

(22) 白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の固定化とその廃水及び汚染土壌の処理への応用

Immobilization of White Rot Fungus, *Phanerochaete chrysosporium* and its applications to wastewater and contaminated soil treatment

尾崎博明*、呉 楓*、寺島 泰*、磯辺良介*、前田かおり**

HIROAKI OZAKI, FENG WU, YUTAKA TERASHIMA, RYOUSUKE ISOBE, KAORI MAEDA

ABSTRACT; White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* was immobilized in polyethyleneglycol(PEG) gel and on nylon, aspen chips and polyurethane foam in shallow stationary cultures. And the polyurethane foam was found to be the best carrier of *P. chrysosporium* according to the results of extracellular enzymes {lignin peroxidase(LiP) and manganese peroxidase(MnP)} production and the azo dye decolorization rate. The behaviors of *P. chrysosporium* immobilized on polyurethane foam was also investigated in 900mL batch reactors in carbon-limited media with different pH(pH5, pH6 and pH7). The LiP and MnP production was obtained under pH5 and pH6, and the mixture of three kinds of azo dyes were also decolorized simultaneously. No LiP and little MnP production was detected under pH7, and the azo dye decolorization rate was poor, either. The *P. chrysosporium* immobilized on aspen chips was inoculated in heavy oil contaminated soils, and the removal rates of about 20% was obtained in 2 weeks.

KEYWORD; *Phanerochaete chrysosporium*, immobilization, lignin peroxidase, manganese peroxidase, azo dyes, decolorization, thick oil, contaminated soil

1. 緒論

近年、難分解性物質による河川水や土壌及び地下水の汚染問題が顕在化しつつあり、廃水等の水系及び土壌系におけるこれらの物質を処理するために種々の物理化学処理法のほか、生物処理法が研究されている。生物処理法の内、リグニンを分解できる *Phanerochaete chrysosporium* (以下 *P. chrysosporium*、担子菌類) は、幾つかの非特異性分解機構を通じて極めて広い範囲の難分解性物質を分解する能力を有する¹⁾ ことから注目を集めている。

著者らは、従来、*P. chrysosporium* の培養条件を明らかにするとともに、有機塩素化合物やアゾ染料の分解に有効であること²⁾ を示してきた。また、汚染物質の分解は *P. chrysosporium* が二次代謝条件下で菌体外へ分泌するリグニン分解酵素 (リグニンペルオキシダーゼ(LiP)とマンガンペルオキシダーゼ(MnP)) と関係することを明らかにした上で、リグニン分解酵素に影響を与える培養因子や、基質となる栄養源の濃度と酵素活性との関係等について検討を行ってきた³⁾。本研究では、これらの検討結果を基礎にして、水系及び土壌系からの難分解性物質除去への白色腐朽菌の適用について検討を加えた。

P. chrysosporium を実際の処理に利用するためには同菌のリグニン分解酵素が大量に生産される必要があり、この目的のためにいくつかのSTR(stirred tank reactor)等のようなリアクターが研究・開発されてき

*京都大学大学院工学研究科環境工学専攻 (Dept. of Environ. Eng., Kyoto University)

** (株) 鴻池組 (Konoike Construction Co. Ltd.)

ている^{4) 5)}。しかし、リグニン分解酵素の発現は振とうすることによって抑制される傾向にある⁶⁾ため、むしろ微生物固定化法が処理効率及び操作性の面から非常に有望であると期待できる。

これらの観点から本研究では、微生物固定化法の内、固定化担体の表面に微生物を接触付着させる付着固定化法と、微生物を高分子ゲルで包括して固定化させる包括固定化法による*P. chrysosporium*の固定化を試み、同菌に適用可能な固定化法について検討した。また選定した固定化担体を用いて回分式リアクターを構成し、アゾ染料の脱色と酵素活性に対するpH値の影響とについて調べた。さらに、木材チップに固定した*P. chrysosporium*を用いて、大規模な土壌・地下水汚染問題を起こしている石油系油分の一 種であるA重油の水系、土壌系における分解実験を行い、その分解特性と同法の適用性について検討した。

