

Corticium rolfsii の β -グルカン生産に対するチアミン および亜鉛イオンの効果

梶 明, 佐藤 優行, 中村 八郎

緒 言

微生物には多糖類を培養液中に分泌するものが多い。*Corticium rolfsii* が β -グルカンを培養液中に分泌することは、Batra ら⁽¹⁾によって1969年に発表された。また Basidiomycetes QM 806 が細胞壁中に β -グルカンを生産することが Bush, Horisberger⁽²⁾ らによって報告されているが、この菌は Reese, Mandels の提供したもので、*C. rolfsii* とは異なり *Ptychogaster* 属のかびのようである⁽³⁾。

著者らの研究グループは、*C. rolfsii* が生産する酸性酵素群について一連の研究を行ってきたが、このかびは *Aspergillus niger* などに比べると生育が遅い。しかし、これをふすまの抽出液または米糠の抽出液を含む培養液を使用して培養するときは、単一炭素源の糖類を使用するときよりもはるかに生育が速く、菌糸の量も多い。そこで、生育促因子の一つであるチアミンの影響を検索中、その濃度がある量を越すときは培養液の粘度が著しく高くなる現象を見いだした。本報においては *C. rolfsii* が生産する β -グルカンの生産条件について報告する。

実験方法

菌 Table 1 に示す 13 strain が実験に使用された。このうち、*C. rolfsii* K2 は京都大学植物病学研究室において分離され、内藤、谷を通じて分離された。*C. rolfsii* C10-2-1~C10-2-5 は農林省農業技術研究所の富永博士から分譲された。

培養方法 グルコース 50g, ペプトン 10g, NH_4NO_3 0.5g, KH_2PO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 2% FeCl_3 0.3ml を 1l の脱イオン水に溶解し、pH を 5.4 に調節した。培養は 500ml 容振とうフラスコに培養液を 50ml 入れて菌を接種し、27°C で往復振とう機上で振とう培養を行なった。種菌にはじゃがいも抽出液寒天シヨ糖添加斜面培養基に新しく生育した菌糸または菌核を使用した。

洗浄菌体の調製法 上記の基本培養液を使用して 7 日間振とう培養を行なった後、菌体を布戸過で集め、0.1M クエン酸ナトリウム-HCl 緩衝液 (pH 2.0) で 3 回洗浄し、次に 10 分間 10,000×g で遠心分離して洗浄菌体を得た。この菌糸を同一緩衝液中に懸濁した。

多糖類の調製法 *C. rolfsii* IFO 4476 をチアミン添加培地で培養した後、菌糸を吸引戸過し、粘稠な戸液を 1.5 倍容のエタノール中に攪拌しながら添加すると白色繊維状の沈殿が得られた。これを布戸過で集め、エタノールで洗浄した後、脱イオン水に溶解する。以上の操作を 6 回繰り返した。つぎに、この溶液を Visking セロファンチューブに入れ、水を外液として 24 時間透析した後、再度 1.5 倍容のエタノール中に滴加して沈殿を生じせしめた。沈殿を戸過した後、50°C で真空乾燥した。乾燥物は粉碎して白色粉末を得た。

多糖類の定量法 溶液の粘度測定によって行なった。培養戸液を適当に希釈した後、Ostwald 粘度計を使用して 30°C で粘度を測定した。上記の方法で調製した多糖類を使用して、その濃度と比粘度との関係を測定すると、Fig. 1 に示すとおり濃度 0.2~0.8mg/ml の範囲で直線関係が得られた。この検量線を使用して溶液中の多糖類の濃度を求めた。

糖の定量法 培養液中および酵素作用液中の還元糖量は原則として Nelson-Somogyi 法^(4,5) により定量した。全糖定量には Phenol- H_2SO_4 法⁽⁶⁾ も使用した。

菌体量の測定法 菌糸を戸液で戸過して、熱水で充分洗浄した後乾燥してその重量を測定した。

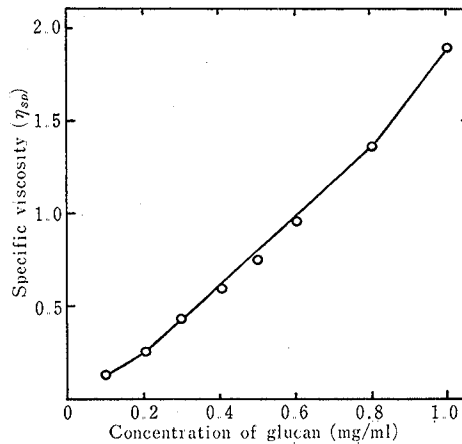


Fig. 1. Relationship of specific viscosity to concentration of glucon.

