

2022 年度 修士論文

ヤケイロタケ Iwa5b 株の
Mn ペルオキシダーゼおよびラッカーゼの生産特性

Producing properties of Manganese peroxidase and laccase

by *Bjerkandera adusta* Iwa5b

高知工科大学 生命科学コース

森林資源学研究室

1255080 町田龍晟

目次

第一章 概要	1
第二章 緒言	3
第三章 実験方法	
3-1 供試菌および木材の種類	6
3-2 培地および培養条件	
3-2-1 PDA 培地	7
3-2-2 液体培地	8
3-3 リグニン分解酵素生産の測定方法	9
第四章 結果	
4-1 プレート培養でのリグニン分解酵素の生産性	
4-1-1 コロニー成長速度	11
4-1-2 RBBR 添加培地	12
4-1-3 タンニン酸添加培地	14
4-2 液体培養でのリグニン分解酵素の生産性	15
第五章 考察	
5-1 プレート培養でのリグニン分解酵素の生産性	18
5-2 液体培養でのリグニン分解酵素の生産性	18
第六章 総括	21
謝辞	22
参考文献	23

第一章 概要

現在、再生可能な森林資源を活用するため、バイオマス変換やバイオレメディエーションの分野において、微生物を利用する研究が行われている。リグニンは木材の細胞壁を構成する主成分の一つであり、およそ 20-30%を占める[1]。セルロースなどの一般的な生体高分子は、単位分子が単一結合で連なった直鎖構造を持つ場合が多いが、リグニンは構成単位にバリエーションがあるうえ、それらが不規則に結合した高分子であり、分解できる微生物は限られている。木材の用途として約半分を占めるパルプ産業では、パルプの製造における漂白などのリグニン分解で、膨大なエネルギーと薬剤を使用しており、環境負荷の高いことが問題となっている。環境負荷を低減するためにリグニン分解に生物処理の利用が考えられるが、微生物や酵素を利用する生物的处理は化学的处理に比べ長い時間を要するという課題がある。そこで我々は、白色腐朽菌のリグニン分解酵素生産能力を向上させる方法の開発を目的とした。

当研究室では、リグニン分解酵素構成さん株としてヤケイロタケ (*Bjerkandera adusta*) Iwa5b 株を環境中から分離した。Iwa5b 株は研究室で保有している他のヤケイロタケに比べ、リグニン分解酵素のマンガンペルオキシダーゼ (MnP) を約 2 倍生産する優秀株である。しかし、この株の MnP の生産が安定せず、突然生産が低下することがあるうえ、その原因は不明である。

本研究では、Iwa5b 株のリグニン分解酵素生産力を総合的に評価したうえで、この酵素群の生産機構を解明しようと考えた。Iwa5b 株を含めたヤケイロタケ 6 株を使用した評価対象としたリグニン分解酵素は、MnP とラッカーゼ (Lac)、リグニンペルオキシダーゼ (LiP)、マンガン非依存ペルオキシダーゼ (MiP) とした。液体培地を用いて回転培養しながら、酵素生産を経時的に測定し、培養時間と酵素生産の関係を調べた。また、液体培地に木材を加えたものと比較し、木材存在下での酵素生産への影響を調べた。その結果、木材添加なしの液体培地では MnP の活性が高くなり、木材添加液体培地では、LiP の活性が高くなった。

第二章 緒言

現在、脱化石資源経済の構築のため、再生可能な森林資源が主要な材料になると考えられている。木材は、細胞壁成分を改変する酵素によって、様々な物質へと変換でき、バイオマス変換などの分野において、微生物やその酵素を利用することが検討されている。

木材の主要な用途として、紙・パルプがあげられる。パルプの製造過程の最終製品の白色度を上げる漂白では、残存リグニンの除去／分解のために、膨大なエネルギーと塩素などの薬剤を使用する化学的方法で処理している。そのため、環境への負荷が大きいことが問題となっており、微生物やその酵素を利用した生物学的方法を用いることが検討されている。しかし、生物学的方法は化学的方法に比べ長い処理時間を必要とし、生産効率の低下する課題が生じる。その課題を解決するためには、白色腐朽菌の酵素生産量を向上させることが重要である。

木材の細胞壁は、セルロース（40-50%）、ヘミセルロース（20-35%）、リグニ

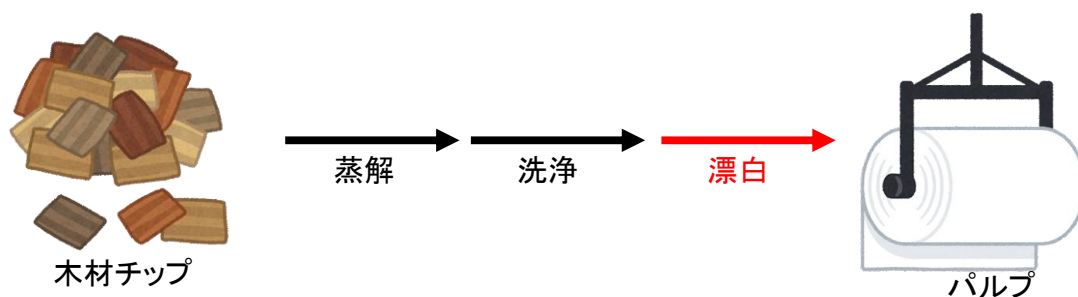


図1 パルプの製造過程の概略図

ン（20-30％）の3種類の化合物が主要な成分である。セルロースやヘミセルロースは、グルコースなどの単糖がグリコシド結合で重合した高分子であり、様々な微生物で分解することができる。しかし、リグニンは不規則に結合しており、セルロースなどと比べ、生分解しにくい化合物である。白色腐朽菌は、単独でリグニンを分解できる数少ない微生物である。

