グァーガムの酵素分解と分解生成物の性質†

山本武彦*, 山本 寛*, 宮原 泉*, 松村芳一**,
平田 敢***, 金 武祥***

Isolation of a β -Mannan Hydrolyzing Enzyme and
Hydrolysis of Guar Gum by the Enzyme Isolated

Takehiko YAMAMOTO,* Satoru YAMAMOTO,* Izumi MIYAHARA,*
Yoshikazu MATSUMURA,** Atsushi HIRATA*** and Mujo KIM***

* Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Fukuyama University
(985, Sanzo, Higashimura-cho, Fukuyama 729-02, Japan)

** Ueda Chemical Industry Co., Ltd.

(1-2-6, Takayanagi, Neyagawa 572, Japan)

*** Central Research Laboratory, Taiyo Chemical Co., Ltd.
(Takara-machi, Yokkaichi 510, Japan)

A β -1,4-mannan hydrolyzing enzyme was isolated from an extract preparation of Koji culture of a strain of *Asp. niger* on wheat bran. After desalting through a column of Sephadex G-50, the enzyme was purified by chromatography on columns of DEAE-Toyopearl 650 S and calcium hydroxylapatite. The optimum pH of the purified enzyme on guar gum was about 5, but even at pH 7.0, the enzyme showed the activity of 70 % of that at the opt. pH. The enzyme was relatively stable to heat and active at 60°C.

The enzyme hydrolyzed locust bean gum, glucomannan, and guar gum and the maximum degrees of hydrolysis were 30, 25, and 15 %, respectively. In the hydrolysate of guar gum were found a trace amount of mannose and small amounts of bioses whose structures were mannobiose and Gal-1 $\rightarrow$ 6-Man. Several other oligosaccharides of trioses and those of more sugar residues were also observed. But, the major part of the hydrolysates of guar gum were those consisted of ten or more sugar residues. This result indicates that, though guar gum consists of 6 parts of mannose and 4 parts of galactose, the fine structure is far from those so far reported as a repeated structure of Gal-1,6- β -Man-1,4-Man where mannosidic linkages constitute the main chain.

Experiments using rats revealed that supplying guar gum digests with above enzyme as a food additive results in decrease of total content of lipids including cholesterol and triglycerides in the liver.

グァー (*Cyanoposis tetragonolobus*)¹⁾ は中近東で数千年来栽培されている作物で、この豆の胚乳に含まれるガラクトマンナンがいわゆるグァーガムである。ローカストビーンガムも構造は異なるがガラクトマンナンである。しかし、第2次大戦後これの供給が難しくなり、代

って資源性の大きなグァーガムが利用されるようになった。とくにグァーガムは冷水中でも水和性が強く、粘土などの水懸濁液に加えると粘土粒子表面の水を奪って沈澱を促進するなどから、廃水や沈澱池の処理、化学工業における沈澱促進剤、濾過助剤として、また製紙分野では紙の強化に、食品分野ではアイスクリームやチーズの安定剤として広汎に利用されている²⁾。

しかし、市販のグァーガムは豆から機械的に製される粉体で、性質上除菌が難しく、また果汁などに混ぜるの

† "Proceedings of the Amylase Symposium, 1989"

* 福山大学工学部 (729-02 福山市東村町字三蔵 985)

** 上田化学工業(株) (572 寝屋川市高柳 1-2-6)

*** 太陽化学(株)総合研究所 (510 四日市市宝町)

Table 1. Enzyme assay.

Guar gum, 0.5 %	4.0 ml	pH 4.5, 40°C
Acetate buffer, 20 mM	3.0 ml	
Enzyme	1.0 ml	

Saccharifying activity :

One unit of enzyme produces one μmol reducing sugar as mannose in every minute.

Viscosity reduction activity :

One unit of enzyme reduces the viscosity into a half in 10 min.

