

〔醸酵工学 第60巻 第3号 145-149, 1982〕

 α -アミラーゼの米タンパク質への吸着*

椎木 敏・立松 悦典・布川弥太郎

国税庁醸造試験所

Adsorption of α -amylase onto rice protein.* SATOSHI SHUNOKI, ETSUNORI TATEMATSU, and YATARO NUNOKAWA (National Research Institute of Brewing, 2-6-30 Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114, Japan) HOKKOKUGAKU 60: 145-149, 1982.

Proteins were separated from white rice and adsorption of α -amylase onto the proteins was examined. α -Amylase was adsorbed well onto the oryzenin fraction but not onto the prolamin fraction; the globulin fraction was intermediate (adsorption efficiency: 78%). The maximum adsorption of α -amylase was 800-1,000 units/mg oryzenin fraction. The optimum pH for the adsorption was 4. The adsorption efficiency differed depending on the organic acids used for the buffer solution; α -amylase was adsorbed completely in lactate and acetate buffers (25 mM, pH 4.5) but only less than 20% in tartarate, oxalate and citrate buffers (25 mM, pH 4.5). The adsorption efficiency decreased with higher concentrations of buffer solution and salt solution; α -amylase was not adsorbed at 100 mM lactate buffer, 10 mM citrate buffer or 50 mM NaCl solution. Adsorption of α -amylase onto the oryzenin fraction decreased on treating the protein with DNFB (2,4-Dinitrofluorobenzene) or DNS (Dansyl chloride). These results coincided with the adsorption of α -amylase onto steamed rice or rice powder.

前報において、 α -アミラーゼ(タカアミラーゼ A)は α 米や生米粉によく吸着されるが、酸性プロテアーゼで処理した米粉には吸着されないことを報告した。¹⁾ また、脱タンパク米粉や米デンプン等には吸着されないことも確認した。²⁾ これらの知見に基づき、 α -アミラーゼの蒸し米や生米粉への吸着には米成分中のタンパク質が関与しているものと考えた。

本報では、生米粉から分画したタンパク質、とくにオリゼニン画分の α -アミラーゼ吸着特性を検討した。その結果、米タンパク質のうちオリゼニン画分が α -アミラーゼを最も吸着し、吸着能は pH、酸濃度および塩濃度によって左右されることを認めた。

実験方法

米タンパク質の分画 米タンパク質は昭和54年度埼玉県産の日本晴(精米歩合75%)から、石川、布川の方法³⁾に準じ、一部次のように改変して分画した。すなわち、各タンパク質の分画は20倍の溶出液でとき

* 清酒もろみにおける蒸し米の溶解機構(第6報)
Mechanism of rice digestion in *saké moromi-mash* (VI)

どきかくはんしながら20時間、5°Cで行った。グロブリンは2.5%食塩水で溶出した。グロブリンとプロラミンは蒸留水に対して透析した。これらの粗タンパク質画分をそれぞれグロブリン画分、プロラミン画分およびオリゼニン画分とした。各画分は湿潤状態(蒸留水にタンパク質として5%懸濁させたもの)のまま5°Cで保存した。

使用酵素 *Aspergillus oryzae* 起源の結晶 α -アミラーゼ(三共株式会社製のタカアミラーゼ A)を用いた。この結晶 α -アミラーゼ 1mg は 2,650 units に相当する。

α -アミラーゼの吸着 オリゼニン画分等の吸着体 100mg または 200mg (湿潤状態のもの)に種々の力価の α -アミラーゼを含んだ各種緩衝液 1ml を加え、十分にかくはんしたのち、5°C で一夜放置して α -アミラーゼを吸着させた。懸濁液はかくはんしたのち遠心分離(3,000 rpm, 15 min)して得た上澄液の α -アミラーゼ力価を測定し、吸着体からの液量増加分を補正して吸着量(率)を算出した。

オリゼニンの化学的処理 DNFB (2,4-Dinitrofluorobenzene) による化学的処理は F. Sanger の方法⁴⁾に準じ、0.2% DNFB エタノール溶液 20ml に 4.5%

炭酸水素ナトリウム 5ml を混合した溶液中にオリゼニン画分 100mg (タンパク質として 5mg) を加え、暗所において 25°C, 4 時間処理した。DNS (Dansyl chloride) による処理は W. R. Gray の方法⁶⁾に準じ、オリゼニン画分 100mg にエチルモルホリン 5ml と DNS 溶液 7.5ml (DNS 400mg を 7.5ml の無水ジメチルホルムアミドに溶解したもの) を加え、25°C, 2 時間処理した。いずれも処理後遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) して、過剰の反応液を除去したのち、蒸留水を加えて水洗したあと、一昼夜流水中で透析した。

