



Title	Corn seed hemicellulose分解酵素hemilcellulaseの作製と分解能について
Author(s)	大宮, 満男; 今里, 祥子; 小川, サチヨ; 深掘, 知子
Citation	長崎大学教育学部自然科学研究報告. vol.25, p.113-120; 1974
Issue Date	1974-02-28
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10069/32971">http://hdl.handle.net/10069/32971</a>
Right	

This document is downloaded at: 2019-06-25T22:05:49Z

## Corn seed hemicellulose 分解酵素 hemicellulase の作製と分解能について

大宮 満男・今里 祥子・小川サチヨ\*・深堀 知子

### Gel Filtration of Hemicellulase of Bacterium 101 isolated from Corn Seed Hemicellulose

Mitsuo OOMIYA, Syoko IMAZATO, Sachiyo OGAWA, Tomoko FUKAHORI

Department of Home Economics, Faculty of Education  
Nagasaki University, Nagasaki

The composition of the medium for the culture of No. 101 bacterium that produces the hydrolytic enzyme (hemicellulase) active towards corn seed hemicellulose had been examined previously in this laboratory.

The crude preparation of hemicellulase was purified by gel filtration, and its hydrolytic activity was investigated.

After 7 days' culture, ammonium sulfate was added in a medium to 60 per cent and the precipitate formed was gel filtrated successively by using Sephadex G-25, G-75 and G-100, and the enzymatic solution was lyophilized.

The hydrolytic activity was measured using the crude hemicellulase preparation and the result indicated that the mode of action of the enzyme was an endo type.

#### 緒 言

さきに、著者らは corn seed よりヘミセルロースを調製<sup>(1)</sup>した。また、このヘミセルロースを用いて同一起源の corn seed より、ヘミセルラーゼ活性を有する菌（以下、これを101号菌とよぶ）を分離<sup>(2)</sup>、さらに培地組成において炭素源として脱ペクチン・コーン粉末、窒素源として  $\text{NaNO}_3$  を用いることにより多量の粗酵素ヘミセルラーゼを得ることができた<sup>(3)</sup>。

今回は、粗酵素ヘミセルラーゼをゲル濾過により、部分精製し、その分解能について検討した。

\* 長崎女子短期大学 Nagasaki Women's Junior College, Nagasaki

## 実験方法

### 1. 培地の組成

第1表に示す4種の物質を水道水に溶解した。

第1表 基本培地組成

$K_2HPO_4$	0.1 %
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02%
脱ベクチンコーン粉末	0.5 %
$NaNO_3$	0.2 %

### 2. 培養法および沈澱物の生成

培地100 mlにつき、101号菌（対数期にもの）を1白金耳ずつ接種し、37°Cで7日間、静置培養をおこなった。

この培養液をパーライトおよびラジオリイトを用いて吸引濾過し、濾液1000 mlに約600 gの硫酸アンモニウムを加えて生じた波澱物を冷凍遠沈で集めた。

### 3. ゲル濾過

脱硫酸のため、第2表の条件により、沈澱物を溶解し、Sephadex G—25により、室温にてゲル濾過をおこなった。脱硫酸は、蛋白量の測定とネスラー試薬の定性反応で確めた。

第2表 ゲル濾過の条件

Sephadex タイプ	G—25・G—75・G—100
溶 媒	0.1M PH7.0 phosphate buffer
圧 力	水柱 約38cm
流 速	20ml/h
分 画	30分毎に10mlづつ採取

