

(注意) この論文には正誤表があります

香川大学農学部学術報告 第15巻第1号 正誤表

URL

http://www.lib.kagawa-u.ac.jp/metadb/up/AN00038339/AN00038339_15_1_e.pdf

Notice

Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kagawa University

Vol.15 No.1 Errata

URL

http://www.lib.kagawa-u.ac.jp/metadb/up/AN00038339/AN00038339_15_1_e.pdf

アラバン分解酵素に関する研究

Ⅲ *Clostridium felsineum* var. *sikokianum* が生産するアラバン分解酵素

梶 明, 穴 吹 吉 夫, 滝 博,
大 山 義 朗, 岡 田 武 久

緒 言

著者の一人梶は共同研究者とともに *Aspergilli* が生産するアラバン分解酵素について実験を進め、その結果を第1報⁽¹⁾および第2報⁽²⁾に報告した。アラバン分解酵素について研究を始めた目的は次の二項目に分けられる。

(1) 植物体においては、アラバンはペクチンとともに存在する。発酵食品原料にもアラバンが含まれていることが多い。*Aspergillus oryzae* などの麴を使用する発酵食品製造の過程において、原料中のアラバンは酵素作用によって分解を受けると考えられる。このような発酵食品製造中のアラバン分解の機構については研究が進展していなかった。一方、発酵食品中にアラビノースが検出された報告はある。例えば、しょう油中にアラビノースが検出された^(3,4)。また、アラビノースを基質とする発酵機構については広く研究が進み、例えば、乳酸発酵については FRED, PETERSON, ANDERSON⁽⁵⁾ の研究を始め多くの研究成果が発表され、とくに HORECKER 一派⁽⁶⁾ の研究成果として、*Lactobacillus pentosus* のペントース発酵の schema が提出された。

アラバン分解酵素の作用は発酵食品の品質に影響するところが多いと考え、その酵素作用の研究を始めた。

(2) 植物の柔組織や紡錘組織においてはペクチンが重要な膠着、整形物質となっているが、アラバンおよびガラクトタンがペクチンと共存している。著者の一人梶はペクチン分解酵素の研究を進め、とくに、紡錘組織や柔組織の細胞間隙において膠着物質となっているペクチン質の酵素による分解の研究を進めてきた。これらの組織においては、ペクチンとともに存在するアラバンおよびガラクトタンも細胞間隙を充填する物質となっている。さらに、近年の研究によれば、膠着物質のペクチンはアラバン、ガラクトタン、セルロースなどと何らかの形式によって結合していることが示されてきた。従って植物の紡錘組織や柔組織の maceration の機構を考えるとにもアラバン分解酵素の作用について検討を加える必要がある。

梶は齊藤⁽⁷⁾とともに発酵精練に極めて有効なバクテリアとして *Clostridium felsineum* var. *sikokianum* を分離した。このバクテリアが著しくペクチン分解酵素を生産することはすでに発表したとおりである⁽⁸⁾。本報においては、このバクテリアが生産するアラバン分解酵素の作用条件などについて実験した結果を報告し、併せて *Aspergilli* のアラバン分解酵素と比較検討した結果を述べる。

実 験 方 法

I. 酵素生産に使用した菌の性質と培養方法

1. 使用菌種 使用した菌は *Clostridium felsineum* var. *sikokianum* である。このバクテリアは梶、齊藤が雁皮より分離した。その性質は和紙原料の発酵精練に関する研究、第8報⁽⁷⁾に詳しく報告された。繊維原料の発酵精練に有用な菌種である^(7,9)。ペクチン質分解酵素の生産が著しく強く、このバクテリアが生産するペクチン質分解酵素のなかには、靱皮繊維を遊離する作用が強い macerating enzyme が存在することを証明し、この酵素はエンド・ポリガラクトツロナーゼと別個のものであることを報告した⁽¹⁰⁻¹⁴⁾。このバクテリアはアラバン分解酵素も生産することがわかったので本実験で酵素生産菌として使用した。

