

桑葉のアミラーゼに関する試験

長野縣蠶業試験場 松 村 季 美
春 日 卓 郎

緒 言

植物界に於ける諸種の酵素作用に就ては多く⁽¹⁾の試験研究が行はれて居るが、桑葉の酵素に就ては其報告せられたものが比較的少い。桑葉のアミラーゼに就ては鈴木博士(1901)⁽²⁾及柴田博士(1903)⁽³⁾が萎縮病の研究に於て健康は病葉に比してアミラーゼの作用が著しく劣つて居る事を報告せられて居るに止る。

著者(1933)⁽⁴⁾は家蠶に於ける遺傳的アミラーゼ四型の研究を續行するに及んで、桑葉のアミラーゼの作用を調査する必要を生じたから 1932 年の春夏秋の三期に亘りアミラーゼ作用に就て次の事項を試験した。

1. アミラーゼの最適 pH 價
2. アミラーゼの抗熱性
3. アミラーゼの作用温度
4. 食鹽のアミラーゼ作用に及ぶ影響
5. 葉位とアミラーゼ作用
6. 桑品種とアミラーゼ作用
7. 晝夜とアミラーゼ作用
8. 日照の多少とアミラーゼ作用
9. 濫採の有無とアミラーゼ作用
10. 新舊(貯藏温度並貯藏時間の長短)とアミラーゼ作用

以下是が成績を示さん。

A. 供試材料並試験方法

a. 供試材料

供試材料は何れも生葉を直径 0.6 cm の圓形に打抜たるものに就き一定重量を用ひし場合と、右の葉片一定數を用ひし場合と二つの方法によつた。比較すべき兩者の材料が切片の厚さに變異の大なる場合は前者の方法により、變異の小なる場合は後者の方法によつた。

柴田博士は酵素の試験材料として生葉の磨碎せるものに蒸溜水を加へて浸出液を作つて供試材料とせられたが右の方法は微弱なるアミラーゼ作用に就て澱粉の沃度反應試験を行ふに不便なる事から著者の場合は上記の方法を主として採用したが、場合によつては浸出液を用ひた。即生葉 50 gr を蒸溜水 300 c.c 中に入れ磨碎し 2.5°C 室に 24 時間浸出し後二重の晒木綿にて濾過したるものを用ふ。

b. 可溶性澱粉液

可溶性澱粉液としては小西製可溶性澱粉 0.05% の溶液を使用し、水素イオン濃度は pH 5.8 に調製した。

c. 酵素作用の測定

前記せる如く圓形打抜生葉片一定重量 (0.6 gr—1.2 gr)、若くは一定數 (500枚) を取り、之

を 0.05% 可溶性澱粉液の一定量 (10 c.c.—20 c.c.) に投じ、一定温度 (35° C) に一定時間 (1 時間—4 時間) 作用せしめたる後該溶液 2 c.c. を採り 1/20 N ルゴール氏液 0.2 c.c. を加へ澱粉の呈色反應の程度を別に調製せる比色計によつてアミラーゼの澱粉糊 精化並糖化作用の強弱を測定した。此際用ひし比色計は著者が (1930)⁽⁶⁾ 唾腺アミラーゼ測定に用ひしものと同様であつて比色計の番號の大なる程酵素作用の強きを示すものである。又澱粉糖化作用の測定には作用液 2 c.c. にフェリング氏液 2.5 c.c. 乃至 4 c.c. を加へ三分間乃至五分間煮沸し後之を微量沈澱計⁽⁷⁾ (先に体液及胃液アミラーゼの消長測定に使用せるもの) に移し一分間 3000 回の速度を以て十分間遠心し管底に生ぜる酸化銅の容量を讀取つた。眞の沈澱量は同時に試験せる對照區の沈澱量を差引いて求めた。其詳細は次の様である。

