

λ-カラギーナン分解酵素の探索

倉掛昌裕*、前野裕紀、地頭俊樹

土壌から、0.5% λ-カラギーナン平板培地を用いて 136 株の λ-カラギーナン分解菌の分離を行った。λ-カラギーナンは高い粘性を有するので、希硫酸で部分分解を行い、分解率 9.9% および 3.13% としたものを液体培地および酵素基質にそれぞれ用いることで、効率良く λ-カラギナーゼ生産菌のスクリーニングを行うことができた。比較的酵素生産性の高い M-7 (放線菌)、M-8 (放線菌)、T-22 (細菌) および T-83 (かび) 株を選択し、培養・調製した粗酵素を λ-カラギーナンに作用させたところ、M-7、M-8 および T-22 株酵素は 2 および 3 糖類を主に生成し、これらのオリゴ糖は α-1, 4 及び β-1, 3 結合を持つ新規性のあるガラクトオリゴ糖であることがわかった。T-83 株酵素では単糖のガラクトースのみが得られた。いずれの菌株酵素も λ-カラギーナンの α-1, 3 および β-1, 4 結合を加水分解する酵素系を有しているものであった。しかし、生成還元糖量は 10.0~27.7 mg/g-λ-カラギーナンと低かった。λ-カラギーナンのガラクトシル基は硫酸基を有しているが、各酵素によって得られた糖は硫酸基を有さないガラクトオリゴ糖であった。これは λ-カラギーナン直鎖に硫酸基を有さない部分が存在し、それが酵素により分解されたためか、硫酸基を遊離させる他の酵素によるためと推察された。

キーワード：カラギーナン、ガラクトオリゴ糖、カラギナーゼ、ガラクトシダーゼ、紅藻類

カラギーナンは紅藻類海藻のスギノリ属 (*Gigartina*)、ツノマタ属 (*Chondrus*)、ギンナンソウ属 (*Iridaea*) 等から抽出される天然高分子物質であり、基本構造としてはガラクトースが α-1, 3 結合または β-1, 4 結合を交互に繰り返している。その化学構造の違いによって κ、ι、λ の 3 タイプに分類されている¹⁾。これらの分類には硫酸基が関係しており、κ-カラギーナンは単位構造当たり硫酸基が 1 つ、ι-カラギーナンは 2 つ付加しており、いずれもガラクトースと 3, 6-アンヒドロガラクトースの単位構造を有している。λ-カラギーナンの構成単糖はガラクトースのみで硫酸基が 3 つ付加している。物性は硫酸基の少ないものほどゲル化性が高く、κ-カラギーナンは食品添加物のゲル化剤として、λ-カラギーナンは流動性があり増粘剤として広く食品に利用されている。ヒトの消化酵素で分解できず、コレステロールの体外排出作用や整腸作用等の食物繊維の機能も有している。

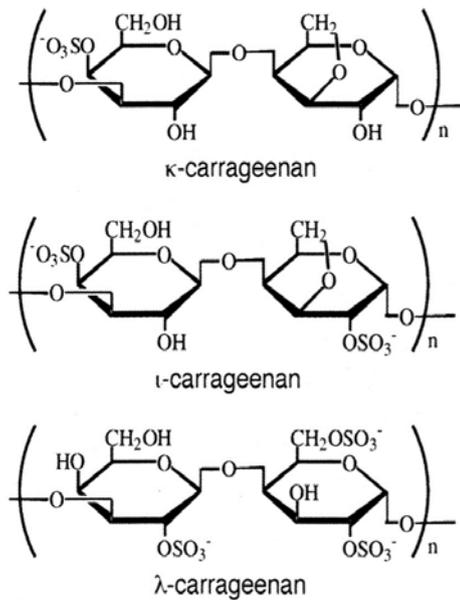
〒729-0292 福山市学園町 1 番地三蔵 福山大学生命工学部海洋生物科学科。

*Tel: +81-84-936-2111, Fax: +81-84-936-2023, E-mail: kurakake@fubac.fukuyama-u.ac.jp

このカラギーナンを低分子化し、オリゴ糖などの糖類まで加水分解することで新たな機能が得られ、付加価値が期待できる。

加水分解の方法には、酸法よりも2次分解物の副生成がない酵素法が食品への利用において適している。酵素によるκ、ι、およびλ-カラギーナンの加水分解に関する研究が行われているが²⁻⁷⁾、難分解性多糖であるためその報告は少ない状況である。

