

白絹病菌の纖維素分解酵素 に就きて(第一報)

農學士 藤村吉之助

A 緒 言

白絹病菌 *Corticium Centrifugum* は廣く世界各地に發生する菌核菌の一種にしてあらゆる草木の地上最下部に著生する白色絹絲狀の菌類にして菌絲を出して菌核を形成す。而して自體の生活には草木の樹皮並びに内部組織の纖維素又は纖維素類似物質を分解して之れを糖となして養分とするのである。此の作用は菌體内に纖維素或は之れと類似物質を分解する種々の酵素を生産するに基くことは易く推知し得られることである。

斯くの如く纖維素、或は、纖維素類似物質を分解する酵素を生産する菌類、並びに、下等動物の種類は相當多いが、特に白絹病菌の分布は廣大である。それは恐くは、此の菌類が易く養分を攝取し得ること、即ち、此の菌が纖維素類分解酵素を旺盛に分泌することに原因するのであらう。斯る考へのもとに恩師京都帝國大學農學部教授近藤金助先生は同教授逸見武雄先生より本菌の分譲を受けられたのである。

菌類、並びに下等動物が分泌する纖維素分解酵素に關して、從來研究發表せられたる報文は多數⁽¹⁾あつて、其の結果、Cellulose は之等下等生物類が分泌する酵素の爲めに分解せられて、先づ可溶性の糖類となることは明かになつたが、此等酵素の性質に就いては充分明瞭にされたとは云ひ難い。是に於いて、近藤教授は、白絹病菌の纖維素類分解酵素の分離、並びに其の利用方法の研究に關して、上記白絹病菌株と標題の如き問題を御指示下されたのである。

B 實 驗 成 績

1. 白絹病菌の發育と培養基の水素イオン濃度との關係

次の組織の二種の培養基を調製す。

白絹病菌の纖維素分解酵素に就きて

第一培養基

Cellulose-Suspension ⁽²⁾	1000 ccm	Mg-Sulfat	0.25 gr
K-Nitrat	1 gr	FeCl ₃	spur
K-Biphosphat	0.5 gr	Agar-Agar	30 gr

第二培養基

Cellulose-Suspension	1000 ccm	Mg-Sulfat	0.5 gr
K-Nitrat	2 gr	FeCl ₃	spur
K-Biphosphat	1 gr		

此等の培養基を 300 ccm 容の三角瓶に約 20 ccm 宛注入し Koch の滅菌器にて 30 分間三日間間歇滅菌したる後、之れに菌を接種して 30°C に保ちて菌の培養に不適當なる事を確めたる後、其の水素イオン濃度を緩衝液を以て種々に調節したる物に就きて同様の處理の後菌を接種して菌の發育状態と水素イオン濃度との關係を實驗した。其の結果は第一表、及び、第二表に示す通りである。

第一表 第一培養基

番 號	水素イオン濃度	發 育 日 數		
		1 日	2 日	3 日
1	2.0	—	—	—
2	3.0	—	+	+
3	4.5	—	+	+++
4	5.0	—	—	+
5	6.0	—	—	—
6	7.0	—	—	—

但し本表中 + は白絹病菌の發育せし事を示し、— は發育せざる事を示す。+ の數は菌の發育の程度を示す。以下之れに準ず。

第二表 第二培養基

番 號	水素イオン濃度	發 育 日 數		
		1 日	2 日	3 日
1	2.5	—	—	—
2	3.8	—	—	—
3	5.0	—	—	—
4	6.0	—	—	—
5	7.0	—	—	—

以上の結果によれば、白絹病菌の發育に對する水素イオン濃度は pH=4.5 又は其の附近に有ることを知るのである。此

處に菌の發育に對して不適當なる培養基を選択したる理由は繁殖力の非常に盛なる此の菌は榮養價の優秀なる培養基に在りては、水素イオン濃度の僅少の差を無視して繁殖し、其の結果菌の發育と水素イオン濃度との關係が不明瞭となる事を顧慮したるに

基くのである。

2. 白絹病菌の發育と温度との關係

之れに就きては、從來、生物學的に詳細なる實驗が行はれて居るが⁽⁹⁾ 私の實驗結果に依ると 28°—40°C の範圍が適當であつて、之れより上下の温度に於いては、培養基の性質にも依るが發育は一般に悪い。

