

ヤマイモのアミラーゼに関する研究

β -アミラーゼの精製とその性質について

林 義男・河端 信・田口邦子

Studies on yam amylase

——Purification and properties of β -amylase——

YOSHIO HAYASHI, MAKOTO KAWABATA and KUNIKO TAGUCHI

ヤマイモが生のみで食用に供することができるのは、サツマイモとは性質を異にするアミラーゼが存在するためと思われるが、その諸性状については、いまだ十分明らかにされていない。

そこで、われわれは、ヤマイモのアセトンパウダーより均一な酵素を分離・精製して、その性質を検討した。その結果、作用至適 pH を 4.5～5.5 と広範囲に持ち、作用至適温度 60°C の β -アミラーゼであることがわかった。

緒 言

ヤマイモ (*Dioscorea Japonica* THONB) は、その塊根を食用とする野菜の一種であるが、他の芋類が加熱処理しなければ食用に適さないのに反して、ヤマイモは生のままですりおろしたり、うす切り、せん切りにしたりして食用とすることができる。

これは、ヤマイモにサツマイモとは性質を異にする強力なアミラーゼが存在することにより、デンプンが良く消化されるためと思われ、加熱すると粘質物のため、組織内の水の交流が少なくなってアミラーゼの活性が失われてかえって消化しにくくなることが知られている¹⁾。

サツマイモの β -アミラーゼについては 1946年 Balls²⁾らによって結晶化されて以来、多くの研究により作用機構もほとんど確立され、その性質が明らかにされているが、ヤマイモのアミラーゼについては 1908年片山³⁾が *Diosco-diastase* と名づけて以来、その粘質物のため取扱いが困難で精製法が確立されていないため、粗酵素による実験はみられるが⁴⁾、その性質の詳細については研究が少なく、最近、高橋ら⁵⁾、守ら⁶⁾によって精製法、酵素化学的性質が検討されているが、いまだ十分にはその諸性状は明らかにされていない。

そこで、われわれは、この特異的なヤマイモのアミラーゼの性質を明らかにするため、まずその分離・精製を CM-セファデックス、DEAE-セルロースを用いて行な

い精製酵素を得た。得られた酵素標品についてその性質の検討を行ない 2, 3 の結果を得たのでここに報告する。

実験材料および方法

1. 供試材料

市販ヤマイモ扁形のもの。

2. サツマイモ β -アミラーゼの調製

Balls⁷⁾らの方法による。

3. α -アミラーゼ活性の測定法

ヨウ素反応による A.O.A.C. 測定法⁸⁾による。

4. 酵素力価およびその測定法

1%可溶性澱粉液 (0.02M酢酸緩衝液 (pH5.0) に溶解) 1 ml と酵素液 1 ml の反応液を 60°C の恒温槽中で 10分間反応させ生成した糖による還元力の増加をジエトロサリチル酸法⁹⁾によりマルトースとして定量し、この測定条件下において酵素液 1 ml の遊離するマルトースの mg 数で amylase activity を表わした。

5. Specific activity (S. A.)

酵素液中のタンパク量 1mg 当りの amylase activity で表わす。タンパク量は Folin-Ciocalteu 試薬法¹⁰⁾により測定した。

6. セロゲル電気泳動

バルビタール緩衝液 (pH 8.6, $\mu=0.1$) でセロゲル (セルロースアセテートのフィルム, 生化学製, 6×6cm)

を用いて行なった。泳動条件は 200V, 40分で、発色は 45 ml のメタノール, 10 ml の氷酢酸, 45 ml の蒸留水に 0.5 g のアミドブラックを溶解したものをを用いた。

