耐熱性糖転移酵素生産菌の分離と同定

枝 広 知 新・山 本 晋 平*
(池田糖化工業<株>,*高知大学農学部)

平成 3 年 4 月 26 日受理

Isolation and Identification of Thermophilic Cyclodextrin Glucanotransferase-producing Microorganism

Synthesis of Stevioside Derivatives by Enzymatic Trausglycosylation (Part 2)

Tomoyoshi EDAHIRO and Shimpei YAMAMOTO*

(Ikeda Tokka Industries Co., Ltd., 95-1 Minooki-cho, Fukuyama-shi, Hiroshima

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kochi University, Nankoku, Kochi)

Thermophilic microorganisms producing cyclomaltodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19) were isolated from various sources. A moderate thermophilic bacterium, isolated strain No. SE-4 was identified as *Bacillus stearothermophilus* from its morphological and physiological properties. The crude enzyme was most active at 75~80°C (pH 6.0) on starch, and the ratio of α -: β -: γ -cyclodextrin produced was 1.00 : 2.03 : 0.55. The major different properties between SE-4 and a typical strain of *B. stearothermophilus* are : (a) the isolate can not reduce nitrate ; and (b) produces acid from glycerol but not from methyl α -glucoside.

Key words : ステビオサイド・酵素的糖転移・耐熱性 CGT-ase

緒 言

Cyclomaltodextrin glucanotransferase (CGT-ase) は、古くから *Bacillus macerans* のアミラーゼ (BMA) として知られている^{1~6)}。また、*Bacillus circulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus megaterium*, Alkalophilic *Bacillus* sp. などのバチルス属細菌からも CGT-ase が得られることが判明している^{7~11)}。そしてこれらの細菌から得られる CGT-ase を利用して各種サイクロデキストリンや各種糖転移製品が生産されている¹²⁾。ステビオサイドの甘味を改良するための手段として用いられる糖転移反応もこの CGT-ase の一利用法である¹³⁾。筆者ら¹⁴⁾は BMA によるステビオサイドへの酵素的糖転移について論述した。しかし、BMA は、サイクロデキストリン分解活性およびオリゴ糖分子間での転移の不均衡化 (disproportionation) 作用が弱いことか

ら¹⁰⁾、糖転移作用が弱いものと考えられた。また、50~60°C の作用温度では雑菌による汚染を受けやすい欠点がある。

そこで、耐熱性 CGT-ase 生産菌を自然界に求めて検索した。その結果、*Bacillus stearothermophilus* SE-4 株を得ることができた。

実験材料および方法

1. 菌株の分離

(1) 一次スクリーニング 分離用培地として、可溶性でん粉 1%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, NaCl 0.1%, CaCO_3 0.1%, 酵母エキス 0.1%, 寒天 2.5%, (pH 7.0) からなる培地を用いた。土壌 0.5 g を滅菌水 100 ml に懸濁し、上澄液 0.1 ml を分離用培地に接種し、60°C で培養した。生じた集落の中から肉眼的に異なると思われたものを分離した。でん粉分解の有無は、分離用寒天培地に生育した集落付近のヨウ素-でん粉反応によって判定した。

酵素的糖転移によるステビオサイド誘導体の合成 (第2報)

(2) 二次スクリーニング CGT-ase 生産用培地として、可溶性でん粉 1%, コーンステープリカー 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%, CaCO_3 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, NaCl 0.1%, pH 7.0 からなる液体培地にて、55°C, 15 時間振とう培養した。その培養濾液を酵素液として CGT-ase 活性の有無を確認した。

2. CGT-ase 活性の確認試験

培養濾液 0.2 ml を酵素液として、0.02 M 塩化カルシウムを含む 0.1 M 酢酸緩衝液、pH 5.8 の 1% 可溶性でん粉溶液 2.5 ml に加え、80°C, 1 時間反応させた。反応後、トリクロロエチレン 1 ml を加えて激しく混合し、氷水中に静置した後生成されたサイクロデキストリンがトリクロロエチレンとの包接化合物を形成し、白濁することで CGT-ase の活性を確認した¹⁵⁾。

3. CGT-ase の活性測定方法

0.02 M 塩化カルシウムを含む 0.1 M 酢酸緩衝液、pH 5.8 の 1% 可溶性でん粉溶液 0.5 ml に適当に希釈した酵素液 0.5 ml を加え、80°C, 10 分間反応させた。水 5 ml を加えて冷却し、直ちに 1 M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 3.0) 1 ml を加えて反応を停止させ、さらにこの液に 0.01 M ヨウ素・0.25 M ヨウ化カリウム溶液 1 ml を加えて発色させ、660 nm の吸光度を測定した。この測定条件にて 660 nm の吸光度を 1 分間に 10% 減少させる酵素量を 1 単位とした。

