[農化 第 37 卷 第 11 号, p. 633~636, 1963]

耐酸性アミラーゼに関する研究 (第2報)*

アミラーゼ力価の新測定法

山 田 覃 洋 (武田薬品工業株式会社研究所)

昭和 38 年 3 月 6 日 受 理

緒 言

著者はさきに⁽¹⁾アミラーゼを定量するにあたり数多くの測定法のうち測定原理において、また操作の簡便さと測定値の正確さにおいてすぐれていると思われる不破氏法⁽²⁾に対して考察を行ない、以後同法を用いてきた。

同法は基質としてアミロースを用いるので力価測定試料中に β -結合または α -1,6 結合を切る酵素を含む場合にも測定値がその影響を受けないという利点が考えられるが、一方アミロースは水溶液中において老化を起しやすく、したがって測定の当日アミロース溶液を作成する必要がある。また、各検体ごとに呈色液を 250 または 100 ml に希釈しなければならないが、一時に測定する検体数が数十に及ぶ場合、この希釈操作はかなりの時間を要するものである。したがって著者はその後、耐酸性アミラーゼの研究過程においてさらに簡易な測定法を確立する必要を痛感し、これに関する検討を行なってみた結果、検体数の多い場合でも比較的かんたんにそれらの力価を測定でき、したがってアミラーゼ生産菌の選択試験によりよく適した新測定法を設定することができたのでこれを報告する。

基 質 の 検 討

著者が設定しようとする測定法では基質にアミロースを使用すると、低力価試料ならびに無酵素対照のヨウ素呈色液において吸光係数がきわめて大となる。そのうえアミロース・ヨウ素複合体による混濁を容易に生じ、それによって正確な吸光係数の測定が困難となる。著者は種々澱粉質のヨウ素呈色液を作成してその吸光係数を比較測定した結果、本報で設定しようとする測定操作に従って呈色液を作成した場合、ばれいしょアミロペクチンと可溶性澱粉(和光純薬製、特級試薬)とは波長 720~750 m μ において、またデキストリンは 630~650 m μ においてそれぞれ通常の光電比色計を用いて測定できる範囲の吸光係数を示すことを知った。これら 3 種の澱粉質のうち天然澱粉に最も近くかつ入手の容易な可溶性澱粉は、また溶液中においてアミロースよりもはるかに老化し難いことが考えられる⁽³⁾。事実、前報⁽¹⁾で述べたように β -アミラーゼによるアミロースの分解はそれが 1 次反応であるにもかかわらず、その個々の分解曲線

第 1 図 β -アミラーゼによる可溶性澱粉の加水分解
反応液組成: 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 5.4) 10 ml, β -アミラーゼ (NBC 社製) 水溶液 20 ml, 4 mg/ml 可溶性澱粉 (和光純薬製、特級試薬) 溶液 30 ml, 合計 60 ml.
反応温度: 37.0 $\pm$ 0.1 $^{\circ}$

第 1 表 第 1 図から求めた β -アミラーゼによる可溶性澱粉の加水分解曲線の D 値* およびそれから得られる個々の分解曲線の示す反応次数**

酵 素 濃 度, μ g/ml	D		反応次数	
	2	4	2	4
基 質 濃 度, mg/ml	2	2	2	2
分 解 率				
ξ_1	ξ_2	ξ_3	ξ_4	
0.02	0.15	0.02	0.20	— 1.44 — 1.5
0.02	0.10	0.02	0.15	— 1.67 — 1.0
0.02	0.05	0.02	0.10	2.96 2.50 3.7 0

* D の定義ならびに分解率に関する記号については第 1 報⁽¹⁾参照。

** D 値と第 1 報の方法により求めた。

* Studies on Acid-Resistant Amylase. Part II. An Improved Method of Amylase Determination.

By Nobuhiro YAMADA (Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd.)

