

焼却飛灰ダイオキシン類の常温分解技術の開発

— リグニン分解酵素の生産と灰ダイオキシン類処理の検証 —

斎藤 祐二・万字 角英・川又 睦

Keywords : white rot fungi, dioxins, ash, enzymatic degradation

白色腐朽菌, ダイオキシン類, 灰, 酵素分解

1. はじめに

ダイオキシン類は、その猛毒性、環境や生体への蓄積性から効率的な分解技術の開発が急務となっている。現在、実用化または実用に供するダイオキシン類の処理技術としては、熔融固化処理、加熱脱塩素化処理、超臨界水処理等の高温高压処理がある。しかし、これらの技術はいずれも設備費が高価だけでなく、高温高压下でダイオキシン類を熱分解するため、コストとともに多大なエネルギーを要する。一方、より安価でエネルギー消費の少ない技術として、分解菌を用いたバイオレメディエーションが挙げられる。しかし、バイオレメディエーションでは、上記の処理技術と比較して処理に長時間を要すること、外気温、pH、降雨等の影響を受け処理の信頼性に欠けることが共通の課題として残されていた。

筆者らは、生物の優れた機能を利用し、短期間でより確実に汚染物を処理する新しいシステムの構築を目指している。微生物の中でも担子菌類に属する白色腐朽菌は、難分解の天然高分子であるリグニンを生分解するだけでなく、このリグニン分解酵素によって様々な化学物質をも生分解できることが知られている¹⁻⁹⁾。一方、筆者らは、国内から分離した白色腐朽菌の中からダイオキシン類の分解性を評価した結果、優れた分解能を有する白色腐朽菌 MS325 株を見出した¹⁰⁾。白色腐朽菌 MS325 株は増殖速度が速いだけでなく、ダイオキシン分解に関与するリグニルペルオキシダーゼ (LIP)、マンガンペルオキシダーゼ (MnP) を効率的に生成する。そこで、本研究では、白色腐朽菌 MS325 株の液体培養にてこれらの分解酵素を生産するとともに、常温付近下で汚染灰と混合し、少ないエネルギーで短期間にダイオキシン類を処理する新システムを目指している。システム構築上、最も主要な課題である効率的酵素液生産手法、灰ダイオキシン分解の最適化について知見が得られたので報告する。

2. 灰ダイオキシン類処理システムの概要

図-1 に示すように、本処理システムは大別して分解酵素の製造を行う「培養液製造工程」、ダイオキシン汚染灰との混練による「灰処理工程」、さらに重金属の不溶化および固液分離を行う「後処理工程」の3工程で構成される。また、各工程を常温付近で行うところに従来までの高温高压処理とは異なる特徴がある。

本システムを構築する上で克服すべき主要な課題として、以下の二つが挙げられる。

第一には、ダイオキシン類の分解は培養液の酵素活性に依存するため、ダイオキシン類分解に関与する酵素活性の高い培養液を効率的かつ簡易に製造する培養条件および方法の確立である。第二には、製造した培養液とダイオキシン汚染灰を混練する際の最適条件を確立し、分解効率を向上させることである。本研究では、システム化に必要なこれらの二課題について実験的な検討を行った。

