Bacillus sp. F-11 のペクチン分解酵素による 植物組織の崩壊作用*

梶 明, 藤川 勇, 岩原章二郎, 佐藤優行
(香川大学農学部農芸化学科)

昭和 47 年 4 月 14 日 受 理

Pectolytic Enzymes with the Macerating Activity Produced by *Bacillus* sp. F-11

(Maceration of Plant Tissues by Microbial Enzymes Part VII)

By Akira KAJI, Isamu FUJIKAWA, Shojiro IWAHARA and Masayuki SATO

Department of Agricultural Chemistry, Kagawa University, Miki-cho, Kagawa-ken

Bacillus sp. F-11 isolated from soil elaborated pectolytic enzymes with macerating activity. Two peaks of macerating activities were observed at pH 6.0 to 7.0 and 9.5 when the crude enzyme preparation acted on the barks of Ganpi (*Wikstroemia sikokiana* Fr. et Sav.). The latter peak coincided with that of polygalacturonic acid *trans*-eliminase. This enzyme was purified with ammonium sulfate, Duolite A-2, Amberlite IRC-50 and DEAE-Sephadex A-50. The purified enzyme retained the macerating activity with an optimum at pH 9.5, but nearly lost the activity at pH 6.0 to 7.0. From these results, it is concluded that the macerating activity at pH 9.5 is due to polygalacturonic acid *trans*-eliminase.
(Received April 14, 1972)

ペクチン質は高等植物の細胞壁成分であり、柔組織などの細胞を接着し、そのうち水に不溶性のものが protopectin といわれている。古い概念によれば、この不溶性ペクチンを可溶性化する酵素の存在が考えられ、“protopectinase”⁽¹⁾と呼ばれていた。しかしながら、endo-polygalacturonase および pectinesterase の研究が進展するに伴い、“protopectinase”の存在を疑問視する考察が発表され、この酵素は endo-polygalacturonase と同一であろうと考えられた^(2,3)。ところが、梶は *Clostridium felsineum* var. *sikokianum* の endo-polygalacturonase⁽⁴⁾を精製したところ、これがペクチン酸に対しては、きわめて活性が高いにもかかわらず、組織中のペクチン質には、全く作用力を示さないことを発見した。これに対して小沢は、*Saccharomyces fragilis* の endo-polygalacturonase⁽⁵⁾を精製して、その macerating activity を証明し、遠藤は *Coniothyrium diplodiella*

の endo-polygalacturonase⁽⁶⁾を精製し、これが3つの component より成立し、そのうちの1つのみが、限定された植物の柔組織に対して活性を示すことを発表した。その他の研究成果^(7,8)を参考にすれば、高等植物のマセレーションは、ある種の endo-polygalacturonase によって引き起こされることが明らかになった。また pectin *trans*-eliminase^(9,10)によっても、この現象が引き起こされることも証明されている。

1956 年 Kaji⁽¹¹⁾は、*Clostridium felsineum* var. *sikokianum* の生産する macerating enzyme を分離精製することに成功し、その性質について報告した。この酵素は、中層のペクチン質に作用力が大きく、遊離のペクチンおよびペクチン酸には、ほとんど作用力を示さなかった。この酵素を雁皮に作用したとき、遊離するペクチンが回収された。Kaji は 1959 年、macerating enzyme に関する追加報告⁽⁴⁾を発表した。酵素による植物組織のマセレーションの際に、ペクチンが回収された報告は、ほかにはみられない。

* 微生物酵素の植物組織崩壊作用 (第 7 報)。前報：香川大学農学部学術報告, 16, 137 (1965)。

本報においては, *Bacillus* sp. F-11 の polygalacturonic acid *trans*-eliminase (E. C. 4.2.99.3) の部分精製を行ない, その macerating activity を証明し, さらに pH 6 付近に最高値を持つ macerating activity について考察を加えた。

実験方法

菌 F-11 は土壌から分離された好気性桿菌であり, 同様に分離された好気性細菌 600 株のうち, macerating activity が最も強いことがわかったので, 本実験に使用した。比較のために, *Bacillus polymyxa* IFO 3020 を使用した。

