

そばのアミラーゼの性状について

羽田 正義^{*}・山岸恵美子^{**}

アミラーゼは、初め R, Kuhn¹⁾ によりその分解生成物の旋光性にもとづいて α -アミラーゼと β -アミラーゼに分類されたが、その後 Ohlsson²⁾ は麦芽アミラーゼにおいては α -アミラーゼと液化型アミラーゼ及び β -アミラーゼと糖化型アミラーゼとは同一のものであることを認めた。それ以来一般に α -アミラーゼ=液化型アミラーゼ、 β -アミラーゼ=糖化型アミラーゼとして扱われてきたが、近年アミラーゼのデンプン分解型式についての研究が進んだ結果、両酵素をそれぞれ同一の酵素として混用することは妥当でないとの見解も生じ³⁾、またアミラーゼは単純に α -、と β -型(液化型と糖化型)の2種に分類するのみでは不十分であって、その起源の異なるにしたがいそれぞれの性質を異にする(液化力と糖化力の相対的比率が異なる)ものであること等が確認されるにいたった⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾。

特に岡崎により認められた糸状菌の α -、 β -アミラーゼ及びマルターゼには、酸処理により不活性化されるもの(非抵抗性)と不活性化されぬもの(抵抗性)の2種の存在することは興味がある。

われわれは、そばのアミラーゼについてその一般的性状を明らかにするとともに、その作用様式に以上の如き傾向が認められるか否かを検討した結果2-3の知見を得たので報告することとした。

なおアミラーゼの性質が異なるにしたがい、分類方式や名称もそれぞれ異なるべきであるが、現在では混乱状態のままになっており、名称について1、2の提案³⁾がなされているにすぎない。

しかしわれわれは従来の慣習にしたがい、ヨード反応により追跡した酵素を α -アミラーゼ、その作用を生成還元糖の量で測定した酵素を β -アミラーゼとして表現した。

実 験

1. 酵素液の調製

* 生活科学担当 ** 生活科学助手

ソバの種子を麦芽の製法に準じて発芽させ、緑芽のまま少量の水を加えてミキサーで十分磨砕する。このものをトルオールを加えて3時間振とうした後更に1夜氷室に放置して十分酵素を抽出する。ついで布でしぼり更に遠心分離して沈殿を除く。上澄液を2N酢酸、2Nアンモニア水を用いてpH6.0に補正した後加熱して60°Cに達した時直に流水で急冷し生成した沈殿を汙別する。汙液にその $\frac{1}{5}$ 容の5%タンニン溶液を滴加しつつ攪拌して酵素を沈殿せしめ、遠心分離して上澄液を除く。この操作で酵素はほとんど完全に沈殿するが、この際pHは6附近でないと沈殿の生成量が少ない。沈殿は更にアセトン・エーテル法で処理した後真空乾燥すると強力な酵素標品が得られる。このものを適宜水で希釈して実験に供する。

なお酵素は上記の乾燥標品以外に、抽出原液を単に透析したのみのもの及び未発芽種子の粉末から調製した乾燥酵素等も一部使用したが、それはそのつど示した。

2. 2%デン粉液の調製

可溶性デン粉(武田製)2gを精秤し、少量の水を加えて乳液とし、これに約50ccの煮沸水を注いで溶解せしめ、更に3分間煮沸した後冷却しメスコルベンにて正しく100ccとする。トルオールを加え氷室に貯える。

3. 緩衝液の調製

$\frac{N}{10}$ 酢酸塩緩衝液(pH4.8)を使用した。最適pHの測定には $\frac{N}{10}$ 酢酸塩緩衝液(pH3~5.5)とリン酸塩緩衝液(pH6~7)を用いた。

4. 測定法

(1) 分解度(糖化力) 作用混液を一定時間ごとに1cc(還元糖を添加した場合は0.5cc)ずつ取り、生成還元糖をSchaffer-Hartmann微量定量法によって定量し、グルコース(mg)として算出しこれより分解度%を求めた。

