

# 小麦粉中の酵母致死因子による酵素 タンパク質の抽出

根 来 秀 夫

酵素は細胞でつくられ、そのあるものは細胞外に分泌、排出される。工業的に広く利用されている微生物の加水分解酵素の多くのものや、動物のいわゆる消化酵素はその代表的な例である。

しかしながら、大多数の酵素は細胞内酵素であり、分化した細胞はその組織がもつ特異な機能に応じた化学反応を主として営み、この化学反応に関与する酵素類をとくに多く含んでいる。生体内で行なわれているこの複雑な化学反応、すなわち生命現象を把握するためには、この現象を組立てている個々の単位反応を切り離して解明することが必要である。この反応は、それぞれ独立の酵素の触媒作用により営まれているものであるから、個々の酵素を単離して、それら酵素の関与する反応を明らかにすることが重要であろう。

このような酵素の生理的機能を解明する立場からも、あるいはまた、酵母インペルターゼのようないわゆる菌体内酵素を工業的に利用する場合にも、まず細胞から目的の酵素を溶離することは極めて有効な手段であり、酵素抽出手段の巧拙は重要な意味をもつものと考えられる。

細胞内に存在している酵素の中には、細胞液に溶存しているものも多数あるが、そのほか、細胞の各部位たとえば細胞核、細胞壁、原形質膜、顆粒体などに不溶性の状態で局在しているものも多い。この場合しばしば、他のタンパク質、核酸、多糖類および脂質などと Complex を形成しているが、このような multi-molecular aggregate は水あるいは稀薄な塩類溶液に不溶性の場合が多い。したがって、これらの bound enzyme を可溶性の状態に取り出すためには、通常、細胞の原形質膜の性状を変化せしめたり、または、酵素と他の物質との結合を dissociate することが必要である。

その有効な手段として、古くからいろいろの方法がとられている。その主なものをあげると次のようである。

- 1) 磨砕または加圧法
- 2) 自己消化法
- 3) 凍結・融解法
- 4) 有機溶媒（アセトンなど）処理法
- 5) 乾燥法
- 6) 超音波処理法
- 7) 浸透圧差法
- 8) Lysozyme その他細胞壁溶解酵素処理法

## 9) 界面活性剤処理法

### 10) Dithiothreitol, Mercaptoethanol などの処理法

酵素抽出源として用いられる細胞の種類、細胞破壊の難易性、あるいは目的とする酵素の安定性や細胞内における存在様式などを十分勘案した上で、それぞれ最も有効適切な手段を採用すべきである。

酵素タンパク質は一般に変性・失活しやすいものであるから、抽出操作においては、目的とする酵素の失活を起さないように注意しなければならない。なお、抽出に当っては、目的酵素の他に、不純タンパク質、多糖類などの高分子化合物が夾雑してくることが避けられない。しかもそれら不純物の排除には、かなり煩雑な操作を必要とする場合もあるので、目的酵素を能率よく溶出して、しかも不純物質の混入をでき得る限り排除するような抽出条件が望ましい。

菌体内酵素のうち、古くより最も広く利用されているものとして酵母インベルターゼがある。その抽出には、従来主として酵母細胞をトルオールなどの存在下で自己消化せしめる方法<sup>1)</sup>がとられていたが、この抽出方法では大量の試料を取り扱う場合に操作がかなり困難であり、また比較的多量の不純タンパク質や多糖類が夾雑してくる欠点があった。

著者は、酵素タンパク質と界面活性剤との相互反応、および微生物細胞に対する界面活性剤の影響について、若干研究を行なって来たが<sup>2,3)</sup>、その一つとして、酵母細胞（圧搾酵母）を *alkyldimethylbenzylammonium chloride* や *benzyldimethyl {2-[2'-(p-1,1,3,3 tetramethyl butyl phenoxy)ethoxy]-ethyl} ammonium chloride* または *dodecyltrimethylammonium chloride* などの陽イオン性界面活性剤の存在下で incubate することを試み、極めて能率よく酵母インベルターゼを抽出し得ることを知った<sup>4,5)</sup>

この方法による時は、トルオール自己消化法の場合に比し、インベルターゼの抽出が促進され、またその溶出量も大となる。また、採取されたインベルターゼ液のタンパクおよび糖 1mg 当りの活性はトルオール自己消化液のそれに比して大となり、夾雑物の少ない比較的純度の高いものが得られるので、その後の精製操作が容易になる。

また、酵母の細胞塊が容易に液状となるので、大量の物量を楽に取り扱うことができる。

陽イオン性の界面活性剤が酵母細胞から、インベルターゼの抽出を促進する機構に、かなり複雑な因子がからみあっていることが推察されるが、圧搾酵母に、少量の陽イオン性界面活性剤液を加えることによって、パンの dough に近い固さのものが、ほとんど瞬間的に液状となり、原形質膜の破壊状態がみられ、また細胞はメチレンブルーで染色されるようになる。これらの諸事実より、酵母生細胞は界面活性剤の処理により多大の損傷をうけて死滅することが明らかである。

