

Pycnoporus cinnabarinus の生産する耐熱性
 α -ガラクトシダーゼに関する研究

光富 勝

(生物資源利用化学講座)

平成 4 年 10 月 29 日 受理

Studies on Thermostable α -Galactosidase from
Pycnoporus cinnabarinus

Masaru MITSUTOMI

(Laboratory of Food Chemistry)

Received October 29, 1992

Summary

α -Galactosidase is a useful enzyme not only in the structural studies of carbohydrates, but in the beet sugar industry. Recently, oligosaccharides having α -galactosidic linkages, such as raffinose and stachyose, are found to promote the growth of bifidobacteria. Galactooligosaccharides synthesized by transgalactosylation action or by condensation action of α -galactosidase are expected to be utilized as growth factor for bifidobacteria. The present study deals with the purification and enzymatic properties of α -galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*, and its application to the enzymatic syntheses of galactooligosaccharides and to the hydrolysis of raffinose in beet sugar molasses.

α -galactosidase from *P. cinnabarinus* was purified by ammonium sulfate fractionation, heat treatment, DEAE-Sephadex A-50 chromatography and Sephadex G-150 gel filtration. The purified enzyme was homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis and ultracentrifugal analysis. The isoelectric point was 3.4 and the molecular weight was estimated to be about 210,000 by gel filtration on Sephacryl S-200 and about 52,000 by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis, suggesting that the enzyme is a homotetrameric protein. The enzyme was glycoprotein containing 14% carbohydrate. Crystals in rhombic plate form were observed when solid ammonium sulfate was added into the purified enzyme solution. The enzyme exhibited the optimum pH at 5.0 and was stable between pH 3 and 9. The optimum temperature of the enzyme was 75°C. The enzyme was thermostable at pH 5.0 and completely lost its activity after heating at 90°C for 15 min. Endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Fravobacterium* sp. could liberate about 50% of the sugar chains from the α -galactosidase. The carbohydrate-depleted α -galactosidase was less stable than the native enzyme below pH 4.0. After 20 freeze-thawings, the native and carbohydrate-depleted α -galactosidase showed 50% and 23% of the original activities, respectively. These results suggest that the sugar chains of the α -galactosidase contribute to the stability of the enzyme.

The α -galactosidase catalyzed the galactosyltransfer reaction in the hydrolysis of raffinose and produced several kinds of transfer products. The structures of the main transfer products

were investigated by acid and enzymatic hydrolysis, and methylation analysis. In addition to raffinose family oligosaccharides, stachyose, verbascose and ajugose, novel oligosaccharides having α -1,3-galactosidic linkages were identified. On the other hand, three kinds of trisaccharides were synthesized using condensation action of the α -galactosidase on the mixture of galactose and sucrose. The three trisaccharides isolated were identified as raffinose, planteose, and 3^c- α -galactosylsucrose. Conditions for synthesis of the trisaccharides by condensation action of the α -galactosidase were studied. The yield of the trisaccharides was approximately 15% based on the amount of galactose used, when α -galactosidase (40 units/ml) was incubated with 10% (w/v) galactose and 60% (w/v) sucrose for 48hr at pH 5.0 and 60°C.

The thermostable α -galactosidase was well immobilized on colloidal chitin with glutaraldehyde. The enzymatic properties of the α -galactosidase immobilized on colloidal chitin were similar to those of native enzyme. However, this immobilized enzyme was tightly packed in a column, and inconvenient for practical use. The thermostable α -galactosidase was also immobilized on chitosan beads, BCW 1000, and crosslinked chitosan beads, BCW 3000 and 3500, which were untreated or pretreated with glutaraldehyde. The activity yields of the immobilized enzymes were 25~45%, except for glutaraldehyde-untreated BCW 1000. Leakage of the enzyme with increasing ionic strength was observed in glutaraldehyde-untreated BCW 1000 and 3000. The α -galactosidase immobilized on glutaraldehyde-treated BCW 3000 and 3500 were active at pH 3~6 and at 70~80°C, and stable between pH 3 and 9, and below 70°C. The immobilized α -galactosidase was continuously used for 30 days to hydrolyze raffinose in beet sugar molasses. Key words: α -galactosidase, transglycosylation, codensation reaction, immobilized enzyme,

Pycnoporus cinnabarinus

目 次

第1章 序論	4
第2章 <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> の生産する耐熱性 α -ガラクトシダーゼの精製と性質	6
第1節 緒言	6
第2節 実験材料および実験方法	6
第1項 実験材料	6
第2項 活性測定法	6
第3項 タンパク質の定量	7
第4項 粗酵素の調製	7
第5項 酵素の精製	7
第6項 酵素の結晶化	7
第7項 ポリアクリルアミドゲル電気泳動	8
第8項 超遠心分析	8
第9項 分子量	8
第10項 等電点	8
第11項 吸光係数	8
第12項 アミノ酸組成	8
第13項 糖組成	9

第14項	エンド- β - <i>N</i> -アセチルグルコサミニダーゼによる糖鎖の除去	9
第3節	実験結果	9
第1項	α -ガラクトシダーゼの精製	9
第2項	α -ガラクトシダーゼのタンパク化学的性質	12
第3項	耐熱性 α -ガラクトシダーゼの酵素化学的性質	14
第4節	考察	19
第5節	小括	21
第3章	α -ガラクトシダーゼの糖転移反応による α -ガラクトオリゴ糖の酵素的合成	21
第1節	緒言	21
第2節	実験材料および実験方法	22
第1項	実験材料	22
第2項	HPLC による糖の分離・定量	22
第3項	糖のペーパークロマトグラフィーによる分離	22
第4項	糖のカラムクロマトグラフィーによる分離	22
第5項	糖転移反応生成物の構成糖の定量	23
第6項	メチル化分析	23
第7項	糖転移反応生成物の酵素分解	23
第8項	ラフィノースに対する作用	23
第9項	<i>p</i> -ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシドを供与体としたときの作用	23
第3節	実験結果	24
第1項	糖転移反応生成物の分離	24
第2項	糖転移反応生成物の構造	27
第3項	糖転移反応生成物の生産条件	30
第4項	受容体特異性	32
第4節	考察	32
第5節	小括	34
第4章	α -ガラクトシダーゼの縮合反応による α -ガラクトオリゴ糖の酵素的合成	34
第1節	緒言	34
第2節	実験材料および実験方法	34
第1項	実験材料	34
第2項	縮合反応生成物の分離	35
第3項	縮合反応生成物の構成糖の定量	35
第4項	メチル化分析	35
第5項	縮合反応生成物の酵素分解	35
第6項	旋光度の測定	35
第7項	縮合反応生成物の定量	35
第3節	実験結果	35
第1項	ガラクトースとスクロースの縮合反応による三糖の合成と分離	35
第2項	縮合反応生成物の構造	36
第3項	縮合反応生成物の生産条件	38

第4節 考察	40
第5節 小括	41
第5章 耐熱性 α -ガラクトシダーゼの固定化と応用	41
第1節 緒言	41
第2節 実験材料および実験方法	42
第1項 実験材料	42
第2項 酵素の固定化	42
第3項 固定化酵素の活性測定法	42
第4項 HPLCによる糖の定量	43
第5項 走査電子顕微鏡観察	43
第6項 廃糖蜜中のラフィノースの連続分解	43
第3節 実験結果	44
第1項 α -ガラクトシダーゼの固定化	44
第2項 α -ガラクトシダーゼのキトサンビーズへの固定化	47
第3項 固定化 α -ガラクトシダーゼによる糖蜜中のラフィノースの連続分解	51
第4節 考察	51
第5節 小括	53
第6章 総括	53
謝辞	55
文献	56

第1章 序 論

近年、めざましい進展を遂げつつあるバイオテクノロジーの中にあつて酵素の果たす役割は極めて重大であり、その高度利用法の開発は食品、医薬などさまざまな分野において重要な課題となっている。 α -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.22) はガラクトース含有糖質の非還元末端の α -ガラクトシド結合を選択的に切断するエキソ型酵素であり、動植物をはじめ微生物にいたるまで広く分布する。¹⁻³²⁾この酵素の有する基質特異性と効率よい触媒能に着眼した応用面における研究は1960年代より着手され、食品工業界にあつては最初、甜菜糖製造におけるラフィノースの除去を目的としてこの酵素が利用されるようになった。甜菜には約15%のスクロースのほか約0.1%のラフィノースが含まれており、これがスクロースの結晶化を著しく阻害し、スクロースの収率低下の原因となっている。Suzukiらは α -ガラクトシダーゼを含む *Mortierella vinacea* のペレット状菌体を用いてラフィノースを分解することにより、スクロースの収率を向上させることに成功し、³³⁻³⁶⁾この方法は現在、ステフェン法による甜菜糖製造において応用されている。

α -ガラクトシダーゼの基質となるラフィノース、スタキオース、ベルバスコースなどの α -ガラクトシド結合を有するオリゴ糖は植物界に広く分布し、貯蔵物質として種子、茎、根などに含まれているが、^{37, 38)}大豆などの豆類に含まれるラフィノース系列のオリゴ糖は腸内細菌により分解され腸内ガスの発生の原因となり、膨満因子として問題になっている。^{39, 40)}この問題を解

決するために Sugimoto と Buren は *Aspergillus saitoi* の生産する α -ガラクトシダーゼを部分精製し、豆乳に添加することによりラフィノース系列のオリゴ糖を分解した。⁴¹⁾その後、*M. vinacea*,⁴²⁾ *A. awamori*,⁴³⁾ *Cladosporium cladosporioides*⁴⁴⁾および *A. oryzae*⁴⁵⁾が生産する α -ガラクトシダーゼの α -ガラクトオリゴ糖分解への応用へ向けての展開がはかられてきたが、最近、ラフィノースやスタキオースはビフィズス菌による選択的利用性が高い糖類であり、^{46, 47)}大豆より抽出されたラフィノース系列のオリゴ糖はヒト腸内ビフィズス菌の増殖を強く促進させるとともに、腸内の β -グルクロニダーゼ活性を低下させる効果を有することが明かとなり、⁴⁸⁾ラフィノース系列のオリゴ糖は膨満因子としてよりも、むしろビフィズス菌増殖因子として重要視されるようになった。このように、機能的食品としてのガラクトオリゴ糖の評価が高まるにつれ、^{49, 50)} α -ガラクトシダーゼの糖転移反応や縮合反応を利用した機能を有する新規なオリゴ糖の創製が試みられるようになった。^{51, 52)}

これまでに、動植物をはじめ微生物など起源を異にする α -ガラクトシダーゼがいくつか見出されているが、なかでも、植物起源の α -ガラクトシダーゼに関しては研究例も多く、ソラマメ^{7, 8)}をはじめ、アルファルファ、¹¹⁾ チョロギ、¹²⁾ サトウキビ、¹³⁾ レンズマメ、¹⁴⁾ およびスイカ¹⁵⁾ から均一な酵素標品として単離され、酵素化学的性質が明らかにされている。しかし、これら植物起源の α -ガラクトシダーゼは pH や熱に対する安定性は低く、食品工業への利用という点では必ずしも満足すべきものとはいえない。これに対して、微生物起源の α -ガラクトシダーゼに関しては純化された例はきわめて少なく、わずかに *M. vinacea* の菌糸体から硫酸分画、DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィー、Bio-Gel P-200 によるゲルろ過により α -ガラクトシダーゼが精製され、結晶化されているにすぎない。また、酵素化学的な面に関してもあまり詳細な研究は行われておらず、*M. vinacea* α -ガラクトシダーゼはメリビオース、ラフィノースおよび *p*-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシド (NPGal) を分解するが、グアガムや B 型血液型物質に作用しないこと、および、pH6 以下では著しく不安定であることが報告されているにすぎない。²⁹⁾ 一般に、食品工業への酵素の利用をはかる上においては、安定で高い活性をもつ酵素の供給が要求される。このような観点に立脚して、著者は微生物界に安定な α -ガラクトシダーゼを求め、担子菌 *Pycnoporus cinnabarinus* IFO 6139 株が培養液中に高い糖転移活性を有する耐熱性 α -ガラクトシダーゼを多量に生産することを見出した。このことは、固定化酵素の調製という点で有利なばかりでなく、高温での酵素反応が可能であるため雑菌の汚染を防ぐことができるなど、酵素の工業的利用において種々の利点を有すると考えられる。耐熱性 α -ガラクトシダーゼに関する報告例は皆無であり、本酵素の酵素化学的性質を明かにし、食品工業への応用を研究することは極めて意義があると考えられる。

本研究では、まず第 2 章において、*P. cinnabarinus* の生産する α -ガラクトシダーゼを収率良く精製する方法を確立し、さらにその結晶化を行った。つぎに、精製酵素のタンパク化学的性質および酵素化学的性質について検討し、本酵素は熱のみでなく、界面活性剤 SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) やプロテアーゼに対して極めて安定であることを見出した。また、本酵素は約 14% の糖を含む糖タンパク質であることを示し、これら結合糖鎖と本酵素の安定性との関係について考察を加えた。

第 3 章では、高濃度のラフィノースを基質として本酵素の糖転移反応により生成した糖転移生成物を単離・同定した。その結果、糖転移生成物としてスタキオース、ベルバスコース、アジュゴースなどのラフィノース系列のオリゴ糖、およびスクロース、ラフィノース、スタキオースの非還元末端にガラクトースが α -1,3 結合した新規なガラクトオリゴ糖が生成することを明らかにした。また、糖転移反応の最適条件および糖転移反応における受容体特異性について

検討した。さらに、第4章においては、本酵素の縮合反応を利用して、ガラクトースとスクロースから α -ガラクトオリゴ糖の合成を試み、縮合反応によって得られる α -ガラクトオリゴ糖は、 3^{G} - α -ガラクトシルスクロース、プランテオースおよびラフィノースであることを明らかにするとともに、これらオリゴ糖生成における最適の条件を設定した。

第5章では、本菌の α -ガラクトシダーゼの工業的利用を目的として、本酵素の固定化を試み、本酵素はコロイド状キチンに高い活性収率で固定化されること、および、キトサンビーズに固定化された α -ガラクトシダーゼは、遊離の酵素と同様に高い熱安定性を有することを示した。また、本固定化酵素を甜菜糖蜜中のラフィノースの連続分解に応用し、本固定化 α -ガラクトシダーゼのバイオリクターとしての有用性を示した。

本論文は、*P. cinnabarinus*の生産する耐熱性 α -ガラクトシダーゼに関して得られた以上の研究成果をまとめたものである。

第2章 *Pycnoporus cinnabarinus*の生産する耐熱性 α -ガラクトシダーゼの精製と性質

第1節 緒 言

今日まで、多くの α -ガラクトシダーゼが動物、植物、微生物から分離され、酵素化学的性質が明らかにされている。しかし、動物や植物起源の α -ガラクトシダーゼに比較して微生物起源の α -ガラクトシダーゼに関しては精製された例は少なく、これまでに*M. vinacea*から高度に純化された酵素標品が得られているにすぎない。²⁹⁾

α -ガラクトシダーゼの食品工業への応用を目的として、微生物の生産する糖質分解酵素を検索した結果、担子菌*P. cinnabarinus*は培養液中に各種グリコシダーゼを生産し、その中に耐熱性の α -ガラクトシダーゼの存在を認めた。本章ではこの特性を生かしつつ*P. cinnabarinus*の培養液から、 α -ガラクトシダーゼを精製し、そのタンパク化学的および酵素化学的諸性質について検討した。

第2節 実験材料および実験方法

第1項 実験材料

P. cinnabarinus IFO 6139株は(財)発酵研究所より入手した。NPGalおよび他の

-ニトロフェニルグリコシド類はKoch-Light社製のものを用いた。メリピオースおよびラフィノースは、それぞれDifco社製および和光純薬工業社製のものを使用した。スタキオース、ローカストビーンガム、グアガムおよびトラガカントガムはSigma社製である。

Flavobacterium sp. 由来のエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼは京都大学農学部山本憲二博士より恵与されたものを用いた。プロナーゼE、ズブチリシン、およびトリプシンはSigma社より、また、カルボキシペプチダーゼYはオリエンタル酵母社より求めた。

第2項 活性測定法

α -ガラクトシダーゼ活性はNPGalを基質に用いて測定した。すなわち、4 mM基質0.2 ml, 0.2M Na₂HPO₄-0.1Mクエン酸緩衝液(pH5.0) 0.2ml, 酵素溶液0.1mlを含む反応液を37°Cで10分間反応させた後、0.2M炭酸ナトリウム溶液2.0mlを加えて反応を停止し、遊離する

-ニトロフェノールを420nmにおける吸光度で測定した。上記の条件下で毎分1 μ molの

-ニトロフェノールを遊離させる酵素量を1酵素単位とした。

メリピオース、ラフィノース、スタキオースに対する水解活性の測定は次のように行った。

すなわち、0.1M 基質溶液0.2ml, 0.2M Na_2HPO_4 -0.1M クエン酸緩衝液 (pH5.0) 0.2ml, 酵素溶液0.1ml を含む反応液を37°Cで10分間反応させ、4分間煮沸することにより反応を停止させた。メリビオースを基質にしたときは、生成するグルコース量を和光純薬工業社製のグルコース-C-テスト (ムタロターゼ・グルコースオキシダーゼ法) を用いて、また、ラフィノースおよびスタキオースを基質にした場合には、生成するガラクトース量を Somogyi-Nelson 法⁵³⁾により定量した。ガラクトース含有多糖に対する活性は、多糖10mg を含む0.2M Na_2HPO_4 -0.1M クエン酸緩衝液 (pH5.0) 1.8ml に酵素溶液0.2ml (20酵素単位) を加え、37°Cで24時間反応を行い、遊離するガラクトース量を Somogyi-Nelson 法⁵³⁾により定量することにより求めた。

第3項 タンパク質の定量

タンパク質は牛血清アルブミンを標準タンパク質として Hartree 法⁵⁴⁾により定量した。

第4項 粗酵素の調製

P. cinnabarinus IFO 6139株はポテトグルコース培地で、25°C, 7日間培養後、低温室に保存した。斜面培地より菌糸約25mm²をとり、スクロース2%, ペプトン3%, 酵母エキス0.5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%からなる培地50ml (pH5.0) を含む250ml容三角フラスコに接種し、30°Cで6日間振盪培養した。この培養液20mlを同培地1ℓを含む5ℓ容三角フラスコに接種し、30°Cで10日間振盪培養した。遠心分離(8,000rpm x 15min)により菌体を除去して得た上清を粗酵素液として以下の実験に供した。

第5項 酵素の精製

酵素の精製は4°Cで行った。粗酵素液10ℓに70%飽和となるように粉末硫酸を攪拌しながら添加した。4°Cで2日静置した後、遠心分離(8,000rpm x 15min)し、沈澱物を集めた。この沈澱物を水に溶解後、0.05M リン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化した Sephadex G-25カラム (5.0 x 79cm) に供した。素通り画分 (690ml) を0.05M リン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化した DEAE-Sephadex A-50カラム (5.0 x 68cm) に添加し、同緩衝液で未吸着部分を溶出後、NaCl 濃度を0から0.4M まで直線的に増加させることにより、吸着画分を溶出した。各溶出画分について280nmにおける吸光度および酵素活性を測定した。 α -ガラクトシダーゼ活性を有する画分を集め、1M 酢酸でpH5.0に調整した後、75°Cで30分間処理した。生じた沈澱を遠心分離 (10,000 rpm x 15min) により除去し、上澄液をアミコン社製の限外ろ過膜 PM-10 (分画分子量10,000) で30mlに濃縮後、0.05M 酢酸緩衝液 (pH4.0) に対して24時間透析した。透析内液 (36ml) を0.05M 酢酸緩衝液 (pH4.0) により平衡化した DEAE-Sephadex A-50カラム (2.6 x 55cm) に供した。溶出は0-0.18M の NaCl 濃度を直線的に上昇することにより行った。活性画分を集め、限外ろ過により約5mlに濃縮した。濃縮液を0.05M 酢酸緩衝液 (pH4.0) で平衡化した Sephadex G-150カラム (2.6 x 95cm) に供し、同緩衝液を用いて溶出した。

第6項 酵素の結晶化

Sephadex G-150によるゲルろ過で得られた活性画分を限外ろ過膜でタンパク質濃度が約13 mg/mlになるように濃縮後、これに粉末硫酸を少しずつ微白濁を呈するようになるまで加え、4°Cで2日間放置した。

第7項 ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Davis の方法⁵⁵⁾に従って行った。泳動は7.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、pH9.5で行った。タンパク質はクマージブリリアントブルー-R-250で染色した。また、糖の染色には過ヨウ素酸一フクシン法⁵⁶⁾を用いた。

第8項 超遠心分析

上記の Sephadex G-150によるゲルろ過で得た精製酵素を0.2M 酢酸緩衝液 (pH4.7) に溶解後、同緩衝液に対して十分に透析した後、超遠心による分析を行った。タンパク質濃度は3.0mg/mlとした。分析は日立分析用超遠心機 (828型) を用い、20°Cで60,000回転に達した後、6分間毎に写真撮影を行った。各時間における回転軸からの距離を測定し、沈降係数を算出した。

第9項 分子量

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量の測定は Webber と Osborn⁵⁷⁾の方法に従った。0.1%SDS を含む7.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、カラム当り 8 mA, 約5時間泳動を行った。泳動後、タンパク質をクマージブリリアントブルー-R-250で染色した。標準タンパク質には BDH 社製の分子量マーカー-L (リゾチームを化学的に重合化して調製された単量体から6量体までの混合物) を使用した。

また、ゲルろ過法による分子量の測定は Andrews⁵⁸⁾の方法に準じて行った。酵素タンパク質および標準タンパク質のゲルろ過は0.1M NaCl を含む0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) で平衡化した Sephacryl S-200カラム (2.6 x 95cm) を用いて、20ml/hr の流速で行った。標準タンパク質としてはオボアルブミン (分子量45,000)、牛血清アルブミン (同68,000)、アルドラーゼ (同158,000)、カタラーゼ (同240,000) およびフェリチン (同450,000) を使用した。

第10項 等電点

α -ガラクトシダーゼの等電点は焦点電気泳動法⁵⁹⁾により求めた。両性担体 (Ampholine (pH2.5~4) : (pH3.5~10) = 4 : 1, 平均終濃度1%) を用い、スクロースで密度勾配を作製した。本酵素を1%グリシンで平衡化後、LKB 等電点分画用カラム (110ml) に添加し、2°C、500V で48時間通電後、2.5mlずつ分画した。pH の測定は氷水冷却下で行った。

第11項 吸光係数

精製酵素標品は0.1M KCl で2日間透析後、蒸留水で3日間透析した。酵素溶液の吸収スペクトルは自記分光光度計 (日立製作所557型) により測定した。また、同時に酵素溶液の一定量を秤量ビンにとり70°C、減圧下で乾燥した後、さらに105°Cで乾燥し、真空デシケーター中で放冷した。一定の重量になるまでこの操作を繰り返し、酵素の乾燥重量を求めた。⁶⁰⁾測定結果より本酵素の280nm における吸光係数を算出した。

第12項 アミノ酸組成

酵素標品を減圧封管した試験管中で6N塩酸により、110°C、24、48、72時間加水分解した。減圧乾固後、pH2.2の0.2M クエン酸ナトリウム-塩酸緩衝液に溶解し、アミノ酸自動分析機 (日本電子 JLC-300) を用いて定量した。セリンとスレオニンは零時間に補外して求めた。バリンとイソロイシンの量は72時間の値を用いた。システインは過ギ酸酸化した試料を酸加水分解し、システイン酸として求めた。また、トリプトファンは Edelhoch⁶¹⁾の方法に従って、分光

学的に定量した。すなわち、試料を 6 M グアニジン塩酸塩溶液 (0.02M リン酸緩衝液, pH6.5 含有) に溶解し、288nm の吸光度を測定した。

第13項 糖組成

構成糖は精製酵素標品を酸加水分解後、ガスクロマトグラフィーで定量した。ガスクロマトグラフィーには水素炎イオン化検出器付 G-180ガスクロマトグラフ (柳本製作所) を用いて行った。すなわち、試料に 2N トリフルオロ酢酸を加え封管し、100°C、8 時間加水分解後、濃縮乾固し、水に溶解して、Dowex 50 (H⁺) (200~400mesh, 8 mm x 5 cm) カラムに添加した。未吸着画分を中性糖画分、2N 塩酸で溶出される画分をアミノ糖画分として集め、それぞれ濃縮乾固した。中性糖画分は 1 ml の水に溶解後、水素化ホウ素ナトリウム 10mg を加え、4°C で一晚還元した。酢酸を加えて過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解した後、Dowex 50 (H⁺) カラムに供した。未吸着画分を濃縮乾固し、さらにメタノールを加えて濃縮乾固する操作を 3 回繰り返した後、ピリジン-無水酢酸 (1 : 1) 100 μ l を加え、100°C で 30 分間加熱してアセチル化した。得られたアルジトール・アセテート誘導体はガスクロマトグラフィーにより分析した。クロマトグラフィーは Gas Chrom Q カラム (液相: 3% ECNSS-M, 100-120mesh, 0.3 x 75cm) を使用し、180°C で行った。内部標準物質としてキシロースを用い、上記と同様に還元後、アセチル化した。

アミノ糖は水素化ホウ素ナトリウムで還元後、酢酸で過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解し、減圧乾固した。残渣にメタノールを加え蒸発乾固を繰り返した後、上記と同様にアセチル化した。ガスクロマトグラフィーは Gas Chrom Q カラム (液相: 3% Poly-A103, 100-120 mesh, 0.3 x 200cm) を用い、220°C で行った。内部標準物質としてはガラクトサミンを用い、上記と同様に還元後、アセチル化した。

第14項 エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼによる糖鎖の除去

α -ガラクトシダーゼ 10mg を 0.05M 酢酸緩衝液 (pH6.0) 1.6ml に溶解し、これにエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ 0.01ml (1 酵素単位) を加え、37°C で 24 時間反応させた。反応液を 0.1M NaCl を含む 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.4) で平衡化した Sephacryl S-200 カラム (2.6 x 95cm) に添加し、同緩衝液を用いて溶出した。糖含量はマンノースを標準物質としてフェノール-硫酸法²⁾により測定した。

第3節 実験結果

第1項 α -ガラクトシダーゼの精製

(1) 酵素の精製

培養ろ液の 70% 飽和硫酸沈澱物を Sephadex G-25 で脱塩後、0.05M リン酸緩衝液 (pH6.0) に平衡化した酵素液について DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーを行った。その結果、Fig. 1 に示すように、3 つの画分を得た。 α -ガラクトシダーゼ活性は画分 II に認められたが、この画分には β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼおよび β -グルコシダーゼ活性も認められた。

この画分を、さらに pH5.0、75°C で 30 分間処理したところ、 α -ガラクトシダーゼの活性は低下しなかったが、 β -ガラクトシダーゼ、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼおよび β -グルコシダーゼ活性は完全に消失した。

熱処理後、pH を 4.0 に調整し、再び DEAE-Sephadex A-50 によるイオン交換クロマトグラ

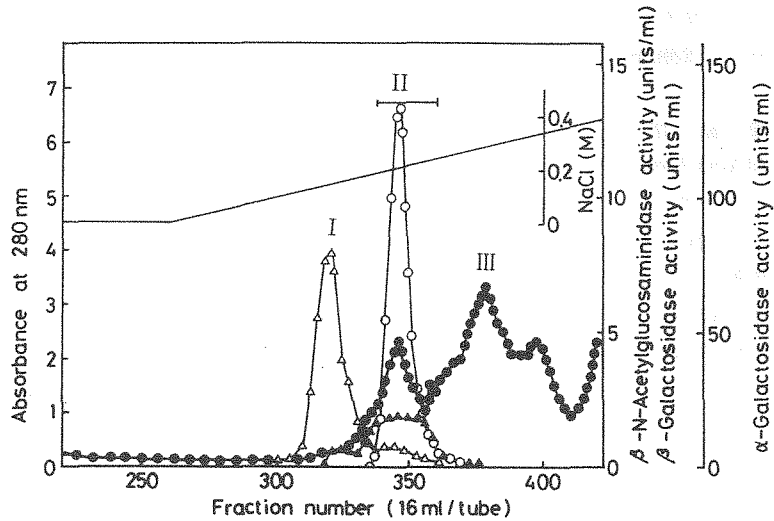


Fig. 1 Chromatography of the Crude Enzyme on DEAE-Sephadex A-50. Desalted enzyme solution (690ml) was applied to a DEAE-Sephadex A-50 column (5.0 x 79cm). The column was washed with 0.02M phosphate buffer (pH6.0) and eluted with a linear NaCl gradient (0 to 0.4M) in the same buffer at a flow rate of 78ml per hr. Fractions indicated by (→) were pooled.