2. 培養方法 培養基としては、雁皮の加圧蒸煮液と Speakman の塩を使用した準合成培養基とを使用した。

(1) *Clostridium felsineum* var. *sikokianum* は雁皮やトウモロコシの加圧蒸煮液に極めてよく生育する。一方、緒言において述べたように、雁皮などの細胞間隙物質を分解する酵素の究明がわれわれの研究目的の一つであるので、関係する酵素が適応的に生産される⁽¹⁵⁾ 場合のことを考えに入れて一般の性質の実験には雁皮の加圧蒸煮液を使用した。すなわち、雁皮は褐色の表皮の部分を完全にナイフで除去しタンニンを除いておいた。2-3 cm に切った状態で使

用した。栄養素の補給のために大豆粕を併せて使った。培養基の配合割合はつぎのとおりであった。雁皮 50g, 大豆粕 5g, 水道水 1L. 加圧蒸煮の条件は125°C, 30分とした。種菌はトウモロコシもろみを使用した。発酵は37°Cで48時間継続した。

(2) 準合成培養基⁽¹⁵⁾として、ペクチン0.75g, ペプトン加水分解液(原ペプトンとして0.7g), 酵素抽出液 5ml, KH_2PO_4 0.05g, K_2HPO_4 0.05g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g, NaCl 0.001g, MnSO_4 0.001g, 水道水100mlを配合し、鉄塩は添加しなかった。培養条件は(1)に述べたとおりである。この培養液中にもアラバン分解酵素が生産されていることを確認したので、酵素の分離用に使用した。

II. 粗酵素剤の調製法

前項(1)に記載した雁皮の発酵液 2Lを布で濾過した後、液のpHを6.0に調節し、3,000rpmで20分間遠心沈殿した。上澄液、1.5Lを少量づつ3Lのクライゼン・フラスコにとり、窒素気流のもとで30°C以下で $\frac{1}{2}$ 容量にまで減圧濃縮した。濃縮液320mlをとり冷却し、これに冷アセトンを添加して50%(V/V)になるとき、添加を終わって、生成する沈殿を遠心分離し、デンケーター中で乾燥し粗酵素剤とした。濃縮液320mlより得られた乾燥標品は2.434gであった。

III. アラバナーゼ作用力の定量法

1. アラバンの調製法 第2報⁽²⁾に記したようにテンサイの搾り粕を材料として調製した。調製されたアラバン風乾体 1gを加水分解したときに生成する還元糖の量はBial法で定量した結果、0.699gであった。

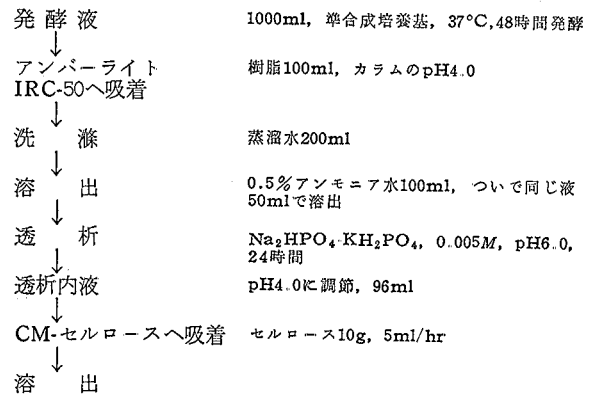
2. アラバナーゼ作用力の定量法 酵素作用液の配合割合を次のようにした。0.5%アラバン溶液 3ml, McIlvaineリン酸塩緩衝液0.5ml, 酵素液1ml, トルオール 2滴。上記の粗酵素剤の濃度は作用液中において0.22%とした。酵素作用温度は37°Cとし、pHを6.0に調節し一定時間作用後に生成する糖を Willstätter, Schudel 法の改良法で定量した。L-アラビノースとして表示した。

IV. 生成糖のペーパークロマトグラフィー

東洋紙紙No.51A, 2×40cmを使用し、上昇法で、ブタノール, 酢酸, 水の比を5:2:3として展開した。呈色剤はアニリン・フタル酸を使用した。

V. アラバナーゼのカラムクロマトグラフィー

CM-セルロース⁽¹⁶⁾ (California Corp. for Biochem. Research, 0.67millieq. per gram)をpH4.0に緩衝化して酵素を吸着した後溶出した。CM-セルロースは水に浸漬した後、pH4.0の緩衝液に浸漬し、液のpHを0.1Mクエン酸によって4.0に調節した。pHが調整された後、McIlvaine緩衝液, pH4.0, 0.005M, で充分洗滌しガラス管に充填してカラムを形成し、さらに同じ液で洗滌した。CM-セルロース10gを使用したときカラムは1.8×23cmであった。このカラムの上端より部分精製した酵素液96mlを添加してアラバナーゼを吸着させた。この酵素液調製の方法を第1図に示す。

