

# 茸類の生化学的研究—VIII

## キシランの分解について—2

橋本 一哉, 高橋 善次郎

### Biochemical Studies on the Mushroom-VIII

#### 2-Enzymatic Hydrolysis of Xylan

KAZUYA HASHIMOTO and ZENJIRO TAKAHASHI

In the previous paper, it was reported that an enzyme preparation obtained from *Agaricus bisporus* hydrolyzes hemicellulose, prepared from rice straw, primarily into xyloöligosaccharides including xylobiose accompanied with the formation of glucose and arabinose but with no production of xylose.

The aim of this paper is to present a method for the purification of xylanase and to describe some of its properties.

Xylanase from the wheat culture of *A. bisporus* was purified by the ammonium sulfate fractionation followed by column chromatography with CM-cellulose. (Table 1)

The purified enzyme is stable below 45° and in the pH range from 4.4 to 6.6, whereas it is inactivated completely by maintaining at 70° for 10 minutes. (Fig. 3, 4)

The optimum pH and temperature for the enzyme activity are 5.4 and 45° to 50° respectively. (Fig. 5, 6)

The enzyme activity increases in the presence of NaCl ( $2.5 \times 10^{-2}$  M), while inhibited by ZnCl<sub>2</sub>. (Table II)

Major enzymatic hydrolysis products of xylan were found to be xyloöligosaccharides, mainly xylobiose. (Fig. 8)

F. HOPPE, SEYLER<sup>1)</sup> によってブナキシランが汚泥中の微生物によって分解されることが報告されて以来、キシランを分解する微生物は広く分布することが知られ、種々の分離菌株について、その酵素生成の条件、酵素の精製、酵素作用機作など多くの酵素化学的研究<sup>2-8)</sup> が成されている。

前報<sup>9)</sup> でマッシュルーム菌 (*Agaricus bisporus*) は生育初期においては炭素源としてヘミセルロースを同化吸収していることを推論し、更にヘミセルロース分解酵素を抽出し、酵素化学的諸性質について若干考察を与えたが、本報では、部分精製の方法を少しく変えて *Agaricus bisporus* の生産するヘミセルラーゼの  $\beta$ -1,4' キシランに対する活性について報告する。

## 実 験 方 法

1. 供 試 菌 株 *Agaricus bisporus* (LANGE) SING
2. 酵 素 試 料 小麦培地に接種し、25°C で約1カ月間培養を行った。
3. 酵素液の調製法 5倍量の蒸留水を加えて、室温で時々攪拌しながら2時間抽出し、さらに冷凍室に一夜放置して酵素の抽出を行った。この抽出液をまず木綿布で濾過し、ついで濾液を 10,000 rpm, 15分の冷凍遠沈を行って透明な抽出液を得た、この透明濾液を粗酵素液とした。
4. 基 質 WHISTLER<sup>10)</sup> の方法により調製した。 $\beta$ -1.4' キシランの1%懸濁液
5. 酵素活性の測定 基質 1 ml, 0.1 M クエン酸, リン酸塩緩衝液 0.4 ml, 酵素液 0.6 ml, の配合液を 50°C で反応を進め、生成還元力を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、pH 5.4 で 50°C において30分間酵素作用を行い作用液 1 ml 中にキシロース 0.1 mg を生ずる酵素量を 1 unit とした。
6. CM セルローズカラムの調製 CM, cellulose (0.72 meg/g Brown 社製) を蒸留水に分散、微粒子を上液と共に傾斜除去して沈下した部分は 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) にて緩衝化し、吸着柱を調製した。
7. 蛋白質の定量 前報<sup>9)</sup> に準じた。
8. オリゴ糖の分離<sup>9)</sup> 活性炭—セライト (1:1) 柱を用いてオリゴ糖類を吸着させ、0%, 5%, 10%……40%とそれぞれ濃度の異った酒精液で順次溶出した。

## 実 験 結 果 お よ び 考 察

### 1 酵素の部分精製

小麦培地から抽出して得た粗酵素液 100 ml に粉末硫酸 54 g を攪拌しながら徐々に添加して生成した沈殿を遠心分離 (12,000 rpm, 15 min) により集め、少量の蒸留水に溶解して 5°C にて蒸留水で24時間、さらに 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 4.8) で 48 時間透折を行い、透折内液を CM セルローズカラム (3×30 cm) に吸着させ、5°C で 0.01 M → 0.2 M 酢酸緩衝液を用いて傾斜法にて溶出速度 25 ml/hr で 10 ml 宛溶出した。各分画について蛋白量とキシラナーゼ活性を測定した結果は Fig. 1 に示すように吸着されたキシラナーゼは 0.1 M 酢酸緩衝液で溶出された。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 1 に示した。