●, absorbance at 280nm; ○, α -galactosidase activity;
 △, β -N-acetylglucosaminidase activity; ▲, β -galactosidase activity;
 —, NaCl concentration.

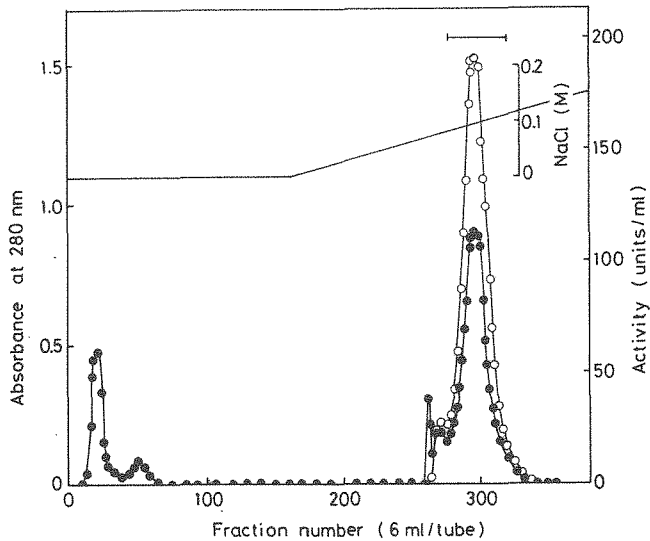


Fig. 2 Rechromatography of Heat-treated Fraction II on DEAE-Sephadex A-50. After treatment for 30 min at 75°C, 36ml of the fraction II (in Fig. 1) was applied to a DEAE-Sephadex A-50 column (2.6 x 55cm). The column was washed with 0.05M sodium acetate buffer (pH4.0) and eluted with a NaCl gradient (0 to 0.18M) in the same buffer at a flow rate of 43ml per hr. Fractions indicated by (→) were pooled.

●, absorbance at 280nm; ○, α -galactosidase activity;
 —, NaCl concentration.

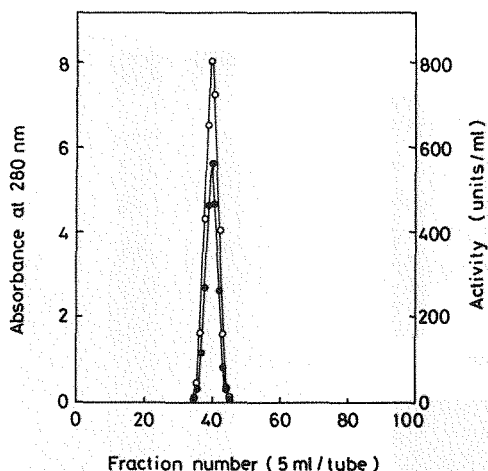


Fig. 3 Gel Filtration of α -Galactosidase on Sephadex G-150.

The enzyme solution obtained from Fig. 2 was concentrated and 5 ml of the solution was applied to a Sephadex G-150 column (2.6 x 95cm). The column was developed with 0.05M sodium acetate buffer (pH 4.0) at a flow rate of 18ml per hr.

●, absorbance at 280nm;
○, α -galactosidase activity

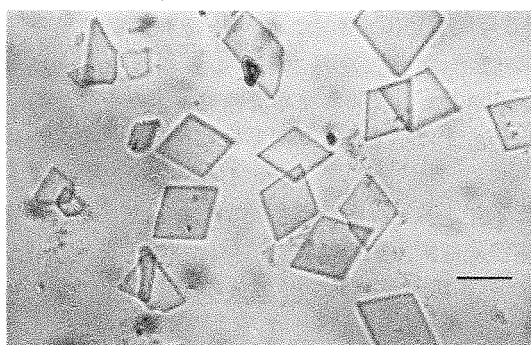


Fig. 4 Crystals of α -Galactosidase from *P. cinnabarinus*. Scale indicates 10 μ m.

フィーを行った (Fig. 2). この操作により本酵素の比活性は41倍に上昇した。

さらに、活性画分を集め Sephadex G-150 カラム (2.6 x 95cm) によるゲルろ過に供し、Fig. 3 に示すような結果を得た。 α -ガラクトシダーゼのピークと280nmの吸収のピークは完全に一致した。

精製過程の各段階における酵素活性、タンパク質量を測定し、Table 1 にまとめた。本酵素は硫酸塩析物から59.4%の収率で約44倍に精製された。精製酵素標品は0.05M リン酸緩衝液 (pH6.5) 中、4°Cで少なくとも6カ月間

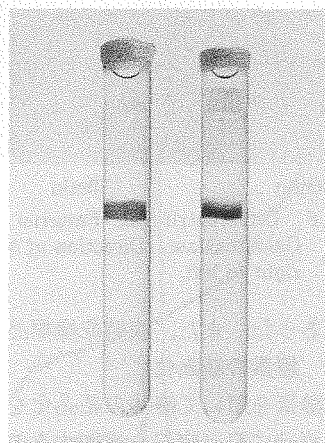


Fig. 5 Polyacrylamide Disc Gel Electrophoresis of Purified α -Galactosidase.

Polyacrylamide gel electrophoresis was carried out in 7.5% polyacrylamide gel at pH 9.5 in a cold room. The purified enzyme (60 μ g) was applied.

Left; stained with Coomassie brilliant blue R-250,
Right; stained with periodic acid-fuchsin.

Table 1 Purification of α -Galactosidase from *Pycnoporus cinnabarinus*.

Step	Protein (mg)	Activity (units)	Yield (%)	Specific activity (units/mg)	purification (fold)
Ammonium sulfate precipitation	4,090	26,600	100	6.50	1
1st DEAE-Sephadex A-50	331	18,400	69.2	55.6	8.6
Heat treatment	278	17,300	65.0	62.2	9.6
2nd DEAE-Sephadex A-50	65	17,300	65.0	266	40.9
Sephadex G-150	55	15,800	59.4	287	44.2

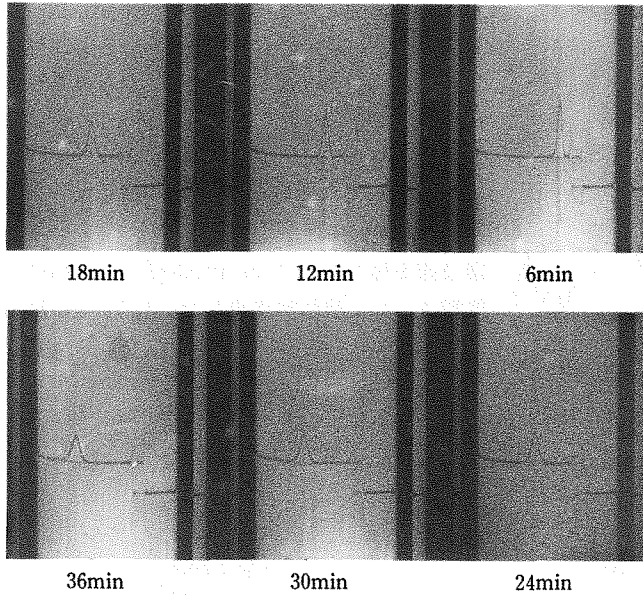


Fig. 6 Ultracentrifugal Patterns of the Purified α -Galactosidase. Direction of sedimentation was from right to left.

安定であった。また、凍結乾燥標品は -20°C で3年間安定であった。

(2) 酵素の結晶化

精製酵素を用いて酵素の結晶化を試みた。Sephadex G-150カラムクロマトグラフィーにより得た画分に粉末硫酸を添加することにより、Fig. 4に示すような菱形板状結晶を得た。

(3) 酵素の均一性

Fig. 5には精製酵素標品のポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示した。左側がタンパク質の染色、右側が糖の染色を示している。本標品は両染色法において単一バンドを示し、その泳動位置が完全に一致しており、このことから本酵素が糖タンパク質であることが明らかとなった。

Fig. 6に本酵素の超遠心による沈降図形を示した。このように左右対称で鋭い単一のピークを示し、本酵素標品は超遠心的にも均一であることが判明した。また、沈降係数($s_{20,w}$)は9.75と算出された。

第2項 α -ガラクトシダーゼのタンパク化学的性質

(1) 分子量

本酵素を1% SDS(2% β -メルカプトエタノール含有)存在下で 100°C 、5分間加熱後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、結果をFig. 7に示した。本酵素はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動においても単一のバンドを示した。また、 β -メルカプトエタノール非存在下で同様に加熱後、泳動した場合と泳動距離は同じであった。このことより、サブユニット間のジスルフィド結合は存在しないことが示唆された。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分子量を測定した結果、Fig. 8-Aに示すよ

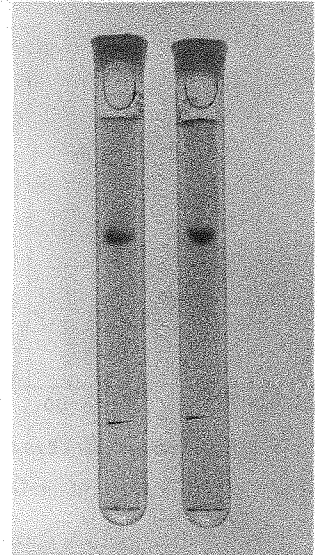


Fig. 7 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Purified α -Galactosidase. Purified enzyme ($15\mu\text{g}$ protein) was applied to a 7.5% SDS - polyacrylamide gel in the presence (left) or absence (right) of β -mercaptoethanol.

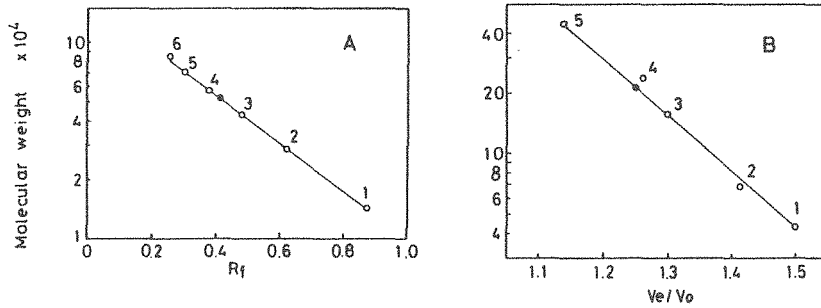


Fig. 8 Estimation of Molecular Weight of α -Galactosidase by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (A) and Gel Filtration on Sephacryl S-200 (B).

○, marker proteins; (A), 1 to 6; monomer to hexamer of lysozyme (MW 14,300 to 85,800), (B), 1; ovalbumin, 2; bovine serum albumin, 3; aldolase, 4; catalase, 5; ferritin, ●, α -Galactosidase.

うに本酵素の分子量は約52,000と算出された。一方, Sephacryl S-200を用いたゲルろ過法によって推定された分子量は約210,000であった (Fig. 8-B)。これらの結果から, 本酵素は分子量52,000の同一サブユニットから構成される4量体であることが示唆された。

(2) 等電点

本酵素の焦点電気泳動の結果を Fig. 9 に示した。この結果より, 本酵素の等電点は pH3.4 と求められ, 酸性タンパク質であることが示唆された。

(3) 吸収スペクトル

本酵素の紫外吸収スペクトルを Fig. 10 に示した。図から明かなように280nm に極大

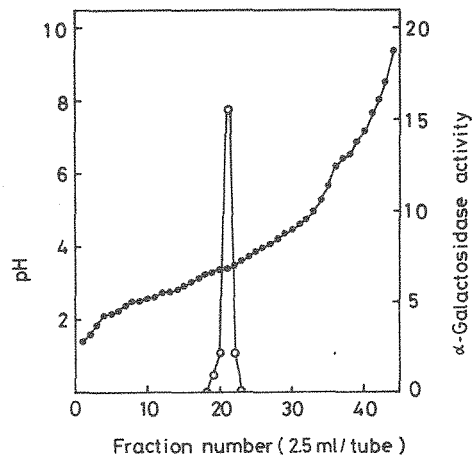


Fig. 9 Isoelectric Focusing of α -Galactosidase.

The purified enzyme was subjected to isoelectric focusing in a 110 ml LKB column containing 1% Ampholine solution, a 4:1 mixture of Ampholine pH 2.5 ~4 and pH 3.5~10 with a stepwise sucrose gradient. Electrophoresis was carried out at 2°C for 48 hr with 500V.

●, pH; ○, α -Galactosidase activity.

を有し, 290nm に肩を有する吸収スペクトルが得られた。また, 本酵素の1%溶液の280nmにおける吸光度 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) は20.7と求められた。

(4) アミノ酸および糖組成

本酵素を構成するアミノ酸および糖の定量を行った。Table 2 に示すように, 本酵素を構成するアミノ酸残基のうち酸性アミノ酸が比較的多く含まれていた。アミノ酸分析の結果

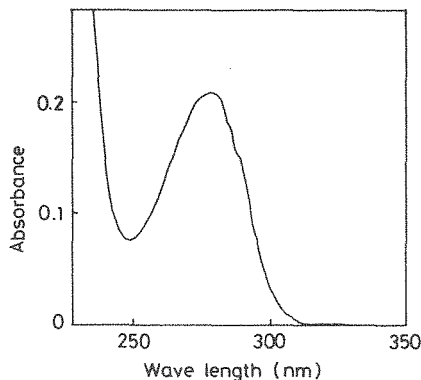


Fig. 10 UV-absorption Spectrum of α -Galactosidase.

The spectrum was recorded in deionized water.

Table 2 Amino acid and Carbohydrate Compositions of α -Galactosidase.

component	Residues per subunit ^{a)}
[amino acid]	
Aspartic acid	59.9
Threonine	25.1
Serine	34.0
Glutamic acid	26.2
Proline	20.0
Glycine	37.7
Alanine	27.9
Half-cystine ^{b)}	7.4
Valine	20.3
Methionine	8.1
Isoleucine	17.9
Leucine	24.6
Tyrosine	13.5
Phenylalanine	13.7
Histidine	13.1
Lysine	7.6
Arginine	10.9
Tryptophan ^{c)}	15.3
[Carbohydrate]	
Mannose	32.9
Glucose	2.2
Glucosamine	4.8

^{a)} The values are expressed on the basis of a subunit molecular weight of 52,000.

^{b)} Determined as cysteic acid after performic acid oxidation.

^{c)} Determined spectrophotometrically.

から明かのように本酵素にはシステインが含まれているが、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB) と反応しないことから遊離のシステインは存在しないことが示唆された。

本酵素の糖鎖を構成している糖はマンノース、グルコース、グルコサミンであり、マンノース含量に富んでいた。また、ガラクトサミンは検出されなかった。これらの結果より、本酵素は約14.2% (w/w) の糖を含む糖タンパク質であることがわかった。

第3項 α -ガラクトシダーゼの酵素化学的性質

精製酵素標品を用いて以下のように本酵素の酵素化学的諸性質を調べた。

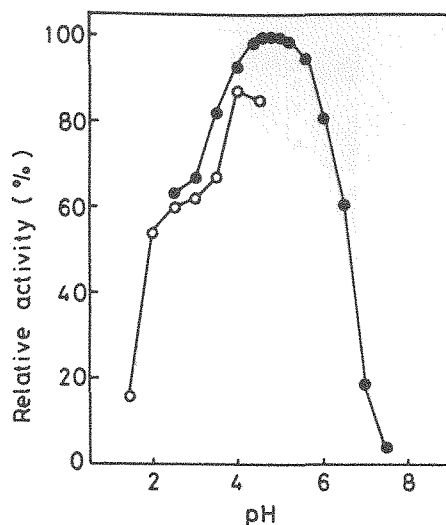


Fig. 11 Effect of pH on α -Galactosidase Activity.

The enzyme activities were measured at 37°C and various pHs. NPGal was used as a substrate.

○, 0.1M sodium citrate-0.1N HCl buffer;

●, 0.2M Na₂HPO₄-0.1M citric acid buffer.

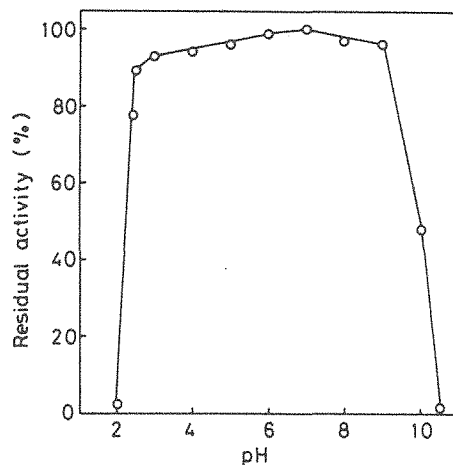


Fig. 12 Effect of pH on the Stability of α -Galactosidase.

The enzyme were kept for 2 hr at 37°C in various buffers of pH 2.0 to 10.5, and the enzyme activities were measured at 37°C and pH 5.0. NPGal was used as a substrate. pH 2.0~2.5, 0.1M sodium citrate-0.1N HCl buffer; pH 3.0~8.0, 0.2M Na₂HPO₄-0.1M citric acid buffer; pH 9.0~10.5, 0.2M boric acid plus 0.2M KCl-0.2M Na₂CO₃ buffer.

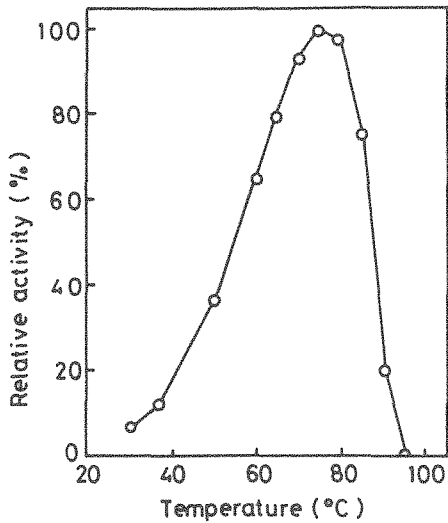


Fig. 13 Effect of Temperature on α -Galactosidase Activity. The enzyme activities were measured at pH 5.0 and at various temperatures.

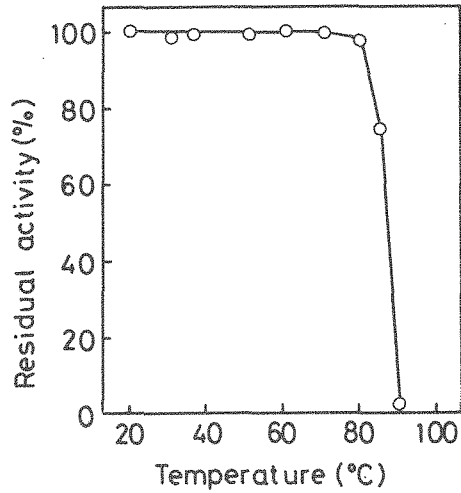


Fig. 14 Effect of Temperature on the Stability of α -Galactosidase. The enzyme solution (pH 5.0) was kept at various temperatures for 15 min, and the enzyme activities were measured at pH 5.0 and at 37°C.

(1) 最適 pH

α -ガラクトシダーゼ活性に及ぼす pH の影響を調べた。NPGal を基質に用いたときの pH-活性曲線を Fig. 11 に示した。本酵素の最適 pH は 5.0 付近にあった。メリビオース、ラフィノース、スタキオースを基質とした場合においても本酵素は pH 5.0 付近で最大活性を示した。

(2) pH 安定性

本酵素を pH 2.0~10.5 の緩衝液と混合し、37°C で 2 時間保温した後、pH を 5.0 とし、残存活性を測定した。その結果、Fig. 12 に示すように、本酵素は pH 3.0 から pH 9.0 の範囲で安定なことが判明した。

(3) 最適温度

反応温度と活性の関係を Fig. 13 に示した。この結果より本酵素の最適温度は 75°C と求めら

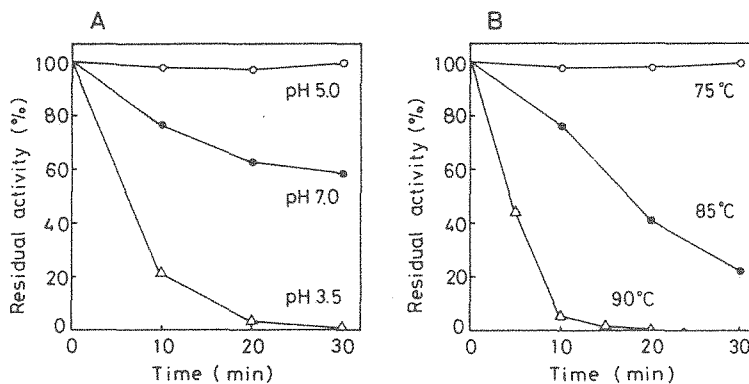


Fig. 15 Effects of Temperature and pH on the Stability of α -Galactosidase. The enzymes were kept at 75°C and at indicated pHs (A), or at indicated temperatures and at pH 5.0 (B).

れた。

(4) 熱安定性

酵素液を pH5.0, 30~90°Cの各温度で15分間処理し, 残存する酵素活性を測定した. Fig. 14 に示すように本酵素は75°Cまでは安定であり, 活性の低下はみられなかったが, 85°Cでは活性は75%にまで低下し, 90°C, 15分間の加熱で完全に失活した. ついで, 精製酵素を pH3.5~7.0 の緩衝液で希釈後, 75°C, 30分間保温し残存活性を測定し, Fig. 15-A に示すような結果を得た. 本酵素は pH5.0では75°C, 30分間の熱処理では活性の低下はみられなかったが, pH7.0では75°C, 30分間の熱処理で60%にまで低下し, pH3.5では活性は急激に低下して, 30分後には完全に失活した. また, pH5.0では, 75°Cで5時間処理しても活性の低下は認められず, 8時間後においても活性は70%以上保持された. しかし, pH5.0においては90°Cの熱処理により急激に活性が低下し, 15分後には完全に失活した (Fig. 15-B). これらの結果から, 本酵素は pH5.0では, 耐熱性がきわめて高いこと, および, その熱安定性は pH に依存することが明らかとなった.

(5) 基質特異性

NPGal, メリビオース, ラフィノース, スタキオースを基質として用い, 基質濃度と反応速度の関係を Lineweaver-Burk の方法に従って作図し, それぞれの基質に対する速度パラメーターを求めた. Fig. 16 に示すようなプロットより, 各基質に対する K_m 値, V_{max} 値を求め Table 3 にまとめた. これらの結果から, K_m 値は NPGal に対して最も小さく, メリビオース, スタキオース, ラフィノースの順に大きくなっ

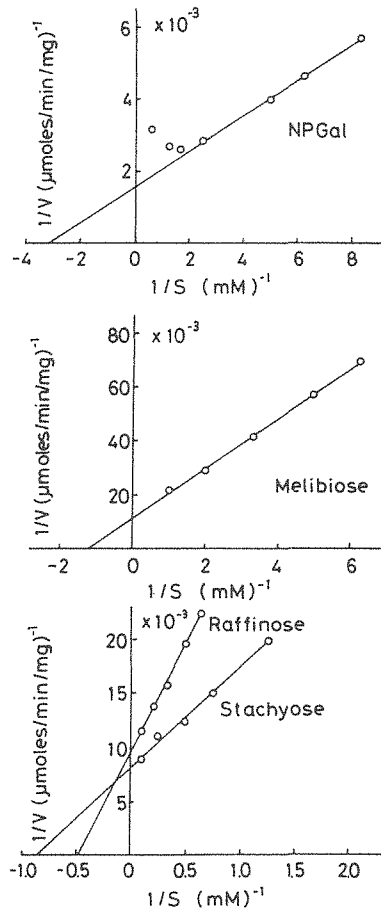


Fig. 16 Lineweaver-Burk Plots for the α -Galactosidase-catalyzed Hydrolysis of NPGal, Melibiose, Raffinose, and Stachyose.

The enzyme activities were measured at substrate concentrations of 0.12 ~ 1.6 mM pNPGal, 0.16 ~ 1.0mM melibiose, 1.6~10mM raffinose, and 0.80~10mM stachyose, under the standard condition.

