

# 小麦のプロテアーゼについて

光 永 俊 郎

Proteases in wheat

Toshio Mitsunaga

## 1. はじめに

プロテアーゼはタンパク質あるいはペプチドに作用して、ペプチド結合を加水分解する酵素である。

このプロテアーゼに関する研究は食物の消化に関連する胃の中のペプシンや膵臓から分泌されるトリプシン、キモトリプシンの発見から始まった。その後、多くの研究者により動物のあらゆる組織や細胞の中にもそれぞれに特有のプロテアーゼが存在することが明らかにされた。また、植物組織や微生物にも存在し、その分布は極めて広いことがわかった。とくに微生物のプロテアーゼについては、最近の酵素精製技術の進歩によって急速にその利用が伸びている。

この酵素はタンパク質、ペプチドに対する加水分解作用の仕組みから、プロテイナーゼとペプチダーゼに分けられている。プロテイナーゼはタンパク質に直接作用してペプチド結合を加水分解する一群の酵素でエンドペプチダーゼともいわれている。ペプチダーゼはポリペプチドに作用して、アミノ末端あるいはカルボキシル末端のペプチド結合を加水分解する酵素でエキソペプチダーゼともいわれている。さらにプロテイナーゼは、触媒反応にその酵素分子のどのアミノ酸残基や補欠分子が直接関与しているかによって、4つのグループに分けられている。

- (1) セリンプロテイナーゼ
- (2) シスチンプロテイナーゼ
- (3) 金属プロテイナーゼ
- (4) アスパルティックプロテイナーゼ

植物起源のプロテアーゼは動物起源あるいは微生物起源のプロテアーゼほど数多く知られていないが、結晶化されているパパインをはじめとして、ブロメライン、ファイシンなどある程度精製されて、性質の調べ

られた植物プロテアーゼは十数種類ある。これらのプロテアーゼのほとんどはシスチンプロテイナーゼである。

このように植物起源のプロテアーゼについてはあまり知られておらず、とくに小麦のプロテアーゼについてはまとめられたものが極めて少ない<sup>1)2)</sup>。そこで小麦のプロテアーゼについて、小麦穀粒を中心に、(1)小麦プロテアーゼの測定法、(2)小麦のどの部分にどのような種類のプロテアーゼが分布、存在するのか。(3)どのような性質を示すのか。(4)発芽、生育時にどのように変化するのか。また、(5)小麦や小麦製品においてどのような役割を果たしているのか。を知るために最近までの研究成果をまとめた。

## 2. 小麦プロテアーゼの測定法

前述のようにプロテアーゼは酵素の働く基質の種類によって、また酵素分子の反応部位によって分類されている。しかし、プロテアーゼには厳格な基質特異性を示す酵素と極めて特異性の広い酵素があるため、その分類は非常に複雑である。また、同一のプロテアーゼでも測定法によって異なった種類として取り扱われるおそれがある。そのため小麦のプロテアーゼ活性の測定法についても検討がなされている。それらを分類すると、(1)基質分子のペプチド結合が何個開裂したか。つまり遊離アミノ基またはカルボキシル基の増加量を測定する方法<sup>6,10,11)</sup>。(2)基質タンパク質が加水分解されることにより生じた非タンパク性物質、つまり、除タンパク剤添加によって沈澱しない低分子生成物の増加量を測定する方法<sup>4,5,13)</sup>。(3)基質タンパク質の加水分解にともなう物理的ならびに化学的性質の変化を測定する方法<sup>3,7,8,9)</sup>。に大別できる。

また、基質の選択としては、構造が既知でしかも、加水分解を受ける分子中1か所しかない基質を用いる

方が測定精度があり、測定結果の解析も容易となる。このためには構造の比較的簡単な合成基質が用いられている。ことに、ペプチダーゼの研究には、合成基質の使用は不可欠である。たとえば、カルボキシペプチダーゼAの場合は、カルボベンゾキシグリシル-L-フェニルアラニン(カビペプチダーゼ)を基質として遊離するフェニルアラニンを測定し、また、ロイシニアミノペプチダーゼの場合は、L-ロイシニアミドを基質として遊離する酸をアルカリ滴定によって測定する。

Breyerら<sup>10)</sup>は、基質としてN-ベンゾイル-DL-アルギニン-P-ニトロアミドを用いたプロテアーゼ活性の測定法がプロテアーゼの熱による失活を測定するのに十分であることを示している。さらにDL型の代わりにL型を使用することによって、平均からのかたよりが±5%から±2%に減少することを明らかにした。

Prestonら<sup>12)</sup>のペプチダーゼの測定においてもカルボキシペプチダーゼは、N-カルボベンゾイル-L-フェニルアラニル-L-アラニンを基質として、また、アミノペプチダーゼの測定には、L-フェニルアラニン、L-アルギニン、L-ロイシンなどのβ-ナフチルアミドを使用している。

次に、(2)のプロテアーゼ作用によって生じた非タンパク性物質を測定する方法として、AyreとAnderson<sup>4)</sup>の方法がある。これは基質としてヘモグロビンを使用し、酵素と反応させた後、残存タンパク質をトリクロル酢酸で沈殿させ、残った可溶性窒素をケルダール法によって測定するものである。方法は改良され、ケルダール法にかえて濾過液の可溶性窒素が275nmにおける吸光度の測定により、また、マイクロケルダール法、フェノール試薬の呈色度からも測定されている。

これらヘモグロビンなどのタンパク質を基質とする方法は簡便、鋭敏であり、性質未知の酵素を取り扱う場合によい。しかし、欠点として分子中の切断を受ける結合が極めて多数でこのことは、生成する分解産物の種類を多くし、性質を複雑にし、精密な測定を困難にする。また、酵素が異なる特異性の混合物から成る場合では、結果はさらに複雑となり、単なる加水分解度の測定は場合によっては全く無意味な値しか与えないということになる。

(3)の物理的变化を測定する方法において、最も広く使用されているものは、Narthrop<sup>3)</sup>によって述べられた粘度法である。これはプロテイナーゼ活性によるゼラチン溶液の粘度の変化を測定するもので、ファリノグラフによってプロテイナーゼの効果を知ることがで

きる。

たとえば、発芽した小麦粉、パパイン、トリプシン、4つの細菌プロテアーゼのプロテアーゼ活性の測定においては、Ayre-Anderson法の結果とファリノグラフによって得られた結果は類似するが、グルテンの消化とミルクの固型物から得られた結果は類似しない。最近、グルテンを柔らかくすることと、可溶性窒素の形成の間には相互関係がないことが示された。

他のプロテアーゼ活性の測定法としてPreston<sup>12)</sup>は、ヘモグロビンを基質として、プロテアーゼの作用で分解したアミノ酸やペプチドが透析膜を通してバッファーの中に入り、フロレンスアミンという蛍光物質と反応し、その蛍光強度によりプロテアーゼ活性を測定した。

小麦のプロテアーゼ測定にいろいろな方法が提案されているが、どの手段によるかは、用いる基質、測定すべき変化量の種類、必要とする精度、測定に必要な労力や経費などで決められる。

### 3. 小麦穀粒中のプロテアーゼの分布

小麦穀粒の断面図は、図1に示すごとくである。中心部は小麦粉になる胚乳がある。胚乳の外側にアリーロン層とよばれる中心部とは異なった性質を示す層よりなっている。この胚乳部は外皮で包まれている。外皮は内側より珠心層、種皮、内表皮、横細胞、下皮、表皮とよばれる6層よりなっている。さらに穀粒には、次の新しい生命体になる胚芽がある。

小麦穀粒を胚乳、麩、胚芽の3部分にわけて、プロ

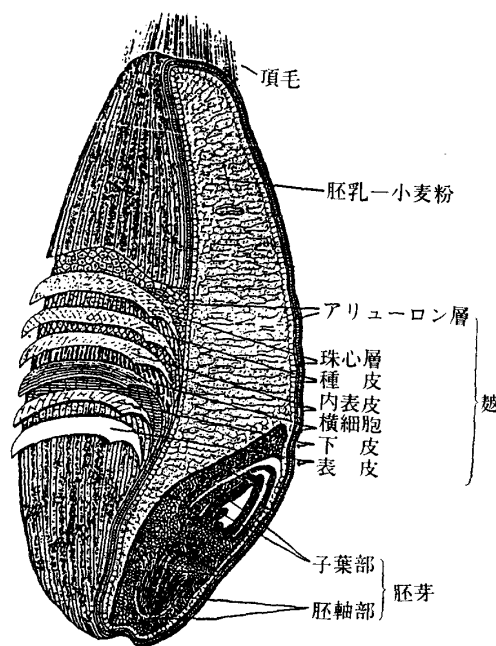


図1 小麦穀粒の断面図

表1 プロテアーゼ活性の測定条件

Activity	Substrate	Condition	
		Temp. (°C)	pH
Proteinase	Casein	37	8.0
LNAase (Aminoamidase)	Leucyl-β-naphthylamide	//	7.0
BAPAase	N-α-Benzoyl-D, L-arginine-p-nitroanilide	//	8.3
CPase (Carboxypeptidase)	Carbobenzoxy-phenylalanyl-alanine	//	6.0
APase (Acid Proteinase)	Acid-modified haemoglobin	//	4.0

