

タケノコに含有される β -アミラーゼの分離と性質

Some Characteristics of β -Amylase Isolated from Bamboo Shoot

大野 信子、黒田 智枝

1. 緒 言

でんぷんを加水分解して糖を生成するアミラーゼには主としてデキストリンをつくる α -アミラーゼ、主として麦芽糖をつくる β -アミラーゼ、主としてぶどう糖をつくるグルコアミラーゼなどがある。またこのほかにでんぷん分子の α -1、6-グルコシド結合を切るイソアミラーゼとプルラナーゼも知られている。これらのアミラーゼはでんぷんまたはオリゴサッカライドなどの構造研究に使用されているばかりでなく、工業的にも広く利用されている。なかでも β -アミラーゼはビール、ウィスキーの醸造のほか麦芽糖含有シラップ、注射用麦芽糖、高純麦芽糖の製造などに応用されている。

筆者は先に、サトイモ科 (*Colocassia*) のサトイモとタケノコイモに含まれる β -アミラーゼの分離精製を行ない、極めて純粋な標品を得、その酵素化学的性質について報告した⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾。今回はイネ科 (*Phyllostachys*) のモウソウチクの中に β -アミラーゼの存在することを発見し、これを純粋に分離し、その酵素化学的諸性質を明らかにすることができたのでここに報告する。

2. 実験の材料と方法

1) 試 料

実験に供したモウソウチク (*Phyllostachys pubescens* MEZEL) のタケノコは九州福岡県産のもので、千葉県市川市内で購入した。1本の重量450g前後のものを揃えて実験に用いた。大きさは大体基部直径6cm、長さ20cmである。

タケノコの先端部、中間部および基部における酵素活性の分布を調査した。タケノコは各部分を2倍量の水とともにミキサーで細砕し、遠心処理して得た上清についてHobsonら⁽⁴⁾の方法で可溶性でんぷん液に作用して生成する還元糖をNelson銅試薬を用いて発色させ、520nm

で比色定量した。マルトースで作成した標準曲線を利用して反応液 1 ml 当り 1 分間に $1 \mu\text{mol}$ のマルトースを遊離する量を β -アミラーゼ酵素活性 1 単位として表わした。

タケノコ全体では酸処理後の g 当り酵素活性は 0.55U を示したが、 100°C 10 分加熱処理により 0.17~0.2U 落ちた。すなわち生のタケノコの酵素活性は 0.35U/g 位であった。またタケノコの先端部、中間部および基部について混在する α -アミラーゼ破壊のため酸処理を行ったあとの酵素活性はそれぞれ 0.58、0.50、0.45U/g と先端部が最も高く、基部が最も低かった。これと反対に、加熱処理後は先端部が 0.35U で最も低く、基部は 0.43U と最も高かった。これらにより β -アミラーゼ活性は先端部が 0.23U で、中間部 0.10U および基部 0.02U よりも高いことが明らかにされた (Table 1)。

Table 1. β -amylase activity of bamboo shoot

	Acid treatment (U/g)	Heat treatment (U/g)	β -amylase activity (U/g)
Top	0.58	0.35	0.23
Middle	0.50	0.40	0.10
Base	0.45	0.43	0.02

2) 実験方法

下記の実験方法については前報告⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾と大体同様である。

- (1) 酵素標品の分離と調製および精製方法
- (2) β -アミラーゼ活性測定および還元糖の定量法
- (3) イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過法
- (4) Disc電気泳動法
- (5) 分子量の測定法
- (6) 等電点の測定法

3. 実験結果と考察

1) 粗酵素標品の分離と調製

タケノコの皮を剥ぎ、直ちに適宜の大きさに刻み、2倍量の水を加えミキサーで1分間細砕し、40分室温に放置したのち低温で遠心処理 (5,000 r.p.m. 10 min.) した。分離した沈でん物に少量の水を加えさらに遠心処理をくり返した。この上清は最初の上清に加えた。

混在する α -アミラーゼを不活性化するため 1 N-HClを加えて pH3.6にして10分間放置したのち直ちに 3%アンモニア水を用いてpH4.8にもどし、再び低温で遠心処理 (8,000 r.p.m. 10min.) し、上清をロータリーエバポレーターで40°C以下で濃縮した (Fig. 1)。

