

甘藷より分離した *Bacillus* 属の マセレーション酵素について (第1報)

Bacillus sp. KYS-7 によるマセレーション酵素の生産とその2, 3の性質

菅沼俊彦・福元哲郎・池水陽子・中間勝之・藤本滋生・永浜伴紀
(澱粉利用学研究室)

昭和61年7月22日 受理

Studies on Macerating Enzyme of the *Bacillus* sp. Isolated from Sweet Potatoes

Part 1. Production of Macerating Enzyme by *Bacillus* sp. KYS-7 and Its Properties

Toshihiko SUGANUMA, Tetsuro FUKUMOTO, Yoko IKEMIZU, Katsuyuki NAKAMA,
Shigeo FUJIMOTO and Tomonori NAGAHAMA
(Laboratory of Applied Starch Chemistry)

緒 言

マセレーションとは植物細胞の間隙物質(セメント物質)であるペクチン質(主にメチルポリガラクトロン酸からなる)が微生物の分泌する酵素などにより分解され、個々の細胞に分離して組織が崩壊する現象である。水不溶性のペクチン質であるプロトペクチンを部分分解により可溶化することからマセレーション活性はプロトペクチナーゼ活性ともいわれていたことがある。比較的多くの植物病原菌がペクチナーゼを分泌し、マセレーション活性をもつことがよく知られており、その中でも *Erwinia* が有名である²³⁾。

サツマイモ (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) の塊根、すなわち甘藷の貯蔵中に発生する微生物病害として軟腐病が知られている。黒斑病のときは異なり、その罹病した甘藷の表面にはあまり顕著な病斑が現れないが、組織が軟化し、強く握ると表皮が容易に破れ、マセレーション化した内容物が漏出して来る。その内容物を顕微鏡で観察すると澱粉粒を含んだまま個々に分離した細胞が多くみられる。このような現象を利用して、微生物のマセレーション酵素により澱粉を製造しようという試みもある¹⁰⁾。甘藷の軟腐はカビの *Ryzo-
pus stolonifer* によって惹き起こされるといわれている⁶⁾。しかし、こういった植物病原性の菌を健全な甘藷に接種してもなかなか発病しない場合が多い¹³⁾。

われわれは甘藷から細菌を分離することを試み、マセレーション活性を顕著に示す2株の好気性の有孢子細菌を得た。概して、マセレーション活性は、植物組

織崩壊能としてなかなか定量化されにくいので、便宜上、ポリガラクトロンナーゼ (PG) やポリガラクトロン酸リアーゼ (PGL) の活性がその代用にされる場合が多い。しかし、われわれはあくまでも甘藷ディスク崩壊活性を直接指標として、活性の高い菌株のスクリーニングを試みた。本報は、マセレーション酵素を生産する細菌として分離した2株の中の1株、*Bacillus* KYS-7 株についての、細菌学的性質と培養条件の検討、ならびに培養濾液を粗酵素としたときの2, 3の酵素的性質に関するものである。

材 料 と 方 法

1. 細菌の分離

表面殺菌した生甘藷のキューブを綿栓した三角フラスコに入れ室温で放置した。潜在していた微生物により自然に崩壊がおきたキューブから、ポテト・グルコース寒天培地 (pH 7.0) の平面培養により細菌を分離した。つぎに、分離した菌株についてポテト・グルコース培地 (pH 7.0) で液体培養を行い、培養濾液のマセレーション活性を調べた。それらの中からとくに崩壊活性の強い菌株を選択した。細菌の保存には肉エキス寒天培地 (0.5% 肉エキス, 1% ポリペプトン, 0.5% NaCl, 2% 寒天, pH 7.0) を用いた。

2. 細菌の同定

分類のための各種生理テストは、長谷川武治編“微生物の分類と同定”¹⁷⁾、“Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”²⁾ならびに、R. E. Gordonの方法^{8,9,22)}に準拠して行った。リゾチームとアジ化

ナトリウムは0.2 μm のマイクロフィルターで除菌した。嫌気条件下での生育テストは文献 (22) に従い、1% グルコース、1% ポリペプトン、0.3% 肉エキス、0.2% 酵母エキス、0.5% K_2HPO_4 からなる培地 (pH 7.0) を、使用前にオートクレーブして溶存酵素をあらかじめ追い出した。接種後、流動パラフィンでシールし、窒素置換したデシケータに入れて30°Cで2週間培養、観察した。そして、標準株の *B. subtilis* IAM 1069, *B. cereus* IAM 1110, *B. megaterium* IAM 1166 も同時に培養して比較した。

3. 培養ならびに粗酵素標品の調製

Ward らの例²⁵⁾に従って、グルコース・ペプトン培地 (0.5% グルコース、1% ポリペプトン、0.5% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.1% KCl , 0.02% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0001% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.00005% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0) 70 ml を入れた100 ml 容側管付き三角フラスコに、前培養した細菌を1白金耳接種し、36°Cで2日間静置培養した。培養後の培養液を遠心分離 (3500 rpm \times 15 min) して菌体を除去後、希塩酸で pH を7.0に調整し、粗酵素標品とした。

4. マセレーション活性の測定

甘藷 (高系14号) の中心部からコルクボーラーで直径6 mmのカラムを打ち抜き、ナイフで厚さ約0.3 mmの甘藷ディスクを作った。そして、70%のエタノールに60秒浸漬し、蒸留水で洗浄した。一方、試験管に粗酵素液3 ml, トリス-HCl 緩衝液 (0.04 M, pH 7.0) 2 ml とチモール1粒をいれ30°Cに保温しておき、それに上記甘藷ディスクを3枚入れて反応を開始した。そして、一定時間ごとに試験管ミキサーで約10秒攪はんして崩壊の程度 (I~IV, 完全に粉々にまで崩壊したときを程度IVとする) を肉眼で観察した。2枚のディスクがほぼ均一にばらばらに崩壊 (程度III) するのに要した時間の逆数 (1/h) でもってマセレーション活性の強さを表した。たとえば1時間で甘藷ディスクを崩壊させる粗酵素液の活性は

$$1 / (\text{崩壊時間}) \times 1 / (\text{希釈率}) = (1/1) \times (5/3) \\ = 1.67 \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

