



Title	Corn Seed Hemicellulose(CSH)分解酵素ヘミセルラ-ゼについて(第2報)
Author(s)	今里, 祥子
Citation	長崎大学教育学部自然科学研究報告. vol.33, p.133-140; 1982
Issue Date	1982-02-28
URL	http://hdl.handle.net/10069/32604
Right	

This document is downloaded at: 2018-12-17T13:05:10Z

Corn Seed Hemicellulose (CSH) 分解酵素 ヘミセルラーゼについて (第2報)

今 里 祥 子

長崎大学教育学部家庭科教室
(昭和56年10月31日受理)

Studies on Corn Seed Hemicellulose(CSH)- Hydrolyzing Enzyme (Hemicellulase)(Part II)

Shoko IMAZATO

Department of Home Economics, Faculty of Education,
Nagasaki University, Nagasaki
(Received Oct. 31, 1981)

Abstract

The corn seed hemicellulose-hydrolyzing enzyme was purified from a culture medium of No. 101 bacterium by the procedures of SP-Sephadex chromatography and Sephadex G-75 gel filtration. The specific activity increased about 40-fold by these procedures.

The purified preparation showed Ultraviolet absorption at a maximum of 280 nm. The enzyme was stable at 30°C for 15 min.. During the enzymatic digestion, the viscosity of seed hemicellulose slution was rapidly decreased, while the liberation of reducing sugar was very low.

緒 言

ヘミセルロースは、植物細胞中に存在し、主としてマイクロフィブリルの間隙を充填する役割をなしている物質であり、セルロースとペクチンを除いた主にペントースとヘキソース及びその誘導体などから構成されている。その構造は、植物の種類はいうにおよばず、同一植物でも、その存在する部位によって、著しく相違するもので、その種類はきわめて多種類にわたっている。それに加えて、ヘミセルラーゼの給源による多様性、同一給源からも多種類のヘミセルラーゼの生産される事実が報告されている。(1,2)

これまでに大宮によりトウモロコシ種子のヘミセルロース (以下 CSH と略した) の分離、同一種の種子を給源とした CSH 分解菌 (101号菌と名付けた) の分離、その菌体外酵

素ヘミセルラーゼの抽出がおこなわれた。CSH については分子量73万前後であり、その構成糖は、キシロース、アラビノースが約90～95%を占め、他にグルコース、ガラクトロン酸などから成っていることを明らかにし、またヘミセルラーゼが endo 型に作用することも確認した。

しかし、CSH の構成成分の定量およびその構造様式が明らかでなく、ヘミセルラーゼの CSH に対する作用様式も明らかでない。そこで、CSH の構造を酵素的な面から追求するため、今回は、101号菌の生産するヘミセルラーゼを精製して、その酵素的性質を検討したので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

寒天平面培地に植え継いで冷蔵庫で保存した101号菌³⁾

2. 基質およびその調製法

使用した基質は大宮⁴⁾の方法でトウモロコシ種子より抽出した CSH を用いた。

3. CSH の加水分解

1% CSH 液10ml に5N H₂SO₄ 2.5ml を加え2時間半沸騰水中で加水分解する。それを25mlに希釈し、更にそのうち1mlを50mlのメスフラスコに採って希釈した後、その2mlをホリン管にとり、0.1N NaOH で中和後、Somogyi-Nelson 法で糖量を測定した。

4. 酵素の作用条件および活性

0.025M リン酸緩衝液に基質濃度を全糖量として1.0%に溶解し、一夜放置後不溶物を除いた基質溶液1mlに酵素液1mlを加え、37°Cで5分間作用させた後、生成する還元糖をSomogyi-Nelson 法で定量した。この条件でキシロース10μg の還元糖を生成する酵素力を1単位とした。

