

微生物を利用した環境有害物質の除去

システムに関する研究 (V)

生産システム課
製品科学課

九曜英雄
高松周一

1. 緒言

担子菌類である白色腐朽菌は、菌体外酵素であるマンガンペルオキシダーゼ、リグニンペルオキシダーゼ、ラッカーゼにより木材の構成成分であるリグニンやセルロースを分解し、それらを栄養源として生育している。リグニンは、他の微生物では分解できない芳香族ポリマーであり、これを分解する白色腐朽菌は、ダイオキシンなどの難分解性物質の分解に適用可能であることが示されてきている。

特に、ラッカーゼは白色腐朽菌が共通して多量に生産する酵素であり、ラッカーゼの作用を媒介する酸化性低分子化合物（メディエータ）との組み合わせにより、様々な物質を分解できる可能性が示されてきている。そこで、本研究では、環境ホルモンとして疑いがあり、エポキシ樹脂の原料や塩化ビニルの安定剤として用いられているビスフェノール A ジグリシジルエーテル（BADGE、図 1）の分解を試みた。

また、この反応系が高分子化合物の分解に適用できるのではないかと考え、工業的に広く利用されているポリエチレングリコール(PEG)、ポリアクリル酸(PAA)、ポリビニルアルコール (PVA) の水溶性合成高分子の分解についても試みたので報告する。

2. 実験

(1) 試薬：ラッカーゼ (Lac) は、*Trametes versicolor* 由来の Fluka 製のものを精製することなしに使用した。酵素活性は、2,6-ジメトキシフェノールを基質とし、1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の 2,6-ジメトキシフェノールキノンドイマー ($\lambda_{\text{max}}=470\text{nm}$, $\epsilon=49,600/\text{M}/\text{cm}$) を生成する量を 1U とした。

メディエータとしては、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT)、2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS)、パラヒドロキシ安息香酸 (HBA) を用いた。

(2) ビスフェノール A ジグリシジルエーテルの分解
0.1mM BADGE、50mM マロン酸緩衝液 (pH4.5)、0.5% メタノール、0.3% 界面活性剤 (Tween20 又は Tween80) からなる水溶液に Lac (0.1U/mL)、メディエータ (0~1mM) を加え、30℃で反応させ、高速液体クロマトグラフで BADGE を定量した。

(3) 水溶性合成高分子の分解

使用した水溶性合成高分子は分子量の異なる PEG、

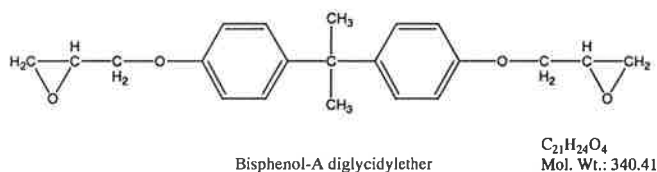


図 1. BADGE の構造

PAA、PVA である。分解は水溶性合成高分子 1mg/ml、50mM 酢酸緩衝液 (pH4.5) に Lac、メディエータを加え、30℃で所定時間反応させた。反応終了後、GPC で高分子の分子量を測定した。

3. 結果と考察

(1) ビスフェノール A ジグリシジルエーテルの分解
Lac は、フェノール性水酸基やアミノ基を酸化解裂する触媒であり、BADGE のような構造を有する化合物を直接分解することはできない。実際、反応系に Lac のみを添加したものは、BADGE の減少は全く認められなかった。しかしながら、メディエータとして、HOBT を添加した場合、BADGE の分解が認められ、HOBT 濃度の増加とともに分解率が大きくなった (図 2)。これは Lac が HOBT と反応し、それがラジカルとなって BADGE と反応すると考えられる。また、本反応系では、BADGE の水への溶解性を高めるため非イオン系界面活性剤である Tween80 または Tween20 を添加しているが、Tween80 を使用した方が、分解率が大きいことが確かめられた。今回データは示さないが、Tween80 を使用した場合、Tween20 の約 2 倍の分解率が高かった。Tween80