実験結果および考察

1) アミラーゼの分離・精製と酵素活性

1. アセトンパウダーの調製

ヤマモは粘性が強く、圧搾後、搾汁を粗酵素とすることは不可能であるので、まずヤマモからアセトンパウダーを調製した。すなわち、ヤマモの皮をむき、その5倍量 (V/W) の氷冷アセトンと共にホモゲナイザーにかけて十分磨砕したのち、吸引ろ過、さらに氷冷アセトンで洗い、乾燥粉末を得る。アセトンは濃硫酸の入ったデシケーター中で十分除く。収量はヤマモの約20%であった。

2. アセトンパウダー抽出液の調製

上記で調製したアセトンパウダーを50倍量 (V/W) の蒸留水を加えて十分攪拌し、冷室 (8°C) に2時間静置して抽出を行ない、ついで冷却遠心分離 (17,000×g, 5分, 0°C) により上澄を得る。この抽出液についてヤマモのβ-アミラーゼ調製法⁷⁾を参照して 60°C, 10

分間加熱処理を試みたが、わずかに白濁した程度で酵素活性の上昇は見られなかったのでこの操作は省略して、硫酸 0.7 飽和とし、沈殿を集め、透析により硫酸を除き、凍結乾燥して粉末試料を得る。この凍結乾燥することにより粘質物が不溶となって粘性が減少するので、以後の操作を容易にするために非常に有効な方法である。また、アセトンパウダー調製後すぐに抽出を行なったものは粘性が非常に強いが、2, 3 カ月保存した後抽出したものの方がある程度粘性が低下して取扱いが容易であった。

3. CM-セファデックス C-50 によるカラムクロマトグラフィー

上記で得た凍結乾燥試料を 200 倍量 (V/W) の 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で1時間抽出を行ない、ろ過により不溶物を除く。同緩衝液で緩衝化した CM-セファデックス C-50 のカラム (1.8×30 cm) に吸着させ、続いて同緩衝液で十分洗う。カラムに吸着されずに通過した画分に酵素活性が認められたので、その画分を集めて硫酸 0.7 飽和として沈殿を集め、透析により硫酸を除く。これを CM-セファデックス非吸着画分とした。つぎに、吸着された部分は 0.2M NaCl で溶出を行なってこの画