Flow time, sec of substrate with heat-inactivated enzyme	$= T_0$	$\left. \begin{aligned} &= B \\ &= T_1 \end{aligned} \right\} \frac{T_0 - T_1}{T_0 - B} = \frac{1}{2}$
" " of 10 mM acetate buffer, pH 4.5		
" " enzyme reaction mixture after incubation		
for t_1 (t_2 , etc.)		

The incubation time required to reduce the viscosity into a half is obtained by plotting the flow time determined at several different times of incubation.

には粘度が高すぎる難点がある。

グァーガムを分解する酵素については国内でもこれまでいくつか報告³⁻⁷⁾されているが、分解生成物の解析についての報告はきわめて少ない。

本研究はグァーガムをできるだけ少ない分解率で粘度を低下させる酵素を探索し、その分離精製、酵素の一般性質、分解生成物の分子量分布や 2, 3 のオリゴ糖についての構造等について検討した。

実験の材料と方法

1. グァーガム

市販印度産グァーガム粉末を 160 メッシュ篩にかけ、通過粉末を基質として使用した。1g 当りの全糖はマン

ノース換算で 850 mg、構成マンノースとガラクトースの比は約 57 : 43 であった。ただし、微量のグルコース、糖酸の存在が認められた。

2. 酵 素

微起源酵素剤を対象に検討して、グァーガムの加水分解力に比べ、粘度低下力が相対的に大であった *Asp. niger* の 1 株の麴麴培養から抽出し、製剤化した“セルロシン GM5”を用いた。

3. 酵素力の測定方法と活性単位

Table 1 の方法に従って活性を測定した。糖化力活性 (saccharifying activity, SA) は同条件で 10 分間にマンノースとして 10 μ mol の還元糖を生成する酵素力を、粘度低下力 (viscosity reduction activity, VRA) は粘

Fig. 1. Chromatography on a column of DEAE-Toyopearl 650 S.

The crude enzyme soln. after desalting through Sephadex G-50, 80 ml ($E_{280}^{280} = 12.8$), was applied on the column, $\phi 2.4 \times 15$ cm, phosphate buffer, pH 6.5 and developed initially with the same buffer and then, by linear gradient of phosphate buffer from 20 to 400 mM.

Fig. 2. Chromatography on a column of hydroxylapatite.

Through a membrane filter (Advantec., UK-10), I and II fractions were applied on the column of $\phi 1.5 \times 40$ cm, respectively. They were developed initially with 10 mM and then with 100 mM phosphate buffer, pH 6.5.

Fig. 3. SDS-PAGE of purified and partially purified enzymes.

1, Markers; 2, IIa; 3, Ia; 4, Ib; 5, IIb.

度半減に至るまでに要したインキュベーション時間が10分である場合をそれぞれ1単位とした。

4. 酵素の分離精製

使用した樹脂、条件は実験の結果の項でそれぞれ述べることにする。

5. グァーガム分解物の解析

これについても実験の結果の項でそれぞれ述べる。

実験の結果と考察

1. 酵素の分離精製について

粗酵素 1.0 g を 50 ml の水に溶解し、ゲル濾過 (Sephadex G50) で脱塩した溶液 ($E_{280} = 6.39$, 80 ml) を DEAE-Toyopearl 650 S のカラムを用いて精製した。Fig. 1 に示すように、目的酵素は同カラムに 10 mM 磷酸緩衝液で吸着され、100~200 mM 緩衝液で溶出された。溶出画分は粘度低下力、加水分解力いずれからも二つのピーク画分からなるとみなされたので、180 mM 前後の磷酸緩衝液で溶出した画分とそれより 220 mM までに溶出された画分に分け (I, II), 分子濾過膜で濃縮した後、Ca-ハイドロキシアパタイトカラムで精製した。

Fig. 2 に示すように、いずれの画分も 10 mM および 100 mM 磷酸緩衝液でそれぞれ画分 a および b とに分かれた。

分離された各画分の電気泳動図と収率ならびに比活性を Fig. 3 および Table 2 に示す。

すなわち得られた 4 画分は、比活性、VRA/SA において異なったが、IIa が電気泳動的に単一で、比活性、VRA/SA が大でまた VRA 収率ももっとも良好であった。IIa の一般酵素化学的性質を Fig. 4 に示す。

Table 2. Summary of purification.

