

玄米の貯蔵中における酵素活性の変化

谷 由美子

The Change of Enzyme Activity in the Preserved Period of the Unhulled Rice

By

Yumiko TANI

緒 言

米の過剰生産によって余剰米の対策が問題視されているが、新米と古米の鑑別も食品学上重要な課題である。著者は玄米に含有される各種の酵素活性が貯蔵中にどのように変化するかをしらべるとともに、その消長が米の鮮度に最も顕著に影響する酵素を検出し、適当な測定法を検討した。又この測定法によって一般の市販精白米の鮮度を鑑定した。

実 験 方 法

1. 貯蔵玄米の諸酵素の活性測定

1967, 1968, 1969, 1970年産の玄米を試薬瓶に入れ、室温および30℃の恒温器に保存し1ヶ月毎に Catalase, Peroxidase, Transaminase, Amylase, Lipase. の活性を測定した。供試料の種類、酵素調整法、酵素活性の測定法は下記のとおりである。

1) 供試料

試料は表1に示すとおりである。

2) 酵素液の調製

玄米5gを秤量し、水洗後水20mlを加えて60分放置する。その後海砂1gを加えて乳鉢で10分間磨砕し、水を加えて50mlとする。これを1000 r.p. m.5分間遠沈しその上澄液を酵素液とした。

3) 酵素活性の測定法

a) Catalase

100ml容三角フラスコに $\frac{M}{15}$ 磷酸緩衝液

$\frac{M}{15}$ -KH₂PO₄ と $\frac{M}{15}$ -Na₂HPO₄ を 5.1 対 4.9 の割合に混合, pH6.8) 35ml と $\frac{M}{10}$ -H₂O₂ 5ml, 水 9 ml を入れ, 0℃ に冷却して酵素液 2 ml を加える。この時を反応開始時として 3 分, 6 分, 9 分後に反応液 5 ml を 2N-H₂SO₄ 5 ml 中に注入し酵素作用をとめる。これを 0.005 N-KMnO₄ で微紅色になるまで滴定する。同時に酵素液の代りに水を加え同様に空試験を行なう。この結果により次式に基いて反応速度恒数を算出した。

$$K = \frac{2.303}{t} \log \frac{b}{a}$$

K : 反応速度恒数

t : 反応時間 (分)

表1 貯蔵玄米の供試料

品 種	産 地	収穫年度	購入年月
きんませ	愛知県農試場	1967	1969. 7
なぎさ	三重 県	1967	1969. 7
ふじみのり	新潟 県	1968	1969. 9
きんはり	滋 賀 県	1969	1969.10
ほうねんわせ	富 山 県	1970	1970. 9
こしほまれ	新 潟 県	1970	1970. 9

a : t 分後の KMnO_4 の滴定値 (ml)

b : 反応開始時の KMnO_4 の滴定値, 即ち空試験の滴定値 (ml)

b) Peroxidase²⁾

J. L. Vetter の方法に基いて行なったが, 反応が顕著に現われるよう検討した結果, 作用条件を若干修正した. 即ち目盛付試験管に酵素液 $5 ml$, $\frac{M}{15}$ 燐酸緩衝液 (pH6.8) $2 ml$, 0.3% H_2O_2 $1 ml$, 1% O -フェニールジアミン (調製後 2 週間以内に使用, 冷暗所保存, 無色であること) $0.5 ml$ の順に加え, よく攪拌して 25°C で 30 分間反応させる. 飽和 NaHSO_3 $1 ml$ で酵素反応をとめ, 95% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ $5 ml$ を加え, 3000 r.p.m. で 10 分間遠沈して (上澄液が濁っている場合はさらに口過する), その上澄液の波長 $430 m\mu$ における吸光度を比色計により測定する. 酵素の作用時間 0 のものを空試験とし, 本実験より差引いた値を玄米 $1 g$ 当りの吸光度に換算して表わした.

c) Amylase

Willstätter-Schudel 法に準じて下記のとおりに操作し, 生成還元糖の定量は微量定量が可能な Somogyi-Nelson 法⁴⁾を採用した.

糖定量試薬

アルカリ性銅試薬: Na_2HPO_4 $28 g$ と酒石酸カリウムナトリウム $40 g$ を $100 ml$ の水にとかし, これに N-NaOH $100 ml$ を加える. 別に $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ $8 g$ を $80 ml$ の水に溶解しておき, これを先の溶液に攪拌しながら滴下していく. 全部の硫酸銅溶液を加え終わったら $180 g$ の Na_2SO_4 を加え, 全量を 1ℓ にし, 2 日間放置後沈澱をガラスフィルターで口過する. この溶液は半永久的に保存できる. 冬期には Na_2SO_4 が折出するので恒温器中に保存する.

