

論文 / 著書情報
Article / Book Information

論題(和文)	担子菌によるビスフェノール系難分解性物質分解反応においてメチル基が及ぼす影響
Title(English)	Effect of Methyl Group of Bisphenolic Xenobiotics on Their Biodegradation Rates by White-Rot Basidiomycete
著者(和文)	浅見和広, 根守浩良, 上島功裕, 太田口和久
Authors(English)	Kazuhiro ASAMI, Hiroyoshi NEMORI, Katsuhiko UESHIMA, Kazuhisa OHTAGUCHI
出典(和文)	担子菌によるビスフェノール系難分解性物質分解反応においてメチル基が及ぼす影響, Vol. 37, No. 4, pp. 344-347
Citation(English)	Effect of Methyl Group of Bisphenolic Xenobiotics on Their Biodegradation Rates by White-Rot Basidiomycete, Vol. 37, No. 4, pp. 344-347
発行日 / Pub. date	2011, 4

担子菌によるビスフェノール系難分解性物質分解反応において

メチル基が及ぼす影響†

浅見 和広^{1††}・根守 浩良¹・上島 功裕²・太田口 和久¹

¹ 東京工業大学大学院理工学研究科化学工学専攻, 152-8552 東京都目黒区大岡山 2-12-1

² 神奈川県企業庁水道水質センター, 253-0106 神奈川県高座郡寒川町宮山 4058

キーワード： 担子菌リグニン分解酵素, ラジカル分解反応, 電子供与性

担子菌の一種である白色腐朽菌は、菌体外に分泌するリグニン分解酵素リグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ、ラッカーゼを生産する。これら分解酵素が生成するラジカル中間体によって難分解性有機化合物を分解し、二酸化炭素と水にまで無機化出来ることが知られている。当該分解反応において、難分解性物質の化学構造が分解反応速度に与える影響に関する研究報告は少ない。本研究では、担子菌 *Coriolus hirsutus* IFO 4917 の培養液において、フェノール系難分解性物質であるビスフェノール A (BPA) とその類似化合物 (BPE, BPF) の分解速度を測定した。BPA, BPE, BPF はいずれもビスフェノール構造を有し、中心に位置する炭素原子に結合したメチル基の数がそれぞれ 2 個, 1 個, 0 個である。これらビスフェノールの分解反応を 1 次反応と仮定したときの分解速度定数は, 3.90, 3.62, 2.81 h⁻¹ であり, 反応速度とメチル基数との間には一定の相関があることが分かった。BPF の生分解物質としてフェノールおよび p-クレゾールが生成することを推論し、これらの物質の分解速度も測定した。その結果, p-クレゾールとフェノールの分解速度定数は, 2.92, 1.05 h⁻¹ であり, フェノールにメチル基のついた p-クレゾールの方が高い分解速度定数を示した。ベンゼン環に電子供与性のメチル基がつくことで担子菌酵素によるラジカル分解反応が促進されることが分かった。

緒 言

近年、化学技術の進展は目覚しく、利便性を追求し人類は新たに有用な化学物質を次から次へと合成し生産してきた。しかし、新規に開発された化学物質の中には、それが環境に洩出した時に極微量であっても生物に悪影響を与えるものも多数ある。初めは急性、慢性の毒性を持った化学物質だけに社会的関心が集っていたが、近年は発がん性、変異原性、内分泌かく乱性などの物質が注目の的となっている。それらの物質の例としてビスフェノール A (BPA; 4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane), ダイオキシン類 (ポリ塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン (PCDD; poly chlorinated dibenzo-para-dioxin); ポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF; polychlorinated dibenzofuran); コプラナーポリ塩化ビフェニル (Co-PCB, coplanar polychlorinated biphenyls)), DDT (1,1,1-trichloro-2,2-di(4-chlorophenyl)ethane) などがあげられる (Degen and Bolt, 2000; Iguchi *et al.*, 2002)。現在は法で使用を制限または禁止されているが、それ以前には世界中で大量に使用されていたため、海、川、土壌などあらゆる場所に広がっていった。これらは今後も世界中に残り続けるであろうが、未だ効果的な対処方法が見つからずにいる。

