放線菌キシラナーゼによる種々のキシランと キシロオリゴ糖の分解について*

日下部功, 安井恒男, 小林達吉
(東京教育大学農学部木材糖化研究施設)

昭和 52 年 1 月 10 日 受 理

The Action of the *Streptomyces* Xylanase on Various Xylans and Xylooligosaccharides (Studies on Xylanase System of *Streptomyces* Part VIII)

By Isao KUSAKABE, Tsuneo YASUI and Tatsuyoshi KOBAYASHI
Laboratory of Wood Hydrolysis and Fermentation, Faculty of Agriculture,
Tokyo University of Education, Komaba-cho, Meguro-ku, Tokyo

In this report, the difference of digestibility and the hydrolysis products on various xylans by the purified xylanase from *Streptomyces* sp. E-86, and the mode of action of the enzyme on insoluble xylan (hardwood) and xylooligosaccharides were described.

When the enzyme acted on xylan which was only composed of xylose residue such as hardwood and cotton seeds xylans, the extent of maximum hydrolysis was higher than that of arabinoxylans from corncobs, and the hydrolysis products mainly consisted of xylose and xylobiose. In the case of the arabinoxylans, main products were similarly xylose and xylobiose, but an appreciable amount of unknown pento-oligosaccharides was also observed on paper chromatography.

The course of hydrolysis of the insoluble xylan by this enzyme was presumed as follows; xylan $\rightarrow$ xylotriase $\rightarrow$ xyloetraose $\rightarrow$ xylobiose $\rightarrow$ xylopentaose $\rightarrow$ xylohexaose $\rightarrow$ xylobiose $\rightarrow$ xylotriase $\rightarrow$ xylose $\rightarrow$ xylobiose $\rightarrow$ xylose $\rightarrow$ xylose $\rightarrow$ xylobiose.

When xylotriase was used as substrate, only xylobiose, but not detectable amount of xylose even in the initial stage of hydrolysis, was detected. When xylooligosaccharides from tetraose to hexaose were hydrolyzed, xylotriase was preferentially accumulated, accompanied with lower xylooligosaccharides than substrates used. In the final stage of reaction, these intermediary products were able to be hydrolyzed to xylose and xylobiose, and the ratio of xylobiose to xylose reached to 1.3~1.4. The enzyme possessed the weak activity against xylobiose and converted it into xylose. (Received January 10, 1977)

緒 言

既に報告したように⁽¹⁻³⁾, 分離菌および既知株を含む数多くの放線菌キシラナーゼによって, 中性糖としてキシロースのみから成る広葉樹不溶性キシランを分解した場合, 反応初期には数種のキシロオリゴ糖の生成がみられるが, 終段階での主産物はすべてキシロースとキシロ

ビオースであった。また, *Streptomyces xylophagus* nov. sp. の精製キシラナーゼによるキシラン分解の様相と分解主産物も著者らと類似した結果を報告している⁽⁴⁾。一方, 天然物のアラビノキシランの場合には, アラビノースを含む数種のキシロオリゴ糖が少量生成されたが, 放線菌酵素による種々のキシランの分解主産物はキシロースとキシロビオースであった⁽⁵⁾。これらの性質は放線菌酵素の特性であって, 他の微生物起源の酵素とは性質を異にしているように思われる。このように, 放線菌酵

* *Streptomyces* 属の Xylanase 系に関する研究 (第 8 報)。

素によるキシラン分解の主産物はよく知られているが、基質特異性やキシランの分解過程の詳細についてはよくわかっていない。

この報告では、*Streptomyces* sp. E-86 の精製キシラーゼによる種々のキシランの分解様相と分解産物の比較、さらに不溶性キシランや数種のキシロオリゴ糖分解の定量的な追跡結果を基にして、不溶性キシランからキシロースとキシロビオースの生成過程を推測した結果について報告する。

実験材料および方法

1. 酵素 *Streptomyces* sp. E-86 の培養液⁽²⁾ から前報⁽⁴⁾のごとく精製し、ゲル濾過法、超遠心分析法ならびにディスク電気泳動法で単一蛋白とみなしうる標品を用いた。活性の測定方法は既報の方法⁽⁷⁾に従った。