ヒモリブデン酸溶液: $25 g$ の $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ヒモリブデン酸アンモニウム) を $450 ml$ の水にとかし $\text{conc. H}_2\text{SO}_4$ $21 ml$ を加える. これに $3 g$ の $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ヒ酸ナトリウム) を水 $25 ml$ にとかしたものを加え, 着色瓶に入れて 37°C で 1 ~ 2 日間放置する.

測定操作

試験管に 2% デンプン液 $2 ml$, $\frac{M}{15}$ 燐酸緩衝液 (pH6.8) $1 ml$, 酵素液 $2 ml$ を加えて, 37°C にて 2 時間作用させる. 2 N-HCl $0.5 ml$ で反応をとめ水を加えて $10 ml$ とする. これより $1 ml$ を目盛付試験管にとり, アルカリ性銅試薬 $1 ml$ を加え沸騰水中にて 10 分間加熱する. これを急冷し, ヒモリブデン酸溶液 $0.5 ml$ を加え室温に 5 分間放置後水を加えて $10 ml$ とし, 4000 r.p.m. 10 分間 遠沈して上澄液の波長 $530 m\mu$ における吸光度を測定する.

空試験として, 2 N-HCl 添加後酵素液を加え以下同様に操作したものについて吸光度を測定する. その結果本実験との差より検量線から生成マルトース量 (mg) を求め基質 $1 g$ 当りのマルトース生成量 (mg) で表わした.

d) Transaminase (Sigma-Frankel 法)⁵⁾

試薬

$\frac{M}{10}$ 燐酸緩衝液 (pH7.4): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $7.12 g$, KH_2PO_4 $1.36 g$ を水にとかして $500 ml$ とする.

アスパラギン酸 α -ケトグルタル酸溶液 (GOT 基質液): L-アスパラギン酸ナトリウム $3.616 g$, α -ケトグルタル酸ナトリウム $36.25 mg$ をとり $\frac{M}{10}$ 燐酸緩衝液で溶解し, N-NaOH を少しずつ加えて pH 約 7.4 に調整し, $\frac{M}{10}$ 燐酸緩衝液で全量 $100 ml$ とする. 少量のクロロホルムを加え強く振盪し冷暗所に保存する.

アラニン α -ケトグルタル酸溶液 (GPT 基質液) : L-アラニン 1.78 g, α -ケトグルタル酸ナトリウム 36.25 mg をとり, $\frac{M}{10}$ 燐酸緩衝液 15 ml を加えて溶かし, pH 7.4 になるように N-NaOH で調整し, $\frac{M}{10}$ 燐酸緩衝液で全量 100 ml とする. 少量のクロロホルムを添加し冷暗所に保存する.

呈色試薬 2-4-ジニトロフェノールヒドラジン 塩酸溶液 : 2-4-ジニトロフェノールヒドラジン 20 mg を conc. HCl 7 ml にとかし水を加えて全量を 100 ml とする. 塩酸終濃度は 0.84~0.85 N となる.

0.4N-NaOH

標準曲線用 焦性ブドウ酸原液 (20mM) : $\text{CH}_3\text{CO} \cdot \text{COOLi} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (純焦性ブドウ酸リチウム) 224 mg に $\frac{M}{10}$ 燐酸緩衝液を加えて全量を 100 ml とする. クロロホルムを添加し冷暗所に保存する. 用いの際み 10 倍に稀釈し 2mM 液とする.

測定操作

試験管に GOT 基質液 (又は GPT 基質液) 1 ml とり, 37°C で 4~5 分加温し, 酵素液 0.5 ml 添加混和後, 37°C で GOT は 60 分, GPT は 30 分正確に作用させる. 次に発色剤 1 ml を加え混和後室温 (25±5°C) に 20 分放置する. これに 0.4N-NaOH 10 ml を加えよく混和して室温に 30 分放置する (液が濁っている場合は口過する). この 505 m μ における吸光度を測定し, 検量線より生成ピルビン酸 (γ) を求め活性値とした.

