

Summary

In this study, we have modified the components of the substrate in the determination method of lipoprotein lipase.

In stead of human plasma, bovine seam albumin was prepered as protein in substrate, and Fatgen was used as triglyceride.

In this substrate that protein / oil was 0.66. oil was 3% in final concentration.

And then, the enzyme activity was prepered quantitavely till the 0.4 ml in *N*/100-KOH titration.

杉浦衛, 小木曾太郎, 羽田野良一, 田中順子: 酵素剤の研究 (33)*1

Xylanase の研究(1)

Aspergillus niger の生産する Xylanase および Glucanase について

Mamoru Sugiura, Taro Ogiso, Ryoichi Hatano, Yoriko Tanaka.

Studies on Enzyme Preparations (XXXIII)

On the Xylanase and Glucanase Produced by *Aspergillus niger*.

Summary

The properties of xylanases and glucanases produced by *Aspergillus niger*. *Trichoderma viride* 1 and 2 were studied.

Optimum pH of these xylanase were found to be about 5, and these were stable in pH range of 4-7. Optimum temperature generally were at 50°C. All xylanases were activated with Ca²⁺, but were inhibited by heavy metals, Hg²⁺ and Ag⁺, urea, sodium lauryl sulfate and KCN.

Xylose and oligosaccharides were detected in the reaction mixture hydrolyzed by these enzymes with paper chromatographic analysis.

Optimum pH of these glucanases were found to be 5-6, and these were activated Ca²⁺, but were inhibited with Hg²⁺ and Ag⁺ as strog as in xylanases.

hemicellulose は cellulose, pectin などと共に植物細胞膜の主成分をなし, 量的にもデンプンをはるかに越す炭水化物であるにもかかわらず, 近年にいたるまで栄養学的見地からは度外視されていた。しかし最近にいたり cellulose 分解酵素と共に hemicellulose 分解酵素 (xylanase, mannase など) も植物性食品の崩壊の面から食品工業および薬剤への利用がさげられるようになった。

そこで著者らは hemicellulase の酵素性質を解明するため *Aspergillus niger* (以下 *A. niger*) の産生する xylanase および glucanase の至適 pH, pH 安定性, 金属イオンおよび阻害剤の影響などについて, *Trichoderma viride* (以下 *T. viride*) の産生するそれらと比較検討した。

供試酵素および実験法

1. 供試酵素および基質

実験に使用した酵素は *A. niger* の産生する Cellulase AP (天野製薬), *T. viride* cellulase-1 (Meicellase,

*1 前報 (32) 杉浦衛, 伊藤万蔵, 田中英郎, 平工誠治

明治製菓) および *T. viride* viridicellulase-2 (Pancellase, 近畿ヤクルト) である。また基質の xylan は東京化成製, β -1, 3-glucan はヘキスト社製を用いた。

2. 活性測定法

xylanase, glucanase 活性の測定法は Somogy-Nelson¹⁾ 法を使用した。すなわち 1% xylan 1 ml に 0.1 M acetate buffer 3 ml を加え加熱する。これに酵素液 1 ml を加え, 40°C で 30 分間反応した後, 銅試薬 2 ml を加え, 20 分間沸騰水溶液中で加熱, 冷後 1 ml の Nelson 試薬を加え, 20 分間室温に放置する。水を加て全量 25 ml とし波長 500 m μ における吸光度を測定する。予め作成した検量線より全還元糖を xylose に換算した。

glucanase の測定は xylanase と同様に行ったが, 反応系は全て 1/2 で, 生成還元糖は glucose に換算してあらわした。

実験結果および考察

1. 至適 pH

xylanase の至適 pH は Fig. 1 に示すように, *A. niger* では pH 4.5, *T. viride* 1 は 5.0, *T. viride* 2 は 4.5~5.5 附近にあり, 三酵素とも一般 cellulase 類に近い至適 pH をもつものと思われる。

