

白色腐朽菌の菌体外酵素によるフミン酸の分解について

岩手大学工学部 学生員 ○荻野目昭

正 員 伊藤歩 相澤治郎 海田輝之

岩手大学農学部

小藤田久義 渡辺久哉

1. はじめに

近年、発ガン性を有することで問題になっているトリハロメタンは、フミン質や類似の有機物が前駆物質となつて、浄水の消毒過程で添加される塩素と反応することにより生じる。従つて、水道水源の水質の悪化や水資源としての下水処理水の利用増大により塩素消毒が強化され、トリハロメタン濃度が増加する可能性がある。

本研究では、フミン質がリグニンと同様の官能基を有していることに着眼し、トリハロメタンの前駆物質の一つであるフミン酸を白色腐朽菌により分解除去することを目的とし、白色腐朽菌の菌体外酵素によるフミン酸の生分解の可能性を検討した。

2. 実験材料及び実験方法

2.1 白色腐朽菌および菌体外酵素の測定

木材腐朽菌の一種である白色腐朽菌¹⁾は、菌体外酵素としてリグニン分解酵素(リグニナーゼ)を生成し、木材細胞壁を構成するセルロースやヘミセルロース、リグニンを分解する。本研究で用いた白色腐朽菌は、岩手大学農学部木材化学研究室から分与されたカワラタケ保存用菌株(Coriorus versicolor K2615)をKirk 培地(表 - 1)に接種し、三角フラスコ(500ml)およびエアーフイルタ付通気装置からなる培養槽において、28℃で静置培養した。培養液をナイロンメッシュ(100 μm)でろ過した後、遠心分離(7500rpm、20min)により菌体を分離し、上澄液を 20mM 酢酸ナトリウム緩衝溶液で一晩透析させたものを菌体外酵素抽出液とした。酵素活性は、分光光度計を用いて 2 つの波長(310nm、496nm)の吸光度を測定し、右式により算出した。310nm はリグニンペルオキシターゼ(LiP)活性を、469nm はマンガンペルオキシターゼ(MnP)活性とラッカーゼ(Lac)活性を測定する波長である。酵素活性の 1 U は、測定反応条件下での 1 分間の 2 量体生成量(μmol)とする。

2.2 フミン酸添加後の吸光度変化の測定

試薬フミン酸 5 g を 0.1N の水酸化ナトリウム溶液 1L に添加し、マグネティックスターラーにより 1 時間分散溶解し、一晩暗所に静置した。この溶液を 1 μm のメンブレンフィルターでろ過し、不溶解性の部分を除去した後、さらにろ液の pH を 1 に調整し、遠心分離により沈殿物を回収して、50 ~ 60℃で乾燥させたものをフミン酸とした。実験では、このように精製したフミン酸を 0.1N の水酸化ナトリウム溶液に溶解させ、pH を 6 に調整後、高圧蒸気滅菌し、フミン酸標準液として使用した。

菌体外酵素抽出液に、フミン酸を 5mg/l、10mg/l、30mg/l になるように添加した後、これらの試料を 25℃、100rpm で振とうしながら、3 波長(260nm、400nm、600nm)の吸光度変化を経時的に測定した。ここで、260nm は溶存有機物の指標であり、400nm と 600nm は腐植酸の光吸収すなわち色の濃さを示す指標である。

3. 実験結果および考察

図 - 1 に培養開始から 5、7、9 日後の菌体外酵素の経時変化を示す。培養日数の増加に伴い、Lac 活性が増加した。MnP 活性は少量であるが、7 日目にその発現が見られた。一方、LiP 活性の発現はまったく見られなかった。

上述した結果をふまえて、5 日目、9 日目の菌体外酵素抽出液にフミン酸を添加したときの、各波長における吸光度変化を図 - 2 に示す。これらの図は、減少率を比較するために、実験開始後の吸光度値を初期値で除したものである。5 日目、9 日目とも各波長において実験開始から 1 時間程度で急激に減少し、その後緩やかに減少していく傾向が見られた。600nm、400nm では、最終的に

表 - 1 Kirk 培地の成分

グルコース	20.0g
酒石酸アンモニウム	0.20g
酵母エキス	0.20g
0.4M フタル酸	50.0ml
Kirk の無機塩溶液	10.0ml
純水	940.0ml
計	1000.0ml

$$\text{酵素活性 (U/ml)} = \frac{A \times 10^3}{\epsilon \times T \times V}$$

A : 反応時間 T における

吸光度変化

ε : 分子吸光係数

T : 酵素反応時間(min)

V : 酵素液添加量(ml)

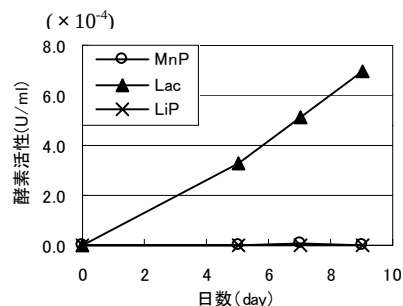


図 - 1 酵素活性の経時変化

5mg/l、10mg/l、30mg/l とフミン酸濃度の低い順に減少率が大きくなっているのが分かる。これはフミン酸自体が暗色を呈しており、低濃度の色の薄いほうからその変化が顕著に示されたと思われる。特に、600nm では9日目の方が減少率が増加しているが、400nm ではほとんど変化がなかった。これより白色腐朽菌の酵素活性が、フミン酸の長波長域の方で有効に作用すると考えられる。有機物濃度の指標である 260nm を比較してみると、5mg/l、10mg/l、30mg/l すべての濃度で同様の減少傾向を示した。減少率が等しいことは、フミン酸濃度が高くなるにつれ、その分解量も多くなっていることを示している。5日目と9日目でも同様の減少率を示し、その違いは見られなかった。また、フミン酸のみ、及び酵素のみに関しても同様に検討したが、その経時変化（図省略）はみられなかったことから、単体のみでの分解はないと言える。

