

Aspergillus niger の生産する細胞外
エキソ型イヌリナーゼ (P-I) の性質について

中村豊彦*・浦川智博*・水光正仁**・太田一良*

Properties of Extracellular Exoinulinase (P-I) from *Aspergillus niger*

Toyohiko NAKAMURA*, Tomohiro URAKAWA**,
Masahito SUIKO**, and Kazuyoshi OHTA*

(平成8年9月11日 受理)

In our previous study, inulinase P-II, one of the two inulinases P-I and P-II, which are known to be produced by 12 strains of *Aspergillus niger* was purified to an electrophoretically single peak and its characterization was done. In the present study, we attempted to purify inulinase P-I from *Aspergillus niger* by ion-exchange chromatography in DEAE-Cellulose column and gel filtration in Sephadex column. The catalytic properties of this electrophoretically homogeneous enzyme were compared with those of inulinase P-II described in the previous report.

The molecular weight of P-I was estimated to be 72,000 and 70,000 by Sephadex G-200 gel chromatography and SDS-PAGE, respectively, suggesting that P-I is a monomer enzyme. The optimum pH was 4.0 for P-I and 5.0 for P-II and the optimum temperature was nearly 50°C for both enzymes. Either of the two was stable within the range of pH 4.0-7.0 and the activity was not affected by heat treatment at 50°C. Further, both enzymes exhibited specific activities to inulin, sucrose and raffinose, but not to levan and melezitose. The values of Km for inulin and sucrose were 0.40 and 7.14 mM for P-I, and 1.87 and 12.50 mM for P-II.

Next, the effects of metal ions and inhibitors on the activities of P-I and P-II were investigated. Mn²⁺ ion activated the both enzymes and Ag⁺ and Hg²⁺ ions showed nearly complete inhibition of them. In addition, Fe³⁺ and PCMB had strong inhibitory effects on the both enzymes and only P-I was slightly resistant to the inhibition of EDTA.

Key words: Inulinase, *Aspergillus niger*, Exo-inulinase, Inulin

* 応用生物化学講座

**生物資源利用化学講座

緒 言

近年、ショ糖の過剰摂取が肥満、動脈硬化症および糖尿病疾患の原因となりうる事が明らかにされ¹⁾、ショ糖に代わる健康志向の新甘味材として、フラクトース(果糖)およびフラクトオリゴ糖の研究開発が活発に行われるようになった。フラクトオリゴ糖は、ヒトの消化酵素では分解され難く、腸内の有用菌とされているビフィズス菌によって選択的に利用され、その結果として、腸内菌叢の改善、脂質改善、便秘改善等の作用があることが見出された²⁾。一方、フラクトースは天然の糖の中で最も甘味が強く、甘味度はショ糖の1.3~1.7倍で、温度が低くなるほど甘味度は強くなる。一般食品向け甘味として利用されなかった最大の理由は、フラクトース単体では存在せず、常に他の糖分と混在するか、または重合体の形で存在しているからである。

筆者らは、フラクトースおよびフラクトオリゴ糖の給源である多糖類イヌリンの有効利用を目的として、イヌリン分解酵素イヌリナーゼの研究に着手した。

イヌリナーゼ(2, 1-β-D-fructan fructanohydrolase [EC 3. 2. 1. 7])は、作用機作からexo型およびendo型酵素の2つに分類される。Exo型酵素はイヌリン分子の非還元フラクトース末端からフラクトース単位に作用し、フラクトースを生成する。一方、endo型酵素はイヌリン分子の内部にendowiseに作用して、主に重合度3~6のフラクトオリゴ糖を生成する。このendo型酵素³⁾は、ショ糖には作用しない新しい型の酵素で、イヌリナーゼとして初めて、結晶化に成功した。

Exo型イヌリナーゼについては、これまで多く報告されているが、ほとんど粗酵素に基づく成果であるため、イヌリナーゼの諸性質および作用機構に関する詳細な知見に乏しく、将来の研究に負うところが大きい。

筆者らは、かかる観点から高イヌリン分解活性菌株、*Aspergillus niger*12株の生産する2種類の細胞外イヌリナーゼ(P-IおよびP-II)のうち、DEAE-Cellulose等を用いて、電気泳動的に単一な成分としてP-I酵素を精製した。本酵素の諸性質について、先に報告しているP-II酵素⁴⁾と比較検討した。その結果、興味ある知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 使用菌株ならびに粗酵素の調製

前報³⁾で報告したイヌリナーゼ生産菌*Asp.niger*12株を使用した。使用した培地は、イヌリナーゼ生産培地として最適と思われるイヌリン3%、コーン・スチープ・リカー2%、リン酸二水素アンモニウム1.2%、塩化カリウム0.07%、硫酸マグネシウム0.05%、硫酸第一鉄0.001%、pH4.5の組成のものを500ml三角フラスコに分注し、*Asp.niger*12株の胞子を1白金耳接種し、30℃、140rpmで5日間回転振とう培養した。得られた培養濾液をポリエチレングリコール(6,000)により、濃縮した。濃縮液は蒸留水に対して48時間透析後、さらにメンブランフィルターPM30(Amicon社製)を用いて濃縮を行った。次に濃縮液に、硫酸アンモニウムを0.7飽和になるまで徐々に加えて溶解し、一昼夜塩析後、沈殿を集め、少量の蒸留水に溶解後、蒸留水に対して透析を行った。得られた透析液をコロジオンバッグ(Sartorius社製)で濃縮して真空凍乾し粗酵素とした。

