

茸類の生化学的研究 XⅢ

Cellulase 活性と植物組織の崩壊 3

橋 本 一 哉

Biochemical Studies on the Mushroom XⅢ

Pholiota cellulase and breakdown of plant tissues-3

Kazuya Hashimoto

A wood-destroying fungus, *Pholiota nameko*, has been found to produce carboxymethyl cellulase in culture medium.

The present report concerns further studies on other components of the cellulase in a crude enzyme preparation, and it was found that the preparation contains remarkable activities of maceration, degradation of filter paper and β -glucosidase.

Optimum pH for each activity was 4.5, and some correlation among the enzyme concentrations and activities were described.

Also, the crude preparation was tested for the breakdown of some plant tissues.

It was recognized that fresh tissues such as potato, onion, broccoli and sweet pepper were degraded completely, but not spinach, bamboo-shoot and some mushrooms.

Cellulase は茸類がその生育に際して最初に植物組織を attack する主要な酵素であり, cellulose およびその誘導体または部分水解物の水解に関与する酵素等数種の基質特異性を有するものがあると考えられる。

また, 一方実際に茸類が植物体を分解する際には植物組織の middle lamella が maceration を受ける必要があるので, 先ず植物体が崩壊を受け次に cell wall が分解されるという 2 段階を考慮しなければならぬと思われる。

本報では *Pholiota nameko* の植物組織を崩壊する maceration 活性, 天然の cellulose に作用する C_1 活性および cellobiose や salicin などに作用する β -glucosidase 活性について検討した。更に *Pholiota nameko* cellulase の酵素的解明を目的として各種の植物組織に対する崩壊作用について観察した。

実 験 方 法

1. 酵素標品の調製

Pholiota nameko の培養ろ液を減圧濃縮し alcohol および acetone で沈澱したのち減圧乾燥した粗酵素粉末

2. 酵素活性測定法

a. Macerating activity

石井²⁾らの方法に従い、馬鈴薯中央部より直径 13mm の円筒を切りとり、長さ 5 mm の馬鈴薯片となし、蒸留水で洗滌後、乾燥ろ紙で脱水し、馬鈴薯片 2 個を重量測定する。酵素液 5 ml, 0.2M acetate buffer 5 ml の入った L 字管 (内径 18mm, 垂直部高さ 45mm, 水平部長さ 150mm) に上記馬鈴薯片 2 個を投入し、Monod 式恒温振盪機にセットし 40°C にて振盪する (振動数 60 rpm, 振幅 4 cm), 反応終了後 馬鈴薯片を蒸留水で洗滌, 脱水し, 残存重量を測定し, 次式より重量減少率を求めた。

$(W_0 - W_t) / W_0 \times 100$ 但し W_0 は反応前の馬鈴薯重量

W_t は反応後の馬鈴薯重量

b. ろ紙崩壊活性 (C_1)

北御門, 外山³⁾の方法に従い測定した。すなわち前記規定の L 字管に酵素液 5 ml と 1M acetate buffer 1 ml を加えて, これに東洋ろ紙 No. 51A (1 × 1 cm) 2 枚を投入して maceration の場合と同様に incubation を行った。活性は 2 枚のろ紙が完全に崩壊するに要した時間 (分) を測定したが酵素活性を比較する場合には 1 時間振盪した後の残存ろ紙の面積を測定して崩壊率を表示した。

c. β -glucosidase 活性

1% salicin 1 ml, 0.1 M acetate buffer (pH 4.5) 0.5ml に適当に希釈した酵素液 0.5ml を加え, 40°C で 60 分間 incubation 後, ジニトロサリチル酸溶液 3 ml を加えて酵素反応を止め, 以後は C_x 活定の場合と同様の操作を行って, 反応液中の glucose 量を求めた。

実 験 結 果

1. 酵素濃度と maceration の関係

Fig. 1 に示すように酵素濃度 0.5% までは, 活性は急速に増加するが, それ以上の濃度では顕著な効果に期待出来なかった。maceration の測定は 1% 酵素を用いるのが適当と考えられた。

2. 酵素濃度と C_1 活性

酵素濃度とろ紙崩壊時間との関係は Fig. 2 に示すように直線関係を示さなかったが, 酵素濃度の逆数を横軸にプロットすれば, 崩壊に要した時間 T は酵素濃度の逆数に比例した。

