

## 堆肥から分離した *Clostridium thermosaccharolyticum* F-9 の $\beta$ -グルコシダーゼの性質

嶋田 協・袴田 佳宏・粟冠 和郎・松嶋 欽一  
三重大学生物資源学部 生物機能利用学講座応用微生物学研究室

### Some Properties of $\beta$ -Glucosidase from *Clostridium thermosaccharolyticum* F-9 Isolated from Compost

Kyo SHIMADA, Yoshihiro HAKAMADA, Kazuo SAKKA  
and Kin-ichi MATSUSHIMA

Laboratory of Applied Microbiology, Department of Bioscience  
Faculty of Bioresources, Mie University

#### Summary

Nine strains of cellulolytic-thermophilic anaerobes were isolated from hot springs and composts and analyzed for their productivity of  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -D-Glucoside glucohydrolase EC 3. 2. 1. 21). Among them, strain F-9 showed the highest  $\beta$ -glucosidase activity, and this strain was identified as a member of *Clostridium thermosaccharolyticum* on taxonomical characteristics. The intracellular  $\beta$ -glucosidase of the bacterium was purified 40-fold with a recovery of 6%.

The purified enzyme preparation was chromatographically homogeneous. The molecular weight of about 350,000 was estimated by gel filtration using Sephadex G-150, Bio-Gel p-300 and Sepharose 4B. Its isoelectric point was estimated to be 4.6. The activity of the enzyme for cellobiose was very much lower than for p-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucoside. The enzyme did not hydrolyse maltose, lactose, carboxymethyl-cellulose and cellulose. It was strongly inhibited by D-glucono- $\delta$ -lactone and was sensitive to thiol reagents.

**Key words:** thermophilic anaerobes ·  $\beta$ -glucosidase · thermostable enzyme

#### 緒 言

好熱嫌気性細菌のセルラーゼについては近年比較的多くの研究が行われ、最近では Jonson ら<sup>1)</sup>、Reynolds ら<sup>2)</sup>の報告がある。セルラーゼ遺伝子の解明<sup>3)</sup>もなされている。著者らは、種々の好熱嫌気性細菌の生産する酵素類の有効利用を目的として、各地の温泉や堆肥から酵素生産菌を分離し、生産酵素の精製<sup>4)</sup>、あるいはクローニン

グによる生産菌の造成などを検討している。今回は、著者らが分離したセルラーゼ生産菌株の中で、特に  $\beta$ -グルコシダーゼ ( $\beta$ -D-Glucoside glucohydrolase, EC 3. 2. 1. 21) 活性の強い F-9 菌株が分類学的に *Clostridium thermosaccharolyticum* に所属し、この *C. thermosaccharolyticum* の  $\beta$ -グルコシダーゼについてはこれまでに全く研究報告がみられないことから、本菌株の  $\beta$ -グルコシダーゼの性質について検討したところ、若干の知見を得たので以下に報告する。

### 実験方法

**供試菌株の培養** 約60°Cの温泉や堆肥から、ハンゲートのロールチューブ法<sup>6)</sup>により純粋分離したセルラーゼ生産性の9菌株を用いた。菌の培養はハンゲートチューブ(16×125 mm)に培地5 mlを分注し、混合ガス(N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:H<sub>2</sub> 90:5:5)で置換したのち殺菌し、種菌を1%量接種して、60°Cで24時間培養した。培地組成は次の通りである。KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.29 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.13 g, 酵母エキス 0.45 g, システイン・HCl 0.1 g, モルホリノプロパンスルホン酸 2 g, レサズリンナトリウム塩 0.2 mg, セロピオース 1 gなどを100 mlの水に溶解し、pH 7.4に調整した。なお、塩類溶液としてMgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.15%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0012%を含んだ溶液を別殺菌して上記培養液に1/10量添加した。

**粗酵素液の調製** 5 mlの培養液を15,000 rpm 20分間遠心分離して集菌し、10倍量の水で2回洗浄後、5 mlの0.01 M リン酸緩衝液(pH 6.0)に懸濁し、これを超音波破壊し、その遠心分離上清を細胞内酵素液とした。なお、上記培養液の遠心上清を細胞外酵素液とした。

