

琉球大学学術リポジトリ

[報文]好熱性糸状菌HG-1の生産する耐熱性キシラナーゼ

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 石原, 昌信, 小野, 伸一, 赤嶺, 紀一郎, 当山, 清善, ISHIHARA, Masanobu, ONO, Shinichi, AKAMINE, Kiichiro, TOYAMA, Seizen メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016565

好熱性糸状菌HG-1の生産する耐熱性キシラナーゼ

石原昌信・小野伸一・赤嶺紀一郎・当山清善

(琉球大学農学部)

Thermostable Xylanase of Thermophilic Fungus HG-1

Masanobu ISHIHARA, Shinichi ONO, Kiichiro AKAMINE,
and Seizen TOYAMA

*College of Agriculture, University of the Ryukyus,
Senbaru, Nishihara-cho, Okinawa, 903-01*

緒 言

キシランは植物細胞壁の主要成分であり、セルロースに次いで2番目に含量の高い再生産可能な多糖類である。同多糖はD-キシロースの β -1,4結合を主鎖とするポリマーであるが、植物組織においては側鎖にアラビノースやウロン酸等が結合した複合多糖として存在している。最近、アラビノースやウロン酸残基には抗酸化活性や抗菌活性を有しているフェノール化合物(フェルラ酸や p -クマル酸等)がエステル結合していることが明かとなり、糖・エステル化合物の植物細胞壁中における機能が注目されている¹⁾。他方キシランは、近年の石油ショック以来、セルロースとともに重要なバイオマス資源として位置づけられており、その資源化利用に関する研究が活発に推進されている^{2, 4, 18)}。キシランの分解には、主として酸及び酵素による方法が検討されているが、エネルギー消費量及び反応副産物の生成等を考えると酵素糖化法に利点が多い。

キシランの酵素糖化には少なくとも2種類の酵素を必要とする。即ち、エンド-1,4- β -キシラナーゼと β -キシロシダーゼであり、両酵素の協同作用によって反応は終了する。とりわけ、前者の酵素はキシランの分解反応において最初

に基質へ作用し、最終的にキシロースまで分解し得ることより、最も重要な酵素であると考えられている。その中でも、微生物起源のキシラナーゼは力価及び生産性の面で優れた特徴を有していることから、広く研究が行われている^{3, 9, 12, 16)}。しかし、こまでに特性が明らかにされている酵素のほとんどが常温菌由来であり、好熱性菌由来の酵素に関する報告文は比較的少ない^{11, 15)}。

著者ら^{5, 6)}は、サトウキビバガス中のキシラン成分の有効利用を目的として、コンポスト中からキシラナーゼ高生産性の好熱性糸状菌の分離を行い、分離菌株の中からHG-1株を優良菌株として選抜した。本菌株は、キシラナーゼとともにセルラーゼ等を細胞外へ産生することが認められたので、これらの酵素活性に及ぼす培地組成の影響及び酵素の特性について調べた。

実験方法

(1) 供試菌株：本研究では、サトウキビ葉・梢頭部を原料とするコンポスト中から分離した好熱性糸状菌を供試菌株とした。本菌株はポテト寒天培地上では白色のコロニーを形成したが、胞子の形成は認められなかった。供試菌株の菌学的特徴の詳細については次報で述べる。

(2) 培地組成と菌の培養：固体培地は、小麦フスマと0.5%NaOH処理バガスを3:1の割合で混

*903-01 沖縄県中頭郡西原町千原1

合し、水分含量を 67%になるように加えたのち、120℃で20分間加圧蒸気殺菌を行った。菌の培養は、供試菌株の斜面培養菌体へ殺菌水 5.0ml加えて懸濁した菌体を固体培地へ注ぎ込み混合した後、50℃で 2 日間静置して行った。液体培地の組成は、100mlあたりグルコース 0.5g、ペプトン0.2g、磷酸第一カリウム 0.1g、磷酸第二カリウム 0.1g、酵母エキス 0.05 g 及び硫酸アンモニウム 0.05g から成り、培地は pH6.0に調節して用いた。菌の培養は、上記液体培地100mlを振盪フラスコに採り、常法通り 20分間殺菌したのち、前培養液5.0mlを接種し、30℃で 2 日間振盪して行った。