2. キシラン

a. Corn hull アラビノキシラン : corn hull (合同酒精株式会社より恵与された) を水に漬け、100°C で約 30 分間加熱した後水洗し、その含水固形物に終濃度 6% になるように NaOH 溶液を加えてアラビノキシランを抽出した。抽出液を酢酸で中和し、アルコールを加えて生じたアラビノキシランの沈殿をセロファン膜につめ、透析し、凍結乾燥して調製した。

b. Corncobs アラビノキシラン : O'Dwyer⁽⁸⁾ および Whistler ら⁽⁹⁾の方法に準じて hemicellulose A および hemicellulose B を調製した。おのおののキシロース/アラビノースの比率 (Xyl/Ara 比) は 17.5 および 6.3 であった。また Xyl/Ara 比 12.0 のアラビノキシランは山陽国策パルプ株式会社より恵与された。

c. 綿実殻キシラン (cotton seeds xylan) : 日本パルプ株式会社より恵与された。

d. クラフトパルプキシラン (kraft pulp xylan) : 山陽国策パルプ株式会社より恵与された。

e. 不溶性キシラン (insoluble xylan) : このキシランは既報と同様のもので、著者らがキシロビオース⁽²⁾やキシロオリゴ糖⁽³⁾の調製に用いたものと同標品である。

3. キシロオリゴ糖 不溶性キシランから既報^(2,8)のごとく調製した。

4. 糖のペーパークロマトグラフィー (PPC) 東洋濾紙 No. 51 を用い、*n*-ブタノール : ピリジン : 水 (6 : 4 : 3) の溶媒系で、上昇法により 1 または 2 回展開し、発色剤として α -アニシジン塩酸塩を用いた。

5. 糖の定量 酵素反応後遠心分離 (キシランの反応液の場合のみ)、その上澄の糖濃度を定量した。全還元糖 (全糖) は 4% 硫酸、100°C、2 時間加水分解し、中和後、また直接還元糖 (直糖) は水解せずにおのおのソモギー法⁽¹⁰⁾で定量し、いずれもキシロースとして表示した。ガスクロマトグラフィー (GLC) による糖の定量は、単糖類については、後に述べる方法に従って加水分解した後、Borchardt ら⁽¹¹⁾の方法で、またキシロオリゴ糖の分別定量は神山ら⁽¹²⁾の方法で行った。さらに PPC によるキシロオリゴ糖の定量は、同一試料を濾紙片で展開し、一片を発色させて糖の分布状態を知り、他紙片のこれに相当する部分を切り取り、水で抽出した後、オルシン法⁽¹³⁾で定量する方法を用いた。

6. 糖の平均重合度、キシランの加水分解率および可溶化率 全糖/直糖を平均重合度 (D.P.) とした。キ

Table I. Component Sugars of Various Xylans

Xylan	Neutral sugar components (%)							Xyl/Ara (ratio)
	Rham	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu	Other sugars	
Corn hull arabinoxylan	0.1	22.8	60.3	0	7.4	9.4	0.1	2.6
Corncobs arabinoxylan (hemicellulose B)	0	13.1	82.6	0	1.4	2.9	0	6.3
Corncobs arabinoxylan	0	7.7	92.3	0	0	trace	0	12.0
Corncobs arabinoxylan (hemicellulose A)	0	5.4	94.6	0	0	trace	0	17.5
Cotton seeds xylan	trace	0	100.0	0	0	0	0	
Kraft pulp xylan (hardwood)	0	0	100.0	0	0	0	0	
Insoluble xylan (from mercerization process)	0	0	100.0	0	0	trace	0	

Rham : rhamnose, Ara : arabinose, Xyl : xylose, Man : mannose, Gal : galactose, Glu : glucose.

To 250mg of xylan was added 3.5ml of 72% H_2SO_4 , and the knead mixture was held at 30°C for 30 min. The solution was diluted with water to bring the acid content to 4% and held at 100°C for 2.5 hr. Then it was neutralized with $BaCO_3$ and filtered. The amount of monosaccharides in the filtrate was determined by Gas-liquid chromatography⁽¹⁴⁾.

