

B-4 白色腐朽菌が産生する酵素によるアゾ染料の分解とその分解機構

大阪産業大学院工学研究科 ○高浪 龍平、有坂 大樹

大阪産業大学 尾崎 博明、林 新太郎

1. はじめに

近年、環境問題に対して人々の関心が高まっており、中でもダイオキシン類をはじめとした難分解性有機物による環境汚染が注目されている。合成化学染料においてはその一部に難分解性を示すものがあり、染料工場等から発生する着色廃液については同様の問題が指摘されている。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。

本研究は白色腐朽菌によるアゾ染料の分解について実験を行った。また、分解実験と並行してラジカル測定を試み、白色腐朽菌により産生される物質による分解機構について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 実験材料

(1) 白色腐朽菌

白色腐朽菌は担子菌類に属するリグニンを分解する代表的な微生物である。白色腐朽菌の分解機構のほとんどはリグニン分解酵素であるヘムを含むペルオキシターゼに関係している。リグニン分解酵素は細胞外酵素であり、リグニンペルオキシターゼ (LiP)、マンガンペルオキシターゼ (MnP)、ラッカーゼ (Lac) の 3 種がある。

白色腐朽菌は独立行政法人製品評価技術基盤機構より分譲された *Phanerochaete chrysosporium* 株 (NBRC-31249) を純粋培養したものを用いた。

(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。アゾ染料はアゾ基-N=N-を発色団とし、これに他の発色団または助色団を組み合わせることによって極めて多数のアゾ染料が合成することができ、安価でかつ脱色しにくい特性から、工業的に使用される染料の中では比較的高い割合を占めている。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っており、そのほとんどが難分解性であるため、アゾ染料を含む廃液の処理が問題となっている。さらに D. Brown¹⁾ によるアゾ染料の毒性評価の結果、調査を行った 47 種類の大部分は水中の濃度が 100mg/l を超えると魚類や水生生物に対して毒性を持つことが明らかになった。

本研究ではアゾ染料として Evans Blue [314-13-6] (図 1) と Sunset Yellow FCF (図 2) を用いた。アゾ染料は芳香環同士をつないでいるアゾ基が切れると脱色する。一般的な処理方法としては凝集などの物理的処理、オゾンや硫化水素等を加える化学的処理、微生物分解による生物的处理がある。

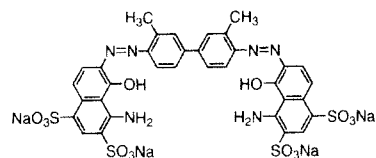


図 1 Evans Blue 構造式

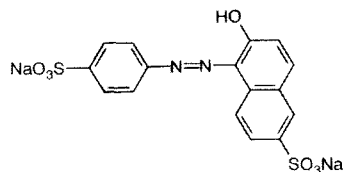


図 2 Sunset Yellow FCF 構造式

2.2 実験および分析方法

500ml 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 2 種の液体培地に *P. chrysosprum* 株を投入し 12 日間、培養した。それぞれに 10mg/l に調整したアゾ染料 2 種を入れ、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。

分析は分光光度計にて各染料濃度を測定した。また、ラジカルの測定には電子スピン共鳴装置 (ESR) を用いた。表 2 に示す 3 種の試料 (試料 A、試料 B、試料 C) に 20% DMPD 溶液、染料、過酸化水素水の順に加え、発生するラジカルをトラップさせ、同溶液を採取しラジカルの測定を行った。分光光度計および電子スピン共鳴装置の仕様および測定条件を表 3 に示す。

表 1 液体培地組成 (11)

培地名	炭素制限培地 (N rich)	窒素制限培地 (C rich)
グルコース	2g	10g
酒石酸アンモニウム	1.1g	0.22g
Mineral solution	100ml	100ml
2.5% Tween 80	40ml	—
Mineral solution		
KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ , CaCl ₂ , MnSO ₄ , NaCl, FeSO ₄ , CoCl ₂ , ZnSO ₄ , N(CH ₂ COONa) ₃ , CuSO ₄ , AlK(SO ₄) ₂ , H ₃ BO ₃ , NaMoO ₄		

表 2 ESR 測定試料

試料 A	純水	各試料に 20% DMPD 溶液、 染料、過酸化水素水
試料 B	培養前の C rich 培地	
試料 C	培養後の C rich 培地	

表 3 使用測定機器の仕様・測定条件

分光光度計	
機種	UV-160A
測定波長範囲	200-1100nm
測光方法	ダブルビーム
本実験測定波長	606nm、480nm
電子スピン共鳴装置	
機種	JES-FA100D
測定周波数帯	X バンド
最大磁場強度	0.65T
使用セル	LC-12
マイクロ波出力	1.0mW
掃引時間	1.0min
使用トラップ剤	DMPD (同仁化学 研究所製)

