

枯草菌の産生する新規なポリガラクトナーゼ

松 浦 康

緒 言

ペクチンは植物細胞壁構成成分の一つであり、主として一次壁に存在して細胞と細胞を接着するセメント物質の役割りをもっており、接着によって柔組織が組み立てられ、組織に適当なかさ、弾性あるいは可塑性が与えられる。

ペクチン分解菌はペクチナーゼを有し、その作用によってペクチンを分解、可溶化して組織を破壊して組織内へ侵入する。ペクチナーゼはポリガラクトナーゼとポリガラクトネート・リアーゼに大別され、それぞれ糖化型(exo-type)⁽¹⁻⁸⁾と液化型(endo-type)⁽⁹⁻¹⁴⁾に分類される。ポリガラクトナーゼによるペクチン酸の最終分解産物はガラクトuron酸、ジガラクトuron酸、トリガラクトuron酸であり、ポリガラクトネート・リアーゼでは、4,5-不飽和ジガラクトuron酸、4,5-不飽和トリガラクトuron酸などである。

本研究においては、腐敗した野菜から分離した枯草菌の産生するペクチン酸分解酵素について検討した。その結果、分子サイズのかなり大きい分解産物を産生する酵素を得たので報告する。

実 験 方 法

1. ペクチン酸分解菌の分離

ペクチン酸分解菌の分離培地の組成は次のとおりである；プロテオースペプトン(Difco Laboratories製)，5.0 g；酵母エキス(Difco Laboratories製)，5.0 g；肉エキス(極東製薬製)，3.0 g； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，1.0 g； K_2HPO_4 ，2.26 g； $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，0.02 g； NaCl ，0.9 g； $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，0.027 g； $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，0.02 g； $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ，0.01 g； $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，0.01 g；ペクチン酸，5.0 g；寒天，15 g；精製水，1,000 ml；pH 7.4。ペクチン酸は別に1.0%溶液とし、5%炭酸ナトリウム液でpHを7.4とした後、121℃，15分間滅菌後、両液を合わせて平板とした。

トマト、ピーマン、レタスの腐敗部分からタンポンで菌を採取し、上記平板上に塗抹し、好氣的に30℃，24時間培養した。生じたコロニーは、上記培地から寒天を除いた液体培地に接種し、30℃で48時間、静置培養した。培養液は遠心沈殿(4,000×g，20分間)し、その3 mlに1N塩酸0.3 mlを加え、ペクチン酸のゲルを生じないものをペクチン酸分解菌とした。一方、同じ上清中のガラクトuron酸量を定量し、対照にくらべて減少しているものをペクチン酸資化性の細菌とした。

2. ペクチン酸の定量

Bitter-Muirの改良カルバゾール法⁽¹⁵⁾でガラクトuron酸を定量し、ガラクトuron酸量によってペクチン酸量とした。

3. ペーパークロマトグラフィー

展開液はn-ブタノール：酢酸：水(5：2：3，v/v)を用い、上昇法で展開した、スポットの検出は紫外線照射(254 nm)により不飽和化合物を、ブロムフェノールブルーの0.1%アルコール液(pH 7.0)により酸性物質を、また、硝酸銀法⁽¹⁶⁾によって還元性物質を検出した。対照物質としてガラクトuron酸と4,5-不飽和ジガラクトuron酸を用いた。

4. 粗酵素液の調製

1.において記述した液体培地に同じ条件で培養した培養液を遠心沈殿し、その上清を0.05 Mのリン酸塩緩衝液(pH 7.4)に対して透析したものを粗酵素液とした。

5. 酵素活性の測定

酵素活性測定のための反応液は、1%ペクチン酸液(pH 7.4) 2.0 ml，粗酵素液0.6 ml，0.1 Mリン酸塩緩衝液(pH 7.4) 0.4 mlの組成で、30℃で反応を行った。

反応液の粘度はOstwaldの粘度計で測定し、比粘度が50%低下するに要する反応時間で酵素量を表わし、100分の反応で比粘度が50%になるときの酵素量を1単位とした。一方、生ずる還元基の量はWillstätter-

Schudelの改良法⁽¹⁷⁾によって測定し、1時間に1 μ molの還元基を生ずる酵素量を1単位とした。

6. ゲル濾過

Sephadex G-50のカラム(2×80 cm)を用いて水で展開し、4 ml画分とした。ペクチン質とその分解産物は改良カルバズール法⁽¹⁵⁾で測定した。

一方、分子量測定のための標準物質としてのマルトヘプタオースはフェノール-硫酸法⁽¹⁸⁾で、タンパク質、ペプチッドは280nmの吸収測定により、ポリエチレングリコールは激しく振とうして泡立つ画分の乾燥重量を測定して、その溶出位置を決定した。

