

令和 2 年度 修士課程論文

IBCA ナノ粒子がヤケイロタケ Iwa5b 株のリグニン分解酵素生産 に与える影響

*Effect of IBCA nanoparticles on lignin degrading enzymes
production by Bjerkandera adusta Iwa5b*

高知工科大学 工学研究科 基盤工学専攻

生命科学コース 森林資源学研究室

1235038 神尾 瑞

指導教員 堀沢栄 教授

目次

1. 概要	P 3
2. 緒言	4-5
3. 実験方法	6-12
3-1. 供試菌	
3-2. 試薬	
3-3. 培地	
液体培地組成と調製方法	
IBCA ナノ粒子懸濁液の滅菌方法	
供試菌の接種	
IBCA ナノ粒子の濃度調製方法	
界面活性剤及びデキストランの濃度調整	
IBCA ナノ粒子製造に用いられる分散剤の濃度調整	
培地内栄養源の濃度調整	
培養方法及び培養・測定期間	
3-4. 酵素生産量の測定	
培養液中の酵素量測法	
Lac 及び MnP 生産量の測定方法	
3-5. 菌体重量の評価	

4. 結果	P 13-30
IBCA ナノ粒子添加時の MnP 生産量測定	
Iwa5b 株培養終了時の菌体量測定	
Iwa5b 株の MnP 生産に対する IBCA ナノ粒子濃度の影響	
ガラスビーズ添加条件と IBCA ナノ粒子条件との MnP 生産量比較	
分散剤添加時の MnP 生産量と菌体量測定	
界面活性剤添加時の Iwa5b 株 MnP 生産量測定	
界面活性剤添加時の Iwa5b 株菌体量測定	
デキストラン 70 添加時の Iwa5b 株 MnP 生産量及び菌体量	
栄養源量変化時の MnP 生産量及び菌体量測定	
5. 考察	31-37
IBCA ナノ粒子によって酵素生産量及び菌体量を増加させる菌株	
IBCA ナノ粒子条件及びガラスビーズ条件の酵素生産量比較	
IBCA ナノ粒子濃度変化時の酵素生産量について	
分散剤及び界面活性剤添加時の酵素生産量増加について	
界面活性剤添加条件における酵素生産量の再現性	
IBCA ナノ粒子及び界面活性剤添加時の菌体量の変化	
界面活性剤が他菌株の酵素生産量に与える影響について	
各栄養源が Iwa5b 株に与える影響	
デキストラン 70 が Iwa5b 株に与える影響	
6. 結論	38
7. 謝辞	39
8. 参考文献	40-41

1. 概要

植物の資源変換やバイオレメディエーションの分野で、生物学的な分解に用いるリグニン分解酵素の利用は、環境負荷低減の観点から重要になっている。我々は工業利用を目的とし、白色腐朽菌の酵素生産能力を向上させる方法について研究している。本研究室ではこれまでに、リグニン分解酵素のひとつであるマンガンペルオキシダーゼ(MnP)の高生産株である *Bjerkandera adusta* Iwa5b を環境中より分離した。しかしこの株は、MnP の生産力が高いが安定しないという問題があった。

本研究では、これまでに菌体の酵素生産に影響を与えるという報告のあった栄養バランスの変化(1)と菌系に対する物理的な刺激のアプローチを元に、株式会社チカミルテックから提供されていた抗菌材料「イソブチルシアノアクリレート(IBCNA)ナノ粒子」の抗菌的なストレスによって Iwa5b 株の安定した酵素生産量増加が可能かを試みた。この IBCNA ナノ粒子はグラム陽性菌のペプチドグリカン層に吸着し破裂させることで抗菌性を示す材料であり(2)、先行研究においてグラム陰性菌の成長速度を遅延させる効果も確認され、担子菌に対してもストレスを与えていると考えられた。抗菌ナノ粒子を添加した培養液で白色腐朽菌株を培養し、MnP 活性を測定した結果、Iwa5b 株と粒径 30nm ナノ粒子の組み合わせによって、MnP 生産量の増加とピークに至るまでの期間が一定になることが確認された。しかし他の菌株やナノ粒子条件では生産量が増減し、Iwa5b 株においてもナノ粒子の粒径や濃度に応じた MnP 生産の明白な関係が見いだせなかった。

次に、ナノ粒子の製造と安定化に使用されている界面活性剤が MnP 生産に及ぼす影響を検討した。3種の界面活性剤をそれぞれ培地に加え、濃度ごとに Iwa5b 株の MnP 生産量に与える影響を調査した。その結果、アニオン系及びノニオン系界面活性剤を添加した際に、生産量が大幅に増加する条件が確認された。

以上の結果から、Iwa5b 株の酵素生産能力を向上し安定化させるためにはアニオン系及びノニオン系界面活性剤の培地への添加が有効だと考えられた。しかし作用機序などがまだ明らかになっていないため、今後検討する必要がある。

2. 緒言

現在多くの研究機関で、白色腐朽菌が生産するリグニン分解酵素を工業利用化に向けた試みが行われている。例として、製紙過程における原料の脱リグニン化や古紙再生のブリーチングに、塩素系漂白剤の代用として白色腐朽菌を利用するバイオブリーチング、及びバイオパルピングが挙げられる。生物による処理を行う利点として、従来の漂白剤を使用する際に必要な施設整備のためのコストが軽減できる点や、排水を処理する際に仮に周辺に漏れたとしても環境負荷が少なく済む点が挙げられる。一方で、薬品を用いた時よりも処理効率が悪くなるというデメリットがある。リグニン分解酵素の生産は白色腐朽菌の成長速度によって左右されるほかに様々な要因が関与すると考えられ、その生産量が安定せずに処理効率の低下を招くことが原因の一つにあげられる。そのため、工業利用などの実用化を考えるのであれば、白色腐朽菌の酵素生産量を増加させる技術・手法の確立が必要になる。

キノコなどの白色腐朽菌は、高炭素低窒素(HCLN)といったアンバランスな栄養環境下において酵素生産量が増加すると考えられている(1)。また先行研究では、ガラスビーズとともに回転培養を行った場合に通常時よりも酵素生産量が増加したことから、ビーズによる菌株への物理的な破碎及び衝撃が関与しているとも考えられた。すなわち白色腐朽菌は、外部から何らかのストレスを与えた時、生産する酵素量を増加させるのではないかと考えられた。

そこで本研究室はイソブチルシアノアクリレート (IBCA) ナノ粒子に注目した。IBCA ナノ粒子は接着剤として使用されるイソブチルシアノアクリレートを重合してナノレベルの粒子としたものである。この材料はグラム陽性のバクテリアや一部の藻類に対し溶菌効果を発揮する(2, 3)。グラム陰性菌および多くの真菌類に対しては高い抗菌性を示さないものの、先行研究では木材腐朽菌の菌糸の伸長を遅延させることから、菌の生理活性に何らかの影響を与えていると考えられた。そこで、IBCA ナノ粒子の持つ抗菌性を用いて菌株にストレスを与え、その酵素生産量を増加できるかを試みた。

本研究室ではヤケイロタケ *Bjerkandera adusuta* Iwa5b 株を含むマンガネロキシダーゼ(MnP)高生産菌 5 株に対して、IBCA ナノ粒子を添加した液体培地中での酵素生産量の評価を行い、その後に使用する菌株のスクリーニングを行った。Iwa5b 株は本研究室で単離された菌株で、既存の特許株よりも高い MnP 生産能を示す株である。MnP はパルプ漂白などバイオブリーチングに適した菌株において高い活性を示すことが報告されており、脱リグニン処理を行う際に最も適したリグニン分解酵素であることが示唆されている(4)。スクリーニングで選抜された菌株については、ナノ粒子の濃度や粒径を変更して更に調査した。

また、ナノ粒子の原料が生分解性のあるイソブチルシアノアクリレートであることと、ナノ粒子添加によって引き起こされた培地の白濁が、Iwa5b 株培養時に日数経過に連れて減少したことから、菌体が分解して栄養源としている可能性が挙げられた。そこで培養後には菌体量の測定を行った。更に、有意に酵素生産量が増加した Iwa5b 株に対して、ナノ粒子濃度に応じて菌体の成長がどのように変化するかを検討した。

先行研究ではナノ粒子とガラスビーズを用いた培養条件において酵素生産量増加が確認されていた。そこでガラスビーズのみの培養条件で酵素生産量を確認し、ナノ粒子のみの条件との比較を行った。リグニン分解酵素の一つであるラッカーゼ(Lac)は菌糸の強度をより強くすることが報告されている(5)ことから、ガラスビーズによる菌糸分散の影響を受けていると考えられた。そこで、ナノ粒子とガラスビーズ条件については Lac の生産量についても評価した。

Iwa5b に対しナノ粒子を添加した際の酵素生産量増加の原因について、チカミルテックがナノ粒子製造の際に用いていた分散剤（界面活性剤）を用いた際に酵素生産量の増加が確認された。よって Iwa5b 株の酵素生産には界面活性剤が影響している可能性が考えられた。そこでアニオン系、カチオン系、ノニオン系の界面活性剤とともにスクリーニングした菌株の培養を行い、酵素生産量と菌体量をナノ粒子条件と比較した。その中で酵素生産量が通常時よりも増加したものに対しては、濃度を変更して培養を行った。

また、ナノ粒子の製造にデキストランが使用されているという報告があったため(6)、その際に使用されるデキストラン 70 を培地内に添加し、Iwa5b 株の酵素生産量・菌体量を測定した。

本研究で用いた菌株の中で MnP 生産に優れた Iwa5b 株において、ナノ粒子添加時に酵素生産量が増加したが、他の株ではみられなかった。また、*B. adusta* の他の菌株で報告された HCLN 条件での酵素生産量増加は、Iwa5b 株では確認できなかった。このように Iwa5b



図 2-1. 和紙における製紙過程の概略図. 多くの複雑な過程を必要とするため大規模工場での生物処理の利用は難しい. 一方, 小規模・単純な工程で製造される和紙などは生物処理に置き換えられる.

株の酵素生産能力には他の株と比べてユニークで未知の部分が多く存在した。そこで、培地の主要な栄養源を各 10 倍に調整した培地で Iwa5b 株の酵素生産量と菌体量を測定し、栄養バランスの点から菌株の特異的な酵素生産能力発現の条件について調査した。

3. 実験方法

3-1. 供試菌

本研究では白色腐朽菌を利用した。ヤケイロタケ（*Bjerkandera adusta*）Iwa5b 株、*B. adusta* FERM P-20326 株、*B. adusta* NBRC106826 株を供試菌として使用した。Iwa5b 株はリグニン分解酵素の 1 つであるマンガンペルオキシダーゼ（MnP）の高生産株であることが知られていた。FERM P-20326 株は特許株である。NBRC106826 株は本研究室の実験で前記 2 つの株と同等のレマゾールブリリアントブルー R（RBBR）培地分解能を示していた。

また、他の担子菌株として、カワラタケ（*Trametes versicolor*）KUT0301 株、*T. versicolor* NBRC4940 株、アラゲカワラタケ（*Trametes hirsuta*）KUT0903 株を供試菌として利用した。過去の実験で RBBR 培地分解能に優れた株であることが明らかとなっていた。

供試菌の継代培養はポテトデキストロース寒天（PDA）培地（日水製薬、東京）に行い、インキュベーター内で 25℃・暗所条件で静地培養した。

3-2. 試薬

IBCA ナノ粒子

本研究では直径 30nm、100nm および 200nm の IBCA ナノ粒子を用いた。原液 1.0%濃度の溶液を低温室(4℃)で保存した。これらはチカミルテック株式会社で製造された(7)。



写真1. チカミルテック製 IBCA ナノ粒子. 左:30nm, 右:200nm. IBCA ナノ粒子の写真.

ガラスビーズ

今回培養の際に用いたガラスビーズは先行研究と同じく径 0.5~0.6mm のものを 30 個添加しオートクレーブで培地と共に加熱滅菌、培養を行った。

界面活性剤及びデキストラン

培養で使用する界面活性剤として、チカミルテック株式会社がナノ粒子製造及び安定化に使用したと考えられるアニオン系の直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム(NaDS) 及びドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ノニオン系のポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート

(Tween20) 及びポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート (Tween80) を用いた(7)。また、チカミルテックとは別に、ポリブチルシアノア

クリレートナノ粒子製造の際に分散剤として利用の報告がなされていたデキストラン 70 を用いた培養を行った(6)。また、カチオン系界面活性剤については *Aspergillus parasiticus* NRRL2999 株のアフラトキシン生産量に影響を与える事が報告された臭化セチルトリメチルアンモニウム(CDAB) に注目し、培養を行った(8)。

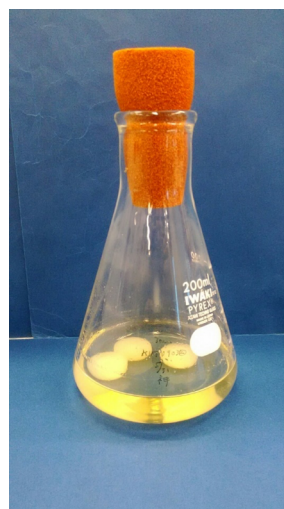


写真 2. 30nm IBCA ナノ粒子添加時の液体培地の写真. 供試菌株の Iwa5b を 3 片接種している.