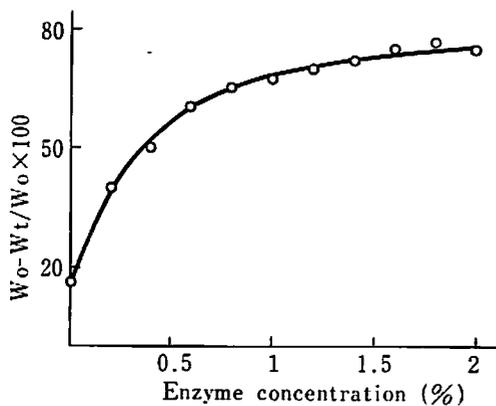


Fig. 1 Effect of enzyme concentration on the macerating reaction

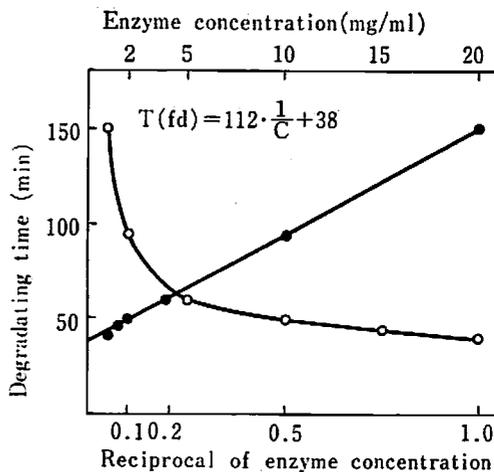


Fig. 2 Effect of enzyme concentration on the C_1 reaction

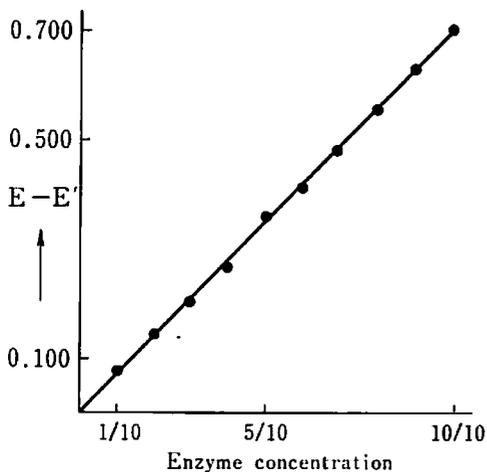


Fig. 3 Effect of enzyme concentration on β -glucosidase activity

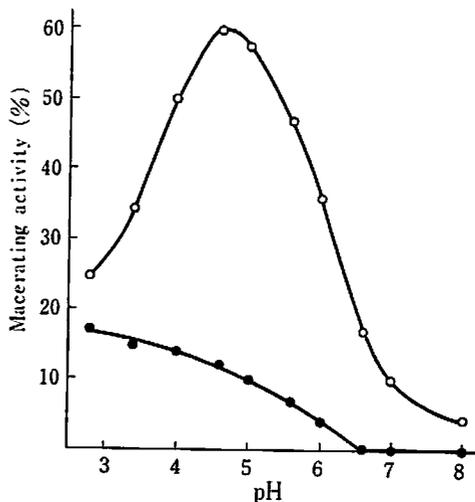


Fig. 4 Effect of pH on enzymatic maceration
○—○ Enzymatic ●—● Nonenzymatic

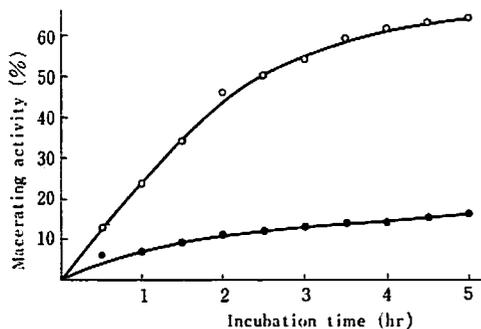


Fig. 5 Time course of maceration
○—○ Enzymatic ●—● Nonenzymatic

Table 1 Effect of pH on degradation of filter paper by *Pholiota cellulase*

pH	Time (min)
3.6	120
4.0	60
4.4	42
4.8	45
5.0	60
5.6	75
6.2	90
6.6	120

酵素濃度を増加するとTは38に収斂し、当条件において *Pholiota nameko* の C_1 活性を測定した場合、ろ紙を完全に崩壊するのに最低38分を要することを認めた。

