

植物繊維原料の醗酵精練について (第17報)

一細菌のペクチン質分解酵素について

今原 広次*・山下 成信**・持田 晃一***・岩井 正憲*・中浜 敏雄*

HIROTSUGU IMAHARA, SEISHIN YAMASHITA, KŌICHI MOCHIDA,
MASANORI IWAI and TOSHIO NAKAHAMA: On the retting
of vegetable-fiber materials (XVII) Pectolytic activity
of strain of bacterium isolated from flax.

要旨：亜麻の浸漬醗酵液中よりペクチン質分解酵素を強く生成する一細菌を見出し No. 431 菌と名称しその菌学的性質を検討した。本菌の生成するペクチナーゼは強力なるペクチン粘度降下作用を示すが、糖化作用及びメチルエステラーゼ作用は殆んど示さなかった。本菌の麩麩抽出液からアセトン40~60%濃度で沈澱する区分をとり更に pH 8.0 で CM-セルロースカラムで精製を行なってほぼ純粋な酵素標品を得た。本酵素の作用最適 pH は 9.0 付近にあり、ペクチンに強く作用して粘度降下作用を示すと共に微量の不飽和ガラクトロニドを生成するが、ペクチン酸にはその様な顕著な作用力を示さなかった。したがって No. 431 菌の生成する酵素はエンド型のペクチントランスエリミナーゼ (endo-pectintranseliminase) であろうと推論した。

I. 緒 言

細菌のペクチナーゼについては梶^{1),2)}らによって *Clostridium* 属の一株の生産するマセレイション作用が報告されている。近年細菌の示すペクチン質分解作用は主にトランスエリミナーゼによることが次第に明らかにされてきた。すなわち岡本³⁾⁻⁵⁾らは *Erwinia* 属の或株のものが強い PATE (Pectic acid transeliminase) 作用を示すことを見出し、又 Starr⁶⁾らは PTE (Pectin transeliminase) について報告している。又 Nagel⁷⁾らは *B. polymyxa* の生産する PTE について検討を行なっている。著者^{8),9)}らは糸状菌の生産するペクチナーゼについて既に若干の検討を行なってきたが、今回亜麻浸漬液中より強いペクチン粘度降下作用を示す細菌を分離し、その酵素作用について2, 3の検討を加えたのでその結果を報告する。

II. 実験の部

1. 菌の分離と選択

亜麻粗繊維約 7g をあらかじめ滅菌したブイオン汁 150ml (pH 7.2) に投入し、37°C, 70時間培養後常法に従って平板培養を行なって約30株を分離した。

これらの菌株をそれぞれペクチン1.2%, (NH₄)₂SO₄ 0.5%, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄ · 7H₂O 0.1%を含んだ亜麻浸出液 10ml を入れた試験管培地にて 37°C, 3日培養し、次に麩培地 (麩 10g に亜麻浸出液 5ml を加え 120°C, 20分加圧滅菌) にさきの培養液を加え 37°C, 3日培養する。次にこの麩麩に生理的食塩水または M/50-McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0) 35ml を加え 30°C, 60分抽出し、その濾液を粗酵素液として、次のごとく反応組成でペクチン液の粘度降下作用をオストワルド粘度計を用いて 30°C で測定し、下に示した式によって作用力を算出した。

反応組成

0.5% ペクチン溶液 (pH 7.0 M/10-McIlvaine 緩衝液)	8ml
酵素液	2ml

作用力の算出

T₀: 反応直後の反応液の落下秒数
T_{30'}: 反応30分後の反応液の落下秒数
T_a: 同一粘度計による純水の落下秒数
A_{30'}: 反応30分における作用力

$$A_{30'} = \frac{T_0 - T_{30'}}{T_0 - T_a} \times 100$$

* 京都府立大学農学部応用菌学研究室

** Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan.

*** 大阪府立園芸高校農芸化学科

** Osaka Prefectural Gardening High School, Agricultural Chemistry, Osaka, Japan.

**** 生産開発研究所

*** Research Institute for Production Development

昭和45年7月31日受理

その結果約30菌株の中から4株を顕著なペクチナーゼ生産菌株として選択した。その作用力は第1表に示す通りである。

第1表 分離細菌の作用力

菌 株	作用力 (A _{30'})
No. 211	77.7
No. 231	77.3
No. 241	72.7
No. 431	85.5

第1表より No. 431 菌が最も作用力が大であるので、以後本菌について検討を行なった。

2. No. 431 菌の菌学的性質

分離選択せるペクチナーゼ生成の最も強力な No. 431 菌の菌学的性質について調べた。

1) 形態的特徴としては 1.0~1.4μ の短桿菌であり、鞭毛、孢子ともに有せず、グラム陽性である。

2) 生理的特徴としては、ブドウ糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、ラフィノース、ガラクトース、アラビノース、マンニットを発酵するがデキストリン、イヌリンは発酵しない。牛乳を凝固せず、ゼラチンを液化する、インドール、スカトール、硫化水素は生成せず、硝酸塩を還元する。ウレアーゼ陰性、カタラーゼ、アミラーゼ陽性、アセチルメチルカルビノールを生成した。

