

VII-56

白色腐朽菌の菌体外酵素によるフタル酸エステルの分解について

岩手大学工学部 学生員 ○蝦名康郎 荻野目昭

正会員 伊藤歩 相澤治郎 海田輝之

1. はじめに

近年、水環境における化学物質による汚染が問題になっており、特に、人工的に合成された環境ホルモンは、生体へ悪影響を及ぼすことが報告されている。それらの物質の一つとされるフタル酸エステル類は、主にプラスチック可塑剤として幅広く使用されており、水環境中で最も多く存在する環境ホルモンとして、水質基準の監視項目にもなっている。

そこで本研究では、白色腐朽菌の菌体外酵素が難分解性物質を分解するという能力を有することに着目し、フタル酸エステル類の分解除去の可能性について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 器具類の洗浄および試薬の調整¹⁾

実験器具類はガラス製のものを、アセトンで洗浄した後 200℃で 2 時間加熱する操作を 2 回繰り返してから使用した。固相ディスクは、ガラスシャーレ内においてアセトンで 6 時間以上漬浸して洗浄し、これを 2 回以上繰り返してから使用した。本研究で用いた対象物質、サロゲート物質及び内部標準物質を表-1 に示す。

2.2 白色腐朽菌の菌体外酵素の測定

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 (*Coriarius Versicolor* K2615) を用いた。菌体を Kirk 培地(表-2) へ植菌し、エアフィルター通気装置付の 500ml 三角フラスコにおいて、28℃で静地培養した。培養液をナイロンメッシュでろ過した後、遠心分離(7500rpm、20min)により菌体を分離し、上澄液を回収して菌体外酵素溶液とした。酵素活性(U/L)は、分光光度計を用いて 2 つの波長(310nm、469nm)の吸光度を測定して、式(1)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。ここで酵素活性の単位を示す 1U は、反応条件下での 1 分間の 2 量体生成量(μmol)を表し、 ΔA は吸光度値、 ε は係数、T は酵素反応時間(min)、V は酵素添加量(cm^3)を表す。

2.3 フタル酸エステル類添加後の前処理及び測定

GC-MS 定量分析の前処理として、アセトンで洗浄したガラス器具と固相ディスクをマニホールドにセットし、図-1 に示した手順で行った。白色腐朽菌の菌体外酵素溶液 10ml に、濃度が 1mg/l になるよう対象物質及びサロゲート物質混合標準液を添加し、吸引ろ過器により流量 50~100ml/分程度で吸引・通水した。次に、溶出溶媒としてアセトンを用いて、まず 2ml で 10 分間溶出させ、次に 4ml で 10 分間溶出させてから吸引する操作を 2 回繰り返して、合計 10ml 弱の溶出液を回収した。回収後、アセトンで 10ml に定容し、希釈を行った。その後、内部標準物質混合標準液を添加して、この溶液に含まれるフタル酸エステル類について GC-MS (SHIMADZU QP-5000) を用いて内部標準法により定量分析を行った。また、溶媒類、器具類、空气中などからの汚染は、フタル酸エステル類の測定結果に大きく影響を及ぼすので、空試験としてアセトン溶出から同様の操作を行い、これに含まれるフタル酸エステル類も測定した。ここで、サロゲート物質は、実験操作を行ったときの回収率を調べるために添加する物質で、内部標準物質は注入誤差や装置のバラツキを補正するために添加する物質である。

表-1 試薬類

対象物質	フタル酸ジメチル (DMP) フタル酸ジエチル (DEP) フタル酸ジブチル (DBP) フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP)
サロゲート物質	フタル酸ジ-n-ブチル d4 フタル酸ビス-2-エチルヘキシル d4
内部標準物質	ビレン d10 ナフタレン d8

表-2 Kirk 培地成分(1L 中)

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

$$\text{酵素活性}(U/L) = \frac{\Delta A \times 10^6}{\varepsilon \times T \times V} \quad (1)$$

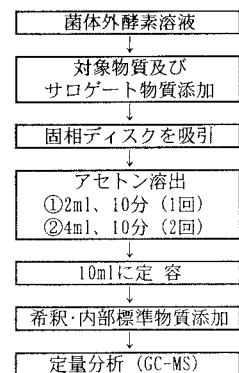


図-1 前処理方法

3. 実験結果および考察

図-2に培養開始から11日目までの菌体外酵素活性の経日変化を示す。培養日数の経過と共にLac活性が高い値を示しながら増加し、7日目にピークを迎えて、その後減少していく傾向が見られた。MnP活性もLac活性に比べ少量ではあるが、同様の傾向を示した。LiP活性は微小ではあるが、その発現が見られた。