本研究では実験操作が容易であることから流動性がありゲル化しないλ-カラギーナンを実験材料に用い、土壌からλ-カラギーナン分解菌を分離し、その生成酵素のλ-カラギーナン分解性およびその生成糖について調べた。また、スクリーニング効率を高め、実験操作を容易にするため、希硫酸で部分分解したλ-カラギーナンを液体培地等に用いることにした。



カラギーナンの構造

実験方法

土壌からのλ-カラギーナン分解菌の分離：蒸留水 100ml にλ-カラギーナン（和光純薬工業(株)）0.5g、酵母エキス 0.2g、寒天 1.5g を加えて混ぜ、オートクレーブ(120℃、20 分間)した。50～60℃程度に冷却後、泡立たないように混合し、φ9mm 浅形シャーレに 15～20ml 程度流し入れ、放冷固化した。土壌から採取した土を滅菌生理食塩水で 100 倍に希釈し、その 0.1ml を平板培地に塗布し 30℃で静置培養した。生育したコロニーを選択し、新しい平板培地に植え継いだ。この操作を繰り返すことにより菌の単離を行った。

分離菌の液体培養：100ml 容三角フラスコに蒸留水 80ml、λ-カラギーナン 1g を混ぜ、スターラーを用いて溶解させ 1M 硫酸 0.1ml を加えてオートクレーブ(120℃、20 分間)した。別に酵母エキス 0.5g、リン酸水素 2 ナトリウム 12 水和物 0.2 g を水 20ml に溶解しオートクレーブし、両者を混合した。このとき pH は 6.6 となった。これを滅菌した φ18mm×180mm 試験管に 3ml ずつ分注し、平板培地で単離した菌株を 1 白金耳植菌し、レシプロ振とう 150 回/分、30℃で 3 日間振とう培養した。フラスコ培養の場合は同混合培地 100ml を 500ml 容フラスコに調製し、24 時間培養した試験管培養液 1 本分(3ml) をすべて植菌した。これを 150rpm、30℃で 4 日間培養した。

λ-カラギーナン分解酵素(λ-カラギナーゼ)の活性測定法：λ-カラギーナン 1g を蒸留水 80ml に溶解し、1M 硫酸 5ml を加え 60℃に設定したウォーターバスにて 2 時間保持した。その後 2M 水酸化ナトリウム水溶液で pH5 に調整し 0.1M 酢酸緩衝液(pH5)で 100ml にメスアップし、基質として用いた。φ16.5mm×105mm 試験管に基質 0.45ml を入れ、40℃で 5 分間保温した。遠心分離 (3000rpm, 10 分間) した分離菌液体培養液の上清

λ-カラギーナン分解酵素の探索

0.05ml を加え、40℃の恒温槽にて反応を開始させた。30 分間反応後に 1M 炭酸ナトリウムを 0.25ml 加え混ぜ反応を停止し、遠心分離 (3000rpm, 10 分間) 後その上清の生成還元糖量を 3, 5-ジニトロサリチル酸 (DNS) 法により分析し、酵素活性を算出した。1 分間に 1 μ mol のグルコース相当の還元糖量を生成する酵素量を 1U と定義した。

λ-カラギーナンの酵素分解物の糖分析：HPLC 分析では日立製作所(株)製の HPLC 装置 (L-3300 型 RI 検出器、L-6200 型インテリジェントポンプ、L-2500 型クロマトデータ処理装置) を用いた。分離用カラムには旭化成(株)製 GL-C610 (ϕ 7mm \times 250mm)を用いた。蒸留水をメンブランフィルター(0.45 μ m)で、3~4 回吸引濾過し、アスピレーターおよび超音波洗浄機により 5 分間脱気したものをキャリアーとした。試料をメンブランフィルター(0.22 μ m)でろ過し、マイクロシリンジでその 10 μ l を取り、HPLC 装置のインジェクターへ注入した。ポンプ流速は 1.0ml/min、カラム温度は 60℃とした。

MALDI-TOF-MS 分析には Voyager DE-STR (Applid Biosystems Ltd) を用いた。試料 1 μ l とマトリックスである 20mg/ml の 2, 5-ジヒドロキシ安息香酸 1 μ l を混合し、その 1 μ l をサンプルプレートにアプライした。