また, glucanase の至適 pH は Fig. 2 に示したが, いずれも pH 5~6 にあり, 弱酸性で高い活性を発揮するものと推察される。

2. pH 安定性

各種 buffer (pH 2.0 は 0.2 M KCl-HCl, pH 2.5 は 0.1 M lactate, pH 3.0~6.0 は 0.1 M acetate, pH 6.0 以上は 0.1 M phosphate buffer) を用い酵素液を所定の pH とし, 30°C, 60 分間処理したのち 0.1 N HCl または NaOH を使用して pH 4.5 に戻し活性を測定した。その結果は Fig. 3 および 4 に示したが, xylanase については *A. niger* が pH 3~8, *T. viride* 1 は 4~7, *T. viride* 2 は 4~8 でほぼ安定であった。

glucanase では *A. niger* が 4~6, *T. viride* 1 は 5~7, *T. viride* 2 は 3.5~6 で概ね安定であった。

xylanase の pH 安定性は三者とも類似した傾向を示し, 中性から弱酸性にかけて安定性を有するものと思考

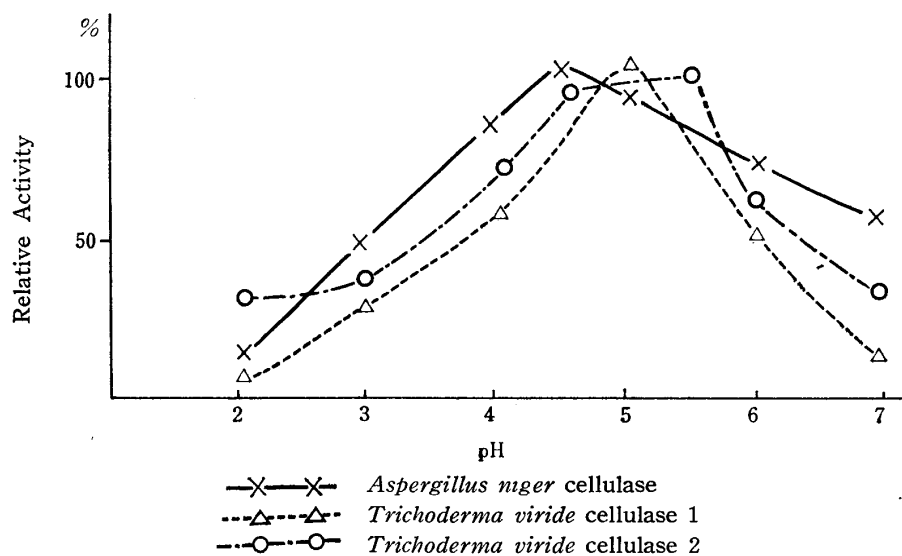


Fig. 1 Optimum pH of Various Xylanases

