

琉球大学学術リポジトリ

成熟サトウキビ茎梢頭部の α -アミラーゼに関する研究(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 知念, 功, 宮城, 大, 伊藤, 敬史, 隈元, 俊和, 屋, 宏典, Chinen, Isao, Miyagi, Masaru, Ito, Takafumi, Kumamoto, Tosikazu, Oku, Hirosuke メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3874

成熟サトウキビ茎梢頭部の α -アミラーゼに関する研究

知念 功*宮城 大**伊藤敬史***隈元俊和****屋 宏典*

Isao CHINEN, Masaru MIYAGI, Takafumi ITO, Tosikazu KUMAMOTO,
and Hirosuke OKU, : Studies on α -Amylase from Top Part of Mature
Sugar Cane Stalks.

Summary

In the first place two types of starch-hydrolyzing enzyme were found to be in top part of mature sugar cane stalk. Because one of them was adsorbed to an α -cyclodextrin-Sepharose column, the other was passed through it. In this paper the former was purified and various properties of it were studied. Purification was carried out by affinity chromatography on epoxy activated Sepharose 6B substituted with α -cyclodextrin and then by gel filtration on Sephadex G-100. As a result, two kinds of amylase showing affinity to α -cyclodextrin-Sepharose existed in the fraction. One of them had high activity and showed homogeneity by disk gel electrophoresis. But the other had low activity and was obtained in very small amounts. So further studies of the former were achieved. The purity was 66,477 times and the recovery was 75%. The molecular weight was estimated to be about 69,000 by disk gel electrophoresis. The optimum temperature and pH values were 65°C and 5.0, respectively. The K_m and V_{max} values for soluble starch were 2.15 mg/ml and 146 units/mg/min. The amylase indicated remarkable thermostability when 1mM calcium chloride was present. In other words, it was stable at 55°C for one hour. The enzyme cleaved considerably soluble starch, amylopectin, amylose, dextrin, and glycogen, but wheat starch, rice starch, cassava starch, sweet potato starch, potato starch, in less extent than the formers. Oligosaccharide composition of products from these starches was determined by high performance liquid chromatography. No difference in tendency of the composition was detected among the starches. But maltoheptaose (G_7) was mainly produced from each starch. Maltooctaose (G_8), maltohexaose (G_6), maltopentaose (G_5), maltotetraose (G_4), maltotriose (G_3) and maltose (G_2) were also formed in less content than the former. Optical rotation of decomposition

**大阪大学蛋白質研究所

***チッソ株式会社

****鹿児島県高山中学校教員

*琉球大学農学部農芸化学科

琉球大学農学部学術報告36: 33~49 (1989)

products from soluble starch was determined, but the result was not clear. But the enzyme was adsorbed to α -cyclodextrin Sepharose, hydrolyzed synthetic substrate (amylose azure), which has been used as a substrate of α -amylase, and was inhibited by α -amylase inhibitor from *Triticum aestivum*, therefore it was decided to be α -amylase producing α -type oligosaccharides from various starches.

Two kinds of α -amylase was found to be in this fraction in the purification as stated above. One of them showing minor activity was found to produce only maltose (G_2) from soluble starch by HPLC.

結 言

アミラーゼは動物^(4,8)、植物^(9,10,11,17,18,22,24)および微生物^(12,16,19)に広く存在している。また、その種類も各種知られており、澱粉等の α -1,4グルコシド結合を加水分解して α 型の糖を生成する α -アミラーゼ、 β 型の糖を生成する β -アミラーゼ、 α -1,6グルコシド結合を加水分解するR-酵素、プルナーゼ、イソアミラーゼ等の枝切りアミラーゼ、 α -1,4および α -1,6結合の両結合を加水分解し、 β 型の糖を生成するグルコアミラーゼ等がある。

植物界にはこれらアミラーゼのうち α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、枝切りアミラーゼが存在することが知られている。その内でもとりわけ β -アミラーゼの活性が高く、植物特有のアミラーゼと言われた事もある。また、いくつかの植物では、これらの植物アミラーゼは高度に精製されている。例えば α -アミラーゼはイネ⁽¹⁷⁾、オオムギ⁽²⁴⁾等、 β -アミラーゼはサツマイモ⁽²²⁾、ダイズ⁽¹⁰⁾等の植物で精製されている。本研究室では過去数年にわたって植物特にサトウキビでその研究を行ってきた。サトウキビは C_4 植物の1つである⁽¹³⁾。一般に C_4 植物は光合成により炭酸ガスから、まずアスパラギン酸、リンゴ酸等のジカルボン酸 (C_4 物質) を生成する。次にそれらは Calvin 回路に入り澱粉に変換され貯蔵される。しかし、サトウキビは生体内に多量のスクロースを蓄積する事から、光合成産物である澱粉をスクロースに変換し貯蔵することも考えられる。

一方、サトウキビには各種糖分解酵素が存在し、葉や茎で各種グルコシダーゼやアミラーゼが存在する事が報告されている^(1,5,14)。後者のアミラーゼでは α -アミラーゼと β -アミラーゼの二種が存在する事が確認されている。しかし、これらアミラーゼのサトウキビ中での役割についてはよく知られていない。また、前述の事から考えると、これらアミラーゼはサトウキビ中でのスクロース生成過程に関連しているとも考えられる。

本研究ではスクロースを貯蔵しているサトウキビ茎にもこれらのアミラーゼが存在する事から、茎と葉で別々にアミラーゼを研究し、両者でその性質を比較する事にした。今回はその研究の一環として、サトウキビ茎梢頭部に存在する α -アミラーゼを高度に精製し、その諸性質を研究した。以下に精製方法および諸性質について詳細に記述する。

実験材料および実験方法

1. 実験材料

実験に用いたサトウキビ茎は昭和61年3月に琉球大学附属農場の圃場で梢頭部のみを採取し、さらに節のみを切り取り冷凍保存しておき随時用いた。

2. 試薬

酵素反応の基質として用いた可溶性澱粉は関東化学株式会社製品を用いた。またアフィニティークロ

マトグラフィー用の α -シクロデキストリンはナカライテクス株式会社製品を、セファロース6Bはファルマシア社製品を用いた。カラムクロマトグラフィーを行なう際に用いたセファデックスG-100はファルマシア社製品を用いた。分子量測定の際に標準蛋白質として用いた蛋白質マーカーセットは、バイオラッド社製品を用いた。その他実験に用いた試薬は全て特級試薬を用い、水は全て蒸留水を脱イオンして用いた。

3. 粗酵素液の調整

サトウキビ茎梢頭部の節部のみを2cm程度に切断した後、その試料50gに10mMクエン酸緩衝液(pH5.5)500mlを加え、家庭用ミキサー(ナショナル製MX-150S)を用いてホモジナイズした。得られた抽出液は麻布を用い濾過した後、8,000rpmで20分間遠心し、その上澄液をNo.2およびNo.5C濾紙を用いて順に吸引濾過し、得られた濾液を粗酵素液とした。

4. 酵素活性の測定法

酵素活性の測定はまず10mMクエン酸緩衝液で適度に希釈した酵素液0.5mlに同緩衝液に溶かした可溶性澱粉液(20mg/ml)0.5mlを基質として加え、65℃で10分間インキュベートした。その後、直ちに氷冷しソモギーネルソン法に従い、銅試薬1.0mlを加え、10分間沸騰溶液中で加熱した。加熱後は直ちに急冷し、発色試薬1.0mlを加え発色し、さらにそれに水10mlを加え希釈した後、波長660nm吸光度を測定した。なお、そのつど標準グルコース溶液(100 μ g/ml)を用意し検量曲線を作成した。また、カラムクロマトグラフィーで得た溶出液は試験管一本当たりで換算してunits/tubeで表示した。なお、この際1unitは μ M/minとした。

5. 蛋白質測定法

酵素精製の際カラムクロマトグラフィーで得た各試料溶出液の蛋白質量は便宜的に波長280nmで吸光度を測定した。一方、精製した酵素液の蛋白質量についてはBradford⁽²⁾の方法を適用し、クマーシブリリアントブルーG-250を用いて測定した。蛋白質定量試薬はクマーシブリリアントブルーG-250 100mgを95%エタノール50mlに溶解した後、85%(W/V)リン酸10mlを加え攪拌し、次に水1 ℓ を加え濾過した。測定の際は試料溶液1mlに蛋白質定量試薬1mlを加え、30分間放置後、波長595nmで吸光度を測定した。なお、標準蛋白として牛血清アルブミンを用いた。

