

追熟中のキウイフルーツ(*Actinidia deliciosa*(A.Chev.)C.F.Liang et A.R.Ferguson,cv.Haywaed)の -グルコシダーゼの精製ならびに性状について

誌名	日本食品保蔵科学会誌
ISSN	13441213
著者名	谷口,亜樹子 谷口,正幸 高野,克己 松本,信二
発行元	日本食品保蔵科学会
巻/号	27巻3号
掲載ページ	p. 133-139
発行年月	2001年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



追熟中のキウイフルーツ (*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C.F. Liang et A.R. Ferguson, cv.Haywaed) の α -グルコシダーゼの精製ならびに性状について

谷口 (山田) 亜樹子*・谷口正幸**・高野克己**・松本信二***

Purification and Properties of α -glucosidase from kiwifruit
(*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C.F. Liang et A.R. Ferguson, cv.Haywaed)
during ripening

TANIGUCHI (YAMADA) Akiko*, TANIGUCHI Masayuki**, TAKANO Katsumi** and MATSUMOTO Shinji***

*Department of Brewing and Fermentation, Junior College of Tokyo University of Agriculture

1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

**Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience,

Tokyo University of Agriculture

1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

***Food Processing Center, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture

1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

α -Glucosidase of kiwifruit was purified by ammonium sulfate precipitation, followed by affinity chromatography (α -cyclodextrin sepharose 6B), ion-exchange chromatography (DEAE-cellulose), gel filtration (Sephadex G-200) and isoelectric focusing (LKB8100). The enzyme was found to be a single band when examined by electrophoresis. The specific activity of the enzyme purified was 294-fold of the crude extract enzyme. The α -glucosidase had a molecular weight of 18,000 and an isoelectric point of 4.9. And the highest activity was at pH 6.5, 45°C. α -Glucosidase was stable at pH 5.0-7.0 and below 40°C. The K_m value for *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside of α -glucosidase was calculated to be 1.9mM. The enzyme activity was inhibited by 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid), *p*-chloromercuribenzoic acid, Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} and Hg^{2+} . When qualitative thin-layer chromatographic analysis on the oligosaccharide hydrolysate solution digested by the enzyme, α -glucosidase produced a glucose from oligosaccharides. The enzyme specifically digested maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, and maltohexaose, but not amylose.

(Received Dec. 4, 2000; Accepted Feb. 9, 2001)

筆者らはキウイフルーツのポリフェノールオキシダーゼの性状¹⁾を明らかにするとともに追熟中の澱粉およびペクチンの量および性状の変化²⁾, ならびにペクチンエステラーゼの性状³⁾などを報告してきた。

前報¹⁾で、追熟における澱粉分解の機序を明らかにすることを目的とし、キウイフルーツのアミラーゼの性状について検討した。キウイフルーツには、アミラーゼIおよびアミラーゼIIの2種類のアミラーゼが存

*東京農業大学短期大学部醸造学科 (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1)

**東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科 (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1)

***東京農業大学応用生物科学部食品加工技術センター (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1)

在した。アミラーゼ I および II の澱粉に対する作用および分解生成物の挙動から、キウイフルーツの追熟中における澱粉分解は、初めにアミラーゼ I が澱粉粒を分解し、その分解生成物にさらにアミラーゼ II が作用し、オリゴ糖が生成するものと推察された。アミラーゼ I および II ともにグルコースを生成しないことから、 α -グルコシダーゼの存在と追熟におけるその作用が推察された。

そこで、本研究ではキウイフルーツの追熟機構解明の一環として、追熟中における α -グルコシダーゼ活性の消長を調べ、さらに α -グルコシダーゼを分離、精製し、その性状を明らかにしたので報告する。

材料および実験方法

1. 試料および追熟処理

前報⁴⁾と同様に神奈川県足柄上郡松田町産のキウイフルーツ、ヘイワード種の開花後5カ月目の果実を収穫し、これを試料とした。収穫後直ちに、温度20℃、飽和湿度の恒温室にて追熟処理を行い、これを実験に供した。

