大豆炭水化物の酵素的分解に関する研究

(第1報) *Bacillus subtilis* No. 17 のヘミセルラーゼの
精製と性質

木内 幹*・太田輝夫*・藤家宏子*・海老根英雄*

Studies on Enzymatic Hydrolysis of Soybean Polysaccharides

Part I. Purification and properties of hemicellulase
from *Bacillus subtilis* No. 17

KAN KIUCHI, TERUO OHTA, HIROKO FUJIE and HIDEO EBINE

The bacteria which produced the enzyme hydrolysing soybean carbohydrates, were screened and identified as *Bacillus subtilis* sp. The enzyme of this strain was partially purified by DEAE-Sephadex A-50 and Sephadex G-100. The characteristics of the enzymes of *B. subtilis* No. 17 were as follows; The optimum temperature is 37°C, optimum pH is 4.5 to 6.0. The enzyme was stable at less than 37°C, about 60% of the initial enzyme activity remained after it kept 20 hours at pH 6.0. The enzymatic hydrolysate fractionated on Sephadex G-15 column did not contain galactose or arabinose, but the fractions hydrolysed by 1.0 N HCl constituted from galactose and arabinose.

(Received July 12, 1972)

大豆蛋白質を広く利用するためにその炭水化物を除去することは、食品工業において重要な工程である。しかしながら脱脂大豆から蛋白質を抽出、濃縮する際に不溶性炭水化物を酵素的に分解することによって蛋白質の抽出を容易に効率よく行なうことは、大豆の炭水化物を構成する多糖類の種類が多く、かなり複雑な構造を有しているために、むずかしい問題である。

最近菊地ら^{1,2)}は *Aspergillus sojae* の生産する酵素を用いて、大豆細胞壁多糖類の 60% を分解した。一方、多糖類の構造については森田ら^{3)~5)}、ASPINALL^{6)~11)} によってその一部が明らかにされ、福本とその共同研究者^{12)~15)} は酵素を用いて植物性炭水化物を水解するために、すでに、mannanase, mannosidase, xylosidase, galactanase などの hemicellulase を見出している。その中で橋本ら¹⁴⁾は *Rhizopus niveus* の galactanase によってコーヒー豆のガラクトンを処理し、不溶性のアラビノガラクトンを水解することを指摘した。

著者らは脱脂大豆粉から蛋白質を抽出する際に多糖類を酵素的に水解することによって蛋白質の抽出効率を上げるために、分解酵素生産菌を検索中であるが、その中に *Bacillus* に属する 1 菌株がその多糖類の一部を効率よく水解することを見出した。この報告では上記 1 株の生産する酵素の精製と性質並びにその水解物の分析結果について述べる。

実験方法

1. 基質の調製

大豆の炭水化物は脱脂大豆粉（昭和産業製 30 メッシュ以上）を 20 倍量の 0.2% 苛性ソーダで処理し、遠心分離して蛋白質を除去した。ついで 20 倍量の 0.2% 苛性ソーダで 2 回洗浄後、純水で中性になるまで洗浄した。この操作で得られた炭水化物は凍結乾燥後粉碎して実験に使用した。

2. 供試菌株の分離

* 農林省食品総合研究所（江東区塩浜 1-4-12）

* National Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, Koto-ku, Tokyo.

土壌・動物の糞・堆肥から分離した菌株と保存菌株併せて約 1000 株の中から、最も明瞭な透明環を生じたものを数株選択した。すなわち、常法に従って上記の基質 0.1%, フィトン (BBL 製) 1%, 酵母エキス (Difco 製) 0.1%, 寒天 1.5%, pH 7.0 の平板培地上で周囲に透明環を生じたコロニーを同じ組成の斜面培地に移植した。能登半島の土壌から分離した (No. 17 株) B-17 株はその中の 1 株である。