3. ペクチン及びペクチン酸に対する粘度降下作用

431 号菌の培養抽出液を粗酵素液として各 pH におけるペクチン及びペクチン酸に対する作用を検討した所第1図の如くであった。

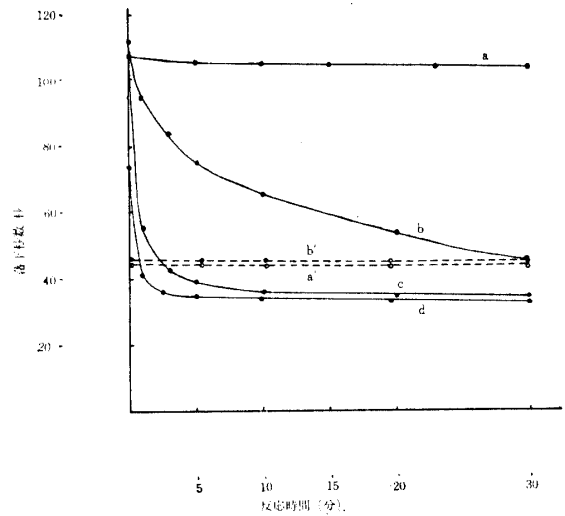
この結果本菌の生成するペクチナーゼは、ペクチンに対しては中性又は微アルカリ性で高い分解率を示すが、ペクチン酸に対してはいずれも低い分解率しか示さなかった。しかしペクチン酸は同一濃度においてもペクチンより粘度が低いので、基質ペクチン酸の濃度を濃くして検討した所第2表の如くであった。

第2表 ペクチン酸に対する作用

作用 pH	基質ペクチン酸比粘度*	作用力 (A _{30'})
6	2.58	7.6
7	2.60	34.8
8	3.49	48.2

* 7.1%

第2表からペクチン酸に対してはその作用力は弱い、基質濃度を高くした場合には明らかに認められ、



第1図 ペクチン、ペクチン酸に対する粘度降下作用と pH

— — — — — ペクチン (比粘度5.0) a: pH4.0, b: pH6.0 c: pH7.0, d: pH8.0
 ペクチン酸 (比粘度1.7) a': pH4.0, b': pH6.0

しかも酸性側より微アルカリ性側において強い作用力を示すことが認められた。

4. ペクチン及びペクチン酸に対する糖化作用

上記と同じ酵素液を用いてペクチン及びペクチン酸に作用させて生成する還元性物質の検出を行なった。

1) 基質

ペクチン溶液：ペクチンを蒸留水に溶解し、HCl 又は NH₄OH で所定 pH とした後 M/10-McIlvaine 緩衝液を全量の1/5加えた後蒸留水で一定量として比粘度5.0の溶液とする。

ペクチン酸溶液：1.0%ペクチン酸溶液を上述と同様にして調製する。

2) 反応

基質 24ml に酵素液 6ml を加え 35°Cで反応させ、一定時間毎に反応液 5ml をとり Willstätter Schudel 法により還元性物質の測定を行なった。

第3表 ペクチン及びペクチン酸に対する糖化作用*

pH	ペクチン			ペクチン酸		
	10分	20分	40分	10分	20分	40分
4	0	0.05	0.08	0	0	0
6	0	0	0	0.05	0.05	0.05
7	0	0	0	0	0	0
8	0.05	0.13	0.13	0.10	0.15	0.15

* N/20-Na₂S₂O₃ 滴定数

この結果本菌の生成する酵素はペクチン及びペクチン酸のいずれに対しても糖化作用を有するとは認め難い。反応液を濃縮してペーパークロマトグラフィーを行なってガラクトツロン酸，ガラクトース，アラビノース等の検出を行なったが確認できなかった。しかしペクチンの場合に未知のスポットが僅か見出せた，その状況は後述第5図に示す如くである。

5. ペクチンメチルエステラーゼ作用

0.5%ペクチン水溶液と粗酵素液を4:1の割合で混合し 35°C, 40°C, 45°C で各 pH で反応させ，反応液 20ml をとり60分後の遊離カルボキシル基を N/50-NaOH で中和滴定して，エステラーゼ作用をしらべた。

