琉球大学学術リポジトリ

未熟サトウキビ茎のグリ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, 仲村, 毅, 玉城, 一, 嶺井, 勝, 真下, 均, 福田, 亘博, Chinen, Isao, Nakamura, Tuyoshi, Tamaki, Hajime, Minei, Masaru, Mashimo, Hitoshi, Fukuda, Nobuhiro
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4050

未熟サトウキビ茎のグリコシダーゼに関する研究

知念　功，仲村　毅，玉城　一，
嶺井　勝，真下　均，福田亘博

Isao CHINEN,* Tuyoshi NAKAMURA,** Hajime TAMAKI,* Masaru MINEI* Hitoshi MASHIMO,*** and Nobuhiro FUKUDA,* Studies on Glycosidases of Immature Sugar Cane Stalks.

I　緒　　論

光合成能を有するほとんどすべての植物が蔗糖を有しているが，砂糖の製造原料として用いられているのは，主としてサトウキビと甜菜である。その栽培地域[4]を見た場合，甜菜は，ソ連，フランス，西ドイツ等の比較的に寒い地域で栽培されているのに対し，サトウキビは，ブラジル，キューバ，インド，メキシコ，オーストラリヤ，中国，フィリッピン等の熱帯亜熱帯地域で栽培され，その地域は，対照的である。蔗糖生産量[4]は，サトウキビの場合，全蔗糖量の約60%をしめている。ところがサトウキビの場合，多量の製糖副産物が生じ，その高度利用は，遅々とし進んでいない。この副産物の高度利用は，いろいろな面から重要であり，今後の農業振興上，見のがすことのできないもののひとつであろう。この副産物としては，バガス，マッド，廃糖蜜等があげられるが，その組成[5]を見た場合，バガスと廃糖蜜には，セルロース，少糖類やセルロース以外の多糖類等の炭水化物が多く含まれている。一方マッドには，これらの炭水化物も多く含まれているが，それ以外にワックスや高級脂肪族アルコールも多い。[5]これらのワックスや高級脂肪族アルコールを高度利用するための基礎研究として，著者らは，これまでに栄養学的面からその価値を知るため，これら両物質を高度に精製した上で，これら両物質を別々に投与した結果，このワックスは，ラット血中コレステロール低下作用を有することがわかった。[6]この知識を生かした利用法を今後は考える必要があろう。また，バガスや廃糖蜜等の副産物に対する基礎研究として，これらの副産物の主成分である炭水化物の構造を解明した上で，それを分解し，糖組成を知ることは，その高度利用の面で必要かつ重要なことである。今回は，この過程で重要な役割をはたすグリコシダーゼを広く求めた結果，サトウキビ梢頭部にこれらの酵素が存在することがわかったのでサトウキビ茎の各節でのこれらのグリコシダーゼの分布を調べると共に，蔗汁からの脱色法を検討した。またディスクゲル電気泳動を行った場合のゲル中でのこれらの酵素活性の染色法についても研究を行なったので，以下にこれらの結果を記述する。

＊琉球大学農学部農芸化学科　＊＊オリオンビール株式会社
＊＊＊三共株式会社
琉球大学農学部学術報告　28：73～80（1981）

Ⅱ　実験材料及び方法

1. 材料； 沖縄県西原町の琉球大学附属農場で生育した3～4ケ月の未熟サトウキビ（*Saccharum officinarum* NCo 310）を実験材料として用いた。

2. 試薬； セファデックスG−25, G−100は，ファルマシア・ジャパン株式会社から購入した。この研究で使用した*p*−ニトロフェニール・グリコピラノサイド及びDEAEセルロースは，生化学工業株式会社から購入した。シュークロース及び硫安は，和光純薬工業株式会社から購入した。本研究で使用したその他の試薬は，試薬特級を用いた。