2.実験方法

2.1 *P. chrysosporium*の固定化とその固定化菌体の特性

*P. chrysosporium*の固定化法としては付着固定化法と包括固定化法を用いた。ここで付着固定化法の担体には、比較的表面がなめらかなナイロン、空隙の多いポリウレタンフォーム、菌体の栄養源となりうる木材チップを選定し、後述する包括固定化担体一種をあわせて酵素活性発現等の比較を行った。

試験に供するナイロンとポリウレタンフォームには市販のものを用いた。また、木材チップには種々あるため、本研究では予備実験として、パルプ材のアスペン、軟質のパルサ、松、トウヒの4種類のチップに*P. chrysosporium*を植菌して増殖速度を調べ、最もその速度の大きいアスペンチップを供試担体として採用することとした。

上記の付着担体につき、表-1に示す炭素制限培地60mLと1cm×2cm×0.2cmのナイロン14枚(1.6g)あるいは1cm×2cm×0.3cmのポリウレタンフォーム14枚(0.6g)とを、それぞれ1Lの三角フラスコ中に入れ、120℃20分間オートクレーブで滅菌した。また、アスペンチップ(15mm×5mm×2mm, 5g)についてはT-N等の栄養源の溶出が見込まれるため蒸留水(培地無添加)及び窒素制限培地(60mL、培地組成は表1に示す)を用いて同様の操作を行った。次に、これら3種の付着担体を入れたそれぞれの三角フラスコに、*P. chrysosporium*の孢子懸濁液を100μLずつ投入し、アスペンチップの場合は*P. chrysosporium*を培養した10mm×10mmの寒天培養片を3~4片加えて植菌し、インキュベーター内で39℃において静置培養を行った。これらの担体はそれぞれの特性が異なるため、菌体増殖量や酵素発現活性を単純に比較することが困難であるが、ナイロンとポリウレタンフォームのみかけ上の表面積(72.8cm²と81.2cm²)には大差なく、両者のある程度の比較は可能であると考えられる。また、PEG担体について白色腐朽菌の

Table 1 Composition of the basic medium

composition	C-limitation(in 1L)	N-limitation (in 1L)
Glucose	2g	10g
Ammonium Tartrate	1.10g	0.22g
0.1M Na-aconitate buffer (pH=4.3)	100mL	100mL
Basal Medium	100mL	100mL
KH ₂ PO ₄	2.0g	20g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g	5g
CaCl ₂	0.1g	1g
Thiamine · HCl	0.005g	0.005g
Mineral solution	70mL	700mL

包括固定化法の有効性を、さらに木材チップについては基質利用が可能な付着固定化担体としての適用性を明らかにすることを目的に試験に供試することとした。なお、オートクレーブ操作等によるアスペンチップからの溶出成分を調べるために、水溶液中のTOC、TN及びいくつかの金属イオン濃度を測定した。TOCはTOC計(島津TOC-5000型)を用いて、金属イオン濃度は原子吸光光度計(NIPPON Jarrell Ash社製AA-11型)を用いて測定した。

包括固定化担体としては、固定化剤の微生物への毒性影響が少ないポリエチレングルコール(PEG)担体を用いることとした。PEGによる*P. chrysosporium*固定化手順の概略を図1に示す。この方法によって*P. chrysosporium*を包括した固定化微生物

物担体（以下PEGペレット、3mmφ×10mmの円柱状）を作成した。図1の手順において菌体懸濁液は、5日間培養した菌糸体（湿重約10g）を滅菌水で洗い、超音波ホモジナイザー（東京理化機械USH-20Z2DS）で約1分間均質化してから滅菌水を40ml入れて作成している。白色腐朽菌の孢子から菌糸体への生長はアゾ染料の添加による阻害されるという報告⁷⁾があったので、ここでは、孢子懸濁液の代わりに菌体懸濁液を用いた。PEGペレット（100個、4.65g）を滅菌した炭素制限培地60mLを含む1000mLの三角フラスコに入れ、インキュベーター内に静置して39°C下で行った。