Prep.	Protein, mg	Viscosity reduction, VRA			Saccharification, SA			
		Total, $\times 10^{-3}$ U	Sp. Act., $\times 10^{-3}$ U/mg	Recovery, %	Total, U	Sp. Act., U/mg	Recovery, %	VRA/SA
Crude prep.	764	5,160	6.75	100	10,300	13.5	100	501
Ia	54.2	884	16.3	17.1	1,990	36.7	19.3	444
Ib	23.0	226	9.83	4.30	500	21.7	4.90	452
IIa*	53.5	1,200	22.4	23.3	820	15.3	8.00	1,460
IIb	46.4	354	7.63	6.90	910	19.6	8.80	389

* The absorbance at 280 nm of 1.0 % solution of IIa was estimated to be about 19.0.

なお Ib, IIb 画分は Ia, IIa と異なり α -galactosidase 作用があり, グァーガムに作用させると粘度低下の初期からガラクトースを遊離することが認められた。ただし, この活性は 65°C 1 時間でほぼ完全に消失した。

Fig. 4. Enzymatic properties of purified enzyme (IIa).

The remaining activities were determined by the standard method. For pH-stability test, the enzymes buffered to various pH values were allowed to stand at 4°C for 20 hr while for thermal stability test, the enzyme was heated at various temp. for 10 min at pH 5.0.

2. 精製酵素 (IIa) の数種マンナン分解様式と反応生成物について

精製酵素をグァーガム, ローカストビーンガム, コンニャクグルコマンナンにそれぞれ作用させた場合の分解-時間曲線は Fig. 5 で, 分解限度は粗酵素では後 2 者のマンナンではほぼ完全に, グァーガムでは約 80%であった。他方精製酵素による場合は, コンニャクグルコマンナン, ローカストビーンガムはそれぞれ 40 および 37%, グァーガムにおいては 14%程度であった。

精製酵素による分解物は, いずれの場合も遊離単糖は少量または微量のマンノースのみで, それら基質を構成する他の糖の遊離は認められなかった。グァーガム分解の限度に達した分解物のゲル濾過パターンを Fig. 6 に

Fig. 5. Hydrolysis of several substrates by crude and purified enzymes.

0.5 % guar gum in 20 mM phosphate buffer, pH 4.5; enzyme, 3 units SA/ml, 40°C.

—, Crude enzyme; ----, purified enzyme; O, guar gum; ●, locust bean gum; Δ, glucomannan.

Fig. 6. Elution profile from Bio Gel P-4 (ϕ 3 cm $\times$ 120 cm) of guar gum digest with purified enzyme.

Enzyme digest applied, 0.95 mg reducing sugar as mannose ; 8.593 total sugar content as mannose in 2 ml.

示すが、種々重合度のオリゴ糖が主で、単糖、2糖はきわめて少ないことがわかる。

他の方法によるゲル濾過パターンもほぼ同じであった。この実験で適宜各画分を分取し、それらを 1.0 N HCl で水解したのちマンノースとガラクトースとの比を測定した結果、Fig. 7 に示すように比較的 low 分子および比較的高分子のオリゴ糖は大略マンノース 6 : ガラクトース 4 の比であるが、その中間のオリゴ糖のそれは、ガラクトースが相対的にマンノースに比べ大であった (Fig. 7)。

なお 2 糖とみなされる分解生成物を Fig. 6, さらに Fig. 7 の条件で分画と標識精製を行い、分離した 2 糖の構成糖比、また IIa 分解物から分離した 2 糖のメチル化分析の結果を Table 3, 4 に示す。

