



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	未発芽米のでんぷん糖化酵素に関する研究
Author(s)	下村, 得治; Shimomura, Tokuji; 秋元, 史夫 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 6(3), 325-334
Issue Date	1968
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11765
Type	departmental bulletin paper
File Information	6(3)_p325-334.pdf



未発芽米のでんぷん糖化酵素に関する研究

下村 得治・秋元 史生
(北大農学部農芸化学科生物化学教室)

Study on Glucoamylase of ungerminated Rice

Tokuji SHIMOMURA and Fumio AKIMOTO
(Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)
Received June 17, 1967

結 論

穀実類、中でも大麦、小麦に関しては未発芽および発芽の状態において存在するアミラーゼの単離ならびに諸性質の検討が多くなされてお¹⁸⁾、¹⁹⁾、²⁶⁻²⁸⁾、また未発芽穀実類に存在するアミラーゼは、他の大豆⁶⁾、甘藷¹⁾に存在するものと同じ、いはゆる β -アミラーゼであり、発芽に際しては、 α -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼなどの生産されてくることもよく知られた事実である。米に関するこの種の研究は比較的少ないが、山岸³¹⁾、³²⁾は発芽米、未発芽米のアミラーゼについて研究し、特に未発芽米において、糖化型アミラーゼの存在、および強い α -グルコシダーゼ活性を認め、この両酵素活性が一種類の酵素蛋白質に依存する可能性の多いことを示した。一方伊賀上¹⁰⁾は乳熟期にある水稲種子のアミラーゼ画分の研究において、この画分は α -アミラーゼ活性の他に強いマルターゼ活性をも併有するが、この両活性は単一の酵素によるものとは考えられないとしている。

著者らは北海道産米の品質についての研究中、未発芽米(新雪種)の磷酸塩抽出液が、アミラーゼ活性と強い α -グルコシダーゼ活性を併有し、基質としての可溶性でんぷんからは、いかなる反応時間内においても葡萄糖のみしか生成しないことを見出した。これらの作用がたとえば β -アミラーゼと α -グルコシダーゼの両酵素によるものか、あるいはそれとは別にグルコアミラーゼ型の単一酵素によるものかを究明すべく実験を行なったので、いかその結果について報告する。

実験材料および方法

材料：北海道立農業試験場空知支場から恵与された、うるち、新雪種(1964年および1965年産)を脱粒、玄米

あるいは精白米を粉碎して用いた。

アミロース、アシロペクチンはSCHOCHのブタノー改良法により馬鈴薯でんぷんから、 β -リミットデキストリンはアミロペクチンに甘藷の β -アミラーゼ¹¹⁾を作用させ、MEYER¹⁷⁾の方法に準じて、それぞれ調製した。マルトースは市販品を更に活性炭カラムにより精製し、マルトトオース、マルトテトラオースは市販マルトースより、イソマルトース、イソマルトトリオースはデキストランの酸加水分解産物より、いずれも活生炭カラムを用いて単離、調製した。パノースは帯広畜大菅原教授より恵与されたものを用いた。

グリコーゲン、可溶性でんぷん、PCMB、EDTA、その他の試薬は市販品である。

精製に使用したCM-セルロースに市販品に再生操作を行ない、着色物質を除いているから使用した。

葡萄糖定量用のグルコースオキシダーゼはSIGMA社のタイプII、パーオキシダーゼはタイプIをそのまま供試した。

方 法：アミラーゼ活性の測定は、基質として用いた可溶性でんぷんから生成された葡萄糖をSOMOGYI変法¹⁶⁾およびSOMOGYI-NELSON法²⁰⁾により定量することで行なった。他のでんぷんよう多糖類の場合も本法に従った。アミラーゼ活性の単位としては、2.5%可溶性でんぷん2ml、0.5M酢酸緩衝液(pH, 4.6)1ml、水1ml、酵素試料1ml計5ml中50mgの基質から45°C、30分間に1.5mgの葡萄糖を生成する酵素量を1単位とした。

α -グルコシダーゼ活性の測定は基質として2.5%マルトース溶液を用いた他は上記に従い、 k_m および初速度はグルコースオキシダーゼ試薬³⁾により測定した。すなはちグルコースオキシダーゼ15mg、パーオキシダーゼ

2 mg を 0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) 約 50 ml にと
かし、1% オルトチアニジンエタノール溶液 0.5 ml を
加え、更に同緩衝液で 100 ml とする。次に反応混液
0.5 ml (葡萄糖含量 50 μ g 以内) を共栓試験管にとり、前
記試薬 3 ml を加え、37°C に 60 分保持後 420 m μ の吸収
を測定し、標準曲線から葡萄糖を算出した。グルコシダ
ーゼ活性の単位は、でんぶんの代りに 2.5% マルトース
溶液を用いた他はアミラーゼの場合と同じで、この条件
下で葡萄糖 8.44 mg を生成する酵素量を 1 単位とした。

蛋白態素量の測定は、トリクロロ酢酸による沈澱をミ
クロケルダール法で行なうか、又は 280 m μ における吸
収から標準曲線によって算出した。

ペーパークロマトグラフィーは東洋濾紙 No. 50 を用
い、展開剤はピリジン:ブタノール:水=6:4:3 V/V, 4
回展開後アンモニヤ性硝酸銀で発色させた。

