

Aspergillus niger の生産する細胞外 エンド型イヌリナーゼ (P-Ⅲ) の固定化と性質

中村豊彦*・藤田 平*・太田一良*

Properties and Immobilization of Extracellular Endoinulinase (P-Ⅲ) from *Aspergillus niger*

Toyohiko NAKAMURA*, Taira FUJITA* and Kazuyoshi OHTA*

(平成8年9月11日 受理)

Our previous study demonstrated that the extracellular inulinase from a strain, *Aspergillus niger* 12 is a new endo-inulinase which is specific only to inulin but not to sucrose and raffinose etc. In this study, the endo-inulinase purified to electrophoretically homogeneous was immobilized onto amino-cellulofine according to carbodiimide coupling method. The activity yield of the immobilized enzyme was 35%.

The characteristics of the immobilized enzyme were compared with those of the native enzyme. The optimum pH was around 5.0 for the both enzyme and the optimum temperatures were 45°C for the native and 40°C for the immobilized enzyme. These results indicate that the immobilization resulted in the lowering of optimum temperature by 5°C. In addition, pH stability of the enzyme became broader and temperature stability was raised by approximately 10°C by the immobilization.

Then, the effects of various reagents on the enzyme activity were examined. An activation by Mn^{2+} , and strong inhibitions by Hg^{2+} , Ag^+ and NBS were found for both enzymes.

Key words: Inulinase, *Aspergillus niger*, Immobilized enzyme, Inulin

緒 言

イヌリンはキクイモ (*Helianthus tuberosus* L.) の塊茎やダリア (*Dahlia variabilis* Desf) の球根などのキク科植物に貯蔵多糖として多量存在しているポリフルクタンである。その構造¹⁾は、約30~40個のフラクトース分子が β -2,1結合により直鎖状に連結し、その末端に1個のグルコース分子が、蔗糖のように α -1,2結合でフラクトースに結合している。

イヌリン分解酵素イヌリナーゼ (2,1- β -D-fructan fructanohydrolase [EC3.2.1.7]) は、作用機作から三つの型に分類される。(1)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、最後にグルコースを生成する酵素。(2)フラクトース末端からフラクトース単位に作用し、fructofuranosyl 残基間の2,1- β -結合のみが感受性である酵素。(3)fructofuranosyl 残基間の2,1- β -結合に作用し、オリゴ糖を主に生成する酵素である。(1)と(2)はexo型酵素であり、(3)はendo

* 応用生物化学講座

型酵素である。

近年、ショ糖に近い甘味と難消化性糖の性質を合わせもつフラクトオリゴ糖が、ショ糖に代わる機能性甘味素材²⁾として高い注目を受けるに至って、類似の構造をもつイヌロオリゴ糖の開発が期待されている。

Endo型イヌリナーゼは、イヌリンにendowiseに作用して重合度 (degree of polymerization, D. P.) 2～6のイヌロオリゴ糖を生成する酵素であり、このendo型イヌリナーゼは、中村ら³⁾によって、初めて *Aspergillus niger* 12株由来のイヌリナーゼから分離され、結晶化に成功している。その後、Zittan⁴⁾、Ettalbiら⁵⁾が *Aspergillus* 属、Xiaoら⁶⁾が *Chrysosporium* 属、Onoderaら⁷⁾が *Penicillium* 属でそれぞれ分離している。

本報では、未利用資源の一つであるイヌリンから、連続的にイヌロオリゴ糖を大量生産することを目的として、イヌリナーゼを固定化し、固定化酵素の諸性質について検討を行った。

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、約1/50にまで濃縮した。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

イヌリン分解活性とショ糖分解活性の測定は前報⁸⁾に準じて行った。また、固定化酵素の場合は、アクロバットスターラー (エムエス機器社製)で攪拌して反

応を行った。

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) を標準として、Lowry法⁹⁾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mg当たりの酵素単位で示した。

4. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

TLCプレートはMerck社製 Silica gel 60を用い、クロロホルム:酢酸:蒸留水 (6:10:1, v/v/v) を展開溶媒として、室温で上昇法により三重展開を行った。発色は、ジフェニルアミン-アニリン-リン酸試薬を用いて検出した。標準物質として使用した各種イヌロオリゴ糖およびフラクトオリゴ糖は、明治製薬(株)より恵与されたものを使用した。