**β-グルコシダーゼ活性** 基質として10 mM p-nitrophenyl β-D-glucoside (pNPG) 0.5 mlと0.1 M コハク酸緩衝液(pH 5.7) 1 mlに酵素液0.5 mlを加え、60°C, 10分間反応させたのち、1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液3 mlを加え反応を停止させ、400 nmの吸光度を測定した。1酵素単位は1分間当り1 μmolのp-Nitrophenolを遊離させるのに必要な酵素量とした。

### 実験結果

**生産菌株の選択** 供試菌株9株の活性をTable 1に示した。堆肥から分離したF-9株は他の菌株に比較して著量のβ-グルコシダーゼを生産した。酵素の存在部位は細胞外にはほとんど認められず、菌体内に大部分の活性が認められた。なお、比較のために*Clostridium thermocellum* ATCC 27405の活性も図に示したが比較的活性が低かった。この結果により、F-9株をβ-グルコシダーゼ生産菌として選択し以下の実験に供した。

**Table 1.** β-Glucosidase activities of thermophilic anaerobes isolated from hot springs and compost

Strain number	β-glucosidase activity (U/5 ml)	
	Extracellular	Intracellular
F 1	14	16
F 7	2	2
F 8	2	8
F 9	1	60
F 12	3	5
F 14	1	8
F 17	2	7
F 20	4	15
F 21	2	5
Ct*	10	4

Cells were grown in 5 ml of medium at 60°C for 24 hrs. Medium: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.29%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.13%, Yeast extract 0.45%, Cystein·HCl 0.1%, MOPS 2%, Resazurin-Na 0.0002%, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.016%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.00012%, Cellobiose 1%, pH 7.4. Extracellular: The supernatants of the culture broth were used as the extracellular enzyme solution. Intracellular: The washed cells were suspended in 5.0 ml of 50 mM succinate buffer (pH 5.7) and disrupted by ultrasonic oscillation. The supernatants of the treated solution were used as the intracellular enzyme solution.

Enzyme assay mixture contained 2.5 mM p-nitrophenyl β-D-glucoside (pNPG), 50 mM succinate buffer, pH 5.7, and appropriate amount of crude enzymes. One unit of β-glucosidase activity was defined as that amount of enzyme which catalyzed the hydrolysis of 1 μmol pNPG per min at 60°C.

\* Ct: *Clostridium thermocellum* ATCC 27405

本菌の菌学的特徴をBergey'sの細菌分類検索書<sup>7)</sup>の記載と照合した結果、グラム陰性の桿菌で、大きさは0.6×10~15 μm, 運動性あり、胞子は1.3~1.5 μmでダ円、細胞はプレクトリデューム型となり、生育適温は60°Cであり、40°Cおよび70°Cでは生育しない。H<sub>2</sub>Sを生成し、セロピオース、フラクトース、ラクトース、マルトース、サリシンに生育する、また、ロールチューブ法によるコロニーの性状、その他においても*Clostridium thermosaccharolyticum*の性質とよく一致した。よって該菌株の1株と同定し、*Clostridium thermosaccharolyticum*

*ticum* F-9 と呼称することとした。

**酵素の精製** F-9 菌の培養は Daniels と Zeikus の嫌気フラスコ培養<sup>8)</sup> に準じて行った。すなわち 1 l 容三角フラスコに前記の培地 500 ml を分注し、ガス置換をしたのち、発酵栓を付して加圧滅菌し、種菌を接種して 60°C で 24 時間培養した。培養液 2 l を 15,000 rpm 10 分間遠心分離して菌体を集め、超音波処理して、その遠心上清を粗酵素液とした。粗酵素液を 40 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8) で透析後、同緩衝液にて緩衝化した DEAE トリスアクリルカラムに吸着後、0.4 M NaCl で溶出した。さらに、バイオゲル p-300 のカラムによりゲル濾過を行い、つづいて焦点電気泳動<sup>9)</sup> により精製酵素標品を得た。この精製操作により混在していた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の大部分が除去され、比活性は 40 倍となり、収率は約 6% であった。

