

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19510096

研究課題名 (和文)

アゾ染料廃水の微生物による完全無毒化処理技術の開発

研究課題名 (英文)

Detoxification of azo dye waste by Microorganisms

研究代表者

早瀬 伸樹 (HAYASE NOBUKI)

新居浜工業高等専門学校・生物応用化学科・教授

研究者番号：00311100

研究成果の概要 (和文)：

アゾ染料の脱色によって生成する芳香族アミン化合物は変異原性等の毒性を有するため、更に完全に無害化する必要がある。そこで、本研究では、微生物及び酵素を用いたアゾ染料の脱色及び完全分解に関する検討を行った。1) アゾ染料であるオレンジⅡのアゾ結合開裂により生成するスルファニル酸を分解する *Bradyrhizobium* sp. No.168 株を分離した。この No.168 株とアゾ染料脱色菌をオレンジⅡに作用させることにより、オレンジⅡが脱色され更にオレンジⅡの脱色により生成するスルファニル酸の消失も確認できた。また、これら微生物を固定化することにより、連続的なオレンジⅡの脱色及びスルファニル酸の処理が可能であった。2) 白色腐朽菌が生産するラッカーゼを用いて、アゾ染料である Bordeaux S の脱色により生じる 4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の分解を確認することができた。また、アルミナに固定化したラッカーゼを用いて、4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の連続分解が可能であった。

研究成果の概要 (英文)：

Most of aromatic amines resulting from the cleavage of azo dyes are potentially carcinogenic. Therefore aromatic amines are should be treated and detoxified completely. The main objective of this study is to observe microbial decolorization and detoxification of azo dyes. 1) *Bradyrhizobium* sp. No.168, which degraded sulfanilic acid resulting from the cleavage of azo bond of Orange II, was isolated. The combination of strain No.168 and azo dyes decolorizing microorganisms decolorized Orange II and degraded sulfanilic acid resulting from the decolorization of Orange II. The continuous decolorization of Orange II and degradation of sulfanilic acid was accomplished by immobilized these microorganisms. 2) 4-amino-1-naphtalenesulfonate resulting from the decolorization of Bordeaux S was degraded by laccase produced from white-rot fungi. The continuous degradation of 4-amino-1-naphtalenesulfonate was accomplished by immobilized laccase on alumina beads.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 2,800,000 | 840,000   | 3,640,000 |
| 2008 年度 | 500,000   | 150,000   | 650,000   |
| 2009 年度 | 400,000   | 120,000   | 520,000   |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野： 応用微生物学

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：アゾ染料、微生物分解、芳香族アミン

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、水溶性アゾ染料の脱色および完全無毒化を目指すものである。染料は、全世界で約 100 万トン生産され、その約半数はアゾ染料によって占められている。これら染料は、人間が生活しているような環境では容易に分解、脱色しないように意図された物質である。非水溶性のアゾ染料は凝集剤等によって比較的容易に除去可能であるが、水溶性のアゾ染料は活性汚泥法等の一般的な水処理法においては、容易に分解脱色されない。自然界においても、環境中に排出された染料は極めて分解しにくく残留性を示す。また、染料による汚染の特性は、染料の濃度は低くても着色の強さは大きく著しい汚濁感を与えるため、臭気、着色等人の感覚に関するアメニティー要素が重要視されるようになってきた。昨今では、染料排水汚染に対する防止対策が求められている。さらに、アゾ染料はその化学構造より、発がん性が指摘され EU 等では使用禁止の動きもでてきている。特に、アゾ染料のアゾ基の還元的開裂により生じる芳香族アミン化合物は難分解性で、その発ガン性や毒性が懸念されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、アゾ染料脱色微生物とアゾ染料の脱色により生成する芳香族アミン化合物を分解する微生物及び酵素を組み合わせることにより、アゾ染料の完全分解及び無毒化処理を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) アゾ染料脱色菌の分離

