

## $\kappa$ -カラゲニンを用いたエンド型イヌリナーゼの 固定化と固定化酵素の性質

小野寺秀一\*・塩見徳夫\*

### Immobilization of *endo*-Type Inulinase with $\kappa$ -Carrageenin and Characterization of the Immobilized Enzyme

Shuichi ONODERA\* and Norio SHIOMI\*

(May, 1989)

#### 緒 言

イヌリンは、キクイモ、チコリなどの植物の塊茎あるいは根茎に貯蔵炭水化物として多量に存在しており、有効利用が期待されている未利用資源の一つである。近年、イヌリンの部分加水分解産物であるイヌロオリゴ糖が、難消化性糖としてダイエタリーファイバー様の生理作用を有していることが明らかにされ<sup>1)</sup>、また食品改良剤、安定化剤としても利用し得ることからイヌリンの有効利用に期待がもたれている。筆者ら<sup>2)</sup>は、すでにペニシリウム属の一菌株が、イヌリンからイヌロオリゴ糖を分解生成するエンド型イヌリナーゼ [EC 3.2.1.7] を大量に生産することを見出し、このエンド型イヌリナーゼを高度に精製して、その基質特異性を詳細に検討した。その結果、酵素の活性中心が少なくともフルクトース7個分を結合するサブサイト構造を有していると推定され得ることを明らかにした。

これまで、イヌリナーゼの固定化に関していくつかの報告<sup>2,3,5,7,8)</sup> がなされているものの、オリゴ糖の調製を目的とした報告はほとんどない。本研究は、イヌリンの有効利用法の一つとして、エンド型イヌリナーゼを不溶性の担体に固定化し、その固定化酵素を用いてイヌリンからイヌロオリゴ糖を連続的に生産することを目的としており、その基礎研究として、本酵素の固定化を行い、固定化酵素の性質について検討を行った。

#### 材料と方法

##### 1. イヌリンの調製

本実験に使用したイヌリンは、キクイモの塊茎より抽

出精製して使用した。すなわち、キクイモ塊茎(10 kg)を乾燥・粉碎後、熱70% エタノールを用いて還流加熱下で可溶性少糖類の抽出を数回繰り返して低分子糖を除去した。残渣に蒸留水 4.5 l を加えてイヌリンを熱水抽出し、炭酸カルシウムを加えて pH 8 とした。沈澱を除去したのちシュウ酸を加えて pH 7 とし、60~70°C で活性炭を用いて脱色した。3°C で冷却すると、イヌリンは細かな球晶として析出した。熱水抽出残渣については、さらに熱水でイヌリンを抽出した。イヌリンの結晶は、アセトン中で一夜静置後ろ取り、乾燥させた。この粗結晶について、再結晶を数回繰り返して精製イヌリン(約 100g)を得た<sup>1)</sup>。全ヘキソース量の定量は、アンスロン—硫酸法<sup>9)</sup>で行った。

##### 2. 供試菌の培養

*Penicillium* 属菌の培養は既報<sup>12)</sup>の方法にしたがって行った。すなわち、イヌリン 2%、マルトース 0.5%、NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5%、MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.05%、Tween 80 0.02% を含む培地を用いて 28°C で 2 日間振とう培養した。この培養液(125 ml)を同培地 2.5 l に接種し、ジャーフェーマンターを用いて 28°C で 3 日間好氣的に培養した。遠心分離して得られた上清液を粗酵素液とした。

##### 3. エンド型イヌリナーゼの精製

粗酵素液(2.5 l)を Minitan (Millipore Ltd.) を用いた限外ろ過により濃縮したのち、イオン交換、疎水性、ゲルろ過の各カラムクロマトグラフィー操作を行って、本酵素を電気泳動的に均一に精製した。

##### 4. 酵素活性の測定

生成した還元糖の定量は、Somogyi-Nelson 法<sup>10,15,16)</sup>

\* 食品科学科，食品栄養化学研究室

Department of Food Science (Food and Nutrition Chemistry), Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan.

