

# 発芽過程におけるトウモロコシ種子中のデンプン代謝に及ぼす乳酸菌発酵産物の影響

美濃 羊輔<sup>1</sup>・木嶋 伸行<sup>1</sup>

(受理 : 1991年 5月31日)

Effects of fermentation product by *Lactobacillus acidophilus* on starch metabolism in germinating seeds of corn

Yosuke MINO and Nobuyuki KIJIMA

## 摘 要

乳酸菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 発酵代謝産物の発芽過程におけるトウモロコシ (*Zea mays* L. cv. Jelly bantam) 種子中のデンプン代謝に及ぼす影響を調べた。種子を上記の産物をカーボングラファイトに吸着させたもの (LC) で粉衣した。無処理種子を対照とした。種子を胚乳、胚盤、および胚軸 (根と芽) の3つの部位に分け、それぞれの部位につき $\alpha$ -アミラーゼ、 $\beta$ -アミラーゼ、枝切り酵素、ホスホリラーゼおよびインベルターゼ活性を測定した。結果は下記の通りである。

- 1) LC処理により、胚乳中のデンプンの分解が促進された。
- 2) LC処理により、胚乳における $\alpha$ -アミラーゼおよび $\beta$ -アミラーゼ活性は増加した。しかし、胚盤および胚軸においてはLC処理と無処理の間に殆ど差異はみられなかった。
- 3) LC処理により、胚乳における枝切り酵素および全ての部位におけるホスホリラーゼ活性は増加した。
- 4) LC処理により、胚軸におけるインベルターゼ活性は増加したが、胚乳と胚盤においてはLC処理と無処理の間に差異はみられなかった。

上記の結果から、LC処理による発根および地上部の生育促進の一因として、胚乳中の活発なデンプンの分解および胚軸中のインベルターゼ活性の増加が考えられる。

キーワード : トウモロコシ, 乳酸菌発酵産物, デンプン代謝

## 緒 論

約20年前、乳しょうと海藻の抽出物を用いて乳酸菌 (*Lactobacillus acidophilus*) を培養し、得られた発酵産物をカーボングラファイトに吸着させたもの

(LC) がアメリカで開発された<sup>5)</sup>。現在、日本でもLCが市販されるようになり実用化が進んでいる。すでに、丸本<sup>1)</sup> は水稲や他の植物に対し、美濃ら<sup>3)</sup> は飼料作物に対しLCが発根を促進することを明らかにした。また、美濃<sup>2)</sup> はトウモロコシにおいてLCが発根

<sup>1</sup> 帯広畜産大学環境植物学研究室 (080 北海道帯広市稲田町)

<sup>1</sup> (Laboratory of Environmental Botany, Department of Agro-environmental Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, 080, Japan)

のみならず、地上部の生育をも促進することを観察した。しかし、その作用機構については未だ明らかにされていない。その一助として、本研究ではLCが発芽過程におけるトウモロコシ種子中のデンプン代謝に係わる諸酵素の動態にどのような影響を及ぼすかを調べた。

## 材料と方法

### 供試作物およびLC処理

トウモロコシ (*Zea mays* L.) の一代交雑品種ゼリーバンタムの種子を用いた。種子重の1/300のLCを種子に粉衣した。

### 栽培方法

播種床として、直径12cm、深さ10cmのプラスチック容器内に黒色火山灰土を約5cm入れたものを用いた。これに、LC処理種子と無処理種子を別々に12粒づつ播種した。2つの播種床を一組として、3反復とした。暗所、25℃に置き、1日1回蒸留水で灌水し栽培した。

### デンプンの定量

栽培した24個の植物体から生育の旺盛な20個体を選り、水道水で十分洗った後、種皮および尖帽部を除去した。さらに、種子を胚軸（幼根と幼芽）、胚乳および胚盤の3つに分け、80℃にて48時間乾燥した。

デンプンの定量は胚乳と胚盤のみにつき行った。乾燥させた試料を乳鉢を用いて、50mlのアセトン溶液中で摩砕した。摩砕物を濾過し得られた残渣100mgに蒸留水8mlを加え10分間加熱した。冷却後、酵素液2mlを加え4時間反応させた。酵素液として0.3mMのCaCl<sub>2</sub>を含む40mlの酢酸緩衝液(0.2M, pH 5.5)に0.2gの $\alpha$ -アミラーゼ(*Bacillus subtilis*製)および0.4gの $\beta$ -アミラーゼ(*Glycine hispida*製)を溶解したものを用いた。反応終了後10分間煮沸し、酵素を失活させた。反応液を濾過し、濾液を蒸留水で4倍に希釈した。その濾液6mlに5% ZnSO<sub>4</sub>・0.3mM Ba(OH)<sub>2</sub>を順次それぞれ1ml加え除蛋白した。除蛋白液2mlにつき、Somogyi-Nelson法<sup>7)</sup>にて還元糖量を測定した。