2. 酵素活性の測定

a) イヌリン分解力は0.05M酢酸塩緩衝液(pH5.0)に溶解した0.5%イヌリン溶液0.5mlに、同緩衝液で希釈した酵素液0.5mlを加え、40℃、30分間反応を行い、生成する還元糖を3,5-ジニトロサリチル酸法⁵⁾により比色定量した。酵素単位は、酵素液1mlあたり1分間に1μmolの還元糖(フラクトース)を生成する酵素量で表した。

b) ショ糖分解力は0.05M酢酸塩緩衝液(pH5.0)に溶解した0.5%ショ糖溶液0.5mlに、同緩衝液で希釈した酵素液0.5mlを加え、40℃、30分間反応を行い、イヌリンの場合と同じ方法で測定した。酵素単位は、酵素液1mlあたり1分間に2μmolの還元糖(フラクトースとグルコース)を生成する酵素量で表した。

3. 蛋白質濃度の測定および比活性

牛血清アルブミン(和光純薬株)を標準として、Lowry法⁶⁾により比色定量した。クロマトグラフィーの際の蛋白質量は、280nmの吸光度で測定した。比活性は、蛋白質mg当たりの酵素単位で示した。

4. 糖のペーパークロマトグラフィー

東洋濾紙No.50を使用し、室温で上昇法により三重展

開を行った。展開剤はn-ブタノール：ピリジン：蒸留水 (6:4:3, v/v/v) の組成の溶媒を用い、5%尿素0.4Nメタリン酸試薬を用いてスポットを検出した。イヌロオリゴ糖の調製は前報⁷⁾に準じた。

5. グルコースの定量

グルコースの測定は、ベーリンガー・マンハイム社の新ブラッド・シュガー・テストTC-PM-II (グルコースオキシダーゼ：ペルオキシダーゼ法) を用いて420 nmで測定した。

6. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

電気泳動は、Laemmliの方法⁸⁾に準じた。分離用ゲル濃度は8%とし、Tris-glycine緩衝液 (pH8.3) 系を用いた。泳動は、プロムフェノールブルー (BPB) をマーカーとして、20mA, 4℃で1時間行った。分子量測定用の標準蛋白質には、シグマ社製の分子量マーカー、 β -ガラクトシダーゼ (分子量, 116,400), フラクトース-6-リン酸キナーゼ (85,200), グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (55,000) および、アルドラーゼ (39,200) を使用した。

7. ゲル濾過法による分子量の測定

Andrewsの方法⁹⁾により測定した。試料および標準蛋白質各2mgを、0.5mlの0.02M酢酸塩緩衝液 (pH5.0) に溶解し、同緩衝液で緩衝化したSephadex G-200カラム (1.5×41.5cm) に注入し、2ml/hrの流速で溶出し、2mlずつ採取し、そのelution volume (Ve) を求めた。蛋白質としては、ベーリンガー・マンハイム社製の γ -グロブリン (分子量, 160,000), 牛血清アルブミン (69,000), キモトリプシノーゲンA (25,000) および、馬チトクロームC (12,400) を使用した。また、ブルーデキストランを用いて求めたvoid volume (Vo) は23mlであった。

実験結果及び考察

1. 細胞外イヌリナーゼP-Iの精製

粗酵素 (蛋白質量3.59g, 酵素活性118,100U) を、0.02M酢酸塩緩衝液 (pH 6.0) 50mlに溶解させ、直ちに2℃, 10,000×gで20分間遠心分離し、得られた上澄液を同上緩衝液に対して透析後、同緩衝液で平衡化したDEAE-Celluloseカラム (2×60cm) に吸着させた。溶出は同緩衝液中にNaClが0.1M, 0.2Mならび

に0.3Mを含む液でstepwiseに溶出を行った。その溶出曲線をFig. 1に示した。この図から明らかなように3種類のイヌリナーゼ, P-I, P-II, およびP-IIIを分離した。今回は、P-I画分の酵素を集めて、メンブランフィルターPM30, およびコロジオンバッグを用いて濃縮後、P-I画分の酵素について、精製を試みた。上記P-I画分の酵素液を0.02M酢酸塩緩衝液 (pH 6.0) で透析後、同緩衝液で平衡化したDEAE-Celluloseカラム (2×45cm) に吸着させ、同緩衝液中のNaCl濃度を0~0.5Mまで直線的に上昇させてgradient elutionを行った。その結果をFig. 2に示した。tube No106~126までを集めて、メンブランフィルターPM30, およびコロジオンバッグを用いて3mlまで濃縮し、同緩衝液で平衡化しておいたSephadex G-100カラム (1.5×43cm) によるゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行った。その結果を、Fig. 3に示した。図から明らかなように、蛋白質と酵素活性のピークがかなり一致している。次に、tube No11~17までを集めて常法により約1mlまで濃縮し、0.02M酢酸塩緩衝液 (pH 5.0) で平衡化しておいたSephadex G-200カラム (1.5×56cm) ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行った。その溶出曲線をFig. 4に示した。この図から明らかなように、蛋白質と酵素活性のピークが一致し、酵素が高度に精製されたことを示している。以上の各精製過程における酵素標品の比活性および収率をTable. 1に示した。DEAE-Cellulose 分画に対し、比活性は5.4倍に増大した。最終酵素標品についての、その均一性を検討するために、SDSポリアクリルアミド電気泳動を行った。Fig. 5に示したとおり、本酵素にサブバンドは認められず、電気泳動的に単一成分であると判断された。

