



Title	長芋のアミラーゼに関する研究： -アミラーゼの精製とその酵素化学的性質について
Author(s)	高橋, 美帆; 下村, 得治
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 6(1), 63-72
Issue Date	1966-10-11
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/11755">http://hdl.handle.net/2115/11755</a>
Type	bulletin (article)
File Information	6(1)_p63-72.pdf



[Instructions for use](#)

# 長芋のアミラーゼに関する研究

$\beta$ -アミラーゼの精製とその酵素化学的性質について

高橋美帆・下村得治

(北海道大学農学部農芸化学科生物化学教室)

Biochemical Studies on Amylase from Chinese yam  
(*Dioscorea batatas* Decne).

Purification and Properties of  $\beta$ -Amylase

MIHO TAKAHASHI and TOKUJI SHIMOMURA

(Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,  
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

## 緒 言

長芋のアミラーゼに関しては、従来、長芋はアミラーゼに富んでいるので消化がよいと報告<sup>1)</sup>され、またそのように知られていた<sup>2)</sup>。しかしながら近年の中村ら<sup>3)</sup>の報告によると、長芋のアミラーゼ活性はむしろ弱かった。この報告は、粗抽出液における活性のみにとどまっていたため、長芋特有の粘質物などを除去した精製アミラーゼについて更に検討を加える必要性を感じた。そこで以下、長芋のアミラーゼの精製を行ない、その酵素化学的性質について調べた結果を報告する。

長芋の抽出液は、他の植物起源のアミラーゼと同様に $\alpha$ -アミラーゼ [3.2.1.1.  $\alpha$ -1, 4-グルカン 4-グルカノヒドロラーゼ] よりも特に  $\beta$ -アミラーゼ [3.2.1.2.  $\alpha$ -1, 4-グルカンマルトヒドロラーゼ] の活性が強かったので  $\beta$ -アミラーゼについて精製をすすめた。 $\beta$ -アミラーゼに関しては現在まで、甘藷、麦芽、小麦、大豆の各  $\beta$ -アミラーゼ<sup>4)</sup> が結晶として得られ、蚕豆<sup>5)</sup>、わさび<sup>6)</sup>、大豆<sup>7)</sup> より精製したものについての報告がある。これらは  $\beta$ -アミラーゼとしてほぼ共通の酵素化学的性質を示すが、長芋の  $\beta$ -アミラーゼを濾紙電気泳動的に単一な蛋白として得た結果、その性質も他の植物起源のものとはほぼ同様であることがわかった。しかしながら最適 pH が従来のものよりアルカリ側にあること、pH 安定性がかなり低いことの点では性質をやや異にしていた。更に精製結果のアミラーゼ活性は植物起源のものでは弱い方に属していた。長芋の粘質物とアミラーゼとの間には直接の関連性は認められなかった。最近、久武<sup>8)</sup> は長芋の粘質物 (糖蛋白

質) は全くアミラーゼ活性を示さないと報告している。

## 実験材料と方法

1 供試材料: 北大農場産 (1963 年及び 1964 年) の長芋 (*Dioscorea batatas* Decne) を用い、また必要に応じて市販のものを一部用いた。

2 基 質: 可溶性澱粉は市販のものを、アミロース、アミロペクチンは天然馬鈴薯澱粉より Schoch の改良法<sup>9)</sup> によって調製したものを、マルトオリゴ糖は酸糖化水飴からカーボンカラム・クロマトグラフィー<sup>10)</sup> により分離調製したものをを用いた。アミロース、アミロペクチンの重合度は 3, 5-ジニトロサリチル酸法<sup>11)</sup> では各、370, 250 附近であった。

3 タカ  $\alpha$ -アミラーゼの調製: タカ  $\alpha$ -アミラーゼは赤堀らの方法<sup>12)</sup> によって精製した。

### 4 酵素力価及びその測定方法

糖化力: 1.2% 可溶性澱粉 (3:1 の割合で McIlvaine の緩衝液を含む) 5 ml と酵素液 (酵素活性が時間に比例するように適度に希釈) 1 ml の反応液を、37°C の恒温水槽中で 15 分間反応させ、生成還元糖を Somogyi の銅試薬改良法<sup>13)</sup> により、マルトースとして定量した。この条件下で 1 分間に 1  $\mu$ M マルトースを生成する酵素量を 1 単位とした。

糊精化力: ヨード呈色測定には山田のアミラーゼ力価の測定法<sup>14)</sup> を用いた。10  $\mu$ M のグルコース当量可溶性澱粉 1 ml, McIlvaine の緩衝液 (pH 6.2) 1 ml と酵素液 1 ml の反応混液を 37°C の恒温水槽で 10 分間反応後 ヨウ素塩酸液 5 ml を加えて酵素反応の停止とヨウ素呈

色を同時に行わせた。ヨウ素塩酸液は1M ヨウ化カリウムを含む0.1M ヨウ素溶液1mlと1N 塩酸199mlとを混合して作った。ヨウ素呈色度を660m $\mu$ で1cmのセルを用いて測り、この条件下でヨウ素呈色度を10%低下させる酵素量をもって1単位とした。

5 比活性: 比活性は、酵素液中の窒素1mg当りの酵素単位で表わす。酵素液中の窒素量はマイクロケルダール法により、蛋白含量は280m $\mu$ の吸光度測定によった。

6 濾紙電気泳動: 濾紙電気泳動はペロナールナトリウム緩衝液(pH 8.18)と酢酸緩衝液(pH 5.0または5.3)で東洋濾紙No. 51とセルローズ・アセテート片(商品名“OXOID”)を用いて行なった。発色には0.05gのプロムフェノール・ブルー、2mlの水酢酸、1gの塩化第二水銀を蒸留水で全量を100mlとしたプロムフェノールブルー発色剤を用いた。