ティナーゼとペプチダーゼの分布を調べると、胚乳と麩には、これら両活性はほとんど、もしくは全く含まれていない。しかし、胚芽にはプロティナーゼ、ジペプシダーゼ活性とも認められ、発芽時には、これら酵素活性が急速に増加することを Pett ら<sup>14)</sup>は報告している。

小麦穀粒のプロテアーゼ活性が、エデスチンを基質として測定されている<sup>18)</sup>。その結果、アリュールン層と胚芽と胚乳の相関的なプロティナーゼ活性は、5:1:0.1であった。

また、軟質冬小麦の胚乳と胚芽のプロテアーゼ活性の比較ではヘモグロビンとカゼインを加水分解する胚芽のプロティナーゼ活性は、胚乳の16倍、37.5倍であった<sup>16,17)</sup>。

筆者ら<sup>28)</sup>は、表1に示すとき5種類の基質を用いてカナダウエスタン種の硬質小麦種子および小麦粉のプロテアーゼ活性を測定した。その結果は、表2に示すように各試料にプロティナーゼ活性および APase 活性がわずかに認められた。これに対して、アミノペプチダーゼ活性は小麦粉、種子ともに認められ、活性の強さは小麦粉に対して種子は4倍も高い値を示した。BAPAase 活性も両試料に認められ、種子が小麦粉に対して2倍の強さを示した。カルボキシルペプチダーゼ活性は小麦粉では存在の有無がはっきりしなかったが、種子では強い活性が認められた。両試料ともプロティナーゼ活性は極めて低い値しか認められなかったが、ペプチダーゼ活性はその存在がはっきり示され、

とくに種子に強い活性が認められた。このことは胚乳部以外の胚芽部、アリュールン層に高い濃度のペプチダーゼが存在していることを示していると考えられる。

小麦のあらゆる製粉画分のプロテアーゼの活性についての報告<sup>15)</sup>では、2時間 40°C での自己消化後の活性の順番は、胚芽>麩>全粒小麦粉>一等粉であり、基質としてカゼインを用いた活性の順番は、麩>全粒小麦>胚芽>末粉>二等粉>一等粉であった。この結果は少なくとも漂白していない小麦粉の自己消化において、末粉が二等粉より50%多くの、そして一等粉の7~8倍の非タンパク窒素を生成するという結果<sup>19)</sup>と一致する。

Audidier ら<sup>20)</sup>により、小麦粉を風選により分画し、得られた各画分についてプロテアーゼ活性が測定されている。中くらい、または、高タンパク画分は、一等粉よりプロテアーゼ活性が高く、低タンパク画分は活性が最も低かった。このように、プロテアーゼの分布は、タンパク質の分布と一致していることがわかった。

さらに、Sobkowska ら<sup>23)</sup>は、小麦穀粉におけるタンパク質濃度は外層で最も高く、内側の胚乳に向かって減少していった。これらの分布は、軟質小麦では外側の胚乳にタンパク質が豊富で、硬質小麦でタンパク質はサブアリュールン層の限られた狭い部分に集中していた。そして、製粉後、タンパク質とプロティナーゼの多くは、軟質小麦では粉中にあり、硬質小麦には麩にあった<sup>22)</sup>。

また、春小麦種、冬小麦種の比較において、春小麦種は、全タンパク質、プロテアーゼ活性とも冬小麦種に比べて高かったという結果が報告されている<sup>27)</sup>。

以上のように、プロテアーゼ活性は、小麦の種類によって多少の違いはあるが、一般にタンパク質濃度の高い胚芽やアリュールン層などに多く分布している<sup>26)</sup>。

小麦粉においても、タンパク質濃度に比例して、一等粉、二等粉、末粉の順にプロテアーゼは多く存在している。このことは、末発芽種子におけるプロテアーゼの分布であるが、発芽によってほとんど活性を示さな

表2 小麦粉および小麦種子のプロテアーゼ活性

Activity	Flour (unit)	Seed (unit)
Proteinase	+	+
LNAase	2,000	8,000
BAPAase	480	960
CPase	±	2,640
APase	+	+

(1.0 g dry matter)

かった胚乳においてもプロテアーゼ活性は著しく増大することが明らかにされている。

#### 4. 小麦のプロテアーゼの特性

プロテアーゼ活性画分は水に可溶なアルブミン画分であるため、小麦のプロテアーゼの大部分は1%食塩水で抽出される<sup>32)</sup>。この抽出液について基質特異性や、賦活剤また阻害剤を加えて、プロテアーゼの性質を検討するとともに、さらに、ゲル濾過クロマトグラフィ<sup>64)</sup>、イオン交換クロマトグラフィ<sup>62)</sup>、また、アフィニティクロマトグラフィ<sup>69)</sup>やゲル電気泳動によって精製してその性質が調べられている。

自己消化によって測定した胚芽、完全小麦粉、小麦麦芽、一等粉のプロテアーゼ活性は、システインやグルタチオンの存在下で増加する。同様に麩の水抽出液のプロテアーゼ活性はシステインの添加によりカゼインの加水分解の割合を増加させる<sup>29,33,37)</sup>。また、この酵素の濃縮物は、もしそれが最初、システイン、シアン化物、硫化水素に処理されなければ、ゼラチンに対してあまり活性を示さなかった。一等粉から分画したプロテアーゼ<sup>35)</sup>は、システインによって活性化し、臭素酸塩、過硫酸塩、メタバナデイト、ヨード酢酸、アスコルビン酸によって阻害されるという点で、麩のプロテアーゼと類似している。

Skupin ら<sup>46)</sup>により、小麦穀粒の抽出液が SE-セファデックス G-50 カラムクロマトグラフィで2つの活性画分プロテアーゼ A と B に分画された。主活性画分のプロテアーゼ A は SE-セファデックス G-50 カラムによる再クロマトグラフィにより、さらに2画分に分けられた。A の両画分ともジスルフィド結合と SH 基を含んでおり、 $H_2O_2$ 、P-クロロマーキュリー安息香酸(PCMB)やSH修飾剤によりプロテアーゼ活性が阻害された。また、プロテアーゼ B も PCMB により容易に阻害されることよりこれらプロテアーゼはパパインのシステインプロテアーゼであると結論づけた<sup>40)</sup>。

冬小麦穀粒の水溶性タンパク質画分がセファデックス G-100 カラムによるゲル濾過クロマトグラフィで、カゼインを加水分解する10種類のプロテアーゼと L-ロイシル- $\beta$ -ナフチルアミドを分解する2種類のアミノペプチダーゼが分画された。このプロテアーゼのうち4種類はシステインプロテアーゼの特性を示して、システインにより活性化され、 $H_2O_2$  と PCMB によって阻害された。また、これらの酵素の他の2つは  $H_2O_2$  によって活性化され、その1つは PCMB

によっても活性化された。

ジャガイモの細胞液を小麦粉抽出液に加えると、小麦粉のプロテアーゼ活性の失活が認められた。この効果は、ゆでたジャガイモの細胞液では少なかった。新鮮なジャガイモの細胞液へ還元されたグルタチオンを付加すると、グルタチオンの SH 基がすばやく酸化されることから、小麦粉のプロテアーゼの阻害は主にジャガイモの細胞液成分がプロテアーゼの SH 基を酸化することによるものであろうと推察された<sup>65)</sup>。

また、発芽した小麦のプロテアーゼは、システインやグルタチオンによって増加し、PCMB によって活性は減少した<sup>70)</sup>。

以上のように、小麦のプロテアーゼがいかなるタイプのものであるかが研究されてきたが、SH 基をもつシステインやグルタチオンの付加により活性化したり、SH 修飾剤や酸化剤によって活性が阻害されることから、パパインと同じタイプのプロテアーゼであることが推察される。しかし、小麦のプロテアーゼはパパインタイプではないという他の報告もある<sup>66)</sup>。

Howe ら<sup>40)</sup>は、ストレート粉を含む混合物に臭素酸塩を付加することは、小麦粉のプロテアーゼ活性に何の効果もないと報告した。これは、Hale の臭素酸塩によって阻害されるという結果<sup>35)</sup>とは異なる。Howe らによって使われた臭素酸塩の量は、小麦粉の 0.001 ~ 0.010 % でこれは商品としてパンを焼く時、習慣として使われる量と一致している。

