ペクチン質分解酵素の簡易定性・定量法

中村 正人, 内山 武夫

(新潟大学農学部農芸化学科)

平成元年8月22日受理

A Simple and Convenient Method for Assaying Pectic Enzyme Activities

Masato NAKAMURA and Takeo UCHIYAMA

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Niigata University, 2-8050 Ikarashi, Niigata 950-21

A simple and convenient assay method for detecting pectic enzymes was devised by using Cetavlon (cetyltrimethylammonium bromide), which forms precipitates with acidic polysaccharides.

Five milliliters of 2% agar solution containing 0.3% pectin or pectic acid was poured into petri dishes (9 cm in diameter), and stainless cups (8 mm in diameter, 10 mm in height) which used to assay antibiotic substances were put on the agar plates. Enzyme solution was poured into the cups and incubated for about 15 hr at 37°C. For detecting the lytic zones, 3% Cetavlon solution was run into the agar plates, and allowed to standing for about 30 min at room temperature. The diameter of lytic zone around the cups was measured with a ruler. There was a linear relationship between the diameter of the lytic zone and logarithms of enzyme concentration. The pH optima of the pectic enzymes were also estimated by changing the pH of the agar plates containing the substrate. Pectic acids with degrees of polymerization below 12 to 15 did not form precipitates with Cetavlon.

(Recived August 22, 1989)

核酸や微生物細胞壁多糖の分離に用いられる陽イオン界面活性剤、セタブロン (Cetyltrimethylammonium bromide)⁽¹⁾ はペクチン酸などの酸性多糖と反応して沈殿を生ずる。しかし、それらが酵素等で分解を受けた場合は反応しない。この性質はペクチン質分解酵素の検出法^(2,3)としても利用されているが、このことについて詳しい検討はなされていない。そこで、われわれは特徴あるペクチン質分解酵素を生産する菌、ならびにペクチン質分解酵素の阻害剤の検索にあたり、酵素活性の測定に対するこの方法の有効性について検討し、若干の考察を加えたので、ここに報告する。

酵素標品としてペクチン酸リアーゼ (EC 4.2.2.2) を生産する *Erwinia carotovora* (AMS 6082) の培養濾液を用いた^(4,5)。その方法は肉汁培地 (肉エキス, 1%; ポリペプトン, 1%; 食塩, 0.5%) に炭素源としてペクチン 0.3% を加え、pH を 7.0 とし常法どおり殺菌し、30°C で一晩前培養 (往復振とう培養, 振幅 7 cm, 振とう数 120 回/分) 後、これより 1 ml を同培地 (500 ml 容

振とうフラスコに培地 100 ml) に接種し、同一条件下で 18 時間培養した。その後、冷却遠心機で除菌し、その上澄を粗酵素液として用いた。また、市販の部分精製された微起源のペクチナーゼ (INC Nutritional Biochemicals) も使用した。なお、酵素の生産と活性測定用の基質はレモンより調製したペクチン (和光純薬) およびペクチン酸 (和光純薬) を使用した。ペクチンは使用に際し 70% エタノールで 3 回洗浄しアセトンで脱水後、乾燥したものを用いた。

酵素の最適 pH 測定用の緩衝液は、1/10 M クエン酸-リン酸二ナトリウムおよび 1/5 M リン酸塩緩衝液を用いた。

1. 最適セタブロン濃度の検討 この方法は、ペクチン (0.3%) またはペクチン酸 (0.3%) を含んだ寒天 (2%) 培地をいれた平板上に菌を接種し、一定時間培養後セタブロン水溶液を注ぎ、室温に約 30 分間放置すると、菌の生産した酵素が拡散したその周辺部はペクチン等が分解され、セタブロンと反応せず透明なゾーンとな

Table I. Diameters of Lytic Zones on the Plates with Two Different Volumes of Agar Solutions Containing Substrates

Agar solution (ml)	Enzyme concentration	Lytic zone (mm)	
		Pectin (0.3%)	Pectic acid (0.3%)
5	1	25.3±1.7	26.6±1.5
	×1/5	20.3±1.1	20.4±1.0
	×1/10	17.0±1.4	18.6±0.5
10	1	20.2±1.5	22.2±1.5
	×1/5	13.8±1.3	16.0±0.6
	×1/10	11.3±0.8	14.6±1.2

Enzyme: A culture broth of AMS 6082 was diluted 1/1, 1/5 and 1/10 with distilled water.

Assay method: Cup assay was conducted in petri dishes (9 cm in diameter) containing either 5 or 10 ml agar (2%) and substrate (0.3%) solution at 37°C for 15 hr.

Data were expressed as the mean of triplicate experiments and the standard deviation.