電気泳動はセルロース・アセテート片 "OXOID" によ
る濾紙電気泳動および日立 HT-B 型を使用し、超遠心分
離には SPINCO-E 型を用いた。

実験結果

1. 酵素の精製

精白した試料を直径 1 mm いないに粉碎しその 5 kg
に磷酸塩緩衝液 (pH, 7.6) 15 l を加え、室温で 18 時間攪

はん抽出後セライトを通して吸引濾過し、濾液約 12 l へ
対し、5N-アンモニヤで pH を 6.8~7.2 に保ちながら、
固形硫酸で 0.7 飽和として一夜放置、生じた沈澱を集め、
容量が初めの抽出液の 1/10 になるように脱塩水にとか
して遠沈 (8,000 rpm)、上澄液を上記と同じ条件下で塩析
処理して 0.2~0.4 飽和区分の沈澱は 500 ml の脱塩水に
溶解する。さらに本操作を 1 回くりかえして得られる沈
澱を 150 ml の水にとかす。この溶液を 1/20 M 酢酸緩
衝液 (pH, 4.8) に対し 4°C で 2 日間透析し、生じた多量
の沈澱を遠沈で除き、その上澄を 1N アンモニヤで pH
6.8 に調整後 0°C 以下でアセトン分画を行ない、30~45%
濃度で得られる沈澱を遠沈 (-5°C, 10,000 rpm) により
集める。この沈澱を 70 ml の 1/20 M 酢酸緩衝液 (pH, 6.2)
にとかし、不溶部を除いた後同緩衝液に対し 4°C で 1 夜
透析、その透析内液を、あらかじめ同一緩衝液で平衡化
した CM-セルロースカラム (3.5 \times 20 cm) に注ぐと酵素
活性は完全に吸着されるので、2 l の同緩衝液で洗った
後 1/20M~1/2M の濃度勾配で溶出を行なった。図-1
に示す如くこのアセトン沈澱区分は更に 4 区分に分画さ
れ、アミラーゼ、グルコシダーゼ両活性ともにピーク III
に見出された。上ってピーク III の両端を除いた区分を
集め、硫酸 0.75 飽和による沈澱を遠沈 (10,000 rpm) で
集め、可及的小量の 1/20 M 酢酸緩衝液 (pH, 5.0) にとか

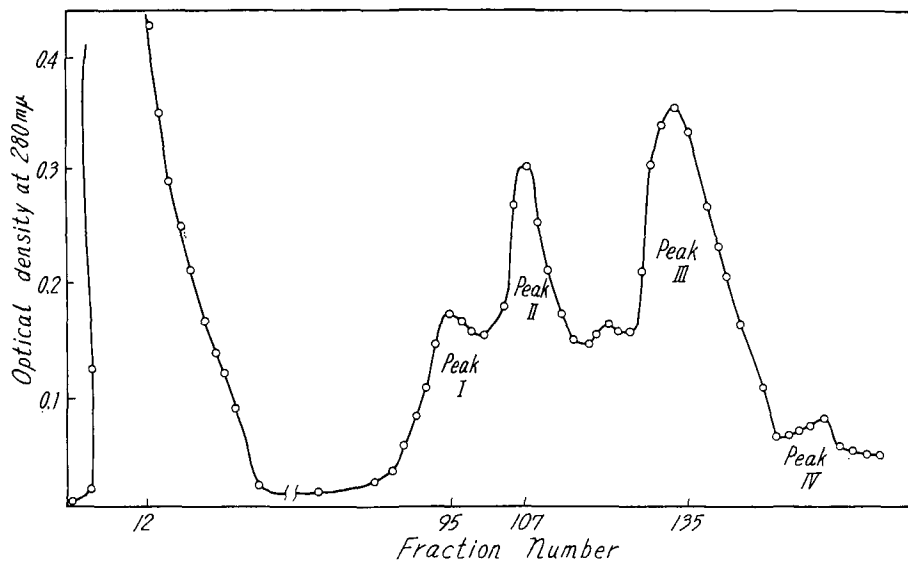


Fig. 1. Column Chromatography of the Precipitate with Acetone from Ungerminated Rice on CM-Cellulose.

○—○: optical density at 280 m μ ; column (3.5 \times 20 cm), equilibrated with 1/20 M acetate buffer (pH 6.2); gradient elution (1/20 M \rightarrow 1/2 M); each fraction, 15 ml.

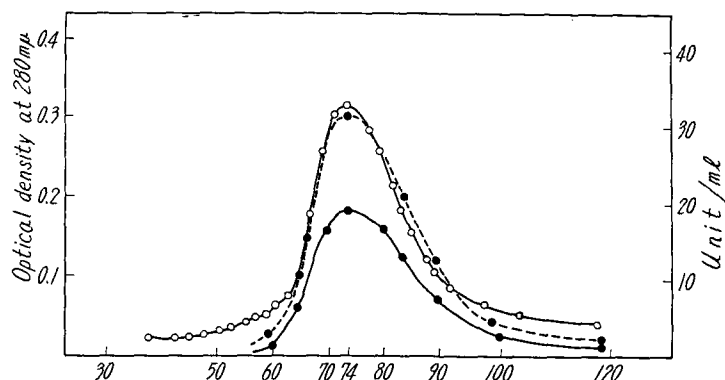


Fig. 2. Rechromatography of Peak III on CM-Cellulose.

○—○: optical density at 280 mμ; ●—●: amylase activity; ●—●: α-glucosidase activity.
 Gradient elution (1/5 M→1/2 M) was carried out with acetate buffer (pH 5.0); each fraction, 10 ml.

