

琉球大学学術リポジトリ

沖縄産サトイモ澱粉アミロペクチンの外側鎖長及び内側鎖長の測定(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: 外間, 宏一, 仲宗根, 洋子, 名嘉真, 勉, 照屋, 勝, Hokama, Koichi, Nakasone, Yoko, Nakama, Tsutomu, Teruya, Masaru メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4097

沖縄産サトイモ澱粉アミロペクチンの外側鎖長及び内側鎖長の測定

外間 宏一*・仲宗根 洋子*
名嘉真 勉*・照屋 勝*

Koichi HOKAMA, Yoko NAKASONE, Tsutomu NAKAMA and Masaru TERUYA: Determination of external and internal chain lengths of the starch amylopectin of wet-taro cultivated in Okinawa

I 緒 言

前報⁴⁾で著者らは、沖縄産サトイモ澱粉から精製したアミロペクチンをスミス分解して求めた平均鎖長についてだけ報告して、それを構成する外側鎖長及び内側鎖長については、未検討のために、報告しなかった。

本研究においては、サツマイモから β -アミラーゼを分離精製し、その酵素の諸性質を調べ、サトイモ澱粉アミロペクチンに本酵素を作用させて求めた分解限度(β -限界デキストリン)と過ヨウ素酸化法で求めた平均鎖長から外側鎖長及び内側鎖長を測定することを目的とした。また過ヨウ素酸化法は、前報で用いたスミス分解法の中間操作を成しているため、両方法で求めた結果も比較検討した。

II 実験及び結果

1. サツマイモからの β -アミラーゼの精製

本研究では、サツマイモからの β -アミラーゼの精製を、特に熟練も必要とせず、簡単な操作で、しかも短時間で酵素を結晶化することができるといわれている竹田¹⁰⁾らの方法で行なった。原料として沖縄百号を使用した。

(1) 抽出

表皮及び形成層を除去してえたサツマイモ 1.7 kg を水洗し、ジューサーで破砕した。その搾汁を 10,000 × g, 0~4°C で 7 分間、遠心分離してえた上清 500 ml を粗酵素液とした。以後の操作では、遠心分離は 10,000 g, 0~4°C で 5 分間行なった。

(2) 酸処理

氷冷した粗酵素液に 1N 塩酸をよく攪拌しながら滴下し、pH を 3.6 とした。10 分後生じた沈殿を遠心分離し、上清液をただちに 3% アンモニア水で pH 4.8 とした。

* 琉球大学農学部農芸化学科

(3) アセトン分画

酸処理した上清液に冷アセトン (-20°C) を47% (v/v) になるよう徐々に加え、生じた沈澱をただちに遠心分離により集め、蒸留水 40 ml に懸濁し、再び遠心分離し不溶物を除去した。

(4) 硫酸分画

アセトン分画でえられた上清液に飽和硫酸溶液 (4°C) を47.5% になるように加え、約10分間放置後、生じた沈澱を遠心分離で集めた。集められた沈澱は、蒸留水に懸濁し、不溶物を遠心分離で除去した。このようにしてえられた上清液約30 ml を精製酵素液とした。

2. β -アミラーゼ精製各段階における比活性及び活性の測定

β -アミラーゼの活性測定はジニトロサリチル酸法⁸⁾で還元力を求めた。比活性を求めるにはさらに蛋白質量を求める必要があり、それはLowry-Folin法^{1,3,7)}で行った。

(1) ジニトロサリチル酸法による酵素活性測定

3,5-ジニトロサリチル酸がアルカリ性溶液で糖により還元され、ニトロ基がアミノ基に変ることによって呈する赤褐色を比色定量する。

試薬

A液 可溶性デンプン1gを0.02 Mリン酸緩液 (pH 6.9) 100 ml に溶かしたもの

B液 3,5-ジニトロサリチル酸1gを2 N カセイソーダ20ml, 水50ml に混じ、30gのロッセル塩を添加し、蒸留水を加えて100 ml にしたもの

基質としてA液1 ml と酵素液1 ml を 25°C で試験管中で3分間反応させた後、呈色試薬としてB液2 ml を加えた。しかる後5分間沸騰している湯浴中で加温した。ついで流水で冷却し蒸留水20 ml を加えて、日立396分光光度計で図1に示す検量曲線より酵素活性を比色定量した。酵素活性単位は1分間に $1\ \mu\text{mol}$ のマルトースを生ずる酵素量を1単位とした。