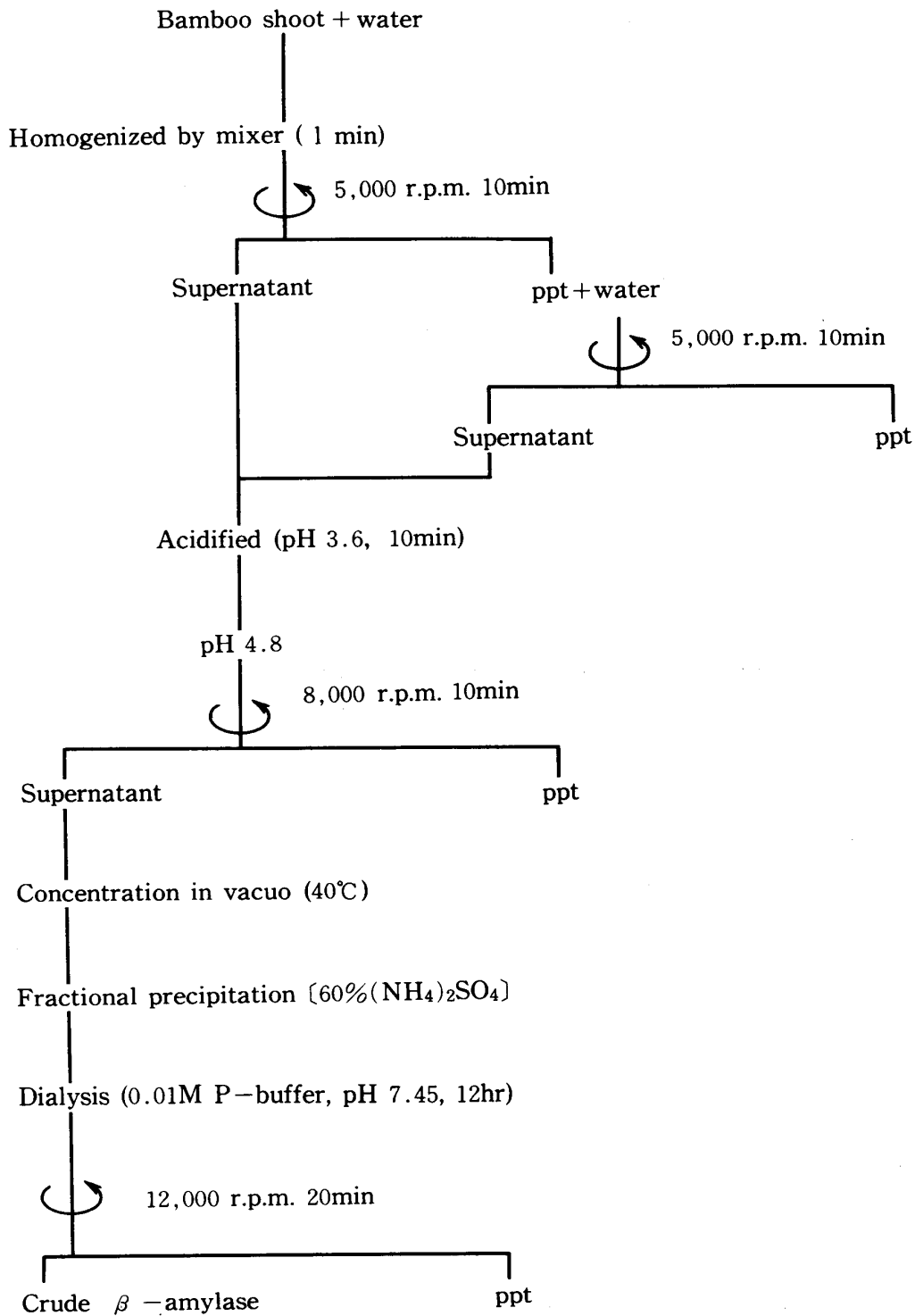


Fig. 1 Scheme for the isolation and preparation of crude β -amylase

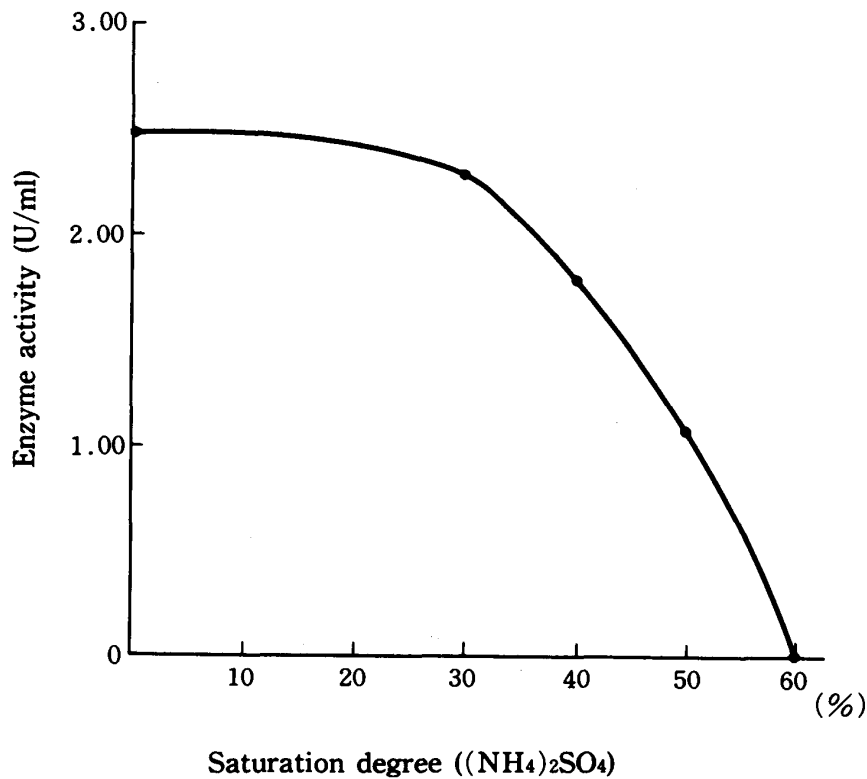


Fig. 2 Ammonium sulfate fractionation

これに硫酸アンモニウムを加え蛋白質の分画を行った。濃度は10~60%飽和になるよう添加して攪拌しながら30°Cで2時間放置したのち生成する沈でん物を冷却遠心処理(8,000 r.p.m. 20min.)して得られた上清液の酵素活性を測定した。

Fig. 2に示すように残存活性は30%飽和で96%、40%飽和で76%、50%飽和で44%の結果を得たが60%飽和では完全に塩折された。比活性(unit/mg Protein)は粗酵素の0.14から1.29になった。

この結果より、本実験では60%飽和による硫酸アンモニウム塩折により生成した沈でん物を集め、少量の0.01Mーリン酸緩衝液(pH7.45)に溶解してセロファンチューブに入れ、同緩衝液を用い4°Cで12時間透析した。つぎに遠心処理(12,000 r.p.m. 20min.)して粗酵素β-アミラーゼ標品を得た。

2) DEAE-Cellulose カラムクロマトグラフィーによるβ-アミラーゼの分別

あらかじめ0.01Mーリン酸緩衝液(pH7.45)で平衡化したDEAE-Celluloseを1.6×63cmのカラムに充填し同緩衝液で透析した酵素標品を吸着させた。