分析法 α -アミラーゼ活性は国税庁所定分析法注解記載の方法⁶⁾により、Wholgemuth 価で表示した。粗タンパク質は国税庁所定分析法注解記載の方法⁷⁾によった。

実験結果

米タンパク質の α -アミラーゼ吸着 分画した各タンパク質画分の α -アミラーゼ吸着能の違いをしらべるため、湿潤状態の各画分 200mg (タンパク質として 10mg を含む) に対して、324 units の α -アミラーゼを含んだ pH 4, 25mM の乳酸緩衝液を加えて吸着試験を行った。その結果、 α -アミラーゼ吸着量はオリゼニン画分 324 units (吸着率 100%)、グロブリン画分 252 units (78%)であった。プロラミン画分はほとんど吸着せず、16 units (5%) 吸着したにすぎなかった。

オリゼニン画分の α -アミラーゼ吸着容量 米タンパク質の 80~90% を占め、かつ α -アミラーゼをよく

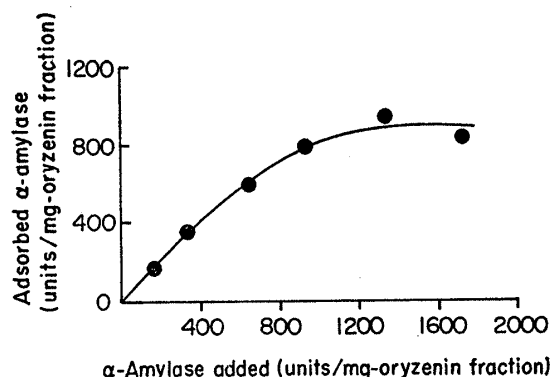


Fig. 1. Adsorption profile of α -amylase onto oryzenin. To 5 mg of oryzenin fraction, 1 ml of 25 mM lactate buffer (pH 4.5) containing various amounts α -amylase was added, and each suspension was mixed thoroughly and allowed to stand overnight at 5°C. The suspension was centrifuged (3,000 rpm, 15 min) and α -amylase in the supernatant was measured.

吸着するオリゼニン画分は、グロブリン画分やプロラミン画分に比べて α -アミラーゼの米への吸着に対して重要な役割を持つものと考えられる。したがって、オリゼニン画分の α -アミラーゼ吸着容量を種々の力価の α -アミラーゼを含んだ pH 4.5, 25mM の乳酸緩衝液を用いて検討した。

結果は Fig. 1 に示したように、 α -アミラーゼ添加量が約 700 units/mg-オリゼニン画分までは 90% 以上吸着し、 α -アミラーゼ添加量がほぼ 1,000~1,700 units/mg-オリゼニン画分のところで最大吸着量に達した。このときの最大吸着容量は、オリゼニン画分 1mg 当たり 800~1,000 units であった。この価は白米中のオリゼニン含量を 5% として白米 1g 当たりの吸着容量に換算すると約 4~5 万 units に相当した。

pH の影響 吸着に及ぼす pH の影響を、オリゼニン画分 100mg (タンパク質として 5mg) に対して α -アミラーゼ 205 units を含んだ 10mM の乳酸緩衝液を用いてしらべた。イオン強度は食塩で 0.01 に調整した。その結果は Fig. 2 に示したように pH 4 で最も吸着し、pH 3 または pH 6 ではあまり吸着しなかった。Fig. 2 には示していないが、緩衝液の代わりに蒸留水 (pH 6.7) を用いると、pH 5 の場合より吸着率 (73.2%) は低かった。これらのことから、pH が α -アミラーゼの吸着に影響を及ぼしていると考えた。

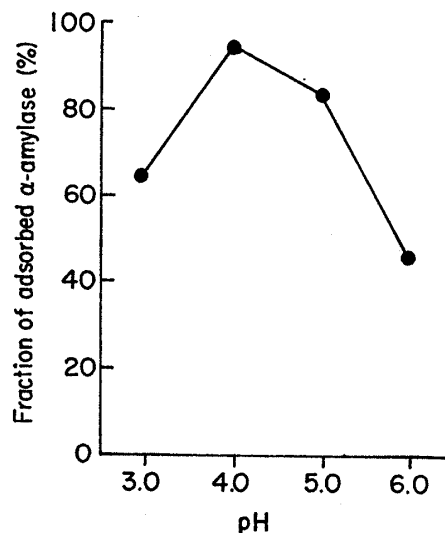


Fig. 2. Effect of pH on α -amylase adsorption. To 5 mg of oryzenin fraction, 1 ml of 10 mM lactate buffer containing 205 units of α -amylase was added, and the suspension was mixed thoroughly and allowed to stand overnight at 5°C. The ionic strength was made up to 0.01 by the addition of NaCl. α -Amylase activity in the supernatant was measured.

