

B-25 白色腐朽菌によるアゾ染料の脱色特性について

高浪 龍平^{1*}・尾崎 博明²・林 新太郎²・陳 霞明³・Rabindra Raj GIRI¹¹大阪産業大学新産業研究開発センター (〒574-8530大阪府大東市中垣内3-1-1)²大阪産業大学工学部 (〒574-8530大阪府大東市中垣内3-1-1)³大阪産業大学院工学研究科 (〒574-8530大阪府大東市中垣内3-1-1)

* E-mail: r-nami@cnt.osaka-sandai.ac.jp

1. はじめに

近年、ダイオキシンをはじめとする難脱色性有害有機物による環境汚染が問題となっている。合成化学染料においてはその一部に難脱色性および毒性を示すものがあり、染色工場等から発生する着色排水については同様の問題が指摘されている。これらの問題解決に向けて様々な浄化技術が開発されているが、その中でもバイオレメディエーション技術は毒性や濃度が低く、かつ汚染範囲が広い、または大量に発生している状態に有効であり、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。しかし、現時点では浄化技術が先行し、浄化メカニズムが不明瞭な為、大きな発展には至っていない。

そこで本研究では白色腐朽菌を用い、白色腐朽菌が産生する酵素による難脱色性有害有機物の脱色を目的にアゾ染料の脱色について実験的検討を行い、その脱色特性から脱色経路の推測を行った。

2. 実験材料

(1) 実験材料

(a) 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。白色腐朽菌が産生す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種が主に産生される。

本研究では独立行政法人製品評価技術基盤機構より譲渡された *Phanerochaete chrysosporium* 株 [NBRC-31249] (以下、PC) および *Coriolus versicolor* 株 [NBRC-9791] (以下、CV) を純粋培養したものを用いた。

(b) 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ち、そのほとんどが難脱色性であることが明らかとなったため、アゾ染料を含む廃液の処理が問題となっている。また 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。

本研究ではアゾ染料として Evans Blue [314-13-6] (以下、E. Blue) を用いた。

(2) 実験方法および分析方法

300ml 三角フラスコを用いた室内回分実験を行った。培養には表-1 に示すグルコースの量が異なる培養液 (C0、C10、C25、C50) を用いてグルコース量の違いによる脱色能力の違いについて検討する。これらの培養液に PC および CV を投入し、室温 25℃ で 10 日間静置培養を行った。培養後、三角フラスコにアゾ染料を培養液中の初期濃度が 20mg/l になるように添加した。添加後、数日おきに分光光度計にて培養液中のアゾ染料濃度および酵素活性を測定した。また、実験終了後には各菌体重量を測定した。分光光度計は日立ハイテック社製

表-1 液体培地組成 (1l)

培養液	C0	C10	C25	C50
Glucose	0mg	1000mg	2500mg	5000mg
Ammonium Tartrate	200mg			
Thiamone · HCL	1mg			
Tween 80	1.5ml			
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 ₃ , N(CH ₃ COONa)				

U-3010を用い、測定波長はそれぞれ、E. Blueは606nm、LiPは320nm、MnPおよびLacは420nmである。また、酵素活性についてはPCに関してはLiPおよびMaP、CVに関してはMaPおよびLacを測定した。それぞれの基質として、LiPはベラトリルアルコール、MnPおよびLacはジメトキシフェノールを用い、酵素溶液1mlで1分間に1 μ molの基質が酸化する酵素量を1unitと定義し測定した。さらに上記と同条件にて酵素のメディエーター¹⁾である1-hydroxybenzotriazole [2592-95-2] (以下、HOBt)を添加した実験も行った。この際、いずれの菌の投入を行わない培養液を作製し、同様に染料を添加したものをブランクとした。

3. 実験結果および考察

(1) PCによるアゾ染料の脱色

PCによるE. Blueの脱色実験結果を図-1に示す。すべての培養液において、脱色が確認され、グルコース量が少ない培養液ほど染料濃度は低下した。これは、グルコースが欠乏する時期に分解酵素を多く産生するため、グルコース量が少ないほど早期に分解酵素を産生し染料を脱色したと考えられる。

