

## アラバン分解酵素に関する研究

## I テンサイアラバンに対する酵素作用および zone electrophoresis

梶 明, 滝 博, 吉原 収\*, 島崎晶互

## Studies on the enzymes acting on arabans

## I Action of arabanase on beet-araban and zone electrophoresis of the enzyme

Akira KAJI, Hiroshi TAKI, Osamu YOSHIHARA and Akihiro SHIMAZAKI

著者等は微生物が生産するアラバン分解酵素を究明する目的をもって研究を開始したが、本報においてはタカジアスターゼ中に含有されているこの酵素について実験を進めた結果を報告する。

タカジアスターゼ中にアラバナーゼが含まれていることは、1928年に EHRlich および SCHUBERT<sup>1)</sup> が彼らのいうところのテトラアラバンにこの酵素を作用させた結果、L-アラビノースが生成することを報告している。しかし、その後はアラバナーゼに関する研究成果がみられない。

## 実験および結果

## A. 酵素作用力の決定方法

## 1. アラバナーゼの作用力

暖地テンサイの搾り粕より調製したアラバンに酵素作用を進めたとき生成するL-アラビノースを WILLSTÄTTER・SCHUDEL 改良法によって定量した。一方、塩酸によってアラバンを加水分解したときに生成する糖量に対し比率を求め、分解百分率として表現した。1g の風乾アラバンの酸加水分解によって 0.7425 g の糖を得、ペーパークロマトグラフィによって生成還元糖は L-アラビノースが主体であることを確認したが、少量のガラクトースを含んでいた。酵素作用液の配合は次の通りであった。1%アラバン溶液 10 ml, McILVAINE の緩衝液 2 ml, 酵素液 2 ml を基その配合割合としたが、実験によっては0.5%アラバン溶液 10 ml を使用した。酵素液の調製にはタカジアスターゼの粉末を使用し、40倍量の水に溶解し、遠心沈殿後の上澄液を酵素原液とし、これを適当に稀釈して酵素液として使用した。特別に記載した以外は酵素作用はすべて37°Cで遂行した。

2.  $\alpha$ -アミラーゼの作用力

WOHLGEMUTH 法によって作用力を決定した。

## 3. 酵素液中の窒素の定量

Folin のフェノール試薬を使用して発色し、光電比色計を使用して 660 m $\mu$  における吸光度を以て窒素の量を指示した。

## B. テンサイアラバンに対するアラバナーゼの作用

## 1. 作用条件の酵素作用におよぼす影響

(1) 酵素濃度の影響 上記の酵素原液を更に 10, 100, 500倍に稀釈して、上記の通りの配合で作用液を調製し、各作用時間後に生成糖を定量した。その結果を第1図に示す。

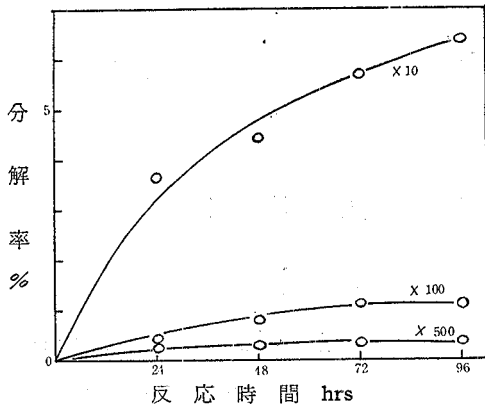
(2) 作用 pH 値の影響 原液の10倍稀釈液を使用して第2図の如き pH 値において酵素作用力を検討した。作用時間は48時間である。このような条件下では、最適 pH 値は3.6に認められた。

(3) 作用温度の影響 第3図に示すように、26, 30, 37, 45, 50°C の各温度において12時間作用後の分解率を求めた。この条件下では最適温度は45°Cに認められた。

## 2. 酵素作用による生産物の検出

ペーパークロマトグラフィによって生成糖を検出した。即ち、作用液を5回原点に添付して、ブタノール、酢酸、

\* 現在の勤務先は船山醤油株式会社



第1図 酵素濃度と作用力

水の混合比 4 : 1 : 5 の展開液で一次元の展開を行い、aniline hydrogen phthalate を呈色剤として生成糖を検出した。この結果、反応開始後 4 時間にして既にアラビノースを確認した。反応時間 96 時間にわたってオリゴ糖のスポットはみられなかった。

