Corticium rolfsii の耐酸性 β -1,3-D-glucanase

梶 明, 大崎武久*, 吉原 収*

(香川大学農学部農芸化学科)

昭和 45 年 11 月 13 日 受理

Acid-stable β -1,3-r-Glucanase Produced by *Corticium rolfsii*

By Akira KAJI, Takehisa OHSAKI* and Osamu YOSHIHARA*

Department of Agricultural Chemistry, Kagawa University

A β -1,3-glucanase was obtained from culture filtrate of *C. rolfsii* by precipitation with ammonium sulfate and purified by DEAE-cellulose chromatography and Sephadex G-100 gel-filtration. The purification gave a 34.5-fold increase in specific activity. The enzyme was stable over the pH range 2.0~9.0, and retained 74% of its activity when stored at pH 2.0 and 5°C for 72 hr; maximum activity occurred at pH 4.5 and 55°C; the inhibitory effect of Hg^{2+} or Fe^{2+} was observed. In the initial reaction, glucose was produced from laminarin at high reaction rate; 80 μ g per min per μ g of enzyme protein at pH 4.5 and 40°C. The reaction product was determined by paper chromatography to be largely glucose after 5 min~72 hr incubation, but oligosaccharides were also detected as faint spots after 5~72 hr incubation.

(Received November 13, 1970)

Corticium rolfsii は Basidiomycetes に属する植物病原菌で、シュウ酸をよく生産する。このかびが endo-polygalacturonase, α -L-arabinofuranosidase, α - および β -D-galactosidase, protease などよく生産すること、およびこれらの酵素が耐酸性を有し、低 pH 活性であることはすでに報告された^(1~4)。本報においてはこの菌が生産する β -1,3-glucanase の性質とくに耐酸性に富むことを報告する。

Basidiomycetes に属するかびが β -1,3-glucanase を生産することはすでに 1959 年に Reese, Mandels⁽⁵⁾ が発見したが, strain QM 806 と記載し, 菌の同定が行なわれていなかった。彼らの菌の性質の記述によると *C. rolfsii* 以外の菌であることは明らかである。

実験方法

菌 *C. rolfsii* strain K 2 が使用された。この菌は京都大学植物病理学研究室において分離され、本学部の内藤を通じて分譲された。

培養方法 ペプトン 10g, NH_4NO_3 0.5g, KH_2PO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, 2% $FeCl_3$ 0.3ml を 1l の

小麦麴の抽出液に溶解し、pH 5.4 に調節した。小麦麴の抽出液は次のように調製した。50g の麴に 20 倍量の水を加えて 1 時間煮沸し、冷却後固形物を除去し、1l に調整した。K 2 菌はジャガイモ抽出液寒天シロ糖添加斜面培養基に新しく生育させた後、その菌糸を種菌として使用した。

500ml 容振とうフラスコに上記の培養基を 100ml 入れて、種菌を接種した後、往復振とう機上で 28°C で 56 時間培養し、3l の培養液を集めて種培養とした。本培養はタンク培養とし、同培養基 200l に種培養を接種し、28°C で 133 時間通気培養した。

粗酵素剤の調製法 培養液より菌体を除去し、透明液 46l (比活性 12.6 unit/mg) に 0.9 飽和まで硫酸を加え沈殿物を集めて脱イオン水にとかし、透析後、硫酸分かくを行なった。硫酸飽和度 0~0.4, 0.4~0.6, 0.6~0.8 に分かくしたが、80.3% の β -1,3-glucanase が第 2 区分に集まり、比活性も 19.5 から 29.1 unit/mg タンパク質に上昇したので、この区分を集めて粗酵素剤とした。

酵素の精製法 上記の粗酵素剤を材料とし、DEAE-cellulose クロマトグラフィーおよび Sephadex G-100 のゲル濾過によって酵素の部分精製を行なった。DEAE-

