

B-30 リグニン分解酵素およびメディエーターによる アゾ染料の脱色と酵素由来ラジカルとの関係

高浪 龍平^{1*}・尾崎 博明²・林 新太郎²・陳 霞明³

¹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、有機フッ素化合物やダイオキシンをはじめとする難分解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。これらの浄化技術として生物学的処理が注目されている。生物学的処理は、環境に配慮した低コストの処理法として注目され、処理技術としての導入が盛んになってきている。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由来のリグニン分解酵素を用い、酵素および酵素の働きを促進するメディエーターによる効率的な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、その脱色特性をラジカルを測定することにより検討を行った。

2 実験材料

(1) 実験材料

(a) リグニン分解酵素

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、主にリグニンペルオキシターゼ (LiP)、マンガニペルオキシターゼ (MnP)、ラッカーゼ (Lac) の3種があり、Lac については大量生産が可能となっている。

本研究では市販され利用が容易なLacを用いることとし、大和化成製ラッカーゼダイワY120を使用した。ラッカーゼダイワY120は白色腐朽菌である *Trametes. sp* 由来のラッカーゼを精製したものである。

(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。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。これを受け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。E. Blue の構造式を図1に示す。脱色はベンゼン環同士をつないでいるアゾ基が切れることで起こる。

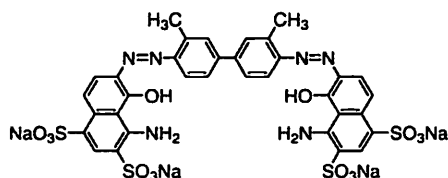


図1 E. Blue 構造式

(c) メディエーター

白色腐朽菌が産生するLacは、産生が容易なため、酸化反応に酵素を使用する際はLiPやMnPに比べてリグニンの分解効率がよいとされている。しかし、Lacはフェノール性化合物あるいは酸化還元電位の低い化合物しか酸化できず、ラッカーゼ単体では非フェノール性化合物の分解ができないという問題がある²⁾。しかし、Lacにメディエーター（電子伝達体）を共存させることによって非フェノール性化合物をも酸化分解することが明らかにされている³⁾。メディエーターには多くの種類があり、ABTSや不飽和脂肪酸のオレイン酸、リノール酸などが

確認されているが、本研究では、1-hydroxybenzotriazole [2592-95-2] (以下、HOBt) をメディエーターとして用い、HOBt の添加した Lac によるアゾ染料分解に及ぼす効果について検討を行うこととした。

(2) 実験方法および分析方法

5ml 試験管を用いた室内実験を行った。脱色実験では各試験管に E. Blue を $10\mu\text{M}$ 、異なる濃度の Lac (0、27、270、540POU/ml)、異なる濃度の HOBt (0、10、100、1000 μM) をそれぞれ分注し、マロン酸にて pH を 4.5 に調整した後、最終液量が 4ml となるように調整した。それぞれの試験管を 20 分間 40°C にて反応させた後、分光光度計にてアゾ染料濃度を測定した。

ラジカルの測定には電子スピン共鳴装置 (ESR) を用いた。ラジカルの捕捉のため脱色実験とは異なる濃度を設定し、Lac (270、540、1080POU/ml)、HOBt (0、10、100、1000 μM) にラジカルのスピントラップ剤である 5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-Oxide [3317-61-1] (以下 DMPO、同仁化学研究所製) を 200mM 添加し、5 分間 40°C にて反応させた後、ESR にて測定を行った。

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 1 に示す。

また、Lac の酵素活性については 4-Aminoantipyrine および phenol を基質として、キノニンミン色素の 505nm における吸光度を 1 分間に 0.1 増加するために必要な酵素量を 1POU と定義した。

3. 実験結果および考察

(1) Lac 単独による E. Blue の脱色

Lac 単独による E. Blue の脱色実験結果を図 2 に示す。Lac を加えなかった対照試料との比較にて脱色率を算出し、

表 1 使用測定機器の仕様および測定条件

分光光度計	
機種	U-3010
測定波長範囲	190-900nm
測光方法	ダブルビーム
本実験測定波長	606nm
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	4.0mW
掃引時間(回数)	2.0min (2回)
使用トラップ剤	DMPO

割合にて示している。Lac の添加により E. Blue の脱色が認められ、Lac の添加量の増加に伴って脱色率は増加した。ただし、Lac 添加量を大きく増加させた場合でも完全な脱色は行われず、本実験においての効果的な Lac 添加量は 27POU/ml であった。

(2) Lac および HOBt 添加による E. Blue の脱色

27POU/ml の Lac にメディエーターである HOBt を添加した E. Blue の脱色実験結果を図 3 に示す。Lac を加えなかった対照試料との比較にて脱色率を算出し、割合にて示している。まず、HOBt のみを加えた試料では脱色は見られず、HOBt 単独での脱色能力がないことを確認した。次に HOBt を加えたすべての試料において HOBt を加えない試料よりも脱色率が高くなり、メディエーターとしての脱色促進効果を確認した。HOBt 添加量の増加に伴って脱色率は増加したが、1000 μM 添加試料では HOBt 由来と思われる変色を確認され脱色率が低下した。これにより今回の実験における HOBt 添加最適量は 100 μM であり、Lac 単独による脱色では困難であった完全な脱色が HOBt 添加により可能であった。