また、Hites ら<sup>19)</sup>は、小麦粉懸濁液へのグルタチオンの付加、またはヘモグロビンの付加は、小麦粉のプロテアーゼの作用により形成される非タンパク窒素の量に影響を及ぼさないことを報告した。このことは、小麦粉のプロテアーゼが SH 化合物によって活性化されないことを示し、SH 化合物によって活性化されるパパインタイプではないと断定された。

shield bag によって損傷を受けた小麦穀粒からのプロテアーゼは本来の小麦粒からのそれと同一のはずであるが、これは SH 基を含む化合物(システイン、還元されたグルタチオン)が、プロテアーゼを活性化せず、PCMB は、それを阻害しなかったことが報告されている<sup>71,74)</sup>。このことは、小麦の酵素がパパインタイプのプロテアーゼでないことを示す。

以上のように、小麦のプロテアーゼがシステインプロテアーゼの特性を示すというものと、そうでないという報告とがあるが、これらの結果の相違は、彼らのテストに使用した還元剤や酸化剤の濃度に大きな違いがあることによって説明される。しかし、Salgo

ら<sup>39)</sup>はハンガリー産小麦よりプロテアーゼ活性成分を食塩溶液で抽出し、ゲル濾過クロマトグラフィ、イオン交換およびアフィニティクロマトグラフィを用いて、プロテアーゼ活性をもつ3画分を単離した。これらの酵素画分の最適 pH は酸性側 (pH 3.8~4.4) にあり、活性中心を検討した結果、これらの酵素活性のほとんどが、ジイソプロピルフルオロフォスフェート (DEP) により阻害された。このことはこれら酵素はセリンプロテイナーゼ群に属することを示している。これらの画分はキレート剤によりわずかであるが失活が認められ、金属プロテイナーゼの存在することも示された。また、SH 基修飾剤による阻害効果は得られず、システインプロテイナーゼの存在は認められなかった。

Olcott らは<sup>39)</sup>、水中でねる操作により小麦粉から分離されたグルテンは、希釈した塩化ナトリウムまたは酢酸の入った水で洗われることによっても取り去ることのできなかったプロテイナーゼを含んでいることを報告した。逆にグルテンに働く酵素は、サリチル酸によって不活性になり、20%チオグリコール溶液によって活性化された。

McDonald<sup>43)</sup> らは、小麦粉中に酢酸バッファ (pH 4.0~6.0)、リン酸バッファ (5.0~8.0) または、10%食塩溶液によって抽出することのできないプロテアーゼの存在することを示した。この抽出できないプロテアーゼは、抽出可能なプロテアーゼと異なった最適 pH、熱に対する安定性および SH 基修飾剤による阻害のされかたを示し、両プロテアーゼ画分が異なった酵素であることを明らかにしている。

また、硬質赤春小麦の酢酸抽出液をデンブengel 電気泳動すると、多くのプロテアーゼ活性画分にわけられた。それぞれの活性画分はさらに2、3活性成分にわけられた。このことは、小麦中には極めて多種類のプロテアーゼが含まれ、他のタンパク質と結合した型で存在することを示唆している。

Wang ら<sup>49)</sup>によれば、小麦粉を酢酸バッファ中に懸濁すると、1回の懸濁では小麦粉中のプロテアーゼ活性の半分以下しか溶解しなかった。抽出をくりかえすことにより、活性成分のほとんどを溶出できることを示している。熱による活性の変化が調べられているが、プロテアーゼ抽出液の1部は 50°C で失活することを示し、他の部分はこの温度では全く変化を示さなかった。

Prentice ら<sup>50)</sup>によって、小麦より大麦のと類似したいろいろなペプチダーゼが単離された。市販小麦、硬質赤春小麦、デュラム小麦の胚芽から抽出精製されたプ

ロテアーゼは、pH、熱に対する安定性や BAEE, BAP-A を基質とする活性の比などにより、発芽大麦に含まれているペプチダーゼ A と類似していた。

さらに、発芽小麦から1種類の中性ペプチダーゼと2種類の酸性ペプチダーゼが単離された。中性ペプチダーゼの方は、熱に対する安定性、最適 pH、いろいろな pH に対する安定性、反応動力学定数、無機イオンの効果などは、大麦のペプチダーゼ B と非常に特徴が似ていた。また、酸性ペプチダーゼの1つは、大麦のペプチダーゼ A と似ていた。もう1つは、酸や熱に対して、極めて安定であった。

小麦胚芽と発芽大麦からは、ペプチダーゼ C の存在が認められた。この酵素は、ジペプチダーゼ活性を示したが、ヘモグロビンを基質とするプロテイナーゼ活性はなかった。

また、Belitz ら<sup>60)</sup>によって、アリューロン層と胚乳画分において2つのプロテアーゼが単離された。1つは、最適 pH 5 でヘモグロビンとカゼインを加水分解し、ヨードアセタイトによって阻害されなかった。その分子量は、67,000以上であると推定された。もう1つのプロテアーゼは最適 pH 7.5 で、トリプシンに対しては働くが、キモトリプシンを加水分解しなかった。この酵素はトリプシンに類似していた。また、分子量は30,000~35,000であった。

Popov らは<sup>75)</sup>、完熟した小麦穀粒より pH 6.75 で最大活性を示すいくつかのプロテアーゼを Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液を用いて抽出した。抽出された酵素はさらに、セリンおよびシステインプロテイナーゼに分画された。

発芽小麦のプロテアーゼは Mounfield<sup>30,31)</sup>によって研究された。水で抽出された酵素は、基質としてエデスチンに対しては、pH 4.1、ゼラチンには pH 5.1、小麦グルテンには、pH 6.0 で最適 pH を示す。この酵素は、オボアルブミンとは反応せず、グルテニンやグリアジンをわずかに加水分解した。シアン化物を添加するとエデスチンの加水分解率を約2倍にしたが、グルテンを基質とした反応では、効果がなかった。また、抽出液は、ロイシルグリシンやグリシルグリシンの加水分解を触媒とするジペプチダーゼも含んでいた。

Hildebrand ら<sup>36,38)</sup>のデータによると、発芽させた小麦の粉砕物のプロテアーゼ活性は、一等粉の3~20倍の強さを示した。

Johnson と Miller<sup>41,42)</sup> は、グルテン基質として発芽小麦の粉砕物のプロテアーゼ活性を測定する際にヨウ素酸塩を加えると45%阻害されることを見出している。しかし、この酸化剤は pH 3.6 でプロテアーゼ活

表3 小麦各部位のプロテアーゼ

部位	研究者	プロテアーゼ
穀粒	Balls, A. K. and Hale, W. S. (1936). Skupin, Janusz and Warchalewski, J. (1971). Belitz, H. D. and Lynen, Frieda (1974).  Pleshkov, A. S., Pleshkov, B. P., Varitsev, Yu. A. and Kuznetsova, N. E. (1976). Abazid, Taha L., Popov, M.P. and Kazakov, E.D. (1978). Kaluderski, G. (1980). Popov, M. P. and Shaninko, E. F. (1983).	proteainase (cysteine proteinase) protease A, B (cysteine proteinase) 2種類の protease 1) mol. wt. 67,000 2) mol. wt. 30,000-35,000 (トリプシン様酵素) 10種類の proteinase と 2種類の aminopeptidase protease (damaged grain からも) protease (damaged grain からも) papain type いくつかの中性 protease (serine, cysteine proteinase)
胚乳	Olcott, H. S., Sapirstein, L. A. and Blish, M. J. (1943). Howe, Marjorie and Glick, D. (1945).  Hites, B. D., Sandstedt, R. M. and Schaumbrg, Lorene (1953). Fleming, J. R., Johnson, J. A. and Milles, B. S. (1960). Mcdonald, C. E. and Chen Lora L. (1964). Kaminski, E. and Bushuk, W. (1969). Wang, C. C. and Grant, D. R. (1969). Falunina, Z. F., Popov, M. P., Roenko, T. F., Shcherbakov, S. S. (1976)	proteinase protease (システインプロテイナーゼの特性を示さない) protease ( // ) proteinase (cysteine proteinase) proteinase (cysteine proteinase) protease (4種類) protease protease (cysteine proteinase)
胚芽	Prentice, N., Burger, W. C., Kastenschmidt, J. and Moeller, M. (1970). Burger, W. C., Prentice, N. and Moeller, M. (1970).	peptidase A peptidase C
麩	Balls, A. K. and Hale, W. S. (1936).	proteinase (cysteine proteinase)
発芽小麦	Mounfield, J. D. (1936, 1938) Johnson, J. A. and Miller, B. S. (1953). Johnson, J. A., Miller, B. S., Boyer, P. D. and Geddes, W. F. (1956). Prentice, N., Burger, W.C. and Moeller, M. (1968). Kruger, J. E. (1971). Beresh, I.D., Valar, A.B. and Sosedov, N.I. (1972). Firsov, O. V. (1975). Kruger, J. E. and Preston, K. R. (1976).	protease 2種類の protease protease 1種類の中性 peptidase, 2種類の酸性 peptidase BAPA-ase (mol. wt. 59,000) protease (cysteine proteinase) 2種類の carboxypeptidase (serine type) 1) mol. wt. 55,000 2) mol. wt. 61,000
葉	Freth, G.J.T., Gordon, K.H.J. and Dallimg, M.J. (1978).	3種類の protease

