原 著 論 文

サツマイモ塊根におけるトリプシンインヒビター(TI)活性の品種・系統間差異

外山 潤^{1,2)}・吉元 誠¹⁾・山川 理^{1,3)}¹⁾農業・生物系特定産業技術研究機構九州沖縄農業研究センター，都城市，〒885-0091²⁾重点研究支援協力員³⁾現：九州沖縄農業研究センター，菊池郡西合志町，〒861-1192

摘 要

サツマイモ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) は家畜飼料として優れた作物であるが、塊根中には抗栄養因子のトリプシンインヒビター (Trypsin inhibitor : TI) を含んでいる。本研究では、サツマイモ品種・系統の TI 活性を調査するための簡易迅速測定法を開発し、栽培品種 (8 品種) および育成途上系統 (199 系統) の分析を行った。測定は、酵素としてブタ膵臓トリプシン、基質として BAPA (Benzoyl-D,L-arginine-p-nitroanilide) を用いて比色法で行う従来法の一部を改変し、少量で多検体の分析が可能なマイクロプレートを用いる方法で行った。本法により、サツマイモの精製 TI (Sweetpotato TI : SPTI) およびダイズの精製 TI (ダイズ TI) の活性を測定し作成した検量線は、0–1 µg (検体 10 µl 中) の範囲で高い精度を示した ($R^2=0.974$: SPTI, $R^2=0.999$: ダイズ TI)。92 検体 (1 マイクロプレート当たり) の分析に要する時間は、試料抽出に 30 分、TI 活性の測定に 90 分となり、従来法に比べて大幅に短縮された。サツマイモの栽培品種の TI 活性は、65–392 U/mg DW (平均 : 197 U/mg DW) の範囲であった。一方、育成途上の 199 系統の TI 活性は 38–944 U/mg DW (平均 : 273 U/mg DW) の広い範囲に分布し、栽培品種よりも著しく高い TI 活性の系統が存在することが示された。これらの高活性系統の一部では、TI 活性が家畜の耐性閾値を越える可能性があるかと推定された。

キーワード

サツマイモ, *Ipomoea batatas*, トリプシンインヒビター, 簡易迅速測定法, 品種間差異, 家畜飼料, 飼料価値

緒 言

日本におけるサツマイモ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) の家畜飼料としての利用は生産量の約 2% であるが、世界においては年間生産量の約 41% がブタや家禽などの家畜飼料として利用されている (FAO 2002)。サツマイモはでん粉を主成分としたカロリー生産性に優れるため、将来における飼料や食用としての重要性は高い。その一方で、サツマイモに含まれる抗栄養因子のトリプシンインヒビター (TI) は家畜の生育を阻害する可能性がある (Yeh and Bouwkamp 1985)。

TI は広く植物界に存在し、ダイズにおいて詳細に研究が行われている (Liener and Kakade 1980, Clarke and Wiseman 2000)。TI を多く含むダイズを摂取したブタや

家禽には、様々な生育障害が見られる (Clarke and Wiseman 2000, Li *et al.* 1998a, Li *et al.* 1998b, Mian and Garlich 1995)。サツマイモの TI はダイズの 1/100 ~ 1/50 のレベルである (Bouwkamp and Tsou 1983, Bouwkamp *et al.* 1985) とされる一方で、ダイズの約 28% と比較的高含量の例も報告されている (Zhang *et al.* 1998)。サツマイモ塊根の TI 活性は、系統内 (Bradbury *et al.* 1985) や、品種・系統間 (Lin and Chen 1980, Bradbury *et al.* 1984, Dickey *et al.* 1984, Ravindran *et al.* 1995) で変動する。また、栽植時期 (Lin and Tsu 1987, Lin 1989)、積算雨量 (Lin 1989)、窒素施肥 (Zhang *et al.* 1998) などの環境要因も TI 活性に影響を与える。乾燥や窒素施肥により TI 活性は増加し、これらの塊根においては TI 活性と粗蛋白質含量間に正の相関が認められる (Lin 1989, Zhang *et al.* 1998)。遺伝的背景や栽培環境の異なる日本においては、TI 活性の変動範囲が異なると考えられるが、関連する情報はない。

