

Erwinia carotovora の生産する ペクチン分解酵素について

穴 吹 吉 夫

On some properties of pectic enzymes secreted by *Erwinia carotovora*

Yoshio ANABUKI (Laboratory of Technical Microbiology)

(Received January 16, 1957)

ペクチン分解酵素は現在 polygalacturonase, protopectinase, pectase の三種に大別されて考えられている。植物の軟腐は主として軟腐病菌の生産するペクチン分解酵素に基くものとされているが, polygalacturonase と protopectinase を分別して実験されてはいない⁽¹⁻³⁾。梶及び著者^(4,5)は *Cl. felsenium* var. *sikokianum* の生産するペクチン分解酵素の分離精製について報告し, 梶⁽⁶⁾は醗酵精練に於いては maceration enzyme が中葉のペクチンに最初に作用して水に不溶性のペクチン酸塩を可溶性のペクチンに分解せしめ解繊作用を行うと報告している。著者は *Erwinia carotovora* の生産するペクチン分解酵素の単離精製を目的として二, 三の実験を行ったのでその大要を報告する。

実験及び結果

I 使用細菌 本学内藤教授の好意により分譲された *Erwinia carotovora* の一株を使用した。

II 酵素作用力の測定方法 *Erwinia* 属細菌の polygalacturonase について小沢⁽³⁾は還元力の増加に比して粘度低下の急激な所謂液化型の polygalacturonase であると報告している。著者も還元力の増加を測定する方法は採用しなかった。OSWALD の粘度計を使用し作用液の落下速度を 25°C にて測定し, WEBER, DEUEL⁽⁷⁾ の分解数 A を次式より算出し表示した。

$$A = \frac{T_a - T}{T_a - T_0} \times 100$$

T_a : 不活性化した酵素液を配合した作用液の落下速度 (秒)

T : 酵素液を配合した作用液の落下速度 (秒)

T_0 : 基質を含有せず水に酵素液を加えた液の落下速度 (秒)

作用液の配合割合は次の通りにした。基質は NORRIS, RESCH⁽⁸⁾ の方法により調製したペクチン酸を使用した。

基質 1% ペクチン酸溶液	2.5cc
MCLVAINE 緩衝液 (pH 6.0)	1.5cc
酵素液 + 蒸溜水	3.0cc

作用液は 37°C に 1 時間保持した後その粘度低下を測定した。

Protopectinase は馬鈴薯切片 (1.0cm × 1.0cm 厚さ 1mm) 及び雁皮白皮 (1.0cm × 1.0cm) に作用せしめた。配合割合は次のごとくにした。

馬鈴薯切片又は雁皮白皮	1片
MCLVAINE 緩衝液 (pH 6.0)	0.5cc
酵素液 + 蒸溜水	2.5cc
Toluol	3滴

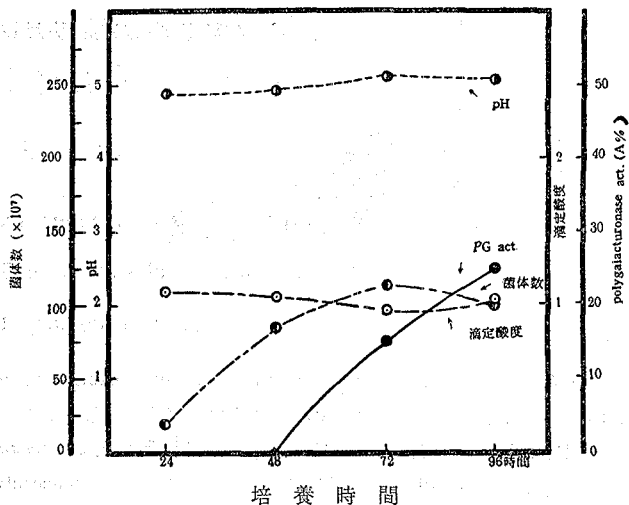
配合液を 37°C に 20 時間作用せしめ切片を水中に取出し分解度を比較して, 完全に分解したものを Ⅲ, 作用力の微弱なるものを Ⅱ, その間を Ⅲ, Ⅲ, Ⅲ, Ⅲ, + にて表示した。