3. 酵素活性測定法[1]；インベルターゼ以外のグリコシダーゼ活性は，基質として*p*−ニトロフェニールグリコピラノサイドを用いた。インベルターゼに対しては，シュークロースを用いた。反応は，適当に希釈した酵素液0.5mlに基質液0.5mlを加えてpH 5.5（クエン酸緩衝液）で30分間インキュベートした。反応温度は，α−ガラクトシダーゼとβ−キシロシダーゼは，60℃で，β−グルコシダーゼとα−マンノシダーゼは，55℃でその他グリコシダーゼは，40℃で行でおこなった。基質液の濃度は，*p*−ニトロフェニールグリコピラノサイドを用いる場合は，0.1％（w／v）に調整した。インキュベートした反応液は，1M炭酸ナトリウム液1mlを加え，波長410nm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。シュークロースを基準と用いる場合は，0.2％に調整した。

4. ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動法[1]；本実験に用いた試料は，精製した酵素液か部分的に精製した酵素液を用いた。ポリアクリルアミドゲル濃度は，7.5％に調製した。用いた緩衝液は，α−マンノシダーゼを泳動する場合は，トリス−グリシン液（pH 8.3）を用い，その他の酵素では，β−アラニン−氷酢酸液（pH 4.5）を用いた。泳動は，1カラム当り2mA通電した。泳動したゲルの蛋白質を染色する場合は，0.044％コマーシーブリリアントブルー液に30分間浸したのち，7％酢酸で脱色した。泳動ゲルの酵素活性を染色する場合は，そのゲルをあらかじめ0.1Mクエン酸緩衝液（pH 5.5）で洗浄した。その方法は，トリス−グリシン緩衝液を用いて泳動した場合は，4～5時間，β−アラニン−氷酢酸緩衝液を用いた場合は，30分間その液に浸した。発色は，このゲルをhexazonium pararosanilin液に25℃で約15分浸した。その時間は，酵素量によって異なる。発色したゲルは，水洗後7％酢酸液中に入れ，密封し，冷却保存した。hexazonium pararosanilin液は，次のように調製した。まずpararosanilin hydrochroride 1gに水20mlと塩酸5mlを加えて溶解しパラロザリン液を調整する(室温で保存可能)。次に4％亜硝酸ナトリウム液を調製した（冷却室で1週間保存可能）このパラロザリン液0.6mlに亜硝酸液0.6mlを加え混和し，1～2分間放置したのち，基質6mgをethylenglycol monomethyl ether 1mlで溶解したのちクエン酸緩衝液（pH5.5）10mlを加えた基質液を加えて良く混和した。次に再びクエン酸緩衝液を加えて20mlとした。尚，基質は，α−ガラクトシダーゼには，1−Naphthyl−α−D−galactopyranoside，α−マンノシダーゼには，1−Naphthyl−α−D−mannopyranoside，β−N−アセチルグルコサミダーゼには，Naphthol AS−B1−2−acetamid−2−deoxy−β−D−glucopyranosideを用いた。

Ⅲ　実　験　結　果

1. サトウキビ茎の各節の長さ，直径，重さおよび糖

この実験で用いたサトウキビ茎は，Fig. 1に示したように，各節を区分するにあたって，その茎の先端を第1節とし，それを基部の方へ数えていき，第7節までをとった。その各節は，それぞれ切断し，各々について長さ，直径，重さおよび糖度を測定した。その結果，Fig. 2に示したように節の長さは，第3節までは，基部に行くにしたがい長くなったが，それより基部の節は，逆に短くなっていった。その