この研究の第 1 報は、“糸状菌によるアミラーゼの生産 (第 1 報) 不破氏 β -アミラーゼ測定法に関する考察”

第2図 種々の量の β -アミラーゼにより加水分解を受けたアミロースのヨウ素呈色度
折線上の数字は酵素量(相対的量比)を示す。
測定方法については本文参照。

第3図 種々の波長でヨウ素呈色度低下率を測定した場合の低下率と糊精化 α -アミラーゼ量との関係

基質試料: 和光純薬製特級試薬可溶性澱粉。

酵素試料: NBC 社製 α -アミラーゼ。

酵素反応およびヨウ素呈色: 本報告で設定する測定操作による。

ヨウ素呈色度測定波長

○—○ 720 mμ □—□ 620 mμ △—△ 560 mμ

の測定を行なってもこのような変則性は見られなかった。

可溶性澱粉に α -アミラーゼを作用せしめた場合のヨウ素呈色度の低下にもアミロースの場合と同様の傾向が認められた(第3図)。

これらの事実から α -アミラーゼ力価測定の感度を高めるためにはヨウ素呈色液の最大吸収波長よりも長波長側で吸光度測定を行なうことが望ましい。可溶性澱粉を基質とする場合第3図に見られるように α -アミラーゼ量-ヨウ素呈色度低下率曲線がほぼ直線となる酵素量の範囲が広く、かつ本測定法において液層1cmの呈色液が測定に適した吸光度を示す波長として720 mμを用いることにする。

新 測 定 法

澱粉糊精化力測定法

基質溶液: 10 μ mole グルコース当量/ml 可溶性澱粉液。乾燥重量 1.622 g に相当する和光純薬製試薬特級可溶性澱粉を蒸留水 10 ml に懸濁し、これに 2N 水酸化ナトリウム水溶液 1 ml を加え、沸騰する水浴上で約 10 分間加熱する。得られた溶液に 2N 塩酸 1 ml を加え蒸留水で全量を正確に 1 l に希釈し、東洋濾紙 No. 5B で濾過する。この基質溶液は冷蔵すれば数日間の保存に耐える。なお、冷蔵した基質溶液は約 1 時間 37° に保ったのちに使用する。

が示す反応次数は 10 以上であったのに反して、可溶性澱粉の分解曲線(第1図)の示す反応次数はいずれもほぼ 1 付近であった(第1表)。この事実は可溶性澱粉は酵素反応中老化等によって反応をしだいに受け難くなる度合がアミロースに比して少ないことを裏付ける。これらの観点からアミラーゼ測定用基質として可溶性澱粉を用いることにした。

測定波長の選択

アミロースに種々の量の α -アミラーゼ作用を受けさせたのち、そのヨウ素呈色度を測定して第2図に示す。その酵素反応液は pH 5.4 の 0.5 M 酢酸緩衝液 1 ml、種々の濃度の NBC 社製 α -アミラーゼ溶液 1.5 ml、0.15% ばれいしょアミロース溶液 5 ml を混合したもので、これを 37°±0.1° で 30 分間酵素作用を行なわせたのち、これに 1N 酢酸 15 ml を加えて酵素作用を停止せしめ、全体を水で約 200 ml に希釈したのち 2% KI 入り 0.2% I₂ 溶液 5 ml を加えさらに水を加えて最終液量 250 ml の呈色液とした。別にアミロース溶液の代わりに水 5 ml を用いて上と同様の呈色操作を行なって得られた液をヨウ素盲験液とした。各呈色液の液層 1 cm の吸光度実測値からその波長におけるヨウ素盲験液液層 1 cm の吸光度実測値を引いた値をもって吸光度とした。なお、使用した比色計が分光光度計でなくフィルター光度計であったので、得られた吸光度を曲線でなく直線で結んでおいた。第2図で認められるように α -アミラーゼ作用にもとづくアミロース・ヨウ素呈色度の低下は長波長側ほど著しく、570 mμ 付近以下の波長では微量の α -アミラーゼ作用によって基質のヨウ素呈色度は逆に増大を示した。なお、 β -アミラーゼを用いてアミロースを分解する際には波長 570 mμ 以下でヨウ素呈色度の

