



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	Biotechnological Production of Pentoses from Lignocellulosic Biomass by Fungal Xylanolytic Enzymes( 内容の要旨 )
Author(s)	A.K.M. Shofiqur Rahman
Report No.(Doctoral Degree)	博士(農学) 甲第305号
Issue Date	2003-03-13
Type	博士論文
Version	
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2646">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2646</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏 名 (本国籍)	A.K.M.Shofiqur Rahman (バングラデシュ人民共和国)
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	農博甲第 305 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 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	Biotechnological Production of Pentoses from Lignocellulosic Biomass by Fungal Xylanolytic Enzymes (カビのキシラン分解酵素を用いたリグノセル ロース系バイオマスからのペントースの生産)
審査委員会	主査 岐阜大学 教授 高見澤 一 裕 副査 岐阜大学 助教授 河 合 真 吾 副査 静岡大学 教授 田 原 康 孝 副査 信州大学 教授 入 江 鏡 三 副査 岐阜大学 教授 加 藤 宏 治

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

30年後には石油が枯渇し、地球上に残された唯一の量的な工業資源がバイオマスとなる。さらに、バイオマスは、カーボンニュートラルであるため、地球温暖化を促進しないエネルギー源としても期待されている。本論文は、バイオマスの資源としての価値を高めるために、バイオマス中に含まれる5単糖をエネルギー低消費型の微生物及び酵素を用いて取り出し、バイオマスを新たな工業用糖源として利用することを目指した研究である。

現在、植物中に約40%含まれる5単糖の重合体(ヘミセルロース)はほとんどの場合、焼却、コンポストもしくは廃棄されて、あまり効率的に利用されていない。ヘミセルロースの主たる5単糖であるD-キシロースやL-アラビノースは、安価に取り出せれば有効な工業用資源となる。本研究では、特に、リグノセルロースのアラビノキシラン(5単糖のD-キシロースとL-アラビノース重合体)からこれら構成糖の酵素加水分解による抽出方法を検討した。用いたキシラン分解酵素群の生産菌は、*Penicillium* 属 AHT-1 株及び *Rhizomucor pusillus* HHT-1 株である。

*Penicillium* 属 AHT-1 株は、キシラナーゼ、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ、 $\beta$ キシロシダーゼを生産する。モデルヘミセルロースであるカラス麦キシラン分解へのこれらの酵素の作用順序を検討した。これらの酵素の培養液中への分泌は30°C、初発pH7.0で6日間で最大となった。これらの酵素を硫酸沈殿、陰イオン交換樹脂であるDEAE Toyopearl 650Sで部分精製し、性質を検討した。キシ

ラーナーゼの分子量は 21kDa で、エンド型であり、糖転移活性も有していた。これらの酵素群によるカラス麦キシランの分解は、協調的かつ連続的に作用し、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ、キシラナーゼ、 $\beta$ キシロシダーゼの順に作用させると一番高い分解効率 61 %を示した。この結果から、キシランの側鎖である L-アラビノースを先に加水分解すれば、主鎖のキシランが効率よく分解されることが明らかとなった。さらに、これら3種類の酵素の温度、pH、培養時間に対する最適条件は同じで、この菌単独で十分にキシランを分解できることがわかった。

$\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼがキシラン分解の初期反応に重要であることが判り、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼの役割の詳細検討を計画した。しかし、*Penicillium* 属 AHT-1 株の  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ生産量は少なく、また、精製も困難であった。そこで、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼの高生産株である *Rhizomucor pusillus* HHT-1 株を選択して以降の実験を行った。L-アラビノースを炭素源とし、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼを生産した。その後、硫酸沈殿、ゲルろ過、陰イオン交換樹脂で酵素を精製した。分子量は 88kDa の単量体で pI4.2、至適 pH と pH 安定性は各々、4.0 と 7.0-10.0、至適温度と温度安定性は両者とも、60°C であった。*p*-ニトロフェニール  $\alpha$ -L-アラビノフラノシドに対する  $K_m$  と  $V_m$  は各々、0.59mM と 387 $\mu$ M/min/protein であった。活性は金属イオンによって促進されなかった。N 末端アミノ酸配列では他の  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼとの相同性はなかった。この酵素は広い範囲のアラビノキシラン多糖類や少糖類に作用した。

次に、この酵素による各種アラビナンへの分解機構を検討した。砂糖ダイコンアラビナンやデブランチアラビナンを同じ効率で加水分解した。 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) 結合残基と末端の  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5) 結合残基を切断した。アラビナンと  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼによる加水分解アラビナンのメチル化分析では、(1 $\rightarrow$ 5)-Araf, T-Araf, (1 $\rightarrow$ 3, 5)-Araf, (1 $\rightarrow$ 3)-Araf 結合の比率は各々 2:2:2:1 と 3:1:2:1 であった。 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ処理した結果、(1 $\rightarrow$ 5)-Araf の比率が増え、T-Araf が減少した。本酵素は、アラビナンの  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5) 結合残基を切断すると理解できた。<sup>1</sup>H と <sup>13</sup>C NMR による解析では、アラビノフラノシルのシグナルが優占し、アラビノピラノシル部分のシグナルは検出されなかった。これらの結果から、本酵素は、アラビナンのアラビノフラノシル残基のみを加水分解できることが明らかとなった。