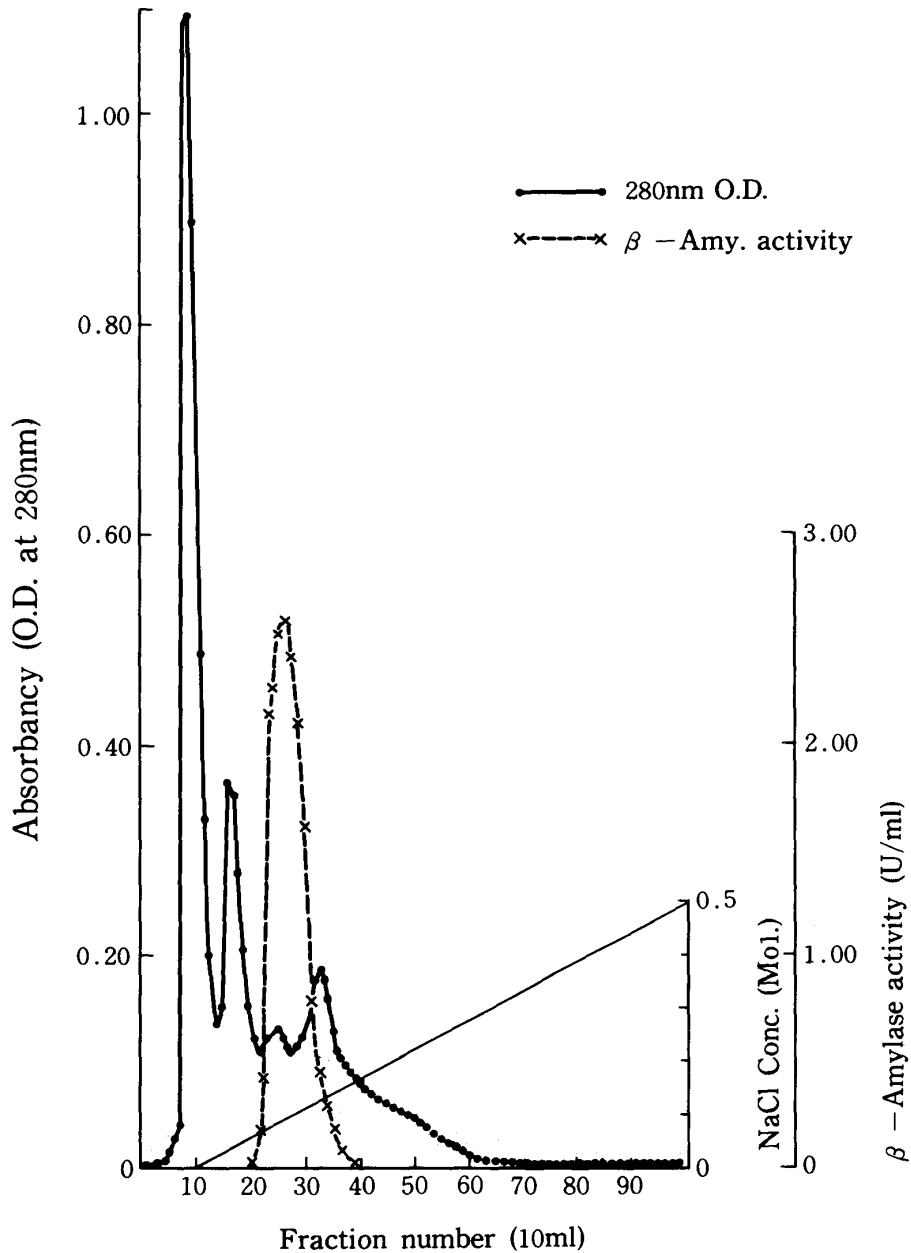


Fig. 3 Chromatographic separation on DEAE-Cellulose column chromatography.

その後、0～0.5M-NaClを含む各250mlの緩衝液の混合によるlinear gradient elutionを行った。流速は120ml/hr.で溶出液は各10mlずつ分取し、各フラクションについて280nmの吸光度および酵素活性を測定した。

その結果をFig. 3に示した。溶出曲線にはいくつかのピークが見出されているが β -アミラーゼ活性はNaCl濃度0.1M点で最高溶出量を示した。この活性個所を集め濃縮透折を行い