他の直径，重さおよび糖度は，節が基部に近ずくにしたがい増加した。

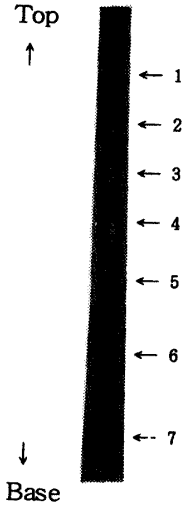

Fig. 1　Joint number of sugar cane stalk

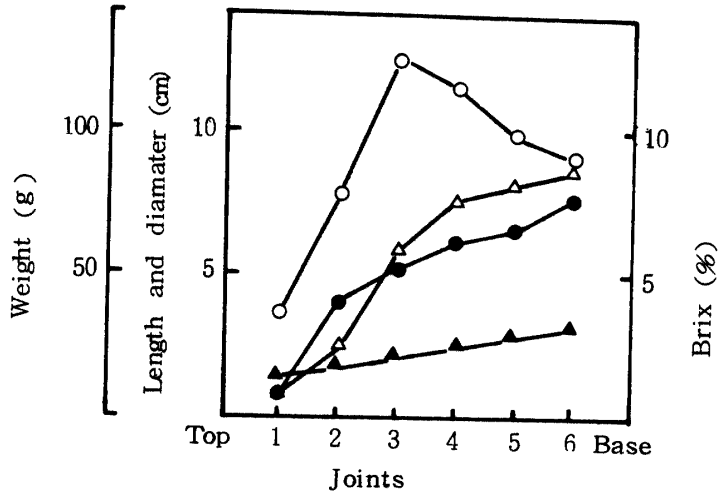

Fig. 2　Length, diameter, weight and brix of sugar cane joints.
(○); Length, (▲); Diameter, (△); Weight (●); Brix.

2. サトウキビ茎の各節での糖濃度とグリコシダーゼ濃度

サトウキビ茎の各節を切断し，各節を別々に圧搾し，得られる蔗汁を冷却遠心（8,000 rpm, 20 min）し，上清を得た。その上清をセファデックスG－15カラムクロマトグラフィーにかけた。溶出は水で行なった。得られる溶出液について，波長280 nmの吸光度と，少糖類及び単糖類の濃度を定量した。その結果をFig. 3に示した。その結果，極少量ではあったがフラクション25付近で多糖類が溶出した。

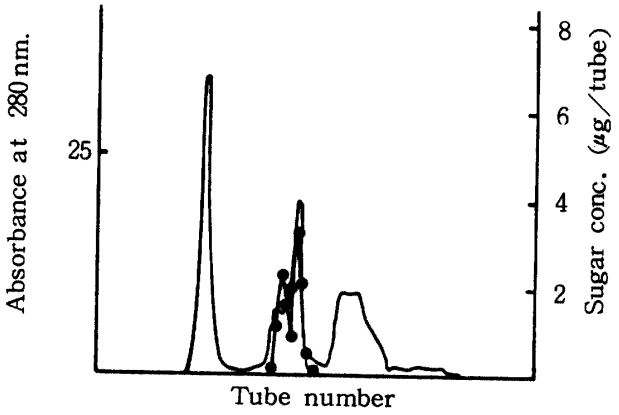

Fig. 3　Sephadex G－15 column chromatography of sugar cane
Column size ; 2 × 100 cm, sample ; 5 ml, one fraction ; 2.5 ml, and eluent ; pure water.

シュークロースは，フラクション39から44で見られ，ヘキソースは，フラクション44から49で見られた。今度は，各節ごとにその蔗汁中のシュークロースおよびヘキソース濃度およびグリコシダーゼ濃度を求めるために，これらの蔗汁を別々に同カラムクロマトグラフィーにかけた。その溶出液について，ヘキソースおよびシュークロース濃度を定量すると共にグリコシダーゼ活性を測定した。各節と糖濃度の関係を調べた結果をFig 4に示した。ヘキソースは，基部へ近づくにしたがい高くなり，第4節でピークに達した。シュクロースは，第3節附近から急激に基部の方へと高くなった。一方，サトウキ

ビ茎の各節でのグリコシダーゼ活性を調べた結果，Fig.5が得られた。α－ガラクトシダーゼ，インベルターゼ，α－マンノシダーゼ，β－N－アセチルグルコサミダーゼ，β－グルコシダーゼ，β－キシロシダーゼの存在が確認された。前4者の酵素活性は，特に高く，また，いずれも第3，4，5節では，その活性は，高かった。

