

琉球大学学術リポジトリ

細菌のアラビナン分解酵素の精製とその性質(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: 安田, 正昭, 德里, 政丈, 瀬底, 正康 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3993

細菌のアラビナン分解酵素の精製とその性質^{††}

安田正昭*・徳里政丈*・瀬底正康*

Masaaki YASUDA, Masatake TOKUZATO and Masayasu SESOKO : Purification and properties of α -L-arabinofuranosidase I from *Bacillus* sp.

Summary

This study was carried out for a purpose of effective utilization of agricultural wastes by microbial enzymes. In order to liberate arabinose from arabinose-containing polysaccharides such as arabinan, arabinoxylan and arabinogalactan, an α -L-arabinofuranosidase was investigated. An α -L-arabinofuranosidase I was purified from the culture fluid of *Bacillus* sp. No. 430, which was isolated from the soil of sugar-cane fields. The process was as follows; salting out by ammonium sulfate, DEAE-cellulose, QAE-Sephadex A-50, DEAE-Toyopearl 650 S, hydroxyapatite and Sephadex G-75 column chromatography. The enzyme was highly purified by the method of disc-electrophoresis. The purified enzyme had the maximum reactivity at pH 6.5 and 40°C. The highly purified enzyme was confirmed to be able to liberate L-arabinose from beet arabinan, arabinogalactan, arabinoxylan and *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside. The reaction product was paper chromatographically demonstrated to be only L-arabinose. The purified enzyme was inactive for *p*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside.

緒 言

アラビナン分解酵素に関する研究は、テンサイアラビナンからアラビノースを遊離する酵素の存在が1928年に Ehrlich と Schubert²⁾ によって報告されたことにはじまるが、それ以後の研究は全くみられなかった。1960年以降、梶ら^{5)-7), 13), 14)} によって同酵素に関する研究が行なわれてきた。細菌のアラビナン分解酵素に関しては、*Clostridium felsineum*³⁾ や *Bacillus subtilis*^{5), 15)} の研究報告がある。

著者ら¹⁷⁾⁻²⁰⁾ は、微生物酵素による農産加工廃棄物の高度利用を目的として有用菌株の分離、検索を行ってきた。前報¹⁹⁾ においては、テンサイ粕から調製したアラビナンを資化、分解する細菌を土壌から分離し、その培養条件を検討した。本報においては、同菌株の生産するアラビナン分解酵素の精製を

† 微生物におけるアラビナン分解酵素に関する研究 (第3報) (前報, 文献 19)

+ 本論文の要旨は沖縄農業研究会昭和58年度大会 (1978年7月那覇市) で発表した。

* 琉球大学農学部農芸化学科

琉球大学農学部学術報告 30: 201~210 (1983)

行ない、その酵素化学的性質を検討した。

実験方法

1. 供試菌株の培養と粗酵素液の調製

供試菌株は前報¹⁹⁾で述べたように、沖縄県下の甘蔗畑土壌から分離されたアラビナン分解活性の高い *Bacillus* sp. No.430 菌である。前培養並びに本培養では以下の組成の液体培地を使用した。硫酸アンモニウム 2.5 g, 酵母エキス 0.1g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g 及びテンサイ粕抽出液 1 liter を含む培地 (pH9.0) 5 ml を試験管に、また、50ml を 500ml 容量の肩付フラスコにそれぞれ分注し、120°C で20分間滅菌した。前培養は、*Bacillus* sp. No. 430 菌の一白金耳を試験管培地に接種し、30°C で24時間振とう培養を行ない、それを 500ml 容量の肩付フラスコの培地に接種し、30°C で24時間振とう培養を行なった。上記培養液から菌体を遠心分離により除去し、0.01M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) で一夜透析し、その透析内液を粗酵素液として用いた。