3-3. 培地

液体培地組成と調製

培地組成を表に示した。添加物はナノ粒子と界面活性剤の二つがあった。また比較条件として、脱イオン水を添加した control 条件も調整した。界面活性剤は滅菌前の培地作成時に目標の濃度に調節した。IBCA ナノ粒子の場合は滅菌後に培地への添加を行い、終濃度を合わせた。液体培地とともに培養に用いる 200ml 三角フラスコ(スポンジ栓で閉じ、アルミ箔を被せたもの)をオートクレーブで 121℃、20 分滅菌した。滅菌後の培地はフラスコに 60ml ずつ分注した。

表 1. 液体培地の組成

試薬	濃度(w/v%)
Glucose	0.1
NH ₄ NO ₃	0.1
KH ₂ PO ₄	0.08
Na ₂ HPO ₄	0.02
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
Yeast extract	0.2
添加物*	

* 添加物は IBCA ナノ粒子, 界面活性剤, 脱イオン水(比較条件時)の 3 条件.

IBCA ナノ粒子懸濁液の滅菌方法

IBCA ナノ粒子を液体培地に添加する前に、ろ過滅菌処理を行った。30nm IBCA ナノ粒子はポアサイズ $0.45\mu\text{m}$ のシリンジフィルター(ザルトリウス、ドイツ)を用いてろ過滅菌を行った。100nm 及び 200nm の IBCA ナノ粒子は、目詰まりを避けるために吸引ろ過を行った。処理には $\phi 47\text{mm}$ のガラスマイクロファイバーフィルター(GE ヘルスケア、UK)を用いた。その後、50ml 遠心チューブに移して 80°C 、1 時間で加熱することで除菌を行った。これらの処理によって、カビやバクテリア等の除去を試みた。以上の操作の後、目的の終濃度に合わせて IBCA ナノ粒子を添加した。

供試菌の接種

滅菌及び添加物を加えた培地を分注した後、PDA 培地上で前培養していた菌株のコロニーを直径 12mm のコルクボーラーで打ち抜いた。その菌糸片 3 個をそれぞれのフラスコ内に接種した。1 つの培養条件に対する繰り返し数は 3 から 12 とした。

IBCA ナノ粒子の濃度調製

本研究では IBCA ナノ粒子の濃度が Iwa5b 株の酵素生産にどのような影響を与えるか検討した。径 30nm、200nm の IBCA ナノ粒子を終濃度が 0.05%、0.10%、0.20% となるように調製した培地を作成した。ナノ粒子終濃度 0.10% 時には、液体培地と 1% ナノ粒子懸濁液の混合割合を 9 : 1 として調製した。0.05% 時には割合を 19 : 1 に、0.20% 時には割合を 4 : 1 として培養液中のナノ粒子濃度を調製した。

界面活性剤及びデキストランの濃度調整

界面活性剤が菌株の酵素生産量に与える影響について検討した。ナノ粒子を添加した際、共に培地に添加されると考えられる界面活性剤の終濃度 0.1% を基準に、添加時の殺菌力や酵素生産量によってそれぞれ濃度を変更した。

アニオン系界面活性剤 NaDS は 0.016% を始めとして 0.0016%、0.00016% の終濃度に調節した。一方の SDS の場合は NaDS の結果を踏まえて終濃度 0.01% で調節し、培養を行った。SDS のスケールが異なるのは、NaDS を原料としてナノ粒子製造に使用されているアニオン系洗剤「ネオペレックス」の濃度に合わせて調整したためである。

Tween20 の終濃度は 0.12% を基準として 0.005%、0.012% と変化させた。その結果を踏まえて Tween80 では 0.12% の終濃度で培養を行った。

デキストラン 70 はナノ粒子製造の際に使用される濃度 2.0% を基準に 1.0%、0.2% で終濃度を調整して培養を行った。またカチオン系界面活性剤 CDAB は終濃度 0.01% 及び 0.001% に調節した。なお、上記の% の内訳として Tween 両種は v/v 、それ以外の条件は w/w で計算し培養を行った。

IBCA ナノ粒子製造に用いられる分散剤の濃度調整

本研究では、チカミルテック株式会社が IBCA ナノ粒子製造の際に使用している分散剤のみを添加した際の Iwa5b 株酵素生産量について調べた。濃度については、普段ナノ粒子とともに培地内に添加されていると考えられた終濃度 0.1% で調整した。

分散剤には、アニオン系およびノニオン系の界面活性剤が使用されていた。一方でそれらの種類や濃度については不明である。

培地内栄養源の濃度調整

炭素源が高濃度、窒素源が低濃度の培地（HCLN 培地）条件時の Iwa5b 株の酵素生産量を調べた。その際には培地組成内 Glucose を通常時の 10 倍（1.0%）にした。また、窒素源増加時の Iwa5b 株酵素生産の動向を検討するために、 NH_4NO_3 及び Yeast extract を 10 倍にしてそれぞれ 1.0% と 2.0% にして培養を行った。Yeast extract 添加条件では培地内総量を他条件と同じにするために 1.0% 条件について調整・測定を行った。

培養方法及び培養・測定期間

培地を分注し菌を接種したサンプルをインキュベーター内、30℃、暗所にて約 2 週間から 1 ヶ月の間、80rpm で回転培養を行った。経時的に培養液をサンプリングし、液中の酵素量を測定した。基本 14 日目で培養及び測定を終了したが、培養液中の酵素活性の持続性が見られたものは、最大で約 1 ヶ月まで続行するものもあった。



写真 3. インキュベーター内での培養の様子

3-4. 酵素生産量の測定

3-4-1. 培養液中の MnP 測定法

菌株が生産する酵素について MnP に注目し、分光光度計を用いて測定が行われた。培養液中から 1.0ml チューブに 1.0ml 分サンプリングした培養液を 15000rpm、5 分間、20℃で遠心分離を行い、固形物を沈殿させた。その後、上澄みを 0.75ml 取って酵素測定試薬 0.25ml とともにピペッティングを行った。試薬組成は表 2 に示す。試

薬と懸濁した培養液 0.75ml を分光光度計のセルに入れ、経時的に吸光度を測定した。グアイアコールに対する酵素活性によって培養液の色が赤褐色に変化するため、その経時的な吸光度の変化を測定した。ユニット数の定義として、一分間あたりの 465nm における吸光度変化量をユニット数として定義した(9)。以上の操作を培養日数経過ごとに行い、酵素生産量の推移をグラフ化した。

なお本研究では MnP の抽出は行っておらず、粗酵素に対する測定結果として示した。

表 2. 酵素測定試薬の組成

試薬組成	終濃度(mM)
Guaiacol	7.50
Succinate(pH4.5)	185
MnSO ₄	1.85
H ₂ O ₂	1.85

MnSO₄の有無で全体の酵素生産量, Lac, MnP の生産量を個々に測定した.

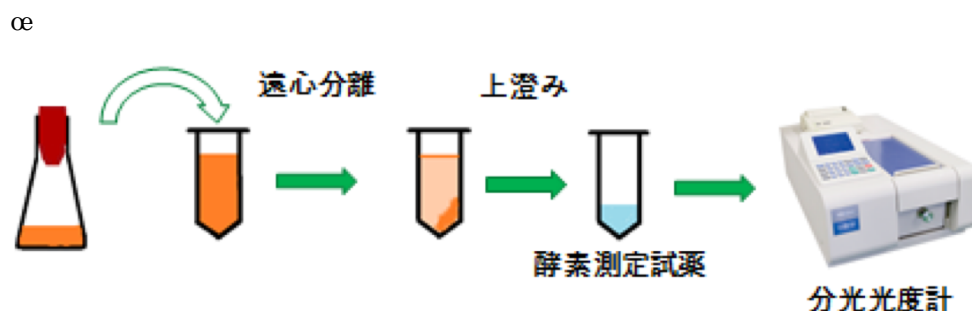


図 3-1. 培養液中の酵素量を検討するための測定フロー概略図。

3-4-2. Lac 及び MnP 生産量の測定方法

IBCA ナノ粒子を培地に添加した際に、Iwa5b 株の酵素生産量を増加させる傾向にあることは過去の研究で示されていたが、その酵素が一体どんな種類の酵素であるかは分かっていなかった。そこで本研究では、Iwa5b 株が高生産能を有する MnP と、Lac の生産量に影響を与えるかを検討した。Lac は、今回用いた試薬で MnP と同じくグアイアコールに活性を持つため、過去の実験でも同時検出された可能性が高いと考え、区別をつけるために測定を行った。

前述したように、Lac と MnP は互いにグアイアコールへの活性を持つことから、今回用いた試薬のような Mn 分の有無だけでは、Lac+MnP 量を同時に測定するか、Lac 単体の量を測定する事しかできなかった。そこで今回は、MnP 単体での評価を行うために、MnP+Lac を同時測定した一分間の吸光度変化量の値から Lac 測定分を除いた値を MnP 評価値として算出し、酵素生産量を評価した。

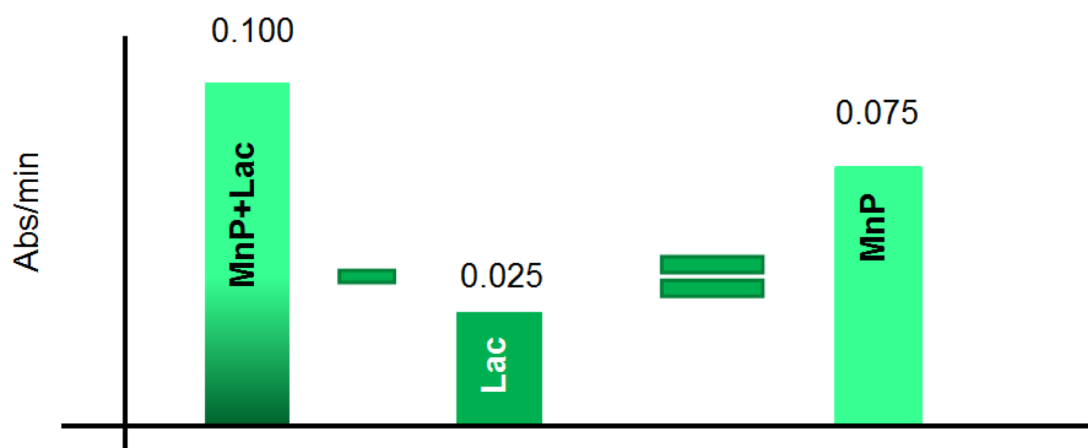


図 3-2. MnP 生産量を求める際に行った処理の概略図.

Mn 分を入れた試薬で測定すると MnP が働くが、Mn 分なしの試薬では Lac のみが働く。本研究では、Lac+MnP 値から Lac の数値を引いて、MnP の酵素生産量を定義した。

3-6. 菌体重量の評価

添加物や界面活性剤、栄養源が Iwa5b 株の成長に与える影響を調べるために菌体量の測定を行った。アルミ箔で作成した袋にφ47mm のガラスマイクロファイバーフィルター（GE ヘルスケア、UK）を入れた状態で 80℃の乾燥機に 2 日間静置し、それらの乾燥重量を最初に測定した。その後ガラスフィルターで菌体の吸引ろ過を行い、アルミ箔に戻したのちに乾燥機で 2 日間ほど乾燥させ、再びそれらの重量を測定した。そして得られた 2 つの乾燥重量の差分を求め、その値を菌体重量として求めた。

また、菌体重量を測定する場合は培養 14 日目の菌体を使用した。



写真 4. フィルター及びアルミ箔(左)とろ過・乾燥後のフィルター(右)の様子

4. 結果

IBCA ナノ粒子添加時の MnP 生産量測定

5つの菌株に対する培養日数に対する培養液中 MnP 生産量の推移を図 4-1 に示した。この測定において培地に添加した IBCA ナノ粒子の濃度は、すべて 0.1%とした。

T. versicolor KUT0301 において (図 4-1, A)、30nm IBCA ナノ粒子を添加した場合、control 条件(水添加)よりも酵素生産開始時期は 8 日目まで遅れ、生産された MnP は少なくなった。一方、MnP 活性は 14 日目に減少した。200nm IBCA ナノ粒子添加時には、比較条件と同じく 2 日目に MnP 生産を開始したが、最終的に生産された量は比較条件より少なくなった。

T. versicolor NBRC4940 の培養液中の MnP 生産量は (図 4-1, B)、30nm IBCA ナノ粒子を添加した場合に 4 日目から緩やかに生産量が増加したが、比較条件より少なくなった。200nm IBCA ナノ粒子添加時は 2 日目から MnP 生産を開始し緩やかに増加したが、比較条件よりも生産された量は少なくなった。