さらに、脱硫酸できたものについては、G—75、G—100により、ゲル濾過をおこなった。

### 4. 粗酵素の作成

G—100でゲル濾過後、蛋白量の多いものを凍結乾燥し、粗酵素とした。

### 5. 蛋白質の紫外線吸収

粗酵素を各種濃度（0.1M, PH5.7, phosphate buffer）に溶解し、波長をかえて紫外線の吸収度を測定した。光電比色計：日立101

### 6. 酵素分解率のための活性測定法

0.1M, PH5.7 の phosphate buffer 200 ml に corn seed ヘミセルロース 200 mg 粗酵素 200 mg を加えて37°Cにて反応させておき、時間の経過と共に、適宜取り出して測定をおこなった。

a) 粘度低下率による酵素活性測定<sup>(3)</sup>

b) 還元力の増加による酵素活性測定

上記作用条件で一定時間酵素反応の後、ヘミセルロースの加水分解に伴う還元力の増加を Somogyi-Nelson 法<sup>(4)</sup>により定量した。

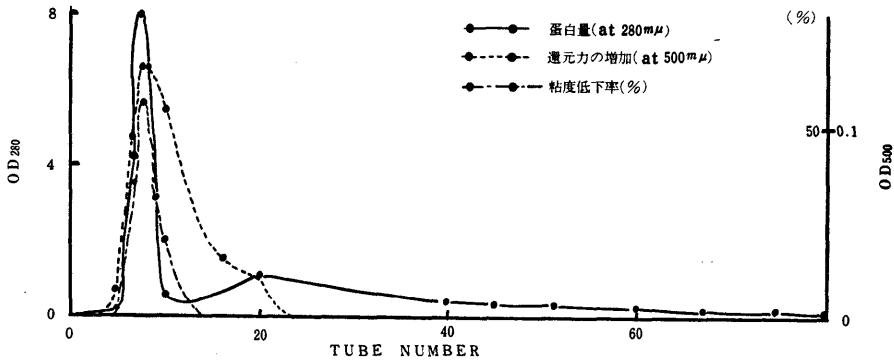
還元力より分解率を算出するため、ヘミセルロースを完全に加水分解<sup>(1)</sup>した結果 1 mg / 12 ml のとき 4OD が 0.113 を示した。これを分解率 100% の 4OD 値とすると 200 mg / 200 ml のときは、1.356 となる。したがって下式より酵素活性を表わした。

$$\text{酵素活性 (還元糖分解率)} = \frac{4OD}{1.356} \times 100(\%)$$

### 実験結果

#### 1. G-25脱硫酸後の蛋白量と酵素活性

G-25で脱硫酸したものの蛋白量を測定すると同時に粘度低下率と還元力の増加により酵素活性を測定した結果、第1図のようになった。

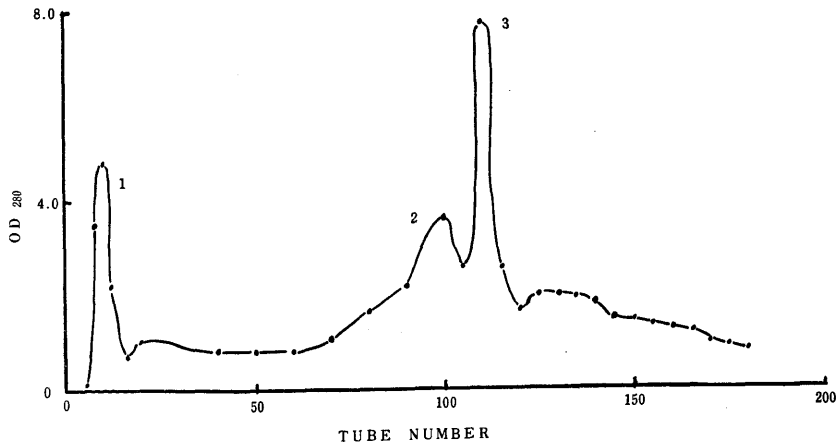


第1図 G-25ゲル汙過後の蛋白量と酵素活性

蛋白量が多くなっているところは、粘度低下率、還元力の増加、共に大きくなっているのので、酵素活性がある、すなわち目的の酵素ヘミセルラーゼがあると認めた。したがって今後ゲル汙過したものについては、蛋白量だけ測定した。

