

- 6) 赤堀四郎, 萩原文二, 池中徳治, 迫田真一, 酵素化学シンポジウム, **8**, 49 (1953)
- 7) R. Bergkuist, *Acta. Chem. Scand.*, **17**, 1541 (1963)
- 8) A. R. Subramanian, G. Kalnitsky, *Biochem.*, **3**, 1861 (1964)
- 9) T. Mizunuma, N. Iguchi, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **22**, 35 (1957)
- 10) K. Hayashi, D. Fukushima, K. Mogi, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **31**, 1171, 1237 (1967)
- 11) A. G. Jönsson, S. M. Martin, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **28**, 734 (1964)
- 12) K. Suminoe, J. Miura, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **31**, 73 (1957)
- 13) K. Yamada, Y. Ota, H. Machida, *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **36**, 860 (1962)

杉浦 衛, 伊藤万蔵: *Aspergillus melleus* の産生するプロティナーゼの
エタノール分画 (酵素剤の研究第44報)¹⁾

Mamoru Sugiura, Manzo Ito: Ethanol Fractionation of Proteinase
from *Aspergillus melleus* (Studies on Enzymes XLIV)¹⁾

(Received October 2, 1969)

Summary

Partial purification of the proteinase from *Aspergillus melleus* was investigated by ethanol fractionation method.

From the data obtained in the proteinase activity, amount of the pigment, absorption ratio at 280 m μ to 260 m μ , difficulty of the fractionated operation etc., it was suggested that the best condition of ethanol fractionation was ethanol concentration 50—70%, at pH 8.0.

¹⁾ 前報において, 著者らは *Aspergillus melleus* によるプロティナーゼの産生条件について検討した。今回は前報¹⁾の検討によって調製されたプロティナーゼ含量の高い麩麴よりプロティナーゼを抽出し, この抽出液を用いプロティナーゼのエタノール分画について検討したので報告する。

実験の部

実験材料および実験方法

酵素液の調製

¹⁾ 前報の検討にもとずき培養条件は 30° で 1 日, 25° で 1 日, 20° で 3 日の 5 日培養とし, 麩培地の水分は 50% とした。酵素の抽出は水道水でおこない, 抽出液の温度が 20° 以上にならないように冷却し, 累浸抽出をおこなった。

酵素活性測定法

¹⁾ 前報に準じておこなった。

蛋白, 色素, 水分の定量

¹⁾ 前報に準じておこなった。

抽出液中の可溶性固形分の定量

抽出液中の固形分の定量は島津製 Abbe 型屈折計を用い, 20° の屈折率を測定し Brix に換算した。

1) 第43報; 杉浦衛, 伊藤万蔵, 岐阜薬大紀要 **19** 29 (1969)

実験結果と考察

プロティナーゼの沈降に要するアルコールの濃度について

プロティナーゼ活性 2×10^{-2} PU/ml, pH 5.8, Brix 5.0 の酵素液 100 ml を 500 ml 容のビーカーにとり, 5° に冷却し, これに攪拌しながらゆっくりアルコールを 5% 間隔で種々の濃度になるように加え, 生じた沈でんを遠心分離し, 沈でん物のプロティナーゼ活性を測定した.

その結果, Fig. 1 に示すように, プロティナーゼはアルコールの炭素数の増加にしたがい低濃度のアルコール濃度で沈でんするようになった. また, 沈でん物の状態はメタノールの場合にはきわめて軽質で, エタノール, イソプロパノール, プロパノールと炭素数の増加にしたがい重質となった.

エタノール分画によるプロティナーゼの精製

酵素蛋白の精製には最も一般的なエタノールを用いることにし, 不純物としての色素および蛋白を除去するにはエタノール濃度の範囲をどのようにすべきかを検討した. 酵素液 (プロティナーゼ活性 2.5×10^{-2} PU/ml, pH 6.0, Brix 5.0) を 1000 ml 容ビーカーに 200 ml ずつ分注し, 5° に冷却後, これに攪拌しながらエタノールを 5—10% 間隔で 60% (v/v) までの各種濃度になるように 10 分間に加え, 酵素液の温度が 5° 以上にならないように冷却し 30 分攪拌を継続した. このエタノールを加えた酵素液を 10000 rpm, 10 分間遠心分離し (以上の操作をエタノール処理と仮称する), 上清にさらにエタノールを加えてエタノール濃度が 70% (v/v) になるように調製後, 30 分間攪拌を継続した. ここに生じた沈でん (分画物) はエタノールでよく洗浄後, 濾過, 真空乾燥した.