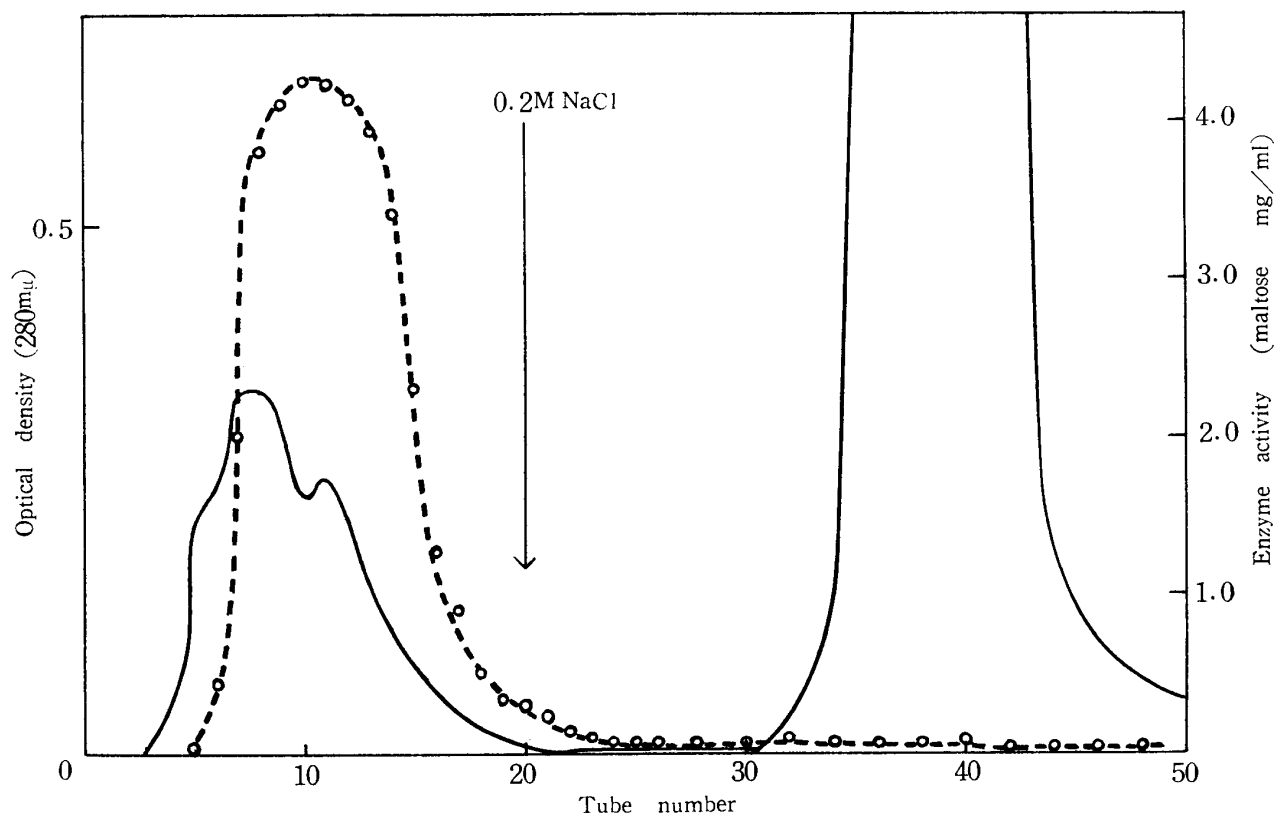


Fig. 1 CM-Sephadex C-50 Column Chromatogram of Yam β -Amylase
buffer solution : 0.1M acetate buffer (pH 5.0), 0.2M NaCl
sample : 1g column size : 1.8×30 cm
—absorbancy at 280 m μ amylase activity