Table 3 Kinetic Parameters for *P. cinnabarinus* α -Galactosidase-catalyzed Reactions.

Substrate	K_m (mM)	V_{max} (μ moles/min/mg)
NPGal	0.31	630
Melibiose	0.80	87
Raffinose	2.16	106
Stachyose	1.15	123

Table 4 Hydrolysis of Polysaccharides Containing Galactose by *P. cinnabarinus* α -Galactosidase.

Polysaccharide	Galactose produced (μ g/24hr)
Locust bean gum	115
Guar bean gum	62
Tragacanth gum	0
Gum arabic	0

た。Vmax 値は NPGal で最も大きくスタキオース、ラフィノース、メリビオースの順に小さくなった。なお、NPGal の場合には高濃度の基質による阻害効果が見られた。

次に、ガラクトース含有多糖に対する本酵素の作用について検討した。その結果、Table 4 に示すように、本酵素は主鎖にガラクトースを含み分岐構造をもつトラガカントガムやアラビアガムには作用しないが、側鎖に α -ガラクトシド結合をもつガラクトマンナンであるローカストビーンガムおよびグアガムを分解することが明かとなった。また、この場合グアガムよりローカストビーンガムの方がより有効な基質となることが明かとなった。

(6) 変性剤の影響

一般に、好熱菌の耐熱性酵素は熱のみでなく変性剤に対する抵抗性も高いことが知られている。⁶³⁾まず、Table 5 に示すように種々の変性剤と α -ガラクトシダーゼを 37°C で 2 時間保温した後、同濃度の変性剤存在下で NPGal を基質として酵素活性を測定した。その結果、本酵素は SDS、エタノールに対して比較的安定であるが、尿素やグアニジン塩酸に対しては不安定であり、6 M グアニジン塩

Table 5 Effect of Denaturants on α -Galactosidase Activity.

Denaturant	Activity (%)*
None	100
1% SDS	98
20% Ethanol	85
6M Urea	42
6M Guanidine-HCl	0

* measured using NPGal as a substrate.

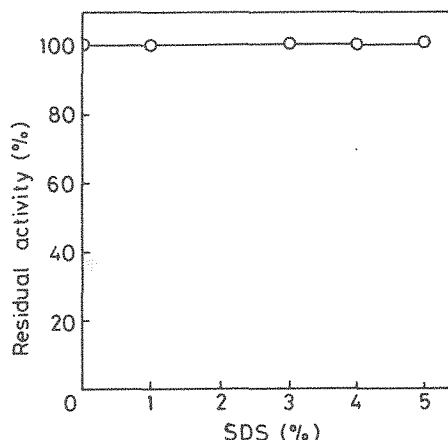


Fig. 17 α -Galactosidase Activity after Treatment with Various Concentrations of SDS.

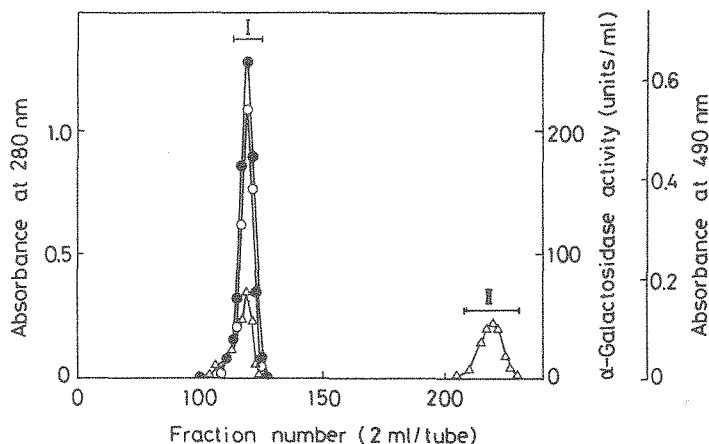


Fig. 18 Sephacryl S-200 Chromatography of the Endo- β -N-Acetylglucosaminidase Digest of α -Galactosidase.

The endo- β -N-Acetylglucosaminidase digest of α -galactosidase was applied to a Sephacryl S-200 column (2.6 x 95cm). Gel filtration was performed with 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.1M NaCl at a flow rate of 20ml per hr. NPGal was used as a substrate.

●, absorbance at 280 nm; ○, α -Galactosidase activity; △, absorbance at 490 nm

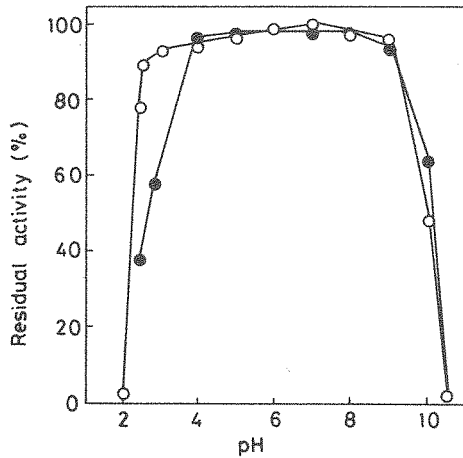


Fig. 19 Effect of pH on the Stability of α -Galactosidase.

NPGal was used as a substrate.

○, native α -galactosidase; ●, carbohydrate-depleted α -galactosidase.

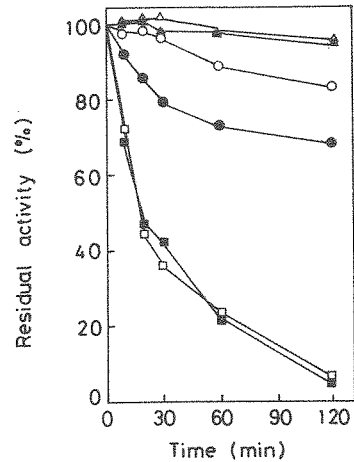


Fig. 20 Effects of Temperature and pH on the Stability of α -Galactosidase.

NPGal was used as a substrate.

○●, pH4.0; △▲, pH5.0; □■, pH6.0; ○△, native α -galactosidase; ●▲■, carbohydrate-depleted α -galactosidase.

酸により完全に失活した。ついで、本酵素を各濃度の SDS を含む 0.01M リン酸緩衝液 (pH7.0) 中に 40°C, 24 時間保温後、残存活性を測定したところ、Fig. 17 に示すように 5% SDS 存在下、40°C, 24 時間保温しても活性の低下はみられなかった。

(7) 糖鎖の除去による安定性の変化

前述のように、本酵素は糖を約 14% 含む糖タンパク質である。本酵素の糖鎖と安定性との関係を検討するために、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼによる糖鎖の除去を試みた。 α -ガラクトシダーゼにエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを作用させた反応液を Sephacryl S-200 カラム (2.6 x 95 cm) に供した (Fig. 18)。酵素活性を有する画分 I を集め、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを作用させてもさらに分解は認められなかった。フェノール-硫酸法⁶²⁾により糖含量を測定した結果、この操作によって糖鎖の約 50% が除去されても、酵素活性の低下は認められないことが判明した。次にエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼによって糖鎖を除去した α -ガラクトシダーゼを用いて、pH 安定性、熱安定性、プロテアーゼに対する被分解性および凍結融解に対する安定性を調

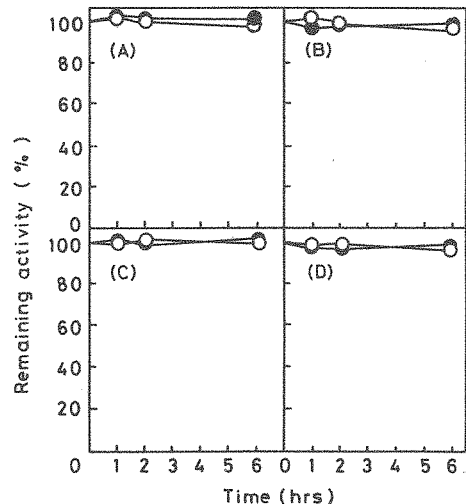


Fig. 21 Enzyme Activities of Native and Carbohydrate-depleted α -Galactosidases after Treatment with Pronase E (A), Subtilisin (B), Trypsin (C) and Carboxypeptidase Y (E). NPGal was used as a substrate. ○, native α -Galactosidase; ●, carbohydrate-depleted α -Galactosidase.

べた。各 pH に 37°C, 2 時間保温した後, 残存活性を測定したところ, Fig. 19 に示すように未修飾酵素は pH3.0 から pH9.0 の範囲で安定であるのに対し, 糖鎖除去酵素では pH3.5 以下において著しい活性の低下がみられた。

一方, 酵素を各 pH で 75°C で処理し, 残存活性を測定した結果, Fig. 20 に示すように, pH5.0 においては糖鎖除去酵素および未修飾酵素はともに安定であったが, pH4 では糖鎖除去酵素の方が未修飾酵素に比べ活性の低下が顕著であった。

ついで, 両酵素に 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) 中で 100 倍量 (w/w) のプロテアーゼ (プロナーゼ E, ズブチリシン, トリプシン, カルボキシペプチダーゼ Y) により, 37°C で処理し, 酵素活性を測定した (Fig. 21)。その結果, 未修飾酵素, 糖鎖除去酵素いずれの場合にもプロテアーゼ処理による活性の低下は認められなかった。また, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法においても分子量の低下は認められないことから, 本酵素はこれらのプロテアーゼに対して強い抵抗性を有すること, および結合糖鎖はプロテアーゼ抵抗性には関与していないことが示唆された。

一方, 本酵素の凍結融解に対する安定性に及ぼす糖鎖の寄与を調べることを目的として, 酵素溶液を, いったんアセトンドライアイス浴を用いて凍結後, 再び 37°C で融解する操作を繰り返す, その都度, 残存活性を測定した。その結果, Fig. 22 に示すように凍結融解を繰り返すごとに酵素活性は低下した。また, このような活性の低下は糖鎖除去酵素における方が顕著であった。

第 4 節 考 察

これまでに, *P. cinnabarinus* の培養液から硫酸分画, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-100, SP-Sephadex C-50 などによるカラムクロマトグラフィーおよび焦点電気泳動の 6 段階の精製操作を経て, α -ガラクトシダーゼを得ていたが, その収率は極めて低かった。⁶⁴⁾本章ではこの点を改良すべく検討し, 熱処理を加えることにより, 精製過程を簡略化し, 均一酵素標品を 60% の高収率で得ることに成功した (Table 1)。微生物起源の α -ガラクトシダーゼとしては, *M. vinacea* が生産する酵素が最もよく研究されているが, *P. cinnabarinus* の酵素は *M. vinacea* 由来の酵素に比べ活性も高く, 熱に対して安定である。

一方, 種々の植物種子の α -ガラクトシダーゼは分子量的に多様性を示すことが報告されており,¹⁾例えばレンズマメの α -ガラクトシダーゼは Sephadex G-100 によるゲルろ過により, α -ガラクトシダーゼ I (分子量 160,000) と α -ガラクトシダーゼ II (分子量 40,000) に分離されている。¹⁴⁾これに対して, *P. cinnabarinus* α -ガラクトシダーゼにはこのような多様性は認められず, ゲルろ過法によって推定された分子量は約 210,000 であり, また, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では β -メルカプトエタノールの有無にかかわらず同一挙動 (分子量 52,000) を示す (Fig. 7) ことから, 本酵素は同一サブユニット (分子量 52,000) 4 個からなるオリゴマ

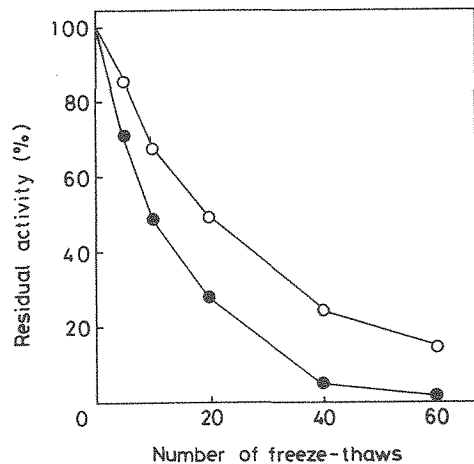


Fig. 22 Effects of Freezing-Thawing on the Enzyme Activities of Native and Carbohydrate-depleted α -Galactosidase. NPGal was used as a substrate. \circ , native α -Galactosidase; \bullet , carbohydrate-depleted α -Galactosidase.

一酵素であり、その会合体形成にはジスルフィド結合は関与していないと考えられる。この点で、本酵素は、オリゴマー酵素である *Bacillus stearothermophilus*¹⁸⁾が産生する α -ガラクトシダーゼ I (分子量280,000) や α -ガラクトシダーゼ II (分子量325,000) とよく似ている。本酵素の分子量は *Bacteroides ovatus*²¹⁾の酵素の分子量 (250,000) および *Cephalosporium acremonium*³²⁾の酵素の分子量 (240,000) に近似しており興味深い。

P. cinnabarinus の α -ガラクトシダーゼは等電点を3.4にもつ酸性タンパク質であり (Fig. 9), この点 *Saccharomyces carlsbergensis*⁶⁵⁾の酵素 (等電点3.6) と似ている。これは構成アミノ酸の中で酸性アミノ酸含量が高いことによっても裏付けられる (Table 2)。また、本酵素はサブユニット当り7個のシステイン残基を含むが、このうち6個は分子内ジスルフィド結合形成に関与し、残りの1個は分子内部に埋もれているか、またはサブユニット間に存在するため DTNB に対する反応性を欠くものと推定した。

最近、糖タンパク質における糖鎖の重要性を示唆する研究成果が蓄積され、微生物が産生するいくつかの酵素についても糖鎖が酵素の耐熱性やプロテアーゼに対する抵抗性を高める上で重要な寄与をしていることが示唆されている。⁶⁶⁻⁶⁹⁾本酵素は約14%の糖を含む糖タンパク質であり、*S. carlsbergensis* の α -ガラクトシダーゼと似ている。⁶⁵⁾Lazo らは *S. carlsbergensis* α -ガラクトシダーゼがマンノース、グルコース、グルコサミンからなる糖鎖 (54%) を有し、これらが、この酵素の pH 安定性や熱安定性を高める上で重要であると推定している。*P. cinnabarinus* α -ガラクトシダーゼについても安定性と結合糖鎖の関連を明らかにするために、酵素法による糖鎖の除去を試みた。ここで使用した *Flavobacterium* sp. 由来のエンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼは高マンノース型のアスパラギン結合糖鎖に作用し、糖タンパク質から糖鎖を切断遊離させる酵素である。^{70, 71)}この酵素を用いて約50%の糖鎖を除去した酵素と未修飾酵素を比較すると、pH5.0での熱安定性には変化はみられなかったが、脱糖鎖により酸性側における酵素の安定性が低下することから (Fig. 19, 20)、結合糖鎖は酸性 pH 領域における α -ガラクトシダーゼの安定性に寄与していることが示唆された。同様な現象は *Rizopus niveus* のグルコアミラーゼ⁶⁹⁾においても観察されている。一方、酵母カルボキシペプチダーゼ、⁶⁶⁾酵母インベルターゼ、⁶⁸⁾*R. niveus* グルコアミラーゼ⁶⁹⁾はいずれも脱糖鎖することにより、プロテアーゼに対する感受性が高まる酵素であるのに対して、本酵素の場合には糖鎖を除去してもプロテアーゼに対する感受性は変化せず酵素活性も低下しないことから (Fig. 21)、本酵素の結合糖鎖はプロテアーゼ抵抗性とは直接関係がないものと推定される。また、本酵素は凍結融解を繰り返すことにより失活するが、この場合、糖鎖除去酵素の方が凍結融解による活性の低下が著しいことから (Fig. 22)、結合糖鎖は本酵素の凍結変性に対して抵抗性を増す要因となっていることが考えられる。

細菌起源の α -ガラクトシダーゼの最適 pH は6.0から7.5の範囲にあるのに対し、^{16-19, 21)}糸状菌および酵母起源の酵素では酸性側 (pH3.5-5.0) に最適 pH をもつものが多い。²⁵⁻³¹⁾本菌の α -ガラクトシダーゼの NPGal に対する最適 pH は5.0であり、この点で本酵素はチヨロギ、¹²⁾サトウキビ、¹³⁾*Streptomyces* sp.,²⁴⁾*M. vinacea*²⁹⁾の α -ガラクトシダーゼに似ている。また、*M. vinacea*²⁹⁾の酵素が pH6 以下で不安定であるのに対し、本酵素は pH3.0から9.0の広範囲の pH で安定である (Fig. 12)。さらに注目すべき点は本酵素の熱安定性である。すなわち、本酵素の活性発現の至適温度は75°Cであり、これまでに報告されているいずれの α -ガラクトシダーゼよりも高く、耐熱性という点においても、75°C、40分間処理で84%の活性を保持するソラマメ由来の α -ガラクトシダーゼよりも優れているといえる。

一般に、 α -ガラクトシダーゼの活性はガラクトピラノース残基の還元末端に α -グリコシド

結合したアグリコンの種類によって左右される。このような基質特異性を明らかにすることは、糖鎖構造の解析など本酵素の応用を考える上でも重要な課題といえる。本実験結果から明らかのように、*P. cinnabarinus* の α -ガラクトシダーゼのラフィノースに対する Km 値は *M. vinacea*²⁹⁾ の α -ガラクトシダーゼのそれとほぼ同じであるが、植物^{7, 11-14)}細菌^{17-19, 21)}酵母⁶⁵⁾などの酵素の Km 値に比べると低い。このことは、本酵素をラフィノースの分解、除去のために利用する場合に大きな利点となることを示している。また、本酵素は豆科植物の種子に存在するガラクトマンナンにも作用し、マンノースの β -1,4結合からなる主鎖に、 α -1,6結合したガラクトースの側鎖をもつグアガムやローカストビーンガムを分解して、ガラクトースを遊離させる (Table 4)。*A. niger*²⁷⁾や植物^{10, 13)}の酵素はグアガムやローカストビーンガムを分解するが、*M. vinacea*²⁹⁾の酵素はこれらを分解しない。また、*M. vinacea*²⁹⁾の酵素は α -1,6結合および α -1,4結合にしか作用しないのに対して、本酵素は α -1,3結合をも分解する (第3章, Fig. 30)。このように本菌の α -ガラクトシダーゼは広い基質特異性を有しており、ガラクトマンナンの物性の改良あるいは糖鎖構造の解析のための有効な手段となるものと期待される。

P. cinnabarinus は硬質担子菌類の一種であり、本菌の発育適温は40°Cである。特に高温を好む菌ではない本担子菌が耐熱性 α -ガラクトシダーゼを生産することはきわめて興味深い。一般に好熱菌の耐熱性酵素について示されているように本酵素は熱に対して安定なばかりでなく各種の変性剤に対して抵抗性を示す (Table 5, Fig. 17)。本酵素に結合した糖鎖がこのような安定性に寄与している一要因と考えられるが、安定化の分子機構については、より詳細な検討を要する。

第5節 小 括

P. cinnabarinus の生産する α -ガラクトシダーゼを精製し、その諸性質を明らかにした。本酵素の沈降係数($s_{20, w}$)は9.75であった。本酵素の分子量はゲルろ過法により約210,000、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により約52,000と推定され、本酵素は同一サブユニットからなる4量体であると考えた。本酵素の等電点は3.4で、約14%の糖を含む糖タンパク質であった。本酵素の280nmにおける吸光係数($E_{1\%}^{1cm}$)は20.7であった。濃縮酵素液に固体硫酸を添加することにより本酵素は菱形板状の結晶として得られた。

本酵素の最適 pH は5.0にあり、最適温度は75°Cであった。本酵素は pH3.0~9.0の範囲で安定であり、pH5.0, 75°C, 15分間の加熱で活性の低下は認められなかった。本酵素は熱に対して極めて安定であり、その熱安定性は pH に依存した。本酵素の NPGal, メリピオース, ラフィノース, スタキオースに対する Km 値はそれぞれ0.31mM, 0.80mM, 2.16mM, 1.15mM であった。また、本酵素はガラクトマンナンにも作用した。

本酵素は熱のみでなく SDS に対しても安定であり、また、プロテアーゼに対し高い抵抗性を示した。エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼを作用させると結合糖鎖の約50%が切断されるが、脱糖鎖によりプロテアーゼに対する感受性は変化しないが、酸性側における安定性および凍結融解に対する安定性は低下し、このことより結合糖鎖は本酵素の安定化に関与していることが明かとなった。

第3章 耐熱性 α -ガラクトシダーゼの糖転移反応による α -ガラクトオリゴ糖の酵素的合成

第1節 緒 言

一般に、グリコシダーゼ類は加水分解反応のみでなく糖転移反応も触媒する。近年、このよ

うなグリコシダーゼの糖転移作用を利用して低カロリー、低う蝕性あるいはビフィズス因子活性を有するオリゴ糖など新規な機能性食品を開発しようとする試みが活発に行われている。⁷²⁾一方、ラフィノースやスタキオースなどの α -ガラクトオリゴ糖はビフィズス菌による選択的利用性が高い糖類であることもあって、^{46, 47)}大豆や甜菜より抽出されたラフィノース系列のオリゴ糖はビフィズス因子活性を有する機能性食品として注目されるようになった。^{49, 50)}このように、 α -ガラクトシダーゼの糖転移反応を利用した α -ガラクトオリゴ糖の合成は基礎的な分野ばかりでなく応用的な面からも興味を持たれている。

本章では、第2章で精製した α -ガラクトシダーゼの糖転移反応について明らかにすることを目的として、まず、ラフィノースを基質としたときに得られる糖転移反応生成物について化学構造を明らかにするとともに、さらに、糖転移反応生成物を高収率で得るための諸条件について検討した。

第2節 実験材料および実験方法

第1項 実験材料

α -ガラクトシダーゼは前章第2節に述べた方法で精製し、電気泳動的に均一な標品を用いた。 β -フルクトフラノシダーゼおよびラミナリトリオースは生化学工業社製のものを用いた。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用の試薬は和光純薬工業社製の高速液体クロマトグラフ用試薬を、ヘキサメチルジシラザンおよびトリメチルクロロシランはガスクロ工業社製のものを用いた。

第2項 HPLCによる糖の分離・定量

糖転移反応生成物および酵素分解物の分離および検出には Waters 社製の6000A型ポンプ、U6K型ユニバーサルインジェクター、Z型加圧モジュールおよびR-401型示差屈折計を用いた。糖の分離には Radial-PAK μ Bondapak NH₂カラム (8 x 100mm) を使用し、アセトニトリル-水系 (流速2.0ml/min) を移動相として用いた。糖転移反応生成物の定量には日本分光工業800シリーズ高速液体クロマトグラフ装置を用いた。糖の検出には示差屈折計(日本分光工業830-RI型)を用い、*p*-ニトロフェニル化合物はUV検出器(日本分光工業875-UV型)により検出した。データ処理はD-2500 Chromato-Integrator (日立製作所製)により行った。

第3項 糖のペーパークロマトグラフィーによる分離

調製用ペーパークロマトグラフィーには東洋濾紙 No.514A を用いた。試料をろ紙に帯状にスポットし、*n*-ブタノール-ピリジン-水 (6:4:3, v/v/v) で上昇法により3回展開した。両端を切り硝酸銀試薬⁷³⁾で発色させ、各糖の位置を確認後、未発色のろ紙を両端の糖の位置に対応するように切り取り、水で抽出した。分析用ペーパークロマトグラフィーには東洋濾紙 No.50を用い、上記と同じ溶媒を用いて展開した。

第4項 糖のカラムクロマトグラフィーによる分離

糖転移生成物は活性炭カラム(クロマトグラフィー用活性炭, 和光純薬工業社製)およびBio-Gel P-2 (200-400mesh, Bio-Rad Laboratories 社製)カラム (2.6 x 180cm) を用いて分離した。各溶出液中の糖含量はフェノール-硫酸法⁶²⁾により求めた。

第5項 糖転移反応生成物の構成糖の定量

オリゴ糖 (2-3 mg) に0.5N 硫酸0.5mlを加え、窒素封管後100°Cで4時間、加水分解した。分解液を炭酸バリウムで中和後、沈澱物をろ過により除き、減圧下で濃縮乾固した。乾固物にピリジン0.2ml, ヘキサメチルジシラザン0.1ml, トリメチルクロロシラン0.05mlを加えてトリメチルシリル化⁷⁴⁾し、得られた誘導体をガスクロマトグラフィーに供した。内部標準物質としてメチル- α -マンノシドを用いた。3%SE-52をコーティングした Chromosorb W (AW-DMCS, 80-100mesh) を充填したガラスカラム (0.3 x 200cm) を使用し、カラム温度を130°Cから160°Cまで毎分0.5°Cずつ上昇させた。フルクトースの定量にあたっては、オリゴ糖に0.02N 硫酸0.5 mlを加え、100°Cで15分間加水分解後、上記の方法によりガスクロマトグラフィーで分析した。

第6項 メチル化分析

オリゴ糖の完全メチル化は Hakomori⁷⁵⁾の方法に従った。すなわち、メチル化糖に1N 硫酸2 mlを加え窒素封管後、100°Cで3時間加水分解し、中和後、水素化ホウ素ナトリウムで還元した後、無水酢酸によりアセチル化して、得られたアルジトール・アセテート誘導体をガスクロマトグラフィーに供した。ガスクロマトグラフィーは、カラムに Gas Chrom Q (液相：3% ECNSS-M, 100-120mesh, 0.3 x 200cm)を用い、カラム温度180°Cで行った。⁷⁶⁾また、2,3,4-トリ-O-メチル-D-グルコースおよび2,4,6-トリ-O-メチル-D-グルコースのアルジトール・アセテート誘導体の同定には Shimalite W (液相：0.3% OV 275-0.4% GEXF 1150, 80-100mesh)を用いた。⁷⁷⁾スタキオースとラミナトリオースから調製した部分メチル化糖のアルジトール・アセテート誘導体の相対保持時間との比較により各メチル化糖を同定した。

第7項 糖転移反応生成物の酵素分解

オリゴ糖 3 mg, α -ガラクトシダーゼ (1酵素単位) および0.02M 酢酸緩衝液 (pH5.6) からなる反応液 1 mlを37°Cで24時間保温した。 β -フルクトフラノシダーゼによる分解は、オリゴ糖 2 mg, β -フルクトフラノシダーゼ (*Candida utilis*, 生化学工業社製, 1酵素単位) および0.02 M 酢酸緩衝液 (pH5.0) からなる反応液 1 mlを37°Cで24時間保温した。5分間の煮沸により反応停止後、反応液を Dowex 50 (H⁺) カラムに通し、未吸着画分を集めて濃縮乾固した。乾固物を200 μ lの水に溶解後、ミリポアフィルター (0.45 μ m) でろ過し、ろ液25 μ lをHPLCに供した。

第8項 ラフィノースに対する作用

糖転移反応生成物の最適生産条件を求めるために、次のような反応系により解析した。0.5M ラフィノース0.4ml, 0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0) 0.4ml, α -ガラクトシダーゼ (5酵素単位/ml) 0.2mlからなる反応液を40°Cで一定時間反応させた。沸騰水浴中で5分間加熱して反応を停止した後、フィルター (0.45 μ m) によりろ過後、糖転移生成物をHPLCにより解析した。

第9項 NPGal を供与体としたときの作用

0.02M NPGal, 0.25M 各種糖類, 0.05M リン酸緩衝液 (pH7.0), および α -ガラクトシダーゼ (1酵素単位/ml) からなる反応液0.4mlを40°Cで8時間反応させ、HPLCで糖転移反応の有無を調べた。受容体として、キシロース, アラビノース, リボース, グルコース, ガラクトース, マンノース, フルクトース, ラムノース, グルコサミン, N-アセチルグルコサミン, ラクトース, スクロース, マルトースを用いた。また, NPGal を受容体として生成する *p*-ニトロフェ

ニル化合物は225nmの吸光度により測定した。

第3節 実験結果

第1項 糖転移反応生成物の分離

0.5 M ラフィノース 160 ml, 0.2 M Na_2HPO_4 -0.1M クエン酸緩衝液 (pH5.0) 160mlに α -ガラクトシダーゼ80ml (400酵素単位) を加え, 60°Cで6時間反応させた。5分間煮沸して反応を停止させた後, HPLCにより分析した結果, Fig. 23のような溶出曲線を得た。ラフィノースの場合には α -ガラクトシダーゼによる分解生成物であるガラクトースとスクロースのほかに, 6種類の糖転移反応生成物を与えた。また, ガラクトースの生成量はスクロースの生成量に比べてかなり低かった。この際, ラフィノース濃度を4 mMとした場合には加水分解反応のみが認められた。メリピオースやスタキオースを基質とした場合も同様に, 加水分解生成物以外の糖転移生成物が検出された。このように本酵素は他の多くのグリコシダーゼと同様に加水分解反応のみならず糖転移反応を触媒することが明らかになったので, 糖転移生成物の分

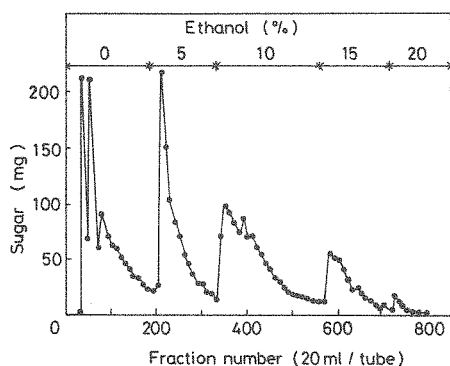


Fig. 24 Charcoal Column Chromatography of the Transfer Products from Raffinose. The reaction mixture (398 ml) was put on a charcoal column (5 x 75cm) and sugars were eluted successively with deionized water (4.2 l), 5% ethanol (2.6 l), 10% ethanol (4.8 l), 15% ethanol (2.9 l), and 20% ethanol (1 l) at a flow rate of 110 ml per hr.

