

VII-20

白色腐朽菌の固定化とアゾ染料の脱色

京都大学工学部 正 員 尾崎博明

磯辺良介

学生員 呉 楓

正 員 寺島 泰

1.はじめに

白色腐朽菌*P.chrysosporium*は各種の難分解性物質の分解に有効であることが知られている。本研究では、白色腐朽菌を実際に廃水処理に用いるための基礎として、適用可能な微生物固定化法の選定について検討するとともに、また、選定した固定化担体を用いた回分実験により、アゾ染料の脱色と酵素活性に対するpH値の影響とについて調べた。

2.白色腐朽菌の固定化担体の選択

2-1 実験方法：表-1に示す炭素制限培地60mlを含む1000mlの三角フラスコ中に、1cm×2cm×0.2cmのナイロンを14片（1g）あるいは1cm×2cm×0.3cmのポリウレタンフォームを14片（0.6g）入れた。滅菌した後に*P.chrysosporium*の胞子懸濁液を接種し、39℃で培養した。一方、*P.chrysosporium*の胞子を包括固定したPEGペレット¹⁾（3mmφ×10mmの円柱状体）を滅菌済の炭素制限培地60mlを含む1000mlの三角フラスコに入れ、39℃で培養した。いずれのフラスコについても培養2日後に滅菌した veratryl alcohol を1mlずつ添加した。また、一定時間ごとに試料液を採取し、LiP活性とMnP活性を測定した²⁾。

2-2 実験結果と考察：白色腐朽菌*P.chrysosporium*をナイロンとポリウレタンフォームに付着固定した場合及びPEGに包括固定した場合のリグニン分解酵素活性の経日変化を図-1に示す。MnP活性の差は顕著ではないが、ポリウレタンフォームに固定した場合、LiP活性は最も高く、その最大値は約ナイロンの4倍、PEGの6倍であった。ポリウレタンフォームにはより多くの菌が付着し、酵素活性の発現結果をあわせると同担体がより優れた固定化材であると評価できた。これは、ポリウレタンが多孔性でより多く空隙を有していることと関係していると考えられる。なお、PEGの場合は、菌体がPEGペレットから沁み出して遊離する現象が見られ、菌体の成長とともに固定性能が悪くなることがわかった。

表-1 使用した炭素制限培地の組成

Glucose	0.2g
酒石酸アンモニウム	110mg
0.1M Na-aconitate buffer (pH=4.3)	10ml
Basal Medium II	10ml
KH ₂ PO ₄	20mg
MgSO ₄ ・7H ₂ O	5mg
CaCl ₂	1mg
thiamine・HCl	0.05mg
Mineral Solution	0.7ml
2.5% Tween 80	4ml

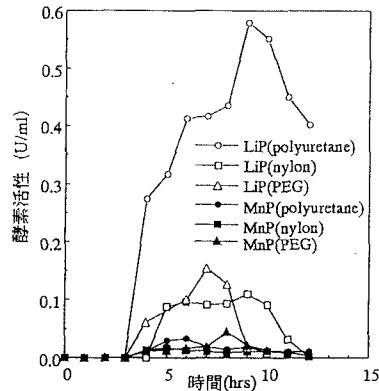


図-1 ポリウレタンフォーム、ナイロン、PEGに固定した場合のLiPとMnPの活性の経日変化（1分間に1μmolの基質と反応することができる酵素量を1Uとする）

3.ポリウレタンフォームに固定した白色腐朽菌によるアゾ染料の脱色及び酵素活性に及ぼすpHの影響

3-1 実験方法：ポリウレタンフォームを固定化材として用い、図-2に示すような固定床方式の回分実験装置を数個作成した。装置の容量は800mlで、無菌操作が可能である。上記の実験装置にまず栄養非制限培地を入れ、接種後39℃下で一週間培養してから、それぞれの装置の培地を500mlのpH5の炭素制限培地、pH6の炭素制限培地、pH7の炭素制限培地に入れ替えた。その後39℃下で空気曝気しながら培養した。培地の組成は緩衝液以外は表-1と同じである。pH5の緩衝液はNa-酒石酸緩衝液であり、pH6とpH7の緩衝液はリン酸緩衝液である。培地を入れ替えた2日後に0.1Mの veratryl alcohol を10mlずつ加えた。以後毎日pH値、リグニン分解酵素活性、グルコース濃度とアンモニア性窒素濃度を測定した。