サツマイモ塊根の TI はいくつかの分子種が報告されている (Sugiura *et al.* 1973, Obidairo and Akpochafo 1984,

Hou and Lin 1997, Hou *et al.* 2001). 近年の報告から、塊根の水溶性蛋白質の 60–80% を占めるスボラミンおよびこれと相同性の高いいくつかの分子種が、主要な TI 成分であると考えられている (Scott and Symes 1996, Yeh *et al.* 1997, Yao *et al.* 2001). また、大腸菌で発現させたスボラミンは TI 活性を示すことが報告された (Yeh *et al.* 1997). スボラミンは還元状態で 25,000、非還元状態でそれぞれ 31,000 (スボラミン A) と 22,000 (スボラミン B) の分子量を示す A と B の多型成分が 2:1 の比に存在する (Maeshima *et al.* 1985). トリプシンアフィニティーカラムにより著者らの粗精製した TI は塊根における TI 活性の大部分を占め、スボラミン A または B に近似の分子量を示す成分が主成分であった (Toyama *et al.* 2003).

TI 活性の測定の一般的な方法は、BAPA (Benzoyl-D,L-arginine-p-nitroanilide) などの合成基質とブタやウシのトリプシンを用いた比色法であり (Kakade *et al.* 1969, Kakade *et al.* 1974), これを基本に改良されたいくつかの方法が用いられているが (Liu and Markakis 1989, Zhang *et al.* 1998), それぞれの方法における活性単位が異なるために、サツマイモや他作物のデータ間の比較が困難である. また、育種分野において、初期世代における選抜では多くの系統のスクリーニングが必要であることや、分析に供試できるサンプル量そのものが極めて限られることも多い. このため、少量のサンプルで迅速に多検体を測定する方法が求められているが、十分な検討はなされていない.

以上の背景より本研究は、1) マイクロプレートを用いた TI 活性の簡易迅速測定法の開発、2) 日本のサツマイモにおける TI 活性の品種・系統間差異の調査、3) TI 活性レベルからみたサツマイモの飼料価値の評価、を目的として行った.

材料および方法

1. 供試材料

供試材料には、サツマイモの栽培品種として、でん粉原料用の「コガネセンガン」「シロユタカ」「コナホマレ」、食用の「種子島紫」「高系 14 号」「ベニオトメ」、加工用 (色素抽出・ジュース・パウダー) の「アヤマラサキ」「サニーレッド」(熊谷 2000) の合計 8 品種を用いた. また、育成途上系統として、でん粉原料用、食用、加工用、色素抽出用、アミラーゼ用などの用途で九州沖縄農業研究センターで育成中の 199 系統 (82 品種・系統の交雑後代) を用いた. これらは TI 活性に関する選抜はこれまで行われていないものである.

2. 栽培方法

上記の材料を九州沖縄農業研究センター畑作研究部の育種圃場 (宮崎県都城市) で栽培した. 栽培方法は、九州沖縄農業研究センター・サツマイモ育種研究室の慣行

法に準じた. 施肥条件は窒素成分で 48 kg/ha を与えた. 栽植密度はアール当たり 381 本植えとし、無マルチ栽培とした. 2001 年 5 月 10 日に各 20 株 2 列植えで植え付け、9 月 25 日に塊根を収穫した. 品種は 3 反復、系統は 1 反復で栽培を行った.

3. 試料の調製

各品種・系統 50 g 以上の塊根 6 個を洗浄後短冊状に切り、混合後、約 200 g を凍結乾燥した. 乾燥試料はブレンダーを用いて破碎し、212 μm の篩通過部分を分析試料とし、分析に使用するまで -30°C に保管した. 抽出および遠心分離は 2 ml のエッペンドルフチューブを用いて 4°C 条件下で行った. 各検体 50 mg を精秤し、2 ml の 50 mM トリス塩酸 (pH 8.0) を加え、振とう器上で 10 分間攪拌することにより TI を抽出した. 13,000 $\times$ g で 10 分間遠心後の上清を粗酵素液とした.