白色腐朽菌はリグニンを分解するためにリグニン分解酵素を生産する。リグニン分解酵素は、マンガンペルオキシダーゼ（MnP）、ラッカーゼ（Lac）、リグニンペルオキシダーゼ（LiP）など、複数確認されている。それぞれの酵素によって反応機構が異なっており、リグニンに限らず、リグニンと類似化合物であるダイオキシンやメラニン化合物などを分解できる（図2）[2][3]。

当研究室では、増殖力やリグニン分解能の高い白色腐朽菌を環境中から分離

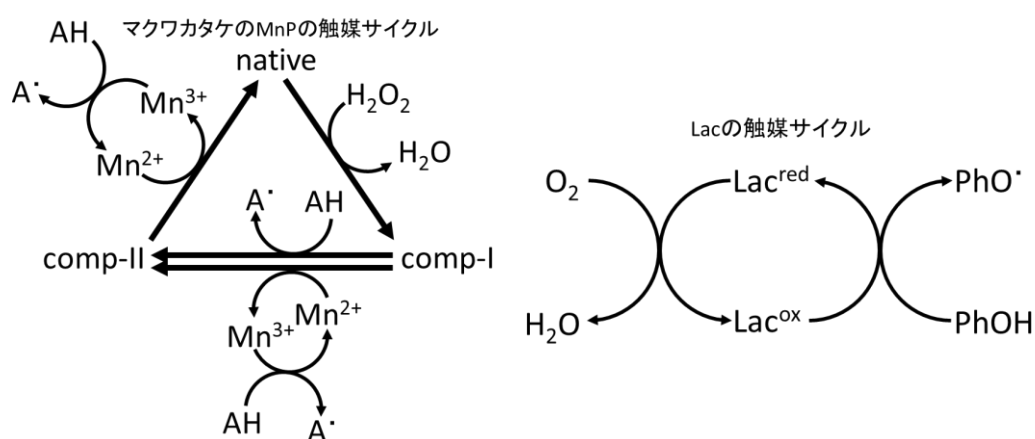


図2 MnP（左）およびLac（右）の触媒サイクル

を続けている。その中で、MnP に関して非常に生産力の高いヤケイロタケ (*Bjerkandera adusta*) Iwa5b 株を単離した。しかし、この Iwa5b 株は、同条件下でも MnP 生産が突然低下するなど、MnP の生産力の安定性がなく、その原因は不明である。

本研究では、Iwa5b 株のリグニン分解酵素生産力を総合的に評価したうえで、この酵素群の生産機構を解明しようと考えた。Iwa5b 株を含めたヤケイロタケ 6 株について、MnP、マンガン非依存ペルオキシダーゼ (MiP)、Lac、LiP の生産力を検討した。液体培地を用いて回転培養しながら、酵素生産を経時的に測定し、培養時間と酵素生産の関係を調べた。また、培地に木材を加えたものと比較し、木材存在下での酵素生産への影響を調べた。

第三章 実験方法

3-1 供試菌および木材の種類

本研究で用いた供試菌を表 1 に示す。Iwa5b 株はこれまでの研究で優秀な MnP 生産株であることが分かっている。FERM P-20326 株は優秀なリグニン分解酵素生産菌として特許登録されている株である。

供試菌はポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地で継代培養した。酵素生産の実験には、PDA に前培養した 10 日前後の供試菌を種菌として用いた。

木材には、当研究室で保存してあるブナの木粉を用いた。

表 1 供試菌リスト

種名	株名	和名
<i>Bjerkandera adusta</i>	Iwa5b	ヤケイロタケ
<i>Bjerkandera adusta</i>	FERM P-20326	ヤケイロタケ
<i>Bjerkandera adusta</i>	NBRC 4983	ヤケイロタケ
<i>Bjerkandera adusta</i>	NBRC 5307	ヤケイロタケ
<i>Bjerkandera adusta</i>	NBRC 104974	ヤケイロタケ
<i>Bjerkandera adusta</i>	NBRC 106826	ヤケイロタケ

※「NBRC」とは「NITE (National Institute of Technology and Evaluation : 製品評価技術基盤機構) Biological Resource Center」の略称である。前述の機関から譲渡または購入して得た菌株のことを指す。

3-2 培地および培養条件

3-2-1 PDA 培地

所定の濃度の PDA 培地（日水製薬，東京）をオートクレーブで 121°C、20 分間滅菌し、径 9cm のシャーレに 15 ml ずつ分注して PDA プレートとした。酵素活性を検出するために、レマゾールブリリアントブルー R (RBBR, シグマアルドリッチ, MO, US) またはタンニン酸（和光純薬，東京）を含む PDA プレートを調製した。滅菌後の PDA に、0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過滅菌した RBBR 溶液 ($6.4 \times 10^{-4} \text{M}$) またはタンニン酸溶液 ($7.0 \times 10^{-4} \text{M}$) を添加し、シャーレに 15 mL ずつ分注した。前培養した供試菌のコロニーから、直径 11 mm の菌糸片を接種した。種菌には、木材無添加 PDA 培地は PDA 培地で、木材添加 PDA 培地は木材添加 PDA 培地で培養したコロニーを使用した。接種後、25°C、暗所にて培養した。

