



Title	ライムギのアミラーゼについて
Author(s)	伊東, 哲雄; 小幡, 弥太郎
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 4(1), 1-6
Issue Date	1962-07-10
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/11714">http://hdl.handle.net/2115/11714</a>
Type	bulletin (article)
File Information	4(1)_p1-6.pdf



[Instructions for use](#)

# ライムギのアミラーゼについて

伊東 哲雄\*・小幡 弥太郎\*\*

## Studies on Rye-Amylases

By

Tetuo ITO and Yataro OBATA

ライムギは主としてヨーロッパで、パンの原料として用いられているのは周知のことであるが、古くドイツの一地方でアルコール醸酵に先立つ糖化の段階で、ライムギ種子を未発芽のまま使用していたと云うことが知られている<sup>1)</sup>。麦類のアミラーゼに関しては、古くから多くの研究があり、現在結晶化されたものに、オオムギ麦芽から  $\alpha$ -アミラーゼ<sup>2)</sup> 及び  $\beta$ -アミラーゼ<sup>3)</sup>、コムギ種子より  $\beta$ -アミラーゼ<sup>4)</sup> 等がある。

ライムギアミラーゼに関しては、それ自体を扱ったものは非常に少なく、pH 及び温度に対する性質を利用して、 $\alpha$ -アミラーゼと  $\beta$ -アミラーゼを分離すると云う古典的研究を行なった OHLSSON et al. がオオムギ・ライムギ・エンバク等一連の研究の一つとしてライムギの  $\alpha$ -及び  $\beta$ -アミラーゼを分別し、それらの未精製の標品につき、若干の性質を調べている。その後にはさしてまとまった研究はなく、僅かにソ連において主としてパン製造に関連して行なわれている他、S. I. PRONIN et al.<sup>6)</sup> は温度と pH との関係をコムギと共に観察している程度である。

われわれは、ライムギと他の既知の麦類のアミラーゼ間の異同を調べる意味で、ライムギアミラーゼの結晶化を目指し、予備実験として少量の試料を用い、かなりの程度に精製することが出来た。ここに得られた試料につき、若干の性質を調べたので、その結果につき報告する。

### 実験及び結果

#### § 実験材料及び方法

ライムギ(北大農場第2畜産部栽培品種)は、後述の様に種々の発育段階及び発芽段階の種子のアミラーゼ活性を調べ、適当なものを選定した。

#### アミラーゼ活性の測定

$\alpha$ -アミラーゼ: WOHLGEMUTH 改変法<sup>7)</sup>により、緩衝液の pH を 5.0 とし、40° で測定した。

$\beta$ -アミラーゼ: 酵素液 5 ml と、酢酸緩衝液 pH 5.0 を含む 2% 澱粉液 5 ml の混液より 1 ml を採取し、反応(40°, 10分)前後の還元力の差を求める。還元力の測定は SOMOGYI 変法<sup>8)</sup>により、アミラーゼ活性は酵素液 1 ml 当り、又は乾物 1 g 当りの生成マルトース mg で表わした。

### § 実験結果

#### 1. 材料選定条件の決定

アミラーゼの分離に先立って、活性度の強い、しかも不純物の少ない材料を選ぶために、登熟過程及び発芽過程におけるアミラーゼ活性の変化を調べた。

#### a. 登熟過程のアミラーゼ活性の変化

開花後約1週間目より採集を始め、採集の間隔は1週間とした。この間の成熟の度合及び風乾重量の増加は第1表に示す様であった。これら各試料を乳鉢で摩砕し、

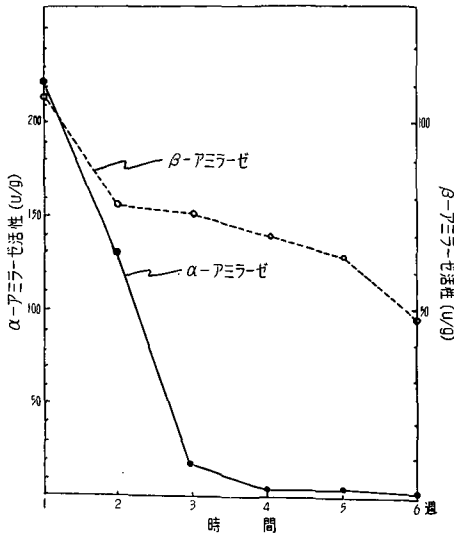
第1表 各熟期における粒重の変化

試料 No.	1	2	3	4	5	6
採集日(月日)	7. 2	7. 9	7.16	7.23	7.30	
熟 期	乳熟期	糊熟期	糊熟期	黄熟期	完熟期	収穫物
100粒重(g)	0.5	1.2	2.4	3.2	3.6	3.4