C. アラバナーゼの zone electrophoresis

1. 電気泳動の装置および方法

zone electrophoresis の装置および方法については、KUNKEL および SLATER<sup>2)</sup> が考案してより多くの実験例が発表されている。著者の一人梶は zone electrophoresis をペクチン分解酵素の分離に応用してその結果を発表した<sup>3)</sup>。本実験に使用した装置および方法はこの既報における同一であった。即ち、水平型の泳動装置で、tray の大きさは、深さ 1.4cm、巾 3.0cm、長さ 25.0cm であり、両極には白金板を使用した。泳動は 5°C の水室中で行った。担体には馬鈴薯澱粉を、緩衝液には M/50 磷酸緩衝液を使用した。

酵素液の導入には澱粉ブロックの中央部を 1cm 巾に切りとり、酵素液を混和した後再びもとの個所へ充填した。泳動後の酵素の溶出は次のように行った。1cm 巾に澱粉ブロックを切りとって、蒸溜水 3ml を加えてよく攪拌後、遠沈して上澄液をとり酵素溶出液として作用刀その他の定量を使った。

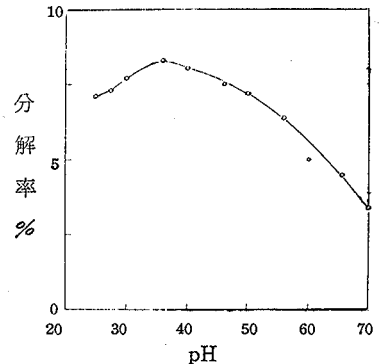
2. 泳動に使用した酵素液の調製法

タカジアスターゼ 10g を 40ml の水で抽出して、遠心沈殿後上澄液に硫酸 0.75 飽和した後沈殿を濾別し、5ml の水に溶解し、水道水に対して 48 時間透析し、更に M/50 磷酸緩衝液 (pH 6.0 又は 3.6) に対して 24 時間透析したものを酵素原液として使用した。この溶液 1ml 中の蛋白の量は 25mg であった。

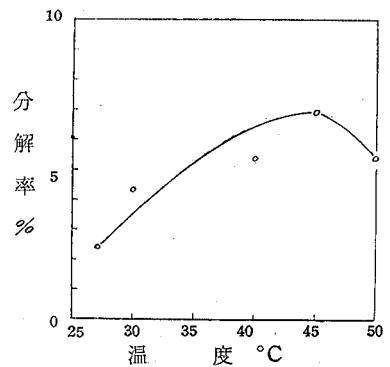
3. 電気泳動の結果

(1) pH 6.0 において泳動した結果 酵素液 1ml を使用し、初期電流を 5mA、電圧を 420V に調整して 16 時間泳動した。第 4 図に示す如く、アラバナーゼは陽極側に泳動し、フラクション 8 の溶出液が最大の作用力を示した。α-アミラーゼの作用力も同じフラクションに最高の作用力が出現した。

(2) pH 3.6 において泳動した結果 酵素液の調製法は上記の通りであるが、0.5ml の酵素液をブロックに導入した。初期電流を 4.5mA、電圧を 460V に調整して 17 時間泳動した。第 5 図に示すように陰極側へ泳動し、フラクション 8 に最大のアラバナーゼの作用力が認められた。この場合にも、α-アミラーゼはアラバナーゼと同様な泳動結果を示した。



