Corticium rolsii が生産する酵素による クロレラ細胞膜分解作用

森 高明*・梶 明**

Chlorella, *Scenedesmus* など微細藻類が栄養学的にはすぐれた組成をもっていることはよく知られ、TAMIYA¹⁾, KANAZAWA ら²⁾ によって大量培養法が確立された。また、これらを食糧あるいは飼料とする研究も多い。しかし、強じんな細胞膜の存在が消化率を低下させる一因になって、動物体内での消化吸収率が低く³⁾、食糧あるいは飼料とする場合には細胞膜の除去、または細胞膜の透過性を高める研究が必要である。

この種の研究のうち、薬品による処理方法としては、田村ら^{4)~6)} はメチルアルコールで脱色処理をしたセネデスムスは白ネズミの発育を良好にし、たんぱく質の利用を著しく向上して、体重増加率、たんぱく効率においてカゼイン群と大差がないことを認め、たんぱく質の人工消化率を著しく促進することを報告している。また、満田ら⁷⁾ は細胞膜の各種の破碎方法を検討し、アルカリによる抽出は非常に効果的であるが着色が著しい。しかし、ブタノール処理による抽出はたんぱく質のみならず、非たんぱく質物、色素成分を分別できて、クロレラ構成成分の完全利用によいと報告している。

酵素によるこれら微細藻類の消化についても多くの研究があるが、田村ら⁸⁾ はセネデスムのトリプシン、人体ならびに白ネズミによる消化細胞の電子顕微鏡観察を行ない、いずれも細胞膜に変化はなく、メタノール処理により、細胞膜をとおして内部の原形質たんぱく質の消化が行なわれていることを観察し、三好⁹⁾ も各種の消化細胞の電子顕微鏡観察を行ない、セネデスムス、クロレラの細胞膜がトリプシン、ペプシンの消化作用を阻害している状態を観察した。神立、保井¹⁰⁾ は市販セルラーゼ剤で前処理を行ない、ペプシンによるたんぱく質の人工消化率を測定したが、前処理の効果は認められなかった。しかし、セルロース分解性糸状菌 *Trichoderma koningi* の酵素液を用いてクロレラ、セネデスムの細胞の柔軟化を行なった外山らの報告¹¹⁾ がある。

著者の1人梶は共同研究者とともに、植物病原菌が生産するペクチン分解酵素、アラバン分解酵素などについて研究を進めているが^{12)~15)}、そのうち *Corticium rolsii* が生産する粗酵素液中に、クロレラの細胞膜に作用して、細胞成分の溶出を促進する効果があることを認めたので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

Corticium rolsii. 香川大学農学部植物病理研究室より分譲された菌である。

2. 酵素液の調整

培養液はペクチン 12.5 g, NH_4NO_3 0.5 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, ペプトン 6.0 g, 2% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 滴を蒸留水 1 l に溶解して、pH を 5.4 に調整した。培養は 28°C で 3 日間振とう培養を行なった。

培養後菌体を布で濾過し、濾液を遠心分離して、この上澄液を硫酸 0.9 飽和として 2°C で 1 夜塩析した。これを 12,000 rpm, 20 分冷却遠心分離機にかけ、沈澱物を少量の蒸留水に溶解して、不溶物をさらに遠心分離して除いた。この上澄液を 2°C で 24 時間 0.01 M クエン酸、リン酸塩緩衝液 (pH 4.0) で透析して、透析内液を酵素液として使用した。布濾過して遠心分離した培養液 368 ml から酵素液 39 ml を得た。

3. 供試クロレラ

日本クロレラ株式会社から提供をうけたものを使用した。藻株は *Chlorella* sp. W-1。培養は培養液 1 l 当たり尿素 6 g, KH_2PO_4 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg, Arnon's 液 1 ml を加えた培養液で、屋外で大量培養し、遠心分離、水洗して 98°C, 5 分加熱処理を行ない、噴霧乾燥をした原色クロレラを使用した。

4. 酵素作用力の測定方法

1% クロレラ懸濁液 5 ml (乾燥クロレラ 50 mg)、緩

* 香川県農業試験場 (高松市仏生山町)

** 香川大学農学部 (香川県木田郡三木町)

Decomposing Action of the Enzyme Produced by *Corticium rolsii* on *Chlorella* Cell Wall.