5. 粘度低下率の測定

3分計の Ostwald 粘度管を37°C恒温水槽に保ち、buffer のみ (t_0)、基質のみ (t_1)、反応液 (t_2) のそれぞれの落下時間を測定し、次式のとうり表わした。

$$\text{粘度低下率} = \frac{t_1 - t_2}{t_1 - t_0} \times 100 (\%)$$

6. 蛋白質の測定

便宜的に280nmにおける吸光度で表わした。

7. 食塩の定量

Mohr 法⁵⁾で測定した。

実験結果

1. ヘミセルラーゼの分離精製

a. 酵素液の調製法

前報ですでに報告済みの培養条件で、予め37°Cで2日間静置培養した101号菌を種菌として1%量接種し、37°Cで7日間培養し、菌体を除去した上澄液を出発酵素液とした。(Preparation 1)

b. 硫酸塩析

出発酵素液に固型硫酸を0.25飽和から0.7飽和の間で加えて塩析した。沈殿を遠心分離で集めて抽出液の約 $\frac{1}{2}$ 量の純水に溶解し、硫酸除去の目的でSephadex G-25のカラムクロマトグラフィーを行ったが、十分に目的が達成されなかったため、Visking Company製のCellulose Tubingで透析した。(Preparation 2)

c. SP-Sephadex カラムクロマトグラフィー

脱塩液にpH5.0の酢酸緩衝液で終末濃度0.01Mになるように添加し同じく0.01MのpH5.0の酢酸緩衝液で十分に緩衝化したSP-Sephadex C-50のカラムに加えた。その結

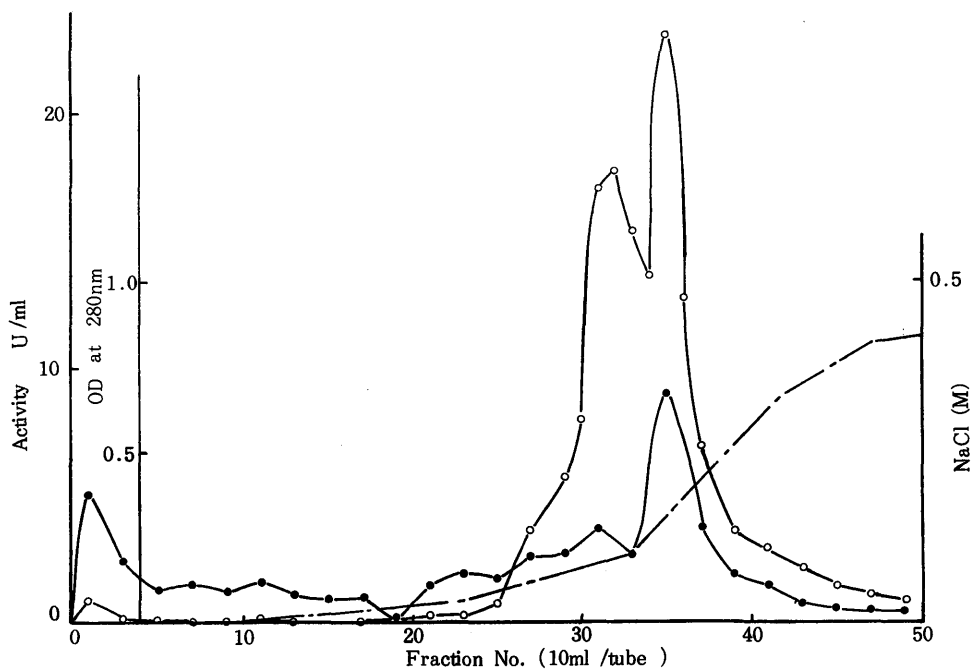


Fig. 1. Chromatography by a Column of SP-Sephadex C-50 of Hemicellulase of No. 101 bacterium.

(column, 2.65 x 35 cm, M/100 acetate buffer, pH 5.0; enzyme applied, 400 ml (activity 32.57 U/ml; $E_{1\text{ cm}}^{280\text{ nm}}$, 1.18); flow rate 31.7 ml/hr.)

