デンプングリコール酸ナトリウムに関する研究 II^{*1}タカアミラーゼの作用^{*2}川崎近太郎, 岡田幸蔵^{*3}, 五味章次(大阪大学薬学部^{*4})Studies on Carboxymethylstarch. II^{*1} The Action of Taka-amylase.^{*2}Chikataro Kawasaki, Kozo Okada^{*3} and Shoji Gomi(School of Pharmacy, Osaka University^{*4})

The hydrolyzing activity of taka-diastase to carboxymethyl derivatives of polysaccharides is still uncertain, therefore the action of taka-diastase to both carboxymethylstarch (CMS) and carboxymethylcellulose (CMC) was investigated.

The degree of hydrolysis of the substrate was determined by measuring the formation of the total reducing sugars, according to the procedure of Somogyi.

Taka-diastase hydrolyzed CMS and CMC to nearly same levels, though it was less effective than in the case of starch. Between CMS and CMC no significant differences were found in regard to the optimal pH or temperature and the rate of hydrolysis in the presence of some enzyme inhibitors. Even heating of the enzyme did not produce any differences of hydrolysis between both substrates.

Taka-amylase A (TAA) and taka-amylase B (TAB) were prepared from taka-diastase, according to the method of Akabori et al. and Okazaki. The former could hydrolyze more strongly CMS than CMC for the first several hours in incubating, while the latter showed always a considerable hydrolyzing activity to CMC but not to CMS. The paper chromatogram of the incubation mixture of CMC and TAB mainly indicated the formation of glucose along with a few oligosaccharides. However, such activity of TAB might be due to a contamination of a hydrolyzing enzyme such as cellulase, because its activity for CMC progressively decreased with its further purification.

(Received August 27, 1966)

前報で諸種のアミラーゼ, セルラーゼ粗酵素液によるデンプングリコール酸ナトリウム (以下 CMS と略記), 繊維素グリコール酸ナトリウム (以下 CMC と略記) の水解について報告した。この中で, タカジアスターゼはデンプンおよび CMS の水解活性すなわちアミラーゼ活性と, CMC の水解活性すなわち Carboxymethylcellulase (以下 CMCase と略記) 活性の両作用が他の酵素標品よりも強く, CMS と CMC に対する水解作用を同時に比較できる利点がある。そこで本報ではタカジアスターゼを用いて CMS や CMC の水解状況をさらに詳細に検討した結果について報告する。

実験方法

1. 基質溶液の調製

CMS (平均置換度 0.60) および CMC (平均置換度 0.55) をそれぞれ水に懸濁し攪拌しつつ水を加えて 1% 水溶液とした。

2. 酵素液の調製

タカジアスターゼ粗酵素液は原末 (三共製) の 1% 水溶液 (または M/50 酢酸あるいはリン酸緩衝液) を調製し遠心後, 上清をそのままあるいは水でさらに希釈したものを用いた。

タカアミラーゼ A (以下 TAA と略記) はタカジアスターゼ原末より赤堀らの方法¹⁾により調製し 2 回再結晶したものの 4.4% - M/50 酢酸カルシウム液を用時さらに水で 100 倍にうすめた。タカアミラーゼ B (以下 TAB と略記) はタカジアスターゼ原末より岡崎の方法²⁾

*1 前報 (I), 岡田幸蔵: 武庫川女子大紀要 13, S 227 (1965).

*2 第15回日本薬学大会 (横浜) で発表 (1962).

*3 現在武庫川女子大学薬学部: 西宮市枝川町4-16

*4 豊中市刀根山 6-5; 6-5, Toneyama, Toyonaka.

で調製した溶液をそのまま用いた。

3. 反応条件ならびに還元糖の測定

1%基質溶液 4 ml と $M/5$ 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 1 ml の混液をあらかじめ 40°C に加温しておき、これに酵素液 1 ml を加えて一定時間保温後反応液の一部をとり Somogyi 法³⁾ (滴定法) により還元糖を測定した。

実験結果

1. タカジアスターゼの分解活性におよぼす諸条件について

(1) 反応 pH の影響

CMS と CMC の分解に対するタカジアスターゼの作用 pH をみるため種々の pH で反応させ還元糖生成度を比較した。Fig. 1 のように最適 pH は 4.8~5.5 で両基質に共通しており、これはまたデンプンに対するタカアミラーゼの作用 pH とも近似している。

Fig. 1 Effect of pH on Hydrolysis of CMS and CMC with Taka-diastase

Reaction Condition: 40 mg substrate, 10mg Taka-diastase and 0.04 M buffer solution at various pH levels were incubated for 60 min at 40°.