一方、これらの研究とは別に、著者は酵母生細胞に対する天然物質とくに食品成分の影響について研究中、小麦粉水抽出液が酵母生細胞を死滅せしめ、かつ顕著な発酵阻害作用を示すことを知り、その阻害因子を分別精製し、また阻害機構について検討を加えた<sup>6)</sup>。

この小麦粉より分離した因子は、酵母生細胞を死滅させると共に、細胞内からタンパク質、多糖類、ヌクレオチド、リン酸などを溶離させる作用が顕著である。このような性質は、既述

の陽イオン性界面活性剤の機能とよく近似している。

そこで著者は、小麦粉中の酵母致死因子によるインベルターゼの抽出について、界面活性剤処理法および自己消化法と比較対照しつつ検討を加えた結果、かなり良好な結果を収めた<sup>7-9)</sup>。

以下その実験的事実を述べながら、この抽出法を適用するに当たっての2, 3の問題点について解説したい。

### 1. 小麦粉水抽出液による酵母インベルターゼの溶出

小麦粉（イーグル）の4倍水抽出液（透析内液）を压榨酵母に加えて、30°Cにincubateして、細胞外に溶離されるインベルターゼ量を経時的に測定した結果の一例を示せば Fig. 1 の如くである。

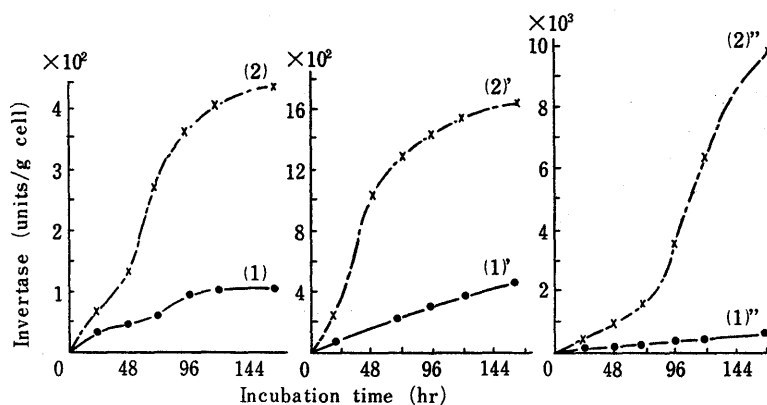


Fig. 1. Release of yeast invertase by aqueous extract of wheat flour.

- (1) Oriental yeast (water)
- (2) Oriental yeast (flour extract)
- (1)' Daiya yeast (water)
- (2)' Daiya yeast (flour extract)
- (1)'' Kaneka blue yeast (water)
- (2)'' Kaneka blue yeast (flour extract)

また、Fig. 2 はオリエンタルドライイーストから、同様に抽出を行なった一例である。

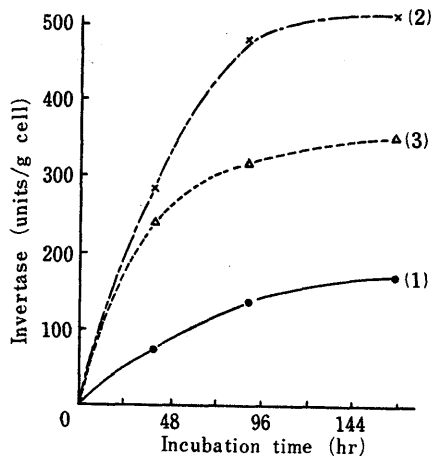


Fig. 2. Extraction of invertase from dry yeast.

- (1) Water
- (2) Flour extract
- (3) 2% Alkyldimethylbenzylammonium chloride solution

いずれの場合にも、インベルターゼは極めて能率よく抽出されていることが認められる。この各実験において、供試酵母の種類によって、採取されるインベルターゼ量に顕著な差異が認められるが、これはそれぞれの酵母に対する抽出因子の効果が相違するためではなく、各酵母中のインベルターゼ量が本質的に異なるためである。

**Table 1** に示す如く、小麦粉の種類によってインベルターゼ抽出効果に差がある。小麦粉の漂白操作は抽出因子に対してほとんど影響を与えない。また、ライ麦中にもインベルターゼ抽出因子の含まれていることが認められた。

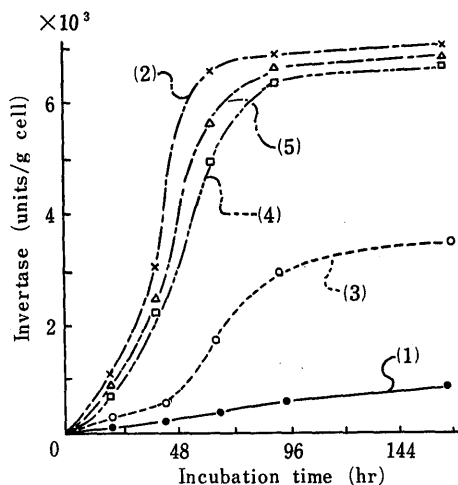
**Table 1.** Invertase-releasing activities of aqueous extracts from various kinds of wheat flours.

