

褐色腐朽菌オオウズラタケのセルラーゼ, ヘミセルラーゼ生産のための培養条件

石原光朗⁽¹⁾・志水一允⁽²⁾

Mitsuro ISHIHARA⁽¹⁾ and Kazumasa SHIMIZU⁽²⁾: Cultural Conditions
for the Production of Cellulase and Hemicellulose by the
Brown Rotting Fungus, *Tyromyces palustris*

要 旨: 褐色腐朽菌オオウズラタケ (*Tyromyces palustris*) の多糖類加水分解酵素の生産を目的として、液体培養および固型培養によるその生産条件を検討し、以下の結果を得た。液体培養においてCx-セルラーゼやヘミセルラーゼの生産性を高めるためには、培地のpHを2.0以上に制御することが必要であった。 β -グルコシダーゼは培養方式に関係なく、また低いpH条件下でも一定のレベルで産生された。C₁-セルラーゼは培地の結晶セルロースが分解され、利用されている固型培養によっても、液体培養からと同様、産生されなかった。この事実は、オオウズラタケの生菌レベルの結晶セルロースの分解に非酵素的因子の関与している可能性を示唆した。

目 次

| | |
|-----------------------------------|-----|
| 1. 緒 言 | 153 |
| 2. 実 験 | 154 |
| 2.1 供 試 菌 | 154 |
| 2.2 液 体 培 養 法 | 154 |
| 2.3 固 型 培 養 法 | 154 |
| 2.4 粗 酵 素 の 調 製 | 154 |
| 2.5 ヘミセルラーゼ基質の調製 | 155 |
| 2.6 酵素活性の測定 | 155 |
| 2.7 SDS ポリアクリルアミドゲル・スラブ電気泳動 | 155 |
| 2.8 オオウズラタケ粗酵素によるカラマツホロセルロースの加水分解 | 155 |
| 3. 結 果 と 考 察 | 155 |
| 3.1 好気的な液体培養によるセルラーゼ、ヘミセルラーゼの生産 | 155 |
| 3.2 固型培養によるセルラーゼ、ヘミセルラーゼの生産 | 160 |
| 4. 結 言 | 162 |
| 謝 辞 | 162 |
| 引 用 文 献 | 162 |
| Summary | 164 |

1. 緒 言

近年、微生物やその産生する酵素を活用した生化学的プロセスによって、残廃材、モミガラ、バガスな

どリグノセルロース資源を食飼料、化学工業原料、エネルギー等へ変換することに関心もたれるようになった^{17)~19)}。リグノセルロースの加水分解工程では、高活性で安価なセルラーゼ、ヘミセルラーゼなどの多糖類加水分解酵素が大量に必要である。現在、高活性のセルラーゼが *Trichoderma* 属、*Aspergillus* 属、*Irpex lacteus* 等から工業的に生産され、実用化に近い段階にあるが、より強力で熱的に安定なセルラーゼを産生する微生物の探索、改良が積極的に推進されている。天然界で木材を分解する微生物群は木材腐朽菌と呼ばれ、腐朽のタイプにより白色腐朽菌、褐色腐朽菌および軟腐朽菌に分類される。これまでに、白色腐朽菌の産生するセルラーゼ、ヘミセルラーゼ成分についてはかなり詳細に検討されてきたが^{18)~19)}、褐色腐朽菌や軟腐朽菌に関しての研究はきわめて少ない。

褐色腐朽菌による木材の腐朽にはつぎのような興味深い特徴がある²⁰⁾。

(1) リグニンにおおわれた木材細胞壁中の多糖類成分を選択的に分解し、リグニンを腐朽材に集積する。

(2) 腐朽初期の段階で、木材多糖(セルロース)の重合度を急激に低下させ、腐朽の進行とともに結晶領域のセルロースも次第に分解する。

本研究では褐色腐朽菌オオウズラタケの産生する多糖類加水分解酵素と培養条件の関係を明らかにし、褐色腐朽菌のセルラーゼ、ヘミセルラーゼ生産のための基礎資料を得ることを目的とした。

2. 実 験

2.1 供 試 菌

オオウズラタケ *Tyromyces palustris* (BERK. et CURT.) MURR. 林試 0507 を使用した。

2.2 液体培養法

20 l の培地を含むジャー・フェーマンター(丸菱理化社 MSJ-U 30 L, 総容量 30 l) に、振盪フラスコで約一週間増殖させたオオウズラタケを接種し、6~11 日間、26~27°C で好氣的に培養した。基本的な培地は水道水 1 l あたり、グルコース 20 g, ペプトン 10 g, イーストエキス 1 g, ブナ KP 5 g, KH_2PO_4 1 g, Na_2HPO_4 100 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500 mg, CaCl_2 10 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mg および $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2 mg から構成されており、滅菌後に初発 pH を 5.0 に調整した。オオウズラタケはグルコースを含む培地ではシュウ酸を集積し、pH を極端に低下させるので、培養によっては 1 N NaOH の滴下により pH の制御を試みた。

