

# リンゴ青カビ病菌 *Penicillium expansum* O-385-10による ペクチン分解酵素の生産とその酵素化学的性質

大野信子, 岡留美穂, 李 晶

## Production of Pectin Degrading Enzymes by an Apple Blue Mold, *Penicillium expansum* O-385-10, and Their Properties

Nobuko OHNO, Miho OKADOME and Chin LEE

The productivity of pectin degrading enzyme in an apple fruit blue mold, *Penicillium expansum* and properties of the partially purified enzymes were examined. In the pectin-inorganic salt medium, the organism produced extracellular polygalacturonases. The activity of total polygalacturonase in the culture solution was achieved largest (1.56 U/ml), when it was incubated in the medium containing pectin (2.0%) and ammonium phosphate (0.5%) at 30°C for 4 days. Two active fractions (polygalacturonase I and II) were purified from the culture filtrate by DEAE-cellulose chromatography. The optimum pHs for the activities of I and II were 4.8 and 5.5, and the optimum temperatures were about 40°C. Both enzymes were stable within 0~40°C and pH 3~7.5. Their activities were remarkably inhibited by 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 1 mM  $\text{Mg}^{2+}$ .

**Key words** : apple blue mold, apple fruit rotting, *Penicillium expansum*, pectin degrading enzyme, polygalacturonase

**キーワード** : リンゴ青カビ病菌、リンゴ果実腐敗、*Penicillium expansum*、ペクチン分解酵素、ポリガラクトナーゼ

## 緒 論

リンゴは生産量も多く、世界的にみても重要な果実の一つである。従って、リンゴの貯蔵、輸送中の腐敗とその防止に関連した研究もこれまでに多数がなされている<sup>1-4)</sup>。収穫後、保存中に腐敗したリンゴ果実からは、広く世界に共通して特定の糸状菌、リンゴ青カビ病菌 *Penicillium expansum* が分離されてくる。この糸状菌は、リンゴの果実を腐敗するのみな

らずマイコトキシンの一つパツリンを生産する<sup>5,6)</sup>。そのため、本菌によるリンゴ果実の腐敗を防ぐことは、貯蔵上の重要な課題となっている。本菌の生育と炭素源との関係を検討した結果は、本菌はキシランやペクチンを利用しての生育に優れ、リンゴ可食部の主要成分、グルコース、フルクトース、スクロースを利用しての生育は不良であること、本菌によるリンゴ果実組織の破壊には、ペクチン分解酵素とキシラン分解酵素が主要な役割を演じていることを示している<sup>7)</sup>。さらに、これらの酵素は本菌の胞子の発芽と発芽後の菌糸の伸長に関連していることが報告されている<sup>8)</sup>。また、果実の腐敗に関連してカルシウムのポリガラクトツロナーゼの活性阻害による腐敗防止の報告がなされている<sup>9-11)</sup>。

*P. expansum* とは別に、収穫後保存中のリンゴ、イチゴ、ブドウ、レタスなど広く果実や野菜の腐敗に係わる灰色カビ病菌 *Botrytis cinerea* の生産する酵素の活性、主に  $\beta$ -グルコシダーゼとリンゴ果実の腐敗過程に関連して詳細な報告もなされている<sup>12-15)</sup>。しかしながら、*P. expansum* について、植物の細胞壁に含まれている構成糖類が、誘導因子として加水分解酵素の生産に対してそれぞれどのように影響するかについては、これまでに明らかにされていない。

本報告では、*P. expansum* によるリンゴ果実の腐敗と関連性があると考えられる酵素の中から、特にポリガラクトツロナーゼを取り上げ、酵素の生産条件を検討し、その培養濾液より酵素を部分精製し、その酵素化学的緒性質について検討を加えた。

## 材料および方法

### 使用菌株とその保存

供試菌株は、国立医薬食品衛生研究所より分与された *Penicillium expansum* O-385-10、MR-213-3 および財発酵研究所から分与された *Penicillium expansum* IFO 8800 を用いた。

各菌株は、ポテトデキストロース寒天培地を用い、30℃で5～8日間静置培養を行い、4℃の低温室で保存した。保存菌株は2ヶ月毎に継代培養をした。

### 培地組成および培養法

培地は、前報<sup>7)</sup>に従って、基本無機塩類培地に各炭素源を2%になるように添加したものを121℃、20分間の条件下でオートクレーブにより滅菌処理して調製した。