### 実験結果

1 試料の調製: 秋に収穫された長芋のアミラーゼ活性は季節によって変化する。その状態はFig. 1に示される。収穫後、徐々に活性の低下を示し、冬期は低く発芽とともに再び活性は増大し夏期には最低となる。長芋を薄く輪切りにし風乾して保存すると活性の変動を防ぎ高い活性のまままで保存可能である。

生の長芋を用いる場合には、長芋を細片にし蒸留水で10°Cで一晩抽出し、ガーゼを用いて濾過、濾液を静置して澱粉を沈澱除去した。風乾した粉末長芋を用いる場合には、長芋粉末を蒸留水で2時間室温で抽出し吸引濾過

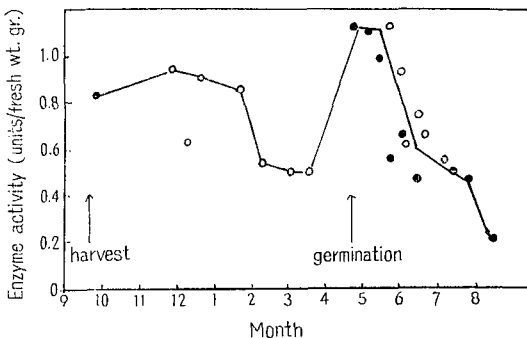


Fig. 1. Seasonal Changes of Amylase-activity of Chinese yam.

- : commercial source (1963.10-1964.8)
- : stored in a cellar all the year round (1963.10-1964.7)

Amylase activity was an average value from two-five pieces of Chinese yam.

して濾液を得た。これらの濾液をアミラーゼの粗抽出液として用いた。りん酸緩衝液(pH 6.98)で抽出すると水抽出の場合に比べてやや活性が高かったが精製操作上の利点をもつ水抽出液を、この実験においては用いた。

2 粗抽出液中のアミラーゼ活性: 粗抽出液中のアミラーゼ活性はFig. 2に示される如く3~4時間の反応でヨウ素呈色を消失した。pH 3.2で40分間室温におく酸処理を行なった粗抽出液では24時間の反応後もヨウ素呈色は紫色であり、反応生成物は薄層クロマトグラフィ<sup>15)</sup>で、マルトースのみであった。また、粗抽出液を70°Cに15分間保った熱処理では、活性が弱い為ヨウ素呈色は紫色を残していたが生成糖としてはマルトースとマルトトリオースが認められた。この結果、長芋の粗抽

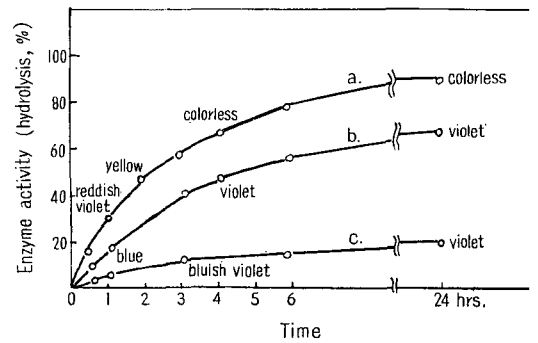


Fig. 2. Amylase-activity Curve in Original Extract.

- a. original extract
- b.  $\beta$ -amylase treated with acid
- c.  $\alpha$ -amylase treated with heat

Experimental conditions, see text.

出液は $\alpha$ -アミラーゼと $\beta$ -アミラーゼを含み、 $\beta$ -アミラーゼに、より富んでいることがわかった。なおサッカラーゼ、マルターゼ活性は全く見られなかった。

3 長芋 $\beta$ -アミラーゼの精製: 上述したように $\alpha$ -アミラーゼは酸処理によって除くことが出来た。精製を妨げる長芋の粘質物の除去には、パパイン、リパノール、リゾチーム、硫酸、酢酸鉛やトリクロル酢酸等の処理が試みられた。これらの処理法<sup>6,16)</sup>は、しばしば粘質物や蛋白の除去に用いられるのであるが、ここではいずれも適当でなく、結局、酵素溶液を塩を全く含まない状態で酢酸処理する方法が粘質物の除去に有効であった。長芋の $\beta$ -アミラーゼの精製方法はFig. 3に示される如くである。粗抽出液に20%塩基性酢酸鉛を攪拌しながら沈澱が生じ粘性が全くなくなるまで加える。灰白色沈澱を遠心分離又はデカンティションで集め蒸留水で洗滌し、その沈澱

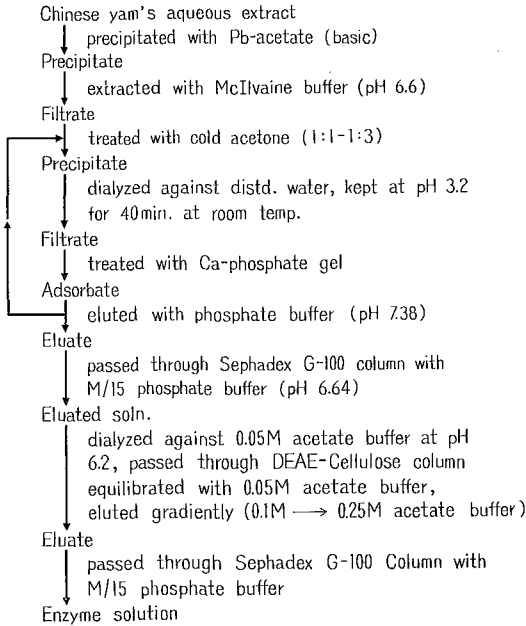


Fig. 3. Purification of Chinese yam  $\beta$ -Amylase.