なおアミラーゼによるデン粉分解反応は約20~40%分解の範囲では大体1分子反応の型をとるので、速度恒数Kは次式によって求めた。

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$$

t = 反応時間, a = 反応前の基質量, x = t時間に分解された基質量

(2) ヨードデン粉反応 細目の試験管に2ccの蒸留水と $\frac{N}{1000}$ ヨード・ヨードカリ液を2

滴滴加したものを準備しておき、これに一定時間ごとに作用混液0.5ccをとって注加しその呈色を見た。

結 果 と 考 察

1. 作用様式から見たソバアミラーゼの型

一般に α -アミラーゼは耐酸性が小さく耐熱性の大きなこと、また反対に β -アミラーゼは耐酸性は大にして耐熱性の小なることが知られている。したがって Ohlsson の行ったように熱処理もしくは酸処理を施すことによって両アミラーゼを分別することも可能である。いいかえれば、酸もしくは熱処理の前後においてヨードデン粉反応と、その時におけるデン粉分解度との間に相対的な変化が見られるか否かによって、その起源には α -, β -両アミラーゼが存在するか、または α -アミラーゼと β -アミラーゼのいずれか一方がそれぞれ単独に存在するかどうか分かる。

表1に示したようにソバにおいては、酸処理及び熱処理の前後におけるヨードデン粉反応と、その時のデン粉分解度を比較するに両者の間に明らかな相違が見られるので、 α -, β -両アミラーゼの混合型であることが認められる。すなわち無処理に比較して熱処理を施したものの分解度は、ヨードデン粉反応の速度よりも著しく劣るし、反対に酸処理のものは分解度に比しヨードデン粉反応の進み方が著しく遅くなっている。

ヨード反応	青	青 紫	紫	赤 紫	赤	橙	黄 橙	無 色
無 処 理	—	15.9	27.0	—	51.7	71.7	73.2	77.5
* 熱 処 理	—	11.4	—	22.8	30.6	38.1	—	41.3

ヨード反応	青	青	青	青	青	青	青	
**酸 処 理	12.9	17.7	21.3	27.6	33.0	42.2	48.5	

数字はデン粉分解度%を示す。

表1 熱処理および酸処理によるアミラーゼ作用の変化

反応条件

2%可溶性デン粉液	4	} 30°±0.1
0.1N酢酸塩緩衝液 (pH4.8)	2	
水	1	
酵素液	1	
	1	

* pH6.0, 65°Cで15分加熱。

** pH3.0, 10°C, 1時間処理後pH6.0に補正。

なお、本実験に使用した酵素液は、緑芽をミキサーで磨砕した後3時間振とう抽出を行い、布でしぼり、汙過し更に3日間流水で透析したものである。しかも透析により生成された沈殿を除くと、上澄液の β -アミラーゼの作用力が弱まり α -アミラーゼとの相対的作用比にかなりの差異を生ずるので、沈殿と上澄液とは敢て汙別しなかった。

2. 耐酸性の強弱から見たソバアミラーゼの型

岡崎⁴⁾は、糸状菌の α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ及びマルターゼには酸処理で不活性化される型（非抵抗性）と、不活性化されない型（抵抗性）の2種があることを報告しており、このことは従来知られなかった新しい知見にして非常に興味深い問題なので、ソバのアミラーゼにもかかる性質や型があるか否かを検討してみた。

その結果は、図1に見られるとおりpH3.0、10°Cで1時間処理したものは、ヨードデン粉反応の消失力すなわち α -アミラーゼ作用をほとんど完全に消失しているにもかかわらず、いまだ相当強力なデン粉分解力すなわち β -アミラーゼ作用を残している。したがってソバアミラーゼは耐酸性の大なる（低抗性） β -アミラーゼを主体として、これに耐酸性の小なる（非抵抗性） α -アミラーゼの少量を共存する型に属するものと認められる。

