岐阜大学機関リポジトリ
Gifu University Institutional Repository

白色腐朽菌の育種と培養に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2014-08-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 三浦, 雅彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2319

氏　　名（本(国)籍）	三　浦　雅　彦　（和歌山県）
学　位　の　種　類	博士（農学）
学　位　記　番　号	農博乙第75号
学位授与年月日	平成15年9月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学　位　論　文　題　目	白色腐朽菌の育種と培養に関する研究
審　査　委　員　会	主査　静岡大学　教　授　西　田　友　昭
	副査　信州大学　教　授　徳　本　守　彦
	副査　静岡大学　教　授　滝　　欽　二
	副査　岐阜大学　教　授　大　橋　英　雄

論　文　の　内　容　の　要　旨

未晒クラフトパルプ中に残留するリグニンを、白色腐朽菌あるいはその酵素で分解してパルプを漂白しようとする「バイオブリーチング」は、塩素系漂白剤の使用量を低減しうる環境保全型のパルプ漂白法として注目されている。これまでに、高活性・高選択性リグニン分解菌（白色腐朽菌）IZU-154株を用いる生菌法でのバイオブリーチングおよびマンガンペルオキシダーゼ(MnP)を用いる酵素法でのバイオブリーチングが試みられており、両法とも全晒パルプを得るに必要な塩素系漂白剤を70%以上低減しうることが示されている。しかしながら、より実用的なバイオブリーチングプロセスを確立するには、生菌および酵素法において解決すべき課題がある。すなわち生菌法では、リグニン分解速度を高めて菌処理時間を短縮することや、セルロース分解を抑制してパルプ収率や強度を向上させる必要がある。また、MnPを用いる酵素法では、白色腐朽菌にMnPを短時間でかつ大量に産生させうる液体培養技術を確立し、MnP価格を安価にする必要がある。このような背景から、本論文では実用的なバイオブリーチングプロセスの確立を目的とし、変異処理によって白色腐朽菌IZU-154株のリグニン分解活性および選択性をさらに高める育種改良およびIZU-154株による効率的なMnP大量産生を可能とする培養技術を検討した。

IZU-154株は胞子を形成せず栄養菌糸も2核性であることから、変異処理を行っても、その変異が表現型として現れ難いことが予想される。このことから先ずは、IZU-154株の栄養菌糸体をプロトプラスト化し、その再生株から変異処理を施し易い単核性の菌株を取得する試みを行った。その結果、リグニン分解活性および生育力が野生株（IZU-154株）と同等の単核性菌株（IZU-154-22株）が分離され、IZU-154-22株を元株として変異処理（紫外線照射、コルヒチン－ベンゾイミダゾール処理）を行うことで、野生株よりもリグニン分解活性に優れ、セルラーゼ分解活性が抑制された変異株の取得に成功した。

次に、野生株（IZU-154株）によるリグニン分解にはMnPが鍵酵素として関与することから、MnPの効率的な産生を可能とする培養技術の確立を試みた。ジャーファーメン

ターを用いる回分培養において、酸化還元電位およびpHはMnP産生挙動をモニタリングする際の培養パラメーターとなりうること見いだし、ジャーファーメンターを用いる濾過連続培養によって、回分培養よりもMnP産生効率を約2倍高めうることも明らかにした。

さらに、高窒素（HN）条件下でのMnP産生能に優れた変異株の取得も試み、紫外線照射処理を行った単核性菌株（IZU-154-22株）のプロトプラスト再生株（90,000株）から、低窒素（LN）条件下よりもHN条件下で多量のMnPを産生し、野生株よりも約2倍高いMnP産生能を有する変異株を分離した。

