

(37) 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の増殖特性と難分解性物質
分解性に関する基礎的研究

Factors Influencing the Growth Characteristics of the White Rot Fungus,
Phanerochaete chrysosporium and its Recalcitrant Substance Degradability

尾崎博明*, 寺島 泰*, 呉 楓*, 大河内由美子*, 前田かおり**

HIROAKI OZAKI, YUTAKA TERASHIMA, FENG WU, YUMIKO OHKOUCHI, KAORI MAEDA

ABSTRACT; Some of the environmental factors influencing the growth characterization of the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*, and the degradation of azo dyes (Reactive Red 22 & Sunset Yellow FCF) and chlorinated substances (2,6-DCP&MCPA) were investigated in shallow batch cultures. The optimum temperature and pH for the growth were around 30°C and 4, respectively. The presence of thiamine was necessary for its growth. The azo dyes were decolorized by the *P.chrysosporium* under nitrogen-limiting condition. Two chlorinated substances were, however, disappeared under both nitrogen-limiting and nitrogen-sufficient conditions. Adsorption onto the mycelia were also investigated. And it was concluded that these recalcitrant substances were degraded by non-specific mechanisms of this lignin-degrading fungus. The azo dyes were also decolorized by the crude enzymes of lignin peroxidase.

KEYWORDS; *Phanerochaete chrysosporium*, growth characterization, azo dyes, chlorinated substances, biodegradation, adsorption, lignin peroxidase

1. 緒論

産業活動等の拡大と多様化に伴い、多種多様な化学物質が環境中に排出されるようになり、有害かつ難分解な物質による水系汚染、土壌汚染が顕在化してきている。このような状況のもとで、各種の微生物の検索とその利用について遺伝子工学をも含めた検討がなされているが、最近、担子菌類に属する白色腐朽菌を用いる排水処理及び汚染土壌のバイオレメディエーションが注目されてきた。これは白色腐朽菌が、(1) 極めて広範囲の難分解性物質を分解する能力をもつ¹⁾ こと、(2) カビと同様に培養が容易で、高い成長速度を有すること、によっている。とくにこの(1)の能力は、通常の微生物反応が強い基質特異性を示すことが多いことを考えると応用上極めて有用な特性であると言える。白色腐朽菌は元来、木質植物中に存在する構造的ポリマーであるリグニンを分解できる微生物であり、リグニン分解に関する研究は従来から数多く行われてきた。リグニンは非重複性フェニールプロパン単位で構成される非常に複雑な3次元ポリマーであり、通常、その立体的不規則性が酵素の攻撃に強く抵抗するとともに、高分子のリグニンが細胞に吸収され細胞内酵素で分解されることは困難である。したがって、白色腐朽菌は、細胞外へ分泌する一群のペルオキシダーゼに関連する極めて非特異的な機構によりリグニンを分解すると考えられている²⁾。リグニンに

*京都大学工学部衛生工学教室 (Dep. of Environ. & Sanit. Eng., Kyoto University)

** (株) 鴻池組 (KONOIKE Construction Co. LTD.)

比較してはるかに小単位である多環芳香族化合物などの様々な生物学的難分解物質が、同様の機構により無機化されることは十分に起こりうると考えられる。

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* による多環芳香族化合物などの汚染物質の分解に関する研究は、日本ではほとんど見られないものの、アメリカ等において徐々に行われつつあり、Benzo [a] pyrene等の多環芳香族化合物、PCP、Dioxin等の有機塩素化合物、DDT等の殺虫剤などのような各種の物質の分解例が報告されている¹⁾。しかしながら、これらの報告は、必ずしも環境浄化を意識したものでなく、また、*P. chrysosporium*の増殖特性とその影響因子などに関する基礎や、汚濁物質分解特性やその条件など、応用にあって必要となる諸事項について十分な検討が行われているとは言えない。

このような状況を背景として本研究では、実際の処理に用いるための基礎として、白色腐朽菌 *P. chrysosporium*の増殖特性及びアゾ染料や有機塩素化合物などの数種の難分解性物質に対する同菌の分解特性について基礎的検討を行った。アゾ染料については活性汚泥による好気条件下での分解は極めて困難であることを確認しており³⁾、また、有機塩素化合物は一般的に毒性物質であり、活性汚泥等の微生物に対して阻害作用を示し、その分解は特定の微生物により行われることが報告されている⁴⁾。

