

Macerating enzyme に関する研究

VI 植物病原菌が生産するペクチン分解酵素と植物組織の崩壊との関係

梶 明, 三国直世志, 田川 清

緒 言

著者の一人梶は和紙原料の発酵精練に有用なバクテリアを野性の雁皮より分離し、*Clostridium felsineum* var. *sikokianum* と命名した⁽¹⁾。同菌の分離に続いてこのバクテリアのペクチン分解酵素の研究を進め、とくにイオン交換樹脂によって酵素の精製を行なったとき、ポリガラクトツロナーゼと別に macerating enzyme が存在することを指摘した^(2,3)。この酵素は中層のペクチンに作用して組織の崩壊を起すが、ペクチン酸に作用することなく、ポリガラクトツロナーゼと異なる酵素であることを明らかにした。

植物組織の崩壊に関与する酵素はプロトペクチナーゼと称せられて、中層の不溶性ペクチンに作用して可溶性ペクチンに変化させるものと考えられていた。この古典的概念は、ペクチン分解酵素の研究の進展に伴って、次第に崩れ、ポリガラクトツロナーゼとペクチンエステラーゼの存在は明確にされたが、プロトペクチナーゼの存在を証明する実験結果は全く得られず否定的意見が多く提示された⁽⁴⁻⁷⁾。しかし、梶は上記のように植物組織の崩壊に直接関係する作用を有する酵素の存在を指摘した。イオン交換樹脂によるカラムクロマトグラフィー⁽²⁾、ゾーン電気泳動⁽⁸⁾、CM-セルロースを使用したカラムクロマトグラフィーがこの酵素の分離に適用された。macerating enzyme から分離されて精製されたエンドポリガラクトツロナーゼ (endo-PG) は植物組織の崩壊を示さないことも証明された⁽⁹⁾。

既に発表された上記の研究は *Clostridium felsineum* var. *sikokianum* によって生産された酵素について遂行されたものである。ペクチン分解酵素を著しく生産することが確認されている微生物として Clostridia のほかに Aspergilli, Penicillia, *Saccharomyces fragilis*, などが発表されたが、植物病原菌には古くからペクチン分解酵素の生産が強いことが報告され (*Botrytis cinerea*⁽¹⁰⁾ など)、また最近に至って優秀な生産菌が報告されている。例えば *Coniothyrium diplodiella*⁽¹¹⁾。従って植物病原菌が生産するペクチン分解酵素に関する研究成果は多くみられるが、macerating enzyme を確実に分離した報告は提出されていない。ただ、谷は植物病理学の見地より著者の macerating enzyme のこの分野への導入を実施し、カキ炭素病菌に侵されたカキの果実中およびカキの健全果が軟腐した際にこの酵素が生成していることを指摘した⁽¹²⁾。しかし、酵素化学の知見より判断すればペクチンエステラーゼ (PE)、ペクチントランスエリミネーゼ (PTE) の生成の検討を必要とする。とくに PTE については macerating enzyme の存在を指摘する前に検討を加える必要があるものと考えられる。

著者らは数種の植物病原菌を培養して培養液中に生産されるペクチン分解酵素を解析し、とくに植物組織の崩壊作用との関係を検討し、*Botrytis cinerea* および *Corticium rolfsii* を選択して macerating enzyme の研究を進めることに決定した。

実験方法

1. 使用菌

Botrytis cinerea Pers., *Sclerotinia libertiana* Fuckel, *Gloeosporium kaki* Hori, *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen, *Corticium rolfsii* Curzi を実験に使用した。以下述べるようにこのうちより *B. cinerea*, *C. rolfsii* を選択して実験を進めた。両菌を使用して第7報および第8報においても実験結果を報告する。

2. 培養方法

(1) 培養基 次の二種類の培養基を使用した。そのうち Richards 氏培養基を改良したものを主として使用した。

(i) Richards 氏改良培養基 Richards 氏培養基⁽¹³⁾を内藤⁽¹⁴⁾が改良しペプトンを加えて *Gloeosporium kaki* の培養に使用したものを採用した。その組成は次のとおりである。ショ糖 25.0g, NH_4NO_3 0.5g, ペプトン 10.0g, KH_2PO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 2% FeCl_3 溶液 0.3ml, 蒸留水 1l, (pH 5.4)。炭素源にペクチンを使用するときは 12.5g 使用した。