従来、これらの物質は、コストを掛け熱や化学薬品を使って物

理的、化学的に処理されてきたが、近年では微生物の力を使った生物的处理方法 (バイオレメディエーション) が注目されている。バイオレメディエーションには、大きな反応装置が必要ない、原位置での浄化が可能、後処理が不要、低コスト、など多くの利点がある (Boopathy, 2000; Chatterjee *et al.*, 2008)。しかし複合汚染には不向きであったり、処理に時間がかかってしまったり、高濃度では微生物が死んでしまったりして浄化できないなどの欠点もある (Boopathy, 2000)。

白色腐朽菌などをはじめとする担子菌はラッカーゼ (Collins and Dobson, 1997)、マンガンペルオキシダーゼ (Maeda *et al.*, 2001)、リグニンペルオキシダーゼ (Andrawis *et al.*, 1989) など多くの菌体外酵素を放出し、樹木の成分である難分解性の天然高分子、リグニンをはじめ、様々な化学構造の難分解性物質を分解することで知られている (Joshi *et al.*, 1993; Tsutsumi *et al.*, 2001; Ueshima *et al.*, 2008)。ラッカーゼは酸素分子を必要とする酸化酵素であり、リグニンの脱メトキシル反応、フェノール類の一電子酸化を触媒する。フェノールを含まない物質でも分解することが知られている。マンガンペルオキシダーゼは過酸化水素を反応で用いる。2 価のマンガンイオンを酸化し、ラジカルを形成する。フェノール類の一電子酸化、C-C 結合開裂を触媒する。リグニンペルオキシダーゼは最も早く見つかったリグニン分解酵素である。過酸化水

素を必要とするのはマンガンペルオキシダーゼと同様である。芳香核の一電子酸化を触媒する (Gold and Alic, 1993)。これら酵素による分解速度は物質の化学構造によって大きく異なると想像できる。実際、塩素置換フェノール (ペンタクロロフェノール, ジクロロフェノール) は、クロロ基の数が多いほどマンガンペルオキシダーゼによる分解率が高い (Hofrichter *et al.*, 1998)。また、炭素数の違うアルキルオキシフェノールやモノクロロフェノール位置異性体をラッカーゼで酸化分解した結果から、炭素数の違いやクロロ基の置換位置が分解速度に影響することが分かっている (D'Annibale *et al.*, 1996)。

本研究では、ビスフェノール系の汚染物質の中でも外因性内分泌攪乱物質としても有名である BPA と、類似した化学構造を有するビスフェノール E (BPE; 4,4'-Ethylidene-bisphenol), ビスフェノール F (BPF; 4-[(4-hydroxyphenyl)methyl]phenol) に注目し、化学構造の違いが担子菌による難分解性物質分解反応に与える影響を解析し、速度論的知見を得ることを目的とした。

1. 実験

1.1 実験材料

本実験では、担子菌 *Coriulus hirsutus* IFO 4917 (和名 アラゲカワラタケ) を使用した。汚染物質のモデルとして BPA, BPE, BPF, フェノール, p-クレゾールを使用した。いずれも特級試薬を和光純薬工業より入手した。

1.3 前培養

生分解反応を行うに際し、菌体の状態を一定にするために、前培養を行った。300 mL の三角フラスコの中に前培養培地として MYG 培地 (10 gL⁻¹ 麦芽エキス, 4.0 gL⁻¹ 酵母エキス, 4.0 gL⁻¹ グルコース) を 50 mL 入れ, 121°C, 20 分間オートクレーブ滅菌して使用した。予め MYG 培地で前々培養した液 50 mL をプロセスホモジナイザー (PH91, エスエムテナー) を用いて, 10,000 rpm, 3 秒間の処理をした。分断された菌をナイロンメッシュ (270 メッシュ) で回収した。そのうちの 1.2 g (湿重量) の菌体を前培養培地に加え, かぶせ式シリコセン C-40 を三角フラスコの口にかぶせた。往復振盪培養器 (T-22S, トーマス科学器械) を用い, 25°C, 100 rpm, 振幅 5 cm の振盪培養を 3 日間行った。この前培養液を回収し, 以下の生分解反応に用いた。

1.4 生分解反応

300 mL 三角フラスコに, イオン交換水 50 mL を入れ, Yeast Nitrogen Base を 6.8 gL⁻¹ となるように入れ, 培地とした。これを 121°C で 20 分間オートクレーブして滅菌し, そこにエタノール中に溶解した 4.7 mmolL⁻¹ の BPA, BPE, BPF を 250 μL 入れた。また追加実験では, 10.6 mmolL⁻¹ のフェノール, p-クレゾールを 250 μL 入れ, 上記同様の条件で 1~1.5 時間の生分解反応を行った。

