レバン分解酵素の研究

(第2報) 放線菌酵素の精製と性質

津村 信蔵*・牧野 重英**

Studies on Microbial Levanase

Part II. Purification and properties of the enzyme from *Streptomyces griseus*

NOBUZO TSUMURA and SHIGEHIDE MAKINO

An enzyme levanase (levan depolymerase) from a strain of *Streptomyces griseus* was purified. The enzyme in cultivation broth was concentrated about 300 times through the treatments such as DEAE-Sephadex adsorption, salting out with ammonium sulphate and gel filtration with Biogel. Purity of the enzyme was certified from the results of polyacrylamide-gel electrophoresis and sedimentation pattern of ultracentrifuge.

The optimum reaction temperature was about 50°C and the enzyme was stable at temperatures under 50°C. pH optimum of the reaction was observed to be at 6.5 and pH stability was found at pH 6-8. The enzyme was reactive on levan produced by *B. subtilis*, but not on sucrose, raffinose, inulin and dextran. The enzyme reaction was inhibited by the presence of the materials such as pCMB, Cu, Ni, Mn, and Zn ions, especially by pCMB and Cu. On the other hand, the presence of Mg ion was found to activate the reaction.

Michaelis constant was calculated as 0.0073 g/ml. Molecular weight of the enzyme estimated by gel filtration was 45000 and its sedimentation coefficient ($S_{20,w}$) was calculated to be 4.75S.

(Received May 26, 1973)

レバンは主として β -2,6 結合よりなるフルクタンで *Bacillus* 属や *Streptococcus* 属の細菌などにより生成されることが知られている¹⁾²⁾⁸⁾。レバンは砂糖工業における精製工程に支障を与える粘質物の成分であるといわれ⁴⁾⁸⁾、また果実のカンヅメ中にも存在するとされている。レバンを加水的に分解する酵素すなわち levandepolymerizing enzyme も各種の細菌や糸状菌が分泌することが知られているが放線菌についての報告は少ない⁶⁾⁷⁾⁸⁾。著者らはさきにレバン分解酵素の実用化を目的として土壤微生物などよりスクリーニングを行ない多数のレバン分解酵素活性株を得て、その中より放線菌の一菌株につき酵素生産のための培養条件などにつき検討した⁹⁾。本報告では培養液より酵素を分離・精製し、その特性を調べた結果について述べる。

試料および実験方法

1. レバン

培地成分および基質として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 株の生産するレバンを用いた。レバンはシステイン・カルバゾール・硫酸法にてそのフラクトース当量を求め、使用量や濃度などはフラクトース当量で表示した。生産菌の培養液からレバンを分離・精製する方法は第1報⁹⁾による。

2. 酵素生産菌株と培養法

放線菌 No. SbI-7 株を用いた。本菌株は菌学的検査の結果、*Streptomyces griseus* と同定された。

脱脂大豆粉アルカリ分解物 (0.5 N 水酸化ナトリウムに脱脂大豆粉を分散させ、120°C にて 15 分間処理し放

* 農林省食品総合研究所 (東京都江東区)

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

** 日研化学株式会社 (埼玉県大宮市)

Nikken Chemicals Co., Ltd. Ōmiya, Saitama.

冷後、塩酸にて中和)を大豆粉量として1.0%, リン酸一カリウム0.1%, 酵母エキス0.1%, レバン0.4%の割合で純水中に加えてpH 7に修正し, 500 ml 坂口フラスコに150 ml 分注して120°C, 15分間滅菌した。これに寒天斜面に生育した菌体を植付け37°Cにて3日間振とう培養した。

3. 酵素の分離精製法

第1図に示した順序に従って分離・精製を行なった。すなわち培養液を遠心分離して菌体を除き, pH 7, 0.05 M リン酸緩衝液にて平衡化したDEAE-Sephadex A-50のカラムを通過させ, 吸着した酵素をpH 7, 0.05 M リン酸緩衝液中に塩化ナトリウムを0.5 M 含む液で溶離して濃縮酵素液を得た。これに0°Cにて硫酸アンモニウムを加え, 処理液100 ml につき70.6 g を飽和量として0.3 S の沈殿を除き0.5 S の沈殿を集めた。塩析物は少量の水に溶かして透析処理したのち, Bio Gel のP-150のカラム処理を2回行なって活性部分を集め, これを精製酵素液とした。

4. 酵素活性の測定法

レバンをpH 7, 0.01 M リン酸緩衝液に懸濁してフラクトース当量5%としたもの0.5 ml に, pH 7 に修

正した酵素液またはpH 7, 0.01 M リン酸緩衝液中に酵素を含有するもの0.5 ml を加え攪拌し, 40°C, 10分間反応させ, 約0.3 N 水酸化バリウム2 ml を加えて反応を止めた。これに水10 ml を加え, さらに中和当量の硫酸亜鉛溶液を加えて除蛋白処理を行ない沈殿を分別した液をSOMOGYI-NELSONの比色定量法¹⁰⁾にて還元糖値を測定した。

