キャベツに存在する一新アミラーゼについて

春日井 愛子

(大阪女子大学)

昭和 44 年 4 月 21 日 受理

A New Amylolytic Enzyme present in Cabbage Leaves (*Brassica oleracea* var. *capitata*)

By Aiko KASUGAI

Osaka Women's University

A new type of amylase was found to exist in Cabbage leaves. The juice obtained by crushing and pressing cabbage leaves was salted out with ammonium sulfate and the resulting precipitate was dialyzed against a buffer solution containing Ca^{2+} , pH 5.0. The dialyzed enzyme was then gel-filtered on a Sephadex G-200 and the top fraction, in which a high activity of hydrolyzing maltose was showed, was treated with EDTA and *p*-chloromercuri-benzoate to inactivate contaminating α - and β -amylase. The enzyme so obtained was observed to produce glucose from starch without accumulation of any other sugars. On a low concentration of maltose the enzyme produced only glucose. However, it produced several oligosaccharides when reacted on a high concentration of maltose. The author suggested to refer the enzyme to transglucosyl-amylase.

(Received April 21, 1969)

緒 言

著者はこれまでに種々の野菜についてアミラーゼの分布, その種類ならびにそれらのアミラーゼの酵素化学的性質について検討を行なってきた⁽¹⁻⁵⁾. キャベツは比較的顕著にアミラーゼを含む野菜の一つで, そのアミラーゼは耐熱性の強いアミラーゼと耐酸性の強いアミラーゼとからなること, 前者は α -, 後者は β -アミラーゼであること, また, キャベツの粗酵素液はマルターゼ作用を有するなどのことを明らかにし, その概略についてはすでに報告した.

最近ある種の微生物⁽⁶⁾や植物⁽⁷⁾に, 既知のアミラーゼとは異なる様式でデンプンを分解する酵素の存在が指摘されている. 著者はその後キャベツのアミラーゼ系について再検討を行なったところ, キャベツにも既知のアミラーゼとは異なる様式でデンプンに作用する酵素が存在することを見出した. 本報では主にこの酵素の分離およびそのデンプン分解様式について検討した実験とその結果について報告する.

実験試料および方法

1. 供試キャベツについて 市販キャベツはほとんど 1 年中入手できるが, 栽培時期, 品種, 部位などによりデンプン分解酵素系の組成, すなわち糊精化力, デンプン糖化力およびマルトース分解力, あるいはそれらの活性の比率はかなり異なるようである. 本実験では主としてマルトース分解力のみに注目し, この強いキャベツの葉を実験試料とした.

2. 酵素力の測定方法 酵素の精製過程ではマルトース分解力のほかにアミラーゼ力も測定した.

a) マルトース分解力: 1/50 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を含む 0.1% マルトース液 1 ml に酵素液 1 ml を加え, 40°C, 10 分間にグルコースとして 10 μg の還元糖を増加する場合をマルトース分解力 1 単位とした. 糖の測定は Somogyi-Nelson 法によった. 比色には Klett-Summerson 光電光度計 (セル径 1 cm の試験管, 540 m μ フィルター) を用いた.

b) 糊精化力: 1/50 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1/100 M 酢酸カルシウムを含む 1% 溶性デンプン液 2 ml に酵

素液 2ml を加え, 40°C で反応させ, 一定時間ごとにその 0.5ml を 1/500 N ヨウ素液 (1/500 N I_2 , 1/50 N KI, 1/50 N HCl) 0.5ml 中に加え, ヨウ素呈色の変化を試験した. この方法でヨウ素呈色が赤色になるまで 1 時間を要した場合を糊精化力 1 単位とした.

c) デンブ糖化力: 糊精化力試験と同一条件で酵素を反応せしめた. すなわち 1/50 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を含む 1% 溶性デンプン液 1ml に酵素液 1ml を反応せしめ, 10 分後に生成還元糖を Somogyi-Nelson 法により測定した. この条件で 10 分間にグルコースとして 10 μ g の還元糖を生成する場合をデンプン糖化力 1 単位として表示した.

3. 生成還元糖のペーパークロマトグラフィー デンブ糖またはマルトースの分解による生成糖はペーパークロマトグラフィーにより検討した. 濾紙は東洋濾紙 No. 50 を用い, 展開液はブタノール:ピリジン:水 (6:4:3) とし, 20°C で上昇法により三重に展開した. 発色にはアンモニア性硝酸銀液を使用した.