性を部分的に失活させるだけで、他の pH では効果がなかった。このことは、発芽させた小麦粉中に少なくとも2つのプロテアーゼの存在を示した。

発芽小麦粉とアスペルギルスオリゼからの2種類のプロテアーゼ調製物の最適 pH は、グルテン、ヘモ

グロビンが基質の場合3.0~4.0, カゼイン基質の場合で5.5~6.0, ゼラチン基質の場合7.0であった<sup>61)</sup>。

発芽させた小麦粉はさらにペプシン様、またはカルボキシペプチダーゼ様活性が認められないという点で、かびのプロテアーゼと類似していた。また、グリシル-

L-チロシンや L-ロイシルグリシンやベンゾイルアルギニンアミドを加水分解するジペプチダーゼ活性が発芽した小麦粉に見られたが、かびのプロテアーゼは後者の2つの基質にしか働かなかった。

さらに、Kruger ら<sup>63)</sup>により、発芽した小麦より BAPAase と2種類のカルボキシペプチダーゼが単離された。BAPAase は、等電点が pH 4.46 で最大活性は pH. 8.1~9.1 において見られ、ゲル濾過による分子量は 59,000 であった。そして、50°C30分 で不活性になり、アゾカゼイン、ヘモグロビン、ゼラチンを分解しなかった。2種類のカルボキシペプチダーゼは、ヘモグロビンやグルテンからすばやくアミノ酸を遊離した。また、カルボベンゾキシの結合したペプチドには広範囲の種類に作用した。分子量は約55,000 と61,000であった。この酵素は DFP によって阻害されることにより、先に単離された数々の植物のカルボキシペプチダーゼと同様、セリントタイプのプロテアーゼであることが示唆された<sup>66,67)</sup>。このカルボキシペプチダーゼは発芽において貯蔵タンパク質やペプチドを加水分解し、アミノ酸を生成し、発芽生長に重要な役割をしていると考えられる。

葉からもいくつかのプロテアーゼが部分的に精製された形で単離された。これらの酵素はすべてヘモグロビンや他のテストされた基質を酸性で加水分解した。これら酵素のうち3つは、生成物から測定された<sup>68)</sup>。全窒素と  $\alpha$ -アミノ態窒素の比によってプロテイナーゼであると推定された。これらの3つの酵素は基質としてヘモグロビンを用いた場合にほぼ同じ最適 pH 4.5 をもっていたが、高温での安定性の点でそれぞれ顕著に異なっていた。

Fursov<sup>62)</sup> によって小麦の幼芽から、プロテアーゼとそのプロテアーゼ自体を阻害するタンパク質インヒビターも単離された。

現在までに単離されているプロテアーゼは表3に示すごとくである。

## 5. 小麦の発芽、生育にともなうプロテアーゼ活性の変動

Preston と Kruger によって、種々のプロテアーゼの発芽、生長中の変化が報告されている<sup>73,81,83,84,87,89,90)</sup>。

発芽初期のプロテアーゼ活性の変化は、まず、カルボキシペプチダーゼ活性とアゾカゼイン基質のプロテアーゼ（アゾカゼイナーゼ）活性の増加で、発芽の4時間後に観察された。この増加は発芽初期の新しいタンパク質合成によるものでなく、プロテアーゼ阻害物

質の移動によるものではないかと推察している。カルボキシペプチダーゼ活性は、72時間後には2~3倍に増加した。そして、アゾカゼイナーゼ活性は4~6倍にも増加した。しかし、BAPAase 活性は、発芽中に大きな変化は観察されなかった。アミノペプチダーゼ活性は、発芽中大きな変化はなかった。

硬質赤春小麦の栽培生長中のいろいろなプロテアーゼ活性の変化も調べられた。ヘモグロビンを分解する酵素の活性は、外層とくにアリュールン層において、結実後、12日まで増加し、その後急速に減退した。これに対して、胚乳のヘモグロビンを分解する酵素活性は、成熟した段階で最高の増加を示した。

小麦種子のいろいろな発達段階で抽出されたプロテアーゼ活性成分は CM-セルロースクロマトグラフィによってヘモグロビンを分解する酵素、4種類を分画した。そのうち、2種類は最適 pH 酸性で、他の2種類は中性であった。中性プロテアーゼが胚乳特有なのに対して、酸性プロテアーゼは主に外層に見られた。

アゾカゼイナーゼは、生長中開花後約16~18日まで増加した。BAPAase は種子の生成初期に活性が認められ、完熟するまで不変の量で残っていた。アゾカゼイナーゼは主に外皮層に見られ、これに反して、BAPAase は主に胚乳において見られた。種子の生長、成熟過程でカルボキシペプチダーゼの分布は主にアリュールン層と胚乳に集中していた。

アリュールン層においてカルボキシペプチダーゼ活性は種子の生長にともなって増加し、その後減少した。これに対して胚乳の活性は種子の生成時に著しく増加した。

アミノペプチダーゼ活性は、硬質赤春小麦、軟質白春小麦、デュラム小麦粒の生長、成熟中のあらゆる段階で測定された。基質としては、フェニルアラニン、アルギニン、メチオニン、ロイシンそれぞれの  $\beta$ -ナフトールアミドを使用した。すべての基質に対する活性は種子の生長中に増加し後に完熟するにともなって減少した。そして、アミノペプチダーゼの大部分は、胚乳やアリュールン層に存在した。

これらと同様の結果が他の研究者によっても示されている。

Parkany ら<sup>91)</sup>によると、ペプチダーゼは開花後2~4週の比較的短い間、高い活性を示した。

Evers ら<sup>80)</sup>も、小麦穀粒の各部位のプロテアーゼ活性を測定した。果皮においてプロテアーゼ活性は、開花後16日まで増加し、その後減少した。これに対して、胚乳、胚芽においてプロテアーゼ活性は、8日では取

るに足らない程であったが、29日には果皮の最大活性に近い高い値を示した。

Shinke<sup>63)</sup>によるとプロテアーゼ活性は発芽中に増加して、ギベレリック酸によってそれは強められた。さらに小麦の幼芽の成長にともなってプロテアーゼ活性がどのように変化するかを観察している。

また、Kohl ら<sup>66)</sup>は発芽中に胚乳において、プロテイナーゼ活性が生じる一方、合成基質を使って測定されたペプチダーゼ活性は初めから存在していたことを明らかにした。

さらに Preston ら<sup>87)</sup>によって、デュラム小麦と硬質赤春小麦の発芽中の貯蔵タンパク質加水分解に対するペプチダーゼとプロテイナーゼ活性の関係について詳細に報告されている。ペプチダーゼ活性が発芽の際にあまり増加しないのに対して、プロテイナーゼ活性は発芽にともない著しく増加した。この傾向は、硬質赤春小麦がもっとも顕著であった。タンパク質分解活性と胚乳タンパク質可溶性画分の変化から、発芽中のプロテイナーゼの増加によって、貯蔵タンパク質が多量に加水分解されることが認められている。アミノ態窒素の増加とペプチドレベルのわずかな変化から、これらはほとんどペプチドの端から切られたアミノ酸によるものであることが明らかになった。ペプチダーゼの十分な量が発芽していない小麦に存在する一方、プロテイナーゼは、発芽にともなって、生成された。また、貯蔵タンパク質加水分解におけるジブレリック酸、アブシシック酸、タンパク質阻害物質、RNA 合成物質の影響とプロテアーゼ活性の変化より、発芽中に小麦の貯蔵タンパク質加水分解が新しく合成されたプロテイナーゼによって生成したホルモンによって調節されることが示されている。

小麦の葉の生育にともなうプロテアーゼ活性の変化も報告されている<sup>79,88)</sup>。

冬小麦と春小麦の葉でのプロテアーゼ活性がいろいろな生長段階で検討されている。これによると自己消化後、冬小麦の細胞液中のタンパク態窒素の減少は、子葉鞘が生成する段階で14%、単子葉の生成段階では41%に達した。春小麦ではタンパク態窒素の減少の範囲は27%~33%であった。葉の生育にともなっても、プロテアーゼ活性は増加を示した。

