

VII-10

白色腐朽菌の菌体外酵素によるフミン酸の除去に関する基礎的研究

岩手大学工学部 学生員 〇篠崎 淳 笹木 宏美
 正 員 相澤 治郎 海田 輝之
 農林水産省森林総研東北支所 窪野 高德

1. はじめに

トリハロメタンは、フミン質やそれと類似の安定有機物質を前駆物質とし、それが塩素処理や消毒のために添加された塩素と反応することにより生じる消毒副生成物質である。トリハロメタンには発ガン性があり、現行の浄水処理システムにおい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再利用化による塩素消毒の強化に伴い、トリハロメタンが増加する可能性がある。トリハロメタンを制御することは重要であり、制御方法の一つとして前駆物質の除去が考えられる。前駆物質の一つであるフミン質は、高分子の有機物質で化学構造が複雑で多種多様なため特定が困難であり、非結晶であること、生物難分解性であること、暗色を呈していること、酸としての性質を持つことなどの特徴がある。一方、木材腐朽菌の一つである白色腐朽菌はリグニン分解酵素、リグニナーゼをもち、セルロースおよびヘミセルロースと同程度に難分解性のリグニンを分解する¹⁾。

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²⁾ことに着眼し、前駆物質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する。本実験では、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. 実験材料および実験方法

2.1 実験材料

a) 白色腐朽菌および菌体外酵素

保存用菌株(*Trametes versicolor* WD1670)を基礎培地(表-1)に添加し、5Lの三角フラスコおよびエアフィルター付き通気装置からなる培養槽において25℃で静置培養した。培養液を遠心分離(5000rpm、10min)により菌体を分離し、上澄み液を菌体外酵素液として使用した。

b) フミン酸標準溶液の調整

試薬フミン酸 5g を 0.1N の水酸化ナトリウム 1L にいれ、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 1.0 μm のメンブレンフィルターで不溶性の部分除去し、さらにろ液を pH1 に調整した後、遠心分離により沈殿物を回収し、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に溶解し、pH6 に調整後、間断滅菌し、フミン酸標準溶液とした。

2.2 実験方法

表 2 に実験条件を示す。実験条件 1 は窒素源が硝酸性窒素によって生成された菌体外酵素、実験条件 2 はアンモニア性窒素によって生成された菌体外酵素を使用する。この条件で生成された菌体外酵素液にフミン酸を添加し、これらの各条件で 1L フラスコ内において 25℃で振とうし、その後経日的に 260、400、600nm での吸光度及び pH を測定した。また、酵素抽出時における基礎培地 A のリグニンペルオキシターゼ(LiP)の活性も測定した。

表-1 基礎培地成分

	基礎培地 A	基礎培地 B
N源		
NH ₄ Cl	無添加	0.128g
Na ₂ SO ₄	0.203g	無添加
KH ₂ PO ₄	0.20g	0.20g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05g	0.05g
CaCl ₂	0.08g	0.08g
Thiamine·HCl	0.10mg	0.10mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01g	0.01g
C ₆ H ₁₂ O ₆	10.0g	10.0g

表-2 実験条件

使用培地	菌培養初期の窒素濃度	酵素抽出時の窒素濃度	Run No. (フミン酸濃度)
1 基礎培地B	203.4 (mg/L) (NO ₃ -N)	5.755 (mg/L) (NO ₃ -N)	Run1 (0mg/L)
			Run2 (5mg/L)
			Run3 (10mg/L)
			Run4 (30mg/L)
2 基礎培地A	128.2 (mg/L) (NH ₄ -N)	3.512 (mg/L) (NH ₄ -N)	Run1 (0mg/L)
			Run2 (5mg/L)
			Run3 (10mg/L)
			Run4 (30mg/L)
			Run5 (50mg/L)
			Run6 (100mg/L)

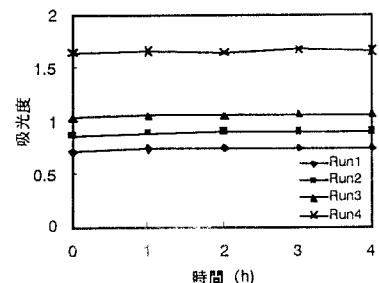


図-1 波長260nmの吸光度の経時変化

3. 実験結果および考察

図-1 に実験条件 1 での波長 260nm の吸光度の経時的な変化を示す。菌体外酵素液にフミン酸を添加した Run2、Run3、Run4 とも、実験開始から 4 時間までほとんど変化を示さなかった。また波長 460nm の吸光度の経時的変化を示した図-2 においても、Run2、Run3、Run4 はほとんど変化を示さなかった。これは、培地の窒素源が硝酸性窒素では窒素源がほとんど消費されてもフミン酸を分解する菌体外酵素は生成されないものと思われる。