* 現在 丸金醤油株式会社技術研究所(香川県内海町)

cellulose カラムクロマトグラフィーは, 0.01 M Na-phosphate buffer (pH 7.5) 中で酵素を吸着し, 同じ buffer (pH 7.0) でカラムを洗い, NaCl 0~0.7 M の gradient elution を行なった. 溶出液のうち活性の高い区分を集めて透析後, DEAE-cellulose の小カラムで濃縮した. すなわち DEAE-cellulose を上記と同じ buffer (pH 7.0) で処理した後, 1.6×10 cm のカラムに調製し, 同じ buffer で透析した酵素液を加えて酵素を吸着した. 溶出には 0.6 M NaCl を添加した同じ buffer を使用し, 1 フラクションを 2 ml, 流速を 10 ml/hr に調整して活性区分を集めた. この酵素液を 0.02 M Na-phosphate buffer (pH 6.0) で透析し, ゲル濾過に移した. Sephadex G-100 のゲル濾過には同じ buffer (pH 6.0) を使用した.

酵素活性の測定法 作用条件: 作用液の基本配合割合を, 0.5% laminarin (pH 4.5) 2.5 ml, McIlvaine buffer (pH 4.5) 0.5 ml, 酵素液 1 ml とし, 40°C で 10 分間酵素反応を進めた後, 作用液 1 ml をとり, 0.1 M Na₂CO₃ 溶液 1 ml を加えて反応を停止した後, Nelson, Somogyi^(6,7) 法で生成した還元糖を定量し, グルコースとして表示した. この条件下で 1 分間に 1 μ mole のアルデヒド基を生成する酵素量を 1 unit とした.

Laminarin の純度: laminarin は K & K Laboratories, Inc. の市販品をそのまま使用した. 風乾体 1 mg より酸分解によって 0.825 mg のグルコースを得た. 糖の確認はペーパークロマトグラフィーによった.

ペーパークロマトグラフィー 酵素作用によって生成した糖の判定には, ペーパークロマトグラフィーを使用した. 作用液を加熱して反応を停止せしめた後, Dowex-50 W-X4 の小カラムを通して脱塩し, 濃縮してペーパークロマトグラフィーにかけた. 濾紙は東洋濾紙 No. 51 A を使い, 展開剤はブタノール, 酢酸, 水 (4:1:5) とし, 下降法で展開した. 呈色剤には aniline hydrogen phthalate またはアルカリ性 AgNO₃ 溶液^(8,9)

を用いた.

タンパク質の定量 280 m μ における吸光度から求めた. 標準タンパク質には *Aspergillus niger* の結晶 α -L-arabinofuranosidase を使用した.

実験結果

I. 酵素の精製

DEAE-cellulose を使用してカラムクロマトグラフィーを行なった結果を Fig. 1 に示す. 比活性は 29.1 から 99.6 unit/mg に上昇した. 溶出液 240 ml を前記の方法で濃縮した. 液量は 14 ml に減少し, 比活性は 124.4 に上昇した. この酵素液をゲル濾過へ移した. Sephadex G-100 によるゲル濾過の結果を Fig. 2 に示す. 比活性は 124.4 から 434.4 に上昇した. 培養濾液の比活性を 1 とすると, 34.5 倍の上昇率を示した. Table I に酵素の精製結果をまとめて表示した. 120 ml の部分精製酵素液を得, これを 1000 倍に希釈して, II の 1~4 の実験に使用した.

II. 酵素の性質

1. 酵素濃度の影響 pH 4.5 において, タンパク質濃度を 0~0.63 μ g/作用液 ml の範囲にとり, 酵素活性を追求した. Fig. 3 に示すように, 酵素濃度と還元糖生成量との間に直線関係が認められた.

2. 初期反応 酵素濃度を 0.31 μ g/作用液 ml, 基質濃度を純 laminarin として 2.31 g/l として, 0~20 分間酵素活性を追求した. Fig. 4 にその結果を示す. 糖生成量は, 80 μ g/min/タンパク質 μ g (pH 4.5, 40°C) であった.

3. pH の影響 Fig. 5 に示すように, 最適 pH 値は 4.5 にあり, pH 3.0~5.5 の範囲で活性が高い結果が得られた.

4. 温度の影響 pH 4.5 において, 10~60°C の酵素活性を比較した. Fig. 6 に示すように, 比較的高温において活性が高く, 最高値は 55°C に指摘された.