4倍量の水及び少量のトルエンを加えてよく攪拌し、1夜の後濾過し、その濾液を酵素液とした。これらの酵素液につき、 $\alpha$ -及び  $\beta$ -アミラーゼ活性を測定し、活性度の単位を試料乾物 1 g 当り生成 mg マルトースで表わして得た結果は第1図に示す。ここで見られる様に、 $\alpha$ -及び  $\beta$ -アミラーゼ活性は共に、乳熟期に最も強く、成熟するにつれて下降してくる点でかわりはないが、その減少

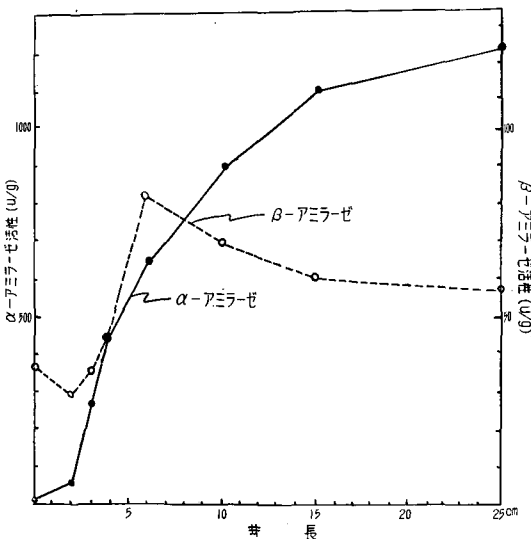
\* 北海道大学農学部附属農場

\*\* 北海道大学農学部農芸化学教室



第1図 発熱過程におけるアミラーゼ活性の変化

の度合に大きな差が見られる。即ち、 $\alpha$ -アミラーゼでは糊熟期後半から黄熟期初期の間に、乳熟期の10~20%にまで減少し、完全期に至って殆んど全く無視し得る程度にしか活性は見られなかった。これに反し、 $\beta$ -アミラーゼは完全種子でも、乳熟期のものに比べ、ほぼ半分の減少に過ぎない。一方、各期の粒重を見ると、乳熟期から糊熟初期は収量の点で問題とならず、黄熟期以後ではアミラーゼ活性にさほどの増減は見られない。又脱穀調整等の操作から考え合せても、完全種子が特に $\beta$ -アミラーゼ調整の材料として好都合であろうと思われる。



第2図 発芽過程におけるアミラーゼ活性の変化

## b. 発芽過程のアミラーゼ活性の変化

0.2% ホルマリンで30分間消毒後、よく水洗した種子を室温で1夜浸漬後、発芽血中の湿潤濾紙上に並べ、20°の恒温器内で暗所発芽させ、毎日一定時間に試料を取り乳鉢で磨碎し、風乾重の9倍量の水を加えて攪拌し、5時間の後濾過し、濾液を酵素液とした。酵素活性は乾物1g 当り生成マルトース mg で表わした。その結果は第2図に示す如く、 $\alpha$ -アミラーゼは急激な増加を続け、未発芽種子の千倍以上に達するのみでなく、登熟過程のどの時期のものより高い活性度を示している。一方 $\beta$ -アミラーゼも増加はするが、せいぜい2~4倍程度に過ぎず、しかも他方で $\alpha$ -アミラーゼの増加が莫大であること等を考え合すると、 $\alpha$ -アミラーゼは発芽種子、 $\beta$ -アミラーゼは未発芽種子を使用するのが妥当であると考えられ、その様に決定された。

## 2. $\alpha$ -アミラーゼの精製及び性質

### a. ライムギ麦芽の調製

ライムギ種子を0.2%ホルマリン水溶液で30分間消毒し、よく洗浄して次いで水道水中で1夜浸漬した後、20°恒温器内で1週間暗所発芽させて、平均芽長約1cmに達したものを風乾し、次いで乾燥器内で徐々に温度を上げ、最後は75°、30分で仕上げた。水分は約5%で、収量は80%であった。