### 粗酵素液の調節

前述の方法にて分けた種子の3つの部分について粗酵素液を調製した。それぞれの部位をホモジナイザーを用いて20mlの蒸留水中で摩砕した。摩砕物に20mlの蒸留水を加えた後濾過した。濾液を遠心分離(0℃, 10分, 8,000×g)し、得られた上清20mlを蒸留水に対して24時間透析した。透析液に蒸留水を加え80ml

に定容した。これを粗酵素液として用いた。

### 全アミラーゼ活性の測定

反応混液として3mlの粗酵素溶液に1%の可溶性デンプンを含む3mlの酢酸緩衝液(0.5M, pH 4.3)を加えたものを用いた。28℃にて1時間反応させた後、10分間煮沸により反応を停止させた。反応混液中に生成された還元糖の量をSomogyi-Nelson法<sup>7)</sup>にて測定した。

### $\alpha$ -アミラーゼ活性の測定

反応混液として、3倍に濃縮した3mlの粗酵素溶液に1%可溶性デンプンと0.1mM HgCl<sub>2</sub>を含む3mlの酢酸緩衝液(0.5M, pH 4.3)を加えたものを用いた。28℃にて3時間反応させた後、上記と同様の方法にて反応を停止させた。反応混液中に生成された還元糖量をSomogyi-Nelson法<sup>7)</sup>にて測定した。

### $\beta$ -アミラーゼ活性の測定

全アミラーゼ活性から $\alpha$ -アミラーゼ活性を差し引いたものを $\beta$ -アミラーゼ活性とした。

### 枝切酵素活性の測定

反応混液として、3倍に濃縮した3mlの粗酵素溶液に0.1%のプルランを含む3mlの酢酸緩衝液(0.2M, pH 7.0)を加えたものを用いた。これに防腐剤として2~3滴のトルエンを加えた。28℃にて24時間反応させた後、上記と同様の方法にて反応を停止させた。反応混液中に生成された還元糖量をSomogyi-Nelson法<sup>7)</sup>にて測定した。

### ホスホリラーゼ活性の測定

反応組成は2mlの粗酵素溶液に、0.1mM HgCl<sub>2</sub>、10mM モリブデン酸アンモニウム、0.025%可溶性デンプンおよび75mMのグルコース-1-リン酸を含む酢酸緩衝液(0.2M, pH 5.8)を加えたものとした。28℃にて15分間反応させた後、上記の方法にて反応を停止させた。冷却後反応混液に1mlのヨード試薬を加え、蒸留水で10倍に希釈した後濾過した。この濾液の660nmにおける吸光度を測定し、ホスホリラーゼ活性とした。

### インベルターゼ活性の測定

反応混液として、3mlの酵素液に0.5%のショ糖を含む酢酸緩衝液(0.2M, pH 5.0)を加えたものを用いた。28℃にて1時間反応させた後、上記と同様の方法にて反応を停止させた。反応液をN-NaOHにて中和後、生じた還元糖量をSomogyi-Nelson法<sup>7)</sup>にて測定した。

結 果

デンプン含量

図1にデンプン含量の変化を示した。胚乳では、処理後2日目にはLC処理と無処理との間に差異はみられなかったが、5日目ではLC処理は無処理の約2/3に減少した。胚盤では胚乳に比べていずれの時期にもデンプン含量は低かった。処理後2日目にはLC処理と無処理との間に殆ど差異はみられなかったが、胚乳同様5日目ではLC処理は無処理の約2/3に減少した。