F-11 の主な性質は, 次のとおりである。試験管中のブイヨンに接種して, 30°C で振とう培養を行ない, 24 時間後の栄養細胞について, $0.8 \times 3.0 \sim 6.0 \mu$ の桿菌であり, グラム染色陽性であった。48 時間培養後, 胞子の形成が認められた。ブイヨン寒天斜面培養は生育良好であり, 24 時間培養の肉眼的観察結果は, *Bacillus subtilis* とよく似ていた。

培養方法 Peptone 10g, K_2HPO_4 0.5g, KCl 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g をふすま抽出液 1l に溶解し, pH を 7.0 に調整して培養基とした。ふすま抽出液は, 井戸水 1l にふすま 50g を加え, 還流冷却器をつけた三角フラスコに入れ, 沸騰水中で 1 時間水抽出し, 冷却後, 布でろ過し, 水で定容 1l にした。

両菌の培養に際しては, 小規模培養は 500 ml 容の振とうフラスコに 50 ml の培養基を入れ, 菌を接種して往復振とう機上で, 28°C において培養を行なった。大規模培養 (F-11) はタンク培養とし, 同培養基 150l に種培養を接種し, 29~30°C で 50 時間通気培養を行なった。

粗酵素剤の調製法 培養液より菌体を除去し, 透明液 120l に 0.9 飽和まで硫酸を加え, 沈殿物を集めて脱イオン水に溶かし, 0.02 M Na-phosphate buffer (pH 6.0) を外液として透析し, 内液を粗酵素液とした。

基質 ペクチンとして Sunkist Growers pectin NF を用いた。ペクチン酸は, ペクチンを材料として Norris, Resch⁽¹²⁾ の方法に従い, 条件を既報⁽⁹⁾ のとおりにして調製した。araban は Hurst, Jones⁽¹³⁾ の方法によって beet pulp から調製し, 粗製品のまま使用した。arabinoxylan は, Howard⁽¹⁴⁾ の方法によって小麦粉から調製した。精製 β -galactan および粗製 arabino-

galactan は, K & K Laboratories, Inc. より購入した。いずれも, カラマツを材料にして調製されたものである。laminarin も, 同社から購入した。carboxymethyl cellulose は, 和光純薬の製品である。Table V に示す合成基質は, 既報^(15,16) のとおりに購入した。雁皮 (*Wikstroemia sikokiana* Fr. et Sav.) の標品は, 採取後 1 年以内の皮を使った。幅約 1.5 cm の白皮を選んで, 表皮を完全に除き, その白皮の中間部を切りとり, さらに 1×1 cm の大きさに切り, 数時間水に浸漬したのち充分指先でもみ, 空気泡を除いて実験に使用した。

酵素活性の測定法

(1) Polygalacturonic acid *trans*-eliminase : 0.5 % ペクチン酸溶液 2.0 ml, 酵素液 0.4 ml, buffer 1.0 ml, 脱イオン水 0.2 ml, 0.01 M $CaCl_2$ 溶液 0.4 ml を混合し, 30°C で 30 分間酵素作用を進めたのち, 235 m μ における吸光度の増加を測定した⁽¹⁷⁾。上記の条件下で, 1 分間に 1 μ mole のアルデヒド基を遊離させる酵素量を 1 単位と定めた。

(2) Endo-polygalacturonase : 0.5 % ペクチン酸溶液 3.5 ml, 酵素液 1.0 ml, buffer 1.0 ml を混合し, 30°C で 60 分間酵素作用を進めたのち, 粘度低下度 (A %) を求め既報⁽¹⁸⁾ のとおりに単位数に換算した。

(3) Arabanase : 1 % araban 溶液 3.0 ml, 酵素液 1.0 ml, buffer 0.5 ml を混合し, 30°C で 60 分間酵素作用を進めたのち, Nelson, Somogyi 法によって還元力を測定し, 既報⁽¹⁹⁾ のとおり酵素単位を測定した。

(4) β -Galactanase, rhamnosidase, β -1,3-glucanase の活性測定は, 上記 arabanase に準じて行なった。

(5) α - および β -D-galactosidase, β -D-xylosidase, α -L-fucosidase, α -D-mannosidase, α -D-glucosidase, N-acetyl β -D-glucosaminidase, α -L-arabinofuranosidase などの酵素作用は, Table V の合成基質を使用して, 既報⁽¹⁶⁾ のとおりに酵素作用を測定した。

