

# 白色腐朽菌によるアゾ染料の脱色とその挙動について

高 浪 龍 平

## A Decoloration Characteristic of Azo Dyes by White-Rot Fungi

TAKANAMI Ryohei

### Abstract

Use of white-rot fungi in bioremediation is gaining considerable attention due to their unique degradation capability. Successful application of white-rot fungi to degrade high concentration organic pollutants is expected to open a new era in bioremediation. This paper aimed to elucidate decolorization characteristics of two azo dyes (Tropaeolin orange and Evans blue) by two white-rot fungi (*Phanerochaete chrysosporium* and *Coriolus versicolor*) in presence of glucose and HOBt by laboratory experiments. Both *P. chrysosporium* and *C. versicolor* could decolorize the dyes. However, decolorization of T. orange was comparatively difficult, which was attributed to its short-chain molecular structure. Decolorization of T. orange by *P. chrysosporium* was characterized by change in color in the initial stage, which did not continue in the latter stage. The distinct color change with E. blue until the end was attributed to its long-chain molecular structure. Decolorization and degradations of the dyes were correlated, and their degradation pathways were proposed.

**Keywords** : White-Rot Fungi, Azo Dyes, Extracellular Enzymes, HOBt-mediator, Bioremediation

### 要旨

バイオレメディエーション技術を用いた白色腐朽菌による難分解性有害有機物の分解メカニズムの解明を目的に、2種のアゾ染料による脱色実験を行った。脱色試験では、培養液条件の設定やメディエーターを加えた条件での脱色効果について検討を行い、白色腐朽菌が産生する分解酵素についても同時に測定することで、分解酵素と染料の脱色との関係についても検討を行った。実験の結果、用いた2種の白色腐朽菌によって2種のアゾ染料

---

平成21年11月30日 原稿受理

大阪産業大学 大阪産業大学新産業研究開発センター助手

の脱色が認められた。しかし、構造が単純なアゾ染料では脱色は困難で、脱色初期段階で起こる変色のみで反応が終息する結果も見られた。脱色実験の各段階で見られた変色によりそれぞれの分解経路を推測し、白色腐朽菌によるアゾ染料の分解挙動および効率的な脱色に関する知見を得た。

キーワード：白色腐朽菌，アゾ染料，リグニン分解酵素，HOBtメディエーター，バイオレメディエーション

## 1. はじめに

近年、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分解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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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分解性有害有機物の分解を目的にアゾ染料の脱色について実験的検討を行い、その挙動から分解経路の推定を行った。

## 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（以下、LiP）、マンガンペルオキシターゼ（以下、MnP）、ラッカーゼ（以下、Lac）の3種が主に産生される<sup>3,4)</sup>。

本研究で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 chrysosprium*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、そのほとんどが難分解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.Brown<sup>5)</sup>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）とTropaeolin Orange [547-57-9]（以下、T.Orange）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。これらの処理には活性炭吸着<sup>6)</sup>や凝集沈殿、電気分解などの物理的処理、オゾンや硫化水素、過酸化水素等を加える化学的処理<sup>7)</sup>、活性汚泥法<sup>8)</sup>、微生物分解による生物的処理が試みられている。

(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。なお、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。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。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ク社製

U-3010を用いた。測定波長はそれぞれ、E.Blueは606nm, T.Orangeは430nm, 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

表-1 液体培地組成 (1l)<sup>9)</sup>

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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , MnSO <sub>4</sub> , NaCl, FeSO <sub>4</sub> , NaMoO <sub>4</sub> , CoCl <sub>2</sub> , ZnSO <sub>4</sub> , CuSO <sub>4</sub> , AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> , N(CH <sub>2</sub> COONa)				

およびLacはジメトキシフェノールを用い<sup>10,11)</sup>, 酵素溶液1 mlで1分間に1  $\mu$  molの基質が酸化する酵素量を1 unit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<sup>12,13)</sup>である1-hydroxybenzotriazole [2592-95-2] (以下, HOBt) を添加した実験も行った。

### 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, T.Orangeの脱色実験結果を図-2に示す。E.Blueではすべてのサンプルにおいて, 脱色が確認され, グルコース量が少ないサンプル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し<sup>14)</sup>, 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。T. Orangeではすべてのサンプルにおいて脱色は見られなかった。しかし, すべてのサンプルにおいてT.Orangeの変色が確認され, T.Orangeの黄色に近いオレンジ色から赤に近いオレンジ色へと変色した。

図-3はアゾ染料を比較的多く脱色した試料C0におけるE.Blueの濃度変化とLiP, MnP酵素活性を示したものです。これより, LiP活性が高い時期に染料濃度の低下が起きていることから, 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。

