The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

〔醗酵工学会誌 第70巻 第4号 293-301. 1992〕

総合論文

清酒もろみにおける蒸米溶解の機作に関する研究

（平成3年度 日本醗酵工学会江田賞受賞）

椎木 敏

仙台国税局鑑定官室
〒980 仙台市青葉区本町3-3-1

Studies on the mechanism of rice digestion in *sake moromi*-mash. —Monograph— SATOSHI SHIINOKI (*Office of Brewing Technology, Sendai Regional Taxation Bureau, 3-3-1, Honcho, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980*) Hakkokogaku **70**: 293-301, 1992.

In Japan, *sake* is a traditional beverage made from rice, rice-*koji*, and water. α-Amylase and glucoamylase are the most important enzymes in *sake* brewing; more recently, the role of acid protease has also been found to be important in the brewing process. The enzymes are usually supplied from rice-*koji* prepared by cultivating *Aspergillus oryzae* on steamed rice. It is known that at an early stage of *sake moromi*-mash fermentation, α-amylase extracted from rice-*koji* is adsorbed onto steamed rice in the *sake moromi*-mash, decreasing its activity in the mash. This study was carried out to explore the mechanism of adsorption of α-amylase produced from *A. oryzae* (Taka-amylase A; TAA) onto steamed rice in *sake moromi*-mash. α-Amylase was adsorbed onto white rice very well, but hardly adsorbed onto rice starch or deproteinized rice. We further found that α-amylase was adsorbed very well to oryzenin (glutelin), which makes up the greater part of rice protein. When acid protease attacked steamed rice in the *sake moromi*-mash, the protein in the rice decreased and the efficiency of α-amylase adsorption was reduced. From these results, the site of α-amylase adsorption in steamed rice was considered to be oryzenin. The results also suggest that α-amylase (TAA) combines well with proteins having basic amino acid residues, with intermolecular ionic bonding. It was presumed that ionic bonding occurred between the basic amino acid residues of oryzenin and the carboxyl groups of TAA, because oryzenin and TAA are oppositely charged in the *sake moromi*-mash (pH 4～pH 4.5); the pI (isoelectric point) of TAA was 3.7 and that of oryzenin was 6.5. Finally, the use of acid protease and an α-amylase which does not adsorb onto rice was found to be the most effective means for *sake moromi* fermentation, promoting digestion of the steamed rice.

はじめに

清酒は米と米麹，水を原料として製造される我が国の伝統的な醸造酒である．

清酒醸造の特徴である並行複発酵において，蒸米の溶解・糖化に関与する重要な酵素としては，α-アミラーゼやグルコアミラーゼ等のデンプン分解酵素が挙げられている．これらの酵素は，一般に黄麹菌(*Aspergillus oryzae*)を用いて製造した米麹から供給されている．

このうち，α-アミラーゼは，もろみ初期の蒸米によく吸着されていることが知られている．この吸着現象は，蒸米の溶解と関連があり，主として清酒もろみ中における消長として捉えられていた．[1~9] 古く徳岡[2]は，米麹のα-アミラーゼが米麹に吸着された状態では，酵素活性の一部が発揮されるにすぎないことを明らかにし，永谷ら[9]も蒸米の溶解系に食塩を添加して，α-アミラーゼを蒸米から遊離させると，蒸米の溶解が促進されることを明らかにした．さらに，三吉ら[10]は，α-アミラーゼが蒸米に吸着され，吸着されたα-

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

アミラーゼは吸着母体の蒸米にはほとんど作用しないが，可溶性デンプンには作用することを認め，この吸着を無効吸着と定義している．

宮部らや岩野らは蒸米の溶解が，α-アミラーゼ単独よりも，酸性プロテアーゼを加えることによって促進されることを報告している．宮部ら[11]は，酸性プロテアーゼの添加効果を，酸性プロテアーゼが蒸米に作用して蒸米を崩壊させ，α-アミラーゼの作用を受けやすくするためであることを示した．岩野ら[12]は，精製酵素を用いて蒸米の溶解試験を行ったところ，酸性プロテアーゼの添加効果を認めた．その効果は，酸性プロテアーゼが蒸米に作用し，蒸米のα-アミラーゼ吸着を解除する等の働きによるものと推察した．さらに Nunokawa ら[13]は，清酒もろみの蒸米の溶解・糖化・発酵には，酸性プロテアーゼの影響の大きいことを明らかにした．

筆者らは，これらの研究を基礎として，清酒もろみにおける酸性プロテアーゼの働きを明らかにするために，蒸米のα-アミラーゼ吸着と溶解の機作を検討した．その結果，α-アミラーゼは蒸米のオリゼニン（グルテリン）と静電的に結合し，蒸米に吸着されることを見いだし，さらに酸性プロテアーゼが蒸米の溶解を促進することを認めた．本稿では，主として蒸米のα-アミラーゼ吸着機作について報告する．