(ii) しょう油培地⁽¹⁵⁾ 細かく切ったタマネギを同量の蒸留水中に入れて蒸気殺菌器中で30分間加熱したのち、濾過してタマネギ煎汁とする。この液 100ml と、しょう油 50ml とを混合してショ糖 50g と蒸留水 850ml とを加えて培養基とする。培養液の pH を 5.4 に調節した。

(2) 培養方法 培養基を 500ml 容振とうフラスコに入れ、28°C で振とう培養した。振とう器は 100 往復/分のもので使用した。フラスコ 1 個に入れた培養基の容量は特に記載した以外はすべて 50ml であった。種菌は斜面培養より 1 白金鈎づつをとり 1 フラスコに加えた。種菌の培養基はジャガイモの抽出液にショ糖を加えた寒天培地である。

3. 分析方法

(1) ポリガラクトナーゼ endo-PG を中心に作用力を測定した。酵素作用液の配合を 1% ペクチン酸溶液 3.5ml, クエン酸・リン酸塩緩衝液 1.0ml, 酵素液 (適宜に希釈した液) 1.0ml とし, Ostwald 粘度計を使用して粘度を測定し, 25° において酵素作用を進めて一定時間後に粘度を再び測定し, 次の式によって粘度低下度 A% を表わした⁽¹⁵⁾。なお, 測定温度は 25° であった。また, 基質のペクチン酸は Sunkist Growers のペクチン NF をアルカリ法によってペクチン酸に変化させたものを使用した⁽¹⁶⁾。

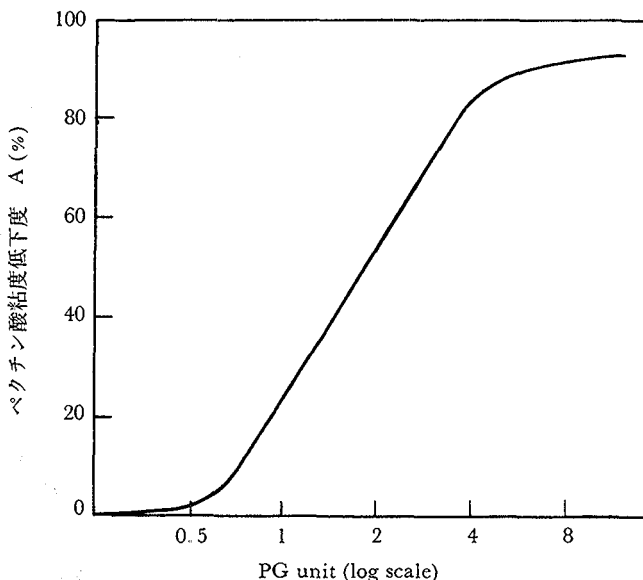
$$A = \frac{T_a - T}{T_a - T_o} \times 100$$

T_a : 不活性化した酵素液を配合した作用液の落下速度 (秒)

T : 酵素液を配合した作用液の落下速度 (秒)

T_o : 基質を含有せず, 水に酵素液を加えた液の落下速度 (秒)

C. rolfssii の酵素液を使用して 25° で 1 時間ペクチン酸の粘度低下を進め, A(%) を計算して A をたての座標にとり酵素濃度の対数を横の座標にとって標準線を作製した。第 1 図に示すように A が 10-80% の間は直線関係を示したので A が 50% を示す酵素量を 2 unit/ml と決定して本実験中の PG unit はすべてこの標準線を使用して計算した。



第 1 図 endo-PG unit 曲線 (*C. rolfssii*)

(2) macerating activity 基質として植物組織の一片を使用した。靱皮繊維を使用するときにはあらかじめ水中に浸漬し、指でよく押して附着する空気の小泡を除いて使用した。野菜、果実はマイクロームで一定の厚さに切断した。酵素作用液の配合は次のとおりであった。組織の一片、靱皮繊維は1×1cm、柔組織は0.5×10mmの円板状のもの、酵素液適宜に希釈した液2.5ml、クエン酸・リン酸塩緩衝液0.5ml、トルオール3滴。この作用液を37°に17時間保持したのち、ペトリ皿の水中に組織を取出し、軽く指先で押してその崩壊度を観察し、完全に崩壊したものを(Ⅲ)とし、順次識別し不活性のものを(-)として表示した。

(3) 菌の増殖状況 フラスコ中に菌糸が分散して充満する状態を(Ⅲ)とし、順次に(-)～(Ⅲ)の間に表現した。また菌糸の量を布で濾過し乾燥して秤量し重量表示を行なった。

