新菌 *Bacillus sectorramus* の生産する プルラナーゼの精製と諸性質

森 茂治*, 廣瀬 進*, 辻 廣二*, 大矢隆一*

Purification and Some Properties of a Pullulanase from *Bacillus sectorramus*

Shigeharu MORI, Susumu HIROSE, Hiroji TSUJI and Takaichi OYA

Amano Pharmaceutical Co., Ltd.

(51, Kunotsubo, Nishiharu-cho, Nishikasugai-gun, Aichi 481, Japan)

A bacterium which produces a pullulanase was isolated from soil. A pullulanase (BSP) produced by the strain, *Bacillus sectorramus*, was purified by precipitation with ammonium sulfate and chromatographies on Phenyl-Sepharose CL-4B, DEAE-Sepharose CL-6B, γ -Cyclodextrin-Sepharose, and Toyopearl HW-55S. The purified enzyme was homogeneous in slab electrophoresis. The optimum pH and temperature of BSP were about 5.0 and 55°C, respectively. The molecular weight of BSP was estimated as 96,000 and its isoelectric point was 4.7. The action pattern of this enzyme on pullulan was endo-wise. The final product from pullulan was maltotriose, not trimer which has α -1,6 linkage in the molecular. By adding BSP, it was possible to significantly increase the glucose level in the standard condition of saccharification (pH 4.5, 60°C).

澱粉中の α -1,6-グルコシド結合を水解するプルラナーゼは、グルコースやマルトオリゴ糖等の製造に増収を目的として利用されている¹⁾。われわれは、澱粉糖化に適した酸性および高温領域に至適をもち、耐酸、耐熱性を有するプルラナーゼ生産菌株のスクリーニングを試み、土壤中より目的とする菌株を分離した。同定の結果、バチルス属の新菌種と判明し、*Bacillus sectorramus* と命名した。

本報では、この新菌種の培養液よりプルラナーゼ（以下 BSP と略す）を精製し、その諸性質について検討したので報告するとともに、BSP とグルコアミラーゼを併用することによって澱粉糖化工程においてグルコース増収効果の確認ができたのでその結果についても併せて報告する²⁾。

実験方法

1. 菌株と同定方法

菌株は愛知県の畑土より分離し、単一の菌とした。菌

株の菌学的諸性質は Bergey's Manual (8 ed.)³⁾ 等に従って調べ、それらの結果より同定した。なお、GC 含量は Saito らの方法⁴⁾ により DNA を調製し、Tm 法⁵⁾ により定量した。

2. 培養方法

30 l 容ジャーフェーマンターを用い、以下の条件で培養した。ワキシースターチ 2%, 肉エキス (カツオ) 0.3%, リン酸 2 アンモニウム 0.3%, リン酸 2 カリウム 0.2%, 硫酸マグネシウム・7 水塩 0.1%, 水道水 20 l (pH 5.5) を培地として、37°C, 40 時間培養した。攪拌数は 250 rpm, 通気量は 10 l/min とした。

培養液 18 l を遠心分離により除菌した後、限外濾過法 (モジュール ACL-1010, 旭化成) で 500 ml に濃縮した。

3. 精製方法

限外濾過法にて得られた濃縮液を硫酸 70% 飽和で塩析を行い、遠心分離後、沈澱を 1.5 M 硫酸アンモニウムを含む 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) に溶解し、同液にて透析を行った。透析後、同液で平衡化させた Phenyl-Sepharose CL-4B カラム (1.6 × 13 cm) に負荷し、1.5 ~

* 天野製薬(株)開発第 2 部 (481 愛知県西春日井郡西春日町九之坪西城屋敷 51)

0 M 硫酸アンモニウムの linear-gradient にて溶出した。活性画分を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) にて透析を行い、同緩衝液にて平衡化させた DEAE-Sepharose CL-6B カラムに供し、0~0.3 M 塩化ナトリウムの linear-gradient にて溶出した。次に 25 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) にて透析し、 γ -Cyclodextrin (以下 γ -CD と略す)-Sepharose に吸着させ、0.15% γ -CD で溶出した。溶出液を Amicon Diaflo membrane PM-10 で濃縮し、0.5 M 塩化ナトリウムを含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) で平衡化させた Toyopearl HW-55S に供し、ゲル濾過を行い、精製酵素を得た。

4. 分析方法

1) プルラーゼ活性

0.5% プルランを含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 1 ml に酵素液 0.25 ml を加え、40°C にて 30 分間反応を行い、生じた還元力を Somogyi-Nelson 法⁶⁾ にて定量した。1 単位はプルランより 1 分間に 1 μ mol のグルコースに相当する還元力を生ずる酵素量とした。

2) タンパク質

標準タンパクとして bovine serum albumin (fraction V) を用い、Lowry らの方法⁷⁾ により定量した。

3) ペーパークロマトグラフィー (P. p. c.)

