

ダイオキシン分解菌の酵素活性と2,4,8-トリクロロジベンゾフランの分解との関連

大川 浩樹* · 伊藤 和貴* · 橘 燦郎*

Relationship between enzymatic activities of fungi having ability for degradation of dioxins and degradation of 2,4,8-trichlorodibenzofuran**

Hiroki OHKAWA*, Kazutaka ITOH* and Sanro TACHIBANA*

Summary : Using the fungus V2 found from the nature by a screening method and a wood-rotting fungus, *Phanerochaete chrysosporium*, the relationship between enzymatic activity in microbial degradation of 2,4,8-trichlorodibenzofuran (2,4,8-TCDF) and degree of degradation of 2,4,8-TCDF was measured. The activity of lignin peroxidase (LiP) of the two fungi reached at maximum during the day from 5 to 15 after the incubation started. On the contrary, the activity of dioxygenase of the two fungi showed the maximum activity on 30 days after the incubation started. The activities of manganese peroxidase (MnP) and laccase (Lac) of the two fungi did not show the constant tendency during the incubation.

From the results obtained here, it was suggested that the enzymes like LiP and MnP functioned by addition of hydrogen peroxide (H₂O₂) and the enzymes like dioxygenase and Lac functioned by no addition of H₂O₂ were responsible for the degradation of 2,4,8-TCDF.

Keywords: 2,4,8-Trichlorodibenzofuran, lignin peroxidase, Manganese peroxidase, Laccase, Dioxygenase, Degradation of dioxins

要 旨 天然からスクリーニングにより見出したダイオキシン分解能の高い1種の菌株(V2)と木材腐朽菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) を用いて、微生物分解時における2,4,8-trichlorodibenzofuran (2,4,8-TCDF)の分解率と酵素活性の関係について検討した。2種の菌株のリグニンペルオキシダーゼ (LiP) 活性は培養開始5日目から15日目の間に最高の活性を示した。また、ジオキシゲ

* 森林資源利用化学研究室 Laboratory of Chemistry and Biotechnology for Utilization of Forest Resources

** Received November 30, 2000. 本報告の一部は第48回日本木材学会大会(1998年4月, 静岡)で発表した。

ナーゼ活性はいずれも培養開始30日目に最高の活性を示した。マンガンペルオキシダーゼ (MnP) 活性およびラッカーゼ (Lac) 活性については2種の菌株に一定の傾向を示さなかった。これらの結果から2,4,8-TCDFの分解には、その分解にH₂O₂必要とするLiPやMnPなどの酵素とジオキシゲナーゼやLacなどその分解時にH₂O₂を必要としない酵素の両方が関与しているものと考えられた。

1. 緒 言

近年、ダイオキシン類などの有機塩素系化合物による環境汚染が社会問題となっている¹⁻³⁾。ダイオキシン類は、ダイオキシン (ポリ塩化ジベンゾ-*p*-ダイオキシン) とジベンゾフラン (ポリ塩化ジベンゾフラン) とを総称する言葉として用いられている⁴⁾。ジベンゾフランはダイオキシンと同様に毒性が高く、化学的に安定で分解されにくいばかりでなく、脂溶性が高いため、生体組織中に蓄積しやすいと言われている。なお、1999年以前には厚生省及び環境庁はダイオキシンとジベンゾフランを総称してダイオキシン類としていた。しかし、1999年以降厚生省及び環境庁はダイオキシンやジベンゾフランと毒性が類似しているコプラナーPCBをも含めてダイオキシン類としている。しかしながら、コプラナーPCBはダイオキシンやジベンゾフランとは構造が基本的に異なるので、前二者をダイオキシン類とする研究者もいる。本報告で言うダイオキシン類は、ダイオキシンとジベンゾフランを総称する意味で使用している。

最近、生物を用いて環境浄化をしようとする「バイオレメディエーション」についての研究が活発に行われるようになってきた。微生物により環境汚染物質を分解ないし無毒化できれば、地球環境保全の観点から有益と考えられるばかりでなく、環境汚染物質の除去法を考える際の一助となるものと考えられる。

