α -アミラーゼ活性に及ぼすクロロフィルの影響The Effect of Chlorophyll on the Activity of α -Amylase

(昭和 41 年 4 月 8 日 受理)

守 康 則
(Yasunori Mori)

小 野 菊 子
(Kikuko Ono)

首尾木 千恵
(Tie Syubiki)

The effect of chlorophyll and its decomposition products on the α -amylase activity was investigated. The chlorophyll and the chlorophylline which is an alkaline decomposition product of chlorophyll inactivated the enzyme. The pheophytin which is an acid decomposition product of chlorophyll had an effect on the enzyme and magnesium had also an effect. The inhibition of the enzyme with chlorophyll was protected by the presence of calcium. The optical decomposition products of chlorophyll inactivated the enzyme but their inactivating action decreased with the progress of the optical decomposition degree of chlorophyll.

緒 言

植物の種子の発芽、生長などの植物生理と酵素作用の発現や活性度の変化との関連において植物アミラーゼに対するビタミンやミネラルの影響については多くの報文がみられ、とくに SH 基を活性基とする植物 β -アミラーゼに対するアスコルビン酸の阻害については多くの報文がみられ¹⁾²⁾、また動植物に豊富に分布し、それらの生体内において酸化還元機構の重要な役割を演じているリポフラビンと α -アミラーゼとの関係については、曾根³⁾がリポフラビンの蛍光物質がとくに光照射下に *in vitro* の状態で細菌 α -アミラーゼ活性を著しく阻害すると報告している。Galston ら⁴⁾もリポフラビンによって光照射下で麦芽 α -アミラーゼ活性が著しく阻害されると報告している。リポフラビンと同様に有色植物に豊富に分布し、植物の葉緑体にタンパク質と結合して可溶性の状態で存在すると考えられているクロロフィルも生葉中で 660~680m μ に赤色蛍光帯をもち、蛍光物質としてリポフラビン同様にアミラーゼに影響をもつものと推考されるが、しかしクロロフィルの α -アミラーゼに及ぼす影響については、ほとんど知見がない。一方クロロフィルの生体内における吸収や体内における分解過程については、最近とくにクロレラの食糧化の研究と関連して比較的検討が加えられているが⁵⁾⁶⁾、しかしクロロフィルや種々の条件下におけるクロロフィル分解物の消化酵素系へ及ぼす影響については、まだ充分な知見がえられていない。著者らは有色野菜のクロロフィルやフラボ

ノイドなどの植物色素が生体内の消化酵素系へいかなる影響をもつか注目し、栄養生理の見地より、唾液や脾液のアミラーゼはすべて α -アミラーゼを主体とするために、 α -アミラーゼに及ぼすクロロフィルならびにクロロフィルの酸、アルカリ、光分解物の影響を検討し、2、3の知見をえたのでここにその結果を報告する。

実験材料と実験方法

1. 酵素: Nutritional Biochemicals Corporation U. S. A. 製の麦芽 α -アミラーゼを使用し、 α -アミラーゼは反応液中の濃度0.05%にて実験に供した。

2. α -アミラーゼ活性度の測定: α -アミラーゼの活性度は Mcleady ら⁷⁾の方法に準拠して、ヨード呈色度(青価)を、島津製回折格子型光電比色計 (Spectronic 20 型)を用い、波長 580 m μ における吸光度より測定し酵素の活性度を求めた。すなわち 1%可溶性デンプン溶液 10 ml に 0.05% α -アミラーゼ水溶液 2 ml を加え、1/20 M-酢酸緩衝液 (pH 5.0) 5 ml を加え、さらに蒸留水 2 ml を加えて、37°Cに所定時間インキュベートしたのち 1 N-塩酸 1 ml を加えて酵素反応を停止せしめ、1/1000 M-ヨード・ヨードカリ液 2 ml を加えて呈色せしめヨード呈色度(青価)を測定した。

3. クロロフィルアルカリ分解物クロロフィリンの抽出分離と定量: 油性性クロロフィル(メルク製) 2 g を分取し、稗田¹⁰⁾らの方法によりエチルエーテル 10 ml に溶解し、メタノール性飽和 KOH 10 ml を加え、よく振とうしたのち氷室に24時間放置してクロロフィルを鹼化

