

カワラタケを用いた銅添加によるアゾ染料分解への影響について

大阪産業大学新産業研究開発センター 正会員 ○高浪 龍平

大阪産業大学工学部 正会員 尾崎 博明、林 新太郎

大阪産業大学院工学研究科 陳 霞明

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。その中でもバイオレメディエーション技術は、汚染物質の毒性や濃度が低く、かつ汚染範囲が広い汚染サイトに有効であり、環境負荷も小さいことから更なる発展が期待されている分野である。

本研究ではバイオレメディエーション技術を用いたカワラタケによるアゾ染料の分解について検討を行う。カワラタケが行うアゾ染料の分解には、リグニン分解酵素が寄与しているが、産生機構および分解メカニズムについてはよくわかっていない。今回、リグニン分解酵素による分解を促進する可能性の高い銅を添加した実験を行い、銅添加がアゾ染料分解に与える影響について検討を行った。

2 銅の添加について

カワラタケが主に産生するリグニン分解酵素のラッカーゼは、その構造の中心に銅を有する銅タンパク質であり、カワラタケがラッカーゼを産生するためには銅イオンの供給が重要である。そのため培養液中に銅イオンが豊富に存在すればラッカーゼの産生が効率的に進み、ラッカーゼ活性が上昇することでアゾ染料の分解が促進されると考えられる。しかし、銅イオンは生命にとって必須元素であると同時に過剰供給されると強い毒性を示すため、過剰な銅の添加はカワラタケの成長を阻害する可能性がある。

3 実験方法

表 1 培養液の成分 (1L)

3.1 実験材料

本実験で使用したカワラタケは、製品評価技術基盤機構より分譲されたカワラタケ (*Coriolus versicolor*) [NBRC-9791] を純粋培養し用いた。純粋培養はポテトデキストロース寒天培地 (1L 中 Potato Extract 4g、Glucose 20g、Agar 15g) を用いた。

アゾ染料はこれまでの実験にて比較的カワラタケによる脱色率が高かった Evans Blue [314-13-6] を用いた。

No.	Cu0	Cu1	Cu2	Cu3	Cu4	Cu5
Cu ²⁺ (mg/l)	0.0	0.2	0.7	1.2	1.7	2.7
Glucose	2,000mg					
Ammonium Tartrate	200mg					
Tween80	2.5ml					
Dimethyl succinate	100ml					
Basal Medium	100ml					
Basal Medium						
KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ , CaCl ₂ , MnSO ₄ , NaCl, FeSO ₄ , NaMoO ₄ CoCl ₂ , ZnSO ₄ , , AlK(SO ₄) ₂ , H ₃ BO ₄ , N(CH ₂ COONa)						

3.2 実験方法

三角フラスコを用いた室内回分実験を行った。表 1 に示す培養液に Evans Blue を 25mg/l になるように添加し、滅菌処理を行う。冷却後、硫酸銅五水和物を表 1 に示す各銅イオン濃度となるよう添加し、カワラタケを投入して試料とし 43 日間培養した。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。分析は採取した試料液を 10 分間、12000rpm で遠心分離した後、分光光度計を用いて染料濃度およびラッカーゼ活性を測定した。ラッカーゼ測定には ABTS[2, 2' azobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] を基質として用い、酵素溶液 1ml で 1 分間に 1 μmol の基質が酸化する酵素量を 1unit と定義した。

キーワード カワラタケ、ラッカーゼ、銅イオン、アゾ染料、バイオレメディエーション

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

4 実験結果

各試料中のラッカーゼ活性の測定結果を図1に、各試料中の Evans Blue 濃度の測定結果を図2に示す。

図1より、銅イオンを含まない Cu0 ではラッカーゼ活性が見られず、それ以外の試料ではラッカーゼ活性がみられた。ラッカーゼ活性の最大値については銅イオン濃度が高い試料ほどラッカーゼ活性が高く、特に Cu3 及び Cu4 の活性最大値は Cu1 の最大活性値の4倍以上の高い活性を示した。ただし Cu5 では、最も銅イオンが含まれているにもかかわらずラッカーゼ活性が低かった。活性の挙動については銅イオン濃度による違いは見られなかった。