2. 実験材料と方法

2.1 *P. chrysosporium*の増殖特性と増殖に及ぼす影響因子

(1) *P. chrysosporium*の培養方法

本研究では、供試菌体として白色腐朽菌 *P. chrysosporium* BKM-F-1767を用いた。この菌は、2% (W/V) 麦芽エキス寒天斜面培地に植菌し、39℃で8日間培養した後に4℃下で保存した。各種の実験は、保存した菌より胞子を白金耳で採取し、5 mLの滅菌水の中に懸濁させて胞子懸濁液を作成し、後述するようにこれを所定の培地に植菌する方法によった。なお、胞子濃度はよく混合した後に650nmにおける吸光度の値によって決定した⁵⁾。

実験に先立ち、*P. chrysosporium*の増殖を視覚的に確認するために、2% (W/V) 麦芽エキス寒天培地を用いて同菌のスライド培養⁶⁾を行った後に標本を作り、位相差顕微鏡(Olympus BH-2)により菌の形態観察を行った。次いで、*P. chrysosporium*の増殖に大きな影響を与えと考えられる温度、pH、微量物質について検討を行った。

(2) 影響因子に関する実験方法

1) 温度

2% (W/V) 麦芽エキス培地を20mLずつ 100mL三角フラスコに分注し、オートクレーブで滅菌後に植菌したインキュベーター内において5、10、15、20、25、30、35、40、45℃の各温度で2個ずつ8日間培養した。次に菌体を取り出し、菌体乾重量⁶⁾を求めた。

2) pH

Czapek液体培地⁶⁾を1NのHClと1NのNaOHを用いてpHを3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0に調整し、それぞれ20mLずつを100mL三角フラスコに分注し、滅菌後に植菌して30℃で13日間培養した。この実験菌体乾重量が少なかったため、菌体を1N NaOHで処理し、ローリー法により測定した蛋白量より菌体量を求めた。

3) 微量物質

菌類の増殖にはいくつかの微量物質が必須であることが知られている。本研究では、表1に示す培地中のミネラル溶液より塩化カルシウム、塩化コバルト、チアミン塩化物のいずれか、あるいは全部を除いた培地を用いて8日間培養し、上記の「1) 温度」の場合と同様に菌

Table 1 Composition of the basic medium

composition	concentration(in 1L)
Glucose	10g
Ammonium Tartrate	0.22g
0.1M Na-asconitate buffer (pH=4.3)	100mL
Basal Medium	100mL
KH ₂ PO ₄	2.0g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
CaCl ₂	0.1g
Thiamine·HCl	0.005g
Mineral solution	70mL

体増殖量を測定した。表 1 に示す培地の組成は緩衝液を除き Kirk らによる培地⁵⁾と同様である。

なお、各実験における植菌量は、濃度約 5×10^5 個/mL の孢子懸濁液について 100 μ L とした。

2.2 *P. chrysosporium* によるアゾ染料と有機塩素化合物の分解

(1) 分解実験

500mL の三角フラスコ内において、後述する培地 50mL に孢子懸濁液（孢子濃度約 3.6×10^6 個/mL）を 200 μ L ずつ植菌し、30℃ で培養した。アゾ染料については培養 4 日後に染料を 40mg/L となるように加え、また有機塩素化合物については、培養 7 日後に 30mg/L となるように加えた。その後、一定時間ごとに 1mL ずつ試料液を採取し、12000rpm で 15 分間遠心分離を行い、上澄み液中の物質に対して分析を行った。染料には Reactive Red 22 (以下 Red B) と Sunset Yellow FCF を、有機塩素化合物には 2,6-ジクロロフェノール (2,6-DCP) と 4-クロロ-2-メトキシフェノキシアセティックアシッド (MCPA; 除草剤) を主に用いた。それぞれの化学構造式を図 1 と図 2 に示す。有機塩素化合物は揮発性を有するため、対照として植菌を行わない培地を用いて同様の実験を行った。また、*P. chrysosporium* によるリグニン分解は培地中の窒素量によって影響されることが確認されている²⁾ ことから、ここでは培地として表 1 に示す基礎培地と、その 10 倍量の窒素を含む培地（以下それぞれ N-limiting と N-sufficient と表記する）を用いた。

染料の濃度は分光光度計（島津 UV200S 型）を用いて測定した。Red B と Sunset Yellow FCF の最大吸収波長はそれぞれ 512nm と 480nm である。2,6-DCP と MCPA の分析は高速液体クロマトグラフィ (HPLC; YANACO L-5000) を用いた。使用カラムは YANAPAC ODS-A であり、カラム温度は 35℃ に設定した。また用いた溶離液の組成は、メタノール：蒸留水：酢酸 = 600 : 400 : 1 であり、流速は 1.5 (mL/min)、測定波長は 210nm とした。また、試料液中のアモニア性窒素濃度はオートアナライザー法 (Technicon™) により、グルコース濃度はアンスロン法によりそれぞれ測定した。