2. 分子量

Sephadex G-200ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより、本酵素の分子量を求めた結果、Fig. 6に示すように、72,000と推定された。また、SDS-PAGEの結果 (Fig. 5) から推定される分子量は70,000であることから、本酵素はモノマーであると考えられる。

3. 吸収スペクトル

本酵素の吸収スペクトルを測定したところ、280nmに最大吸収、250nmに最小吸収があり、293nmに吸収の肩を認めた。可視吸収には、補酵素などに起因する吸収は認められなかった。

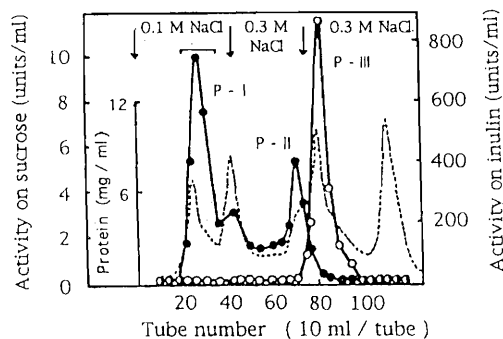


Fig. 1. Stepwise elution pattern of extracellular inulinase from *Aspergillus niger* 12 on DEAE-Cellulose. A column of DEAE-Cellulose (2×60cm) was equilibrated with 0.02 M acetate buffer (pH6.0). The column was eluted by stepwise elution with 0.02 M acetate buffer (pH6.0) containing 0.1 M, 0.2 M and 0.3 M NaCl. -----, protein; —○—, activity on inulin; —●—, activity on sucrose.

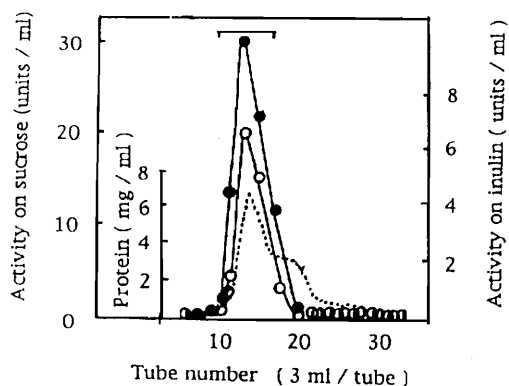


Fig. 3. Gel filtration of the Peak-I on Sephadex G-100. A column of Sephadex G-100 (1.5×43cm) was equilibrated with 0.02 M acetate buffer (pH5.0). Elution was performed with the same buffer at a flow rate of 7 ml/hr. Fractions 11 to 17 were combined. -----, protein; —○—, activity on inulin; —●—, activity on sucrose.

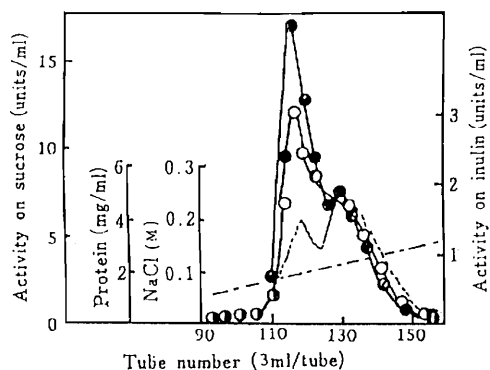


Fig. 2. Gradient elution pattern of the Peak-I on DEAE-Cellulose. column size:2×45cm, flow rate:15ml/hr. DEAE-Cellulose was equilibrated with 0.02 M acetate buffer (pH6.0). The column was eluted with a linear gradient of 0 to 0.5 M NaCl with constant 0.02 M acetate buffer (pH6.0). Fractions: 106 to 126 were combined. -----, protein; —○—, activity on inulin; —●—, activity on sucrose. -----, NaCl.

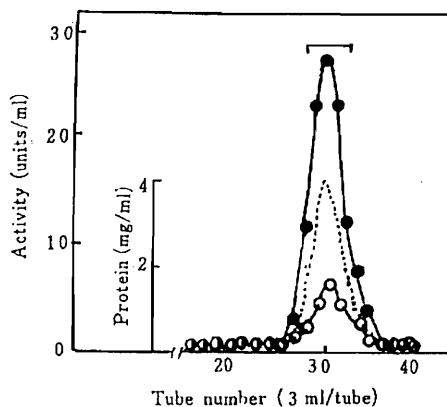


Fig. 4. Gel filtration of the Peak-I on Sephadex G-200. A column of Sephadex G-200 (1.5×56cm) was equilibrated with 0.02 M acetate buffer (pH5.0). Elution was performed with the same buffer at a flow rate of 5 ml/hr. Fractions 27 to 34 were combined. -----, protein; —○—, activity on inulin; —●—, activity on sucrose.