3. 菌株の同定

分離菌株の菌学的性質の検討ならびに同定は *Aerobic Sporeforming Bacteria*¹⁸⁾ と *Bergey's manual of Determinative Bacteriology* (7 訂版)¹⁷⁾ に従った。

4. 酵素活性の測定

炭水化物 100 mg, 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 5 ml および酵素液に純水を加えて 10 ml とし、インキュベーター (MN-1 型, 大洋物産 KK 製) で 37°C, 3 時間振

盪 (148 rpm) しながら反応させたのちソモギー法¹⁸⁾¹⁹⁾ で生成した還元糖を測定した。この条件でグルコース 10 μ g に相当する量の還元糖を生成する酵素量を 1 単位とし、25 単位に相当する量の酵素を反応液中に加えた。

5. 蛋白量の測定

蛋白質濃度は Warburg and Christian の方法²⁰⁾ で測定した。

6. 糖の分析法

還元糖量の測定はソモギー法を用いた。酵素水解物は Sephadex G-15 のカラムを用いて純水で溶出し、分画後、ブタノール:ピリジン:水 (6:4:3, V/V)²¹⁾ の溶媒系で東洋ろ紙 No. 51 で 2 回展開した。酵素水解物の構成糖は酢酸エチル:酢酸:ギ酸:水 (18:3:1:4) の溶媒系で東洋ろ紙 No. 51 で 3 回展開した。発色剤にはジフェニルアミン試薬またはアルカリ性硝酸銀を用いた。

Table 1. Characteristics of Strain No. 17

A. Morphological characteristics	
Form	Straight rods
Size	0.5×1.6~2.5 μ
Motility	Motile
Flagella Staining	Peritrichous
Gram Staining	Positive
Sporangia	Not Swollen
Spores	0.5×0.7 μ , central to terminal
B. Cultural characteristics	
Nutrient Agar Slants	Growth abundant, opaque, rough, cream white to brownish white
Nutrient Broth	Non-turbidic, Flocculant sediment, membranous
Glucose Nutrient Agar Slant	Growth abundant, rugose pale yellow
NaCl Broth	Good growth in 7% NaCl; Growth at 10%
Tyrosine Agar Slants	Growth same as on nutrient agar
Utilization of Citrate	Positive
Soybean Agar Slants	Growth more abundant than on nutrient agar, brownish white
Glucose Nitrate Agar Slants	Scanty growth
Glucose Asparagine Agar Slant	Moderate growth
C. Biochemical Characteristics	
Acetylmethyl carbinol Production	Positive
Gelatin Hydrolysis	Positive
Starch Hydrolysis	Positive
Nitrate Reduction	Positive
Anaerobic Production of Gas from Nitrate	Negative
Anaerobic Growth in Glucose Broth	Scanty Growth, pH 6.0 at 14 days
Potato	Growth heavy, blackened
D. Temperature	
Growth at 20° to 55°C. Optimum growth at 37°C	

実験結果および考察

1. 菌株の同定

顕著な透明環を生成し、ヘミセルラーゼ生成能の強力な B-17 株は好気性の周毛を有する運動性の桿菌 ($0.5 \times 1.6 \sim 2.5 \mu$) で、グラム陽性である。芽胞を形成するが、Sporangia は膨張しない。7% の食塩存在下で生育し、澱粉分解能を有し、硝酸塩を還元する。嫌気的条件下では生育が悪く、生育後 14 日目の培地の pH は 6.0 であった。また硝酸塩を含むアルカリ性の嫌気性培地でガスを発生しない。普通寒天培地上では白色のシワ状のコロニーを生じ、ゲラチンを液化し、クエン酸を資化する。以上の諸点からこの菌株は *Bacillus subtilis* に属するものと同定した。Table 1 に菌学的性質をまとめて示す。