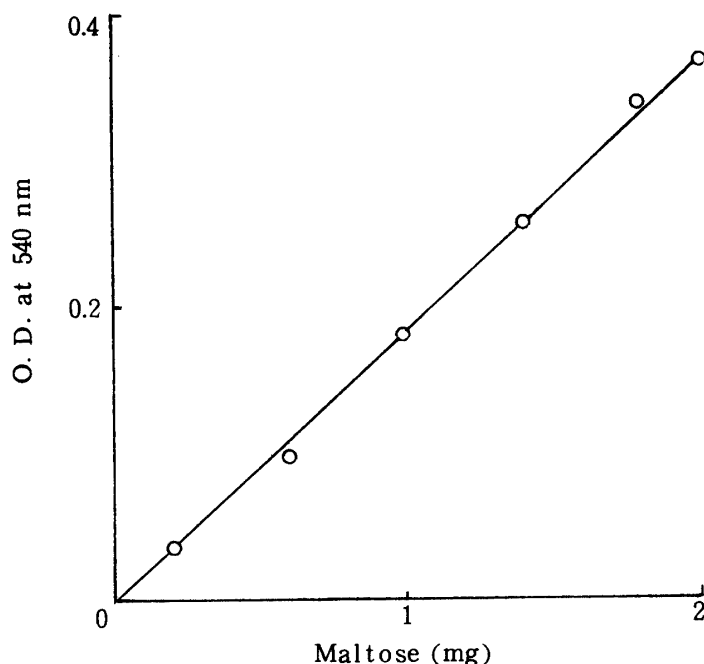


Fig. 1. Calibration curve of maltose according to dinitro salicylic acid method

(2) Lowry - Folin 法による酵素量の測定

試薬

C液 2% Na_2CO_3 / 0.1N NaOHD液 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ / 1% 酒石酸カルシウム

E液 C液50mlとD液1mlとを混合し、使用直前毎回調製する。

F液 市販品のFolin - Ciocalteu 試薬を2倍に希釈する。

検量曲線は、蛋白質標準溶液として図2に示のように、牛血清アルブミンを用いて作成した。酵素液を透析膜に入れ、流水で2日間透析したのち、更に蒸留水中で3日間透析し、上清を0.2ml試験管にとり、E液を1ml添加しながら混合した。室温で15分間放置した後、F液0.1mlをすばやく加えて十分攪拌し、40分経過した後、水を3倍量加えてから検量曲線により酵素液中の蛋白量を比色定量し、之を酵素量とした。また比活性は、表1が示すように精製酵素液は、粗酵素液に較べて約3.7倍に増加したが、之は竹田ら⁹⁾が報告したサツマイモ β -アミラーゼの比活性倍率が約13であるのに比較してかなり低い値を示した。

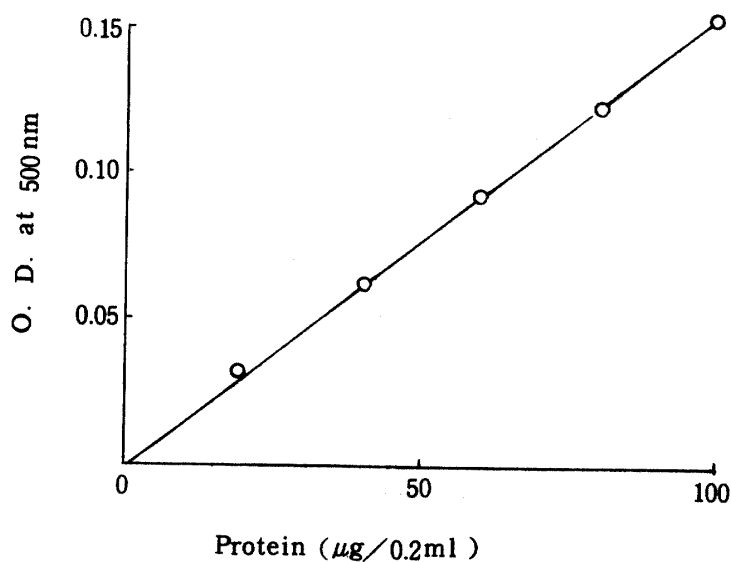


Fig 2. Calibration curve of protein according to Lowry - Folin method

Table 1. Relative activity in each purification step

Purification step	Total protein (mg)	Relative activity (unit/mg)	Yield (%)
Crude enzyme	341.6	2.0	100
Acid treatment	208.0	2.7	77.9
Acetone treatment	19.8	4.4	12.4
Purified enzyme	9.5	7.4	10.5

