equation with a 5% significance level:

$$Y = 104.35 X$$

(3) The coefficient variation of this colorimetric and the standard urease method were 3.68 and 2.90, respectively, with a 5% significant level (Table 4).

Therefore, by means of the colorimetric method described above, the content of urea in milk was determined as follows:

(4) It appeared with a 0.1% significance level that the content of urea in milk is different for each cow (Table 5).

(5) The percentage of urea in market milk was 14.02~18.37 mg % with a 5% significance level obtained from 56 samples.

The correlation coefficient between the color of milk heated to 120° for 1.5 hours and the content of urea in milk before heating was 0.0678~1.0278 with a 5% significance level. It is found that the content of urea in milk is probably a factor in the browning of heated milk which is different in each milk as shown by WEBB⁽²⁶⁾ (Fig. 1 and Table 7).

麦芽 Amylase に関する研究 (第 4 報)

麦芽の自己消化に於ける Amylase 及び 2, 3 の成分の変化について (その 1)

池 宮 正 行 (京都大学化学研究所)

昭和 30 年 10 月 19 日 受 理

Studies on Malt Amylase. Part IV.

Fluctuation of Amylase Activity and Some Components during

Autolysis of Green Malt

By Masayuki IKEMIYA (Institute for Chemical Research, Kyoto University)

IRVINE が 1785 年すでに麦芽による澱粉の糖化を認めて以来、麦芽アミラーゼに関する研究は多岐に亘り、その数も多い。併しアミラーゼの生成機構については他の一般の諸酵素と同様に単なる推論の域を出ない。筆者はアミラーゼの生成機構を究明する一手段として自己消化時のアミラーゼの変化と他成分との関係を考察した。

大麦を発芽させて強力なアミラーゼを有する麦芽を製するには適度の水分、温度、通気を必要とし、その一つを欠いても麦芽製造は成功しない。

今必須条件中の通気(酸素供給)をエネルギーの面から考えて見ると⁽¹⁾

呼吸作用では $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 675.6 \text{ Kal } (+30 \sim ph)$

酒精醱酵では $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CO_2 + 2C_2H_5OH + 27.9 \text{ Kal } (+2 \sim ph)$

であり、醱酵に於ける ΔF は頗る低い。処が、植物組織は酸素の供給がないと無気呼吸(分子間呼吸)を行い酒精醱酵を起すが、この際に生じる ΔF は僅少であるから合成作用の面を考慮に入れずにアミラーゼの変化を追究出来るわけである。このような考えから先づ大麦の無気呼吸下のアミラーゼの変化を見、更に長期に亘る自己消化時のアミラーゼの変化を調べた。又その際古く FORD, GUTHRIE(1908) 以来認められた Zymogen Amylase についても特に留意した。

実 験 の 部

1. 無気呼吸下の緑麦芽

水浸漬、発芽 2 日目の緑麦芽を 30 g 宛 100 ml 容三角フラスコに入れ、ゴム栓で密栓し室温(18~20°)に放置した際の酒精の生成は 5 日目で最高に達した。穀粒磨砕水抽出液について KOLTHOFF 法で定量した結果は、緑麦芽 100 g 当り、滋賀産在来種 0.256 g(1,000 粒当り 0.142 g)、米国産二条種 0.546 g(1,000 粒当り 0.525 g)であつた。LÜERS⁽²⁾ は大麦の嫌気処理によつて 137 時間で 100 g 当り 0.170 g の酒精を得ている。又穀粒の水抽出液のアミラーゼ力は密栓後 2~4 日目迄は対照の通気麦芽と同等乃至は反つて高い activity を示したが以後低下した。併し防腐剤を添加せずに 5 日以上も放置することは、雑菌汚染の影響が多分に考えられるので

以後の実験はすべて密栓時 toluene を添加し防腐して長い日数その変化を追究することにした。尚 2 項以下の供試大麦は特に明記しない限り 1953 年産米国産二条大麦 (1,000 粒重 49.0 g) を使用した。

Fig. 1. Fluctuation of Amylase Activity during Malting on Aerobic or Anaerobic Conditions

—●— Saccharogenic activity and —×— Dextrinogenic activity of malt kept on aerobic condition ;
 .....●..... Saccharogenic activity and .....×..... Dextrinogenic activity of malt kept on anaerobic condition.

