

# 琉球大学学術リポジトリ

## 未熟サトウキビ茎の $\beta$ -グルコシダーゼに関する研究(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, 野波, 京子, 玉城, 一, 福田, 亘博, Chinen, Isao, Noha, Kyoko, Tamaki, Hajime, Fukuda, Nobuhiro メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/4021">http://hdl.handle.net/20.500.12000/4021</a>

知念 功\*・野波京子\*・玉城 一\*・福田亘博\*

Isao CHINEN, Kyoko NOHA, Hajime TAMAKI, and Nobuhiro FUKUDA : Studies on  $\beta$ -glucosidase from immature stalks of *Saccharum officinarum* (sugar cane)

## Summary

Some enzymatic properties of  $\beta$ -glucosidase from immature sugar cane stalk were investigated by the use of crude enzyme preparation, which was obtained by decolorization of the juice on DEAE-cellulose column and ammonium sulfate fractionation. The optimum temperature and pH were found to be 50°C and 5.5, respectively. The enzyme was stable in the range of pH 4.5 to 6.0 and then thermostable at 40°C, but unstable above the temperature. The hydrolysis of *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside was markedly inhibited by AgNO<sub>3</sub>, HgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and PCMB, and slightly by maltose.  $\beta$ -Glucosidase, which was partially purified by gel-filtration of the crude enzyme preparation on a Sephadex G-100 column, was able to hydrolyze *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside and salicin but not any celluloses. Furthermore the enzyme hydrolyzed *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside more rapidly than salicin.

## 緒 言

サトウキビ茎には、インベルターゼ<sup>1), 3), 9)</sup>をはじめとして、トレハラーゼ<sup>2), 8)</sup>、 $\beta$ -アミラーゼ<sup>2), 11)</sup>、ポリガラクトナーゼ<sup>6)</sup>、 $\alpha$ -<sup>4)</sup>、および $\beta$ -ガラクトシダーゼ<sup>4), 6)</sup>、 $\alpha$ -<sup>6)</sup>、および $\beta$ -グルコシダーゼ<sup>4)</sup>、 $\alpha$ -マンノシダーゼ<sup>4)</sup>、 $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ<sup>4)</sup>、 $\beta$ -キシロシダーゼ<sup>4), 5)</sup>、等の数多くのグリコシダーゼが存在することがこれまでに報告されている。また未熟サトウキビ茎では、前報<sup>4)</sup>で述べたように、インベルターゼ以外に $\alpha$ -マンノシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 $\beta$ -キシロシダーゼと $\beta$ -グルコシダーゼが存在するが、粗酵素液をセファデックスG-100ゲルカラムを用いてゲル透過を行なった場合、 $\beta$ -キシロシダーゼと $\beta$ -グルコシダーゼは、殆んど同じ溶出量で溶出している。これまでに $\beta$ -グルコシダーゼ<sup>10)</sup>は、アンズや *Aspergillus wentii* から結晶化されているが、いずれの標品も $\beta$ -キシロシダーゼ活性を示すと報告されている。一方ポッシュウボラ<sup>7)</sup>から精製された $\beta$ -キシロシダーゼは、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性を伴うことがわかっている。そのため未熟サトウキビ茎から調製した粗酵素液で示す $\beta$ -キシロシダーゼ活性と $\beta$ -グルコシダーゼ活性は、同一の酵素による活性であるとも考えられるが、この $\beta$ -キシロシダーゼは、耐熱性であるため、その性質を利用して、均一化した標品を得ることができたため、それを用い

\*琉球大学農学部農芸化学科

て $\beta$ -グルコシダーゼ活性を調べたがその酵素活性は見られなかった。そのことからサトウキビ茎中では、 $\beta$ -グルコシダーゼと $\beta$ -キシロシダーゼは、別々に存在するものと判断し、今回は、この $\beta$ -グルコシダーゼを精製することを前提として、蔗汁より、粗酵素を調製し、それを用いてその $\beta$ -グルコシダーゼの酵素学的基礎的性質を調べた。以下にその結果を詳細に述べる。

