

- 研究 -

ヒトヨタケ属 (HFP - Co90 - 6) のセルラーゼ活性

富 樫 巖 米 山 彰 造*
瀧 澤 南海雄

Cellulase Activity of Coprinus sp. (HFP-Co 90-6)

Iwao TOGASHI
Namio TAKIZAWA

Syozo YONEYAMA

The optimal temperature and pH for the mycelial growth of Coprinus sp. HFP-Co 90-6 which was isolated from rice-straw compost were found to be 37 and 10.8, respectively. On the other hand, the maximum specific activity of a crude enzyme solution of the fungus was 21.9×10^6 unit/g at pH 5.0 and at 40 towards CMC-Na, and 4.2×10^6 unit/g at pH 6.0 and at 50 towards filter paper. However, the activity fell to 3.5×10^6 unit/g at pH 10.7 and to 1.4×10^6 unit/g at pH 9.5, respectively.

稲わら堆肥から分離したヒトヨタケ属HFP - Co90 - 6は、培養温度37、培地pH10.8で最大の菌糸生長速度を示した。一方、Co90 - 6の粗酵素液の最大のセルラーゼ比活性は、CMC - Naを基質とした場合には反応温度40、PH5.0において 21.9×10^6 unit/g、また、ろ紙(ワットマンNo. 1)を基質とした場合には反応温度50、PH6.0において 4.2×10^6 unit/gであった。しかし、アルカリ環境下での比活性は、それぞれ、 3.5×10^6 unit/g (pH10.7)と 1.4×10^6 unit/g (pH9.5)に低下した。

1. 緒言

堆肥化した稲わらに発生したヒトヨタケ属を分離し、その菌の生育温度やpHなどの培養特性を測定した。その結果、同菌は、最適生育温度と同pHが37と11付近の高温性の好アルカリ微生物であることが分かった。一方、ヒトヨタケは稲わらのセルロースを分解することが知られている¹⁾。そこで、同菌が生産するセルロース分解酵素は、アルカリ環境下で高い活性を有する可能性があると考え、同酵素の性能評価を試みた。

2. 実験方法

2.1 供試菌

1989年に北竜町で栽培された『ゆきひかり』の稲わらを堆肥化した際に、ヒトヨタケ属(Co90-6)の子実体が発生した。本研究ではこの菌株を用いた。同菌株は、子実体や胞子の形態などから、Coprinus radiatus (ネナガノヒトヨタケ)かC. cinereus (ウシグソヒトヨタケ)²⁾のいずれかに該当する。

2.2 温度特性試験

YMSA (yeast extract : 2.5 g, malt extract : 5 g, soluble starch : 20 g, tap water : 1000ml) 斜面培地 (直径18mm, 長さ180mmの試験管を使用) にCo 90-6を接種した。そして、9.1~49.9 の温度範囲に設定

した温度勾配培養器を用いて培養し、経時的にコロニーの大きさを測定して菌糸生長速度を求めた。斜面培地の供試数は1条件2本とした。

接種源には、PDA平板培地上で培養（25℃，暗黒下で4～8日間）したCo90-6をコルクボーラーで培地ごと打ち抜き、直径5mmのディスクとしたものを用いた。

2.3 培地pH特性試験

2.2で示したYMSA培地のtap waterの一部を0.1N HCl, 0.1N KOH, 1.0N KOHで置き換えて、初発pHを4.0～11.9に調整した平板培地（直径90mmのシャーレを使用）を作製した。そして、平板培地の中央にCo90-6を接種して、25℃，暗黒下で培養を行い、経時的にコロニーの直径を測定して菌糸生長速度を求めた。平板培地の供試枚数は1条件3枚とした。

接種源は、2.2と同様に作成した。

2.4 粗酵素液の調製

粗酵素液は、以下に示すようにpHを変えた2種類の液体培地を用いて調製した。

カルボキシメチルセルロースナトリウム塩（以下、CMC-Na と略す）：20g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ：1.5g, KH_2PO_4 ：0.46g, K_2HPO_4 ：1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ：0.5g, 塩酸チアミン：500 $\mu\text{g}/\text{l}$, tap water：1000ml（殺菌後培地pH：7.4）の組成の培地を作成し、500ml容の坂口フラスコに100mlを分注して20分間高圧殺菌した。そして、PDA平板培地上で培養（25℃，暗黒下で8日間）したCo90-6をコルクボーラーで培地ごと打ち抜き、直径10mmのディスクとしたものを接種した。次いで、30℃，暗黒下で3～13日間振とう培養（110rpmの往復振とう）し、菌体を濾別して得たる液を粗酵素液とした。