6. α -シクロデキストリンセファロース6Bゲルの調整法

本酵素精製の際アフィニティゲルとして使用した α -シクロデキストリンセファロース6BゲルはRosa Uy⁽²³⁾らの方法に従って調整した。まずセファロース6Bは吸引濾過装置を用いて脱イオン水で数回洗浄した。次にセファロース6B 15g(湿重量)に1,4ブタンジオールグリシジルエーテル15gと水素化ホウ素ナトリウム30mgを加えた0.6N水酸化ナトリウム溶液15mlを加え懸濁した。その後この懸濁液を室温で10時間緩やかに振とうし活性化した。活性化されたセファロース6Bゲルは吸引濾過装置を用いて十分に洗浄した後、 α -シクロデキストリン1.5gを加えた0.1N水酸化ナトリウム溶液30mlに懸濁した。さらにその懸濁液を37℃で24時間緩やかに振とうし、活性化セファロース6Bと α -シクロデキストリンを結合させた。結合を終えたゲルは、再度吸引濾過装置を用い十分量の脱イオン水と0.1Nホウ酸緩衝液(pH8.0)2 ℓ で洗浄した。これを α -シクロデキストリンセファロース6Bゲルとした。

7. 純度検定法

精製酵素の純度測定はDavis⁽⁷⁾の方法に準じて、デスクゲル電気泳動を行ない調べた。7.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、10℃、pH9.4で2mA/tubeの電流を通電した。泳動後、蛋白質染色は0.25%クマーシブリリアントブルーR-250を用いた。脱色には7%酢酸(V/V)を用いた。また、同電気泳動ゲルを活性染色する際は予めゲル作成時に0.05%濃度に可溶性澱粉を加えた。なお染色に際しては、泳動後同ゲルを0.25Mリン酸水素-カリウム溶液に浸し、50℃で10分間インキュベートした。その後0.2%ヨウ素-2%ヨウ化カリウム溶液に浸し染色した。(アミラーゼが存在する箇所は澱粉消化作用を受け白くなり、他の箇所は暗褐色に染まる。)

8. 酵素反応生成物の測定

酵素0.5mlに基質溶液 (20mg/ml) 0.5mlを加え活性測定の項で述べたように反応させ、直ちに水冷した。次にその反応液に1mlのエタノールを加え、未反応の基質を沈澱させ除去した後、ポアサイズ0.3 μ mのメンブランフィルターで除去した。この濾液を高速液体クロマトグラフィーにかけた反応生成物を調べた。その際、カラムはShim-pack CLC-NH₂ カラム (0.6 \times 15.0cm) を用い、移動相はアセトニトリル：水=6：4 (V/V) を用いた。また、流速は1.0ml/minとし、検出は示差屈折計を用いた。標準糖としてはグルコース(G₁)、マルトース(G₂)、マルトトリオース(G₃)、マルトテトラオース(G₄)、マルトペンタオース(G₅)、マルトヘキサオース(G₆)、マルトヘプタオース(G₇)を用いた。

9. 分子量測定法

分子量の測定はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を行い調べた。ゲルは7.5%ポリアクリルアミドゲルを調整して用いた。また電気泳動用試料は蛋白質1~2 μ gと50%グリセロール-2%SDS-0.02Mリン酸緩衝液(pH7.2)を等量混合し、泳動用マーカースとして0.05%プロモフェノールブルー(BPB)を全量の1/4量加えよく混合し調整した。次にその試料20~30 μ lを7.5%ポリアクリルアミドカラム(5.0 \times 100.0cm)上部に重層した後、上下の電極層に0.1%SDS-0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液を満たし、15 $^{\circ}$ C、8mA/tubeで約6時間通電した。その後、泳動ゲルは0.25%クマーシーブリリアントブルーR-250で蛋白質を染色した。また脱色には7%酢酸(V/V)溶液を用いた。なお、標準蛋白質としては Rabbit muscle phosphorylase b (M.W.97,400)、Bovine serum albumin (M.W.66,200)、Hen egg white ovalbumin (M.W.42,699)、Bovine carbonic anhydrase (M.W.31,000)、Soybean trypsin inhibitor (M.W.21,500)、Hen egg white isozyme (M.W.14,400)を用い、それぞれ20 μ g/mlの濃度になるように調整した。また分子量を求めるに当たっては片対数グラフ用紙を用い、縦軸に各標準蛋白質の電気泳動移動度を、横軸に分子量をとりプロットした後、そのグラフ上に精製 α -アミラーゼの移動度をプロットしてその分子量を推定した。

10. 酵素反応生成物のアノマー型決定。

酵素反応生成物のアノマー型決定はOno⁽²⁰⁾らの方法に従って行なった。まず、10mMクエン酸緩衝液(pH5.0)で可溶性澱粉(20ml/ml)を溶かした。その基質溶液に酵素液を1：1の割合で混ぜ合わせ、施光度計(日本分光DIP-180型)のキュベットにすばやく入れ、0~50分間まで5分毎に587nmで施光度の変化を測定した。残りは室温で静置しながら、同様に0~50分間まで5分毎に0.2mlずつ取り、還元力をソモギーネルソン法で測定した。

なお、比施光度 α は次のようにして求めた。

$$[\alpha] = 100 \delta / lP$$

δ : 旋光度計で観測される回転角 (度)

l : 物質層の厚さ (dm)

P : 溶液の濃度 (g/100ml)

以上の操作終了後、酵素反応によって変化した比施光度 α と還元力および時間との関係をグラフに書き、これらの変化から酵素反応生成物のアノマー型を決定した。

11. 着色基質に対する反応性

本酵素を市販の α -アミラーゼ活性測定用着色基質(ナカライテクス株式会社製、レマゾールブリリアントブルーデンブロン)に作用させ発色の有無を調べた。まず、着色基質10mgを取り、10mMクエン酸緩衝液(pH5.0)0.5mlに懸濁した。この基質液に1mM濃度に塩化カルシウムを加えた本酵素液0.5mlを加え、40 $^{\circ}$ Cで10時間反応させた。なお、その際、比較用サンプルとして、サトウキビ葉の β -アミラーゼ、枯草菌 α -アミラーゼについても同様の実験を行なった。

Top part of mature
sugar cane stalks

実験結果

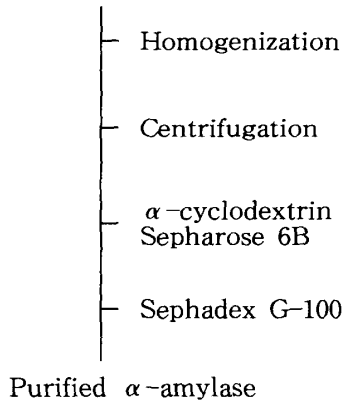


Fig. 1 Purification of α -amylase from top part of mature sugar cane stalks.

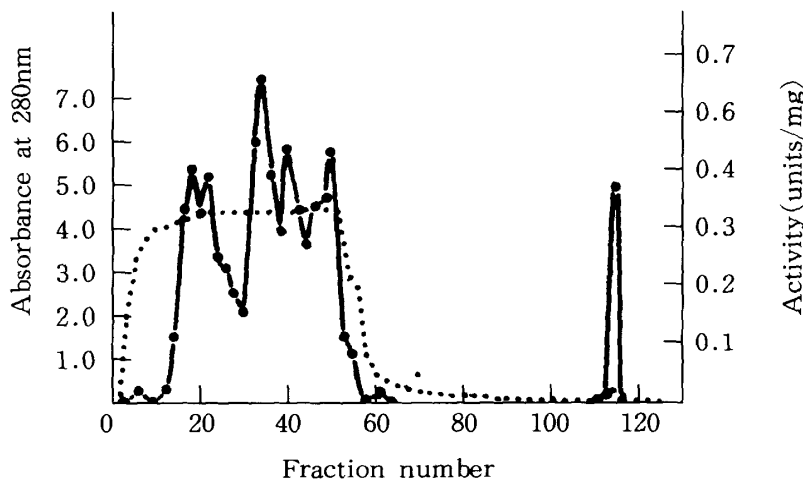


Fig. 2 Affinity chromatography of α -amylase on α -cyclodextrin Sepharose 6B column. The enzyme solution, which was obtained by homogenizing of top part of mature sugar cane stalks with 10 mM citrate buffer (pH5.5) and then centrifuging at 8,000 rpm for 20 minutes, was applied to α -cyclodextrin Sepharose 6B column (2×10cm) which had been equilibrated with same citrate buffer. Elution was accomplished with 500mg α -cyclodextrin in 100ml same citrate buffer. (—●—) Amylase activity; (·····) Absorbance at 280 nm.