酵素活性の測定法

(1) β -1, 3-gluconase 0.2% 基質溶液 1.0ml, 0.2M McIlvaine 緩衝液 (pH 4.5) 0.2ml, 酵素液 0.2ml, 脱イオン水 0.6ml およびトルエン 1 滴を配合し, 30°C で30分ないし24時間酵素作用を進めた後, 作用液 0.5ml を取り 0.1M Na_2CO_3 溶液 0.5ml を加えて反応を停止した。生成した還元糖を定量し, グルコースとして表わした。基質には上記の *C. rolfisii* 多糖類および市販のラミナリン (K & K Laboratories, Inc.) を使用した。 β -1, 3-gluconase は *C. rolfisii* が生産した酵素を本研究室において高度に精製したもので, *exo*- β -1, 3-gluconase である⁽⁷⁾。

(2) α -amylase 0.2% 基質溶液 0.5ml, 0.2M McIlvaine 緩衝液 (pH 4.5) 0.25ml, 酵素液 0.25ml を配合し, 30°C で2時間酵素作用を進めた後, 上記同様に反応を停止して, 生成還元糖量を求めた。基質には上記多糖類および可溶性澱粉 (和光純薬工業株式会社) を使用した。使用した α -amylase は *Aspergillus oryzae* の精製酵素 (三共株式会社) を使用した。

(3) glucoamylase α -amylase と同様の配合割合で酵素作用を進めた後, 還元糖を定量した。使用した glucoamylase は *C. rolfisii* が生産した酵素を本研究室で浪越がほぼ均一タンパク質にまで精製した酵素である (未発表)。

ペーパークロマトグラフィー 東洋汙紙 No. 51 を使用し, 糖を添付した後, 下降法で展開した。溶媒 A: n-ブタノール, 酢酸, 水 (4:1:5), B: n-ブタノール, ピリジン, 水 (6:4:3) C: フェノール, 水 (5:1)。糖の呈色にはアニリン水素フタル酸またはアルカリ性 AgNO_3 溶液^(8,9) を使用した。

実験結果

I 各種 strain による多糖類の生産

予備実験の結果, 培養液中にチアミンを添加するとき多糖類がよく生産されることが認められた。上記の基本培地にチアミン 500 $\mu\text{g}/\text{l}$ を加えて7日間振とう培養したとき, 培養液中に分泌される多糖類の量を Table 1 に示す。13の strain すべてが多糖類を生産し, C10-2-4 が最も良好な成績を示し, C10-2-5, C10-2-3, IFO 4878, 4476 などが良好な成績を示した。以下の実験では, 研究室で使いなれた IFO 4476 を使用した。

II 多糖類生産に対する培養条件

1. 炭素源の影響 すでに発表したとおり, *C. rolfisii* はペントースを資化する能力は小さい^(10,11)。本実験においても, アラビノースおよびキシロースを炭素源とするときは菌の生育は悪く, 多糖類生産量もきわめて少量であった。グルコース, マンノース, マルトース, ショ糖, 可溶性澱粉は生育も良好であり, 多糖類生産量も同じ程度であった。ガラクトース, フラクトースを炭素源とするときは生産量はきわめて少量であった。そこで, 以下の実験では炭素源

Table 1. Production of glucan by thirteen strains of *Corticium rolfsii*

Strain	Amount of glucan (mg per ml of culture fluid)
<i>Corticium rolfsii</i>	
IFO 4476 (<i>Hypochnus centrifugus</i>)	3.5
IFO 4878 (<i>Sclerotium rolfsii</i>) (<i>C. rolfsii</i> ATCC 24964)	3.7
IFO 5253 (<i>C. centrifugum</i>)	0.5
IFO 6142 (<i>C. centrifugum</i>)	2.7
IFO 6146 (<i>C. rolfsii</i> ATCC 24965)	1.7
IFO 5926	1.0
K 2 (<i>C. rolfsii</i> ATCC 24963)	1.1
C 10-2-1	0.6
C 10-2-2	3.0
C 10-2-3	4.2
C 10-2-4	7.0
C 10-2-5	4.4
IAM 9028 (<i>C. centrifugum</i>)	1.6

Culture medium was composed of 50 g of glucose, 10 g of peptone, 0.5 g NH_4NO_3 , 0.5 g of KH_2PO_4 , 0.2 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 ml of 2% FeCl_3 solution, 500 μg of thiamine and 1 l of deionized water. The initial pH was adjusted to 5.4. The cultivation was carried out at 30°C, for 7 days.