を用いて行い、精製過程においては、0.5% イヌリン 0.5 ml, 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.1) 0.45 ml, 酵素溶液 0.05 ml を標準反応液として、37°C で1分間に  $1 \mu\text{mol}$  の還元糖を生成する酵素量を1ユニットと定めた。また、固定化酵素の場合、上記の反応液組成に準じ振とうさせて反応を行った。

### 5. タンパク量の測定

タンパク量は、280 nm における比吸光係数を 14.4<sup>12)</sup> として算出した。

### 6. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ディスクゲル電気泳動は、Reisfeld ら<sup>13)</sup> の方法に準じた。分離ゲル濃度は 7.5% とし、Tris-glycine 緩衝液 (pH 8.3) 系を用いた。プロモフェノールブルー (BPB) をマーカーとして、カラムあたり 1 mA の定電流、4°C で泳動を行い、クマシーブリリアントブルー (CBB) で染色した。

### 7. エンド型イヌリナーゼの固定化

本酵素の固定化は、 $\kappa$ -カラゲニンを用いて包括法で行った。 $\kappa$ -カラゲニンは、低温下、あるいはカリウムイオンやカルシウムイオンなどの存在下でゲル化する<sup>17)</sup>。本研究では、 $\kappa$ -カラゲニンを加熱溶解後、酵素溶液と混合して低温下でゲル化させたのち、ゲル強度を増加させるため 0.3 M KCl で処理した。その後、3 mm 角に成型し固定化酵素として使用した。

### 8. 固定化酵素を用いたイヌリンの加水分解

イヌリンの加水分解は、上記の固定化酵素を含む反応液を、37°C で振とうして反応させた。所定時間反応ののち、反応液 0.1 ml を取り、Somogyi-Nelson 法で遊離還元糖量を定量した。

## 結果と考察

### 1. エンド型イヌリナーゼの精製

#### a) DEAE-Sepharose CL-6 B カラムクロマトグラフィー

ペニシリウム属菌を好氣的に培養して得られた培養ろ液 (2.5 l, 18.3 g of protein, 6,860 U for inulin) を、限外ろ過法により 500 ml まで濃縮し、0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に対し一夜透析したのち、同緩衝液で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6 B カラムに添加し、0~0.5 M NaCl 濃度勾配により溶出させた (Fig. 1)。

#### b) Toyopearl HW-65 F カラムクロマトグラフィー

上記のカラム操作で回収された活性画分 (297 mg of protein, 4,422 U for inulin) を  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  40% 飽和とした 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に対して一夜透析し、同緩衝液で平衡化した Toyopearl HW-65 F カラムに

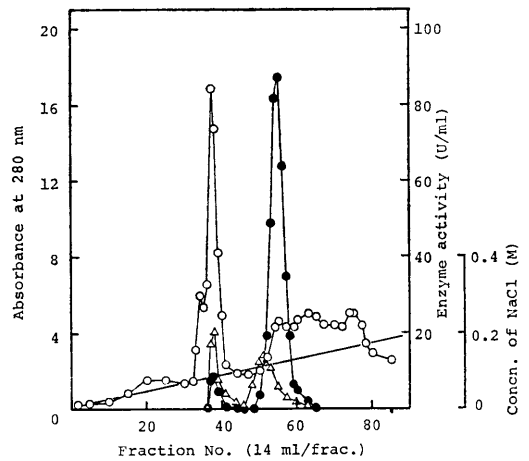


Fig. 1. DEAE-Sepharose CL-6 B column chromatography.

Enzyme solution, 1,000 ml; column size,  $3.0 \times 30$  cm; equilibration, 0.01 M sodium acetate buffer (pH 5.0); gradient elution, 0~0.5 M NaCl in the same buffer; flow rate, 120 ml/hr.

○, absorbance at 280 nm; ●, inulin as a substrate; △, sucrose as a substrate; —, concn. of NaCl.

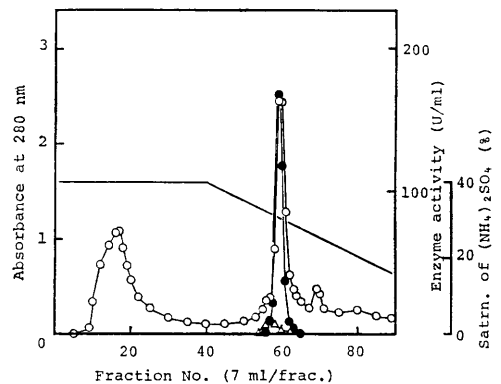


Fig. 2. Toyopearl HW-65 F column chromatography.

