

## 包装食品の微生物変敗防止に関する研究(20)

誌名	愛知県食品工業試験所年報
ISSN	03887758
著者	内藤, 茂三
巻/号	28号
掲載ページ	p. 60-65
発行年月	1988年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 包装食品の微生物変敗防止に関する研究 (第20報)

### 変敗五平餅から分離した細菌の $\alpha$ -アミラーゼの性質

内藤茂三

既報<sup>1)</sup>において包装五平餅の液化品より4種の *Bacillus* を分離・同定し、液化原因はこれらの *Bacillus* が分泌するアミラーゼであることを報告した。でん粉を水解して単一のオリゴ糖を蓄積するアミラーゼはすでに多く報告されている。グルコアミラーゼ<sup>2)</sup>、 $\beta$ -アミラーゼ<sup>3)</sup>、*Streptomyces griseus* のマルトトリオース生成アミラーゼ<sup>4)</sup>、*Pseudomonas stutzeri* のマルトテトラオース生成アミラーゼ<sup>5)</sup>、および *Aerobacter aerogenes* のマルトヘキサオース生成アミラーゼ<sup>6)</sup>等がその代表的なアミラーゼであるが、*Bacillus* でマルトトリオース、マルトペンタオース等を生成するアミラーゼは比較的少ない。

こうした点から包装五平餅の液化品にはマルトトリオース、マルトペンタオースが多いのに興味をもち、これらの分離 *Bacillus* のでん粉分解様式を検討した。

### 実 験 方 法

1. 供試菌株 包装五平餅の液化品より分離した *Bacillus* 4 菌株 (No. 1 : *B. megaterium*, No. 2 : *B. polymyxa*, No. 3 : *B. circulans*, No. 4 : *B. mycoides*, 無加熱包装五平餅より分離した *Bacillus* 4 菌株 (No. 5 : *B. mesentericus*, No. 6 : *B. polymyxa*, No. 7 : *B. cereus*, No. 8 : *B. macerans*), 加熱包装五平餅より分離した *Bacillus* 1 菌株 (No. 9 : 未同定) を用いた。

2. 培養方法及び酵素液の調製 基本培地 (2%ポリペプトン, 0.5%可溶性でん粉, 0.3%  $K_2HPO_4$ , 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , pH 7.0) 50ml を 300ml 容三角フラスコに入れロータリシェイカー (30℃, 150r.p.m.) を用いて1~7日間培養を行った。培養液を冷凍遠心分離器 (0℃, 10,000r.p.m., 10分) にかけて、その上澄液を粗酵素液として用いた。

3. アミラーゼ活性の測定 液化力の測定は既報<sup>1)</sup>と同じ。糖化力の測定は2%可溶性でん粉 2ml (アミラーゼ定量用, M/20酢酸緩衝液 pH 6.0に溶解) に0.1M酢酸緩衝液 (pH 6.0) 1ml, 粗酵素液 1ml (活性度により適当に希釈) を加え、40℃で30分間反応させ生成する還元糖をフェーリングレーマンシュール法で測定した。上記条件で30分間に可溶性でん粉から1mgのグルコース換算還元物質を生ずる酵素量を1糖化力単位とした。

プルランを基質としたときは1mgのマルトトリオース (G3) を生ずる酵素量を1糖化力単位とした。

4. 可溶性でん粉及びプルランの酵素加水分解物の分析 糖の分離は東洋ろ紙No.50を用い、ピリジン：n-ブタノール：水 (4：6：3) の溶媒で一次元展開法で行い、発色は硝酸銀法で行った。なお高速液体クロマトグラフ (日本分光機製, Trirotar-Ⅲ) での糖の分析は Fine Pak NH<sub>3</sub> のカラムを用いて行った。