2.3 固型培養法

固型培養法については前報²⁰⁾に記述した。

2.4 粗酵素の調製

粗酵素の調製操作は低温室内(5°C)で行った。液体培養では、培養終了後、まず母液と菌体に分別し、菌体は 5 l の 1/10 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0) を使用してホモジナイザーで磨砕し、菌体内酵素を抽出した。固型培養では、7.5 l の 1/10 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 3.8) を使用してブロック状の培地をホモジナイザーで磨砕し、培地中に生産された酵素を抽出した。液体培養からの培養母液と菌体内酵素抽出液、および固型培養からの酵素抽出液をそれぞれ硫酸アンモニウムで 90% 飽和にし、一晚放置後、遠心分離により沈澱部を回収した。沈澱を少量の水に溶解しウシ膀胱膜中に入れて、透析外液に硫酸イオンが検出されなくなるまで、脱イオン水に対して透析を続けた。脱塩された粗酵

素液の不溶部を遠心分離で除去した後、ホローファイバー (アミコン社, U. S. A., 分画分子量 5,000) を用いて濃縮した。濃縮された粗酵素液を凍結乾燥し、乾燥粉末として、液体培養からの菌体外粗酵素と菌体内粗酵素および固型培養からの粗酵素をそれぞれ得た。

2.5 ヘミセルラーゼ基質の調製

キシランはシラカンバ (*Betula platyphylla*) から、グルコマンナンはカラマツ (*Larix leptolepis*) からそれぞれ単離した²¹⁾²²⁾。キシランおよびグルコマンナンは微酸性の緩衝液に溶解しないので、以下の方法により 0.5% 基質溶液を調製した。キシランは、0.5 g を 40 ml の水に懸濁させ、沸騰浴で 15 分間加熱し、透明な溶液とした後に 0.166 M の酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) で全量を 100 ml とした。グルコマンナンの場合は、0.5 g を予め 3/10 N NaOH (20 ml) に溶解させ、0.125 M 酢酸で全量を 100 ml とした。

2.6 酵素活性の測定

Cx-セルラーゼ、キシラナーゼ、マンナーゼおよび β -グルコシダーゼは、カルボキシメチルセルロース (CMC, 和光純薬, 置換度: 0.53), キシラン, グルコマンナンおよび *p*-ニトロフェニル- β -D-グルコシッド (半井化学) をそれぞれ基質とし、0.5% 基質 (pH 5.0) 2 ml に適当な濃度の酵素液 1/2 ml を加え、40°C で 10~30 分間インキュベーションした後、生成した還元糖を Somogyi-Nelson 法²³⁾ で定量した。Cx-セルラーゼ活性は、L 字試験管に濾紙 (東洋濾紙 No. 51) 10 mg, 粗酵素 10 mg, M/10 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 10 ml を入れ、モノの振盪機で 40°C, 24 h インキュベートした。反応後、濾液中の還元糖を Somogyi-Nelson 法で定量した。酵素の活性単位は、40°C, 30 分間のインキュベーションで 1 μ モルの単糖を生成する酵素量を 1 単位と定義した。

2.7 SDS ポリアクリルアミドゲル・スラブ電気泳動

オオズラタケ粗酵素成分の分子量の分析のため、スラブ電気泳動装置 (アトー社, SJ-1060・SDH 型) により 0.1% のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む 10% のポリアクリルアミドゲル, トリス-グリシン緩衝液 (pH 8.3) を用いて電気泳動を行った。蛋白の染色には 7% 酢酸に溶解した 1% アミドブラック液を使用し、7% 酢酸で脱色した。

2.8 オオズラタケ粗酵素によるカラマツホロセルロースの加水分解

酵素加水分解は、L 字試験管にカラマツホロセルロース 200 mg, 粗酵素 50 mg, M/10 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 10 ml を入れ、モノの振盪機で 40°C, 48 h インキュベートすることにより行った。反応後、G4 のガラスフィルターで加水分解液と未分解残渣に分別し、カラマツホロセルロースの重量減から加水分解率を求めた。加水分解液の糖組成分析は前報²⁰⁾の方法に従って分析した。

3. 結果と考察

3.1 好氣的な液体培養によるセルラーゼ、ヘミセルラーゼの生産

オオズラタケのセルラーゼ、ヘミセルラーゼの生産に及ぼす主要な因子として、培養期間、炭素源の種類と濃度、インデューサー、培地の pH 条件等が考えられる。そこで、基本的な液体培養のモデルとして、培養日数: 10 日間, 炭素源: グルコース 2%, インデューサー: プナ KP 0.5%, および培地の pH 条件として、初発 pH: 5.0, 最低 (制御) pH: 2.0 を設定し、それらの因子を変動させることにより、合計 8 回の培養を試みた。とくに、培地の pH は最も重要な因子と考えられ、制御条件を詳細に検

討した。

合計 8 回の培養の諸条件と得られた菌体外、菌体内粗酵素の収量を Table 1 に示した。褐色腐朽菌は、グルコースを含む培地ではその代謝物としてシュウ酸を集積するので²⁴⁾、培地の pH を制御しない場合 (培養 No. 1 と 2) は、pH が 1.4~1.5 にまで極端に低下した。培養 No. 3~8 では、アルカリを添加することにより最低 pH が 2.0~2.95 の範囲の 所定の値より 低下しないようにそれぞれ制御した。菌体外および菌体内粗酵素の収量から、好気的な液体培養でオオウズラタケは産生した酵素の大半を菌体外に分泌していることが認められた。粗酵素の収量および培地の炭水化物あたりの粗酵素の収率は、pH を制御した培養では制御しなかった場合に比べて飛躍的に向上したが、制御の最低 pH の値 (2.0~2.95) の間ではとくに差違はなかった。

