

茸類の生化学的研究—VII

ヘミセルロースの分解 1

橋本一哉・磯部信昭・高橋善次郎

BIOCHEMICAL STUDIES ON THE MUSHROOMS VII ENZYMATIC HYDROLYSIS OF RICE STRAW HEMICELLULOSE BY MUSHROOM (*AGARICUS BISPORUS*) — 1

Kazuya Hashimoto, Nobuaki Isobe and Zenjiro Takahashi

Carbohydrates are known to be the general carbon sources for the cultivated mushroom, and the wood-destroying basidiomycetes are especially active on the hydrolysis of hemicellulose.

In the present investigation, hemicellulase was purified from the wheat culture and the mushroom fruit bodies by the ammonium sulfate fractionation and column chromatography with DEAE-cellulose (Table 1-3, Fig. 2-5).

The production of reducing sugars by the action of the hemicellulose preparations was estimated under various conditions. Hemicellulose prepared from rice straw was employed as the substrate. A linear relationship between the enzyme concentration and the quantity of xylose liberated was obtained within the range tested (Fig. 6).

The enzyme is stable below 45°C and in the range of pH from 3.4 to 5.4, whereas it is inactivated at higher temperature and at the alkaline and the extremely acid pH (Fig. 7,8).

The enzyme has an optimal pH of 4.8 and an optimal temperature ranging from 40 to 55°C (Fig. 9,10).

The enzyme activity increases in the presence of NaCl, but is not affected by the presence of other salts (Table 4, Fig. 11, 12).

Hydrolysis products of hemicellulose by the enzyme are principally xyloöligosaccharides with a very small quantity of arabinose, glucose and xylose (Table 5, Fig. 14, 15).

緒 論

栽培マッシュルームの炭素源は自然界では、一般に多糖類として供給され、加水分解酵素の作用で単糖類に分解、同化されるものと考えられている。

わが国では炭素源として稲わらを用いているが、稲わらの細胞壁の主要構成成分であるヘミセルロースは、セルロースと共に広く分布している多糖類で、その含有量は30%にも達しており炭素源として重要な役割りを果すものと推察される。

TRESCHOW¹⁾は1944年マッシュルーム菌系 (*Ps. bispora* f. *avellanea*) はキシランを速やかに分解し、菌体生育において最もすぐれた炭素源であることを報告しており、一方著者ら²⁾もコンポスト中のヘミセルローズが培養の初期によく消費されていることを認めた。

ヘミセルローズの分解に関しては、牧草の保存中の変化^{3,4,5)} や大豆子葉のヘミセルローズの分解⁶⁾ に関して、また種々な微生物によるキシランの分解^{7,8,9,10,11,12,13)} やアラバンの分解^{14,15)} について詳細な報告がなされている。特に稲岡、⁹⁾ 高橋¹⁰⁾ らはそれぞれ別個に *Bacillus subtilis* の培養液から結晶性酵素標品を得ている。

著者らは栽培マッシュルームの生育究明を目的とし、その物質代謝の機作を明らかにするため、小麦培地および子実体よりヘミセルローズ分解酵素を抽出、部分精製を試み、その性質について検討を行なった。

実験方法

1. 供試菌 *Agaricus bisporus*.

2. 酵素試料

24°Cで45日間培養した *Agaricus bisporus* の小麦培地および子実体。

3. 酵素液調製法

培地および子実体の石付部をホモゲナイズし、5倍量の蒸溜水を用いて、5°Cにて一夜抽出して、木綿にて濾過し、通過濾液を粗酵素液とした。

4. ヘミセルローズ

DEWAR らの方法⁹⁾ で稲わらより調製した。

5. 基質 (1%ヘミセルローズ溶液)

ヘミセルローズは中性または酸性では水に不溶性のため、まず 0.25M NaOH に溶解し蒸溜水で5倍量に稀釈し、さらに0.05M H₂SO₄で中和し懸濁液として用いた。

6. 酵素活性の測定

基質1ml 0.1Mクエン酸・リン酸塩緩衝液0.4ml、酵素液0.6ml、の配合の作用液を50°Cで反応を進め、還元力を SOMOGYI NELSON 法の改良法¹⁶⁾ で定量し、キシロースとして計算した。酵素力は前記作用液を使用して、pH4.8で50°Cにおいて30分間酵素反応を進めたときに作用液1ml中にキシロース0.1mgを生成する酵素量を 1unit とした。