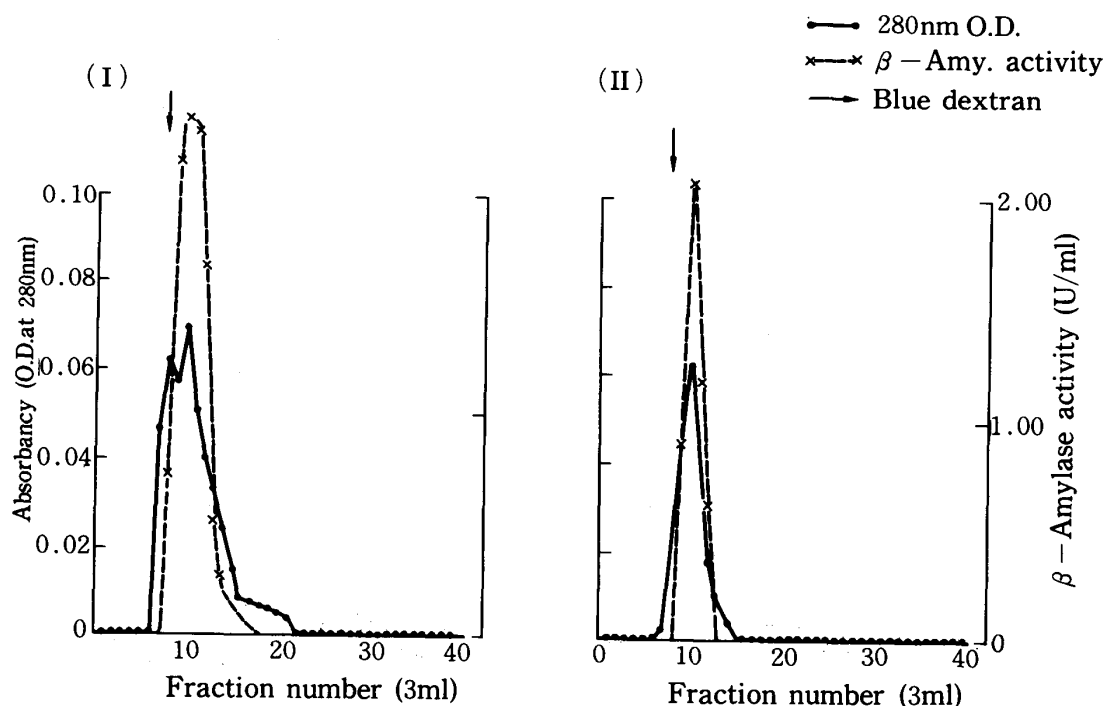


Fig. 4 Purification through gel filtration

次の実験に供した。なお、この時の比活性は32.9であった。

3) Bio-Gel P-100によるゲル濾過

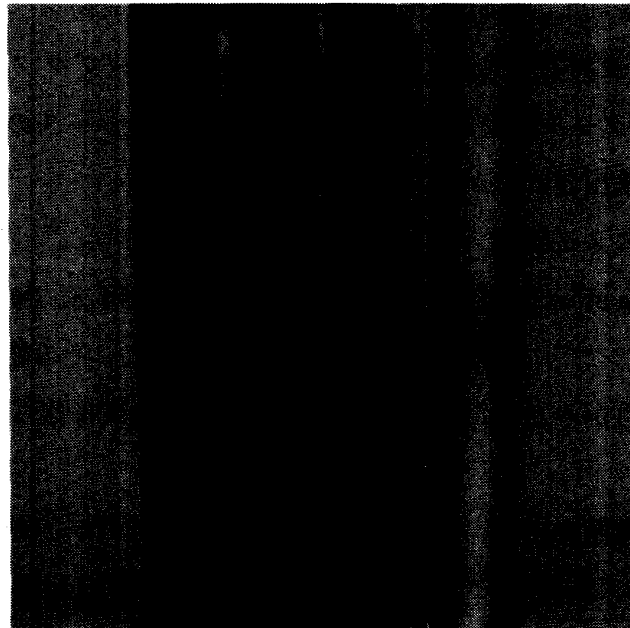
常法により活性化し充分平衡化したBio-Gel P-100のカラム (1.5×25cm) を用い、DEAE-Celluloseにより部分的に精製した酵素をのせ10ml/hr.の流速で溶出し、各3.0mlずつ分取した。その結果をFig. 4-1に示したがまだ蛋白質の混在が認められ、極めて接近して2つのピークが得られた。すなわちelution volume 18mlと27mlの点であるが、 β -アミラーゼ活性個所は後のピークに最高溶出点が見出された。

そこでこの活性個所を集めて濃縮透析を行った酵素標品を再度同一カラムを用いゲル濾過を行った結果、Fig. 4-2に示すようにFig. 4-1と同一elution volume 27ml点に β -アミラーゼ活性の最高溶出点が見出された。この時の比活性は53.5であった。

なお、このカラムのvoid volumeはblue dextran 2000を用いて660nmで測定した結果15mlであった。

4) Disc 電気泳動による精製

粗酵素およびDEAE-Celluloseカラムクロマトグラフィー、Bio-Gel P-100によるゲル濾過で得られた3つの酵素標品について永井の方法⁵⁾に準じてDisc電気泳動を行ないFig. 5に示



(1) (2) (3) (4)

- (1) Crude enzyme solution
- (2) Eluate from DEAE-Cellulose column
- (3) Eluate from Bio-Gel P-100 column (II)
- (4) The pure enzyme finally obtained

Proteins moved from top to bottom of the gels
in the photograph

Fig. 5 Acrylamide Disc-electrophoresis of β -amylase

す結果を得た。

ゲル濾過を2度行った標品についてもまだ他の蛋白質の混在が認められ2個のバンドが検出された (Fig. 5-(3))。そこで電気泳動後のゲルを染色しないで0.2cm間隔に切断し各々1mlの緩衝液に浸漬し4°Cの低温室中で酵素抽出を1夜行った。その後活性個所を検出して得られた β -アミラーゼの移動度 (M_{BPB}) を求めると0.52の値を得た。この活性個所を集め濃縮、透折を行い再度電気泳動を行いゲルを染色した結果、最終的に単一の蛋白質のバンドを得ることができた (Fig. 5-(4))。この M_{BPB} は0.51の値を示し上記の酵素抽出で得られた結果とほぼ同一の値であった。

この酵素標品を用いて次の酵素化学的性質を2、3検討した。

5) β -アミラーゼの確認

- (1) でんぷんの分解生成物による確認

可溶性でんぷんに酵素を40°C、20時間作用させ、その分解生成物をペーパークロマトグラフィにかけた。濾紙は東洋濾紙No.50、溶媒はピリジン-n-ブタノール-水(4:6:3)、発色剤として水素フタル酸塩を用いた。その結果、マルトースのみが検出され、グルコースやその他の糖類は検出されなかった。

(2) でんぷん分解曲線による確認

基質は2% waxy-maize starch(東京化成工業株式会社)でpH4.8、30°Cで反応させ、Fig. 6に示すように経時的にサンプリングしてその分解様相を探った。その結果、反応開始40分位までは直線的に分解の進行がみられたが50分、60分と徐々に速度は落ち80分すぎるところからほぼ一定となった。

フェノール硫酸法で全糖値を求め、これから、分解率を算出すると約50%であった。

β -アミラーゼのでんぷん分解は分枝グルコースポリマーの構造と深いかわりがあるが一般にアミロペクチンの分解率は β -アミラーゼの特質として57~58%とされていることから、本実験の結果はこれに比較すると若干低い値であるが、アミロペクチンに対する作用挙動は β -アミラーゼ特有の性質を示した。

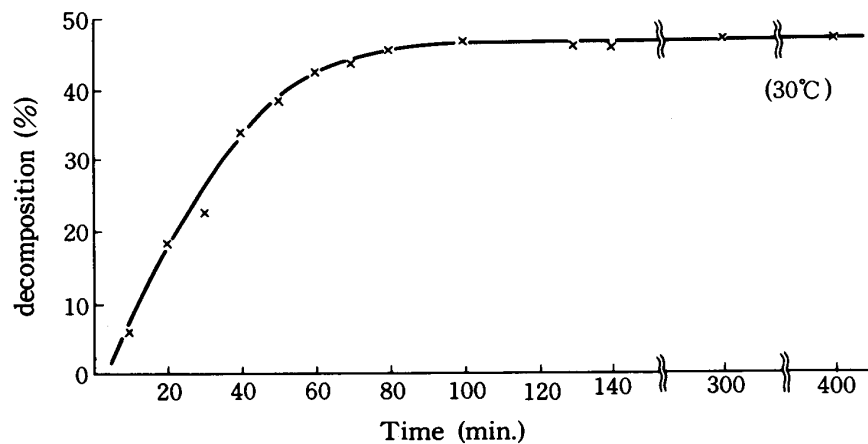


Fig. 6 Time course of hydrolysis of waxy-maize starch

以上のことから本酵素は β -アミラーゼであることを確認した。

6) 水素イオン濃度と酵素活性

水素イオン濃度の差による酵素活性の変化を追及した結果をFig. 7に相対値で示した。pH 3、4、5はacetate buffer、pH 6、7、8はphosphate buffer、pH 9、10はCarbonate