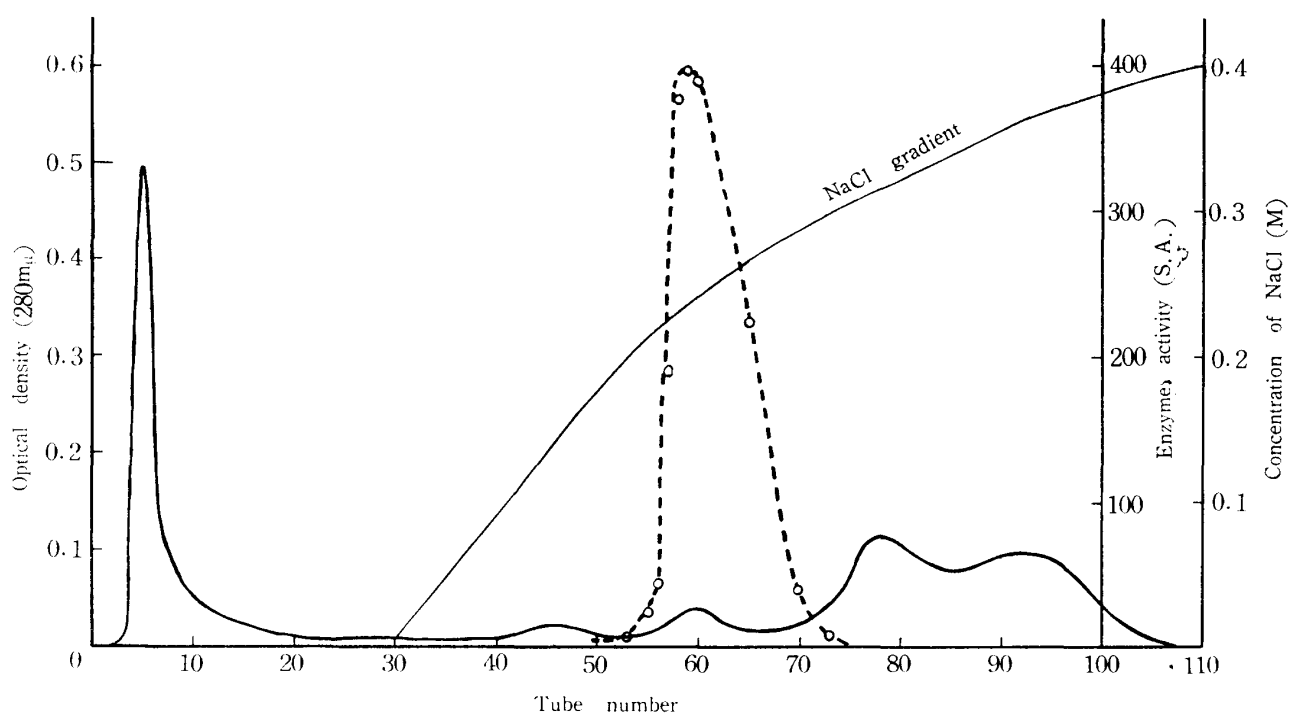


Fig. 2 DEAE-Cellulose Column Chromatogram of Yam β -Amylase
column (1.8×30 cm) equilibrated with 0.01 M phosphate buffer (pH 6.4)
eluted gradiently (\rightarrow 0.01 M phosphate buffer of pH 6.4 containing 0.5 M NaCl)
——absorbancy at 280 m μ amylase activity

分の酵素活性を調べたが認められなかった。このCM-セファデックス C-50 によるカラムクロマトグラフィーの結果を Fig.1 に示す。この結果より、60~70%の粘質タンパク質が CM-セファデックスに吸着されて除かれることがわかった。

4. DEAE-セルロースによるカラムクロマトグラフィー

CM-セファデックス非吸着画分を 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.4) で緩衝化し、同緩衝液で緩衝化した DEAE-セルロースカラム (1.8×30cm) に吸着させ、同緩衝液で十分洗ったのち、0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.4) と 0.5 M の NaCl を含む 0.01 M リン酸緩衝液で gradient elution を行ない同時に酵素活性の測定を行なった。その結果を Fig. 2 に示す。これにより食塩濃度約 0.2 M で溶出される画分に酵素活性が認められたので、その画分を集めて透析ののち、凍結乾燥して精製酵素を得た。その収量はアセトンパウダー 100g から約 30mg であった。

以上の精製法をまとめて Table 1 に示す。また、精製の各操作段階における アミラーゼ活性をまとめて Table 2 に示す。この結果より、最初のアセトンパウダー抽出液に比べて約 80 倍の Specific activity を持つ アミラーゼが得られたことがわかる。

5. 粗酵素液中のアミラーゼ活性

α -アミラーゼに 特異的な ヨウ素 デンプン 反応による

Table 1 Purification of Yam β -Amylase

	<u>Acetone powder</u>
	—extracted with distilled water (1 : 50)
	—centrifuged at 17,000×g for 5 min. at 0°C
Step (1)	<u>Supernatant</u>
	—70% saturation with ammonium sulfate
(2)	<u>Precipitate</u>
	—dialysed against distilled water
	—lyophilized
	—extracted with 0.1 M acetate buffer, pH 5.0 (1 : 200)
(3)	<u>Extract</u>
	—applied on CM-Sephadex C-50 column, equilibrated with 0.1 M acetate buffer pH 5.0
(4)	<u>Not adsorbed fraction</u>
	—buffered with 0.01 M phosphate buffer pH 6.4
	—DEAE-Cellulose column chromatography
(5)	<u>β-Amylase</u>

A.O.A.C. 測定法により α -アミラーゼの活性を調べた。酵素液としては、アセトンパウダー 8 g を蒸留水 200ml で抽出したもの、対照としてだ液を蒸留水で 20 倍に希釈したものを使用した。その結果、希釈だ液では 30 分で標