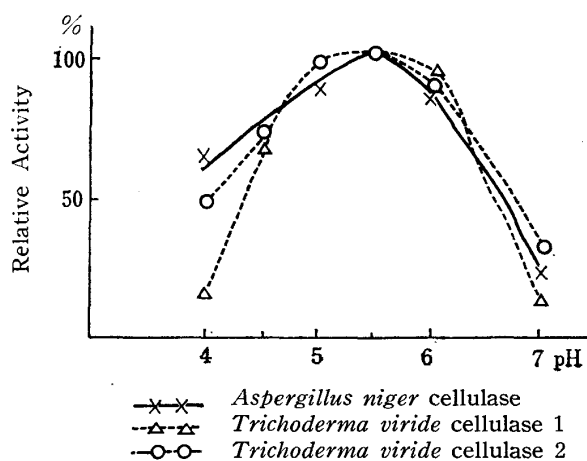


Fig. 2 Optimum pH of Various β -Glucanases

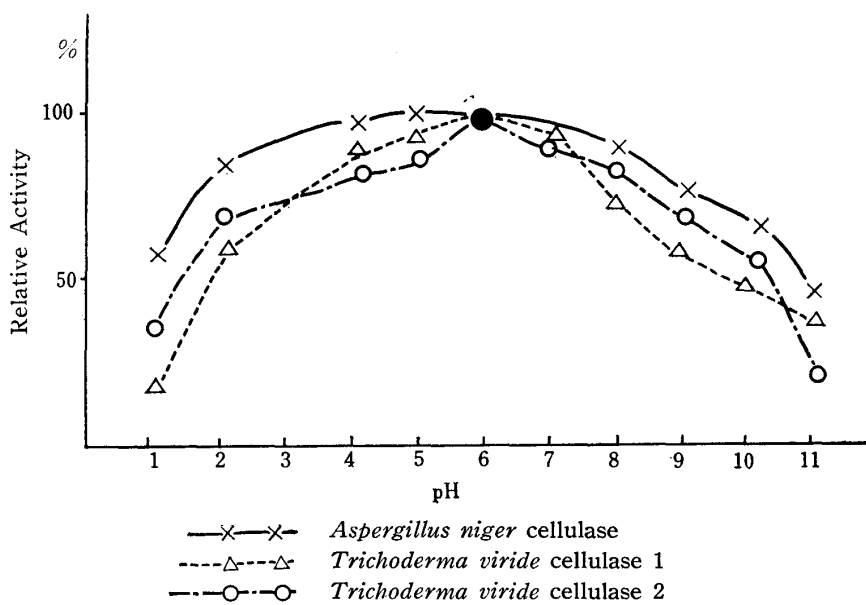


Fig. 3 pH Stability of Various Xylanases

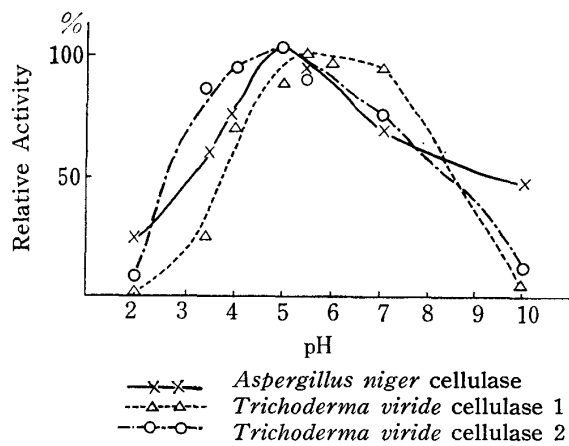


Fig. 4 pH Stability of Various β -Glucanases

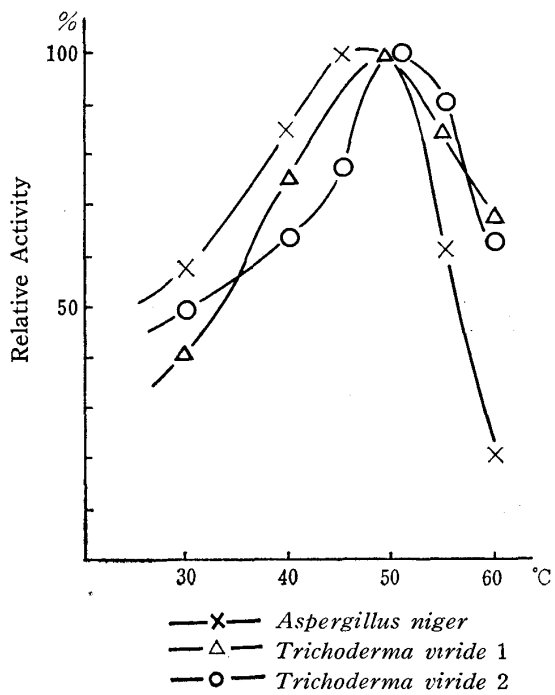


Fig. 5 Optimum Temperature of Various Xylanases

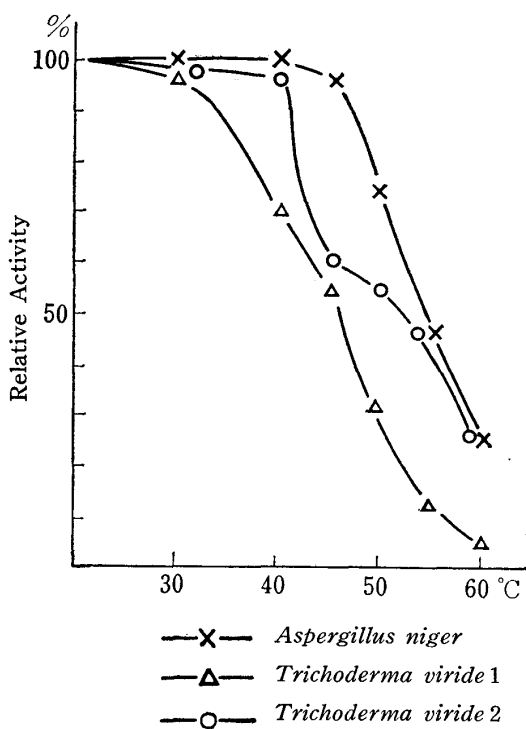


Fig. 7 Stability of Xylanase Activities in Solution at Various Temperature

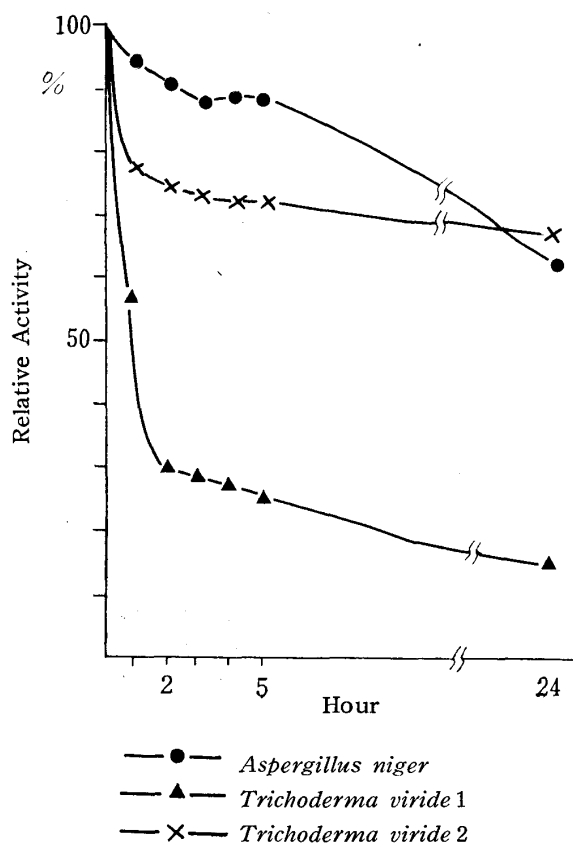


Fig. 6 Stability of Xylanase Activities in Dry State at 100° C

される。

3. 至適温度