T. hirsuta KUT0903 の MnP 生産の推移については (図 4-1, C) 生産能力の持続性に期待し、14 日間以降も培養を行った。30nm IBCA ナノ粒子添加した際には 4 日目まで MnP 生産量は他に比べ少なかった。しかし 8 日目に比較条件の量を上回り、16 日目にピークに達してその後緩やかに低下した。200nm IBCA ナノ粒子条件では 4 日目から比較条件を上回る速度で MnP が増加したが、6 日目にピークを迎えた後酵素活性が緩やかに減少した。比較条件の MnP 生産量は、6 日目に 1 回目のピークを迎えた後に減少し 12 日目から再び MnP の増加が確認された。その後 28 日目まで緩やかに増加した。しかし、比較条件と比べてナノ粒子条件で MnP 生産量は増加しなかった。

B. adsuta FERM P-20326 に対しては 30nm IBCA ナノ粒子を添加した時、MnP 生産は 6 日目から開始した (図 4-1, E)。10 日目にピークが訪れたのち、緩やかに減少した。200nm IBCA ナノ粒子添加時には 2 日目に MnP 生産が開始し、4 日目にピークに達した。その後酵素活性は減少した。

B. adsuta Iwa5b においては (図 4-1, D)、30nm IBCA ナノ粒子を添加したとき、MnP 生産は比較対象に 3 日程度遅れて 6 日目から開始し、8 日目に比較条件を上回る大幅な増加が確認された。その後、酵素活性は減少した。200nm IBCA ナノ粒子条件では、30nm 条件と同じく 6 日目から MnP 生産を開始して 10 日目にピークに達し、比較条件と同程度の酵素量を示した。Iwa5b 株については 100nm の粒径についても測定を行った。比較条件と同じく 2 日目以降から酵素生産を開始し 6 日目でピークに達した。酵素生産量の最大値は比較条件とほぼ同等となった。

以上の結果から、30nm IBCA ナノ粒子と Iwa5b 株の組み合わせにおいて MnP 生産量増

加が確認された

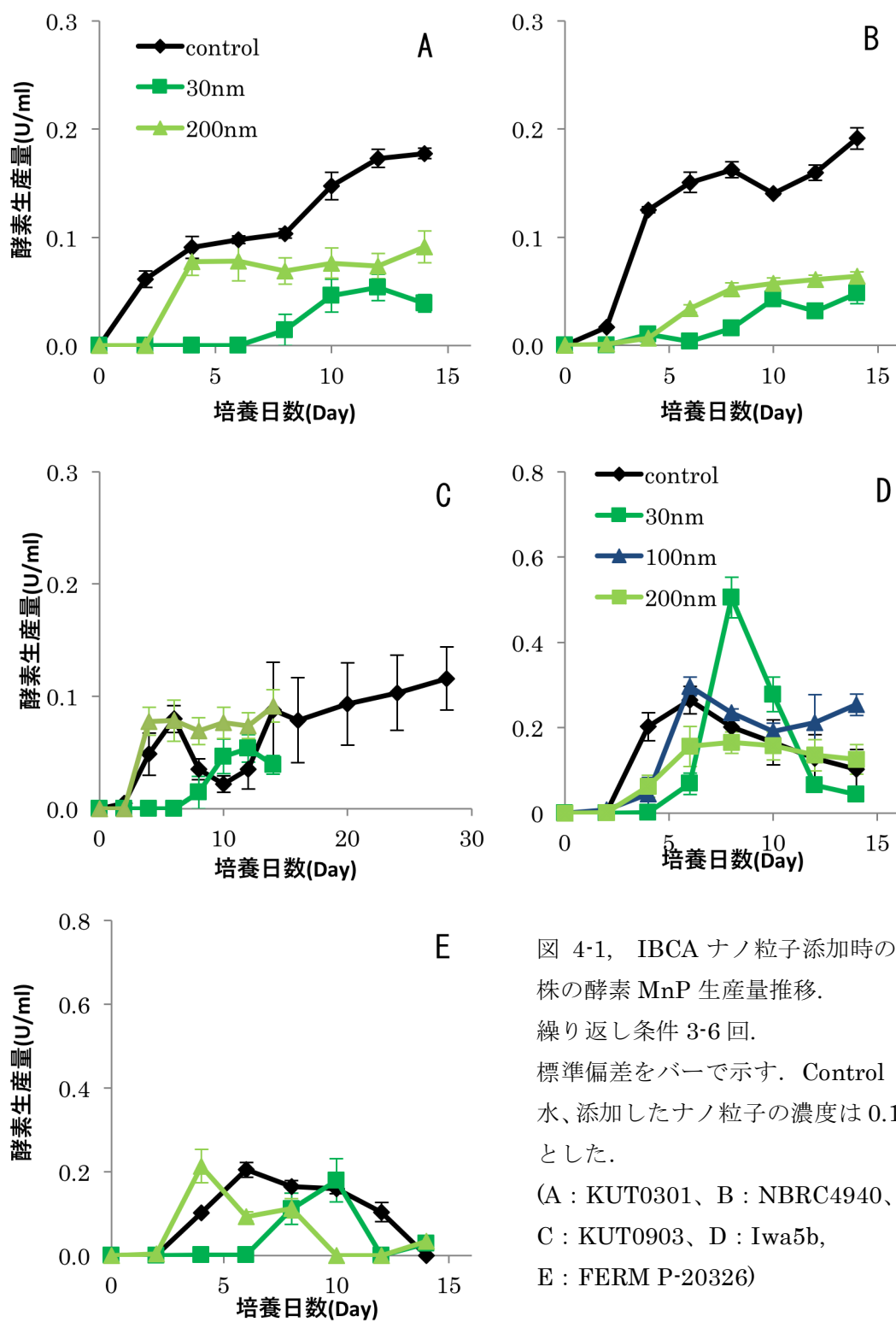


図 4-1, IBCA ナノ粒子添加時の菌株の酵素 MnP 生産量推移。
繰り返し条件 3-6 回。
標準偏差をバーで示す。Control は水、添加したナノ粒子の濃度は 0.1% とした。
(A : KUT0301、B : NBRC4940、
C : KUT0903、D : Iwa5b、
E : FERM P-20326)

Iwa5b 株培養終了時の菌体量測定

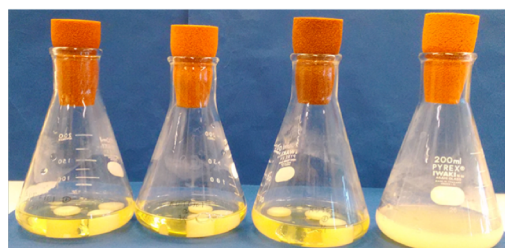
B. adsuta Iwa5b 株の条件において、培地は IBCA ナノ粒子によって写真の様に白濁した (写真 5)。一方で培養期間を重ねるごとに、菌株を接種した条件のみで培地中の濁度が減少した。これは、Iwa5b 株がナノ粒子を分解し栄養分とした可能性があると考え、培養終了時の菌体量を測定した。その測定結果を図 4-2 に示す。Control(水添加)条件とその他の試験条件で、95%信頼区間での t 検定を行った際、30nm 及び 100nm IBCA ナノ粒子条件において菌体量は有意に増加していた。一方で、200nm IBCA ナノ粒子条件では有意差は検出されなかった。また、ナノ粒子の粒径が小さくなるにつれて菌体量が増加する傾向が見られた。

培養2日目



濁度(Abs)	1.073	1.092	1.080	1.101
---------	-------	-------	-------	-------

培養14日目



濁度(Abs)	0.078	0.084	0.078	1.214
---------	-------	-------	-------	-------

写真 5, 培地濁度の変化を観察した写真. 菌株は Iwa5b. ナノ粒子の粒径は 200nm. 右端のフラスコは Iwa5b 未接種. Abs は 600nm で測定した.

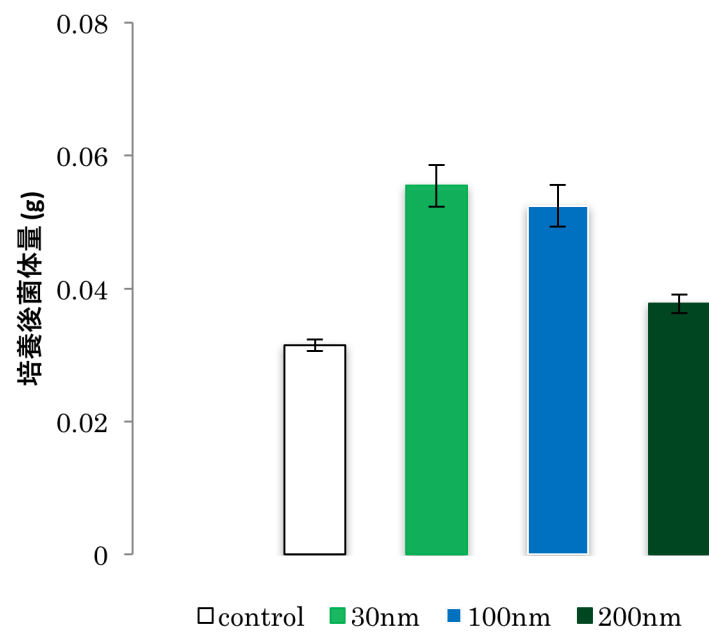


図 4-2, Iwa5b 株の菌体量測定結果. Control は水、添加したナノ粒子の濃度は 0.1%とした. 培養期間は 14 日.

Iwa5b 株の MnP 生産に対する IBCA ナノ粒子濃度の影響

Iwa5b 株における培養日数に対する培養液中 MnP 生産量の推移を図 4-3 に示した。培地に添加した IBCA ナノ粒子の培地中の終濃度は、それぞれの粒径で 0.05%、0.10%、0.20% とした。

30nm IBCA ナノ粒子終濃度が 0.05%および 0.10%のとき 6 日目に MnP 生産が開始し、8 日目に酵素量がピークに達した。(図 4-3, 上)しかし、その時点における量は 0.05%ではかなり低くなった。終濃度 0.20%では、MnP 生産は 8 日目に開始し、14 日目にピークに達した。そのときの酵素量は他の粒径よりも高い値を示した。粒径 200nm の条件ではナノ粒子濃度の増加につれて生産量が増加し、ピークまでの時期が遅れた。

200nm IBCA ナノ粒子については(図 4-3, 下)、終濃度が 0.05%のとき、4 日目に MnP 生産が開始し、6 日目に MnP の量がピークに達した。濃度 0.10%と比べると、ピークに達するまでの期間は短かったものの、最終的な値はほぼ同じ値になった。またピークが過ぎた後も培養終了まで酵素活性は持続した。終濃度 0.2%では MnP 生産は 4 日目に開始し、6 日目に酵素量がピークに達した。また比較条件と比べると、生産された酵素量は少なかった。結果的に、ナノ粒子の濃度が増えるにつれ MnP 生産量が低下する結果となった。

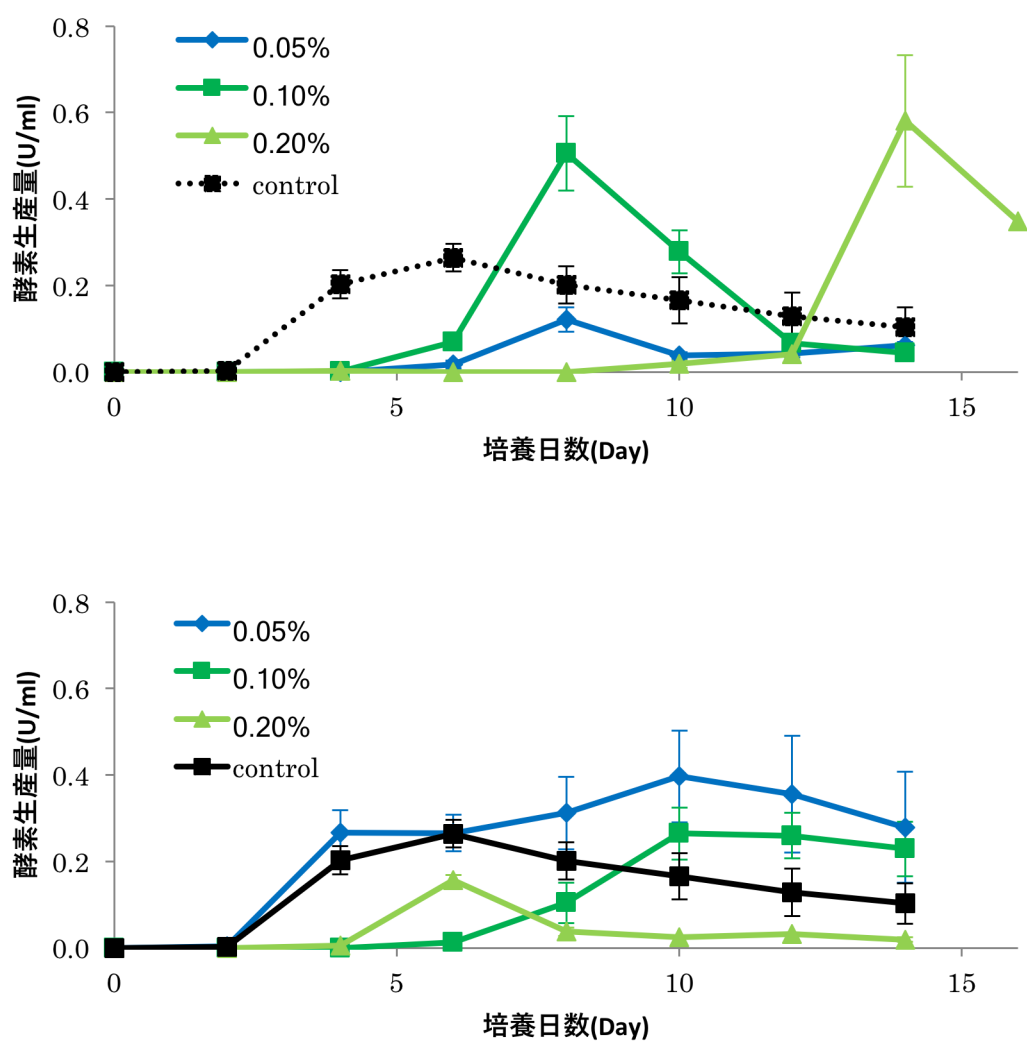


図 4-3, IBCA ナノ粒子の濃度変化による Iwa5b の MnP 生産量への影響.
(上 : 30nm, 下 : 200nm) 繰り返し条件 3 回. Control は水とした.