### 2 キシラナーゼの酵素化学的諸性質

上記部分精製キシラナーゼを用いて酵素化学的諸性質について検討した。

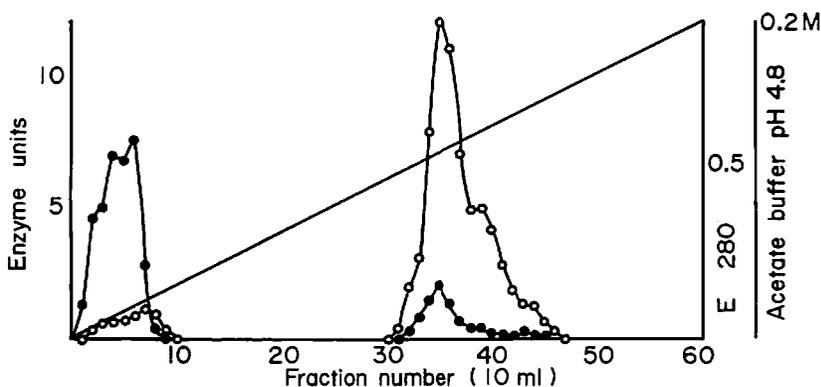


Fig. 1 Chromatography on CM cellulose column

○ — xylanase  
● — protein

Table 1 Purification of xylanase

| Step  | Volume ml | Activity units/ml | Total Activity | Protein mg/ml | Specific Activity | Yield % |
|---|-----------|-------------------|----------------|---------------|-------------------|---------|
| Culture extract                                 | 500       | 4.82              | 2410.0         | 5.69          | 0.85              | 100     |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 200       | 6.58              | 1316.0         | 4.55          | 1.45              | 54.6    |
| CM-cellulose                                    | 50        | 8.96              | 448.0          | 0.43          | 20.84             | 18.6    |

1) 酵素量と活性

酵素原液を希釈し、作用液に配合し、反応後の生成キシロースと酵素濃度との関係は Fig. 2 に示すように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。

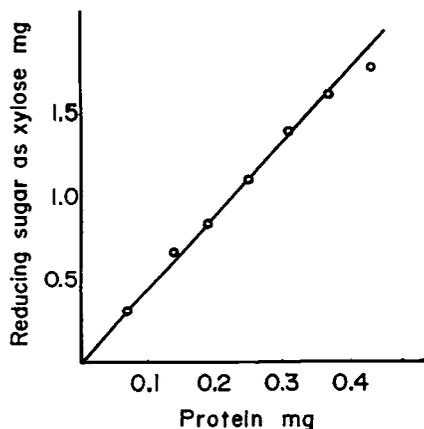


Fig. 2 Correlation between protein concentration and amounts of reducing sugar produced from xylan

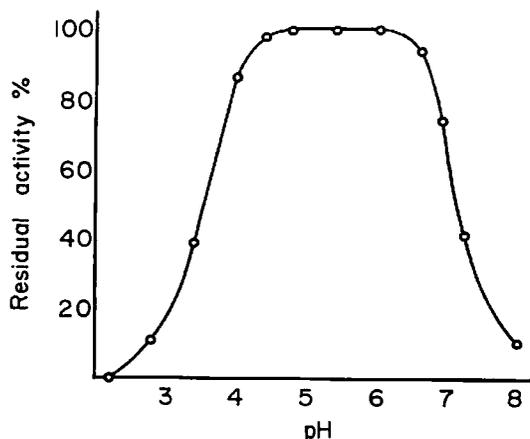


Fig. 3 pH stability of the xylanase

## 2) 酵素の安定性

### a) 酵素の安定性におよぼす pH 値の影響

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, Fig. 3 に示すように当酵素は pH 4.4~6.6 の間で安定であった.

### b) 酵素の安定性におよぼす温度の影響

酵素液を pH 5.4 で種々な温度にて10分間処理し, 急冷後残存酵素力を測定した, Fig. 4 に示すように, 45°C 附近より不活性化が認められ 70°C で全く失活した.

