研究論文

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

金山 望*・鈴木 徹**・河合啓一***

要 旨

マニラ麻の高アルカリ性パルプ化廃液（黒液）を含む培地にて培養した*Aspergillus terreus* LD-1が培地中に生産するアルカリ性リグニンペルオキシダーゼを精製し、その諸性質を調べた。酵素は、粗酵素液より硫酸分画及び各種のカラムクロマトグラフィーを用いる5段階の精製操作により、収率8.2%、10.8倍で電気泳動的に均一にまで精製された。本酵素の分子量はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動から24kDa、ゲル濾過から22kDaと求められ、単量体と判断された。至適pHは9.5で、安定pH域はpH9.0からpH10.0であり、pH8.0以下では活性を示さないアルカリ性リグニンペルオキシダーゼであった。本酵素は1 mM Fe^{2+} により1.3倍活性が促進され、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 及び Ag^{+} で完全に阻害された。また、1 mM マレイン酸で活性が2倍促進され、1 mM EDTAで完全に阻害された。酵素の可視部吸収スペクトルから、本酵素はヘム蛋白質であることが示された。本リグニンペルオキシダーゼはアルカリ側に作用域を持つことから、高アルカリ性のパルプ化廃液や漂白排水の処理に直接利用可能であることが示唆された。

キーワード：アルカリ性リグニンペルオキシダーゼ、*Aspergillus terreus* LD-1、黒液、ヘム蛋白質

1. はじめに

現在、工業的に採用されている化学パルプの製造はアルカリ条件下での反応が主流であり、蒸解後に黒液と呼ばれる強アルカリ性の廃液が生ずる。クラフト法と呼ばれる木材の化学パルプ蒸解法では連続蒸解の過程で黒液を回収ボイラーにて燃焼させエネルギーとしての利用や薬品の回収に用いられているが、マニラ麻のような非木材繊維の蒸解は回分方式で行われており、黒液の利活用はまったく行われておらず、中和後、排水処理施設にて処理されている。

蒸解後の未晒パルプはアルカリ性であり、リグニンの一部がまだ繊維中に残留しているので漂白処理が必要である。漂白工程もアルカリ抽出段や次亜塩素酸処理段のようなアルカリ条件下の処理が中心であ

るため、漂白廃液も高アルカリ性である。

これら廃液の主成分はリグニン又はその分解物である。自然界ではリグニンは微生物の働きで最終的に水と二酸化炭素にまで分解されている。リグニンを分解する酵素としては、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三種類が知られている。

環境への負荷を低減するために、パルプ化^{1,2)}、漂白^{3,4)}、或いはこれら工程から発生する排水の処理にリグニン分解酵素の応用を目指した研究⁵⁻¹⁰⁾が行われてきたが、いずれも酸性側に至適pHと作用域を持つリグニン分解酵素が用いられているため、漂白や排水処理に適用するには酸性化処理が必要であった。未晒パルプの漂白や黒液、漂白排水の処理にリグニン分解酵素を用いるバイオ技術の導入を図るためには、アルカリ域で高い活性を示すリグニン

*岐阜大学大学院連合農学研究科 Nozomi KANAYAMA

**同遺伝子実験施設 Tohru SUZUKI

***同農学部生物資源利用学科 Keiichi KAWAI

2002年5月27日受付

2002年6月17日受理

表1 BL-1 培地の組成

黒液	(固形分)	2.50 %
酵母エキス		0.10 %
MnSO ₄ · 4 ~ 5H ₂ O		0.025 %
NaNO ₃		0.30 %
K ₂ HPO ₃		0.15 %
KCl		0.10 %
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.10 %
FeSO ₄ · 7H ₂ O		0.002 %
		pH12.5

表2 BL-2 培地の組成

黒液	(固形分)	2.50 %
酵母エキス		0.10 %
MnSO ₄ · 4 ~ 5H ₂ O		0.025 %
NaNO ₃		0.30 %
K ₂ HPO ₃		0.15 %
KCl		0.10 %
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.10 %
FeSO ₄ · 7H ₂ O		0.002 %
ショ糖		3.0 %
		pH5.0

