

白色腐朽菌のリグニン分解酵素活性に対する培地組成の影響

京都大学大学院 学生員 井上直子* (株)東芝 今田敏弘

学生員 呉 楓 正員 尾崎博明

正員 寺島 泰 正員 越川博元

1. はじめに

白色腐朽菌の1つである *Phanerochaete chrysosporium* (以下 *P. chrysosporium*) のリグニンペルオキシダーゼ (以下 LiP) は、リグニンを分解するだけでなく、広範囲の難分解性物質を分解することが知られている¹⁾。そこで、本研究では *P. chrysosporium* による連続処理の実現に向け、難分解性物質の分解に関与している LiP をより長期間、より効率良く発現させることを目的として LiP の発現に対して培地組成が与える影響について検討を行った。

2. 実験方法

a. LiP 活性に対する VA の影響

表1の培地①に示す組成の液体培地を7個の500mL三角フラスコに50mLずつ分注し、*P. chrysosporium*の孢子懸濁液500 μ Lを植菌して39℃において3日間静置培養を行った。一方、新たに表1の培地②に示す液体培地を50mLずつ7個用意し、先に3日間静置培養を行った菌をこの培地②に移した。その後、下記の培養条件のもとで39℃において静置培養を行い、それぞれについて移し替え1日後から、LiP活性を測定し²⁾、培養条件との関係について検討した。

培養条件; 3個の三角フラスコにおいては、それぞれ移し替え直後、2日後、4日後にあらかじめろ過滅菌した0.1M veratryl alcohol (以下 VA) を0.8mLずつ添加した。残りの4個については、移し替え2日後にろ過滅菌済みのVAをそれぞれ各培地中の濃度が0mM、1mM、2mM、8mMになるように添加した。

b. LiP の生産に必要な培地組成について

5個の500mL三角フラスコを用意し、aと同様に3日間静置培養を行った菌を表2に示す培地②の各成分をそれぞれ含まない培地A~Eに移し替えた。それぞれについて移し替え2日後にろ過滅菌済みの0.1M VAを0.8mLずつ添加して、移し替え1日後からLiP活性を測定し²⁾、培養条件との関係について検討した。

c. グルコース添加によるLiP活性への影響

表1の培地③の液体培地を2個の500mL三角フラスコに50mLずつ分注し、各培地に植菌をした後、39℃において静置培養を行った。植菌後3日目にろ過滅菌済み0.1M VAを1mLずつ添加した。その後、活性が低下し始めた植菌11日後及び15日後にグルコース濃度400mg/Lの溶液5mLを1個のフラスコのみに添加した。それぞれの培養液中のLiP活性の変化²⁾とグルコースの添加を行った培養液中のグルコース濃度の変化を測定した。なお、グルコース濃度はアンスロン法により測定した。

表1 液体培地の組成

組成	培地①	培地②	培地③
Glucose	10g	1g	2g
Ammonium Tartrate	2.2g	1.1g	1.1g
0.1M Na-aconitate buffer (pH=4.5)	100mL	100mL	100mL
Basal Medium	100mL	100mL	100mL
KH ₂ PO ₄	2.0g	0.2g	0.2g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g	0.05g	0.05g
CaCl ₂	0.1g	0.01g	0.01g
Thiamine · HCl	0.005g	—	0.005g
Mineral solution	10mL	7mL	7mL

表2 液体培地A,B,C,D,Eの組成

培地	培地②から除かれる成分
A	—
B	Glucose
C	Ammonium Tartrate
D	0.1M Na-aconitate buffer
E	Basal Medium

キーワード; LiP 活性 VA グルコース

連絡先; 〒606-01 京都市左京区吉田本町 京都大学大学院工学研究科環境工学専攻

TEL 075-753-5171 FAX 075-753-5175

3. 実験結果と考察

a. LiP 活性に対する VA の影響

VA の添加時期と LiP 活性の経時変化との関係を図 1 に、VA の濃度と LiP 活性の経時変化との関係を図 2 に示す。図 1 から LiP 活性は VA 添加後 3～4 日後に発現し始めたことが読みとれ、図 2 から VA 濃度が高くなるにつれ、LiP 活性の最大値が高くなり、持続性が長くなることが読みとれた。*P. chrysosporium* の二次代謝物である VA は LiP を誘導する働きと培養中に菌体より生産される H_2O_2 による不活性化から LiP を保護する働きとが考えられており²⁾、本実験でも VA は LiP 活性の発現に非常に重要な因子であることが確認できた。