(2) 吸着実験

P. chrysosporium による液相からの基質の除去は菌体への吸着とその後の分解により行われているものと考えられる。この基質吸着量を評価するために以下の実験を行った。

基礎培地で 6 日間培養した菌糸体を蒸留水で洗浄し、pH 7.5 のリン酸緩衝液と染料（濃度 40mg/L、80mg/L）または有機塩素化合物（濃度 30mg/L）を含む培地に移して 30℃ 下に置いた。菌糸体を移す前と、移してから 1 時間後、4 時間後、8 時間後の試料を採取し、染料についてはその濃度と菌体乾重量を測定した。一方、有機塩素化合物については、菌糸体への付着部分をメタノールで抽出し、これを吸着分として菌体乾重量当たりの吸着量を算出した。

2.3 *P. chrysosporium* が生成する酵素による脱色

(1) 酵素の濃縮

P. chrysosporium BKM-F-1767 菌を上述した基礎培地で培養した培養液（約 3000mL）を濃縮し、これを菌体外粗酵素液として実験に供した。まず、1000mL の三角フラスコ中に 60mL ずつ培地を分注し、植菌後 3 日毎に一回（約 3 分間）酸

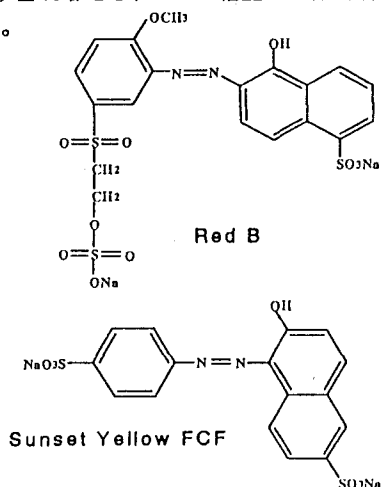


Fig.1 The chemical structure of Red B & Sunset Yellow FCF

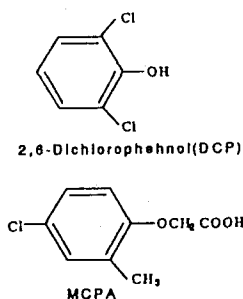


Fig.2 The chemical structure of 2,6-DCP & MCPA

素を吹き込み、6日目に菌をろ紙でろ過し、得られた培養液を4℃下で遠心分離（10,000×g、15分）した。上澄み液を4℃下で限外ろ過（ADVANTEC UHP-761c、分画分子量10000）により濃縮し、濃縮液をろ過滅菌してから4℃下で保存した。この濃縮液をリグニンペルオキシダーゼの粗酵素液として用いることとし、その酵素活性はTien & Kirkが提示した方法⁵⁾により測定した。

(2) 酵素試験

所定濃度の染料に上述した粗酵素液、0.45mMのH₂O₂及び95mMのNa-酒石酸bufferを添加し、酵素反応による染料脱色実験のための供試液（総量3.3mL）とした。対象染料としては上記した一つのアゾ結合を有するRed BとSunset Yellow FCFの他に、二つのアゾ結合を有するEvans Blue（構造式は図3に示す）を用いた。Red Bの脱色実験では、反応液中のRed B濃度を約12mg/Lとし、酵素濃度は0～0.0426U/mLの間で変化させた。ここで、1Uの酵素活性は室温において1分間に1μmolのVeratryl alcoholを酸化する能力を表わしている。また、Sunset Yellow FCFとEvans Blueに対する脱色実験では、染料濃度はそれぞれ12.9mg/Lと5.4mg/Lとし、酵素濃度は0.0107U/mL一定とした。以上のように調整した反応供試液を分光光度計の試料セルに入れ、ただちに染料濃度の変化を測定した。また、対照として0.45mMのH₂O₂、95mMのNa-酒石酸bufferと染料を混合し、同様に染料濃度の変化を測定した。

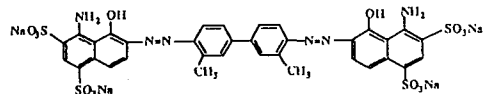


Fig. 3 The chemical structure of Evans Blue

3. 実験結果と考察

3.1 *P. chrysosporium*の増殖特性と増殖に及ぼす影響因子

(1) *P. chrysosporium*の形態特性

10日間のスライド培養により作成した標本のスケッチを図4に示す。ここでは、菌糸の先端が丸く膨らみ分生胞子に変化していく様子や、すでに形成された分生胞子が見られ、発達した菌糸には隔壁と考えられる仕切りが観察できた。菌糸の太さは2～3μmであった。白色腐朽菌*P. chrysosporium*は分類学的には担子菌亜門菌蕈綱に属している。担子菌類の生活環は一般的に、子実体に着生する担子胞子の発芽によりまず一次菌糸が生育し、一次菌糸の接合・交配が起こることにより、二次菌糸が形成される。また、一次菌糸、二次菌糸は一部が自発的に分節して分生胞子を形成し、無性的に生殖することができる⁷⁾。本研究で用いた*P. chrysosporium*についても、この菌は子実体を作らずに容易に分生子を形成しており、上記の生活環に従うことが視覚的に確認された。