#### 2. 脱硫酸による成績

G-25でゲル汙過をおこなった結果、第2図のようになった。



第2図 G-25によるゲル汙過

第2図において、2番目と3番目のピークは、沈澱物が完全に溶けていなかったもので、途中で攪拌した結果、十分にゲル濾過されたことを意味している。

第3表 ネスラー試薬による硫酸の検出

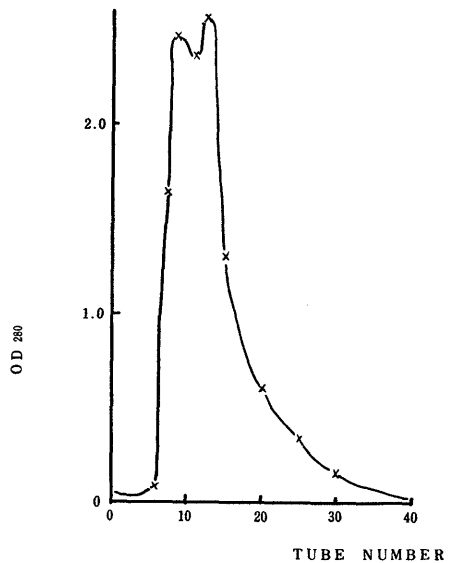
画分No	溶出液量 ml	ネスラー 試薬の反応	画分No	溶出液量 ml	ネスラー 試薬の反応
6	60	± 白濁	15	150	+
7	70	± 白濁	16	160	+
8	80	—	81	810	+
9	90	—	90	900	+
10	100	—	100	1000	+
11	110	+	105	1050	+
12	120	+	110	1100	+
13	130	+	115	1150	+
14	140	+	120	1200	+

6, 7の白濁は buffer によるものである。

第2図および第3表により、脱硫酸ができたものと、できていないものに分け、

No. 8, 9, 10 ..... I }  
No. 10~16, 90~120 ..... II }とした。

IIについては、380 ml という多くの量になるから、G-25で約70 ml に濃縮し、再び脱硫酸を試みた結果、第3図および第4表のようになった。



第3図 G-25 による I の脱塩

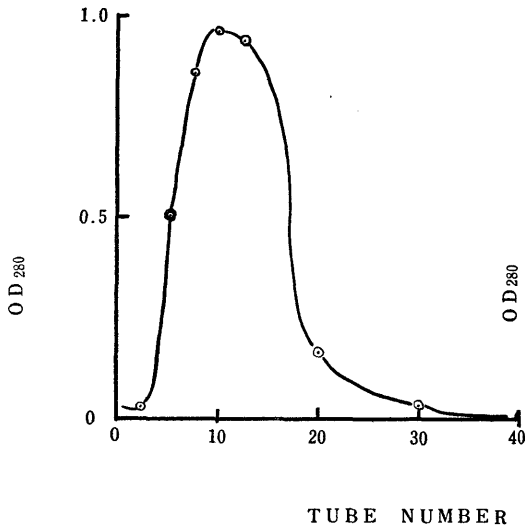
第4表 ネスラー試薬による硫安の検出

画分No	溶出液量 ml	ネスラー試薬の反応	画分No	溶出液量 ml	ネスラー試薬の反応
8	80	—	13	130	—
9	90	—	14	140	—
10	100	—	15	150	+
11	110	—	16	160	+
12	120	—	17	170	+

