グシリコーン 550 を固定相に、ジオキサン-エチレンクロロヒドリン-クロロホルム-水(9:1:0.1:10), アセトン-酢酸-メチルアルコール-クロロホルム-水(11:0.5:1:0.8:9), テトラヒドロフラン-アセトン-メチルアルコール-酢酸-水(30:30:2:1:45)等の混合溶媒を移動相にした溶媒系がすぐれていることを見だし、それぞれの R_F 値を決定した。

終りに臨み、終始御指導いただいた農薬科長福永一夫博士、並びに農薬化学第三研究室長諏訪内正名博士、貴重な試料を御恵与いただき、また種々御助言を与えられた昆虫科の深見順一博士に感謝いたします。

(1) Y. L. Chen, C. S. Tsai: <i>J. Taiwan Pharm. Assoc.</i> , 7 , 31 (1955).	(4) 矢戸 孝, 諏訪内正名: 本誌, 32 , 956 (1958).
(2) M. Jacobson, I. Hornstein, R. Murphy: <i>J. Assoc. Offic. Agr. Chemists</i> , 42 , 174 (1959).	(5) 矢戸 孝: 本誌, 36 , 222 (1962).
(3) 土井彬堂: 科学警察研究所報告, 12 , 492 (1959).	(6) T. Kritchevsky, A. Tiselius: <i>Science</i> , 114 , 299 (1951).
	(7) R. Metcalf, R. March: <i>ibid.</i> , 117 , 527 (1953).

〔農化 第 36 卷, 第 9 号, p.784~788, 1962〕

マメ類もやしのアミラーゼ, 特に α -アミラーゼについて

春日 井 愛 子 (大阪女子大学)

昭和 37 年 3 月 2 日 受 理

緒 言

禾穀類種子の発芽にともなうアミラーゼ力の変遷についてはこれまで多くの報告⁽¹⁻³⁾があるが、マメ類についてのこの種の研究はほとんどない。著者はこれまでいろいろの野菜についてアミラーゼの存在やその種類、酵素化学的性質などを研究^(4,5)してきたが、おなじような研究を数種のマメもやしについてもおこなってみた。とくにもやしの α -アミラーゼについてはそれをあるていど精製し、その酵素化学的性質を検討した。これらの結果について報告する。

実験試料および方法

I. もやしの製法 マメ種子をまず無菌水で充分洗滌し、ついで約 30° に保った無菌水に数時間浸して充分吸水させてから、木箱の中のしめった布の上にまいた。温度は 22° から 28° までの間に、また水分の補給は第 1 図のようにして調節した。なお発芽中、雑菌の侵入をできるだけ防ぐため、容器および布はあらかじめ熱湯で

第 1 図 発 芽 装 置

で摩砕した。もやしの水分含有量は発芽とともに増加するので、それを考慮して摩砕にさいして添加する水の量を調節した。すなわちまいた当日のマメの重量を基準とし、それより増した重量だけ少ない量の水を加えた。摩砕汁は約 1 時間室温に放置したのち、布でこし、その口液をさらに口紙で口過して粗酵素液とした。

III. 酵素力の測定

i) 糖化力の測定: 前報⁽⁵⁾とおなじ条件で酵素反応をおこない、生成糖は Fehling-Lehmann-Schoorl 法の変法で便宜上グルコースとして測定し、40° で 15 分間にグルコースとして 15 mg の還元糖を生成する酵素力を

* Studies on Bean Sprout Amylase, Especially on the α -Amylase.

