

染料脱色微生物による染料脱色機構の解析

馬場 直子・坂口 博脩・田口 隆章^{a)}・早瀬 伸樹^{b)}
田村 隆・稲垣 賢二
(生物機能化学講座)

Analysis of Decolorization Mechanism by Azo Dyes
Decolorizing Microorganisms

Naoko Baba, Hiromichi Sakaguchi, Takaaki Taguchi^{a)}
Nobuki Hayase^{b)}, Takashi Tamura and Kenji Inagaki
(Department of Biofunctional Chemistry)

The mechanism of azo dyes decolorization by *Candida* sp. MK-1, *Aeromonas* sp. B-5 and *Actinobacillus* sp. B-11 were analyzed. The maximal decolorization activity was observed at pH 7.5 and 30°C on *Candida* sp. MK-1, at alkaline and at 35°C on *Aeromonas* sp. B-5 and *Actinobacillus* sp. B-11. The HPLC analysis of the supernatant of the Acid Red 27 decolorization mixture with *Candida* sp. MK-1 cell free extract indicated a peak which was not detected in the blank. The retention time of this peak matched that of a reference standard compound of 4-amino-1-naphthalenesulfonate, produced by reductive cleavage of Acid Red 27. The decolorization of azo dyes with cell free extract of *Candida* sp. MK-1 was promoted by the addition of several coenzymes or lawsone. The remarkable promotion of decolorization was observed by the addition of NADPH or NADP⁺. On the other hand the decolorization was suppressed by the addition of glutamate dehydrogenase with α -ketoglutarate and NH₄⁺. Therefore, it was suggested that *Candida* sp. MK-1 azoreductase catalyzed decolorization of azo dye by NADPH dependent reductive cleavage.

Key words : azo dyes, decolorizing microorganism, azoreductase

緒 言

現在、染色工場などから出る有色廃水の処理には、活性炭吸着、沈殿、オゾン酸化、光分解、膜ろ過等の物理化学的方法が多く用いられている。これらは、処理効率がよい反面、温和な条件で反応が行えない、高い処理コストや高いエネルギー消費が要求されるなどの問題がある。一方、こうした方法に替わる方法として生物的处理が注目を集めている。生物的处理の長所としては、温和な条件、つまり常温常圧で反応が行なえることがあげられる。実際に、染料を分解する酵素や微生物を固定化させた担体が工業的に生産されている。こうした背景から、染料分解脱色菌を研究することは工業的にも有効である。現在使用されている合成染料のうち半数以上がアゾ染料である。アゾ染料は1つもしくはそれ以上のアゾ基(-N=N-)を持ち、その両側の芳香環にスルホン基やヒドロキシル基などの置換基を持つことでさまざまな色を呈することが知られている。また、アゾ染料は水溶性であることから非常に用途が広く、2000種類以上のアゾ染料が繊維、皮、プラスチック、化粧品、食品などの染色に用いられている。その中でも最も広く使用されているのが

繊維の染色である。この場合、用いた染料の約10%が繊維に結合せず、下水処理場や環境中に流出していると言われている。瀬戸内地域では繊維産業が盛んで、染色工場から排出される有色排水が瀬戸内海汚染の一因となっている。このため経済的で、有効な有色排水処理法の確立が求められている。

本研究ではアゾ染料を脱色する、3つの菌体を対象に実験を行った。本研究室の川口らによって単離された、*Candida* sp. 酵母 MK-1 株⁶⁾及び、新居浜工業高専 早瀬らにより単離された *Aeromonas* sp. B-5 株⁷⁾、*Actinobacillus* sp. B-11 株⁸⁾を用いた。これらはいずれも土壌から単離された。以上3菌株を用い、その脱色に関与した物質を同定しそのメカニズムを明らかにするとともに、最終的にはより効率的な脱色システムを確立することを目的として本研究を行った。

Received October 1, 2005

a) 有限会社 タグチ
(Taguchi Corp.)

b) 新居浜工業高専
(Niihama Nat. Col. of Tech.)