として主にグルコースを使用した。上記と同様に、チアミンを添加した基本培地を用いて、グルコースの濃度を0～10%として多糖類の生産量を検討した。Table 2の結果が示すとおり、培養液中のグルコース濃度は3%または5%が良好であった。以下の実験ではグルコースの濃度を5%として培養液を調製した。

Table 2. Effect of glucose concentration on the production of polysaccharide

Concentration of glucose (per cent)	Amount of glucan (mg per ml of culture fluid)			Dry weight of mycelia (mg per 50 ml of culture fluid)			Ratio of glucan to dry wt. of mycelia (mg/mg per ml of culture fluid)		
	5	7	9 days	5	7	9 days	5	7	9 days
2	*	*	*	—	321	—	—	—	—
3	3.8	3.3	0.3	428	556	426	0.44	0.30	0.04
5	2.5	3.6	4.5	381	513	764	0.33	0.35	0.29
7	—	2.7	—	—	550	—	—	0.25	—
10	—	2.7	—	—	550	—	—	0.25	—

* Polysaccharide produced was unable to be assayed by viscosity method because its concentration was very low.

3. 窒素源の影響 各種窒素源を培養液に加えて多糖類生産に及ぼす影響を検討した。添加量は基本培養液中、窒素として約0.15%になるように調製した。各窒素源ごとにチアミン添加 (500 $\mu\text{g}/\text{l}$) とチアミン無添加の2種類の培養液を定量した。いずれも8日培養後、多糖類を定量した。チアミン添加培養基においては酵母エキス、ペプトン、 NH_4NO_3 併用、カザミノ酸、ペプトン添加の場合には生産が順調であったが、その他の窒素源はよい結果を示さなかった。チアミン無添加の場合には酵母エキスを窒素源としたときのみ良好な成績を示した。

3. 金属塩の影響 酵母エキスの効果が明らかになったので、代表的金属塩の効果を検討した。基本培地から FeCl_3 を除き、チアミンを $500\mu\text{g/l}$ を含有する培養基に代表的金属塩を加えてその効果を調べた。Table 3 に示すとおり、 Zn^{2+} の効果が著しいことがわかった。この効果は菌糸の増殖にもみとめられた。

Table 3. Effect of metal ions on the production of glucan

Salt	Concentration (μg per ml)	Amount of glucan (mg per ml of culture fluid)	Weight of mycelia (mg per 50 ml of culture fluid)	Ratio of glucan to dry wt. of mycelia (mg/mg per ml of culture fluid)
None	—	3.4	681	0.25
FeCl_3	6.0	3.3	467	0.35
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.0	9.8	859	0.57
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.6	3.3	521	0.32
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3.0	1.1	465	0.12

4. ビタミンの影響 チアミンの効果が明快になったので、そのほかのビタミンの効果を検討した。Table 4 に示す各種のビタミンを単独または混合して培養液に添加し、多糖類生産に対する効果を調べた。その結果、チアミンのみが効果を示し、その他のビタミンはまったく菌糸の生産および多糖類生産に対する効果を示さなかった。

Table 4. Effect of vitamins on the production of glucan

Vitamin	Concentration (g per l)	Amount of glucan (mg per ml of culture fluid)	Weight of mycelia (mg per 50 ml of culture fluid)
None	0	negligible	98.7
Thiamine HCl salt	500	2.67	568.8
Riboflavine	500	negligible	107.0
Pyridoxal phosphate	500	negligible	100.0
Nicotinic acid	2000	negligible	87.2
Biotin	50	negligible	94.0
Pantothenic acid	2000	negligible	86.0
<i>p</i> -aminobenzoate Na salt	500	negligible	92.2
Mixture of vitamins (B_1 , B_2 , B_6)	500	2.82	438.0

5. 酵母エキスの影響 上記のとおり、酵母エキスの効果が著しいので、その適当な濃度を検討した。基本培地中に酵母エキスを0~0.2%添加し、常法どおり培養した後多糖類の生産量を測定した。その結果、多糖類の生産量は酵母エキスの濃度の上昇とともに高くなり、0.1%でその効果を著しく現わし、0.2%で最高を示した。

