特集2・難分解性物質の環境影響とその処理技術

白色腐朽菌による難分解性物質の処理

藤田正憲*・池道彦*・立田真文*・恵良彰**・宮田直幸***

1. 背景

現在、廃棄物最終埋立処分場からの浸出水による環境汚染が危惧され始めている。一般的に浸出水は色素や外因性内分泌攪乱物質（環境ホルモン）といった難分解性物質（POPs：Persistent Organic Pollutants）を含有しており、従来のように標準活性汚泥法などの一般的生物学的処理方法では処理することはできない。ここでは、種々のPOPsを分解することで知られる白色腐朽菌を用いて行った分解実験について報告する。

2. 白色腐朽菌適用の利点

白色腐朽菌（White Rot Fungi）は担子菌類に属するキノコの仲間であり、我々の身近なものとしてシイタケ（*Lentinula edodes*）やヒラタケ（*Pleurotus ostreatus*）、カワラタケ（*Coriolus versicolor*）が挙げられる。白色腐朽菌はパーオキシダーゼやラッカーゼなどの強力な酸化力を持った酵素を菌体外に分泌する。この菌体外酵素分泌システムが、不溶性または高毒性といった難分解性物質の分解に大きく寄与しており、その分泌は、炭素、窒素、硫黄といった主要栄養素の欠乏の状態によって誘導される。したがって、この栄養飢餓の状態をつくり出すことでいつでも分解反応を誘導することができるため、ターゲットであるPOPsに菌体を馴養する必要がないという利点を有している。またPOPsの濃度が酵素誘導に関連しているわけではないため、低濃度のPOPs汚染に対しても効果的に分解することができるなどの利点がある¹⁾。DDT、リンデン、PCB、ダイオキシン類、アゾ色素等の実に幅広いPOPsが無機化され、それらほとんどの分解に白色

腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium*（ファネロキーテ クリソスポリウム）が関与していることが明らかにされている²⁾。

3. 分解のメカニズム

きわめて多種のPOPsが分解されるメカニズムには、リグニン分解酵素（Ligninolytic Enzyme）が関与している。リグニンは図-1のようにフェニルプロパンを骨格とする非常に多様で複雑な構造をした網状高分子化合物であり、植物体の構成成分の一つである⁴⁾。このような化合物は、一般的な基質特異性の高い酵素では分解することができず、リグニン分解酵素のような非基質特異性（Nonspecific Mechanisms）の酵素が不可欠となる。リグニン分解酵素にはヘムタンパク質のリグニンパーオキシダーゼ（LiP）とマンガンパーオキシダーゼ（MnP）、それに銅含有タンパク質であるラッカーゼがある。図-2にパーオキシダーゼの触媒作用サイクルを示す¹⁾。LiPやMnPの作用発現には過酸化水素が電子受容体として必要であるが、白色腐朽菌は自らその生産を行うこともできる。休止状態であるパーオキシダーゼのヘム鉄は3価の状態であるが、これに過酸化水素が反応して2電子を奪い取り、パーオキシダーゼを4価の鉄でラジカルな形のCompound Iに酸化してしまう。ここでPOPsはCompound Iと反応し、ラジカルな状態にされる。Compound IはPOPsと反応し1電子を奪いCompound IIの状態になるが、POPsともう一度反応して再度電子を奪った後、元の休止状態のヘム鉄3価の状態に戻る。このサイクルが繰り返される。一方ラジカルな状態にされたPOPs内では分子間の結合の切断や芳香環の開裂等がおこり、分解されていく。LiPとは異なり、

*大阪大学大学院工学研究科環境工学専攻 Masanori FUJITA, Michihiko Ike, Masafumi TATEDA

オルガノ株式会社総合研究所 Akira ERA, *静岡県立大学環境科学研究所 Naoyuki MIYATA

(A)

(B)

図-3 (A) 熱処理廃液処理トータルシステム, (B) FBプロセス

表 1 各熱処理廃液の性状

	生物処理廃液	活性汚泥処理後(1—4日後)	合成熱処理廃液
色度 (CU)	1710-7300	1680-2940	4200
TOC (mg/ℓ)	1790-4500	280-650	720
有機性窒素(mg/ℓ)	160-530	33-94	100
pH	5.2-5.7	8.0-8.3	4.5

成分を物理的に除去することでさらに安定した脱色効果が得られるようにした。白色腐朽菌は初期の実験で *P. chrysosporium* よりも脱色能が高かった *Coriolus hirsutus* IFO4917を用い、FBは最適生育条件である温度30℃、pH4.5で運転した。UFによって濃縮された菌体は熱処理殺菌を行い外来菌の不活性化処理をした後、FBに返送するようにした。

6. 提案したFBプロセスの検証

6.1 FB運転条件

FBプロセスは連続回分式で運転した。容量12ℓのFBにエタノール1000mg/ℓを含有した合成熱処理廃液（オートクレープ処理によりメラノイジンを人工的に作成、表1参照）10ℓを供給し、非滅菌、FB内温度30℃の条件下で3日間、毎分5ℓの送気量で曝気した（第1サイクル＝リアクター立ち上げ

期間). FB処理水はストックタンクに移し替えUF膜処理 (0.15Mpa) に供した. ろ過液が5ℓに達した時点で膜処理を終了し, 濃縮液 (5ℓ) は熱処理殺菌を行った後, FBに返送した. 新しく5ℓの合成熱処理廃液をFBに供給し, 全体を10ℓにしてから再度運転を行った (第2サイクル). 第2サイクルからは1日間だけ曝気を行い, 以後はこの操作を毎日繰り返し実験を行った (HRT = 2日).

