

光合成細菌の細胞外物質による光脱色処理の反応特性評価

The characteristics of decolorization by extracellular material separated from photosynthetic bacteria

0540404 伊藤瑞希 Mizuki ITO

1. 背景と目的

現在、染色工場から排出される染色排水は、凝集沈殿、活性炭による吸着除去、オゾンによる酸化分解などの物理学的処理、化学的処理の方法で処理されているが、処理コストや有害な副産物の生成などの問題がある。そこで、低コストであり、且つ安全な生物学的処理の確立が必要とされている。光合成細菌共存型脱窒汚泥 (photosynthetic bacteria coexisting in denitrifying sludge: PBCDS) から分離された光合成細菌は、可視光照射下において高い脱色能力を持っている¹⁾。

既存の研究において、光合成細菌が体外に分泌する物質 (以下、細胞外物質と呼ぶ) にも反応が引き起こされることがわかっている²⁾。この細胞外物質を利用することができれば、細菌の培養、生息条件を整える必要がなく、様々な条件の下で効率よく染色排水の脱色を行うことができる可能性がある。しかしそのためには、この細胞外物質について反応機構の解明や、反応特性の把握を行う必要がある。

本研究では、細胞外物質による染料の脱色反応の高効率化を目指し、細胞外物質の同定、脱色反応の影響因子の解明を行った。

2. 方法

2-1. 光合成細菌培養と細胞外物質の分離

PBCDS 培養槽から光合成細菌を採取し、植菌して得られたコロニーを 5 個ほど釣菌して液体培地に懸濁させ、再び光照射下及び 37°C 下にて培養を行い、光合成細菌を単離培養した。培養した光合成細菌溶液を孔径 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過して、細胞を除去した濾液を細胞外物質溶液とし、各実験に供した。以下のいずれの実験は 37°C、8,500~10,000 lx の照射下で行った。

2-2. 細胞外物質の同定

a) タンパク質酵素

細胞外物質溶液の脱色反応がタンパク質の働きによるものかを調べるため、Bradford 法を用いてタンパク質の定量を行い、さらに酵素を壊す働きのあるトリプシンを加え、染料 Acid Blue92 (以下 AB92 と略す) の脱色反応を行った。

b) 分子量分画

細胞外物質の分子量範囲を絞り込むため、分画分子量 3,000 のマイクロコン (遠心式濾過ユニット, MILLIPORE 社製) を使用し、分子量 3,000 以下の物質のみを含む溶液を得て、染料 AB92 の脱色反応を行った。

2-3. 細胞外物質による脱色反応の影響因子の解明

a) pH の影響

pH による脱色反応への影響を調べるため、NaOH 溶液 (5 N)、 H_2SO_4 溶液 (0.5 N) を用いて細胞外物質溶液の pH を 2~12 に調整し、染料 AB92、Acid Red88 (AR88)、Acid Black1 (AB1)、Reactive Black5 (RB5) の脱色反応を行った。

b) 温度による影響

温度による脱色反応への影響を調べるため、37°C に加えて 80°C 下において、染料 AB92 の脱色反応を行った。

c) 保存による影響

細胞外物質の劣化性を調べるため、細胞外物質溶液を 10 mL ずつ分取し、暗所で 0~24 週間冷蔵保存 (4°C) した。保存後、各細胞外物質溶液の染料 AB92 の脱色能力を比較した。

d) 熱による影響

細胞外物質の耐熱性を調べるため、細胞外物質溶液 10 mL を 20 分高圧蒸気滅菌 (120°C) し、染料 AB92 の脱色反応を行った。

e) 反応光波長の解明

脱色反応の影響を与える光の波長を調べるため、フィルターを用いて脱色反応の照射光を調整し、染料 AB92 の脱色反応を行った。その結果、800 nm 以上の波長光が主に働いていたため、続いて赤外線ランプを用いて染料 AB92、AB1 の脱色反応を行った。波長 800 nm 以下の光を遮断し、1,800 nm で最大透過率 90% となるガラスフィルターを用いて、脱色反応に影響を与える波長光の絞り込みを行った。また pH を調整し、同様に染料の脱色反応も行った。