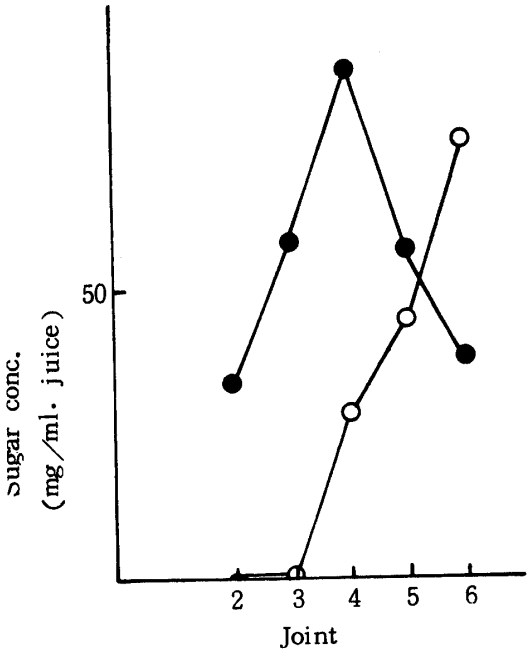

Fig. 4 Sugar concentration of sugar cane joints
(●); Hexose,
(○); Sucrose.

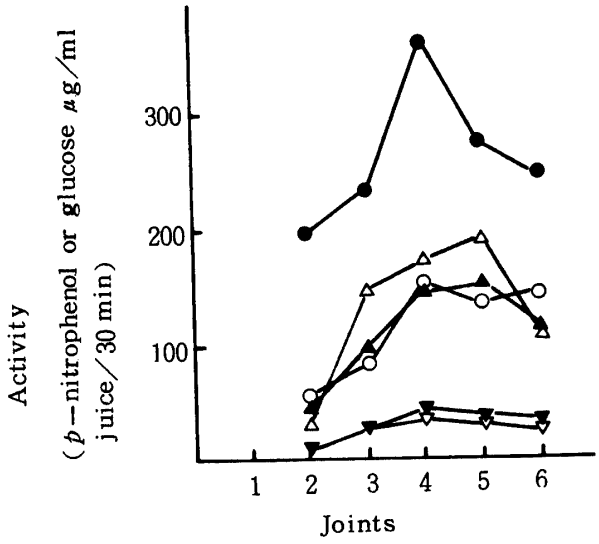

Fig. 5 Glycosidase activities of sugar cane joints
(●); α－galactosidase,
(▽); β－glucosidase
(△); invertase, (▼): β－xylosidase
(○); α－mannosidase,
(▲); β－N－acetylglucosominidase

3. 蔗汁からの脱色法

本研究では，サトウキビ茎に存在するグリコシダーゼを精製する前段階で或る程度蔗汁を脱色するとあとの操作が容易になるため，蔗汁をDEAE－セルロースカラムにかけて脱色を行なった。また比較のため活性炭カラムも使用した。その結果，Fig.6に示すように，蔗汁をDEAE－セルロースカラムにかけた場合，著じるしい脱色効果が見られた。活性炭カラムにかけた場合は，さらに脱色効果が見られた。ところが，蔗汁を両カラムにかけて得られる溶出液について，波長280nmでの吸光度，糖濃度，酵素活性を比較した結果，糖濃度は，Fig.7に示すように，両カラムで溶出されていたが，波長280nmでの吸光度では，差異が見られ，DEAE－セルロースカラムでは，著じるしく高いのに対し，活性炭カラムでは，極端に低くかった（Fig.8）。また念のためDEAE－セルロースカラムで得られた溶出液についてα－ガラクトシダーゼ活性を調べた結果，Fig.9に示すように，酵素は，溶出されていることがわかった。