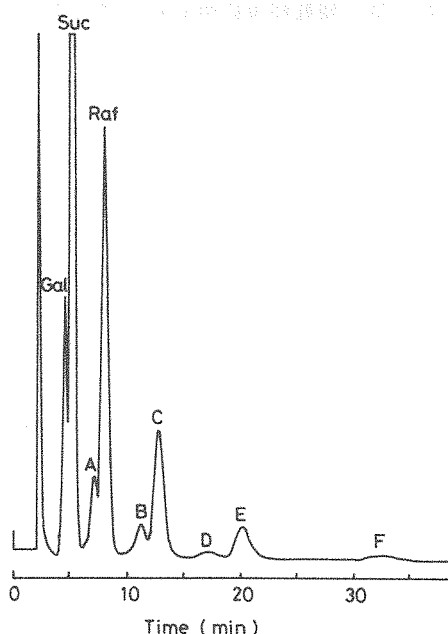


Fig. 23 HPLC of the α -Galactosidase Digest of Raffinose.

Two ml of the reaction mixture was treated with Dowex 50 (H^+) and Amberlite CG4B (CH_3COO^-) and evaporated to dryness, and the residue was dissolved in 2 ml of water. The mixture was filtered through a 0.45 μm Millipore filter and 20 μl of the mixture was injected. Gal, galactose; Suc, sucrose; Raf, raffinose; A, oligosaccharide A; B, oligosaccharide B; C, oligosaccharide C; D, oligosaccharide D; E, oligosaccharide E; F, oligosaccharide F.

離および同定を行った。上記酵素反応液(398 ml)を活性炭カラム (5 x 75cm) に添加し, 脱イオン水 (4.2 l) で洗浄後, 吸着した画分を5%エタノール (2.6 l), 10%エタノール (4.8 l), 15%エタノール (2.9 l), 20%エタノール (1 l) で段階的に溶出 (110ml/hr) し, Fig. 24 に示すような結果を得た。各画分に含まれる糖を HPLC で分析した結果, 脱イオン水で溶出された画分 (No. 1-No. 209) にはガラクトースとスクロースが, また, 5%エタノール溶出画分 (No. 210-No. 339) にはラフィノースと少量の糖転移反応生成物が認められた。また, 10%エタノール溶出画分 (No. 340-No. 579) は主としてラフィノース

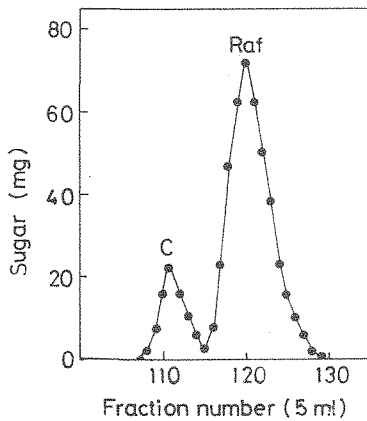


Fig. 25 Gel Filtration of the 10% Ethanol Fraction Obtained in Fig. 24 on Bio-Gel P-2.

The sugar solution was applied to a Bio-Gel P-2 column (2.6 x 180 cm). The column was developed with water. Raf, raffinose; C, oligosaccharide C.

が含まれていたが、特に、オリゴ糖A、BおよびEの含量が高かった。20%エタノールによって溶出された画分にはオリゴ糖B、D、Fおよび未知の糖が含まれていた。

10%エタノール溶出画分はロータリーエバポレーターで濃縮後、Bio-Gel P-2 カラムに供し、蒸留水で展開 (21ml/hr) したところ、Fig. 25 に示すようにオリゴ糖Cはラフィノースよりも早く溶出されたので、この画分を集め、濃縮後、凍結乾燥した (収量 1,290mg)。

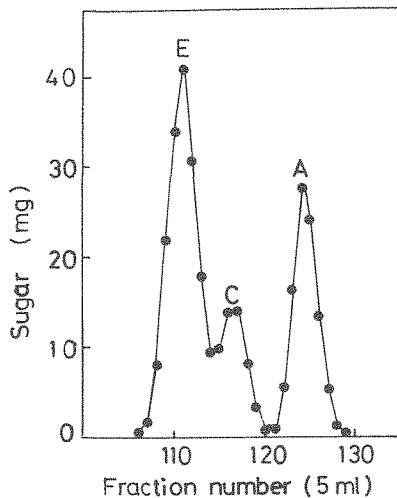


Fig. 27 Gel Filtration of the Fraction I Obtained in Fig. 26 on Bio-Gel P-2.

Gel filtration was done under the same condition as in Fig. 25. A, oligosaccharide A; C, oligosaccharide C; E, oligosaccharide E.

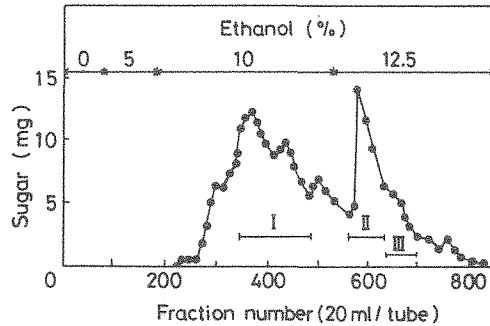


Fig. 26 Rechromatography of the 15% Ethanol Fraction (Fig. 24).

The sugar solution was put on a charcoal column (5 x 42 cm) and sugars were eluted successively with deionized water (2 l) and 5% ethanol (2 l), 10% ethanol (6 l), and 12.5% ethanol (5.3 l) at a flow rate of 110 ml per hr.

とオリゴ糖Cであった。15%エタノール溶出画分 (No. 580-No. 724) には6種類の転移糖

15%エタノール溶出画分は50mlに濃縮後、再び活性炭カラム (5 x 42cm) に供した。脱イオン水 (2 l) および5%エタノールで洗浄後、10%エタノールおよび12.5%エタノール

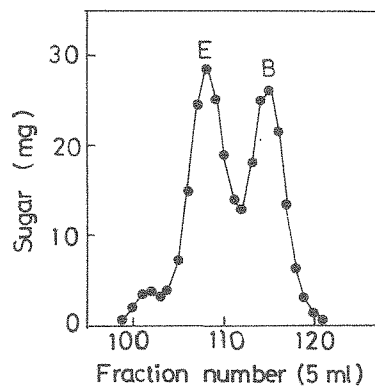


Fig. 28 Gel Filtration of the Fraction II Obtained in Fig. 26 on Bio-Gel P-2.

Gel filtration was done under the same condition as in Fig. 25. B, oligosaccharide B; E, oligosaccharide E.

で吸着したオリゴ糖を溶出した (Fig. 26). 画分 I (No. 346-490) には, おもにオリゴ糖 A と E が含まれていたため, さらに Bio-Gel P-2 によるゲルろ過を行い, オリゴ糖 A (243mg) とオリゴ糖 E (524mg) を分離した (Fig. 27). 画分 II (No. 569-No. 635) からはさらに Bio-Gel P-2 によるゲルろ過により, オリゴ糖 B (157mg) を分離した (Fig. 28). 画分 III (No. 636-No. 700) にはオリゴ糖 B, D および F が含まれていた. Bio-Gel P-2 によるゲルろ過を行い (Fig. 29), オリゴ糖 D を含む画分を集め, さらに HPLC を用いて分取し, オリゴ糖 D を得た (収量 30mg).

1 回目の活性炭カラムクロマトグラフィーによって得られた 20% エタノール溶出画分については, さらに調製用ペーパークロマトグラフィーにより, オリゴ糖 F (83mg) を分離した. 得られたオリゴ糖はペーパークロマトグラフィーおよび HPLC により均一な標品であることを確認した.

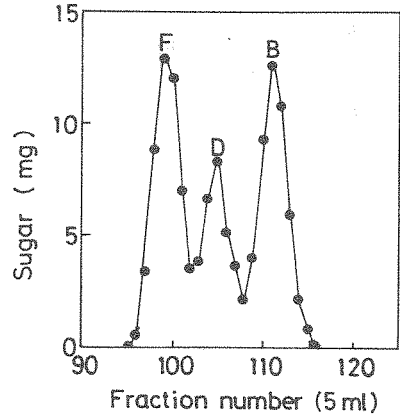


Fig. 29 Gel Filtration of the Fraction III Obtained in Fig. 26 on Bio-Gel P-2. Gel filtration was done under the same condition as in Fig. 25. B, oligosaccharide B; D, oligosaccharide D; F, oligosaccharide F.

Table 6 Sugar Compositions of the α -Galactosidase-catalyzed Transfer Products.

Oligosaccharides	$R_{glc}^{a)}$	Molar ratio of sugars		
		Galactose	Glucose	Fructose
A	0.66	1.2	1.0	1.2
B	0.37	2.1	1.0	0.8
C	0.26	2.2	1.0	0.9
D	0.17	3.0	1.0	0.9
E	0.12	2.9	1.0	0.9
F	0.06	4.1	1.0	1.0

^{a)} Rf value of the oligosaccharide relative to glucose on Toyo No. 50 filter paper. Solvent; *n*-butanol-pyridine-water (6:4:3).

Table 7 Molar Ratios of Alditol Acetates Derived from Permethylated Transfer Products.

Oligosaccharide	1,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -Me-D-Fru (T=0.72)	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -Me-D-Gal (T=1.24)	2,4,6-Tri- <i>O</i> -Me-D-Glc (T=1.94)	2,4,6-Tri- <i>O</i> -Me-D-Gal (T=2.25)	2,3,4-Tri- <i>O</i> -Me-D-Glc (T=2.50)	2,3,4-Tri- <i>O</i> -Me-D-Gal (T=3.46)
A	1	1	1			
B	1	1		1	1	
C	1	1			1	1
D	1	1		1	1	1
E	1	1			1	2
F	1	1			1	3

Retention time of the corresponding alditol acetate relative to 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-glucitol. Column, 3% ECNSS-M on Gas Chrom Q.

第2項 糖転移反応生成物の構造

前節で単離したオリゴ糖A, B, C, D, EおよびFの構造を酸加水分解, 酵素分解およびメチル化分析により決定した。

(1) オリゴ糖A

オリゴ糖Aを酸加水分解後, ガスクロマトグラフィーにより構成糖を調べた。Table 6に示すようにオリゴ糖Aは等モルのガラクトース, グルコースおよびフルクトースから構成されていることが判明した。Table 7にメチル化分析の結果を示した。メチル化分析では1, 3, 4, 6-テトラ-O-メチル-D-フルクトース, 2, 3, 4, 6-テトラ-O-メチル-D-ガラクトースおよび2, 4, 6-トリ-O-メチル-D-グルコース (モル比, 1:1:1) が得られ, ガラクトースがグルコースの3位に結合していることが判明した。オリゴ糖の α -ガラクトシダーゼおよび β -フルクトフラノシダーゼによる酵素分解物のHPLCにおける分離パターンをそれぞれFig. 30およびFig. 31に示した。オリゴ糖Aは α -ガラクトシダーゼにより等モルのガラクトースとスクロースに分解された。このことからスクロースのグルコース残基に α -D-ガラクトシル基が1,3結合していることが示唆された。また, オリゴ糖Aは β -フルクトフラノシダーゼによっても分解され, フルクトースが遊離することよりフルクトースは還元末端に β -フルクトフラノシド結合しているものと考えた。これらの結果から, オリゴ糖Aの構造をO- α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)-O- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシドと推定した。

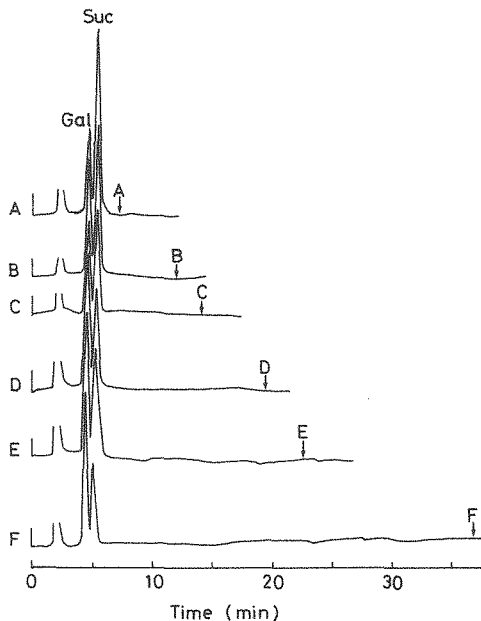


Fig. 30 HPLC of the α -Galactosidase Digests of Oligosaccharides.

Fifteen microliters of the sample solution was injected. Sugars were eluted with acetonitrile-water (72:28). Gal, galactose; Suc, sucrose. Arrows, A~F, indicate the position of oligosaccharides A~F.

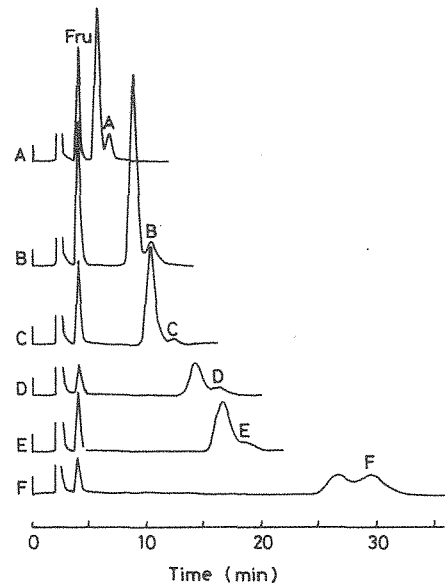


Fig. 31 HPLC of the β -Fructofuranosidase Digests of Oligosaccharides.

Fru, fructose; A~F, oligosaccharides shown in Fig. 23.

(2) オリゴ糖B

完全加水分解物の分析結果より、オリゴ糖Bの構成糖はガラクトース、グルコースおよびフルクトースであり、そのモル比は2:1:1であることが明かとなった (Table 6)。メチル化分析では、1, 3, 4, 6-テトラ-O-メチル-D-フルクトース、2, 3, 4, 6-テトラ-と2, 4, 6-トリ-O-メチル-D-ガラクトース、および2, 3, 4-トリ-O-メチル-D-グルコースが等モル得られた (Table 7)。したがって、結合様式はO-D-ガラクトピラノシル-(1-3)-O-D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O-D-グルコピラノシル-(1-2)-D-フルクトフラノシドと推定された。オリゴ糖Bは α -ガラクトシダーゼによりガラクトースとスクロース (モル比, 2:1) に完全に分解される (Fig. 30) ことから、ガラクトースは α 型の結合でスクロースに結合していること、および、 β -フルクトフラノシダーゼにより分解されることからフルクトースは末端に β 型で結合していることが明かとなった。以上の結果から、オリゴ糖Bの構造はO- α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)-O- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシドと推定した。

(3) オリゴ糖C, EおよびF

Table 6 に示すように、オリゴ糖C, オリゴ糖Eおよびオリゴ糖Fの構成糖はガラクトース、グルコースおよびフルクトースであり、そのモル比はそれぞれ2:1:1, 3:1:1および4:1:1であった。Bio-Gel P-2によるゲルろ過の結果より、オリゴ糖C, オリゴ糖Eおよびオリゴ糖Fの重合度はそれぞれ4, 5および6と考えた。これら3種類のオリゴ糖のメチル化分析では、スタキオースと同様に1, 3, 4, 6-テトラ-O-メチル-D-フルクトース、2, 3, 4, 6-テトラ-と2, 3, 4-トリ-O-メチル-D-ガラクトース、および2, 3, 4-トリ-O-メチル-D-グルコースが検出された (Table 7)。Fig. 30およびFig. 31に示すように、オリゴ糖C, オリゴ糖Eおよびオリゴ糖Fは α -ガラクトシダーゼによりガラクトースとスクロースに完全に分解され、また、 β -フルクトフラノシダーゼによっても分解され、フルクトースが生成した。以上の結果より、オリゴ糖CはO- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド (スタキオース)、オリゴ糖EはO- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -

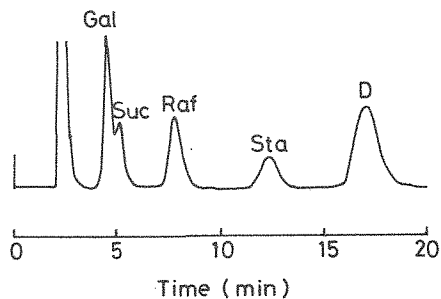


Fig. 32 HPLC of the α -Galactosidase Digest of Oligosaccharide D.

One ml of the reaction mixture containing 3 mg of oligosaccharide D and 1 unit of α -Galactosidase in 0.02M acetate buffer (pH 5.6) was incubated for 5 hr at 37°C. Gal, galactose; Suc, sucrose; Raf, raffinose; Sta, stachyose; D, oligosaccharide D.

D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド (ベルバスコース)、オリゴ糖FはO- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド (アジュゴース) であることが推定された。

(4) オリゴ糖D

オリゴ糖Dはガラクトース3分子、グルコース1分子およびフルクトース1分子からなる五糖類であった (Table 6)。メチル化分析では、2, 3, 4-トリ-と2, 4, 6-トリ-O-メチル-D-ガラクトースが検出されることから (Table 7)、1位と6位および1位と3

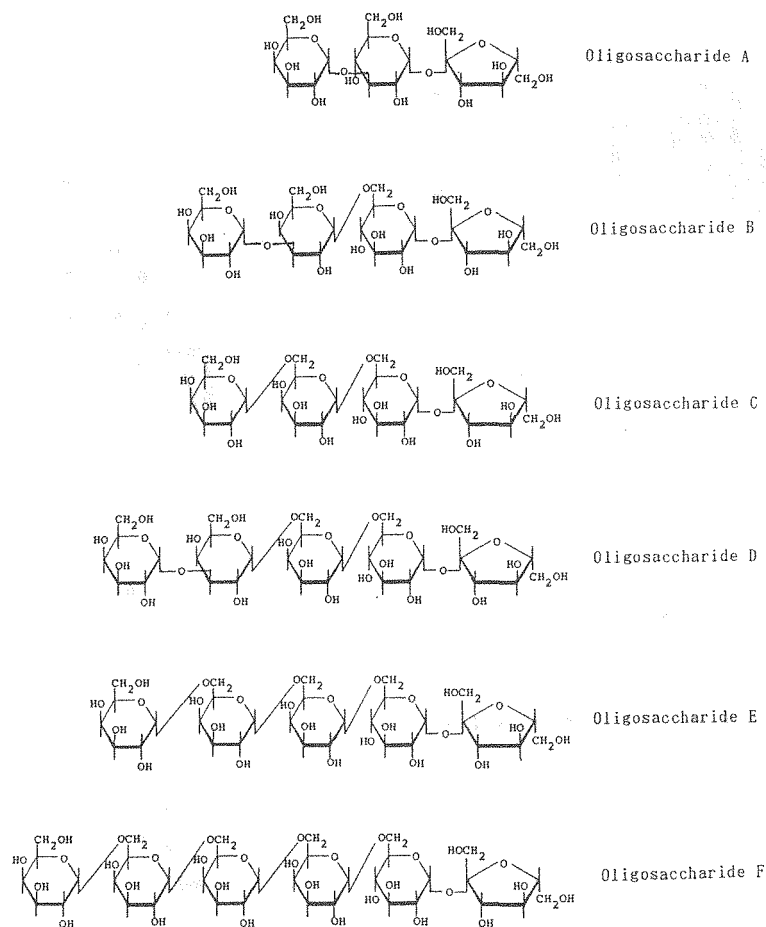


Fig. 33 Structures of the Transfer Products.

位の炭素が結合に関与しているガラクトースが存在していることが明らかとなった。さらに、オリゴ糖Dは α -ガラクトシダーゼにより3モルのガラクトースと1モルのスクロースに完全に分解され (Fig. 30), また, β -フルクトフラノシダーゼによっても分解された (Fig. 31)。これらの結果からオリゴ糖Dの構造はO- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)-O- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシドあるいはO- α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)-O- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシドであると考えた。さらに、非還元末端のガラクトースの結合様式を明らかにするために、オリゴ糖Dに α -ガラクトシダーゼを作用させ、得られた分解生成物をHPLCにより分離した (Fig. 32)。部分水解生成物としてガラクトース、スクロース、ラフィノースおよびスタキオースが検出されたことから、オリゴ糖Dはスタキオースの非還元末端に位置するガラクトース残基のC-3位にガラクトースが結合したO- α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)-O- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシドの構造を有する五糖類であることが示唆された。以上転移生成物として得られたオリゴ糖の構造式を Fig. 33 にまとめた。

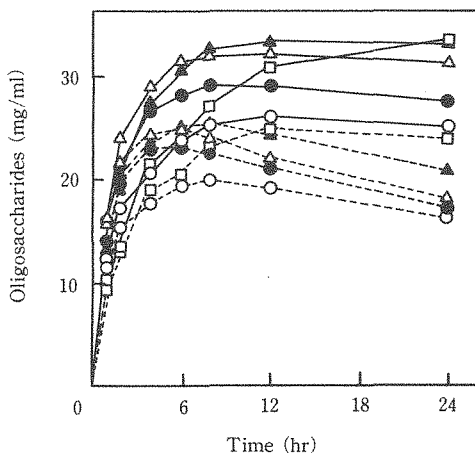


Fig. 34 Effect of pH on the α -Galactosidase-catalyzed Transgalactosylation Reaction.

—, total transfer products;
 ----, stachyose.
 ○, pH 6.0; ●, pH 6.5; △, pH 7.0;
 ▲, pH 7.5; □, pH 8.0.

第3項 糖転移反応生成物の生産条件

前項において *P. cinnabarinus* α -ガラクトシダーゼはラフィノースを基質にしたとき、転移生成物としてスタキオース、ベルバスコース、アジュゴースなどのラフィノース系列のオリゴ糖と、非還元末端のガラクトースが α -1, 3結合した *O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)-*O*- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド (オリゴ糖A), *O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)-*O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-*O*- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド (オリゴ糖B), および *O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)-*O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-*O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-*O*- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド (オリゴ糖D) の各オリゴ糖を生成することを示した。本項ではさらに、ラフィノースを基質とした場合の糖転移反応に及ぼす諸因子の影響について検討した。

(1) pHの影響

Fig. 34に各pHにおける転移生成物の総量とスタキオースの生成量の経時的变化を示した。転移生成物の総量は、pH7.0からpH7.5付近で最大となった。転移生成物のうち最も生成量の多いスタキオースの量は6時間で最大となり、反応時間が長くなるに従って減少した。Fig. 35

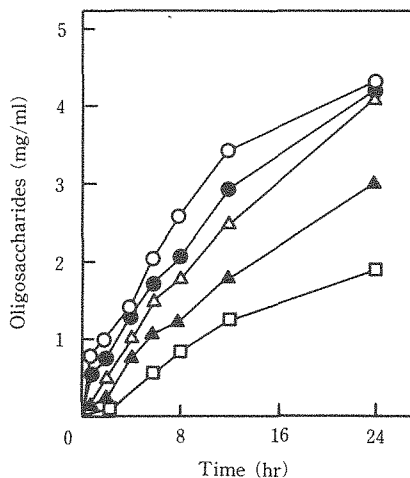


Fig. 35 Effect of pH on the Formation of Oligosaccharides Containing α -1,3-Galactosidic Linkage.