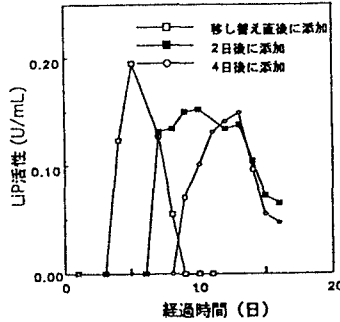


図 1 VA添加時期とLiP活性の関係

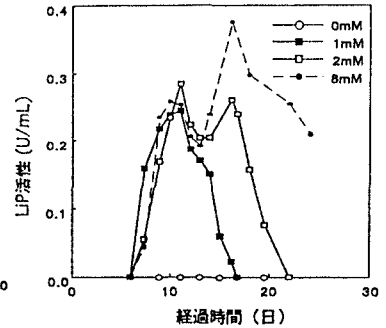


図 2 VA濃度とLiP活性の関係

謝物である VA は LiP を誘導する働きと培養中に菌体より生産される H_2O_2 による不活性化から LiP を保護する働きとが考えられており²⁾、本実験でも VA は LiP 活性の発現に非常に重要な因子であることが確認できた。

b. LiP の生産に必要な培地組成について

各培地組成と LiP 活性の経時変化との関係を図 3 に示す。図 3 から、培地 B すなわちグルコースの含まれない培地において LiP 活性が発現しなかったことが読みとれ、ある程度生育した菌において LiP 活性を発現させるのに最も必要な要素は炭素源であることが分かった。また、ここでは示していないが窒素濃度 340mg/L 以下で炭素源が存在する場合であれば、他の成分は LiP の発現に大きな影響を与えないという結論が得られている。

c. グルコース添加による LiP 活性への影響

グルコース添加による LiP 活性への影響とグルコース濃度の経時変化を図 4 に示す。図 4 からグルコースを新たに添加することにより LiP 活性が持続することが読みとれた。このことより、グルコースの添加は LiP 活性を持続させる効果があることが分かった。

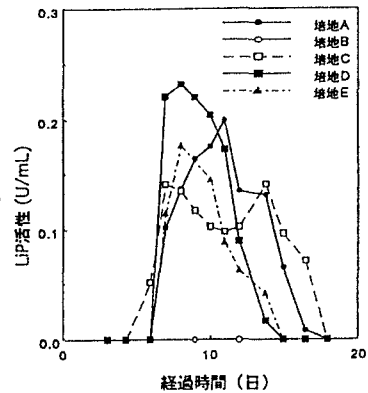


図 3 培地A-EとLiP活性の関係

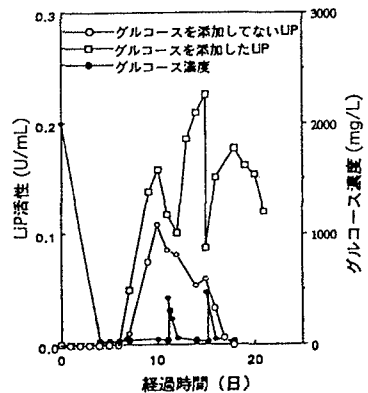


図 4 グルコース添加によるLiP活性への影響

4. 結論

本研究で得られた結果を以下に示す。

- (1) VA の添加時期は LiP 活性の発現の時期に大きな影響を与える。
- (2) VA 濃度 0～8 mM の範囲では VA 濃度が高い程、LiP 活性は高くなり、LiP 活性の持続期間も長くなる。
- (3) ある程度生育した菌にとって、炭素源は LiP 活性を発現させるのに最も必要な要素である。
- (4) LiP 活性が低下した場合であっても、新たに炭素源を添加することで LiP 活性を再び高めることができる。

参考文献；1) 志水一允:木質バイオマスの利用技術;文永堂出版、1991

2) 尾崎博明、呉楓ら：リグニン分解酵素の活性に影響を及ぼす因子と粗酵素によるアゾ染料の脱色；環境工学研究論文集・第 32 巻、1995