材料と方法

使用菌体

本研究室単離酵母 *Candida* sp. MK-1 株⁶⁾ 及び、新居浜工業高等専門学校単離細菌 *Aeromonas* sp. B-5 株⁷⁾, *Actinobacillus* sp. B-11 株⁸⁾ を使用した。いずれも土壌から単離された。

培地及び培養方法

Candida sp. MK-1 は GPY 培地 (1.0% Glucose, 0.3% Polypeptone, 0.3% Yeast extract, 0.1% KH_2PO_4 , 0.1% $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH6.0), *Aeromonas* sp. B-5 及び *Actinobacillus* sp. B-11 は L 培地 (1.0% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, pH7.0) を用い、30℃, 200rpm にて培養した。固体培養はそれぞれの培地に1.5%寒天と染料(終濃度100ppm)を添加した培地で行なった。

使用染料

本実験では4種類のアゾ染料を使用した。その構造を Fig. 1 に示した。脱色機構の解析には主に Acid Red 27 (Color Index : C.I. 16185) を用いた。

HPLC による分解生成物の同定 : 測定条件

流動相 : メタノール50%/水49.7%/リン酸0.3%, 流速 : 0.6ml/min, Inertsil CN-3 カラム (GL Science Inc. 4.6mm×150mm) を使用し分画したサンプルを210nmの吸収波長で検出した。検出には Waters 484 Tunable Absorbance Detector を用いた。サンプルは遠心分離(15,000, 5 min) 後、10,000 Da のフィルターで不純物を除いたものをカラムに供した。

培地上清、洗浄菌体及び無細胞抽出液の調整法

5 ml の液体培地の入った試験管で前培養 (12時間) を行い、150ml の液体培地の入った500ml容坂口フラスコもしくは300mlの液体培地の入った1000ml容坂口フラスコで本培養 (12時間) を行った。本培養の終了した培地を遠心 (10,000 rpm, 20 min) し、培地上清と菌体に分離した。*Actinobacillus* sp. B-11 株は集菌されにくいためさらに超遠心 (39,000 rpm, 60 min) した。集菌した菌体を洗浄 (0.9% NaCl, 10 mM KPB MK-1 株は pH7.0, *Aeromonas*

sp. B-5 株と *Actinobacillus* sp. B-11 株は pH7.5) 後、各培地に懸濁したものを洗浄菌体とした。また、*Aeromonas* sp. B-5 株及び *Actinobacillus* sp. B-11 株については洗浄菌体を各 pH の緩衝液に菌体量が 0.2 g/ml となるように懸濁し、超音波破碎機 (KUBOTA Insonator 201M) で破碎 (150W×15 min を 2 回) 後、遠心分離 (10,000 rpm, 20 min) した上清を無細胞抽出液とした。*Candida* sp. MK-1 株の破碎には Zymolyase を用いた。*Candida* sp. MK-1 株の洗浄菌体を 0.2 g/ml (菌体湿重量の 4 倍量) になるように 50 mM KPB pH7.5 (Sorbitol 1.2M 含) に懸濁し、菌体湿重量 1 g あたり 5 mg の Zymolyase を加え、30℃の恒温槽で 30~60 分間振とう (90 rpm) した。スフェロプラストを確認するために、経時的に 40 µl の試料をとり蒸留水で 50 倍希釈して 600 nm の吸光度を測定した。吸光度の減少としてスフェロプラスト化の程度を確認した。3,000×g で 5 分間遠心し酵母菌体を集めた上清を Zymolyase 処理画分とした。その沈殿を、使用直前に 1 M phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) を 50 µl 加えた 50 mM KPB pH7.5 (Sorbitol 0.6M 含) に懸濁し、超音波破碎機で破碎 (150W×15 min を 2 回) 後、遠心分離 (10,000 rpm, 20 min) した上清を無細胞抽出液とした。

染料脱色活性測定法

試料 1,000 µl 中に染料を終濃度 200 ppm になるように添加し、各条件で反応を開始させた。経時的に反応液を 200 µl 取り、10 倍希釈した遠心上清の吸光度を測定した。染料濃度は各染料の最大吸収波長から計算した。脱色活性は 1 時間当たりの染料の脱色量 (nmol) で示した。最適 pH の検討では Britton and Robinson 広域緩衝液を用いた。

結果と考察

3 菌株の菌体による脱色反応の最適化

本研究に用いた 3 菌株それぞれについて、脱色反応条件の最適化を試みた。温度は 25℃~50℃にて、pH は Britton and Robinson 広域緩衝液を用いて 2.6~12 にて検討した。これまでの研究により *Candida* sp. MK-1 は振とう条件にて、*Aeromonas* sp. B-5 及び *Actinobacillus* sp. B-11 は静置条件で、脱色が促進されることが分かっているの、それぞれの条件にて反応させた。

Candida sp. MK-1 は 30℃, pH2.6 にて、*Aeromonas* sp. B-5 及び *Actinobacillus* sp. B-11 は 35℃, pH10 と pH8 にて最大活性を示した。*Candida* sp. MK-1 とその他の 2 細菌でその条件が異なるという結果となった (Table 1)。