Agent for extraction	Invertase activity (units per g cell)	Relative activity
Water	4,830	1
Extract of Milling	10,890	2.25
Extract of Mighty	10,380	2.14
Extract of Pilot	10,950	2.27
Extract of Kyokuba	10,810	2.24
Extract of Kyokuba (unbleached)	10,880	2.25
Extract of Ocean (unbleached)	9,240	1.91
Extract of Pellican (unbleached)	5,400	1.12
Extract of Mon Paris	7,070	1.46
Extract of Kabuto Masamune	6,800	1.41
Extract of Flower	10,910	2.26
Extract of Violet	10,230	2.12
Extract of rye flour	10,230	2.12

The mixture of 20 g yeast (Kaneka blue yeast) and 60 ml of flour extract (1:4) was incubated at 30°C for 120 hr. A small amount of toluene was added to the mixture.

## 2. 抽出因子の精製

次に抽出因子の分別精製を試みた一例を示す。**Fig. 3** は小麦粉の水抽出液より硫酸アンモ



**Fig. 3.** Fractionation of the factor with ammonium sulfate.

- (1) Water
- (2) Flour extract
- (3) Fraction precipitated with 30% saturation of ammonium sulfate
- (4) Fraction precipitated with 50% saturation of ammonium sulfate
- (5) Fraction precipitated with 70% saturation of ammonium sulfate

ニウムで分画した結果であり、本因子は30%飽和ではあまり沈殿されないが、50%あるいは70%飽和で、ほぼ完全に塩析されることが明らかとなった。

Fig. 4 は硫酸アンモニウム70%飽和で塩析した区分を透析後、エチルアルコールで分画沈殿した操作法を示した一例であり、Fig. 5 はこの方法で精製した区分のインベルターゼ抽出効果を示した一例である。

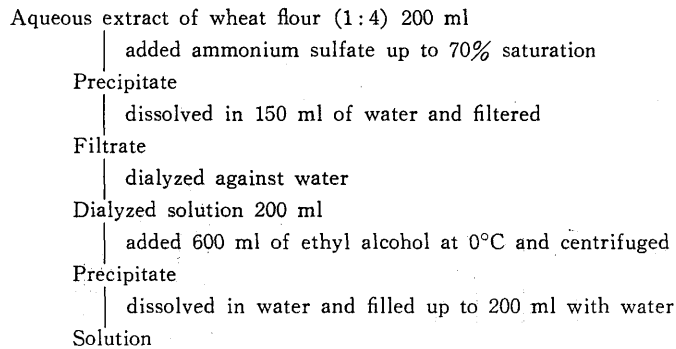


Fig. 4. Fractionation of the factor with ammonium sulfate and ethyl alcohol.

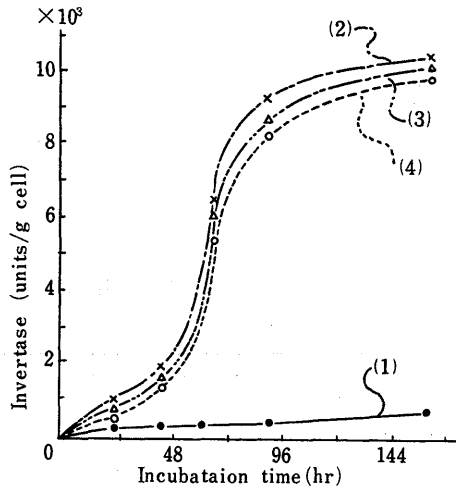
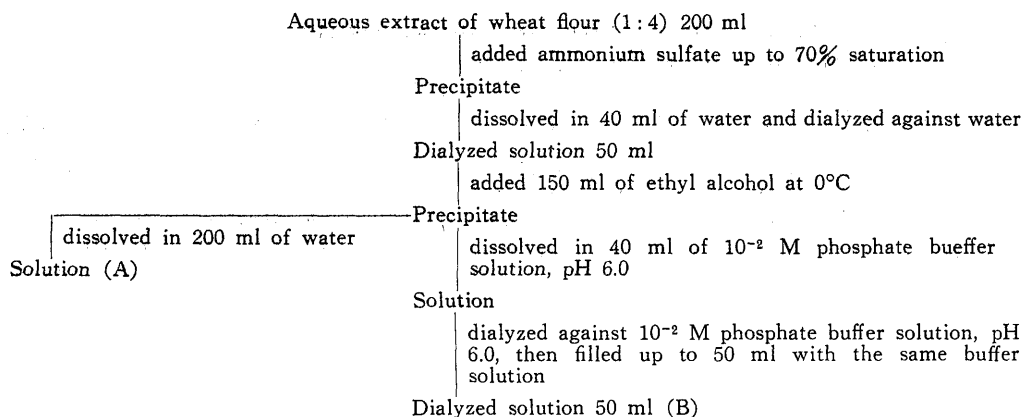


