

茸類の生化学的研究 XII

Pholiota nameko の Carboxymethyl cellulase

生産条件について 2

橋 本 一 哉

Biochemical Studies on the Mushroom XII

Production of carboxymethyl cellulase in submerged culture of *Pholiota nameko* -2

Kazuya Hashimoto

Cellulase from some edible mushrooms have been reported in the previous papers. The cell-free filtrates of *Pholiota nameko* is one of the most active sources of cellulolytic mushroom enzymes studied so far.

The present study is an investigation on the production of carboxymethyl cellulase in the submerged culture of *Pholiota nameko*.

Cellulose powder and peptone were found to be an important factor for inducing the enzyme production. (Table 1 4)

The culture conditions were also studied in detail. (Table 5, 6 Fig. 2)

Major enzymatic hydrolysis products of CMC were found to be cellobiose and glucose. (Fig. 3)

With gel filtration, the cellulase sample obtained separates into 2 fractions which include carboxymethyl cellulase and β -glucosidase (Fig. 4)

The culture filtrate also contained several carbohydrase including xylanase, pectinase and galactomannase. (Fig. 5)

食用茸類の中で *Pholiota nameko* の培地中に強力な Carboxymethyl cellulase が生成することは前報¹⁾で報告した。cellulase は適応酵素として認められ、Mandels^{2~4)} は inducer の検索と共に、その適応的生産について増殖と関連して検討を加えている。

本報では、*Pholiota nameko* を用いて、inducer による誘導生成、窒素源の影響等、生産条件について、また他の Carbohydrase 活性についても検討した。さらに培地より Carboxymethyl cellulase の単離を試みた。

実験方法

1. 供試菌株

市販ナメコより分離、常法により純化した *Pholiota nameko* を用いた。

2. 培養

500ml 容肩付フラスコに前報¹⁾で述べた組成の培地 150ml をとり、常法に従って殺菌したのち接種し、往復振盪培養機で 25°C 10 日間培養を行った。

3. 酵素活性測定法

Carboxymethyl cellulase (Cx) は前報¹⁾に従った。β-glucosidase は 1% salicin を基質として 45°C、60 分間酵素反応を行い、xylanase, pectinase および galactomannase はそれぞれ 0.5% の xylan, pectic acid および galactomannan を基質として 40°C、30 分間酵素反応を行い、生成した還元糖を 3.5 DNS 法により測定した。

4. Paper Chromatography

東洋ろ紙 No. 51 を用い、展開溶媒 butanol : pyridine : 水 (6 : 4 : 3) で上昇法により多重展開した。発色剤としては anilin hydrogen phtalate によった。

実験結果および考察

1. セルラーゼ生成の経時変化

培養中の pH、還元糖および Cx 活性の経時変化は Fig. 1 のとおりで、pH は 5 日目まで低下するが、その後再び上昇する。この時期になってはじめて Cx の生成が見られるようになる。還元糖は pH と同様に 5 日目で最低となり、その後 Cx の生成と共に増加した。Cx は 10~12 日で最高に達した後減少した。

2. 炭素源の影響

cellulase は一種の適応酵素として、この酵素の生成を促すためには inducer が必要であることは一般に認められている。基本培地の粉末セルロースの代りに、各種の炭素源を添加して培養した結果は Table 1 に示したとおりである。

cellulose 以外では salicin, CMC-Na, lactose がすぐれていたが cellobiose は cellulose 分解の際の重要な生成物であるにもかかわらず、実験の範囲では inducer として適当とは思われ

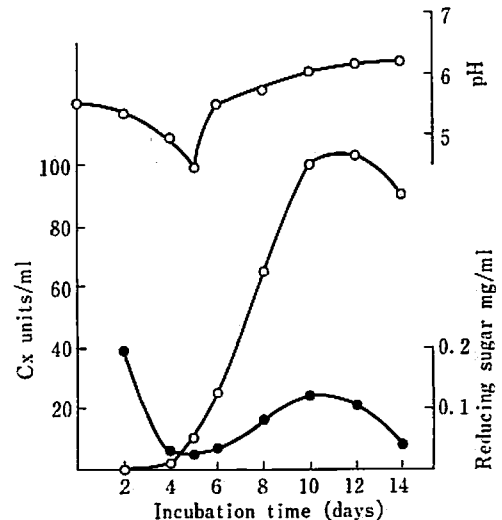


Fig. 1 Production of cellulase by *P. nameko* grown on cellulose powder.