2. 菌株の培養

培地 (フィトン 1%, 酵母エキス 0.1%, pH 7.0) 1 l を、5 l のイボツキフラスコに分注殺菌し、30°C、12~14 時間振盪培養した。なお、種菌は 500 ml 容坂口フラスコに 100 ml の同じ培地を加え、1 白金耳接種し、30°C 24 時間培養したものを培養液量の 1/100 量接種とした。

3. 酵素の分離・精製

培養液より遠心分離によって菌体を除去し上澄液 1 l を 0.9 飽和まで硫酸を加え、沈澱物を集めて 0.03 M リン酸塩緩衝液 pH 6.5 に懸濁させたのち、同じ緩衝液

Fig. 1. Chromatogram of crude enzyme on DEAE-Sephadex A-50 column.

About 13mg of protein was loaded on a column (1.3×59 cm) after equilibrated with 0.03 M phosphate buffer (pH 6.5). The enzyme was eluted with linear gradient of 0.0 to 0.4 M sodium chloride.

●—● protein; ○—○ activity.

で 4°C で一夜透析した。透析後、沈澱物を遠心して除去し、上澄液を粗酵素液とした。この粗酵素液をコロージオンバッグで濃縮したのち、DEAE-Sephadex A-50 クロマトグラフィーおよび Sephadex G-100 のゲル濾過によって酵素の精製を行なった。DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーはあらかじめ 0.03 M リン酸塩緩衝液 (pH 6.5) で平衡化したカラム (1.3×59 cm) に酵素を吸着し、流速 20 ml/hr, 各分画 10 ml に調節し、0~0.4 M NaCl を含む 0.03 M リン酸塩緩衝液溶液で直線的に gradient elution を行なった。その結果を第 1 図に示す。活性は 0.03~0.1 M 食塩濃度の区分にピークが得られ 0.1~0.4 M の溶出区分にはみられなかった。

活性の高い画分 (No. 3~9) を集めてコロージオンバッグで濃縮し、その酵素液を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) 中で Sephadex G-100 のカラム (1.0×53 cm) を用いてゲル濾過を行なった。3 ml ずつ分画を行ない、流速を 10 ml/hr に調整した。活性は No. 8~16 の画分にみられた。(第 2 図) ついて Sephadex G-100 の同じカラムを用いて No. 9~12 画分を濃縮し、同様に再度溶出した結果、単一のピークが得られた (第 3 図)。No. 10~12 の分画を合せて -20°C で凍結保存した。この液を酵素液として以下の実験に用いた。

4. 最適温度

酵素の最適温度は 10 分間各温度に preincubation し

Fig. 2. First chromatogram of partially purified enzyme on Sephadex G-100 column

Fraction No. 3~9 (Fig. 1) were combined and concentrated with collodion bag and applied on Sephadex G-100 column (1.0×53 cm) equilibrated with 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5). Elution was carried out with the same buffer.

Fig. 3. The Second chromatogram on Sephadex G-100 column.

Fraction No. 91~2 (Fig. 2) were combined and concentrated with collodion bag and refractionated. The column and the buffer are the same as Fig. 2.

Fig. 4. Effect of temperature on enzyme activity
The reaction mixture contained about 25 units of enzyme.

たのち、温度勾配培養装置(TN-3型、東洋科学産業製、65 rpm)を用い、10~65°Cにおいて測定した。第4図に示すように 37°Cにおいて最大の活性を示し、この活性を 100% とすると 29°C および 43°C で約 50% であった。

5. 最適 pH

第5図に酵素に及ぼす pH の効果を示す。pH は 0.2M McIlvaine 緩衝液で pH 3.5~7.0 に調整した。最大の活性は pH 4.5~6.0 の広い範囲にみられた。

6. 熱安定性

0.1M リン酸塩緩衝液 (pH 6.0) 中で 30~65°C にそ

Fig. 5. Effect of pH on enzyme activity.

Fig. 6. Effect of temperature on stability of enzyme.

