

## ペクチン分解酵素に関する研究 (第21報)

## 植物組織の崩壊に關与する酵素の作用力測定法について

田 川 清, 梶 明

微生物による植物組織の崩壊現象は古くから知られており、これに關与する酵素としては古典的なプロトペクチナーゼの存在が考えられていたが、その証明はなされたことがなく、現在ではエンドポリガラクトロナーゼ (endo-PG) およびペクチンエステラーゼ (PE) が考えられ、両酵素の協同作用によって組織の崩壊が起るものと認められている。(1,2)

著者の一人梶は1956年に中葉ペクチンに作用して組織の崩壊を行うがペクチン酸には殆ど作用力を示さないことを特徴とする酵素を *Clostridium felsineum* var. *sikokianum* から分離し(3,4)、続いてこの酵素がペクチン酸よりもペクチンに作用することが著しい一種のペクチングリコシダーゼであり、ポリメチルガラクトロナーゼ (PMG) とは異なる酵素であることを証明した。(5)

セルラーゼなどによって崩壊作用が起るという報告がみられるが(6,7,8)、著者らの実験によれば沪紙崩壊作用を示すセルラーゼ (結晶酵素) では植物組織の崩壊作用はみられない。

植物組織の崩壊に關しては古くから種々検討され報告も多いのであるが、酵素の活性度測定については各研究者それぞれ異り、活性度を比較検討することは非常に困難なことである。

我々はかびの生産するペクチン分解酵素の精製を行い、植物組織崩壊活性、作用機構などを究明するにあたり、再現性のある力価測定法の必要なことから、従来一般にとりあげられている馬鈴薯切片の崩壊による方法および梶らが長年使用している雁皮切片を用いる測定法(9)を検討し、これを改良した方法を設定したのでここに記述する。

## 実験方法および結果

## (1) 馬鈴薯切片の崩壊度測定法

## a) 酵素試料

*Botrytis cinerea*(9)の培養液を硫酸塩析後透析した液を使用した。

RICHARDS 氏-内藤氏改変培地(10)に炭素源としてシヨ糖の代りにペクチン1.25%を用い、ペプトン0.6%を添加した培地20Lを30L容ジャーフアーメンターに仕込み、同培地で25°Cにて4日間培養した種菌液200mlを接種25°Cにて通気攪拌を行いつつ60 hrs培養後、菌体を布沪過して除き硫酸を添加0.9飽和となし、沈澱を遠心分離 (12,000 r. p. m. 10min) し水に溶解後5°Cにおいて水道水で24 hrs; PH4.0, M/200クエン酸リン酸緩衝液にて24 hrs透析した。

この酵素液の蛋白質量は8.51mg/ml (280m $\mu$ における吸光度の測定より求む) であり、既報(11)の如く馬鈴薯、雁皮の切片に対してpH2.5および4.0において最も強く崩壊を起す。

## b) 装置

崩壊状態を観察するには一定条件のもとで定まった衝撃を与える

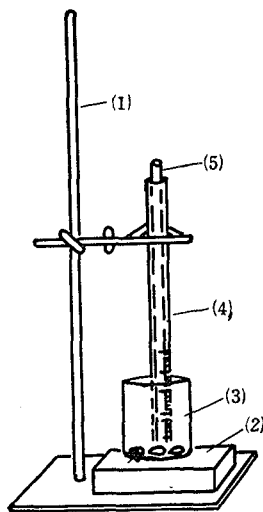


Fig. 1 Apparatus

- (1) Holder
- (2) Sponge mat
- (3) Vessel containing reaction mixture
- (4) Graduated glass tube supported vertically by the holder (diameter 12mm)
- (5) Inside glass tube with the object of giving the impulsion (diameter 8 mm, weight 12 g)

ことにより破壊されるか否かを知るのが妥当である。その為に第1図の装置を使用した。

c) 測定方法

25ml容秤量瓶に被験酵素液10ml, 緩衝液 (MCILVAINE 緩衝液, PH 4.0を使用する) 5 ml を入れ, この中に馬鈴薯切片 (径10mm, 厚さ 1 mm) 5 個を投入しトルオールを加えて37°Cにて作用を続ける。一定時間間隔で崩壊の有無を検す。即ち作用容器を前記装置のスポンジマット上にのせ器中の馬鈴薯切片一ケが丁度外側ガラス筒内におさまるようにし, 切片より 5 cm上から12gの衝撃用ガラス筒を落下させる。崩壊状態にあるものは破壊されガラス筒内径に一致した切片ができる。このようにして5個の切片のうち3片までが崩壊に到る時間を求める。

d) 酵素作用力の表示法 (単位の設定)