しクロロフィリンとなし、これに蒸留水 50 ml を加えてクロロフィリン (クロロフィリン・カリウム塩) を水層に移し、分液ろう斗にて分液し 100 ml 定容とする。抽出分離したクロロフィリン水溶液を島津製光電比色計により波長 400 m μ における吸光度を測定し、稗田¹⁰⁾の標準検量曲線によってクロロフィリンの含量を求めた。

4. クロロフィル酸分解物フェオフィチンの抽出分離：水溶性クロロフィル (メルク製) 2 g を蒸留水 30 ml に溶解し、2 N-塩酸 30 ml を加え、湯浴中 60°C に 24 時間加温し、遠心分離してえられた上澄液を減圧濃縮して塩酸を除き、さらにエチルアルコールを加えてフェオフィチンを沈澱せしめフェオフィチンを分離した。なお、クロロフィリンはかなり安定で、きれいな緑を示すが¹¹⁾、フェオフィチンは不安定で Buren ら¹²⁾はクロロフィルに熱をかけたときのフェオフィチンのでき方は、条件によりかなり変わるが、pH とフェオフィチン生成との関係において pH 5.5 以下の強酸性において生成がいちじるしく 55°C, pH 5.5 4 時間で、40% フェオフィチン生成を報告している。

5. クロロフィルの光分解：水溶性クロロフィル 20 mg% 水溶液 50 ml をペトリシャーレに入れ光源として 100 V, 15 W の紫外線殺菌灯を用い、光源からペトリシャーレまでの距離を約 10cm とし照射処理を行なった。

6. クロロフィル分解物のペーパークロマトグラフィー：クロロフィル光分解物およびクロロフィル酸分解物 (フェオフィチン) を Holden ら¹³⁾の方法に準拠してペーパークロマトグラフィーを行ない検索および同定を行なった。すなわちクロロフィルの上記分解試料を東洋濾紙 No. 50 にスポットし、一次元のクロマトグラフィー・下降法により、展開溶媒として石油エーテル・ベンゼン・アセトン (4:1:0.5) を用い、室温にて展開を行ない、島津製蛍光鑑識器にて蛍光反応をしらべクロロフィル分解物の同定を行なった。なおクロロフィル光分解物中にはピロール環物質などの存在も推測されるので、梶本¹⁴⁾の方法に準拠して呈色剤としてエーリッヒ試薬を噴霧し 30°C にて乾燥し、ピロール環物質の検索同定を併わせ行なった。

実験結果と考察

1. α -アミラーゼ活性に及ぼすクロロフィルの影響：0.05% α -アミラーゼ水溶液 2 ml に、1/20 M-酢酸緩衝液 (pH 5.0) 5 ml と水溶性クロロフィル (反応液中の濃度 1, 10, 20, 50, 100 mg%) 2 ml を加え、さらに 1% 可溶性デンプン溶液 10 ml を加え、37°C にて所定時間反応処理し、クロロフィルの α -アミラーゼ活性阻害性の有

第1図 α -アミラーゼ活性に及ぼすクロロフィルの影響

A : 100 mg%, B : 50 mg%, C : 20 mg%, D : 10 mg%, E : 1 mg%, F : 対照 (pH 5.0, 37°C)

第1表 α -アミラーゼ活性に及ぼすクロロフィルアルカリ分解物の影響 (クロロフィリン)

反応時間 (min.)	0	5	10	15	30	60
クロロフィリン (mg%)						
対照(無添加)	1.500	1.270	0.480	0.085	0.012	0.011
2	1.500	1.300	0.800	0.171	0.078	0.058
10	1.500	1.305	0.830	0.216	0.210	0.090
15	1.500	1.375	0.940	0.320	0.270	0.260
20	1.500	1.400	1.060	0.450	0.340	0.320

