[農化 第 40 卷, 第 9 号, p. 325~330, 1966]

ペクチン質分解酵素に関する研究 (第 23 報)

Corticium rolfii が生産する耐酸性酵素の利用に関する研究

梶 明, 田 川 清 (香川大学農学部農芸化学科)

昭和 41 年 3 月 22 日 受 理

Studies on the Pectic Enzymes

Part XXIII. Utilization of Acid-Stable Enzymes Produced by *Corticium rolfii*

By Akira KAJI and Kiyoshi TAGAWA

Faculty of Agriculture, University of Kagawa

Corticium rolfii was cultivated in the medium containing 20 g of sugars or 12.5 g of pectin, 10 g of peptone, 0.5 g of NH_4NO_3 , 0.5 g of KH_2PO_4 , 0.2 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.3 ml of 2% FeCl_3 solution, in 1 l of dist. water. The initial pH of the cultural solution was adjusted at pH 5.4, and cultures of the mold were carried out at 30°C, for 8 days (shake culture) or 30 days (stationary culture). By the both cultural methods, pectic enzymes were effectively produced in the media containing pectin as carbon source. The crude enzyme solution was prepared by the method of ammonium sulfate fractionation from the stationary culture solution. The optimum pH values were found to be 4.5~5.0 for endo-polygalacturonase (endo-PG), 4.5 for pectinesterase, 3.5 for pectin depolymerase, 3.0~3.6 for arabanase, 2.5 for protease and 1.5~2.5 for maceration of plant tissues, respectively. It was also found that endo-PG had characteristic of acid stableness. The utilization of these enzymes was discussed especially in maceration action of various plant tissues.

(Received March 22, 1966)

緒 言

Corticium rolfii は植物病原菌で、各種の植物に寄生して軟腐病を起す。その病理学については早くから研究が進められているが、このかびが生産する酵素に関する研究はほとんどみられない。

著者らは、このかびのペクチン質分解酵素による植物組織の崩壊作用が pH 1.5~2.5 において著しいことを見だし、同時にエンドポリガラクトナーゼ (endo-PG) などのペクチン分解酵素の生産が著しく大きく、アラバナーゼおよびプロテアーゼの生産も大きいことを指摘したので、本報にこれらの酵素の生産および性質を報告する。このかびの酵素生産は著しいものがあるとともに安定性に富み、とくに耐酸性を有することが特徴であり、これらの性質を基礎として応用面の開発が期待される。

実 験 方 法

1. 菌の培養方法

培養基の組成は次のとおりである。炭素源 20 g, ただしペクチンの場合は 12.5 g, ペプトン 10 g, NH_4NO_3 0.5 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 2% FeCl_3 溶液 0.3 ml, 蒸留水 1 l. pH は 5.4 に調節した。振とう培養には 500 ml 容の振とうフラスコに 50 ml の培養基を入れ、静置培養のときは 3 l 容の三角フラスコに 1 l ずつ入れた。培養温度は 30° とした。

2. 酵素液の調製方法

本報の実験には粗酵素液を使用した。すなわち、培養液を布で濾過し、さらに遠沈した上澄液に硫酸を加えて完全飽和とし、沈殿を遠沈した後蒸留水にとかし、セロファンチューブを使用して水道水を外液として 5° で 24 時間透析し、続いて pH 4.0 の 0.005 M クエン酸・リン酸塩緩衝液を外液として 24 時間透析した。この透析

内液を粗酵素液とした。酵素生産の実験においては培養液を直接透析して酵素液とした。

3. 酵素作用力の測定方法

(1) **endo-PG** : Sunkist Growers のペクチン NF よりアルカリ法⁽¹⁾によってペクチン酸を調製し、粘度低下法によって endo-PG の作用力を測定した。すでに報告したように⁽²⁾, Ostwald の粘度計を使用し、25°において作用液の粘度を測定した。酵素作用液の配合は次のように行なった。1% ペクチン酸溶液 3.5 ml, 酵素液 1 ml, 緩衝液 1 ml, 30° で 1 時間酵素作用を進めた後、粘度低下度 A (%) を既報^(2,3) の如く求め、さらに Fig. 1 の検量線によって単位数を求めた。

Fig. 1. Standard Line of endo-PG Activity.

