

# 白色腐朽菌による合成染料の脱色

早瀬伸樹\* 金丸健司\*\* 堤主計\* 中川 克彦\*

## Decolorization of synthetic dyes by white-rot fungus

Nobuki HAYASE, Kenji KANAMARU, Chikara TSUTSUMI, and Katsuhiko NAKAGAWA

White-rot fungus strain UH-1 which has the ability to decolorize azo dye, Bordeaux S, was isolated. Strain UH-1 decolorized various dyes such as azo dyes, anthraquinone dyes, indigo dye, and polymeric dye. Meanwhile, triphenylmethane dye, Crystal Violet, was not decolorized due to the inhibition of growth. The activity of laccase was only detected during decolorization of Reactive Blue 5 by strain UH-1. Decolorization activity of Reactive Blue 5 and the activity of laccase were stimulated by the addition of laccase inducers such as Naringin or Xylidine. These result indicate strain UH-1 decolorize various dyes by laccase.

### 1. はじめに

染料は一般的に、人間が生活するような環境条件では容易に分解を受けないように設計された化学物質であり、環境水中でも分解を受けにくいことが知られている。

近年、わが国では水の清浄さの指標に、色度、臭気、発泡等の人の感覚に関係するアメニティ要素が重要視されるようになってきている。特に染色工場や染料合成工場からの染料を含む排水は、その濃度が低くても着色の強さは大きく、しかも多種の染料の混合により、一層強い汚濁感を与える。その結果、水辺環境のアメニティを破壊することになる<sup>1)</sup>。

この防止対策として提案されているのが、オゾン酸化、活性炭吸着などの物理化学的処理である。これらの処理方法には、低コストで高い脱色率を得ることが求められているが、実用においては比較的高い処理コストがかかってしまうのが現状である。

そこで、微生物を用いた脱色法が着目されている。微生物的脱色法は、低コストで処理が可能であると期待されているが、物理化学的処理法に比べあまり普及していない。その原因として、脱色能力のある微生物を効率的に利用する方法が確立されていないことが一つの原因であると考えられる。

そこで本研究では微生物的脱色法に着目し、アゾ染料やアントラキノン染料など、さまざまな染料を脱色する菌を分離し、その菌の脱色特性また、脱色に関与している酵素について検討することを目的とし、研究を行った。

### 2. 実験方法

#### 2-1 使用染料

アゾ染料として Bordeaux S、Methyl Orange、Orange II、Tartrazine、アントラキノン染料として Remazol Brilliant Blue R、Acid Blue 45、Reactive Blue 5、重合染料として PolyR-478、インジゴ染料として Acid Blue 74、トリフェニルメタン染料として Crystal Violet、チアジ染料として Nigrosine を用いた。

#### 2-2 使用菌株

アゾ染料である Bordeaux S (100 mg/l) を添加した Potato dextrose broth 寒天培地上に土壌を接種し、30°C で培養を行った。増殖してきた菌株の内より Bordeaux S の脱色を示す白色腐朽菌 UH-1 株を分離した。UH-1 株の DNA の調製を FastDNA キット (BIO 101, CA, USA) と FastPrep

平成 24 年 9 月 20 日受付 (Received Sep.20, 2012)

\* 新居浜工業高等専門学校生物応用化学科 (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Niihama National College of Technology, Niihama, Ehime, 792-8580)

\*\* 新居浜工業高等専門学校専攻科生物応用化学専攻 (Advanced Applied Chemistry and Biotechnology Course, Niihama National College of Technology, Niihama, Ehime, 792-8580)

FP120(BIO 101, CA, USA)を用いて行った。そして、この DNA をテンプレートとして PCR 法により 18S rDNA フラグメントの増幅を行った。PCR プライマーには NS1 および NS8 を用いた。PCR で増幅した 18S rDNA は、ABI Prism 377 DNA Sequencer を用いて塩基配列を決定した。この塩基配列の相動性検索を GenBank(GenBank/EMBL/DDBJ 国際 DNA データベース)に対して行った。

