

琉球大学学術リポジトリ

クワズイモ葉のインベルターゼ(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, 安井, 勝, Nakasone, Yoko, Yasui, Masaru メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4027

仲宗根洋子*・安井勝*

Yoko NAKASONE and Masaru YASUI :
Invertase from *Alocasia* leaves

Summary

The paper reports the presence and some properties of acid invertase from *Alocasia odora* C. Koch leaves. Invertase activities for the protein fractions obtained by acetone, ethanol or ammonium sulfate precipitations were determined. The specific activities of acetone fraction, ethanol fraction and ammonium sulfate fraction were 11.9, 14.3 and 2.2, respectively, indicating that the activities of the fractions obtained by the two organic solvents were about six times higher than that obtained by ammonium sulfate. Acetone fraction had an almost equivalent value to that of ethanol fraction in specific activity and the former had two times more than the latter in the content of enzyme protein. The fraction precipitated under 20-40% concentration of acetone, containing most of the invertase, was used for examination of the properties of the invertase from alocasia leaves. The invertase present in the leaves was acid invertase, having a pH optimum of 5.0 and almost no activity at alkaline areas. It had an optimum temperature of 35°C and was inactivated at temperatures higher than 45°C. The enzyme was inhibited by the presence of 1 mM of Hg^{2+} , Mn^{2+} and Mg^{2+} and was not affected by that of Ca^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} and K^+ . The enzyme mainly showed β -fructofuranosidase activity with small level of maltase activity.

緒 言

近年、生物資源の利用面から熱帯・亜熱帯の植物が注目されはじめている。

イモ類は、古くから人類の主要な食糧資源であり、今後も多方面にわたる利用が可能である。

クワズイモ属 (*Alocasia*) はテンナンショウ科 (*Alaceae*) に属する植物で、熱帯・亜熱帯に広く分布⁴⁾している。この塊茎には、デンプンが含まれるが蔘酸塩が混在するために、ポリネシアで食用に栽培されている一種を除いては、一般に食用にはなっていない。本属の植物に含まれる成分のうち有効利用の対象となりうるものとしては、*A. macrorrhiza* を用いた、デンプン²⁾、配糖体 trigichinin の分解酵素¹³⁾ および蔘酸分解細菌¹⁴⁾ についての報告がある。一方、*A. odora* C. Koch は、沖縄において極めて普通にしかも多量に生育している種であるが、これまでにはデンプンに関する報告^{7, 11)} があるにすぎない。

今回は、光合成の初期に合成される蔗糖の分解酵素インベルターゼ (β -D-fructofuranoside fructohydrolase) に着目し、その酵素活性および一般的性質について研究した。

* 琉球大学農学部農芸化学科

実験材料および方法

1. 酵素の調製

葉柄を除去した新鮮なクワズイモ葉を細片し、乳鉢で海砂とともに磨碎した。磨碎物を木綿布で濾し、濾液を $8,000 \times g$ で15分間遠心分離して上澄液を得た(粗酵素液)。これに相当量の有機溶剤(アセトン, エタノール)あるいは、硫酸を添加して酵素蛋白を沈澱させた。その沈澱部分を $8,000 \times g$, 15分間遠心分離して回収し、これに0.05 Mリン酸緩衝液pH7.0を加えてけん濁させ、同緩衝液で透析した。これを酵素液とした。

2. 酵素活性の測定

0.1 M蔗糖 0.3 ml, 0.5 M酢酸緩衝液pH5.0, 0.3 ml, および酵素液 0.1 mlを含む酵素反応液, 1 ml. を30℃, 30分間インキュベートした。生成された還元糖をSomogyi-Nelson 法で定量し, グルコースに換算して酵素活性の測定をおこなった。

実験結果および考察

1. アセトン, エタノールおよび硫酸処理により得られた沈澱画分の酵素活性

有機溶剤あるいは無機塩により沈澱した蛋白画分のインベルターゼ活性をTable 1. に示した。硫酸

Table 1. Invertase activities of fractions precipitated by acetone, ethanol or ammonium sulfate