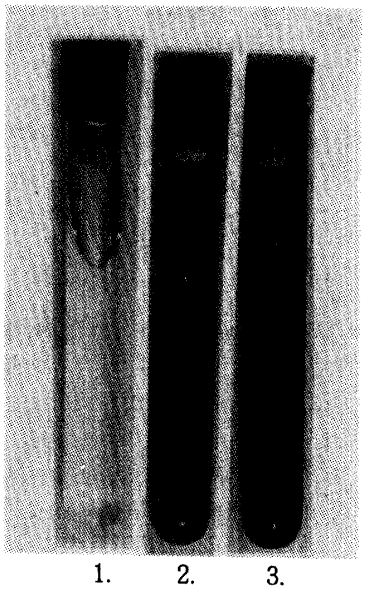

Fig. 6 Decolorization from suger cane juice by DEAE−cellulose column chromatography
1. Control (distl. water),
2. Sugar cane juice fraction obtained from DEAE−cellulose column chromatography
3. Sugar cane juice.

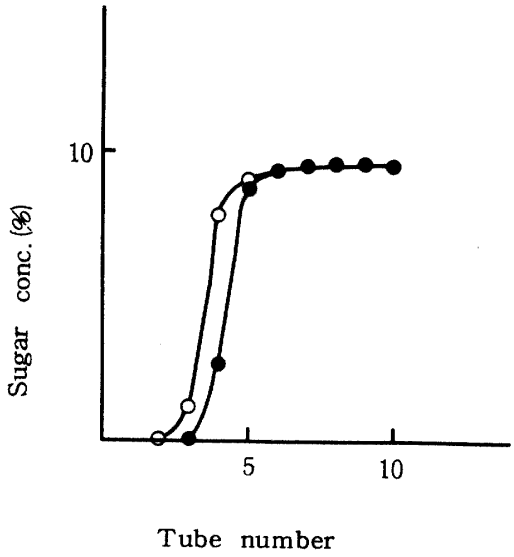

Fig. 7 Sugar concentration of eluent solution obtained from DEAE−cellulose and activated carbon columns chromatography
(●): DEAE cellulose column
(○): Activated carbon column

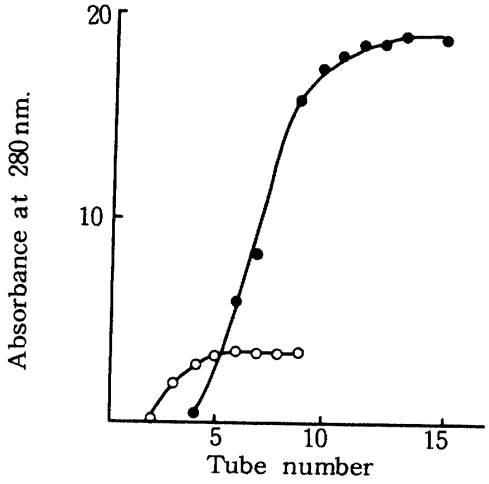

Fig. 8 Absorbance at 280nm of eluent solution obtained from DEAE−cellulose and activated carbon column chromatography
(●): DEAE−cellulose column
(○): Activated corbon column

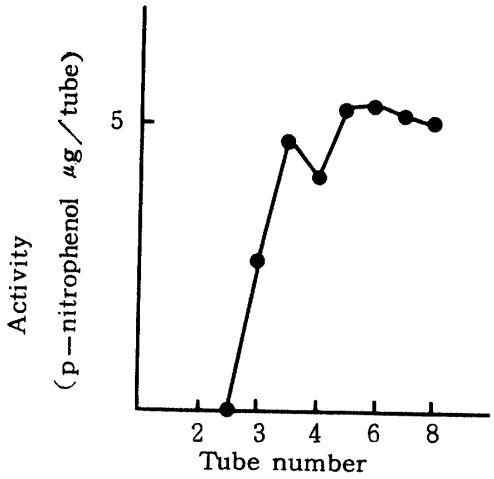

Fig. 9 DEAE−cellulose column chromatography of α−galactosidase from sugar cane juice.

4. ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動ゲルの酵素活性染色

サトウキビ茎中に存在するα－ガラクトシダーゼ，α－マンノシダーゼ，およびβ－N－アセチルグルコサミダーゼをカラムクロマトグラフィー等により部分的又は均一化するまで精製したものをポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動にかけた。そのゲル中の蛋白質およびこれらの酵素活性を染色した結果をFig.10に示した。α－ガラクトシダーゼとα－マンノシダーゼは，かなり精製が進んでいるため，蛋白質バンドも活性バンドも単一バンドであった。β－N－アセチルグルコサミダーゼは，精製が進んでいないため，蛋白質バンドは複数見られた。また活性バンドも複数見られた。

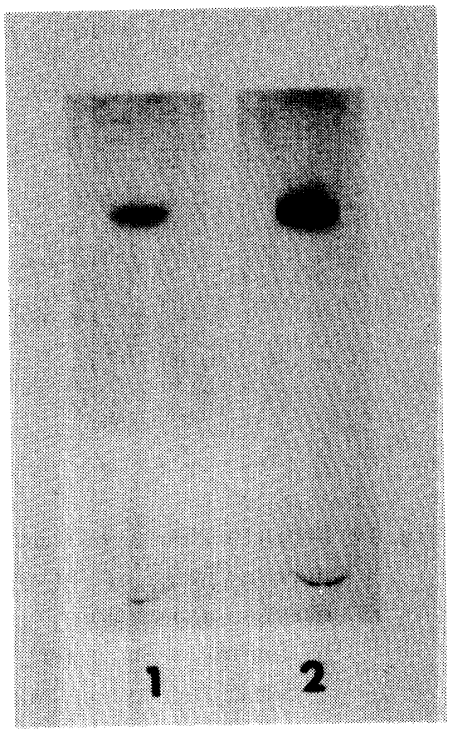

Fig. 10　Disc polyacrylamide electrophoresis of purified α－galactosidase
Electropholesis was carried out on 7.5 % polyacrylamide gel with β—alanine —acetic acid buffer (pH 4.5)
1. stained for protein
2. stained for enzymatic activity.

Ⅳ　考　　察

サトウキビの茎は，いくつかの節からなっているが，その節の長さは，基部では，甚だ短く，頂上にいくにしたがって，次第に長くなり，最長に達し，再び短かくなることは，これまでに多くの研究者によって調べられて来ている。[2] 著者らも，青葉のついた茎について調べた結果，Fig. 2 で示したように，同様な結果が得られた。またその茎の直径は，基部に向って大きくなる傾向がみられ，この現象は，その茎の耐倒伏性を増すといわれている。[2] このような傾向は，著者らの調べた茎でも見られ，その径は，基部に向かって大きくなっていた。ブリックスと蔗糖濃度の間には，高い正の相関関係がある[3]ため，本研究では，茎中の蔗糖濃度を知るためにこの茎の各節から得た蔗汁についてブリックスを測定した。そのブリックスは，このような若いサトウキビでは，基部から頂部へいくにつれて急速に低下していた。これまでのこの研究でもそのブリックスは，土壌表面近くの茎では最高を示し，頂部へいくにつれ，急速に低くなる[3]と云われており，著者らの結果とよく一致していた。ところがヘキソース濃度は，第4節で，ピークに達していた。このように節ごとにその単糖類の濃度を調べた研究は，これまでに見られないが，茎を大きくわけて，それについてブドウ糖濃度を調べた研究はあり，それによるとそのブドウ糖濃度は，若い節では，高く，節間が成熟するにつれ低下していくといわれている。[3] このような若い節では，呼吸作用が活発である[3]ことから，茎でのヘキソース濃度は，呼吸作用と密接な関係があると思われる。Natal uba, Co210, Co213 等の茎では，澱粉を比較的に多く含んでいることが知られてい