PDA 培地では、コロニー直径を 1 日ごとに測定した。測定した直径から接種した菌糸片の直径を差し引き、培養日数で割ることで、コロニー成長速度を算出した。RBBR 添加培地では、RBBR の分解による脱色帯（ハロー）の形成を、タンニン酸添加培地では、バーベンダム反応による褐変を、2 日ごとに目視で観察した。

3-2-2 液体培地

液体培地の組成を表 2 に示す。ブナ木粉を除いた液体培地を調製し、200 mL 三角フラスコに 60 mL ずつ分注した。木材添加培地には、ブナ木粉を 0.12 g ずつ添加した。これらをオートクレーブで 121°C、20 分間滅菌した。前培養した供

表 2 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
ブナ木粉*	0.2

* 木材添加液体培地のみ使用

試菌のコロニーから、直径 11 mm の菌糸片を 3 片ずつ接種した。木材無添加液体培地は PDA 培地で、木材添加液体培地は木材添加 PDA 培地で培養したコロニー片を種菌として使用した。供試菌を接種後、30°C、暗所、80 rpm で回転培養を行った。2 日ごとに液体培地を 1 ml 採取し、MnP、MiP、Lac、LiP 活性を約 2 週間、測定した。

3-3 リグニン分解酵素生産能の測定方法

各培養液の上清（1つの酵素に対し、約1 mL程度）をそれぞれチューブに採取した。固形物を分離するために、チューブを遠心機にセットし、15000 rpm、10分間、4度で遠心した。また、表3-6に示した終濃度になるように、それぞれの活性測定反応液ストックを調製し、未滅菌の1.5 mLチューブに250 µLずつ分注した。遠心した培養液から750 µL測り取り、反応液250 µLと混和し、速やかに750 µLをセルに移した。指定の波長で3分間吸光度を測定し、毎分1 µmolの基質を変化させる酵素活性量（U/L）を算出した（式1）。

$$\text{酵素活性量 (U/L)} = \frac{\text{反応速度 } (\Delta \text{Abs/min})}{\text{モル吸光係数}} \times \frac{1 \text{ mL}}{0.75 \text{ mL}} \times 10^6 \quad \text{----- (式 1)}$$

MnP および MiP 活性は、Guaiacol を基質とし、波長 465 nm で測定した。酵素活性量は、モル吸光係数 $12100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて算出した[4]。また、MiP 活性はエチレンジアミン四酢酸を Mn イオンとのキレート剤として用いることで測定した。Lac 活性は 2,2'-アジノ-ジ-(3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸) (ABTS) を基質とし、波長 420 nm で測定した。酵素活性量は、モル吸光係数 $36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて算出した[5]。LiP 活性は、veratryl alcohol を基質とし、波長 310 nm で

測定した。酵素活性量は、モル吸光係数 $9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて算出した[6]。

表 3 MnP 活性測定用反応液の組成

試薬	濃度 (mM)
Guaiacol	4
Succinate Buffer pH 4.5	100
MnSO ₄	1
H ₂ O ₂	1

表 4 MiP 活性測定用反応液の組成

試薬	濃度 (mM)
Guaiacol	4
Succinate Buffer pH 4.5	100
EDTA	1
H ₂ O ₂	1

表 5 Lac 活性測定用反応液の組成

試薬	濃度 (mM)
ABTS	4
Acetate Buffer pH 5.0	1

表 6 LiP 活性測定用反応液の組成

試薬	濃度 (mM)
veratryl alcohol	1.7
Succinate Buffer pH 3.0	20
H ₂ O ₂	0.2

第四章 結果

4-1 プレート培養でのリグニン分解酵素の生産性

4-1-1 コロニー成長速度

コロニー成長速度の結果を表 7 に、コロニー成長直径を図 3 に示す。コロニー成長速度は、図 3 で最も傾きが大きくなった 3 日目時点の値を示す。

木材無添加 PDA 培地で育成した FERM P-20326 株が最も大きく、木材無添加 PDA 培地で育成した NBRC 4983 株が最も小さくなった。木材無添加 PDA 培地と木材添加 PDA 培地で大きな誤差は見られなかった。

NBRC 4983 株は、木材無添加 PDA 培地において約 10 日目に、木材添加 PDA 培地において 8 日目にシャーレ端まで成長した。また、NBRC 4983 株を除く株は、6 日目にシャーレ端まで成長した。

表 7 コロニー成長速度 (mm/day)

株名	木材無添加培地	木材添加培地
Iwa5b	12.9 ± 3.0	13.2 ± 1.7
FERM P-20326	17.3 ± 3.8	16.7 ± 6.8
NBRC 4983	5.9 ± 0.8	7.2 ± 0.3
NBRC 5307	13.3 ± 1.3	14.7 ± 0.5
NBRC 104974	10.3 ± 0.6	13.1 ± 0.5
NBRC 106826	11.6 ± 6.0	14.3 ± 4.2