となる。

5. 培養の至適温度と至適 pH

“Temperature Gradient Incubator 12” (東洋科学産業製) を用い、温度範囲23~53°Cで振盪培養した。培地は上記グルコース・ペプトン培地 (pH 7.0) である。生育とマセレーション酵素の生産の pH 依存性は、グルコース・ペプトン培地を基本とし、 H_3PO_4

と Na_2CO_3 を用いて培地の pH を調整した。オートクレーブ後の pH を確認して行った。菌体の生育量は Klett-Summerson 比色計により、フィルター66で測定した。

結 果

1. 細菌の同定

今回甘藷より分離した細菌, KYS-7 株は, Table 1 に示すようにグラム陽性の好気性有孢子桿菌でカタラーゼ活性や運動性を持つことなどから, *Bacillus* 属であることは明らかである。さらにアセトインを生成し (V-P 反応), 最高生育温度がかなり高く (48°C), 7% NaCl 含む肉エキス培地で生育し (最高11%でも1日後にコロニー観察), 嫌気条件下では生育できず, アミラーゼ活性をもつといった生理テストの結果は *B. subtilis* の性質と一致したが, 肉エキス培地72時間培養後の内生孢子の形態 (膨らみ, 位置) はその標準株 (IAM 1069) の性質とは少し異なっていた。今回同時に分離したもう一つの細菌, KYS-6 株は栄養細

Table 1. Some characters of *Bacillus* sp. KYS-7

Rods	0.8 \times 3 μm
Gram reaction*1	+
Sporangium*2	slightly swollen
Spores	ellipsoidal
position	term. to cent.
Motility	+
Catalase	+
Anaerobic growth	-
V-P Reaction	+
Growth maximum temp.	48°C
minimum temp.	15°C
Growth 0.001% lysozyme	+
media at pH 5.7	+
7% NaCl	+
0.02% azide	+
Acid from glucose	+
arabinose	+
xylose	weak
mannitol	+
Hydrolysis of starch	+
Use of citrate	+
propionate	-
acetate	+
Reduction of NO_3 to NO_2	+
Gas from inorganic N	-
Decomp. of casein	+
Lyquefying of gelatin	+

A symbol (+) represents a positive reaction and a symbol (-) a negative reaction.

*1 ; 20 h-cultured

*2 ; 72 h-cultured

胞の大きさが KYS-7 株よりやや小さいが、各種生理テストにおける陽性・陰性の結果は程度の差はあれ、すべて両菌株は一致した。

2. 培養経過

グルコース・ペプトン培地で36℃、pH 7.0 で試験管培養した時の経過を Fig. 1 に示す。静置培養では液表面に菌膜を造り試験管ミキサーでは壊れにくいので、濁度の数値は菌体量を正確に表してない。

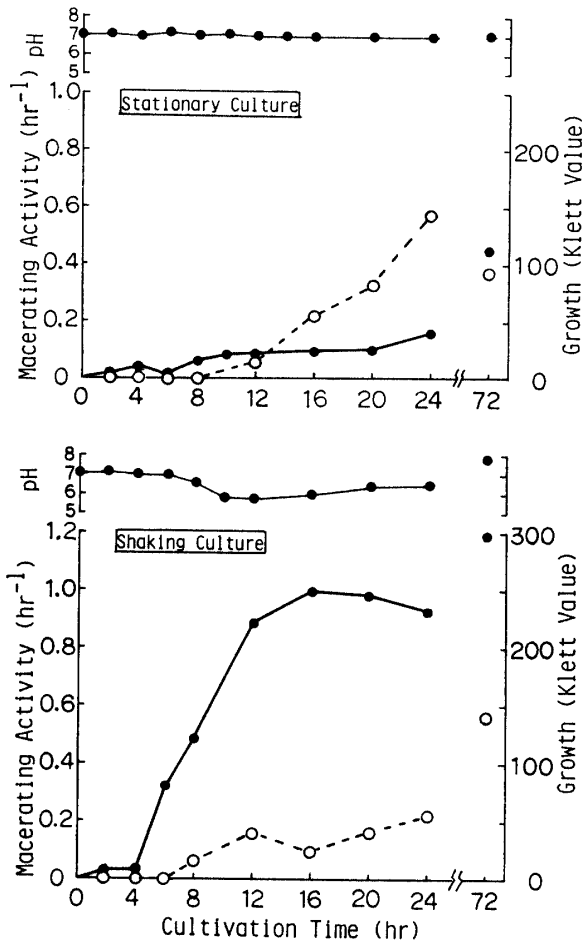


Fig. 1. The growth and production of macerating enzyme in the courses of the shaking and stationary cultures of *Bacillus* sp. KYS-7. The organism was cultivated at 36℃ in the glucose-peptone medium (pH 7.0). The shaking culture was performed at 130 rpm. Symbols ; ●, growth ; ○, macerating activity

マセレーション酵素の生産性は振盪培養と静置培養とであまり差がなかった。すなわち、振盪培養では8時間後からマセレーション活性が認められ、静置培養のときの12時間より少し早いものの、培地当たりの活性の最高値はともに0.6 h⁻¹となった。しかし、これ

はグルコース・ポリペプトン、あるいはグルコース・硫酸の培地だけで、それ以外の培地ではたいてい振盪培養の方が静置培養よりマセレーション活性が高かった。培養経過に伴って、静置培養では培地の pH の変動はほとんどないが、振盪培養では菌の増殖期(8~10時間)に培地の pH が一時的に低くなり、その後しだいに高くなって最終的(3日)には初発の pH 7.0 より高くなった。

結果は示していないが、*Clostridium acetobutylicum*¹⁰⁾ を鹿児島県工業試験場の浜崎氏より分与していただいて培養し、われわれの手法でマセレーション活性を測定して比較した。培地当たりの最大活性は嫌気培養16日後に0.5 h⁻¹となり、本菌とはほぼ同程度のマセレーション活性を示した。しかし、培養のバッチによっては活性がほとんどなくなる場合があり、不安定であった(未発表)。