シランの加水分解率 (degree of hydrolysis, %) は、用いたキシランの全キシロース換算量に対し、可溶化された直糖の百分率を以て、またキシランの可溶化率 (xylan solubilized, %) は、用いたキシランの全キシロース換算量に対し、可溶化された全糖の百分率を以ておのおの表わした。

実験結果

1. 抽出キシランの酵素分解

放線菌キシラナーゼは不溶性キシランの可溶化力が強く、分解主産物はキシロースとキシロビオースであったが、この実験は給源や調製方法の異なった数種のキシランの可溶化率や分解産物が、不溶性キシランとどのような相違があるかを比較検討する目的で行った。なお、以後の説明では、キシロース、キシロビオース、キシロトリオース…などを X_1, X_2, X_3 …などの略号で示した。

a. 抽出キシランの構成糖：キシラン粉末 250mg を乳鉢に採り、72%硫酸でぬり、泥状にした後、水を加え、酸濃度を4%に調整し、100°Cで2時間30分加水分解した。加水分解液を $BaCO_3$ で中和し、濾過した後、濾液の糖をアルディールアセテート誘導体にし、GLC⁽¹¹⁾ で中性糖の定量を行った。その結果を Table I に示したが、給源や調製方法の違いにより、構成糖や糖比 (Xyl/Ara 比) に差があり、広葉樹や綿実殻などから得られたキシランは中性糖としては X_1 のみから成っていた。corncobs キシランにはアラビノースが含まれており (以下、アラビノキシランと呼ぶ)、Xyl/Ara 比が 6.3, 12.0, 17.5 のものがえられた。また corn hull アラビノキシランの Xyl/Ara 比は 2.6 であり、これは他のものと異なっていた。なお、上述のキシランの硫酸加水分解物の PPC では、いずれのキシランにもウロン酸と思われるスポットが検出されたが、綿実殻キシランと corn hull アラビノキシランは、定性的に見てその含量が多少高いように観察された (未発表)。

b. 酵素による抽出キシランの分解：anhydroxylose として 1200mg、水 8ml および緩衝液 (pH 5.7) 10ml を L 字管に採り、酵素液 2ml (993 units, 純キシラナーゼ蛋白として約 3.9mg) を加え、55°C で反応を行った。その結果を Fig. 1 に示した。まずキシランの分解率 (Fig. 1-A) は、反応末期 (36hr) では不溶性キシラン、クラフトパルプキシランおよび綿実殻キシランが高く、アラビノキシラン (破線で表示) では、Xyl/Ara 比

Fig. 1. Time Course of Enzymatic Hydrolysis of Various Xylans.

A : Degree of hydrolysis (direct reducing sugar in supernatant/total reducing sugar in original sample).

B : Xylan solubilized (total reducing sugar in supernatant/total reducing sugar in original sample).

C : Average degree of polymerization of supernatant (D. P.).

The composition of reaction mixture was. 1200mg of xylan (anhydroxylose), 8ml of water and 10ml of McIlvaine buffer solution of pH 5.7. After preincubation, 2ml of purified enzyme (993 units) was added to the reaction mixture and incubated at 55°C on a Monod shaker continually. An aliquot of reaction mixture was withdrawn in 1, 3, 6, 12, 24 and 36 hr, and centrifuged to remove remaining xylan. The amount of direct reducing sugar in the supernatant was determined by Somogyi's method⁽¹⁰⁾ using D-xylene as reference standard. The amount of total reducing sugar was determined by the same method after hydrolysis with 4% H_2SO_4 at 100°C for 2 hr.

---○--- corn hull arabinoxylan, ---△--- corncobs arabinoxylan (Xyl/Ara ratio=6.3), ---□--- corncobs arabinoxylan (Xyl/Ara ratio=12.0), ---◇--- corncobs arabinoxylan (Xyl/Ara ratio=17.5), ---●--- cotton seeds xylan, ---○--- kraft pulp xylan, ---●--- insoluble xylan.

Fig. 2. Paper Chromatograms of Enzymatic Hydrolysates from Various Xylans.

The samples of the experiment described in the legend of Fig.1 were spotted on No.51 filter paper (TÔYÔ ROSHI Co.). The paper was developed twice by ascending method using the solvent system of *n*-butylalcohol:pyridine:water (6:4:3). *p*-Anisidine hydrochloride was used as spray to reveal the position of sugar on the chromatograms.

A; corncocks arabinoxylan (Xyl/Ara=6.3), B; corncocks arabinoxylan (Xyl/Ara=12.0), C; corncocks arabinoxylan (Xyl/Ara=17.5), D; cotton seeds xylan, E; kraft pulp xylan, F; insoluble xylan.

S: authentic samples, X₁: xylose, A₁: arabinose, G₁: glucose, X₂: xylobiose, X₃: xylotriose, X₄: xylotetraose, X₅: xylopentaose, X₆: xylohexaose.

