

# 琉球大学学術リポジトリ

## 土壌から分離された細菌によるアラビナーゼの生産(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, 瀬底, 正康, Yasuda, Masaaki, Sesoko, Masayasu メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/4024">http://hdl.handle.net/20.500.12000/4024</a>

# 土壌から分離された細菌による アラビナーゼの生産<sup>†</sup>

53

安田正昭\*・瀬底正康\*

Masaaki YASUDA and Masayasu SESOKO : Production of arabinanase from *Bacillus* sp. isolated from soils

## Summary

The production of the enzyme hydrolyzing arabinan was investigated with 561 strains of microorganisms isolated from soils of sugar-cane fields in Okinawa. The highest production of the enzyme was found in the culture fluid of *Bacillus* sp. No. 430. In order to find the medium conditions required for the improvement of the enzyme production by this strain, the organism was grown in the medium containing beet-pulp extract. The best enzyme production was obtained when the organism was grown in the medium (initial pH 9.0-10.0) containing beet arabinan (1.0%) and ammonium sulfate (0.25%) at 30°C for 18 hr under aerobic conditions.

The enzyme had maximum reactivity at pH 7.0 and 40°C.

## 緒 言

アラビナンはL-アラビノースから成るホモグリカンであり、落花生、リンゴ、テンサイなどのペクチン質から分離され、その構造についてはHirstとJones<sup>1)</sup>によりすでに明らかにされている。アラビナン分解酵素は微生物界に広く分布している<sup>8)</sup>。棍らは、細菌<sup>7)</sup>、糸状菌<sup>5,6)</sup>、酵母<sup>13)</sup>及び放線菌<sup>9)</sup>から本酵素の単離、精製を行ないその酵素化学的性質を明らかにした。

筆者ら<sup>14,15)</sup>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。今回、テンサイ粕から調製したアラビナンを資化、分解する微生物を検索したところ、アラビナン分解活性の高い細菌が土壌から分離された。本報では分離された菌株の培養条件を検討した。

## 実験方法

### 1. 基質の調製

基質に用いるアラビナンは前報<sup>14)</sup>に従ってテンサイ粕から調製した。

### 2. 菌の分離並びにスクリーニング

#### 1) 菌の分離

菌の分離は既報<sup>14)</sup>に従った。すなわち、ブドウ糖-アスパラギン寒天培地を用いた寒天平板法により沖縄県下の土壌から各種微生物を分離した。

<sup>†</sup>微生物におけるアラビナン分解酵素に関する研究(第2報)(前報, 文献14)

\* 琉球大学農学部農芸化学科

琉球大学農学部学術報告 29 : 53 ~ 59 (1982)

## 2) スクリーニング

ペプトン 10 g, 酵母エキス 0.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g 及びテンサイ粕抽出液 1 l を含む培地 (pH 7.0) 50 ml を 500 ml 容肩付フラスコに分注し, 120 °C で 20 分殺菌した。土壤より分離した微生物を上記培地に接種し, 30 °C で 72 時間振とう培養を行ない, 培養液中のアラビナーゼ活性の高い菌株を検索した。

## 3. 酵素液の調製

2・2) で述べた方法により分離した菌株を培養し, 遠心分離 (12,000 rpm, 15 min) により菌体を除去した。その上澄液を 0.01 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で一夜透析し, 透析内液を粗酵素液として実験に用いた。

## 4. タンパク質の定量

酵素液中のタンパク質の定量は Lowry ら<sup>11)</sup> の方法に準じて行なった。

## 5. アラビナーゼ活性の測定

酵素反応混液の組成は 1% テンサイアラビナン 0.5 ml, McIlvaine 氏緩衝液 (pH 7.0) 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<sup>11, 12)</sup> 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  $\mu\text{mole}$  の L-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. 細菌のアラビナーゼ活性

沖縄県下の土壤から 561 株の微生物を分離し, それぞれアラビナーゼ活性を調べた。最も高い酵素活性を示した菌株は No. 430 であった。続いて No. 160, No. 425, No. 351 が高い値を示した。以下の実験では No. 430 菌株を使用した。No. 430 菌株はグラム陽性の細菌であり, 生理試験や顕微鏡観察の結果から *Bacillus* 属菌であることが判明した。