先に著者ら^{5, 6)}は、天然からダイオキシン分解能を有する菌のスクリーニング法を見出した。そして、それにより選抜した3種の菌株 (563, V1, V2) および2種の木材腐朽菌 (*Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor*) による2,7-ジクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン (2,7-DCDD) の分解率と酵素活性との関係について検討し、リグニンペルオキシダーゼ (LiP) 活性が高い程2,7-DCDDの分解率も高いことを見出した。さらに、これらの5種の菌を用いて、2,4,8-トリクロロジベンゾフラン (2,4,8-TCDF) 及び塩素置換のないジベンゾフラン (DF) の分解についても検討した。その結果、5種の菌は2,4,8-TCDFを2%~76%分解できること、DFは2種の菌 (*P. chrysosporium*とV2) により81%~95%分解されることを見出した⁷⁾。しかしながら、その分解過程と酵素活性との関連については調べていなかった。

そこで、本研究では、*P. chrysosporium*とV2菌による2,4,8-TCDFの分解率と、LiP、マンガンペルオキシダーゼ (MnP)、ラッカーゼ (Lac) およびジオキシゲナーゼの酵素活性との関連について検討した。

2. 実 験

2.1 試薬

2,4,8-TCDFは、シグマアルドリッチジャパン(株)より購入した。また、3,5-ジクロロ安息香酸および2,5-ヒドロキシ安息香酸は東京化成(株)より購入した。

2.2 供試菌

前報⁷⁾で使用した2種の菌，すなわち天然からスクリーニングにより見出した1種の菌株(V2)と1種の木材腐朽菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) (IFO 31249) を用いた。

2.3 *P. chrysosporium* 及びV2の液体培養および酵素活性の測定

2.3.1 *P. chrysosporium* 及びV2の液体培養

前報⁶⁾と同様に培養液は，Kirkら⁸⁾のBasal溶液を基本とした。この溶液にコハク酸ナトリウム(20mM)とグルコース(2%)および窒素源として酒石酸アンモニウム(1.2mM)を加え，培養液のpHを4.5に調整後，オートクレーブで滅菌した。これに0.1%濃度になるようにTween80を加えた。上記の培養液各20mlを100mlの三角フラスコに分注し，これに*P. chrysosporium* 及び V2を一白金耳植菌した。その後，フラスコにダブルキャップをして25℃で5, 15, 21, 30, 36日間静置培養した。なお，毎日1回各培養フラスコに酸素を吹き込んだ。また，培養6日目に，一つのフラスコ毎に200 μ lのN,N-ジメチルホルムアミドに溶解した2,4,8-TCDF (1.25mM) を添加した。所定期間培養後，遠心分離(10,000rpm, 4℃, 15分間)し，菌体と培養ろ液に分けた。培養ろ液を菌体外粗酵素液として使用した。

2.3.2 酵素活性の測定

2.3.1で調製した菌体外粗酵素液を用いて酵素活性を測定した。

(1) タンパク質の定量

菌体外粗酵素液中のタンパク質の定量はLowry法⁹⁾により行った。

(2) LiP活性の測定

LiP活性はTienとKirk¹⁰⁾の方法により測定した。ペラトリルアルコール(0.4mM)，酒石酸ナトリウム(0.1M) (pH 3.0)，Tween 80 (0.1%)の溶液(2ml)にタンパク質濃度が5 μ g/mlになるように菌体外粗酵素液(1ml)を加えた。これに過酸化水素水(H₂O₂) (0.15mM)を300 μ l加え反応を開始した。反応は37℃で行い，310nmにおける吸光度の変化を測定してLiP活性を求めた。

(3) MnP活性の測定

MnP活性はPerieとGold¹¹⁾らの方法により測定した。2,6-ジメトキシフェノール(1mM)，硫酸マンガン(1mM)，マロン酸緩衝液(50mM) (pH 4.5)の溶液(2ml)にタンパク質濃度が5 μ g/mlになるように菌体外粗酵素液(1ml)を加えた。これにH₂O₂ (0.2mM)を300 μ l加え反応を開始した。反応は28℃で行い，470nmにおける吸光度を測定してMnP活性を求めた。

(4) Lac活性の測定

Lac活性は，LeonowiczとGrzywnowicz¹²⁾の方法により測定した。0.5mMのシリンガアルダジンのエタノール溶液 0.2mlと酢酸ナトリウム緩衝液(0.1M) (pH 5.3)1.5mlを混合した。これにタンパク質濃度が5 μ g/mlになるように菌体外粗酵素液1.8mlを加え反応を開始した。反応は20℃で5分間振盪した。反応後生成したテトラメチルアゾービス-メチレンキノンの吸光度(525nm)を測定し，Lac活性を求めた。