Enzyme solution, 50 ml; column size,  $1.6 \times 30$  cm; equilibration, 0.1 M sodium acetate buffer saturated with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  to 40% (pH 5.0); gradient elution, 40~0%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in the same buffer; flow rate, 7.5 ml/hr.

○, absorbance at 280 nm; ●, inulin as a substrate; △, sucrose as a substrate; —, satrn. of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

添加し、40~0% 飽和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  の濃度勾配により溶出させた (Fig. 2)。

#### c) Sepharose CL-6 B カラムクロマトグラフィー

上記のカラム操作で回収された活性画分 (44.7 mg of

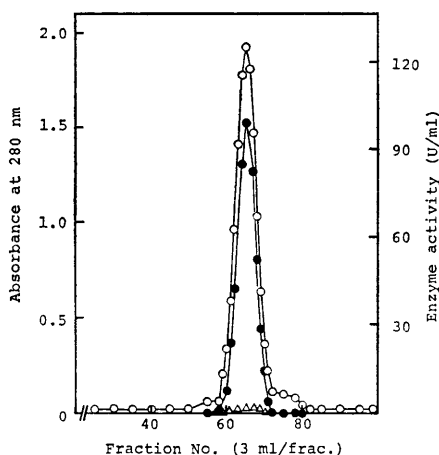


Fig. 3. Sepharose CL-6 B column chromatography.

Enzyme solution, 3 ml; column size, 2.5×67 cm; equilibration and elution, 0.05 M sodium acetate buffer containing 0.1 M NaCl and 2 mM 2-mercaptoethanol (pH 5.0); flow rate, 18 ml/hr.

○, absorbance at 280 nm; ●, inulin as a substrate; △, sucrose as a substrate.

Table 1. Summary of purification procedure of *endo*-type inulinase

	Total protein (mg)	Total activity for inulin (units)	Specific activity (units/mg)		I/S	Purification (-fold)	Yield (%)
			for inulin	for sucrose			
Filtrate	18,300 <sup>a</sup>	6,860	0.37	0.19	1.9	1	100
DEAE-Sepharose CL-6B	297 <sup>a</sup>	4,422	14.9	1.45	10.3	40	64.5
Toyopearily HW-65	44.7 <sup>a</sup>	2,254	50.4	1.52	33.2	136	32.9
Sepharose CL-6 B	21.6 <sup>b</sup>	1,552	71.9	0.54	133	194	22.6

I/S, the ratio of specific activity for inulin to that for sucrose.

a, These values were calculated under the assumption that  $E_{1cm}^{1\%}$  at 280 nm was 10.

b, The value was calculated on the basis that  $E_{1cm}^{1\%}$  at 280 nm was 14.4.

protein, 2,254 U for inulin) を 0.1 M NaCl および 2 mM 2-メルカプトエタノールを含む 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した Sepharose CL-6 B カラムに添加し、流速 15 ml/hr で溶出させた (Fig. 3)。この段階で、エンド型イヌリナーゼは電気泳動的に均一に精製された。精製標品の比活性は、イヌリンを基質として 71.9 U/mg であった。以上の精製過程を Table 1 にまとめた。

## 2. 固定化イヌリナーゼの性質

### a) 固定化酵素の調製

κ-カラゲニン 0.34 g を 0.1 M NaCl を含む 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 9 ml に懸濁し、約 70°C で溶解したのち約 50°C まで冷却した。あらかじめ 37°C に保温しておいた酵素溶液 (3 ml, 5.8 mg, 417 U) を κ-カラゲニン溶液に手早く混合し、4°C で 30 分間放置後 0.3 M KCl 溶液に浸して硬化処理を行った。このゲルを 3 mm 角に切断し、固定化酵素 ( $1.3 \times 10^{-2}$  mg of protein/cube) とした。固定化酵素は、実験に用いるまで 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中、4°C で保存した。