の値が小さい(アラビノース含量が高い)ほど分解率が低下することが判明した。また corn hull アラビノキシランの分解率は約 16% で、他に比して非常に低かつ

たが、この構造は corncocks アラビノキシランの構造とはかなり異なっているものと思われた。他方糖の平均重合度(D.P.)は、Xyl/Ara 比の値が小さいものほど反応

初期から末期まで高かった (Fig.1-C). 一方キシランの可溶化率 (Fig.1-B) は, Xyl/Ara 比の値が大きいものほど可溶化され難く, corn hull アラビノキシランや hemicellulose B のように Xyl/Ara 比の値が小さいキシランでは, 酵素反応の前にすでに約 80% 以上も水に可溶であった.

c. 分解生成物: Fig.2 に分解生成物の PPC を示した (corn hull アラビノキシランの酵素水解物は tailing が著しく, PPC による分離は不可能であった). その結果, すべてのキシランについて, 分解主産物は終始 X_1 と X_2 であることがわかった. 不溶性キシラン, クラフトパルプキシラン, 綿実殻キシランなどはほとんど X_1 と X_2 であったが, 綿実殻キシランでは X_5 に相当する未知の糖のスポットが検出された. 他方アラビノキシランでは, X_1 と X_2 以外の糖も著量に生成され, その生成量は Xyl/Ara 比の値が小さいものほど, 定性的には多いようにみうけられた. なお, グルコースの Rf 値に相当する糖の発色は, ペントースの色調 (紅色) であり, グルコースではなかった (キシラン各標品中のグルコース成分は非常に少ない. Table I).

2. 不溶性キシランの分解

該酵素によるどのキシランの分解主産物も X_1 と X_2 であったが, まず, 不溶性キシランから, どのような段階を経て X_1 と X_2 が蓄積されるのかを明らかにするために, 反応の初期から終段階に至るまでの生成物の蓄積推移を追跡した.

a. 比較的低い酵素濃度での分解: 不溶性キシラン 71.4mg (anhydroxylose として, 50.0mg), 水 2ml および緩衝液 (pH 5.7) 2ml を L 字管に採り, 酵素液 1ml (反応終濃度は 2.26 units/ml) を加え, 45°C で反応を行った. その結果を Fig.3 に示した. まず, 反応開始後 (1分) のオリゴ糖の蓄積量は, $X_3 > X_4 > X_2 > X_5 + X_6$ の序列であったが, 15分後では $X_3 > X_2 > X_4 > X_5 + X_6 > X_1$ となり, 時間の経過とともに X_2 の生成量が増加し, 60分後では $X_2 > X_3 > X_4 > X_1$, さらに8時間後では $X_2 > X_3 > X_1 > X_4$ であった (Fig.3-B). 反応液上澄の D.P. の経時変化は, 反応直後は高かったが, その後急激に低下し, 15分後は約 8.5 で, それ以後は徐々に低下する傾向にあり, 8時間後では約 2.5 であった (Fig.3-A).

b. 比較的高い酵素濃度での分解: 反応液の組成および条件は, 上記 a の実験と同じであるが, 反応液中の

Fig. 3. Time Course of Hydrolysis of Insoluble Xylan on Relatively Low Concentration of Enzyme (2.26 units/ml of reaction mixture).

A: Degree of hydrolysis, xylan solubilized, average degree of polymerization (D.P.).

B: Xylosaccharides produced.

Reaction mixture consisted of 71.4mg of xylan (50.0mg as anhydroxylose), 2ml of water, 2ml of buffer solution and 1ml of enzyme solution (11.3 units). Reaction was carried out at 45°C under pH 5.7 for the time period in this figure, and after that, the mixture was heated in boiling water bath for 15min. After removal of remained xylan by centrifugal settling, reducing sugars in the supernatant were determined by Somogyi's method. On the other hand, a certain amount of the supernatant was spotted on paper strip and paper-chromatographed. A half of the paper strip was developed as guide strip in order to obtain a location of xylosaccharides. Each sugar on chromatogram was extracted with distilled water for overnight at room temperature and was determined by orcinol-ferric chloride reaction.⁽¹³⁾

Symbols of this figure-A; —○— degree of hydrolysis and amount of direct reducing sugar, —●— xylan solubilized and amount of total reducing sugar, —×— average degree of polymerization.

Symbols of this figure-B; —●— xylose, —○— xylobiose, —■— xylotriose, —△— xylotetraose, —△— xylopentaose plus xylhexaose.