### 2. 細菌の培養時間と酵素活性

*Bacillus* sp. No. 430 菌株をテンサイ粕抽出液を含む培地で各時間振とう培養し, アラビナーゼ活性を調べた結果を Fig. 1 に示した。比活性は培養 12 時間目で急激に増加し, 18 時間目で最大に達するが, 84 時間目まで同程度の酵素活性を保持していた。

### 3. 酵素生産に及ぼす培養液の初発 pH の影響

*Bacillus* sp. No. 430 菌株のアラビナーゼ生産に及ぼす培養液の初発 pH の影響について調べた結果を Fig. 2 に示した。供試菌株の本酵素の生産力は培養液の水素イオン濃度に影響され, pH 9-10 付近で最大活性を示した。また, 供試菌株は培養液の初発 pH 6-11 の広領域で本酵素を最もよく生成することが明らかとなった。同様の酵素を生成する *Streptomyces* sp. No. 44 (安田ら<sup>14)</sup>) の場合には, 培養液の初発 pH は 6.5-7.0 に限定されていた。

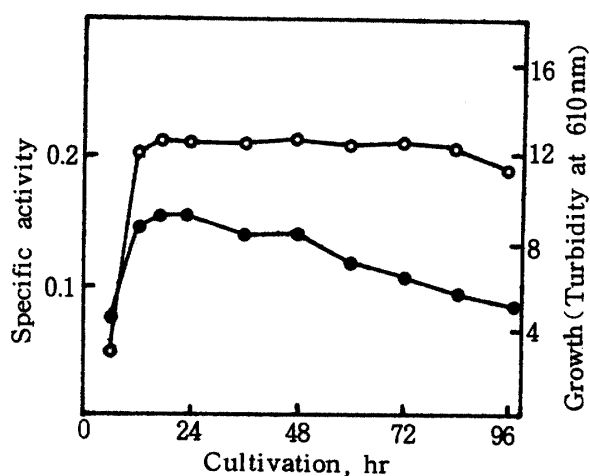


Fig. 1.

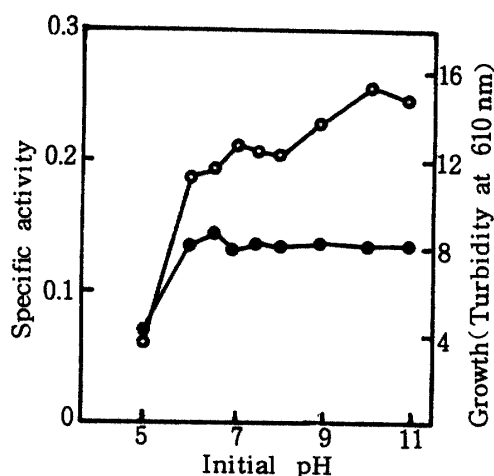


Fig. 2.

Fig. 1. Effect of Cultivation Time on the Production of Arabinanase by *Bacillus* sp. No. 430

Screening of arabinanase was carried out as follows. Five hundred and sixty one strains of microorganisms isolated from soils of sugar-cane fields in Okinawa were tested for their abilities of arabinanase production on the beet extract culture medium (pH 7.0) composed of 1 liter of beet-pulp extract, 10g of peptone, 0.5g of yeast extract, 1.0g of  $K_2HPO_4$ , and 0.1g of  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . The microorganisms were inoculated in 50 ml of the medium in 500 ml flask. And the media were inoculated at 30 °C for 72 hr on a reciprocal shaker. The cells were removed by filtration and centrifugation. The clear supernatant was dialyzed against 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) and employed as the enzyme source. The standard reaction system consisted of 0.5 ml of 1.0% beet arabinan, 0.25 ml of McIlvaine buffer (pH 7.0), and 0.25 ml of enzyme solution was incubated at 40 °C for 60 min. The reaction was terminated by addition of 1 ml of 0.1N NaOH to 1 ml of the reaction mixture. The amount of arabinose liberated was determined by the method of Somogyi-Nelson<sup>12,14)</sup>. One unit of arabinanase was defined as the amount of the enzyme which released 1  $\mu$ mol of aldehyde group per min under the conditions mentioned above. The specific activity was expressed as unit per mg of protein.