1. 精製

本酵素はFig. 1 に示した方法で精製した。その詳細については次に記述する。

1) α -シクロデキストリンセファロース6Bカラムクロマトグラフィー

粗酵素液1,000mlを α -シクロデキストリンセファロース6Bをカラム(2.5×10cm)に添加し、粗酵素液通過後、つまり素通り部分の糖類、 β -アミラーゼ等が完全に溶出するまで10mMクエン酸緩衝液(pH5.5)を流し十分に洗浄した。その後、同緩衝液で溶かした α -シクロデキストリン溶液(5mg/ml)を流し、吸着された α -アミラーゼを溶出した。その結果はFig. 2 に示した。粗酵素液を同カラムにかけた場合、本酵素は約365.30倍に純化され、比活性は0.166(units/mg)となり、酵素回収率は100%であった。

2) セファデックスG-100カラムクロマトグラフィー

α -シクロデキストリンセファロース6Bゲルに吸着された α -アミラーゼ画分はさらに精製するため、ミリポア濃縮装置を用い濃縮した後、セファデックスG-100カラム(5.0×100.0cm)に添加した。

その結果はFig. 3 に示した。同カラムクロマトグラフィーの結果2つの活性ピークが見られた。そこで、同クロマトグラフィーで前方で溶出した活性画分を活性画分I、後方で溶出した活性画分を活性画分IIとした。本研究ではこのうち活性が高い活性画分IIについて主に研究し、活性画分Iについては可溶性澱粉に作用させ、生成した糖の組成のみを調べた。

セファデックスG-100カラムクロマトグラフィーを行なう事により活性画分IIは約66,477倍に純化され、比活性は30.227 (units/min) になり、酵素回収率は75.01%になった。以上の精製過程の結果は

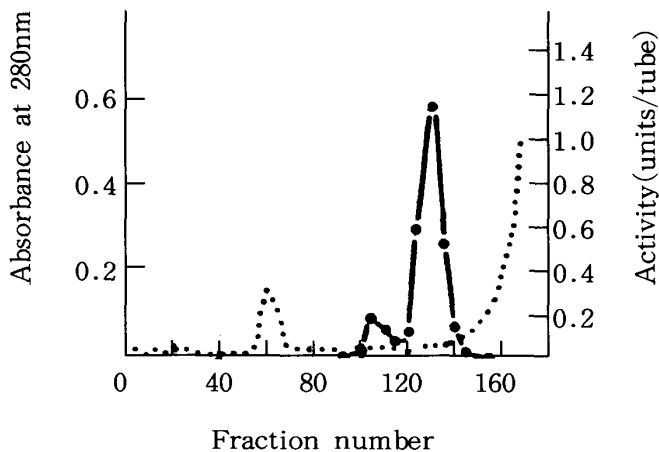


Fig. 3 Sephadex G-100 column chromatography of α -amylase from top part of mature sugar cane stalks. The enzyme solution obtained from α -cyclodextrin Sepharose 6B column, was applied to Sephadex G-column (5 \times 150cm), which had been equilibrated with same citrate buffer (pH 5.5).
(—●—) Amylase activity; (·····) Absorbance at 280 nm.

℃毎に活性を測定した。なお、得られた活性値は其中最も高い活性値を100とし、それに対する比でこれら活性値を表示した。その結果はFig. 5に示した。同図では65℃で活性ピークが見られた事から、本酵素の至適温度は65℃である事がわかった。

2) pHの影響

精製酵素はpH3.0からpH8.0まで種々反応液のpHを変えて10分間、65℃で反応させ、各pH毎に酵素活性を測定し至適pHを求めた。なお、この場合も得られた活性値の中で最も高い活性値を100とし、それに対する比でこれら活性値を表示した。その結果はFig. 6に示した。その結果、本酵素の至適pHはpH5.0である事がわかった。

3) 基質濃度の影響

酵素濃度を一定にし、基質(可溶性澱粉)濃度を0.3%から2.4%まで種々変えて反応させ、各濃度毎に活性を測定した。その結果はFig. 7に示した。次にこれらの結果をLineweaver-Burkのプロット法に従ってプロットしFig. 8が得られた。同図よりミカエリ定数Km値と最大速度Vmax値を求めた結果、本酵素のKmは2.15mg/ml、Vmax値は146units/mgとなった。

Table. 1にまとめた。今回の α -アミラーゼの精製ではアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いているため、最終活性回収率が約75.01%と高くなった。

2. 精製酵素の均一性

前述のような精製の過程を経て得られた α -アミラーゼを7.5%ポリアクリルアミドデスクゲル電気泳動(pH9.4)にかけその均一性を調べた。その結果はFig. 4に示した。その結果、単一の蛋白質バンドが確認され、同一の移動位置に活性バンドも確認された。以上の結果、本酵素はポリアクリルアミドデスクゲル電気泳動的に均一である事が証明された。

3. 精製酵素の諸性質

1) 温度の影響

精製酵素は30℃から80℃まで、5℃毎に反応温度を変えて10分間反応させ、それぞれ温度を変えて反応を行なう毎に酵素活性を測定した。さらに至適温度付近では2.5

Table. 1 Purification of α -amylase from top part of mature sugar cane stalks.

Procedure	Protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)	Purification
Crude enzyme	15237.63	6.93	0.0005	100.00	1.00
α -Cyclodextrin Sepharose 6B	41.71	6.93	0.166	100.00	365.30
Sephadex G-100	0.17	5.20	30.227	75.01	66476.80

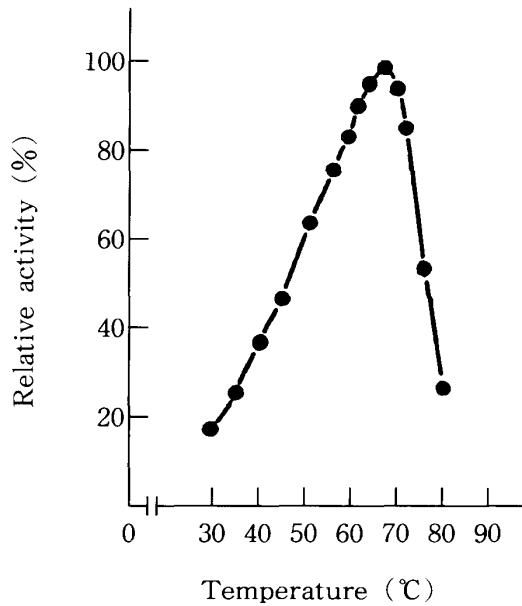


Fig. 5 Effect of temperature on α -amylase activity. Assays were performed in 10 mM citrate buffer (pH 5.5) at various temperatures ranging from 30–80°C.

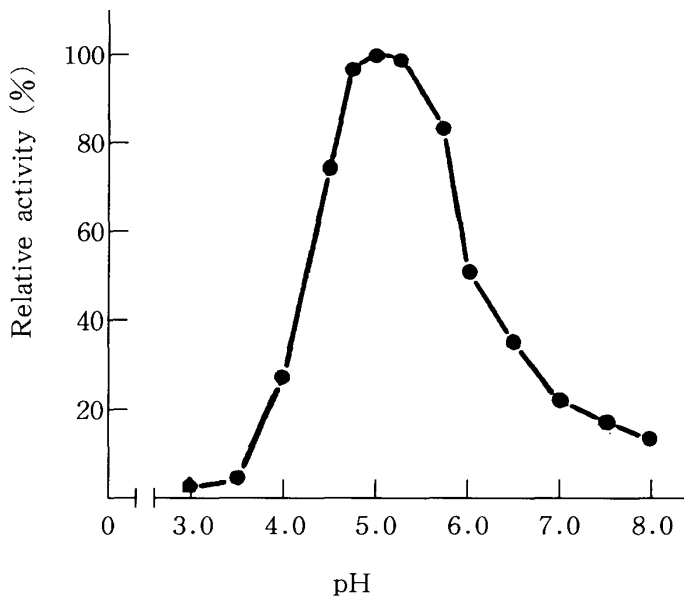


Fig. 6 pH Dependence of α -amylase activity. Assays were performed at 65°C by using 100mM citrate buffers ranging from pH 3.0–8.0.

