

染料脱色微生物の検索, 単離及び脱色機構の解析

稲垣 賢二・川口 将和・田口 隆章^{a)}・田村 隆
田中 英彦

(生物資源開発学講座)

Screening and Isolation of Azo Dyes Decolorizing Microorganisms and Analysis of Their Mechanism

Kenji Inagaki, Masakazu Kawaguchi, Takaaki Taguchi
Takashi Tamura and Hidehiko Tanaka

(Department of Bioresources Chemistry)

A yeast, *Candida* sp. MK-1, newly isolated from activated sludge as a dye decolorizing microorganism, decolorized Color Index (C.I.) Reactive orange 16 and C. I. Reactive red 21 on the solid medium. Both azo dyes were also decolorized even in the liquid medium. The decolorizing activity by *Candida* sp. MK-1 depends on glucose concentration. Textile stained by Reactive orange 16 or Reactive red 21 was decolorized by *Candida* sp. MK-1. These results suggest that *Candida* sp. MK-1 has potential applications for the decolorization of textile and for the bioremediation of dye-contaminated wastewater.

Key words : decolorization, azo dyes, *Candida* sp., screening, bioremediation

緒 言

染色工場や、染料製造産業の工程で排出される各種合成染料は難分解性物質が多く、その有色廃水の処理には主に吸着、濃縮、化学的変換等の物理化学的方法が用いられている。それらは、処理効率がよい反面、高い処理コスト、有害な副産物の生成や高いエネルギー消費が要求されるなどの短所がある。一方、こうした方法に替わる方法として微生物処理が注目を集めている。微生物処理の良い面としては常温常圧での反応であること及び生成物が無毒であることが考えられる。また染着した布地の微生物を用いた脱色が可能ならば、その用途はさらに広がるものと考えられる。一例を挙げると、染料脱色菌は染色方法の一種である抜染法に応用できる。染料を分解することにより、ぼかし染めや絞り染めに応用できるのが特徴で、染色に使用した化学薬品の廃水処理の必要がなく、またエネルギーの消費も少ないので、環境にやさしい染色法として利用できる。これまで染料を脱色する微生物として最も研究が行わ

れているのはリグニン分解活性を示す白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* でその分解メカニズムも明らかになっている¹⁻⁴⁾。白色腐朽菌では、分泌するリグニンペルオキシダーゼやマンガンペルオキシダーゼ、さらにラッカーゼのようなフェノール酸化酵素が、リグニンの分解や染料の脱色に関与しているとされている。また脱色菌としては、*Pleurotus ostreatus*⁵⁾、*Coriolus vesicolor*⁶⁾、*Streptomyces* spp.^{2,3)}でも研究されている。本報では近年高まりを見せる環境問題への解決の糸口となることを目的として、染料を脱色する微生物を検索し、その脱色機構の解析を試みた。

材料と方法

染料脱色微生物の分離

目的とする染料脱色微生物の検索のため、岡山県

Received October 1, 1997

a) 有限会社タグチ
(Taguchi Corp.)

内各地の土壌を採取し、また岡山市内各地の下水処理場及び岡山大学環境管理センターに赴き、活性汚泥を採取した。サンプルを滅菌水に懸濁し、この懸濁液を染料100 ppmを添加した GPY 寒天培地 (1.0% グルコース, 0.3% ポリペプトン, 0.3% 酵母エキス, 0.1% 硫酸マグネシウム, 0.1% リン酸二水素カリウム, 1.5% 寒天, pH 6.0) に載せ広げた。30°C で数日間培養し、染料の脱色が見られたコロニーについては常法により分離した。実験に用いた染料は、アゾ染料の Color Index (C.I.) Reactive orange 16, C.I. Reactive red 21, C.I. Reactive Blue 220, Metanil Yellow 及び Orange II の5種類である。Reactive red 21を除く4種類の染料の構造を Fig. 1 に示す。

菌の培養と休止菌体の調整

分離した菌は GPY 液体培地を用いて30°Cで24時間培養した。遠心分離 (8000 rpm 15 min) にて集菌後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し休止菌体を調製した。

休止菌体を用いた脱色機構の解析

培地に含まれる脱色因子の検討は、GPY 培地の各培地組成をそれぞれ添加する事により実施した。50 ml 容のガラスサンプル管瓶に休止菌体溶液2.5 ml, 2倍濃度の培地2.5 mlを添加後、10 μ l の Reactive orange 16を添加後30°Cで反応を開始し、各時間ごとに200 μ lをエッペンドルフチューブに分注し、12000 rpm, 10分間遠心し上清を Absorbance 490 nm で測定することにより、染料の脱色を検討した。