3. 酵素生産に及ぼす培養条件の検討

(1) 窒素源

0.5%グルコースを炭素源として種々の有機態ならびに無機態窒素について調べたのが Fig. 2 である。カゼインの振盪培養の場合のマセレーション活性(1.25 h⁻¹)を100%として相対活性で表した。窒素源として蛋白質とその部分加水分解物を与えた場合には生育もよく(図示していない)、培地中のマセレーション活性も高かったが、アミノ酸を個別に与えた場合にはマセレーション活性はほとんどなかった。無機態窒素の中では硫酸が静置、振盪培養とも比較的良好であった。

(2) 炭素源

0.2%硫酸を窒素源として、炭素源としての糖を調べたのが Fig. 3 である。概して振盪培養の方が静置培養よりマセレーション酵素の生産性が高かった。グルコースの場合(0.95 h⁻¹)を100%として相対活性で表した。グルクロン酸ではマセレーション活性がなかった。セロピオースではかなりマセレーション活性が高かったがカルボキシメチルセルロース(CMC)では全くなかった。ガラクトロン酸では振盪培養のときにはマセレーション活性がかなりあるのにその高分子であるペクチン酸、ペクチンでは生育も悪く(図示していない)活性も非常にわずかであった。フラクトース、シュクロース、マルトースの場合はマセレーション酵素を良く生産した。ラクトース、ラフィノースでも良好だった。シクロヘキサアミロースとシクロヘプタアミロースではマセレーション活性がなかった。

(3) 培養温度

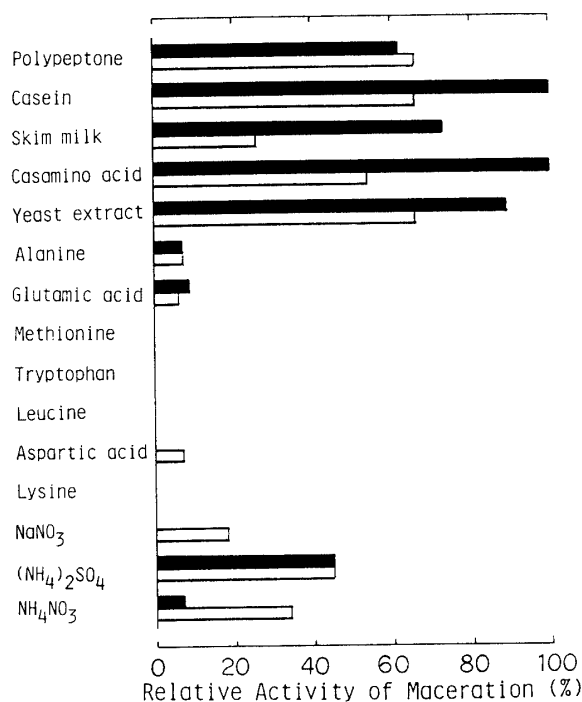


Fig. 2. The effect of nitrogen sources on the production of macerating enzyme, using shaking and stationary cultures. The organism was cultivated for 3 days at 36°C in the basal mineral medium (pH 7.0) containing 0.5% glucose and a nitrogen source. The nitrogen sources consisted of 1% complex nitrogen (peptone, casein, etc.), 0.5% amino acid or 0.2% inorganic nitrogen. The macerating activities were expressed in values relative to the highest activity in the media. Filled column, shaking culture; empty column, stationary culture

グルコース・ペプトン培地での振盪培養12時間後の結果を Fig. 4 に示す。23~45°Cのかなり広い温度範囲でマセレーション活性が認められた。その中でも25~37°Cがマセレーション酵素生産の適温のようである。30~47°Cの範囲では培地の最終 pH が低いほど最終濁度も少し低いといった傾向がみられた。

(4) 培地の初発 pH

グルコース・ペプトン培地を基本として H₃PO₄ と Na₂CO₃ を添加して培地の pH を変えた場合を Fig. 5 に示す。HCl と NaOH で pH を調整したときもほぼ同様の結果が得られた。振盪培養3日後では、初発 pH が4.5から8.0のかなり広範囲にわたって生育とマセレーション活性が認められた。pH 5.5のときに培地のマセレーション活性が最も高く (2.0 h⁻¹) になった。図示していないが、培養後の pH は生育が認められ



Fig. 3. The effect of carbon sources on the production of macerating enzyme, using shaking and stationary cultures. The organism was cultivated for 3 days at 36°C in the basal mineral medium (pH 7.0) containing 1% peptone and a carbon source of 0.5% sugars. The macerating activities were expressed in values relative to the highest activity in the media. Filled column, shaking culture; empty column, stationary culture

たところは初発の pH より0.4~1.9高くなった。静置培養 (2日後) の場合にはマセレーション活性は pH 7 を頂点とする山形を示し、培養後の pH の変動は小さかった。

4. 粗酵素の性質

(1) マセレーション活性

グルコース・ペプトン培地での静置培養2日後の培養濾液を粗酵素として用いた。これは冷蔵庫で保存したとき2週間以上安定であった。粗酵素の希釈率と甘露ディスク崩壊能でみたマセレーション活性の比例関係を Fig. 6 に示す。ディスクの崩壊を肉眼で観察するという簡便法でも活性の強さをかなり定量的に表わせることがわかった。

(2) 至適温度と至適 pH

粗酵素のマセレーション活性の温度依存性をトリス

-HCl 緩衝液 (pH 7.0) 中で調べた。また、30°C における活性の pH 依存性も調べた。それぞれ 50°C (Fig. 7) と pH 7.5 (Fig. 8) で最大活性を示した。

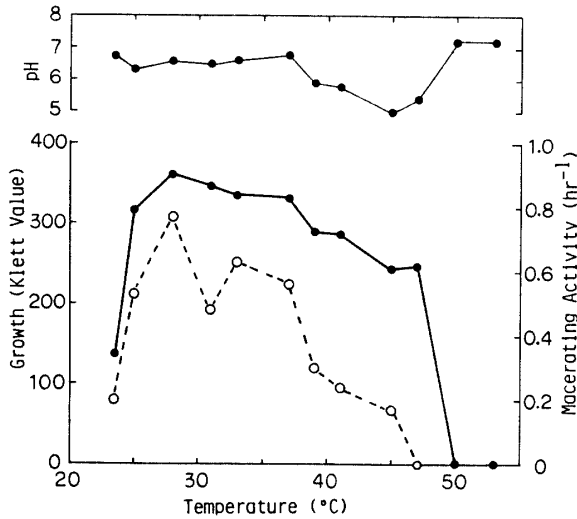


Fig. 4. Effect of cultivation temperature on growth and enzyme production. The organism was cultivated for 12 hrs. in the glucose-peptone medium (pH. 7.0), using a "Temperature Gradient Incubator 12" equipped with a shaker (Toyo Kagaku Sangyo Co., Ltd.). Symbols ; ●, growth ; ○, macerating activity