なかった。

3. セルローズ添加量の影響

炭素源として粉末セルローズを添加した時に Cx の誘導が最もすぐれていることを知ったので、0.1%~2.0%の粉末セルローズをそれぞれ添加して、Cx生成量を測定した。結果は Table 2 のとおりである。

0.5%添加以上では余り差はなかったが、実験の範囲では1%のとき最も良く誘導した。濃度を更に増加すると活性が低くなるが、これは生成した Cx が cellulose の表面に吸着されるためと思われる。

4. 窒素源の影響

茸類の培養においては窒素源の要求性は極めて限定され、無機の窒素を殆ど利用出来ない、

Pholiota nameko がよく資化し得た窒素源は peptone, casamino acid, L-asparagine 等の有機窒素と数種の有機酸のアンモニウム塩であったが、栄養源の内では窒素源の生理的生質がセルラーゼ生成の重要な因子の一つと考えられる。そこで培地の窒素源をそれぞれ同量の窒素よりなる他の窒素源で置き換えて培養した結果を Table 3 に示した。peptone 以外はいずれも菌体の生育が旺盛であるにもかかわらず Cx 生成は劣った。

5. 窒素濃度の影響

peptone は Cx 生成の良好な窒素源であることを認めたので、その濃度の影響について検討した結果を Table 4 に示した。

peptone 1.5%までは添加量に比例して Cx の生成を見たが、2.5%のごとき高濃度ではかえって生成は阻害された。

6. 磷酸塩の影響

磷酸は茸類培養における必須栄養源の一つで

Table 1 Effect of various carbon sources on Cx production

| Compounds | Cx units/ml |
|-------------------------|-------------|
| Powdered cellulose | 104.05 |
| Salicin | 47.15 |
| Carboxymethyl cellulose | 27.65 |
| Cellobiose | 3.52 |
| Lactose | 16.95 |
| Maltose | 2.09 |
| Starch | 2.06 |
| Xylan | 9.25 |
| Glucose | 1.96 |

Table 2 Effect of cellulose concentration on Cx production

| Cellulose % | Cx units/ml | | |
|-------------|-------------|--------|---------|
| | 5 days | 8 days | 10 days |
| 0.1 | 0.79 | 5.48 | 11.60 |
| 0.5 | 0.91 | 34.08 | 83.23 |
| 1.0 | 1.10 | 42.78 | 98.14 |
| 1.5 | 1.16 | 36.12 | 76.49 |
| 2.0 | 2.57 | 24.91 | 68.16 |

Table 3 Effect of nitrogen compounds on Cx production

| Compounds | Cx units/ml | Final pH |
|---------------|-------------|----------|
| Casamino acid | 3.75 | 5.6 |
| Yeast extract | 22.71 | 5.7 |
| L-Asparagine | 0.73 | 5.3 |
| Peptone | 101.16 | 6.1 |

Table 4 Effect of peptone concentration on Cx production

| Pepton % | Cx units/ml | | |
|----------|-------------|--------|---------|
| | 5 days | 8 days | 10 days |
| 0.2 | 0.82 | 31.21 | 58.68 |
| 0.4 | 0.45 | 45.77 | 96.18 |
| 0.8 | 1.12 | 45.77 | 104.08 |
| 1.5 | 0.82 | 47.06 | 105.30 |
| 2.5 | 0.59 | 41.03 | 65.97 |

あるが普通 KH_2PO_4 または K_2HPO_4 などの形で用いられる。本実験で用いている KH_2PO_4 の濃度の影を調べたところ Table 5 に示すように最適添加量は 10g/L 程度で通常の培地組成にくらべて著しく多かった、おそらく KH_2PO_4 の緩衝作用によってセルラーゼの誘導に適する pH を保持することにあると推定された。しかし KH_2PO_4 の過剰添加は Cx 生成を著しく阻害した。

