

〔生物工学会誌 第73巻 第5号 405-408. 1995〕

ノ ー ト

粘度低下法を用いたグアガム分解酵素活性の測定

吉田 清司^{1*}・内田 有恒²・左子 芳彦²・石田祐三郎²銚鴻池組技術研究所,¹ 京都大学農学部水産微生物学研究室²¹〒554 大阪市此花区伝法4-3-55²〒606 京都市左京区北白川追分町

(平成7年3月22日受付 平成7年7月3日受理)

Measurement of Guar Gum-Degrading Enzyme Activity by Decreasing Viscosity —Note—

SEIJI YOSHIDA,^{1*} ARITSUNE UCHIDA,² YOSHIHIKO SAKO,² and YUZABURO ISHIDA² (*Research Institute of Technology, Konoike Construction Co., Ltd., 4-3-55 Denpo, Konohana-ku, Osaka 554¹, Laboratory of Microbiology, Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Oiwake-cho, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606²*) *Seibutsu-kogaku* 73: 405-408, 1995.

An easy and accurate assay method for measuring guar gum (GG)-degrading enzyme activity based on the relationship between the enzyme activity and the rate of decreasing viscosity (RDV) of the mixture of GG solution and the enzyme was developed. One unit of GG-degrading enzyme activity was defined as an amount of the enzyme which reduced the viscosity into a half after 10 min following the start of the enzyme reaction in a mixture of 0.5 ml of a solution of the enzyme and 10 ml of a 0.2% GG solution. The enzyme activity was determined by measuring the viscosity after 60 min following the start of the enzyme reaction. In this case, the enzyme activity (U_{60}) was calculated as follows: $U_{60} = 10^{(0.023R - 1.93)}$, where R is RDV and $30 < R < 72$.

[**Key words:** guar gum, galactomannan, guar gum-degrading enzyme, measurement of enzyme activity, viscosity]

水溶性の高分子多糖を基質とし、酵素による基質の分解活性を評価する場合、酵素作用によって生成する還元糖(糖化力)を測定する方法^{1, 2)}や基質の分子鎖切断による水溶液の粘度低下(液化力)を測定する方法^{2, 3)}などが用いられている。糖化力に基づく生成還元糖の測定手法⁴⁾は糖の分析技術としてすでに定着している。

一方、粘度低下力に基づく酵素活性の測定に関してはリゾザイムによるグリコールキチンの分解⁵⁾、プロティナーゼによるゼラチンの分解⁶⁾、ポバール分解菌によるポバールの分解例⁷⁾などが報告されている。これらの報告は、いずれも酵素反応液の粘度低下と酵素

反応時間から酵素活性を求めているが、これらの測定手法に従って活性を求めようとすれば、測定試料ごとに粘度の低下を経時的に測定しなければならず、試料数が多くなると、必ずしも便利な方法とは言えない。

筆者らは先に、ガラクトースとマンノースからなるヘミセルロースの一種である水溶性植物多糖のグアガム⁸⁻¹⁰⁾を分解する細菌 *Bacillus circulans* K-1 株¹¹⁾を分離し、本菌がグアガム分解酵素を菌体外に分泌することを報告した。¹²⁾本報はグアガム分解酵素活性が粘度低下法から簡便に求められないかどうかについて検討されたものである。

基質水溶液の調製 粉末グアガム(三晶銹製 Meyproguar G200/50, 含水率10%) 2.2 g を 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 1 l に添加し、24時間スターラで

* 連絡先, Corresponding author.

攪拌溶解した後、夾雑物を除去するために 8,000 rpm, 30分間の遠心分離を行い、上清を 120°C, 10分間オートクレーブした。

酵素液の調製 基質を含む液体合成培地 [K_2HPO_4 3 g, KH_2PO_4 0.3 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 0.1 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02 g, グアガム 2.2 g, 蒸留水 1 l] に *B. circulans* K-1 株を接種し 30°C で 24 時間振とう培養した後、この培養液を 8,000 rpm, 10 分間遠心分離した。遠心後、上清に含まれる酵素タンパク質を 80% 硫酸飽和で塩析し 15,000 rpm, 30 分間遠心分離して沈殿を得た。この沈殿を Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 5 ml に溶解し、これを同緩衝液中で分画分子量 10,000 の透析膜によって 24 時間透析を行ったものを粗酵素液として使用した。酵素濃度は粗酵素液の濃度を 1 とする相対濃度で表した。

粘度の測定 試料液 5 ml をオストワルド粘度計 (水 5 ml の流下時間が 59 秒) に入れ、この液が 30°C のもとで粘度計の標線間を流下するのに要する時間で示した。