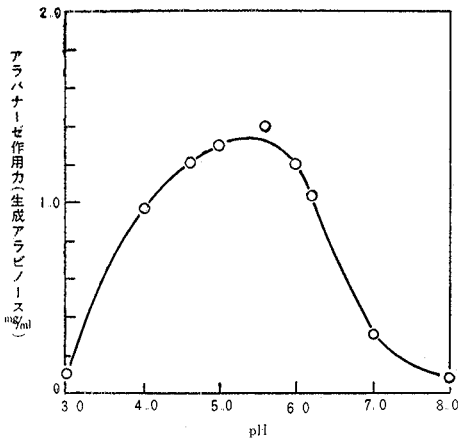


第1図 発酵液よりカラムクロマトグラフィーまでの実験方法

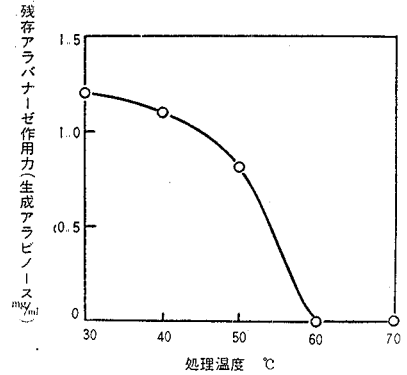
実験結果

I. 酵素作用に対するpH値の影響

作用液のpHを3.0, 4.0, 4.6, 5.0, 5.6, 6.0, 6.4, 7.0, 8.0に調節して24時間酵素作用を継続した後、生成糖を定量した結果は第2図のとおりであった。pH5.6において酵素作用は最高を示した。



第2図 酵素作用に対するpHの影響



第3図 温度処理による酵素の不活性化

II. 酵素の安定性に対する温度の影響

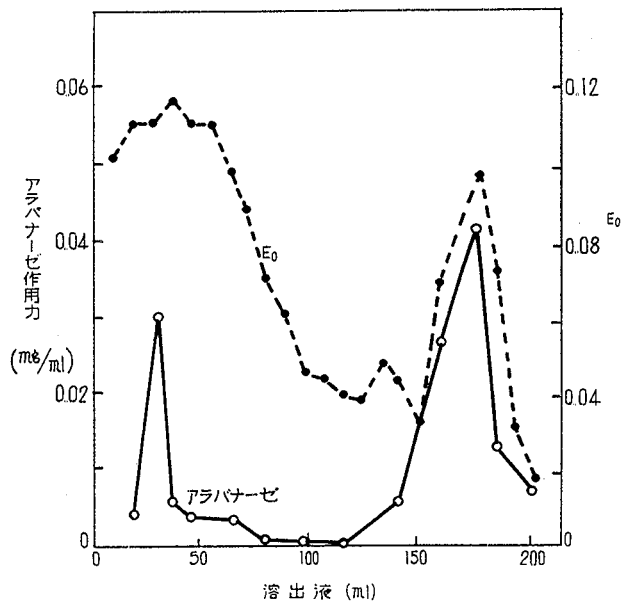
粗酵素剤を1%濃度に溶解し、その液1ml づつを試験管にとって30, 40, 50, 60, 70, 100°Cに20分間保持した後急冷した。これらの酵素液を使って49時間酵素作用を続けた。その結果を第3図に示す。60°Cに20分間保ったときこの酵素は不活性化された。Asp. nigerのアラバナーゼ(粗酵素剤)は熱に対して安定である。バクテリアのアラバナーゼとこの点において著しい相異がある。