### b. $\alpha$ -アミラーゼの分離精製

粉碎ライムギ麦芽860gに水3.5 $l$ (1:4)及びトルエン15mlを加えてよく攪拌し、1夜放置後布濾紙したものを遠心分離で上澄みを取り、残渣は更に1.5 $l$ の水で再抽出し、さきの上澄みと合わせて粗抽出物とした。これより $\beta$ -アミラーゼを除くため70°で30分熱処理し、急冷した後生じた沈澱物を遠心分離で除き、結晶硫酸を加えて0.7飽和とし、アンモニア水を加えてpHを6.0に調整し、生じた沈澱物を遠心分離でとり、0.7飽和硫酸溶液で洗浄した。こうして得た沈澱物を水にとかして700mlとし、硫酸0.2~0.5飽和で分別し、少量の水にとかしたものを流水で2日、蒸留水で1日透析した。透析内液に塩化カルシウムを1 $l$ 中に5g含む80%の冷アルコールを等量加え、不溶物を遠心分離で除く。ここに得たアルコール溶液は、直ちに澱粉柱に吸着させた。澱粉柱はトウモロコシ澱粉とセラライトの等量を混合して直径4cmの管につめて約10cmの層を作った。この管に室温で溶液を流し込んで吸着させ、次いで吸着物を40%アルコール溶液で洗液が無色となるまで洗う。溶出液は硫酸カルシウムを含む水で行ない、溶出液は数個の画分に分けて活性の高い部分のみを集めて濃縮し、殆んど無色の透明な

第2表 a-アミラーゼ精製の主要段階における活性の変化

	容積 (mℓ)	活性 (u/mℓ)	比活性 (u/ mg prot.)	収量 (%)
粗抽出液	3,500	150	1,070	100
第1回塩析物	700	700	—	92
第2回塩析・透析液	120	2,000	1,600	80
精製酵素液	50	1,200	31,300	8.8

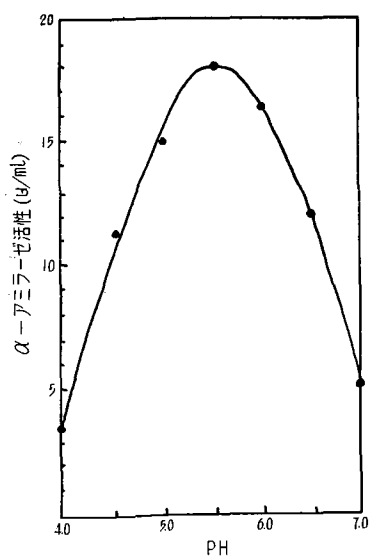
液を得た。この操作により、比活性約30倍の標品を収量約9%で得た。これらの主要段階の活性の変化を第2表に示す。

c. 精製 a-アミラーゼの諸性質

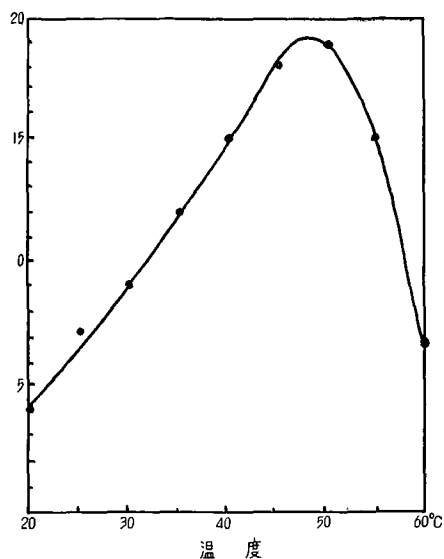
i. 最適 pH の測定

50倍希釈の精製酵素液を McIRVAINE 緩衝液で種々の pH に調整し、40° で活性を測定した。その結果第3図に見られる様な曲線が得られ、pH 5.4~5.8 に活性の極大があり、pH 8.0 以上及び 3.5 以下では殆んど活性が見られなかった。

