

## 大豆の利用に関する研究 (第1報)

—— *Rhizopus oligosporus* 8631 株のマannaーゼについて ——

三 好 康 之

### Studies on the Utilization of Soybean

—— Part 1 Purification of Mannanase from *Rhizopus oligosporus* IFO 8631 ——

Yasutaka Miyoshi

日本人は昔から、豆腐、みそ、しょう油にみられるように、大豆を重要なたん白資源として有効に活用してきている。ところが近年、食生活の欧風化現象により、動物性たん白質の摂取量は年々増加傾向を示している。昭和60年の国民栄養調査報告書によると、たん白質摂取量約80gの50%を動物性たん白質が占め、この傾向はしばらく続くものと思われる。このため、これ以上動物性たん白質の摂取が増加することは好ましくないと指摘している<sup>1)</sup>。

ところで、食品に含まれるたん白質の栄養価を評価する方法として、1985年改めてFAO/WHO/UNUより提案された成人に対する必須アミノ酸評点パターンと大豆たん白質のそれと比較すると、アミノ酸スコアは100を示し、大豆たん白質は良質たん白質であることがわかる<sup>2)</sup>。さらに、たん白質需給という観点からみれば、大切なたん白質資源であり、大豆を輸入して圧さくし、大豆油を絞り、その脱脂大豆を家畜の餌料としていた時代は終わりつつあり、脱脂大豆中の大豆たん白質の有効利用が急務となっている。

最近では、輸入された大豆は種皮をはがし、低温溶媒抽出法により大豆油を採り、脱脂大豆から未変成の水溶性たん白質を抽出し、粉末状、果粒状あるいは繊維状等に加工した大豆たん白質を用いた食品も市場をにぎあわせている<sup>3)</sup>。

他方、インドネシアでは、大豆を丸ごと全利用したテンペ食品がみられる。テンペ食品の特徴は、その醗酵の過程で、*Rhizopus oligosporus*の生育に伴って、蒸煮大豆中で一連の変化がおこり、*Rhizopus oligosporus*菌の産生する酵素による消化や合成がおこる。そしてたん白質分解の結果、遊離のアミノ酸やその他水溶性の窒素化合物が増加し、加水分解の結果脂質の総量が減少し、遊離の脂肪酸が増加する。そして、リボフラビン、ナイアシン、ビタミンB<sub>6</sub>、パントテン酸を含む多くのビタミンの割合が増加するなどの現象がみられる。こうした化学変化により、大豆本来の性質を改善し、その結果、味覚、香り、食べやすさなど、ただ単に蒸煮した大豆よりより一層魅力的な食品と思わせるテンペ食品を作りあげている<sup>4)</sup>。

しかし、大豆中に含まれるガラクトマンナン、アラビノキシランなどのヘミセルロースを分解するヘミセルラーゼの種類やそれらの役割りは、あまり知られていない。そこで、テンペ製造中、*Rhizopus oligosporus*菌が、大豆中のヘミセルロース類を加水分解し、易消化性になっているものと推測し、*Rhizopus oligosporus*菌をふすま培養し、その時産生されたヘミセルラーゼを分離し、それらの酵素を蒸煮した大豆に作用させることにより、大豆ヘミセルロースをある程度分解した大豆あるいは脱脂大豆を全利用する新しい大豆食品の開発を目的に、これらの実験を行った。

本報では、*Rhizopus oligosporus* 菌を培養した菰の水抽出物を材料とし、酵素を分離精製し、基質として、大豆種皮内のガラクトマンナンを加水分解して、ガラクトースおよびマンノースを産生する、マンナナーゼの分離、精製を行ったので報告する。

## 実 験 方 法

### 1. 供試菌株と保存培地

実験には *Rhizopus oligosporus* IFO 8631 (*R* 菌と略記する) を使用した。この菌株は、テンペの製造時に広く使用されているものである。

この菌の保存培地には、酵母エキス 4g、麦芽エキス 10g、ブドウ糖 8g、粉末寒天 20g、蒸留水 1l、pH7.0 の組成のものを使用した。この斜面培地に、*R* 菌の胞子を植付け、27°C にて 2 日間培養し、胞子の形成を確認して、5°C の冷蔵庫内に保存した。