III. カラムクロマトグラフィーによるアラバナーゼの分離

第1図に示した方法によって部分精製したアラバナーゼの溶液96mlをCM-セルロースのカラム, 1.8×23cm, に添加した後、次の溶液を使用して溶出を行った。なお、カラムに対する酵素の吸着は極めて良好であり、通過液中にはアラバナーゼはほとんど検出されなかった。溶出剤は ① 0.005M KH₂PO₄, pH4.0, 100ml ② 0.05M KH₂PO₄, Na₂HPO₄ の混液, pH 5.0, 100ml ③ 0.05M KH₂PO₄, Na₂HPO₄, pH6.0 に1MKClを含む液 100mlを使用し、傾斜法で溶出した。その結果を第4図に示す。アラバナーゼは溶出液量15-25mlおよび150-180mlの間に出現し、この2区分の溶出液を使って次項の実験を行なった。

IV. 酵素作用による生産物の検出

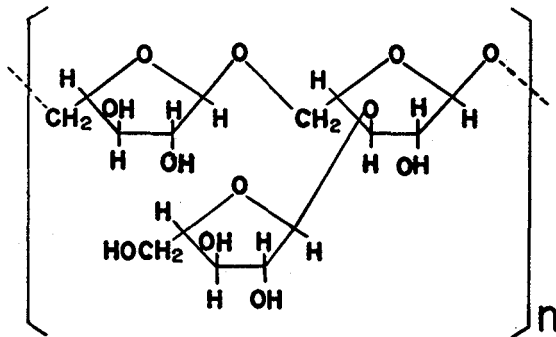
上記の2種類の酵素液を使ってアラバンの分解を37°Cにおいて144時間継続した後、反応液にアルコールを添加し、生成する沈殿を濾過して、濾液を濃縮してペーパークロマトグラフィーによって生成糖を検出した。展開は20°Cにおいて3回多重展開を実施した。その結果を第1表に示す。カラムクロマトグラフィー溶出液15-25mlの区分のアラバナーゼはアラビノー



第4図 CM-セルロースを使用した、カラムクロマトグラフィーによる、アラバナーゼの分離

カラム, 1.8×23cm; 溶出剤, 0.005M, KH₂PO₄(pH4.0) 100ml; 0.05M KH₂PO₄-Na₂HPO₄(pH5.0) 100ml; 0.05M KH₂PO₄-Na₂HPO₄(pH6.0, 1MKClを含む) 100ml, 傾斜溶出。

スのみを生成した。このアラバナナーゼをアラバナナーゼ I と呼ぶことにする。150-180ml の区分の場合にはアラビノースのほかに2種のオリゴアラビノースが検出された。このアラバナナーゼをアラバナナーゼ II と命名する。



第5図 アラバンの構造式 (HIRST, JONES)

第1表 バクテリアのアラバナナーゼによる生産物

アラバナナーゼの種類	アラバナナーゼ I	アラバナナーゼ II
クロマトグラフィーにおける溶出区分 (ml)	15-25	150-180
生成糖 (R _F)	0.73	0.71, 0.59, 0.53

備考 1. L-アラビノースの R_F は0.70, D-ガラクトースの R_F は0.64
 2. 生成糖の呈色はすべてアラビノースと同様の赤褐色。

考 察

アラバンの構造式と酵素作用による分解型式

HIRSTおよび JONES⁽¹⁷⁾ は1947年にラッカセイよりアラバンを抽出し、その構造式として第5図の式を提案した。ついで、両氏はテンサイより抽出したアラバンもラッカセイ、アラバンと同様な構造を有するものと考えた⁽¹⁸⁾。

アラバンは純粋に抽出することは難しく、特にガラクトタンが混入してくることが多い。アラバンの分子量は4970または6328 という報告があり⁽¹⁹⁾、稀酸によって容易に加水分解される、構成する L-アラビノース残基の数は比較的少数である。アラバン中においてはアラビノース残基はすべて α-L-アラビノース結合をしていると考えられている。

前報⁽²⁾に報告したように *Aspergillus niger* が生産するアラバナナーゼがテンサイアラバンに作用した時には約33%の分解率を示すまで直線的に分解が進行し反応初期よりつねに L-アラビノースが検出された。本報の実験結果に示すように *Clostridium felsineum* var. *sikokianum* が生産するアラバナナーゼがアラバンを分解する時は還元力生成は緩やかであって、粗酵素剤の濃度を1%に高めて96時間作用しても分解率は21.9%であった。生産物はL-アラビノースのほかにオリゴアラビノースが検出された。この結果より考えられることはバクテリアのアラバナナーゼはアラバンの側鎖の1,3-結合を切断する作用は小さく、主鎖の1,5-グリコシド結合を切るものと考えられる。著者の一人梶は *Clost. felsineum* var. *sikokianum* のペクチン分解酵素について研究を行ない、特にこのバクテリアが生産するポリガラクトナーゼはペクチン酸を大きい単位に位置に無差別に (at random) 切断し、ペクチン酸の粘度低下は極めて速かであるが、それに比較すると還元力の生成は極めて小さいことを見出した^(8,20)。すなわちこの菌はエキソ・ポリガラクトナーゼの生産は少なくエンド・ポリガラクトナーゼを集中的に生産するバクテリアである。

