



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Aspergillus terreus

LD-1の生産するアルカリ性リグニン分解酵素に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 金山, 望 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2623

氏名(本国籍)	金山 望 (岐阜県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第282号
学位授与年月日	平成14年9月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	<i>Aspergillus terreus</i> LD-1の生産するアルカリ性 リグニン分解酵素に関する研究
審査委員会	主査 岐阜大学 教授 河合 啓一 副査 岐阜大学 助教授 鈴木 徹 副査 静岡大学 教授 田原 康孝 副査 信州大学 教授 寄藤 高光

論文の内容の要旨

工業生産活動に伴う環境負荷の低減は、早急に解決しなければならない課題となっている。そのための解決策のひとつにバイオ技術の導入があげられており、バイオ技術の担い手として微生物が注目されている。1980年代以降、紙・パルプ産業においても、パルプ製造、漂白、廃液処理などに微生物機能を利用する研究が進められてきた。これらの研究に用いられている微生物は白色腐朽菌と称される担子菌類の仲間であり、それらの菌の生産するリグニン分解酵素は酸性側に最適pH及び作用域を有するものであったため、アルカリ条件下で行われる紙・パルプ製造や廃液処理等へこれらのリグニン分解酵素を直接導入することはできなかった。このような背景から、パルプ製造や漂白工程あるいは廃液処理には高アルカリ域で作用するリグニン分解酵素が望まれていた。

本研究は、アルカリ性リグニン分解酵素生産微生物の分離、分離微生物の同定、分離微生物の培養特性、リグニン分解酵素の生産特性、並びにリグニンペルオキシダーゼ及びマンガンペルオキシダーゼの精製と諸性質の解明を目的に行われたものである。

まず、マニラ麻の高アルカリ蒸解廃液(黒液、固形分11.8%、pH 13.1)の微生物浄化処理を考慮し、黒液を培養基質として用い、2.5%黒液と0.05%MnSO₄・4~5H₂Oを含むスクリーニング用液体培地(pH 12.5)に、土壌試料を植菌し、この液体培地に増殖した菌を同組成の平板寒天培地に塗布しコロニー形成させ、高アルカリ条件で増殖することのできる微生物の分離を行った。土壌試料として約500検体を用いて、目的とする微生物4株(糸状菌1株、細菌3株)の分離に成功した。これらの菌株の生産したリグニン分解酵素(リグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ及びフェノールオキシダーゼ)について培養上清を用いて調べ、3酵素とも最も高い活性を示した糸状菌を選抜し、以降の実験

に用いた。この糸状菌は不完全菌類に属する *Aspergillus terreus* LD-1 と同定された。次に、本菌によるこれらの酵素生産条件について検討を加え、2.5% 黒液、 $0.025\% \text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 及び 0.1% 酵母エキスからなる BL-1 培地 (初発 pH 12.5) を開発した。この培地の培養上清を用いたときの酵素の最適 pH は、リグニンペルオキシダーゼは 10.0、マンガンペルオキシダーゼは 12.5、またフェノールオキシダーゼは 12.0 であり、いずれも高いアルカリ側にあることを認めた。さらに、BL-1 培地に 3.0% 蔗糖を添加し pH を 5.0 に調整した BL-2 培地にて菌体をあらかじめ増殖させた後、BL-1 培地を用いて酵素を生産させる 2 段培養法を開発し、およそ 2 倍量の酵素を生産させることに成功した。また、BL-1 培地の培養経過に伴う培地成分の変化を調べ、高分子成分の低分子化、紫外部吸収物質の減少、エステル構造やアルキル基の減少を認めるとともに、カラーユニットが 33% 程度減少していることを観察した。これらの諸結果から、*A. terreus* LD-1 がリグニンを分解利用して増殖していることを推定、本菌が黒液の浄化処理に活用できることを示した。次に、リグニン分解に密接に関連しているリグニンペルオキシダーゼとマンガンペルオキシダーゼについて、それぞれ硫安分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等により電気泳動的に単一にまで精製し、その基本的な特性を明らかにした。リグニンペルオキシダーゼは培養上清より収率 8.2% で 10.7 倍精製された。本酵素は分子量が約 22~24 kDa の単量体で、最適 pH 及び温度はそれぞれ 9.5 及び 30°C であった。フェノール性及び非フェノール性化合物をともに酸化し、ペラトリルアルコール及び過酸化水素に対する K_m 値はそれぞれ $9 \mu\text{M}$ 及び $220 \mu\text{M}$ であった。本酵素はヘム蛋白質であった。マンガンペルオキシダーゼは収率 14.2% で 13.1 倍まで精製された。分子量が約 43~44 kDa の単量体で、最適 pH 及び温度はそれぞれ 12.5 及び 37°C であった。2,6-ジメトキシフェノール、過酸化水素及び Mn^{2+} に対する K_m 値はそれぞれ $20 \mu\text{M}$ 、 $320 \mu\text{M}$ 及び $33 \mu\text{M}$ であった。フェノール性化合物は酸化されたが、非フェノール性化合物は酸化されず基質にはならなかった。本酵素もヘム蛋白質であった。