By TAKAOKI MORI and AKIRA KAJI.

衝液 (pH 1.5~2.0 は酢酸ナトリウム, 塩酸緩衝液, pH 2.5~6.0 はクエン酸, リン酸塩緩衝液) 1 ml, 酵素液 1 ml, トルエン 3 滴の割合に加えて, 30°C で作用させた。

糖の溶出量は Somogyii-Nelson 法によりブドウ糖として求め, たんぱく質の溶出量は 280 m μ の吸光度を測定して, あらかじめ作製した検量線より求めた。酵素作用による糖およびたんぱく質の溶出量は次式で表わした。

酵素作用による溶出量 = 酵素液添加区の溶出量 - (対照区の溶出量 + 酵素液中の糖あるいはたんぱく質量)

実験結果

1. 作用液の pH と細胞成分の溶出

作用液の pH を 1.5~6.0 の間に選び, 20 時間酵素を作用させた場合の酵素作用による還元糖およびたんぱく質の溶出量を第 1, 2 図に示した。

この酵素液は還元糖, たんぱく質の溶出から, pH 2.5 に最高の作用力があり, また pH 1.5 付近にも作用力の強いところがある。作用液の pH が中性に近づくに従い, 還元糖およびたんぱく質の溶出力が弱くなった。

この酵素液の還元糖の溶出力は第 1 図のように, pH

第1図 酵素作用による還元糖の溶出と pH との関係
作用時間 20 時間, 作用温度 30°C

第2図 たんぱく質溶出と pH との関係

○— 酵素作用による溶出量
—⊗— 酵素液無添加の場合の溶出量

酵素作用による溶出量 = 酵素液添加区の溶出量 - (対照区の溶出量 + 酵素液中のたんぱく質量)
作用時間 20 時間, 作用温度 30°C

3.0 では pH 2.5 の最高溶出量に対して約 57% となり, 急激に減少した。pH 4.0, 5.0 では約 10% となり, pH 6.0 ではほとんど溶出力がなくなった。

これに対して, この酵素のたんぱく質の溶出力は第 2 図に示したように, pH 3.0 では pH 2.5 の最高溶出量の約 83%, pH 4.0, 5.0, 6.0 ではそれぞれ約 35, 25, 19% の溶出力があり, 還元糖とたんぱく質の溶出力の間には若干の違いが認められる。

また, 酵素液を加えない対照区では, 還元糖はいずれの pH でも測定できなかった。これに対してたんぱく質は第 2 図に示したように pH 4.0 以下の酸性側では溶出量に差はなかったが, pH 6.0 では急激に溶出量が増加した。

2. 酵素液の濃度と作用力との関係

酵素液のたんぱく質量を 1 ml 中 0.244~0.006 mg, 作用液の pH を 2.5 として 20 時間酵素作用を進めた場合の酵素作用によるクロレラ細胞からのたんぱく質の溶出量は第 3 図のとおりであった。酵素濃度を対数にとった場合, 酵素液のたんぱく質量が 0.122~0.012 mg のときには, 酵素作用によるクロレラ細胞からのたんぱく質の溶出量と, 酵素液の濃度との間には直線的な関係がある。

3. 酵素作用の失活温度

酵素液をあらかじめ 30~100°C に 10 分間保持したのち, 前記のとおり作用液を配合して, pH 2.5 で 20 時間酵素作用を進めた。酵素液を各温度で 10 分加熱した作用液のたんぱく質量と, 100°C で 10 分加熱した場合の作用液のたんぱく質量との差を, 酵素作用によるクロレラ細胞からの溶出量として, この場合の結果を第 4 図に示した。