から McIlvaine の緩衝液 (pH 6.64) で一晩抽出する。この抽出液は再び強い粘性を示し、これを吸引濾過すると粘性の弱い濾液を得る。この濾液を同量の冷アセトンで処理し、沈澱は遠心分離によって除き、更に上澄液を3倍量のアセトンで処理し、沈澱を遠心分離により集め蒸溜水に対して約5日間透析する。完全に塩を除いた透析溶液を2Nの酢酸でpH 3.2に調節し室温で40分間保つ。この時攪拌によって酵素溶液中の粘質物は絡みあうようにして沈澱し、全く粘性のない透明濾液が得られる。沈澱を濾過除去した後、重炭酸塩溶液でpH 5.5に調節し、りん酸カルシウムゲル処理を行なう。吸着部分を蒸溜水で洗滌後、pH 7.38のりん酸緩衝液で3回溶出する。この溶出液を再びアセトン処理、りん酸カルシウムゲル処理を経て、M/15 りん酸緩衝液で洗滌したセファデックス G-100 のカラムに通した。Fig. 4 に示す如く、りん酸緩衝液で溶出すると二つの蛋白のピークが得られ、アミラーゼ活性は最初のピークに認められた。

このアミラーゼ活性のある分画を0.05 M の酢酸緩衝液 (pH 6.2) に対して透析後、同じ緩衝液で平衡化した DEAE-セルロースカラムに通し、同じ緩衝液で洗滌後、0.1 M と 0.25 M の pH 6.2 の酢酸緩衝液で gradient elution を行ない、更に 0.5 M の同じ緩衝液を流した。溶出状態は Fig. 5 に示される如くである。

アミラーゼ活性を示した分画をセファデックス G-100

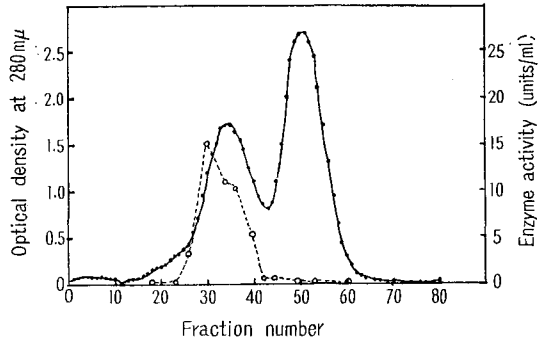


Fig. 4. Column Chromatography of Chinese yam  $\beta$ -Amylase on Sephadex G-100.

●—● : absorbance at 280 m $\mu$ ; ○—○ : amylase activity; sample, 45 ml; column (3 $\times$ 33 cm), equilibrated with 1/15 M phosphate buffer (pH 6.64); flow rate, 0.8 ml/min; each fraction, 5 ml.

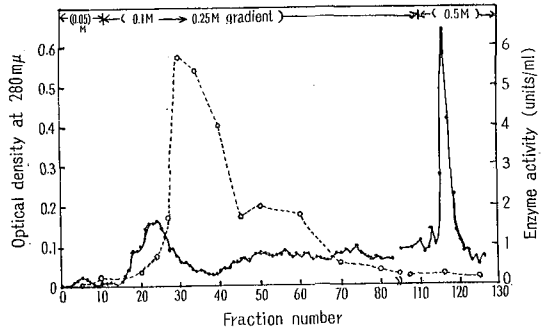


Fig. 5. Column Chromatography of Chinese yam  $\beta$ -Amylase on DEAE-Cellulose.

●—● : absorbance at 280 m $\mu$ ; ○—○ : amylase activity; sample, 30 ml; column (3 $\times$ 6 cm), equilibrated with 0.05 M acetate buffer (pH 6.2); elution (0.1 M → 0.25 M, gradient, 0.5 M); flow rate, 1 ml/min.; each fraction, 10 ml.

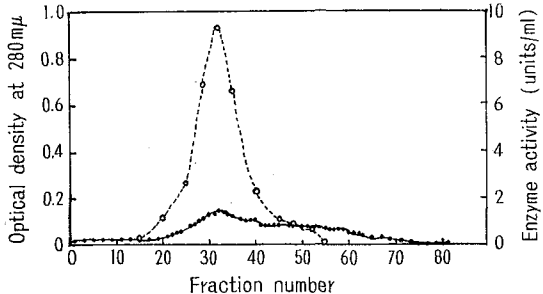


Fig. 6. Column Chromatography of Chinese yam  $\beta$ -Amylase on Sephadex G-100.

●—● : absorbance at 280 m $\mu$ ; ○—○ : amylase activity; sample, 60 ml; column (3 $\times$ 36 cm), equilibrated with M/15 phosphate buffer (pH 6.64); flow rate, 0.8 ml/min.; each fraction, 5 ml.

Table 1. Purification of Chinese yam  $\beta$ -Amylase

Procedure	Vol. (mℓ)	(a) Activity* (units/mℓ)	Total Activity (%)	mg. N/mℓ	Specific Activity (units/N) mg.	(b) Dext. Activity (DU)**	(a)/(b)
Original Extract***	2000	0.61	100	1.07	0.57	55.4	0.011
Pb-Filtrate	800	1.13	74.3	0.733	1.54	41.8	0.027
First Acetone ppt.	200	3.62	59.3	0.902	4.01	58.4	0.062
First Ca-Phosphate Gel Extract	114	5.19	84.5	0.389	13.57	52.9	0.098
Second Acetone ppt.	40	12.80	42.5	0.525	24.36	98.4	0.13
Second Ca-Phosphate Gel Extract	36	12.50	36.9	0.288	43.44	62.5	0.20
Second Sephadex Column Fraction (Final Enzyme Solution)	32	9.84	25.6	0.069	142.30	46.8	0.21

\* 1 unit = 1  $\mu$ M maltose/min., 37°C at pH 6.6.