Table 1. Summary of purification procedures of extracellular inulinase P-I from *Asp. niger* 12

Fraction	Total protein (mg)	Total units with inulin(I)	Units/mg protein with inulin(I)	Units/mg protein with sucrose(S)	I/S ^{a)}	Yield (%)
Culture filtrate	24,650	147,500	6.00	0.19	31.6	100
Concentrate	12,740	137,700	10.80	0.31	34.8	93.4
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0-0.7S)	3,590	118,100	33.00	1.00	33.0	80.1
DEAE-Cellulose (stepwise)	735	230	0.31	1.78	0.17	0.16
DEAE-Cellulose (gradient)	182	113	0.62	3.14	0.20	0.08
Sephadex G-100	132	97	0.74	3.62	0.20	0.07
Sephadex G-200	52	87	1.68	7.30	0.23	0.06

Reaction mixture: 0.5 ml of enzyme solution and 0.5 ml of 0.5% substrate solution (inulin or sucrose in 0.05 M acetate buffer, pH 5.0). Inulin-hydrolyzing activity unit was expressed with 1 μ mole of fructose liberated/min at 40°C and pH 5.0; substrate conc., 0.25%. Sucrose-hydrolyzing activity unit was expressed with 2 μ mole of fructose or glucose liberated/min at 40°C and pH 5.0; substrate conc., 0.25%.

^{a)}I/S expresses the ratios of hydrolysis rates with inulin and sucrose as substrate, respectively.

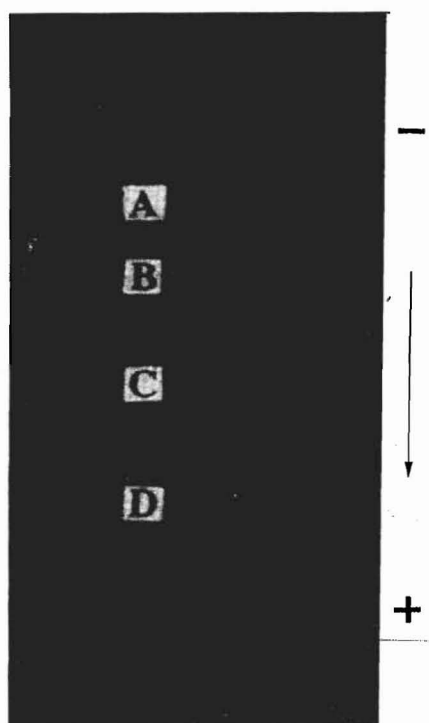


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of extracellular inulinase P-I from *Asp. niger* 12. A, β -galactosidase (M.W. = 116,400); B, fructose-6-phosphate kinase (85,200); C, glutamate dehydrogenase (55,000); D, aldolase (39,200).

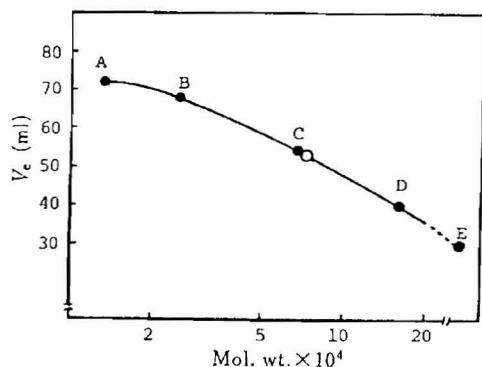


Fig. 6. Estimation of molecular weight of extracellular inulinase P-I by Sephadex G-200 column chromatography. A, cytochrome c (M.W. = 12,400); B, chymotrypsinogen A (25,000); C, bovine albumin (67,000); D, γ -globulin (160,000); E, blue dextran. See "Methods" for the experimental details.

4. 酵素の一般的性質

a) 至適pH

0.05Mの各種pHの緩衝液を含む0.5%イヌリン溶液0.5mlに、酵素液(蛋白質量 $27.7\mu\text{g}/\text{ml}$)0.5mlを加え、 40°C 、30分間作用させて、酵素活性を測定した結果をFig. 7に示した。本酵素の至適pHは4.0付近を示すこ

とがわかった。これまで報告されている至適pHは *Asp. niger*で4.3~4.4¹⁰⁾、*Asp. ficuum*で4.7¹¹⁾、酵母 *Saccharomyces fragilis*で5.1¹²⁾、*Candida Kefyr*で4.5¹³⁾、細菌 *Arthrobacter ureafaciens*で6.0¹⁴⁾の報告がある。

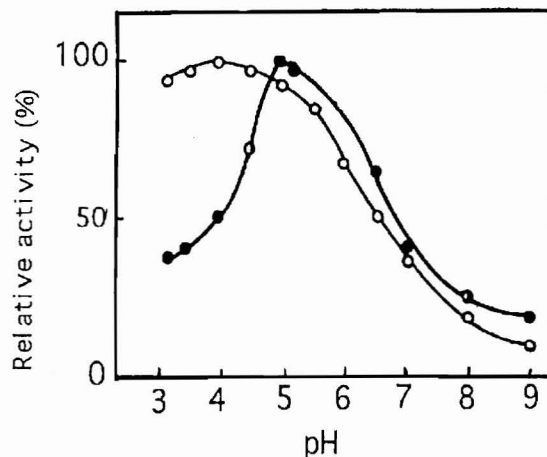


Fig. 7. Effect of pH on the activity of extracellular inulinase. The reaction was carried out at 40°C for 30 min. Buffers used were 0.05 M acetate buffer (pH 3.2 to 6.0), phosphate buffer (pH 6.0 to 8.0), and 0.1 M glycine + NaCl-NaOH buffer (pH 9.0). —○—: P-I, —●—: P-II.