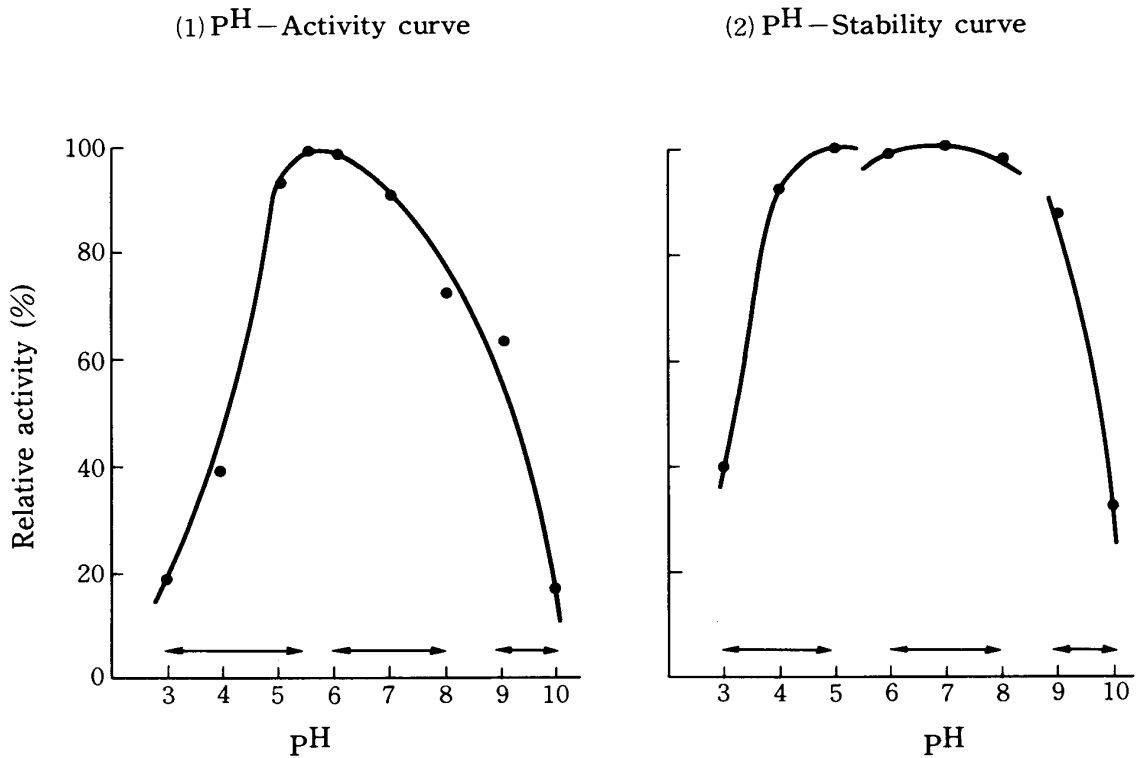


Fig. 7 pH and enzyme activity and stability

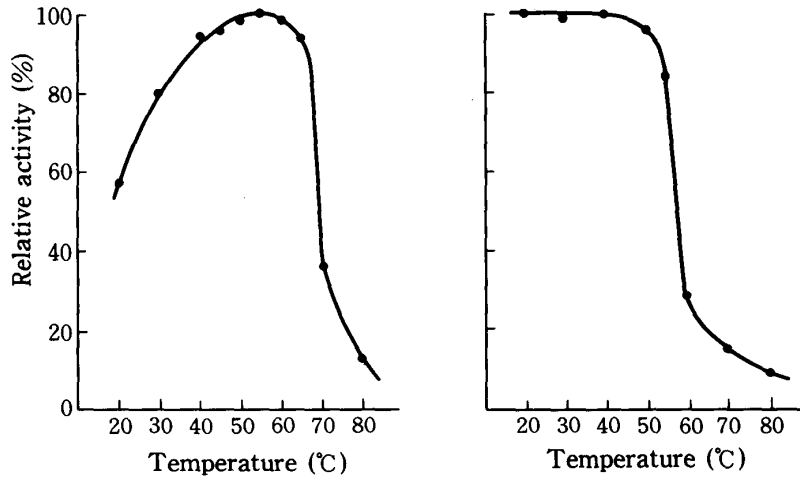
-bicarbonate bufferを使用し、その濃度は0.2Mである。Fig. 7-1の結果から本酵素は最適pH5.5であり、先に報告したサトイモβ-アミラーゼpH5.0⁽²⁾、タケノコイモβ-アミラーゼpH6.0⁽³⁾などと大きな差はない。また、ダイズβ-アミラーゼpH6.0、オオムギ麦芽、コムギβ-アミラーゼは共にpH5.2⁽⁶⁾であり植物起源のβ-アミラーゼの活性域はどれもpH5.0~6.0で酸性である。これに対し微生物起源のものではpH6.0~7.0と微アルカリ性である酵素が多い⁽⁷⁾。この点で高等植物のβ-アミラーゼと微生物のそれとでは著しい相違がみられる。

また、pH安定性についてはFig. 7-2に示すようにpH5.0~pH8.0が安定範囲である。先にサトイモのpH5.0~7.0⁽²⁾、タケノコイモのpH5.0~8.0⁽³⁾の結果を得ているが、これらとも大差は認められなかった。

pH安定性はコメ、ダイズ、オオムギ麦芽など高等植物起源のβ-アミラーゼは、アルカリ性側においてpH8.0位まで安定でタケノコβ-アミラーゼの場合と同様であるが、コムギβ-アミラーゼだけはpH9.2⁽⁷⁾で微生物起源のものに近い。例えば、*Bacillus cereus*、*Pseudomonas pseudomalles*、*Bacillus polymyxa*、などに関係する報告ではすべてpH9.0である⁽⁷⁾。ただ、*Bacillus megaterium*だけはpH5.0~7.5⁽⁷⁾と狭安定域で植物性起源のものと同様