### 2-3 各種染料の脱色試験

各種染料を 100 mg/l の濃度で添加した Potato dextrose broth を作成し、オートクレーブ滅菌を行った。その後、白色腐朽菌 UH-1 株を植菌し、30℃で 6 日間振とう培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離 (13000 rpm、10 分) し、培養上清において各染料の最大吸収波長の吸光度を測定することにより各染料の脱色率を求めた。

### 2-4 窒素濃度の Reactive Blue 5 脱色への影響

NH<sub>4</sub>Cl 濃度を 0 mM、1 mM、5 mM、10 mM、50 mM、100 mM と変化させた脱色基本培地 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.0 g/l; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.2 g/l; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.50 g/l; グルコース, 10 g/l; 微量元素溶液, 20 ml/l; ビタミン溶液, 20 ml/l) に Reactive Blue 5 を 100 mg/l の濃度で添加し、オートクレーブ滅菌を行った。その後、白色腐朽菌 UH-1 株を植菌し 30℃で 4 日間振とう培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離 (13000 rpm、10 分) し、培養上清の 604 nm の吸光度を測定することにより脱色率を求めた。

### 2-5 ラッカーゼ活性測定法

反応液 (200 mM 酢酸緩衝液(pH 4.5), 2.5 ml; 5 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 0.5 ml; H<sub>2</sub>O, 1.9 ml) を 30℃に加温した後、培養上清を添加し、即座に 436nm の吸光度を測定した。さらに、30℃で数分間反応させ、再び吸光度の測定を行った。反応前後の吸光度の差より、一定時間に酸化された ABTS の濃度を求めた。この ABTS 濃度よりラッカーゼ活性を求めた<sup>2)</sup>。

### 2-6 マンガン非依存性パーオキシターゼ活性測定法

反応液 (200 mM 酢酸緩衝液(pH 4.5), 2.5 ml; 5 mM ABTS, 0.5 ml; 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.05 ml; H<sub>2</sub>O, 1.85 ml) を 30℃に加温した後、培養上清を添加し、即座に 436 nm の吸光度を測定した。さらに、30℃で数分間反応させ、再び吸光度の測定を行った。反応前後の吸光度の差より、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下で一定時間に酸化された ABTS の濃度を求めた。この ABTS 濃度より求めた酵素活性からラッカーゼ活性を差し引き、マンガン非依存性パーオキシターゼ活性を求めた<sup>3)</sup>。

### 2-7 アリルアルコールオキシターゼ活性測定法

反応液 (200mM 酢酸緩衝液(pH 4.5), 2.5 ml; 0.1 M veratryl alcohol, 0.2 ml; H<sub>2</sub>O, 2.2 ml) を 30℃に加温した後、培養上清を添加し、即座に 310 nm の吸光度を測定した。さ

らに、30℃で数分間反応させ、再び吸光度の測定を行った。反応前後の吸光度の差より、一定時間に酸化された veratryl alcohol の濃度を求めた。この veratryl alcohol 濃度よりアリルアルコールオキシターゼ活性を求めた<sup>2)</sup>。

### 2-8 リグニンパーオキシターゼ活性測定法

反応液 (200 mM 酢酸緩衝液(pH 4.5), 2.5 ml; 0.1 M veratryl alcohol, 0.2 ml; 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.05 ml; H<sub>2</sub>O, 2.15 ml) を 30℃に加温した後、培養上清を添加し、即座に 310 nm の吸光度を測定した。さらに、30℃で数分間反応させ、再び吸光度の測定を行った。反応前後の吸光度の差より、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下で一定時間に酸化された veratryl alcohol の濃度を求めた。この veratryl alcohol 濃度より求めた酵素活性からアリルアルコールオキシターゼ活性をひくことにより、リグニンパーオキシターゼ活性を求めた<sup>4)</sup>。

### 2-9 Reactive Blue 5 脱色における種々の酵素活性の測定

脱色基本培地(NH<sub>4</sub>Cl 濃度は 10 mM)に Reactive Blue 5 を 100 mg/l の濃度で添加しオートクレーブ滅菌を行った。その後、白色腐朽菌 UH-1 株を植菌し、30℃で 9 日間振とう培養を行った。経時的に培養液を採取し、遠心分離 (13000 rpm、10 分) 後の培養上清を用いて Reactive Blue 5 脱色に関与すると予想される、ラッカーゼ活性、マンガン非依存性パーオキシターゼ活性、アリルアルコールオキシターゼ活性、リグニンパーオキシターゼ活性の測定を行った。