Candida sp. MK-1 無細胞抽出液による脱色機構の解析

本研究で用いた 3 菌株で唯一無細胞抽出液にて脱色活性を持つ *Candida* sp. MK-1 無細胞抽出液での様々な検討を行った。

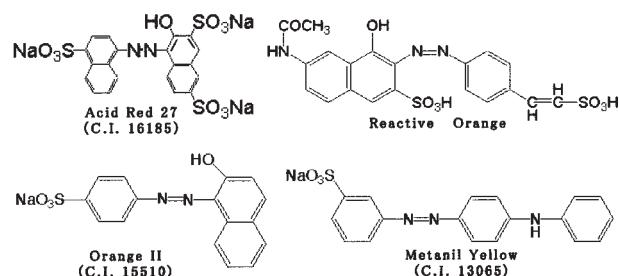


Fig. 1 Chemical structure of azo dyes.
Chemical structure of Acid Red 27, Reactive Orange 16, Orange II and Metanil Yellow. C.I., color index.

Table 1 Optimum condition for decolorization by three microorganisms

Microorganisms	Temp.	pH	condition
<i>Candida</i> sp. MK-1	30 °C	2.6	shake
<i>Aeromonas</i> sp. B-5	30 °C	10.0	static
<i>Actinobacillus</i> sp. B-11	35 °C	8.0	static

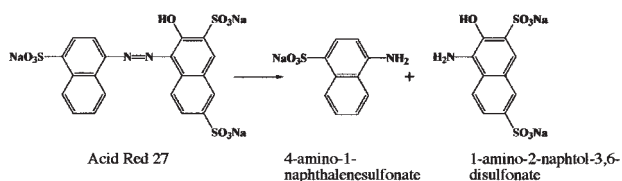
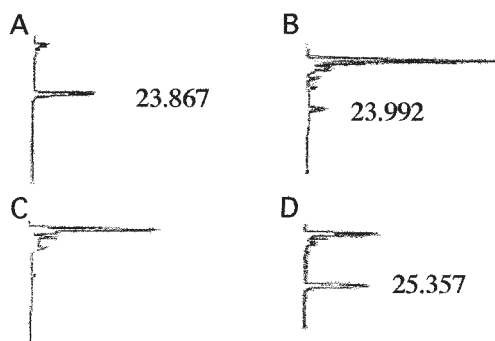


Fig. 2 Reductive cleavage of Acid Red 27.

Fig. 3 HPLC analysis of the reaction mixture decolorized by the crude extract of *Candida* sp. MK-1.

The crude extract was incubated with Acid Red 27 (B) or without the dye (C) at 30 °C for 10 h under static condition. The authentic sample of 4-amino-1-naphthalensulfonate was also analyzed (A) and the authentic sample was co-injected with the decolorized mixture (D).

まず, *Candida* sp. MK-1 無細胞抽出液の染料脱色後生成物の同定を行うことでその分解機構を推測した. Acid Red 27 のアゾ基が還元的に開裂すると 4-amino-1-naphthalensulfonic acid と 1-amino-2-naphthol-3,6-disulfonic acid が生成する (Fig. 2). そこで, *Candida* sp. MK-1 無細胞抽出液による Acid Red 27 分解生成物の HPLC 分析を行った. Fig. 3 に示したように, Acid Red 27 を *Candida* sp. MK-1 無細胞抽出液で脱色させ分析すると, 4-amino-1-naphthalensulfonic acid とほぼ一致する 24 分付近にピークが見られた. また, Acid Red 27 脱色後 *Candida* sp. MK-1 無細胞抽出液と 4-amino-1-naphthalensulfonic acid を共添加した場合に単一のピークが確認できた. 以上の結果から *Candida* sp. MK-1 無細胞抽出液は Acid Red 27 のアゾ基を還元的に開裂し, 4-amino-1-naphthalensulfonic acid を生成しているものと考えられる. この結果は *Aeromonas* sp.

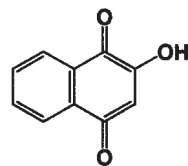
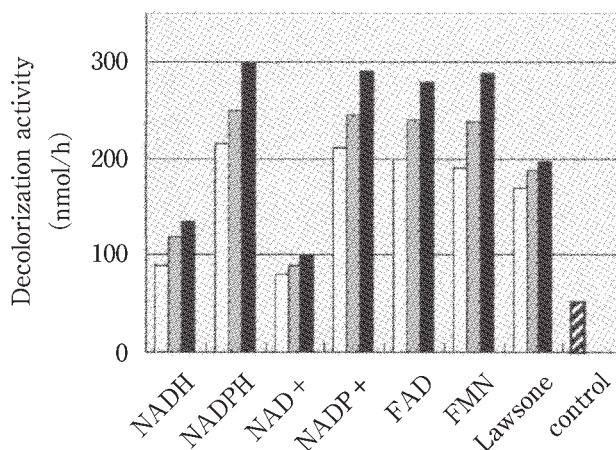


Fig. 4 Chemical structure of lawsone.