\*\* 1 DU = 10% decrease of blue value.

\*\*\* 750 g of fresh Chinese yam was treated.

で再クロマトグラフィーを行なった。

Fig. 6 に示される如く、一つのアミラーゼ活性をもつピークが得られた。

この分画を精製酵素液として本実験では用いた。

精製の各操作における比活性の一例を Table 1 に示す。この精製操作によって最初の粗抽出液に比べて、約 233 倍の比活性をもつ  $\beta$ -アミラーゼが得られた。

#### 4 精製酵素の酵素化学的性質

1). 濾紙電気泳動図：精製酵素について濾紙電気泳動をセルロース・アセテート片“OXOID”で、ベロナールナトリウム緩衝液と酢酸緩衝液で行なったところ、Fig. 7 に示す如く一つのバンドを示した。このバンドがアミラーゼ活性と一致することを、セルロースアセテート片を 0.5 cm ずつの細片とし各々を 0.5 M, pH 6.2 の酢酸緩衝液で 30 分間抽出後、1.2% の可溶性澱粉に反応させて確めた。

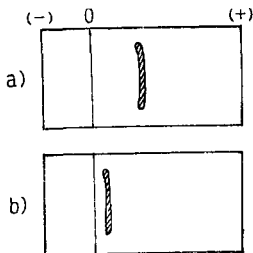


Fig. 7. Electrophoretic Diagrams on Cellulose Acetate Strips.

a) Veronal-Na buffer of pH 8.18, electrophoretic time, 2 hrs. at 1.2 mA/cm, 12.2-16.3 V/cm.

b) 0.05 M acetate buffer of pH 5.0, electrophoretic time, 2 hrs. at 0.61 mA/cm, 35-30 V/cm.

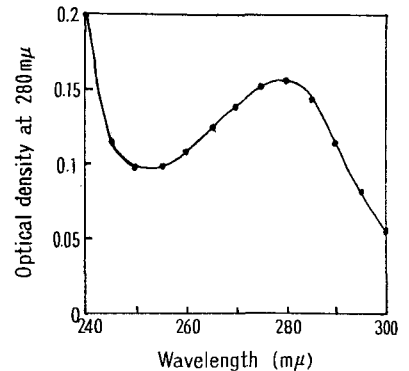


Fig. 8. Ultraviolet Absorption Spectra of Chinese yam  $\beta$ -Amylase from Fractions in Fig. 6.

2). 紫外外部吸収スペクトル：精製酵素の吸収スペクトルは Fig. 8 に示す如く 280  $m\mu$  附近に極大吸収を示す蛋白として典型的なものであった。

3). pH と酵素活性：酵素液 1 ml, 種々の pH の McIlvaine 緩衝液 1 ml と 1.6% 可溶性澱粉 3 ml の混合液を 37°C に 15 分間保った後、その還元力を測定した。Fig. 9 に示す如く pH 6.2 から pH 6.5 に最大活性があった。

4). 温度と酵素活性：1.6% 可溶性澱粉 3 ml と pH 6.2 の McIlvaine 緩衝液 1 ml の混合液を種々の温度に 5 分間 preincubation した後、酵素液 1 ml を加えて反応させ、その還元力を測定した。Fig. 10 に示す如く 50°C から 55°C で最大活性を示した。

5). pH と安定性：pH 安定性を粗抽出液(酸処理直後のもの)と精製酵素の両者について調べた。酵素液 1

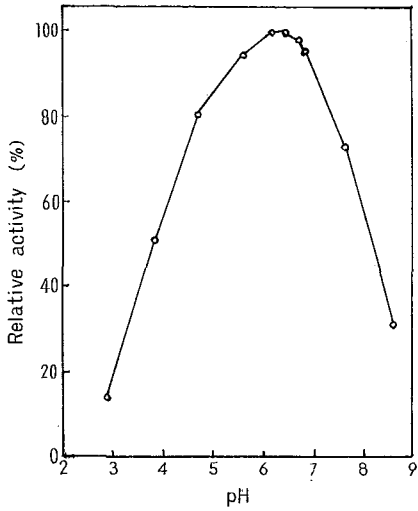


Fig. 9. pH-Activity Curve of Chinese yam  $\beta$ -Amylase.  
reaction condition, see text.

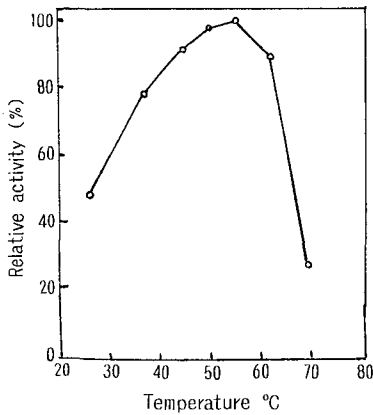


Fig. 10. Temperature-Activity Curve of Chinese yam  $\beta$ -Amylase.  
reaction condition, see text.