By Aiko KASUGAI (Osaka Women's University)

洗い、また水はつねに無菌水を使用した。また供試マメは均一に発芽させるために収穫年度のものをあらかじめデシケーター内に貯蔵した。

II. 酵素液の調製 できるだけ均一に発芽した一定数のもやしを採取し、まずその種皮をはぎとったのち、水を加えて乳鉢

1 単位とした。

ii) 糊精化力の測定: 糖化力測定の時と同一の条件で酵素反応を行わせ、時々その反応液 1 ml を 1 ml の 1/1000 N ヨウ素液 (1/1000 N KI および 1/100 N HCl をふくむ) に加え、ヨウ素呈色反応を試験した。この方法でヨウ素反応が無色になるのに 1 時間を要する場合を糊精化力 1 単位とした。

IV. α -アミラーゼと β -アミラーゼについて III の方法で酵素力を測定し、糊精化力がみとめられずに糖化力のみがみとめられたときは一応 β -アミラーゼのみが存在するとみなし、一方糖化力が糊精化力にくらべて比較的小さく (ヨウ素の色が消失したときのデンプン分解率が 20% 附近)、しかもその比が酵素の精製等によってもかわらないときは α -アミラーゼとみなし、またかなり強い糖化力とともに糊精化力がみとめられ、精製などによりそれらの比があきらかに変化するときは、 α および β -アミラーゼの両者が共存するとみなした。

実 験 結 果

I. 発芽日程ならびにもやしの部位と酵素力について いろいろのマメ類もやしの発芽日程と糊精化力ならびに糖化力の関係は第 1 表、また試料採取時のもやしの伸びと発芽日程との関係は第 2 表のとおりであった。

第 1 表 マメ類もやしの発芽日程と糊精化力ならびに糖化力

種類	発芽日数	酵素力	0		1		3		6		8	
			糊精化力	糖化力	糊精化力	糖化力	糊精化力	糖化力	糊精化力	糖化力	糊精化力	糖化力
ダ イ	ズ	キ	+	35.7	+	30.9	+	33.0	0.5	31.3	0.6	23.1
ア	ズ	キ	—	—	+	—	+	—	+	+	+	1.6
リ	ョ	ク	—	—	+	—	0.75	+	0.9	+	/	/
エ	ン	ド	—	—	—	—	+	0.5	+	1.1	0.5	3.9
ソ	ラ	マ	—	—	—	—	+	+	+	+	+	2.1
ゴ	ガ	ツ	—	—	+	+	0.6	0.5	1.1	1.4	1.5	2.2

糊精化力/ml: — 酵素作用のみとめられないもの, + 酵素力 0.1 以下, 〃 酵素力 0.2 から 0.4 まで
糖化力/ml: — 酵素作用のみとめられないもの, + 酵素力 0.4 以下

すなわち“ソラマメ”, “アズキ”, “エンドウ”は未発芽種子中には全く, また発芽してから糊精化力, 糖化力は僅かしかみとめられなかった。一方“ダイズ”の未発芽種子中には糊精化力はほとんどみとめられな

第 2 表 もやしの伸びと発芽日程

種類	発芽日数	もやしの伸び	0	1	3	6	8
			はい軸 (cm)	はい軸 (cm)	はい軸 (cm)	はい軸 (cm)	はい軸 (cm)
ダ イ	ズ	キ	—	1.0~1.5	6~8	13~15	15~16
ア	ズ	キ	—	0.5~0.7	2~3	12~13	18~20
リ	ョ	ク	—	1.0~1.2	5~6	10~13	/
エ	ン	ド	—	0.7~0.8	3~4	10~11	18~20
ソ	ラ	マ	—	0.7~0.8	3~4	7~8	9~10
ゴ	ガ	ツ	—	2.0~2.5	5~6	10~12	15~17

ったが、糖化力は多数の報告⁽⁶⁾にみられるようにいちじるしく強大であった。しかし発芽とともに糊精化力はわずかながら増加したが、糖化力はむしろ減少した。

“リョクトウ”や“ゴガツササゲ”も発芽とともに糊精化力があらわれ、しかもそれは発芽日数とともに増加した。“ゴガツササゲ”のもやしでは糊精化力とともに糖化力も増加した。“ゴガツササゲ”もやしにつ