Table I. Purification of β -1,3-Glucanase

	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Yield (%)	Specific activity (units/mg)
Culture filtrate	46,000	11,007	138,684	100	12.6
Ammonium sulfate (0.9 sat.)	680	6,735	131,334	94.7	19.5
Ammonium sulfate (0.4~0.6 sat.)	170	3,600	105,400	76.0	29.1
DEAE-cellulose (chromatography)	240	486	48,400	34.9	99.6
DEAE-cellulose (concentration)	14	352	43,800	31.6	124.4
Sephadex G-100	120	76.8	33,360	24.1	434.4

Fig. 1. Chromatography on DEAE-Cellulose.

DEAE-Cellulose was equilibrated with 0.01M sodium phosphate buffer, pH 7.5, and packed in a column, 2.2×40 cm. The enzyme solution, 170 ml containing 3.6 g of protein or 105,400 units of β -1,3-glucanase, was poured onto the column which was then washed with the same buffer (pH 7.0). β -1,3-Glucanase was eluted with a linear gradient of 0~0.7 M NaCl with constant 0.01 M same buffer, pH 7.0. Fractions 59~67, indicated by arrows, were combined. Enzyme activity is shown by the solid line; protein by the dashed line.

For the purpose of concentration, the enzyme was adsorbed on a column, 1.6×10 cm, of DEAE-cellulose which had been equilibrated with 0.01 M Na-phosphate buffer, pH 7.0, and eluted in each 2 ml fraction with the same buffer containing 0.6 M NaCl. The enzyme rich fractions were combined and dialyzed against 0.02 M Na-phosphate buffer, pH 6.0.

Fig. 2. Gel-filtration on Sephadex G-100.

Sephadex G-100 was equilibrated with 0.02 M sodium phosphate buffer, pH 6.0, and packed in a column, 2.6×95 cm. The enzyme solution, 14 ml containing 352 mg of protein or 43,800 units of β -1,3-glucanase, was poured onto the column which was then washed with the same buffer. Fractions 54~65 were combined. Enzyme activity is shown by the solid line; protein by the dashed line.

Fig. 3. Effect of Enzyme Concentration on Activity of β -1,3-Glucanase.

Laminarin, 2.5ml of 0.5% solution at pH 4.5, 0.5ml of citrate-phosphate buffer at pH 4.5, and 1ml of purified enzyme solution were mixed and incubated at 40°C for 10 min.

Fig. 4. Initial Reaction.

Reaction mixture was the same in Fig. 3. Enzyme concentration was adjusted to 0.31 μ g per ml of reaction medium.

5. 耐酸性 Sephadex G-100 の溶出液の 100 倍希釈液 10ml (タンパク質 64.0 μ g, 酵素単位 27.8 unit を含む) と buffer 10ml とを混合し, トルエン 3 滴を加えて, 各 pH において, 5°C, 72 時間保持した後, 各酵素液の pH を 4.5 に調節して残存活性を測定した。無処理液の活性と比較すると, Fig. 7 の残存比率になる。pH 2.0~9.0 の広い範囲で安定であることが証明され

Fig. 5. Effect of pH on Activity of β -1,3-Glucanase.

Sodium citrate-HCl buffer was used for pH 1.0 to 2.5 (●); citrate-phosphate buffer for pH 2.5 to 7.0 (○). Reaction medium was kept at 40°C for 10 min.

Fig. 6. Effect of Temperature on Activity of β -1,3-Glucanase.

Reaction mixture was the same in Fig. 4. The mixtures were kept at pH 4.5 and 40°C, for 10 min.

た。すなわち, 失活した酵素は pH 2.0 で 26%, pH 2.5 で 11%, pH 3.0 で 4%, pH 5.0 では 1.5% であった。

Fig. 7. Effect of pH on Stability of β -1,3-Glucanase.