(5) ジオキシゲナーゼ (カテコール-1,2-ジオキシゲナーゼ) 活性の測定

ジオキシゲナーゼ活性は諸星ら¹³⁾の方法およびCain¹⁴⁾の方法を参考にして測定した。カテコール(0.1mM)を酢酸緩衝液(0.1M, pH 7.0) (1ml)に溶解した。これにタンパク質濃度が5 μ g/mlになるように菌体外粗酵素液1.5mlを加えて反応を開始し，30℃で40分間振とうした。その後，260nmの吸光度を測定してジオキシゲナーゼ活性を求めた。

2.4 *P. chrysosporium* の菌体外粗酵素による2, 4, 8-TCDFの分解

2.4.1 菌体外粗酵素の調製

2.3.1と同様にして5日間前培養して得た*P. chrysosporium*からの菌体外粗酵素液に硫酸アンモニウムを加え0.9飽和として、4℃で一晩放置した。その後、冷却遠心分離(10,000rpm, 4℃, 20分間)して沈殿部を得た。この沈殿部を少量の酢酸緩衝液(20mM) (pH3.0)に溶解し、4℃で一晩透析した。これをもう一度冷却遠心分離(10,000rpm, 4℃, 20分間)して沈殿部を取り除いた。この溶液をLowry法⁹⁾によりタンパク量を測定し、1mg/mlになるように酢酸緩衝液(20mM, pH3.0)で希釈して、菌体外粗酵素とした。

2.4.2 粗酵素による2, 4, 8-TCDFの分解

上記菌体外粗酵素に0.1%濃度になるようにTween80を添加した後、その溶液を10mlずつ試験管に分注して25℃で保温した。その後、H₂O₂(200mmol)を添加し、一つの試験管毎に0.2mlのN,N-ジメチルホルムアミドに溶解した2, 4, 8-TCDF(1.25mM)を添加した。この溶液を25℃で振とうしながら、15, 30, 45分および1, 2, 3, 6, 12, 24時間反応した。また、H₂O₂無添加のものもH₂O₂添加のものと同様にして行った。

2.4.3 抽出

所定時間反応した後、反応液を塩酸(1N)でpH2.0とした。これに酢酸エチル(10ml)を加えて抽出した。抽出は2回繰り返した。抽出液は合併し、飽和食塩水で洗浄した。芒硝で乾燥後、減圧濃縮して各反応生成物を得た。

2.4.4 反応生成物の分析

2.4.3で得た各反応生成物(1.0mg)にN,O-ビス-トリメチルシリルアセトアミド(40μl), トリメチルクロロシラン(20μl), ピリジン(40μl)を加え、加温(80℃, 10分間)してトリメチルシリル(TMS)化したものをGLC用試料とした。この試料をGLCに注入し、予め作成しておいた検量線より、2, 4, 8-TCDF, 3, 5-ジクロロサリチル酸, 2, 5-ジヒドロキシ安息香酸を定量した。2, 4, 8-TCDFの分解率は、反応前後の2, 4, 8-TCDFの量から求めた。

GLCの条件：カラムはキャピラリーカラム, TC-17(0.25mm×30m)を使用した。分析温度は、150℃で1分間保持した後、1℃/minの割合で180℃まで昇温した後、180℃で1分間保持した。その後、180℃から280℃まで10℃/minで昇温した。そして、280℃で1分間保持した。なお、検出器は水素炎イオン化検出器(FID)を使用し、注入口の温度は250℃、検出器の温度は250℃に設定した。キャリアガスとしてヘリウム(He 3.0kg/cm²)を使用した。カラム出口で試料成分と混合する水素ガスを3.0kg/cm²の圧力で、燃焼室内に供給される空気を1.1kg/cm²の圧力で流した。また、スプリット比は1:30として測定を行った。

2.4.5 菌体外粗酵素中の酵素活性の測定

2.3.2と同様にして行った。

3. 結果と考察

3.1 LiP活性と2, 4, 8-TCDF分解率との関係

本研究で使用した2種のダイオキシン分解菌のLiP活性の経時変化を図1に示した。*P. chrysosporium*では5日目に最高の活性を示したが、その後減少し、21日目以降は殆ど変化が認め