れぞれ 10 分間処理したのち、急冷し残存活性を測定した。その結果第6図に示すごとく 37°C までは安定であったが、それ以上の温度では急激に失活し、65°C では残存活性は認められなかった。

7. 酵素の安定性におよぼす pH の影響

Sephadex G-100 カラムの分画で得られた酵素液をローゾンバック中で 30 倍容の 0.001M McIlvaine 緩衝液 (pH 6.5) を加えて 3 時間透析したのち、pH 4.0~8.0 の 0.02M McIlvaine 緩衝液で 10 倍に希釈して 20°C に 20 時間保持したのち、酵素液とし、0.2M の酢酸緩衝液 (pH 5.5) を用いて酵素活性を測定した (第7図)。

8. 酵素水解物の分析

炭水化物 5g に約 25 単位/ml の酵素液 10ml, 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 250ml, 純水 240ml を添加し、37°C, 3 時間反応させ、未だ不溶性の炭水化物を遠心分

Fig. 7. Effect of pH on enzyme stability
After enzyme solutions in 0.02 M McIlvanine's buffers (pH 4.0~8.0) adjusted to various pH values were kept at 20°C for 20 hours, the reaction mixture was incubated at 37°C for 3 hours.

離して除去したのち、上澄部に等量のエタノールを添加して沈澱した物質を遠心除去し、50°C で減圧濃縮した。

第8図に示すように濃縮液を純水で平衡にした Sephadex G-15 のカラム (1.3×101 cm) で、各フラクションを 3 ml になるように調整して分画し、各分画についてペーパークロマトグラフィーにより還元糖を検出した。その結果を第8, 9図に示す。このクロマトグラフによれば No. 23~28, No. 26~29, No. 29~31 分画に R_f の異なる3種の水解物が認められた。ついで、No. 25, No. 28, No. 31 分画を新たに展開し、それぞれの Spot を下降法によって水抽出したのち、N塩酸で、120°C, 2時間分解して MB-3 (日本オルガノ商会製) 処理で塩酸を除去したのち、その構成糖を東洋ろ紙

Fig. 8. Column chromatogram G-15 of the enzymatic hydrolysate on Sephadex.

About 500 mg of enzymatic hydrolysate was loaded on a column (1.3×101 cm) and eluted with pure water. The arrow shows the peak of blue dextran eluted.

No. 51 を使用してペーパークロマトグラフィーで調べた (第10図)。その結果いずれのスポットもガラクトースとアラビノースから構成されていることが明らかとなった。酵素によって水解された糖の中に、ガラクトース、アラビノースのモノマーが見出されないのに対し、Sephadex G-15 のカラムを用いて分画した糖を塩酸で水解して、ペーパークロマトグラフで展開し、検出するとガラクトース、アラビノースのモノマーのみが認められるので、Sephadex G-15 で分画される3種の糖は、ガラクトースとアラビノースから構成される少糖類であ

Fig. 9. Paper chromatogram of the oligosaccharides fractionated on Sephadex G-15 in a hydrolysate of soybean carbohydrate by the enzyme.

Fraction number were the same as indicated in Fig. 8.

Fig. 10. Paper chromatogram of sugars obtained hydrolysis by 1.0*N* hydrochloric acid of the oligosaccharides fractionated as shown in Fig. 9.

Fraction number were the same as shown in Fig. 8. and Fig. 9. 28 (1) and 28 (2) respectively showed the spots with higher and lower *R_f* of spot No. 28 in Fig. 9.