(1) Temperature-Activity curve

(2) Temperature-Stability curve



(3) Heat inactivation

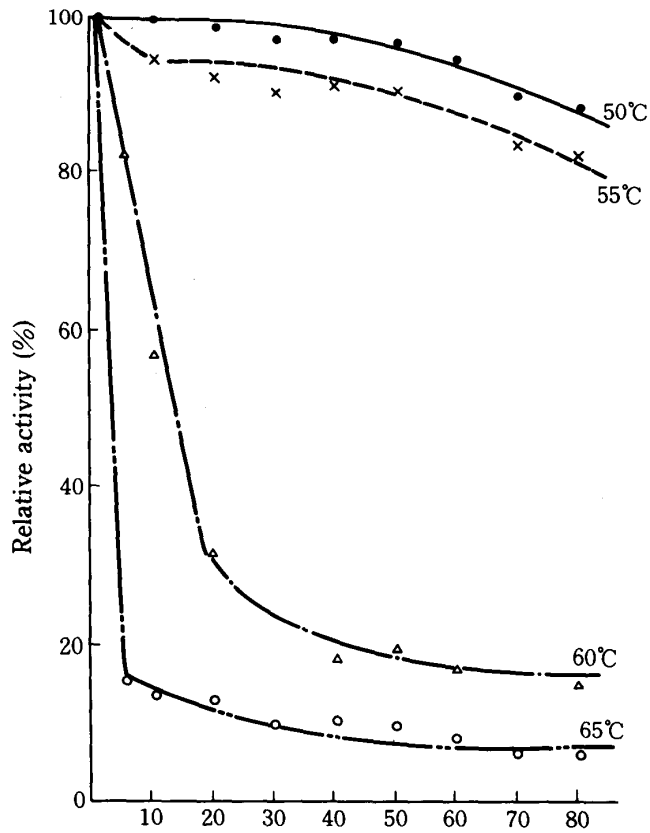


Fig. 8 Temperature and enzyme activity and Stability

している。

7) 温度と酵素活性

β -アミラーゼ活性と酵素反応の温度との関係を検討しFig. 8に示した曲線を得た。その結果、最適温度は55°Cを示し (Fig. 8-1) これはサトイモ β -アミラーゼ⁽²⁾と同一値であった。またタケノコイモの場合50°Cであり⁽³⁾やや温度に対して差を生じた。

本酵素の熱安定性について、各温度に30分放置して温度に対する変化を追及した (Fig. 8-2)。その結果50°Cまでは安定であるが、55°Cになると85%位まで残存活性は低下した。

つぎに温度を50°C、55°C、60°C、65°Cと定温にしてFig. 8-3に示すような各時間放置した場合の安定性について再試験を試みた。その結果50°C、55°Cにおいては80分放置しても80%以上の酵素活性を有するが、60°Cにすると約20%に急減し、55°Cから60°Cの間で酵素活性に著しい変化をもたらした。

β -アミラーゼの温度安定性については、微生物あるいは高等植物起源のものでは50~60°Cが限界で耐熱性のものはさほど見出されていない⁽⁷⁾⁽⁸⁾。しかしダイズにおいては酸性域で比較的安定で耐熱性も65°C⁽⁸⁾と他の酵素に比較して大きいことが知られている。なお、サツマイモ β -アミラーゼではpH6.0で70°Cが最高限界温度とされており⁽⁸⁾かなり耐熱性である。

