



Title	土壌から分離された放線菌によるテンサイ粕アラビナンの分解について(農芸化学科)
Author(s)	安田, 正昭; 宮里, 興信; 菊池, 修二
Citation	琉球大学農学部学術報告 = The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of the Ryukyus(27): 109-117
Issue Date	1980-11-29
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4091
Rights	

土壤から分離された放線菌によるテンサイ粕アラビナンの分解について

安田正昭*・宮里興信*・菊池修二*

Masaaki YASUDA, Koshin MIYAZATO, Shuji KIKUCHI:
On the decomposition of arabinan of beet-pulp by
Streptomyces sp. isolated from soils

I 緒 言

アラビナンは L-アラビノースから成る多糖類であり、植物の柔組織、紡錘組織の膠着あるいは整型成分としてペクチン質とともに広く存在しその構造についてはすでに明らかにされている²⁾。アラビナン分解酵素については Ehrlich と Schubert¹⁾によりタカジアスターゼ中にその存在が認められて以来、最近になって本酵素の性質が明らかにされつつある。梶らは、各種微生物に存在するアラビナン分解酵素（アラビナーゼ）について調べ糸状菌⁵⁾⁻⁹⁾、細菌¹⁰⁾および酵母¹⁷⁾から本酵素の単離、精製を行い酵素化学的性質を明らかにした。

テンサイ粕にはアラビナン、甘蔗バガスにはヘミセルロースがそれぞれ多量に含まれており、本酵素の特性を利用したアラビノースあるいはキシロースの調製法を確立することは植物成分の高度利用の観点から極めて有意義である。

今回、テンサイ粕から調製したアラビナンを資化分解する微生物を検索したところ、アラビナン分解活性の高い放線菌が土壤から分離された。本報では、分離された菌株の培養条件を調べるとともに本菌株が生産するアラビナーゼの性質について検討したので報告する。

II 実験方法

1. 基質の調製

1) アラビナンの調製方法

基質に用いるアラビナンは梶ら⁵⁾の方法に従ってテンサイ粕より調製した。すなわち、20 g の消石灰を 800 ml の水に加え、これにテンサイ粕 100 g を投入し沸騰湯浴中で 100℃、12 hr 加熱した。布で濾過し、更に遠心分離して上澄液をとり酢酸 50 ml を加えて酸性 (pH 4) にした後 1 夜放置して遠心分離を行った。清澄液に 80% 濃度になるようにアルコールを加え、沈澱アラビナンを 100 ml の水に溶かし不溶部を除いた。清澄液にアルコールを加えて再沈澱し、この沈澱物を真空乾燥器中で乾燥した。

* 琉球大学農学部農芸化学科

2. 放線菌の分離ならびにスクリーニング

1) 放線菌の分離

ブドウ糖アスパラギン寒天培地 (ブドウ糖 1.0%, アスパラギン 0.05%, KH_2PO_4 0.05%, 寒天 2.0%, pH 7.0) を用いて寒天平板培養法により土壌から放線菌を分離した。沖縄県下さとうきび畑土壌, 北海道旭川市付近のテンサイ畑土壌およびじゃがいも畑土壌の土壌稀釈液を上記寒天板に塗抹して 30°C で培養し生育旺盛なコロニーを釣菌し, 同組成の培地にペプトンを 1.0% 加えた斜面培地に保存した。

2) スクリーニング

ペプトン 10 g, 酵母エキス 0.5 g, KH_2PO_4 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g およびビートパルプ抽出液 1 ℓ の培地 (pH 7.0) 50 ml を 500 ml 容肩付フラスコに分注し, 120°C, 20 min 殺菌後, 土壌より分離した放線菌および本学農学部農芸化学科応用微生物学研究室保存の放線菌を接種し, 30°C, 72 hr 振とう培養を行い, 培養液中のアラビナナーゼ活性の高い菌株を検索した。

3. 酵素液の調製

2. 2) で述べた方法により放線菌を培養し, 12,000 rpm, 15 min 遠心分離により菌体を除去した培養液を 0.01 M クエン酸 — 0.02 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で一夜透析した。透析中に生じた不溶物を遠心分離により除去し, 清澄液を粗酵素液として使用した。