7. DEAE-cellulose カラムの調製

DEAE-cellulose (0.92meq/g Brown社) を蒸溜水中に分散し、微粒子や共雑物を上液と共に傾斜除去し、沈下した部分は0.1N NaOH にてOH型とし、水洗中和後、0.01M リン酸緩衝液 (pH5.85) に分散緩衝化し、吸着柱を調製した。

8. 蛋白質の定量

Folin法¹⁷⁾で750 μ にて卵白アルブミンから検量線を作製し、比色定量を行なった。

9. 生成糖のペーパークロマトグラフィ

東洋汙紙 No.50 を使用し、ブタノール、酢酸、水（4：1：5）を展開剤とし、アニリン水素フタル酸塩で呈色した。

10. オリゴ糖類の分離

Charcoal-celite（1：1）柱を用いてオリゴ糖類を吸着させ、蒸留水を流して単糖類を流出後、5%、10%……40%とそれぞれ濃度の異なった酒精液で順次溶出した。

実験結果および考察

1. ヘミセルロースの構成糖

稲わらより抽出、精製したヘミセルロースを72% H₂SO₄で20°C、2時間、さらに3% H₂SO₄にて湯浴上で4時間加水分解を行ない、硫酸をイオン交換樹脂で除き、糖液を減圧濃縮シラップ

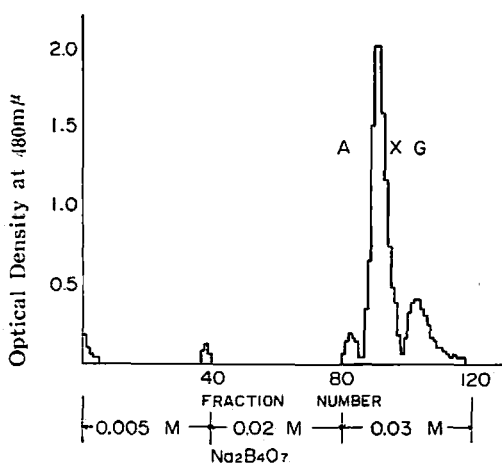


Fig. 1 Separation of composite sugars in hemicellulose

と成し、Dowex 1×8にて分離、定量を行なった。結果は Fig. 1 のように各糖の比率は、アラビノース10.87%、キシロース70.24%、グルコース 17.29%、他に未知物質（グルクロン酸として）1.60%の検出が見られ、主要構成糖はキシロースであることを確認した。すなわち、稲わらのヘミセルロースは、β-1,4'-キシロピラノシッド結合を主体とする多糖類である。

2. ヘミセルラーゼの精製

小麦培地より得た粗酵素液に硫酸を添加0.2飽和とし、生ずる沈澱は Table 1 のように酵素活性が低いので除去し、さらに硫酸を添加し、0.8飽和として 12000×G で遠心分離し、生じた沈澱を蒸留水に溶解し、5°C、3日間蒸留水にて透析し、さらに透析外液を0.01Mリン酸塩緩衝液（pH5.85）に換えて24時間透析を行ない、透析内液をDEAE-セルロースカラム（3×30cm）に吸着させ、5°Cで0.01M→0.2Mリン酸塩緩衝液で溶出速度25ml/hrで10ml宛gradient elutionを行なった。結果は Fig. 2 のように、カラムに吸着されたヘミセルラーゼは0.05Mリン酸塩緩衝液で溶出されるので、このフラクションをさらに硫酸0.8飽和として celite と共に汙過し、celite

Table. 1 Fractionation of hemicellulase with ammonum sulfate

Fraction step	Activity units/ml	Ratio
0.2 saturated	0.18	1
0.2 — 0.4 "	3.96	22
0.4 — 0.6 "	1.79	10
0.6 — 0.8 "	1.80	10
0.8 — 1.0 "	0	0

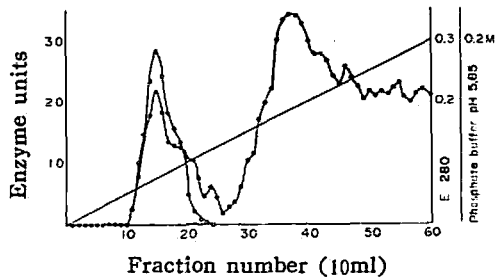


Fig. 2 Chromatography of the hemicellulase from wheat culture on a DEAE-cellulose column

