

豇豆に関する研究

(其の五) 豇豆の Urease 及 Catalase について

清水純夫・上島 肇・梅村 弘

(信州大学農学部農産化学研究室)

Studies on Vigna plants

Part V. Urease and Catalase of Vigna beans

Sumio Shimizu, Hazime Kamizima, and Hiroshi Umemura

(Agric. Chem. Lab. of Shinshu University)

Urease は植物界に広く分布している SH 基を含む酵素であるが、なかでも大豆、刀豆、南瓜、西瓜等の種実によく含有されていることは、竹内¹⁾、Kiesel²⁾ Fosse³⁾ Matler and Marshall⁴⁾ Damodarau⁵⁾ Sumner⁶⁾ 北川⁷⁾ 石丸の諸氏によつて既に報告されてゐる。豇豆の Urease に関しては未だ報告を見ないが、北川氏⁷⁾ は刀豆の Urease を研究し、タチナタマメ (A)、アカナタマメ (B)、シロナタマメ (C) ハマナタマメ (D) の Urease の含有量の多少は (A) > (B) > (C) > (D) の順であるが、栽培地を異にするとときはこの順序を異にすることがあると述べてゐる。

著者等は前報に於て報告した如く⁹⁾ 豇豆には各種の作物型がみられ、又化学成分も品種によつては著しい差違の存在することが認められたのであつたが、今回はこの豇豆の品種作物型グループ間に於る Urease の活性度の差違ならびにこれら豇豆類の Urease 含有量を既に報告されている「大豆」「小豆」「菜豆」及び「豌豆」等の Urease に比較して、その量的関係の面から豆類中に於る豇豆の位置を推定せんと試み若干の知見を得たのでその結果を報告する。

尙 Urease 作用の測定と同時に同一試料について Catalase の活性度についても測定した。それは分析された試料の活性状態を判定する一助となるものと考へられるからである。

I. 実験方法

(1) 試料の説明

分析に用いた豇豆は既述の方法⁹⁾で1951年信大農学部農場に均一栽培したものにつきよく揃つた完熟種実を金属の影響を避けて石臼を用いて品種別に出来るだけ均一に粉碎したものを試料として1952年9月~12月までの間に測定を行つた。

(2) Urease 作用測定

Urease の活性度を測定する方法としては種々報告されているが¹⁰⁾、我々は尿素の分解によつて生ずるアンモニヤ瓦斯を 40°C. に於て一定減圧で吸引する Euler の方法¹¹⁾ に準じ $\frac{N}{100}$ H₂SO₄ 液中に吸収せしめる方法によつた。対照実験は 3% H₂SO₄ で作用を停止させた酵素液を含む尿素基質液から同一条件のもとに生ずるアンモニヤ瓦斯を控除して、Urease の activity を $\frac{N}{100}$ H₂SO₄ に吸収された $\frac{N}{100}$ NH₃ の cc を以て表示することにした。

(3) Catalase 作用の測定法

Catalase の活性度測定は、用いた一定量の基質 H₂O₂ が、酵素液によつて分解される量を $\frac{N}{20}$ KMnO₄ 滴定によつて求める方法によつた。¹⁰⁾ 尙別に 1:3 H₂SO₄ にて作用を止めた酵素液による場合をブラ

ンクとして前の値より控除し、分解された H_2O_2 量に相当する $\frac{N}{20} \text{KMnO}_4$ の cc を以てその作用の強さを表示することとした。

II. 豇豆 Urease 及び Catalase の測定条件

(1) Urease

(i) 豇豆 Urease の抽出条件について

Urease の抽出法としては 2% アラビヤゴム液を用いる方法に従い、その抽出時間及び抽出温度についてその品種間の作用比較に対しての影響を知るための基礎として次の如き実験を行つた。即ち試料豇豆粉末 5g に 2% アラビヤゴム液 15cc を加へ、所定の定温槽中に一定時間別に攪拌抽出した後遠心分離して得られる上澄を酵素液とする。反応は Sørensen Buffer (pH=7.0) にて基質尿素の含量を 3% としたものを 1cc に酵素液 1cc を加へ 20 時間作用せしめる。この際トルオール 1~2 量を加へる。後 3% H_2SO_4 にて作用を停止し、前述の方法で尿素分解によつて生じたアンモニヤを定量した。これにより得られた Urease の activity に及ぼす抽出時間及び温度の影響は 第 1 及び 第 2 図の如くであつた。