第4表 ペクチンメチルエステラーゼ作用

pH	反 応 温 度		
	35°C	40°C	45°C
4	0.03	0.05	0.09
7	0	0.14	0.10

この結果本菌はペクチンメチルエステラーゼ作用は極めて微弱であることを認めた。

6. 酵素の精製

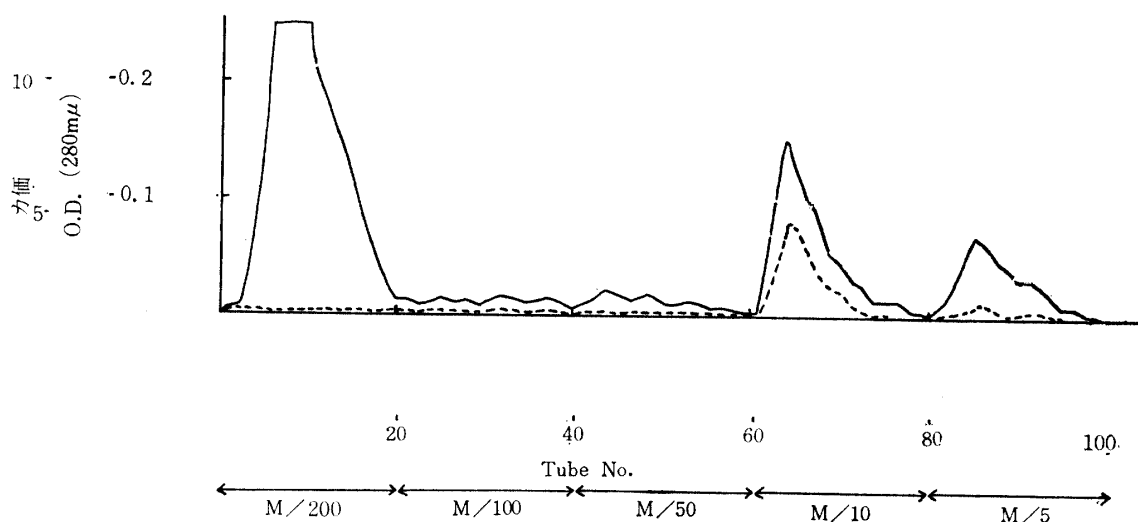
上述までの結果により本菌の生成するペクチン質分解酵素は主にペクチン粘度降下作用を示し，他にペク

チン酸に対する作用又はメチルエステラーゼ作用，糖化力作用などは微弱であることが明らかとなった。したがって本菌のもつ主なペクチン質分解酵素は主として粘度降下作用力を指標として分離・精製を行なうことが可能である。そこで粗酵素液をまずアセトン分別を行なった結果第5表の如くであった。

第5表 アセトン分別沈澱

区 分	液 量 (ml)	単位 ml 当 たり の 力 価	全 力 価
粗 酵 素 液	800	6.2	4,960
0~20%アセトン区分	50	0	0
20~40%アセトン区分	50	4.5	225
40~60%アセトン区分	50	25.8	1,02

第5表から40~60%アセトン沈澱区分に最も多くの酵素が集まることが判ったので，次にこの区分の酵素を pH 5, 6, 8 の各 M/200 緩衝液に溶解し，同液で緩衝化した DEAE-セルロース及び，CM-セルロースカラムに通過させ，吸着・溶離により精製可能な条件を求めた所 pH 8.0 CM-セルロースカラムによる場合が最も良好であったので，第2図に示す様に溶出を M/100, M/50, M/10, M/5 の如くステップワイズに行なって精製した。



第2図 CM-セルロースカラムクロマトグラフィー
 ———— 蛋白濃度 (O.D. at 280mμ)
 - - - - - 酵素力価 (粘度降下作用力)
 pH 8.0 10ml 区分

この結果 M/10 緩衝液で溶出する区分に最も多くの精製酵素を見出すことができた。

以上の結果をまとめて各精製段階の様子を表示すれば第6表の如くなる。

第6表 酵素精製の経過

酵素精製区分	全液量	単位 ml 当たりの力価	全力価	比力価 mg N 当たり
粗 酵 素 液	800	6.2	4,960	0.4
40~60%アセトン沈澱区分	50	25.8	1,290	1.2
CM セルロースカラムクロマトグラフィー				
M/200 通過液	135	0	0	
M/10 溶出液	110	4.1	451	11.4
M/5 溶出液	95	0.3	28	0.7