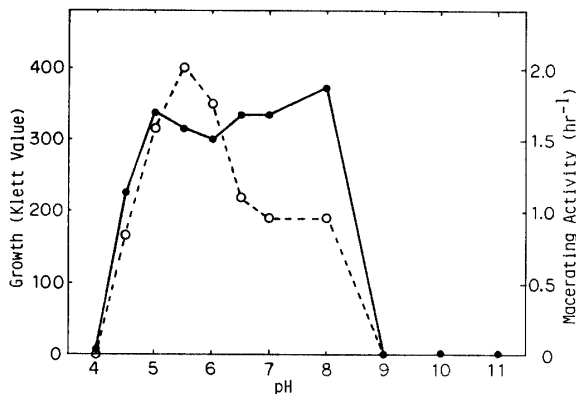


Fig. 5. Effect of the initial pH of the medium on growth and enzyme production. The organism was cultivated for 3 days at 36°C in the glucose-peptone medium (pH 4-11), the pH's of which were adjusted with H₃PO₄ or Na₂CO₃. The macerating activity was measured under standard conditions. Symbols ; ●, growth ; ○, macerating activity

(3) 添加剤

2価金属イオン, キレート剤, SH 保護剤, 界面活性剤のマセレーション活性に及ぼす効果を 50 mM ト

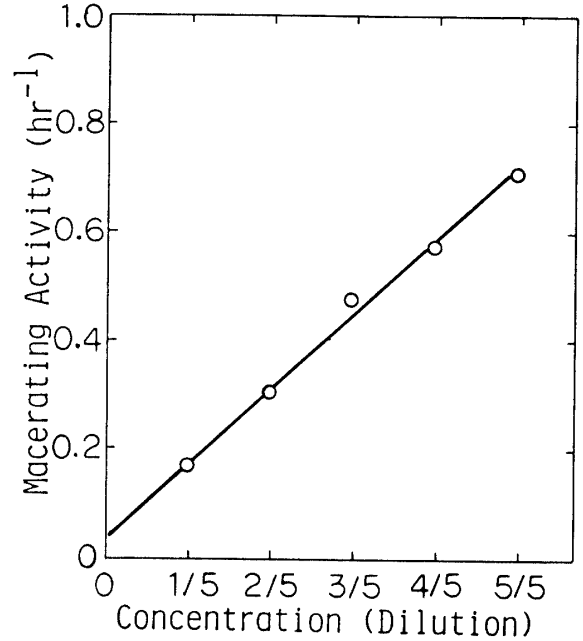


Fig. 6. A plot of the macerating activity vs. enzyme concentration (dilution of crude enzyme preparation). The macerating activity was expressed as 1/t, where t was the time (h) for the sweet potato discs to lose coherence on stirring vigorously with a flash mixer. The enzyme reactions were performed in tris-HCl buffer, pH 7.0, at 30°C.

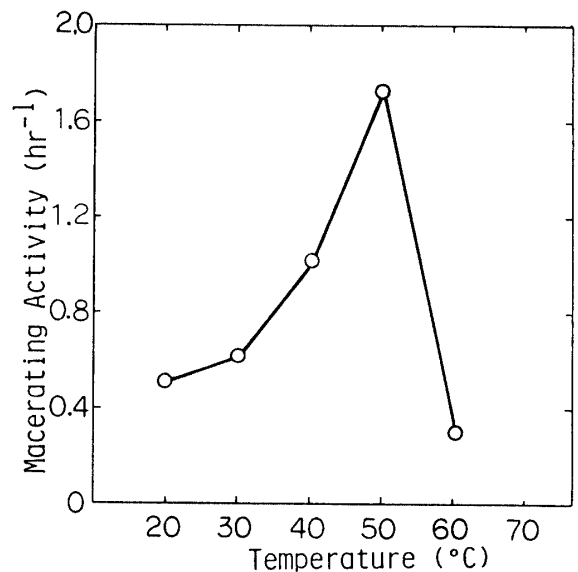


Fig. 7. Temperature dependence of the macerating activity of the crude enzyme. The enzyme reactions were performed in tris-HCl buffer, pH 7.0.

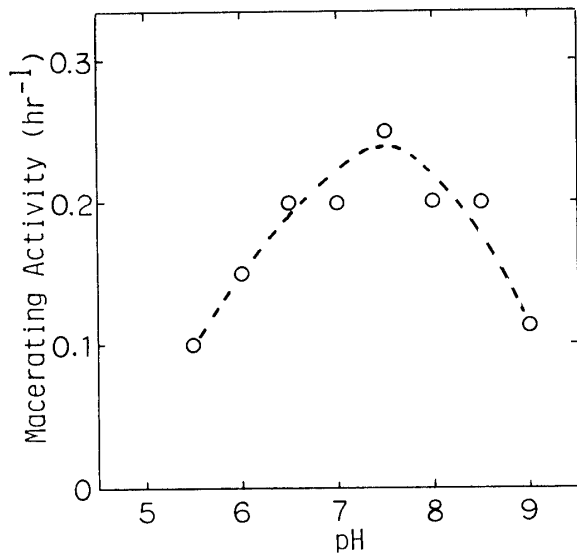


Fig. 8. The pH dependence of the macerating activity of the crude enzyme. The enzyme reactions were performed in tris-HCl buffer, at 30°C.

