

茸類の生化学的研究 XI

食用茸類の Carboxymethyl cellulase について 1

橋 本 一 哉

Biochemical Studies on the Mushroom XI

Carboxymethyl cellulase from edible mushrooms 1

Kazuya Hashimoto

Cellulose is the most abundant of naturally occurring organic compounds. Some edible mushrooms are able to digest cellulosic substances directly to satisfy their carbohydrates requirements. But little research has been done on the cellulases of edible mushrooms.

The present report concerns the carboxymethyl cellulase which are produced by 5 kinds of edible mushroom, and it was found by the author that a strain of *Pholiota nameko* excrete a remarkable amount of cellulase in the culture medium. (Table 2)

The enzyme is stable below 45°C and in the pH range from 4.0 to 6.0, and is completely inactivated by being maintained at 70°C for 10 minutes. (Fig. 4, 5)

The optimum pH value and temperature for the enzyme activity are 4.5 and 40°C respectively. (Fig. 6, 7)

The enzyme activity increases in the presence of Co⁺⁺, while inhibited by Cu⁺⁺ and Zn⁺⁺. (Table 3)

自然界において、セルラーゼは carbon cycle の重要な役割を果しているが、木材腐朽菌のセルラーゼに関する研究は *Polyporus versicolor*¹⁾ *Trametes suginea*^{2~4)} *Irpex lacteus*^{5~8)} *Schizophyllum commune*⁹⁾ *Lampteromyces japonicus*¹⁰⁾ 等に限られており、食用茸類を対象とした研究は殆ど見られない。著者は今後、各種の食用茸類の生理生態や培養法を開発する上から、これら茸類によるセルロースの分解機構を解明することは重要なことであると考え、予備的な実験を行った。

Reese¹¹⁾ は天然のセルロースの酵素的分解経路を Fig. 1 のごとく提唱しているが、本報では、広く食用に供されている数種の茸類を用いて多様性を有するセルラーゼの内 CMC に作用する Cx 活性について検討した。

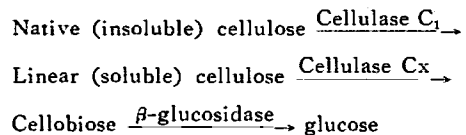


Fig. 1 Multiple components in cellulolytic systems⁹⁾

実 験 方 法

1. 供 試 菌 種

ナメコ (*Pholiota nameko*), エノキタケ (*Flammulina velutipes*), ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*), シイタケ (*Lentinus edodes*) およびキクラゲ (*Auricularia auricula-judae*) を glucose 4g malt ext. 10g yeast ext. 4g を 1 l の 蒸溜水に溶解した培地 20 ml 中で約 10 日間前培養した。

2. 培 養 方 法

Table 1 の基本培地を 500 ml 容の振盪フラスコに 150 ml 宛分注し、常法に従って、121°C、15 分間加圧殺菌した。上記前培養によって得た菌蓋は無菌水と共に磨碎し、1 ml を接種した。25°C で 10 日間振盪培養 (120rpm, 振幅 5 cm) を行い得られた澄明培養ろ液をコロジオン膜を用いて 3 日間水道水で透折し、これを酵素液として使用した。

Table 1 Composition of medium used to obtain cellulytic culture filtrate

Powdered cellulose	10 g
KH ₂ PO ₄	10 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂	0.1 g
Peptone	4 g
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	3 mg
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	3 mg
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	3 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·H ₂ O	3 mg
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	1 mg
Thiamine·HCl	100 µg

Distilled water to give 1 L. Final pH of medium about 5.2

3. 粗酵素標品の調製

酵素の諸性質を検討する場合には、培養液を 5°C に保ちつつ、エタノール 70 % 溶液として、生成する沈澱を遠心分離し、エーテルで洗滌し、減圧乾燥したものを粉末粗酵素とした。

4. Cx 活性の測定法

CMC-Na を 0.1M acetate buffer (pH 4.5) に溶解、1 % 溶液となし基質とした。基質溶液 1 ml を共栓試験管に採り、40°C の恒温槽中で 5 分間予熱した後、稀釈酵素液 1 ml を加えて、60 分間 incubate させる。反応終了後、3.5-dinitrosalicylic acid (DNS) 試薬 3 ml を加えて酵素反応を停止し、沸騰水中で 15 分間加熱発色し、流水中で冷却した後、蒸溜水 2.5 ml を加えて、640m μ における吸光度を測定した。

5. 酵 素 力 価

上記条件で、酵素液 1 ml 当り 1 mg の glucose に相当する還元糖を生成する場合を 1 unit とし、試料酵素の稀釈培数を乗じて酵素力価を表わした。

実 験 結 果

1. 酵素濃度と活性

0.1M acetate buffer (pH 4.5) で一定量に稀釈した酵素液 1 ml に基質 1 ml を加えて、40°C

で60分間 incubate する, 次で DNS 試薬を加えて, 640m μ における吸光度Eを測定する, 別に反応操作を省いたもので吸光度E'を測定するE-E'の値は予め作製した検量線より glucose の mg 数として表わすことが出来る. Cx 活性のE-E'値は Fig. 2のように0.500以下であれば, 酵素量と比例関係を示すので, この範囲内で測定することとした.

