

Erwinia aroideae の糖化型ポリガラクトユロ

ナーゼについて

小沢潤二郎・岡本賢一

細菌のペクチン—ポリガラクトユロナーゼ(PG)は液化型のものが知られているが, digalacturon 酸を分解する糖化型の酵素はまだ報告されていない。*Erwinia aroideae* の PG も培養液に分泌されているものは液化型である(小沢, 武田, 岡本 1953)。この細菌はペクチンを加水分解するだけでなく, 強く酸化分解する。多糖類は加水分解または加磷酸分解され, 単糖類やその磷酸エステルとなつて醗酵されるのが普通の経路であるから, もし *Er. aroideae* が液化型の PG の作用だけで galacturonide 結合を分解するとすれば, 醗酵は途中で止まり, 多量の digalacturon 酸その他の加水分解中間生成物を残すはずである。実際には完全に分解されて oligouronide が残るようなことはないので, 液化型の PG 以外の galacturonide 結合分解酵素が生成しているにちがいない。

実験の方法と結果

細胞内の PG

Er. aroideae (前報と同じ菌株) を馬鈴薯煎汁 (sucrose を加えずにペプトンを 0.5%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を 0.5%, KH_2PO_4 を 0.1% 加えた) に 28°C で 48 時間振盪培養し, アセトン菌体をつくり, m/15 の phosphate buffer (pH 7.0) にこれを浮遊させ, 5°C に 15 時間放置し, 10,000 r.p.m. (9,000×g) で 10 分間遠心分離した上清を酵素液 (アセトン菌体抽出液) とした。この中の酵素と, 培養液からアセトンで沈澱させた酵素 (培養液を 10,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離し上清に 2 倍容のアセトンを加えてつくつた) のペクチン酸に対する作用を比較した。その結果は第 1 表の通りであつた。第 1 表の実験で酵素作用の条件は前報と同じにした (小沢, 岡本 1956)。

第 1 表 菌体と培養液の PG の作用 (1)

作用時間 (分)	菌 体		培 養 液	
	相対粘度	N/50 I ₂ 消費量	相対粘度	N/50 I ₂ 消費量
0	2.58	—	2.58	—
120	1.20	1.02	1.18	0.32
195	1.06	—	1.08	—
265	1.06	2.02	1.08	0.60
340	—	2.21	—	0.73

アセトン菌体抽出液は培養液に比べて糖化作用が強い。また digalacturon 酸に同じ条件で作用させた結果, 培養液は前報と同様これを分解しなかつたが, アセトン菌体抽出液の方には反応生

成物として galacturon 酸が認められた。なおアセトン菌体抽出液は同じ条件で galacturon 酸を消費しなかつた。

アセトンによる沈澱の代わりに、菌体を除いた培養液をそのまま用いた場合でも、第2表のように digalacturon 酸の分解作用は認められない。

第2表 菌体と培養液のPGの作用(2)

作用時間 (分)	培 養 液		アセトン菌体			
			Buffer		水	
	ヘクチン酸	Digalacturon 酸	ヘクチン酸	Digalacturon 酸	ヘクチン酸	Digalacturon 酸
90	0.73	0	0.39	0.10	0.30	0.08
240	1.28	0	0.92	0.26	0.74	0.26

第2表の実験で、培養条件(培養時間は24hr)と酵素作用の条件は第1表の場合と同じにした。酵素はアセトン菌体から m/15 の phosphate buffer のほかに水で抽出した。酵素液は水の場合は buffer による抽出液の5倍容用いているので、第2表の結果から、PGは塩類溶液で抽出され易いことが分る。

人工培養基の場合でも、培養液の方には第3表のように digalacturon 酸分解作用は認められなかつた。第3表の実験では、前報と同じ組成の培地に28°Cで24時間と45時間振盪培養し、

第3表 菌体と培養液のPG

基 質	ヘクチン酸培地				グルコース培地			
	24 時間		45 時間		24 時間		45 時間	
	培養液	菌体*	培養液	菌体**	培養液	菌体***	培養液	菌体****
ヘクチン酸	40	141	30	69	0	145	8	90
Digalacturon酸	1以下	12	1以下	7	1以下	0.6	1以下	0.6

* 86mg, ** 91mg, *** 155mg, **** 161mg

酵素液はアセトン菌体から buffer で抽出し、培養液の方はアセトンで沈澱させず、そのまま用いた。表の数字は、前の実験と同じ作用条件で0—60minの間に I₂ 消費量(反応液2ml)を0.5ml増加させるに必要な反応液2mlの中に含まれる酵素量を仮りに1単位として、培養液100ml中に産生される酵素の総量を表したものである。第3表の結果から菌体内のPGは培養液に分泌されるものよりも多く、液化型のPGの産生は構成的で、糖化型のPGは幾分適応的であるようである。