5. 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¹⁰⁾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は、ファルマシア社製の分子量マーカーとして、ホスホリラーゼb (分子量、97,400)、牛血清アルブミン (66,200)、オプアルブミン (45,000)、およびカーボニックアンヒドラーゼ (31,000) を使用した。

6. Endo型イヌリナーゼの固定化

Endo型イヌリナーゼの固定化は、アミノセルロファインによるカルボジイミドカップリング法で行った。蒸留水で十分に洗浄したアミノセルロファイン (生化学工業社製) 500mgを試験管にとり、これに縮合剤 (EDC) 20mgと0.1M酢酸塩緩衝液 (pH5.0) で希釈した酵素液1ml (蛋白量1.7mg/ml, 酵素活性290U) を加え、pH5.0に調整後、4℃低温室内でアクロバットスターラーを用いて一晩振とうした。振とう後、吸引濾過及び洗浄を行い、0.1M酢酸塩緩衝液 (pH5.0) 2mlに懸濁した。このときの濾液は回収し、イヌリン分解活性および蛋白質量を測定した。次に、固定化酵素の固定化率および活性収率は次の式から求めた。

固定化率= $[(A-B)/A] \times 100$, 活性化率= $[C/(A-B)] \times 100$, なお、Aは使用酵素の活性単位、Bは洗浄

液の活性単位, Cは固定化酵素の活性単位を表示している。

実験結果及び考察

1. Endo型イヌリナーゼの精製

a) DEAE-Celluloseカラムクロマトグラフィー

粗酵素 (蛋白質量20.75g, 酵素活性198,525U) を, 0.02M酢酸塩緩衝液 (pH6.0) に対して一夜透析し, 同緩衝液で平衡化したDEAE-Celluloseカラム (2.6×100cm) に吸着させた。溶出は同緩衝液中にNaClが0.1 M, 0.2Mならびに0.3Mを含む液でstepwiseに溶出を行った。その溶出曲線はFig. 1に示した。この図から明らかなように, *Asp. niger* 12株由来のイヌリナーゼは, DEAE-Celluloseカラムにより, 3種類のイヌリナーゼ (P-I, P-II, P-III) として分画された。今回は, 応用的見地から固定化酵素の実験を行うために, イヌリン活性の高いP-III画分の酵素について精製を行った。

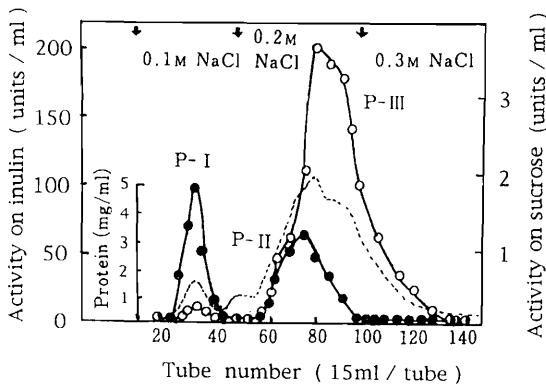


Fig. 1. Stepwise elution pattern of extracellular inulinase from *Aspergillus niger* 12 on DEAE-Cellulose. A column of DEAE-Cellulose (2×60cm) was equilibrated with 0.02 M acetate buffer (pH 6.0). The column was eluted by stepwise elution with 0.02 M acetate buffer pH 6.0 containing 0.1 M, 0.2 M and 0.3 M NaCl. -----, protein; —○—, activity on inulin; —●—, activity on sucrose.

b) 等電点電気泳動法による精製

上記のP-III画分の酵素液 (蛋白質量2.1g, 酵素活性84,430U) を, 限外濾過膜 (YM-10) を用いて, 5 mlまで濃縮し, 等電点分画装置LKB2117 Multiphor) による精製を5回に分けて行った。ゲルの調製は, ゲル濃度を4%, 5%アンフォライン緩衝液 (pH範囲2.5~6, LKB製) になるように調製し, 調製ゲルに上記酵素液1 mlを加えてよく混和し泳動した。泳動条件は常時8 Wで17時間行った。泳動後, 直ちにフラクシヨ

ネーショングリッド (LKB製) でゲルを陽極の方から30分画し, 蒸留水で抽出後, 各抽出液の蛋白質量および酵素活性を測定した。その結果をFig. 2に示した。図から明らかなように, 蛋白質と酵素活性の曲線がほぼ一致し, 酵素が高度に精製されたことを示している。なお, P-III酵素の等電点は, 3.6~3.7付近であった。