3. 精製 β -アミラーゼの澱粉分解率及び純化確認

澱粉分解状況において、 α -アミラーゼのヨード反応は直ちに消失するが、 β -アミラーゼのそれは、なかなか消失しないという両アミラーゼの性質の相違を利用した春日井の方法⁶⁾に準じて行った。結果を図3に示した。

即ち、第2項の場合と同様に、基質として1%可溶性澱粉溶液を用い、25°Cで、0.02 Mリン酸緩衝液 (pH 6.9) 中で粗酵素液及び精製酵素液とそれぞれ3分間反応させた後、ヨード呈色反応を行なったところ、前者は、始め赤紫を呈し、24時間で無色になったのに比べ、後者は、24時間経過するまで、終始青紫を呈した。このような呈色状況の相違から、精製酵素液は、 α -アミラーゼを含まず、かなり純化されたものと思われた。

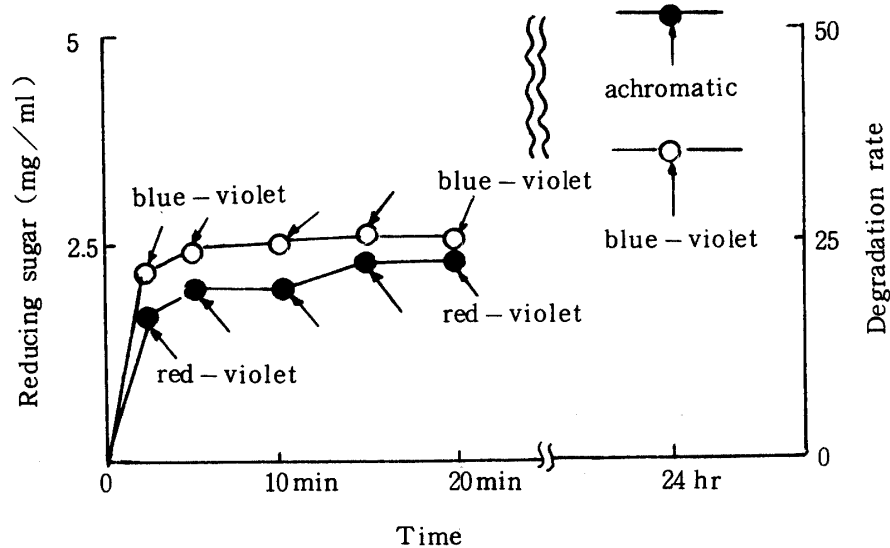


Fig 3. Relationship between starch degradation by sweet potato β -amylase and iodine color reaction
 ●—● : Crude ○—○ : Purified
 ↓ : Iodine color reaction

4. 精製 β -アミラーゼの一般的性質

本酵素の至適 pH, 至適温度及び熱安定性などの諸性質を調べ、次項に示すサトイモ澱粉アミロペクチンの本酵素による分解率を求める実験における反応条件とした。

(1) 至適作用温度

A液 1 ml と酵素液 1 ml をいろいろの温度で作用させ、それぞれの酵素活性を測定した結果を図4に示した。図からもわかるように、至適作用温度は50°Cにあるが、それに達するまでは温度は徐々に上昇し、之を過ぎると急激に低下した。