(2) 反応温度の影響

反応温度について調べた結果は Fig. 2 のように、pH 4.8, 60 分の反応では 40~45°C のばあいには最大の糖生成がみられ、CMC と CMS とで差がなかった。

(3) 加熱時の酵素の安定性

タカジアスターゼ中に存在する各基質に対応する酵素が酵素液を加熱したとき、それぞれ異なった態度をとるのではないかと考え、各温度で 15 分間酵素液を加熱しデンプン、CMS、CMC に対する分解活性を測定した。TABLE I のように、どの基質に対する酵素も 60°C の加熱でかなり失活が起こり 70°C 以上で大部分が活性を失

Fig. 2 Effect of Temperature on Hydrolysis of CMS and CMC with Taka-diastase

Condition: 40 mg of substrate was incubated with 10 mg of Taka-diastase at pH 4.8 for 60 min.

TABLE I Stability of Taka-diastase on Heating

Substrate	Reducing sugars formed (mg, glucose equivalent)		
	Starch	C M S*	C M C**
Heat			
control	33.1	1.1	2.5
60°C	27.3 [82]	0.8 [68]	1.3 [53]
70°C	6.3 [19]	0.1 [7]	0.2 [9]
80°C	0.4 [1]	0 [0]	0 [0]

Reaction condition: 40 mg of substrate, 10 mg of taka-diastase (it was previously heated in its solution for 15 min. at each temperature) and 0.04 M acetate buffer (pH 4.5) in 6 ml total volume were incubated at 40° for 60 min.

Values in parentheses are expressed as the percentage of the enzyme activity of control (not heated).

* Degree of substitution: 0.60

**Degree of substitution: 0.55

なった。CMCase がアミラーゼより加熱に対しいくぶん不安定な傾向を示す以外 3 つの基質に対する作用の著しい違いはみられない。

(4) 酵素阻害剤添加の影響

上で記したと同様の目的で CMS、CMC 分解活性に対するいくつかの酵素阻害剤の影響を調べた。TABLE II のように試験した酵素阻害剤のうち FeCl_3 、 ICH_2COOH は 3 つの基質に対する分解作用を強く阻害するが、 KCN 、 NaF は逆に CMS 分解活性をいくぶん増大した。トルエンは CMC ase 活性のみを阻害する傾向を有し基質ごと

TABLE II Effects of Some Enzyme Inhibitors on Hydrolyzing Activities of Taka-diastase

Inhibitor	Substrate	Reducing sugars formed, (mg, glucose equivalent)		
		Starch	C M S	C M C
—	—	53.3	0.8	2.6
0.1 M KCN	—	30.6 [57]	1.6 [191]	1.8 [69]
0.5 M NaF	—	45.9 [83]	1.3 [149]	2.6 [100]
0.5 M ICH ₂ COOH	—	0.8 [2]	0.6 [67]	1.4 [54]
0.5 M FeCl ₃	—	0 [0]	0 [0]	0.3 [12]
0.5 M Caffeine	—	46.1 [85]	0.7 [80]	2.1 [82]
10 ⁻⁶ M Quinine sulfate	—	37.8 [71]	1.3 [152]	2.2 [86]
0.04 M HCHO	—	38.7 [73]	0.8 [100]	2.0 [77]
Toluene	—	47.9 [90]	0.9 [101]	1.6 [64]

Reaction condition: 40 mg of substrate, 10 mg of taka-diastase, 1~2 ml of each inhibitor solution at a given concentration and 0.04 M acetate buffer (pH 4.5) in 8 ml total volume were incubated at 40° for 60 min. Values in parentheses are expressed as the percentage of the enzyme activity of control (in the absence of drug)