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (unit)*	Specific activity (unit/mg)
60% acetone	159	190	11.9
60% ethanol	85	120	14.3
70% ammonium sulfate	1,174	264	2.2

* expresses μmol of glucose formed per 30 min at 30℃. Protein was determined by the Lowry method. Enzyme preparation: *Alocasia* leaves were cut into small pieces and homogenized with sea sand in phosphate buffer, pH8.0. The homogenate was filtered through four layers of cheesecloth and centrifuged at $8000 \times g$ for 20 min. Acetone, ethanol or ammonium sulfate was added to the supernatant so that their concentrations were equivalent to 60%, 60% and 70%, respectively. Resulting precipitates were resuspended in phosphate buffer, pH 7.0 and were dialyzed against the same buffer.

The reaction mixture was consisted of 0.03M sucrose, 0.15M sodium acetate buffer, pH 5.0, and 0.1 ml enzyme fraction in final volume of 1 ml. The mixture was incubated at 30℃ for 30 min. The enzyme activity was determined by the method of Somogyi-Nelson, using glucose as standard.

塩析は、多量の蛋白を沈殿させ、他の蛋白沈殿剤の15%程度の比活性を示した。有機溶剤による蛋白沈殿画分は、硫酸沈殿画分よりも活性の高いことがわかった。一方、アセトンとエタノールとを比較すると、アセトンによる蛋白の収率がエタノールの約2倍であることが明らかとなった。従って、酵素の調製にはアセトンを用いることにした。次に、粗酵素液の60%アセトン沈殿画分を集めて、アセトン濃度別分画をおこなった。その結果、20~40%アセトン沈殿画分が最も高い比活性を有した。このことから、以下の実験では、この画分を酵素標品として用い、その性質を明らかにした。

2. インベルターゼの性質

本酵素の活性は、酵素濃度が増すにつれて、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の酵素濃度までは直線的に増加した。

1) 至適pHとpH安定性

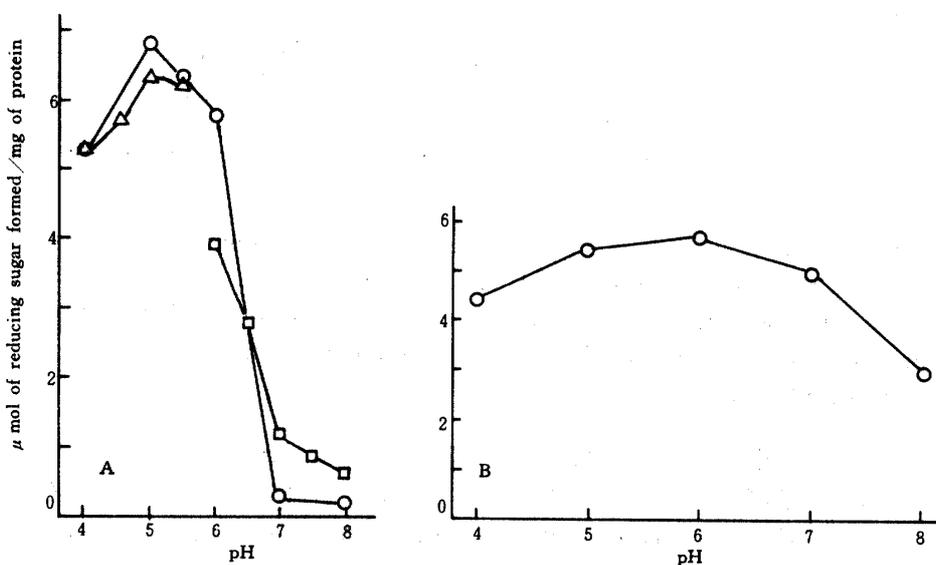


Fig. 1. Effects of pH on invertase activity (A) and invertase stability (B)

(A) The reaction mixtures (1 ml) consisted of 0.03 M sucrose solution, 0.1 ml enzyme solution, 0.1 ml enzyme solution (50 μg of protein, 20-40% -acetone fraction) and 0.15 M buffer of given pHs were incubated at 30°C for 30 min. \circ : Mcllvaine, \triangle : Acetate, \square : Phosphate.