3. 培養基の選擇

從來、白絹病菌の培養に關しては杏寒天、又は麴寒天培養基が適當とせられて居るのであるが、私は、人工的に安價にして、榮養價の優れ、而も使用に便なるものを作り度いと希望し、先づ、之等二種の培養基の持つ糖量、全窒素量、及び、水素イオン濃度等を測定した。

然る後、稻藁を細斷して之れの 200 gr を 2 時間水で煎出し濾過して 1 立となし、之れに Cellulose-Suspension 400 ccm を添加し、之れに對し蔗糖を 5% の割合に加ふ。之れを第三培養基となし、此の第三培養基 1 立に Mc Collum 氏鹽類混合物第 185 號を 18.5 gr 加へたるものを第四培養基 A とす。

杏寒天一、麴寒天一、並びに、第四培養基 A の成分を比較すれば次の如し。

第 三 表

培 養 基	糖 (葡萄糖として)	全 窒 素	水素イオン濃度
杏 寒 天 培 養 基	2.08	0.014	pH 3.73
麴 寒 天 培 養 基	10.69	0.229	5.00
以上二培養基の平均	6.39	0.122	4.37
第 四 培 養 基 A	5.14	0.011	4.44

上記の通り杏寒天、及び、麴寒天培養基の各成分の平均値は第四培養基 A のそれと大體に於いて一致して居る。特に第四培養基 A の全窒素量は、寧ろ杏寒天培養基のそれに酷似して居る。又水素イオン濃度は第一表に示す通り、最適水素イオン濃度を有して居るのである。

第四培養基 A 100 ccm に照内ペプトンを 2 gr 又は 1 gr 加へたるものを、夫々、第四培養基 B、又は第四培養基 C とす。

斯くして、調製したる四種の培養基、並びに、杏寒天、及び、麴寒天培養基を同様に處理したる後 30°C に保ちて菌の發育状態を驗したる結果を第四表に示す。

第 四 表

番 號	培 養 基	發 育 日 數				
		1 日	2 日	3 日	4 日	5 日
1	第三培養基	+	+	+	++	++
2	第四培養基A	+	+	++	+++	+++++
3	" " B	+	++	+++	++++	+++++
4	" " C	+	++	+++	++++	+++++
5	杏寒天培養基	+	++	++	+++	++++
6	麴寒天培養基	+	++	++	++	++++

以上の結果によれば、第四培養基 A, B, C 並びに杏寒天、及び、麴寒天培養基の間には殆んど大差はない。但し、第三培養基とはかなりの差の有る事が解る。故に、以後の實驗に於いては第四培養基Aを使用する事となす。

4. 白絹病菌株から調製した粗酵素液についての實驗

上記の方法に依りて、白絹病菌を 300 ccm の三角瓶内にて 10 日間培養したるもの 60 本を取りて菌體と培養基とを分別秤量した。その量は次の通りである。

菌 體	58 gr
培 養 廢 液	342 ccm

菌體は少量宛乳鉢内にて磨り潰し、之れに培養廢液を加へて充分攪拌す、之れに更に水 200 ccm を混和振盪したる後遠心分離器に依りて固形物を除去し 450 ccm の粘稠褐色不透明の溶液を得た。之れを粗酵素溶液となす。

次に Karrer⁽⁴⁾ 氏の方法に依りて 150°C に加熱したる Li-Chlorid の濃厚溶液に、純粹の Cellulose を溶解し、之れを水中にそゞろで Cellulose を再生せしめ、之れを完全に水洗し、水に懸游せしめて其の 1 ccm が 6—9 mg の Cellulose を含む様にする。

斯くして粗酵素溶液 10 ccm に再生 Cellulose-Suspension 5 ccm を加へ、更に之れに第五表に示す種々の緩衝液を 5 ccm 宛加へて其の全容を 20 ccm となし、之れを 50 ccm 容の三角瓶に入れ Toluol を 5 滴宛滴下しコルク栓を施して 30°C の恒温器中に靜置

し、一定時間後に其の内容を振盪濾過し 其の 2ccm を以て Cellulose の分解に依りて生成せられたる葡萄糖の量を Bertland 氏法に依りて定量したのである。今酵素反應液に添加したる緩衝液の種類、並びに反應結果を示せば次の通りである。