### 2. 基質およびその調整

ヘミセルラーゼ活性測定用基質ガラクトマンナンは、大豆種皮から福本らの報告<sup>5)</sup> を参考にして調整した。すなわち、2kg の大豆種皮乾燥物を水洗し、有効塩素量 2% の次亜塩素酸ソーダー 20l を加えて一夜浸漬し、リグニンおよび色素をとり除いた。これを木綿袋に入れ、一昼夜流水で洗浄し、塩素の臭いがなくなったものを 90°C で通風乾燥した。この乾燥種皮に 10l の水を加え、3 時間煮沸して、熱水可溶性多糖類を抽出後、木綿袋中に入れて自然濾過し、濾液と残渣に分けた。濾液に、等量のアセトンを加え、攪拌静置して沈澱生成後、上澄をアスピレーターで吸引除去し、残渣を遠心分離して沈澱物を得た。これを、50% アセトン、無水アセトン、エタノール、エチルエーテルで順次洗浄し、最後に 40°C にて乾燥して、白色粉末 37g を得た。つぎにこれを 80°C の熱水に溶解、濾過し、濾液に 20% トリクロル酢酸溶液を濾液量の半量加え、沈澱したたん白質を静置後遠心分離し、その上澄に等量のアセトンを加えて多糖類を沈澱させた。この方法をさらに 2 回繰り返して、無水アセトン、エタノール、エチルエーテルで順次洗浄して、40°C で乾燥後、白色粉末 15g を得た。これを大豆種皮ガラクトマンナンとして、以後の酵素の基質として使用した。

### 3. 酵素反応条件および活性の測定

2 の方法で調整したガラクトマンナン 10mg を 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 4ml 中に溶かし、適宜希釈した酵素液 1ml を加え、40°C、30 分間反応させ、Somogyi 法<sup>6)</sup> により還元糖を定量した。この時、1mg のマンノースを生ずる酵素活性を 1 単位とし、酵素試料の力価を 1g (酵素水溶液の場合には A 280nm=1.0 のとき 1mg/ml の酵素量として計算) 当りの比活性 (U/g) で示した。

### 4. ガスクロマトグラフィ<sup>7)</sup>

予めマンノース、ガラクトースの標準液 (1mg/ml) を作成し、必要量 (1~3mg) を採って凍結乾燥した。その中に内部標準物質として、D (+)-アラビトール (1mg) を含む乾燥 N, N-dimethylformamide (DMF) 1ml を加え、ついで、200  $\mu$ l の hexamethyldisilazane (HMDS) と 100  $\mu$ l の trimethyl-chlorosilane (TMS) を加え約 30 秒間激しく振り、室温に 5 分以上放置した。この上澄をマイクロシリンジで採り (1~5  $\mu$ l)、ガスクロマトグラフィ用試料とした。ガスクロマトグラフィ (GLC) の条件は、4mm×2.0m ガラスカラム (dual) に 5% SE-30 on chromo-

sorb W AW (60~80 mesh) を充填した。キャリアーガスは窒素を用い、検出部温度は、インジェクター側が180°C、ディテクター側が220°C、カラム槽温度は170°C から 200°C とし、昇温は2°C/min. とし、キャリアーガス流速はすべて 40 ml/min. (1 kg/cm<sup>2</sup>) とした。つぎに、内部標準物質 D (+)-アラビトール,  $\alpha$ ,  $\beta$ -マンノース,  $\alpha$ ,  $\beta$ -ガラクトースの保持時間を求めた後、それぞれの重量比, 検出ピークの間接点の幅にピークの高さを乗じて面積を出して面積比を求め、検量線を作成して、図1, 図2に示した。