●—●, OD at 280 nm; ○—○, Activity; — — —, Conc. of NaCl

果、通過液中に約2.05%の活性が認められたので、ほとんど SP-Sephadex に吸着されたものと推定された。

次にカラムを 0.01M, pH5.0 の酢酸緩衝液で十分に洗浄したのち食塩濃度を 0 から 0.5M まで linear gradient に上昇させて、吸着された酵素を溶出した。そのクロマトグラムは Fig. 1 に示すとうりであった。

d. DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィー

SP-Sephadex C-50 の通過液を前と同じく 0.01M, pH5.0 の酢酸緩衝液で緩衝化した DEAE-Sephadex A-50 のカラムに加えた。

次に前記の緩衝液で十分に洗浄したのち、食塩濃度を 0 から 0.5M まで linear gradient に上昇させて溶出した。しかしほとんど活性部分はみられなかった。

e. Sephadex G-75 によるゲル濾過

SP-Sephadex C-50 吸着部分を collogion bag で濃縮し (Preparation 3), Sephadex G-75 のカラムでゲル濾過した。そのクロマトグラムは, Fig. 2 のとうりであった。(Preparation 4)

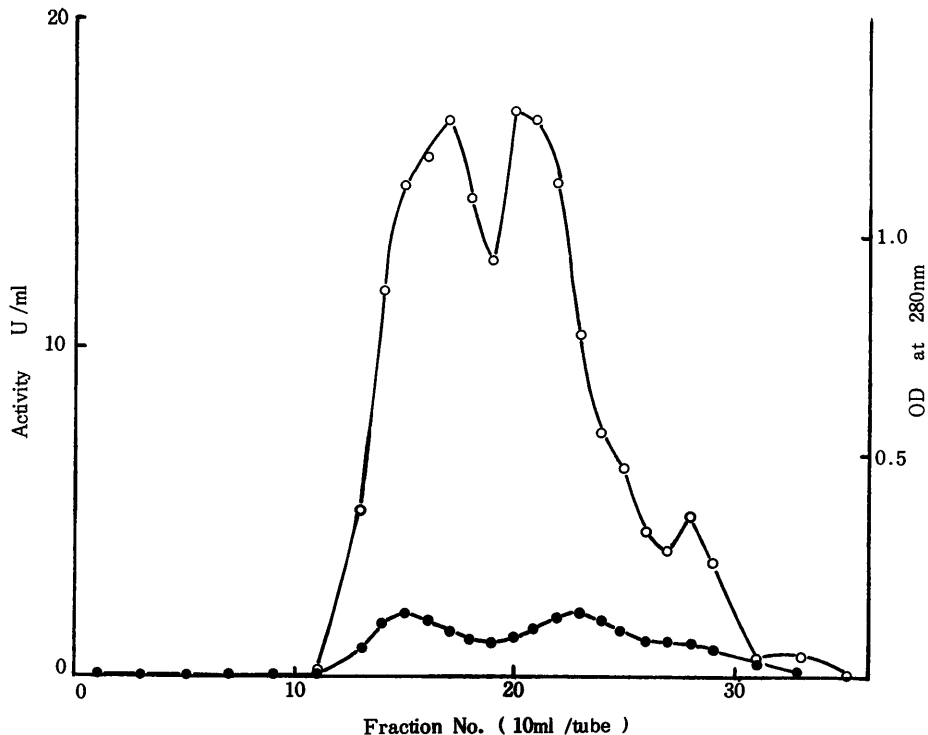


Fig. 2. Chromatogram of Hemicellulase on Sephadex G-75.

Fraction No. 27-47 (Fig. 1) were combined and concentrated to 25ml with a collogion bag and applied on Sephadex G-75 column (2.65 x 57cm) equilibrate with 0.01 M acetate buffer (pH 5.0). Elution was carried out with the same buffer.

