酵素剤の分別定量に関する研究 (第 7 報¹⁾) 膵臓, 細菌および *Aspergillus*
 α -アミラーゼの混合物中から細菌 α -アミラーゼの定量
(酵素剤の研究 第 54 報¹⁾)

杉浦 衛, 小木曾太郎, 岩田忠彦, 加藤好夫
岐阜薬科大学²⁾

Studies on Separative Determination on Enzymes. VII.¹⁾ On the Separative
Determination of Bacterial α -Amylase in a Mixture of Pancreatic,
Bacterial and *Aspergillus* α -Amylase.
(Studies on Enzymes. LIV¹⁾)

MAMORU SUGIURA, TARO OGISO, TADAHIKO IWATA and YOSHIO KATO
Gifu College of Pharmacy²⁾

(Received May 22, 1970)

A method for the separatory determination of bacterial α -amylase in a mixture of pancreatic, *Aspergillus* and bacterial α -amylase was investigated. Treatment with 8M urea was used for this separatory determination. After preincubation with 8M urea at 37° for 30 min, 83.4% of activity of bacterial α -amylase was recovered by dilution while the other α -amylases were almost denatured completely. This property of bacterial α -amylase was applied to the separatory determination. Activity of bacterial α -amylase and total activity of mixed amylases were obtained in the presence or absence of 8M urea, respectively. The average percentage of recovery of bacterial α -amylase was $100.8 \pm 7.6\%$. Various compounds, except sodium chloride, used in drugs did not affect the practical application of this method.

著者らは消化酵素剤に配合される各種起源の α -アミラーゼの分別定量法を確立する目的でその定量法である blue value 法について基礎的検討を加え, それに基づいて至適 pH 曲線を利用した各種起源の α -アミラーゼの分別定量法および Cl イオンによる活性化を利用した膵臓 α -アミラーゼの分別定量について報告した.³⁾

今回は各種起源 α -アミラーゼ混合物中の細菌 α -アミラーゼの分別定量法について検討した. 最近, タカアミラーゼ A⁴⁻⁷⁾ (*Aspergillus oryzae*) および枯草菌 α -アミラーゼ^{4,8-10)} (*Bacillus subtilis*) の変性, 失活およびその活性回復と蛋白の高次構造の変性について数多くの報告がなされ, 両者の変性からの活性回復および構造の変性には相違があることが認められている.

そこで尿素による変性と活性回復の条件を選定すれば, 分別定量に応用できるものと考え, その条件の検討を行なった. その結果, 細菌 α -アミラーゼ活性のみが回復する条件を見出し得たので他起源の α -アミラーゼとの分別定量が可能となった.

- 1) 第 53 報: 杉浦 衛, 伊藤万蔵, 岩田忠彦, 薬剤学, 投稿中. 本報告の要旨は日本薬学会東海支部例会で発表, 岐阜, 1969 年 11 月.
- 2) Location: Mitahora 492-36, Gifu.
- 3) 杉浦 衛, 伊藤万蔵, 岩田忠彦, 薬剤学, 投稿中.
- 4) 伊勢村寿三, 日化, 86, 447 (1965).
- 5) T. Takagi, H. Toda, *J. Biochem.* (Tokyo), 52, 16 (1962).
- 6) T. Takagi, T. Isemura, *J. Biochem.* (Tokyo), 52, 314 (1962).
- 7) K. Miyagawa, *Agr. Biol. Chem.* (Tokyo), 31, 761 (1967).
- 8) T. Isemura, A. Imanishi, *J. Biochem.* (Tokyo), 51, 172 (1962).
- 9) A. Imanishi, K. Kakiuchi, T. Isemura, *J. Biochem.* (Tokyo), 54, 89 (1963).
- 10) T. Yamamoto, A. Nishida, J. Fukumoto, *Agr. Biol. Chem.* (Tokyo), 30, 994 (1966).