る[3]。この澱粉は，製糖操作を極めて困難にするといわれている[3]。*S. officinarum* の78品種について調べた結果，68品種では，その蓄積が見られなかったが，残りの10品種では，極く微量含まれていたと報告されている[3]。著者らの研究で，蔗汁をセファデックスG－25ゲルを用いてゲル沪過を行なった結果，多糖類の存在が見られた。この多糖類が澱粉かどうかは現在検討中である。またこの茎の第4節附近は，種々のグリコシダーゼ濃度が最も高かった。これまでに蔗糖合成に関与しているといわれているインベルターゼ[3]や呼吸作用に関与しているといわれているオキシダーゼ[3]も茎の梢頭部に存在するといわれている。また，この第4節附近は，先述のように，ヘキソース濃度が高いところであり，この節を境いとして蔗糖濃度は，急激に高くなるため，サトウキビの茎の形成，蔗糖の合成でこの節は，きわめて重要な役割をなしていると推察される。

V 要 約

用いた若いサトウキビの茎の直径，重さ，糖度を各節ごとに調べた結果，基部では，すべてその数値が大きく，頂部にいくにつれ小さくなった。その長さは，第3節で最も長かった。ヘキソース濃度は，第4節でピークになった。蔗糖濃度は，第4節から基部へ向かって急激に高くなった。この茎には，α－ガラクトシダーゼ，α－マシノシダーゼ，インベルターゼ，β－N－アセチルグルコサミダーゼ，β－グルコシダーゼ，β－キシロシダーゼ等のグリコシダーゼが存在し，これらのグリコシダーゼ濃度は，第4節附近でピークをなしていた。これらのグリコシダーゼを精製する目的で，蔗汁からの脱色法を検討した結果，DEAEセルロースカラムを用いると脱色効果が大で，蛋白質やこれらのグリコシダーゼの吸着が殆んどないことがわかった。またα－マンノシダーゼ，α－ガラクトシダーゼおよびβ－N－アセチルグリコサミダーゼは，或る程度精製すると，ディスクゲル電気泳動にかけたのち，ゲル中の酵素活性を発色させることができた。

引 用 文 献

1. 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
2. Dillewijn C. V.（内原彪訳） 1971 Botany of Sugar Cane（甘蔗植物学）1－10琉球分蜜糖工業会
3. ＿＿＿ 1971 Botany of Sugar Cane（甘蔗植物学）230－250 琉球分蜜糖工業会
4. Licht F. O. 1979 World sugar production 1978／'79 International Sugar Rpt. **111** 161－165
5. 3日会，輪講会訳 1972 Cane Sugar Hand book 日本製糖工業会
6. Sho H, Chinen I. Uchihara K and Fukuda N 1981 Effects of Okinawa sugar cane rind on serum and liver cholesterol and triglyceride levels in the rat. Jounal of Nuritional Science and Vitaminology 投稿中

Summary

The diameter, weight and sugar concentration of joints of immature sugar cane stalk were largest at the base, and gradually decreased to the top. But the lenghth and the hexose concentration were largest at the 4th joint from top of the stalk. Various glycosidase such as α-

galactosidase, α - mannosidase, invertase, β - N - acetyglucosaminidase, β - glucosidase, and β - xylosidase occured in this plant, and these concentrations were largest at the 4th joint. Decolorization from the juice was studied as a preliminary experiment to purify these glycosidases. Application of the juice to the DEAE - cellulose column previously equlibrated with 1 /100 M citrate buffer (pH 5.5) was effective in juice clarification. Protein and these glycosidases were not adsorbed. After purification to some extent, α - galactosidase, α - mannosidase, and β - N - acetylglucosaminidase were applied to polyacrylamide gel electrophoresis and located in the gel by staining for enzymatic activity by using naphthyl glycopyranosides as substrate.