6. 培養経過と多糖類生産 前項までの実験をもとに、*C. rolfssii* による多糖類生産のための最適培養基を Table 5 のように設定した。この最適培養基を用いて常法通り *C. rolfssii* を振とう培養し、経時的に多糖類の生産量を測定した。培養液の pH、菌糸の量ならびに糖類を追跡した。その結果を Fig. 2 にまとめた。培養7日後多糖類の量は最高、9.3mg/ml に達し、対消費糖22%、対菌糸量59%であった。

7. 培養におけるチアミンの効果 培養の始めからチアミンを添加する実験では7日間振とう培養継続中、チアミンの濃度が $250\mu\text{g/l}$ までは菌糸の量、多糖類の量ともに直線的に増加した。そこで、上記の基本培養基（チアミンを含まない）を用いて6日間 *C. rolfssii* を振とう培養した後、チアミンを各種の濃度に無菌的に加え、再び2日間振とう培養を継続した。培養終了後多糖類の量および菌糸量を測定し、結果を Fig. 3 に示す。菌糸の生育後チアミンを添加したときは、その濃度 $100\mu\text{g/l}$ まで多糖類生産量が増加し、対菌糸量の比は0.29となった。すなわちチアミンの効果は菌糸の生育に有効であるとともに多糖類生産に対しても直接的な効果があるようであった。

8. 洗浄菌体による多糖類生産に対するチアミンの効果 実験方法の項に述べたとおり洗浄菌体を調製し、湿潤

Table 5. Typical cultivation medium for the production of glucan

Composition	Concentration (g/l)
Glucose	50.0
Peptone	10.0
NH ₄ NO ₃	0.5
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.006
Thiamine HCl salt	500 (μg)

The nutrients were dissolved in deionized water and the initial pH was adjusted to 5.4.

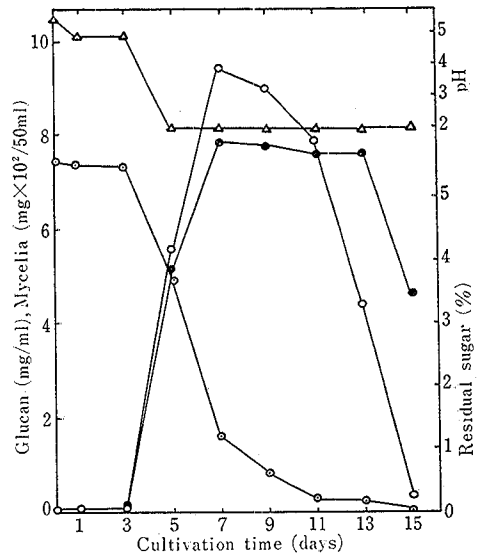


Fig. 2. Time course of cultivation and production of glucan. The fungi were grown in the same medium as shown in Table 5.

—○— glucan, —●— mycelia, —○— residual sugar, —△— pH.

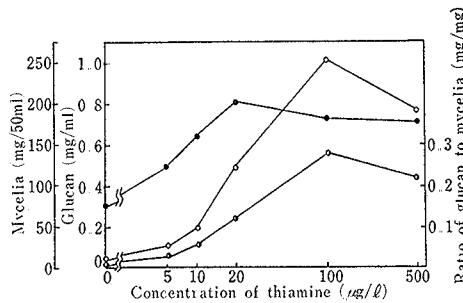


Fig. 3. Effect of thiamine on the production of glucan in cultivation.

After the fungi were grown in the basal medium without thiamine for 6 days, various amounts of thiamine were added to the culture fluid and the cultivation was carried out for further 2 day.

—○— glucan, —●— mycelia, —○— ratio of glucan to mycelia.

状態の重量約 130mg/ml の濃度に 0.1M クエン酸ナトリウム-HCl 緩衝液 (pH 2.0) 中にけんだくさせた。このけんだく液 6ml にグルコースを 2% 添加し、さらにチアミンを 0~100μg/l 添加して最終液量 8ml とした。この液を L 字型フラスコ (直径 1.8cm, 9.8×12.3cm) に入れ、30°C の湯浴中、モノ型振とう機 (60回/分) 上で 8 時間振とうした後多糖類の生産量を測定した。チアミン濃度 0~20μg/l までは直線的に多糖類の生産量が増加し 20μg/l 以上では増加が認められなかった。なお、けんだく液を 8 時間振とうした前後において菌糸の量に変化が認められなかった。

III 多糖類の性質

1. 純度 乾燥多糖類粉末を用いて 0.2% の溶液を作製し、その 0.5ml に 2N H₂SO₄ 0.5ml を加えてよく混合し、100°C の湯浴中で 5 時間加水分解を行なった後、アルカリで中和、沝過して得られた沝液を 10ml に定容した。その

