

# セルロース系廃材を用いた環境汚染物質の生物学的分解

生産システム課 九曜英雄\*

## 1. 緒言

木材を分解する糸状菌は、木材のセルロースを分解するときに菌体外酵素セロビオースデヒドロゲナーゼ (CDH) を分泌する。この CDH は、Fe(III)を Fe(II)に還元するとともに過酸化水素を発生し、有機物を強力に分解するフェントン反応を引き起こすと考えられており、通常の菌では分解できない木材の難分解性リグニン成分や結晶性セルロースを分解するのではないかと推測されている。

そこで我々は、この反応を利用すれば、廃棄物処理で問題となっている綿繊維や古紙、廃パルプなどのセルロース系廃材を糸状菌で分解処理すると同時に、その時に生ずるフェントン反応によって有機系の環境汚染有害物質を分解することが可能であると考えた。

本研究では、糸状菌として木材を分解する褐色腐朽菌を用い、難分解性物質であり、かつ、人体への有害性が指摘されているジアゾ系色素の分解を試みたので、その結果を報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 使用した菌

実験に用いた糸状菌は褐色腐朽菌である *Coniophora puteana*(NBRC6275) 及び *Gloeophyllum trabeum* (NBRC6430) である。また、比較として白色腐朽菌 *Coriolus versicolor* (IF04937) も使用した。

### 2.2 CDH活性の確認

CDH活性は、Dichlorophenolindophenol (DCPIP) のCDHによる還元脱色で評価した。DCPIP 1mM、セルロース 0.1%、セロビオース 20mM を含む寒天培地上に菌を繁殖させ、CDHによってDCPIP が還元され、脱色されることで評価した。

寒天培地の組成は、NaNO<sub>3</sub> 3g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.5g/L、FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O 0.01g/L、ショ糖 3g/L、寒天 15g/L とした。

### 2.3 鉄の還元確認

CDHによる Fe(III)の Fe(II)への還元は、フェロジ

ンと Fe(II)との呈色反応により評価した。

ポテトデキトローース寒天培地 (Difco 製) 39g/L、Yeast Extract (Difco 製) 0.5g/L からなる平板寒天培地に菌を移植し、30℃で、3日間及び10日間培養した。培養後、それぞれの平板培地上にフェロジン 2mM、FeCl<sub>3</sub> 0.2mM、EDTA 0.4mM、酢酸緩衝液 (pH4.5) 50mM、寒天 10g/L からなる滅菌溶液 10mL を積層した。30℃で24時間放置した後、フェロジンと Fe(II)との呈色反応により、Fe(III)の還元を評価した。

## 2. 4 色素の分解

分解性評価のための色素には、アマランスを用いた (Fig. 1)。本色素は、ジアゾ基を持つ難分解性化合物であり、発がん性も指摘されている。この色素が 0.05% になるように、CDH 活性の評価に用いたものと同じ組成の寒天培地で調整し、さ

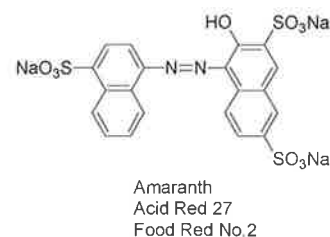


Fig.1 Structure of Amaranth

らにセルロース系物質 (セルロース 0.1%とセロビオース 20mM) や鉄 (1mMFeCl<sub>3</sub>や 0.2mMFeCl<sub>3</sub>) を適宜添加した平板寒天培地作成した。この培地上に糸状菌を 30℃で2週間培養し、色素の分解を調べた。

## 3. 実験結果および考察

CDHは、糸状菌の中でも褐色腐朽菌が生産されている。CDH活性テストの結果 *Coniophora puteana* 及び *Gloeophyllum trabeum* が繁殖した寒天培地部分はいずれもDCPIPが還元され、脱色された。しかし、白色腐朽菌である *Coriolus versicolor* の繁殖部分は脱色されなかった。これより、本実験で用いた2種類の褐色腐朽菌はCDHを生産することが確かめられた。