2. 基質濃度と活性

反応液中のCMCの濃度と活性の関係は Fig. 3に示すように, 1%以下では直線性を示したで, 基質として1% CMCを用いることにのした.

3. 酵素作用の安定性

a) 酵素の安定性におよぼす pH 値の影響

粗酵素1%溶液 10ml に Macclvain buffer 10ml を加えて, 種々な pH の溶液として, 40°C, 24時間放置後, 0.1M acetate buffer (pH 4.5) で pH 調節したのち, 各酵素液の残存酵素活性を測定した. 各種茸類の Cx に対する pH 安定性は Fig. 4に示すように, それぞれ, ナメコ4~6, ヒラタケ5~7, キクラゲ4~7, エノキタケ4~7, シイタケ3~7付近で安定であった. いずれの茸類に於ても, その Cx 活性は酸性側特に pH 5付近では安定であるが中性以上では不安定であった.

b) 酵素の安定性におよぼす温度の影響

0.1M acetate buffer (pH 4.5) に溶解した酵素を種々な温度で10分間加熱処理した後, 急冷し残存酵素活性を測定した. Fig. 5に示すように, 各茸類共に Cx 活性は 45°C 付近より不活性化が認められ, 50°C 以上では急速に不活性化された.

4. 最適 pH

Macclvain buffer で pH 2~8に調節した酵素液を用いて40°C, 60分間反応して酵素活性を測定した結果は Fig. 6に示すように, シイタケ 3.5, エノキタケ 4.0, ナメコ 4.5, キク