上記のいずれのフラスコについても滅菌した0.1M veratryl alcoholを培養2日後に1mlずつ添加し、4日目から一定時間ごとに試料液を採取し、LiP活性とMnP活性³⁾を測定した。また、ナイロン、ポリウレタンフォーム、PEGを固定化材として用いた反応系には、培養4日目にアゾ染料Reactive Red 22（図3）を加えて、吸光度計（島津UV-2500PC、波長509nm）により染料濃度を求めた。なお、PEGペレットの場合、染料がペレットに吸着され、24時間以内に培地から検出できなくなったため、毎回5個ずつPEGペレットをサンプリングし、染料をメタノールで脱着させて反応系中の染料濃度（PEGペレットの大きさが同じで、それぞれの染料吸着量はほぼ同じである）を求めた。脱着したペレットは廃棄することにした。

PEG prepolymer A	17.5g
PEG prepolymer B	5.6g
NNN'N'-tetramethylethylenediamine	0.5mL
add distilled water to	58.5mL

↓
mix (pH is adjusted to 7.5 using 3.5% HCl)

↓
P. chrysosporium mycelium suspension 40mL is added

↓
1mL 2.5% potassium persulfate is added
and mix for 15 seconds

↓
draw into a 3mm φ tube with a syringe,
then leave for 30min at room temperature

↓
extrude from the tube, wash with water,
and cut into 1cm long columnar pellets

↓
P. chrysosporium mycelial pellets in PEG

Fig.1 Immobilization procedure of *P. chrysosporium* mycelium in PEG.

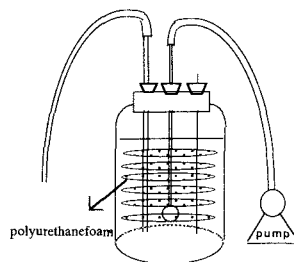


Fig.2 Schematic diagram of experimental batch reactor with *P. chrysosporium* immobilized on the polyurethane foam.

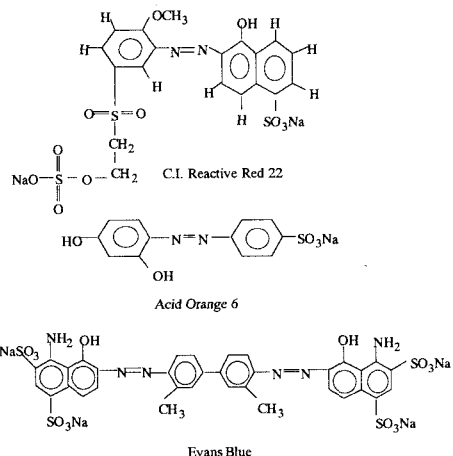


Fig.3 The chemical structure of Reactive Red 22, Acid Orange 6 & Evans Blue.

2.2 回分装置によるアゾ染料の脱色と酵素活性に及ぼすpHの影響

2.1の結果に基づき、ポリウレタンフォームを付着固定化担体として用い、図2に示すような固定床方式の回分実験装置を数個作成した。装置は容量は900mLのガラス製容器で、無菌操作が可能である。装

置内には円板状のポリウレタンフォーム（直径7cm、厚さ0.5cm）6枚をステンレス線を用いて約2cmの間隔でつり下げ、培地に浸るように設置した。上記の実験装置にまず栄養非制限培地（後述）を入れ、植菌後39℃下で一週間静置培養してから、それぞれの装置の培地を500mlのpH5の炭素制限培地、pH6の炭素制限培地、pH7の炭素制限培地に入れ替え、39℃下で連続的に空気曝気しながら培養した。栄養非制限培地の組成は、窒素量のみが表1に示す窒素制限培地の10倍となっている。炭素制限培地組成は緩衝液以外は表1に示すものと同じである。なお、初期以後培地のpH調整はとくに行わなかった。pH5の緩衝液にはNa-酒石酸緩衝液を、pH6とpH7の緩衝液にはリン酸緩衝液を用いた。培地を入れ替えた2日後に0.1Mのveratryl alcoholを10mlずつ加えた。これは、従来の研究結果により、炭素制限下においてLiP活性が高まるには、培地中にグルコースの二次代謝であるveratryl alcoholが必須であることが明らかになっているためである。以後毎日pH値、リグニン分解酵素活性、グルコース濃度とアンモニア性窒素濃度を測定した。ここで、グルコースはアンスロン法、NH₄-Nはオートアナライザー法により測定した。