2. 粗酵素の調製

前報⁴⁾と同様に、果肉に等容量の0.5Mリン酸緩衝液(pH7.0、酸化防止剤として5 mM 2-メルカプトエタノール、ポリフェノール除去剤として1.5%ポリビニルピロリドン、1 mM塩化カルシウム含有)を加え、ワーリングブレンダーで破碎した。ホモジネートを4℃で3時間攪拌抽出後、遠心分離(16,000×g、20分間)し上澄液を抽出液とした。この抽出液に硫酸アンモニウムを飽和濃度80%になるように加え、塩析した。1時間静置(4℃)後、遠心分離(10,000×g、20分間)し、沈殿画分を10mMリン酸緩衝液(pH7.0、5 mM 2-メルカプトエタノールおよび1 mM塩化カルシウムを含む)に溶解し同緩衝液に対して透析し粗酵素液とした。

3. α -グルコシダーゼ活性の測定

α -グルコシダーゼ活性は、酵素液0.5mlに10mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside⁵⁾(1 mM塩化カルシウムを含む0.1M酢酸緩衝液、pH6.5に溶解)0.5mlを加え、37℃で1時間の反応を行った。なお、1分間に1 μ molの *p*-nitrophenolを生成する酵素量を1単位(unit)とした。

4. タンパク質の定量

タンパク質は、Lowry法の改良法⁶⁾により定量した。

5. α -サイクロデキストリン・セファロース 6Bアフィニティークロマトグラフィー

前報^{4),7)}と同様に α -サイクロデキストリン・セファロース 6Bゲルを調製した。本ゲルを10mMリン酸緩衝液(pH7.0、5 mM 2-メルカプトエタノールおよび1 mM塩化カルシウムを含む)にて緩衝化させた後、カラム(2×20cm)に充填し、これに粗酵素液を添加した。溶出は、前述の緩衝液300mlおよび0.5% β -サイクロデキストリン溶液300mlにて行い、溶出液は6 mlずつ分取し、 α -グルコシダーゼ活性およびタンパク質の紫外外部吸収に起因する280nmの吸光度を測定した。

6. DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィー

10mMリン酸緩衝液(pH7.5、5 mM 2-メルカプトエタノールを含む)で緩衝化したDEAE-セルロースカラム(3×15cm)に粗酵素液を添加し、前述の緩衝液350mlを流下した後、同緩衝液250mlと0.5M塩化ナトリウム溶液250mlによるリニアグラジェント溶出を行った。溶出液は5 mlずつ分取し、 α -グルコシダーゼ活性および280nmの吸光度を測定した。

7. ゲルクロマトグラフィー

セファデックスG-200カラム(2.5×80cm)を10mM酢酸緩衝液(pH6.5)で平衡化し用いた。溶出は前述の緩衝液200mlで行った。溶出液は5 mlずつ分取し、 α -グルコシダーゼ活性および280nmの吸光度を測定した。

8. 等電点電気泳動法

LKB8100(110ml)カラムを用いてキャリアーアンホライン(pH2.5~5.0)を使用しグリセロール濃度配にて等電点電気泳動(4℃、500V、40時間)⁸⁾を行った。泳動終了後、内溶液を2 mlずつ分取して、pH、 α -グルコシダーゼ活性および280nmの吸光度を測定した。

9. 純度検定

ディスク電気泳動法により行った。永井の方法⁹⁾に準じて分離用ゲル(10%ポリアクリルアミド、pH4.3)を調製し、これにタンパク質(5 μ g)を添加し、ゲル1本当たり2 mAにて泳動を行った。タンパク質染色は、クマシーブリリアントブルーR-250にて行った。

10. 分子量の測定

前報⁴⁾と同様に、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって測定した。酵素タンパク質をSDS化¹⁰⁾し、これを15%ポリアクリルアミド分離用ゲルに添加し一定電流(8 mA/本)にて泳動を行った。