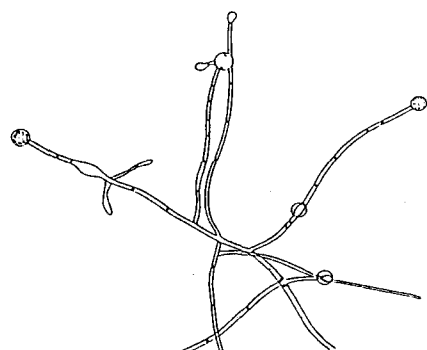


Fig. 4 Morphology of *P. chrysosporium* based on the photography by microscope (×400)

(2) *P. chrysosporium*の増殖に及ぼす温度の影響

菌体増殖に及ぼす培養温度の影響を図5に示す。各温度について試料の平均値を用い、25℃の菌体乾重量（108.95±7.7mg）を1として重量比で比較している。この結果から、菌体の増殖には30℃付近が最適であると考えられる。また15℃以下では菌の増殖が著しく抑制され、30℃以上でもそれ以下ほどではないが、増殖量は低下している。リグニン分解酵素の最適温度は、Kirkら⁸⁾によって39～40℃が最適とされているが、この結果は、菌の増殖に最適な温度とリグニン分解酵素活性の最適温度が必ずしも一致しないことを示唆している。同菌は木材腐朽菌として自然界に棲息しており、その条件から考えても、本実験で得

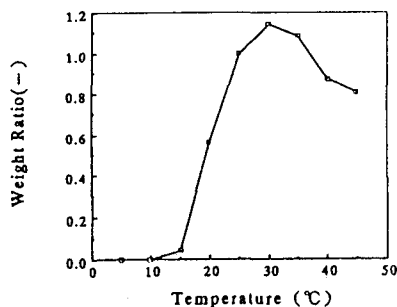


Fig 5 Effect of temperature on the growth of *P. chrysosporium*

られた30℃という値は妥当であると考えられる。しかし、胞子の生成は40℃前後において最も多く見られ、最適増殖温度より高い温度下の方が分生子の生成活動は活発であった。

(3) *P. chrysosporium*の増殖に及ぼすpHの影響

得られた結果を図6に示す。実験終了時のpHは、初期pHと比較してほとんど変化がなかった。この図より培地のpHは菌の増殖に大きく影響しており、*P. chrysosporium*の最適pHは4付近であると考えられる。また、pH5.5以上では、菌の成長は著しく抑制されることがわかった。自然界に存在する菌類の最適pHは酸性側に偏っているのが普通である。

*P. chrysosporium*は環境のpHを変える能力を持っていることがよく観察され、通常、同菌はその周囲の環境のpHを4.5前後に低下させる¹⁾。これは基質代謝によるシュウ酸などの強い有機酸の生成及びプロトンの分泌に関係すると考えられている。従って、最適pHを求める実験では、培地の選択が最も重要となる。本研究では、最初に麦芽エキスを培地を用いて実験を行ったが、pH値が5以上の培地では菌の成長とともにpHが急激に低下し、最後にほとんど4.5前後に低下して菌体増殖量に差は見られなかった。ここで用いたCzapek液体培地は菌類の培養によく用いられる簡単な培地であるが、菌の増殖量は総じて少なかった。これは同培地が*P. chrysosporium*の成長に必須な何らかの因子を欠くためと推定される。

(4) *P. chrysosporium*の増殖に及ぼす微量物質の影響

実験結果を表2に示す。この表より、*P. chrysosporium*の増殖にはチアミン (VB1) の影響が最も大きいことがわかる。一般にCa²⁺は細胞の糖代謝・アミノ酸代謝・脂質代謝など数多くの代謝系やイオン輸送、細胞分裂などの細胞機能調節に関連していると考えられている。Co²⁺はビタミンB₁₂の成分である。ビタミンB₁₂は本来、酵素反応における水素やメチル基運搬体として重要であり、種々の生物の発育に関与する因子としての役割を果たしていると考えられる。一般にビタミン類はかなり多くの微生物によって要求され、とくに真菌類は一種類または数種類のビタミンを添加しないと成長しない。特に、チアミンについては全ての担子菌に共通の必須成長因子という報告もされている⁸⁾。Ca²⁺とCo²⁺及びチアミンはすべて重要な微量物質であるが、*P. chrysosporium*の増殖に対するCa²⁺とCo²⁺の影響はチアミンほど大きくなかった。したがって、*P. chrysosporium*の利用においてはチアミンの存在に十分な注意が必要である。