(6) Macerating activity : 雁皮白皮 (1.0×1.0 cm), 酵素液 1.0 ml, buffer 1.0 ml, 脱イオン水 1.0 ml, トルオール 2 滴を混合し, 37°C で作用を進めた。ジャガイモ切片 (径 1.0 cm, 厚さ 1 mm), 酵素液 1.0 ml, buffer 1.0 ml, 脱イオン水 1.0 ml, トルオール 2 滴を混合し, 37°C で作用を進めた。作用時間は, 実験結果の項で記載した。macerating activity の表示方法は, 既報⁽²⁰⁾ のとおりである。一般に, 植物組織の崩壊作用を数値で表

現することはむずかしく、とくにジャガイモなどの柔組織を基質とするときに困難である。従って、本報では数値をもって酵素活性を表示するためには、主として雁皮を基質に使用した。

酵素の精製法

Polygalacturonic acid *trans*-eliminase の精製：
粗酵素液中の色素および不純タンパク質の一部を、Doulite A-2 (pH 6.0) によって除去した。次に、0.02 M Na-phosphate buffer (pH 6.0) で平衡化した Amberlite IRC-50 (100~200 メッシュ) のカラムに酵素を吸着させたのち、0.2 M Tris-HCl buffer (pH 9.0) でカラムを洗い、続いて 0.2 M NH_4OH 溶液、または 0.2 M NH_4Cl - NH_4OH buffer (pH 11.4) を添加して、polygalacturonic acid *trans*-eliminase を溶出し、酵素液を 0.2 M NH_4Cl - NH_4OH buffer (pH 9.3) を外液として透析したのち、同一 buffer で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 のカラムを通過させて不純タンパク質を除去した。さらに、0.02 M Na-phosphate buffer (pH 7.0) で酵素液を透析した。

実験結果

I. 粗酵素液を使用した実験結果

(1) **Macerating activity：**F-11 の雁皮およびジャガイモに対する macerating activity-pH 曲線を Fig. 1 に示す。あわせて *B. polymyxa* の粗酵素液によるものを示す。Fig. 1 に示すとおり、pH 8.0~9.5 に酵素活性のピークが明快に現われ、これは両菌とも、主として polygalacturonic acid *trans*-eliminase の作用によることを示す。F-11 においては、このピークと別に pH 6.0~7.0 においても、macerating activity がはっきりと認められた。これに対して *B. polymyxa* については、pH 6.0~7.0 には明らかなピークが現われなかった。

(2) **pH 6.0 および pH 9.0 における酵素活性：**
種々の基質を使用して、F-11 の酵素活性を pH 6.0 および pH 9.0 において検索した。その結果を Table I に示す。Table I に示す天然基質に対する酵素活性は、pH 9.0 における polygalacturonic acid *trans*-eliminase が最も著しく、合成基質に対するグリコシダーゼ活性としては α -D-glucosidase および N-acetyl β -D-glucosaminidase がわずかに認められたが、その他に対しては活性は現われなかった(作用時間 2 時間)。pH 6.0

Fig. 1. Effect of pH on Macerating Activities of the Enzymes from *Bacillus* sp. F-11 and *B. polymyxa*.

For pH 4 to 6, 0.1 M sodium citrate-0.2 M Na_2HPO_4 buffer was used; for pH 6 to 9, 0.2 M trisaminomethan-0.1 M HCl buffer; for pH 9 to 11, 0.2 M Na_2CO_3 - NaHCO_3 buffer.

F-11: ○—○ Ganpi bark, △—△ potato disk.
B. polymyxa: ●—● Ganpi bark.