前記作用条件において酵素濃度を種々変えて崩壊所要時間を測定した値を第2図の各点で示した。

酵素濃度の対数値と崩壊所要時間の対数値の間にはほぼ直線関係が得られ次式の関係が成立つ。

$$\text{Log [E]} = \alpha \text{Log T} + \text{Log } \beta \dots\dots\dots (1)$$

ここで [E] は酵素濃度を, Tは崩壊所要時間を示し,  $\alpha, \beta$  は定数である。

第2図の各値から $\alpha$ を算出すると $\alpha = -1.4$ となり, 崩壊所要時間の1.4乗した値の逆数を酵素作用力とするこの値は酵素量に比例する。

崩壊所要時間を分単位にとり, 実用的立場から $\beta$ の値を $10^8$ としたとき(1)式で示される酵素量を 単位力価とした。

即ち単位計算式は(2)式で示される。

$$[\text{Mu}]_{\text{potato}}^{37^\circ} = \frac{10^8}{T^{1.4}} \dots\dots\dots (2)$$

$[\text{Mu}]_{\text{potato}}^{37^\circ}$  : 馬鈴薯切片崩壊活性度 (単位)

(2)式で示めた単位標準直線を第2図中の実線で示す。図から明らかなように崩壊所要時間が50分以下又は12時間以上の場合には適用できない。

(2) 雁皮切片の崩壊度測定法

a) 酵素試料

前項と同様である。

b) 雁皮

雁皮 (*Wikstroemia sikokiana Fr. et sav*) の柔組織を使用した。樹皮を水に浸し黒い表皮を取り除いたもの (白皮) を風乾し軸に垂直に 2 mm 中に切断したものである。その組成は既報<sup>(3)</sup>の如くペクチン11-12%, ペントーザン27-28%, 粗繊維42-45%, 灰分2-3%である。

c) 測定方法

雁皮100mgを秤とり, 径18mmの試験管に入れ, 酵素液 4 ml, 緩衝液 (MCILVAINE 緩衝液 pH4.0を使用) 2 ml, トルオール3滴を加えて密栓をほどし, 37°Cの恒温器中で反応を進める。一定時間後試験管を30秒上下に激しく振盪してから水14mlを加えて内容をよく混和し, 濾紙で濾過する。濾液 1 ml に 4 ml の 0.06N, NaOHを加え室温に30min放置して脱メチルを行い, その1 mlを用いて常法通り Carbazole法<sup>(12, 13)</sup>によりペクチン量をガラクトロン酸当量として定量する。空試験は酵素液を100°C, 10min処理して失活させたものを用いて同様の操作によりペクチン量を測定する。

一方雁皮の全ペクチン含量を知るには雁皮100mgに0.5%シユウ酸アンモニア溶液10mlを加え, 途中数回激しく振盪しつつ85°C, 15hrs抽出を行い, 濾過洗滌して濾液洗液を合せて定容にした後前記同様の方法によりペクチン量を

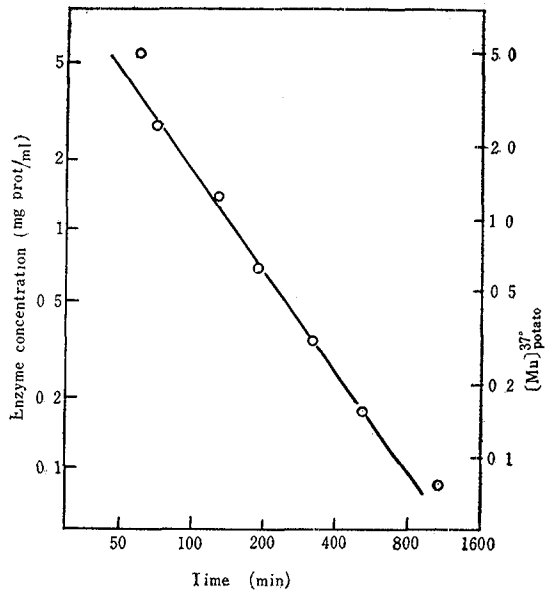


Fig. 2 Relation between enzyme concentration and time required for macerating potato slices

求めた。

酵素作用によるペクチン除去率を下式により求めた。

$$\text{ペクチン除去率} = \frac{\text{作用により溶出したペクチン量} - \text{空試験ペクチン量}}{\text{修安抽出による全ペクチン量}}$$

d) 酵素作用力の表示法 (単位の設定)