4. タンパク質の定量

酵素液中のタンパク質の定量は Lowry ら¹²⁾の方法に準じて行った。

5. アラビナナーゼ活性の測定

酵素反応混液の組成は 1% ビートアラビナン溶液 3.0 ml, McIlvaine 氏緩衝液 (pH 7.0) 0.5 ml, 粗酵素液 1.0 ml とし, 37°C, 60 min 酵素反応を行い生成した還元力を Somogyi-Nelson 法^{13, 15)}により比色定量し L-アラビノースとして計算した。酵素単位は, 上記条件下で反応 1 分間に 1 μmole の L-アラビノースを生成する酵素量と定義し, 比活性はタンパク質 1 mg あたりの単位数で表わした。

6. ペーパークロマトグラフィー

ペーパークロマトグラフィーは東洋紙製 No. 50 の紙を用い, 上昇法により 3 回展開した。展開には n-ブタノール:エタノール:水 (9:1:10 v/v/v) の組成の溶媒を用い, 発色はアニリン水素フタル酸塩¹⁴⁾によった。

III 実験結果

1. 放線菌のアラビナナーゼ活性

沖縄のさとうきび畑土壌, 北海道旭川市付近のテンサイ畑土壌およびじゃがいも畑土壌から分離された放線菌ならびに保存放線菌株をテンサイ粕抽出液を含むペプトン培地で 30°C, 72 hr 振とう培養を行い, アラビナン分解力について検討した結果を Table I に示した。比較的高い分解力を示した菌株は *Streptomyces* sp. No. 44, No. 34, No. 45 などであり, これらの菌株はさとうきび畑土壌から分離されたものである。以下の実験では供試菌株で最も高いアラビナナーゼ活性を示した *Streptomyces* sp. No. 44 菌株を使用した。

Table I. Distribution of arabinanase in various strains of actinomycetes

Strains	Specific activity (10 ⁻³)
<i>Mycobacterium avium</i> , Chester IFO 3145	3
<i>Nocardia corallina</i> , Waksman IFO 3338	1
<i>asteroides</i> IFO 3384	0
<i>Actinomyces auranticus</i> IFO 13017	0
<i>Streptomyces flavus</i> , Waksman et Henrici IFO 3359	2
<i>griseus</i> IFO 3102	0
<i>albus</i> ATCC 3004	1
<i>olivaceus</i> IFO 3409	2
<i>griseus</i> IFO 3430	0
<i>aureus</i> IFO 3175	0
<i>Streptomyces</i> sp. No. 44	43
34	35
45	21
119	19
67	18
53	11

Two hundred and sixty two strains of actinomycetes were tested for their abilities of arabinanase production on the beet extract culture medium (pH 7.0) composed of 1 liter of beet-pulp extract, 10 g of peptone, 0.5 g of yeast extract, 1 g of KH₂PO₄, and 0.1 g of MgSO₄·7H₂O. The actinomycetes were inoculated in 50 ml of the medium in a 500 ml flask. And the media were incubated at 30°C for 72 hr on a reciprocal shaker. The cells were removed by filtration and centrifugation. The clear supernatant was dialyzed against 0.01 M citrate-0.02 M Na₂HPO₄ buffer (pH 7.0) and employed as the enzyme source. The standard reaction system consisted of 3.0 ml of 1.0% beet arabinan, 0.5 ml of McIlvaine buffer (pH 7.0), and 1.0 ml of enzyme solution was incubated at 37°C for 60 min. The reaction was terminated by the addition of 1 ml of 0.1 N NaOH to 1.0 ml of the reaction mixture. The amount of the arabinose liberated was determined by the method of Somogyi-Nelson. One unit of arabinanase was defined as the amount of the enzyme which released 1 μmole of aldehyde group per min under the conditions mentioned above. The specific activity was expressed as unit per mg of protein.