Fig. 4. Time Course of Hydrolysis of Insoluble Xylan in Relatively High Concentration of Enzyme (138 units/ml of reaction mixture).

A : Degree of hydrolysis, xylan solubilized, average degree of polymerization (D.P.).

B : Xylosaccharides produced.

Reaction mixture consisted of 71.4 mg of xylan, 1 ml of water, 2 ml of buffer solution and 2 ml of enzyme solution (690 units). Enzyme reactions and assay of sugars were carried out as described in the legend of Fig. 3.

Symbols of this figure-A; —○— degree of hydrolysis and amount of direct reducing sugars, —●— xylan solubilized and amount of total reducing sugar, —□— average degree of polymerization.

Symbols of this figure-B; —●— xylose, —○— xylobiose, —■— xylotriose, —□— xylotetraose~xylohexaose.

酵素終濃度は 138 units/ml of reaction mixture とした。酵素濃度を基準にすれば上述の実験 (a, Fig. 3) の約 60 倍である。Fig. 4 にその結果を示したが、反応直後 (5 分) は $X_2 > X_3 > X_4 \sim X_5 > X_1$ であったが、 X_3 と $X_4 \sim X_5$ の減少に伴って X_2 と X_1 が増加し、8 または 24 時間後には X_3 は検出されなかった。 X_2/X_1 比 (重量比) は、反応後 60 分では約 2.5 であったが、その後しだいに減少し、48 および 72 時間後ではおのおの 1.2 および 0.9 で、ほぼ 1 となった (Fig. 4-B)。また D.P. も時間とともに減少し、72 時間後の D.P. は 1.33 であった (Fig. 4-A)。

c. キシランの酵素分解液の再分解: 前述の実験 b (Fig. 4) で得たキシラン分解液について、さらに酵素濃

Fig. 5. Time Course of Enzymatic Hydrolysis of Insoluble-xylan Hydrolyzate (1530 units/ml of reaction mixture).

A : Degree of hydrolysis, average degree of polymerization (D.P.).

B : Xylose and xylooligosaccharides produced.

Preparation of insoluble xylan hydrolyzate; the reaction mixture was consisted of 235.6 mg of insoluble xylan (200 mg as anhydroxylose), 10 ml of water, 2 ml of buffer solution (pH 5.7) and 8 ml of enzyme solution (2760 units). Reaction was carried out at 45°C for 72 hr. Following that, the mixture was heated in boiling water bath 15 min. After filtration, 10 ml of filtrate was concentrated under reduced pressure to 2 ml.

Hydrolysis of the hydrolyzate; the reaction mixture was consisted of 2 ml of the hydrolyzate and 8 ml of enzyme solution (15,300 units). Reaction was carried out at 45°C under pH 5.7. Assay of sugars was carried out as described in the legend of Fig. 3.

Symbols of this figure-A; —○— degree of hydrolysis, —□— average degree of polymerization.

Symbols of this figure-B; —●— xylose, —○— xylobiose, —■— xylotriose~xylohexaose.

度を高め、再分解を行った。基質溶液の調製は Fig. 4 と同一条件で、72 時間酵素反応を行った後、加熱して酵素を失活させ、ろ過した濾液 10 ml を 2 ml まで濃縮した。反応液の組成は、濃縮液 2 ml に酵素液 8 ml (15,300 units) からなり、酵素濃度を基準にすれば Fig. 4 での実験の約 11 倍である。酵素反応の結果は、Fig. 5 のとおりであったが、 X_2 の減少とともに X_1 が増加し、120 時間後の X_1/X_2 は約 9:1 であった。またこの実験の PPC は Fig. 6 に示されている。なお、 $X_5 \sim X_6$ 付近に 2 種のスポット

Fig. 6. Paper Chromatograms of Enzymatic Hydrolysis of Insoluble Xylan Hydrolyzate.

The samples in this figure correspond to ones in Fig. 5. S: authentic xylosaccharides from xylose to xylohexaose. See footnotes for Fig. 2.