5. 蛋白質の定量法

銅-FOLIN 法¹¹⁾にてアルブミンを標準物質として測定した。

実験結果

1. 酵素の分離, 精製経過

第1表に示すごとく5 l の培養液遠心上澄より21%の収率で精製酵素液を得た。比活性は培養液遠心上澄に対して約300倍に上昇した。酵素濃度と生成還元糖値の関係は第2図のごとく原点を通る直線となる。したがってここでは実験方法4に述べた方法で測定し, 反応液中

第1図 酵素の分離・精製方法

第2図 反応液の酵素濃度と活性
反応条件: 基質濃度レバン 2.5%
pH 7 (0.01 M リン酸緩衝液)
40°C にて10分間反応

第1表 酵素の精製経過

方 法	液 量 (ml)	活 性 (unit/ml)	活性の合計		蛋白質 (mg/ml)	比 活 性	
			(unit)	(%)		(unit/prot.)	比 率
培 養 液	5,000	2.33	11,650	100	3.70	0.63	1
A-50 吸着溶離	815	12.42	10,120	87	3.10	4.01	6.4
硫 安 沈 殿	50	57.90	2,900	25	1.23	47.07	75
Bio Gel P-150 処理 (第1回)	56	47.88	2,680	23	0.37	129.41	205
Bio Gel P-150 処理 (第2回)	31	78.80	2,440	21	0.43	184.11	295

に還元糖をフラクトースとして 1 mg 生ぜしめる反応液中の酵素量を 1 unit とした。

2. 精製酵素の純度

(1) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

pH 7, 0.015 M のリン酸緩衝液濃度のゲルを 20 cm × 7.5 cm × 0.5 cm に調製し、酵素液に浸した濾紙片 0.4 cm × 1.2 cm をゲル中に挿入し、4 mA/cm の定電流をかけ、4~6°C で7時間の泳動後アミドブラック 10B にて染色した。酵素は陽極側へ約 4.5 cm 移動した単一なスポットとして検出された。

(2) 超遠心分離

pH 7, 0.01 M リン酸緩衝液中に 0.7% の酵素蛋白を含む溶液を試料とし、日立製 UCA-1A 型分析用超遠心機を用い、54,300 rpm にて 9~50 分間沈降図型を観察した。第3図に示すごとく単一の山のみが認められた。なおこの条件で測定した本酵素の沈降係数 $S_{20,w}$ は 4.75 S であった。

第3図 酵素の超遠心沈降図
日立製 UCA-1A 型, 54300 rpm, 20°C, 傾斜角 70°
酵素蛋白 0.7% pH 7, 0.01 M リン酸緩衝液

第4図 熱安定性
反応前に酵素液 (pH 7) を 10 分間処理した

3. 酵素の諸性質

(1) 熱安定性

酵素液を pH 7 (0.01 M リン酸緩衝液) にて各温度で 10 分間処理したのち、実験方法 4 に述べた測定法にて活性を調べた。第4図に示すごとく 50°C まで活性は変わらず、55°C 以上で著しく活性は低下した。

(2) 反応温度

反応温度を種々に変えて 10 分間および 20 分間反応させた場合を第5図に示す。50°C までは活性は上昇するが 60°C では著しく低下する。

(3) pH の影響

i) pH 安定性: 各 pH の 0.02 M リン酸緩衝液中にて 30°C, 24 時間保持したのち、pH 7 に修正して活性

第5図 反応温度の影響

第6図 pH の影響

を調べた。第6図に示すごとく pH 6~8 の間で安定であった。

ii) 至適 pH: リン酸緩衝液にて反応液の pH を変えた場合を同じく第6図に示す。至適 pH は 6.5 付近にあると思われた。

(4) 基質特異性

レバン 5% 液の他に、イヌリン 2%, シュクロース 2%, ラフィノース 2%, デキストラン 2% の各液をそれぞれ酵素約 1 unit/ml と 1:1 に混合し、40°C にて 15 分間および 30 分間反応させた。レバンを除く他のものはいずれも反応液中に還元糖の生成を認めなかった。

(5) 金属イオンなどの影響

pH 7, 0.025 M ペロナル塩酸緩衝液中に酵素 4 unit/ml 含むものを 0.25 ml, 流水にて 1 日透析しさらに pH 7, 0.025 M ペロナル塩酸緩衝液中にて 1 日透析したレバンの 5% 液を 0.5 ml, 金属イオンその他の 4×10^{-3} M 液を 0.25 ml, 以上の三者を混合し 40°C, 10 分間反応させた。結果は第2表に示すごとく PCMB, 銅イオンで強く阻害され、ニッケル、マンガン、亜鉛の各イオンにも阻害が認められた。一方マグネシウムイオンは $10^{-1} \sim 5 \times 10^{-3}$ M でやや賦活化の傾向が認められた。