—○— hemicellulase activity
—●— protein

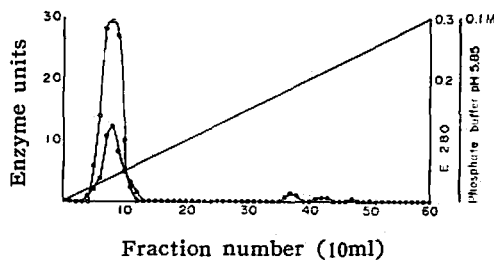


Fig. 3 Rechromatography of the hemicellulase from wheat culture on a DEAE-cellulose column

—○— hemicellulase activity
—●— protein

cake を0.01Mリン酸塩緩衝液にて溶出し、溶出液は 5°Cで24時間透析し、透析内液を再び Fig 3 のようにDEAE—セルロースカラム (1.7×40cm) に吸着し、再クロマトグラフィーを行なった。

同様にマッシュルーム子実体より抽出した粗酵素を硫酸塩析および DEAE—セルロース処理によって部分精製した Fig. 4 およびFig. 5 のようであった。

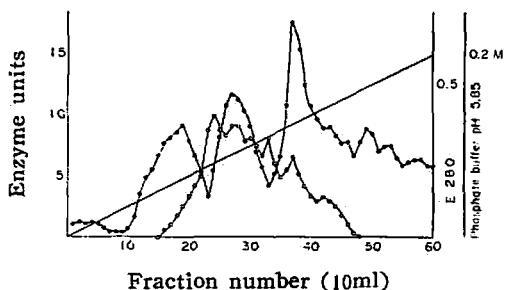


Fig. 4 Chromatography of the hemicellulase from fruit-body on a DEAE-cellulose column

—○— hemicellulase activity
—●— protein

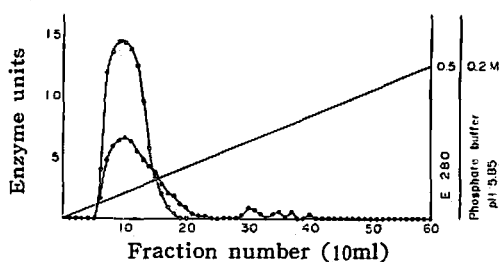


Fig. 5 Rechromatography of the hemicellulase from fruit-body on a DEAE-cellulose column

—○— hemicellulase activity
—●— protein

Table. 2 Summary of the purification of mushroom hemicellulase in wheat culture

Step No.	Vol(ml)	Activity units/ml	Total Activity units	Protein mg/ml	Specific activity	Yield%
1	1100	2.35	2585	3.10	0.76	100
2	200	10.96	2196	9.20	1.19	85.0
3	70	11.90	833	1.18	10.08	34.2
4	20	16.88	338	0.26	64.92	13.1

当酵素部分精製の各操作過程における酵素活性および比活性は Table 2 および Table 3 のよう
で、小麦培地および子実体より精製したヘミセルラーゼの比活性は、それぞれ90倍に濃縮する事
が出来た。

Table 3 Summary of the purification of mushroom hemicellulase in fruit-body

Step No.	Vol(ml)	Activity units/ml	Total Activity units	Protein mg/ml	Specific activity	Yield%
1	1150	1.96	2254	4.57	0.43	100
2	200	6.82	1364	5.27	1.29	60.6
3	100	7.17	717	0.27	26.55	31.8
4	90	7.11	640	0.18	39.50	28.4

3. ヘミセルラーゼの酵素化学的諸性質

上記の部分精製酵素を用いて、各性質について検討した。

1) 酵素量と活性

各酵素量（蛋白量で表示）に対するキシロースの生成量は Fig. 6 のように直線性を示し、酵素
量と活性は比例したので、酵素活性は、この範囲内で測定することとした。