2. 基質

基質に用いるアラビナンは前報¹⁹⁾に従ってテンサイ粕から、アラビノガラクトンは大豆及びコーヒー豆から Morita⁹⁾ の方法を参考にしてそれぞれ調製した。また、甘蔗バガスのアラビノキシランの調製は既報¹⁶⁾に従った。アラビナン、アラビノガラクトン及びアラビノキシランの精製は Tagawa と Kaji¹³⁾ の方法を参考にして DEAE セルロース及びセファデックス G-50 カラムクロマトグラフィーにより行なった。*p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside, *p*-nitrophenyl α -D-galactopyranoside, *p*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside 及び *p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside はそれぞれシグマ社より購入した。

3. タンパク質の定量

酵素液中のタンパク質は Lowry⁸⁾ の方法に準じ、酵素の精製過程では 280 nm における吸光度を測定することにより定量した。

4. ペーパークロマトグラフィー

ペーパークロマトグラフィーは東洋ろ紙社製 No. 50 のろ紙を用い、上昇法により 2 回展開した。展開剤は *n*-ブタノール : エタノール : 水 (9 : 1 : 10 V/V/V) の組成の溶媒を用い、発色はアニリン水素フタル酸塩¹¹⁾ によった。

5. ディスク電気泳動

精製酵素のディスク電気泳動は、Davis¹⁾ の方法で行なった。

6. 酵素活性の測定

酵素反応混液の組成は 1% アラビナン 0.5 ml, McIlvaine 氏緩衝液 (pH 6.5) 0.25 ml, 酵素液 0.25 ml とした。この条件下で 40°C, 60 分間酵素反応を行ない、生成した還元力を Somogyi-Nelson 法^{10), 12)} により比色定量し、L-アラビノースとして計算した。酵素 1 単位は上記条件下で反応 1 分間に 1 μ mole のアラビノースを生成する酵素量として定義し、比活性はタンパク質 1 mg あたりの単位数で表わした。

実験結果及び考察

1. 酵素の精製

供試菌株 (*Bacillus* sp. No. 430) の培養を行ない、その培養ろ液を粗酵素液として酵素の精製を行なった。精製操作はすべて4°Cで行なった。

- (1) 硫酸アンモニウムによる分画：粗酵素液(1liter)のpHを7.0-7.5に保ちながら硫酸アンモニウムを加え、90%飽和にして60分間放置したのち、遠心分離により沈澱物を集めた。得られた沈澱物を少量の0.01Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に溶かし、100倍量の同緩衝液で一夜透析した。透析で生ずる沈澱物を遠心分離により除き次の操作に用いた。
- (2) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー：0.01Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で予め平衡化したDEAE-セルロースカラムに酵素液を添加した。溶出は同緩衝液中のNaClの濃度を変えて段階的に行なった。このクロマトグラムをFig. 1に示した。本酵素活性は非吸着画分(以下アラビナーゼIと呼ぶ)及び0.5M NaCl溶出画分(以下アラビナーゼIIと呼ぶ)にみられた。そのうちアラビナーゼIは総活性の80%を占めていることがわかった。そこで、主要画分であるアラビナーゼIを集めて以下の精製に用いた。