本実験結果によれば、*Clost. felsineum* var. *sikokianum* のアラバナナーゼは二種類あってアラバナナーゼ II はアラバンの1,5-グリコシド結合を at random に切断し、L-アラビノースの2糖類および3糖類を生産するものと考えられる。

第2報に報告したように、*Asp. niger* のアラバナナーゼはアラバナナーゼ I の生産が著しく大きいと考えられる。従って *Clostridia* によるアラバナナーゼの生産と *Aspergilli* による生産との間に大きい相異が指摘される。

文 献

(1) 梶明, 滝博, 吉原取, 島崎晶互: 香川大農学報, 12, 265(1961). *Ibid.*, 15, 34(1963).
 (2) KAJI, A., TAKI, H., SHIMAZAKI A., SHINKAI, T.: (3) 市川邦介: 発酵工学, 29, 48(1951).
 (4) 吉野宏: 醸協, 46, 34, 109, 149(1951).

- (5) FRED, E. B., PETERSON, W. H., ANDERSON, J. A. : *J. Biol. Chem.*, **48**, 385(1921).
- (6) HEATH, E. C., HURWITZ, J., HORECKER, B.L., GINSBURG, A. : *Ibid.*, **231**, 1009(1958).
- (7) 梶明, 齊藤博 : 発酵工学, **30**, 242(1952).
- (8) ——— : 農化, **27**, 699(1953).
- (9) ——— : 同上, **27**, 855(1953).
- (10) KAJI, A. : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 8 (1956).
- (11) ———, ANABUKI, Y. : *Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, **7**, 222(1956).
- (12) ——— : *Ibid.*, **9**, 141(1958).
- (13) ——— : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 131 (1959).
- (14) 梶明, 橋禎男, 栗飯原重男, 穴吹吉夫 : 香川大農学報, **11**, 248(1959).
- (15) ———, 穴吹吉夫 : 同上, **7**, 67(1955).
- (16) PETERSON, E. A., SOBER, H. A. : *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 751(1956).
- (17) HIRST, E. L., JONES, J. K. N. : *J. Chem. Soc.*, 1221(1947).
- (18) ———, ——— : *Ibid.*, 2311(1948).
- (19) GAPONEKOV, T.K. : *J. Gen. Chem. (U.S.S.R.)*, **7**, 1729(1937); *C. A.*, **31**, 8307(1937).
- (20) 梶明, 穴吹吉夫 : 農化, **29**, 775(1955).

Studies on the enzymes acting on arabans

III Action and separation of arabanase produced by

Clostridium felsineum var. *sikokianum*

Akira KAJI, Yoshio ANABUKI, Hiroshi TAKI, Yoshio ŌYAMA and Takehisa OKADA

Summary It was already reported that *Clostridium felsineum* var. *sikokianum* was isolated from Ganpi tree, and was useful for fermentative retting of plant fiber materials. In this report, the authors have studied on the arabanases of this bacteria. The optimum pH of the enzymic action was 5.6, and the enzymes were inactivated at 60°C when its solution was kept on the temperature for 20 minutes. The arabanases of this bacteria hydrolyzed beet-araban, and L-arabinose and oligosaccharides were detected from the condensed reaction media by paper chromatography. The arabanases were separated by the procedure of column chromatography in which CM-cellulose was used. As shown in Fig. 4, arabanase I was eluted in effluent volume, 15 to 25 ml and arabanase II in 150 to 180 ml. When these enzymes acted on beet-araban, the reaction products were found to be L-arabinose in the case of arabanase I while L-arabinose and oligosaccharides in arabanase 2.

(Received June 20, 1963)