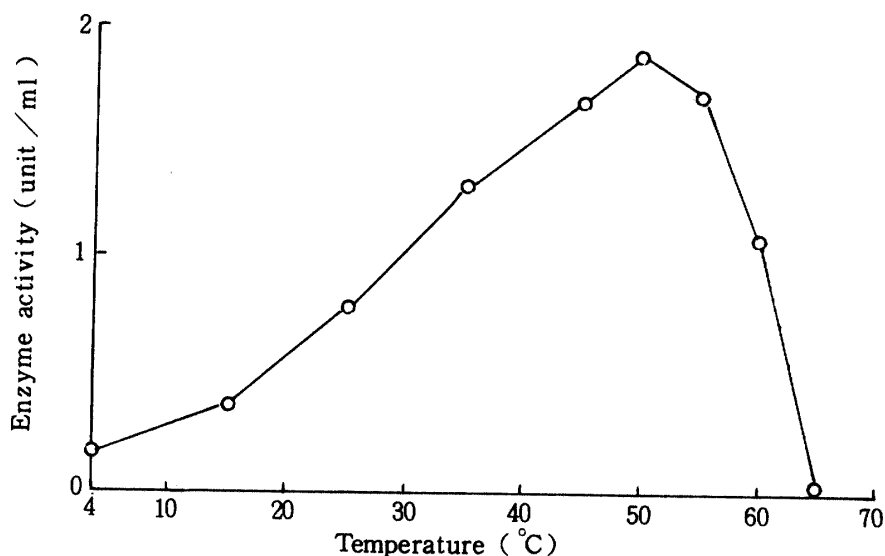


Fig 4. Effect of temperature on sweet potato β -amylase activity

(2) 至適作用 pH

いろいろのpH緩衝液2mlにA液1mlと酵素液1mlを加え、至適作用温度50°Cで3分間反応させ、それぞれの酵素活性を測定した結果を図5に示した。図から、至適pHは5~6の酸性側に幅広い範囲にあることがわかるが、至適pHを5.5に設定した。之は春日井⁶⁾が求めたわさび β -アミラーゼの至適pH 5.3とほぼ同じ値を示していることがわかる。

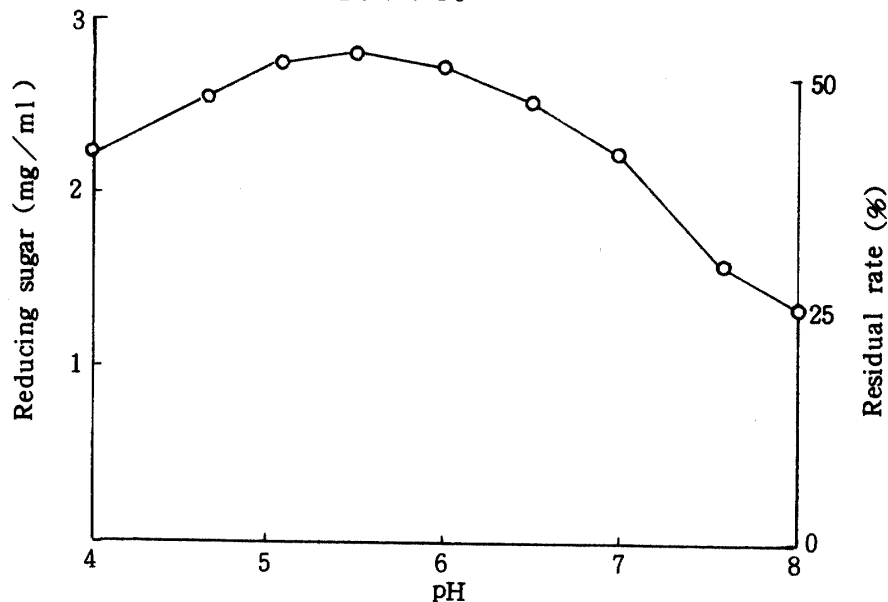


Fig 5. Effect of pH on sweet potato β -amylase activity

(3) 耐熱性

酵素液(pH 5.0)を、いろいろの温度で5分間保持した後、25°Cで3分間反応させ、残存酵素力を測定した結果を図6に示した。図からわかるように、65°C付近まではほとんど一定の熱安定性を示し、この温を過ぎると、急激に低下し、80°Cでは完全に失活した。之は、わさび β -アミラーゼ⁶⁾が温度の上昇とともに、熱安定性は曲線的に低下し、かつ、失活温度が60°C付近にあるのはその性質を異にしていた。