第五表
酵素反應液に加へたる緩衝液の pH 價

番 號	緩衝液の pH 價
a	pH 5.29
b	5.98
c	6.98
d	8.08

第六表 酵素反應結果
(0.5%過滿俺酸加里液滴定量)

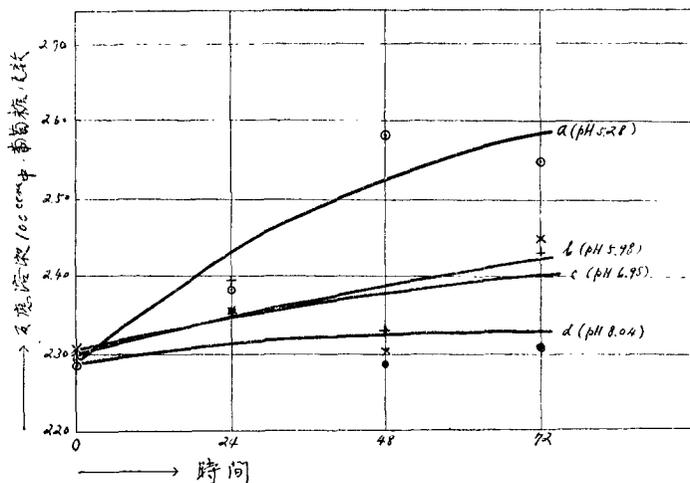
番 號	反 應 時 間			
	0 時間	24時間	48時間	72時間
a	ccm 9.0	ccm 9.3	ccm 10.05	ccm 9.9
	8.9	9.3	10.00	9.9
b	9.0	4.9	9.1	9.45
	9.0	9.3	9.1	9.50
c	9.0	9.3	8.8	9.45
	9.05	9.1	9.2	9.65
d	8.95	9.2	8.9	9.00
	9.00	9.2	9.0	9.05

第七表
反應溶液 100 ccm 中の葡萄糖の瓦數

番 號	反 應 時 間			
	0 時間	24時間	48時間	72時間
a	gr 2.300	gr 2.381	gr 2.588	gr 2.547
	2.272	2.381	2.574	2.547
平 均	2.286	2.381	2.581	2.547
b	2.300	2.408	2.327	2.423
	2.300	2.381	2.327	2.436
平 均	2.300	2.395	2.327	2.430
c	2.300	2.381	2.245	2.422
	2.312	2.327	2.354	2.476
平 均	2.306	2.354	2.300	2.449
d	2.286	2.354	2.272	2.300
	2.300	2.354	2.300	2.313
平 均	2.293	2.354	2.286	2.307

以上の結果に依れば反應溶液に酸性の強い緩衝液を加ふるに従つて酵素反應は促進せられて居る。故に其の最適を知らんと欲して、更に酸性の強い緩衝液を加へて實驗を反復して見た。其の時の酵素反應溶液の組成は前と同様の方法に依りて調製したる粗酵素溶液 10 ccm に 5 ccm の再生 Cellulose-Suspension を加へて之れに第八表に示す種々の緩衝液を 5 ccm 宛添加して其の全容を 20 ccm となし、前の場合と同様の處理、及び操作の許に實驗したのである。酵素反應溶液に加へたる緩衝液の種類並びに反應結果は次の通りである。

第 1 圖



分解試験の條件，並びに糖の定量方法は前の場合と全く同様である。

第九表 酵素反應結果
(0.5%過滿俺酸加里液滴定量)

第八表
酵素反應液に加へたる緩衝液の pH 價

番 號	緩衝液の pH 價
g	1.04
h	1.93
i	3.36
j	4.16
k	4.96

番 號	反 應 時 間			
	0 時間	24時間	48時間	72時間
g	ccm 8.9	ccm 9.0	ccm 8.9	—
	8.9	9.0	9.0	—
h	8.6	9.3	8.8	9.3
	8.6	9.0	9.0	9.2
i	8.55	8.8	8.8	9.5
	8.65	8.9	8.6	9.4
j	8.5	9.3	9.5	—
	8.6	9.0	9.6	9.3
k	8.8	8.7	9.5	9.3
	8.8	8.9	9.7	9.3

上掲二組の實驗は別々に培養したる菌株から調製した所の粗酵素液に就いての實驗結果であるけれども其の結果は概括すれば分解は主として酸性の側に於いて行はれるものであつて，粗酵素溶液に pH 5.28 の緩衝液を第八表に示す割合に加へたる反應溶