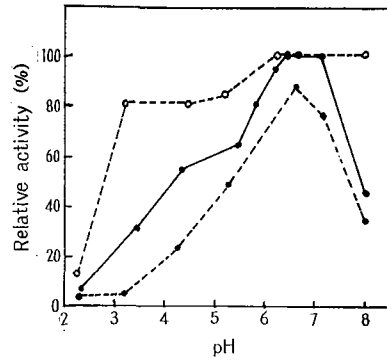


Fig. 11. pH-Stability Curve of Chinese yam  $\beta$ -Amylase.  
○—○: crude prep. (25°C, 4 hrs.)  
●—●: purified prep. (25°C, 4 hrs.)  
●—●: " (25°C, 24 hrs.)  
reaction condition, see text.

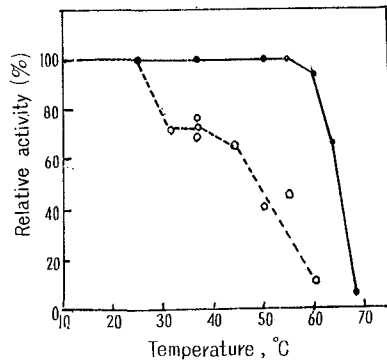


Fig. 12. Temperature-Stability Curve of Chinese yam  $\beta$ -Amylase.  
●—●: 15 min., pH 6.2  
○—○: 4 hrs., pH 6.2  
reaction condition, see text.

ml と種々の pH の McIlvaine 緩衝液 2 ml の混合液を 25°C に 4 時間あるいは 24 時間保った後、1 N 酢酸、または 1 N 水酸化ナトリウムで pH 6.4 に調節し、全容量が 5 ml になるようにし、1.6% 可溶性澱粉 3 ml と pH 6.2 McIlvaine 緩衝液 1 ml を加えて反応させ還元力を測定した。Fig. 11 に示す如く粗抽出液は pH 6.0 から 8.0 の範囲で、精製酵素は pH 6.2 から 7.2 の範囲で安定であったが 24 時間では安定性はよくなかった。

6). 耐熱性: 酵素液 1 ml と pH 6.2 の McIlvaine 緩衝液 1 ml の混合液を種々の温度に 15 分間あるいは 4 時

間保った後、pH 安定性の場合と同じ条件で残存酵素活性を求めた。Fig. 12 に示す如く、15 分間では 55°C まで安定であり、4 時間では 25°C まで安定であった。

7). 種々の基質に対する作用: 基質として、可溶性澱粉、アミロース、アミロペクチン、マルトオリゴ糖とマルトトリオースを用いた。結果は Fig. 13 に示される。24 時間の反応後、多糖類の反応混合液にタカ  $\alpha$ -アミラーゼを加えると直ちに分解率は上昇、一方、混合液に同じ長芋  $\beta$ -アミラーゼを添加した場合には分解率の上昇は認められなかった。このことは、精製アミラーゼは全く  $\alpha$ -アミラーゼを含んでいないことを示す。基質に対

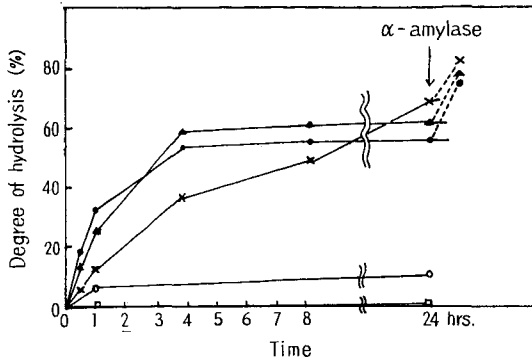


Fig. 13. Action of Chinese yam  $\beta$ -amylase on Several Kinds of Substrate.

- ▲—▲ amylopectin (ca. 250 glucose units)
- soluble starch
- ×—× amylose (ca. 370 glucose units)
- malto-oligosaccharide (8 and 7 glucose units)
- maltotriose

The reaction mixture consisting of 25 ml of 1.2% substrate solution containing McIlvaine buffer (pH 6.2) and 10 ml of enzyme solution was kept at 37°C. At definite intervals degree of hydrolysis was determined.

Table 2. Effect of SH-reagents

Inhibitor (M)	Cysteine (M)	Remaining Activity (%)
(1) PCMB		
0	0	100
$2.05 \times 10^{-5}$	0	5.5
$6.25 \times 10^{-5}$	0	0
$2.00 \times 10^{-5}$	$2.00 \times 10^{-3}$	188.3
0	$2.00 \times 10^{-3}$	187.8
(2) Mono-Iodo acetate		
$2.05 \times 10^{-3}$	0	8.3
$5.00 \times 10^{-3}$	0	0
$1.66 \times 10^{-3}$	$3.3 \times 10^{-3}$	133.7
$8.30 \times 10^{-4}$	$3.3 \times 10^{-3}$	156.7

A mixture containing 1 ml of enzyme solution, 1 ml of McIlvaine buffer (pH 6.2) and PCMB or mono-iodo acetate was brought to 4 ml, preincubated at 37°C for 5 min, and added with 3 ml of 1.6% soluble starch and 1 ml of McIlvaine buffer (pH 6.2) to determine amylase activity. In case cysteine was added immediately after preincubation, the substrate solution was added after 30 min.

Table 3. Effect of Salts

Salts ( $10^{-2}$ M)	Variation in Activity (%)
Control	100
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	100
$\text{K}_2\text{SO}_4$	100
$\text{MgSO}_4$	95.6
$\text{CuSO}_4$	0
Ca-acetate	100
$\text{HgCl}_2$	0
KCl	100
$\text{KNO}_3$	100
KCN	100

After a mixture containing 1 ml of  $10^{-2}$  M salt solution, 1 ml of acetate buffer (pH 6.2) and 1 ml of enzyme solution was preincubated at 37°C for 5 min., amylase activity was determined under the same condition as in Table 2.