6.2 PUFへの菌体固定化の検証

GPY培地で生育させた菌体は24時間以内には99%以上がPUFに吸着した. 96時間目後には4g乾量/ℓの固定化菌体が得られた. 12ℓのFBに1000個のPUFを供給したが, これは1つ1つのPUFにそれぞれ乾量で4gの白色腐朽菌が存在することを意味する. これらの菌体はPUFに非常に安定に固定化されており, 実験を通してほとんど固定菌体量には変化がなかった (データ不掲載).

6.3 フラスコ実験による種々の検討

ここでは滅菌条件下でのフラスコ実験において, 固定化菌体連続使用の可能性の検証を行うとともに, 種々の実験条件の変化 (エタノール, グルコース, マンガンの添加) が脱色効率に及ぼす影響を調べた. 図-4に1000mg/ℓのエタノールが含有されている熱処理廃液の処理状態を示した. これはサイクルを1日に設定したHRT 2日の連続回分実験の結果であるが, 各サイクルにおいて, 色度が3000~3200CUから1800~2000CUに安定して減少しているのが確認できた (平均脱色速度: 1170CU/日). 結果として, 最初の7日間では, 50%以上の脱色効率が達成されている. この連続運転において, 浮遊菌体の大きな増加は確認されなかった. このことは, 菌体がPUFに強固に固定化していることを示唆するものであり, 滅菌条件下ではPUF固定化は連続運転に耐えうるものであるといえる. 一方, 菌体をペレット状にする方法をとった場合は, 同じ条件下において3サイクル目あたりから脱色効率が極端に下がり, 50%から10~30%あたりまで低下することが明らかになっている. 固定化の担体としてはPUF以外にも, ウレタンポリマー, アルギン酸ビーズなども選択肢として挙げられる. 菌体の固定化は固液分離の促進のみでなく, 菌体の菌体外酵素の生産を促進することも注目すべきことである. 次に, エタノールの濃度を1000mg/ℓから5000mg/ℓに増加させた場合の脱色効率に及ぼす影響を

図-4 FBによる合成熱処理廃液 (初期色度4200CU) の脱色

1日サイクル連続回分式, HRT = 2日. 最初の2日間は立ち上げ期間

検討したところ, あまり影響がないことが判明した. またエタノールの代替としてグルコース (1000~5000mg/ℓ) を添加した時は, エタノール添加時よりも脱色効率が悪化した. さらに, MnPの活性を促進する目的でマンガンをも5~40mg/ℓ添加したが, 脱色効率にはほとんど効果がないことがわかった. 白色腐朽菌の脱色作用には, マンガンが必ずしも重要な役割をしていないことは以前から報告されていることであり, この結果はその議論を裏付けている. また1サイクルを1日から2日に (HRT = 4日) に設定した時の脱色効率の影響をみると, 1日のサイクルの場合とほぼ同じであることが確認された.

6.4 膜処理の効果の検討

初期実験で精密ろ過 (MF) とUFとの膜処理方法の比較を検討した. FBで処理された熱処理廃液の膜へのFluxを比較したところ, UFの方がMFより高いことが明らかになったことから, 本実験ではUFの方を適用した. UFは浮遊菌体を完全に, また白色腐朽菌で脱色処理された色素成分の66%を除去することができた. FB単一では, 滅菌された条件下 (HRT = 2日) で熱処理廃液の色素成分を50~60%分解することができるため, FBとUF膜処理をプロセスとして連結することで, 全体として80~85%の脱色効率を達成できることが判明した. 図-5にSephadex G-50 (Void volume 55ml) に

図-5 Sephadex G-50による合成熱処理廃液色素成分のゲルろ過

×: FB処理前, ●: FB処理後, ○: UF膜処理後

よる各工程におけるゲルろ過の結果を示した。分子量10,000Da（ダルトン）以上の色度成分がVoid volume 55mlで溶離する。図より、FBによって相当量の色度成分が取り除かれているのがわかる。またFB（生物処理）によって除去できなかった高分子の色素成分もUF膜処理により除去され、残存しているのは低分子の色素成分のみであることが確認できた。色度で見ると、熱処理廃液原液では4200CUであったものが、FBの後では1780CUに減少（約58%除去率）し、UF膜処理後ではさらに600CUまで減少（約86%除去率）し、各FBプロセスの有効性が示された。