分解酵素の開発が不可欠である。

そこで、筆者らは、マニラ麻の高アルカリ蒸解廃液（黒液）を培地に用いてアルカリ性リグニン分解酵素生産微生物のスクリーニングを行った。その結果、アルカリ域で高い活性を示した三種類のリグニン分解酵素（リグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ、フェノールオキシダーゼ）を生産する糸状菌 *Aspergillus terreus* LD-1 の分離に成功し¹¹⁾、アルカリ域に最適 pH を有するリグニン分解酵素の存在を初めて指摘した。本菌のアルカリ性マンガンペルオキシダーゼについては、高度に精製しその諸性質について既に報告した¹²⁾。本報では、本菌のアルカリ性リグニンペルオキシダーゼについて、酵素の精製とその諸特性について報告する。

2. 実験材料及び方法

2.1 使用菌株、培地及び培養法

土壌より分離したアルカリ性リグニン分解酵素生産菌 *A. terreus* LD-1 を用いた¹¹⁾。リグニンペルオキシダーゼ生産用培地として BL-1 培地（表1）及び菌体増殖用培地として BL-2 培地（表2）を使用した。両培地とも 121℃、15 分間のオートクレーブ処理にて滅菌した。100 ml の BL-2 培地を入れた 500 ml 容坂口フラスコに *A. terreus* LD-1 を植菌し、37℃で7日間静置培養して菌体を増殖させた。培養後 No.2 濾紙（アドバンテック）にて菌体を回収し、直ちに 750 ml の BL-1 培地を入れた 3 リットル容三角フラスコに全量植菌し、37℃で4日間振盪培養（125rpm）した。

本実験に用いた黒液は、マニラ麻を水と水酸化ナトリウムのみでパルプ化した際の廃液で、全固形分が 11.8 %（有機成分 5.7 %，無機成分 6.1 %）で、pH は 13.1 であった。

2.2 リグニンペルオキシダーゼの精製法

2.2.1 遠心分離条件及び緩衝液等

遠心分離条件は 10,000rpm（19,000 × g）で 4℃、25 分間とした。緩衝液は 10mM グリシン-塩化ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液 pH9.5 を用いた（以下“グリシン緩衝液”と表記）。各精製操作は 0 ~ 10℃で実施した。

2.2.2 粗酵素液の調製

培養後の BL-1 培地を遠心分離することにより菌体を除去し、得られた上清を粗酵素液として用いた。

2.2.3 硫酸アンモニウム分画

粗酵素液 1200 ml をマグネティックスターラーにて攪拌しつつ硫酸アンモニウム（以下“硫安”と表記）粉末を添加し、硫安飽和度を 30 % とした。さらに 30 分間攪拌して硫安を完全に溶解させた後、遠心分離し上清を回収した。この上清に硫安粉末を 80 % 飽和添加し、60 分間攪拌した後、遠心分離し沈澱を集めた。沈澱はグリシン緩衝液に溶解し、同緩衝液にて一夜透析を行い脱塩した。

2.2.4 イオン交換クロマトグラフィー

アニオン交換樹脂 TIN200L05E（東レ）カラム（1.5 × 60 cm）に、前項の透析内液を 1 ml/分の流速で流入し、次にグリシン緩衝液 300 ml にてカラムを洗浄後、グリシン緩衝液中の NaCl 濃度を 0 M から 2.0 M まで変化したグラジエント法により酵素を溶出させた。全量 1000 ml の緩衝液を酵素の溶出に使用し、各画分は 10 ml あてに分取した。活性画分を回収し、グリシン緩衝液に対して透析し、脱塩した。

2.2.5 疎水クロマトグラフィー

前項の透析内液に飽和度が 50 % となるよう粉末硫安を加え、十分攪拌後、遠心分離にて沈澱を除去した。この上清を予め 50 % 飽和硫安含有グリシン緩

衝液にて平衡化しておいた疎水クロマトグラフィー用樹脂 Phenyl-TOYOPEARL 650M (東ソー) カラム (1.5 × 21 cm) に 1 ml/分の流速で流入した。50 %飽和硫酸含有グリシン緩衝液 200 ml にて樹脂を洗浄した。続いて 40 %飽和硫酸含有グリシン緩衝液 200 ml にて夾雑成分を除去した後、最後に 30 %飽和硫酸含有グリシン緩衝液 300 ml を用いてリグニンペルオキシダーゼを溶出させ、活性画分を回収した。