調査事項	實驗例	調査月日	供試材料	澱粉液	作用温度並時間	酵素作用の測定
最適 pH 價	A	九月廿七日	改良鼠返 5—8 葉目打拔生葉 0.8 gr	0.05%, 10 c.c.	35° C, 3 時間	澱粉糖花作用を沈澱計によつて讀取つた
	B	九月廿九日	改良鼠返 5—8 葉目浸出液 5 c.c.	0.05%, 15 c.c.	35° C, 3 時間	同
抗熱性	A	六月三日	島ノ内打拔生葉 500 枚	0.05%, 20 c.c.	35° C, 1.5 時間	澱粉糊精化及糖化作用を比色計により測定した
	B	六月七日	同	同	同	同
作用温度		九月九日	改良鼠返 5 葉目打拔生葉 0.8 gr	0.05%, 10 c.c.	5—45 C, 2 時間	同
食鹽の作用	A	七月十八日	改良鼠返 5—10 葉目打拔生葉 0.8 gr	0.05%, 20 c.c.	35° C, 2 時間	沈澱法による
	B	七月十九日	改良鼠返 5—10 葉目打拔生葉 0.8 gr	0.05%, 20 c.c.	35° C, 2 時間	同
葉位	A	六月四日	島ノ内 3—8 葉目打拔生葉 1.2 gr	0.05%, 20 c.c.	35° C, 1 時間	比色法による
	B	七月十七日	改良鼠返 1—25 葉目打拔生葉 500 枚	0.05%, 20 c.c.	33° C, 1.5 時間	沈澱計法による
	C	九月九日	改良鼠返 1—10 葉目打拔生葉 0.8 gr	0.05%, 20 c.c.	35° C, 2—4 時間	比色計による
桑品種	A	六月四日	打拔生葉 1.2 gr	0.05%, 20 c.c.	35° C, 1 時間	比色計法による
	B	七月十八日	同	同	同	沈澱計法による
晝夜	A	六月二日	島ノ内扶桑丸 3—5 葉目打拔生葉 500 枚	同	35° C, 1.5 時間	比色計法による
	B	六月五日	島ノ内扶桑丸軟葉及硬葉打拔生葉 500 枚	同	35° C, 2 時間	沈澱計法による
	C	七月十五日	改良鼠返 3—5 葉目打拔生葉 1.2 gr	同	同	比色計法による
日照の多少	A	六月一日	扶桑丸軟葉打拔生葉 500 枚	同	35° C, 2.5 時間	同
	B	七月十九日	改良鼠返 5—10 葉目打拔生葉 500 枚	同	35° C, 1.5 時間	沈澱計法による
	C	八月七日	甘樂桑二齡用桑打拔生葉 500 枚	同	同	同
澱採の有無		九月十八日	改良鼠返 1—5 葉目打拔生葉 500 枚	同	35° C, 2 時間	比色計法による
貯蔵の長短	A	七月廿二日	扶桑丸 10 葉打拔生葉 500 枚	同	35° C, 1.5 時間	沈澱計法による
	B	八月七日	甘樂桑二齡用桑生葉打拔 500 枚	同	同	同

B. 試験成績

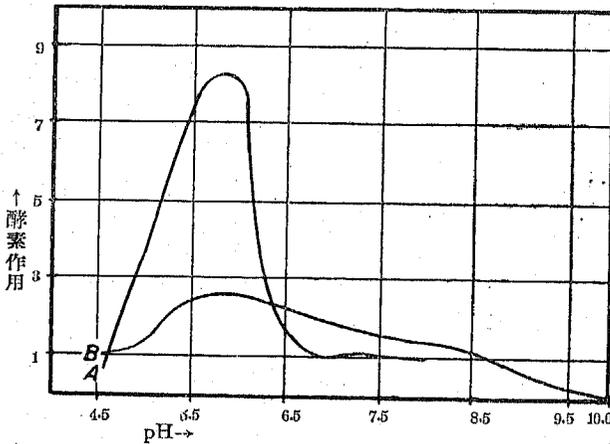
a. アミラーゼの最適水素イオン濃度

晩秋 (九月下旬) 期改良鼠返を使用した。試験液の pH は 4.6—7.0 迄はマクベン氏混液、

7.6—10 迄はクラーク及ルプス氏液を用ひて調製した。試験の結果は第一表に示すが如く桑葉アミラーゼの最適 pH は 5.8 附近にある。此價は從來桑葉の pH として示されて居る價と大体一致して居るのを見る。桑葉の pH は試験者により供試材料により、可成りの變動があるが、6.0 附近に在る⁽⁷⁾ (1928) 事よりして桑葉アミラーゼの最適 pH が桑葉夫自身の pH と一致して居る事が甚だ意義のあるものと云はねばならぬ。