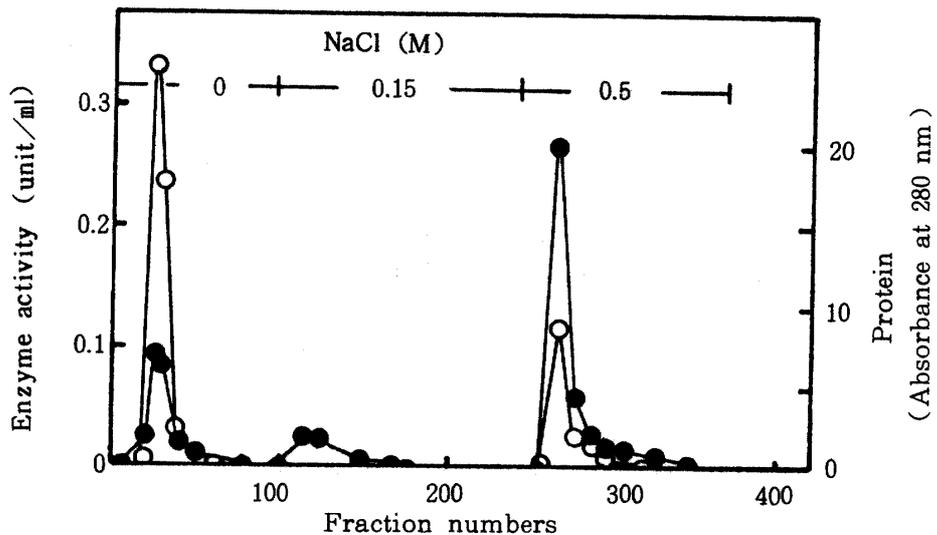


Fig. 1. Column chromatography on DEAE-cellulose.

A DEAE-cellulose column ($\phi 3.0 \times 21.2$ cm) was equilibrated with 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 7.0. The enzyme solution, 194 ml, containing 218 units or 1,147 mg of protein, was placed on the column. The enzyme was eluted by step wise addition of 0, 0.15 and 0.5 M NaCl in the same buffer. Fractions of 10 ml were collected. $-\bigcirc-$; arabinanase activity on beet arabinan, $-\bullet-$; protein.

- (3) QAE-セファデックスA-50 カラムクロマトグラフィー：0.01Mリン酸カリウム緩衝液で予め平衡化したQAE-セファデックスカラムに酵素液を添加した。本酵素はQAE-セファデックスに非吸着であった。活性画分を集めて以下の操作に用いた。
- (4) DEAE-トローパーラ 650 S：0.01Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で予め平衡化したDEAE-トローパーラカラムに酵素液を添加した。本酵素はDEAE-トローパーラカラムによく吸着された。0.10M NaClを含む同緩衝液でカラムを十分に洗浄後0.5M NaClを含む同緩衝液で溶出を行なった。活性画分を集めて0.001Mリン酸カリウム緩衝液にて一夜透析を行ない次の操作に用いた。

(5) ヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー: 0.001 Mリン酸カリウム緩衝液 (pH7.0) に平衡化したヒドロキシアパタイトカラムに酵素液を添加した。溶出はリン酸カリウム濃度を変えた段階的溶出法により行なった。本酵素活性は非吸着画分 (総活性の46%, 比活性0.66) と0.10 Mリン酸カリウム溶出画分 (総活性の54%, 比活性1.78) にみられた。比活性の高い0.10 Mリン酸カリウム溶出画分を集めて0.02 Mリン酸カリウム緩衝液で一夜透析後, 限外濃縮を行ない, 次の操作に用いた。

(6) セファデックスG-75カラムクロマトグラフィー: 酵素液をセファデックスG-75カラムに添加してクロマトグラフィーを行なった結果, 単一のピークが得られた。酵素の精製過程をTable 1に示した。精製酵素の比活性は約8倍に増大した。収率は約8%であった。

精製酵素標品の純度をディスク電気泳動法で調べた結果, 主バンド以外に数本の薄いバンドが検出された。本酵素は高度に精製されていることが判明した。

Table 1. Purification of arabinanase of *Bacillus* sp. No. 430

Purification steps	Total protein (mg)	Total units	S. A. (unit/mg)	Yield (%)
Crude enzyme	973	216	0.22	100
Ammonium sulfate	960	182	0.19	84
DEAE-Cellulose				
P-I	243	115	0.47*	53
P-II	377	30	0.08	(14)
QAE-Sephadex A-50	134	97	0.72	45
DEAE-Toyopearl 650 S	67.2	64	0.95	30
Hydroxyapatite				
P-I-1	30.2	20	0.66	(9.3)
P-I-2	12.9	23	1.78*	11
Sephadex G-75	9.8	18	1.84	8.3

*Active fraction which was high in specific activity was used for next steps.