また、上記のtap waterの一部を0.1N KOH120mlに置き換えて培地を作製（殺菌後培地pH：8.7）し、以下同様の操作を行って粗酵素液を調製した。

2.5 菌体量の測定

菌体量は、2.4でろ別した菌体を105℃で一昼夜乾燥して重量を測定することにより求めた。

2.6 粗酵素液のpH測定

2.4で調製した粗酵素液のpHを、PHメーターを用いて測定した。

2.7 セルラーゼ活性の測定

セルラーゼ活性は、以下に示すように2種類の基質を用い、酵素反応によって生じた還元糖の増加量を測定して求めた。

基質にCMC-Na（半井化学一級）を用いた場合には、1.0% CMC-Na水溶液0.25ml, 0.5M緩衝液（pH4.0～10.7）0.10ml, 粗酵素液0.10ml（ブランクには純水0.10mlを使用）、および純水0.55mlを混合して40℃で120分間酵素反応を行った後、ジニトロサリチル酸試薬（同試薬の組成は、3,5-ジニトロサリチル酸：1%、フェノール：0.2%、水酸化ナトリウム：1%、亜硫酸ナトリウム：0.05%）3mlを加えて沸騰浴中で5分間加熱して発色反応を行った。そして、40%ロツシエル塩水溶液1mlを加えてその反応を停止させ、水浴中で冷却した後に純水10mlを加え、575nmにおける吸光度を測定し、生じた還元糖をグルコースに換算して求めた。測定の繰り返しは2回とした。

なお、上記の0.5M緩衝液については、pH4.0とpH5.0には酢酸塩緩衝液を、pH6.0, pH7.1およびpH8.2にはリン酸塩緩衝液を、pH9.5とpH10.7には炭酸塩緩衝液を用いた。

基質にろ紙（ワットマンNo.1）³⁾を用いた場合には、上記の方法において、幅1cm、長さ6cmのろ紙（約50mg）に0.1M緩衝液（pH4.8, 6.0, 9.5）1.0mlと粗酵素液0.5ml（ブランクは純水0.5mlを使用）を加え、50℃で60分間酵素反応を行った後、吸光度測定前に加える純水を9.5mlに変更して還元糖を測定した。

なお、0.1M緩衝液については、pH4.8には酢酸塩緩衝液を、pH6.0にはリン酸塩緩衝液を、pH9.5には炭酸塩緩衝液を用いた。

酵素単位としては、各反応温度（40または50℃）における1時間の反応で1 μg のグルコースに相当する還元力を生成する酵素活性を1unitとした。また、酵素の比活性は、この酵素活性を2.8に示す方法で測定したタンパク質含量（g）で割って算出した。

2.8 粗酵素のタンパク質含量

粗酵素のタンパク質含量の測定は BIO-RAD 社製プロテインアッセイキット I を使用して行った。測定は繰り返して 2 回とした。

3. 結果と考察

3.1 ヒトヨタケ属の菌糸生長と培養温度

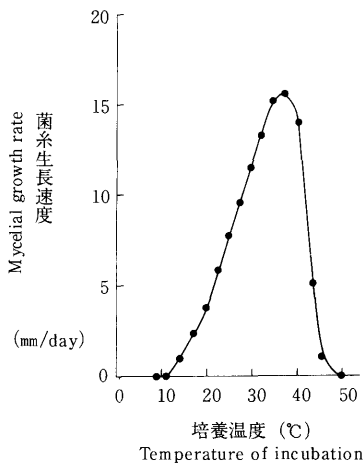
第 1 図に培養温度と Co 90-6 の菌糸生長速度の関係を示した。最大菌糸生長速度は 37℃ 付近にあり、Co 90-6 は高温性の担子菌であることが分かる。

シイタケなど、日本で人工栽培が行われている担子菌の最適培養温度は 25℃ 前後⁴⁾ である。また台湾などで栽培されているフクロタケの中には、菌糸の発育適温が 35℃ にあるものが知られている⁴⁾。

3.2 ヒトヨタケ属の菌糸生長と培地 pH

第 2 図に培地 pH と Co 90-6 の菌糸生長速度の関係を示した。最大菌糸生長速度は pH 10.8 付近にあり、Co 90-6 は好アルカリ性の担子菌であることが分かる。Co 90-6 に限らずヒトヨタケ属には、アルカリ環境を好む培養特性がみられる⁷⁾。

ちなみに、シイタケの菌糸生長最適 pH は 4.0 ~ 5.0^{4,5)}、その他の人工栽培が行われている担子菌の最適 pH についても pH 7 以下の酸性側にあるものが