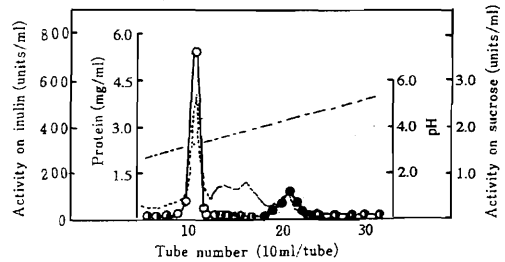


Fig. 2. Isoelectric focusing of extracellular inulinase P-III from *Asp. niger* 12. -----, protein; —○—, activity on inulin; —●—, activity on sucrose; -----, pH.

c) SephadexG-75カラムクロマトグラフィー

上記の泳動操作で回収された活性画分の酵素液 (蛋白質量179.2mg, 酵素活性28,145U) を, 0.1M酢酸塩緩衝液 (pH5.0) で平衡化した Sephadex G-75カラムに添加して, 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曲線が一致し, 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。最終酵素標品について, 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。その結果をFig. 4に示したとおり, 酵素にサブバンドは認められず, 本酵素はディスク電気泳動的に単一成分であると判断された。なお, SDS-PAGE (Fig. 4) で求めた本酵素の推定分子量は68,000と推定された。

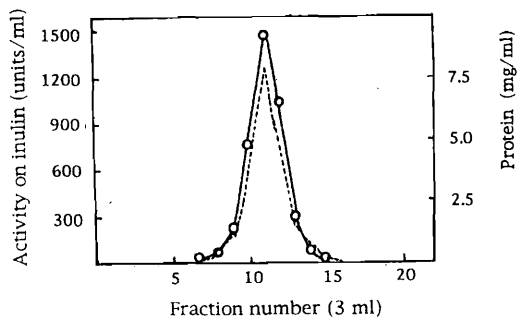


Fig. 3. Gel filtration of extracellular inulinase P-III *Asp. niger* 12 on Sephadex G-75. —○—, activity on inulin; -----, protein

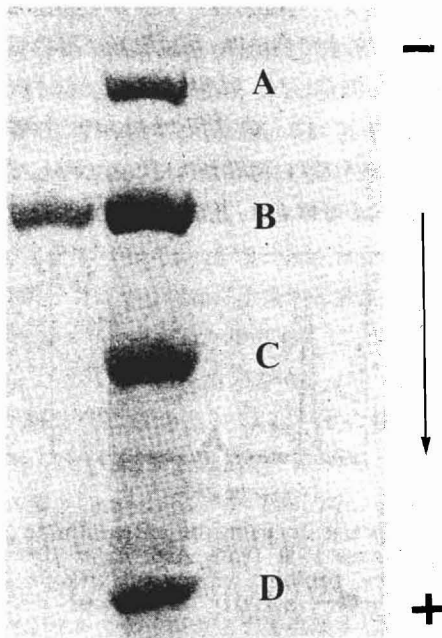


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of extracellular inulinase P-III from *Asp. niger* 12.

A, phosphorylase b (M.W.=97,400);
 B, bovine serum albumin (66,200);
 C, ovalbumin (45,000);
 D, carbonic anhydrase (31,000).

2. 固定化イヌリナーゼの性質

a) 固定化酵素の調製

*Asp. niger*12株由来のendo型イヌリナーゼを、上記方法に基づき、pH5.0、担体量500mg/ml、縮合剤EDC 20mg/ml、使用酵素蛋白質量1.7mg/mlの条件下で固定化を行った。結果をTable. 2に示した。表から明らかのように本酵素の固定化率は85.5%、活性収率は35.5%と、かなり高い値を示していることから、アミノセルロファインは有望な担体と考えられる。アミノセルロファインに固定化して、固定化酵素の化学的諸性質について、Native酵素と比較検討した。なお、固定化酵素は0.01M酢酸塩緩衝液 (pH5.0) に懸濁し4℃で保存した。

b) 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、酵素懸濁液(酵素活性0.26U/ml) 0.5ml加え、40℃、30分間反応させて、酵素活性を測定した。結果はFig. 5に示したとおり、両酵素とも、至適pH 5.2付近を示し、変化は認められなかった。

c) 至適温度

pH5.0に調整した0.5%イヌリン溶液0.5mlに、酵素

Table 1. Summary of purification of endoinulinase P-III from *Asp. niger* 12

Fraction	Total protein (mg)	Total units on inulin	Total units on sucrose	Units/mg. protein on inulin	I/S ^{a)}	Yield (%)
Crude enzyme	270,660	196,215	3,168	0.7	61.9	100.0
Concentration	20,751	198,525	2,380	9.6	83.4	101.2
DEAE-Cellulose (Stepwise)	2,099	84,430	289	40.2	292.0	43.0
Isoelectric focusing	179	28,145	0	157.4	∞	14.3
Sephadex G-75	100	18,473	0	184.7	∞	9.4