3.2 白色腐朽菌*P. chrysosporium*によるアゾ染料と有機塩素化合物の分解

(1) *P. chrysosporium*によるアゾ染料の脱色特性と菌体への吸着特性

1) 脱色特性

N-limiting及びN-sufficientにおけるRed B濃度、アンモニア性窒素濃度、及びグルコース濃度の経時変化をそれぞれ図7、図8に示す。12日間の培養を経てN-limitingでは、染料の初期濃度の97%が脱色されているのに対し、N-sufficientでは40%に留まっている。また、N-limitingでは染料を加えた時に窒素は全く残留しておらず、以後、グルコースは緩やかに減少している。一方、N-sufficientでは、アンモニア性窒素が残留しており、グルコースは急激に減少した。アンモニア性窒素とグルコースの微生物による代謝から考えると

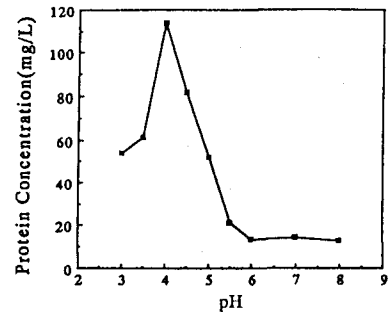


Fig. 6 Effect of pH on the growth of *P. chrysosporium*

Table 2 Effect of the presence of Ca²⁺, Co²⁺, Thiamine·HCl on the growth of *P. chrysosporium*

Variation from the basic medium	dry weight(mg)
without Ca ²⁺ added	38.1
without Co ²⁺ added	43.3
without Thiamine·HCl added	4.8
without Ca ²⁺ , Co ²⁺ , Thiamine·HCl added	4.2
with Ca ²⁺ , Co ²⁺ , Thiamine·HCl added	42.7

N-limitingでは窒素が消費されてほとんど存在しないため、グルコースは菌体増殖にあまり用いられず、この菌の特性であるペラトリルアルコールの生合成など二次代謝のための補助基質として用いられると推定される。一方、N-sufficientでは窒素が存在するため、グルコースは菌体の成長といった一次代謝用に消費される量が多いと考えられる。

前述した通り、*P. chrysosporium*は元来リグニンを分解する菌であり、その研究過程においてリグニンは、炭素、窒素、あるいは硫黄元素が欠乏する頃に発現するリグニネルオキシダーゼに関連する種々の反応機構によって分解されることが明らかになってきている。したがってアゾ染料の脱色においても、N-limiting条件下ではリグニネルオキシダーゼ活性があり、N-sufficient条件下ではリグニネルオキシダーゼ活性がないと推定できる²⁾。以上の結果より、アゾ染料の脱色はリグニネルオキシダーゼの活動に関係していると考えられる。なお、アゾ染料の脱色に対する酵素の作用については次節で記述する。図9はRed BとSunset yellow FCFに対する脱色実験結果を比較したものである。Sunset yellow FCFの構造はより簡単であるが、脱色率は低い。J. Spadaroら⁹⁾によると、水酸基、アミノ基、ニトロ基などの置換基を有するアゾ染料はより効率的に*P. chrysosporium*によって無機化される。またPaszczynskiら¹⁰⁾は、グアヤコール基をアゾ染料の構造に導入することによって染料の分解がより容易になることを報告している。したがってRed BとSunset yellow FCFの結果についても置換基が異なることに起因している可能性が高い。

2) 吸着特性

菌糸体1mg当たりのRed Bの吸着量を図10に示す。吸着量は染料濃度にほぼ比例し、約1~4時間経過すると吸着平衡に達している。この図より、染料の初期濃度が40mg/Lの時の吸着平衡量は5mg/gMLSS程度と考えられる。N-limitingとN-sufficientのそれぞれの脱色量に、この初期吸着の影響を考慮してみると、脱色量の内N-limitingでは最高30%、N-sufficientでは92%が初期吸着によるものと考えられた。したがって、N-sufficientの場合の染料の脱色のほとんどは吸着によるものであり、N-limitingの場合は吸