P. p. c. は、1-butanol : pyridine : water (6 : 4 : 3) で 3 回展開し、硝酸銀にて発色させた。

4) スラブ電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は 7.5% ゲル濃度を用い、おのおの、Davis⁸⁾、および Laemmli らの方法⁹⁾ に従った。

5) 等電点電気泳動法

両性担体として pH 4~6 の Ampholine (L. K. B) を用い、110 ml カラムにて 2°C、2 日間泳動した。

6) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

精製 BSP によるプルラン分解物は HPLC (ウォーターズ) にて分析した。カラムとして Aminex HPX-42A (Bio-Rad) を用い、85°C、溶出液は水、流速は 0.4 ml/min で行った。

5. BSP とグルコアミラーゼによる澱粉糖化

澱粉液化装置 (小沢製作所) を用い、コーンスターチ (庄野澱粉) を耐熱性 α -アミラーゼ (アミラーゼ AH 「アマノ」, 天野製薬) にて液化し、液化澱粉 (DE 11.0, Bx 33) を調製した。この液化澱粉にグルコアミラーゼ

Table 1. Physiological properties of *Bacillus sectorramus*.

A. Form				
Shape :	Rods	Spore :	Present	Size : 1.0-1.3 $\times$ 1.5-5.2 μ
Gram stain :	Positive	Mobility :	None	Acid-fast stain : Negative
B. Growth in various media				
Standard agar plate culture : Colony is circular, with complete periphery.				
Surface is smooth and semitransparent gray-white.				
Standard liquid culture : Slightly turbid, with powdery precipitate.				
Standard gelatin stab culture : Straight, no liquefaction.				
Litmus milk : No change.				
C. Physiological properties				
Temperature :	15-45.5°C	pH :	4.0-7.1	Oxidase : Negative
Oxygen :	Aerophobic	Catalase :	Positive	Urease : Negative
Nitrate reduction :	Positive	Hydrogen sulfide formation :	Negative	
Indole production :	Negative	Hippuric acid decomposition :	Negative	
Starch hydrolysis :	Positive	Phenylalanine deamination :	Negative	
Pigments formation :	Negative	Alkaline in VP broth :	Negative	
Heat tolerance :	Positive	Growth in 0.02% azide medium :	Negative	
Gas from glucose :	Negative	Growth in 0.001% lysozyme :	Positive	
Acetoin production :	Negative	Dihydroxyacetone formation :	Negative	
Acid from : Arabinose, xylose, glucose, mannose, fructose, galactose, maltose, sucrose, trehalose, melibiose, and ethanol.				

Table 2. Comparison of *Bacillus sectorramus* with reference strains of three similar *Bacillus* species.

Characteristic	<i>B. sectorramus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. acidopullulyticus</i>
Diameter of majority (μm)	1.0-1.3	1.0-1.2	1.2-1.5	0.6-1.0
Growth in				
7.0% NaCl	—	+	+	—
3.5% NaCl	+	+	+	—
anaerobic agar	+	+	—	—
Lecithinase	—	+	—	—
Decomposition of tyrosine	+	+	d	—
casein	—	+	+	d
Assimilation of citrate	+	+	+	—
Acid from mannitol	—	+	d	+
arabinose	+	—	d	d
xylose	+	—	d	d
Hydrolysis of gelatin	—	+	+	ND
Mol % G+C	40-41	32-33	36-38	ND

Symbols : d, slowly positive and variable ; ND, no data.

剤 (グルクザイム NL, 天野製薬) 2.5 u/g dry starch と, 上記精製にて得られたプルラナーゼを 0~0.2 u/g dry starch 添加し, 各温度, 各 pH にて 48 時間糖化を行った. 糖化後のグルコース量は HPLC にて分析した. カラムは SCR-101N (島津) を用い, 55°C, 溶出液は水, 流速 1.0 ml/min で行った.