3. 酵素濃度と β -glucosidase 活性

Fig. 3 に示したように、測定範囲内では比例関係を示した。

4. maceration の最適 pH

L字管に各pHの0.2 M acetate buffer 5 ml と酵素液 5 ml を採り、40°C で5時間 incubation を行った後、減少率を求めた。同時に酵素液の代りに蒸留水を用いて非酵素的な反応を測定した結果 Fig. 4 に示すように、非酵素的な maceration の場合は、測定範囲内では pH 2.8 で20%の減少率を示して最も高く、pH が高くなるにつれて減少率は低くなり、pH 6.6 以上では maceration は認められなかった。これに対して、酵素的な反応では pH 4.5 付近に最大減少率を認めた。pH 4.5 における maceration の経時的变化は Fig. 5 に示すように、反応2時間までは急速に崩壊が進むが、それ以後では徐々に活性が低下した。

5. ろ紙崩壊活性 (C_1) の最適 pH

前報により C_x 活性および β -glucosidase 活性の最適 pH はそれぞれ 4.5~5.0 付近に認めたが、maceration 活性およびろ紙崩壊活性の最適 pH も大略一致した Table 1 は各 pH において、ろ紙が完全に崩壊するに要した時間を示したもので、最適 pH は 4.4~4.8 を示した。しかし 3.4 以下または 7.0 以上では120分以上の反応でもろ紙の崩壊は認められなかった。

6. 植物組織の崩壊試験

粗酵素粉末を 0.1 M acetate buffer (pH 4.5) で1%に希釈した溶液 10ml に各植物の細片 1g を規定の L 字管に投入し、Monod 式 恒温振盪機にセットした。40°C で5時間振盪反応後、各植

Table 2 Breakdown test of plant tissues by *Pholiota cellulase*

Material ¹⁾	Degree ²⁾	Mushroom ¹⁾	Degree ²⁾
Potato	++++	Shiitake (<i>L. edodes</i>)	+
Sweet potato	++++	Enokitake (<i>C. velutipes</i>)	+
Taro	++++	Haratake (<i>A. bisporus</i>)	+
Yam	++++	Hiratake (<i>P. ostreatus</i>)	-
Onion	++++		
Sweet pepper	++++		
Brocoli	++++		
Raddish	+++		
Carrot	++		
Bamboo shoot	++		
Cabbage	++		
Chinese cabbage	++		
Spinach	+		

1) Each raw material was cut into slices and shaken in 1% enzyme solution at 40°C for 5 hours.

2) - ~ ++++ No change ~ Complete breakdown

1g 物組織の崩壊状態を観察した。その結果を Table 2 に示した。

人参、ホウレン草、筍等は崩壊が著るしく困難であったが、馬鈴薯、甘藷、里芋、玉葱、ピーマン、ブロッコリー等は完全に崩壊した。

また茸類はいずれも崩壊されにくかったが、茸類の細胞壁が主に β -1,3 glucan や chitin よりなるとされているため、当 cellulase による溶菌性が弱いものと推定される。

考 察

Pholiota nameko の cellulase として Cx 活性の他に、maceration 活性、ろ紙崩壊活性および β -glucosidase 活性を示すことを認め、植物組織の崩壊にこれら cellulase の各成分の作用はもちろん、共存する各種分解酵素の共同作用であると推定される。

maceration 活性およびろ紙崩壊活性は酵素濃度と必ずしも直線関係を示さなかったが、おそらく固体基質に対する酵素の均一な作用が阻害されるためと考えられる。

要 約

Pholiota nameko の酵素の内、maceration 活性、ろ紙崩壊活性および β -glucosidase 活性について検討した結果、酵素濃度と β -glucosidase 活性は直線関係を示したが、maceration 活性は 0.5 % 以上では効果が減少した。ろ紙崩壊活性は酵素濃度の逆数に比例したが、当酵素の濃度を増加しても最低 38 分を要することを認めた。各活性の最適 pH はいずれも 4.5 付近に認められた。

植物組織の崩壊性は植物の種類によって異なるが完全に崩壊されない場合も組織の軟柔化が認められた。しかし植物組織の崩壊にはこれら cellulase 系以外の加水分解酵素も関与していると推定される。茸類に対する溶菌性は殆ど認められなかった。

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) 石井・菊地・横塚：農化，43，536 (1969)。
- 2) 北御門・外山：醸工，40，85 (1962)。