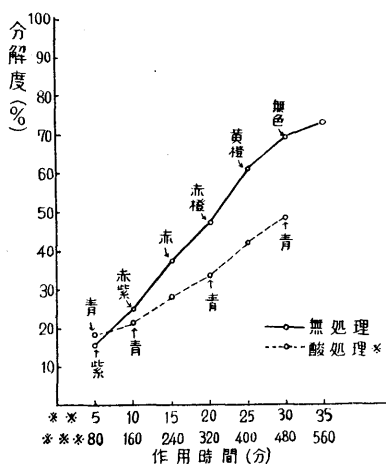


図1 無処理および酸処理酵素液におけるデン粉分解反応

反応条件

2%可溶性デン粉液	4
0.1N酢酸緩衝液 (pH4.8)	2
水	1
0.5%酵素液	1

30°±0.1

* 酸処理に用いた0.5%酵素液は、1%の酵素原液をpH3.0、10°Cで1時間処理後、pH6.0に補正し水を加えて2倍に希釈して調製した。

** 無処理の作用時間（5分間隔）

*** 酸処理の作用時間（80分間隔）

3. 最適水素イオン濃度

酵素原液に熱もしくは酸処理を施し、それぞれ耐熱性のもの（ α -アミラーゼ）と耐酸性のもの（ β -アミラーゼ）とに分けて、そのおのおのにつき最適pHを測定してみた。

（図2,3,4）

それによると、 α -アミラーゼの最適pHは4.5～5.0附近にあり、 β -アミラーゼのそ

れは4.0附近にあるようである。しかも α -アミラーゼの場合はかなり活性範囲が広く、 β -アミラーゼの場合は酸性側に片寄った狭い活性範囲をもっているようである。

また、熱処理アミラーゼのpH別分解度曲線は無処理のそれとほとんど同一の傾向を示しているが、これはソバアミラーゼの耐熱性が小なるため、極端な熱処理が出来ないことからかなりの β -アミラーゼが残存して作用しているためと考えられる。

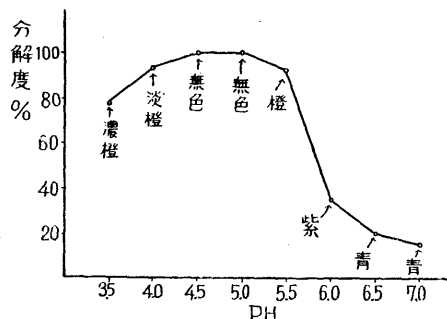


図2 無処理アミラーゼのpH別分解度曲線

反応条件

2%可溶性デンプ粉液	2	} 30°±0.1,
0.1N酢酸塩緩衝液(pH4.8)	1	
0.5%酵素液	1	
		15分作用

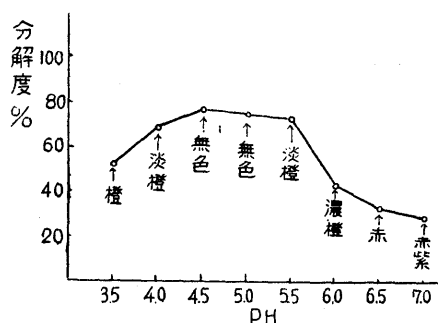


図3 *熱処理アミラーゼ(α -)のpH別分解度曲線

反応条件

2%可溶性デンプ粉液	2	} 30°±0.1,
0.1N酢酸塩緩衝液(pH4.8)	1	
2%酵素液	1	
		135分作用

* 2%酵素液をpH6.0, 70°Cで15分加熱

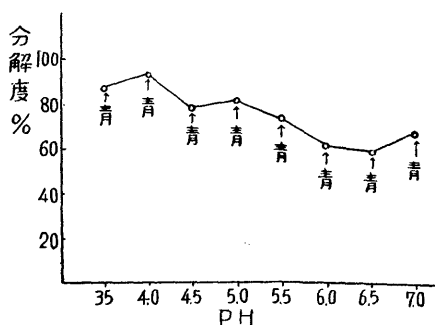


図4 *酸処理アミラーゼ(β -)のpH別分解度曲線

反応条件

2%可溶性デンプ粉液	2	} 30°±0.1,
0.1N酢酸塩緩衝液(pH4.8)	1	
2%酵素液	1	
		210分作用

* 4%の酵素原液をpH3.0, 10°Cで1時間処理後、pH6.0に補正し、更に水を加えて2倍に希釈し2%酵素液を調製した。

4. マルトース及びグルコースのソバアミラーゼに対する阻害作用

アミラーゼによるデンプ粉分解生成物(グルコース, マルトース, 低分子デキストリン)