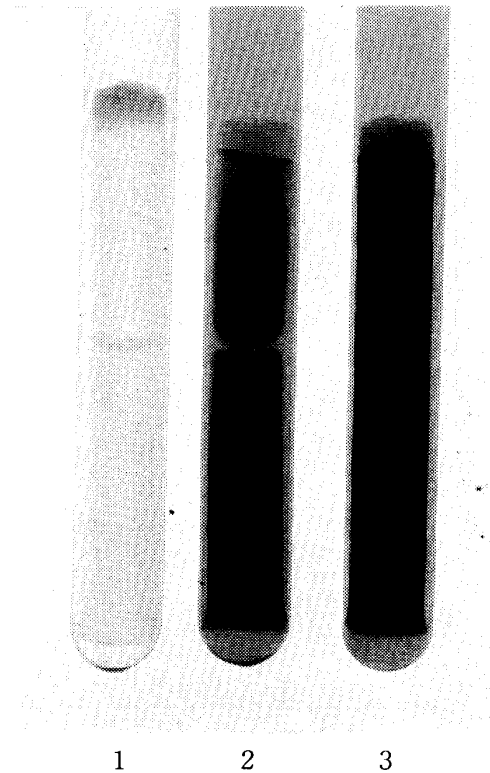


Fig. 4 Disk polyacrylamid gel electrophoresis of purified α -amylase. Electrophoresis was carried out on 7.5% polyacrylamid gel containing 0.05% soluble starch. The enzyme solution containing 1 mM calcium chloride concentration was used.
 1. Control for activity stain;
 2. Activity stain;
 3. Protein stain.

4) 基質特異性

本酵素を各種基質に作用させ、酵素活性を測定した。その結果はTable. 2に示した。その結果、本酵素は可溶性澱粉に最もよく作用し、他にもアミロペクチン、短鎖アミロース、デキストリン、グリコーゲンによく作用した。また、小麦澱粉、米澱粉、キャッサバ澱粉、サツマイモ澱粉、ジャガイモ澱粉、トウモロコシ澱粉等の生澱粉にも作用した。

5) 酵素反応生成物の測定

前述のように基質特異性を調べた結果、本酵素は各種澱粉に作用する事がわかつ

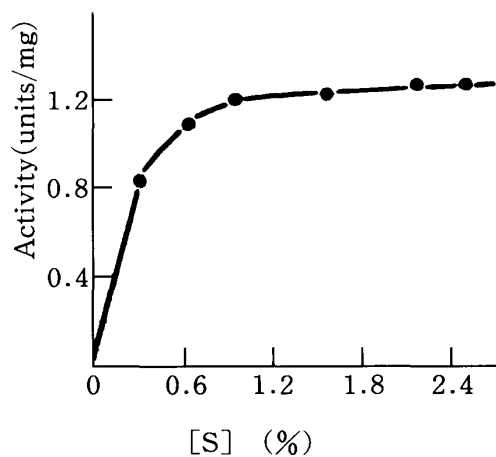


Fig. 7 Effect of substrate concentration on the activity of α -amylase.

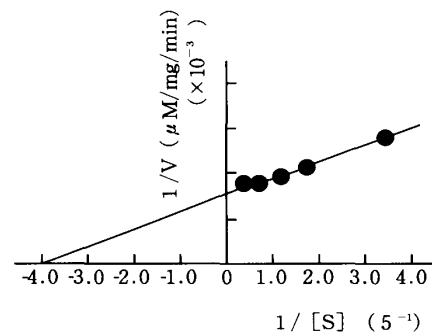


Fig. 8 Lineweaver-Burk plots of α -amylase for hydrolysis of the substrates.

Table. 2 Substrate specificity of α -amylase

Substrate	Activity(units/mg)
Soluble starch	33.49
Cassava starch	20.89
Potato starch	19.14
Rice starch	14.03
Wheat starch	13.05
Sweet potato starch	12.88
Corn starch	6.60
Amylopectin	28.05
Amylose($\overline{DP17}$)	4.72
Dextrin	7.81
Dextran(M. W. 170,000-200,000)	1.89
Dextran(M. W. 50,000- 70,000)	Not hydrolyzed
Glycogen	15.55
Agar	0.13
Pullulan	Not hydrolyzed
Laminarin	Not hydrolyzed
Methyl- α -D-glucoside	0.27
D(+)-Trehalose	Not hydrolyzed

た。そこでこの項では、先に述べた主な澱粉について再度本酵素を作用させ、その反応生成物の糖組成を高速液体クロマトグラフィーを用いて調べた。その結果はFig. 9に示した。その結果、本酵素はいずれの基質に対しても、主にマルトヘプタオース(G_7)を生成した。また、その糖以外にもマルトヘキサオース(G_6)、マルトオクタオース等のオリゴ糖も生成した。

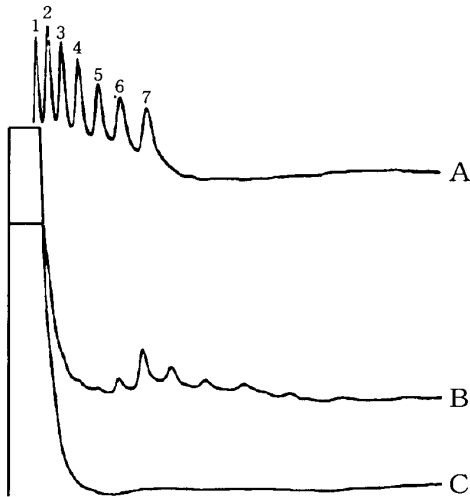


Fig. 9-a High performance liquid chromatograms of hydrolysis products from soluble starch by α -amylase from top part of mature sugar cane stalks. The enzyme solution containing calcium chloride in 1mM concentration was used. A mixture (1ml) consisting of 1% soluble starch (0.5ml) in 20mM citrate buffer (pH 5.5) and the enzyme (0.5ml) was incubated at 60 °C for 2 hours and then 1 ml of ethyl ether was added. The mixture was filtered by membrane filter (0.3 μ m). The filtrate was applied to high performance liquid chromatography. A. Standard (1. glucose, 2. maltose, 3. maltotriose, 4. maltotetraose, 5. maltopentose, 6. maltohexaose, 7. maltoheptaose), B. Sample, C. Soluble starch alone.

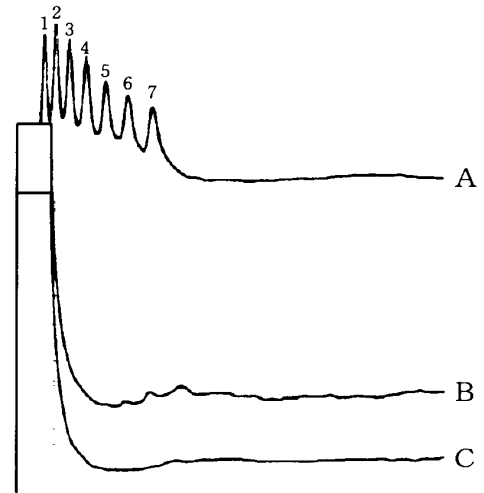


Fig. 9-b High performance liquid chromatograms of hydrolysis products from cassava starch by α -amylase from top part of mature sugar cane stalks. A. Standard (1. glucose, 2. maltose, 3. maltotriose, 4. maltotetraose, 5. maltopentose, 6. maltohexaose, 7. maltoheptaose), B. Sample, C. Cassava starch alone.