第2表 金属イオンなどの影響

金属イオンその他	反応液中の濃度	活性比
無添加		100%
Li ⁺	10^{-3} M	101
Ni ²⁺	10^{-3}	86
Mn ²⁺	10^{-3}	84
Cu ²⁺	10^{-3}	19
Zn ²⁺	10^{-3}	66
Co ²⁺	10^{-3}	96
Ca ²⁺	10^{-3}	90
Mg ²⁺	10^{-3}	111
	5×10^{-3}	122
	10^{-2}	122
	5×10^{-2}	119
	10^{-1}	118
EDTA	10^{-3}	107
Cysteine	10^{-3}	103
PCMB	10^{-3}	10

反応液の酵素濃度: 0.5 unit/ml

緩衝液: pH 7, 0.03 M ペロナル塩酸

レバン: 透析処理

6) MICHAELIS 定数

レバンを流水にて 1 日透析し、さらに pH 7, 0.01 M リン酸緩衝液中にて 1 日透析したのち 5% 液とし、これをさらに各段階に希釈して 2 unit/ml の酵素液と 1:1 で混合し、40°C, 5 分間反応させて生成還元糖量を測定した。得られた値を反応速度 V とし、基質濃度の逆数 1/S に対して 1/V をプロットする作図法より K_m を計算した。結果は第7図のように $K_m = 0.0073$ (g/ml) であった。

4. 酵素の分子量

Sephadex G-100 を用いてゲル濾過法により分子量の

第7図 MICHAELIS 定数 (K_m) の測定

反応液: 酵素 1 unit/ml
pH 7 0.01 M リン酸緩衝液
レバンは透析処理して使用

第8図 分子量の測定

カラム: Sephadex G-100, 2.5×45 cm
緩衝液: 0.1 M KCl を含む 0.05 M トリス-塩酸, pH 7.5
1. リボヌクレアーゼ 4. ボビナルブミン
2. トリプシン 5. 供試酵素
3. オボアルブミン

測定を行った。分子量の対数に対して溶出液量をプロットした結果は第8図に示すとおりである。本酵素は標準物質のオボアルブミン ($MW=4.5 \times 10^4$) と全く同時に溶出され、したがって分子量は約 45,000 と推定した。

要 約

Streptomyces griseus に属する一菌株の培養液よりレバン分解酵素を分離・精製した。精製酵素はポリアクリルアミドゲル電気泳動および超遠心分離法により純度を確認した。本酵素は反応温度 50°C まで活性は増加し 60°C では急激に低下した。50°C, 10 分間は安定であり, 55°C, 10 分間で著しく失活した。安定 pH は 6~8 であり, 至適 pH は 6.5 付近であった。本酵素は *B. subtilis* 生産のレバンには作用するが, シュクロース, ラフィノース, イヌリン, デキストランには作用しなかった。金属イオンなどの影響は銅イオン, PCMB で強く阻害され, ニッケル, マンガン, 亜鉛の各イオンにも阻害が認められた。マグネシウムイオンはやや賦活化の傾向が認められた。 K_m 値は 0.0073 (g/ml) と測定し, 分子量は約 45,000 と推定され, 沈降係数 $S_{20,w}$ は 4.75 S であった。

終りに Sbl-7 株の同定をお願いした日研化学研究部塩津晋氏に厚く謝意を表する。

文 献

- 1) EVANS, T. H., and HIBBERT, H.: *Advan. Carbohydr. Chem.*, **2**, 204 (1946).
- 2) NIVEN, C. E. Jr., SMILEY, K. L. and SHERMAN, J. M.: *J. Bacteriol.*, **41**, 479 (1941).
- 3) NEWBRUN, E. and BAKER, S.: *Carbohydr. Res.*, **6**, 165 (1968).
- 4) SCHNEIDER, F., HOFFMANN-WALBECK, H. P., und ABDON, M. A. F.: *Zucker*, **22**, 561 (1969).
- 5) SCHNEIDER, F., REINEFELD, E. und THIELECKE, K.: *Zucker*, **24**, 153 (1971).
- 6) AVIGAD, G. and ZELIKSON, R.: *Bull. Res. Council. Israel*, **11A4**, 253 (1963).
- 7) ZELIKSON, R. and HESTRIN, S.: *Biochem. J.*, **79**, 71 (1961).
- 8) LOEWENBERG, J. R. and REESE, E. T.: *Can. J. Microbiol.*, **3**, 643 (1957).
- 9) 津村信蔵・牧野重英: 食品総研, **28**, 45 (1973).
- 10) NELSON, N.: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
- 11) 赤堀四郎編: 酵素研究法, 第6版, (朝倉書店), p. 166 (1962). (昭和48年5月26日受理)