に異なった分解因子が存在することを暗示している。

(5) 反応途中に、あるいは反応後分離した基質に酵素を再添加したばあいの分解度

CMS あるいは CMC に対するタカジアスターゼの作用で検出される還元糖が基質に混在するかもしれないデンプンの分解に由来するものでないことを確める意味で、反応の途中あるいは反応後未反応の基質を分離し、これに酵素を再び作用して還元糖の生成状況を比較した。Fig. 3 のように反応途中に酵素を再び加えると CMC, CMS からの還元糖生成はいずれも添加しないものにくらべかなり増加したが、CMS の増加度が CMC にくらべてやや大であった。また基質と酵素を 40°C, 60 分反応した後煮沸して酵素を失活させ、冷後倍量のアルコールを加えて基質を沈でんして分離した再生基質に再び酵素を使用して還元糖の生成度を測定し対照（前処理で酵素液の代りに水を加え以下実験と同様に操作したもの）と比較した。Fig. 4 のように一度酵素処理を受けた基質の分解の初速度は対照にくらべて CMS, CMC ともやや小さいがほぼ同じ分解曲線を示した。このように一度酵素処理を行なった基質もタカジアスターゼにより同じような分解を受けるほか、長時間（72時間）の反応でもほぼ一定した還元糖の持続的な増加がみられることは CMC あるいは CMS 自身が基質になって酵素の分解作用を受けることを暗示する。

Fig. 3 Effect of Enzyme Supplement on Hydrolysis of CMS and CMC

Reaction condition: 20 mg of substrate, 5 mg of taka-diastase and 0.04 M acetate buffer (pH 5.5) in 6 ml total volume were incubated at 40° for 45 min., and then 10 mg of taka-diastase was supplemented to the solution, followed by the continued incubation. An arrow shows the time of supplement of the enzyme.

..... with; — without supplement

Fig. 4 Enzymic Hydrolysis of Preincubated Substrates

The preincubated substrates were prepared by the following. After preincubation of the substrates with taka-diastase at 40° for 60 min. (the system contained the same components as in the experiments described in TABLE I), the mixtures were boiled for 1~2 min, and followed by ethanol addition into them in order to recover the substrates. Reaction condition

is the same as described in TABLE I.

.....preincubated, — not preincubated

2. TAA および TAB の CMS, CMC に対する作用

タカジアスターゼ原末よりアミラーゼ (TAA および TAB) のみを純粋に分離しセルラーゼをほとんど含まない状態で CMS と CMC に対する分解作用を比較した。Fig. 5 のように両精製アミラーゼはいずれも CMS, CMC 分解力を有するが、還元糖生成度は CMS よりも CMC を基質としたときの方がむしろ大きい。TAA は反応の初期で CMS の方をより強く分解したが、反応24時間目以後になると逆に CMC の分解が CMS を上廻る傾向が認められた。一方 TAB の CMS に対する分解活性はかなり弱いが、逆に CMC を分解する力は他のいずれのばあいよりも大であった。本酵素はタカジアスターゼを硫酸、透析、昇汞処理の過程まで行なって精製した酵素標品 (TAB-I) であるが、これをさらに岡崎の方法²⁾にしたがい、アクリノール、酸性白土吸着、透析処理を行なって精製したもの (TAB-II) は TABLE III のようにでん粉分解活性 (アミラーゼ活性) に対する CMC ase 活性の比率が精製前にくらべ著しく低下した。この結果から TAB の標品でみられた強い CMC ase 活性は TAB 自体の作用によるものではなく、酵素標品中にセルラーゼまたは CMC ase のような CMC の分解酵素が混在したことによるものと推定される。

Fig. 5 Hydrolysis of CMS or CMC with Taka-amylase A (TAA) and Taka-amylase B (TAB)

Reaction condition: 20 mg of substrate, 1 ml of enzyme solution and 0.04 M acetate buffer (pH 5.5) in 6 ml total volume were incubated at 40°

— CMS, ---- CMC

TABLE III Hydrolysis of Starch and CMC with Two Kinds of Taka-amylase B (TAB)

Substrate TAB*	Reducing sugars formed, (mg, glucose equivalent)		Ratio (b)/(a)
	Starch (a)	CMC (b)	
I	12.4	1.3	0.105
II	12.7	0.04	0.003

*TAB-I was prepared from taka-diastase by the treatments of ammonium sulfate precipitation, dialysis and mercuric chloride addition, according to Okazaki²⁾.

TAB-II was obtained from TAB-I by its further purifications (acrinol precipitation, acid clay adsorption and dialysis are involved) according to Okazaki²⁾.

Fig. 6

Paper Chromatograms of the Hydrolyzing Products of CMC with TAB, cellulase or Hydrochloric Acid

I : Incubated with TAB at 37° for 96 hr.

II : Heated in N-HCl at 95° for 4 hr.