第十表
反應溶液 100 ccm 中の葡萄糖の瓦數

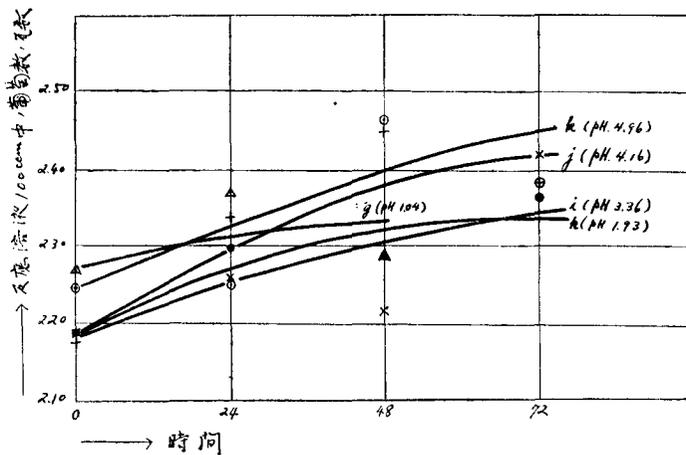
番 號	反 應 時 間			
	0 時間	24時間	48時間	72時間
g	gr 2.272	gr 2.300	gr 2.272	gr —
	2.272	2.354	2.300	—
平 均	2.272	2.327	2.286	—
h	2.188	2.300	2.272	2.381
	2.188	2.300	2.300	2.354
平 均	2.188	2.300	2.286	2.368
i	2.174	2.245	2.245	2.436
	2.200	2.272	2.188	2.408
平 均	2.187	2.259	2.217	2.422
j	2.161	2.381	2.436	—
	2.188	2.300	2.463	2.381
平 均	2.175	2.341	2.450	2.381
k	2.245	2.226	2.436	2.381
	2.245	2.272	2.490	2.381
平 均	2.245	2.249	2.463	2.381

液は最適水素イオン濃度を有することとなる。而して pH 5.98—3.36 の緩衝液を同様の割合に加へたるものは、尙相當の分解成績を示す。pH 1.93 以上 又は 3.98 以下の緩衝液を加へたる反應溶液に於いては分解は殆んど行はれないのである。

以上に依つて上述の様にして調製せる溶液は Cellulase を含む事を知るのである。

一體 Substrat が酵素溶液に溶存する場合には酵素溶液の稀釋率は分解速度に殆んど影響しないのであるが再生 Cellulose-Suspension の場合に酵素溶液に不溶性のまゝ存在する時には、其の糖化作用は其の表面に於ける反應であつて、表面に

第二圖



對しては酵素溶液の濃度に無關係であり得ないのである。其處で Karrer⁽⁵⁾ 氏は酵素溶液の濃度が幾何級數的に稀釋される時は Substrat の分解速度は算術級數的に減少する事を報告して居る。

此の事を確める爲めに次の如き實驗を行つて見た。即ち菌の克く繁殖したるものを處理して 376 gr の菌體と 370 ccm の培養廢液とを分離し、之れを上記と同様の操作のもとに得たる粗酵素溶液を 30°C 以下で

第十一表

番 號	粗酵素溶液の稀釋度
1	1/1
2	1/2
3	1/4
4	1/8
5	1/16
6	1/32

減壓濃縮して 125 ccm の粗酵素溶液を得た。此の溶液を第十一表に示す様に種々に稀釋し各稀釋液 20 ccm に再生 Cellulose-Suspension 10 ccm を加へ、之れに種々の緩衝液 15 ccm 宛加へて各、反應溶液の水素イオン濃度を pH 5.50 附近となし、全容を 45 ccm として各、に就きて同様の方法で分解試験を行ひ、其の直後、及び、24 時間後に於ける糖の生成量を定量したのである。但し實驗に際しては 1/1 のものは反應溶液の 1 ccm 他は 2 ccm を用ひたのである。今粗酵素溶液の稀釋度並びに實驗成績を示せ

