

白色腐朽菌の育種と培養に関する研究

2003年

岐阜大学大学院
連合農学研究科

三浦雅彦

白色腐朽菌の育種と培養に関する研究

学位論文：博士(農学) 乙75

三 浦 雅 彦

— 目 次 —

	頁
第 1 章 緒論	1
第 2 章 IZU-154 株からの単核性菌株の分離	7
第 1 節 序	7
第 2 節 プロトプラスト再生株からの単核性菌株の分離	8
2.1 実験	8
2.1.1 供試菌株および培地	8
2.1.2 プロトプラストの調製および再生	8
2.1.3 核染色	11
2.1.4 DNA 含有量の測定	11
2.1.5 プロトプラスト再生株のリグニン分解能評価	12
2.2 結果および考察	13
2.2.1 プロトプラストの調製および再生	13
2.2.2 単核性菌株の取得	15
第 3 節 小括	18
第 3 章 IZU-154-22 株からのセルラーゼ低産生株の育種	19
第 1 節 序	19
第 2 節 セルラーゼ低産生変異株の選抜	20
2.1 実験	20
2.1.1 変異処理	20
2.1.2 セルラーゼ低産生株の選抜	20

2.1.3	バイオブリーチング	21
2.1.4	木粉処理時の成分変化	22
2.2	結果および考察	22
2.2.1	変異処理法の比較	22
2.2.2	紫外線照射によるセルラーゼ低産生株の育種	24
第3節	Cel-139株のセルラーゼおよびMnP産生	27
3.1	実験	27
3.1.1	酵素産生条件	27
3.1.2	MnP活性の測定	29
3.1.3	セルラーゼ活性の測定	29
3.2	結果および考察	29
第4節	Cel-139株を用いるバイオブリーチング	32
4.1	実験	32
4.1.1	バイオブリーチング	32
4.1.2	Kappa 価の測定	32
4.2	結果および考察	32
第5節	小括	36
第4章	セルラーゼ低産生株（Cel-139株）の育種によるパルプ白色化能 の向上	37
第1節	序	37
第2節	セクター形成株誘導条件の検討	38
2.1	実験	38
2.1.1	供試菌株	38
2.1.2	コルヒチン処理	38

2.1.3 ベンゾイミダゾール処理	39
2.2 結果および考察	40
第3節 高パルプ白色化能を有する菌株の選抜	44
3.1 実験	44
3.1.1 セルラーゼ活性の検出	44
3.1.2 バイオブリーチング	44
3.2 結果および考察	44
3.2.1 高パルプ白色化能を有するセクター形成株の選抜	44
3.2.2 M215-13株のバイオブリーチング特性	46
第4節 小括	49
第5章 IZU-154株による MnP 産生	50
第1節 序	50
第2節 IZU-154株の MnP 産生に及ぼす培養条件の検討	51
2.1 実験	51
2.1.1 供試菌株および培地	51
2.1.2 MnP 活性の測定	51
2.1.3 培養液中の Mn(III)濃度の測定	53
2.1.4 菌体量の測定	53
2.2 結果および考察	53
2.2.1 NEOX レベルと Mn(III)濃度との関係	53
2.2.2 IZU-154株の MnP 産生へ及ぼす窒素及び Mn(II)濃度 の影響	55
第3節 ジャーファーマンターでの回分培養による MnP 産生と 培養パラメーターの関係	58

3.1 実験	58
3.2 結果および考察	58
第4節 ジャーファーマンターでの濾過連続培養による MnP 生産性の向上	61
4.1 実験	61
4.2 結果および考察	62
4.2.1 希釈率と MnP 活性の関係	62
4.2.2 濾過連続培養と回分培養における MnP 生産性の比較	64
第5節 小括	66
第6章 IZU-154 株からの MnP 高産生株の育種	67
第1節 序	67
第2節 高窒素条件下でのメラニン脱色菌株の分離	68
2.1 実験	68
2.1.1 供試菌株	68
2.1.2 メラニン脱色による MnP 産生株の選抜	68
2.2 結果および考察	70
2.2.1 メラニン脱色へ及ぼす窒素濃度の影響	70
2.2.2 HN 条件下でのメラニン脱色菌株の選抜	70
第3節 選抜株の MnP 産生能	73
3.1 実験	73
3.1.1 供試菌株	73
3.1.2 培養および MnP 活性の測定	73
3.1.3 菌体量の測定	73
3.2 結果および考察	73

第4節 小括	77
第7章 総括	78
謝辞	82
参考文献	83

第1章 緒論

リグニンは、セルロースやヘミセルロースとともに樹木および木化植物を構成する主要な成分の一つであり、針葉樹には25~30%、広葉樹には20~25%、草本植物には15~25%程度含有されている。植物体内では、ヘミセルロースとともにセルロースマイクロフィブリルを充填して細胞壁を強固にし、細胞同士を膠着させて機械的強度を付与する機能を有している。また、リグニンはその分子内でフェニルプロパン単位の大部分が化学的に安定なエーテル結合および炭素-炭素結合で結合しているために、加水分解され難い化合物であり、同時に複雑な三次元網目状構造をとるフェノール性の高分子であることから、微生物による分解を受け難くする「天然の防腐剤」としての役割も果たしている。

しかしながら、リグニンも自然界においては木材腐朽菌の作用で長い期間をかけて分解され、最終的には二酸化炭素と水にまで変換されている。木材腐朽菌は木材に対する腐朽のタイプにより、腐朽が進むと外見を白く変化させる白色腐朽菌(9, 32)と褐色に変化させる褐色腐朽菌(38, 39)に大別される。自然界におけるリグニン分解は主として白色腐朽菌によってなされており、褐色腐朽菌にはリグニン分解能力はほとんどないとされている。

白色腐朽菌のリグニン分解においては、菌体外酵素が先ず高分子のプロトリグニンを攻撃し、次いで、ある程度低分子化(水可溶化)されたリグニンを菌体内に取り込み、菌体内酵素で二酸化炭素と水にまで分解すると考えられている。現在のところ、研究の焦点は菌体外酵素に当てられており、リグニンペルオキシダーゼ(LiP)、マンガンペルオキシダーゼ(MnP)、ラッカーゼなどの菌体外酵素がリグニン分解に関与していると提案されている(12, 19, 21, 28, 43, 57, 58)。

LiPとMnPは、ともにヘムを含有する糖タンパクであり、複数のアイソザイムの存在が知られている(21, 57-59)。LiPの触媒サイクルは、先ず電子受容体で

ある過酸化水素によって休止状態の LiP が 2 電子酸化されて活性化状態の Compound-I になり、これが基質から 1 電子を引き抜き Compound-II となる。Compound-II は、基質からさらに 1 電子を引き抜いて休止状態の LiP に戻るが、このような二度にわたるリグニン（基質）からの 1 電子引き抜き（1 電子酸化）でカチオンラジカルおよびフェノキシラジカル中間体が形成され、これらの中間体に分子状酸素が非酵素的に付加し側鎖炭素 $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 間の開裂、芳香環の開裂、脱メチルおよび側鎖炭素 C_{α} 位の酸化などが起こり、リグニンを低分子化するとされている (59, 64)。MnP についても、過酸化水素により 2 電子酸化されて活性化状態の Compound-I となり、Mn(II) を Mn(III) に酸化して Compound-II になる。そして、生成した Mn(III) は不安定なため、フェノール性の基質を 1 電子酸化して安定な Mn(II) へと復帰する。さらに、Compound-II が休止状態の MnP に戻る過程でも同様の反応が生じる。このように、MnP は Mn イオンを一種のメディエーターとしてリグニンを分解する点に特徴があるが、リグニン分解においては、MnP 触媒サイクルで生じた Mn(III) がリグニンのフェノール部位を酸化してフェノキシラジカルを形成し、LiP の場合と同様に分子状酸素による非酵素的な反応で低分子化が生じると考えられている (65)。一方、ラッカーゼは銅を含有する糖タンパク質であり、複数のアイソザイムが知られている。LiP および MnP は過酸化水素を還元して基質を 2 電子酸化するのに対して、ラッカーゼは分子状酸素を 2 分子の水にまで還元する間に、フェノール性基質（リグニン）を 4 電子酸化し、フェノキシラジカルの形成を経てリグニンを分解すると提案されている (24)。

これまでに、白色腐朽菌および白色腐朽菌の産生するリグニン分解酵素を応用しようとする研究は種々なされており、その成果は、

- ①省資源・省エネルギー・低公害でのパルプ化および漂白、例えばバイオパルピング (2, 34, 55)、バイオブリーチング (35, 36, 40, 53, 62)
- ②木質資源の脱リグニンによる有用成分への生化学的変換、例えば木材糖化のた

めの前処理 (25, 47)、木質資源の粗飼料化 (29)

- ③環境汚染物質の除去、例えばパルプ漂白廃液 (5)、繊維染色廃液の脱色 (50)、環境ホルモン類 (ダイオキシン、ビスフェノールA、ノニルフェノールなど) の分解 (5, 63) および合成高分子 (ナイロン、ポリエチレン) の分解 (10, 11, 26)

などの広い分野に応用が可能であるとされている。

①に記したバイオブリーチングとは、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考えに基づくものであり、塩素系漂白剤の使用量および有機塩素系化合物の排出を減少できることから、環境保全型のパルプ漂白法として注目されている。バイオブリーチングの先駆的な研究は Kirk らによってなされ、既知の代表的なリグニン分解菌 (白色腐朽菌) である *Phanerochaete chrysosporium* で針葉樹未晒クラフトパルプ (SWKP) 中の残留リグニンを部分的に分解できることを報告している (40)。なお、その後の Paice らの研究では、カワラタケ (*Trametes versicolor*) によって広葉樹未晒クラフトパルプ (HWKP) の白色化 (漂白) は認められるが、SWKP への漂白効果は認められないとしている (53)。これらの研究成果は、供試菌株によってパルプの白色化における挙動は異なるものの、白色腐朽菌が未晒クラフトパルプを漂白しうる可能性を持つことを示唆している。しかしながら、これらの菌株はリグニン分解能力が低いためパルプ白色度の向上は僅かであり、塩素系漂白剤の使用量を大幅に低減するには物足りないものであった。また、パルプ残留リグニンの分解に伴ってセルロースも分解するため、パルプ収率や粘度が顕著に低下するという難点もあった。

Nishida らは *P. chrysosporium* や *T. versicolor* よりもリグニン分解能力に優れ、しかもセルロースの分解が少ない高活性・高選択性のリグニン分解菌 IZU-154 株を分離し (48, 49)、本菌株を用いた HWKP および SWKP のバイオブリーチン

グを試みている (17, 18, 46)。その結果、*P. chrysosporium* やカワラタケと比べると高白色度のパルプが高収率で得られ、IZU-154 株で HWKP および SWKP を処理した後に軽度の塩素系薬品処理 (C-E-D) を適用すると、全晒パルプを得るに必要な塩素系薬品量を従来の塩素系多段漂白プロセス (C-E-D-E-D) と比べ、70%以上削減しうることを報告している。しかしながら、生菌を用いるバイオブリーチング (生菌法) では、一般に白色腐朽菌がリグニン分解酵素を産生し始めるまでにラグタイムがあることから処理に長期間 (日単位) を要し、さらにはパルプ残留リグニンの分解に伴ってセルロース系多糖類も分解されることからパルプ収率や強度の低下を回避できないという難点がある。このため、白色腐朽菌を別途液体培養してリグニン分解酵素を産生させ、その酵素を用いて未晒クラフトパルプ中の残留リグニンを短時間で分解し、かつセルロースの損失がないバイオブリーチング (酵素法) が試みられるようになった。

前述したように、白色腐朽菌のリグニン分解には、LiP、MnP およびラッカーゼが関与すると考えられている。そこで Katagiri らは、これらの酵素とパルプ白色化との関係を明確にする目的で、*P. chrysosporium* およびカワラタケを用いて HWKP のバイオブリーチングを行い、パルプ白色化と累積酵素活性との関係から、パルプ白色化 (脱リグニン) には MnP が最も重要な役割を果たす鍵酵素であることを報告している (35)。次いで Ehara らは、IZU-154 株由来の MnP を用いた HWKP および SWKP のバイオブリーチングを試み、MnP 処理によっても全晒パルプを得るに必要な塩素系薬品量を大幅に削減しうることを実証している (15)。

以上のように、IZU-154 株を用いる生菌法および IZU-154 株由来の MnP を用いる酵素法のバイオブリーチングは、環境保全型のパルプ漂白法として注目されるが、実用的なバイオブリーチングプロセスを構築するためには、生菌および酵素法ともに解決すべき技術課題が残っている。すなわち生菌法では、リグニン分

解酵素の産生速度や産生量を高めて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ことが必要となる。また、MnP を用いる酵素法では、白色腐朽菌に MnP を効率的かつ大量に産生させる液体培養技術を確立して、MnP を安価にする必要がある。

本論文は、以上のような背景のもと、実用的なバイオブリーチングプロセスの確立を図ることを目的とし、変異処理によって 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方法について検討した結果をとりまとめたものである。

まず、第 2 章では、菌糸体が 2 核性であり孢子も形成しない IZU-154 株において、変異は生じ難いことが予想されたため、菌糸をプロトプラスト化し、その再生株から単核性菌株を分離することを試み、以降の変異処理に用いる親株として IZU-154-22 株（単核性株）を取得した。

第 3 章では、IZU-154 株のリグニン分解選択性をさらに高めてバイオブリーチング時のセルロース分解を抑制することを目的に、第 2 章で取得した単核性株である IZU-154-22 株のプロトプラストに変異処理（紫外線照射）を行い、得られた再生株からセルラーゼ低産生株（Cel-139 株）を分離した。続いて、Cel-139 株を用いてバイオブリーチングを行い、この株は IZU-154 株（野性株）のリグニン分解活性を保持しながら、セルロース分解活性が抑制された変異株であることを確認した。

第 4 章では、バイオブリーチング時の菌処理期間の短縮を目的に、Cel-139 株のバイオブリーチング（リグニン分解）能をさらに向上させる試みを行った。まず、Cel-139 株をコルヒチン処理して同質倍数体化し、次いでベンズイミダゾール処理によって半数体化して染色体レベルでの組換えを誘導することで、リグニン分解活性に優れ、かつセルロース分解活性が抑制された菌株（M215-13 株）を分離した。

第5章では、IZU-154株は、未晒クラフトパルプ残留リグニンの分解に関与する鍵酵素であるMnPを窒素制限下でのMn(II)添加によって効率的に産生することを明らかにした。また、ジャーフェーマンターによるMnP大量生産を試み、酸化還元電位とpHがMnP産生の指標(培養パラメーター)となりうることを見いだした。続いて、連続的な「培地の注入」と「濾液の引き抜き」による濾過連続培養を行い、MnP生産性の向上を可能とした。

第6章では、IZU-154株からMnP高産生株の分離を試みた。変異処理を施したIZU-154-22株(単核性株)のプロトプラスト再生株から、メラニン脱色能を指標として高窒素条件下でのMnP高産生株IZU-882株を分離した。

最後に第7章では、第2章から第6章までで得た成果を総括した。

第2章 IZU-154株からの単核性菌株の分離

第1節 序

微生物の持つ有用形質を向上させるために、変異株の選抜による育種が従来から行われてきた。既知の代表的な白色腐朽菌である *P. chrysosporium* においては、胞子に変異処理を施し、セルラーゼ欠損株やリグニン分解酵素高産生株などの変異株を選抜した研究が報告されている (4, 16, 30, 42, 60)。よって、高活性・高選択性のリグニン分解菌 (白色腐朽菌) IZU-154 株においても、同様の育種改良を行えば有用菌株を選抜しうるものと期待される。しかしながら、IZU-154 株においては有性世代が観察されず胞子を形成しないという難点がある。また、栄養菌糸の破碎菌体を対象にして変異処理を行っても、担子菌類は2核性であることから変異を相補的に補ってしまう可能性が高く、変異株の効率的な選抜の実施は困難なことが予想される。

そこで本章では、胞子を形成せずしかも2核性であるという難点を解決するために、IZU-154 株をプロトプラスト化し、その再生株から単核性菌株を分離することで、変異処理を行う際の親株を取得することにした。

第2節 プロトプラスト再生株からの単核性菌株の分離

2.1 実験

2.1.1 供試菌株および培地

供試菌として IZU-154 株を用いた。プロトプラスト調製用の菌体培養にはポテトデキストロース (PD) 培地 (DIFCO 社製) を、栄養菌体の継体培養にはポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地 (DIFCO 社製) を用いた。

2.1.2 プロトプラストの調製および再生

Scheme 1 に示す Kakezawa らの方法 (31) に従ってプロトプラストの調製および再生を行った。50 ml の PD 培地を含む 100 ml 容三角フラスコに IZU-154 株を接種し、28°C で 3 日間培養した菌体をガラスフィルター (3G1) で分離した後、0.6 M 硫酸マグネシウム (浸透圧調節剤) を含む 50 mM マレイン酸緩衝液 (pH 5.6) で洗浄した。次いで、2% Novozym 234 (細胞壁溶解酵素) および 0.6 M 硫酸マグネシウムを含む 50 mM マレイン酸緩衝液 (pH 5.6) を、孔径 0.45 μm のフィルター (Millipore Filter HA、Millipore 社製) で濾過し、その 1 ml を上記洗浄菌体 (湿潤重量で 0.1 g) に添加して、37°C、120rpm で 3 時間振盪した。菌体の細胞壁を溶解させた後、ガラスフィルター (3G2) で濾過し、その濾液を 700G で 5 分間、遠心分離した。得られた沈殿物を 0.6 M ソルビトール溶液 3 ml に懸濁し、同様の遠心洗浄処理を 3 回繰り返した後、沈殿物を 1 ml の 0.6 M ソルビトール溶液に再懸濁し、精製プロトプラストを得た。なお、プロトプラスト数は希釈した後、トーマ氏血球計測板を使用して顕微鏡観察で計測した。

次いで、0.6 M サッカロース (浸透圧調節剤) を含む PDA 培地 (1.5%寒天)

に 0.1 ml のプロトプラスト希釈液 (約 200 個/ml) を塗布した後、10 ml の PDA 培地 (0.8%寒天) を重層し、28℃で 5 日間培養してプロトプラストの再生を行った。また対照実験として、浸透圧調節剤を添加しない PDA 培地を用いプロトプラストを同様に再生させた (31)。なお、プロトプラスト再生率は下式により算出した。

$$\text{再生率 (\%)} = \{ (A-B) \div C \} \times 100$$

A : サッカロース添加培地における再生コロニー数

B : サッカロース無添加培地における再生コロニー数

C : プロトプラスト希釈液中のプロトプラスト数

Culture of the fungus in a 100-ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of potato dextrose broth at 28 °C for 3 days.



Harvest of mycelia by filtration using a glass filter (3G1) and washing of mycelia with 50 mM malate buffer containing 0.6 M MgSO₄.



Enzyme (2% Novozym) treatment of mycelia at 37 °C for 3 h.



Removal of mycelial debris by filtration with a glass filter (3G2).



Gathering and washing of protoplasts by centrifugation.



Inoculation of protoplasts on potato dextrose agar (1.5%) containing 0.6 M saccharose and overlaying with potato dextrose agar (0.8%) containing the same osmotic stabilizer.



Incubation at 28 °C for 5 days.



Regeneration.

Scheme 1 Procedure of the formation and regeneration of protoplasts from mycelia of IZU-154.