以下この定量法について詳述する

実験の部

実験方法

供試酵素 細菌 α -アミラーゼとして、*Bacillus subtilis* の産生するジアスメン SS×3 (大和化成, 0.1M 酢酸緩衝液 pH 6.0 の条件で 14070 単位/g), カビ α -アミラーゼは *Aspergillus oryzae* の産生するバイオヂアスターゼ-2000 (天野製薬, 0.1M 酢酸緩衝液 pH 5.0 で 13300 単位/g), 膵臓 α -アミラーゼはパンクレアチン原末 (天野製薬, 0.1M リン酸緩衝液 pH 0.7 で 259 単位/g) を使用した。

酵素活性測定法 α -アミラーゼ活性測定法——1% (1.1 g→100 ml) 可溶性澱粉 5 ml および 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 4 ml の混液を 37° で 10 min 予熱したのち酵素液 1 ml (0.5—0.7 単位/ml) を加える。37° で 20 min 反応させ、その 0.2 ml をとり、ヨード・塩酸混液 (0.25% I_2 -2.5% KI 溶液 1 ml; 1N 塩酸液 1 ml を全量 100 ml に希釈したもの) 10 ml 中に加える。ヨード・澱粉反応による呈色を波長 660 m μ において測定する。

α -アミラーゼ 1 単位は上記実験条件で 1 hr に澱粉 1 g をアクロデキストリンにまで分解するに必要な酵素量で表わした。

$$\text{単位} = \frac{OD_{\text{Blank}} - OD_{\text{Reaction}}}{OD_{\text{Blank}}} \times \frac{3}{t} \times D$$

t : 反応時間 (min) D : 酵素の希釈倍数

細菌 α -アミラーゼの分別定量法——混合酵素液 1 ml を 8.9M 尿素液 9 ml 中 (酵素系で 8M) に加えて 37°, 30 min 予熱したのち、その活性 (吸光度) を B とする。同様に冷精製水 9 ml に酵素液 1 ml を加えた液の活性 (全活性) を A とする。求める細菌 α -アミラーゼ活性 (%) は $B/A \times 100$ の値を検量線 (Fig. 2) に挿入することにより得られる。

試薬および装置 8.9M 尿素溶液は尿素 (和光純薬) 534.5 g を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解し全量を 1 liter とした。

吸光度の測定には日立 101 型分光光度計を使用した。

結 果

分別定量条件の検討

定量法を確立するにあたって種々の定量条件を検討した。

8M 尿素共存下の還元剤の影響

8M 尿素または 0.2M 還元剤 (チオグリコール酸ナトリウム, メルカプトエタノール) を加えた 8M 尿素液中で酵素を 37°, 30 min, 加温したのち、冷精製水で 50 倍に希釈して常法により酵素活性を測定した。その結果 8M 尿素のみで細菌 α -アミラーゼは 82.4%, *Aspergillus* α -アミラーゼは 6.9% という活性を示すのに対し、還元剤が共存すると細菌 α -アミラーゼは 65—75%, *Aspergillus* α -アミラーゼは 5—10% の残存活性を示した。したがって 8M 尿素処理が分別定量に使用しうるものと判断された。

Fig. 1. Effect of Urea on α -Amylase Activity

a) effect of various concentration of urea on α -amylase activity
b) effect of preincubation with 8M urea on α -amylase activity
Effect of urea on α -amylases from *Bacillus subtilis* (—) and *Aspergillus oryzae* (---) were compared as described in the text.