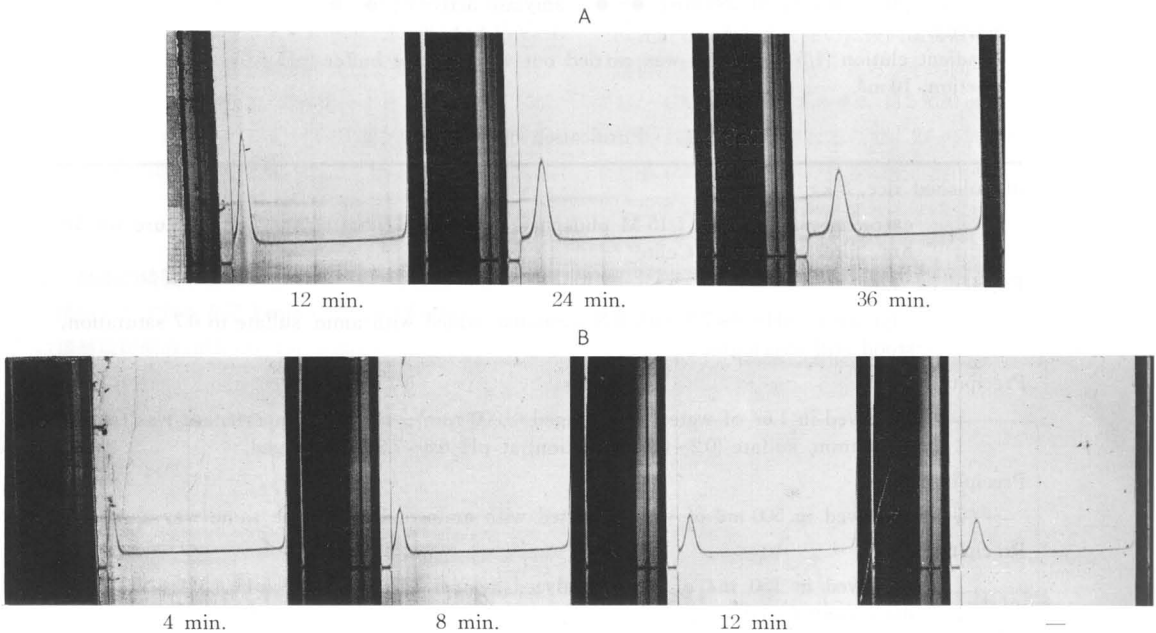
Table 1. Purification of Amylase

Powder of polished rice, 5 kg	
↓	extracted with 15ℓ of 1/15 M phosphate buffer (pH 7.6) at room temperature for 18 hrs., filtered through Celite.
Extract, ca. 12ℓ	
↓	adjusted to pH 6.8~7.2 with 5 N ammonia, added with amm. sulfate to 0.7 saturation, stood still overnight.
Precipitate	
↓	dissolved in 1.5ℓ of water, centrifuged (8,000 rpm); resulting supernatant was treated with amm. sulfate (0.2~0.4 saturation) at pH 6.8~7.2, centrifuged.
Precipitate	
↓	dissolved in 500 ml of water, treated with amm. sulfate in the same way as above.
Precipitate	
↓	dissolved in 150 ml of water, dialyzed against acetate buffer (pH 4.8) at 4°C for 2 days, centrifuged.
Supernatant	
↓	adjusted to pH 6.8, added with acetone to 30~45% concentration below 0°C, centrifuged (10,000 rpm) at -5°C
Precipitate	
↓	dissolved in 70 ml of 0.05 M acetate buffer (pH 6.2), dialyzed against the same buffer at 4°C.
Dialyzate	
↓	adsorbed on CM-Cellulose column at pH 6.2, eluted with acetate buffer gradiently (0.05 M→0.5 M).
Active Fraction, Peak III	
↓	dissolved in minimum amount of 0.05 M buffer (pH 5.0), treated with amm. sulfate (0.75 saturation), centrifuged, rechromatographed in the same way with acetate buffer (pH 5.0) (0.2 M→0.5 M).
Enzyme Solution	

Table 2. Progress of Enzymic and Specific Activity

Purification Step	Total Amylase Activity (unit)	A/M*	Specific Activity as Amylase (unit/mg-N)
Precipitate at 0.7 Saturation	54,600	1.0	30
Precipitate at 0.2~0.4 Saturation	43,500	0.95	60
Supernatant after dialyzing against acetate buffer (pH 4.8)	44,000	0.90	128
Precipitate after Acetone Treatment	27,800	0.79	330
Peak III after Chromatography	—	0.74	676
Peak III after Rechromatography	12,000	0.75	743

* unit as amylase per mℓ/unit as α -glucosidase per mℓ; value found with precipitate at 0.7 saturation was taken as 1.0.

**Fig. 3.** Sedimentation Patterns of Purified Amylase.

A: protein concentration, 0.92% in acetate buffer ($\mu=0.1$) of pH 5.0; B: 0.46% in the same buffer. The photographs were taken after final speed reached 56,100 rpm. Temperature, 20°C.

