

琉球大学学術リポジトリ

サトウキビの褐変現象に関与すると思われる *Phoma* sp. 菌の生産するインベルターゼの一般的性質

メタデータ	言語: 出版者: 沖縄農業研究会 公開日: 2009-01-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 外間, 宏一, 喜舎場, 曠恵, Hokama, Koichi, Kishaba, Kokei メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015316

サトウキビの褐変現象に関与すると思われる *Phoma* sp. 菌の生産するインベルターゼの一般的性質

外間 宏一・喜舎場 曠恵
(琉球大農学部農芸化学科)

Koichi Hokama and Kokei Kishaba: General properties of the invertase produced by *Phoma* sp. found to cause sugar cane red rot

1. はじめに

サトウキビの褐変は、いままでに数多くの研究がなされてきた。Went は、サトウキビの褐変は菌類によるものであると報告している(4)。その菌は、Arxと Muller によって分類され *Physalospora tucumanensis* Speg. と命名された(4)。

琉球大学農学部農芸化学科第二研究室でもサトウキビ褐変の研究が行なわれ、1971年、褐変したサトウキビから赤色の糸状菌の一種 *Phoma* sp. が分離された。1911年、Edgertonは、褐変したサトウキビ中の蔗糖分が減少していることを報告している。(4)

この *Phoma* sp. 菌は、*Physalospora tucumanensis* Speg. と同様にサトウキビの褐変に関与しているのではないかと推測され、かつある種の糸状菌には、インベルターゼ (β -h-fructosidase) が含まれていることが報告されているので(3)、予備実験を行ったところ、この *Phoma* sp. にもインベルターゼが含まれていることが確認された。本実験は、このようにサトウキビの褐変現象に関与していると思われる *Phoma* sp. の生産する酵素インベルターゼの一般的性質を検討するために行った。

2. 材料と方法

1) 供試菌株 前述の *Phoma* sp. を用いた。

2) 培養基, 培養方法 斜面培養基は、坂口・王氏液(7)を用い、寒天濃度2%, 蔗糖濃度15%, pH6.5に調整した。その組成は、第1表に示した。

液体培養基は、坂口・王氏液を用い、蔗糖濃度15%, pH6.5に調整した。その組成は、第2表に示した。

第1表 斜面培養基組成

蔗糖	150g	NaNO ₃	2g
K ₂ HPO ₄	1g	KCl	0.5g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g	FeSO ₄	0.01g
蒸留水	1ℓ	寒天	20g

第2表 液体培養基組成

蔗糖	75g	NaNO ₃	1g
K ₂ HPO ₄	0.5g	KCl	0.25g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25g	FeSO ₄	0.01g
留蒸水	500ml		

斜面培養方法は、カキ状に曲げた白金鉤で *Phoma* sp. の孢子または菌糸の一部を1~2白金鉤とり、斜面培養(試験管に下記の固体培養基を適量分注した培養基)に付着させ、35°Cの孵卵器に入れて一週間培養を行なった。その菌糸を種菌として使用した。

液体培養方法は、数個の500ml, 1ℓの三角フラスコに上記の液体培養基を適量入れて、種菌を1~2白金鉤とりこの液体培養基の表面に接種した後、35°Cの孵卵器に入れて3~4週間静置培養を行なった。

3) 酵素液の抽出(1) 液体培養基中で増殖した菌蓋を取り、培養基に蔗糖を使用したので糖分を除くために蒸留水を用いて水洗し、ろ紙に狭んで残りの水分を除き、その菌蓋300gを冷水と海砂の適量で乳パチですりつぶし、冷凍遠心機で10000 rpm, 20分間遠心してその上澄液をとり全量を緩衝液(1/15 M K₂HPO₄ ·

1/15 M K_2HPO_4 : 1/15 M H_3PO_4 = 1:1, pH 6.81で500mlとして粗酵素液とした。

4) 酵素活性の測定 反応液組成は 10%蔗糖液, 粗酵素液の等容積とし, 孵卵器中で 45°C, 48時間 酵素反応を進めた後, 1/10 M Na_2CO_3 溶液の適当量を加えて反応を停止した後, 反応によって生成した還元糖を Lane法⁽⁸⁾ で定量した。