2. 酵素活性に及ぼす pH の影響と酵素の pH 安定性

アラビナン分解活性と pH との関係を知るために各 pH で酵素反応を行ない酵素活性を調べた (Fig. 2(A))。反応の至適 pH は 6.5 にあった。*Clostridium felsineum*³⁾ や, *Bacillus subtilis*¹⁵⁾ の反応至適 pH は 5.6 及び 6.5 であることがそれぞれ報告されている。本酵素の反応至適 pH は後者のそれと一致した。著者ら²⁰⁾ が分離した *Streptomyces* 属菌の生産する精製アラビナナーゼの作用至適 pH は 6.0 であった。また, 植物病原菌⁴⁾ や酵母¹⁴⁾ 起源の酵素の反応至適 pH は 2-3 付近で酸性側にあることが知られている。

精製酵素を各 pH で 40°C, 5 分間加温したあと pH 6.5 で酵素活性を調べた (Fig. 2(B))。本酵素は pH 6-8 で安定であった。

3. 本酵素活性に及ぼす温度の影響と酵素の熱安定性

アラビナン分解活性と温度との関係を知るために各温度で酵素反応を行ない酵素活性を調べた (Fig. 3(A)) 反応の至適温度は 40°C にあった。

精製酵素の熱安定性を調べるために酵素液をpH6.8で各温度に5分間保ったのち、残存活性を測定した (Fig. 3(B))。本酵素は40°Cまでは安定であるが、それ以上の温度では急激な熱失活を受けた。

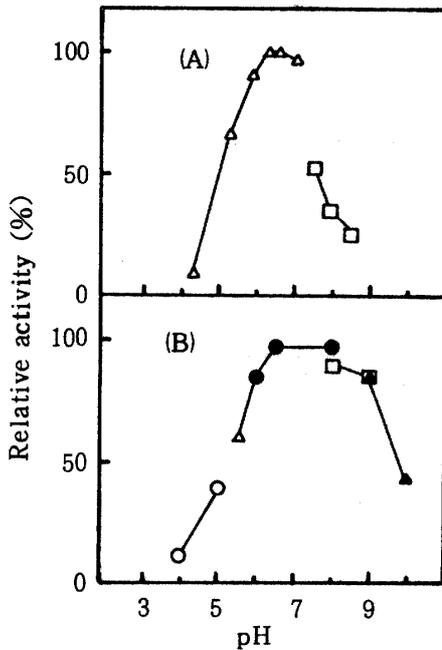


Fig. 2

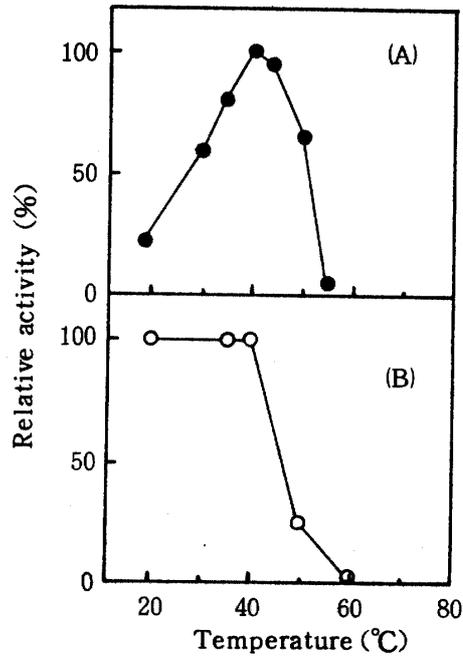


Fig. 3

Fig. 2. Effect of pH on the activity of arabinanase I (A) and the enzyme stability (B).

The enzyme activity was assayed at various pHs (A). The enzyme was incubated at pHs and 40°C for 5 min, and the activity was then assayed at pH 6.5 (B). Buffers used: -○-; sodium phosphate-HCl buffer, -△-; McIlvaine buffer, -●-; potassium phosphate buffer, -□-; Tris-HCl buffer, -▲-; Na₂CO₃-NaHCO₃ buffer.

Fig. 3. Effect of temperature on activity of arabinanase I (A) and the enzyme stability (B).