し、前記と同じ処理を経た後本緩衝液を用いて1/5M~1/2Mの濃度勾配で再クロマトグラフィーを行なった。結果は図-2に示すように、兩種の酵素活性は完全に一致していることが知られた。精製操作の概略は表-1、精製に伴う収量、比活性、兩酵素の活性比の変動は表-2に示す。すなわちいずれの精製段階においても兩酵素活性の分離は困難であり、かつ精製の進むにつれて兩酵素活性の比は一定値を示すことがわかる。

他の精製法たとえばリバノール、塩基性酢酸鉛、リン

酸カルシウムゲル、DEAE-セルロース、SEPHADEX、などによる処理は、実験したはんい内では好ましい結果は得られなかった。

最終的に精製した試料より酵素を硫酸で沈澱させ、蛋白濃度0.92%および0.46%において $\mu=0.1$ の酢酸緩衝液(pH, 5.0)を用いた場合の沈降パターンは図-3の如くで、いずれの濃度においても単一のピークが得られた。又セルロースアセテート片“OXOID”で、上記と同じ酢酸緩衝液を用いて行なった濾紙電気泳動の結果は図-4

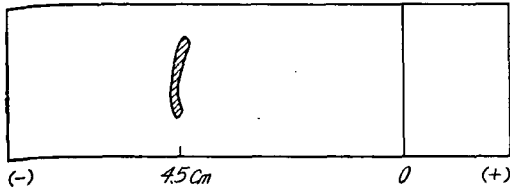


Fig. 4. Electrophoretic Diagram on Cellulose Acetate Strip.

Acetate buffer, pH 5.0; ionic strength, 0.1; 1.5 mA/cm; 120 min..

の通りで、2時間の泳動で陰極側に4.5 cm 移動し、単一のバンドを与えた。

2. 酵素化学的性質

1) 最適 pH の測定

緩衝液は MCLVAINE のものを用いた。2.5% 可溶性でんぷんあるいは2.5% マルトース 2 ml, 緩衝液 2 ml を 45°C に 10 分保持後酵素溶液 2 ml (約 8.5 単位) を加え 30 分反応させた。図-5 に示す如くアミラーゼ、グルコシダーゼ活性ともに pH 4.6 において最大活性が得られた。

2) 最適温度の測定

基質溶液 2 ml, 1/2 M 酢酸緩衝液 (pH, 4.6) 1 ml, 水 1 ml の混液を各温度に 10 分保持後酵素 1 ml を加え 15 分反応を行なはせた。図-6 に示す如く両酵素活性ともに 55°C で最大活性が得られ、その曲線もほとんど同じ経過を示している。

3) 熱処理と活性

酵素 1 ml を各温度に 15 分保持した後直ちに各基質溶

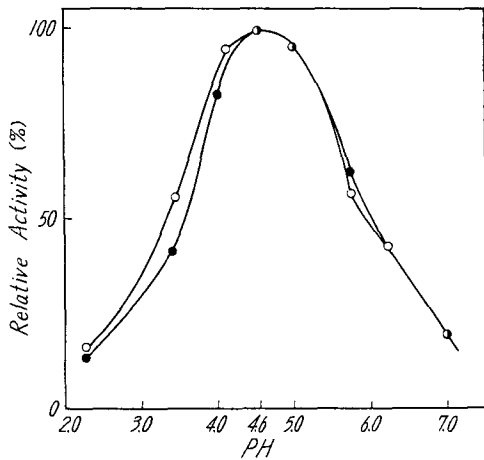


Fig. 5. pH-Activity Curve of Amylase and α -Glucosidase Activity.

●—●: Amylase activity; ○—○: α -Glucosidase activity. Reaction condition, see text.

液 2 ml, 前記緩衝液 (pH, 4.6) 1 ml, 水 1 ml を添加, 45°C で 15 分反応させた。図-7 に結果を示すが, 65°C, 15 分の処理で両酵素活性はほぼ完全に失活するが, 各温度における失活の度合いにおいても殆んど差は認められなかった。60°C における処理時間と失活の関係を調べたが, この場合も両酵素活性は同じ割合で失活し差は見られなかった。

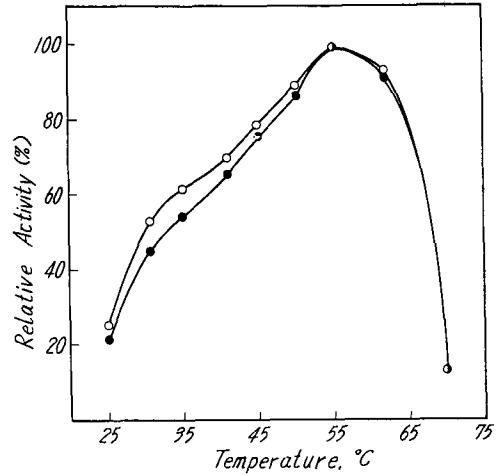


Fig. 6. Temperature-Activity Curve of Amylase and α -Glucosidase Activity.

●—●: Amylase activity; ○—○: α -glucosidase activity.

Experimental condition, see text.

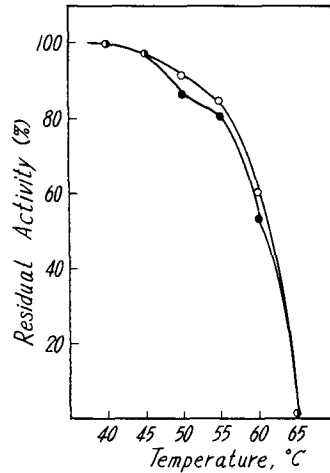


Fig. 7. Temperature-Stability Curve of Each Enzymic Activity.

Expressions are the same as in Fig. 6. Reaction condition, see text.

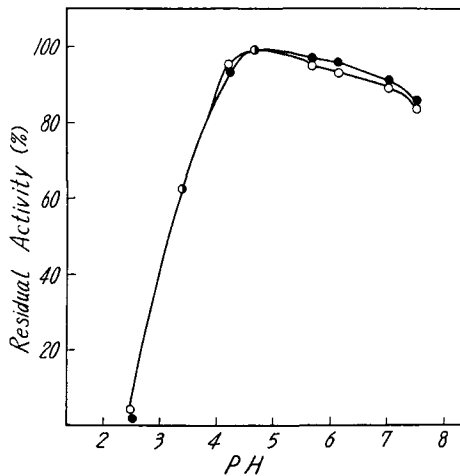


Fig. 8. pH-Stability Curve of Each Enzymic Activity.