b) 至適温度

pH5.0に調整した0.5%イヌリン溶液0.5mlに、酵素液(蛋白質量 $27.7\mu\text{g}/\text{ml}$)0.5mlを加え、 $30\sim 70^\circ\text{C}$ の各温度で30分間作用させた。結果はFig. 8に示した。両酵素の至適温度はともに 55°C 付近を示した。これまで報告されている糸状菌のイヌリナーゼの至適温度は、*Asp. niger*で $55\sim 56^\circ\text{C}$ ¹⁰⁾、*Asp. ficuum*で 60°C ¹¹⁾、*Pen. sp-I*のp-I、p-II、p-III酵素⁷⁾でそれぞれ至適温度 45°C 、 45°C 、 50°C の報告がある。

c) pH安定性

0.025Mの各種pHの緩衝液に溶解した酵素液(蛋白質量 $220\mu\text{g}/\text{ml}$)1mlを試験管にとり、 30°C で24時間保持した後、0.1M酢酸塩緩衝液(pH 5.0)で8倍に希釈し、未処理の酵素液を対照として残存する活性を測定した。その結果をFig. 9に示した。両酵素ともpH 4.0~7.0の範囲では安定であり、その他のpH領域においては、本酵素がP-II酵素に比べて安定であることがわかった。また他の起源のイヌリナーゼでは、*Pen. sp-I*の各酵素⁷⁾のpH 4~6の範囲で安定であり、*C. Kefyr*の細胞内外イヌリナーゼ^{13) 15)}と変わりな

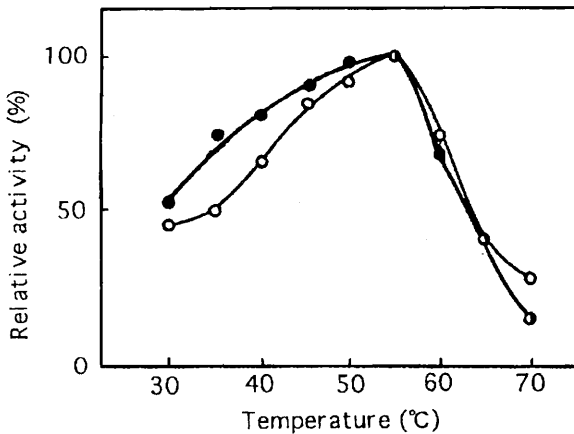


Fig. 8. Effect of temperature on the activity of extracellular inulinase. The reaction was carried out various temperature for min, in 0.05 M acetate buffer (pH 5.0).
—○—: P-I, —●—: P-II.

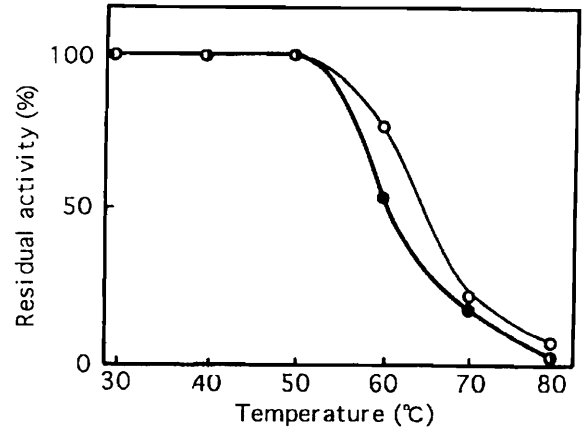


Fig. 10. Thermal stability of extracellular inulinase. The enzyme solution various in 0.05 M acetate buffer (pH 5.0) were kept at various temperatures for 30 min.
—○—: P-I, —●—: P-II.

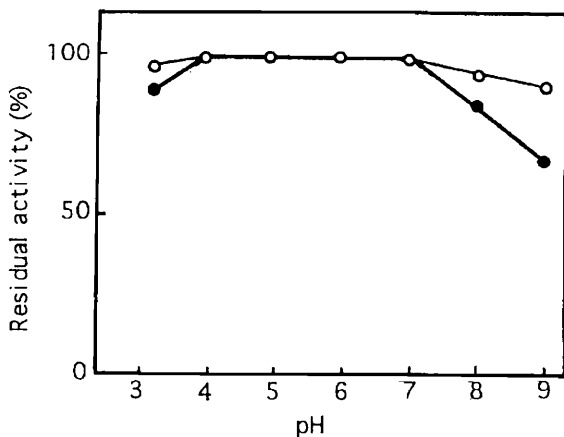


Fig. 9. Effect of pH on the stability of extracellular inulinase. The enzyme was incubated in various buffers 0.05 M acetate buffer (pH 3.2 to 6.0), phosphate buffer (pH 6.0 to 8.0) and 0.1 M glycine + NaCl-NaOH buffer (pH 9.0) at 30°C for 24 hr.
—○—: P-I, —●—: P-II.

