

研究ノート

椎茸菌体の低温倍数化処理による 微結晶セルロース分解力の増強

外山英男

発酵利用学研究室

2012年10月11日受付; 2013年1月29日受理

Enhancement of cellulose degrading ability in the mycelia of *Lentinula edodes* caused by autopolyploidization under lower temperature conditions

Hideo Toyama

Laboratory of Utilization of Fermentation, Minami Kyushu University,
Miyazaki 880-0032, Japan

Received October 11, 2012; Accepted January 29, 2013

A mycelial mat of *Shiitake* strain was treated with colchicine solution under lower temperature conditions and the micro-crystalline cellulose degrading ability was compared with that of the original strain. When the treated mycelia were incubated on the agar plates containing 0.1% (w/v) micro-crystalline cellulose for 3 weeks at 26°C followed by heating at 50°C for 24h, transparent zones which were caused by degradation of micro-crystalline cellulose were formed in the white agar plates. In the case of the original strain, such results could not be obtained. Furthermore, three enzyme activity related with cellulose degradation (Avicel, CMC-Na, and Salicin degrading activity) increased. From these results, it was suspected that these transparent zones in the agar plates were produced by the enhanced degrading ability of micro-crystalline cellulose in the treated mycelial mat. The enhancement of such degrading ability seemed to be caused by autopolyploidization under lower temperature conditions.

Key words: cellulase, colchicine, *Lentinula*, polyploid, nuclei.

緒言

椎茸には旨味成分や食物繊維が豊富に含まれており、宮崎県の中山間地の重要な特産品である^{1,2,3}。著者はこの椎茸の高付加価値化を目指し、その一環として同質倍数体の構築とその応用を検討している。椎茸は、ほだ木や菌床を用いて栽培されているので、セルロース分解力を向上させた場合、ほだ木や菌床上での子実体形成にいかなる影響が表れるか関心がもたれる。もし、早期に収穫が可能になるとカビや昆虫の被害を軽減できる可能性が出てくる。また、前述した椎茸の旨味成分や食物繊維の量もどのように変化するか関心がもたれ、もし、それらの量が增大するなら食材としての付加価値向上も望めることになる。前報では、

低温で倍数化処理を行うことにより、菌体内に安定に倍数核を構築することに成功し、そのような菌体は増殖性が向上することが判明した⁴。今回は、椎茸菌体の微結晶セルロース分解力に着目し、これを同方法で増強することを試みた⁵。椎茸の微結晶セルロース分解力と子実体に含まれる食物繊維量や収穫時期等との相関関係に関心がもたれる。

方法

菌株と培地

この実験には *Lentinula edodes* (IFO 30724) を使用した。この株はポテトデキストロース寒天 (PDA) (BBL) 培地上で26°Cで培養し、4°Cで保存した。

倍數化処理用培地として、Czapek 培地 25 ml を加えた 50 ml 三角フラスコに、グルコース (Wako) 0.25 g, ペプトン (BD) 0.13 g, コルヒチン (Wako) 0.025 g を加えて使用した (pH 7.0). Czapek 培地の構成は NaNO_3 2.0 g/l, K_2HPO_4 1.0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l, KCl 0.5 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/l, DW 1000 ml であった。

セルロース分解力評価用培地として、蒸留水 400 ml を加えた 1000 ml 三角フラスコに、微結晶セルロース (MERCK) 0.4 g, モルトエキス (日水製薬) 4.0 g, イーストエキス (極東製薬) 1.6 g, 寒天 (BD) 6.0 g を加えて使用した (pH 6.0).