III 培養基組成と酵素作用力 味付醤油寒天培養基上に 24 時間培養したものから 1 白金耳量を釣り採り bouillon 液 50cc に接種し, 24 時間培養した液を種懸とした。25)cc の三角フラスコに次の四種の培養液 5)cc を作製し, 種懸 5 cc 宛接種した。

1. Bouillon glucose
2. Bouillon pectin
3. 0.72% KNO₃ 0.2% K₂HPO₄ glucose
4. 0.72% KNO₃ 0.2% K₂HPO₄ pectin

基本培養基として bouillon 液及び 0.72% KNO₃ 0.2% K₂HPO₄ 液を用い、これに 0.2% glucose 又は pectin を加え炭素源の影響を調べた。培養温度は 30°C で行い、24, 48, 72, 96時間培養して分析に供した。結果は第 1~4 図の通りである。

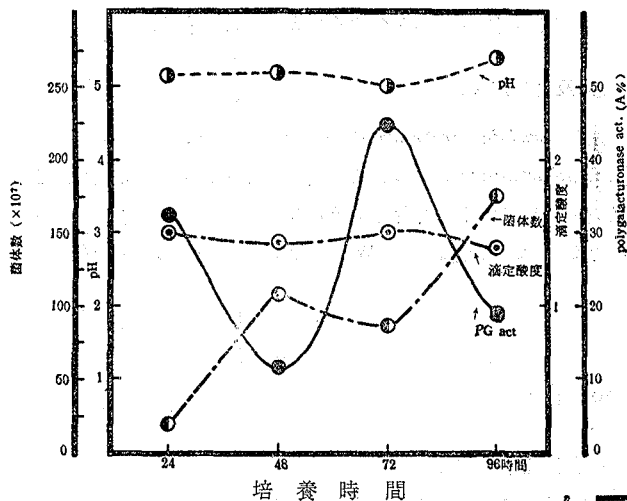
PHの測定は東洋濾紙製 pH 試験紙を用い、滴定酸度は醗酵液 10cc を中和するに要する N/10NaOH の cc 数により、菌体数は醗酵液 1 cc の中の細菌数によって表示した。細菌のペクチン分解酵素のうち protopectinase は適応酵素であり、polygalacturonase の液化型は構成酵素、糖化型は適



第 1 図 酵素作用力と繁殖状況 (Bouillon glucose)

応的であると報告している⁽⁴⁾。第 1~4 図によれば *Erwinia carotovora* の生産する液化型 polygalacturonase の作用は菌体数に殆んど差のない 24時間培養に於いて顕著な差異を生じて pectic acid に対して適応的な性質を示した。PH 及び滴定酸度は初期より 96時間培養に於いても大差なかった。

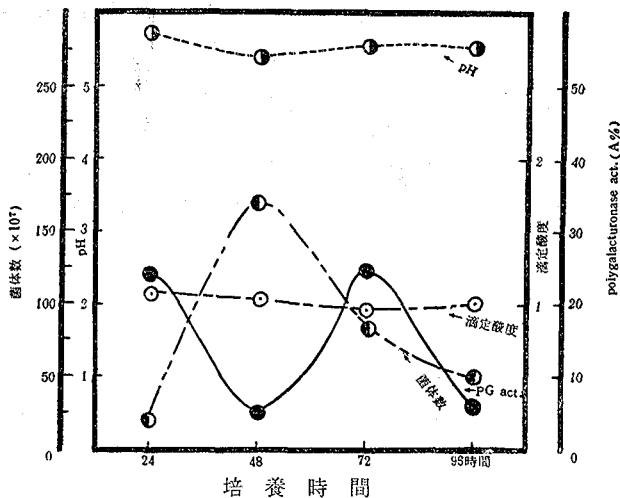
IV イオン交換樹脂に対する吸着性
TAIBAYS⁽¹⁰⁾ は *Bact. aroideae* の polygalacturonase が樹脂に吸着されることを報告し、梶⁽⁶⁾、梶及び著者^(4,5) は Amberlite IRC-50 及び Duolite CS 101 を使用して *Cl. felsenium* var. *sikoki-*