Sodium citrate-HCl buffer was used for pH 1.0 to 2.5 (●); citrate-phosphate buffer for pH 2.5 to 8.0 (○); $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-KH}_2\text{PO}_4$ buffer for pH 8.0~9.0 (●); $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ buffer for pH 9.0~10.0 (○). Ten ml of purified enzyme solution containing 64.0 μg of protein or 27.8 units of enzyme was mixed with 10 ml of each buffer and 3 drops of toluol, and the mixtures were kept at 5°C, for 72 hr. After incubation, the pH of each mixture was adjusted to 4.5 and deionized water added to bring each solution to the same volume. Enzyme assay was performed as described above. Residual activity is represented as per cent of untreated enzyme solution.

6. 反応生産物 1% laminarin (pH 4.5) 50 ml, McIlvaine buffer (pH 4.5) 10 ml, 酵素液 (タンパク質 6.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 酵素単位 2.78 unit/ml) 20 ml にトルエンを加え 40°C, 72 時間まで反応を進め, 生成糖をペーパークロマトグラフィーによって判定した. 各作用時間後に作用液 10 ml をとり, 加熱によって酵素作用を停止し, Dowex-50 W-X4 の小カラムを通した後, 液を濃縮し, 0.5 ml としてペーパークロマトグラフィーにかけた. Fig. 8 に示すとおり, 5 分後にはすでにグルコースが認められ, 以後それが増加した. 5 時間以後において, 少糖類が少量生成したようであるが, 生成糖のほとんどがグルコースであると判断された.

7. 阻害剤 上記第 3 項における作用条件で pH 4.5 とし, 各阻害剤を酵素液と混合し, 20°C で 10 分間保持した後, 酵素液と配合して, 活性を測定した. Table

Fig. 8. Products of Enzyme Reaction.

Laminarin, 50 ml of 1% solution, 10 ml of citrate-phosphate buffer at pH 4.5, 20 ml of purified enzyme solution containing 128.0 μg of protein and 1 ml of toluol were mixed and inoculated at 40°C.

Reaction medium, 10 ml was withdrawn at each time, the salts were removed with Dowex-50 W-X4, and the solution was concentrated to 0.5 ml. Paper chromatogram developed with descending butanol-acetic acid-water (4:1:5). The sugars were made visible on the paper Toyo filter paper No. 51 A with aniline hydrogen phthalate or a alkaline AgNO_3 .^(8,9)

Table II. Effect of Metal Ion on Enzymic Action

Salt (10^{-3}M)	Relative activity (%)
None	100.0
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	102.7
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	53.2
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	98.0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	101.0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	102.6
Calcium acetate	100.0
Mercuric acetate	0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100.0
AgNO_3	97.8

II に示すとおり, Hg^{2+} で完全に酵素作用は阻害され, Fe^{3+} の阻害作用も明らかであった.

考 察

C. rolfssii は種々の植物に寄生して病害を起こす菌としてよく知られており, 植物病理学の面からよく研究されてきた. このかびが生産する酵素についての一連の研究が当研究室において継続された結果, strain K 2 の endo-polygalacturonase がまず精製されて, その活性は pH 2~5 の間に高く, 最適値が 2.5 にあり, 耐酸性

に富むことが証明され⁽¹⁾, 続いて, α -L-arabinofuranosidase の生産⁽²⁾ および精製, 性質について研究が進められ, pH 2.5 において最適 pH を認め, endo-polygalacturonase よりも pH 曲線がより低い pH に傾き, pH 1.0 においてもなおかなりの活性を有し, 酵素は耐酸性に富むことが発見された⁽¹⁰⁾. このかびは, 著しい量の α - および β -galactosidase をも生産し, ともに耐酸性酵素であり, 後者はとくに低 pH 曲線を有することも見いだされた⁽⁸⁾. *C. rolfsii* が生産するその他の酵素についての実験結果^(4,11,12)をあわせて考えると, このかびが生産する酵素はいずれも耐酸性に富むことが特徴であり, その活性は pH 2~5 において高く, 酵素の種類によっては, 上記の α -L-arabinofuranosidase のように, 異常に低 pH 活性に傾くことが特徴であると判断される.

このかびはシュウ酸を生産し, 培養液の pH も 5.4 から次第に低下し, 最低値 2.0 を示すことから考えて, その生理活性が極端な低 pH において遂行されていることは明らかであり, 生産される酵素が異常な耐酸性を有し, 低 pH 活性を示すことも合理的なことと考えられる.

