

323

### 高温系状菌の耐熱性セルラーゼ(第5報) セルラーゼの変性剤に対する耐性並びに $\beta$ -グルコングターゼの精製と性質

(九大農化 ○吉岡 一, 米倉秀昭, 林田晋策)

1. 目的 高温系状菌 *Humicola insolens* YH-8 のセルラーゼ精製標品 Avicelase 及び CMCase が顕著な耐熱性を有することは既に報告したが<sup>1)</sup>, 本報では, 本酵素が化学的変性剤に対しても顕著な耐性を示すことを明らかにするとともに, 本菌の穀培養液から  $\beta$ -グルコングターゼを精製し, その酵素化学的性質をセルラーゼのそれと比較しようとした。

2. 方法 本菌の穀培養液から, 硫酸分画, Sephadex G-50, Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-50 及び Sephadex G-200 を用いて,  $\beta$ -グルコングターゼを精製した。酵素の純度検定, 分子量測定及びアミノ酸組成の決定は常法に従い, 結合糖含量はフェノール・硫酸法により測定した。 $\beta$ -グルコングターゼ活性については, 1 分間にセロビオースから 1 mg のグルコースを生成する酵素カ価を 1 unit と定義した。測定方法はセルラーゼと同様, L 型試験管による Monod 式振とう機を用い, 生成グルコース量をグルコースオキシダーゼ法により比色定量した。

3. 結果  $\beta$ -グルコングターゼ精製標品は Disc 電気泳動法により単一タンパク質であり, 分子量は SDS 電気泳動法により 250,000 であった。Avicelase 及び CMCase の結合糖含量は, それぞれ 26.1% 及び 39.0% で, その耐熱性及び pH 安定性は *N*-アセチルグルコサミンに富む多量の結合糖に起因したが<sup>2)</sup>  $\beta$ -グルコングターゼの結合糖含量は僅かに 2.5% で, その糖組成は, マンノス 1.7%, グルコース 0.8% で, *N*-アセチルグルコサミンは認められなかった。その至適温度及び pH は, 50°C, pH 5.0 であり, 1% セロビオース溶液では糖残基転移作用を示さず, 24 時間で完全にグルコースへ分解された。セロビオースのほか, サリシン, *p*-Nitrophenol- $\beta$ -D-glucopyranoside をも分解した。Avicelase 及び CMCase は顕著な熱安定性及び pH 安定性を示すのに対し,  $\beta$ -グルコングターゼは, 75°C, 5 分加熱で完全に失活し, pH 安定領域は pH 4.5~7.5 であった。Avicelase, CMCase 及び  $\beta$ -グルコングターゼのアミノ酸組成は, いずれも Asp, Thr, Ser 及び Gly 含量が高く, *Trichoderma* 起源のものと類似していた。Avicelase は  $\text{Cu}^{2+}$  及び  $\text{Fe}^{2+}$  により,  $\beta$ -グルコングターゼは  $\text{Cu}^{2+}$  により著しく阻害された。Avicelase 及び CMCase は SDS 耐性を示し,  $10^{-3}$ % 濃度では逆に活性化した。Avicelase, CMCase 及び  $\beta$ -グルコングターゼは低濃度のグアニジン塩酸溶液中で失活したが, 尿素溶液及び塩化ナトリウム溶液に対して顕著な耐性を示した。特に CMCase は 7M 尿素溶液及び 5M 塩化ナトリウム溶液中でも, それぞれ 50% 及び 80% の相対活性を示した。Avicelase は有機溶媒中で速かに失活したが, CMCase 及び  $\beta$ -グルコングターゼは有機溶媒に対して著しい耐性を示した。すなわち, 30% エチルアルコール溶液中で, CMCase は 45%,  $\beta$ -グルコングターゼは 92% の相対活性を示し, 30% ジメチルスルホキシド溶液中でも, CMCase は 78% の相対活性を示し,  $\beta$ -グルコングターゼは本条件で安定で, 40% 溶液中でも 70% の相対活性を示した。以上の各種化学的変性剤に対する耐性は, 酵素利用の観点から有益であると推察した。なお熱及び酸・アルカリ処理により  $\beta$ -グルコングターゼを失活させた本菌穀培養液の使用により, 50°C で, セロロースから多量のセロビオースが生産された。<sup>1)</sup> 吉岡, 林田: 昭和 53 年度 日本農芸化学会大会要旨集 (名古屋), p 305. <sup>2)</sup> 吉岡, 林田: 昭和 54 年度 日本農芸化学会大会要旨集 (東京), p 50.