エタノール分画物のプロティナーゼ活性は, Fig. 2 に示すように, 0—40% までの処理濃度ではほとんど変化がなく, 45—60% までの間で急激に上昇した. また, プロティナーゼ活性の収率は 0—50% までの処理濃度ではほ

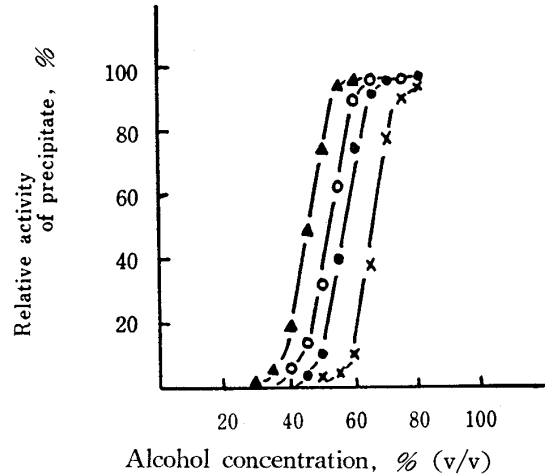


Fig. 1 Precipitating Curves of *Aspergillus* Proteinase by Cold Various Alcohols
 —x— methanol, —●— ethanol,
 —○— isopropanol, —▲— propanol.

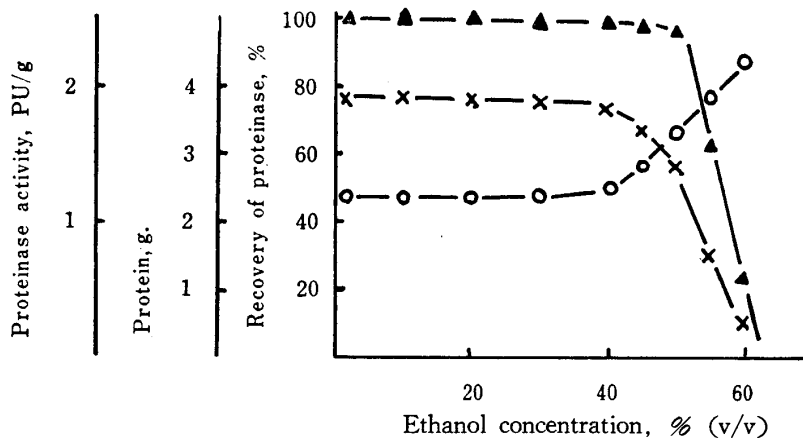


Fig. 2 Relation between Concentration of Ethanol Treatment and Proteinase Activity of Precipitate
 —▲— recovery, —x— protein in precipitate,
 —○— proteinase activity of precipitate.

とんど変化はなく100%であり, 処理濃度が60%になると活性収率は急に低下した. そしてプロティナーゼ活性収率は分画物の蛋白量とほぼ同じ傾向を示した.

エタノール処理濃度と分画物の色素量との関係は, Fig. 3に示すように, 処理濃度の上昇にともない分画物の色素収率は漸次低下し, エタノール濃度が40%を越すと急激に低下した.

これは不純物としての色素が蛋白に吸着されて沈でんするためと考えられ, 蛋白の沈でんし始めるエタノール濃度より色素の収率は低下する傾向を示した.

一方, 分画物の重量に対する色素量(CV)は処理濃度の40%までは漸次低下するが, この濃度を越えると上昇傾向に変化した.

酵素蛋白の精製のバロメーターともいえる280 m μ /260 m μ 吸光比は, Fig. 4に示すように, 処理濃度の40%ぐらいまではほとんど変化はないが, これを越すと急激に上昇した. このことは, プロティナーゼの沈降するエタノール濃度において酵素蛋白の精製が著しいことを示している.

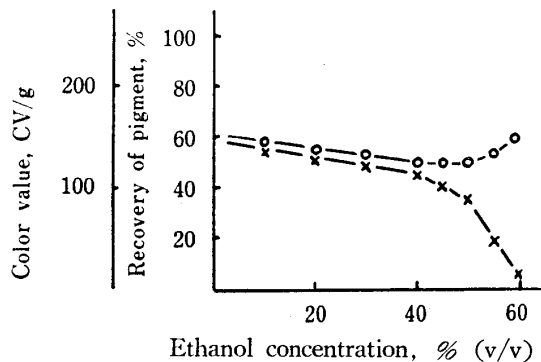


Fig. 3 Relation between Concentration of Ethanol Treatment and Color Value of Precipitate
—○— color value of precipitate
—×— recovery of pigment

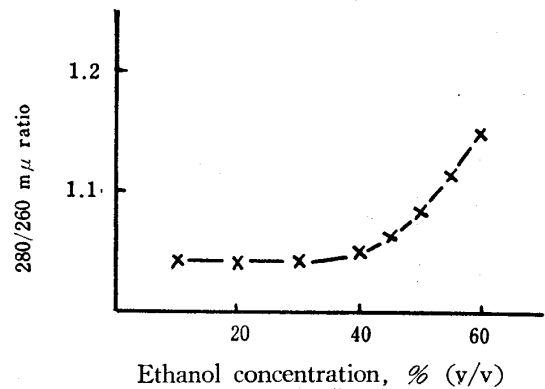


Fig. 4 Relation between Concentration of Ethanol Treatment and 280/260 m μ Absorption Ratio of Precipitate

以上の結果より, エタノール分画の濃度範囲はせまいほど, すなわち処理濃度が高いほど酵素の精製率は高いものと考えられるが, 処理濃度を高くするとプロティナーゼの活性収率が低下しこのましくない.