酵素の生産を調べるための培養は、以下のように行った。上記培地の30mlを100ml容三角フラスコに入れたものに、供試菌株の分生孢子懸濁液（およそ $10^5$  spores/ml）0.2～0.3mlを接種し、30℃で4～5日間、180rpmの回転数で振盪して行った。なお、分生孢子懸濁液は、5～8日間培養したポテトデキストロース寒天斜面培養に滅菌水約10mlを加えて調

製した。

酵素精製のための培養は1 L容三角フラスコに300mlのペクチンを2%含む無機塩類培地を入れ、上記に述べた条件下で供試菌株を接種し、30℃で4日間180rpmの回転数で振盪培養した。

#### 粗酵素液の調製

各種の培養実験における酵素活性の測定には、上記培養液を遠心分離して、得られた上清液を粗酵素液として用いた。

また、酵素精製用粗酵素液は、*P. expansum* O-385-10を、4日間培養して得られた培養上清液に80%飽和となるよう硫酸アンモニウムを加えたのち、遠心分離(20,000×g、15 min)を行い、その沈殿物を、20mMリン酸緩衝液(pH6.3)に溶解し、透析膜(Cellulose tube、三光純薬)を用いて、4℃で、約一晚透析して調製した。

#### 酵素活性測定法

ペクチナーゼ(ポリガラクトナーゼ)の活性は、0.25M酢酸緩衝液(pH5.0)に0.5%になるように溶解した可溶性ペクチン酸を基質とし、これを0.8ml酵素溶液0.2mlの混合液を30℃、20分間反応させ、生じた還元糖を3,6-ジニトロフタル酸法<sup>16)</sup>を用いて450nmにおける吸光度を測定して求めた。酵素活性の1単位(U)はこの条件下で1分間に1 μmolのD-ポリガラクトロン酸相当の還元糖を遊離する酵素量として表示した。

アミラーゼ活性は、1 M酢酸緩衝液(pH5.0)に2%の濃度になるように溶解した可溶性デンプン溶液を基質とし、これを3.0ml、酵素溶液1.0mlの混合液を30℃、20分間反応させ、生じた還元糖を3,6-ジニトロフタル酸法を用いて450nmにおける吸光度を測定して求めた。酵素活性の1単位(U)はこの条件下で1分間に1 μmolのグルコース相当の還元糖を遊離する酵素量として表示した。

キシラナーゼやセルラーゼなどの活性は、セルロースおよびキシラン0.005g、蒸留水0.25ml、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液0.5mlをそれぞれL字型試験管にとり、このL字管に酵素液0.25mlを加えて、30℃、20分間反応させ、生じた還元糖を3,6-ジニトロフタル酸法を用いて450nmにおける吸光度を測定して求めた。キシラナーゼ活性の1単位(U)はこの条件下で1分間に1 μmolのキシロース相当の還元糖を遊離する酵素量として表示した。セルラーゼ活性の1単位(U)はこの条件下で1分間に1 μmolのセルビオース相当の還元糖を遊離する酵素量として表示した。なお、キシランおよびセルロースは不溶性であるため、30℃恒温水浴で反応させる際には、Monod式振とう機を使用して行った。

## タンパク質の定量

タンパク質は、牛血清アルブミンを標準としてLowryら<sup>17)</sup>の方法で測定した。また、精製過程での、クロマトグラフィー溶出液のタンパク質は、280nmにおける吸光度を測定して求めた。

## ポリガラクトナーゼの部分精製

上述の透析内液をあらかじめ同緩衝液で平衡化したDEAE-Cellulose DE52 (Whatman) カラム ( $\phi 2.0 \times 40\text{cm}$ ) に吸着させ、同緩衝液で洗浄したのち、塩化ナトリウムの直線濃度勾配 (0~800mM) の緩衝液を用いて、溶出した。得られた活性画分を限外濾過装置 (Centriprep 30, Amicon) によって濃縮した。この濃縮液を同緩衝液であらかじめ平衡化したSephacryl S-200 HR (Pharmacia) カラム ( $\phi 1.6 \times 100\text{cm}$ ) によるゲル濾過に供し、溶出した活性画分を集め、酵素の性質を調べるためのサンプルとした。