図2より、全ての試料で染料濃度が低下していた。濃度は最終の時点で Cu3、Cu4、Cu2、Cu1、Cu5 の順で濃度が低く、Cu0 が最も濃度が高かった。

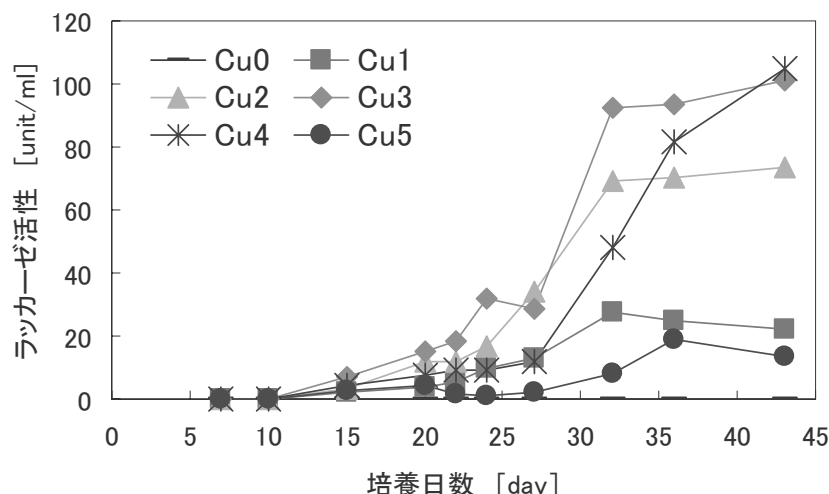


図1 ラッカーゼ活性測定結果

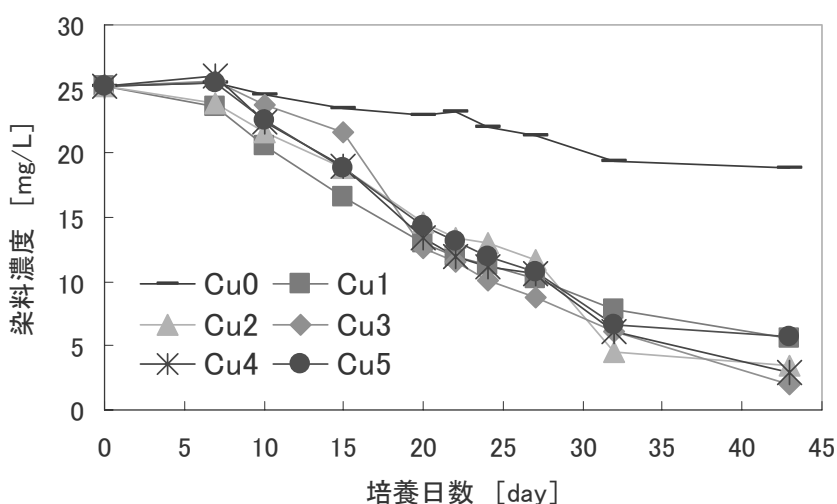


図2 染料濃度測定結果

5 考察

試料中の銅イオン濃度が高いほどラッカーゼ活性が高くなったのは、試料中にラッカーゼの原料である銅イオンが豊富に存在し、ラッカーゼの産生を促進したためと考えられる。また、銅イオンが含まれていない Cu0 では、ラッカーゼ活性がほとんど見られなかったことから、銅イオンがラッカーゼの産生にとって必要不可欠だということがわかった。しかし、銅イオン濃度が最も高い Cu5 のラッカーゼ活性は非常に低くなっている。これは、過剰な銅イオンがラッカーゼの産生に寄与する前にカワラタケの成長を阻害したものと考えられる。

Evans Blue の分解量は、ラッカーゼ活性が高い試料ほど多かった。これは、銅イオンの添加によりラッカーゼが効率的に産生されラッカーゼ活性が上昇したことで、Evans Blue の分解が進んだためだと考えられる。一方、ラッカーゼ活性がほとんど見られなかった Cu0 でも Evans Blue 濃度が低下していた。これは菌体への吸着やカワラタケが産生する他のリグニン分解酵素であるマンガンペルオキシターゼ (MnP) による Evans Blue の分解が起こったためだと考えられる。同様にラッカーゼ活性があまり見られなかった Cu1 および Cu5 でも分解は進んでおり、ラッカーゼ産生量と Evans Blue 分解量との関係が完全な比例関係ではなかった。

以上より、本実験にてラッカーゼ産生に銅イオンは不可欠であることがわかり、過剰ではない銅イオンの添加によってアゾ染料の分解が促進された。

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」(平成14年度～平成18年度) および文部科学省科学研究費補助金「萌芽研究」(平成17年度～平成18年度)の一環として行ったものである。