(2) **exo-PG** : endo-PG の作用力の測定と同一の配合液にトルオールを加えて 30° に 24 時間放置し、還元力の増加を Willstätter, Schudel 法の改良法^(4,5)によって測定した。

(3) **Pectin depolymerase** (polymethylgalacturonase) : 0.5% ペクチン NF 溶液 3.5 ml, 酵素液 1 ml, クエン酸・リン酸塩緩衝液 1 ml の配合液を 30° に 1 時間保ち、粘度低下度を endo-PG と同様に求めた。

(4) **Pectinesterase** : 1% ペクチン NF 溶液 20 ml を使用して前報⁽⁶⁾と同様に定量し、PMU で表現した。

(5) **CMCase** : 前報⁽⁶⁾と同様に測定した。

(6) **Macerating activity** : 種々の植物組織 1 片を試験管にとり、酵素液 1 ml, 緩衝液 1 ml, 蒸留水 1 ml, トルオール 0.2 ml を加え、37° に一定時間放置して maceration の状態を観察した。単位数を求めるときは第 21 報⁽⁷⁾に記載した方法によった。

(7) **アラバナーゼ** : 1% アラバン溶液 3 ml, クエ

ン酸・リン酸塩緩衝液 0.5 ml, 酵素液 1 ml, トルオール 0.2 ml の配合液を 40° におき、生成する還元力を Somogyi, Nelson 法の改良法⁽⁸⁾で定量し、著者らのアラバナーゼの報告⁽⁹⁾に記したように酵素単位数を求めた。

(8) **プロテアーゼ** : 2% カゼイン溶液 1 ml, 酵素液 1 ml を配合し、30 分間反応を進めた後、5% トリクロール酢酸 3 ml を添加し、30 分後沈殿を除き上澄液を水で 2.5 倍に希釈して 280 mμ における吸光度を測定した。カゼインは Merck の casein を使用し、0.05 M の乳酸緩衝液に 100°, 3 分間加温して溶解し、所定の pH に補正した後 2% の濃度になるように調製した。

Fig. 2. Influence of pH Value on Enzymatic Reactions (I).

○—○ endo-PG □—□ CMCase
●—● Pectin depolymerase

Fig. 3. Influence of pH Value on Enzymatic Reactions (II).

○—○ exo-PG ●—● pectinesterase

4. 培養液中の糖の定量方法

グルコース, アラビノースは Somogyi, Nelson 法の改良法⁽⁸⁾で定量し, ペクチンは Carbazole 法^(10,11)で定量した。

実験結果

I. ペクチン分解酵素

1. 酵素作用に対する pH 値の影響 種々のペクチン分解酵素および CMCase について影響を測定した。Fig. 2, 3 に示すように, endo-PG: 4.5~5.0, exo-PG: 4.0, pectin depolymerase: 3.5, pectinesterase:

4.5, CMCase: 3.0 の pH 値において最高の作用力がみられた。endo-PG の基質はペクチン酸であり, この溶液は pH 4.0 以下では, 粘度が次第に高くなるのでこの範囲は正確な値は求め難いが, Fig. 2 の曲線から考えられるように, pH 4.5 より低い pH 値で endo-PG の作用力はなお大きいことがわかった。

2. 酵素の生産状況 上記の培養液を使用し, 炭素源をグルコース, アラビノース, ペクチンとして 3 種類の培養基を作製した。種菌を接種後, 一定時間毎に培養液を無菌的に取り, 10 ml を遠心沈殿した後透析して内液を 15 ml として定量に使用した。定量値はすべて培養液 1 ml 当りに換算して表わした。

