

小麦の吸水，発芽に及ぼすアンモニアの影響

中村 泰彦，新納 登喜子*，平田 陽子**

(1992年10月7日 受理)

Effects of Ammonia on the Imbibition and Germination of Wheat

Yasuhiko NAKAMURA, Tokiko NIRO and Youko HIRATA

A 30 min soaking of wheat in ammonia water resulted in a marked decrease in the percent germination of the wheat. The carbonates and hydroxides of alkaline metals and amino compounds did not decrease the percent germination though the pH of the solutions was similar to or a little higher than that of the ammonia water. Ammonium salts had no effects on the germination. The inhibition of germination by ammonia water did not occur when wheat was soaked after first 30 min imbibition. The wheat soaked in ammonia water imbibed normally but α -amylase activity did not appear in the wheat during 50 hr imbibition.

1. 緒 言

アンモニアやアンモニウム塩は古くから食品添加物として食品の加工や調理に利用されている。アンモニアについては，凍り豆腐の調理時の膨潤・軟化を良くする目的で，製造の最終工程でその蒸気で飽和させることがある¹⁾²⁾。この場合，製品中のアンモニアの残存量は0.05～0.1%²⁾といわれている。一方，アンモニウム塩は1剤式または2剤式合成膨張剤として菓子製造に使用されており，一部はふくらし粉として家庭でも使われている。また，ある種のアンモニウム塩は醸造用材として清酒の製造の際に添加される。アンモニアおよびアンモニウム塩の生物に対する作用は，それが分子かイオンかによって異なり，分子の形では微生物に対する殺菌作用³⁾，植物における生育障害⁴⁾，人における代謝毒性・中毒⁵⁾など生命現象にとって有害な面が大きい。しかし，イオンの形では，多くの微生物や植物は生きていくための窒素源としてこれを利用することができるし，動物でも，条件によってはアミノ酸合成のための材料として使われることが知られている。ある系で，

鹿児島大学教育学部家政科

*現在 鹿児島県立奄美高等学校

**現在 日本ブレインウェアトラスト

アンモニアが分子形とイオン形のどちらが多くを占めるかは存在環境の pH によって決まり、初期条件によって一義的に定まってしまうものではない。したがってアンモニアおよびアンモニウム塩の生物に対する作用を試験するにあたっては、pH が重要な意味を持つてくる。

著者は先にアンモニアの小麦粒殺菌剤としての使用について報告したが、同時にアンモニアが小麦の発芽力を低下させることを認めた。発芽は、休眠状態にある組織が吸水を契機にして細胞分裂を再開する過程であり、吸水による膜の構築、酵素の合成・活性化など生命活動にとって基本的に重要なプロセスを含んでいるので、これらのプロセスの阻害が生物に対する有害作用の要因として疑われる場合の実験材料として適している。ここでは、アンモニアの発芽阻害作用を分子形と作用時期を中心に検討した。

2. 実験材料および方法

(1) 小麦

実験には、前年度産の品種オマセコムギを使用した。小麦は厚手のポリエチレン袋に入れて5℃に保存しておき、使用に際して、表面に傷やしわの認められる粒、変色している粒、特に大きい粒および小さい粒は取り除いた。

(2) 試験液への浸漬

小麦2g (50~60粒) を250ml容の広口のポリプロピレンびんに採り、20℃の試験液80mlを加え、手で30秒間振って粒表面の気泡を除き、ただちに20℃の恒温器中の往復振とう器にかけ、容器の底に沈んだ小麦が緩やかに動く程度に振とうした。所定時間後に、小麦をステンレス製茶こしに空け、蒸留水を30秒間吹きつけて粒表面に付着した残留液を洗い流した後、ろ紙に挟んで表面の水を吸い取った。

(3) 発芽試験

No.2のろ紙3枚を敷いた直径9cmのシャーレに、0.05M MES 緩衝液 (pH 6.5) 8mlを加えてろ紙を湿らせ、この上に2g (保存状態の乾燥小麦の重量で。以下同じ。) の小麦を並べて25℃のインキュベーター中に保った。3日後に粒外に幼根の現れているものを発芽個体とし、その全体に対する割合 (%) を発芽率とした。試験は3~10回繰り返し行った。