実験結果

1. 酵素の精製

まずマルトース分解力の強い市販キャベツの葉 30 kg

を試料とし, Table I および Table II に示す操作でキャベツ酵素液をある程度部分精製した. 部分精製酵素液はマルトース分解力, 糊精化力およびデンプン糖化力のいずれの活性をも有し, 硫酸塩析を再度行なった場合, いずれの酵素力も並行して濃縮された. この部分精製酵素液を Sephadex G-200 によってゲル濾過した結果は Fig. 1 で, マルトース分解力を示す区分は手前に, 糊精化を示す区分は後の方に現われた. なおデンプン糖化力は糊精化力の強い区分とはほとんど一致した. すなわち, 少なくとも α - および β -アミラーゼとは別にマルターゼ作用を示す区分を分離することができた.

2. Sephadex G-200 によって分画されたアミラーゼの 2, 3 の性質について

一般に α -アミラーゼはカルシウム除去剤, たとえば ethylenediaminetetraacetate (EDTA) などにより, また β -アミラーゼは SH 基閉塞剤, たとえば *p*-chloromercuri-benzoate (*p*CMB) などにより失活することが知られている. そこで Sephadex G-200 により分画したアミラーゼの A, B, C 各区分について, それらの化学試薬を添加した場合の影響を試験した. 試験の条件とその結果を Table III に示す. すなわち A 区分は当初より

Table I. Partial Purification of Amylase of Cabbage

Crude amylase preparation	Procedure
Cabbage (Leaves)	
Juice	Crushed and pressed
Filtrate	Added with 1/100 M Ca-acetate, pH 5.0 filtered after overnight at 4°C.
I Precipitate	Salted out with $(NH_4)_2SO_4$, 0.6 sat.
Dialyzed solution	Dialyzed against 1/100 M acetate buffer containing 1/300 M Ca-acetate, pH 5.0
II	Precipitated with $(NH_4)_2SO_4$, 0.6 sat. and again dialyzed against the same buffer as above
III Crude amylase employed for further purification	

Table II. Summary of Partial Purification of Amylase of Cabbage

Crude amylase preparation	Total vol. ml	$E_{280m\mu}^{1cm}$	Saccharifying activity (S. A.)			Dextrinizing activity (D. A.)				Maltose-hydrolyzing activity (M. A.)			
			U/ml	Total U	Spe. act.*	U/ml	Total U	Spe. act.*	S. A. D. A.	U/ml	Total U	Spe. act.*	S. A. M. A.
I	15,000												
II	600	9.24	240	144,000	25.9	15	9,000	1.62	16	10	6,000	1.08	2.4
III	26	76.03	3,068	79,768	40.3	198	5,148	2.60	15.5	132	3,432	1.73	2.3

* Specific activity (Spe. act.) was expressed by dividing the activity per ml of enzyme solution by absorbancy ml of the solution.

糊精化力は微弱で、その糊精化力は EDTA により完全に消失する。しかし、デンプン糖化力は EDTA, *p*CMB のいずれによってもほとんど影響を受けず、またマルトース分解力も同様にそれらの試薬により影響を受けないことが認められた。B 区分は EDTA の添加によって

糊精化力は完全に消失し、また EDTA と *p*CMB との併用によってデンプン糖化力も微弱にしか認められなかった。微弱ながらこの区分にはマルトース分解力が認められたが、それはこれらの試薬により影響されなかった。C 区分は当初よりマルトース分解力を示さなかつ

Fig. 1. Gel Filtration on Sephadex G-200 of the Crude Amylase Preparation III.

Column, 4×67 cm, buffered with $1/30$ M acetate buffer containing $1/100$ M Ca-acetate, pH 5.0. Flow rate, 40 ml per hr.

×—×, Dextrinizing activity ●—●, Saccharifying activity
○—○, Maltose-hydrolyzing activity
——, O. D. at $280 m\mu$

た。糊精化力は EDTA の添加により消失し、また EDTA と *p*CMB とによってデンプン糖化力も微弱になった。これらの事実から B 区分および C 区分のアミラーゼは α -ならびに β -アミラーゼが主体であること、一方、A 区分のアミラーゼは少なくとも α -アミラーゼや β -アミラーゼとは異なるアミラーゼであることが判明した。ただし A 区分の示すデンプン糖化力とマルトース分解力とが同一酵素に基づく作用力か否かが問題で、これについては後述する。

3. EDTA および *p*CMB で処理した A 区分アミラーゼによるデンプンの分解について

前述の Table III の方法で A 区分を EDTA ならびに *p*CMB で処理した酵素 (以後これを A 区分処理酵素 (F. A. T.) とよぶ) を溶性デンプンに作用させ、デンプン分解の伸びを試験した。なお、対照として Table I の部分精製酵素 III (C. A. P.) をそのまま、あるいは α -アミラーゼと β -アミラーゼとの混合とみられる C 区分酵素 (Fig. 1 に示す Fraction C), およびそれに A 区分処理酵素 (F. A. T.) を添加したも

Table III. Effect of EDTA and *p*CMB on Activity of the Amylase Fractions separated by Gel Filtration in Fig. 1.