られずほぼ一定であった。一方、V2では培養15日目に最高の活性を示したが、それ以降LiP活性の減少が見られた。しかしながら、21日目以降LiP活性の変化は認められずほぼ一定であった。*P. chrysosporium*では培養5日目にLiP活性が最大となった。この結果は、Keyserら¹⁵⁾の報告した結果と一致した。

図1には前報⁷⁾での2,4,8-TCDFの分解率の経時変化を合わせて示した。この場合、基質は培養6日目(前培養5日間)に加えている。

P. chrysosporium, V2いずれの場合もLiP活性が高い間は2,4,8-TCDFの分解はあまり進まず、LiP活性がほぼ一定となる培養21日目(本培養15日目)以降において2,4,8-TCDFの分解が進むことが分かった。本研究では前培養により、LiP活性が高くなった培養液中に基質を添加している。基質添加によりその分解にLiPが関与したため、その活性が減少したものと考えられた。

前報⁶⁾での2,7-DCDDの分解の場合は、培養21日目(本培養15日目)までに大部分が分解され、培養21日目以降は殆ど分解が進行しなかった。しかし、2,4,8-TCDFの分解の場合は、2,7-DCDDの場合のそれとは異なっていた。この違いは2,4,8-TCDFと2,7-DCDDの化学構造が異なるためと、塩素置換数の差によるためと考えられた。2,4,8-TCDFと2,7-DCDDのいずれの場合も、脱塩素反応とエーテル結合の開裂から分解反応が始まることは既に前報⁷⁾で示しているため、化学構造の差がこの分解反応時に大きく関与したものと考えられた。また、この結果は、2,4,8-TCDFの分解にはValliら¹⁶⁾が2,7-DCDDの分解に関与する酵素として指摘したLiP, MnP以外にも分解に関与する酵素が存在していることを示唆している。しかし、本研究では前培養によってLiP活性が高くなった時に基質である2,4,8-TCDFを添加したため、基質の分解が促進されていることも考えられた。それゆえ、LiP活性の減少が2,4,8-TCDFの脱塩素反応とエーテル開裂反応に関与しているものと考えられた。

3.2 MnP活性と2,4,8-TCDF分解率との関係

本研究で使用した2種のダイオキシン分解菌のMnPの活性の経時変化を前報⁷⁾での2,4,8-TCDFの分解率の経時変化とともに図2に示した。*P. chrysosporium*では培養5日目と30日目に高い活性を示した。V2は培養5日目に最高値を示したが、15日目以降は活性が認められなかった。前項3.1でのLiP活性の場合は両菌とも培養21日目以降はほぼ同等のLiP活性を示したが、MnP活性の場合は一定の傾向は認められなかった。この差は*P. chrysosporium*とV2の有する酵素特性の違いを示していると考えられた。

MnPはフリーのフェノール性水酸基を持つ基質を分解できるが、フェノール性水酸基がエーテル化

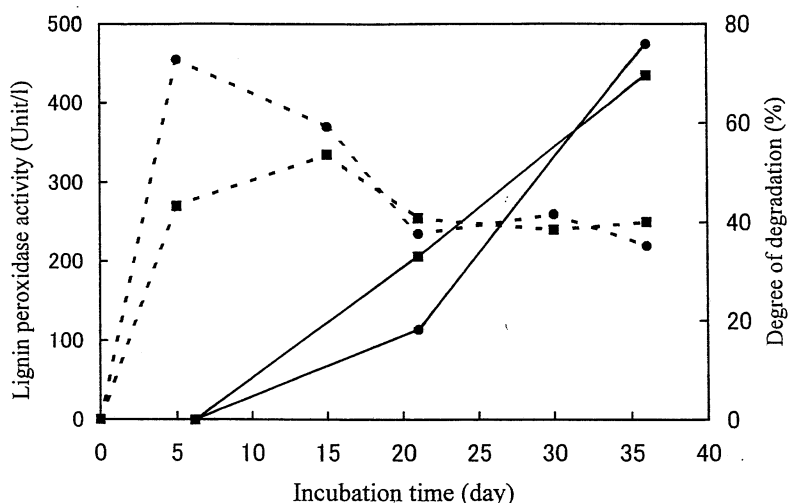


Fig.1 Relationship between degree of degradation of 2,4,8-trichlorodibenzofuran (2,4,8-TCDF) and lignin peroxidase activity in an extracellular crude enzymes solution from fungi. Notes; ● : *Phanerochaete Chrysosporium*; ■ : Fungus V2 Dotted lines show enzyme activity and the solid lines show degree of degradation.