実験結果と考察

1. ペクチン酸分解菌の分離

野菜から採取塗抹したペクチン酸分解菌分離用平板培地から19株を釣菌した。そのうち6株がペクチン酸を分解し、ペクチン酸分解菌のうち2株(No. 15, No. 16株)がペクチン酸をよく資化した(表 I)。

2. ペクチン酸分解菌の同定

ペクチン酸分解菌は、いずれもカタラーゼ陽性であ

り、グラム陽性の芽胞を有する桿菌であって、好氣的条件下でよく発育した。

東^(19, 20)、松田ら⁽²¹⁾の記載を参考にしながら、Cowan⁽²²⁾に従って同定を行った結果、いずれの菌株も*Bacillus subtilis*と同定された(表 II)。

Table I. Degradation of Pectic Acid by *Bacillus* sp. from Spoiled Vegetables.

Strain No.	Gel formation by HCl addition	Amounts of fermented pectic acid *
12	—	7
13	—	14
14	—	9
15	—	20
16	—	29
17	—	12
18	±	0
20	—	0
Control	+	0

*, mg per 10 ml of culture solution.

Table II. Morphological, Cultural and Biochemical Characteristics of Bacteria from Spoiled Vegetables.

Characteristics	Strains			
	No. 15	No. 16	No. 18	No. 20
Gram reaction	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+
Spore				
round	—	—	—	—
dominant position	ST	ST	ST	ST
swollen	—	—	—	—
Growth at 45 °C	+	+	+	—
Growth at 65 °C	—	—	—	—
Growth at pH 5. 7	+	+	+	+
Growth in 7 % NaCl	+	+	+	+
Anaerobic growth in glucose bouillon	—	—	—	—
Utilization of citrate	+	+	+	+
Acid from				
glucose	+	+	+	+
arabinose	+	+	+	+
mannitol	+	+	+	+
xylose	+	+	+	+
Voges-Proskauer test	+	+	+	+
Hydrolysis of				
starch	+	+	+	+
casein	+	+	+	+
gelatin	+	+	+	+
Formation of indol	—	—	—	—
Nitrate reduced to nitrite	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+
Egg-Yolk lecithinase	—	—	—	—
Growth with lysozyme present	+	+	+	—
Gas formation in glucose bouillon	—	—	—	—

3. 粗酵素液によるペクチン酸の分解

分離菌株No.15は比粘度が50%低下したときの還元基の生成量は1%であり、No.16株では同じく、還元基の生成量は2%であった。No.18株は比粘度が50%低下するのに90分以上を要したが、還元基の生成量は1%程度であると推定される。No.14, 17株は酵素量が少ないため正確な測定ができなかった(図1)。

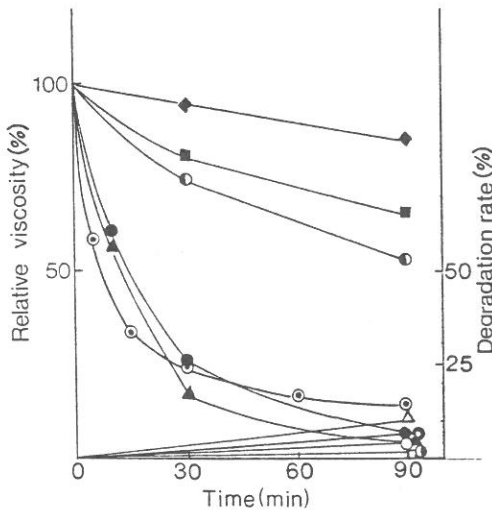


Fig. 1. Degradation of Pectic Acid by Polygalacturonase from *Bacillus* sp..

Viscosity ; ◆, strain No.14 : ●, strain No.15 : ▲, strain No.16 : ■, strain No.17 : ○, strain No.18 : ◎, strain No.20. Reduced group ; ○, strain No.15 : △, strain No.16 : □, strain No.17 : ●, strain No.18 : ○, strain No.20.