は一般にアミラーゼ作用を阻害する傾向のあることが報告されており、しかも阻害の様式や度合はアミラーゼ及び糖の種類によってかなりの相違が見られる。⁶⁾⁸⁾

よってソバの無処理アミラーゼ(α —, β —混溶)についても同様の傾向が見られるか否かを検討してみた。その結果図5に示すとおり、6%マルトースは明らかにデン粉糖化作用を阻害し、しかも作用時間の経過とともに漸次阻害度を増す傾向が見られた。しかしヨードデン粉反応に対する阻害作用は著しくなく、2%グルコースを添加した場合のそれとほとんど同一である。一方グルコース添加の場合の分解度曲線は対照のそれとほとんど変化がなく、このことはマルトースによりソバアミラーゼが阻害を受ける度合は α —よりも β —の方が一層顕著であることを意味するものである。

また福本⁶⁾が細菌アミラーゼについて観察したように、分解反応の末期においてはマルトースの阻害度が減少するか否かはソバアミラーゼでは明らかでなかった。

反応条件

2%可溶性デン粉液	4	} 30°±0.1
0.1N酢酸緩衝液(pH4.8)	2	
水(又は2%グルコース, 6%マルトース)	1	
	1	
0.25%酵素液	1	

* グルコース及びマルトースはそれぞれ盲検を行い数値を補正した。マルトースの盲検は時間ごとに行った。

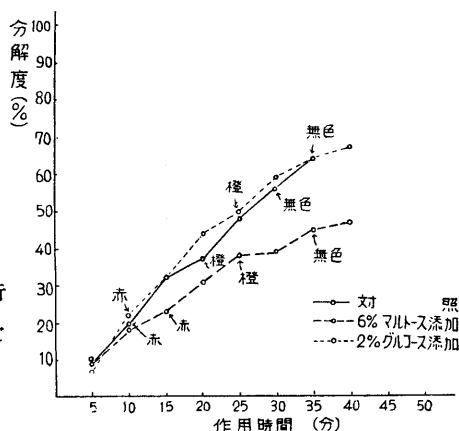


図5 * マルトースおよびグルコース阻害の経時の変化

また添加するマルトースとグルコースの濃度を変えてみて、 α —アミラーゼに対する阻害度をヨードデン粉反応による定性的な観察で検したところ、いずれも対称に比較して明

表2 濃度の異なるマルトースおよびグルコースの阻害によるヨードデン粉反応の変化

反応条件

2%可溶性デン粉液	4	} 30°±0.1
0.1N酢酸緩衝液(pH4.8)	2	
水(又はマルトース, グルコース)	1	
	1	
0.25%酵素液	1	

作用時間(分)	5	10	15	20	25	30	35	40
対 照	紫	濃赤	淡赤	橙	淡橙	無色		
マルトース 添加	6%	紫	赤紫	濃赤	淡赤	橙	淡橙	無色
	10%	紫	赤紫	濃赤	淡赤	橙	淡橙	無色
グルコース 添加	2%	紫	濃赤	淡赤	濃橙	橙	淡橙	無色
	5%	紫	濃赤	淡赤	濃橙	橙	淡橙	無色

つぎに同じく無処理酵素液 (α -, β -アミラーゼ混溶) について, デン粉分解反応が一分子反応の型をとる範囲 (分解度20~40%) でその作用比を比較したところ, 対称的作用比1に対してグルコースのそれは1.1で, 2%程度のグルコースには阻害作用は認められなかった。

表3 マルトース及びグルコースの阻害による作用比の変化

2%可溶性デンプン液	4	} 30°±
0.1N酢酸緩衝液(pH4.8)	2	
水(または6%マルトース, 2%グルコース)	1	
0.25%酵素液	1	} 0.1
	1	

グルコース及びマルトースはそれぞれ盲検を行い数値を補正した。マルトースは時間ごとに盲検を行った。

	作用時間 分	分解度 %	$K \times 10^3$	平均	作用 比
対 照	15 20	30.2(赤橙) 37.3 (橙)	10.38 10.19	10.29	1
6%マルト ース添加	15 20	23.0(濃赤) 30.8(赤橙)	7.95 8.05	8.00	0.8
2%グルコ ース添加	10 15	21.5(濃赤) 32.3(淡赤)	10.51 11.29	10.90	1.1

作用比は対照のKを1として算出した。

5. 未発芽種子及び発芽種子アミラーゼの作用力の強弱

一般にカコク類の種子は、未発芽の状態のものでは β -アミラーゼの作用が強力であるにもかかわらず、 α -アミラーゼのそれは極めて微弱かもしくはほとんど不活性であり発芽に伴って β -アミラーゼの作用が一層強力となるにしたがい α -アミラーゼの活性度も急激に上昇してくることが知られている。