5) 基質の調製 10%蔗糖液 50mlを用いた。

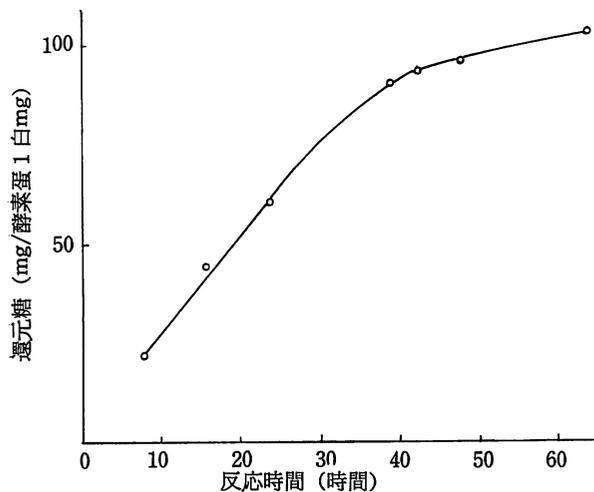
6) pHの調整 pH 2~7までは1/10 N HCl, pH 8~12までは1/10N NH_4OH を用い, pH メーターで調整した。

7) ペーパークロマトグラフィー 酵素作用によって生成した糖の同定には, 反応液を加熱して反応を停止させた後, 濃縮してペーパークロマトグラフィーを行なった。ろ紙は東洋ろ紙 No. 5 Aを用い, 展開剤は, n-ブタノール: 醋酸: 水(4: 1: 5)とし, 上昇法で展開した。発色剤は, アニリンフタル酸を用いた。

3. 実験結果

1) 反応時間の酵素活性に及ぼす影響

10%蔗糖溶液50mlに酵素液50mlを加え, 45°Cで8時間毎に反応液 10mlをとり, 1/10 Na_2CO_3 で活性を停止させて全容を 50mlとなし, 還元糖を定量した。結果を第1図に示す。incubate してから39時間までは, 順次直線的に酵素活性が高くなっているが, 39時間を過ぎると酵素活性はほぼ一定になっている。39時間目に, 酵素活性は 91.87mg/ 酵素蛋

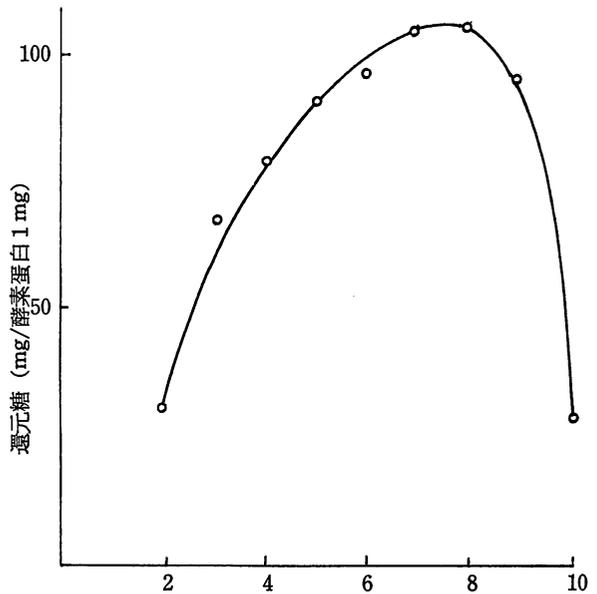


第1図 反応時間の酵素活性に及ぼす影響

白 1 mgを示している。

2) pHの酵素活性に及ぼす影響

酵素液 5 mlを各おのpHに調整した後, 10%蔗糖溶液 5 mlを加え全容を50mlとなし, 45°Cで48時間反応させた後, 10%蔗糖溶液 5 mlを加え全容を 50mlとなし, 45°Cで48時間反応させた後, 1/10 M Na_2CO_3 で活性を停止させて還元糖を定量した。結果を第2図に示す。酸性側では, かなり安全であるが, アルカリ側では, 活性が急速に低下し, pH 6~8の間で最高の活性