酵素生産用培地として、蒸留水 50 ml を加えた 100 ml 三角フラスコに、微結晶セルロース 0.25 g, ペプトン 0.50 g, イーストエキス 0.2 g, Tween 80 (Difco) 0.025 ml を加えて使用した (pH 6.0). 遺伝安定性評価用培地としては PDA 培地を使用した。

低温倍數化処理法

寒天平板 (PDA) 培地上で 26°C, 10 日間培養したコロニー端部の菌体 2 センチ四方を 50 ml 三角フラスコに入れた倍數化処理用培地 25 ml に加え, 8°C で 30 日間静置培養した。

核染色法

菌体の一部をスライドグラス上でギームザ液 (Merck) に 10 分間浸漬して核染色を行い, カバーグラスをかぶせた後, 圧着し, デジタルカメラ (CANON A95) を用いて顕微鏡写真撮影 (OLYMPUS BH-2) を行った。

同様な操作を DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) 液 (Sigma) と蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX-50) を用いて行ない, ギームザ液で染色される箇所が核であることを確認した⁶⁾。

セルロース分解力評価法

元株ないしコルヒチン処理菌体 2 ミリ四方をセルロース分解力評価用培地上において 26°C で 21 日間培養した。その後恒温培養器 (LAB-LINE 120) 中で 50°C, 24 時間加熱し培地中の微結晶セルロースの分解状況を観察した。

酵素生産法

元株ないしコルヒチン処理菌体 3 ミリ四方を寒天培地から切り取って酵素生産用培地に加え, 回転振盪機 (TAITEC BioShaker BR-12FH) を用いて回転振盪培養 (160 rpm) を 26°C で 3 週間行った。培養後, ガラスフィルター (3G-3) を用いて, 菌体を除去し, ろ液を酵素液として使用した。

ろ紙崩壊力評価法

酵素液 5.0 ml と 1.0 cm 四方のろ紙 (Wako No.2) 1 枚を L 字管 (120 mm × 68 mm) に加え, モノ振盪機 (TAITEC Monod Shaker PERSONAL-11) を用いて 50°C でモノ振盪を行い, ろ紙が崩壊するまでの時間をデジタルストップウォッチ (Casio) で計測した。

セルロース分解酵素活性測定法

0.5 g の微結晶セルロース (Merck), CMC-Na (Wako), ないしはサリシン (Wako) を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 50 ml に加えて基質として使用した。酵素液 2 ml と基質 4 ml を試験管に加え, 45 度に傾けて 50°C で往復振盪機 (125 stroke/min) を用いて 1 時間反応させた。微結晶セルロース懸濁液を加えた試験管は 15 分ごとに攪拌した。

反応後, 反応液をろ紙 (Wako No.2) でろ過後, ろ液中の還元糖を 3, 5-DNS 法で測定した⁶⁾。還元糖量より培養液 1 ml あたりの酵素活性を算出し, 1IU は「1 分間に 1 マイクロモルのグルコースと等量の還元糖を生成する酵素量」と定義した。菌体重量は, 菌体をアルミカップに乗せて 80°C で 24 時間乾燥後, 秤量して算出した。

遺伝安定性評価法:

斜面培地上の菌体 2 mm 四方を 1 株につき 5 枚の遺伝安定性試験用培地上に置き, 恒温培養器 (IUCHI IC-450P) を用いて 26°C, 4 週間培養し, 扇状セクターの有無を観察した。

結果

低温倍數化処理

図 1 に示すように, 核染色により菌体内の核径が増大していることが確認された。これらの大型の核は倍數核とみなした。

固体培地でのセルロース分解評価

図 2 に示すように, コルヒチン処理株は 0.1% (w/v) 微結晶セルロースを含むセルロース分解力評価用寒天培地をほぼ半透明化した。しかし元株ではこのような結果は得られなかった。

ろ紙崩壊力評価

1 cm 四方の正方形のろ紙はコルヒチン処理株の酵素液中で 50°C で 3 時間モノ浸透したが, ろ紙は崩壊にまで至らなかったが, 角の部分が丸くなった。元株の酵素液では四角いままであった。

セルロース分解酵素活性測定

表 1 に示すように, コルヒチン処理株ではアビセル, CMC-Na, サリシン加水分解活性が元株よりもそれぞれ 1.9 倍, 1.6 倍, 1.8 倍に向上していた。液体培養中に生成した菌体重量に関しては処理株がわずかに多い程度であった。

遺伝安定性試験

コルヒチン処理株は 4 週間培養しても扇状セクターを形成することはなかった。扇状セクターは遺伝的不安定性の目安となるもので, これの形成がないことから遺伝的に安定であると考えられた。