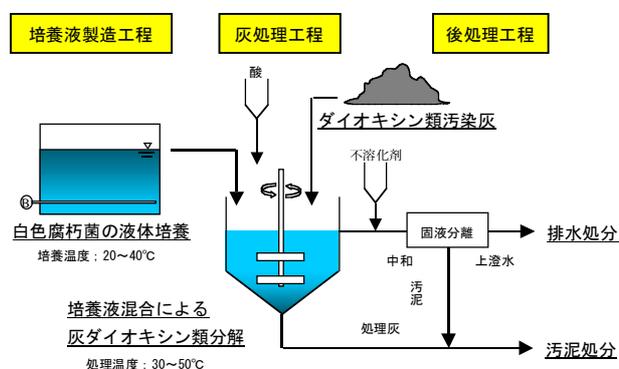


図-1 灰ダイオキシン類分解システムの概要

Overview of the degrading system of dioxins in incinerated ashes

3. 実験

3.1 高活性培養液の製造

3.1.1 酵素活性の向上条件の把握

白色腐朽菌が生成するリグニン酵素 LIP、MnP はともにヘムタンパクに属するが、これらの前駆体として 5-アミノレブリン酸 (ALA) が知られている。ALA は自然界においてテトラピロール化合物の共通前駆体として動植物を問わず生物界に広く存在する物質である。テトラピロール化合物は生物にとって必須の物質であり、呼吸系複合体、光集積複合体、カタラーゼおよびペルオキシダーゼ等の補欠因子を構成するヘム、クロロフィル、ビタミン B₁₂ などの物質がある。前述のように LIP、MnP も同様にヘムタンパクであることから、これらの前駆体である ALA を培地中に添加することによって、LIP、MnP 活性を向上させることが期待できる。そこで、白色腐朽菌 MS325 株の液体培養における酵素活性に及ぼす ALA の添加効果を検討した。

3.1.1.1 実験方法

炭素源としてグルコース、窒素源としてアンモニアを含む Basal III 液体培地をフィルター滅菌した後、オートクレーブ滅菌した 500ml 三角フラスコ 4 本に各々 100ml ずつ添加した。これに 2.4%PD 寒天培地で増殖させた MS325 株を無菌的に植菌し、30℃にて振とう培養 (120rpm) を開始した。培養開始時、3 日後、7 日後に 1mM になるように各培養液に ALA を添加した。なお、ALA を添加しない条件をブランクとした。経日的に各フラスコから培養液を採取し、培養液中の LIP 活性を測定した。

3.1.1.2 分析方法

(1) LIP 活性

採取した培養液を 0.2 μm メンブレンフィルターでろ過した後、10kDa の限外ろ過膜遠心チューブに所定量入れ、7,500g×50min の条件で濃縮した。最終的に 50mM コハク酸緩衝液 (pH4.5) で二度洗浄した後、元の培養液量の 1/8 倍容に濃縮調整したものを分析サンプルとした。この濃縮液 20 μl を 16 μM Azure B を含む 50mM コハク酸緩衝液 500 μl と混合し、37℃恒温の分光光度計に設置した。さらに、0.031% H₂O₂ 水溶液 10 μl を添加した後、651nm の吸光度の減少速度を LIP 活性とした。なお、Azure B のモル吸係数は 84,600M⁻¹cm⁻¹ である。

(2) グルコース

採取した培養液を 0.2 μm メンブレンフィルターでろ過した。得られたろ過液中のグルコース濃度をグルコース CII テストワコー試薬を用いて定量した。本試薬には

グルコースオキシダーゼが含まれており、サンプル中のグルコースの酸化で生じる H₂O₂ と、試薬中のフェノール、4-アミノアンチピリンとの酸化縮合により赤色素を生じる。この発色を 505nm で比色定量した。

(3) アンモニア

採取した培養液を 0.2 μm メンブレンフィルターでろ過した。得られた濾過液中のアンモニア濃度を IC-PAK Cation カラム (Waters、4.6×50mm) をセットした島津イオンクロマトグラフィー IC-6A にて分析した。移動相は 0.1mmol エチレンアミン四酢酸-1mmol 硝酸混合溶液であり、流速 0.5ml/min で行った。なお、カラム温度を 40℃とし、サンプル注入量は 10 μl とした。

3.1.1.3 実験結果

図-2 に各培養条件での LIP 活性の経日変化を示す。ALA の添加時期によって LIP 活性は大きく異なり、培養 7 日目に添加した条件で最も高い活性が得られた。これは、ブランク (ALA 無添加) の最大値と比較して約 4 倍もの活性向上となった。このような ALA 添加時期による LIP 活性の差異は、培地成分の組成変化によるものと考えられる。