○, pH 6.0; ●, pH 6.5; △, pH 7.0;
 ▲, pH 7.5; □, pH 8.0.

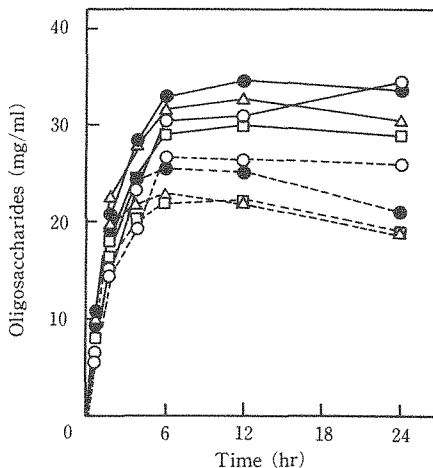


Fig. 36 Effect of Temperature on the α -Galactosidase-catalyzed Transgalactosylation Reaction.

—, total transfer products;
 ----, stachyose.
 ○, 30°C; ●, 40°C; △, 50°C; □, 60°C.

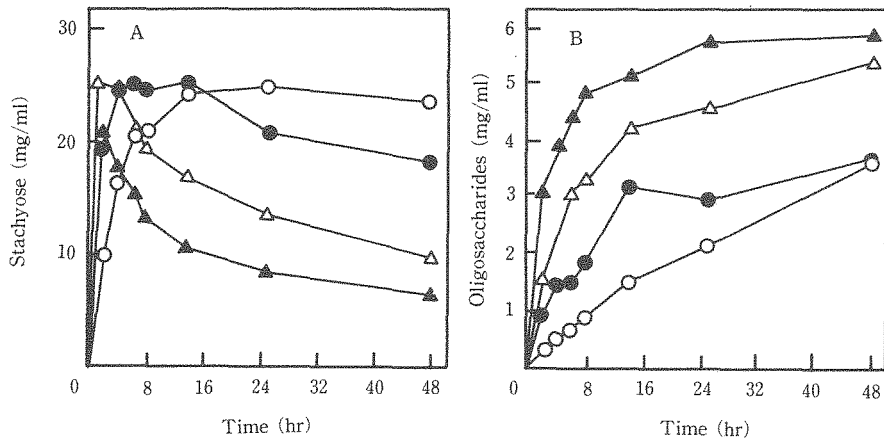


Fig. 37 Effect of Enzyme Concentration on the Formation of Stachyose (A) and Oligosaccharides Containing α -1,3-Galactosidic Linkage (B) by Transgalactosylation Reaction catalyzed by α -Galactosidase.

○, 1 unit/ml; ●, 2 units/ml; △, 5 units/ml; ▲, 10 units/ml.

に非還元末端のガラクトースが α -1, 3 結合したオリゴ糖 (オリゴ糖 A, B および D) の総生成量の経時的变化を示した。 α -1, 3 結合を有するオリゴ糖は, 酸性側での生成速度が大きく, 24 時間後まで増加し続けた。

(2) 温度の影響

30°C から 60°C における転移生成物の総量およびスタキオースの生成量を比較した。その結果, Fig. 36 のように反応初期での生成速度は反応温度に比例して大きくなったが, 生成量は 40°C で最大となった。また, 長時間の反応では温度が高くなるに従ってスタキオース量は減少した。

(3) 酵素濃度の影響

酵素濃度を変えて転移生成物の量を経時的に測定し, Fig. 37-A のような結果を得た。酵素濃度が 10 酵素単位/ml の場合には, 2 時間でスタキオースの生成量は最大となりその後減少したが, 酵素濃度が 1 酵素単位/ml の場合には, 生成量は 24 時間後に最大となり, その後次第に減少した。これらの結果より, 酵素濃度が高くなるほど生成速度は大きく, また, 最大生成量に達した後の減少速度も大きいことが判明した。

一方, Fig. 37-B に示すように, 酵素濃度 10 酵素単位/ml で 24 時間反応したとき, 非還元

Table 8 Rates of the Hydrolysis of Galactooligosaccharides by *P. cinnabarinus* α -Galactosidase.

Substrate (10 mM)	Relative rate (%)
Raffinose (Gall-6Glc1-2Fru)	49.3
A (Gall-3Glc1-2Fru)	48.1
Stachyose (Gall-6Gall-6Glc1-2Fru)	100
B (Gall-3Gall-6Glc1-2Fru)	9.8

Table 9 Acceptor Specificity of α -Galactosidase in Transgalactosylation Reaction.

Acceptor	Products
Xylose	-
Arabinose	+
Ribose	-
Glucose	+ + +
Galactose	+ +
Mannose	+ +
Fructose	+ +
Rhamnose	-
Glucosamine	+ +
N-Acetylglucosamine	+
Lactose	+ + +
Sucrose	+ + +
Maltose	+ + +

+, transfer products formation; -, no transfer products formation.

末端に α -1, 3 ガラクトシド結合をもつオリゴ糖の生成量は最大となり、その後一定となった。このように α -1, 3 ガラクトシド結合をもつオリゴ糖はスタキオースと異なり、酵素濃度の増加に伴って生成速度および生成量は増加することが判明した。

(4) α -ガラクトシダーゼによる転移生成物の加水分解

転移生成物(ラフィノース, スタキオース, オリゴ糖A, オリゴ糖B)の *P. cinnabarinus* α -ガラクトシダーゼによる加水分解速度を比較した。25mM オリゴ糖0.2ml, 0.2M Na_2HPO_4 -0.1M クエン酸緩衝液 (pH5.0) 0.2ml, および α -ガラクトシダーゼ (0.05酵素単位) 0.1mlを37°Cで30分間反応させた後、生成したガラクトースをSomogyi-Nelson法⁵³⁾により定量した。Table 8からも明かなように、オリゴ糖Aおよびオリゴ糖Bの加水分解速度は、それぞれスタキオースの48%および9.8%であり、 α -1, 3 ガラクトシド結合を有するオリゴ糖は本酵素により加水分解されにくいことが示唆された。

第4項 受容体特異性

本酵素の糖転移反応における受容体特異性についてNPGalをガラクトシル基供与体として検討し、その結果をTable 9にまとめた。ここでは、転移糖が生成されたものを+, 生成されなかったものを-で示した。実験に供した単糖の中では、グルコース, ガラクトース, マンノース, グルコサミンがよい受容体となったが, アラビノース, フルクトース, *N*-アセチルグルコサミンはさほどよい受容体ではないことが判明した。また, キシロース, リボース, ラムノースは糖転移反応の受容体になりえないことが明かとなった。二糖のラクトース, スクロース, マルトースは単糖に比べ多量の転移生成物が得られた。

第4節 考 察

これまでに報告されている α -ガラクトシダーゼの糖転移反応に関する研究においては、転移生成物をペーパークロマトグラフィーによって定性的に確認したにとどまるものが多く、その構造解析はほとんど行われていない。最近, Kitahataら⁷⁸⁾は苦みがなく甘味度の高い低カロリー甘味料の調製を目的として α -ガラクトシダーゼの糖転移作用によるルブソシド誘導体の合成について報告している。本章で示したように, *P. cinnabarinus* α -ガラクトシダーゼを高濃度のラフィノースに作用させ, 反応生成物をHPLCを用いて調べた結果, 加水分解生成物であるガラクトースとスクロース以外に糖転移生成物として6種類のオリゴ糖のピークが確認された(Fig. 23)。これら6種類の糖転移生成物は活性炭カラムクロマトグラフィー, Bio-Gel P-2によるゲルろ過, 調製用ペーパークロマトグラフィー, HPLCにより, それぞれ単離することができた。

一般に, α -ガラクトシダーゼは加水分解によって生じるガラクトシル基を受容体の第一級アルコール基に優先的に転移させることが知られており,¹¹⁾シロツメグサ,¹⁰⁾*M. vinacea*,²⁹⁾*Streptococcus bovis*,⁷⁹⁾*Diplococcus pneumoniae*,⁸⁰⁾アーモンド⁸¹⁾の α -ガラクトシダーゼによるオリゴ糖の分解では, ラフィノースを受容体にしたとき, 転移生成物としてスタキオースが生成することが確認されている。本章で示したように, *P. cinnabarinus* α -ガラクトシダーゼによるラフィノースの分解において生成した糖転移生成物の構造を酸分解, 酵素分解およびメチル化分析により推定した結果, 主にスタキオース, ベルバスコース, アジュゴースといったラフィノース系列のオリゴ糖が生成していることがわかった。さらに, ラフィノース系列のオリゴ糖以外に α -1, 3 ガラクトシド結合をもつオリゴ糖も生成することが明かとなった。すなわち, オリゴ糖Aはガラクトースがスクロースのグルコース残基のC-3位の水酸基に結合した三糖,

オリゴ糖Bはガラクトースがラフィノースの末端のガラクトース残基に α -1, 3 結合した四糖, オリゴ糖Dはガラクトースがスタキオースの末端のガラクトース残基に α -1, 3 結合した五糖であった。これに関連して, Petek と Courtois⁸²⁾はコーヒー豆の α -ガラクトシダーゼがフェニル- α -ガラクトピラノシドを分解して, ガラクトースをセロビオースのグルコース残基の C-6 位あるいは C-3 位の水酸基に転移させることを報告している。D. pneumoniae α -ガラクトシダーゼの場合, ラフィノース系列のオリゴ糖とともにガラクトビオースやガラクトトリオースの生成も報告されている,¹⁾また, チョロギ⁸³⁾の α -ガラクトシダーゼの糖転移反応により α -1, 4 結合をもつオリゴ糖の生成が確認されているが, 本実験では α -1, 4 結合をもつオリゴ糖やガラクトビオースやガラクトトリオースは分離されず, この点でチョコロギ α -ガラクトシダーゼとは異なることが示唆された。

P. cinnabarinus α -ガラクトシダーゼの糖転移反応により生成したラフィノース系列のオリゴ糖は植物に広く分布している。^{37, 38)} α -1, 3 結合を有するオリゴ糖の中ではオリゴ糖Aは *Lolium perenne* と *Festuca pratensis* に存在が認められている。⁸⁴⁾しかし, オリゴ糖Bおよびオリゴ糖Dは文献未記載の新規なオリゴ糖であった。ラフィノースやスタキオースはビフィズス菌増殖因子として利用されているが,^{49, 50)} α -1, 3 結合をもつ α -ガラクトオリゴ糖については生理学的な機能性の評価はまだなされていない。矢沢ら⁴⁷⁾はビフィズス菌に選択的に利用される糖源を検索した結果, ラフィノース, スタキオース, イヌリンが選択性が高く, その選択性の発現にはフルクトース部分が寄与しており, また分子量の大きい方が選択性が発現しやすいと述べている。したがって, 本章で糖転移反応によって合成された α -ガラクトオリゴ糖もビフィズス菌増殖因子としての利用が期待される。

本酵素の加水分解活性の最適 pH および最適温度は pH5.0 および 75°C であるのに対し, 高濃度のラフィノースを基質にしたときの本酵素の触媒する糖転移反応によるオリゴ糖合成の最適条件は pH7.0-7.5, 温度 40°C であった (Fig. 34, 36)。主な転移生成物であるスタキオースの生成速度は酵素濃度に比例して増加したが, スタキオースは最大生成量に達した後, 反応時間が長くなるにしたがって減少し, その減少速度も酵素濃度に比例した。また, 非還元末端のガラクトースが α -1, 3 結合したオリゴ糖は酵素濃度と反応時間に比例して増加した (Fig. 37)。本酵素によるスタキオースと非還元末端のガラクトースが α -1, 3 結合したオリゴ糖との加水分解速度を比較すると, スタキオースの方が速く分解された (Table 8)。これらのことより反応時間が長くなるとスタキオースの収量が低下するのは, 糖転移生成物であるスタキオースが糖転移反応の受容体として使われるとともに加水分解を受けやすいためであると考えた。

次に, 本酵素の糖転移反応における受容体特異性について検討した。NPGal をガラクトシル供与体として pH7.0, 40°C で反応を行った結果, ガラクトースはグルコース, ガラクトース, マンノース, グルコサミン, ラクトース, スクロース, マルトースに比較的良好に転移し, アラビノース, フルクトース, N-アセチルグルコサミンへの転移はわずかであった。しかし, キシロース, リボース, ラムノースへのガラクトースの転移は認められなかった (Table 9)。pH5.5 で本酵素の受容体特異性を検討したが, アラビノースおよびフルクトースへのガラクトースの転移は認められず, pH の変化により本酵素は異なる受容体特異性を示すことが明らかとなった。前述したように, ラフィノースを基質にしたときの糖転移反応では還元末端のガラクトース残基の C-6 位の水酸基に優先的にガラクトースが転移しており, C-6 位の水酸基の存在が受容体となるために重要であると考えられる。したがって, マンノースの C-6 位の水酸基が水素原子で置換された構造をもつラムノースや五炭糖類は受容体になりにくいと考えられる。

第5節 小 括

P. cinnabarinus の α -ガラクトシダーゼの糖転移反応を明かにするため、高濃度のラフィノースを基質に用いたとき糖転移反応によって生成したオリゴ糖を単離し、それらの構造を調べた。単離した6種類の糖転移反応生成物は、酸分解、酵素分解およびメチル化分析の結果からそれぞれ O - α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)- O - α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド、 O - α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)- O - α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)- O - α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド、スタキオース、 O - α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)- O - α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)- O - α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)- O - α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド、ベルバスコース、アジュゴースと同定した。 O - α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)- O - α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)- O - α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシドおよび O - α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)- O - α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)- O - α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)- O - α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシドは文献未記載の新規なオリゴ糖であった。

糖転移反応生成物の生成量は pH7.0, 40°C で最大となった。また、本酵素は NPGal に作用し、アラビノース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、グルコサミン、*N*-アセチルグルコサミン、ラクトース、スクロースおよびマルトースにガラクトースを転移することが明かとなった。

第4章 耐熱性 α -ガラクトシダーゼの縮合反応による α -ガラクトオリゴ糖の酵素的合成

第1節 緒 言

グリコシダーゼを用いてオリゴ糖を酵素的に合成する方法として、前述の糖転移反応を利用する方法のほかに縮合反応を利用する方法がある。しかし、グリコシダーゼでは反応の平衡が極端に加水分解側に傾いているため、縮合反応によるオリゴ糖合成に関する報告は極めて少なく、Clancy と Whelan⁸⁵⁾による酵母 α -ガラクトシダーゼを用いたガラクトースからガラクトピオースの合成や、*M. vinacea* の α -ガラクトシダーゼを用いたガラクトースとスクロースの縮合反応によるラフィノースとプランテオースの合成⁸⁶⁾が報告されているにすぎない。

P. cinnabarinus の生産する α -ガラクトシダーゼは前章で示したように高い糖転移活性をもっている。しかし、ラフィノースやスタキオースなどの α -ガラクトオリゴ糖を糖転移反応により合成する場合、安価で大量に入手可能な α -ガラクトシル供与体は無い。そこで、本章ではガラクトースとスクロースを基質として、本酵素の触媒する縮合反応による α -ガラクトオリゴ糖の酵素的合成を試みた。

第2節 実験材料および実験結果

第1項 実験材料

ガラクトース、スクロース、ラフィノースは和光純薬工業製のものを用いた。 O - α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)- O - α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド (3^o- α -ガラクトシルスクロース) は前章に述べた方法により調製した。プランテオースは岐阜大学上野良光教授より恵与されたものを使用した。 α -ガラクトシダーゼは第2章で述べた方法により精製した標品を用いた。

第2項 縮合反応生成物の分離

縮合反応生成物の分離には第3章第2節と同様に活性炭カラムおよび Bio-Gel P-2 カラムを用いた。溶出液中の糖の定量はフェノール-硫酸法⁶²⁾によった。HPLCによる糖の分離・定量は第3章第2節と同様に行った。

第3項 縮合反応生成物の構成糖の定量

オリゴ糖(2 mg)に0.25N 硫酸1.0mlを加え、窒素封管後加水分解した。分解時間はガラクトースとグルコースの定量を目的とする場合には4時間、フルクトースの定量を目的とする場合には2時間とした。構成単糖の定量は第3章第2節と同様にしてガスクロマトグラフィーにより行った。

第4項 メチル化分析

第3章第2節と同様にしてメチル化分析を行った。ラフィノース、プランテオース、3^o- α -ガラクトシルスクロースから調製した部分メチル化糖のアルジトール・アセテート誘導体のガスクロマトグラフィーでの保持時間と縮合生成物から得られた誘導体の保持時間を比較した。

第5項 縮合反応生成物の酵素分解

縮合反応生成物2.5mg, 5 mM リン酸緩衝液 (pH5.8), *P. cinnabarinus* α -ガラクトシダーゼ (1.25酵素単位) あるいは *C. utilis* β -フルクトフラノシダーゼ (1.25酵素単位) からなる反応液0.25mlを37°Cで24時間保温した。5分間の煮沸により反応を停止した後、反応液を HPLC に供した。

第6項 旋光度の測定

オリゴ糖の旋光度は DIP-370型デジタル旋光計 (日本分光工業) を用いて、20°Cで測定した。溶媒には H₂O を使用した。

第7項 縮合反応生成物の定量

10% (w/v) ガラクトース, 60% (w/v) スクロース, 0.05M 酢酸緩衝液 (pH5.0) および α -ガラクトシダーゼ (20酵素単位/ml) からなる反応液2.2mlを一定温度で一定時間反応させた。沸騰水浴中で5分間加熱して反応を停止後、縮合反応生成物を第3章第2節と同様に HPLC により分離定量した。

第3節 実験結果

第1項 ガラクトースとスクロースの縮合反応による三糖の合成と分離

10% (w/v) ガラクトース, 60% (w/v) スク

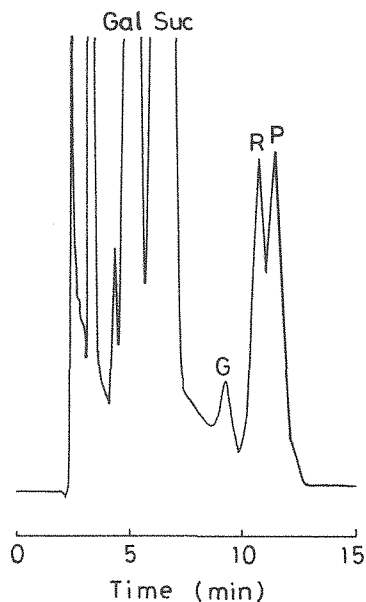


Fig. 38 HPLC of the Reaction Products Formed by the α -Galactosidase-catalyzed Condensation of Galactose and Sucrose. The reaction mixture was filtered and 10 μ l of the sample was injected. Sugars were eluted with acetonitrile-water (74:26). Gal, galactose; Suc, sucrose; G, oligosaccharide G; P, oligo-saccharide P; R, oligosaccharide R.

コース, 0.02M 酢酸緩衝液 (pH5.0) および α -ガラクトシダーゼ (732酵素単位) からなる反応液 (18.3ml) を60°Cで48時間反応させた後, 5分間煮沸して反応を停止し, 反応生成物を HPLC に供した。Fig. 38 に示すように, 基質であるガラクトースとスクロース以外に3種類の反応生成物が検出された。これら反応生成物は溶出順にオリゴ糖G, オリゴ糖R, オリゴ糖Pとした。オリゴ糖G, RおよびPのHPLCにおける溶出位置はそれぞれ3'- α -ガラクトシルスクロース, ラフィノースおよびプランテオースの溶出位置と一致した。

ついで, 酵素反応液を蒸留水で37mlに希釈し, 活性炭カラム (5 x 28cm) に供した。脱イオン水 (6.17 l) で洗浄後, 吸着した糖を6%エタノール (2.74 l), 9%エタノール (0.45 l) および12%エタノール (1.75 l) で順次溶出 (91ml/min) し, 画分I~Vを得 (Fig. 39), 各画分に含まれる糖質の分析結果を Table 10 にまとめた。

画分Iにはガラクトースとスクロースが, 画分IIにはスクロースと少量のオリゴ糖GとPが含まれていた。画分IIIには主にオリゴ糖Pと少量のスクロースおよびオリゴ糖Gが, 画分IVには主にオリゴ糖Rが含まれていたが, 画分Vにはオリゴ糖Gのみが含まれていた。画分III中に含まれるスクロースはBio-Gel P-2によるゲルろ過によりオリゴ糖と分離した。三糖画分にはオリゴ糖Pと少量のオリゴ糖Gが含まれていたため, この画分を集め, さらに活性炭カラム (1.8 x 23cm) クロマトグラフィーを行った。オリゴ糖Pは6%エタノールで溶離されたがオリゴ糖Gとは完全に分離されなかったため, 再度活性炭カラムクロマトグラフィーを行い, オリゴ糖Pを含む画分を集め, 凍結乾燥した (収量173mg)。画分IVについては, 画分IIIと同様に, Bio-Gel P-2によるゲルろ過および活性炭カラムクロマトグラフィーにより, オリゴ糖Rを単離した (収量173mg)。画分Vにはオリゴ糖Gのみが含まれていたため, 濃縮後, 凍結乾燥した (収量25mg)。得られたオリゴ糖はいずれもHPLCにより均一成分であることが確認された。

第2項 縮合反応生成物の構造

前項で単離したオリゴ糖G, PおよびRの構造を酸加水分解, 酵素分解, 比旋光度の測定お

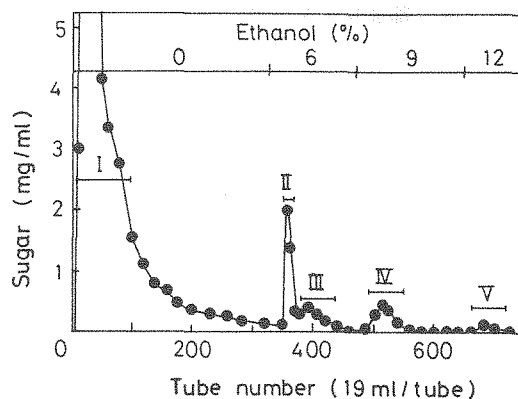


Fig. 39 Charcoal Column Chromatography of the Reaction Products Formed by α -galactosidase-catalyzed Condensation of Galactose and Sucrose.

The reaction mixture was put on a charcoal column (5 x 28 cm) and sugars were eluted successively with deionized water (6.17 l), 6% ethanol (2.74 l), 9% ethanol (0.45 l) and 12% ethanol (1.75 l) at a flow rate of 91 ml per hr.

Table 10 Reaction Products Obtained by the α -Galactosidase Catalyzed Condensation Reaction.

Fraction	Concentration of ethanol (%)	Sugar (mg)	Identification by HPLC
I (10-100)	0	9,787	Suc, Gal
II (353-370)	6	381	Suc, P, G
III (371-440)	6	346	P, Suc, G
IV (490-550)	9	324	R, G
V (670-720)	12	25	G

Gal, galactose; Suc, sucrose; G, oligosaccharide G; P, oligosaccharide P; R, oligosaccharide R.

よびメチル化分析により決定した。

オリゴ糖G、PおよびRの加水分解物について、ガスクロマトグラフィーにより分析した結果、これらの糖質はいずれも等モルのガラクトース、グルコースおよびフルクトースから構成されていることが判明した。また、Bio-Gel P-2 によるゲルろ過の溶出位置よりこれら3種類のオリゴ糖はいずれも三糖類であると判断した。

縮合反応生成物を α -ガラクトシダーゼおよび β -フルクトフラノシダーゼにより酵素分解し、HPLCで分解生成物を分析し、Fig. 40-a に示すような結果を得た。オリゴ糖GおよびRを α -ガラクトシダーゼにより分解すると、等モルのガラクトースとスクロースが得られた。また、GとRは β -フルクトフラノシダーゼによっても完全に分解された (Fig. 40-b)。これら酵素分解の結果より、オリゴ糖GとRは、いずれもガラクトースがスクロースに α -ガラクトシド結合し、フルクトースが末端に β -フルクトフラノシド結合していることがわかった。一方、オリゴ糖Pは α -ガラクトシダーゼ消化により等モルのガラクトースとスクロースを生じたが、 β -フルクトフラノシダーゼによつては全く分解されなかった。このことより、オリゴ糖Pは末端に α -ガラクトシド結合を有するが、フルクトースがオリゴ糖Pの末端には結合していないという点でオリゴ糖GやRとは異なることが明らかとなった。

オリゴ糖のメチル化分析の結果をTable 11に示した。オリゴ糖Gからは1, 3, 4, 6-テトラ-O-メチル-D-フルクトース、2, 3, 4, 6-テトラ-O-メチル-D-ガラクトースおよび2, 4, 6-トリ-O-メチル-D-グルコースが検出され、フルクトースのC-2位、ガラクトースのC-1位、およびグルコースのC-1位とC-3位がそれぞれ結合に関与していることがわかった。

オリゴ糖Pから得られた三種類のメチル化糖は2, 3, 4, 6-テトラ-O-メチル-D-グルコース、2, 3, 4, 6-テトラ-O-メチル-D-ガラクトースおよび1, 3, 4-トリ-O-メチル-D-フル

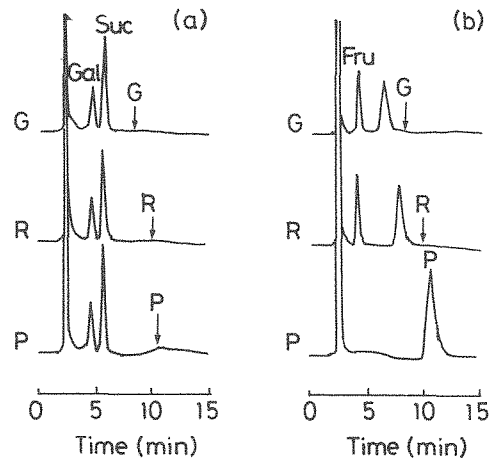


Fig. 40 HPLC of the Enzymatic Digests of the Oligosaccharides.

(a), *P. cinnabarinus* α -Galactosidase; (b), *C. utilis* β -Fructofuranosidase. Sugars were eluted with acetonitrile-water (76:24). Gal, galactose; Suc, sucrose; G, oligosaccharide G; P, oligosaccharide P; R, oligosaccharide R.