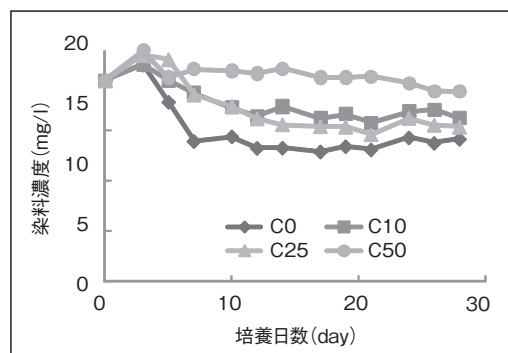


図-1 PCによるE.Blueの濃度変化

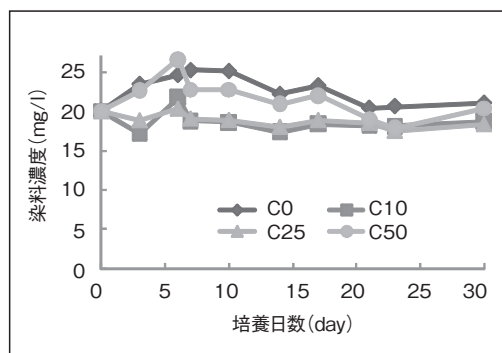


図-2 PCによるT.Orangeの濃度変化

#### (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-4に, T.Orangeの脱色実験結果を図-5に示す。すべてのサンプルにおいて, 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, 試料C10が最もよく脱色できていた。また, E.Blueの脱色では試料

C10において変色が確認され、E.Blueの青色から白色が混じった水色へと変色した。

図-6は試料C10のT.Orangeの濃度変化とMnP, Lac酵素活性を示したものです。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推測される。

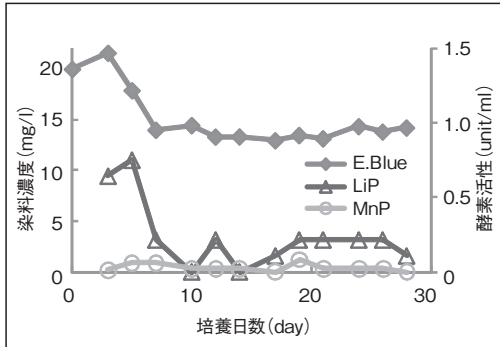


図-3 PC-C0の染料濃度と酵素活性

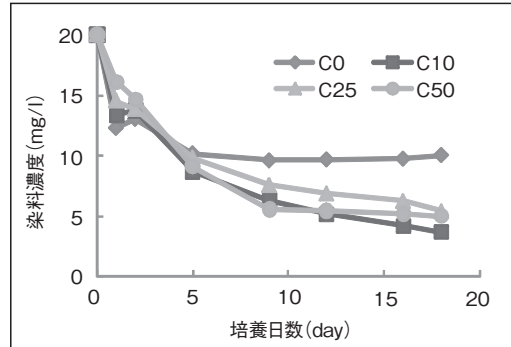


図-4 CVによるE.Blueの濃度変化

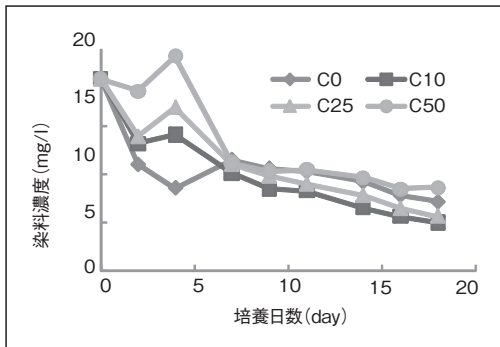


図-5 CVによるT.Orangeの濃度変化

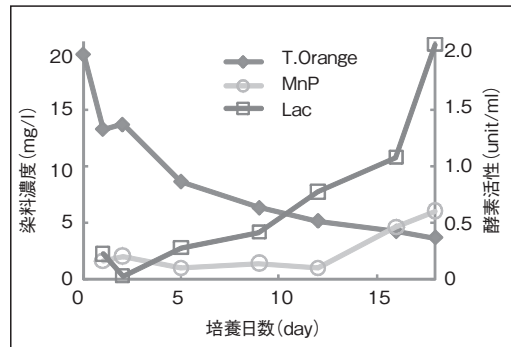


図-6 CV-C10の染料濃度と酵素活性

### (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-7に、T.Orangeの脱色実験結果を図-8に示す。E.BlueはHOBtを添加したCV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と反応していると言える。また、T.OrangeはPCによって脱色されず、CVにおいてはHOBtの有無にかかわらず同様の挙動を示して脱色した。これはE.BlueとT.Orangeの構造の違いによるもので、T.Orangeの方がE.Blueよりも難分解性であると考えられる。これはPCの脱色実験において変色のみ確認された結果と一致する。HOBtによる効果は初期の反応において変色は引き起こすものの、吸光度による測定