第 3 表 “ゴガツササゲ” もやしの部位と酵素力

発芽日数	部位	酵素力		糊精化力/ml		糖化力/ml	
		子葉+	はい軸+	子葉+	はい軸+	子葉+	はい軸+
2	幼芽	+	—	+	+	+	+
4	幼芽	1.2	—	1.4	+	+	+
8	幼芽	1.6	—	2.2	0.89	+	+
14	幼芽	2.4	—	2.0	0.55	+	+

酵素液抽出条件: 子葉+幼芽: 種皮をはぎとり等重量の水を加えて 20°, 1 時間放置後遠心分離し, その上澄みを酵素液とした。はい軸+幼根: 水を加えずに摩砕した後, 上記同様に操作して酵素液とした。

糊精化力/ml: — 酵素力のみとめられないもの, + 0.5 以下のもの
糖化力/ml: + 0.4 以下のもの

もちいて粗酵素液を調製した。すなわち摩砕したもやしに等量の水を加えて室温で約 2 時間放置したのち布越しし, トルエン存在の下に冷所で 3 日間保存するといわゆるおりが生ずるのでそれをのぞき, その上澄液をさらにろ紙でろ過した。

この α -アミラーゼも他の起源の α -アミラーゼと同じようにカルシウム塩の添加で耐熱性が増加する (第 2 図

いて酵素力を部位別に試験した結果, 第 3 表に示すように, 部位によって酵素力はことなつた。すなわち子葉および幼芽の部には糊精化力も糖化力もともにみとめられたが, はい軸および幼根の部には糖化力のみしかみとめられなかった。また子葉と幼芽の部では糊精化力は 14 日目に, 糖化力は 8 日目にそれぞれ最大に達した。

II. “ゴガツササゲ” もやしの α -アミラーゼの精製とその酵素化学的性質 糊精化力に富み糖化力の少ない, すなわち α -アミラーゼの多い発芽 14 日の“ゴガツササゲ”もやしの子葉ならびに幼芽の部分のみを

第2図その1 ゴガツササゲ粗酵素液の耐熱性におよぼす酢酸カルシウムの影響
 —○— カルシウム添加 ……×…×… カルシウム無添加
 酢酸カルシウム (1/100 M) 10 分間, 加熱

第2図その2 ゴガツササゲ粗酵素液の熱処理前後のデンプン分解率とヨウ素呈色との関係
 —○— カルシウム添加, 70°, 10 分間, 加熱処理酵素液
 ……×…×… 未処理粗酵素液 → ヨウ素呈色
 2% 溶性デンプン 5 ml, 1/30 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 4 ml, 酵素液 1 ml, 40°

その1) ことがわかったので, 酢酸カルシウム 1/100 M を添加したのち 70° に 10 分間加熱した。これにより β -アミラーゼは除去された。加熱処理をしない酵素を用いた場合, ヨウ素反応が無色になったときのデンプン分解率は 23% であったのに反し, 酢酸カルシウム存在で加熱処理した酵素によるそれは 20% であった(第2図その2)。加熱によって生じた沈澱を遠心分離によってのぞき, その上澄みに硫酸アンモニウム (0.6 飽和) を加えてアミラーゼを塩析した。ついで塩析したアミラーゼを酢酸カルシウム 1/100 M 溶液にたいして透析した。これを一応精製 α -アミラーゼとして酵素化学的性質を検討した。

すなわちこの α -アミラーゼの作用最適 pH は 5.2 (第3図), また pH 5 から 8 の間で安定であった(第4図)。また前にのべたようにカルシウム塩の存在に

第3図 ゴガツササゲ α -アミラーゼ pH-活性曲線
 2% 溶性デンプン 5 ml, 1/30 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 4 ml, 酵素液 1 ml, 40°, 15 分間作用。
 pH 3 は酢酸, pH 6 以上はカセイソーダで pH を調整した。

第4図 ゴガツササゲ α -アミラーゼの pH-安定曲線
 —○— 30 分後 ……×…×… 20 時間後
 酵素液 1 ml に 1/30 M 種々 pH の緩衝液 3 ml を加え 17° に保ち, 1/10 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.2) で 2 倍に希釈後, 酵素力測定。