2.2.6 ゲル濾過

前項の回収液に粉末硫酸を添加して 80 %飽和とし、遠心分離にて沈澱を回収後、少量のグリシン緩衝液に溶解した。この沈澱溶解液を 0.25 ml/分の流速で TOYOPEARL HW55S (東ソー) カラム (2.5 × 95 cm) に流入した。グリシン緩衝液にてゲル濾過を行い、各画分は 10 ml あて分取した。活性画分を回収後、粉末硫酸を添加して 80 %飽和とし、遠心分離にて沈澱を集めた。沈澱は少量のグリシン緩衝液に溶解し、次いで TOYOPEARL HW50S (東ソー) カラム (1.5 × 35 cm) に 0.25 ml/分の流速で流入した。ゲル濾過にはグリシン緩衝液を用い、各画分は 4 ml あて分取した。活性画分を集め、粉末硫酸にて 80 %飽和とし、使用するまで低温下で保存した。

2.3 電気泳動法

精製リグニンペルオキシダーゼの均一性の確認及び分子量の測定は Laemmli の方法¹³⁾に従って、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) -ポリアクリルアミドゲル電気泳動により行った。分離用ゲル濃度は 12 %とし、蛋白質のバンドはクマシーブリリアントブルー R-250 で染色した。分子量の標準蛋白質として a) フォスフォリラーゼ (97.4 kDa), b) ウシ血清アルブミン (66.2 kDa), c) アルドラゼ (42.4 kDa), d) カルボニックアンヒドラーゼ (29 kDa), e) トリプシンインヒビター (20.1 kDa) 及び f) リゾチム (14.4 kDa) を使用し、相対移動度を比較して分子量を求めた。

2.4 ゲル濾過による分子量測定法

精製リグニンペルオキシダーゼはゲル濾過法により未変性状態での分子量の測定を行った。

予めグリシン緩衝液にて平衡化しておいたゲル濾過用樹脂 Superdex 200 HR10/30 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) カラム (1.0 × 30 cm) に酵素溶液を流入し、グリシン緩衝液

を 0.1 ml/分の流速で流してゲル濾過を行った。蛋白質の検出は 280 nm における吸光度により行った。分子量の標準蛋白質として a) β -アミラーゼ (200 kDa), b) アルコール脱水素酵素 (150 kDa), c) ウシ血清アルブミン (66.2 kDa), d) カルボニックアンヒドラーゼ (29 kDa) 及び e) チトクローム C (12 kDa) を用い、溶出体積の比較から分子量を求めた。標準蛋白質は各々の濃度が 1 mg/ml となるようにグリシン緩衝液に溶解し、リグニンペルオキシダーゼと同じ方法でゲル濾過を行った。

2.5 蛋白質定量法

ウシ血清アルブミンを標準蛋白質としてビウレット法にて定量した。

2.6 酵素活性測定法

リグニンペルオキシダーゼの活性測定は前報に従って行った¹¹⁾。

50 mM グリシン緩衝液 pH 9.5 に溶解した 10 mM ベラトリルアルコール溶液 1.4 ml に酵素溶液 1.5 ml を加え、0.1 ml の 6 mM 過酸化水素溶液を添加することにより反応を開始した。反応は 30 °C で行い、1 分毎に 330 nm の吸光度を測定し、1 分間当たりの吸光度の増加量を求めた。対照は 6 mM 過酸化水素溶液の代わりに水を用いた。

酵素活性の 1 unit は 30 °C で 1 分間あたり 1.0 の吸光度を増加させる酵素量と定義した。比活性は蛋白質 1 mg あたりの酵素量 (unit) で表示した。

2.7 至適 pH と pH 安定性の測定

酵素反応の至適 pH の測定は、基質溶解用の 50 mM グリシン緩衝液の pH を 8.0 から 13.5 まで 0.5 pH 単位ずつ変化させることにより行った。又、pH 7.0 及び pH 8.0 については 50 mM リン酸緩衝液を用いて測定した。