が検出されたが、このおのおのを、PPC から抽出し、次いで抽出液を酸水解した後、再度 PPC で展開・発色した結果、これらの糖はいずれも X_1 とグルクロン酸と思われる糖から構成されていたため、グルクロン酸を含むオリゴ糖と推定した(未発表)。

3. キシロオリゴ糖の酵素分解

上述のように、不溶性キシランの酵素分解では、反応初期に数種のオリゴ糖が生成され、生成されたオリゴ糖は再分解され、しだいに X_1 と X_2 が蓄積されることが明らかとなった。そこで、数種の個々のキシロオリゴ糖について、反応の初期から終段階に至るまでの分解生成物の蓄積の様相を観察した。これらの結果から、不溶性キシランの分解過程で生成した各オリゴ糖は、どのような分解過程を経て X_1 と X_2 になるかを推測するために、次の実験を行った。

a. 比較的低い酵素濃度でのキシロオリゴ糖の分解： $X_3 \sim X_6$ (各 200mg) をそれぞれ水 16ml と緩衝液 2ml からなる液に溶解し、酵素液 2ml (15units) を加え(酵素

Fig. 7. Degradation Products from Enzymatic Hydrolysis of Several Xylooligosaccharides (0.75 units/ml of reaction mixture).

The reaction mixture consisted of 200mg of oligosaccharides such as xylotriase, xyloetraose, xylopentaose or xylohexaose, 16ml of water and 2ml of buffer solution (pH 5.7). After pre-heated at 45°C for 15 min, 2ml of enzyme solution (15 units) was added to the reaction mixture. The mixture was held at 45°C for the time indicated in this figure, and then quickly heated in boiling water for 10 min, followed by determination of hydrolysis products using gas-liquid chromatography⁽¹²⁾.

* See footnotes for Fig. 2.

■; hydrolysis product, □; substrate.

終濃度は 0.75 units/ml of reaction mixture), 45°C で反応を行った。生成物は GLC⁽¹²⁾ で定量し、生成物の量は X_2 (1 とする) に対する重量比で表示した (Fig. 7)。反応の初期ではいずれの基質からも X_1 の生成はほとんどなく、また X_3 からの生成物はほとんど X_2 のみで、 $X_4 \sim X_6$ では X_3 の生成量が X_2 よりも多く、 X_6 からは特に X_3 の生成量が多かった。また反応末期(24時間)では、その蓄積物の大部分は X_2 であった。なお反応の

Table II. Degradation Products from Enzymatic Hydrolysis of Several Xylooligosaccharides (100 units/reaction mixture)

Reaction time		a) Substrate					
		X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	E.P.H.
Average degree of polymerization	1 min	2.09	1.91	1.90	2.06	1.98	2.28
	5 min	2.05	1.84	1.84	1.89	1.91	2.10
	15 min	2.05	1.73	1.76	1.82	1.79	1.94
	60 min	2.04	1.71	1.69	1.72	1.69	1.80
	6 hr	2.00	1.63	1.65	1.67	1.64	1.72
	24 hr	1.79	1.54	1.53	1.58	1.54	1.61
	48 hr	1.65	1.44	1.49	1.47	1.45	1.52
X ₂ /X ₁ (weight ratio)	1 min	—	3.76	4.47	7.99	5.12	6.35
	5 min	—	3.43	4.49	5.03	4.28	4.70
	15 min	—	3.37	4.21	4.83	4.19	3.97
	60 min	21.5	3.24	3.78	3.75	3.81	4.12
	6 hr	12.0	2.55	3.19	3.14	3.02	3.32
	24 hr	4.46	1.93	2.20	2.00	1.97	2.10
	48 hr	2.18	1.33	1.39	1.39	1.35	1.37
X ₃ /X ₁ (weight ratio)	1 min	—	0.64	0.42	2.49	1.13	2.76
	5 min	—	0.29	0.33	0.78	0.73	1.02
	15 min	—	0.11	0.25	0.27	0.48	0.34

a) See footnotes for Fig. 2. E.P.H.; enzymatic partial-hydrolyzate of insoluble xylan.

The composition of the reaction mixture was the same as described in the legend of Fig. 7, exclusive of enzyme concentration. Two ml (2000 units) of enzyme solution was added to the reaction mixture. At 1, 5, 15, 60 min and 6, 24, 48 hr after the beginning of incubation at 45°C, aliquots of the reaction mixture were withdrawn and applied on filter paper strips. The paper strips were then chromatographed. The sugars were determined by the same as described in the legend of Fig. 3.