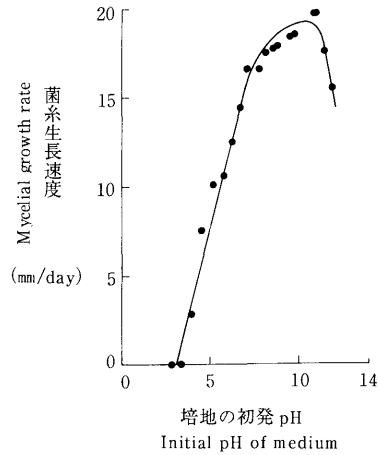
第 1 図 ヒトヨタケ属 (Co 90-6) の菌糸生長速度と温度の関係

Fig. 1. Relationship between mycelial growth rate of *Coprinus* sp. (Co 90-6) and temperature of incubation

ほとんどである⁴⁾。

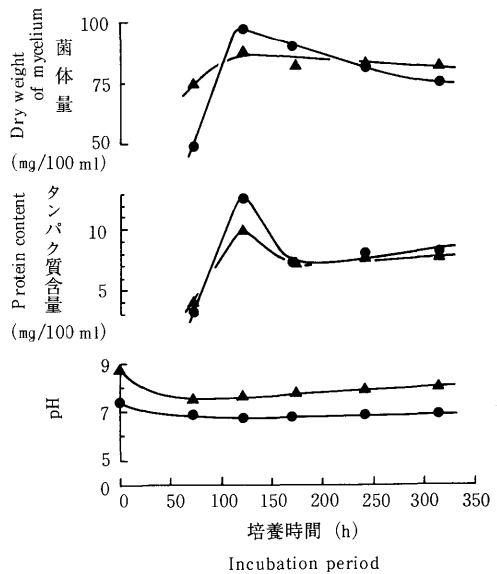
3.3 ヒトヨタケ属の液体培養

第 3 図に Co 90-6 の液体培養における菌体量、粗酵



第 2 図 Co 90-6 の菌糸生長速度と培地の初発 pH との関係

Fig. 2. Relationship between mycelial growth rate of Co 90-6 and initial pH of medium



第 3 図 Co 90-6 の振とう培養における菌体量、粗酵素液のタンパク質含量と pH の経時変化

Fig. 3. Lapse of dry weight of mycelium, protein content and pH in the crude enzyme solution of Co 90-6 on shaking culture

note : ●培地の初発 pH は 7.4, Initial pH of medium is 7.4
▲培地の初発 pH は 8.7, Initial pH of medium is 8.7

素液中のタンパク質含量，粗酵素液のpHについての経時変化をまとめて示した。液体培地の初発pHの値に関係なく菌体量と粗酵素液中のタンパク質含量は，120時間培養時に最大値を示した。その後，菌体量は徐々に減少したが，粗酵素液中のタンパク質含量は急激に減少した後に再度上昇した。こうした現象の原因としては，120時間培養後に菌体の自己溶解が始まったことで菌体量が徐々に減少し，この溶解した菌体成分と自己溶解酵素が粗酵素液に移り，粗酵素液中のタンパク質含量が150時間培養後に再び増加したと考察された。

菌体量は，初発pH7.4の培養液の方が初発pH8.7の培養液より大きかった。この結果は第2図に示した培地pHと菌糸生長速度の関係と一致しない。この原因は液体培養と固体培養の違い，菌体量と菌糸生長速度の違いなどによるものと思われる。

初発pH7.4の培養液における粗酵素液のpHの値は培養開始後低下し，120時間培養後はpH6.8前後を推移した。初発pH8.7の培養液における粗酵素液のpHの値は72時間培養後に7.5まで低下したが，以後上昇

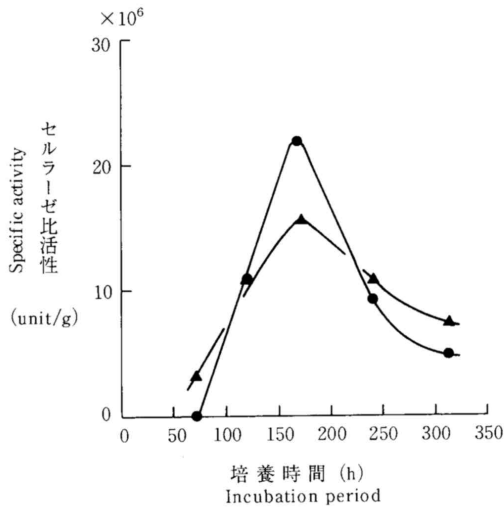
傾向を示し312時間培養後には8.0となった。こうした現象が生じた原因は不明であり，今後の検討が必要である。