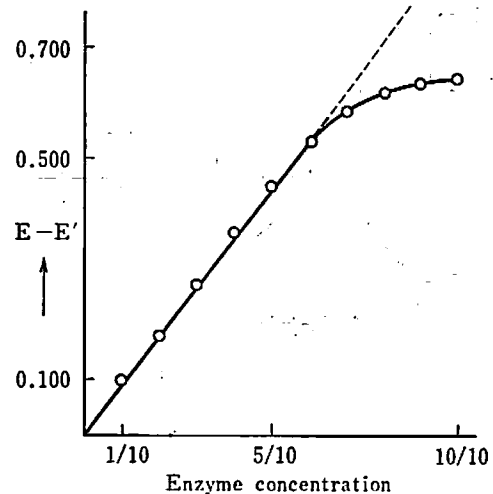


Fig. 2 Effect of enzyme concentration on the Cx activity

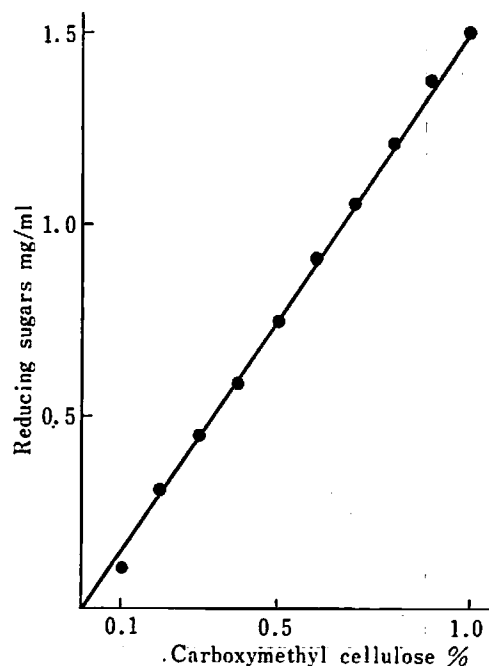


Fig 3 Effect of carboxymethyl cellulose concentration on the enzymatic reaction

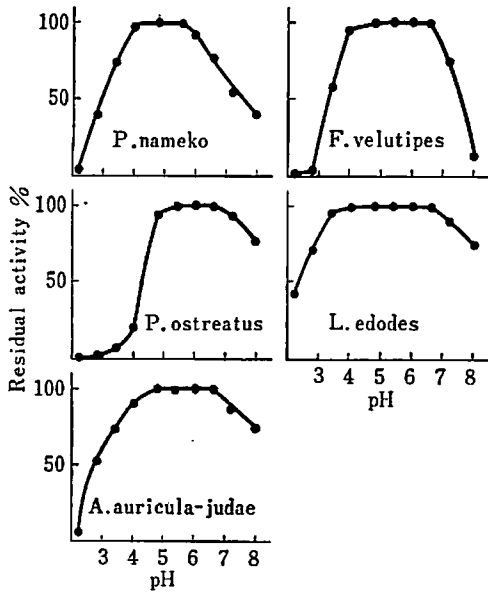


Fig. 4 pH stability of Cx activity

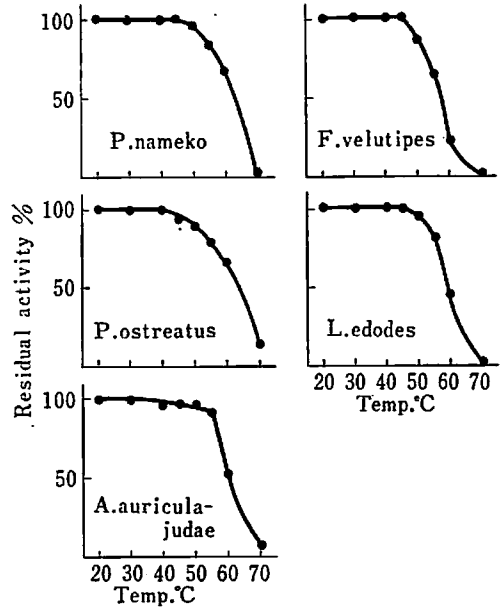


Fig. 5 Thermal stability of Cx activity

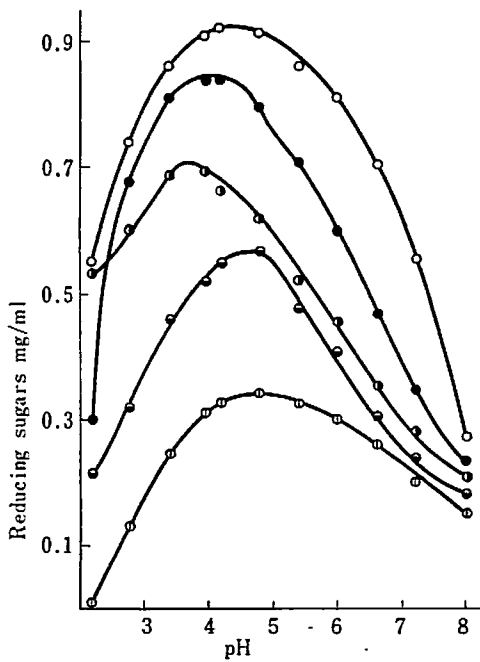


Fig. 6 Effect of pH on Cx activity of various filtrates

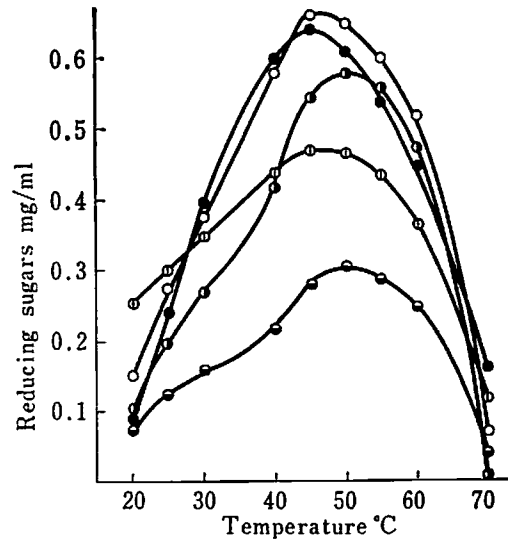


Fig. 7 Effect of temperature on Cx activity of various filtrates Symbols were the same as Fig 6

ラゲ 4.5, ヒラタケ 5.0 に最適 pH があり, シイタケの最適 pH は他の茸類の Cx 活性に比較して低い値を示したが, シイタケは培地中に蔭酸の蓄積があり, pH が 3 付近まで低下し菌体の生育を阻害する現象がしばしば認められることから, 生理的に当酵素活性との間に関係があると思われる。

5. 最適温度

pH 4.5 に調製した作用液を用い, 各温度に 60 分間作用させた結果は Fig. 7 に示すように, ナメコ, エノキタケ, ヒラタケは 45°C 付近に, キクラゲ, シイタケは 50°C 付近に最適温度を示した。