する長芋  $\beta$ -アミラーゼの作用は、アミロペクチン、アミロース、マルトオリゴ糖の順であり、反応終期においてはアミロースの分解がアミロペクチンより増大した。マルトトリオースは、この条件下では全く分解されなかった。

8). SH 試薬の影響: SH 試薬である PCMB とモノヨード酢酸の酵素活性に対する影響については Table 2 に示す如くである。酵素は  $10^{-5}$  M の PCMB と  $10^{-3}$  M のモノヨード酢酸によって完全に阻害された。  $10^{-3}$  M のシステインの添加は酵素活性を完全に回復させ、更に高い割合で活性化する働きがあった。

9). 塩の影響: 塩の影響の結果は Table 3 に示す如くである。長芋の  $\beta$ -アミラーゼは、 $\text{Cu}^{2+}$  と  $\text{Hg}^{2+}$  によって完全に阻害され他のカチオンとアニオンは阻害作用をほとんどもたなかった。

### 考 察

長芋の  $\beta$ -アミラーゼを精製し、その酵素化学的性質について調べた。

試料の調製にあたっては、生の長芋と風乾粉末としたものの両方を用いた。風乾粉末としたものは季節的变化による活性の低下を起させずに保存出来る利点があるとともに、抽出の際、生のものより、より粘性が低くなっているため大量処理が可能であった。

長芋の蛋白、あるいは粘質物については、高橋<sup>17)</sup>が研

究し、この粘質物は水抽出液から酢酸によって沈澱させたと報告しているが、本実験においては抽出液中の塩類が粘質物の沈澱を妨げ、さらに粘質物とアミラーゼとの分離を妨げて適当でなかった。そこで抽出液を蒸留水に対して透析、完全に塩類を除いた後酢酸を加えると粘質物は容易に沈澱し、アミラーゼとの分離も可能で極めて良好な結果を得た。最近、久武<sup>8)</sup>は長芋の糖蛋白(粘質物)を硫酸塩析で精製したのものには、アミラーゼ活性が認められなかったと報告しているが、本実験でも示したように長芋の粘質物はアミラーゼ活性をもたないことがわかった。

おそらく、アミラーゼは粘質物に単に附着しているか、あるいは塩を介して弱い結合状態にあるのみで粘質物そのものはアミラーゼ活性とは関係ないのであろう。

精製操作中のゲル濾過にはセファデックス G-75 (coase) と G-200 も用いてみたがセファデックス G-100 が最もよい結果を得た。

Fig. 4 と Fig. 5 に示す如く、セファデックス G-100 と DEAE-セルロースのカラムクロマトグラフィーは各々

アミラーゼ活性をもつ一つのピークを与えたが Fig. 14, Fig. 15 に示す如く、場合によってはアミラーゼ活性のピークが二つに分離されることが認められた。すなわち、Sephadex G-100 のカラムでは明らかに二つに分けられ

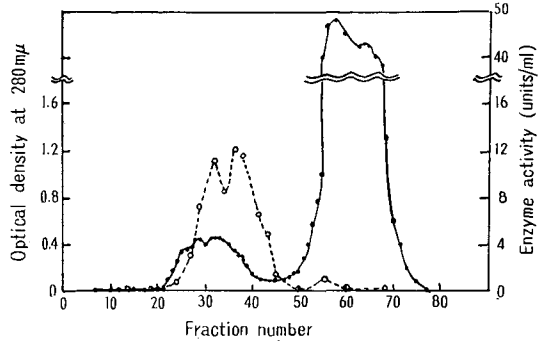


Fig. 14. Column Chromatography of Chinese yam  $\beta$ -Amylase on Sephadex G-100.

●—●: absorbancy at 280  $m\mu$ ; ○—○: amy-  
lase activity; sample, 51 ml; column (3×30 cm),  
equilibrated with M/15 phosphate buffer (pH 6.64);  
flow rate, 0.8 ml/min.; each fraction, 4 ml.

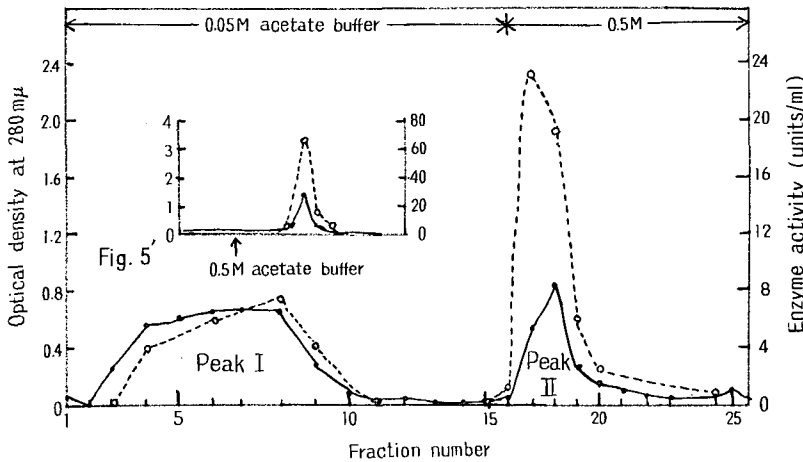


Fig. 15. Column Chromatography of Chinese yam  $\beta$ -Amylase on DEAE-Cellulose.

●—●: absorbancy at 280  $m\mu$ ; ○—○: amy-  
lase activity; sample, 36 ml; column (1.3×7 cm),  
equilibrated with 0.05 M acetate buffer  
(pH 6.2); flow rate 0.8 ml/min.; each fraction, 4 ml.

