

琉球大学学術リポジトリ

サトウキビ茎の中性インベルターゼ(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: 仲宗根, 洋子, 永友, 浩二郎, Nakasone, Yoko, Nagatomo, Kojiro メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4000

仲宗根 洋子*・永友 浩二郎*

Yoko NAKASONE and Kōjirō NAGATOMO: Neutral invertase from sugar cane stalk.

Summary

The neutral invertase prepared from the mature sugar cane stalk by ammonium sulfate fractionation had K_m value for sucrose of 9.5 mM, a pH optimum of 7.0 and a low activity at acidic areas. It was completely inhibited by the presence of 10 μM of PCMB or Hg^{2+} and 0.1 mM of Cu^{2+} and was not affected by 1 mM of EDTA, Mn^{2+} or Mg^{2+} . The enzyme was inactivated in as much as 40% by the thermal-, acid-stable substance from the sugar cane stalk or leaf. It had an optimum temperature of 35~40°C and was stable at temperatures lower than 45°C. The enzyme mainly showed β -fructofuranosidase activity with small level of maltase activity.

諸 言

一般に、イネやジャガイモなどの植物の貯蔵炭水化物はデンプンであるが、サトウキビ茎に集積されるのはシュクロースである。サトウキビの茎には、不溶性の高分子化合物の形ではなしに水溶性で低分子のシュクロースがエネルギー源として蓄積するという特徴をもっている。一方、サトウキビの茎には、最適pHの異なる、いわゆる、酸性および中性のインベルターゼが存在することが知られている¹⁾。このうち、中性インベルターゼは、本来、シュクロースの分解酵素であるにもかかわらず、シュクロース含量の高いサトウキビ茎の下部に局在する²⁾。このことから、サトウキビ茎の下部には中性インベルターゼの酵素活性に影響を及ぼす何らかの機構があると考えられる。本研究では、蔗茎下部より中性インベルターゼを調製し、いくつかの性質を調べた。

実験方法

1. 酵素の調整

サトウキビは、琉大農場で栽培したNCO310品種を用いた。新鮮な蔗茎下部を洗浄し、皮および節を除去したのち、ジューサーにて磨碎した。磨碎液を $10,000 \times g$ で20分間遠心分離して上澄液を得た。これに70%飽和になるように硫酸アミニウムを加え、酵素蛋白を沈殿させた。遠心分離後の沈殿部分を少量のリン酸緩衝液pH 7.0を加えてけん濃させ、同緩衝液で透析した。これを酵素液として使用した。

* 琉球大学農学部農芸化学科

琉球大学農学部学術報告 30: 241~246 (1983)

2. 中性インペルターゼ活性の測定

シュクロース 17.5 μ moles, リン酸緩衝液, pH 7.0, 30 m molesおよび酵素液を含む1 mlの酵素反応液を, 35°C, 60分間インキュベートした。生ずる還元糖は Somogyi - Nelson 法, OD 520 で定量し, グルコース相当量として表わした。

実験結果および考察

1. 最適pHおよびpH安定性

中性インペルターゼ活性におよぼすpHの影響についてしらべた。Fig. 1に示したように, 酵素反応の最適pHは7.0であった。Hatchら²⁾と同様に, サトウキビ茎の下部には, 中性インペルターゼ(また

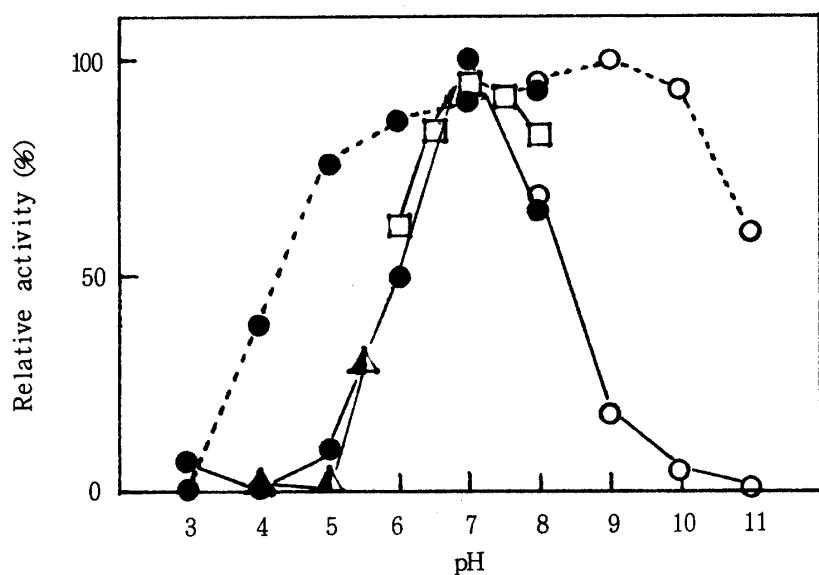


Fig. 1. pH-Activity and -stability curves for neutral invertase
—, pH-activity: The reaction mixture (1ml) containing 17.5 μ moles of sucrose, 30mmoles of buffer of given pHs and enzyme solution (0.1mg of protein) was incubated at 35°C for 60 min.