培養の9日目に滅菌した3種のアゾ染料Reactive Red 22、Evans Blue、Acid Orange 6をそれぞれの反応装置に加え、その濃度の経時変化を測定した。染料の化学構造を図3に示す。Evans Blue、Acid Orange 6の濃度はそれぞれ波長619nm、383nmにおける吸光度により求めた。

2.3 白色腐朽菌を用いた石油系油分の分解

(1) 液体培地中での分解実験

200mlの三角フラスコに、表1に示す炭素制限培地を20mlとり、*P. chrysosporium*の孢子懸濁液0.1mlを植菌し、インキュベーター内で39℃下で静置培養を行った。植菌時に1.5分間酸素の吹き込みを行い、以降3日おきに同操作を行った。また、植菌2日後に、ろ過滅菌済みの0.1M veratryl alcoholを0.4ml加えた。5日後、LiPとMnPの生成を確認し、A重油を20mg（初期濃度1,000mg/Lに相当）加えた。一定期間ごとに一試料全量を採取して、クロロフルオロカーボン50mlを加えて1時間振とうし、油分を抽出した。油分の濃度の測定には、油分濃度計（堀場製作所、OCMA-300）を使用した。なお、対照として植菌しない状態の培地を用いて同様の実験を行った。

(2) 汚染土壌中での分解実験

園芸用赤玉土（以下赤土）を粉砕した土10g、あるいはろ過用山砂（野島砂、840～980μm）20gをそれぞれ200mlの三角フラスコに入れ、エタノール中に溶かしたA重油（5g/L）を加えて、土壌1kgあたりA重油を5,000mg含む模擬汚染土壌を作成した。エタノールを揮発させた後、この模擬土壌に、2.1に示す方法で*P. chrysosporium*を植菌し、10日間培養したアスベン材チップ（5片）と窒素制限培地20mlを加え、インキュベーター内で39℃において静置培養した。油分の測定法は（1）と同じである。植菌時に1.5分間酸素の吹き込みを行い、以降3日おきに同操作を行った。また、対照としてオートクレーブで滅菌したアスベンチップを含む模擬土壌を用いて同様の実験を行った。

3. 実験結果と考察

3.1 *P. chrysosporium*の固定化とその固定化菌体の特性

著者らは、白色腐朽菌によるアゾ染料の脱色及び有機塩素化合物等の分解反応が白色腐朽菌が分泌するLiP及びMnP活性と深く関連していること³⁾を明らかにしてきた。このことから、菌の固定化による酵素活性の発現を菌の分解活性を評価する重要な指標として取り扱っている。白色腐朽菌*P. chrysosporium*をナイロン、ポリウレタンフォーム、アスベンチップに付着固定した場合及びPEGに包括固定した場合のリグニン分解酵素活性の経日変化を図4に示す。MnP活性の値はLiP活性と比較して低く、差は顕著ではないが、LiP活性についてはポリウレタンフォームに固定した場合に最も高く、その最大値はナイロンの約4倍、PEGの6倍に達した。菌の付着状況として、ポリウレタンフォームは多孔のスポンジ状であり、

菌糸体がその内部まで入り込み、薄く均一状に担体に付着したことが考えられる。*P. chrysosporium*が分泌するリグニン分解酵素の活性は酸素の供給（分圧）に大きく左右される⁹⁾ことがわかっており、ポリウレタンフォームの通気性がよいことも高いLiP活性が得られた理由としてあげられる。ナイロンは表面が繊維状であり糸状菌を固定しやすいが、菌はナイロンの周囲に付着し、厚い菌糸体が形成されたため、通気性の面からはポリウレタンフォームの方が優れていると判断できる。PEGの場合は、菌体がPEGペレットから沁み出して遊離する現象が見られ、菌体の成長とともに固定性能が悪くなることがわかった。

なお、それぞれの反応系における染料の脱色結果を表2に示す。ナイロン、ポリウレタンフォーム、PEGペレットのいずれについても、1日後には培地中の染料はほとんど脱色されたが、PEGの場合、ペレットが染料を吸着することによって赤くなり、他と比較して脱色速度はかなり遅くなった。これは脱色に関与する酵素のうち、糖タンパク質であるLiPの分子量が4万～4.5万、糖ヘムタンパク質であるMnPの分子量が4.6万であること⁹⁾から考えて、生成した高分子の酵素がペレットの内部に移行しにくく、その働きが阻害されたことなどに起因していると考えられる。ナイロンとポリウレタンフォームについては培地中の染料がなくなった時点で固定化担体への吸着は認められなかった。