### 2-10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加による Reactive Blue 5 脱色活性への影響

脱色基本培地 (NH<sub>4</sub>Cl 濃度は 10 mM) に Reactive Blue 5 を 100 mg/l の濃度で添加しオートクレーブ滅菌を行った。その後、白色腐朽菌 UH-1 株を植菌、30℃で 17 日間振とう培養を行った。経時的に培養液を採取し、遠心分離 (13000 rpm、10 分) し、培養上清を用いて Reactive Blue 5 脱色活性および H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 mM) 添加における Reactive Blue 5 脱色活性の測定を行った。

### 2-11 グルコース濃度の Reactive Blue 5 脱色活性及びラッカーゼ活性への影響

グルコース濃度を 0 g/l、5 g/l、10 g/l、15 g/l、20 g/l と変化させた脱色基本培地に、Reactive Blue 5 を 100 mg/l の濃度で添加しオートクレーブ滅菌を行った。その後、白色腐朽菌 UH-1 株を植菌し、30℃で 17 日間振とう培養を行った。経時的に培養液を採取し、遠心分離 (13000 rpm、10 分) し、培養上清を用いて Reactive Blue 5 脱色活性とラッカーゼ活性の測定を行った。

### 2-12 キシリジン及びナリンジン添加による Reactive Blue 5 脱色活性及びラッカーゼ活性への影響

ラッカーゼ誘導物質としてキシリジン及びナリンジンを用いた。キシリジン及びナリンジン濃度を変化させて添加した脱色基本培地に Reactive Blue 5 (100 mg/l) を添加しオ

ートクレーブ滅菌を行った。その後、白色腐朽菌 UH-1 株を植菌し、30℃で 6 日間振とう培養を行った。経時的に培養液を採取し、遠心分離 (13000 rpm、10 分) 後の培養上清を用いて Reactive Blue 5 脱色活性とラッカーゼ活性の測定を行った。

### 3. 結果及び考察

#### 3-1 白色腐朽菌 UH-1 株の同定

UH-1 株の 18S rDNA の相同性検索の結果から、サルノコシカケ (Polyporales) 目の *Wolfiporia cocos* FPL4198 株と 99.9% の相動性を示し、Polyporales 目の担子菌であると考えられた。

#### 3-2 UH-1 株による各種染料の脱色試験

新居浜市内の土壌より分離した *Wolfiporia* 属の担子菌 UH-1 株を用いて種々の染料の脱色試験を行った結果を Table 1 に示した。アゾ染料である Bordeaux S、Methyl Orange、Orange II は 6 日後には、ほぼ 100% の脱色率を示したが、同じアゾ染料である Tartrazine では 14.72% と低い脱色率を示した。しかし、結果は示していないが、培養期間を延長することで Tartrazine も、ほぼ 100% 脱色された。アントラキノン染料である Remazol Brilliant Blue R、Acid Blue 45、Reactive Blue 5 は全て 100% 近い脱色率が得られた。また重合染料である PolyR-478 も、ほぼ 100% の脱色が観察された。一方、トリフェニルメタン染料である Crystal Violet では、菌の増殖阻害が観察され、全く脱色が進行しなかった。以上の結果より、分離した白色腐朽菌 UH-1 株は Crystal Violet を除いて非常に幅広い脱色スペクトルを有すると考えられる。染料による汚染は各種染料の複合的な汚染であることが多いことより、幅広い脱色スペクトルを有する白色腐朽菌 UH-1 株は染料汚染水域の浄化に適した特性を有していると考えられる。

Table 1 Decolorization of various dyes by strain UH-1

Dyes	Decolorization (%)
Bordeaux S	99.93
Methyl Orange	90.04
Orange II	98.25
Tartrazine	14.76
Remazol Brilliant Blue R	97.20
Acid Blue 45	97.98
Reactive Blue 5	99.47
PolyR-478	99.31
Acid Blue 74	98.38
Crystal Violet	0.00
Nigrosine	44.00