ガラスビーズ添加条件と IBCA ナノ粒子条件との MnP 生産量比較

ガラスビーズと IBCA ナノ粒子が、Iwa5b 株の Lac 及び MnP 生産量に与える影響を図 4-4 に示した。

ガラスビーズ添加条件では、Lac 及び MnP 共に 6 日目に酵素生産量のピークを迎え、その後緩やかに減少した。30nm 条件との比較を行ったところ、より酵素生産量が少なくなる結果となった。また今回の MnP 測定結果を control(水添加)条件と比較した際には、ガラスビーズ条件は通常時と同じ程度かそれよりも少ない酵素生産量を示した。

30nm ナノ粒子条件については、先述した通り 8 日目に大きく MnP 生産量が増加した。Lac 生産についても同様に 8 日目にピークが確認されたが、その生産量自体は MnP に比べて 6 分の 1 程度少なかった。

また、両条件共に Lac 生産量を増加させる働きは小さかった。

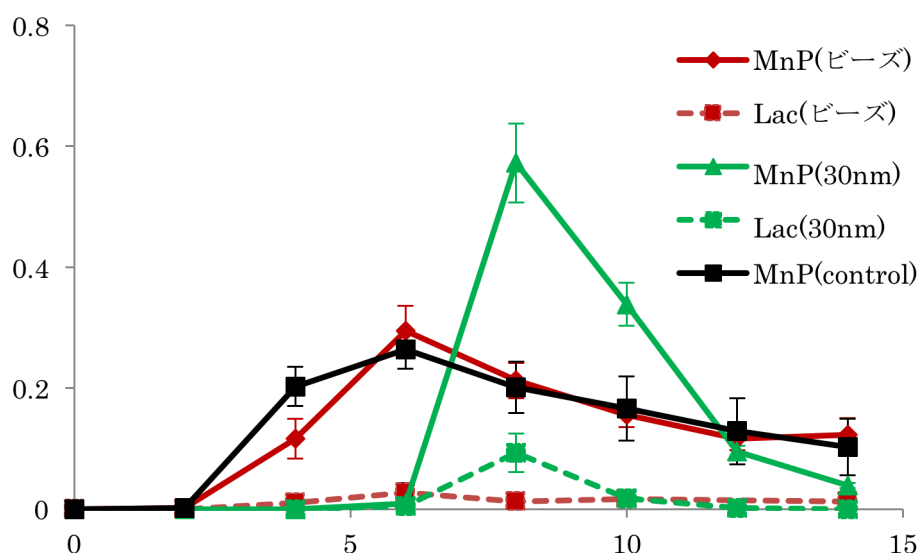


図 4-4, MnP 及び Lac の生産量測定結果. 繰り返し条件 3 回.

各酵素量の測定には同じフラスコからサンプリングした培養液を使用した.

分散剤添加時の MnP 生産量と菌体量測定

チカミルテックから提供された分散剤を終濃度 0.1%で添加した際の Iwa5b 株 MnP 生産量を図 4-5 に示した。

分散剤添加条件では 2 日目から酵素生産が開始されていた。これは control 条件(水添加)と同じタイミングであり、30nm 条件よりも 2 日ほど早かった。その後 8 日目に生産量のピークに達し、30nm 条件とほぼ同程度の MnP 生産量の値を示した。その後は 14 日目まで他条件と同じように緩やかに減少した。

図 4-6 には培養終了時の菌体量を示した。分散剤添加時の Iwa5b 株は MnP 生産量の増加が確認された 30nm 条件と異なり、菌体量を増やさず control 条件とほぼ同等の値を示す結果となった。

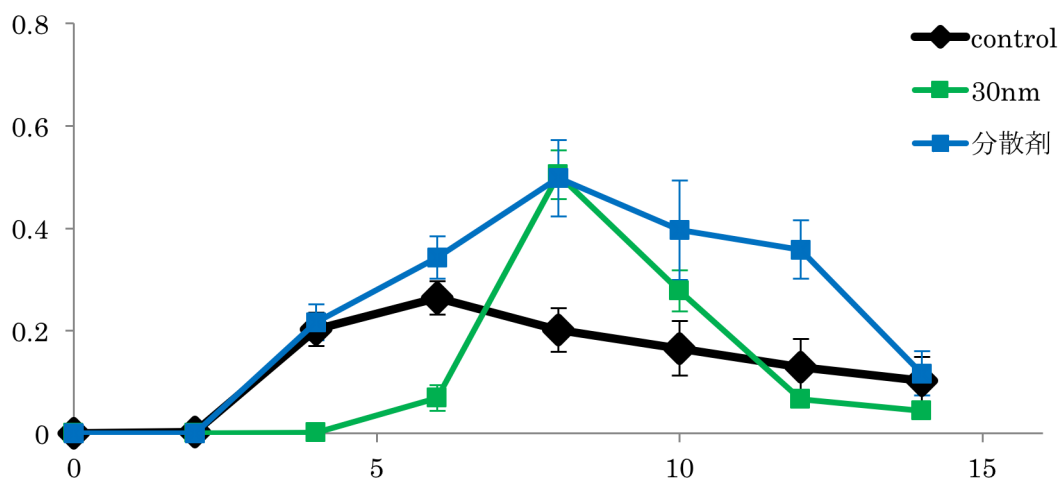


図 4-5, 分散剤添加時の Iwa5b 株 MnP 生産量測定結果.

比較条件は control(水)と 0.1% 30nmIBCA ナノ粒子. 繰り返し条件:control 及び 30nm

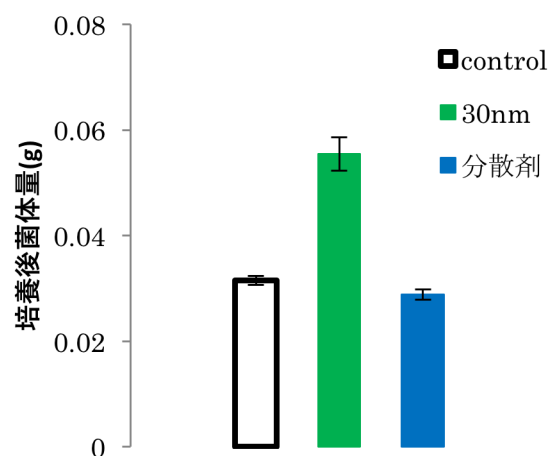


図 4-6, 分散剤添加時の Iwa5b 株培養後菌体量測定結果. 培養期間 14 日.

界面活性剤添加時の Iwa5b 株 MnP 生産量測定

6種類の界面活性剤を添加した際の Iwa5b 株 MnP 生産量を所定の培養日数ごとに測定し、図 4-7 に示した。

カチオン系界面活性剤である CDAB を終濃度 0.01% 及び 0.001% で調節した条件では、Iwa5b 株は MnP を全く生産しない結果となった。

アニオン系界面活性剤である NaDS 添加時、終濃度 0.0016% 条件において 4 日目に MnP 生産量の大幅な増加が確認された。また、酵素生産開始時期が 2 日目となり、他のどの条件よりも早い段階 MnP を生産している結果となった。一方でその前後である培養期間 2 日目及び 6 日目の酵素生産量は低く、4 日目のみの増加を示していた。アニオン系界面活性剤 SDS は、終濃度 0.01% 条件で control 条件（水添加）と同程度の MnP 生産量となった。ピークに至るまでの期間は 8 日となり、control 条件よりも 2 日ほど遅くなった。

ノニオン系界面活性剤である Tween20 及び Tween80 は終濃度 0.12% で control 条件よりも高い酵素生産量を示した。特にピーク時の Tween20 条件の MnP 生産量の値は、30nm IBCA ナノ粒子条件のピークの値と同程度になった。Tween80 条件については 8 日目に control 条件を上回る MnP 生産量を示したものの、30nm IBCA ナノ粒子条件よりも少ない値となった。

上記のうち、Iwa5b 株の MnP 生産量増加に貢献したと考えられたアニオン系界面活性剤 NaDS 及びノニオン系界面活性剤 Tween20 について、終濃度を変更して Iwa5b の酵素生産量を測定した結果を図 4-8 に示した。

NaDS 0.016% 条件下で Iwa5b 株は 14 日の間 MnP 活性が検出されなかった。また終濃度 0.00016% では Iwa5b 株の MnP 生産を確認し 4 日目にピークを迎えたものの、control 条件よりも終始少ない酵素生産量を示した（図 4-8, 上）。

Tween20 の終濃度 0.05% 及び 0.012% 条件では、共に control 条件の Iwa5b 株 MnP 生産量よりも減少した。また Tween20 条件では、培地中の終濃度が減少するにつれ Iwa5b 株の MnP 生産量も減少する傾向にあった（図 4-8, 下）。

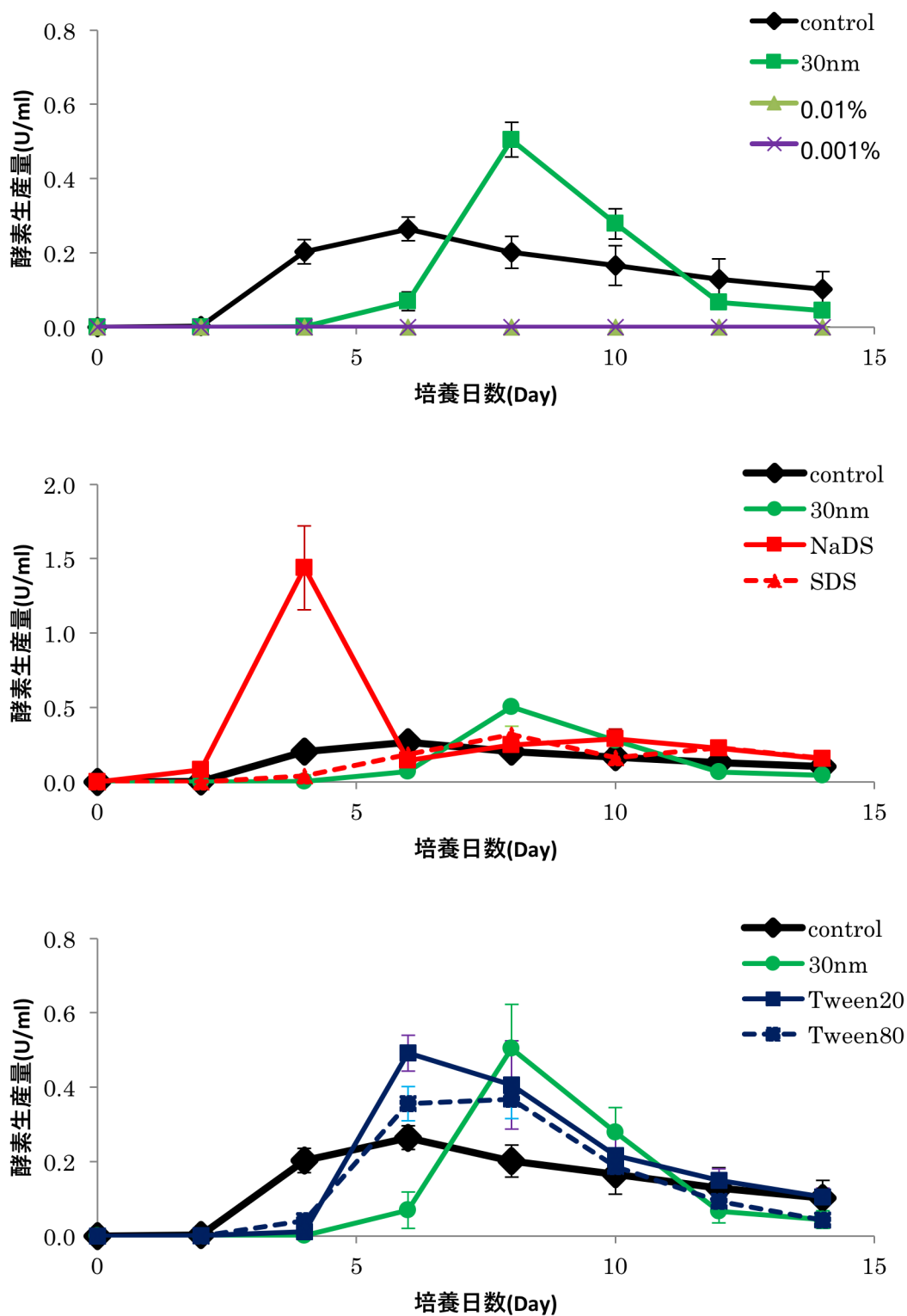


図 4-7, 界面活性剤添加による Iwa5b の MnP 生産量への影響. 30 nm 終濃度 0.1%とした. 繰り返し条件(比較条件を除く): NaDS 及び Tween20 6回, それ以外 3回とした. Control は水とした. (上: CDAB、中: SDS 及び NaDS、下: Tween20 及び Tween80)