----, pH-stability: The enzyme solutions were preincubated in 0.02M buffer of given pHs at 35°C for 15min. and then assayed for the remaining activities with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, at 35°C for 60min. ●: McIlvaine, ▲: Acetate, □: Phosphate ○: Atkins & Pantin

はアルカリインペルターゼ)が顕著に存在することが判った。また、本酵素活性は、緩衝液の違いによって最適pHが変るとか活性の度合が大きく異なるということはほとんどなかった。

pHに対する酵素の安定性をしらべると、本酵素はpH 6~10の範囲で安定であった(Fig. 1)。

2. 最適反応温度および温度安定性

リン酸緩衝液 pH 7.0を用い、基質のシュクロースとともに、20°Cから70°Cまでの各温度において、60分間酵素反応を行った(Fig. 2)。この条件下では、本酵素の最適温度は35°C~40°Cにあった。次に、酵素そのものの温度に対する安定性を調べるために、酵素だけを25°Cから70°Cまでの各温度に、リン酸緩衝液 pH 7.0中で15分間保持したのち、残存する酵素活性を測定した。45°Cまでは安定であるが、

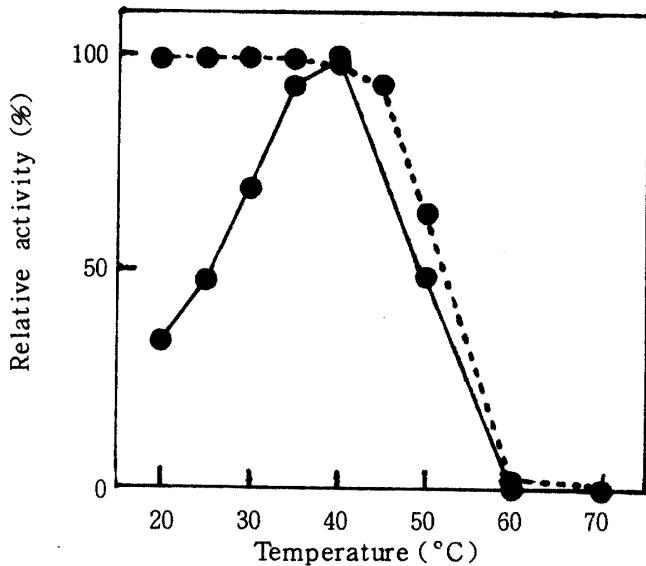


Fig. 2. Temperature - activity and - stability curves for neutral invertase
—, temterature activity: The mixture containing 17.5 μ moles of sucrose, 30 mmoles of phosphate buffer, pH 7.0, and enzyme solution was incubated at given temperatures for 60 min.
----, temperature activity: The enzyme solutions in phosphate buffer, pH 7.0, were preincubated at given temperatures for 15 min, and then assayed for the remaining activities at 35°C for 60 min.

60°C以上ではほぼ完全に失活した。なお、本酵素は4°C保存では活性低下を示したが凍結・融解による活性低下は見られなかった。

3. Michaelis定数 (Km)

Fig. 3に示したように、シュクロースに対するKm値は9.5mMであった。Rosarioら⁶⁾の、より精製された蔗茎酵素の0.32mMにはおよばなかった。ミカン³⁾およびサツマイモ⁵⁾の精製中性インペルターゼ(25～35mM)のKm値と同レベルにあった。

4. 金属イオン等の影響

Table 1に示した各化合物の存在下において、pH 7.0で35°C、60分間反応を行ない酵素活性を測定した。本酵素の活性は、*p*CMB (*p*-chloromercurybenzoate), 水銀イオンおよび銅イオンによって最も強く阻害された。なお、水銀イオンの10⁻⁵Mおよび10⁻⁶Mでは、それぞれ、1.6%, 86%の相対活性を示した、これは、10⁻⁵M以上では酵素活性が著しく阻害されるようになることを示す。また、銅イオンの10⁻⁴Mおよび10⁻⁵Mにおける相対活性は、それぞれ、43%, 97%であった。サトウキビの葉鞘⁷⁾、サツマイモ⁵⁾およびミカン³⁾の中性インペルターゼは50～60mMのTrisで、それぞれ、66%, 75%および37%阻害された。しかし、Table 1に示されたように、本酵素の活性には、1mMのTrisでもかなりの影響があった。また、EDTAおよび二価金属イオンによる影響がほとんど認められないことから、本酵素の活性には、二価イオンを必要としないことが示唆された。上記の化合物以外に、サトウキビの抽出物中には本酵素活性に影響する因子が存在することをつきとめた。即ち、サトウキビの茎や葉の抽出液を熱および酸処理した画分によって酵素活性が40%阻害された。この画分については今後更に詳しく調べる必要があろう。