染料脱色に対するグルコース濃度の影響の検討は、菌体濃度を150 mg/mlに固定し、菌体懸濁液1.5 mlに

各濃度のグルコース溶液を0.5 ml加え、20 μ l の Reactive orange 16を添加して30°Cで反応を開始し、各時間ごとに200 μ lをエッペンドルフチューブに採取し、12000 rpm, 10分間遠心し上清を Absorbance 490 nm で測定することにより行った。

休止菌体反応中のグルコース濃度の測定は、和光純薬工業で市販されているグルコース B-テストと同様の試薬を作り行った。この試薬1.4 mlにサンプル (各時間での試料の上清) 0.1 mlを加え、37°C, 20分反応を行い、試薬中のフェノールと4-アミノアンチピリンが酸化縮合することにより発色した赤色色素を Absorbance 505 nm で測定することにより、グルコース消費量を求めた。

無細胞抽出液による染料の脱色

無細胞抽出液は菌体をフレンチプレス法で破碎することにより調製した。3.0 mlの100 mM グルコースを含む10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に1.0 mlの無細胞抽出液と40 μ l の Reactive orange 16を添加することにより30°Cで反応を開始した。各時間ごとに200 μ lずつ採取し800 μ lの0.2 N Na₂CO₃で反応を停止し、Absorbance 490 nm を測定することにより、染料の脱色を検討した。

染色済みの生地への脱色

50 ml容のガラスサンプル管と試験管を用いて行った。反応溶液の組成は菌体懸濁液3.0 mlにグルコースを1.0 ml加え、pH 7.0, 30°Cで行った。

結果及び考察

1. 染料脱色微生物の検索及び単離

採取したサンプルをpH 6.0, 30°Cという条件で GPY 固体培地上で培養したところ、多くのコロニーの生育が確認された。均一にする目的で単離操作を繰り返した。その結果、岡山市内の旭西浄化センターから採取したサンプルから染料脱色菌を1株 (MK-1) 単離できた。形態観察及び種々の糖類の発酵性、資化性の検討など^{7,8)}から MK-1株は *Candida* 属酵母に属し、*Candida kresei* 及び *Candida diversa* が近縁種であることが判明した。Fig. 2は、*Candida* sp. MK-1の顕微鏡写真である。GPY 培地を用いたスクリーニングでは、*Geotrichum candidum* Dec 1株が染料を脱色するという報告がある⁹⁾。また *Candida* 属酵母が染料の脱色を行う例としては、*Candida curvata* によるアゾ染料の脱色が報告されている¹⁰⁾。

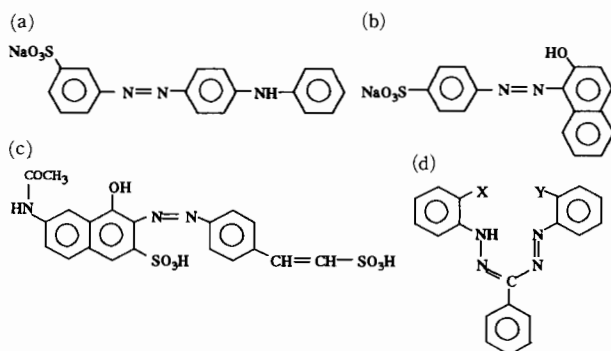


Fig. 1 Structure of dyes.

(a) Metanil yellow; (b) Orange II; (c) Color Index (C.I.) Reactive orange 16; (d) C.I. Reactive blue 220

2. *Candida* sp. MK-1 株による染料の脱色

Candida sp. MK-1 株は培養時に染料を添加した結果 Reactive orange 16及び Reactive red 21を脱色することができた。しかし Reactive blue 220, Metanil Yellow 及び Orange II を脱色することはできなかった。Reactive orange 16, Reactive red 21は構造が類似しており、そのため両者が脱色されたものと考えられる。Fig. 3 に両色素の MK-1 株による脱色の写真を示した。また *Candida* sp. MK-1 株の生育は培養開始後約7時間で定常期に達し、染料は対数期において急激に脱色され定常期に達する頃には、ほぼ完全に脱色された。