第5図 ゴガツササゲ α -アミラーゼのキレート剤の影響
 ……×…×… EDTA 処理酵素液
 ……△…△… シュウ酸アンモニウム処理酵素液
 —○— 未処理酵素液
 酵素液 [1/20 M (pH 4.2) 酢酸緩衝液を含む] 3 ml に EDTA (1/100 M) またはシュウ酸アンモニウム (1/18 M) 3 ml を加え, 17° に保った。

第4表 “ゴガツササゲ” もやしの α -アミラーゼの精製

操 作	容量 ml	糊精化 力/ml	収率 %
子葉および葉芽 (80 g)			
摩砕してから等量の水を加えて 布ごし, トルエンを加えて冷所 3日間, 貯蔵, ロ紙口通			
ロ液 (粗酵素液)	134	3.1	100
酢酸カルシウム添加 (1/100 M, pH 5.6) 70°, 10 分間加熱, ロ通			
熱処理酵素液	130	2.3	72
硫酸アンモニウム添加 (0.6 飽和, pH 5.4)			
塩析物	12	18.0	52
水に溶解			
塩析酵素液			
1/100 M 酢酸カルシウムにたい し透析 (pH 5.6)			
精製酵素液	22	9.0	48

第6図 リョクトウ α -アミラーゼのpH-活性曲線
酵素力測定条件は第3図に同じ。

よって耐熱性は増し, また EDTA やシュウ酸塩など金属キレート剤を加えるとたやすく失活した(第5図)。なおこの α -アミラーゼの精製過程は第4表のとおりであった。

III. “リョクトウ” もやしの α -アミラーゼの精製とその酵素化学的性質 前にのべたように, いろいろのマメ類もやしの中で“リョクトウ”もやしのみが比較的強力な糊精化力を示した(第2表)ので, その α -アミラーゼの精製を行い, その酵素化学的性質を検討した。しかしこの実験には発芽6日目の市販“リョクトウ”もやしをもちいた。もやしの褐変防止のため, 出荷にさいして薬品による漂白操作が普通に行われているが, それをさけるため, もやしは直接製造所よりもとめ, 子葉のみを酵素原料とした。

精製法は“ゴガツササゲ”もやしに準じた(第5表)が, 子葉から酵素を抽出するとき酢酸カルシウム液を使用し, また第1回目の塩析酵素液(透析ののち)を

第5表 “リョクトウ” もやしの α -アミラーゼの精製

操 作	容量 ml	糊精化 力/ml	収率 %
子 葉 (300 g)			
摩砕後 650 ml の酢酸カルシウム (1/100 M) を添加, 2 時間, 40° のち布ごし, ロ液をさらに ロ紙口通			
ロ液 (粗酵素液)	525	5.1	100
70°, (pH 5.6), 10 分間加熱 ロ通			
熱処理酵素液	490	5.7	104.3
硫酸アンモニウム添加 (0.55 飽和, pH 5.4)			
塩析物			
酢酸カルシウム (1/100 M) に たいして透析			
透析内液	68	20.6	52.3
塩析, 透析を反復			
透析内液	32	33.2	39.7
Duolite A-2 による脱色 (pH 5.8)			
脱色酵素液	35	23.4	30.6
硫酸アンモニウム (0.5 飽和) 塩析酢酸カルシウム (1/100 M) にたいして透析			
精製酵素液	7	113.2	29.6

第7図 リョクトウ α -アミラーゼのpH-安定曲線
—○— 30 分後 ……x… 20 時間後
試験条件は第4図に同じ。 第8図 リョクトウ α -アミラーゼにおよぼす EDTA の影響

…x… EDTA 処理酵素液 —○— 未処理酵素液
糊精化力/ml 6.8 (1/50 M, pH 4.4 酢酸緩衝液をふくむ) 3 ml
に 1/125 M EDTA 3 ml を加え, 25° に保った。

