

白色腐朽菌によるアゾ染料の分解と分解酵素の産生について

大阪産業大学院工学研究科 学生会員 ○有坂 大樹
大阪産業大学工学部 正会員 尾崎 博明、林 新太郎
大阪産業大学新産業研究開発センター 正会員 高浪 龍平

1 はじめに

現在、ダイオキシンをはじめとした難分解性物質による環境汚染が深刻な問題となっている。これらの難分解性物質は処理が困難なため現在においても有効かつ効率的な処理方法というものが確立されておらず様々な研究が行われている。処理方法としては小規模で高濃度に汚染されたサイトの浄化に適する物理化学処理法、大規模で低濃度に汚染されたサイトの浄化に適する生物処理法がある。

本研究では生物処理法であるバイオレメディエーション技術を用いた白色腐朽菌によるアゾ染料の分解について検討を行う。ダイオキシン類をはじめとする白色腐朽菌による難分解性物質の分解には、白色腐朽菌が産生するリグニン分解酵素が寄与しているが、産生機構についてはよくわかっていない。本実験によりリグニン分解酵素の生産に大きく関わっているとされる炭素源の量と酵素の産生との関係について検討を行った。

2 実験方法

2.1 実験材料

2.1.1 白色腐朽菌

本実験では、製品評価技術基盤機構より分譲された PC (*Phanerochaete chrysosporium*) [NBRC-31249]、ヒイロタケ (*Pycnoporus coccineus*) [NBRC-9768]、カワラタケ (*Coriolus versicolor*) [NBRC-9791] の3種類を純粋培養し用いた。培養は表1に示す成分の C10 培養液を用いた。

表1 培養液の成分 (1L)

培養液	C0	C10	C20	C50	C100
Glucose	0mg	100mg	200mg	500mg	1000mg
Ammonium Tartrate	500mg				
Thiamone・HCL	1mg				
Basal Medium	100ml				
Basal Medium					
KH ₂ PO ₄ ,MgSO ₄ ,CaCl ₂ ,MnSO ₄ ,NaCl,FeSO ₄ ,NaMoO ₄ CoCl ₂ ,ZnSO ₄ ,CuSO ₄ ,AlK(SO ₄) ₂ ,H ₃ BO ₄ ,N(CH ₂ COONa)					

2.1.2 アゾ染料

合成染料であるアゾ染料は、繊維をはじめ食品や紙の着色など工業的に広範囲に渡って使用されている。しかし、アゾ染料は種類によって様々な性質を持つことが明らかになり、毒性の有するものがあることが報告されている。EU では一部のアゾ染料に関して発がん性を理由に 2004 年 6 月より EU 内での流通と使用を禁止している。本実験では Acid Orange6 [C1-14270] と Evans Blue [C1-23860] の2種類のアゾ染料を用いた。

2.2 実験方法

2.2.1 アゾ染料の分解実験

三角フラスコを用いた室内回分実験を行った。滅菌処理した表1に示す C10 培養液に3種の白色腐朽菌を投入し10日間培養した。その後、それぞれに 20mg/1 に調整したアゾ染料2種を入れ、20日間培養を継続した。また、実験環境は、室温 25℃、2000lux にて 24 時間照射とし、静置培養を行った。分析は各染料濃度を分光光度計にて測定した。

2.2.2 リグニン分解酵素の測定

カワラタケを表1に示す炭素源の量が異なる培養液 (C0、C10、C20、C50、C100) の入った三角フラスコに投入し、室温 25℃で6日間静置培養を行った後、数日おきに培養液を採取し、遠心分離後の上澄み液についてラッカーゼ活性とグルコース濃度を測定した。

キーワード 白色腐朽菌、リグニン分解酵素、ラッカーゼ活性、グルコース濃度、アゾ染料

連絡先 〒574-8530 大阪府大東市中垣内 3-1-1 TEL 072-875-3001 E-mail s05mk02@sub.osaka-sandai.ac.jp

3 実験結果

アゾ染料の分解実験結果として Acid Orange6 濃度の経日変化と Evans Blue 濃度の経日変化を図 1、図 2 に示す。全ての白色腐朽菌において染料濃度が低下している。しかし、Evans Blue に関しては染料濃度の低下が確認できたが、目視において PC とヒイロタケに培養液中に色が残っており、アゾ染料の菌体への吸着を確認した。