結果には反映されず、PCではそのまま脱色は進まず、CVでは脱色が進み、HOBtによる脱色挙動に差が生じなかったものと考えれる。

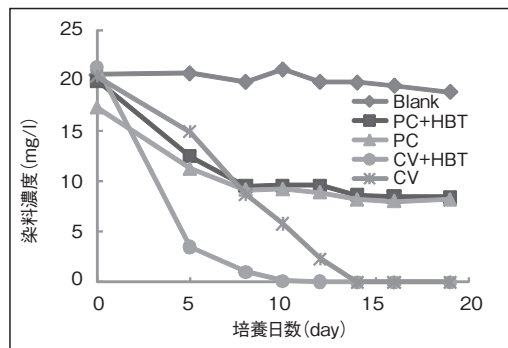


図-7 HOBt使用時のE.Blueの濃度変化

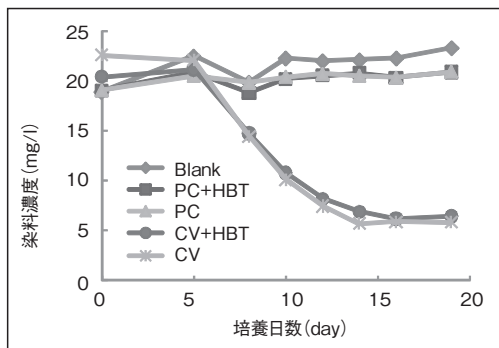


図-8 HOBt使用時のT.Orangeの濃度変化

#### (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、実験後の菌体重量を測定し、アゾ染料の吸着について検討した。

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<sup>15)</sup>。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。

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 PC	推定吸着量	菌体重量 CV	推定吸着量
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

#### 4. 分解挙動による分解経路の推定

実験でみられた変色の結果より推測されたE.Blueの分解経路を図-9に、T.Orangeの分解経路を図-10に示す。E.Blueは発色団側のアゾ基を残し、助色団側の芳香環との結合が先に切断することで、白色の副生成物質が生成される。その後、白色の副生成物質のA

ゾ基が切断されることで完全な脱色になると推測した。T.Orangeの脱色は、まず水酸基にリグニン脱色酵素が作用し、酸素が二重結合することで濃い赤みのあるオレンジ色に発色する物質に変化する。その後、芳香環の開環が起こり、アゾ基が切断されることで脱色がおこると推測した。T.Orangeは構造が比較的単純で脱色するには芳香環の開環が必要であり、E.Blueに比べ脱色が起こりにくいため、今回の実験においても濃度低下が小さくなったと考えられる。