試みた 8 回の培養の中で、培養経過を示す代表例として培養 No. 2, 7 および 8 (Table 1 参照) の培地の糖濃度と pH の変化、培養液中に見出された酵素量の変化をそれぞれ Figs. 1~3 に示した。いずれの培養においても、オオウズラタケはグルコース (またはキシロース) を短期間に消費して増殖した。糖の代謝によりシュウ酸が培地に集積され pH は低下したが、pH を制御しなかった培養 (Fig. 1) では、最低 pH は 1.4 にまで低下した。pH の戻りは、低いグルコース濃度での培養 (Fig. 3) を除いて緩やか

Table 1. 種々の液体培養条件下で得られたオオウズラタケの粗酵素の収量
Yield of crude enzymes from various submerged cultures
of *T. palustris*.

| No. of culture | Culture period (days) | Culture medium | | | pH condition | | Yield of crude enzyme (mg) | Yield of crude enzyme per carbohydrate used (%) |
|----------------|-----------------------|----------------|--------------------------|----------------|--------------------|----------|-----------------------------|---|
| | | Carbon source | Inducer | Inorganic salt | Lowest pH | Final pH | | |
| 1 | 6 | 2% Glc | 0.5% Hardwood meal | | 1.50 ^{b)} | 1.80 | Extra* 1,612 Intra** 344 | 0.4 |
| 2 | 11 | 2% Glc | 0.5% Buna KP | | 1.40 ^{b)} | 2.15 | Extra 3,225 Intra 378 | 0.7 |
| 3 | 10 | 2% Glc | 0.5% Buna KP | | 2.00 | 3.25 | Extra 12,307 Intra 396 | 2.5 |
| 4 | 10 | 2% Glc | 0.5% Buna holo-cellulose | | 2.00 | 3.10 | Extra 14,307 Intra 563 | 3.0 |
| 5 | 9 | 2% Glc | 0.5% Buna KP | | 2.95 | 3.05 | Extra 14,410 Intra 1,382 | 3.2 |
| 6 | 9 | 2% Glc | 0.5% Buna KP | | 2.30 | 3.25 | Extra 8,224 Intra 1,100 | 1.9 |
| 7 | 10 | 2% Xyl | 0.75% Buna KP | a) | 2.00 | 2.90 | Extra 24,350 Intra 1,722 | 4.6 |
| 8 | 8 | 0.5% Glc | 0.75% Buna KP | a) | 2.75 | 4.10 | Extra 6,159 Intra 1,677 | 3.1 |

* Extracellular crude enzyme, ** Intracellular crude enzyme.

a) CaCl₂ (6g/20liter) and CoCl₂ (40mg/20liter) were added to the basal medium.

b) The pH of the culture medium was not cotrolled.

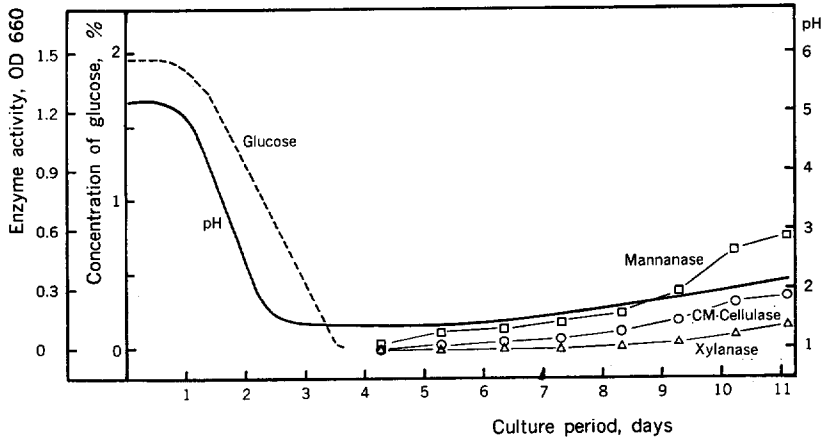


Fig. 1. オオズラタケの液体培養 (No. 2) における酵素の生成と培地の pH 変化

Enzyme production and pH change of culture medium in submerged culture (No. 2) of *T. palustris*.