Table 2. Effect of various chemicals on the activity of macerating enzyme

Chemicals	Relative Activity (%)
No addition	100
CaCl ₂ (5 mM)	62
MgCl ₂ (5 mM)	86
HgCl ₂ (5 mM)	0
EDTA · 2Na(2 mM)	12
2-Mercaptoethanol(2 mM)	103
Triton X-100(0.04%)	100

The enzyme reactions were performed at 30°C in tris-HCl buffer, pH 7.0

リス-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で透析した粗酵素を用いて調べたのが Table 2 である。Hg²⁺ で完全に失活した。Ca²⁺, Mg²⁺ でも少し失活が認められた。EDTA でもかなり失活した。2-メルカプトエタノール, トリトン X-100ではほとんど影響がなかった。

(4) NaCl の影響

マセレーション活性に対するイオン強度の効果を NaCl を用いて調べたのが Fig. 9 である。かなり顕著に影響を受け、0.2 M で40%, 1 M で70%失活した。LiCl でもほぼ同様の結果が得られた。

(5) ペクチン, ペクチン酸, ガラクツロン酸の阻害

マセレーション (植物組織崩壊) というのは植物細胞間隙物質であるペクチン質が可溶化されて起こると考えられている。そこで、甘藷ディスク崩壊活性に対する、メチルポリガラクトuron酸であるペクチン, ポリガラクトuron酸であるペクチン酸, それらの構成糖であるガラクトuron酸の阻害効果をみたのが Fig. 10

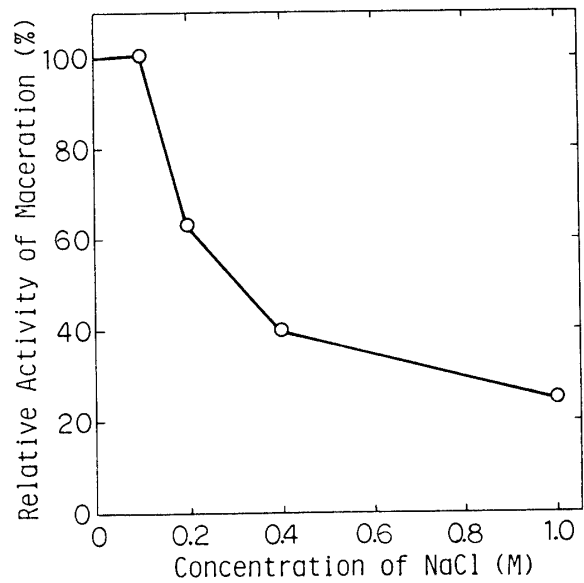


Fig. 9. The effect of NaCl concentration on the macerating activity of the crude enzyme. The enzyme reactions were performed in tris-HCl buffer, pH 7.0, at 30°C.

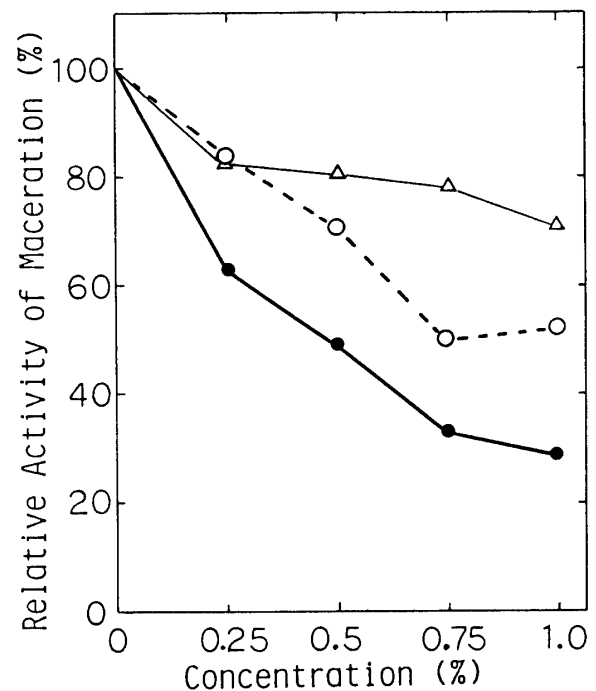


Fig. 10. The inhibitory effect of pectin, pectic acid and galacturonic acid on macerating activity. The enzyme reaction was performed in tris-HCl buffer, pH 7.0, at 30°C.

Symbols ; ●, pectin ; ○ pectic acid ; △, galacturonic acid

である。いずれの場合も阻害効果が現れた。その中でも、本質的にチャージを持たないペクチンが最も強く、0.5%で約50%阻害を示した。

考 察

青果物の軟腐病細菌としては一般に *Erwinia* 属がよく知られているが^{18, 19)}, 甘藷の貯蔵中に起きる軟腐は *Rizopus stolonifer* により惹き起こされるといわれている⁶⁾. われわれは軟腐病にかかった甘藷の内部から細菌の分離を試みた. ポテト・グルコース培地 (pH 7と5) 上で分離したが生じたコロニーは真菌類は意外に少なく細菌類が多く見られた. また, 健全な甘藷を殺菌液 (オーソサイド) に浸漬後, 滅菌ナイフで表皮をむき, さらに70%アルコールで表面殺菌した甘藷の切断面をシャーレの寒天培地にスタンプしたとき, 常に細菌のコロニーがいくつか観察された. また, 貯蔵中の甘藷ばかりでなく, 畑から掘り出した直後のものでもやはりコロニーの生成が認められた. われわれのマセレーション活性の強い2株の分離菌は外観上健全な甘藷から得られたものであった. これら両菌株を甘藷だけでなく, ニンジン, タマネギ, ジャガイモ, キャッサバ, キュウリの70%アルコール殺菌切片に接種したときも褐変や組織の軟化が生じた. したがって, 健全な甘藷中にも軟腐を惹き起こす細菌がすでにある数棲息しており, 健全な甘藷中では増殖できないが, たとえば機械的な損傷や低温障害等により, 宿主である貯蔵中の甘藷の生理活性が弱ったとき, これらの細菌が増殖をはじめ, ペクチナーゼを分泌してマセレーションを惹き起こし, その結果として軟腐になるのではないと思われる. すなわち, 従来いわれている *R. stolonifer* のようなカビ以外でも, われわれの分離菌のような細菌類によって甘藷の軟腐が惹き起こされる可能性が示唆された. 黒斑病の阻止を目的とするときには, キュアリングの温度を従来から行われている30~33℃より高い温度 (40℃) で行うことにより発病率を著しく減少できる²⁴⁾. しかし, 軟腐病の場合には生理障害を起ささないように, 適度な湿度と温度と通風下で甘藷を貯蔵することの方が大切だと考えられる.