e) Lipase

Lipase はアルカリ滴定法によって下記のとおり測定を試みたが, 酵素活性が弱く本法で明確な結果の得られない場合は反応液の pH の変化を測定した. 即ち 100 ml 容三角フラスコに酵素液 10 ml, オリーブ油 2 ml, $\frac{M}{15}$ 燐酸緩衝液 (pH 6.8) 1 ml, 水 1 ml を入れよく混和後栓をして振盪器にかけ 37°C にて 3 時間反応させ, アルコール 30 ml, エーテル 15 ml を添加して酵素作用をとめた後フェノールフタレンを指示薬として $\frac{N}{50}$ -NaOH で滴定する. 同時に空試験を行なう. 即ちアルコール, エーテル, 酵素液, オリーブ油, 燐酸緩衝液, 水の順に加えて同様に滴定する. これより次式によって酵素活性を表わす.

$$(a - b) \times F$$

a : 本実験の滴定に要した $\frac{N}{50}$ -NaOH の ml

b ; 空実験の滴定に要した $\frac{N}{50}$ -NaOH の ml

F : $\frac{N}{50}$ -NaOH の力価

上記のアルカリ滴定法で滴定の終点が明確でない場合は酸生成量を pH メーターで測定した. 即ち上記と同様に反応液を調整してよく混和後, pH メーターで pH を測定し栓をして振盪器にかけ, 37°C にて 3 時間反応させた後再び pH メーターで pH を測定し pH の変化量 Δ pH で活性を表わした.

II 市販精白米の鮮度検定

玄米貯蔵中における諸酵素の消長を測定した上記 I の実験結果, 鮮度に最も高い相関性をもつ Ferroxidase 比色法と, 従来一般に採用されている Ferroxidase による呈色粒の計数法を採用して市販米の鮮度検定を行なった.

1) 供試料

実験に供した試料の種類別供試数は表 2 のとおりである.

2) 測定方法

a) 計数法

形の整った精白米100粒をシャーレにとり1%グアヤコールアルコール液5mlを加え浸透させ、さらに0.3% H_2O_2 1mlを加え3分間放置する。その後試薬を除去し米粒を沓紙に移して米粒の表面についている試薬をとり去る。この結果新しい米は胚芽部が茶色を呈し、古い米は変化がないので、着色米粒を数え100粒中の着色粒数によって米の鮮度測定を目安とする。

表2 鮮度検定用供試数

購入地域 種類	鮮度検定用供試数		合計
	名古屋市内	名古屋市外	
自主流通米	13	8	21
自由米	24	9	33
配給米	14	8	22
徳用上米	4	2	6
徳用米	0	2	2
合計	55	29	84