実験結果

1. 5種の植物病原菌によるPGの生産とmacerating activityとの関係

代表的な菌として次の5種を選択しPGの生産と三稜の崩壊度との関係を観察し併せて菌の繁殖状況を記録した。

第1表 5種の植物病原菌の増殖状況

菌名, 培養液の種類		培養日数	1	2	3	4	菌体量 mg/15ml
<i>B. cinerea</i>	{	しょう油	++	+++	Ⅲ	Ⅲ	376
		Richards液	+	++	+++	Ⅲ	169
<i>S. libertiana</i>	{	しょう油	+	+	+++	Ⅲ	192
		Richards液	+	+	+++	+++	93
<i>G. kaki</i>	{	しょう油	++	+++	Ⅲ	Ⅲ	249
		Richards液	++	++	Ⅲ	Ⅲ	227
<i>F. oxysporum</i>	{	しょう油	+++	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	136
		Richards液	+++	Ⅲ	Ⅲ	Ⅲ	218
<i>C. rolfsii</i>	{	しょう油	±	+	+++	+++	83
		Richards液	±	+	+++	+++	170

備考 1. 培養液の炭素源はショ糖, 1フラスコ中の培養液は100ml, 28°で振とう培養。
2. 菌体重量は4日間培養したときの乾燥菌体量, 培養液15ml中。

菌糸の増殖状況は第1表に示すように、*Fusarium oxysporum* が極めて速く *Gloeosporium kaki*, *Botrytis cinerea* も増殖状況は良好であった。*Corticium rolfsii* のみこの振とう培養で増殖が劣った。種菌を移植後2,3,4日にわたって培養液をとり菌糸を布で除き、さらに液を遠心沈殿して上澄液を5°で24時間透析し透析内液を一定量にして酵素液として使用した。その macerating activity と endo-PG の単位量とを第2表に示す。

第2表に示すように *B. cinerea*, *C. rolfsii* の培養液中の酵素によって三稜の崩壊は著しく進行した。一方 endo-PG は *B. cinerea* によって最もよく生産された。*B. cinerea* と *C. rolfsii* との endo-PG unit の比をとってみると第2表中に示すように2.9-4.7の値を示した。しかし三稜の崩壊度は両菌の4日間培養液によって等しい度数を示した。

2. *Corticium rolfsii* と *Botrytis cinerea* の酵素生産に及ぼすペプトン量の影響

前項の実験結果が示すように、*C. rolfsii* と *B. cinerea* の酵素によって植物組織の崩壊は進行し、しかも両菌の endo-PG の生産量が異なることが分かったので、今後これらの菌を使用して実験を進めることにした。培養液は Richards 氏液を内藤が改良した液を使用することにしたが、この培養液は *Gloeosporium kaki* の培養に設定されたものである。従ってペクチン分解酵素の生産に好適であるが、とくに窒素源の使用量が適当であるかについて実

第2表 植物病原菌の macerating activity と endo-PG 作用

菌名, 培養液の種類	培養日数	2		3		4	
		MA	PG unit/ml	MA	PG unit/ml	MA	PG unit/ml
<i>B. cinerea</i>	しょう油			+++	4.2	+++	3.3
	Richards 液	+++	2.3	+++	4.5	+++	4.0
<i>S. libertiana</i>	しょう油	-	0.9	+	1.9	+++	2.1
	Richards 液	-	0.8	-	0.8	-	0.9
<i>G. kaki</i>	しょう油	±	1.2	±	1.9	++	1.5
	Richards 液	-	0.8	±	4.3	+	1.7
<i>F. oxysporum</i>	しょう油	-	0.8	±	1.1	+	0.9
	Richards 液	-	0.9	±	0.9	±	0.9
<i>C. rolfsii</i>	しょう油	±	1.2	++	1.2	+++	0.7
	Richards 液	±	0.8	++	1.0	+++	1.1
<i>B. cinerea</i> PG unit	しょう油				3.5		4.7
<i>C. rolfsii</i> PG unit	Richards 液		2.9		4.5		3.6

備考 1. 培養液の炭素源はショ糖, 1 フラスコ中の培養液は 100 ml, 28° で振とう培養, 第1表と同一培養.
 2. MA は三椶の崩壊度, 酵素液 2 ml を使用して本文中のとおり作用液を配合して酵素作用を進めた.
 3. PG は粘度低下法で測定.

験を進めた. 炭素源にはすべてペクチンを使用しその量を 12.5g/l に調節した. 基本培養液にペプトン量を添加して 0-10g/l の変化を与えて培養したのち, 前記と同様の方法で macerating activity を測定した.

