インゲンマメ種子の成熟および発芽過程で現れる β -N-アセチルヘキソサミニダーゼとキトビアーゼ活性量の変化

岩 本 徹・A. L. ハモス・福 山 寿 雄・野 並 浩

愛媛大学農学部

Changes in Activities of β -N-Acetylhexosaminidase and Chitinase Developed in Kidney Beans during Maturation and Germination

Tohru IWAMOTO, Ana Luiza RAMOS, Toshio FUKUYAMA and Hiroshi NONAMI

College of Agriculture, Ehime University, Matsuyama 790, Japan

Activities of β -N-acetylhexosaminidase and chitinase were measured in maturing and germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cvs. Suratto-wanda and Maisugata. The chitinase activity became higher when embryos began to develop prior to rapid fresh weight increase in seeds, and decreased rapidly when seeds began to increase their fresh weight rapidly. When the seed growth was inhibited by low temperature, the chitinase activities decreased dramatically in developing seeds. The β -N-acetylhexosaminidase and chitinase activity patterns were different between the two varieties, and did not exhibit clear correlation with growth and development of seeds in both varieties. Additionally, the β -N-acetylhexosaminidase activities were not sensitive to changes in seed growth and development affected by low temperature. In dry seeds, the chitinase activities were not detected, and when seeds germinated, its activities became apparent. The β -N-acetylhexosaminidase activities were present in dry and germinating seeds, and had similar values in Suratto-wanda and Maisugata. Although β -N-acetylhexosaminidase and chitinase have been known to be the same group of enzymes in general, the present study suggests that they are different, and that chitinase may be one of key enzymes related to seed development and germination processes.

(Received April 22, 1996)

1996年4月22日受付

緒 言

高等植物は受精後の種子の形成過程で、発芽に必要な各種の貯蔵物質とこれを分解する酵素を生産する。 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼはいろいろなマメの休眠種子あるいは発芽子葉に存在して (Bahl and Agrawal, 1968; Li and Li, 1970; Basha and Beevers, 1976; Bouquelet and Spik, 1976; Ohtakara and Tran, 1978; Carratu *et al.*, 1985; Poci *et al.*, 1990), 発芽時に何らかの貯蔵物質を分解するために生産されていると考えられる。一方、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼにはキチンやキトオリゴ糖を分解する役割もあると

考えられており (Bahl and Agrawal, 1968; Li and Li, 1970; Ohtakara and Tran, 1978; Yi, 1981), 病原性の *Fusarium* 属のカビの抑制に本酵素が関係している可能性も指摘されている (Poci *et al.*, 1990)。そうであれば、本酵素を多く含む品種はカビに対する抵抗性が高いとも考えられる。これらの報告をみると、いずれも β -N-アセチルヘキソサミニダーゼとキトオリゴ糖分解酵素 (キトビアーゼと呼称) が同じ酵素であることを前提としている。さらに、マメの β -N-アセチルヘキソサミニダーゼについての報告も休眠種子あるいは発芽に際してのものが大部分で、種子形成と関連づけた報告は見当たらない。

我々は先にインゲンマメの β -N-アセチルヘキソサ

ミニダーゼとキトビアーゼは別の酵素であることを推察させる実験結果を得たので報告した (Iwamoto *et al.*, 1993, 1996)。続く実験において、 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼとキトビアーゼは成熟途上の種子にも存在し、その量は品種によって著しく異なることを認めた。これらの背景のもとに、種子の形成過程における両酵素の生産量を品種を変えて調べることは、種子の形成における両酵素の生理作用の解明につながるのではないかと考え、本実験を行った。成熟度の異なる種子中の酵素量を比較し、さらにこの比較を栽培法と品種を変えたインゲンマメでも確かめた。加えて、品種の差が休眠種子と発芽子葉にも認められるかどうか調べた結果、 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼとキトビアーゼは異なった酵素であることを再確認し、キトビアーゼが種子形成初期および発芽時に活性化される特異的な酵素であることを示唆する知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 栽培と種子測定

植物材料として筋なし丸莢つるありインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L. cv. スラットワンダー (Surattowanda), タキイ種苗株式会社, 京都) および丸莢つるありインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L. cv. 舞姿 (Maisugata), サカタのタネ株式会社, 横浜) を使用した。スラットワンダーの秋栽培は市場へ出荷するための栽培で、9月中旬から11月末まで露地栽培を行った。