(3) 粗酵素液の調製：酵素の抽出は、固体培養菌体へ 2 倍量の蒸留水を加え、室温で 1 時間保持して行った。次に、ポリエステルの布で濾過して得られた抽出液を遠心分離により上澄液を得、蒸留水に対して透析を行い、粗酵素液として用いた。液体培養の場合には、ブフナー濾過により得られる濾過液を同様に透析を行って粗酵素液を調製した。

(4) 酵素活性の測定法：アビセラーゼ活性の測定は下記の様な手順によった。即ち、酵素反応の組成は、アビセルセルロース 20mg、1 M酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.2ml、0.2%窒化ナトリウム0.2ml、及び適当な濃度の酵素液で総量を2.0 mlとし、40℃で24時間反応を行った。反応停止は、反応混液を煮沸することにより行い、冷却後生成された還元糖量を Somogyi-Nelson 法により定量した。カルボキシメチルセルラーゼ (CMCアーゼ) とキシラナーゼ活性の測定は、基質のみを代え、その他は同一条件で行った。即ち、0.5% の CMCまたはキシラン0.8 mlに 1 M酢酸緩衝液 (pH4.5) 0.2ml及び酵素液 1.0 mlを加えて総量を 2.0mlとした後、40℃で 30分間酵素反応を行った。次に、反応混液を 10 分間煮沸することにより反応を停止させ、冷却後生成された還元糖量を測定した。各酵素活性の 1 単位は、所定条件下で 1 時間あたり 1 mg のグルコースまたはキシロースを生成する酵素量

とした。

実験結果

1. 酵素活性に及ぼす培養温度の影響

供試菌株の培養温度と酵素生産性との関係を明らかにする目的で、各温度で小麦フスマ培地にて菌の培養を行い、得られた粗酵素液についてアビセラーゼ、CMCアーゼ及びキシラナーゼ活性を測定した。Fig.1 に示したように、供

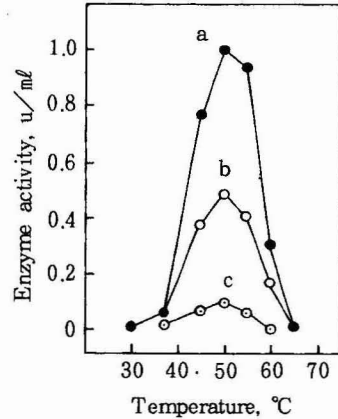


Fig.1 Effect of cultivation temperature on the enzyme production

Thermophilic fungus HG-1 which was isolated from compost heaps was cultured at various temperature for 2 days in petridish containing wheat bran and 0.5% NaOH treated bagasse(1:1). After cultivation, the culture was added twice of distilled water and allowed to stand at room temperature for 60 min to extract enzyme. The obtained extracts were dialyzed against distilled water for overnight and following enzyme activities were assayed.

Avicelase activity was measured in 2.0 ml of a reaction mixture containing 0.2 ml of 1 M acetate buffer, pH 4.5, 20 mg of avicel cellulose, and 1.0 ml of enzyme solution. After incubation at 40 °C for 24 hr, the reaction was stopped by boiling for 10 min and the reducing sugar formed was determined as glucose by the Somogyi-Nelson method. CMCase activity was also assayed by measuring the reducing sugar released by the action of enzyme on carboxy-methyl cellulose (CMC). The assay mixture contained 0.2 ml of 1 M acetate buffer, pH 4.5, 0.8 ml of 0.5% CMC and properly diluted enzyme in a total volume of 2.0 ml. After incubation at 40°C for 30 min, the reaction was terminated by boiling for 10 min in water bath. For xylanase activity, the reaction assay was performed under conditions identical to those described for CMCase by replacing substrate from CMC to xylan. One unit of enzyme activity was defined as that amounts of enzyme which produces 1 mg of reducing sugar per hour under the above conditions. (a)Xylanase (b)CMCase (c)Avicelase

