米の発芽期における糖化酵素と少糖類

高橋 布 往, 後藤 由 美 子, 下 村 得 治

北海道大学農学部農芸化学科

Carbohydrases and Oligosaccharides during the Germination of Rice Seeds

Nobuyuki Takahashi, Yumiko Goto, Tokuji Shimomura

Department of Agricultural Chemistry, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido

J. Jap. Soc. Food and Nutr., 24 (8), 434~437 (1971)

The change of amylase (E.C. 3.2.1.3) and maltase (E.C. 3.2.1.20) activities, 80% ethanol-soluble sugar content and constituent of this sugar fraction was investigated during the germination of rice seeds.

In the earlier stage of the germination, the enzyme activities and content of sugar were a little, and constituent of the sugar was only glucose, fructose and sucrose. In the next stage of the germination, rapid increase of soluble sugar content was observed according to the increase of amylase activity. In the sugar, di-, tri- and tetra-saccharide were detected by paper chromatography.

Disaccharides formed during the germination were sucrose, nigerose, maltose, kojibiose and isomaltose. They were isolated by carbon-Celite column chromatography and paper chromatography, and identified by paper and thin-layer chromatography, specific rotation and paper electrophoresis. The order of the yield of each saccharide was as follows: sucrose>maltose>isomaltose>kojibiose>nigerose. Formation of isomaltose, kojibiose and nigerose was presumed to be due to transglucosylation action of maltase.

(Received July 19, 1971)

植物種子の発芽過程において存在する遊離糖として、グルコース、フラクトースおよびスクロースなどが一般的に知られている。その他の糖としては福井ら¹⁾が米にマルトースおよびラフィノース、松下²⁾がもち米、うるち米、ひえ、大麦、小麦および蕎麦などの穀類にもマルトース、ラフィノースおよびスタキオースが存在すると報告している。一方、高橋ら³⁾は蕎麦の発芽過程においてマルトースは認められずイソマルトース (6- α -glucosylglucose) が一時的に現われると報告している。

今回、著者らはいうるち米の発芽過程における糖の加水分解に関与する酵素活性と糖成分の変化を調べたところイソマルトース、コジビオース (2- α -glucosylglucose) およびニゲロース (3- α -glucosylglucose) の存在を認めた。従来、このような二糖類については麴汁⁴⁾ および麦酒中⁵⁾ での存在、さらに試験管内酵素反応による生成が知られているが、生体内での存在は報告されていない。本報ではこれらの糖の分離確認およびその生成について検討を行なった。

実験材料および方法

1. 供試米および発芽条件

うるち米「新雪」種で、1969年度、北海道産のものを用了。種子は2%ホルマリン液に1時間浸漬後、充分に水洗し、27°Cの暗所で発芽させた。

2. 糖の抽出および精製

1) 可溶性糖 未発芽または発芽した種子は手早く80%エタノール中に入れ、湯浴上で還流冷却下で30分間沸騰させて酵素反応をとめる。抽出液を除いてから、さらに新しい80%エタノールを試料に加えて乳鉢中で充分に磨砕し、濾過して抽出液を得る。この操作をさらに3回繰返し、得られた抽出液を合して50°C以下で減圧濃縮し、飽和酢酸鉛溶液を沈澱が生じなくなるまで滴下してから沈澱物を濾別し、濾液は硫化水素で脱鉛する。得られた濾液をAmberlite IR-120 (H⁺型) とAmberlite IRA-410 (OH⁻型) にとおして脱塩したものを可溶性糖画分とした。

2) 還元糖 可溶性糖画分に含まれる還元糖を表わす

3. 糖の定量

可溶性糖はフェノール硫酸法⁶⁾で、還元糖はフェリシアン化カリ法⁷⁾で定量し、いずれもグルコース量に換算して表わした。

4. カーボンカラムクロマトグラフィー

カーボン(活性炭, 精製白鷺)とセライト No. 535 を等量ずつ混合したものを 5.0×52.0 cm のカラムに詰めて行なった。

5. ペーパークロマトグラフィー(PC)

東洋紙 No. 50 を用い、展開剤はブタノール:ピリジン:水(6:4:3)で上昇法により3回多重展開を行なった。発色剤としてアニシジンフタレート試薬(アルドース用)およびナフトレゾルシン試薬(ケトース用)を使用した。

6. 薄層クロマトグラフィー(TLC)

クロマトプレートには Kieselgel G(Merck) を用い、展開剤はブタノール:イソプロパノール:水(10:5:4)で上昇法により3回多重展開を行なった。発色剤としてアニスアルデヒド試薬を使用した。

7. 糖類

グルコース, フラクトース, マルトースおよびスクロースはすべて市販の特級品を使用した。イソマルトースは Turvey ら⁸⁾の方法に従い、デキストランの酸部分加水分解物より調製した。ニゲロース⁹⁾($[\alpha]_D: +138$, β -オクタアセテート: mp 151°C) とコージビオース¹⁰⁾(結晶, $[\alpha]_D: +137$, mp 195°C) は α -グルコシダーゼの糖転移作用によりマルトースから調製した。