○—○, Activity U/ml; ●—●, OD at 280 nm

以上精製の概要は、Table I の示すごとくで、それに伴う活性の推移は、Table II に示すごとくであった。その結果、比活性で培養液の約40倍に精製された。

Table I. Purification Procedure of Hemicellulase from No. 101 Bacterium

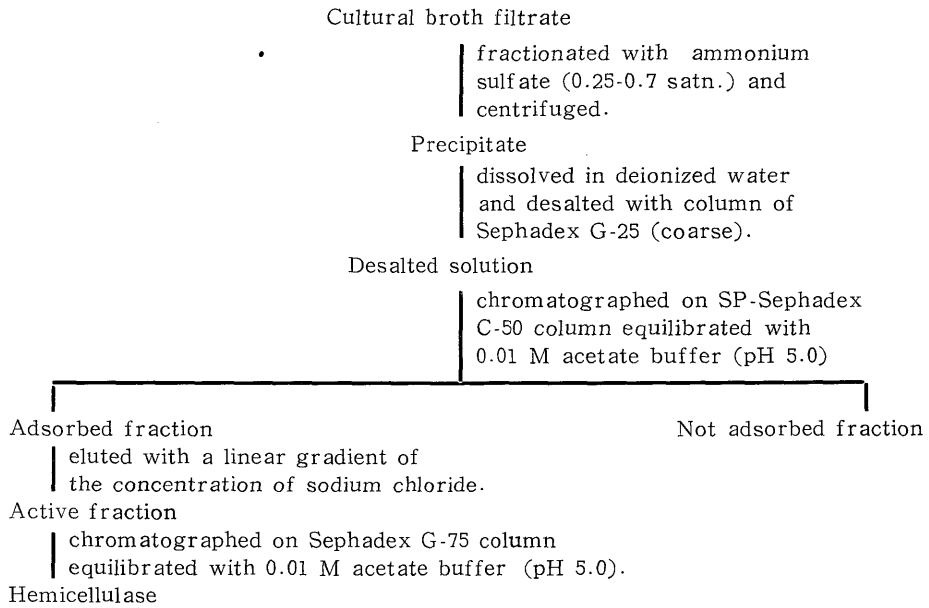


Table II. Change of Various Activities in the Course of Purification of Hemicellulase from No. 101 Bacterium

Preparation	Vol. ml	E _{280nm} 1 cm	Activity U/ml	Specific activity	Recovery yield %
1	7,050	2.211	9.44	4.27	100
2	400	1.18	32.57	27.60	19.6
3	25	.90	54.80	60.62	2.1
4	50	.092	15.16	169.80	1.6

2. ヘミセルラーゼの酵素的性質

a. 熱安定性

酵素液を各温度に15分間保った後、ただちに $1 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に30分間冷却して、活性を測定した。残存活性は、処理前の活性を100%とした相対活性で示した。結果は Fig. 3 の通りであった。

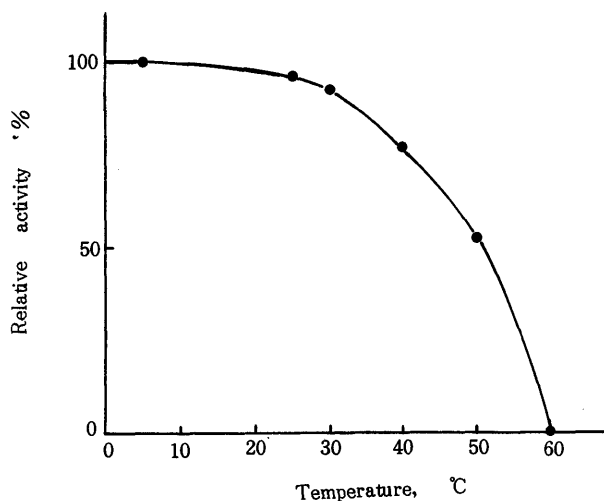


Fig. 3. Thermal-Stability of Hemicellulase of No. 101 bacterium.