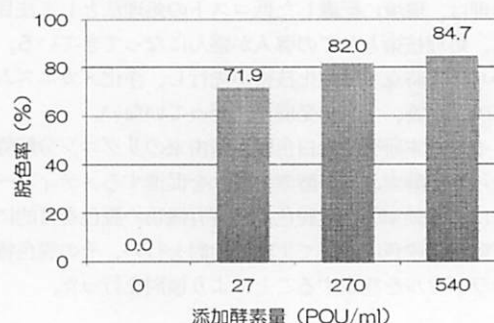


図 2 酵素量別の E. Blue 脱色率

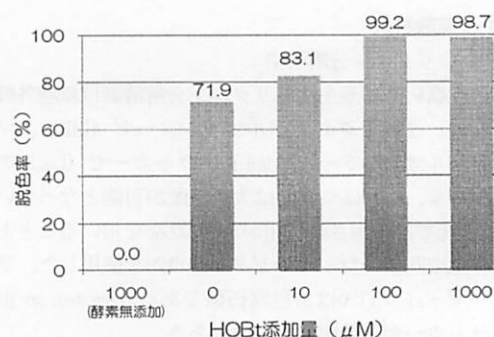


図 3 Lac (27POU/ml) 添加および HOBt 添加量別の E. Blue 脱色率

(3) ESRによるラジカル測定

ESR によるラジカルの測定結果として代表的な HOBt のみの試料および Lac のみの試料について発生したラジカルをスピントラップ剤 DMPO にて捕捉し、その DMPO から検出されたシグナル形状を図 4 に示す。HOBt のみの試料である DMPO+HOBt のシグナルから OH ラジカルが存在しているときに見られる波形が検出された。HOBt 自体に酸化力があることを示しているが、ラジカル発生量が少なく、脱色実験において脱色も起こっていなかったことから、HOBt の持つ酸化力は大きくないと考えられる。Lac のみの試料である DMPO+Lac のシグナルからは酸化反応が強いときに生じる DMPOX (DMPO 副生成物) が存在しているときに見られる波形が検出された。これにより Lac の酸化力をラジカルでも捉えることができることを確認した。また、その他に測定を行った Lac 濃度の変更した試料および Lac と HOBt を加えた試料のすべてにおいて DMPOX の波形が見られ、それぞれが強い酸化力を有しているものと考えられる。

それぞれの試料において検出された DMPOX の波形より、一番目のピークに対する高さを基準となるマンガンマーカースとの比較によりピーク高さの比を算出し、まとめたものを表 2 に示す。270PDU/ml の Lac を用いた試料を基準としてそれぞれの比の値を示している。Lac の濃度を変化させた場合の DMPOX の波形は Lac 濃度の増加に伴って波形も大きくなっており、ピーク高さにおいておよそその比例関係にあった。一方、Lac 濃度を 270PDU/ml に固定し、HOBt の濃度を変化させて添加した試料は、HOBt 添加濃度の増加によって DMPOX の波形は小さくなった。これはメディエーターである HOBt が Lac の電子伝達体として機能し、飛躍的に酸化力を向上させたため、DMPOX 自体を分解し、検出濃度が低下したか、スピントラップ剤である DMPO では捉えることのできない他のラジカルを発生させ、DMPOX の発生量を低下させている可能性が考えられる。

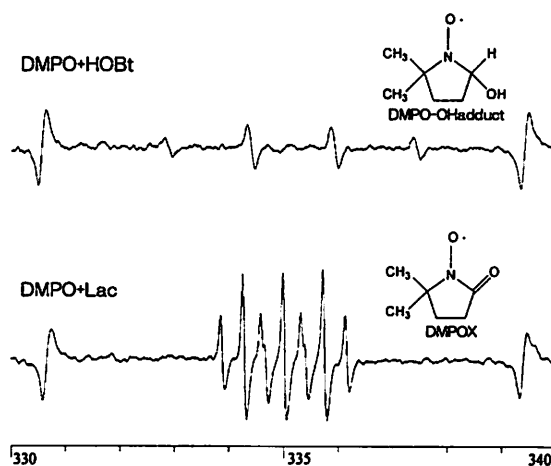


図 4 ESR によるラジカル測定結果

4. まとめ

白色腐朽菌由来のリグニン分解酵素であるラッカーゼおよびメディエーターである 1-hydroxybenzotriazole によるアゾ染料 Evans Blue の脱色実験結果より、アゾ染料はリグニン分解酵素により脱色され、メディエーターを添加した試料にて完全に脱色した。ラッカーゼ単体では Evans Blue を完全に脱色できなかったが、メディエーターを用いることで完全な脱色が可能であったため、メディエーターの有効性が明らかとなった。

また、これらの脱色特性を把握するために電子スピン共鳴により発生したラジカルの検出を試み、Lac を添加したすべての試料からスピントラップ剤の副生成物が検出されそれぞれに強い酸化力を有していることが明らかとなり、メディエーターを加えた試料では Lac 単体と反応が異なり、より酸化力強いことが示唆された。これによりメディエーターによる反応が Lac 単体と異なっていることが明らかとなり、メディエーター添加によって完全に脱色することができた原因のひとつであるといえる。

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「社会連携推進事業」（平成 19 年度～平成 23 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) 竹田智昭、池道彦、藤田正憲：白色腐朽菌由来のラッカーゼを用いた有害化学物質の分解、日本水処理生物学会誌 別巻, No. 24, p107, 2004
- 3) 西田友昭：白色腐朽菌およびその酵素によるバイオレメディエーション、環境修復と有用物質生産、シーエムシー出版, p135, 2003

表 2 DMPOX 波形のピーク高さの比

試料名	ピーク高さの比
270PDU Lac	1.000
540PDU Lac	1.894
1080PDU Lac	3.555
270PDU Lac + 10 μ M HOBt	1.107
270PDU Lac + 100 μ M HOBt	0.410
270PDU Lac + 1000 μ M HOBt	0.225