzae* 起源の酵素剤より精製して用いた。トランスグルコシダーゼ⁴⁾ および酸性カルボキシペプチダーゼ⁵⁾ は *A. oryzae* の米麹から精製して使用した。

酵素吸着体 白米粉は昭和53年埼玉県産の日本晴(精米歩合75%) 30 gを穀粒粉碎器(トリオブレンダー TR-BL)にとり、18,000 rpm, 3分間粉碎を行い、粒度区分60~100メッシュの粉末を用いた。白玉粉、そば粉、小麦粉およびとうもろこし粉は市販品を用いた。米デンプンは白米粉を常法⁶⁾ によって脱タンパクし、さらに精製したものを使用した。小麦、とうもろこし、じゃがいもおよびさつまいもの各デンプンは、和光純薬工業(株)の試薬を使用した。

脱タンパク米粉カラムの調整 内径1.1 cmのカラム内に約1 cmの海砂の層をつくり、その上に白米粉(ソックスレー脂肪抽出器で脱脂したもの、30~60メッシュ) 2 gとセライト545を3 gおよび海砂10 gとをよく混合したものを詰め、その上に約1 cmの海砂層を重ねた。このカラム中の米粉タンパクを Maes抽出法⁷⁾ に準じて脱タンパクした。

カラム1は蒸留水でアルブミンを除去したものである。カラム2は蒸留水でアルブミンを除去したあと、10%食塩水でグロブリンを除去したものである。カラム3はカラム2と同じ操作によってアルブミンとグロブリンを除いたあと、60%エタノールを流し、プロラミンまで除去したものである。カラム4はカラム3と同じ操作をしたのち、さらに0.1% KOH溶液と0.5% KOH溶液を用いてオリゼニンまで除去したカラムである。各タンパクの溶出はニンヒドリン反応陰性になるまで行った。

酵素の吸着 白米粉等の各種穀粒粉およびデンプ

ン1 gに種々の力価の酵素を含んだ20 mM 乳酸緩衝液(pH 4.0) 5 mlを加え、かくはん後5℃で一夜放置したあと、遠心分離(3,000 rpm, 15 min)によって得た上澄液の酵素活性を測定した。

脱タンパク米粉カラムへの酵素の吸着および溶出

あらかじめ20 mM 乳酸緩衝液(pH 4.0)で平衡化した脱タンパク米粉カラム(カラム1~4)に種々の力価の酵素液0.5 mlを添加し、同緩衝液を流下させた。吸着した酵素は1 M NaClを含んだpH 5.0, 20 mM 酢酸緩衝液(以下1 M 食塩水と略す)で溶出した。

分析法および活性表示法 α -アミラーゼおよび酸性プロテアーゼは国税庁所定分析法注解の方法⁸⁾、グルコアミラーゼ⁹⁾ およびトランスグルコシダーゼ¹⁰⁾ は岩野らの方法、酸性カルボキシペプチダーゼは中台ら¹¹⁾の方法に準じて測定した。

活性の表示は次のとおりとした。 α -アミラーゼは可溶性デンプンを基質として、40℃, 30分間反応させた Wohlgemuth 価で表示した。グルコアミラーゼは可溶性デンプンを基質として、40℃, 60分間に1 mgのグルコースを生成する活性を1単位とした。トランスグルコシダーゼは α -メチル-D-グルコシドを基質として、40℃, 60分間に1 μ gのグルコースを生成する活性を1単位とした。酸性プロテアーゼはカゼインを基質として、38℃, 60分間に1 μ gのチロシンを生成する活性を1単位とした。酸性カルボキシペプチダーゼは *N*-carbobenzoxy-L-glutamyltyrosine を基質として、30℃, 60分間に1 μ gのチロシンを生成する活性を1単位とした。

実験結果および考察

各種酵素の白米粉への吸着 清酒醸造に関与する主要酵素(α -アミラーゼ, グルコアミラーゼ, トランスグルコシダーゼ, 酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼ)の白米粉への吸着を米麹酵素と純粋酵素を用いてしらべた。

米麹粗酵素および純粋酵素を用いた場合の結果を Table 2 に示した。酵素の吸着は白米粉2 gに対して、米麹粗酵素の1%溶液0.5 mlを含んだ緩衝液10 mlを加え、5℃で一夜放置して行った。

粗酵素液中の α -アミラーゼおよび酸性プロテアーゼは吸着率83%と92%でよく吸着されたが、トランス

Table 2. Adsorption of enzymes onto rice flour.