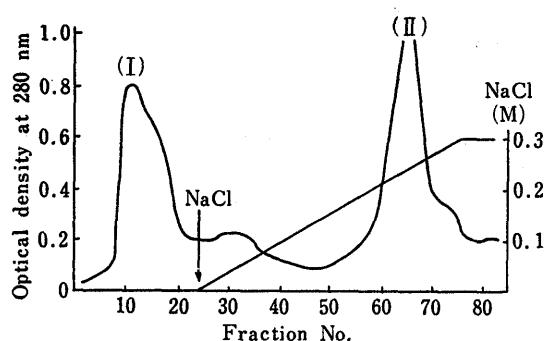
Fig. 5. Invertase-releasing activity of the factor fractionated with ammonium sulfate and ethyl alcohol.

- (1) Water
- (2) Flour extract
- (3) Fraction precipitated with 70% saturation of ammonium sulfate
- (4) Factor fractionated with ammonium sulfate followed by precipitation with 75% ethyl alcohol

さらにこの区分から、SE-Sephadex C-50 カラムクロマトグラフィーにより分別を試みた。その一例を示せば Fig. 6 および Fig. 7 の如くである。



**Fig. 6.** Preparation of the factor solution for charging on SE-Sephadex C-50 column.



**Fig. 7.** Separation of the factor by SE-Sephadex C-50 column chromatography.

**Table 2** はカラムクロマトグラフィーで得られた各区分のインベルターゼ抽出効果を見た一例であり、この結果、**Fig. 7** の peak II はインベルターゼ抽出作用を示すが peak I はほとんどその作用のないことが明らかとなった。

**Table 2.** Invertase-releasing activities of the fractions separated by SE-Sephadex C-50 column

Agent for extraction	Invertase activity (units per g cell)	Relative activity (%)
Charged factor solution	4,350	100
Fraction of peak I	1,280	29.4
Fraction of peak II	2,365	54.5
Water	1,110	25.3

**Fig. 8** は peak I および peak II の紫外外部吸収スペクトルを示したもので、いずれも 280 nm に極大を示している。

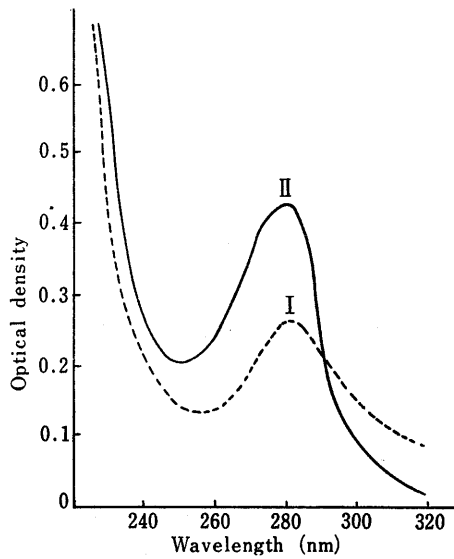


Fig. 8. Absorption spectra of the purified factors.

### 3. 精製抽出因子の諸性質

#### i) 耐熱性

Fig. 9 に本因子の耐熱性を示す。インベルターゼの抽出効果は加熱温度の上昇に伴い低下するが、100°C、10分間の加熱でもなおいくぶんその作用を保有している。

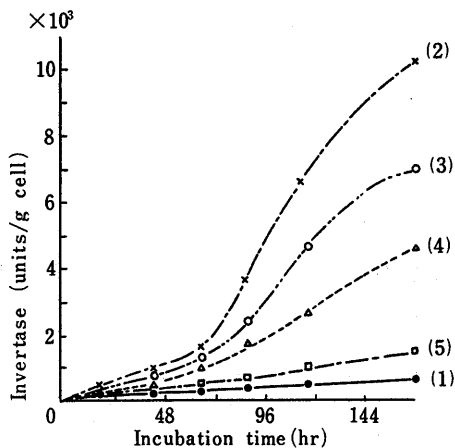


Fig. 9. Stability of the factor to heat.

- (1) Water
- (2) Untreated factor
- (3) Factor treated at 60°C for 10 min
- (4) Factor treated at 80°C for 10 min
- (5) Factor treated at 100°C for 10 min

#### ii) pH と安定性

各 pH において本因子を処理し、純水に対し透析後、透析内液についてインベルターゼ抽出効果を見ると Table 3 の如くであり、本因子は pH2 以下の酸性および pH11 以上のアルカリ側で失活することが認められた。

**Table 3. Stability of the factor to pH.**

Agent for extraction	Invertase activity (units per g cell)	Relative activity (%)
Water	1,400	19
Untreated factor	7,500	100
Factor treated at pH 2.0	4,050	55
Factor treated at pH 3.5	5,400	72
Factor treated at pH 7.0	7,100	95
Factor treated at pH 10.0	6,600	88
Factor treated at pH 11.5	2,200	29

Invertase activities were assayed with the supernatants obtained from suspensions incubated at 30°C for 120 hr.