#### 3-3 窒素濃度の Reactive Blue 5 脱色への影響

白色腐朽菌 UH-1 株を種々の NH<sub>4</sub>Cl 濃度で Reactive Blue 5 脱色試験を行った時の、4 日後の脱色率と NH<sub>4</sub>Cl 濃度の関係を Fig.1 に示した。0 mM、1 mM、5 mM、10 mM の NH<sub>4</sub>Cl 低濃度の培地において高い脱色率を示した。それに対し、50 mM、100 mM といった NH<sub>4</sub>Cl 高濃度の培地では脱色率の低下が観察された。以上の結果より、白色腐朽菌 UH-1 株の脱色活性は、低窒素濃度において高い活性を示し、高窒素濃度において活性の低下が観察されるリグニン分解活性とよく似た挙動を示すことが明らかになった。

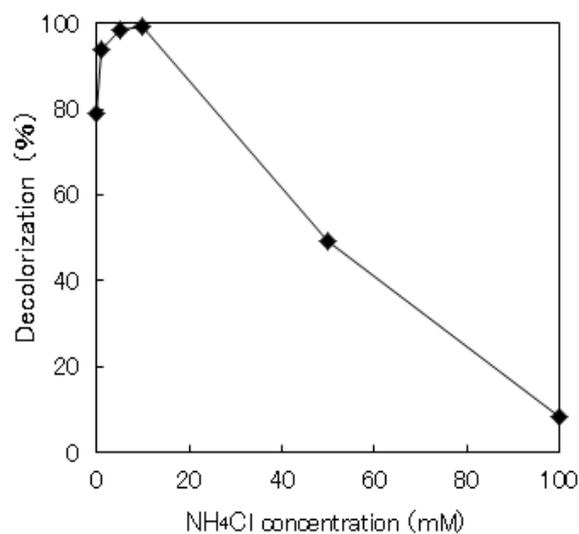


Fig.1 Effect of NH<sub>4</sub>Cl concentration on decolorization of Reactive Blue 5 by strain UH-1

#### 3-4 Reactive Blue 5 脱色における種々の酵素活性

UH-1 株による Reactive Blue 5 脱色中に、ラッカーゼ活性、マンガン非依存性パーオキシダーゼ活性、リグニンパーオキシダーゼ活性、アリルアルコールオキシダーゼ活性を測定したが、活性が検出されたのはラッカーゼのみであった。その時のラッカーゼ活性は、5 日後に 0.067 μmol/ml·min、7 日後に 0.306 μmol/ml·min、9 日後に 0.54 μmol/ml·min であった。従って、Reactive Blue 5 の脱色にはラッカーゼが関与している可能性が高いと考えられた。

#### 3-5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加による Reactive Blue 5 脱色活性への影響

Fig. 2 に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加による Reactive Blue 5 脱色への窒素濃度の影響を示した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加による Reactive Blue 5 脱色活性への影響試験において H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加による Reactive Blue 5 脱色活性への影響は観察されなかった。以上のことより Reactive Blue 5 脱色への H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の関与は認められず脱色に関与している酵素はパーオキシダーゼではない可能性が示唆された。

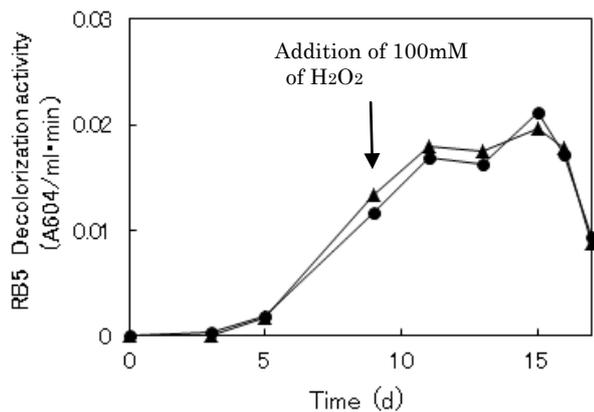


Fig.2 Effect of the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (filled circle) on decolorization of Reactive Blue 5 by strain UH-1

