

廃棄物処理等科学研究費補助金 総合研究報告書概要版

研究課題名・研究番号 = リグニン分解酵素を含む培養液を用いた焼却灰ダイオキシン類の分解に関する研究

国庫補助金精算所要額 (円) = 31,403,000

研究期間 = 2002-2004

研究年度 = 2004

代表研究者 = 斎藤祐二 (大成建設株式会社 技術センター)

研究目的 = 現在、ダイオキシン類による環境汚染が顕在化する中、すでに焼却方法の改善に伴いダイオキシン類の排出量は低減されつつある。一方、すでに環境中に広範囲に放出されたダイオキシン類については、より効率的な処理方法が今もなお望まれている。

ダイオキシン類の処理技術としては、光分解法、化学分解法、溶融法、微生物分解法がある。中でも微生物分解法は、他の分解法と比較して多くのエネルギーを要せず、二次汚染物質の発生が少ないメリットを持つことから、分解菌を用いた環境修復(バイオレメデーション)の研究が勢力的に進められている。しかしながら、バイオレメデーションでは、pHや降雨、乾燥等の環境因子を直接受けるために、処理に長期を要すること、処理そのものの信頼性に欠けることが共通の課題として残されている。本研究では、微生物分解法のメリットを生かしながら上記の課題を克服すべく、汚染物へ分解菌を直接投与する従来のやり方ではなく、事前に分解酵素を製造しこれを汚染物に作用させることによって、常温付近下で処理期間の短縮と信頼性を高める新しい微生物処理法の開発を目指している。本研究では、独自に選抜した白色腐朽菌 MS325 株の液体培養でリグニン分解酵素群を高効率で生産し、焼却灰を始めとする土壌や底質に含まれるダイオキシン類の処理性能を把握し、システム構築と適用性を評価することを目的とする。

研究方法 = 本研究を推進するに当たり、ダイオキシン類分解性能の高い白色腐朽菌を保有すること、ダイオキシン類分解に関与するリグニン分解酵素を見極めること、リグニン分解酵素を発現させる培養方法を確立すること、得られた分解酵素をダイオキシン類に効率的に作用させる諸条件を把握するこ

と、これらの知見に基づいた工学的なシステムを構築すること、以上の5点が研究全体の遂行に必須な項目と考えられる。本研究では、3年間の補助を仰ぎながら上記の項目を実験的に推進した。

白色腐朽菌 MS325 株の遺伝的解析；国内森林から分離した数千株の白色腐朽菌からパルプの脱色性に優れる白色腐朽菌 52 株を絞り込み、さらにジベンゾフランの分解から選抜した MS325 株を本研究で使用した。さらに、白色腐朽菌 MS325 株のゲノム DNA を抽出し、18S rDNA および 28S rDNA D1/D2 領域の解析から既知の白色腐朽菌との遺伝的同一性について検討した。これによって MS325 株の遺伝的な位置付けを明確にした。

ダイオキシン類分解に關与するリグニン分解酵素の推定；MS325 株はリグニン分解酵素として細胞外に LIP、MnP、マンガン非依存性ペルオキシダーゼ（MIP）等を生成する。これらの中で特にダイオキシン類の分解に關与する酵素の推定を飛灰ダイオキシン類の処理性能より検討した。

リグニン分解酵素の活性向上条件の把握と培養方法の検討；リグニン分解酵素の生成に及ぼす安価な培地の探索を行った。さらに、リグニン分解酵素の活性向上に寄与する物質の探索を行った。また、大量培養を目的とした培養条件を実験的に明らかとした。

白色腐朽菌 MS325 株によるダイオキシン類の分解

- 1) 白色腐朽菌 MS325 株の培養液を用いた OCDD（オクタクロロジベンゾ-p-ジオキシン）の分解；多塩素置換ダイオキシン類の基本的な分解性を把握するために、培養液による OCDD（オクタクロロジベンゾ-p-ジオキシン）の分解を検討した。
- 2) 白色腐朽菌 MS325 株の培養液を用いた土壌、灰、底質ダイオキシン類の分解；本処理システムの適用範囲を明確にするために、飛灰以外に、土壌、底質のダイオキシン類の酵素分解を検討した。
- 3) 重金属の不溶化条件の把握；灰や土壌、底質に含まれるダイオキシン類をリグニン分解酵素で処理する場合、リグニン分解酵素が作用する pH に制御する必要がある。一般にリグニン分解酵素の多くは酸性側で作用するため、ダイオキシン類以外に重金属を含む場合はイオンとして液中に溶出する危険性がある。そこで、重金属の不溶化プロセスを検討した。

実証試験と実用性の評価；実証試験装置の製作および実証サイトの探索を行った。また、実証装置を設置し培養液製造試験および実汚染物を用いた処理実験に着手した。さらに、本研究で得られた実験結果及び知見に基づいて本処理方法の実用性を検討した。

結果と考察 = 以下に各項目毎の結果を要約する。

白色腐朽菌 MS325 株の遺伝的解析 ; 28S rDNA D1/D2 領域の解析から、MS325 株は白色腐朽菌 *Bjerkandera adusta* に最も近縁である結果が得られた。しかしながら、MS325 株と *B. adusta* との相同性は 97.8% であり、28S rDNA D1/D2 の別種判断基準 1% を大きく上回ったことから、MS325 株は新種である可能性が示唆された。