OHLSSON E. et al.<sup>5)</sup> の粗抽出液による 5.1~5.9 とほぼ一致し、SCHWIMMER et al.<sup>2)</sup> のオオムギ麦芽結晶アミラーゼの 4.7~5.4 とは幾分差のある様に思われる。又 PRONIN et al.<sup>6)</sup> の温度により pH の最適条件が変動すると云う知見よりすれば、この程度の差は問題とすべき程のものではないのかも知れない。一方 SOROJA et al.<sup>9)</sup> は未発芽大麦の a-アミラーゼの最適 pH が 7.0 だと報



第3図 α-アミラーゼの pH による影響



第4図 α-アミラーゼの温度による影響

告しているが、これは Q 酵素に近いものではあるまいかと想像される。

ii. 最適温度の測定

精製酵素の 50 倍希釈液を pH 5.5 において、種々の温度の活性を測定し、第4図に示す曲線が得られた。50° 附近に活性の極大が見られ、それより高温では急激に減少し、65° では全く活性が見られなかった。粗抽出液で同様のことを試みたが、60° 附近が最高で、70° でも幾分活性が見られた。

d. EDTA による酵素活性への影響

希釈酵素液に、種々の濃度の EDTA で 10 分間前処理し、その活性を測定してみると、第3表の如くになり  $10^{-3}$  M で完全に失活する。又 60 分処理では  $2 \times 10^{-4}$  M で失活が見られる。この失活処理後 Ca 塩を加えて、再活性化を試みたが、その効果は見られなかった。それゆえこの不活性化は、酵素蛋白分子内に強く結合しているカルシウムが EDTA と結合して、不可逆的に失活をおこすものと考えられ、他の既知の a-アミラーゼと似た性質を持つ様に思われる。

第3表 EDTA による a-アミラーゼの阻害

処理時間 (分)	EDTA 濃度 (M)				
	0	$10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$	$10^{-3}$
10	20.0	10.6	7.2	4.19	0
60	20.0	4.0	0	—	—

### 3. $\beta$ -アミラーゼの精製及び性質

#### a. ライムギ $\beta$ -アミラーゼの分離・精製

粉碎ライムギ 500 g を 0.2 M 食塩水 2  $\ell$  で 1 夜抽出し、布濾し及び遠心分離で分けた抽出液を酢酸で pH を 3.8 に下げて 3 時間処理することにより、微量存在する  $\alpha$ -アミラーゼを除き、中和後硫酸 0.7 飽和で沈澱を集め、0.7 飽和硫酸溶液で洗浄後水にとかし流水透析 2 日蒸溜水透析 1 日の後濃縮し、生じた沈澱を除き、アセトン 40~60% の部分を分別し、更に硫酸で 0.3~0.5 飽和の部分少量の水にとかし、帯黄色の標品を得た。この様な分別沈澱による操作をくりかえすことにより、比活性は徐々に上って行くが、能率、収率共に悪く、他の方法を適用すべきであると考え、種々の吸着剤、例えば、カオリン、酸性白土、珪酸アルミニウム、シリカゲル、リン酸カルシウムゲル等を用いた吸着による精製も試みたが、いずれも良い結果は得られなかった。

上の操作の諸段階での活性の変化を第 4 表に示す。

この酵素標品につき、他の類似カーボハイドラーゼの混在の有無を調べるため、 $\alpha$ -アミラーゼ、マルターゼにつき試験したが、いずれも活性は見られなかった。

第 4 表  $\beta$ -アミラーゼ精製の主要段階における活性の変化

処 理	容 量 (ml)	活 性 (mg malt / ml)	比活性 (u / mg prot.)	収 率 (%)
粗 抽 出 液	1,500	44	250	100
酸 処 理	1,500	41	357	92.5
硫 安 0.7 飽 和	330	116	494	58.0
アセトン沈澱 I	150	187	843	42.5
アセトン沈澱 II	50	260	—	19.7
硫 安 0.3-0.5 飽 和	20	555	1,300	16.8