xylanase の至適温度は Fig. 5 に示したが *A. niger* は 45~50°C *T. viride* 1 および 2 は 50°C 前後であった。

4. 熱安定性

酵素粉末の熱安定性は Fig. 6 に示すように xylanase については *A. niger* のそれが最も安定で 100°C, 24 時間後も 70% 程度の残存活性を示したが, *T. viride* 2 は最も不安定で 100°C, 2 時間で 70% の活性低下が認められた。これら熱安定性の差異は酵素性質以外に共存する水分もかなり影響するものと思われる。

酵素水溶液の熱安定性を Fig. 7 に示したが, xylanase 活性は 40°C 以上では不安定で, 60°C ではほとんど活性が消失した。一般に cellulase 水溶液は耐熱性が弱いといわれるが, xylanase についても同様の傾向がみられた。

5. 金属イオンの影響

その結果は Fig. 8, および 9 に示したが, xylanase 活性は, いずれの酵素も Ca^{2+} によって活性化されたが, 他の金属イオンでは全て阻害された。FeCl₃ では, いずれも僅かに阻害されるのみで他の重金属イオンと異なった影響を示した。

glucanase 活性についても, *A. niger*, *T. viride* 1 および 2 ともに Ca^{2+} によって活性化されたが, Hg²⁺, Ag⁺ は強い阻害作用を示した。