(1) 振とう培養による酵素生産: 前記の最適 pH において endo-PG, pectinesterase の作用力および macerating activity を測定した結果を Fig. 4 に示す。他の菌における同様に *C. rolfssii* においてもペクチンを炭素源に使用したとき, 著しくペクチン分解酵素の生産が大きく, 培養 7 日後で最高値に達した。

(2) 静置培養による酵素生産: *C. rolfssii* を静置培養したときの菌の増殖および酵素生産速度は比較的緩やかであったが, ペクチン含有培地の酵素生産量は極めて高く, 最高値は 24 日後に 1,575 unit/ml に達し, 酵素生産が著しいことがわかった。Fig. 5 に生産状況を示す。菌蓋の生成はいずれの炭素源においても充分に進行したがペクチン含有培地が最も良好で, グルコースがこれに

(I) Carbon source: pectin

(II) Carbon source: glucose

(III) Carbon source: arabinose

Fig. 4. Production of Pectic Enzymes during Shake Culture of *C. rolfssii*.

Pectinesterase did not produced in the culture medium containing glucose or arabinose.

○—○ sugar ●—● endo-PG △—△ pH
◐—◐ macerating activity ◑—◑ pectinesterase

(I) Carbon source: pectin

(II) Carbon source: glucose

(III) Carbon source: arabinose

Fig. 5. Production of Pectic Enzymes during Stationary Culture of *C. rolfssii*.

Pectinesterase did not produced in the culture medium containing glucose or arabinose.

○—○ sugar ●—● endo-PG △—△ pH
●—● pectinesterase ●—● macerating activity

次ぎアラビノースの順であった。

3. *endo*-PG の安定性に対する pH 値の影響 ペクチンを炭素源として静置培養によって生産された酵素を硫酸塩析、透析して得た溶液を原酵素液とした。この溶液 5 ml ずつを試験管にとり、0.1 N HCl または 0.1 N NaOH で所定の pH に調節した後、指定の pH の緩衝液 (pH 3.0 以下は塩酸・クエン酸ナトリウム緩衝液, pH 4.0 以上はクエン酸・リン酸塩緩衝液)

2 ml および蒸留水を加えて全容を 20 ml とし、トルオール 5 滴を添加後 15° において 120 時間放置した。次に各液の pH を 4.0 に調整し、この酵素液を適当に稀釈して酵素作用液に配合した。*endo*-PG を粘度低下法で測定し A (%) を求め、さらに PG unit/ml に換算して残存率を求めた。対照は原酵素液 (pH 4.0) を水で 4 倍に稀釈した溶液を -20° に保存したものである。Fig. 6 にその結果を示す。pH 1.5~8.0 の範囲において全般的に酵素は安定であり、pH 1.5 に処理した区分も *endo*-PG の残存率は 50% であった。別の実験において、pH 1.8~8.0 の酵素液を 2° において 72 時間保持

Fig. 6. Influence of pH Value on Stability of *endo*-PG.

TABLE I. MACERATION OF PLANT TISSUES

Dilution of enzyme solution	Materials	pH						
		1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
×100	Barks of Ganpi	+++	+++	+++	±	±	±	—
	Barks of Mitsumata	+++	+++	+++	±	±	±	—
	Potato	+++	+++	+++	++	+++	++	±
	Sweet potato	+++	+++	+++	++	+++	+++	—
	Carrot	+++	+++	+++	++	+++	+++	—
	Radish	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Segment of orange	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
×500	Barks of Ganpi	±	—	—	—	—	—	—
	Barks of Mitsumata	±	—	—	—	—	—	—
	Potato	+++	±	—	—	—	—	—
	Sweet potato	+++	+++	+	±	—	—	—
	Carrot	+++	+++	+++	++	—	—	—
	Radish	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	Segment of orange	+++	+++	++	++	—	—	—
×2,000	Barks of Ganpi	—	—	—	—	—	—	—
	Barks of Mitsumata	—	—	—	—	—	—	—
	Potato	+++	—	—	—	—	—	—
	Sweet potato	+++	++	±	—	—	—	—
	Carrot	+++	+++	+	—	—	—	—
	Radish	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—
	Segment of orange	+++	+++	++	—	—	—	—
Blank test	Barks of Ganpi	—	—	—	—	—	—	—
	Barks of Mitsumata	—	—	—	—	—	—	—
	Potato	+	—	—	—	—	—	—
	Sweet potato	—	—	—	—	—	—	—
	Carrot	++	++	—	—	—	—	—
	Radish	—	—	—	—	—	—	—
	Segment of orange	+++	++	—	—	—	—	—