酵素の pH 安定性は、pH を 8.0 から 13.5 まで 0.5 pH 単位ずつ変化させた 10 mM グリシン緩衝液に一夜処理した酵素溶液を用いて、処理後の残存活性を測定することにより求めた。pH 7.0 及び pH 8.0 については 10 mM リン酸緩衝液を用いた。

2.8 至適温度と温度安定性の測定

至適温度は、10 ~ 70 °C の範囲で反応温度を変えて酵素活性を測定することにより求めた。温度安定性は、酵素を 0 ~ 80 °C の範囲の温度で 60 分間処理した後、残存活性を測定することにより求めた。

2.9 各種の基質に対する反応性の測定

ベラトリルアルコールの代わりに各種の基質を用

表3 *A. terreus* LD-1のリグニンペルオキシダーゼの精製結果

精製段階	総液量 (ml)	総活性 (Unit)	総蛋白質 (mg)	比活性 (U/mg)	倍率	収率 (%)
粗酵素液	1200	103	3970	0.026	1.0	100
硫酸30-80%飽和画分	430	90.3	2820	0.032	1.2	88
TIN200L05E	330	37.7	221	0.170	6.5	37
Phenyl-TOYOPEARL 650M	160	35.0	174	0.200	7.7	34
TOYOPEARL HW55S	32	10.1	40.7	0.250	9.6	9.8
TOYOPEARL HW50S	18	8.5	30.6	0.280	10.8	8.2

図-1 精製リグニンペルオキシダーゼの均一性と分子量

いて酵素活性を測定した。

2.10 金属イオン、有機酸及びEDTAの影響の測定

酵素活性測定時における酵素溶液量を1.4 mlとし、終濃度が1 mMとなるよう金属イオン、有機酸及びEDTAの各溶液を0.1 ml添加して酵素活性を測定した。

2.11 吸収スペクトルの測定

精製酵素を50 μ g/mlなるようにグリシン緩衝液に溶解し、日立100-50型ダブルビーム分光光度計にて340nmから700nmまでの吸収スペクトルを測定した。対照セルにはグリシン緩衝液を用いた。

3. 結果及び考察

3.1 酵素の精製結果

表3にリグニンペルオキシダーゼの精製結果を示

す。リグニンペルオキシダーゼは粗酵素液より収率8.2%で10.8倍にまで精製された。精製酵素の比活性は0.280unit/mg-蛋白質であった。疎水クロマトグラフィーの導入は比活性の上昇に顕著な効果は見られなかったが、夾雑色素の除去には極めて有効なプロセスであった。

3.2 精製酵素の均一性と分子量

精製リグニンペルオキシダーゼのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を図-1 (A) に示す。精製酵素は電気泳動で単一の蛋白質バンドとして泳動しており、5段階の精製操作により電気泳動的に均一な酵素標品を得ることができた。

図-1 (B) にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量測定の結果を示す。標準蛋白質の相対移動度との比較から、*A. terreus* LD-1のリグ

図-2 酵素の活性 (A) 及び安定性 (B) に及ぼす pH の影響

ニンペルオキシダーゼの分子量は24kDaと求められた。図-1 (C) にゲル濾過による分子量測定の結果を示す。ゲル濾過では22kDaと推定された。電気泳動とゲル濾過による分子量がほぼ一致したので、*A. terreus* LD-1 のリグニンペルオキシダーゼは分子量が22~24kDaの単量体と判断された。白色腐朽菌由来のリグニンペルオキシダーゼの分子量については38~45kDaと報告¹⁴⁻¹⁷⁾ されているので、本酵素は白色腐朽菌の酵素の約半分の分子量で、*Streptomyces viridosporus* 株の酵素の分子量 (17.8kDa) に近い値であった¹⁸⁾。

3.3 pHの影響

酵素の活性及び安定性に及ぼす pH の影響について調べた結果を、それぞれ図-2 (A) 及び図-2 (B) に示す。なお、相対活性100%の時の酵素活性はいずれも0.47U/mlであった。