The enzyme activity was assayed at various temperatures (A). The enzyme was incubated at various temperatures and at pH 6.5 for 5 min, and the activity was then assayed (B).

4. アラビナンに対する加水分解率

精製酵素 (アラビナーゼ I) のテンサイアラビナンに対する加水分解率を調べた結果を Fig. 4 に示した。本酵素のアラビナンに対する加水分解率は、時間の経過とともに増大するが、24時間付近で一定の値を示し、80時間までさらに酵素反応を続けても変わらなかった。本酵素のアラビナンに対する加水分解限度は約50%であった。

5. 酵素反応生成物

アラビナンに対する酵素反応生成物をペーパークロマトグラフィーにより調べた結果を Fig. 5 に示した。反応開始後30分より時間の経過とともにアラビノース量が増大した。本酵素反応生成物は L-アラビノースのみであり、アラビノオリゴ糖やガラクトースは全く検出されなかった。以上の実験結果から、

本酵素はエキソ型のアラビナーゼであることが判明した。

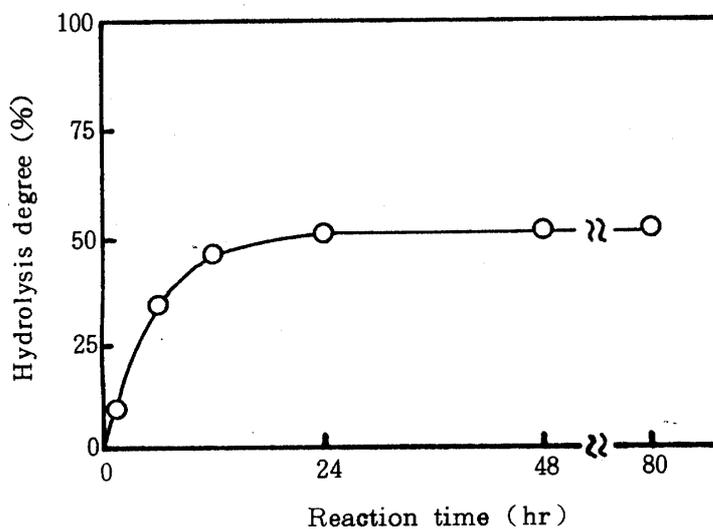


Fig. 4. Hydrolysis of beet arabinan by arabinanase I of *Bacillus* sp. No. 430.

The reaction mixture, containing 10ml of 1% arabinan solution, 5ml of 0.1M potassium phosphate buffer (pH7.0) and 5ml of enzyme solution, was incubated at 40°C. An aliquot of the reaction mixture was withdrawn at intervals as indicated in figure, and the reducing sugar liberated was measured by the method of Somogyi-Nelson.

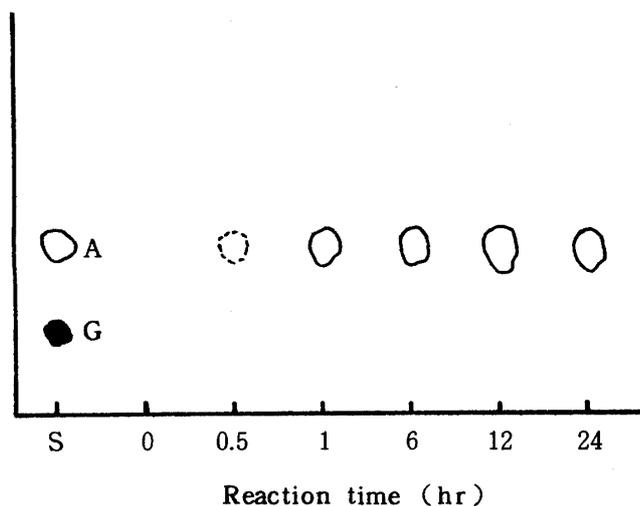


Fig. 5. Paperchromatogram of the products from beet arabinan by arabinanase I of *Bacillus* sp. No. 430.