### 3-6 グルコース濃度の Reactive Blue 5 脱色活性及びラッカーゼ活性への影響

グルコース濃度 0 g/l の培地においては、炭素源であるグルコースが入っていないため、白色腐朽菌 UH-1 株がほとんど増殖せず、Reactive Blue 5 脱色活性、ラッカーゼ活性ともに検出されなかった。その他の濃度ではグルコース濃度が高濃度になるほど Reactive Blue 5 脱色活性、ラッカーゼ活性ともに強い活性を示した。また、すべての濃度においてラッカーゼ活性が増加すると Reactive Blue 5 脱色活性も増加し、ラッカーゼ活性が減少すると Reactive Blue 5 脱色活性も減少するというようにラッカーゼ活性と Reactive Blue 5 脱色活性は高い相関性を示した。以上のことから Reactive Blue 5 脱色へのラッカーゼの関与が示唆された。

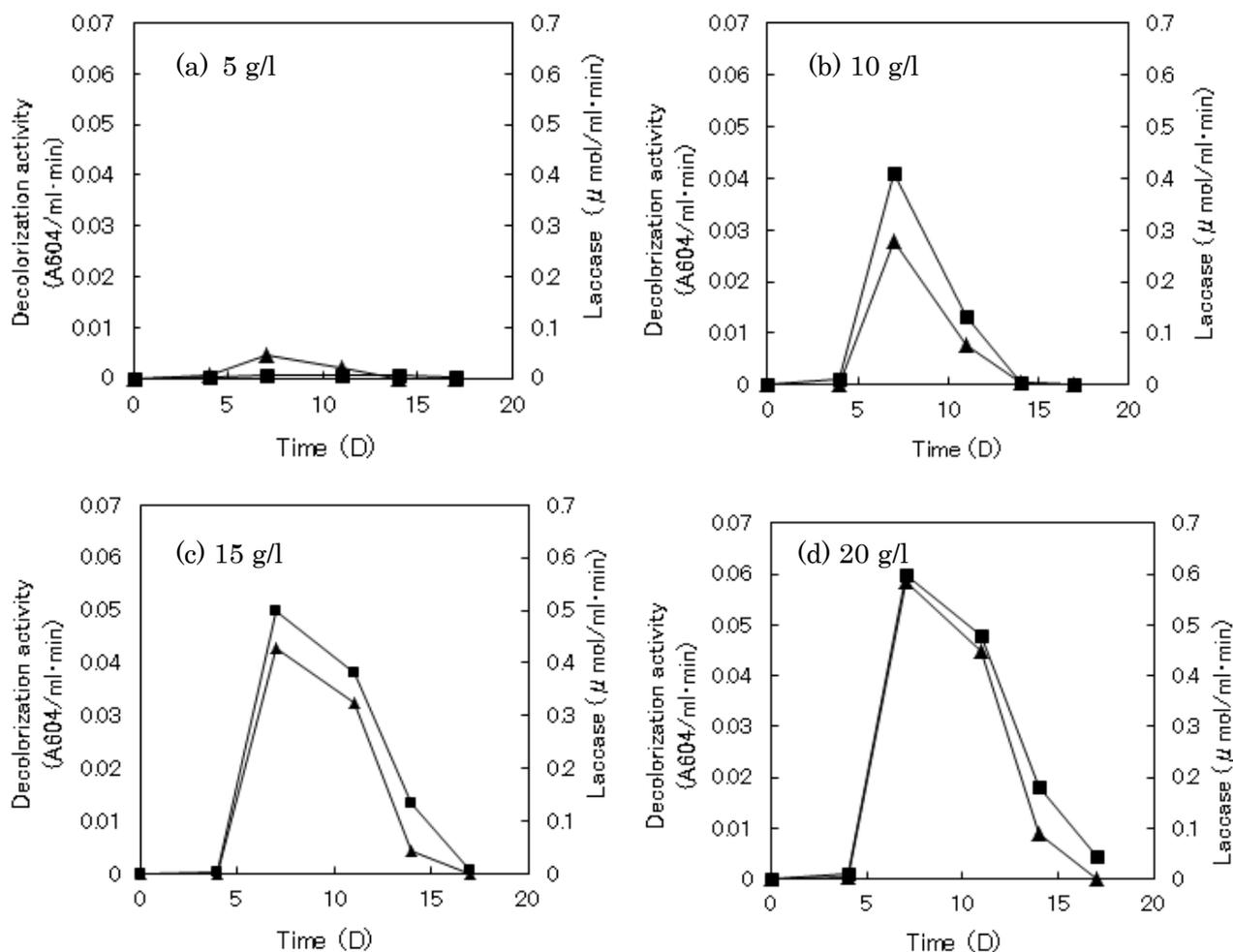


Fig.3 Effect of glucose concentration on laccase activity (filled square) and decolorization of Reactive Blue 5 (filled triangle) by strain UH-1. Strain UH-1 was inoculated in the medium containing 5 g/l glucose (a), 10 g/l glucose (b), 15 g/l glucose (c), and 20 g/l glucose (d).