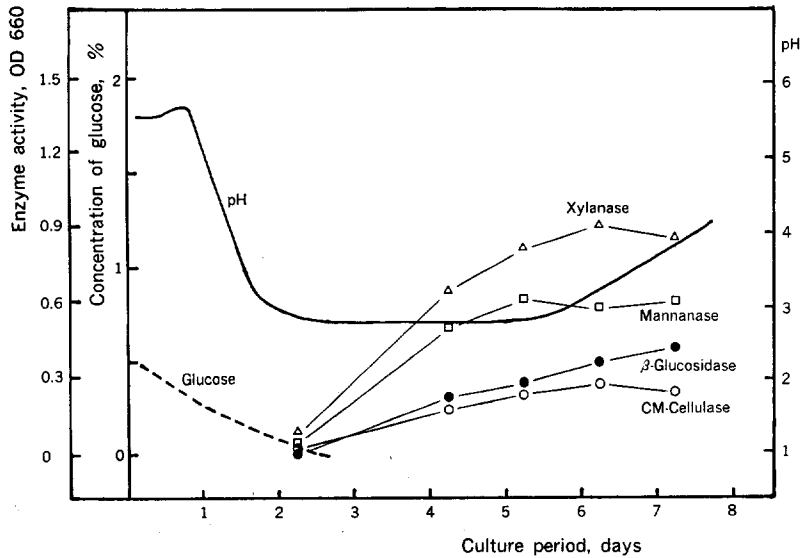


Fig. 2. オオズラタケの液体培養 (No. 7) における酵素の生成と培地の pH 変化

Enzyme production and pH change of culture medium in submerged culture (No. 7) of *T. palustris*.

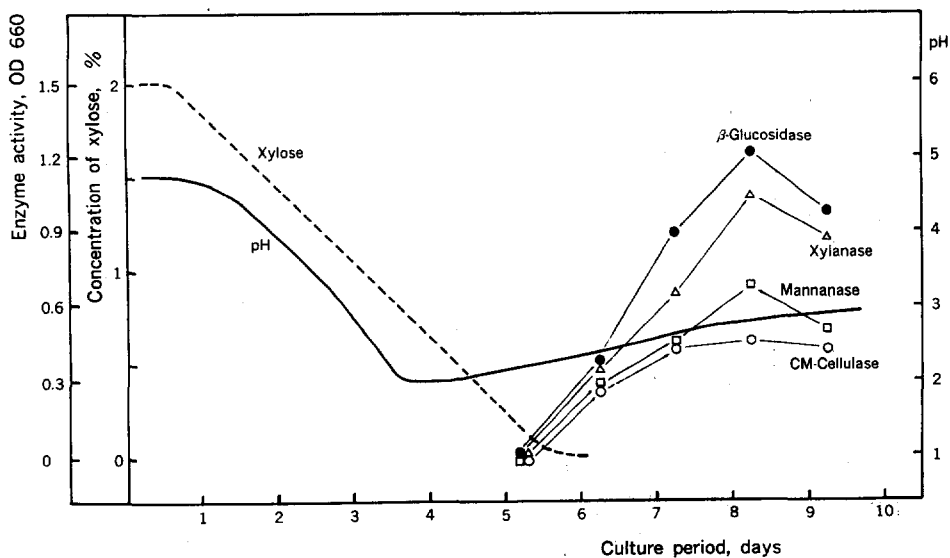


Fig. 3. オオウズラタケの液体培養 (No. 8) における酵素の生成と培地の pH 変化

Enzyme production and pH change of culture medium in submerged culture (No. 8) of *T. palustris*.

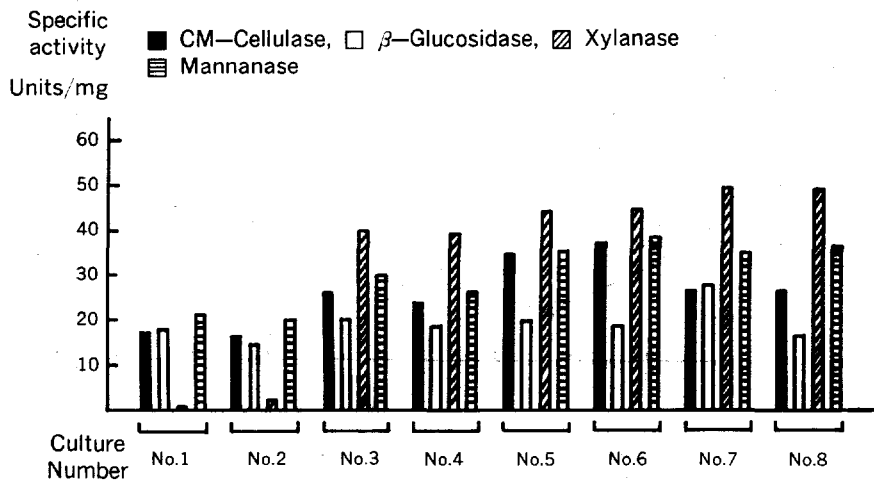


Fig. 4. オオウズラタケの液体培養から得られた菌体外粗酵素の比酵素活性

Specific enzyme activity of extracellular crude enzymes from submerged culture of *T. palustris*

であった。グルコースの代わりにキシロースを炭素源として用いた場合 (Fig. 2), その取込速度がグルコースより遅く, pH の制御が容易となり, また粗酵素の収量もグルコースの場合より増加した。セルラーゼ, ヘミセルラーゼおよび β -グルコシダーゼは単糖が完全に消費されて初めて汚液中に出現し, それらの酵素の相対的な濃度は培養日数が経過しても出現期からほとんど変化しないことが認められた。したがって, 酵素の誘導, 生産にあたって, 培養の初期条件がとくに重要であると考えられる。