2. 自己消化時の諸変化

(a) **Amylase** : 麦芽の処理方法は前項と同様発芽 2 日目の麦芽を密栓時 toluene 1 ml を添加した後室温 (20~22°) に放置した。爾後適時開栓し 10 粒宛を採り乳鉢で磨碎, 25 ml の蒸留水で 40°, 2 時間抽出, 遠沈し残渣を更に 25 ml で 40°, 1 時間抽出遠沈し両液を合して水溶性遊離アミラーゼの酵素原液とした。又水抽出残渣はパプイン 1% 溶液 25 ml を加え, 30°, 20 時間抽出後濾過し, 残渣を更に蒸留水 25 ml で洗滌し両液を合して, 水に不溶性の Zymogen amylase に由来したアミラーゼとした。対照は発芽途中で通気下に発芽を続けさせ, 自己消化麦芽と同様に採試し, 同様にして酵素液をつくつた。尚密栓後, 麦芽の葉根芽の伸長は殆んど認められないが対照麦芽に於ては経過日数と共に相当伸長する。この際, 葉根芽中に CHRZASZCZ⁽³⁾ の sisto-substance の存在が僅かに認められるので, 供試時には, 凡て芽を切り除いて, 穀粒中のアミラーゼを比較した。尚除去した芽の中のアミラーゼ力は測定出来ない程微量であつた。

酵素力の測定は, 糖化力は酵素原液を activity の変化に応じて適宜稀釈しその 5 ml を 2% 可溶性澱粉液 20 ml, 醋酸緩衝液 (pH 4.7) 5 ml の混液に加えて, 40°, 30 分間反応させ, その 5 ml を採り生成した還元糖を Iodometry で定量し, 滴定値を以て酵素力の比とした。糊精化力は WOHLGEMUTH 法に準じて行い供試粒 10 粒中のアミラーゼが 40°, 1 時間, pH 5.3 (acetate buffer) に於て消化する 1% 可溶性澱粉の ml 数で表わした。

(b) **磷** : 磷酸代謝とアミラーゼの変化との間の関連を考へて水溶性磷を定量した。試料 10 粒宛を水 100 ml で磨碎抽出し, その透明濾液について ALLEN⁽⁴⁾ の法で定量し, 水溶性有機 P 並びに無機 P として表わした。

Fig. 2. Fluctuation of Amylase Activity during Autolysis of Green Malt.

—●— free amylase, and .....●..... zymogen amylase of malt kept on aerobic condition ;
 —○— free amylase, and .....○..... zymogen amylase of malt kept on autolysis ; and arrow represents onset of autolysis.

Fig. 3. Fluctuation of Water Soluble-P during Malting

—●— Water soluble inorganic P, and —×— water soluble organic P of malt kept on aerobic condition
 .....●..... Water soluble inorg. P, and .....×..... water soluble org. P of malt on autolysis

Table 1. Nitrogen Substances of Barley and Malt (mg of Nitrogen per 1,000 Corns with Rootlets)

Nitrogen	Total	Soluble	Hordein	Glutelin	Albumin	Globulin	Free-Amino
Barley	705	234	165	276	51	43	36
2 days' autolysis*	558	296	106	156	33	30	63
Control	679	287	96	295	59	57	60
5 days' autolysis*	527	313	113	101	45	22	71
Control	638	368	75	195	84	73	41

* Green malts germinated for 2 days were kept autolysis for 2 or 5 days : and in control experiments germination of green malts were still carried on the same 2 or 5 days.

較的少いが、最近では TOWERS⁽⁶⁾ が諸種の葉については多数のケト酸を検出確認し、又 BARKER⁽⁷⁾ は potato を種々処理してケト酸の変化を見ている。筆者は試料 40 g を粉砕又は磨砕し 70% 酒精 140 ml (conc. HCl 1 ml を添加酸性とす) で 50°, 3 時間抽出、濾液を中和、除糖、除蛋白後濃縮し、常法により 2, 4-DNPH を添加加温、醋酸エチル溶出、更に 10% Na₂CO₃ で転溶し、両 fraction についてペーパークロマトグラフ法によりブタノール：エタノール：水 (5:1:4) で展開し guide spots と比較してケト酸を推定した。尚 R_F 0.9 の spot は Na₂CO₃ 不溶、他は凡て Na₂CO₃-soluble fraction であつた。Pyruvic acid は一般に知られているように 2 つの spots (*cis* 及び *trans*) を与えた。α-Ketoglutaric acid の変化は明瞭であつた。