Sopanen<sup>85)</sup>らの研究でも、小麦の第一葉において、可溶性タンパク質の容量は、種をまいた後の7~19日の間にプロテアーゼの働きにより最初の50%まで減少した。葉におけるプロテアーゼ活性を知るため、4つの異なった世代の葉の抽出液からいくつかのペプチダ

ーゼ活性が測定された。カルボキシペプチダーゼ活性は、葉の生長中にはじめ増加した。さらに生育が進むにともない逆に、減少しはじめた。アルカリペプチダーゼ活性は、BAPAase 活性が減少するのに反して、生長中に増加した。

ナフトールアミダーゼ活性は最初ゆるやかに増加し、その後、減少した。研究されたすべてのペプチダーゼは、かなり高濃度で葉に存在していた。これらはすべて、葉のタンパク質を遊離アミノ酸に加水分解するのに関与しているのであろうと推察されている。

また、5%アンモニウム硝酸塩溶液をスプレーすると、葉の老朽が促進された。コントロールと比較において処理された葉には、プロテアーゼ活性の減少が促進されることが観察された。これにより、葉の老朽にともなって、プロテアーゼ活性は減少するといえる。葉が老朽化すると、タンパク質含量が成葉よりも低下する。このような葉では、タンパク質の合成よりも分解の方が多く、分解によって生じたアミノ酸やその他の可溶性の窒素化合物は、通導組織を通して、旺盛な生長をしている葉や生長点に運ばれる。これにともなって、葉の生育中に増加したアミノペプチダーゼ活性も、葉からの窒素の移動と同時に減少した。カルボキシペプチダーゼも、葉の生育中に増加し、老朽中に減少したが、この酵素の減少はアミノペプチダーゼのそれよりは後におこった。これら2種類のペプチダーゼと比較して、プロテイナーゼの活性は老朽の初期に増加し、窒素の移動中に最大になった。プロテイナーゼ活性は、葉よりのタンパク質の老朽移動と関係しているようである。

貯蔵によってもプロテアーゼ活性は変化する<sup>28)</sup>。発芽によりプロテアーゼ活性は増加するが、この増加は、発芽前に種子を14~16か月貯蔵した時は、およそ半減する。一方、プロテアーゼの最大活性は、小麦を2か月貯蔵した時に得られた。Makarova ら<sup>82)</sup>の研究によっても、商業的条件下での16年間の冬小麦の貯蔵は、プロテアーゼ活性を減少させると報告している。

一般に種子が発芽する時は、プロテアーゼが著しく増大し、貯蔵タンパク質を加水分解して生じたアミノ酸を発芽植物に供給するのに役立っている。しかし、以上に述べたように、活性の変化は、プロテアーゼの存在する部位やプロテアーゼの種類によって異なっている。部位による差として、果皮やアリュロン層などの外層のプロテアーゼの活性は、開花後2~3週目までは増加するが、その後、減少するのに対し、胚乳のプロテアーゼは、成熟中に最高の活性に達し、その



後も減少することはなかった。

また、カルボキシペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ、BAPAase で示されたように、ペプチダーゼは小麦中にはじめから十分な量が存在しており、生育中にはそれ程増加しない。それに対して、カゼインやヘモグロビンを分解するプロティナーゼは、発芽、生育時に著しく増加することがわかった。これはペプチダーゼが貯蔵タンパク質の末端のペプチド結合を加水分解することによって、プロティナーゼがタンパク質分子内部のペプチド結合を加水分解するために生成されるものと思われる。植物体内では、タンパク質の合成と分解がたえず行なわれており、生育状態により、プロテアーゼがうまく働いていると言える。

## 6. 小麦粉および小麦粉製品におけるプロテアーゼの効果

小麦粉に含まれているプロテアーゼは、製パンの際にグルテンタンパク質を変化させたり、ドウのレオロジックの性質に影響を与えることはないと考えられているが、これらの活性はメイラード反応によるパンの皮の色の形成やパンの芳香のある種の特異成分の生成に役立っていると言われている。しかし、最近ドウにプロテアーゼを添加して、ドウの物性を改良する方法が検討され、利用されている。

Redman<sup>109)</sup>により発芽させた小麦を製粉して、小麦粉に加えて、プロテアーゼを補うと、ドウの粘弾性が低下する。これは、プロテアーゼによりグルテンのペプチド鎖が切断されたためと考えられている。この効果は、発芽しはじめた小麦を製粉した小麦粉ではグルテンの軟化がより顕著に認められている<sup>101)</sup>。

製パン時に小麦グルテンがプロテアーゼにより加水分解を受け、高分子量のグルテニンの約8%が低分子量タンパク質になると、無処理の小麦粉のドウと比較して、顕著にドウのレオロジックの性質が変化することが報告されている<sup>104)</sup>。

また、この小麦プロティナーゼの加水分解はグリアジンに対してより、グルテニンに対しての方が高く、これはタンパク質分子のち密さに関係していると考えられている。

Popov<sup>75)</sup>らは、冷却した70%エタノールで、グルテンをグリアジンに分離するとプロテアーゼ活性は2/3に減少したが、プロテアーゼはグルテニン画分のみに存在することが示されている。

グルテンの粘度の減少は、ペプスタチンによって効果的に防げた。そして、ペプスタチンとDFPの同時

付加は完全にグルテンタンパク質の自己消化を防げた。それゆえ、ペプスタチンとDFPに反応するプロテアーゼは、グルテンタンパク質の自己消化に貢献していると言える。

塩は、ドウのプロテアーゼ活性をとっても効果的に阻害する。塩のこの効果は、酵素自身への阻害というより、グルテン基質のプロテアーゼに対する感受性を減少させることによることが明らかにされている。

以上により、プロテアーゼがドウの粘弾性を減少させることは明らかである。そして、今日では、ドウにかびのプロテアーゼを添加することが一般的になっている。

ワッフルや他の小麦製品の製造において、ドウの粘度は、ペプシン、トリプシン、スブチリシン、パパインなどのプロテアーゼの処理によって、粘度を減少させることができる。81 kgの小麦粉を水と混捏して、43°Cに加熱、次に30 gのプロテアーゼを加えて40分間放置した後に使用されている。

また、プロテアーゼの適度の添加は、最適なドウの粘弾性を得るための混捏時間を短縮する。麹菌プロテアーゼを小麦粉に対して、0.25%添加するとき、混捏時間が20%短縮されるという。そして、弾性が低下し、生地は伸度性が増すのでグルテンの膜が薄くなり、発酵の際、グルテンの網目構造が細くなる。これにより、製品としては触感のやわらかな、すだちの細かく、よく揃ったパンが得られることになる。

プロテアーゼは、小麦粉のタンパク質に作用し、ペプチド、アミノ酸にすることによって、酵母に窒素源を供給するので発酵を促進する。発酵の初期においては、小麦粉に存在する窒素化合物が利用されるが、後期になると不足するので、プロテアーゼの添加の効果があらわれることが示されている。

以上のように、プロテアーゼの適度の添加は、ドウ物性を改良するが、発芽などにより小麦の $\alpha$ -アミラーゼやプロテアーゼが増加すると小麦粉のベイキングポテンシャルは、減少する。

いろいろな発芽の度合いの小麦から製粉した小麦粉での製パンの実験で、過度の $\alpha$ -アミラーゼの存在はドウの粘度を低下しすぎ、粘稠性を増し、手や機械での取り扱いをしにくくする。そして、過度のプロテアーゼは、グルテンの特性に影響を及ぼし、パンの体積が広がり、内部がすかすかになった。発芽した小麦からのパンの質の低下は発芽によって、おこるデンプンとグルテンの損傷（物理生物学的特性の変化）によるよりは、酵素活性の増加によるところが大きい。

また、発芽以外にも、欠陥のある小麦穀粒からの粉は、ふつうの小麦粉よりも6倍もの高いプロテイナーゼ活性を示す。この活性は、0.01%Na-D-イソアスコロビン酸を加えることによって、4倍に減少した。0.005%Na-D-イソアスコロビン酸の添加はドウのレオロジ的特性を著しく改良した。

ある昆虫やかびによって損傷を受けた小麦からの小麦粉には、より多くのプロテアーゼが存在する。たとえば、wheatbugsは熟した小麦の穀粒に作用して小麦粉の製パン特性を害するプロテアーゼを注入する。非常に損傷した穀粒を製粉した粉は過度のプロテアーゼ活性により、ほとんどグルテンを形成しなくなると報告されている。ハイレベルのプロテアーゼによって、パンの品質は低下するが、かびに害された小麦粉からの小麦粉においても同様の結果が示されている。