3. 実験結果および考察

3.1 アゾ染料分解実験

染料濃度の経日変化を図 1 に示す。行った 4 種の実験すべてに染料濃度の低下が見られ、特に窒素制限培地 (以下、C rich) において、Evans Blue を投入したものは 11 日後に、Sunset Yellow FCF を投入したものは 17 日後に濃度が検出下限以下となった。これにより、アゾ染料は *P. chrysosprum* によって分解されたといえる。一般的には C rich 培地よりも炭素制限培地 (以下、N rich) において酵素活性が高く、分解速度が速いといわれているが²⁾、今回の実験においては C rich 培地における染料分解が顕著であった。これには菌の成長などのばらつきが影響したものと考えられる。

3.2 ESR による OH ラジカル測定

トラップ剤 DMPD を用いた ESR による OH ラジカルの測定結果を図 2 に示す。試料 A、試料 B、試料 C のすべてにおいて OH ラジカルのシグナルが見られた。シグナルの大きさは異なり、試料 B が非常に大きく、試料 C のシグナルは微小であった。試料 B では培地に含まれる鉄や銅イオンによるフェントン反応 ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH} + \cdot\text{OH}$)³⁾ によって OH ラジカルが発生し、トラップされたと考えられる。逆に試料 C ではリグニン分解酵素による OH ラジカル発生やフェントン反応による OH ラジカル発生はほとんど見られなかった。これは *P. chrysosprum* からフェントン反応を阻害し、OH ラジカルの発生を抑制する能力がある物質が産生されたと考えられる。

D. P. Berr ら⁴⁾ による反応機構の説によると、*P. chrysosprum* から産生される酵素リグニンペルオ

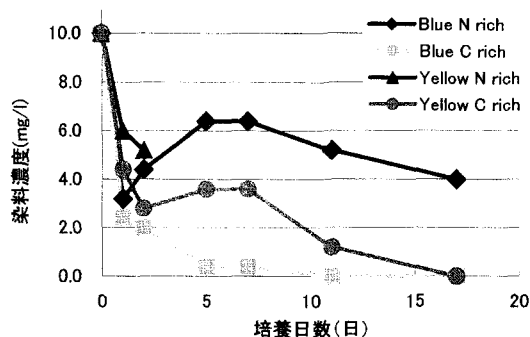


図1 染料濃度の経日変化

(N rich 培地に Sunset Yellow FCF を投入したサンプル
は2日目以降の測定値が異常だったため記載せず)

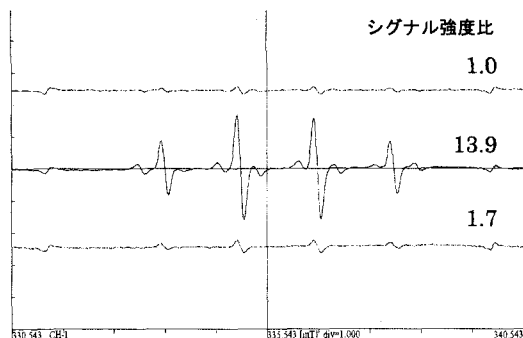


図2 ESR 測定結果

上より試料 A、試料 B、試料 C

キシターゼ (LiP) は過酸化水素水を用いて基質の一電子酸化を促進してフリーラジカルを生成する (図3) としている。今回の実験結果はこの説を裏付ける形となり、*P. chrysosprum*からの産生物質が OH ラジカルを抑制し、基質等を酸化したと考えられる。今回のラジカル測定では基質としてアゾ染料を用いているため、染料の一部または *P. chrysosprum*からの産生物質がフリーラジカルとなって染料を分解したと推測される。

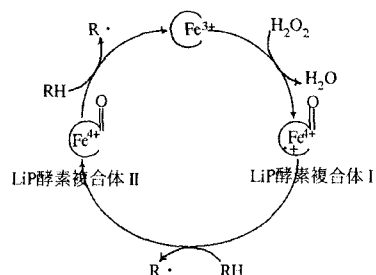


図3 LiPによる直接的酸化反応機構

以上より、アゾ染料は OH ラジカルではなく、フリーラジカルによって間接的に分解されたと考えられる。今回の ESR 測定では基質等の酸化によって生じるフリーラジカルを捉えることができなかったため、*P. chrysosprum*から産生されるリグニン分解酵素による直接酸化 (一次酸化) の反応機構の解明には至らなかった。今後の研究において、直接酸化の反応機構およびフリーラジカルによるアゾ染料の間接酸化 (二次酸化) を明らかにし、白色腐朽菌による難分解性有機物の効率的な分解方法についてさらなる検討を行う。

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。

【参考文献】

- 1) D.Brown : Environmental assessment of dyestuffs. Presented before the Division of Environmental Chemistry ACS, pp.351-352, 1992
- 2) F.Wu, H.Ozaki, Y.Terashima, T.Imada, Y.Ohkouchi : Activities of ligninolytic enzymes of the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosprum* and its recalcitrant substance degradability., Wat. Sci. Technol., Vol. 34, No. 7-8, pp.69-78, 1996
- 3) 河野雅弘 : 電子スピン共鳴法, オーム社, pp17-28, pp109-114, 2003
- 4) D.P.Berr and S.D.Aust : Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutions. Environ., Sci. Technol., Vol. 28, No. 2, pp. 79-87, 1994