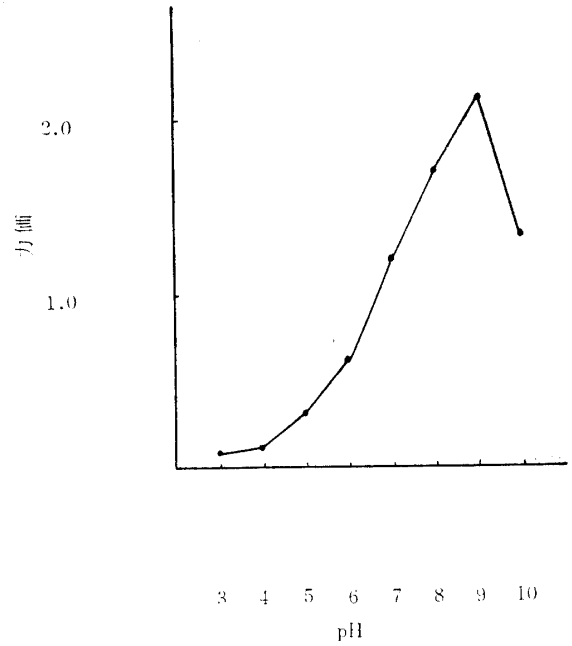
7. 精製酵素の基質分解作用

1) 作用最適 pH

M/50-緩衝液 (pH 3~8 : McIlvaine bufter, pH9~10 : Borate buffer) に溶解したペクチン溶液を用い各 pH における粘度降下力をしらべた所第 3 図の如く pH 9.0 が最適であることが判った。

2) 反応生成物の検出

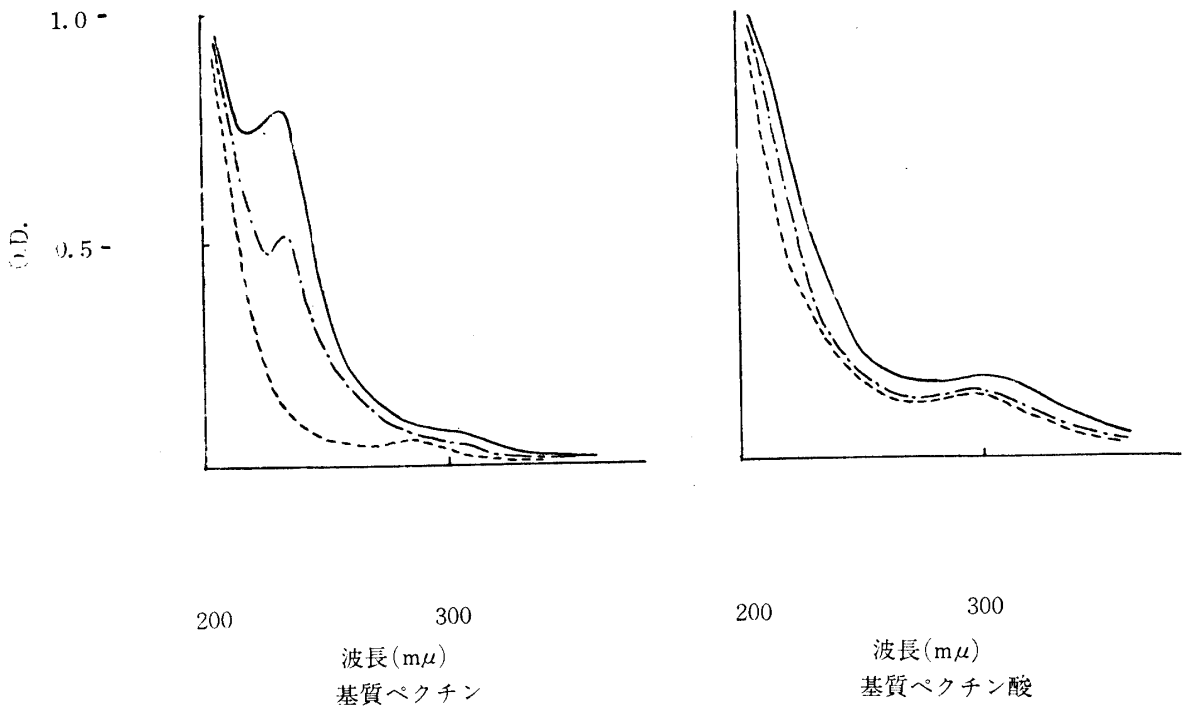
精製酵素 (5 単位/ml) を用いペクチン (0.6%) , ペクチン酸 (1.1%) に pH 8.0 で作用させて一定時間の後反応液の紫外部吸収曲線を測定した所第 4 図の