この酵素液は 40°C, 10 分の加熱処理で, クロレラ細胞からのたんぱく質の溶出力が無処理の場合の約 62%

第3図 酵素濃度と作用力との関係

作用力 = 酵素作用による溶出量
作用時間 20 時間, 作用温度 30°C, pH 2.5

第4図 酵素作用の失活温度

粗酵素液を 15 倍に希釈して使用
作用時間 20 時間, 作用温度 30°C, pH 2.5

に低下し, 60°C, 10 分の加熱処理では作用力がほとんど失われた。

4. 酵素の作用時間と細胞成分の溶出

作用液の pH を 2.5 に調整して, 酵素液を添加しない対照区および酵素液を添加した場合の酵素作用による還元糖の溶出量を第 5 図に, たんぱく質の溶出量を第 6, 7 図に示した。

第 5 図にみられるように, 酵素液を添加しない場合, 還元糖は pH 2.5 の緩衝液中では懸濁直後には測定できず, 24 時間以後はわずかではあるが直線的に溶出量が増加して, 96 時間後には 1% クロレラ懸濁液 5 ml から 0.38 mg (0.76 g/100 g) 溶出した。酵素を各時間作用させた場合の酵素作用による還元糖の溶出は, 24 時間後に 1% クロレラ懸濁液 5 ml から 2.91 mg (5.82 g/100 g) 溶出し, 48 時間以後は漸増して 96 時間後には 4.99 mg (9.98 g/100 g) 溶出した。

いっぽう, 280 m μ の吸光度で測定したたんぱく質の溶出量は, 酵素液を添加しない対照区は第 6 図のとおりであった。pH 2.5 の緩衝液に懸濁した直後に 1% クロレラ懸濁液 5 ml から 1.15 mg (2.30 g/100 g) の溶出があり, 72 時間後までは時間の経過とともに溶出量が増加した。しかし, 96 時間後には溶出たんぱく質が減少した。酵素を各時間作用させた場合の酵素作用によるたんぱく質の溶出は第 7 図のとおりで, 72 時間後までは作用時間とともに溶出量が急激に増加して, 72 時間後には 1% クロレラ懸濁液 5 ml から 17.51 mg (35.02 g/100 g) 溶出した。使用したクロレラのケールダール法による粗たんぱく質含量は 51.38% であって, 72 時間後には粗たんぱく質含量の約 68% を溶出させることができた。しかし, 96 時間後の測定では溶出たんぱく質が著しく減少した。

第5図 還元糖の溶出と作用時間との関係

○—酵素作用による溶出量
□—酵素液無添加の場合の溶出量
作用温度 30°C, pH 2.5

第6図 酵素液無添加の場合のたんぱく質の溶出と作用時間との関係

作用温度 30°C, pH 2.5

第7図 酵素作用によるたんぱく質の溶出と作用時間との関係

作用温度 30°C, pH 2.5

96 時間後の溶出たんぱく質の減少は前述のように, 酵素液を添加しない対照区でも認められ, 還元糖は酵素液を添加しない場合も, 添加した場合も時間の経過とともに溶出量が増加した。

写真 1 対照区 24 時間処理

写真 2 酵素処理 24 時間

写真 3 対照区 48 時間処理

写真 4 酵素処理 48 時間

写真 5 対照区 72 時間処理

写真 6 酵素処理 72 時間

5. 酵素処理したクロレラ細胞の顕微鏡観察

顕微鏡観察では酵素作用 24 時間後には、酵素を添加しない対照区に比べて、細胞周辺の光の透過がややよくなったように観察された。しかし、酵素作用の影響はカバーガラスに指圧をかけた場合に明確な差が認められた。この場合の顕微鏡写真を写真 1~6 に示した。

pH 2.5 で酵素を 24 時間作用させると、細胞膜が容易に崩壊されるようになった。pH 2.5 の緩衝液のみの場合には、48 時間以上懸濁すると細胞が崩壊されやすくなるが、酵素作用 48 時間以上の場合には、細胞顆粒が不鮮明となり細胞質が溢出するようになった。

考 察

Chlorella, *Scenedesmus* などの微細藻類を食糧あるいは飼料として利用するには価格が安いことと、消化吸収をよくすることが必要である。これらのたんぱく質の消化については、細胞膜と含有クロロフィルならびにある種のメタノール可溶性物質が消化の阻害因子と考えられている³⁾⁹⁾。