他の小麦製品においても、プロテアーゼの適量の利用は、よい結果を得ている。クラッカーにおいては、小麦粉中のグルテンを酵素によって矯正し、ドウの機械適応性および伸張性を良くし、オープンにおける収縮性を減少させる。さらに、普通に行えば比較的長時間発酵を要する工程を風味を変えずに短縮できるという。焼酎にかびからの酸性プロテアーゼを付加することは、色沢と芳香性を改良し、品質を高め、タンパク質を強化した栄養食品として完成している。製めんにおいて、プロテアーゼを使用すると小麦粉中のグルテンがペプチド、アミノ酸になり、製品の風味が向上する。一方、グルテンの質の改良によって舌ざわりも上品で仕上がりも極めて良存になると考えられる。

小麦製品へのプロテアーゼの利用は、食品加工、調理において研究課題であろう。

## 7. おわりに

小麦のプロテアーゼは穀粒においてはタンパク質濃度の高い胚芽やアリューロン層に多く分布している。さらに、これらプロテアーゼ活性は種子の発芽とともに著しく増大する。未発芽種子のプロテアーゼとしてカルボキシペプチダーゼやアミノペプチダーゼなどのペプチダーゼ活性が高く、プロテイナーゼ活性は低い値を示している。しかし発芽、生育とともにプロテイナーゼ活性が著しく増大し、ペプチダーゼ活性はあまり大きな変化が認められていない。このことはプロテアーゼとくにプロテイナーゼは潜在型あるいは前駆体の型で存在していて、発芽とともに種子に含まれているペプチダーゼなどにより活性化されることが予

想される。そして種子の貯蔵タンパク質を加水分解して、発芽、生育に必要なアミノ酸を供給すると考えられる。

プロテアーゼ活性の抑制には小麦に含まれているプロテアーゼインヒビターも何らかの役割をなしていることが推察されている。小麦穀粒のプロテアーゼインヒビターとしては小麦穀粒各部位にトリプシンインヒビター、キモトリプシンインヒビターが存在し<sup>116)</sup>、それぞれ胚乳<sup>119)</sup>、胚芽<sup>117)</sup>、麩部<sup>118)</sup>より単離されている。しかし今まで小麦穀粒より単離されたプロテアーゼインヒビターはすべてセリンプロテナーゼに対して阻害を示すインヒビターである。これに対して小麦穀粒中に存在するプロテイナーゼは一部をのぞき、そのほとんどがシスティンプロテアーゼである。このように現段階では内生プロテアーゼとプロテアーゼインヒビターとの関連は明確でない。しかし小麦の発芽に際してプロテアーゼ活性が増大するとともに、プロテアーゼインヒビター活性とくにトリプシンインヒビター活性も増大する<sup>120)</sup>。このことはこれらインヒビターは内生プロテアーゼ活性の調節のために存在しているのではないかということを示唆している。

休眠状態の小麦種子のプロテアーゼ活性は低いが、種子の各部位にプロテアーゼが存在するとともにプロテアーゼインヒビターも含まれており、発芽とともに多数のプロテアーゼ活性が発現する。この機構については不明な点が非常に多く、現在では明確な説明ができないが、極めて興味ある研究課題である。これらの解明について今後の研究に期待される。

## 文 献

- 1) Hilderbrand, F. C., Enzymes and Their role in wheat technology, vol. 1. ed. Anderson, J. A., Interscience, New York 1946 p. 275.
- 2) Reed, G. and Thorn, J. A., Wheat Chemistry and technology, ed. Pomeranz, J. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul 1971 p. 469
- 3) Northrop, J. H. Pepsin activity units and methods for determining peptic activity. *J. Gen. Physiol*, 16, 41 (1932)
- 4) Ayre, C. A. and Anderson, J. A. Varietal differences in barleys and maits. VI. Autolytic proteolytic activity of malt and its correlation with wort nitrogen fractions. *Can. J. Research* 17 C, 239 (1939).

- 5) Abbott, D. C., Miller, B. S. and Johnson, J. A. A spectrophotometric modification of the Ayre-Anderson method for estimation of proteolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **38**, 85 (1952).
- 6) Bowlby, Carol, Tucker, H., and Miller, B. S. and Johnson, J. A. A comparison of methods for determining proteolytic activity. *Cereal Chem.* **30**, 480 (1953).
- 7) Koch, R. B. and Ferrari, C. G. Investigation of proteolytic enzymes by a gelatin viscosity technic. *Cereal Chem.* **32**, 254 (1955).
- 8) Pomeranz, Y., Rubenthaler, G. L. and Finney, K. F. Evaluation of the effects of proteolytic enzymes on bread flour properties. *Food Technol.* **20**(3), 95 (1966).
- 9) Hanford, J. The proteolytic enzymes of wheat and flour and their effect on bread quality in the United Kingdom. *Cereal Chem.* **44**, 499 (1967).
- 10) Breyer, D. and Hertel, W. Determination of protease activities with synthetic substrates in wheat and rye and their milling products. *Getreide, Mehl Brot* **27** (1), 13 (1974).
- 11) Breyer, D. and Hetrel, W. Improvement of protease determination in wheat and rye with N-Benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (L-BAPA) as the substrate. *Getreide, Mehl Brot* **29** (7), 185 (1975).
- 12) Preston, K. R. Automated fluorometric assay for proteolytic activity in wheat. *Cereal Chem.* **52**(4), 451 (1975).
- 13) Finley, J. W. Sulfanilamide-asoglutin: A chromophoric gluten derivative for colorimetrically estimating protease activity on gluten. *Cereal Chem.* **52**, 714 (1975).
- 14) Pett, L. B. Studies on the distribution of enzymes in dormant and germinating wheat seeds. I. Dipeptidase and protease. *Biochem. J.* **29**, 1898 (1935).
- 15) Balls, A. K. and Hale, W. S. Proteolytic enzymes of flour. *Cereal Chem.* **13**, 54(1936).
- 16) Howe, Marjorie, and Glick, D. The proteolytic enzyme activity of milled fractions of wheat and the effect of bromate in flour. *Cereal Chem.* **23**, 360 (1946).
- 17) Howe, Maryorie, Further studies on the mechanism of the action of oxidation and reduction on flour. *Cereal Chem.* **23**, 84 (1946).
- 18) Engel, C. and Heins, J. The distribution of the enzymes in resting cereals. II. The distribution of the proteolytic enzymes in wheat, rye, and barley. *Biochem. Biophys. Acta* **1**, 190 (1947).
- 19) Hites, B. D., Sandstedt, R. M. and Schaumburg, Lorene. Study of the proteolytic activity in wheat flour dough and suspensions. III. The misclassification of the proteases of flour as papainases. *Cereal Chem.* **30**, 404 (1953).
- 20) Audidier, Y. and Seince, Y. Distribution of proteolytic activity of wheat flours. Conventional milling-air classification. *Ind. Aliment. agr. (paris)* **83**, 529 (1966).
- 21) Prentice, N., Burger, W. C., Kastenschmidt, J. and Huddle, J. D. The distribution of acidic and neutral peptidase in barley and wheat kernels. *Physiol. Plant* **20**, 361 (1967).
- 22) Abazid, Taha L., Popov, M. P. and Kazakov, E. D. Wheat grain neutral proteinase. Distribution of enzymes during the processing of grain into flour. *Intensifik. Sushchestvuyushchikh i Razrab. Nov. Technol. Protessov v Pishch. Prom-sti* **17** (1978).
- 23) Sobkowska, E., Barko, Jolanta, and Czarnecki, zbigniew Investigation of protein and proteolytic enzyme distribution in wheat grain and milling fractions. *Rocz. Akad. Roln. Poznaniu* **107**, 81 (1979).
- 24) Lin, Willy, and Wittenbach, Vernon A Subcellular localization of proteases in wheat and corn mesophyll protoplasts. *Plant Physiol.* **67** (5), 969 (1981).
- 25) Wittenbach, Vernon A., Lin, Willy and Hebert, Richard R. Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. *Plant Physiol.* **69** (1), 98 (1982).
- 26) Levitaskii, A. P., Vovchuk, S. V. and Adamovskaya, V. G. proteolytic enzymes and trypsin inhibitors in wheat endosperm and embryo. *Fiziol. Biokhim. Kul't. Rast.* **14** (6), 545 (1982).
- 27) Subda, Hanna Chemical composition of flour and the baking properties of spring and winter wheat varieties. *Hodowala Rosl., Aklim.*