(1) *C. rolfsii* の酵素生産 第3表に示すようにペプトンの増加は菌体量, macerating activity いずれにも良好結果を与えた. 三椶を基質とするときの崩壊度はペプトン 6g/l の培養基を使用して3日間培養した区分でも良好な結果を与えた.

(a) *B. cinerea* の酵素生産

実験結果によれば菌の増殖はペプトンを欠くときも進行したがペプトンを 4g/l 以上添加するときは菌そのものが良好になった. ジャガイモの崩壊作用に対してはペプトン 10g/l 使用の区分が最も良好な結果を与えた. 一方, 三椶の崩壊作用に対しては 6g/l の使用区分が最も良好であり, 8g および 10g 使用の場合には酵素生産は良好であったが培養日数が4-5日に達するときは急激に酵素作用が失活した. これらの結果を第4表に示す.

第3表 酵素生産に及ぼすペプトンの影響 (*C. rolfsii*)

ペプトン量 g/l 培養日数	0	2	4	6	8	10
	三椶崩壊度 {					
3	+	++	++	+++	+++	+++
4	+	++	++	+++	+++	+++
ジャガイモ崩壊度 {						
3	+	+	++	++	+++	+++
4	+	+	++	+++	+++	+++
菌体量 mg/50ml {						
3	-	62.8	66.0	108.5	137.2	157.8
4	61.0	69.0	87.8	175.0	130.2	119.0

備考 1. 三椶の崩壊度に対しては 10 倍稀釈液を 2.5 ml 配合して 20 時間作用させた.
 2. ジャガイモの崩壊度に対しては 10 倍稀釈液を 2.5 ml 配合して 5 時間作用させた.
 3. 培養液の炭素源はペクチン.

第4表 酵素生産に及ぼすペプトンの影響 (*B. cinerea*)

		ペプトン量 g/l	0	2	4	6	8	10
		培養日数						
三極崩壊度	}	2	—	—	±	+	++	++
		3	—	—	++	+++	+++	+++
		4	—	±	+	+++	+	+
		5	±	±	+	+++	±	+
ジャガイモ崩壊度	}	2	—	—	—	++	+++	+++
		3	+	+	+	+++	+++	+++
		4	—	—	—	+++	+++	+++
		5	—	—	—	+++	++	+++

備考 1. 三極の崩壊度に対しては5倍稀釈液を、ジャガイモの崩壊度に対しては10倍稀釈液を2.5 ml 配合して17時間作用させた。

2. 培養液の炭素源はペクチン。

考 察

1. 菌種の選択

植物病原菌のうちで最も強くペクチン分解酵素を生産する菌として *B. cinerea* が20世紀の始めより指摘されてきた⁽¹⁷⁾。近年になって果汁清澄剤に植物病原菌の製剤が使用されるようになり、遠藤は多数の菌のペクチン分解酵素の生産および果汁清澄力を検討した⁽¹¹⁾。この発表を参考にして、著者は上記の5種の菌を選び出し、macerating activity の生産能力をみたところ実験結果に示すように *B. cinerea* が優れた能力を示した。しかし、極めて興味あることは *C. rolfssii* の培養液を透析した液中には PG 生産が比較的少いにもかかわらず macerating activity が強く認められたことであつた。従つて以後の実験には *B. cinerea* および *C. rolfssii* を使用することに決定した。

2. 培養基の選定

かびの酵素生産には固体培養を行なうことが多いが、酵素の精製には液体培養から出発することが不純物の夾雑を少くする。また、発酵化学の知見を得るため、とくに酵素の生産状況を観察し、生産条件を設定するためにも液体培養法が望ましい。よつて、著者は液体培養法で出発し、Richards 氏液にペプトンを添加して基本培養基を設定した。第3、4表に示すように有機態窒素の存在は必要であり6g/lのペプトンが適当と認められた。炭素源については第1、2表のショ糖の結果よりも第3、4表に示すペクチンを使用した場合が優れているものと判断した。この結果は *Cl. felsenium* var. *sikokianum* の酵素生産と同様である⁽¹⁸⁾。

