

白色腐朽菌による 4-ノニルフェノールの分解

大成建設（株） 正会員 川又 睦
大成建設（株） 正会員 藤原 靖

1. 背景および目的

内分泌攪乱化学物質、いわゆる環境ホルモンは生物個体の内分泌系に変化を起させ、その個体またはその子孫に健康障害を誘発する外因性物質と定義されている。環境中における 4-ノニルフェノール（NP）をはじめとする環境ホルモンは難分解性であり、極微量で生態系に影響を及ぼすことから市民生活においても大きな社会問題となっており、これを解決するための技術的対策が急務となっている。本研究では難分解性物質の処理技術開発の一環として NP の微生物分解処理に関する基礎的データを得ることを目的とした。

2. 実験材料および方法

2-1. 白色腐朽菌の培養方法と実験材料

実験材料として使用した白色腐朽菌 MS325 株（図-1）はポテトデキストロース培地（PDA）で増殖させた後、液体培地 Basal（50mL/300mL フラスコ）に植菌して 7～14 日間静置培養した¹⁾。

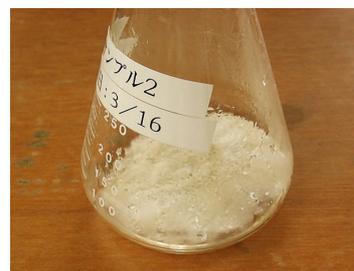


図-1 白色腐朽菌MS325株
(Bjerkandera adustaの近縁種)

2-2. NP の分析方法

標準試薬 4-ノニルフェノール（NP）はエタノールに適時溶解して使用した。NP は表-1 に示す HPLC を用いて分析した。

2-3. NP 分解能の評価

前述した MS325 株は Basal（50mL）培地の最終濃度が 1ppm になるように NP を添加した後さらに 7 日間培養した。菌体を含む培養液は超音波処理とクロロホルム抽出を 3 回行い、エタノールに転溶後 NP を測定した。ブランクには NP を添加する直前にオートクレーブで滅菌処理したものを使用した。

表-1 HPLCによるNPの分析条件

カラム	ODP-50 4E(4.6 X 250mm)
移動相	アセトニトリル：水（80：20）
流速	1.0mL/min
カラム温度	40
検出	277nm

2-4. 評価方法の改善と粗酵素の性状

白色腐朽菌を 7～14 日間培養後、培養液をメンブランフィルター（0.2 μm）で処理し、そのろ液（粗酵素液）と NP（1～20ppm）を試験内で反応させて NP 分解率（%）を評価した。ブランクには培養ろ液を反応停止液（1N 硫酸）で処理したものを使用した。本実験では特に断わりのない限り反応温度 28、反応時間 30 分、pH は未調整（pH4.78）で行なった。

(1) 時間別粗酵素液の NP 分解能評価

粗酵素液と NP の反応時間を 1、3、5、8、30、60 分間に設定して各条件における NP の分解率（%）を測定した。反応時の NP 濃度は 20～40ppm とした。また、反応には振とう恒温槽を使用した。

(2) 温度別粗酵素液の NP 分解能評価

反応温度を 19、28、37、45 に設定して各条件における NP の分解率（%）を測定した。

(3) pH 別粗酵素液の NP 分解能評価

pH を 3.5～8.0 に設定して各条件における NP の分解率（%）を測定した。

(4) 分子量別粗酵素液の NP 分解能評価

キーワード 内分泌攪乱化学物質，ノニルフェノール，白色腐朽菌，酵素，廃水処理

連絡先 〒245-0051 神奈川県横浜市名瀬町 344-1

大成建設（株） 技術センター 土木技術研究所 生物環境研究室

TEL045-814-7226 FAX045-814-7257 e-mail:mutsumi.kawamata@sakura.taisei.co.jp

NP 分解に係わる酵素の分子量を推定するために、限外ろ過膜 (Ultrafree-4CentrifugalFilter, MILLIPORE) を使用して、粗酵素を 100kD 以下の分子量別に分画してそれぞれの NP の分解率 (%) を測定した。

3. 実験結果

3-1. NP 分解能の評価

増殖した白色腐朽菌 MS325 株に NP (1ppm) を添加し、さらに 7 日間培養した後、培養液中の NP は検出されなかった (検出限界: <0.05ppm)。ブランクの NP 回収率は 43~45%であった。MS325 株は 1ppm の NP を 7 日間でほとんど分解した。また、その他の白色腐朽菌株についても分解活性は異なるが総体的に NP を分解することが分かった。