一方, エタノール分画における操作面より観察すると, エタノール処理した酵素液は処理濃度が高くなるほど澄明になり, このましいが, エタノール濃度を70%にしたときの酵素の沈降状態は処理濃度の上昇にともない悪くなる傾向, すなわちアメ化傾向を示した. そしてエタノール処理酵素液が澄明で, しかもエタノール濃度を70%にしたときの酵素の沈降状態がほぼ良好な処理濃度は50%付近であり, 処理濃度が55%を越えると酵素の沈降状態が急に悪化した.

真空乾燥して得られた粗酵素の状態はエタノール処理濃度が高くなればなるほど色が強くなり粒度も粗くなる傾向を示した.

エタノール処理をおこなわない場合の粗酵素は黄白色の細かい粉末であり, 処理濃度が40%付近になると黄褐色になり, 50%を越すと褐色が著しくなり, 粒度も粗く重質の粗酵素が得られるようになった. そして処理濃度が50%までの分画物は真空乾燥において, その品質が低下する(部分的にアメ化しプロティナーゼ活性が低下すること)ことはなかった.

このようにエタノール分画の操作面より観察しても、分画物重量当りのプロティナーゼ活性および色素量、活性収率、 $280\text{ m}\mu/260\text{ m}\mu$ 吸光比などから推察しても、エタノール処理濃度は50%付近が良好と考えられる。

エタノール分画における酵素液の pH の影響

固形分濃度を Brix 10 に調製した酵素液を 1N または 0.1N の NaOH または HCl にて pH を 3.5 から 8.5 まで 0.5 間隔に調整した。この pH 調整酵素液の固形分濃度を Brix 5.0 に希釈後、 5° に冷却し、前記と同様エタノールを加えて 50—70% (v/v) の沈でん分画をとり真空乾燥した。そして粗酵素のプロティナーゼ活性および蛋白量を測定した。

その結果 Fig. 5 のようになり、エタノール分画時の酵素液の pH を高くしても、低くしても粗酵素のプロティナーゼ活性は上昇した。

一方、蛋白は pH 6 付近において最もよく沈降した。

次に、エタノール分画における酵素液の pH と分画物中の色素量の関係を検討した。

その結果、Fig. 6 に示すように、分画物の色素含量は pH 5 付近が最も少なく、pH の上昇にともない多くなった。しかし、分画物の色素収率は蛋白の最もよく沈でんする pH 6 付近が最高で、酵素液の pH が 6 よりはなれるにしたがい色素収率は低下した。

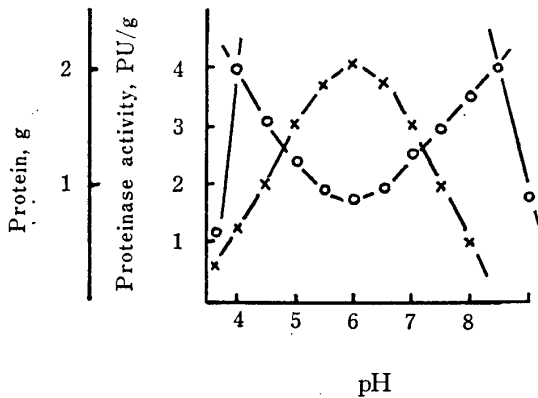


Fig. 5 pH-Precipitating Curves of *Aspergillus* Proteinase
—x— protein in precipitate
—o— protease activity of precipitate

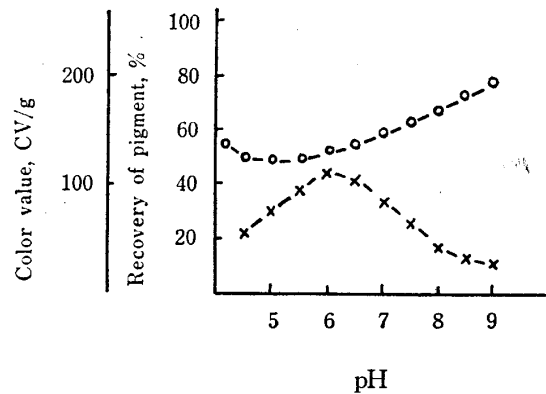


Fig. 6 pH-Precipitating Curves of Pigment in Enzyme Solution
—o— color value of precipitate
—x— recovery of pigment