図-2はE. Blueを比較的多く脱色したC0のE. Blueの濃度変化とリグニン分解酵素LiP、MnPの酵素活性を示したも

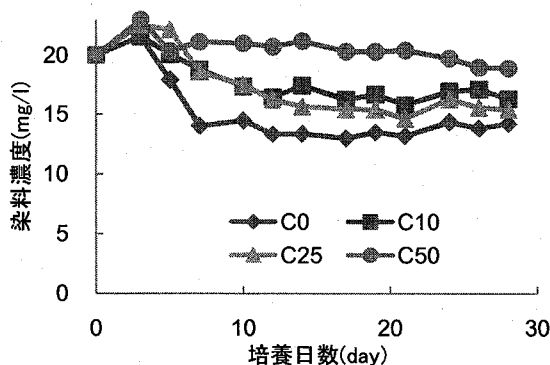


図-1 PCによるE. Blueの濃度変化

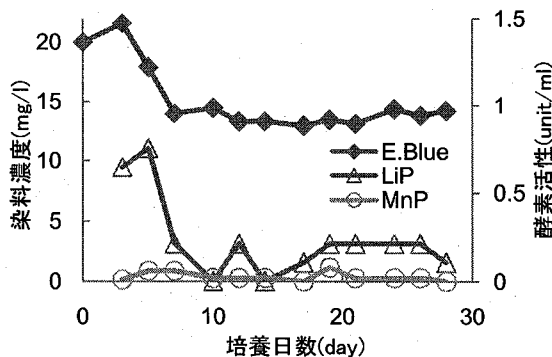


図-2 PC-C0のE. Blue濃度と酵素活性

のである。これより、LiP活性が高い時期に染料濃度の低下が起こっていることから、PCによるアゾ染料の脱色はLiPによるものであると考えられる。

(2) CVによるアゾ染料の脱色

CVによるE. Blueの脱色実験結果を図-3に示す。すべての培養液において、脱色が見られた。グルコース濃度の違いによる脱色の差はあまり見られないものの、C10が最もよく脱色できていた。また、E. Blueの脱色ではC10において変色が確認され、E. Blueの青色から白色が混じた水色へと変色した。

図-4はC10のE. Blueの濃度変化とMnP、Lac酵素活性を示したものである。これより、LacがMnPよりも多量に酵素を産生しており、染料脱色はLacによるものであると考えられる。

(3) HOBtを用いたアゾ染料の脱色

HOBtを用いたPCおよびCVによるE. Blueの脱色実験結果を図-5に示す。CVではE. BlueはHOBtを添加した培養液において、すばやく脱色された。一方でPCではHOBtの有無にかかわらず同様の挙動を示した。これより、HOBtによる脱色はPCが産生するLiPやMnPではなく、CVが大量に産生するLacによって起こったと考えられ、HOBtメディエーターはLacと反応し脱色を促進していると言える。

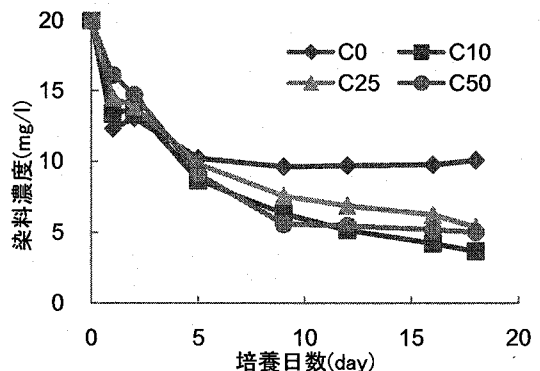


図-3 CVによるE. Blueの濃度変化

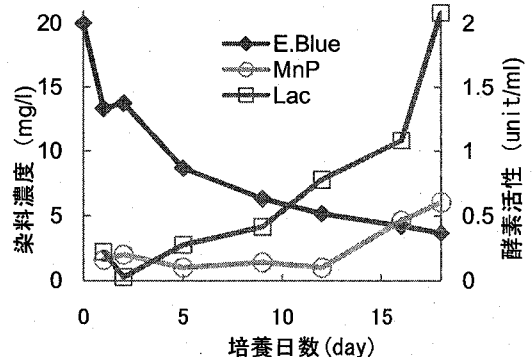


図-4 CV-C10のE. Blue濃度と酵素活性

(4) 白色腐朽菌によるアゾ染料の吸着

白色腐朽菌は液体培養を行うと菌体が薄い膜状になりアゾ染料が菌体に吸着しやすくなる。そのためアゾ染料が一旦、菌体に吸着すると培養液中のアゾ染料濃度が低下し、みかけの脱色がおこるため、実験後の菌体重量より、アゾ染料の吸着を検討した。