第十二表

粗酵素溶液の稀釋度	0 時間後に於ける葡萄糖の量		24 時間後に於ける葡萄糖の量		24 時間中に於ける葡萄糖の増加數瓦數 (反應溶液 100 ccm 中)
	0.5% 過滿 俺酸加里 液滴定數	葡萄糖瓦數 (反應溶液 100 ccm 中)	0.5% 過滿 俺酸加里 液滴定數	葡萄糖瓦數 (反應溶液 100 ccm 中)	
1/1	17.1	9.3466	17.75	9.7473	0.4009
	17.1	9.3466	17.75	9.7473	
1/2	16.2	4.3948	16.45	4.4713	0.0459
	16.5	4.4866	16.55	4.5019	
1/4	8.9	2.2708	9.50	2.4340	0.1632
	8.9	2.2708	9.50	2.4340	
1/8	4.45	1.0914	4.65	1.1430	0.0322
	4.60	1.1301	4.65	1.1430	
1/16	2.45	0.5919	2.55	0.6168	0.0189
	2.45	0.5919	2.50	0.6047	
1/32	1.35	0.3267	1.40	0.3390	0.0123
	1.35	0.3267	1.40	0.3390	

ば次の通りである。(第十一表参照)

此の實驗成績に依つて見れば、24時間後に於ける糖の増加量は一つの例外を除きて粗酵素溶液の稀釋率の増加に従つて Substrat の分解速度は算術級數的に減少する事が解るのである。

C 要 約

(1) 稻藁を材料として調製せる培養基は、其の糖量 5.14%，全窒素 0.011%，pH 價 444 にして之れは白絹病菌の最適水素イオン濃度を保ち而も之等の各條件は從來最適とされたる杏寒天、又は麴寒天培養基のそれに大體に於いて一致し、其の發育成績は之等培養基に比較していさゝかの遜色なく寧ろ優るのである。

(2) 白絹病菌の菌體、並びに培養廢液から粗酵素液を作り、之れに再生 Cellulose-Suspension を加へ、更に pH 5.28 の緩衝液を加へて反應を調節せばよく纖維素の分解が進み、反應に依りて生ずる葡萄糖の増加量に依りて Cellulose の存在を確めることが出来る。pH 1.93 以上又は 5.98 以下の緩衝液を加へたるものに於いては、分解は殆んど起らない。

(3) 粗酵素溶液を幾何級數的に稀釋する時は纖維素の分解速度は算術級數的に減少する。

斯くの如くして白絹病菌は Cellulose を分泌することを知り得たのであるが、本實驗に使用せる酵素溶液は極めて粗なるものにして、此處には唯本菌中に Cellulase の存在を證明したに過ぎないが、今後の研究に依つて之れが精製分離に向ふと共に共存すると考へられる、Cellobiase, Lichenase, Xylase 又は mannase 或は其他の酵素に就きても實驗を進め度いと思ふ。

終りに臨み、本實驗を行ふに際して、終始御懇篤なる御指導と御校正を賜はりし恩師京都帝國大學農學部教授近藤金助先生に對して深謝すると共に、本菌の分譲と種々文獻の御教示とを仰ぎたる京都帝國大學農學部教授逸見武雄先生、並びに同助手瀬戸房太郎氏に對して厚く謝意を表すると共に、實驗上種々助力下されし近藤研究室浜才藏君に對しても亦感謝する次第である。(第八回大阪講演會に於て發表)

文 獻

1. H. Pringsheim :— *Z. Physiol. chem.*, 78, 266 (1912).
G. van Iterson :— *Zbl. Bakt.*, 11, 689 (1904).
P. Karrer, B. Joos u. M. Staub :— *Helv chim. acta*, 6, 800 (1923).
R. Falk u. W. Haag :— *Ber.*, 60, 225 (1927).
W. Ziese :— *Z. Physiol. chem.*, 203, 87 (1931).
W. Trager :— *Biochem. J.*, 26, 1762 (1932).
W. Grassmann, R. Stadler u. R. Bender :— *Ann.*, 502, 20 (1933).
W. Grassmann, L. Zechmeister, G. Toth u. R. Sadler :— *Ann.*, 503, 167 (1933).
2. 佐藤 :— 日本植物病理學會報第二卷第四號(昭和六年四月發行) p. 394.
3. 中田 :— *Bul. Sci. Fakul. Terk. Kyushu Imp. Univ.*, 2, 169 (1927).
中田 :— *Bul. Sci. Fakul. Terk. Kyushu Imp. Univ.*, 3, 293 (1929).
4. P. Karrer :— *Helv. chim. acta*, 8, 797 (1925).
5. P. Karrer :— *Helv. chim. acta*, 8, 797 (1925).