における活性のうち、arabanase が比較的高い活性を示した。pH 6.0 におけるペクチン分解酵素活性が、ほとんど見られなかったことは注目すべき点である。

(3) Polygalacturonic acid *trans*-eliminase：

F-11 および *B. polymyxa* の同酵素の activity-pH 曲線を Fig. 2 に示す。両菌の酵素とも、pH 9.0~9.5 に最高値が認められ、上記の macerating activity の最適 pH とほとんど同じであった。

(4) **Arabanase：**F-11 の酵素活性の pH 曲線を、Fig. 3 に示す。実験結果によれば、pH 4.0 から 9.0 の広い範囲に酵素活性が認められたが、最適 pH 値は pH 5.5 から 6.5 に確認された。

II. 酵素の精製

粗酵素液を Doulite A-2 のカラム (3.7×80 cm, pH 6.0) に添加し、0.02 M Na-phosphate buffer (pH 6.0) をひきつづいて加え、通過液中酵素活性の高い区分を集めた。この操作で、不純タンパク質の一部、および色素の大部分が除去された。次に、Amberlite IRC-50 によるカラムクロマトグラフィーを行ない、その結果を Fig. 4 に示した。この操作で polygalacturonic acid *trans*-eliminase はピーク I, II, III に分かれた。ピーク I は、非吸着酵素である。ピーク II は、polygalact-

Table I. Various Enzymes Produced by *Bacillus* sp. F-11

Enzyme	Substrate	Time of reaction (min)	Amount of enzymes (units/ml)	
			pH 6	pH 9
Polygalacturonic acid <i>trans</i> -eliminase	pectic acid (citrus)	30	<1	51
	pectin (citrus)	30	<1	17
	pectin (Ganpi)	30	<1	30
Arabanase	beet araban	120	0.46	0.08
Xylanase	arabinoxylan	120	0	0
β -Galactanase	β -galactan	120	0	0
	arabinogalactan	120	0	0
β -1,3-Glucanase	laminarin	120	0	0
α -L-Arabinofuranosidase	phenyl α -L-arabinofuranoside	120	0	0
α -Rhamnosidase	methyl α -L-rhamnoside	120	0	0
	naringin	120	0	0
β -Xylosidase	<i>p</i> -NP β -D-xyloside*	120	0	0
α -D-Fucosidase	<i>p</i> -NP α -D-fucoside	120	0	0
α -D-Glucosidase	<i>p</i> -NP α -D-glucoside	60	0.18×10^{-3}	0
β -D-Glucosidase	<i>p</i> -NP β -D-glucoside	60	0	0
α -D-Galactosidase	<i>p</i> -NP α -D-galactoside	60	0	0
β -D-Galactosidase	<i>p</i> -NP β -D-galactoside	60	0	0
α -D-Mannosidase	<i>p</i> -NP α -D-mannoside	60	0	0
N-Acetyl β -D-glucosaminidase	<i>p</i> -NP N-acetyl β -D-glucosaminide	60	3.47×10^{-3}	0.34×10^{-3}
Cellulase	filter paper	240	0	0
	CMC	60	0	0
Viscosity decrease A (%)** of	pectic acid (citrus)	60	0(%)	47.8(%)
	pectin (citrus)	60	5.5	19.9
	pectin (Ganpi)	60	2.8	33.0

* *p*-nitrophenyl β -D-xyloside.** Crude enzyme solution was diluted 10 fold, and decrease in viscosity of substrate solution was determined by the method described in the previous paper.⁽¹⁸⁾ Fig. 2. Effect of pH on Activity of Polygalacturonic Acid *trans*-Eliminase.

For pH 6 to 7, 0.1 M sodium citrate-0.2 M Na_2HPO_4 buffer was used; for pH 7 to 9, 0.2 M Tris-0.1 M HCl buffer; for pH 9 to 11, 0.2 M Na_2CO_3 - NaHCO_3 buffer.

F-11: ○—○, *B. polymyxa*: ●—●

Fig. 3. Effect of pH on Activity of Arabanase Produced by F-11.

Buffers used were the same as described in the legend of Fig. 1.

uronic acid *trans*-eliminase に富む区分であるので、次の精製過程に移した。ピーク III には、低い polygalacturonic acid *trans*-eliminase 活性が認められたが、同時に macerating activity (pH 6.0 および 9.5) が認められた。

ピーク II の区分に硫酸を加えて酵素を沈殿させたのち、上記のとおり DEAE-Sephadex A-50 を通過させ

Fig. 4. Chromatographic Purification of Polygalacturonic Acid *trans*-Eliminase.