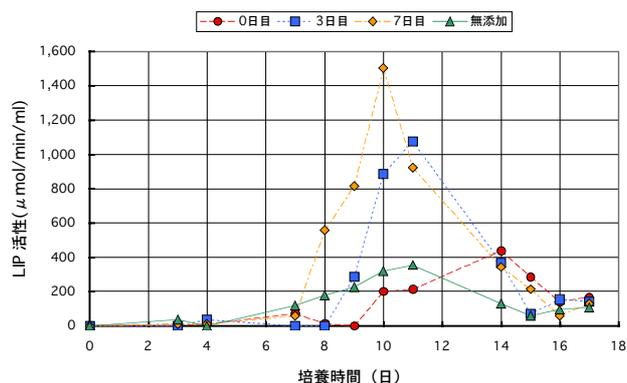


図-2 ALA 添加による LIP 活性の経時変化
Time course of lignin peroxidase (LIP) production by addition of 5-aminolevulinic acid (ALA) in the medium

図-3、図-4 には各々培養液中のグルコース、アンモニアの経日変化を示す。

培養初期および 3 日目に ALA を添加した条件では、培養液中のグルコース、アンモニアともに消費までの誘導期が長くなっており、ALA が白色腐朽菌 MS325 株の増殖自体を阻害したものと推察された。一方、高い LIP 活性が得られた培養 7 日目に ALA を添加した条件では、添加時にアンモニアがすでに消費されていた。これらの結果より、ALA は LIP 活性の向上に著しい効果を示す。しかし、白色腐朽菌の増殖を阻害するため、増殖が完了した段階、すなわち、増殖の必須成分である窒素源等が培地中から欠如した段階に培養液へ添加することによ

て、増殖を阻害することなく高い LIP 活性の培養液を製造できると考えられた。

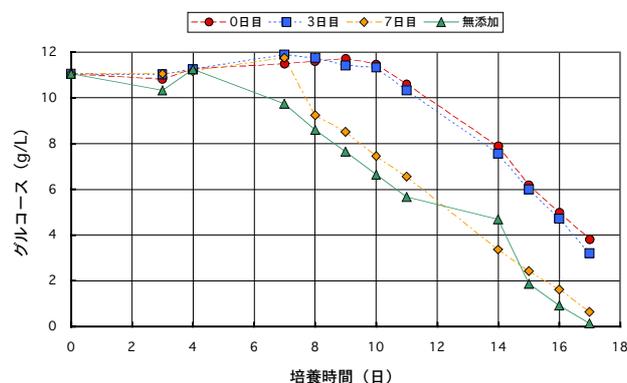


図-3 グルコースの経時変化
Time course of glucose in the medium

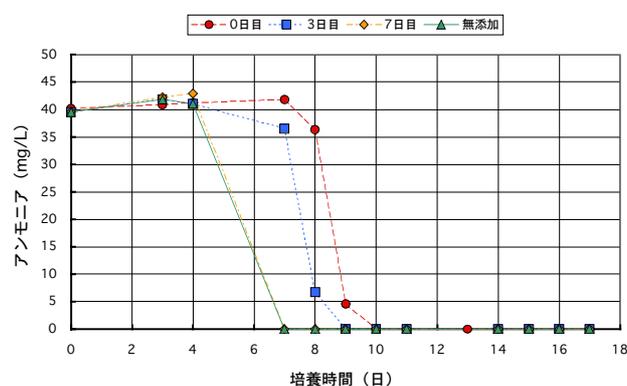


図-4 アンモニアの経時変化
Time course of ammonium in the medium

3.1.2 開放系での高活性培養液製造の検討

培養液を汚染現場にて直接製造することができれば大幅なコストダウンとなる。そこで、通常の排水処理で広く用いられている開放系通気培養による培養液製造の可能性を検討した。