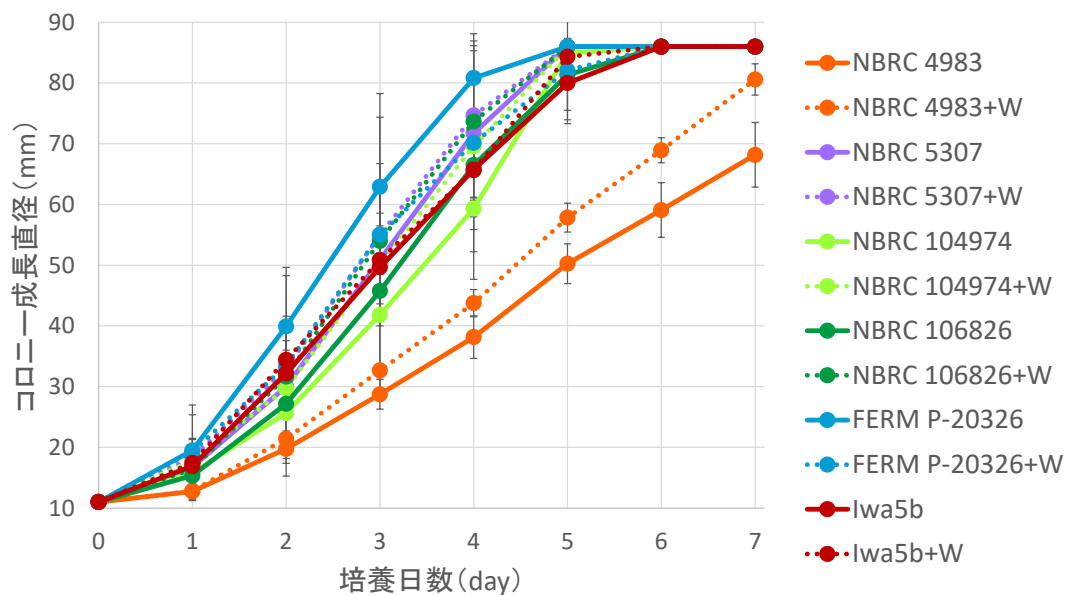


図3 コロニー成長直径をグラフ化したもの。実線は木材無添加 PDA 培地、点線が木材添加培地を示している。

4-1-2 RBBR 添加培地

RBBR 添加培地の 10 日目の様子を図 4 に示す。FERM P-20326 株、NRBC 106826 株は、コロニー直径より少し小さいハローが形成された。Iwa5b 株は木材無添加培地、木材添加培地どちらも 1 枚ずつ、ハローが全く形成されなかった。また Iwa5b 株のハローの形成は、1、2 日目は種菌を中心に見られ、3、4 日目からシャーレに対し垂直方向へ成長した場所からハローの形成が見られた。NBRC 5307 株は薄らとハローが形成されたが、木材添加 PDA 培地 1 枚はしっかりとハローを形成した。NBRC 104974 株および NBRC 4983 株は、まったくハローは形成されなかった。

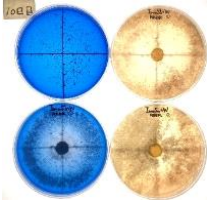
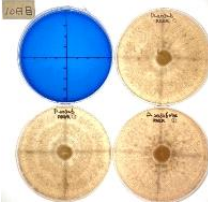
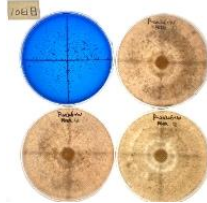
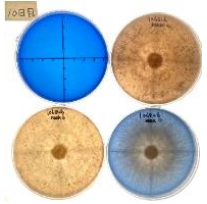
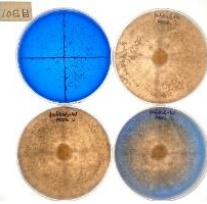
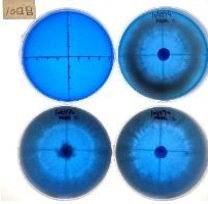
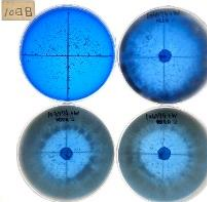
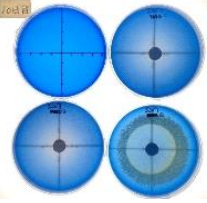
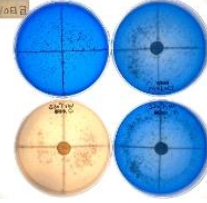
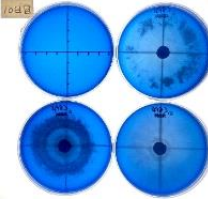
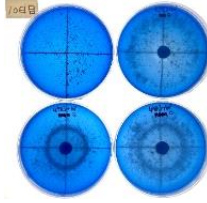
木材無添加培地	木材添加培地	木材無添加培地	木材添加培地
			
Iwa5b		FERM P-20326	
			
NBRC 106826		NBRC 104974	
			
NBRC 5307		NBRC 4983	

図4 培養10日目のRBBR添加培地の様子。コロニー培養したプレート透過光で撮影した。それぞれの写真の左上は、種菌を接種していない基準としたRBBR添加培地である。

