

3C11-1 Functions of family-22 carbohydrate-binding module in *Clostridium josui* Xyn10A

Ehsan ALI, Rie ARAKI, Guangshan ZHAO,
Makiko SAKKA, Shuichi KARITA, Tetsuya KIMURA,
○Kazuo SAKKA
(Fac. Biores., Mie Univ.)

Clostridium josui xylanase Xyn10A is a modular enzyme comprising two family-22 carbohydrate-binding modules (CBMs), a family-10 catalytic module (CM), a family-9 CBM and two S-layer homologous modules, consecutively from the N-terminus. To study the functions of the family-22 CBMs, truncated derivatives of Xyn10A were constructed: a recombinant catalytic module polypeptide (rCM), a family-22 CBM polypeptide (rCBM), and a polypeptide composed of the family-22 CBMs and CM (rCBM-CM). Recombinant proteins were characterized by enzyme and binding assays. rCBM-CM showed the highest activity toward xylan and weak activity toward some polysaccharides such as barley beta-glucan and carboxymethyl-cellulose. Although rCBM showed an affinity for insoluble and soluble xylan as well as barley beta-glucan and Avicel in qualitative binding assays, removal of the CBMs negligibly affected catalytic activity and thermostability of the CM.

Functions of family-22 carbohydrate-binding module in *Clostridium josui* Xyn10A

Ehsan ALI, Rie ARAKI, Guangshan ZHAO, Makiko SAKKA,
Shuichi KARITA, Tetsuya KIMURA, ○Kazuo SAKKA
(Fac. Biores., Mie Univ.)

Key words *Clostridium josui*, xylanase, carbohydrate-binding module, CBM

3C11-3 *Bacillus macerans* V230 株由来 β-フラクトフラノシダーゼによるフラクトシルトレハロースおよびラクトスクロースの生成

ポスター
発表あり

○山本 拓生¹, 仲田 哲也¹, 西本 友之¹, 阿賀 創¹, 岡部 浩幸²,
神戸 三幸², 久保田 倫夫¹, 栗本 雅司², 茶園 博人¹,
福田 恵温¹
(¹林原生化学研, ²林原)

【目的】*Bacillus macerans* V230株β-フラクトフラノシダーゼ(β-FFase)の受容体特異性調査により、トレハロースが良い受容体となることが分かった。そこでフラクトシルトレハロースの構造と機能性を調べた。ラクトースも良好な受容体で、機能性糖質のラクトスクロース(LS:β-D-Galp-(1→4)-α-D-Glcp β-D-Fruf)を生成したことから、LSの生成条件検討を行った。【方法】トレハロースとスクロースを各10g含む40%濃度溶液にβ-FFaseを80u加え、pH6.0,55℃,20h反応させた。転移糖は各種クロマトグラフィーにより精製し、¹³C-NMRにより構造解析を行った。腸内細菌による*in vitro*資化性試験を行った。また、ラクトースとスクロースにβ-FFaseを作用させLSの生成条件を検討した。糖組成はHPLC分析により求めた。【結果】トレハロースへの糖転移反応によりフラクトシルトレハロースが22.8%生成した。構造解析の結果、本糖質はβ-D-Fruf-(2→6)-α-D-Glcp α-D-Glcpであり、ビフィズス菌に選択的に資化された。LSの生成条件検討では、各20%濃度のラクトースとスクロースを含む溶液にβ-FFaseをスクロース当り1u/g加え、pH5.0,55℃,24h反応させたとき37%のLSを生成した。スクロース非資化性酵母を添加して反応させた場合は、糖組成としてLSを71%生成した。

Production of fructosyltrehalose and lactosucrose with beta-fructofuranosidase from *Bacillus macerans* V230

○Takuo YAMAMOTO¹, Tetsuya NAKADA¹,
Tomoyuki NISHIMOTO¹, Hajime AGA¹, Hiroyuki OKABE²,
Mitsuyuki KANBE², Michio KUBOTA¹, Masashi KURIMOTO²,
Hiroyuki CHAEN¹, Shigeharu FUKUDA¹
(¹Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., ²Hayashibara)