図-3に5日目と9日目の腐植化度²⁾ ($\log K$) の変化を示す。 $\log K$ は、波長 400nm における吸光度値の常用対数から 600nm における吸光度値の常用対数を引いたものである。腐植化度は、腐植化の程度を表し、その増加は暗色有機物の暗色の増大という変化をも内包する。 $\log K$ の増加は、腐植化度が低下することを表している。図から5日目、9日目とも、時間が経つにつれて $\log K$ の値が増加する傾向が見られた。これは腐植化の低下、つまり暗色有機物の暗色が減少していることを示しており、従って高分子フミン酸が分解されていると考えられる。5日目に比べて9日目の方が $\log K$ が増加したが、これは9日目の Lac 活性が高いことからこのようになったと思われる。一方、260nm での減少の割合は変化しなかったが、 $\log K$ が増加したことから高分子有機化合物であるフミン酸が低分子化されたと考えられる。

4. まとめ

本研究から、白色腐朽菌の菌体外酵素の Lac によりフミン酸が分解されることが分かった。また、酵素活性が高いほど腐植化は減少するが、有機物量は変化しないことから、フミン酸を構成する分子の低分子化の可能性が示唆された。

白色腐朽菌は温度、湿度、培地などの生育条件が異なると酵素活性の発現傾向も異なるため、これからの実験にあたり白色腐朽菌の性質の把握、種々の菌体外酵素によるフミン酸の分解や環境ホルモンの分解等を行っていく予定である。

<参考文献>

- 1) 日本木材会編著：木質バイオマスの利用技術、文永堂出版、1991
- 2) 熊田恭一 著：土壌有機物の化学 第2版、学会出版センター、1995

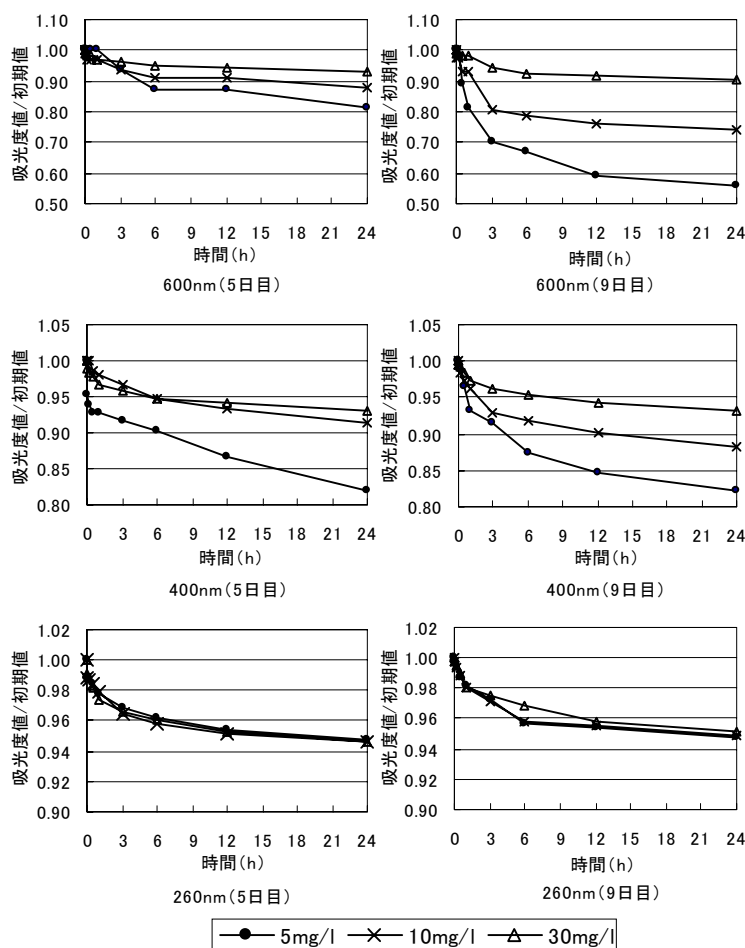


図-2 各波長における吸光度の経時変化

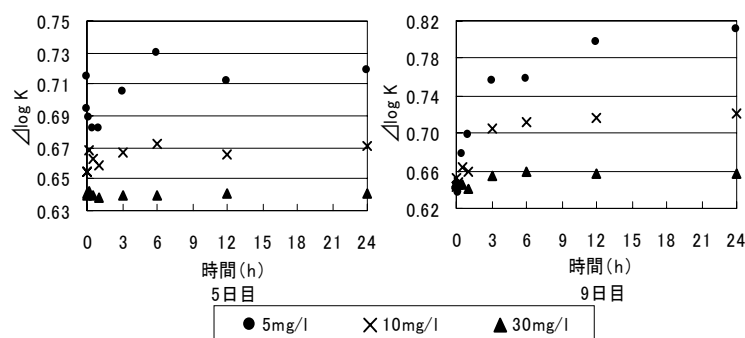


図-3 腐植化度