さらに、菌が繁殖するときに、フェントン反応を引き起こすのに必要な Fe(II)が、CDHによって Fe(III)から還元生成されているかを、Fe(II)とフェロジンの呈色

Table 1. Ferrozine test for detecting Fe(II)

Fungi	Days of growth		
	3	10	14
<i>Coniophora puteana</i>	+	++	+++
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	+	+++	+++
<i>Coriolus versicolor</i>	-	-	+

No color change: - ; Intensity of the ferrozine coloration from pink + to magenta +++



*C. puteana*      *G. trabeum*      *C. versicolor*

Fig2. Decolorization of Amaranth by fungi  
Agar plate was supplemented with 1mM of FeCl<sub>3</sub>.

Table 2. Effect of culture condition on decolorization and growth of fungi.

Medium condition	<i>C. puteana</i>	<i>G. trabeum</i>	<i>C. versicolor</i>
Basal medium	- (++)	- (++)	+++ (++)
Basal medium+Cellulose+Cellobiose	- (++)	- (++)	++ (++)
Basal medium+Cellulose+Cellobiose+1mM FeCl <sub>3</sub>	++ (++)	- (++)	- (-)
Basal medium+1mM FeCl <sub>3</sub>	+++ (+)	- (+)	- (-)
Basal medium+Cellulose+Cellobiose+0.2mM FeCl <sub>3</sub>	++ (++)	+ (++)	+ (++)
Basal medium+0.2mM FeCl <sub>3</sub>	+ (++)	+ (++)	+ (++)

No color change :- ; Intensity of decolorization from + to +++

In brackets: No growth :- ; Growth speed of fungi from low + to high +++

反応で調べた。フェロジンは Fe(III) と共存するときはピンク色を示すが、Fe(II) と共存するときには濃青色に変色する。褐色腐朽菌である *C. puteana*、*G. trabeum* ともに、3日目から Fe(II) の生成を示す呈色反応が認められ、10日以降さらに強く濃青色に変色した。これらより、CDHによって Fe(III) が Fe(II) に還元されることが確かめられた。また、白色腐朽菌である *C. versicolor* については、明確な変化は認められなかった。そこで、これらの糸状菌を用いて、難分解性物質のアマランスを分解することを試みた(表2)。*C. puteana*、*G. trabeum* は、基礎培地や基礎培地にセルロース・セロビオースのみを添加した場合は、アマランスを分解しな

かったが、FeCl<sub>3</sub> を 0.2mM 添加したときに菌の繁殖部でアマランスが分解された。*C. puteana* は、セルロース・セロビオースの添加でさらに、分解が進み、FeCl<sub>3</sub> が 1mM では分解が最も大きくなり、通常は分解されない寒天培地まで分解された。これは、フェントン反応によって

生じた OH ラジカルによる分解と考えられた。しかし、*G. trabeum* は、分解が起こらなかった。また、いずれの菌も増殖速度が遅くなる傾向が認められた。一方、白色腐朽菌である色腐朽菌 *C. versicolor* については、逆に、基礎培地のみときに、アマランスの分解性を示し、まったく異なる分解機構を持っていることが分る。

これらの結果から、*C. puteana* は、鉄の存在下で有機化合物を強力に分解することが確かめられたので、今後は、さらに他の難分解性化合物への適用を検討していく予定である。

キーワード：有害物質、生分解、セルロース、糸状菌、セロビオースデヒドロゲナーゼ

## Biodegradation of pollutant with cellulose waste by Fungi

Hideo KUYO

Biodegradation of recalcitrant dye Amaranth with cellulose by brown rot fungi, *Coniophora puteana* and *Gloeophyllum trabeum*, was investigated. *C. puteana* and *G. trabeum* did not decolorized Amaranth without Fe and Cellulose. But by addition of FeCl<sub>3</sub> and Cellulose, Amaranth has decolorized. This mechanism has been considered that OH radical from Fenton reaction, which was generated from Fe(II) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Then this biodegradation system using brown rot fungi with cellulose will be adaptable to another pollutants