秋栽培の舞姿の水耕栽培は養液栽培装置で pH を調節したホーグランド改変養液 ($\text{EC } 0.15 \text{ S m}^{-1}$, pH 6.0) (Nonami and Schulze, 1989) を培養液として行った。

春栽培は実験用の栽培で、土耕栽培では堆肥を入れた同じ畑に舞姿とスラットワンダーの苗を3月下旬に定植し、追肥は適宜ホーグランド改変養液 (Nonami and Schulze, 1989) を灌水に織りまぜることで行った。

開花後からの莢の伸長を定規で計測した。莢中に存在する種子を取り出し、莢の長さを計測した後、個々の種子長をデジタルノギスを用いて計測した。ただちに莢と個々の種子の新鮮重を測定した。莢ごとに種子を一括して 70°C で24時間乾燥させて全乾物重を測定したのち、莢ごとに1個の種子の平均値を算出した。さらに、新鮮重と乾燥重を用い、種子の含水率を (新鮮重 - 乾燥重) / 新鮮重の関係から求めた。

莢の成長率を計測した後、莢長で割って莢の相対成

長率を求めた。形成された莢の長さは異なっているため、計測日の莢の成長は、相対成長率の平均値で評価した。

つるの先端に位置する誘引ネットにテープで印を付け翌日そのテープからの伸びを計測して莢の成長率を計測した。また、莢頂から5 mm 間隔でマジックインクで印を付け、部位別成長率を計測した。伸長部位は莢頂部から250 mm までであり、成長率を成長部位の長さで割って莢の相対成長率を求めた。

2. 酵素の抽出と活性測定

定植後78日目(1995年10月30日)と88日目(1995年11月9日)のマメを採取し、莢の長さとし新鮮重を計測した後、その中の種子の長さを計測するとともに、長さの異なる種子ごとに酵素を抽出し酵素活性を測定した。

発芽種子の酵素活性を調べるため、種子を洗浄をかねて1時間吸水させたあと、これをシャーレ内の水を含ませたろ紙上に置いて暗黒下 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で発芽させた。発芽処理したあと、スラットワンダーは4日後、舞姿は10日後に子葉が展開し、同様の生育ステージとなったので子葉を採取し酵素を抽出した。

生の種子あるいは子葉に対してその重量の10倍量の0.05 M, pH 6.0 のリン酸緩衝液 (以下、標準緩衝液) を加えホモジナイザーで破碎したのち、 $27,000 \times g$, 10分間の遠心分離を行い上清部分を集め抽出液とした。乾燥した休眠種子の酵素活性はコーヒールで種子を粉末にしたのち、同じように抽出して測定した。

2.1 β -*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ活性の測定

1 mM の *p*-ニトロフェニル β -*N*-アセチルグルコサミニド 0.5 mL に酵素液 0.25 mL と標準緩衝液 0.25 mL を加え、 40°C で10分間反応させたのち、0.1 M Na_2CO_3 1.5 mL を加え、遊離した *p*-ニトロフェノールを430 nm で比色定量した。この条件で1分間に1 μmol の *p*-ニトロフェノールを遊離する酵素量を1単位とした。

2.2 キトビアーゼ活性

標準緩衝液で1 mM に調製したキトビオース溶液 0.25 mL に試験液 0.25 mL を加え、 40°C で1時間反応させたのち、反応液中の遊離 *N*-アセチルグルコサミンを Reissig らの方法 (Reissig *et al.*, 1955) で測定した。酵素活性は1時間の反応で1 μmol の *N*-アセチルグルコサミンを遊離する酵素量を1単位として示した。

結 果

1. スラットワンダーと舞姿の種子の成長

スラットワンダーも舞姿もケンタッキーワンダー由来の品種といわれている。同じ圃場で同時に隣り合わせに定植した両品種の開花後からの莢の成長を調べてみると、Fig. 1 に示すように同様の成長速度であった。

Fig. 1 Pod length of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Suratto-wanda (■) and *Phaseolus vulgaris* L. cv. Maisugata (○) after flowering.

Vertical bars indicate the standard deviations.