いが, *A. ureafaciens*のそれが $\text{pH } 4 \sim 11^{14)}$ の範囲で安定であるのに比べると劣ることが分かった。

d) 熱安定性

0.05M酢酸塩緩衝液 (pH 5.0) で2倍に希釈した酵素液 (蛋白質量 $27.7 \mu\text{g/ml}$) 1 mlを試験管にとり, 30~80°Cの各温度で30分間保ち, 直ちに急冷したのち, 未処理の酵素液を対照として活性の残存率を測定した。その結果をFig.10に示した。それによると両酵素とも, 50°C以下で安定であるが, 60°Cでは, P-I酵素が80%, P-II酵素が54%の残存活性率を示した。他の起源の熱安定性では*Pen.sp.-1*の細胞外P-I, P-II, P-III酵

素⁷⁾は, 40°C, 30分で安定であるが, *Pen.sp.-1*の細胞内P-II, P-III, P-IV酵素¹⁶⁾は50°C, 30分で安定, *C.kefyr*の酵素¹³⁾は55°Cである。

e) 金属イオンおよび各種阻害剤の影響

酵素液 (蛋白質量 $55.4 \mu\text{g/ml}$) 0.25mlにそれぞれ 4 mMの各種金属イオン溶液および阻害剤溶液 (0.05 M酢酸塩緩衝液, pH 5.0) 0.25mlを加え, 30°C, 1時間処理した。この処理液を用いて残存活性を測定した。Table. 2に示したように両酵素, Mn^{2+} によって賦活され, Ag^+ , Hg^{2+} , Fe^{3+} , PCMBで強く阻害を受けた。この結果は, *Pen.sp.-1*の生産する細胞外酵素⁷⁾と *Asp.-niger*12株の生産するP-III酵素⁹⁾のそれと一致する。他の起源のイヌリナーゼに対する金属イオンおよび阻害剤の影響については, *Aspergillus*属の酵素¹⁷⁾は, Fe^{3+} で強く賦活され, Mn^{2+} , Mg^{2+} で阻害を受けている。これは著者らが得た各酵素が Mn^{2+} によって活性化されたものに比べると明らかに異なっている。

f) 基質特異性

基質としてフルクトース分子を含むショ糖 (和光純薬, 特級), ラフィノース (和光純薬, 特級), イヌリン (D.P.40, Merck), バクテリアレバン (*Bacillus natto*) を基質として選び, 酵素の基質に対する分解力を, イヌリンを100として相対活性率でTable. 3に示した。反応は各0.5%基質溶液0.5mlに, 酵素液 (蛋白質量 $27.7 \mu\text{g/ml}$) 0.5mlを加え, 40°Cで30分間反応させた, メレチトースに限り反応時間は24時間とした。

Table 2. Effect of metal ions and enzyme inhibitors on the activity of extracellular inulinases P-I and P-II from *Asp. niger* 12

Inhibitor or metal ion added (1.0mM)	Relative activity (%)	
	P-I	P-II
None	100	100
Co ²⁺	100	105
Ca ²⁺	100	107
Mg ²⁺	100	100
Mn ²⁺	131	133
Hg ²⁺	0	0
Ag ⁺	0	0
Na ²⁺	100	100
K ⁺	100	100
Fe ³⁺	20	35
KCN	104	105
EDTA ^{a)}	87	66
PCMB ^{b)}	34	30

The enzyme solution were preincubated with chloride of each metal and inhibitor (1/500 M) for 1 hr at 30°C before activities measurement, and were incubated at 40°C for 30 min at pH 5.0 after addition of the equal volume of inulin solution.

^{a)}EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
^{b)}PCMB : *p*-Chloromercuribenzoic acid

Table 3. Substrate specificity of extracellular inulinases P-I and P-II *Asp. niger* 12

Substrate	<i>Asp. niger</i> 12	
	P-I	P-II
Inulin	100	100
Sucrose	394	126
Raffinose	120	19
^{a)} Levan	0	0
Melezitose	0	0

The concentration of each substrate was 0.25%. The results were compared with the hydrolysis rate of inulin.

^{a)}Levan : *Bacillus natto*.

本酵素はイヌリン、シヨ糖、ラフィノースに作用するが、バクテリアレバンおよびメレチトースには作用しないことがわかった。*Chrysosporium pannorum*の生産するF2酵素¹⁸⁾はレバンに作用しない酵素で本酵素と同じ挙動を示している。本酵素のイヌリン分解力とシヨ糖分解力の比 (I/S) は0.25であった。筆者らが得た各イヌリナーゼの I/S は*Pen.sp.-1*の細胞外P-I、P-II、P-III酵素⁷⁾の場合、それぞれ2.0, 0.65, 1.1を示し、*S.fragilis*の I/S が0.043¹²⁾であるに比べると高い値を示している。*Pen.sp.-1*¹⁹⁾の細胞外イヌリナーゼは β - (2→6) 結合のレバンに作用している。従って、exo型イヌリナーゼには、レバンにも作用する酵素と作用しない酵素の二つが存在するようである。