なお, GLC には島津ガスクロマトグラフ GC-4C を用いた。

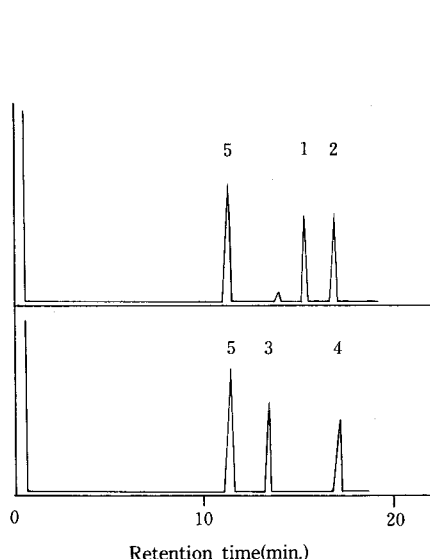


Fig. 1 Retention Time of TMS-derivatives of Galactose, Mannose and D (+)-Arabitol

TMS-derivatives of galactose, mannose and D (+)-arabitol as internal standard were applied on the column of SE-30 on chromosorb W AW and detected by FID. 1;  $\alpha$ -galactose, 2;  $\beta$ -galactose, 3;  $\alpha$ -mannose, 4;  $\beta$ -mannose, 5; D(+)-arabitol

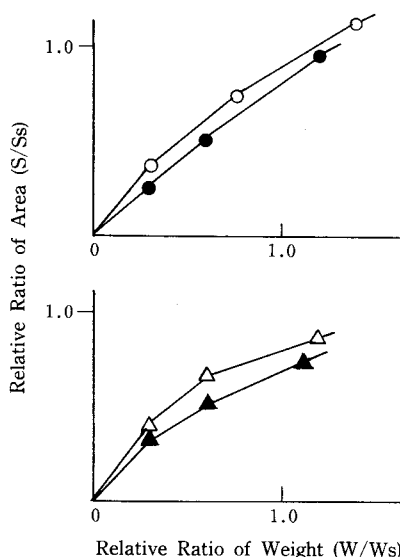


Fig. 2 Calibration Curve of TMS-derivatives of Mannose and Galactose

TMS-derivatives of mannose and galactose were applied on the column of SE-30 on chromosorb W AW and detected by FID. Relative ratios were determined using D(+)-arabitol as the internal standard.

—●—  $\alpha$ -mannose, —○—  $\beta$ -mannose,  
—▲—  $\alpha$ -galactose, —△—  $\beta$ -galactose

## 実験結果

### 1. R菌の培養と粗酵素液の調整

麹300 g と純水 200 ml をよく混合し、オートクレーブ中、120°C, 40分間殺菌、放冷した。別に、孢子形成の良好なR菌の斜面培養に殺菌水 10 ml を加え、よく攪拌して孢子懸濁液を作り、殺菌ふすまに加えてよく混ぜ合わせた後、40 cm×20 cm のふた付滅菌パットに入れ、27°C で2日間培養し麹麹とした。この際、白色菌糸がふすま上に拡がり、かつ、孢子の形成が見られないうちに出麹とする。この麹をビーカーに入れ、約 500 ml の純水を加え冷蔵庫中に一夜放置した。これを濾紙で濾過し、粗酵素原液約 200 ml を得た。この原液は、A 280 mm の測定結果から、たんぱく質量は、22.7 mg/ml と推定された。

## 2. 水抽出粗酵素原液の精製

### 実験 1. 硫酸飽和30~70%沈澱画分中の酵素の Sephadex G-50による精製

永冷下、酵素原液 (100 ml) に硫酸を加えて 30%飽和とし、生じた沈澱を 5°C で冷却遠心 (6,000 rpm, 10分間) した。得られた上澄に硫酸を加えて同様に操作し、30~70%飽和沈澱画分を得た。この画分を少量の蒸留水に溶解し (粗酵素液 (I)), 予め準備しておいた Sephadex G-50のカラム (直径 4.5×27 cm) につけ、水で溶出した。フラクションコレクターにて 10 ml ずつに分画し、各画分の A 280 nm を測定して、たん白質溶出部分については、大豆ガラクトマンナンを基質として酵素反応を行った。