4-1-3 タンニン酸添加培地

タンニン酸添加培地の 10 日目の様子を図 5 に示す。NBRC 4983 株以外、タンニン酸の褐色化が見られた。FERM P-20326 株および NBRC 106826 株は、シャーレ端まで褐色化が最も早く見られた。成長速度は、PDA 培地上に比べ遅かった。

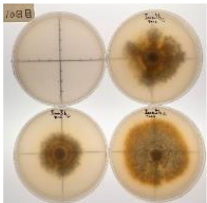
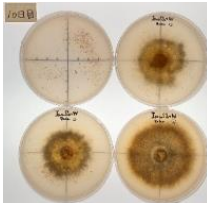
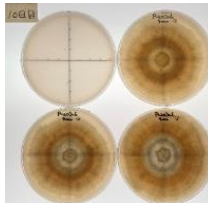
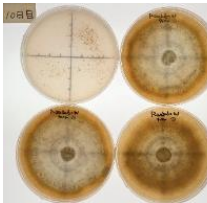
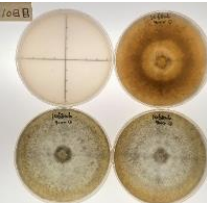
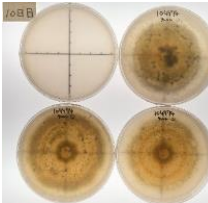
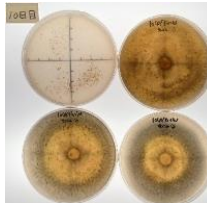
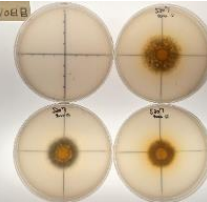
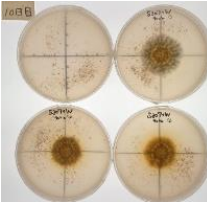
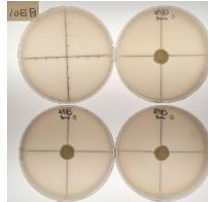
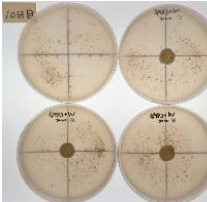
木材無添加培地	木材添加培地	木材無添加培地	木材添加培地
			
Iwa5b		FERM P-20326	
			
NBRC 106826		NBRC 104974	
			
NBRC 5307		NBRC 4983	

図 5 培養 10 日目のタンニン酸添加培地の様子。コロニー培養したプレートを通光で撮影した。それぞれの写真の左上は、種菌を接種していない基準としたタンニン酸添加培地である。

4-2 液体培養でのリグニン分解酵素の生産性

液体培養におけるリグニン分解酵素の酵素活性量を図 6 および 7 に示す。どちらの液体培地においても、Iwa5b 株、FERM P-20326 株、NBRC 106826 株は、酵素活性があり、NBRC 104974 株、NBRC 5307 株、NBRC 4983 株は、あまり活性がみられなかった。

Iwa5b 株は、木材無添加液体培地において、MnP の生産が最も高くなった。この結果は、これまで行われてきた研究と同様の結果であった。MiP、LiP も生産することが分かった。また、いずれの酵素も 6~8 日目あたりにピークがみられた。木材添加培地では、LiP が最も生産が高くなった。木材を添加することで、MnP、MiP、LiP の生産はゆるやかになった。また、MnP の生産の安定性は、他の株に比べ、どちらの培地においても標準偏差が大きくなった。これらの結果から、木材の添加により、Iwa5b 株のリグニン分解酵素生産に影響を及ぼすことが考えられる。

FERM P-20326 株および NBRC 106826 株は、木材を添加することで、MnP の生産が約 3 倍向上した。FERM P-20326 株は、他の株と比べ、最も高い値を示した。4 日目から 8 日目にかけて生産のピークがみられた。