The experimental details were same as described in the legends of Fig. 4. At indicated time, an aliquot of the mixture was withdrawn and spotted on Toyo filter paper No. 50. The paper was developed two times by the ascending using the solvent system of $n\text{-BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1:10, v/v/v). The spots were detected by aniline hydrogen phthalate. S represents the standard sugar solutions. A and G indicate L-arabinose and D-galactose, respectively.

6 精製酵素のアラビノース含有糖質に対する作用

精製酵素（アラビナーゼ I）の種々のアラビノース含有糖質に対する基質特異性について調べた結果を Table 2, 3 に示した。

Table 2. Substrate specificity of arabinanase I (1)

The enzyme activity was assayed as follows: The reaction mixture containing 0.25ml of 1 mM substrate, 0.15ml of McIlvaine buffer, pH 6.5, and 0.1 ml of enzyme solution was incubated at 37°C for 20 min. The reaction was stopped by addition of 0.5ml of 0.1M Na₂CO₃ solution and the amount of *p*-nitrophenol released was determined spectrophotometrically at 400 nm.

Substrates	Relative activity (%)
<i>p</i> -Nitrophenyl α -L-arabinofuranoside	100
<i>p</i> -Nitrophenyl α -D-galactopyranoside	0
<i>p</i> -Nitrophenyl β -D-galactopyranoside	0
<i>p</i> -Nitrophenyl β -D-xylopyranoside	0

Table 2 から明らかなように本酵素の合成基質に対する基質特異性は極めて高く、*p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside にのみ特異的に作用するが、*p*-nitrophenyl α -D-galactopyranoside、*p*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside 及び *p*-nitrophenyl β -D-xylopyranoside には全く作用しないことが確認された。これらの事実から、本酵素は α -L-arabinofuranosidase⁴⁾ であることが考えられる。*Clostridium felsineum*³⁾ や *Bacillus subtilis*^{5), 15)} のアラビナン分解酵素はエキソ型の α -L-arabinofuranosidase の他に、エンド型のアラビナーゼの存在が報告されているが、供試菌株 *Bacillus* sp. No. 430 のアラビナーゼ II が後者の例であるかどうかは不明であり、今後明らかにしたい。

Table 3. Substrate specificity of arabinanase I (2)

The enzyme activity was assayed as follows: The reaction mixture containing 0.5ml of 1% purified substrate 0.25ml of McIlvaine buffer, pH 6.5, 0.25ml of enzyme solution was incubated at 40°C for 60 min. The reaction was stopped by the addition of 1ml of 0.1M sodiumhydroxide solution. The reducing sugars released by the action of the enzyme was determined by the method of Somogyi-Nelson.

Substrates	Relative activity (%)
Arabinan (Sugar-beet)	100
Arabinogalactan (Coffe beans)	140
Arabinogalactan (Soybean)	40
Arabinoxylan (Sugar-cane bagasse)	25
Xylan	0
Gum arabic	0

本酵素のアラビノース含有多糖類に対する基質特異性は比較的 low、コーヒー豆のアラビノガラクトタン、テンサイアラビナン、大豆のアラビノガラタン及び甘蔗バガスのアラビノキシランの順に作用することが明らかとなった (Table 3)。なお、酵素反応生成物をペーパークロマトグラフィーにより調べた結果、アラビノースのみが遊離されていることが確認された。すなわち、本酵素を用いることにより、高純度のガラクトタンやキシランを得ることができた。

本酵素の酵素化学的、並びに物理化学的諸性質を詳しく調べるためには、酵素の精製をさらに行なう必要があり、現在検討中である。本酵素の特性を利用した応用面の開発が期待される。

