

B-15 光合成細菌の細胞外物質による 光脱色処理の反応特性評価

○伊藤 瑞希^{1*}・大瀧 雅寛¹

¹お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科 ライフサイエンス専攻 (〒112-0011 東京都文京区大塚 2-1-1)

* E-mail: g0540404@edu.cc.ocha.ac.jp

1. はじめに

現在、染色工場から排出される染色排水は、凝集沈殿、活性炭による吸着除去、オゾンによる酸化分解などの物理学的処理、化学的処理の方法で処理されているが、処理コストや有害な副産物の生成などの問題がある。そこで、低コストであり、且つ安全な生物学的処理の確立が必要とされている。光依存性脱窒汚泥 (photo dependent denitrifying sludge: PDDS) から分離された光合成細菌は、可視光照射下において高い脱色能力を持っている^{1) 2)}。

光合成細菌による脱色反応は、光合成細菌が体外に分泌する物質 (以下、細胞外物質と呼ぶ) にも反応が引き起こされることがわかっている³⁾。この細胞外物質を利用することができれば、細菌を培養したり、生息条件を整える必要がなく、様々な条件の下で効率よく染色排水の脱色を行うことができる可能性がある。しかし、そのためには、この細胞外物質について反応機構の解明や、反応特性の把握を行う必要がある。

本研究では、細胞外物質による染料の反応速度について、脱色反応の影響因子、細胞外物質の分子量推定について実験を行った。

行い、光合成細菌を単離培養した。培養した光合成細菌溶液を 3,000×g で約 4 分間遠心分離させ上澄みだけを分取し、孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過して、細胞を除去した濾液を細胞外物質溶液とし、各実験に供した。

(2) 染料

今回使用した染料は、酸性染料 3 種、反応性染料 1 種であった。酸性染料および反応性染料は染料の中でも吸尽率が低い染料である。これらは染色の際に布に吸尽されなかった染料が排水中に残る可能性が高いことから対象物質として選択した。各染料の構造式を図-1, 2, 3, 4 に示す^{4) 5)}。

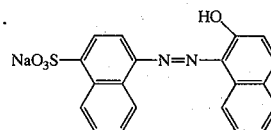


図-1 Acid Red88 構造式

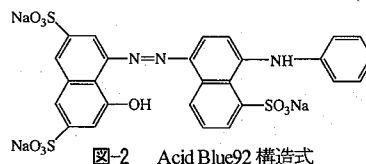


図-2 Acid Blue92 構造式

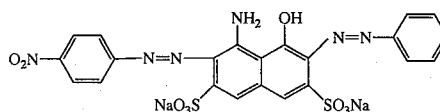


図-3 Acid Black1 構造式

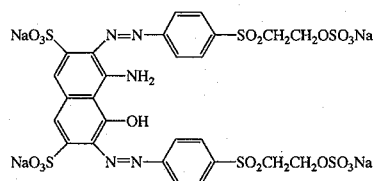


図-4 Reactive Black5 構造式

2. 実験方法

(1) 光合成細菌培養と細胞外物質の分離

PDDS 培養槽から 5~10 mL 程度の光合成細菌および脱窒菌混合溶液を採取し、5,800 rpm で 10 分間遠心分離し、超音波発生器 (300 Hz, 1.5 min 間) でフロックを分散させた。その後 0.8% の生理塩水を用いて希釈し、滅菌した GM 固体培地を入れてあるシャーレに、0.5 ml ずつ植菌した。蛍光灯 (3,000 lux) による光照射下、および 37℃ 下で約 1 週間培養した。形成したコロニーを 5 個ほど鈎菌して液体培地に懸濁させ、再び光照射下及び 37℃ 下にて培養を

(3) 実験条件

a) pH の影響

細胞外物質溶液に高濃度の NaOH, H_2SO_4 を加え, pH を 2.45, 6.75, 8.8 (無調整), 10.23, 12.25 に調整した. pH 調整した各溶液 10 mL に濃度 1,000 mg/L の染料 AB1 を 0.4 mL 加えた. また, 染料 AB92, AR88, RB5 を用いた実験は, pH を 4.5, 7.1, 8.2 (無調整), 10.1 に調整し, pH 調整した各溶液 6 mL に濃度 1,000 mg/L の染料 AB1 を 0.1 mL 加えた.

蛍光灯による可視光照射下, および 37°C で脱色実験を行った. また, 時間経過ごとに各溶液の吸光ピーク値を測定した. 各染料溶液の吸光ピーク波長は, AB92: 560 nm, AR88: 510 nm, AB1: 620 nm, RB5: 600 nm である.

b) 分子量分画

細胞外物質溶液を分画分子量 3,000 のマイクロコン (遠心式濾過ユニット, MILLIPORE 社製) に 0.5 mL 投入し, 2,900 × g で約 30 分間遠心分離させ, 分子量 3,000 以下の物質のみ含む溶液を得た. また濾過前の細胞外物質溶液原液, MilliQ 水を対照試料として用意した.