Bordeaux S と酵母エキスを添加した無機塩培地に、土壌、汚泥、コンポスト等を添加して 30°C で振とう培養を行った。Bordeaux S の脱色が見られた培養区においては、培養液の一部を同じ組成の培地に植え継いで集積培養を行った。その後 Bordeaux S の脱色の認められた集積培養液を、Bordeaux S (100 mg/l) を含む栄養塩寒天培地に植菌し、30°C で培養し、コロニーのまわりに Bordeaux S の脱色によるクリアゾーンを形成したコロニーを分離した。

### (2) 各種芳香族アミン化合物分解菌の分離

一般に広く用いられているアゾ染料のアゾ結合が還元的に開裂して生成する芳香族アミン化合物を推定し、これら芳香族アミン化合物を分解できる微生物を取得するため、芳香族アミンを炭素源とした集積培養法による目的微生物の濃縮を行った後、芳香族ア

ミンを単一炭素源とした寒天培地での分離を行った。その後、分離菌を用いて芳香族アミンの分解特性について検討を行った。

### (3) オレンジⅡ脱色菌とスルファニル酸分解菌混合培養によるアゾ染料完全分解の検討

アゾ染料脱色菌とスルファニル酸分解菌 *Bradyrhizobium* No.168 株の混合培養により、オレンジⅡの脱色及びオレンジⅡの脱色より生成するスルファニル酸の分解を試みた。

### (4) 固定化微生物によるアゾ染料完全分解試験

アルギン酸ゲルにアゾ染料脱色菌 *Aeromonas* sp. B-5 株またはスルファニル酸分解菌 *Bradyrhizobium* No.168 株を包括固定化した。そして、それぞれの固定化菌体を用いて、アゾ染料の脱色またはスルファニル酸の分解能力の検討を行った。その後、それぞれのゲルを充填したカラムに、100mg/l のオレンジⅡを含む人工下水を連続的に流すことにより、オレンジⅡの脱色及びオレンジⅡの脱色により生成するスルファニル酸の分解を観察した。

### (5) アゾ染料の脱色により副生する芳香族アミン化合物の酵素処理方法の検討

4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸をクエン酸緩衝液 (100mM, pH5.0) に溶解し、ラッカーゼによる分解を検討した。また、ラッカーゼをアルミナビーズに固定化し、この固定化酵素を使用して、4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸の連続分解特性について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) アゾ染料脱色菌の分離

100mg/l の Bordeaux S を添加した栄養塩寒天培地上でコロニーのまわりに Bordeaux S の脱色を示すクリアゾーンを形成する MA-1 株を分離した。MA-1 株は、グラム染色陰性の運動性のある桿菌で、グルコース、マルトース等の糖を発酵的に代謝した。また、硝酸、亜硝酸を還元して、ガス状窒素にして放出する脱窒細菌であった。

### (2) 各種芳香族アミン化合物分解菌の分離

4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸、1-アミノ-2-ナフトール、スルファニル酸を単一炭素源として生育する微生物の分離を試みたところ、スルファニル酸を炭素源として生育する No. 168 株を分離できた。No. 168 株の形態、生化学的性質及び rDNA の塩基配列の解析を行ったところ、No. 168 株は *Bradyrhizobium* に属する微生物であると推

察された。No. 168 株をスルファニル酸ナトリウム 1g/l 含む無機塩培地に植菌し、30℃で振とう培養を行い、定期的にスルファニル酸濃度を HPLC により測定した。図 1 に示した様に、培養とともにスルファニル酸濃度の減少が観察され、No. 168 株のスルファニル酸分解能力を確認することができた。