酸の種類と濃度の影響 オリゼニン画分の α -アミラーゼ吸着に及ぼす酸の種類と濃度について、オリゼニン画分 100mg (タンパク質として 5mg) を用いて検討した。

酸の種類の影響については、 α 米への α -アミラーゼ吸着に及ぼす有機酸の影響を検討した知見⁸⁾に基づき、6種類の有機酸を選んで α -アミラーゼ 338 units を含んだ pH 4.5, 25mM の緩衝液を調製してしらべた。その結果、乳酸と酢酸は 338 units (吸着率100%)、マレイン酸は 150 units (44%)、酒石酸は 66 units (20%)、シュウ酸は 63 units (19%)、クエン酸は 38 units (11%) 吸着した。

この結果が α -アミラーゼの α 米への吸着と同一の傾

向を示した⁸⁾ので、吸着量の多い乳酸と少ないクエン酸 (いずれも pH 4, 25mM 緩衝液) について酸濃度の影響をしらべた。結果は Fig. 3 に示したように、乳酸の場合 50mM まではほぼ100%吸着し、100mM 以上の高濃度になって初めて吸着率の低下が見られた。一方、クエン酸では 10mM の低濃度でも吸着率は低かった。

塩濃度の影響 オリゼニン画分の α -アミラーゼ吸着に及ぼす塩濃度の影響について、種々の濃度の食塩を含んだ pH 5.0, 25mM の酢酸緩衝液を用いて検討した。その結果は Fig. 4 のとおりで、食塩濃度 20mM のときの吸着量は 111 units (吸着率65%)であるが、50mM 以上では 19 units (11%) となり、ほとんど吸着しなくなった。

化学的処理したオリゼニンの α -アミラーゼ吸着能 DNFB および DNS で処理したオリゼニン画分 (タンパク質として 5mg) に対して、938 units の α -アミラーゼを含んだ pH 4.5, 25mM の乳酸緩衝液を加えて吸着させたのち、液中に遊離している α -アミラーゼをしらべた。その結果、DNFB 処理の場合、無処理区分 (DNFB を添加せず、その後の操作は処理区分と同様に行ったもの) では 5 units の α -アミラーゼが液中に遊離しているにすぎず、ほとんどが吸着されていたが、処理区分では 749 units が遊離していることが認められた。DNS 処理の場合では無処理区分の 173 units に

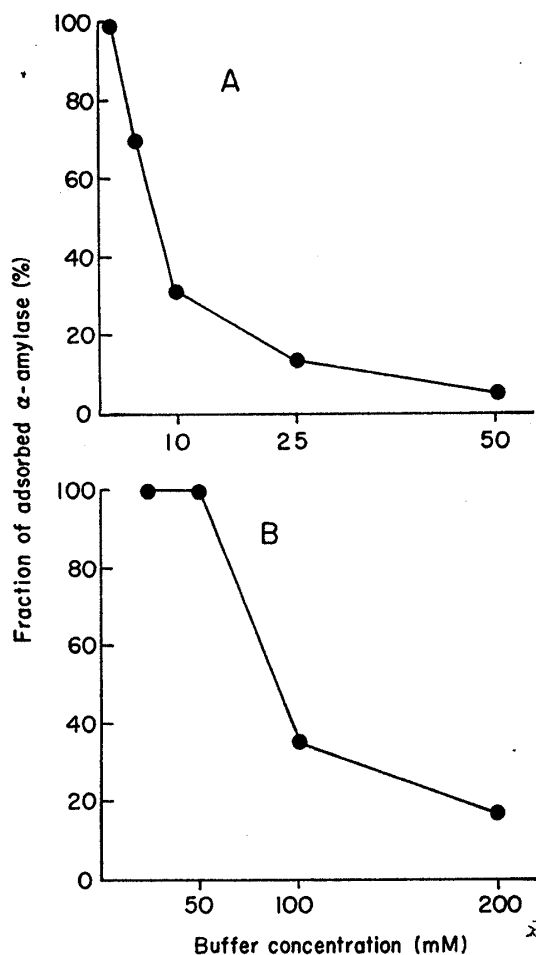


Fig. 3. Effect of buffer concentration on α -amylase adsorption.