- Nasienn.* **26** (4), 309 (1982).
- 28) Mitsunaga, T. in press.
- 29) Jorgensen, H. Ein Beitrag zur Beleuchtung der hemmenden Wirkung von Oxydationsmitteln auf proteolytische Enzymtätigkeit: Über die Natur der Einwirkung von Kaliumbromat und analogen Stoffen auf die Backfähigkeit des Weizenmehles. I. *Biochem. Z.* **280**, 1 (1935).
- 30) Mounfield, J. D. The proteolytic enzymes of sprouted wheat. *Biochem. J.* **30**, 549 (1936).
- 31) Mounfield, J. D. The proteolytic enzymes of sprouted wheat. II. *Biochem. J.* **30**, 1778 (1936).
- 32) Balls, A. K. and Hale, W. S. The preparation and properties of wheat proteinase. *Cereal Chem.* **15**, 622 (1938).
- 33) Jorgensen, H. Entwicklung der Theorie der Bromatwirkung, 1935-1938. *Muhlenlab.* **8**, 201 (1938).
- 34) Mounfield, J. D. The proteolytic enzymes of sprouted wheat. III. *Biochem. J.* **32**, 1675 (1938).
- 35) Hale, W. S. The proteinase in wheat flour. *Cereal Chem.* **16**, 695 (1939).
- 36) Hildebrand, F. C. A comparison of methods for the determination of proteolytic activity. *Cereal Chem.* **16**, 792 (1939).
- 37) Jorgensen, H. Further investigation into the nature of the action of bromates and ascorbic acid on the baking strength of wheat flour. *Cereal Chem.* **16**, 51 (1939).
- 38) Hildebrand, F. C. and Burkert, G. M. Amylase and protease systems of malted wheat flour. *Cereal Chem.* **19**, 27 (1942).
- 39) Olcott, H. S., Sapirstein, L. A. and Blish, M. J. Stability of wheat gluten dispersions toward reducing agents in the presence and absence of a gluten proteinase. *Cereal Chem.* **20**, 87 (1943).
- 40) Howe, Maryorie, and Glick, D. Activity-pH relationships and inhibition of proteolytic enzyme activity of milled fractions of wheat. *Cereal Chem.* **22**, 502 (1945).
- 41) Johnson, J. A. and Miller, B. S. The relationship between dough consistency and proteolytic activity. *Cereal Chem.* **30**, 471 (1953).
- 42) Johnson, J. A., Miller, B. S., Boyer, P. D., and Geddes, W. F. Properties of certain protease systems used in bread-making. *Cereal Chem.* **33**, 1 (1956).
- 43) McDonald, C. E. and Chen, Lora, L. Properties of wheat-flour proteinases. *Cereal Chem.* **41**, 443 (1964).
- 44) Hasegawa, J. Isoenzymes of wheat germ naphthylamidase. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 424 (1964).
- 45) Bernardin, Y., Mechem, D. K. and Pence, J. W. Proteolytic action of wheat flour on nonfat dry milk proteins. *Cereal Chem.* **42**, 97 (1965).
- 46) Skupin, J., Rosinska, K., Skupin, A. and Warchalewski, J. Sulfhydryl nature of wheat grain protease B. *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Biol.* **14**, 397 (1966).
- 47) Prentice, N., Burger, W. C. and Moeller, M. Partial purification and characterization of peptide hydrolases from germinated wheat. *Phytochemistry* **7**: 1899 (1968).
- 48) Kaminski, E. and Bushuk, W. Wheat proteases. I. Separation and detection by starch-gel electrophoresis. *Cereal Chem.* **46**, 317 (1969).
- 49) Wang, C. C. and Grant, D. R. The proteolytic enzymes in wheat flour. *Cereal Chem.* **46**, 537 (1969).
- 50) Prentice, N., Burger, W. C., Moeller, M. and Kastenschmidt, J. Characterization of an acid-stable peptide hydrolase and of a peptid hydrolase in germinated wheat. *Phytochemistry* **8**, 1897 (1969).
- 51) Prentice, N., Burger, W. C., Moeller, M. and Kastenschmidt, J. Peptide hydrolase in wheat embryo. *Phytochemistry* **9**, 41 (1970).
- 52) Prentice, N., Burger, W. C., Moeller, M. and Kastenschmidt, J. The hydrolysis of alpha naphthyl acetate and L-leucyl-beta-naphthylamide by enzymes from wheat embryo. *Cereal Chem.* **47**, 282 (1970).
- 53) Kruger, J. E. Purification and some properties of malted-wheat BAPA-ase. *Cereal Chem.* **48** (5), 512 (1971).
- 54) Beresh, I. D., Vakar, A. B., Sosedov, N. I. Kinetic properties of proteolytic enzymes of germinating wheat grain. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **203** (2), 473 (1972).

- 55) Kolesnikova, Z. M., Polesko, Yu. A., Brazhnik, S. P. Role of mineral fertilizers in the mobilization of nitrogen in thick slightly leached chernozem. *Agrokimiya* (7): 3 (1972).
- 56) Gibson, R. A. and Paleg, L. G. Lysosomal nature of hormonally induced enzymes in wheat aleurone cells. *Biochem. J.* 128 (2): 367 (1972).
- 57) Grant, D. R. and Wang, C. C. Dialyzable components resulting from proteolytic activity in extracts of wheat flour. *Cereal Chem.* 49 (2): 201 (1972).
- 58) L'vova, L. S., Shul'gina, A. P. and Bogoroditskaya, V. P. Biochemical and bread-baking features of rose-colored wheat grains without fusariosis *Tr., Vses. Nauch. -Issled. Inst. Zerna Prod. Ego Pererab.* No. 75, 106 (1972).
- 59) Kolosha, O. I. and Kostenko, I. I. Water regulation, enzyme activities, and the frost resistance of winter wheat. *Doki. Vses. Akad. Selskokhoz. Nauk* (3): 11 (1973).
- 60) Belitz, H. D. and Lynen, Frieda. Proteolytic activity of wheat. Occurrence of a trypsinlike enzyme. *Chem. Mikrobiol., Technol. Lebensm.* 3 (2): 60 (1974).
- 61) Vagerova, K. and Macura, J. Effect of microorganisms and sprout on the protease activity of plant roots. *Folia Microbiol.* (Prague) 19 (4): 329 (1974).
- 62) Fursov, O. V. Isolation of a protease and protease inhibitor from wheat grain. *Khim. Prir. Soedin.* (5): 642 (1975).
- 63) Shinke, Ryu, and Nishira, Hiroshi, Malt protease. III. Chromatographic behavior of wheat protease during germination with gibberellic acid treatment. *Kobe Daigaku Nogakubu Kenkyu Hokoku* 11 (2): 347 (1975).
- 64) Pleshkov, A. S., Pleshkov, B. P., Varitsev, Yu. A. and Kuznetsova, N. E. Separation of proteolytic enzymes of winter wheat grain on Sephadex G-100. *Izv. Timiryazevsk. S-kh. Akad.* (1): 184 (1976).
- 65) Falunina, Z. F., Popov, M. P., Rogenko, T. F. and Shcherbakov, S. S. Inhibition of wheat flour proteinases by potato cell juice. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 12 (6): 894 (1976).
- 66) Preston, K. R. and Kruger, J. E. Purification and properties of two proteolytic enzymes with carboxypeptidase activity in germinated wheat. *Plant Physiol.* 58: 516 (1976).
- 67) Preston, K. and Kruger, J. Specificity of two isolated wheat carboxypeptidases. *Phytochemistry* 16: 525 (1977).
- 68) Frith, G. J. T., Gordon, K. H. J. and Dalling, M. J. Proteolytic enzymes in green wheat leaves. I. Isolation on DEAE-cellulose of several proteinases with acid pH optima. *Plant Cell Physiol.* 19 (3): 491 (1978).
- 69) Preston, K. R. Note of separation and partial purification of wheat proteases by affinity chromatography. *Cereal Chem.* 55 (5): 798 (1978).
- 70) Sethi, V. B. and Bains, G. S. Factors influencing the malting quality of Indian wheats. *J. Food Sci. Technol.* 15 (2): 62 (1978).
- 71) Abazid, Taha L., Popov, M. P. and Kazakov, E. D. Comparative study of normal and shield bugdamaged wheat grain. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Pishch. Technol.* (1): 168 (1978).
- 72) Kolostori, Maria, Flour quality and proteolysis. *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.* 8 (1): 1 (1979).
- 73) Preston, K. R. and Kruger, J. E. Physiological control of exo- and endo- proteolytic activities in germinating wheat and their relationship to storage protein hydrolysis. *Plant Physiol.* 64 (3): 450 (1979).
- 74) Kaluderski, G. Autolytic activity of wheat damaged by wheat bugs. *Zito Hleb* 7 (2): 15 (1980).
- 75) Popov, M. P. and Shanenko, E. F. Proteolytic enzymes of wheat. *Dev. Food Sci.* SA (Prog. Cereal Chem. Technol.), 117 (1983).
- 76) Flening, J. R., Johnson, J. A. and Miller, B. S. Effect of malting procedure and wheat storage conditions on alpha-amylase and protease activities. *Cereal Chem.* 37: 363 (1960).
- 77) Myczkowski, J. Protease activity in leaves during growth and development of wheat. *Acta Agrobot.* 23 (1): 159 (1970).
- 78) Bushuk, W., Hwang, Paulina, Wrigley, C. W. Proteolytic activity of maturing wheat grain.