7. pH の影響

Pholiota nameko の生育は中性から微酸性までかなり広い pH 域で旺盛であったが、Cx 生成の最適 pH は Table 6 に示すように 5.0~5.5 付近であり、pH が 4.0 以下または 6.5 以上では著しく阻害された。

8. 培地量の影響

好気性の茸類にとっては、培養中の酸素溶解量は菌体生育を共にセルラーゼ生成に大きな因子となる。振盪培養にさいして 500ml 容のフラスコに培地 150ml を添加しているが、培地量が異れば培地に対する酸素溶解量も変化し、当然セルラーゼ生成にも影響を与えるであろう、従って培地量を 50~200ml に変化させたときの Cx 活性との関係を Fig. 2 に示した。培養日数に関係なく、150ml を添加した時に Cx 生成は最大であった。

9. 粗酵素による CMC の分解生成物

粗酵素液 (100unit) 20ml と 1% CMC-Na 20ml を pH 4.5 に調製し、40°C で 120分間 incubate し、反応終了後未反応の CMC を除去、脱塩処理し、その濃縮液を paper chromatography にて展開した。発色度から Fig. 3 に示すように glucose と cellobiose および少量の oligo-糖を検出した。

10. Cx と β -glucosidase の分離

Ppholiota nameko の培養終了後、菌体その他不溶物を除去した粗酵素液を 40°C, pH 4.5, 15

Table 5 Effect of phosphate concentration on Cx production

| KH_2PO_4 % | Cx units/ml | Final pH |
|----------------------------|-------------|----------|
| 0.2 | 52.17 | 5.9 |
| 0.4 | 62.28 | 5.8 |
| 0.6 | 68.73 | 5.8 |
| 0.8 | 90.30 | 5.6 |
| 1.0 | 95.64 | 5.6 |
| 1.5 | 35.76 | 5.2 |
| 2.0 | 6.69 | 5.0 |

Table 6 Effect of pH on Cx production

| Initial pH | Final pH | Cx units/ml |
|------------|----------|-------------|
| 4.0 | 4.3 | 8.52 |
| 4.4 | 5.4 | 77.29 |
| 5.0 | 5.7 | 84.29 |
| 5.2 | 5.7 | 102.24 |
| 5.5 | 5.7 | 90.64 |
| 5.8 | 6.0 | 77.29 |
| 6.2 | 6.4 | 72.25 |
| 6.4 | 6.6 | 46.51 |
| 6.8 | 7.0 | 25.42 |

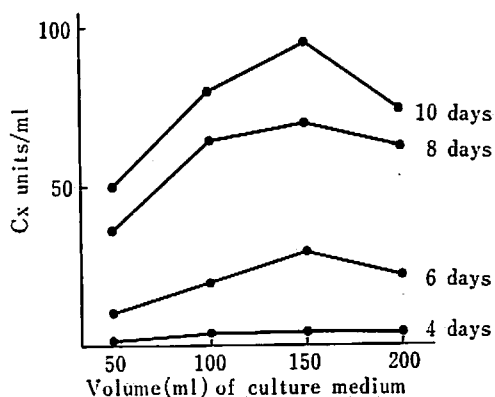


Fig 2 Effect of volume of culture medium on cellulase activity

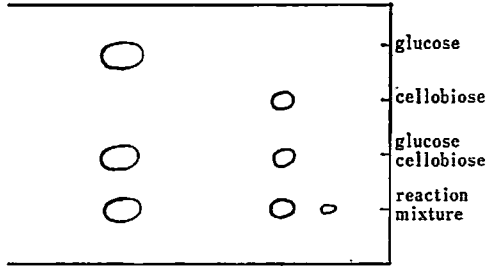


Fig. 3 Paper chromatographic detection of sugars from CMC after enzymatic hydrolysis

mmHg の減圧下で $\frac{1}{10}$ 量まで濃縮したのち硫酸を 0.8 飽和度になるように添加し塩析を行う。生成した沈澱は少量の 0.1M acetate buffer (pH 4.5) に溶解して、 5°C で上記緩衝液を数回更新しながら 1 夜透析を行った。透析内液 5 ml (18.5mg protein を含む) を $1.5 \times 38\text{cm}$ の Sephadex G 100 を用いて溶出温度 5°C でゲルろ過を行った。Fig. 4 にするように Cx と β -glucosidase は明らかに異った酵素で、 β -glucosidase はより大きな分子量を有する基質に作用する Cx よりも大きな分子量を有すると推定した。

cellulose の分解機構において、Cx により生じた cellobiose は β -glucosidase により glucose に分解されるとした Reese⁵⁾ の説は当酵素にも適応出来ると考えられた。