その結果、図 3 に示すように、ヘミセルラーゼ活性は No 65~75画分にあることがわかった。

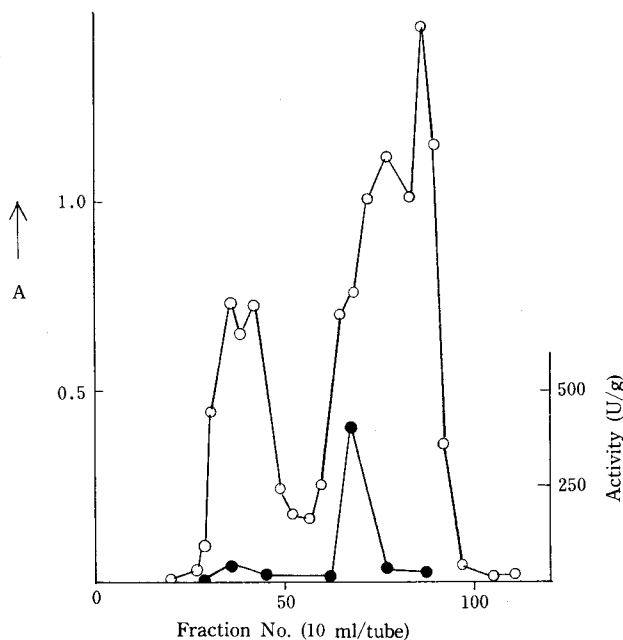


Fig. 3 Elution Pattern of Crude Hemicellulase from Column of Sephadex G-50

The enzyme solution (I) was applied on the column of Sephadex G-50 (4.5×27 cm). Elution was carried out with water.

—○— Absorbance of protein at 280 nm

—●— Activity on the galactomannan from soy-bean hull

### 実験 2. 硫酸飽和30~70%沈澱画分中の酵素の Biogel P-60による精製

実験 1 と同様にして得られた粗酵素液 (I) を Biogel P-60カラム (直径 2.8×80 cm) につけ、水で溶出しながら、フラクションコレクターで 10 ml ずつ分画し、各画分の A 280 nm を測定し、たん白溶出部分について、大豆ガラクトマンナンを基質に酵素反応を行った。

この結果は、図 4 に示すように、フラクション No 53~65付近にヘミセルラーゼ活性がみられた。

実験 1, 2 の結果から、ヘミセルラーゼ活性部分はいずれも後ろのピーク部分にみられることから、このヘミセルラーゼの分子量は小さいものと推測された。

### 実験 3. 硫酸飽和50~80%画分中の酵素の Biogel P-60による精製

実験 1 同様に、粗酵素原液 250 ml の硫酸飽和50~80%画分を少量の純水に溶かし (粗酵素

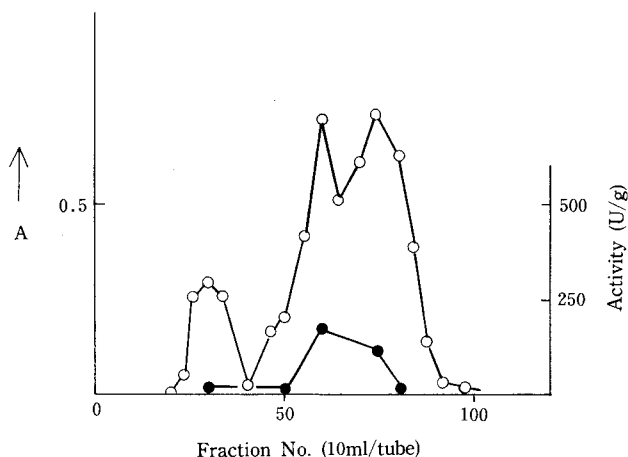


Fig. 4 Elution Pattern of Crude Hemicellulase from Column of Biogel P-60

The enzyme solution (I) was applied on the column of Biogel P-60 (2.8×70 cm). Elution was carried out with water.

—○— Absorbance of protein at 280 nm

—●— Activity on the galactomannan from soy-bean hull

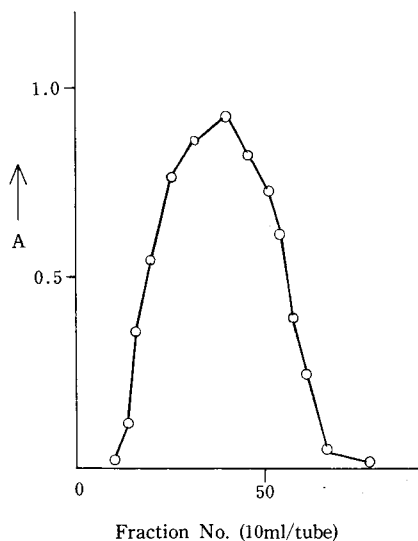


Fig. 5 Elution Pattern of Crude Hemicellulase from Column of Biogel P-60

The enzyme solution (II) was applied on the column of Biogel P-60 (4.5×27 cm). Elution was carried out with water.