## 実 験 結 果

1. 分離菌によるでん粉の分解 分離菌9株について基本培地で48時間培養し、そのろ液を酵素液として2.0%可溶性でん粉に作用させた。反応開始後、経時的にヨード呈色度を測定し、ヨード呈色度消失時における還元力を測定した。併せて40℃、24時間反応後の分解率も測定した。また細菌液化型アミラーゼは EDTA 等の Ca<sup>++</sup> 除去剤で失活するのに対し、糖化型アミラーゼは失活しないことが知られている<sup>7)</sup>ので、同時にM/20 EDTA 共存下での分解率を測定し、これらの結果を第1表に示した。でん粉分解作用はヨード反応消失点における還元糖生成率がNo.2 (*B. polymyxa*), No.6 (*B. polymyxa*), No.9 (*Bacillus sp.*) でそれぞれ15.6%, 13.9%, 13.7%であった。また、これらの菌株でのでん粉の24時間後の加水分解率は約25~30%を示した。

第1表 分離菌のアミラーゼ生産

菌株No.	培養液の 液化力 (u/ml)	加 水 分 解 率 (%)		
		ヨウ素反応 消 失 点 (ヨウ素反応 消 失 時 間 (分))	24時間 反 応 後	24時間反応後 (1/20M EDTA添加)
1	207.1	2.6 (210.0)	3.2	2.6
2	1828.6	15.6 ( 5.0)	30.8	29.2
3	357.1	3.2 (220.0)	3.5	3.2
4	434.3	1.9 ( 21.0)	2.2	2.2
5	611.4	2.9 (120.0)	14.8	14.4
6	1020.0	13.9 ( 5.0)	29.8	27.9
7	—	— ( — )	0.9	1.9
8	—	— ( — )	0.9	1.6
9	834.3	13.7 ( 5.0)	25.2	21.6

30℃、48時間ロータリシェイカー(150r.p.m)で培養(300ml容三角フラスコに基本培地50ml使用)分解率の測定：40℃で2%可溶性でん粉2ml、粗酵素液1ml、酢酸緩衝液(pH6.0)1mlの反応条件で測定

さらにいずれの菌株の生産するアミラーゼもM/20 EDTA 共存下での失活は認められなかった。

分離菌9株のうち強い液化力と糖化力を示したNo.2 (*B. polymyxa*), No.5 (*B. mesentericus*) およびNo.6 (*B. polymyxa*), 弱い液化力と糖化力を示したNo.7 (*B. cereus*) を一例として、でん粉の加水分解物の生成割合を調べ、その結果を第2表に示した。No.2はG-2, G-3, G-5, No.5とNo.7はG-

3, G-4, G-5, G-6, No.6はG-3, G-6が多く生産された。

第2表 分離菌によるでん粉分解生成物の比較

菌株No.	同定名	でん粉分解生成物 (%)						
		G-1	G-2	G-3	G-4	G-5	G-6	G-7
2	<i>B. polymyxa</i>	5.9	22.1	16.4	6.2	35.5	13.9	—
5	<i>B. mesentericus</i>	0.2	8.5	23.4	26.6	13.3	18.7	9.3
6	<i>B. polymyxa</i>	4.8	14.6	28.7	9.3	4.9	29.7	8.0
7	<i>B. cereus</i>	0.5	8.0	18.9	24.0	17.1	21.5	10.0

G-1: グルコース, G-2: マルトース, G-3: マルトトリオース, G-4: マルトテトラオース, G-5: マルトペンタオース, G-6: マルトヘキサオース, G-7: マルトヘプタオース  
—: 検出せず

でん粉分解条件: 40°C, 30分 2% 可溶性でん粉 2ml, 粗酵素液 1ml, 酢酸緩衝液(pH6.0) 1ml。

2. 分離菌によるプルランの分解 プルランを基質として糖化力を測定した結果, No.3~9の菌株の培養液に糖化力が認められた。分解物の還元力は, 可溶性でん粉を基質とした場合に比較して弱かった。これらの菌株の生成する還元糖は80~90%がG-3 (マルトトリオース) であり残りがG-6 (マルトヘキサオース) であった (第3表)。

第3表 分離菌によるプルラン分解生成物の比較

菌株No.	同定名	プルラン分解生成物 (%)		
		G-3	G-6	G-9
3	<i>B. circulans</i>	87	13	0
4	<i>B. mycoides</i>	85	15	0
5	<i>B. mesentericus</i>	90	10	0
6	<i>B. polymyxa</i>	95	5	0
7	<i>B. cereus</i>	85	15	0
8	<i>B. macerans</i>	90	10	5
9	<i>Bacillus sp.</i>	95	5	0