以上、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ、キシラナーゼ、 $\beta$ キシロシダーゼの順に作用させるとバイオマスから酵素によって D-キシロースと L-アラビノースを効率的に加水分解抽出出来ることを明らかにした。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、リグノセルロースであるアラビノキシランの酵素分解による利用方法を研究したものである。キシラン分解酵素群は、バイオマスの工業的利用という観点から重要な酵素群で、本研究では、*Penicillium* 属 AHT-1 及び *Rhizomucor pusillus* HHT-1 をキシラン分解酵素の生産株として利用した。

*Penicillium* 属 AHT-1 は、キシラナーゼ、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ、 $\beta$ キシロシダーゼを生産する。モデルヘミセルロースであるカラス麦キシラン分解へのこれらの酵素の作用順序を検討した。これらの酵素の培養液中への分泌は 30°C、初発 pH7.0 で 6 日間で最大となった。これらの酵素を硫酸沈殿、陰イオン交換樹脂である DEAE Toyopearl 650S で部分精製し、性質を検討した。キシラナーゼの分子量は 21kDa で、エンド型であり、糖転移活性も有していた。これらの酵素群に

よるカラス麦キシランの分解は、協調的かつ連続的に作用し、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ、キシランナーゼ、 $\beta$ キシロシダーゼの順に作用させると一番高い分解効率を示した。これら3種類の酵素の温度、pH、培養時間に対する最適条件は同じで、この菌単独で十分にキシランを完全分解できることがわかった。

$\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼがキシラン分解の初期反応に重要であることが判り、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼの役割の詳細検討を計画した。しかし、*Penicillium* 属 AHT-1 の  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ生産量は少なく、また、精製も困難であった。そこで、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼの高生産株である *Rhizomucor pusillus* HHT-1 を選択して以降の実験を行った。Lアラビノースを炭素源とし、 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼを生産した。その後、硫酸沈殿、ゲルろ過、陰イオン交換樹脂で酵素を精製した。分子量は 88kDa の単量体で pI4.2、至適 pH と pH 安定性は各々、4.0 と 7.0-10.0、至適温度と温度安定性は両者とも、60°C であった。p-ニトロフェニール  $\alpha$ -L-アラビノフラノシドに対する  $K_m$  と  $V_m$  は各々、0.59mM と 387 $\mu$ M/min/protein であった。活性は金属イオンによって促進されなかった。N 末端アミノ酸配列では他の  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼとの相同性はなかった。この酵素は広い範囲のアラビノキシラン多糖類や少糖類に作用した。

次に、この酵素による各種アラビナンへの分解機構を検討した。砂糖ダイコンアラビナンやデブランチアラビナンを同じ効率で加水分解した。 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) 結合残基と末端の  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5) 結合残基を切断した。アラビナンと  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼによる加水分解アラビナンのメチル化分析では、(1 $\rightarrow$ 5)-Araf, T-Araf, (1 $\rightarrow$ 3, 5)-Araf, (1 $\rightarrow$ 3)-Araf 結合の比率は各々 2:2:2:1 と 3:1:2:1 であった。 $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼ処理した結果、(1 $\rightarrow$ 5)-Araf の比率が増え、T-Araf が減少した。本酵素は、アラビナンの  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5) 結合残基を切断すると理解できた。<sup>1</sup>H と <sup>13</sup>C NMR による解析では、アラビノフラノシルのシグナルが優占し、アラビノピラノシル部分のシグナルは検出されなかった。これらの結果から、本酵素は、アラビナンのアラビノフラノシル残基のみを加水分解できることが明らかとなった。

以上、本研究は石油枯渇後の唯一の資源と考えられるバイオマスの分解及び有用糖類の抽出方法として酵素分解方法が有効であることを示した。特に、アラビノキシランの側鎖であるアラビノースを遊離する  $\alpha$ -L-アラビノフラノシダーゼの役割が大きいことを明らかにした。さらに、この酵素によるアラビノキシラン分解機構の一部を明らかにしたことは学問及び応用上大きいと考えられる。

審査委員会は、本論文について、研究の進め方、論文の構成、内容、図表並びに引用文献などについて慎重に審議すると共に、公表されている論文についても検討した。その結果、審査委員一同は、本論文を岐阜大学大学院連合農学研究科の博士論文として価値あるものと認め、「合格」と判定した。

#### 基礎となる論文

1. A. K. M. S. Rahman, S. Kawamura, M. Hatsu, M. M. Hoq, and K. Takamizawa: Physicochemical properties of a novel  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Rhizomucor pusillus* HHT-1. *Can. J. Microbiol.* 47, 767-772, 2001.
2. A. K. M. S. Rahman, N. Sugitani, M. Hatsu, and K. Takamizawa: A role of xylanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, and xylosidase in xylan degradation. *Can. J. Microbiol.* 48, 2002 (in press).