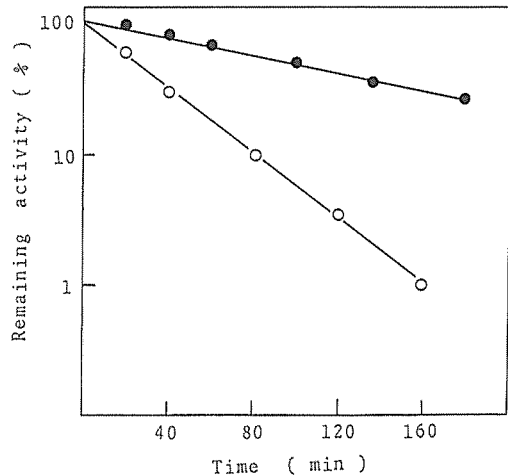
酵素標品はセファデックス G-150 およびセファロース 4B などの分画から、分子量が 350,000 と推定され、従来報告されている嫌気性菌の  $\beta$ -グルコシダーゼの分子量の中で、*Clostridium thermocellum* の 43,000<sup>5)</sup>, *Ruminococcus albus* の 82,000<sup>10)</sup>, *Bacteroides polypragmatus* の 100,000<sup>11)</sup> とは大きく異なっていたが、*Bifidobacterium breve* 203<sup>12)</sup> の 450,000 に近い分子量であった。なお、精製標品のポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果、coomassie brilliant blue 染色により分子量約 35,000 の位置にバンドが現れるが、さらに銀染色を行うと二本のバンドが認められた。したがって、まだ完全に純粋な標品とはいえないが、SDS 電気泳動により分子量約 60,000 の位置に主なバンドが検出されることからサブユニット構造をとると考えられる。これらの点については今後さらに詳細に検討を加えたい。

**酵素の性質** 種々の基質に対する活性の比較を Table 2 に示した。なお、*Clostridium thermocellum* NCIB 10682 の報告<sup>5)</sup> との比較も行った。F-9 株の  $\beta$ -グルコシダーゼは合成基質である pNPG やセロビオースには作用するが、ラクトースには作用がほとんど認められず、*C. thermocellum* の精製酵素がラクトースにかなり作用する点<sup>5)</sup> において異っていた。また、p-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactoside に対する作用も *C. thermocellum* の精製酵素<sup>5)</sup> の方が著者らの精製酵素よりも 2 倍近い値を示した

**Table 2.** Hydrolysis of various compounds by  $\beta$ -glucosidase from *C. thermosaccharolyticum* F-9

Substrate	Rate of hydrolysis ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ )
p-Nitrophenyl $\beta$ -D-glucoside	6.471
p-Nitrophenyl $\beta$ -D-galactoside	1.093
p-Nitrophenyl $\beta$ -D-xyloside	0.199
Salicin	0.078
Maltose	0
Lactose	0
Cellobiose	0.109
Carboxymethylcellulose	0
Cellulose	0

Assay mixture contained 5 mM substrate, 50 mM succinate buffer, pH 5.7, and appropriate amount of purified enzyme to give a linear rate of reaction for each substrate. The rate was determined by following glucose liberation, except for the first three substrate listed where the production of p-nitrophenol was measured.



**Fig. 1.** Effect of  $\text{Ca}^{++}$  on the thermostability of  $\beta$ -glucosidase.

Enzyme preparations contained 50 mM succinate buffer, pH 5.7, were incubated at 60°C for up to 180 min in the absence (○) and presence (●) of 10 mM  $\text{CaCl}_2$ . Enzyme activity was assayed as described in Table 1, and remaining activity was expressed as a percentage of the initial activity.

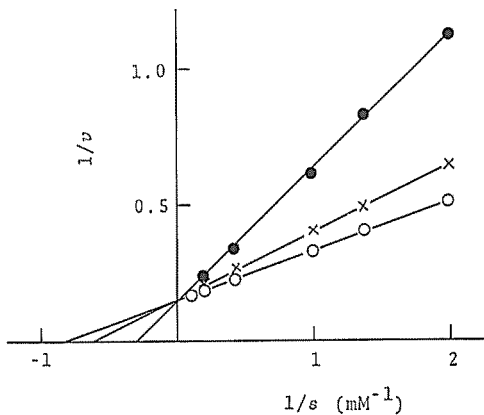


Fig. 2. Competitive inhibition of the hydrolysis of p-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucoside by D-glucono- $\delta$ -lactone.