る可能性を示し、DEAE-セルロースのカラムでは吸着されずに溶出するピーク(ピーク I)と 0.5 M の酢酸緩衝液によって溶出されるピーク(ピーク II)に分けられた。Fig. 5 における酵素を直ちに 0.5 M の酢酸緩衝液で溶出させた場合には、Fig. 5' に示すような結果を得る。これ

は Fig. 15 のピーク II に相当する。)

ピーク I とピーク II をセファデックス G-100 で再クロマトグラフィーを行なうと、Fig. 16 に示す如く今度は各々のアミラーゼ活性は一つのシャープなピークとして得られた。この二つのピークの濾紙電気泳動図をみると



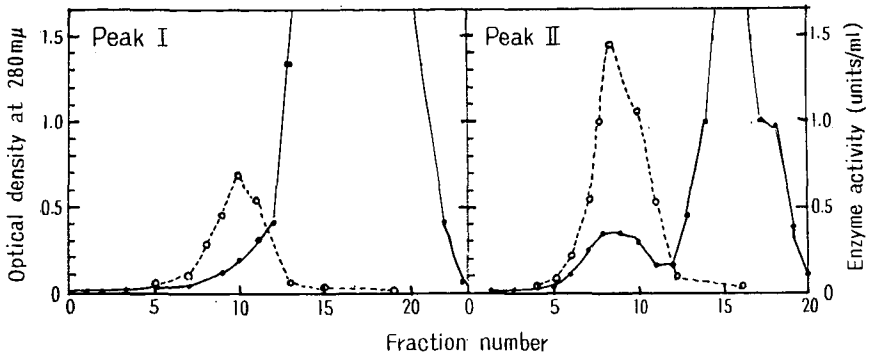


Fig. 16. Column Chromatography of Chinese yam  $\beta$ -Amylase on Sephadex G-100.

●—●: absorbancy at 280  $m\mu$ ; ○----○: amylase activity; sample, each 20  $ml$ ; column (2 $\times$ 20 cm), equilibrated with M/15 phosphate buffer (pH 6.64); flow rate, 0.6  $ml/min.$ ; each fraction, 4  $ml$ .

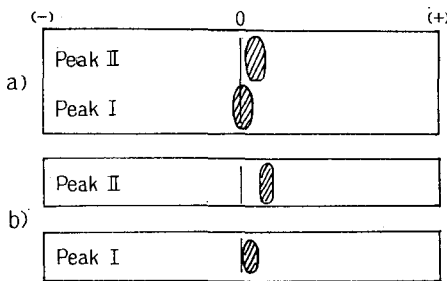


Fig. 17. Paper Electrophoretic Diagrams of Two Fractions.

filter paper, Toyo roshi No. 51 (11.5 $\times$ 27.5 cm);

- a) 0.05 M acetate buffer (pH 5.3); electrophoretic time, 8 hrs. at 0.31 mA/cm, 14.7–10.4 V/cm.  
b) Veronal-Na buffer (pH 8.18); electrophoretic time, 8 hrs. at 0.61 mA/cm, 5.2 V/cm.

Fig. 17 に示す如く互に異なった易動度を示した。しかしながら他の酵素化学的性質の違いは認められず、また Fig. 6 の一つのピークとして得た酵素と Fig. 16 の二つのピークの酵素との性質の差異も認められなかったため、酵素の活性中心部分の構造には恐らく差異はないものと思われる。

同一起源のものから得られた  $\beta$ -アミラーゼで同じ基質特異性をもちながら異なった分子構造をもつ酵素、いわゆるアイソザイムに関するものとしては、K. H. Tippler と R. Tkachuk<sup>8)</sup> は、小麦のアミラーゼについて小麦は水抽出では一つの“free”アミラーゼを溶出するが、再び塩溶液で抽出すると、DEAE-セルロースのカラムクロマト的に区別される数種のアミラーゼ活性をもつ成分、いわゆる“bound”アミラーゼが得られたと報

告している。また P. Graber と Jean Daussant<sup>19)</sup> は、大麦の  $\beta$ -アミラーゼとその麦芽の  $\beta$ -アミラーゼは免疫学的には同じであるが溶解性と電気泳動における易動度を異にするとして報告している。 $\alpha$ -アミラーゼに関しては結晶タカミラーゼがりん酸カルシウムゲルのクロマトグラフィで二つの区別に分けられたとの報告<sup>20)</sup>もある。

本実験においては、いずれの場合も抽出液は蒸溜水のみであり、供試長芋がすべての季節にわたっているものを用いた場合にピークは一つであることから、抽出剤による差異、季節的差異によって二つの  $\beta$ -アミラーゼが得られたとは考えられない。

精製上の操作については、操作中変性したと考えられる酵素蛋白は、DEAE-セルロースには吸着されず、そのまま溶出するが、セファデックス G-100 のクロマトグラフィでは後から溶出される蛋白の部分 (Fig. 4 参照) と一緒に溶出されることがわかったので、操作中の部分的変性によって生じたものとも考え難い。処理時間や微細な条件が何らかの影響を及ぼしている可能性も考えられるが、現在のところ明らかでない。この電気泳動的に異なる二つの  $\beta$ -アミラーゼが、精製の操作中に二次的に生じたか否かはまだ不明である。

ともかく、長芋  $\beta$ -アミラーゼは、いずれの場合にも、Fig. 9, 10, 11, 12, 13, Table 2, 3 で示される如き酵素化学的性質をもっていた。これらの諸性質は、緒言で述べた結晶又は精製された他の植物の  $\beta$ -アミラーゼと次の二、三の点を除いては共通であった。