表中の数値は 580 m μ における吸光度 (ヨード呈色度) を示す。

無を検討した。結果は第1図に示されるごとく、本酵素は水溶性クロロフィルによりかなりの阻害がみとめられる。水溶性クロロフィルはクロロフィリンでクロロフィルそのものの影響をみるため油性クロロフィル (メルク製) をエチルアルコールに溶解した溶液 2 ml を加え上記と同じ反応液中の濃度にて検討を行なったが、反応中微量の白色沈澱を生成し、クロロフィルの濃度が増加するにしたがって沈澱生成が著しく、いずれの濃度においても酵素阻害性が一応みとめられたが、ヨード呈色度に沈澱にもとづく誤差が伴って、酵素活性の測定に難があった。

2. α -アミラーゼ活性に及ぼすクロロフィルアルカリ

第 2 図 α -アミラーゼ活性に及ぼすクロロフィル酸分解物の影響

A : 対照, B : 20 mg%, C : 50 mg%, D : 100 mg%

第 2 表 α -アミラーゼ活性に及ぼすマグネシウムの影響

反応時間 (min.)	0	5	10	15	30	60
マグネシウム (mg%)						
対照(無添加)	1.403	1.300	0.340	0.066	0.030	0.030
10	1.400	1.250	0.280	0.052	0.030	0.029
50	1.400	1.225	0.260	0.051	0.020	0.020
100	1.400	1.200	0.200	0.050	0.020	0.020

表中の数値は波長 580 m μ における吸光度(ヨード呈色度)を示す。

分解物クロロフィリンの影響: 稗田ら¹⁰⁾の方法により調製したクロロフィリンを標準検量曲線より次式を利用して濃度を決定し, 反応液中の濃度 2, 10, 15, 20 mg% にてクロロフィリンの酵素阻害性の有無を検討した。 $y=0.0229+0.134x$, ただし y =吸光度(400 m μ), x =クロロフィリン含有量(mg/dl)。結果は第 1 表示されるごとく, クロロフィリンの濃度が高くなるにしたがって酵素の阻害性は増大する。

3. α -アミラーゼ活性に及ぼすクロロフィル酸分解物フェオフィチンの影響: フェオフィチンはエチルアルコールには難溶でエーテルには溶解しエーテル溶液は黄緑で赤蛍光がみとめられるが, エーテルは低沸点で酵素反応を行なうのに支障をきたす。したがってクロロフィル

第 3 図 クロロフィルによる酵素失活とカルシウムとの関係

A : クロロフィル 20 mg% 添加反応系
B : クロロフィル 20 mg%・カルシウム 10^{-4} M 反応系
C : クロロフィル 20 mg%・カルシウム 10^{-3} M 反応系
D : クロロフィル 20 mg%・カルシウム 10^{-2} M 反応系
E : 対照 (クロロフィル・カルシウム無添加) 反応系

より調製したフェオフィチンをエチレングリコールモノメチルエーテル (和光純薬製) へ溶解し, 該溶液 2 ml をそれぞれ反応液に加え, 20, 50, 100 mg の反応液中の濃度にて酵素阻害性の有無を検討した。なおエチレングリコールモノメチルエーテルの酵素阻害は本実験濃度においてはみとめられなかった。結果は第 2 図に示されるごとく, クロロフィル酸分解物フェオフィチンは酵素活性にほとんど影響をおよぼさない。

4. α -アミラーゼ活性に及ぼすマグネシウムの影響: クロロフィルのアルカリ分解物クロロフィリンが, いちじるしい酵素阻害性を持ち, 酸分解物フェオフィチンには阻害性がみとめられないが, この原因は, クロロフィリンは分子構造中フィトール ($C_{20}H_{39}OH$) を欠き, 酸基 ($-COOH$) をもち, フェオフィチンはフィトールをもちマグネシウムを欠く構造上の相違にもとづくことが推考されるので, 一応マグネシウムの α -アミラーゼに対する阻害性を検討した。すなわち 0.05% α -アミラーゼ水溶液 2 ml に, 1/20 M-酢酸緩衝液 (pH 5.0) 5 ml と 10, 50, 100 mg% の硫酸マグネシウム水溶液を各々 2 ml を加え, さらに 1% 可溶性デンプン溶液 10 ml を加えて酵素反応を行ない, マグネシウムによる酵素阻害性の有無を