Barks were cut in size of 1×1cm, others in 1cm diameter, 0.1 cm thick. The reaction medium was prepared as follows, one piece of material, 1ml of enzyme solution, 1ml of buffer solution (Sørensen buffer; pH 1.5~2.5, McIlvaine buffer; pH 3.0~7.5), 1ml of dist. water, and 2 drops of toluol. The medium was incubated at 37° for 5 hrs, then the material was discarded, tapped in water, and the degree of maceration was represented by the indication, +++ completely, +++, ± slightly. At pH 5.0~7.5, no maceration was detected in all plant materials.

したときは全く失活は認められなかった。これらの結果から, *C. rolfii* の endo-PG は極めて安定で, 耐酸性に富むことがわかった。

II. 酵素による植物組織の崩壊現象

酵素作用に対する pH 値の影響 上記の酵素原液を 100, 500, 2,000 倍に稀釈して作用液に配合し, 37° において 5 時間作用し, 各種の植物組織の崩壊作用を pH 1.5~7.5 において検討した。Table I に示すように多くの植物組織が崩壊され, 細胞が遊離された。pH 2.0 を中心にして作用は最高であった。ジャガイモのような柔組織では対照区分で pH 1.0~1.5 においても崩壊が認められたので, これらの組織では pH 2.0~2.5 において酵素作用が著しいものと判断された。

崩壊に関与する酵素は極めて安定であって, endo-PG のときと同一条件で酵素液を処理したとき, pH 1.8~8.0 で全く失活が認められなかった。

III. アラバナナーゼおよびプロテアーゼ

1. 酵素作用に対する pH 値の影響

Fig. 7 に pH 曲線を示す。アラバナナーゼは pH 3.0~3.6 に, プロテアーゼは pH 2.5 において最高の作用力を示した。プロテアーゼは酸性プロテアーゼと判断された。

2. 酵素の安定性に対する pH 値の影響

endo-PG の区分と同一の条件で各種の pH に酵素液を保持して失活の度を求めた。Fig. 8 に示すように, プロテアーゼは pH 2.3~

Fig. 7. Influence of pH Value on Activities of Arabanase and Protease.

○—○ arabanase (McIlvaine buffer)
●—● arabanase (Sørensen buffer)
○····○ protease

Fig. 8. Influence of pH Value on Stability of Arabanase and Protease.

○—○ arabanase
●····● protease

5.0 において極めて安定であり, pH 1.8 において 76.9 %, pH 1.5 で 68.9 % の残存率を示した. アラバナーゼは pH 3.0~7.0 において全く安定であったが pH 2.3 以下では著しく失活した.

考 察

1. endo-PG の生産と安定性

実験結果によれば *C. rolfsii* は endo-PG をかなりよく生産する. この酵素の生産について知られているように本菌においてもペクチンを炭素源とした培養によってよく生産される. 静置培養液中では生産された endo-PG は安定である. 最適 pH 値は 4.5~5.0 にあり, より低い pH においても活性を有することが推定された. 培養液より塩析, 透析された粗酵素液の endo-PG は極めて安定性に富み, 常温においても広い pH 範囲で安定で, とくに耐酸性を有している. 市販のペクチン分解酵素剤に比較してもこれらの性質は優れていることがわかった.