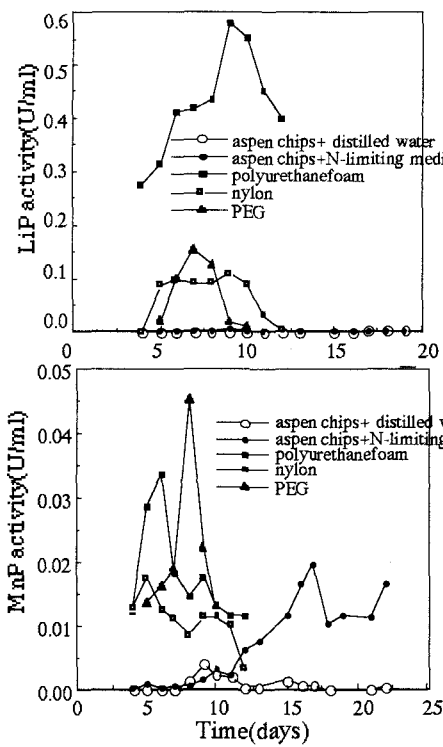


Fig.4 Effect of carrier materials on LiP& MnP activity.

Table 2 The decrease of Reactive Red 22 concentration (mg/L) in reactors with *P. chrysosporium* immobilize on(in) different carrier material.

time(days)	0	1	2	3	4	5	6
nylon	38.6	2.0	0	0	0	0	0
polyurethane	43.0	0	0	0	0	0	0
PEG pellet	36.56	9.77	5.03	0.73	1.09	0.46	0.41

Table 3 Composition of the percolate from aspen chips (1g aspen chips+ 10mL distilled water) by autoclave.

	concentration(mg/L)
TOC	527.4mg/L
TN	21.5mg/L
Ca ²⁺	19.7mg/L
Na ⁺	3.4mg/L
pH	4.68

アスベンチップに関しては図4の結果より、窒素制限培地及び蒸留水のいずれについてもLiP活性は検出されなかった。MnP活性は検出され、窒素制限培地を用いた場合はより高く、蒸留水の場合にはについてもわずかではあるが活性が確認された。オートクレーブ操作等によるアスベンチップからの溶出成分の分析結果を表3に示す。炭素濃度は窒素濃度の約25倍であり、無機イオンの溶出も確認できた。木材チップは*P. chrysosporium*の担体として実際に土壌汚染汚染と廃水処理に応用された例がある^{10) 11)}。白色

腐朽菌は元来樹木から発生したものであり、樹木中のセルロースを利用しながらリグニンを分解していくので、白色腐朽菌の固定化担体として木材チップは安価で有望な固定化担体であるが、様々な培養条件下での酵素の発現状況はまだ明らかになっていない。本研究の結果からは、アスベンチップを入れることにより酵素活性が特に高まる効果は認められなかったが、とくに窒素制限培地においてある程度のMnP活性が検出されたこと、また、微量の溶出成分が確認できたことから、木材チップは白色腐朽菌に安定な棲息場所を与えながら栄養源として用いる可能性があると考えられた。

以上の結果、特に酵素活性と染料の脱色容易さから総合的に判断すると、ポリウレタンフォームが最も利用しやすい。ポリウレタンフォームの場合 *P. chrysosporium* がその表面ではなく、内部まで入り込むことが可能であり、また、その細孔がPEG ベレットと比較してはるかに大きく、酵素の移行も容易であり、対象物質分解に有利に作用すると考えられる。

