〔農化 第 36 卷, 第 8 号, p.704~705, 1962〕

葉たばこ乾燥に関する研究(第1報)*

乾燥中における酵素活性の変化について

富田 英夫, 玉置英之助 (日本専売公社中央研究所)

昭和 37 年 1 月 12 日 受 理

たばこ植物葉の乾燥中における酵素活力については従来も数多くの研究がなされている^(1~4)。しかし乾燥方法や活性測定法が多岐にわたり、また乾燥段階別に細かく測定されているものは少ない。われわれは農産加工におけるプロセスを酵素的に見る研究の重要性を考え、在来種および黄色種葉たばこ乾燥法合理化の基礎として従来用いられている活性測定法に検討を加えた上で、現在行われているもの、あるいはその改変法である数種の異なる乾燥法を実施し、乾燥中に変化も大きく品質への影響も多い糖、および蛋白質に関係した α -、 β -アミラーゼ、インペルターゼ、プロテアーゼならびに色相および喫味に関係が大きいと思われるカタラーゼ、パーオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼについて、乾燥経過に伴う酵素活性の変化を段階的に測定し、以下の結果を得たので報告する。

実 験 の 部

1. 試料 測定に用いた試料葉は、昭和 35 年度に日本専売公社宇都宮たばこ試験場において栽培された黄色種 (*Nicotiana tabacum* L. var. Bright Yellow) およびだるま種 (*N. tabacum* L. var. Daruma) で、前者は上位より 5~6 枚目 (全葉数 15 枚)、後者は 6~7 枚目 (全葉数 18~19 枚) の着葉のものを収穫した。収穫は正常に生育した植物体から行い、乾燥用の連には着葉位置の異なるものを交互につけた。乾燥方法は黄色種は鉄管乾燥とし、だるま種は鉄管乾燥、連干標準法、急速連干および幹干の 4 種の乾燥法に付した。収穫から乾燥終了まで鉄管乾燥では 8 段階、空気乾燥**では 4 段階に分け、各段階ごとに上述の連の中から 30 枚の試料葉を採取した。鉄管乾燥温度経過は第 1 図の通りで、最初の 20 時間は蒸酵期であってこの間の温度は 36~38°、湿度

第 1 図 乾燥温度経過

○—○ 黄色種 ×……× だるま種
○および×は試料採取時期を示す。

90% 以上を保持させる。ついで一時的昇温を行うのを伸長と称するが、薄葉型のだるま種ではこれを行わなかった。さらに 38~40° の温度を持続してこの間に葉色を黄変させ、黄変度が肉眼によって 60~70% に達したときから段階的昇温を開始し、黄色を固定する固定期に入る。最後に葉中骨部を高温で乾燥する中骨乾燥期に入る。試料採取は収穫時、蒸酵終了 (黄色種 20 時間、だるま種 19 時間)、伸長終了 (26 時間、だるま種なし)、黄変 6 割 (45 時間、64 時間)、黄変完了 (64 時間、83 時間)、固定末期 (79 時間、98 時間)、中骨乾燥中期 (91 時間、110 時間)、乾燥終了 (106 時間、

116 時間) の各時期に行った。黄色種とだるま種では葉質、熟度などの差に基いて乾燥経過に大きな差が現れ、葉の色調その他の条件によって試料採取を行った結果、黄変期以後の試料採取時間が両品種の間で 10~20 時間のずれを生じた。空気乾燥では幹刈りして室内につるした幹干、連にあみつけて屋内につるして黄変させたのち屋外で枠につけて乾燥する連干 (標準法)、この連干の乾燥を速めるために黄変後地上に広げて急速に乾燥させる連干急乾法の 3 種を用いた。葉は黄変完了に 5 日、褐変完了に 12 日を要した。急乾法は褐変終了時においてすでに中骨部分まで乾燥していたので、以後屋内につけて保存した。連干は乾燥終了に 20 日、幹干では 30 日を要

*Studies on the Curing of Tobacco Leaves. Part I. Changes in Some Enzyme Activities During the Curing of Tobacco Leaves.