A: Citrate buffer, B: Lactate buffer
To 5 mg of oryzenin fraction, 1 ml of buffer (pH 4.5) containing 168 units of α -amylase was added, and the suspension was mixed thoroughly and allowed to stand overnight at 5°C. α -Amylase activity in the supernatant was measured.

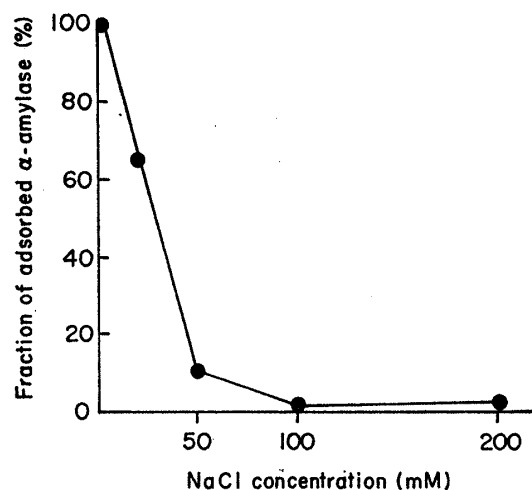


Fig. 4. Effect of NaCl concentration on α -amylase adsorption.

To 5 mg of oryzenin fraction, 1 ml of 25 mM lactate buffer (pH 5.0) containing 170 units of α -amylase and various amounts of NaCl was added, and the suspension was mixed thoroughly and allowed to stand overnight at 5°C. α -Amylase activity in the supernatant was measured.

対して、処理区分では 677 units の α -アミラーゼが液中に遊離していた。これらからオリゼニン画分を DNFB または DNS で処理すれば、 α -アミラーゼ吸着能が低下することがわかった。

考 察

α -アミラーゼが脱タンパク米粉や米デンプンに吸着されないという知見に基づき、 α -アミラーゼの蒸し米等への吸着には米タンパク質が関与しているものと考え、米タンパク質を分画し、 α -アミラーゼ吸着特性について種々検討した。

米タンパク質の80~90%を占めるオリゼニン画分は、他のタンパク質画分に比べ α -アミラーゼをよく吸着し、かつその最大吸着容量は Fig. 1 に示したように、オリゼニン画分 1mg 当たり 800~1,000 units であり、白米 1g 換算では約4~5万 units に達した。 α -アミラーゼの吸着サイトが白米粉中のオリゼニンや分画したオリゼニン画分の露出部分にあると考えて、この値が白米粉の α -アミラーゼ最大吸着容量にほぼ等しいこと⁹⁾、さらに白米粉の主成分である米デンプンが α -アミラーゼを吸着しないこと⁹⁾から、 α -アミラーゼ吸着サイトはオリゼニンに存在するものと理解した。

α -アミラーゼの蒸し米への吸着はイオン強度や pH、酸の種類などによって左右されることが、三吉、照井、¹⁰⁾ 永谷ら¹¹⁾ によって報告されており、筆者ら⁹⁾ も同じような結果を得ている。吸着特性は最大吸着量で検討するのが厳密な方法であるが、本報では便宜的に吸着率や吸着量を用いたが、オリゼニン画分の α -アミラーゼ吸着も蒸し米の場合とほぼ一致した。すなわち、Fig. 2 に示した pH の影響については、pH 4 で α -アミラーゼをよく吸着し、pH 3 や pH 6 ではあまり吸着しなかった。難波、布川¹²⁾ はオリゼニンの溶解に関して、pH 3 では溶解することを認めているが、pH 4~pH 6 ではほとんど溶解しないと報告している。したがって、 α -アミラーゼの吸着に pH が影響を及ぼしていると考えられる。

α -アミラーゼ吸着に及ぼす有機酸の影響は、明らかに蒸し米の場合とよく一致した。すなわち、酢酸や乳酸緩衝液ではよく吸着し、クエン酸緩衝液などでは吸着率が低く、酸濃度の影響は Fig. 3 に示したように、乳酸緩衝液では 50mM までは吸着率は高いが、クエン酸緩衝液では 10mM の低濃度でも吸着率は低いことが認められた。