b) Peroxidase 比色法

方法は上記 I の(3) bに記載したとおりである。

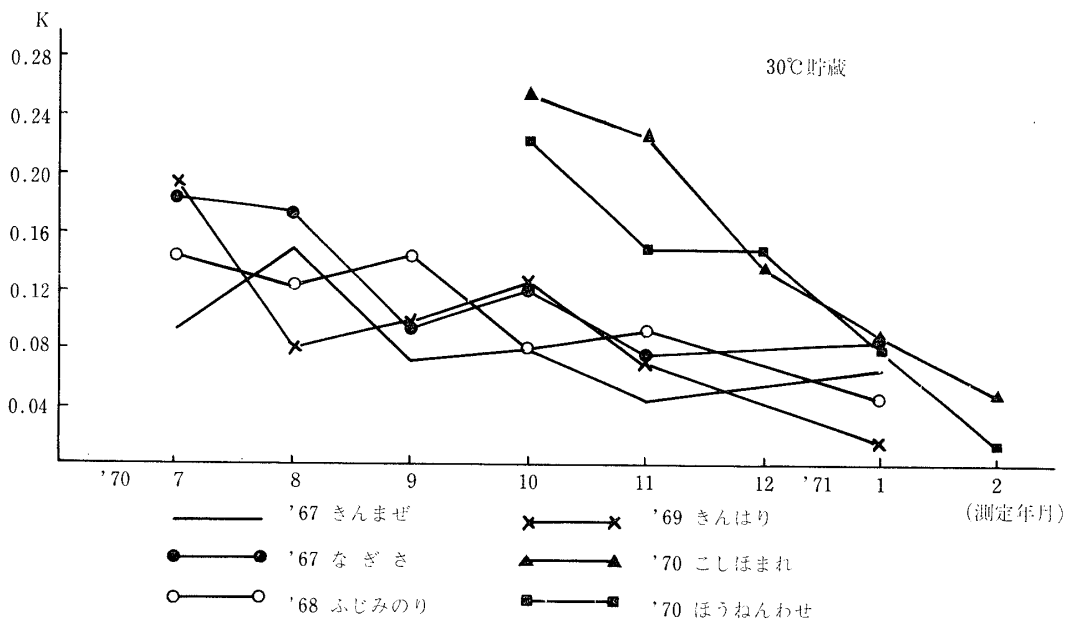
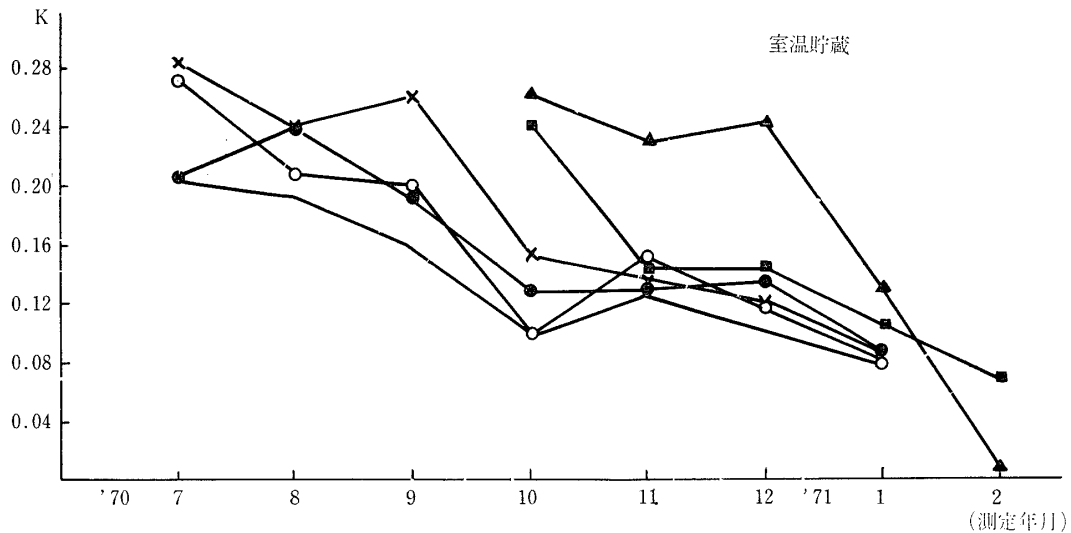


図1

Catalase の消長

結果および考察

I. 玄米貯蔵中における諸酵素の消長

1) Catalase の消長

実験結果を図1に示す。Catalase の活性はいずれも経時的に減少の傾向をしめしている。減少率は新しい玄米において大きい。又室温貯蔵のものより30℃貯蔵の方が全般に酵素活性は低くなっている。