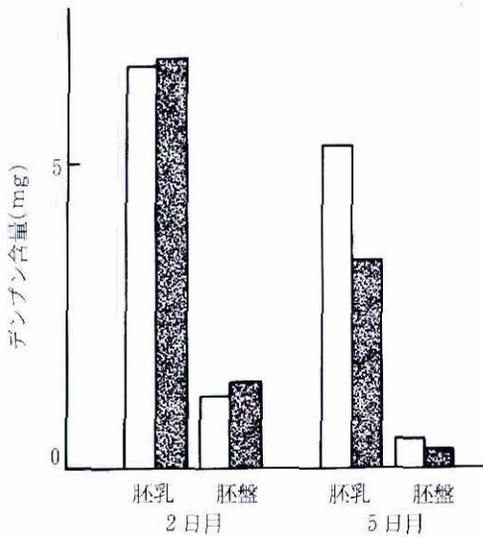


図1 デンプン含量の変化  
□無処理 ■LC処理

α-アミラーゼ活性

図2にα-アミラーゼ活性の変化を示した。α-アミラーゼ活性は胚乳、胚盤ともに処理後LC処理が無処理より常に高い値で推移した。特に、胚乳ではLC処理は4日目以降も増加したのに対し、無処理は減少した。

図3にβ-アミラーゼ活性の変化を示した。β-アミラーゼ活性は胚乳において、LC処理が2日から3日目にかけて無処理より増加した。しかし、それ以降は定常状態となり両処理間に差異はみられなかった。胚盤においてはLC処理が常に無処理より高い値で推移した。胚軸においてはLC処理と無処理の間に殆ど差異はみられなかった。

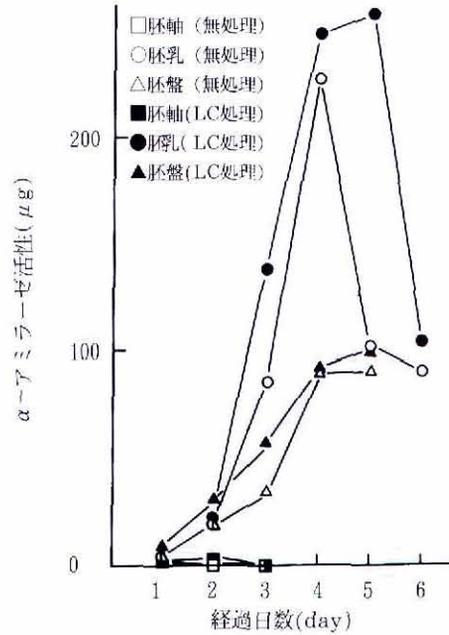


図2 各部位のα-アミラーゼ活性の変化

酵素活性は生成された還元糖量 (μg/ml)で表した。

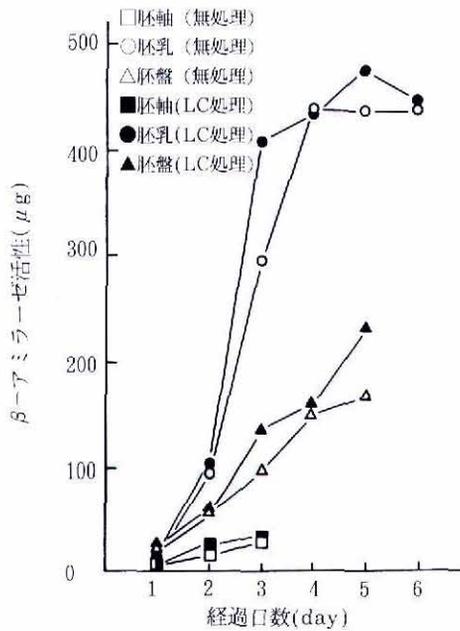


図3 各部位のβ-アミラーゼ活性の変化

酵素活性は生成された還元糖量 (μg/ml)で表した。

図4に枝切り酵素活性の変化を示した。枝切り酵素は胚乳においてLC処理が常に無処理より高い値で推移した。胚盤では逆にLC処理の方が若干低い値で推移した。胚軸においてはLC処理、無処理ともに殆ど活性がみられなかった。