- Cereal Chem.* 48 (6) 637 (1971).
- 79) Al'tergot, V. F., Galachalova, Z. N. and Makhotkina, G. A. Translocation of organic compounds into ripening wheat grain as a function of the aging rate of the leaf. *Fiziol. Mekh. Adapt. Ustoich. Rast.* 1: 268 (1972).
- 80) Evers, Anthony D. and Redman, David G. Location of proteolytic enzymes in developing grains of wheat. *Chem. Ind. (London)* (2), 90 (1973).
- 81) Kruger, J. E. Changes in the levels of proteolytic enzymes from hard red spring wheat during growth and maturation. *Cereal Chem.* 50, 122 (1973).
- 82) Makarova, V. V., Prokhorova, A. P. and Razorenova, E. I. Experimental long-term storage of wheat in industrial conditions. *Tr., Vses. Nauchno-Issled. Inst. Zerna Prod. Ego Pererab.* 80, 72 (1974).
- 83) Kruger, J. E. and Preston, K. The nature and role of proteolytic enzymes during early germination. *Cereal Res. Commun.* 4 (2), 213 (1976).
- 84) Kruver, J. E. and Preston, K. Location and activity of proteolytic enzymes in developing wheat kernels. *Can. J. Plant Sci.* 56 (2), 217 (1976),
- 85) Sopanen, Tuomas, and Lauriere, Christiane, Activities of various peptidases in the first leaf of wheat. *Physiol. Plant* 36 (3), 251 (1976).
- 86) Kohl, Johannes Guenter, and Nicklisch, Andreas, Investigation on the detection of the proteolytic activity during the germination of different winter wheat varieties. *Wiss. Z. Humboldt-Univ. Berlin., Math. Naturwiss. Reihe* 25 (6), 697 (1976).
- 87) Preston, K. and Kruger, J. E. The distribution of carboxypeptidases in anatomical tissues of developing and germinating wheat kernels. *Cereal Chem.* 54, 167 (1977),
- 88) Feller, U. and Erismann, K. H. Changes in gas exchange and in the activities of proteolytic enzymes during senescence of wheat leaves (*Triticum aestivum* L.). *Z. Pflanzenphysiol.* 90 (3), 235 (1978).
- 89) Kruger, J. E. and Preston, K. R. Changes in aminopeptidases of wheat kernels during growth and maturation. *Cereal Chem.* 55, 360 (1978).
- 90) Preston, K. R., Dexter, J. E. and Kruger, J. E. Relationship of exoproteolytic and endoproteolytic activity to storage protein hydrolysis in germinating durum and hard red spring wheat. *Cereal Chem.* 55 (6), 877 (1978).
- 91) Parkany-Gyarfas, A., Vamos-Vigyazo, L., Palosi-Szantho, V., Pozang-Vicze, I. and Temesvari, J. Changes in the activities of some enzymes in the wheat kernel during ripening. *Proc. Hung. Annu. Meet. Biochem.* 21 st 151 (1981).
- 92) Shub, I. S. and Filina, M. I. Effect of ascorbic acid and sodium D-isoascorbate on the protein-proteinase complex of wheat flour. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Pishch. Technol.* (5), 46 (1982).
- 93) Salgo, A. and Lasztity, R. Die Protease des Weizens und ihre Technologische Bedeutung (1980).
- 94) Gabor, Rosemarie, Taeufel, Alfred, and Ruttloff, Heinz, Changes in the molecular weights of the proteins of wheat gluten after weak proteolysis. *L. Lebensm. -Unters. Forsch.* 175 (6), 399 (1982).
- 95) Subda, Hanna, Correlations between flour qualitative characteristics and their effect on bread making potential of spring and winter wheat varieties. *Hodowla Rosl., Aklim. Nasienn.* 26 (4), 287 (1982).
- 96) Kulp, Karel, and Lorenz, Karel, Change in bread-baking properties of starch and gluten wheat flour components causing damage as a result of preharvest germination. *Mlyn.-Pek. Prum. Tech. Skladovani Obili* 28 (12), 368 (1982).
- 97) Kawamura, Yukio, and Yonezawa, Daizo, Wheat flour proteases and their action on gluten proteins in dilute acetic acid. *Agric. Biol. Chem.* 46 (3), 767 (1982).
- 98) Ciacco, C. F. and D' Appolonia, B. L. Reconstitution studies with sound and sprouted wheat flour. *Cereal Chem.* 59 (2), 77 (1982).
- 99) Lorenz, K., Roewe-Smith, P., Kulp, K. and Bates, L. Preharvest sprouting of winter wheat.

- II. Amino acid composition and functionality of flour and flour fractions. *Cereal Chem.* **60** (5), 360 (1983).
- 100) Ikhsanova, D. I. Popov, M. P. and Kretovich, V. I. Enzymic activity of wheat gluten and its fractions. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **19** (5), 659 (1983).
- 101) Read, J. W. and Haas, L. W. Further studies on the baking quality of flour as affected by certain enzyme actions. Relative starch liquefying power of the distatic agents investigated. *Cereal Chem.* **13**, 14 (1936)
- 102) Kretovich, V. L. Biochemistry of the damage to grain by the wheatbug. *Cereal Chem.* **21**, 1 (1944).
- 103) Hildebrand, F. C. Role of proteases in baking. In: *Enzymes and their role in wheat technology*, ed. by J. A. Anderson; p-275. AACC Monograph Series, Vol. I. Interscience: New York (1946).
- 104) Miller, B. S. and Johnson, J. A. High level of alpha-amylase in baking. II. Proteolysis in straight and sponge doughs. *Cereal Chem.* **25**, 178 (1948).
- 105) Pomeranz, Y., Halton, P., and Peers, F. G. The effects on flour dough and bread quality of molds grown in wheat and those added to flour in the form of specific cultures. *Cereal Chem.* **33**, 157 (1956).
- 106) Reed, G. and Thorn, J. A. Use of fungal protease in the baking industry. *Cereal Sci. Today* **2**, 280 (1957).
- 107) Morimoto, T. Free amino acids in sponges, doughs and baked soda crackers and bread. *J. Food Sci.* **31**, 736 (1966).
- 109) Redman, David, G. Softening of gluten by wheat proteases. *J. Sci. Food Agr.* **22** (2), 75 (1971).
- 110) Kretschmer, Peter, Ruttloff, Heinz, and Sehlbach, Carl R. Decreasing the viscosity of cereal suspensions. *Ger. (East)*. **106**, 130 (1974).
- 111) Liss, Wiesława, and Kaczkowski, Jerzy, Proteolysis as the compactness index of wheat molecules. *Acta Aliment. Pol.* **1**, (3-4), 281 (1975).
- 112) Galinska, Zdzisława and Kaczkowski, Jerzy, Electrophoretic investigations of proteolysis products of wheat gluten. *Acta Aliment. Pol.* **3** (4), 378 (1977).
- 113) Terada, Masaki, Minami Junichi, and Yamamoto, Takehiko, Activities of several enzymes in neutral and alkaline doughs. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **53** (5), 135 (1979).
- 114) Hussein, L., Abbassy, M., Arafa, A. and Morcos, S. R. Evaluation of the protein quality of wheat grains (Grizza 155) and eight related products by the dose-response bioassay. *Z. Ernaehrungswiss.* **18** (4), 275 (1979).
- 115) Petruzzelli, Luciana, Della Gatta, C., De Leo, P. and Colaprico, G, Technical note: semolina BAPA-ase activity and its possible relationship to pasta cooking quality. *J. Food Technol.* **16** (2), 213 (1981).
- 116) Mitsunaga, T. Some properties of protease inhibitors in wheat grain. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **20**, 153 (1974).
- 117) Mitsunaga, T. Isolation and characterization of trypsin inhibitors from wheat germ. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **25**, 43 (1979).
- 118) 光永俊郎, 清水まゆみ 小麦麩部のトリプシンインヒビターの単離およびその二, 三の性質について。日本農芸化学会誌**56**(1), 7(1982)
- 119) Mitsunaga, T., Kimura, Y. and Shimizu, M. Isolation and partial characterization of a Trypsin inhibitor from wheat endosperm. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **28**, 419 (1982)
- 120) 光永俊郎, 朝倉直子, 清水まゆみ, 発芽過程における小麦種子のトリプシンインヒビターの変動・日本農芸化学会誌 **57** (9), 857 (1983)