2. 放線菌の培養時間と酵素活性

Streptomyces sp. No. 44 菌株をテンサイ粕抽出液を含むペプトン培地で各時間振とう培養し、アラビナーゼ活性を調べた結果を Fig 1. に示した。比活性は培養後 36 時間の付近で最大に達するが、72 時間まではほぼ同程度の酵素活性を保持していた。

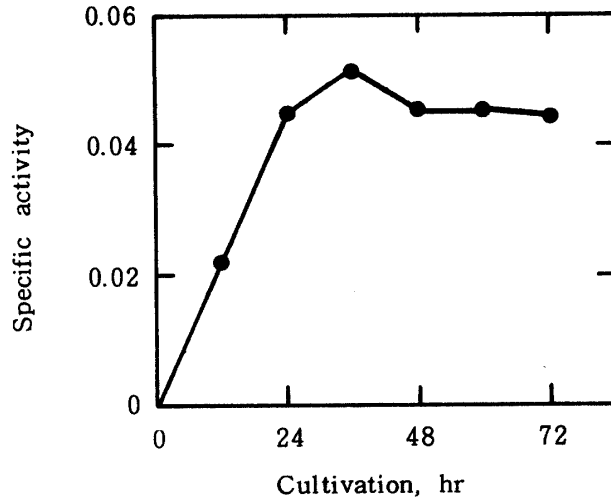


Fig. 1. Effect of cultivation time on the production of arabinanase by *Streptomyces* sp. No. 44.

Cultivation was carried out for the time indications were the same as Table I.

3. 酵素生産に及ぼす培養液の初発 pH の影響

アラビナナーゼ生産に及ぼす培養液の初発 pH の影響について調べた結果、本酵素の生産力は培地の初発 pH に影響され、pH 6.5 ~ 7.0 付近が最適であった。培養液の初発 pH が 6.0 以下あるいは 7.5 以上では酵素生産力は低下した。

4. 酵素生産に及ぼす培養液中の炭素源の影響

アラビナナーゼ生産に及ぼす培養液中の炭素源の影響を調べる為にペプトンを含む基本培地に各種糖類を加え、*Streptomyces* sp. No. 44 菌株の培養を行った。Table II から明らかなように、菌体生育は

Table II. Effect of carbon sources on the production of arabinanase by *Streptomyces* sp. No. 44^a

Carbon source	Specific activity (10^{-3})	Relative growth ^b
Arabinose	2	+
Xylose	1	+
Glucose	0	++
Fructose	0	++
Galactose	0	++
Sucrose	0	++
Starch	0	++
Pectin	0	++
Hemicellulose of bagasse	0	++
Bran extract ^c	1	++
Bagasse extract ^d	0	++
Beet-pulp extract ^e	43	++

^a *Streptomyces* sp. No. 44 was grown on the indicated carbon source (2%) for 72 hr. Other conditions were the same as Table I.

^b Symbols: ++, grow well; +, grow.

^c Bran extract was prepared by boiling 50 g of bran for 1 hr; the solid matter was removed from the suspension and the supernatant fluid was adjusted to 1 liter.

^d Bagasse extract was prepared by boiling 50 g of sugar-cane bagasse with 5% KOH solution for 1 hr, and the solid matter was removed from the suspension. The supernatant fluid was neutralized with dilute HCl, and adjusted to 1 liter.

^e Beet-pulp extract was prepared by boiling 50 g of beet-pulp with 0.5% NaOH solution for 1 hr, and the solid matter was then removed. The filtrate was neutralized with dilute HCl, and the solution was diluted with water to 2 liters.

培養基にグルコース、フルクトース、デンプン、フスマ抽出液、テンサイ粕抽出液等を添加することにより増大した。しかし、本酵素の生産力は培養基にグルコース、フルクトース、デンプンあるいはフスマ抽出液等を添加しても効果は見られなかった。一方、テンサイ粕のアルカリ抽出液を添加することにより本菌は高い酵素生産力を示すことがわかった。尚、アラビノースを炭素源に用いても本酵素活性は若干増大することが認められた。

5. 酵素活性に及ぼす pH の影響

アラビナーゼ活性と pH との関係を知るために各 pH で酵素反応を行い酵素活性を測定した結果を Fig.2 に示した。*Streptomyces* sp. No. 44 菌株から調製した酵素の反応最適 pH は 5.5 ~ 7.0 付近にあり、かなり広範囲の pH 領域に最適 pH があることが判明した。pH 5.0 以下あるいは pH 7.5 以上では活性が低下した。