第3図 pH-Activity 曲線

如くであった。

この結果ペクチン酸に対しては十分な考察はできないがペクチン基質の場合、反応によって明らかに 230 mμ に吸収の極大を生ずる。これは4-5-不飽和ガラクトソロニドの生成を意味するものであり、チオバルビツール酸反応によっても認められた。したがって本酵素はペクチントランスエリミネラーゼ作用を有するものと

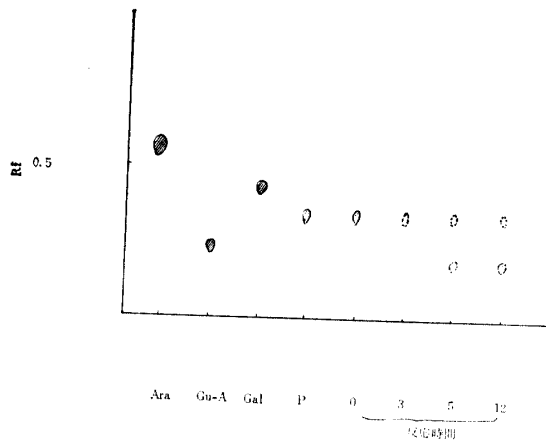


第4図 反応液の UV 吸収曲線

..... 基 質 - - - - 反応20時間後 ——— 反応30時間後

考えられる。

次に反応液をペーパークロマトグラフィーによって還元性物質検出を行なった所第5図の如くであった。



第5図 ペクチン分解生成物のペーパークロマトグラフィー

展開流媒 水飽和フェノール

発色剤 アニリンフタル酸水和物

Ara: アラビノース Gu-A: ガラクツロン酸

Gal: ガラクトース P: 基質ペクチン

この結果ペクチン酸については殆んど分解生成物としての還元性物質は認められなかったが、ペクチンの場合、ガラクトン酸、ガラクトースなどのポリガラクトナーゼの場合にみられる還元性物質は認められず、他の未知の還元性物質の生成がみられ、これが上述の UV- 吸収曲線及びチオバルビツール酸反応により認められた不飽和ガラクトニド又は不飽和ガラクトン酸であろうと推察された。

III. 考 察

亜麻の醗酵液より分離された、強力なペクチン粘度降下作用を有する細菌 No. 431 菌の生成する酵素は、ポリガラクトナーゼではなく、又本菌はペクチンメ

チルエステラーゼ作用も殆んど認められない、したがって、アセトン沈澱区分についての CM-セルロースカラムにより精製した酵素標品を用いた実験より、その反応液中に不飽和化合物が生成することを認め、その UV-吸収曲線の結果と、ペーパークロマトグラフィーによる検出結果を合せて考えるならば、本酵素はペクチン酸には僅かに作用を示すにすぎず主としてペクチンに作用して粘度を強く降下させ、不飽和ガラクトニドを生成することが判る、したがってエンド型のペクチントランスエリミナーゼ (endo-PTE) であろうと推論した。

文 献

- 1) 梶明・穴吹吉夫(1950)：農化, **23**：398.
- 2) 梶明・橋禎男・粟飯原重男・穴吹吉夫(1959)：香川大学報農学, **11**：248.
- 3) 岡本賢一・畑中千歳・小沢潤二郎(1964)：農化, **38**：237.
- 4) Okamoto, K., C. Hatanaka & J. Ozawa (1964)：Agr. Biol. Chem. **28**：331.
- 5) Okamoto, K., C. Hatanaka & J. Ozawa(1964)：Ber. des Öhara Institute für landwirtschaftliche Biologie **12**：107, 115.
- 6) Starr, M. P. & F. Morgan (1961)：In Bacteriological Proceedings, Society of American Bacteriologist, Baltimore 169.
- 7) Nagel, C.W. & R.H. Vaughn (1961)：Arch. Biochem. Biophys. **93**：344, **94**：328.
- 8) 今原広次・中浜敏雄(1963)：京府大学報・農学, **15**：89.
- 9) 今原広次・中浜敏雄(1966)：京府大学報・農学, **18**：125.

Summary

We isolated some bacteria showing a strong activity of pectinase action from flax fermentating solution.

One of these strain, No. 431, acted strongly to pectin and the taxonomic properties of the strain were researched. The pectinase produced by strain was partially purified by ionexchange column-chromatography with CM-cellulose.

It was recognized that this enzyme, showed much activity for viscosity reduction to pectin solution, but little to pectic acid solution. On each decomposition of pectic substances by this enzyme the galacturonate or the homologue was not produced from the materials and we could explain that the enzyme showed strong transe-liminase action to pectin but little to pectic acid.