結果と考察

1. プルラナーゼ生産菌株の同定

愛知県の畑土から分離されたプルラナーゼ生産菌株の主な生理学的諸性質を Table 1 に示す. グラム染色陽性, 胞子を着生し, 好氣的に生育することから, バチルス属に属する菌株であると判定した. 類似菌株との菌学的性質の比較を行った結果は Table 2 に示すように, 明らかに違いがみられ, さらに Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2, International Journal of Systematic Bacteriology Vol. 19~38 記載のいずれの菌株とも一致しないことから新菌種と同定し, *Bacillus sectorramus* (FERM-P No. 8973) と命名した.

2. *Bacillus sectorramus* の培養

ジャーフェーマンターにて, 10.2 u/ml のプルラナーゼ活性をもつ培養液が得られた. 活性ピークは 28 から 30 時間目で, このときの活性は 12.0 u/ml であった. 77.3% の収率で, プルラナーゼ活性 284 u/ml の濃縮液を得た.

Fig. 1. Polyacrylamide (PAGE) and SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) gel electrophoresis of purified BSP.

PAGE: Electrophoresis was done at pH 8.8 in constant current of 30 mA. SDS-PAGE: The sample was heated at 100°C for 3 min in the presence of 2% SDS and 5% 2-mercaptoethanol, and then subjected to 7.5% gel electrophoresis. Side lanes, standard proteins, rabbit muscle myosin (MW 205,000), *E. coli* β -galactosidase (MW 116,000), rabbit muscle phosphorylase b (MW 97,400), bovine albumin (MW 66,000) and egg albumin (MW 45,000); center lane, purified BSP.

Table 3. Purification procedures of pullulanase from *Bacillus sectorramus* (BSP).

	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Concentrated broth	695	5852	8.8	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation (70% saturation)	104	4056	39	69
Phenyl-Sepharose CL-4B	72	3312	46	57
DEAE-Sepharose CL-6B	63	3150	50	54
γ -CD-Sepharose	36	2376	66	41
Toyopearl HW-55S	23	1725	75	29

Fig. 2. Effects of pH on BSP.

●—●: Effect of pH on the activity of BSP. Buffer used was 25 mM McIlvaine buffer and the reaction was carried out at 50°C. ○—○: pH stability of BSP. The enzyme solution was kept in the 25 mM McIlvaine buffer for 30 min at 50°C, and then the residual activity was measured.

3. *Bacillus sectorramus* の生産するプルラーゼの精製

精製酵素は PAGE および SDS-PAGE による分析の結果, single band であった (Fig. 1). 本酵素の分子量, および等電点は, それぞれ 96,000 および 4.7 と推定した. 精製過程の結果をまとめたものを Table 3 に示す. 本酵素は 29% の収率で, 比活性 8.5 倍に精製された.

Fig. 3. Effects of temperature on BSP.

●—●: Effect of temperature on the activity of BSP. Buffer used was 50 mM acetate buffer pH 5.0 and the reaction was carried out at 30–65°C. ○—○: Thermal stability of BSP. The enzyme solution was kept in the 50 mM acetate buffer (pH 5.0) at various temperatures for 30 min, and then residual activity was measured.

4. 精製 BSP の諸性質

1) 一般的性質

精製 BSP の pH と温度に対する影響を Fig. 2, および Fig. 3 に示した. 至適 pH および温度は, それぞれ 5.0 および 55°C であった. また, pH 5.0–6.0 および 55°C 以下にて安定であった. しかし, 30% sorbitol 中では, 60°C においても 90% 以上の残存活性を有していた. 本酵素は *Klebsiella pneumoniae* の生産するプ

Fig. 4. HPLC analysis of hydrolyzates of pullulan by BSP.

3% of pullulan (pH 5.0) was incubated with BSP (2 u/g pullulan) at 40°C. Reaction products were analyzed using HPLC under the following condition. Column, Aminex HPX-42A; temperature, 85°C; solvent, water; detector, RI.

ルランナーゼ¹⁰⁾よりも耐熱、耐酸性に優れていた。

Bacillus cereus var. *mycoides* や *Bacillus acidopullulyticus* の生産するプルランナーゼは SH-酵素であると報告されている^{11,12)}。データは示さないが、BSP は Hg^{2+} , Ag^+ や *p*-chromo-mercuribenzoate (*p*-CMB) にて阻害され、*p*-CMB による阻害はシステインや β -mercaptoethanol などの還元剤にて活性は回復することから、本酵素も同様に SH-酵素であると推定された。