## 実験結果

### *P. expansum* 3菌株の液体培養における酵素の生産

本研究とは別に、すでに*P. expansum*のペクチン分解酵素の細胞外への生産に関しては報告されているが<sup>18,19)</sup>、培養の詳細やペクチン分解酵素以外の糖質分解酵素との関連は必ずしも明らかにされていない。そこで、まず、*P. expansum* O-385-10、MR-213-3、IFO 8800の3菌株について、液体振とう培養におけるポリガラクトナーゼの生産を調べた。

ペクチンを炭素源とした培地で、3菌株共に良好な生育を示したが、その分解に関連するポリガラクトナーゼはO-385-10株が、他の菌株と比較して、高い生産性を示した。また、酵素の生産量は、いずれの株も、培養4日目で、最大に達し、その後、急速に低下した。この結果より、以下、O-385-10株を取り上げて検討を続けた。

各種の糖類を炭素源として、リン酸アンモニウムを窒素源とする無機塩類培地を用いて、O-385-10株の酵素生産性を調べた。本菌株は、ペクチンとキシランを炭素源とした場合、生育が良好で、培養5日で、それぞれポリガラクトナーゼとキシラナーゼを生産した。セルロースを炭素源とした場合、培養10日目で、わずかにセルラーゼの生産が見られた。グルコースを炭素源とした培地では、前述したように本菌の生育は不良で、これらの酵素を生産しなかった (Table 1)。生育の必ずしも良好でなかったデンプンやスクロースを炭素源とした培地においては、ほとんどアミラーゼやインベルターゼの生産が認められなかった。

リンゴ果実の成分の中ではペクチンを初め数種の多糖類を主成分として、多くの糖類が共存している。それらの糖類が供試菌株の生育及び酵素の生産に及ぼす影響について調べた。

2%ペクチンを含む基本培地に、グルコース、スクロース、マルトース、フルクトース、セルロース、デンプン、キシランをそれぞれ2%の濃度で添加し、ペクチンを単独で含む培地での酵素の生産量と比較した。ポリガラクトナーゼの生産は、グルコース以外の糖類が加えられている培地では、ペクチンを単独で含む培地での酵素生産量とほぼ同じだった。これらに対して、グルコースを添加した培地では、菌の生育は悪くなり、酵素の生産も抑制されることが分かった (Table 2)。

O-385-10株による酵素の生産における培地の初発pHについては、2%ペクチンを含む基本培地を用いた場合、pH4.0に調整した培地においてポリガラクトナーゼの生産は最大に達した (1.56U/ml)。培地に添加するペクチンの濃度については、2%の場合が酵素の生産が最大で、2%以上の濃度で添加された場合、培地の粘度が急激に上昇し、振盪培養が十分にできなくなった。

炭素源に2%ペクチンを用いた基本培地に、各種の窒素を0.5%の濃度で加え、それぞれのポリガラクトナーゼの生産について比較検討した結果、供試菌株による酵素の生産は、酵母エキを用いた培地で、最も良好であった。次に、ポリペプトンを用いた培地は、酵素の生産量が高かったのに対し、無機窒素源については、リン酸アンモニウム、硫酸アンモニウ

**Table 1 Effects of growth substrates on production Of enzymes by *P. expansum* O-385-10**

Enzyme	Growth substrates (2%)	Activity (U/ml)	
		5days	10days
Polygalacturonase	Pectin	1.446	0.115
	Malic acid	0.110	0.008
	Glucose	ND*	ND*
Cellulase	Cellulose	0.091	ND*
Xylanase	Xylan	0.776	0.592
Amylase	Starch	ND*	ND*
	Glucose	ND*	ND*
Invertase	Saccharose	ND*	ND*

The organism was incubated for 5days and 10 days, respectively under conditions described in the text.