6. 阻害剤の影響

T. viride の cellulase 活性は尿素, グリセリン, sodium benzene sulfonate などによって阻害されるので,

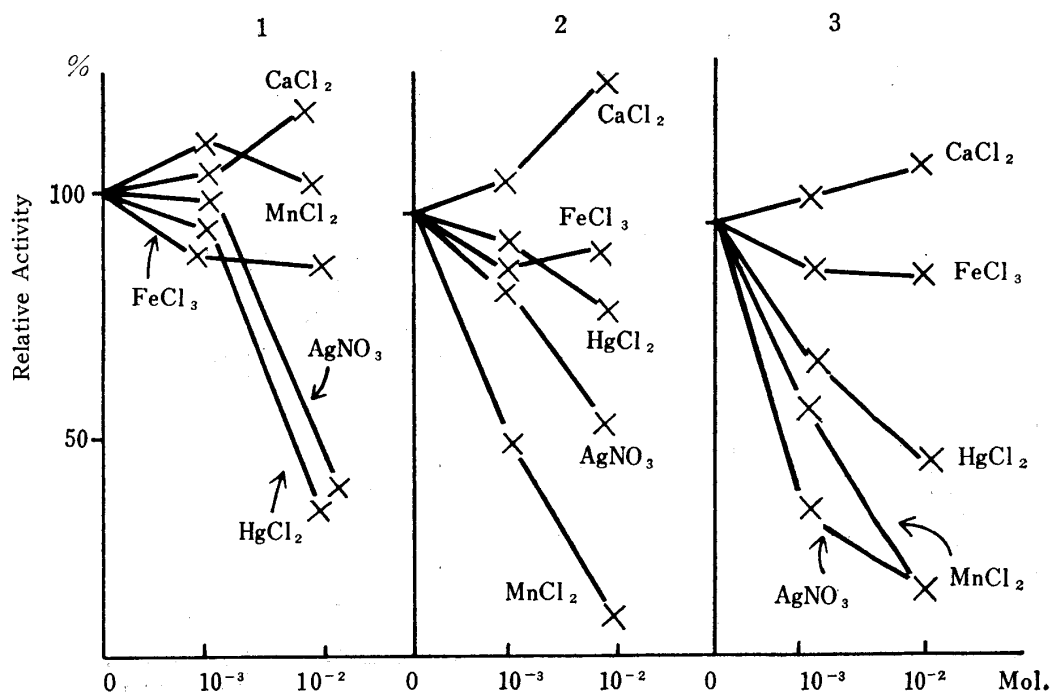


Fig. 8 Effect of Various Metal Ions on Xylanase Activity

1. *Aspergillus niger* cellulase
2. *Trichoderma viride* cellulase 1
3. *Trichoderma viride* cellulase 2