われわれの観察によれば、図6に示すようにソバの無処理アミラーゼにおいても同様の傾向が見られ、未発芽種子におけるヨードゲン粉反応は24時間経過しても何等変化なく青であり、還元糖の定量では同じく24時間作用で約70%の分解を示している。これに対し発芽アミラーゼでは、例えば長芽の場合に見られるとおり、僅か30分の作用で70%、無色となっており、 α -、 β -アミラーゼともに著しく強力であることを示している。特に α -アミラーゼは発芽の伸長に伴い急速に活性化(生成)され、また β -アミラーゼ作用も一層強力となるもののようである。例えば短芽(全長5~10mm)と長芽(全長25~30mm)の

作用力を比較すると、前者において30分作用、24%、青紫であるのに対し、後者では同じく30分作用で70%、無色となっており、 α 、 β —アミラーゼ共に長芽の方が著しく強くなっていることが分る。しかも短芽ではヨードデン粉反応が赤となるのに100分を要しているのに対し、長芽では僅か15分であり、また分解度についてみても長芽ではヨードデン粉反応が赤となる点で38%程度であるのに対し、短芽では90%以上となっており、このことから β —アミラーゼに比し α —アミラーゼ作用の方が発芽の伸長に伴い一層急速に増加していることがうかがわれる。

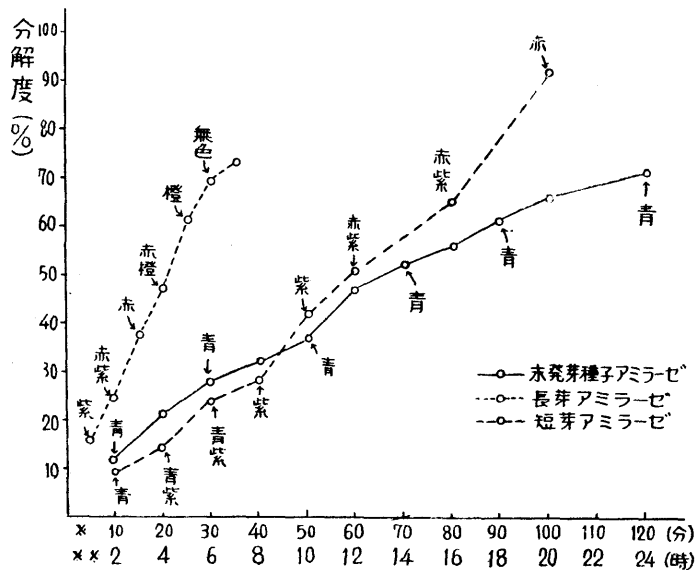


図6 未発芽および発芽種子アミラーゼの経時的な作用変化

反応条件

2%可溶性デンプ粉液	4
0.1N酢酸塩緩衝液 (pH4.8)	2
水	1
0.5%酵素液	1
	30°±0.1

また未発芽アミラーゼと発芽アミラーゼ（いずれも無処理）の作用比について検討してみると、長芽アミラーゼは未発芽アミラーゼの48倍、短芽アミラーゼは14倍の大きさを示している。さらに同じく発芽アミラーゼにおいても、長芽の方は短芽に比しその作用比が3.5倍となっており、いずれも α 、 β —混溶のアミラーゼ作用比は未発芽<短芽<長芽の順に漸次大となっていく傾向を示している。（表4）

表4 未発芽種子および発芽種子アミラーゼの作用比の変化

反応条件

2%可溶性デンプ粉液
0.1N酢酸塩緩衝液(pH4.8)
水
0.5%酵素液

4
:
2
:
1
:
1

30°C
±0.1

		作用時間 分	分解度 %	K×10 ³	平均	作用比
未発芽種子		360 720	20.6 36.2	0.28 0.27	0.28	1
	長芽	15	37.4	13.5	13.5	48.2
発芽種子	短芽	30 40	24.0 28.3	3.98 3.61	3.80	13.6

作用比は未発芽種子のKを1として算出した。

すなわち以上を要約するとソバの未発芽種子においては、 β -アミラーゼの作用のみが強力であり、 α -アミラーゼはほとんど不活性であり、また発芽の伸長に伴い α -アミラーゼが漸次活性化され、同時に β -アミラーゼも未発芽種子に比し一層強力となるもののである。

