

氏 名	河 孝 哲
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1203 号
学位授与の日付	平 成 13 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 林 産 工 学 専 攻
学位論文題目	PRODUCTION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES BY THE EDIBLE BASIDIOMYCETE <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> (食用担子菌 <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> によるリグニン分解酵素の生産) (主 査)
論文調査委員	教 授 栞 原 正 章 教 授 酒 井 富 久 美 教 授 島 田 幹 夫

論 文 内 容 の 要 旨

白色腐朽菌と呼ばれる一群の担子菌類は植物の細胞壁中に大量に存在するリグニンを分解する能力を有しており、リグニン分解に関与する酵素としてマンガネルオキシダーゼ (MnP)、リグニネルオキシダーゼ (LiP) およびラッカーゼ (Lac) を生産する。これらの酵素を産業的に利用するためには大量生産のための培養法を確立することが必要である。本研究は白色腐朽菌の一種であり、食用きのことして用いられている *Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) に着目し、リグニン分解酵素生産のスケールアップに必要な条件および方法を検討した。得られた成果は次のように要約される。

- (1) *P. ostreatus* 60 菌株からリグニン分解酵素の高生産菌を選抜し、得られた菌株による種々の培地条件でのリグニン分解酵素の生産を検討した。その結果、MnP 高生産株として数菌株が選抜され、最も高い MnP 生産を与える培地としてグルコース-ペプトン-フスマ抽出液培地 (GPW 培地) を設定した。一方、これらの菌株の多くは、アビセラーゼ、CMC アーゼ、 β -グルコシダーゼ、キシラナーゼなど多糖分解酵素活性も示した。
- (2) 選抜した *P. ostreatus* を用いて GPW 培地における静置培養条件下でのリグニン分解酵素の生産を検討し、培養液から MnP を分離した。また、全ての菌株で MnP アイソザイムの生産が認められ、培養条件の変化にかかわらずアイソザイムパターンには類似性が高く、主要なアイソザイムの等電点および N 末端アミノ酸配列は同一であることが確認された。
- (3) 選抜した菌株のうち、No. 42 株が GPW 培地を用いるフラスコ振とう培養において MnP と Lac が生産されることを認めた。この振とう培養においては、培養液の溶存酸素濃度は MnP 生産に大きく影響を与えるだけでなく、グルコース利用率にも関係することが認められた。また、菌糸が小ベレット状に生育することが酵素生産に必要であることを認めた。MnP の生産は培地中のグルコース濃度が低下した状態で生産されることから、本酵素の生産が二次代謝であることが推測された。一方、Lac は MnP に先んじて生産されることから、この酵素の生産は比較的一次代謝に近いことが推測された。
- (4) 振とう培養においては少なくとも二つの MnP アイソザイムが生産されることが示された。電気泳動により、等電点の異なる二つの MnP アイソザイムが分離された。主要なアイソザイムは静置培養により得られる MnP3 と同一の性質を示すとともに、従来知られている MnP とは異なり、 Mn^{2+} 非依存性活性を示すことを認めた。
- (5) 種々のバイオリアクターを用い、No. 42 菌株による GPW 培地での酵素生産を試みた結果、Rotary draft tube fermentor が有用であることを認めた。この装置を用いることにより、培養液容量 2000ml までのスケールアップを行った。この培養においても、培養液中の溶存酸素濃度が 5ppm 以上であること、また、菌糸がベレット状に生育することが酵素生産に必要であることを認めた。得られた MnP の主要アイソザイムは他の培養と同様に MnP3 であることを認めた。

以上の研究結果によって食用担子菌 *P. ostreatus* からリグニン分解酵素である Mnp をバイオリアクターを用いて大量生産することが可能であることが示され、得られた MnP の酵素化学的な性質が明らかにされた。

論文審査の結果の要旨

本研究は食用担子菌 *Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ) からリグニン分解酵素の高生産菌を選抜し、これら酵素の大量生産のための培養法を確立するとともに、生産されるリグニン分解酵素の性質を明らかにすることを目的としている。評価すべき主な点は以下のとおりである。

- (1) *P. ostreatus* 60 菌株からリグニン分解酵素高生産菌を選抜し、グルコース-ペプトン-ふすま抽出液 (GPW) 培地がりグニン分解酵素であるマンガンペルオキシダーゼ (MnP) およびラッカーゼ (Lac) の生産に有効であることを示した。また、多くの菌株が同時にアビセラーゼ、CMC アーゼ、 β -グルコシダーゼ、キシラナーゼなどセルロースおよびキシランの分解に関与する酵素群を生産することを明らかにした。
- (2) GPW 液体培地を用いる *P. ostreatus* の静置培養から MnP を分離し、種々のクロマトグラフィーを用いて培養条件にかかわらず同様のアイソザイムが生産されることを示した。また、主要なアイソザイムは基質の酸化、等電点および N 末端アミノ酸配列においても、培養条件の相違に関わらず、類似性が極めて高いことを確認した。
- (3) MnP 高生産性の No. 48 株が振とう培養においても MnP を生産することを認めた。MnP の生産には培地中の溶存酸素濃度が重要な因子であること、また、菌体の小径のペレット形成が酵素生産に必要であることを認めた。さらに、主要な MnP アイソザイムが MnP3 であり、従来知られている MnP と異なり、基質の酸化に対して Mn^{2+} 非依存性を示すことなど、本菌で生産される MnP の諸性質を明らかにした。
- (4) 種々のバイオリアクターを用いる通気攪拌培養を試みた結果、Rotary draft tube fermentor を用いて MnP の大量生産が可能であることを示した。この装置を用いることにより GPW 液体培地 2000ml までの培養を行い、静置培養の場合よりも高い MnP 活性が得られた。また、得られた酵素の主要なアイソザイムは MnP3 であることを認めた。

以上のように、本研究はバイオリアクターを用いることにより食用担子菌 *P. ostreatus* がマンガンペルオキシダーゼ (MnP) を大量生産することが可能であることを示し、従来困難とされていた担子菌による酵素の大規模生産への可能性を示唆したものであり、応用微生物学、応用酵素化学並びに木質変換化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年3月10日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。