(B) The enzyme solutions were preincubated in 0.05 M Mcllvaine (pH 4-8) buffers at 30°C for 15 min. and then assayed for the remaining activities with 0.15 M acetate buffer, pH 5.0, at 30°C for 30 min.

植物組織は、しばしば、二種のインベルターゼ、即ち、酸性側に至適pHをもつ酸性インベルターゼとpH7附近に至適pHをもつアルカリ性インベルターゼを含むことが認められている。Fig. 1-Aに示したように、クワズイモ葉のインベルターゼの至適pHは5.0にあった。pH6以上になると活性は急激に低下した。また、緩衝液の違いによって、至適pHが変わるとか中性以上のpHで酵素活性が増大するということはなかった。これらのことから、クワズイモ葉は酸性インベルターゼのみを持つことが明らかとなった。

pHに対する酵素の安定性については、pH 4~8のMcllvaine緩衝液中に30°Cで15分間保持したのち、残存する酵素活性を測定した。この条件下では、pH4~7の範囲内で安定であった (Fig. 1-B)。従って、酵素そのものの安定性という面ではpH 7までの範囲が含まれるが、酵素活性を測定する場合にはpH6以上では不適當であり、弱酸性側のpH 5附近が最適であると云える。

2) 至適反応温度と温度安定性

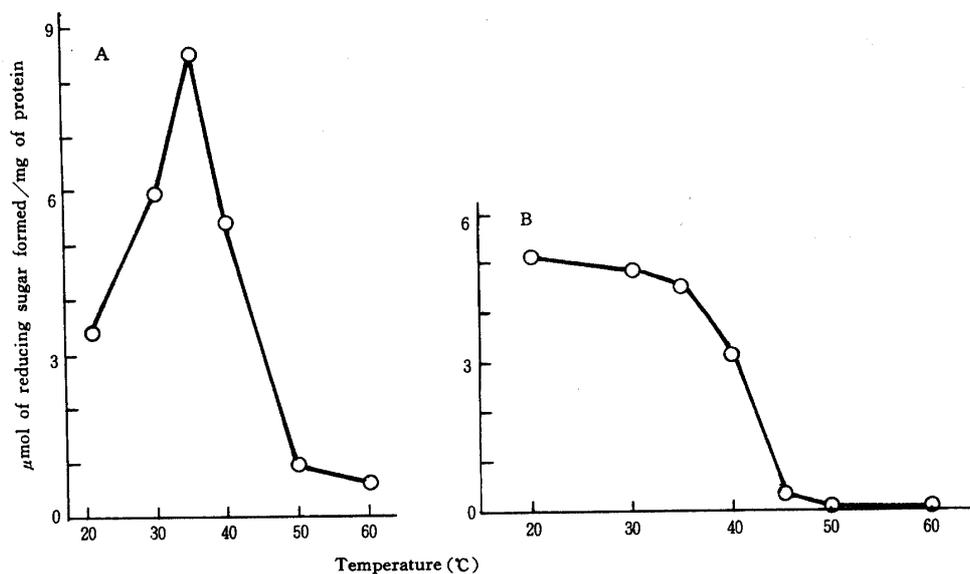


Fig. 2. Effects of temperature on invertase activity (A) and invertase stability (B)

(A) The activity was determined at pH 5.0 under 30°C for 30 min.

(B) The enzyme solutions in acetate buffer, pH 5.0, were incubated at given temperatures for 15 min. and then assayed for the remaining activities at the conditions stated in (A).