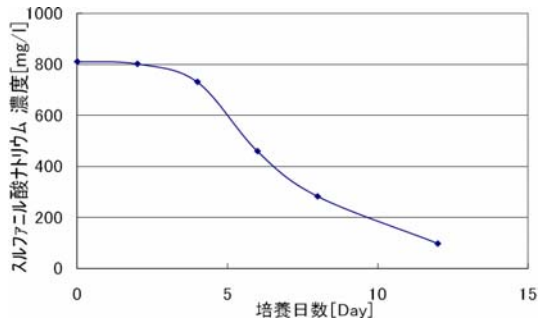
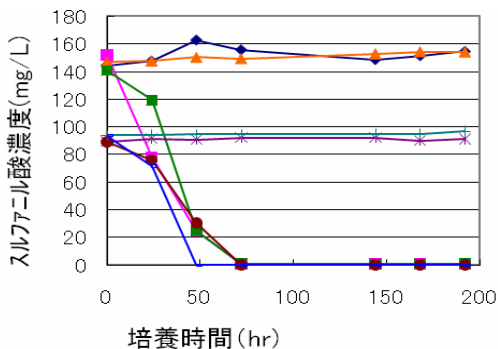


図 1 NO. 168 株によるスルファニル酸の分解

また、図 2 に示したように、検討した全ての条件で No. 168 株はスルファニル酸を分解することが観察された。本結果より、合成下水培地中で No. 168 株を作用させることが可能であり、実際の染料廃水等への適用の可能性が示唆された。



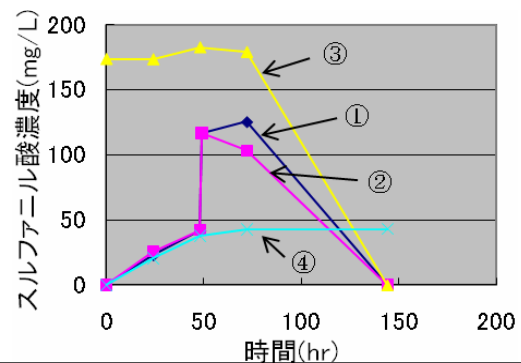
- 人工下水培地(未植菌)
- 人工下水培地(No.168株植菌)
- ▲ 人工下水培地オレンジⅡ含有(未植菌)
- 人工下水培地オレンジⅡ含有(No.168株植菌)
- \* 無機塩培地(未植菌)
- 無機塩培地(No.168株植菌)
- + 無機塩培地オレンジⅡ含有(未植菌)
- 無機塩培地オレンジⅡ含有(No.168株植菌)

図 2 No.168 株によるスルファニル酸分解への培地組成の影響

### (3) オレンジⅡ脱色菌とスルファニル酸分解菌混合培養によるアゾ染料完全分解の検討

図 3 に、No. 168 株によるスルファニル酸の分解状況を示した。No. 168 株を投入した全ての条件①～③において、144 時間が経過した時点でスルファニル酸を完全に分解したことが確認された。本結果より、No. 168 株によるスルファニル酸の分解において、アゾ染料脱色菌 MA-1 株の存在は障害にならないことが明らかになった。これらの結果より、MA-1 株及び No. 168 株を併用し、アゾ染料の脱色及び脱色に伴い生成したスルファニル酸の除去が可能であることが明らかになった。図 3 の条件①・②において、No. 168 株を投入した際にスルファニル酸濃度が上昇している原因は、No. 168 株の培養液中にスルファニル酸が残存していたためと考えられる。

の条件①～③において、144 時間が経過した時点でスルファニル酸を完全に分解したことが確認された。本結果より、No. 168 株によるスルファニル酸の分解において、アゾ染料脱色菌 MA-1 株の存在は障害にならないことが明らかになった。これらの結果より、MA-1 株及び No. 168 株を併用し、アゾ染料の脱色及び脱色に伴い生成したスルファニル酸の除去が可能であることが明らかになった。図 3 の条件①・②において、No. 168 株を投入した際にスルファニル酸濃度が上昇している原因は、No. 168 株の培養液中にスルファニル酸が残存していたためと考えられる。