(4) アンモニアの定量

あらかじめ冷やした乳鉢に小麦2gを採り、乳棒ですばやく粒を押しつぶし、これに氷冷した0.05N 塩酸10mlと海砂少量を加えて十分にすりつぶした。冷水90mlを加えてときどきかき混ぜながらしばらく放置した後、上澄を定量用ろ紙でろ過した。ろ液を10倍に希釈して Solórzano ら⁵⁾ のインドフェノール・ブルー比色法で定量した。

(5) アミラーゼの抽出⁶⁾ と活性測定⁷⁾

小麦2gを蒸留水または0.1Nの試験物質の溶液に(2)の方法で90分間浸漬処理した後、(3)の方

中村, 新納, 平田: 小麦の吸水, 発芽に及ぼすアンモニアの影響

法で所定時間インキュベーター中に置いた。この小麦に 0.05N 塩酸10mlと海砂少量を加え, 乳鉢ですりつぶし, 37°Cに1時間置いた後, ハイフロースーパーセル (ナカライテスク製) を敷いた吸引ろうとでろ過したものを酵素抽出液として用いた。希釈した酵素抽出液0.5mlに, 0.05M酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解した1.2%の可溶性デンプン溶液 5 mlを加え, 30°Cで10分間反応させた後, その0.5mlを 0.1N 塩酸 5 ml中に移し反応を停止させた。この混合液0.5mlに, 0.005%ヨウ素-0.05%ヨウ化カリウム溶液 5 mlを加えて発色させ, 660nmの吸光度を測定した。 α -アミラーゼ活性は, 酵素液を加えた場合の吸光度 D' , 酵素液の代わりに蒸留水を加えた場合の吸光度 D , 酵素の希釈率 n から, 式 $n(D-D')/D$ により求めた。

3. 結果および考察

0.1Nのアンモニア水および同じ濃度の他の塩基およびアルカリ性の塩の溶液に小麦を30分間浸漬処理したときの発芽率を Table 1 に示した。アンモニア水への浸漬により小麦の発芽率は著しく低下したが, pHがアンモニア水と同程度かやや高い炭酸ナトリウム, 炭酸カリウム, アミノプロ

Table 1. Effects of alkaline solutions on the germination of wheat

Solute	Soak solution		Germination (%)
	Concentration (M)	pH	
K ₂ CO ₃	0.05	11.46	100
Na ₂ CO ₃	0.05	11.39	100
Tris	0.10	10.55	99
Aminopropanol	0.10	11.53	98
NH ₄ OH	0.10	11.23	30
KOH	0.10	13.16	84
NaOH	0.10	13.14	99

Soak time : 30 min

Table 2. Effects of ammonium salts on the germination of wheat

Solute	Soak solution		Germination (%)
	Concentration (M)	pH	
NH ₄ Cl	0.10	5.12	100
NH ₄ NO ₃	0.10	5.33	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05	5.30	100
(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄	0.05	6.30	100

Soak time : 30 min

パノールの溶液では発芽の抑制は見られなかった。さらにアルカリ性の強い水酸化ナトリウム、水酸化カリウムの溶液でも、このような浸漬条件下では、発芽率の低下は見られないかごくわずかであった。一方、アンモニウム塩は同じ条件下で、小麦の発芽をまったく抑制しなかった (Table 2)。このことは、アンモニア水浸漬による発芽の抑制がそのアルカリ性やアンモニウムイオンによるものではなく、アンモニア分子そのものの作用の結果であることを示唆している。

アンモニア水の濃度と浸漬時間の影響を Fig. 1 に示した。アンモニア濃度が 0.05N のときは60分間浸漬でも発芽率は 77% と比較的高いが、0.1N では 4%、さらに 0.2N では 1% と著しく低下した。また、0.2N のような高い濃度では20分間という短時間の浸漬でも発芽率は20%程度にまで低下することが示された。

小麦を水に浸漬したとき、小麦粒に最初に起こる変化は言うまでもなく吸水である。吸水が十分でなければ、発芽は抑制される。そこで、アンモニア水への浸漬によって、小麦粒の吸水が阻害されるかどうか試験した。結果は Fig. 2 のように、25時間までの吸水は、水や他の発芽を阻害しないアンモニウム塩、アルカリ性の塩とまったく変わらなかった。25時間以降、アンモニア水浸漬小麦は吸水が緩やかであるのに対して、他は吸水量が著しく増加した。これは発芽を抑制されていない小麦では、幼根、幼芽の伸長とそれに続く生長のためにあらたな水分吸収が開始されるからである。