2.1.3 核染色

菌糸の核のギムザ染色は Colotelo らの変法 (7) によって行った。PDA 培地上に生育する菌糸の一白金耳を蒸留水で懸濁した後、スライドグラス上で風乾し火炎固定した。次いで、スライドグラスを Singleton's fixative 固定液 (12.5 ml 酢酸、12.5 ml 乳酸、80 ml エタノール) に 10 分間浸漬した後、95%エタノール、75%エタノールおよび蒸留水で各々 10 秒間洗浄し、60°C の 1 N 塩酸に 6 分間浸漬した。その後、スライドグラスを蒸留水で 5 回洗浄し、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) に 5 分間浸漬した。次いで、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) で 20 倍に希釈したギムザ液 (WAKO 社製) によって 60 分間染色した後、蒸留水により軽く洗浄した。

4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色は Kuroiwa らの方法 (41) に準じて行った。ギムザ染色の場合と同様に菌糸体をスライドグラス上に火炎固定し、固定液 (50 ml エタノール、10 ml ホルムアルデヒド、5 ml 酢酸、35 ml 蒸留水) に 30 分間浸漬した後、十分量の 0.7 M NaCl で 3 回洗浄した。その後、25 µg/ml DAPI によって 15 分間染色した後、0.7 M NaCl を用いて余剰の DAPI を除去した。

2.1.4 DNA 含有量の測定

DNA 含有量は Zolan らの方法に従って測定した (67)。PD 培地で 3 日間静置培養した菌体を集菌し、イオン交換水で数回洗浄した菌体を液体窒素で急速凍結した後、凍結乾燥し、乳鉢で磨砕した。磨砕菌体 400 mg を 1.5 ml 容エツペンドルチューブにとり、600 µl の DNA 抽出用緩衝液 [1% hexadecyltrimethylammonium bromide、0.7 M 塩化ナトリウム、10 mM EDTA および 1% 2-mercaptethanol を含む 50 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0)] に懸濁し、60°C で 30 分間放置した。これに、等量のクロロホルム・イソアミルアルコール混液 (24 : 1、

v/v) を加え、激しく攪拌した後、遠心分離 (12,000 rpm、4°C、5 分間) を行った。次いで、上清を回収し、等量のイソプロパノールを加えて緩やかに攪拌した後、再び遠心分離 (12,000 rpm、4°C、5 分間) を行った。得られた沈殿物を 300 μ l の TE 緩衝液 [1 mM EDTA を含有する 10 mM Tris 緩衝液 (pH 8.0)] に懸濁した後、RNase A (100 μ g/ml) を添加し、37°C で 30 分間放置した。次いで、等量のクロロホルム・イソアミルアルコール混液 (24 : 1、v/v) を加え、激しく攪拌した後、遠心分離 (12,000 rpm、4°C、5 分間) を行い、水相画分を回収した。これに 2 倍量のエタノールを加え、生じた沈殿物を 50 μ l TE buffer に懸濁して DNA サンプルとした。DNA の定量は 260 nm における吸光度から算出し、吸光度 1.0 の場合の DNA 量を 50 μ g/l とした。

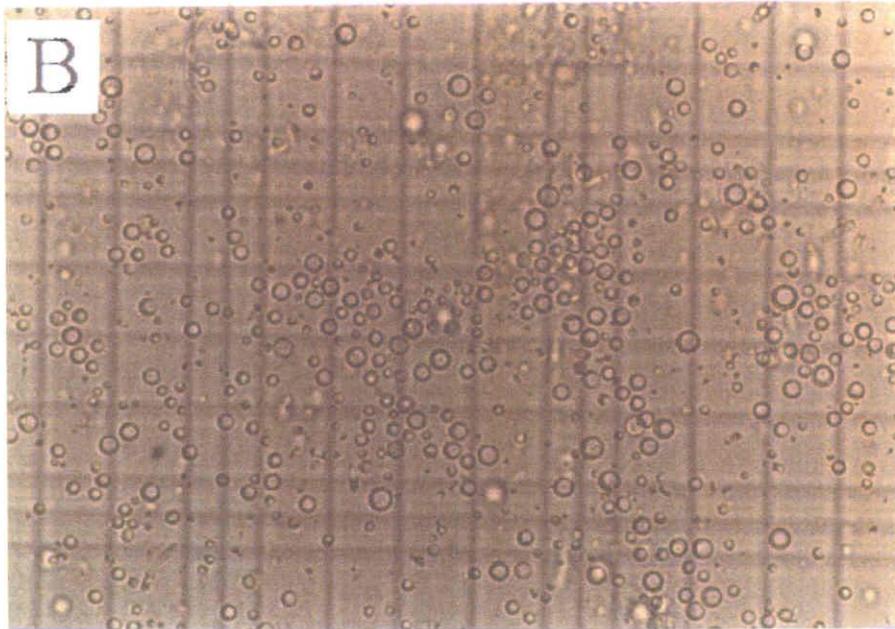
2.1.5 プロトプラスト再生株のリグニン分解能評価

50 ml 容三角フラスコにブナ脱脂木粉 (60~80 メッシュ) 1.0 g と蒸留水 2.5 ml を加え、直径 5 mm のコルクボーラーで PDA 培地から打ち抜いた菌体を 1 個接種し、28°C で 30 日間培養した。培養前後の木粉についてクラーソンリグニンを定量し (48) 、クラーソンリグニン減少率を算出した。

2.2 結果および考察

2.2.1 プロトプラストの調製および再生

Scheme 1 に示す条件で、IZU-154 株のプロトプラストを調製した結果、0.1 g の湿潤菌体から 1×10^7 個/ml 以上の個数でプロトプラストが得られ、再生率は 10% 以上を示した。なお、Sunagawa らはアカキクラゲのプロトプラスト再生を試みており、IZU-154 株の場合と同様に細胞壁溶解酵素として Novozym 234 を、浸透圧調節剤としてサッカロースを用いているが、0.1 g の湿潤菌体当たり $1.5 \sim 2.2 \times 10^7$ 個/ml の個数でプロトプラストが得られ、再生率は 4~8% であると報告している (56)。よって、IZU-154 株のプロトプラスト化およびその再生効率は、アカキクラゲの場合と同程度であったといえる。なお、IZU-154 株の菌糸および調製プロトプラストの顕微鏡写真を Fig. 1 に示すが、プロトプラストの大きさは 5~15 μm 程度であった。



100 μ m

Fig. 1 Microphotographs of mycelia (A) and protoplasts (B) of IZU-154.

2.2.2 単核性菌株の取得

担子菌の多くは、その無性世代を 2 核性菌糸体の状態で生存している。IZU-154 株の菌糸も同様に 2 核を有しており、その 2 核性が変異を相補的に補うことで変異株の作製を困難にすることが予想される。よって、効率的に変異株を取得するには単核性菌株を得る必要があると考え、プロトプラスト再生株から単核性菌株の分離を試みた。

IZU-154 株由来のプロトプラスト再生株 50 株を分離し、ギムザおよび DAPI 染色によって核数を確認した結果、6 株が単核、22 株が 2 核であった（残りの 22 株の核数については不明）。そこで、単核性菌株と判定された 6 株について菌体重量当たりの DNA 含有量を測定した。その結果、IZU-154-11 株と IZU-154-22 株の DNA 含有量は、IZU-154 株（野生株）の約半分であったことに（Table 1）、先のギムザおよび DAPI 染色（Fig. 2）の結果を合わせて、これら 2 株は単核性菌株であると判断した。なお、リグニン分解能は IZU-154-22 株の方が IZU-154-11 株よりも高く、IZU-154 株の分解能と同程度であったことから（Table 1）、次章では、IZU-154-22 株を親株としてセルラーゼ低産生株を育種することにした。

Table 1 Number of nuclei and DNA contents of protoplast regenerants of IZU-154

Strain	Number of nuclei		DNA content (mg/mg mycelial weight)	Klason lignin loss (%)
	Giemsa	DAPI		
IZU-154(Wild type)	2	2	0.031	52.1
IZU-154-5	1	n. d.	0.025	48.9
IZU-154-7	1	1	0.039	52.5
IZU-154-11	1	1	0.013	48.4
IZU-154-22	1	1	0.012	51.5
IZU-154-29	1	n. d.	n.d.	42.5
IZU-154-43	1	1	n.d.	50.5

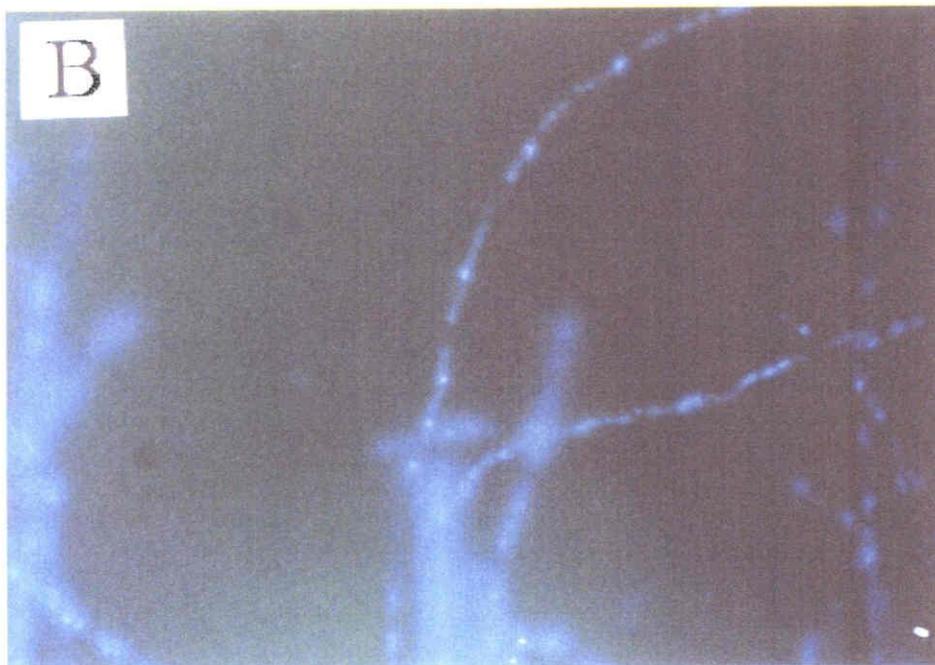
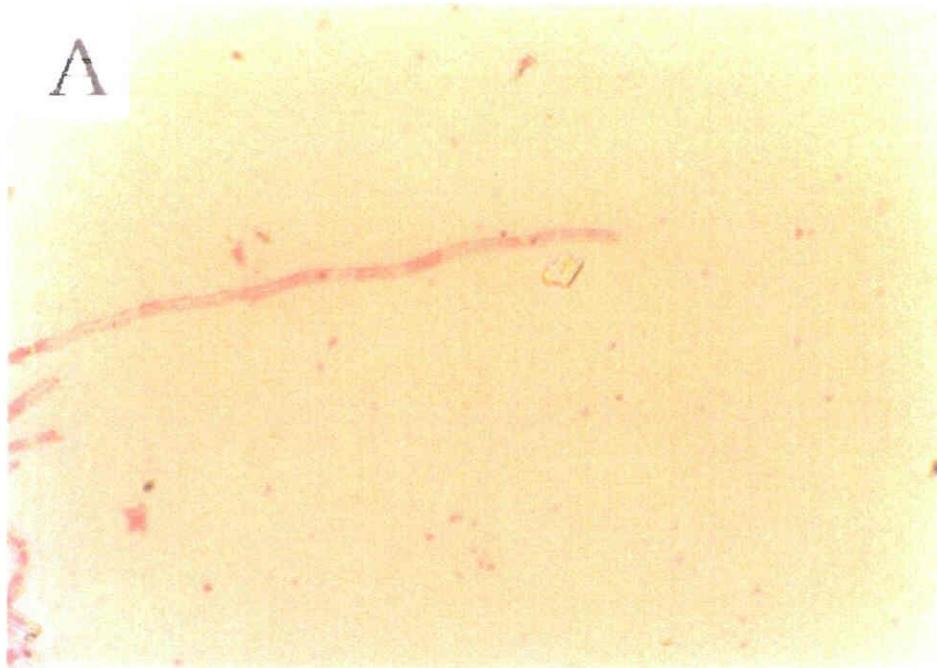


Fig. 2 Microphotographs of nuclear staining of IZU-154-22.

A, Giemusa staining; B, DAPI staining.

第3節 小括

P. chrysosporium においては、胞子を変異処理することによってリグニン分解酵素の高産生株やセルラーゼ欠損株の分離がなされている。しかしながら、IZU-154 株は胞子を形成せず、しかも菌糸体は 2 核性を有するため、変異処理を施しても相補性から変異は生じ難いことが懸念される。そこで、本章では IZU-154 株を変異処理する際の親株として単核性株を取得することにした。

IZU-154 株の栄養菌糸体をプロトプラスト化し、50 株のプロトプラスト再生株について核染色および DNA 含有量測定を行った結果、6 株の単核性株が分離された。次いで、これらの菌株のリグニン分解活性を比較したところ、IZU-154-22 株が IZU-154 株 (野生株) と同等の活性を有していた。よって次章では、IZU-154-22 株のプロトプラストを変異処理することでセルラーゼ産生が抑制された変異株を育種することにした。

第3章 IZU-154-22株からのセルラーゼ低産生株の育種

第1節 序

白色腐朽菌を用いた生菌法による未晒クラフトパルプの漂白（バイオブリーチング）については多くの報告がなされているが、代表的な白色腐朽菌である *P. chrysosporium* やカワラタケ (*Trametes versicolor*) などは、パルプ中のリグニンのみでなく、共存するセルロースをも分解するという難点がある (1)。この点を克服するために、これらの菌株においてはセルラーゼ欠損株の分離が行われ (1, 16)、それらによるバイオブリーチングも試みられている (52)。しかしながら、得られた分離株では親株本来のリグニン分解能が低いことから、パルプの有為な白色度の上昇が認められるには至っていない。

一方、IZU-154株は選択的にリグニンを分解しうるため、リグニン分解に伴うセルロースの分解も少なく、高収率でのバイオブリーチング (17, 18, 46) や効率的な木材糖化前処理 (47) を行えることが示されている。しかしながら、さらに実用性の高いプロセスを構築するには、IZU-154株においてもリグニン分解能を維持したままでセルロース分解を抑制することが望まれるため、本章では前章で分離した単核性菌株 (IZU-154-22株) のプロトプラストに変異処理を施し、セルラーゼ低産生株の育種を試みた。

第2節 セルラーゼ低産生変異株の選抜

本節では、前章で分離した単核性菌株 (IZU-154-22 株) の菌糸体プロトプラストに、紫外線照射処理および *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) 処理を行い、両処理の効果、変異効率を比較した。次いで、紫外線照射処理した再生株からセルラーゼ産生能の低い菌株を分離することを目的とした。

2.1 実験

2.1.1 変異処理

第2章 第2節 2.1.2 の方法 (Scheme 1) に準じて IZU-154-22 株のプロトプラストを調製した後、 1×10^7 個/ml となるよう 0.6 M サッカロースを含有する 50 mM マレイン酸緩衝液 (pH 5.6) に懸濁し、紫外線照射または NTG 処理による変異処理を行った。

紫外線照射の場合は、シャーレ (直径 90 mm) 内にプロトプラスト懸濁液 10 ml を加え、これを緩やかに攪拌しながら 4.8 J/m^2 の強度で紫外線 (260 nm) を所定時間照射した。

NTG 処理については、プロトプラスト懸濁液 1 ml に NTG 20 μg を加え、 20°C で処理した後、0.6 M 硫酸マグネシウムを含む 50 mM マレイン酸緩衝液 (pH 5.6) で遠心洗浄した。

2.1.2 セルラーゼ低産生株の選抜

本章 2.1.1 に準じて調製したプロトプラスト懸濁液に対して、死滅率が 99% となる程度の紫外線照射処理を行い、PDA 培地上で培養して再生株を得た。次いで、

NS 寒天培地 [(NH₄)H₂PO₄ 4 g/L、K₂HPO₄ 2 g/L、ZnSO₄·7H₂O 5.0 mg/L、MnSO₄·4H₂O 1.0 mg/L、CuSO₄·5H₂O 1.0 mg/L、ferric citrate 5.0 mg/L、thiamine 0.1 mg/L、CaCl₂ 20.0 mg/L、MgSO₄·7H₂O 0.89 g/L、寒天 15 g/L] に、2% Walseth セルロース (WC) 、0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) または0.5%キシランを加え、これらの培地上にメンブレンフィルター (孔径 0.45 μm、Durapore Filter、Millipore 社製) を置き、PDA 培地上の再生株を 5 mm 径のコルクボーラーで打ち抜いて接種した。30°Cで 3~5 日間培養した後、メンブレンフィルターを除き、WC 及びキシラン添加培地では分解ハロー形成の有無、CMC 添加培地ではコンゴレッド染色後のハロー形成の有無を観察し、ハロー形成が認められない再生株をセルラーゼ低産生株として選抜した。

2.1.3 バイオブリーチング

本章 2.1.2 で選抜したセルラーゼ低産生株および野生株 (IZU-154 株) の各々を PDA 培地に接種し、30°Cで 5 日間前培養した後、滅菌ナイフを用いて菌体マット (1 cm×1 cm) を小片化 (1 mm×1 mm) した。これを、50 ml のコーンスティープリカー・グルコース (CG) 培地 [13 g コーンスティープリカー (CSL)、18 g グルコース、1000 ml 蒸留水、pH 4.5] を含む 300 ml 容三角フラスコに加え、30°C、180 rpm において 3 日間振盪培養した。遠心分離 (3000 rpm、5 分間) にて菌体を分離し、蒸留水 50 ml に再懸濁した後、オーステライザーで 30 秒間破碎して菌液を得た。次いで、300 ml 容三角フラスコに 10 g の広葉樹未晒クラフトパルプ (HWKP : 白色度 33%、kappa 価 13.9) と 10 ml の蒸留水を加えて滅菌処理し、これに 60 mg の乾燥重量菌体を含む菌液と蒸留水を加えてパルプ濃度を 25%とし、十分に混合した後、30°Cで所定期間静置培養した。

なお、白色度は Katagiri らの方法 (35) に従って測定し、パルプ収率は処理後パルプの 105°Cにおける乾燥重量から算出した。

2.1.4 木粉処理時の成分変化

50 ml 容三角フラスコにブナ脱脂木粉 (60~80 メッシュ) 1.0 g と蒸留水 2.5 ml を加え、これに PDA 培地であらかじめ培養 (30°C、5 日間) した菌体マットから 5 mm 径コルクボーラーで打ち抜いた菌体を接種し 30°C で 2 週間培養した。培養前後の木粉について 105°C で乾燥後の重量、クラースンリグニンおよび酸可溶性リグニン含有量を測定し、重量減少率およびクラースンリグニン減少率を算出した。なお、ホロセルロース含有量は木粉重量からクラースンリグニンと酸可溶性リグニン含有量を差し引いて算出した (49)。

2.2 結果および考察

2.2.1 変異処理法の比較

IZU-154-22 株のプロトプラストについて紫外線照射処理あるいは NTG 処理を行った結果、両処理ともに処理時間が延びるに伴って生存率が低下し、紫外線照射処理では 3 分間で死滅率 99%、NTG 処理では 120 分間で 97% の死滅率となった (Fig. 3)。

このことから、紫外線照射の方が効率的な変異処理を行えると判断し、以降の IZU-154-22 株プロトプラストの変異処理には紫外線照射を適用することにした。

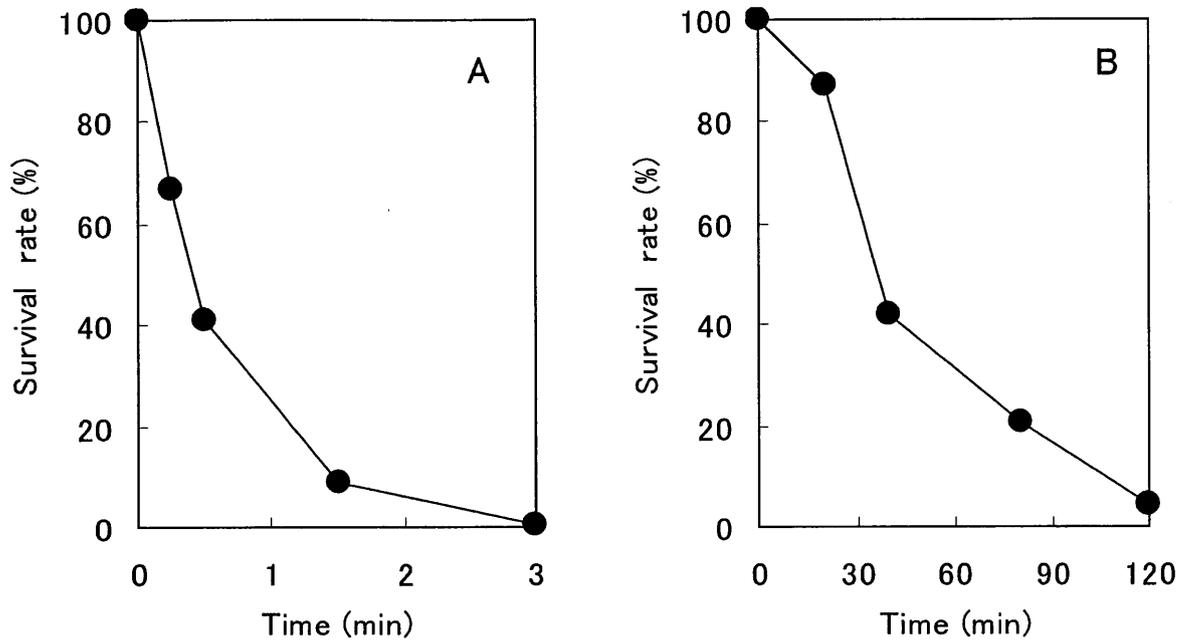


Fig. 3 Lethal effect of UV irradiation (A) and NTG exposure (B) on the protoplasts of IZU-154-22. Survival rate (%) was defined as the percentage of number of colonies regenerated from UV- or NTG-treated protoplasts compared to that of untreated protoplasts.