- ① MA-1 株で脱色後、MA-1 株を取り除かないで No.168 株を投入
- ② MA-1 株で脱色後、MA-1 株を取り除いて No.168 株を投入
- ③ MA-1 株と No.168 株を同時に投入
- ④ MA-1 株で脱色だけ行う

図 3 MA-1 株と No. 168 株によるスルファニル酸の分解

### (4) 固定化微生物によるアゾ染料完全分解試験

アルギン酸ゲルに B-5 株を固定化し、100mg/L の Bordeaux S を添加した合成下水培地（各成分の濃度を増加させた培地、濃度×2、×5、×10）を用いて繰り返し脱色試験を行った結果を図 4 に示した。静置培養で脱色反応を進めていた 3 回目の脱色試験まではすべての培地で 80%を超える高い脱色率を示していた。本結果より、菌体を固定化したゲルによって、繰り返しアゾ染料の脱色を行うことが可能であることが明らかになった。次に、染料及び代謝物の拡散性の向上、菌体増殖速度向上による脱色速度の更なる改善を期待して 4 回目以降は振とう培養に変更した。すると、4 回目からは×1、×2、×5 の濃度の培地において急激な脱色効率の低下が確認された。反応速度が低下した原因として、振とう培養に変更することにより、培地中の溶存酸素濃度が上昇し、培養液が好気条件になってしまった可能性が考えられる。

次に、アルギン酸ゲルに固定化した No. 168 株によるスルファニル酸分解試験の結果を図 5 に示した。時間の経過と共にスルファニ

ル酸濃度の減少が確認されたことから、固定化 No. 168 株によるスルファニル酸の分解が可能であることが明らかになった。

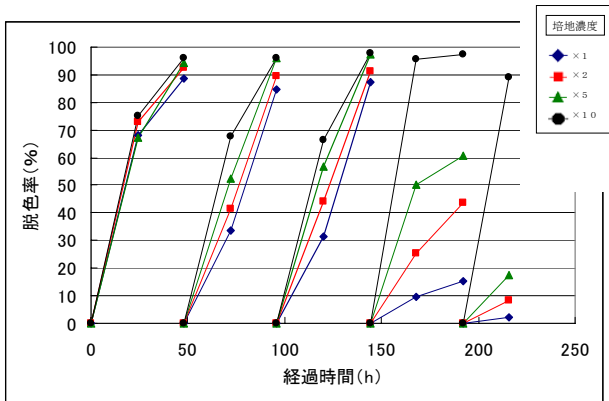


図4 繰り返し脱色試験における Bordeaux S の脱色率

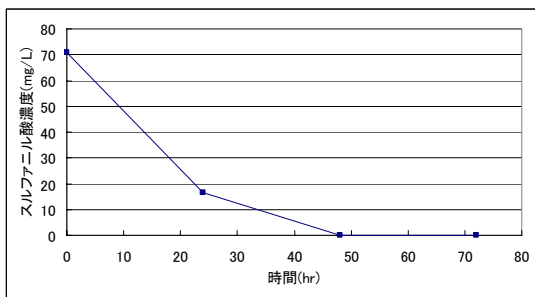


図5 固定化 No. 168 株によるスルファニル酸分解試験

図6にB-5株固定化ゲルによるOrange II脱色試験の結果を示した。脱色が進行するに伴って、スルファニル酸濃度が上昇していることが確認された。図7にB-5株固定化ゲルによるOrange II脱色液におけるNo. 168株固定化ゲルによるスルファニル酸分解試験の結果を示した。このグラフから、アゾ染料の脱色によって生成したスルファニル酸の濃度が時間の経過と共に減少していることが確認された。これらの結果から、アルギン酸カルシウムゲルに固定化したB-5株及びNo168株によるOrange IIの脱色及び脱色に伴い生成するスルファニル酸の除去が可能であることが明らかになった。