6.5 連続回分式FBプロセスの検討

非滅菌条件下において、FBプロセス（図3(B)）の運転を行い、脱色効率の検証を行った。図-6に濃縮液の熱処理殺菌処理を行わない条件下におけるFBプロセスの脱色効率の変化を示した。FB内は*C. hirsutus*の最適生育条件（温度、pH）で運転しているにもかかわらず、空気・水由来の外来菌によるコンタミネーションが 10^6 CFU/ml以上のレベルで観察された。結果として、脱色効率は運転が進むにつれ低下しているのがわかる。白色腐朽菌は、外来菌によるコンタミネーションに非常に影響を受けやすいことが明らかになった。一方、非滅菌系の運転においてでも脱色効率が低下しない例も報告されているが、この場合にはリアクター内温度が40℃に設定されており、白色腐朽菌にとっては適切な温

図-6 FBプロセスによる合成熱処理廃液の脱色（熱処理殺菌なし）

1日サイクル連続回分式、HRT = 2日、最初の3日間は立ち上げ期間

●: FB内の色度成分, ○: ろ過液中の色度成分

図-7 FBプロセスによる合成熱処理廃液の脱色（熱処理殺菌あり）

1日サイクル連続回分式、HRT = 2日、最初の3日間は立ち上げ期間

●: FB内の色度成分, ○: ろ過液中の色度成分

度であったが、外来菌の生育できない温度であったことが原因とも考えられる。一方、我々が使用した*C. hirsutus* IFO4917は40℃の温度では効果的な脱色活性（メラノイジン分解活性）は示さなかった。そこで、これら外来菌によるコンタミネーションを抑制するために、UF膜処理後の濃縮液を50℃、10

図-8 菌体の繰り返し利用によるBPA (20 mg/ℓ) の分解

■: *C. hirsutus* ●: *P. chrysosporium*

分間熱処理殺菌を行った後、FBに返送するようにした。この滅菌処理によって外来菌の80%が減少し、かつ分解酵素活性には大きな影響を与えないことが明らかになった。また熱処理滅菌を60～70℃、10分間行った場合には、外来菌の99%が死滅したが、分解酵素活性が失活してしまうことが確認されたため、運転操作条件としては適切でないといえる。結果として、50℃、10分間の条件が熱処理殺菌には最も適したものであり、高い脱色速度 (1300CU/日) を安定に得ることができた (図-7)。この脱色速度は、滅菌条件下で行った図4の実験結果に匹敵し得るものである。FBプロセスの脱色率は常に70%に達していることから判断すると、連続回分式FB単一の脱色率は45%まで達しているといえる。

6.6 提案したFBプロセスの評価

以上の検討結果から、提案したFBプロセスでは安定して脱色率70%が得られ、熱処理廃液の処理にきわめて有効であることが示唆された。またFB単独での脱色率は45%であり、白色腐朽菌 *C. hirsutus* IFO4917が難分解性であるメラノイジンを効率よく分解していることを示すことも実証された。

7. 白色腐朽菌 *C. hirsutus* IFO4917によるビスフェノールA (BPA) の分解

環境ホルモンによる環境汚染は今日我々の大きな驚異となっており、かなりの調査・研究が行われている。我々は硬化剤、添加剤、顕色剤として非常に幅広く使用されているBPAの分解を白色腐朽菌を用いて試みた。BPAは廃棄物最終埋立処分場からの浸出水中を始めとして、あらゆる環境サンプル中に確認できる難分解性の物質であり、効率のよい処

理リアクターを構築することは、急務であるといえる。図-8はバッチ試験によるBPA分解の結果を示している。一度BPA分解に使用した菌体ペレットを再度回収して連続的に使用した。比較に用いた *P. chrysosporium* IFO31249もある程度の分解率は示したものの、分解実験を繰り返すにつれて分解率が低下していくのが観察された。一方、*C. hirsutus*

IFO4917の方は安定して80%以上の分解率を示した。また菌体への吸着によりBPAが分解されているように見えているだけの可能性もあったため、熱処理で酵素を失活させた系、酵素阻害剤としてアジカナトリウムを添加した系、それに培養液をろ過し菌体を除去し菌体外酵素のみを残存させた系でそれぞれ分解試験を行った。30℃、12時間の反応において、菌体外酵素のみを残存させた系のみが70～80%のBPA分解率を示し、他の系ではほとんどBPAは分解されなかった。この結果より、BPAは菌体への吸着ではなく酵素により分解除去されていることが判明した。

8. まとめ

我々は、*C. hirsutus*がメラノイジンやBPAの他にも天然女性ホルモンである17βエストラジオールを分解することも確認しており、将来白色腐朽菌の活躍の場がいままで以上に広がることには疑いの余地はないと考えている。しかし、ここで紹介したようなFBプロセスの実用化に向けてはさらなる研究が必要であろう。

参考文献

- 1) Barr D P., Aust D.: Mechanisms White Rot Fungi Use to Degrade Pollutants, Environmental Science and Technology, Vol. 28, No.2, 79A-87A (1994).
- 2) 高田智: ダイオキシンを分解する白色腐朽菌, BIO INDUSTRY, Vol.14, No.10, 5-12 (1997).
- 3) 岩田進午, 喜田大三編: 土の環境圏, フジテクノシステム (1997).
- 4) 化学大辞典編集委員会編, 化学大辞典, 共立出版 (1964).