種々の培養条件で得られた菌体外粗酵素の比活性 (粗酵素 1 mg あたりの酵素活性) を Fig. 4 に示した。培地の pH を制御しなかった培養 (No. 1 と 2) では, Cx-セルラーゼ, キシラナーゼ, マンナーゼの酵素活性が制御を試みた場合に比べて低い値であった。特にキシラナーゼの活性は著しく抑えられた。極端に低い pH 条件の下では, 木材の多糖成分の分解に関する酵素系の産生が抑制されるか, あるいは産生されてもそれらの一部が pH 条件のために失活するものと思われる。 β -グルコシダーゼは, 培地の pH 条件に関係なくほぼ一定のレベルにあり, グルコースの代わりにキシロースを炭素源とした場合 (No. 7) のみ, 50% 程度増加が認められた。トリコデルマ属の液体培養では, 低い pH でセルラーゼが安定であるのに対して, β -グルコシダーゼは pH 3.0 以下の条件で特異的に産生の抑制を受けるかまたは失活すると報告されている²⁵⁾。オオズラタケの場合, トリコデルマ属とは対照的に β -グルコシダーゼは低い pH 条件でも一定のレベルで産生されたが, キシラナーゼが pH 条件に最も鋭敏であり, 培地の pH を制御することによりその生産性が著しく改善された。C₁-セルラーゼについては, すべての菌体外粗酵素が Cx-セルラーゼやヘミセルラーゼと比較して極端に低い活性レベルにあった。培養 No. 7 と 8 では, オオズラタケのセルラーゼ生産に及ぼすグルコース阻害を考慮して, 培地の炭素源であるグルコースをキシロースに代替するか (No. 7) またはグルコース濃度を低下させ (No. 8), さらにトリコデルマ属のセルラーゼの生産に有効であると報告されている塩化コバルトと塩化カルシウム²⁶⁾を無機塩類として培地に加えたが, それらの効果は C₁-セルラーゼ, Cx-セルラーゼともに認められなかった。

オオズラタケの液体培養から得られた各菌体外粗酵素の SDS ポリアクリルアミドゲル・スラブ電気泳動の結果を Fig. 5 に示した。分離ゲル (図のフレーム) の上端がマイナス, 下端がプラスの電極であり, 各粗酵素試料は電気泳動により濃縮ゲルで濃縮された後, 上方から下方へ移動した。標準蛋白質の移動位置から, オオズラタケの菌体外粗酵素は 10 数万から 1 万までの幅広い分子量域で数多くの蛋白から構成されていることが認められた。また, 各粗酵素間で蛋白ゾーンの濃淡の差はみられるが, 構成につ

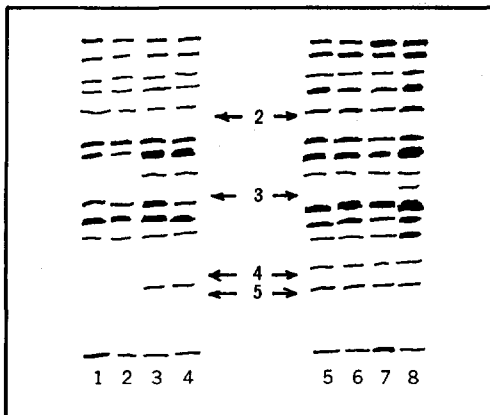


Fig. 5. 好気的な液体培養からのオオズラタケ菌体外粗酵素の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the extracellular crude enzymes from the aerated submerged cultures of *T. palustris*.

Tracks 1~8 contain the crude enzyme from the culture of experimental number corresponding to the track number (see Table 1). Arrows 2~5 show the migration position of standard proteins; 2: Bovine serumalbumin (67,000), 3: Ovalbumin (45,000), 4: Myoglobin (17,800), 5: Cytochrome C (12,400).

いては類似していた。

3.2 固型培養によるセルラーゼ、ヘミセルラーゼの生産

前報²⁰⁾で、オオズラタケによるシラカンバおよびカラマツの腐朽で重量減が 20% を越す段階から、腐朽材ホロセルロースの結晶化度が低下し始め、腐朽がさらに進んだ段階でセルロースの結晶部分も次第に分解を受けることを述べた。しかしながら、オオズラタケの液体培養で、Cx-セルラーゼやヘミセルラーゼは菌体外粗酵素に見出されたが、結晶性セルロースに作用する C₁-セルラーゼは、事実上、産生されなかった。そこで、天然界での腐朽条件に近いと考えられる固型培養によってオオズラタケから C₁-セルラーゼが産生されるのか否か、また固型培養の培養期間を長くすることによって C₁-セルラーゼ成分が増加するのか否か関心が持たれた。

オオズラタケの固型培養での、培養函あたりの粗酵素の収量および蒸煮シラカンバ材の組成変化に及ぼす培養期間の影響を Table 2 に示した。広葉樹材の水蒸気による蒸煮処理は多糖成分の加水分解酵素に対する反応性を著しく改善するが²⁷⁾、蒸煮、解繊後、可溶化したヘミセルロースを水で抽出した残渣を唯一の炭素源とする固型培養によってオオズラタケはよく増殖し、培養の経過とともに固型培地は菌糸体に完全に被われたブロックとなり、9 週間の培養で蒸煮シラカンバ材の見掛けの 58% を消費した。Table 2 の重量減、ホロセルロース含量およびクラソン・リグニン含量については、培養残渣に含まれているオオズラタケ菌糸体の重量を補正しなかった。オオズラタケの産生する加水分解酵素の等電点は、いずれも 3.5 付近に偏っているので²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾、酵素の培地への吸着を最少限に抑えるため、酵素の抽出には pH 3.8 の緩衝液を使用した。固型培養による粗酵素の収量は、培養期間 38 日で最高となり、セルロースの結晶部分の分解が進行しているとみられる培養期間 49~63 日では、かなり低下した。