ヨウ素原液 : 1 M ヨウ化カリウム入り 0.1 M ヨウ素溶液。

ヨウ素・塩酸液 : 測定の当日ヨウ素原液 1 ml と 1 N 塩酸 199 ml とを混合する。

測定操作 : 試験管に緩衝液 1 ml と酵素液 1 ml とを入れたものを $37^{\circ}\pm 0.1^{\circ}$ の恒温水槽中に立て, 約 10 分間放置したのちこれに基質溶液 1 ml を加える。なお酵素を緩衝液中にながく保たせることが好ましくないような場合は, 緩衝液, 基質溶液, 酵素液の順に加え合わせる。正確に 10 分間酵素反応を行なわせてからヨウ素・塩酸液 5 ml を加え酵素反応の停止とヨウ素呈色とを同時に行なって酵素反応呈色液とする。また酵素液の代わりに蒸留水 1 ml を用い酵素反応呈色液の作成と同じ操作を行なって得た呈色液を無酵素対照呈色液とする。さらに, 別の試験管に順次緩衝液 1 ml, 酵素液 1 ml, ヨウ素・塩酸液 5 ml および基質溶液 1 ml を加え合わせたものを無反応対照呈色液とし, その酵素液の代わりに蒸留水を用いたものを無酵素無反応対照呈色液とする。これら 4 呈色液の波長 $720\text{ m}\mu$, 液層 1 cm での吸光度をそれぞれ A, B, C, D とする。

力価単位の設定と力価の求め方 : 本測定条件でヨウ素呈色度を 10% 低下させる酵素作用量をもって 1 単位とし, これを 1 DU と示すことにする。すなわち酵素液の力価は第 1 式で求められる。

$$\text{酵素液の澱粉糖精化力} = 10\{C - A - (D - B)\} / B \quad \text{DU/ml} \dots\dots\dots \text{第 1 式}$$

本法においてヨウ素呈色度減少率 50% 以下の部分で酵素量とヨウ素呈色度減少率とがほぼ直線的な関係を示す(第 3 図参照)。したがって第 1 式によって力価を計算する場合, 本法の力価測定可能範囲は 5 DU 以下であり, 誤差は 2% 以下である。

細菌 α -アミラーゼを酵素試料として用い, DU と他の単位とをそれぞれの測定法に準じて比較してみたところつぎのような結果が得られた。

本法 1 DU = 不破法 2.7 D. P. = Wohlgemuth⁽⁴⁾ 法 $D_{30}^{37^{\circ}}$ 0.2~0.25

澱粉糖化力測定法

基質溶液 : 澱粉糖精化力測定法と共通のものを用いる。

銅試薬 : Somogyi⁽⁵⁾ 法に従って調製したもの。

アルセノモリブデン酸試薬 : Nelson⁽⁶⁾ 法の原液を 1.5 N 硫酸で 2 倍に希釈する。

1 $\mu\text{mole/ml}$ グルコース溶液

測定操作 : 酵素反応は澱粉糖精化力測定操作に準じて行なう。すなわち 10 分間反応を行なわせた 3 ml の反応液に直ちに銅試薬 3 ml を加え, これを沸騰水浴中でよく振り混ぜたのち 30 分間加熱し, 水道水で冷却する。これにアルセノモリブデン酸試薬 2 ml を加えて反応呈色液をうる。またその酵素液 1 ml の代わりに蒸留水 1 ml を使用して同様の操作を行ない, 無酵素盲験呈色液をうる。

第 4 図 澱粉糖化力価測定用検量曲線

○ : *Aspergillus usamii* IFO 4397 ふすまこうじ抽出液を用い, pH 4.5 で測定した値。
 □ : β -アミラーゼ (NBC 社製) を用い, pH 5.5 で測定した値
 △ : α -アミラーゼ (NBC 社製) を用い, pH 7.0 で測定した値

他の試験管に緩衝液 1 ml, 酵素液 1 ml および銅試薬 3 ml を入れ, 沸騰水浴中で 5 分間加熱したのちこれに基質溶液 1 ml を加え, 引き続き 25 分間加熱したのち冷却し, アルセノモリブデン酸試薬 2 ml を加えて無反応盲験呈色液をうる。また酵素液の代わりに蒸留水を用いこれと同様の操作を行なって無酵素無反応盲験呈色液とする。さらに別の試験管内に緩衝液 1 ml, 基質溶液 1 ml, 1 $\mu\text{mole/ml}$ グルコース溶液 1 ml および銅試薬 3 ml を加え合わせた混合液をつくり, これを 30 分間加熱するとともに呈色させて標準呈色液をうる。