G-3: マルトトリオース, G-6: マルトヘキサオース

G-9: マルトナノオース

プルランを分解する代表的な微生物として *Aerobacter aerogenes* があり, その生産する酵素をプルランに作用させると  $\alpha-1, 4$  グリコシド結合のみからなるG-3だけが生成されることが明らかにされている<sup>8)</sup>。

一般に今回, 分離した菌はプルランを炭素源として培養を行うと増殖度は非常に良好であるが, でん粉の液化力, 糖化力とも比較的弱い。しかし, No.7 (*B. cereus*), No.8 (*B. macerans*) は炭素源をでん粉とした場合よりもプルランを用いた方が, でん粉の液化力, 糖化力が強いことを認めた。

ペーパークロマトグラフィーにおいてもプルラン分解産物であるG-3, G-6の確認を行うことができた。

## 考 察

*Bacillus* が増殖中に多量のアミラーゼを生産することが広く知られている。中島<sup>9)</sup>は食品中に見られるでん粉分解菌について研究し、*B. subtilis*-*mesentericus* に属する細菌が最もでん粉分解能が大であることを報告し、Schardinger<sup>10)</sup>は *B. macerans* の菌体をでん粉に作用させると25%の収量で還元性を全く有しない2種のデキストリンの結晶が得られることを示した。Tildren<sup>11)</sup>, Kneen<sup>12)</sup>, Rose<sup>13)</sup>は *B. polymyxa* について強力なアミラーゼ生産がみられることを報告し、Higashihara<sup>14)</sup>は *B. megaterium* にアミラーゼ生産能が認められることを報告している。今回、分離した *Bacillus* 9菌株はいずれもでん粉分解力を有し、液化五平餅より分離したNo.2 (*B. polymyxa*), 無加熱五平餅より分離したNo.6 (*B. polymyxa*), 加熱五平餅より分離したNo.9 (*Bacillus* sp.) に強力なアミラーゼ生産が認められた。

これらの菌株の類似菌は精白米には存在せず、冷却等の製造工程中に外部から汚染された可能性が強い。顕著なでん粉分解力をもつ細菌液化型 $\alpha$ -アミラーゼは Beckord<sup>15),16)</sup>により次の4種に分類されている。

① *B. subtilis* 糖化型：でん粉分解の際、液化作用が先行し、この間は醗酵性糖の生成が少なくこれが終ってから醗酵性糖が著しく増加する。

② *B. subtilis* 非糖化型（液化型）：主として液化を行うものででん粉よりの醗酵性糖の生成量が分解の初期においても終りにおいても少ない。

③ *B. polymyxa* 型：でん粉の初期の分解の過程からすでに多量の醗酵性糖を生成する。

④ *B. macerans* 型：6または7個のグルコース残基よりなる非還元性の環状デキストリンを生成し、その後に糖の生成を行うもので終りには糖化がかなり高度にすすむ。この分類にしたがって分離菌9株を第4表のように区別した。

No.1 (*B. megaterium*), No.3 (*B. circulans*), No.4 (*B. mycooides*) はでん粉よりの醗酵性糖の生成量が分解の初期においても終りにおいても少なく、主として液化を行うものであるところから *B. subtilis* 非糖化型（液化型）に属する。

No.2 (*B. polymyxa*), No.6 (*B. polymyxa*), No.9 (*Bacillus* sp.) は初期の液化の過程からすでに多量の醗酵性糖が生成されるところから *B. polymyxa* 型に属する。

No.5 (*B. mesentericus*) は液化作用が先行し、この間は醗酵性糖の生成が少なく、その後醗酵性糖が増加するところから *B. subtilis* 糖化型に属する。