液 (II)), Biogel P-60 カラム (直径 4.5×27 cm) にかき, 水で溶出し, 10 ml ずつに分画した。各画分の A<sub>280 nm</sub> を測定し, たん白質溶出部分のフラクション No 20~60 の画分を集めた。これにエタノール (約 400 ml) を加え, 沈澱を冷却遠心分離して, 粗酵素 (III) を得た。これを純水に溶かし, 凍結乾燥し, 0.46 g を得た。(図 5)

同様に粗酵素原液 (50 ml) についても, エタノール沈澱後, 冷却遠心分離し, これを純水に溶かし, 凍結乾燥し, 粗酵素 (原) を 0.34 g を得た。

なお, これらの粗酵素の活性を前回同様の条件で測定した結果, 基質ガラクトマンナンの場合, 粗酵素 (原) の活性は 198 U/g, 粗酵素 (III) のそれは 1598 U/g であった。すなわち, 硫酸飽和 50~80% 分画とそれに続く Biogel P-60 カラム操作により, その活性は 8 倍に精製さ

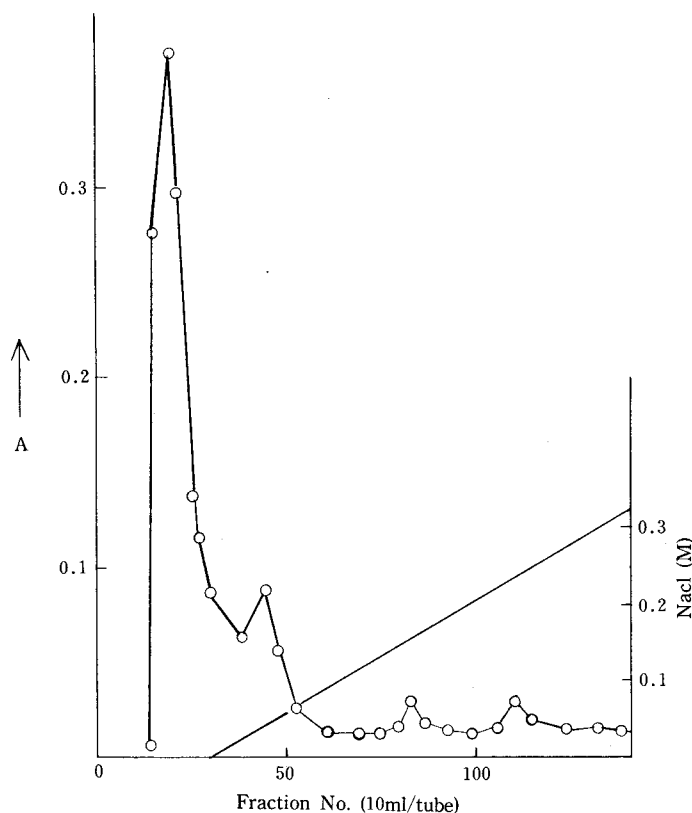


Fig. 6 Chromatogram of the Hemicellulase on DEAE-Sephadex A-25

Two hundred milligrams of crude enzyme preparation (III) was dissolved in 11 ml of 0.01 M acetate buffer (pH 5.0), and applied on DEAE-Sephadex A-25 column (2.8×70 cm) previously equilibrated with the same buffer. Elution was carried out with 300 ml of the same buffer, followed with a linear gradient solution of 0~0.32 M sodium chloride.