米のα-アミラーゼ吸着とその要因

清酒もろみにおけるα-アミラーゼの消長については，古くから多くの研究者によって報告されている．それらを総合すると，もろみの初期，α-アミラーゼは蒸米にほとんど吸着されるが，発酵が進むにしたがい再び液中に遊離し，その活性は低下しながらも後期まで持続することが明らかにされている．

1. 白米粉末のα-アミラーゼ吸着能 清酒もろみ中で，α-アミラーゼは蒸米に吸着されることから，白米が黄麹菌α-アミラーゼ（タカアミラーゼA; TAA）*をどの程度まで吸着するかを検討した．

白米を一定の条件で粉砕した場合，種々の粒度の粉末を生ずるが，その白米粉末を用いてα-アミラーゼの最大吸着量をしらべた．すなわち，種々の酒造用白米 40 g を穀粒粉砕器にとり，18,000 rpm で 5 分間粉砕したあと，種々の粒度区分に篩別すると，30～60 メッシュ区分がもっとも多く得られた．この最多区分をさらに 2 次粉砕して200メッシュ以上に細粉したものに，乳酸緩衝液 (pH 4, 25 mM) 中でα-アミラーゼを吸着させた．その結果，Fig. 1 に示すように白米粉末 1 g あたりの吸着量は，日本晴が約 62,000 units，トヨニシキが約 55,000 units，マツマエが約 40,000 units であり，品種間に差があるものの，白米粉末は多量のα-アミラーゼを吸着することがわかった．[14]

2. 蒸米のα-アミラーゼ吸着能に及ぼす諸要因 蒸米のα-アミラーゼ吸着および脱着に及ぼす要因は，すでに三吉ら，正井ら，永谷ら[9]によって検討されている．

三吉ら[6]は，蒸米のα-アミラーゼ吸着能は pH 4 台で最大になり，pH 5.1 では吸着しなくなり，低濃度のコハク酸緩衝液 (10 mM～40 mM) で80%以上を吸着し，100 mM では吸着しなくなることを明らかにした．正井ら[7]も，蒸米に吸着されたα-アミラーゼを 100 mM 酢酸緩衝液で溶出している．

筆者らは，蒸米のα-アミラーゼ吸着条件*を決めるため，種々の吸着要因を検討した．その結果，蒸米

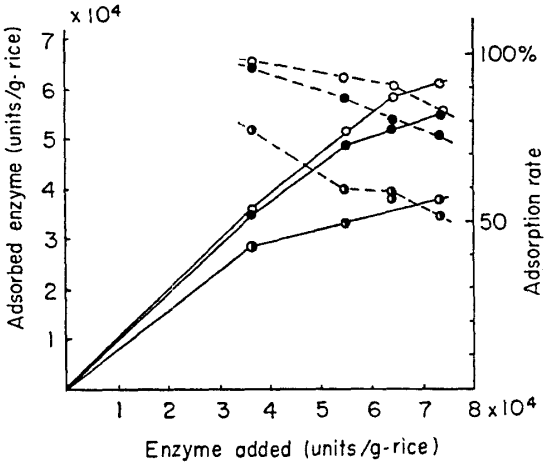

Fig. 1. Adsorption isotherm of α-amylase onto rice pulverized into coarse particles and repulverized into fine particles. Coarse particles of 30–60 mesh were repulverized into fine particles of >200 mesh. To 1 g of powder of 30–60 mesh, 5 ml of 25 mM lactate buffer (pH 4.0) containing various amounts of α-amylase was added, and the suspension was mixed thoroughly and left standing at 5°C overnight. α-amylase activities in supernatants were measured. Symbols and lines: ○, *Nihonbare*; ●, *Toyonishiki*; ◑, *Matsumae*; ——, adsorption, ---, adsorption rate.

* 特に断らない限り三共㈱の *A. oryzae* 起源のタカアミラーゼ A を使用した．

* 通常，吸着操作は pH 4.0, 25 mM 乳酸緩衝液中で行い，吸着量と吸着率は初発酵素液と吸着操作後の溶液部分の α-アミラーゼ濃度（力価）の差から算出した．

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 1. Effect of organic acid buffers on rice digestion by α-amylase.

Organic acid	Liquid vol. (ml)	α-Amylase (units/ml)	Extract (g-glucose)	pK_1
Oxalic acid	15.6	72.7	2.84	1.27
Maleic acid	13.0	62.1	3.03	1.92
Malonic acid	12.3	19.4	2.09	2.85
Phthalic acid	14.5	97.7	3.23	3.00
Fumaric acid	14.7	91.8	3.24	3.02
Tartaric acid	15.9	92.2	3.64	3.04
Citric acid	14.8	99.8	3.34	3.13
Malic acid	13.9	26.6	2.66	3.42
Formic acid	6.5	0	0.41	3.74
Glycolic acid	6.6	0	0.36	3.83
Lactic acid	7.4	0	0.40	3.90
Succinic acid	7.7	0	0.74	4.22
Glutaric acid	9.7	0	1.07	4.34
Adipic acid	9.8	0	0.94	4.41
Acetic acid	6.1	0	0.29	4.76
Propionic acid	6.4	0	0.21	4.87

To 25 ml of a 20 mM organic acid solution (pH 4.0) containing 100 units α-amylase (Taka-amylase A)/ml, 10 g of α-rice was added and incubated at 15°C for 3 d. The reaction mixture was centrifuged and volume, total sugars, and α-amylase activity of the supernatant were measured.