ダイオキシン類分解に関与するリグニン分解酵素の推定 ; 培養液を用いたダイオキシン類の酵素分解の最適化を目的として、培養液に含まれるリグニン分解酵素群の基本的な作用条件を検討するとともに、実汚染飛灰を用いた酵素処理実験を実施した。その結果、マンガンイオンの共存がダイオキシン分解に大きく影響したことから、ダイオキシン類の分解には MnP (マンガンペルオキシダーゼ) が主要酵素であると考えられた。

リグニン分解酵素の活性向上条件の把握と培養方法の検討 ; 白色腐朽菌 MS325 株の増殖と酵素生産に効果のある培地を検討した結果、コーンステイプリカー (CSL) の有効性を確認した。CSL を用いた培地では、白色腐朽菌 MS325 株の増殖が極めて優れているとともに、リグニン分解酵素が培養開始後速やかに培地中に高活性で検出された。また、CSL と共存させる炭素源としては、従来使用してきたグルコースと同様にシュクロースの適用が可能であることを見出した。これらの結果より、酵素の生産性を向上させるだけでなく、原料単価を大幅に低減できることとなった。白色腐朽菌の培養方法としては、一般的な培養法である通気攪拌培養が可能であり、攪拌速度を最適化することによって、培養液中の酵素活性を向上できることを明らかとした。

白色腐朽菌 MS325 株によるダイオキシン類の分解

- 1) 白色腐朽菌 MS325 株の培養液を用いた OCDD (オクタクロロジベンゾ-p-ジオキシン) の分解 ; MnP の至適条件にて OCDD の酵素分解を試みたところ、共存する Mn イオンおよび処理温度によって OCDD の分解性が大きく変化した。特に、Mn イオン濃度を 10mM とした 50 でのスラリー処理では、OCDD の分解率が 71.1% となった。また、OCDD の分解に伴う低塩素置換の DD は全く検出されなかった。なお、これらの分解生成物については、本研究期間では明確に把握できなかった。
- 2) 白色腐朽菌 MS325 株の培養液を用いた土壌、灰、底質ダイオキシン類の分解 ; 灰、土壌、底質に含まれるダイオキシン類の処理を試みた。飛灰の場合には、ダイオキシン類濃度の明確な減少は見られたものの、今回の実験の範囲では焼却残渣の埋立て処分基準である 3ng-TEQ/g を下回ることとはできなかった。この要因としては、飛灰のアルカリが

極めて高いために、pH 調整に用いる酸の添加量が多く、培養液の酵素を阻害したものと考えられた。一方、土壌や底質を用いた場合には、土壌や底質に関わらず、培養液によって分解されたダイオキシン類の総量と MnP 活性にはほぼ比例的な関係があることを見出した。

- 3) 重金属の不溶化条件の把握；酸による pH 調整で溶出する重金属の不溶化として、酸抽出-硫化物固定化法の適用を検討した。その結果、硫酸で酸抽出し  $\text{Na}_2\text{S}$  で不溶化することによって、重金属の溶出を抑えることを確認した。さらに、酸抽出後に  $\text{Na}_2\text{S}$  と  $\text{NaOH}$  を併用することによっても重金属の不溶化が可能であることを見出した。

試験と実用性の評価；以上の基礎的検討結果に基づき最終年度に実証装置の作成を行った。本装置は通気攪拌装置を設置した開放系培養槽（総容量 3.4m<sup>3</sup>）、攪拌装置を設置した混合分解槽（総容量 3.4m<sup>3</sup>）の 2 槽及び各槽の付属制御ユニットから構成される。本装置を用いた試験実施に向けて実証サイトを探索した結果、静岡県 A 市護岸にて試験を行う許可を得、年明けから現地に装置を設置し底質を対象としたダイオキシン類処理試験を開始した。培養液製造では白色腐朽菌の純粋培養を行う必要があるが、現位置での製造を目的とし蒸気滅菌を行わない簡易殺菌による酵素製造を試みた。その結果、殺菌方法としてタンク及びラインのアルカリ洗浄が非常に効果があり開放系でも現位置にて白色腐朽菌の純粋培養が可能となった。また、得られた培養液中の MnP 活性は 100 (nkat/mL) 近くまで上昇し、実験室にて実施した無菌培養時の値を上回る活性となった。また、現位置で製造した培養液を用いた底質ダイオキシン類処理を実施した。さらに、本処理方法の実用性に関する机上検討を行った。本処理方法はダイオキシン類の湿式方法であることも含め、今までの実験結果より底質への適用性が最も期待されることから、底質ダイオキシン類を処理対象とした評価を行った。算定条件として浚渫後の底質を 240t / 月の能力で処理し機器償却期間を 15 年としたところ、スケールアップ効果が大きく処理コストの大幅な低減が期待できる結果が得られた。

結論 = 本研究では、分解微生物を汚染物や汚染サイトに直接摂取する従来のバイオレメデーションと異なり、白色腐朽菌由来のリグニン分解酵素により分解期間の短縮と浄化の信頼性向上を目指したものである。その結果、リグニン分解酵素の効率的生成条件及び培養方法を見出すと共に、環境試料中のダイオキシン類分解の最適化もほぼ達成することができた。また、スケールを上げた実証試験結果により本技術の実用性も十分期待できる結果を得ることができた。残された課題は、リグニン分解酵素群とダイオキシン類の分解機構が十分明確

になっていないことである。今後、より基礎的な研究を開始しリグニン分解酵素による分解メカニズムを明確にする必要がある。