3. 休止菌体及び無細胞抽出液での脱色条件検討

GPY 培地の培地成分をそれぞれ添加した結果、菌体とグルコースを同時に添加したものにおいてのみ、染料の脱色が確認された。グルコース存在下で *Can-*

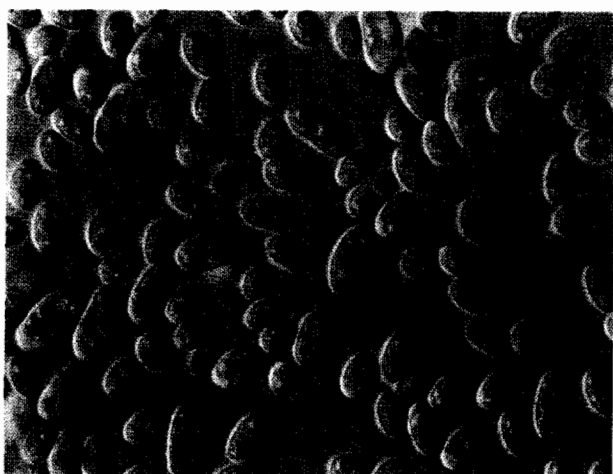


Fig. 2 Micrograph of *Candida* sp. MK-1 (X1250).

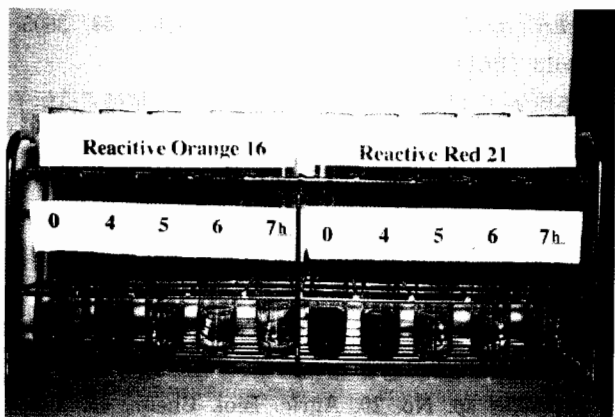


Fig. 3 Decolorization of Reactive orange 16 and Reactive red 21 by *Candida* sp. MK-1.

didia sp. MK-1 株が染料を脱色することが判明したので、グルコース濃度の検討を行った。その結果 MK-1 株の脱色はグルコース濃度1.0%で最大、脱色率87.5%を示すことがわかった。残存グルコース量を測定したところ、約1時間で99%のグルコースを消費した (Fig. 4)。 *Geotrichum candidum* による染料の脱色はグルコースの再添加により脱色がさらに進行する⁹⁾。また *Pleurotus ostreatus* による Remazol brilliant blue R の脱色においては菌体外の過酸化水素が関与しており、グルコースオキシダーゼによって産出した過酸化水素を利用している¹¹⁾。MK-1 株では休止菌体反応中のグルコースが完全消費された後でも、脱色反応が続いているので、グルコース代謝とそれに伴う過酸化水素の発生が脱色に影響を与えているかどうか注目される。

無細胞抽出液を調製し脱色反応を行った結果では、16.15 mg/mlのタンパク濃度で31%の脱色率を示した。しかし、タンパク質濃度が非常に濃いため、無細胞抽出液を用いた場合の脱色活性は吸光度の減少のみでは正確に測定することが困難であり、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等の他の検出方法を検討する必要がある。

4. 染色済み生地の脱色

染色済み生地の脱色では、Reactive orange 16, Reactive red 21及び Reactive blue 220により染色された3種の生地を用いたところ、*Candida* sp. MK-1 株により3種とも脱色されていた (Fig. 5)。これにより、本菌が抜染法等へ応用可能であること

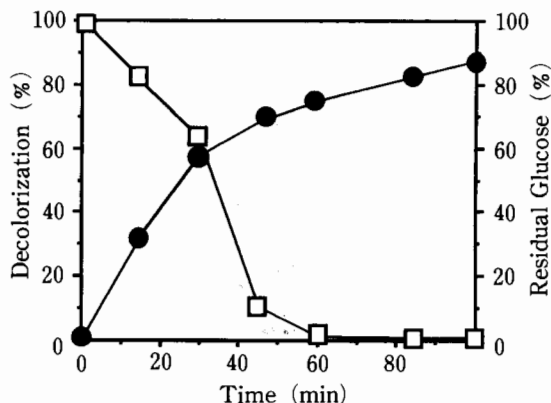


Fig. 4 Consumption of glucose during decolorization of Reactive orange 16. ●, Decolorization of Reactive orange 16; □, residual glucose.