イオン交換樹脂 Duolite A-2 をもちいて脱色したことにより、高力価の酵素液がえられた。なお 70°, 10 分間の加熱処理は不純蛋白の除去に有効であった。しかし酵素をこのように精製しても、それによるデンプン分解反応においてヨウ素反応が消えたときのデンプン分解率は粗酵素液のそれと同じでいずれも 20% であった。

なお精製 α -アミラーゼの作用最適 pH (第6図), 安定 pH 範囲 (第7図), ならびに EDTA による酵素力の変化は“ゴガツササゲ”のそれとはほとんど差がなかった (第8図)。

考 察

マメ類の発芽にともなうアミラーゼの変遷は禾穀類のそれとはかなりことなっている。すなわち周知のようにコメ、ムギではその種子中にすでに豊富に β -アミラーゼが存在していて、発芽によりそれはさらに増加し、また α -アミラーゼは発芽によりあらわれ、しかも発芽とともに急激に増大する。しかしマメ類では豊富に β -アミラーゼを有していたのは“ダイズ”のみであった。しかし“ダイズ”でも発芽にともなうアミラーゼの変遷は禾穀類の場合とは少しことなり、発芽とともに α -アミラーゼはあらわれるが、 β -アミラーゼはむしろ減少した。

一方“リュクトウ”では α -アミラーゼのみが、また“ゴガツササゲ”では α および β 両アミラーゼが発芽とともにあらわれた。すなわち禾穀類の場合とことなり、マメの場合はその種類により出現するアミラーゼの種類ならびに酵素力の変化の方向がことなることがうかがわれる。

発芽により、 α および β -アミラーゼがみとめられる“ゴガツササゲ”もやしと、 α -アミラーゼのみがあらわれる“リュクトウ”もやしから、それぞれ α -アミラーゼを精製したが、それらの酵素化学的性質はほとんど同じで、しかも他起源の α -アミラーゼ⁽⁷⁾と同じようにカルシウム塩により耐熱性が増し、またカルシウム除去により失活した。 α -アミラーゼはその起源により蛋白構造をことにすると考えられるが、しかしマメ類 α -アミラーゼもカルシウムによって安定化される事実は種々の起源の α -アミラーゼがカルシウムを必要とする事実をいっそう普遍的にするように思われる。

要 約

(1) “ダイズ”をのぞきマメ類は発芽によってのみアミラーゼがあらわれた。“ゴガツササゲ”のもやしには α および β -アミラーゼが、“リュクトウ”もやしには α -アミラーゼのみがみとめられた。

(2) 精製した“ゴガツササゲ”もやしと“リュクトウ”もよしの α -アミラーゼはヨウ素反応が無色になるときのデンプン分解率は約 20% 附近で両者の間には差がなかった。

(3) 精製 α -アミラーゼの作用最適 pH は 5 で、pH 5 から 8 までの間は安定であって、なおこれらの α -アミラーゼは他起源の α -アミラーゼとおなじようにカルシウム除去剤の添加で酵素力を失った。

終りにのぞみ終始御親切に御指導を賜った大阪市立大学理学部教授福本寿一郎博士ならびに講師山本武彦博士に感謝の意を表する。

- (1) E. Ohlson, C.E. Uddenberg: *Z. physiol. Chem.*, **221**, 165 (1933).
- (2) 池宮正行: 本誌, **30**, 131, 135, 138 (1956).
- (3) 中山 包: 発芽生理学, 内田老鶴圃, p. 104 (1960).
- (4) 春日井愛子: 家政学雑誌, **3-4**, 6 (1953); **5-1**, 322 (1954); **5-3**, 413 (1954).

- (5) 春日井愛子: 本誌, **33**, 1111 (1959); **33**, 1115 (1959).
- (6) 福本寿一郎, 辻阪好夫: 科学と工業, **28**, 282 (1954).
- (7) T. Yamamoto, J. Fukumoto: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 68 (1959); **24**, 16 (1960).