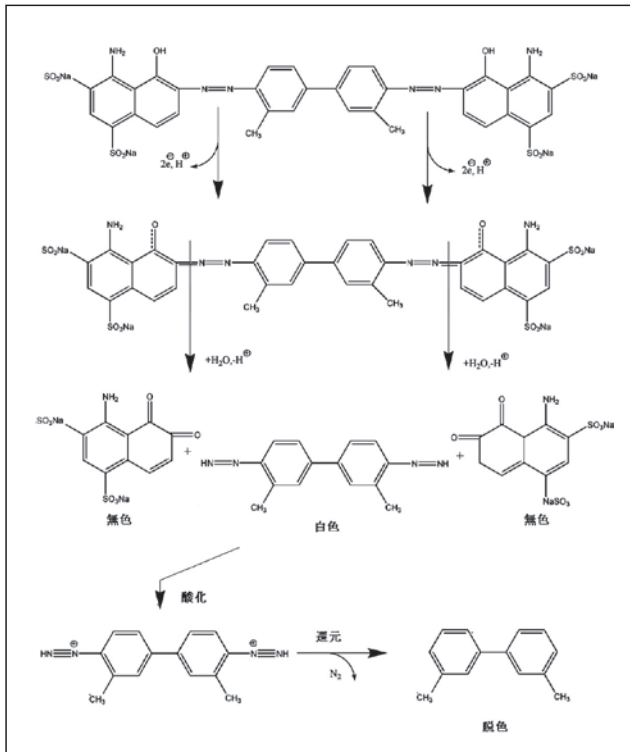


図-9 推定されるE.Blueの分解経路

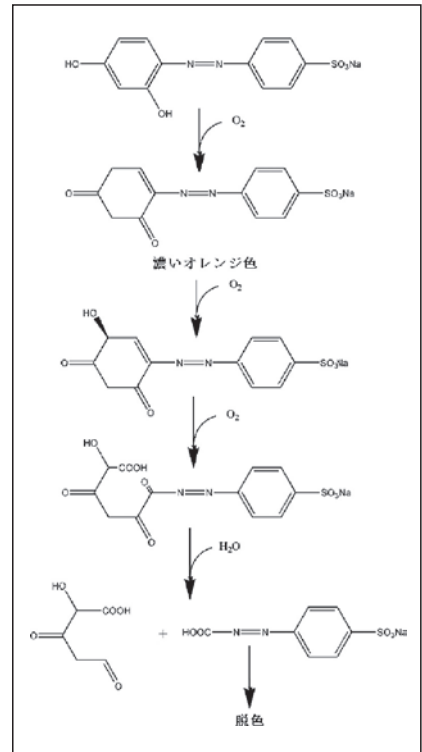


図-10 推定されるT.Orangeの分解経路

## 5. まとめ

白色腐朽菌によるアゾ染料の脱色過程と実験結果より、アゾ染料はリグニン分解酵素により脱色され、T.Orangeのような完全な脱色に芳香環の開環が求められる場合は、分解には時間を要し、脱色過程初期の濃いオレンジ色に変色までは進むものの、芳香環の分解を行うことができず終息し、PCによって脱色することができなかった。しかし、高分子でかつ助色団が大きいE.Blueは脱色しやすい物質で、PCおよびCVともに脱色が可能で

あった。

HOBtを用いたメディエーター系が有効に作用し、素早く脱色が行われた。これより、メディエーターを用いた分解には、分解酵素と同様に対象物質の特性が大きく影響し、物質構造が単純で芳香環の開環が求められる脱色よりも、助色団が大きく、それらの分解によって脱色が起こる物質の方が分解は容易であるといえる。

今回の実験において脱色に寄与するリグニン分解酵素はPCではLiP、CVではLac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。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。

### 参考文献

- 1) 東国茂, [1997],「染料含有排水の水環境への影響」,『水環境学会誌』,Vol.20, pp.210-214.
- 2) Aust S.D. and Benson J.T., [1993], "The fungus among us: use of white-rot fungi to biodegrade environmental pollutants", *Environmental Health Perspectives*, 101(3), pp.232-233.
- 3) Reddy C.A. and Mathew Z., [2001], "Bioremediation potential of white-rot fungi. Fungi in bioremediation", G.M. Gadd Cambridge, UK, *Cambridge University Press*.
- 4) Aust S.D, [1995], "Mechanisms of degradation by white-rot fungi", *Environmental Health Perspectives*, 103(5), pp.59-61.
- 5) D.Brown, [1992], "Environmental assessment of dyestuffs", *Presented before the Division of Environmental Chemistry ACS*, pp.351-352.
- 6) J.J.Porter, [1972], "Treatment of textile waste with activated carbon", *Am. Dyestuff Rep.*, Vol.61, pp.8-12.
- 7) 海賀信好, [1997], 「染料含有排水の脱色技術の動向」,『水環境学会誌』, Vol.20, pp.218-223.
- 8) G.M.Shaul,T.J.Holdworth,C.R.Dempsey,and K.A.Dostal, [1977], "Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process", *Chemosphere*, Vol22, No1-2, pp.107-119.
- 9) 呉楓, [1999], 「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』, pp36.
- 10) 尾崎博明, 呉楓, 今田敏弘, 寺島泰, [1995], 「リグニン分解酵素の活性に及ぼす因子と粗酵素によるアゾ染料の脱色」,『環境工学研究論文集』, 第32巻, pp111-119.
- 11) 西田友昭, 堤祐司, 毛見誠, 羽田崇, 岡村秀雄, [1999], 「白色腐朽菌によるアントラキノン系染料の脱色とそれに関する酵素」,『水環境学会誌』, 第22巻, 第6号, pp467-471.
- 12) Michizoe J., Uchimura Y., Ichinose H., Maruyama T., Kamiya N., Wariishi H., Furusaki S. and Goto M. , [2004], "Activation of manganese peroxidase in an organic medium using a



mediator", *Biochemical Engineering Journal*, 19(1), pp.43-46.

- 13) 杉野菜々美, [2002], 「微生物培養液中のラッカーゼメディエーターの探索」, 『日本農芸化学化学大会講演要旨集』, p296.
- 14) 有坂大樹, 高浪龍平, 尾崎博明, 林新太郎, [2006], 「白色腐朽菌を用いたアゾ染料の分解（1）  
- 酵素の産生について -」, 『第40回 日本水環境学会年会講演集』, pp250.
- 15) 呉楓, [1999], 「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.