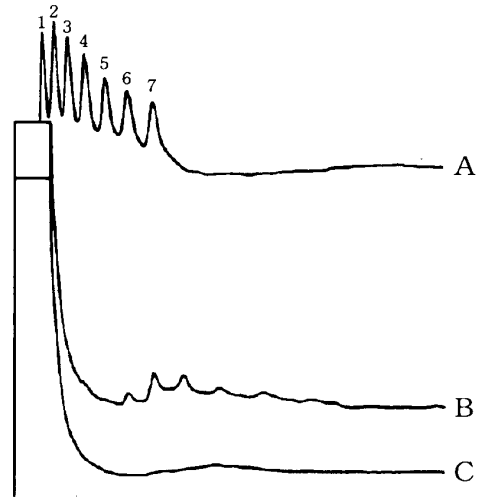


Fig. 9-c High performance liquid chromatograms of hydrolysis products from potato starch by α -amylase from top part of mature sugar cane stalks. A. Standard (1. glucose, 2. maltose, 3. maltotriose, 4. maltotetraose, 5. maltopentose, 6. maltohexaose, 7. maltoheptaose), B. Sample, C. Potato starch alone.

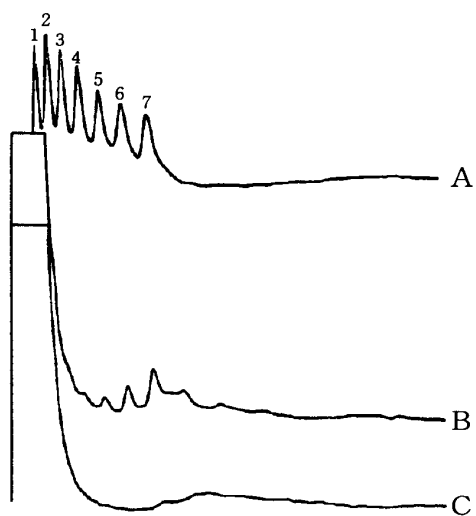


Fig. 9 -d High performance liquid chromatograms of hydrolysis products from rice starch by α -amylase from top part of mature sugar cane stalks. A. Standard (1. glucose, 2. maltose, 3. maltotriose, 4. maltotetraose, 5. maltopentose, 6. maltohexaose, 7. maltoheptaose), B. Sample, C. Rice starch alone.

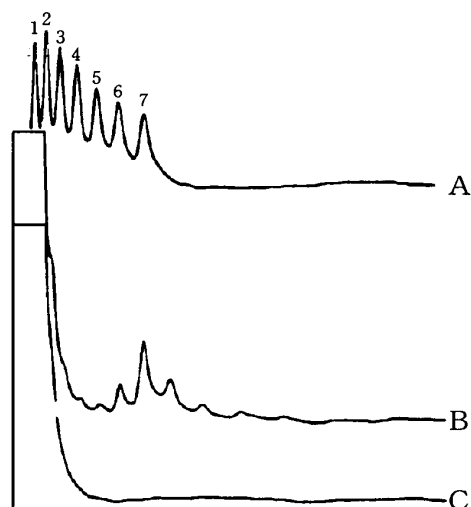


Fig. 9 -e High performance liquid chromatograms of hydrolysis products from wheat starch by α -amylase from top part of mature sugar cane stalks. A. Standard (1. glucose, 2. maltose, 3. maltotriose, 4. maltotetraose, 5. maltopentose, 6. maltohexaose, 7. maltoheptaose), B. Sample, C. Wheat starch alone.

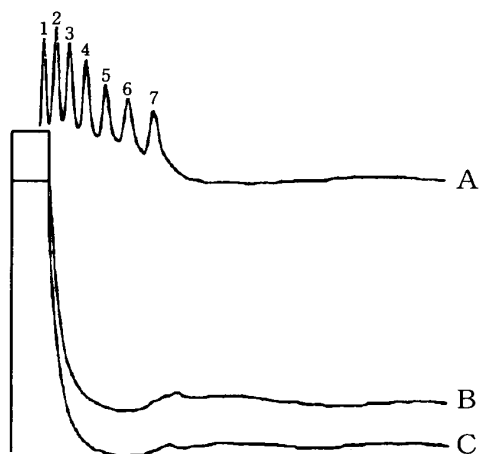


Fig. 9 -f High performance liquid chromatograms of hydrolysis products from sweet potato starch by α -amylase from top part of mature sugar cane stalks. A. Standard (1. glucose, 2. maltose, 3. maltotriose, 4. maltotetraose, 5. maltopentose, 6. maltohexaose, 7. maltoheptaose), B. Sample, C. Sweet potato alone

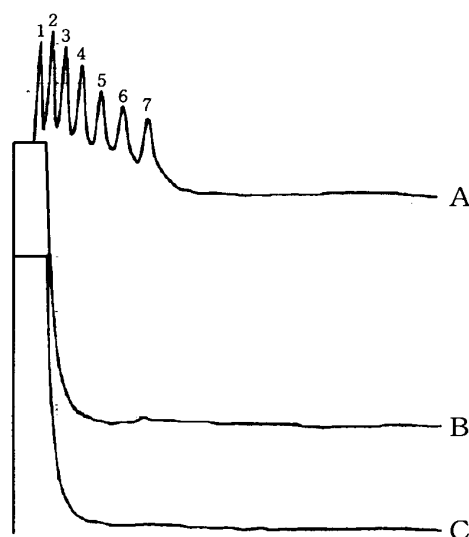


Fig. 9 -g High performance liquid chromatograms of hydrolysis products from corn starch by α -amylase from top part of mature sugar cane stalks. A. Standard (1. glucose, 2. maltose, 3. maltotriose, 4. maltotetraose, 5. maltopentose, 6. maltohexaose, 7. maltoheptaose), B. Sample, C. Corn starch alone.

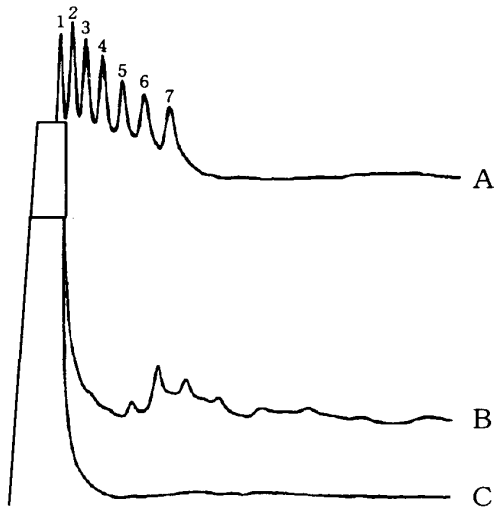


Fig. 9-h High performance liquid chromatograms of hydrolysis products from amylopectin starch by α -amylase from top part of mature sugar cane stalks.
A. Standard (1. glucose, 2. maltose, 3. maltotriose, 4. maltotetraose, 5. maltopentose, 6. maltohexaose, 7. maltoheptaose), B. Sample, C. Amylopectin Soluble starch alone.

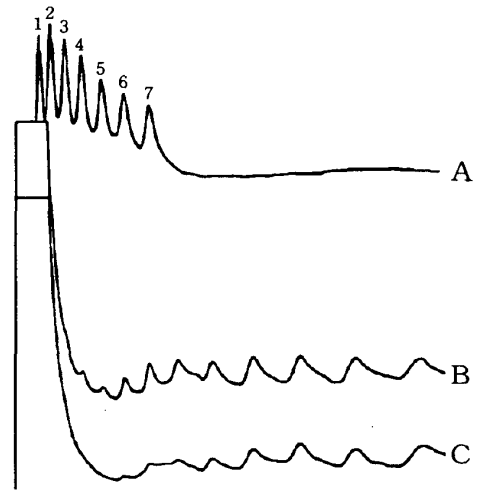


Fig. 9-i High performance liquid chromatograms of hydrolysis products from amylose (DP 17) starch by α -amylase from top part of mature sugar cane stalks.
A. Standard (1. glucose, 2. maltose, 3. maltotriose, 4. maltotetraose, 5. maltopentose, 6. maltohexaose, 7. maltoheptaose), B. Sample, C. Amylose (DP17) alone.