三好⁹⁾ は原色セネデスミス粉末はトリブシンを用いたほうが、ペプシンを用いた場合よりも消化率が高く、このことは両酵素の至適 pH がそれぞれ 8.6, 1.8 で、セネデスミスがアルカリ側でその窒素の大部分が溶出する上に、トリブシン消化の際に使用する緩衝液がアルカリ側の pH 8.6 であることが、トリブシンの消化性を高める要因のひとつと考えている。

クロレラ、セネデスミス粉末の全窒素あるいはたんぱく質はアルカリ側でよく抽出されるが⁷⁾¹⁶⁾¹⁷⁾、著者らの結果でも第 2 図に示したように、緩衝液のみの場合にはクロレラのたんぱく質の溶出は、pH 4.0 までの酸性側では pH による差は認められなかったが、pH 6.0 と中性に近づくくと急激に溶出量が増加した。このことから、乾燥クロレラの細胞膜の透過性は、酸性側では非常に小さく、酸性側で消化の行なわれるペプシンおよび胃内消化の困難なことが推察される。

しかし、*C. rolsfii* の生産する酵素液は還元糖およびたんぱく質の溶出からみて第 1, 2 図のように、pH 2.5 にもっとも強い作用力を有し、1.5 付近にも作用力の強いところがある。

微細藻類の糖類については MILNER¹⁸⁾ が指摘しているように、あまり知られていないが、BROWN¹⁹⁾ によれば *Scenedesmus obliquus* の還元糖は 0.1 ~ 0.5% で、少糖類、水溶性多糖類も少なく、不溶性多糖類が 15.1~16.9% 含まれるという。また、NORTHCOTE らによれば *Chlorella pyrenoidosa* の細胞膜は全細胞の 13.6% を占め、細胞膜の組成はたんぱく質 27%、脂質 9.2%、 α -セルロース 15.4%、ヘミセルロース 31.0%、グルコサミン 3.3%、灰分 5.2% を含むとい²⁰⁾、また *C. pyrenoidosa* の全細胞のアルカリ可溶性多糖類はヘミセルロース A、ヘミセルロース B、澱粉が 9:2:1 の割合に含まれるという²¹⁾。

著者らの実験では、酵素を加えない pH 1.5~6.0 の緩衝液中に溶出してくる還元糖は、20 時間後には Somogyii-Nelson 法では定量できなかったが、第 5 図に示したように酵素液を添加しない場合には溶出量としては僅かではあるが、時間の経過とともに直線的に増加して 96 時間後には 0.38 mg/50 mg (0.76 g/100 g) 溶出した。このことから細胞内の遊離の還元糖は少ないと考えられる。しかし、*C. rolsfii* の生産する酵素を加えて pH 2.5 で処理した場合には、第 5 図にみられるように 24 時間後に 2.91 mg/50 mg (5.82 g/100 g)、96 時間後

には 4.99 mg/50 mg (9.98 g/100 g) の還元糖が溶出した。このことは、この酵素がクロレラの細胞膜、細胞質の多糖類を分解して生じたものと推論される。

また、たんぱく質は第7図に示したように、pH2.5で72時間酵素処理することにより 17.51 mg/50mg (35.02 g/100 g)、粗たんぱく質含量の約 68% が溶出したことについては、細胞膜が細胞の 13.6% を占め、細胞膜のたんぱく質含量が 27% であるとすれば²⁰⁾、細胞膜中のたんぱく質は全細胞の 3.75% に相当し、細胞膜のたんぱく質のみならず、細胞質のたんぱく質も多量に溶出したことが明らかである。

顕微鏡観察でもこの酵素を pH 2.5 で 24 時間作用させると、細胞が崩壊されやすくなることが認められ、さらに 48 時間後の観察では細胞顆粒が不鮮明になって溶解し、酵素作用が細胞内部にまでおよんでいることがわかる。

以上のことから *C. rolfii* の生産する酵素は強い酸性側でクロレラの細胞膜に作用して、細胞膜の透過性をよくし、細胞内部から還元糖や、たんぱく質を溶出する作用を有するものである。したがって、酸性側で消化作用を有するため消化率が低いと考えられたペプシン、胃内消化も⁹⁾、この酵素との併用によって消化をよくすることが推論できる。また、実用的立場から考えれば比較的短時間の酵素処理と機械的処理方法を併用して、細胞成分を利用しやすくなることが可能であろう。