7、9、11日目にフタル酸エステル類を添加したときの各々の濃度の経時変化を図-3に示す。これらの図は、各前処理実験時における回収率が異なるため、対象物質濃度をサロゲート物質濃度で除して回収率を揃えてある。

まず、空試験の結果、実験器具類、空気中からのフタル酸エステル類の混入はほとんど無く、本実験の測定には影響しないことが分かった。従って、図-3において対象物質/サロゲート物質の値が1.0を超えているのは、酵素溶液に当初から含まれていたものに加え、添加量と検量線との微小誤差が生じたためと考えられる。

次に、7日目を見ると、全体的に減少傾向を示しており、特にDEHPが大きく減少しているのが分かる。9日目では、DEHPは7日目と同様の傾向を示し、DMPも僅かだが減少しているものの、DEPとDBPの値はばらついてしまった。これは、DEPとDBPを除しているサロゲート物質の回収率が、他方と比べて低くなってしまったために、このような結果になってしまったと考えられる。また、11日目では、DEPとDEHPが3時間後に少し減少しているが、大きな減少は見られなかった。これら3つの図から4つの対象物質の中で、特にDEHPの減少率が大きいことが分かった。これら4つの対象物質の構造はほぼ同じで、分子量が異なっている違いがあるが、その中で一番分子量の大きいDEHPに、白色腐朽菌の菌体外酵素が有効に作用したのではないかと推測される。また、菌体外酵素によりDEHPが減少していることから、DEHPの細分化が考えられ、現在、中間生成物の定性分析を行っているところである。

図-4に7、9、11日目のDEHPの経時変化を示す。各日ともに、添加後3時間で大きく減少し、その後緩やかに減少していく傾向が見られた。また、3時間までの減少勾配を見ると、7日目が一番大きく、9日目、11日目と続くが、これは酵素活性が7日目に高く発現し、その後減少しているため、このような結果になったと考えられる。この結果には、菌体外酵素のLac活性とMnP活性が作用していると考えられるが、11日目にMnP活性の発現が見られないにもかかわらず、11日でのDEHPが減少していることから、菌体外酵素活性のうち、Lac活性が大きく寄与していると推測される。

4. まとめ

フタル酸エステル類の中で、特に分子量の大きいDEHPの減少が見られたことから、白色腐朽菌の菌体外酵素によるフタル酸エステル類の分解の可能性が示唆された。また、酵素活性としてはLac活性が大きく寄与していると考えられる。

<参考文献>

- 1) 藤本千鶴：水中のフタル酸エステル類の分析方法の検討とモニタリング、用水と排水、Vol.41、No.12、41-47、1999

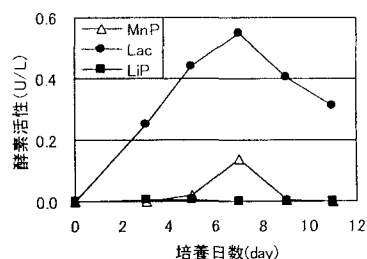


図-2 酵素活性の経日変化

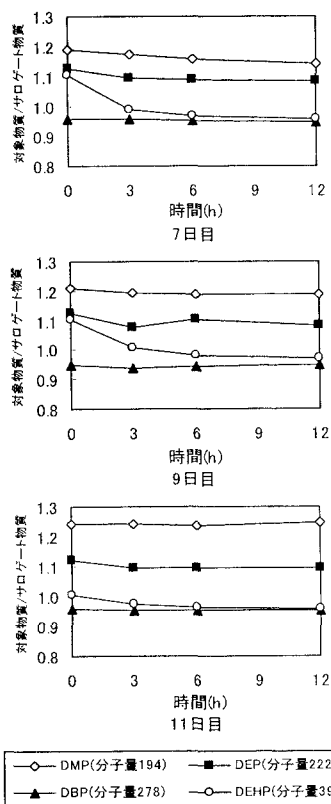


図-3 フタル酸エステル類の経時変化

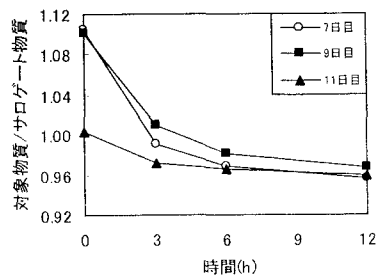


図-4 DEHPの経時変化