Bacillus 属の中の種の分類は, まず, 孢子嚢細胞 (sporangium) の膨らみ方や内生孢子子の位置 (中心・偏心), 形 (球形・楕円形) をそして, 栄養細胞の径 (0.9 μm) といった形態的特徴を指標とする方法と, カタラーゼ反応, アセトイン生成, 嫌気条件下での生育などの生理的特徴を指標とする二つの分類の手法がある^{8, 9)}. 後者の方法によると本菌 (KYS-7 株) は嫌気条件下で生育できず, アミラーゼ活性を持つことなどより, *B. subtilis* に問題なく到る. 前者の方法では最初

の孢子嚢細胞の膨らみの程度の判定に少し問題が残るが, それ以外のチェック・ポイント (7% NaCl 培地生育可, pH 5.7培地生育可, アセトイン生成など) を当てはめて進むと, やはり, *B. subtilis* に到る. 馬鈴薯菌として良く知られている *B. mesentericus* は, かつては麻の精練などに使われたこともあり¹⁾, ペクチナーゼ活性や植物組織崩壊活性を持つが, 現在の分類によるとアメリカの保存株はアミラーゼ活性と硝酸塩還元能を持たない *B. pumilus* に属し, ヨーロッパの株は *B. subtilis* に属するようである²²⁾. *B. polymyxa* も, 軟腐になったジャガイモから分離され, ジャガイモ, ニンジン, タマネギに軟腐を惹き起こすことが知られている¹⁸⁾. 孢子の形状が大変特徴的で, 表面にしわが走っていて横断面は星形を示す. そして, 嫌気条件下でも生育し, グルコースや硝酸塩培地でガスを発生する. その他ペクチナーゼを産生する *Bacillus* 属菌として堀越らのアルカリ性細菌がある¹¹⁾.

現在マセレーション活性の表示あるいは測定法が各研究者によりかなりまちまちで, 他に報告されている菌のマセレーション活性との比較が簡単に出来ない. まず, 用いる植物材料がジャガイモ^{3, 4, 7, 12, 15, 20)}, ニンジン^{4, 7)}, ガンピ (雁皮)^{14, 15)}, それにわれわれの甘藷がある. 植物組織のディスクの崩壊を肉眼で判定する方法にしても, 一定時間反応後の崩壊程度を段階的に表示したり^{14, 20)} (この場合, 活性の強弱しか表わせず, 何倍強いといった定量関係は表わせない), 組織の重量減少率で表わしたり^{4, 12)}, われわれと同じく一定の崩壊程度に達する時間を測定し, その時間の逆数でもって活性の強さを表わす場合もある³⁾. われわれの甘藷ディスクの崩壊時間でみる場合には用いるディスクの厚みにより崩壊時間がかかなり異なるが, この方法にある程度習熟すると, Fig. 6に見るごとく, 酵素濃度に比例してマセレーション活性が強くなり, きれいな直線関係 (検量線) が得られた. また, ジャガイモディスクを作って甘藷ディスクと比較してみると面白いことに組織の固い甘藷の方がジャガイモより常に早く (およそ倍) 崩壊した (未発表). 市販のペクチナーゼ (東京化成 “ペクチナーゼ”, 上田化学 “セルロシン AC-15”) の場合も程度の差はあるがやはり同じ傾向を示した (未発表). したがってこの違いは酵素の特異性の違いというより, ジャガイモと甘藷の細胞間の物質構造と組成の違いに主に由来するのであろう.

ペクチン, ペクチン酸を炭素源として与えたとき, 本菌は生育もマセレーション酵素の生産も良くなかったが, むしろグルコース, フラクトースおよびそれら

のオリゴ糖を一般的に良く資化し、マセレーション酵素の生産性も高いという結果が得られた (Fig. 3). また、グルコース・ペプトン培地にペクチンやペクチン酸を添加しても培地のマセレーション活性はそれ以上強くならなかった (未発表). したがって、本菌はマセレーション酵素を誘導的にではなく、構成的に産生すると考えられる. *B. polymyxa*²¹⁾ や *B. pumilus*⁵¹⁾ のポリガラクトロン酸リアーゼ (PGL) の場合は誘導酵素であるが、Ward らがエゾマツの辺材より分離した *B. subtilis* の PGL の場合は構成酵素で、炭素源としてグルコースのみを与えたとき生育も酵素の生産もともに良い²⁵⁾. しかし、ペクチン、ペクチン酸でも比較的良く酵素を生産することや窒素源としてアラニン、グルタミンを与えた方がペプトンより酵素の生産性が高いといった点²⁵⁾ は本菌の傾向 (Figs. 2, 3) と少し異なる.

Bacillus 属は細菌としては生育温度と pH の範囲が一般的に広いが、本菌の場合もかなり広い pH と温度範囲で濁度の上昇とマセレーション活性が認められた (Figs. 4, 5). グルコース・ペプトン培地の初発の pH を変えたとき、振盪培養 1 日後のマセレーション活性は pH 5~8 であまり変わらないが (図示してない)、培養 3 日後では初発 pH 5~6 の方が高いという結果が得られた.

現在市販されているペクチナーゼは、著者らの知る限りではペクチンエステラーゼ以外は、全て真菌類の中の糸状菌と担子菌が起源であり、そのマセレーション活性の作用 pH が酸性側にある. したがって、果汁の pH はそれに近いので、果汁の清澄化の場合には適している. しかし、野菜の組織の pH は一般に中性付近にあり、野菜ジュースをペクチナーゼで処理したいときには現在の真菌類起源のものはあまり適当でない. 細菌起源のペクチナーゼのように中性に至適 pH を持つものも期待される. 本菌のマセレーション酵素の至適 pH は 7.5 であった (Fig. 8). 振盪培養 1 日後の粗酵素液の mg 蛋白当たりのマセレーション活性を市販ペクチナーゼと比較すると、東京化成“ペクチナーゼ”の約 1/4, 上田化学“セルロシン AC-15”の約 1/2 であった (未発表). “ペクチナーゼ”と“セルロシン AC-15”のマセレーション活性の至適 pH は両者とも 2.5 とかなり酸性側にあった (未発表). “セルロシン”の方はセルラーゼ活性 (濾紙崩壊活性) が認められた.