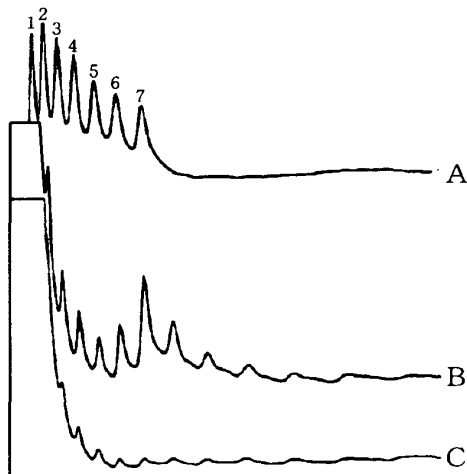


Fig. 9-j High performance liquid chromatograms of hydrolysis products from dextrin starch by α -amylase from top part of mature sugar cane stalks.
A. standard (1. glucose, 2. maltose, 3. maltotriose, 4. maltotetraose, 5. maltopentose, 6. maltohexaose, 7. maltoheptaose), B. Sample, C. Dextrin alone.

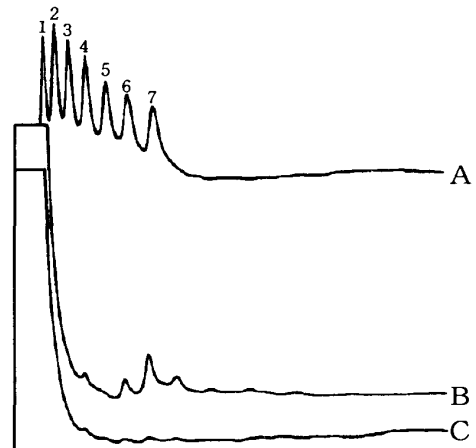


Fig. 9-k High performance liquid chromatograms of hydrolysis products from glycogen starch by α -amylase from top part of mature sugar cane stalks.
A. Standard (1. glucose, 2. maltose, 3. maltotriose, 4. maltotetraose, 5. maltopentose, 6. maltohexaose, 7. maltoheptaose), B. Sample, C. Glycogen alone.

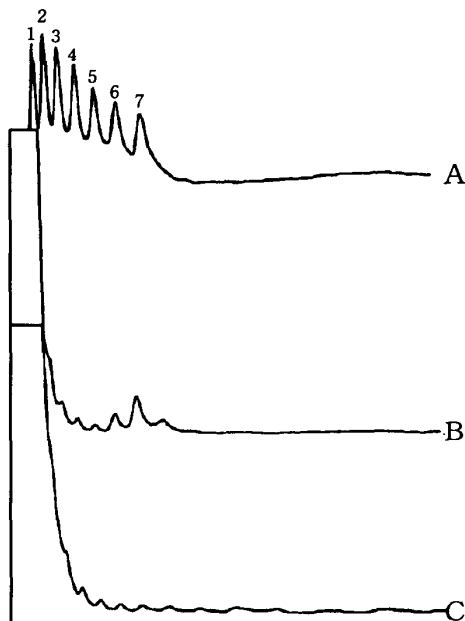


Fig. 10 Effect of long incubation on production of oligosaccharide from dextrin by α -amylase from top part of mature sugar cane stalks. Incubation was carried out at 60°C for 5 hours.
A. Standard (1. glucose, 2. maltose, 3. maltotriose, 4. maltotetraose, 5. maltopentose, 6. maltohexaose, 7. maltoheptaose), B. Sample, C. Dextrin alone.

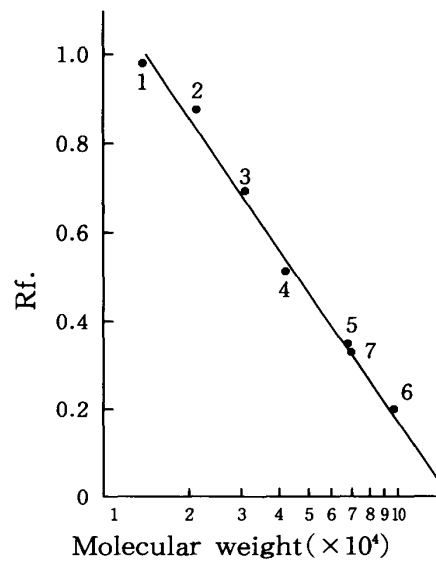


Fig. 11 Determination of molecular weight of α -amylase from top part of mature sugar cane stalks.

1. Hen egg white lysozyme (M.W. 14,400), 2. Soybean trypsin inhibitor (M.W. 21,500), 3. Bovine carbonic anhydrase (M.W. 31,000), 4. Hen egg white ovalbumin (M.W. 42,699), 5. Bovine serum albumin (M.W. 66,200), 6. Rabbit muscle phosphorylase b (M.W. 97,400), 7. α -amylase.

以上澱粉に作用させた結果、デキストリンに作用させた場合が比較的その反応生成物の糖組成が顕著に見られた。そこで、本酵素を再度同糖に長時間作用させ、反応生成の糖組成におよぼす影響を調べた。その結果はFig. 10に示した。Fig. 9-jと比べるとFig. 10では糖組成のピークは低くなったが、同図でもG₇が主に生成された。また、Fig. 9-jではG₈以上のオリゴ糖のピークが見られたが、Fig. 10ではG₈以上のピークは見られず著しくその組成で異なっていた。

以上の事から本酵素はG₈以上の糖鎖に作用し、G₇を特異的に生成する酵素であると判断された。また本酵素が澱粉に作用する場合は、まず澱粉鎖を内部からランダムに切断しG₈以上の長鎖の糖を生成した後G₇単位で切断し、特異的にG₇を生成すると推測された。

6) 分子量測定

本酵素の分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により測定した。その結果はFig. 11に示した。同図から精製 α -アミラーゼの分子量は約69,000である事がわかった。

7) 熱安定性

各種 α -アミラーゼはカルシウムイオンの存在する場合の方が、存在しない場合に比べて熱安定性が高い事が報告されている⁽¹⁹⁾。そこで、本酵素についても同様にカルシウムイオンが存在する場合と存在しない場合で熱安定性を調べるため、55°Cと60°Cで加熱時間の影響を調べた。その結果はFig. 12に示した。その結果、カルシウムイオンを加えた場合は55°Cで60分、60°Cで20分間ほぼ100%安定であった。しかし、カルシウムイオンを加えない場合は55°Cと60°Cの熱処理で共に急速に失活し、20分間でほとん

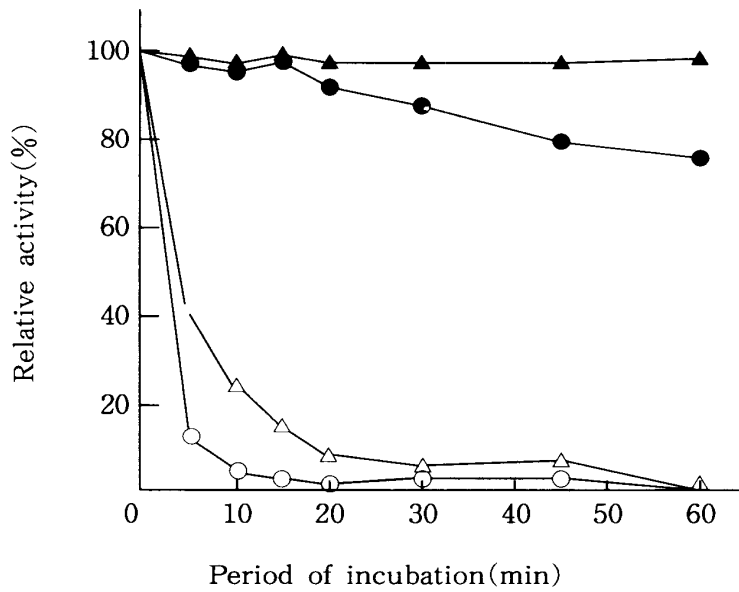


Fig.12 Thermostability of α -amylase from top part of mature sugar cane stalks. After adding calcium chloride to 1mM concentration, the purified enzyme solution was maintained for various times at 55°C and 60°C at pH 5.5, and then assays were performed in 10 mM citrate buffer(pH5.5)at 65°C for 10 minutes. (—△—)The enzyme solution absented calcium chlorid was treated at 55°C, (—○—)The enzyme solution absented calcium chlorid was treated at 60°C, (—▲—)The enzyme solution presented calcium chlorid was heated at 55°C, (—●—)The enzyme solution presented calcium chlorid was heated at 60°C.