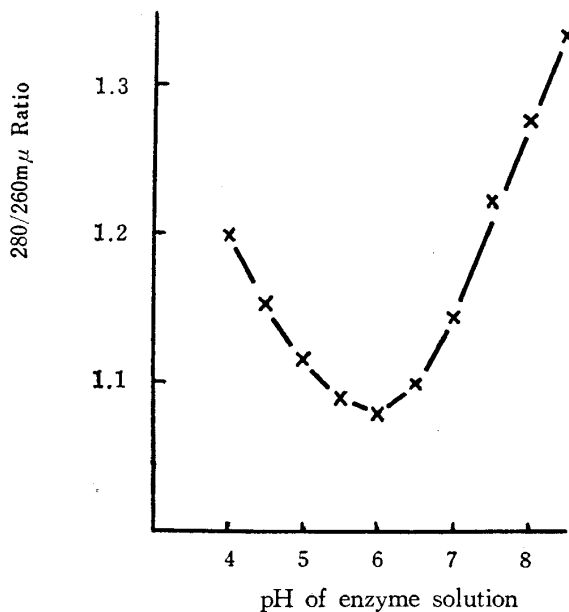


Fig. 7 Relation between pH of Enzyme Solution and $280/260\text{ m}\mu$ Absorption Ratio of Precipitate

エタノール分画における酵素液の pH と酵素蛋白の精製の程度を示す 280 m μ /260 m μ 吸光比は Fig. 7 に示す関係にあり, 蛋白の最もよく沈でんする pH 6 ではその比が最も低く, 酵素液の pH が 6 よりはなれるにしたがい高くなった。

一方, エタノール分画における酵素液の pH の影響を操作面から観察すると, エタノール処理における濾過速度は酵素液の pH が低くなるほど速く, pH が高くなるにしたがい細かい沈でんが生じ濾過速度は急激に遅くなった。エタノール処理酵素液の清澄度は濾過の場合には, 濾過速度とは逆に沈降 pH が高いほど澄明な酵素液が得られた。

エタノール濃度を 70% にしたときの沈でん蛋白量は pH 6 付近がもっとも多く, 酵素液の pH が 6 を離れるにしたがい漸次少なくなった。そしてこのときの酵素の沈でん時間は pH 4 の酵素液の場合約 30 分, pH 6 の酵素液の場合約 15 分, pH 8 の酵素液の場合約 35 分であり, pH 9 の酵素液では 45 分以上必要であった。しかも酵素液の pH が低い場合や高い場合には沈でんと上清の境界面が不明瞭で酵素の沈降状態は良好とはいえなかった。

真空乾燥して得た粗酵素は, pH 6 付近でエタノール分画された場合には比較的軽い, 粒度の小さい均一な粉末状態であり, 色も黄白色であるが, pH が 6 より離れるにしたがい粒度は粗く, 重質で, 色は黒褐色になる傾向を示した。とくに粗酵素の着色の程度は酸性よりアルカリ性側でエタノール分画するときに著しく強くなった。pH 4 および pH 9 の酵素液ではエタノール分画時または真空乾燥時におけるアメ化傾向が著しく, 良好な粗酵素を得ることは困難と考えられるが, pH 8 におけるエタノール分画ではほぼ良好な粗酵素が得られ, 分画物の重量に対するプロティナーゼ活性および色素量, プロティナーゼ活性収率, 280 m μ /260 m μ 吸光比などにより, pH 8 でエタノール分画することがこのましいものと考えられる。

以上, *Aspergillus melleus* の産生するプロティナーゼのエタノール分画について検討した。このように粗酵素を得る段階で pH 処理とエタノール分画を併用することにより, 単なるエタノール沈でんのみに比して約 3 倍の比活性の上昇をみることができ, この方法はプロティナーゼの精製結晶化原料としての粗酵素を得るのに最も適した方法と思われる。

要 約

Aspergillus melleus の産生するプロティナーゼの部分精製をエタノール分画法によって検討した。その結果, エタノール分画の最適条件はプロティナーゼ活性, 色素量, 280/260 m μ 吸光比, 分画操作における困難性等より推察し, pH 8, エタノール濃度 50—70% であった。

杉浦 衛, 伊藤万蔵: *Aspergillus melleus* の産生するプロティナーゼの
イオン交換樹脂による脱色 (酵素剤の研究第45報)¹⁾

Mamoru Sugiura, Manzo Ito: Decolorization of Proteinase
from *Aspergillus melleus* by Ion Exchange Resin
(Studies on Enzymes XLV)¹⁾

(Received October 3, 1969)

Summary

The decolorization of crude proteinase from *Aspergillus melleus*, was investigated by anion-exchange-resin

1) 第44報: 杉浦衛, 伊藤万蔵, 岐阜薬大紀要 19 37 (1969)