これら 5 種類の呈色液につき波長 $500\sim 520\text{ m}\mu$, 液層 1 cm で吸光度を測定してそれぞれ K, L, M, N, G とする。

力価単位の設定と力価の求め方 : まずつぎの式により酵素反応によって生成した還元糖量を見かけのグルコース量として求める。

見かけのグルコース量 = $\{K - M - (L - N)\} / (G - N)$ μ mole 第 2 式

本測定条件で基質中のグルコース基の 10% を遊離のグルコースに分解させた場合と等しいだけの還元力を示す還元糖を生成させる酵素力, すなわち見かけのグルコース量 1μ mole を与える酵素作用量をもって澱粉糖化力の 1 単位として, これを 1 GU と表示する。

あらかじめ純粋の糖化または β -アミラーゼ試料を用いて見かけのグルコース生成量-酵素量検量曲線 (第 4 図参照) を作成しておく。測定試料の示す見かけのグルコース生成量に対応する酵素力価を検量曲線上で読みとる。

この測定法の定量範囲は 0.08~1.5 GU であり, 測定誤差は 5% 以下である。

酵素試料として大麦麦芽 β -アミラーゼ (NBC 社製) を用い GU と他の単位との比較試験をそれぞれの方法に従って行なつてつぎの結果を得た。

本法 1 GU = 不破法 1.2 S. P. = Lintner⁽⁷⁾ 法 18 単位

この両力価測定法は酵素反応と呈色との両者を試験管内で行ないうる程度の少量の液を用いて操作を行なうものであり, 本法はアミラーゼ生産菌株の選択あるいはアミラーゼ耐酸性度の測定などにあたって, 多数のアミラーゼ試料の力価測定を行なう場合に適した簡易な定量法である。

要 約

従来のアミラーゼ測定法のうちですぐれていると思われる定量操作と基質とについて吟味し, 糊精化力ならびに糊化力を簡易に測定しうる 1 新測定法を設定した。

すなわち澱粉糊精化力測定操作は, 10μ mole グルコース当量/ml 可溶性澱粉溶液を基質として用い, 緩衝液 1 ml, 基質溶液 1 ml ならびに供試酵素液 1 ml を試験管内で混ぜ合わせ, 37° , 10 分間酵素反応を行なわせたのちこれにヨウ素・塩酸液を加えることによって反応の停止と呈色とを同時に行なう。こうして得られる 8 ml の供試酵素反応呈色液とそれと平行して作成した対照呈色液との吸光係数を波長 720 m μ で測定して力価を求める。また糖化力測定操作は酵素反応については糊精化力測定の場合と全く同様に行ない, 得られた酵素反応液につきアルセノモリブデン酸法により還元糖を定量して力価を求める。力価単位としては本測定条件において基質の 10% を分解する酵素力をもって糊精化力および糖化力の 1 単位と定め, それぞれ 1 DU および 1 GU と表示する。なおこれら両単位と従来のそれらとの換算係数を示した。

本研究にあたり終始御鞭撻を賜った前研究所長桑田智博士, 前副所長佐藤喜吉博士に深謝の意を表するとともに, 御指導を賜った阿部又三博士, 武田六郎博士に厚く感謝いたします。

(1) 山田覃洋 : 本誌, 32 , 581 (1958).	(4) J. Wohlgemuth : <i>Biochem. Z.</i> , 9 , 1 (1908).
(2) H. Fuwa : <i>J. Biochem. (Japan)</i> , 41 , 583 (1954).	(5) M. Somogyi : <i>J. Biol. Chem.</i> , 195 , 19 (1952).
(3) 二国二郎編 : デンプンハンドブック, 朝倉書店, p. 69 (1961).	(6) N. Nelson : <i>ibid.</i> , 153 , 375 (1944).
	(7) C. J. Lintner : <i>J. Prak. Chem. N.F.</i> , 34 , 383 (1886).