図8に連続脱色分解試験におけるOrange IIの脱色率測定結果を示した。このグラフから、実験開始から200時間が経過した時点までの間で80%以上の脱色率が確認できた。この結果より、B-5株固定化ゲルによるOrange IIの連続脱色が可能であることが明らかになった。図9に連続脱色分解試験におけるスルファニル酸の濃度測定結果を示した。このグラフから、No. 168株固定化ゲルを充填した分解槽において、Orange IIの脱色によって生

成したスルファニル酸の分解が進行していることが明らかになった。しかし、実験開始から徐々にスルファニル酸の残留濃度が上昇していることから、No. 168株によるスルファニル酸の分解活性が低下していることが確認された。

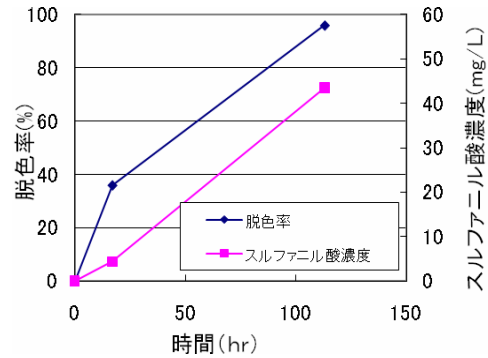


図6 B-5 株固定化ゲルによる Orange II 脱色試験結果

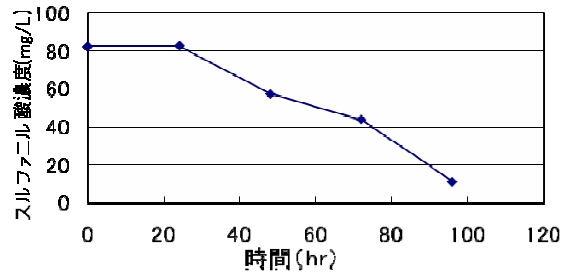


図7 B-5 株固定化ゲルによる脱色液における No.168 株固定化ゲルによるスルファニル酸分解試験結果

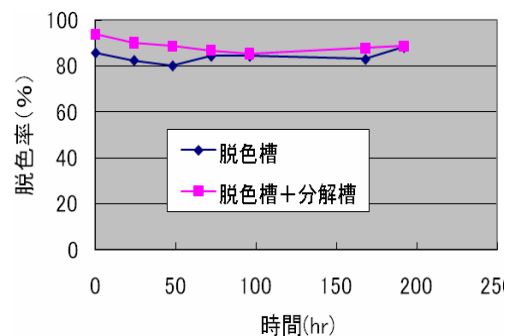


図8 連続脱色分解試験における Orange II 脱色率

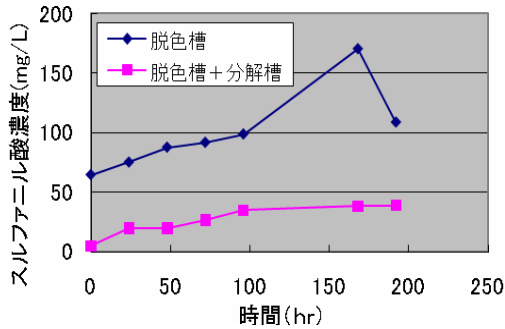


図9 連続脱色分解試験におけるスルファニル酸の分解

### (5) アゾ染料の脱色により副生する芳香族アミン化合物の酵素処理方法の検討

ラッカーゼ (*Trametes* sp. 由来) による分解結果を図10に示した。反応と共に4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の残存濃度が減少し、ラッカーゼによる4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の分解が明らかになった。また、ラッカーゼの濃度を増加させると共に、4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の分解率の上昇が観察された。しかし、48時間後にも完全分解には至らなかった。その原因としては、4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の分解物によるラッカーゼ活性の阻害が考えられる。同様に白色腐朽菌 *Wofliporia* UH-1 株粗酵素を用いた場合でも、反応時間の経過とともに4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸濃度が減少し、UH-1 株粗酵素によって4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の分解が可能であることが明らかになった。