第4図 α -アミラーゼ活性に及ぼすクロロフィル光分解物の影響

A : 紫外線照射直後 B : 2時間紫外線照射
C : 4時間紫外線照射 D : 8時間紫外線照射
E : 24時間紫外線照射 F : 対照

検討した。結果は第2表に示されるごとく、マグネシウムによる酵素の阻害性はみとめられない。なおフィトールの酵素阻害性賦活性の有無についてはさらに検討を加えたい。

5. クロロフィルによる酵素の失活とカルシウムとの関係： α -アミラーゼはCaを含むmettal enzymeで、その酵素活性の発現や安定性においてCaを必要とし、一般に Ca^{++} により α -アミラーゼ活性は保護されることが報告されている⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。したがって著者らはCa共存時の酵素に対するクロロフィルの阻害性について検討した。すなわち0.05%酵素液2mlに1/20 M-酢酸緩衝液(pH 5.0)に溶解した酢酸カルシウム溶液(反応液中の濃度 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} M) 5mlを加えさらに水溶性クロロフィル20mg%水溶液2mlと1%可溶性デンプン溶液10mlを加えて酵素反応を行ない酵素阻害性の有無を検討した。結果は第3図に示されるごとくクロロフィルによる酵素阻害はCaによっていちじるしく保護される。

6. α -アミラーゼ活性に及ぼすクロロフィル光分解物の影響：0.05% α -アミラーゼ水溶液2mlに1/20 M-酢酸緩衝液(pH 5.0) 5mlと紫外線照射によるクロロフィル光分解物2mlと1%可溶性デンプン溶液10mlを加えて反応を行ない酵素に対する阻害性を検討した。結果は第4図に示されるごとくクロロフィル光分解物は酵

第5図 クロロフィル酸分解物のペーパークロマトグラム

a : クロロフィル酸分解物 b : クロロフィル酸分解物
c : クロロフィル f : Holden⁽¹⁸⁾による
溶媒系：石油エーテル：ベンゼン：アセトン(4:1:0.5)
IIII. 蛍光スポット

第6図 クロロフィル光分解物のペーパークロマトグラム

a・b 紫外線2時間照射, c・d 紫外線4時間照射, e・f 紫外線8時間照射, 溶媒系：石油エーテル：ベンゼン：アセトン(4:1:0.5), IIII 蛍光スポット

素活性をいちじるしく阻害するが、クロロフィルの光分解度の増大にともなってその阻害度の減少がみとめられる。曾根⁽⁴⁾⁽⁵⁾は蛍光性をもつリボフラビンがとくに光照射下において細菌 α -アミラーゼ活性を阻害し、その要因として光照射により励起されたフラビンの色素分子の酵素に対する光化学的触媒反応(増感反応)をあげ、光により励起された色素のラジカル構造にもとづく増感反応によって酵素阻害が与えられるとしている。クロロフィルも蛍光物質としてリボフラビンと同様に光化学的な増感反応をもち、本実験においても紫外線照射時間の増大に伴ってクロロフィル光分解物に蛍光性の減少がDL-紫外線鑑識器によってみとめられる。したがって光分解度の増大にともなう酵素阻害性の減少はクロロフィルのも

第7図 クロロフィル光分解物の吸収スペクトル

I : クロロフィル, II : 紫外線 2 時間照射緑色スポット
III : 紫外線 8 時間照射緑色スポット, IV : 蛍光スポット

つ蛍光性がなんらかの原因をもつものと推考される。中林¹⁷⁾は食用色素のタンパク質に対する染着性を報告しており、クロロフィルもタンパク質と結合する性質があるので染着性にもとづく酵素阻害も考えられ、また Hall¹⁸⁾はクロロフィルは油脂の過酸化を助けるので、クロレラの利用に当ってクロレラのように多量のクロロフィルと高度不飽和酸の共存は好ましくないと報ぜられ、クロロフィルの酸化性も酵素阻害に関係をもつことが予想されるがこれらについてはさらに検討を加えたい。