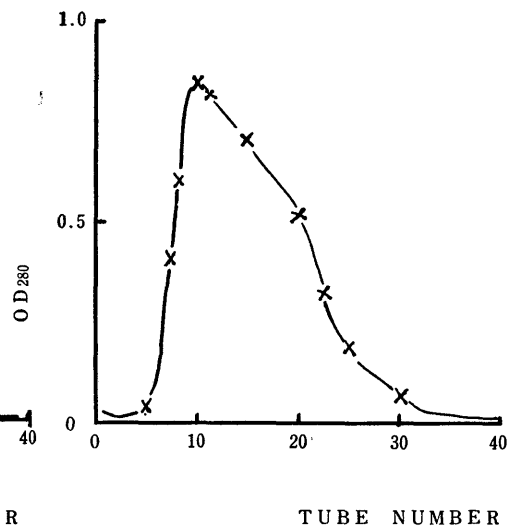
第3図, 第4表より, 完全に脱硫安できた。

3. G-75, G-100 によるゲル濾過

I と II についてそれぞれ G-75 でゲル濾過をおこなった結果は第4図, 第5図どうりであった。

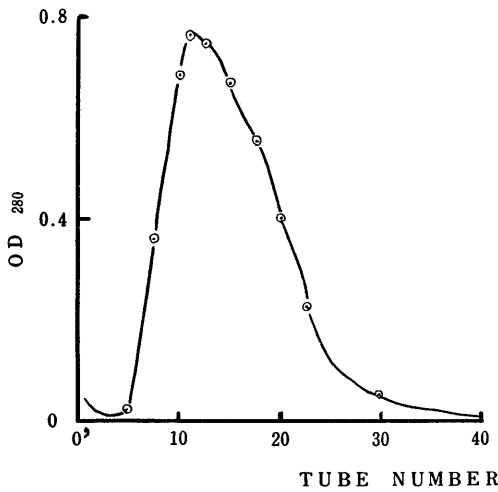


第4図 G-75による I のゲル濾過

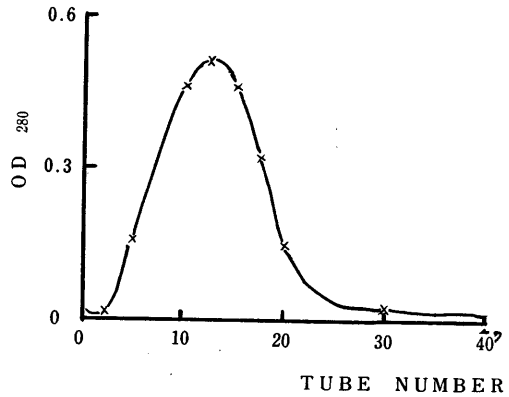


第5図 G-75による II のゲル濾過

I は No. 7 ~ 16 までを, II は No. 8 ~ 18 までを G-100 でゲル濾過した。その結果は, 第6図, 第7図どうりであった。



第6図 G-100によるⅠのゲル透過



第7図 G-100によるⅡのゲル透過

G-75, G-100において、山がそれぞれひとつであり、またⅠ, Ⅱが全く重なるので、この粗酵素は1種類であると考えられる。

#### 4. 粗酵素の収量

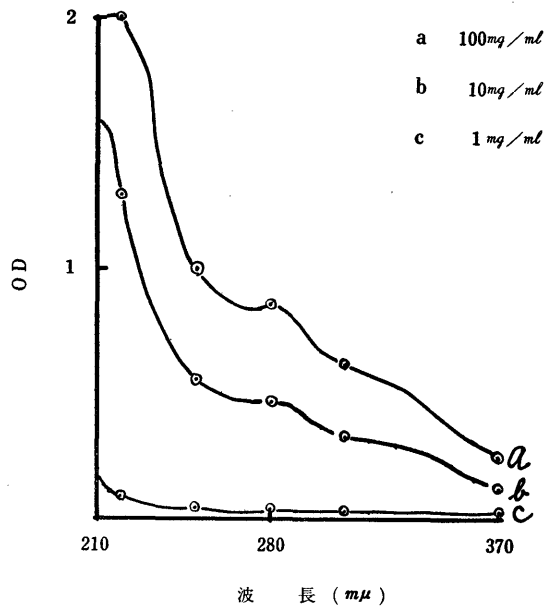
G-100でゲル透過後、ⅠはNo.7~19, ⅡはNo.8~18までをそれぞれ凍結乾燥し、粗酵素を得た。その収量は第5表どおりであった。

第5表 粗酵素収量  
(培地9ℓより)