3.1.2.1 実験方法

51 ジャー 2 基に非滅菌の Basal III 液体培地を 2.7l ずつ添加した (No.1 ; ALA 無添加系、No.2 ; ALA 添加系)。さらに、2.4%PD 液体培地で回転振とう培養 (30℃、120rpm) した白色腐朽菌 MS325 株の培養液 300ml を各ジャーに接種した。通気量を 1.0VVM に設定しコンプレッサにより通気培養を開始した。なお、通気空気は特に除菌せずにそのまま培養液に導入した。経日的に各ジャーから培養液を採取し、LIP 活性、MnP 活性を測定した。なお、No.2 のジャーには培養 88 時間後に ALA を 1mM になるように添加した。

3.1.2.2 分析方法

(1) LIP 活性

3.1.1.2 に示した方法に準じた。

(2) MnP 活性

10kDa 限外ろ過膜遠心チューブで濃縮調整した濃縮液を分析サンプルとした。この濃縮液 20 μ l を 200 μ M MnSO₄ と 60 μ l フェノールレッドを含む 50mM マロン酸緩衝液 500 μ l と混合し、37℃恒温の分光光度計に設置した。0.31% H₂O₂ 水溶液 10 μ l を添加した後、431nm の吸光度の減少速度を MnP 活性とした。なお、フェノールレッドのモル吸係数は 22,985,000M⁻¹cm⁻¹ である。

3.1.2.3 実験結果

図-5 には LIP 活性の経時変化を示す。ALA 無添加の条件である No.1 では、LIP 活性が変動しながら徐々に向上したものの、最大活性は 150 μ mol/min/ml であった。一方、培養 88 時間経過後に ALA を添加した No.2 では、培養 260 時間後に No.1 の 2.3 倍に当たる 350 μ mol/min/ml の活性に達した。

図-6 には MnP 活性の経時変化を示す。No.1 では、培養 160 時間に最大活性となったが、その後徐々に低下し培養 260 時間後には培養液中に活性は確認されなかった。一方、培養 88 時間経過後に ALA を添加した No.2 の条件では、添加後から MnP 活性が徐々に上昇し、培養 260 時間後には No.1 の最大値の 2.8 倍に当たる 12 μ mol/min/ml に達した。

以上の結果、開放系での通気培養では前述した純粋培養系より酵素活性は劣るものの、培養液中に ALA を添加することによって、開放系であっても LIP、MnP 活性の高い培養液を製造できることが確認された。これらの結果より、通常の生物的排水処理に見られるような開放系での通気培養が可能であり、培養液の製造が非常に簡易かつ低コストで実現できる可能性が得られた。

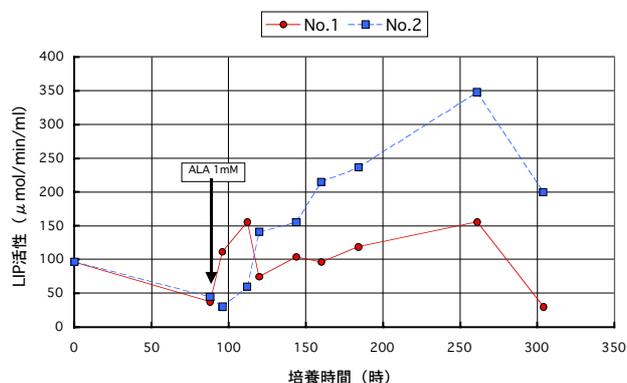


図-5 開放系培養での LIP 活性の経時変化
Time course of LIP production on the open culture conditions

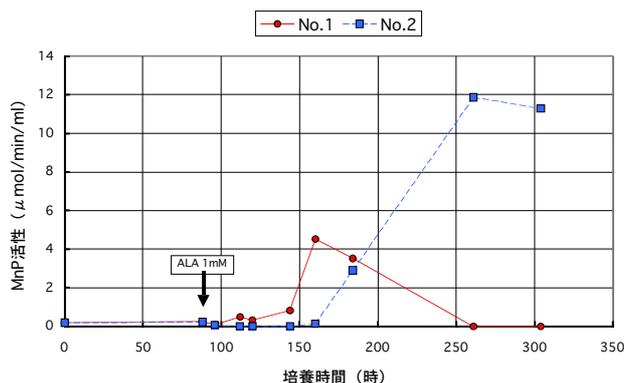


図-6 開放系培養での MnP 活性の経時変化
Time course of MnP production on the open culture conditions