4. TI 活性測定手順

TI 活性の測定は、浅尾ら (1998) および Zhang *et al.* (1998) の方法を参考にして下記のようにマイクロプレートを用いた方法に改変して行った. トリプシン活性の測定には、酵素としてブタ膵臓トリプシン (和光純薬製)、基質として BAPA (和光純薬製) を用いた. 原理的には、BAPA を含む緩衝液に、トリプシンと TI を含む検体液を加え、BAPA の吸光度の減少を測定する方法である. 基質液には、ジメチルスルホキシドに 10 mg/ml の濃度で溶解した BAPA 原液を 100 mM トリス塩酸、100 mM 塩化カルシウム、pH 8.0 の緩衝液にて 20 倍に希釈したものを用時調整して用いた. 測定は、まず、160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のトリプシン溶液 20 μl と検体液 20 μl を 37°C で 2 分間混合し、混合液 20 μl を 96 穴マイクロプレートに移した. この混合液に、基質液 200 μl を添加し、 37°C で 10 分間反応させた. 10 分後、100 μl の 10% 酢酸を添加することにより反応を停止し、反応液の 410 nm の吸光度を測定した. トリプシンと検体の混合液の残り 20 μl に予め 10% 酢酸液を添加し、基質液を加えたものをブランクとして同様に吸光度を測定した. 反応液の吸光度とブランク吸光度との差をトリプシン活性とした. 検体の代わりに抽出バッファーを用いて同様の測定をしたものをコントロールとし、この測定値から各検体の測定値を差し引いた値 ($A_{410r}-A_{410s}$ (A_{410r} , A_{410s} はそれぞれコントロールと検体の 410 nm の吸光度を表す)) を用いて、次式のように阻害されたトリプシン単位を求めた.

阻害されたトリプシン単位 (U) = $(A_{410r}-A_{410s}) \times 100$ (1U は A_{410} の 0.01 の増加と定義する).

TI 活性は、乾燥試料当たりの阻害されたトリプシン単位で表した. すなわち、

$$\text{TI 活性 (U/mg DW)} = (A_{410r}-A_{410s}) \times 100 \text{ (U) /mg DW}$$

測定法の検討および評価には、サツマイモ塊根 (品種: シロユタカ) より粗精製された TI (Sweetpotato Trypsin

Inhibitor: SPTI) (Toyama *et al.* 2003) および市販のダイズ TI (和光純薬製) を用いた。

5. 粗蛋白質含量の分析

粗蛋白質含量は、ケルダール法により測定した全窒素量×6.25より推定した。TI 活性の測定に供試したすべてのサンプルについて乾燥試料 2 g を用いて測定した。

結 果

1. TI 活性の簡易迅速測定法

トリプシンアフィニティーカラムにより粗精製された SPTI (Toyama *et al.* 2003) の添加量とトリプシン阻害率について本法により測定した結果を図 1 に示す。SPTI 量を 0–10 µg まで増加させることによりトリプシン阻害率は著しく増加した。トリプシン阻害率が約 40% 以下の範囲において、SPTI 量と阻害率の関係は直線性を示した。理論的にはこの範囲内であればすべての希釈率で同じ結果が得られるはずであるが、実際の測定においては希釈率が大きくなるほど測定誤差が結果に反映されやすい (Liu and Markakis 1989)。本法においては、トリプシン阻害率が 20–40% の範囲になるように希釈して測定を行うこととした。原液の粗酵素液が 12–90% のトリプシン阻害率を示した塊根試料について、適宜この範囲に希釈して再度測定を行った。希釈後の測定値×希釈率から求めた TI 活性 (38–944 U/mg DW) はばらつきの少ない連続