次に吸水開始後のどの段階でアンモニアが小麦の発芽過程を阻害するかを確かめるために、吸水開始後0時間から2.5時間の間で小麦をアンモニア水に30分間浸漬して、発芽状況を調べた。結果を

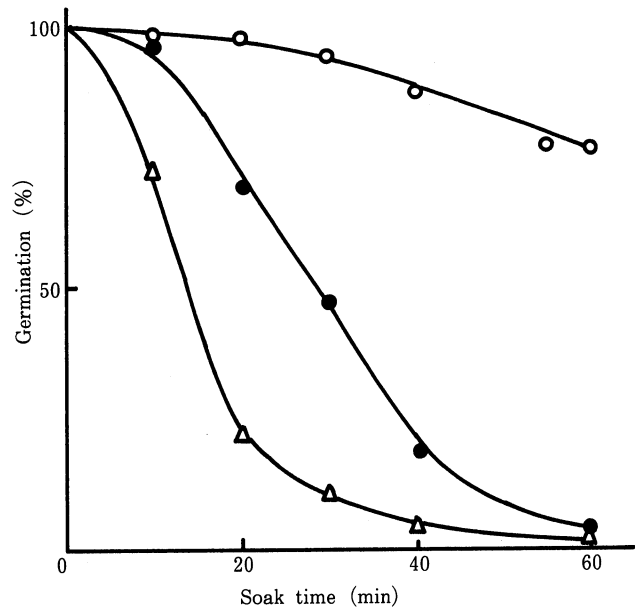


Fig. 1 Effects of soak time and the concentration of ammonia on germination
○, 0.05N; ●, 0.1N; △, 0.2N.

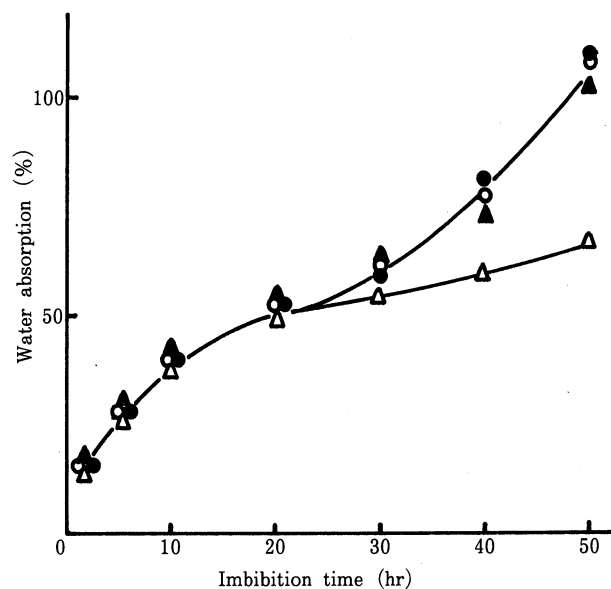


Fig. 2 Water absorption of wheat after soak treatment
Soak time: 90 min.
△, NH₄OH; ○, NH₄Cl; ▲, Na₂CO₃; ●, Control (H₂O).

中村, 新納, 平田: 小麦の吸水, 発芽に及ぼすアンモニアの影響

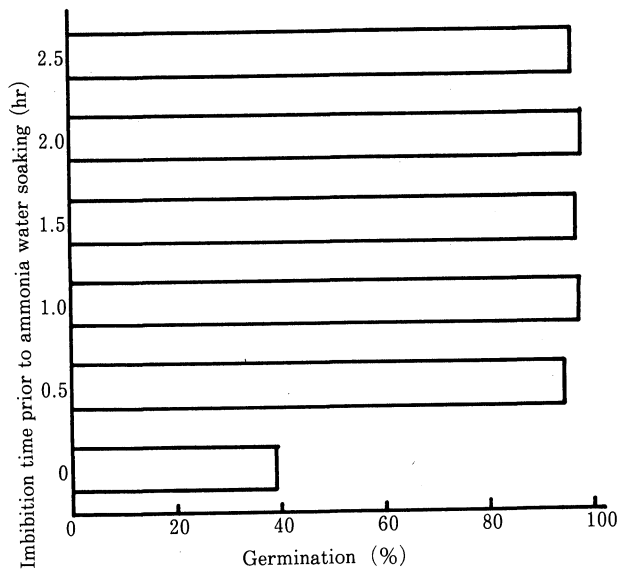


Fig. 3 Relationship between the time of imbibition elapsed and the inhibitory action of ammonia