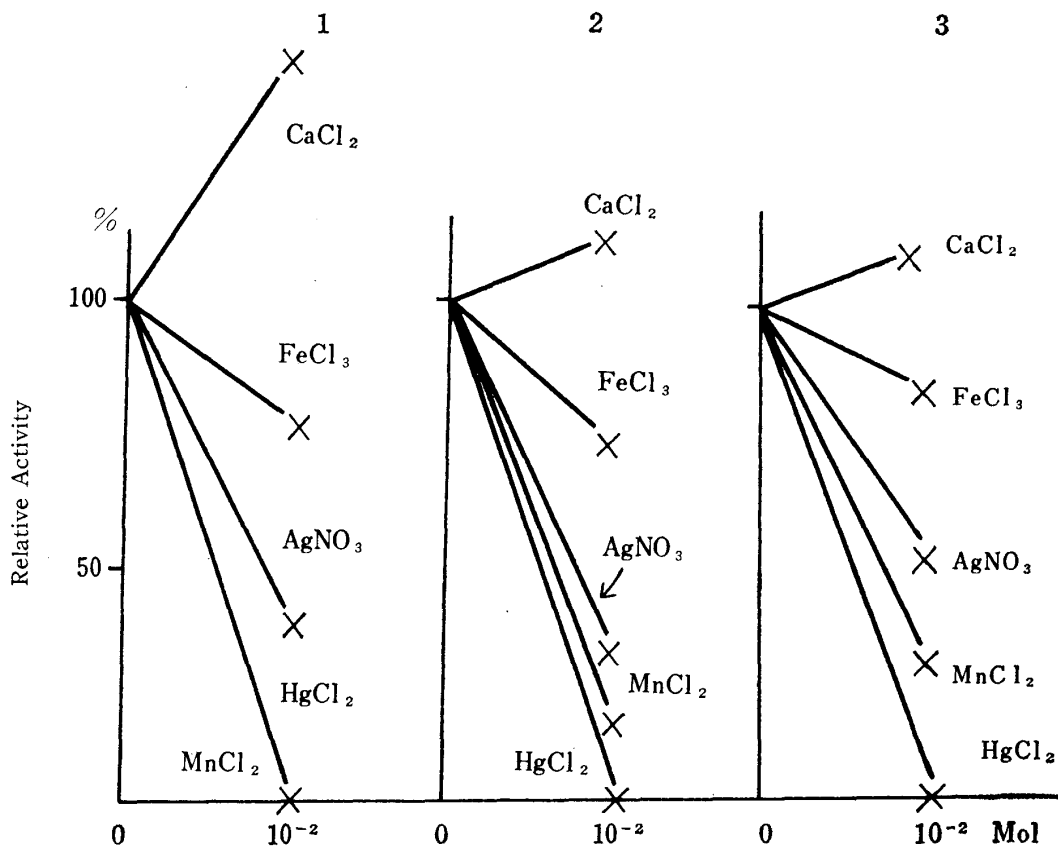


Fig. 9 Effect of Various Metal Ions on β -Glucanase Activity

1. *Aspergillus niger* cellulase
2. *Trichoderma viride* cellulase 1
3. *Trichoderma viride* cellulase 2

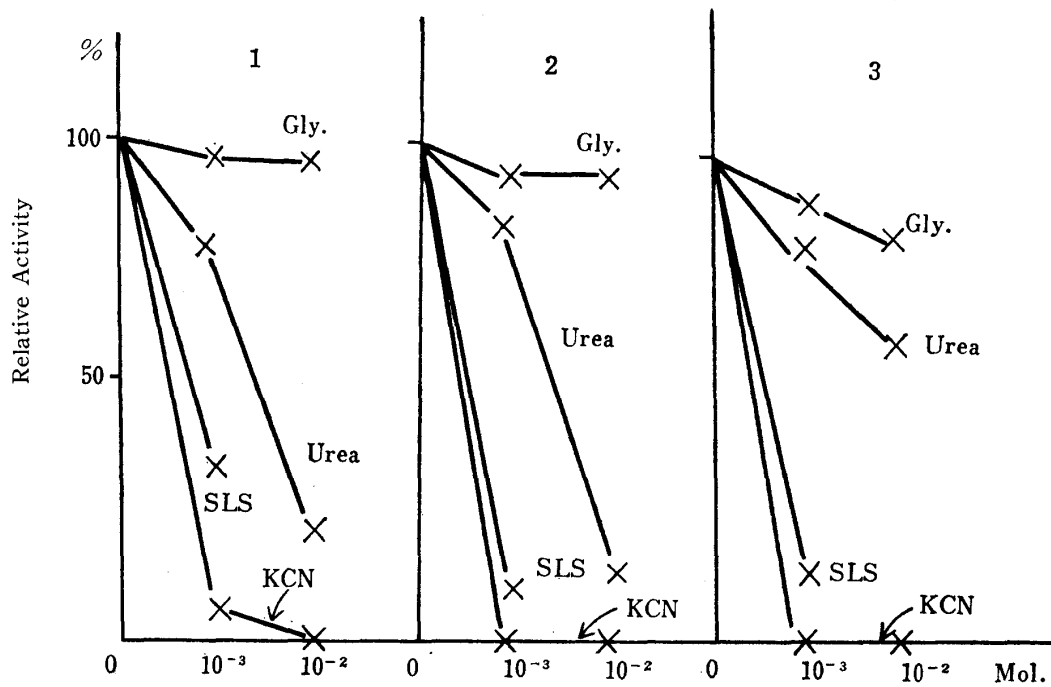


Fig. 10 Effect of Various Inhibitors on Xylanase Activity

1. *Aspergillus niger* cellulase
2. *Trichoderma viride* cellulase 1
3. *Trichoderma viride* cellulase 2

xylanase, についてもその影響を検討した. その結果を Fig.10 に示したが, xylanase, glucanase 活性は尿素の $10^{-2}M$, ラウリル硫酸ナトリウムおよび KCN によって著しく阻害された. グリセリンではほとんど阻害されなかった.

glucanase についても KCN によって強い阻害を受け, $10^{-1}M$ ではほとんど活性を消失した. また, ラウリル硫酸ナトリウム, 尿素の阻害は *A. niger* のそれが最も大であった. グリセリンの影響は xylanase の場合と同様僅少であった. したがって尿素などの cellulase 阻害剤は概ね xylanase, glucanase 活性を阻害するものと思われる.