第2図 pHの酵素活性に及ぼす影響

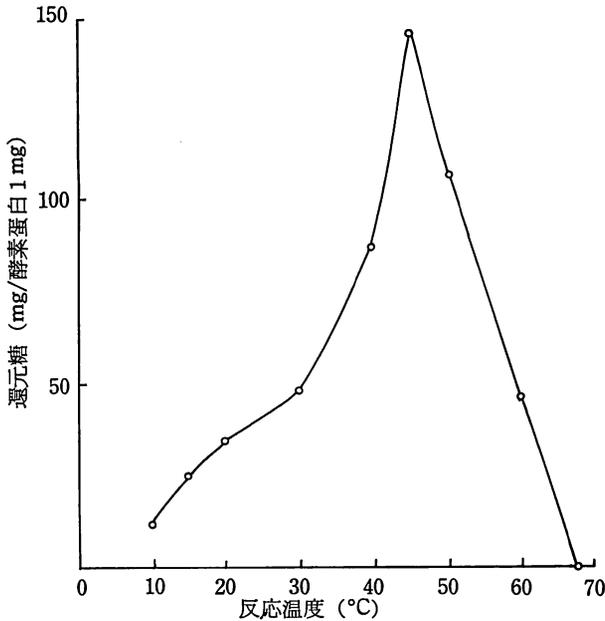
を示していることがわかる。pH7.0で 105.8mg/ 酵素蛋白 1 mgを示し, pH11ではほとんど活性はみられなかった。

3) 反応温度の酵素活性に及ぼす影響

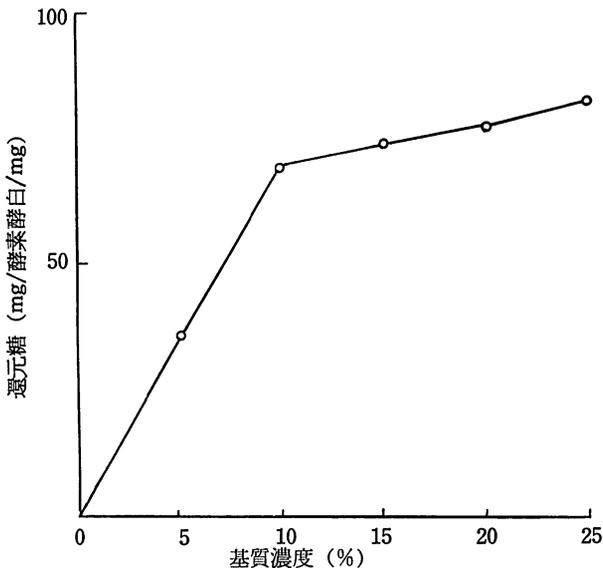
酵素液 5 mlに 10%蔗糖溶液 5 mlを加え, pH 6.8, 0°C₂ ~70°Cの各おの温度で48時間反応させ, 1/10 M Na_2CO_3 で活性を停止させ, 50mlとなし, 還元糖を定量した。その結果は, 第3図に示してあるように, 比較的高温において活性が高く, 最高値41.83mg/ 酵素蛋白 1 mgは 45°Cにおいてみられた。60°Cでもある程度の活性を示しているが, 70°Cではほとんど活性がない。

4) 基質濃度の酵素活性に及ぼす影響

5%, 10%, 15%, 20%, 25%の各蔗糖溶液 5 mlに酵素液 5 mlを加え, pH6.8で45°C, 48時間反応



第3図 反応温度の酵素活性に及ぼす影響



第4図 基質濃度の酵素活性に及ぼす影響

させた後、 $1/10\text{ M Na}_2\text{CO}_3$ を加えて活性を停止させ、定容して 50 ml となし、還元糖を定量した結果は、第4図である。第4図に示されるように、 $5\sim 10\%$ では活性が順次増加している、 10% では、 $87.1\text{ mg/酵素蛋白 } 1\text{ mg}$ を示している。 $10\sim 25\%$ では活性がほぼ一定となっている。