試菌株は菌体外へ上記三種の酵素を産生したが、何れの酵素活性も菌を50℃で培養した時に最も高い値を示した。中でも、キシラナーゼは他の酵素に比べて著しく高い値を示したことから、分離好熱性糸状菌はキシラナーゼを主に生産する菌であることがわかった。菌の生育度及び酵素活性からみた場合、本菌株の最適培養温度は50℃であると判断されたので、以下の実験では同温度に培養温度を固定した。

2. 酵素活性に及ぼす培養時間の影響

小麦フスマ培地を用いて供試菌株の培養時間における酵素活性の変動について調べるため、24時間毎に試料を採取し、4日間キシラナーゼ及びCMCアーゼ活性を追跡した(Fig.2)。両酵素活性は共に培養24時間目から認められ、培養時間の経過とともに増大し、培養3日目で最大値に達した。しかし、培養4日目には両酵素活性共に低下する傾向を示した。従って、供試菌株の固体培養における最適培養時間は3日間であることがわかった。

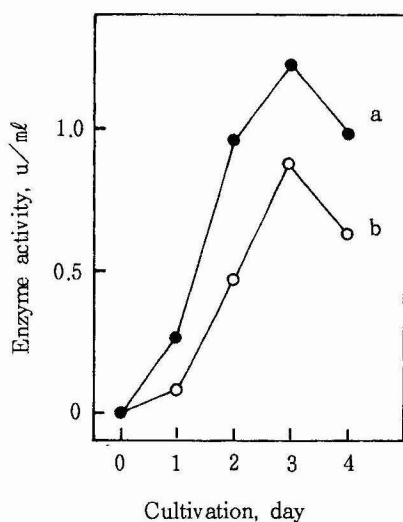


Fig.2 Effect of cultivation time on the production of cellulolytic enzymes

The fungus strain was incubated at 50℃ for various times with solid culture medium. After cultivation, CMCase and xylanase activities for each samples were measured. (a)Xylanase (b)CMC Case

Other conditions were stated in the legend to Fig.1.

3. 酵素活性に及ぼす培地中のセルロース物質の影響

一般にカビ由来のキシラナーゼやセルラーゼは、培地へオリゴ糖やセルロース物質を加えると誘導的に酵素活性が増大することが知られている。供試菌株においてもそのようなことが認められるかどうかを調べた。硝酸アンモニウムを窒素源とする合成培地へ各種セルロース物質を1.0% (W/V) になるように加え、50℃で10日間振盪培養を行い、各酵素液のキシラナーゼ及びセルラーゼ活性を測定した(Table. 1)。キシラナーゼ活性は培地へバーチウッドキシランやサトウキビバガスから調製されたヘミセルロースを加えた時に顕著に高い値を示したことから、キシラン等によって酵素が誘導されることがわかった。しかし、キシランの構成糖であるキシロース添加では活性増大は全くみられなかった。一方、アビセラーゼやCMCアーゼ活性は用いた培地においては炭素源の違いによって著しい差異は認められなかったが、バガスヘミセルロース含有培地で幾分高い値を示した。

Table 1. Effect of various cellulosic substances in the liquid medium on enzyme production

Carbon sources	Avicelase	CMCase	Xylanase
Pulverized bagasse	0.03	0.37	0.41
0.5% NaOH treated bagasse	0.02	0.28	0.48
Bagasse cellulose	0.01	0.28	0.32
Bagasse holocellulose	0.01	0.21	0.21
Bagasse hemicellulose	0.04	0.42	0.81
Birchwood xylan	0.03	0.30	1.10
Wheat bran	0.02	0.34	0.50
Xylose	-	-	0.19

The mold was cultured at 50℃ for 3 days with liquid culture medium containing indicated carbon sources under shaking. After cultivation, the culture was filtrated with Whatman no.2 paper to remove mycerium and dialyzed against distilled water for overnight. The cellulolytic enzyme activities were assayed for dialyzates.