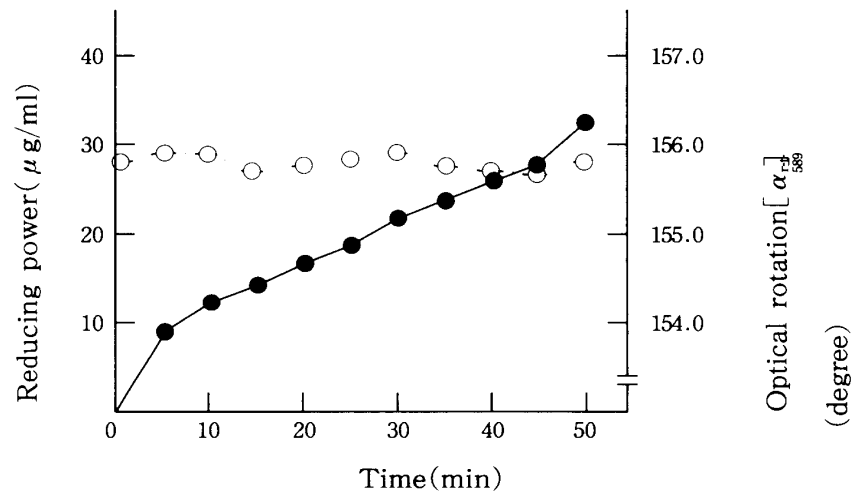


Fig.13 Change of optical rotation and reducing power during hydrosysis of soluble starch at pH5.0(20mM citrate buffer)and at 22°C. Concentration of soluble starch,1.0;wavelingth,589 nm. (···○···)Optical rotation(degree);(—●—)Reducing power(glucose equivalent μg/ml).

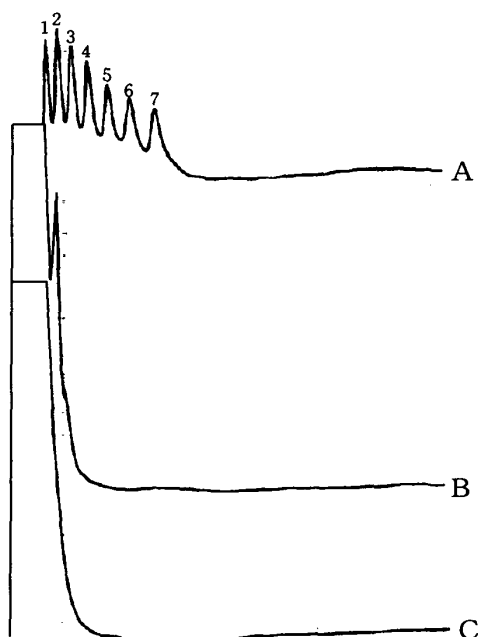


Fig.14 High performance liquid chromatograms of hydrolysis products from soluble starch by the minor enzyme (fr.No.88-118), which was obtained from Sephadex G-100 column chromatography.

Incubation was carried out at 35°C for 1.5 hours.

A. Standard (1. glucose, 2. maltose, 3. maltotriose, 4. maltotetraose, 5. maltopentose, 6. maltohexaose, 7. maltoheptaose), B. Sample, C. Soluble starch.

であることが確認することができた。

10) セファデックスG-100カラムクロマトグラフィーで得られた活性画分 I の基質特異性

セファデックスG-100カラムクロマトグラフィーで得られた活性画分 I を可溶性澱粉に作用させ、さらにそれを高速液体クロマトグラフィーにかけて生成糖の組成を調べた。その結果はFig.14に示した。その結果は同図では活性画分 II には著しく異なりマルトースのピークのみが見られた。この事より本酵素は β -アミラーゼと同様、マルトースのみを特異的に生成する酵素であると推測された。

考 察

本酵素は G_8 以上のオリゴ糖や各種澱粉に作用した。また作用型式は、最初に澱粉鎖を内部からランダムに切断し G_8 以上の長鎖の糖を生成した後、再度 G_7 単位で切断し、特異的に G_7 を生成すると推測された。国際生化学会命名委員会(Enzyme Nomenclature 1979)では α -アミラーゼとは、1)多糖または α -1,4グルコシド結合を2個以上有するオリゴ糖の α -1,4グルコシド結合を切断する。2) α 型の糖を生成する。3)作用型式はエンド型で澱粉鎖にランダムに作用する。という条件を満たす酵素であると定義している⁽¹⁹⁾。本酵素もその条件をほぼ満たしており、 α -アミラーゼと推測された。

本酵素のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量測定の結果、分子量は約69,000であっ

ど活性はなくなった。

以上の結果から、本酵素はカルシウムイオンが存在した場合は著しく熱安定性を示すことがわかった。また、本酵素の熱安定性維持にはカルシウムイオンが必須である事もわかった。

8) 酵素反応生成物のアノマー型の決定

本酵素の反応生成物のアノマー型はOno⁽²⁰⁾らの方法に従い測定した。酵素液と基質液と混合物を室温(21°C)で0分から50分までの5分毎に本酵素活性と、生成糖のアノマー型の旋光度を測定した。その結果はFig.13に示した。その結果、本酵素の酵素活性は比例的に増加したが、旋光度はあまり変化がなく殆ど一定であった。この事から本酵素のアノマー型は α -型であると推測された。

9) 着色基質に対する反応性

本酵素、枯草菌 α -アミラーゼ、サトウキビ葉 β -アミラーゼの3種の酵素を用い、市販の α -アミラーゼ活性測定用着色基質に作用させてみた。その結果、本酵素および枯草菌 α -アミラーゼを作用させた場合は基質液は淡青色になり、合成基質に作用する事が確認された。しかし、 β -アミラーゼを作用させた場合は、基質液は呈色しなかった。 α -アミラーゼ測定用着色基質は一般に部分的加水分解澱粉で着色する。そのためにエンド型の α -アミラーゼはその基質に作用するが、エキソ型の β -アミラーゼは作用しないことが知られている。このことから本酵素は α -アミラーゼ

た。他の植物起源の α -アミラーゼでも分子量は測定されており、それらはだいたい45,000~50,000の範囲にある⁽¹⁹⁾。本酵素の分子量値はこの分子量範囲を若干こえていた。また本酵素の至適pHはpH5.0であったが多くの植物とその値はpH5.6~6.0の弱酸性側にある事が報告されている⁽¹⁹⁾。

植物 α -アミラーゼはカルシウムイオンを必要とする場合がある。そこでカルシウムイオンが存在する場合の本酵素の分子形態をポリアクリルアミドデスクゲル電気泳動法で調べてみた。同電気泳動を行なう際、澱粉を添加したゲル、澱粉を添加していないゲルを用意し、それにカルシウムイオンを添加した本酵素と、EDTAを添加した本酵素をのせ泳動させた後、蛋白質染色および活性染色を行なってみた。その結果、澱粉を添加したゲルは活性染色で大きな差は見られなかった。一方、澱粉を添加していないゲルでは、カルシウムイオンを添加した場合単一の蛋白質バンドが得られたが、EDTAを添加した場合は不均一なバンドが得られた。また、本酵素はカルシウムイオンが存在しない場合は熱に対して不安定であったが、カルシウムイオンが存在する場合は著しく熱安定性であった。本酵素はカルシウムイオンの存在にかかわらず触媒作用を示した事より、カルシウムイオンは酵素の活性中心以外で結合し、熱安定性を発揮する構造を形成していると推察される。

以上3つの事より、本酵素は典型的な植物 α -アミラーゼである事が推測された。

次にサトウキビ茎梢頭部と葉で同アミラーゼを比較してみた。その結果、両者は分子量値、至適温度値、至適pH値、基質特異性等全てがほぼ同じであった。以上の事から、サトウキビにおいては組織間では差異は見られず、同一の α -アミラーゼが存在していると判断された。