培養の9日目にアゾ染料の一種であるEvans blue（投入直後の濃度：10mg/l）を反応装置に加え、その濃度の経時変化を測定した。Evans blueの化学構造を図-3に示す。

3-2 実験結果と考察：pH5、pH6、pH7の各装置におけるpH値の変化と酵素活性の経日変化を図-3に示す。pH5とpH6の場合にLiPとMnPの活性が出現し、LiP活性よりMnPの活性が低かった。pH7の場合は酵素活性は検出できなかった。pH値はいずれもまず低下しその後は上昇した。上昇する原因は培地中のアンモニア性窒素の蓄積と考えられ、溶液中のpH値の上昇はリグニン分解酵素の活性の下降の原因の一つと考えられている。

pH6、pH6とpH7の各装置におけるEvans blueの濃度変化を図-4に示す。LiP活性が最も高かったpH6の装置における脱色率が最も高い結果が得られた。pH7の場合LiP活性は認められなかったが、初期の3時間内に染料の初期濃度の約50%が減少した。これは主に菌体とポリウレタンフォームへの吸着によるものと考えられる。以上のことから、白色腐朽菌の作用によりアゾ染料の脱色が起こり、LiP活性が高いほど脱色率がよいことが明らかとなった。

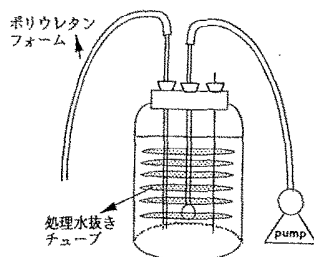


図-2 ポリウレタンフォームを固定化した反応装置

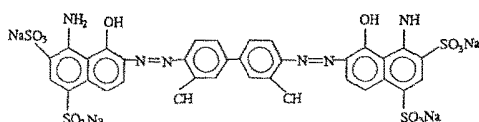


図-3 アゾ染料Evans blueの構造式

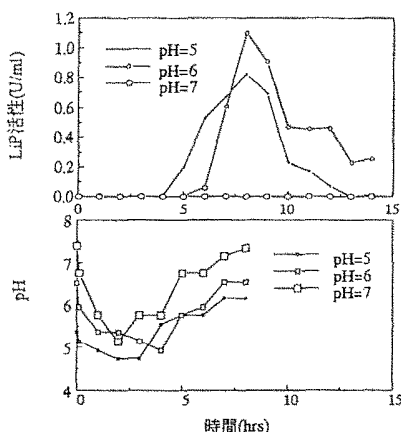


図-4 pH5、pH6とpH7におけるLiP活性とpH値の経日変化

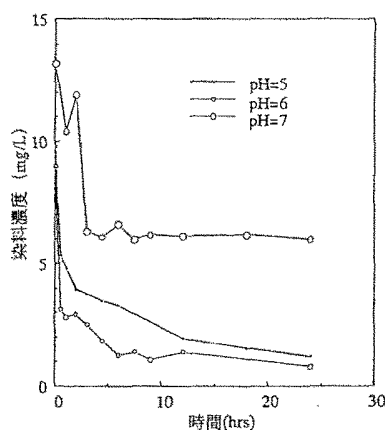


図-5 pH5、pH6とpH7におけるEvans blueの濃度変化

4.おわりに

白色腐朽菌*P.chrysosporium*を用いて行った実験により以下の結論を得た。

1. 白色腐朽菌*P.chrysosporium*を固定化する担体としては、ポリウレタンフォームが優れている。
2. ポリウレタンフォームを附着担体とする反応装置においては、炭素制限下で酵素活性が発現するが、培地のpH値が高くなると酵素活性が抑制される。
3. ポリウレタンフォームを附着担体とする反応装置を用いて、アゾ染料を脱色することができる。

参考文献

- 1) 多田はか：固定化硝化菌を用いた浮遊循環型窒素除去プロセスの検討、第5回下水道研究発表会講演集、413、1988
- 2) 呉楓、尾崎博明等：リグニン分解酵素の活性に及ぼす窒素濃度の影響、土木学会第50回年次学術講演会講演概要集、1140、1995