### iii) 尿素処理に対する安定性

次に本因子の尿素に対する安定性次に本因子の尿素に対する安定性について検討した。すなわち、抽出因子に尿素をそれぞれ、2, 4, 6, および8モルになる如く配合し、30°Cに2hr処理した後透析し、透析内液についてインベルターゼ抽出効果をみた一例は **Table 4** の如くである。

**Table 4. Stability of the factor to urea.**

Agent for extraction	Invertase activity (units per g cell)		
	48 h	72 h	96 h
Water	1,100	1,700	2,400
Untreated factor	2,500	4,600	8,600
Factor treated with 2M urea	1,800	4,200	8,200
Factor treated with 4M urea	1,500	3,500	6,200
Factor treated with 6M urea	720	1,500	1,800
Factor treated with 8M urea	650	1,300	1,800

この結果、本抽出因子は高濃度の尿素で処理することにより、失活することが明らかとなった。

### 4. 抽出因子と酵母細胞との反応

次に本因子と酵母細胞との反応様式について若干検討を加えた。

本因子は強力な酵母致死作用を有し、その効果は殺菌剤として知られている陽イオン性界面活性剤と同等またはそれ以上である。**Table 5** にその一例を示す。

**Table 5. Death of native yeast cells caused by the factor.**

Treatment	Survival (%)
None	85
Water 60 ml	85
Factor solution (0.12 mg protein/ml) 60 ml	25
Alkyldimethylbenzylammonium chloride (0.3%) 60 ml	28
Toluene 5 ml	5

Twenty grams of the pressed yeast were incubated with each solution at 30°C for 2 hr.



また生細胞の死滅に伴ってインペルターゼが溶離されると共に、細細胞内からタンパク質、炭水化物およびヌクレオチド類が溶出されてくる。その一例を示せば Fig. 10 の如くである。

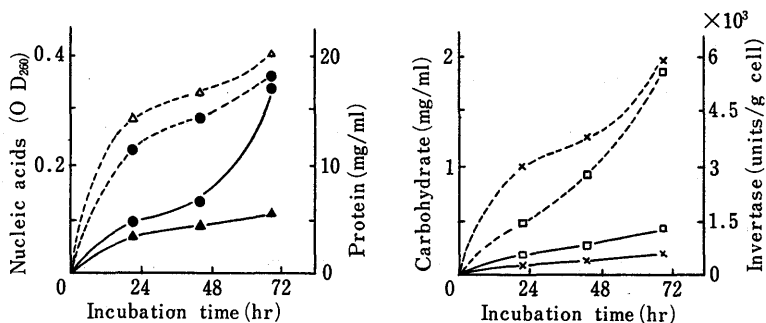


Fig. 10. Release of cell components and invertase by the factor.

Experimental conditions are given in the text. Optical densities were estimated with the supernatants diluted 150 times with water.

●—● Nucleic acids (OD<sub>260</sub>) (control), ×—× Carbohydrate content (control), ●...● Nucleic acids (OD<sub>260</sub>) (factor), ×...× Carbohydrate content (factor), ▲—▲ Protein content (control), □—□ Invertase activity (control), ▲...▲ Protein content (factor), □...□ Invertase activity (factor).

さきにも述べた如く、陽イオン性の界面活性剤もこれとほぼ同様の作用を示すが、界面活性剤と本抽出因子の酵母生細胞に対するアタックの様式に顕著な相違が観察される。

すなわち、少量の界面活性剤 (0.2~0.3%) を圧搾酵母に添加すると、酵母塊がほとんど瞬間的に液状となるのに対して、本因子を加えた場合にはかかる現象は全くみられず、かえって、細胞懸濁液の凝集を促進する傾向がみられる。

以上のように、酵母生細胞は本因子によって著しい損傷をうけることが明らかとなった。そこで次に、生細胞を本因子で短時間前処理した後水洗したものについて、因子無添加の条件で incubate することを試みた。

その一例を示せば Table 6 の如くなり、前処理操作をうけた細胞は因子の存在なしに、極めて容易に、細胞外にインペルターゼおよび細胞内成分を溶離することが認められた。なお、細胞と因子との相互反応は細胞成分の遊離反応に比し、極めてすみやかに進行することが明らかとなった。

Table 6. Release of cell components and invertase by pretreatment with the factor.

Pretreatment agent	Protein released (mg/ml)	Carbohydrate released (mg/ml)	Invertase activity (units/g cell)
Water	3.8	0.24	1,200
Factor	18.6	2.1	5,700

Mixtures of 10 g of pressed yeast and 30 ml of the factor solution (0.12 mg protein/ml) or water as a control were incubated at 30°C for 2 hr. The cells were collected by centrifugation, washed with water, and suspended in a total volume of 38 ml in water. After incubation at 30°C for 60 hr, released substances were assayed.