Fig. 2 Pod fresh weight with respect to pod length of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Suratto-wanda (○) and *Phaseolus vulgaris* L. cv. Maisugata (●).

草丈も同じくらいになった。また、栽培条件を変えてスラットワンダーは土耕で、舞姿は水耕で生育させて莢の長さとおの新鮮重の関係を調べても同様に同じであった (Fig. 2)。その莢の中にある種子の種子長と新鮮重の関係を比較しても、Fig. 3 に示すようにスラットワンダーと舞姿は同様の形態をしていた。しかし、種子の色はスラットワンダーが白色で、舞姿が少し茶色を帯びており、遺伝形質が多少異なっていることが示唆された。

土耕の場合も (Fig. 4A)、水耕の場合も (Fig. 4B)、種子の新鮮重は、莢が成長して 15~19 cm 以上になってから急激な増加が始まり、乾物重の増加は新鮮重よりも遅れ時間があった。種子の含水率 (Fig. 4C) は初期の段階では 0.85~0.90 と高く、種子の乾物重の増加が始まるにつれて含水率の急激な低下が見られた (Fig. 4)。

2. 土耕栽培と水耕栽培における酵素活性

舞姿を使用して土耕および水耕栽培を行って、土耕および水耕が種子の生理活性に差異があるか調べた。

土耕栽培でも水耕栽培でもキトビアーゼ活性は種子長が 3 mm 以下では小さく、4~5 mm になると活性値が最大となった (Fig. 5)。一方、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼは、種子長が 10 mm 以下では活性が低く、種子が成熟する頃に活性が高くなった (Fig. 5)。

土耕栽培では、キトビアーゼ活性が水耕栽培の時よりも高くなる傾向にあり、逆に、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性は水耕栽培よりも種子の大きさが小

Fig. 3 Bean fresh weight with respect to bean length of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Suratto-wanda (○) and *Phaseolus vulgaris* L. cv. Maisugata (●).

Fig. 4 Fresh weight (○) and dry weight (●) of seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Suratto-wanda grown in soil (A) and *Phaseolus vulgaris* L. cv. Maisugata grown in hydroponic culture (B), and water content of seeds (C) of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Suratto-wanda in soil (■) and *Phaseolus vulgaris* L. cv. Maisugata grown hydroponically (□).

さくて成長が起こっている時期に低くなる傾向にあった (Fig. 5)。この酵素活性の栽培方法の違いに依存した差異は、水ストレスが影響している可能性が唆された。

3. スラットワンダーと舞姿における酵素活性の差異

キトピアゼ活性に関して、スラットワンダーで舞姿より約 10 倍高い活性があったが、種子の生育に依存した活性の変化は同傾向であった (Fig. 6A)。一方、 β -N-アセチルヘキササミニダーゼ活性は両品種間での差は大きく、種子の生育に依存した活性の変化のパターンも大きく異なっていた (Fig. 6B)。スラットワンダーにおける β -N-アセチルヘキササミニダーゼ活性に関して、種子の生育過程に依存しての変化は少なくともほぼ一定量の活性が見られた。舞姿における β -N-アセチルヘキササミニダーゼ活性に関しては、種子が小さくて種子の成長が盛んなときに小さく、スラットワン

Fig. 5 Chitobiase (○) and β -N-acetylhexosaminidase (HexoNAcase) (●) activity with respect to bean length of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Maisugata grown in soil (A) and hydroponically (B).

Fig. 6 Comparison between enzyme activities of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Suratto-wanda (■) and *Phaseolus vulgaris* L. cv. Maisugata (○) grown in soil simultaneously in chitobiase (A) and β -N-acetylhexosaminidase (HexoNAcase) (B).