By Hideo TOMITA and Einosuke TAMAKI (Central Research Institute, Japan Monopoly Corporation)

** 空全な空気乾燥といえないものもあるが、便宜上鉄管乾燥と対比して使用する。

した。乾燥開始後 30 日で試料は堆積発酵に付するわけであるが、その直前に採取したものを乾燥終了時の試料とした。採取した試料葉は直ちに凍結して保存後凍結乾燥し、粉末にして無水リン酸デシケーター中に保存し、これを試料とした。

2. 酵素活性の測定 この実験のように着色粗酵素液を用いる場合には活性測定上にいろいろの制約を受ける。 α -アミラーゼは Wohlgemuth 法やその改変法⁽⁵⁾、ないし不破法⁽⁶⁾などに難点があるので有色標準液を用いての吸光度測定法を検討した結果、高い再現性が得られた。 β -アミラーゼについても従来の報告に用いられた時間を短縮するほうがより再現性が高いから、反応時間を 3 時間とした。カタラーゼは粗酵素液ではヨード滴定法⁽²⁾、検圧法⁽⁷⁾が考えられるが、前者によった。パーオキシダーゼは比色法を用いにくいので Ettori の検圧法⁽⁸⁾を一部改変して良好な再現性が得られた。ポリフェノールオキシダーゼも検圧法が最適であった。

a) α -アミラーゼ : 試料 1 g に 20 ml の pH 7 の McIlvaine-クエン酸-第 2 リン酸ナトリウム (以下同じ) 緩衝液を加え、水冷しながら 5 分間ホモゲナイザーにかけて抽出し、ガーゼでろ過した。ロ液は冷却遠心器で 0°, 8,000 r. p. m. で 15 分遠心分離し、上澄液を酵素液とした。酵素液 1 ml を pH 7 の緩衝液 4 ml に加え、これに別に調製したデンプン液 (可溶性デンプン 1 g を 50 ml の水に入れ、数分煮沸後 50 ml の緩衝液を加えたもの) 5 ml を加えて 10 ml とし、40° の恒温水槽中で 15 分反応させ、その反応液 1 ml を採り 2 N 硫酸 5 ml に注ぎ入れ、これに 5 ml の水を加えて光電比色の標準液に用いる。別に同時にとった反応液 1 ml に 5 ml の 2 N 硫酸と水の代りに 0.001 M ヨード・ヨードカリ (2%) 液 5 ml を加える。標準液および反応液から 1 ml ずつとり、それぞれを水 2 ml の入った試験管に加え、正確に 5 分後 Beckmann B 型光電比色計で、波長 570 m μ の吸光度を測定した。同様にして反応 30 分にも測定し 15 分との差をとる。反応液 1 ml についてこの条件で得た吸光度の差を α -アミラーゼの活性とする。したがってこの方法は 1/200 g の乾物中の酵素活性について測定することになる。

b) β -アミラーゼ : 1 g の試料に pH 6.0 の McIlvaine 緩衝液 40 ml を加え、上と同様にして酵素液を作る。この酵素液 10 ml をとり 1% デンプン溶液 20 ml、緩衝液 20 ml を加えて 50 ml とし、この 20 ml を 100 ml に水で薄め、その 5 ml について還元性糖量を測定した。残りの 30 ml を 40° で 3 時間反応後 20 ml をとり、対照と同様にして糖の定量を行った。還元性糖量は Somogy の新試薬を用い、M/20 チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定し、滴定値の差をもって β -アミラーゼの強さとした。したがってこの活性測定値は 1/200 g の乾物中の酵素によって生成される還元性糖の滴定値になる。