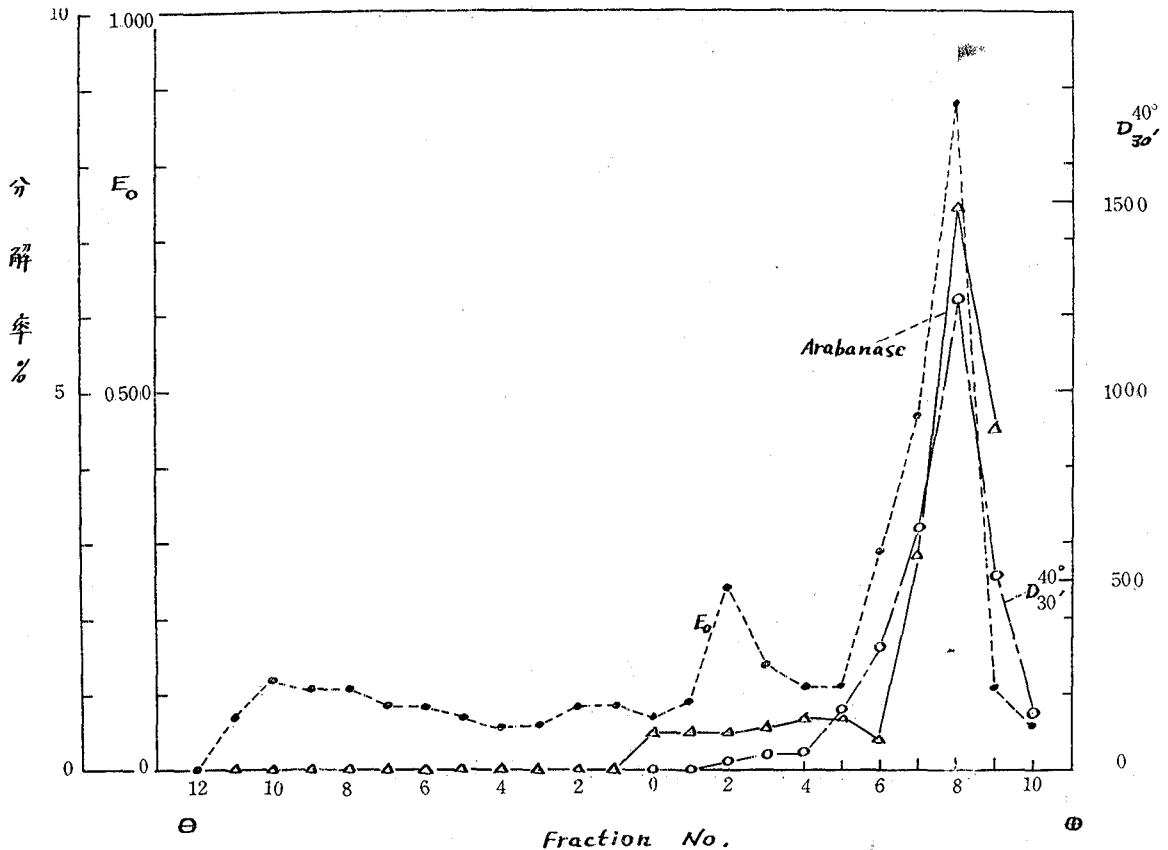
第2図 作用 pH 値の影響



第3図 作用温度の影響

要 旨

1. タカジアスターゼのアラバナーゼについて実験を行った。この酵素のテンサイアラバンに対する作用は、pH 3.6、45°C において最高の作用力を示した。
2. 酵素作用の生成物として L-アラビノースを確認した。



第4図 zone electrophoresis (pH 6.0)

3. この酵素の zone electrophoresis を行ったところ、pH 6.0 においては陽極側へ、pH 3.6 においては陰極側へ泳動した。この二つの pH 値における泳動において、アラバナナーゼと  $\alpha$ -アミラーゼの作用力の最高点は同一フラクションに現われた。

御懇篤なる御指導を賜った京都大学名誉教授片桐英郎博士に深く感謝いたします。

(本研究の要旨は昭和35年10月7日、日本農芸化学会関西支部秋季大会第173回講演会、高松、において発表した)