The highest production of the enzyme was found in the culture fluid of *Bacillus* sp. No. 430. It was grown in the medium as described above. Culture was carried out for the time indicated.

Growth (-●-), Enzyme activity (-○-).

Fig. 2. Effect of Initial pH of the Medium on the Production of Arabinanase

Culture was initiated at the pH indicated. Other conditions were same as Fig. 1. Growth (-●-), Enzyme activity (-○-).

#### 4. 酵素活性に及ぼす培養液の炭素源の影響

アラビナーゼ生産に及ぼす培養液中の炭素源の影響を調べるためにペプトンを含む基本培地に各種糖液(1%)を加えて *Bacillus* sp. No. 430 菌株の培養を行なった。Table I から明らかなように、本酵素は培養液にテンサイアラビナンやアラビノースを添加することにより誘導的に生成された。また、供試菌株は培養液にフスマ抽出液を用いてもテンサイ粕抽出液の場合とほぼ同程度のアラビナーゼを生産した。これらの現象は植物病原菌 (*Corticium rolfsii*<sup>4)</sup>) においても同様に観察されている。しかし、筆者ら<sup>14)</sup> が報告した放線菌においてはフスマ抽出液による本酵素の誘導効果は全く見られなかった。

Table I. Effect of carbon sources on the production of arabinanase by *Bacillus* sp. No 430<sup>a</sup>

Carbon source	Specific activity	Growth <sup>b</sup>
Arabinose	0.10	2.0
Xylose	0	1.0
Glucose	0	3.0
Fructose	0	1.6
Sucrose	0	2.3
Starch	0	1.4
Pectin	0	0.2
Arabinan	0.32	2.4
Hemicellulose of bagasse	0	2.5
Bran extract <sup>c</sup>	0.20	10.6
Bagasse extract <sup>d</sup>	0	0.4
Beet-pulp extract <sup>e</sup>	0.24	3.7

<sup>a</sup>*Bacillus* sp. No 430 was grown on the indicated carbon source (1%) for 18 hr. Other conditions were the same as Fig. 1.

<sup>b</sup>Growth was expressed as turbidity at 610 nm.

<sup>c</sup>The preparations of *c*, *d* and *e* were previously reported<sup>14)</sup>.

酵素生産に及ぼす培養液中のアラビナン濃度の影響について調べた結果、本酵素活性は培養液中のアラビナン濃度に依存し、1%濃度で最大の活性を示した。なお、供試菌株は培養液中に甘蔗バガスのヘミセルロース、ペクチン、デンプン、グルコースなどを添加してもアラビナーゼを全く生成しなかった。

##### 5. 酵素生産に及ぼす培養液の窒素源の影響

アラビナーゼ生産に及ぼす培養液中の窒素源の影響を調べるためにアラビナンを含む基本培地に各種窒素源(0.25%)を加えて*Bacillus* sp. No 430 菌株の培養を行なった。その結果、比活性は(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, ペプトンの順に増大した。菌体生育は培養液にペプトンを添加することにより著しく増大したが、比活性は他の無機塩類に比べて若干低かった。供試菌株の酵素生産は硫酸アンモニウム濃度の影響を受け、0.25%濃度で最大の酵素活性を示した。

##### 6. 酵素活性に及ぼすpHと温度の影響

3.で述べたように本供試菌株は培養液の初発pH 6-11で本酵素をよく生産したが、これを酸性(pH 5.0)、中性(pH 7.0)、アルカリ性(pH 10.0)で培養したところ、粗酵素液の各反応最適pHはいずれも7.0であった。(Fig. 3)。

アラビノシダーゼの反応最適pHは、*Aspergillus niger*<sup>3,5)</sup>の酵素では4.0付近、*Corticium rolfsii*<sup>6)</sup>及び*Rhodotorula flava*<sup>13)</sup>の酵素においては2-3付近で酸性側にあり、本供試菌株のそれとは異なっていることが指摘される。なお、筆者ら<sup>14)</sup>が土壌から分離した放線菌の酵素の最適pHは5.5-7.0であった。