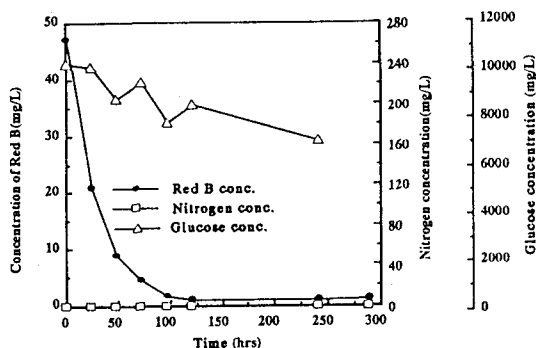


Fig.7 Concentration profile of Red B, Nitrogen and Glucose under N-limiting condition

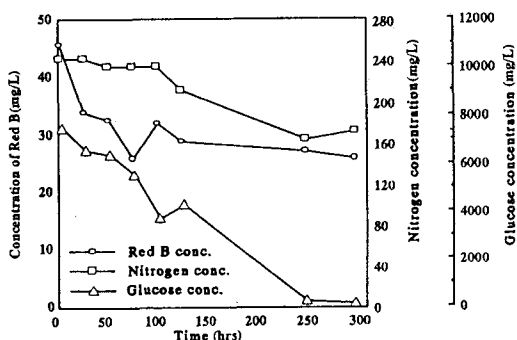


Fig.8 Concentration profile of Red B, Nitrogen and Glucose under N-Sufficient condition

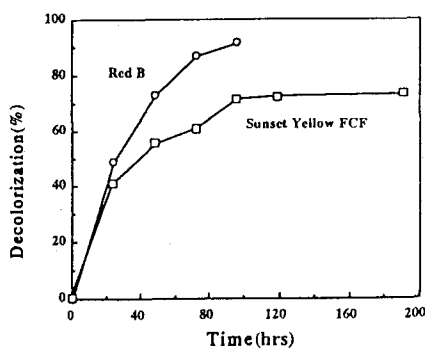


Fig. 9 Comparison of decolorization between Red B & Sunset Yellow FCF

着以外の生物学的分解系の脱色機構が働いていると推定できる。

(2) *P. chrysosporium*による有機塩素化合物の分解特性と菌体への吸着特性

1) 分解特性

実験結果を図11 (2,6-DCP)、図12 (MCPA) に示す。2,6-DCPについては、ほぼ0次反応的に約3日間で消失した。ただし、揮発性が高いため対照実験においても2,6-DCPが大きく減少している。MCPAについては、29日後にはN-limitingで残存率24.5%、N-sufficientでは8.4%であった。なお、実験終了後の菌体乾重量は2,6-DCPで71.6mg、MCPAで81.5mg (N-limiting) 及び110.6mg (N-sufficient) であった。N-limiting及びN-sufficient培地中のリグニンペルオキシダーゼの活性は測定しなかったため、MCPAの減少は酵素反応による生分解性を直接に示すものではないが、生分解や吸着などの機構を予見しうる有機塩素化合物の減少が認められた。菌体への有機塩素化合物の吸着については以下で検討を加える。

2) 吸着特性

2,6-DCPとMCPAの吸着量の経時変化を図13に示す。いずれも約1時間経過すると平衡に達している。この結果から、菌体単位重量当たりの吸着量として2,6-DCPについて3.35 mg/g MLSS、MCPAについて4.50mg/g MLSSの値を得た。この値に基づいて初期吸着量を計算すると、例えばMCPAについて図12に見られる初期の急激な減少量にほぼ相当した。また2,6-DCPについても1日後までの減少量にほぼ相当した。また、MCPAに関するN-limitingとN-sufficientの29日後の残存率の差は、N-sufficientでの増殖菌体への吸着分にほぼ相当した。このような初期吸着及び増殖した菌体への吸着を考慮した上でそれ以上の減少分を生分解によるものとする、図11、図12の結果より2,6-DCPでは添加量の80%、MCPAでは44%程度がそれに相当することになる。なお今回のMCPAに関する実験では、N-limitingとN-sufficientのいずれもが吸着特性を除いてほぼ同様の除去性を示した。

*P. chrysosporium*によるリグニン及び種々の汚染物質の除去機構は極めて複雑であり、対象物質によって分解機構は異なる。リグニンペルオキシダーゼが触媒する一連の自由ラジカル反応が多く、汚染物質の分解に関わっていると考えられているが、リグニン酵素と関係なく、何らかの機構で汚染物質を除去（特に還元）することがある。例えば、*P. chrysosporium*によるTNTの還元反応はリグニン分解酵素が存在しない条件下で起こることが報告されている¹⁾。特