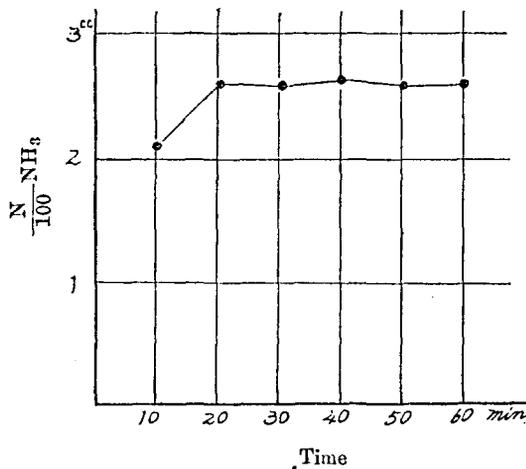


Fig. 1.—Effect of Extraction time on urease activity

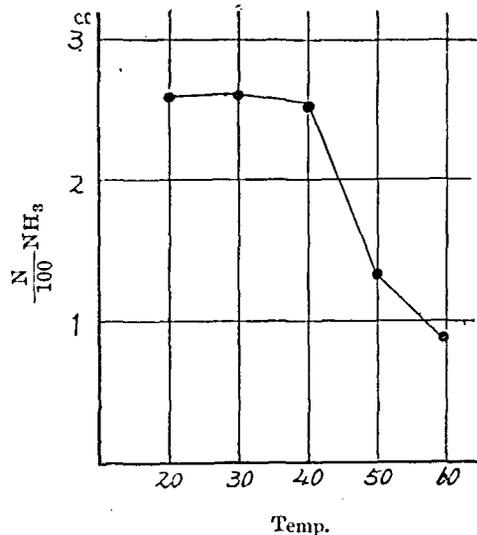


Fig. 2.—Effect of Extraction temperature on urease activity

即ちこの結果によれば豇豆ウレアーゼの 2% アラビヤゴム液抽出に於ては抽出時間は 20 分で、抽出温度は 20°C. で充分と考へられる。以下の実験はこの条件によつて行つた。

(ii) 豇豆 Urease の反応条件について

(a) 反 応 時 間

Sumner によると Urease の反応は一次反応であつて作用力 f は時間 t に対して $f = kt$ (k は恒数) で表示される。即ち分解によつて生ずるアンモニヤ瓦斯の量は反応時間に対して直線的であると報告されている。本実験に於る酵素液は豇豆の水性抽出による粗抽出液をそのまま実験に用いているので、この条件に於る反応時間の影響を実験した結果は第 1 表、第 3 図の如くであつた。

第 3 図によれば豇豆の水性抽出による粗酵素液の場合に於ても畧直線的に反応していることを知る。

Table 1.—Decomposition Velocity of Vigna bean Urease

React. time	Decomp. $\frac{N}{100} NH_3$ cc	React. time	Decomp. $\frac{N}{100} NH_3$ cc
1.5 h	0.25 cc	11.5 h	1.40 cc
3.5	0.49	13.5	1.54
5.5	0.85	15.5	1.93
7.5	1.00	17.5	2.04
9.5	1.25	19.5	2.46