Amberlite IRC-50 was equilibrated with 0.02M sodium phosphate buffer (pH 6.0) and packed in a column, 4.2×76cm. The enzyme solution passed through Doulite A-2 column (1000ml, 1.79g protein and 3361 units of polygalacturonic acid *trans*-eliminase/liter) was poured onto the Amberlite IRC-50 column. The enzyme was eluted with step-wise addition of 0.02M Tris-HCl buffer (pH 9.0) and 0.2M $\text{NH}_4\text{Cl-NH}_4\text{OH}$ buffer (pH 11.4). Fractions 251~350 were collected. — polygalacturonic acid *trans*-eliminase, --- protein.

た。この操作は pH 9.3 において行なったので、大部分の不純タンパク質は変性し、カラムの上端に止まったものと判断された。これに反して、polygalacturonic acid *trans*-eliminase は、この pH において変化を受けることなく、カラムを通過して回収された。この結果、比活性は著しく上昇したものと考えられる。通過液中 polygalacturonic acid *trans*-eliminase の強い区分を集め、0.02M Na-phosphate buffer (pH 7.0) を外液として透析した液を、精製酵素液とした。精製の全過程を Table II に示す。比活性は、64.8 倍に上昇した。

III. 精製酵素の性質

(1) Polygalacturonic acid *trans*-eliminase の activity-pH 曲線： Fig. 5 に示すとおり、F-11 の polygalacturonic acid *trans*-eliminase の最適 pH は、

Fig. 5. Effect of pH on Purified Polygalacturonic Acid *trans*-Eliminase.

Buffers used were the same as described under Fig. 2.

Fig. 6. Effect of pH on Macerating Activity of Polygalacturonic Acid *trans*-Eliminase.

Buffers used were the same as described under Fig. 2. Purified polygalacturonic acid *trans*-eliminase. ○—○ (diluted 4 fold) Partially purified enzyme, peak III in Fig. 4 ●—●.

Table II. Purification of Polygalacturonic Acid *trans*-Eliminase Produced by *Bacillus* sp. F-11

Step	Vol. (ml)	Total protein (g)	Total activity (units)	Yield (%)	Specific activity (units/mg)
1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	730	7.79	6476	100	0.83
2. Duolite A-2	1000	1.79	3361	51.9	1.88
3. Amberlite IRC-50	1690	0.118	632	9.8	5.35
4. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	240	0.049	296	4.6	6.04
5. DEAE-Sephadex A-50	250	0.003	162	2.5	53.82

9.5 であることがわかった。

(2) **Macerating activity の pH 曲線** : 精製 polygalacturonic acid *trans*-eliminase の macerating activity-pH 曲線を, Fig. 6 に示す。同時に比較のために, Amberlite IRC-50 で分離したピーク III の曲線も示した。この結果から判断すると, 精製酵素には pH 6.0 における活性がほとんどなくなり, pH 9.5 に単一のピークが認められた。これに対して部分精製の酵素 (ピーク III) においては, pH 6.0~7.0 と pH 9.5 に macerating activity が認められた。

(3) **基質特異性** : 精製酵素液を使用して, Table I に示す各基質に対する酵素活性を, pH 9.5 において調べた。citrus pectic acid, citrus pectin, Ganpi pectin に対しては, *trans*-eliminase 活性および粘度低下が確認され, これらの基質に対する活性の比率も, 粗酵素液とはほぼ同じであった。その他の基質に対しては, 全く酵素活性は認められなかった。このことは, 精製操作によって arabanase, α -glucosidase, N-acetyl β -D-glucosaminidase が, 完全に除去されたことを示している。

ピーク III の酵素液を使用して, 同様に基質特異性を pH 9.5 において検討した。3 種類のペクチン質に対しては, 明らかに *trans*-eliminase 活性が認められたが, arabanase, N-acetyl glucosaminidase 活性は認められなかった。

これらの結果から, F-11 の polygalacturonic acid *trans*-eliminase (pH 9.5) は, 雁皮の中層ペクチンに対しても, 明らかに活性があるものと結論される。なお, 雁皮ペクチンの $\text{CH}_3\text{O}-$ 含量は, 前報⁽⁴⁾の実験結果によれば 3.33% であった。