Expressions are the same as in Fig. 7.
Reaction condition, see text.

4) pH と安定性

酵素液 1 ml と各 pH の MCILVAINE 緩衝液 2 ml を混合し、40°C で 1 時間保持、その 1 ml を緩衝液 (pH, 4.6) 1 ml, 基質 2 ml, 水 1 ml の混液に加え、30 分間 40°C で反応させる。図-8 に示す如く両酵素活性の間には差を生ずることがなく、かつ本酵素は酸性側においてもかなり安定であることが知られる。

5) 種々の多糖類に対する作用

アミロース、アミロペクチン、可溶性でんぷん、グリコーゲン、 β -リミットデキストリンを基質として用いた。

i) 分解限度

0.1% 基質 2 ml, 1/2 M 酢酸緩衝液 (pH, 4.6) 1 ml, 酵素 1 ml (60 単位) を 40°C に保ち、所定時間後に 0.5 ml をとり還元糖を測定した。結果は図-9 に示す如く、アミロース 70.9%, アミロペクチン 82.8%, 可溶性でんぷん 80.3%, グリコーゲン 68.4%, β -リミットデキストリン 68.4% といずれの場合も 100% 加水分解は得られなかったが、 β -アミラーゼによる分解とは明らかに異なっている。アミロースおよび可溶性でんぷんのこの分解点におけるヨウド呈色はいずれも青紫色であった。

ii) 可溶性でんぷん、 β -リミットデキストリンからの分解生成物

基質は 2.5% 溶液、酵素 5 単位を用いた他は前記と同じである。ペーパークロマトグラフィーにより、1, 2, 4, 8, 24 時間後の反応生成物を調べたが、何れも葡萄糖のみが検出され、他の少糖類は見られなかった。

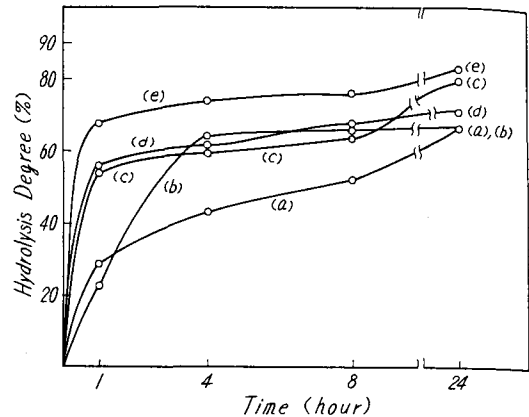


Fig. 9. Hydrolysis Degree of Various Polysaccharides by Present Enzyme.

(a) denotes glycogen; (b), β -limit dextrin; (c), soluble starch; (d), amylose; (e), amylopectin. Reaction mixture: 1 ml of enzyme (60 units), 2 ml of each substrate soln. (0.1%), 1 ml of 1/2 M acetate buffer soln. (pH 4.6). Temperature, 40°C.

6) α -1,6 結合を有する少糖類に対する作用

基質としてはイソマルトース、イソマルトリオース、パノースを用いた。2.5% 基質溶液 1 ml, 1/10 M 酢酸緩衝液 0.5 ml, 酵素 0.5 ml (20 単位) 計 2 ml より、5 分、30 分、1, 2, 4, 8, 24 時間ごとに反応混液より少量を取り出して加熱後ペーパークロマトグラフィーで生成糖を調べた結果、イソマルトースからは葡萄糖のみが、イソマルトリオースからは分解過程でイソマルトースが常に検出された。しかしパノースからは葡萄糖のみであり、マルトース若しくはイソマルトースは見られなかった。なおパノースの場合は酵素量を 5 単位を用いて実験した。

7) マルトース、マルトリオース、マルトテトラオースに対する K_m

酵素 1 ml (0.55 単位)、1/5 M 酢酸緩衝液 1 ml, 各濃度の基質 2 ml の混液を 40°C に保ち、5, 10, 15 分に 0.5 ml をとり 1 N-酢酸 1 ml を加えて反応をどめ 1 N-苛性ソーダで中和、それより 0.5 ml をとり葡萄糖オキシダーゼ試薬を用いて葡萄糖を定量し、LINEWEAVER-BURK 法によって K_m を算出した。マルトースに対しては $5.3 \times 10^{-3} M$, マルトリオース、 $1.5 \times 10^{-3} M$, マルトテトラオース、 $5.0 \times 10^{-3} M$ が得られた。

8) マルトース及び可溶性でんぷんに対する初速の比較

両種の基質に対して一定量の酵素を用いた場合、その最大速度を与える基質濃度においていずれの α -1,4 結合

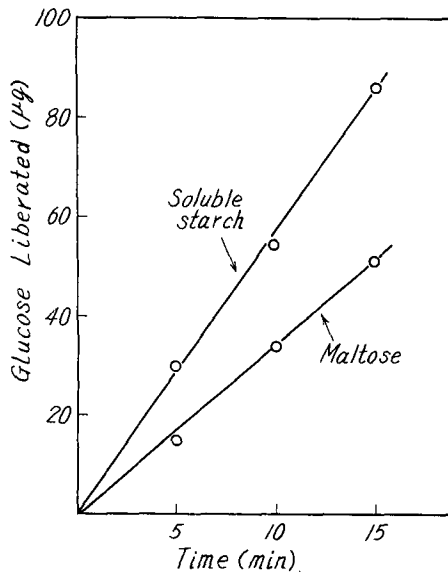


Fig. 10. Initial Velocity on Starch and Maltose. One ml of enzyme (0.087 units), 2 ml of 1% soluble starch or of 10^{-2} M maltose, 1 ml of $1/2$ M acetate buffer, pH 4.6. Temperature, 40°C .