### 3-7 キシリジン及びナリンジン添加による Reactive Blue 5 脱色活性及びラッカーゼ活性への影響

Fig. 4 には、キシリジン添加による Reactive Blue 5 脱色活性及びラッカーゼ活性への影響、Fig.5 には、ナリンジン添加による Reactive Blue 5 脱色活性及びラッカーゼ活性への影響を示した。また、Reactive Blue 5 脱色活性、ラッカーゼ活性ともに最も高い活性を示した培養6日後の両活性を、キシリジン、ナリンジン濃度で比較したところ、キシリジンまたはナリンジンを添加した培地でラッカーゼ活性及び Reactive Blue 5 脱色活性がともに上昇することが明らかになった。キシリジン添加培地においては濃度が高いほどラッ

カーゼ活性、Reactive Blue 5 脱色活性ともに強い活性を示したが、キシリジンよりも約 10 倍濃度で添加したナリンジン添加培地では、1mM 添加においてラッカーゼ活性、Reactive Blue 5 脱色活性の両方で活性の低下が観察された。また、キシリジン添加培地の方がラッカーゼをよりよく誘導し、誘導を開始するまでの誘導期間はナリンジン添加培地の方が短い傾向が観察された。以上の結果より、ラッカーゼ誘導物質として知られているキシリジン、ナリンジンの添加により、UH-1 株のラッカーゼ活性、Reactive Blue 5 脱色活性ともに上昇し、UH-1 株のラッカーゼにより、染料が脱色されている可能性が強く示唆された。