考 察

I. Polygalacturonic acid *trans*-eliminase による植物組織の崩壊

実験結果に示したように, *Bacillus* sp. F-11 による maceration においては, polygalacturonic acid *trans*-eliminase が重要な役割をになっていることが明らかである。精製酵素による実験結果, および比較のために行なった *B. polymyxa* の結果によれば, この酵素の macerating activity の最適 pH 値は, 9.5 であると断定できる。

Pectin *trans*-eliminase による maceration については, Byrde, Fielding⁽⁹⁾ および石井ら⁽¹⁰⁾ が, かびにつ

いて証明した。本実験結果によれば, 好気性細菌においては広く polygalacturonic acid *trans*-eliminase が, maceration にあずかっているものと考えられる。

II. *Clostridium felsineum* var. *sikokianum* の macerating enzyme について

この酵素に関しては, Kaji が part I⁽¹¹⁾ および IV⁽¹²⁾ において発表した。

(1) **Part I について** : この報告の実験においては, *C. felsineum* の macerating enzyme を Amberlite IRC-50 によって分離した。その性質は, 雁皮に対する macerating activity が大きいにもかかわらず, 遊離のペクチンおよびペクチン酸に対しては, ほとんど活性が認められなかった。この酵素の最大の特徴は, 中層ペクチン質に対しては作用力が大きく, 雁皮の maceration を遂行したとき, ペクチンが高い回収率 (93.7%) で得られたことにある。この酵素の最適 pH は, 6.0 であった。part I に記載したとおり, この精製酵素には arabanase および xylanase 活性は認められなかった。この報告の発表後, pectin または polygalacturonic acid *trans*-eliminase 活性を検討したが, 全く認められなかった。この酵素の作用機構については, 基質が天然の巨大分子であるために, 判定がむずかしい。最も考えられることは, size specificity であろう。この立場をとれば, macerating enzyme は中層の巨大分子のペクチン質に対して酵素作用が大きく, 遊離のペクチン酸に対しては, 作用力が小さい endo-polygalacturonase であると考えられる。

(2) **Part IV について** : Part IV の報告の実験においては, macerating enzyme は Doullite CS-101 によって分離精製された。この酵素による雁皮の maceration においては, ペクチンの回収率は 78.0% であった。報告に記載したとおり, 精製酵素液には xylanase 活性は認められなかった。しかし, その後の検討によれば arabanase 活性が認められ, 雁皮の maceration を進めたあとの作用液中に, アラビノースとガラクトロン酸を含むオリゴ糖が検出された。part IV の精製酵素標品には, macerating enzyme および arabanase が含まれていたものと考えられる。従って, maceration に際してペクチン回収率が, part I の結果よりも低い値を示したものと判断される。畑中, 小沢^(21,22)により, 靱皮植物のペクチンは, その構成糖にガラクトロン酸, アラビノース, ガラクトースなどを含むことが明らかになっ

た。 *C. felsineum* の macerating enzyme に arabanase が混在しているときは、雁皮のペクチン中の arabinosyl linkage が切断され、そのためにペクチンの回収率が低下したものと考えられる。

要約すれば、part I の実験結果は macerating enzyme 単独の作用であり、part IV の結果は、macerating enzyme および arabanase の共同作用によるものであると判断される。

III. F-11 の pH 6.0 における macerating activity

本実験結果が示すとおり、F-11 の酵素による maceration は、polygalacturonic acid *trans*-eliminase (pH 9.5) による作用のほかに、pH 6.0 における活性が存在する。後者の作用に主役をなす酵素については、次の 2 つの考察が与えられる。

(1) Polygalacturonic acid *trans*-eliminase の pH shift による現象：Fig. 4 のピーク III による maceration は Fig. 5 に示すとおり、pH 9.5 および pH 6.0~7.0 に現われる。この現象は、polygalacturonic acid *trans*-eliminase の活性が、遊離のペクチン酸を基質とするときは pH 9.5 に最高であり、中層ペクチンを基質にするときには、pH 6.0~7.0 に最適値を示すという酵素の pH shift によっても説明がつく。F-11 の polygalacturonic acid *trans*-eliminase には、数種類の component があり、中層ペクチンを基質とするときに、shift を起こす component と起こさない component があるという考察が成り立つ。