c) インベルターゼ : 基質としてデンプンの代りに 1% ショ糖溶液を用い、その他は β -アミラーゼに準じた。

d) プロテアーゼ : 試料 6 g に 60 ml の蒸留水を加えて抽出し、遠心分離上澄液を酵素液とする。基質としてミルクカゼインを沈殿精製し、その 1 g を 63 ml の M/5 第 2 リン酸ナトリウムに加温溶解し、M/10 クエン酸 37 ml を加えた後クエン酸で pH 6.0 に調節する。酵素液 10 ml、基質 5 ml に McIlvaine 緩衝液 pH 6.0 を 20 ml 加え、38° で 4.5 時間反応後、25% トリクロール酢酸 5 ml を加えて反応を停止し、30 分以上放置してから東洋濾紙 No. 5C を用いてろ過し、ロ液 20 ml をとってキェルダール法により生成するアンモニアを N/10 硫酸に受け、N/20 カセイソーダで滴定した。別に反応時間 0 のものを対照とし、滴定値の差をもって酵素活性とした。この値は 0.5 g の乾物中の酵素活性について測定することになる。

e) カタラーゼ : 試料 1 g に 10 ml の pH 6.4 の McIlvaine 緩衝液 10 ml を加えて抽出し、同様にして上澄液を酵素液とした。酵素液 5 ml を同じ緩衝液 10 ml、蒸留水 10 ml で薄め 0° に氷冷する。この酵素液を 5 ml ずつ 4 本の 100 ml の三角フラスコに分注し、その 2 本は対照として用いる。対照にはあらかじめ 20% 硫酸 10 ml を加えた後各フラスコに 0.1% 過酸化水素溶液 5 ml を加え、0° に正確に 10 分保った後対照以外のフラスコに 20% 硫酸 10 ml を加えて反応を停止する。各フラスコに 5% ヨードカリ溶液 5 ml を加え、正確に 5 分後に生成したヨードを 1% デンプン溶液を指示薬として N/40 チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定し、対照との差をもってカタラーゼの活性とした。この滴定値の差は 0.1 g の乾物中のカタラーゼによって分解された過酸化水素によるものである。

f) パーオキシダーゼ : 試料 1 g に 10 ml の pH 7.0 の M/15 Sørensen のリン酸緩衝液を加えて抽出し、同様にして上澄液を酵素液とする。検圧計を用い、主室には 1% 過酸化水素溶液 1 ml および 5% ピロガロール

0.2 ml を入れ, 側室 I には酵素液 1 ml を入れ, 20° で 15 分平衡後酵素液を加え, 正確に 5 分後側室 II より 20% 硫酸 0.5 ml を加えて反応を停止し, 10 分後に目盛を読んだ. ビロガロール溶液の代りに 0.2 ml の蒸留水を加えたものを対照におき, 対照との差から炭酸ガス放出量を求めて酵素活性とした. これは 0.1 g の乾物中のパーオキシダーゼが 5 分間に酸化するビロガロールから生じた炭酸ガスによるものである.

g) ポリフェノールオキシダーゼ: 試料 0.5 g に 10 ml の pH 6.4 の McIlvaine 緩衝液を加えて抽出し, 上澄液 5 ml をセロハンチューブに入れて 18 時間流水透析を行い, 透析後蒸留水を用いて完全にチューブより洗い出し, 10 ml の定容にした後再び 0° , 7,000 r. p. m. で 15 分遠心分離した上澄を酵素液とした. 検圧計を用い, 主室には pH 6.4 の緩衝液 1 ml と酵素液 1 ml, 副室には 10% カセイカリ 0.2 ml, 側室に M/100 クロロゲン酸あるいはカタコール 0.4 ml を入れ, 30° で 15 分平衡後基質を加え, 5 分間の酸素吸収量をもって酵素活性とした. この酸素吸収は 1/40 g の乾物中のポリフェノールオキシダーゼによるものである.

実験結果

鉄管乾燥中の酵素活性の変化は第 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 図に, 空気乾燥中については第 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 図に示す.

鉄管乾燥では α -アミラーゼの活性は次第に増加し, 乾燥後期に至ると急速に低下するが, まだ乾燥初期の生葉よりもかなり高い酵素活性を保持している(第 2 図). また黄色種においては伸長操作を加えているが, これにより活性の一時的低下が認められる. 空気乾燥葉についても黄変期まで活性が増加し, 以後減少に向うが, 鉄管乾燥と比較すると最高値も著しく低い. 発酵前の試料では連干急乾法で増加する一方, 幹干では微弱となる(第 3 図).