Enzyme	Crude enzyme		Purified enzyme	
	Before adsorption (units/ml)	Adsorption rate (%)	Before adsorption (units/ml)	Adsorption rate (%)
α -Amylase	99	83	88	87
Glucoamylase	29	41	16	25
Transglucosidase	45	0	241	0
Acid protease	222	91	169	100
Acid carboxypeptidase	536	52	365	83

To 2 g of rice flour (60~100 mesh) was added 10 ml of 20 mM lactate buffer (4.0) containing the crude enzyme prepared from rice-*koji* extract or the purified enzyme, and the suspension was mixed thoroughly and left to stand at 5°C overnight.

The suspension was centrifuged (3,000 rpm, 15 min) and enzyme activity in the supernatant was measured.

グルコシダーゼは全く吸着されなかった。グルコアミラーゼの吸着率は41%, 酸性カルボキシペプチダーゼの吸着率は52%であった。

純粋酵素の吸着は白米粉 1 g に対して, 純粋酵素を単独に含んだ緩衝液 5 ml を加え, 5°C で一夜放置して行った。

結晶 α -アミラーゼと精製酸性プロテアーゼは米麹粗酵素の場合と同様によく吸着された。精製トランスグルコシダーゼも米麹粗酵素と同様に全く吸着されなかった。

精製酸性カルボキシペプチダーゼは米麹粗酵素の場合と異なり, 吸着率がよく83%であった。このような差が生じたことは, 米麹の酸性カルボキシペプチダーゼには数種あり今回の精製酵素はとくに吸着性の高い酵素であったのか, 粗酵素液のように他の酵素と共存する場合吸着率が低下するのか, これらについては今後さらに検討を加えなければならない。

結晶グルコアミラーゼは米麹粗酵素の場合と同様に吸着率が低かった。三吉ら¹²⁾は *A. niger* 起源のグルコアミラーゼが蒸し米に吸着されるが, *A. oryzae* 起源のグルコアミラーゼには吸着性を認めていない。これらのことから, 米麹粗酵素液中のグルコアミラーゼの吸着は強いとは考えられない。

α -アミラーゼの各種穀粒粉への吸着 結晶 α -アミラーゼ 100 units/ml を含んだ緩衝液に各種穀粒粉を加え, α -アミラーゼ吸着性の違いをしらべた。その結果を Table 3 に示した。

穀粒粉の α -アミラーゼ吸着能は, その種類によ

Table 3. Adsorption of Taka-amylase A onto various cereal flours.

Flour	Adsorption rate (%)
White rice	92
Shirata-mako	87
Wheat*	84
Buckwheat	10
Corn	35

The enzyme activity before adsorption was 100 units/ml.

* Treated with hot ethanol.

て異なった。白米粉・白玉粉および小麦粉の吸着率は84~92%と高く, そば粉やとうもろこし粉の吸着率は10%および35%と低かった。小麦粉の場合, それ自体に多量のアミラーゼを含んでいるため, 熱アルコール処理をしたものを用いた。

α -アミラーゼの各種デンプンへの吸着 α -アミラーゼが白米粉や白玉粉などによく吸着することから, α -アミラーゼの吸着が白米粉などのデンプンに対して起こるものか否かをしらべるために, 各種デンプンを用いて吸着をしらべた。 α -アミラーゼは 100 units/ml 用い, その結果を Table 4 に示した。

α -アミラーゼはいずれのデンプンへもほとんど吸着しなかった。小麦やとうもろこしのデンプンは *Bacillus subtilis* 起源の液化型 α -アミラーゼをよく吸着し, α -アミラーゼの精製手段として利用されているが, ここに用いた *A. oryzae* 起源の結晶 α -アミ

Table 4. Adsorption of Taka-amylase A onto starches of various origins.

Starch	Adsorption rate (%)
Rice	4
Wheat	2
Corn	2
Potato	1
Sweet potato	2

The enzyme activity before adsorption was 100 units/ml.