III : Incubated with Asp. niger cellulase at 30° for 72 hr.

Solvent : Pyridine : n-BuOH : H₂O (4 : 6 : 3)

Paper : Toyo Roshi No. 50

Color reagent : Aniline hydrogen phthalate

Spot No. 1 is glucose, and No. 2, 3 and 4 appear to be cellotriose, cellotetrose and cellopentoxy, respectively.

また CMC の TAB による分解産物（還元糖）をろ紙クロマトグラフィーで調べると Fig. 6 のように主要分解物はグルコースであるが、このほかに cellotriose, cellopentoise に相当する oligosaccharide が検出された。比較のため同時に CMC の塩酸分解液およびセルラーゼ分解液のろ紙クロマトグラフィーを行なったが、いずれも主要分解物はグルコースであり、このほか酸分解液には3つのオリゴ糖（Rf 値よりこれらは cellotriose, cellotetrose, cellopentoise と考えられる）が検出された。これらの成績は TAB 標品による CMC の分解様式が酸による分解様式に比較的類似していることを暗示する。

考 察

Asp. oryzae は多くの水解酵素を含みこの中にはセルラーゼの存在も報告されているが、今回著者らもタカジアスターゼ標品（三共製，原末）が CMS と CMC の両方に対して水解作用を有することを示した。この2つの基質に対するタカジアスターゼの作用条件，加熱，酵素阻害剤の影響などを調べたが両者に共通した点が多く簡単な処理で一方のみの酵素活性を分別して測定することは困難である。しかしタカジアスターゼより精製して得られる TAA と TAB では CMS と CMC に対する水解作用に差がみられた。TAA と TAB はデンプンに対する水解様式を異にしているが、このうち TAB は CMC への作用が強い。しかし TAB にはなお他の水解酵素が夾雑しており，さらに精製を行なうとそのアミラーゼ活性に対する CMC ase 活性の比がしだいに低下するからその CMC に対する作用は混在するセルラーゼによるものである。他方 TAA のようなかなり精製したアミラーゼ標品においても CMC ase 活性がみられるのは興味深い現象であるが，なおセルラーゼの混在している可能性もありさらに精製した酵素標品で検討する必要がある。また CMS に対する作用が TAB より TAA で強いのはアミラーゼ活性の大小によるものであり，CMC に対する作用の強い TAB が CMS に対してほとんど分解力を示さないことからみて CMS にはセルラーゼはほと

んど作用しないものといえる。

以上の結果ならびに細菌，動物性アミラーゼは CMC を水解しないが CMS を水解し，セルラーゼ標品は高い CMC ase 活性を有するという前報での知見を総合すると，タカジアスターゼが有する CMC と CMS に対する酵素的水解作用のうち，CMC の水解にはその中のセルラーゼ（あるいは CMC ase）が，CMS の水解にはその中のアミラーゼが関与していると結論される。

総 括

(1) タカジアスターゼは CMS あるいは CMC のいずれにもかなり強い水解作用を示した。その至適作用条件はデンプンに対するとほぼ同じであり最適 pH は 4.8 ～ 5.5，最適温度は 45～55℃ で両基質に共通していた。

(2) 精製タカアミラーゼも CMS，CMC に対する分解力を持ち，CMS の分解には主として TAA が，CMC に対して TAB が強く作用した。TAB は精製度が進むと CMC ase 活性が低下するのでセルラーゼが混入しているおそれがあるが，この際の主要分解産物はグルコースであり，このほか3種のオリゴ糖をろ紙クロマトグラフィーで検出した。

(3) 以上の結果より CMC の水解にはセルラーゼが，CMS にはアミラーゼが主に関与しているといえる。

終りに試料を提供された三共研究所松居所長，日本資糧工業株式会社に感謝する。

文 献

- 1) S. Akabori, T. Ikenaka, B. Hagihara: J. Biochem., **41**, 577 (1954).
- 2) 岡崎浩: 農化, **28**, 48, 51 (1954); *ibid.*, **29**, 181 (1955).
- 3) M. Somogyi: J. Biol. Chem., **160**, 61 (1945); *ibid.*, **195**, 19 (1952).
- 4) M. A. Jermyn: Aust. J. Sci. Res., B, **5**, 409 (1952); W. Grassman, R. Stadler, R. Bender: Ann., **503**, 167 (1933); K. Freudenberg, T. Proetz: Z. physiol. Chem., **259**, 19 (1939).