4. サイクロデキストリンの分析方法

α -, β -, γ -の各サイクロデキストリンは、高速液体クロマトグラフィーによって定量した¹⁶⁾。測定条件は：カラム, Hibar-NH₂ (ϕ 4×250 mm)；溶媒, アセトニトリル/水=70/30；流速, 1 ml/min；検出器, 東ソー製示差屈折計によった。サンプルの調製は、次のごとく行った。アミロース 20 mg を水 1.5 ml に溶解し、0.02 M 塩化カルシウムを含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.8) 0.3 ml を加えた後、培養濾液を酵素液として 0.3 ml 加えて 80°C, 90 分間反応させた。反応後、沸騰水中で 10 分間保ち酵素を失活させた。この溶液にグルコアミラーゼ溶液 (生化学工業製グルコアミラーゼ 20 mg を 10 ml の 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解させた溶液) 0.2 ml を加えて 50°C, 30 分間反応させた後沸騰水中で 10 分間保ち酵素を失活させた。この溶液の 20 μ l を用いて高速液体クロマトグラフィーで分析した。

5. 試薬類

培養に使用する可溶性でん粉は、半井化学製一級試薬を用いた。活性測定に使用する可溶性でん粉は、メルク社製特級試薬を使用した。 α -, β -, γ -の各サイクロデキストリンの標準品は林原生物化学研究所製を使用した。

6. 菌株の同定

SE-4 株の菌学的性質の試験は、米国細菌学会微生物試験マニュアル¹⁷⁾によった。また、同定にあたっては、Bergey's Manual 第 7 版¹⁸⁾, 第 8 版¹⁹⁾に従って同定した。

実験結果

1. 耐熱性 CGT-ase 生産菌の検索

土壌中から、60°C で生育し、しかも、でん粉を分解する微生物 8 株を分離した。このうち、4 株について CGT-ase を生産することが確認された。Table 1 に分離した 4 菌株について、CGT-ase の生産量、酵素の耐熱性の程度、CGT-ase によって生産されるサイクロデキストリンの種類と割合を示す。この 4 菌株の中から、培養液中の酵素の生産が 220~450 U/ml と高く、生産されるサイクロデキストリンが β -タイプで他の菌株と異なる特徴があり、しかも、酵素の耐熱性が最も高い SE-4 株を研究対象として選定した。

2. SE-4 株の分類学性質

SE-4 株の形態学的性質、生理学的性質、炭水化物からの酸の生成や抗生物質に対する感受性などの諸性質を、Fig. 1 および Table 2, 3, 4, 5 に示す。

3. SE-4 株の同定

Bergey's Manual 第 7 版¹⁸⁾, 第 8 版¹⁹⁾に従って SE-4 株の同定を行った。

Family の決定

SE-4 株は、細胞は単一、acid-fast でなく、stalk がない。グラム陽性の桿菌で内生孢子を形成することから、Bacillaceae であると判定した。

属の決定

好気性でカタラーゼを生成することから、*Bacillus* と判定した。

種の決定

Bacillus 属 48 種について SE-4 株との類似性を Bergey's Manual に記載されている形態学的性質および生理学的性質について比較した。SE-4 株は、*B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. brevis*

Table 1 CGT-ase Activity and Formation of Cyclodextrin by the Isolated Strains.

Strain No.	CGT-ase		Ratio of CDs formed $\alpha : \beta : \gamma$
	Activity (U/ml of culture filtrate)	Heat stability	
SE-1	60~120	~75°C	1.00 : 0.92 : 0.41
-2	60~120	~75°C	1.00 : 0.89 : 0.42
-3	60~120	~75°C	1.00 : 1.06 : 0.47
-4	220~450	~80°C	1.00 : 2.03 : 0.55

Fig. 1 Electron Microphotograph of SE-4 Strain Cells ($\times 5,000$).

Table 2 Morphological and Cultural Characteristics of the SE-4 Strain.