Fig. 5 Effect of the addition of various concentrations of coenzymes or lawsone on decolorization by crude extract of *Candida* sp. MK-1.

The reaction mixture contained 200 ppm Acid Red 27, 0–0.3 mM coenzyme or lawsone and 50 mM KPB (pH 7.5). (▨): control, (□): 0.1 mM coenzyme or lawsone (▒): 0.2 mM, (■): 0.3 mM.

B-5 及び *Actinobacillus* sp. B-11 と同様であった^{7,8)}.

データでは示していないが, *Candida* sp. MK-1 無細胞抽出液は最適温度 50 °C, 最適 pH 7.5 を示し, 熱処理及びプロテアーゼ処理により失活した. このことからこの反応は酵素反応であることが推測された. また透析による失活, 様々な染料の脱色 (基質特異性の低さ) から低分子の関与が推測された. 以上のことから *Candida* sp. MK-1 無細胞抽出液反応は低分子の関与する酵素反応であることが示唆された. そこで次に反応に関与する低分子の検討を行った.

まず, 酸化還元反応に関わる補酵素 (NADH, NADPH, NAD⁺, NADP⁺, FAD, FMN) と Lawsone でその濃度依存的な添加効果の検討を行った. Lawsone とは Fig. 4 に示した構造を持ったキノンで, 酸化還元反応の触媒として工業的にも用いられている物質である. 既知アゾレダクターゼがキノンの添加により活性が促進されたという報告があり, 6 種類のキノンで検討した. その結果 Lawsone で活性が促進されたことから本実験で用いた. Fig. 5 に示したように, いずれのサンプルでも濃度依存的に脱色活性が促進されていることが分かる. 特に NADPH と NADP⁺ で顕著な結果となった. 次に, 補酵素に加えて Lawsone を添加する実験を行った. この実

験でも NADPH と NADP⁺ で最も有効な促進が見られた (Fig. 6). この結果より, 特に NADPH と NADP⁺ に注目してグルタミン酸脱水素酵素 GLDH) 添加効果の影響を調べた. GLDH は Fig. 7(A) のような反応を触媒する酵素であり, 補酵素 NADPH を NADP⁺ に酸化する. また比較のため乳酸脱水素酵素 LDH) 添加効果の影響も調べた. LDH は Fig. 7(B) のような反応を触媒する酵素であり, 補酵素 NADH を NAD⁺ に酸化する. Control と比較して GLDH と基質 α -ケトグルタル酸を添加したサンプルでは脱色活性が抑制されていることが分かった (Fig. 8). 一方, LDH と基質ピルビン酸を添加したサンプルでは GLDH のような活性の抑制は見られなかった. 以上の結果から Fig. 9 に示す脱色機構を推測した. 還元型の NADPH を補酵素とする酵素 (アゾレダクターゼであると推測される) がアゾ染料に作用し, アゾ染料を還元的に分解脱色するという機構である. この機構は *Bacillus* 属細菌のアゾレダクターゼの報告⁵⁾の一部と共通するものである.

データは示していないが, 既知アゾレダクターゼ遺伝子⁹⁾より設計したプライマーを用いたゲノム遺伝子の PCR により 3 菌株でいくつかの DNA 増幅断片を得ている. 今

後, アゾレダクターゼ遺伝子のクローニングが成功し, 遺伝子レベルでの脱色機構解析が期待される.

要 約

Candida sp. 酵母 MK-1 と細菌 *Aeromonas* sp. B-5 及び *Actinobacillus* sp. B-11 によるアゾ染料の脱色機構を分析した. 菌体反応において *Candida* sp. 酵母 MK-1 は最適温度 30℃, 最適 pH 2.6 を示し, *Aeromonas* sp. B-5 及び *Actinobacillus* sp. B-11 は最適温度 35℃, 中性から弱アルカリ性側で最適 pH を示した. 染料分解生成物の HPLC 分析では, 染料脱色後反応液にて Acid Red 27 の還元的開裂反応産物の一つが確認され, アゾ染料の還元的開裂反応により分解脱色していることが示された. *Candida* sp. MK-1 は無細胞抽出液でも脱色活性を持ち, その活性は補酵素及び Lawsone の添加により促進された. 特に NADPH と NADP⁺ において顕著な結果となった. α -ケトグルタル酸と NH₄Cl を基質とした GLDH 反応により活性が抑制されたことから *Candida* sp. MK-1 のアゾ染料脱色反応は還元型 NADPH を補酵素とするアゾレダクターゼ反応であることが示唆された.