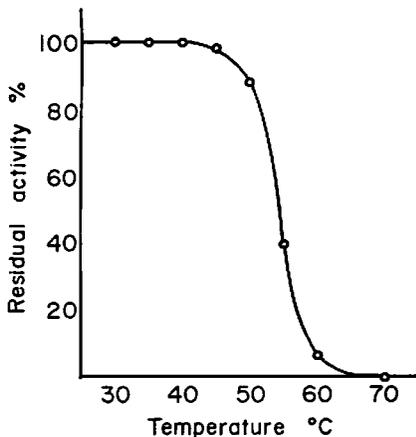


Fig. 4 Thermal stability of the xylanase

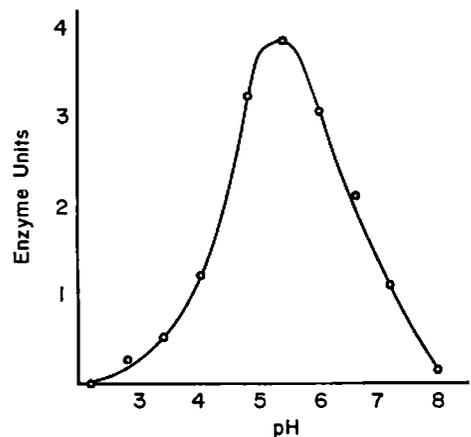


Fig. 5 pH activities of the xylanase

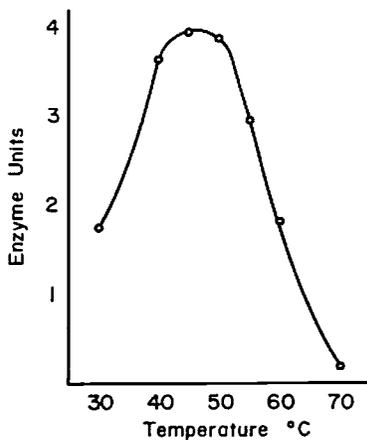


Fig. 6 Activities of the xylanase at various temperature

### 3) 最適 pH と最適温度

Fig. 5 の pH 活性度曲線より pH 5.4 に最適 pH を有することが認められた, 同時に pH 5.4 における最適温度は Fig. 6 に示すように 45~50°C であった.

### 4) 酵素作用におよぼす塩類の影響

種々の金属塩を作用液に添加して, 反応後の生成キシロース量を Table 2 に示した. ここで強い阻害作用を示したものは  $Zn^{++}$  で,  $Mg^{++}$  も阻害の傾向が見られた, NaCl により当酵素は活性化された. しかし他の塩類による影響は殆ど受けなかった.

## 5) キシランの分解と生産物

部分精製酵素液を希釈して 3.4 unit の酵素液を調整して pH 5.4, 50°C の条件で基質と反応を継続し, 各時間毎に作用液から 2 ml を採取し生成還元力をキシロースとして測定した分解曲線は

Table 2 Influence of salts on the xylanase activity

| Salts                           | Concentration<br>(M) | Reducing sugar (as xylose) produced |       |
|---------------------------------|----------------------|-------------------------------------|-------|
|                                 |                      | mg                                  | %     |
| Cont.                           | $2.5 \times 10^{-2}$ | 0.6922                              | 100   |
| KCl                             | "                    | 0.6894                              | 99.6  |
| NaCl                            | "                    | 0.7714                              | 114.4 |
| MgSO <sub>4</sub>               | "                    | 0.5488                              | 79.2  |
| CaCl                            | "                    | 0.6422                              | 92.7  |
| Ca-acetate                      | "                    | 0.6744                              | 97.4  |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | "                    | 0.6912                              | 99.9  |
| ZnCl                            | "                    | 0.3328                              | 48.0  |

Fig. 7 に示すように、反応2時間までは還元力が急速に増加し、24時間後においても還元力の増加が認められた。

6) キシラン分解過程中の生成糖の分布

pH 5.4, 50°C の条件で24時間および48時間酵素反応を行い、それぞれの作用液は前報<sup>9)</sup>に従って未反応キシランを70%エタノールを加え遠沈除去し、上澄液を減圧濃縮し、活性炭：セライト (1:1) カラムを用いてエタノールの濃度を徐々に増加して各オリゴ糖の分離を行った、その1例は Fig. 8 に示した、フラクション上部の数字はキシロースの重合度を示す。反応の進行と共にキシロピオースの割合が増加しキシロトリオース以上の重合度の高いオリゴ糖は減少した。またキシロースの増加は認められず、当キシラナーゼは基質分子の内部からキシランを分解していく、所謂エンド型酵素でキシロピオースからキシロースへの分解は行わないようである。

Table 3 に *A. bisporus* と既報の他の微生物からのキシラナーゼの作用条件を比較した。

Table 3 Comparison of properties of xylanase from *Agaricus bisporus* and other organisms

| Organisms                                    | Opt. pH | Opt. Temp. | Stabilities                    |
|--|---------|------------|--------------------------------|
| <i>Aspergillus foetidus</i> <sup>11)</sup>   | 3.4     | 37°C       | Inactivated at 65°C for 5 min  |
| <i>Bacillus subtilis</i> <sup>5)</sup>       | 6.0-6.2 | 37-45°C    | " at 70°C for 5 min            |
| <i>Aspergillus niger</i> <sup>12)</sup>      | 4.2     | 45°C       | " at 60°C for 10 min           |
| <i>Bacillus firmis</i> <sup>13)</sup>        | 7.2     | 55-60°C    | Not inactivated at 100°C       |
| <i>Aspergillus botatae</i> <sup>14)</sup>    | 4.0-4.5 | 50°C       | for 10 min                     |
| <i>Streptomyces xylophagas</i> <sup>8)</sup> | 6.2     | 50-60°C    | Inactivated at 70°C for 10 min |
| <i>Agaricus bisporus</i>                     | 5.4     | 45-50°C    | " at 70°C for 10 min           |