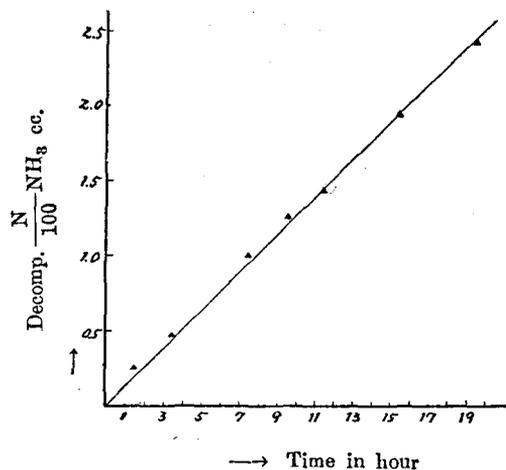


Fig. 3.—Reaction Velocity of Vigna bean Urease

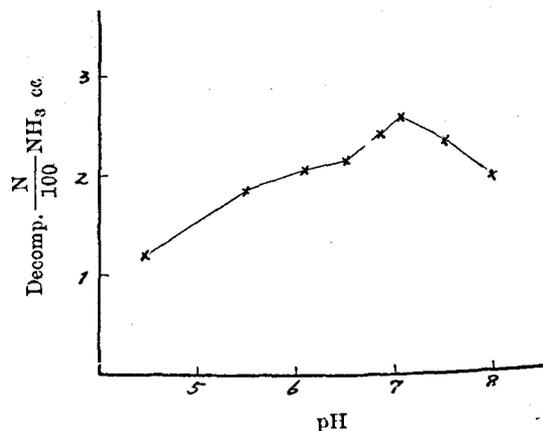


Fig. 4.—Effect of pH on Urease activity

下記の品種間の差違を目的とす本実験に於ては、反応時間を 20 時間とすることにした。

(b) 反応最適水素イオン濃度及び最適温度、前述の抽出法による酵素液 1 cc に種々の pH の Sørensen buffer (この中に尿素 3% を含む) 1 cc を加へ、20°C. の恒温槽中に 20 時間保つた後、分解により生じたアンモニヤ量は第 4 図の如くであつた。この結果によると pH 7.08 が最大である。これは大豆及び刀豆の Urease は pH 7.0 で最もすみやかに尿素を分解するという定説と略一致している。同様に調製した反応液を pH 7.0 に於て 20 時間一定の温度の恒温槽中にて反応させた場合のアンモニヤ生成量は第 5 図の如くであつた。

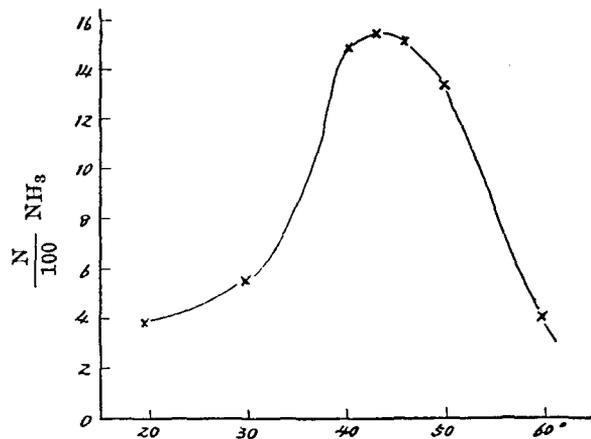


Fig. 5.—Effect of Temp. on Urease activity

この結果によれば、豆 Urease の最適温度は 43°C. 附近にあるものと考えられる。Sumner は Urease は多くの植物性酵素の如く可成り高い至適温度をもつてをり、短時間の反応では 65°C. 附近であると述べている。しかし本実験は酵素液が水性抽出液で他の物質と共存することと反応時間を 20 時間という長時間に作用させたためにやゝ低い 43° が至適温度という結果になつたものと考えられる。

(2) Catalase

i) 豆 Catalase の抽出条件について

豆 Catalase の抽出の最適条件及び抽出条件の差違が Catalase 活性度の測定にどれ程の差違を生ずるかを知るため、試料豆粉 5 g に蒸留水 100 cc を加へ一定時間一定温度に於て抽出し、乳状液を遠心分離し、上澄液を酵素液として 1 cc 用い、之に $N/20$ H_2O_2 10 cc buffer solution (Sørensen pH = 6.8) 5 cc を加へ、一定温度中に反応させて一定時間後に 1:4 H_2SO_4 で反応を停止し、 $N/20$ $KMnO_4$ で滴定する方法によつた。抽出温度を $25^\circ C$. とし、抽出時間を変化したる場合の H_2O_2 分解を反応時間をかへて滴定した結果は第 6 図の如くであり、30 分抽出と 2 時間抽出の間には殆んど差が認められず、30 分で充分であると考へられる。抽出温度は抽出時間を 30 分として作用温度を $25^\circ C$. とした場合の反応速度として第 7 図の如き結果が得られた。この結果によれば、 0° 抽出が一番強力であるけれども、本実験の範囲では $25^\circ C$. との間に大差が認められないので $25^\circ C$. で抽出することとした。従来報告によると出来るだけ低温抽出の方が活性を失はないと述べられているが、本実験の如く同一条件に於る多数品種比較という場合には零度抽出よりも実験操作の便宜上の点から 25° 抽出処理を行つた。⁸⁾