上記と同様に供試菌株を酸性、中性、アルカリ性で培養して得られた粗酵素液の酵素活性に及ぼす温度の影響を調べた(Fig. 4)。本酵素の反応最適温度はいずれも40°C付近にあった。これらのことから、供試菌株は培養液のpHに関係なく同一の性質をもったアラビナーゼを生成することが示唆された。従って本供試菌株は培養管理上有利であることを示している。

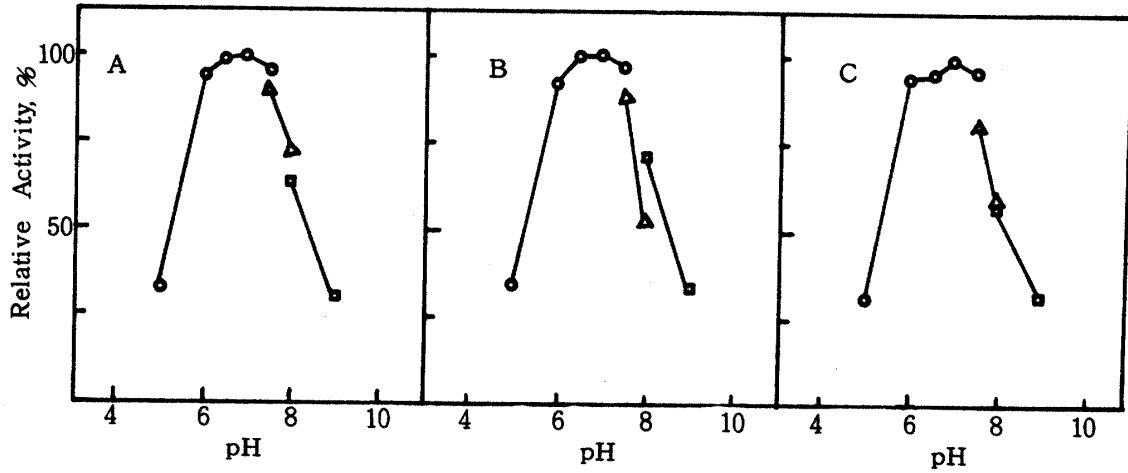


Fig. 3. Effect of pH on Activity of Arabinanase

In Fig. 3, A, B and C indicate effect of pH on the activity was shown with arabinanases prepared from culture fluids of *Bacillus* sp. No 430 which was grown at pH 5.0, 7.0 and 10.0, respectively. The activity was assayed at various pH. Buffers used were as follows. -○-; McIlvaine buffer, -△-; Potassium phosphate buffer, -□-; Tris-HCl buffer.