### b) 固定化酵素の活性

前述の方法で 30 分間反応させ、イヌリン分解活性を調べた。その結果、酵素 1 mg あたりの活性は 8.4 U となり、固定化前の 11.7% に低下した。これは、固定化過程における本酵素の失活が主要な原因と考えられるが、ゲルを再溶解したのち活性を測定したところ、固定化前の約 40% まで活性が回復することから、ゲルマトリックスにも活性低下の原因があるものと考えられる。

### c) イヌリナーゼ活性に対する反応時間の影響

酵素反応は標準反応液に準じ、反応時間を変化させて行った。所定時間反応後、反応液 0.1 ml を採取し、遊離還元糖を定量した。その結果、30 分間反応までは反応時間を長くすると単位時間当たりの活性が高くなり、30 分反応で最大となり 60 分反応までほとんど変わらなかった (Fig. 4)。これは、基質および生成物がゲル通過する際に、ゲルマトリックスが物理的な障害となり拡散に時間を要することが原因であると考えられる。

### d) 至適 pH

標準反応条件下、緩衝液のみを Britton-Robinson の広域緩衝液<sup>4)</sup> に変更し、至適 pH を調べた。Fig. 5 に示

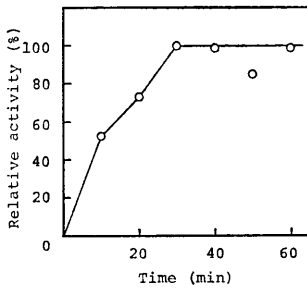


Fig. 4. Effect of reaction time on hydrolysis of inulin. These values were relative to the maximum value.

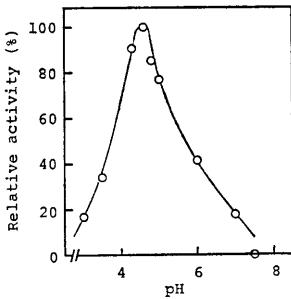


Fig. 5. pH-Activity curve of immobilized inulinase. Details were described in the text.

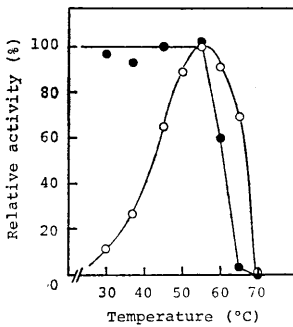


Fig. 6. Temperature-activity and -stability curves of immobilized inulinase.

Details were described in the text.

○, temperature-activity curve;

●, temperature-stability curve.

したように、pH 4.6 付近で最も活性が高いことがわかった。遊離酵素で同様の実験を行って得られた至適 pH は 5.1 付近であるので、固定化により至適 pH が 0.5 単位ほど酸性側にシフトすることが明らかになった。κ-カラゲニンは、構成糖であるガラクトースの C<sub>4</sub> あるいは C<sub>6</sub> 位

Table 2. Some properties of immobilized inulinase compared with free enzyme

	Immobilized	Free
Optimum pH	4.6	5.1
Stable pH	—	5.0-7.5
Optimum temp. (°C)	55	—
Stable temp. (°C)	≤55	≤55

の約 27% が硫酸エステル化されて負に帯電しているため<sup>6)</sup>、本酵素の活性解離基と推定されるカルボキシル基<sup>11)</sup>の解離に影響し、至適 pH が酸性側にシフトしたものと考えられる。

#### e) 至適温度

標準反応条件に準じ、反応温度を 30°C から 75°C まで変化させて活性を測定した。その結果、55°C 付近で最も高い活性を示し、60°C 以上の温度では急激に活性が低下した (Fig. 6)。

#### f) 温度安定性

本酵素を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.6) 中、30°C から 75°C で 30 分間処理し、各処理酵素について標準反応条件に準じて反応させ、残存活性を測定し、未処理酵素の活性を 100% として示した。Fig. 6 に示したように、本酵素は 55°C まで安定であった。この結果は、遊離酵素<sup>12)</sup>の場合と全く同じであった。以上の結果を遊離酵素の一般性質とともに Table 2 にまとめた。