オオズラタケの固型培養から得られた各粗酵素の Cx-セルラーゼ、β-グルコシダーゼ、ヘミセルラーゼの比活性を Fig. 6 に、C₁-セルラーゼ活性を Table 3 に示した。各粗酵素を沱紙に作用させた場合、基質：酵素の比率が 1 にもかかわらず沱紙の分解率は非晶部分の選択的分解とみられる 6% 前後の低い水準にとどまり、培養期間を長くしても C₁-セルラーゼの産生は認められなかった。Cx-セルラーゼ、β-グルコシダーゼ、ヘミセルラーゼも培養期間によって変化せず、それぞれ一定の比活性を示したが、液体培養からの粗酵素と比較して、Cx-セルラーゼの比活性は特異的に向上した (Fig. 4 参照)。Cx-セルラーゼの比率が高くなった理由については、液体培養でグルコース濃度を抑えても Cx-セルラーゼの比活性

Table 2. オオズラタケの固型培養における粗酵素の収量および蒸煮シラカンバ材の組成変化に及ぼす培養期間の影響
Effect of culture period on yield of crude enzymes and compositional change of steamed shirakamba wood in a solid state culture of *T. palustris*.

| Culture period (days) | Yield of crude enzyme (mg) | Weight loss by decay (%) | Holocellulose content (%) | Klason lignin content (%) |
|-----------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 0 | — | 0.0 | 73.4 | 26.7 |
| 13 | 620.7 | 25.7 | 55.6 | 41.2 |
| 25 | 795.4 | 32.3 | 50.9 | 44.8 |
| 38 | 832.9 | 37.8 | 46.2 | 49.3 |
| 49 | 541.1 | 45.8 | 38.3 | 56.1 |
| 63 | 457.7 | 58.0 | 28.6 | 66.8 |

の向上がとくに認められなかったことから、培地の炭素源組成で単糖類を含有するか否かの因子よりも、むしろ培養方式の相違によるものと考えられる。

カラマツホロセルロースを基質として、固型培養からの粗酵素によってカラマツの多糖成分(セルロース, キシラン, グルコマンナン)がどの程度に加水分解されるのか検討した結果を Table 4 に示した。加水分解液中のグルコースの一部はグルコマンナンの分解に由来するとして計算した^{a)}。カラマツホロセルロースの加水分解率は、液体培養からの粗酵素と同様、18~24%であり、各多糖成分の分解率はセルロースが1~3%, キシランが70~100%, グルコマンナンが40~60%であると推定され、ヘミセルラーゼに関する限りオオウズラタケは培養方式に関係なくヘミセルロース成分を糖化するのに十分な活性単位を産生したと考えられる。生菌レベルにおいて、セルロース、とくに結晶部分はヘミセルロース成分よりも遅れて分解を受けることが認められたが、長期間の培養によ

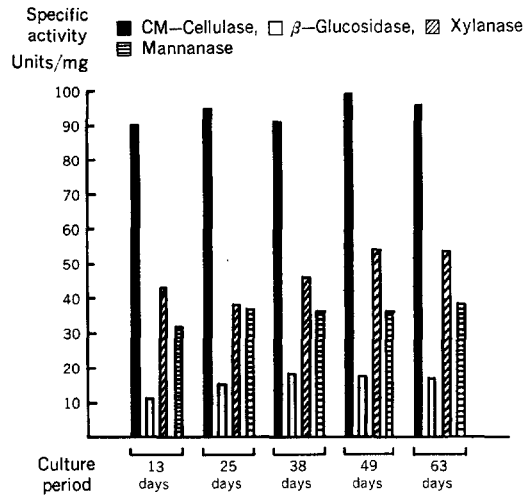


Fig. 6. オオウズラタケの固型培養から得られた粗酵素の比酵素活性
Specific enzyme activity of crude enzymes from solid state culture of *T. palustris*.

Table 3. オオウズラタケの固型培養から得られた粗酵素の C₁-セルラーゼ活性
C₁-Cellulase activity of crude enzymes from solid state culture of *T. palustris*.

| Culture period (days) | Hydrolysis rate of filter paper (%) | Specific activity (units/mg) |
|-----------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| 25 | 5.7 | 0.0103 |
| 38 | 6.8 | 0.0126 |
| 49 | 5.9 | 0.0103 |
| 63 | 5.8 | 0.0110 |

Table 4. 固型培養からのオオウズラタケの粗酵素によるカラマツホロセルロースの加水分解

Hydrolysis of karamtsu holocellulose with crude enzymes from a solid state culture of *T. palustris*.