2.2.2 紫外線照射によるセルラーゼ低産生株の育種

IZU-154-22 株のプロトプラストを紫外線照射（3 分間）し、再生株から単菌分離して 2,700 株を得た。これらの菌株を 0.5% WC を含む NS 寒天培地に接種し、30°C で所定期間培養した。その結果、野生株（IZU-154 株）では 3 日目でハロー形成が観察されたのに対し、Table 2 に示す 10 株は 5 日間培養後においてもハローを形成しなかった。そこで、これら 10 株をセルラーゼ低産生株として選抜し、CMC 分解能、キシラン分解能および HWKP バイオブリーチング時のパルプ白色化能について比較した。

上記のように、選抜した 10 株は WC 活性（exoglucanase 活性）を欠損していたが、CMCase 活性（endoglucanase 活性）は有しており、キシラナーゼ活性については 7 株で欠損していた（Table 2）。しかしながら、キシラナーゼ欠損株のいずれもがパルプ白色化能を有していないことから（Table 2）、パルプ残留リグニンを分解して白色化をもたらすにはキシラン分解能を伴う必要があるものと判断された。

白色腐朽菌は一般にシュウ酸などの有機酸を生産すること（54）、さらには木材およびパルプ中のマンガンは MnO_2 [Mn(IV)] として存在することが知られている（22）。一方、MnP はその触媒サイクル中で Mn(II) を Mn(III) に酸化し、生成した Mn(III) がリグニンを酸化分解するので（21）、MnP によるリグニン分解には Mn(II) の共存が必須となるが、Harazono ら（22）や Katagiri ら（36）は、*in vitro* 系での MnP によるバイオブリーチングにおいて HWKP にシュウ酸を添加すると MnO_2 の還元が生じ、Mn(II) を反応系内に供給する必要があることを報告している。これらの結果は、キシラン分解に伴って生成するシュウ酸などの有機酸が HWKP や木材中に含有される MnO_2 を還元して MnP 触媒サイクルに必要な Mn(II) を供給している可能性を示唆しており、キシラン分解能を有する再生株のみがパルプ白色化をもたらすという Table 2 の結果もこのことに起因してい

るものと考えられる。

なお Table 2 に示したように、WC 分解活性 (exoglucanase 活性) を欠損していた 10 株の中で、Cel-139 株は野生株 (IZU-154 株) に匹敵するパルプ白色化能を有しており、CMCase およびキシラナーゼ活性は有しているものの、バイオブリーチング後のパルプ収率は 1.3% 高くなった。さらに、Cel-139 株を用いてブナ木粉を処理した際にもクラーソンリグニン減少率は IZU-154 株より若干劣るものの、ホロセルロースの分解は少ないという結果が得られた。また、この株は既知の代表的なリグニン分解菌であるカワラタケ (*Trametes versicolor*) の場合と比べると、リグニン分解能は 2.3 倍向上し、ホロセルロース分解能は約 1/2 に抑制されていた (Table 3)。

Table 2 Phenotype of selected cellulolytic mutants of IZU-154

Isolation No.(Strain)	Activity		Pulp bleaching	
	CMCase ^a	Xylanase ^b	Brightness increase (ISO point)	Pulp yield (%)
4-1-80	+	—	—	N. D. ^c
4-7-133	++	+++	28.0	93.7
5-18-26	+	—	—	N. D.
5-18-32	+	—	—	N. D.
5-22-5	++	+	30.1	94.6
5-22-139 (Cel-139)	+	+	33.4	95.7
6-1-13	+	—	—	N. D.
6-1-24	+	—	—	N. D.
6-1-31	+	—	—	N. D.
6-1-37	+	—	—	N. D.
Wild type (IZU-154)	++	++	32.5	94.4

^a CMCase activity was determined from the Congo red staining halo on NS agar plate containing 0.5 % CMC after 5 days incubation. —, no reaction; +, 0-20mm; ++, 20-40mm; + + +, 40-60mm.

^b Xylanase activity was determined from the diameter of clear zone on NS agar plate containing 0.5 % xylan after 5 days incubation. —, no reaction; +, 0-20mm; ++, 20-40mm; + + +, 40-60mm.

^c N. D. means not determined.

Table 3 Degradation of beech wood powder with isolates

Strain	Content (%) ^a			Loss (%) ^b		
	Klason lignin	Acid soluble lignin	Holocellulose	Weight	Klason lignin	Holocellulose
IZU-154	13.5	4.5	69.8	12.2	36.6	6.8
Cel-139	14.4	4.6	71.4	9.6	32.4	4.7
<i>T. versicolor</i>	18.3	3.8	67.7	10.1	14.2	9.5
Control ^c	21.3	3.8	74.9	—	—	—

^a Data are mean of three replicates.

^b Based on untreated beech wood powder.

^c Untreated beech wood powder.

第3節 Cel-139株のセルラーゼおよびMnP産生

前節で分離された Cel-139 株をバイオブリーチング実験に供した結果、この株はセルロース系多糖類の分解能が低下していた。よって、本節では Cel-139 株のリグニン分解酵素 (MnP) およびセルロース分解酵素 (セルラーゼ) の産生挙動を野生株 (IZU-154 株) と比較した。

3.1 実験

3.1.1 酵素産生条件

MnP 産生は以下の培養方法で行った。PDA プレートに IZU-154 株または Cel-139 株を接種し、30°Cで5日間培養した菌体マット (1 cm×1 cm) を滅菌ナイフを用いて小片化 (1 mm×1 mm) した。これを、50 ml の CG 培地を含有する 300 ml 容三角フラスコに接種し、30°C、180 rpm において3日間振盪培養した。次いで、培養液を30秒間ホモジナイズした後、菌体量が0.6% (wt./vol.) となるように、50 ml の低窒素含有 (LN) 培地 (Table 4) を含む 300 ml 容三角フラスコに接種し、30°C、180 rpm で振盪培養した。

セルラーゼ産生は、試験管 (12 mm 径) に分注した 2%アビセルを唯一の炭素源とする NS 培地 (4 ml) に、菌体量が0.6% (wt./vol.) となるように接種し、30°Cにおいて振盪培養した。

Table 4 Composition of LN medium

Component	Amount of in:
Ammonium tartrate (g)	0.2
Glucose (g)	10.0
Tween 80 (g)	0.5
KH ₂ PO ₄ (g)	2.0
MgSO ₄ ·H ₂ O (g)	0.5
CaCl ₂ ·H ₂ O (g)	0.1
MnSO ₄ ·H ₂ O (mg)	33.8
Tiamine·HCl (mg)	1.0
Sodium nitroacetate (μ g)	1.5
NaCl (μ g)	1.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O (μ g)	0.1
ZnSO ₄ (μ g)	0.1
20mM Sodium tartrate (pH 4.5)	
Distrilled water 1.0 liter	

3.1.2 MnP 活性の測定

MnP 活性は 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) 酸化活性 (65) により測定した。反応液には、1 mM 2,6-DMP、0.1 mM H₂O₂、0.5 mM MnSO₄ を含む 0.5 M 酒石酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) を使用し、469 nm の吸光度により測定した。この際、30°Cにおいて 1 mol のキノン二量体 ($\epsilon_{469} = 49,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) を 1 秒当りに生成する酵素量を 1 katal (kat) と定義した。

3.1.3 セルラーゼ活性の測定

セルラーゼ活性は Yamanobe らの方法 (66) に従い、酵素処理によって基質 (アビセル、CMC およびサリシン) から生成する還元糖を定量することで求めた。アビセルをアビセラゼ、CMC を CMCcase、サリシンを β -グルコシダーゼ活性測定用の基質とし、50°Cにおいて 1 μmol の還元糖を 1 秒当りに生成する酵素量を 1 unit (U) と定義した。また、タンパク量は protein assay kit (Bio-Rad 社製) により測定した。

3.2 結果および考察

IZU-154 株の産生するリグニン分解酵素に関しては Matsubara らの報告があり、この菌は主として MnP を産生し、LiP やラッカーゼなどは殆ど産生しないことが報告されている (45)。そこで、IZU-154 株および Cel-139 株を液体培養し、MnP の産生挙動を比較した。両菌株ともに培養 1 日目で MnP が産生されており、2 日目に最大活性の約 5 nkat/ml となり、3 日目には低下するという類似した挙動を示した (Fig. 4)。Katagiri らは、*P. chrysosporium* およびカワラタケによる HWKP のバイオブリーチングを行い、パルプ残留リグニンの分解には MnP が最

も重要な役割を果たしていると報告している (35)。よって、Cel-139 株と IZU-154 株のパルプ白色化能が同レベルであったのは、両菌株間で MnP 産生能に大差がなかったことに起因するものと考えられる。

一方、セルラーゼ活性については、培養 3 日目では両菌株に大差は認められなかったが、6 日目では Cel-139 株のセルラーゼ活性が IZU-154 株と比べて顕著に低下していた。アビセラーゼ (exoglucanase)、CMCase (endoglucanase) および β -グルコシダーゼ活性についてはそれぞれ、86%、39%および 65%抑制され、特にアビセラーゼ活性の低下が顕著であった (Table 5)。Cel-139 株は、野生株 (IZU-154 株) よりもバイオブリーチング時のパルプ収率 (Table 2) およびブナ木粉を処理した際のホロセルロース収率 (Table 3) が高いことを先に述べたが、これはセルロースの非還元末端部位から作用してセロオリゴ糖を生成する exoglucanase の産生が、Cel-139 株では顕著に抑制されたことによるものと考えられる。

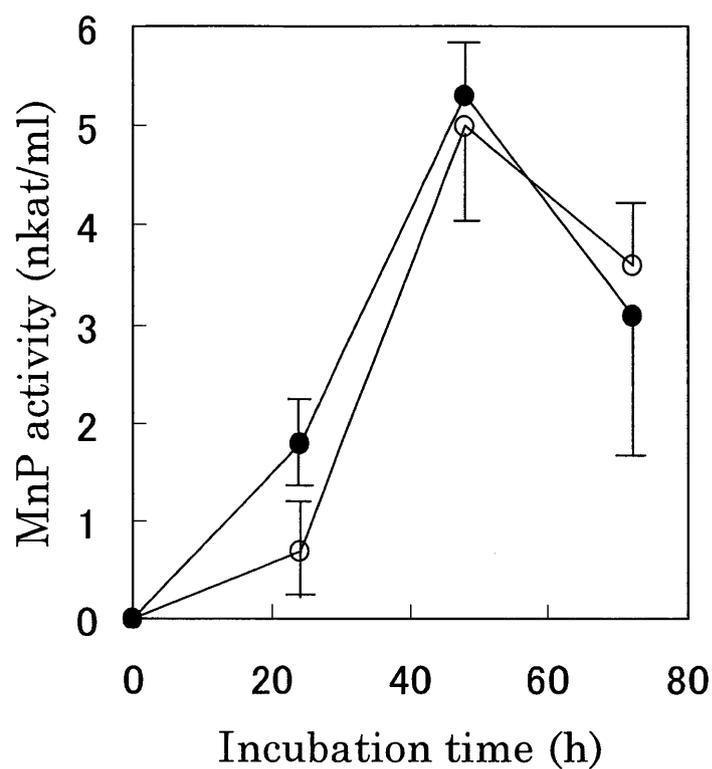


Fig. 4 Time course of MnP activities of Cel-139 and wild type IZU-154. ○, Cel-139; ●, wild type IZU-154.

Each points shows the mean of three replicates.

Table 5 Production of cellulolytic enzymes by Cel-139 and IZU-154

Strain	Cultivation period (d)	Protein concentration ^a (mg/ml)	Cellulolytic activity (IU/ml) ^a		
			Avicelase	CMCase	β -Glucosidase
IZU-154 (wild type)	3	61.5 \pm 5.7	0.8 \pm 0.5	6.4 \pm 1.3	0.7 \pm 0.2
	6	67.4 \pm 5.5	8.5 \pm 1.2	21.4 \pm 1.9	8.8 \pm 1.3
Cel-139	3	59.0 \pm 5.1	0.6 \pm 0.3	5.6 \pm 1.5	0.4 \pm 0.2
	6	72.7 \pm 3.4	1.2 \pm 0.3	13.0 \pm 1.8	3.1 \pm 0.5

^a Data are mean of three replicates.

第4節 Cel-139株を用いるバイオブリーチング

本節では、セルラーゼ低産生株 Cel-139 株を用いて HWKP のバイオブリーチングを行い、白色度及び Kappa 価とパルプ収率の関係を詳細に検討し、リグニン分解に伴うセルロース系多糖類の分解程度を IZU-154 株の場合と比較した。

4.1 実験

4.1.1 バイオブリーチング

本章 2.1.3 に準じて、HWKP のバイオブリーチングを行った。

4.1.2 Kappa 価の測定

Kappa 価の測定は、TAPPI STANDARDS 236 に従い、絶乾重量 1g のパルプが消費する 0.1 N 過マンガン酸カリウム溶液の ml 数から求めた。

4.2 結果および考察

Cel-139 株と野生株 (IZU-154 株) を用いてバイオブリーチングを行い、白色度、kappa 価および収率を経時的に測定した。その結果、HWKP の白色化挙動には両菌株で差がなく、1 日目以降から白色度が急激に上昇し、3 日目で約 20 ポイント、5 日目で約 30 ポイントの白色度上昇を示した (Fig. 5)。白色度上昇ポイントと収率の関係を Fig. 6A に、kappa 価と収率の関係を Fig. 6B に示すが、同レベルの白色度の上昇ポイントおよび kappa 価でパルプ収率を比較すると、

Cel-139 株の方が IZU-154 株よりも収率は約 1 ポイント高く、Cel-139 株がパルプ中のリグニンを選択的に分解していることが再確認された。

なお、Table 3 に示したように、ブナ木粉を処理した際には Cel-139 株の方が IZU-154 株よりも若干ではあるがリグニン分解活性が劣っていた。しかしながら、HWKP のバイオブリーチングにおいては両菌株が同様なリグニン分解活性（白色化および kappa 価減少）を示し、ブナ木粉の場合とは矛盾する結果となった。この理由としては、ブナ木粉と HWKP とではリグニン含有量およびその構成単位が異なることが挙げられよう。すなわち、ブナ木粉中には約 25 % のリグニンが含有されているのに対し、HWKP 中には数%しか含有されておらず、両者には量的な差異がある。また、ブナをはじめとする広葉樹中にはシリングルおよびグアイアシルリグニンがほぼ同じ割合で含有されるのに対し、HWKP のリグニンは主としてグアイアシルリグニンのみで構成されるという質的な差異もあり、さらにはグアイアシルリグニンの方がシリングルリグニンよりも白色腐朽菌で分解され難いことも知られている。このように、HWKP はブナ木粉と比べるとリグニン含有量が極めて少なく、さらには白色腐朽菌で分解を受け難いグアイアシルリグニンで構成されているため、ブナ木粉処理で認められた Cel-139 株と IZU-154 株のリグニン分解活性の差異が HWKP のリグニン分解の場合には認められなかったものと考えられる。

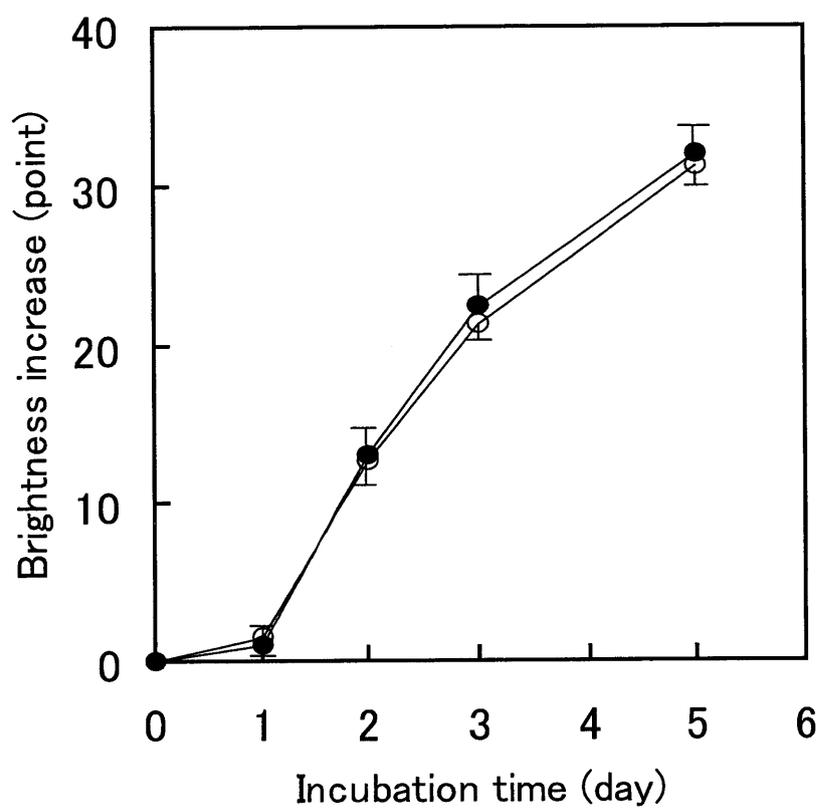


Fig. 5 Brightness increase of HWKP during biobleaching with Cel-139 and wild-type IZU-154. ○, Cel-139; ●, IZU-154. Each points shows the mean of three replicates.