すなわち、粗酵素によって生じた 2 糖は大部分マンノースからなる 2 糖であるのに対し、Ia からのはガラクトースを含む 2 糖が含まれていることがうかがわれる。

なお、IIa による分解で生じ、2 糖として分離されたオリゴ糖のメチル化物の酸分解で生じた糖のメチル化位から、同 2 糖は *O*-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-mannopyranose, *O*-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-mannopyranose の混合物であったことがわかる。

いずれにしてもグァーガムの IIa による分解生成物は

単糖、2 糖は少なくほとんどが 3 糖以上の種々オリゴ糖であることが明らかになった。もし、グァーガムが β -1, 4-結合のマンノース鎖にガラクトースが規則的間隔で結合 (たとえば、*O*- α -D-galactosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-mannopyranose の繰り返し構造) しているならば、そのような結果になるはずがない。逆説的にいえば、グァーガムの構造にはなお解明されるべき問題があるといえる。

3. グァーガムの精製酵素 IIa による分解生成物の性質について

グァーガムの精製酵素 (IIa) による分解を加熱などにより適宜制御すれば、たとえ加水分解率が 6~8% でも、その噴霧乾燥標品は、10% 濃度で冷水に可溶で、粘度は低く約 10 CPS で、遊離糖はほとんど認められない。もちろん Prosky¹⁰⁾ 法を適用すれば沈澱物としてほとんど回収される。

同標品の被資化性について、代表的ヒト腸内細菌 110 種を対象に試験した結果、少なくとも各菌個々による場合はほとんどの菌が資化しなかった¹¹⁾。グァーガムないしその軽度分解物のヒト腸管内における被資化性については最終的には多数の人体実験によらねばならないが、少なくともマウスを用いた実験では、Table 5, 6 に示すように肝脂肪蓄積を抑制し、糞便量の増加をもたらした。

Fig. 7. Molecular weight distribution and sugar composition of guar gum digest with purified enzyme.

The guar gum digest, 100 μ l containing 47.5 μ g reducing sugar and 430 μ g total sugar content as mannose was applied on TSK-G 3000 SW column (ϕ 0.75 $\times$ 30 cm) and developed with water in the presence of 0.01 % NaN_3 , monitoring refraction indices. The ratio of Man to Gal was determined by separation analysis (TSK-G ODS-120A) with the mixture which was obtained by acid hydrolysis followed by converting the sugars into amino benzyl ethyl derivatives.^{8,9)}

○, Galactose ; ●, mannose.

Nyman ら¹²⁾は、グァーガムはヒト腸内細菌でかなり分解されるが同様効果があることを報告している。

食物繊維と称される物質の生理効果と被資化性との関連の解明研究は容易でないが、少なくとも可溶性である

Table 3. Sugar composition of mono- and disaccharides mixture isolated from guar gum digests with purified and partially purified enzymes.

Enzyme		Galactose	: Mannose
Crude	monose	1.0	1.3
	biose	1.0	1.3
Purified Ia	monose	0.0	1.0
	biose	1.0	3.1
IIa	monose	0.0	1.0
	biose	1.0	2.2
Ib	monose	1.0	0.4
	biose	1.0	5.0
IIb	monose	1.0	0.5
	biose	1.0	6.2

Table 4. Methylation analysis of disaccharides in guar gum hydrolysates by purified enzyme (IIa).

	Retention time, relative to glucose	Sites methylated	Sugar
Monosaccharide	1.01	2, 3, 4, 6	Man
Disaccharide	0.99	2, 3, 4, 6	Man
	1.24	2, 3, 4, 6	Gal
	2.20	2, 3, 6	Man
	2.48	2, 3, 4	Man

こと、そして腸内細菌で一部資化されて有機酸を生じる性質のものが有効であると Roehrf¹³⁾ は報じている。

まとめ

1. 黒黴の麩麴培養抽出物から β -1,4-マンナンを分子内部から水解する酵素 (β -1,4-mannan endohydro-

Table 5. Effect of food added with enzyme-guar gum digest on rat liver lipids.