ND\* : Not detectable

ムで若干の酵素の生産が認められたが、他の無機窒素源での生産量は極めてわずかなものであった。

### ポリガラクトツロナーゼの精製

ペクチンを炭素源として生育させた *P. expansum* の培養上清液より、ポリガラクトツロナーゼを部分精製した。

前述した無機塩類液体培地で、4日間振とう培養して得られた培養上清に、硫酸アンモニウムを加えて、その沈殿物を一晚透析した。その内液をDEAE-セルロースDE-52 (Whatman) カラムに吸着させ、塩化ナトリウムの直線濃度勾配で溶出した。ポリガラクトツロナーゼの活性は、それぞれフラクションNo.50~100とNo.125~150 (ポリガラクトツロナーゼ I と II) に溶出してきた (Fig. 1)。さらに、これらの活性画分をそれぞれ集め濃縮したのち、Sephacryl S-200 High-Resolution (Pharmacia) を用いて、ゲル濾過を行った。以上の精製過程の要約をTable 3に示した。ゲル濾過して得られた両活性画分は、ポリアクリルアミド電気泳動にて単一なバンドを示さなかった。

以下、これら部分精製標品を用いて酵素化学的諸性質について検討した。

### ポリガラクトツロナーゼの酵素化学的性質

2種類のポリガラクトツロナーゼについて、pHの酵素の安定性に及ぼす影響を、100mM酢酸緩衝液 (pH3.5~5.0)、100mMリン酸緩衝液 (pH6.0~8.0)、100mM炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.0~11.0) を用いて検討した。ポリガラクトツロナーゼ I と II の最適pHはそれぞれ4.8と5.5であった。酵素の安定性に及ぼすpHの影響については、両酵素を30℃において

**Table 2 Effects of addition of carbohydrates to pectin medium on Polygalacturonase production by *P. expansum* O-385-10**

Added to pectin medium	Activity (U/ml)	Final pH	Growth
None	1.344	3.70	##
Glucose	ND*	3.85	+
Saccharose	1.661	3.78	++
Maltose	0.867	3.72	++
Fructose	0.994	3.97	++
Cellulose	1.551	5.43	##
Xylan	1.057	4.26	##

The organism was incubated for 4days under conditions described in the text.

\* : ND, Not detectable

+, Worse; ++, Ordinary; ##, Fine;

30分間各緩衝液でインキュベートしたのち、残存活性を標準活性測定法で求めた。ポリガラクトツロナーゼⅡ (pH5.2~6.8) はポリガラクトツロナーゼⅠ (pH5.2~7.2) と比べて、若干広い範囲のpH域で安定であった。

ポリガラクトツロナーゼⅠとⅡの最適温度は、ほぼ同じで、40℃であった。両酵素は、50℃以上の温度で1時間加熱すると、それらの活性は急激に低下し始めた。

ポリガラクトツロナーゼⅠとⅡの活性に及ぼす金属イオンの影響を調べた。なお、添加した金属イオンはすべて塩化物塩を用いて検討した (Table 4)。ポリガラクトツロナーゼⅠとⅡは、金属イオン1 mMの存在下において、両方ともCa<sup>2+</sup>とMg<sup>2+</sup>を加えた時に最も強く阻害され、Ⅰは52.5%と74%、Ⅱは57%と80%にまでそれぞれ活性が低下した。

## 考 察

リンゴ果実の腐敗菌 *Penicillium expansum* は、広く世界に共通し、現在、リンゴ果実を腐敗する指標菌となっている。本菌によるリンゴ果実の腐敗する機構、特に、果実細胞壁を構成する糖質を利用するの生育とその分解酵素の生産との関連については、明らかにされていない部分が多く残されている。木村ら<sup>7)</sup>は、本菌はリンゴ果実の果肉の主要成分である可溶性糖類 (グルコース、フルクトース、スクロース) を利用するの生育が不良で、不溶性糖類 (キシランやペクチン) を利用して良好に生育することを示し、キシラン分解酵素は果実