審　査　結　果　の　要　旨

未晒クラフトパルプ中に残留するリグニンを、白色腐朽菌あるいはその酵素で分解してパルプを漂白しようとする「バイオブリーチング」は、塩素系漂白剤の使用量を低減しうる環境保全型のパルプ漂白法であることが示されている。しかしながら、生菌法による実用的なバイオブリーチングプロセスを確立するには、リグニン分解速度を高めて菌処理時間を短縮することや、セルロース分解を抑制してパルプ収率や強度を向上させる必要がある。また、MnPを用いる酵素法では、白色腐朽菌にMnPを短時間でかつ大量に産生させうる液体培養技術を確立し、MnP価格を安価にする必要がある。このような背景から、本論文では実用的なバイオブリーチングプロセスの確立を目的とし、変異処理によって白色腐朽菌 IZU-154 株のリグニン分解活性および選択性をさらに高める育種改良およびIZU-154株による効率的なMnP 大量産生を可能とする培養技術を検討している。

IZU-154株は胞子を形成せず栄養菌糸も2核性であることから、変異処理を行っても、その変異が表現型として現れ難いことが予想される。このことから先ずは、IZU-154 株の栄養菌糸体をプロトプラスト化し、その再生株から変異処理を施し易い単核性の菌株を取得する試みを行い、リグニン分解活性および生育力が野生株（IZU-154株）と同等の単核性菌株（IZU-154-22株）を分離するに至っている。その後、IZU-154-22株を元株として変異処理（紫外線照射、コルヒチン－ベンゾイミダゾール処理）を行うことで、野生株よりもリグニン分解活性に優れ、セルラーゼ分解活性が抑制された変異株の取得に成功し、バイオブリーチング時における脱リグニンとパルプ収率の向上を可能としている。

次に、野生株（IZU-154株）によるリグニン分解にはMnPが鍵酵素として関与することから、MnPの効率的な産生を可能とする培養技術の確立を試みている。ジャーファーメンターを用いる回分培養において、酸化還元電位およびpHはMnP産生挙動をモニタリングする際の培養パラメーターとなりうること見いだし、ジャーファーメンターを用いる濾過連続培養によって、回分培養よりもMnP産生効率を約2倍高めうることも明らかにしている。

さらに、高窒素（HN）条件下でのMnP産生能に優れた変異株の取得も試みており、紫外線照射処理を行った単核性菌株（IZU-154-22株）のプロトプラスト再生株（90,000株）から、低窒素（LN）条件下よりもHN条件下で多量のMnPを産生し、野生株よりも約2倍高いMnP産生能を有する変異株を分離している。

選択性の向上と、効率的な MnP 産生を可能としており、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

1) Miura, M., Deguchi, T., Matsubara, M., and Kakezawa, M. 1997. Isolation of Manganese Peroxidase-Producing Mutants of the Hyper-Lignolytic Fungus IZU-154 under Nitrogen Nonlimiting Conditions. J. Ferment. Bioeng., 83, 191-193.
2) Miura, M., Deguchi, T., Yanagi, C., Suzuki, J., Kitaoka, Y., and Kakezawa, M. 1997. The Indicative Culture Parameters of Manganese Peroxidase Production by White Rot Fungus IZU-154. J. Ferment. Bioeng., 84, 414-420.
3) Miura, M., Kitaoka, Y., Kakezawa, M., and Nishida, T. 1998. Biobleaching of Hardwood Kraft Pulp with Cellulase-Deficient Mutant from Hyper Ligninolytic Fungus IZU-154. Appl. Biochem. Biotechnol., 73, 113-126.

既発表学術論文

1) Kakezawa, M., Miura, M., Nishida, T., and Takahara, Y. 1993. The formation and Regeneration of Mycelial Protoplasts in Hyper Lignolytic Fungus, Strain IZU-154. J. Ferment. Bioeng., 75, 65-67.
2) Jhoncon, J., Miura, M., and Tsuyumu, S. 1994. Cloning of a Region Encoding Multiple Polygalacturonases of *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* EC1.Ann. Phytopath. Soc. Japan, 60, 202-207.
3) Matsubara, M, Suzuki, J., Deguchi, T., Miura, M., and Kitaoka, Y. 1996. Characterization of Manganese Peroxidases from the Hyperlignolytic Fungus IZU-154. Appl. Environ. Microbiol., 62, 4066-4072.
4) 桂　健治, 三浦雅彦, 長谷川　進. 1998. 好熱性微生物を利用した余剰汚泥が発生しない活性汚泥プロセス. 水環境学会誌, 21, 360-366.