## 要 約

イヌリンからイヌロオリゴ糖を効率良く生産するために、ペニシリウム属菌よりエンド型イヌリナーゼを高度に精製し、それを κ-カラゲニンを用いて固定化した。固定化酵素を用いたイヌリン分解反応の場合、反応時間が影響を及ぼし、単位時間あたりの活性は、30~60 分間反応で最も高かった。固定化標品の至適 pH は、4.6 付近と求められ、固定化前に比べて 0.5 単位酸性側にシフトすることがわかった。至適温度は、30 分反応で 55°C と求められ、60°C 以上では急激に失活した。また、30 分処理の場合、55°C まで安定であった。

今回の結果から固定化酵素は、遊離酵素とほぼ同一の一般性質を保っており、固定化状態でもイヌリンの加水分解が可能であることが確認された。

なお、本研究は、昭和 63 年度酪農育英会研究奨励金の援助を受けた。

## 参 考 文 献

1. Aspinall, G. O. and E. L. Hirst 1965: In Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. V. (ed. by R. L. Whistler), p. 157, Academic Press, New York.
2. Bajpai, P. and A. Margaritis 1985: Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* cell with inulinase in agar. J. Gen. Appl. Microbiol., **31**: 297-303.
3. Bajpai, P. and A. Margaritis 1987: Characterization of molecular-sieve-bound inulinase. J. Ferment. Technol., **65**: 239-242.
4. Britton, H. T. S. and R. A. Robinson, 1931: The use of the antimony-antimonous oxide electrode in the determination of the concentration of hydrogen ions and potentiometric titration. J. Chem. Soc., **1931**: 458.
5. Guiraud, J. P., S. Demeulle and P. Galzy, 1981: Inulin hydrolysis by the *Debaryomyces phaffii* inulinase immobilized on DEAE-cellulose. Biotechnol. Lett., **3**: 683.
6. 井川憲明 1975: 多糖類. 食品酵素高分子概論 (上) (長谷川忠夫, 相澤孝亮, 片岡栄子監修), pp. 163-165, 地人書館, 東京.
7. Kim, W. Y., S. M. Byun and B. H. Nahm 1979: Production of fructose from Jerusalem artichoke tubers by enzymatic hydrolysis. Kor. J. Food Sci. Technol., **11**: 283-290.
8. Kim, W. Y., S. M. Byun and T. B. Uhm 1982: Hydrolysis of inulin from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on aminoethylcellulose. Enz. Microb. Technol., **4**: 239-244.
9. Morris, D. L. 1948: Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. Science, **107**: 254-255.
10. Nelson, N. 1944: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., **153**: 375-380.
11. 小野寺秀一, 塩見徳夫 1988: エンド型イヌリナーゼの活性解離基の推定. 農化, **62**: 532.
12. Onodera, S. and N. Shiomi 1988: Purification and substrate specificity of *endo*-type inulinase from *Penicillium purpurogenum*. Agric. Biol. Chem., **52**: 2569-2576.
13. Reisfeld, R. A., U. J. Lewis and D. E. Williams 1962: Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature, **195**: 281-283.
14. 塩見徳夫, 牧田康志, 小野寺秀一, 桐山修八 1987: イスロオリゴ糖の栄養特異性. 日農化東北・北海道支部昭和年62度秋期合同学術講演会要旨集, p. 5.
15. Somogyi, M. 1945: Determination of blood sugar. J. Biol. Chem., **169**: 69-73.
16. Somogyi, M. 1952: Note on sugar determination. J. Biol. Chem., **195**: 19-23.
17. Tosa, T., T. Sato, T. Mori, K. Yamamoto, I. Takata, Y. Nishida and I. Chibata 1979: Immobilization of enzyme and microbial cells using carrageenan as matrix. Biotechnol. Bioeng., **21**: 1697-1709.

## Summary

Inulinase was purified from a culture broth of *Penicillium* sp., and immobilized with  $\kappa$ -carrageenin. The enzymatic properties of the immobilized inulinase were investigated and compared with those of free enzymes. The enzymatic activity was reduced by the immobilization procedure, and the yield of activity was 11.7% of free enzyme. The activity of the immobilized enzyme was affected by the gel, and the activity per min was increased to that at 30 min. The optimum pH was shifted from 5.1 to 4.6. The optimum temperature was 55°C. The immobilized enzyme was stable up to 55°C.