以上、本研究において、不完全菌類である *Aspergillus* 属の一菌株によりアルカリ性リグニン分解酵素が生産されることを初めて指摘した。特に、アルカリ側に最適 pH を有するリグニン分解酵素については世界で初めて明らかにしたもので、学術的にも極めて貴重な知見を提供した。また、*A. terreus* LD-1 はアルカリ性リグニン分解酵素の給源として、パルプ製造や漂白工程に利用できるとともに、漂白廃液や黒液の浄化処理にも活用可能であることを指摘した。

審 査 結 果 の 要 旨

1980 年代以降、紙・パルプ産業においても、環境負荷の低減を目指して、パルプ製造、漂白工程、廃液処理等に微生物機能を利用する研究が進められてきた。これらの研究に用いられた微生物は担子菌類に属する白色腐朽菌で、その生産するリグニン分解酵素は酸性側に最適 pH 及び作用域を有するものであった。アルカリ条件下で行われる紙・パルプ製造やその廃液処理等へこれらの微生物やリグニン分解酵素を直接導入することはできなかった。このため、高アルカリ域で増殖するリグニン分解微生物が望まれていた。

本研究は、アルカリ性リグニン分解酵素生産微生物の分離と生産されたリグニン分

解酵素の特性について明らかにすることを目的に行われたものである。マニラ麻の高アルカリ蒸解廃液(以下黒液)を培養基質として用いたスクリーニング用液体培地(pH 12.5)を用い、増殖可能な微生物のスクリーニングを行い、土壌試料約500検体から糸状菌1株と細菌3株を分離した。これらの菌株の中から、アルカリ性リグニン分解酵素(リグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ及びフェノールオキシダーゼ)高生産菌として不完全菌類に属する *Aspergillus terreus* LD-1 を選抜した。次に本菌の酵素生産条件について検討を加え、2.5%黒液、0.025% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 5\text{H}_2\text{O}$ 及び0.1%酵母エキスからなるBL-1培地(pH12.5)を開発した。培養上清におけるリグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ及びフェノールオキシダーゼの最適pHはそれぞれ10.0、12.5及び12.0であった。さらに、BL-1培地に3.0%蔗糖を添加したBL-2培地(pH5.0)にて菌体を増殖させた後、BL-1培地にて酵素を生産させる2段培養法を開発、およそ2倍量の酵素を生産させることに成功した。また、BL-1培地の培養経過に伴う培地成分の変化を調べ、高分子成分の低分子化、紫外吸収の減少、エステル構造やアルキル基の減少、カラーユニットの減少等を認め、*A. terreus* LD-1がリグニンを分解利用して増殖していることを明らかにした。次に、リグニン分解に密接に関連しているリグニンペルオキシダーゼとマンガンペルオキシダーゼについて、それぞれ硫安分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等により高度に精製し、各酵素の基本的な特性を明らかにした。リグニンペルオキシダーゼは分子量が約22~24kDaの単量体で、最適pH及び温度はそれぞれ9.5及び30℃であった。フェノール性及び非フェノール性化合物をともに酸化した。ベラトリルアルコール及び過酸化水素に対する K_m 値はそれぞれ9 μM 及び220 μM であった。本酵素はヘム蛋白質であった。マンガンペルオキシダーゼの分子量は約43~44kDaの単量体で、最適pHは12.5であった。 K_m 値は2,6-ジメトキシフェノール、過酸化水素及び Mn^{2+} に対しそれぞれ20 μM 、320 μM 及び33 μM であった。非フェノール性化合物は酸化されず、基質にはならなかった。本酵素もヘム蛋白質であった。

本論文は、*A. terreus* LD-1によるアルカリ性リグニン分解酵素の生産特性とリグニンペルオキシダーゼ及びマンガンペルオキシダーゼについて分子レベルで解析した内容になっており、いずれも世界で初めて明らかにしたものであり、学術的に極めて貴重な知見を与えたものとして高く評価される。また、本菌の発見は、紙・パルプ産業におけるバイオ技術の導入に大きな道を拓くものとしても注目に値する。

以上について、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) 金山 望, 鈴木 徹, 河合啓一. マニラ麻アルカリ蒸解廃液を培養基質とした *Aspergillus terreus*によるアルカリ性リグニン分解酵素の生産
廃棄物学会論文誌 Vol. 9, No. 2/3, pp. 87-94(1998).
- 2) Kanayama, N., Suzuki, T. and Kawai, K. Purification and characterization of an alkaline manganese peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1.
J. Biosci. Bioeng., Vo. 93, No. 4, pp. 405-410 (2002).
- 3) 金山 望, 鈴木 徹, 河合啓一. *Aspergillus terreus* LD-1の生産するアルカリ性リグニンペルオキシダーゼの精製と諸性質
環境技術 (2002年8月号掲載予定)