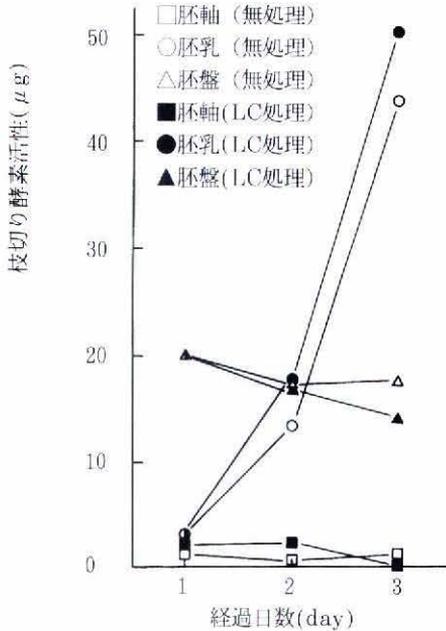


図4 各部位の枝切り酵素活性の変化

酵素活性は生成された還元糖量 ( $\mu\text{g/ml}$ ) で表した。

図5にホスホリラーゼ活性の差異を示した。3日目のホスホリラーゼ活性は若干ながらLC処理が無処理より3つの部位すべてにおいて高かった。

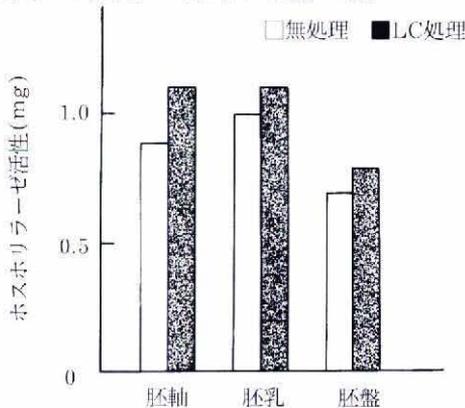


図5 ホスホリラーゼ活性の変化

ホスホリラーゼ活性は播種後3日目に測定した。酵素活性は生成されたデンプン量 ( $\text{mg/ml}$ ) で表した。

図6に示したように、胚軸においてインベルターゼ活性はLC処理の方が無処理より高い値で推移した。胚乳と胚盤はLC処理、無処理ともにインベルターゼ活性は殆ど認められなかった。

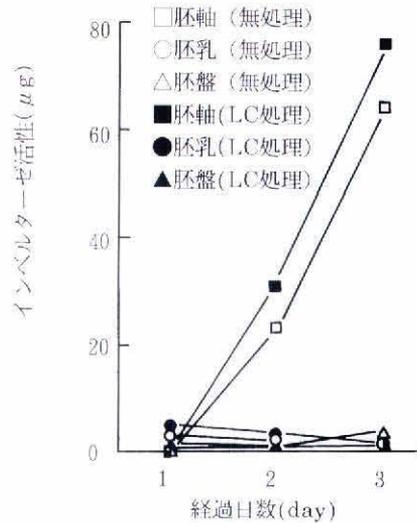


図6 各部位のインベルターゼ活性の変化

酵素活性は生成された還元糖量 ( $\mu\text{g/ml}$ ) で表した。

## 考 察

トモロコシ種子をカルバック粉衣剤 (LC) で処理すると、発根や地上部の生育が促進されることが明らかとなっている<sup>1-3)</sup>。しかし、その機構については何ら解明されていない。そこで、本実験ではトモロコシ種子中の貯蔵養分、主としてデンプンに着目し、LC処理がデンプン代謝にどのような影響を与えるかを調べた。

図1に示したように、LC処理により、特に、胚乳中デンプンの分解が促進された。この現象を解明するために、デンプンの分解に関与する諸酵素の活性の変動を追跡した。特に胚乳中の $\alpha$ -アミラーゼ活性はLC処理により4日日以降も増加したのに対し、無処理は4日目から激減した(図2)。また、胚乳中の $\beta$ -アミラーゼ活性はLC処理により3日目に無処理より若干高くなったが、4日日以降はほぼ定常状態となり両者間に殆ど差異はみとめられなくなった(図3)。枝切り酵素活性はLC処理の方が無処理より若干高い値で推移したが、 $\alpha$ -および $\beta$ -アミラーゼ活性と

比較するとその活性はかなり低かった(図4)。ホスホリラーゼ活性については3日目のみしか調べていないが、LC処理の方がすべての部位で若干高い値を示した。しかし、両者間に著しい差異があるとはいえない。これらの結果を総合すると、LCで処理した胚乳中におけるデンプン分解の促進は、主として $\alpha$ -アミラーゼ活性の増加に起因するものと考えられる。中村<sup>4)</sup>は大麥種子の発芽過程におけるデンプン代謝を調べ、デンプン粒の分解には $\alpha$ -アミラーゼが主役であり、 $\beta$ -アミラーゼは $\alpha$ -アミラーゼと共存する時のみ作用すると報告している。