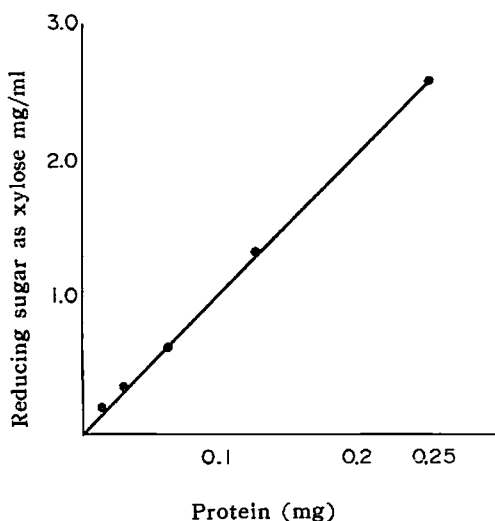


Fig. 6 Correlation between protein concentration and amounts of reducing sugar produced from hemicellulase

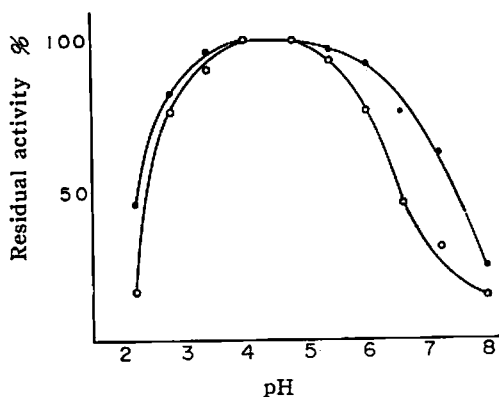


Fig. 7 pH stability of the hemicellulase

○—○ wheat culture
●—● fruit-body

2) 酵素の安定性

a) pHと安定性

酵素液を種々のpHの緩衝液に36°C 18時間放置し、残存酵素力を測定した。その結果は Fig. 7
のようにpH3.4~5.4の間では安定であったが、他のpH域では容易に失活した。

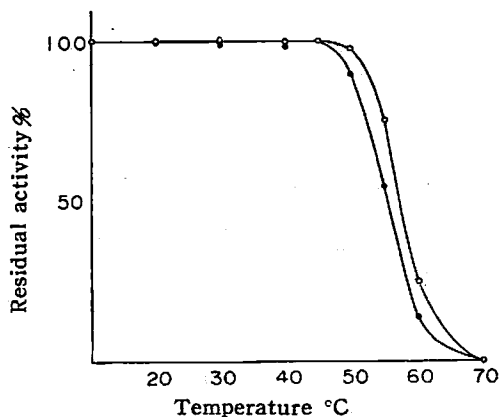


Fig. 8 Thermal stability of the hemicellulase

—●— wheat culture
—○— fruit-body

酸塩緩衝液 (pH4.8) 0.4ml, 酵素液 0.6ml, 塩類溶液 0.5ml の配合液を 50°C, 30分間反応させて, 生成還元力をキシロースにて表示した結果はTable 4のように, 当酵素はMn⁺⁺イオンによって阻害され, Na⁺イオンによって活性化されるが, 他の塩類によっては殆んど影響を受けなかった. なお阻害剤EDTAによって著しく阻害を受けた. 稲岡ら⁹⁾は結晶細菌キシラナーゼがCa⁺⁺によって活性化されると報告しているが, 当酵素では活性を示さなかった.

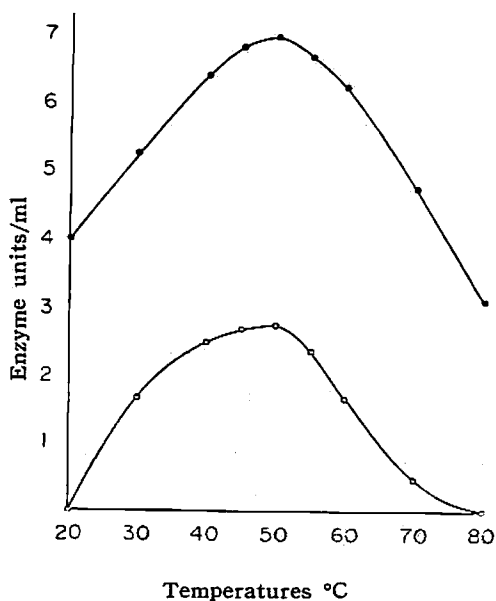


Fig. 9 Activities of the hemicellulase at various temperatures

—●— wheat culture
—○— fruit-body

b) 温度と安定性

酵素液とクエン酸・リン酸塩緩衝液 (pH4.8) の混合液を種々な温度で10分間加熱処理し, 急冷後に残存酵素力を測定すれば Fig. 8 のように, 45°C 以下では安定であるが, それ以上では次第に不安定となり, 70°Cで失活した.