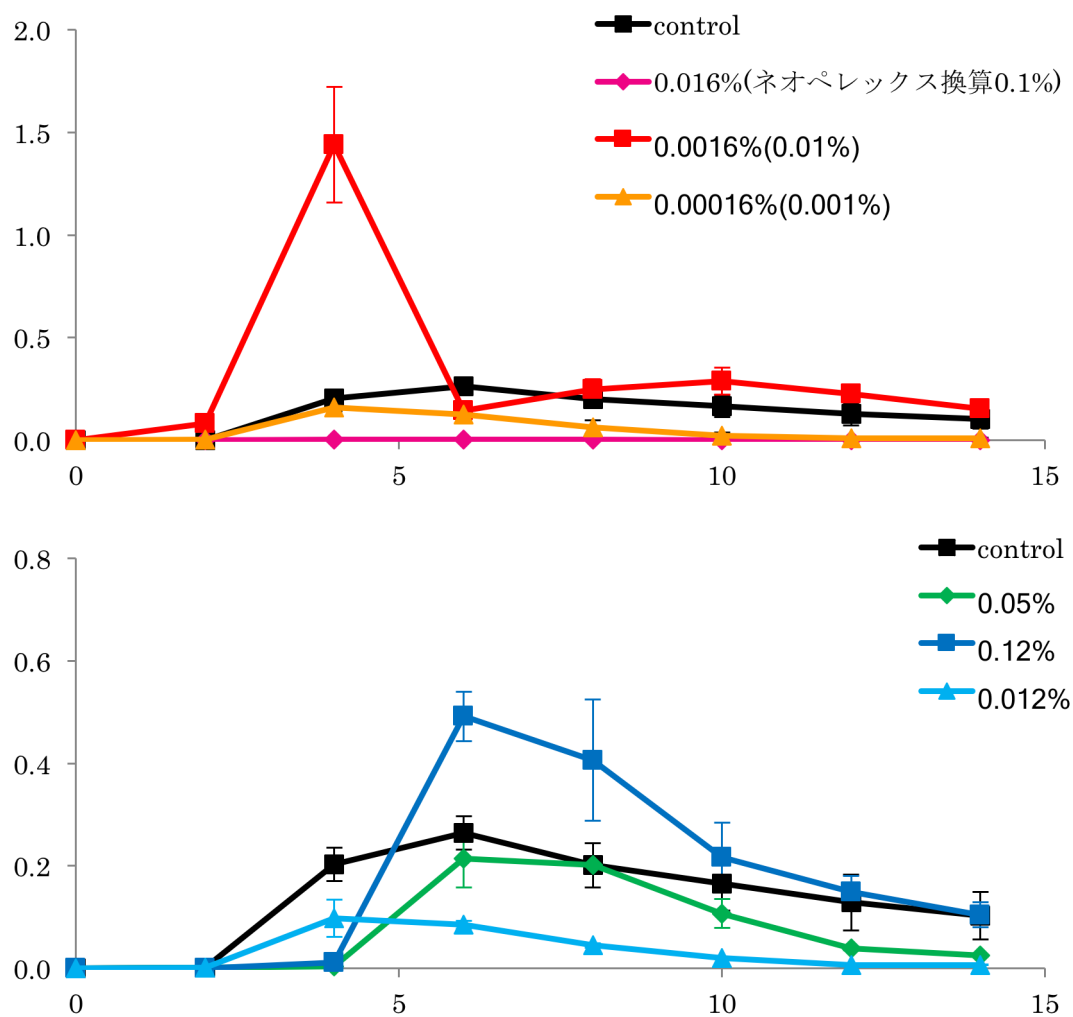


図 4-8, 界面活性剤濃度変化時の Iwa5b 酵素生産量への影響.

繰り返し条件(比較条件を除く): NaDS 0.0016%及び Tween20 0.1% 6 回, それ以外 3 回とした. Control は水とした. (上: NaDS 添加、下: Tween20 添加)

界面活性剤添加時の Iwa5b 株菌体量測定

4 種の界面活性剤を添加した際の Iwa5b 株培養終了時菌体量を 14 日目に測定し、図 4-9 及び 4-10 に示した。

カチオン系界面活性剤である CDAB 0.01% で調節した条件では、Iwa5b 株の菌体量が少なく測定困難だったため省略した。その中で終濃度 0.001% 条件での菌体量は control 条件よりも大幅に減少する結果となった。

アニオン系界面活性剤の条件については CDAB ほどではないものの、酵素生産量の増加が確認された NaDS 及び SDS 共に control 条件よりも菌体量が減少する結果となった。

ノニオン系界面活性剤 2 種類の結果として、Tween20 は 30nm IBCA ナノ粒子条件とほぼ同等の酵素生産量を示していたが、菌体量は control と同じ程度の値となった。また Tween80 条件についても、通常の培養条件と菌体量はあまり変化しなかった。

結果的に、IBCA ナノ粒子添加時の菌体量を上回る条件は確認できなかった。

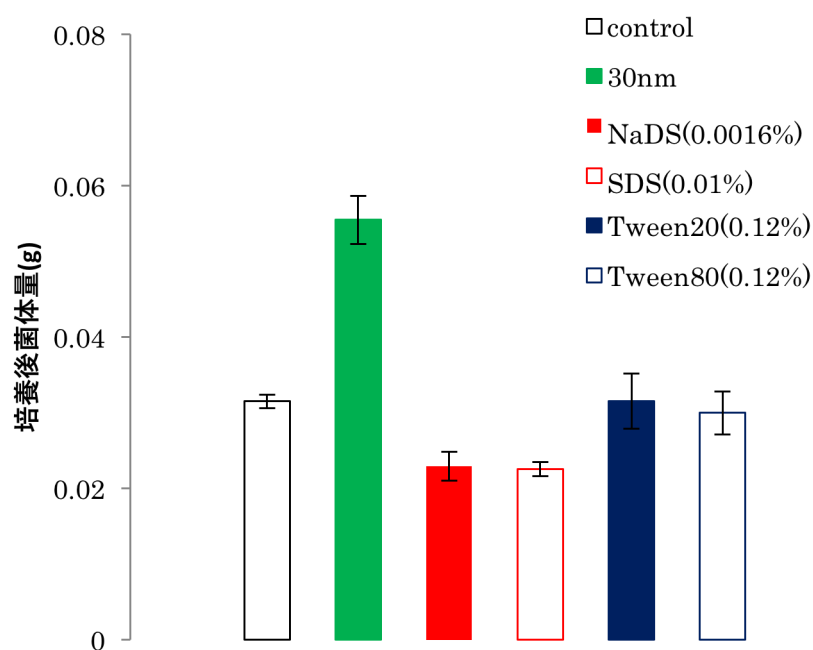


図 4-9, 界面活性剤添加時の Iwa5b 株菌体量測定結果. 培養期間は 14 日. Control は水とした.

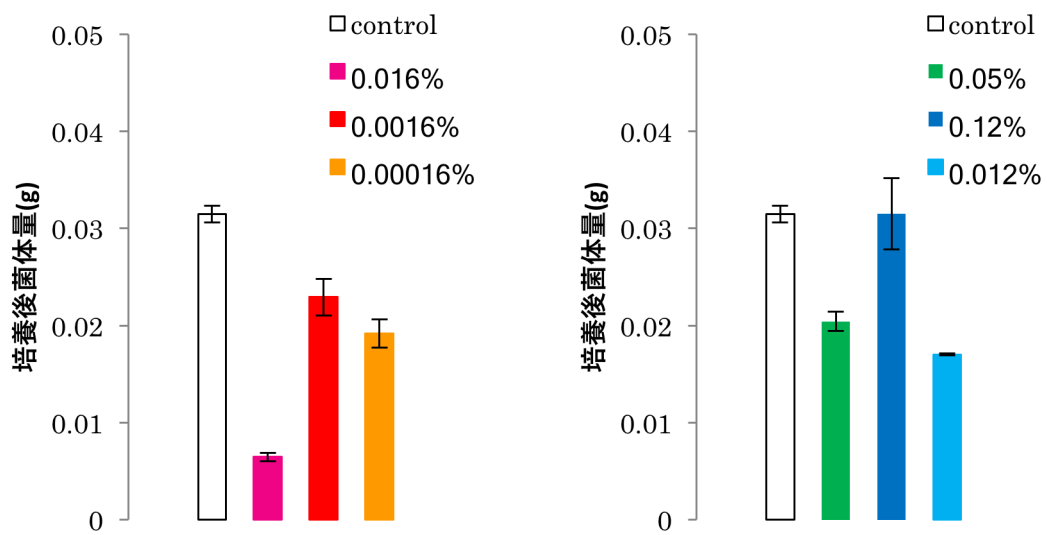


図 4-10, 濃度変化時の菌体量測定結果.右: NaDS, 左: Tween20. 培養期間は 14 日. Control は水とした.

デキストラン 70 添加時の Iwa5b 株 MnP 生産量及び菌体量

デキストラン 70 を 3 つの濃度で調製した培地において、培養時間ごとに Iwa5b 株の MnP 生産量及び 14 日目の菌体量を測定し、図 4-11, 4-12 に示した。

デキストラン 70 の濃度 0.2% 条件の場合、培養期間中の MnP 生産量は control 条件(水)よりも低かった。菌体量についても、control よりも減少していることが示された。1.0% 条件では、4 日目に MnP 生産量が control よりも増加したものの、その後は低い値となった。一方で菌体量は 0.2% 条件よりも増加しており、control と同じ程度の値となった。また、2.0% 条件については、1.0% 条件よりも MnP 生産量は減少したものの、菌体量は control 条件を上回り 30nm IBCA ナノ粒子条件と同程度の値まで増加した。

傾向として、デキストラン 70 は濃度が高いほど菌体量を増加させることが示された。

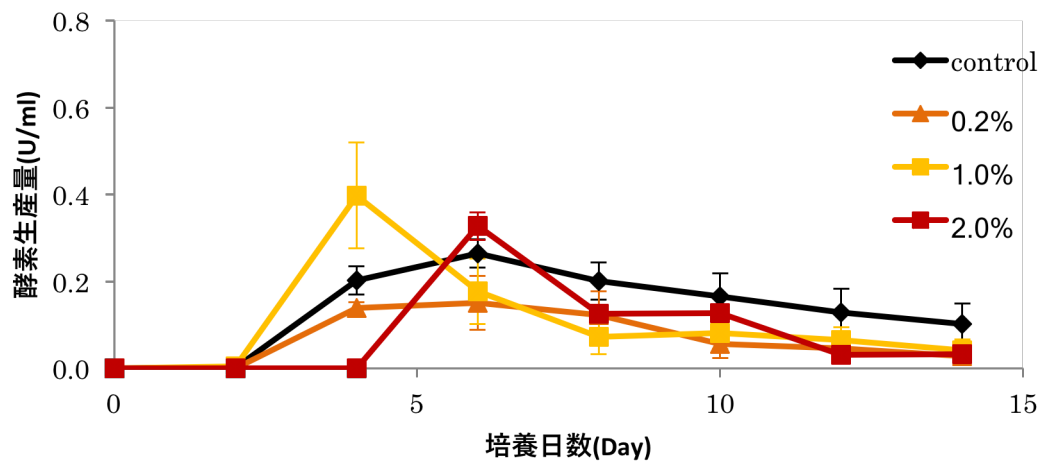


図 4-11, デキストラン 70 添加時の Iwa5b 株 MnP 生産量.
デキストラン 70 条件は全て繰り返し条件 3 回とした. Control は水とした.