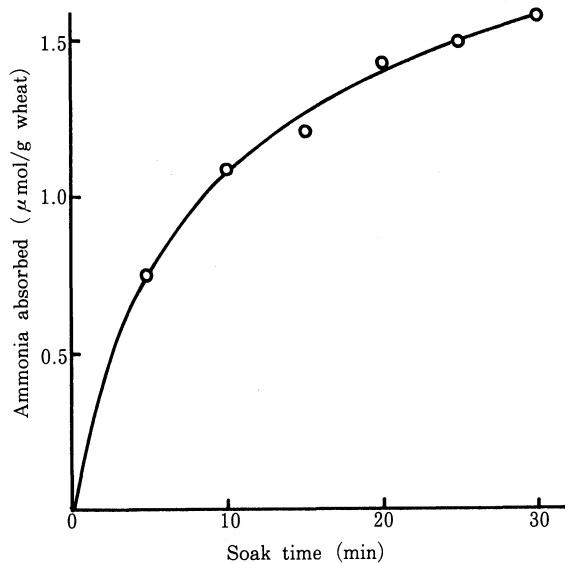


Fig. 4 Permeation of ammonia into wheat grains on soaking in ammonia water after first 30 min imbibition
Soak solution: 0.1N ammonia.

Fig. 3 に示した。吸水開始と同時にアンモニア水を作作用させると発芽は強く抑制されたが、吸水開始から30分以上経過して作用させた場合にはほとんど抑制しなかった。吸水30分以降ではアンモニア水による発芽阻害が起こりにくい理由として、アンモニアが種子内部に浸透しにくくなるからではないかということが考えられる。そこで小麦を蒸留水に30分間浸漬した後アンモニア水に浸漬したときの、小麦粒内のアンモニアの量を測定した。Fig. 4 に示したように吸水30分後でも、吸水させていない小麦の場合と同じように、アンモニアは小麦粒内に浸透していることがわかった。ただし、浸透したアンモニアが単に細胞間隙に保持されているのか細胞膜を透過して細胞内部に入ったかはこの実験結果からは明らかでない。しかし分子状のアンモニアはアンモニウムイオンと違って選択透過性を維持している膜をも自由に透過すること、pHと解離定数から計算すると実験条件下ではアンモニアの99%が分子として存在すると考えられることから、吸収されたアンモニアの一部は細胞内にまで浸透しているものと予想される。

Crofts⁹⁾は、アンモニアの脱共役作用に関連して、アンモニア分子はプロトプラスト膜を自由に通って内部に入り、

膜内の H^+ を結合してアンモニウムイオンとなり、膜内外の H^+ の濃度差を低下させるとしている。 H^+ の濃度差の解消は H^+ -ATPase による ATP の合成を不能にし、その結果 ATP を必要とする酵素の新規合成は阻害されるであろう。発芽力のある小麦胚では吸水の初期段階でポリリボゾームの形成が顕著に見られ、それと並行してアミノ酸の取り込みが上昇することが認められている¹⁰⁾。さらに、このようなポリリボゾームの形成は、ATP を外部から添加してやれば、小麦胚からの抽出

液でも起こることが観察されている¹¹⁾。Obendorf¹²⁾らは、小麦種子内の ATP は吸水後30分で5倍になり、1時間で10倍に達し、以後15時間はこのような高い ATP レベルが維持されると報告している。Fig. 3の、アンモニア水浸漬による著しい発芽阻害が起こる時期は、ATP が急激に増加する時期と一致している。小麦のアンモニア水への浸漬の場合にも、アンモニアが脱共役剤として働き、吸水初期の ATP の十分な蓄積をできなくしているとする、この時期的な一致は説明できる。

小麦の発芽過程で働く酵素の中で、活性の増大が著しく、かつ発芽の進行に重要な酵素は α -アミラーゼである。そこで、アンモニア処理した小麦粒の発芽過程での α -アミラーゼ活性の変化を測定した。結果を Fig. 5 に示した。水や塩類溶液浸漬小麦では、浸漬後25時間で α -アミラーゼ活性の急激な上昇が見られるが、アンモニア水浸漬小麦ではまったく上昇しなかった。アンモニア水浸漬小麦が、発芽過程で進行していく一連の生化学的変化の中で、少なくとも α -アミラーゼの合成以前の段階で、決定的な