（またはα米）のα-アミラーゼ吸着能は，有機酸の種類と濃度，反応液のpHとイオン強度等に影響されることを認めた.[15] すなわち，蒸米は乳酸緩衝液の場合，初発pHがpH 3～pH 4.5のときα-アミラーゼを吸着し，pH 3およびpH 6ではほとんど吸着しなかった．緩衝液の濃度の影響は，酸の種類で異なり，乳酸の場合は50 mM以下で，蒸米はα-アミラーゼをよく吸着し，100 mM以上の高濃度では吸着しなかった．これに対して，クエン酸では10 mMのような低濃度でも吸着しないことを認めた．さらに，食塩等の各種塩類を加えて，イオン強度を高めるとα-アミラーゼ吸着能は低下した．これらの結果は，三吉ら[6]の結果とほぼ一致した．

酸の種類ではTable 1に示すように，モノカルボン酸およびジカルボン酸のうち，コハク酸，グルタール酸，アジピン酸等の緩衝液で蒸米はα-アミラーゼをよく吸着し，液中にα-アミラーゼが認められなかった．しかも液中にα-アミラーゼが少ない場合，蒸米の溶解も悪い傾向が認められた．また，Table 1に示すように，pKがα-アミラーゼの等電点（3.7）より大きければよく吸着し，さらに塩類を添加してイオン強度を高めれば吸着が解除されることから，蒸米とα-アミラーゼの吸着現象はイオン結合の可能性が示唆される．

α-アミラーゼを吸着する米の成分

白米粉末は，品種間に差はあっても，多くのα-アミラーゼを吸着することがわかった．そこで，α-アミラーゼが米のどのような成分に吸着されるかを検討した．すなわち，α-アミラーゼが米のどの成分（部位）に吸着されるかを知ることによって，蒸米のα-アミラーゼ吸着機作と蒸米の溶解を解明する手がかりとした．

1. 精米歩合とα-アミラーゼ吸着能の関係[16]

白米のα-アミラーゼ吸着能は，精米歩合によって影響された．すなわち，精米歩合90%の白米はα-アミラーゼをほとんど吸着しないが，精米歩合70%以下まで精米した白米はきわめてよく吸着した．そこで，α-アミラーゼ吸着に対する金属と脂肪の影響をしらべた．

α-アミラーゼを吸着しない精米歩合90%の白米粉末を，常法によって塩酸処理すると，総金属の90%以上が除去された．特に，カリウムは870 ppmから0 ppmに，マグネシウムは200 ppmから7 ppmにい

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

ちじるしく減少した．

脱金属処理を行った白米粉末のα-アミラーゼ吸着率は，未処理の場合の0％から39％へと高くなった．すなわち，脱金属された白米は，液中への金属の溶出量が少なく，液中のイオン強度が低下するため，α-アミラーゼを吸着できるようになったと考えられる．曽我ら[17]は，玄米または低精白パフ米で仕込んだ清酒もろみは，初期の流動性がいちじるしく増加し，溶解性がよくなることを認め，その原因は多量のマグネシウムがもろみのイオン強度を高めるためであることを明らかにしている．

さらに，常法によって脱脂肪処理した白米のα-アミラーゼ吸着能が変化しないことも認めた．

これらの結果から，白米中の脂肪はα-アミラーゼの吸着には関与しないが，金属は液中のイオン強度を高めて，白米のα-アミラーゼ吸着に阻害的に働くものといえる．

2. デンプンのα-アミラーゼ吸着能[18] 白米の主成分であるデンプンのα-アミラーゼ吸着能をしらべた．その結果，α-アミラーゼは米デンプンのほか小麦，トウモロコシ，ジャガイモ，サツマイモなど，いずれのデンプンにも吸着されないことを認めた．この結果はTonomuraら，[19] Sandstedtら[20]が黄麹菌のα-アミラーゼはデンプンに吸着されないと認めた報告と一致した．

3. 酸性プロテアーゼ処理した蒸米のα-アミラーゼ吸着能[21] 岩野ら[12]は，純粋酵素を用いて蒸米の溶解試験を行ったところ，α-アミラーゼのほかに酸性プロテアーゼを溶解系に添加すれば，α-アミラーゼが液中に遊離するのに反し，無添加では液中にα-アミラーゼを認めないことを明らかにしている．

α-アミラーゼが米デンプンに吸着せず，酸性プロテアーゼを添加した蒸米溶解系の液中に，α-アミラーゼが遊離していることから，蒸米のα-アミラーゼ吸着は米タンパク質が関与していると考えられる．