された基質は分解できないと言われている。それゆえ、Valliら¹⁶⁾が*P. chrysosporium*を用いて2,7-DCDDを分解した時に報告したのと同様に、MnPは2,4,8-TCDFがLiPにより分解され、フェノール性水酸基が新生された分解物の分解に参与しているものと考えられた。これらの反応には電子の酸化-還元による電子の授受により生ずるラジカルによって一連の分解反応が起こっていることが分かっている。これらのことから、培養初期にLiPにより一部の2,4,8-TCDFが分解され、フェノール性水酸基を持った分解物が生成され、これをMnPが分解していることを示唆している。

3.3 Lac活性と2,4,8-TCDF分解率との関係

本研究で使用した2種のダイオキシン分解菌のLac活性の経時変化を前報⁷⁾での2,4,8-TCDFの分解率の経時変化とともに図3に示した。*P. chrysosporium*ではLac活性は低く、培養期間を通じてほぼ一定であった。一方、V2ではLac活性は培養15日目以降急激に増加し、30日目に最高の活性を示したが、36日目に急激な活性の低下が見られた。しかし、2種の菌のLac活性は、LiP活性およびMnP活性に比べ約1/1000と低いものであった。これらの結果から、*P. chrysosporium*からのLacは2,4,8-TCDFの分解には殆ど参与していないものと考えられるが、V2ではLac活性の増加と2,4,8-TCDFの分解率の増加が平行に起こっていることから、

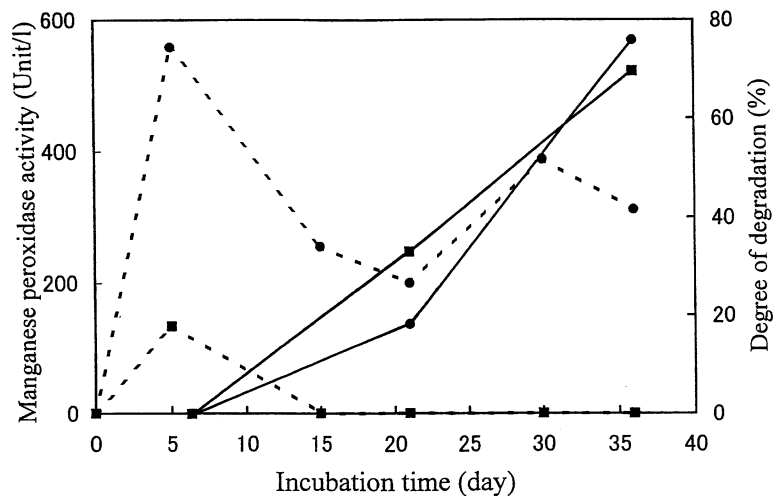


Fig.2 Relationship between degree of degradation of 2,4,8-trichlorodibenzofuran (2,4,8-TCDF) and manganese peroxidase activity in an extracellular crude enzymes solution from fungi. Notes; ● : *Phanerochaete Chrysosporium*; ■ : Fungus V2 Dotted lines show enzyme activity and the solid lines show degree of degradation.