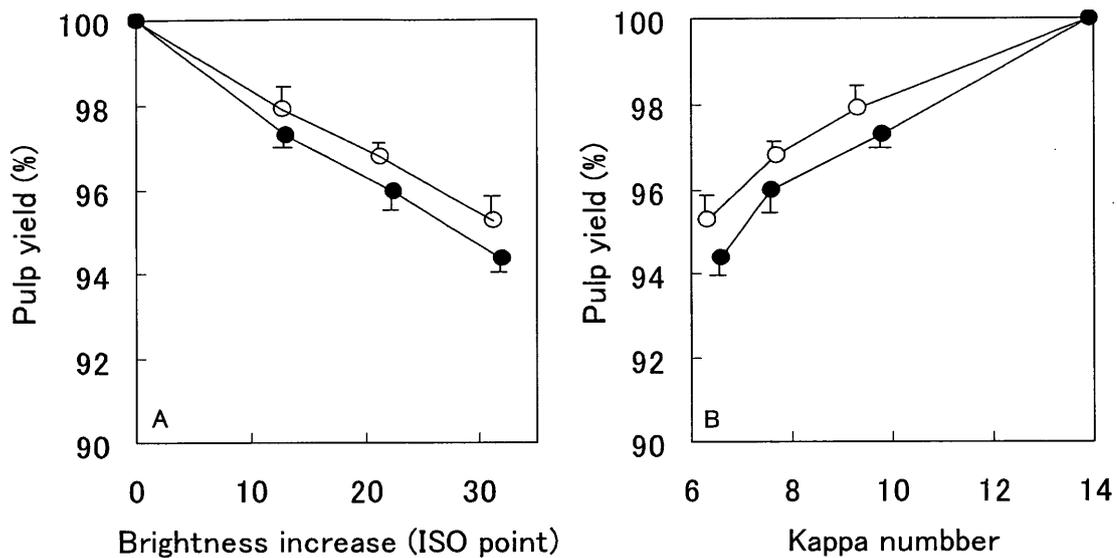


Fig. 6 Relationships among brightness increase, kappa number, and pulp yield during the biobleaching by Cel-139 and wild type IZU-154. (A) Relationship between brightness increase and pulp yield. (B) Relationship between kappa number and pulp yield. ○, Cel-139; ●, wild type IZU-154. Each point shows the mean of three replicates.

第5節 小括

第2章で分離した単核性 IZU-154-22 株のプロトプラストを紫外線照射および NTG 処理した結果、前者の方法においてより効率的な変異が生じた。よって、IZU-154-22 株のプロトプラストを紫外線照射し、再生株の中からセルラーゼ低産生株の選抜を試みた。

選抜した Cel-139 株は、野生株 (IZU-154 株) と同程度の MnP 活性を保持したまま、アビセラーゼ活性が 86%、CMCase 活性が 39%、 β -ガラクトシダーゼ活性が 65%抑制されていた。さらに、栄養源を無添加とした固体培養条件下で、Cel-139 株による HWKP のバイオブリーチングを行った結果、5 日間の処理で約 30 ポイントの白色度上昇を示し、野生株 IZU-154 株と同等の白色度上昇が得られた。また、処理パルプの白色度上昇及び kappa 価とパルプ収率の関係を解析したところ、同レベルの白色度および脱リグニン度におけるパルプ収率は、Cel-139 株の方が野生株よりも約 1%高いという結果を得た。よって、Cel-139 株は IZU-154 株のリグニン分解活性 (MnP 活性) を保持しながら、セルロース分解活性が抑制された変異株であり、特に、アビセラーゼ (exoglucanase) 活性の低下がセルロース分解を抑制したものであると考えられた。

第4章 セルラーゼ低産生株 (Cel-139株) の育種によるパルプ白色化能の向上

第1節 序

白色腐朽菌のリグニンの分解には、単一の遺伝子ではなく複数の遺伝子に支配される酵素群が関与している可能性がある。そこで、紫外線等による遺伝子レベルでの変異処理よりもさらに大きな形質変化を期待できる染色体レベルでの変異処理として、コルヒチンによる同質倍数体化と、それに続くベンゾイミダゾールによる単数体化を取り上げ、第3章で育種したIZU-154株由来のセルラーゼ低産生株 Cel-139 株をコルヒチン-ベンゾイミダゾール処理することによって、バイオブリーチング時のパルプ白色化能（リグニン分解能）に優れた菌株を育種することを目的とした。

第2節 セクター形成株誘導条件の検討

コルヒチンは細胞中の微小管形成に作用する有糸分裂阻害剤の一種であり(14)、この阻害剤による同質倍数体化は動物細胞(8)や植物細胞(6)において報告されている。例えば、微生物では、*Candida sp.*のコルヒチン処理によって細胞径の大型化が生じるとともに生育速度およびアルコール資化活性が向上すると報告されている(27)。また、*Trichoderma reesei*のコルヒチン処理ではセルラーゼ生産性の向上した菌株が分離されており(61)、コルヒチンによる同質倍数体化処理が多形質変異の誘導をもたらすことになるので、優良菌株の育種に有効であることが示されている。一方、ベンゾイミダゾールは二倍体菌株を単数体化して扇状体(セクター)形成を誘導することが知られており、本処理では染色体数の異なる異数体核が生成し、様々な染色体レベルでの変異が起こると報告されている(23)。

そこで本節では、Cel-139株のコルヒチン-ベンゾイミダゾール処理に注目し、この処理のセクター形成に最適な処理条件を検索した。

2.1 実験

2.1.1 供試菌株

IZU-154株由来の単核性菌株 IZU-154-22株から分離したセルラーゼ低産生変異株 Cel-139株を用いた。

2.1.2 コルヒチン処理

コルヒチンによる同質倍数体化処理はToyamaらの方法(61)を参考にして行

った。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g/L、 KH_2PO_4 2.0 g/L、 尿素 0.3 g/L、 CaCl_2 0.3 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/L、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0016 g/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0014 g/L、 CoCl_2 0.002 g/L、 L-arginine 0.08 g/L、 glucose 20.0 g/L から構成される Natick 培地 10 ml に、 コルヒチン (0.5%) およびサッカロース (0.6 M) を添加し、 NaOH で pH 9.0 に調整した。 この溶液に、 第 2 章 第 2 節 2.1.2 に準じて調製した Cel-139 株由来のプロトプラストを懸濁し (1×10^7 個/ml)、 30°C において静置培養した。 所定期間培養後、 第 2 章 第 2 節 2.1.2 に準じてプロトプラストの再生を行い、 同質倍数体化した再生株を得た。

2.1.3 ベンゾイミダゾール処理

0.05%ベンゾイミダゾールを含む各種寒天培地 (Table 7) に、 コルヒチン処理後の再生株を接種し、 Fig. 7 に示すような扇状のセクター形成部位より単数体化した菌株を分離した。

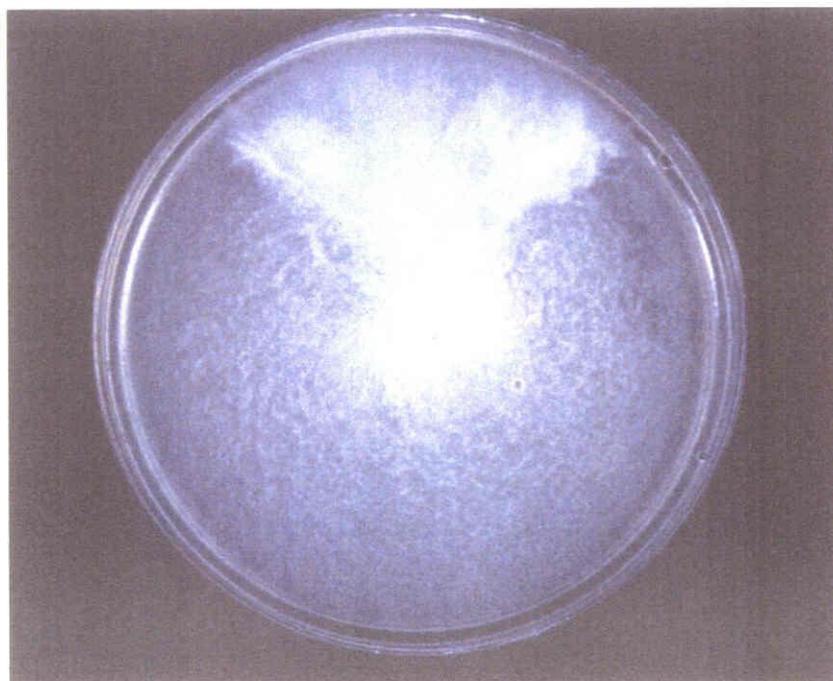


Fig. 7 Sector formation by benzimidazole treatment.

2.2 結果および考察

ベンゾイミダゾール処理後のセクター形成に及ぼすコルヒチン処理時間の影響について検討した。なお、コルヒチン処理は2.1.2に準じて行い、セクター形成の誘導にはベンゾイミダゾール0.05%を含むPDA培地を用いた。

コルヒチン処理時間を変化させ、得られたプロトプラスト再生株100株についてベンゾイミダゾール処理（7日間）を行い、セクター形成株の割合からセクター形成率を求めた。その結果をFig. 8に示しているが、コルヒチン未処理では0%、3日間処理では23.5%、5日間処理では29.1%、7日間処理では1.8%のセクター形成率となり、5日間のコルヒチン処理がセクター形成にとって最適であると判断した。

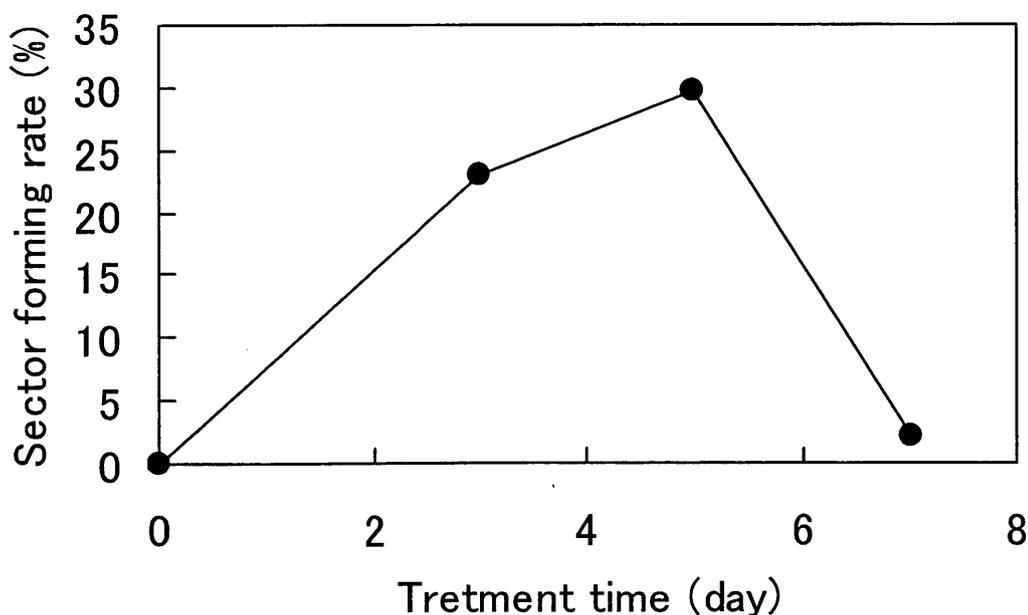


Fig. 8 Changes in the sector formation of Cel-139 during colchicine treatment.

次いで、コルヒチン処理を 5 日間とし、単数体化を誘導するベンゾイミダゾールの濃度を 0.005%~0.2%に変化させた PDA 培地を用いてセクター形成への影響について検討した (Table 6)。その結果、0.05%の条件で、最も高いセクター形成率が得られ、それ以下の濃度ではセクターが形成されず、それ以上の濃度では菌体の生育が阻害されることが判明した。

なお、ベンゾイミダゾール濃度を 0.05%とした時のセクター形成に及ぼす培地成分の影響を検討したが、PDA 培地で最も高いセクター形成率が得られた (Table 7)。

Table 6 Effect of benzimidazole concentration on sector formation of Cel-139

Concentration of benzimidazole (%)	Mycelium diameter (mm)	Sector formation rate (%)
0.2	—	—
0.1	50	1.1
0.05	85	24.4
0.005	85	0
0	85	0

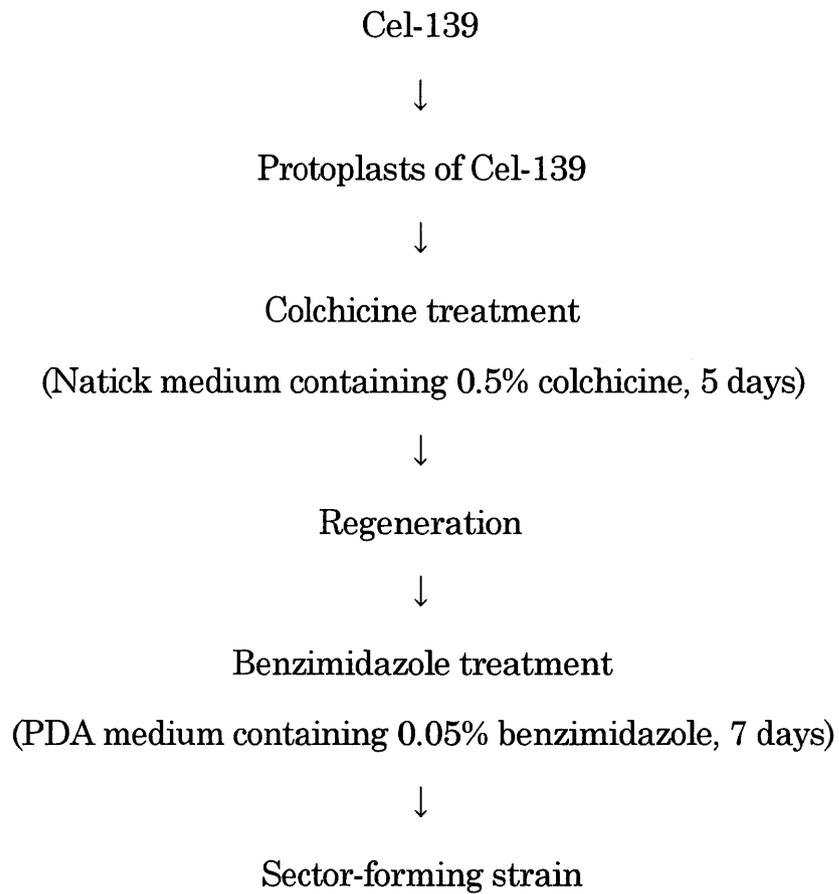
PDA medium containing benzimidazole was inoculated with colchicine-treated Cel-139 and incubated at 30°C for 7 days.

以上の結果から、0.5%コルヒチンを含む Natick 培地での 5 日間処理と、0.05%ベンズイミダゾールを含む PDA 培地での 7 日間処理がセクター形成に最適である判断した (Scheme 2)。そこで次に、Cel-139 株のプロトプラストをコルヒチン処理し、再生した 900 株をベンズイミダゾール処理に供した結果、260 株のセクター形成株が得られた。よって、次節ではこれらのセクター形成株を用いてバイオブリーチングを行い、パルプ白色化能に優れた菌株を選抜することにした。

Table 7 Effect of medium component for benzimidazole treatments on sector formation of Cel-139

Medium component	PDA ^{a)}	Yeast Ex. ^{b)} +WC	Yeast Ex. ^{c)} +CMC	CSL ^{d)} +WC	CSL ^{e)} +CMC	NS ^{f)} +WC
Sector formation rate (%)	29.0	16.0	15.0	8.0	8.0	2.2

a) PDA; potato dextrose agar, b) Yeast Ex. + WC; 10g/L yeast extract and 10g/L WC(pH4.5), c) Yeast Ex. + CMC; 10g/L yeast extract and 10g/L CMC (pH4.5), d) CSL + WC; 10g/L CSL and 10g/L WC (pH4.5), e) CSL + CMC; 10g/L CSL and 10g/L CMC (pH4.5), f) NS+WC; NS medium containing 10g/L WC.



Scheme 2 Isolation of sector-forming strain from Cel-139.

第3節 高パルプ白色化能を有する菌株の選抜

本節では、Cel-139 株から誘導したセクター形成株を用いて HWKP のバイオブリーチングを行い、セルラーゼ低産生性を保持したままパルプ白色化能（リグニン分解能）が向上した菌株の選抜を試みた。

3.1 実験

3.1.1 セルラーゼ活性の検出

第3章 第2節 2.1.2 の方法に準じ、2% WC を唯一の炭素源とする NS 寒天培地を用いてセクター形成株のセルラーゼ活性の有無を検出した。なお、液体培養時のセルラーゼの産生および活性測定は、それぞれ第3章 第3節 3.1.1 および 3.1.3 の方法に準じて行った。

3.1.2 バイオブリーチング

第3章 第2節 2.1.3 の方法に準じて、HWKP のバイオブリーチングを行い、パルプ白色度および収率を測定した。

3.2 結果および考察

3.2.1 高パルプ白色化能を有するセクター形成株の選抜

Cel-139 株のプロトプラストをコルヒチン処理し、再生株をベンゾイミダゾール処理して得られた 260 株のセクター形成株を WC 含有 NS 寒天培地に接種・培

養し、ハロー形成を指標としてセルラーゼ活性が Cel-139 株のそれと比べて同等もしくは低い菌株を選抜した。次いで、選抜された 30 株についてバイオブリーチングを行ったところ、野生株 (IZU-154 株) と比べ、パルプ白色化能 (リグニン分解能) に優れた菌株 (M215 株) が分離された。

なお、M215 株は菌体マット上に形成されたセクターから分離した菌株であるため遺伝子的には単一ではない可能性があった。よって、再度、プロトプラスト再生による菌株分離を行い、得られた 20 株を用いてバイオブリーチングを行った結果、再分離株のいずれもが野生株よりもパルプ白色化能に優れていた (Fig. 9)。次いで、再分離株の中で、最もパルプ白色化能の高かった No.13 株を M215-13 株として選抜し、本菌株のバイオブリーチング特性について詳細に検討した。

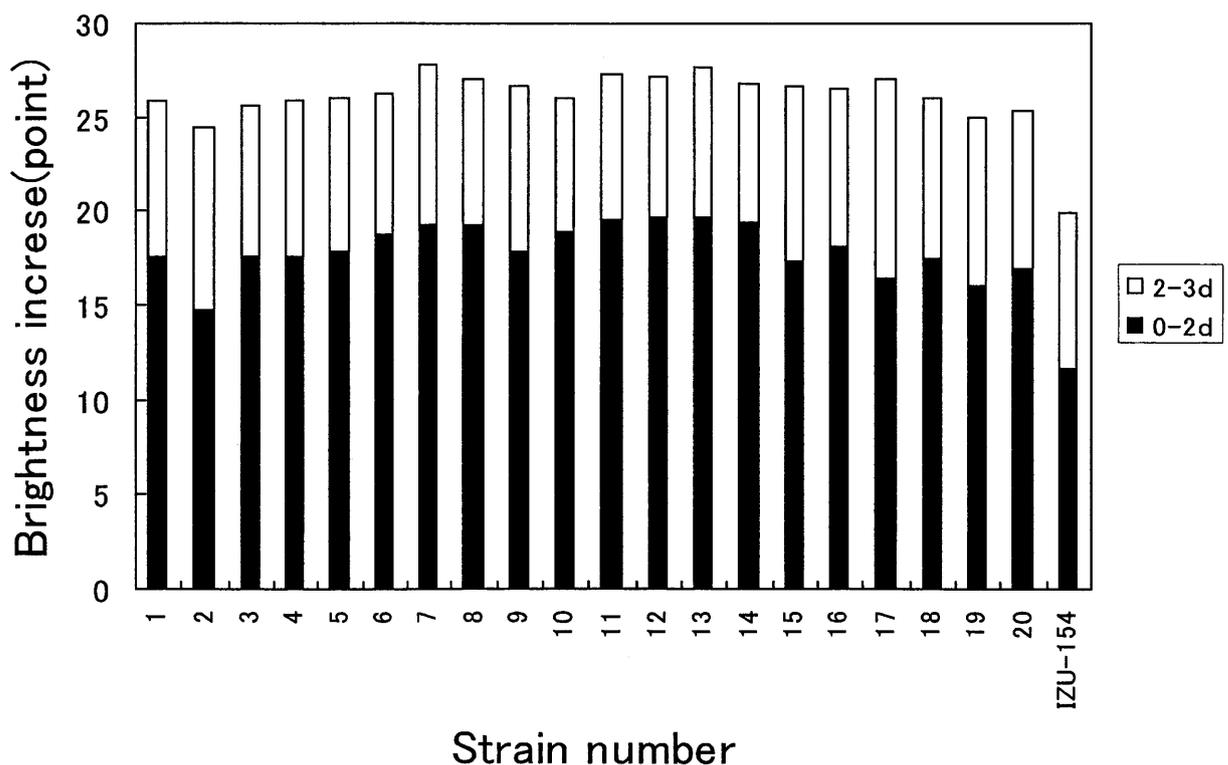


Fig. 9 Brightness increase of HWKP treated with isolates from sector-forming fungus M215.