図 1. SPTI によるトリプシン活性の阻害

10 µl のトリプシン溶液 (1.6 µg トリプシン含む) と 10 µl の SPTI 溶液 (0–10 µg SPTI 含む) の混合液に 200 µl の基質液 (0.1 mg BAPA 含む) を加え、37°C で 10 分間反応後に 100 µl の 10% 酢酸で反応を停止し、410 nm の吸光度 (A_{410}) を測定。

¹⁾ トリプシン阻害率 (%) = $(A_{410r} - A_{410s}) / A_{410r} \times 100$

²⁾ 阻害されたトリプシン単位 (U) = $(A_{410r} - A_{410s}) \times 100$
 A_{410s} : 検体 (SPTI: 1–10 µg) の吸光度。
 A_{410r} : コントロール (SPTI: 0 µg) の吸光度。

的な分布を示し、この希釈域による測定で測定誤差は少ないと思われた (図 2)。良好な直線性が保たれる SPTI 1 µg 以下の範囲でさらに検討した結果、SPTI およびダイズ TI の検量線は 0–1 µg の範囲でそれぞれ $y=23.029x-1.7$ および $y=60.526x-0.38$ の回帰式で表され (x: 検体 10 µl 中の TI 量 (µg), y: 阻害されたトリプシン単位とする), それぞれの回帰における決定係数 (R^2) も 1 に近い値となった。検量線を用いて算出された SPTI およびダイズ TI の比活性は、22 U/µg および 60 U/µg となった (図 3)。

2. TI 活性の品種・系統間差異

栽培 8 品種の TI 活性は 65–392 U/mg DW の範囲にあり、シロユタカ (340 U/mg DW) とサニーレッド (392 U/mg DW) の TI 活性が比較的高かった (表 1)。一方、育成途上系統の TI 活性は 38–944 U/mg DW (平均 277 U/mg DW) の広い範囲に分布した (図 4)。栽培品種にはみられなかった高活性域 (392–944 U/mg DW) に育成途上系統の 18% にあたる 36 系統が存在した (図 5)。また、栽培品種と育成途上系統は TI 活性が高いほど粗蛋白質含量が高い傾向がみられ、両形質間には有意な高い正の相関が認められた ($r=0.871^{**}$, $n=207$)。栽培品種よりも TI 活性の高いほとんどの系統は、栽培品種よりも粗蛋白質含量が高かった (図 5)。SPTI の検量線 (図 3) から推定した栽培品種および育成途上系統の TI 含量は、それぞれ 2.9–17.1 mg/g DW および 1.7–41.1 mg/g DW の範囲と推定された。また、ダイズ TI の検量線を用いると、それぞれ 1.1–6.5 mg/g DW および 0.63–15.6 mg/g DW の範囲であった。

図 2. 原液の粗酵素液で 12–90% のトリプシン阻害率を示したサツマイモ塊根試料¹⁾の TI 活性

各試料は原液のトリプシン阻害率を測定後、適宜この値が 20–40% の範囲になるように希釈して再度測定を行い、希釈後の測定値×希釈率から TI 活性を求めた。

¹⁾ 育成途上系統の測定データより

図 3. TI の検量線

SPTI: トリプシンアフィニティーカラムにより粗精製されたサツマイモトリプシンインヒビター (Toyama *et al.* 2003)
 ダイズ TI: 和光純薬製

表 1. 栽培品種の TI 活性

品種名	TI 活性 (U/mg DW)
サニーレッド	392 ± 102 ^a
シロユタカ	340 ± 8 ^a
アヤムラサキ	226 ± 10 ^b
高系 14 号	170 ± 30 ^{bc}
ベニオトメ	152 ± 19 ^{cd}
コガネセンガン	148 ± 39 ^{cd}
コナホマレ	79 ± 8 ^{de}
種子島紫	65 ± 33 ^e

a-e: 同一アルファベットで示した品種間には有意差がないことを示す (LSD:5%).