1.5 分析

残留汚染物質 BPA, BPE, BPF およびその分解物に関しては, 反応液から抽出した後, 高速液体クロマトグラフィー (日立製作

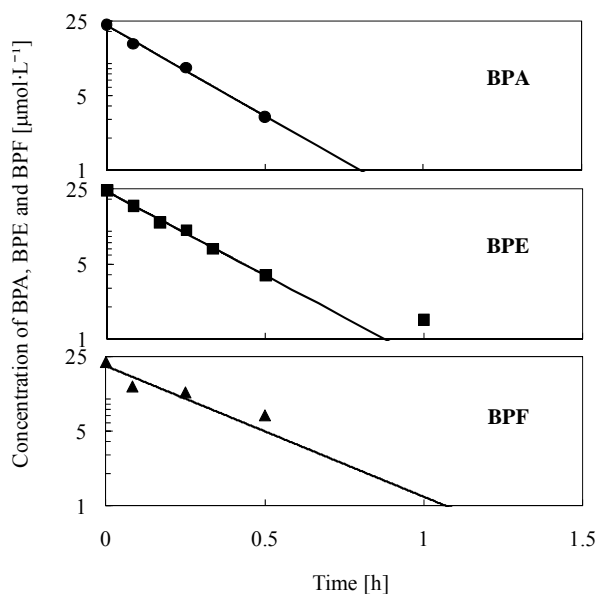


Fig. 1 Time courses of BPA, BPE and BPF concentration

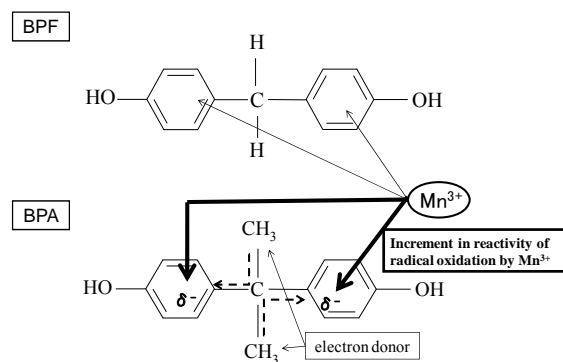


Fig. 2 Reaction model of BPA and BPF degradation by Mn³⁺

所 655A-11 形) を使用し HPLC 定量分析を行った。カラムは, 粒径 5 μm の ODS-C18 (オクタデシルシリル基) 逆相分配カラム (4×250 mm) を使用した。分析条件は, BPA の測定の場合, 移動相をアセトニトリル/水 = 40/60, 流速を 1.0 mL min⁻¹, UV 検出波長は 275 nm, カラム温度は 40°C とした。また BPE, BPF の測定の場合は移動相をアセトニトリル/水 = 50/50, その他の条件は BPA の測定のとおりで行った。フェノール, p-クレゾールの場合, 移動相をアセトニトリル/水 = 50/50, 流速を 1.0 mL min⁻¹, UV 検出波長を 280 nm, カラム温度を 35°C とした。測定で得られたピーク面積の大きさと, 既知の濃度の場合のピーク面積の大きさから残留汚染物質濃度を求めた。まず, 生分解反応後の液体を吸引ろ過 (0.20 μm, PTFE 製; ADVANTEC) し, 菌体と上清を分離した。上清に濃塩酸 (6 molL⁻¹) を 200 μL 入れ pH を下げ, 酵素を失活させた。その後 100 mL 分液漏斗を用いて, 酢酸エチル 25 mL による抽出を 3 回行った。このとき, 水と酢酸エチルの相互溶解を防ぐため, 塩化ナトリウム (特級; 和光純薬工業) を適宜加えた。次にロータリーエバポレーターを用いて酢酸エチルを