3) 最適 pH と最適温度

最適pHは Fig.10 のように 4.8であり, 最適 pHにおける最適温度はFig. 9 のように 50°C であった.

4) 酵素作用におよぼす塩類の影響

2%ヘミセルロース0.5ml, クエン酸・リン

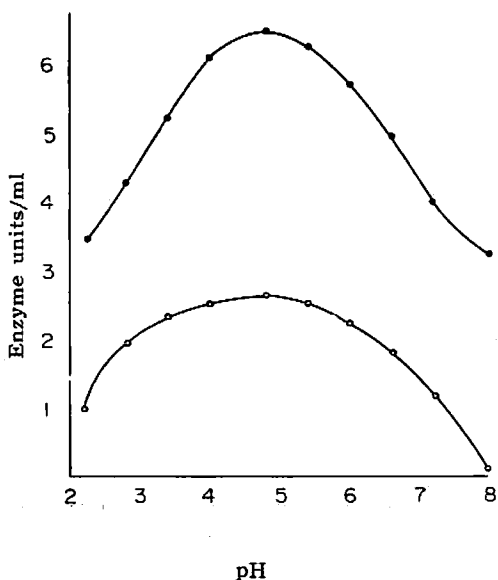


Fig. 10 pH activities of the hemicellulase

—●— wheat culture
—○— fruit-body

Table. 4 Influence of salts on hemicellulase activity of *Agaricus bispora*

Salts **	In wheat culture		In fruit-body	
	* Xylose	%	* Xylose	%
None (control)	1.0892	100	0.1802	100
CaCl ₂	1.0824	99.4	0.1802	100
Ca-Ac	1.0548	96.8	0.1630	90.5
NaCl	1.2564	115.4	0.2025	112.4
MgSO ₄	0.9740	89.4	0.1448	80.4
MnCl ₂	0.7672	70.4	0.1210	67.1
KCl	1.0146	93.1	0.1906	105.8
Na ₂ SO ₄	1.1460	105.2	0.1831	101.6
EDTA	0.2116	19.4	0.0094	0.5
ZnCl ₂	0.7912	72.6	0.1464	81.2