3.2.2 M215-13株のバイオブリーチング特性

M215-13株を用いてバイオブリーチングを行った際の白色度の変化を Fig. 10 に示す。M215-13株は全処理期間（5日間）を通してIZU-154株（野生株）よりも白色度上昇が大きく、特に処理3日目までの白色化能に優れていた。なお、処理終盤（5日目）においては両菌株間で白色度上昇に大差は認められなくなったがこの時においてもM215-13株の方が白色度は1.7ポイント高く、パルプ収率も0.9ポイント高いという結果が得られた（Table 8）。さらに、M215-13株の親株であるCel-139株と比較すると、同レベルのパルプ収率を示しながら白色度は2.2ポイント向上していた（Table 8）。また、M215-13株を液体培養した際に産生されるセルラーゼ系酵素の活性を測定したところ、いずれの活性もIZU-154株よりは低く、Cel-139株と同レベルであった（Table 9）。この結果は、バイオブリーチング時のパルプ収率がIZU-154株よりも高く、Cel-139株と同レベルであるというTable 8の結果とよく符合した。

以上のことから、M215-13株はセルラーゼ低産生株であるというCel-139株の長所を保持しながら、HWKP中のリグニン分解能が向上した菌株であると結論され、バイオブリーチングへの適用やセルロース系多糖類を含む木質系資源の有効利用を図る上で有用な菌株であると考えられる。

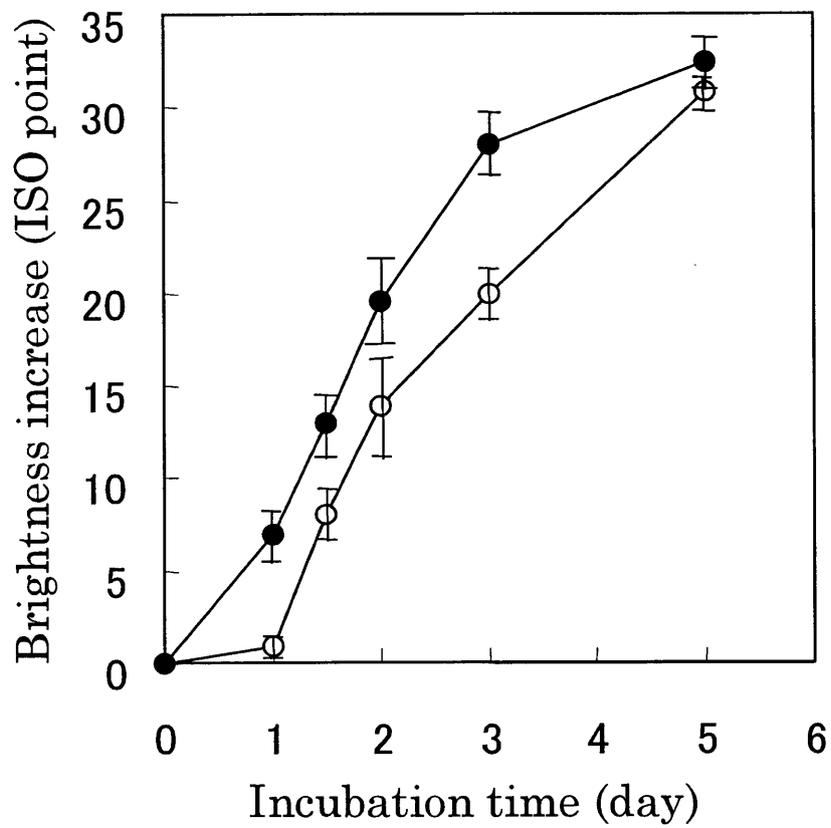


Fig. 10 Brightness increase of HWKP during treatments with M215-13 and wild type IZU-154. ●, M215-13; ○, IZU-154. Each points shows the mean of three replicates.

Table 8 Biobleaching of HWKP by isolates and IZU-154

Strain	Brightness Increase ^a (ISO point)	Pulp yield ^a (%)
M215-13	32.5 ± 0.5	95.5 ± 0.1
IZU-154 (wild type)	30.8 ± 1.2	94.6 ± 0.1
Cel-139	30.3 ± 0.8	95.3 ± 0.2

^a Data are the mean of three replicate HWKPs treated for 5 days.

Table 9 Production of cellulolytic enzymes by isolates and IZU-154

Strain	Protein concentration ^a (μ g/ml)	Cellulolytic activity (IU/ml) ^a		
		Avicelase	CMCase	β -Glucosidase
M215-13	37.6	0.2	4.5	0.2
IZU-154 (wild type)	42.5	1.2	8.1	0.6
Cel-139	35.2	0.3	3.9	0.3

^a Data are the mean of three replicates.

第4節 小括

本章では、セルラーゼ低産生株 Cel-139 株からバイオブリーチング時のパルプ白色化能が高い菌株を育種することを目的とし、コルヒチン-ベンゾイミダゾール処理による同質倍数体化と、倍数体株からの単数体化による染色体レベルでの変異を誘導した。

Cel-139 株由来のプロトプラストをコルヒチン処理した後に再生した 900 株をベンゾイミダゾールで処理し、260 株のセクター形成株を得た。セクター形成株について、寒天培地上での WC セルロースの分解およびバイオブリーチング時のパルプ白色化を指標として選抜を行った結果、Cel-139 株の有していたセルロース分解が少くパルプ収率が高いという特長を維持しながら、Cel-139 株および IZU-154 株よりもパルプ白色化能に優れた M215-13 株が分離された。

第5章 IZU-154株による MnP 産生

第1節 序

バイオブリーチングは、リグニン分解能を有する白色腐朽菌を用いる生菌法と白色腐朽菌の産生するリグニン分解酵素を用いる酵素法とに大別される。生菌法においては、白色腐朽菌をパルプに接種してからリグニン分解酵素が産生されるまでにラグタイムがあり、産生量も低いことから処理に長期間（日単位）を要し、さらにはパルプ残留リグニンの分解に伴ってセルロース系多糖類も分解されることから、パルプの収率や強度の低下を回避できないという難点がある。そこで前章までの検討では、実用的な生菌法によるバイオブリーチングを指向して IZU-154 株の変異処理を行い、本菌株が本来有する高度でかつ選択的なリグニン分解活性をさらに強化した菌株の育種を試みた。

一方、予め白色腐朽菌に産生させたリグニン分解酵素を用いる酵素法においては、リグニン分解酵素が産生されるまでのラグタイムは問題としなくても良く、セルロース系多糖類の分解も生じないため、生菌法と比べると処理期間が短縮され、パルプ収率や強度低下を防止しうることが期待される。このような観点から、Ehara らは IZU-154 株由来の MnP を用いるバイオブリーチングを試みており、生菌法よりも短時間の処理で全晒パルプを得ることができ、化学的漂白に必要な塩素系漂白剤を大幅に削減でき、さらに、パルプ収率の低下もないことを明らかにしている (15)。

そこで本章では、MnP バイオブリーチングを指向して、IZU-154 株の MnP 産生に及ぼす窒素源および二価マンガン[Mn(II)]の影響を検討した。さらには、ジャーファーメンターでの MnP 大量産生を可能とする培養パラメーターを検索し、濾過連続培養による MnP 生産性の向上を試みた。

第2節 IZU-154株のMnP産生に及ぼす培養条件の検討

白色腐朽菌は、培地中の窒素源が制限された培養条件でMnPを産生し、さらには培地中にMn(II)を添加するとMnP産生を誘導することが知られている(21)。そこで本節では、IZU-154株のMnP産生へ及ぼす窒素濃度及びMn(II)添加の影響について検討し、さらには、培地に添加したMn(II)がMn(III)へ酸化されることに伴う2,6-ジメトキシフェノール(2,6-DMP)の酸化とMnP産生の関係および菌体量変化とMnP産生の関係を解析した。

2.1 実験

2.1.1 供試菌株および培地

第3章第3節の3.1.1に準じて、PDAプレート上に生育したIZU-154株をCG培地にて前培養した。次いで、オーステライザーでホモジナイズした前培養液1mlを、200 μ MのMn(II) (33.8mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) を含有する低窒素(LN)および高窒素(HN)培地(50 ml)に加えて培養し、窒素濃度がMnP産生に及ぼす影響について検討した。なお、上述のMn(II)添加LN培地からMn(II)を除去した培地を用いて同様に培養し、MnP産生に及ぼすMn(II)の影響についても検討した(Table 10)。

2.1.2 MnP活性の測定

第3章第3節の3.1.2に準じて、MnP活性を測定した。

Table 10 Composition of LN and HN medium

Component	Amount of component in:	
	LN	HN
Ammonium tartrate (g)	2.4	48.0
Glucose (g)	10.0	10.0
Tween 80 (g)	0.5	0.5
KH ₂ PO ₄ (g)	2.0	2.0
MgSO ₄ ·H ₂ O (g)	0.5	0.5
CaCl ₂ ·H ₂ O (g)	0.1	0.1
MnSO ₄ ·H ₂ O (mg)	33.8	33.8
Tiamine·HCl (mg)	1.0	1.0
Sodium nitroacetate (μ g)	1.5	1.5
NaCl (μ g)	1.0	1.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O (μ g)	0.1	0.1
ZnSO ₄ (μ g)	0.1	0.1
20mM Sodium tartrate (pH 4.5)		
Distilled water 1.0 liter		

2.1.3 培養液中の Mn(III)濃度の測定

1 mM 2,6-DMP および 1 mM アジ化ナトリウムを含有する 400 μl の 0.5 M 酒石酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) に 100 μl の培養液を加え、60 秒間攪拌した後、2,6-DMP の酸化に基づく 469 nm における吸光度上昇を測定した。なお本反応は、 H_2O_2 を無添加とし、ヘム酵素の阻害剤であるアジ化ナトリウムを添加した条件下で行うことから、MnP 触媒サイクル上での MnP の活性化と Mn(II)の酸化 [Mn(III)の生成] は起こらない。よって、本反応条件下での 2,6-DMP 酸化は、培養液中に存在する Mn(III)によって生じる非酵素的な酸化 (nonenzymatic 2,6-DMP oxidation) に基づくことから、469 nm における吸光度を「NEOX レベル」として表示した。

なお、培養液の代わりに酢酸マンガン [Mn(III)] 濃度を種々に変化させた溶液 100 μl を加え、同様に吸光度 (469 nm) を測定した。次いで、Mn(III)濃度と吸光度 (NEOX レベル) の関係から検量線を作成し、その検量線から培養液中に存在する Mn(III)濃度を算出した。

2.1.4 菌体量の測定

LN および HN 培地で培養した 5 ml の培養液をガラスフィルターを用いて濾過し、105°Cで一晩乾燥した後の重量を菌体量とした。

2.2 結果および考察

2.2.1 NEOX レベルと Mn(III)濃度との関係

MnP は H_2O_2 存在下で活性化され、Mn(II)を Mn(III)に酸化するため (21)、IZU-154 株が培養液中に MnP および H_2O_2 を産生すると、培養液中に添加された Mn(II)は Mn(III)に酸化されることになる。そこで、NEOX レベルから培養液中

の Mn(III)濃度を求め、Mn(III)濃度が MnP 産生の指標になり得るのかについて検討した。

IZU-154 株を三角フラスコ内で 2 日間培養し、得られた培養液を 2,6-DMP と反応させ、NEOX レベル (A₄₆₉) を経時的に測定した (Fig. 11)。その結果、NEOX レベルは約 30 秒間の反応で平衡に達したことから、以降の実験では 60 秒間反応させた後の吸光度を測定して NEOX レベルとすることにした。一方、酢酸マンガンを用いて 2,6-DMP との反応 (60 秒間) を行ったところ、Mn(III)濃度と NEOX レベルには良好な相関関係が認められた (Fig. 12)。そこで Fig. 12 に、培養液の NEOX レベル値 (0.43) を外挿して Mn(III)濃度を求めた結果、培養液中の Mn(III)濃度は 206 μM に相当し、この濃度は培養液中に予め添加した Mn(II)濃度 (200 μM) とほぼ一致した。以上の結果から、培養液中に産生された MnP によって、添加した Mn(II)の全量が Mn(III)へ酸化されていることが明らかとなり、NEOX レベルを MnP 産生の指標としうる可能性が示唆された。

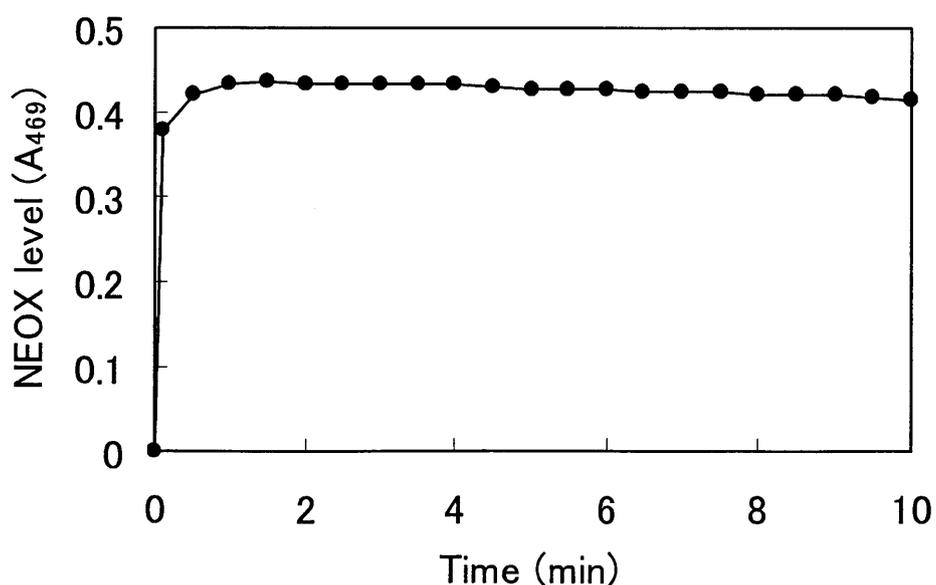


Fig. 11 Time course of the nonenzymatic 2,6-DMP oxidation (NEOX) reaction.

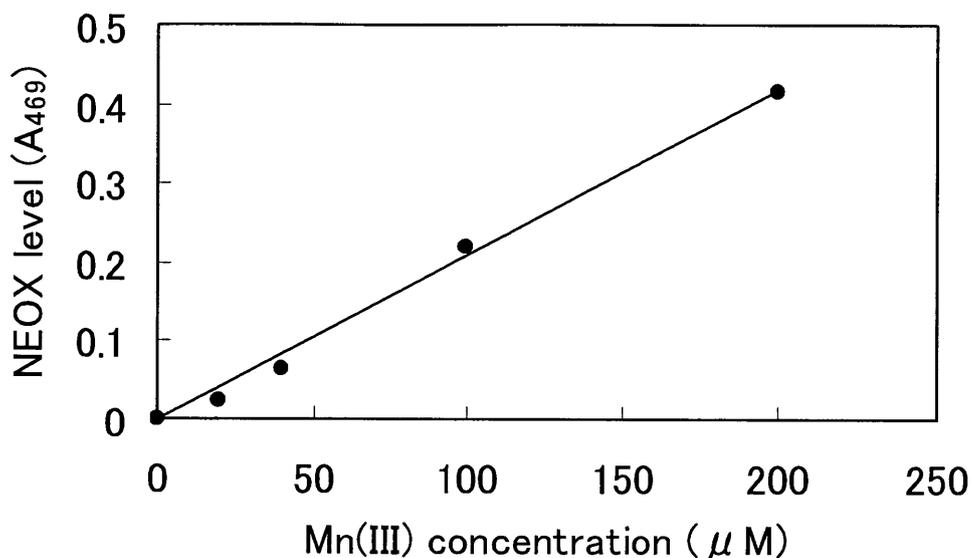


Fig. 12 The NEOX level of Mn(III) acetate dihydrate as function of its concentration.