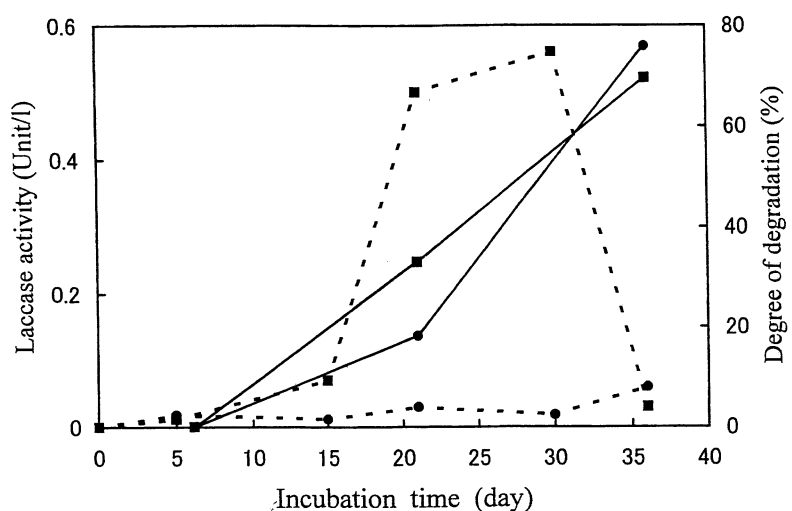


Fig.3 Relationship between degree of degradation of 2,4,8-trichlorodibenzofuran (2,4,8-TCDF) and laccases activity in an extracellular crude enzymes solution from fungi. Notes; ● : *Phanerochaete Chrysosporium*; ■ : Fungus V2 Dotted lines show enzyme activity and the solid lines show degree of degradation.

その分解に関与していることも示唆された。LacもMnPと同様、フリーのフェノール性水酸基を持った基質を分解できるが、フェノール性水酸基がエーテル化された基質は分解できないと言われている。それゆえ、V2の場合でもLacはMnPと同様、2,4,8-TCDFのエーテル結合が開裂するような分解には関与していないが、2,4,8-TCDFがLipにより分解され、新生されたフェノール性水酸基を有する分解中間体をLacが分解しているものと考えられた。

3.4 ジオキシゲナーゼ活性と2,4,8-TCDF分解率との関係

図4にジオキシゲナーゼ活性の経時変化と2,4,8-TCDFの分解率の経時変化を示した。

P. chrysosporium およびV2
いずれも培養21日目(本培養15日目)以降にジオキシゲナーゼ活性が急激に増加することが認められた。最も活性の高かったのは、V2の64Unit/Lであった。ジオキシゲナーゼ活性は、各菌株とも培養30日目(本培養24日目)で最高活性を示し、培養21日目(本培養15日目)以降2,4,8-TCDFの分解率の向上が見られた結果と一致した。このことは、2,4,8-TCDF分解にジオキシゲナーゼが関与していることも示唆した。

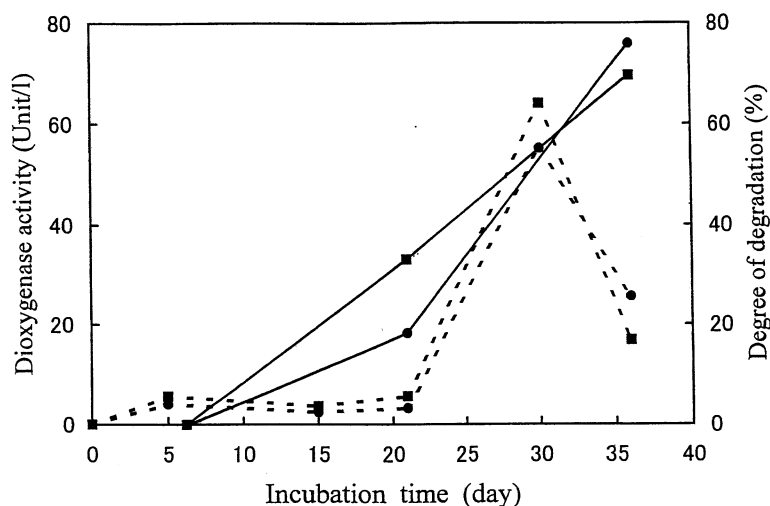


Fig.4 Relationship between degree of degradation of 2,4,8-trichlorodibenzofuran (2,4,8-TCDF) and dioxigenase activity in an extracellular crude enzymes solution from fungi.

Notes; ● : *Phanerochaete Chrysosporium*; ■ : Fungus V2
Dotted lines show enzyme activity and the solid lines show degree of degradation.