Table 11 Molar Ratios of Alditol Acetates Derived from Permethylated Transfer Products.

Oligosaccharide	1,3,4,6-Tetra-O-Me-D-Fru	2,3,4,6-Tetra-O-Me-D-Glc	2,3,4,6-Tetra-O-Me-D-Gal	1,3,4-Tri-O-Me-D-Fru	2,4,6-Tri-O-Me-D-Glc	2,3,4-Tri-O-Me-D-Glc
Oligosaccharide G	0.8		1.0		1.2	
Oligosaccharide P		1.2	1.0	0.7		
Oligosaccharide R	0.8		1.0			1.1
3 ^c - α -galactosylsucrose	0.8		1.0		1.1	
Planteose		1.2	1.0	0.8		
Raffinose	0.8		1.0			1.0

クトースであり、ガラクトースはスクロース分子中のフルクトース残基のC-6位に結合していることが判明した。オリゴ糖Rでは1, 3, 4, 6-テトラ-O-メチル-D-フルクトース, 2, 3, 4, 6-テトラ-O-メチル-D-ガラクトースおよび2, 3, 4-トリ-O-メチル-D-グルコースが検出され、グルコースのC-1位とC-6位が結合に関与していることが判明した。このように、オリゴ糖G, P, Rから得られた部分メチル化糖はそれぞれ3^G- α -ガラクトシルスクロース, プランテオース, ラフィノースの部分メチル化糖と一致した。

オリゴ糖Rおよびオリゴ糖Pの比旋光度はそれぞれ $[\alpha]_D^{20} + 124^\circ$ ($c=1.0$, H₂O), $[\alpha]_D^{20} + 130^\circ$ ($c=1.0$, H₂O)であり、これらの値はそれぞれラフィノースおよびプランテオースの文献値⁸⁷⁾とよく一致した。オリゴGの比旋光度は $[\alpha]_D^{20} + 141^\circ$ ($c=0.2$, H₂O)であり、この値は3^G- α -ガラクトシルスクロースの文献値⁸⁸⁾とよく一致していた。

以上の結果より、オリゴ糖GはO- α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)-O- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド (3^G- α -ガラクトシルスクロース), オリゴ糖PはO- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- β -D-フルクトフラノシル-(2-1)- α -D-グルコピラノシド (プランテオース), オリゴ糖RはO- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-O- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド (ラフィノース)であると推定した。得られた縮合反応生成物の構造式をFig. 41に示す。

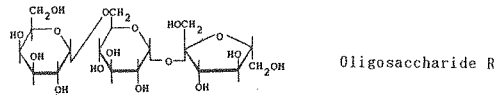
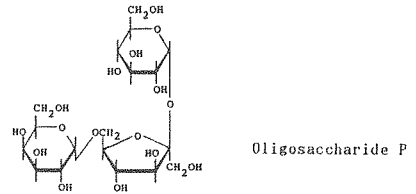
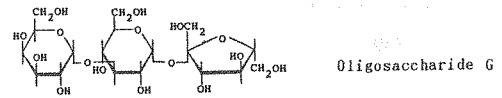


Fig. 41 Structures of the Condensation Products

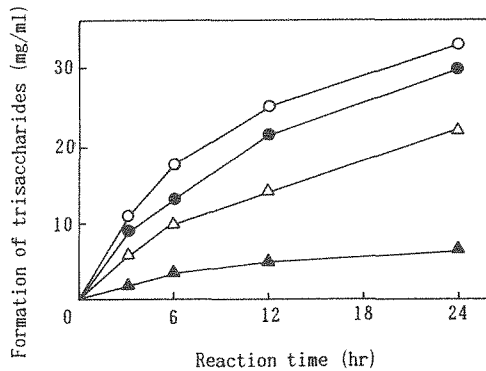


Fig. 42 Effect of pH on the Formation of the Trisaccharides by Condensation Action of α -Galactosidase.

The mixture of 10% (w/v) galactose and 60% (w/v) sucrose was incubated with α -Galactosidase (20 units/ml) in various buffers of pH 4.0 to 7.0 at 60°C. Buffers: pH 4.0 (○) and 5.0 (●), 20mM acetate buffer; pH 6.0 (△) and 7.0 (▲), 20mM sodium phosphate buffer.

第3項 縮合反応生成物の生産条件

前項で、 α -ガラクトシダーゼの触媒する縮合反応によりガラクトースとシュクロースから三種類の三糖 (3^G- α -ガラクトシルスクロース, プランテオース, ラフィノース) が生成することを示した。本項では、縮合反応によるこれらガラクトオリゴ糖の合成条件について検討した。

(1) pHの影響

Fig. 42に各pHにおける縮合反応生成物の経時変化を示した。なお、生成量は三糖 (3^G- α -ガラクトシルスクロース, プランテオース, ラフィノース)の総量で示した。三糖の生成速度はpHが低くなるにしたがい増加し、pH4で最大となったが、これより酸性領域で

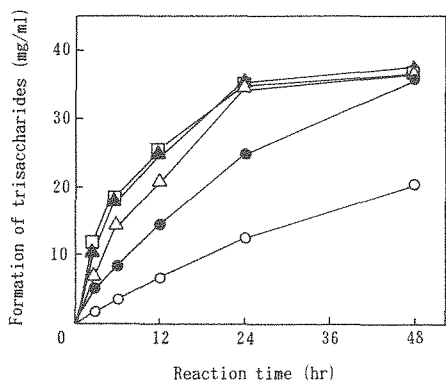


Fig. 43 Effect of Temperature on the Formation of the Trisaccharides by Condensation Action of α -Galactosidase.

The mixture of 10% (w/v) galactose and 60% (w/v) sucrose was incubated with α -Galactosidase (20 units/ml) in 20mM acetate buffer (pH 5.0) at various temperatures from 40 to 80°C.

○, 40°C; ●, 50°C; △, 60°C; ▲, 70°C; □, 80°C.

はフルクトースの遊離が認められた。この実験結果をもとに、以下の実験は pH5 で行うことにした。

(2) 温度の影響

反応温度を40°Cから80°Cまで変えて三糖の生成量を経時的に比較した(Fig. 43)。生成速度は反応温度に比例して増大し、三糖の最大生成量は60°C~80°Cの間でほぼ等しく、約37 mg/mlであった。3^G- α -ガラクトシルスクロース、ラフィノース、プランテオースの生成比は約1 : 4 : 5で、この生成比率は温度によってほとんど変化しなかった。

(3) 基質濃度の影響

縮合反応に及ぼす基質濃度の影響を検討するため、 α -ガラクトシダーゼ(100酵素単位/ml)存在下で、10% (w/v) ガラクトースと10~60% (w/v) スクロースをpH5.0, 60°Cで24時間反応させた。なお、ガラクトース間の縮合を抑えるためにガラクトース濃度は10% (w/v) とした。Fig. 44 に示すように、三糖類の生成量はスクロース濃度に比例して増加した。また、プランテオースとラフィノースはほぼ同量生成したが、3^G- α -ガラクトシルスクロースの生成量はわずかであった。

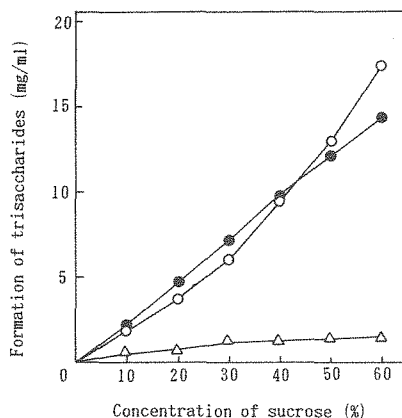


Fig. 44 Effect of Sucrose Concentration on the Formation of the Trisaccharides by Condensation Action of α -Galactosidase.

The mixture of 10% (w/v) galactose and 10-60% (w/v) sucrose was incubated with α -Galactosidase (100 units/ml) in 20mM acetate buffer (pH 5.0) for 24 hr at 60°C.

△, 3^G- α -galactosylsucrose; ○, planteose; ●, raffinose.

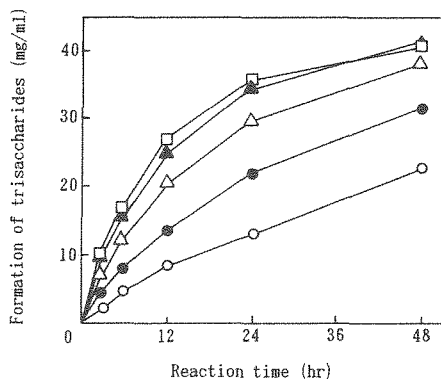


Fig. 45 Effect of Enzyme Concentration on the Formation of the Trisaccharides by Condensation Action of α -Galactosidase.

The mixture of 10% (w/v) galactose and 60% (w/v) sucrose was incubated with α -Galactosidase (5-80 units/ml) in 20mM acetate buffer (pH 5.0) at 60°C.

○, 5 units/ml; ●, 10 units/ml; △, 20 units/ml; ▲, 40 units/ml; □, 80 units/ml.

(4) 酵素濃度の影響

酵素濃度を5~80酵素単位/mlとして変えて、三糖の生成量を経時的に測定し、Fig. 45のような結果を得た。酵素濃度に比例して三糖の生成速度は増加し、酵素濃度40酵素単位/mlで最大となった。 α -ガラクトシダーゼ(40酵素単位/ml)、10% (w/v) ガラクトースおよび60% (w/v) スクロースからなる反応液をpH5.0、60°Cで48時間反応させたとき得られる縮合生成物の収量は基質ガラクトースの約15%であった。

第4節 考 察

P. cinnabarinus α -ガラクトシダーゼの触媒する縮合反応によるオリゴ糖の合成を行った。本実験ではガラクトース間の縮合を避けるために、ガラクトース濃度を10% (w/v)、スクロース濃度を60% (w/v) として反応を行った。縮合生成物をHPLCで確認した結果、3種類のオリゴ糖が生成していた(Fig. 38)。これら3種類の縮合生成物は活性炭クロマトグラフィーおよびBio-Gel P-2によるゲルろ過を行うことにより単離された。縮合により生成したオリゴ糖はいずれも三糖であった。これらのオリゴ糖は酸分解、酵素分解、メチル化分析、旋光度の測定結果より、3^o- α -ガラクトシルスクロース、プランテオース、ラフィノースと同定された。すなわち、本縮合反応では、スクロース分子中のグルコース残基のC-6位とC-3位の水酸基およびフルクトース残基のC-6位の水酸基にガラクトースが結合したオリゴ糖が生成した。3^o- α -ガラクトシルスクロースの生成量は他のオリゴ糖の生成量に比べきわめて低く、本縮合反応では α -1,6結合をもつオリゴ糖が優先的に合成されることが明かとなった。

前章でも述べたように、本酵素の糖転移反応ではスクロースあるいはラフィノースのフルクトース残基へのガラクトースの転移は見られないことから、糖転移反応ではサブサイトへの受容体の結合には一定の方向性があるように推測される。これに対し、上記の結果は、縮合反応ではスクロースのサブサイトへの結合は自由度が大きく方向性が一定していないことを示唆している。これに関連して、AjisakaとFujimoto⁸⁶⁾は10% (w/v) ガラクトースと50% (w/v) スクロースに *M. vinacea* の α -ガラクトシダーゼをバッチ式で作用させると縮合反応によりラフィノースとプランテオースが生成し、固定化 α -ガラクトシダーゼと活性炭カラムを組み合わせたカラム循環方式で反応させるとラフィノースのみが生成することを報告している。しかし、これらいずれの方法を用いた場合でも3^o- α -ガラクトシルスクロースの生成は確認されていない。ClancyとWhelan⁸⁵⁾は酵母 α -ガラクトシダーゼを用いて縮合反応により α -1,2、 α -1,3、 α -1,4、 α -1,5、 α -1,6ガラクトシド結合をもつガラクトピオースを合成し、それら生成物の約60%が α -1,6ガラクトピオースであると報告している。*P. cinnabarinus* α -ガラクトシダーゼもガラクトースとスクロースの縮合反応の外に、ガラクトースとガラクトース、グルコース、フルクトース、グルコサミン、ラクトースなどとの縮合反応も触媒する。これら縮合反応によって合成される α -ガラクトオリゴ糖は、今後、機能性オリゴ糖として、あるいは糖転移反応における新たなガラクトシル供与体として利用されるものと期待される。

本酵素による三糖の合成条件について検討した結果、10% (w/v) ガラクトース、60% (w/v) スクロースおよび α -ガラクトシダーゼ(40酵素単位/ml)からなる反応液をpH5.0、60°Cで48時間反応させたとき、縮合生成物の収率は約15% (対ガラクトース)であった。縮合は単に加水分解の逆反応にすぎない。したがって、グリコシダーゼの触媒する縮合反応によってオリゴ糖を収率よく合成するためには1) 基質濃度を高くする、2) 生成物を反応系外に取り出す、3) 水の濃度を低くすることが有効な手段として考えられる。1) の例としては、タチナタマメ α -マンノシダーゼによるマンノオリゴ糖の合成例があげられる。Johanssonら⁸⁹⁾は75°Cで反

応を行い、マンノース濃度を85% (w/v) まで上昇させることにより37%の収率でマンノピオースを得ている。Ajisaka ら⁹⁰⁾は90% (w/v) グルコースにアーモンドの β -グルコシダーゼを作用させることによりグルコオリゴ糖の収率が40%以上になると報告している。基質濃度を高くすることは同時に水の濃度を低下させることになり、本実験においてもスクロース濃度を高くすることにより縮合生成物の収量を増加させることができた (Fig. 40)。一方、2) に関しては、固定化 β -ガラクトシダーゼと活性炭カラムを連結することにより生成物を反応系外に除き、縮合生成物を増加させる方法が報告されており、⁹¹⁾今後、この点に関して詳細に検討する必要がある。

以上のような実験条件に加えて、*P. cinnabarinus* α -ガラクトシダーゼは第2章で述べたように熱に対して極めて安定である。したがって、反応温度を高くすることにより高基質濃度(低水分含量)で反応を行うことが可能であり、縮合反応によるオリゴ糖の合成に適していると考えた。

第5節 小 括

P. cinnabarinus の α -ガラクトシダーゼの縮合反応による α -ガラクトオリゴ糖の合成を行った。本酵素を10% (w/v) ガラクトースおよび60% (w/v) スクロースに作用させて生成した3種類の三糖を単離し、それらの構造を酸分解、酵素分解およびメチル化分析により決定した。生成した三糖はそれぞれ *O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)-*O*- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド (3^o- α -ガラクトシルスクロース)、*O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-*O*- β -D-フルクトフラノシル-(2-1)- α -D-グルコピラノシド (プランテオース)、*O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-*O*- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド (ラフィノース) と同定された。縮合反応生成物の生成量は基質濃度に比例して増加した。 α -ガラクトシダーゼ (40酵素単位/ml)、10% (w/v) ガラクトースおよび60% (w/v) スクロースからなる反応液を pH5.0、60°Cで48時間反応させ、縮合生成物を約15%の収率(対ガラクトース)で得た。

第5章 耐熱性 α -ガラクトシダーゼの固定化と応用

第1節 緒 言

近年、 α -ガラクトシダーゼは甜菜糖製造工程における糖蜜中のラフィノースの分解⁹⁶⁾や豆乳中のラフィノースやスタキオースの分解⁴¹⁻⁴⁵⁾に利用されている。このように α -ガラクトシダーゼを工業面に応用する場合には、遊離の酵素を用いるよりは不溶性担体に酵素を結合させ固定化酵素として使用するのが経済的といえる。このような観点から、これまでに α -ガラクトシダーゼの固定化がいくつか試みられている。^{92, 93)}第2章で述べたように *P. cinnabarinus* の α -ガラクトシダーゼは熱安定性に優れ、高純度の酵素標品を高収率で得ることができるという利点を有している。*P. cinnabarinus* α -ガラクトシダーゼの不溶性担体への固定化は、本酵素の有する優れた特性を応用面においてより有効に活用するうえにおいても重要な課題といえる。

ここでは本酵素を固定化するための担体について検討するとともに、固定化 α -ガラクトシダーゼを用いて甜菜糖蜜中のラフィノースの連続分解を試みた。

第2節 実験材料および実験方法

第1項 実験材料

DEAE-Sephadex A-50と DEAE-Cellulose DE-23は、それぞれ Pharmacia 社と Whatman 社より得た。粉末キチンは Hackman⁹⁴⁾の方法によりカニ殻から調製した。この方法は条件が過酷であるため、調製されたキチンは10%程度脱アセチル化されている。⁹⁵⁾コロイド状キチンは上記の粉末キチンを用いて Jeuniaux⁹⁶⁾の方法により調製した。粉末キトサンは共和油脂社製のものを用いた。コロイド状キトサンは Price と Storck⁹⁷⁾の方法により調製した。多孔性キトサンビーズ* (Chitopearl BCW 1000, Chitopearl BCW 3000, Chitopearl BCW 3500) は富士紡績社製のものを使用した。

固定化に用いた酵素標品は第2章で述べた方法に準じて調製した。

廃糖蜜としては日本甜菜糖株式会社より供与された、スクロース43.6%、ラフィノース11.3%、グルコース2.2%、フルクトース2.5%、ガラクトキノール1.9%およびベタイン14.2%を含む甜菜廃糖蜜を使用した。

第2項 酵素の固定化

(1) コロイド状キチンへの固定化

0.2gの固定化担体を0.05M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 30mlに分散させ、これに25%グルタルアルデヒド溶液3.3mlを加え、25°Cで1時間振盪した。担体はろ過してろ紙 (東洋濾紙, No. 2) 上に集め、水で十分に洗浄して過剰のグルタルアルデヒドを除去した。得られたグルタルアルデヒド処理担体に0.05M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 10mlに溶解した α -ガラクトシダーゼ (50酵素単位) を加え、25°Cで1時間振盪した。固定化 α -ガラクトシダーゼはろ過してろ紙上に集め、蒸留水で十分に洗浄した後、水に懸濁して4°Cに保存した。

(2) 多孔性キトサンビーズへの固定化

(方法1) Chitopearl BCW 3000 5g (湿重量) に0.05M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 5ml, α -ガラクトシダーゼ溶液 (50酵素単位) 5mlを加え、30°Cで1時間振盪した。ろ紙 (東洋濾紙 No. 2) 上に固定化酵素を集め、脱イオン水で充分洗浄した。

(方法2) Chitopearl BCW 3000 5g (湿重量) に0.05M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 5ml, 5% グルタルアルデヒド 5mlを加え、30°Cで1時間振盪した。Chitopearl をろ紙上に集め、脱イオン水で洗浄し、過剰のグルタルアルデヒドを除去した後、0.05M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 5ml, α -ガラクトシダーゼ溶液 (50酵素単位) 5mlを加え、30°Cで1時間振盪して固定化反応を行った。固定化 α -ガラクトシダーゼはろ紙上に集め、脱イオン水で充分に洗浄した。Chitopearl BCW 3000の代わりに Chitopearl BCW 1000を用いた場合にも上記の操作に準じて固定化酵素を調製した。この場合 Chitopearl BCW 1000は pH5.0では一部水に溶解するので、固定化反応の溶媒としては0.05M 酢酸緩衝液 (pH6.0) を用いた。

第3項 固定化酵素の活性測定法

固定化酵素の α -ガラクトシダーゼ活性は次のように測定した。すなわち、4 mM NPGal 0.4 mlと0.2M Na_2HPO_4 -0.1M クエン酸緩衝液 (pH5.0) 0.4mlを混合した後、固定化酵素懸濁液

* Chitopearl BCW 1000はキトサン酢酸溶液を塩基性凝固浴に放出することによりビーズ状に成形されたものである。また、BCW 3000はヘキサメチレンジイソシアネートで架橋されたビーズであり、BCW 3500は4,4'-ジフェニルメタンジイソシアネートで架橋された製品である。⁹⁸⁾

Table 12 Immobilization of α -Galactosidase on Several Adsorbents.

Compound	Unbound enzyme activity (units)	Immobilized enzyme activity (units)	Activity yield (%)
Chitin	0.55	2.74	27.5
Colloidal chitin	1.32	7.20	72.1
Chitosan	0	2.34	23.4
Colloidal chitosan	0	4.49	45.0
DEAE-Sephadex A-50	0	3.91	39.2
DEAE-Cellulose DE-23	0	4.22	42.3

α -Galactosidase (9.98 units) was mixed with 0.2 g of each adsorbent treated with glutaraldehyde and the mixture was shaken for 1 hr at 25°C and at pH 5.0. After the mixture was filtered, unbound and immobilized enzyme activities were measured by assessing α -galactosidase activity of the filtrate and precipitate, respectively, under the condition described in the text. The activity yield was expressed as the percentage of immobilized enzyme activity to added enzyme activity.

0.2mlを加えて37°Cで10分間振盪した。0.2M 炭酸ナトリウム 4 mlを加えて反応を停止後、遠心分離して、上澄液中に遊離する *p*-ニトロフェノールを420nmにおける吸光度を測定して求めた。一方、ラフィノースを基質にした場合の固定化酵素の活性は0.04M ラフィノース 1 ml, 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 1 mlおよび固定化酵素 (30~100mg, 湿重量) を含む反応液を37°Cで10分間振盪反応させた。反応上澄液を0.2mlから0.5mlとり、1 mlの銅試薬に添加、混合することにより反応を停止させ、生成したガラクトース量を Somogyi-Nelson 法⁵⁸⁾により定量した。

第4項 HPLC による糖の定量

HPLC による糖の定量は第3章第2節と同様に行った。

第5項 走査電子顕微鏡観察

臨界点乾燥あるいは凍結乾燥したキトサンビーズに金蒸着し、その表面を走査型電子顕微鏡 (JSM-F15型, 日本電子) を用いて観察した。

第6項 廃糖蜜中のラフィノースの連続分解

オートクレーブで殺菌した粒径 1 mm の chitopearl BCW 3000 (15.6 g, 湿重量) に α -ガラクトシダーゼ (150酵素単位) を方法2 (本節第2項) により固定化した。固定化 α -ガラクトシダーゼ (52酵素単位, 15.4 g) をガラスジャケット付カラム (16 x 130mm) に充填し50°Cに保った。一方、200 g の甜菜糖蜜を 1 ℓ の脱イオン水に溶解し、オートクレーブを用いて殺菌してから、0.1N 硫酸で pH を 5.2 に調整した後、少量のトルエンを添加した。この様にして調製した糖蜜液 (ラフィノース濃度 2.4%) を固定化カラムに 7.2 ml/hr の流速で連続的に供し、溶出液中のラフィノース量を HPLC により定量した。試料は SEP-PAK C₁₈ カートリッジでろ過し、次にミリポアフィルター (0.45 μ m) でろ過した後、HPLC に供した。

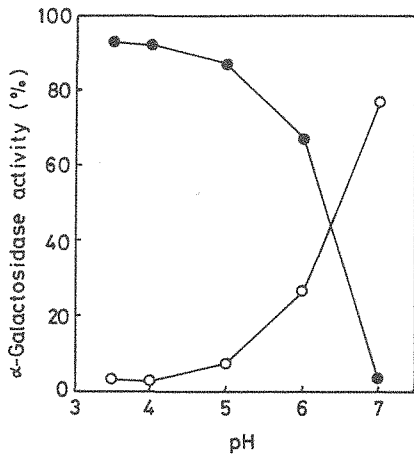


Fig. 46 Effect of pH on the Immobilization of α -Galactosidase to the Glutaraldehyde Treated Colloidal Chitin. pH 3.5~6.0, 0.2 M Na_2HPO_4 -0.1 M citric acid buffer; pH 7.0, 0.2 M phosphate buffer. \circ , unbound enzyme activity; \bullet , immobilized enzyme activity.

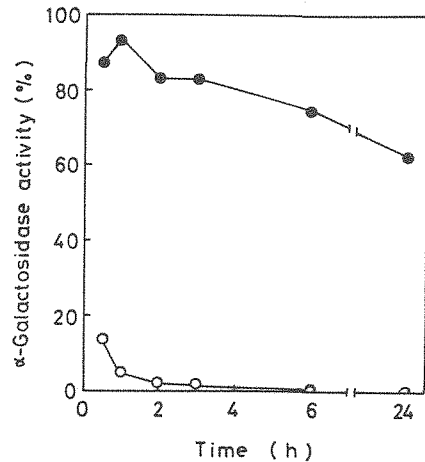


Fig. 47 Effect of Incubation Time on the Immobilization of α -Galactosidase to the Glutaraldehyde Treated Colloidal Chitin. \circ , unbound enzyme activity; \bullet , immobilized enzyme activity.

第3節 実験結果

第1項 α -ガラクトシダーゼの固定化

(1) 固定化担体の検討

6種類の担体を用いて、グルタルアルデヒドによる α -ガラクトシダーゼの固定化率と活性収率について検討した。その結果、Table 12に示すように、キトサン、コロイド状キトサン、DEAE-Sephadex A-50、DEAE-Cellulose DE-23への固定化率は100%であったが、活性収率は20~45%と低かった。これに対し、コロイド状キチンを固定化担体としたときの固定化率は87%と高く、また、活性収率も72.1%であった。

(2) コロイド状キチンへの固定化条件の検討

(1)の結果をもとにして、本酵素のコロイド状キチンへの固定化の最適条件についてさらに詳しく検討した。なお、酵素活性はNPGalを基質に用いて測定した。

a) pHの影響

グルタルアルデヒド処理したコロイド状キチン(0.2g)に α -ガラクトシダーゼ(50酵素単位)を加え、各pHで、25°C、1時間反応させた後、反応上澄液中の酵素活性および固定化酵素の活性を測定した。その結果、Fig. 47からも明かなように、本酵素はpH3.5~5.0の酸性側では固定化率は高いが、pH7.0ではほとんど固定化されないことが判明した。pH5.0における固定化率は95%、活性収率は約85%と高いこと、

Table 13 Effects of Enzyme Amount on Immobilization of α -Galactosidase to the Glutaraldehyde Treated Colloidal Chitin.

Added enzyme activity (units)	Unbound enzyme activity (units)	Immobilized enzyme activity (units)	Activity yield (%)
10	1.3	7.0	70.0
25	3.1	19.8	79.2
50	5.6	42.6	85.2
100	28.5	56.1	56.1
150	58.5	68.5	45.7

α -Galactosidase (10-150 units) was incubated with 0.2g of colloidal chitin treated with glutaraldehyde for 1 hr at 25°C in 0.05M acetate buffer, pH5.0.