## 実験材料と方法

### 1 実験材料

琉球大学農学部附属農場(沖縄県西原町千原)の圃場で生育した3~4ヶ月の未熟サトウキビ(*Saccharum officinarum* NCo 310)を用いた。

### 2 試薬

酵素反応基質として用いた

-

ニトロフェニル $\beta$ -D-グルコピラノサイドは、Koch-Light Laboratories Ltd(Colnbrook Bucks England)製品を用いた。HL-セルロースとHB-セルロースは、生化学工業株式会社から購入した。CM-セルロースとサリシンは、和光純薬工業株式会社の製品を入手した。蔗汁を脱色する際、用いたDEAE-セルロースは、生化学工業株式会社から購入した。本酵素の製精の際、用いたセファデックスG-25とG-100は、ファルマシア株式会社から購入した。

### 3 粗酵素の調製法

採取したサトウキビは、その場で葉部をはぎとり、先端から7節までを材料として用いた。土やワックス等を洗浄し除去したのち、電動圧搾機で圧搾し、蔗汁を得た。それをサラシを用いて濾過したのち、8,000 rpmで、30分間冷却遠心し、上清を得た。その上清液をあらかじめ66.7 mMリン酸緩衝液(pH 5.5)で平衡化しておいたDEAE-セルロースカラムにかけて脱色を行なった。次に70%飽和度になるように硫酸アンモニウムを加え、4℃で一夜放置したのち、8,000 rpmで冷却遠心し沈澱を得た。それを先に用いたリン酸緩衝液で溶解したのち、再び冷却遠心し、得られる上清を粗酵素液とし、-20℃に凍結保存して用いた。

### 4 酵素活性測定法

p-ニトロフェニル- $\beta$ -D-グルコピラノサイド2 mgを43.3 mM McIlvaine 緩衝液(pH 5.5)1 mlに溶解した基質溶液0.5 mlに、適当に希釈した酵素液0.5 mlを加えて、50℃で30分間インキュベートした。次にその反応液に直ちに1 M炭酸ナトリウム溶液1 mlを加え、波長410 nmで吸光度を測定し、遊離したp-ニトロフェノール量を求めた。酵素活性は、反応時間1分間当り、酵素量mg当りに遊離したp-ニトロフェノール量をunit数に換算して表わした。1 unitは、その基質1  $\mu$ Mを水解する酵素量として表わした。また基質特異性を調べるに際しては、CM-セルロース、HB-セルロース、HL-セルロースおよびサリシンを各々20 mgずつとり、それに5 mM McIlvaine 緩衝液(pH 5.5)2 mlと酵素液1 mlを加えたのち、50℃で30時間反応を行なった。その後濾過し、得られた濾液について、遊離した還元糖量をSomogyi-Nelson法で求めた。

## 実験結果及び考察

### 1 酵素濃度の影響

未熟サトウキビ茎中に存在する $\beta$ -グルコシダーゼの酵素学的基礎的諸性質を調べるに先だち、まず粗酵素の活性とその濃度との関係を調べた。酵素液は、粗酵素液を10倍と20倍に希釈して用いた。Fig.1