しかし、ジオキシゲナーゼ活性の低い培養21日目(本培養15日目)以前でも2,4,8-TCDFは分解されていることから、2,4,8-TCDFの分解後期にジオキシゲナーゼが関与しているものと推定された。Wilkesら^{17, 18)}はSphingomonas属菌によるダイオキシン類の分解にはジオキシゲナーゼが関与していることを報告している。著者らも前報⁷⁾で2,4,8-TCDFを5種の菌を用いて分解した結果を報告すると共に、菌による2,4,8-TCDFの分解経路を推定した。その分解経路には、(1)Lipによる分解経路および(2)ジオキシゲナーゼによる分解経路があり、各々の経路で生成すると考えられる中間体が反応生成物中に存在することを確認したことから、この分解経路により分解が起こっているものと考えられた。

ここで得られた結果および前報⁷⁾で得られた結果から、*P. chrysosporium*の場合は、ジオキシゲナーゼ、Lip、MnP活性が認められたことから、ジオキシゲナーゼなどその作用時にH₂O₂を必要としない酵素だけでなくLipやMnPなどその作用時にH₂O₂を必要とする酵素も分解に関係しているものと考えられた。また、V2による2,4,8-TCDFの分解にもLipなどその作用時にH₂O₂を必要とする酵素とジオキシゲナーゼおよびLacなどその作用時にH₂O₂を必要としない酵素の両方が関与しているものと考えられた。

上記のことを確認するためには、Lip、MnP、ジオキシゲナーゼを単離し、各々の酵素による分解

活性と2,4,8-TCDFの分解率の関係を直接明らかにすることが必要と考えられる。

3.5 *P. chrysosporium*の菌体外粗酵素による2,4,8-TCDF分解

図5に*P. chrysosporium*の菌体外粗酵素による2,4,8-TCDFの分解の経時変化の結果を示した。また、その菌体外粗酵素中の酵素

活性は、LiPは574Unit/l、MnPは370Unit/l、Lacは2.4Unit/l、ジオキシゲナーゼは53Unit/lであった。それぞれは異なった条件（各酵素活性測定時のpHの違い）での活性測定値であるが、比較のため、それぞれの条件下で1分間に1 μ molの基質変化を触媒する

酵素の活性として示した。ここで使用した菌体外粗酵素中にはLiP、MnP、Lac、ジオキシゲナーゼが認めら

れたが、その作用時に H_2O_2 を必要とするLiPとMnPが高い活性を有する酵素であった。2,4,8-TCDFは H_2O_2 を添加した場合には15分後に7.3%が分解され、24時間後には15.8%が分解された。一方、 H_2O_2 を添加しなかった場合は、15分後に2.4%、24時間後には10.5%が分解された。なお、菌体外粗酵素を加えず H_2O_2 のみを添加した場合には、基質（2,4,8-TCDF）は全く分解されなかった。図5に示したように、菌体外粗酵素に H_2O_2 を添加した場合も、 H_2O_2 を添加しなかった場合もいずれも2,4,8-TCDFが分解された。LiPやMnPはその作用時に H_2O_2 を必要とするので、 H_2O_2 無添加の場合はジオキシゲナーゼやLacなどその作用時に H_2O_2 を必要としない酵素により分解されたものと考えられた。

図1～5の結果から、2,4,8-TCDFの分解には H_2O_2 必要とする酵素(LiP等)と H_2O_2 を必要としない酵素(ジオキシゲナーゼ、Lac等)が関与していることを強く示唆している。なお、2,4,8-TCDFの分解におけるLiP、MnP、Lac、ジオキシゲナーゼなどの酵素の詳細な役割については、今後解明していかなければならない課題と考えられる。

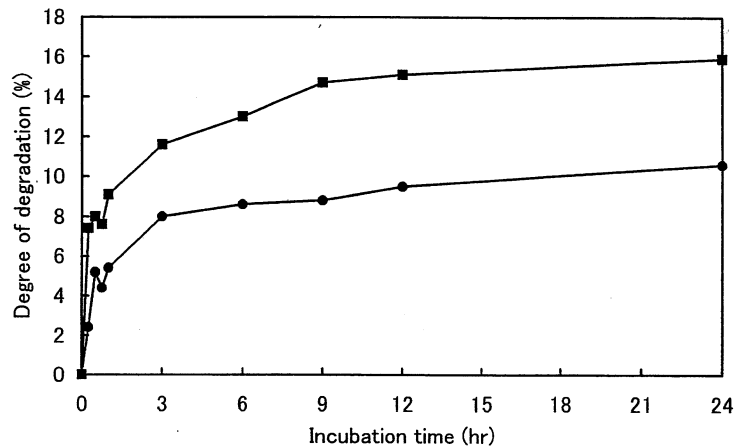


Fig.5 Change in degree of degradation of 2,4,8-trichlorodibenzofuran (2,4,8-TCDF) with extracellular crude enzymes solution from *Phanerochaete chrysosporium*.