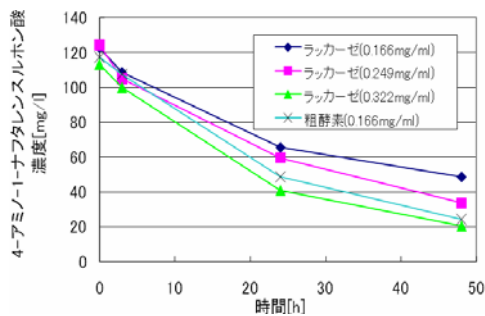


図10 粗酵素(UH-1株)及びラッカーゼ (*Trametes* sp. 由来) による4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の分解結果

固定化ラッカーゼ(アルミナ)による4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の連続分解試験の結果を図11に示した。分解開始から4日間は滞留時間24時間で90%以上の高い除去率を維持することができ、固定化ラッカーゼ

を用いて4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の分解を確認することができた。しかし、その後時間の経過と共に除去率の低下が観察され、最終的には31.9%の除去率にまで低下した。その詳細な原因は不明だが、4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の連続分解試験装置中でpHが変化したか、もしくはラッカーゼ活性を阻害する物質が生成された可能性が示唆されるため、徐々にラッカーゼ活性が失われ除去率の低下に至ったと考えられる。

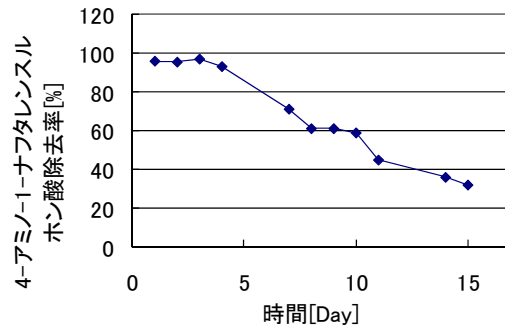


図11 固定化ラッカーゼによる4-アミノ-1-ナフトレンスルホン酸の連続分解試験結果

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 早瀬伸樹、伊藤真希、牛尾一利、中川克彦、脱窒細菌MA-1株による合成染料の脱色、新居浜工業高等専門学校紀要、査読無、44巻、2008、31-36

[学会発表] (計 6 件)

- ① 八木裕悟、牛尾一利、中川克彦、早瀬伸樹、アゾ染料の微生物分解に関する研究 (第2報)、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月30日、東京大学駒場キャンパス
- ② 中川祐登、堤主計、中川克彦、早瀬伸樹、固定化ラッカーゼによる芳香族アミン化合物の分解、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月30日、東京大学駒場キャンパス
- ③ 八木裕悟、山崎 露、牛尾一利、中川克彦、早瀬伸樹、アゾ染料の微生物分解に関する研究、日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月28日、マリンメッセ福岡
- ④ 中川祐登、堤主計、中川克彦、早瀬伸樹、白色腐朽菌が生産する酵素による芳香族アミン化合物の分解、日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月28日、マリンメッセ福岡
- ⑤ 八木裕悟、山崎 露、牛尾一利、中川克彦、早瀬伸樹、微生物によるアゾ染料分解、

第14回高専シンポジウム、2009年1月24日、高知市文化プラザ

- ⑥ 中川祐登、早瀬伸樹、堤 主計、中川克彦、白色腐朽菌が生産する酵素の担体への固定化、第14回高専シンポジウム、2009年1月24日、高知市文化プラザ

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

早瀬 伸樹 (HAYASE NOBUKI)

新居浜工業高等専門学校・生物応用化学科・教授

研究者番号：00311100

### (2) 研究分担者

中川 克彦 (NAKAGAWA KATSUHIKO)

新居浜工業高等専門学校・生物応用化学科・教授

研究者番号：40149977

(H20→H21：連携研究者)

牛尾 一利 (USHIO KAZUTOSHI)

新居浜工業高等専門学校・生物応用化学科・教授

研究者番号：30203508

(H20→H21：連携研究者)