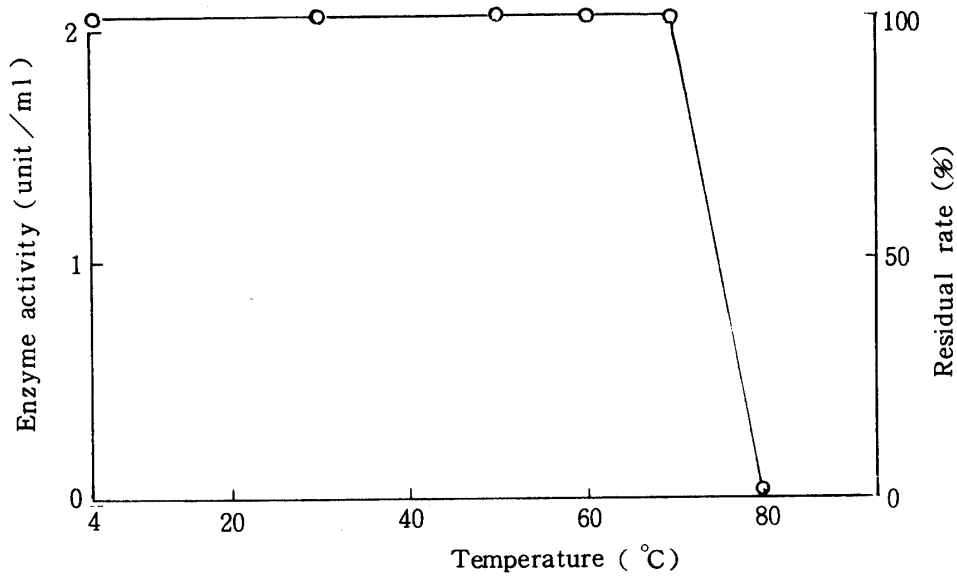


Fig 6. Heat stability of sweet potato β -amylase when treated for five minutes

5. β -アミラーゼによるサトイモ澱粉アミロペクチンの分解率

pH 5.5 に調整した精製サトイモ澱粉アミロペクチンの1%溶液1 ml に酵素液1 ml を加え、50°C で反応させて分解限度 (β -限界デキストリン) を求めた。結果を図7に示した。反応開始後48時間経過した場合の分解率61%を本実験における分解限度とした。

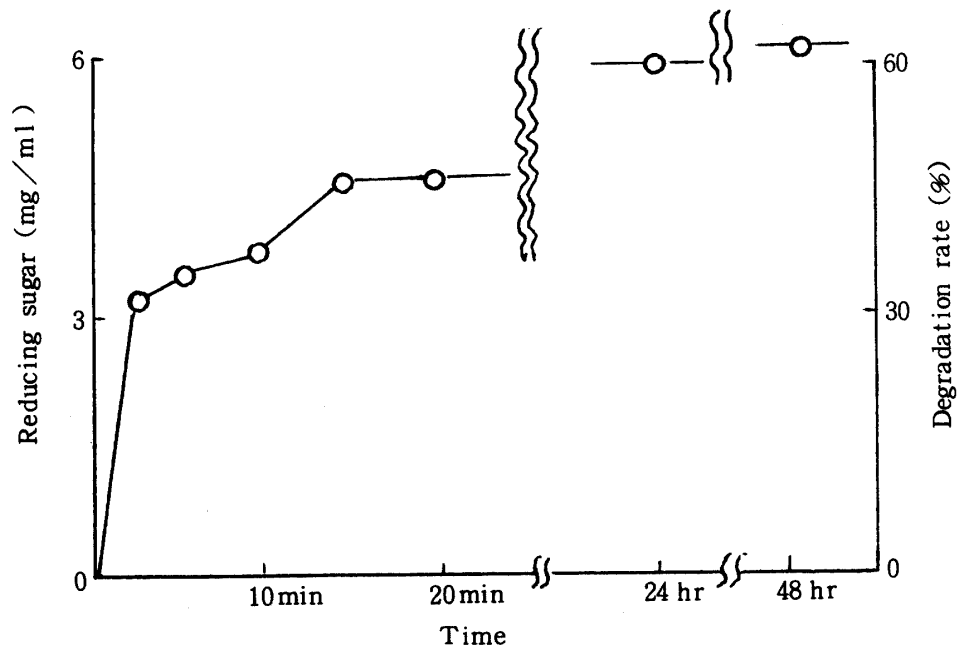


Fig 7. Degradation rate of wet-taro starch amylopectin by sweet potato β -amylase

6. 過ヨウ素酸化法によるサトイモ澱分アミロペクチンの平均鎖長の測定

過ヨウ素酸化は、前報^{4,5)}に準じて行なったが、その消費量は、8日間でほぼ一定値に達した。またアルカリ滴定によって求めた蟻酸生成量は、ほぼ4日間で終了した。結果を図8と図9に示した。