Key words *Bacillus macerans*, beta-fructofuranosidase, trehalose, lactosucrose

3C11-2 *Bacillus macerans* V230 株由来 β-フラクトフラノシダーゼの精製と性質、遺伝子クローニング

ポスター
発表あり

○津崎 桂二¹, 仲田 哲也¹, 中原 寅次郎², 池上 庄治²,
栗本 雅司², 茶園 博人¹, 福田 恵温¹
(¹林原生化学研, ²林原)

【目的】フラクトシル転移反応の強いβ-フラクトフラノシダーゼ(β-FFase)を生産する菌として*Bacillus macerans* V230株を土壌より単離した。本酵素の性質及び、塩基配列を調べ、特徴を明らかにした。【方法】培養液上清から70%飽和硫酸塩析、DEAE-, Butyl-トヨパールクロマトグラフィーにより電気泳動的に単一にまで酵素を精製した。活性は、スクロースを基質とし、還元力の増加により求めた。遺伝子は、精製酵素のリジレンドペプチダーゼ消化物のアミノ酸配列に基づくプライマーをもとに得られたPCR法増幅DNA断片を用いてコロニーハイブリダイゼーション法を行い、目的酵素遺伝子全域を含むクローンを得た。

【結果】精製標品は、SDS-PAGEにより分子量49kDaと算出された。反応最適pH5.5~6.0、反応最適温度50℃、pH5.0~8.0の領域において、45℃まで安定であった。スクロース、エルロース、ラフィノースに対するKm値は、それぞれ7.7mM、22.7mM、8.7mMであった。*Arthrobacter* K-1株酵素と比較して、本酵素はラフィノースに対するKm値がエルロースに対する値より低かった。また、広範な受容体からフラクトシル転移物を生成した。本酵素遺伝子は、1464bpからなり、分泌シグナルペプチド32残基を含む487アミノ酸残基をコードしていた。本酵素のアミノ酸配列には、β-FFaseに共通の3つの保存領域が存在した。

Purification, characterization and gene cloning of beta-fructofuranosidase from *Bacillus macerans* V230

○Keiji TSUSAKI¹, Tetsuya NAKADA¹, Torajirou NAKAHARA²,
Shouji IKEGAMI², Masashi KURIMOTO², Hiroto CHAEN¹,
Shigeharu FUKUDA¹
(¹Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., ²Hayashibara)

Key words *Bacillus macerans*, beta-fructofuranosidase

3C11-4 シマミズ由来の糖質分解酵素について

○上田 光宏, 浅野 友彦, 中澤 昌美, 宮武 和孝
(阪府大院・農生命・応生化)

【目的】ミミズは環形動物門貧毛目の生物で、地球上で3000~7000種存在するといわれている。本研究で用いたシマミズ(*Eisenia fetida*)は主に欧米諸国で、食品廃棄物などの有機ゴミのコンポスト化に利用されており、摂取された有機ゴミは腸内酵素と微生物群によって分解され、非常に栄養価の高い糞を排泄する事が知られている。これは土壌改良剤として使用されている。そこで、本研究では、コンポスト化において重要な働きをすると考えられる、シマミズ由来の加水分解酵素群のスクリーニングを行い、特に食品廃棄物処理に有用と考えられる、酵素の単離精製を行い、その性質を明らかにすることを目的とした。【方法および結果】シマミズを凍結乾燥し、破碎後バッファーに懸濁し、遠心分離後の上清を粗酵素液とした。本酵素を用いて、デンプン、キチン、セルロース、β-1,3-グルカン、キシラン等の分解活性を調べたところ、キチナーゼ、セルラーゼ、β-1,3-グルカンナーゼ、キシランナーゼ活性は極わずかであるが活性は認められた。また、アミラーゼは非常に高い活性をもつことが分かった。そこで、現在シマミズ由来のアミラーゼの単離・精製を行っている。

Polysaccharide digesting enzymes from earthworm (*Eisenia fetida*)

○Mitsuhiro UEDA, Tomohiko ASANO, Masami NAKAZAWA,
Kazutaka MIYATAKE
(Dept. Appl. Biol. Chem., Osaka Pref. Univ.)

Key words earthworm, starch, amylase, polysaccharides