* mg/ml

** Conc. in the reaction mixture was M/60

5) 酵素作用におよぼす NaCl および CaCl₂ の濃度との関係

a) NaCl の影響

1 M以下の NaCl の添加では Fig.11 のように、阻害作用は見られず。0.4M NaCl の添加で活性は最高を示した。

b) CaCl₂ の影響

Fig.12 のように CaCl₂ の濃度の増大と共に活性は降下し、0.8 M CaCl₂ 以上では酵素作用を完全に阻害した。

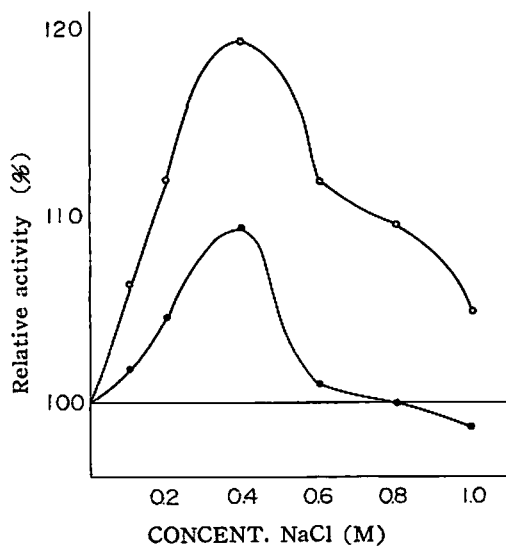


Fig. 11 Concentration of NaCl and hemicellulase activity

—●— wheat culture
—○— fruit-body

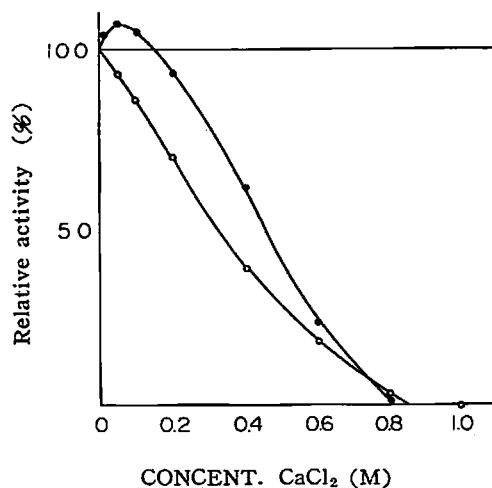


Fig. 12 Concentration of CaCl₂ and hemicellulase activity

—●— wheat culture
—○— fruit-body

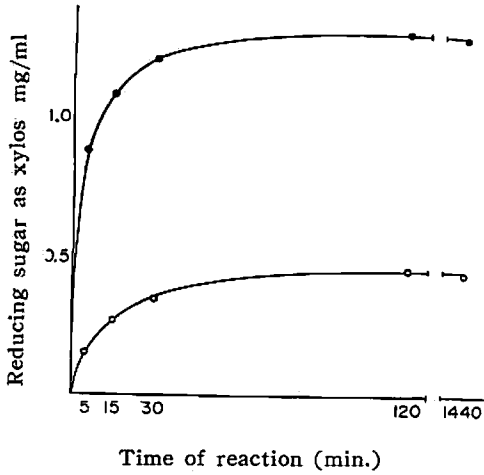


Fig. 13 Hydrolysis of hemicellulose by hemicellulase
 —●— wheat culture
 —○— fruit-body

6) 部分精製酵素によるヘミセルロースの分解
 上記配合液を上記条件のもとに所定の時間反応させ、生成還元力をキシロースとして求めた結果は Fig.13 のように30分で一定に達した。

a) ヘミセルロースの分解生成物

各反応過程の酵素反応液を採取し、エタノールを添加70%濃度として不溶物を除去し、エタノールを減圧除去した後、ペーパークロマトグラフィーにて多重展開を行なった結果は、Fig. 14のように反応の初期にはグルコースを生じ、キシロピオース、アラビノースが著明になり、分解が進行した24時間後にはキシロピオース、キシロトリオースを大量に生じた。キシロースも反応中に検出されるが微少で、当酵素はヘミセルロースの β 1,4'-xylopyranoside 結合を

キシロピオースまで分解し、キシロピオースからキシロースへの分解は行なわないようである。

b) ヘミセルロース分解生成物の分離

上記条件で24時間反応後、未反応のヘミセルロースを70%エタノールにて沈澱、遠心分離し上澄液を減圧濃縮し、活性炭、セライト(1:1)カラムによりエタノールの濃度を徐々に増大し分別を行なった結果は Fig.15 および Table 5 に示すように、24時間経過後のキシロピオース、キシロトリオース、キシロテトロース、キシロペントースの割合は 4:2:2:1 であったが、時間の経過と共にキシロピオースの比率は増加するものと推定された。

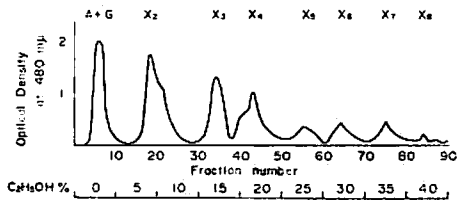


Fig. 15 Separation of oligosaccharides in reaction mixture after incubation for 1440 minutes by carbon-celite column chromatography

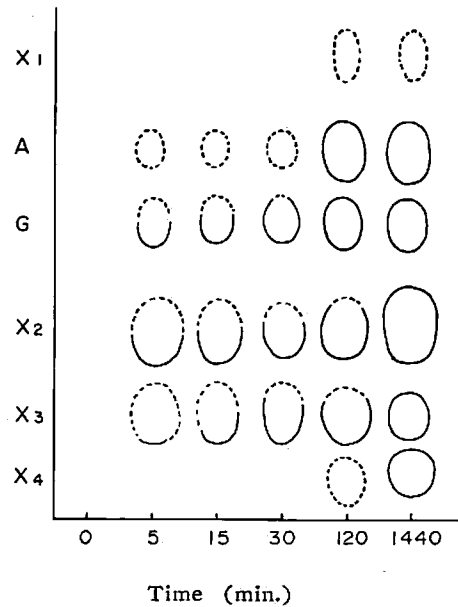


Fig. 14 Paper chromatogram of hemicellulose digest by hemicellulase of *Agaricus bisporus*