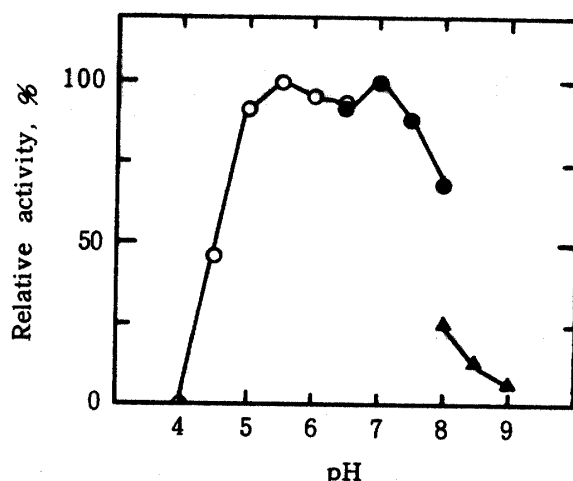


Fig. 2. Effect of pH on activity of arabinanase.

The enzyme was prepared from *Streptomyces* sp. No. 44. The activity was assayed at various pHs. Other assay conditions were the same as Table I. —○—, McIlvaine buffer; —●—, Potassium phosphate buffer; —▲—, Tris-HCl buffer.

6. 酵素活性に及ぼす温度の影響

酵素活性に及ぼす温度の影響について調べる為各温度で酵素反応を行い、酵素活性を測定した結果を Fig. 3 に示した。*Streptomyces* sp. No 44 菌株から調製した酵素の最適温度は 50°C にあった。55°C 以上では急激な活性の低下が見られた。

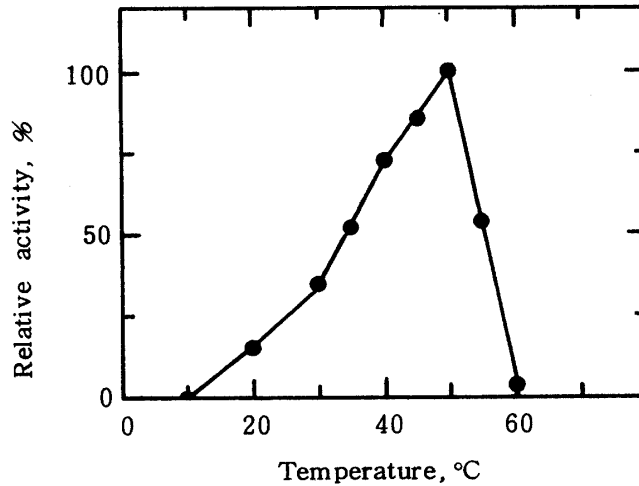


Fig. 3. Effect of temperature on activity of arabinanase.

The enzyme was prepared from *Streptomyces* sp. No 44. The activity was assayed at various temperatures. Other assay conditions were same as Table I.

7. 酵素作用による生産物の検出

アラビナンに対する本酵素の反応生成物をペーパークロマトグラフィーにより調べた結果を Fig. 4 に

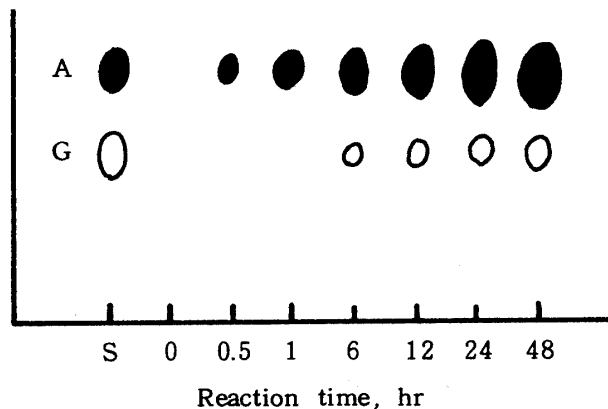


Fig. 4. Paper chromatogram of reducing sugars in the digests of beet arabinan with the enzymes of *Streptomyces* sp. No 44.

The enzyme reactions were carried out as described in the legend of Table I. The samples digested were spotted on a Toyo filter paper No 50. The paper was developed three times by the ascending method using the solvent system of *n*-BuOH:EtOH:H₂O (9:1:10). The spots were detected by aniline hydrogen phthalate. S represents the standard sugar solutions. A and G indicate L-arabinose and D-galactose, respectively.

