

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Ajeng Arum Sari
審査委員	主査 橋 燦郎 副査 大谷 慶人 副査 鈴木 利貞 副査 伊藤 和貴 副査 市浦 英明

論文名

Biodegradation of Persistent Organic Pollutants (POPs) and Dyes by Fungi Screened from Nature

(天然から選抜した菌による残留性有機汚染物質および染料の生分解)

審査結果の要旨

環境中に排出される様々な汚染物質による環境汚染が大きな社会問題となっている。残留性有機汚染物質(POPs)を減少する目的で、これらの物質の生産や使用等を中止して人類や環境を保全するためのストックホルム条約が 2004 年に発効した。これら物質のいくつかは、農薬、薬剤等として使用されている。しかし、これらの物質以外にも染料、農薬、多環芳香族炭化水素等の環境汚染物質があり、これらの毒性を軽減ないし無毒化することは人類や環境保全のために必要である。菌やバクテリア等によるこれらの汚染物質の生分解は、これらの汚染物質の危険性を減少できる方法の一つである。本研究では、天然から選抜した菌を用いて、2 種の POPs [4,4'-(2,2,2-トリクロロエタン-1,1-ジイル)ビス(クロロベンゼン)(DDT)、ペンタクロロベンゼン (PC)] の分解について検討するとともに、環境中に放出され環境汚染問題となっている 2 種の染料の脱色 (分解) について検討した。

2 種の染料 [レマゾールブリリアントブルー-R (RBBR), Reactive green 19] および 2 種の有機汚染物質(DDT, PC)を指標物質として用いる分解菌選抜法により、天然からこれらを分解できる菌を 2 種 (*T. versicolor* U97, U80) を選抜した。まず始めに、*T. versicolor* U97 菌を用いて DDT の分解について検討した。液体培養により DDT(0.1mM)を 73%分解 (40 日間培養) できることを見出した。液体培養時に DDT を添加しても添加しなくても、培養時のグルコースの消費量と菌の成長量には差異が見られなかったことから、DDT の分解はグルコースによる菌の成育ではなく、糖の消費により誘導される二次代謝であることを見出した。培養時に数種の物質 (メディアエーター、酵素活性剤および酵素阻害剤) を添加して、DDT 分解におけるそれらの影響を調べた。その結果、DDT の分解には、分解菌が産出するリグニナーゼの一種、リグニンペルオキシダーゼが関与していることを明らかにした。そして、この酵素を誘導するベラトリルアルコールを培養時に添加すると、DDT 分解率が向上するだけでなく最高 80%分解できることを見出した。また、DDT 分解物として 6 種の分

解物を同定し、その菌の DDT 分解メカニズムを解明した。さらに、*T. versicolor* U97 菌を油ヤシの実から得られる繊維 (EFB) に繁殖させた培養物を用いた液体培養およびこれらの培養物をカラムに充填したバイオリクターにより、それぞれ DDT(0.1mM)を 61%, 58%分解 (15 日間処理) できることを明らかにした。この培養物による分解は、菌による分解、EFB への吸着、EFB によるリグニン分解酵素の促進が関係していることも見出した。さらに、土壌中の DDT(10ppm)も *T. versicolor* U97 菌を EFB に繁殖させた培養物により、54%分解 (30 日間処理) できることを見出した。さらに、DDT の分解はベラトリルアルコールを添加することによりさらに向上 (63%分解) できることも見出した。

次に、*T. versicolor* U80 菌によるペンタクロロベンゼン (PC) の分解について検討した。*T. versicolor* U80 菌および固定化菌の液体培養により、PC(1mM)がそれぞれ 43%および 54%分解 (40 日間培養) できることを見出した。しかし、PC は分解菌の成育には影響をおよぼさなかった。そして、分解菌による PC の代謝物も同定し、その分解メカニズムを解明した。さらに、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) およびピペロニルブトオキサイドの添加により、PC の分解にリグニンペルオキシダーゼと P-450 モノオキシゲナーゼが関与していることを明らかにした。また、この分解菌により土壌中の PC(10ppm)が 43% (40 日間処理) 分解できることを明らかにした。数種の物質 (酵素活性剤および酵素阻害剤等) を添加して、PC 分解におけるそれらの影響を調べた。その結果、リグニンペルオキシダーゼが PC 分解に関与していることを見出した。そして、ベラトリルアルコールの添加により、液体中および土壌中の PC の分解は促進され、PC の分解率はそれぞれ最高 57%および 65% (40 日間処理) まで向上することを明らかにした。

最後に、*T. versicolor* U97 菌による染料の脱色 (分解) について検討した。この菌の液体培養により RBBR(100ppm)を 85%脱色 (6 時間培養) 出来ることを見出した。そして、この分解菌により染料が分解されることを代謝物の HPLC 分析により明らかにした。また、この分解菌の培養時に数種の添加物 (メディエーター、酵素活性剤等) を添加することにより、RBBR(100ppm)の分解は促進された (87%, 72 時間培養)。 *T. versicolor* U97 菌から調製した固定化菌および固定化酵素により、染料(Reactive green 19)(100ppm)をそれぞれ 42%, 21%脱色 (72 時間培養) できることも見出した。しかし、それらの培養時に数種のメディエーターを添加することにより、脱色率を 2~4 倍向上できることを見出すとともに、染料(Reactive green 19)がそれぞれ最高 88%, 82%脱色できることも明らかにした。

以上から、指標物質を用いる分解菌選抜法により、天然から有機汚染物質および染料を分解できる菌を 2 種選抜し、これらの菌により 2 種の POPs (DDT, PC) が分解できることを明らかにするとともに、それらの分解に関与する酵素およびそれらの分解機構を解明した。また、これらの分解菌により POPs により汚染された土壌や水が浄化できることを見出した。さらに、分解率は培養時にメディエーター等を添加することにより向上できることも明らかにした。また、この分解菌により染料が脱色 (分解) できることを明らかにするとともに、その分解に関与する酵素も見出した。さらに、メディエーターや酵素活性剤の添加により染料の分解率を向上できることも明らかにした。

本論文の公開審査会は 2013 年 8 月 3 日に高知大学農学部で開催され、論文審査と質疑応答が行われた。それに引き続いて、学位論文審査委員会を開催して審査し、審査委員全員一致して本論文が博士 (学術) の学位を授与するに値するものと判断した。