そこで，酸性プロテアーゼを蒸米に作用させ，生じた粒子のα-アミラーゼ吸着能をしらべた．すなわち，蒸米を40°Cで酸性プロテアーゼ処理したあと，30メッシュのふるいで篩別し，30メッシュのふるいを通過するものを微細粒子，通過しないものを粗大粒子とし，この微細粒子の生成率を経時的にしらべたのがFig. 2である．

Fig. 2から明らかなように，微細粒子の生成量は経時的に増加し，反応液中に溶出する総窒素量も微細粒子の増加に伴って増加した．このことは，米粒中のデンプン粒子を結合しているタンパク質が，酸性プロテアーゼによって分解され，微細粒子を生ずるとともに，分解されたタンパク質は液中に溶出したものと考えられる．宮部ら[11]は，蒸米に酸性プロテアーゼを作用させると，蒸米から単位デンプン粒または切片が遊離し，α-アミラーゼの溶解作用が受けやすくなることを明らかにしている．

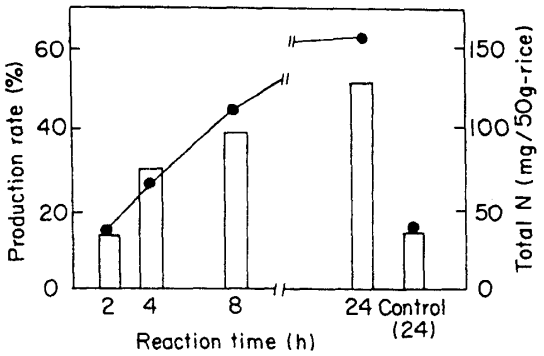

Fig. 2. Production of fine particles from steamed rice by acid protease action. To 50 g steamed rice, 200 ml of 50 mM lactate buffer (pH 3.0) containing 500 units acid protease/ml was added and reacted at 40°C for a fixed time. The reaction mixture was centrifuged and total N in the supernatant was measured. The precipitate was suspended in 500 ml of water and sieved through a 30 mesh sieve. The coarse particles that remained on the sieve were again suspended in 500 ml of water and sieved. The coarse particles finally remaining on the sieve were dehydrated 3 times with 200 ml of 95% alcohol and dried at 65°C for 15–20 h. The suspension that passed through the sieve was centrifuged and the fine particles precipitated were dehydrated with 95% alcohol and dried at 65°C for 15–20 h. As a control, the steamed rice was treated with the 50 mM lactate buffer without acid protease for 24 h at 40°C. Symbols: ▭, production rate of fine particles; ●, total nitrogen in the supernatant.

Table 2に示すように，微細粒子のα-アミラーゼ吸着は，酸性プロテアーゼの反応時間が長くなるに従って減少した．これに反して，粗大粒子の場合，反応が8時間までは吸着率の低下は少なかった．しかしながら，24時間の反応で得られた粗大粒子は粗タンパク質含量が5.7％と多いにもかかわらず，α-アミラーゼ吸着率は28％まで減少した．また，トリプシンで53°C，45時間処理して生じた微細粒子のα-アミラーゼ吸着率をしらべたところ，酸性プロテアーゼと異なって，吸着率の減少は見られなかった．さらに，トリプシン

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 2. Crude protein content of particles obtained by acid protease action and adsorption of α-amylase on the particles.

Acid protease reaction (h)	Crude protein content in (%)		Adsorption rate of α-amylase onto (%)	
	fine particles	coarse particles	fine particles	coarse particles
2	1.8	5.9	32	100
4	1.4	5.8	27	96
8	1.4	5.9	7	86
24	1.1	5.7	6	28
Control	1.9	5.9	95	100

To 1 g of the treated particles, 4 ml of 20 mM lactate buffer (pH 4.0) containing 100 units α-amylase/ml was added, and the suspension was mixed thoroughly and left to stand at 15°C for 4 h. α-Amylase activities in the supernatants were measured. As a control, the steamed rice was treated with the 50 mM lactate buffer without acid protease for 24 h at 40°C. Crude protein content is shown based on dry matter.

処理で得られた粒子に酸性プロテアーゼを作用させたところ，α-アミラーゼ吸着率が減少することを認めた．これらの結果から，蒸米のα-アミラーゼ吸着サイトは，米タンパク質であり，しかも吸着には特定のアミノ酸残基の関与が示唆された．

4. オリゼニンのα-アミラーゼ吸着能 段階的に脱タンパク質を行った白米粉末を調製して，タンパク質とα-アミラーゼ吸着能の関係をしらべた．すなわち，白米粉末（30～60メッシュ）を脱脂肪処理したあと，Maesの抽出法[22]に準じて脱タンパク質した白米粉末をカラムに詰め，結晶α-アミラーゼ(TAA)と米麹の粗酵素α-アミラーゼ*の吸着能をしらべた．その結果，アルブミン，グロブリンおよびプロラミンを除いただけの白米粉末カラムでは，α-アミラーゼを吸着するが，オリゼニンまで除いたカラムでは吸着しないことを認めた．[18]

Table 3に示すように，白米からグロブリン，プロラミンおよびオリゼニンの各タンパク質を分画し，各画分のα-アミラーゼ吸着能をしらべると，プロラミン画分にはほとんど吸着しないが，グロブリン画分とオリゼニン画分は吸着することがわかった．[23] しかもオリゼニン画分は米タンパク質の大部分を占めることから，α-アミラーゼは主として，オリゼニン画分に吸着されると考えられる．

Table 3. Adsorption of α-amylase onto rice proteins.