No.7 (*B. cereus*), No.8 (*B. macerans*) は還元糖の生成が初期には認められず、終りに若干の還元

第4表 分離菌の $\alpha$ -アミラーゼの分類

菌株No.	分離源	同定名	Beckordらの分類 (細菌液化型 $\alpha$ -アミラーゼ)	プルラン分解
1	液化品	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i> 非糖化型(液化型)	—
2	"	<i>B. polymyxa</i>	<i>B. polymyxa</i> 型	—
3	"	<i>B. circulans</i>	<i>B. subtilis</i> 非糖化型(液化型)	+
4	"	<i>B. mycooides</i>	<i>B. subtilis</i> 非糖化型(液化型)	+
5	無加熱品	<i>B. mesentericus</i>	<i>B. subtilis</i> 糖化型	+
6	"	<i>B. polymyxa</i>	<i>B. polymyxa</i> 型	+
7	"	<i>B. cereus</i>	<i>B. macerans</i> 型	+
8	"	<i>B. macerans</i>	<i>B. macerans</i> 型	+
9	加熱品	<i>Bacillus sp.</i>	<i>B. polymyxa</i> 型	+

+ : 分解, — : 非分解

糖の生成が認められるところから *B. macerans* 型に属すると推定される。

糸状菌の $\alpha$ -アミラーゼはいずれもG-4, G-5, G-6のオリゴ糖に対して全く同様に作用し、しかもどの糖からもG-1を生じない。しかし、細菌糖化型アミラーゼは反応の初期からG-1を生じることが、これはG-4がG-2のほかG-1とG-3に分解されるためで、一般的にいて $\alpha$ -アミラーゼの起源によりG-4の切れ方が異りG-1生成速度に大きな影響を与えると報告されている<sup>6)</sup>。

No.2 (*B. polymyxa*) とNo.6 (*B. polymyxa*) はG-4が比較的少ないがその分だけG-1とG-3が増加しているところからG-4が分解されていることが推察される。それに比較してNo.5 (*B. mesentericus*) とNo.7 (*B. cereus*) はG-4が多く、G-1が少ないところからG-4の分解速度がおそいと考えられる。

No.6 (*B. polymyxa*) はG-5が少ないがG-6, G-3, G-2が多いのが特徴である。

## 要 約

五平餅より分離した *Bacillus* 9菌株のでん粉分解様式を検討し、次の結果を得た。

No.1 (*B. megaterium*), No.3 (*B. circulans*), No.4 (*B. mycooides*) はでん粉よりの醗酵性糖の生成量が分解の初期においても終期においても少なく、液化作用が主たるものであることから、*B. subtilis* 非糖化型(液化型)に属する。No.2 (*B. polymyxa*), No.6 (*B. polymyxa*), No.9 (*Bacillus sp.*) は初期の液化の過程から多量の醗酵性糖が生成されるところから *B. polymyxa* 型に属する。

No.5 (*B. mesentericus*) は液化作用が先行し、この間は醗酵性糖の生成が少なく、これが終わってから醗酵性糖が増加するところから *B. subtilis* 糖化型に属する。No.7 (*B. cereus*), No.8 (*B. macerans*) は還元糖の生成が初期には認められず、終期に若干の還元糖の生成が認められるところから *B.*

*macerans* 型に属すると推定される。

文 献

- 1) 内藤：愛知食品工試年報，23，27 (1982)
- 2) H. Okazaki : Proc. Int. Symp. Enzyme Chem., Tokyo, Kyoto, 1957, 2, 294 (1958)
- 3) A. K. Balls, R. P. Thompson and M. K. Walden : J. Biol. Chem., 136, 571 (1946)
- 4) 若生ら：澱粉科学，26，175 (1979)
- 5) J. F. Robyt and R. H. Ackerman : Arch. Biochem. Biophys., 145, 17 (1971)
- 6) K. Kainuma, K. Wako, S. Kobayashi, A. Nogami and T. Suzuki : Biochem. Biophys. Acta, 410, 333 (1975)
- 7) 福本ら：科学と工業，33，170 (1959)
- 8) 上田：科学と生物，7，658 (1969)
- 9) 中島：日本微生物誌，18，1089 (1924)
- 10) F. Schardinger : Zentr. Bakt, II, 14, 772 (1905)
- 11) E. B. Tildren : J. Bact., 43, 527 (1947)
- 12) E. Kneen : Arch. Biochem., 10, 41 (1946)
- 13) D. Rose : Arch. Biochem., 16, 349 (1948)
- 14) M. Higashihara : Agri. Biol. Chem., 38, 1023 (1973)
- 15) L. D. Beckord : J. Bact, 50, 711 (1945)
- 16) L. D. Beckord : Arch. Biochem., 10, 41 (1941)