7. 基質分解機序

xylanase および glucanase 基質分解機序をみるため分解生成物を経時的にペーパークロマトグラフィーで展開した. Fig.11 にその結果を示したが, xylanase については *A. niger* および *T. viride* 2 の両者ともその分解生成物に oligo 糖がみられ, 終局的に xylose の生成がみられることから, これら xylanase は xylan を at random に水解してゆくものと考えられる.

一方, glucanase については, *A. niger* のそれは分解産物として oligo 糖を生成しないことから β -1, 3-

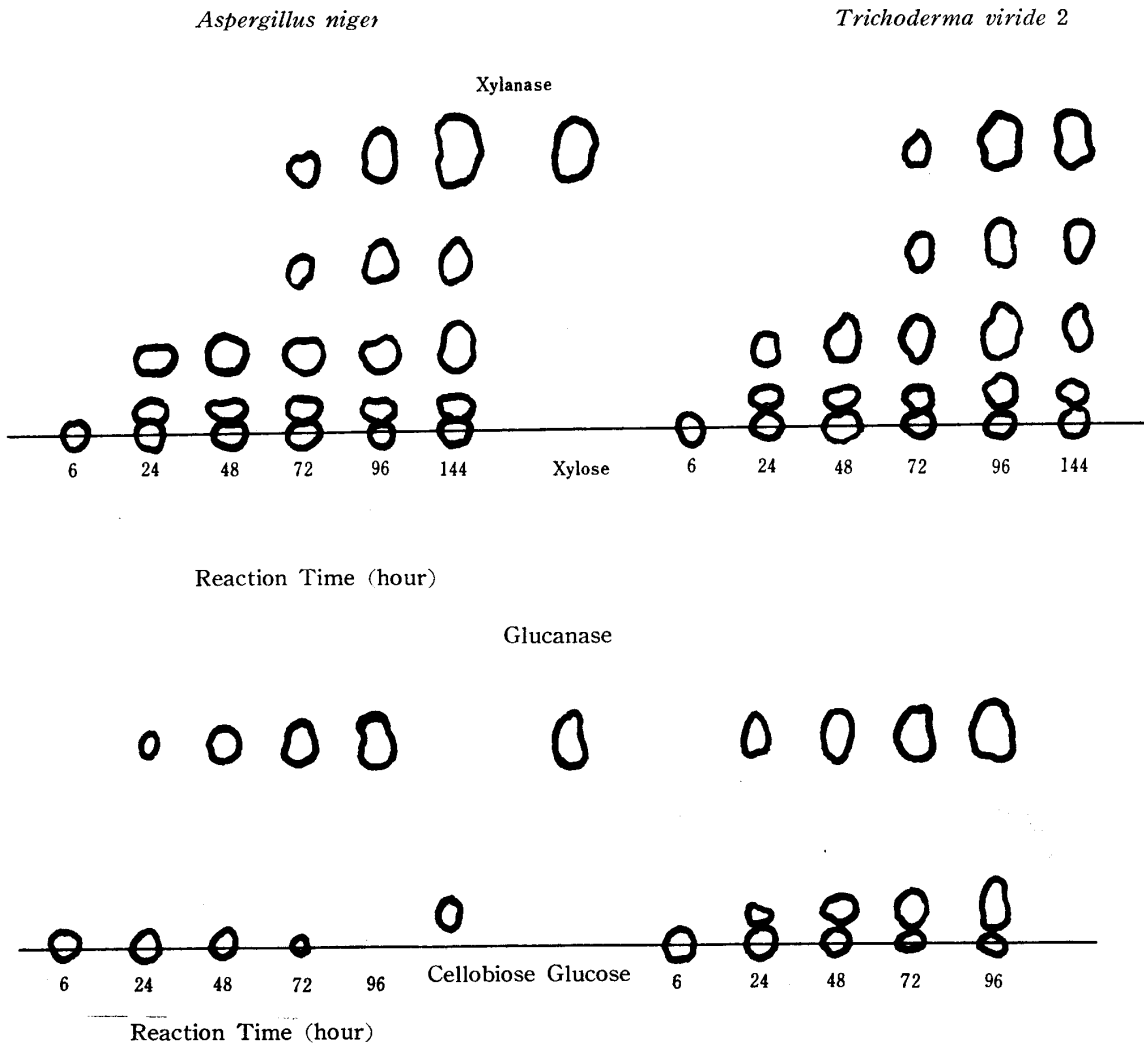


Fig.11 Paperchromatographs of Xylan and β -1, 3-Glucan Hydrolyzates by Xylanase and Glucanase Produced by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*

glucan を glucose 単位に切断してゆくものと思われる。

一般に xylanase (β -1, 4-glucanase) には少くとも二つの型があるといわれる。すなわち分子の内側に作用して xylobiose などの oligo 糖を最終主生物とする endo (または random) 型と、基質分子の末端に作用して xylose 残基を一つずつ遊離する exo 型の二つである。細菌 xylanase は endo 型²⁾であり、糸状菌 xylanase は両者の混合であるといわれるが、この実験からは *A. niger* と *T. viride* 2 の xylanase は endo 型の酵素を含むものと考えられる。^{3),4)}

総 括

1. *A. niger*, *T. viride* 1 および 2 の産生する xylanase 活性は、至適 pH がいずれも 5 前後にあり、pH 安定性も同じく弱酸性から中性附近にあった。至適温度は 50°C 前後で、粉末の熱安定性は *A. niger* のそれが最良であった。水溶液は 40°C 以上では不安定であった。また三酵素とも Ca^{2+} によって活性化され、 Hg^{2+} , Ag^{+} によって強く阻害された。尿素、ラウリル硫酸ナトリウム、KCN により阻害され、グリセリンは影響を与えなかった。基質の分解型式は *A. niger*, *T. viride* 2 の両者とも xylan を at random に水解するものと思われる。