と思われる。この酵素は大豆炭水化物中のアラビノガラクトタンあるいはそれに類似する多糖類の加水分解酵素であると推定される。EMI ら²²⁾は植物の細胞壁のヘミセルロースの構造を明らかにする目的で大豆の水溶性アラビノガラクトタンを基質にして *Bacillus subtilis* の分泌するアラビノガラクタナーゼを見出した。EMI et al. の酵素生産菌と *B. subtilis* 17 株は同菌種であるが、前者の酵素と B-17 の酵素は最適 pH が前者の 6.0 に対して後者では 4.5~6.0 と比較的広い範囲を示し、また前者の最適温度が 55°C に対して、後者では 37°C である。これらの点から B-17 株の酵素は EMI らのそれとは相異なる酵素と思われる。

要 約

大豆炭水化物分解酵素を生産する菌株を検索した結果、細菌の中に生産菌を見出し *Bacillus subtilis* と同定した。この菌株によって菌体外に生産される酵素を DEAE-Sephadex A-50 と Sephadex G-100 によって部分的に精製した。この酵素の最適温度は、37°C、最適 pH は 4.5~6.0 であり、37°C 以下で安定である。また pH 6.0、20°C、20 時間放置したところ、初発活性の約 60% が残存していた。酵素の水解物を Sephadex G-15 カラムで分画したが、ガラクトース、アラビノースのモノマーは見出されなかった。しかし塩酸分解し、ペーパークロマトグラフィーで検出したところ酵素水解によって生成された少糖類はいずれもガラクトースとアラビノースから構成されていた。

終りに本実験を行なうにあたり終始有益な御指導を賜った農林省食糧研究所所長渡辺篤二博士に厚くお礼申し上げます。また、菌株の同定に対し御指導いただいた東京大学駒形和男博士に深謝いたします。そして実験を手伝っていただいた鈴木達郎氏にも深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 菊地忠昭・石井茂孝・福島男児・横塚 保：農化，**45**，228 (1971).
- 2) 菊地忠昭・石井茂孝・福島男児・横塚 保：農化，**45**，235 (1971).
- 3) MORITA, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 564 (1965).
- 4) MORITA, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 626 (1965).
- 5) MORITA, M., OKUHARA, M., KIKUCHI, T. and SAKURAI, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 314 (1967).
- 6) ASPINALL, G. O. and WHYTE, J. N. C.: *J. Chem. Soc. (c)*, p. 5058 (1964).
- 7) ASPINALL, G. O., HUNT, K. and MORRISON, I. M.: *J. Chem. Soc. (c)*, p. 1945 (1966).
- 8) ASPINALL, G. O., et al.: *J. Chem. Soc. (c)*, p. 1065 (1967).
- 9) ASPINALL, G. O., COTTRELL, I. W., EGAN, S. V., MORRISON, I. M. and WHYTE, J. N. C.: *J. Chem. Soc. (c)*, p. 1071 (1967).
- 10) ASPINALL, G. O., HUNT, K., and MORRISON, I. M.: *J. Chem. Soc. (c)*, p. 1080 (1967).
- 11) ASPINALL, G. O. and COTTRELL, I. W.: *Canad. J. Chem.*, **49**, 1020 (1971).
- 12) 橋本揚之助・福本寿一郎：農化，**43**，317 (1969).
- 13) 橋本揚之助・福本寿一郎：農化，**43**，564 (1969).
- 14) 橋本揚之助・辻阪好夫・福本寿一郎：農化誌，**43**，831 (1969).
- 15) 福本寿一郎・辻阪好夫・竹西繁行：農化誌，**44**，447 (1970).
- 16) SMITH, N. R., GORDON, E. R. and CLARK, F. E.: *Aerobic Sporeforming Bacteria*, (U. S. Department of Agriculture) (1952).
- 17) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7th ed.) (The Williams and Wilkins Co.) (1957).
- 18) SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.* **195**, 19 (1952).
- 19) SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.*, **160**, 61 (1945).
- 20) WARBURG, O. and CHRISTIAN, W.: *Biochem. Z.* **310**, 384 (1941).
- 21) HOUGH, L. and JONES, J. K. N.: *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Academic Press) (1962).
- 22) EMI, S., FUKUMOTO, J. and YAMAMOTO, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1891 (1971).

(昭和47年7月12日受理)