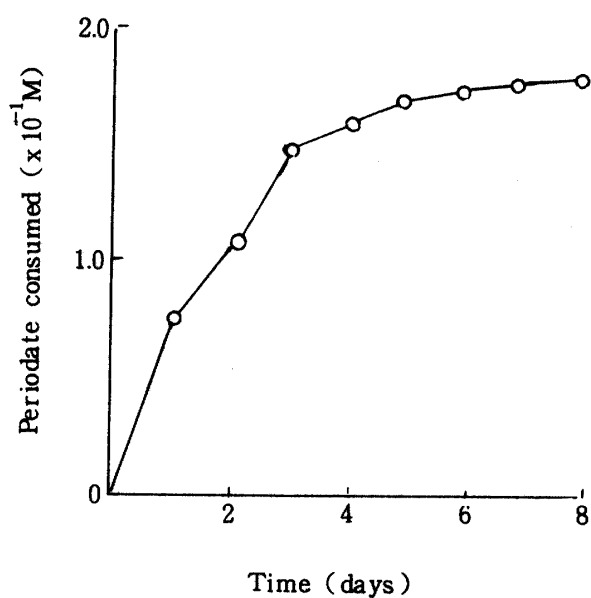


Fig 8. Periodate consumed in periodate oxidation of amylopectin

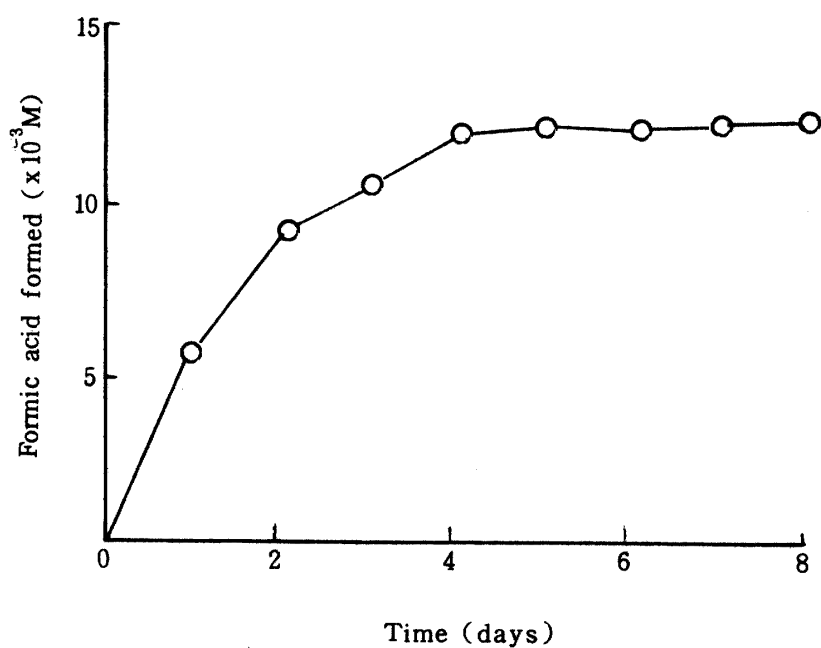


Fig 9. Formic acid formed in periodate oxidation of amylopectin

反応が完了した時点でのアミロペクチン20g当りの過ヨウ酸消費量及び蟻酸生成量は、それぞれ0.18モル、0.0127モルであったので、次式から平均鎖長は、13と計算された。

$$(0.181 \div 0.0127) - 1 = 13.25$$

また分解限度は61%であるので、次式から外側の鎖長 (E, C, L) 及び内側の鎖長 (I, C, L) は、それぞれ10, 2と計算された。

$$E. C. L. = 13 \times \frac{61}{100} + 2.0 = 10, \quad I. C. L. = 13 - (10 + 1) = 2$$

平均鎖長13は、スミス分解で求めた $12^{(4)}$ をほぼ満足していると言える。

本実験で求めたサトイモ澱粉アミロペクチンの平均、内側、内側の鎖長をそれぞれ表2に示し、他植物それらと比較検討した。外側の鎖長10は普通の長さであるが、外側の鎖長2はスイートコーンIIの3に次いで最も小さい値を示した。

Table 2. Average, external and internal chain lengths of amylopectin in various kinds of plant²⁾