が示唆された。液体培養等の実験において脱色が認められなかった Reactive blue 220が脱色された理由としては、セルラーゼによる脱着作用や MK-1 株による色素の吸着などが考えられる。セルラーゼによる脱着作用は既に実用化されており、ジーンズ特有の風合いを出すためにセルラーゼを用いたバイオウォッシュという方法がある。MK-1 株に同様の作用があるか今後検討してみる必要がある。

Candida 属に分類される酵母であることが判明した MK-1 株は、今回の研究において実施した染料5種のうち Reactive orange 16, Reactive red 21を効率よく脱色した。また Reactive blue 220については、液体培養等の実験において脱色が認められなかったにもかかわらず、染色した生地への脱色現象が認められた。

休止菌体反応を行った結果では、グルコースを反応液中に添加することにより染料が脱色され、染料の脱色はグルコース濃度に依存していることがわかった。グルコースは休止菌体反応では約60分で完全に消費されたが、その後も染料の脱色反応は続いていることから、グルコースが菌体内で代謝された代謝産物が染料に影響を与えていると考えられる。この場合脱色を行う微生物によく報告されているペルオキシダーゼ反応である可能性がある。今後は本菌による脱色の機構を解明するとともに、応用に関する研究を進めていきたい。

要 約

アゾ染料を脱色する微生物の検索を行い、岡山市旭西浄化センターの活性汚泥サンプルから染料脱色

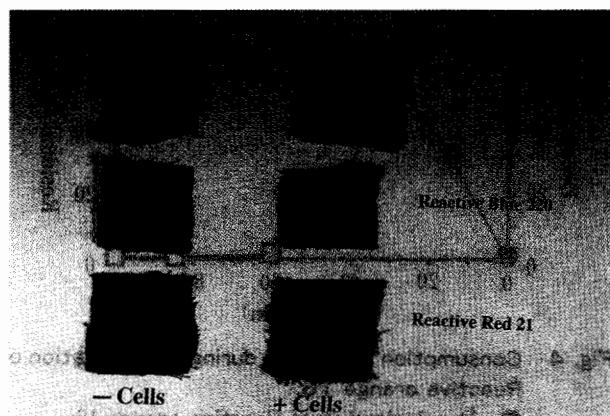


Fig. 5 Decolorization of stained textiles.

菌1株を単離した。単離菌 MK-1 株は *Candida* 属に分類される酵母であり、実験に用いた5種のアゾ染料のうち Color Index (C.I.) Reactive orange 16, C.I. Reactive red 21の2種類の染料を効率的に脱色した。脱色機構を検討したところ *Candida* sp. MK-1 株による脱色はグルコースに依存していることが判明した。さらに菌体を用いた染色生地への脱色も可能であった。これらの結果は、今回単離した *Candida* sp. MK-1 株が、抜染法等に応用可能であり、更に染料を多量に含んだ有色廃水の処理等のバイオレメディエーションにも応用できる可能性を示した。

謝 辞

単離菌株を同定していただいた天野製薬株式会社研究開発本部の松浦 明氏に感謝致します。なお本研究は、1995年度から1997年度までの3年間にわたる岡山大学学内特定研究(特殊環境微生物の機能開発と物質生産への応用)を分担して行ったものである。

文 献

- 1) Spadaro, J. T., M. H. Gold, and V. Rengahathan : Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2397-2401 (1992)
- 2) Paszczynski, A., M. B. Pasti-Grigsby, S. Goszczynski, R. L. Crawford, and D. L. Crawford : Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3598-3604 (1992)
- 3) Pasti-Grigsby, M. B., A. Paszczynski, S. Goszczynski, D. L. Crawford, and R. L. Crawford : Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3605-3613 (1992)
- 4) 本田与一・桑原正章 : キノコのリグニン分解酵素遺伝子群. *日本農芸化学会誌*, **69**, 365-368 (1995)
- 5) Platt, M. W., Y. Hadar, and I. Chet : The decolorization of the polymeric dye poly-blue (polyvinylalanine sulfonate-anthraquinone) by lignin degrading fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 394-396 (1985)
- 6) Watanabe, Y., R. Sugi, Y. Tanaka, and S. Haya-shida : Enzymatic decolorization of melaniodin by *Coriolus* sp. No. 20. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1623-1630 (1982)
- 7) Kreger-van Rij, N. J. W. : The yeasts. a taxionomic

- study. Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam (1984)
- 8) 長谷川武治: 微生物の分類と同定. 学会出版センター (1984)
- 9) Kim, S. J., K. Ishikawa, M. Hirai, and M. Shoda: Characteristics of newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Decl, which decolorizes various dyes. J. Ferment. Bioeng., **79**, 601-607 (1995)
- 10) 角田潔和・館野悦之・小泉武夫・小玉健吉・吉沢 淑・野白喜久雄: アゾ色素脱色酵素の固定化による廃水処理. 醗酵工学会誌, **70**, 387-393 (1992)
- 11) Vyas, B. R. M. and H. P. Mollitoris: Involvement of extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 3919-3927 (1995)