酢酸緩衝液pH 5.0を用い、20°Cから60°Cまでの各温度において、30分間酵素反応をおこなった(Fig. 2-A)。本酵素の至適温度は35°Cにあり、40°C以上では、酵素活性は急激に減少した。次に酵素だけを20°Cから60°Cまでの各温度に15分間保持したのち、残存する酵素活性を測定した(Fig. 2-B)。本酵素は35°C付近までは安定であるが、45°C以上はほぼ完全に活性を失なった。なお、本酵素は凍結・融解によつては、ほとんど活性低下を示さなかった。

3) 基質濃度

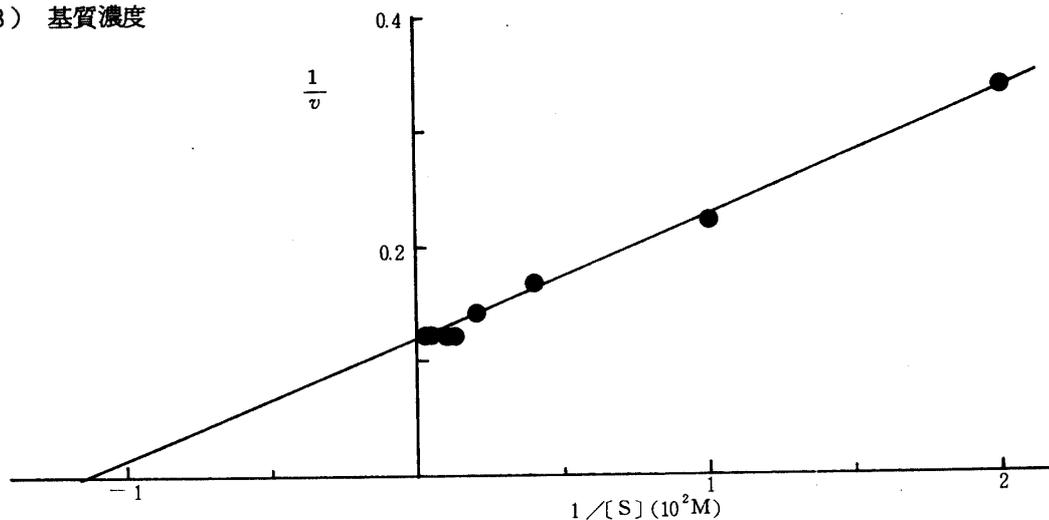


Fig. 3. Lineweaver-Burk reciprocal plot of invertase

The activity was determined at pH 5.0 under 30°C for 30 min.

Fig. 3 に示したように蔗糖に対する k_m 値は、9 mMであった。みかん⁶⁾やトマト¹⁰⁾のインベルターゼ

の k_m 値と同レベルにあった。

4) 各種試薬の影響

Table 2. Effect of chemicals on invertase activity

Chemicals	Relative activity (%) in concentration of		
	0 mM	0.1 mM	1 mM
None	100		
EDTA		109	
Tris - Cl		101	
MgCl ₂		100	50
MnCl ₂			36
FeSO ₄		100	
CoCl ₂			102
NiCl ₂			99
ZnSO ₄			87
CuSO ₄			84
CaCl ₂			96
HgCl ₂			6
CdCl ₂			90
KCl		110	117

Tris - Cl was adjusted to pH 5.0.

Table 2 に示した濃度の各種試薬の存在下で、pH 5.0 で30分間反応をおこない酵素活性を測定した。酵素活性は、水銀イオンによって最も強く、マンガンイオンやマグネシウムイオンによって中程度に阻害された。なお、マグネシウムイオンの5 mM濃度では、90%阻害された。その他の2価イオンの酵素活性におよぼす影響は、ほとんど認められなかった。また一価のカリウムイオンは、0.1mMから10 mMの範囲で、相対活性が100%附近であった。従って、このカリウムイオンによる賦活現象はないものと思われる。植物のインベルターゼには、本酵素のように水銀イオンによってほぼ完全に阻害される場合¹⁾と、それほど阻害されない場合¹²⁾とがある。マグネシウムの影響については、0.5mM~10mMでも酵素活性がほとんど失われぬという報告^{9, 12)}があるが、本酵素では50%以上阻害されている。このちがいが酵素の起源あるいは酵素調製法等によるものかどうかは、不明である。ある植物では Tris で阻害される^{3, 12)}ことが知られている。50~60mMでも阻害されない場合^{6, 8)}もある。本酵素の活性には、0.1mM濃度の Tris では何ら影響を及ぼさなかったが、高濃度の Tris については今後検討する必要がある。

