第 8 表 第 3 回試験結果

風乾内容物組成 %	豚番号	小腸Ⅱ				大腸	直腸
		98	99	98	99	98	99
吸収率 %	CR	1.913	1.965	1.897	2.062	2.201	2.323
		1.965	2.062	2.555	2.698		
	粗蛋白質	16.21	17.11	14.52	14.63	12.25	12.46
		17.11	14.63	13.15	14.23		
	純蛋白質	13.82	10.36	12.22	10.22	9.70	10.22
		10.36	10.22	10.89	11.87		
	有機物	79.65	76.10	76.89	73.75	79.70	76.06
		76.10	73.75	74.05	71.66		
	粗蛋白質	63.8	63.4	67.3	70.2	76.3	77.1
		63.4	63.6	70.2	76.4	77.9	77.5
吸収率 %	純蛋白質	66.4	71.4	69.4	73.5	79.0	79.0
		71.4	73.5	80.0	79.5*	80.0	80.0
	有機物	49.9	53.3	51.2	56.9	56.4	60.6
		53.3	51.2	60.8	64.3	65.1	68.0
	平均	51.6	54.1	60.8	64.3		
	粗蛋白質	63.8	63.4	67.3	70.2	76.3	77.1
		63.4	63.6	70.2	76.4	77.9	77.5
	純蛋白質	66.4	71.4	69.4	73.5	79.0	79.0
		71.4	73.5	80.0	79.5*	80.0	80.0

* 大腸部の吸収率より低いのは分析値の誤差によるものと考えられる

- (1) A. F. Schürch, L. E. Lloyd, E. W. Cramp-ton : *J. Nutrition*, 41, 629 (1950).
- (2) H. H. Mitchell, J. S. Hamilton, C. H. Kick : Illinois Station Rep., 117 (1928).
- (3) L. A. Moore, O. B. Winter : *J. Dairy Sci.*, 17, 297 (1934).
- (4) 齊藤道雄, 木部久衛 : 日畜会誌, 27, 105 (1956).
- (5) R. W. Carroll, G. W. Hensley, W. R. Graham : *Science*, 115, 36 (1952).
- (6) R. W. Carroll, G. W. Hensley, C. L. Sittler,

酸化クローム指標物質法により豚の消化器内における蛋白吸収を調べた結果を得た。

籾及び大豆粕よりなる 22% 蛋白含有飼料を与えた場合の粗蛋白吸収率は直腸で 78~79%, 小腸末端で約 64% となり消化吸収蛋白全量の約 80% が小腸末端に至る間に吸収されることになる。盲腸と大腸前半部では給与粗蛋白の約 14% が吸収された。有機物の吸収は直腸で 65% 前後, 小腸末端で約 52%, 大腸中部以後では殆ど吸収されない。

終りに本研究に御鞭撻を頂いている名大齊藤道雄教授, 並びに試験動物の管理試料採取等に御助力願った三重県種畜場佐々木, 野呂両技師に衷心より感謝の意を表します。尚本報告の一部は昭和 31 年 5 月日本農芸化学会関西中部支部合同大会において発表した。

- E. L. Wilcox, W. R. Graham : *Arch. Biochem. and Biophys.*, 45, 260 (1953).
- (7) 高野晃一 : 栄養と食糧, 8, 250 (1956).
- (8) D. W. Bolin, L. E. Klosterman : *Science*, 116, 634 (1952).
- (9) L. M. Dansky, F. W. Hill : *J. Nutrition*, 47, 449 (1952).
- (10) W. E. Deming, 森口訳 : 推計学によるデータのまとめ方, 132 (1950).
- (11) 石川鹿生 : 昭和 31 年 4 月日本畜産学会講演。

細菌のアミラーゼ生成に関する研究 (第 3 報)*

アミラーゼ生成に対する納豆エキス中の有効物質について

福田重夫 (東京大学理学部植物学教室)

昭和 32 年 7 月 4 日 受理

著者は前報⁽¹⁾において, 納豆エキスが細菌のアミラーゼ生成に対して著しい効果があるのは, 大豆粕のアルカリ浸出液よりも C:N 比が適当であって原料大豆粕のそれと大差がなく, 原料中の窒素分が有効に利用されているためであることを述べた。しかし, 納豆エキスの効果は単にそれのみではなく, その中にアミラーゼの生成を促進させる特殊な有効物質が含まれていることによるとも考えられるので, そのような物質についての検索を行った。その結果有効成分の本態について若干の新知見を得たのでここに報告する。