8. 比旋光度

これは日立旋光計(PO-B型)を使用して測定した。

9. 予電泳泳動

東洋紙 No. 51 を用い、0.05M ホウ酸緩衝液(pH 9.9)で300V, 2時間泳動させた。風乾後アニシジンフタレートまたはナフトレゾルシン試薬で発色させた。

10. 酵素液の調製

未発芽または発芽した種子 100 個を乳鉢中で十分に磨砕し、水を 10ml 加えて 3 時間攪拌抽出後、遠心分離し、得られた上澄液を水道水(11°C)に対し 12 時間透析する。生じた沈澱を遠心分離して除き、上澄液に水を加えて 20ml にしたものを酵素液とした。

11. 酵素活性の測定および酵素単位

酵素活性の測定は、0.1M 酢酸緩衝液(pH 4.0) 3ml, 1% 基質(可溶性澱粉またはマルトース) 2ml および酵素液 5 ml を含む反応混合液を 37°C で 1 時間反応させた。生成した還元糖は Somogyi 変法¹¹⁾によりグルコースとして定量した。酵素単位は上記条件で 10 分間にマルトースから 1 mg のグルコースを生成する酵素量をマルターゼ(E. C. 3.2.1.20) 1 単位とし、可溶性澱粉から 1 mg

のグルコースを生成する酵素量をアミラーゼ(E. C. 3.2.1.3) 1 単位とした。

実験結果

1. 発芽過程における酵素活性と糖含量の変化

発芽過程における糖化酵素活性と可溶性糖含量の変化を Fig. 1 に示す。アミラーゼ活性は 3 日目までは変化が認められず 4 日目以後急激に増加し、澱粉の分解を活性に行なっていると考えられる。マルターゼ活性も 3 日目までは変化せず 4 日目以後徐々に増加が認められた。糖含量は発芽初期にはわずかに増加し、アミラーゼ活性の増加に 1 日遅れ、5 日目から急激な増加が観察された。また可溶性糖画分に含まれる還元糖は、可溶性糖が増加するに伴って増加し、ほぼ一定の割合を保っているようである。

Fig. 1. Change of enzyme activity and free sugar content of rice during germination.

(●) amylase activity (○) maltase activity
(□) soluble sugar (△) reducing sugar

2. 発芽過程における糖成分の変化

発芽過程における糖成分の変化を PC で調べた結果を Fig. 2 に示す。発芽初期の段階ではグルコース, フラクトースおよびスクロースがわずかに存在し、発芽 6 日目になるとマルトースとイソマルトースの位置にスポットが認められた。7 日目以降になるとコージビオースやニゲロース, さらに順次三および四糖類と推定される高級少糖類の位置にもスポットが認められた。

3. 発芽種子中に認められる二糖類の分離同定

酵素活性が高く、糖含量の多い発芽 8 日目の種子の二糖類を単離同定するために以下の実験を行なった。発芽 8 日目の種子の可溶性糖(グルコースとして約 18g)をカーボンセライトカラムに吸着させて、まず水 3.6 l でグルコースとフラクトースを溶出後、二糖類を 5% エタ

Fig. 2. Paper chromatogram of soluble sugars of rice during germination.

Rg: ratio of the distance of each sugar on paper to that of glucose.

ノール 3.2 l で溶出した。この溶出フラクションを集めて減圧濃縮し、シラップとした。このシラップには PC および TLC で糖成分を検討したところ、Fig. 3 に示すように 5 種類の糖が認められ上から順に O_1 から O_5 として表わした。ここで O_4 および コージビオースは 2,3,5-トリフェニールテトラゾリウムクロライド試薬を噴霧したところ発色しなかった。つぎにシラップを PC によっ

Fig. 3. Paper (PC) and thin-layer (TLC) chromatograms of the eluted fraction with 5% ethanol from carbon-Celite column.

5%F: 5% ethanol fraction S: standard
Rg: see Fig. 2

て展開し、 O_1 から O_5 に相当する部分をそれぞれ切り抜き、温水抽出後、減圧濃縮し、エタノール処理して白色粉末を得た。収量は O_1 : 830mg, O_2 : 10mg, O_3 : 310mg, O_4 : 33mg および O_5 : 203mg であった。

単離した O_1 から O_5 の糖と対照の糖の比旋光度を Table 1 に示した。

Table 1. Specific rotation of saccharides $O_1 \sim O_5$ and reference saccharides

	O_1	O_2	O_3	O_4	O_5
$[\alpha]_D$	+66	+140	+132	+128	+122
Sucrose					
Nigerose					
Maltose					
Kojibiose					
Isomaltose					
$[\alpha]_D$	+67	+138	+130	+137	+122

濾紙電気泳動は二糖類の構造決定に有効な手段であることが知られている。そこで単離した糖と対照の糖の濾紙電気泳動を行なった結果を Fig. 4 に示した。

Fig. 4. Paper electrophoresis of saccharides $O_1 \sim O_5$ and reference saccharides.