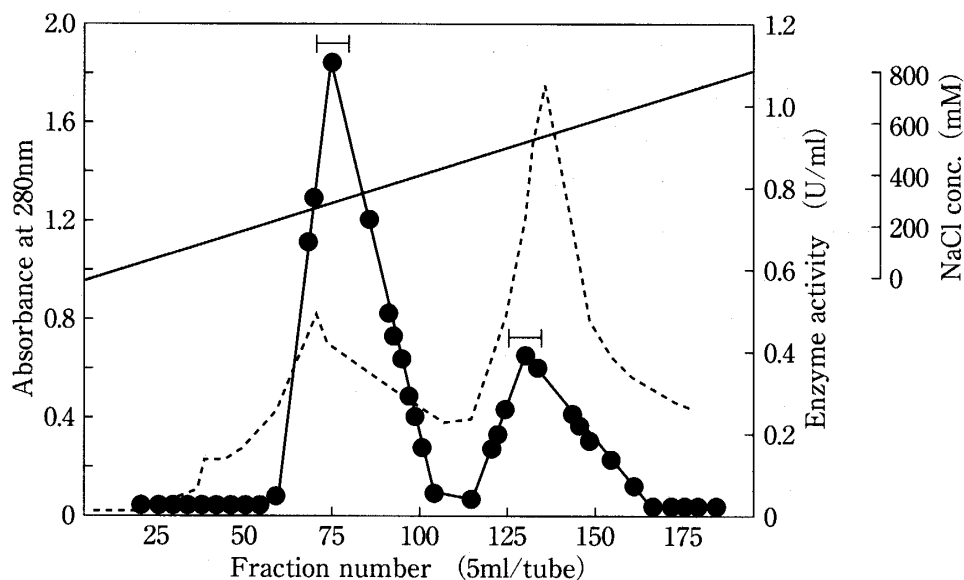


Fig. 1 DEAE-cellulose chromatography of polygalacturonase from *P. expansum* O-385-10.

Samples were prepared from culture the filtrates of *P. expansum*. Proteins were eluted by a linear gradient of NaCl (800ml from 0 to 0.8M) at a flow rate of 30ml/hr. in 20mM potassium phosphate buffer (pH7.5).

**Table 3 Summary of Purification of Polygalacturonases produced by *P. expansum* O-385-10**

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)
Culture filtrate	1,867	1,905	0.98
30-90% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Sat.	90	720	1.25
DEAE-cellulose DE-52			
Polygalacturonase I	750	175	4.29
Polygalacturonase II	184	60	3.03
Sephacryl S-20			
Polygalacturonase I	35	4	8.75
Polygalacturonase II	13	2	8.33

の細胞の細胞壁を崩壊する、ペクチン分解酵素は細胞間の結合を遊離する働きをそれぞれ持つことを明らかにしている。また、胞子の発芽とこれら酵素との関連について若干の知見を報告している<sup>8)</sup>。

リンゴの果実と腐敗機構に関して酵素化学的に詳細にされている例には、種々の果実に腐敗をもたらすことが知られている多犯性の病原菌である *B. cinerea* において、 $\beta$ -グルコシダーゼが主に分泌され、本酵素によるセルロースの分解がリンゴ果実の腐敗に中心的役割を

**Table 4 Effects of metal ions activity of polygalacturonases**

Each enzyme was incubated in 100mM sodium acetate buffer (pH5.0) containing various metal ions. After 2~3min incubation with each metal ion, the remaining activity was assayed.

Ion added (1 mM)	Relative enzyme activity (%)	
	Polygalacturonase I	Polygalacturonase II
None	100	100
Fe <sup>2+</sup>	107	101
Cu <sup>2+</sup>	102	102
Mn <sup>2+</sup>	101	98
Zn <sup>2+</sup>	100	100
Hg <sup>2+</sup>	85	91
Ni <sup>2+</sup>	104	94
Ba <sup>2+</sup>	101	100
Mg <sup>2+</sup>	74	80
Ca <sup>2+</sup>	52	57



演じているとの報告がある<sup>12-15)</sup>。

*P. expansum* のポリガラクトナーゼについては $\text{Ca}^{2+}$  イオンによる性質を中心に報告がなされているが<sup>9-11, 18, 9)</sup>、酵素化学的性質は不明なところも残されている。

本研究において *P. expansum* O-385-10 菌株はペクチンを炭素源とした無機塩類培地でペクチン分解酵素を菌体外に生産した。本菌の培養濾液から 2 種のポリガラクトナーゼ (I、II) が部分精製された。両酵素は、DEAE-セルロース DE52 イオン交換クロマトグラフィーで容易に 2 つの活性画分に分別された。これら 2 つのポリガラクトナーゼの pH や温度に対する性質は、これまでの微生物由来の多くのポリガラクトナーゼと比較してあまり特徴がないようであった。これに対して、*P. expansum* に由来する 2 種のポリガラクトナーゼは、活性が  $\text{Ca}^{2+}$  イオンにより強く阻害された。