なお、本実験では硫酸塩析、透析液を酵素液として使用したが、実用的立場から考えれば、酵素の部分精製には Dowex 50 W-X4 を適用すべきである²¹⁾。*C. rolfii* は醗酵生産物としてシュウ酸を形成するので、この酸と酵素の分離のためにもイオン交換樹脂の使用が望ましい。

要 約

植物病原菌の1種である *Corticium rolfii* の生産する粗酵素を使用して、この酵素の噴霧乾燥クロレラに対する作用を検討してつぎの結果を得た。

(1) この酵素は還元糖およびたんぱく質の溶出からみて、pH 2.5 にもっとも強い作用力をもつ。

(2) クロレラの細胞膜成分を分解して、細胞膜の透過性をよくし、粗たんぱく質含量の約 68% に相当するたんぱく質を溶出した。

(3) 顕微鏡観察では細胞膜を崩壊しやすくなる作用があり、細胞質を溶出する作用をもつことが観察された。

(4) この酵素の最適作用温度は 30°C 付近にあり、

40°C、10 分の加熱処理では失活が認められた。

この実験は香川大学農学部醗酵化学研究室で行なったもので、実験に協力いただいた田川清氏に感謝します。また、試料の提供をいただいた日本クロレラ株式会社、同社宮之原篤氏および実験の機会を与えられた香川県農業試験場長末沢一男博士に感謝いたします。

本報告の一部は、昭和 40 年 4 月、日本農芸化学会大会で発表した。

文 献

- 1) TAMIYA, H.: Proceedings of the World Symposium on Applied Solar Energy, Phenix, Arizona, Nov., (1955).
- 2) KANAZAWA, T., FUJITA, C., YUHARA, T. and SASA, T.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 4, 1 (1958).
- 3) 神立 誠・保井忠彦: 栄養と食糧, 16, 411 (1963).
- 4) 田村盈之輔・馬場春夫・田村 敦・小島義樹: 栄養誌, 17, 73 (1959).
- 5) 田村盈之輔・馬場春夫・田村 敦・小島義樹: 栄養誌, 17, 75 (1959).
- 6) 田村盈之輔・馬場春夫・小島義樹・田村 敦: 栄養誌, 17, 89 (1959).
- 7) 満田久輝・河合文雄・鹿内健彦・中沢 淳: 栄養と食糧, 12, 149 (1959).
- 8) 田村盈之輔・馬場春夫・田村 敦・小島義樹: 栄養誌, 17, 197 (1959).
- 9) 三好 保: 四国医誌, 16, 453 (1960).
- 10) 神立 誠・保井忠彦: 栄養と食糧, 16, 516 (1963).
- 11) 外山信男・佐瀬 勝・川本正和・宮崎大農時報, 6, 130 (1960).
- 12) 梶 明・三国直世志: 香川大農, 16, 139 (1965).
- 13) 梶 明・田川 清・元山浩二郎: 農化, 39, 352 (1965).
- 14) 梶 明・田川 清・山下昌之: 農化, 40, 209 (1966).
- 15) 梶 明・田川 清: 農化, 40, 325 (1966).
- 16) 馬場春夫・小島義樹・田村 敦・田村盈之輔: 栄養誌, 18, 3 (1960).
- 17) 三好 保: 四国医誌, 15, 21 (1959).
- 18) MILNER, H.W.: Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant, (Edited by BURLEW, J.S.), (Carnegie Inst. of Washington), p. 295 (1953).
- 19) BROWN, A.H.: *Plant Physiol.*, 23, 331 (1948).
- 20) NORTHCOTE, D.H., GOULDING, K.J. and HORN, R.W.: *Biochem. J.*, 70, 391 (1958).
- 21) OLATAN, S.A. and NORTHCOTE, D.H.: *Biochem. J.*, 82, 509 (1962).
- 22) 梶 明・田川 清: 未発表。

(1966 年 9 月 12 日受理)