

(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

IV *Aspergillus niger* のアラバナーゼの硫酸分割およびリバノール分割

田川 清, 梶 明

酵素によるアラバンの分解が、酵素の起原によって異なることについてはすでに報告した⁽¹⁾。しかし、その作用機作に関しては不明な点が多い。

アラバン分解の一形式をもつ *Aspergillus* 属のアラバナーゼについて、酵素の精製を行ない、それによる作用機作の究明を目的として研究を進めてきた。前報⁽²⁾までに *Aspergillus* 属のアラバナーゼでは、*Asp. niger* のものが最も強力であることが判明したので、この菌種の変異株の酵素製剤である市販サナクターゼより、酵素の精製を試みた。

天野ら⁽³⁾はタカジアスターゼのプロテアーゼの分離に、山田⁽⁴⁾は *Asp. niger* のアミラーゼなどの分別にリバノール沈殿法を利用し、精製効果をあげている。著者の一人梶は井上とともに *Asp. niger* の変異株 (サナクターゼ) のアラバナーゼの性質を調べ、リバノール沈殿によってこの酵素が精製され得る見通しをたてた^(4a)。

本報告ではサナクターゼに含まれるアラバナーゼの性質を検討し、さらに精製への一過程である硫酸分割・リバノール分割による酵素の分別を試験した結果を報告する。

実験材料および実験方法

酵素液調製の材料：市販されているサナクターゼを使用した。この酵素剤は *Asp. niger* の変異株の培養によって製造されたものである。

テンサイ・アラバン：酵素の基質として用いたアラバンは、テンサイ粕より林⁽⁵⁾の方法に準じて調製した。このものの純度は、酸分解糖量ペントースとして62.56%であり、ペーパークロマトグラフィーによりL-アラビノースの他に少量のD-ガラクトースが認められた。

アラバナーゼの力価の測定：0.5%アラバン液 3ml, pH3.8 Mc ILVAINE 緩衝液0.5ml, トルオール1滴に酵素液 1ml を加え、恒温にて一定時間反応せしめた後 WILLSTÄTTER-SCHUDEL の改良法で還元糖を測定しアラバン分解率を求めた。酵素単位は上記反応液組成で50°C 2時間の作用による分解率から、あらかじめ作成した単位標準曲線にプロットして決定した。

蛋白質量の測定：280m μ における吸光度を島津分光光度計で測定し、蛋白質0.1mg/mlの吸光度0.24なることより求めた。

実験結果

1. 酵素の作用条件

サナクターゼ粉末を水抽出後硫酸0.4-0.6飽和沈殿区分の透析液を酵素試料として、以下の実験を行なった。

(1) アラバン分解に対する酵素濃度、作用時間の影響 二段階の酵素濃度において、経時的にアラバンの分解を追究したのがFig. 1である。

またFig. 2は作用時間を一定にしたときの、酵素濃度とアラバン分解率を示したものである。

両図からアラバンの分解は、分解率30%までは急速に進むが、それ以上になると次第に衰える。

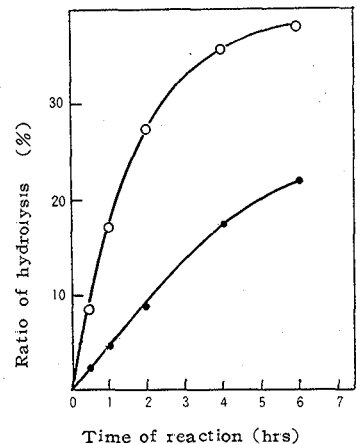


Fig. 1 Relation between reaction time and arabanase activity. Incubating condition: 50°C, pH3.8

- An enzyme solution containing 0.415mg of protein in 1 ml was used.
- An enzyme solution containing 2.487mg of protein in 1 ml was used.

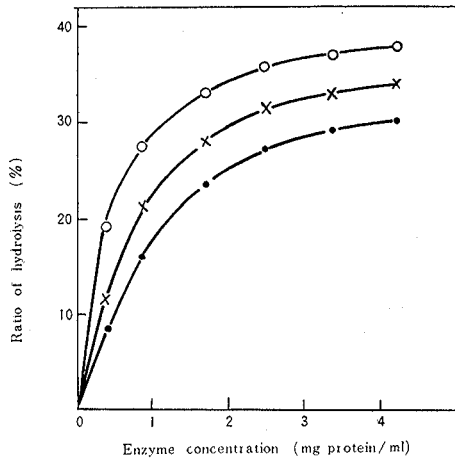


Fig. 2. Relations between enzyme concentration and its activity.