4. 液体培養における酵素活性の変動

バガスヘミセルロースを炭素源 (1%, W/V) とする液体培養における酵素活性及びpHの変化について調べた (Fig. 3)。

菌の生育は培養5日目まではほぼ直線的に増大したが、それ以後は一定値を示した。培養液のpHは菌の生育に伴って低下し、pH5.0付近を推移した。キシラナーゼ、アビセラーゼ及びCMCアーゼ活性は菌の生育とともに増大し、5日目で最大値を示し、以後培養20日目まで一定の値を維持した。キシラナーゼはセルラーゼより培養期間を通して高い値を示し、培養20日目においてはCMCアーゼの約2倍、アビセラーゼの約8倍の値を示した。

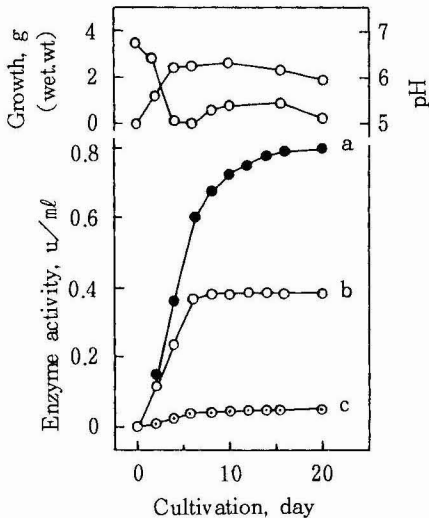


Fig.3 Time course of growth and cellulolytic enzymes production in the liquid cultivation

The mold was cultured at 50 °C for indicated times with liquid culture medium containing bagasse hemicellulose as a main carbon sources undershaking. After cultivation, mycerium growth, pH and enzyme activity were measured.

(a)Xylanase (b)CMCase (c)Avicelase

5. 酵素の最適反応 pH 及び pH 安定性

酵素の最適反応pHを調べるため、各種pHの緩衝液中で酵素反応を行なった。結果を相対活性で示した (Fig. 4-A)。図から、キシラナーゼの最適反応pHは5.0付近であり、アビセラーゼ及びCMCアーゼのそれは共に4.0であるこ

とがわかった。これら3酵素はpH2においても約50%の活性を示したが、pH8以上では極めて低い値であった。次に、酵素を各種pHの緩衝液中で30℃、60分間加温処理した後、残存活性を測定することにより酵素のpH安定性について調べた (Fig. 4-B)。

図に示した様に、キシラナーゼは、pH 3-7の範囲で安定であり、pH10においても約50%の残存活性を示した。一方、アビセラーゼ及びCMCアーゼはpH3-8の広い領域において100%の活性を保持していたが、pH9.5以上のアルカリ領域ではやや不安定であった。

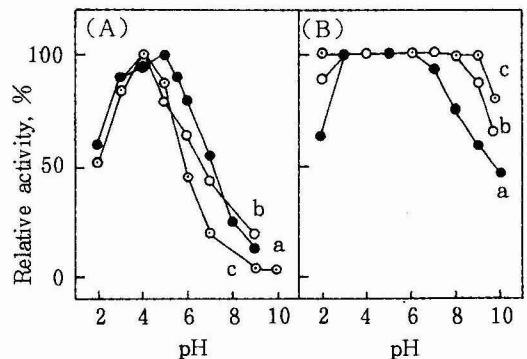


Fig.4 Effect of pH on the activity of enzyme and enzyme stability

The cellulolytic enzyme activity was assayed at the indicated pH(A). The enzyme was incubated at various pHs and 37°C for 60 min, and the residual activity was assayed at pH 4.5 (B).

(a) Xylanase (b)CMCase (c)Avicelase

6. 酵素の最適反応温度及び熱安定性

酵素の最適反応温度について調べるため、各温度で常法に従って酵素活性を測定した。結果を相対活性で表示した (Fig. 5-A)。図より、3酵素の最適反応温度は共に60℃であることがわかった。アビセラーゼ及びCMCアーゼは65℃においても60℃と同程度の活性を示したが、キシラナーゼは約60%の活性であった。次に、酵素を各温度、pH4.5で30分間加温処理した後、残存活性を測定することにより酵素の熱安定性を調べた (Fig. 5-B)。

キシラナーゼは60℃付近までは熱に対して比

較的安定であったが、70℃では約70%の活性を失った。一方、アビセラゼ及びCMCアーゼは60℃で加温処理した後も100%の活性を保持しており、極めて耐熱性であることがわかった。特にCMCアーゼは、70℃で加温処理した後も高い活性を有しており、耐熱性に優れていることが明らかになった。