れ、たん白質の回収率は27%であった。

#### 実験4. DEAE-Sephadex A-25による粗酵素(Ⅲ)の精製

DEAE-Sephadex A-25(100 g)に pH 5.0, 0.01 M 酢酸緩衝液を加えて1日放置し、膨潤したゲルをカラム(直径2.8 cm×70)に詰め、同じ緩衝液を一夜通した。ついで、粗酵素(Ⅲ)の凍結乾燥標品 200 mg を同じ緩衝液 11 ml に溶解してカラムの先端に加え、同じ緩衝液で溶出し、10 ml ずつ分取した。この際、先づ緩衝液を 300 ml 通じた後、食塩を加えて、0~0.32 M NaCl の直線濃度勾配溶出を行った。結果を図6に示す。

各画分の酵素活性を測定したところ、フラクション No 19; 1320, 47; 400, 82; 6200, 110; 1950 となった。得られた酵素は少量であるが、No 82 画分をマンナーゼと推定した。

このマンナーゼ活性は、粗酵素(原)に対しては約31倍に精製されたと計算される。

#### 実験5. ガスクロマトグラフィによる酵素反応生成物の確認

実験4で得られたマンナーゼ画分の酵素反応生成物の糖組成を知るため、ガスクロマトグラフィを行った。酵素反応12時間後、反応混液 0.5 ml を凍結乾燥し、常法により TMS 化し、ガスクロマトグラフィを行い、反応生成物の同定と定量を行った。

その結果、図7に示すように、 $\beta$ -マンノースと $\beta$ -ガラクトースは近似の保持時間を持って

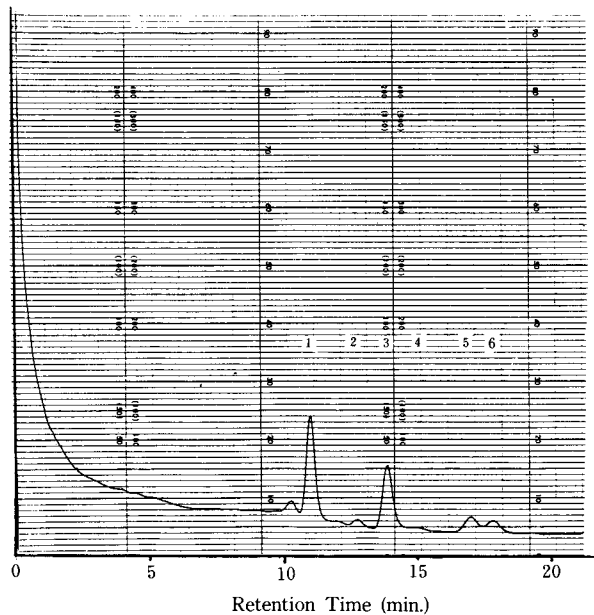


Fig. 7 Gaschromatogram of TMS-derivatives of sugars produced by Enzymatic Reaction

The enzymatic reactions were carried out using galactomannan as substrate. After the reaction, 0.05 ml. of the reaction mixture were lyophilized, trimethylsilylated and applied on the column of SE-30 on chromosorb W AW. FID system was used to detect the sugar derivatives.

1; D (+)-arabitol, 2;  $\alpha$ -mannose, 3;  $\alpha$ -glucose, 4;  $\alpha$ -galactose, 5;  $\beta$ -mannose,  $\beta$ -galactose, 6;  $\beta$ -glucose

いるために区別しにくい、ピークの番号順に、D (+)-アラビトール、 $\alpha$ -マンノース、 $\alpha$ -グルコース、 $\alpha$ -ガラクトース、 $\beta$ -マンノースと $\beta$ -ガラクトースの混合物、 $\beta$ -グルコースと推定される。図2に示す検量線からマンノース ( $\alpha + \beta$ ) 0.50 mg, グルコース ( $\alpha + \beta$ ) 0.83 mg, ガラクトース ( $\alpha + \beta$ ) 少量と計算された。なお、5のピークはすべて、 $\beta$ -マンノース量として計算した。グルコースの同定及び定量は森本の報告<sup>8)</sup>に従って行った。

#### 実験6. マンナナーゼ画分の酵素反応最適温度、最適pHの測定

実験4のフラクション81~83を混合し、5°Cで6時間透析し、酵素溶液 (0.02 mg/ml) とし、ガラクトマンナンを基質として、酵素反応を行った。

まず、最適反応温度測定は、pH 4.5の酢酸緩衝液を用い、30°C~60°Cについて反応を行った。その結果を図8に示す。これから最適酵素反応温度は50°Cで、その活性は6700 U/gを示した。