実験方法

供試菌株には *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefacus*, 培地は $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, CaCl_2 0.01%, KCl 0.01%, マルトース 1.5% (pH 7.2) の組成のものを用い, 37° で 16~18 時間液内培養を行った。その後遠心沈澱によって菌体を集め, 生理食塩水にて数回洗滌した⁽²⁾。この洗滌細胞を M/10 磷酸塩緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し, マルトース (1.0%) と試験物質を添加して 37° で振盪した。予備実験の結果によれば, この際に細菌は殆んど増殖していないことを確かめておいた。

アミラーゼの力価は Blue value 法⁽³⁾にしたがい, 570 mμ の filter を用いて日立光電光度計 EPO-B 型によ

* Studies on the Amylase Formation by Bacteria. Part III. Factors in "Natto-Extract" Effective in Accelerating Amylase Formation.
By Shigeo FUKUDA (Botanical Institute, Faculty of Science, University of Tokyo)

り、1.0% 可溶性澱粉液と 0.001 N ヨード液との澱粉・ヨード複合体の変化を測定し、酵素液 1 ml が 40°, 30 分に加水分解し得る澱粉の mg 数を D_{30}^{40}/ml の単位にて表した。

納豆エキスの調製、その他は前報にのべた方法によった。

窒素化合物の検索はペーパークロマトグラフィにより、濾紙は Whatman No. 1, 展開溶媒は一次元では *n*-ブタノール:酢酸:水 (4:1:2) を、二次元ではルチジン:コリジン:水 (1:1:飽和) と 90% フェノール (0.1% NH_4OH 含有) を用い、いずれも上昇法によった。呈色試薬には 0.2% ニンヒドリン-*n*-ブタノール溶液、標準クロマトグラムには市販アミノ酸 (E. Merck Co., Nutritional Biochemical Co., 味の素製品等の純標品) を用いた。

試料の加水分解は封管中に塩酸 (最終濃度 3.0%) を加えたものを 5 気圧で 3 時間行い、アミノ態窒素の測定は Van Slyk 法⁽⁴⁾によった。

実 験 結 果

1. 納豆エキスの無機成分 松島氏⁽⁵⁾は *Bac. mesentericus* Trevisan var. *amylolyticus* の増殖細胞を用いた実験で野菜類の灰分がアミラーゼの生成に対して著しい促進効果を示すことを報告しているので、筆者は納豆エキスの灰化したものを種々の濃度に加えてその影響を調べた。その結果は第 1 表に示す通り、この場合洗滌細胞には殆んど影響が認められない。

第 1 表 納豆エキス中の無機成分の影響

添加量 %	水 溶 性 無機成分 D_{30}^{40}/ml	1 N 塩酸可溶 性無機成分 D_{30}^{40}/ml	納豆エキス 10% 溶液 D_{30}^{40}/ml
0	120	120	360
0.1	128	114	—
0.5	119	118	—
1.0*	126	121	—
1.5	121	121	—
2.0	121	121	—

培養 6.5 時間, 接種菌量 15.6 mg

* 約 10% の納豆エキスを相当する無機成分の量

り判断してペプチッド類でないかと思われる) の存在することが認められた。納豆エキスの加水分解物について調べた結果は第 2 図に示す通り、上記のアミノ酸のほかにメチオニン、アラニン、スレオニン、ゼリン等 4 種の

2. 納豆エキスとカゼイン水解物の比較 筆者はさきに納豆エキスや合成培地に各種の糖質を添加して、そのアミラーゼ生成に対する影響を検討したが⁽⁶⁾, 著しい効果のあるものは認められなかった。またペーパークロマトグラフィにより納豆エキス中の窒素化合物の分布を調べた結果は第 1 図に示す通り、フェニールアラニン、ロイシン、チロシン、ヒスチジン、アルギニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、パリン、オキシプロリン等 10 種のアミノ酸と 2 種の不明な物質 (この物質は R_F 値が低く、呈色状態その他よ

第 1 図 納豆エキスのペーパークロマトグラム

1. フェニールアラニン, 2. ロイシン, 3. チロシン, 4. パリン, 5. オキシプロリン, 6. ヒスチジン, 7. アルギニン, 8. リジン, 9. グルタミン酸, 10. アスパラギン酸, 11, 12. ペプチッド類