又桑葉アミラーゼは pH9 以上では其作用を認め得難い事からして蠶兒の消化管内では桑葉中のアミラーゼは其作用を示し難いものと認めねばならぬ。是⁽⁸⁾蠶兒の消化液の pH は (1928) 9.5—10.0 の間に在る事が確められて居るからである。直接蠶兒消化液内に於ける桑葉アミラーゼの試験をして見たが(未發表)前記の豫想通りである事が明かとなつた。

第一圖



第一表 桑葉アミラーゼの最適 pH 價

A		B	
pH 價	酵素作用 (沈澱計 讀取)	pH 價	酵素作用 (沈澱計 讀取)
4.6	0.5	4.6	1.0
5.0	5.0	5.0	1.0
5.4	6.5	5.4	2.5
5.8	11.0	5.8	2.5
6.2	5.5	6.2	2.5
6.6	1.0	6.6	2.0
7.0	1.0	7.0	2.0
7.6	1.5	8.0	1.0
8.0	0.5	9.0	0.5
		10.0	0

b. アミラーゼの抗熱性

供試桑(品種鳥ノ内)を各目的温度の温水中に 30 分乃至 60 分浸漬したるものを用ひて試験せるに桑葉アミラーゼは 60° C 60 分、70° C 30 分に於て非働性となり、50° C 30 分に於て既に減弱するを見る。此關係は蠶の消化液アミラーゼの安定度に就て著者が⁽⁹⁾ (1928) 試験せる成績と類似して居るのを見る。

第二表 アミラーゼの抗熱性(比色計法)

水 温	浸漬時間											
	40° C		50° C		60° C		70° C		80° C		90° C	
	30分	60分										
實驗例 A	4.5	4.8	3.5	1.0	0.5	—	—	—	—	—	—	—
B	1.5	1.0	1.0	1.0	0.5	※	—	—	—	—	—	—

※ 欠調

アミラーゼ作用中温度の影響

供試材料改良鼠返の晩秋葉をとり 5° C より 45° C に至る種々なる温度に於て作用せしめたるに右温度の範囲内に於ては温度高きに従つて酵素作用大なるを示して居る。前表に示すが如くアミラーゼの安定度は 50° C 30 分に於て既に破るゝにより酵素作用の適温は(作用時間 1 時間以上で)先づ 50° C 以下と認むべく、第三表の示す所より綜合して 45° C 乃至 50° C の附近に在りと認むべきである。

d. 食鹽の影響

蠶の唾腺(1930) アミラーゼ⁽⁹⁾に於ては澱粉溶液内食鹽の有無が甚しき影響を及すを知つた。桑葉アミラーゼに於ては前者の如き顯著なる差異は認め難きも、食鹽の微量存在がアミラーゼの作用を促進せしめる事實は之を認めることが出来る。

第四表 アミラーゼに及す食鹽の影響
(沈澱計法)

實驗例 生理的食鹽 水添下量	供試材料	A	B
		10葉目	10葉目
0.2 c.c		3.5	
0.4 c.c		4.0	4.5
食鹽を添下せざるもの		3.0	3.6

は下位葉(比較的硬葉)に比して作用強いが、夏秋蠶葉に在つては上位葉(軟葉)に比して下位葉(硬葉)が作用強く中島氏の所謂完成葉附近に於て其作用が最も強い。

f. 桑品種とアミラーゼ作用

春蠶桑と夏蠶桑に就き山桑型、白桑型及魯桑型に就て比較せるに兩期共山桑型の島ノ内桑は格段の差を以てアミラーゼ作用が強いが其他の品種間では顯著なる差異を示さない。

蠶兒飼育成績(1932)⁽¹¹⁾に於て又分析結果(1930)⁽¹²⁾に於て島ノ内桑が特別優秀の成績を示して居り、特に炭水化合物及糖類含量の多いと云ふ點から考へても此アミラーゼ作用の強いと云ふ事が意味ある様に考へられる。