このように、本因子が酵母細胞をアタックする機構としてかなり複雑な過程が考えられる。

Alper ら<sup>10)</sup> および Ottolenghi<sup>11)</sup> らは牛血清アルブミンあるいはリボヌクレアーゼが酵母細胞の plasmalemma に結合されることを示し、また岡田ら<sup>12)</sup>は小麦から分離した Purothionin A が、酵母細胞膜のリン脂質に結合することを報告している。

本因子による酵母細胞損傷の第一段階として、まず因子の細胞に対する結合の可能性が考えられた。そこで、この点を明らかにするために、著者は因子の水溶液を種々の量の酵母細胞と共に、0°C で予め 2 h incubate した後遠心分離し、得られた上澄についてインベルターゼ抽出効果をしらべた。

その結果は Table 7 の如くであり、高濃度の細胞と共に preincubation することによって、最初保有していた因子のインベルターゼ抽出作用はほとんど失われることが明らかとなった。この事実は本因子が酵母細胞に吸着あるいは結合することを示唆するものと思われる。

**Table 7.** Binding of the factor to native cells.

Amount of cells in preincubation (g)	Invertase activity released (units/g cell)
0.64	7,200
3.2	6,200
6.4	1,700
16	1,600
Water 60 ml	1,200
Control	8,700

Various amounts of cells (40 ml) were preincubated with 40 ml of the factor (0.24 mg protein/ml) at 0°C for 2 hr and centrifuged.

Fresh yeast cells (20 g) were suspended in 60 ml of the above supernatant (or water) and incubated at 30°C for 96 hr. Invertase activity released was assayed.

**Table 8.** Effect of pH on the preincubation of cells.

pH of preincubation	Factor	Invertase activity released (units/g cell)
3.0	-	500
	+	4,700
4.0	-	2,200
	+	5,200
5.0	-	2,600
	+	5,400
6.0	-	1,800
	+	5,400
7.0	-	500
	+	4,900

Twenty grams of yeast was mixed with 60 ml of the factor (0.12 mg protein/ml), and the suspension was adjusted to indicated pH, preincubated at 30°C for 2 hr, and centrifuged. The above cells were suspended in 30 ml of water, mixed with 30 ml of water or the factor (0.24 mg protein/ml), and incubated at 30°C for 72 hr.

次に、この細胞と因子の interaction に対する pH の影響を吟味した。すなわち、生細胞を種々の pH で因子と共に preincubate し、水洗後水および因子溶液に懸濁して、インベルターゼ溶出量を比較した。その一例は Table 8 の如くであり、本因子は、pH 4~6 の間で生細胞をアタックする作用の顕著なことが知られた。

#### 5. 因子の作用に対する NaCl および MgSO<sub>4</sub> の影響

佐藤ら<sup>13)</sup> および著者<sup>6)</sup> は小麦粉水抽出液の発酵阻害作用は NaCl または MgSO<sub>4</sub> によって顕著に抑制されることを認めている。また、岡田ら<sup>12)</sup> は Purothionin A の毒作用は Ca<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> あるいは K<sup>+</sup> によって抑制されることを報告している。

そこで、これらの研究と比較対照して、本因子のインベルターゼ抽出作用に対する NaCl および MgSO<sub>4</sub> の影響を検討した。その結果を Table 9 に示す。

**Table 9.** Effect of magnesium sulfate or sodium chloride on invertase release by the factor.

Agent for extraction	Invertase activity released (units g/cell)
Water	1,100
Factor	8,700
Factor + 20 mM MgSO <sub>4</sub>	1,700
Factor + 10 mM MgSO <sub>4</sub>	2,700
Factor + 2 mM MgSO <sub>4</sub>	7,800
Factor + 400 mM NaCl	1,400
Factor + 200 mM NaCl	2,600
Factor + 50 mM NaCl	7,600

Mixtures of 20 g of the pressed yeast and 60 ml of each solution with or without the factor (0.12 mg protein/ml) were incubated at 30°C for 96 hr.

この結果、本因子によるインベルターゼの抽出はこれら塩類によって、顕著に抑制されることが明らかとなった。

これらの塩類が因子の活性を抑制する機構は、細胞と因子の interaction の様式を解明する上に、極めて重要な問題である。

前述の如く、本因子は酵母生細胞を死滅させる働きをもつが、これらの塩類がこの細胞損傷

**Table 10.** Effect of magnesium sulfate on the interaction of yeast cells with the factor.

MgSO <sub>4</sub> in preincubation	MgSO <sub>4</sub> in incubation	Invertase activity released (units/g cell)
-	-	6,600
-	+	6,000
+	-	720
+	+	540

A mixture of 20 g of pressed yeast and 60 ml of the factor solution (0.12 mg protein/ml) was preincubated with or without 10 mM MgSO<sub>4</sub> at 30°C for 2 hr and washed. The pretreated cells were suspended in 60 ml of the solution with or without 10 mM MgSO<sub>4</sub> and incubated at 30°C for 96 hr.