ダー種と比べると約 1/100 であり、種子が成長して 10 mm 以上になってから活性が上がってきて、スラット

ワンダー種の約 1/2 に達した (Fig. 6B)。これらの結果から、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼは、品種間での特異性が高いため、種子の形成過程での関与が強い酵素群とはいえない可能性があることが分かった。一方、キトビアーゼは、品種間において活性量の差異は見られたが、活性化傾向に共通性が見られ、種子の発達段階に関与した酵素であることが推測された。

また、スラットワンダーと舞姿は、ケンタッキーワンダー由来の品種で、形態的には類似性が高いが (Fig. 1, 2)、選抜・交配過程で酵素活性の差に見られるように遺伝形質の差が顕著に現れてきていることが分かった。

4. 種子の成長過程における酵素活性の温度依存性

スラットワンダーの開花は 9 月末から 10 月終盤まで連続的に起こった。10 月 30 日、莢の成長が盛んな時

期に採種し、酵素活性を計測すると、キトビアーゼでは種子長が 4 mm になったとき、活性が最大となり、種子が成熟するにつれて活性は低下した (Fig. 7)。 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性は、種子の発達段階に依存せずほぼ一定であった (Fig. 7)。11 月に入り、松山で急に気温が低下して (Fig. 8A における 11 月 7 日)、莢の成長が阻害されたときに酵素活性を計測した (Fig. 8B)。同一植物体から採集した種子を使用したにもかかわらず、キトビアーゼ活性は、種子の初期成長過程で活性量が順調に成長していた時期に比べて約 1/4 に低下していた (Fig. 7)。これは、低温により、成長阻害が起こったときキトビアーゼ活性も低下したものと推測された。一方、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性は、低温および莢の成長阻害に伴った影響

Fig. 7 Seasonal changes in chitinase (Δ , $\blacktriangle$) and β -N-acetylhexosaminidase (HexoNase) ($\circ$, $\bullet$) activities in seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Suratto-wanda grown in soil.

Data shown in open symbols (Δ , $\circ$) were obtained from seeds harvested on October 30, 1995, and those shown in closed symbols ($\blacktriangle$, $\bullet$) were obtained from seeds harvested on November 9, 1995. Vertical bars indicate the standard deviations. Pod growth rates are shown in Fig. 8B, and pods were harvested at the arrows shown in Fig. 8B.

Fig. 8 Seasonal changes in the maximum (T_{max}) and minimum (T_{min}) air temperature and the average relative humidity (R.H.) (A), and the relative growth rate of pods (B) and stems (C).

Vertical bars indicate the standard deviations. Enzyme assay was conducted in seeds taken from pods shown at arrows in B, and enzyme assay data are shown in Fig. 7.

Table 1 Enzyme activity in dry and germinating seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cvs. Suratto-wanda and Maisugata.

	Chitinase (unit/mL)	HexoNase ² (unit/mL)
Dry seeds		
Suratto-wanda	0±0	70.4±2.5
Maisugata	0±0	56.7±5.5
Germinating seeds		
Suratto-wanda	1 791.1±102.9	62.5±1.8
Maisugata	961.9± 51.4	56.1±2.6

Data are shown with the standard deviations.

² β -N-acetylhexosaminidase

を受けなかった (Fig. 7)。低温によって莢の成長と茎の成長は阻害され、11月中旬には成長がほとんど停止した (Fig. 8)。

これらの結果から、キトビアーゼ活性は、種子の発達段階に依存するのみでなく、莢が成長する温度環境の影響を強く受けることが明らかとなった。

5. 乾燥種子および発芽種子における酵素活性

種子が成熟したあと、乾燥し、乾燥種子となる。乾燥種子における酵素活性と、吸水させたあと発芽させた発芽種子における酵素活性を比較した。乾燥種子においてはスラットワンダーも舞姿もキトビアーゼ活性はなかった (Table 1)。発芽種子においてはキトビアーゼ活性が顕著に現れたが、スラットワンダーでの活性が舞姿での活性よりも約2倍ほど高かった (Table 1)。茎葉および根の成長が起こって植物体が大きくなるとキトビアーゼ活性はなくなった。

一方、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性は、乾燥種子においても発芽種子においても酵素活性の差異はほとんどなく一定とみなすことができ、さらに、品種間の差異もほとんどなかった (Table 1)。

以上の結果から、キトビアーゼは、種子の発芽初期過程に活性化され、また、発達中の種子から活性が見つかることから胚成長および休眠誘導・休眠打破の生理活性に関連していることが示唆された。

考 察

β -N-アセチルヘキソサミニダーゼにはキトビアーゼ活性を持つもの (Bahl and Agrawal, 1968; Li and Li, 1970; Ohtakara and Tran, 1978; Yi, 1981) と持たないもの (Bouquelet and Spik, 1978; Pocsy *et al.*, 1990) がある。多くはキトビアーゼ活性を持ちながら