第 2 図 酵素作用力と繁殖状況 (Bouillon pectin)

anum の polygalacturonase と maceration enzyme を分離している。著者は Duolite CS-101 を用いて *Erwinia carotovora* の polygalacturonase 及び protopectinase の吸着及び溶出を試みた。樹脂を HIRS, STEIN, MOORE⁽¹¹⁾ の方法により 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 に緩衝化した樹脂及び H-form, Na-form をおのおの 10cc 宛を用い III の実験にて検討した培養基のうち 0.72% KNO₃ 0.29% K₂HPO₄ 0.2% pectin にて 24時間培養し遠沈した上澄液を 130cc宛 sv = 6 で通過させ酵素を吸着せしめた。酵素を吸着した樹脂は 0.3N アンモニア水にて 3分間溶出し溶出液を 20時間 5°C にて透析し酵素作用力を測定した。結果は第 5 図及び第 1 表の通りである。

Erwinia carotovora の生産する液化型 polygalac-



第 3 図 酵素作用力と繁殖状況 (0.72%KNO₃, 0.2%K₂HPO₄, glucose)

第1表 通過液及び溶出液の protopectinase 作用力

	通過液		溶出液	
	雁皮に対する作用*1	馬鈴薯に対する作用*2	雁皮に対する作用*1	馬鈴薯に対する作用*2
H-form	+		—	
5.0	++~		—	
6.0	++~	~	—	
7.0	+		—	~
8.0	+		—	~
9.0	+		—	~
Na-form	++		—	~
遠沈液				~
対照	—	—	—	—

*1 酵素液 1.0cc を使用

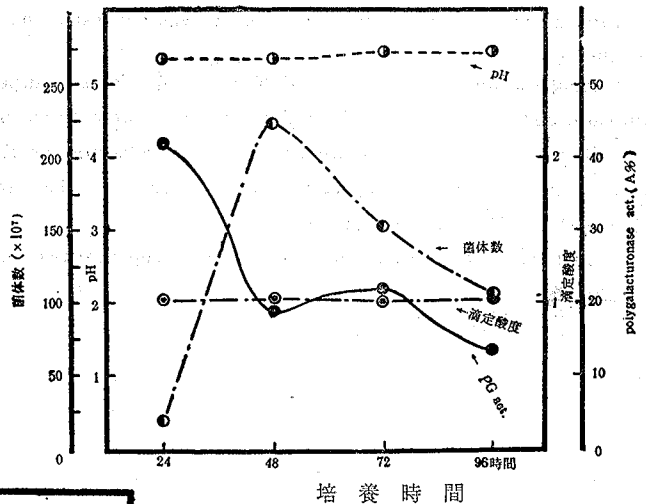
*2 酵素液 0.1cc を使用

原液及び通過液の polygalacturonase 作用力は次の通りであった。

原液 A% 80.0
H-form 通過液 31.6

turonase は樹脂の緩衝化が pH=6.0より酸性側で吸着され、pH=7.0よりアルカリ性になると吸着及び溶出が行われない。

Protopectinase は pH=7.0 よりアルカリ性側に於いても吸着及び溶出が行われる。即ち protopectinase は polygalacturonase よりも広い範囲の pH 値に於いて吸着及び溶出が行われるようであり樹脂の種類、緩衝化の程度等の条件を選択することにより梶^⑥が *Cl. felsineum* var. *sikokianum* について成功したごとく両酵素の分離が可能であると推測される。