3.2 培養液混合による灰ダイオキシン類分解の検証

前述のような通気培養にて製造した白色腐朽菌 MS325 株の培養液を用いた灰ダイオキシン類の分解可能性を検証した。

3.2.1 実験材料

3.2.1.1 供試灰

用いた灰は A 市焼却処分場より採取した飛灰である。分解実験に供する前に、灰中のダイオキシン類濃度および毒性等量を分析したところ、濃度で 960ng/g、毒性等量で 7.54ng-TEQ/g であった。また、本灰はポリクロロ-p-ジオキシン (PCDDs)、ポリクロロジベンゾフラン (PCDFs)、コプラナーPCB (Co-PCBs) のダイオキシン類で構成されたが、主要成分は PCDDs と PCDFs であった。さらに、図-7 に示すように、通常微生物分解が困難と言われている塩素置換数 6、7 の高塩素数異性体成分が多く存在していた。

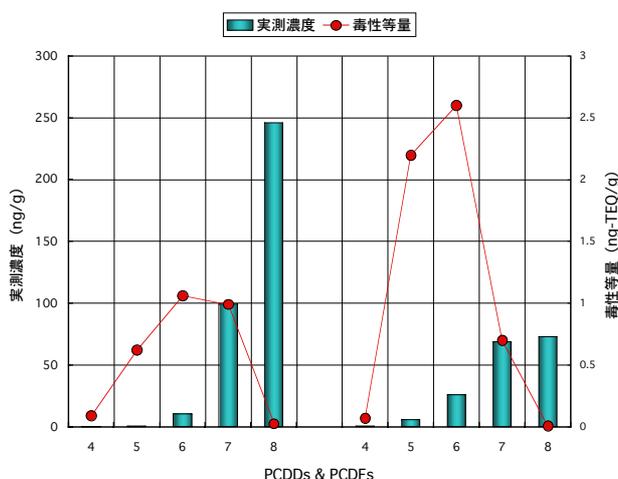


図-7 供試灰のダイオキシン組成
Dioxins composition contained in incinerated ashes to have used for this experiment

3.2.1.2 供試培養液

白色腐朽菌 MS325 株の通気攪拌培養にて培養液を製造した (培養温度 30℃、通気量 1.0VVM、培養期間 6 日)。これを 0.2 μm メンブレンフィルターでろ過したものを用いた。なお、本培養液中の LIP、MnP 活性を測定したところ、LIP は 569 μmol/min/ml、MnP は 1.52 μmol/min/ml の活性であった。

3.2.2 実験条件および方法

表-1 に実験条件を示す。100ml 密閉バイアル瓶 7 本に粉体化した飛灰を各々 10g ずつ入れ、30%塩酸水溶液で pH を 3.5 に調整した。これに、20mM MnSO₄ と所定量の培養液を入れ、最終的に 50mM マロン酸緩衝液 (pH3.5) で 80ml にメスアップした。表-1 に示した振とう期間に応じて、各バイアル中のスラリーに一日一回 H₂O₂ を 0.01% になるように添加し、37℃のインキュベーター内で所定期間 180/min の往復振とうを行った。所定日数経過後に各バイアル瓶を回収し、各サンプル中のダイオキシン類を定量した。なお、ダイオキシン類の分析は厚生省告示第 633 号に準じた。

表-1 MS325 株の培養液による灰ダイオキシン類の分解試験
Conditions for enzymatic degradation of dioxins contained in incinerated ashes by culture liquid of MS325 strain

No.	飛灰 (g)	培養液 (ml)	振とう期間 (日)
1	10	0	3
2	10	10	3
3	10	25	3
4	10	50	3
5	10	50	1
6	10	50	2
7	10	50	4