Morphological characteristics	
Shape	Rods, rounded ends, occurring singly, in pairs and irregular masses
Size	0.8~1.2 $\times$ 1.6~3.6 μ m
Motility	Motile
Flagellum	Peritrichous distribution
Gram strain	Positive
Acid-fast	Negative
Spores (Position)	Non-projecting
(Size)	1.0~1.4 $\times$ 1.2~1.5 μ m
(Shape)	Ovoid, subterminal
Capsules	Capsulate
Culture characteristics	
Colony on agar	Moderate growth at 55°C, 12~24 hrs, circular, convex, entire or irregular, smooth, luster, light gray or light yellow, no chromogenesis in the medium
Broth	Moderate growth at 55°C, 12~24 hrs, turbid, no pellicle, sediment, no ring
Gelatin stab	Growth at 55°C, turbid after 10 days in 12% gelatin medium but no liquefaction
Litmus milk	Slight coagulation, reduction of litmus, turning blue to red
BCP milk	Slight coagulation, slightly acidic

などとの類似性が高い。しかし、SE-4 株は 65°C にも生育することから、*B. circulans*, *B. coagulans*, *B. brevis* などではないと判定した。SE-4 株と *B. stearothermophilus* ATCC 12980 とは、硝酸塩の還元性、アセトインの生成、 α -メチルグルコシドからの酸の生成

Table 3 Physiological Properties of the SE-4 Strain.

Action on nitrates	
Nitrate salt-meat extract medium	—
Succinate-nitrate salt medium	—
Denitrification (Komagata <i>et al.</i> ²⁰⁾)	—
Methyl red test	+
Voges-Proskauer test	—
O-F test	Aerobic, oxidative
Relation to free oxygen	Strictly aerobic
Formation of indole	—
Production of hydrogen sulfide	+
Production of ammonia	+
Formation of acetoin	—
Formation of dihydroxyacetone	—
Hydrolyzation of starch	+
Utilization of citrate	
Simmon's medium	—
Christensen's medium	—
Utilization of inorganic nitrogen	
NaNO ₃	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	—
Production of oxydase	+
Production of catalase	+
Production of urease	—
Cultivation with Sabouraud-dextrose medium	
Agar medium	—
Liquid medium	—
0.02% Sodium azide tolerance	—
NaCl tolerance (2% NaCl agar)	±
(2% NaCl liquid)	—
Lysozyme tolerance (0.01%)	—
Temperature in nutrient broth	Maximum : 70°C Optimum : 55°C Minimum : 40°C
pH range for growth	5 to 9

Table 4 Acid Formation from Carbohydrates by the SE-4 Strain.

Carbohydrate	Acid formation	Carbohydrate	Acid formation
Arabinose	—	Sorbitol	—
Xylose	—	Mannitol	—
Glucose	+	Inositol	—
Mannose	+	Glycerol	+
Fructose	+	Salicin	—
Galactose	—	Methyl α -glucoside	—
Lactose	—	Inulin	+
Maltose	+	Dextrin	+
Sucrose	+	Starch	+
Trehalose	+	Cellulose	—
Raffinose	—		

No gas produced in any case.

において差が認められるが、非常によく一致していることが確認された。この結果から、SE-4 株は、*B. stearothermophilus* の新菌株であると判定され、*B. stearothermophilus* SE-4 と命名した。

Table 5 Growth Inhibition of the SE-4 Strain by Antibiotics.

Antibiotics	Inhibition zone diameter (mm)	Antibiotics	Inhibition zone diameter (mm)
Ampicillin	23.8	Cefmetazole	16.3
Benzylpenicillin	17.3	Tetracycline	16.0
Cloxacillin	18.7	Minocycline	17.3
Sulbenicillin	18.3	Lincomycin	9.8
Piperacillin	18.3	Chloramphenicol	7.3
Erythromycin	8.3	Gentamicin	11.3
Kitasamycin	8.3	Kanamycin	8.8
Oleandomycin	3.3	Amikacin	9.0
Cefaloridine	21.8	Colistin	0
Cefazolin	20.0	Nalidixic acid	0