Table 2 Summary of Purification Procedure

Step	Fraction	Total protein (mg)	Total units	Specific activity (units/mg. protein)	Yield (%)
1	Acetone powder extract	520.6	2600	5.0	100
2	0.7saturated ammonium sulfate	92.0	782	8.5	30
3	Lyophilization followed by buffer extraction	28.3	439	15.5	17
4	CM-Sephadex treatment	8.8	380	43.2	15
5	DEAE-Cellulose column eluate	0.4	156	389.5	6

準色となったのに比べて、アセトンパウダー抽出液では60分で少し赤味がさし、120分でも青紫色に少し赤味がかった程度であったので、ヤマイモのアミラーゼ活性は β -アミラーゼによると判断した。

6. セロゲル電気泳動

精製酵素につき、粗酵素と比較してセロゲル電気泳動を行なった結果を Fig. 3 に示す。その結果、粗酵素では4つのバンドに分かれたが、精製酵素では先端より2番目のバンドのみを示し、電気泳動的に単一であることがわかった。なお比較のためサツマイモの β -アミラーゼについて泳動を行なったが、ヤマイモより少し易動度の遅いバンドを示した。また、同じ条件で CM-セファデックス非吸着画分の酵素液について泳動した結果は、先端より3番目の tailing のひどいバンドが見あたらないことから、粘質タンパク質が CM-セファデックスカラムに吸着されて除かれたことがこれによってもわかる。

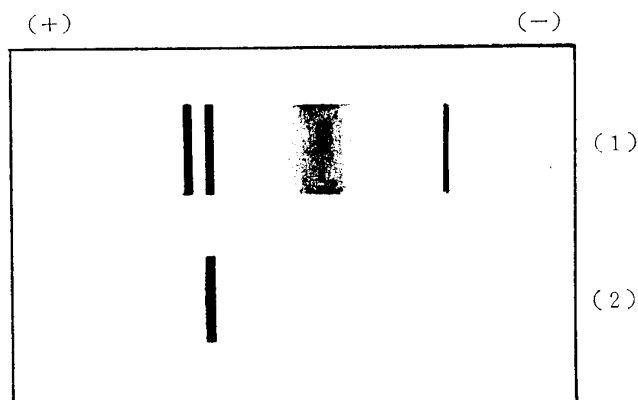


Fig. 3 Cellogel Electrophoretic Diagrams of Yam β -Amylase

- (1) acetone powder extract
- (2) DEAE-Cellulose column eluate
barbital buffer (pH 8.6, $\mu=0.1$),
200V, 40min.

2) 酵素活性におよぼす pH および温度の影響

ヤマイモの β -アミラーゼ活性が反応液の pH や温度によってどのように影響を受けるかについて調べ、サツマ

イモの β -アミラーゼとの比較検討を行なった。基質には2%可溶性澱粉液を使用し、緩衝液は pH 3.6~5.5 は 0.04 M 酢酸緩衝液を pH 6.0~8.0 は 0.04 M リン酸緩衝液を使用した。すなわち、基質 0.5ml に緩衝液 0.5ml と酵素液 1 ml を入れ、30~80°C にそれぞれ調節した恒温槽中で10分間反応させ、ジニトロサリチル酸法によりそれぞれの活性を測定し、活性の一番高かった pH 5.0, 60°C の活性を100として表わした結果を Fig. 4 に示す。