3.4セルラーゼ活性の経時変化

第4図に経時的に得られた粗酵素液について，基質に CMC - Naを用いて測定したセルラーゼ比活性を示した。いずれの初発pHにおいても，168または171時間培養して得られた粗酵素液のセルラーゼ比活性が最大となり，以後活性は減少した。第3図に示すように菌体量と粗酵素液中のタンパク質含量は120時間培養時に最大値を示した。従って，粗酵素液のセルラーゼ比活性の経時変化は菌体量や粗酵素液中のタンパク質含量の経時変化と一致しなかった。

3.5pHとセルラーゼ比活性との関係

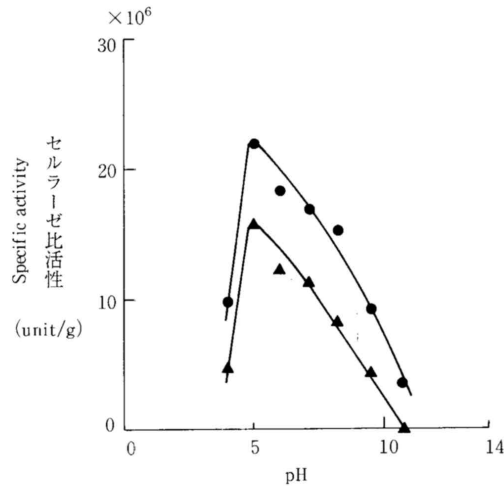
第5図には，168時間（培養液の初発pH7.4）または171時間（培養液の初発pH8.7）培養して調製した粗酵素液とCMC - Naを反応させた場合のセルラーゼ比活性と pHの関係を示した。いずれのpHにおけるセルラーゼ比活性も，培養液の初発pH7.4が培養液



第4図 Co 90-6の培養時間とセルラーゼ比活性 (CMCase) との関係

Fig. 4. Effect of incubation period of Co 90-6 on specific activity of the crude enzyme solution towards CMC-Na

Note : 記号の表示は第3図に同じ
The meaning of symbols are the same as in Fig. 3.



第5図 Co 90-6のセルラーゼ比活性 (CMCase) と pH との関係

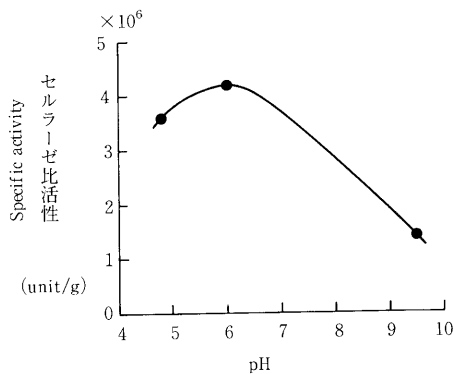
Fig. 5. Effect of pH on specific activity of the crude enzyme solution of Co 90-6 towards CMC-Na

Note : 反応条件 : 40℃, 2時間
Reaction condition : 40℃, 2 hours
記号の表示は第3図に同じ
The meaning of symbols are the same as in Fig. 3.

の初発 pH8.7より高かった。しかし、両者共に pH5.0においてセルラーゼ比活性が最大となった。比活性の最大値は、培地初発 pH7.4が 21.9×10^6 unit/g、培地初発 pH8.7が 15.6×10^6 unit/gであった。そして、pH4.0と9.5におけるセルラーゼ比活性は最大値の $\frac{1}{2}$ 以下に低下した。

3. 2に示したように、固体培地での最大菌糸生長速度が pH10.8で得られたことから、Co 90-6は好アルカリ性の担子菌と考察された。しかし、粗酵素液のセルラーゼ比活性は pH5.0において最大であり、pH10.8では最大値の $\frac{1}{6}$ 以下に低下している。さらに、いずれの pH で測定したセルラーゼ比活性値も、培地初発 pH8.7の粗酵素液が培地初発 pH7.4のものより小さいことから、Co 90-6のセルラーゼ活性は酸性の環境下で最大の能力を発揮することが観察された。

第6図には、168時間(培養液の初発 pH7.4)培養して調製した粗酵素液と濾紙を3種類の pH 下で反応させた場合のセルラーゼ比活性を示した。測定を行った3点の pH の中では、pH6.0における活性が最も高く 4.2×10^6 unit/gであった。pH9.5の比活性は最大活性の $\frac{1}{2}$ に減少した。基質に CMC-Na を用いて測定し



第6図 Co 90-6のセルラーゼ比活性(ろ紙崩壊)と pH との関係

Fig. 6. Effect of pH on specific activity of the crude enzyme solution of Co 90-6 towards filter paper

Note : 反応条件 : 50℃, 1時間

Reaction condition : 50℃, 1 hour

記号の表示は第3図に同じ

The meaning of symbols are the same as in Fig. 3.