進行中, 用いた基質よりも D.P. の大きいオリゴ糖が PPC で微量観察されたが (定量できるほどではなかった), 24 時間後では検出されなかった。

b. 比較的高い酵素濃度でのキシロオリゴ糖の分解: 上述の実験 a (Fig. 7) と同じ基質濃度および反応条件で, 酵素量を 2000 units 加えて反応を行った (酵素濃度は 100 unit/ml of reaction mixture). その結果を Table II に示した。なお, キシラン分解液の調製は, 前報⁽⁹⁾の方法に従い, オリゴ糖の生成・蓄積する条件, すなわち 69°C, 1 時間 40 分で反応を行った。この結果, 反応初期 (1~15 分) では X₂ が多少検出されたが, その後の生成物はいずれの基質からの生成物も X₁ と X₂ であり, さらに反応末期での X₂/X₁ 比は 1.32~1.39 となり (X₂ を基質とした場合を除いて), D.P. は 1.44~1.52 であった。この反応液の PPC では, 反応の進行中に転移生成物は検出されなかった。

考 察

既に報告したように, キシラナーゼによるキシラン分解の主産物についてはよく知られているが, 基質特異性やキシラン分解の様相, 性質の異なったキシランからの分解生成物の比較などに関する情報はほとんどない。他

方キシランについては, 給源や調製方法によって物理的・化学的に性質の異なったキシランが得られることは古くから知られているが, アラビノキシランのアラビノース結合の周辺の微細な構造については不明な点が多い。したがって, 分解の様相や生成物の構造を検討することによって, アラビノキシランの構造に関して何らかの知見をうる事が可能であり, また酵素の分解特性に関しても新知見をうる事が可能と思われる。このような観点から酵素と基質の両面から研究を進めている。

まず, 給源や調製方法の異なった数種のキシランの構成糖比を比較した。その結果, corn hull アラビノキシランの Xyl/Ara 比の値は他のアラビノキシランと比較すれば特に小さく (2.6), この比のみから比較すれば, 辻阪ら⁽¹⁴⁾によって調製された稲わら (3.4) 大豆種皮 (2.7), 燈心草 (3.2), トウモロコシ穂軸 (2.8) などのキシランならびに NBC (Nutritional Biochemical Co., Cleveland, Ohio) 社製市販キシラン (2.6) などに性質が類似しているものと思われる。

次に数種のキシラン (Table I) について, 酵素分解の様相ならびに分解生成物の比較検討を行った。その結果, アラビノース含量が高いキシランは溶解性が高いが, 分解率は低く (D.P. の値が大きい), 逆にアラビノ

ース含量が少ない(純キシランに近い)キシランは溶解性は低い分解率が高い(D.P. の値が小さい)という結果を得た。このことは、Xyl/Ara 比の値が小さいキシランは水に溶けやすいが、アラビノース周辺の結合が水解され難いため、アラビノースを含むキシロオリゴ糖の形で酵素反応は停止したものと推定した。これは Xyl/Ara 比の値が小さいキシランでは、 X_1 と X_2 以外に他のオリゴ糖の生成量が多いが、キシロースのみから成るキシランではほとんど X_1 と X_2 であった結果 (Fig. 2) と一致している。なお、広葉樹と綿実殻キシランはキシロースのみから成っているが、後者の分解液の D.P. は幾分高かった。これは X_5 付近に相当するスポットの糖が多いためと思われ、この糖はウロン酸を含むオリゴ糖と推定される。

最後に不溶性キシランから X_1 と X_2 の生成経過について考察を試みる。不溶性キシランの分解における反応初期から終期に至る生成物の移行様相は次のように観察された。キシラン $\rightarrow X_3 > X_4 > X_2 > X_5 + X_6 \rightarrow X_3 > X_2 > X_4 > X_5 + X_6 > X_1$ を経て、生成された高分子オリゴ糖はしだいに分解され、 $X_2 > X_3 > X_4 > X_1 \rightarrow X_2 > X_3 > X_1 > X_4$ となる。前報でも述べたように、 X_4 の分解は非常に速いが X_3 の分解は比較的遅いため⁽⁶⁾、 $X_2 > X_3 > X_1$ となり、さらに X_2 の分解は非常に遅いため、 $X_2 > X_1$ を経て $X_2 \rightleftharpoons X_1$ となった。また酵素濃度が非常に高い場合には X_2 も分解され、 $X_1 > X_2$ となった。以上の結果を整理すれば、Fig. 8 のように要約されよう。したがって、著者らが既に報告した研究では、不溶性キシランからのキシロオリゴ糖の調製^(a)は Fig. 8 の Step I で反応を停止させたものであり、またキシロビオースの調製^(b)は