マセレーション酵素の実体はペクチンに作用するポリメチルガラクトンナーゼ (PMG) やポリメチルガラクトン酸リアーゼ (PMGL) ではなく、ペクチ

ン酸に働くポリガラクトン酸リアーゼ (PGL) と考えられている³⁾. endo-PGL は Ca^{2+} イオンによって著しく活性化され^{4,5,7,11,16,21)}, キレート剤の EDTA により失活する¹⁶⁾. 本菌のマセレーション酵素に対する Ca^{2+} と EDTA の効果を調べたところ、両者とも阻害効果が認められた (Table 2). Ca^{2+} イオンにより変化を受け甘藷ディスクが崩壊しにくくなるのか、あるいは Ca^{2+} により失活する未知のペクチナーゼがあるのか今後の研究に待ちたい.

マセレーション活性が、ペクチンを分解する酵素とペクチン酸を分解する酵素との、どちらに関係が深いかを調べるために阻害実験を行った結果、ペクチン酸よりペクチンの方が甘藷ディスク崩壊を抑える作用が強いことが明らかとなった (Fig. 10). ガラクトン酸モノマーやペクチン酸もペクチンより弱い明確な阻害効果が認められた. 本菌のマセレーション活性は NaCl によって部分失活した (Fig. 9) のので、ガラクトン酸やペクチン酸の場合にはこれらの持つチャージの効果も一部考えられる. しかし、ペクチンの場合には構成糖であるガラクトン酸のカルボキシル基がメチルエステル化して本質的にチャージを持たないので、ペクチンによる阻害はかなり特異的作用といえよう. PGL が本菌のマセレーション活性にどの程度関係しているのか現在検討中である.

要 約

現在市販のペクチナーゼはペクチンエステラーゼを除いてすべて真菌類起源であり、そのマセレーション活性の至適 pH は酸性側にある. われわれは生甘藷より至適 pH を中性にもつマセレーション酵素を生産するグラム陽性好気性桿菌 (*Bacillus* sp. KYS-7) を分離した. そして、細菌の同定テスト、培養条件の検討ならびに培養濾液を粗酵素として、その酵素的 2, 3 の性質を調べ以下の結論を得た.

1. 本菌の生理的性質はすべて *B. subtilis* のそれと一致した. しかし、内生孢子の位置ならびに孢子嚢細胞の膨らみが少し見られるところが標準株の IAM 1069 とは異なっていた.

2. マセレーション活性は、トリス緩衝液で pH 7.0 に調整した粗酵素液に甘藷ディスクを入れ、30℃ に保温してその崩壊の程度を一定時間ごとに観察した. そして、ほぼ均質にバラバラに崩壊した時間の逆数 (1/h) でもってマセレーション活性の強さを表すと、酵素濃度に比例してほぼ原点を通る直線 (検量線) が得られた.

3. 本菌のグルコース・ペプトン培地での培地当たりのマセレーション活性は振盪・静置培養ともほぼ同程度であった。そして、かなり広い温度範囲(23~45℃)と pH 範囲(4.5~8)で生育とマセレーション活性が認められた。

4. 窒素源としては振盪・静置培養ともに、ポリペプトン、カゼイン、カザミノ酸のような蛋白質やその分解物を用いたときの方が、アラニン、グルタミン酸のような個々のアミノ酸を用いたときよりずっとマセレーション酵素をよく生産した。無機態窒素では硫酸が比較的良好だった。

5. 硫酸を窒素源として、炭素源としての糖類を検討した。グルコースはガラクトース、ガラクトロン酸よりマセレーション酵素をよく生産した。そして、むしろペクチン、ペクチン酸は菌の生育もマセレーション酵素の生産性も非常に低く、グルコース・ペプトン培地に添加しても効果がなかった。したがって、本酵素は構成酵素と思われる。グルコース、フラクトースおよびそれらのオリゴ糖、ラクトース、セロピオースなどは酵素の生産性が高かった。シクロデキストリン、グルクロン酸、CMC は生育もマセレーション酵素の生産もなかった。

6. 培養濾液を粗酵素として甘藷崩壊能としてのマセレーション活性の最適 pH, 温度を測定した。それぞれ、7.5と50℃であった。

7. 一般に細菌のマセレーション活性の実体はポリガラクトロン酸リアーゼ(PGL)であると言われており、そのPGLはCa²⁺によって著しく活性化を受ける。本菌のマセレーション酵素はCa²⁺, EDTAのいずれの存在下でも活性の減少が観察された。NaClにより反応液のイオン強度を高めたときも部分失活が生じた。

8. マセレーション活性が、ペクチン分解酵素とペクチン酸分解酵素のどちらに、より密接な関係にあるかを調べるため阻害実験を行った。本質的にチャージを持たないペクチンの方が、ペクチン酸、ガラクトロン酸より強い阻害効果が認められた。