5) 熱処理の酵素活性に及ぼす影響

酵素液 5 ml を試験管にとり 50°C 、 60°C 、 70°C の温度で $10\sim 60$ 分間加熱処理した後、 10% 蔗糖溶液 5 ml を加えて 45°C 、 48 時間反応を行なった後、 $1/10\text{ M Na}_2\text{CO}_3$ を加えて活性を停止させ、定容して 50 ml となし、還元糖を定量した。結果を第5図に示す。 50°C の熱処理では、酵素活性が順次直線的に減少しているのが認められた。 60°C の熱処理では、 $10\sim 20$ 分間は酵素活性にはあまり影響がみられず、 30 分になると酵素活性の減少がみられた。 50 分を過ぎると活性は認められず、 70°C の熱処理では酵素活性は全く認められなかった。

6) 重金属塩の酵素活性に及ぼす影響

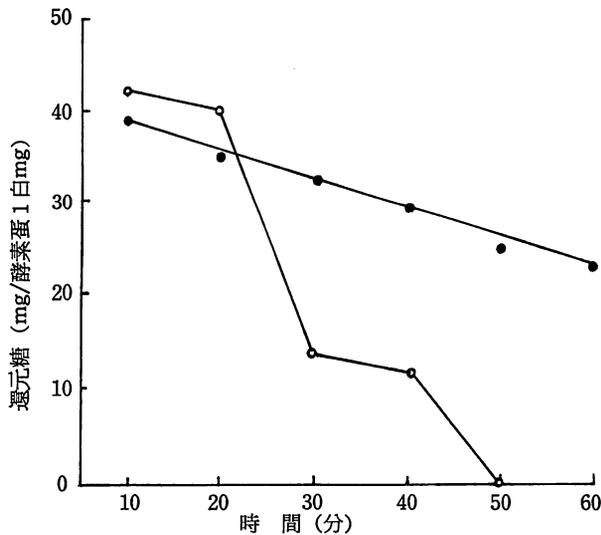
酵素液 5 ml と8種の金属塩溶液 (各 10^{-2} M) 5 ml の混合液をそれぞれ8個の試験管にとり、 10 分間放置し、 10% 蔗糖溶液 5 ml を各おのに加え、 45°C で、 48 時間反応させた後、 $1/10\text{ M Na}_2\text{CO}_3$ を加えて活性を停止して、定容して 50 ml となし、還元糖を定量した。結果は第3表に示すように、 Ba^{2+} 、 Na^+ で著しく酵素活性が阻害され、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} でほぼ阻害されている。

第3表 金属塩の酵素活性に及ぼす影響

金属塩 (10^{-2} M)	比活性度
$\text{Ba}(\text{OH})_2$	0
Hg Cl_2	$0<$
$\text{Mg Cl}_2 \cdot 6\text{ H}_2\text{ O}$	110.24
$\text{Na}_2\text{ CO}_3$	0
CaCl_2	107.66
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{ H}_2\text{ O}$	29.79
KCl	117.69
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{ H}_2\text{ O}$	108.67
無添加	100

7) 熱処理後金属塩による影響

賦活性を調べるために、酵素液 5 ml を試験管にとり、結果5)を参考にして、 60°C 、 30 分間熱処理した後、6)項で示された各金属塩溶液 5 ml と、 10% 蔗糖溶液 5 ml を加えた後、 10 分間放置し、 45°C で、 48 時間反応させ、 $1/10\text{ M Na}_2\text{CO}_3$ を加えて活性を停止して、 50 ml となし、還元糖を定量した。プラ