精製リグニンペルオキシダーゼは pH8.5 から pH12.5 の間で活性を示し、至適 pH は9.5であった。pH8.0以下では活性が認められなかった。精製リグニンペルオキシダーゼは、pH9.0からpH10.0の間で安定であった。pH8.0以下やpH13.0以上で酵素を処理するとほぼ完全に失活した。このように本酵素は至適 pH が9.5にあり、また、高いアルカリ領域 (pH9.0からpH10.0) でも安定である点で従来の酸

性リグニンペルオキシダーゼと著しく異なっており、この pH 特性が本酵素の最大の特徴であり、*A. terreus* LD-1 のリグニンペルオキシダーゼの最もユニークな点である。

3.4 温度の影響

酵素の活性及び安定性に及ぼす温度の影響について調べた結果を、それぞれ図-3 (A) 及び図-3 (B) に示す。なお、相対活性100%の時の酵素活性はいずれも0.47U/mlであった。

精製リグニンペルオキシダーゼは20℃から60℃の間で活性を示し、至適温度は30℃であった。また、65℃以上では活性が認められなかった。温度安定性では、酵素は60分間の処理で0℃から30℃までは安定であったが、30℃を越えると活性が減少し、60℃以上では完全に失活した。

3.5 各種基質に対する反応性

本酵素の各基質に対する酸化速度については、各基質の極大波長における吸光度の1分間あたりの変化量を求めた。本酵素の基質として用いたベラトリルアルコール (330nm) の酸化速度が0.71/分であるのに対し、2,6-ジメトキシフェノール (470nm) では0.50/分、2,2'-アジノビス (3-エチル-ベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (420nm) では0.34/分、バニリン (350nm) 及びグアヤコール (450nm) では

図-3 酵素の活性 (A) 及び安定性 (B) に及ぼす温度の影響

ともに0.21/分であった。以上の基質にて吸光度の上昇が認められたことから、白色腐朽菌由来のリグニンペルオキシダーゼ¹⁹⁾と同様、本酵素もフェノール性化合物のみならず非フェノール性化合物も酸化し、広い基質特異性を示すことが明らかになった。

3.6.1 金属イオンの影響

精製リグニンペルオキシダーゼは Fe^{2+} により活性が1.3倍促進されたが、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} は酵素活性には影響を与えなかった。一方、 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 或いは Ag^{+} などの重金属で完全に失活した。なお、金属イオン無添加の場合の酵素活性は0.47U/ ml であった。

3.6.2 有機酸の影響

精製リグニンペルオキシダーゼ活性に及ぼす有機酸の影響について検討した結果を表4に示す。1 mMで各種の有機酸を作用させたところ、マレイン酸が酵素活性を2倍促進することが判明した。一方、ピルビン酸、コハク酸及びグリオキシル酸は弱い阻害作用を示した。その他の有機酸は活性にほとんど影響を与えなかった。1 mMマレイン酸の添加によりリグニンペルオキシダーゼの活性が2倍促進されたが、先に報告したようにマンガンペルオキシダーゼの場合には同濃度のマレイン酸で5倍上昇してい

ることが認められているので¹²⁾、リグニンペルオキシダーゼに対するマレイン酸の活性促進作用は幾分弱かった。マンガンペルオキシダーゼの場合には酵素反応に Mn^{2+} を必要とし、反応の結果生成した Mn^{3+} を有機酸がキレート作用により安定化させるため、結果としてマンガンペルオキシダーゼの活性が促進されるものと考えられているが²⁰⁻²²⁾、リグニンペルオキシダーゼは Mn^{2+} を反応に必要としないので、マレイン酸による*A. terreus* LD-1のリグニンペルオキシダーゼの活性促進機構については現在

表 4 酵素活性に及ぼす各種有機酸の影響

有機酸 (1 mM)	相対活性 (%)
— (対照)	100 ^{a)}
マレイン酸	200
シュウ酸	100
フマル酸	100
アジピン酸	100
酢 酸	100
乳 酸	100
リンゴ酸	100
クエン酸	100
酒石酸	100
ピルビン酸	72
コハク酸	70
グリオキシル酸	63

a) 対照の酵素活性は0.47U/ ml であった。

図-4 リグニンペルオキシダーゼの吸収スペクトル

のところ不明である。

3.6.3 EDTAの影響

精製リグニンペルオキシダーゼはマンガンペルオキシダーゼと同様 1 mM EDTA により活性は完全に阻害された。この阻害は 1 mM Fe^{2+} を共存させることにより回避された。この結果は本酵素の活性発現に Fe^{2+} が関与していることを示している。Tuiselらにより *Phanerochaete chrysosporium* 由来のリグニンペルオキシダーゼの H2 アイソザイムについて、同様の結果が得られている¹⁷⁾。