尿素濃度、処理時間および希釈条件の検討

細菌 α -アミラーゼと *Aspergillus* α -アミラーゼについて尿素濃度および処理時間について検討した結果、Fig. 1 に示すように、8M 尿素的処理条件によって両 α -アミラーゼの残存活性に大きな差が認められた。したがって分別定量に用いる条件としては 8M 尿素液で 37°, 30 min 処理するのが最適であることを見出した。さらにこの条件で処理した酵素液を冷精製水および各種 pH の 0.01M リン酸緩衝液で希釈した場合の残存活性を比較したが、いずれの α -アミラーゼにも顕著な差は認められず、以下の実験には冷精製

水を使用した。なお伊勢村らは^{6,7)} 尿素変性後の活性回復は pH 8 付近で最大であると述べているが、著者らの結果とはわずかに差が認められた。また 8M 尿素処理後、尿素の影響をなくするための希釈倍数を検討したが、

原液から 100 倍希釈液の間で活性回復に差は認められず、伊勢村の報告⁴⁾ とほぼ一致した。この結果、尿素処理後の酵素液をそのまま活性測定に用いれば（反応系において 10 倍に希釈される）尿素の影響は無視できるものと思われ、分別定量時の希釈は特に行なわなかった。

以上の結果に基づいて 8M 尿素液中 37°, 30 min, 処理の条件を使用し各種 α -アミラーゼの活性を測定した。

TABLE I. Effect of 8M Urea on Various α -Amylase Activities

α -Amylase	Remaining activity		
	Control	8M Urea ^{a)}	% $\pm$ S.E.
Bacterial α -amylase	0.225	0.188	83.4 $\pm$ 7.4
Aspergillus α -amylase	0.197	0.013	6.9 $\pm$ 5.9
Pancreatic α -amylase	0.248	0.007	3.1 $\pm$ 1.2
Mixture of <i>Aspergillus</i> and pancreatic α -amylase	0.166	0.038	19.6 $\pm$ 4.2

a) One ml of each enzyme solution was incubated at 37° for 30 min with 9 ml of 8.9M urea solution. Enzyme activity was then measured as described in the text.

その結果、Table I に示したように細菌 α -アミラーゼは 83.4% の活性を示したが、カビ α -アミラーゼおよび膵臓 α -アミラーゼはそれぞれ 6.9% と 3.1% であり、活性回復はほとんど認められなかった。

分別定量結果

以上の実験の結果、分別定量の条件が確立したのでジアスメン SS $\times$ 3 (0.70 単位/ml), ビオヂアスターゼ (0.67 単位/ml), パンクレアチン原末 (0.52 単位/ml)

の希釈液を各種の割合に混合した酵素液を用い、酵素活性測定法の項に記述した方法により分別定量を行なった。なお実験は各試料について 7 回行なった。混合剤の分別定量から得られた結果に基づいて混合 α -アミラーゼ中の細菌 α -アミラーゼを定量するための検量線を Fig. 2 に示した。

Fig. 2a は細菌とカビ α -アミラーゼの混合剤から細菌 α -アミラーゼを定量するための検量線、Fig. 2b は細菌と膵臓 α -アミラーゼの混合剤から前者を定量するための検量線、Fig. 2c はカビ、膵臓および細菌 α -アミラーゼの混合剤から細菌 α -アミラーゼを求める検量線である。

この検量線を用いて別に分別定量した結果を Table II に示した。いずれの場合にも良好な回収率が得られ、その平均変動係数は 7.5% であった。

各種添加剤の影響

酵素製剤中に混在すると考えられる賦形剤、崩壊剤、結合剤および滑沢剤などの分別定量におよぼす影響について検討した。大過剰の添加剤、すなわち 5 mg/ml に細菌 α -アミラーゼ 30 μ g/ml, *Aspergillus* α -アミラーゼ 10 μ g/ml, 膵臓 α -アミラーゼ 400 μ g/ml の割合で含有する混合酵素液について total activity (A) と細菌 α -アミラーゼ活性 (B) を測定した。その結果を Table III に示した。