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℃ 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℃ and pH 5.0; substrate conc., 0.25%.

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

Table 2. Immobilization of endo-inulinase from *Asp. niger* 12 onto Amino-Cellulofine with EDC

pH	Activity loaded (U)	Activity in washings (U)	Activity of immobilized inulinase (U)	Immobilization yield (%) ^{a)}	Activity yield (%) ^{b)}
5.0	290	42.1	87.9	85.5	35.5

$$a) \text{ Immobilization yield}(\%) = \frac{\text{Activity when loaded (U)} - \text{Activity in washings (U)}}{\text{Activity when loaded (U)}} \times 100$$

$$b) \text{ Activity yield}(\%) = \frac{\text{Activity in immobilized inulinase (U)}}{\text{Activity when loaded (U)} - \text{Activity in washings (U)}} \times 100$$

EDC, 1-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride.

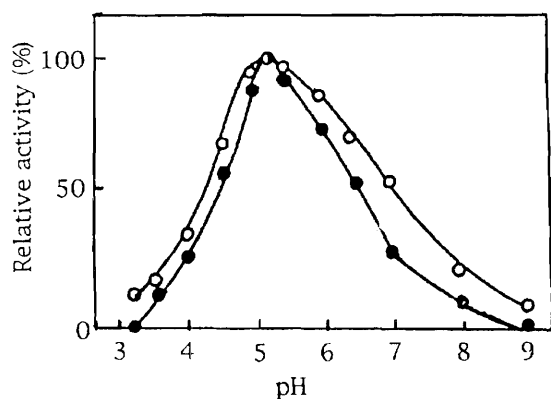


Fig. 5. Effect of pH on the activity of extracellular inulinase P=III from *Asp. niger* 12. The reaction was carried out at 40°C for 30 min. Buffers used were 0.05 M acetate buffer (pH 3.2 to 6.0), phosphate buffer (pH 6.0 to 8.0) and 0.1 M glycine + NaCl-NaOH buffer (pH 9.0). —○—, native; —●—, immobilized.

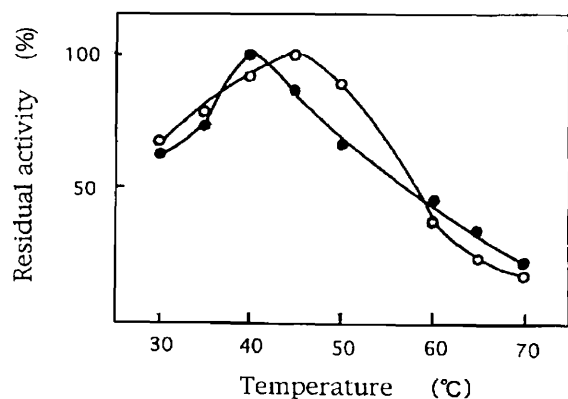


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of extracellular inulinase P=III from *Asp. niger* 12. —○—, native; —●—, immobilized.

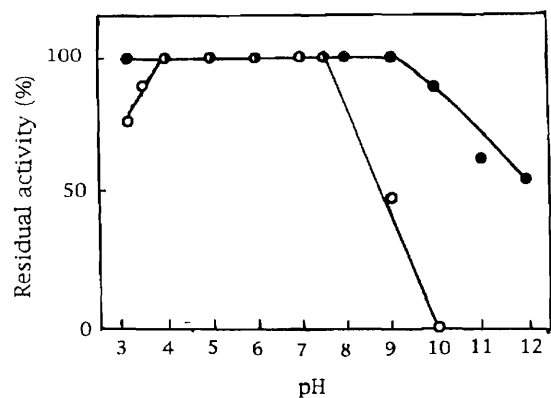


Fig. 7. Effect of pH on stability of extracellular inulinase P=III from *Asp. niger* 12. —○—, native; —●—, immobilized.

