

平成23年度 修士論文

白色腐朽菌を利用した染料の生分解

Biodegradation of dyes using
white-rot fungi.

高知工科大学大学院 工学研究科 基盤工学専攻
物質・環境システム工学コース

堀澤研究室 修士2年 1145007 加藤 紘將

1. 概要

白色腐朽菌は木材を白色に腐朽させる担子菌である。白色腐朽菌が木材を腐朽させる過程で分泌するリグニン分解酵素は基質特異性が低いという特徴がある。このためリグニンと部分構造が類似するダイオキシソール類に代表される難分解性化合物の分解が可能である。染料(インジゴ、コンゴレッドなど)もまた難分解性である。本研究では白色腐朽菌を用いて染料を生分解処理することを考えた。これまでの研究で、担体を用いて菌体を固定化することによりリグニン分解酵素の生産性が増加することがわかっている。しかし、白色腐朽菌染料分解は、菌糸への吸着、培養器内の他材料への吸着、pHの変化による分解、物理化学的要因による分解など、菌が生産する分泌するリグニン分解酵素による貢献度にはまだ議論の余地がある。また、生物学的な分解のために物理的処理に比べて処理速度が遅く効率が悪いなどの問題点が挙げられる。そこで本研究は、白色腐朽菌が分泌するリグニン分解酵素を利用し、より効率的な染料の生分解を目的とした。分解対象の染料をレマゾールブリリアントブルーR (RBBR, 0.4 g/l (6.4×10^{-4} M))、クリスタルバイオレット (0.005 g/l (8.8×10^{-6} M))、コンゴレッド (0.1 g/l (1.4×10^{-4} M))、p-(フェニルアゾ)フェノール (0.05 g/l (2.5×10^{-4} M)) の4種類とした。液体培養の際に菌体が空気面への接触の有無での影響を比較検討、菌体外酵素による染料分解の検討、白色腐朽菌の培養の際に培養液上面の面積(気液接触面積)の染料分解に対しての影響の検討、そして、菌体成長後に染料を添加すること、最後に、染料分解後の培養液の分析を行った。

菌体外酵素による染料の分解では、菌体を7日間前培養した培養液を粗酵素液として染料を含む水溶液に毎日1.5mlずつ添加した。菌体の培養の際に気液接触面積の違いによる染料分解では、気液接触面積20 cm²と75 cm²の培養容器を用い、染料を加えた培養液に菌を接種した。そして菌体成長後の染料添加と染料分解後の反応液の分析では、75 cm²の培養容器を用い、菌接種7日後に培養液に染料を無菌的に加えた。すべて25°Cの暗所で静置培養とした。培養液中の染料の測定方法はそれぞれの上澄み液を4倍希釈し、吸光度(RBBR、クリスタルバイオレットが593 nm、コンゴレッドが497 nm、p-(フェニルアゾ)フェノールが390 nm)によって残存染料濃度を測定した。

菌体の培養において空気面に接触させて培養を行ったほうが、接触していないものと比較すると RBBR とクリスタルバイオレットでは前者の条件で染料分解が進んだ。粗酵素液による染料の分解において、カワラタケは RBBR を 90%以上除去した。また、アラゲカワラタケでは約 20%、ヒラタケでは約 60%の除去率だった。クリスタルバイオレットの分解では、カワラタケ、アラゲカワラタケで約 70%、ヒラタケで約 45%の除去率を示した。コンゴレッドの分解では、カワラタケ、ヒラタケで約 40%、アラゲカワラタケで約 30%を示し、白色腐朽菌のリグニン分解酵素によって染料が分解されていることが示唆された。気液接触面積の違いによる白色腐朽菌の培養での RBBR の分解は、カワラタケ、アラゲ

カワラタケの 2 種類で、気液接触面積が大きいほうが 4 日目から除去速度が上がり、最終的な除去率も高いことが分かった。一方クリスタルバイオレットの分解では、最終的な除去率はカワラタケ、アラゲカワラタケの 2 種類では差がなかった。どの供試菌においても気液接触面積の小さい培養器のほうが除去速度が大きかった。菌体成長後の染料添加では、RBBR においてはカワラタケで染料添加から 1 日で約 90%の除去率を示し、すべての菌体で最終的に除去率が 90%を超えた。コンゴレッドでは、カワラタケが約 90%、アラゲカワラタケ、ヒラタケはそれぞれ約 75%の除去率を示した。コンゴレッドは以前の実験で、染料を混合した液体培地での培養では菌が増殖できず死滅したが、菌体の成長後に添加することによって、分解が可能となった。p-(フェニルアゾ)フェノールでは、アラゲカワラタケで約 70%、カワラタケで約 55%、ヒラタケで約 30%の除去率を示し、クリスタルバイオレットでは、すべての供試菌で 90%を超える除去率を示した。染料分解後の培養液の可視紫外吸収スペクトルを測定したところ、すべての染料において最も高いピークが消失した。しかし、RBBR においては 593nm のピークが、分解後では 300nm 付近にシフトし、色も黄色のような色に変化した。リグニン分解酵素によって分解された染料がどこまでの化学構造に分解されているかまだ明らかではないため、今後詳細な分析が必要である。