3. 結果および考察

3-1. 細胞外物質の同定

a) タンパク質酵素

Bradford 法により、細胞外物質溶液にはアルブミン換算で約 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のタンパク質が含まれることがわかった。しかしトリプシンを加えた溶液でも染料の脱色反応がみられた。このことにより細胞外物質はタンパク質酵素ではないことがわかった。

b) 分子量分画

分画による AB92 の脱色反応を Fig.1 に示す。

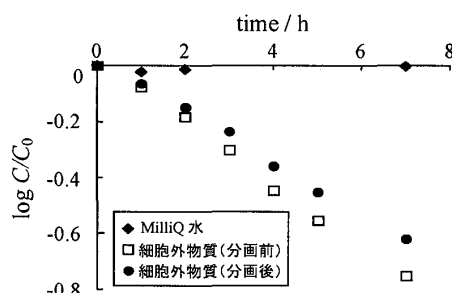


Fig.1 decolorization of AB92

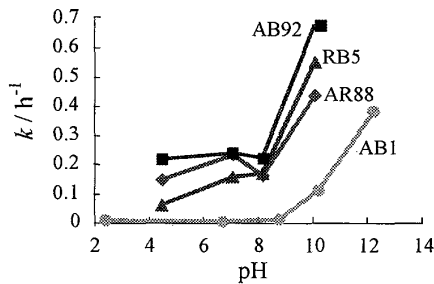
分画して得られた 3,000 以下の溶液と、細胞外物質溶液は変わらない脱色反応を示した。このことにより、細胞外物質は分子量 3,000 以下の低分子であることがわかった。

また細胞外物質による脱色反応は一次反応であることがわかった。以下、一次反応における反応速度係数 k で比較を行うこととした。

3-2. 細胞外物質による脱色反応の影響因子の解明

a) pH の影響

脱色反応の一次反応における反応速度係数 k を Fig.2 に示す。4 種類の染料の脱色反応を行ったが、いずれの染料においても、高 pH において脱色反応効率が低いことがわかった。また、pH8~9 付近において閾値が存在することがわかった。

Fig.2 influence of pH on rate constant k

また対照実験として細胞外物質を含まない GM 培地のみの溶液を、pH 10.1 に調整し同様の実験を行ったが、24 h で脱色率 15 %程度になり、細胞外物質を含むものに比べて効率が非常に低いことから、細胞外物質の影響を受けて染料の脱色反応が起こっていることが明らかであった。

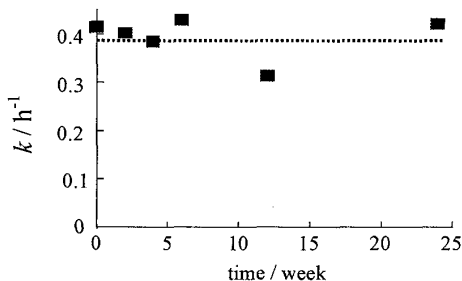
光脱色反応の pH 依存性の傾向はどの染料にも見られるので、pH による染料物質の解離状態の違いが関与しているのではないかと考えられる。

b) 温度による影響

37°Cと比較すると、80°Cの方が一次反応における反応速度係数 k が大きいことがわかった。しかし、温度上昇に伴う反応速度係数の増大は、Arrhenius 型と一致せず、一般的な微生物反応における活性化エネルギー60.3 kJ/mol とは大きく離れた、8.5 kJ/mol となり、本研究における脱色反応は非常に速いことがわかった³⁾。