損傷を受けていることが推測できる。発芽過程には多くの酵素が関与しており、それらは時間的に相互に関連しながら発芽のタイムスケジュールの中で必要な物質の合成、分解を行っている。そのような流れの中では、1つの酵素の合成あるいは活性化の阻害は以降の過程で作用する酵素の活性発現を不能にするであろう。 α -アミラーゼの出現は吸水開始から25時間後であるが、発芽阻害が大きいのは吸水開始後30分程度までであることからすると、 α -アミラーゼ出現の抑止は別の初期過程の阻害の結果である可能性が強い。それが初期の ATP 合成の段階であるか、あるいはそれ以外の段階であるかを明らかにするには発芽過程をさらに細かく区切って検討することが必要である。

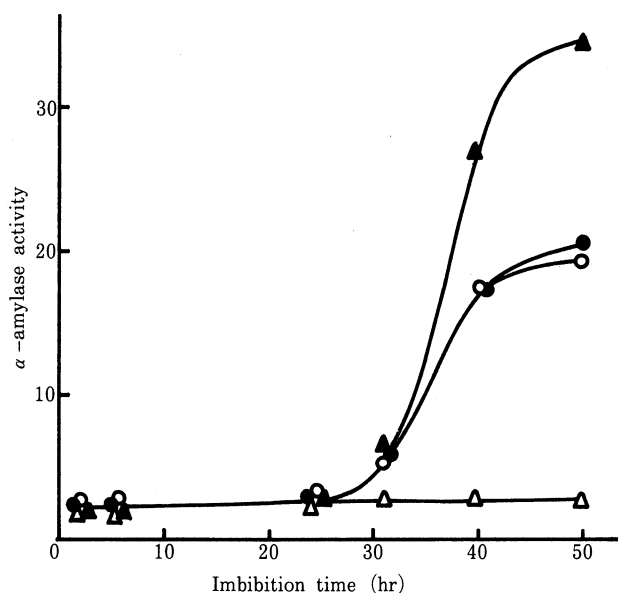


Fig. 5 Emergence of α -amylase activity in the wheat soaked in different soak solutions
Soak time: 90 min. Δ , NH_4OH ; \circ , NH_4Cl ; \blacktriangle , Na_2CO_3 ; \bullet , Control (H_2O).

4. 要 約

短時間の浸漬処理で、アンモニア水は小麦の発芽率を著しく低下させた。pH がそれより高いアルカリ金属の炭酸塩および水酸化物、さらにアミノ化合物は発芽を阻害しなかった。アンモニウム塩は、発芽をまったく阻害しなかった。アンモニア水による発芽阻害は、小麦の吸水開始後30分以降に作用させた場合には認められなかった。アンモニア水は小麦の吸水に影響しなかったが、 α -

中村, 新納, 平田: 小麦の吸水, 発芽に及ぼすアンモニアの影響

アミラーゼ活性の出現を抑制した。

文 献

- 1) 桜井芳人, 斉藤道雄, 東秀雄, 鈴木明治編: 総合食料工業, 恒星社厚生閣 (1975) p. 316
- 2) 石館守三, 谷村顕雄監修: 第五版食品添加物公定書解説書, 廣川書店 (1987) p. D-81
- 3) 中村泰彦: 家政誌, 41, 67 (1990)
- 4) 環境汚染物質の医学・生物学的影響に関する委員会編 (松下秀鶴, 井村伸正訳): 環境汚染物質の生体への影響19 アンモニア, 東京化学同人 (1989)
- 5) L. Solorzano: *Limnology and Oceanography*, 14, 799 (1969)
- 6) 二国二郎編: デンプンハンドブック, 朝倉書店 (1961) p. 275
- 7) 中村道徳, 鈴木繁男編: 澱粉科学ハンドブック, 朝倉書店 (1977) p. 261
- 8) A. R. Crofts: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24, 127 (1966)
- 9) A. R. Crofts: *J. Biol. Chem.*, 242, 3352 (1967)
- 10) A. Marcus, J. Feeley and T. Volcani: *Plant Physiol.*, 41, 1167 (1966)
- 11) A. Marcus, J. Feeley: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 56, 1770 (1966)
- 12) R. L. Obendorf and A. Marcus: *Plant Physiol.*, 53, 779 (1974)