Incubating condition; 50°C, pH3.8
 ●—● 2 hrs; ×—× 3 hrs;
 ○—○ 5 hrs

(2) pHと酵素活性 pHと酵素作用の関係はFig. 3の如くで、活性の最適はpH3.8附近にあると認められた。

(3) 熱安定性 あらかじめ所定の温度にした水中に酵素液を注入し、その温度の恒温槽中に10分間保ち、後冷水にて室温まで急冷してから一定酵素濃度になるよう水を加えたものについて、酵素活性を測定した。活性の残存率は原液の活性度(単位)を100として比較した。

Fig. 4からみられるように50°Cでは全く活性の損失はなく、70°Cで80%、98°Cで40%近い活性を示した。

2. 酵素の部分精製

(1) 硫酸分割 サナクターゼ粉末を室温にて2時間水抽出し、不溶解物を遠心分離した液に、硫酸を所定飽和度となし、分割を行なった。各区分の沈殿は水に溶かし、5°Cで水道水にて24時間透析を行ない酵素力価、蛋白質量を測定した。

Table 1にみられるように、アラバナーゼは硫酸0.4-0.6飽和区分に沈殿してくる。そして比活性は処理前の粗酵素液の約1.6倍であった。

0.9 飽和では比活性は高くなるも収率は少なく、0.4-0.6 飽和区分の約1/2であった。

(2) リバノール沈殿による分割 前記硫酸0.4-0.6飽和沈殿区分の透析酵素液に1%リバノールを加え分割を行なった。各区分の沈殿は0.5Mクエン酸緩衝液、pH4.5に溶かし、溶液の10-20%の重量の酸性白土を加え、リバノールを吸着除去し、後水道水で5°Cにて24時間透析を行なった。

操作過程をFig. 5に、その結果をTable 2に示す。

Table 2から、アラバナーゼは最初の区分に沈殿することがわかる。第2、第3の区分は不純蛋白質であり、ここで大部分が除かれる。かくして第1の区分に集められたアラバナーゼの比活性は処理前の7倍に達する。

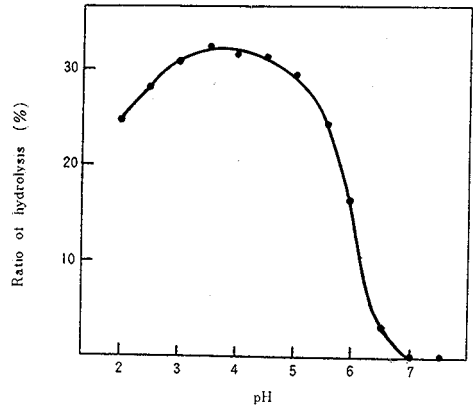


Fig. 3. Variation of the activity of arabanase with pH.
 Incubating condition; 50°C, 5hrs

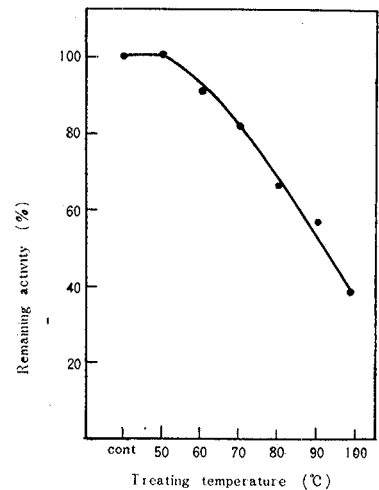


Fig. 4. Effect of heat treatment on arabanase activity.
 Experimental details are described in the text.

考 察

すでに報告した如く⁽²⁾, *Asp. niger* のアラバナーゼは活性の最適 pHを3.6にもつ、サナクターゼのそれも殆んど

Table 1. Fractionation of the enzyme with ammonium sulfate.