分解産物をゲル濾過によって分析した結果を図2に示した。

4. 粗酵素液によるペクチン酸分解産物の分子量の推定

Sephadex G-50のカラム(2×80 cm)を用いて各標準物質ならびに分解産物の溶出位置(V_e)を測定し、図3に示した結果を得た。この結果から、No.15, 16株の産生する酵素のペクチン酸分解産物の分子量は約2,200と推定された。No.18株の産生する酵素による分解産物の分子量はさらに大きいものであった(図2による)。

5. 低分子分解産物の検索

各菌株の産生する粗酵素による分解産物について、235nmにおける紫外部吸収またはペーパークロマトグ

ラフィーでの紫外線(254nm)による検出を行ったが、4,5-不飽和化合物と考えられる物質は検出されなかった。また、ペーパークロマトグラフィーで少量のガラクトン酸に相当するスポットを検出したが、ゲル濾過において、相当するピークは、検出されなかった。

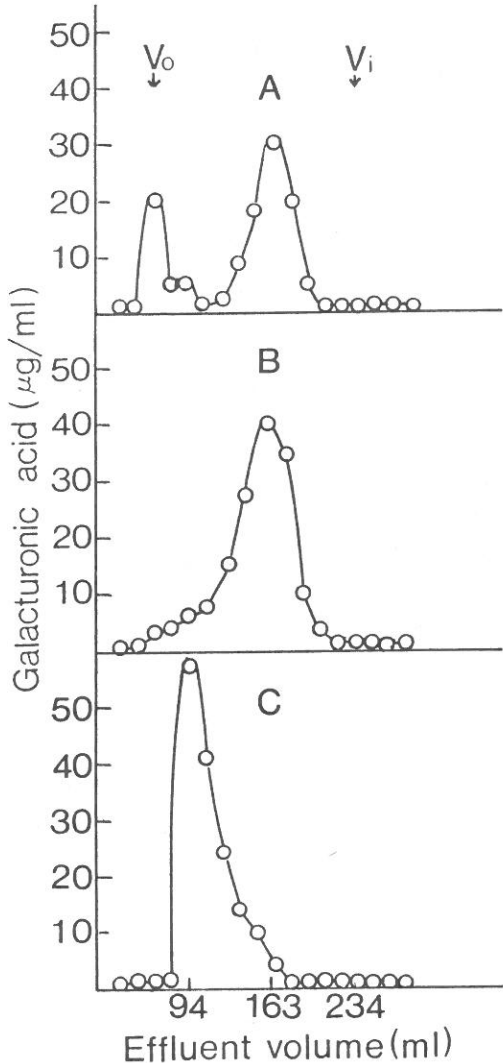


Fig. 2. Gel Filtration of Degradation Products of Pectic Acid by Polygalacturonase from *Bacillus* sp..

Column, Sephadex G-50 column, 2×80 cm, eluted with water, 5 ml fraction. A, strain No.15 ; B, strain No.16 ; C, strain No.18.

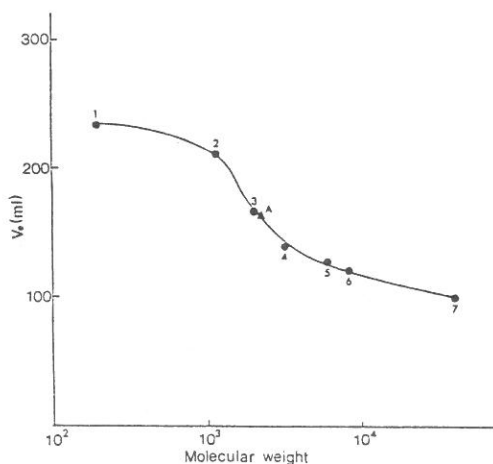


Fig. 3. Molecular Weight Analysis of Degradation Product of Pectic Acid by Gel Filtration.

Column, Sephadex G-50 column, 2 × 80 cm. 1, galacturonic acid; 2, maltoheptaose(M. W., 1,153); 3, polyethylene glycol 2,000(M. W., 2,000); 4, polyethylene glycol 4,000(M. W., 3,100); 5, insulin(M. W., 5,732); 6, polyethylene glycol 6,000(M. W., 8,400); 7, egg albumin(M. W., 14,300); A, degradation product.