に対してより早く作用するかを検討することは基質特異性を調べる場合に重要である。よって酵素 1 ml (0.087 単位), 可溶性でんぷん 1% 溶液 2 ml あるいは 10^{-2} M マルトース溶液 2 ml, $1/2$ 酢酸緩衝液 1 ml の混液で 40°C に保ち, 5, 10, 15, 30 分に 0.5 ml をとり, でんぷん基質の場合は SOMOGYI-NELSON 法, マルトース基質の場合はグルコースオキシダーゼ試薬により生成グルコースを測定した。結果は図-10 に示す如く, でんぷん: マルトース = 1:0.55 の割合で, でんぷんの α -1, 4 結合に対する活性が大きかった。

9) 糖転移作用

現在のところ一般には糸状菌からのグルコアミラーゼ又は, アミログルコシダーゼが α -グルコシダーゼ活性を有するにもかかわらず糖転移作用を行なうことは否定されている。最近 JØRGENSEN¹³⁾ は麦芽 α -グルコシダーゼはでんぷんをも加水分解するとともに, マルトース, でんぷんを基質としてグルコースへの糖転移作用を行なうことを示した。著者らによる本酵素が超遠心的および電気泳動的に均一な酵素として得られかつグルコアミラーゼ, α -グルコシダーゼ両活性を有することより見てその糖転移能を調べることは有意義である。すなわち 5% マルトース 4 ml, $1/10$ M 酢酸緩衝液 2 ml, 酵素 2 ml (12.4 単位) 計 8 ml を 40°C で反応させ, 30 分, 1, 2, 4, 8,

12, 24 時間ごとにペーパークロマトグラフィーによって生成物を検討した。この結果マルトースが 24.6% 加水分解される 30 分後から 60% 分解される 4 時間後まで微量ではあるが, マルトトリオースおよびパノースが検出され, その後加水分解の進むにつれてマルトリオースが消失し, パノースとイソマルトースが明らかに検出された。これらの結果は本酵素試料が糖転移能を有することを示している。

10) PCMB に対する態度

酵素 1 ml (61.5 単位), $1/2$ M 酢酸緩衝液 (pH, 7.0) 1 ml, 2.5% でんぷん又は 2.5% マルトース液 2 ml, 各濃度の PCMB 1 ml の割合で 45°C , 30 分反応させた。PCMB の最終濃度 2×10^{-3} M においてアミラーゼ及びグルコシダーゼ活性は 100% 近く阻害され, アミラーゼ活性に関しては 2×10^{-4} M において 70%, 2×10^{-5} M では 20% の阻害が見られた。レステインによる回復効果を調べるために, 1×10^{-2} M PCMB, 2.5% でんぷん, 緩衝液, 酵素を上述の如く混合, 45°C で 30 分保持したあと, 1×10^{-1} M システイン 1 ml を添加, 更に 30 分反応させた結果 90% の活性の回復が見られた。

11) EDTA に対する態度

一般に植物の β -アミラーゼは Ca^{++} や Cl^{-} などのコファクターを必要としないが, 麦芽, 微生物, 動物の α -アミラーゼは Ca^{++} により保護される性質がある。伊賀上ら¹⁰⁾ によっても乳熟期の米粒中のアミラーゼ活性区分も EDTA の添加により活性の 30% の低下が知られている。本酵素 (6.15 単位) に最終濃度 2×10^{-2} M の EDTA の存在で反応させるとアミラーゼ活性は約 7% 阻害されるが, それ以下の濃度ではほとんど阻害は示されなかった。精製操作中透析実験においても活性の変化が見られないことから少なくとも本酵素に対して Ca^{++} の影響はないものと思われる。

考 察

未発芽梗米新雪を材料として精製を行ない, 超遠心的, 電気泳動的に均一な標品として得られたアミラーゼは, でんぷんからグルコースのみを生成し, かつ α -グルコシダーゼ活性をも併有し, 熱処理, 酸処理によっても両種の酵素活性を分離することはできず両種の作用は単一の酵素によるものであり, いはゆるグルコアミラーゼに属するものであると考えられる。植物起源のこの種のアミラーゼの存在は従来知られていなかったが, 最近春井¹⁴⁾ はこの種の酵素を緑豆もやしから精製し, マルトース及びでんぷんよりの糖転移作用を含めて諸性質の検討

を行なっている。同氏のアミラーゼは基質の重合度の増加とともに分解速度は低下するが、著者らの標品は、図-10に示す如く、初速は明らかに高重合度のでんぷんに対する場合の方が大きかった。

本酵素の最適 pH は 4.6 と測定され、*Asp. niger*, *Asp. oryzae*^{(21), (22)}, *Rh. delemar*⁽²⁵⁾, *Asp. awamori*⁽¹⁵⁾ などの糸状菌のグルコアミラーゼの 4.5 付近とは一致している。一方 *Schizosaccharomyces* 属^{(21), (7)}, *Asp. niger*⁽⁷⁾, *Asp. oryzae*⁽⁷⁾, 植物起源のものとしては、大麦麦芽、乳熟期の米、未発芽ソバ種子⁽²⁹⁾ の α -グルコシダーゼは、最適 pH がいずれも 4.5~5.0 にあることは、グルコース単位による分解作用の機構を調べる上の、一助になるかもしれない。