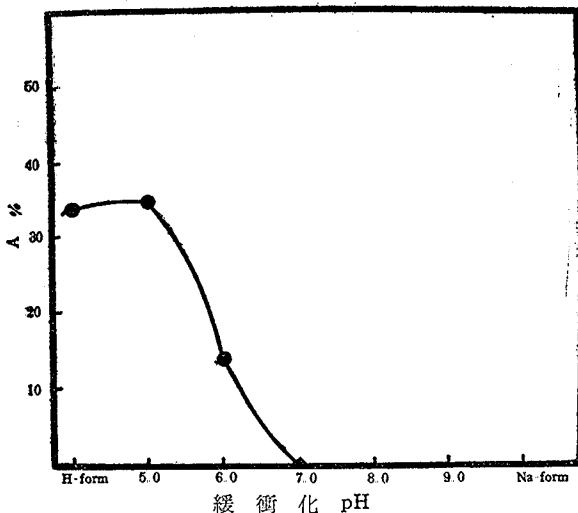


第4図 酵素作用力と繁殖状況 (0.72% KNO₃ 0.2% K₂HPO₄ pectin)

要 旨

1. *Erwinia carotovora* の液化型 polygalacturonase は pectic acid に対して適応的であった。
2. Duolite CS-101 に対する液化型 polygalacturonase の吸着及び溶出は樹脂の緩衝化が pH=6.0より酸性側に於いて行われ pH=7.0 よりアルカリ性側では行われない。
3. Protopectinase は樹脂の緩衝化が pH=7.0 よりアルカリ性側に於いても吸着及び溶出が行われる。
4. *Erwinia carotovora* の polygalacturonase と protopectinase の分離の可能性を指摘した。

最後に終始御懇篤なる御指導を賜った本学梶教授に深甚なる謝意を表する。又菌株を御恵下さった本学



第5図 溶出液の polygalacturonase 作用力

内藤教授に厚く感謝する。

文 献

- (1) 赤井, 大石: *Forsch. Gebiet Pflanzenkrankheiten*, **V**, 57 (1954).
 (2) 赤井, 大石: *ibid.*, **V**, 15 (1955).
 (3) 小沢: *農学研究*, **42**, 42 (1955).
 (4) 梶, 穴吹: *農化*, **29**, 775 (1955).
 (5) 梶, 穴吹: *香川農大大学報*, **7**, 222 (1956).
 (6) 梶: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 8 (1956).
 (7) WEBER, F., DEUEL, H.: *Trav. chim. aliment. hyg.*, **36**, 368 (1945).
 (8) NORRIS, F. W., RESCH, C. F.: *Biochem. J.*, **31**, 1945, (1937).
 (9) 梶, 穴吹: *香川農大大学報*, **7**, 67 (1955).
 (10) TALBAYS, P. W.: *Nature*, **166**, 1077 (1950).
 (11) HIRS, C. H. W., STEIN, W. H., MOORE, S.: *J. Biol. Chem.*, **200**, 493 (1953).

R é s u m é

In this paper, the author studied on the production of liquefying polygalacturonase by *Erwinia carotovora*, and on some behaviors of the pectic enzymes of this bacteria on the ion exchange resin, Duolite CS-101.

The activity of liquefying polygalacturonase was increased remarkably, when pectin was added to the culture media as carbon source, therefore it was suggested that the production of this enzyme would be adaptive.

Using the ion exchange resin, Duolite CS-101, for the purpose of separation of liquefying polygalacturonase and protopectinase, the following results were obtained.

The liquefying polygalacturonase was never adsorbed on the resin, CS-101, from Na-form to buffered resin at pH 7.0, while protopectinase was adsorbed on the same resin and was easily recovered in the eluate by 0.3 N ammonia solution.

From these observations, it will be able to separate two enzymes by the ion-exchange chromatography on Duolite CS-101.