| Culture period (days) | Hydrolysis rate (%) | Sugar composition of hydrolyzate | | | | | Estimated decomposition rate ^{a)} | | |
|-----------------------|---------------------|----------------------------------|---------|---------|---------|---------|--|-----------|----------------|
| | | Man (%) | Ara (%) | Gal (%) | Xyl (%) | Glc (%) | Cellulose (%) | Xylan (%) | Glucmannan (%) |
| 25 | 18.2 | 38.9 | 5.3 | 4.6 | 25.3 | 25.9 | 3.2 | 71.9 | 39.8 |
| 38 | 23.3 | 44.2 | 2.2 | 5.7 | 26.5 | 21.4 | 2.1 | 96.5 | 57.9 |
| 49 | 23.9 | 46.0 | 3.1 | 6.1 | 26.4 | 18.4 | 1.0 | 98.6 | 61.8 |
| 63 | 23.9 | 45.0 | 3.1 | 6.4 | 22.9 | 22.6 | 2.5 | 85.5 | 60.4 |
| Liquid culture No. 3 | 22.7 | 46.3 | 2.7 | 4.8 | 20.6 | 25.7 | 3.4 | 73.1 | 59.1 |

a) Based on the assumption that glucomannan is β -(1 \rightarrow 4)-linked linear polymer consisting of D-glucose and D-mannose residues in a molar ratio of 1:3.

て得られた粗酵素でもセルロースの分解率の向上は認められなかった。また、固型培養からの粗酵素の Cx-セルラーゼ成分の比率は液体培養からの粗酵素よりも2～3倍高くなったが、セルロースの分解率は全く改善されず、オオウズラタケの粗酵素に C₁-セルラーゼが欠如することを示唆した。

オオウズラタケの粗酵素の汚紙に対する作用やカラマツホロセルロースの酵素分解の結果から、オオウズラタケの産生する加水分解酵素系には C₁成分が欠如し、褐色腐朽菌の生菌レベルでの結晶セルロースの分解には、菌体外の H₂O₂/Fe²⁺系による酸化作用^{81)~83)}や炭水化物酸化酵素の作用から生成する活性酸素種または・OHラジカルによる酸化作用⁸⁴⁾など非酵素的因子の関与している可能性が考えられる。

4. 結 言

9～14週間の実験室レベルの腐朽で針葉樹材、広葉樹材ともに、50%以上の重量減を起こす褐色腐朽菌オオウズラタケからセルラーゼ、ヘミセルラーゼを生産するための培養条件を検討した。炭素源としてグルコースやキシロースを含む液体培養では、糖の代謝によりシュウ酸が培地に集積されたので、Cx-セルラーゼやヘミセルラーゼの生産性の改善のためには培地のpHを少なくとも2.0以上に制御することが必要であった。β-グルコシダーゼは培養方式に関係なく、また極端に低いpH条件下でも一定のレベルで産生された。液体培養によってC₁-セルラーゼが得られなかったので、自然界での腐朽条件に近いと考えられる固型培養法によってC₁-セルラーゼの生産を試みたが、固型培養からの粗酵素にはCx-セルラーゼ成分の比率の向上が認められたが、液体培養からの粗酵素と同様、C₁-セルラーゼを欠如していた。

謝 辞

本研究にあたり、終始ご指導と激励を賜った石原達夫林産化学部第三科長に深謝致します。また、本実験に協力して下さいた瀬谷聡子氏に謝意を表します。

本研究は農林水産省のバイオマス変換計画の一部として行われた。(BCP 84-V-1-12)

引 用 文 献

- 1) Su, T. M. : Bioconversion of plant biomass to ethanol, AICHE Sym. Ser., **74**, 75~78, (1978)
- 2) BERNHARDT, W., MENRAD, H. and KÖNIG, A. : Ethanol aus Biomasse als zukünftiger Kraftstoff für Automobile, *Staerke*, **31**, 254~259, (1979)
- 3) LADISCH, M., FLICKINGER, M. C. and TSAO, G. T. : Fuels and chemicals from biomass, *Energy*, **4**, 263~275, (1979)
- 4) 石原達夫 : 残廃材からの微生物蛋白の生産, *木材工業*, **34**, 192~197, (1979)
- 5) WEISS, D. E. : Energy from biomass, *Appita*, **33**, 101~110, (1979)
- 6) SEIDL, R. J. : Energy from wood : a new dimension in utilization, *Tappi*, **63**, 26~29, (1980)
- 7) SHIBB, C-H., BARNETT, S. M. and HIRA, A. U. : Production of enzymes and single cell protein from rice hulls, *Food Process Eng.*, **2**, 289~294, (1980)
- 8) 田中三男 : セルロース性資源の再利用, *醸酵工学*, **58**, 145~155, (1980)
- 9) HUFF, G. F. : Ethanol from biomass, *Altern. Energy Sources Part A*, 331~353, (1981)
- 10) 越島哲夫 : 木材の酵素加水分解とその前処理, *木材研究*, **16**, 16~25, (1981)
- 11) GARG, S. K. and NEELAKANTAN, S. : Bioconversion of sugar cane bagasse for cellulase enzyme and microbial protein production, *J. Food Technol.*, **17**, 271~279, (1982)
- 12) 志水一允 : 木質系資源の酵素糖化による総合利用, *化学工学*, **47**, 296~300, (1983)