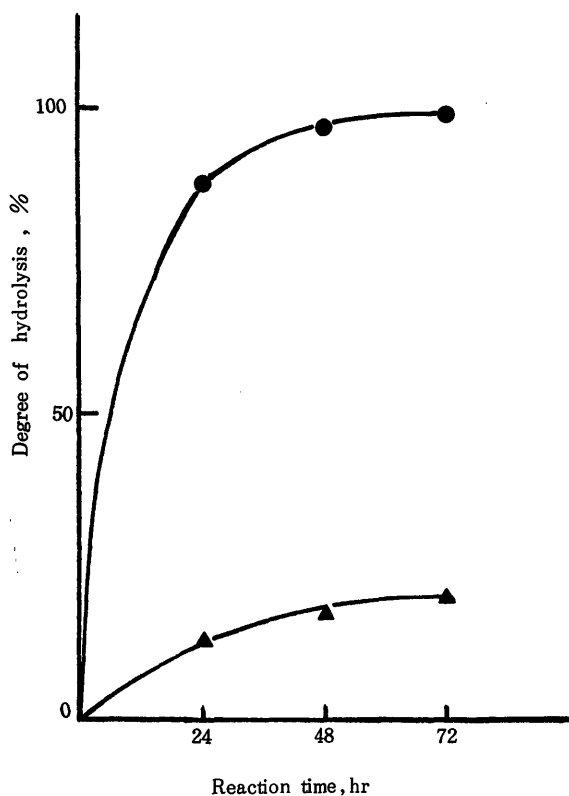


Fig. 4. Time Course of Hydrolyses of Hemicellulase of No. 101 bacterium.

●—● Viscosity
▲—▲ Reducing Sugar

b. 基質分解曲線

0.025Mリン酸緩衝液 pH5.7, 100ml に CSH 100^{mg} を溶解し, 精製ヘミセルラーゼを 100 活性単位になるように加え, 防腐剤としてトルエンを 2, 3 滴加え, 37°C で incubate した。結果は Fig. 4 のとおりであった。

c. 紫外線の吸収曲線

精製ヘミセルラーゼについて, 各波長の吸収率を測定した結果 Fig. 5 の示すとおりであった。

考 察

先に CSH 分解ヘミセルラーゼについて, Sephadex G-25, 75,100 を用いたゲル透過により部分精製を行い, endo 型のヘミセルラーゼであることを明らかにした⁶⁾。今回は, 陽イオン交換体, 陰イオン交換体を用い, 精製を行った。

硫酸塩析の 0.25 飽和から 0.7 飽和に活性を有する蛋白が約 90% 集まることは, 前報⁷⁾ですでに報告したが, 塩析, 脱塩, 透析後における活性収量の著しい低下は, pH の安定範囲への調整, Sephadex G-25 における脱硫酸が不十分であったこと, 透析膜への吸着, 操作時間が長すぎるなどが原因であると考えられた。

またこの酵素蛋白は, SP-Sephadex と pH5.0 で結合していることから, 等電点は, pH5.0 より上であることが考え

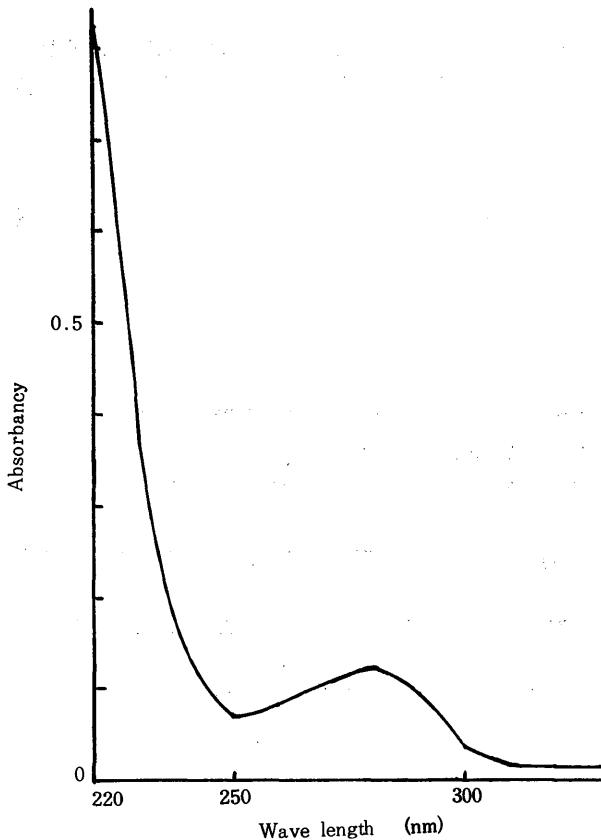


Fig. 5. Ultraviolet Absorption Spectra of Hemicellulase of No. 101 bacterium.