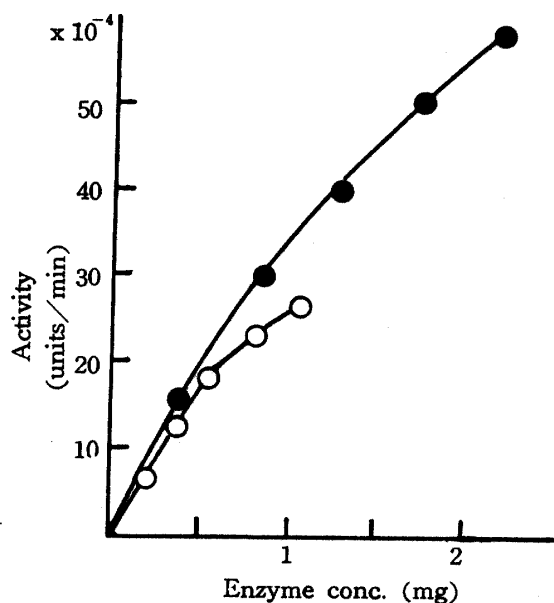


Fig. 1 Effect of Enzyme Concentration. The enzyme solution containing 2.15 mg as protein per ml (○) and one containing 4.3 mg (●) were prepared by employing crude enzyme preparation, which was obtained by decolorization and ammonium sulfate fractionation. Then *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (1 mg) was added to the enzyme solution at various concentration and volume of the reaction mixture was adjusted to 1 ml with 43.3 mM McIlvaine buffer, pH 5.5. The liberated aglycone was estimated. The procedure was the same as described previously.<sup>4)</sup>

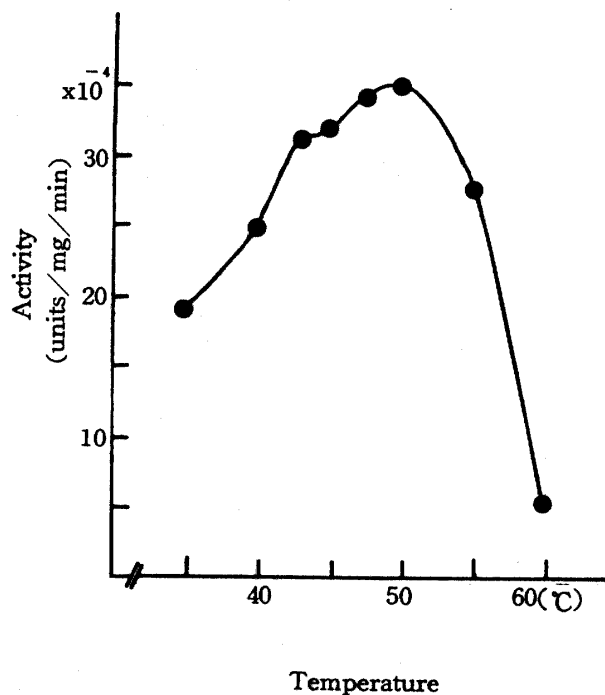


Fig. 2 Effect of Temperature on  $\beta$ -Glucosidase Activity. The reaction mixture containing the enzyme solution 0.5 ml (850  $\mu$ g) and the substrate (1 mg) was incubated at various temperatures for 30 min.

に示した様に、10倍希釈した酵素液を用いた場合は、酵素量 860  $\mu$ g (タンパク質として) まで、酵素活性と酵素濃度間に直線関係が見られた。ところが20倍希釈酵素液を用いた場合は、645  $\mu$ g まで直線関係が見られた。後述する様に、本酵素は、過酸化水素添加により、阻害を受けることから、恐らく酸素との接触によっても阻害を受けるのではないかとと思われる。この様に20倍希釈した場合は、酸素等との接触が多くなり不安定になるものと推察される。そのため酵素活性を測定するに際しては、酵素と酸素との接触を出来るだけ少なくするように濃い酵素液を用いるかまたは濃い濃度の緩衝液を用いることが望ましいと思われる。そのため以後の実験では、酵素液は、粗酵素液を 43.3 mM McIlvaine 緩衝液 (pH 5.5) で10倍希釈したものを 0.2 ml (860  $\mu$ g) 用いることにした。

## 2 至適温度

前項で述べた様に調製した反応混合液を30°Cから60°Cまで種々反応温度を変えて、30分間反応し、酵素活性を求め、反応温度と酵素との関係を調べた。Fig. 2 に示すように本酵素活性は、反応温度50°Cで主要ピークが見られ43°Cで小活性ピークが見られた。このことから粗酵素液中には、50°Cに至適

温度を有する $\beta$ -グルコシダーゼと43℃に至適温度を有する $\beta$ -グルコシダーゼと2種存在するとも考えられる。またこの活性小ピークは、活性測定誤差等によるものとも考えられる。