第 2 図 加水分解した納豆エキスのペーパークロマトグラム

1. フェニールアラニン, 2. ロイシン, 3. チロシン, 4. パリン, 5. オキシプロリン, 6. ヒスチジン, 7. アルギニン, 8. リジン, 9. グルタミン酸, 10. アスパラギン酸, 11. アラニン, 12. スレオニン, 13. ゼリン, 14, 15, 16. 不明物質, 17. メチオニン

第3図 アミラーゼ生成に対する納豆エキスとカゼイン加水分解物の影響

- 10.0% カゼイン加水分解物添加
 - ▲—▲ 1.0% "
 - 0.5% "
 - △—△ 0.1% "
 - M/10 磷酸塩緩衝液+1.0% マルトース (対照)
 - 対照に 10% 納豆エキス添加
- 菌量 14.4 mg

第4図 納豆エキス中の有効物質の分別

アミノ酸と3種の不明な物質が検出された。他方更に多く(16~17種)のアミノ酸を含む試料としてビタミン・フリー・カゼイン加水分解物(Difco)と納豆エキスについて、それぞれのアミラーゼ生成に対する効果を比較した。その結果は第3図に示す通り、カゼイン加水分解物では多少の促進効果はみられるにしても、その程度はどの添加濃度(0.1~10.0%の範囲)についても納豆エキスには遙かに及ばなかった。カゼイン加水分解物にビタミン B₁, B₂, B₆, ビオチン, パントテン酸, ニコチン酸, ピリドキサール塩酸塩, ピリドキサミン塩酸塩, 酵母エキス等をそれぞれ 50 μg/ml ~ 500 μg/ml の濃度に加えても促進効果は殆んど認められない。

3. 納豆エキス中の有効物質 納豆エキス中の有効成分を検索する目的で、これを一次元ペーパークロマトグラフィにより濾紙上に展開し、ニンヒドリンで発色させた対照と比較しながら、その相当する各区分のspotを切りとり、それぞれを2.0 mlの蒸留水で溶出した後アミラーゼ生成に対する影響を検した。その結果は第2表に示す通り、有効成分は R_F 値の低いヒスチジン, アスパラギン酸, アルギニン, リジン, ペプチッド等に相当する区分に見出された。

第2表 ペーパークロマトグラム各区分のアミラーゼ生成に対する影響

区分	D_{30}^{40}/ml	R_F	区分中に含まれると推定される窒素化合物
1	146	0.74	フェニールアラニン
2	63	0.69	ロイシン
3	94	0.58	チロシン
4	94	0.49	β -アラニン, パリン
5	123	0.34	グルタミン酸
6	146	0.29	オキシプロリン
7	216	0.25	{ヒスチジン アスパラギン酸}
8	216	0.14	{アルギニン, リジン ペプチッド類}
対照	107		

培養 6.0 時間, 接種菌量 12.3 mg

4. 有効物質の分別 納豆エキスを第4図に示す方法⁽⁷⁾によって分別し、得られた各区分液をもとの納豆エキスに換算してこれを種々の濃度に加え、そのアミラーゼ生成に対する影響を検した。その結果は第3表に示す通りであるが、比較のために納豆エキスとその加水分解並びに各区分液とその加水分解物の効果を調べたものが第4表であって、このように前述の知見と

ほぼ一致する結果を与えた。即ち、促進効果は [A] 区分で最も大きく、[G] 区分がこれに次いでいたが、ペーパークロマトグラフィにより検した結果によれば、[A] 区分にはロイシン, ヒスチジン, アルギニン, リジン等のアミノ酸のほか2種の不明な物質(ペプチッド類?), [G] 区分はアルギニン, ヒスチジン, リジン等3種の

第 3 表 分別処理した各区分液のアミラーゼ生成に対する影響

区分	納豆エキスを換算して添加した濃度				対照
	5 % D ₃₀ ⁴⁰ /ml	10 % D ₃₀ ⁴⁰ /ml	15 % D ₃₀ ⁴⁰ /ml	20 % D ₃₀ ⁴⁰ /ml	
[A]	224	285	351	351	—
[B]	121	154	161	161	—
[C]	85	103	103	103	—
[D]	85	103	103	103	—
[E]	85	85	85	85	—
[F]	85	85	85	85	—
[G]	188	221	287	287	—
[H]	114	127	127	127	—