一定量をとって還元糖量を定量した。多糖類 100.0mg から 108.0mg の還元糖（グルコースとして）が得られた。ケトースの検出反応，カルバゾール 硫酸反応，ニンヒドリン反応はいずれも陰性であった。これらの結果から，*C. rolfssii* の生産する多糖類はアルドースのみを含みケトース，ウロン酸ならびにアミノ酸は含有されないものと判定した。但し，多糖類の均一性は今後の研究課題である。

2. 構成糖 試料を $1N H_2SO_4$ 中で $100^\circ C$ で 5 時間加熱した後，炭酸バリウムで中和し，生じた沈殿を濾過し，洗浄してその濾液を洗液をあわせて減圧下で濃縮乾固した。これに脱イオン水を加えて溶解し，ペーパークロマトグラフィーにかけた。実験方法の項に記載した溶媒 A, B, C, を使用して展開し，呈色したところ構成糖の大部分はグルコースであることが確認された。

3. β -1, 3-glucanase, α -amylase および glucoamylase の作用 実験方法の項目に記載した 3 種類の精製酵素を使用して，*C. rolfssii* の多糖類溶液に配合し，その酵素作用を検討した。活性がみられたのは β -1, 3-glucanase のみであり， α -amylase および glucoamylase には活性はみられなかった。しかも， β -1, 3-glucanase 作用もラミナリンを基質とした作用液に比較すれば，初速度は 140 分の 1 にすぎなかった。24 時間作用後も *C. rolfssii* の多糖類の分解率は 1.6% にとどまった。したがって，本多糖類は β -1, 3-グルコシド結合を有していると考えられるが，その他の結合様式も併せ持っているので，酵素作用が速かに停止されるものと判断された。

4. 多糖類溶液の粘性 本実験で得られた多糖類は粗製品であり，その均一性については今後の問題であるが，溶液の高粘性は特性である。市販の粘性多糖類と比較して，その粘度を測定した結果を Fig. 4 に示す。pH 4.0, $30^\circ C$ において 0.1% 以下の低濃度溶液で高い粘度を示した。pH 8.0 の溶液においても同様な結果が得られた。

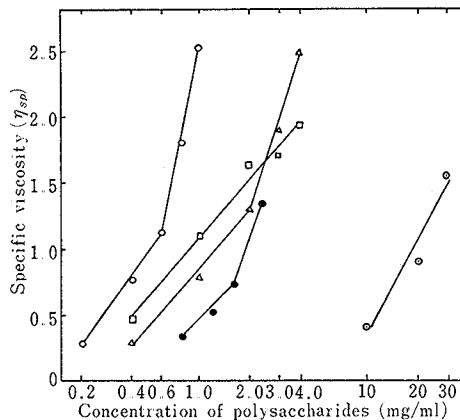


Fig. 4. Relationship of specific viscosity to concentration of various polysaccharides. Polysaccharides were dissolved in deionized water and their pH was adjusted to 4.0. The viscosity measurement was carried out at $30^\circ C$.
—○— glucan of *C. rolfssii*, —△— pectin, —□— carboxymethyl cellulose (CMC), —●— tamarind seed polysaccharide, —●— dextran.

考 察

Batra ら⁽¹⁾は *C. rolfssii* をグルコース，酵母エキス等を含有する培養基中で培養して，多糖類を得，これが β -D-(1→3)-グルコシド結合を主鎖とし，側鎖に β -D-(1→6)-結合のグルコース残基を有していることを証明した。彼等は酵母エキスを使用したのてチアミン含有培養基を使用したことになるが，その効果については明記していない。一方 Bender ら⁽¹²⁾は *Pullularia pullulans* がプルランを生産する際，その収率増加にチアミンが効果のあることを報告した。

本研究においては，*C. rolfssii* の β -グルカン生産に対してチアミンが明らかに有効であることを証明した。菌の生育に対して効果を示すのみならず，多糖類の生産または菌体外分泌についても有効であることを示した。*C. rolfssii* は単糖類を炭素源とするとき，その糖消費率が低い。とくにペントースのときに著しい。ヘキソースを使用するときも

この傾向は強く、本研究においてもグルコースの糖消費率は28%であるにすぎないが、培養液にチアミンを添加するときは始発グルコース濃度5.6%がほとんど消費しつくされた。この結果から分るとおり、チアミンの添加はグルコースの代謝に必須であり、この菌がチアミン合成能を欠くことを示す。菌の生育にも有効であることは当然であると考えられる。しかし、本実験結果はチアミンの添加は糖代謝のみならずグルカン合成、分泌にも効果があることを示している。このチアミン効果の機構は今後の研究課題であろう。