結果および考察

表 1 は平成 26 年度に各地で採取した土壌から、0.5% λ-カラギーナン平板培地にて λ-カラギーナン分解菌を分離した結果で、細菌 27 株、放線菌 12 株、カビ 10 株の計 49 株が得られた。平成 25 年度に分離したものと合わせて 136 株を土壌より分離した。

表1 土壌からの λ-カラギーナン分解菌の分離

菌株番号	形態	色	分離場所	菌株番号	形態	色	分離場所
M-1	放線菌	灰	福山大学28号館1	M-25	カビ	灰	舞鶴(京都府)
M-2	細菌	白		M-26	細菌	白	
M-3	放線菌	灰		M-27	細菌	黄	
M-4	放線菌	橙	M-28	細菌	黄		
M-5	細菌	白	M-29	放線菌	灰		
M-6	細菌	白黄	M-30	放線菌	赤		
M-7	放線菌	茶灰	M-31	細菌	黄		
M-8	放線菌	灰白	M-32	細菌	白		
M-9	細菌	白	M-33	細菌	白		
M-10	細菌	白	M-34	細菌	白		
M-11	カビ	白	M-35	細菌	黄	吹上浜 (鹿児島県)	
M-12	カビ	黄	M-36	細菌	灰		
M-13	カビ	橙	M-37	放線菌	灰茶		
M-14	カビ	白	M-38	細菌	黒		
M-15	細菌	白	M-39	細菌	黒		
M-16	細菌	白	M-40	細菌	灰		
M-17	細菌	白	M-41	カビ	緑		
M-18	細菌	黄	M-42	カビ	灰緑		
M-19	カビ	灰	M-43	カビ	黒		
M-20	放線菌	白	M-44	細菌	白		
M-21	カビ	灰	M-45	細菌	白		
M-22	細菌	白	M-46	細菌	黄		
M-23	細菌	白	M-47	放線菌	灰		
M-24	細菌	白黄	M-48	放線菌	灰		
			M-49	放線菌	灰		

平板培養条件: 0.5% λ-カラギーナン、0.2%酵母エキス、1.5%寒天、30℃、72時間

λ-カラギーナンは高い粘性を有しており、炭素源として液体培地に用いた場合、振とうでのエアレーションに不都合であった。また、酵素活性測定での基質として用いる場合、粘性のためその反応性は低くなり精度の良い活性測定が行えなかった。さらに液体培養液中の酵素を硫酸塩析する場合、残存するλ-カラギーナンがゲル化し、粗酵素活性の調製が困難であった。そこで希硫酸により部分分解することで粘性を除き培地および基質に用いることとした。表2は0.94% λ-カラギーナンを0.6~59 mM 硫酸で120°C、20分間処理したときのλ-カラギーナンの粘性及び分解率を示したもので、硫酸1.2 mM以上でλ-カラギーナン分解率は9.9%以上となり粘性が認められなくなった。これより、1.2 mM 硫酸処理λ-カラギーナンを液体培地に用いることとした。

基質用のλ-カラギーナンの硫酸処理では酸分解を抑えるため低温の60°Cでの処理を行った。表3は、60°Cで1~4時間処理したλ-カラギーナンの分解率と、それを基質とし用いた時の相対酵素活性を示したものである。この硫酸処理での分解率は1.65~4.56%となり、分解率の増加に伴い酵素活性は低下した。1時間処理では幾分粘性があったので、同程度の活性である2時間硫酸処理（分解率3.13%）のものを基質に用いることとした。

表2 液体培地用のλ-カラギーナンの硫酸処理

硫酸 (mM)	粘性	分解率 (%)
59	無し	38.6
24	無し	30.3
12	無し	25.0
5.9	無し	19.7
2.4	無し	12.3
1.2	無し	9.9
0.6	有り	3.2
0.0	有り	2.1