第六表 桑品種とアミラーゼ作用

實驗例 測定方法	供試材料	A		B		
		酵素作用(比色計法)		酵素作用(沈澱計法)		
		3葉目	6-8葉目	5葉目	10葉目	
桑品種 島ノ内 改良 伊甘扶	ノ 良 ノ 遠 扶	内 返 返 瀬 平 桑 丸	6.0	2.0	2.5	3.6
			1.5	1.0	1.5	2.5
			1.5	1.0	2.0	3.0
					1.8	3.0
		3.0	2.0			
		1.0	1.0	1.0	2.5	

第三表 アミラーゼ作用中温度の影響

作用時間 作用温度	酵素作用(比色計法)	
	2時間	4時間
5°C	—	0.5
15°C	0.5	1.5
25°C	1.0	3.0
35°C	1.5	4.0
45°C	3.5	4.0

e. 葉位とアミラーゼ作用

根刈桑葉は葉位によつて著しく其物理化學的性狀を異にし夏秋蠶桑葉に於て此關係顯著なる事は既に中島茂(1931)⁽¹⁰⁾氏によりて明かにせられて居る。従つて酵素作用に於ても春夏秋の桑葉により又葉位によつて差異あるべきを思はしめるが調査の結果によれば春蠶期に於ては上位葉(比較的軟葉)

第五表 葉位によるアミラーゼ作用

實驗例 測定方法 桑品種	A	B	C
	酵素作用(比色計法)	酵素作用(沈澱計法)	酵素作用(比色計法)
	島ノ内(春)	改良鼠返(夏)	改良鼠返(秋)
1葉目		1.0	1.5
3同	6.0	1.6	3.0
5同		4.5	4.0
7同	2.0	4.5	5.0
10同		5.0	
15同		4.0	
25同		2.0	

g. 晝夜とアミラーゼ作用

スエルベルグ氏(1922, 1923)⁽¹³⁾

の實驗によれば、葉のアミラーゼ作用は晝夜によりて差異を認めず、従つてアミラーゼ作用と澱粉量及砂糖量との間に一定の關係を認め得ないと云はれて居るが、著者の桑葉アミラーゼの場合では眞夜中では日中に比してアミラーゼ作用が強きを認めた。

第七表 晝夜とアミラーゼ作用

摘採時刻	A				B				C	
	酵素作用(比色計法)				酵素作用(比色計法)				酵素作用(沈澱計法)	
	鳥ノ内		扶桑丸		鳥ノ内		扶桑丸		改良鼠返	
	3葉目	5葉目	3葉目	5葉目	3葉目	5葉目	3葉目	5葉目	3葉目	5葉目
午後 6 時					3.5	3.0	3.0	1.0	1.0	2.0
午後 12 時	5.0	4.5	5.0	4.0	4.0	3.5	4.0	1.5	3.0	5.0
午前 6 時					3.0	2.0	4.5	1.5	1.0	2.0
午前 12 時	3.5	2.5	2.0	1.5	1.5	0.5	2.0	0.4	0.5	1.0

h. 日照の多少とアミラーゼ作用

日覆桑(日照不足桑)が正常桑に比して炭水化物殊に糖類の含量僅少なるは既報(1932)⁽¹⁾せるが如くであるが、アミラーゼ作用に於ても日覆桑は正常桑に比して劣つて居る。

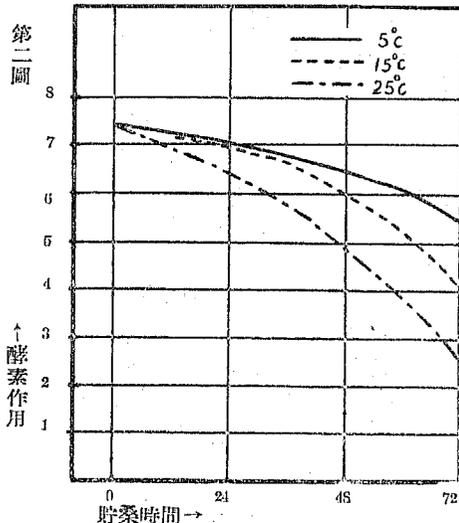
第八表 日照の多少とアミラーゼ作用

日照の多少	実験例		
	A	B	C
	酵素作用(比色計法)	酵素作用(沈澱計法)	酵素作用(沈澱計法)
対照桑	3.5	2.5	7.5
日照不足桑	1.0	2.0	5.0