β -アミラーゼの鉄管乾燥中の経過は α -アミラーゼに似たものが見られるが, 伸長による活性低下はなく

第2図 α -アミラーゼ (F.C.)
●—● 黄色種 ●—● だるま種

第3図 α -アミラーゼ (A.C.)
●—● 連干標準法 ●—● 連干急乾法
●—● 幹干

第4図 β -アミラーゼ (F.C.)
●—● 黄色種 ●—● だるま種

第5図 β -アミラーゼ (A.C.)
●—● 連干標準法 ●—● 連干急乾法
●—● 幹干

第 6 図 インペルターゼ (F.C.)
●—● 黄色種 ●- - - ● だるま種

第 7 図 インペルターゼ (A.C.)
●—● 連干標準法 ●- - - ● 連干急乾法
●—● 幹 干 ●- - - ● 幹 干

では緑葉で高い活性を示し、黄色種と異なる活性消長を示す(第 8 図)。空気乾燥ではしだいに活性が低下するが発酵前になって幹干以外のものは著しく活性が上昇する(第 9 図)。

カタラーゼの鉄管乾燥中の活性消長も両品種に差があるが、黄色種の乾燥初期の急激な活性上昇以外はともにしだいに減少する。また他の酵素との比較ではピークの移動があるが、プロテアーゼとの類似が認められる(第 10 図)。空気乾燥葉は発酵前に活性の若干の増加が見られる(第 11 図)。

パーオキシダーゼは比較の変動の少ない酵素で、鉄管乾燥中固定期ころまではほぼ様な活性を保持し、以後大きく低下する(第 12 図)。空気乾燥においてはしだいに活性を減じ、発酵前には著しく弱くなる(第 13 図)。

ポリフェノールオキシダーゼの鉄管乾燥中の変化では黄色種の場合に黄変 6 割ころ一時的に活性の低下が見ら

第 8 図 プロテアーゼ (F.C.)
●—● 黄色種 ●- - - ● だるま種

第 9 図 プロテアーゼ (A.C.)
●—● 連干標準法 ●- - - ● 連干急乾法
●—● 幹 干 ●- - - ● 幹 干

(第 4 図) 空気乾燥での経過も大差はない(第 5 図)。

インペルターゼの鉄管乾燥中の経過は β -アミラーゼにかなり似ているが(第 6 図)、空気乾燥においては活性の低下がほとんど見られず、連干の標準、急乾法などではむしろ増加している(第 7 図)。

プロテアーゼは鉄管乾燥中黄色種において黄変完了時まで活性が増加し、以後減少する。しかしだるま種

第10図 カタラーゼ (F.C.)

●—● 黄色種 ●---● だるま種

第12図 パーオキシダーゼ (F.C.)

●—● 黄色種 ●---● だるま種

第11図 カタラーゼ (A.C.)

●—● 連干標準法 ●---● 連干急乾法
●—● 幹 干 ●---● 幹 干

第13図 パーオキシダーゼ (A.C.)

●—● 連干標準法 ●---● 連干急乾法
●—● 幹 干 ●---● 幹 干

れること、伸長により活性の増加が認められることが目だっている (第14図)。この酵素は空気乾燥においても乾燥終了時にはほとんど活性を示さない (第15図)。

考 察

試料調製上で凍結乾燥法により酵素活性が変動するか否かが問題となるが、別に検討したところ測定誤差範囲内で、またその失活も初期保有活性に比例的で、かつ1カ月程度では保存中の失活も問題とならない。乾燥中に乾物減少が起ることを考慮して一部の試料によってカルシウムを測定し^(9,10)、それを基準として酵素活性の算出をしたが大局的に見た酵素活性消長に変動を招くほどではないので、この実験では算入しなかった。

たばこのポリフェノールオキシダーゼについてカテコールとクロロゲン酸は異なる酵素で酸化されるという報告もあるが⁽¹¹⁾、両基質に対する活性の変化の傾向はほとんど同一であった。黄色種鉄管乾燥において黄変6割の

第 14 図 ポリフェノールオキシダーゼ (F.C.)