条件:0.94%λ-カラギーナン、0.6~59mM硫酸、液量42.5ml
50ml容メジューム瓶で120°C、20分処理後pHを7に調整した。

表3 反応基質用のλ-カラギーナンの硫酸処理

処理時間 (h)	分解率 (%)	相対酵素活性 (%)
1	1.65	100
2	3.13	96
3	3.84	83
4	4.56	80

条件:1.2%λ-カラギーナン、59mM硫酸、60°C、1~4時間処理後、pHを5に調整し基質とした。

図1は1.2 mM 硫酸処理したλ-カラギーナンの培地を用い分離菌株を液体培養し、λ-カラギーナン分解活性(λ-カラギナーゼ活性)を測定した結果である。多くの菌株で活性が認められたが、その中で比較的活性が高かった4つの菌株M-7(放線菌)、M-8(放線菌)、M-9(細菌)、およびM-30(放線菌)を選び、液体培地100mlとし500ml容フラスコを用いて液体培養のスケールアップを行った。ここでM-9およびM-30株は生育が悪かったので除外した。また、平成25年に分離し比較的高活性であったT-22(細菌)およびT-83(かび)株も同様にフラスコでの液体培養を行った。

λ-カラギーナン分解酵素の探索

表4はフラスコ培養液のλ-カラギーナーゼ活性を示したもので、フラスコでのエアレーションの影響と思われるが、λ-カラギーナン分解活性値は0.058 U/ml以下と低いものであった。次に、この培養ろ液100mlに対し80%飽和となるように硫酸を溶解させ、酵素蛋白質の塩析を行った。硫酸処理カラギーナンを培地に用いたので、硫酸塩析による残存カラギーナンのゲル化は起こらなくなり酵素塩析物のろ過分離が可能となった。表4に示すように、塩析物を10mlの0.1M酢酸緩衝液(pH5)で溶解した粗酵素溶液の活性値は、0.101~0.219 U/mlと培養ろ液の3.8~7.5倍となった。

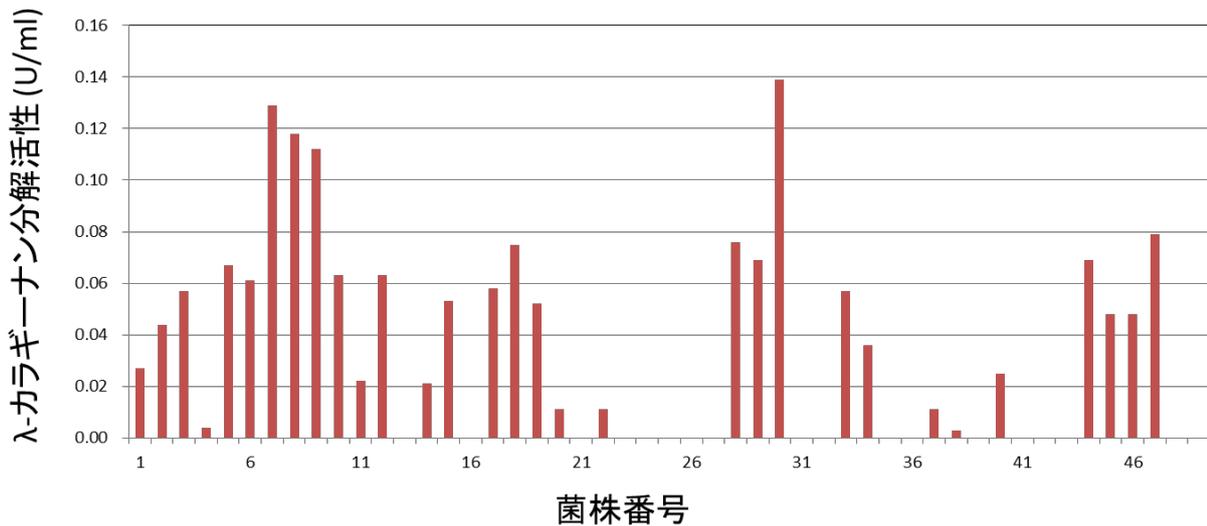


図1 λ-カラギーナン分解菌培養液の酵素活性

液体培養条件: 1%λ-カラギーナン(1.2mM硫酸処理)、0.2%酵母エキス、液量3ml(試験管)
30°C、150rpm、72h培養

表4 λ-カラギーナン分解菌のフラスコ液体培養

菌株	液体培養液の 酵素活性 (U/ml)	80%硫酸塩析 粗酵素活性 (U/ml)
M-7 (放線菌)	0.042	0.192
M-8 (放線菌)	0.022	0.165
T-22 (細菌)	0.000	0.101
T-83 (かび)	0.058	0.219