3.2 回分装置におけるアゾ染料の脱色と酵素活性に及ぼすpHの影響

初期pH値が5、6、7の各装置におけるpH値、LiP活性、グルコース濃度とNH₄-N濃度の経日変化を図5に示す。pH5とpH6の場合にLiPとMnPの活性が出現し、LiP活性よりMnPの活性が低かった。pH7の場合はLiP活性はなく、MnP活性はわずかししか検出できなかった。グルコースが消費された後に酵素が発現し、その後NH₄-N濃度が上昇する現象はshallow stationary cultureにおける現象と一致している³⁾。pH値はまず、pH5とpH6の場合は4.5以下、pH7の場合は5.0前後に低下し、その後は上昇した。低下する原因はグルコースの代謝物である有機酸やプロトンの分泌などが考えられ¹⁾、上昇する原因は培地中のアンモニア性窒素の蓄積と考えられる。pH7の培地については、その後pH5前後に低下し、グルコースも欠乏状態にあったにもかかわらずLiP活性が出現しなかった。その理由については明確ではないが、リグニン分解酵素が発現するpH限界値に達していなかった可能性が大きい。溶液中のpH値の上昇はリグニン分解酵素の活性の下降の原因の一つと考えられ、今後、さらに連続実験による検討が必要である。

pH5、pH6とpH7の各装置におけるEvans blueの濃度変化を図6に示す。LiP活性が最も高かったpH6の装置における脱色率が最も高い結果が得られた。pH7の場合のLiP活性は認められなかったが、初期の3時間内に染料の初期濃度の約50%が減少した。これは主に菌体とポリウレタンフォームへの染料の吸着によるものと考えられる。LiP活性が高いほど脱色率がよいという結果は著者らの以前の研究³⁾と一致している。pH6の装置における3種のアゾ染料の脱色結果を図7に示す。アゾ染料の初期濃度が異なるため、脱色速度を比較しにくい。が、*P. chrysosporium*は混合した染料を同時に脱色することができると考えられる。最近、*P. chrysosporium*が酸化機構を通じてアゾ染料を無機化することが報告されているが¹²⁾、その代謝経路及び脱色速度と染料構造との関係などについてさらに検討する必要がある。

3.3 白色腐朽菌を用いた石油系油分の分解

(1) 液体培地中での分解実験

液体培地におけるA重油の除去率及びリグニン分解酵素の活性変化を図8に示す。なお、ここでいう除去率とは、対照実験でのA重油濃度と*P. chrysosporium*を植菌した培地中でのA重油濃度との差を、対照実験でのA重油濃度で除したものである。

A重油添加時のLiP及びMnP活性の測定値はそれぞれ0.285U/l、0.0629U/lであった。0～7日までの間はA重油の分解が急速に進んでいるが、7日目以降は除去率があまり上昇せず、図8に示したように、7日以降酵素活性がなくなったことによるものと考えられる。また、A重油は多種類の炭化水素化合物であるため、低分子の物質のみを分解している可能性もある。

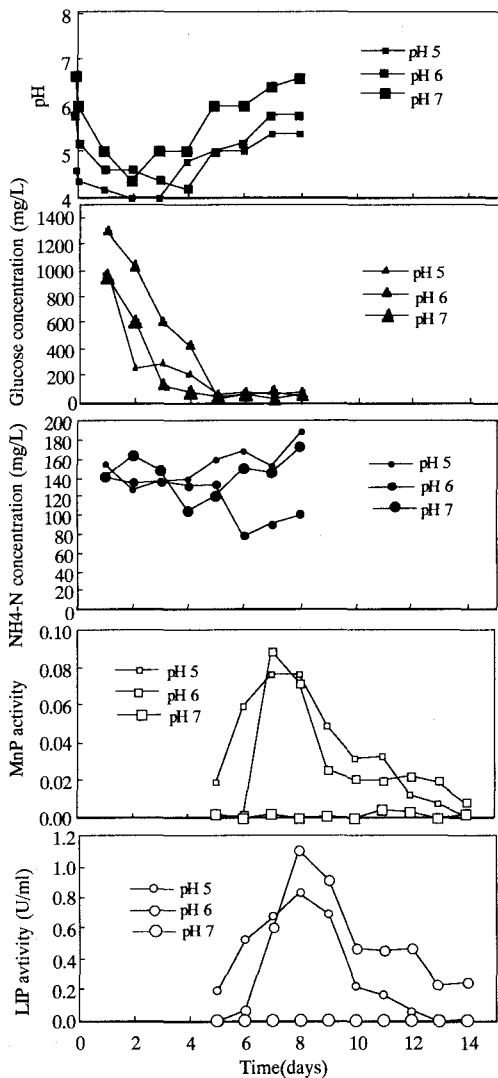


Fig.5 The pH, glucose concentration, NH₄-N concentration, MnP and LiP activity profiles under pH5, pH6, pH7.

