

## M03

## アゾ染料分解菌の分離と分解特性

(和歌山高専)○梶原 克之・中 康之・弓場 拓実・米光 裕\*

**1. 緒言**

アゾ染料は織物、食品、化粧品などに用いられている合成染料であり、現在、世界で年間 70 万トン以上が生産されている。使用後は、オゾン化やフェントン反応、吸着などにより化学的・物理的に分解され廃棄されている。しかし、この方法は危険な副産物の生成や設備費がかかることから、最近、それら問題が少ない微生物を用いた分解方法が注目されている。

本研究では、アゾ染料分解菌の分離と同定を行い、そのアゾ染料分解条件を検討した。

**2. 操作****2.1 培地**

Soy broth 培地を用いた。アゾ染料には赤色の Sumifix Red B (S.R.B と略記) を用いた。

**2.2 アゾ染料分解菌の選抜**

アゾ染料含有寒天培地において、ハローを形成するコロニーをアゾ染料分解菌とした。

**2.3 アゾ染料分解菌の同定**

グラム染色は常法に従い行った。形態観察は光学顕微鏡により行った。同定は、ゲノム DNA を抽出後、16S rDNA を PCR 増幅し、ジデオキシ法により得られた塩基配列を FASTA により日本 DNA データバンクにおける既知のバクテリア遺伝子の塩基配列と相同性検索することにより行った。

**2.4 アゾ染料分解実験**

菌体を液体培地にて前培養後、遠心分離により回収した。この菌体を S.R.B 含有液体培地あるいはリン酸 Na 緩衝液に前培養液の菌体濃度と等倍になるように接種し、各種温度および pH にて振とう培養または静置培養し、S.R.B 残存率および菌濃度を経時的に測定した。S.R.B 残存率は培養液をメタノールで 2 倍希釈し、遠心分離後、上清の  $A_{505}$  を測定することによりアゾ染料濃度を測定した後、算出した。また菌濃度は OD<sub>660</sub> を測定した。

**3. 結果及び考察**

アゾ染料含有寒天培地にハローを形成するコロニー 1 種類を発見した (KJ1 株と命名)。この菌株をグラム染色後、形態観察したところ、グラム陽性の桿菌とわかった。次いで、KJ1 株の 16S rDNA の塩基配列の相同性検索を行ったところ *Rhodococcus yunnanensis* と 99.1% の相同があった。これらより本菌は *Rhodococcus* 属菌であると推定した。

KJ1 株のアゾ染料分解条件として、0.02%S.R.B 含有 Soy broth 培地(pH7.0)にて 30°Cで振とう培養と静

置培養を検討した結果、S.R.B 残存率は静置培養では 3 日目において約 10%で、振とう培養では約 82 %であった。これより、KJ1 株による S.R.B 分解には溶存酸素が低い方が良いとわかった。

次に、0.02% S.R.B 含有リン酸 Na 緩衝液(pH7.0)中で 30°Cにて静置培養したところ、S.R.B 残存率は先の Soy broth 培地の場合と同等であった(図 1)。これより KJ1 株では S.R.B を含まない培地で前培養したときにすでにアゾ染料分解酵素が構成的に発現していることが示唆された。

続いて、0.02%S.R.B 含有リン酸 Na 緩衝液中の S.R.B 分解における至適温度および pH を調べたところ、30°Cで pH6~8 が適していることがわかった(データ省略)。

次に、高 S.R.B 濃度(0.1%, 0.5%)を含む Soy broth 培地およびリン酸 Na 緩衝液(pH7.0)中、30°Cにて静置培養した結果、0.1% S.R.B において、培養 4 日目以降、リン酸 Na 緩衝液中で分解が止まった(図 1)。0.5%においても同様の傾向が見られた。これらよりリン酸 Na 緩衝液中の休止菌体では培養 4 日目より分解酵素が失活するが、Soy broth 培地中の増殖菌体では、分解酵素を発現しつづけるため分解活性が持続することが考えられ、長時間の分解には栄養源の供給が必要とわかった。

現在、HPLC などによる S.R.B 分解産物の同定を行っている。

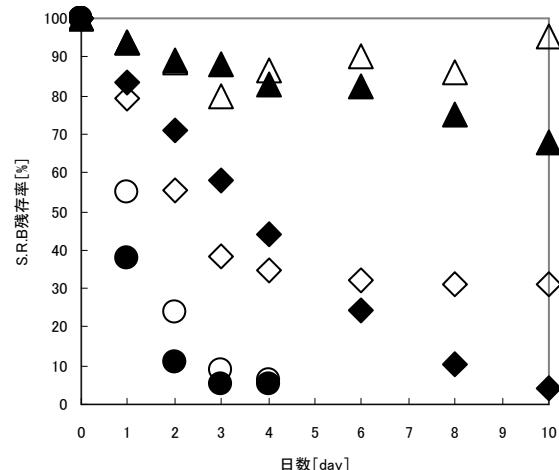


図 1 KJ1 株の静置培養におけるアゾ染料分解条件の検討

- : 0.02 % S.R.B 含有 Soy broth 液体培地
- : 0.02 % S.R.B 含有リン酸 Na 緩衝液
- ◆ : 0.1 % S.R.B 含有 Soy broth 液体培地
- ◇ : 0.1 % S.R.B 含有リン酸 Na 緩衝液
- ▲ : 0.5 % S.R.B 含有 Soy broth 液体培地
- △ : 0.5 % S.R.B 含有リン酸 Na 緩衝液

\*yonemitsu@wakayama-nct.ac.jp