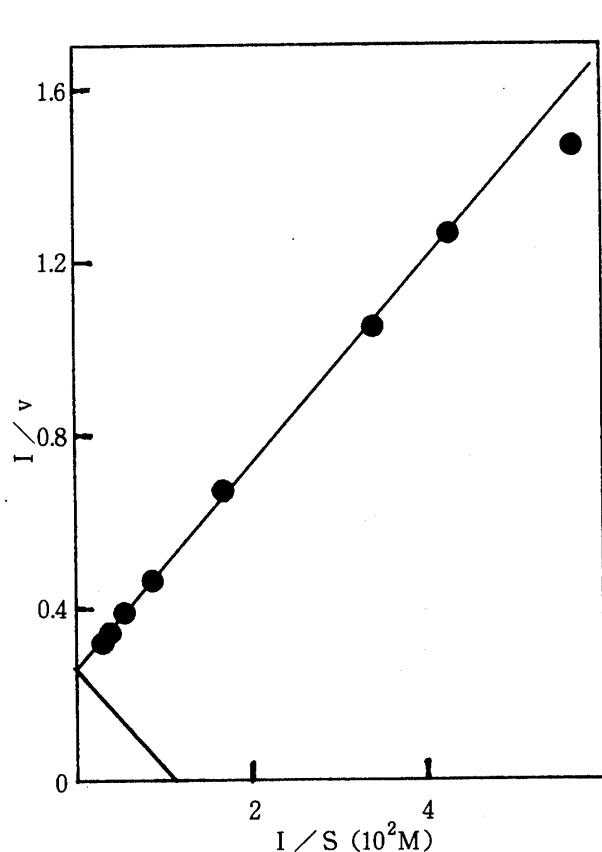


Fig. 3. Lineweaver - burk plots of neutral invertase

Table 1. Effect of several compounds on neutral invertase activity

Compound	Relative activity %
None	100
CaCl_2	110
EDTA	109
MnCl_2	107
MgCl_2	95
FeSO_4	94
ZnSO_4	86
NiCl_2	59
CdCl_2	20
HgCl_2	5
CuSO_4	0
Tris-HCl	64
PCMB	5

* Tris-HCl was adjusted to pH 7.0.
Each compound was used at $1 \times 10^{-3} \text{M}$
except PCMB whose concentration was
 $1 \times 10^{-5} \text{M}$.

5. 基質特異性

Table 2 の酵素活性は、シュクロースを基質に用いたときの酵素活性に対する相対値で表わした。この結果から、本酵素は主としてシュクロースを分解するインペルターゼであることがわかった。しかしマルトースをも分解するのでインペルターゼ以外の酵素の存在も示唆された。またラフィノースに対する本酵素の水解活性は、サツマイモ⁵⁾およびミカン³⁾の中性インペルターゼの場合(5.8%, 10%)よりも高い値を示した。

Table 2. Substrate specificity of neutral invertase

Substrate	Relative activity %
Sucrose	100
Raffinose	24
Maltose	11
Melezitose	1

要 約

完熟サトウキビの搾汁液より硫酸安塩析した酵素蛋白画分を、インペルターゼ酵素標品として用い、その諸性質をしらべた。本酵素は、最適 pH を 7.0 附近にもつ中性インペルターゼであって、最適 pH 5 の酸性インペルターゼを、ほとんど含まなかった。本酵素は K_m 値が 9.5 mM で、シュクロースの分解率を 1.0 としたときにラフィノース、マルトースに対して、それぞれ、0.24, 0.11 であった。本酵素は PCMB、水銀イオンおよび銅イオンにより著しく阻害され、搾汁中の耐熱性物質によっては中程度の阻害

をうけた。またEDTAあるいはマグネシウムイオン、マンガンイオンなどの二価イオンは、酵素活性にはほとんど影響を及ぼさなかった。最適温度は35°C～40°Cにあって、温度に対する安定性では、15分間保持の45°Cまでは安定であった。

引 用 文 献

1. Hatch, M. D., J. A. Sacher and K. T. Grasziou 1963 Sugar accumulation cycle in sugar cane, *Plant Physiol.*, **38** : 338-343
2. Hatch, M. D. and K. T. Grasziou 1963 Relationship of invertase activity to sugar content and growth rate in storage tissue of plants grown in controlled environments, *Plant Physiol.*, **38** : 344-348
3. Kato, T. and S. Kubota 1978 Properties of invertases in sugar storage tissues of citrus fruit and changes in their activities during maturation, *Physiol. Plant.*, **42** : 67-72
4. Madan V. K., K. Singh, H. P. Pande and Y. R. Saxena 1981 Foliar enzymes of sugar cane, *I. S. J.*, **83** : 163
5. Matsushita, K. and I. Uritani 1974 Change in invertase activity of sweet potato in response to wounding and purification and properties of its invertases, *Plant Physiol.*, **54** : 60-66
6. Rosario, E. J. and V. Santisopasri 1977 Characterization and inhibition of invertases in sugar cane juice, *Phytochem.*, **16** : 443-445
7. Vattuone, M. A., F. E. Prado and A. R. Sampietro 1981 Cell wall invertases from sugar cane, *Phytochem.*, **20** : 189-191