の過程を抑制するのか、あるいはインベルターゼ溶離のプロセスに影響を及ぼしているのか。この点を確かめるために行なった実験の一例を **Table 10** に示す。

この結果、 $MgSO_4$  はインベルターゼ遊離のプロセス自体にはほとんど影響することなく、むしろ、因子と細胞の interaction を阻止していることが示唆された。さらに、この点を明確にするために、因子と細胞の結合に対する  $MgSO_4$  の影響を検討した。すなわち、因子と細胞を  $MgSO_4$  無添加および添加の系で、 $0^\circ C$  に 2 h incubate した後遠心分離し、それぞれの上澄中に残存しているインベルターゼ抽出活性を比較した。その一例を **Table 11** に示す。

**Table 11.** Inhibitory effect of magnesium sulfate on the binding of the factor to yeast cells.

$MgSO_4$ in preincubation	Invertase activity released (units/g cell)
Absent	1,200
Present	6,200

A mixture of 12 g of cells and 30 ml of the factor (0.48 mg protein/ml), totalling 45 ml, was preincubated with 15 ml of 40 mM  $MgSO_4$  (or water) at  $0^\circ C$  for 2 hr and centrifuged. The supernatant (40 ml) was dialyzed and diluted to 80 ml with water. A mixture of 20 g of cells and 60 ml of the dialyzed solution was incubated at  $30^\circ C$  for 72 hr.

この結果、塩類無添加の系で細胞と共に incubate した因子は、細胞に結合することによってその機能を消失しているが、 $MgSO_4$  共存の系で incubate した場合にはかかる現象は全くみられず、インベルターゼ抽出能は、ほぼ完全に保有されていることが判明した。

このことから、 $MgSO_4$  は因子と細胞との結合を阻止することが明らかである。

#### 6. 因子抽出法および Dithiothreitol 抽出法の比較

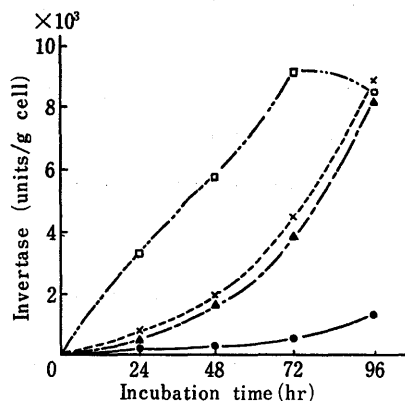
Dithiothreitol (DTT) と Phosphomannanase が酵母インベルターゼ抽出剤として有効なことは、よく知られている<sup>14-16)</sup>。

mannan-protein および glucan-protein が酵母細胞壁内層中に存在している。これらは、多分 disulphide bridge を介して結合することによって、細胞壁の構造維持に関与しているものと考えられているので<sup>17)</sup>、還元剤によってそれらを切断すると細胞壁を弱めて、インベルターゼの溶出を促進する可能性がある。

本抽出因子の細胞構造に対する反応様式を、DTT のそれと比較するため、それぞれ単独に、あるいは両者共存の系で酵母細胞を前処理したものについて、インベルターゼ抽出量を経時的に追跡した。

その一例を示せば **Fig. 11** の如くなり、DTT 前処理、因子前処理いずれの場合にも、細胞から容易にインベルターゼが抽出され、両者共存の系で前処理した場合には、一層インベルターゼの抽出が促進されることが明らかとなった。しかし、最終的に得られるインベルターゼ量は増加しない。

山本ら<sup>18)</sup> によれば、DTT は酵母細胞からマンナン層を溶出するのに有効であるといわれる。



**Fig. 11.** Effect of dithiothreitol and the factor on invertase extraction.

A mixture of 20 g of pressed yeast and 60 ml of the factor (0.12 mg protein/ml) with or without DTT (10 mM) was incubated at 30°C for 2 hr. The cells thus treated were washed with water, suspended in 60 ml of water, and incubated at 30°C.

●—● Water, ▲---▲ DTT, ×...× Factor, □-...-□ Factor+DTT.

著者は因子および DTT で前処理した細胞について、パパイインによる消化試験を試みた。その一例を示せば **Table 12** の如くなり、DTT 前処理細胞からは炭水化物が、因子前処理細胞からはタンパク区分が溶出されやすいことが確かめられた。従って因子と DTT の酵母生細胞をアタックする様式はやや異なるものと推察される。

**Table 12.** Digestion of the cells treated with the factor or dithiothreitol.

Medium	Protein released (mg) from 1 g cells	
	2 h	5 h
a	3.5	15.6
b	30.6	48.5
c	19.6	25.0
d	45.0	52.8

Medium	Carbohydrate released (mg) from 1 g cells	
	2 h	5 h
a	2.91	3.58
b	3.60	5.64
c	6.50	12.56
d	7.37	13.52

The following media (a-d) were respectively incubated at 30°C for 5 hr, then the cells were washed with water. The mixture of 8 ml of the washed cell suspension and 2 ml of 1% papain solution was incubated at pH 5.0, 30°C. The protein and the carbohydrate released from the cells were estimated with the supernatants.