3.7 リグニンペルオキシダーゼの可視部吸収スペクトル

リグニンペルオキシダーゼの活性発現に Fe^{2+} が関与していることから、本酵素がヘム蛋白質の一種である可能性が示唆された。そこで、本酵素の可視部における吸収スペクトルを測定したところ、図-4 に示す結果が得られた。本酵素の吸収スペクトルは、405nm に極大吸収を有し、他に 500nm と 633nm にも吸収が認められた。この吸収スペクトルはヘム蛋白質として明らかにされている *Trametes versicolor* 由来のリグニンペルオキシダーゼのスペクトルに類似していた¹⁵⁾。従って、この結果から *A. terreus* LD-1 のリグニンペルオキシダーゼがヘム蛋白質であり、ヘムとしてプロトポルフィリン IX を分子内に持つことが示唆された。

4. ま と め

高アルカリ性のマニラ麻蒸解廃液（黒液）を用い

た培地にて *A. terreus* LD-1 を培養し、本菌の生産するリグニンペルオキシダーゼの精製と諸性質の検討を行った。その結果、

1) リグニンペルオキシダーゼは、粗酵素液から硫酸分画及び各種カラムクロマトグラフィーを組み合わせた 5 段階の精製操作により、収率 8.2 % で 10.8 倍にまで精製された。精製酵素の比活性は 0.280 unit/mg-蛋白質であった。精製酵素は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一の蛋白質バンドとして泳動し、高度に精製されていた。精製リグニンペルオキシダーゼの分子量は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により 24kDa、ゲル濾過法により 22kDa と推定されたことから、本酵素は分子量が 22 ~ 24kDa の単量体と判断された。白色腐朽菌由来のリグニンペルオキシダーゼの分子量については 38 ~ 45kDa と報告されているので、本酵素は白色腐朽菌由来の酵素の約半分の分子量で、放線菌 *S. viridosporus* の酵素の分子量 (17.8kDa) に近かった。

2) 精製リグニンペルオキシダーゼは pH 8.5 から pH 12.5 の間で活性を示し、至適 pH は 9.5 であった。高いアルカリ領域 (pH 9.0 から pH 10.0) で安定であった。これらの pH 特性は、*A. terreus* LD-1 のリグニンペルオキシダーゼの最もユニークな点である。

3) 精製リグニンペルオキシダーゼは Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ag^{+} などの重金属で完全に失活した。 Fe^{2+} により酵素活性は 1.3 倍促進されたが、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} は酵素活性には影響を与えなかった。各種有機

酸のうちマレイン酸が2倍酵素活性を促進した。一方ピルビン酸、コハク酸及びグリオキシル酸は弱い阻害作用を示した。精製リグニンペルオキシダーゼの活性は1 mM EDTAにより完全に阻害された。この阻害は1 mMの Fe^{2+} を共存させることにより回避された。

4) 精製リグニンペルオキシダーゼの可視部における吸収スペクトルは、ヘム蛋白質に特徴的な405nm, 500nm及び633nmに吸収が認められたことから、本リグニンペルオキシダーゼはヘム蛋白質であることが明らかになり、またヘムとしてプロトポルフィリンIXを分子内に持つことが示唆された。

5) *A.terreus* LD-1のリグニンペルオキシダーゼはアルカリ側に作用域を有し、かつ安定であることから、この酵素は未晒パルプのバイオブリーチング、黒液や漂白排水のバイオプロセスによる浄化処理に極めて有用な酵素であると言えよう。