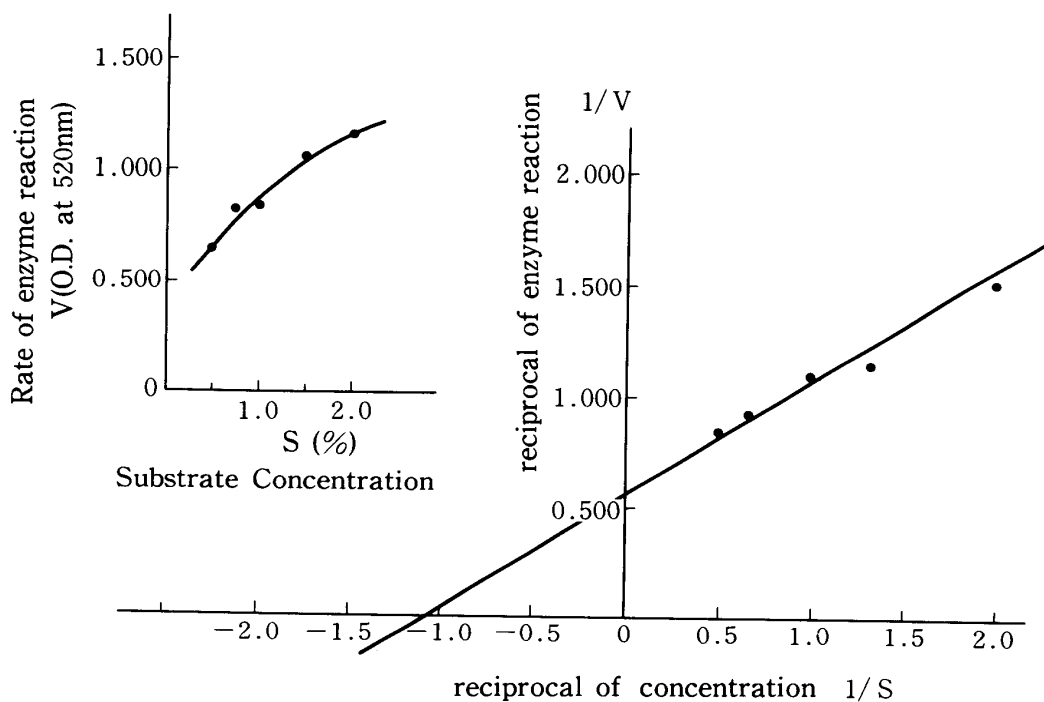


Fig. 9 Relationship of substrate concentration and enzyme activity

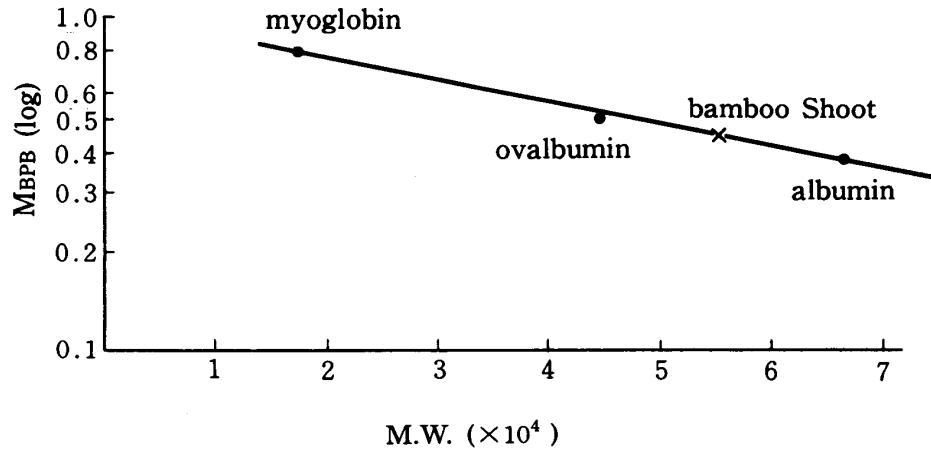
8) 基質濃度と酵素反応の速度

可溶性でんぷんを用い基質濃度を変えて酵素反応を行ない生じた還元糖の生成をNelson銅試薬を用いて比色定量した。これから酵素の k_m 値の測定を行った結果、本酵素の k_m は0.91%の値を得た (Fig. 9)。

9) 分子量の測定

分子量の測定はSodium dodecyl sulfate (SDS) を含むポリアクリルアミドを支持体とする林、大場らの方法⁽⁹⁾に準じたSDSゲル電気泳動法と、Andrewsの方法⁽¹⁰⁾によるBio-Gel P

(1)SDS-gel electrophoresis



(2)Bio-Gel P-100

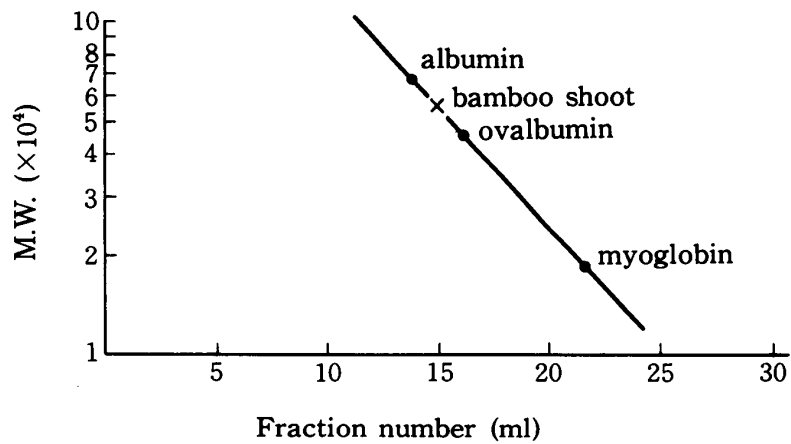


Fig. 10 Determination of molecular weight

-100を用いたゲル濾過法の2つの方法によった。

本酵素の分子量を測定するために標準蛋白質としてMann Research Laboratories Inc., New Yorkのmyoglobin (M.W. 17,800)、ovalbumin (M.W. 45,000)、albumin (M.W. 67,000) を用いこれらと比較して未知の分子量を推定した。その結果Fig. 10—(1)よりSDS—ゲル電気泳動法においては55,000~55,500、Fig. 10—(2)よりゲル濾過法においては55,000~56,000の値を得、オオムギ麦芽β-アミラーゼの分子量56,000と一致している⁽⁷⁾。

サツマイモβ-アミラーゼはサブユニット構造を有し、分子量152,000とも、また197,000とも報告⁽⁷⁾⁽⁸⁾されているが、これを除いて植物起源の大部分のβ-アミラーゼではモノマーであり、分子量60,000前後と報告⁽⁷⁾されている。本酵素においても分子量の大きさから考えるとこれらと同じくモノマーであろうと推定される。

10) 等電点の測定

本酵素の等電点をCatsimpoolesの方法⁽¹¹⁾に従いGel-Electrofocusing法で測定しTable 2に示すようにpH6.4の値を得た。この値はタケノコイモpH6.5⁽³⁾に近く、サトイモpH6.8⁽²⁾ともさほど大きな差はない。しかしコムギ、オオムギ麦芽pH6.0、ダイズpH5.1~5.9より高く、サツマイモpH4.77とはかなり大きな差がある。また*Bacillus megatherium* pH9.1⁽¹²⁾とは極めて対照的である。

Table 2. Determination of isoelectric point

Experiment No.	1	2	3	4
Isoelectric point	6.5	6.5	6.4	6.3

11) 酵素活性に及ぼす金属イオンおよび蛋白質修飾剤の影響

数種類の金属塩あるいは蛋白質修飾剤を酵素溶液とpH4.8において25°C30分インキュベートし、その残存活性を糖化力により調べた。結果はTable 3に示すように、HgCl₂においては完全な失活が見られた。またFeSO₄、FeCl₃、AgNO₃、CuSO₄などの重金属イオンにおいても著しい阻害を受けた。またPCMB (p-chloromercuribenzoate) やIAA (iodoacetamide) など蛋白質の化学的修飾剤も極めて大きな阻害反応を示した。

このように本酵素はHg⁺⁺、Cu⁺⁺、Ag⁺などの重金属イオンやSH試薬であるPCMBまたSH基を不可逆的に修飾するIAAなどの存在下で強く阻害された結果から本酵素の活性発現に対するSH基の関与が考えられる。

そこでこの点の確認のためにSH基に対する特異性が高いPCMBの酵素活性に及ぼす影響

Table 3. Effects of reagents on enzyme activity

Reagents	Relative Activity	Reagents	Relative Activity
None	100	CaCl ₂	102.4
FeSO ₄	9	ZnCl ₂	79.1
FeCl ₃	10.2	CuSO ₄	16.7
CoCl ₂	97	AgNO ₃	19
NiCl ₂	100	DTT	109
HgCl ₂	0	Cystein	112
PCMB	20	SDS	10.8
NEM	94.6	Toriton×100	96.4
IAA	10.8	Tween80	88.6