でんぷん様多糖類に対するアミラーゼの作用形式については多くの検討がなされているが^{(5), (9)}, 本アミラーゼについては、アミロース、アミロペクチン、可溶性でんぷん、 β -リミットデキストリン、グリコーゲンをを用いた場合に、分枝の少ないほど速度が大きい傾向およびアミロース、可溶性でんぷんのそれぞれ 70% および 80% の分解時においても青紫色のヨード呈色を示すことより、ある程度 Single chain 説⁽⁵⁾ によるものであろう。

本酵素が α -1, 4 結合の他に α -1, 6 結合にも親和性を有することは、イソマルトース、イソマルトトリオース、パノースに対して、比較的酵素量を多くした場合 (20 単位) 100% 加水分解されることから明らかである。イソマルトトリオースの分解過程中にはインマルトースが必ず検出されたが、パノースの場合は生成物としては常にグルコースのみが見られ、イソマルトースあるいはマルトースは見出すことができなかったが、これはタカアミラーゼ B の場合⁽²³⁾ と同様であり、 α -1, 6 結合の切断による生成マルトースの瞬間的分解による結果との岡崎の見解に従うものであろう。しかし α -1, 6 結合を多く有する β -リミットデキストリン、グリコーゲンなどについては 60~70% 程度の分解に終わった。

本酵素はマルトース、でんぷんの何れをも分解するが、最近植物源の麦芽⁽¹³⁾, ソバ⁽²⁹⁾ の α -グルコシダーゼがでんぷんを分解することが報告されてきている。よって本酵素について、最大速度を与えるそれぞれの基質濃度における初速の比を測定すると、マルトース:でんぷんは約 1:2 の値が得られ、でんぷんの α -1, 4 結合に対する活性の方が大きいことが知られた。しかしこの結果は *Rh. delemar*⁽²⁵⁾, タカアミラーゼ B の 1:4 とは異なっている。

マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース

に対する K_m は、それぞれ、 5.3×10^{-3} M, 1.5×10^{-3} M, 5.0×10^{-3} M であったが、小野ら⁽²⁴⁾ による *Rh. delemar* のグルコアミラーゼでは、マルトース、マルトトリオース、マルトペンタオースに対し、それぞれ、 1.16×10^{-3} M, 2.02×10^{-4} M, 1.17×10^{-4} M と報告され、又麦芽の α -グルコシダーゼ⁽¹²⁾, ではマルトース、 2.0×10^{-3} M, マルトトリオース、 2.4×10^{-4} M と示されている。本酵素のテトラオースに対する K_m がトリオースのそれよりも大であることは、基質のグルコース残基の増加に伴って、 α -グルコシダーゼでは K_m は増加し、グルコアミラーゼでは減少するというような単純な考え方は必ずしも適用されないことを示唆しているかもしれない。

一般に糸状菌のグルコアミラーゼは、 α -グルコシダーゼ活性を併有するが、糖転移作用を行なうことは否定されている。春日井⁽¹⁴⁾ は緑豆もやしの新アミラーゼはマルトース及びでんぷんを基質として糖転移作用を行なうことを報告し、一方麦芽の α -グルコシダーゼ⁽¹³⁾ がでんぷんをも分解するのみならず、マルトース及びでんぷんから糖転移作用を行なうこと、更には著者ら⁽²⁹⁾ により未発芽ソバ種子の α -グルコシダーゼも全く同様にでんぷんよりグルコースのみを生成し、かつマルトース、でんぷんより各種の転移糖を生成することが報告され、特に植物起源の α -グルコシダーゼとグルコアミラーゼとの区別が不明確になってきている。現在の未発芽米のグルコアミラーゼについても、マルトース濃度 2.5% においては、マルトース、パノース、イソマルトースが検出され、少なくとも植物起源のグルコアミラーゼは糖転移作用を示すものと考えられる。

又本酵素が PCMB による阻害およびシステインによる活性の回復が見られることは、SH 酵素としての β -アミラーゼと一致している^{(4), (30)}。EDTA による活性への影響のほとんどないことは、本酵素に対する Ca^{++} の効果は考慮外にあるものと思はれる。

要 約

1. 新雪種未発芽米中に存在するでんぷん分解酵素は強い α -グルコシダーゼ活性を併有し、グルコアミラーゼと同様にでんぷんから直接グルコースを生成する。
2. 本酵素は超遠心的およびセルロースアセテート片による電気泳動的に均一の標品として得られた。
3. アミラーゼ活性および α -グルコシダーゼ活性の熱および酸に対する態度は同一であり、最適 pH 4.6, 最適温度 55°C においても一致した。
4. 本酵素はイソマルトース、イソマルトトリオース、

パノースの α -1,6 結合を分解し得るが、可溶性でんぷん、アミロース、アミロペクチン、 β -リミットデキストリン、グリコーゲンなどの多糖類の100%の分解は得られなかった。

5. 本酵素のマルトース、マルトトリオース、マルトテトラオースに対する K_m はそれぞれ、 $5.2 \times 10^{-3} M$ 、 $1.6 \times 10^{-3} M$ 、 $5.0 \times 10^{-3} M$ であった。

6. マルトースとでんぷんに対する初速の比は1:2ででんぷんに対する活性の方が大きかった。

7. 本酵素を最終濃度2.5%マルトースと反応させた場合、糖転移生成物として、初期にはマルトトリオース、パノース、後期においてはイソマルトース、パノースが検出された。