謝辞：本研究を実施する機会を与えて下さいました大福製紙株式会社の松久達三相談役、水野豊彦社長、實生治郎技術部長並びに久保修研究課長の各氏に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 小林良生：リグニンの微生物分解とそのバイオケミカルパルピングへの応用, 35, pp.556-559 (1986)
- 2) 西田友昭：微生物によるリグニン分解, 紙パ技協誌, 43, pp.1071-1084 (1989)
- 3) 土川圭一, 近藤隆一郎, 坂井克己：多段バイオ処理によるクラフトパルプの漂白, 紙パ技協誌, 49, pp.1332-1338 (1995)
- 4) 土川圭一, 近藤隆一郎, 坂井克己：リグニン分解酵素系によるクラフトパルプの漂白 (第2報), 紙パ技協誌, 50, pp.899-905 (1996)
- 5) Helene Giroux, Pierre Vidal, Jean Bouchard and Francois Lamy : Degradation of kraft indulin lignin by *Streptomyces viridosporus* and *Streptomyces badius*, Appl. Environ. Microbiol., 54, pp. 3064-3070 (1988)
- 6) 原口隆英：パルプ廃液生物処理の生化学, 紙パ技協誌, 29, pp.289-294 (1975)
- 7) 李宜鎬, 近藤隆一郎, 坂井克己, 西田友昭, 高原義昌：リグニン分解菌によるクラフトパルプ漂白廃液の処理 (第1報), 木材誌, 39, pp.470-478 (1993)
- 8) Joseph Marton, Arther M. Stern and Terezia Marton : Decolorization of kraft black liquor with *Polyporus versicolor*, a white rot fungus, Tappi, 52, pp.1975-1981 (1969)
- 9) Frederick C. Micher, Jr., S. B. Dass, Eric A. Grulka and C. A. Reddy : Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent, Appl. Environ. Microbiol., 57, pp. 2368-2375 (1991)
- 10) C. Raghukumar, D. Chandramohan, F. C. Michel Jr. and C. A. Reddy : Degradation of lignin and decolorization of paper mill bleach plant effluent (BPE) by marine fungi, Biotechnol. Lett., 18, pp. 105-106 (1996)
- 11) 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, 9, pp.87-94 (1998)
- 12) Nozomi Kanayama, Tohru Suzuki and Keiichi Kawai : Purification and characterization of an alkaline manganese peroxidase from *Aspergillus terreus* LD-1, J. Biosci. Bioeng., 93, pp.405-410 (2002)
- 13) U. K. Laemmli : Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, Nature (London), 227, pp.680-685 (1970)
- 14) Michele Asther, Hans Vilter, Bernard Kurek and Jean C. Meunier : An improved method for the purification of lignin peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 : Properties of two major isoforms, Int. J. Biochem., 24, pp. 1377-1383 (1992)
- 15) Tomas Johansson and Per O. Nyman : Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white - rot basidiomycete *Trametes versicolor*, Arch. Biochem. Biophys., 300, pp. 49-56 (1993)
- 16) Marja L. Niku-Paavola, Eija Karhunen, Paivi Salola and Veijo Raunio : Ligninolytic enzymes of the white - rot fungus *Phlebia radiata*, Biochem. J., 254, pp. 877-884 (1988)
- 17) Helfried Tuisel, Robert Sinclair, John A. Bumpus, William Ashbaugh, Barry J. Broch and Steven D. Aust : Lignin peroxidase H2 from *Phanerochaete chrysosporium* : Purification, characterization and stability to temperature and pH, Arch. Biochem. Biophys., 279, pp. 158-166 (1990)
- 18) Muralidhara Ramachandra, Don L. Crawford and Greg Hertel : Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*, Appl. Environ. Microbiol., 54, pp. 3057-3063 (1988)
- 19) 渡辺隆司, 桑原正章：リグニンの酵素的分解, 化学と生物, 38, pp.161-166 (2000)
- 20) I - Ching Kuan and Ming Tien : Glyoxylate-supported reaction catalyzed by Mn peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* : activity in the absence of added hydrogen peroxide, Arch. Biochem. Biophys., 302, pp. 447-454 (1993)
- 21) I - Ching Kuan and Ming Tien : Stimulation of Mn peroxidase activity : a possible role for oxalate in lignin biodegradation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, pp.1242-1246 (1993)
- 22) Frederic H. Perie, Dawei Sheng and Michel H. Gold : Purification and characterization of two manganese peroxidase isozymes from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*, Biochem. Biophys. Acta, 1297, pp.139-148 (1996)