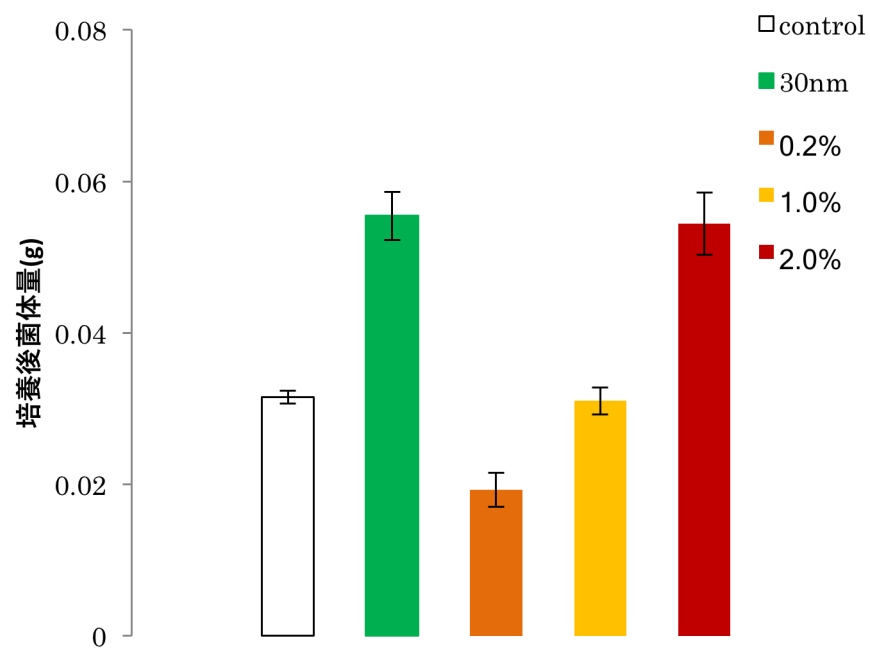


図 4-12, デキストラン 70 添加時の Iwa5b 株菌体量測定結果. 培養期間は 14 日とした.
Control は水、30 nm の IBCA ナノ粒子の添加濃度は 0.1%とした.

栄養源量変化時の MnP 生産量及び菌体量測定

液体培地の組成を表 4 のように変化させて Iwa5b 株を培養、MnP 生産量及び 14 日目の菌体量を測定して、図 4-13, 4-14 に示した。

糖源である Glucose を 1.0%とした際の酵素生産量は、栄養源が豊富であるにもかかわらず control(水添加)条件と同等か、それよりも少ない値となった。その一方で菌体量は 0.1 グラムを上回り、通常条件やナノ粒子条件よりも大幅に増加していることが示された。NH₄NH₃ 1.0%条件では酵素生産量は 14 日目まで増加傾向にあり、最終的な値では 30nm IBCA ナノ粒子条件を上回る事となった。一方で菌体量の増加は見られず、control 条件と同じ程度の数値になった。Yeast extract については 1.0%及び 2.0%両濃度条件について酵素生産量の大幅な増加が確認された。また 1.0%濃度の場合は 6 日目にピークが訪れた後、酵素生産量は低下したが、2.0%では培養 14 日目まで増加傾向にあることが確認された。菌体量についても両条件共に通常時より増加していたが、Glucose 1.0%条件を上回ることにはなかった。

表 4. 栄養源量変更時の各条件の培地組成の詳細。

表に振られた番号は次のグラフに対応している

培地 1. Glucose 10 倍

試薬	濃度(w/v%)
Glucose	1.0
NH ₄ NO ₃	0.1
KH ₂ PO ₄	0.08
Na ₂ HPO ₄	0.02
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.05
Yeast extract	0.2

培地 2. NH₄NO₃ 10 倍

試薬	濃度(w/v%)
Glucose	0.1
NH ₄ NO ₃	1.0
KH ₂ PO ₄	0.08
Na ₂ HPO ₄	0.02
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.05
Yeast extract	0.2

培地 3. Yeast extract 5 倍

試薬	濃度(w/v%)
Glucose	0.1
NH ₄ NO ₃	0.1
KH ₂ PO ₄	0.08
Na ₂ HPO ₄	0.02
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.05
Yeast extract	1.0

培地 4. Yeast extract 10 倍

試薬	濃度(w/v%)
Glucose	0.1
NH ₄ NO ₃	0.1
KH ₂ PO ₄	0.08
Na ₂ HPO ₄	0.02
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.05
Yeast extract	2.0

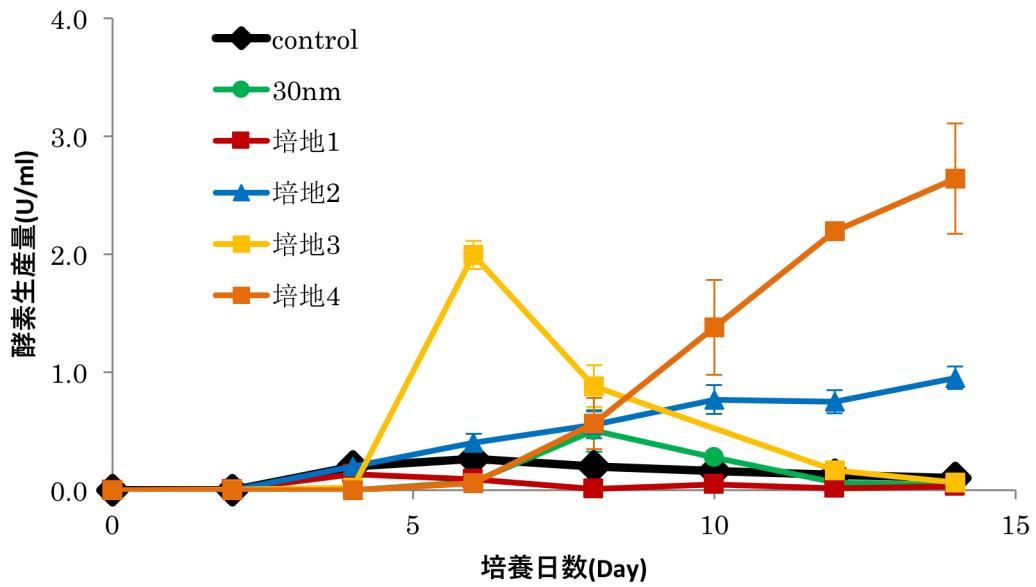


図 4-13, 栄養源調節ごとの Iwa5b 株の MnP 生産量. 繰り返し条件 3 回. Control は水とした.

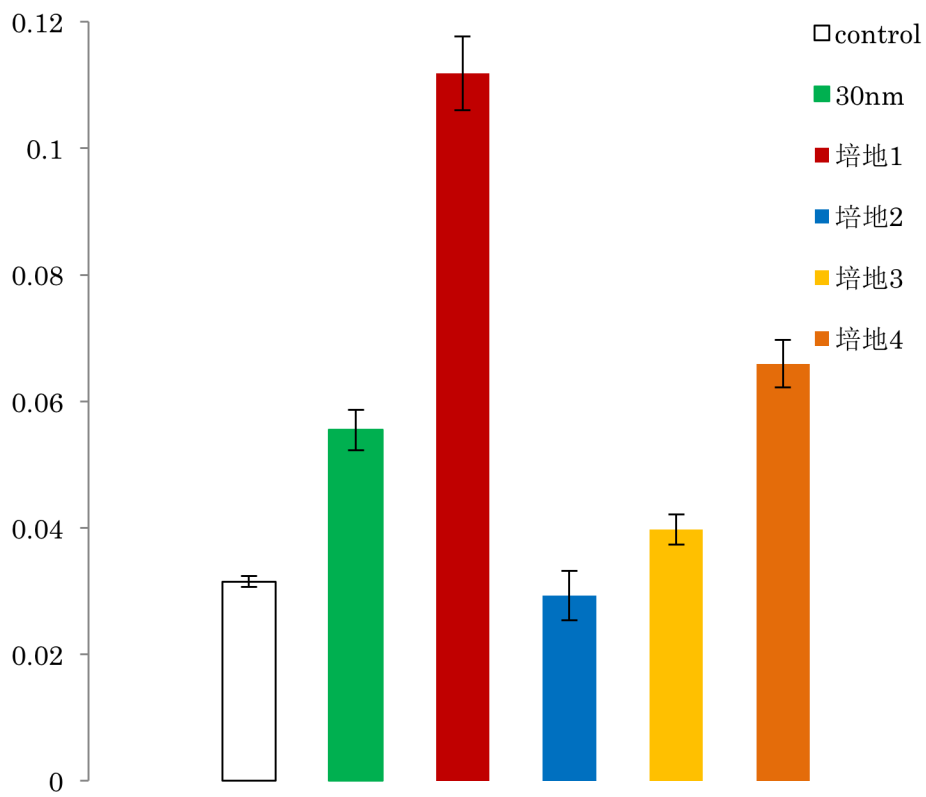


図 4-14, 栄養源調整ごとの Iwa5b 株菌体量測定結果. 培養期間は 14 日. Control は水とした.

5. 考察

IBCA ナノ粒子によって酵素生産量及び菌体量を増加させる菌株

今回は MnP 生産能に優れた Iwa5b 以外に、特許株である *B. adusta* FERM P-20326 や、RBBR 培地分解能に優れた菌株等計 6 種類に対して、IBCA ナノ粒子が酵素生産に与える影響を調べた。その結果、Iwa5b にナノ粒子を添加した条件が、最も酵素生産を増加させるということがわかった。30nm 及び 200nm それぞれのナノ粒子を添加した場合において、比較条件よりも酵素生産量は増加したことから、Iwa5b 株に対して酵素生産を促すためにナノ粒子を添加する手法は有効だと思われる。また他の菌株においても、ナノ粒子を添加することで比較条件とは異なる酵素生産の推移が見られたことから、増加傾向でなくとも菌株の酵素生産に対してナノ粒子が影響を与えていると考えられた。今後とも、他の菌株に対してナノ粒子との培養を行うことで、酵素生産を増加させる効果を与える菌株を探ることが重要になると考える。

IBCA ナノ粒子条件及びガラスビーズ条件の MnP 生産量比較

ガラスビーズを添加した際に MnP 生産量が増加する傾向が先行研究において確認されていたため、IBCA ナノ粒子との比較を行い、優劣を確認した。結果として、MnP 生産の開始時期はビーズ添加時のほうが早くなったが、増加量に対してはナノ粒子添加条件が優れる結果となった。また担子菌の菌糸が傷つけられた際に、その修復のために Lac が分泌されるという報告があった(5)。そのため、菌体への物理的な刺激が大きいと考えられるビーズ条件の Lac の生産量について測定及び比較を行ったが、ナノ粒子とビーズどちらにおいても MnP ほどの生産量増加は確認できなかった。これについては、ビーズよりもさらに粒径の小さいナノ粒子のほうが菌体に刺激を与えやすかった可能性がある。また、そもそも Iwa5b 株が Lac 生産能力に長けておらず結果的にナノ粒子やガラスビーズが影響を与えなかったことが考えられた。そのため、Lac 生産に優れた他の菌株と培養を行い、ビーズ等が木材腐朽菌の MnP 以外の生産に与える影響を再度検討する必要がある。

IBCA ナノ粒子濃度と MnP 生産量の関係について

IBCA ナノ粒子添加による MnP 生産量増加が確認された Iwa5b 株に対して、ナノ粒子の濃度の違いによる MnP 生産量への影響を検討した。結果的に、粒径 200nm のナノ粒子に関しては、試行間の差が大きくなったものの、比較的濃度を低くした方が酵素生産量を増

加させる傾向にあると考えられた。また、粒径が 30nm である場合は、濃度が濃い方が MnP 生産開始時期は遅れるものの、その値は高くなると考えられた。しかし試行間の差の大きさから、その傾向が今後とも再現されるかは確定できない。以上の結果から、ナノ粒子の濃度は菌株の MnP 生産開始時期と生産量両方に関係し、最も生産効率を上げる濃度が存在すると考えられた。その濃度については、今後もさらに検討していく必要がある。その一方で、濃度変化ごとに Iwa5b 株が示した MnP 生産の増減については、振れ幅が大きく再現性があるとはいえなかった。そのため、菌株の MnP 生産量増加に影響を与えているものとして、ナノ粒子以外の要因を検討していく必要があると考えられた。

分散剤及び界面活性剤添加時の MnP 生産量増加について

IBCA ナノ粒子を添加した際の Iwa5b 株 MnP 生産量増加が別の要因にある可能性を考え、チカミルテックから提供された分散剤を加えた培養を行った。分散剤は、ナノ粒子の製造及び保存に用いられている。結果として、Iwa5b 株に対して最も MnP 生産量を増加させた粒径 30nm ナノ粒子条件と同じ程度のピーク値を示す結果となった。しかし、その増加及び減少の推移については分散剤のほうが穏やかであり、両条件で大きな違いが表れた。また、MnP 生産開始時期は control(水添加)条件と同じ程度となった。