たセルラーゼ比活性と同様に、アルカリ性よりも酸性の環境下でのセルラーゼ比活性が高いことが示された。

以上のように、培養特性とセルラーゼの特性が一致しない原因としては、培養特性の測定を菌の生長に十分な栄養が存在している栄養寒天培地を使用して行ったことと、セルラーゼは菌が生産した酵素の一つであり全ての酵素の特性を代表していないためであろうと考察された。

3.6 Co 90-6セルラーゼの性能評価

アルカリ性セルラーゼ生産菌として特許が取得されている *Streptomyces* sp. KSM-9 の粗酵素液は、基質を CMC とした pH9, 40℃の環境下において、1ℓ 当り1分間に450mgのブドウ糖に相当する還元糖の生成能力を有する⁶⁾。これに対して、Co 90-6の粗酵素液は、最大の活性を示した pH5の環境下においても1ℓ 当り1分間に27mgのブドウ糖に相当する還元糖しか生成せず、KSM-9の粗酵素液の約 $\frac{1}{17}$ の活性しかなかった。一方、同じようにセルラーゼ生産菌として特許が取得されている *Coprinus cinereus* KK-37M の粗酵素液は、基質をろ紙とした pH6.0, 50℃の環境下において最大の活性 1.4×10^6 unit/gを示すが、pH9.5における比活性値は最大活性値の約 $\frac{1}{10}$ に減少する⁷⁾。

Co 90-6と KK-37M の最大比活性値は、前者が粗酵素液の値 (4.2×10^6 unit/g)、後者が粗酵素の値 (1.4×10^6 unit/g) であるため、単純に比較できないが、数値の桁数が等しい点を考慮すると両者のセルラーゼ活性は同程度と考察される。

4. まとめ

堆肥化した稲わらに発生した、ヒトヨタケ属 HFP-Co 90-6 (*Coprinus radiatus* または *C. cinereus*) の培養特性の把握と同菌が生産するセルロース分解酵素の性能評価を行った結果、以下の点が明らかになった。

- (1) 固体培養の最大菌糸生長速度は、培養温度37℃、培地 pH10.8で得られた。従って、Co 90-6は高温、好アルカリ性の担子菌であることが分かった。

- (2) 液体培地を供試した振とう培養において、菌体生成量と粗酵素液中のタンパク質含量は、120時間培養時に最大となった。また、菌体量は、培養液の初発 pH がアルカリ性の8.7よりも中性に近い7.4の場合に大きかった。
- (3) 基質に CMC-Na を用いて測定したセルラーゼ比活性は、いずれの培地 pH においても約7日間の培養後に調製した粗酵素液を使用した時に最大となった。
- (4) 約7日間培養 (pH7.4において168時間、pH8.7において171時間) して調製した粗酵素液と CMC-Na とを、反応温度40℃、pH4.0~10.7で酵素反応させた結果、いずれの pH におけるセルラーゼ比活性も、培養液の初発 pH7.4の粗酵素が培養液の初発 pH8.7の粗酵素よりも高かった。また、両者共に pH5.0においてセルラーゼ比活性が最大となり、培地初発 pH7.4が 21.9×10^6 unit/g、同 pH8.7が 15.6×10^6 unit/gであった。
- (5) 7日間培養 (pH7.4において168時間) して調製した粗酵素液とろ紙とを、反応温度50℃、pH4.8、6.0および9.5で酵素反応をさせた結果、

pH6.0における活性が 4.2×10^6 unit/gと最も高く、pH9.5の比活性は最大活性の $\frac{1}{2}$ にとどまった。

文 献

- 1) S. T. Chang, T. H. Quimio: "Tropical Mushrooms", The Chinese University Press, P. 189 (1989)
- 2) 本郷次雄: 日本菌学会会報, 27, 211-219 (1986)
- 3) M. Mandels and D. Sternberg: *Journal of Fermentation Technology*, 547, 267-286 (1976)
- 4) 中村克哉: "キノコの事典", 朝倉書店, p.492, (1987)
- 5) 富樫 巖, 瀧澤南海雄: 林産試験場報, 7, 1, 1-4 (1993)
- 6) 岡本暉公彦, 中井良三, 佐藤朋一: 特公平4-64675
- 7) 松浦勝, 川合源四郎: 特公昭60-24710 (1985)

—きのこ部 生産技術科—

—*きのこ部 品種開発科—

(原稿受理 H 5 . 3 .31)