3.2.3 実験結果

3.2.3.1 培養液量の効果

図-8 には、培養液量に応じた灰ダイオキシン類の分解試験結果 (3日間振とう処理; No.1,2,3,4) を示す。配合する培養液量に応じて、灰ダイオキシン類が明確に減少しており、培養液中に含まれる LIP、MnP 等の酵素によりダイオキシン類の分解が進行したものと考えられる。なお、本実験によれば、灰 10g (ダイオキシン類総量; 9,600ng、毒性総量; 75ng-TEQ) に対して、培養液量 25ml (LIP 総活性; 14,225 μmol/min、MnP 総活性; 38 μmol/min)、50ml (LIP 総活性; 28,450 μmol/min、

MnP 総活性；76 μmol/min) の配合条件で廃棄物処分基準値 3ng-TEQ/g を下回る結果となった。

酵素処理では、基質であるダイオキシン濃度と酵素活性との関係が最も重要である。一方、酵素とダイオキシン類との接触効率も分解性能に大きく影響する。本実験では、灰と培養液を混合したスラリーを 180/min の振とう処理という緩やかな条件にて評価した。今後、酵素とダイオキシン類との接触効率を上げる混練方法を採用することによって、単位培養液量当たりのダイオキシン類分解量をさらに向上させることが十分期待される。

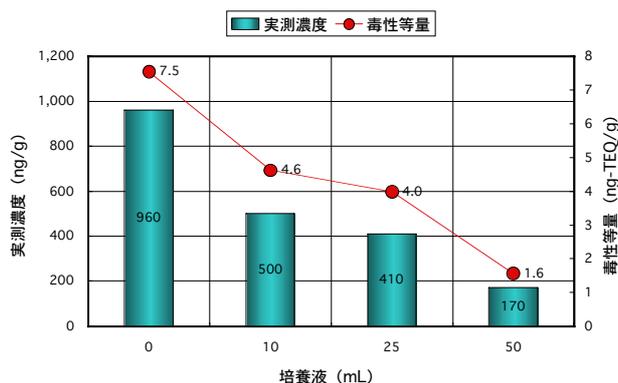


図-8 培養液量に応じた灰ダイオキシン類の分解

Enzymatic degradation of the dioxins contained in incinerated ashes according to the culture fluid quantities

3.2.3.2 ダイオキシン分解の経日変化

図-9 には、配合する培養液量を 50ml とした場合の経日的なダイオキシン類の変化を示す。処理日数に伴って灰ダイオキシン類の濃度、毒性ともに指数的に減少した。特に、4日後の値は、ダイオキシン類の分解率で 87%、毒性減少率で 83%となった。

図-10 には、PCDDs (塩素置換数 4~8)、PCDFs (塩素置換数 4~8)、Co-PHBs の同族体濃度の変化を示す。また、図-11 には、各同族体の毒性等量変化を示す。その結果、PCDDs、PCDFs、Co-PHBs とともに、塩素置換数に係わらず、処理日数に伴ってすべての同族体の濃度および毒性が一様に低下していることがわかった。

Valli ら¹¹⁾ は、白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* が 2,7-ジクロロジベンゾ-p-ジオキシン (2,7-DCDD) を二酸化炭素まで完全分解することを示し、この分解に LIP および MnP が関与することを示している。特に、LIP は分解の初期段階として 2,7-DCDD のエーテル結合を切断することを示している。今回実験に用いた白色腐朽菌 MS325 株により製造した培養液も前述のように LIP 活性が高く、灰中ダイオキシン類の分子骨格そのものを開裂していたものと推察される。