報どおり、分解の様式は *endo* 型を示した。

更に紫外線の吸収度合を測定したところ、前報では、280nm で肩程度の吸収ピークであったのが、今回は明らかなひとつのピークが認められた。しかし、スペクトルの形から判断する方法で、例えば、 E_{min}/E_{max} の量を算出すると、0.56となり、単純タンパク質の場合0.3~0.4という報告⁶⁾に対し、大きくなり、不純物(例えば核酸など)の混入、タンパク質の変性、着色物質などの混入が考えられた。

以上、今回の CSH 分解ヘミセルラーゼの精製度合は、比活性において、培養液より約40倍に達し、その性質からも、精製の上昇が明らかであった。しかし、酵素活性からみた回収率はかなり低く、紫外線の吸収スペクトルから判断しても、十分な精製ができたとは云いがたい。これは、夾雑物の除去や、脱色などの操作を省いてイオン交換へ進んだために、それらと結合した状態で、イオン交換体やゲル濾過剤等に残留したり、溶出したりしたためと考えられた。またイオン交換体の選択の適否や各精製段階における pH の安定範囲への調整、操作時間が長すぎるための損失やタンパクの変性等も考えられた。

られた。しかし回収率から推定して活性蛋白の可成りの損失がありイオン交換体が強すぎたのではないかと考えられた。すなわち、この酵素が不安定であるために、強イオン交換体より弱イオン交換体の方が適していると云える。

次に酵素の一般的性質をみると、安定性に及ぼす温度の影響は、40°Cより急激に低下し、60°Cでは完全に失活してしまった。これは、45°Cで低下し始めた初期のアセトン沈殿物での安定性より5°Cほど低下し、精製度合の上昇と共に保護物質の損失が考えられた。

基質分解曲線を前報と比較すると、粘度低下率においては、90%に達するのに1週間かかったが、今回の実験では、3日でほぼ100%に達し、還元糖生成力においては、前報では、6日目で約20%であったのが、3日目で20%まで上昇し、ほぼ分解限度に達したように思えた。前

総 括

硫酸による塩析，SP-Sephadex C-50 によるイオン交換，Sephadex G-75 によるゲル
濾過により CSH 分解ヘミセルラーゼを精製した結果，培養液から比活性で約40倍に精
製できた。

本研究にあたり，終始御指導を賜りました，元本学部教授大宮満男先生に深甚なる謝
意を表します。

参 考 文 献

- (1) 福本寿一郎，辻阪好夫，岡田茂孝，東原昌孝，竹西繁行，加藤進：農芸化学大会講演（1966）。
- (2) 福本寿一郎，辻阪好夫，竹西繁行：農芸化学大会講演（1967）。
- (3) 大宮満男，高橋紀子，小川サチヨ：長大・教育・自然研報 No.23, 143~149（'72）。
- (4) 大宮満男：熊本大・教・自然・紀要 No.10-1, 23~38（'62）。
- (5) 京都大学農学部農芸化学教室編：新改版農芸化学実験書（増補）第1巻，p. 105~106，産業図
書K.K.（S44）。
- (6) 大宮満男，今里祥子，小川サチヨ，深堀知子：長大・教育・自然研報 No.25, 113~120（'74）。
- (7) 今里祥子，大宮満男：長大・教育・自然研報 No.31, 155~164（'80）。
- (8) 林勝哉：蛋白質取扱法に関する講習会冊子：九大農学部農芸化教室編（S43）