2) Peroxidase の消長

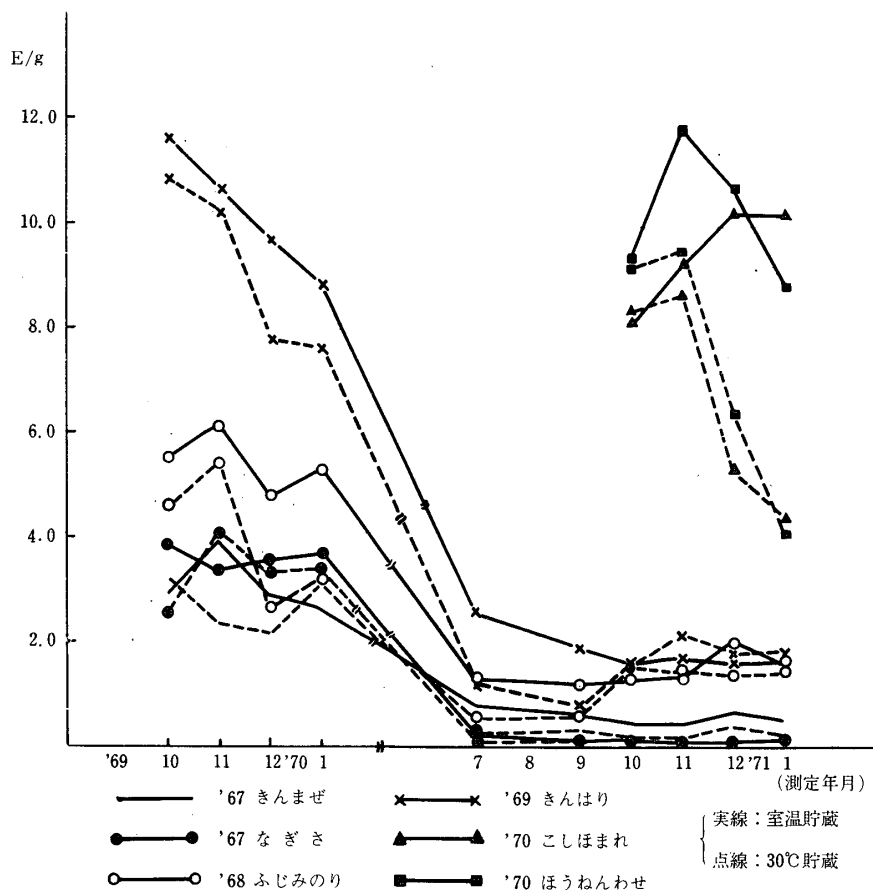


図2 Peroxidase の消長

実験結果を図2に示す。Catalase と同様貯蔵期間が長くなるに従い酵素活性値は低下している。いずれも実験開始後10ヶ月までは酵素活性値は大きく減少するが、その後ゆるやかに減少している。全般に30℃貯蔵の方が室温貯蔵より低い酵素活性値を示している。試料間では1969年産のきんはりが一段と強い Peroxidase 活性をしめしている。1970年産の玄米においては貯蔵1ヶ月位すぎると室温貯蔵と30℃貯蔵に活性値の差があらわれてくる。

3) Amylase の消長

実験結果を表3にしめす。Amylase 活性は貯蔵条件および収穫年度においてほとんど差がみられない。

4) Transaminase の消長

Glutamic acid-Oxaloacetic acid Transaminase の実験結果を図3に示す。酵素活性値は Catalase や Peroxidase のように貯蔵期間との間に顕著な相関性はみられないが、全般にゆ

表3 Amylase の 消 長

(生成 maltose / starch)
mg / g

貯蔵温度	測定年月	1967年産 きんまぜ	1967年産 なぎさ	1968年産 ふじみのり	1969年産 きんはり	1970年産 ほうねんわせ	1970年産 こしほまれ
室 温	1970. 7	0.50	1.50	1.25	0.70	—	—
	8	0	2.00	0.50	0.88	—	—
	9	0	1.87	0	0.38	—	—
	10	0	0.50	2.25	0.75	0.88	1.50
	11	0	0.88	1.37	1.75	1.38	1.38
	12	0	0.25	0.13	0.88	1.50	2.50
	1971. 1	0	1.00	0	1.00	0.07	1.50
30℃	1970. 7	1.18	1.25	1.00	1.13	—	—
	8	1.00	1.50	1.13	1.36	—	—
	9	1.50	1.18	1.00	0.88	—	—
	10	0.38	1.75	1.00	1.63	0.75	2.00
	11	0	1.75	0.88	0	2.00	2.38
	12	—	—	—	—	1.50	1.85
	1971. 1	1.50	1.00	0.63	0.75	0.31	0.69