— 黄色種 だるま種
● クロロゲン酸 ▲ カテコール

第 15 図 ポリフェノールオキシダーゼ (A.C.)

— 連干標準法 連干急乾法 --- 幹干
● クロロゲン酸 ▲ カテコール

は負の影響を与え、ポリフェノールオキシダーゼは伸長操作により活性が増加しその最大期が前にずれるが、これが葉たばこの黄色固定に有効に働く要因の一つとして考えられよう。鉄管乾燥しただるま種は葉が薄いため無伸長乾燥を行ったので黄色種と十分な比較ができないが、全行程を通じてポリフェノールオキシダーゼの活性はだるま種のほうがむしろ高い結果を示しており、だるま種の鉄管乾燥による黄色固定の困難性との結びつきを示すと見られる。

一般的にいうと酵素の活性は黄色種のほうが高いと見てよいが、緑葉における二、三の酵素に見られるように両品種間にはかなりの差があるものがある。このことは単に品種の差以外に収穫期における両品種の熟度、着葉枚数などに相当の隔たりがあることも考えられる⁽¹³⁾。いずれの酵素も鉄管乾燥中に緑葉より活性の強い時期があるが、昇温、脱水に伴い直接ないし間接的に活性化されるものか、葉の生命持続中なお酵素の生成が起るものか、あるいは単に抽出が容易になったとか、その他の理由によるのか、この活性増加の機構は今後に残された問題である。

乾燥終了時に酵素活性が保存され、これが以後の熟成、発酵などの過程でどの程度の役割を果し得るものかについては従来も問題にされているところであるが^(2,8,14,15)、鉄管乾燥終了後も各加水分解酵素は相当の活性を保持している。これは酸化酵素群に比較して、熱あるいは乾燥に対する抵抗力の強いことを示している。空気乾燥法においては乾燥経過時間も長く、多くの酵素は著しく活性を失うが、インペルターゼ、プロテアーゼなどが比較的安定に保たれている。また一部の酵素活性が発酵前に急激に増加することが見られるが、幹干のように乾燥経過が遅く乾燥終了時と発酵の間の貯蔵期間の短いものではこうしたことが見られないことや、カタラーゼの増加^(16,17)やその他増加する酵素の種類から見て、この活性増加は後に外から付着した微生物に由来するものと考えられる。また空気乾燥葉は鉄管乾燥葉と異なり、乾燥終了後さらに再乾燥、樽詰せず堆積発酵を行うが、そのような葉のいくつかに認められるような⁽¹⁸⁾発酵以後の過程でたばこ葉が本来所有していた酵素によるほかに、微生物による作用が多分に加わってくる可能性が考えられる。

以上の結果について留意すべきことは本実験が葉中水分、葉中における基質との接触を考慮した生理上の活性を示すものではないことで、したがって化学的分析との対比が今後の問題であり、またさらに規制された条件による基礎的研究を行う必要がある。

要

約

黄色種およびだるま種葉たばこの鉄管乾燥の 8 段階およびだるま種の連干標準法、急速連干および幹干の各 4 段階について α -, β -アミラーゼ、インペルターゼ、プロテアーゼ、カタラーゼ、パーオキシダーゼおよびポリフ

ェノールオキシダーゼの活性の変化を乾燥経過を追って測定した。鉄管乾燥終了後もかなりの酵素は最初に保有していた程度の活性があるが、空気乾燥終了後は多くの酵素活性が微弱になる。一般に加水分解酵素は酸化酵素に比較して乾燥処理に対して安定であり、鉄管乾燥では黄変期まで活性の著しい増加が認められる。空気乾燥葉が幹干を除き終了時にプロテアーゼ、カタラーゼなどの活性が上昇するのは外部からの微生物によると考えられる。

終りに本研究の発表を許可された日本専売公社中央研究所大熊規矩男所長、研究の遂行上で種々協力いただいた元当所飯田正直氏、活性測定に協力された当所斎藤憲二、馬場要子両氏に深謝いたします。また試料葉作成に尽力された宇都宮たばこ試験場各位に厚く御礼申上ます。