11. 分解生成物の検討

マルトース (G_2) からマルトヘキサオース (G_6) までのマルトオリゴ糖およびアミロース (G_{18}) の 1 mM 溶液 0.5 ml に酵素液 0.1 ml (5 units) を加え、37°C で 20 時間まで反応させ加熱処理 (100°C, 10 分間) して反応を停止させた後、0.1 ml に減圧濃縮して試料溶液とした。試料溶液 (2 μ l) をシリカゲル薄層板 (メルク社製, Kieselgel 60F₂₅₄) にスポットし、酢酸エチル:酢酸:水 (2:1:1, v/v) にて二重展開¹¹⁾ (室温) した後、5% (w/v) 硫酸・メタノール溶液を噴霧し、100°C にて、30 分間加熱処理してスポットを検出した。なお、標準物質としてグルコース (G_1)、マルトース (G_2)、マルトトリオース (G_3)、マルトテトラオース (G_4)、マルトペンタオース (G_5) およびマルトヘキサオース (G_6) を用いた。

結果および考察

1. 追熟過程の α -グルコシダーゼ活性の変化

追熟に伴う活性量の変化を調べ、Fig. 1 に示した。追熟開始時において、 α -グルコシダーゼ活性量は果肉 100 g あたり 2.5 units であったが、追熟 7 日目より活性量が急激に増加し、追熟 12 日目で追熟開始時の約 10 倍の 24 units と最高値に達した。その後は活性は大きく低下したが 20 日目においても約 14 units を保持し、追熟中における活性量の変動は前報⁴⁾ のアミラーゼと同様であった。

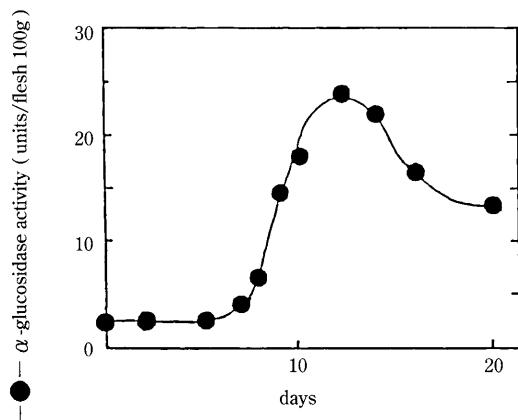


Fig. 1 Changes in α -glucosidase activity of kiwifruit during ripening

One unit of α -glucosidase activity was 1 μ mol of *p*-nitrophenol liberated per min with did hydrolyze *p*-nitrophenol- α -glucopyranoside at 37°C and pH 6.5.

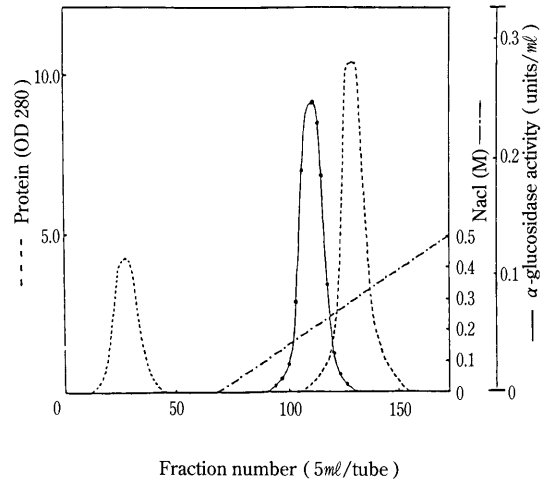


Fig. 2 Ion-exchange chromatography of kiwifruit α -glucosidase on DEAE-cellulose

The enzyme, after affinity chromatography, was applied on a DEAE-cellulose column (3 \times 15 cm) previously equilibrated with 10 mM phosphate buffer (pH 7.5) containing 5 mM 2-mercaptoethanol. The enzyme was eluted by the linear gradient with 10 mM phosphate buffer (pH 7.5) and 0.5 M NaCl solution (500 ml).