8. 本酵素は $2 \times 10^{-3} M$ の PCMB によりほぼ完全に活性を阻害されるが、過剰のシステインにより90%の活性の回復が見られた。EDTAによる失活もしくは阻害はほとんど起らなかった。

本研究にあたり試料米の入手に御便宜をいただいた北海道立中央農業試験場稲作部長茅野三男氏に心から感謝の意を表します。

(本研究の要旨は既に昭和40年11月日本農芸化学会北海道支部秋季大会において発表したものである)。

文 献

- 1) BALLS, A. K., R. R. THOMPSON and M. K. WALDEN 1948. *J. Biol. Chem.* **173**: 7.
- 2) CHIBA, S. and T. SHIMOMURA 1965. *Agr. Biol. Chem.* **29**: 540.
- 3) DAHLQVIST, A. 1961. *Biochem. J.* **80**: 547.
- 4) ENGLARD, S., S. SOROF and T. P. SINGER 1951. *J. Biol. Chem.* **189**: 217.
- 5) FRENCH, O., M. L. LEVINE, J. H. PAZUR and F. NORBERG 1950. *J. Am. Chem. Soc.* **72**: 1746.
- 6) 福本寿一郎・辻阪好夫 1955. *科学と工業*, **29**: 124.
- 7) HOFMANN, E. 1935. *Biochem. Z.* **275**: 320.
- 8) ————— 1936. *ibid.* **287**: 271.
- 9) HOPKINS, R. H. and B. JELINEK 1949. *Nature*, **164**: 955.
- 10) 伊賀上郁夫・真島 進・倉沢文夫 1960. *農化誌*, **34**: 253.
- 11) 伊藤正春. *デンプンハンドブック* (朝倉書店), 278頁.
- 12) JØRGENSEN, O. B. 1963. *Acta Chem. Scand.* **17**: 1765.
- 13) ————— 1964. *ibid.* **18**: 53.
- 14) 春日井愛子 1967. 私信.
- 15) 北原覚雄・久留島通俊 1949. *醸工*, **213**: 254.
- 16) 小林達吉・田端武士 1954. *農化誌*, **28**: 171.
- 17) MEYER, K. H., P. BERNFELD, R. A. BOISSONNAS, P. GÜRTLER and G. NOELTING 1949. *J. Phys. Colloid. Chem.* **53**: 319.
- 18) —————, E. H. FISCHER and A. PIQUET 1951. *Helv. Chim. Acta.* **34**: 316.
- 19) —————, P. F. SPAHR and E. H. FISHER. 1953. *ibid.* **36**: 1924.
- 20) NELSON, N. J. 1944. *J. Biol. Chem.* **153**: 375.
- 21) 岡崎 浩 1954. *農化誌*, **28**: 48, 51.
- 22) ————— 1955. 同上, **29**: 273.
- 23) ————— 1958. 同上, **32**: 316.
- 24) ONO, S. and K. HIROUMI 1964. *J. Biochem.* **55**: 315.
- 25) PHILLIPS, L. L. and M. L. CALDWELL 1950. *J. Am. Chem. Soc.* **73**: 3559, 3563.
- 26) PIQUET, A. and E. H. FISHER 1952. *Helv. Chim. Acta.* **35**: 257.
- 27) SCHWIMMER, S. and A. K. BALLS 1948. *J. Biol. Chem.* **176**: 465.
- 28) —————, 1949. *ibid.* **179**: 1063.
- 29) 下村得治・高橋美帆 1967. 日本農芸化学会昭和42年度大会講演要旨集, 133頁.
- 30) WEIL, C. W. and M. L. CALDWELL 1954. *J. Am. Chem. Soc.* **67**: 212, 214.
- 31) 山岸五平 1938. *農化誌*, **14**: 1001.
- 32) ————— 1942. 同上 **18**: 1082.

Summary

Amylase preparation purified from ungerminated rice (SHINSETSU), which was ultracentrifugally and paper-electrophoretically homogeneous, produced only glucose upon hydrolysis of starch and at the same time showed strong α -glucosidase activity. Any attempt to separate these two enzymic activities into respective single activity by acid- or heat-treatment was unsuccessful and the same optimal pH (4.6) and optimal temperature (55°C) were observed for both amylase- and α -glucosidase-activities. These experimental results show that both enzymic activities are due to a single enzyme, that is, so-called glucoamylase.

The paper-chromatographical examination of the behavior of present enzyme toward oligosaccharides containing α -1,6 glucosidic linkage indicated the cleavage of isomaltose to glucose, isomaltotriose to glucose and isomaltose, and panose to glucose via the most probable formation of maltose. Under the

experimental conditions adopted, complete hydrolysis of soluble starch, amylose, amylopectin, β -limit dextrin and glycogen was not attained. The degree of hydrolysis is as follows: soluble starch, 80.3%; amylose, 70.9%; amylopectin, 82.8%; β -limit dextrin, 68.4%; glycogen, 68.4%. The initial rate of hydrolysis of polysaccharides decreased in following order: amylose, soluble starch, amylopectin, glycogen and β -limit dextrin.

K_m value for maltose, maltotriose and malto-

tetraose was 5.2×10^{-3} , 1.6×10^{-3} and 5.0×10^{-3} , respectively.

Transglucosidation action was observed when present enzyme was incubated in 2.5% maltose solution. As transglucosidation product, maltotriose and panose were clearly detected in the initial stage of reaction and isomaltose and panose, in the latter stage.

Inhibition experiments with PCMB showed that present amylase is sulfhydryl enzyme.