図 4. 育成途上系統の TI 活性の分布

考 察

本研究で確立したマイクロプレートを用いる TI 活性測

図 5. 栽培品種と育成途上系統の粗蛋白質含量および TI 活性の分布

定法により、多検体の迅速測定が可能となった。分析に必要な試料も少量 (50 mg) であるため、抽出および遠心分離の作業を 2 ml チューブ内で行うことができ、多検体の同時調製が可能となった。Zhang *et al.* (1998) の方法では、試料 1 g、抽出バッファー 20 ml と比較的多量の試料および抽出バッファーを要するため、この方法において多検体の同時調製による所要時間の短縮は困難であった。本法により、92 検体 (1 マイクロプレート当たり) の分析に要する時間は、試料抽出に 30 分、TI 活性の測定に 90 分 (原液と希釈液の 2 回測定) となり、従来法に比べて大幅に短縮された。また、検体によるトリプシン阻害率が 20–40% の範囲になるように、適宜、検体を希釈して測定することにより、正確な測定が可能となった。さらに、SPTI およびダイズ TI の検量線における決定係数が 1 に近い値となり、測定精度が高いことを示すとともに、検量線の回帰式を用いて TI 活性を TI 含量へ変換し、サツマイモや他作物の一部の既存データとの比較を可能にした。

本研究で用いた全供試系統 (栽培 8 品種、育成途上 199 系統) の TI 活性 (38–944 U/mg DW) は約 25 倍レンジ (最大値は最小値の 25 倍) に分布していた。サツマイモの TI 活性の品種・系統間差異に関してはいくつかの報告がある (Lin and Chen 1980, Bradbury *et al.* 1984, Bradbury *et al.* 1985, Dickey *et al.* 1984, Ravindran *et al.* 1995)。Ravindran *et al.* (1995) の報告では、同一圃場で栽培された 16 品種・系統間で 12 倍レンジに分布している。また、パプアニューギニアの 2 つの異なる地域から採取された合計 21 品種間の TI 活性は 67 倍レンジに分布している (Bradbury *et al.* 1984)。さらに栽培された地域および栽培年次の異なる 30 品種を用いた場合には 167 倍レンジに分布している (Bradbury *et al.* 1985)。本研究における 25 倍レンジの系統間差は、同一環境下で栽培されたものとしては比較

的大きいと考えられる。

本試験においては、TI 活性と粗蛋白質含量間に有意な高い正の相関 ($r=0.871^{**}$, $n=207$) が認められた (図 5)。品種・系統間における同様の相関は、台湾の系統を用いた調査で認められている (Lin and Chen 1980)。一方、北アメリカ (Dickey *et al.* 1984) およびパプアニューギニア (Bradbury *et al.* 1984) の系統を用いた場合には相関が認められていない。塊根における水溶性蛋白質の大部分 (60–80%) を占めるスボラミンは TI 活性を示すことや (Yeh *et al.* 1997), TI 活性の品種間差は TI 蛋白質の量的な差による (Dickey and Collins 1984) ことを考えると、品種・系統間において両者はよく相関すると考えられる。各研究者で異なる結果が生じているのは、サツマイモ品種・系統の遺伝的背景の違いによるものと考えられる。

既存の栽培品種の TI 活性は比較的低く、狭い範囲 (65–392 U/mg DW) に分布していたのに対し、育成途上の 199 系統の TI 活性は広い範囲 (38–944 U/mg DW) に分布していた。育成途上系統のうち、栽培品種よりも TI 活性の高い系統のほとんどは粗蛋白質含量も著しく高かった (図 5)。このことは、日本においては、これまで積極的な選抜の行われていない高蛋白系統の中に、栽培品種よりも著しく TI 活性の高い系統が潜在していることを示すものである。

SPTI の検量線から推定した育成途上の 199 系統の TI 含量は 1.7–41.1 mg/g DW の範囲に推定され、極めて高含量の系統が存在した。また、SPTI の活性 (22 U/ μ g) はダイズ TI の活性 (60 U/ μ g) の約 37% に相当し、ダイズ TI よりも弱い比活性を示した (図 3)。中村ら (1988) によると、スボラミンのアミノ酸配列はダイズの Kunitz 型 TI と相同性を示すが、活性に重要な残基はすべて置換されており弱い活性しか示さないとされている。サツマイモの TI はダイズの TI と比較して比活性は低いが、量的に多く存在することにより、系統によっては比較的高活性を示すと思われる。