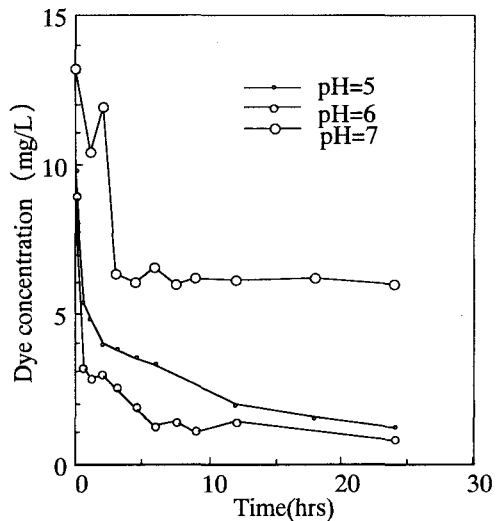


Fig.6 The profile of Evans Blue concentration under pH5, pH6 and pH7.

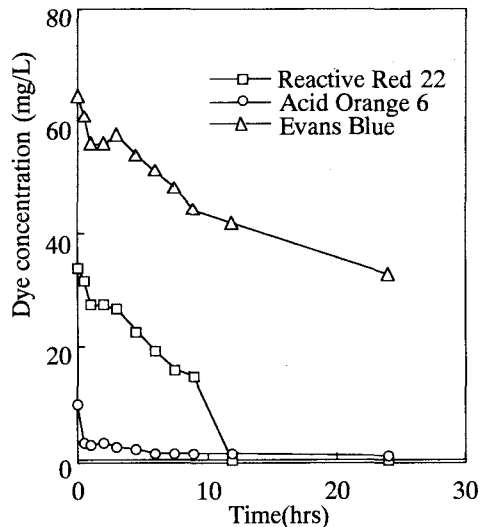


Fig.7 The decolorization of three kinds of azo dyes under pH6.

(2) 汚染土壤中での分解実験

植菌後7日目及び14日目のA重油の分解率を表4に示す。なお、この分解率は、対照実験の土壤中のA重油濃度と*P. chrysosporium*を植菌した土壤中のA重油濃度との差を、対照実験でのA重油濃度で除したものである。7日目には分解率は10%にも満たないが、14日目には20%以上まで分解率が増加しており、徐々にではあるが*P. chrysosporium*によるA重油の分解が進行しているものと考えられる。また、赤土と山砂では、わずかではあるが赤土の方が分解率が高い、これは赤土に含まれる栄養分によるものと考えられる。しかし、液体培地中と比べて分解速度が遅いため、今後は、菌体増殖速度と酵素活性を高めるためのより効果的な分解条件について検討する必要がある。

白色腐朽菌による土壌浄化の研究は幾つか報告されている¹⁰⁾が、白色腐朽菌の土壌中での増殖状況、

菌の成長と土質との関係、リグニン分解酵素の発現状況などについては未だ解明されていない。本研究では、土壤中からリグニン分解酵素を抽出し、その酵素の活性を測定する試みを行ったが、現在のところ十分な結果が得られていない。今後、土壌系におけるこのような基礎的な検討を行う必要があると考えられる。

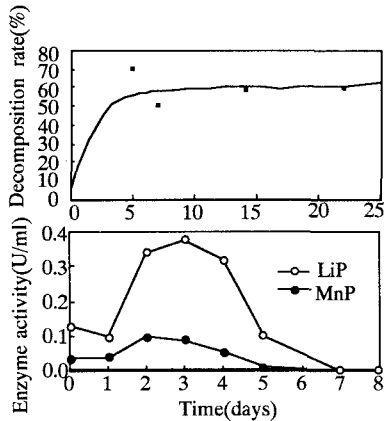


Fig.8 The profile of A decomposition rate of thick oil A and LiP & MnP activity by *P.chrysosporium* in C-limiting medium.

Table 4 The decomposition rate of thick oil A by *P. chrysosporium* in two kinds of soil.