(1) 仁藤武雄, 北村栄寿 : 本誌, 12 , 87 (1936).	(10) 福澄哲夫, 荒井兼男, 高原広康, 渡辺竜策 : 専売研, 103 , 30 (1961).
(2) 中井武文, 稲葉 泰 : 本誌, 24 , 170 (1950).	(11) E. S. Sisler, H. J. Evans : <i>Plant Physiol.</i> , 33 , 255 (1958).
(3) R. E. Barrett : <i>J. Agr. Food Chem.</i> , 5 , 220 (1957).	(12) 松山晋, 石戸谷賢髓 : 本誌, 34 , 662 (1960).
(4) I. Zelitch, M. Zucker : <i>Plant Physiol.</i> , 33 , 151 (1958).	(13) 中井武文, 稲葉 泰 : 本誌, 24 , 167 (1950).
(5) H. Hagihara : <i>Ann. Rept. Sci. Works, Fac. Sci. Osaka Univ.</i> , 2 , 35 (1954).	(14) 仁藤武雄, 北村栄寿 : 本誌, 12 , 105 (1936).
(6) H. Fuwa : <i>J. Biochem. (Tokyo)</i> , 41 , 583 (1954).	(15) 福島好郎 : 日化誌, 59 , 1079 (1938).
(7) R. E. Greenfield, V. E. Price : <i>J. Biol. Chem.</i> , 209 , 355 (1954).	(16) J. J. Reid, D. E. Haley, D. W. McKinstry, J. D. Surmatis : <i>J. Bact.</i> , 34 , 460 (1937).
(8) J. Ettori : <i>Biochem. J.</i> , 44 , 35 (1949).	(17) F. Berky : <i>Élelmiszervizsgáló Közlemények</i> , 4 , 236 (1958) ; <i>Chem. Zentr.</i> , 131 , 5677 (1960).
(9) W. G. Frankenburg : <i>Arch. Biochem.</i> , 14 , 157 (1947).	(18) W. G. Frankenburg : <i>Advances in Enzymology</i> , 10 , 325 (1950).

〔農化 第 36 卷, 第 8 号, p. 710~715, 1962〕

乳蛋白質のポーラログラフ的研究 (第1報)*

人乳全カゼイン並びに牛乳全カゼインの差異について

前野正久, 清沢 功, 桑原邦介 (森永乳業中央研究所)

昭和 37 年 1 月 25 日 受理

緒 言

1933 年 Brdicka⁽¹⁾ がポーラログラフ蛋白波を発見して以来、多数の研究がなされ、蛋白波が蛋白質の物理化学的性質と密接な関係があり、個々の蛋白質に特有な波形、波高を示すことが明らかにされた^(2~6)。

乳蛋白質のポーラログラフ的研究として、秦⁽²⁾および Bruiana⁽⁷⁾ らは牛乳カゼイン (α -, β - 並びに γ -カゼイン)、伊藤⁽⁸⁾は β -ラクトグロブリンについて詳細に検討している。また浜本⁽⁹⁾は人乳と牛乳の蛋白波を比較し、その栄養学的意義を考察している。さらに Koltoff⁽⁹⁾ らは牛乳蛋白質を変性させ、また Swiatek⁽¹⁰⁾ らは牛乳蛋白質に酵素を作用させ、ポーラログラフ的に追求している。

他方、Mellander⁽¹¹⁾ は人乳全カゼインについて、電気泳動的にくわしく研究し、磷酸塩緩衝液 (pH 7.57, イオン強度 0.15) において α -, β - および γ -カゼインの成分を認め、その電気泳動移動度が牛乳全カゼインの α -, β - および γ -カゼインの易動度と異なることを述べており、また前野ら⁽¹²⁾ は牛乳全カゼインの調製法に基づき、人乳全カゼインの調整法を確立し、人乳全カゼインの溶解度並びにカルシウムイオンとの結合による混濁度が牛乳全カゼインとかなり相違することを報告している。

* Polarographic Investigation on the Proteins of Milk. Part I. The Differences of Human and Cow's Milk Caseins.

By Masahisa MAENO, Isao KIYOSAWA and Kunisuke KUWAHARA (Central Research Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)