懸濁液 (酵素活性0.15U/ml) 0.5mlを加え, 30~70°Cの各温度で30分間作用させた. 結果はFig. 6に示したとおり, 固定化酵素の至適温度がNative酵素に比べて5°Cほど低下した.

d) pH安定性

0.05Mの各種pHの緩衝液で2倍に希釈した酵素懸濁液 (酵素活性1.08U/ml) 1mlを, 30°Cで24時間保った後, 0.1M酢酸塩緩衝液 (pH5.0) で5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. 7に示した. 固定化酵素の安定領域はpH3.2~9.0と広くなり, 固定化することによりpH安定性が酸性側, アルカリ側の両領域で増大した.

e) 熱安定性

0.05M酢酸塩緩衝液 (pH5.0) で2倍に希釈した酵素懸濁液 (酵素活性0.15U/ml) 0.5mlを, 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. 8に示した. 固定化することにより, 熱安定性が10°Cほど増大することがわかった. 安定性が増大することは, 工業的に利用しようとする場合に非常に有利な点となる.

f) 金属イオンおよび阻害剤の影響

固定化酵素の活性に及ぼす金属イオンおよび阻害剤の影響を調べた結果をTable. 3に示した. 表から明らかかなように, 両酵素とも, Mn^{2+} によって賦活され, Ag^+ , Hg^{2+} およびNBSによって強く阻害を受けるこ

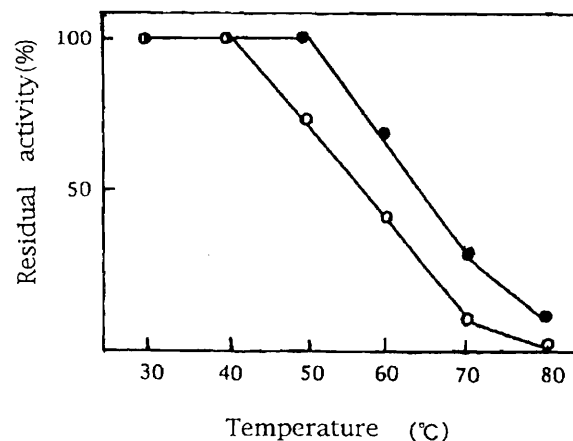


Fig. 8. Thermal stability of extracellular inulinase P=III from *Asp. niger* 12. —○—, native; —●—, immobilized.

Table 3. Effect of metalions and enzyme inhibitors on the activity of extracellular inulinases P-III from *Asp. niger* 12

Inhibitor or metalion added (1.0mM)	Relative activity (%)	
	Native inulinase	Immobilized inulinase
None	100	100
Co ²⁺	117	100
Ca ²⁺	100	108
Mg ²⁺	84	80
Mn ²⁺	132	136
Hg ²⁺	0	0
Ag ⁺	0	0
Na ⁺	100	100
K ⁺	100	100
Fe ³⁺	20	80
SN ²⁺	74	100
EDTA ^{a)}	48	56
PCMB ^{b)}	17	75
NBS ^{c)}	0	0
PM ^{d)}	70	81

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

^{c)}NBS : N-Bromosuccinimide

^{d)}1, 10-phenanthroline monohydrate

とがわかった. また, Native酵素は, Fe³⁺ および PCMBでも強く阻害を受けるが, 固定化酵素はそれほど強い阻害を受けないことがわかった. 固定化することによって, Fe³⁺ およびPCMBに対する抵抗性が増大したことを示している.

g) イヌリンの酵素分解産物の検討

0.025M酢酸塩緩衝液 (pH5.0) を含む 4%イヌリン溶液 5 mlに, 0.13U/mlに調製した酵素懸濁液を加えて, 40°Cで作用させ, 生成還元糖を経時的に測定した結果をFig. 9 に示した. 固定化酵素によるイヌリン分解限度は, 生成還元糖を果糖として計算して約47.3%であった. 次に, TLCを用いて, 先の反応液を経時的にスポットして, イヌリンの分解産物を検討した. その結果をFig.10に示したように, 反応初期から主に D.P. 3~6 のオリゴ糖が多く検出され, 反応が進むにつれて, D.P. 1 および 2 の糖も生成されている. これは, Native酵素と同じで, 固定化における作用機構の変化は認められなかった.