水溶性賦形剤である塩化ナトリウムによって混合酵素液中の膵臓 α -アミラーゼが著しく活性化される結果、total activity が約 2 倍に増加したが、尿素処理によって対照と同じように変性を受けることが認められた。一方崩壊剤である陰イオン界面活性剤のラウリル硫酸ナトリウムによりわずかに阻害され、炭酸カルシウム、クエン酸カルシウム、リン酸カルシウムなどの不溶性賦形剤によってわずかに保護作用が観察されたが定量値に対しては影響がほとんど認められなかった。

Fig. 2. Calibration Curve of Bacterial α -Amylase in Mixtures of Various α -Amylase

Activity (OD at 660 m μ) of α -amylase untreated with 8M urea (A) and treated with 8M urea (B) were measured in the mixtures of bacterial and *Aspergillus* α -amylase (a), bacterial and pancreatic α -amylase (b) and bacterial, *Aspergillus* and pancreatic α -amylase (c).

TABLE II. Separative Determination of Bacterial α -Amylase in Mixtures of Various α -Amylase and Bacterial α -Amylase

Mixtures		Mixed ratio of bacterial α -amylase(%)			
		80	60	40	20
Bac. + Asp.	added activity	81.3	62.0	42.1	21.5
	measured activity	77.0	59.0	42.4	23.8
	corrected activity	82.1	61.8	42.6	21.9
	recovery ^{a)}	100.9 $\pm$ 3.1	99.7 $\pm$ 4.6	101.5 $\pm$ 6.8	102.8 $\pm$ 9.1
Bac. + Panc.	added activity	78.5	57.8	37.9	18.7
	measured activity	71.8	64.1	48.6	24.6
	corrected activity	79.2	58.9	38.6	18.3
	recovery ^{a)}	100.9 $\pm$ 10.9	101.6 $\pm$ 9.0	101.8 $\pm$ 6.6	98.1 $\pm$ 6.8
Bac. + Asp. + Panc.	added activity	82.3	63.6	43.8	22.5
	measured activity	76.0	67.5	57.0	40.4
	corrected activity	81.6	64.4	44.0	22.5
	recovery ^{a)}	99.1 $\pm$ 8.3	102.5 $\pm$ 9.8	100.5 $\pm$ 5.6	99.8 $\pm$ 10.6

a) mean $\pm$ S.E. of each 7 samplesTABLE III. Effect of Various Compounds on the Separative Determination of Bacterial α -Amylase

Additions	Relative activity(%)		(B/A) $\times$ 100
	A	B	
None	100.0	100.0	100.0
Lactose	94.4	95.3	100.8
Sucrose	96.9	96.3	99.9
Glucose	96.9	100.0	103.3
Starch	100.4	99.8	99.3
Cellulose	99.1	92.4	93.3
Sod. CMC ^{a)}	93.3	94.3	101.1
Agar agar	100.0	104.5	104.6
Sod. arginate	107.7	108.0	102.8
Gum arabic	100.5	106.1	105.7
Gelatine	107.5	103.0	95.9
PEG-6000 ^{b)}	107.9	106.1	98.3
Stearic acid	108.2	101.0	93.3
Sod. laurylsulfate	82.0	89.2	108.8
Cal. citrate	107.2	112.9	105.3
Boric acid	101.0	93.9	93.0
Sod. bicarbonate	101.8	93.4	91.9
Cal. carbonate	111.3	113.0	102.2
Sod. chloride	204.2	99.1	48.4
Cal. phosphate	114.0	118.9	104.0
Kaolin	91.1	91.9	100.0

a) Sod. CMC: sodium carboxymethyl cellulose

b) PEG-6000: polyethylene glycol 6000

A : activity (OD at 660 m μ) untreated with 8M ureaB : activity (OD at 660 m μ) treated with 8M ureaEnzyme solution used in this experiments consisted of Bacterial α -amylase, *Aspergillus* α -amylase, Pancreatic α -amylase and additions as described in the text.