次に、最適pHの測定では、温度を40°Cに固定し、pHを4.5~7.5に変えて反応を行った。緩衝溶液は、クエン酸-リン酸ナトリウム系を用いた。その結果を図9に示す。これから、最適酵素反応pHは5.5で、その活性は5580 U/gを示した。

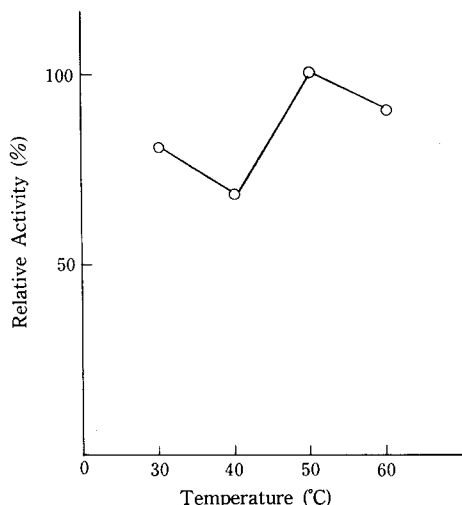


Fig. 8 Effect of Temperature on Activity

The enzyme solutions and substrate solutions dissolved in acetate buffer (pH 4.5) were kept at respective temperature for 10 min. before mixing, and the enzymatic reactions were carried out for 30 min. The activities at various temperature were expressed as percentages of the maximum activity.

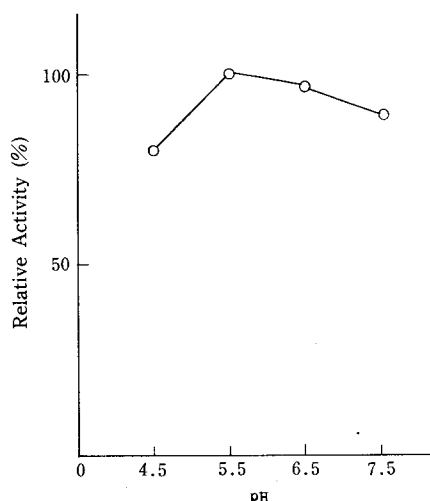


Fig. 9 Effects of pH on Activity

The enzyme solutions and the respective substrate solutions with various pH dissolved in citric acid-sodium phosphite buffers were kept at 40°C for 10 min. before mixing, and the enzymatic reactions were carried out for 30 min. The activities at various pH were expressed as percentages of the maximum activity.

## 考 察

一般に多糖類を基質とした酵素反応により生成した単糖類、二糖類の分離定量には、ペーパークロマトグラフィが使用される。しかし、この方法では、単糖類の $\alpha$ -あるいは $\beta$ -などの区別はできない。この区別をつける試みとして、トリメチルシリル化した単糖類のガスクロマトグラフィを行った。この方法では、 $\alpha$ 、 $\beta$ -ガラクトース、あるいは $\alpha$ 、 $\beta$ -マンノースの分離定量ができたが、ガラクトースとマンノースの混合物では、 $\beta$ -ガラクトースと $\beta$ -マンノースの保持時間はきわめて近接しており、両者の混合物を独立したピークとして同定定量することはできなかった。このため、マンナナーゼは基質ガラクトマンナンを加水分解して、 $\alpha$ -マンノース、 $\beta$ -ガラクトース及び $\beta$ -マンノースと $\beta$ -ガラクトースの混合物を生ずるとすれば、それらの分離定量を行うことができた。すなわち、酵素反応液を凍結乾燥後、トリメチルシリル化し、SE-30 on chromosorb W AWのカラムにかけ、そのチャートと同定し、検量線からそれを定量した。この方法は、ペーパークロマトグラフィによる分離、定量法に比べると正確で簡便であり、Somogyi分析にはみられない、単糖類の分離定量ができた。しかしながら、ガスクロマトグラフィでは、二糖類以上の糖は分析できないことが欠点である。なお、グルコースのピークの由来については、なお検討中である。