Proteins	Adsorption rate (%)
Prolamin	5
Globulin	78
Oryzenin	100

To 20 mg of each proteins, 5 mg of 25 mM lactate buffer (pH 4.5) containing 324 units of α-amylase was added, and the each suspension was mixed thoroughly and allowed to stand overnight at 5°C. α-Amylase activity in the supernatant measured.

* 市販の種麹菌 (*A. oryzae*) で造った米麹のα-アミラーゼ (KAA).

オリゼニンのα-アミラーゼ吸着特性

オリゼニン画分のα-アミラーゼ吸着量と吸着に及ぼす諸要因を蒸米の場合と同じように検討した．

1. オリゼニン画分のα-アミラーゼ吸着量 Fig. 3に示すように，オリゼニン画分がα-アミラーゼを吸着する最大量は，オリゼニン画分1 mgあたり800～1,000 unitsであった．[23] この値は，白米粉末1 g

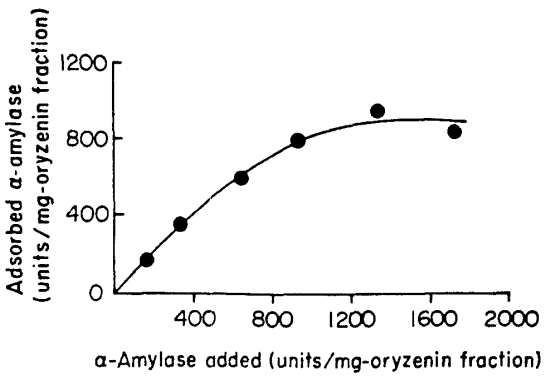

Fig. 3. Adsorption profile of α-amylase onto oryzenin. To 5 mg of oryzenin fraction, 1 ml of 25 mM lactate buffer (pH 4.5) containing various amounts of α-amylase was added, and each suspension was mixed thoroughly and allowed to stand overnight at 5°C. The suspension was centrifuged (3,000 rpm, 15 min)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

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

あたりに換算すると，4万～5万 units となり，白米粉末の最大吸着量[14]にほぼ一致する．

2. オリゼニン画分の α-アミラーゼ吸着に及ぼす諸要因[23]

(1) pH の影響　Fig. 4 に示すように，オリゼニン画分は pH 4 の乳酸緩衝液中で，α-アミラーゼをもっともよく吸着し，pH 3 または pH 6 では吸着量が減少した．この結果は蒸米の場合とほぼ一致した．

(2) 酸の種類の影響　pH 4.5, 25 mM の各種有機酸緩衝液を調整して，α-アミラーゼ吸着に及ぼす影響をしらべたところ，吸着率は乳酸と酢酸が100%，マレイン酸が40%，酒石酸が20%，クエン酸が11%であった．この結果が，蒸米の場合と同じ傾向を示したので，α-アミラーゼをよく吸着する乳酸と吸着しないクエン酸の緩衝液 (pH 4) を用いて酸濃度の影響をしらべた．その結果，乳酸の場合は 50 mM 以下でほぼ100%吸着し，100 mM 以上の高濃度で吸着率の低下が認められた．一方，クエン酸では 10 mM の低濃度でもほとんど吸着しなかった．

(3) 塩濃度の影響　オリゼニン画分 5 mg を種々の濃度の食塩を含んだ酢酸緩衝液 (pH 4.5, 25 mM) に加えて，α-アミラーゼの吸着に及ぼす影響をしらべた．食塩濃度 20 mM の吸着量は 111 units（吸着率 11%）に減少し，100 mM 以上ではほとんど吸着しなかった．この結果も蒸米の場合とほぼ一致した．

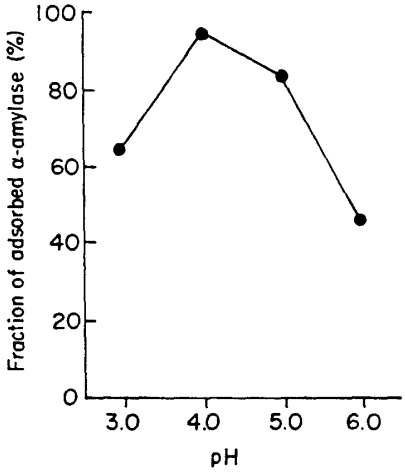

Fig. 4. Effect of pH on α-amylase adsorption. To 5 mg of oryzenin fraction, 1 ml of 10 mM lactate buffer containing 205 units of α-amylase was added, and the suspension was mixed thoroughly and allowed to stand overnight at 5°C. The ionic strength was made up to 0.01 by the addition of NaCl. α-Amylase activity in the supernatant was measured.