2.2.2 IZU-154 株の MnP 産生へ及ぼす窒素および Mn(II)濃度の影響

代表的な白色腐朽菌である *P. chrysosporium* やカワラタケにおける MnP 産生には、窒素源の制限と Mn(II)の添加が必須とされている (21)。そこで、IZU-154 株の MnP 産生に対する両因子の影響を明らかにする目的で、窒素源および Mn(II)の濃度を変化させた系で IZU-154 株を培養し、MnP 活性、菌体量および NEOX レベルの挙動を追跡した。

その結果、IZU-154 株においても Mn(II)を添加した LN 条件下で MnP は効率的に産生されたが、Mn(II)添加 HN および Mn(II)無添加 LN 条件下での MnP 産生はほとんど認められなかった (Fig. 13A)。よって、IZU-154 株においても他の白色腐朽菌の場合と同様に、窒素源を制限した LN 条件下での Mn(II)添加によって MnP 産生は誘導されることが判明した。

NEOX レベル、すなわち培養液中での Mn(III)生成についても、Mn(II)添加 LN 条件下で検出され、MnP 産生の開始と連動して培養 20 時間付近から NEOX レベルも上昇し始めた (Fig. 13B)。なお、培養 24 時間では約 0.4 の NEOX レベルを示し、このレベルについて Fig. 12 より Mn(III)濃度を求めたところ約 200 μ M に相当した。このことから、LN 培地へ添加された Mn(II) (200 μ M) の全量が 24 時間後には Mn(III)へ酸化されていることが示された。しかしながら、MnP 活性と NEOX レベルを対比すると、MnP 活性は培養 45 時間以降から減少するのに対し、NEOX レベルは 24 時間以降ほぼ一定となり、MnP 活性と NEOX レベルの変化は必ずしも一致しないという結果となった。よって、NEOX レベルは MnP 産生挙動の全体を反映するものではなく、MnP 産生の開始時期を示す指標であると判断された。

一方、培養に伴う菌体の増殖は HN 条件下の方が LN 条件下よりも優れており、LN 条件下における Mn(II)の添加は菌体増殖に影響を及ぼさなかった (Fig. 13C)。また、MnP 活性 (Fig. 13A) と菌体量 (Fig. 13C) の変化を対比すると、Mn(II) 添加 LN 条件下においては菌体増殖が定常期に達した直後に MnP 活性が最大となり、その後、速やかに低下するという傾向を示した。よって、菌体の増殖挙動を追跡すれば、MnP が最大に産生される培養時期 (ハーベスト時期) をある程度管理しうる可能性が示唆された。

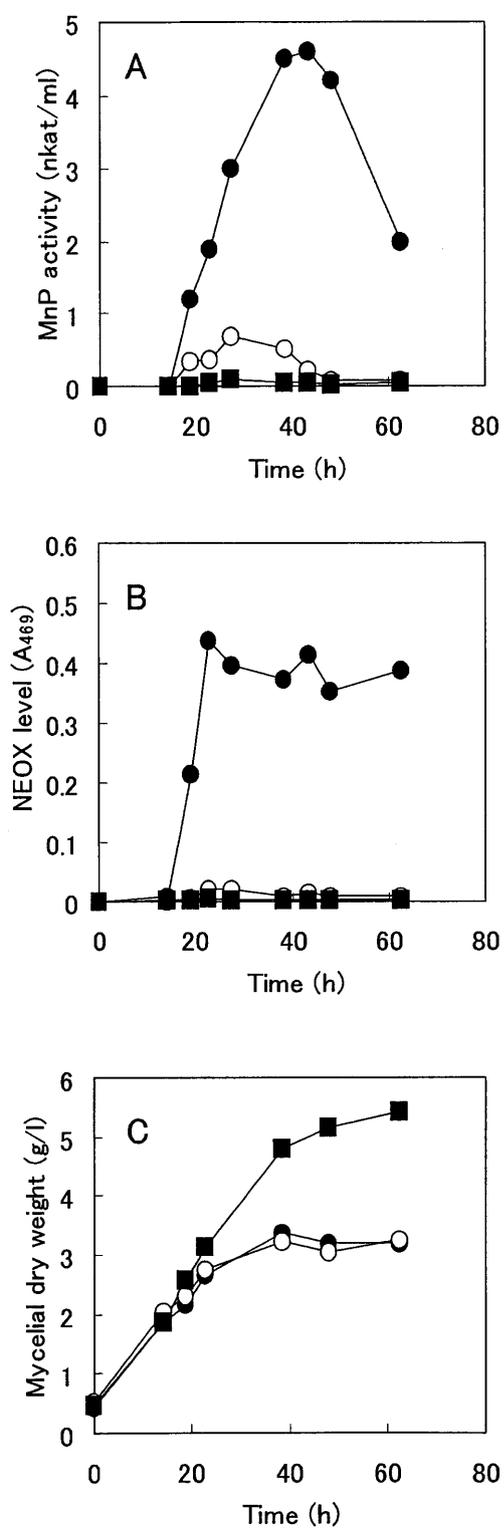


Fig. 13 Time courses of MnP activity (A), NEOX level (B), and mycelial dry weight (C) in the culture fluids of IZU-154. ●, cultivation under LN conditions; ■, cultivation under HN conditions; ○, cultivation under Mn(II)-free LN conditions.

第3節 ジャーファーマンターでの回分培養による MnP 産生と培養パラメーターの関係

本節では、IZU-154 株での MnP 大量産生技術の確立を目的として、ジャーファーマンターを用いる回分培養によって MnP 産生を試み、同時に MnP 産生をモニタリングできる培養パラメーターに関する検索を行った。

3.1 実験

回分培養での MnP 産生は、1800 ml 容のジャーファーマンター (B. E. Marubishi 社製) を用いて行った。第3章 第3節の 3.1.1 に準じて、ホモジナイズした前培養液 (MnP 産生用の接種菌液) を調製し、その 20 ml を 1000 ml の LN または HN 培地に接種して、30°C、2 vvm、150 rpm で所定期間培養した。また、pH および ORP 電極 (B. E. Marubishi 社製) を挿入し、pH と酸化還元電位をオンラインで測定した。なお、MnP 活性、NEOX レベルおよび菌体量は本章の前節に準じて測定した。

3.2 結果および考察

ジャーファーマンターを用いて IZU-154 株の大量培養を行い、培養パラメーターとして pH および酸化還元電位をオンラインで測定し、MnP 活性との関係について検討した。さらに、NEOX レベルおよび菌体量と MnP 活性との関係についても検討した。なお、このための実験系として、Mn(II)を 200 μ M 添加した LN 培地で培養する系 (Run 1) と、Mn(II)無添加の LN 培地で培養を開始し、45 時間後に Mn(II)を 200 μ M 添加して培養する系 (Run 2) を設定した。

Fig. 14A に示すように、培養開始時から Mn(II)を添加した Run 1 では、MnP 活性は 20 時間培養後から検出され、44 時間培養後には最大活性値 (9.7 nkat/ml) を示した。MnP 産生挙動はフラスコ培養の場合 (Fig. 13A) と類似していたが、フラスコ培養での MnP の最大活性値は 4.7 nkat/ml であったことから、ジャーファーメンター培養の MnP 活性のほうが約 2 倍高い値を示した。なお、Run 1 (Fig. 14E) とフラスコ培養 (Fig. 13C) において菌体量には差がなかったことから、ジャーファーメンター培養時の強制通気と攪拌による溶存酸素量の増大が MnP 産生を促進したものと推察される。Run 1 における NEOX レベルについては、MnP 活性に連動して培養 20 時間目から検出され始め、24 時間目以降はレベルオフするというフラスコ培養の場合と同様の挙動を示した (Fig. 14B)。また、酸化還元電位は MnP 産生が開始される培養 15 時間付近から急激に上昇し、MnP 活性が検出された 20 時間以降では徐々に低下した (Fig. 14C)。よって、酸化還元電位変動のレスポンスは MnP 活性のそれより鋭敏といえる。なお、pH は一端低下した後、MnP 活性が検出される 20 時間以降から上昇に転じ、MnP 活性が最大に達する直前から pH 上昇が緩やかになるという傾向を示し (Fig. 14D)、pH 変化はある程度 MnP 活性の変化と連動していた。菌体量については、28 時間後に最大の 3.2 g/l となり、その後は漸減したが (Fig. 14E)、定常期に達した後に MnP 活性が最大となっており、この点は定常期になると MnP 活性が低下するというフラスコ培養の場合とは異なっていた。

一方、Mn(II)を無添加として培養を開始し、45 時間後に Mn(II)を添加した Run 2 においては、Mn(II)添加前までの MnP 産生は僅かであり、Mn(II)を添加してさらに 17 時間培養した 62 時間目から産生され始めた (Fig. 14A)。なお、NEOX レベル、酸化還元電位および pH については、Mn(II)添加による MnP 産生の誘導に呼応した変化を示しており、それぞれが Run 1 の場合と同様に MnP 産生に伴って増加した。しかしながら、Run1 と Run2 では菌体量に差はないものの、

Run2 の MnP 産生効率は Run 1 の場合よりも明らかに劣っていた。これは、Mn(II)添加時の菌齢が高いことや培地中のグルコースなどの栄養源が消費されて枯渇したことに起因するものと推察される。

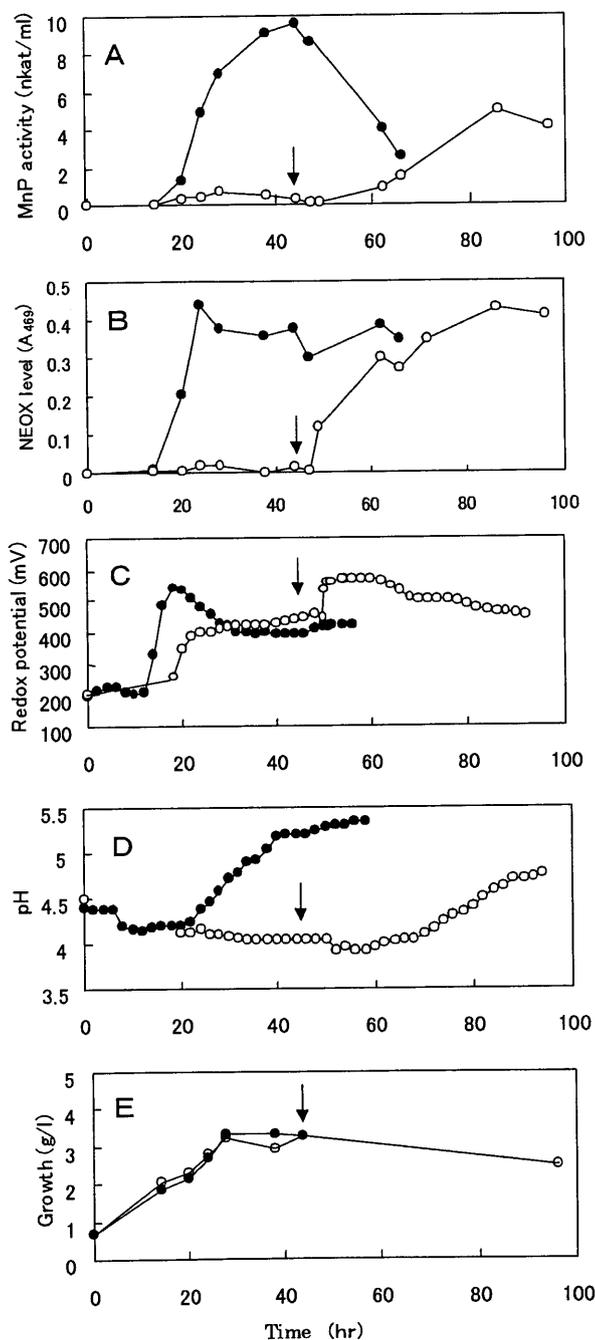


Fig. 14 Time course of MnP activity and other parameters during the batch cultivation of IZU-154. (A) MnP activity, (B) NEOX level, (C) redox-potential, (D) pH, (E) mycelial growth. ●, Mn sufficient condition (Run 1); ○, Mn-deficient conditions until 45h cultivation. Arrows indicate the time of Mn(II) addition (Run 2).

第4節 ジャーファーマンターでの濾過連続培養による MnP 生産性の向上

IZU-154 株による MnP 産生は定常期に達すると、速やかに低下する傾向にある。その原因として、培養液中に添加した Mn(II)の枯渇やプロテアーゼ産生による MnP の失活などが考えられている (13)。そこで、新たな培養液をジャーファーマンター内に連続的に注入し、同時に注入した培養液と同量の培養濾液を系外へ排出することによって、菌体の代謝ステージを MnP 産生に好ましい状態に保つことを指向した濾過連続培養による MnP 産生を試みた。

4.1 実験

濾過連続培養による MnP 産生も、本章第3節の3.1と同様にジャーファーマンターを用いて行った。LN 培地を一定の滞留時間となるよう添加し、ケラミフィルター (Iuchi 社製) で菌体をジャーファーマンター内に保持しながら、添加する LN 培地と同量の培養濾液をジャーファーマンター外へ排出した。また、LN 培地の添加量を変化させることによって、希釈率 (一日当たりの LN 添加量/槽内培養液容量) を制御した。なお、培養濾液についてはフラクションコレクターで 5 ml 毎に分取した後、各フラクションを希釈率に応じて混合し、1 時間毎の排出量に相当する量を調製した。次いで、MnP 活性を測定し、これをジャーファーマンター内部に滞留する培養液の MnP 活性とした。その他の培養条件については、回分培養の場合と同一とした。

4.2. 結果および考察

4.2.1 希釈率と MnP 活性の関係

LN 培地の添加速度によって制御される希釈率を変化させて濾過連続培養を行い、MnP 産生へ及ぼす希釈率の影響を検討した。その結果を Table 11 に示すが、希釈率が高くなるにつれて MnP 活性が低くなり、希釈率 2.88 では MnP 産生がほとんど認められなくなった。この理由は、希釈率が高い条件では新しい培地が順次注入されるためジャーファーメンター中の窒素源濃度が高まり、MnP 産生に必須である窒素制限状態に維持できなかったことによるものと考えられる。なお、検討した範囲内では、希釈率 0.88 が MnP 産生に最適であり、培養 21 時間で 8.1 nkat/ml の最大活性値が得られた (Table 11)。

Fig. 15 に、希釈率 0.88 での濾過連続培養における MnP 活性の経時変化を示すが、MnP 活性は培養 13 時間目から検出され始め、21 時間目には最大 (8.1 nkat/ml) となり、その後は緩やかに低下した。回分培養 (Fig. 14A) においては、培養 44 時間で最大活性値 (9.7 nkat/ml) を示したが、これと比べると、濾過連続培養では最大活性値に達する培養時間を約 1/2 に短縮できることから、MnP 産生効率は濾過連続培養の方が回分培養よりも優れていることと考察した。そこで次項の 4.2.2 では、濾過連続培養と回分培養における MnP 生産性を比較した。

Table 11 Effect of dilution rate on manganese peroxidase production with filter-cultivation by IZU-154

Experiment No.	Dilution rate (1/day)	MnP activity	
		Maximum (nkat/ml)	Detection time (h)
1	0.88	8.1	21
2	1.06	5.4	18
3	1.44	2.8	20
4	2.88	0.1	46

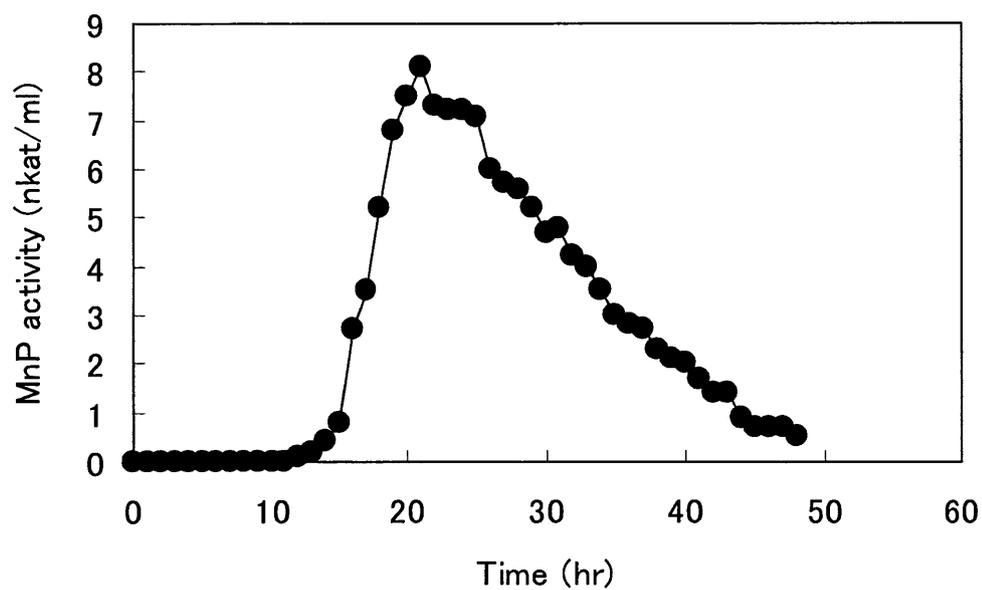


Fig. 15 Time course of MnP activity in the culture fluids of the filter-cultivation of IZU-154.

4.2.2 濾過連続培養と回分培養における MnP 生産性の比較

希釈率 0.88 の連続濾過培養においては、21 時間培養で最大の MnP 活性 (8.1 nkat/ml) を示したが (Table 11 および Fig. 15)、21 時間培養時における Total MnP 産生量は、次式によって求められる。

【前提】

希釈率 : 0.88

ジャーファーメンター内の培養液量 : 1,020 ml

ジャーファーメンター内から排出される培養濾液量 : $1,020 / (0.88 \times 24) = 48.3$ ml/h

培養 21 時間目における培養濾液の MnP 活性 : 8.1 nkat/ml

【計算式】

培養 21 時間目における

(A) 培養液の MnP 産生量 = $1,020 \text{ ml} \times 8.1 \text{ nkat/ml} = 8,262 \text{ nkat}$

(B) 培養濾液中の MnP 産生量

= {培養 21 時間目までの 1 時間毎の MnP 活性(nkat/ml)の総和} $\times 48.3 \text{ ml/h}$

(C) Total MnP 産生量 (nkat)

= 培養液中の MnP 産生量 (A) + 培養濾液中の MnP 産生量 (B)

そこで、各培養時間における培養液 (A) と培養濾液 (B) の MnP 産生量および両者 (A+B) を合計した Total MnP 産生量 (C) を算出し、経時的にプロットした (Fig. 16)。また、回分培養時 (Fig. 14A) に産生された Total MnP 産生量も Fig. 16 にプロットし、濾過連続培養と回分培養の MnP 生産性を比較した結果、最大の Total MnP 産生量には両者で差異は認められなかった。しかしながら、最大の Total MnP 産生量を得るに要する培養時間は、回分培養では 44 時間を必要としたのに対して、濾過連続培養では 21 時間でよく、濾過連続培養によって MnP 産生速度は約 2 倍向上し、MnP 産生の効率化を図りうる事が再確認された。

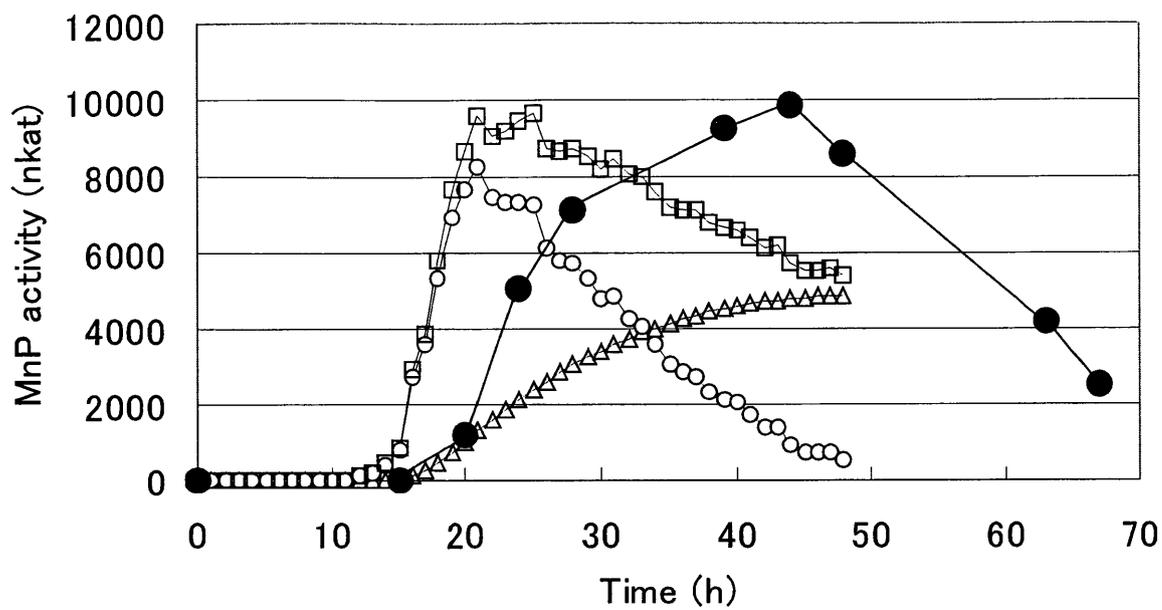


Fig. 16 Production of MnP by the filter-cultivation of IZU-154. ○, MnP in the culture fluids of the filter-cultivation; △, MnP in the filtrate of the filter-cultivation; □, Total MnP in the culture fluids and filtrate of the filter-cultivation, ●, MnP in the culture fluids of the batch cultivation (Fig. 14).