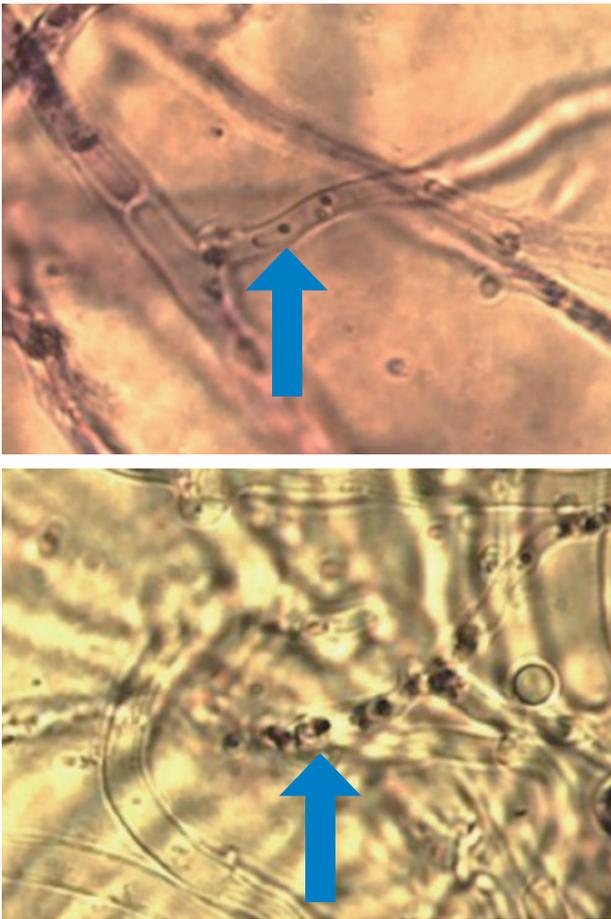


図1. 元株と処理株の菌体核染色結果

上: 元株, 下: 処理株 菌体の一部をスライドガラス上でギームザ液に10分間浸漬して核染色を行い, カバーガラスをかぶせた後, 圧着し顕微鏡写真撮影を行った。

表1. セルロース分解酵素活性測定結果

菌株	加水分解活性 (IU/ml)			菌体重量 (mg)
	Avicel	CMC-Na	Salicin	
処理株	19	32	16	218.4
元株	10	20	9	205.4

菌体をイーストエキス, ペプトン, Tween 80, それに微結晶セルロースを含む液体培地に加え, 26℃で3週間回転振盪培養を行った。還元糖量は3,5-DNS法で測定した。

考 察

固体培地での微結晶セルロース分解力の評価について, 処理株だけがなぜ培地を半透明化できたのかを検討した。倍数化処理した菌体中には多数の倍数核が存在し, 倍数体の遺伝状況にある。この倍数化による強勢効果によって微結晶セルロース分解力が増強され, 寒天培地中の微結晶セルロースの大半が分解されたと考えられた。