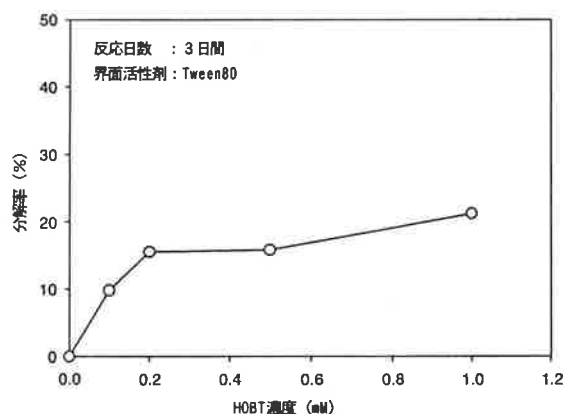


図 2. Lac/HOBT による BADGE の分解

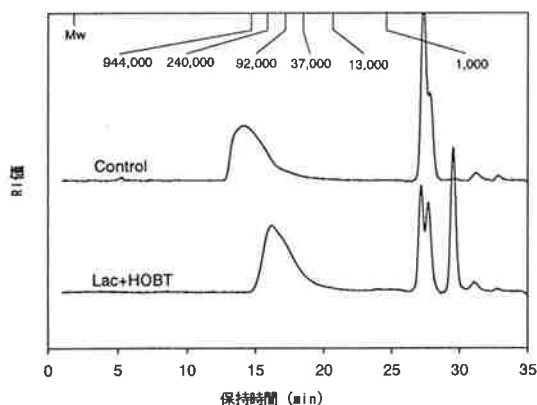


図 3.Lac/HOBT 系によって分解された
PEG2,000,000 の GPC チャート

は構造中にオレイン酸に起因する不飽和基を有しており、ラジカルとの反応に関与している可能性が高い。

また、メディエータとして ABTS を用いた場合は、全く分解されなかった。

(2) 水溶性合成高分子の分解

水溶性合成高分子の場合でも、Lac とメディエータである HOBT を組み合わせることにより分解が可能であった。図 3 は、水溶性合成高分子である PEG（平均分子量 2,000,000）を Lac と HOBT で 1 日反応させたときの GPC チャートである。PEG が分解されて分子量が全体的に低分子側にシフトしている。図 4 は、平均分子量 500,000 及び 20,000 の PEG の分解挙動を示したものである。分子量 500,000 のものは急激に分子量が小さくなるが、最終的には数万レベルで止まった。そのため、最初から分子量が 20,000 と低い PEG は、時間が経過しても分子量は変化しなかった。一般に分子量の高い高分子は、ラジカルによって重合鎖が分解しやすく、分子量が小さいと分解しにくいといわれているが、今回の系においても、HOBT のラジカルによる分解と考えられるため、このような現象が生じたと考えられた。

また、PAA の場合も、平均分子量が 1,000,000 と大

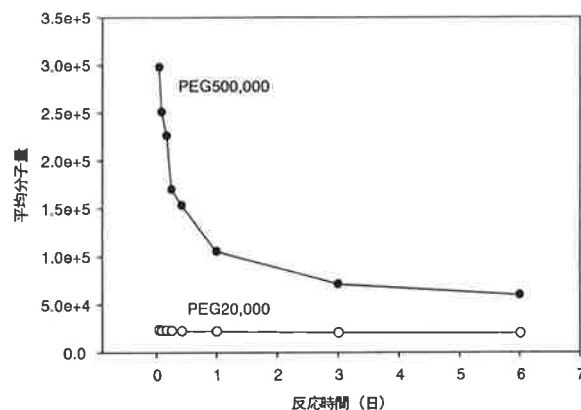


図 4.Lac/HOBT 系による PEG の分解挙動

きなものは、1 日で 500,000 まで低下したが、分子量 25,000 のものは全く変化しなかった。PVA の場合は、平均分子量が 150,000、40,000 のものを使用したが、分子量低下が観察されなかった。

メディエータの種類は、BADGE と同じように ABTS では全く分子量低下が起きなかった。また、PEG の場合、微生物の代謝産物である HBA を用いても、速度が遅いながらも分解することができた。

このように、Lac とメディエータにより PEG、PAA を完全には分解できないが、数万レベルまで低分子化できた。一般に水溶性合成高分子の微生物分解は、数十万から数百万レベルの分子量の高いものは不可能であるが、数万レベルのものであれば分解する菌が存在すると言われている。そのため、本方法は微生物処理のための前処理として有用であると考えられた。

4. まとめ

白色腐朽菌の産出する Lac とメディエータを組み合わせることにより、環境ホルモンである BADGE を分解することができた。また、生分解の起きにくい水溶性合成高分子においても分解が生じ、低分子量化できることがわかった。

キーワード：白色腐朽菌、分解、高分子、ラッカーゼ、メディエータ

Study on removal system of environmental pollutants using microorganisms (V)

Hideo KUYO, Shuichi TAKAMATSU

The degradation of Bisphenol-A-diglycidylether (BADGE) which was considered as an endocrine disrupting chemical and Synthetic water-soluble polymers (Polyethyleneglycohol, Polyacrylic acid and Polyvinylalcohol) were studied in systems consisting of laccase from White rot fungi and so-called mediator compounds. The degradation of BADGE was caused by using 1-Hydroxybenzotriazole(HOBT) as mediator, but not by 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). And this system was applied to degradation of Synthetic water-soluble polymers. In result, Polyethyleneglycohol, Polyacrylic acid were degraded and molecular weights of these became smaller to several tens of thousands. But Polyvinylalcohol was not degraded.