Table 2. Ketonic Acids of Barley, and of Green Malts kept on Aerobic or Anaerobic Conditions

R _F	0.2 α-KGT	0.4 PVA	0.55 PVA	0.6 α-KBT(?)	0.9 Aldehyde(?)
Barley	++	—	—	—	+
Green Malt	++	+	±	—	++
2 days' autolysis*	++	+	±	—	++
Control	+	+	±	—	+
5 days' autolysis*	++	+	±	±	+++
Control	+	++	+	+	—

* as was mentioned in Table 1.

処理後 5 日以後はプロテアーゼ力以外は急激に減少する傾向にあつた。なお各酵素力の自己消化時の変化については後報に於て詳細に述べる予定である。

考

案

大麦の発芽に際してアミラーゼが強力に生成されることは古くから知られ、その機構についても多くの推論がなされているが、一般に DE CLERCK⁽⁸⁾ の説くように呼吸の増大と、アミラーゼ、プロテアーゼの増大が併行していることから、酵素呼吸とアミラーゼ生成との関連性が考えられている。又一方 KROPFF⁽⁹⁾ は古く (1927) CO₂-resting system によつて麦芽中のアミラーゼの増加を認めており、OPARIN⁽¹⁰⁾ は粉砕小麦が自己消化をおこすとアミラーゼ、プロテアーゼが極く僅かではあるが増加することを発見しているが、筆者の採つた嫌氣的処

なお原麦 1 粒当りの全 P の平均は 220 γ であつた。Fig. 3 に見るように自己消化の場合は普通の発芽の場合と異つて無機 P が始め急激に減少し後に再び増加している。

(c) 窒素化合物：各種 N 成分については、試料約 10 g を採り順次 soluble-N 以下各成分を BISHOP 法⁽⁶⁾ で定量、total-N は試料約 1 g について定量しそれぞれ 1,000 粒当りに換算した。Table 1 中の autolysed malt は発芽 2 日目の緑麦芽を 2 日間、又は 5 日間自己消化させた試料であり、対照は発芽 2 日目の緑麦芽を通気下に 2 日又は 5 日発芽させたものである。分析の際はどれも根芽葉芽を除去しなかつた。

(d) Ketonic Acids：通気下の緑麦芽の代謝機構は KREBS' cycle に従うと見られるが、自己消化に於てはこの Cycle は当然変化を来し、或る stage の生産物が顕著に蓄積したり酒精の前段階のアルデハイドの変化も見られるのではないかとケト酸を常法によつて、ペーパークロマトグラフィーで検出した。植物組織内のケト酸の研究は従来比

(e) その他：発芽日数 2 日の緑麦芽を処理した場合 WARBURG manometer で測る O₂ 吸収量、5% ゼラチン及び 1% カゼインの消化によるプロテアーゼ力、1% H₂O₂ に対するカタラーゼ力、pyrogallol に対するパーオキシダーゼ力等は初期の 3 ~ 5 日迄は僅かに増加しているが、対照の通気麦芽に比較すると著しく低い。而して

理乃至自己消化時のアミラーゼの変化を追究した報告は見当らない。

生体を扱う実験に於ては、品種、新鮮度その他による試料の個体差の大きいことは多大の困難性を伴うものであるが、筆者は品種、採取時期、処理条件を能う限り変えて実験を行い、麦芽中のアミラーゼの変化の本性を追究している次第であり、次報以下に更に詳細に報告の予定である。

自己消化時にプロテアーゼ、カタラーゼ、パーオキシダーゼの諸酵素は増加せず又は著しく低下するにも拘らず、アミラーゼは滋養在来、茨城在来（第1図）、米国産二条大麦（第2図）のいずれについても自己消化中に増加する特異的な変化を示している処に大きな興味があるが、その機構については今後の多数の実験結果から考察したい。水溶性磷酸中、無機Pが自己消化で急激に減少し再び増加すること（第3図）はアミラーゼの変化に似ていることは注目に値するが、更に phosphatase との関係も調べないと分らない。