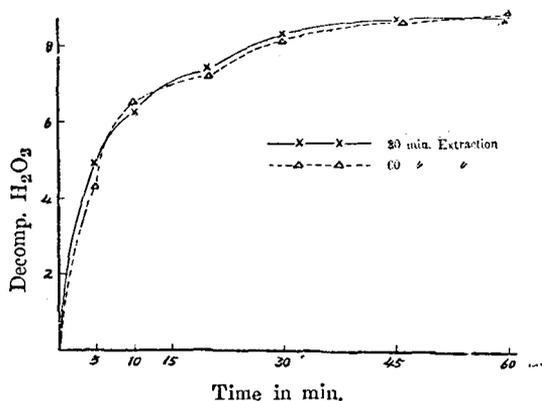


Fig. 6.—Effect of Extraction (on) time/Catalase Activity H_2O_2 10 cc + Buffer Sol. (pH 6.8) 5 cc + Enz. Sol. 1 cc ($25^\circ C$)

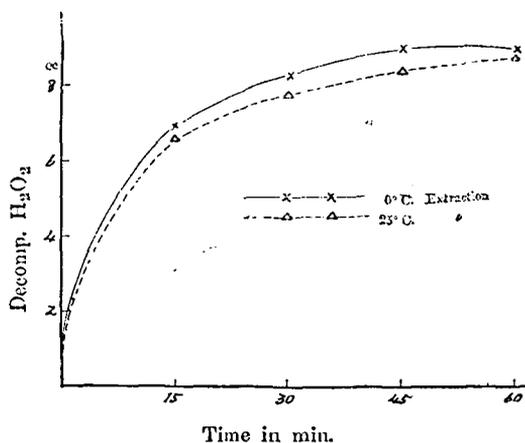


Fig. 7.—Effects of Extraction Temp. on Catalase activity. H_2O_2 10 cc + Buffer Sol. (pH 6.8) 5 cc + Enz. Sol. 1 cc

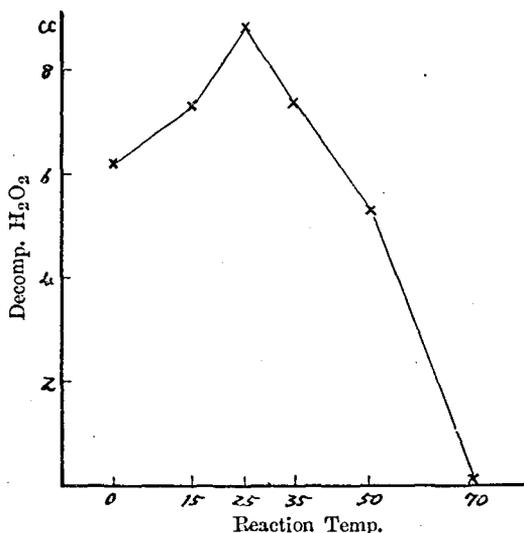


Fig. 8.—Effect of Reaction Temp. on Catalase activity (Reaction hour 30 min.)