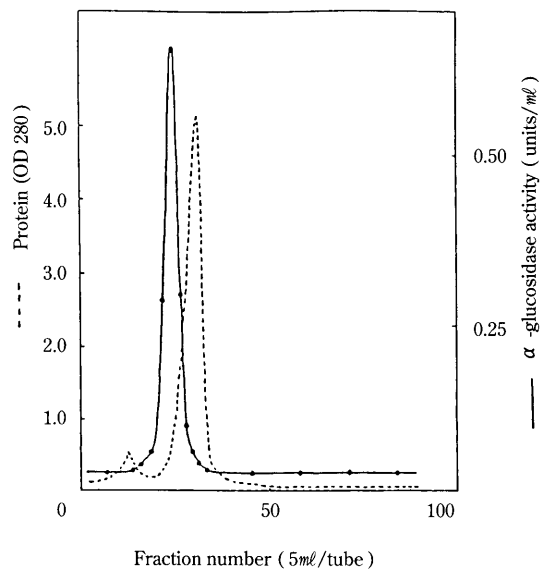


Fig. 3 Gel filtration of kiwifruit α -glucosidase on Sephadex G-200

The enzyme, after ion-exchange chromatography, was applied on a Sephadex G-100 column (2.5 \times 80 cm) previously equilibrated with 10 mM acetate buffer (pH 6.5), and then the enzyme was eluted with the same buffer.

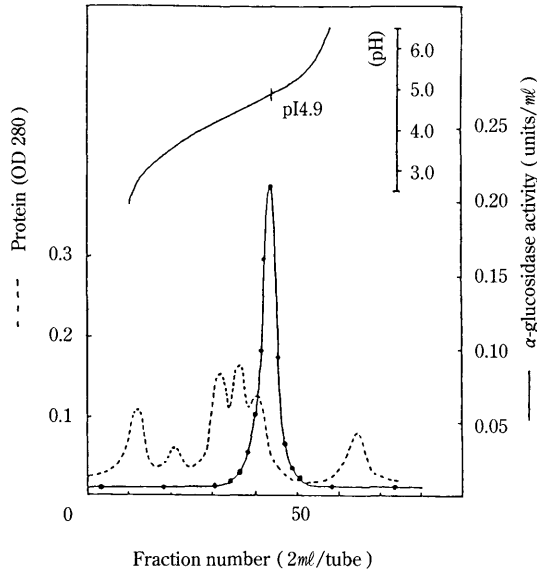


Fig. 4 Isoelectric focusing of kiwifruit α -glucosidase

Isoelectric focusing was used a LKB 8100 column (110 ml) of 1% ampholine carrier ampholyte (pH 2.5~5.0) and 20% glycerol.

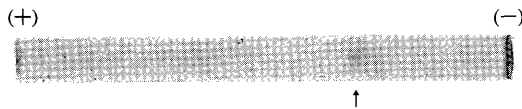


Fig. 5 Disc-polyacrylamide gel electrophoresis of purified kiwifruit α -glucosidase

The purified enzyme (5 μ g) was applied to 10% polyacrylamide gel (pH 4.3).

The gel was stained for protein with Coomassie brilliant blue R-250.

2. α -グルコシダーゼの精製

粗酵素を α -サイクロデキストリン・セファロース 6Bカラムに供し、0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.5, 0.5 M塩化ナトリウム, 5 mM 2-メルカプトエタノールを含む), 2% β -サイクロデキストリンを溶解した同緩衝液により順次溶出を行った結果, α -グルコシダーゼは未吸着画分に溶出し, アミラーゼは本ゲルに吸着し, α -グルコシダーゼとアミラーゼを完全に分離することができた。この α -グルコシダーゼ画分を透析処理した後, さらにDEAE-セルロースカラムに添加した。その結果, Fig. 2に示したようにNaCl濃度 0.2M付近に一つの α -グルコシダーゼ画分が得られた。さらに, この画分をSephadex G-200ゲルクロマトグラフィにより精製した。その結果Fig. 3に示したように, 単一のピークが得られた。この画分をさらに等電点電気泳動法により分画したところ, Fig. 4に示したようにpH4.9に等電点をもつ α -グルコシダーゼ画分が得られた。ディスク電気泳動法によって純度検定を行ったところ, 単一のタンパク質バンドが得られ (Fig. 5), 高度に精製されていることが確認されたので, この画分を精製酵素とし, 以下その性状について検討を行った。なお, 以上の精製段階の比活性ならびに活性の回収率をTable 1に示した。比活性は抽出液に比べ精製酵素は294倍に上昇し, 活性回収率は1.9%であった。