5) 基質特異性

酵素活性は、蔗糖を基質として用いたときの酵素活性に対する相対値で表わした(Table 3)。この結果から、本酵素は主として蔗糖を分解するインベルターゼ(β -D-fructo furanoside fructohydrolase)であることがわかった。しかし、蔗糖のほかにマルトースなどの α -glucosideも若干分解するのでインベル

Table 3. Substrate specificity of invertase

Substrate	Relative activity
Sucrose	100 %
Raffinose	17
Maltose	10
Melezitose	7.4

Final concentration of each substrate was 30 mM.

ターゼ以外の酵素の存在も十分考えられる。また、Table 3 に示した本酵素の基質特異性の結果は、他の植物インベルターゼ^{5, 6)}と類似した。

摘 要

クワズイモ葉のインベルターゼの調製方法としては、硫酸塩析よりもアセトン沈澱法が効果的であった。そこで、20~40%アセトン濃度で沈澱した、部分精製の蛋白画分を、インベルターゼ酵素標品として用い、その諸性質を検討した。本酵素は至適pHが5.0で K_m 値が9mMの酸性インベルターゼであることが明らかとなった。本酵素は1mM水銀イオンによりほぼ完全に失活し、マンガンイオンおよびマグネシウムイオンの阻害をもうけた。また、至適温度は35℃にあって、15分間保持の45℃以上の温度ではほとんど活性を失なった。

引用文献

1. 知念功, 江川義和, 外間宏一, 四方治五郎, 1977 甘蔗幹基酸性インベルターゼに関する研究, 琉大農学報, 24 : 217 ~ 229
2. 土井新次 1944 どくいもの発酵工業用原料としての価値, 農化, 20 : 457 ~ 464
3. Hatch, M.D., Sacher, J. A. and Graszioiu, K. T. 1963 Sugar accumulation cycle in sugar cane, Plant Physiol., 38 : 338-343
4. 初島住彦 1975 琉球植物誌, 762 沖縄生物教育研究会
5. Hawker, J. S., R. R. Walker and H. P. Puffner 1976 Invertase and sucrose synthase in flowers, Phytochem., 15 : 1441-1443
6. 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
7. Kobamoto, N., Toyama, M. and Shimizu, T. 1980 Pesticide producing agricultural food processing. Chemical composition of the stem of *Alocasia odora* C. Koch. Sci. Bull. Coll. Agr. Univ. Ryukyus, 27 : 149-154
8. 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
9. 増田宏志, 菅原四郎 1973 甜菜主根スライス中に発現する結合型サッカラーゼの塩類による可溶化, 農化, 47 : 147 ~ 152
10. Nakagawa, H., K. Iki, M. Hirata, S. Ishigami and N. Ogura 1980 Inactive β -fructofuranosidase molecules in senescent tomato fruit. Phytochem., 20 : 195-197
11. 仲宗根洋子, 水谷直人, 外間宏一 1981 クワズイモの澱粉に関する研究, 琉大農学報, 28 : 119 ~ 125
12. Vattuone, M. A., F. E. Prado and A. R. Sampietro 1981 Cell wall invertase from sugar cane, Phytochem., 20 : 189-191
13. Wolfgang, H. und A. Nahlstedt 1975 Spezifische glucosiden fur das cyanoglucosid triglochinin. Reinigung und charakterisierung von glucosidasen aus *Alocasia macrorrhiza* Schott, Hoppe-Selyer's Z. Physiol. Chem., 356 : 1265-1275
14. Yara, K. and Usami, S. 1968 Studies on oxalate-decomposing bacteria isolate from *Alocasia* plants, Bot. Mag. Tokyo, 81 : 425-433