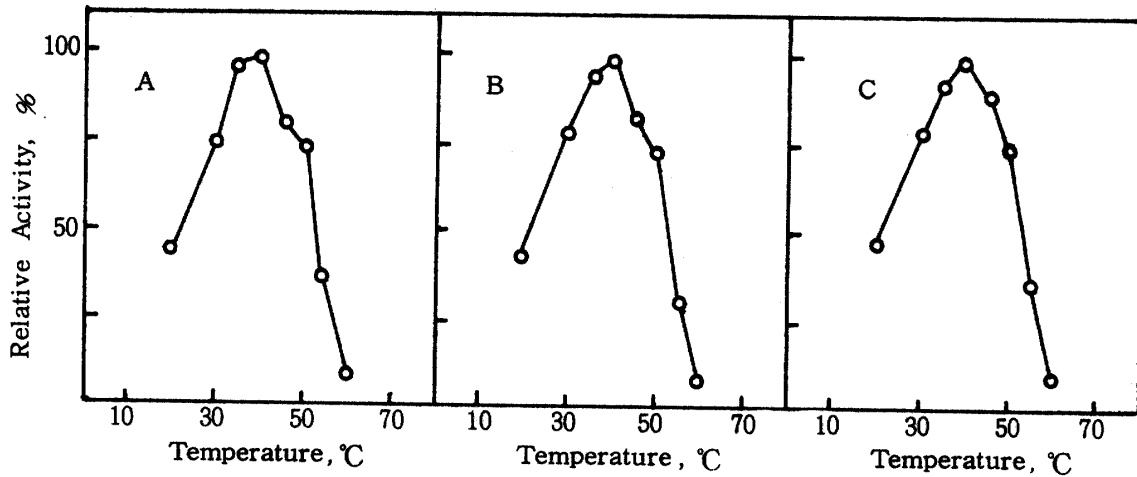


Fig. 4. Effect of Temperature on Activity of Arabinanase

In Fig. 4, A, B and C indicate effect of temperature on the activity was shown with arabinanases prepared from culture fluids of *Bacillus* sp. No 430 which was grown at pH 5.0, 7.0 and 10.0, respectively. The activity was assayed at various temperatures.

以上のことからアラビナーゼ生産のための *Bacillus* sp. No 430 菌株の最適培養条件は、テンサイアラビナン (1%) あるいはテンサイ粕抽出液及び硫酸アンモニウム (0.25%) を含む培地 (pH 9.0-10.0) で 30°C, 18 時間振とう培養することに設定された。

細菌<sup>2,7)</sup>のアラビナーゼはL-アラビノースのみを生成するエキソ型とアラビノースのほかにアラビノオリゴ糖を生成するエンド型の両タイプの酵素の存在が報告されているが、本供試菌株の酵素はどのタイプに属するのか不明である。今後、*Bacillus* sp. No 430 菌株のアラビナーゼの単離、精製を行ない

その詳しい性質を調べる予定である。

## 要 約

農産加工廃棄物の高度利用を目的として、テンサイ粕から調製したアラビナンを資化、分解する微生物を土壌から分離、検索した。その結果、アラビナン分解活性の高い *Bacillus* 属細菌が沖縄のさとうきび畑から分離された。

アラビナナーゼ生産のための *Bacillus* sp. No. 430 菌株の最適培養条件は、テンサイアラビナン(1%)及び硫酸アンモニウム(0.25%)を含む培地(pH 9.0-10.0)で、30°C、18時間振とう培養を行なうことに設定された。本酵素は培地中のアラビナンによって誘導生成された。本酵素の反応最適pHは7.0、反応最適温度は40°Cであった。

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. Hirst, E. L. and Jones, J. K. N. 1947 Pectic substances, Part VI. The structure of the araban from *Arachis Hypogaea*, J. Chem. Soc., P 1221-1225
2. 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
3. Kaji, A., Tagawa, K. and Matsubara, K. 1967 Studies on the enzymes acting on araban. Part VIII. Purification and properties of arabanase produced by *Aspergillus niger*, Agric. Biol. Chem., 31:1023-1028
4. Kaji, A. and Yoshihara, O. 1969 Production and properties of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Corticium rolfsii*, Appl. Microbiol., 17:910-913
5. Kaji, A. and Tagawa, K. 1970 Purification, crystallization and amino acid composition of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*, Biochim. Biophys. Acta, 207:456-464
6. Kaji, A. and Yoshihara, O. 1971 Properties of purified  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Corticium rolfsii*, Biochim. Biophys. Acta, 250:367-371
7. Kaji, A. and Saheki, T. 1975 Endo-arabinanase from *Bacillus subtilis* F-11, Biochim. Biophys. Acta, 410:354-360
8. 梶明 1980 アラビノシダーゼ, 農化, 54:561-567
9. Kaji, A., Sato, M. and Tsutsui, Y. 1981 An  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produced by wild-type *Streptomyces* sp. No. 17-1, Agric. Biol. Chem., 45:925-931
10. 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
11. Nelson, N. 1944 A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, J. Biol. Chem., 153:19-23
12. Somogyi, M. 1952 Notes on sugar determination, J. Biol. Chem., 195:19-23
13. Uesaka, E., Sato, M., Raiju, E. and Kaji, A. 1978  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Rhodotorula flava*, J. Bacteriol. 13:1073-1077

14. 安田正昭, 宮里興信, 菊池修二, 1980 土壤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
15. 安田正昭, 宮里興信, 島袋政朋, 1980 土壤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