114

培養 6.5 時間, 接種菌量 14.1 mg

第 4 表 納豆エキスと分別区分液並びにその加水分解物のアミラーゼ生成に対する影響

添加物	D ₃₀ ⁴⁰ /ml	アミノ酸態窒素
10% 納豆エキス	392	18.6 μg/ml
同上加水分解物*	303	31.8
10% [A] 区分液*	356	19.5
同上加水分解物*	278	30.6
10% [G] 区分液*	281	23.8
同上加水分解物*	281	23.4

培養 6.5 時間, 接種菌量 14.4 mg

* 試料添加濃度はそれぞれ, もとの納豆エキスを換算した濃度で示した。

[A] 区分は前述のアミノ酸とフェニールアラニン, グルタミン酸, アスパラギン酸のほか 2 種の不明な物質, [G] 区分は前述のアミノ酸のほかにも認められなかった (納豆エキスについては前記参照)。

5. アミノ酸の効果 種々のアミノ酸 (並びに核酸構成成分) をいろいろな濃度に添加し, そのアミラーゼ生成に対する影響を検したが, その結果は第 5 表に示す通りである。アルギニン, ヒスチジン等を加えた場合には著しい促進効果がみられた。このことは先に述べた結果から予想されるところとほぼ一致するものである。大部分のアミノ酸はアミラーゼ生成に殆んど影響を与えなかったが, 添加によりかえって阻害を示すアミノ酸もあった (核酸構成成分中ではグアニンのみに幾分の促進効果がみられた)。以上の結果は添加したアミノ酸の濃度 (50 ~ 1,000 μg/ml の範囲) によってあまり変動することはない。

6. アミノ酸混液の効果 アミノ酸添加の効果における相加, または相乗作用を検討するために上記の実験で有効と認められたアルギニン, ヒスチジン相互間, 或はそれらと他のアミノ酸との組合せについて促進効果を調べ, 第 6 表に示すような結果を得た。即ち, アルギニンとヒスチジンとの組合せでは明らかな相加作用が認められたが, 組合せによっては混合することによりかえって阻害の現れるものもあった (例えばリジンとロイシン)。

第 5 表 アミノ酸添加の効果

アミノ酸	D ₃₀ ⁴⁰ /ml	アミノ酸	D ₃₀ ⁴⁰ /ml
α-アラニン	78	L-リジン	166
β-アラニン	94	dl-メチオニン	130
アスパラギン	94	L-オキシプロリン	166
アスパラギン酸	147	L-プロリン	130
アデニン硫酸塩	100	dl-フェニールアラニン	130
アルギニン塩酸塩	217	dl-ゼリン	75
システイン塩酸塩	146	dl-スレオニン	94
L-シスチン	75	dl-チロシン	94
L-グルタミン酸	146	dl-トリプトファン	75
グアニン塩酸塩	157	ウラシル	111
L-グリシン	75	dl-バリン	94
L-ロイシン	94	キサンチン	130
dl-イソロイシン	113	リボ核酸	125
ヒスチジン塩酸塩	188	対 照	103

培養 6.0 時間, 接種菌量 11.8 mg, アミノ酸添加量はいずれも 100 μg/ml。

アミノ酸のみを含んでいた。また, 納豆エキス, [A] 区分及び [G] 区分等を加水分解し, そのアミノ態窒素を測定すると納豆エキスや [A] 区分には著明な増加がみられたが, [G] 区分では変化がなかった。そして, 納豆エキスや [A] 区分の加水分解物を加えた場合アミラーゼの力価はかえって減少していたが, [G] 区分には変化がみられなかった。そこで加水分解物をペーパークロマトグラフィにより検した結果によれば

第 6 表 アミノ酸混液の効果

アミノ酸混液	D ₃₀ ⁴⁰ /ml	アミノ酸混液	D ₃₀ ⁴⁰ /ml
アルギニン+ヒスチジン	275	アルギニン+ヒスチジン+リジン	305
アルギニン+リジン	198	アルギニン+ヒスチジン+オキシプロリン	305
アルギニン+ロイシン	114	アルギニン+ヒスチジン+ロイシン	256
アルギニン+オキシプロリン	114	アルギニン+オキシプロリン+グルタミン酸	220
アルギニン+グルタミン酸	152	アルギニン+リジン+ロイシン	183
ヒスチジン+リジン	233	ヒスチジン+リジン+ロイシン	195
ヒスチジン+オキシプロリン	184	アルギニンのみ	210
ヒスチジン+グルタミン酸	184	ヒスチジンのみ	186
ヒスチジン+ロイシン	114	リジンのみ	166
リジン+ロイシン	107	対 照	112