6. 茸類の Cx 活性の比較

食用茸類の生産するセルラーゼの内, Cx 活性の測定には当酵素の諸性質から考察して, pH 4.5, 温度 40°C, 反応時間 60 分なる作用条件を選定した。

5 種類の食用茸類と従来強いセルラーゼ活性を有することが認められているヒイロタケを基本培地で 10 日間 25°C で振盪培養し, 培地中に生産された Cx 活性を測定した結果は Table 2 に示すようにナメコが特に強い Cx 活性を示すことを認めた。

Table 2 Production of Cx by various mushrooms

Mushrooms	Cx units/ml
<i>Pholiota nameko</i>	148.47
<i>Flammulina velutipes</i>	7.40
<i>Lentinus edodes</i>	3.24
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1.67
<i>Auricularia auricula-judae</i>	1.36
<i>Trametes sanguinea</i>	101.16

7. ナメコ・セルラーゼの塩類に対する影響

食用茸類の内, ナメコが強力な Cx 生産菌であることを知ったので, 当セルラーゼの塩類に対する影響を調べた。作用液に Table 3 の各濃度の塩類を添加して, 作用賦活と阻害について検討した。

Table 3 Effect of metallic ions on Cx activity

Compounds	Cx activity %		
	10 ⁻² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M
NaCl	79.97	86.57	96.34
KCl	79.97	96.56	100.00
Na ₂ SO ₄	85.37	93.29	100.00
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	98.51	100.65	100.00
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	124.26	114.94	103.65
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	112.58	103.51	102.37
CuSO ₄ · 7 H ₂ O	31.20	77.02	96.52
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	52.63	85.65	100.00
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	139.35	122.70	115.06
EDTA	98.15	103.92	100.00

Cu⁺, Zn⁺, Na⁺, K⁺ の 10⁻²M 塩類の添加は阻害作用を示したが, 濃度が低い場合例えば 10⁻⁴M 濃度程度では殆ど影響を受けなかった。

Co⁺, Ca⁺, Fe⁺ 等の塩類は賦活効果を示したが, 特に Co⁺ は 10⁻²M で 1.4 位の活性を示した。しかし EDTA による影響は認められなかった。

考 察

担子菌とくに木材腐朽菌は cellulase 生産菌として知られている。ここで供試した各菌はすべて

CMC 分解活性を示し、いわゆる Cx 酵素生産菌であることを認めた。特に *Pholiota nameko* は *Trametes sanguinea* に劣らず強い活性を有した。これに反して、*Pleurotus ostreatus* では粉末ろ紙を唯一の炭素源とした場合にも菌体および子実体の生育が旺盛であるにもかかわらず Cx 活性は意外に少なかった。両者の cellulose 分解機構に相異があるのかも知れない。

要 約

食用茸類5種類の生産する Carboxymethyl cellulase 活性を検討した。その内で特に *Pholiota nameko* が強い活性を有することを認めた。

各茸類より調製した粗酵素について2.3の酵素化学的諸性質について検討した結果は供試茸類の起源により多少異ったが *Pholiota nameko* では最適 pH は 4.5, 最適温度は 40°C, pH 4.0~6.0 で安定である。耐熱性は pH 4.5 において、45°C 以下では 10 分の熱処理でも安定であるが 50°C 以上では急速に失活した。塩類の影響としては、Co²⁺ は賦活効果を示したが Cu²⁺, Zn²⁺ は強く阻害を示した。他の4種の茸類においても、大略 *Pholiota nameko* の Carboxymethyl cellulase に一致した。またろ紙崩壊活性および植物組織崩壊活性を有することを認めたが、これらに関しては後報にて述べる。

本研究を行うに当って終始有益なご教示を賜った高橋善次郎先生に深く感謝の意を表する。

文 献

- 1) Petterson, G., E. B. Cowling and J. Porath: Biochim. Biophys. Acta 67:1 (1963).
- 2) 畚野・奈良・吉野: 醸工, 42, 405 (1964).
- 3) 奈良・畚野・吉野: 醸工, 42, 410 (1964).
- 4) 奈良・畚野・吉野: 醸工, 43, 653 (1965).
- 5) 西沢・小林: 日農化, 27, 239 (1953).
- 6) 若林・神田・西沢: 醸工, 42, 347 (1964).
- 7) 若林・神田・西沢: 醸工, 43, 739 (1965).
- 8) 若林・神田・西沢: 醸工, 44, 669 (1966).
- 9) 立花・山下・塩出: 醸工, 43, 713 (1965).
- 10) 川合: 日菌報, 11, 23 (1970).
- 11) Reese, E. T.: Appl. Microbiol. 4:39 (1956).