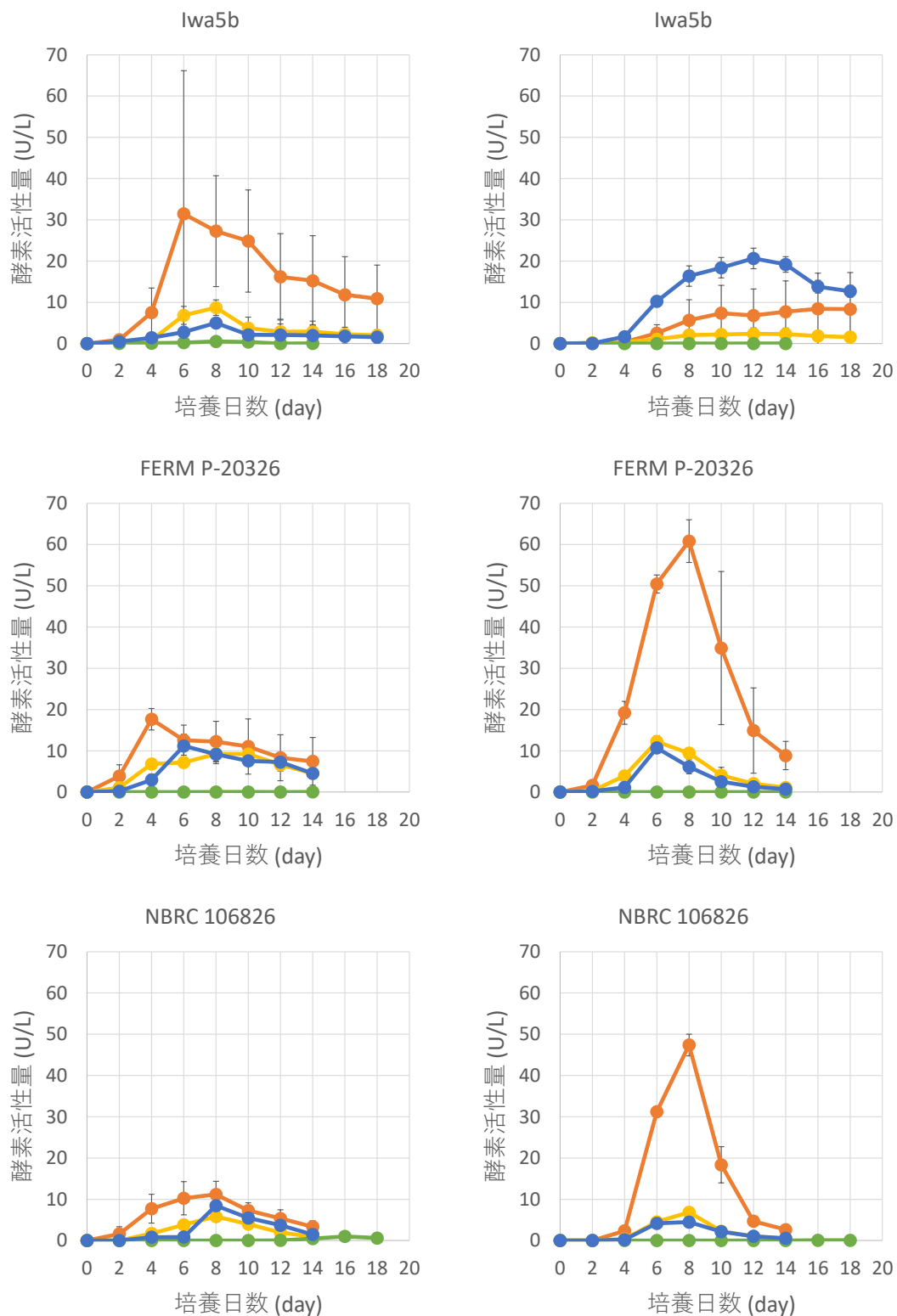


図 6 酵素生産をする 3 株における酵素活性量。左は木材無添加液体培地、右は木材添加液体培地。橙：MnP、黄：MiP、緑：Lac、青：LiP。

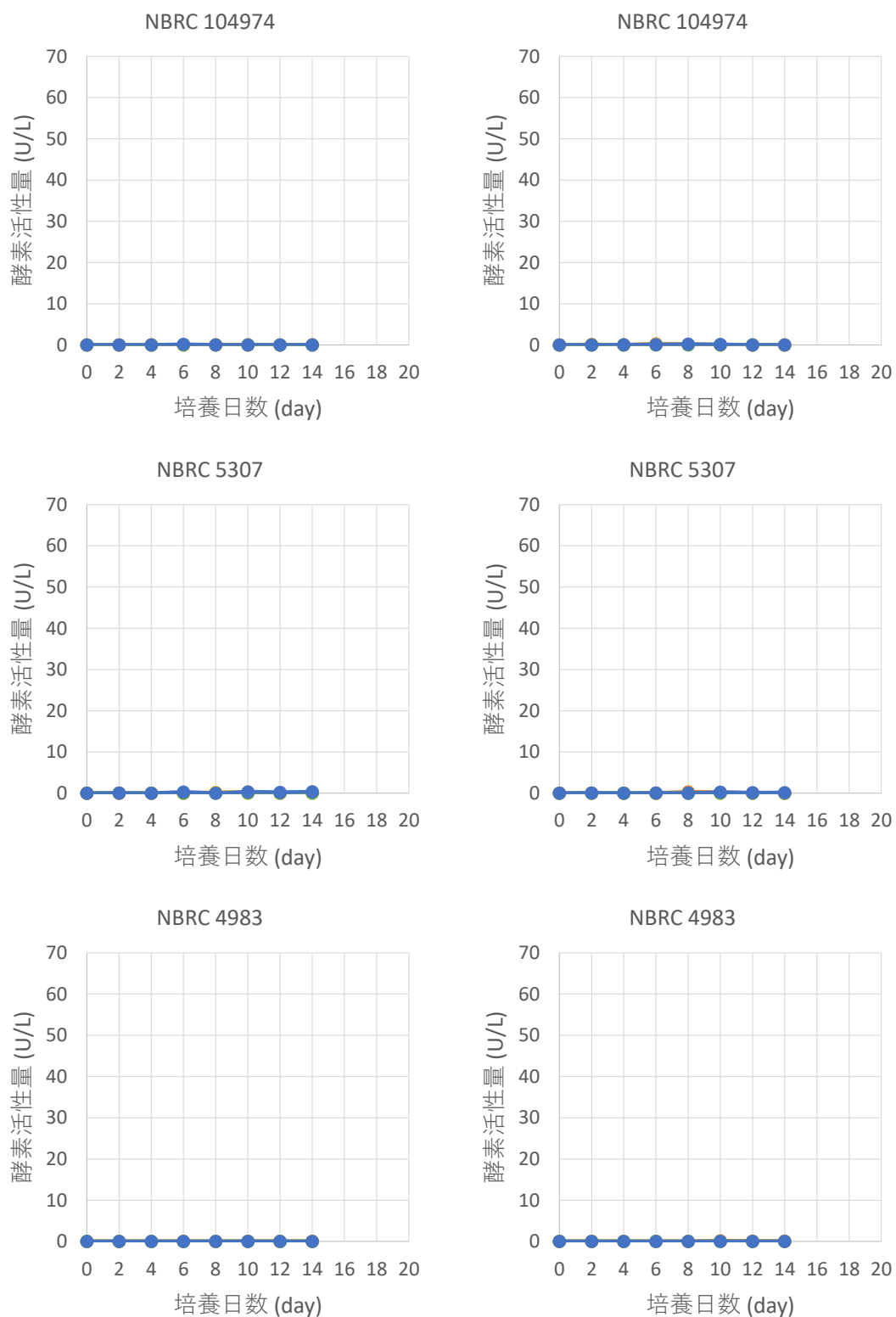


図7 酵素生産をしない3株における酵素活性量。左は木材無添加液体培地、右は木材添加液体培地。橙：MnP、黄：MiP、緑：Lac、青：LiP。

第五章 考察

5-1 プレート培養でのリグニン分解酵素の生産性

プレート培養ではヤケイロタケ 6 株に対して、木材の添加が影響していることがあまり観察されなかった。この理由として、PDA 培地が木材に完全に覆いかぶさってしまい菌糸が木材と接触できなかったことが考えられる。木材添加した RBBR 添加培地で NBRC 5307 株の 1 枚で、ハローが形成されたのを確認したが、これまでの研究[7]で、木材を添加していない培地においても同様の結果が得られているため、木材の影響ではなく、この株のもともとのリグニン分解能であると考えられる。

5-2 液体培養でのリグニン分解酵素の生産性