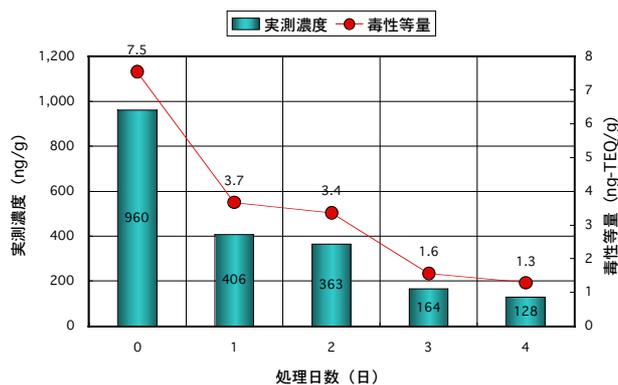
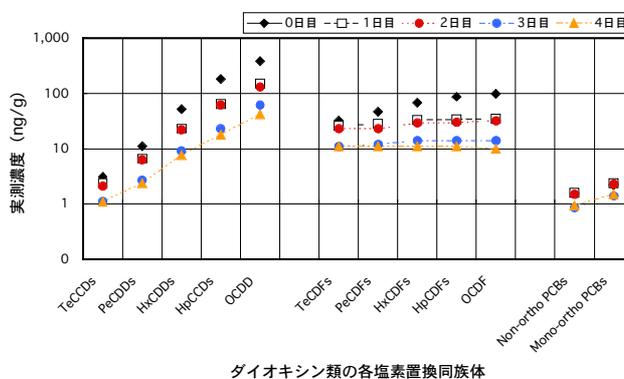


図-9 灰ダイオキシン類分解の経時変化

Time course of the degradation of dioxins contained in incinerated ashes



- TeCDDs；四塩素化ジベンゾ-p-ジオキシン
- PeCDDs；五塩素化ジベンゾ-p-ジオキシン
- HxCDDs；六塩素化ジベンゾ-p-ジオキシン
- HpCDDs；七塩素化ジベンゾ-p-ジオキシン
- OCDD；八塩素化ジベンゾ-p-ジオキシン
- TeCDFs；四塩素化ジベンゾフラン
- PeCDFs；五塩素化ジベンゾフラン
- HxCDFs；六塩素化ジベンゾフラン
- HpCDFs；七塩素化ジベンゾフラン
- OCDF；八塩素化ジベンゾフラン
- No-ortho PCBs；オルト位非塩素置換型塩化ビフェニル
- Mono-ortho PCBs；オルト位1塩素置換型塩化ビフェニル

図-10 各同族体濃度の変化

Change of each congener Concentration of the dioxins contained in incinerated ashes

4. 考察

本研究は、生物を利用した環境浄化で共通の課題であった処理期間の短縮と処理の信頼性向上を目的に行ったものである。システム構築において重要な課題であった

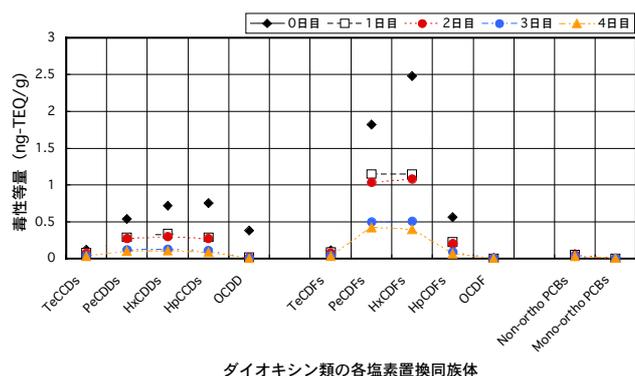


図-11 各同族体毒性の変化
Time course of the toxic equivalency quantities (TEQ) of each congener of dioxins contained in incinerated ashes

単位培養液量当たりの酵素活性向上では、白色腐朽菌 MS325 株の液体培養時に ALA を添加することによって、ダイオキシン分解に参与する酵素 LIP、MnP の活性を著しく向上させることが明らかとなった。さらに、開放系での製造も可能であり、汚染現場、処理現場にて培養液を製造できる可能性が得られた。

通常、単一菌の純粋培養では、コンタミネーションを防止するために培養タンク、培養ラインさらに培地そのものを滅菌する必要がある。そのため、全体の処理コストに占める培養液製造コストの比率が著しく高くなる可能性があり、本研究で得られた知見は処理コストの削減に大きく寄与するものと考えられる。また、本処理方法は酵素を利用するため、通常、数カ月は要するであろう生物処理における処理期間を数日で達成することができた。