酵素濃度を種々の段階にとり、2, 4, 8, 16hrsの各作用時間後におけるペクチン除去率を測定した。結果は第3図の各点で示した数値である。

いづれの作用時間においても、酵素濃度の対数値とペクチン除去率の間にはほぼ直線関係が認められ、除去率0.15から0.7の範囲内の各測定値より最小自乗法により直線をひくと図中の実線となる。

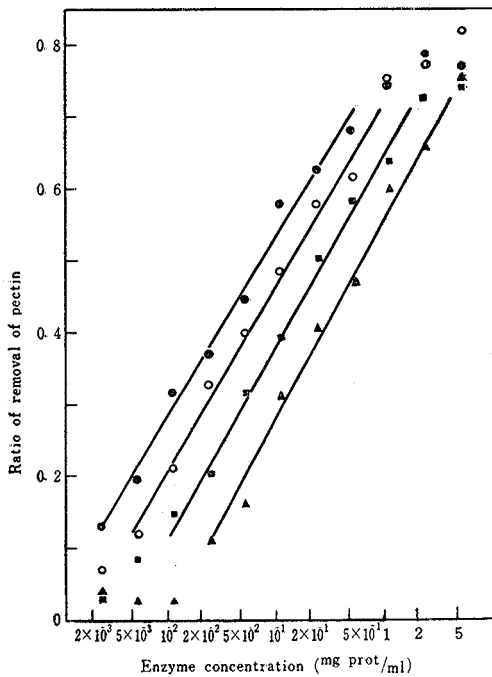


Fig. 3 Relation between enzyme concentration and ratio of removal of pectin

▲ 2 hrs      ○ 8 hrs  
■ 4 hrs      ● 16 hrs

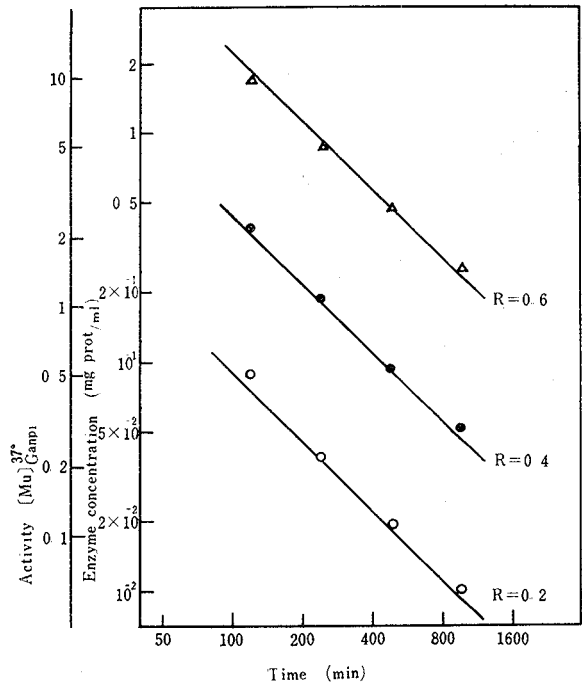


Fig. 4 Relation between enzyme concentration and time required for the ratio of removal of pectin to reach a certain extent

R represents the ratio of removal of pectin.

除去率0.2, 0.4, 0.6における酵素濃度と作用時間の関係を第3図実線の値から求め描写したのが第4図である。第4図の各点はほぼ直線上に並び前項(1)式の適用が可能となる。

図の各点の値から(1)式右辺の係数 $\alpha$ を求めると0.98で、1としてよいことが認められた。

又(1)式第2項の数値は明らかに除去率の函数である。第4図の各値から関係式を求めると(3)式が得られる。

$$\beta = 3.42R + \gamma \text{-----(3)}$$

R: ペクチン除去率,  $\gamma$ : 定数

実用面と計算の便なることを考慮して単位換算式を提示した。

$$(\text{Mu})_{\text{Ganpi}}^{37^\circ} = \frac{10^{1+3.5R}}{T} \text{-----(4)}$$

$(\text{Mu})_{\text{Ganpi}}^{37^\circ}$ : 雁皮切片崩壊活性度 (単位)

T: 作用時間 (min)

ペクチン除去率0.2, 0.4, 0.6における酵素力価と作用時間の関係を示す単位標準直線を第4図実線で示した。

e) ペクチン除去率と組織の崩壊状態ならびに本測定法の適用範囲

酵素液を適宜希釈して試料を作り、4 hrsおよび15hrs作用後のペクチン除去率を測定し、同時に組織の崩壊状態を観察した。

崩壊状態の観察は既報<sup>(9)</sup>にならい酵素液2.5ml緩衝液 (McILVAINE 緩衝液 pH4.0) 0.5mlに雁皮 (1×1 cm) 1片の組成でトルオールを加えて37°Cにて作用させ、作用終了後シャーレに切片をとり出し指で軽く押して、崩壊の有無をみた。崩壊度の表示は全く変化のみられないものを(-), 明らかに崩壊が認められる場合を(+)以下順次度合をつけ(###)までとした。