Fraction step	Volume (ml)	Arabanase activity			Protein (mg/ml)	Specific activity (unit/mg of protein)
		(unit/ml)	Total unit	Ratio of recovery (%)		
Extracted solution*	1,430	37.4	53,482	100.0	7.0	5.34
0.4 saturated fraction	103	6.6	680	1.3	1.8	3.67
0.6 saturated fraction	320	98.8	31,616	59.1	11.2	8.82
0.9 saturated fraction	195	51.5	10,043	18.8	5.3	9.71

* An extract of Sanactase (100g, dried powder) was prepared as described in the text, the volume of clear extract was 1,430 ml.

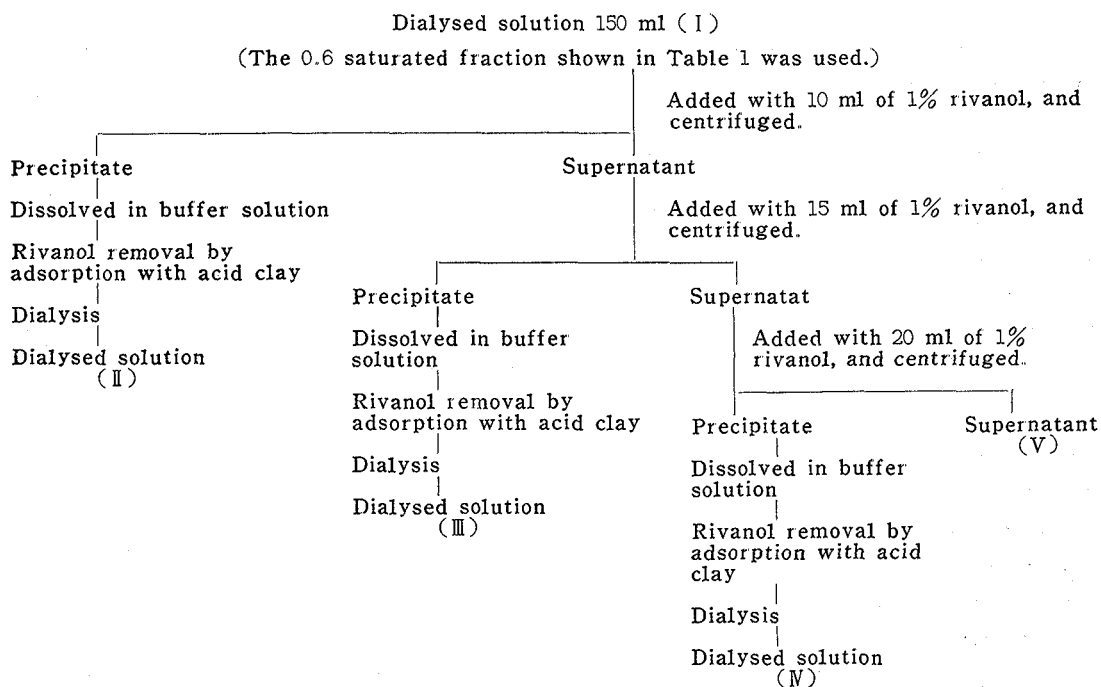


Fig. 5. Scheme of fractionation of the enzyme with rivanol.

Table 2. Summary of fractionation of the enzyme with rivanol
(Fractions designated I, II, III, IV and V are as shown in Fig. 5.)

Fraction No.	Rivanol concentration (%)	Volume (ml)	Arabanase activity			Protein (mg/ml)	Specific activity (unit/mg of protein)
			(unit/ml)	Total unit	Ratio of recovery (%)		
I	0.00	150	98.8	14,820	100.0	11.2	8.82
II	0.06	33	290.0	9,570	64.6	4.7	61.70
III	0.15	32	28.6	915	6.2	6.8	4.21
IV	0.23	15	0	0	0	8.5	0
V	0.23	188	0	0	0	—	—

同じ最適 pH を有していた。しかし、前者の場合熱に対してそれほど安定ではなかったが、サナクターゼのものはすこぶる耐熱性が強く 98°C 10 分間の加熱でなお 40% 近い活性を示した。このことが本酵素の本質によるものかどうかは精製された標品による実験にまたねばならないが、一方 *Asp. niger* のポリガラクチュロナーゼが耐熱性であると⁽⁶⁾ いわれることなどを考え合せると興味ある点である。