ラーゼは、いずれのデンプンにもほとんど吸着しなかった。したがって、清酒醸造に用いられている米麴中の α -アミラーゼが蒸し米に吸着するのは、蒸し米のデンプン以外の成分に起因すると考えた。

脱タンパク米粉カラムへの酵素の吸着 α -アミラーゼは白米粉に吸着するが、米デンプンには吸着しないことが明らかとなったので、酵素は米のタンパク質に吸着するのではないかと考え、Maes 抽出法⁷⁾によって脱タンパクした米粉カラムを用いて酵素の吸着をしらべた。

Fig. 1 は結晶 α -アミラーゼが米タンパク質のどの区分に吸着するかをしらべた結果である。カラム1、カラム2およびカラム3はともに α -アミラーゼを吸着した。これに反してオリゼニンまで除去したカラム4では α -アミラーゼを吸着しなかった。吸着した α -アミラーゼは1 M食塩水で溶出したところ、回収率はカラム1が79%，カラム2が92%，カラム4が100%であったが、カラム3では56%と低かった。カラム3では粗酵素液の場合 (Fig. 2) も同様に回収率が低い、この原因については、アルコール処理によって吸着機構が異なり溶出しにくくなったのか、あるいは失活したのか検討しなければならない。いずれにしても α -アミラーゼはオリゼニンを含むカラム1～3には吸着するが、カラム4のようにオリゼニンまで除去したものへは吸着しないことが明らかとなった。ここで α -アミラーゼの溶出に1 M食塩水を用いたのは、一般に用いられている0.1 M食塩水では α -アミラーゼおよび酸性プロテアーゼが十分に溶出しなかったためである。

次に、米麴粗酵素中の α -アミラーゼと酸性プロテアーゼの脱タンパク米粉カラムへの吸着をしらべ、その結果を Fig. 2 に示した。 α -アミラーゼはカラム3

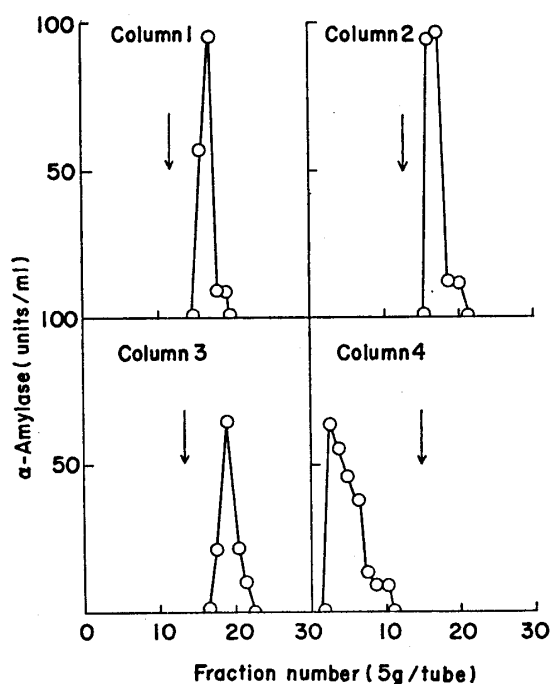


Fig. 1. Adsorption of Taka-amylase A on the deproteinized columns.

A 0.5-ml portion of Taka-amylase A (2,200 units/ml) was applied to the deproteinized column equilibrated with 20 mM lactate buffer (pH 4.0). The deproteinized column was washed with the same buffer solution, then with 20 mM acetate buffer (pH 5.0) containing 1 M NaCl, shown by the arrows.

には全て吸着したが、カラム4ではほとんど吸着しなかった。吸着した α -アミラーゼは1 M食塩水で溶出した。

以上の結果と、筆者らが前報¹³⁾において酸性プロテアーゼで処理した蒸し米は α -アミラーゼ吸着能が減少することを認め、さらに白米中の各タンパク質の α -アミラーゼ吸着能をしらべたところ、プロラミンには全く吸着しないが、オリゼニンとグロブリンには吸着すること¹⁴⁾を認めていることから、 α -アミラーゼはデンプンに吸着するのではなく、米タンパクの大半を占めるオリゼニンに吸着するものと推測した。

酸性プロテアーゼの場合は Fig. 2 に示したように、カラム3では93%，カラム4では59%吸着した。タンパク質が除去されたカラム4でも酸性プロテアーゼが吸着するのは、米麴中には酸性プロテアーゼが多種¹⁵⁻¹⁷⁾あり、白米中のタンパク質を介して吸着するものと、デンプン等に吸着するものがあるように考えられる。