サツマイモを飼料とした場合の TI 活性が家畜に与える影響に関して利用できる情報は少ないが、ダイズでは多くの研究がある (Clarke and Wiseman 2000, Li *et al.* 1998a, Li *et al.* 1998b, Mian and Garlich 1995)。ダイズでの情報を活用するために、サツマイモの TI 活性をダイズ TI 当たり換算した。栽培品種および育成途上系統のダイズ TI 換算値は、それぞれ 1.1–6.5 mg/g DW および 0.63–15.6 mg/g DW の範囲であった。Zhang *et al.* (1998) は、サツマイモ 9 系統とダイズ 5 品種の TI 活性の比較を行い、サツマイモ系統の TI 含量は 3.5–7 mg/g DW の範囲であると推定している。これは本研究に供試した 8 栽培品種のダイズ TI 換算値 (1.1–6.5 mg/g DW) と類似していた。ダイズ飼料を用いたブタの給与試験の一例として、1 kg 当たり 13.4 g の TI を含む飼料を与えた場合、オートクレーブにより TI 量を 3.0 g (1 kg 当たり) に減じた飼料を与えた場合に比べて、著しい蛋白質消化率の低下等に

よる生育阻害が見られている (Li *et al.* 1998a)。この結果より、ブタの TI に対する耐性閾値は 3.0–13.4 mg/g DW の間にあると推測される。このデータとの比較において本試験の結果をあてはめれば、サツマイモの育成途上系統のダイズ TI 換算値 (0.63–15.6 mg/g DW) はブタの耐性閾値を超える可能性があることを示している。一方、既存の栽培品種のダイズ TI 換算値 (1.1–6.5 mg/g DW) が耐性閾値を越える可能性は少ないと思われる。

以上より、サツマイモの TI 活性の品種・系統間差異は比較的大きいといえ、日本においては、これまで選抜の行われていない高蛋白系統の中に栽培品種よりも著しく高活性の系統が存在し、これらが家畜の TI 耐性閾値を越える可能性はあると考えられる。

謝 辞

本研究は、農業・生物系特定産業技術研究機構・九州沖縄農業研究センター・サツマイモ育種研究室で遂行中の育成試験において、育成途上系統および当センターで開発された品種を主に材料として用いている。育成試験の総括者である中澤芳則室長 (現大豆育種研究室長)、および各試験担当者の熊谷亨主任研究官 (現作物研究所甘しょ育種研究室)、甲斐由美主任研究官、石黒浩二研究員 (現畑作物変換利用研究室主任研究官) には研究遂行上の全般にわたって的確なアドバイスを頂いた。同研究室の日高 操氏にはケルダール分析に多大なるご協力を頂いた。また、同研究室の研究アシスタントの皆様および業務第三科の皆様にはサツマイモ品種・系統の栽培および実験の遂行にご協力頂いた。さらに、同センター・遺伝資源利用研究室の高畑康浩室長には、論文を作成するにあたり校閲および示唆に富むアドバイスを頂いた。ここに記して心から感謝の意を表する。

引用文献

- 浅尾俊夫・堀口美和・寺田慎子・高橋享子 (1998) ユリ根中トリプシンインヒビターの精製とその性質。日本食品科学工学会誌 45: 663–670.
- Bouwkamp, J.C. and S.C.S. Tsou (1983) Trypsin inhibitors in sweet potatoes: genotype and environment effects. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. Trop. Reg. 27B: 126–135.
- Bouwkamp, J.C., S.C.S. Tsou and S.S.M. Lin (1985) Genotype and environment effects on the relationship between protein concentration and trypsin inhibitor levels in sweet potatoes. HortScience 20: 886–889.
- Bradbury, J.H., J. Baines, B. Hammer, M. Anders and J.S. Millar (1984) Analysis of sweet potato (*Ipomoea batatas*) from the highlands of Papua New Guinea: Relevance to the incidence of *Enteritis necroticans*. J. Agric. Food Chem. 32: 469–473.
- Bradbury, J.H., B. Hammer, T. Nguyen, M. Anders and J.S. Millar (1985) Protein quantity and quality and trypsin inhibitor content of sweet potato cultivars from the highlands of Papua New