3. 精製酵素の性状

1) pHの影響 McIlvaine緩衝液 (pH4.0~8.0), 炭酸水素ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 8.0~11.0), リン酸水素ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH11.0~12.0) を用い, 最適pHおよびpH安定性について測定した。結果はFig. 6に示したように, α -グルコシダーゼの最適pHはpH6.5であり, アミラーゼ I および II (pH7.0)⁴⁾ とほぼ同様であった。本酵素はpH7.0では約90%, pH7.5および6.0では約

Table 1 Purification process of kiwifruit α -glucosidase

Stages	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification (fold) (%)	Yield
Extract*	32200	937.0	0.029	1	100
Crude enzyme	4200	146.0	0.035	1.2	15.6
α -CD sepharose 6 B	4000	140.0	0.035	1.2	14.9
DEAE-cellulose	184	79.2	0.430	14.8	8.5
Sephadex G-200	62.4	69.2	1.109	38.2	7.4
Isoelectric focusing	2.1	17.9	8.524	293.9	1.9

*kiwifruit flesh used was 8 kg.

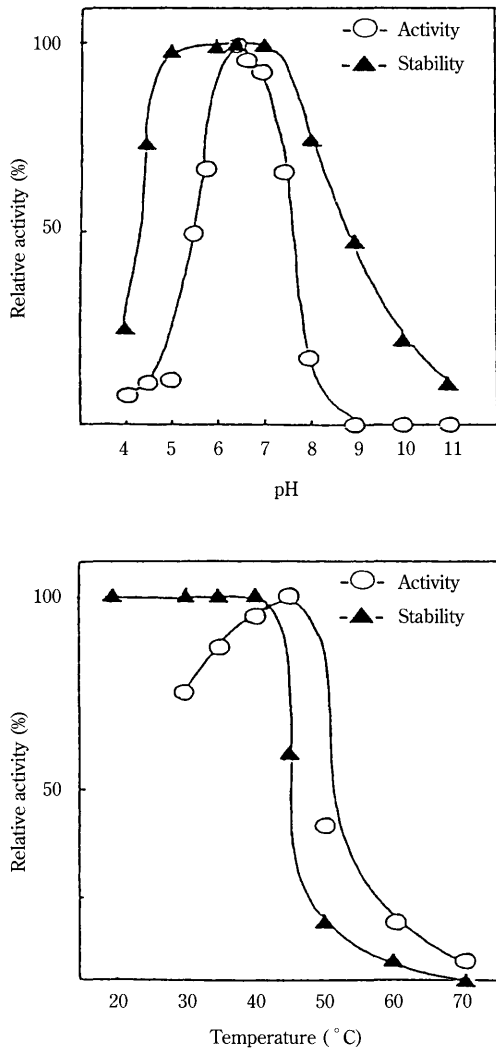


Fig. 6 Effects of pH and temperature on the activity and stability of kiwifruit α -glucosidase

Buffers used were 0.1 M McIlvaine buffer (pH 4-8), 0.1 M NaHCO_3 -NaOH buffer (pH 8-11), 0.1 M Na_2HPO_4 -NaOH buffer (pH 11-12).

Optimum activity: the reaction was carried out for 60 min with pH alteration (at 37°C) or with temperature alteration (at pH 6.5), and the activity was expressed as a percentage of the maximum activity.

Stabilities against pH and temperature: the enzyme was preincubated at various pH or temperatures and the remaining activity was determined at 37°C for 60 min and expressed as a percentage of the initial activity.

70%の活性を示したが、pH 5および8ではほとんど失活した。本酵素の最適pHはコメ (最適pH4.0)¹²⁾、サトイモ (最適pH4.0)¹³⁾、ソバ (最適pH5.0)¹⁴⁾およびホウレンソウ種子 (最適pH5.0)¹⁵⁾の α -グルコシダーゼに比べ中性側であった。pH安定性 (37°C, 30分間)はpH5.0~7.0であり、アミラーゼ I および II⁴⁾に比べ酸性域の安定性が大きく、アルカリ性域での安定性が小さかった。

2) 温度の影響 最適温度および温度安定性を検討した (Fig. 6)。 α -グルコシダーゼの最適温度は45°Cで、アミラーゼ I および II (55°C)⁴⁾に比べ低かったが、温度安定性 (30分間)は40°C以下ではほぼ同様であった。コメ (最適温度50°C)¹²⁾、サトイモ (最適温度50°C)¹³⁾、ソバ (最適温度52°C)¹⁴⁾およびホウレンソウ種子 (最適温度65°C)¹⁵⁾の α -グルコシダーゼに比べ、最適温度はやや低かった。