Group fed	Liver wt./body wt., %	Cholesterol, mg/g	Triglycerides, mg/g	Total lipids, mg
Basic food	3.68 $\pm$ 0.42	5.9 $\pm$ 2.0	43.8 $\pm$ 1.2	80.1 $\pm$ 19.4
Control food	3.74 $\pm$ 0.25	49.4 $\pm$ 9.5	79.5 $\pm$ 19.2	221.5 $\pm$ 49.7
Test food	2.87 $\pm$ 0.06**	5.4 $\pm$ 0.8	21.7 $\pm$ 1.1	59.4 $\pm$ 5.2**

Mean $\pm$ S. D. : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Feeding experiment : Mature female rats (Wistar) weighing about 180 g were previously fed with basic food for 4 days. They were then divided into 3 groups and fed for 14 days with one of the following 3 diets, respectively : basic food : 22% casein, 6% corn oil, 8% lard, 4% salt mixture, 1% vitamin mixture, 59% corn starch. Control food : 1% corn oil, 10% lard, 62% corn starch, others were the same as above. Test food : 57% corn starch, 5% enzyme-guar gum digest, others were the same as control food.

Table 6. Effect of food added with enzyme-guar gum digest on the amount of rat feces.

Group fed	Feces, dry wt., g/day/head
Basic food	0.62±0.05*
Control food	0.68±0.08*
Test food	0.83±0.07**

Mean±S. D. : * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

lase) を分離した.

2. 同酵素は、至適 pH 4.5, pH 7.0 でも 70% の活性を示し、また微酵素としては比較的耐熱性で最大活性は 65°C 付近で示された.

3. 同酵素によるグァーガムの最大分解度は約 14%, 分解生成物は分子量的にきわめて不斉一で、微量の遊離マンノース、少量の 2 糖、他は重合度 3 およびそれ以上から成っていた. 2 糖として O-mannopyranosyl-(1→4)-mannopyranose, O-galactopyranosyl-(1→6)-mannopyranose が認められた.

4. 同酵素による分解生成物の添食はラットを用いた実験で糞便量にある程度増加させ、また肝脂質の蓄積にある程度抑止する効果が認められた.

文 献

- 1) E. J. H. CORNER and K. WATANABE : in *Illustrated Guide to Tropical Plants*, 廣川書店, 東京, p. 261 (1969).
- 2) A. M. GOLDSTEIN, E. N. ALTER and K. SEAMAN : in *Industrial Gums*, Academic Press, New York and London, p. 303 (1973).
- 3) 橋本揚之助, 福本寿一郎, 辻阪好夫 : 農化, **43**, 317-323 (1969).
- 4) 橋本揚之助 : 農化, **44**, 287-293 (1976).
- 5) S. EMI, J. FUKUMOTO and T. YAMAMOTO : *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1891-1898 (1971).
- 6) S. EMI, J. FUKUMOTO and T. YAMAMOTO : *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 991-1001 (1972).
- 7) S. EMI, J. FUKUMOTO and T. YAMAMOTO : *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 1945-1959 (1972).
- 8) W. T. WANG, N. C. JR. LEDONNE, B. ACKERMAN and C. C. SWEELY : *Anal. Biochem.*, **141**, 366-381 (1984).
- 9) F. MATSUURA and A. IMAOKA : *Glycoconjugate J.*, **5**, 13-26 (1988).
- 10) L. PROSKY : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 1044-1056 (1984).
- 11) 西元勝也, 平田 敢 : 未発表.
- 12) M. NYMAN and A. NILS-GEORG : *Br. J. Nutr.*, **55**, 487-496 (1986).
- 13) K. L. ROEHRIF : *Food Hydrocolloids*, **2**, 1-18 (1988).

(平成 2 年 3 月 24 日受付)