

氏名(本籍)	ウィカンダ ウィンヤスク (タイ)
学位の種類	博士(生物工学)
学位記番号	博甲第5958号
学位授与年月日	平成24年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	<b>Studies on Enzymatic Degradation of Hexenuronosyl-xylotriose</b> (ヘキセンウロノシルキシロトリオースの酵素的分解に関する研究)

主査	筑波大学教授	農学博士	佐竹隆顕
副査	筑波大学教授	農学博士	佐藤誠吾
副査	筑波大学教授	理学博士	繁森英幸
副査	筑波大学准教授	博士(学術)	中島敏明
副査	筑波大学准教授	博士(農学)	吉田滋樹

### 論文の内容の要旨

電子媒体が汎用される現代においても世界的な紙の消費量は増加傾向にあり、それに伴い原料である木材資源の確保やパルプ製造技術の改良が盛んに行われている。特にパルプ製造における漂白過程には、その効率の高さから塩素が多用されていたが、環境への負荷が大きいため酸素やオゾン漂白へとその製法が変遷している。さらにこのパルプ製造過程において木材チップのヘミセルロースより生成するヘキセンウロン酸(HexA)は、パルプのオゾン漂白過程においてオゾンを消費し、また製紙後の黄変の一因とも言われている。そこで本研究では、オゾン漂白をさらに効率化するための酵素剤開発の一環としてHexA遊離酵素の探索を目的とした。

まず、HexA遊離酵素の探索および活性測定のための基質として、ヘキセンウロン酸含有キシロオリゴ糖の調製を行った。クラフトパルプからアルカリ抽出により調製したヘキセンウロン酸含有キシランを市販セルラーゼで加水分解した。得られた糖液から活性炭およびシリカゲルの各クロマトグラフィーにより効率的に $\Delta$ -X<sub>3</sub>を精製した。精製した $\Delta$ -X<sub>n</sub>の構造は質量分析などの機器分析法での結果に基づいてヘキセンウロノシルキシロトリオースと決定した。

次いで、部分精製したヘキセンウロノシルキシロトリオースを炭素源として土壤中よりヘキセンウロノシルキシロトリオース資化性菌を探索し、同資化性細菌を釣菌した。形態学的観察や生化学的同定試験、16S rDNAの塩基配列の相同性に基づいて、本菌は*Paenibacillus*属に分類された。さらに本菌株を用いて菌体内酵素を調製し、その反応生成物の同定を行った。ヘキセンウロノシルキシロトリオースを基質として菌体内酵素を作用させ、得られた生成物を薄層クロマトグラフィーで分析した結果、基質が分解され2種の未知物質が生成した。これらの未知生成物はチオバルビツール酸反応の結果より、不飽和ウロン酸を含むことが確認され、ヘキセンウロン酸モノマーとヘキセンウロノシルキシロピオースと推定された。さらに調製用薄層クロマトグラフィーで単離し、質量分析を行った結果、ヘキセンウロノシルキシロピオースの分子イオンが観察されたが、ヘキセンウロン酸モノマーは構造的に不安定なため相当する分子イオンが観察されなかった。これらの結果より、ヘキセンウロノシルキシロトリオースは、菌体内酵素に含まれるキシロシダーゼやキシ

ラナーゼの作用によりヘキセンウロノシルキシロピオースに分解された後、ヘキセンウロン酸特異的遊離酵素によって分解されるものと推察された。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

パルプ漂白過程の研究遂行において、モデル化合物としてヘキセンウロン酸含有オリゴ糖は利用価値が高いが、その調製が困難であり、調製法が未確立であった。またヘキセンウロン酸特異的な遊離酵素は未だ報告されていない。本研究では、そのオリゴ糖基質の調製法を確立し、さらに調製したオリゴ糖を用いて同酵素の探索を行い、かつ酵素生産菌を単離したことは学術的に非常に高く評価される。さらに生産菌の同定試験及び得られた粗酵素中のヘキセンウロン酸遊離酵素の基本的な反応メカニズムが明らかにされ、酵素化学分野における学問的および応用的な発展に大きく寄与する、価値の高い業績と評価できる。

平成 23 年 12 月 5 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。