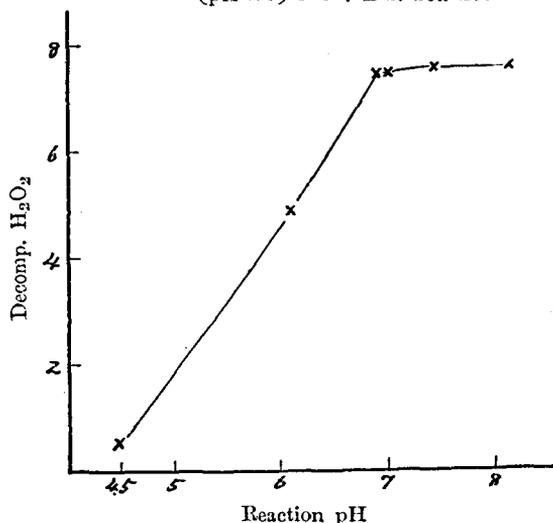


Fig. 9.—Effect of Reaction pH on Catalase activity (Reaction Temp. $25^\circ C$ Reaction hours 15 min.)

(ii) 豇豆 Catalase の反応条件について

反応時間は 第6,7図 の結果によれば 30 分区と 60 分区との間に於る差は僅かであり, 反応温度は 第8図の結果からみると 25°C が至適と考へられる. 25°C での反応に於る pH の影響は第 9 表の結果によれば 6.8, 7.4, 8.2 と中性から微アルカリの間に差は僅かで酸性側では作用は減少している. この

Table 2.—Urease and Catalase activity of Vigna seeds

No.	Groups	Name of varieties	Urease	Catalase
1	I	蔓 性	3.2	0.98
2		金 時 (長)	2.8	0.87
3		オ カ メ	3.2	0.94
4		白 (榜)	3.0	0.91
5	II	奴	4.0	0.95
6		中 黒	2.2	0.95
7		赤 斑	2.5	0.97
8		鶉 (東)	1.7	0.91
9		金 時 (神)	2.1	0.94
10		サ サ ゲ	2.3	0.96
11		小 豆	0.9	0.98
12		白 (神)	2.1	0.96
13		ウヅラ (神)	2.3	0.95
14	III	褐 色 (内)	2.0	0.95
15		褐 色 (友)	2.2	0.96
16		淡 茶	1.5	0.95
17	III	黒 (東)	1.4	0.91
18		黒 (神)	3.2	0.92
19		米 豆	2.3	0.95
20	V	大 長	3.1	0.98
21		長 豆	1.9	0.97
22		長 江	3.9	0.94
23		長 紅	2.9	0.96
24		三 尺	2.6	0.97
25		早 16	2.5	0.97
26		赤 16	2.6	0.98
27	VI	南 海	3.3	0.96
28		セレベスサラサ	2.6	0.95
29		カウビーキチ	2.6	0.95
30		カウビーハブ	3.0	1.00
31	VII	美 人 豆	2.8	0.97
32		黒 (長)	3.0	0.96
33		琉 球	2.0	0.96
34		金 時 (東)	1.4	0.96

註: Catalase はカウビーハブを 1.00 としたときの各品種の相対値

結果は近末氏の報告と一致している.⁸⁾

下記の品種比較実験に於ては上述の結果から pH 6.8 の buffer solution を用い, 25°C で 1 時間反応させる方法により行つた.

II. 豇豆品種間の Urease 及び Catalase の活性度

前記の方法で 34 品種の豇豆種実につき Urease 及び Catalase の活性度を測定した結果は第 2 表の通りであつた. この結果に依れば, Catalase の差は僅少であつて, 調製貯蔵中の変化は大體同一の経過をたどり特記する様な変化はなかつたものと想像される, これに対し Urease の方はその分散は Catalase の場合より大であるが, 作物型 7 グループ別の間に於る F 表検定のための計算は第 3 表の如くであつて, 即ちこの検定によれば, 豇豆品種グループ間に於る Urease の活性度については有意な差を認めえないという結論に達する. Vitamin B₁ の含量の著しく大であつた美人豆, 米豆についても, 風味良好でない Cowpea 類の如きも Urease の面からは大差が認められず, 従つて既報の蛋白含量との間に北川氏がナタマメの場合に認た如き明らかな関係は見られない.⁷⁾

III. 豇豆と他の豆類との Urease 活性度の比較

豇豆 34 品種のグループ間に於てその Urease 及び Catalase については差を認め難かつたのであるが, 同年度に栽培した「大豆」「小豆」「菜豆」「豌豆」等の他種の豆類との比較を試みた結果は第 4 表の如くであつた.