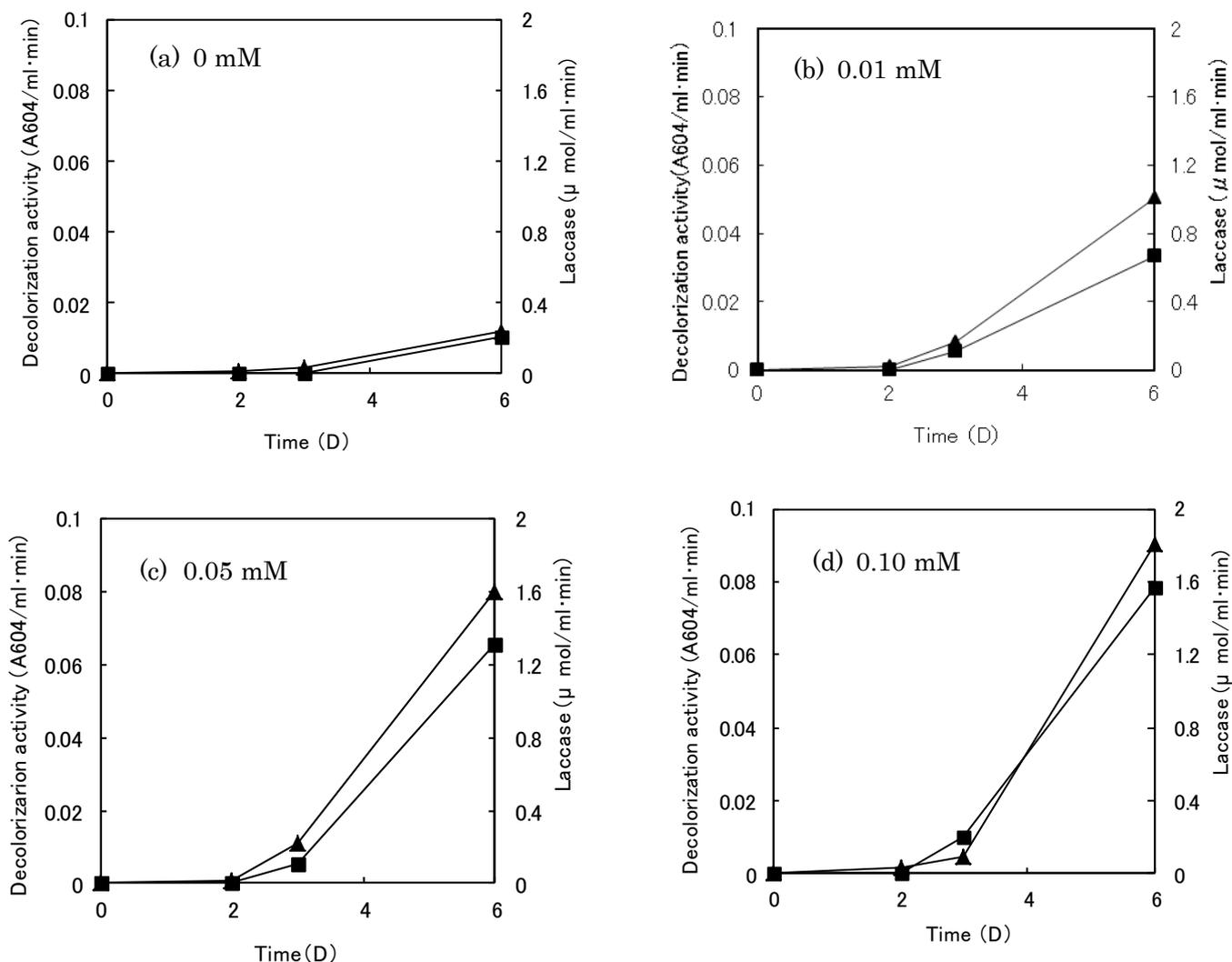


Fig.4 Effect of Xylidine concentration on laccase activity (filled square) and decolorization of Reactive Blue 5 (filled triangle) by strain UH-1. Strain UH-1 was inoculated without Xylidine (a), with 0.01 mM Xylidine (b), 0.05 mM Xylidine (c), and 0.10 mM Xylidine (d).