Notes; ■ : Addition of H_2O_2 ; ● : No addition of H_2O_2

引用文献

- 1) 尾鍋忠彦：紙・パルプ産業におけるダイオキシン問題の現状と将来の展望，紙パ技協誌，45(4)，462-474(1991)。
- 2) P.C.Kearney, A.R.Isensee, C.S.Helling, E.A.Woolson, J.R.Plimmer: Environmental Significance of Chlorodioxins, Advan.Chem.Ser., 120, 105-111(1973)
- 3) D.J.Hanson: Dioxin Toxicity: New Studies Prompt Debate, Regulatory Action, Chem.Eng.News, 69(32), 7-14 (1991)

- 4) 長山淳哉：しのびよるダイオキシン汚染，講談社，23-27(1994)
- 5) 橘 燦郎，大川浩樹，伊藤和貴，沖 妙，平林達也：木材腐朽菌によるバイオレメディエーション(I)，ダイオキシン分解能を有する菌のスクリーニングおよび選抜した菌と数種の木材腐朽菌による2,7-ジクロロジベンゾ-p-ダイオキシンの分解，紙パ技協誌，50(12),1806-1815(1996)。
- 6) 伊藤和貴，大川浩樹，橘 燦郎，平林達也：木材腐朽菌によるバイオレメディエーション(II)，ダイオキシン分解菌の酵素活性と2,7-Dichlorodibenzo-p-Dioxinの分解との関連およびダイオキシン分解菌のスクリーニング法の改良，紙パ技協誌，51(11),1759-1768 (1997)。
- 7) 大川浩樹，伊藤和貴，橘 燦郎：木材腐朽菌によるバイオレメディエーション(III)，ダイオキシン分解菌による2,4,8-トリクロロジベンゾフラン及びジベンゾフランの分解，紙パ技協誌，53(8)，1054-1062(1999)。
- 8) T.K.Kirk, E.Schultz, W.J.Connors, L.F.Lorenz and J.G.Zeikus:Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*, Arch.Microbiol, 117, 277-285 (1978)。
- 9) 鮫島正浩：“木材科学実験書” II。化学編，日本木材学会化学編集委員会，内外産業調査会，1985, P.338-339。
- 10) M.Tien and T.K.Kirk :Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 2280-2284 (1984)。
- 11) F. Perie and M. H. Gold:Manganese Regulation of Manganese Peroxidase Expression and Lignin Degradation by the White Rot Fungus *Dichomitus squalens*, Appl. Environ. Microbiol., 57, 2240-2245 (1991)。
- 12) Leonowicz, A. and Grzywnowicz, K.:Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate, Enzyme Microb. Technol.3,55-58(1981)。
- 13) 諸星紀幸，中村 剛，原口隆英：カワラタケ菌体外酵素によるリグニン分解 (第1報)，東京農工大農学部演習林報告，21号，101-105 (1984)。
- 14) R. B. Cain:Utilization of Anthranilic and Nitrobenzoic Acids by *Nocardia opaca* and a Flavobacterium, J. Gen. Microbiol., 42, 219-235 (1966)。
- 15) P. Keyser, T. K. Kirk and J. G. Zeikus: Ligninolytic Enzyme System of *Phanerochaete chrysosporium* :Synthesized in the Absence of Lignin in Response to Nitrogen Starvation, J. Bacteriology, 135(3), 790-797 (1978)。
- 16) K.Valli, H.Wariishi and M. H. Gold:Degradation of 2,7-Dichlorodibenzo-p-Dioxin by the Lignin Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, J. Bacteriology, 174(7),2131-2137 (1992)。
- 17) H.Wilkes, R.M.Wittich, K.N.Timmis, P.Fortnagel and W.Francke:Degradation of Chlorinated Dibenzofurans and Dibenzo-p-Dioxins by *Sphingomonas* sp. Strain RW1, Appl.Environ. Microbiol., 62(2), 367-371 (1996)。
- 18) R.M.Wittich, H.Wilkes, V.Sinnwell, W.Francke and P.Fortnagel:Metabolism of Dibenzo-p-Dioxin by *Sphingomonas* sp. Strain RW1, Appl. Environ. Microbiol.,58(3),1005-1010 (1992)。