- (a) Cell suspension 10 ml + water 10 ml
- (b) Cell suspension 10 ml + factor solution + water 5 ml
- (c) Cell suspension 10 ml +  $4 \times 10^{-2}$  M DTT 5 ml + water 5 ml
- (d) Cell suspension 10 ml + factor solution 5 ml +  $4 \times 10^{-2}$  M DTT 5 ml

## 7. 本因子のインベルターゼ抽出能と抽出インベルターゼの比活性

以上小麦粉より分離した酵母致死因子によるインベルターゼの抽出について、いくつかの問題点を解説したが、この因子を実際にインベルターゼの抽出に適用する場合に、工業的立場から最も重要な点は、インベルターゼの抽出効果と採取されるインベルターゼ液の比活性である。そこで従来のトルオール自己消化法、界面活性剤抽出法と比較を試みた。その一例を示せば **Table 13** の如くなる。

**Table 13.** Amounts of invertase released by various methods and their specific activities.

Agent for extraction	Invertase activity		
	(units per g cell)	(units per mg protein)	(units per mg sugar)
Water	665	17.3	38.5
Flour extract (1:4)	10,700	176	108
Fraction precipitated with 70% saturation of ammonium sulfate	11,100	227	169
Fraction separated with 70% saturation of ammonium sulfate followed by precipitation with 75% ethyl alcohol	9,760	173	158
BC*	9,250	185	123
Toluene	10,000	216	88

\*BC: Alkyldimethylbenzylammonium chloride.

この結果、本抽出法によるときは、採取されるインベルターゼ量および得られたインベルターゼ液のタンパクおよび糖 1 mg 当りの比活性も、従来の方法に比して大となり、かなり有効な手段であると考えられた。なおこの方法がインベルターゼ以外の酵母細胞内酵素の抽出に広く適用されることが期待される。

## 引 用 文 献

- 1) Colowick, S.P., Kaplan, N.P. : *Methods in Enzymology* Vol. 1 251(1955)
- 2) 根来秀夫 : *生化学* **32**, 306, 310, 316, 319, 324(1960)
- 3) 根来秀夫 : *コロイドと界面活性剤* **1**, 535(1960)
- 4) 根来秀夫, 平野幸夫, 福本寿一郎 : *科学と工業***35**, 423(1961)
- 5) 根来秀夫, 平野幸夫 : *科学と工業* **36**, 475(1962)
- 6) 根来秀夫 : *論集* **21**, 69(1974)
- 7) Negoro, H., Fuse, M. : *J. Ferment. Technol.* **51**, 887(1973)
- 8) Negoro, H. : *Abstracts Fifth International Fermentation Symposium Berlin* p. 501(1976)
- 9) Negoro, H. : *J. Ferment. Technol.* **56**, 96(1978)
- 10) Alper, R.E., Dainko, J.L., Schlenk, F. : *J. Bacteriol.*, **93**, 425(1971)
- 11) Ottolenghi, P. : *C.r. Lab. Carsberg*, **36**, 95(1967)
- 12) Okada, T., Yoshizumi H. : *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2289(1973)
- 13) 佐藤友太郎, 田中康夫 : *イースト工業会技報***27**, 47(1961)
- 14) Matsuoka, H., Yamamoto, S., Nagasaki, S. : *J. Ferment. Technol.*, **49**, 572(1971)
- 15) Somer, A., Lewis, M.J. : *J. Gen. Microbiol.*, **68**, 327(1971)

- 16) Nagasaki, S., Matsuoka, H., Yamamoto, S. : Res. Report Kochi Univ., **19**, 171(1970)
- 17) Nickerson, W. J. : Bacteriol. Rev, **27**, 305(1963)
- 18) Yamamoto, S., Nagasaki, S., Lampen, J. O. : J. Ferment. Technol., **49**, 338(1971)

原稿受理 1979年9月7日

## Summary

# Extraction of Enzymes by a Factor in Wheat Flour

Hideo Negoro

I found that aqueous extracts of wheat flours were effective in releasing invertase from yeast cells. The factor responsible for releasing invertase occurred widely in various kinds of wheat flours and also rye flours, however the amounts varied considerably owing to the different kinds of wheat flours.

The factor was first fractionated with ammonium sulfate then precipitated with ethyl alcohol and finally further purified by SE-Sephadex C-50 column chromatography. The purified factor had a maximum adsorption at 280 nm and lost some activity with heating, although a little activity was retained even after treatment at 100°C for 10 minutes. The factor was stable between pH 3.0-10.0, but labile at pH values lower than 2.0 or higher than 11.5.

The amount of invertase released from the cells by this extraction method, and also the specific activity of the resulting enzyme solution per mg carbohydrate, was a little higher than that of the extract prepared by the usual autolysis method or that of the extraction method using cationic detergents.

Invertase release by the factor was markedly inhibited by sodium chloride or magnesium sulfate. The salt did not inhibit the invertase-release system itself, but affected the mechanism of cell damage by the factor.

Invertase was readily released from dithiothreitol-treated cells as well as from factor-treated cells. Simultaneous use of both in the pretreatment process, further facilitated the invertase release.