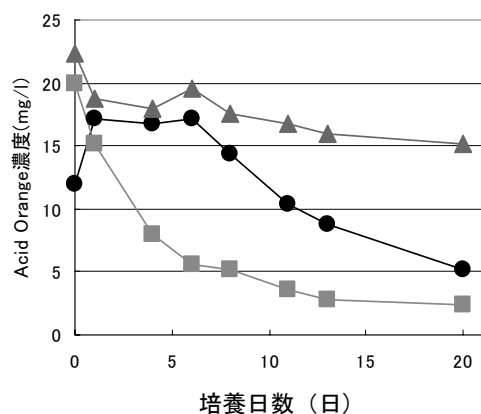


図 1 Acid Orange6 濃度の経日変化

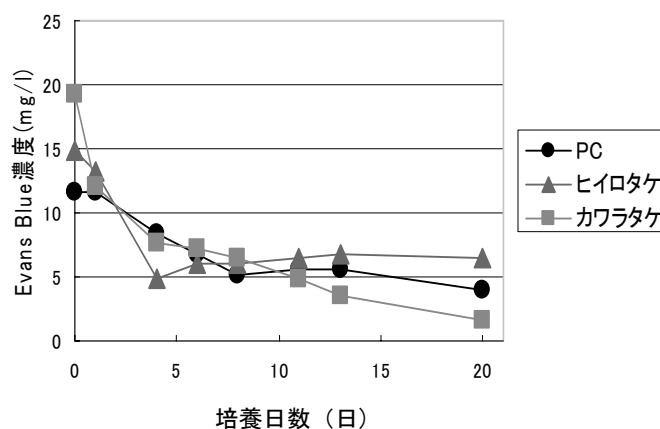


図 2 Evans Blue 濃度の経日変化

リグニン分解酵素の測定結果としてラッカーゼ活性の測定結果を図 3、グルコース濃度の測定結果を図 4 に示す。なお、ラッカーゼ活性は上澄み液 1 ml が 1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の基質を酸化させる酵素量を 1 unit とした。ラッカーゼ活性測定より、C0 以外の全ての培養液でラッカーゼ活性がみられた。培養液の違いによって活性の発生時期、最大の活性値が異なった。図 4 のグルコース濃度測定では、全ての培養液でグルコース濃度が減少しており、C10 では 15 日目に、C20 では 22 日目に、C50 では 32 日目にグルコースが無くなった。

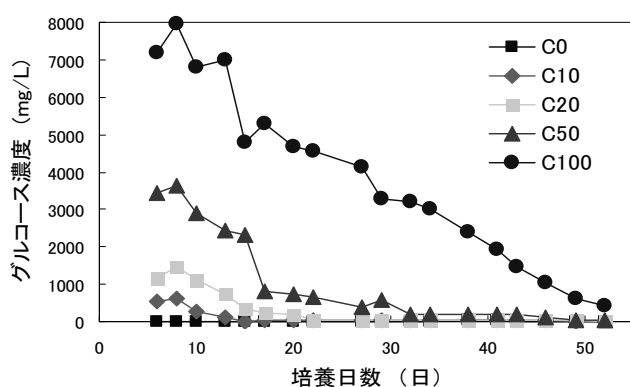


図 3 ラッカーゼ活性測定結果

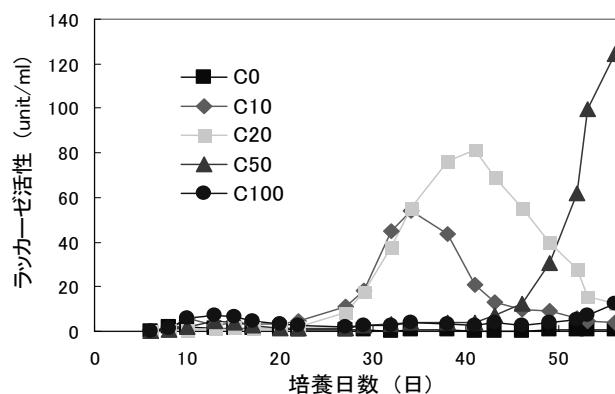


図 4 グルコース濃度測定結果

4 考察

アゾ染料の分解実験より、菌体への吸着はあるものの本実験で用いた 3 種類全ての白色腐朽菌においてアゾ染料の分解が確認された。白色腐朽菌の種類により分解されるアゾ染料の量に違いがあり、本実験ではカワラタケが最も効率よくアゾ染料を分解した。

リグニン分解酵素の測定結果よりカワラタケにおいては、初期グルコース濃度が高いほどラッカーゼ活性が高く、その発生時期は遅延した。また、活性の発生時期はグルコースの欠乏時期とほぼ一致し、初期グルコース濃度を調整することでリグニン分解酵素の発生時期と産生量をコントロールし、アゾ染料を効率的よく分解することができる考える。

なお、本研究の一部は文部科学省私立大学学術研究高度化推進事業「産学連携推進事業」「地域産業創生型有害物質新制御システムの開発に関する研究」（平成 14 年度～平成 18 年度）の一環として行ったものである。