11. *Pholiota nameko* の生成する他の加水分解酵素

培養中のセルラーゼに関連する他の carbohydrase の生成について検討して、xylanase, pectinase および galactomannase を認めた。

最適 pH は Fig. 5 に示すように、いずれも 4 ~ 5 付近に存在した。しかし amylase, inulase, alginase, invertase, trehalase 等は検出されなかった。

茸類はその生育過程において、有機質を分解資化しているが、植物組織の middle lamella である pectic substance や hemicellulose を分解し、次いで遊離した細胞を分解するという 2 段階で反応していると考えられる。またこれら反応を触媒する carbohydrase が相互に近似の作用 pH を有することは有機質分解過程にお

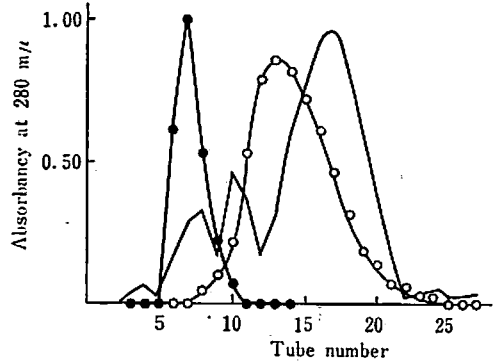


Fig. 4 Distribution of protein, cellulase and β -glucosidase activity after gel filtration of an enzymatic preparation from *P. nameko* on Sephadex G-100

○—○ cellulase (Cx) ●—● β -glucosidase
— absorbancy at 280m μ

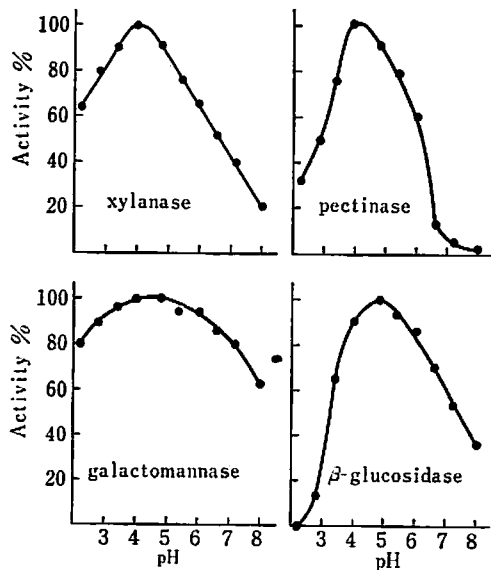


Fig. 5 pH activity curves of hydrolytic enzymes in culture filtrate.

いて非常に有利な条件となり得るであろう。

要 約

Pholiota nameko の液内培養によるセルラーゼ生成の条件を検討し、培地組成の影響について基礎的な研究を行い、inducer として粉末セルローズ、窒素源として peptone が適した培地組成であり、培地の pH 条件は 5.0~5.5 付近で、この pH 域を保つために磷酸塩は比較的高濃度を用いる。培養時の酸素供給が多い時は菌体の生育には適するが、セルラーゼの生成は低下するので適当な供給が必要であろうと思われた。

CMC の分解によって生ずる主な生成糖は glucose および cellobiose であった。

ついで培地中に生成蓄積したセルラーゼの内 Cx と β -glucosidase を分離した。

また xylanase, pectinase, galactomannase 等細胞壁の分解に関与すると思われる酵素を同時に生成することを見出した。

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) 橋本：本誌, 10, 163 (1972)
- 2) Mandels M., E. T. Reese, : J. Bact. 73, 269 (1959).
- 3) Mandels M., E. T. Reese, : J. Bact. 79, 816 (1960).
- 4) Mandels M., F. W. Parrish, E. T. Reese, : J. Bact. 83, 400 (1962).
- 5) Reese E. T., : Appl Microbiol. 4, 39 (1956).