また、シクロデキストリン (α , γ -CD) にて BSP は阻害され、 γ -CD のほうが α -CD より本酵素に対する阻害は大きかった。

2) プルランに対する作用様式

Fig. 4, 5 に BSP をプルランに作用させた生成物の HPLC 分析, および P. p. c. 分析の結果を示した。反応初期にマルトトリオースおよびマルトトリオース単位が α -1,6 結合したと思われる一連のオリゴ糖が生産され、最終的にはほとんどマルトトリオースにまで分解された。エンド型に作用し、また最終生成物は分子内の α -1,6, α -1,4 結合をもつ 3 糖 (例えば、パノース, イソパノース) ではなく、 α -1,4 結合のみからなるマルトトリオースであり、このことは本酵素がプルラン中の α -1,6 結合に作用しているものと思われた。なお、Fig. 5 に示したペーパークロマトグラム中、4 糖と思われるスポットが検出された。プルラン中にはマルトテトラオース単位も存在することが報告されている¹³⁾が、検出された 4 糖の *R_f* 値はマルトテトラオースと異なり、 α -1,4 結合以外の結合も含んでいると思われる。この 4 糖については今後検討していきたい。

3) 基質特異性

α -1,6 結合を分子内に有する種々の多糖に対する BSP の相対速度, および K_m 値, V_{max} 値をそれぞれ、Table 4 に示した。これら多糖類の中で本酵素はプルランを最も速く水解し、プルランを 100% とした場合、アミロペクチンで 3.8~4.0%, グリコーゲンに対しては 1.7% であった。主に α -1,6 結合より成るデキストランに対しては作用しなかった。

BSP のアミロペクチンに対する K_m 値はプルランの約 10 倍であり、最大速度は約 1/10 であった。本酵素はマルトオリゴ糖 (DP 2, 3, 5) および、パノース, イソパノースには作用しなかった。また、多糖に対しては、*K. pneumoniae*, *B. acidopullulyticus*¹⁴⁾ の生産するプルランナーゼと同様にアミロペクチン, およびグリコーゲンよりもプルランに対して最もよく作用した。*Pseudomonas amyloclavata* の生産する枝切り酵素であるイソアミラーゼ¹⁵⁾は、プルランよりもアミロペクチンおよびグリコーゲンによく作用する。このことから本酵素はイソアミラーゼ・タイプの枝切り酵素ではなく、プルランナーゼ・タイプの枝切り酵素であると推定された。

現在までにプルランナーゼ生産菌として、*K. pneumoniae*¹⁰⁾, *Streptomyces* sp.¹⁶⁾, *B. cereus* var. *mycoides*¹¹⁾, *B. acidopullulyticus*¹²⁾ 等が報告されている。しかし、*Aspergillus niger* 起源のグルコアミラーゼによる澱粉のグルコース糖化に併用できる耐熱、耐酸性を有するプルランナーゼとしては現在まで *B. acidopullulyticus* の生産するプルランナーゼのみであった¹⁷⁾。*B. acidopulluly-*

Fig. 5. Paper chromatogram of the hydrolyzates of pullulan by BSP.

3% of pullulan was incubated with BSP (2 u/g pullulan) at pH 5.0, 40°C. P. p. c. was carried out with solvent system : 1-butanol : pyridine : water (6 : 4 : 3). Mal, standard of glucose and maltooligosaccharides (DP 2-7) ; Iso, standard of glucose and isomaltooligosaccharides (DP 2-5) ; Pan, standard of panose.

Table 4. Relative reaction rates and Michaelis constants of BSP on various polysaccharides.

Polysaccharides	Relative activity (%)	K_m (mg/ml)	V_{max} (μ mol/min/mg protein)
Pullulan	100	0.25	83
Soluble starch	6.7	—	—
Amylopectin (corn)	3.8	2.65	8.3
Amylopectin (potato)	4.0	2.60	9.6
Soluble waxy corn starch	13.5	—	—
Glycogen (oyster, type II)	1.7	3.00	3.5
Dextran (T 70)	0	—	—

The reaction mixture, containing 1 ml of substrate solution in 50 mM acetate buffer (pH 5.0) and 0.25 ml of enzyme solution, was incubated at 40°C for 10 min. The final concentration of substrate was 0.5%. The reducing sugar released was measured by the Somogyi-Nelson method.