g) イヌリン分解産物の検討

4%イヌリン溶液 5 mlに酵素液 (酵素活性0.13 u/ml) 5 mlを加え、40°Cで作用させて、経時的に生成還元糖を測定した。その結果をFig.11に示した。両酵素ともイヌリンを100%加水分解することがわかった。次に、経時的に得た反応液について、反応時におけるヘキソース (H, フラクトース+グルコース) とグルコース (G) の生成量について検討を行った。その結果をFig.12に示した。図から明らかなように、ヘキソースとグルコースの比 (H/G) は、反応6時間で45を示し、加水分解が進行するに従い H/G が小さくなり、その最終値は39を示した。反応初期から H/G 比が39に近い値を示していることは、イヌリン分子に対してsingle chain attackの様式で反応が進行しているように思われる。次に、ペーパークロマトグラフィーを用いて、上述反応液を経時的にスポットして、分解生産物を検討した。その結果をFig.13に示した。反応初期から主に1つの単糖類 (フラクトース) が検出され、反応が進むにつれて、多量に生成されていることがわかった。

k) 基質濃度と反応速度との関係

本酵素のイヌリン (推定分子量5,400²⁰⁾ および各種オリゴ糖に対するMichaelis定数 (km) をLineweaver-burkの作図法で求め、結果をTable. 4に示した。各酵素のイヌリンに対する km 値は、(P-I, $km=0.4$)、(P-II, $km=1.87$)を示し、P-I酵素のほうが基質親和力が高いといえる。次に、イヌロオリゴ糖系列 (F_n) とフラクトオリゴ糖系列 (GF_n) について km 値を比べると明らかに差異が認められた。両酵素とも、基質の鎖長が大きくなると km 値は小さくなり、イヌリンの km 値に近づくことから、本酵素が高分子の基質に対して強い親和性を有することが認められた。

要 約

Aspergillus niger 12株の生産するexo型P-I酵素について、DEAE-Celluloseカラムによるイオン交換クロマトグラフィーおよびSephadexによるゲル濾過クロマトグラフィーによって、電気泳動的に、単一成分に精製し、その酵素的諸性質について、先に報告したexo型P-II酵素と比較検討した。

(1) 本酵素の分子量は、Sephadex G-200ゲル濾過クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEにより、72,000および70,000と算出され、本酵素はモノマーと推察され

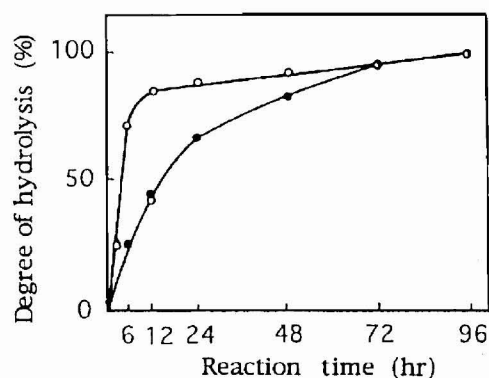


Fig. 11. Time course of the hydrolysis of inulin with Inulinase Peak-I and Peak-II.
—○—: Peak-I, —●—: Peak-II.

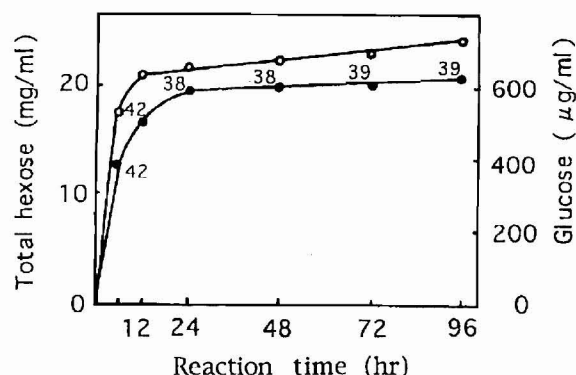


Fig. 12. Production of total hexose (calculated as fructose) and glucose during enzymic hydrolysis of 2% inulin with extracellular inulinase Peak-I. The numbers at each point on the glucose curve represent the ratios of total hexose to glucose.
—○—: total hexose, —●—: total glucose.

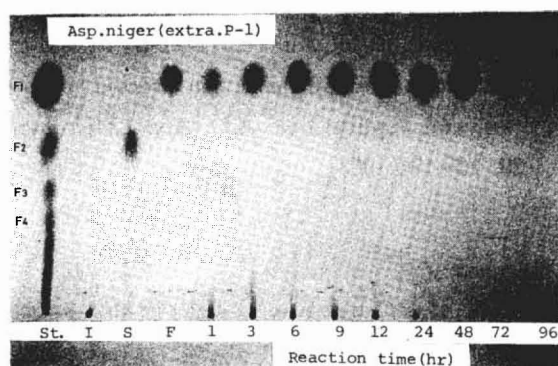


Fig. 13. Paper chromatogram of a product from inulin with inulinase Peak-I. The products of inulin hydrolysis in Fig. 10 were applied on the paper.
F₁: fructose, F₂: inulobiose, F₃: inulotriose, and through F₃.
St.: standard, S: sucrose.