第5節 小括

本章では先ず、三角フラスコによる培養で IZU-154 株の MnP 産生に及ぼす培地中の窒素および Mn(II)濃度の影響について検討し、既知の白色腐朽菌の場合と同様に窒素制限条件下での Mn(II)添加によって MnP 産生が誘導されることを確認した。

次いで、IZU-154 株での MnP 大量産生技術を確立する目的でジャーフェンターを用いる回分培養によって MnP 産生を試みるとともに、MnP 産生と関連のある培養パラメーターを検索した。その結果、ジャーフェンター培養では、最大で 9.7 nkat/ml の MnP 活性を示し、三角フラスコ培養による場合よりも約 2 倍高い活性が得られた。また、IZU-154 株培養中の培養液の NEOX レベル、酸化還元電位および pH については、MnP 産生の誘導と呼応した変化を示しており、これらは MnP 産生の培養パラメーターとなりうる可能性が示唆された。

さらに、MnP 生産性の向上を目的として、濾過連続培養による MnP 産生を行った結果、この培養法では MnP 産生効率を回分培養の場合の 2 倍に高めることが明らかとなった。

第6章 IZU-154株からのMnP高産生株の育種

第1節 序

白色腐朽菌のリグニン分解は、一般に「二次代謝」すなわちセルロースなどの炭水化物を分解し、一次成長が完了した後に発現する代謝活性であること、さらには窒素源や炭素源の濃度が分解活性に影響を及ぼし、低窒素あるいは低炭素濃度条件下において活性発現は大きくなることが知られている (37, 57)。このことから、合成培地によるリグニン分解酵素の産生のための培養においても、二次代謝を誘導するために窒素または炭素源を制限した培地が用いられており、菌体増殖およびタンパク生産にとって不利な条件下で培養がなされている。この欠点を克服するために *P. chrysosporium* においては、窒素源を制限しない高窒素 (HN) 条件でもリグニン分解酵素を産生する変異株を分離し、MnP 産生能の向上した株が分離されている (16, 30, 42, 51, 60)。

前章では、IZU-154株のMnP産生に及ぼす窒素濃度の影響について検討し、この株は、一般的な白色腐朽菌と同様に低窒素条件下でMnPを産生することを確認した。そこで本章では、第2章で分離した単核性菌株であるIZU-154-22株の変異処理を行い、高窒素条件下でMnPを産生し、しかも低窒素条件下より産生能に優れた菌株を育種することを目的とした。

第2節 高窒素条件下でのメラニン脱色菌株の分離

従来、寒天平板培地上でのリグニン分解活性はグアヤコールや没食子酸の酸化重合による着色、Poly-R478 や Remazol Brilliant Blue R などの色素の分解による脱色を利用して検出されてきた(3, 44)。しかしながら、窒素や炭素源を高濃度に含有する合成培地においては、これらの方法がリグニン分解活性の検出には不完全なものであることが Nishida らにより報告されている (49)。また、Kashino らは合成メラニンを含有する低窒素 (LN) 寒天培地に IZU-154 株を接種して培養すると、メラニンの分解に伴う脱色ハローが生じ、その分解には MnP が関与することを明らかにしている (33)。そこで本節では、メラニン脱色を指標にして高窒素 (HN) 条件下で、MnP を産生できる株を選抜することにした。

2.1 実験

2.1.1 供試菌株

第2章で分離した単核性菌株 IZU-154-22 株および野生株 (IZU-154 株) を供試した。

2.1.2 メラニン脱色による MnP 産生株の選抜

第2章 第2節 2.1.2 に準じて IZU-154-22 株の菌糸体から 10 ml のプロトプラスト懸濁液 (1×10^7 個/ml) を調製し、第3章 第2節 2.1.1 に準じて紫外線および NTG を用い、95%以上の死滅率になるよう変異処理を施した。これを、40 ml の液体再生培地 (0.6 M サッカロースを浸透圧調節剤として添加した PD 培地) に加え、30°C で 2 日間再生させた。再生した菌糸体をオーステライザーで 30 秒間破碎した後、ガラスフィルター (3G1) で濾過して微細化された菌体の懸濁液

を得た。この菌体懸濁液を所定濃度（1枚の寒天培地に約100株が再生する濃度）に希釈した後、矮小化コロニーの誘導剤（4%ソルボースおよび10 mg/l デオキシコーレート）（20）および0.3 g/lの合成メラニン（SIGMA社製）を含有する寒天培地に塗布し、30°Cで培養した後、脱色ハローの形成を観察した。なお、培地中の窒素源[酒石酸アンモニウム(AT)]は3段階に濃度を変化させた(Table 12)。

Table 12 Composition of culture media

Component	Amount of component in:		
	N-0	LN	HN
Ammonium tartrate (mM)	0	2.4	48.0
Melanin (g)	0.3	0.3	0.3
Sorbose (g)	40.0	40.0	40.0
Sodium deoxycholate (mg)	10.0	10.0	10.0
Agar (g)	1.5	1.5	1.5
Glucose (g)	10.0	10.0	10.0
Tween 80 (g)	0.5	0.5	0.5
KH ₂ PO ₄ (g)	2.0	2.0	2.0
MgSO ₄ ·H ₂ O (g)	0.5	0.5	0.5
CaCl ₂ ·H ₂ O (g)	0.1	0.1	0.1
MnSO ₄ ·H ₂ O (mg)	33.8	33.8	33.8
Tiamine·HCl (mg)	1.0	1.0	1.0
Sodium nitroacetate (μg)	1.5	1.5	1.5
NaCl (μg)	1.0	1.0	1.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O (μg)	0.1	0.1	0.1
ZnSO ₄ (μg)	0.1	0.1	0.1
20mM Sodium Tartrate (pH 4.5)			
Distilled Water 1.0 liter			

2.2 結果および考察

2.2.1 メラニン脱色へ及ぼす窒素濃度の影響

予備実験として、変異処理を施さない IZU-154-22 株の破碎菌液を用い、その再生株のハロー形成に及ぼす窒素濃度の影響を検討した。その結果、窒素源 (AT) を除去したメラニン含有寒天培地 (N-0 培地) では、3 日培養後に再生株の 13% がハローを形成した。一方、メラニンを含有する LN 寒天培地 (2.4 mM AT) では 5 日目から、また、メラニン含有 HN 寒天培地 (48 mM AT) では 6 日目からハローを形成する再生株が得られた (Table 13)。以上の結果をふまえ、メラニン含有 HN 寒天培地において培養 3 日間でハローを形成する株を選抜することにした。

Table 13 Effect of ammonium tartrate concentration on melanin decolorization by IZU-154-22

Ammonium tartrate (mM)	Melanin decolorization frequency (%)			
	3 day	4 day	5 day	6 day
0 (N-0 medium)	13	93	100	100
2.4 (LN medium)	0	0	48	100
48 (HN medium)	0	0	0	15

2.2.2 HN 条件下でのメラニン脱色菌株の選抜

紫外線照射または NTG 処理後に再生した 90,000 株をメラニン含有 HN 寒天培地に接種培養し、脱色ハロー形成の有無を観察した。Fig. 17 にハロー形成の様子を示すが、培養 3 日間で脱色ハローを形成する 107 株を選抜した (Table 14)。

続いて、これら 107 株を HN 液体培地で 2 日間培養し、培養液中の MnP 活性を測定したところ、97 株は 1 nkat/ml 以下の活性を、7 株が 1~2 nkat/ml の活性を、そして、3 株が野生株 (IZU-154 株) を LN 液体培地で培養した場合と同等以上の MnP 活性を示した (Table 15)。よって次節では、活性の高かった 3 菌株 (IZU-811 株、IZU-881 株、IZU-882 株) の MnP 産生能について、さらに詳細に検討した。

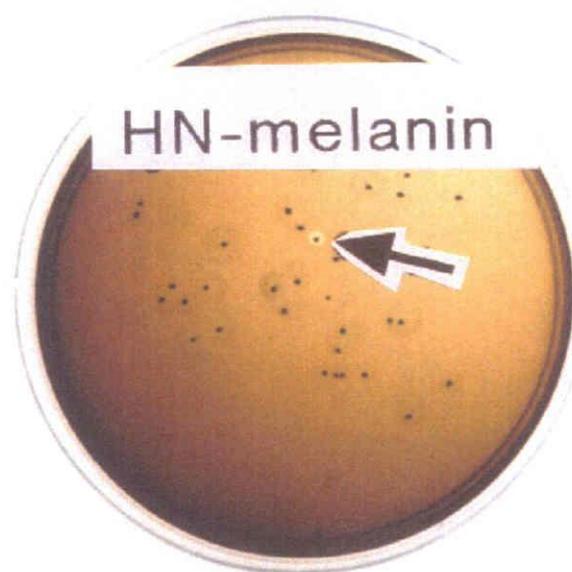


Fig. 17 Melanin-decolorizing mutant of IZU-154-22. Black points indicate the colonies of mutants after 3 days of incubation at 30°C. The arrow shows a mutant capable of decolorizing synthetic melanin under an HN condition (48 mM AT).

Table 14 Isolation of melanin-decolorizing mutants from IZU-154-22

	UV irradiation	NTG exposure
Survival rate (%)	1	5
No. of colonies screened (A)	34,000	56,000
No. of melanin decolorizing mutants (B)	77	30
Mutant rate (% , B/A)	0.2	0.05

Table 15 Production of MnP by melanin-decolorizing mutants under an HN condition

MnP activity (nkat/ml)	No. of mutants
~ 1	97
1~ 2	7
2~	3 (IZU-811, IZU-881, IZU-882)

第3節 選抜株の MnP 産生能

前節において、HN 培養条件下で MnP を産生できる株として 3 菌株 (IZU-811、IZU-881 および IZU-882 株) を選抜した。そこで、これらの HN および LN 培養条件下における MnP 産生能を詳細に検討し、野生株 (IZU-154 株) の LN 条件下での MnP 産生能と比較した。

3.1 実験

3.1.1 供試菌株

供試菌として変異株 (IZU-811、IZU-881、IZU-882 株) と野生株 (IZU-154 株) を用いた。

3.1.2 培養および MnP 活性の測定

第3章 第3節の 3.1.1 および 3.1.2 に準じて供試菌株を培養し、培養液中の MnP 活性を測定した。なお、培養には Table 12 に示す培地からメラニン、ソルボース、デオキシコーレートおよび寒天を除いた HN および LN 液体培地を用いた。

3.1.3 菌体量の測定

第5章 第2節 2.1.4 に準じた。

3.2 結果および考察

変異株および野生株の MnP 産生能を比較した結果、野生株 (IZU-154 株) は

LN 条件下において MnP を産生し、HN 条件下では産生しなかった。これに対して、変異株 3 菌株は両条件下で MnP を産生し、IZU-881 および IZU-882 株の 2 菌株は LN よりも HN 条件下での MnP 産生能に優れていた。特に、IZU-882 株は HN 条件下での 2 日間培養によって、9.7 nkat/ml の最大 MnP 活性値を示し、これは LN 条件下における野生株のそれ (4.7 nkat/ml) よりも約 2 倍高い活性値に相当した (Fig. 18A, B)。

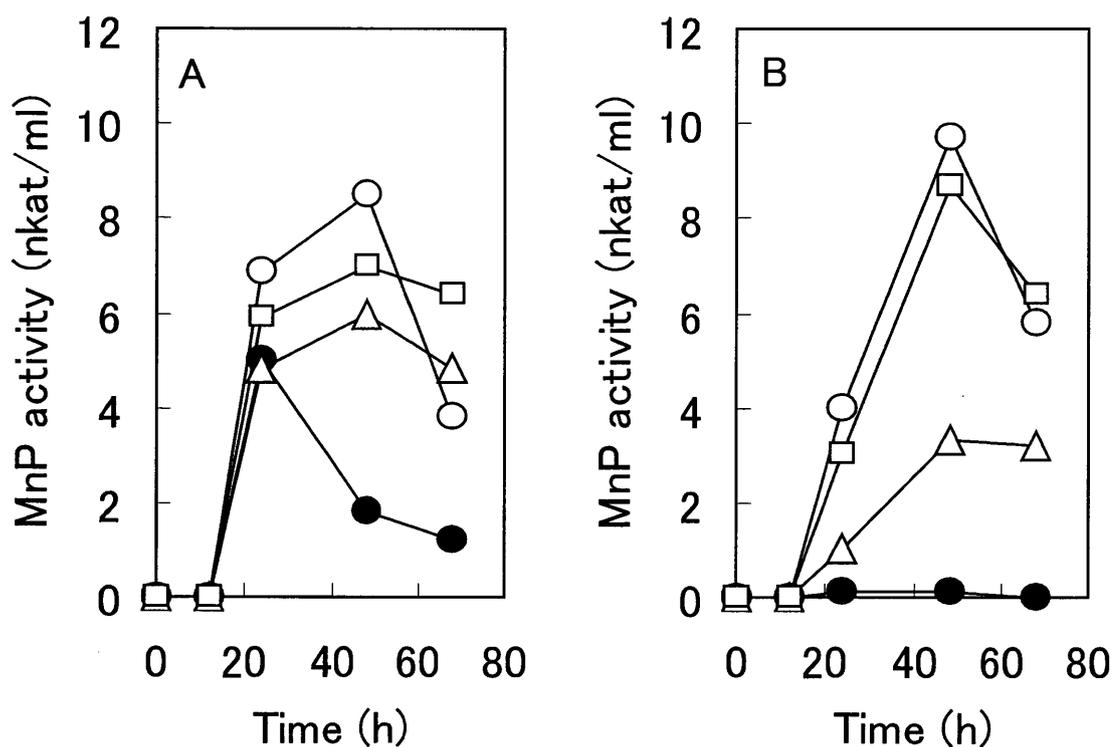


Fig.18 MnP production by mutants and the wild-type IZU-154 under LN (A) and HN (B) conditions. Each datum is the average of three experiments. ●, IZU-154; □, IZU-811; △, IZU-881; ○, IZU-882.

次いで、HN 条件下において IZU-882 株が産生した MnP の総和量（累積 MnP 活性）を求めた結果を Fig. 19A に示すが、LN 条件下における野生株よりも高い累積 MnP 活性を示し、変異株は HN 条件下において MnP を持続的に産生する菌株であることがわかる。

なお、菌体生育量と累積 MnP 活性の関係に着目すると、HN 条件下での IZU-882 株は 24 時間培養で 3.2 g/l、48 時間で 5.2 g/l の菌体量を示し、48 時間以降はほぼ一定となった。一方、累積 MnP 活性については定常期に達した 48 時間以降から上昇が緩やかになり、MnP 産生は菌の増殖期に生じ、定常期になると低下するという挙動を示した（Fig. 19A および 19B）。Orth らは *P. chrysosporium* BKM-F-1767 から HN 条件下でも MnP を産生する変異株 PSBL-1 を分離しているが、IZU-882 株の場合と同様に HN 条件下での増殖期に MnP が産生されることを認めている（51）。なお、LN 条件下における IZU-154 株（野生株）の培養でも、定常期に達した 24 時間以降から MnP 産生速度が次第に緩やかになるという挙動を示し（Fig. 19A および 19B）、この挙動は HN 条件下における IZU-882 株の場合と類似していた。よって、IZU-882 株も野生株と同様に一次成長が完了した後に MnP を産生するものと判断される。

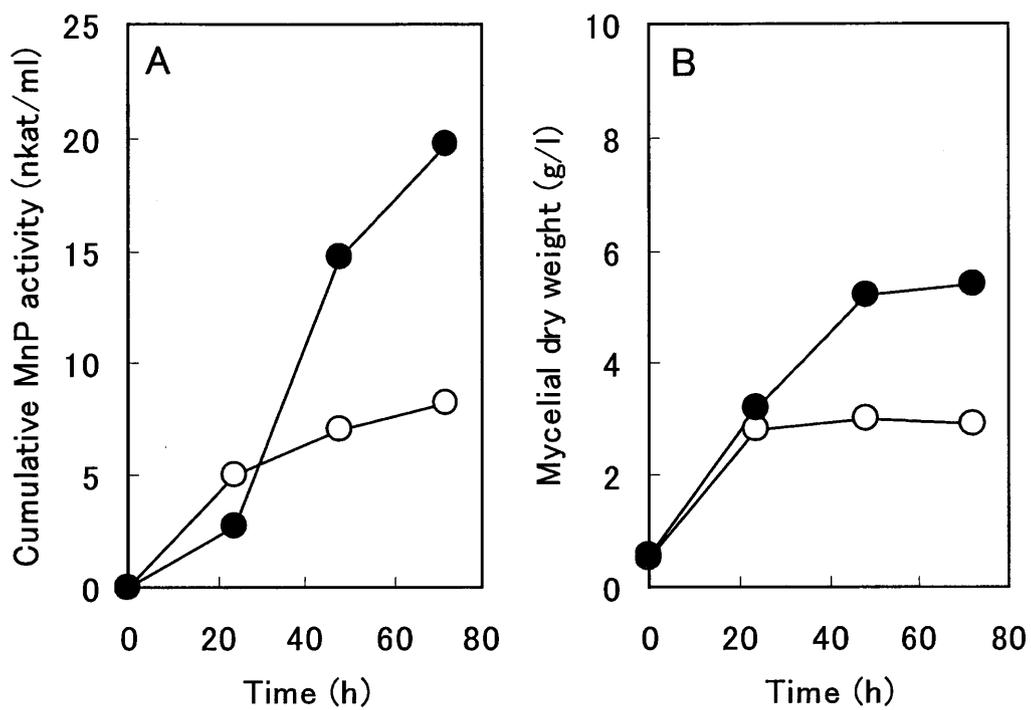


Fig. 19 Time courses of the cumulative MnP activity (A) and mycelial growth (B) during the cultivation of IZU-822 under an HN condition (●) and IZU-154 under an LN condition (○).