Table. 5 Relative quantities and Rx values of oligosaccharides after incubation for 1440 minutes

Chromatography Sugars	C ₂ H ₅ OH%	Carbon-Celite Column								Paper ^{a)}
		0	5	15	20	25	30	35	40	Rx values ^{b)}
Arabinose+Glucose		2.53								—
Xylobiose			4.00							0.57
Xylotriose				2.07						0.36
Xylotetraose					2.29					0.27
Xylopentaose						1.05				0.17
Xylohexaose							1.10			0.11
Xyloheptaose								1.02		0.05
Xylooctaose									trace	—

a) The solvent was n-butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 5)

b) Ratio of the movement of the xylooligosaccharides relative to that of D-xylose.

要 旨

マッシュルームの小麦培地および子実体よりヘミセルローズ分解酵素を抽出し、部分精製を試みた。

また稲わらより抽出精製したヘミセルローズに作用させて、当酵素の一般的性質を検討した。

1. 当酵素の稲わらヘミセルローズに対する作用は pH4.8, 温度50°C において最適を示した。
2. pHに対する安定性は 3.4~5.4 であり、温度に対する安定性は45°C 10分の処理では影響はないが、50°C 以上では急速に不安定となり、70°C 以上 10分の処理では失活した。
3. 塩類による影響は NaCl によって活性化されるが、他の塩類では殆んど影響されなかった。0.4M NaCl 添加のとき活性は最高を示した。CaCl₂ は濃度の増大と共に阻害作用を示した。
4. 稲わらヘミセルローズの分解産物として反応の初期にはグルコース、アラビノースらを検出するが、反応の進行と共にキシロビオース、キシロトリオースが著明となり、キシロースの生成が殆んどなく、キシロオリゴ糖を生成することより当酵素はエンド型であると推定される。マッシュルームは、その培地中に多量に存在するヘミセルローズを菌体外に分泌したヘミセルラーゼによりオリゴ糖に分解し、さらに共存する他の酵素によって単糖に分解し、菌体に吸収され細胞形成や、エネルギー源として利用されるものと考えられるが、詳細についてはさらに検討をしたい。

終りに臨み、本研究に御協力された岡信子さん、森木豊秋氏、今村英市氏に厚く御礼申し上げます。

文 獻

- 1) TRESCHOW.C: Dansk Bot. Arkiv 6 1 (1944)
- 2) 橋本, 高橋, 磯部: 本誌 8 353 (1968)
- 3) V. HARWOOD: J. Sci. Fd. Agric., 5 270 (1954)
- 4) P. McDONALD et al. *ibid.*, 13 581 (1962)
- 5) W.A. DEWAR et al.: *ibid.*, 14 411 (1963)
- 6) T. NARASAKI: Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.: 18 16 (1966) 18 23 (1966)
- 7) R.L. WHISTLER et al.: J. Am. Chem. Soc., 77 1241 (1955)
- 8) L.H.SORENSEN: Nature 17 2305 (1953) 176 74 (1955) 177 845 (1956)
- 9) M. INAOKA: *ibid.*, 178 202 (1956)
- 10) M. TAKAHASHI et al.: J. Ferm. Tech., 41 116, 118, 181, 186 (1963)
- 11) 福井作蔵: 蛋白質, 核酸, 酵素 6 90 (1961)
- 12) S. FUKUI, M. SATO: Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 21 392 (1957)
- 13) H. IIZUKA, T. KAWAMINAMI: Agr. Biol. Chem., 29 520 (1965)
- 14) A. KAJI et al.: Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ. 12 265 (1960) 15 34, 40, 45 (1963) 16 143 (1965)
- 15) 梶明, 田川清: 日農化誌, 38 580 (1964)
- 16) R. L. WHISTLER, M. L. WOLFROM: "Methods in Carbohydrate Chemistry" Vol. 1, New York and London, Acad. Press, p. 386 (1962)
- 17) 赤堀四郎編: "酵素研究法" 朝倉1p. 164 (1955)