3-2. 時間別粗酵素液の NP 分解能

反応温度 28 および 37 における反応時間別の NP 分解率を図-2 に示す。NP 分解率は全体的に 28 に比べて 37 においてまた反応時間が長くなるに伴って高くなった。この結果から菌の NP 分解能を迅速に評価するためには 30 分の反応時間で十分であると判断した。

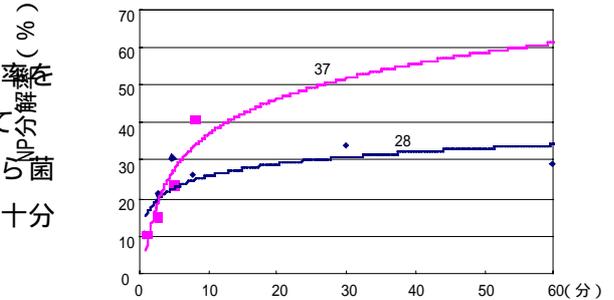


図-2 反応時間別粗酵素液のNP分解特性

3-3. 温度別粗酵素液の NP 分解能

粗酵素液の至適温度を把握するために各温度における NP 分解率を測定した。その結果を図-3 に示す。菌の培養温度の 28 が最適と予想したが、本酵素の至適温度は 37 前後と推定された。

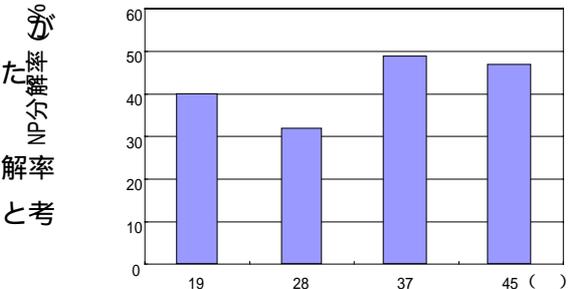


図-3 反応温度別粗酵素液のNP分解特性

3-4. pH 別粗酵素液の NP 分解能

粗酵素液の至適 pH を把握するために各 pH における NP 分解率を測定した結果を図-4 に示す。本酵素の至適 pH は約 4.0 と考えられた。

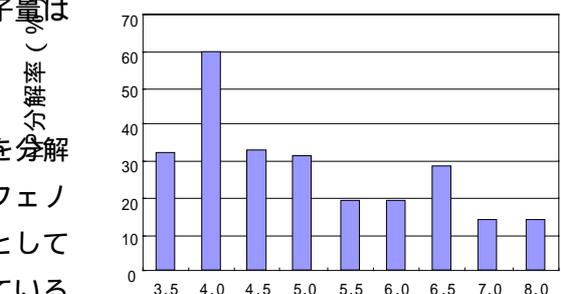


図-4 pH別粗酵素液のNP分解特性

3-5. 分子量別粗酵素液の NP 分解能

粗酵素の分子量を推定するために分子量分画した各フラクションにおける NP 分解率を測定した結果、NP 分解酵素の分子量は 50~100kD と推定された。

4. まとめ

本研究で用いた白色腐朽菌の MS325 株がダイオキシン類を分解することをすでに報告している¹⁻²⁾。本研究では 4-ノニルフェノール (NP) を効率良く分解することを確認した。分解酵素としてリグニンおよびマンガンペルオキシダーゼの関与を推定している。また、本菌株は幅広い有害化学物質を分解できる可能性が高く、複合的に汚染された工業排水、処分場浸出水、土壌・地下水等の微生物処理に有効であると考えている。

謝辞

本研究で使用した菌株は日本製紙株式会社から分譲していただいた。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたっては東京医薬専門学校の吉田栄司氏から多大な御協力をいただいた。ここに厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 川又 睦・斎藤祐二・鈴木朝香・高畑 陽・大場美保・万字角英：白色腐朽菌によるダイオキシン類 (ジベンゾフラン) 分解の検討, 大成建設技術研究所報, 第 33 号, 2000, pp67-70.
- 2) 斎藤祐二・川又 睦・万字角英・友沢 孝：白色腐朽菌培養濃縮液を用いた飛灰中ダイオキシン類の分解, 第 13 回廃棄物学会研究発表会講演論文集, 2002, pp1113-1115.