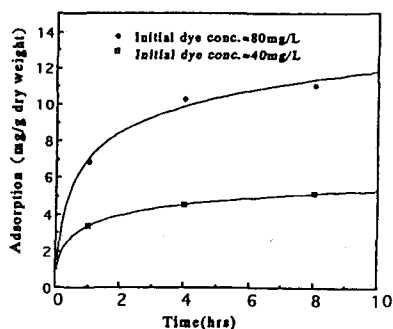


Fig. 10 Red B adsorption profile for *P. chrysosporium*

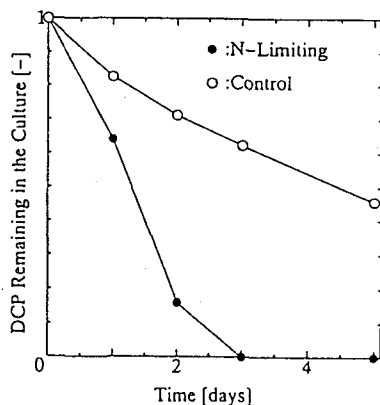


Fig.11 Disappearance of 2,6-DCP

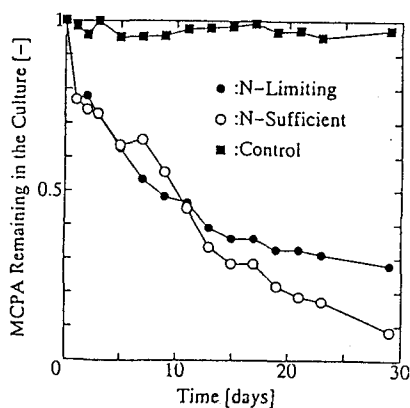


Fig.12 Disappearance of MCPA

定の汚染物質に対して幾つかの機構が重なって作用すること
も考えられ、酵素反応も含めてさらに検討する必要がある。

3.3 *P. chrysosporium*が生成する酵素による脱色

添加する酵素濃度を異ならせて行ったRed B染料の脱色
実験の結果を図14に示す。酵素を含まない反応系では染料
濃度に変化は見られなかった。酵素を添加すると、最初の
数秒内に染料濃度が急激に減少し、酵素濃度が高いほど減
少量が大きく、反応時間もやや長くなる傾向が見られた。
3種類のアゾ染料、Red B、Sunset Yellow FCFとEvans BLue
に対する脱色率の比較を図15に示す。Sunset Yellow FCFの
脱色は脱色率は異なるもののRed B染料とほぼ同様の傾向を
示し、初期反応速度が非常に速く、5分後には反応がほとん
ど停止した。一方Evans BLueの反応速度は時間とともに低下
する傾向が見られた。Evans BLueは2つのアゾ結合を持つ長
い構造を有する染料であり、反応速度はこのような化学構造
と関連している可能性が高い。20分間の脱色率については
Evans BLueが8.5%と最も高く、Red Bの脱色率は5.9%、
Sunset Yellow FCFは1.9%であった。これは、図9に示した
結果とも一致している。以上の結果から、アゾ染料の脱色
はリグニンペルオキシダーゼに関連し、脱色速度及び脱色
の容易さは染料の構造に影響されることがわかった。前節
でも記述したようにリグニン分解酵素に関連する汚染物質
の除去機構は種々報告されている¹⁾。たとえば、直接的酸化、
リグニン分解酵素の触媒により生成した高反応性を有する自
由ラジカルによる酸化、また高い酸化態にある汚染物質に
ついては、まず自由ラジカルなどによる還元経路によって
還元されてから酸化されるなどがあり、リグニン分解酵素
が関与しない代謝経路の存在なども否定できない。したが
って、上述したアゾ染料の脱色がリグニン分解酵素の作用
によることは確実であっても、その分解経路などについて
まだ不明点が多く、今後さらに詳細な検討が必要である。

4. 結論

本研究では、白色腐朽菌 *P. chrysosporium*の増殖特性と
影響因子、同菌を用いたいくつかのアゾ染料と有機塩素
化合物の分解等について実験的な検討を行った。得られ
た主な結果を以下に列挙する。

(1) 菌体増殖に対して大きく影響する因子としては、まず、
培養温度とpHが挙げられる。培養温度は30℃付近にあり、
30℃以上では増殖量が低下し、15℃以下では菌の増殖は著
しく抑制された。また、培地の最適pHは4付近にあった。
ただし、*P. chrysosporium*はある程度周囲の環境のpHを4.5