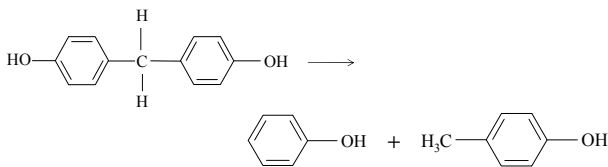


Fig. 3 Expected mechanism of BPF degradation

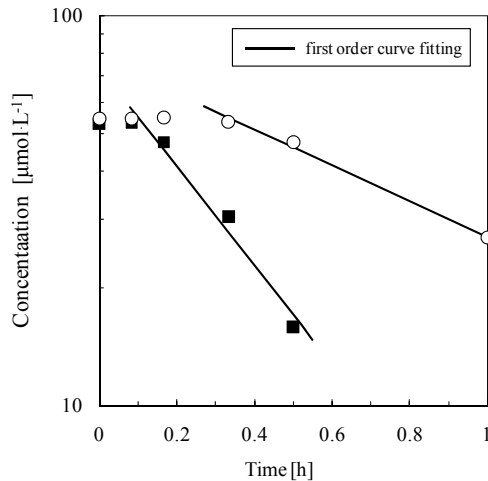


Fig. 4 Time courses of phenol and p-cresol concentration
Symbols: ○, phenol; ■, p-cresol

揮発させ、乾燥試料を得た。なお、フェノール、p-クレゾールに関しては抽出を行わず、反応液を 1 mL 測り取り、0.25 μm のメンブレンディスク (0.20 μm, PTFE 製; ADVANTEC) でろ過し、上述の HPLC 分析を行った。

2. 結果と考察

2.1 担子菌による BPA, BPE, BPF の分解

担子菌による BPA, BPE, BPF 分解時の濃度の経時変化を Figure 1 に示す。1 時間後にはほとんど分解し、2 時間後には検出限界以下の濃度まで分解された。1 次反応で近似し、反応速度式を求めると反応速度定数はそれぞれ 3.90, 3.62, 2.81 h⁻¹ となった。

反応速度定数の値が BPA の場合が一番高く、BPF で一番低かった理由を考察するために、Figure 2 に反応機構モデルを示す。担子菌が放出する 3 つの酵素のうちラッカーゼは Figure 2 の OH の部分を、さらには、マンガネルオキシダーゼとリグニンペルオキシダーゼは酵素反応により生成されるラジカルがベンゼン環の部分と、それぞれ反応して生分解が始まる。ここでラジカルの反応を考えると、BPF と比べて BPA にはメチル基が 2 つ付いている。メチル基は電子供与性であり、そこから電子がベンゼン環の方に流れ、Mn(III)などのラジカルがベンゼン環に近づきやすくなり、反応速度が上がると思われる。

2.2 反応速度定数に及ぼすメチル基の影響の考察

ビスフェノール化合物の生分解反応に及ぼすメチル基の置換基効果について分解中間産物の生分解反応の観点から考察する。

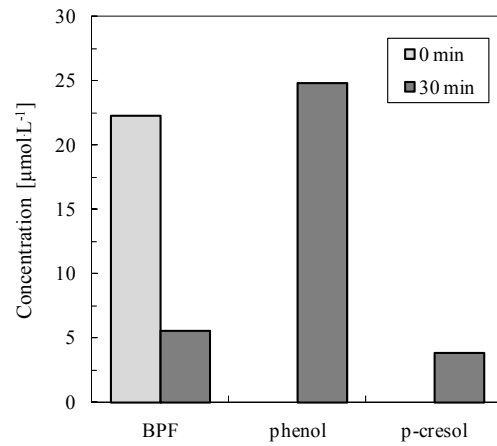


Fig. 5 BPF, phenol and p-cresol concentrations at 0 and 30 min after the addition of basidiomycete