考察および結論

一般に 8M 尿素溶液による蛋白変性は尿素と蛋白質中のアミノ酸残基との間に競合的に水素結合が作られる結果、ペプチド鎖の高次構造が破壊され稠密な構造がふくれあがって糸まり状の構造に変化することに基因すると考えられている。細菌 α -アミラーゼは分子内に -S-S- 結合を全く持っていないという点でカビ α -アミラーゼと非常に異なっているが、分子内のカルボキシル基とチロジン残基の水酸基の間に多数の水素結合があり、またカルシウムが安定化に寄与している点など、両者は相互にきわめて類似性を有している。著者らの実験では、各種 α -アミラーゼは還元剤の有無にかかわらず、変性あるいは活性回復がほとんど同じようにみられることから分別定量に用いた条件、すなわち 8M 尿素 30 min 処理の際には、還元剤の存否は酵素の変性あるいは活性回復には特に関係がないものと考えられる。タカアミラーゼ A について酸変性後、中和することにより 50 hr 後に酵素活性の回復が 80—90% であり、⁵⁾ 8M 尿素変性後にも 40—50% (pH 7—9) の回復であるといわれ、⁶⁾ 一方枯草菌 α -アミラーゼに関しては 8M 尿素による変性後希釈と pH を適当に選択することにより 5 hr 後に活性を 90% 近くまで回復すると報告されている。⁸⁾

著者らも反応液中に各種濃度の尿素を共存させて酵素活性を観察したところ、3M 尿素共存下では細菌 α -アミラーゼ 56%、カビ α -アミラーゼ 10.1% という残存活性を示した。これらの事実および Table I に示した結果から細菌 α -アミラーゼはカビ α -アミラーゼよりも 8M 尿素処理の初期においては抵抗性が強く、しかもその活性回復もすみやかであると推察された。この事実は -S-S- 結合が存在すると変性を受けても生の構造への復帰が容易であるという伊勢村らの説¹¹⁾ と全く相反するものである。この理由はおそらく尿素変性の初期には細菌 α -アミラーゼの立体構造がほどこにくく、native な構造への復帰がすみやかであることに基因するものと推察される。細菌 α -アミラーゼのこの性質を利用して各種起源 α -アミラーゼ中より細菌 α -アミラーゼを分別定量することができた。その分別定量結果は Table II に示したように平均回収率 100.8%、変動係数 7.6% というきわめて良好な定量結果が得られた。7.6% の変動係数は blue value 法自体に 6—8% の測定バラツキがあるのでやむを得ないものと推察される。なお細菌と脾臓 α -アミラーゼの共存する場合および細菌、脾臓、カビの三者が共存する場合の細菌 α -アミラーゼの検量線に直線性がないのは、尿素処理に対して脾臓 α -アミラーゼがかなりの抵抗性を示すこと、および混合酵素剤の total activity が相互作用の結果、いくぶん減少することに基づくものと判断される。

この分別定量法を酵素製剤に応用すべく添加剤の影響を酵素量の 10 倍量を用いて検討した。その結果、塩化ナトリウムが定量結果に影響をおよぼした以外にこの定量法を妨害するようなものはみられなかった。したがって、市販製剤中のほとんどすべての賦形剤、結合剤などは定量値に影響を与えないものと考えられる。 α -アミラーゼはカルシウムが共存すると変性から保護されるといわれる。¹⁰⁾ 酵素製剤中の賦形剤としては不溶性カルシウム塩が添加されるが、Table III の結果から明らかなように 10 倍量のカルシウム塩を添加しても定量結果にはほとんど影響を与えなかった。

以上の結果から 8M 尿素を用いる細菌 α -アミラーゼの分別定量法は比較的、定量誤差が少なく簡便な方法であり、各種起源 α -アミラーゼより細菌 α -アミラーゼを分別するのに良好な方法と結論し得る。

11) 伊勢村寿三編, “生体高分子 I (生物物理学講座 4),” 吉岡書店, 京都, 1965, pp. 141—173.