Fract. No., combined	Enzyme activity Additions	Dextrinizing activity U/ml		Saccharifying activity U/ml		Maltose-hydrolyzing activity U/ml	
		EDTA*		EDTA + <i>p</i> CMB**		EDTA + <i>p</i> CMB**	
		—	+	—	+	—	+
A	65~74	trace	0	10	8	6.8	6.8
B	110~113	15	0	28	trace	trace	trace
C	130~132	26	0	280	trace	0	0

* To the amylase dialyzed against deionized water was added EDTA in a concentration of $1/50$ M and the mixture (pH 6.0) was incubated at 20°C for 24 hr. The remaining activity was assayed on a starch sol. (0.5%) containing EDTA ($1/100$ M, pH 6.0), in order to prevent reactivation of α -amylase.

** *p*CMB (the final concentration, 10^{-4} M) was added to the amylase which had been incubated with EDTA and then dialyzed against running deionized water overnight in the cold. After one hr. incubation in the *p*CMB at 20°C , the remaining activity was assayed using a starch sol. (0.5%) or maltose sol. (0.5%) containing *p*CMB (2×10^{-4} M).

のについても同時に検討した。この場合 A 区分処理酵素 (F. A. T.) 以外の 3 者の酵素については糊精化力をいずれも等しくして実験に供した。これらの実験結果は Fig. 2 で A 区分処理酵素 (F. A. T.) 単独では、デンプン糖化

Fig. 2. Comparison of Starch Hydrolysis Curves by Amylase Fractions separated by Gel Filtration.

F. A. T. : Fraction A amylase in Fig. 1, treated with EDTA and *p*CMB.

C : Fraction C amylase in Fig. 1, not treated with reagents.

C. A. P. : Crude amylase preparation III, in Table I.

Blue, red and achroic, respectively, indicate the color developed upon addition of iodine solution to the incubation mixture.

の伸びはかなり低く 20 時間でも分解率は約 20% で、そのときのヨウ素呈色はなお青色であるが、対照の部分精製酵素 III (C. A. P.) によっては、反応の初期 (12 分後) にヨウ素呈色は無色となり、デンプン分解率は 1 時間後で 38%, 20 時間後には 93% にも達した。しかし C 区分を単独に使用した場合、および C 区分と A 区分処理酵素 (F. A. T.) とを併用した場合は、いずれもヨウ素呈色赤色時におけるデンプン分解率は大体等しいが、ヨウ素反応無色以後は次第にデンプン分解の伸びに差を生じ、A 区分処理酵素 (F. A. T.) を添加した場合の方の分解率が高くなった。すなわち A 区分処理酵素 (F. A. T.) と C 区分酵素との併用では、20 時間後のデンプン分解率は C 区分単独使用の場合の 2.2 倍で 80% 近くになった。しかし部分精製酵素 III (C. A. P.) による場合の分解率にはおよばなかった。

4. A 区分処理酵素 (F. A. T.) によるデンプンおよびマルトースの分解

A 区分処理酵素 (F. A. T.) は Fig. 2 の実験で、デンプンを 20% 以上分解してその反応液のヨウ素呈色はなお青色であったが、この段階における反応生成糖をペーパークロマトグラフィーにより検討した。その結果は Fig. 3 で A 区分処理酵素 (F. A. T.) は、デンプンから直接グルコースを生成することが認められた。また 0.05% マルトースに作用させ、その分解率 79% の点でも反

Fig. 3. Paperchromatograms of the Digests with the Crude Amylase Preparation III (C. A. P.) and Fraction A Amylase treated with EDTA and *p*CMB (F. A. T.).