ダイオキシン類には、PCDDs、PCDFs、Co-PHBs の 3 つの基本的な分子骨格がある。また、各分子骨格へ結合する塩素数およびその位置によって、その同族体数は数百以上にも及ぶ (DD で 75 種、DF で 135 種)。一方、毒性に関しては 4 塩素置換の DD [2,3,7,8-テトラジベンゾ-p-ジオキシン (2,3,7,8-TCDD)] が最も高く、単にダイオキシン類の脱塩素反応のみでは毒性が逆に増加する危険性もある。また、ダイオキシン類そのものが非常に安定な化学物質であるために、ダイオキシン類の分解・無害化は、今まで知られる環境汚染化学物質の中でも極めて複雑かつ困難な化合物と言える。しかし、本研究結果のように、白色腐朽菌 MS325 株の培養液を用いた灰ダイオキシン類の分解では、塩素数に係わらず各異性体の濃度、毒性ともに明確に低減した。これは、白色腐朽菌が生成する LIP、MnP 等の酵素作用によるものであり、バクテリアには無い優れた化学物質の分解能力を有することを示している^{12, 13)}。LIP、MnP 等のリグニン分解

酵素は、本報告に示したダイオキシン類以外にも PCB、環境ホルモン様物質、殺虫剤、農薬等の様々な有機系環境汚染物質の分解が可能である¹⁾。本研究では焼却飛灰に着目し、ダイオキシン類にターゲットを絞っている。しかし、土壌や底質の浄化では、これらの有機複合汚染となっている可能性が高く、白色腐朽菌の適用場面は非常に広いものとする。

5. おわりに

本研究は、ダイオキシン類を常温付近で効率的に処理する新技術の構築を目指したものである。前述のように、生物を用いた処理方法は他の方法と比較して安価で消費エネルギーが少ないというメリットを持つ反面、処理期間や処理の信頼性の面で課題が残されていた。本研究では、生物の持つ優れた機能を活かしながら、処理期間短縮と信頼性を向上させるべく分解酵素生産に着目した新しい処理システムを検討した。今後これらの要素技術を集約し一連のシステムとして構築する予定である。また、今後、廃棄物処理においても処理性能とともに LCA の観点を取り入れた総合評価が必要と考えられ、本研究を通じて今後の環境保全、環境浄化に微力ながら貢献していきたいと考えている。

なお、本研究の一部は、平成 14 年度環境省廃棄物処理等科学研究費補助事業であることを付記する。

参考文献

- 1) 高田, BIO INDUSTRY, 14(10), 5 (1997) .
- 2) G.J.Mileski, J.A.Bumpus, N.A.Jurek, and S.D.Aust, *AEM*, 54(12), 2885(1988).
- 3) R.T.Lamar, M.J.Lavsen, and T.K.Kirk, *AEM*, 56(11), 3519(1990).
- 4) R.T.Lamar, and D.M.Dietrich, *AEM*, 56(10), 3093(1990).
- 5) J.K.Spiker, D.L.Crawford, and R.L.Crawford, *AEM*, 58(9), 3199(1992).
- 6) D.K.Toshi, and M.H.Gold, *AEM*, 59(6), 1779(1993).
- 7) J.S.Vadav, and C.A.Reddy, *AEM*, 59(9), 2904(1993).
- 8) D.Dietrich, W.J.Hickey, and R.Lamar, *AEM*, 61(1), 3904(1995).
- 9) J.S.Yavav, R.E. Wallace, and C.A. Reddy, *AEM*, 61(2), 677(1995).
- 10) 斎藤, 川又, 万宇, 友沢, 第 13 回廃棄物学会研究発表会、講演論文集 II, 1113 (2002.11 京都) .
- 11) Valli, K., Wariishi, H., Gold, M.H., *J.Bacteriol.*, 174, 2131 (1992).
- 12) H.Wilkes et al. ; *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(2), 367(1996).
- 13) G.M.Klecka, D.T.Gilson ; *Biochem.J.*, 180, 639(1979).