謝辞：本稿の校閲と助言をいただいた植物病理学研究室の荒井 啓教授と、菌の培養に便宜をはかっていたいただいた応用微生物学教室に心より感謝の意を表します。

文 献

- 1) 朝井勇宣・小松栄太郎：醱酵による繊維の精練について(第2報)。2種の芋麻繊維精練菌について。農化誌, **19**, 566-570 (1943)
- 2) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. : Bergey's manual of determinative bacteriology. Eighth ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1974)
- 3) Byrde, R. J. W. and Fielding, A. H. : Pectin methyl-trans-eliminase as the maceration factor of *Sclerotinia fructigena* and its significance in brown rot of apple. *J. Gen. Microbiol.*, **52**, 287-297 (1968)
- 4) Chesson, A. and Codner, R. C. : The maceration of vegetable tissue by a strain of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.*, **44**, 347-364 (1978)
- 5) Dave, B. A. and Vaughn, R. H. : Purification and properties of a polygalacturonic acid trans-eliminase produced by *Bacillus pumilus*. *J. Bacteriol.*, **108**, 166-174 (1971)
- 6) Edmond, J. B. : Sweet potato pest. Part 1. Destructive fungi. in Edmond, J. B., *Sweet potatoes: production, processing, marketing*. p. 148-175, The AVI Publishing Company Inc., West Port, Connecticut (1971)
- 7) Garibaldi, A. and Bateman, D. F. : Pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi* and their effects on plant tissue. *Physiol. Pl. Pathol.*, **1**, 25-40 (1971)
- 8) Gordon, R. E. : The genus bacillus. in Laskin, A. I. and Lechevalier, H. A. (eds.), *Handbook of Microbiology*, vol. **1**, p. 71-88, CRC Press, Cleveland, Ohio (1973)
- 9) Gordon, R. E., Haynes, W. C. and Pang, C. H. : The genus bacillus. *Agriculture Handbook*, No. **427**, U. S. Dept. of Agr. (1974)
- 10) 浜崎幸男・川原 一：微生物酵素による甘藷澱粉の製造(第2報) *Cl. acetobutylicum* S-1 酵素によって得られた澱粉の性状について。澱粉工業学誌, **13**, 105-107 (1966)
- 11) Horikosi, K. : Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part III. Alkaline pectinase of *Bacillus* No. P-4-N. *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 285-293 (1972)
- 12) 石井茂孝・川村 敏・横塚 保：植物組織の酵素的分解に関する研究(第4報) *Asperigillus sojae* No. 48の macerating activity について。農化誌, **44**, 306-311 (1970)
- 13) Jellis, G. J. : Laboratory assessments of the susceptibility of potato tubers to gangrene (*Phoma exigua* var. *foveata*). *Plant Pathol.*, **31**, 171-177 (1982)
- 14) Kaji, A. : Studies of macerating enzyme acting on middle lamella pectin. Part I. Separation of the macerating enzyme produced by *Cl. felsineum* var. *sikokianum*. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 8-12 (1956)
- 15) 梶 明・藤川 勇・岩原章二郎・佐藤優行：*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。農化誌, **46**, 509-516 (1972)
- 16) Kelly, C. T. and Fogarty, W. M. : Production and properties of polygalacturonate lyase by an alkalophilic microorganism *Bacillus* sp. RK 9. *Can. J. Microbiol.*, **24**,

- 1164-1172 (1978)
- 17) 駒形和男：細菌の分類と同定 (1)好気性細菌. 微生物の分類と同定, 長谷川武治編著, p. 203-245, 学会出版センター, 東京 (1975)
- 18) Lund, B. M. : Bacterial spoilage. in Dennis, C. (ed.) *Post-harvest pathology of fruits and vegetables*. p. 219-257, Academic Press (1983)
- 19) 正子 朔：青果物の市場病害 1. 微生物による病害. 青果保蔵汎論, 緒方邦安編, p. 246-260, 建帛社, 東京 (1977)
- 20) Mount, M. S., Bateman, D. F. and Basham, H. G. : Induction of electrolyte loss, tissue maceration, and cellular death of potato tissue by an endopolygalacturonate trans-eliminase. *Phytopathology*, **60**, 924-931 (1970)
- 21) Nagel, C. W. and Vaughn, R. H. : The characteristics of a polygalacturonase produced by *Bacillus polymyxa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 344-352 (1961)
- 22) Smith, N. R., Gordon, R. E. and Clark, F. E. : Aerobic sporeforming bacteria. *Agriculture Monograph*, No. 16, U. S. Dept. of Agr. (1952)
- 23) Starr, M. P. and Chaterjee, A. K. : The genus *Erwinia* : Enterobacteria pathogenic to plants and animals. *Ann. Rev. Microbiol.*, vol. 26, p. 389-426 (1972)
- 24) 田之上隼雄：高温処理の適正条件の把握と高温処理が調理芋の品質に及ぼす影響 (第2報). 流通と加工に関する試験成績書 (昭和59年度), p. 69-87, 鹿児島県農業試験場流通加工部 (1985)
- 25) Ward, O. P. and Fogarty, W. M. : Polygalacturonate lyase production by *Bacillus subtilis* and *Flavobacterium pectinovorum*. *Appl. Microbiol.*, **27**, 346-350 (1974)

Summary

A strain of *Bacillus*, KYS-7, isolated from sweet potatoes, grew and produced macerating enzyme in a glucose-peptone medium, using both shaking and stationary cultures.

The physiological properties of the bacteria were noted to be in good agreement with those of *B. subtilis*, excepting the existence of a little swollen sporangium unobservable in the authentic bacteria, IAM1069.

Macerating activity was expressed by a reciprocal of the time (1/h) when sweet potato discs were broken to pieces in the course of the enzyme reaction at 30°C in tris-HCl buffer, pH 7.0. A plot of macerating activity against enzyme concentration was noted to be linear.

On the glucose-peptone medium, the macerating enzyme was produced over wide ranges of the initial pH's of the medium (4.5~8) and of cultivation temperatures (23~45°C).

Higher yields of enzyme production were given by the complex nitrogen sources such as polypeptone, casamino acid etc. than those by any of the amino acids (alanine, glutamic acid etc.) or by inorganic nitrogens.

Glucose was a more suitable carbon source for the enzyme production than galactose and galacturonic acid. A little growth and enzyme production were observed in pectin or pectic acid. Thus, it seemed that the enzyme was produced constitutively by the bacteria.

Besides glucose, the sugars fructose, sucrose, maltose, soluble starch, lactose and cellobiose gave rise to good yields of enzyme production. No production occurred in cyclodextrin, glucuronic acid or CMC.

In the reaction of crude preparation of the enzyme, the optimum temperature and pH were 50°C and pH 7.5, respectively.

Among pectinases, polygalacturonate lyase (PGL) is said to be responsible for macerating activity. The enzyme is markedly activated by the Ca^{2+} ion and inhibited by EDTA. The *Bacillus* macerating enzyme was inhibited by both the Ca^{2+} ion and EDTA. The activity decreased with an increase in the ionic strength of the reaction media by the addition of NaCl.

To examine which enzyme is responsible for the macerating activity of the *Bacillus* enzyme, a pectin degrading enzyme or a pectin acid degrading enzyme, inhibition experiments were performed. Pectin, having essentially no charge, showed more inhibitory effect on the macerating activity than pectic acid and galacturonic acid, though both of them also inhibited the activity to some extent.