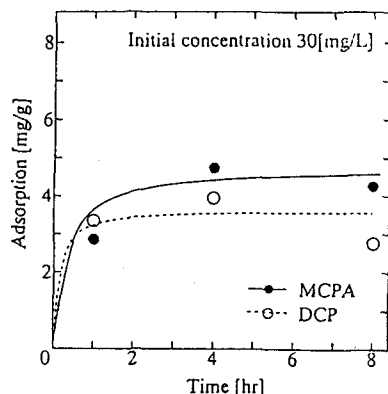


Fig.13 Chlorinated substance adsorption profile for *P. chrysosporium*

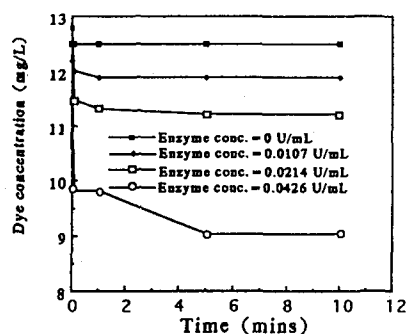


Fig.14 Decolorization of Red B by Lignin peroxidase of different concentration

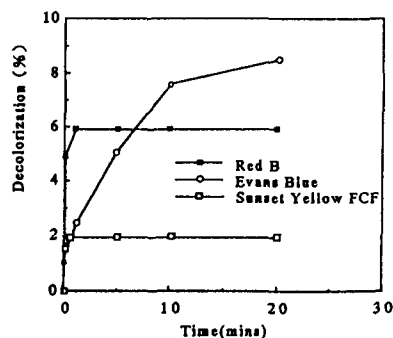


Fig.15 Comparison of decolorization of Red B, Sunset Yellow FCF and Evans Blue by Lignin peroxidase

前後に低下させる能力も有していることがわかった。

(2) *P. chrysosporium*の増殖にはビタミン類、特にチアミンが必須因子である。

(3) *P. chrysosporium*はアゾ染料 (Red B及びSunset Yellow FCF) を脱色し、菌体外酵素によっても脱色が見られた。この結果及び窒素濃度の高い培地での *P. chrysosporium* によるアゾ染料の分解が起こりにくかったことから、脱色にはリグニン分解酵素の作用が関与していると考えられた。

(4) *P. chrysosporium*及び菌体外酵素による染料脱色実験より、脱色の容易さと脱色速度は染料の化学構造に依存されると考えられた。

(5) *P. chrysosporium*は2,6-DCPとMCPAといった有機塩素化合物濃度を減少させた。後述する菌体への吸着分はその減少分の一部であり、生物学的な反応による減少が認められた。なお、培地の窒素含有量の差による分解状況の相違はあまりみられなかった。

(6) *P. chrysosporium*への初期吸着は急激におこる。吸着量は物質によるが、本研究での実験系では、アゾ染料 (Red B) の添加量の30%、有機塩素化合物の20%強が初期吸着により除去された。

*P. chrysosporium*などの白色腐朽菌は、その特性から土壌浄化や廃水処理への応用が非常に期待される。しかしながら、リグニン以外の物質の分解については未解明な点が非常に多い。今後、その実際の処理システムを構成することを目的として、汚濁物質分解機構、分解生成物、影響因子をはじめ、多成分系への適用や装置化などについてさらに検討する必要がある、また、菌種の改良や遺伝子レベルでの代謝機構の解明なども期待されている。

なお、本研究を遂行するに当たり、京都大学木質科学研究所の島田幹夫教授、梅沢俊明助教授より、*P. chrysosporium*の分与及びご助言をいただいたことを付記し、深謝致します。

参考文献

- 1) David P. Barr & Steven D. Aust: Mechanisms White Rot Fungi Use to Degrade Pollutions, Environ. Sci. Technol., Vol. 28, No. 2, pp. 79-87, 1994
- 2) 志水一允等: 木質バイオマスの利用技術、文永堂出版、1991
- 3) 寺島 泰、尾崎博明: アゾ染料の微生物による分解、BIO INDUSTRY Vol. 9, No. 4, pp. 239-246, 1992
- 4) Hester Kobayashi & Bruce E. Rittmann: Microbial removal of hazardous organic compounds, Environ. Sci. Technol., Vol. 16, No. 3, pp. 170A-181A, 1982
- 5) Ming Tien & T. Kent Kirk: Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, Method in Enzymology, Vol. 161, pp. 238-347, Academic Press, Inc. 1988
- 6) 京都大学農学部食品工学教室編: 食品工学実験書 (下巻)、養賢堂、1970
- 7) 石川辰夫他: 図解微生物学ハンドブック、丸善株式会社、1990
- 8) T. K. Kirk et al., Influence of Culture Parameters on Lignin Metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*, Arch. Microbiol., Vol. 117, pp. 277-295, 1978
- 9) Jack T. Sparado et al., Degradation of Azo Dyes by the Lignin Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 58, No. 8, pp. 2397-2401, 1992
- 10) A. Paszczynski et al., New Approach to Improve Degradation of Recalcitrant Azo Dyes by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*, Enzyme Microb. Technol., Vol. 13, pp. 378-383, 1991