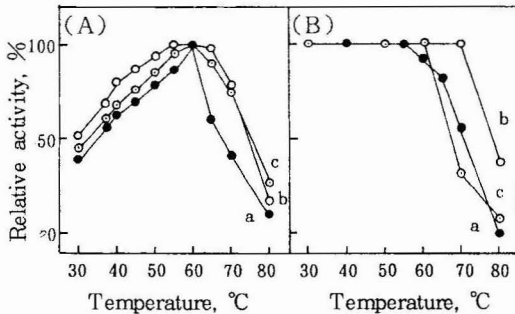


Fig.5 Effect of temperature on the activity of enzyme and enzyme stability

The enzyme activity was assayed at various temperature (A). The enzyme was incubated at various temperatures and pH 4.5 for 30 min, and the residual activity was assayed (B). (a) Xylanase (b) CMCase (c) Avicelase

考 察

コンポスト中から分離された各種好熱性糸状菌の粗酵素液についてキシラナーゼ活性を比較した結果、HG-1菌株に高い活性が認められたので、同菌株の酵素生産条件と酵素の性質について調べた。

本菌株は、中温ではほとんど生育はみられないが、50℃付近の高温で良好な生育を示した。粗酵素液はキシラン以外にアビセルセルロースおよびCMCを基質としたが、これらの分解率はキシランに比べて低い値であった。これらの酵素活性は菌を50℃で培養した時に最も高い値を示した。小麦フスマ培地への0.5% NaOH処理バガスの添加効果は認められず、小麦フスマの含量が高い程酵素活性も高い値を示した。小麦フスマがキシラナーゼ誘導に良い基質であることは他の菌株においても報告されている³⁾。また、木材キシラン及びバガスヘミセルロー

ス添加でキシラナーゼ誘導が認められたが、キシロースでは認められなかった。細菌や酵母ではキシロースによってキシラナーゼが誘導されたという報告¹⁷⁾もあり、菌種間で相違がある。各種微生物においてキシランがキシラナーゼの誘導に最も有効な糖類であると思われるが、酵素利用の観点から、キシランに代わる安価で調製が容易な誘導物質の検索が検討されている^{2, 10, 13, 14)}。セルラーゼ活性はキシラン添加培地で比較的高い値が得られたが、添加効果は微弱であった。セルラーゼ活性がアルカリ処理バガスによって誘導されたという報告⁷⁾があるが、供試菌株においては顕著な添加効果は認められなかった。バガスヘミセルロース含有培地では、培養液のpHは菌の生育に伴って低下し、pH 5.0付近を推移した。一方、酵素活性は培養5日間ではほぼ最高となり、20日目まで同等の活性を示した。この結果からも、3酵素が高温および酸性領域で安定であることが推測された。

キシラナーゼの最適反応pHは5.0であり、アビセラゼ及びCMCアーゼのそれは共にpH 4.0であった。また、最適反応温度は3酵素共に60℃付近であった。これらの結果は、*Humicola*属のキシラナーゼ、セルラーゼおよび*Talaromyces*属のキシラナーゼと異なっている^{8, 19)}。キシラナーゼはpH 3-7、アビセラゼ及びCMCアーゼはpH 3-8の範囲で安定であった。キシラナーゼは60℃までは比較的安定であったが、70℃以上では失活した。一方、セルラーゼは著しく耐熱性であり、特にCMCアーゼは*H. lanuginosa*酵素⁸⁾に匹敵する熱安定性を有していた。

要 約

サトウキビ葉・梢頭部を原料とするコンポストから分離した好熱性糸状菌HG-1の酵素生産性及び酵素の性質について調べた。

最も生育が良好で酵素活性が高い培養温度は50℃付近であった。粗酵素液はバーチウッドキシランやバガスヘミセルロースを良好な基質と

した。キシラナーゼ活性は、キシラン含有培地において誘導的に増大したが、キシロース添加培地ではその影響は認められなかった。酵素のキシラン、アビセルセルロース及びCMC分解反応における最適反応温度は共に60℃であり、最適反応 pH は 4-5 であった。アビセラゼ及びCMCアーゼは PH 2-9の広い領域で安定であったが、キシラナーゼは pH 7.0以上では不安定であった。セルラーゼ活性は60℃で30分間加温処理した後でも、100%の活性を保持していたが、キシラナーゼは10%程度の失活が認められた。

