

アラバン分解酵素に関する研究

VI *Coniothyrium diplodiella* の生産するアラバナナーゼ

梶 明, 田 川 清

細菌のアラバン分解酵素について著者の一人梶は作用形式の異なるアラバナナーゼの存在を指摘した⁽¹⁾。かびについては *Asp. niger* につき検討した結果を報告したが⁽²⁻⁴⁾、植物病原菌にもアラバナナーゼの生産が予測された。即ち植物組織中ではアラバンは常にペクチン物質と随伴して存在することから、必然的にペクチン分解酵素の強力な植物病原菌にもアラバン分解酵素の存在が窺われる。

遠藤⁽⁵⁾は植物病原菌のうちよりペクチン分解酵素生産の強力な菌株の検索を行い、最も有力なものとして *Coniothyrium diplodiella* をあげている。著者らはこの菌の酵素剤を使用して粗酵素液による酵素の性質を検討したので報告する。

実験方法および実験結果

1. 粗酵素液の調製

Coniothyrium diplodiella の酵素剤粉末に5倍量 (V/W) の水を加え、2時間室温抽出を行なったのち、不溶物を遠心分離 (4000 rpm 10 min) し、上澄液に粉末硫酸を添加して0.75飽和となし、沈澱を遠心分離 (12000 rpm 15min) により集め、少量の水に溶かして5°Cにて水道水で24時間、つぎに0.02M クエン酸・リン酸塩緩衝液 (pH 5.4) で24時間透析したものを酵素液とした。

2. 酵素作用力の測定

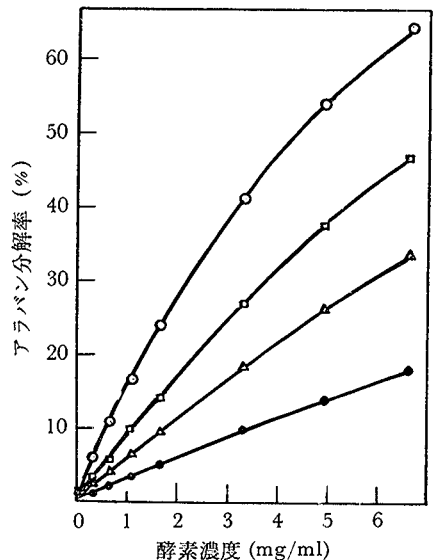
前報⁽³⁾と同様テンサイアラバンに作用させたときの還元力の増加を Willstätter, Schudel の改良法で測定し、下式によって分解率を求めた。

$$\text{分解率 (\%)} = \frac{(t \text{ 時間反応後の還元力}) - (\text{未反応液の還元力})}{(\text{反応液の塩酸分解液の還元力}) - (\text{未反応液の還元力})} \times 100$$

3. 酵素の作用条件

(1) 酵素濃度の影響 種々なる酵素濃度におけるアラバン分解率を求めた。

第1図にみられるように分解率の低いところでは酵素濃度と分解率の間には直線関係が示された。



第1図 酵素濃度とアラバン分解率との関係
作用条件: 40°C, pH 4.0

●—● 1 hr
△—△ 2 hrs
□—□ 3 hrs
○—○ 5 hrs

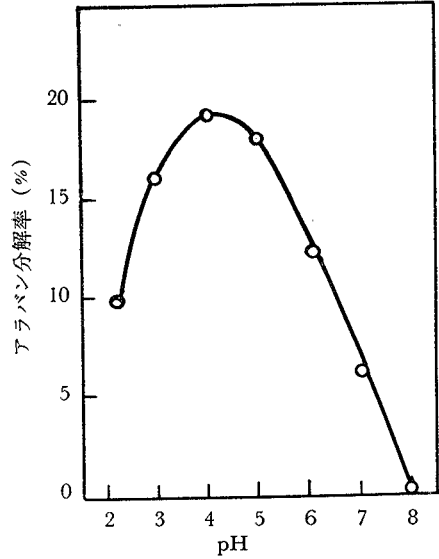
(2) pH の影響 0.1M ケエン酸・リン酸塩緩衝液にて作用液の pH を種々変えて作用させたときの分解率を測定し、第2図の pH-活性度曲線を得た。これより pH 4.0 附近に最適 pH を有することが認められた。

(3) 温度の影響 酵素濃度と分解率が直線関係を示す条件下で酵素作用を 30°, 40°, 50°, 60°, 70°C の各温度において行わせたときの分解率を求めた。第3図に示すように 50°C に最適が認められ、60°C では著しく失格することが認められた。