Table 4. Michaelis constants with various sugar of the extracellular inulinases P-I and P-II from *Asp. niger* 12

Sugars	<i>Asp. niger</i> 12	
	P-I <i>K_m</i> (mM)	P-II <i>K_m</i> (mM)
Inulin	0.40	1.87
Sucrose (GF)	7.14	12.50
1-Kestose (GF ₂)	3.70	5.88
Nystose (GF ₃)	1.74	3.13
Inulobiose (F ₂)	3.33	6.67
Inulotriose (F ₃)	1.43	2.94
Inulotetraose (F ₄)	0.74	1.87

Substrate concentration was calculated by assuming that the molecular weight of inulin was 5,400.

る。

(2) 本酵素は、イヌリンを100%分解し、イヌリンに対する作用機構は、イヌリン分子のフラクトース末端からフラクトース単位にsingle chain mechanismで作用するexo型酵素である。

(3) 両酵素の至適pHは、P-I酵素が4.0、P-II酵素が5.0であり、至適温度は、両酵素とも約50℃であった。また、両酵素は、pH4.0~7.0の範囲で安定であり、50℃の熱処理でもほぼ活性を保持した。

(4) 基質特異性については、両酵素とも、イヌリン、スクロース、ラフィノースに作用するが、レバンおよびメレチトースには作用しなかった。

(5) 本酵素のイヌリンおよびスクロースに対する*k_m*値は、P-I酵素でそれぞれ0.4mM、7.14mMを示し、P-II酵素でそれぞれ1.87mM、12.50mMであった。

(6) 金属イオンおよび阻害剤の影響については、両酵素の活性は、Mn²⁺で賦活化され、Ag⁺、Hg²⁺でほとんど完全に阻害され、Fe³⁺およびPCMBで強く阻害を受けた。EDTAに対しては、P-I酵素が若干ではあるが低活性を示した。

キーワード: イヌリナーゼ, アスペルギルス・ニガー, エキソ型イヌリナーゼ, イヌリン

謝 辞

本研究に際し、ご指導を頂きました元宮崎大学農学部中津誠一郎教授、およびバクテリアレバンをご恵くださった元福岡女子大学藤井久雄教授に深く感謝いたします。また、実験の一部に協力した井上典明氏に感謝します。

文 献

- 1) 細谷憲政編 : 「新・栄養学読本」, 日本評論社(1983)
- 2) 日高秀昌・栄田利章・足立堯・斉藤安弘 : フラクトオリゴ糖の工業生産とその利用開発, 農化, **61**, 915-923(1987)
- 3) 中村豊彦・黒川隆則・中津誠一郎・上田誠之助 : *Aspergillus* 属菌の生産する細胞外イヌラーゼ(P-III)の結晶化とその性質について, 農化, **52**, 159-166(1978)
- 4) 中村豊彦・丸木誠一郎・中津誠一郎・上田誠之助 : *Aspergillus* 属菌の生産する細胞外イヌラーゼ(P-II)の性質について, 農化, **52**, 159-166(1978)
- 5) 福井作蔵 : 還元糖の定量法 II, 化学と生物, **3**, 36-42(1965)
- 6) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275(1951)
- 7) 中村豊彦・中津誠一郎 : *Penicillium* 属菌の生産する細胞外イヌラーゼの性質について, 農化, **51**, 681-689(1977)
- 8) LAEMMLI, L. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685(1970)
- 9) Andrews, P. : The gel-filtration behaviour of protein related to their molecular weights over a wide range, *Biochem. J.*, **96**, 595-606(1965)
- 10) DERYCKE, D. G. and VANDAMME, E. J. : Production and properties of *Aspergillus niger* inulinase, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **34B**, 45-51(1984)
- 11) ETTALIBI, M. and BARATTI, J. C. : Molecular and kinetic properties of *Aspergillus ficuum* inulinases, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 61-68(1990)
- 12) SNYDER, H. E. and PHAFF, H. J. : Studies on a beta-fructosidase (inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*, *Antonie van Leeuwenhoek*, **26**, 433-452(1960)
- 13) NEGORO, H. : Purification and enzymatic properties of extracellular β -fructofuranosidase from *Candida kefyr*, *J. Ferment. Technol.*, **51**, 879-886(1973)
- 14) UCHIYAMA, T., NIWA, S. and TANAKA, K. : Purification and properties of *Arthrobacter urea-faciens* inulinase II, *Biochim. Biophys. Acta*, **315**, 412-420(1973)
- 15) NEGORO, H. and KITO, E. : Purification and enzymatic properties of intracellular β -fructofuranosidase from *Candida kefyr*, *J. Ferment. Technol.*, **51**, 103-110(1973)
- 16) 中村豊彦・中津誠一郎 : *Penicillium*属菌の生産する細胞内のイヌラーゼの性質について, 宮崎大農報, **25**, 235-245(1978)
- 17) AZHARI, R., SZLAK, A. M., SAMUEL, E. L. and LOTAN, N. : Purification and characterization of endo- and exo-inulinase, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **11**, 105-117(1989)
- 18) XIAO, R., TANIDA, M. and TAKAO, S. : Purification and characteristics of two exoinulinases from *Chrysosporium pannorum*, *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 331-334(1989)
- 19) 中村豊彦・帆足信一郎 : *Penicillium* 属菌のイヌラーゼ生産のための基本的培養条件について, 農化, **43**, 599-605(1969)
- 20) VANDAMME, E. J. and DERYCKE, D. G. : Microbial inulinases : fermentation process, properties, and applications, *Adv. Appl. Microbiol.*, **29**, 139-176(1983)