液体培養において、Iwa5b 株では MnP 生産の低下および LiP 生産の向上、FERM P-20326 株と NBRC 106826 株では MnP 生産の約 3 倍以上の向上を見出し、木材無添加培地でも酵素活性を示す株において、木材添加によって酵素生産に影響を与えることが分かった。また、木材を添加することで、リグニン分解酵素の生産の向上を促すことで、高生産状態で安定化できると考えていた。しかし、Iwa5b 株は木材添加液体培地においても、標準偏差が非常に大きくなる結果となった。

Iwa5b 株は他 2 つの株と異なる結果を得た。その原因として、Iwa5b 株はブナ木材より成長に関して負の影響を受け、酵素生産も制限されたということが考えられる。しかし、木材無添加液体培地と同等の生産量が観測できたサンプルや測定期間内にピークが見られなかったものがあるため、この理由だけで説明することができない (図 8)。他の理由として、遺伝子配列の違い、または、グルコースなどの栄養源の量が原因であると考ええる。

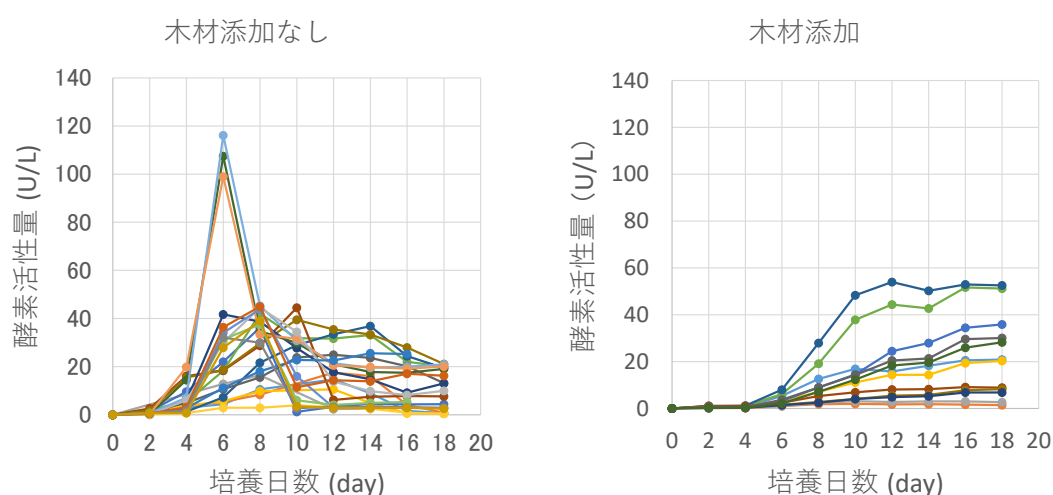


図 8 Iwa5b 株の MnP 酵素活性量の全データ。

文献[8]では、本研究で用いたヤケイロタケ 6 株について、rDNA の ITS -D1D2 領域の塩基配列および細胞全体のタンパク質による種内のタイピングを試みている。ITS-D1D2 の情報では、この 6 株にはほとんど違いはなく、種内の変異は小さいことが明らかとなった。一方で全細胞のタンパク質の MS スペ