測定手順 試験管に分取した基質水溶液 10 ml に酵素液 0.5 ml を添加し、ただちに数秒間チューブミキサーで攪拌を行い、30°C で所定時間反応させた。その後反応液を 100°C で 15 分間加熱し、酵素反応を停止させ、再び 30°C で粘度を測定した。酵素反応による水溶液粘度の低下は粘度低下率 (RDV%) で表し、試料の初期粘度を η_0 、酵素反応後の粘度を η 、水の粘度を η_w として、 $RDV = (\eta_0 - \eta) / (\eta_0 - \eta_w) \times 100$ で表した。

酵素活性 酵素反応によって低下する基質水溶液の粘度を測定し、10 分間に一定の粘度低下率を引き起こす酵素活性を 1 単位 (U) として定義した。ここで、一定の粘度低下率と表現したのは、一定の粘度低下率として取り得る値は種々考えられるからである。

結果および考察 酵素活性が粘度低下率を指標として表現できるかどうか、酵素濃度、粘度低下率および時間をパラメーターにして、これら相互間の関係について検討した。グアガム基質水溶液の粘度が酵素作用によってどのように変化するのか、調製した酵素原液を 1 として適当に希釈した酵素量を 0.2% GG 水溶液に添加し、経時的に粘度を測定した。この結果を粘度低下率と時間との関係として求めると、Fig. 1 に示す曲線が得られた。次に、種々の酵素量における反応液粘度の低下から定義に基づく酵素活性を求め、酵素量との関係について調べた。定義の中の一定の粘度低

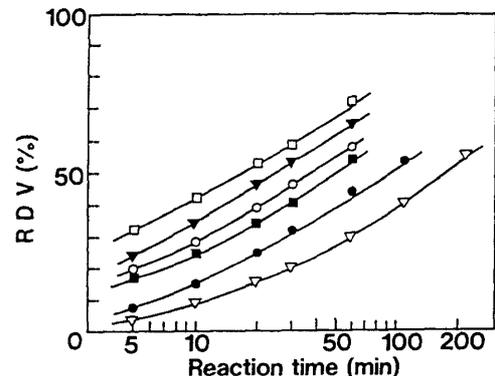


Fig. 1. Time courses of RDV for various enzyme concentrations. The mixtures of 0.5 ml of the enzyme solution, 10 ml of a 0.2% solution of GG dissolved in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 were incubated at 30°C. The enzyme concentrations of the mixtures, adjusted by dilution with water, were expressed as relative values of the enzyme concentration of the original crude enzyme solution taken as 1. Enzyme concentrations: ∇ , 0.005; \bullet , 0.01; \blacksquare , 0.018; \circ , 0.023; \blacktriangledown , 0.033; \square , 0.05.

下率としては任意の値を選ぶことができるが、本実験では反応液粘度が粘度低下率として 30, 40 および 50% に達するのに要する時間から酵素活性を求めた。得られた酵素活性を酵素量に対して整理すると Table 1 に示す結果が得られた。また、Table には酵素活性と酵素量との関係が対比しやすいように、得られた酵素活性を酵素量 0.005 の活性値に対する相対活性として、さらに酵素量を酵素量 0.005 に対する相対酵素量とし

Table 1. Relationship between relative enzyme concentration and enzyme activity on 30, 40 and 50% of RDV for a reaction time of 10 min.

Enzyme conc.	RDV for a reaction time of 10 min		
	30%	40%	50%
0.005 (1.0)	0.17 (1.0)	0.095 (1.0)	0.058 (1.0)
0.01 (2.0)	0.36 (2.1)	0.20 (2.1)	0.12 (2.1)
0.018 (3.6)	0.67 (3.9)	0.36 (3.8)	0.21 (3.6)
0.023 (4.6)	0.91 (5.3)	0.46 (4.8)	0.27 (4.6)
0.033 (6.6)	1.35 (7.9)	0.71 (7.5)	0.38 (6.7)
0.05 (10)	2.17 (13)	1.14 (12)	0.63 (11)

One unit of GG-degrading enzyme activity was defined as an amount of the enzyme which reduced the viscosity into 30%, 40% and a half after 10 min following the start of the enzyme reaction in a mixtures of 0.5 ml of a solution of the enzyme and 10 ml of a 0.2% GG solution, respectively. In parentheses, the relative values on the basis of the enzyme concentration of 0.005 are shown.

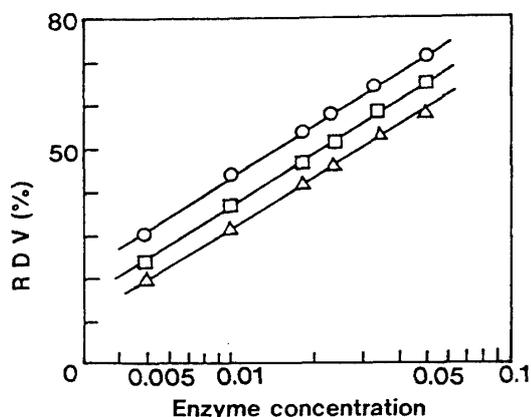


Fig. 2. Relationship between the enzyme concentration and the rate of decreasing viscosity (RDV) measured in constant time after the enzyme reaction. Constant time: Δ , 30 min; \square , 40 min; \circ , 60 min following the start of the enzyme reaction.