ざるものに比して遙かに劣つて居るのを見る。

j. 貯桑とアミラーゼ作用

桑葉 5°C 乃至 25°C の範圍に於て 24 時間乃至 72 時間貯藏して葉中アミラーゼ作用の如何を比較せる結果によれば同一貯藏溫度では其時間長きに從ひ、又同一貯藏期間では貯藏溫度高きに從つて酵素作用の減少するのを認めた。



i. 濫採の有無とアミラーゼ作用

同一枝條よりの採葉回数多きに從つて該枝條に成育せる桑葉の飼料的價値減少するは空頭病の發生原因試験によつても明かになつて居るがアミラーゼ作用も濫採桑は然ら

第九表 濫採の有無とアミラーゼ作用

摘採回数	実験例		
	酵素作用(比色計法)		
	1葉目	3葉目	5葉目
2回	4.0	4.0	5.0
6回	2.0	3.0	3.5

第十表 貯桑とアミラーゼ作用(沈澱計法)

貯桑時間	実験例					
	A			B		
	5°C	15°C	25°C	5°C	15°C	25°C
0時	4.6	4.6	4.6	7.5	7.5	7.5
24同	4.5	4.3	2.5	7.0	7.0	6.5
48同	3.8	4.0	3.0	6.8	6.5	5.0
72同	3.8	3.5	2.8	5.5	4.0	2.5

綜 括

- I. 春夏秋蠶根刈仕立桑葉のアミラーゼに就き次の事項を試験した。
1. 最適 pH 價 2. 抗熱性 3. 作用溫度 4. 食鹽の影響 5. 葉位
 6. 桑品種 7. 晝夜 8. 日照の多少 9. 濫採の有無
10. 貯桑の長短（溫度及時間）
- II. 其成績は次の様である。
1. アミラーゼの最適 pH は 5.8 附近である。9.0 以上では作用殆ど認め得ぬ。蠶兒の消化液の pH は 9.5—10.0 であるから消化管内では桑葉のアミラーゼは非働性であると認め得る。
 2. アミラーゼは熱に對する安定度は稍々大であるけれども 50° C, 30 分の接觸によりて影響を受け 60° C, 60分、70° C, 30分の接觸によつて全く非働性となる。
 3. アミラーゼ作用中の溫度は 5° C 乃至 45° C の範圍に在つては作用中の溫度高きに從つて酵素作用が盛んである。
 4. 食鹽の微量存在はアミラーゼの作用を活潑ならしめる。
 5. 葉位によつてアミラーゼの作用に差異がある。春蠶桑葉に於ては軟葉は硬葉に比して（第三葉は第五葉乃至七葉に比して）酵素作用が強いが、夏秋蠶桑葉では軟葉は硬葉に比して（上位葉は下位葉=25 葉程度迄に比して）酵素作用が弱い。
 6. 桑品種に於て島ノ内桑は春夏を通じて特にアミラーゼ作用が強いが、其他の供試品種間（春。島ノ内、伊達市平、鼠返、改良鼠返、甘衆桑。夏。島ノ内、鼠返、改良鼠返、一ノ瀬、扶桑丸）では大差は無い。
 7. 眞夜桑は日中桑に比してアミラーゼ作用が強い。
 8. 日照不足桑は正常桑に比してアミラーゼ作用劣る。
 9. 濫採桑は否らざるものに比しアミラーゼ作用が弱い。
 10. 貯桑溫度高く貯桑時間長きに從つてアミラーゼ作用は減少する。