示した。反応開始後 30 min より時間の経過とともにアラビノース量が多くなっていることを示している。本酵素反応生成物はL-アラビノースのみであり、オリゴ糖が検出されなかった。反応開始 6 hr 後よりガラクトースの生成が認められたが、これは供試アラビナンと酵素液が精製されていない為に混在しているガラクタンがガラクターナーゼにより作用を受けた結果、ガラクトースが生成されたものと思われる。

IV 考 察

テンサイ粕から調製したアラビナンを資化分解する微生物を検索したところ、アラビナン分解活性の高い放線菌 *Streptomyces* sp. No 44 菌株が土壌から分離された。放線菌のアラビナン分解酵素については日下部ら¹¹⁾により紹介されているがほとんど研究は行われていない。

放線菌のアラビナナーゼ生産条件について調べた結果、グルコース、フラクトース、蔗糖あるいはデンプンを添加した培養基で本菌を生育させると、菌体生育は良好であるにもかかわらず酵素の生産はほとんど見られなかった。しかし、テンサイ粕のアルカリ抽出液を炭素源として用いることにより生育良好にして且つ酵素生産力が高いことが明らかになった。本酵素はテンサイ粕アルカリ抽出液中に存在するアラビナンによって誘導生成されたものと思われる。*Corticium rolfssii*⁷⁾においては、培地にフスマ抽出液を用いてもテンサイアラビナンを添加した場合と同程度にアラビナナーゼ活性が増大することが報告されている。本菌においては、本酵素のフスマ抽出液に対する誘導効果はほとんど見られなかった。

土壌から分離された *Streptomyces* sp. No 44 菌株が生産するアラビナナーゼの最適 pH は 5.5~7.0 付近にあった。アラビナナーゼの最適 pH は、*Aspergillus niger*⁶⁾の酵素では 4.0 付近、*Corticium rolfssii*^{7), 9)}あるいは *Rhodotorula flava*¹⁷⁾の酵素においては 2-3 付近で酸性側にあり、本菌のそれとは異なっていることが指摘される。尚、日下部ら¹¹⁾によって調べられた *Streptomyces* sp. の酵素の最適 pH は 5.0 付近であった。本酵素の最適温度は 50°C 付近にあり、*Coniothyrium diplodiella*⁴⁾のアラビナナーゼと同じであった。

Streptomyces sp. No 44 菌株のアラビナンに対するアラビナナーゼ作用をペーパークロマトグラフィーを用いて調べたところ、反応生成物はアラビノースのみが検出され、オリゴ糖は検出されなかった。このことは、本酵素が糖化型のアラビナナーゼであることを示している。*Aspergillus niger*^{6), 16)}、*Corticium rolfssii*⁹⁾、*Streptomyces* sp.¹¹⁾のアラビナナーゼ作用においても酵素反応生成物は同様にアラビノースのみであり糖化型アラビナナーゼ (α -L-アラビノフラノシダーゼ)であることが報告されている。ところが、*Clostridium felsineum*³⁾あるいは *Bacillus subtilis*¹⁰⁾のアラビナナーゼはアラビノース以外にアラビノオリゴ糖 (アラビノピオース) をも生成し、これらの酵素はいわゆる液化型アラビナナーゼであることが報告されている。

我々は酵素による農産加工廃棄物の高度利用を目的として多糖類分解酵素について検討を行っている。例えばテンサイ粕からアラビノースを調製する方法に本酵素を応用することが考えられるし、甘蔗バガスからキシロースを調製する方法にも本酵素を応用することが考えられる。即ち、甘蔗バガスのヘミセルロースから高純度のキシランあるいはキシロースを調製する為にはヘミセルロース中のアラビノースをいかにして除去するかということが重要な問題点である。本酵素の特性を利用することによりこのアラビノース除去操作が容易に行われることが期待できるものと思慮される¹⁸⁾。

V 要 約

放線菌のアラビナン分解活性を調べた結果、さとうきび畑から分離した *Streptomyces* sp. No 44 菌

株が最も高い活性を有することがわかった。*Streptomyces* sp. No 44 菌株をテンサイ粕抽出液を含むペプトン培地 (初発 pH 6.5~7.0) で 30°C, 36 時間振とう培養を行うことによりアラビナーゼがよく生産された。

本酵素はアラビナンを加水分解し、非還元性末端よりアラビノースのみを生成するいわゆる糖化型アラビナーゼであることが明らかになった。本酵素の反応最適 pH は 5.5~7.0 で、反応最適温度は 50°C であった。