第1表による窒素成分の変化は生体内の分解と合成の両面の決算であることは勿論であるが、対照と自己消化麦芽との間には歴然たる差がある。BISHOP⁽¹¹⁾は発芽によつて insoluble protein が減じて salt soluble products を生じることを詳細に追究しているが、筆者の自己消化麦芽に於ては insoluble fraction では対照に比して hordein が多く、glutelin が少い。Soluble fraction では albumin 及び globulin が対照に比して低いが Amino-N は反つて高い。従来発芽の際のプロテアーゼ力の上昇に伴つてアミラーゼの増加が見られる現象からプロテアーゼとアミラーゼの関連性が考えられたが、筆者の自己消化麦芽ではプロテアーゼ力も低く又分解物の salt soluble fraction も少いにも拘らずアミラーゼは高いという現象が見られた。

又、DANIELSSON⁽¹²⁾ (1947) によるとアミラーゼは Albumin fraction に集積されているといい、片桐、麦林⁽¹³⁾は多数の大麦について実験し未発芽種子（原麦）中の Albumin-N よりそれから得られる麦芽のアミラーゼ力を推定出来ると報じている。このように Albumin は麦芽アミラーゼにとつて重要な要素であるが、自己消化麦芽は Amylase Activity に比して Albumin の含量が低い、これは対照が発芽に際して不溶性-Nが可溶化して Albumin fraction が増加したのに対して自己消化麦芽は可溶化が少い為である。とにかく、N-成分とアミラーゼとの関係を説明するには更に詳細な検討を必要とするのでここでは何ともいえない。

最後に Ketonic Acids（第2表）はその含有量が少いので多種類の Ketonic Acids の検出が出来ないが自己消化麦芽に於て R_F 0.9 のアルデハイドの区分の増加が著明であるがピルビン酸は歴然たる差はない。アルファケトグルタル酸は増加して居る。

以上本報に於ては、大麦緑麦芽の自己消化時のアミラーゼを中心とした諸成分の変化を普通の発芽を対照として比較した。酸素呼吸によらない又発芽現象を伴はないでもアミラーゼが増強することを見出したが、フォスファターゼその他の酵素、窒素その他の成分との関係については更に考察を重ねる予定である。

御指導をいただいた京大片桐英郎教授に深く感謝致します。本研究費の一部は科学研究助成金によつた。本報文の一部は、昭和28年12月京大化学研究所講演会、昭和29年6月日本生化学会近畿支部会で発表した。

- (1) F. LIPMANN : STEPHENSON (田中正三訳) 細菌の代謝, 102 (1955).
- (2) HEINRICH LÜERS : *Wochenschr. Brau.* 41, 125 (1924).
- (3) T. CHRZASZCZ : *Biochem. Z.*, 260, 354 (1933).
- (4) R. ALLEN : *Biochem. J.*, 34, 858 (1940).
- (5) L. R. BISHOP : *J. Inst. Brew.*, 34, 101 (1928); 35, 316 (1929).
- (6) G. H. N. TOWERS : *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 2392 (1954).
- (7) J. BARKER : *Proc. Roy. Soc.*, B143, 523

- (1955).
- (8) J. DECLERCK ; *Wochenschr. Brau.*, 57, 103 (1940).
- (9) H. KROPFF : *Wochenschr. Brau.*, 47, 552 (1927).
- (10) A. OPARIN : *Biochem. Z.*, 148, 476 (1924).
- (11) L. R. BISHOP : *J. Inst. Brew.*, 35, 323 (1929).
- (12) C. E. DANIELSSON : SUMNER ; *The Enzyme* (1), 679 (1950).
- (13) 片桐, 麦林 : 農化, 15, 309 (1939).

Summary

In the present paper, the author has reported the fluctuation of amylase, water-soluble phosphorus compounds, nitrogen substances and ketonic acids during autolysis of green malt of American two-rowed barley, subjected to 2 days' germination, placed in a closed vessel containing a small amount of toluene as a disinfectant, and kept to autolysis.

It was found that activity of several enzymes except amylase decreased, while the increase of amylase activity (both saccharogenic and dextrinogenic powers) was observed by the anaerobical treatment mentioned above.