7. クロロフィル分解物の検索

(1) ペーパークロマトグラフィーによるクロロフィル酸分解物フェオフィチンの検索：クロロフィル酸分解物フェオフィチンは強酸にての加熱分解においては、フィトールが分離するおそれがあるので¹⁹⁾本実験に用いたクロロフィル酸分解物がフェオフィチンのみから構成されるのか確かめるため、Holden ら¹³⁾の方法に準拠してクロロフィル酸分解物をベンゼンに溶解した。展開溶媒石油エーテル・ベンゼン・アセトン (4:1:0.5) を用い一次元、下降法によりペーパークロマトグラフィーによる検索を試みた。結果は第5図に示されるごとく、ろ紙上の展開溶媒 Front の先端部に蛍光をもつ物質がみつめられる。Holden ら¹³⁾によるとフェオフィチンはろ紙の溶媒 Front の先端部に検出され、クロロフィルは Rf 値 0.5 (クロロフィル b) と 0.7 (クロロフィル b) と報告されており、Rf 値と蛍光性よりろ紙上の溶媒 Front 先

端部に検出される蛍光物質はフェオフィチンと考えられる。

(2) ペーパークロマトグラフィーによるクロロフィル光分解物の検索：紫外線照射によるクロロフィル光分解物を Holden ら¹³⁾の方法に準拠してクロロフィル酸分解物のときと同様の実験条件でペーパークロマトグラフィーを行なった。結果は第6図に示されるごとく、ろ紙上の溶媒 Front の先端部に蛍光物質がみつめられ、さらに Rf 値 0.55~0.88 に緑色スポットがみつめられる。梶本²⁰⁾はクロロフィル分解物のピロール環物質の検出にエーリッヒ呈色反応を用いているが、クロロフィルの紫外線照射による光分解物についてエーリッヒ呈色反応を検するにろ紙上の溶媒 Front の先端部の蛍光スポットは陰性であったが、Rf 値 0.55~0.88 の緑色スポットはいずれも赤色のいちぢるしい陽性をみとめた。緑色スポットには蛍光はみつめられない。

(3) クロロフィル分解物の吸収スペクトル：ペーパークロマトグラフィーによるクロロフィル酸分解物のろ紙上の溶媒 Front 先端部の蛍光スポットならびにクロロフィル光分解物のろ紙上溶媒 Front 先端部の蛍光スポットと Rf 値の緑色スポットを切り取りさらにろ紙片を細かく切ってそれぞれ試験管に入れ、ベンゼン 5 ml を加えて蛍光物質と緑色スポットの物質を溶出し、そのベンゼン溶出液について吸収スペクトルを求めた。結果は第7図に示されるごとく、蛍光スポットの物質は波長 530 mμ に λ_{max} がみつめられる。紫外線照射クロロフィル光分解物の緑色スポットについては照射時間とともにクロロフィルの波長 640 mμ における λ_{max} が消失し、これとともに 540 mμ 附近に新たな λ_{max} がみつめられ紫外線 8 時間照射クロロフィル光分解物 (Rf 0.55) については 540 mμ 附近の λ_{max} が顕著にみつめられる。クロロフィルは油性クロロフィルを石油エーテル・ベンゼン・アセトン (4:1:0.5) にて東洋ろ紙 No. 50 を用い一次元ペーパークロマトグラフィーを行ない、ろ紙上のクロロフィルスポット (Rf 0.54~0.60) を切りとりベンゼンにて溶出して吸収スペクトルを求めた。波長 640 mμ に λ_{max} がみつめられた。Molecki²¹⁾によるとフェオフィチンは 535 mμ に λ_{max} をもって報告しており、蛍光物質はフェオフィチンと考えられる。540 mμ 附近に λ_{max} をもつ緑色スポットのエーリッヒ呈色陽性物質 (蛍光はみつめられない) についてはさらに検討を加えたい。