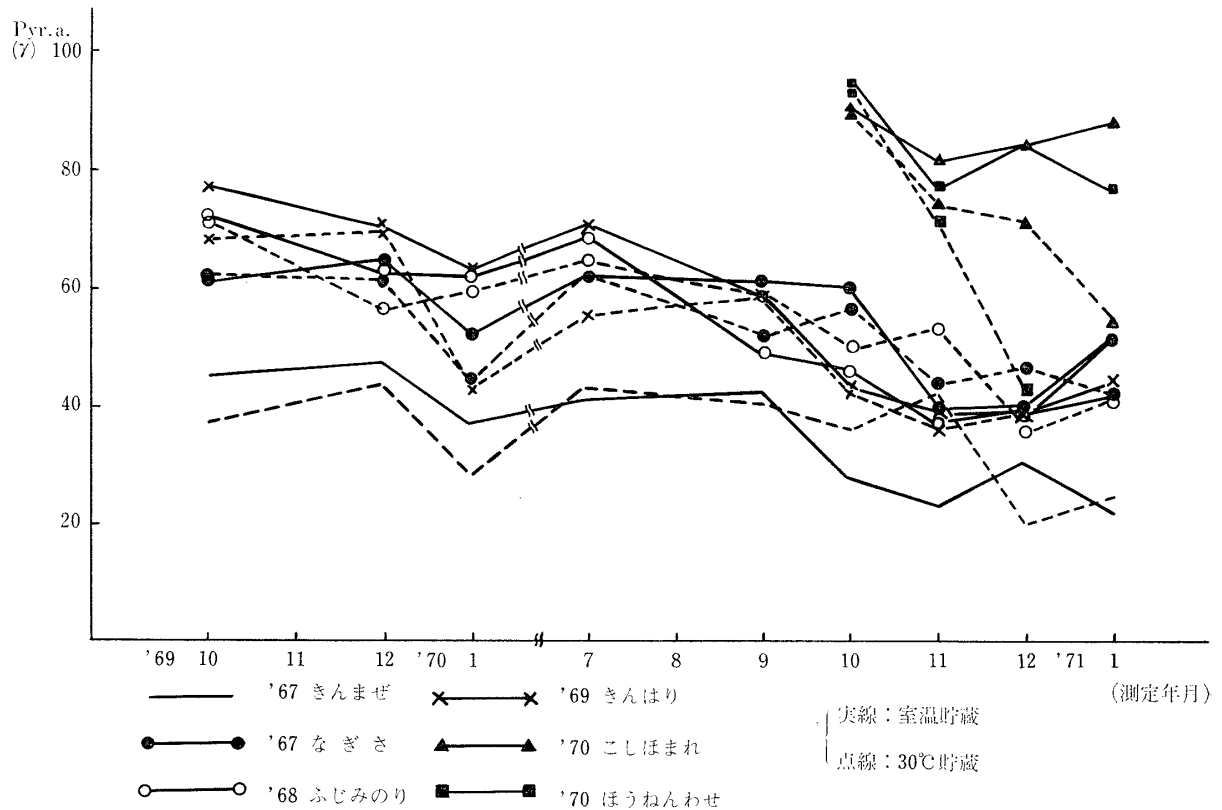


図3 Transaminase (GOT) の消長

るやかに減少の傾向をしめしている。収穫年度別にみても新玄米（1970年産ほうねんわせ）の

酵素活性値が最も高い。各試料とも室温、30℃貯蔵において多少の起伏を示しているが室温貯蔵の方が高い酵素活性値をしめしている。

5) Lipase の消長

表4 Lipase の 消 長 (ΔpH)

測定年月	試料名		1970年産 ほうねんわせ		1970年産 こしほまれ	
	貯蔵温度		30℃	室 温	30℃	室 温
1970.	10.	13	0.60	0.32	0.53	0.44
	10.	24	0.25	0.30	0.28	0.35
	11.	5	0.35	0.25	0.29	0.15
	11.	19	0.28	0.24	0.27	0.26
	12.	3	0.15	0.25	0.11	0.24
1971.	1.	19	0.28	0.13	0.19	0.13
	1.	29	0	0.02	0	0

実験結果を表4にしめす。Amylaseと同様、酵素活性は貯蔵条件および収穫年度においてなとんど差がみられない。

以上の結果より貯蔵期間によって酵素活性が著しく影響をうけるのはCatalaseおよびPeroxidaseであることを認めたが、今回はPeroxidase活性を市販米の鮮度検定指標にすることを試み、以下の実験結果を得た。

II. 市販精白米の鮮度検定

市販されている精白米84種類を用いて鮮度検定を行なった。実験は精米購入後3日以内にするようにした。実験期間は昭和44年9月9日から同年12月8日までで、購入地域は名古屋市、稲沢市、春日井市、多治見市その他である。この結果より鮮度と価格の関係、鮮度と種類の関係、鮮度と購入地域の関係の3つの観点から考察し、さらに米の鮮度検定法として計数法お

