

アルギン酸分解酵素の予備精製  
Prepurification of alginate lyase

1160207 小林 史弥  
Fumiya Kobayashi

【緒言】 アルギン酸は、海藻に含まれる多糖類であり、増粘剤、ゲル化剤、安定剤、糊料など、広い用途で使用され、血中コレステロールを下げる効果も認められている。本研究では、硫酸アンモニウム(硫安)とヒドロキシアパタイト(HA)を用いて、アルギン酸分解酵素の精製を試みた。

【実験方法】 *Cellvibrio* sp. 0A-2007 を、アルギン酸ナトリウムを加えた培地で培養した後、トリス緩衝液で菌体を洗浄し、超音波破壊を行い、粗酵素液を調製した。アルギン酸ナトリウム溶液に粗酵素を添加し、25°Cで種々の時間反応させ、加熱(100°C)により反応を止めた。反応液を針(内径 0.7mm)付きシリンジに入れ、1mL が滴下する時間を計測した。粗酵素を種々の濃度の硫安で硫安分画を行った。さらに、HA を用いて種々の濃度で酵素の精製を行った。アルギン酸分解酵素の活性を、反応液の 235nm の吸光度から算出し、タンパク質濃度を、BCA Assay Kit を使用し測定し、比活性(タンパク質量当たりの活性)を算出した。また、HA 処理を行った酵素の耐熱性等の諸特性を調べた。

【結果・考察】 粗酵素を添加した 1 時間後の反応液では、無添加の場合と比較し、滴下時間が約 28% となったことからアルギン酸が粗酵素液により分解されていることが確認された。種々の硫安濃度で 1 時間硫安沈殿を行い、沈殿したタンパク質の比活性を元の粗酵素と比較したところ、硫安濃度 70% の時に最も比活性が高く、約 1.8 倍となった。さらに、70%硫安で精製した酵素タンパクに、HA を種々の濃度で加え、1 時間吸着させた後、遠心分離により HA を回収し、種々の濃度のリン酸緩衝液で 1 時間脱着反応を行った。HA 処理後の比活性は、300mM のリン酸緩衝液での脱着が最も高く、HA 処理前の酵素タンパクと比べ、約 3.0 倍となった。HA 処理を行った酵素を、50°C で 1 時間加熱したところ活性の低下は見られなかった。