マイクロコン (遠心式濾過ユニット) の上部溶液に試料を投入し, 遠心分離させることによって, 限外濾過膜を通ったものを細胞外物質 (分画後) と呼ぶ.

分解対象試料として酸性染料の AB92 を用い, 光源として蛍光灯 (日立製 20 W) を用いた. 染料溶液 (1×10^{-3} M) 0.5 ml と分画前の細胞外物質溶液と分画後の溶液をそれぞれ 9.5 ml を混合させ, 溶液の吸光スペクトルの時間変化を調べた. 対照実験として, 染料溶液 0.5 ml と MilliQ 水 9.5 ml を混合させた場合も調べた.

c) 高圧蒸気滅菌の影響

細胞外物質溶液 10 mL を 20 分高圧蒸気滅菌 (120 °C) を行い, 濃度 1,000 mg/L の染料 AB92 を 0.2 mL 加えた. 蛍光灯による可視光照射下, 37°C で実験を行い, 時間経過ごとに各溶液の吸光ピーク値を測定した. 対照実験として, 高圧蒸気滅菌を行っていない細胞外物質溶液を用いた.

3. 結果と考察

(1) 脱色反応の影響因子

図-5, 6, 7, 8 に pH の違いによる各染料の濃度変化を示す. 図に示される様に, 高 pH においては, いずれの染料においても脱色反応効率が低いことがわかった.

AB92, AR88 は pH 調整前 (pH 8.2) においても反応効率がいたため, 高 pH 域における pH の差が表れにくかった. 一方, AB1, RB5 は, 低 pH ~ 高い pH において pH

依存性が大きく表れた.

しかし, 細胞外物質のない場合でも pH を変えることによって, 脱色が起こっている可能性も考えられる. そこで, 対照実験として細胞外物質を含まない GM 培地のみの溶液を, pH 10.1 に調整し同様の実験を行った. しかし, 24 h で脱色率 15% 程度になり, 細胞外物質を含むものに比べて非常に低いことから, pH 10.1 では, 染料自身の脱色反応だけではなく, 細胞外物質の影響を受けて染料脱色反応が起こっていると考えられる.

また光脱色反応の pH 依存性の傾向は酸性染料 AB1 でも反応性染料 RB5 のどちらも見られるので, pH による染料の解離状態の違いが関与しているとは考えにくいと言える.