(4) 化学的処理したオリゼニン画分の α-アミラーゼ吸着能　DNFB (2,4-Dinitrofluorobenzene) および DNS (Dansylchroride) で処理したオリゼニン画分の α-アミラーゼ吸着能の変化をしらべたところ，いずれも α-アミラーゼ吸着能の低下が認められた．

(5) オリゼニン画分の α-アミラーゼ吸着特性　これまでの結果から，オリゼニン画分の α-アミラーゼ吸着は，蒸米や白米粉末の吸着特性と同じ傾向を示すことが明らかとなり，蒸米の α-アミラーゼ吸着サイトは米のオリゼニン画分に存在すると考えられる．

α-アミラーゼの吸着機作

α-アミラーゼは，白米中のオリゼニン画分によく吸着され，そ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であることが推察される．ここでは，オリゼニン等を用いて，オリゼニンの α-アミラーゼ吸着機作をしらべた．

1. 各種タンパク質による α-アミラーゼの吸着[24]

オリゼニンのほか，プロタミン，ヒストン等の α-アミラーゼ吸着性を pH 4.5 の条件下でしらべ，その結果を Table 4 に示した．

塩基性アミノ酸を多く含むプロタミン，ヒストンおよびオリゼニンは，α-アミラーゼをよく吸着するが，塩基性アミノ酸をほとんど含まないフィブロインは α-アミラーゼを吸着しなかった．

また，α-アミラーゼは塩基性ポリアミノ酸であるポリリジン，ポリヒスチジン，ポリアルギニンには吸

Table 4. Adsorption of α-amylase onto proteins.

Proteins	Amino acid content		Adsorption
Oryzenin	Basic amino acid	ca. 13%	+
Protamine	〃	ca. 67%	+
Histone	〃	ca. 27%	+
Fibroin	〃	ca. 1%	−
Polylysine	Basic amino acid		+
Polyhistidine	〃		+
Polyarginine	〃		+
Polyasparatic acid	Acidic amino acid		−

To column of oryzenin, protamine and poly-amino acids immobilized with Sepharose 6B, 20 mM acetate buffer (pH 4.5) containing TAA was applied. To histone and fibroin, 20 mM lactate buffer (pH 4.5) containing TAA was added. Symbols: +, adsorption; −, non-adsorption.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

着されるが，酸性ポリアミノ酸のポリアスパラギン酸には吸着されなかった．

これらの結果から，α-アミラーゼの吸着にはタンパク質中のリジン，ヒスチジンおよびアルギニンなどの塩基性アミノ酸が関与していることが示唆される．

2. イオン交換樹脂によるα-アミラーゼの吸着[24] 各種イオン交換樹脂を用いて，pH 4.5 における TAA と KAA の吸着性をしらべたところ，両酵素とも陽イオン交換樹脂には吸着されないが，陰イオン交換樹脂には吸着されることを認めた．

3. 疎水性吸着体によるα-アミラーゼの吸着[25] 疎水性吸着体として Octyl Sepharose CL-4B を用いて，4 M 食塩水で平衡化し，α-アミラーゼを吸着させたところ，まったく吸着されず，疎水性相互作用による吸着はないものと考えられた．

4. セルロースパウダーによるα-アミラーゼの吸着[25] 一般にセルロースは，不溶性のポリグルコースであり，多数の水酸基を有している．この水酸基の一部は分子間で水素結合し，残りは水分子と水素結合していると考えられている．カオトロピック効果の低い硫安などが高濃度に存在すると，セルロースから，またタンパク質に水素結合している水分子がタンパク質から除去され，その結果セルロースとタンパク質間に水素結合が形成され，タンパク質はセルロースに吸着されると考えられる．[26]

セルロースパウダーは，pH 4.5 でα-アミラーゼをほとんど吸着しないが，3 M 硫安の存在下では吸着し，濃度が 2 M 以下に低下すると脱着した．このことから，α-アミラーゼは水素結合による吸着も可能と考えられるが，清酒もろみの状態からは，蒸米のα-アミラーゼ吸着が水素結合によるとは考えられない．

また，α-アミラーゼは CM セルロースには吸着されないが，DEAE セルロースにはよく吸着されることを認めた．

5. オリゼニンのα-アミラーゼ吸着機作 *A. oryzae* 起源の TAA と KAA の両酵素とも固定化オリゼニンカラムに吸着され，イオン強度を高めると容易に溶出されることから，両酵素の吸着性は類似していると考えた．しかしながら，*Bacillus subtilis* 起源のα-アミラーゼはほとんど吸着されないことから，[24] タンパク質のα-アミラーゼ吸着現象は酵素の起源によって異なると考えられる．

Tonomura ら[27] は，*A. oryzae* 起源のα-アミラーゼが菌体細胞区分へ結合することを明らかにし，この結合は pH 4～pH 5 付近で最大となり，細胞のアミノ基が結合に関与していると推論した．最近になって，中村ら[28] も *A. kawachii* 起源のα-アミラーゼが pH 4.3 で米粒にもっともよく吸着され，pH 3 または pH 6 ではあまり吸着されないことを報告している．Asano ら[29] は，ビールの起泡現象がビールに含まれている起泡性タンパク質のε-アミノ酸とイソフムロンの水酸基との静電的結合によって生ずることを明らかにしている．