条件: 1% λ-カラギーナン(1.2mM硫酸処理)、0.5%酵母エキス、液量100ml(500ml容三角フラスコ)、
30°C、150rpm、72時間

調製した粗酵素溶液を 5% λ -カラギーナンに 48 時間反応させ、生成物を HPLC にて分析した。図 2 で示すように M-7、M-8 および T-22 株酵素で 2 および 3 糖類が検出され、特に M-7 および M-8 株酵素による 3 糖類の生産性が高かった。これらのオリゴ糖は α -1, 4 及び β -1, 3 結合を持つ新規のガラクトオリゴ糖と推察される。T-83 株酵素では単糖のみが得られ、その生産性は比較的高いものであった。高いガラクトシダーゼ活性を有する酵素と思われ、ガラクトシル基転移作用の有無について興味をもたれる。

図 3 は生成糖を TOF-MS にて分析した結果で、M-7、M-8 および T-22 株酵素ではガラクトースの 2 および 3 糖類にナトリウムイオンが結合した 365 および 527 のスペクトルがそれぞれ検出され、M-8 では 4 糖類にナトリウムイオンが結合した 689 のスペクトルも検出された。T-83 株酵素では単糖のガラクトースにナトリウムイオンが結合した 203 のスペクトルが検出された。

報告されている *Pseudoaltermanas* 属起源^{6,7)} の λ -カラギーナン分解酵素は、 λ -カラギーナンから主に 4 糖類を生成し、その構造は Gal- α -1, 3-Gal- β -1, 4-Gal- α -1, 3-Gal (Gal: ガラクトース) であった。*Pedobacter hainanensis*²⁾ および *Pseudoalteromonas porphyrae* 起源⁴⁾ の κ -カラギーナン分解酵素も同様の結合様式の 4 糖類を主に生成した。いずれの酵素も α -1, 3 および β -1, 4 結合の繰り返し構造の β -1, 4 結合を加水分解する酵素であった。*Bacillus sp* 起源³⁾ の λ -カラギーナン分解酵素は 2 糖類を主に生成したが、これは α -1, 3 結合のネオガラクトースであり、同様に β -1, 4 結合を加水分解する酵素であった。本研究で得られた M-7、M-8 および T-22 株酵素は 2 糖類の他に 3 糖類も多く生成し、特色ある酵素と言える。これは α -1, 3 結合も切断することを示唆するものである。T-83 株酵素は単糖まで分解することから α -1, 3 および β -1, 4 結合を効率良く分解する酵素系を有していると言える。これら酵素系の各成分酵素の性質について調べることで、生成オリゴ糖の重合度の調整が期待できる。