応生成物はグルコースのみであった。しかし5% マルトースに作用させて分解率 26% の点で検討してみると、グルコース、マルトース以外に数種のオリゴ糖の生成が認められた。

対照として行なった部分精製酵素 III (C. A. P.) による場合、デンプンの分解は容易に 90% 以上に達し、生成糖は主としてグルコースであるが、ある種のオリゴ糖、とくに重合度約5のオリゴ糖が検出される。このオリゴ糖は部分精製酵素 III (C. A. P.) を5% マルトースに作用させた場合にもみられ、それらは A 区分処理酵素 (F. A. T.) を5% マルトースに作用させた場合に認められたオリゴ糖の 1, 2 を除いてほぼ同じとみなされた。すなわち A 区分処理酵素 (F. A. T.) は基質濃度が低い場合はマルトース、デンプンを分解して直接グルコースを生じ、それらの基質濃度が高い場合は糖転移作用により種類のオリゴ糖を生ずること、部分精製酵素 III (C. A. P.) の示すマルトース分解作用あるいは糖転移作用は、結局、この A 区分処理酵素 (F. A. T.) に基づくことが明らかである。

考 察

本研究においてキャベツ中には既知アミラーゼとは全く性質が異なり、しかも糖転移作用を行なうアミラーゼの存在することが判明した。そのアミラーゼは Sephadex G-200 を用い、ついで EDTA および pCMB で処理することにより α - および β -アミラーゼから分離することができた。

著者はさきにリョクトウもやしのアミラーゼ系の解析において、既知アミラーゼとは全く異なる作用を行なう transglucosyl-amylase とも称すべきアミラーゼ⁽⁸⁾ の存在することを指摘した。このアミラーゼはキャベツの新アミラーゼと同じく Ca キレート剤や SH 基閉塞剤によってなら活性は阻害されず、一方、デンプンあるいはマルトースに作用せしめると直接グルコースを生成するが、しかしそれらの基質濃度が高い場合には転移作用を起こし、種々のオリゴ糖を生成するなどのことが認められた。沢井はある種の酵母に transglucosyl-amylase が存在⁽⁶⁾することを報じている。また高橋らによれば、ソバなど穀類種子の芽生えにはトランス作用を示す α -グルコシダーゼ⁽⁷⁾があるという。

キャベツのアミラーゼ系は α -, β -アミラーゼおよび本研究で明らかにされた transglucosyl-amylase より

なるが、このアミラーゼは前2者のアミラーゼに比し量的に少ないようにみられる。しかし、この種のアミラーゼは植物界に広く分布しているかも知れない。またこのアミラーゼは植物の生理活性にかなり関与しているようにも思われる。これについては今後の研究に委ねたい。

要 約

(1) マルトース分解力の強いキャベツの葉を酵素試料とし、硫酸塩析により部分精製したのち、Sephadex G-200 によりゲル濾過し、さらに EDTA, pCMB で処理して α - および β -アミラーゼ作用のないマルトース分解力を示す酵素区分を分離することができた。

(2) この酵素をデンプンに作用させると直接グルコースを生ずることが認められた。この酵素のみではデンプンの分解は容易に進行しないが、 α -および β -アミラーゼと併用すればデンプンをグルコースとして 80% 糖化する。

(3) マルトースの低濃度の場合はこれをほとんど完全にグルコースに分解するが、高濃度になるとグルコースの生成とともに種々の重合度のオリゴ糖を生成することが認められた。

以上の実験結果からキャベツ中にはデンプンより直接グルコースを生じ、かつ転移作用を有する transglucosyl-amylase ともいうべきアミラーゼの存在することを見出した。

終りに、本研究に終始ご指導をいただきました大阪市立大学理学部教授福本寿一郎博士、ならびに助教授山本武彦博士に厚く感謝いたします。

本報告の要旨は昭和 42 年 5 月 13 日、第 21 回栄養食糧学会総会において講演した。

- (1) 春日井愛子：家政学, **3**-4, 6 (1953) ; 5-1, 322 (1954) ; 5-3, 413 (1954).
- (2) 春日井愛子：農化, **33**, 1111 (1959) ; **33**, 1115 (1959).
- (3) 春日井愛子：農化, **36**, 784 (1962).
- (4) 春日井愛子：農化, **37**, 761 (1963).
- (5) 春日井愛子：大阪女子大学紀要, 生活理学編, **1**, 69 (1963).
- (6) T. Sawai : *J. Biochem.*, **48**, 382 (1960).
- (7) M. Takahashi and T. Shimomura : *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 929 (1968).
- (8) 春日井愛子：学位論文〔野菜アミラーゼ、特にリョクトウもやしのデンプン分解酵素系に関する研究, 大阪市立大学理学部 (1966)〕.