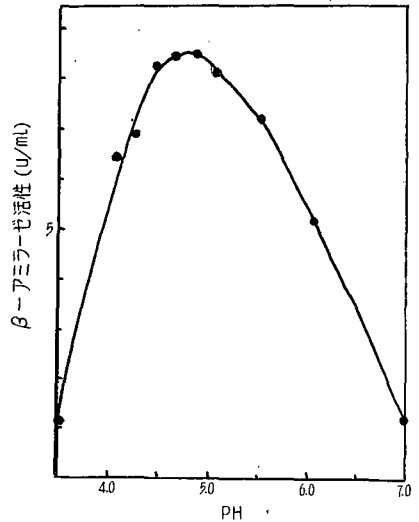
#### b. 精製 $\beta$ -アミラーゼの諸性質

冷所では pH 4.0~8.0 にわたって安定で、硫酸沈澱物は 1 年以上活性を保持することを確かめた。pH の最適条件は第 5 図に示す様に 4.6~4.8 の間に見られる。これは OHLSSON E. et al.<sup>5)</sup> による 4.0 とは大分ちがう様に思われる。これにくらべてオオムギ<sup>3)</sup>・コムギ<sup>4)</sup>の結晶アミラーゼでは、5.2~5.3 の附近で、幾分差が見られる様に見える。

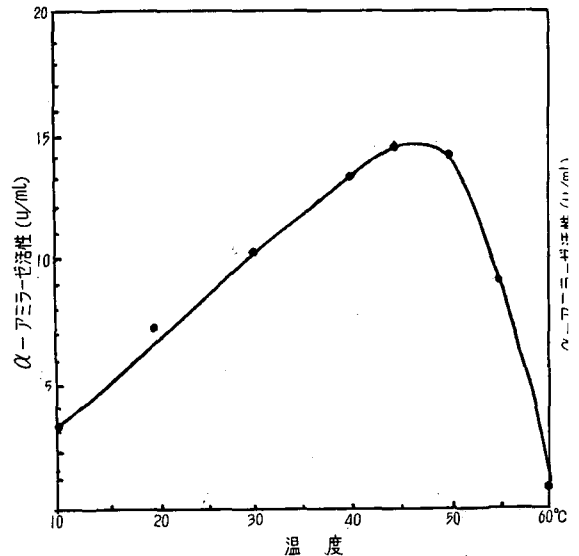
次に温度の影響を見ると第 6 図に示す様に 45~50° の附近に最高の活性が見られる。

#### c. 各種試薬による酵素活性の阻害

各種試薬による  $\beta$ -アミラーゼ阻害の実験結果をまとめて第 5 表に示す。



第 5 図  $\beta$ -アミラーゼの pH による影響



第 6 図  $\beta$ -アミラーゼの温度による影響

これより PCMB, 昇汞, 硝酸銀の様な (SH を阻害する) 試薬によって 100% 阻害され、このうち PCMB 処理のものを、硫化水素 1 時間処理して、第 6 表に示す様に 90% 以上の活性をとりもどすことがわかった。

又、モノヨーン酢酸で 60 分の処理により 30% 位の阻害が見られると云う点からも、従来結晶化された  $\beta$ -アミラーゼと類似構造を持つことが推定される。

一方、馬鈴薯ホスホリラーゼを阻害する<sup>10)</sup>ことが知られているビートサポニン及び大豆サポニンによる阻害及びその機構解明のための一手段として、2 種の界面活性

第5表 各種薬剤による $\beta$ -アミラーゼの阻害

試薬	処 理		不活性化	
	濃 度	時 間 (分)	活 性	阻害率 (%)
対 照	0	—	16.8	0
PCMB	$10^{-5}M$	10	0	100
HgCl <sub>2</sub>	$10^{-5}M$	10	0	100
AgNO <sub>2</sub>	$10^{-4}M$	10	0	100
ICH <sub>2</sub> COOH	$5 \times 10^{-2}M$	60	12.5	28.0
ビート・サポニン	0.1%	10	10.2	38.0
大豆・サポニン	0.01%	10	16.0	4.7
オレイル・アルコール スルホン酸ソーダ	$10^{-1}M$	10	0.4	96
ジソブチル・ナフタ レンスルホン酸ソーダ	$10^{-1}M$	10	5.4	68

第6表 硫化水素による活性化

対 照	不活性化		再活性化	
	16.5 ml*	100%	17.5 ml*	107%
PCMB $10^{-5}M$	0	0	16.3	99

\* 活性度は SOMOGYI 試薬 D 液の滴定値で表わした。

剤による阻害実験を試みた。結果は大豆サポニンの場合は溶解度が低いため、はっきりした結果は得られなかったが、ビートサポニンはたしかに阻害効果を示し、2種の界面活性剤も、かなりの高濃度で阻害作用を示した。以上より、これらの試薬による阻害作用は酵素蛋白と基質間に界面活性剤として入り込み、相互間の接触をさまたげることによると推定される。