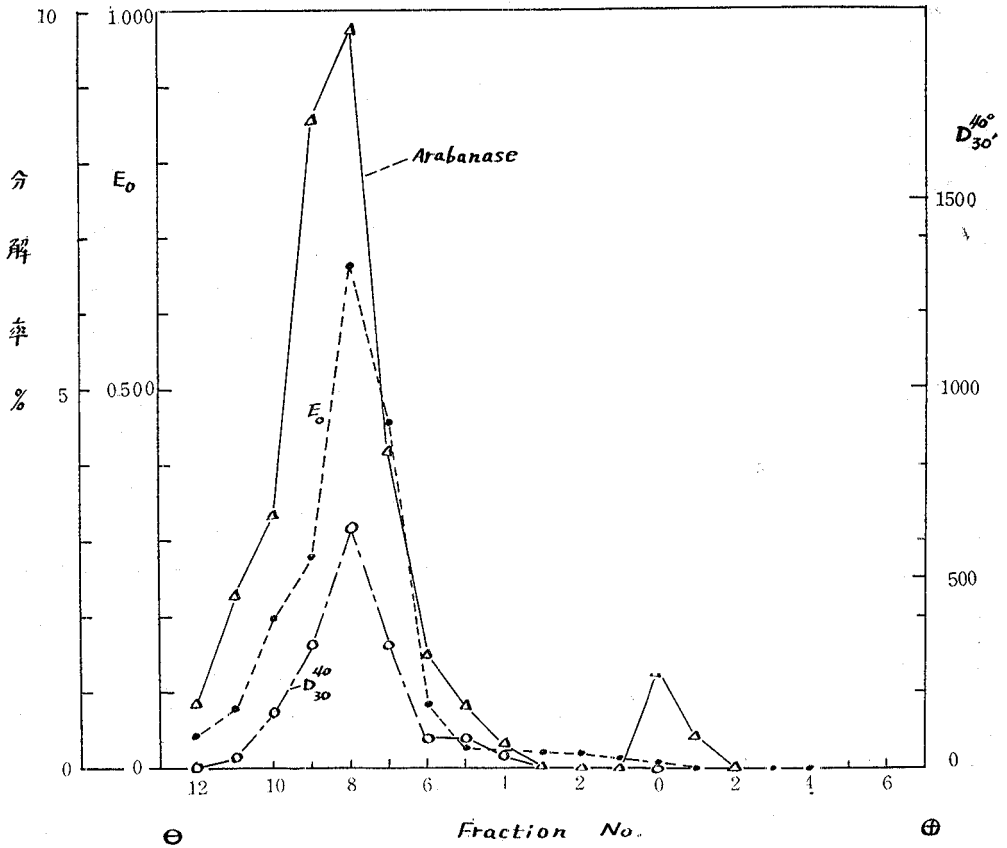
文 献

- (1) EHRLICH, F., SCHUBERT, F.: *Biochem. Z.*, **203**, 343 (1928). *Biol. Med.*, **80**, 42 (1952).
- (2) KUNKEL, H.G., SLATER, R.J.: *Proc. Soc. Exp.*
- (3) 梶, 橘, 粟飯原, 穴吹: 本誌, **11**, 248 (1959).

Summary

We have studied on the enzyme which acted upon beet-araban. A crude enzyme solution was prepared from the commercial preparation of powdered Takadiastase. The optimum pH and optimum temperature of this enzyme was found to be 3.6 and 45°C respectively. When the enzyme acted on beet-araban for 4 to 96 hrs., the spot of L-arabinose was detected from the reaction medium by paper partition chromatography, and no oligosaccharide appeared in the same solution.

Electrophoretic migration of this enzyme was performed by the method of zone electrophoresis. Potato starch was employed for the supporting medium and its pH value was adjusted to 6.0 or 3.6 by M/50 phosphate buffer solutions. The size of the tray was 3.0×25.0cm. and in 1.4cm height. Electrophoresis



第5図 zone electrophoresis (pH 3.6)

was conducted at potential gradient of 420 to 460 V, as to get a current of 4.5 to 5 mA. The apparatus was placed in an ice chamber at 5°C, and electrophoresis was carried out for 16 to 17 hrs. Ten g of Takadiastase preparation was dissolved in 40 ml of water, and the solution was centrifuged, and then the enzymes were salted out by the addition of ammonium sulfate. The precipitate was dissolved in 5 ml of water, and the solution was dialyzed against tap water for 48 hrs., and then against M/50 phosphate buffer solution for 24 hrs. The dialyzed solution was employed as enzymatic solution, 1 ml of this solution contained 25 mg of protein, and was charged to the starch block, and then zone electrophoresis was carried on. After electrophoresis was performed, 3 ml of water was added to each section of starch block, and the enzymes were eluted from the supporting medium. When electrophoresis was carried out at pH 6.0, arabanase was found to migrate toward the anode, and maximum action of this enzyme was detected in the fraction 8. After electrophoresis was performed at pH 3.6, arabanase was found to migrate toward the cathode, and maximum action appeared in the fraction 8. In both cases of pH 6.0 and 3.6,  $\alpha$ -amylase migrated toward the same electrodes as arabanase did, and the maximum actions of the former were detected in the fraction 8. The results of zone electrophoresis were shown in Fig. 4 and 5.

(Received November 30, 1960)