- 13) ERIKSSON, K-E. and PETTERSSON, B. : Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose I. Separation, purification and physico-chemical characterization of five endo-1,4- β -glucanases, *Eur. J. Biochem.*, **51**, 193~206, (1975)
- 14) ERIKSSON, K-E. and PETTERSSON, B. : Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. III. Purification and physico-chemical characterization of an exo-1,4- β -glucanase, *ibid.*, **51**, 213~218, (1975)
- 15) STREAMER, M., ERIKSSON, K-E. and PETTERSSON, B. : Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignolum*) for the breakdown of cellulose. IV. Functional characterization of five endo-1,4- β -glucanases and one exo-1,4- β -glucanase, *ibid.*, **59**, 607~613, (1975)
- 16) KANDA, T., WAKABAYASHI, K. and NISIZAWA, K. : Purification and properties of an endo-cellulase of avicelase type from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*), *J. Biochem.*, **79**, 977~988, (1976)
- 17) KANDA, T., WAKABAYASHI, K. and NISIZAWA, K. : Xylanase activity of an endo-cellulase of carboxymethyl-cellulase type from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*), *ibid.*, **79**, 989~995, (1976)
- 18) KANDA, T., WAKABAYASHI, K. and NISIZAWA, K. : Synergistic action of two different types of endo cellulase components from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) in the hydrolysis of some insoluble celluloses, *ibid.*, **79**, 997~1006, (1976)
- 19) DESHPANDE, V., ERIKSSON, K-E. and PETTERSSON, B. : Production, purification and partial characterization of 1,4- β -glucosidase enzymes from *Sporotrichum pulverulentum*, *Eur. J. Biochem.*, **90**, 191~198, (1978)
- 20) 石原光朗・志水一允 : オオウズラタケによる褐色朽の化学的特性, *林試研報*, **330**, 141~152, (1984)
- 21) ISHIHARA, M., SHIMIZU, K. and ISHIHARA, T. : Purification and enzymatic properties of intracellular xylanase from the mycelium of brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*, *Mokuzai Gakkaishi*, **21**, 680~685, (1975)
- 22) ISHIHARA, M. and SHIMIZU, K. : Hemicellulases of brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*. IV. Purification and some properties of an extracellular mannanase, *ibid.*, **26**, 811~818 (1980)
- 23) SOMOGYI, M. : Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19~23, (1952)
- 24) 島圃平雄・田窪健次郎 : 木材腐朽菌の生化学, 第1報, Bavendamm 氏反応と蔞酸集積, *林試研報*, **53**, 117~125, (1952)
- 25) STERNBERG, D. : Production of cellulase by *Trichoderma*, *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*, **6**, 35~53, (1976)
- 26) MANDELS, M. and REESE, E. T. : Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals, *J. Bacteriol.*, **73**, 269~278, (1957)
- 27) SHIMIZU, K., SUDO, K., NAGASAWA, S. and ISHIHARA, M. : Enzymatic hydrolysis of woods. VII. Enzymatic susceptibility of autohydrolyzed woods, *Mokuzai Gakkaishi*, **29**, 428~437, (1983)
- 28) ISHIHARA, M., SHIMIZU, K. and ISHIHARA, T. : Hemicellulases of brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*. III. Partial purification and mode of action of an extracellular xylanase, *ibid.*, **24**, 108~115, (1978)
- 29) ISHIHARA, M. and SHIMIZU, K. : Hemicellulases of the brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*. VI. Purification and some properties of an extracellular β -D-xylosidase and β -D-

- glucosidase complex, *ibid.*, **29**, 315~323, (1983)
- 30) ISHIHARA, M. and SHIMIZU, K. : Purification and properties of two extracellular endo-cellulases from the brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*, *ibid.*, **30**, 79~87, (1984)
 - 31) KOENIGS, J. W. : Production of extracellular hydrogen peroxide and peroxidase by brown-rotting fungi, *Phytopathology*, **62**, 100~110, (1972)
 - 32) KOENIGS, J. W. : Production of hydrogen peroxide by wood-decaying fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization and pH changes, *Arch. Microbiol.*, **99**, 129~145, (1974)
 - 33) KOENIGS, J. W. : Hydrogen peroxide and iron : A proposed system for decomposition of wood by brown-rot basidiomycetes, *Wood and Fiber*, **6**, 66~79, (1974)
 - 34) HIGLEY, T. L. : Is extracellular hydrogen peroxide involved in cellulose degradation by brown-rot fungi ?, *Mater. Org.*, **17**, 205~214, (1982)

**Cultural Conditions for the Production of Cellulase and Hemicellulase
by the Brown Rotting Fungus, *Tyromyces palustris***

MITSURO ISHIHARA⁽¹⁾ and KAZUMASA SHIMIZU⁽²⁾

Summary

With reference to the production of polysaccharide degrading enzymes by the brown rotting fungus, *Tyromyces palustris*, the conditions of the submerged and solid state fermentations were studied. The following results were obtained :

- 1) To produce and maintain high Cx-cellulase and hemicellulase yields in the submerged fermentation, the pH of the medium had to be kept above 2.0 by addition of alkali.
- 2) β -Glucosidase was obtained in a constant level irrespective of the culture method and the pH condition of the medium.
- 3) Cellulase of the C₁-type was not produced by any fermentations, even by a solid state fermentation in which the crystalline cellulose of the medium was obviously utilized, suggesting the possible involvement of non-enzymatic factors in the fungal degradation of the crystalline cellulose.

Received February 22, 1984

(1) (2) For. Products Chemistry Division