2. *A. niger*, *T. viride* 1 および 2 の glucanase 活性は、至適 pH がいずれも 5~6 にあった。酵素粉末の熱安定性は *A. niger* が最も安定であったが、それらの水溶液は 40°C 以上では失活した。いずれの Glucanase も Ca^{2+} により活性化され、 Hg^{2+} , Ag^{+} により、また尿素、ラウリル硫酸ナトリウム、KCN によって強く阻害された。*A. niger* と *T. viride* の glucanase の基質分解型式は僅かに差がみられ、*A. niger* は β -1, 3-glucan を glucose 単位に水解するものと思われる。

文 献

- 1) N. Nelson: J. Biol. Chem., **153**, 375 (1944)
- 2) B. H. Howard, G. Jones, M. P. Purdom: Biochem. J., **74**, 173 (1960)
- 3) S. Fukui, M. Sato: Bull. Agr. Soc. Japan, **21**, 392 (1957)
- 4) K. Sumizu, M. Yoshikawa, S. Tanaka: J. Biochem., **50**, 538 (1961)

加藤好夫, 杉浦衛, 堀場孝彦, 猪口孝子, 加藤敏子:

制酸剤の制酸力とそのアミラーゼ活性におよぼす影響について

**Yoshio Kato, Mamoru Sugiura, Takahiko Horiba,
Takako Inokuchi and Toshiko Kato.**

Ability of some Antacids and their Effect on Amylase Activity

This study on the antacids has been experimented on the antacid ability and the effect of Co-precipitated compounds and Aluminium silicate etc on amylase activity.

Thus, these Co-precipitated compounds were compared with the orthodox antacids on antacid ability, absorptive ability and effect of these on amylase activity.

In this experiment, it was found that calcium carbonate and Co-precipitated compounds, Appomitten, FMA-11 and Polymigel, had excellent acid-consuming capacity.

The particle size of Glycinal-S, Glycinal-A, Appomitten and FMA-11 were very fine, powder of be-