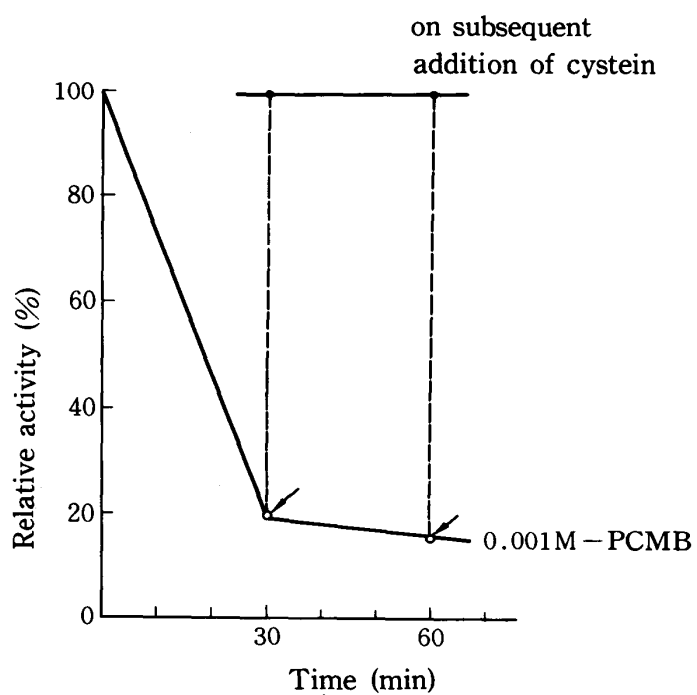
DTT (dithiothreitol)

PCMB (p-chloromercuribenzoate)

IAA (iodoacetamide)

SDS (sodium dodecyl sulfate)

NEM (N-ethylmaleimide)



(Arrows indicate the point of addition of 0.01M-Cystein)

Fig. 11 Inhibition by PCMB and the reactivation effect of cystein

について検討した。

Fig. 11に示すようにSH試薬との反応時間が30分経過した時点で残存活性は20%まで急低下し、60分経過後では15%で反応30分以後はあまり大きな変化は見られなかった。

このPCMBにより阻害されたものに0.01M-システインを添加することによりその活性を100%近い点にまで回復することができた。PCMBによる失活およびシステイン添加による活性回復の効果はPCMBの処理時間およびシステインとの接触時間には関係ないようであった。以上の結果から本酵素は分子内にSH基を有するものと推定される。

酵素分子内のSH基の数についてダイズ β -アミラーゼでは5個含有している⁽¹³⁾など植物起源のものでは3~5個のSH基を含むとされているのに対し、微生物 β -アミラーゼ中のSH基について南森ら⁽¹⁴⁾は*Bacillus cereus*の場合1個のSH基を含むのみと報告しており、微生物起源の酵素のSH基は1個だけ含まれていると考えられている⁽⁸⁾点で両アミラーゼ間の大きな差異が見られる。しかしこれらのSH基は遊離の型で存在するSH基であるため、いずれの β -アミラーゼもSH試薬処理で活性低下がみられることは一致している。

4. 要 約

- 1) モウソウチク (*Phullstachys pubescens* MEZEL) のタケノコに β -アミラーゼが存在することを知り、その分離、精製およびこの β -アミラーゼの性質の解明を試みた。
- 2) タケノコ中の β -アミラーゼ活性は先端部が最も高く、基部が最も低く、中央部は両者の中間にあった。
- 3) タケノコに水を加えミキサーで細砕し、低温で遠心処理し、酸性にして混在する恐れのある α -アミラーゼを破壊したのち、塩析、透折、遠心処理などにより粗酵素標品を得た。
- 4) 粗酵素標品はDEAE-CelluloseカラムクロマトグラフィーおよびBio-Gel P-100ゲル濾過により精製し、最終的には電気泳動的に単一のバンドが得られるまで純化した。これを β -アミラーゼの精製標品として以下の実験に供した。
- 5) β -アミラーゼの確認は、可溶性でんぷんに作用させたときの生成物がマルトースであることおよびwaxy-maize starchの分解様相によった。
- 6) こうして得た純アミラーゼは最適pH5.5、安定性pH5.0~8.0、最適温度55°C、km 0.91%、分子量55,000~56,000、等電点pH6.4であった。
- 7) 以上の特性をサトイモ、タケノコイモ、コムギ、オオムギ麦芽、サツマイモおよび微生物 β -アミラーゼのそれと比較し検討を加えた。
- 8) 金属イオン、蛋白質修飾剤などの酵素活性への影響を調べた。またPCMBによる酵素

活性の失活がシステインにより回復される事実から本酵素は分子内にSH基を有するものと推定した。

本報告の一部は昭和60年度日本家政学会第37回年次大会において口頭発表したものである。

終りに臨み、終始ご指導を賜りました和洋女子大学御園光信教授、務台蔵人元教授、千葉大学矢吹 稔教授に深謝いたします。また本学元助手補横倉玲子さんにご協力いただきましたことをお礼申し上げます。

文 献

- (1) 大野信子、横倉玲子：和洋女子大学紀要、(第2分冊) 24 (1983)
- (2) 大野信子：家政学会誌35、7 (1984)
- (3) 大野信子：和洋女子大学紀要 (第2分冊) 26 (1985)
- (4) 二国二郎監修：澱粉科学ハンドブック、朝倉書店、267、(1977)
- (5) 永井 裕：蛋白質 核酸 酵素、別冊、3、(1967)
- (6) 二国二郎監修：澱粉科学ハンドブック、朝倉書店、99、(1977)
- (7) 中村道德監修：アミラーゼ、学会出版センター (1986)
- (8) 大西正健、岡田巖太郎、谷口 肇、坂野好幸：蛋白質 核酸 酵素、30、5、(1985)
- (9) 林 建二、大場義樹：蛋白質 核酸 酵素、17、304 (1972)
- (10) P. Andrews: Biochem. J. 91, 222 (1964)
- (11) N. Catsimpoles: Anal. Biochem., 26, 480 (1968)
- (12) M. Higashihara. and S. Okada: Agr. Biol. Chem., 38, 5, 1023 (1974)
- (13) 丸尾文治、田宮信雄監修：酵素ハンドブック、朝倉書店、493、(1983)
- (14) 南森隆司、新家龍、中野長久、北岡正三郎、西羅寛：日本生化学会講演要旨集、163、(1983)

大野 信子 (本学助教授)

黒田 智枝 (本学助手補)