第4節 小括

本章では、IZU-154株からの高MnP産生株の取得を目的とし、高窒素条件でのMnP産生制御が解除された菌株の育種を試みた。第2章で分離した単核性IZU-154-22株のプロトプラストを変異処理し、その再生株(90,000株)からHN条件下でのメラニン脱色を指標として選抜した結果、HN条件下でもMnPを産生する3種の変異株が得られた。中でも、IZU-822株は他の変異株よりもHN条件下でのMnP産生能に優れており、さらにはLN条件下よりもHN条件下で多量のMnPを産生した。これに対して、野生株はHN条件下においてMnPを全く産生しないことから、変異株IZU-822株と野生株IZU-154株の窒素源に対するレスポンスは対照をなすものであった。

第7章 総括

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、化学的漂白における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。Nishida らは、*Phanerochaete chrysosporium* やカワラタケ (*Trametes versicolor*) よりもリグニン分解能力に優れ、しかもセルロース分解が少ない高活性・高選択性のリグニン分解菌 IZU-154 株を自然界から分離し、同菌株を用いたバイオブリーチングによって、全晒パルプを得るに必要な塩素系薬品量を 70%以上削減しうることを明らかにしている。しかしながら、生菌を用いるバイオブリーチングでは、白色腐朽菌がリグニン分解酵素を産生し始めるまでにラグタイムがあることから処理に長期間（日単位）を要し、さらにはパルプ残留リグニンの分解に伴ってセルロース系多糖類も分解されパルプ収率や強度の低下を回避できないという欠点がある。このような観点から、白色腐朽菌の産生するリグニン分解酵素を用いて未晒クラフトパルプ中の残留リグニンを短時間で分解し、かつセルロースの損失なくパルプを漂白しようとする酵素法のバイオブリーチングが試みられるようになり、IZU-154 株由来のマンガンペルオキシダーゼ (MnP) 処理によっても塩素系薬品量を 70%以上削減しうることが示されている。

以上のように、IZU-154 株を用いる生菌法および IZU-154 株由来の MnP を用いる酵素法のバイオブリーチングは、環境保全の点で極めて有用なパルプ漂白法であるが、実用的なバイオブリーチングプロセスを構築するためには、生菌および酵素法ともにまだ解決すべき技術課題が残っている。すなわち生菌法では、リグニン分解酵素の産生速度や産生量を高めて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ことである。また、MnP を用いる酵素法では、白色腐朽菌に MnP を効率的かつ大量に産生させる液体培養技

術を確立して、MnP 価格を安価にすることが必要がある。

本論文は、以上のような背景に基づいて、実用的なバイオブリーチングプロセスの確立を図ることを目的とし、変異処理によって 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について検討した。

まず第 2 章では、IZU-154 株の栄養菌糸体をプロトプラスト化し、その再生株から単核性菌株を分離し、変異処理用の親菌株を取得した。

従来から多くの研究が行われている白色腐朽菌 *P. chrysosporium* では、その胞子を変異処理することによって種々の変異株が分離されている。しかしながら、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を受けにくいという難点がある。そこで、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菌株を取得することにした。その結果、リグニン分解活性および生育力が IZU-154 株と同等の単核性菌株 (IZU-154-22 株) を分離するに至り、IZU-154-22 株のプロトプラストは紫外線照射処理によって効率的に変異を受けることも明らかにした。

第 3 章では、前章で分離した IZU-154-22 株のプロトプラストに紫外線照射を行い、その再生株からセルラーゼ低産生株を取得した。

2,700 株の再生株から、Walseth セルロース分解能が欠損した 10 株をセルラーゼ低産生株として一次選抜し、バイオブリーチング時のパルプ白色化能およびパルプ収率を指標として二次選抜を行った。その結果、野生株 (IZU-154 株) のパルプ白色化能を保持しながら、パルプ収率を向上させうる菌株として Cel-139 株が得られた。なお、本変異株のセルラーゼ系酵素産生能および MnP 産生能を野生株と比べたところ、アビセラゼ、CMCase および β -ガラクトシダーゼ産生能が、各々 86%、39% および 65% 抑制されていた。一方、この変異株の MnP 産生能は野生株と同程度であることが確認された。

次いで第4章では、セルラーゼ低産生株 Cel-139 株のリグニン分解能をさらに向上させる目的で、Cel-139 株をコルヒチン-ベンゾイミダゾール処理し、同質倍数体化と単数体化による染色体レベルでの変異を誘導した。

Cel-139 株のプロトプラストをコルヒチン処理し、再生した 900 株を引き続きベンゾイミダゾール処理することで 260 株のセクター形成株を得た。セクター形成部から菌糸体を分離し、セルラーゼ系酵素の活性が Cel-139 株と同等もしくは抑制された 30 株の中から、パルプ白色化能の高い M215 株を選抜した。次に、遺伝子的に単一な変異株を得る目的で、M215 株を再度プロトプラスト化し、再生した 20 株の中から野生株 (IZU-154 株) よりもパルプ白色化能に優れた M215-13 株を分離した。本変異株は Cel-139 株と同等のパルプ収率を示したことから、Cel-139 株のセルラーゼ低産生性を保持しながら、リグニン分解活性が IZU-154 株および Cel-139 株よりも向上した菌株であった。

第5章では、野生株 (IZU-154 株) が MnP を効率的に産生しうる培養技術を確立した。

MnP 産生に及ぼす窒素源および Mn(II)濃度の影響をフラスコ培養により検討したところ、既知の代表的な白色腐朽菌である *P. chrysosporium* の場合と同様に、窒素制限下での Mn(II)添加によって MnP 産生が誘導されることを確認した。また、ジャーファーマンターを用いる回分培養において、MnP 活性の発現は酸化還元電位および pH の上昇と連動することを見だし、これらは 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可能性を指摘した。さらに、ジャーファーマンターを用いる濾過連続培養についての検討から、この培養法が回分培養よりも効率的な MnP 産生を可能とすることも見いだした。

第6章では、第2章で分離した IZU-154-22 株のプロトプラストを変異処理し、高窒素条件下での MnP 産生能に優れた変異株の取得を試みた。

変異処理プロトプラストからの再生株 (90,000 株) から、高窒素 (HN) 条件

でのメラニン脱色を指標として一次選抜を行い、得られた 107 株に対して HN 条件下における MnP 産生能を指標として二次選抜を行った。その結果、HN 条件下で MnP 産生能に優れた 3 菌株が得られ、中でも、IZU-822 株が最も高い MnP 産生能を示した。野生株 (IZU-154 株) は低窒素 (LN) 条件下では MnP を産生するものの HN 条件下では MnP を全く産生できない。これに対し、IZU-822 株は LN 条件下よりも HN 条件下で多量の MnP を産生したことから、本変異株は HN 条件下での MnP 産生制御が完全に解除された菌株であることを確認した。

以上のように、本論文では白色腐朽菌 IZU-154 株の育種によるリグニン分解活性および選択性の向上と、IZU-154 株による MnP 大量産生技術の確立について検討し成果を上げた。白色腐朽菌およびリグニン分解酵素による効率的なリグニン生分解技術が開発されれば、再生可能な木質資源の省資源・省エネルギー・低環境負荷型の有効利用が可能となることから、本研究のような白色腐朽菌の育種や大量培養技術について考究することは今後ますます重要な研究課題になるものと考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導を賜りました静岡大学農学部 西田友昭教授に衷心より感謝いたします。

本論文のとりまとめにあたり、多くのご指摘とご教示を賜った静岡大学農学部 滝 欽二教授、岐阜大学農学部 大橋英雄教授、信州大学農学部 徳本守彦教授に深甚なる謝意を表します。

また、数多くの有益なご助言を頂きました株式会社神戸製鋼所 生物研究所 掛澤雅章博士、北岡義久博士および出口哲也氏に心より感謝の意を表します。

さらには、本研究にご協力を頂いた株式会社神戸製鋼所 生物研究所の皆様方に御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Ander, P. and Eriksson, K-E. (1975). Influence of carbohydrates on lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Sevnsk Papperstidn.* 18, 643-652.
- 2) Ander, P. and Eriksson, K-E. (1978). Lignin degradation and utilization by microorganisms. *Ind. Microbiol.* 14, 1-58.
- 3) Bavendamm, W. (1928). Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstörenden Pilzen. *Z. Pflanzenkr.* 38, 257-276.
- 4) Boominathan, K., Balachandra, D. S., Randall, T. A., and Reddt, C. A. (1990). Nitrogen-deregulated mutants of *Phanerochaete chrysosporium*—a lignin-degrading basidiomycete. *Arch. Microbiol.* 153, 521-527.
- 5) Bumps, J. A. and Aust, S. D. (1987). Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin-degrading system. *Bioessays.* 6, 166-170.
- 6) Chen, C. H. and Gueden, Y. C. (1974). *In vitro* production of polyploidy plantlets after colchicine treatments of daylily callus. *Amer. J. Bot.* 61, 6, Suppl, 1.
- 7) Colotelo, N. and Grinchenko, A. H. (1962). Growth of *Kabatiella caulivola* on different media. *Can. J. Bot.* 40, 439-466.
- 8) Cox, D. M. (1973). A quantitative analysis of colcemid-induced chromosomal nondisjunction in Chinese hamster cells *in vitro*. *Cytogenet. Cell. Genet.* 12, 165-174.
- 9) Crawford, R. L. (1981). Lignin biodegradation and transformation. John Wiley & Sons, Inc., New York.

- 10) Deguchi, T., Kakezawa, M., and Nishida, T. (1997). Nylon biodegradation by lignin-degrading fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 329-331.
- 11) Deguchi, T., Kitaoka, Y., Kakezawa, M., and Nishida, T. (1998) Purification and characterization of a nylon-degrading enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1366-1371.
- 12) Dodson, P. J., Evans, C. S., Harevey, P. J., and Palmer, J. M. (1987). Production and properties of an extracellular peroxidase from *Coriolus versicolor* which catalyzes cleavage in a lignin model compound. *FEMS Microbiol. Lett.* 42, 17-22.
- 13) Dosoretz, C. G. and Grethelein, H. E. (1991). Physiological aspects of the regulation of extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Biochem. Biotech.* 28/29, 253-265.
- 14) Driscall, C. J. and Darvey, N. L. (1970). Chromosome pairing: effect of colchicine on isochromosomes. *Science.* 169, 290-291.
- 15) Ehara, K., Tsutsumi, Y., and Nishida, T. (1997). Biobleaching of softwood and hardwood kraft pulp with manganese peroxidase. *Mokuzai Gakkaishi.* 43. 861-868.
- 16) Eriksson, K-E. and Goodell, E. W. (1974). Pleiotropic mutants of the wood-rotting fungus *Polyporus adustus* lacking cellulase, mannase and xylanase. *Can. J. Microbiol.* 20, 371-378.
- 17) Fujita, K., Kondo, R., Sakai, K., Kashino, Y., Nishida, T., and Takahara, Y. (1991). Biobleaching of kraft pulp using white-rot fungus IZU-154. *Tappi J.* 74, (11), 123-127.
- 18) Fujita, K., Kondo, R., Sakai, K., Kashino, Y., Nishida, T., and Takahara, Y. (1993). Biobleaching of softwood kraft pulp with white-rot fungus IZU-154.

- Tappi J. 76, (1), 81-84.
- 19) Glenn, J. K. and Gold, M. H. (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 242, 329-341.
 - 20) Gold, M. H. and Cheng, T. M. (1978). Induction of colonial growth and replica plating of the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 35, 1223-1225.
 - 21) Gold, M. H. and Alic, M. (1993). Molecular biology of the lignin- degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiol. Rev. 57, 605-622.
 - 22) Harazono, H., Kondo, R., and Sakai, K. (1996). Bleaching of hardwood kraft pulp with manganese peroxidase from *Phanerochaete sordida* YK-624 without addition of MnSO₄. Appl. Environ. Microbiol. 62, 913-917.
 - 23) Hastie, A. C. (1970). Benlate-induced instability of *Aspergillus diploids*. Nature. 226, 771-772.
 - 24) Higuchi, T. (1986). Catabolic pathway and role of ligninases for the degradation of lignin structure models by white-rot fungi. Wood Res. 73, 58-81.
 - 25) Hiroi, T. (1981). Susceptibility of rotted-woods to cellulase from *Trichoderma viride*. Mokuzai Gakkaishi. 27, 684-690.
 - 26) Iiyoshi, Y., Tsutumi, Y., and Nishida, T. (1998). Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase. J. Wood. Sci. 44, 222-229.
 - 27) Jibiki, M., Kuno, Y., Shinoyama, H., and Fujii, T. (1993). Isolation and properties of large cell strains from a methanol-utilizing yeast, *Candida* sp.

- N-16 by colchicine treatment. J. Gen. Appl. Microbiol. 39, 439-442.
- 28) Johansson, T. and Nyman, P. O. (1987). A manganese(II)-dependent extracellular peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Acta. Chem. Scand. 41, 762-765.
- 29) Johnsrud, S. C. and Eriksson, K-E. (1986). The Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, The 3rd. International Conference, p53.
- 30) Kaker, S. N., Perez, A., and Gonzales, J. (1994). *Phanerochaete* mutants with enhanced ligninolytic activity. Appl. Biochem. Biotechnol. 45/46, 339-347.
- 31) Kakezawa, M., Miura, M., Nishida, T., and Takahara, Y. (1993). The formation and regeneration of mycelial protoplasts in hyper ligninolytic fungus, strain IZU-154. J. Ferment. Bioeng. 75, 65-67.
- 32) Kalahatai, K. K., Nambudiri, A. M. D., and Kjaarik, A. A. (1974). Biology of plant litter decomposition. Academic Press, New York.
- 33) Kashino, Y., Matsubara, M., Kakezawa, M., and Nishida, T. (1995). Abstr. Ann. Meet. Soc. Ferment. Bioeng. Japan, p111.
- 34) Kashino, Y., Nishida, T., Takahara, Y., Fujita, K., and Sakai, K. (1993). Biomechanical pulping using white-rot fungus IZU-154. Tappi J. 76, (12),167-171.
- 35) Katagiri, N., Tsutumi, Y., and Nishida, T. (1995). Correlation of brightening with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation during biobleaching of kraft pulp by white rot fungi in the solid-state fermentation system. Appl. Environ. Microbiol. 61, 317-322.
- 36) Katagiri, N., Tsutumi, Y., and Nishida, T. (1997). Biobleaching of softwood kraft pulp by white-rot fungi and its related enzymes. Mokuzai Gakkaishi.

- 43, 678-685.
- 37) Keyser, P., Kirk, K., and Zeikus, J. G. (1978). Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *J. Bacteriol.* 135, 790-797.
- 38) Kirk, T. K. (1971). Effects of microorganisms on lignin. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 185-210.
- 39) Kirk, T. K. and Ander, E. (1970). Methoxyl-deficient structural elements in lignin of sweetgum decayed by a brown-rot fungus. *Acta. Chem. Scand.* 24, 3379.
- 40) Kirk, T. K. and Vang, H. H. (1979). Partial delignification of unbleached kraft pulp with ligninolytic fungi. *Biotechnol. Lett.* 1, 347-352.
- 41) Kuroiwa, T. and Suzuki, T. (1980). An improved method for the determination of the *in situ* chloroplasts nuclei in higher plants. *Cell structure and Function.* 5, 195-197.
- 42) Kuwahara, M. and Asada, Y. (1987). Lignin enzymatic and microbial degradation, INRA Publications, Versailles, France, 171-176.
- 43) Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A., and Gold, M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS. Lett.* 169, 247-250.
- 44) Kuwahara, M. (1984). *Abstr. Ann. Meet. Soc. Agric. Biol. Chem. Japan*, p34.
- 45) Matsubara, M., Suzuki, J., Deguchi, T., Miura, M, and Kitaoka, Y. (1996). Characterization of manganese peroxidase from the hyperligninolytic fungus IZU-154. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4066-4072.

- 46) Murata, S., Kondo, R., Sakai, K., Kashino, Y., Nishida, T., and Takahara, Y. (1992). Chlorine-free bleaching process of kraft pulp using treatment with the fungus IZU-154. *Tappi J.* 75, (12), 91-94.
- 47) Nishida, T. (1989). Lignin biodegradation by wood-rotting fungi IV. The effect of lignin biodegradation by the fungus IZU-154 on the enzymatic hydrolysis of wood. *Mokuzai Gakkaishi.* 35, 649-653.
- 48) Nishida, T., Kashino, Y., Katayama, Y., Mimura, A., and Takahara, Y. (1989). Lignin biodegradation by wood-rotting fungi II. Degradation of phenolic and nonphenolic β -O-4 lignin substructure compounds by fungus IZU-154. *Mokuzai Gakkaishi.* 35, 144-151.
- 49) Nishida, T., Kashino, Y., Mimura, A., and Takahara, Y. (1988). Lignin biodegradation by wood-rotting fungi I. Screening of lignin-degrading fungi. *Mokuzai Gakkaishi.* 34, 530-536.
- 50) Nishida, T., Tsutumi, Y., Kemi, M., Haneda, T., and Okamura, H. (1999). Decolorization of Anthraquinone dyes by white-rot fungi and its related enzymes. *Mizukankyou Gakkaishi.* 22, 465-471.
- 51) Orth, A. B., Denny, M., and Tien, M. (1991). Over-production of lignin-degrading enzymes by an isolate of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2591-2596.
- 52) Paice, M. G., Jurasek, L., Ho, C., Bourbonnas, R., and Archibald, F. S. (1989). Direct biobleaching of hardwood kraft pulp with the fungus *Coriolus versicolor*. *Tappi J.* 72, 217-221.
- 53) Paice, M. G., Reid, I. D., Bourbonnas, R., Archibald, F. S., and Jurasek, L. (1993). Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl. Environ.*

- Microbiol. 59, 260-265.
- 54) Punja, Z. K. and Jenkins, S. F. (1984). Influence of medium composition on mycelial growth and oxalic acid production in *Sclerotium rolfsii*. Mycologia. 77, 947-950.
- 55) Samuelsson, K., Mjoberg, P. J., Harter, N., Vallander, L., and Eriksson, K-E. (1980). Influence of fungal treatment on the strength versus energy relationship in mechanical pulping. Svensk Papperstidn. 83, 221-225.
- 56) Sunagawa, M., Ohmasa, M., Yokota, S., Yoshizawa, N. and Idei, T. (1989). Isolation and reversion of protoplasts of *Auricularia aulicula-judae* and *Aulicula polytricha*. Mokuzai Gakkaishi. 35, 1131-1138.
- 57) Tien, M. and Tu. C. -P. D. (1987). Cloning and sequencing of a cDNA for ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. Nature (London). 326, 520-523.
- 58) Tien, M. and Kirk, T. K. (1983). Lignin-degrading enzyme from hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. Science. 221, 661-663.
- 59) Tien, M. and Kirk, T. K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81, 2280-2284.
- 60) Tien, M. and Myser, S. B. (1990). Selection and characterization of mutants of *Phanerochaete chrysosporium* exhibiting ligninolytic activity under nutrient-rich conditions. Appl. Environ. Microbiol. 56, 521-527.
- 61) Toyama, H. and Toyama, N. (1990). Autopolyploid formation of *Trichoderma reesei* QM9414 by colchicine treatment. J. Ferment. Bioeng.

69, 51-53.

- 62) Tran, A. V. and Chamber, R. P. (1987). Delignification of an unbleached hardwood kraft pulp by *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiol. Biotechnol. 25, 484-490.
- 63) Tsutsumi, Y., Haneda, T., and Nishida, T. (2001). Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. Chemosphere. 42, 271-276.
- 64) Umezawa, T. and Higuchi, T. (1986). Aromatic ring cleavage β -O-4 lignin model dimmers without prior demethoxylation by lignin peroxidase. FEBS Lett. 205, 293-298.
- 65) Wariishi, H., Akileswaran, L., and Gold, M. H. (1988). Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Spectral characterization of the oxidized states and catalytic cycle. Biochemistry. 27, 5365-5370.
- 66) Yamanobe, T., Mitsuishi, Y., and Takasaki, Y. (1987). Isolation of a cellulolytic enzyme producing microorganism, culture conditions and some properties of enzymes. Agric. Biol. Chem. 51(1), 65-74.
- 67) Zolan, M. E. and Pukkila, P. J. (1986). Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. Mol. Cel. Biol. 1, 195-200.