The D-glucono- $\delta$ -lactone concentrations were 0 (O), 0.01 mM (x) and 0.05 mM (●). Rates ( $v$ ) are expressed as  $\mu$ mol p-nitrophenol liberated  $\text{min}^{-1}$  (ml enzyme) $^{-1}$ . Enzyme activity was assayed as described in Table 1.

が、これが $\beta$ -ガラクトシダーゼの混在によるものか否かは今後の検討課題としたい。

酵素の作用至適温度は $60^{\circ}\text{C}$ であり、熱に対する安定性は $55^{\circ}\text{C}$ までは安定であるが、それ以上の温度になると失活した。その際、カルシウム塩の共存により安定性が増大した (Fig. 1)。

酵素活性は高濃度 (20 mM) のグルコース存在下で約 50% の阻害をうけるが、Fig. 2 に示したように低濃度 (0.05 mM) の D-glucono- $\delta$ -lactone の存在により拮抗型の阻害をうけた。また、pCMB などの SH 試薬により阻害された。その他の性質として、最適反応 pH および最適温度は、各々 pH 5.5 付近および  $60^{\circ}\text{C}$  付近であった。金属イオンのうち、 $\text{Fe}^{++}$  イオンおよび  $\text{Cu}^{++}$  イオンにより阻害され、 $\text{Hg}^{++}$  によっては 0.1 mM 濃度でも完全に失活した。

#### 文 献

- 1) JOHNSON, E. A., F. BOUCHOT and A. L. DEMAIN. Regulation of cellulase formation *Clostridium thermocellum*. *J. Gen. Microbiol.*, **131**: 2303-2308 (1985).
- 2) REYNOLDS, P. H., C. H. SISSONS, R. M. DANIEL and H. W. MORGAN. Comparison of cellulolytic activities in *Clostridium thermocellum* and three thermophilic cellulolytic anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51** (1): 12-17 (1986).
- 3) GRÉPINET, O. and P. BÉGUIN. Sequence of the cellulase gene of *Clostridium thermocellum* coding for endoglucanase B. *Nucleic Acid Res.*, **14** (4): 1791-1799 (1986).
- 4) 古瀬伸二, 粟冠和郎, 松嶋欽一, 嶋田 協. 好熱嫌気性細菌 F-1 株のセルラーゼについて —酵素の多様性—. 日本農芸化学会昭和60年度大会講演要旨, p. 708 (1985).
- 5) AÏT, N., N. CREUZET and J. CATTANEO. Properties of  $\beta$ -glucosidase purified from *Clostridium thermocellum*. *J. Gen. Microbiol.*, **128**: 569-578 (1982).
- 6) HANGATE, R. E., Methods in Microbiology. (ed. by J. R. HARRIS and D. W. RIBBONS) Academic Press, New York Vol. 3B, p. 117 (1969).
- 7) CATO, E. P., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (ed. by P. A. SNEATH, N. S. MAIR, M. E. SHARP and J. G. HOLT) The Williams and Wilkins Co., Baltimore, Vol. 2, p. 1198 (1986).
- 8) DANIELS, L. and J. G. ZEIKUS. Improved culture flask for obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.*, **29** (5): 710-711 (1975).
- 9) DOI, E. and C. OHTSURU. Simplified isoelectric focusing columns of small scales. *Agric. Biol. Chem.*, **38** (9): 1747-1748 (1974).
- 10) OHMIYA, K., M. SHIRAI, Y. KURACHI and S. SHIMIZU. Isolation and properties of  $\beta$ -glucosidase from *Ruminococcus albes*. *J. Bacteriol.*, **161** (1): 432-434 (1985).
- 11) MACKENZIE, C. R. and G. B. PATEL. Cellodextrin utilization and  $\beta$ -glucosidase production by *Bacteroides polypragmatus*. *Arch. Microbiol.*, **145**: 91-96 (1986).
- 12) SAKAI, K., T. TACHIKI, H. KUMAGAI and T. TOCHIKURA. Isolation and Characterization of two  $\beta$ -D-glucosidase from *Bifidobacterium breve* 203. *Agric. Biol. Chem.*, **50** (9): 2287-2293 (1986).