又試料中の蛋白濃度は280mμにおける吸光度の測定により、結晶アミラーゼを用いた標準線を対照にして決定した。

Table 1. Comparison between ratio of removal of pectin and macerating degree by enzyme action on Ganpi barks

Sample No.	Reaction time Enzyme concentration (mg protein/ml)	T = 240 (min)				T = 900 (min)			
		Macerating degree	Ratio of removal of pectin	(Mu) <sup>37°</sup> <sub>Ganpi</sub>	(Mu) <sup>37°</sup> <sub>Ganpi</sub> (ml) (mg protein)	Macerating degree	Ratio of removal of pectin	(Mu) <sup>37°</sup> <sub>Ganpi</sub>	(Mu) <sup>37°</sup> <sub>Ganpi</sub> (ml) (mg protein)
1	0.80	++	0.546	3.92	4.90	+++	0.659	2.25	2.81
2	0.29	+	0.414	1.17	4.04	+++	0.585	1.24	4.27
3	0.18	±	0.356	0.73	4.06	++	0.490	0.57	3.17
4	1.79	+++	0.653	8.05	4.50	++++	0.722	3.74	2.09
5	0.03	-	0.032	0.05	1.67	±	0.273	0.10	3.33
6	0.47	+	0.485	1.67	3.55	+++	0.637	1.90	4.04
7	0.06	-	0.201	0.21	3.50	+	0.362	0.21	3.50
8	2.43	+++	0.706	12.33	5.07	++++	0.821	8.31	3.42
9	0.31	±	0.398	1.03	3.32	++	0.574	1.13	3.64
10	0.66	++	0.540	3.23	4.89	+++	0.648	2.06	3.12

これらの結果は第1表の如くである。

表から明らかな如く、雁皮の崩壊作用は可溶化したペクチンの増加量 (除去率) として表わされることが認められる。除去率が0.8程度になると繊維束はバラバラになり全く原形をとめなくなる。

蛋白量当りの活性度より測定法の適用範囲は除去率0.15-0.65内が妥当な値を示すものと認められる。又作用時間が20hrsを越す長い場合は当然誤差が大きくなることが考えられる故我々は通常4-17時間を採用している。

考 察

馬鈴薯切片を用いる植物組織崩壊の酵素作用力測定が一般に行われている。しかし酵素活性度の表し方はさまざまである。

BROWN<sup>(14)</sup>は完全崩壊に要する作用時間の逆数を、WOOD<sup>(15)</sup>は時間の2乗値の逆数を採用している。我々は本法により測定した結果酵素活性は崩壊所要時間の1.4乗の逆数に比例することが示され、McCLENDONら<sup>(16)</sup>、有馬ら<sup>(17)</sup>の報告と一致する結果が得られた。このことは用いた馬鈴薯切片の大きさ、作用条件の違いによるものと考えられる。特に切片の大きさが問題となる。拡散の理論<sup>(18)</sup>によれば酵素が拡散によって到達する距離は時間の1/2乗に比例する。それ故切片の厚さを2倍にすると作用時間は4倍に長引くことになる。我々は0.5mm, 1.0mmおよび1.3mmの厚さの切片を用いて実験した結果0.5mmの場合は測定値の精度が低く、1.3mmでは明らかに崩壊所要時間が長引

き測定に不便であった為1.0mmのものを使用することにした。

組織の崩壊を直接観察する方法が一般的であるが、崩壊により附随して起る成分変化を測定する方法はより正確な結果を期待できる。

雁皮切片を用いた場合について検討したところ、ペクチン除去率を作用時間を変えて測定することにより可成り良好な結果が得られた。しかし天然の基質を使用する限り精度の向上は望めない。

植物組織の崩壊現象が純粋なペクチンおよびペクチン酸の酵素分解により起るのであればポリガラクトンナーゼおよびペクチンエステラーゼの活性度測定により充分であるが、著者の一人梶<sup>(3,4)</sup>が指摘したようにペクチン酸に作用がみられなくても崩壊作用が強く起ることがあり、この場合にはendo-PG、とPEの共同作用では説明がつかない。この場合ペクチンデポリメラーゼのみの測定で充分理解できるであろうか、酵素の精製は目下当研究室において各種の微生物源の酵素について行われている。この精製過程において崩壊作用力の表示法として本報の方法が役立つものと考えられる。