本研究を遂行するにあたり有益な御助言を賜わり、御便宜をはかっていただきました本学農学部農芸化学科当山清善教授、清水俊秀元教授、小波本直忠助教授ならびに香川大学農学部農芸化学科梶明教授に深謝致します。また、試料に用いたテンサイ粕を提供下さった北海道糖業株式会社北見製糖所に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

1. Ehrlich, F. and Schubert, F. 1928 Über Tetra-araban und seine Beziehung zur Tetragalakturon säure, den Hauptkomplex der Pektinstoff, *Biochem. Z.*, **203**: 343~350
2. Hirst, E. L. and Jones, J. K. N. 1947 Pectic substances. Part VI. The structure of the araban from *Arachis Hypogena*, *J. Chem. Soc.*, p 1221~1225
3. 梶 明, 穴吹吉夫, 滝 博, 大山義郎, 岡田武久 1963 アラバン分解酵素に関する研究Ⅲ, *Clostridium felsineum* var. *Sikokianum* が生産するアラバン分解酵素, *香川大農学報* **15**: 40~44
4. 梶 明, 田川清 1965 アラバン分解酵素に関する研究Ⅵ, *Coniothyrium diplodiella* の生産するアラバナーゼ, *香川大農学報* **16**: 143~146
5. Kaji, A., Tagawa, K. and Matsubara, K. 1967 Studies on the enzymes acting on araban. Part VIII. Purification and properties of arabanase produced by *Aspergillus niger*, *Agric. Biol. Chem.*, **31**: 1023~1028
6. Kaji, A. Tagawa, K. and Ichimi, T. 1969 Properties of purified α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*, *Biochim. Biophys. Acta*, **171**: 186~188
7. Kaji, A. Yoshihara, O. 1969 Production and properties of α -L-arabinofuranosidase from *Corticium rolfsii*, *Appl. Microbiol.*, **17**: 910~913
8. Kaji, A. and Tagawa, K. 1970 Purification, crystallization and amino acid Composition of α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*, *Biochim. Biophys. Acta*, **207**: 456~464
9. Kaji, A. and Yoshihara, O. 1971 Properties of purified α -L-arabinofuranosidase from *Corticium rolfsii*, *Biochim. Biophys. Acta*, **250**: 367~371
10. Kaji, A. and Saheki, T. 1975 Endo-arabinanase from *Bacillus subtilis* F-11, *Biochim. Biophys. Acta*, **410**: 354~360
11. 日下部功, 安井恒男, 小林達吉 1975 種々の微生物のアラバン分解酵素とそれらを応用したアラビノースの調製, *農化* **49**: 295~305
12. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951 Protein measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**: 265~275
13. Nelson, N. 1944 A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.*, **153**: 19~23

14. Partridge, S. M. 1949 Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars, *Nature*, **164** : 443~443
15. Somogyi, M. 1952 Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.*, **195** : 19~23
16. Tagawa, K. and Kaji, A. 1969 Preparation of L-arabinose containing polysaccharides and the action of an α -L-arabinofuranosidase on these polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, **11** : 293~301
17. Uesaka, E., Sato, M., Raiju, E. and Kaji, A. 1978 α -L-Arabinofuranosidase from *Rhodotorula flava*, *J. Bacteriol.*, **13** : 1073~1077
18. 安田正昭, 宮里興信, 島袋政朋 1980 土壌から分離された放線菌による甘蔗バガスヘミセルロースの分解について, *琉大農学報* **27** : 119~128

Summary

The production and some properties of the enzyme hydrolyzing arabinan by *Streptomyces* sp. were described. The production of the enzyme was investigated with 262 strains of the actinomycetes isolated from soils of sugar-cane fields in Okinawa. The highest production of the enzyme was found in the culture fluid of *Streptomyces* sp. No. 44. In order to find the medium conditions required for the improvement of the enzyme production by this strain, the organism was grown in the medium containing beet-pulp extract. The best enzyme production was obtained when the organism was grown in the medium (initial pH 6.5 - 7.0) containing beet pulp extract at 30°C for 36 hr under aerobic conditions.

When L-arabinan was hydrolyzed with arabinanase, oligo saccharide was not liberated, but only L-arabinose was liberated. The enzyme had the maximum reactivity at about pH 5.5 - 7.0 and 50°C for the arabinanase reaction.