3) 分子量、等電点およびKm値 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて分子量の測定を行った結果、 α -グルコシダーゼは18,000と推定された。ホウレンソウ種子 (78,000~82,000)¹⁵⁾、酵母 (60,000~100,000)¹⁶⁾、糸状菌 (110,000~130,000)¹⁷⁾に比べ、本酵素は低分子量であった。等電点電気泳動法にて測定した結果、 α -グルコシダーゼの等電点はpH4.9であった。LINEWEAVER-BURKの方法¹⁸⁾に従い、精製酵素の *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside に対する親和性を測定した結果、Km値は1.9mMであった。

4) 各種試薬の影響 酵素液 (10units) に各種試薬を1mMになるように加え、40°C, 30分間処理した後、残存活性を測定し、試薬無添加の活性値を100%として、相対活性で示した。Table 2 に示したように、DTNBおよびPCMBにより残存活性はそれぞれ38および45%と大きく低下したことから、本酵素はSH酵素であると推測された。また、 Zn^{2+} および Cu^{2+} によっても著しく阻害され、残存活性はそれぞれ24および34%を示し、 Ni^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} によっても42~55%阻害された。サトイモの α -グルコシダーゼは Cu^{2+} 、 Hg^{2+} で活性が阻害され、 K^+ 、 Mg^{2+} 、EDTAで影響を受けないことが報告されている¹³⁾が、本酵素も同様の結果が得られた。

5) オリゴ糖分解性 マルトオリゴ糖 (G_2 ~ G_6) およびアミロース (G_{18}) の1mM溶液に α -グルコシダーゼを37°C, pH6.5で20時間反応し、その分解生成物を薄層クロマトグラフィーにて検討した (Fig. 7)。本酵素は G_2 ~ G_6 のいずれのオリゴ糖にも作用し、生成物としてグルコースが検出された。また、アミロース

Table 2 Effect of various reagents on the activity of kiwifruit α -glucosidase

Reagents (1 mM)	Relative activity (%) ^{*1}
None	100
KCl	91
ZnCl ₂	24
CuCl ₂	34
NiCl ₂	42
CdCl ₂	42
HgCl ₂	55
MgCl ₂	80
PbCl ₂	98
AlCl ₃	89
DTNB ^{*2}	38
PCMB ^{*3}	45
EDTA ^{*4}	91
CH ₂ ICOOH	98

* 1 The enzyme was preincubated with 1 mM of various reagents at 37°C for 60 min, and the remaining activity was determined and expressed as a percentage of the activity under non-addition.

* 2 DTNB: 5, 5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)

* 3 PCMB: *p*-chloromercuribenzoic acid.

* 4 EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.

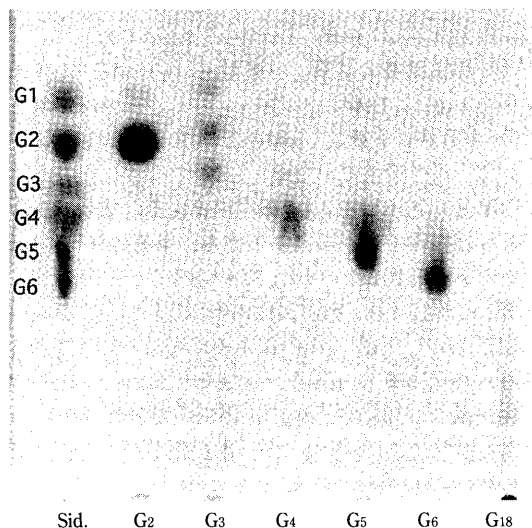


Fig. 7 Thin-layer chromatogram of hydrolysates of oligosaccharides and amylose with kiwifruit α -glucosidase

(G₁₈)には作用せず、オリゴ糖の生成は認められなかった。このことから、本酵素は重合度の高いオリゴ糖には作用せず、低分子量のオリゴ糖に作用し、これをグルコース単位に分解することが明らかになった。