要 約

α -アミラーゼ活性に及ぼすクロロフィルおよびクロロフィル分解物の影響を追究し、次の結果をえた。

1. クロロフィルは α -アミラーゼ活性に対し阻害性をもつ。
2. クロロフィルのアルカリ分解物クロロフィリンは α -アミラーゼ活性を阻害する。
3. クロロフィル酸分解物フェオフィチンは酵素活性に対し影響を与えない。
4. マグネシウムは酵素活性に対し影響を与えない。
5. クロロフィルによる酵素阻害はカルシウムにより保護される。
6. クロロフィル光分解物は酵素活性に対し阻害性をもつが、クロロフィル光分解度の増大につれて阻害性は減少する。

文 献

- 1) 別所秀子：農化，28，143 (1954)
- 2) 伊藤正春，安部道夫：農化，28，368，751 (1954)
- 3) J. Janicki: *Enz-smologia.*, 7, 182 (1939)
- 4) 曾根清秀：農化，33，1119 (1959)
- 5) 曾根清秀：農化，36，7，13 (1962)
- 6) A. W. Galston, R. S. Baker: *Science.*, 109, 485 (1949)

- 7) 速水 洸，篠 岡彦：栄養と食糧，18，78 (1965)
- 8) 佐藤健二，糠沢 敦：生化学，30，882 (1959)
- 9) R. C. Mcleady, G. Guggoly and H. Owens: *Anal. Chem.*, 22, 1156 (1950)
- 10) 稗用福二，土方久恒：農産加工技術研究会誌，4，1 (1957)
- 11) Sweeney ほか：Food. Technol., 15, 263 (1961)
- 12) V. Buren: *Food Technol.*, 18, 94 (1964)
- 13) M. Holden: *Biochemica et Biophysica Acta.*, 56, 378 (1962)
- 14) 梶本五郎：栄養と食糧，13，313 (1961)
- 15) 山本武彦，福本寿一郎：酵素化学シンポジウム，14，315 (1960)
- 16) 福本寿一郎：アミラーゼシンポジウム，p.34(1965)
- 17) 中村敏郎，橋本博司：日本食品工業学会誌，13，14 (1966)
- 18) J.L. Hall and D.L. Mackintosh: *J. Food Science.*, 29, 420 (1964)
- 19) 佐橋佳一ら編集：生物化学ハンドブック，p. 873 (1953)技報堂
- 20) 梶本五郎：栄養と食糧，16，10 (1963)
- 21) Malecki: *Food Engineering.*, 36, 93 (1964)

(広島大学教育学部)

α -アミラーゼ活性の比色測定法 (ICC法)

小麦やライ麦中の α -アミラーゼ活性 (α -A)の測定法である Wohlgemuth 法は種々改良されてきた。Sandstedt 等の方法もその一つであるが、 α -A の低いものには精度が悪く、測定に時間がかかる欠点があった。ここに述べるのは1964年の ICC 総会でとりあげられ、その後著者によって改良され、ICC の専門委員会で改訂された比色による測定法で、穀類およびその加工品について α -A の非常に低い値から高い値までの測定が可能である。また 30°C という比較的低温で操作するため、熱に不安定なカビやバクテリア性の α -A の測定にも利用できる。測定法の概要：粉碎して 0.8 mm の篩を通した試料 5 g を 100 ml (20倍量) の 0.2%CaCl₂ 溶液で抽出し (30°C)，遠沈または戸過して得た清澄液を酵素検液とする。この検液 15 ml を 30°C に保ち 5 ml (1/3量) の標準限界デ

キストリン基質を添加し，5 分ごとに 2 ml にずつ取出して，ヨウ素液 50 ml と混ぜ 20°C に保温後 575 m μ で透過率を測定する。 α -A は次式で表わされる。 $A=500 \cdot k \cdot f / c$ (k は限界デキストリンの分解速度常数， c はアミラーゼ濃度， f は酵素検液の稀釈度)

別の測定単位と置換えることも可能で， $A \times 0.27 = H$ ・単位， H ・単位 $\times 0.42 = SKB$ 単位となる。(表 1，図 1)

A Colorimetric Method for the Determination of Alpha-Amylase Activity (ICC Method).

by Perten H.: *Cereal Chem.*, 43, (3), 336~343 (1966)

(堀 井)