- Guinea. J. Agric. Food Chem. 33: 281–285.
- Clarke, E.J. and J. Wiseman (2000) Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans II. Anti-nutritional factors. J. Agric. Sci. Cambridge 134: 125–136.
- Dickey, L.F., W.W. Collins, C.T. Young and W.M. Walter Jr. (1984) Root protein quantity and quality in a seedling population of sweet potatoes. HortScience 19: 689–692.
- Dickey, L.F. and W.W. Collins (1984) Cultivar differences in trypsin inhibitor of sweet potato roots. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109: 750–754.
- FAO (2002) FOOD BALANCE SHEET.
- Hou, W.C. and Y.H. Lin (1997) Polyamine-bound trypsin inhibitors in sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam cv. Tainong 57) storage roots, sprouted roots and sprouts. Plant Science 126: 11–19.
- Hou, W.C., Y.C. Chen, H.J. Chen, Y.H. Lin, L.L. Yang and M.H. Lee (2001) Antioxidant activities of trypsin inhibitor, a 33 KDa root storage protein of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam cv. Tainong 57). J. Agric. Food Chem. 49: 2978–2981.
- Kakade, M.L., N. Simons and I.E. Liener (1969) An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. Cereal Chem. 46: 518–526.
- Kakade, M.L., J.J. Rackis, J.E. McGhee and G. Puski (1974) Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chem. 51: 376–382.
- 熊谷 享 (2000) 九州頒業試験場におけるサツマイモ育種の最近の成果. 育種学研究 2: 97–104.
- Li, S., W.C. Sauer and W.R. Caine (1998a) Response of nutrient digestibilities to feeding diets with low and high levels of soybean trypsin inhibitors in growing pigs. J. Sci. Food Agric. 76: 357–363.
- Li, S., W.C. Sauer, S. Huang and R.T. Hardin (1998b) Response of pancreatic secretions to feeding diets with low and high levels of soybean trypsin inhibitors in growing pigs. J. Sci. Food Agric. 76: 347–356.
- Liener, I.E. and M.L. Kakade (1980) Protease inhibitors in “Toxic constituents of plant foodstuffs” Liener, I.E. (ed.), Academic press, New York, 7–68.
- Lin, Y.H. and H.L. Chen (1980) Level and heat stability of trypsin inhibitor activity among sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) varieties. Bot. Bull. Academia Sinica 21: 1–13.
- Lin, Y.H. and B.S. Tsu (1987) Some factors affecting levels of trypsin inhibitor activity of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) roots. Bot. Bull. Academia Sinica 28: 139–149.
- Lin, Y.H. (1989) Relationship between trypsin-inhibitor activity and water-soluble protein and cumulative rainfall in sweet potatoes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114: 814–818.
- Liu, K. and P. Markakis (1989) An improved colorimetric method for determining antitryptic activity in soybean products. Cereal Chem. 66: 415–422.
- Maeshima, M., T. Sakaki and T. Asahi (1985) Characterization of major proteins in sweet potato tuberous roots. Phytochem. 24: 1899–1902.
- Mian, M.A. and J.D. Garlich (1995) Tolerance of turkeys to diets high in trypsin inhibitor activity from untoasted soybean meals. Poultry Sci. 74: 1126–1133.
- 中村研三, 服部東穂, 松岡 健 (1988) サツマイモ塊根における蛋白質の蓄積機構とその制御. 化学と生物 26: 391–398.
- Obidairo, T.K. and O.M. Akpochafo (1984) Isolation and characterization of some proteolytic enzyme inhibitors in sweet potato (*Ipomoea batatas*). Enzyme Microb. Technol. 6: 132–134.
- Ravindran, V., G. Ravindran, R. Sivakanesan and S.B. Rajaguru (1995) Biochemical and Nutritional assessment of tubers from 16 cultivars of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). J. Agric. Food Chem. 43: 2646–2651.
- Scott, G.K. and C.W. Symes (1996) Isolation, characterization and cell growth regulatory properties of kumara (sweet potato) trypsin inhibitors. Biochem. Mol. Biol. Int. 38: 333–344.
- Sugiura, M., T. Ogiso, K. Takeuti, S. Tamura and A. Itou (1973) Studies on trypsin inhibitors in sweet potato I. Purification and some properties. Biochimica et Biophysica Acta 328: 407–417.
- Toyama, J., M. Yoshimoto and O. Yamakawa (2003) Selection of sweetpotato with high protein and/or low trypsin inhibitor activity. Proceeding of the 13th Symposium of the International Society for Tropical Root Crops (In press).
- Yao, P.L., M.J. Hwang, Y.M. Chen and K.W. Yeh (2001) Site-directed mutagenesis evidence for a negatively charged trypsin inhibitory loop in sweet potato sporamin. FEBS Letters 496: 134–138.
- Yeh, T.P. and J.C. Bouwkamp (1985) Roots and vines as animal feeds. In “Sweetpotato products: A natural resource for the tropics” Bouwkamp, J.C. (ed.), CRC press, Boca Raton, Fla, 235–253.
- Yeh, K.W., J.C. Chen, M.I. Lin, Y.M. Chen and C.Y. Lin (1997) Functional activity of sporamin from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.): a tuber storage protein with trypsin inhibitory activity. Plant Mol. Biol. 33: 565–570.
- Zhang, D., W.W. Collins and M. Andrade (1998) Genotype and fertilization effects on trypsin inhibitor activity in sweetpotato. Hort-Science 33: 225–228.