図-3 に実験条件 2 での波長 260nm の吸光度の経時変化を示す。菌体外酵素液にフミン酸を添加した Run2 から Run6 は、実験開始後 30 分で急激に吸光度が低下し、フミン酸濃度が高いほど減少速度は速くなった。これは菌体外酵素によりフミン酸が分解したことを示している。図-4 に波長 460nm における吸光度の経時変化を示す。Run2 から Run6 までいずれもわずかな減少しか示さなかった。これは分解される過程で生じた自由ラジカルのいくつかが重合し、これが可視部吸光度域の波長である 460nm に影響を及ぼし、分解による吸光度の減少をほとんど相殺したためと思われる。図-5 に基礎培地 A の酵素抽出時における菌体外酵素の一つである LiP の活性の経時変化を示す。波長 310nm における吸光度の増加は、ペラトリルアルコールが酸化されて生成されるペラトリルアルデヒドによるものだが、吸光度の増加はわずかであることより、抽出した菌体外酵素液の LiP 活性はほとんどなかったことが分かる。また、菌体外酵素液の酵素である LiP とマンガンペルオキシターゼ(MnP) の活性発現には、過酸化水素が必要とされている³⁾。このことより、本実験でのフミン酸の分解は、菌体外酵素の中でも LiP や MnP によるものではなくラッカーゼによるものであると考えられる。同じ基礎培地 A を使用し酵素抽出時のアンモニア性窒素濃度が 18.452mg/L だったとき、フミン酸の分解は行われなかった。このことより、ラッカーゼの生成にはある一定以上の窒素源の欠乏が必要であると思われる。図-6 に pH の経時的変化を示す。Run1 から Run6 まで経時的にほとんど変化していない。これは菌体外酵素がフミン酸を分解するときに、pH に影響を及ぼす物質を生成していないことが分かる。

4. まとめ

本研究から、白色腐朽菌の菌体外酵素のラッカーゼによりフミン酸を分解する可能性が示唆された。ラッカーゼを生成する条件として、窒素源が硝酸性窒素ではアンモニア性窒素に比べ同じ消費量であってもほとんど生成されない。また、アンモニア性窒素を使用してもある一定以上の窒素源の欠乏が必要であること示された。

今後は、ラッカーゼの活性測定およびラッカーゼと LiP、MnP のフミン酸の分解能の違い、自然界由来のフミン酸の除去実験などを行っていく予定である。

<参考文献>

- 1) 木材科学と利用技術Ⅳ、日本木材学会編、1996
- 2) 丹保憲仁、水道とトリハロメタン、技報堂出版
- 3) 諸星紀幸、木質バイオマスの利用技術、文永堂出版、1991

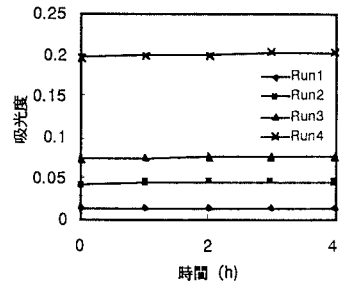


図-2 460nmの吸光度の経時変化

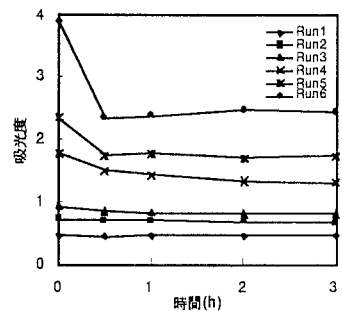


図-3 波長260nmの吸光度の経時変化

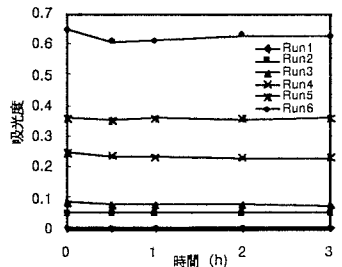


図-4 波長460nmの吸光度の経時変化

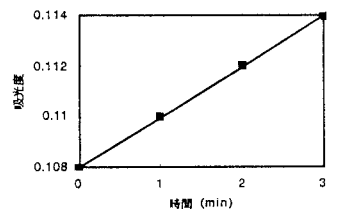


図-5 LiP活性の経時変化

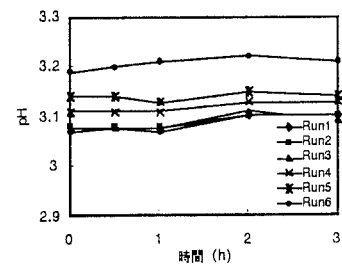


図-6 pHの経時変化