培養 6.0 時間, 接種菌量 12.7 mg, アミノ酸添加量各々 50 μg/ml

考 察

この実験で示したように納豆エキ스는、本菌が旺盛な発育をする条件の下ばかりでなく、静止菌懸濁系においてもアミラーゼの生成が認められることは興味深い事実である。納豆エキ스가このような著しい促進効果をもつのは、その中に含まれるある種の有効物質に基因するものと考えるべきであろう。しかし、上述の実験結果を総合すると、このような促進効果は納豆エキス中に含まれるただ一種類の物質の作用とは認め難く、第5及び6表の結果から明らかのように有効物質としてはアミノ酸のうち特にアルギニン・ヒスチジン等が考えられ、この両者の効果は相加的に作用するので、納豆エキス中でも有効な役割をはたすものは実際これらの両アミノ酸であろうと推定される。即ち、ここに実験された諸条件の範囲では、これらの両アミノ酸が律速的な因子となっていると考えられる。しかし、ある種のアミノ酸はそれを上記のアミノ酸と組み合わせて同時に与えた場合にかえって促進効果を減殺することが認められたので、このことはカゼイン加水分解物の促進効果において納豆エキスに比べた場合に劣るのもその原因の一つは、その中に含まれる種々のアミノ酸の量的均衡の不適當なことによるものであらうと推察される。山本氏⁽⁸⁾は *Bac. amyloliquefaciens* Fukumoto について微量のトリプトファンを他のアミノ酸と共に加えると促進効果が認められると言うが、筆者の場合にはそのような事実は認められなかった（納豆エキスには認められる程度のトリプトファンを含んでいない）。

納豆エキスまたはその分別した有効区分を加水分解すると促進効果はもとの納豆エキスまたは区分に比べて、かえって減少することが認められた。この現象は加水分解処理によって、上述の阻害作用をするアミノ酸や他の成分の増加によるのか（塩分による阻害でないことは確かめた）、あるいはもとの試料中に含まれていた補足的有効物質（もとの納豆エキス及び区分 [A] には2種のペプチッドが含まれていた）が加水分解により失われたことによるのかは未だ明らかでないが、いずれにしてもこの事柄は酵素生産工業の実際において、有効な材料をどの程度処理した状態（抽出物や加水分解物等）で用うるのが最も有利であるかに関連して、注目されねばならぬことであると考ええる。

要 約

- (1) 納豆エキスには細菌の静止菌懸濁系においてもアミラーゼ生成を著しく促進する働きがある。
- (2) カゼイン加水分解及びそれにビタミン類を加えたものもある程度の促進効果を示したが、それらのものは納豆エキ스에みられるほどの著しい効果はなかった。
- (3) 納豆エキスの有効物質は塩基性アミノ酸やペプチッド等を含む区分に見出された。しかし、これらのものを加水分解するとアミラーゼの力価はかえって減少した。
- (4) 単独または組合せて添加したアミノ酸の促進効果について、ヒスチジン及びアルギニンは著しい効果をもつが、両者を同時に与えたものは更に著しい促進効果を示した。

終りに終始御懇切な御指導を賜った東京大学の田宮博先生、朝井勇宣先生並びに有益な御助言を頂いた研究室の諸氏に厚く感謝する。

（本報告の一部は昭和 29 年 3 月、日本農芸化学会大会において講演した。）

(1) 福田重夫：本誌，27，745，749 (1953).	(4) 東大農芸化学教室編：実験農芸化学，上巻 (1952) 朝倉書店。
(2) 福本寿一郎，山本武彦：酵素化学シンポジウム，7，1 (1952).	(5) 松島欽一：醸酵工学，30，166 (1952).
(3) Myron K. Brakke, Louis G. Nickell : <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 32, 28 (1951); Jo-Fen Tung Kung, Virginia H. Hanrahan, M. L. Coldwell : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 75, 5548 (1953); C. S. Hanes, M. Cattle : <i>Proc. Roy. Soc. (London)</i> , 125B, 387 (1938).	(6) 福田重夫：未発表。
	(7) J. Przylecki, K. Kasprzyk : <i>Biochem. Z.</i> , 288, 29 (1936); 289, 241 (1937); H. D. Darkin : <i>J. Biol. Chem.</i> , 44, 499 (1920).
	(8) 山本武彦：私信。