も、発芽時にエネルギー源と細胞構成原料を供給するために働くと考えられている。キトビアーゼ活性を持つ β -N-アセチルヘキソサミニダーゼは発芽時に貯蔵物質の分解に働く以外に、病原性カビに対する防御に関与している可能性も示されている (Pocsy *et al.*, 1990)。これらの報告をみると、いずれも β -N-アセチルヘキソサミニダーゼとキトビアーゼは同じ酵素であることを前提としている。これに対し、我々は両酵素が異なる酵素であることを報告している (Iwamoto *et al.*, 1993, 1996)。

本研究では、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼとキトビアーゼの活性量が、種子の発達段階で非常に異なる上に (Fig. 5, Table 1)、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼの活性は温度による影響を受けず、キトビアーゼ活性は温度感受性が高いことから (Fig. 7)、両酵素は異なる酵素であるということができ、前報 (Iwamoto *et al.*, 1993, 1996) で得られた結果を再確認することができた。さらに、 β -N-アセチルヘキソサミニダーゼは品種間での活性特性が非常に異なっていて (Fig. 6)、キトビアーゼでは活性特性が品種間で類似していることから (Fig. 6)、両酵素が異なっているということがいえる。

スラットワンダーと舞姿の β -N-アセチルヘキソサミニダーゼが休眠種子と発芽子葉に存在するという結果は他の報告 (Bahl and Agrawal, 1968; Bouquelet and Spik, 1976; Ohtakara and Tran, 1978; McFarlane *et al.*, 1984) と一致するが、タチナタマメの休眠種子から精製した β -N-アセチルヘキソサミニダーゼはキトビアーゼ活性があるとされている (Li and Li, 1970) ので、この点はインゲンマメと異なる。ほとんどの β -N-アセチルヘキソサミニダーゼは β -N-アセチルガラクトサミニダーゼ活性と β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性をあわせもっている (Bahl and Agrawal, 1968; Li and Li, 1970; Bouquelet and Spik, 1976; Ohtakara and Tran, 1978; McFarlane *et al.*, 1984; Pocsy *et al.*, 1990) ので、種子中にある N-アセチルガラクトサミンあるいは N-アセチルグルコサミンを含む糖タンパクに作用すると考えられる。そのため、本酵素は発芽時に糖タンパクに作用して必要なエネルギー源あるいは細胞構成原料を供給するために合成されると推察される。この推察は今回の実験に用いたマメの β -N-アセチルヘキソサミニダーゼとキトビアーゼにも当てはまると考えられる。しかし、キトビアーゼは β -N-アセチルヘキソサミニダーゼと異なり、休眠

種子には存在せず発芽で発現するので、二つの酵素がまったく同じ働きをしているのではないと推察される。種子の形成と発芽時の酵素の発現について最もよく研究されているのはアミラーゼである (Minami-kawa, 1979; Miyata and Akazawa, 1982; Tomura and Koshiba, 1985)。種子の形成過程で合成されたキトビアーゼ活性が休眠種子になるとなくなるという点はアミラーゼに似ているが、キトビアーゼの発現する時期はアミラーゼのそれより早く、種子の成長が始まる以前の段階である。そこで、キトビアーゼは種子の成長に働くというよりむしろ成長に必要な反応の準備のために働く可能性が高い。たとえば、成長過程で働く酵素の活性化をするなどが考えられるが、これ以上は現段階では分からない。

推察されている β -N-アセチルヘキソサミニダーゼの別の役割にカビの防御に関係しているのではないかというものがある。今回調べたキトビアーゼの特徴は種子形成の初期に現れ、成熟・乾燥に向かうにつれて著しく活性を低下させるということである。この結果から考えると、キトビアーゼがカビに対する抵抗のために働くとは考えにくい。ここでは示していないが、キトビアーゼが存在しない莢中にはキチナーゼが認められるので、カビへの抵抗性はむしろキチナーゼが担っていると推察している。

以上、述べてきたこれらの推察は主にスラットワンダーと舞姿の実験から得られたものであるが、種子の成長過程で認められたスラットワンダーと舞姿間の酵素量の差は発芽で認められなかった。種子の形成過程で推察したキトビアーゼの生理作用をさらに確認すること、この推察がインゲンマメ一般あるいは他のマメにどこまで適用できるか調べることが次の課題である。