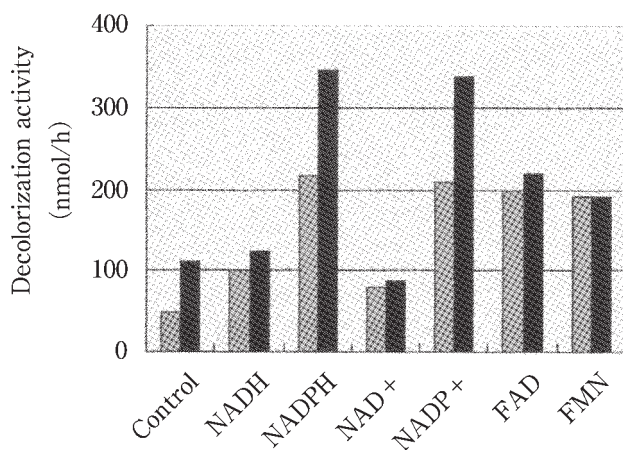


Fig. 6 Effect of the addition of coenzyme and lawsone on decolorization by crude extract of *Candida* sp. MK-1. The reaction mixture contained 200ppm Acid Red 27 and 0.1mM coenzyme with (■) or without 0.1mM lawsone (□).

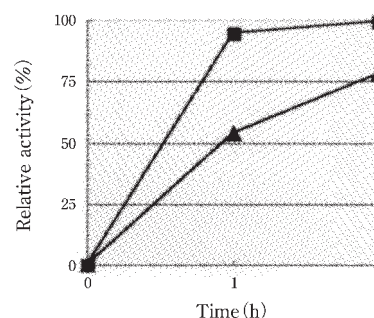


Fig. 8 Effect of the addition of GLDH on the decolorization by *Candida* sp. MK-1 crude extract. (■): decolorization of Acid Red 27 by *Candida* sp. MK-1 crude extract, (▲): decolorization of Acid Red 27 by *Candida* sp. MK-1 crude extract with 3mU/mL GLDH, 0.22 M NH₄Cl, 7.5mM α -ketoglutarate. The reaction was started at 50°C.

A. L-glutamate dehydrogenase (GLDH) reaction



B. L-lactate dehydrogenase (LDH) reaction

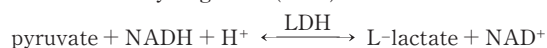


Fig. 7 Enzymatic reaction of GLDH and LDH.



Fig. 9 Proposed mechanism for decolorization reaction of azo dyes by *Candida* sp. MK-1.

謝 辞

本研究を実施するにあたりご支援頂いた岡山県環境科学振興財団に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Chivukula, M. and J. T. Spadaro : Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides, *Biochemistry*, **34**, 7765-7772 (1995)
- 2) Lopes, C., M. T. Moreira, G. Feijoo and J. M. Lema : Dye decolorization by manganese peroxidase in an enzymatic membrane bioreactor, *Biotechnol. Prog.*, **20**, 74-81 (2004)
- 3) Claus, H., G. Faber and H. König : Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 672-678 (2002)
- 4) Blumel, S., H. J. Knackmuss and A. Stolz : Molecular cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF 46F, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3948-3955 (2002)
- 5) Suzuki, Y., T. Yada, A. Ruhul and W. Sugiura : Molecular cloning and characterization of the gene coding for Azoreductase from *Bacillus* sp. OY 1-2 isolated from soil, *J. Biol. Chem.*, **276**, 9059-9065 (2001)
- 6) 稲垣賢二・川口将和・田口隆章・田村 隆・田中英彦 : 染料脱色微生物の探索, 単離及び脱色機構の解析, 岡山大学農学部学術報告, **87**, 47-51 (1998)
- 7) Hayase, N., K. Kouno and K. Ushio : Isolation and characterization of *Aeromonas* sp. B-5 capable of decolorization various dyes, *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 570-573 (2000)
- 8) 早瀬伸樹・河野和子・中川克彦・牛尾一利 : アゾ染料を脱色する *Actinobacillus* sp. B-11株の分離およびその脱色特性, 新居浜工業高等専門学校紀要, **38**, 71-75 (2001)
- 9) Yan, B., J. Zhou, J. Wang, C. Du, H. Hou, Z. Song and Y. Bao : Expression and characteristics of the gene encoding azoreductase from *Rhodobacter sphaeroides* AS 1.1737, *FEMS Microbiol. Letters*, **236**, 129-136 (2004)