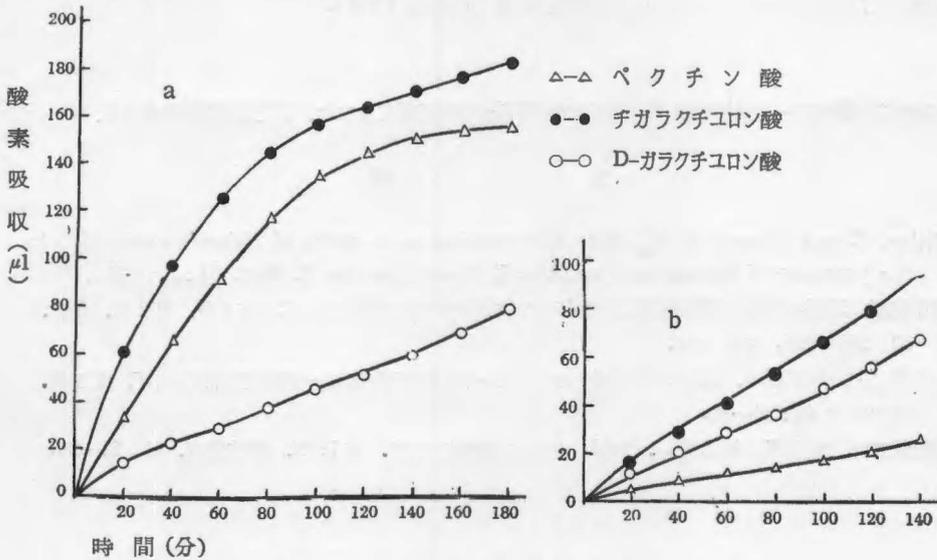
第1—3表の結果から、アセトン菌体抽出液は恐らく、液化型のPGのほかに、比較的細胞の外に溶出しにくい糖化型のPGを含んでいるのであろう。この酵素液を Amberlite IRC 50 で処理すると、第4表のように液化型の方がよく吸着され、母液に糖化型のPGが多く残つた。IRC 50はpH6.3の0.2mの磷酸ソーダ溶液で緩衝化し、樹脂の容量の4倍の菌体抽出液を加え、10°Cで5分間攪拌し、上清を元の菌体抽出液と比較した。作用条件は基質0.5%、磷酸塩m/30、pH6.4、35°Cにした。

第 4 表 アセトン菌体抽出液と Amberlite IRC 50 による吸着母液の PG

作用時間 (分)	原 液			母 液		
	ペクチン酸		Digalacturon酸	ペクチン酸		Digalacturon酸
	相対粘度	N/50 I ₂ 消費量	N/50 I ₂ 消費量	相対粘度	N/50 I ₂ 消費量	N/50 I ₂ 消費量
0	2.06	—	—	2.08	—	—
30	1.30	—	—	1.90	—	—
90	1.08	0.50	—	1.67	0.41	—
180	1.06	0.84	0.03	1.47	0.84	0.26

ガラクトキロン酸とその重合物の酸化

Er. aroideae の休止菌体の galacturon 酸, digalacturon 酸, ペクチン酸に対する酸素吸収を調べた結果は第 1 図 a のようであつた。菌体は前報と同じ組成の培養液に 28°C で 45 時間振盪培養し, 10,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して集菌し, 水で 2 回, m/45 の phosphate buffer (pH 7.0) で 1 回洗い, 同じ buffer に浮遊させたものを用いた。Warburg 容器内の組成は菌体懸濁液 0.6 ml (乾燥菌体 0.88 mg を含む), 磷酸塩 m/45, 基質 m/1000, pH 7.0, 反応液の容量 2.40 ml, 20% KOH 0.2 ml にした。



第 1 図 ガラクトキロン酸の重合物の酸化

第 1 図 a の結果から, digalacturon 酸は galacturon 酸よりも酸化され易いようである。ペクチン酸も galacturon 酸より容易に酸化されたが, いつもそうとばかりは言えない。前報と同様, ペクチン酸培地に FeSO_4 を 0.05 % 加えたものに静置培養した菌体は第 1 図 b のようにペクチン酸を galacturon 酸よりも酸化しにくい。

第 1 図 b の酸素吸収の条件は同図 a の場合と同じにした (菌体は乾燥菌体に換算して 0.74mg を用いた)。静置培養の時間は 45 hr, 培養後の pH は 6.4 であつた。培養液 100 ml の中に産

生された PG は培養液中に 0, 菌体内に 52 単位, 菌体内の digalacturon 酸分解酵素 6 単位であった。また培養液 100 ml の中に繁殖した菌体量は 37 mg であった。したがって菌体内に含まれている PG の力価は第 1 図 a の場合と著しい差はない。ペクチン酸が galacturon 酸よりも酸化されにくいのは菌体内の PG 不足によるとは言えないようである。

考 察

藤井 (1956) は *Er. aroideae* のペクチン代謝を促進する "Soluble factor" は oligogalacturonide であろうと述べている。第 1 図の結果も digalacturon 酸が容易に酸化されることを示している。培養液の PG は液化型であるが、菌体内には digalacturon 酸を分解する糖化型の PG も認められるので、ペクチン酸が好氣的に代謝されるまでに次のような加水分解の経路が存在するようである。



digalacturon 酸は galacturon 酸より容易に酸化されるけれども、その理由は分らない。加糖酸分解が行われているかもしれない (Fitting and Scherp 1951)。

本研究の費用の一部は昭和 31 年度文部省科学研究費によつた。ここに謝意を表する。

文 献

- Fitting, C. and Scherp, H. W. 1951. Observations on a strain of *Neisseria meningitidis* in the presence of glucose and maltose. I. Growth studies. *J. Bact.* 61: 203—214.
- 藤井義紹. 1956. 野菜軟腐病原菌によるペクチン物質の酸化的分解について。第 1 報。第 2 報。農化。30: 363—366, 367—371.
- 小沢潤二郎, 岡本賢一. 1956. *Erwinia* のペクチン—ポリガラクトクロナーゼ産生条件について。第 1 報。農学研究 44: 34—38.
- 小沢潤二郎, 武田晃, 岡本賢一. 1953. ペクチン醱酵について。第 16 報。農学研究。41: 21—26.