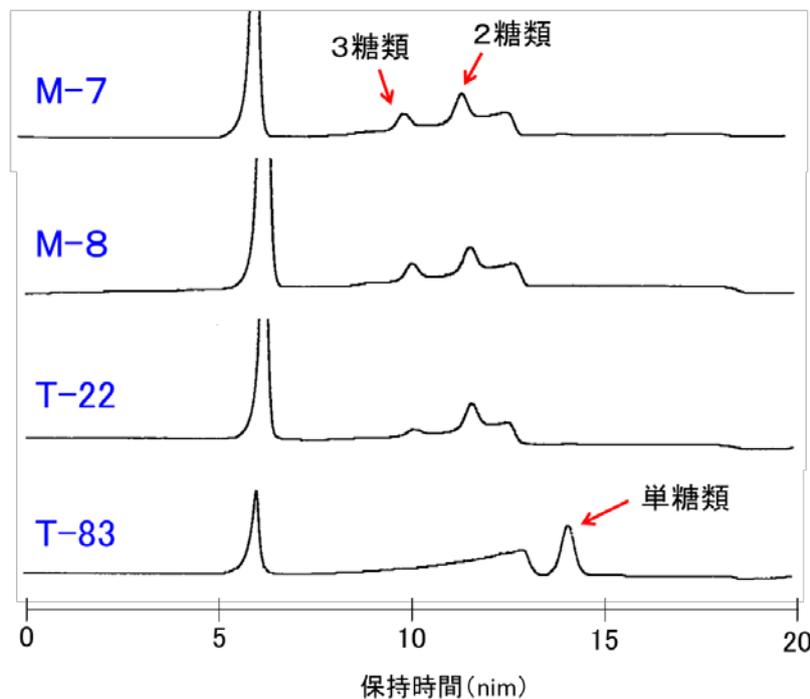


図2 λ -カラギーナン反応液のHPLCチャート

反応条件: 5% λ -カラギーナン、pH5、40°C、48時間

λ-カラギーナン分解酵素の探索

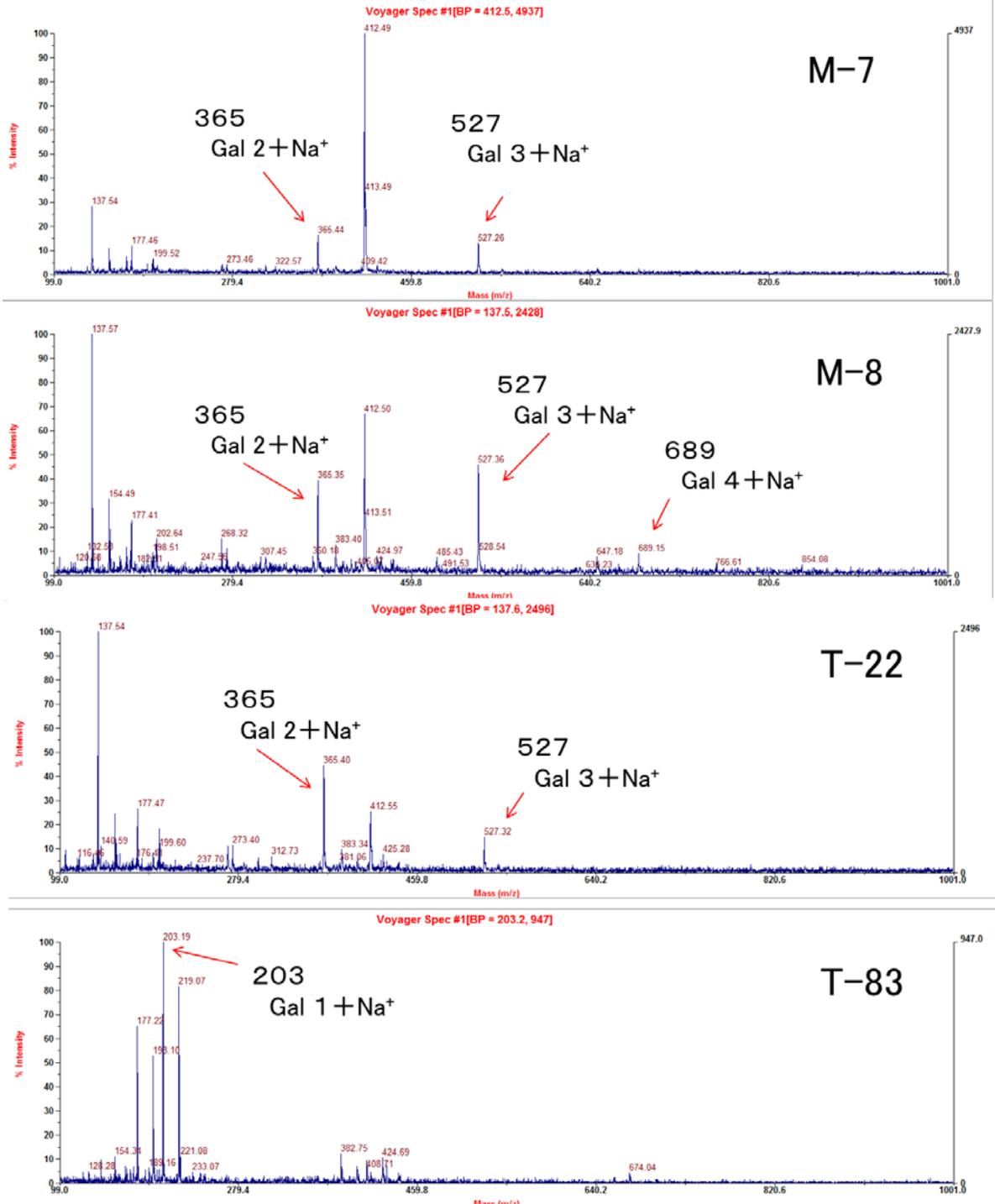


図3 λ-カラギーナン反応液のMALDI-TOF-MSスペクトル

表5はλ-カラギーナン1g当たりの生成還元糖量を示したもので、各酵素による生成糖量は10.0～27.7 mg/gと低いものであった。λ-カラギーナンのガラクトシル基は硫酸基を有しているが、各酵素から得られた糖はTOF-MS分析で示されるように硫酸基を有さないガラクトオリゴ糖であった。これはλ-カラギーナン直鎖に硫酸基を有さない部分が存在し、それが酵素により分解されたためか、あるいは硫酸基を遊離させる酵素が存在していたためと推察される。