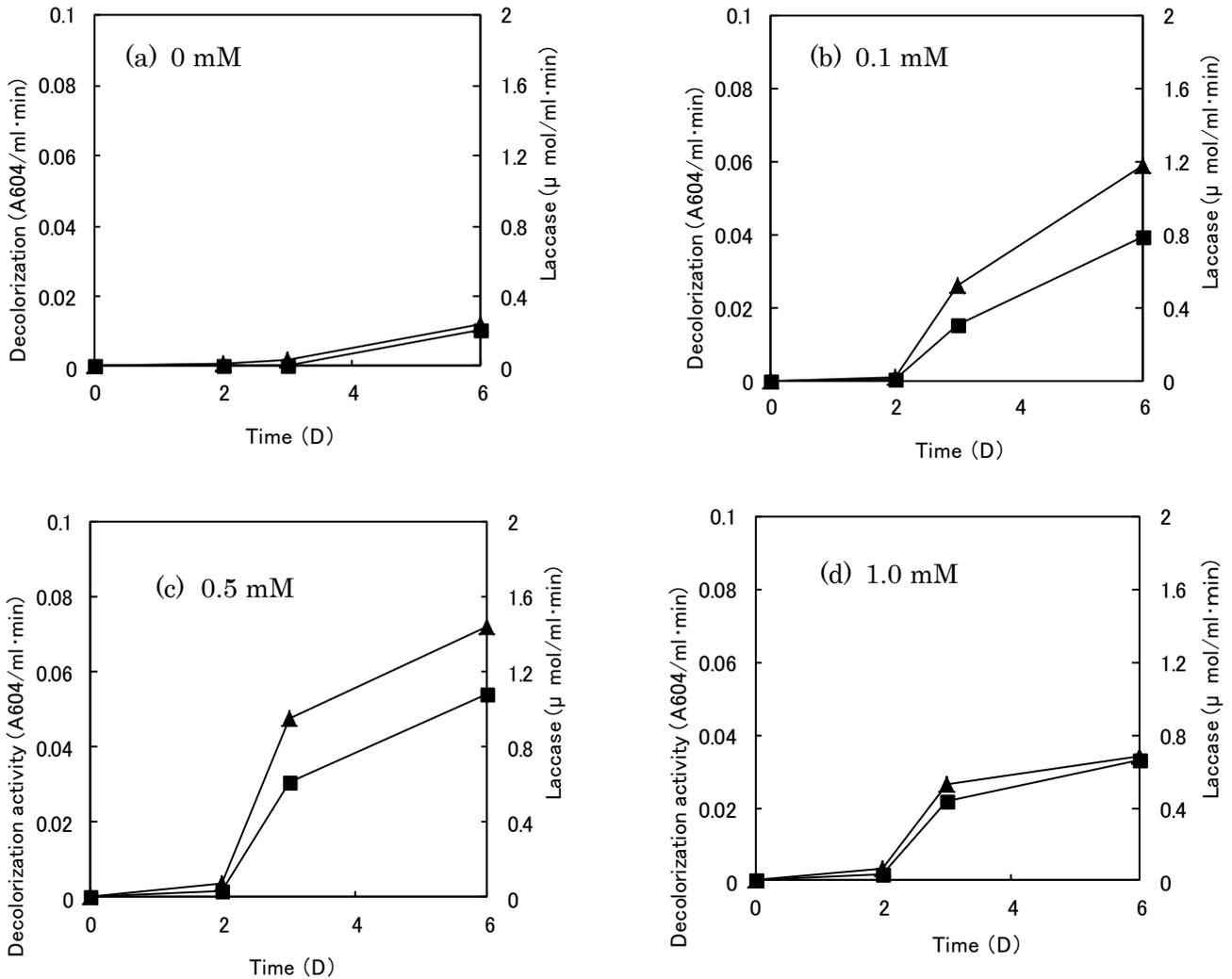


Fig.5 Effect of Naringin concentration on laccase activity (filled square) and decolorization of Reactive Blue 5 (filled triangle) by strain UH-1. Strain UH-1 was inoculated without Xylidine (a), with 0.01 mM Xylidine (b), 0.05 mM Xylidine (c), and 0.10 mM Xylidine (d).

#### 4. 結言

アゾ染料やアントラキノン染料等の幅広い種類の染料を脱色する白色腐朽菌 UH-1 株を分離した。UH-1 株は、18S rDNA の相同性検索の結果から、Polyporales 目の担子菌であると考えられた。UH-1 株の培養液の脱色に関与すると考えられる酵素活性を測定したところ、ラッカーゼ活性のみが検出された。そこで、ラッカーゼ誘導物質としてキシリジンとナリンジンを使用し、これらラッカーゼ誘導物質によるラッカーゼ活性及び Reactive Blue 5 脱色活性への影響試験を行ったところ、キシリジンまたはナリンジンを添加したすべての培養液でラッカーゼ活性及び Reactive Blue 5 脱色活性がともに上昇した。また、ラッカーゼ活性と Reactive Blue 5 脱色活性は高い相関性を示し、UH-1 株のラッカーゼにより、各種染料が脱色されている可能性が強く示唆された。

#### 参考文献

- (1) 東国茂, 水環境学会誌, Vo.20, No.4 p210-21, (1997).
- (2) Munoz C., Gillen F., Martinez AT., and Marinez MJ., Appl. Environ. Microbiol., Vol.63, p.2166-2174 (1997).
- (3) Pointing S. B., Jones E. B. G., and Vrijmoed L. L. P., Mycologia, Vol.92, p.139-144 (2000).
- (4) Tien M. and Kirk T. K., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.81, p.2280-2284 (1983).