終りに臨み Carbazole 法の文献を貸与下さいました真部正敏氏ならびに実験の一部を助力された森川孝一氏に感謝致します。

## 文 献

- (1) WINSTEAD N. N. and J. C. WALKER: *Phytopathology*, 44, 153 (1954).
- (2) 遠藤 章: 日農化関東支部第 231 回講演会, 東京, 1964年9月12日
- (3) AKIRA KAJI: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 20, 8 (1956).
- (4) ———: 香川大学農学部学術報告, 9, 141(1958).
- (5) ———: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 23, 131 (1959).
- (6) NOBUO TOYAMA: *Memoris Facult. Agric. Univ. Miyazaki*, 3, 71 (1962).
- (7) 平緒, 浦島, 黒田: セルラーゼ研究会, 第2, 3回シンポジウム記録, 60 (1963).
- (8) 藤井 昇, 外山信男: 醸酵工学雑誌, 42, 105 (1964); セルラーゼ研究会, 第4回シンポジウム記録, 71 (1964).
- (9) 梶 明, 三国直世志, 田川 清: 香川大学農学部学術報告, 16, 143 (1965).
- (10) 内藤中人: 香川大学農学部紀要, No. 2 p. 12 (1957).
- (11) 梶 明, 田川 清, 山下昌之, 森川孝一: 日農化関西支部例会 214回講演会, 大阪, 1964年12月12日.
- (12) E. A. McCOMB and R. M. MCCREARY: *Anal. Chem.*, 24 1630 (1952).
- (13) Z. DISCHE: "Methods in Carbohydrate Chemistry" (J. N. BE MILLER, F. SHAFIZADEH, M. L. WOLFROM, R. L. WHISTLER) Vol. 1 p 497 (1962) Academic Press, N. Y.
- (14) W. BROWN: *Ann. Bot.*, XXIX, 313 (1915).
- (15) R. K. S. WOOD: *Ann. Bot.*, 19, 1 (1955).
- (16) J. H. McCLENDON and G. F. SOMERS: *Ame. J. Bot.*, 47, 1 (1960).
- (17) K. ARIMA, M. YAMASAKI and T. YASUI: *Agr. Biol. Chem.*, 28, 248 (1964).
- (18) D; I. HITCHCOCK: "Physical Chemistry of cells and tissues" (R. HÖBER) 59 (1945) Blakiston Co. Philadelphia.

## Studies on Pectolytic Enzymes (XXI)

### Assay methods of enzymatic activity causing plant tissue maceration

Kiyoshi TAGAWA and Akira KAJI

**Summary** The action of macerating enzymes, which involved in this case polygalacturonase, pectin-esterase and other pectolytic enzymes, offers two practical possibilities for measurement.

First, the rate of maceration of plant tissues might be measured.

Second, the decrease in contents contained in the substrate may be followed by suitable methods.

The experimental work reported here has been done to evaluate the methods and provide a sound basis for quantitative measurement of enzyme concentration.

Potato tuber slices and Ganpi barks were used as the substrates, and the dialysed solution after salting out from the culture fluid of *Botrytis cinerea* was used as a enzyme preparation.

1) The method by measuring the rate of maceration of potato slices: Five pieces of potato slices (10mm in diameter, 1 mm in thick) were placed in a solution composed of 10 ml of enzyme solution, 5 ml of Mcilvain buffer (pH 4.0) and 5 drops of toluol, at 37°C, and observation was made on the time required for a glass rod (8mm in diameter) to penetrate the softened tissue under a certain impulse.

Relationship between enzyme activity ( $(\text{Mu})_{\text{potato}}^{37^\circ}$ ) and time required (T) is given by the following equation.

$$(\text{Mu})_{\text{potato}}^{37^\circ} = \frac{10^3}{T^{1.4}}$$

2) The method by measuring the decrease in pectin content of Ganpi barks: Reaction mixture was composed of 100 mg of Ganpi barks (2 mm in width), 4 ml of enzyme solution and 2 ml of buffer solution and incubated at 37°C.

After arbitrary reaction time, the amount of pectin removed from tissue by enzymatic action was determined under the settled procedure and compared with total pectin content which estimated by means of extraction with ammonium oxalate solution from Ganpi barks.

The activity ( $(\text{Mu})_{\text{Ganpi}}^{37^\circ}$ ) was expressed as the function of reaction time (T) and the ratio of removal of pectin (R).

$$(\text{Mu})_{\text{Ganpi}}^{37^\circ} = \frac{10^{3.5R+1}}{T}$$

(Received October 30, 1965)