この結果によると、Urease については豇豆類と「大豆」「小豆」との間には著しい差が認められるが、「大豆」と「小豆」との間の差は僅小である。Catalase に於ては大豆は少しく小さいが、「小豆」と「豇豆」とは近似している。この点からすれば、Urease の測定は「豇豆」と「小豆」との区別に充分利用出来ると考へられる。

「豇豆」と「菜豆」との Urease は大差なく、「豌豆」はやゝ小さい値を示している。一方 Catalase の方は「豇豆」「菜豆」は殆んど同一であり、豌豆が極めて僅少である。この点我々の実験に用いた試料は調製貯蔵中に変異があつたかとも考へられる。豇豆各品種は同一圃場で均一栽培を行つた試料であるが、「大豆」「小豆」「菜豆」「豌豆」は豇豆と同年度産であるが厳密には均一の栽培でないこの点は將來の研究によつて検討されねばならないと考へる。

本実験の範囲内に於ては Urease の面からみれば「大豆」と「小豆」は相近く、豇豆はむしろ「菜豆」に近く、外観的には「小豆」に近似する豇豆品種もあるが「小豆」と「豇豆」の間は可成距離があるものと考へられる。

Table 3.— Analysis of Variance for Urease activity

Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Variance	Variance ratio
Between groups	3.41	6	0.57	1.26
Residual	12.29	27	0.45	
Total	15.70	33		

$$F_{27}^6(0.05) = 2.47$$

Table 4.— Urease activity of various beans

Kinds	Varieties	Urease	Catalase
豇 豆	平 均	2.50 ± 0.47	1.00
大 豆	晚 生 黒 先	92.5	
	銀 白	92.2	0.70
小 豆	中 納 言	89.5	1.00
菜 豆	衣 笠	1.2	1.01
豌 豆	米 国 大 莢	1.7	
	兵 庫 大 莢	0.8	
	日 本 絹 莢	0.7	0.15

註：Catalase は豇豆を 1.00 した場合の相対値

V. 摘 要

1) 豇豆 34 品種につき Urease の活性度を測定したが、既に報告した 7 型の作物型分類群間に F 表検定では有意の差は見られず Catalase も殆んど大差を認めなかつた。

2) 豇豆の Urease を「大豆」「小豆」のそれに比較すると、我々の実験の範囲内では約 $1/40$ にすぎず、「菜豆」「豌豆」との差は僅小であつた。従つて豇豆の若干の品種は外観的には「小豆」と類以点の認められるものもあるが、Urease の面からすれば「小豆」と「豇豆」類の距離は遠く、「豇豆」はむしろ「菜豆」に近いという結果を得ている。

3) 豇豆に於る Urease activity と蛋白含量との関係は北川氏がナタマメの場合に認た如くには明らかでなかつた。

文 献

- 1) J. College Agric. Tokyo Imp. Univ. 1, 1 (1909)
- 2) Z. physiol. chem. 75, 169 (1911)
- 3) Ann. Inst. Pasteur 30, 739 (1916)
- 4) J. Biol. chem. 28, 297 (1916)
- 5) Biochem. J. 31, 1041 (1937)
- 6) The Enzymes (1951) Vol. I, Part 2, 873
- 7) 九大学芸 8, 192, 293 (1939)
- 8) 三重大学農学部学術報告 No. 7, 128(1953)
- 9) 信州大学紀要 No. 2, 221(1952)
- 10) 化学実験学 (1946) 第 2 部 河出書房 12, 716
- 11) Biochem. Z. 183, (1927) 1

Résumé

In previous reports (part II) some relation between the chemical components and the type of plant forms was found. In this paper we first studied the Urease activity of 34 vigna bean varieties. (Table. 2.) But the variance between groups was not significant. (Table. 3.)

Secondly we compared the Urease activity of Vigna beans with that of other beans. Urease activity of Vigna bean was about one fortieth as strong as that of Soy bean and Azuki bean but there was not any significant difference between Kidney bean and Vigna bean. (Table. 4).