Figure 3 に示すように BPF はフェノール、p-クレゾールの連結した化学構造をもつ。BPF 分解過程をこの図のような経路を辿る反応と推論し、担子菌によるフェノール、p-クレゾールの分解実験を行った。担子菌によるフェノール、p-クレゾールの分解に関しては高濃度条件で数日間の分解実験が報告されているが (Kennedy and Lema, 1994)、低濃度で短時間での分解速度を比較検討した報告は本研究が初めてであった。ここで、2.1 節において述べたメチル基の置換基効果より、フェノールのメチル基置換体である p-クレゾールは、フェノールと比較して分解速度が高いと推論できる。実験結果を Figure 4 に示す。フェノールは図中○印が示すように反応開始後 10 分は殆ど分解されなかったが、20 分以降に分解されていった。反応が進行している 20 分以降の 3 点に注目して 0 次あるいは 1 次反応で近似し、反応速度定数を求めると、それぞれ 40.1 μmol h⁻¹ と 1.05 h⁻¹ となった。p-クレゾールの場合、図中■印が示すようにフェノールに比べ早く反応が進行した。1 点目を除外し、反応が進行している 5 分以降の分解過程を 0 次あるいは 1 次反応で近似し、反応速度定数を求めると、それぞれ 91.2 μmol h⁻¹ と 2.92 h⁻¹ となった。この 1 次定数 2.92 h⁻¹ は、BPF の値 2.81 h⁻¹ と非常に近似しており、p-クレゾールの分解において、BPA の分解反応と同様、Mn(III)などのラジカルがベンゼン環を攻撃すると思われる。つまり、電子供与性であるメチル基が存在するために、p-クレゾールの反応速度がフェノールと比較して増大すると考える。さらに、BPF の分解反応の 1 次定数は p-クレゾールと同様の値をもつことが分かった。ここで、Figure 3 に示した担子菌による BPF の分解経路を確認するために、分解生成物としてフェノール、p-クレゾールが検出できるか否かを検討した。分解反応液に 5 mmol L⁻¹ の BPF を 250 μL 入れ、そこに担子菌を植え付け、植菌後 0, 30 分において BPF, フェノール, p-クレゾールの濃度測定を行った。測定結果を Figure 5 に示す。30 分間の BPF 分解により、分解量とほぼ等量あるいは少し多い量のフェノールが検出された。一方、p-クレゾールの検出量はフェノールほど高くなかった。これらの結果について以下のように考察した。BPF

は予想通り、BPF の OH 基の p-位にある C-C 結合が切断され、フェノールが検出された。その結果として、Figure 5 に示されるとおり、比較的少ないながらも p-クレゾールが検出された。p-クレゾールの検出量が少ない理由の一つに、OH 基の p-位にある C-C 結合が切断するよりも先に p-クレゾール部分のベンゼン環が Mn(III)ラジカルの攻撃を受け、分解している可能性が考えられる。もう一つの理由として、Figure 4 にあるとおり、p-クレゾールはフェノールに比べ分解速度が速いことから、p-クレゾールが生成すると即座にそのベンゼン環が Mn(III)ラジカルの攻撃を受け、分解することが考えられる。また、30 分におけるフェノールの量が BPF 分解量とほぼ等量あるいは少し多い量であった理由として、一部の p-クレゾールがフェノールへと分解された可能性が考えられるが詳細は明らかでない。

これまでに精製マンガンペルオキシダーゼによる BPA の分解 (Hirano *et al.*, 2000) や、精製ラッカーゼを BPA に作用させた場合に重合反応と分解反応が同時進行することが報告されている (Fukuda *et al.*, 2001)。本研究の一連の実験において、重合生成物は観察されなかったが、BPF の分解機構をより詳細に検討するためには、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた重合生成物の分析と同時に、GC-MS を用いた分解中間産物の同定作業が必要である。また生分解反応に関わる酵素の特定と、精製酵素を用いた生分解反応実験が今後の検討課題である。さらに、水環境の汚染物質として調査されているトルエン、クロロフェノール、クロロベンゼンなどについて、たとえばクロロ基の数と反応速度の関係について分析をすすめることが重要であろう。

結 言

本研究では担子菌の菌体外酵素によるフェノール系難分解性物質の分解に着目し、物質の化学構造と分解速度に関する知見を得ることを目的として実験を行った。その結果、電子供与性をもつメチル基の存在が、フェノール系物質の分解速度に影響を与えることが分かった。