第5図 熱処理の酵素活性に及ぼす影響

○—○ 60°C ●—● 50°C

シクとして金属塩を添加しないものを用いた。その結果、ブランクと何ら異なることなく影響は認められなかった。

8) 反応生成物の確認

10% 蔗糖液 5 ml, 酵素液 5 ml の混合液にトルエンを加え、45°C で、48時間反応させ、生成糖をペーパークロマトグラフィーによって同定した。生成糖は2スポットで標準グルコース、フラクトースの Rf 値 (それぞれ 0.17, 0.23) と完全に一致した。

9) 蛋白質の定量

粗酵素液 5 ml をとり、蒸留水を加えて 50 ml に定容し、280 m μ で分光光度計で検量線により測定した結果、粗酵素液 5 ml 中に 4.3 mg 蛋白質が定量された。

4. 考察

インベルターゼは β -フルクトフラノシダーゼ、 β -h-フルクトシダーゼ、サツカラゼ、スクラーゼなどとも呼ばれ、糸状菌、酵母菌、細菌、高等植物に存在し、 β -h-フルクトフラノシド結合、すなわち β -h-フルクトケトーズがケトン OH を供給しているグリコシド結合の解離、結合を触媒する酵素である。 α -グリコシダーゼもインベルターゼと同様に蔗糖を分解し、両者は上記生物細胞中に共存していることが多い⁽⁵⁾と言われている。

予備実験で糸状菌である *Phoma* sp. 中にもインベル

ターゼの存在が確認されたので、この酵素の諸性質について検討したところ、ある程度の知見をえたので、以下のとおり考察を行なった。

第1図において、反応時間が60時間の長時間に及んだのは、基質濃度が高く分解に時間がかかるためであり、第4図において、基質濃度が10~25%でやや分解状態が一定であるのは、糖濃度が高いことおよび酵素蛋白が蔗糖の分解によって生じたグルコース、フルクトース等の糖類の阻害作用⁽²⁾を受けるためであろう。

第2図に示すように、*Phoma* sp. の生産するインベルターゼの至適pHが7.5付近にあることは糸状菌のそれが6.0~8.0⁽⁶⁾にあること矛盾しないが、サトウキビのインベルターゼの至適pHが5.7⁽⁸⁾であることは若干異なる。第3図に示すように、反応は、0~70°Cの温度範囲で行なったが、45°Cでピークを示した。0~20°Cで活性が低いのは酵素活性の阻害が考えられ、60~70°Cで活性が低いのは酵素蛋白の変性が考えられる。

第3表から、金属塩中で、Ba²⁺、Hg⁺、Na⁺、が阻害作用を有していることがわかる。この中で、Hg⁺で阻害される場合は、硫化水素で可逆的に除去しうることから、Hgによって酵素分子が著しい変化を受けていないことが推察される⁽⁵⁾。

熱処理後の金属塩の影響は認められなかったことから、金属塩による賦活作用はないものと考えられる。

Phoma sp. 菌の粗酵素液が蔗糖溶液に作用したとき、ペーパークロマトグラフィーにより、グルコースとフルクトースが確認できることから、本実験の酵素液中にインベルターゼが存在することは明らかである。

5. 要約

1) *Phoma* sp. 菌の生産するインベルターゼの諸性質は次のとおりである。至適作用pHは7.5付近、至適作用温度は45°C、Hg⁺、Ba²⁺、Na⁺によって阻害を受ける。

2) 反応生成物はグルコースとフルクトースであり、酵素液中にインベルターゼが存在することは明らかである。

参考文献

- (1) 赤堀四郎 1971 酵素研究法(1) p. 3
- (2) ——— 1971 酵素研究法(2) P.100~103
- (3) ——— 1970 酵素ハンドブック P. 479

-
- (4) Edgerton C.W 1958 Sugarcane and its disease p.69~90
- (5) 神前武和 1943 酵素学 p.265~267
- (6) 水島三一郎 (編集委員長) 1964 化学大辞典 8卷 p.64
- (7) 東京大学農芸化学教室 1969 農芸化学実験書上巻 p.192
- (8) 友田宜孝・工藤憲資・玉置弥栄 1958 炭水化物実験法 p.42
-
- 