なお補助的な意味で本実験に用いた同一試料のアミラーゼの耐熱性を調べた結果、50°C では強力な活性を示したが、80°C 10 分の加熱では全く失活した。

次に、酵素精製におけるリバノール処理では、最初の区分すなわちリバノール濃度 0.06% のところで効果的に沈殿回収された。天野ら⁽⁸⁾の酸性プロテアーゼ、BOETTICHER ら⁽⁸⁾の血漿中のアルブミンのリバノールによる沈殿など多くの報告⁽⁹⁻¹³⁾から、リバノールによる蛋白質の沈殿性は蛋白質の酸性度に強く依存するものと考えられ、このことから本酵素は含有する他の蛋白質よりより酸性であると推定された。今後この問題を電気泳動に対する挙動とからみ合せて検討するつもりである。

要 旨

サナクターゼ中のアラバン分解酵素の性質を検討した結果

(1) 本酵素は熱に対してすこぶる安定で 50°C では全く失活せず、98°C 10 分の加熱でなお 40% 近い活性を示した。

(2) 酵素の精製を目的として、硫酸分割、リバノール分割を行った結果

(i) 硫酸分割では、硫酸飽和度 0.4-0.6 の区分に 60% のアラバナーゼが沈殿回収された。飽和度が高くなるにしたがい、酵素の比活性の増加が認められたが、0.6-0.9 飽和区分では 20% 以下の回収率であった。

(ii) 硫酸分割後透析した試料についてリバノール分割した。その結果最初の区分すなわちリバノール濃度 0.06% において、ほとんどのアラバナーゼが沈殿回収され、リバノールの蛋白沈殿性から本酵素は含有不純蛋白質より酸性であろうと推定された。

終りに臨み、使用菌種名調査に御協力頂きました東京大学教授山田浩一博士および明治製菓株式会社石川哲夫氏に感謝いたします。また、本実験に助力された、井上一誠氏に感謝いたします。

引 用 文 献

- | | |
|--|--|
| (1) 梶明, 穴吹吉夫, 滝博, 大山義明, 岡田武久: 香川大農学報, 15, 40 (1963). | 東京, 共立出版 (1955). |
| (2) KAJI, A., TAKI, H., SHIMAZAKI, A., SHINKAI, T.: <i>Ibid.</i> , 15, 34 (1963). | (6) SCHUBERT, E.: <i>Melliand Textilber.</i> , 8, 1 (1954). |
| (3) AMANO, T., ISOJIMA, S., FUJIO, H.: <i>Med. Jour. of Osaka Univ.</i> 4, 255 (1953). | (7) KOCH, J.: <i>Fruchtsaft-Ind.</i> 1, 66 (1956). |
| (4) 山田浩一: 文部省研究報告集録 昭36 農学[II], 73 (1961). | (8) BOETTICHER, E. W., KISTTER P., NITSHMANN, H.: <i>Nature</i> 181, 490 (1958). |
| (4a) 梶明, 井上一誠: 未公表. | (9) 外山信男: 醸酵工学, 35, 356 (1957). |
| (5) 左右田徳郎, 江上不二夫(編): 多糖質化学, 220, | (10) 大谷義夫, 高橋慧: 同上, 39, 30, 191 (1961). |
| | (11) 松島欽一, 嶋田協: 農化, 36, 193 (1962). |
| | (12) 清沢功, 前野正久: 同上, 36, 957 (1962). |
| | (13) 山田浩, 蓑田泰治: 醸協誌, 20, 254 (1962). |

Studies on the enzymes acting on araban

IV Fractionation of arabanase of *Aspergillus niger*

with ammonium sulfate and rivanol

Kiyoshi TAGAWA and Akira KAJI

Summary Characteristic studies of arabanase of *Aspergillus niger* have been done employing the extracted solution of Sanactase.

(1) This enzyme was highly thermostable; for instance no inactivation was observed at 50°C

and about 40% of its original activity remained after heating at 98°C for 10 minutes.

(2) In the experiments concerning fractionation with ammonium sulfate and rivanol for partial purification of this enzyme, the following results were obtained.

i) The fraction precipitated at 0.4 to 0.6 saturation with ammonium sulfate contained 60% of the original total activity, and represented a 1.6 fold increase in the specific activity as compared with the extract before addition of the salt.

ii) In the rivanol fractionation of the enzyme solution from the preceding step, this enzyme was effectively collected in earlier fraction (0.06% rivanol), and its specific activity was about 12 times higher than that of the original extract of Sanactase.

(Received June 20, 1936)