本実験においては、それぞれの酵素を分画せずに用いた。したがって、厳密にはいえないが、デンプンの分解量と酵素活性の相関からみる限り、トウモロコシの胚乳においても $\alpha$ -アミラーゼが主役を演じているものと推定される。また、新家<sup>6)</sup>は発芽過程における大麥種子中の $\beta$ -アミラーゼの増加は潜在型酵素の活性化によるものとしている。しかし、本実験でみられた $\beta$ -アミラーゼの増加が同様の機構によるのかどうかは今後の研究に待ちたい。従来<sup>1)</sup>の報告によれば、ホスホリラーゼはデンプン粒の分解に関与しないものとされている<sup>9)</sup>。先にも述べたように、LC処理により各部位ともにホスホリラーゼ活性が増加した。しかし、この増加が実際にデンプンの分解に係わっているのかどうか今後の重要な課題となろう。

丸本<sup>1)</sup>は本乳酸菌発酵代謝産物(FPL)の中にサイトカイニンおよびオーキシン様物質の存在は認めているものの、ジベレリン様物質の存在については報告していない。種々の発芽種子において、胚盤で作られるジベレリンが $\alpha$ -アミラーゼの合成を誘導することが知られている<sup>10)</sup>。また、ジベレリンは吸水後2日ころから出現し、それに $\alpha$ -アミラーゼ活性の変動が対応するとされている。本実験において、2日目の $\alpha$ -アミラーゼ活性はLC処理と無処理の間に差異がみられなかった(図2)。このことは、FPL中にジベレリン様物質が存在しないことを示唆するものである。したがって、2日目以降の $\alpha$ -アミラーゼ活性の増加はFPL中のある成分による直接的なものではなく、むしろ間接的にジベレリンの合成促進を介して、行われるものと考えられる。

一般に、貯蔵器官でデンプンが分解されると、その後主としてショ糖の形で新しく生長する芽はえに送られるといわれている<sup>9)</sup>。本実験においてインベルター

ゼ活性がLC処理の方が無処理より高く推移することが明らかとなった(図6)。このことは、主として胚乳から送られてきたショ糖がLC処理された胚軸において、より活発に分解されることを示唆している。したがって、LC処理による根および地上部の生育促進の一つの理由として、胚乳中におけるデンプンの分解および胚軸におけるショ糖の分解促進が考えられる。しかし、トウモロコシ種子中にはタンパク質や脂質も含まれている。したがって、今後これらの貯蔵養分の代謝におよぼす影響についても調べ、総合的にその機構を解明する必要がある。

## 謝 辞

本実験を遂行するにあたり、野中佐知子嬢に多大な協力を頂いたことに心から謝意を表します。

## 引 用 文 献

- 1) 丸本卓哉(1988). 山口大学農学部学術研究報告 35: 58.
- 2) 美濃羊輔(1990). カルバックのトウモロコシの初期生育に及ぼす影響. 帯広畜産大学環境植物学研究室.
- 3) 美濃羊輔・藤間 充・村田有美子・横山和成(1991). 日草誌 37: 283.
- 4) 中村道徳(1978). 化学と生物 16: 626.
- 5) PEER, H. R. (1976). Cultured whey product and process for producing the same. United States Patent office NO. 3, 497, 359.
- 6) 新家 龍(1972). 化学と生物 10: 426.
- 7) SOMOGYI, M. (1952). J. Biol. Chem. 195: 19.
- 8) 鈴木 怒(1972). 植物生理学講座2. 代謝生理. 古谷雅樹ら編. 朝倉書店. 東京. p. 43.
- 9) TSAI, C. Y. and D. E. NELSON(1968). Plant Physiol. 43: 103.
- 10) VARNER, J. E. (1964). Plant Physiol. 39: 413.

## Summary

Effects of fermentation product by *Lactobacillus acidophilus* on starch metabolism in germinating seeds of corn (*Zea mays* L. cv. Jelly bantam) were examined. The seeds were coated

with carbon graphite (LC) to which the fermentation product was adsorbed. Non-treated seeds were used as control run. The seeds were separated into endosperm, scutellum and axis (radicle + shoot). Enzyme activities involved in starch and sucrose metabolism were examined. The results were summarized as follows.

- 1) Decomposition of starch in the endosperm was enhanced by LC treatment.
- 2)  $\alpha$ -Amylase and  $\beta$ -amylase activities in the endosperm were increased by LC treatment, while those in the scutellum and axis were not.
- 3) Debranching enzyme activity in the endosperm and phosphorylase activities in three parts were increased by LC treatment.
- 4) Invertase activities in the axis were increased by LC treatment, while the activity in the endosperm or scutellum treated with LC was almost the same as that in control run, respectively.

From these results it is inferred that growth enhancement of radicle and shoot by LC treatment is due partly to active decomposition of starch in the endosperm, together with increase in invertase activity in the axis.