### 3 至適 pH

pH 2.5 から 8.0 まで、種々 pH の異なる緩衝液を調製し、それを用いて種々 pH の異なる反応混合液を調製した。前項で述べたように至適反応温度が 50℃ と 43℃ に見られることから、それらの反応液を 50℃ と 40℃ で 30 分間反応し、反応 pH と酵素活性との関係を調べた。Fig. 3 に示すように本酵素活性は、50

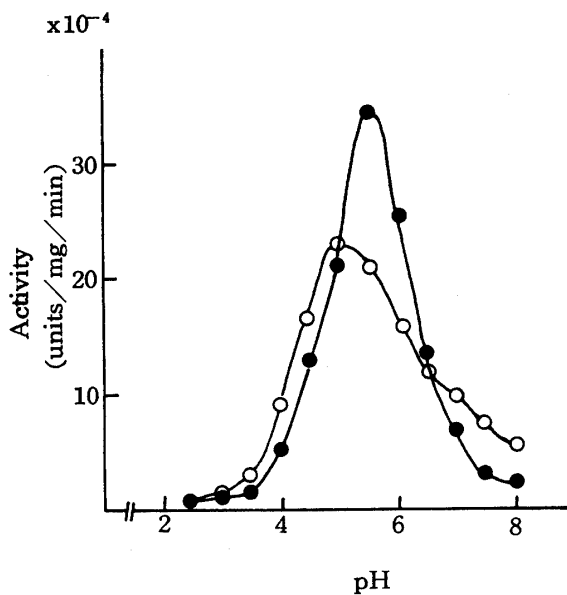


Fig. 3 Effect of pH on  $\beta$ -Glucosidase Activity. The various pH reaction mixtures preparing by the use of 43.3 mM McIlvaine buffer with pH values ranging from 2.5 to 8.0 were incubated at 50°C (●) and 40°C (○) for 30 min.

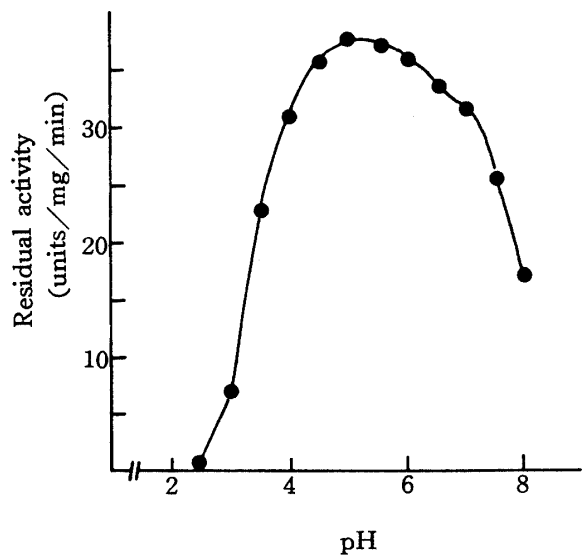


Fig. 4 pH-Stability. The different pH enzyme solutions maintained at 4°C for 24 hr and suitable samples were withdrawn and assayed with *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside.

℃で反応を行なった場合、pH 5.5 で活性ピークが見られた。また 40℃ では、pH 4.0 で活性ピークが見られた。そのことから至適 pH 5.5、至適温度 50℃ を有する $\beta$ -グルコシダーゼと至適 pH 5.0、至適温度 43℃ を有する $\beta$ -グルコシダーゼとが存在するものと考えられる。しかし至適 pH 5.5、至適温度 50℃ を有する $\beta$ -グルコシダーゼの方が酵素活性は、高いため、以後の実験では、pH 5.5、反応温度 50℃ で反応を行なった。

### 4 pH 安定性

pH 2.5 から 8.0 まで、種々 pH の異なる酵素液を調製し、4℃ で 24 時間放置したのち、酵素活性を測定し、本酵素の pH 安定性を調べた。Fig. 4 に示したように本酵素活性は、pH 5.0 でピークが見られた。pH 5.5 で調製直後の酵素液を用いて測定した活性値を 100 とし、それぞれの pH での残存活性を調べた場合、pH 4.5 では 90%、pH 5.0 では 94%、pH 6.0 では 90% であり、この範囲の pH では、本酵素は、4℃ で 24 時間ほぼ安定であった。pH 4.5 以下または pH 6.0 以上では、本酵素活性は、急激に低下し、不安定であった。