2. 植物組織の崩壊

C. rolfsii の酵素による植物柔組織および紡錘組織の maceration は, pH 4.5 以下において高く, とくに pH 1.5~2.5 において著しい. 柔組織については pH 1.5 においては水素イオン濃度の影響も或る場合には考慮に入れなければならないので, pH 2.0~2.5 において強い maceration が示されるものと判断される. このかびの endo-PG (pH 4.5~5.0) および pectinesterase (pH 4.5) よりも低い pH 範囲に maceration の最高値が現われることから, endo-PG (pH 4.5~5.0) の作用によって maceration が引き起されるのではなく, 別のペクチン質分解酵素やアラバン分解酵素によるものと考えられる. この maceration に関与する酵素も極めて広い範囲の pH 値で安定性に富み, 耐酸性であることも証明された. 従って植物組織の崩壊に *C. rolfsii* の酵素を利用することは興味深いものと考えられる.

3. アラバナーゼおよびプロテアーゼ

C. rolfsii はアラバナーゼおよびプロテアーゼをよく生産する. アラバナーゼは pH 3.0~3.6 に活性が高く, プロテアーゼは pH 2.5 にピークがあり, 酸性プロテアーゼと考えられる. 両酵素ともに安定性に富むが, プロテアーゼはとくに耐酸性を有する. 農産物の加工に関して単に maceration の応用のみならず, アラバンやタンパク質の分解も可能であり, これらの物質を含有する植物組織の崩壊および可溶化された物質の分解方面にも応用の可能性がある.

4. 低い pH の果汁の清澄

C. rolfsii の酵素によって夏ダイダイの果汁のような低い pH の果汁の清澄が可能である. 一般に果汁清澄酵素剤はリンゴ汁のような微酸性果汁の清澄に有効であるが, このかびの酵素による場合は, より低い pH の果汁の清澄に効果的である. この実験結果については別に詳しく報告する⁽¹²⁾.

要 旨

(1) *C. rolfsii* は endo-PG, pectinesterase, pectin depolymerase, アラバナーゼ, プロテアーゼをよく生産する.

(2) 最適 pH は endo-PG : 4.5~5.0, pectinesterase : 4.5, pectin depolymerase : 3.5, アラバナーゼ : 3.0~3.6, プロテアーゼ : 2.5 である. maceration は pH 1.5~2.5 に強く出現した.

(3) endo-PG, maceration に関与する酵素, プロテアーゼは耐酸性に富むことがわかった.

(4) 酵素による植物組織の崩壊作用およびアラバナーゼ, プロテアーゼによる応用面開拓の可能性を指摘した.

菌株の使用に便宜を与えられた香川大学農学部教授内藤中人博士に謝意を表します. 実験に助力された元山浩二郎, 山下昌之, 森川孝一, 三田村宏の諸氏に感謝の意を表します.

- (1) F. W. Norris, C. F. Resch : *Biochem. J.*, **31**, 1945 (1937).
- (2) 梶 明 : 本誌, **27**, 699 (1953).
- (3) 梶 明, 穴吹吉夫 : 本誌, **29**, 775 (1955).
- (4) R. Willstätter, G. Schudel : *Ber.*, **51**, 780 (1918).
- (5) J. R. Collins : *Anal. Chim. Acta*, **9**, 500 (1953).
- (6) 梶 明, 田川 清, 山下昌之 : 本誌, **40**, 209 (1966).
- (7) 田川 清, 梶 明 : 香川大学農学部学術報告, **17**, 104 (1966).
- (8) R. L. Whistler, M. L. Wolfrom : "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol. I, New York, London, Acad. Press, p. 386 (1962).
- (9) 梶 明, 田川 清 : 本誌, **38**, 580 (1964).
- (10) S. M. Stark : *Anal. Chem.*, **22**, 1158 (1950).
- (11) E. A. McComb, R. M. McCready : *ibid.*, **24**, 1630 (1952).
- (12) 真部正敏, 梶 明, 樽谷隆之 : 日本食品工業学会誌, **13**, 269 (1966).