Literature Cited

- Andrawis, A., E. A. Pease, I. C. Kuran, E. Holzbaur and M. Tien; "Characterization of two lignin Peroxidase Clones from *Phanerochaete chrysosporium*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162, 673-680 (1989).
- Boopathy, R.; "Factors Limiting Bioremediation Technologies," *Biores. Technol.*, 74, 63-67 (2000)
- Chatterjee, S., P. Chattopadhyay, S. Roy and S. K. Sen; "Bioremediation: A Tool for Cleaning Polluted Environments," *J. Appl. Biosci.*, 11, 594-601 (2008)
- Collins, P. J. and A. D. W. Dobson; "Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*," *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3444-3450 (1997)
- D'Annibale, A., D. Celletti, M. Felici, E. DiMattia, G. Giovannozzi-Sermanni; "Substrate Specificity of Laccase from *Lentinus edodes*," *Acta Biotechnol.*, 16, 257-270 (1996)
- Degen, G. H. and H. M. Bolt; "Endocrine Disruptors: Update on Xenoestrogens," *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 73, 433-441 (2000)
- Fukuda T., H. Uchida, Y. Takashima, T. Uwajima, T. Kawabata and M. Suzuki; "Degradation of Bisphenol A by Purified Laccase from *Trametes villosa*," *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 284, 704-706 (2001)
- Gold, M. H. and M. Alic; "Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*," *Microbiolog. Reviews*, 57, 605-622 (1993)
- Hirano T., Y. Honda, T. Watanabe, and M. Kuwahara; "Degradation of Bisphenol A by Lignin-Degrading Enzyme, Manganese Peroxidase, Produced by the White-rot Basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 1958-1962 (2000)
- Hofrichter, M., K. Scheibner, I. Schneegaß and W. Fritsche.; "Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*," *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 399-404(1998)
- Iguchi, T., M. Sumi and S. Tanabe; "Endocrine Disruptor Issues in Japan," *Congenital Anomalies*, 42, 106-119 (2002)
- Joshi, D. K. and M. H. Gold; "Degradation of 2,4,5,-Trichlorophenol by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*," *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1779-1785 (1993)
- Kennes, C. and J. M. Lema; "Simultaneous Biodegradation of p-Cresol and Phenol by the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*," *J. Indust. Microbiol.*, 13, 311-314 (1994)
- Maeda, Y., S. Kajiwara and K. Ohtaguchi; "Manganese Peroxidase Gene of the Perennial Mushroom *Elfvigina appianata*: Cloning and Evaluation of Its Relationship with Lignin Degradation," *Biotechnol. Lett.*, 23, 103-109(2001)
- Tsutsumi, Y., T. Honda and T. Nishida; "Removal of Estrogenic Activities of Bisphenol A and Nonylphenol by Oxidative Enzymes from Lignin-Degrading Basidiomycetes," *Chosmophere*, 42, 271-276 (2001)
- Ueshima, K., K. Asami and K. Ohtaguchi; "Kinetics of the Growth of White-Rot Fungus *Coriolus hirsutus* in Soil for Bioremediation," *J. Chem. Eng. Japan*, 41, 100-107 (2008)

Effect of Methyl Group of Bisphenolic Xenobiotics on Their Biodegradation Rates by White-Rot Basidiomycete

Kazuhiro ASAMI, Hiroyoshi NEMORI, Katsuhiro UESHIMA and Kazuhisa OHTAGUCHI

Department of Chemical Engineering, Tokyo Institute of Technology, 12-1 Ookayama 2, Meguro-Ku, Tokyo 152-8552, Japan

Keywords: Basidiomycetes ligninolytic enzymes, radical degradation reaction, electron donating

White-rot basidiomycetes produce extracellular lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase, which catalyze the degradation of aromatic xenobiotics via free-radical intermediates into CO₂ and H₂O. There are not sufficient data available on the dependency of degradation rate constants on the chemical structure of xenobiotics. This study examines the degradation rate of bisphenol compounds BPA, BPE and BPF by white-rot basidiomycete, *Coriolus hirsutus* IFO 4917. The bisphenol compounds, BPA, BPE and BPF, have the bisphenol structure, and the numbers of methyl group bonded with the central carbon, located between two phenol groups, are 2, 1 and 0, respectively. Experimental analysis was performed assuming that the degradation of bisphenol compounds follows the first order reaction kinetics. Results show that the degradation rate constant for BPA, BPE and BPF was 3.90, 3.62 and 2.81 h⁻¹, respectively. The positive relation between the numbers of methyl group and the rate constants of degradation was observed. Considering that BPF is composed of phenol and p-cresol, the additional experiments were performed in which the degradation of phenol and p-cresol by *C. hirsutus* IFO 4917 was observed. The degradation rate constant of p-cresol and phenol was 2.92 and 1.05 h⁻¹, respectively. The p-cresol has the structure of methyl-group-substituted phenol in *para*-position, and the degradation rate was higher than that of phenol. This observation leads to the conclusion that the substitution of benzene ring with the electron-donating methyl group promotes the xenobiotics biodegradation via radical reaction by white-rot basidiomycetes.