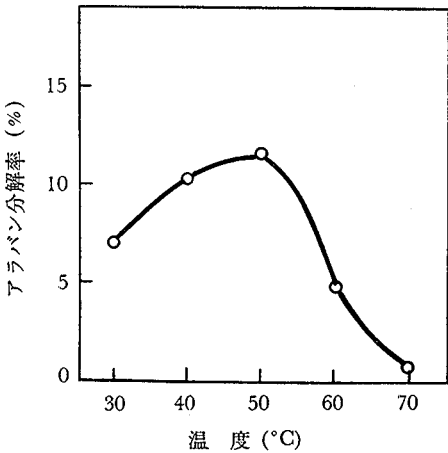
4. 酵素の pH 安定性

酵素液に 0.1M ケエン酸・リン酸塩緩衝液を添加して、第4図中の各 pH にし、これを 5°C に 24 時間および 1 週間保ったのち、作用の最適 pH に前記緩衝液で規正してから、酵素濃度を一定に調整したものについて、40°C、2 時間の作用条件で残存する活性をしらべた。残存率は無処理酵素液によるアラバン分解率を 100 (%) として、各温度処理液による分解率の比をもって示した。

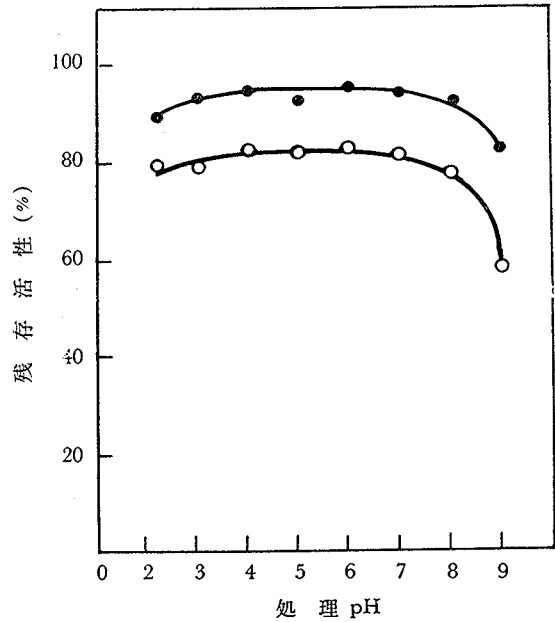
図にみられるとおり pH 2.0-7.5 附近まで活性は殆んど変わらず pH 9.0 において僅かに減少が認められた。



第2図 pH の影響
作用条件：40°C, 5時間



第3図 温度の影響
作用条件：pH 4.0, 2時間

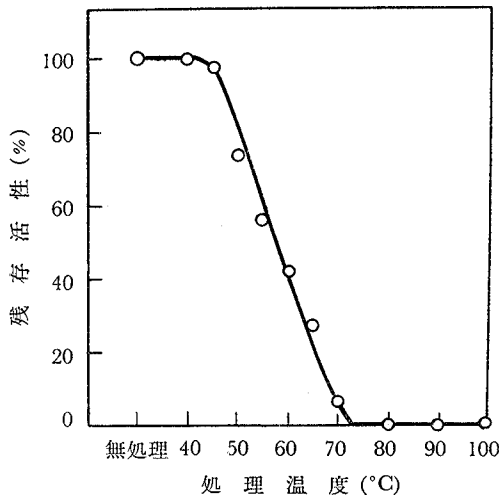


第4図 酵素の安定性に及ぼす pH の影響
●—● 5°C で 24 時間処理
○—○ 5°C で 7 日間処理

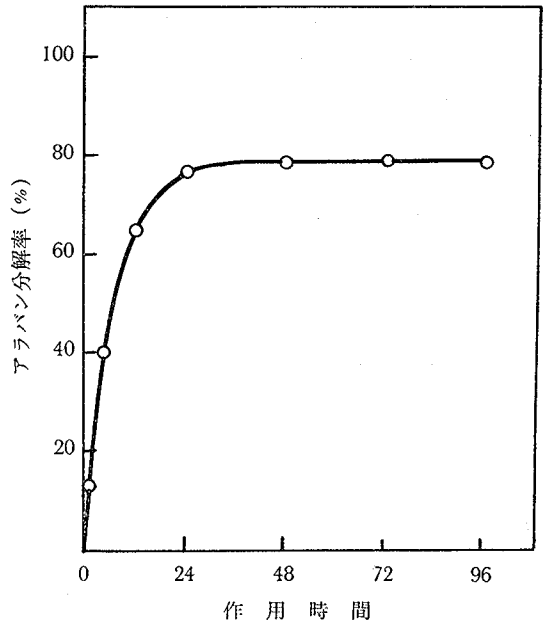
5. 熱に対する安定性

第5図中の各温度で酵素液を10分間処理した後残存活性を40°C, 2時間の作用条件で測定した。活性の残存率は前記同様無処理酵素液による分解率との比をもって示した。

50°C前後から失活が認められ、70°Cでは全く失活することが確認された。



第5図 加熱に対する安定性
処理条件: pH 4.0, 10分間各温度で処理



第6図 アラバン分解曲線
作用条件: 30°C, pH 4.0

6. アラバン分解限度と分解産物

反応液中のアラバン濃度を0.67%に調節した組成で、30°Cにて酵素作用を進めて、一定時間毎に生成還元力を定量した。同時にペーパークロマトグラフィーにより分解産物を検討した。すなわち作用液3mlをとり、これに98%エチルアルコールを加え、沈澱を遠心分離(4000 rpm 15 min)し、上澄液を減圧濃縮して1mlとなし、その10μlを東洋濾紙 No. 51に添付して、n-ブチルアルコール、酢酸、水(4:1:5)の上層にて展開し、アニリン水素フタル酸塩にて発色させた。