Breeding Research 7: 17–23 (2005)

Varietal Differences in Trypsin Inhibitor Activity of Sweetpotato Roots

Jun Toyama^{1,2)}, Makoto Yoshimoto¹⁾ and Osamu Yamakawa^{1,3)}

¹⁾ National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Miyakonojo, Miyazaki 885-0091, Japan

²⁾ Research Fellow of Cooperative System for Supporting Priority Research

³⁾ Present address: National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192, Japan

The colorimetric method assay for the trypsin inhibitor activity (TIA), using porcine pancreatic trypsin as enzyme and BAPA (Benzoyl-D, L-arginine-p-nitroanilide) as substrate was modified to become suitable for microplate analysis. Our method allows sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) breeders to analyze rapidly a large number of samples using a smaller sample size. In the present study, this method was applied to determine the TIA of sweetpotato genotypes. The coefficient of determination (R^2) of TIA with the partially purified trypsin inhibitor (SPTI) and the commercially available soybean trypsin inhibitor in a range of 0–1 μg was 0.974 and 0.999, respectively. A single microplate required approximately 30 min for sample preparation and 90 min for analysis. Sweetpotato roots of 8 cultivars and 199 breeding lines at the initial stages of a breeding program were analyzed for TIA. The TIA values of 8 cultivars ranged for 65 to 392 U/mg DW with an average value of 197 U/mg DW. On the other hand, The TIA values of the 199 lines ranged from 38 to 944 U/mg DW with an average value of 273 U/mg DW. These data revealed that TIA was considerably higher in the breeding lines than in the cultivars tested. In conclusion, the TIA range of the breeding lines was relatively wide and in some of the lines with a higher TIA value the threshold level may exceed that for pigs estimated by the conversion value of TIA to the amount of soybean trypsin inhibitor.

Key Words: sweetpotato, *Ipomoea batatas*, trypsin inhibitor, rapid analysis, varietal difference, feed, feeding value.