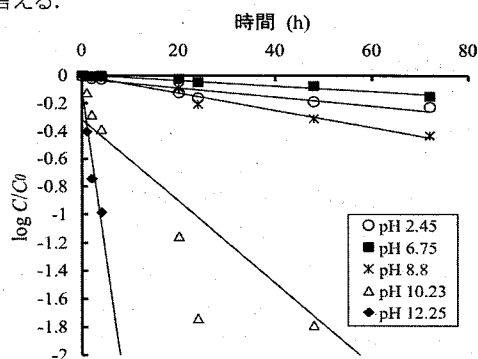


図-5 AB1 の脱色率への pH の影響

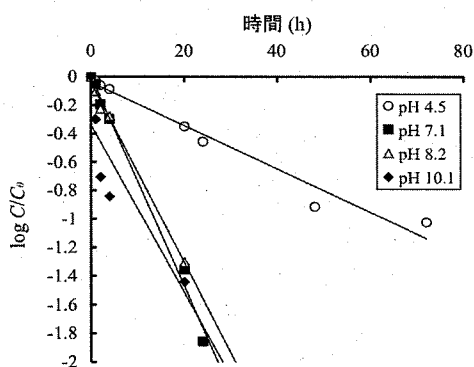


図-6 AB92 の脱色率への pH の影響

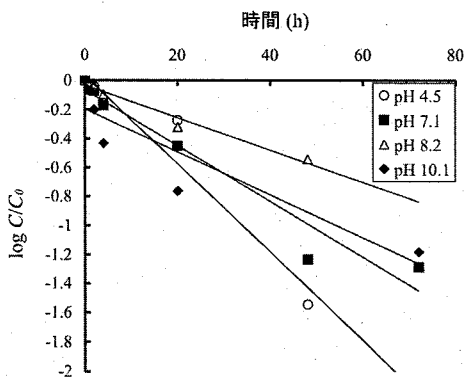


図-7 AR88 の脱色率への pH の影響

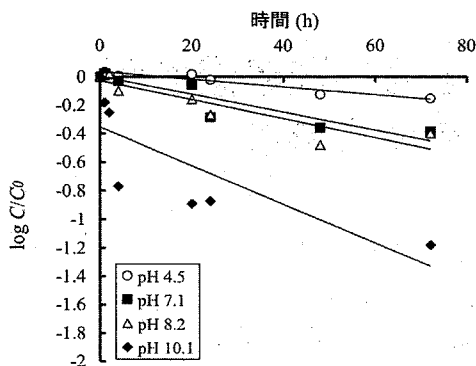


図-8 RB5の脱色率へのpHの影響

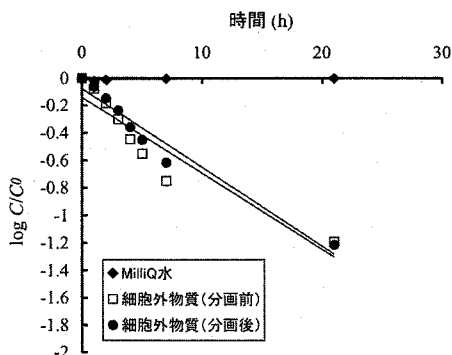


図-9 分子量分画前後の細胞外物質溶液によるAB92の脱色率

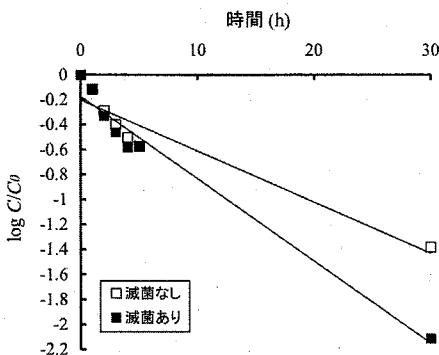


図-10 高圧蒸気滅菌前後の細胞外物質溶液によるAB92の脱色率

(2) 分子量分画

図-9 に分子量分画前後の細胞外物質溶液による AB92 の脱色率を示す。

細胞外物質（分画前）、細胞外物質（分画後）2つを比較すると、脱色反応の傾向に差はみられなかった。このことから、細胞外物質による脱色反応は主に 3,000 以下の分子量物質によるものであると考えられ、一般的なタンパク酵素に比べて非常に分子量が小さい物質であることがわかった。

(3) 高圧蒸気滅菌

図-10 に高圧蒸気滅菌前後の細胞外物質溶液による AB92 の脱色率を示す。

この図から、高圧蒸気滅菌を行っても、細胞外物質による光脱色反応の効率が悪化することはなかった。植物や動物の酵素の至適温度は 35～60℃であり、高熱性細菌の至適温度は 80～100℃である⁶⁾。高圧蒸気滅菌は 120℃であることから、細胞外物質の脱色反応は一般的なタンパク酵素反応によるものではないと考えられる。

4. 結論

光依存性脱窒汚泥から単離された光合成細菌より分離された細胞外物質を用いて、光照射脱色実験を行った結果、次のことがわかった。

- (1) 脱色反応は、pH の影響を受け、高 pH (10 程度) においては、いずれの染料においても反応速度が早くなることがわかった。
- (2) 脱色反応を引き起こす細胞外物質の分子量は 3000 以下であり、かつ高圧蒸気滅菌前後において反応効率が変わらないことから、一般的なタンパク酵素反応によるものではないと推定された。

謝辞：本研究において、洪静蘭博士には、光合成細菌の培養方法、物質の分離方法について指導を頂いた。ここに記して感謝いたします。

参考文献

- 1) 古川憲治, 黒木征一郎, 中岡元信：光依存性脱窒条件下での染料の微生物分解, 用水と廃水, Vol.40, No.9, pp.775-780, 1998.
- 2) 洪静蘭, 大龍雅寛：薄膜固定光触媒を利用した脱窒菌共存光合成細菌による脱色リアクターの高効率化, 土木学会論文集, No.734, pp.111-118, 2003.
- 3) Jinglan Hong, Hiroko Emori, Masahiro Otaki : Photodecolorization of Azo Dyes by Extracellular Metabolites under Fluorescent Light and Influence of Operational Parameters, JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, Vol.100, No.2, pp.192-196, 2005.
- 4) 有機化合物辞典, 講談社, 1985.
- 5) THE SOCIETY OF DYES AND COLOURISTS : COLOUR INDEX Third Edition VOLUME 1,3, AMERICAN ASSOCIATION OF TEXTILE CHEMISTS AND COLORISTS, 1971.
- 6) 北尾高嶺：生物学的排水処理工学, コロナ社, pp.15-36, 2003.