予備実験結果によれば, *C. rolfsii* K 2 による β -1,3-glucanase の生産も著しく, 麹の抽出液に好氣的培養を行なったときに最高値を与えることがわかった. 本報告においては上記の結果が示すように最適 pH は 4.5 に指摘され, 同じ菌の α -L-arabinofuranosidase または β -galactosidase の低 pH 活性に比較すれば, やや pH 曲線は高い方向に傾くことが判明した. しかし, 他の酵素と同様に耐酸性を有することは明らかであった.

Reese, Mandels⁽⁵⁾ は β -1,3-glucanase を生産する菌の検索を行ない, その中で Basidiomycete QM 806 が最良の菌と判断し, exo-type の酵素と考えた. 同報文中に, この菌の性質についても若干の記載が行なわれているが, *C. rolfsii* とは全く異なる菌である. QM 806 の β -1,3-glucanase は, 後に Nelson ら⁽¹³⁾ によって精密に研究され, substrate analogs に対する酵素作用から判断して, exo- β -1,3-D-glucanase と認定された.

本実験結果によれば, *C. rolfsii* の β -1,3-glucanase が作用液の laminarin (純 laminarin として作用液 1 l 中 2.31 g) に作用したとき, 生成グルコース量は 80 μ g/分/タンパク μ g (pH 4.5, 40°C) と異常に糖生成速度は

高く, ペーパークロマトグラフィーによる生産物の確認の結果も 5 分間作用後にすでにグルコースを検出し, 以後 3 日間作用後にいたるまで, ほとんどグルコースのみが検出された. β -1,3-glucanase には endo-wise の分解作用を示す酵素が報告されているが, この場合には Horikoshi らの報告⁽¹⁴⁾によれば, 単糖よりも少糖類が量的にはるかに多く生産されることが認められた. 従って, 本実験において分離精製された酵素は, exo- β -1,3-D-glucanase と考えられる.

要 約

(1) *C. rolfsii* の β -1,3-glucanase が DEAE-cellulose, Sephadex G-100 を使用して, 部分精製された. 比活性上昇は 34.5 倍であった.

(2) 精製酵素の性質は次のとおりであった. 最適 pH: 4.5, 最適温度: 55°C, 耐酸性: pH 2.0 で 5°C, 72 時間保持したときの残存活性 74%, laminarin に作用してグルコースを速やかに生産し, Hg^{2+} , Fe^{2+} によって阻害を受ける.

(3) 反応生産物はほとんどグルコースであり, 本実験において分離された酵素は exo- β -1,3-D-glucanase と考えられる.

C. rolfsii K 2 の使用に便宜を与えられた本学部, 内藤, 谷両教官に謝意を表します.

- (1) A. Kaji and T. Okada: *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**, 203 (1969).
- (2) A. Kaji and O. Yoshihara: *Appl. Microbiol.*, **17**, 910 (1969).
- (3) A. Kaji and T. Ichimi: *ibid.*, **18**, 1036 (1969).
- (4) 梶 明, 田川 清: *農化*, **40**, 325 (1966).
- (5) E. T. Reese and M. Mandels: *Can. J. Microbiol.*, **5**, 173 (1959).
- (6) N. Nelson: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
- (7) M. Somogyi: *ibid.*, **160**, 61 (1954).
- (8) W. E. Trevelyan, D. P. Procter and J. S. Harrison: *Nature*, **166**, 444 (1950).
- (9) R. H. Smith: *Biochem. J.*, **57**, 140 (1954).
- (10) 梶 明, 吉原 収: *農化大会講演要旨集*, p. 145 (1970).
- (11) 梶 明, 一見多恵: 同上, p. 50 (1969).
- (12) 梶 明, 吉原 収, 植田美紀子: 同上, p. 50 (1969).
- (13) T. E. Nelson, J. Johnson, E. Jantzen, Jr. and S. Kirkwood: *J. Biol. Chem.*, **244**, 5972 (1969).
- (14) K. Horikoshi, H. Koffler and K. Arima: *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 268 (1963).