#### d. 酵素標品による澱粉分解物について

この酵素標品を可溶性澱粉に作用させ、30, 60分及び20時間後の反応生成物に夫々エタノールを加えて50%エタノール溶液とし、沈澱物を除いて濃縮し、ペーパークロマトグラフィーにより生成糖を調べたところ、マルトース以外の糖類は全く検出されなかった。

### 要 約

ライムギより $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼの分別・精製法及び性質のいくつかにつき記載した。

1. ライムギアミラーゼの分離に先立ち、ライムギの登熟及び発芽過程でのアミラーゼ活性の変動を調べ、 $\alpha$ -アミラーゼには発芽種子、 $\beta$ -アミラーゼには未発芽種子を用いることに決定した。

2.  $\alpha$ -アミラーゼは、ライムギ麦芽抽出物を澱粉柱吸

着によって精製し、比活性約30倍の標品を得た。このものは最適 pH 5.4~5.8 で OHLSSON et al. の結果とほぼ一致し、又 EDTA による失活の様子から、他の既知 $\alpha$ -アミラーゼと類似するものであることがわかった。

3.  $\beta$ -アミラーゼは、ライムギ種子の0.2 M 食塩水抽出物を、硫安及びアセトン分別で精製して得た標品は最適 pH 4.6~4.8 と OHLSSON et al. の4.0とはかなり異なる。又阻害実験から SH 基が酵素活性に対し一つの要因であり、この点からも既知の諸 $\beta$ -アミラーゼと類似することがわかった。

本研究にあたり、当初より助言をいただいた伊藤光治氏並びに、ライムギを恵与下さった北大農学部直営農場第2畜産部の方々に厚く感謝致します。

### 文 献

- 1) 大島幸吉・板谷真一, 醸造学雑誌 **2**, 501 (1865).
- 2) SCHWIMMER, S. and BALLS, A. K., J. Biol. Chem. **176**, 465 (1948), **179**, 1063 (1949).
- 3) MEYER, K. H., FISCHER, E. H. and PIGUET, A., Helv. Chim. Acta **34**, 316 (1951). PIGUET, A., FISCHER, E. H., Helv. Chim. Acta **35**, 257 (1952).
- 4) MEYER, K. H., SPAHR, P. H. and FISCHER, E. H., Helv. Chim. Acta **36**, 1942 (1953).
- 5) OHLSSON, E. and UDDENBERG, C. E., Z. physiol. Chem. **221**, 165 (1933).
- 6) PRONIN, S. I. and DAKH, B. M., Doklady Acad. Nauk. SSSR. **77**, 321 (1951). C.A. **45**, 7198 g (1951).
- 7) HAGIHARA, B., Ann. Rep. Osaka Univ. **2**, 35 (1954) 酵素研究法 II, 108 (1957) 朝倉書店.
- 8) SOMOGYI, M., 澱粉化学 p. 424, p. 428 (1955) 朝倉書店.
- 9) SOROJA, K. and GIRI, K. V. J., Indian Inst. Soci. **35** A, 99 (1953), C.A. **47**, 4433 g (1953).
- 10) 小幡弥太郎・石川芳典・吉田司, 農化 **29**, 947 (1955), 農化 **30**, 89 (1956), **30**, 397 (1956).

### Summary

The authors tried to separate amylases from rye.

1) At the beginning of the study, changes of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase activities in rye seeds during development and germination processes were investigated. From these results, the authors decided to use germinated rye seeds for  $\alpha$ -amylase and ungerminated for  $\beta$ -amylase.

2)  $\alpha$ -Amylase was separated from rye-water-extract by adsorption through a starch column. This prep-

aration has optimal pH at 5.4-5.8, the figure of which were closely related to OHLSSON's result.

The behavior of inhibition by the addition of EDTA to the enzyme solution was similar to  $\alpha$ -amylases of other sources.

3)  $\beta$ -Amylase was separated from rye-water-extract by means of fractionations with ammonium sulfate and with acetone.

This preparation has optimal pH at 4.6-4.8, considerably different from that of OHLSSON, 4.0. Judging from the data done on the inhibitors, such as PCMB, silver nitrate etc., some SH-groups existing in this preparation play an important role in enzymic action as in case of other  $\beta$ -amylases crystallized from various sources.