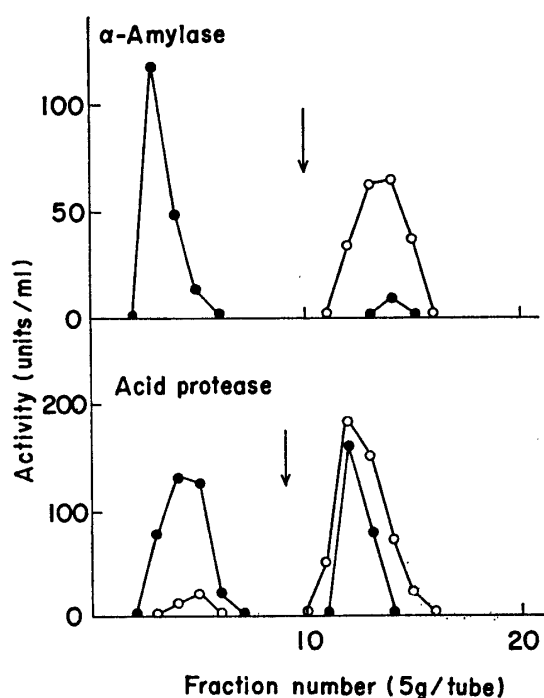


Fig. 2. Adsorption of crude enzymes from rice-koji on the deproteinized columns.

A 0.5-ml portion of the crude enzyme solution was applied to the deproteinized columns, and enzymes were eluted by the method described in Fig. 1. Arrows indicate the elution by 1 M NaCl.

—○— column 3 —●— column 4

要 約

清酒醸造に関連する主要酵素すなわち、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、トランスグルコシダーゼ、酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼの白米粉等への吸着をしらべ、以下の知見を得た。

1. 白米粉への酵素の吸着性はその種類によって異なり、 α -アミラーゼや酸性プロテアーゼはよく吸着するが、トランスグルコシダーゼは全く吸着しなかった。グルコアミラーゼと酸性カルボキシペプチダーゼはその中間であった。

2. α -アミラーゼは白米粉、白玉粉および小麦粉によく吸着するが、そば粉にはあまり吸着しなかった。

3. α -アミラーゼは白米、小麦あるいはじゃがいも等のデンプンにはほとんど吸着しなかった。

4. オリゼニンまで脱タンパクした白米粉には、 α -アミラーゼは吸着しないが、酸性プロテアーゼは約60%吸着した。

5. 以上の結果から、 α -アミラーゼの白米粉への吸着は、白米成分中のタンパク質とくにオリゼニンが関与しているものと推測した。

文 献

- 1) 布川, 椎木: 醸酵工学, **58**, 10 (1980).
- 2) 布川, 椎木, 小口: 醸協, **75**, 337 (1980).
- 3) 布川, 岩野: 醸協, **71**, 796 (1976).
- 4) 岩野, 柴田, 光永, 佐藤, 布川: 醸協, **72**, 513 (1977).
- 5) 岩野, 飯塚, 伊藤, 布川: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 412 (1979).
- 6) 二国: 澱粉科学ハンドブック, p. 167, 朝倉書店 (1977).
- 7) Maes, E.: *Nature*, **193**, 880 (1962).
- 8) 村上: 国税庁所定分析法注解, p. 210, 日本醸造協会 (1974).
- 9) 岩野, 風間, 布川: 醸協, **71**, 383 (1976).
- 10) 岩野, 佐藤, 柴田, 光永, 布川: 醸協, **72**, 459 (1977).
- 11) 中台, 那須野, 井口: 調味科学, **18**, 435 (1971).
- 12) 三吉, 照井, 加賀谷, 小松: 醸工, **54**, 962 (1967).
- 13) 椎木, 布川: 醸酵工学, **58**, 355 (1980).
- 14) 椎木, 立松, 布川: 日本醸酵工学会大会講演要旨集, p. 6 (1980).
- 15) 鈴木, 布川, 馬場: 醸協, **53**, 802 (1958).
- 16) Nunokawa, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 687 (1965).
- 17) Tsujita, Y., Endo, A.: *J. Bacteriol.*, **130**, 48 (1977).

(昭55. 8. 26 受付)