本研究は, イヌリンに特異的に作用して, イヌロオリゴ糖を主に生産するendo型イヌリナーゼを電気泳動的に単一なバンドに精製し, 固定化して, 固定化酵

素の諸性質を明らかにした点で意義深いものと思われる.

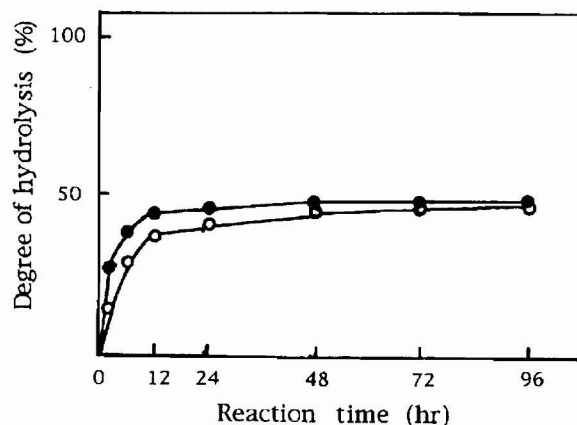


Fig. 9. Time course of the hydrolysis of inulin with native and immobilized extracellular inulinase P=III from *Asp. niger* 12. —○—, native; —●—, immobilized.

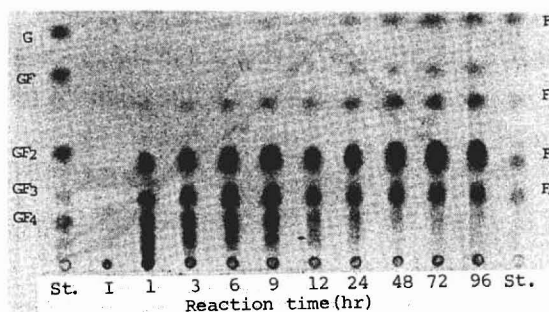


Fig.10. Thin-layer chromatogram of the product from inulin with immobilized extra-cellular inulinase P=III from *Asp. niger* 12. St : standard, I : inulin, F : fructose, F₂ : inulobiose, F₃ : inulotriose, G : glucose, GF : sucrose, GF₂ : 1-kestose, GF₃ : nystose.

要 約

*Asp. niger*12株由来のendo型イヌリナーゼを, アミノノーセルロファインによるカルボジイミドカップリング法で固定化した. 固定化酵素について, 諸性質の検討を行い, 次の結果を得た.

- (1) 本酵素の固定化率は85.5%, 活性収率は35.5%を示した.
- (2) 固定化酵素の至適pHに変化は認められなかったが, 至適温度がNative酵素に比べて5°Cほど低下した.
- (3) 固定化酵素のpH安定性では酸性側, アルカリ

側の両領域で安定化され、広くなり、熱安定性も10℃ほど高くなった。

(4) 両酵素とも、 Mn^{2+} で賦活化され、 Ag^+ 、 Hg^{2+} およびNBSによって顕著に阻害された。固定化酵素は Fe^{3+} およびPCMBによる阻害に対して、抵抗性が増大した。

(5) 本酵素によるイヌリン最終分解限度は約47.3%で、主な分解産物はD.P. 3, 4, 5および6のイヌロオリゴ糖であった。

謝 辞

本研究に際し、貴重な試料を提供して頂きました明治製菓(株)に深く感謝いたします。

キーワード : イヌリナーゼ, アスペルギルス・ニガー, 固定化酵素, イヌリン

文 献

- 1) VANDAMME, E. J. and DERYCKE, D. G.: Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications, *Adv. Appl. Microbiol.*, **29**, 139-176(1983)
- 2) 日高秀昌・柴田利章・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) ZITTAN, L.: Enzymatic hydrolysis of inulin: an alternative way to fructose production, *Starch*, **33**, 373-377(1981)
- 5) ETTALIBI, M. and BARATTI, J. C.: Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 13-20(1987)
- 6) XIAO, R., TANIDA, M. and TAKAO, S.: Purification and some properties of endoinulinase from *Chrysosporium pannorum*, *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 244-248(1989)
- 7) ONODERA, S. and SHIOMI, N.: Purification and substrate specificity of endo-type inulinase from *Penicillium purpurogenum*, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2569-2576(1988)
- 8) 中村豊彦・帆足信一郎: *Penicillium*菌属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)
- 9) 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)
- 10) LAEMMLI, L. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, *Nature*, **227**, 680-685(1970)