5 熱安定性

D-グルコースは、基質アナログであるため、その糖の添加は、本酵素の加熱処理には、効果があると考えられる。そのためpH 5.5に調製した酵素液とその液に0.5% D-グルコースを加えた酵素液を調製し、それを40℃から65℃まで種々温度を変えて加熱処理したのち、酵素活性を測定し、本酵素の熱安定性を調べた。加熱処理前の酵素液で求めた活性を100とし、それぞれの加熱処理温度での残存活性を求めた。D-グルコースを加えた酵素液でも加えていない酵素液でも40℃では、その残存活性は、100%であったが、その温度より加熱温度を上げるにしたがって、残存活性は、徐々に減少して行き60℃では、ほとんど活性は見られなかった (Fig. 5)。

前報<sup>4), 5)</sup>で述べたようにサトウキビ茎中に存在する $\alpha$ -ガラクトシダーゼ<sup>4)</sup>と $\beta$ -キシロシダーゼ<sup>5)</sup>は、耐熱性であり、前者に対しては、ガラクトースが、後者に対しては、D-キシロースがその耐熱性促進効果が見られたが、この $\beta$ -グルコシダーゼの熱安定性に対しD-グルコースは、その促進効果は、見られなかった。

6 金属塩および特殊試薬の影響

本酵素を精製するに際し種々の緩衝液等を使用することが予想されるため、金属塩または特殊試薬を加えた反応液を調製し前述の条件で反応し、酵素活性を測定した。その結果、Table Iに示したように、特に著しい阻害を示したものは、硝酸銀、塩化第一水銀、過酸化水素で、それらは最終濃度1mMでそれぞれ91%、58%、39%阻害した。またPCMBも著しく阻害を示し、60 $\mu$ Mで54%阻害した。

Table I Inhibition of  $\beta$ -Glucosidase by Metal Ions and Specific Reagents.

Metal ions and sp. reagents	Conc.(M)	Relative activity (%)
None	none	100.0
AgNO <sub>3</sub>	1 x 10 <sup>-3</sup>	9.5
KCl	〃	95.4
CaCl <sub>2</sub>	〃	89.6
CoCl <sub>2</sub>	〃	94.4
CuSO <sub>4</sub>	〃	90.7
HgCl <sub>2</sub>	〃	42.4
MnCl <sub>2</sub>	〃	85.2
ZnCl <sub>2</sub>	〃	94.4
EDTA	〃	87.6
L-Cysteine	〃	91.7
Iodoacetic acid	〃	98.3
Mercapethanol	〃	97.0
PCMB	6 x 10 <sup>-5</sup>	46.5
Thiourea	1 x 10 <sup>-3</sup>	102.2
Bromoacetic acid	〃	103.4
KI	〃	99.0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	〃	60.6

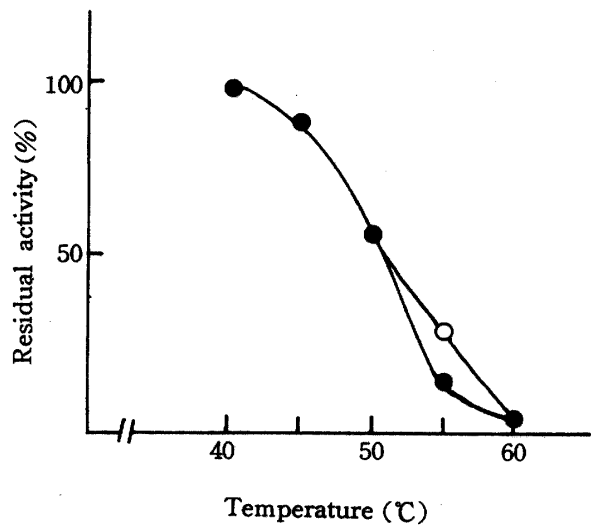


Fig. 5 Thermal Stability. The enzyme solution containing 0.2 M D-glucose (○) and one lacking (●) were maintained for 30 min at the given temperatures, and suitable samples were withdrawn and assayed with *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside as substrate.