3. macerating activity

上に述べたように *B. cinerea*, *C. rolfssii* の macerating activity は endo-PG 作用と必ずしも比例せず、これらの菌種は著者が *Cl. felsenium* var. *sikokianum* において発見したと同様の macerating enzyme⁽²⁾ を生産する公算が大きい。事実、別報⁽¹⁹⁾に述べるように、*B. cinerea* の生産する種類の酵素の最適 pH 値を追求した結果、endo-PG, PE は 5.5, exo-PG は 5.0 に最適値を示したが、macerating activity は pH 2.2~2.5 および 4.0~4.5 の2箇所ピークがあり、一方、*C. rolfssii* については endo-PG, exo-PG の最適 pH は 4.0 であるに対し macerating activity は 2.2~2.5 に最適値を示した。同時に別報に述べるように両菌株の生産する macerating enzyme は特定のイオン交換樹脂を使用するカラムクロマトグラフィーによって完全に分離精製され、*Cl. felsenium* var. *sikokianum* の研究^(2,3)の際と同様な成果があげられた。著者はこの両菌株を使用して macerating enzyme の作用機構および応用について実験を進めている。

要 旨

macerating enzyme を研究するために植物病原菌中より *Botrytis cinerea*, *Corticium rolfssii* の2菌株を適当な

る微生物として選定した。培養基を設定し、培養液中に macerating enzyme の生産していることを考察した。

菌株を分けて下さった本学部教授内藤中人博士に感謝し、御助言を頂いた同教授および助教授谷利一博士に感謝の意を表します。実験に助力された山下昌之、森川孝一両氏に謝意を表します。

文 献

- | | |
|---|---|
| (1) 梶 明, 斎藤 博: 発酵工学, 30 , 242 (1952). | (1947). |
| (2) KAJI, A.: <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 20 , 8 (1956). | (11) ENDO A.: <i>Agr. Biol. Chem.</i> : 25 , 389 (1961). |
| (3) ———: <i>ibid.</i> , 23 , 131 (1959). | (12) TANI I.: <i>Ann. Phytopath. Soc. Japan</i> , 28 , 4 (1963). |
| (4) SUMNER J. B., SOMERS G. F., "Chemistry and methods of Enzymes" p. 111 (1947). | (13) 明日山秀文, 向 秀夫, 鈴木直治: 植物病理実験法, p. 765 (1962). |
| (5) KERESZ Z. I., "The Enzymes" (J. B. SUMNER, K. MYRBÄCK) Vol. I, Part 2, p. 751 (1951). | (14) 内藤内人: 香川大農紀要, No. 2, p. 12 (1957). |
| (6) LINEWEAVER H., JANSEN E. F., "Advances in Enzymology" Vol. 11, p. 267 (1951). | (15) 梶 明: 農化, 27 , 699 (1953). |
| (7) KERESZ Z. I., "Methods in Enzymology" (S. P. COLOWICK, N. O. KAPLAN) Vol. I, p. 158 (1955). | (16) NORRIS F. W., RESCH C. F.: <i>Biochem. J.</i> , 31 , 1945 (1937). |
| (8) 梶 明, 橘 禎男, 栗飯原重男, 穴吹吉夫: 香川大農学術報告, 11 , 248 (1959). | (17) SMITH R. E.: <i>Bot. Gaz.</i> , 33 , 421 (1902). |
| (9) 梶 明: 末公表 | (18) 梶 明, 穴吹吉夫: 香川大農学術報告, 7 , 67 (1955). |
| (10) GÄUMANN E., BÖHNI E.: <i>Helv. chim. Acta</i> , 30 , 1591 | (19) 梶 明, 田川 清, 山下昌之, 森川孝一: 農化会関西支部例会 214回講演会, 12月12日, 大阪 (1964). |

Studies of macerating enzyme acting on middle lamella pectin

VI Relation of pectic enzymes to macerating activity produced by plant pathogens

Akira KAJI, Naoyoshi MIKUNI and Kiyoshi TAGAWA

Summary One of the authors, Kaji, reported in 1956 that macerating enzyme was separated from the culture fluid of *Cl. felsineum* var. *sikokianum* by the method of column chromatography using ion-exchange resin and this enzyme converted insoluble pectic substance in middle lamella of plant tissue to water soluble pectinic acid in spite of no activity on pectic acid.

In this report, five species of plant pathogenes, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia libertiana*, *Gloeosporium kaki*, *Fusarium oxysporum* and *Corticium rolfsii* were employed for the experiment of macerating enzyme. *B. cinerea* and *C. rolfsii* were found to be suitable for studing on separation and characterization of this enzyme. The microorganisms were cultivated in Richards media added 6 g of peptone per liter, at 28° for 72 hrs by the method of shake culture. The macerating activity on bark of Mitsumata and tissue of potato appeared in the dialyzed solution of cultured fluid. Correlation between macerating activity and pectic enzymes was discussed, and it was detected that the ratio of enzyme activities between endo-PG and macerating enzyme was variable depending on cultural conditions.