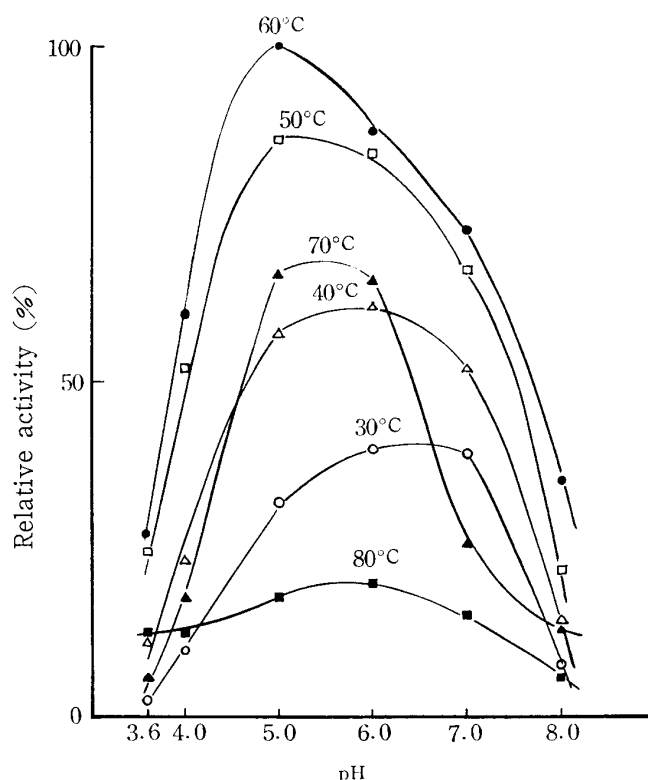


Fig. 4 Activity-Temperature and -pH Curves of Yam β -Amylase

これにより、まず温度の影響については、30~60°C までは温度上昇により酵素反応は増大しているが、60°C を境として 70°C では急に低下し、80°C ではほとんど活性を示さない。これはサツマイモの β -アミラーゼが

70°C, 80°C においても 60°C とほとんど同じ活性を示し, 至適温度範囲がかなり広いのに比べて, ヤマイモでは至適温度範囲が 50°~60°C と狭く, 熱に対する安定性の異なることがわかった.

つぎに pH による影響については, pH 5.0 付近で活性のピークを示し, サツマイモでは pH 5.0 以下で急激に活性が低下しているのに比して, ヤマイモでは pH 4.5~5.5 と広い至適 pH 範囲を持っており, pH 4.0 でも 6.0 と同程度にかなりの活性を示している. これにより, サツマイモに比べて酸性側での安定性が高く, 調理方法における特異性と関連して注目に値する結果を得た.

要 約

ヤマイモよりアセトンパウダーを調製し, その抽出液の硫酸 0.7 飽和沈殿物を CM-セファデックス処理, DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによりアミラーゼを分離・精製して電気泳動的に単一な酵素標品を得た.

その性質について検討した結果, 作用至適 pH は, サツマイモの β -アミラーゼと異なり, pH 4.5~5.5 と広い範囲をもっており, pH 4.0 でもかなり活性を残している.

また, 作用温度については, 30°~60°C までは温度の

上昇と共に活性は増大し, 60°C で最高を示すが, 70°C では急に低下し, 80°C ではほとんど活性を示さないことがわかった. (1972年8月1日受理)

文 献

- 1) 井上吉之監修: 日本食品事典, 30(1968), 医歯薬出版
- 2) A. K. Balls, R. R. Thompson and M. K. Walden: *J. Biol. Chem.*, **163**, 571 (1946)
- 3) 片山 崑: 薬学雑誌, **315**, 446 (1908)
- 4) 岡 啓次郎, 坂入和彦, 島田慶子: 立正学園女子短大研究紀要, **2**, 1 (1959)
- 5) 高橋美帆, 下村得治: 北大農学部邦文紀要, **6**, 63 (1966)
- 6) 守 康則, 財津恭子, 塚原洋子: 栄養と食糧, **20**, 205 (1967)
- 7) A. K. Balls, R. R. Thompson and M. K. Walden: *J. Biol. Chem.*, **173**, 9 (1948)
- 8) *Methods of Analysis*-AOAC. 11th ed., 172 (1970)
- 9) 京大, 農, 農化編: 農芸化学実験書(増補第二巻) 618 (1967) 産業図書
- 10) 満田久輝: 実験栄養化学〔全〕71 (1966) いずみ書房