Experimental conditions: Toyo Roshi No. 51 filter paper, 0.05M borate buffer (pH 9.9), 24 V/cm, 2 hr.

以上、PC および TLC での挙動、比旋光度および濾紙電気泳動における移動率の結果から O_1 はスクロース、 O_2 はニゲロース、 O_3 はマルトース、 O_4 はコージビオースおよび O_5 はイソマルトースであると同定した。

考 察

発芽過程においてアミラーゼおよびマルターゼ活性は初期 (0~3 日) には変化が認められないが糖含量 (80 % エタノール可溶性糖) は徐々に増加する。しかし、糖成分には変化はなくグルコース、フラクトースおよびスクロースが認められる。4~5 日目以降になるとアミラー

ゼ活性が急激に増加し、その結果、澱粉が加水分解されて可溶性糖が急激に増加すると考えられる。一方、マルターゼ活性は徐々にしか増加しないが、この時期に糖成分をPCで検討するとグルコースが増加し、二糖類および三糖類の生成が認められる。すなわち、アミラーゼの作用によって生成した α -1,4結合の可溶性糖、たとえばマルトースなどが増加した時、マルターゼがそれらの糖をグルコースに加水分解するだけでなく、 α -1,4結合以外の結合を持つ少糖類の生成に何んらかの関与をしていると考えられる。

ここで生成される少糖類のうちスクロースはUDPglucose-fructose glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.13)によって、マルトースは β -アミラーゼ(E.C. 3.2.1.2)によって澱粉から生成されることが知られている。一方、ニゲロース、コージビオースおよびイソマルトースのみを生成する酵素は現在まで報告されてない。しかしながら *in vitro*の実験において、これら3種の二糖類はマルターゼ(α -グルコシダーゼ)の糖転移作用によってマルトースから生成されることが知られており¹⁰⁾, *in vivo*においてもそのような条件があればニゲロース、コージビオースおよびイソマルトースなどが生成されると考えられる。本実験に供した、うるち米「新雪」には β -アミラーゼとマルターゼが含まれていることを報告した¹²⁾。したがって、ここで単離したニゲロース、コージビオースおよびイソマルトースの生成にはつぎのようなことが考えられる。まず β -アミラーゼによって澱粉からマルトースが生成され、それにマルターゼが作用してグルコースに加水分解するだけでなく、マルトースのグルコシル基を遊離して存在するグルコースに転移する、いわゆる糖転移作用によってこれらの二糖類が生成されたものと考えられる。

要 約

うるち米「新雪」種の発芽過程におけるアミラーゼお

よびマルターゼ活性、糖含量および糖成分の変化を調べた。その結果、酵素活性の低い発芽初期の段階ではグルコース、フラクトースおよびスクロースしか認められないが酵素活性が増加するとともに糖含量も増加し、糖成分も二糖類、三糖類および四糖類と推定される少糖類の生成が認められた。

発芽中に生成された二糖類のうちスクロース、ニゲロース、マルトース、コージビオースおよびイソマルトースを単離、同定した。生成量はスクロース>マルトース>イソマルトース>コージビオース>ニゲロースの順で、イソマルトース、コージビオースおよびニゲロースはマルターゼの糖転移作用によって生成されたものと考察した。

終わりに臨み、「新雪」を提供して下さった北海道立中央農業試験場稲作部と北海道大学農学部 喜多助教授に謝意を表します。

文 献

- 1) 福井俊郎, 二國二郎: 日農化会誌, **33**, 72(1959)
- 2) 松下アヤコ: 日農化会誌, **41**, 646 (1967)
- 3) 高橋美帆, 下村得治: 栄養と食糧, **19**, 361(1965)
- 4) 松田和雄, 麻生 清: 発酵工誌, **32**, 399(1954)
- 5) 麻生 清, 渡辺敏幸: 日農化会誌, **35**, 1078(1961)
- 6) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
- 7) Schales, O. and Schales, S. S.: *Arch. Biochem.*, **8**, 285 (1945)
- 8) Turvey, J. R. and Whelan, W. J.: *Biochem. J.*, **64**, 49 (1957)
- 9) Chiba, S., Sugawara, S., Shimomura, T. and Nakamura, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 787 (1962)
- 10) Takahashi, M., Shimomura, T. and Chiba, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1399(1969)
- 11) 小林達吉, 田淵武士: 日農化会誌, **28**, 171(1954)
- 12) Takahashi, N., Shimomura, T. and Chiba, S.: *Agr. Biol. Chem.*, 投稿中

(昭和46年7月19日受理)