テンペ食品の製造に広く用いられているR菌株のふすま培養液中から、大豆ガラクトマンナンに作用して、ガラクトースとマンノースに加水分解するマンナナーゼの一種を分離精製した。



同時に、大豆種子アラビノキシランを分解する酵素<sup>9)</sup>を確認した。この酵素も純粋に単離できていないが、ソモギー分析から計算した酵素活性値は低かった。このため、テンペ製造におけるこれらヘミセルラーゼの役割りは、ヘミセルロースに対してエンド型に作用して、大豆中のヘミセルロースの低分子化にあるのではないかと推測される。

## 要 約

1. *Rhizopus oligosporus* IFO 8631株のふすま培養抽出液に、硫酸アンモニウムを加えて、50～80%飽和とし、生じた沈澱を Biogel P-60, DEAE-Sephadex A-25のカラムクロマトグラフィにより精製した結果、大豆種皮より調整したガラクトマンナンを加水分解して、ガラクトースとマンノースを生成するマンナーゼを得た。
2. このマンナーゼは、ガラクトマンナンを基質として、pH 4.5 の酢酸緩衝液中、40°C、30分間反応後、ソモギー法で分析した結果、6,200 U/g の活性を示した。
3. この酵素反応後の溶液を凍結乾燥し、トリメチルシリル化し、D (+)-アラビトールを内部標準物質として、ガスクロマトグラフィを行った結果、 $\alpha$ -マンノース、 $\alpha$ -ガラクトース、 $\alpha$ -グルコース、 $\beta$ -マンノースと $\beta$ -ガラクトースの混合物及び $\beta$ -グルコースとみられるピークを確認し、それらを定量した。
4. マンナーゼ画分は純粋には単離されていないとみられるが、最適酵素反応温度は 50°C で、その活性は 6,700 U/g、同 pH は 5.5 で、その活性は、5,580 U/g を示した。

謝辞 この研究を行うに当り、御指導、御助言を下さいました本学三輪萬治教授に厚く御礼申し上げます。

酵素活性測定法について御教示下さいました辻坂好夫博士 (元大阪市工研)、貴重な菌株を供与下さいました米田雅彦博士 (元 (財) 発酵研究所)、大豆種皮を供与いただきました橋田度博士 (不二製油株研究所) の方々に対し、深甚なる謝意を表します。

## SUMMARY

A hemicellulase was purified from extracts of brain *Koji* of *Rhizopus oligosporus* IFO 8631 by salting-out techniques, Biogel P-60, and DEAE-Sephadex A-25 column chromatographies in order.

The hemicellulase seems to be mannanase, since it catalyzes the hydrolysis of galactomannan obtained from soy-bean hull.

## 参 考 文 献

- 1) 昭和64年国民栄養調査成績の概要、厚生省保健医療局健康増進栄養課、全栄施協月報 pp. 65 ('87)
- 2) 吉田 昭、食品のアミノ酸組成と栄養、食生活情報“食べる” No 14 味の素KK. ('87)
- 3) 渡辺篤二、大豆加工食品、特に新たん白食品について、“大豆たん白質の栄養” pp. 3, 大豆たん白質栄養研究会, ('87)
- 4) 宇田川俊一・松田良夫監訳、食品菌類ハンドブック (R. A. Samson *et al* INTRODUCTION TO FOOD-BORNE FUNGI), pp. 259, 医歯薬出版(株), ('84)
- 5) 福本寿一郎・辻坂好夫・竹西繁行、ヘミセルラーゼに関する研究 (第1報)、農化, 44 447 ('70)
- 6) J. E. Hodge and B. T. Hofreiter, Determination of Reducing Sugars and Carbohydrates, Methods in Car-

bohydrate Chemistry Vol. 1, pp. 380, Academic Press ('62)

- 7) 池中徳治, ガスクロマトグラフィ, 生物化学実験法, 糖質実験法 pp. 49, 共立出版 ('68)
- 8) 森本由美子, 食物栄養課題研究, 広島文教女子大学短期大学部 ('83)
- 9) 山中裕美・小林京子, 食物栄養課題研究, 広島文教女子大学短期大学部 ('83)

(食物栄養学科 教授)

— 昭和63年 9 月30日 —