キウイフルーツよりその追熟中のデンプン分解ならびに糖度の上昇に関与する2種アミラーゼを前報⁴⁾にて、また本報にて α -グルコシダーゼ1種を分離、精製し、それらの性状を明らかにした。これらの結果からキウイフルーツの追熟過程において、アミラーゼおよび α -グルコシダーゼ活性は著しく増大し、澱粉は作用特性の異なるアミラーゼIおよびIIの協調的な作用によって分解され、生成したオリゴ糖は α -グルコシダーゼによってさらにグルコースに分解されるなど、追熟過程における澱粉分解ならびに糖生成と酵素作用との関係を解明することができた。

今後は、さらにアミラーゼ、 α -グルコシダーゼなど、追熟に関与する酵素の増大の機序ならびにその調整要因について検討を行うことが必要と考える。

要 約

キウイフルーツから α -グルコシダーゼを抽出し、 α -サイクロデキストリン・セファロース6Bカラム、DEAE-セルロース、ゲルクロマトグラフィーおよび等電点電気泳動法により精製を行い、1種類の精製酵素を得た。

- ① 精製酵素の最適pHは、6.5であり、その活性はpH 5.0~7.0で安定であった。最適温度は45°Cであり、40°Cで30分間まで安定であった。
- ② 分子量は18,000であり、等電点はpH4.9であった。*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranosideに対する*K*_m値は1.9mMであった。
- ③ 本酵素はDTNB、PCMBで阻害されたことからSH酵素であることが推測された。Zn²⁺、Cu²⁺、Ni²⁺、Cd²⁺、Hg²⁺によっても阻害することが認められた。
- ④ 反応生成物を調べたところG₂~G₆のオリゴ糖をグルコース単位に分解したが、アミロース(G₁₈)には作用しなかった。

文 献

- 1) 松本信二・高野克己・鴨居郁三：熱帯農業，37，197 (1993)
- 2) 松本信二・三森一司・谷口正幸・高野克己・鴨居郁三：日食工，40，262 (1993)
- 3) 松本信二・高野克己：東京農業大学農学集報，37，

- 284 (1992)
- 4) 谷口 (山田) 亜樹子・谷口正幸・高野克己・松本信二: 日食保蔵誌, 印刷中 (2000)
- 5) KELLY, C. T., GIBLIN, M. and FOGARTY, W. M.: *Can.J.Microbiol.*, **32**, 342 (1986)
- 6) HATREE, E. F.: *Anal.Biochem.*, **48**, 422 (1972)
- 7) 千畑一郎・土佐哲也・松尾雄志: 実験と応用・アフィニティクロマトグラフィー 第1版 (講談社サンエンティフィック, 東京), p.73 (1976)
- 8) 青木幸一郎: 最新電気泳動法 (青木幸一郎・永井裕編) (広川書店, 東京), p.370 (1970)
- 9) 永井 裕: 蛋白質・核酸・酵素, **11**, 744 (1966)
- 10) 林 健志・大場義樹: 蛋白質・核酸・酵素, **17**, 304 (1972)
- 11) 友田正司: 糖質実験法 (蛋白質・核酸・酵素 別冊, 蛋白質・核酸・酵素編集部編) (共立出版, 東京), p.27 (1968)
- 12) TAKAHASHI, N. and SHIMOMURA, T.: *Agr.Biol.Chem.*, **37**, 67 (1973)
- 13) 間島英之・山崎良樹・今野晴義: 岡大資生研報, **5**, 129 (1998)
- 14) TAKAHASHI, M. and SHIMOMURA, T.: *Agr.Biol.Chem.*, **32**, 923 (1968)
- 15) 古井 聡・杉本 学・鈴木幸雄: 岡大資生研報, **4**, 239, (1996)
- 16) 山本武彦: 酵素ハンドブック 第2版 (田宮信雄・丸尾文治編, 朝倉書店, 東京) p.499 (1987)
- 17) 山崎良樹・鈴木幸雄: 澱粉科学, **27**, 74 (1980)
- 18) 橋本 隆: 生化学実験講座5 酵素研究法 下 第1版 (日本生化学会編, 東京化学同人, 東京), P.567 (1975)
- (平成12年12月4日受付, 平成13年2月9日受理)