(2) Macerating enzyme の存在： *C. felsineum* の macerating enzyme と同様に、polygalacturonic acid *trans*-eliminase 系の macerating enzyme が、F-11 によって生産されていると考えられる。この酵素も、遊離のペクチン酸には作用力が小さく、中層ペクチンのごとき巨大分子を基質とするときは、作用力が大きいものと考えられる。ただし、 *C. felsineum* の macerating enzyme は、endo-polygalacturonase 系であり、この点において、F-11 の macerating enzyme と異なるものと考えられる。

pH 6.0~7.0 の macerating activity が、上記 (1)、(2) のいずれによるものかは、polygalacturonic acid *trans*-eliminase, macerating enzyme および endo-arabanase の分離精製が完遂されたのちに決定されるであろう。

著者らによる菌の分離、検索の結果によれば、F-11

に類似の酵素生産を行なう好気性細菌は、土壌中に広く分布している。また、 *Erwinia carotovora* の酵素による maceration (梶, 平田, 佐藤, 未発表) の研究結果によれば、この菌の酵素作用は F-11 と類似している。これらの結果をあわせて考えると、自然界の好気性細菌による植物組織の崩壊現象には、polygalacturonic acid *trans*-eliminase が重要な役割をになっているものと判断される。

要 旨

(1) 土壌より分離した *Bacillus* sp. F-11 を使用して、植物組織の崩壊に関する酵素の研究を行なった。粗酵素を使用するときは、macerating activity の最適値が pH 9.5 および pH 6.0~7.0 に認められた。

(2) Polygalacturonic acid *trans*-eliminase を精製し、その酵素活性および macerating activity が pH 9.5 において最高であることを明らかにした。

(3) pH 6.0~7.0 における macerating activity についても実験を行ない、考察を加えた。

- (1) C. S. Brinton, W. H. Dore, H. J. Wichmann, J. J. Willaman and C. P. Wilson: *J. Amer. Chem. Soc.*, **49**, 38 (1927).
- (2) Z. I. Kertesz: "The Enzymes," Vol. I, Part 2, ed. by J. B. Summer and K. Myrbäck, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1951, p. 751.
- (3) *idem*: "Methods in Enzymology," Vol. I, ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1955, p. 158.
- (4) A. Kaji: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 131 (1959).
- (5) 小沢潤二郎, 岡本賢一, 林 哲吾: 農学研究, **47**, 105 (1959).
- (6) 遠藤 章: 農化, **40**, R 43 (1966).
- (7) M. Yamasaki, T. Yasui and K. Arima: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 1119 (1966).
- (8) A. Kaji and T. Okada: *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**, 203 (1969).
- (9) R. J. W. Byrde and A. H. Fielding: *J. Gen. Microbiol.*, **52**, 287 (1968).
- (10) 石井茂孝, 川村 敏, 横塚 保: 農化, **44**, 306 (1970).
- (11) A. Kaji: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 8 (1956).
- (12) F. W. Norris and C. F. Resch: *Biochem. J.*, **31**, 1945 (1937).
- (13) E. L. Hurst and J. K. N. Jones: *J. Chem. Soc.*, **1948**, 2311.

- (14) B. H. Howard : *Biochem. J.*, **67**, 643 (1957).
 - (15) A. Kaji and T. Ichimi : *Appl. Microbiol.*, **18**, 1036 (1969).
 - (16) A. Kaji and O. Yoshihara : *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1335 (1972).
 - (17) P. Albersheim, H. Neukom and H. Deuel : *Helv. Chim. Acta*, **43**, 1422 (1960).
 - (18) 梶 明, 穴吹吉夫 : 農化, **29**, 775 (1955).
 - (19) A. Kaji and K. Tagawa : *Biachim. Biophys. Acta*, **207**, 456 (1970).
 - (20) 田川 清, 梶 明 : 香川大農学術報告, **17**, 104 (1966).
 - (21) 畑中千歳, 小沢潤二郎 : 農化, **40**, 98, 421 (1966).
 - (22) 畑中千歳, 小沢潤二郎 : 農化, **42**, 645 (1968).
-