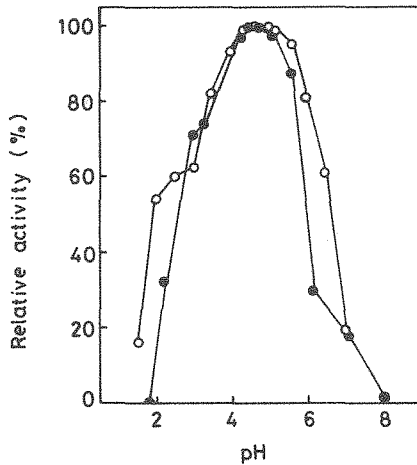


Fig. 48 Effect of pH on α -Galactosidase Activities of Native and Immobilized Enzyme.
○, native enzyme;
●, immobilized enzyme.

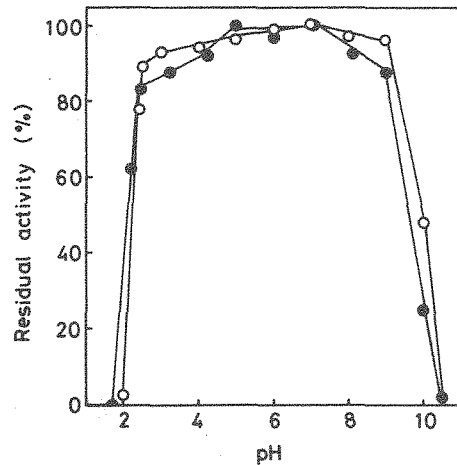


Fig. 49 Effect of pH on the Stability of Native and Immobilized Enzyme.
○, native enzyme;
●, immobilized enzyme.

および本酵素は第2章第3節で示したように pH5.0付近で最も安定であることを考慮して、以後の固定化の実験は pH 5.0で行うこととした。

b) 反応時間の影響

α -ガラクトシダーゼ (50酵素単位) およびグルタルアルデヒド処理したコロイド状キチン (0.2g) を0.05M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 中、25°C、0.5~24時間反応させた。その結果、Fig. 47に示すように、活性収率は1時間後に最高となり、その後次第に低下した。

c) 酵素量の影響

酵素添加量の活性収率におよぼす影響を検討するために、グルタルアルデヒド処理したコロイド状キチン (0.2g) に対して、種々の濃度の α -ガラクトシダーゼを加え、0.05M 酢酸緩衝液 (pH5.0) 中で25°C、1時間反応させた。

Table 13に示すように、酵素添加量が増加するに従って固定化酵素の活性は増加したが、活性収率は50酵素単位の酵素を添加したとき最高 (85.2%) となり、それ以上酵素量を増すとむしろ活性収率が低下した。上記の a), b), c) の実験結果をもとにして、固定化 α -ガラクトシダーゼの調製のための最適条件として、グルタルアルデヒド処理コロイド状キチン0.2g に対する酵素量は50酵素単位、反応は pH5.0、25°C、1時間と設定した。

(3) 固定化酵素の性質

a) pH の影響

Fig. 48に示すように固定化酵素の pH 依存性曲線は遊離の酵素のそれと類似しており、最適

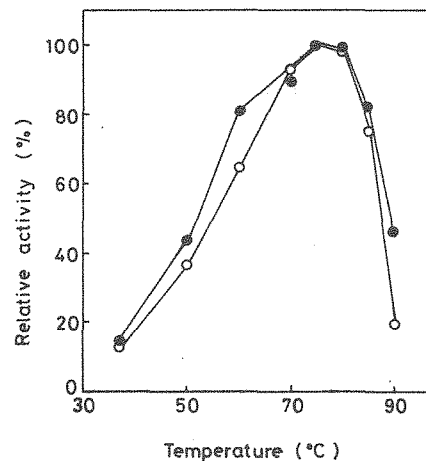


Fig. 50 Effect of Temperature on α -Galactosidase Activities of Native and Immobilized Enzyme.
○, native enzyme;
●, immobilized enzyme.

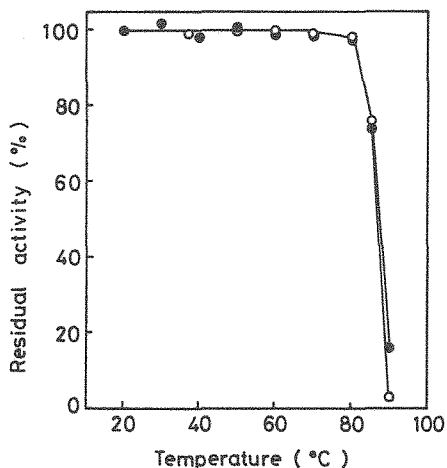


Fig. 51 Effect of Temperature on the Stability of Native and Immobilized Enzyme.
○, native enzyme;
●, immobilized enzyme.

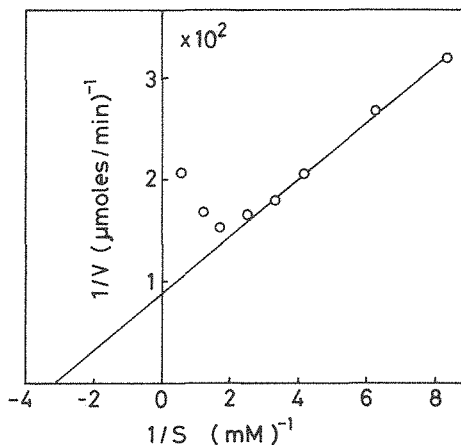


Fig. 52 Lineweaver-Burk Plots for the Hydrolysis of NPGal Catalyzed by the immobilized α -Galactosidase.

pH は4.5~5.0付近であった。また、第2章第2節と同様にして pH 安定性を調べた結果、固定化酵素は遊離の酵素の場合と同様に pH3.0~9.0の範囲で安定であった (Fig. 49)。

b) 温度の影響

酵素活性に対する反応温度の影響について検討した結果、Fig. 50 に示すように、固定化酵素の最適温度は遊離の酵素同様に75°Cであり、また、熱安定性も遊離の酵素とほぼ等しかった (Fig. 51)。

c) 基質濃度の影響

NPGal を基質に用いたときの基質濃度と反応速度の関係を Lineweaver-Burk の方法に従って解析した。その結果、Fig. 52 より求めた見かけの K_m 値は0.32mM、 V_{max} 値は603 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ protein と求められ、これらの値は遊離の α -ガラクトシダーゼについて得られた結果とよく一致したが、この場合にも遊離の酵素を用いた時と同様な基質阻害効果が見られた (第2章, Fig. 16)。以上の結果より、本酵素の諸性質はコロイド状キチンへの固定化後も保持されていることが明らかとなった。

(4) 固定化酵素の反復使用に対する安定性

50mM ラフィノース水溶液 8 ml、0.2M Na_2HPO_4 -0.1M クエン酸緩衝液 (pH5.0) 5 ml をコロイド状キチンに固定化した α -ガラクトシダーゼ (3.8酵素単位) 懸濁液 7 ml と混合し、37°C、1時間振盪して反応させた。反応終了後、固定化 α -ガラクトシダーゼを遠心分離 (3,000 rpm x 5 min) により集め、

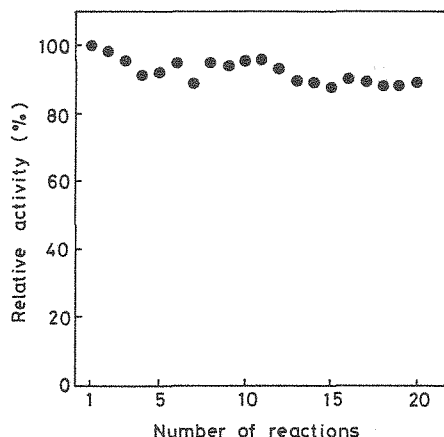


Fig. 53 Repeated Use of the Immobilized α -Galactosidase for the Hydrolysis of Raffinose.

Table 14 Immobilization of α -Galactosidase on Various Types of Chitosan Beads.

Chitosan beads	Added enzyme activity (units)	Unbound enzyme activity (units)	Immobilized enzyme activity (units)	Activity yield (%)
BCW 1000	47.0	0.20	3.8	8.1
BCW 1000+glutaraldehyde	47.0	0.21	16.4	34.9
BCW 3000	45.2	0.24	13.5	30.0
BCW 3000+glutaraldehyde	45.2	0.28	14.8	32.7
BCW 3500	45.2	0.40	12.6	27.9
BCW 3500+glutaraldehyde	45.2	0.38	11.9	26.3

α -Galactosidase was mixed with 5 g of chitosan beads (1.0 mm diameter) pretreated with or without glutaraldehyde and the mixture was shaken for 1 hr at 30°C. After the mixture was filtered, unbound and immobilized enzyme activities were measured by assessing α -galactosidase activity of the filtrate and beads, respectively. The activity yield was expressed as the percentage of immobilized enzyme activity to added enzyme activity.

Table 15 Effects of Enzyme Amount on Immobilization of α -Galactosidase to Chitosan Beads.

Chitosan beads	Added enzyme activity (units)	Unbound enzyme activity (units)	Immobilized enzyme activity (units)	Activity yield (%)
BCW 3000	10	0	4.5	45.0
	20	0.3	8.3	41.5
	50	0.3	16.3	32.6
	100	0	34.0	34.0
	200	0.1	66.5	33.3
BCW 3500	10	0	3.0	30.0
	20	0.2	9.1	45.5
	50	0.2	17.1	34.2
	100	0	33.5	33.5
	200	0.4	64.7	32.4

α -Galactosidase (10-200 units) was incubated with 5 g of chitosan beads (1.0 mm diameter) treated with glutaraldehyde, under the same conditions as in Table 14.

水で充分洗浄した後、緩衝液および基質を加え再度反応させた。この操作を20回繰り返し、残存酵素活性を測定した。その結果、Fig. 53 に示すように、本固定化酵素は20回使用後も活性はほとんど低下せず、最初の活性の約90%を保持していることが判明した。

第2項 α -ガラクトシダーゼのキトサンビーズへの固定化

前項では、耐熱性 α -ガラクトシダーゼがコロイド状キチンに収率よく固定化され、固定化酵素も遊離の酵素と同様に安定性が高いことを示した。しかし、コロイド状キチンは微細で、脆弱なためカラムに充填して使用することは困難であり、工業的な利用には適していないと考えられる。この点を改良することを目的として、コロイド状キチンの代わりにビーズ状の多孔性キトサンへの本酵素の固定化を試み、固定化の諸条件について検討するとともに、この方法に

Table 16 Effects of the Size of Chitosan Beads on Immobilization of α -Galactosidase

Chitosan beads	Diameter (mm)	Added enzyme activity (units)	Unbound enzyme activity (units)	Immobilized enzyme activity (units)	Activity yield (%)
BCW 3000	0.3	50.0	0.1	20.8	41.6
	1	49.7	0	17.1	34.3
	3	52.2	0.1	17.5	33.4
BCW 3500	0.3	52.2	0.1	20.7	39.6
	1	49.9	0.2	17.1	34.2
	3	52.0	0	12.8	24.6

α -Galactosidase was incubated with 5 g of different sizes of chitosan beads treated with glutaraldehyde. Each immobilization was done under the same conditions as in Table 14.

より得られた固定化酵素を用いて甜菜糖蜜中のラフィノースの連続分解を試みた。なお、酵素活性はラフィノースを基質として測定した。

(1) 各種キトサンビーズへの固定化

α -ガラクトシダーゼを直径1mmの Chitopearl BCW 1000, 3000および3500に固定化した。その結果、Table 14に示すように、本酵素はいずれの担体ビーズに対しても99%以上保持され、その際の活性収率は25~35%であった。BCW 3000および3500ではグルタルアルデヒド処理の有無による活性収率の違いは見られなかったが、BCW 1000を用いた場合にはグルタルアルデヒド未処理のビーズに酵素を吸着させると、活性収率は8.1%に低下した。

(2) 添加酵素量と活性収率の関係

グルタルアルデヒド処理した Chitopearl BCW 3000および3500を用いて、添加酵素量が活性収率に及ぼす影響について検討したところ、Table 15に示すように、両ビーズにおいて固定化酵素の活性は添加酵素の量に比例して高くなった。活性収率は約30~45%であり、10~20酵素単位の酵素量を用いた場合に若干高くなった。

(3) 担体の粒径と活性収率の関係

粒径0.3, 1, 3mmの Chitopearl BCW 3000およびBCW 3500に方法2(第2節第2項)により α -ガラクトシダーゼを固定化し、活性収率を比較した。Table 16に示すように、固定化酵素の活性収率は粒径が大きくなるに従って低下する傾向が見られたが、粒径3mmのビーズを使用した場合でも、著しい活性の低下は認められなかった。

(4) 固定化酵素の安定性

固定化酵素の安定性に及ぼすNaCl濃度の

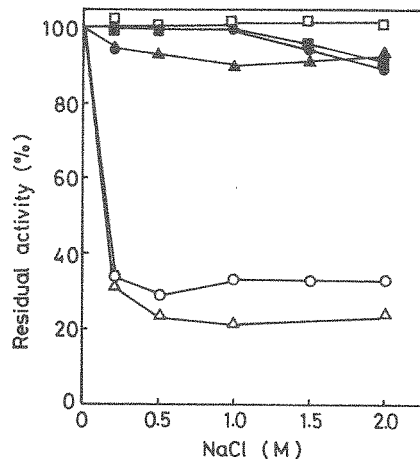


Fig. 54 Effect of NaCl on the Release of α -Galactosidase from the Adsorbents. Chitosan beads: 1.0 mm diameter. ○, BCW 1000; ●, BCW 1000+glutaraldehyde; △, BCW 3000; ▲, BCW 3000+glutaraldehyde; □, BCW 3500; ■, BCW 3500+glutaraldehyde.

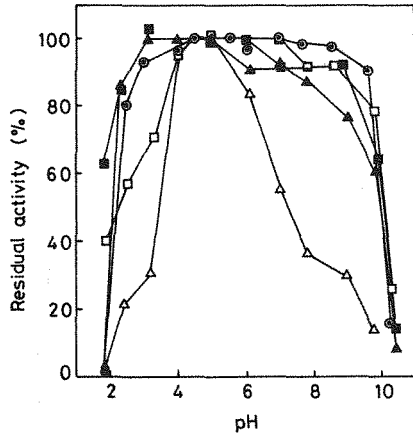


Fig. 55 Effect of pH on the Stabilities of Native and Immobilized Enzyme.
 ●, native enzyme; △, BCW 3000;
 ▲, BCW 3000+glutaraldehyde;
 □, BCW 3500; ■, BCW 3500+glutaraldehyde.

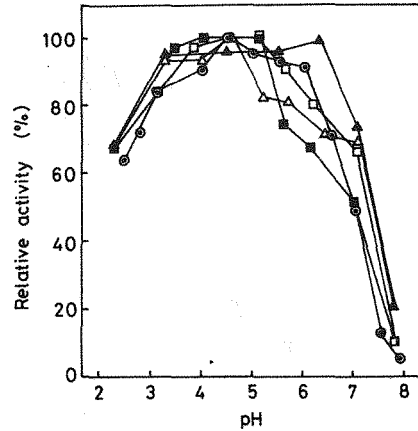


Fig. 56 Effect of pH on α -Galactosidase Activities of Native and Immobilized Enzyme.
 ●, native enzyme; △, BCW 3000;
 ▲, BCW 3000+glutaraldehyde;
 □, BCW 3500; ■, BCW 3500+glutaraldehyde.

影響について検討した。各固定化酵素を 0~2.0M NaCl を含む 0.05M 酢酸緩衝液 (pH5.0, BCW 1000 の場合は pH6.0) 中に 37°C で 15 分間保温した後、固定化酵素をろ別して、脱イオン水で洗浄し、残存活性を測定した。Fig. 54 に示すように、BCW 3500 はグルタルアルデヒド処理の有無にかかわらず、2.0M NaCl を添加しても 90% 以上の活性が保持されていた。一方、BCW 1000 および BCW 3000 の場合には、グルタルアルデヒド処理したビーズでは塩濃度を上げて活性の著しい低下はみられなかったが、グルタルアルデヒド未処理のビーズでは 0.2M NaCl の添加で 20~30% にまで低下した。この場合、洗浄液中に α -ガラクトシダーゼ活性が確認されたことから、このような活性の低下は酵素の担体からの脱離によることが判明した。

また、本固定化酵素を各 pH の緩衝液中に 37°C で 2 時間保温した後、ろ別し、0.2M Na_2HPO_4 -0.1M クエン酸緩衝液 (pH5.0) で洗浄し、残存活性を測定した。その結果、Fig. 55 に示すように、グルタルアルデヒド処理したビーズに固定化した酵素は pH 3 から 9 の範囲で安定であった。グルタルアルデヒド未処理の Chitopearl BCW 3000 に固定化した酵素では pH3.5 以下および pH 6 以上で急激な活性の低下がみられた。グルタルアルデヒド未処理の BCW 3000 に固定化した酵素を各 pH の緩衝液中に放置後、上澄液中の活性を測定したところ、pH3.5 以下および pH 6 以上では上澄液中に α -ガラクトシダーゼ活性が認められ、この pH 領域では担体から酵素が脱離することが判明した。

(5) 固定化酵素の活性に及ぼす諸因子

架橋タイプのキトサンビーズ (粒径 1 mm), Chitopearl BCW 3000 および BCW 3500 に第 2 節第 2 項の方法 1 あるいは方法 2 を用いて固定化した α -ガラクトシダーゼの酵素的諸性質を調べた。

a) pH の影響

Fig. 56 に α -ガラクトシダーゼ活性に及ぼす pH の影響を示した。BCW 3000 および BCW 3500 に固定化された酵素の pH-活性曲線は遊離酵素の pH-活性曲線とほぼ一致しており、pH 3 から 6 の間で高い活性を示した。

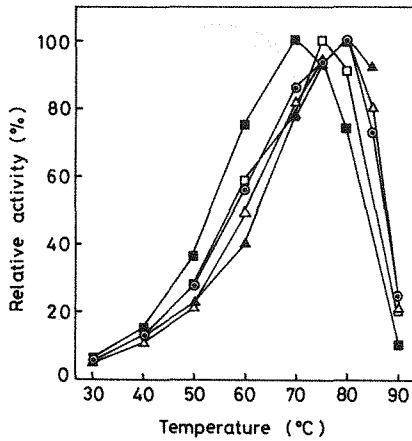


Fig. 57 Temperature Dependence Curves for α -Galactosidase Activities of Native and Immobilized Enzymes.

●, native enzyme; Δ , BCW 3000;
 \blacktriangle , BCW 3000+glutaraldehyde;
 \square , BCW 3500; \blacksquare , BCW 3500+glutaraldehyde.

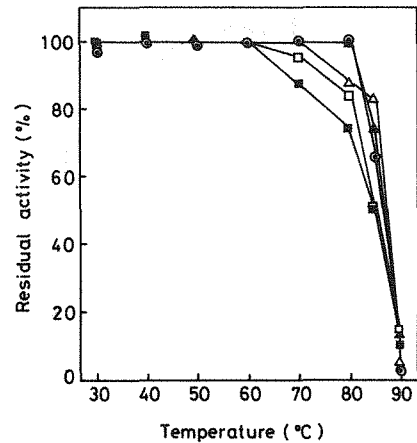
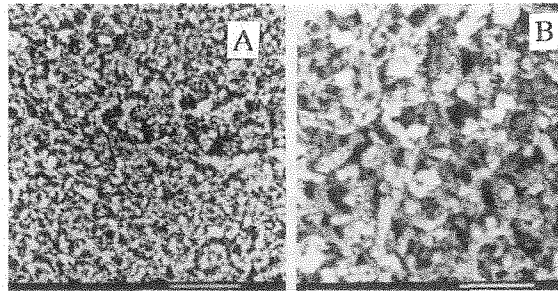


Fig. 58 Effect of Temperature on the Stabilities of Native and Immobilized Enzymes.

●, native enzyme; Δ , BCW 3000;
 \blacktriangle , BCW 3000+glutaraldehyde;
 \square , BCW 3500; \blacksquare , BCW 3500+glutaraldehyde.

BCW 3000



BCW 3500

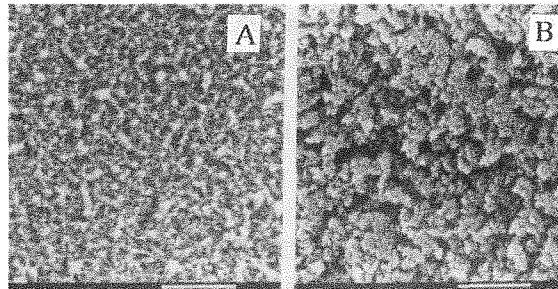


Fig. 59 Scanning Electron Micrographs of the Surface of Chitosan Beads. A, critical-point dried bead; B, lyophilized bead. Scale indicates $10\mu\text{m}$.

b) 温度の影響

固定化酵素の活性に及ぼす温度の影響について調べたところ、グルタルアルデヒド処理および未処理の BCW 3000 に固定化した酵素の最適温度は遊離酵素と同様に 80°C であった (Fig. 57). これに対して、グルタルアルデヒド処理 BCW3500 およびグルタルアルデヒド未処理 BCW

3500に固定化した酵素の最適温度はそれぞれ70°C, 75°Cと若干低くなっていた。Fig. 58に示すように、BCW 3000に固定化した酵素は遊離酵素と同様に80°C付近まで安定であり、BCW 3500では70°C付近まで安定であった。

c) 凍結乾燥の影響

Chitopearlに固定化した酵素は凍結乾燥に対しては不安定であり、90%以上の活性が失われた。Fig. 59にキトサンビーズ表面の走査電子顕微鏡の写真を示した。臨界点乾燥したビーズの表面には約0.1~3 μm の細孔が比較的均一に分布しているのに対して、凍結乾燥標品ではキトサンビーズの網目状の組織が破壊され、細孔が減少していることが判明した。

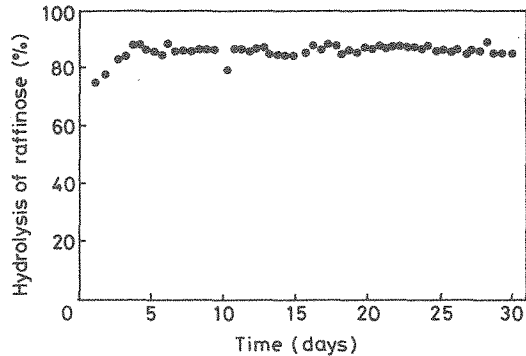


Fig. 60 Hydrolysis of Raffinose in Beet Sugar Molasses in the Column Packed with Immobilized α -Galactosidase.