一般に，酵素・基質結合体の形成に働く力は主としてイオン結合，水素結合および疎水結合であると考えられている．[30] オリゼニンとα-アミラーゼのようなタンパク質間にも同様の結合が考えられる．

タンパク質は，その等電点を境として，それより高い pH では陰イオンとして，またそれより低い pH では陽イオンとして挙動する．清酒もろみのような pH 4～pH 4.5 のもとでは，アスパラギン酸，グルタミン酸，リジン，ヒスチジンおよびアルギニン等が解離していると考えられる．

オリゼニンの等電点は pH 6.5 であり，[31] pH 4.5 のもとではリジンのε-アミノ基，アルギニンのグアニジル基およびヒスチジンのイミダゾール基が解離し，正に荷電していると考えられる．TAA と KAA の等電点は pH 3.7 であり，[32] pH 4.5 のもとではアスパラギン酸のβ-カルボキシル基が解離し，負に荷電していると考えられる．

pH 4.5 において，α-アミラーゼがポリアスパラギン酸に吸着されないことは，α-アミラーゼにアスパラギン酸のα-カルボキシル基と結合する正電荷の解離基の少ないことを示している．

これらの結果から，α-アミラーゼのオリゼニンに吸着されるサイトは，α-アミラーゼのカルボキシル基であり，オリゼニンの吸着サイトは塩基性アミノ酸残基であると考えられる．

オリゼニンのα-アミラーゼ吸着能は，pH 4～pH 5 で強く，pH 3 と pH 6 で弱くなることを明らかにしたが，通常の清酒もろみ中では，pH 3 のときはα-アミラーゼの負電荷が弱く，pH 6 ではオリゼニンの正電荷が弱く，いずれも静電的結合が弱くなる．中村ら[28] は，*A. kawachii* 起源のα-アミラーゼが，焼酎もろみ中 (pH 3.6) で蒸米に吸着されにくいのは，この酵素の等電点が pH 4.2[33] であるためと推察している．焼酎もろみでα-アミラーゼ活性が清酒の 1/10 程度であっても，蒸米が溶解するのは，蒸米に吸着されないからと考えられている．[28,35]

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 5. Effect of acid protease on steamed rice digestion by α-amylase.

Enzyme (units/g rice)		Non-adsorbed α-amylase (units/ml)	Digestion rate (%)
AAase	Apase		
200	500	9.6	27.2
200	0	1.3	17.8

To 20 ml of a 20 mM lactate buffer (pH 4.5) containing α-amylase (AAase) and acid protease (APase), 10 g of steamed rice was added and incubated at 15°C for 2 d.

蒸米の溶解に及ぼす酸性プロテアーゼの影響

蒸米の溶解系にα-アミラーゼのほかに，酸性プロテアーゼを添加すれば，Table 5に示すように，岩野ら[12]の結果ほどいちじるしい差は見られなかったが，溶解率は27.2%と無添加の17.8%より高くなった．また，液中のα-アミラーゼも無添加系は1.3 units/mlであったが，添加系では9.6 units/mlと多かった．

α-アミラーゼで蒸米を溶解するとき，液中にα-アミラーゼを検出しなくても蒸米は微量ではあるが溶解することが認められている．[15]三吉ら[34]は，吸着されたα-アミラーゼが蒸米をわずかながら溶解することを認め，溶解速度式を求めている．また，α-アミラーゼを吸着した白米でα米を溶解する場合，α米の粒度を小さく，しかも振とうしてα-アミラーゼと接触する機会を多くすれば，α-アミラーゼが液中に遊離しなくても，わずかではあるが溶解量の増加が認められた．[36]

これらの結果は，α-アミラーゼの吸着部位と活性部位が異なることが推察される．さらに，先にも述べたように，酸性プロテアーゼは蒸米に作用して，蒸米中のタンパク質を減少させ，α-アミラーゼ吸着能を低下させる働きと，蒸米を崩壊させる働きによって，α-アミラーゼの作用を受けやすくして，蒸米の溶解を促進すると考えられる．

おわりに

黄麹菌(*A. oryzae*)で造った米麹のα-アミラーゼは，清酒もろみ中で蒸米によく吸着され，吸着されたα-アミラーゼは活性を十分に発揮できなくなる．また，清酒もろみにおける蒸米の溶解・糖化と発酵に対して，酸性プロテアーゼが大きな役割を果している．これらの知見を基礎に，蒸米のα-アミラーゼ機作の解明と蒸米の溶解に対する酸性プロテアーゼの影響を検討した．

まず，黄麹菌α-アミラーゼが白米にきわめて多く吸着され，主として米タンパク質の主成分であるオリゼニンに吸着されることを明らかにした．さらに，その吸着が酸の種類，酸の濃度，pH等の要因に影響されることを認め，清酒もろみのような環境(pH 4〜pH 4.5)では，オリゼニンは黄麹菌α-アミラーゼを静電的結合によって吸着することを推察した．