*ticus*のプルラナーゼは2種存在し、等電点は5.0と5.2、分子量は115,000と116,000と報告されている¹⁴⁾。BSPは前述したように等電点4.7、分子量96,000であり、酵素蛋白としては明らかに異なる。しかし、基質特異性などについては違いが認められないことから、BSPもこの用途に十分使用できるものと思われた。

5. グルコアミラーゼによる澱粉糖化におけるプルラナーゼの添加効果

Asp. niger 起源のグルコアミラーゼ剤を用いた澱粉糖化における BSP の添加効果を検討した。pH、温度の影響をみた結果を Fig. 6 および Fig. 7 に示す。図に示したごとく、pH が4.5~4.7、温度が58~60°C 付近で最も目立ったグルコース増収効果が認められ、現在の糖化業界で一般的に使用されている *Asp. niger* 起源の

Fig. 6. Effect of pH on saccharification of starch by simultaneous addition of glucoamylase and BSP.

Substrate, 33% (w/w) of liquefied corn starch (DE 11); reaction condition, 60°C, 48 hr; glucoamylase dosage, 2.5 u/g DS; BSP dosage, 0 u/g DS (○—○), 0.1 u/g DS (●—●), 0.2 u/g DS (▲—▲).

グルコアミラーゼ剤に適した条件である pH 4.5, 60°C で十分使用可能なプルラーゼであると考ええる。

要 約

1) 土壌から分離した, プルラーゼ生産菌株を同定したところ, 新菌種と判定され, *Bacillus sectorramus* と命名した。

2) *Bacillus sectorramus* の培養液よりプルラーゼを硫酸塩析, 各種クロマトグラフィーにより分離精製を行い, 精製酵素を得た。比活性は 8.5 倍に上昇し, 電気泳動的に単一であった。

3) 分子量は約 96,000 と推定され, 等電点は 4.7 であった。プルランの分解様式から, 本酵素はプルラン中の α -1,6 結合をランダムに水解するエンド型であった。また, グリコーゲン, アミロペクチンよりもプルランを最も早く水解し, K_m 値も最も小さく, イソアミラーゼ型ではなくプルラーゼ型の枝切り酵素であると思われる。

4) グルコアミラーゼによる澱粉糖化における *Bacillus sectorramus* の生産するプルラーゼ添加効果について調べた結果, 通常に行われているグルコース製造の糖化条件である pH 4.5, 60°C 付近でも十分なグルコー

Fig. 7. Effect of temperature on saccharification of starch by simultaneous addition of glucoamylase and BSP.

Substrate, 33% (w/w) of liquefied corn starch (DE 11); reaction condition, pH 4.5, 48 hr; glucoamylase dosage, 2.5 u/g DS; BSP dosage, 0 u/g DS (○—○), 0.1 u/g DS (●—●), 0.2 u/g DS (▲—▲).

ス増収効果が認められ, 工業的に十分使用可能な酵素であった。

この研究を遂行するにあたり, 貴重なイソパノースを恵与していただいた東京農工大 坂野好幸先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) 原田篤也: 化学と工業, **35**, 788-799 (1982).
- 2) 森 茂治, 辻 廣二, 大矢隆一: 農化, **63**, 82 (1989).
- 3) T. GIBSON and R. E. GORDON: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, R. E. BUCHANAN and N. E. GIBBONS, 8th eds., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 529 (1974).
- 4) H. SAITO and K. MIURA: *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 619 (1963).
- 5) J. MARMUR and P. DOTY: *J. Mol. Biol.*, **5**, 109 (1962).
- 6) M. SOMOGYI: *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
- 7) O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 8) B. J. DAVIS: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
- 9) U. K. LAEMMLI: *Nature*, **227**, 680-685 (1970).

- 10) H. BENDER, J. LEHMAN and K. WALLENFELS :
Biochim. Biophys. Acta, **36**, 309 (1959).
- 11) Y. TAKASAKI : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1515, 1523
(1976).
- 12) B. E. NORMAN : *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **30**, 200-
211 (1983).
- 13) B. J. CATLEY : *FEBS Lett.*, **10**, 190 (1970).
- 14) S. KUSANO, N. NAGAHAMA, S. TAKAHASHI, D.
FUJIMOTO and Y. SAKANO : *Agric. Biol. Chem.*,
52, 2293-2298 (1988).
- 15) K. YOKOBAYASHI, H. AKAI, T. SUGIMOTO, M.
HIRAO, K. SUGIMOTO and T. HARADA : *Bio-
chim. Biophys. Acta*, **293**, 197-202 (1973).
- 16) M. YAGISAWA, K. KATO, Y. Koba and S. UEDA :
J. Ferment. Technol., **50**, 572-579 (1972).
- 17) 草山泰和 : フードケミカル, **7**, 87 (1986).

(平成 2 年 6 月 15 日受付, 平成 2 年 9 月 26 日受理)