Amylopection	A.C.L.	β -Amylolysis (%)	E.C.L.	I.C.L.
Barley	26	59	17~18	7~8
Malt	17~18	44	9~10	7
Lily	27	60	18	8
Corn	25	63	17~18	6~7
Potato	27	59	18	8
Wheat	23	62	16	8
Coco	22	62	15~16	5~6
Sweet corn I	12	47		
Sweet corn II	11	45	7	3
Glutinous corn	22	53	13~14	7~8
*Wet-taro	13	61	10	2

* Produced in Okinawa and determined by the authors

III 考 察

竹田らが精製したサツマイモ β -アミラーゼが著者らが精製したものよりも活性が約3倍も高いのは、実験方法、実験時期、使用品種、産地等の相違によるものと思われる。竹田らは、最も高い β -アミラーゼ収量をあげる品種は農林2号で、10月から12月までの新鮮な材料を用いると収量がよいと報告している。

本研究では、使用品種として沖縄百号を用いた。沖縄百号を使用したのは、色素を含まないので、酵素精製度合において、その阻害を受けず、他品種より優れていると思われたからである。

本研究で調製したサツマイモ β -アミラーゼの澱粉分解率を春日井が調製したわさび β -アミラーゼのそれと比較すると、精製酵素による24時間経過後の分解率は、ともに35%付近にあった。また粗酵素による15分経過後の分解率においては、後者は38%であったのに対し、前者は25%であったが、之は24時間経過すると51%に達した。

大橋⁹⁾は、種々のアミロペクチンの平均鎖長及び β -限界デキストリンは、それぞれ、20~26, 53~61%と報告している。平均鎖長は、極限粘度法で求められ、著者らの方法と相違するので、比較検討することはできないが、 β -限界デキストリンは、著者らが求めた61%とほぼ一致している。また大橋は、アミロペクチンの鎖長を、長鎖長、中間鎖長及び短鎖長部に分類して百分率で求めているので、これも著者らが求めた平均、外側鎖長と内側鎖長と比較検討することはできない。

A, B, C鎖より成る meyer の樹状構造アミロペクチン²⁾の β -アミラーゼによる分解限度、即ち β -限界デキストリンの生成機構を図10に示した。A鎖はB鎖に、B鎖はC鎖に、それぞれ、 α -1.6-結合をして分岐し、C鎖は分子中に1本しかなく、還元性末端基を有している。

β -アミラーゼは、 α -1.6-結合に作用せず、アミロペクチンの外側の枝を構成しているA鎖及びB鎖を非還元末端基より、逐次的に、マルトース単位で切断し、分岐点において、A鎖に2~3個、B鎖1~2個、平均2個のグルコース残基の切株を残して分解を停止する。そのときの分解限度を β -限界デキストリンと呼び、普通約50%である。

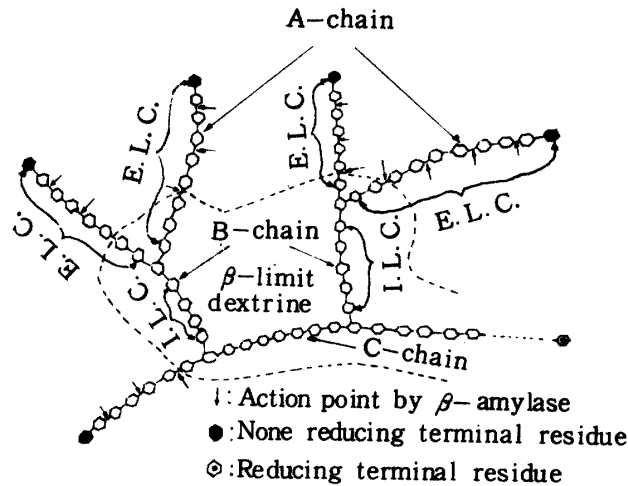


Fig 10. Action of sweet potato β -amylase and formation of β -limit dextrine

スミス分解による平均鎖長は、アミロペクチンを過ヨウ素酸化して生ずるポリアルデヒドを還元してポリアルコールとなし、それを加水分解して生ずるグリセロールとエリトリールのモル比から求めるのであるが、本研究では、スミス分解法の前段階である過ヨウ素酸化によって平均鎖長を求めたので、前報より操作はかなり簡略化された。