処理菌体を液体培養してセルロース分解活性を測定した結果, すべての酵素活性が向上しており, その中のアビセル分解活性とサリシン分解活性が微結晶セル

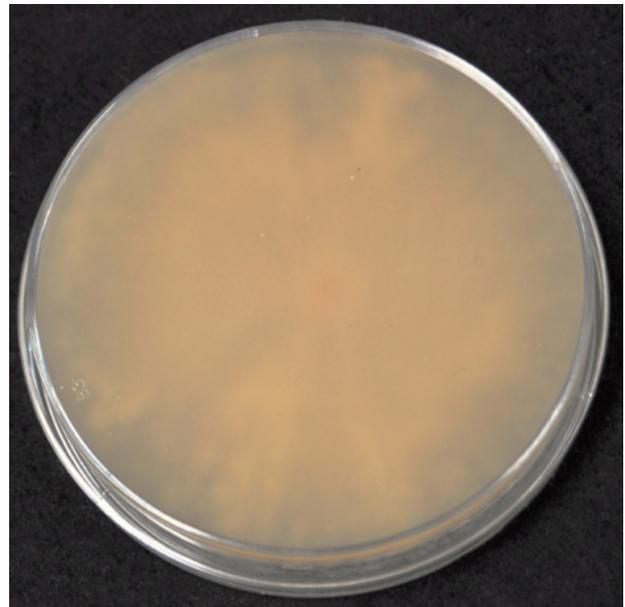
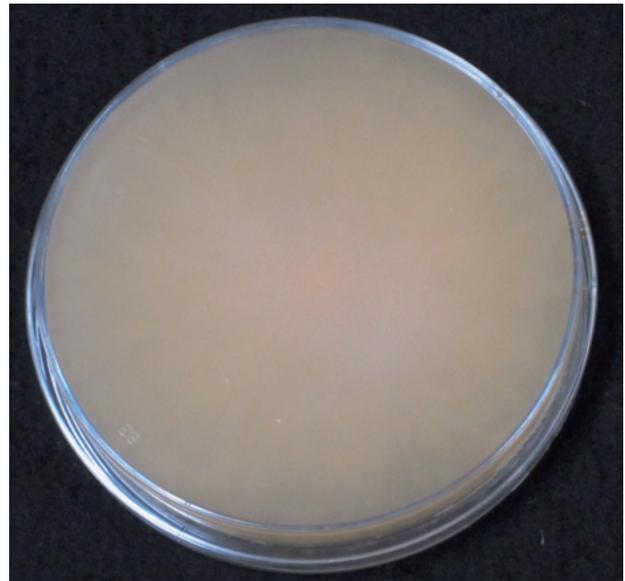


図2. 固体培地での微結晶セルロース分解力評価結果

上: 元株, 下: 処理株 元株ないし処理菌体2ミリ四方をセルロース分解力評価用培地上に置き, 26℃で21日間培養した。その後恒温培養器中で50℃, 24時間加熱し培地中の微結晶セルロースの分解状況を観察した。

ロース分解に関与する酵素活性であった。これらの結果は, 処理株において培地中の微結晶セルロースの大半が分解されて培地が半透明化したのは増強された微結晶セルロース分解力によるとする推測を裏付けた。また, 液体培養中に生産された処理株の菌体量が予想よりも少なかった点については, 培養中に同時に生産されたβ-1,3-グルカナナーゼ等によって菌体が分解された可能性が示唆された。今後の研究課題としては, より高濃度の微結晶セルロースを分解させることを視野に入れ, 菌体内の倍数核の割合と微結晶セルロース分解力との関連をさらに明確化することを目指す。

要旨

椎茸菌体を低温下で倍数化処理し、その微結晶セルロース分解力を元株と比較した。

0.1% (w/v) 微結晶セルロース含有寒天培地上で元株と処理株を26℃で3週間培養後、50℃で24時間加熱したところ、処理株は培地中の微結晶セルロースを分解して透明域を形成したが、元株ではそのような結果は得られなかった。また、処理株においてはセルロース分解に関わる Avicel, CMC-Na, サリシン分解活性すべてが元株よりも向上していた。これらの結果から、処理株が微結晶セルロース含有寒天培地で透明域を形成できたのは、処理株の向上した微結晶セルロース分解力によると考えられた。

そのような分解力の向上は低温下での同質倍数体化によって生じたと推測された。

引用文献

- 1) Kobayashi, H., Imanaka, M., Inokuchi, N., Koyama, T., and Irie, M. (1998) Characterization of ribonucleases from culture medium of *Lentinus edodes*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 1604-1608.
- 2) Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Kapoti, M., Komaitis, M., Aggelis, G., and Philippoussis, A. (2012) Mushroom polysaccharides and lipids synthesized in liquid agitated and static cultures. Part I: screening various mushroom species. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **167**: 536-551.
- 3) 田原博美, 中島豊 (1999) シイタケ短木栽培技術の開発に関する研究日本林学会九州支部研究論文集 **52**: 123-124.
- 4) 外山英男 (2009) 有糸分裂阻害剤を用いたシイタケ高増殖性菌体の構築 南九大研報 **40A**: 87-90.
- 5) Wiesmann, V., Held, C., Palmisano, R., and Wittenberg, T. (2012) Segmentation of HeLa cells in phase-contrast images with and without DAPI stained cell nuclei. *Biomed. Tech.* **57**: 519-522.
- 6) Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.