7 糖類およびその誘導体の影響

本酵素を精製する上で種々の糖との親和性を利用したり、その糖を利用し本酵素の安定化をはかる必要が予想されるためTable IIに示した糖類またはその誘導体を加えた反応液を調製し、前述の条件で反応し、酵素活性を求めた。その結果、マルトースでは約20%の阻害作用が見られたが、その他の糖やその誘導体では、顕著な阻害効果または促進効果は、見られなかった。

8 セファデックスG-100 カラムクロマトグラフィ

$\beta$ -グルコシダーゼのこのカラムでの精製効果を推定するため、粗酵素液をこのカラムにのせた。その結果、Fig. 6に示すように本酵素活性は、フラク

Table II Inhibition of  $\beta$ -Glucosidase by Various Sugars and their Derivatives.

Inhibitors (Final conc. 20mM)	Relative activity
None	100.0
D-Xylose	98.9
Inositol	99.9
Glucose	97.7
L-Ascorbic acid	104.9
L-Arabinose	103.8
D-Galactose	100.0
Melibiose	98.0
Raffinose	96.0
Fructose	96.3
Mannose	91.6
Lactose	100.2
Maltose	78.3
Sucrose	98.3
N-Acetyl-D-glucosamine	95.1
Salicine	99.1

ション80から100の間でピークとなってあらわれその精製効果は、大であることがわかった。このカラムに対する本酵素の溶出量から推定し本酵素の分子量は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ (46,000) より大きく、 $\beta$ -キシロシダーゼ (62,000) より小さいものと思われた。

### 9 基質特異性

上述のセファデックス G-100 カラムクロマトグラフィによって得られた部分精製酵素液を用いてその  $\beta$ -グルコシダーゼに対する基質特異性を調べた。その結果、Table III に示したように本酵素は、*p*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-グルコピラノサイドとサリシンには作用するがセルロースには、作用しなかった。またサリシンよりも *p*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-グルコピラノサイドを優先的に水

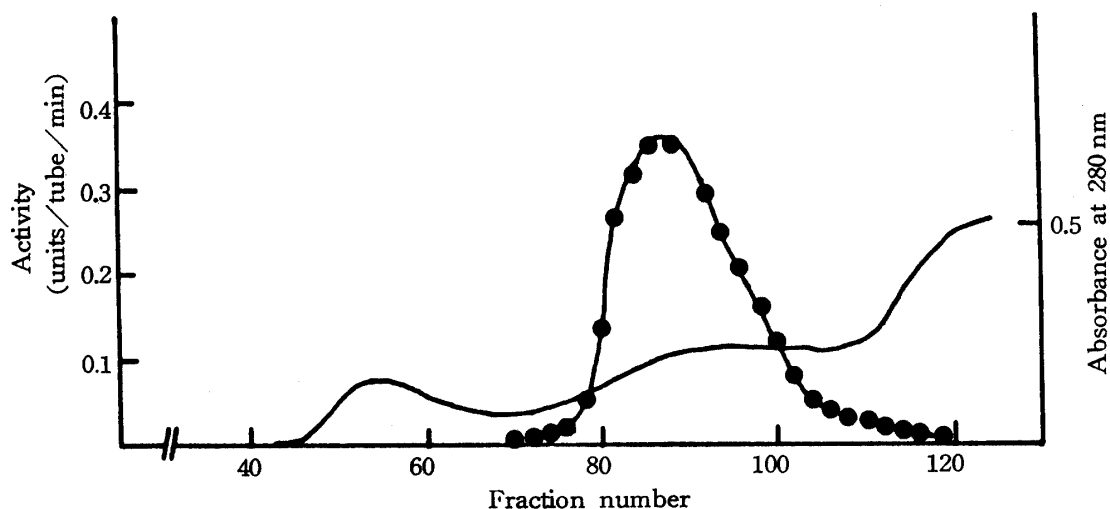


Fig. 6 Gel Filtration of *Saccharum officinarum*  $\beta$ -Glucosidase. Thirty ml crude enzyme solution was applied to a Sephadex G-100 column (3.8 x 130 cm), which had been equilibrated with 10 mM McIlvaine buffer (pH 5.5) containing 0.1 M sodium chloride.  $\beta$ -Glucosidase (●) and absorbance at 280 nm (—).