Step III で反応を停止させたものといえよう。なお、該酵素は極端に高濃度であれば X_2 も分解した (Fig. 5, 6) が、使用した酵素はゲル濾過法、超遠心分析法およびデキスタ電気泳動法で単一蛋白とみなしえる標品であるが、 X_2 の分解が混在酵素で行われているかどうかの確証はない。 X_2 の分解速度が余りにも遅いため、 X_2 と X_3 のおのおのの分解についての酵素的性質の差異の検討は現在のところ行っていない。また、比較的低い酵素濃度で X_3 を分解した場合、反応初期から中期では (Fig. 7)、分解生成物がほとんど X_2 で、 X_1 の生成が非常に少ないということは、転移反応を伴いながら水解が進行していることを示すものと考えられる。その他のオリゴ糖の分解でも、反応初期では X_1 の生成が非常に少ないので、上と同様のことが考えられる。したがって、おのおののキシロオリゴ糖について、どの結合部位が水解され易いかは、この実験結果からは結論できない。

要 約

Streptomyces sp. E-86 の精製キシラナーゼを用い、構成糖やその比の異なる数種のキシランの分解様相と分解産物の比較、さらに不溶性キシランや数種のキシロオリゴ糖の分解生成物の蓄積量を経時的に追跡し、次の結果を得た (キシロース, キシロビオース, キシロトリオース……などを、 X_1, X_2, X_3 ……などの略号で表わす)。

(1) X_1 含量の高いキシランは、アラビノキシランに比較して分解率は高く、また加水分解物の平均重合度も低く、かつ、分解産物はほとんど X_1 と X_2 であった。他方アラビノキシランでは、アラビノース含量が高いものほど可溶化率は高いが、分解率は低く、また平均重合度も高かった。さらに分解主産物は X_1 と X_2 であったが、これら以外の糖も著量に生成され、その量はアラビノース含量の高いものほど多くなる傾向にあった。

(2) 不溶性キシランの分解は次のように進行するものと推察した。キシラン $\rightarrow X_3 > X_4 > X_2 > X_5 > X_6 \rightarrow X_2 > X_3 > X_1 \rightarrow X_2 \rightleftharpoons X_1 \rightarrow X_1 > X_2$ 。

(3) $X_3 \sim X_6$ の初期分解産物は、 X_3 からは $X_2, X_4 \sim X_6$ のおのおのの基質では X_3 の生成量が多く、 X_3 の量は X_6 から特に多かった。また反応終期での分解産物は、いずれの基質でも X_1 と X_2 であった。なお、該酵素は、速度は非常に遅いが、 X_2 を分解し、 X_1 を生成した。

Fig. 8. Proposed Degradation Pattern of Insoluble Xylan by *Streptomyces* Xylanase.

X_1 refers to xylose. $X_2 \sim X_n$ refer to (1→4)-linked xylose saccharides.

本研究の遂行に際し、キシランを恵与された日本パルプ株式会社、山陽国策パルプ株式会社ならびに corn hull を恵与された合同酒精株式会社に感謝いたします。本研究の概要は昭和50年5月日本農芸化学会関東支部第261例会（東京教育大学）で講演発表した。

- (1) 日下部功, 安井恒男, 小林達吉: 農化, **43**, 145 (1969).
- (2) I. Kusakabe, T. Yasui and T. Kobayashi: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 1355 (1975).
- (3) 日下部功, 安井恒男, 小林達吉: 農化, **49**, 383 (1975).
- (4) H. Iizuka and T. Kawaminami: *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 520 (1965).
- (5) 日下部功, 安井恒男, 小林達吉: 農化, **50**, 199 (1976).
- (6) 日下部功, 安井恒男, 小林達吉: 農化, **51**, 429 (1977).
- (7) 日下部功, 安井恒男, 小林達吉: 醸工, **53**, 135 (1975).
- (8) M. H. O'Dwyer: *Biochem. J.*, **20**, 657 (1926).
- (9) R. L. Whistler, I. Bachrach and D. R. Bowman: *Arch. Biochem.*, **19**, 25 (1948).
- (10) M. Somogyi: *J. Biol. Chem.*, **160**, 61 (1945).
- (11) L. G. Borchardt and C. V. Piper: *Tappi*, **53**, 257 (1970).
- (12) Y. Kamiyama and Y. Sakai: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 2385 (1974).
- (13) W. R. Fernell and H. K. King: *Analyst*, **78**, 80 (1953).
- (14) 辻阪好夫, 竹西繁行, 福本寿一郎: 農化, **45**, 253 (1971).