考 察

土壌中から、60℃で生育し、しかも、でん粉に作用してサイクロデキストリンを合成する CGT-ase を生産する微生物 4 株を分離した。この 4 菌株について、CGT-ase の生産量、酵素の耐熱性の程度、CGT-ase によって生産されるサイクロデキストリンの種類と割合を検討して、特徴的な SE-4 株を研究対象として選定した。次いで、SE-4 株の菌学的性質を調べ、分類学上の位置について検討し、本菌株を *Bacillus stearothermophilus* と同定した。本菌株は多量の CGT-ase を生産した。本 CGT-ase の最適温度は 75~80℃、生産されるサイクロデキストリンの主成分は β -タイプであった。CGT-ase は、*B. macerans* の酵素が古くから有名であった。しかし、近年、いろいろな CGT-ase 生産菌が知られるようになり、でん粉からの生産物によって、 α -、 β -、 γ -サイクロデキストリン合成酵素に分類されるようになった¹²⁾。耐熱性 CGT-ase 生産菌として、すでに *B. stearothermophilus* TC-60 が報告されている¹¹⁾。しかし、TC-60 の CGT-ase が主に α -サイクロデキストリンを生産するのに対し、SE-4 では主に β -サイクロデキストリンを生産することで大きく異なっている。一方、菌学的性質に関しては TC-60 の詳細な性質が報告されていないため、SE-4 の性質と比較することが困難であるが、TC-60 の細胞は、大きさが 0.5~1.3~10 μ であるのに対し、SE-4 は 0.8~1.2~1.6~3.6 μ で、SE-4 よりやや細長い。胞子は TC-60 の大きさが 1~1.2~1.5~2.2 μ であり、SE-4 の 1.0~1.4~1.2~1.5 μ よりやや大きい。生理学的性質については、TC-60 はゼラチンを加水分解するが、SE-4 は分解しない。 β -サイクロデキストリンを合成する CGT-ase 生産菌は、いずれも *Bacillus* 属であるが、65℃で生育できる中等度好熱菌による報告はなされていない。これらの検討結果か

ら、SE-4 株は、これまでに報告されていないタイプの耐熱性 CGT-ase を生産する微生物であると考えられる。

要 約

1. 土壌中から、60℃で生育し、しかも、でん粉に作用してサイクロデキストリンを合成する CGT-ase を生産する微生物 SE-4 株を分離した。
2. SE-4 株の菌学的性質を調べ、分類学上の位置について検討し、*Bacillus stearothermophilus* と同定した。
3. SE-4 株の培養濾液中に生産された CGT-ase は、最適温度 75~80℃で、生産するサイクロデキストリンは主に β -タイプであった。これらの結果から、SE-4 株は、これまでに報告されていないタイプの耐熱性 CGT-ase を生産する微生物であると考えられる。

文 献

- 1) E. B. TILDEN and C. S. HUDSON: *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 2900 (1939)
- 2) E. B. TILDEN and C. S. HUDSON: *J. Bacteriol.*, **43**, 527 (1942)
- 3) D. FRENCH, J. PAZUR, M. L. LEVINE and E. NORBERG: *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3145 (1948)
- 4) J. A. DEPINTO and L. L. CAMPBELL: *Biochemistry*, **7**, 114 (1968)
- 5) J. A. DEPINTO and L. L. CAMPBELL: *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 253 (1968)
- 6) D. FRENCH, M. L. LEVINE, J. H. PAZUR and E. NORBERG: *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 353 (1949)
- 7) S. KITAHATA, N. TSUYAMA and S. OKADA: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 387 (1974)
- 8) S. KITAHATA and S. OKADA: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2185 (1975)
- 9) N. NAKAMURA and K. HORIKOSHI: *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 935 (1976)
- 10) S. KITAHATA and S. OKADA: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **29**, 13 (1982)
- 11) 塩坂 誠：特許公開，昭 50-63189 (1975)，特許公告，昭 53-27791 (1978)
- 12) 岡田茂孝：バイオサイエンスとインダストリー，**48**, 431 (1990)
- 13) 笠井良次，金田 宣，田中 治，山崎和男，坂本征則，森本一義，岡田茂孝，北畑寿美雄，古川秀子：日本化学会誌，726 (1981)
- 14) 枝広知新，山本智平：醸協，86，(3) 215 (1991)
- 15) S. OKADA, N. TSUYAMA and S. KITAHATA: *Amylase Symposium, Japan*, **7**, 61 (1972)
- 16) S. KITAHATA, S. YOSHIKAWA and S. OKADA: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **25**, 19 (1978)
- 17) Society of American Bacteriologists: Man-

- nual of Microbiological Methods, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York (1957)
- 18) R. S. BREED, E. G. D. MURRAY and N. R. SMITH: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th Edition, The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1957)
- 19) R. E. BUHANAN and V. E. GIBBONS: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th Edition, The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974)
- 20) K. KOMAGATA, H. IIZUKA and M. TAKAHASHI: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 11, 191 (1965)
-