クトルの情報では明確に 2 つのグループ、すなわちリグニン分解酵素を生産する Iwa5b, FERM P-20326、NBRC 106826 の 3 株と、あまり生産しない NBRC 4983、NBRC 5307、NBRC106826 の 3 株に分けられた。タンパク質の情報による種内のブルーピングは酵素生産と関係があることを示唆していると考えられる。しかし、木材添加による影響はリグニン分解酵素を生産するグループのなかでも差があり、それはタンパク質による分類と一致しなかった。このことより考えられることは、リグニン分解酵素の遺伝子配列、または、生産機構の中で、Iwa5b 株と他 2 つの生産する株を分類することができるのではないかと考える。

当研究室では、過去に Iwa5b 株の MnP の生産に対して、栄養源となるグルコースや Yeast extract の量が影響するかという研究を行っていた[9][10]。これらの結果では、グルコースを増加させることで MnP 生産量が低下する傾向がみられることが分かっている。木材を添加した培地では、木材に含まれるセルロースが分解された結果生じるグルコースが影響し、リグニン分解酵素の生産を抑制したと考えることもできる。しかし、Iwa5b は木粉添加培地においてリグニン分解酵素の生産量が少ないため、セルラーゼがセルロースにアクセスしやすい条件が実現されていたわけではないことになり、この理由で決定することができない。

第六章 総括

本研究では、ヤケイロタケ 6 株に対して、木材添加による影響をプレート培養、液体培養で、リグニン分解酵素生産を評価した。

プレート培養では、木材添加による影響を評価することは難しいことが分かった。

液体培養では、FERM P-20326 株および NBRC 106826 株は木材添加によって、MnP 生産量の向上が見られ、Iwa5b 株は MnP 生産量の低下／遅延、LiP 生産量の向上が見られ、ヤケイロタケのリグニン分解酵素生産を行う株の中でも、Iwa5b 株は異なる挙動を示すことが分かった。しかし、その原因は不明であるため、今後、リグニン分解酵素の遺伝子の同定および他木材を用いた液体培養をし、木材成分による影響を調べる必要があると考える。

謝辞

本研究を行うにあたり大変多くのご指導を頂きました高知工科大学の堀沢栄教授に深く感謝いたします。

また、森林資源学研究室の皆様方頂いた様々なご意見やご協力に深く感謝いたします。

最後に、学生生活を支えて下さいました家族に深く感謝いたします。

参考文献

- [1] 飛松裕基, (2017), 植物と人を“支える”細胞壁の化学, 生存圏研究, 13, 10–18.
- [2] K.Valli, H. wariishi, M. H. Gold, (1992), Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Bacteriol.*, 174(7), 2131–2137.
- [3] K. E. Hammel, (1995), Mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by ligninolytic fungi, *Environ. Health Perspect*, 103(Suppl 5), 41–43.
- [4] A. Komal, V. Pradeep, (2019), Laccase: addressing the ambivalence associated with the calculation of enzyme activity, *3 Biotech*, 9, 365.
- [5] R. Bourbonnais, M. G. Paice, I. D. Reid, P. Lanthier, M. yaguchi, (1995), Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization, *Appl. Environ. Microbiol*, 61(5), 1876–1880.
- [6] J. Wang, R. Yin, X. Zhang, N. Wang, P. Xiao, H. Hirai, T. Xiao, (2021), Transcriptomic analysis reveals ligninolytic enzymes of white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 participating in bisphenol F biodegradation under ligninolytic conditions, *Enciron. Sci. Pollut. Res. Int.*, 28(44), 602390–62397.
- [7] 柳生昂平 (2016) ヤケイロタケによるリグニン分解酵素の生産, 高知工科大学卒業論文
- [8] S. Horisawa, K. Iwamoto, (2022), Identification and Typing of Strains of Wood-Rotting Basidiomycetes by Protein Profiling Using MALDI-TOF MS, *BioTech*,

11(3), 30.

- [9] 神尾瑞 (2021) 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, 高知工科大学修士論文.
- [10] 藤脇卓範 (2022) ヤケイロタケ Iwa5b 株の Mn ペルオキシダーゼの生産量に対する栄養濃度の影響, 高知工科大学卒業論文.

付録

o-phenyldiamine を基質として Lac 活性測定した結果。

表 Lac 活性測定用反応液の組成

試薬	濃度 (mM)
<i>o</i> -phenyldiamine	4
Succinate Buffer pH 4.5	100
MnSO4	1
H2O2	1

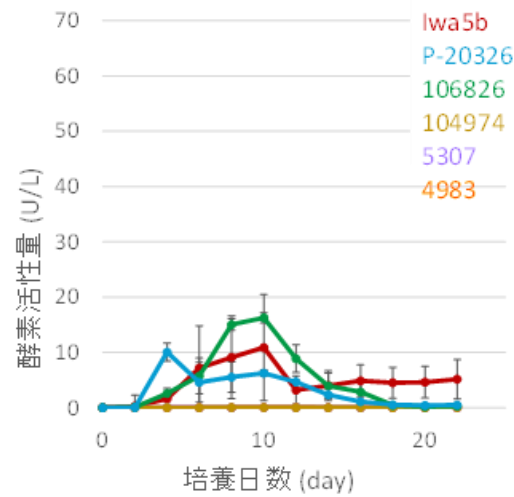


図 ヤケイロタケ 6 株の Lac 酵素活性量。