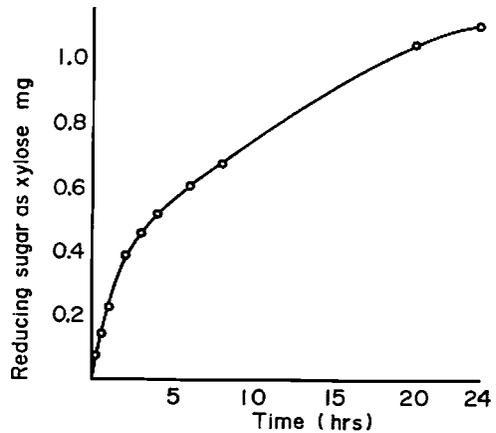


Fig. 7 Hydrolysis curve of xylan

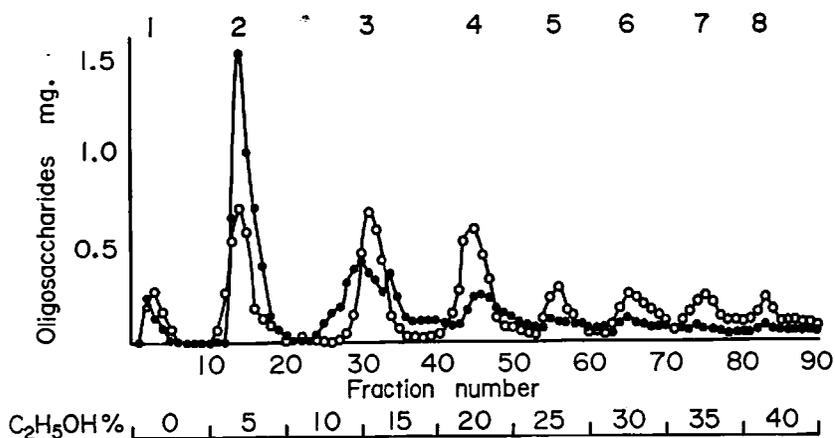


Fig. 8 Separation of oligosaccharides in reaction mixture after incubation by carbon column chromatography

○—○ 24 hrs.  
●—● 48 hrs.

## 要 旨

*A. bisporus* のキシラナーゼを小麦培地より抽出し、部分精製を試みて、当酵素の一般的性質を検討した。

1.  $\beta$ -1,4' キシランに対する作用は pH 5.4 温度 45°~50°C において最適を示した。
2. pH に対する安全性は 4.4~6.6 であり、温度に対する安定性は 50°C 以上10分の処理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、Zn<sup>++</sup> で阻害される。
4. キシランの分解産物として、最終的にはキシロビオースを生成し、エンド型であると推定される。

当 *A. bisporus* のキシラナーゼ作用様式はイナワラヘミセルローズに対するヘミセルラーゼ作用様式と殆ど同様の結果を得た。

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

## 文 献

- 1) HOPPE F., Hoppe-Seylers' Zeitschr, Physiol, Chem., 13, 66 (1889)
- 2) WHISTLER R. L., J. Am. Chem. Soc., 77, 1241 (1955).
- 3) SORENSEN L.H., Nature., 172, 305 (1953). ibid. 176, 74 (1955), ibid. 177, 845 (1956),
- 4) INAOKA M., Nature., 178, 202 (1956).
- 5) 高橋光雄, 酵工誌, 41 116, 119, 181, 186 (1963)

- 6) 福井作蔵, 蛋白質核酸酵素. 6, 90 (1961)
- 7) 福井, 鈴木, 北原, 日農化誌, 34, 48 (1960)
- 8) IIZUKA H. and KAWAMINAMI T., Agr. Biol. Chem., 29, 520 (1965).
- 9) 橋本, 磯部, 高橋, 本誌. 8, 359 (1968)
- 10) WHISTLER R.L., Arch. Biochem., 19, 25 (1948).
- 11) " J. Am. Chem. Soc., 77, 1241 (1955).
- 12) 福岡, 早田, 日農化大会講演 (1960)
- 13) " " (1959)
- 14) FUKUI S. and SATO M., Bull. Agr. Chem. Soc. Japan., 21, 392 (1957).