文 献

- Bahl, O. P., Agrawal, K. M. L. 1968. Glycosidases of *Phaseolus vulgaris*. 1. Isolation and characterization of β -N-acetylglucosaminidase. J. Biol. Chem. **243**: 98-102.
- Basha, S. M. M., Beevers, L. 1976. Glycoprotein metabolism in the cotyledons of *Pisum sativum* during development and germination. Plant Physiol. **57**: 93-97.
- Bouquet, S., Spik, G. 1976. Characterization and localization of four forms of N-acetyl- β -D-hexos-aminidase from fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) germinated seeds. FEBS Lett. **63**: 95-101.
- Bouquet, S., Spik, G. 1978. Properties of four molecular forms of N-acetyl- β -D-hexosaminidase isolated from germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). Eur. J. Biochem. **84**: 551-559.
- Carratu, G., Colacino, C., Conti, S., Giannattasio, M. 1985. β -N-Acetylglucosaminidase and β -galactosidase from aleurone layers of resting wheat grains. Phytochemistry **24**: 1465-1469.
- Iwamoto, T., Hamada, Y., Fukuoka, Y., Okada, T. (岩本 徹・濱田康文・福岡裕幸・岡田俊明) 1996. Localization and development of β -N-acetylhexos-aminidase and N,N'-diacetylchitobiase during germination of *Phaseolus vulgaris* L. (発芽インゲンマメにおける β -N-アセチルヘキソサミニダーゼとキトビアーゼの分布と消長). (Japanese text with English abstract) Nippon Nogeikagaku Kaishi **70**: 173-175.
- Iwamoto, T., Sonobe, A., Somsit, A., Nagasaki, S. 1993. Jack bean β -N-acetylhexosaminidase does not hydrolyze N-acetylchitooligo-saccharides. Biosci. Biotech. Biochem. **57**: 841-842.
- Li, S. C., Li, Y. T. 1970. Studies on the glycosidases of jack bean meal. 3. Crystallization and properties of β -N-acetylglucosaminidase. J. Biol. Chem. **245**: 5153-5160.
- McFarlane, E. F., McFarlane, D. R., Kennedy, I. R. 1984. Isolation of β -N-acetyl-D-hexosaminidases from lupin seed. Phytochemistry **23**: 2431-2433.
- Minamikawa, T. 1979. Hydrolytic enzyme activities and degradation of storage components in cotyledons of germinating *Phaseolus mungo* seeds. Bot. Mag. Tokyo **92**: 1-12.
- Miyata, S., Akazawa, T. 1982. α -Amylase biosynthesis: evidence for temporal sequence of NH₂-terminal peptide cleavage and protein glycosylation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**: 6566-6568.
- Nonami, H., Schulze, E.-D. 1989. Cell water potential, osmotic potential, and turgor in the epidermis and mesophyll of transpiring leaves: Combined measurements with the cell pressure probe and nanoliter osmometer. Planta **177**: 35-46.
- Ohtakara, A., Tran, T. K. (大宝 明・トラン ティ キムガン) 1978. Occurrence β -N-acetylglucosaminidase in the germinated seeds of mung bean and its purification and properties (発芽緑豆における β -N-アセチルグルコサミニダーゼの存在と酵素の精製および性質). (Japanese text with English abstract) Nippon Nogeikagaku Kaishi **52**: 591-597.
- Pocsi, I., Kiss, L., Nanasi, P. 1990. Studies on the N-acetyl- β -hexosaminidase B from germinating *Lupinus luteus* L. seeds. 1. Purification and characterization. Biochim. Biophys. Acta **1039**: 110-118.
- Reissig, J. L., Strominger, J. L., Leloir, L. F. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. J. Biol. Chem. **217**: 959-966.
- Tomura, H., Koshiba, T. 1985. Biosynthesis of α -amylase in *Vigna mungo* cotyledon. Plant Physiol. **79**: 939-942.
- Yi, C. K. 1981. Increase in β -N-acetylglucosaminidase activity during germination of cotton seeds. Plant Physiol. **67**: 68-73.