文 獻

1. Waksman and Davison (1926) Enzymes p. 95—105
2. 鈴木梅太郎 (1901) Diastase 化糖素に就て 萎縮病調査報告 No. 5 p. 441—444
3. 柴田 桂太 (1903) 健葉及病葉中の Diastase 萎縮病調査報告 No. 7 P. 436—445
4. 松村 季美 (1933) 家蠶に於ける遺傳的 Amylase 四型に關する研究
日本蠶絲學雜誌 vol IV. No. 2 p. 168—170
5. 同 (1930) 家蠶に於ける唾腺 Amylase 作用 蠶絲學雜誌 vol. II No. 2 p. 142—145
6. 同 (1926) 家蠶の血液及胃液に於けるアミラーゼ並チロシナーゼ作用の消長に就て
長野縣蠶業試驗場報告 No. 1 p. 14
7. 勝又 藤夫 (1923) 家蠶の体液及消化液の水素イオン濃度に關する研究(第二回報告)
食下桑葉に差異ある場合に就て 蠶業新報 No. 416 p. 154—156 417 p. 313—320
8. 同 (1928) 家蠶の体液及消化液の水素イオン濃度に關する研究(第一回報告)
健蠶及軟化病蠶に就て 蠶絲學雜誌 vol 1 No. 1 12—34
9. 松村 季美 (1928) 溫度の酵素作用に及ぶ影響に就て〔溫度の蠶に及ぶ影響に關する研究〕
長野縣蠶業試驗場報告 No. 6 p. 9—12
10. 中 島 茂 (1932) 桑葉の生長に伴ふ理化學的變化並其飼料的價値
長野縣蠶業試驗場報告 No. 14 p. 2—64

11. 松村季美、中島茂、金崎真英及北島正生 (1932) 空頭性軟化病蠶發生原因に関する研究
長野縣蠶業試験場報告 No. 24 p. 38—39
12. 中島茂 (1930) 夏秋期稚蠶用桑の化學成分 蠶絲科學講演集第三輯 p. 252—253
13. Sjöberg (1922, 1923) Beiträge zur Kenntnis der Amylase in Pflanzen. Biochem. z. 133. Ibid. 139,
Ibid., 142

(昭和八年十月三十日受理)

On Leaf Amylase of the Mulberry Leaves

Suemi MATSUMURA and Takuroh KASUGA

(Received Oct. 30. 1933)

Résumé

Concerning the leaf amylase of the mulberry leaves, a few reports were found. Dr. U.Suzuki (1901) and Dr. K.Shibata (1903) touched leaf amylase in their investigations on the cause of dwarf-disease of the mulberry leaves, and found that sick leaves showed more diastatic power than healthy ones.

In the course of their investigations on the four types of hereditary amylase activity in the body fluid and the digestive juice of the silkworm, (*Bombyx mori* L.) the present authors found it necessary to have clearer knowledge about the leaf amylase of the mulberry leaves, and studied the enzyme activities in relation to the following factors:—

- a). Optimum pH. b). thermostability. c). optimum temperature. d). influence of NaCl salt. e). degree of the maturity of the leaves. f). species difference. g). day and night. h). leaves exposed to sun shine and shaded ones. i) normal leaves and those grown after several times gatherings. j). time and temperature of the storage of the leaves. The results thus obtained are as follows.
1. The optimum pH for the action of the leaf amylase lies near 5.8.
2. 60°, 60 minutes or 70° 30 minutes totally destroy leaf amylase. 50° 30 minutes reduce the enzyme action remarkably.
3. The optimum temperature for the action of leaf amylase comes between 40° and 50° C.
4. The Presence of small amount of NaCl salt, exerts a favorable effect upon the amylase activity.
5. There are found some species differences in the amylase activity. Shimano-uchi always shows more amylolytic power than Fusōmaru, Kanrasō, Kairyō-nezumigaeshi, and Ichinose.
6. Much more amylase is found in tender leaves than matured ones in Spring, but quite contrary in Autumn.
7. Mid-day leaves contain less amylase than mid-night ones.
8. Leaves sheltered from sun shine for long time, show less amylolytic power than normal ones.
9. Leaves grown after several times gatherings contain more amylase than normal ones.
10. The longer the time and the higher the temperature of the storage of the leaves, the less becomes the enzyme action of leaf amylase.

(Nagano Sericultural Experiment Station, Japan).