アラバン分解の経時変化を第6図に示す。この酵素による分解はほぼ一次反応式に従うものとみなされ、最終分解率は78.8%であった。

分解産物のペーパークロマトグラムでは R_F 0.28のL-アラビノースと R_F 0.16の未知糖のスポットが認められた。未知糖の区分を切りとり、水抽出後1N硫酸を加えて加水分解後バリタで中和し、上澄液を減圧濃縮して、ペーパークロマトグラフィーで検討した結果、L-アラビノースとD-ガラクトースであることが判明した。

考 察

Coniothyrium diploidiella が生産するアラバナナーゼ作用について実験した結果は上に述べたように、その最適pHは4.0, pH 2.0~7.5の間において安定であったがこれを70°Cにおいて10分間加熱すると失活した。アラバンの分解は容易に進行し、酵素作用が96時間進行したときは78.8%の分解率に達した。その分解曲線はなだらかな一次曲線を示し、既に発表した*Aspergillus niger*のアラバナナーゼ⁽²⁻⁴⁾の分解曲線とやや趣きを異にし、とくに反応の初期において、分解率が30%に達する前後の曲線のあり方に相異が指摘できる。すなわち、*Asp. niger*のアラバナナーゼ作用は30%までは完全に直線的にアラバン分解を進め、それよりのちは急激に還元糖の生成速度が

小さくなった。一方、生産物のペーパークロマトグラムを比較するときは *Asp. niger* のアラバナーゼ作用においては大部分が L-アラビノースであり、とくに反応の初期には完全に単糖のみであるに反し、*Con. diplodiella* のアラバナーゼ作用の場合は比較的早期より少糖類の生成が指摘された。分解曲線および生成糖についてのこの二つの相異は両菌種のアラバナーゼ生産様式の相異と直結するものと考えられる。すでに梶らは *Clostridium* の菌を使用してそのアラバナーゼに I および II の二つの型の存在することを指摘した⁽¹⁾。アラバンの側鎖、1,3 結合を加水分解するアラバナーゼ I は *Asp. niger* に豊富に生産されるものと考えられる。これに対して、*Con. diplodiella* はアラバンの主鎖、1,5-結合を位置に無差別に切断するアラバナーゼ II を比較的良好に生産するものと考えられる。しかし、両菌種のアラバナーゼはともにアラバンを分解して分解率約 80% に及ぶものである故に、いずれも I、II 両型のアラバナーゼの生産は順調なものと考えられ、ほかの菌種に比較してアラバナーゼ生産は優れているものと判断される。

菌種名調査に御協力頂いた三共株式会社中村路一博士に感謝の意を表します。

文 献

- (1) 梶 明, 穴吹吉夫, 滝 博, 大山義朗, 岡田 武久 : 香川大農学術報告, 15, 40 (1963).
 (2) KAJI A., TAKI H., SHIMAZAKI A., SHINKAI T. : *Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.*, 15, 34 (1963).
 (3) 田川 清, 梶 明 : 香川大農学術報告, 15, 45 (1963).
 (4) 梶 明, 田川 清 : 農化, 38, 580 (1964).
 (5) ENDO A. : *Agr. Biol. Chem.*, 25, 382 (1961).

Studies on the enzyme acting on araban

VI Arabanase produced by *Coniothyrium diplodiella*

Akira KAJI and Kiyoshi TAGAWA

Summary A study has been done on the arabanase of *Coniothyrium diplodiella*. The activity of enzyme was determined by Willstätter, Schudel's hypiodite method when the enzyme acted on beet-araban. Crude enzyme solution was prepared by the following method. Water, five fold weight of material was added to the enzyme preparation of *Coniothyrium diplodiella*, and arabanase was extracted for 2 hrs at room temperature. The extracted solution was centrifuged, and ammonium sulfate was added to the supernatant until 0.75 saturation, and then the precipitate was dissolved in cold water. This enzyme solution was dialyzed against 0.02 M McIlvaine's buffer at pH 5.4, 5°C for 24 hrs. The experiments were carried out using this dialyzed solution, and the results are summarized as follows. The optimum pH value was found to be 4.0, optimum temperature was 50°C, and the enzyme was inactivated at 70°C when its solution was kept on the temperature for 10 min, and the enzyme was stable between pH 2.0 and 7.5. As shown in Table 6, the rate of hydrolysis reached 78.8% and a large spot of L-arabinose appeared on paper chromatogram while faint spots of oligosaccharide and D-galactose were detected in the same PPC, when the action of arabanase was continued at 30°C for 96 hrs.