今後、さらに反応性の高い酵素を探索し、λ-カラギーナン分解酵素系について検討して行きたい。

表5 各菌株酵素によるλ-カラギーナンからの生成還元糖量

菌株酵素	生成還元糖量 (mg/g)
M-7	14.8
M-8	15.8
T-22	10.0
T-83	27.7

反応条件: 5% λ-カラギーナン、pH5、40°C、48時間

文献

- 1) Therkelsen, G. *Industrial Gums 3rd ed.*, Roy L. Whistler and James N. BeMiller, Academic Press, p.155 (1993).
- 2) Sun, Y., Liu, Y., Jiang, K., Wang, C., Wang, Z., and Huang, L. Electrospray ionization mass spectrometric analysis of κ-carrageenan oligosaccharides obtained by degradation with κ-carrageenase from *Pedobacter hainanensis*. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 2398–2405 (2014).
- 3) Li, J., Hu, Q., and Seswita, Z. D. Purification and characterization of a thermostable λ-carrageenase from a hot spring bacterium, *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, **36**, 1669-1674 (2014).
- 4) Liu, G. L., Li, Y., Chi, Z., and Chi, Z. M. Purification and characterization of κ-carrageenase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas porphyrae* for hydrolysis of κ-carrageenan. *Process Biochemistry*, **46**, 265–271 (2011).
- 5) Hatada, Y., Mizuno, M., Li, Z., and Ohta, Y. Hyper-production and characterization of the ι-carrageenase useful for ι-carrageenan oligosaccharide production from a deep-sea bacterium, *Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94T, and insight into the unusual catalytic mechanism. *Marine Biotechnology*, **13**, 411-422 (2010).
- 6) Guibet, M., Colin, S., Barbeyron, T., Genicot, S., Kloareg, B., Michel, G., and Helbert, W. Degradation of λ-carrageenan by *Pseudoalteromonas carrageenovora* λ-carrageenase: a new family of glycoside hydrolases unrelated to κ and ι-carrageenases. *Biochem. J.*, **404**, 105–114 (2007).
- 7) Ohta, Y., and Hatada, Y. A novel enzyme, λ-carrageenase, isolated from a deep-sea bacterium. *J. Biochem*, **140**, 475-481 (2006).

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (14), 35-43 (2015)

Screening of λ-carrageenase-producing strains from soil.

Masahiro Kurakake*, Hiroki Maeno, and Toshiki Jito

Department of Marine Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology,
Fukuyama University,
Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

λ-Carrageenan-utilizing strains (136 stains) were separated from soil using 0.5% λ-carrageenan medium plate. High viscosity of λ-carrageenan solution has disappeared by partial hydrolysis with diluted sulfuric acid. The treated λ-carrageenan was used to medium of liquid culture and substrate for determination of enzymatic activity in order to progress effectively the screening of the enzymes. Crude enzymes was prepared from the strains with higher enzyme productivity, M-7 (actinomycetes), M-8 (actinomycetes), T-22 (bacteria) and T-83 (fungi). In the hydrolysis of λ-carrageenan, M-7, M-8 and T-22 enzymes released di- and trisaccharides, which are galactooligosaccharides with α-1, 4 and β-1, 3 linkages. T-83 enzyme released monosaccharide. These crude λ-carrageenase had the enzyme system for the hydrolysis of α-1, 4 and β-1, 3 linkages. The amounts of the reducing sugar from λ-carrageenan were very small (10.0~27.7 mg/g-λ-carrageenan). It is wondered that the released oligosaccharides did not have sulfate groups. This suggests that λ-carrageenan has the portion without the sulfate groups or esterase which release the sulfate groups is also produced.

Key words : carrageenan, galactooligosaccharides, carrageenase, galactosidase, redalgae