このことから、Iwa5b 株の MnP 生産量に対し、ナノ粒子の製造及び保存に用いられる分散剤は影響を与えることが示唆された。実際に担子菌とは異なるが、真菌である *Aspergillus niger* や *Trichoderma harzianum* においては、アニオン系界面活性剤が含まれる洗剤を培地中に添加した際に、それらが生産する酵素量が増加傾向にあることが報告されている(10, 11)。このことから Iwa5b 株に対して、分散剤に含まれる界面活性剤の抗菌性が、MnP などの生産量増加の要因に繋がっていることが推測された。

界面活性剤において、アニオン系及びノニオン系の 4 種類を使用した、そのうち NaDS において最も MnP 生産量が高くなる結果が得られた。これについては、NaDS が培地内の電位をマイナスに傾け、菌株の膜透過性に影響を及ぼして栄養の透過速度を鈍くしたことが原因の候補だと考えられる。これにより担子菌は飢餓ストレスを早い段階で受け、酵素生産の急激な増減を引き起こしたと考察した。しかし、細胞壁で覆われる担子菌に対してその影響が大きいとは限らない。また NaDS は生分解性の高さが特徴であり、菌体が分解し栄養源とした可能性も考えられる。こういった事情から、今後も他の要因についても検討する必要がある。SDS については菌体への殺菌効果は確認されなかったが、MnP 生産量は control 条件(水)とほとんど変わらなかった。このように同じアニオン系界面活性剤でも MnP の生産量が異なったが、今回の測定では NaDS ではなくネオペレックス換算の濃度を基準として SDS の調整を行っていた。また、繰り返し培養の中で、図 5-1 の様に NaDS 条件の酵素生産量は 1 日で激しい増加と減少を起こしていることが示されている。そのため、今後は濃度を再設定して SDS の培養を行う必要がある。

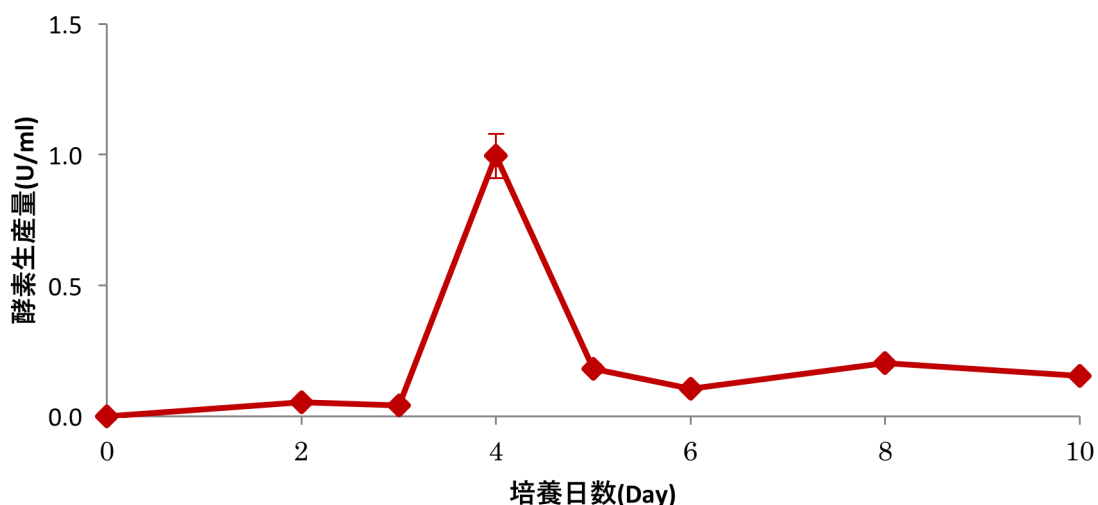


図 5-1, NaDS 測定 of 酵素生産量結果. 3 日目、4 日目、5 日目の結果を追加したもの.
繰り返し条件は 3 回.

ノニオン系界面活性剤添加時の酵素生産量は Tween20 及び Tween80 共に control 条件 (水) よりも増加する傾向にあり、特に 30nm IBCA ナノ粒子条件と Tween20 条件の MnP 生産量推移は類似していた。このことからナノ粒子条件の酵素生産量増加には Tween20 が影響しているとも考えられた。しかし後述する通り、Iwa5b 株の培養後の菌体重量については大きく差が開いており、すべてが Tween20 の影響とは断言できなかった。これら界面活性剤が酵素生産に影響を与えた要因としては抗菌的なストレス以外に、その構造内に含まれる脂肪酸が栄養源として吸収された事が考えられるが、その場合は菌体量に与える影響を検討しなければならない。また他研究論文では、*Phanerochaete sordidas* について Tween80 を添加した培地で培養を行ったところ、MnP を用いたクラフトパルプ漂白能力が向上したという報告がある(12)。しかしこれは、Tween80 が酵素活性を高めたことが原因であると考えられている。そのような報告から、本研究の結果においても酵素生産だけではなく酵素活性についても検討を行う必要があると考えられた。

カチオン系界面活性剤の条件では CDAB についての条件で培養を行ったが、0.001%濃度までで菌体の成長が確認できなかったことから断念した。

また、界面活性剤が Iwa5b 株の MnP 生産量増加に影響を与えられることは確認されたが、ナノ粒子についても、30nm の粒径においては酵素生産開始時期が遅延し、濃度が増加するごとに更にその時期が遅延する結果が示されている。そのためナノ粒子についても Iwa5b 株の酵素生産に影響を与える要因があると考えられた。その要因として、本学大濱研究室の中で、IBCA ナノ粒子のゼータ電位がマイナスに傾いていることが報告されていることから、培地中にナノ粒子が分散することで菌周辺と菌内の電位差を縮め、栄養交換速

度の低下を招いたことが挙げられる。しかし、ナノ粒子が担子菌に与える抗菌性においては未知の部分も多く、その作用機序の理解が今後必要となる。

界面活性剤添加条件における MnP 生産量の再現性

界面活性剤添加時の MnP 生産量増加については、NaDS 及び Tween20 条件にある程度の再現性が確認された(図 5-2)。なお、その他の界面活性剤条件については繰り返し回数が少なく、再現性について検討の余地がある。

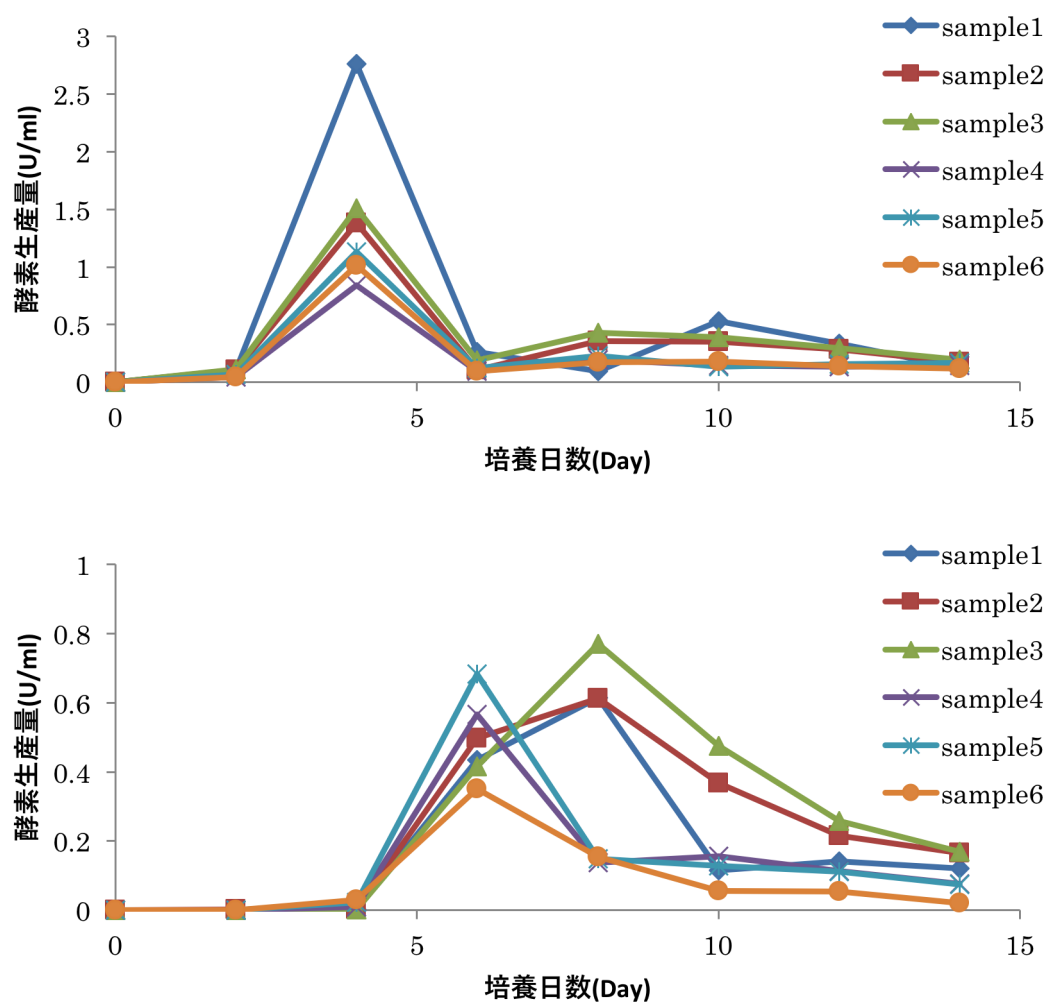


図 5-2, NaDS 及び Tween20 の繰り返し条件ごとの MnP 生産量測定結果。
(上 : NaDS 0.0016% , 下 : Tween20 0.1%)

NaDS についてはある程度 MnP 生産量に差が見られたものの、2 日目からの酵素生産開始、4 日目の急激な増加と減少、その後の平坦な数値等、グラフの特徴がどれも共通していることが示された。Tween20 については、ほとんどの条件で 4 日目から酵素生産が開始し、6 日目もしくは 8 日目にピークに達することが示された。このことから、NaDS ほどではないが Tween20 の効果は再現性が高いということが考えられた。元々 Iwa5b 株の傾向として、MnP 生産量の推移には大きなばらつきが生じる事が先行研究で知られており、界面活性剤の添加はそのばらつきをある程度抑えられることが考えられた。一方で、30nm の IBCA ナノ粒子を加える事で Iwa5b 株の酵素生産に規則性が表れる事も確認されている。今後はこの共通点について、界面活性剤とナノ粒子が同じ要因で影響を与えたのか、それとも別々に要因があるのかを調査する必要がある。

IBCA ナノ粒子及び界面活性剤添加時の菌体量の変化

菌糸成長の外観について、培地条件ごとにその成長度合いに違いが生じていることが確認されていた(写真 6)。そこで Iwa5b 株の菌体量に差が表れていると考え、測定を行ったところ、界面活性剤と IBCA ナノ粒子の添加条件ではその重量に違いが表れた。ナノ粒子添加時には、酵素生産量の増減に関わらず、control 条件よりも菌体量が増加していることが示された。また、30nm から 200nm までの条件の中では、粒径が小さくなるほど菌体量が増加する傾向にあった。この原因について、ナノ粒子の原料であり生分解性を持つイソブチルシアノアクリレートが菌株に栄養源として分解・吸収されたと考えられた(13)。実際に先行研究において、粒度分布及び培地濁度よりで培地中からナノ粒子が減少または分解消滅したと考えられる。しかし、栄養源は酵素生産量にも影響を与える可能性があることから、今後もその二つについて検討を続ける必要がある。また粒径によって菌体量に差が生じた件については、径が小さいほどに表面積が大きくなることから、担子菌の分解を受けやすくなったのではないかと考えられた。この現象についての理解を深めるためには、生分解性を持たない他ナノ粒子での培養実験や培養日数ごとの IBCA ナノ粒子の粒径を測定する事などが必要である。

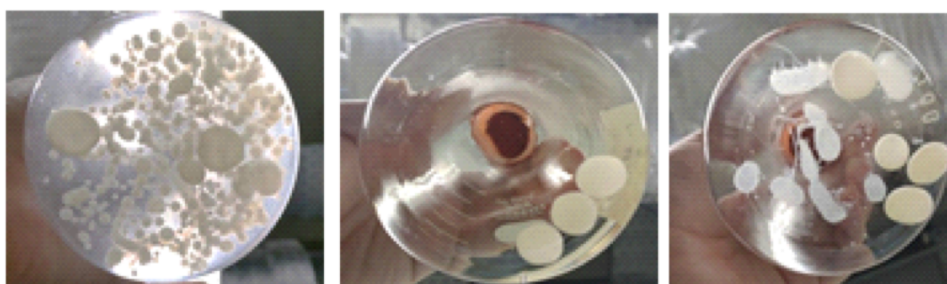


写真 6, Iwa5b 株培養中の各条件菌糸外観.