表-2に実験終了後の各菌体重量と推定される吸着量を示す。菌体への推定吸着量はこれまでで明らかになった平均吸着量より算出した²⁾。最も多く吸着した場合でも0.3mg以下であり、添加するアゾ染料の1.5%未満であるため、菌体への吸着は考慮しなくてよいものとした。

4. 脱色特性による分解経路の推測

実験での変色の結果より推測された E. Blue の分解経路について図-6 に経路図を示す。E. Blue は発色団側のアゾ基と助色団側の芳香環との結合が先に切断し、白色の副生成物質が生成する。その後、白色の副生成物質のアゾ基が切断されることで完全な脱色になると推測した。

5. まとめ

白色腐朽菌によるアゾ染料の実験結果より、アゾ染料はリグニン分解酵素により脱色され、E. Blueの実験時に起こった変色より分解経路の推測を行った。これよりE. Blueは助色団が多く比較的脱色しやすい物質で、PCお

よびCVともに脱色が可能なことがわかった。また、今回の実験においては白色腐朽菌が産生するリグニン分解酵素による脱色はPCではLiPが、CVではLacによるものであった。さらに、HOBtメディエーターはLacと反応し脱色効率を向上することができた。これより、メディエーターの有効性が確認され、難脱色性有害有機物の脱色に適用することが可能であるといえる。今回、LacとHOBtメディエーターを用いた系において最も脱色効果が高かった。

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「社会連携推進事業」（平成19年度～平成23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。

参考文献

- 1) Michizoe J., Uchimura Y., Ichinose H., Maruyama T., Kamiya N., Wariishi H., Furusaki S. and Goto M. : Activation of manganese peroxidase in an organic medium using a mediator, *Biochemical Engineering Journal*, 19(1), pp.43-46, 2004.
- 2) 呉楓：アゾ染料の微生物分解に関する研究，京都大学工学博士学位論文，pp47, 1999.

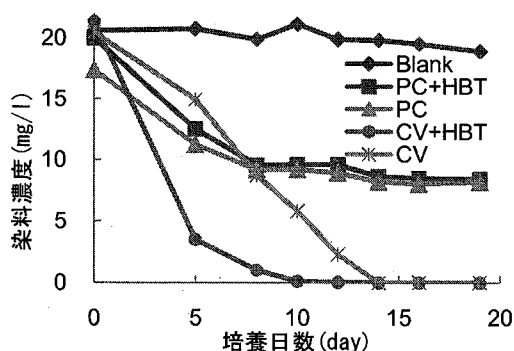


図-5 HOBt使用時のE. Blueの濃度変化

表-2 菌体重量と推定されるアゾ染料吸着量

培養液	菌体重量	推定吸着量	菌体重量	推定吸着量
	PC		CV	
C0	20mg	0.04mg	25mg	0.05mg
C10	41mg	0.082mg	52mg	0.104mg
C25	50mg	0.1mg	76mg	0.152mg
C50	54mg	0.108mg	144mg	0.288mg

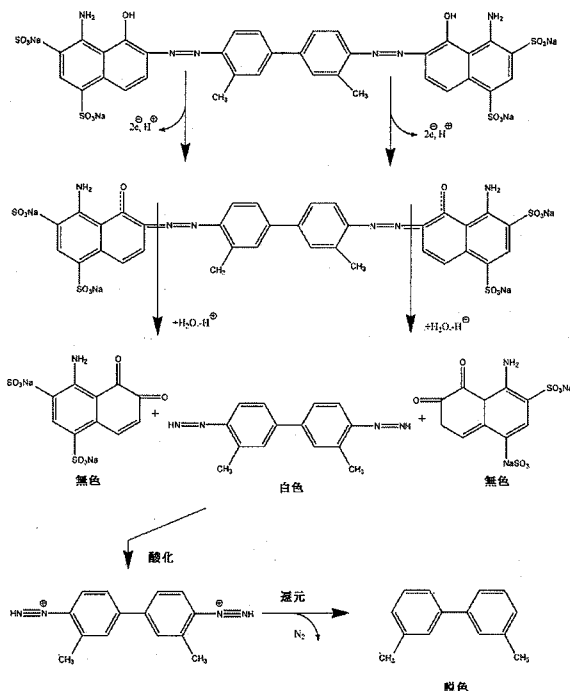


図-6 推測される Evans Blue の分解経路