アミロペクチンを過ヨウ素酸化すると図11に示すように、非還元末端基では、2モルの過ヨウ素酸が消費され、1モルのギ酸を生ずる。その他の1-4結合のグルコース残基、1-6結合のグルコース残基では、1モルの過ヨウ素酸が消費されるだけである²⁾。よって過ヨウ素酸の消費量(モル数)をギ酸生成量(モル数)で除し、その値から1を減じてアミロペクチンの平均鎖長を求め、次式から外側鎖長及び内側鎖長を算出することができる。

$$\text{外側鎖長} = \text{平均鎖長} \times \text{分解限度}(\%) + 2$$

$$\text{内側鎖長} = \text{平均鎖長} - (\text{外側鎖長} + 1)$$

耐熱性実験は、春日井の実験結果と比較検討するために、それに用いられた条件、即ち pH 5.0, 温度 25°C で行ない、本実験の設定 pH, 温度で行なわなかった。

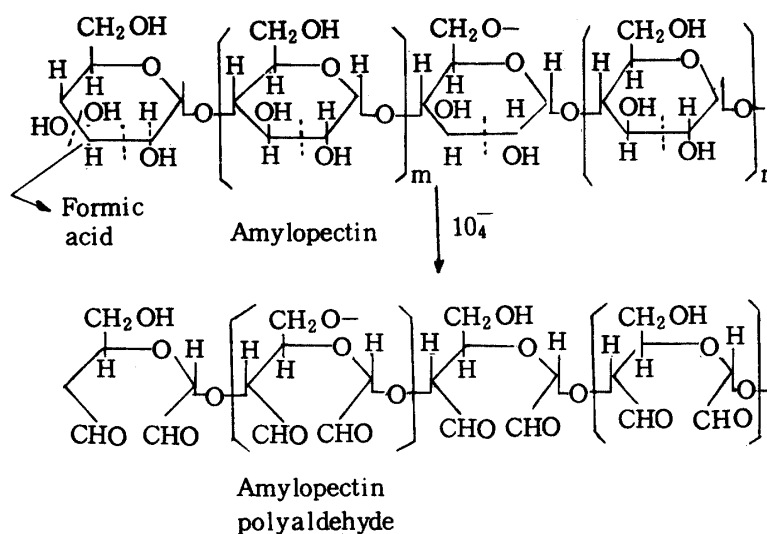


Fig 11. Periodate oxidation of amylopectin and its cleavage (: marks)

IV 要 約

1. サツマイモ β -アミラーゼによる沖縄産サトイモ澱粉アミロペクチンの β -限界デキストリンは、61%であった。
2. 過ヨウ素酸化法で求めた同アミロペクチンの平均鎖長は、13であった。
3. 平均鎖長と β -アミラーゼ分解限度との組合せによって求めた外側の鎖長及び内側の鎖長は、それぞれ、10及び2であった。

参 考 文 献

1. 安藤鋭郎, 寺山 宏, 西沢一俊, 山川民夫 1967 生化学研究法Ⅱ, 442, 東京, 共立出版
2. 江上不二夫, 鈴木 旺, 松村 剛, 山科郁夫 1969 多糖生化学1, 220~226, 東京, 共立出版
3. 副島正美, 福武 直 1971 蛋白質の定量法, 89~91, 東京大学出版会
4. 外間宏一, 仲宗根洋子, 宮城春勝 1979 沖縄産サトイモ澱粉アミロペクチンのスミス分解, ならびに平均鎖長の測定 琉大農学報 26: 169~181
5. Hamilton J. K. and Smith F. 1956 Reduction of the products of periodate oxidation of carbohydrates J. Am. Soc., 78: 5907~5909
6. 春日井愛子 1959 わさび β -アミラーゼに関する研究 農化, 33(13): 1141~1116
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. 1951 Protein measurement with the phenol reagent J. Biol. Chem., 193: 265~275
8. 三井哲夫, 満田久輝, 泰 忠夫 1976 農芸化学実験書第2巻, 619, 東京, 産業図書
9. 大橋一二 1961 アミロペクチンの微細構造について(第3報) 農化, 35(11): 1065~1069
10. 竹田靖史, 檜作 進 1976 植物酵素, 蛋白質研究法, 438~439, 東京, 共通出版

Summary

1. The β -limit dextrine of the starch amylopectin of the wet-taro cultivated in Okinawa was determined as 61% by the β -amylase prepared from sweet potato.
2. The average chain length of amylopectin was found to be approximately 13 by periodate oxidation procedure.
3. The external and internal chain lengths were calculated as 10 and 2, respectively, by utilizing both of the average chain length and the β -limit dextrin.