本研究で得られた多糖類は β -グルカンを中心とするものと考えられるが、とくにその高い粘性は注目すべきである。現在、食品工業において使用されているペクチン、カルボキシメチルセルロース、タマリンド種子多糖類に比べても、なお粘性は高い。今後、応用面における研究の発展が期待される。

要 約

1. *C. rolfii* に属する 13 strain はチアミン添加培養基を用いた場合いずれも粘性 β -グルカンを分泌した。
2. *C. rolfii* IFO 4476 を用い、多糖類の生産条件を検討した。グルコース 5%, ペプトン 1%, NH_4NO_3 0.05%, KH_2PO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0006%, チアミン塩酸塩 500 $\mu\text{g}/\text{l}$ (脱イオン水使用) が好適な培養基であった。27°C, 7日間の振とう培養により多糖類の分泌量は 9.3g/l であり、対消費糖生産比率は 22%であった。
3. 本菌の多糖類の生産にはチアミンを培養基に添加することが必要であり、この添加は菌糸の生育のみならず、グルカン生産または分泌機構にも関連があると判断した。

内藤中人名誉教授に対する謝辞

当研究室においては1963年三国直世志君の卒業論文に *C. rolfii* をとりあげて以来、このかびの生化学的研究が進展し、とくに酸性酵素群については多数の新知見が得られている。この発見の契機は内藤先生による *C. rolfii* の分譲であった。ここに同先生の退官記念号の出版に際して、当研究室の小論文を捧げ、深甚なる感謝の意を表する。

strain C10-2-1~5 を分譲下さった農林省農業技術研究所富永時任博士に感謝する。

文 献

- | | |
|---|---|
| (1) BAIRA, K. K., NORDIN, J. H. and KIRKWOOD, S.: <i>Carbohydr. Res.</i> , 9 , 221 (1969). | (7) 梶 明, 大崎武久, 吉原 収: <i>農化</i> , 45 , 278 (1971). |
| (2) BUSH, D. A., and HORISBERGER, M.: <i>ibid.</i> , 22 , 361 (1972). | (8) TREVELYAN, W. E., PROCTER, D. P. and HARRISON, J. S.: <i>Nature</i> , 166 , 444 (1950). |
| (3) REESE E. T., and MANDELS M.: <i>Can. J. Microbiol.</i> , 5 , 173 (1959). | (9) SMITH, R. H.: <i>Biochem. J.</i> , 57 , 140 (1954). |
| (4) NELSON, N.: <i>J. Biol. Chem.</i> , 153 , 375 (1944). | (10) KAJI, A. and YOSHIHARA, O.: <i>Appl. Microbiol.</i> , 17 , 910 (1969). |
| (5) SOMOGYI, M.: <i>ibid.</i> , 160 , 61 (1954). | (11) KAJI, A. and ICHIMI, T.: <i>ibid.</i> , 18 , 1036 (1969). |
| (6) DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. and SMITH, F.: <i>Anal. Chem.</i> , 28 , 350 (1956). | (12) BENDER, H., LEHMANN, J. and WALLENFEELS, K.: <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 36 , 309 (1959). |

EFFECTS OF THIAMINE AND ZINC IONS ON THE β -GLUCAN
PRODUCTION BY *CORTICIUM ROLFSII*

Akira KAJI, Masayuki SATO and Hachiro NAKAMURA

Summary

Corticium rolfsii is a plant pathogen belonging to the Basidiomycete. The 13 strains including *Corticium centrifugum*, *Sclerotium rolfsii*, excreted β -glucan into the culture fluid. The best culture medium for production of polymer was found to contain 50 g of glucose, 10 g of peptone, 0.5 g of NH_4NO_3 , 0.5 g of KH_2PO_4 , 0.2 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.006 g of $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 500 μg of thiamine HCl salt, in 1 L of deionized water. The initial pH was adjusted to 5.4, and the cultivation was carried out at 27°C for 7 days under aerobic condition. Thiamine had a remarkable effect for growth of mycelia and production of polymer. Zinc ions also stimulated the production. The yield of polymer was calculated to be 22 per cent of the consumed glucose. The polysaccharide was hydrolyzed by the purified β -1, 3-glucanase to small extent. Its solution was found to be highly viscous as shown in Fig. 4.

(1975年10月31日 受理)