c) 保存による影響

脱色反応の一次反応における反応速度係数 k を Fig.3 に示す。

Fig.3 stability of rate constant k

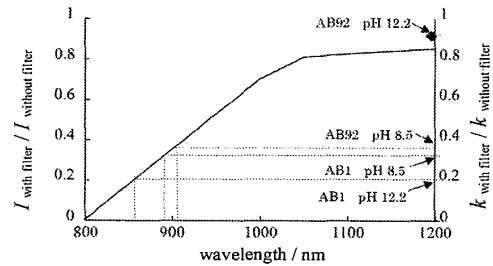
0~24 週冷蔵保存を行ったが、染料の脱色反応に差が見られなかった。このことにより、細胞外物質は冷蔵保存により半年間の長期保存が可能であることがわかった。

d) 熱による影響

120°Cの高圧蒸気滅菌を行ったが、行っていないものと脱色反応に差が見られなかった。このことにより、細胞外物質は耐熱性があることがわかった。一般的なタンパク酵素は 120°C で変性が起こることより、このことから細胞外物質はタンパク酵素ではないと言える。

e) 反応光波長の解明

赤外線ランプを用いた染料 2 種の脱色反応は、いずれの染料も高 pH において脱色速度の上昇がみられた。またフィルターの有無により、反応速度に差が見られた。各脱色反応の一次反応速度係数 k のフィルターの有無による比と、波長毎のフィルターの透過率より算定される照射強度 I の比率を Fig.4 に示す。

Fig.4 ratio of light intensity I and rate constant k with/without filter

AB92 の pH 12.2 のフィルターの有無による比以外の 3 つの比は、近い値となり、850~900 nm における算定照射強度 I の比率と一致する。このことから、細胞外物質の脱色反応に影響を与える光は、850~900 nm の光と考えられる。また AB92 の pH 12.2 における値が範囲から外れてしまった要因としては、AB92 は高 pH 下では AB92 の化学構造が変化して、変色を示したことが考えられる。

光合成細菌の色素成分は、細菌の属性から考えてバクテリアクロロフィル a と考えられる。バクテリアクロロフィル a は、吸光ピークを 830~890 nm に持ち、分子量 812.5 であることがわかっており、本研究の実験結果より、反応主体の有力な候補の一つとして考えられる。また、バクテリアクロロフィル a の含有量は、細菌を培養する際の照射強度と酸素量に依存することがわかっている⁴⁾。本研究において、反応速度に差がみられたのは、照射強度と酸素量の因子を持つバクテリアクロロフィル a の生成量から生じたものと考えられる。

4.まとめ

染料の脱色反応能力を持つ細胞外物質は、タンパク酵素ではないこと、また分子量は 3,000 以下であること、耐熱性であること、冷蔵保存によって劣化しないことがわかった。

細胞外物質による脱色反応は、pH が高く、反応温度が高いほど反応速度の上昇がみられた。

脱色反応を引き起こす光は、波長 850~900 nm の光であることがわかった。このことから、細胞外物質は、光合成細菌の色素成分であるバクテリアクロロフィル a である可能性が高いことがわかった。

【参考文献】

- 1) 古川憲治, 黒木征一郎, 中岡元信: 光依存性脱色条件下での染料の微生物分解, 用水と廃水, Vol.40, No.9, pp.775-780, 1998.
- 2) Jinglan Hong, Hiroko Emori, Masahiro Otaki: Photodecolorization of Azo Dyes by Extracellular Metabolites under Fluorescent Light and Influence of Operational Parameters, JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, Vol.100, No.2, pp.192-196, 2005.
- 3) 北尾高嶺: 生物学的排水処理工学, コロナ社, pp.15-36, 2003.
- 4) 北村博, 森田茂廣, 山下仁平: 光合成細菌, 学術出版センター, 1984.

【発表状況】

- 生活工学研究,7(2),168-169,2005.
 生活工学研究,8(1),106-107,2006.
 生活工学研究,8(1),108-109,2006.
 生活工学研究,8(2),196-197,2006.
 第 43 回環境工学研究フォーラム講演集,77-79,2006.

(指導教官 大瀧雅寛)