リンゴ果実の腐敗菌 *P. expansum* については、本研究も含めて糖類の特徴的な利用性が明らかにされた。一方、生産されたペクチンを分解するポリガラクトナーゼについては、現在の段階で、酵素としてすでに報告されている  $\text{Ca}^{2+}$  イオンによる活性阻害を除いて特徴のある性質が見だされなかった。従って、*P. expansum* のリンゴ果実への優先的な発生の要因の一つは供試菌株の炭素源の利用性と密接な関係があるものと予想された。これらをもとに、実際、*P. expansum* による汚染されたリンゴ果実の中に、細胞壁を構成する各糖類における供試菌株の利用性、またその加水分解酵素の生産などを明らかにすることは、今後の重要な課題であるとともに興味の持たれるところであると考えられる。

## 要 約

リンゴ果実青カビ病菌 *Penicillium expansum* の酵素の生産とペクチン分解酵素を精製し、酵素化学的性質を調べた。

供試菌株は、ペクチン-無機塩類培地で、比較的短時間に、培養濾液の中に、ポリガラクトナーゼを生産した。本菌株を窒素源としてリン酸アンモニウム (0.5%)、ペクチン (2.0%) 含む無機塩類培地を用いて 30℃ において、4 日間振とう培養した場合、培養液中の総ポリガラクトナーゼの活性が最大 (1.56U/ml) に達した。培養濾液中から DEAE-セルロースクロマトグラフィーで 2 つの活性画分 (ポリガラクトナーゼ I、II) を精製した。それぞれポリガラクトナーゼ I と II の活性の最適 pH は 4.8 と 5.5、最適温度は同じく 40℃ であった。両酵素とも 0～40℃、pH 3～7.5 の範囲で安定であった。両酵素の活性は 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 、1 mM  $\text{Mg}^{2+}$  によってそれぞれ約 50～60% と約 70～80% までに阻害された。

本研究を遂行するにあたり、有益なご助言ならびに実験協力を頂いた千葉大学園芸学部藤井貴明教授、千葉県衛生研究所 高橋治男氏に感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) K.M.J. Swanson, S.B. Leasor, D.L. Downing: *J. Food. Sci.*, 50, 366-339 (1985).
- 2) E. Fallik, S. Grinberg, M. Gambourg, J.D. Klein, S. Lurie: *Plant Pathol.* 45, 92-97 (1996).
- 3) L.J. Penrose, W. Koffmann, H.I. Ridings: *Plant Pathol.*, 38, 421-426 (1989).
- 4) D. Ryu, D.L. Holt: *J. Food. Protection*, 56, 862-867 (1993).
- 5) N. Paster, D. Huppert R. Barkaigolan: *Food Add. Contamin.*, 12, 51-58 (1995).
- 6) E. Podgorska: *Acta Microbiol. Pol.*, 41, 89-95 (1992).
- 7) 木村聡一郎、大野信子、福田晴美、高橋治男、篠山浩文、藤井貴明：日食微誌、16、171-179、(1999)。
- 8) S. Kimura, S. Amachi, N. Ohno, H. Takahashi, H. Shinoyama: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 1126-1129 (2002).
- 9) W.S. Conwy: *Plant Disease*, 66, 402-403 (1982).
- 10) W.S. Conwy, K.C. Cross, C.E. Sams: *Plant Disease*, 71, 78-80 (1987).
- 11) W.S. Conwy, K.C. Cross, C.D. Boyer, C.E. Sams: *Phytopathology*, 78, 1052-1005 (1987).
- 12) I. Sasaki, H. Nagayama: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 616-620 (1994).
- 13) I. Sasaki, H. Nagayama: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 100-101 (1995).
- 14) I. Sasaki, H. Nagayama: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 54-56 (1996).
- 15) I. Sasaki, H. Nagayama: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1073-1076 (1997).
- 16) 百瀬勉、向井良子、河辺節子、鈴木順子、山本恭子：分析化学、11、956-959(1962)。
- 17) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- 18) T.R. Swinburne, M.E. Corden: *J. Gen. Microbiol.*, 55, 85-87 (1969).
- 19) A.E.L. Ghaough, C.L. Wilson, M.E. Wisniewski: *Plant Disease*, 79, 3 (1995).

大野 信子 (家政学部健康栄養学科教授)

岡 留 美 穂 (家政学部健康栄養学科助手補)

李 晶 (千葉大学園芸学部微生物工学研究室)