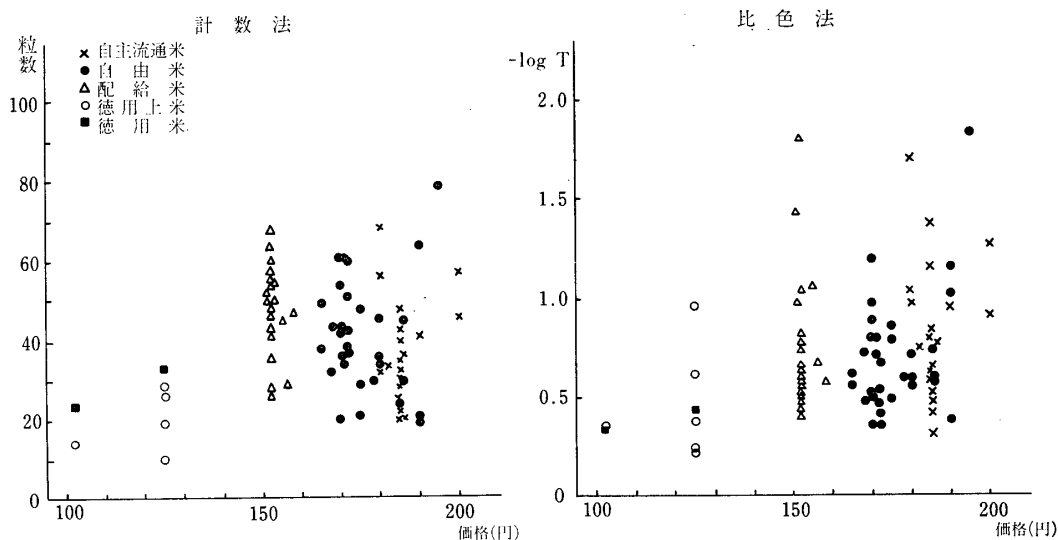


図4 市販米の鮮度と価格の関係

よび Peroxidase 比色法の比較検討を行なった。

1) 鮮度と価格の関係

結果を図4に示す。計数法、比色法いずれも鮮度と価格の間には一定の相関性は認められない。つまり価格が高ければ鮮度も高いとはかぎらない。

表5 市販米の鮮度と価格の関係 (昭和44年9月~12月)

購入米種類	供試料数	購入価格 円/kg	鮮度	
			計数法 粒数/100粒	比色法 -logT
自主流通米	21	185.8 ± 10.0	36.3 ± 24.0	0.796 ± 0.702
自由米	33	177.8 ± 40.0	40.8 ± 29.5	0.707 ± 0.745
配給米	22	153.0 ± 3.5	48.5 ± 20.5	0.742 ± 0.698
徳用上米	6	121.3 ± 11.3	22.3 ± 9.0	0.467 ± 0.359
徳用米	2	113.8 ± 11.3	28.5 ± 4.5	0.401 ± 0.044

2) 鮮度と種類の関係

結果を表5に示す。計数法においては配給米の鮮度が最も高く、ついで自由米、自主流通米、徳用米の順に鮮度が低下する。比色法においては自主流通米が高く、ついで配給米、自由米、徳用米の順である。

3) 鮮度と購入地域の関係

結果を図5に示す。自主流通米、配給米、徳用上米はいずれも市外の販売所で購入した方が鮮度が高い。自由米は市内、市外の差がほとんどないが、わずかに市内の販売所で購入した米の方が鮮度が高い値をしめている。

4) 計数法および比色法の比較

従来米の鮮度検定法としては計数法が採用されていた。しかしこの方法によると米の種類例えば自主流通米と配給米とではあまり大きな差は認められない。これは着色粒は時間とともに変色したり、温度によっても左右され、又着色の程度は最終的には測定者の主観的な判断によるため測定者によって実験値が変動しやすいからで、結局明確な結果が得がたい。特に玄米については胚芽部分の着色が認めにくいいためこの方法は採用できない。

一方比色法は収穫年度、貯蔵期間、貯蔵条件によって顕著な差があらわれやすく、酵素液調整法、測定条件を一定にすれば再現性もよく、鮮度検定法としては計数法よりすぐれている。

ま と め

1) 1967, 1968, 1969, 1970年度玄米6種類を室温および30℃に貯蔵し、1ヶ月毎に各種酵素の消長を測定した結果、Catalase および Peroxidase の活性は経時的に顕著な減少を認めた。Transaminase の活性は測定期間を通じてゆるやかに減少しており、Amylase, Lipase の活性は貯蔵条件、収穫年度による差は現われなかった。

2) J.L. Vetter の Peroxidase 比色法を一部修正して米の鮮度検定に応用し、従来採用されている計数法による鮮度検定法と比較した結果、比色法の方が再現性、安定性、正確さにおいてすぐれていることを認めた。