考 察

腐敗した野菜からペクチン酸分解能を有する細菌を分離したが、いずれも *Bacillus subtilis* と同定された。これらはペクチン酸を資化する性質を有するものと、ペクチン酸分解酵素のみを産生して分解産物を資化しないものとに分類されたが、後者の産生するペクチン酸分解酵素は植物組織の破壊のみを行い、他の栄養素を利用することを目的としたものであると考えられる。ペクチン酸分解菌はヒドロラーゼまたはリアーゼを

産生する。ヒドロラーゼによる分解産物はガラクトン酸、ジガラクトン酸、トリガラクトン酸であるが、量的にはガラクトン酸が多い。リアーゼの場合は4,5-不飽和ジガラクトン酸、4,5-不飽和トリガラクトン酸が最終分解産物であるが、4,5-不飽和ジガラクトン酸の場合が多く、いずれも低分子化合物である。

今回分離した *Bacillus subtilis* から得た酵素の分解形式は、還元基の生成量が小さいにもかかわらず、粘度の低下が著るしいものであって、液化型であると考えられる。一方、Na 15 株、Na 16 株の産生する酵素による分解産物の分子量は約 2,200 (ガラクトン酸平均重合度, 12.6) と推定され、ペクチン酸分解酵素による分解産物としては、かなり大きい分子量のものであった。また、この分解産物には不飽和化合物は含まれていなかったのも、ヒドロラーゼである。Na 18 株の産生する酵素は、さらに高分子の分解産物を生成した。この場合、粘度の低下が比較的小さいが、分子が十分小さくならないために粘度低下が起りにくくなったものと考えられる。

Sakai^(23,24) はプロトペクチナーゼについて報告しているが、この酵素はプロトペクチンを分解してペクチンを生成する酵素と定義されており、本研究で得た酵素とは明らかに異なると考えられる。

要 約

腐敗した野菜からペクチン酸分解能を有する *Bacillus subtilis* を分離、同定した。

本菌が産生するペクチン酸分解酵素は液化型のヒドロラーゼであり、分解産物の平均分子量は約 2,200 (平均重合度, 12.6) と推定され、ペクチン酸分解酵素による分解産物としてはかなり大きい分子であった。

文

- 1) 小沢潤二郎：農化，**26**，505 (1952)。
- 2) C. Hatanaka and J. Ozawa：Agric. Biol. Chem., **28**, 627 (1964)。
- 3) S. Hasegawa and C. W. Nagel：Arch. Biochem. Biophys., **124**, 513 (1968)。
- 4) 畑中千歳，小沢潤二郎：農化，**41**，165 (1967)。
- 5) 畑中千歳，小沢潤二郎：農化，**43**，67 (1969)。
- 6) 畑中千歳，小沢潤二郎：農化，**43**，77 (1969)。
- 7) 畑中千歳，小沢潤二郎：農化，**43**，85 (1969)。
- 8) C. Hatanaka and J. Ozawa：Agric. Biol. Chem., **33**, 116 (1969)。
- 9) H. J. Phaff and A. L. Demain：J. Biol. Chem., **218**, 875 (1956)。
- 10) K. Okamoto, C. Hatanaka and J. Ozawa：Agric. Biol. Chem., **27**, 596 (1963)。
- 11) K. Okamoto, C. Hatanaka and J. Ozawa：Agric. Biol. Chem., **28**, 331 (1964)。

献

- 12) C. Hatanaka and J. Ozawa : *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 627 (1964).
- 13) J. D. Macmillan and R.H. Vaughn : *Biochemistry*, **3**, 564 (1964).
- 14) C. W. Nagel and R. H. Vaughn : *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 344 (1961).
- 15) T. Bitter and H. M. Muir : *Anal. Biochem.*, **4**, 330 (1962).
- 16) W. E. Trevelyan, D. P. Protector and J. S. Harrison : *Nature*, **166**, 444 (1950).
- 17) 畑中千歳 : 農化, **41**, 448 (1967).
- 18) M. Dubois, K. A. Gills, J. K. Hamilton, P. A. Robers and F. Smith : *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 19) 東 量三 : ニュー・フード・インダストリー, **4** (9), 67 (1962).
- 20) 東 量三 : ニュー・フード・インダストリー, **4** (10), 61 (1962).
- 21) 松田典彦, 駒木 勝, 市川良子, 後藤幸恵 : 日食工誌, **32**, 391 (1985).
- 22) S. T. Cowan (坂崎利一訳) : 「医学細菌同定の手引き」, 近代出版, 1983, P 94.
- 23) T. Sakai and Y. Ozaki : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1019 (1988).
- 24) T. Sakai, K. Ikemoto and Y. Ozaki : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1213 (1989).

平成2年10月5日受付

平成2年11月18日受理