解することから本酵素は、基質に対しアグリコン特異性を有すると推察された。

Table III Substrate Specificity of  $\beta$ -Glucosidase

Substrates	Activity (units/mg/min)
<i>p</i> -Nitrophenol- $\beta$ -D glucopyranoside	0.1280
Salicine	0.0127
HB-Cellulose	0.0000
HL-Cellulose	0.0000
CM-Cellulose	0.0000

## 要 約

サトウキビ汁液を脱色したのち、70%飽和硫酸で沈澱させて得られる粗酵素液を用いて $\beta$ -グルコシダーゼの酵素学的基礎的性質を調べた。本酵素の至適温度は、50℃であり、至適pHは、5.5であった。pH4.5～6.0では、比較的安定であった。熱安定性に対し、40℃で30分間は、安定であったがそれ以上の温度では、不安定であり、60℃では、ほぼ完全に失活した。D-グルコースには、その熱安定性に対する促進効果は、見られなかった。硝酸銀、塩化第一水銀、過酸化水素、PCMBによって著しく阻害を受けた。またマルトースによっても若干阻害を受けた。粗酵素をセファデックスG-100ゲルカラムにかけ得られる部分精製酵素を用いて基質特異性を調べた結果、*p*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-グルコピラノサイドとサリシンには、作用したがセルロースには、作用しなかった。またサリシンよりも*p*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-グルコピラノサイドを優先的に水解した。

## 引用文献

- Alexander A. G., 1965 Hydrolytic Protein of Sugarcane: The Acid Invertases, J. Agric. Univ. Puerto Rico, 49, 287-307
- Alexander A. G. and Lebrón J., 1973, Isolation and Purification of Amylase from Sugarcane Leaves, Proc. Intern. Soc. Sugarcane Technol. 13, 514-521
- 知念 功・江川義和・外間宏一・四方治五郎, 1977, 甘蔗幹茎酸性インベルターゼに関する研究 琉球大学農学部学術報告, 24, 217～229
- Chinen I. Nakamura T. and Fukuda N., 1981 Purification and Properties of  $\alpha$ -Galactosidase from Immature Stalks of *Saccharum officinarum* (Sugar Cane). J. Biochem., 90, 1453-1461.
- Chinen I. Oouchi K. Tamaki H. and Fukuda N., 1981, Purification and Some Properties of Thermostable  $\beta$ -Xylosidase from Immature Stalks of *Saccharum officinarum* L. (Sugar Cane), J. Biochem. in Press.
- Etcheberrigaray J. L. Vattuone M. A. and Sampietro A. R., 1981,  $\beta$ -Galactosidase from Sugar Cane., Phytochemistry, 20, 49-51.
- Fukuda M. and Egami F., 1968,  $\beta$ -Xylosidase from the Liver of *Charonia Lamphas*. II.  $\beta$ -Xylosidase and  $\beta$ -Glucosidase, J. Biochem., 66, 157-164.
- Glasizious K. T. and Gayler K. R., 1969, Sugar Transport: Occurrence of Trehalase Activity in Sugar Cane. Planta, 85, 229-302.
- Glasizious K. T. and Gayler K. R., 1972, Storage of Sugars in Stalks of Sugar Cane. Bo-



tanical Review, 38, 471-490.

10. 村松 喬, 酵素の分解 "多糖生化学" 江上不二夫他編集, 共立出版株式会社, 2 665 ~ 722.
11. Rougan P. G. Waldron J. C. and Glasziou K. T., 1972, Starch Inheritance in *Saccharum*. Enzymatic Polymorphism for  $\beta$ -Amylase in Interspecific and Hybrids. Proc. Intern. Soc. Sugarcane Technol., 14, 257-265.