本研究の結果、サトウキビ茎梢頭部には α -シクロデキストリンセファロース6Bゲルに吸着する酵素が二種存在した。その一つは主としてマルトヘプタオースを生成し、他の一つはマルトースを生成した。一般に α -アミラーゼのみが同ゲルに吸着されると考えられている事から判断すると、他の一も α -アミラーゼであると推測される。以上の事からサトウキビには二種の α -アミラーゼが存在する事になる。その他に同ゲルに吸着されない β -アミラーゼが存在する事から併せると、サトウキビには三種類のアミラーゼがアイソザイムとして存在している事になる。

本酵素は主としてマルトヘプタオースを特異的に生成した。これまでこのような長鎖のオリゴ糖を生成する酵素の例は数少なかった。そのうちでもマルトヘプタオースを特異的に生成するアミラーゼはさらに数少ない事から、オリゴ糖生成に非常に有益な酵素であると考えられる。しかし、本酵素を工業生産に供するにはいくつかの問題点がある。第一に本酵素は植物酵素であるために原料が得難く、得られる酵素の絶対量も少ない。第二にエンド型アミラーゼであるため、マルトヘプタオース以外のオリゴ糖も少量ながら同時に生成する等の問題点がある。しかし本酵素は本精製法を適用した場合その精製が比較的簡単で、活性回収率も高い。さらにカルシウムイオンを加えると著しく熱安定性を示す事から、不溶化酵素としてバイオリクターとして利用できる可能性もある。これらの事より、サトウキビの付加価値利用という点では大きく期待される酵素である。

最後に本実験の問題点をいくつか考察してみた。本実験では10mMクエン酸緩衝液を用いている。そのため各種金属塩、特殊試薬を添加すると緩衝力が弱いため若干pHが異なってくる。一方緩衝液濃度を上げると、活性測定を行う際ソモギーネルソン法を適用しているために、そこに影響が出てくる。以上の理由より緩衝液に関してはさらに改良が望まれる。

本研究における分子量測定はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法のみを適用した。しかし、より正確に分子量を求めるにはゲル濾過法、ポリアクリルアミドデスクゲル電気法等によっても測定する必要がある。ゲル濾過法の場合、セファデックス等のアガロース系ゲルを用いゲル濾過を行なうと、本酵素はそれらのゲルと僅かながら親和性を示す。また、バイオゲルP等のアクリルアミド系ゲルでも同様の結果を示し正確な値が得られないという結果が得られた事から、ゲル濾過法で測定するにはさらに工夫が必要である。

要 約

サトウキビ茎梢頭部には二種類のアミラーゼ、 α -アミラーゼと β -アミラーゼが存在した。本研究では前者の α -アミラーゼを高度に精製し諸性質を調べた。精製は α -シクロデキストリンセファロース6Bゲルを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーとセファデックスG-100カラムクロマトグラフィーにかけて行なった。その結果、さらに二種類の α -アミラーゼが存在する事がわかった。その両酵素のうち活性の高い酵素はポリアクリルアミドデスク電気泳動的に均一に精製された。同酵素はこの精製法で66,476.8倍に純化され、回収率は75.01%であった。精製酵素をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分子量を求めた結果、約44,000であった。至適温度と至適pHはそれぞれ、65℃とpH5.0であった。また、可溶性澱粉に対するKm値とVmax値はそれぞれ、2.15mg/mlと146units/mgであった。本酵素は塩化カルシウムを1mM濃度で添加すると著しい熱安定性を示し、55℃で1時間加熱しても安定であった。基質特異性を調べた結果、いずれの基質でも主にマルトヘプタオース(G7)を生成した。また澱粉分解物の変旋光を測定した結果、その生成物は α 型である事がわかった。また、本酵素は α -アミラーゼ測定用着色基質に作用した。以上の事から本酵素の作用型式はエンド型で、主としてマルトヘプタオースを生成する α -アミラーゼであると推測された。精製を行なう際、セファデックスG-100カラムクロマトグラフィーで2つの活性ピークが見られた。今回は活性が高かったピークについて諸性質を調べた。しかし活性が低かったピークについても試験的に可溶性澱粉に作用させ、その生成糖の組成を調べてみた。その結果、本酵素は澱粉に作用させた場合マルトースのみを特異的に生成する事がわかった。

引用文献

- 1) Alex, G. A. and J. Lebron (1965) Isolation and purification of amylase from sugarcane leaves. *Agr. Univ. P. R.*, **49**(3)308-514-521.
- 2) Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- 3) Bain, J. M. and Mercer, F. V., *Aust. J. Biol. Sci.*, **19**, 69-84
- 4) Caldwell, M. L., Adams, M. Kung, J. T. and Toralballa, T. C. (1952) Crystalline pancreatic amylase. II. Improved method for preparation from hog pancreas glands and additional studies of its properties. *J. Am. Chem. Soc.*, **44**, 4033.
- 5) 知念 功、松下洋一、福田亘博(1979) 甘蔗茎のインベルターゼと α -ガラクトシダーゼに関する研究、琉球大学農学部学術報告**26**, 91-104
- 6) 知念 功、仲村 毅、玉城 一、嶺井勝、真下均、福田亘博(1981) 未熟サトウキビ茎のグリコシダーゼに関する研究
琉球大学農学部学術報告**28**, 73-80.
- 7) Davis, B. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404(1964)
- 8) Dyk, J. W. van and Caldwell, M. L. (1956) A study of the kinetics of the hydrolysis of waxy maitze starch by crystalline pancreatic amylase from Swine. *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 3345
- 9) Emiola, L. O. (1980) Multiple components of α -amylase in germinating tubers of a yam, *dioscorea dumetorum*. *J. Biochem.*, **87**, 289-295.
- 10) Gertler, A. and Birk, Y. (1965) Purification and characterization of a β -Amylase from soya beans. *Biochem. J.*, **95**, 621.
- 11) Isizaki, Y., Taniguchi, H., Maruyama, Y. and Nakamura, M. (1983) Debranching enzyme of potato tubers. (*Solanum tuberosum* L.) *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **30**, No. 1, 19-29.

- 12) Kainuma, K., Kobayasi, S. and Harada, T. (1978) Action of Pseudomonas isoamylase on various branched oligo- and poly-saccharides. *Carbohydr. Res.*, **61**, 345-357.
- 13) 金井龍二(1972)C₄-光合成p173-185蛋白質、核酸、酵素Vol.17, No.21 林健志、大場義樹編 共立出版株式会社
- 14) Kortschak, H. P. Hartt, C. E. and Burr, G. O. (1965) *Plant Physiol.*, **40**, 209
- 15) Kosiba, T. and Minamikawa, T. (1981) Purification by affinity chromatography of α -amylase. A main amylase in cotyledones of germinating vigna mungo seeds. *Plant Cell Physiol.*, **22**, 979-987
- 16) Mikami, S., Iwano, K., Shinoki, S. and Simada, T. (1987) Purification and some properties of acid-stable α -Amylase from Shochu koji. (*Aspergillus kaweachii*) *Agric. Biol. Chem.*, **51**(9), 2495-2501.
- 17) Miyata, S. and Akazawa, T. (1982) Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seed. *Plant Physiol.*, **70**, 147-153.
- 18) Matuda, H., Takahasi, T. and Sugawara, S. (1987) Changes in activities of starch hydrolyzing enzyme in root of Sugar Beet. *Agric. Biol. Chem.*, **51**(9), 2583-2584.
- 19) 板野好幸(1986) α -アミラーゼ p142- アミラーゼ 中村道徳他編学会出版センター
- 20) Sama, B. C. and Ueda, S. (1984) Raw starch degradation by Glycoamylase II of black *Aspergillus*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **31**, No. 1, 8-13
- 21) Shozaburo Ono, Keitarou Horikosi, Zenichirou Hamazu (1965) Quantitative determination of anomeric forms of sugar produced by amylase. *J. Biochem.*, Vol. **57**, No. 1, 34-38.
- 22) Spradlin, J. and Thoma, J. A. (1970) β -Amylase thiol groups. *J. Biochem.*, **245**, 117-127
- 23) Uy, R., Wold, F. (1977) 1,4-Butanediol diglycidyl ether coupling of carbohydrates to Sepharose : affinity absorbents for lectines and glycosidases. *Anal. Biochem.*, **81**, 98-107.
- 24) Varner, J. E. and Chandra, G. R. (1964) Hormonal control of enzyme synthesis in Barley Endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **52**, 100-106.