て () の中に記載した。この結果から、反応液の粘度が10分間で粘度低下率として50%に低下した場合の活性を1単位として求めた活性と酵素量との関係が良好な比例関係にあることが認められた。この結果はセルラーゼ活性の測定法として知られている CMC 粘度低下法³⁾を支持する結果となった。

次に、酵素量と粘度低下率との関係を調べるために酵素量ごとの一定時間（時間は任意に選定できるが、ここでは30、40および60分を選定した）後の反応液粘度を測定し、両者の関係を調べた。その結果を Fig. 2 に示した。粘度低下率と酵素量との関係は酵素量を対数として、反応30分後における測定では粘度低下率20~58%の範囲で、同様に40分および60分後の測定ではおおよそ24~65%および30~72%の範囲で、いずれの関係も直線関係として認められた。またデータとして記載されていないが10分および20分での測定における両者の関係についても同様な結果が得られ、任意の時間に対して良好な直線関係が成り立つものと考えられた。そこで、酵素活性の定義が成り立つためには10分間の粘度低下率として50%を与え、この時の酵素活性と酵素量との関係、さらに Fig. 2 で得られた粘度低下率と酵素量との関係から、一定時間後の粘度低下率と酵素活性との関係を求めると Fig. 3 に示す結果が得られ、粘度低下率と酵素活性との相関（相関係数 r はいずれも0.99のオーダーである）は良好な関係にあることが認められた。

この結果から、酵素活性は一定時間後の酵素基質反応液の粘度測定から求められることになるが、測定に

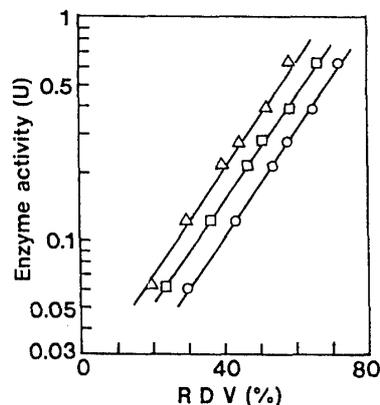


Fig. 3. Relationship between the enzyme activity and the rate of decreasing viscosity (RDV) measured in constant time after the enzyme reaction. Constant time: Δ , 30 min; \square , 40 min; \circ , 60 min following the start of the enzyme reaction.

あたっては必ず反応時間を明記することが必要である。著者らは反応60分後の粘度測定から酵素活性 (U_{60}) を求めているが、その場合の酵素活性は粘度低下率 (R) との関係から $U_{60} = 10^{(0.023R - 1.93)}$ ($30 < R < 72$) として表すことができた。したがって、この関係式を酵素活性の検量線式として求めておき、試料の粘度を一度測定することによって一義的に酵素活性が求められた。

要 約

グアガム分解酵素活性は、反応液の粘度を10分間に粘度低下率として50%減少させる酵素活性を1単位とし、一定反応時間後の粘度低下率との関係を検量線化することによって簡便に求めることができた。著者らは、反応60分後の粘度測定から酵素活性を求めたが、この時の酵素活性 (U_{60}) は粘度低下率 (R) との関係から、 $U_{60} = 10^{(0.023R - 1.93)}$ ($30 < R < 72$) として測定できることが明らかになった。

文 献

- 1) 小崎道雄：酵素利用ハンドブック，p. 301-302，地人書館（1988）。
- 2) 山本武彦，山本 覚，宮原 泉，松村芳一，平田 敢，金 武祥：澱粉科学，37，99-105（1990）。
- 3) 小崎道雄：酵素利用ハンドブック，p. 300-301，地人書館（1988）。
- 4) Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, 195, 19-23（1952）。
- 5) Hamaguchi, K., Funatsu, M.: *J. Biochem.*, 46, 1659-1660（1959）。
- 6) 赤堀四郎：酵素研究法2，p. 253-254，朝倉書店

- (1956).
- 7) 酒井清文, 浜田信威, 渡辺安人: 大阪市立工業研究所報告, 78, p. 5 (1987).
- 8) 谷口正浩: フラグランスジャーナル, 2, 98-101 (1974).
- 9) Jones, N. R.: *Food Technology in Australia*, December, p. 626-639 (1972).
- 10) Chudzkowski, R. J.: *J. Soc. Cosmet.*, 22, 43-60 (1972).
- 11) 吉田清司, 岡村昭彦, 橋 敏明: 日本農芸化学会講演要旨集, p. 538 (1992).
- 12) 吉田清司, 左子芳彦, 内田有恒, 石田祐三郎: 生物工学, 72, 291-297 (1994).