第3項 固定化 α -ガラクトシダーゼによる糖蜜中のラフィノースの連続分解

固定化酵素の反復使用あるいは連続使用に対する安定性は、固定化酵素の工業的利用において最も重要な課題といえる。現在、甜菜糖製造工程におけるスクロース収率の増加のために用いられている α -ガラクトシダーゼをより有効に利用することを目的として、ここではグルタルアルデヒド処理後の Chitopearl BCW 3000に固定化した α -ガラクトシダーゼを用いて甜菜糖蜜中のラフィノースの連続分解を試みた。その結果、Fig. 60に示すように、糖蜜中のラフィノースの分解率は約85%であり、この分解率は30日間連続使用後も変化しなかった。このことは本固定化 α -ガラクトシダーゼはバイオリクターとして連続使用が可能であることを示唆している。

第4節 考 察

α -ガラクトシダーゼは甜菜糖製造においてラフィノースの分解除去に利用されている。現在、甜菜糖製造工程には微生物菌体が使用されているため酵素や菌体内物質の漏出が問題となり、より安定な固定化酵素の開発が望まれている。

P. cinnabarinus の生産する耐熱性 α -ガラクトシダーゼは酸性タンパク質 (等電点3.4) であることから、DEAE-Sephadex A-50や DEAE-Cellulose DE-23などの陰イオン交換体に容易にイオン結合により固定化されることが予測される。一方、部分的に脱アセチル化された粉末キチンやフレーク状のキチンには多くの酵素が物理的吸着やグルタルアルデヒドを用いた架橋により固定化されている。⁹⁹⁻¹⁰⁵⁾ また、キトサンはポリカチオンとしての性質をもち、弱酸に溶解することからキチンに比べ成形加工しやすく、イオン結合法、架橋法あるいは包括法などの種々の固定化法により多くの酵素や微生物が固定化されている。¹⁰⁶⁻¹¹¹⁾ 本章では、*P. cinnabarinus* の α -ガラクトシダーゼを各種担体に、グルタルアルデヒドを架橋剤として固定化した。本酵素にグルタルアルデヒドおよび担体を同時に添加し、固定化を行うと活性収率が著しく低下するが、これはグルタルアルデヒドにより酵素分子間の架橋形成によるものと推定される。したがって、本実験で示したように、活性収率を向上させるためには担体をグルタルアルデヒドで処理後、過剰のグルタルアルデヒドを除いた後、酵素を固定化する方法が効果的であると考えられ

る。

本酵素はキチン、キトサン、コロイド状キトサン、DEAE-Sephadex A-50、DEAE-Cellulose DE-23によく固定化されたが、活性収率は20~45%と低い。これに対し、コロイド状キチンに固定化した場合、活性収率が最も高く72.1%となる (Table 12)。これは、コロイド状キチンの粒子が非常に微細で表面積が大きいことによると考えられる。一方、最適 pH、pH 安定性、最適温度、熱安定性、NPGal に対する Km 値などコロイド状キチンに固定化した α -ガラクトシダーゼの酵素的特性はすべての点で遊離の酵素と類似しており (Fig. 48-52)、このことは本酵素の触媒部位が固定化によって変化していないことを意味している。

固定化酵素が耐熱性を有することは工業的利用にとってきわめて有意義である。すなわち、反応温度を上げることにより基質の拡散速度を速めることができ、また、雑菌の汚染を防ぐことができる。他起源の α -ガラクトシダーゼ^{112, 113)}においても、固定化により熱安定性が向上することが報告されている。本実験で調製したコロイド状キチン固定化 α -ガラクトシダーゼは、これまでに報告されているいずれの固定化 α -ガラクトシダーゼよりも、熱に対して安定であり、80°Cまで活性の低下はみられない (Fig. 51)。また、本固定化酵素は反復使用に対しても安定であり、20回使用後も最初の活性の約90%が保持されており (Fig. 53)、工業的利用という点で優れた固定化酵素標品であるといえる。

コロイド状キチンに固定化した酵素は高い活性を示したが、カラムに充填して使用することは困難である。これに対して、ビーズ状に成形された多孔性キトサンを用いた場合には、グルタルアルデヒド処理の有無にかかわらず、添加した α -ガラクトシダーゼの99%以上が3種類のキトサンビーズに固定化された (Table 14)。このように、多孔性キトサンビーズは本酵素をよく固定化するという点で優れているが、ここで用いた3種のキトサンビーズはそれぞれ特性が異なり、とくに分子内架橋をもたない Chitopearl BCW1000においては pH 5 以下で溶解するために固定化担体として用いるのには問題がある。一方、固定化酵素の調製に際しては、担体粒子の粒径を考慮すべきである。本実験に供したキトサンビーズはいずれも0.1~3 μm の細孔をもつ多孔質ビーズであり、比表面積が大きいために、0.3~3.0mmの範囲では粒径はさほど問題とならないと考えられ、このことは粒径を変えても活性収率に大きな影響をもたらさないという実験結果によっても裏付けられた。

グルタルアルデヒドで酵素-キトサンビーズ間を架橋した固定化酵素は NaCl を添加しても、担体からの酵素の脱離は認められないが、グルタルアルデヒド処理をしないで固定化した場合には、キトサンビーズの種類によって担体からの酵素の脱離は異なり、BCW 1000や BCW 3000では0.2M NaClの添加で酵素は容易に脱離するのに対して、BCW 3500の場合には脱離しない。BCW 1000は分子内架橋をもたず、また、BCW 3000は脂肪族系化合物によって架橋されたキトサンビーズである。したがって、これら2種のキトサンビーズへの α -ガラクトシダーゼの固定化は主としてイオン結合によるものであり、NaClの添加により酵素タンパク質が脱離するものと考えられる。このような酵素-キトサンビーズ間のイオン結合は BCW 3000に結合した酵素が中性の pH では脱離しないが、酸性やアルカリ pH 領域で脱離するという結果からも支持できる。P. cinnabarinus α -ガラクトシダーゼの等電点は pH 3.4であり (Fig. 9)、キトサンの pKa は6.3である。¹¹⁴⁾したがって、pH3.5以下の酸性領域では α -ガラクトシダーゼおよびキトサンは正に荷電しており、イオン結合を形成しにくい。また、アルカリ pH 領域ではキトサン分子中のアミノ基は電荷を失い、 α -ガラクトシダーゼ分子は負荷電を帯びるようになり、そのために担体から酵素が脱離しやすくなると考えられる。一方、BCW 3500は芳香族系化合物により架橋されたキトサンビーズであり、したがって、これを担体とした場合には、キ

トサン分子のアミノ基を介したイオン結合だけでなく芳香族系の架橋領域と酵素タンパク質分子の疎水性領域との間に疎水性相互作用が形成される可能性がある。中性塩の添加によりイオン結合は弱められるが、疎水性相互作用は影響を受けないと考えれば BCW 3500から α -ガラクトシダーゼが脱離しにくいという現象は無理なく説明できる。

キトサンビーズに固定化した酵素の性質は遊離の酵素と同様に、高い熱安定性を有し、長期間安定である。このように、キトサンビーズは本酵素の固定化用担体として有用であることが証明できたが、ただひとつの難点は、本固定化酵素は湿潤状態では安定であるが、乾燥すると失活するという点である。走査電子顕微鏡による観察結果からも明らかのように、凍結乾燥による活性の低下は細孔表面に固定化されていた酵素が、ゲル組織の破壊によりキトサンビーズ内に閉じ込められることが原因であると考えた。

上で述べたような固定化酵素の特徴を利用して、次に、甜菜糖蜜中のラフィノースの連続分解を試みた。グルタルアルデヒドで Chitopearl BCW 3000に固定化した α -ガラクトシダーゼは30日間連続使用しても活性の低下は認められないという実験結果 (Fig. 60) から明らかのように、本固定化酵素は安定性に優れ、バイオリアクター用固定化酵素として極めて有用であると考えられる。また、本実験条件下では転移反応生成物は認められないが、高濃度のラフィノースに作用させると遊離の酵素の場合と同様に糖転移反応が起こることから、本固定化酵素はオリゴ糖の酵素的合成のためのバイオリアクターとしても使用しうるものと期待される。

第5節 小 括

P. cinnabarinus α -ガラクトシダーゼの工業的利用を目的として本酵素の固定化を試みた。本酵素をグルタルアルデヒドを架橋剤として用いコロイド状キチンに固定化したとき、最も高い活性収率が得られた。本固定化酵素の酵素化学的性質は未修飾酵素と極めて類似しており、固定化後も熱に対する安定性には変化は認められなかった。また、反復使用に対しても安定であり、20回繰り返し使用した後も最初の活性の約90%を保持していた。

次に本酵素の甜菜糖蜜中のラフィノースの連続分解への応用を目的として、キトサンビーズへの固定化を行った。 α -ガラクトシダーゼを Chitopearl BCW 1000, BCW 3000, BCW 3500に直接あるいはグルタルアルデヒドを用いて固定化した。本酵素はグルタルアルデヒド未処理の BCW 1000を除く Chitopearl によく固定化され、活性収率は20~45%であった。BCW 1000および BCW 3000に固定化された酵素では、イオン強度の増加あるいは pH の変化により、担体から酵素の脱離がみられた。Chitopearl に固定化した酵素の酵素化学的性質も未修飾酵素の性質と類似していた。Chitopearl BCW 3000に固定化した α -ガラクトシダーゼをカラムに充填し、pH5.2, 50°Cで甜菜糖蜜中のラフィノースの連続分解を行った結果、30日間活性の低下は認められなかった。

第6章 総 括

α -ガラクトシダーゼは糖鎖構造解析に利用されるばかりでなく、甜菜糖製造における廃糖蜜中のラフィノースの分解や豆乳中のラフィノースおよびスタキオースの分解に利用される有用な酵素である。また、最近では、本酵素の糖転移反応あるいは縮合反応を利用した機能性オリゴ糖の合成が試みられるようになった。本論文は、担子菌 *P. cinnabarinus* の培養上清より耐熱性 α -ガラクトシダーゼを単離し、そのタンパク化学的ならびに酵素化学的性質を明らかにするとともに本酵素による機能性オリゴ糖の酵素的合成、および甜菜糖蜜からショ糖製造へ向け

での利用を目的として行った研究成果をまとめたものである。

本研究においては、まず、本酵素を迅速かつ収率よく精製する方法を確立し、精製酵素を用いて、本酵素のタンパク化学的性質および酵素化学的性質を明らかにした(第2章)。 *P. cinabarinus* の培養上清から、硫酸塩析、熱処理(75°C, 30分間)、およびDEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-150によるカラムクロマトグラフィーを用いて精製し、電気泳動のおよび超遠心的に均一な α -ガラクトシダーゼ標品を得た。本酵素の分子量はゲル濾過法により約210,000, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により約52,000と推定され、本酵素は同一サブユニットから構成される4量体であると考えられた。本酵素の等電点は3.4で、約14%の糖を含む糖タンパク質であり、濃縮酵素液に固体硫酸を添加することにより、菱形板状の結晶を得ることができた。

本酵素活性の最適pHは5.0、最適温度は75°Cであった。本酵素は熱に対して極めて安定であり、pH5.0, 75°C, 15分間の熱処理でも活性の低下は認められず、また、その熱安定性はpHに依存していた。本酵素は広い基質特異性を有し、NPGalとともにメリビオース、ラフィノース、スタキオースなどのオリゴ糖のみならずローカストビーンガムやグアガムのようなガラクトマンナンをも分解することが明かとなった。

本酵素は好熱菌の耐熱性酵素について示されているように、熱に対して安定であるばかりでなく各種の変性剤およびプロテアーゼに対し抵抗性を示した。また、本酵素は *Flavobacterium* sp. 由来のエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼにより結合糖鎖の約50%除去すると、酸性pH領域における安定性および凍結融解に対する安定性が低下することから、結合糖鎖が本酵素の安定性に関与していることを示唆した。

第3章では本酵素の糖転移反応を明らかにするため、本酵素を高濃度のラフィノースと反応させて得られるオリゴ糖を単離し、それらの構造を酸分解、酵素分解およびメチル化分析により決定した。糖転移反応生成物は活性炭クロマトグラフィー、Bio-Gel P-2によるゲルろ過、および調製用ペーパークロマトグラフィー、HPLCを用いて分離調製した。単離した6種類の糖転移生成物(オリゴ糖A, B, C, D, EおよびF)は、それぞれ *O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)-*O*- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド、*O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)-*O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-*O*- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド、スタキオース、*O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-3)-*O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-*O*- α -D-ガラクトピラノシル-(1-6)-*O*- α -D-グルコピラノシル-(1-2)- β -D-フルクトフラノシド、ベルバスコース、アジュゴースと同定した。これらの生成物の中でオリゴ糖Bおよびオリゴ糖Dは文献未記載の新規なオリゴ糖であった。このように、ラフィノースを基質にしたときの糖転移反応では、本酵素は非還元末端のガラクトース残基のC-6位およびC-3位の水酸基にガラクトースを転移させることが明かとなった。

また、本酵素は広い受容体特異性を示し、アラビノース、グルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、グルコサミン、*N*-アセチルグルコサミン、ラクトース、スクロース、およびマルトースが糖転移反応の受容体となることが判明した。さらに、糖転移反応の最適条件についても検討し、pH7.0, 温度40°Cで反応を行ったとき転移生成物の生成量は最大となることを明かにした。

第4章では本酵素の触媒する縮合反応を用いて α -ガラクトオリゴ糖の合成を行った。 α -ガラクトシダーゼを10%(w/v)ガラクトースおよび60%(w/v)スクロースに作用させたところ3種類の三糖が生成した。各オリゴ糖は活性炭カラムクロマトグラフィーおよびBio-Gel P-2によるゲルろ過を用いて単離した。3種のオリゴ糖は酸分解、酵素分解およびメチル化分析によ

り 3^G- α -ガラクトシルスクロース、ラフィノース、およびプランテオースと同定した。3^G- α -ガラクトシルスクロースの生成量は他のオリゴ糖の生成量に比べきわめて少なく、本縮合反応では α -1,6ガラクトシド結合の形成が主反応であることが明かとなった。さらに、縮合反応による上記三糖の合成条件について検討し、10% (w/v) ガラクトース、60% (w/V) スクロースおよび α -ガラクトシダーゼ (40 酵素単位/ml) からなる反応液を pH5.0、60°C で 48 時間反応させたとき、縮合生成物の収率は 15% (対ガラクトース) となることが明かとなった。

第 5 章では甜菜糖蜜中のラフィノースの分解への応用を目的として α -ガラクトシダーゼの固定化について検討した。種々の担体に本酵素の固定化を試みたところ、部分的に脱アセチル化したコロイド状キチンに固定化したとき最も高い活性収率が得られた。コロイド状キチンに固定化した酵素の酵素化学的性質は未修飾酵素ときわめて似ており、本酵素の諸性質はコロイド状キチンへの固定化後も保持されていることが明かとなった。また、20 回反復使用した後も最初の活性の約 90% を保持していた。しかし、コロイド状キチンに固定化した酵素はカラムに充填して使用することは困難であったため、ビーズ状の多孔性キトサンを固定化用担体として用いて検討した。その結果、 α -ガラクトシダーゼを Chitopearl BCW 1000, BCW 3000, BCW 3500 に直接あるいはグルタルアルデヒドを用いて固定化した場合、活性収率は 20~45% であることが判明した。また、BCW 1000 および BCW 3000 に直接固定化した酵素は高イオン強度あるいは pH の変化で、担体から脱離することを見出し、このことより、本酵素のグルタルアルデヒド処理していないキトサンビーズへの結合はイオン結合によるものと考えた。一方、グルタルアルデヒドによる架橋反応を利用してキトサンビーズに固定化した α -ガラクトシダーゼの酵素化学的性質は未修飾酵素と類似しており、酵素-担体間の架橋形成は酵素活性部位に大きな影響を与えないことが示唆された。粒径 1 mm の Chitopearl BCW 3000 に固定化した α -ガラクトシダーゼをカラムに充填し、pH5.2、50°C で甜菜糖蜜中のラフィノースの連続分解を行った結果、30 日間活性の低下は認められず、本固定化 α -ガラクトシダーゼがバイオリアクターとして連続使用が可能であることが示唆された。

以上述べたように、担子菌 *P. cinnabarinus* が産生する耐熱性 α -ガラクトシダーゼは加水分解反応のみでなく、糖転移反応や糖残基間の縮合反応も効率よく触媒する能力を有しており、今後、機能的食品としてのオリゴ糖の創製や甜菜糖製造において広く活用されるものと期待される。

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました九州大学農学部 山崎信行教授に深い感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました佐賀大学農学部 大宝明教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の著述に際し、有益な御助言を賜った九州大学農学部 箆島 豊教授ならびに麻生陽一助教授に深謝の意を表します。

本研究中、終始有益なる御助言、御激励を賜りました佐賀大学農学部 内田泰教授ならびに中川浩毅教授に深甚なる謝意を表します。

本研究において、超遠心分析をしていただきました広島大学工学部 岡智教授に深く感謝の意を表します。

また、本研究中、エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼを御恵与下さるとともに、有益

な御助言を賜りました京都大学農学部 山本憲二助教授に深甚なる謝意を表します。

さらに、本研究に御協力いただきました佐賀大学農学部食品製造学教室の卒業生諸氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) P. M. Dey and J. B. Pridham, *Advan. in Enzymology*, Vol. 36, Academic Press Inc., p.91 (1972).
- 2) R. L. Coleman, *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 192 (1968).
- 3) K. J. Dean and C. C. Sweely, *J. Biol. Chem.*, **254**, 9994 (1979).
- 4) K. J. Dean and C. C. Sweely, *J. Biol. Chem.*, **254**, 10001 (1979).
- 5) D. F. Bishop and R. J. Desnick, *J. Biol. Chem.*, **256**, 1307 (1981).
- 6) K. M. L. Agrawal and O. P. Bahl, *J. Biol. Chem.*, **243**, 103 (1968).
- 7) F. Petek, E. Villarroya and J. E. Courtois, *Eur. J. Biochem.*, **8**, 395 (1969).
- 8) P. M. Dey and J. B. Pridham, *Biochem. J.*, **113**, 49 (1969).
- 9) Y. T. Li and S. C. Li, *Methods in Enzymology*, Vol. 28, Academic Press Inc., New York, p. 714 (1972).
- 10) J. Williams, E. Villarroya and F. Petek, *Biochem. J.*, **161**, 509 (1977).
- 11) T. Itoh, S. Shimura and S. Adachi, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1499 (1979).
- 12) Y. Ueno, T. Ikami, R. Yamauchi and K. Kato, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2623 (1980).
- 13) I. Chinen, T. Nakamura and N. Fukuda, *J. Biochem.*, **90**, 1453 (1981).
- 14) P. M. Dey, E. M. Del Campillo and R. P. Lezica, *J. Biol. Chem.*, **258**, 923 (1983).
- 15) T. Itoh, Y. Uda and H. Nakagawa, *J. Biochem.*, **99**, 243 (1986).
- 16) Y. T. Li, S. C. Li and M. R. Shetlar, *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**, 436 (1963).
- 17) T. Akiba and K. Horikoshi, *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1851 (1976).
- 18) D. M. Pederson and R. E. Goodman, *Can. J. Microbiol.*, **26**, 978 (1980).
- 19) S. Kawamura, T. Kasai and S. Tanusi, *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 641 (1976).
- 20) Y. Nagao, T. Nakada, M. Imoto, T. Shimamoto, S. Sakai, M. Tsuda and T. Tsuchiya, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **151**, 236 (1988).
- 21) F. Gherardini, M. Babcock and A. A. Salyers, *J. Bacteriol.*, **161**, 500 (1985).
- 22) H. Suzuki, Y. Ozawa and O. Tanabe, *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 1039 (1966).
- 23) K. Oishi and K. Aida, *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 578 (1972).
- 24) K. Oishi and K. Aida, *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 2129 (1975).
- 25) P. S. Lazo, A. G. Ochoa and S. Gascon, *Eur. J. Biochem.*, **77**, 375 (1977).
- 26) Y. T. Li and M. R. Shetlar, *Arch. Biochem. Biophys.*, **108**, 523 (1964).
- 27) O. P. Bahl and K. M. L. Agrawal, *J. Biol. Chem.*, **244**, 2970 (1969).
- 28) S. Adya and A. D. Elbein, *J. Bacteriol.*, **129**, 850 (1977).
- 29) H. Suzuki, S. C. Li and Y. T. Li, *J. Biol. Chem.*, **245**, 781 (1970).
- 30) A. Kaji and O. Yosida, *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 1335 (1972).
- 31) H. C. Wong, C. A. Hu, H. L. Yeh, W. Su, H. C. Lu and C. F. Lin, *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 1147 (1986).
- 32) O. M. Zaprometova and I. V. Ulezlo, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **10**, 232 (1988).
- 33) H. Suzuki, Y. Ozawa, H. Oota and H. Yoshida, *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 501 (1969).
- 34) H. Kobayashi and H. Suzuki, *J. Ferment. Technol.*, **50**, 625 (1972).
- 35) H. Kobayashi and H. Suzuki, *J. Ferment. Technol.*, **50**, 835 (1972).
- 36) J. Obara, S. Hashimoto and H. Suzuki, *Sugar Technol. Rev.*, **4**, 209 (1977).
- 37) P. M. Dey, *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*, Academic Press Inc., London, p.53 (1984).
- 38) T. M. Kuo, J. F. Van Middlesworth and W. J. Wolf, *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 32 (1988).
- 39) J. J. Rackis, D. J. Sessa, F. R. Steggerda, T. Shimizu, J. Anderson and S. L. Pearl, *J. Food Sci.*, **35**,

- 634 (1970).
- 40) E. Cristofaro, F. Mottu and J. J. Wuhrmann, *Sugars in Nutrition*, Academic Press Inc., New York, p. 313 (1974).
 - 41) H. Sugimoto and J. P. Van Buren, *J. Food Sci.*, **35**, 655 (1970).
 - 42) D. Thananunkul, M. Tanaka, C. O. Chichester and T. C. Lee, *J. Food Sci.*, **41**, 173 (1976).
 - 43) K. L. Smiley, D. E. Hensley, H. J. Gasdorf, *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 615 (1976).
 - 44) R. Cruz, J. C. Batistela and G. Wosiacki, *J. Food Sci.*, **46**, 1196 (1981).
 - 45) R. Cruz and Y. K. Park, *J. Food Sci.*, **47**, 1973 (1982).
 - 46) K. Yazawa, K. Imai and Z. Tamura, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3306 (1978).
 - 47) 矢沢幸平, 南 善広, 田村善蔵, 腸内フローラと食物因子, 学会出版センター, 東京, p.15 (1984).
 - 48) 正井輝久, 和田光一, 早川邦彦, 吉原一郎, 光岡知足, 日本細菌学会誌, **42**, 313 (1987).
 - 49) 正井輝久, ニューフードインダストリー, **32**(5), 5 (1990).
 - 50) 正井輝久, ジャパンフードサイエンス, **29**, 23 (1990).
 - 51) 北畑寿美雄, フードケミカル, **6**, 70 (1988).
 - 52) 鯉坂勝美, 藤本 浩, 澱粉科学, **36**, 113 (1989).
 - 53) M. Somogyi, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19 (1952).
 - 54) E. F. Hartree, *Anal. Biochem.*, **48**, 422 (1972).
 - 55) B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
 - 56) R. M. Zacharius, T. E. Zell, T. H. Morrison and J. J. Woodlock, *Anal. Biochem.*, **30**, 148 (1969).
 - 57) K. Webber and M. Osborn, *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969).
 - 58) P. Andrews, *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964).
 - 59) O. Vesterberg, *Method in Enzymology*, Vol. 22, Academic Press Inc., New York, p.389 (1971).
 - 60) 日本生化学会編, 生化学実験講座 1 タンパク質の化学II, 東京化学同人, 東京, p.5 (1976).
 - 61) H. Edelho, *Biochemistry*, **7**, 1948 (1967).
 - 62) M. Dubois, R. Gills, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith, *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1959).
 - 63) 大島泰郎, 好熱性細菌, 東京大学出版会, 東京, p.50 (1978).
 - 64) A. Ohtakara, M. Mitsutomi and Y. Uchida, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1319 (1984).
 - 65) P. S. Lazo, A. G. Ochoa and S. Gascon, *Arch. Biochem. Biophys.*, **191**, 316 (1978).
 - 66) K. Yamamoto, K. Takegawa, J. Fan, H. Kumagai and T. Tochikura, *J. Ferment. Technol.*, **64**, 397 (1986).
 - 67) K. Yamamoto, K. Takegawa, H. Kumagai and T. Tochikura, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2167 (1986).
 - 68) K. Yamamoto, K. Takegawa, H. Kumagai and T. Tochikura, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1481 (1987).
 - 69) K. Takegawa, M. Inami, K. Yamamoto, H. Kumagai, T. Tochikura, B. Mikami and Y. Morita, *Biochim. Biophys. Acta*, **955**, 187 (1988).
 - 70) K. Yamamoto, S. Kadowaki, K. Takegawa, H. Kumagai and T. Tochikura, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 421 (1986).
 - 71) 山本憲二, 梶倉辰六郎, 農化, **64**, 1475 (1990).
 - 72) 吉積智司, 伊藤 汎, 国分哲郎, 甘味の系譜とその科学, 光琳, 東京, p.276 (1986).
 - 73) W. E. Trevelyan, D. P. Procter and J. S. Harrison, *Nature*, **166**, 444 (1950).
 - 74) C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita and W. W. Wells, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2497 (1963).
 - 75) S. Hakomori, *J. Biochem.*, **55**, 205 (1964).
 - 76) B. Lindberg, *Methods in Enzymology*, Vol. 28, Academic Press Inc., New York, p. 182 (1972).
 - 77) M. Hisamatsu, J. Abe, A. Amemura and T. Harada, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1049 (1980).
 - 78) S. Kitahata, H. Ishikawa, T. Miyata and O. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2929 (1989).
 - 79) R. W. Bailey, *Biochem. J.*, **86**, 509 (1963).
 - 80) Y. T. Li and M. R. Shetlar, *Arch. Biochem. Biophys.*, **108**, 301 (1964).
 - 81) P. M. Dey, *Phytochemistry*, **18**, 35 (1979).
 - 82) F. Petek and J. E. Courtois, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **46**, 1093 (1964).
 - 83) K. T. Kato, T. Ikami, H. Kono, R. Yamauchi and Y. Ueno, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1089 (1982).

- 84) A. M. MacLeod and H. McCorquodale, *Nature*, **182**, 815 (1958).
- 85) M. J. Clancy and W. J. Whelan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **118**, 724 (1967).
- 86) K. Ajisaka, H. Fujimoto and H. Nishida, *Carbohydr. Res.*, **185**, 139 (1989).
- 87) 日本生化学会編, 生化学データブック [I], 東京化学同人, 東京, p.472 (1979).
- 88) R. Somme and A. Wickstrom, *Acta Chem. Scand.*, **19**, 537 (1965).
- 89) E. Johansson, E. Hedbys and P-O. Larsson, *Biotechnol. Lett.*, **8**, 421 (1986).
- 90) K. Ajisaka, H. Nishida and H. Fujimoto, *Biotechnol. Lett.*, **9**, 243 (1987).
- 91) K. Ajisaka, H. Nishida and H. Fujimoto, *Biotechnol. Lett.*, **9**, 387 (1987).
- 92) J. C. Linden, *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 130 (1982).
- 93) J. H. Reynolds, *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 135 (1974).
- 94) R. H. Hackman, *Austral. J. Biol. Sci.*, **7**, 168 (1954).
- 95) キチン・キトサン研究会編, キチン・キトサン実験マニュアル, 技報堂出版, 東京, p.1 (1991).
- 96) C. Jeuniaux, *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, **66**, 408 (1985).
- 97) J. S. Price and R. Storck, *J. Bacteriol.*, **124**, 1574 (1975).
- 98) 谷邊博昭, 倉橋五男, 川村佳秀, 公開特許公報, 昭61-76504 (1986).
- 99) R. A. A. Muzzarelli, *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 177 (1980).
- 100) W. L. Stanley, G. G. Watters, B. G. Chan and J. M. Mercer, *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 315 (1975).
- 101) W. L. Stanley, G. G. Watters, S. H. Kelly, B. G. Chan, J. A. Garibaldi and J. E. Shade, *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 439 (1976).
- 102) J. W. Finley, W. L. Stanley and G. G. Watters, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1895 (1977).
- 103) W. L. Stanley, G. G. Watters, S. H. Kelly and A. C. Olson, *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 135 (1978).
- 104) W. H. Liu, S. D. Wang and Y. C. Su, *Proc. Natl. Sci. Council*, **2**, 275 (1978).
- 105) L. Iyengar and A. V. S. P. Rao, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1333 (1979).
- 106) F. Bissett and D. Sternberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 750 (1978).
- 107) J. D. Desai, R. Ray and A. Desai, *J. Ferment. Technol.*, **64**, 255 (1986).
- 108) T. Kasumi, M. Tsuji, K. Hayashi and N. Tsumura, *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1865 (1977).
- 109) K. Uzura, J. Owaki, Z. Minami and k. Kusai, *J. Ferment. Technol.*, **64**, 199 (1986).
- 110) S. Hirano and O. Miura, *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 711 (1979).
- 111) R. Yamaguchi, Y. Arai, T. Kaneko and T. Itoh, *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1081 (1982).
- 112) A. W. Schram, M. N. Hamers, N. Oldenbroek-Haverkamp, A. Strijland, A. de Jonge, F. A. J. T. H. M. Van den Bergh and J. M. Tager, *Biochim. Biophys. Acta*, **527**, 456 (1978).
- 113) D. Shepard, M. Donovan, E. Raghupathy, K.-K. Yeung, A. J. Owen and J. A. Dain, *Carbohydr. Res.*, **118**, 239 (1983).
- 114) R. A. A. Muzzarelli, *Chitin*. Pergamon Press, Oxford, p. 103 (1977).