すなわち、 $\beta$ -アミラーゼの最適 pH は 4.5 から 6.0 の範囲にみられ、 $\alpha$ -アミラーゼのそれは pH 6.2 から 6.9 の間にみられる<sup>21)</sup>が、長芋  $\beta$ -アミラーゼはその中間である

pH 6.2から6.45に最適 pH があった。β-アミラーゼに対するカルシウムイオンの阻害が報告されている<sup>5,22)</sup>が長芋 β-アミラーゼは何らの影響も受けなかった。また精製長芋 β-アミラーゼは、従来のものより酸に対してもアルカリに対してもかなり安定性が低かった。

### 要 約

1. 貯蔵長芋のアミラーゼ活性の季節的变化を調べた。

2. 長芋 β-アミラーゼを最終的に、DEAE-セルロースとセファデックス G-100のカラムクロマトグラフィーで精製し、粗抽出液に対して233倍の比活性の高いものを得た。精製酵素は濾紙電気泳動的に単一であった。

3. 長芋 β-アミラーゼの酵素化学的性質は次の如くであった。

i) 紫外外部吸収において280 mμ付近に最大吸収を示した。

ii) 澱粉加水分解で還元糖としてマルトースのみを生じ、基質に対する反応速度は、アミロペクチン、アミロース、マルトオリゴ糖の順であった。

iii) 最適 pH は6.2から6.42, 最適温度は50°C から55°C であった。

iv) 25°Cにおいて4時間でpH 6.2から7.2の範囲で安定であったが、24時間では安定性は低かった。70°C, 15分間では完全に失活した。

v) SH 試薬によって阻害されるSH 酵素であり、システインによって活性を回復、さらに活性化された。

vi) Cu<sup>+</sup> と Hg<sup>+</sup> により完全に阻害されたが、他のアニオン、カチオンの影響は認められなかった。

4. 精製長芋 β-アミラーゼが、場合によってはカラムクロマトグラフィーによって電気泳動的に異なる二つの分画に分けられたが、それらの他の酵素化学的性質は全く同じであった。

### 文 献

- 1) 田所哲太郎：食品化学，丸善，p. 405 (1918).
- 2) 化学大辞典：共立出版，6，p. 596 (1961).
- 3) 中村道徳・山崎鏡次・丸尾文治：農化，24，196 (1949).
- 4) D. FRENCH：The Enzyme, Academic press, New York, 4, 347 (1960).
- 5) S. R. NADKARNI and KAMALA SOHONIE：Enzymologia, 26, 6 (1963).
- 6) 春日井愛子：農化，33，111 (1959).
- 7) A. GERTLER and YEHUDITH BIRK：Biochem. J., 95, 621 (1965).

- 8) 久武綾子：栄養と食糧，17，273 (1964).
- 9) J. WILSON, Jr., T. J. SCHOCH and C. S. HUDSON：J. Am. Chem. Soc., 65, 1380 (1943).
- 10) W. J. WHELAN, J. M. BAILEY and P. J. ROBERTS：J. Chem. Soc., 1953, 1293.
- 11) 二国二郎：デンプンハンドブック，朝倉書店，p. 228 (1961).
- 12) AKABORI S., IKENAKA T., and HAGIHARA B., J. Biochem., 41, 557 (1954).
- 13) 小林達吉・田淵武士：農化，28，171 (1954).
- 14) 山田覃洋：農化，37，633 (1963).
- 15) S. CHIBA and T. SHIMOMURA：Agri. Biol. Chem., 29, 486 (1965).
- 16) 赤堀四郎：酵素化学研究法 I，朝倉書店，p. 37, 158 (1955).
- 17) 高橋徳藏：農化，4，191, 648 (1929)；14，650 (1936).
- 18) K. H. TIPPLES and R. TKACHUK：Cereal Chem., 42, 111 (1965).
- 19) P. GRABER and JEAN DAUSSANT：ibid., 41, 523 (1964).
- 20) 湊真正・中西一夫：生化，33，165 (1961).
- 21) 二国二郎：デンプンハンドブック，朝倉書店，p. 110 (1961).
- 22) 同上，p. 275 (1961).

### Summary

1. Seasonal changes of amylase activity of Chinese yam harvested in fall were observed.

2. Chinese yam β-amylase was purified by chromatography on DEAE-cellulose and on Sephadex G-100 as final procedure. The procedure of purification gave β-amylase preparation with specific activity 233 times greater than that of the original extract.

The homogeneity of the purified enzyme was proved by paper electrophoresis on cellulose acetate strip.

3. The properties of Chinese yam β-amylase were as follows:

1) The enzyme exhibited maximal absorption at 280 mμ in ultraviolet absorption spectra.

2) The enzyme hydrolyzed starch producing only maltose as reducing sugar and the rate of hydrolysis decreased in the following order: amylopectin, amylose and malto-oligosaccharide.

3) Optimum pH was 6.2 to 6.45 and the temperature optimum was 50 to 55°C.

4) The enzyme was stable in the range of pH 6.2 to 7.2 at 25°C for 4 hours.

5) The enzyme lost all the enzymatic activity at

70°C in 15 minutes.

6) The enzyme was found to be a sulfhydryl enzyme which was completely inhibited by SH-reagents and activated by cysteine.

7) The enzyme was strongly inhibited by  $\text{Cu}^{++}$  and

$\text{Hg}^{++}$ , but other cations and anions had no effects.

4. On occasion two fractions of the enzyme were obtained by column chromatography, and they differed from each other electrophoretically, but their enzymatic properties were always the same.