要 約

土壌から分離した細菌のアラビナン分解酵素の精製を行ない、その性質を検討した。酵素の精製は、*Bacillus* sp. No. 430 の培養ろ液から硫酸アンモニウム分画、DEAE-セルロース、QAE-セファデックスA-50、DEAE-トローパーール650S、ヒドロキシアパタイト及びセファデックスG-75などのカラムクロマトグラフィーを組み合わせて行なった。精製酵素はディスク電気泳動的に高度に精製されていた。精製酵素の反応至適pHは6.5、反応至適温度は40°Cであった。精製酵素はビートアラビナン、アラビノガラクトン、アラビノキシランや *p*-nitrophenyl α -L-arabinofuranoside に作用した。反応生成物はL-アラビノースのみが検出された。本精製標品は α -L-arabinofuranosidase であると考えられた。

本研究に際し、御助言をいただいた本学農学部農芸化学科当山清善教授ならびに小波本直忠教授に感謝します。

引用文献

1. Davis, B. J. 1964 Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404-427.
2. Ehrlich, F. and Schubert, F. 1928 Über Tetra-araban und seine Beziehung zur Tetragalakturonsäure, den Hauptkomplex der Pektinstoffe, *Biochem. Z.* **203**: 343-350.
3. 梶明, 穴吹吉夫, 滝博, 大山義郎, 岡田武久, 1963 アラバン分解酵素に関する研究 III. *Clostridium felsineum* var. *sikokianum* が生産するアラバナーゼ, 香川大農学報, **16**: 143-146.
4. Kaji, A. and Yoshihara, O. 1971 Properties of purified α -L-arabinofuranosidase from *Corticium rolfssii*, *Biochim. Biophys. Acta*, **250**: 367-371
5. Kaji, A. and Saheki, T. 1975 Endo-arabinanase from *Bacillus subtilis* F-11, *Biochim. Biophys. Acta*, **410**: 354-360.
6. 梶明 1980 アラビノシダーゼ, 農化 **54**: 561-567.
7. Komae, K., Kaji, A. and Sato, M. 1982 An α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces purpurascens* IFO 3389, *Agric. Biol. Chem.*, **46**: 1899-1905.
8. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951 Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
9. Morita, M. 1965 Polysaccharides of soybean seeds. Part I. Polysaccharide constituents of "Hot-water-extract" fraction of soybean seeds and an arabinogalactan as its major component, *Agric. Biol. Chem.*, **29**: 564-573.
10. Nelson, N. 1944 A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, **153**: 19-23.
11. Partridge, S. M. 1949 Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars, *Nature*, **164**: 443.
12. Somogyi, M. 1952 Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.*, **195**: 19-23.

13. Tagawa, K. and Kaji, A. 1969 Preparation of L-arabinose containing polysaccharides and the action of an α -L-arabinofuranosidase on these polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, **11**: 293-301.
14. Uesaka, E., Sato, M., Raiju, E. and Kaji, A. 1978 α -L-Arabinofuranosidase from *Rhodotorula flava*, *J. Bacteriol.*, **13**: 1073-1077.
15. Weinstein, L. and Albersheim, P. 1979 Structure of plant cell walls IX. Purification and partial characterization of a wall-degrading endo-arabanase and an arabinosidase from *Bacillus subtilis*, *Plant Phys.* **63**: 425-432.
16. 安田正昭, 金城棟秀, 比嘉賀得, 清水俊秀 1977 沖縄産甘蔗バガスの化学組成とその多糖類について, *琉大農学報*, **24**: 269-274.
17. 安田正昭, 宮里興信, 菊池修二, 1980 土壌から分離された放線菌によるテンサイ粕アラビナンの分解について, *琉大農学報*, **27**: 109-117.
18. 安田正昭, 宮里興信, 島袋政朋 1980 土壌から分離された放線菌による甘蔗バガスヘミセルロースの分解について, *琉大農学報*, **27**: 119-128.
19. 安田正昭, 瀬底正康 1982 土壌から分離された細菌によるアラビナーゼの生産, *琉大農学報*, **29**: 53-59.
20. 安田正昭, 瀬底正康, 徳里政丈 1983 放線菌におけるアラビナン分解酵素, *日本食品工業学会第30回大会講演集* p. 11 (1983年4月, 大阪).