(左 : 30nm IBCA ナノ粒子, 中 : NaDS 0.0016%, 右 : Tween20 0.1%)

一方の界面活性剤の条件では、NaDS や Tween20 の条件では MnP 生産量が大きく増加したにも関わらず、菌体量は control 条件と比べると増えることはなかった。アニオン系界面活性剤の 2 種については僅かに菌体量が減少していることが分かった。この要因として、元々殺菌作用のある界面活性剤の中に Iwa5b 株の栄養源となるようなものが少ないことが挙げられる。更にノニオン系よりもアニオン系界面活性剤のほうがタンパク質変性や膜タンパク可溶化などの影響が高く、殺菌性に優れたためだと考えられる。しかし今回使用した直鎖 NaDS は生分解性に優れた物質であり Tween には脂肪酸が含まれているため、担子菌の分解を受けて吸収された可能性も考えられる。これらについては担子菌に対する分解性が言及された資料が少ないため、分枝型の NaDS を用いて培養する等、今後の検討が望まれる。

界面活性剤が他菌株の酵素生産量に与える影響について

本研究で用いた界面活性剤は、Iwa5b 株の MnP 生産に対して影響を与えていたことから、他の菌株に対してもその影響が見られるのではないかと考えた。そこで予備実験として MnP 高生産菌ヤケイロタケ FERM P-20326 株に対して界面活性剤とナノ粒子を添加して培養を行ったものの、MnP 生産量増加に与える影響は少ないということが示された(図 5-3)。

このことから、界面活性剤添加による MnP 生産量の増加現象は、他の菌株でも起こりうる共通した現象ではないと考えられた。これらについての知見を深めるために、更に他の菌株と界面活性剤との培養を継続し、MnP 生産に影響が見られた菌株と Iwa5b 株の比較検討を続けていく必要がある。

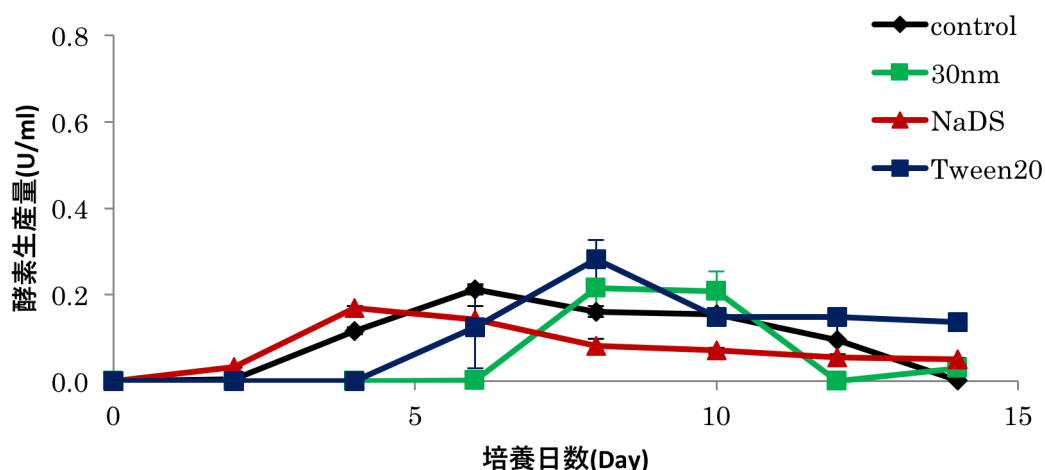


図 5-3, 培養液に加えた添加物と P-20326 株の MnP 生産量の関係. Control は水とした. 各条件における繰り返しは 3 回.

各栄養源が Iwa5b 株に与える影響

今回は高炭素低窒素条件下でヤケイロタケ由来の菌株の MnP 生産量が増加したという報告を受け、Glucose と NH_3NO_4 及び Yeast extract をそれぞれ増加させた培地内で培養を行った。糖源である Glucose のみを増加させた場合、MnP 生産量は低下し菌体量の増加が見られた。そして窒素源である NH_3NO_4 を増加させた条件ではその逆の現象が起こり、同じく窒素源かつその他ミネラル等を含む Yeast 条件では、更に MnP 生産量と菌体量が増加する結果となった。これは前述した報告とは異なる結果であり、Iwa5b 株の特徴を示したとも考えられた。しかし、Iwa5b 株と同じく *Bjerkandera* 属の菌株において、窒素源が過剰な場合に MnP 生産量が増加する菌株の存在が報告されている(14, 15)。更に、担子菌ではないものの、炭素源が不足する事で糖質活性酵素をコードする遺伝子の発現量が増加する *Aspergillus* 属の菌が確認されていることから、酵素生産量増加の要因は窒素源の増加なのか、炭素源の低下なのかについても検討が必要だと考えられる (16)。今後については Iwa5b 株以外の菌株を使用し、栄養源に偏りが生じた場合に菌株ごとにどのような影響を受けるかを分類することで、Iwa5b 株への理解を深められると考える。

デキストラン 70 が Iwa5b 株に与える影響

ナノ粒子製造に用いられる試薬の 1 つとして、多糖類の一種であるデキストラン 70 に注目し MnP 生産量を測定したが、control 条件（水）と比較した際の有意な増加は今回確認できなかった。しかし、菌体量についてはデキストラン濃度が高くなるにつれて増加傾向にあることが示された。先に述べた通りデキストランは多糖であることから、担子菌が栄養源として吸収し、菌体量を増加させたことが考えられる。仮に分解され栄養源として吸収されていた場合、高い Glucose 添加条件で菌体量が増加した現象を裏付けるような結果となった。

今後は、デキストランが実際に分解されたのかを確認するために、HPLC 等を用いて培養液中の糖濃度を測定することが求められると考える。

6. 結論

本研究では、Iwa5b は 30nm IBCA ナノ粒子と共に培養することでリグニン分解酵素のひとつである MnP 生産量を増加させることがわかった。それは、本研究室で報告されていたガラスビーズ添加時の MnP 生産量よりも高い値となった。一方で、RBBR 分解能の高い他の担子菌株は IBCA ナノ粒子を添加することによる MnP 生産量の増加は見られなかった。

しかし、Iwa5b に対して 30nm ナノ粒子以外の粒径や濃度で培養を行っても MnP 生産量に規則性のある変化が見られなかったことから、生産量増加の要因はナノ粒子とは別にあると考えられた。その中でナノ粒子製造に用いられている分散剤添加時に MnP 生産量が増加したことから、それに使用されている界面活性剤に注目して Iwa5b 株との培養を行ったところ、いくつかの種類で菌体量を増加させずとも、Iwa5b 株の MnP 生産量増加が確認された。その要因としては膜透過への影響やタンパク質変性等の抗菌的要因と、分解能の高さや構造内栄養分が影響を与えた栄養源としての働きが考えられる。しかし同じ系列の界面活性剤や *B. adusta* 由来の菌株でも MnP 生産量の増加は確認できないことも示された。そのため今後とも他の菌株・界面活性剤・濃度で培養し、知見を深める必要がある。

また、ナノ粒子についても菌糸成長の外観から菌体量に影響を与えていると考えられ、他条件との乾燥重量を比較したところ、ナノ粒子添加時に菌体量が他条件より有意に増加していることが確認された。また粒径が細くなるごとにその値が増加する傾向が分かった。これらの現象の考察として、原料であるイソブチルシアノアクリレートに生分解性があることから(15)、担子菌が栄養源として分解・吸収したことが考えられる。また粒径ごとに差が生じた件については、ナノ粒子が細かいほどに表面積が大きくなるために担子菌の分解を受けやすかったのではないかと考えられた。しかし、これらについてはナノ粒子が MnP 生産量に影響を与えられるとも考えられ、今後はナノ粒子の種類や粒度分布について更に測定を続けながらも菌体量と MnP 生産量両方の要素について検討を続ける必要がある。

以上の結果から、IBCA ナノ粒子と界面活性剤はそれぞれ Iwa5b 株の活動に別々に影響を与えていることが考えられた。

また、栄養源の偏りが Iwa5b 株の酵素生産に与える影響について検討した。その結果、他の研究論文で報告された *B. adusta* 株とは異なる動向を示し、高炭素源低窒素源の条件では菌体量が増加し低炭素源高窒素源条件では酵素生産量の大幅な増加が示された。この要因については、炭素源及び窒素源が栄養源として高いことに意味があるのか、低いことに意味があるのかが不明であり、窒素源が MnP 生産量増加に影響を与えているというような決定はできない。先に述べた通り、他の菌株で傾向が異なると思われるため今後とも同条件で Iwa5b 株以外の菌株を検討していく必要がある。

7. 謝辞

本研究を行うにあたって、抗菌剤及び分散剤を提供して頂いたチカミルテック株式会社様、抗菌剤をお譲りいただいた本学分子発生制御学研究室 蒲池雄介教授にお礼申し上げます。

また自身の研究活動及び大学生活を支えてくださった同研究室の皆様、論文作成にあたりご指導いただいた堀沢栄教授に深く感謝申し上げます。

8. 参考文献

1. Y. Nakamura et al., (1999) Lignin-degrading enzyme production by *Bjerkandera adusta* immobilized on polyurethane foam, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88(1), 41-47.
2. 城武 昇一, (2011) 新しい抗菌機序を有するナノポリマーと抗生物質耐性菌への応用, *コンバーテック* 39(2), 112-116.
3. AJS Al-Azab et al. (2021) A resin cyanoacrylate nanoparticle as an acute cell death inducer to broad spectrum of microalgae, *Algal Research* 54, 102191.
4. H Hirai et al., (1994) Screening of Lignin-Degrading Fungi and Their Ligninolytic Enzyme Activities during Biological Bleaching of Kraft Pulp, *Mokuzai Gakkaishi* 40(9), 980-986.
5. 桃原 郁夫, (1995) 木材腐朽の酵素学(II)-リグニン生分解に関わる酵素-, *木材保存*, 21(4), 163-170.
6. H Ebrahimi et al., (2014) An investigation into the parameters affecting preparation of polybutyl cyanoacrylate nanoparticles by emulsion polymerization, *Indian journal of clinical biochemistry* 29(3), 357-361.
7. 千頭 邦夫ら, 特開 2017-81852 抗菌剤および抗菌剤の製造方法
<https://ipforce.jp/patent-jp-A-2017-81852>.
8. T Kosuri et al., (2010) Effect of Various Surfactants (Cationic, Anionic and Non-Ionic) on the Growth of *Aspergillus parasiticus* (NRRL 2999) in Relation to Aflatoxin Production, *Mycotoxin Research* 26(3), 155-170.
9. H Kofujita et al., (1991) Alkyl-aryl cleavage of Phenolic β -O-4 lignin substructure model compound by Mn(II)-peroxidase isolated from *Pleurotus ostreatus*, *Mokuzai Gakkaishi* 37(6), 556-561.

10. V Jakovljevic et al., (2016) Capacity of *Aspergillus niger* to Degrade Anionic Surfactants and Coproduce the Detergent Compatible Enzymes, *Applied Biochemistry and Microbiology* 52(2), 183-189.
11. V Jakovljevic et al., (2015) The potential application of fungus *Trichoderma harzianum* Rifai in biodegradation of detergent and industry, *chemical industry & chemical engineering quarterly* 21(1), 131-139.
12. R Kondo et al., (1995) Bleaching of Hardwood Kraft Pulp with Manganese Peroxidase Secreted from *Phanerochaete sordida* YK-624, *Applied and Environmental Microbiology* 60(12), 4359-4363.
13. 宮入 祐夫, (1999) 生体材料の接着技術, 表面化学, 20(9), 629-633
14. T Mester et al., (1996) Nutrient regulation of extracellular peroxidases in the white rot fungus, *Bjerkandera* sp. strain BOS55, *Applied Microbiology and Biotechnology* 44(6), 778-784.
15. A Tripathi et al., (2012) Extracellular Ligninolytic Enzymes in *Bjerkandera adusta* and *Lentinus squarrosulus*, *Indian Journal of Microbiology* 52(3), 381-387.
16. JM van Munster et al., (2014) The role of carbon starvation in the induction of enzymes that degrade plant-derived carbohydrates in *Aspergillus niger*, *Fungal Genetics and Biology* 72, 34-47.

大まかな変更点

- ・酵素を **MnP** で統一しました
- ・ **Control** に水添加の文字を追加しました。
- ・結果の部分でいきなり分散剤のグラフを示してしまっていたので、実験手法に分散剤濃度などについて表記しました。
- ・ガラスビーズの測定結果に **MnP** の **Control** 条件測定結果を追加しました。
- ・栄養源濃度変化時の測定結果について、培地の票とそれに合わせたグラフの凡例に変更しました。