6. 透析・タンニン処理等による酵素作用力の変化

ソバの緑芽をミキサーで磨碎して酵素を振とう抽出したものについて、汙過して透明とし、流水でセロファン紙を用いて透析すると、新たに生成された沈殿部分にかなり強力な β -アミラーゼが残り、一方 α -アミラーゼは大部分上澄液に溶出されていることがわかった。つまりソバにおいては β -アミラーゼが比較的沈殿部分に吸着され易いものと考えられる。

また長芽の酵素抽出液からタンニン処理法と、アセトン・エーテル法（詳細は酵素液調製法の項参照）により調製した酵素の乾燥粉末においても、ほとんど透析の場合の濾液と同様の分解様式を示すことが認められた。（表5）

したがって透析、タンニン等の処理を施した酵素液を使用する場合は、基質デンプ粉に対するヨード反応と糖化率の相対的比率が多少対照と異なることがあるから、分解様式を検討

表5 透析もしくはタンニン処理酵素によるデンプ粉分解作用

ヨード反応		青	青紫	紫	赤紫	赤	赤橙	橙	黄橙	無色
酵素液										
透析処理酵素	汙液	—	—	18.9	22.1	38.8	—	59.6	62.0	75.7
	* 沈でん	65.3	—	98.0	—	—	—	—	—	—
	** 混合液	—	15.9	27.0	—	51.7	—	71.7	73.2	77.5
*** タンニン処理酵素		—	—	15.4	24.6	37.5	47.4	—	60.8	69.5

反応条件

2%可溶性デンプ粉液	4	} 30°±0.1
0.1N酢酸塩緩衝液(pH4.8)	2	
水	1	
酵素液	1	
	1	

* 透析により生成された沈でんをアセトン・エーテル法で乾燥粉末としたものを2%の酵素溶液として使用した。

** 沈でんを分別しないで透析した酵素液をそのまま使用した。

*** 酵素抽出液に5%タンニン溶液を $\frac{1}{5}$ 容添加して生成した沈でんをアセトン・エーテル法で乾燥粉末としたものを0.5%の酵素溶液として使用した。

尚以上の酵素はすべて緑芽からとった。

する際などはこの点に考慮を払うべきである。ただしタンニン処理による乾燥粉末は、随時所要濃度の酵素液が得られる点ではなはだ便利である。

要 約

1. ソバ芽アミラーゼは α —、 β —アミラーゼの混合型である。ただし未発芽種子には α —アミラーゼ作用はほとんど認められない。 α —アミラーゼは発芽に伴って漸次活性化(生成)され、同時に β —アミラーゼ作用も増大する。

2. ソバ芽アミラーゼは、耐酸性の大なる β —アミラーゼを主体とし、それに耐酸性の小なる α —アミラーゼの少量が共存する型に属する。

3. 最適pHは α —アミラーゼでは4.5~5.0、 β —アミラーゼでは4.0附近にある。

4. マルトースによりその作用が阻害される度合は、特に β —アミラーゼが大で α —アミラーゼは小である。しかしグルコースは α —アミラーゼに対しては、マルトースよりも若干阻害作用が大きいようである。またマルトースは高濃度のものほど α —アミラーゼに対する阻害作用が大となるのに対し、グルコースでは濃度による差異は認められなかった。

5. 透析もしくはタンニン処理は、 β —アミラーゼの作用のみをより多く弱める。

文 献

- 1) R. kuhn : Ber; 57, 1965 ; Ann;443, 1 (1925)
- 2) E. Ohlsson : Z. Physiol. Chem ; 189, 17 (1930)
- 3) 不破・二国 : 酵素化学シンポジウム, 8, 47 (1953)
- 4) 岡崎 : 〃 〃 , 1, 60 (1949)
- 5) 福本 : 〃 〃 , 7, 104(1952)
- 6) 〃 : 〃 〃 , 8, 40 (1953)
- 7) 春日井 : 家政学雑誌 Vol,3, No,4, 6(1952), 5, 322(1953), 5, 413(1954)
- 8) 福本 : 日農化, 19, 487, 634, 689, 853 (1943) ; 20, 23, 121, 309 (1944)