次に，蒸米の溶解に対して，酸性プロテアーゼの効果が大きいことを認めた．この効果は，酸性プロテアーゼが蒸米に作用して，蒸米を崩壊することによって，酵素作用を受けやすくすると共に，蒸米中のタンパク質を減少させ，α-アミラーゼ吸着能を弱くするためと考えられる．

終りに，清酒もろみにおける蒸米の溶解を促進する有効な手段として，酸性プロテアーゼや蒸米に吸着されないα-アミラーゼの使用が挙げられる．今後は，これらの酵素の有効利用の研究が進み，清酒もろみの溶解・糖化と発酵の制御が容易になることが期待される．

最後に，本研究に関しご指導とご助言を賜りました布川弥太郎博士（現，大関株式会社）ならびに国税庁醸造試験所の皆さんに深謝いたします．また，本研究に関与された共同研究者の皆さんにお礼申し上げます．

文献

1) 大島幸吉：醸造学，**4**, 193–200 (1926).
2) 徳岡有三：農化，**12**, 1189–1194 (1936).
3) 武藤始太郎，室谷 博：醸協，**38**, 48–45 (1943).
4) 北原覚雄，村田卯一：醗工，**31**, 349–354 (1953).
5) 外池良三，山野 久：醸協，**51**, 555–542 (1956).
6) 三吉和重，照井堯造，加賀谷謙治，小松信弥：醗工，**45**, 962–972 (1967).
7) 正井成之：醗工，**47**, 69–77 (1969).
8) 大津正紀：醸協，**64**, 830–833 (1969).
9) 永谷正治，水谷行夫，難波康之祐：醗工，**51**, 35–40 (1973).
10) 三吉和重，照井堯造：醗工，**45**, 973–983 (1967).
11) 宮部敏則，大林 晃，田辺 脩：アミラーゼシンポジウム，**8**, 93–98 (1973).
12) 岩野君夫，布川弥太郎：醸協，**71**, 943–947 (1977).
13) Nunokawa, Y., Sumiya, S., Iwano, K.: *J. Ferment. Technol.*, **56**, 380–388 (1978).
14) 布川弥太郎，椎木 敏：醗酵工学，**58**, 10–16 (1980).
15) 椎木 敏，岩野君夫，布川弥太郎：醗酵工学，**57**, 214–219 (1979).
16) 椎木 敏，植木俊博，島田豊明：醸協，**81**, 421–422 (1986).

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

17) 曽我 浩，古川雅文，高橋康次郎，吉沢 淑：昭和60年度日本醗酵工学会講演要旨集，p. 57 (1985).
18) 椎木 敏，五味勝也，恩田紀男，細野長悦，布川弥太郎：醗酵工学，**59**, 23-27 (1981).
19) Tonomura, K., Iwama, K., Futai, F., Tanabe, O.: *Agric. Biol. Chem.*, **27**, 128-132 (1963).
20) Sandstedt, R.M., Ueda, S.: *J. Jap. Soc. Starch Sci.*, **17**, 215-228 (1969).
21) 椎木 敏，布川弥太郎：醗酵工学，**58**, 355-366 (1980).
22) Maes, E.: *Nature*, **193**, 880 (1962).
23) 椎木 敏，立松悦典，布川弥太郎：醗酵工学，**60**, 145-149 (1982).
24) 椎木 敏，土橋潤二，島田豊明，布川弥太郎：農化，**58**, 261-266 (1984).
25) 椎木 敏，五味勝也，細野長悦，島田豊明，布川弥太郎：醸協，**78**, 566-568 (1983).
26) 堀尾武一，山下仁平：蛋白質・酵素の基礎実験法，p. 125-126 (1981).
27) Tonomura, K., Futai, F., Tanabe, O.: *Biochem. Biophys. Acta.*, **78**, 802-805 (1976).
28) 中村明弘，飯盛直樹，須藤茂俊，三上重明，伊藤清，石川雄章：醸協，**85**, 114-119 (1990).
29) Asano, K., Hashimoto, N.: *Rept. Res. Lab. Kirin Brewery Co.*, Ltd., No. 19, 9-16 (1976).
30) 堀尾武一，山下仁平：蛋白質・酵素の基礎実験法，p. 89 (1981).
31) 竹内五男，島田 清，中村清二：農化，**42**, 294-299 (1968).
32) Akabori, S., Ikenaka, T., Hagihara, B.: *J. Biochem.*, **41**, 577-582 (1954).
33) Mikami, S., Iwano, K., Shiinoki, S., Shimada, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2495-2501 (1987).
34) 三吉和重，照井堯造：醗工，**51**, 305-314 (1973).
35) 岩野君夫，三上重明，福田清治，椎木 敏，島田豊明：醸協，**81**, 554-557 (1985).
36) 椎木 敏，土橋潤二，水野鉄治，島田豊明：醸協，**78**, 558-561 (1978).

NII-Electronic Library Service