るが未分解の部分は反応して沈殿・白濁を生じることを利用したものである。そこで、最もコントラスト良く溶解ゾーンを識別できるセタブロン濃度を知るため、*E. carotovora* の培養濾液を粗酵素液としてカップ（抗生物質検定用：8×10 mm）に満たし一定時間培養後、1, 3 および 5% 水溶液で調べた。その結果、1% では薄く溶解円径を判別しにくい、3 および 5% 濃度では良好なコントラストが得られた。しかし、経済性の面から 3% セタブロン水溶液を用いることにした。なお、ペーパードISKでも試験したがカップ法に比して溶解円径は小さく、酵素濃度の変化による差異も見られなかった。この結果より、カップ法が有効と判断され、以後の実験はカップ法で行った。

2. 最適培地量の検討 基質を含んだ寒天培地の厚さと反応時間が、酵素の濃度およびその拡散面積との関係から溶解円径に大きな影響を与えられと考える。そこで、ペクチンおよびペクチン酸を基質とし培地量を 5 および 10 ml として溶解円径を調べた。なお、反応時間は 37°C で 15 時間とした。その結果、Table I に示したように、培地量 10 ml では基質を含んだ寒天層が厚いため溶解円径は小さく、かつ酵素濃度間の差も少ない。しかし 5 ml では層が薄いため酵素の拡散面積も広く、したがって溶解円径も大きくなり最良と判断された。なお、結果は 3 回の実験の平均値と標準偏差値で示した。

Fig. 1. Relationship between the Diameter of Lytic Zone and Enzyme Concentrations. Enzyme: See the note in Table 1. Assay method: See the note in Table 2. Reducing sugar was measured by Somogyi method. —■—, 0.1% pectin; —●—, 0.3% pectin; —▲—, 0.1% pectin.

また、この粗酵素液による基質間の差異は認められなかった。

3. 酵素濃度と溶解円径について *E. carotovora* の培養濾液を粗酵素液として検討した。すなわち、培養濾液を原液として、それを 2 倍、5 倍、10 倍に希釈し、カップ法で溶解円径と酵素液の希釈率の対数との間に直線関係が認められるか否かについて検討した。その結果、Fig. 1 に示したように、酵素液の希釈率（原液～4

Table II. Effect of pH on the Activities of Pectolytic Enzymes

Enzymes	Substrates	Lytic zone (mm)			
		pH 3.5	5.0	7.0	8.0
Fungal	Pectin	25	14	7	10
Pectinase ^a	Pectate	23	14	7	10
Culture filtrate	Pectin	14	14	19	21
of AMS 6082 ^b	Pectate	14	16	21	21

^a Fungal pectinase was dissolved in distilled water (1 mg/ml). ^b Culture filtrate of AMS 6082 was used without dilution. Cup assay was conducted in petri dishes (9 cm in diameter) containing 5 ml agar (2%) and substrate (0.3%) solution at 37°C for 15 hr.

倍希釈)と溶解円径との間に、比較的良好な直線関係が見られ、比較のために行ったソモギー法による還元糖量(吸光度として示した)の増加に基づいて測定した酵素活性との間にも良い対応が見られた。以上の結果から、酵素濃度と溶解円径が直線関係を示す範囲内であれば、試料中の酵素活性を測定することも可能と考えられる。

4. ペクチン質分解酵素の最適 pH について この方法で最適 pH の測定が可能か否かを検討した。酵素標品として最適 pH が 9.5 にある *E. carotovora* のペクチン酸リアーゼを含む培養濾液と、最適 pH が 3.5 にある黴由来のペクチナーゼにより検討した。その結果 (Table II), 黴由来の酵素では pH 3.5 で最大の溶解円径が得られ、pH がアルカリ領域に移行するにつれ減少した。一方、*E. carotovora* の培養濾液では pH 8.0, 7.0 で最大の溶解円径を示し、酸性領域で減少した。この結果は、本法が酵素の最適 pH を予想する有効な方法であることを示している。

5. 基質の重合度に対するセタブロンの反応性 基質であるペクチンやペクチン酸がどの程度分解されると、セタブロンとの反応性を失うのかを知るため、畑中ら⁽⁶⁾の方法により平均重合度 12 および 44 のペクチン酸を、真部ら⁽⁷⁾の方法により 15 のペクチン酸を調製し、それぞれ約 10 mg を秤取し水 1 ml に溶解後、3% セタブロン水溶液 1 ml を加え攪拌後、さらに同溶液を 1 ml

添加し、反応性を調べた。その結果、平均重合度が 12 ではまったく反応しないが、15 では白濁し弱い反応を示すことから、セタブロンとの反応性を失うペクチン酸の重合度は 12 から 15 の間と思われる。この結果は、セタブロンがペクチン酸の酵素分解物等の分画にも利用できることを示している。

本研究を行うにあたり、菌の分譲をいただきました本学の上宮助教授に厚く感謝いたします。なお、本研究の一部は昭和 62 年度の日本農芸化学会大会において発表した。

- (1) A. S. Jones : *Biochim. Biophys. Acta.*, **10**, 607 (1953).
- (2) F. G. Priest : "Aspects of Microbiology 9," Extracellular Enzymes, Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd., 1984, p. 52.
- (3) Y. Bertheau, E. Madgidi-Hervan, A. Kotoujansky, C. Nguyen-The, T. Andro and A. Coleno : *Analyt. Biochem.*, **136**, 383 (1984).
- (4) S. Kamimiya, K. Izaki and H. Takahashi : *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 2367 (1972).
- (5) Y. Itoh, J. Sugiura and K. Izaki : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 199 (1982).
- (6) 畑中千歳, 小沢潤二郎 : 農化, **42**, 645 (1968).
- (7) 真部正敏 : 農化, **46**, 185 (1972).