引用文献

1. Akin, D. E., Borneman, W. S., Rigsby, L. L., and Martin, S. A. 1993 *p*-Coumaroyl and feruloyl ababinxylans from plant cell walls as substrates for ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 644-647
2. Araujo, A., and D`souza, J. 1986 Enzymatic saccharification of pretreated rice straw and biomass production. *Biotechnol. and Bioeng.* 28 : 1503-1509
3. Biswas, S. R., Mishra, A. K., and Nauda, G. 1988 Xylanase and β -xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. *Biotechnol. and Bioeng.* 31 : 613-616
4. 入江利夫、小西哲哉、沓名俊章、古賀邦正、仲田俊之 1992 *Chaetomium gracile* 変異株1161のキシラナーゼ：精製およびキロビオース生成に関する性質 発工 70(2) : 109-114
5. 石原昌信、石垣克巳、当山清善 1989 バガスの酵素分解性とフェノール化合物 琉大農学報 36 : 59-65
6. 石原昌信、有満和人、当山清善 1992 サトウキビ葉・梢頭部の化学的前処理と酵素糖化性 琉大農学報 39 : 109-113
7. Kawamori, M., Morikawa, Y., and Takasawa, S. 1986 Induction and production of cellulases by L-sorbose in *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24 : 449-453
8. Kitpreechanich, V., Hayashi, M., and Nagai, S. 1984 Production of xylan-degrading enzymes by thermophilic fungus, *Aspergillus fumigatus* and *Humicola lanuginosa*. *J. Ferment. Technol.* 62(1) : 63-69
9. Kluepfel, D., Vats-mehta, S., Aumont, F., Shareck, F., and Morosoli, R. 1990 Purification and characterization of a new xylanase (xylanase B) produced by *Streptomyces lividans* 66. *Biochem. J.* 267 : 45-50
10. Mackenzie, C. R., Bilous, D., Schneider, H., and Johnson, K. G. 1987 Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(12) : 2835-2839
11. Mitsuishi, Y., Yamanobe, T., Yagisawa, M., and Takasaki, Y. 1987 Purification and properties of thermostable xylanases from mesophilic fungus strain Y-94. *Agric. Biol. Chem.* 51(12) : 3207-3213
12. Nakamura, S., Nakai, R., Wakabayashi, K., Ishiguro, Y., Aono, R., and Horikoshi, K. 1994 Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. strain TAR-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58(1) : 78-81
13. 中西載廣、安井恒男、小林達吉 1976 放線菌のキシラナーゼ生産におけるInducerについて *J. Ferment. Technol.* 54(11) : 801-809
14. Nakanishi, K., Marui, M., and Yasui, T. 1992 Comparison of xylan and methyl β -xyloside-induced xylanases from *Stre-*

- ptomyces* sp. J. Ferment. Bioeng. 74(6) : 392-394
15. Nishino, N., Kurisu, H., and Nagai, S.
1981 Thermophilic cellulase production by *Taralomyces* sp. in solid-state cultivation. J. Ferment. Technol. 59(5) : 407-410
 16. 大野信子、藤原佳奈、篠山浩文、藤井貴明、
1994 特異な不完全菌 *Fusarium* sp. BX-1 の生成するキシラナーゼ 生物工学 72(1) : 13-19
 17. Pou-Llinas, J., and Driguez, H. 1987 D-xylose as inducer of the xylan-degrading enzyme system in the yeast *pullularia pullulans*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27 : 134-138
 18. Silva, R. D., Yim, D. K., and park, Y. K.
1994 Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp. for pulp improvement. J. Ferment. Bioeng. 77(1) : 109-111
 19. Yoshioka, H., Nagato, N., Chavanich, S., Nilubol, N., and Hayashida, S. 1981
Purification and properties of thermostable xylanase from *Talaromyces byssachlamydoides* YH-50. Agric. Biol. Chem. 45 (11) : 2425-2432
 20. Yoshioka, H., Anraku, S., and Hayashida, S. 1982 Production and purification of a novel type of CMCase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* YH-78. Agric. Biol. Chem. 46(1) : 75~82