液中のイオン強度が α -アミラーゼ吸着に及ぼす影響

を食塩添加によって検討したところ、食塩添加量 20 mM (イオン強度0.02) まではよく吸着するが、添加量が 50mM (イオン強度0.05) になるとほとんど吸着しなくなることを認め、蒸し米の場合と同じようにイオン強度の影響を強く受けることがわかった。

以上の結果を総合すると、オリゼニン画分の α -アミラーゼ吸着特性は蒸し米や白米粉の吸着特性と同じような傾向を示し、蒸し米の α -アミラーゼ吸着サイトは米成分中のオリゼニン画分に存在するものと考えられる。オリゼニンの α -アミラーゼ吸着サイトとしては、オリゼニン画分を DNFB や DNS で処理すると α -アミラーゼ吸着能が低下することから、アミノ基やイミダゾール基などが考えられる。一般に化学修飾剤は溶液状のタンパク質に対して用いられており、反応の程度や進行状況は吸収波長の変化等から求められているが、オリゼニン画分のように固体の状態で処理する場合の修飾程度の把握は容易ではない。ここではオリゼニン画分の表面に露出している部分のみが DNFB や DNS の作用を受けたものとみなした。オリゼニンと α -アミラーゼの吸着はオリゼニンのアミノ基やイミダゾール基と α -アミラーゼのカルボキシル基のイオン結合が考えられ、イオン強度や pH の変化によって吸脱着が起こるものと推測される。さらに pH 4 付近で α -アミラーゼをよく吸着することから、 α -アミラーゼの等電点(3.7)との関連も考えられる。これらの問題や、厳密な吸着特性についてはさらに検討しなければならない。

要 約

米タンパク質の α -アミラーゼ吸着特性を検討し次の知見を得た。

1. 分画した米タンパク質の α -アミラーゼ吸着能はオリゼニン画分が最も大きく、次いでグロブリン画分であった。プロラミン画分はほとんど吸着しなかった。
2. オリゼニン画分の α -アミラーゼ最大吸着容量は、オリゼニン画分 1mg 当たり 800~1,000 units であった。この値を白米粉 1g に換算すると4~5万 units になる。
3. pH や酸の種類、濃度および塩濃度はオリゼニン画分の α -アミラーゼ吸着能に影響を及ぼした。pH は4のところで最もよく吸着した。酸の種類では酸濃度 25 mM (pH 4.5) の場合、乳酸や酢酸の緩衝液は100%吸着したが、酒石酸、シュウ酸、クエン酸の吸着率は20%以下であった。酸濃度については、乳酸では 50mM まではほぼ100%吸着し、100mM 以上の高

濃度で初めて吸着率は低下した。クエン酸の場合は 10 mM の低濃度でも吸着率は低かった。食塩濃度は 50 mM 以上になるとほとんど吸着しなくなった。

4. DNFB や DNS で処理したオリゼニン画分の吸着能は低下した。

5. これらの結果から、蒸し米や白米粉の α -アミラーゼ吸着サイトは主としてオリゼニン画分に存在するものと考えた。

終わりに本研究を遂行するにあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました前国税庁醸造試験所長大塚謙一博士に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 椎木, 布川: 醸酵工学, **58**, 355 (1980).
- 2) 椎木, 五味, 思田, 細野, 布川: 醸酵工学, **59**,

23 (1981).

- 3) 石川, 布川: 農化, **44**, 21 (1970).
- 4) F. Sanger: *J. Biochem.*, **39**, 507 (1945).
- 5) 日本生化学会: 生化学実験講座 Vol. 1, タンパク質の化学 II, p. 147, 東京化学同人, 東京 (1976).
- 6) 村上: 国税庁所定分析法, p. 210, 日本醸造協会, 東京 (1974).
- 7) 村上: 国税庁所定分析法注解, p. 222, 日本醸造協会, 東京 (1974).
- 8) 椎木, 岩野, 布川: 醸酵工学, **57**, 214 (1979).
- 9) 布川, 椎木: 醸酵工学, **58**, 10 (1980).
- 10) 三吉, 照井: 醸工, **45**, 973 (1967).
- 11) 永谷, 水谷, 難波: 醸工, **51**, 35 (1973).
- 12) 難波, 布川: 醸協, **63**, 177 (1968).

(昭56.10. 2受付)