	7	14
Red Clay	8.8%	23.8%
Nojima Sand	3.5%	20.9%

4.結論

本研究では、*P. chrysosporium*への固定化法への適用について検討し、固定化法を用いた回分式廃水処理と土壌浄化実験により、以下の結論を得た。

1) 固定化担体としてナイロン、ポリウレタンフォーム、アスベンチップ、PEGペレットの4つについて検討したところ、酵素活性とアゾ染料の脱色の点から、付着担体としてのポリウレタンフォームが優れていることがわかった。

2) アスベンチップを付着担体とした場合、培地を入れなくても白色腐朽菌*P. chrysosporium*の増殖が認められた。アスベンチップを入れることにより、リグニン分解酵素活性が高まる傾向は認められなかったが、同チップは菌体の安定な棲息場所となるとともに栄養源となる可能性がある。

3) ポリウレタンフォームを付着担体とする固定床式の回分装置では、炭素制限条件下においてリグニン分解酵素が発現した。それによって、混合したアゾ染料が同時に脱色され、同方式は水処理に利用可能と考えられる。

4) ポリウレタンフォームを付着担体とする回分装置においては、培地のpH値がある限界値（7前後）まで高くなるとリグニン分解酵素活性が抑制される。

5) 白色腐朽菌*P. chrysosporium*はA重油を分解し、これはリグニン分解酵素の働きによるものと推定される。

6) 土壌中における白色腐朽菌*P. chrysosporium*によるA重油の分解は液体培地中より速度が遅かったが、分解の進行は認められた。土壌中での菌体増殖と酵素活性の発現は液体培地とはかなり異なると予想される。

以上の結果から、白色腐朽菌は廃水処理や汚染土壌の浄化に利用できるものと期待される。今後、固定化菌を用いた連続処理実験や、土壌中における菌体の増殖及び酵素発現状況等についての検討を行うとともに、白色腐朽菌による物質の分解経路についても検討を加える必要がある。

なお、本研究で用いた*P. chrysosporium* は、京都大学木質科学研究所の島田幹夫教授、梅澤俊明助教授より分譲いただき、また、PEG固定化担体の作成については日立プラント建設（株）のご協力を得ました。記して深謝致します。

参考文献

- 1) D. P. Barr & S. D. Aust; Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutions., Environ. Sci. Technol., Vol.28, No.2, pp.79-87, 1994
- 2) 尾崎博明ら；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、環境工学研究論文集、Vol.31、pp.359-368、1994
- 3) 尾崎博明ら；リグニン分解酵素の活性に影響を及ぼす因子と粗酵素によるアゾ染料の脱色、環境工学研究論文集、Vol.32、pp.111-120、1995
- 4) S. Linko; Continuous production of lignin peroxidase by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a pilot scale bioreactor., J. Biotechnol. , Vol.8, pp.163-170, 1988
- 5) H. Jansheker & A. Fiechter; Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* and production of lignin peroxidases in submerged stirred tank reactors., J. Biotechnol. , Vol.8, pp.97-112,1988
- 6) M. S. A. Leisola & A. Fiechter; New trends in lignin biodegradation., Adv. Biotechnol. Proc. , Vol.5, pp.59-89. 1985
- 7) N. Capalash and Prince Shama; Biodegradation of textile azo-dyes by *Phanerochaete spp.* , World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol.8, pp. 309-312, 1992
- 8) T. K. Kirk, E. Schultz, W. J. Connors, L. F. Lorenz, J. G. Zeikus; Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium* ., Arch. Microbiol., Vol.117, pp.277-285, 1978
- 9) 志水一允ら；木質バイオマスの利用技術、文永堂出版、pp.141-163、1991
- 10) R. T. Lamar and D. M. Dietrich; In situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete spp.* , Appl. Environ. Microbiol., Vol.56, No.10, pp. 3093-3100, 1990
- 11) G. A. Lewandowski, P. M. Armenante and D. Pak; Reactor design for hazardous waste treatment using a white rot fungus, Wat. Res., Vol. 24, No.1, pp75-82, 1990
- 12) S. Goszczynski, A. Paszczynski, M. B. Pasti-Grigsby, R. L. Crawford and D. L. Crawford; New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*., J. Bacteriol., Vol.176, No.5, pp.1339-1347, 1994