3) 市販精白米84種の鮮度検定を行なったところ徳用米はおおむね鮮度が低く、自主流通

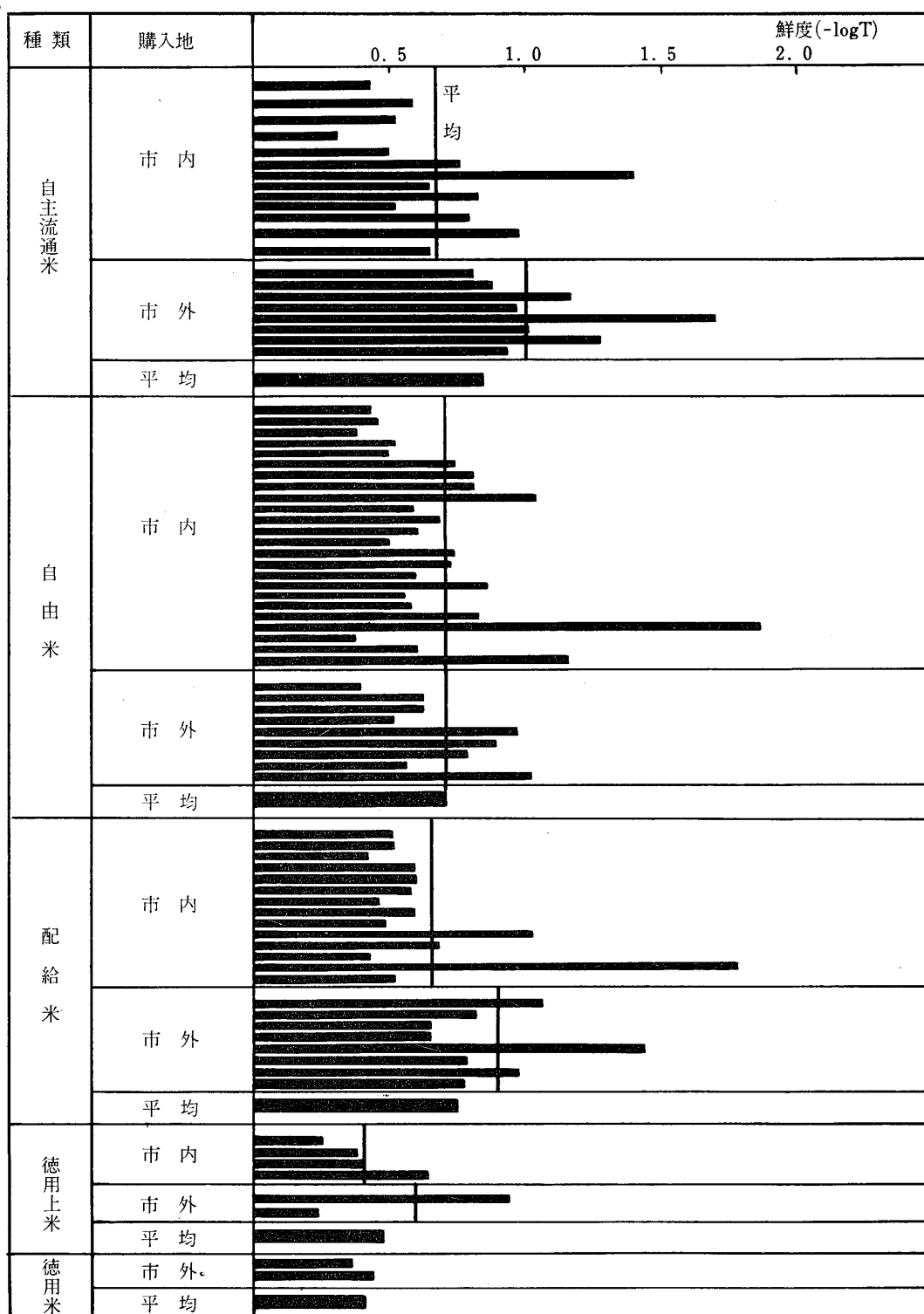


図5 市販米の鮮度と種類の関係（比色法）

米，自由米，配給米の鮮度は一定せず，価格の高い自主流通米が鮮度が高いとはかぎらないことを認めた。又鮮度と購入地域の関係では，一般に市外地の方が市内の販売所で購入した米より鮮度が高いようである。

おわりに本学の青木みか教授の御指導に深謝致します。

文 献

- 1) 京大農学部農芸化学教室；1960, 農芸化学実験書第二卷, P.646. 産業図書.
- 2) J. L. Vetter, M. P. Steinberg and A. I. Nelson ; 1958. J. Agr. Food. Chem. 6. 39.
- 3) 小原哲二郎他；1969, 食品分析ハンドブック P.218, 建帛社.
- 4) 東大理学部生化学教室生化研編；1967, 生物化学実験法, P.133 朝倉書店.
- 5) 亀田治男他；1964, 臨床検査法 P.205 杏林書院.
- 6) 赤堀四郎；1966, 酵素研究法2 P.5 朝倉書店.