粗酵素	収量 (mg)
Ⅰ	1491.1
Ⅱ	1448.9
計	2940.0

#### 5. 粗酵素の紫外線吸収

粗酵素のⅠについて、それぞれ濃度を変えて、紫外線の吸収率を測定したら、第8図のようになった。

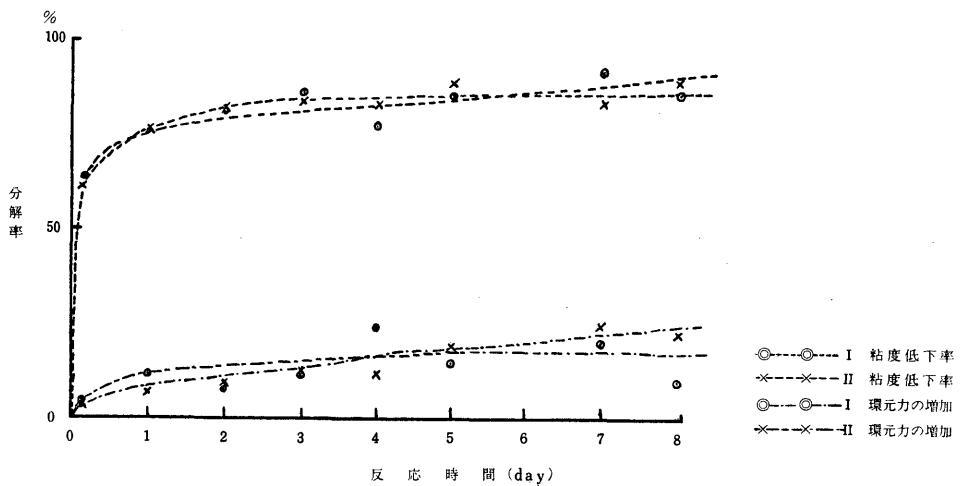


第8図 紫外線の吸収曲線

ほぼ 280 mμ で最大吸収を示す蛋白であることがわかった。

6. 粗酵素の分解率

実験方法6に従い, I と II についてそれぞれ分解率を示すと第9図のとうりであった。



第9図 粗酵素の分解率

粘度低下率と還元力の増加について別々に見ると, I と II が互いに, 同じような曲線をえがいている。



また、粘度低下は高い率を示すのに対し、還元力の増加の方は20%前後という低い率しか示さなかった。

### 考 察

1. この粗酵素は、紫外線 280 m $\mu$  で最大吸収を示す蛋白質である。
2. IとIIの粗酵素を比較すると、ゲル濾過および分解率において、ほぼ重なるので、種類のヘミセルラーゼであると考えられた。
3. 分解率において、粘度低下率では高い値を示すのに対し、還元力の方はあまり増加しないことから、この粗酵素は endo 型のヘミセルラーゼであることが推論される。
4. これまでヘミセルラーゼについては、給源を異にするものの多様性が論じられてきたが、ここでは、基質、細菌、酵素すべて同一給源のものについて研究してきた。したがって従来のもとのこの点に関する比較検討は今後の研究課題となろう。

### 総 括

さきに、corn seed より調整したヘミセルロースの分解酵素ヘミセルラーゼを、部分精製し、その分解能について検討をおこなった。

37°C、7日間静置培養後の培養液の硫酸沈澱物を Sephadex ゲルG-25, G-75, G-100 でゲル濾過し、凍結乾燥後、粗酵素ヘミセルラーゼを得、分解率を測定した。

実験結果より、粘度低下率と還元力増加での分解率の違いにより、この粗酵素は endo 型のヘミセルラーゼであると考えられた。

粗ヘミセルラーゼについては、更に精製を重ね、結晶化の方向へ進みたいと思っている。

最後に、本研究に当って有益なご助言をいただいた本学薬学部鶴教授に感謝の意を表する。

### 文 献

- (1) 大宮満男；熊本大・教・自然・紀要 No.10-1, 23-38 ('62)
- (2) 大宮満男, 高橋紀子, 小川サチヨ；長崎大・教・自然, 紀要 No.23, 143-9 ('71)
- (3) 大宮満男, 高橋紀子, 小川サチヨ, 徳安泰子；長崎大・教・自然・紀要 No.24, 121-7 ('72)
- (4) 日本化学会編；実験化学講座, 23, 丸善 ('62), p.417-8