白色腐朽菌によるアントラキノン系染料の脱色と それに関与する酵素

西 田 友 昭* 堤 祐 司*
毛 見 誠* 羽 田 崇* 岡 村 秀 雄**

Decolorization of Anthraquinone Dyes by White-Rot Fungi and Its Related Enzymes

Tomoaki NISHIDA*, Yuji TSUTSUMI*,
Makoto KEMI*, Takashi HANEDA* and Hideo OKAMURA**

* Faculty of Agriculture, Shizuoka University, 836, Ohya, Shizuoka 422-8529 Japan

** Research Institute for Bioresources, Okayama University, 2-20-1, Chuo, Kurashiki, Okayama 710-0046 Japan

Abstract

Decolorization of an anthraquinone dye (Mitui Nylon Fast Sky Blue B, SBB) by white-rot fungi, *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*, was investigated in a low-nitrogen and high-carbon liquid culture. Over 90% of the dye was decolorized after the 12h-incubation with *T. versicolor*. On the contrary, the decolorization by *P. chrysosporium* occurred mainly due to biological adsorption of the dye. The production of ligninolytic enzymes, laccase and manganese peroxidase (MnP), was observed during decolorization by *T. versicolor*, suggesting that the decolorization of SBB is related to ligninolytic activity of white-rot fungi. Four kinds of anthraquinone dyes were treated with partially purified laccase and MnP. Decolorization of each dye by laccase was reached to more than 80%, but two dyes were not decolorized by MnP at all. These results demonstrate that laccase is the most important enzyme in decolorization and degradation of anthraquinone dyes by white-rot fungi. Toxicities of SBB before and after laccase treatment were evaluated by algal growth inhibition test using *Selenastrum capricornutum*. Although the dye itself showed toxicity at low concentration ($2.4\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ as ErC_{50}), the dye treated with laccase was found to be nontoxic. These findings indicate that the treatment of anthraquinone dyes with laccase is effective in decolorization and detoxification of the dyes.

Key words: anthraquinone dye, white-rot fungi, laccase, decolorization, toxicity,

1. はじめに

近年、染料を含有する染色排水による環境水への着色汚染や水圏生態系への影響が懸念されており¹⁾、これらへの対策が望まれている。現在のところ、染色排水は主として活性汚泥や凝集沈殿法によって処理されており、その他に活性炭吸着、電気分解および紫外線照射等の物理処理、過酸化水素やオゾンを用いる化学処理が試みられている^{2,3)}。一方、生物処理という観点から、染料を効率的に脱色しうる微生物の探索が行われており、*Bacillus subtilis*⁴⁾や *Proteus*⁵⁾、*Streptococcus*^{6,7)}および *Clostridium* 属細菌^{8,9)}がアゾ系染料を、*Geotrichum candidum*¹⁰⁾がアントラキノンおよびアゾ系染料を脱色しうると報告されている。さらに、近年、リグニン分解能を有する白色腐朽菌をバイオレメディエーションに応用し

ようとする種々の試み¹¹⁻¹⁷⁾がなされており、*Phanerochaete chrysosporium* によるアゾ系染料の脱色が明らかにされている¹⁸⁻²⁰⁾。また、カワラタケ (*Trametes* (旧名: *Coriolus) versicolor*) がアントラキノン系染料 (1,4-dihydroxyanthraquinone: violet 12) を脱色しうるとする報告²¹⁾もあり、本染料はフタル酸さらには安息香酸を経由して酸化的に分解されることが示されている。しかしながら、その分解に関与する酵素の特定はなされていないため、本研究では既知の代表的な白色腐朽菌であるカワラタケおよび *P. chrysosporium* を用いてアントラキノン系染料の処理を試み、脱色 (分解) に関与する酵素系の解明を行うこととした。

一方、有害化学物質で汚染された環境をバイオレメディエーションによって浄化・修復する過程では、目的とする化学物質の分解が最も重要な要因となるが、分解

* 静岡大学農学部 〒422-8529 静岡市大谷836

** 岡山大学資源生物科学研究所 〒710-0046 倉敷市中央 2-20-1

に伴って残留性の高い分解産物が生成することや、生成した分解産物の毒性が親化合物よりも強いこと、あるいは親化合物にない毒性を発現することなどが危惧される。近年、有害化学物質を含む排水の処理（浄化）効果を評価するためにバイオアッセイが活用されており、海産発光細菌²²⁾、藻類²³⁾、甲殻類²⁴⁾、魚類²⁵⁾などを用いた評価がなされている。そこで、本研究では酵素（ラッカーゼ）で脱色処理したアントラキノン系染料排水を環境に放出することを想定し、ラッカーゼ処理前後における染料の毒性を藻類を用いたバイオアッセイにより評価した。

2. 実験材料および方法

2.1 供試菌株

カワラタケ (*T. versicolor*) IFO 7043および *P. chrysosporium* ME-446を用いた。

2.2 供試染料

三井東圧染料(株)製の Mitui Nylon Fast Sky Blue B (SBB; C. I. Acid Blue 78, Fig. 1) および Mitui Acid Milling Sky Blue FSE (C. I. Acid Blue 112), 日本化薬(株)製の Kayanol Milling Violet FBW (C. I. Acid Violet 48) および Kayanol Milling Blue 2RW (C. I. Acid Blue 140) を用いた。

Fig. 1 Chemical structure of SBB.

Table 1 Composition of LN-HC culture medium

Ammonium tartrate (g)	0.2
Glucose (g)	20.0
KH ₂ PO ₄ (g)	1.0
NaH ₂ PO ₄ (g)	0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g)	0.5
Dimethyl succinate (g)	1.46
Thiamine hydrochloride (μg)	100
CaCl ₂ (μg)	100
FeSO ₄ ·7H ₂ O (μg)	100
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (μg)	10
CuSO ₄ ·H ₂ O (μg)	20
MnSO ₄ ·7H ₂ O (μg)	10
Distilled water (ℓ)	1.0

2.3 白色腐朽菌によるアントラキノン系染料の脱色

供試菌株をポテト・デキストロース・寒天培地に接種し、30°Cで5日間培養した。培養後、菌糸の外縁付近をコルクボーラー（直径7 mm）で打ち抜き、10個のディスクを50mlのPMY培地（グルコース30g・l⁻¹、ペプトン10g・l⁻¹、麦芽エキス10g・l⁻¹、酵母エキス4g・l⁻¹）に加え、30秒間ホモジナイズした。次いで、これを150mlのPMY培地を含む500ml容三角フラスコに加え、30°C、200rpmで4日間振盪培養した。培養液を30秒間ホモジナイズした後、50mlを150mlのPMY培地を含む500ml容三角フラスコに加え、30°C、200rpmで3日間振盪培養した。

500ml容三角フラスコに、Table 1に示す組成の低窒素—高炭素含有（LN-HC）培地250mlと Mitui Nylon Fast Sky Blue B (SBB) 19mgを加え、これにPMY培地で3日間培養した前培養菌体（カワラタケ：0.05g, *P. chrysosporium*：0.1g）を接種し、30°C、200rpmで振盪培養した。

所定時間ごとに培養液を採取し、遠心分離後の上澄み液の吸光度を分光光度計で測定した。その際、SBBの極大吸収波長である592nmで吸光度を測定し、吸光度の減少からSBBの脱色率を算出した。

なお、吸光度減少がSBBの菌体への吸着による可能性もあることから、NaN₃無添加あるいは添加系でカワラタケによるSBB処理を行った。NaN₃無添加系では、SBB 19mgを含有する250mlのLN-HC培地にカワラタケの前培養菌体0.05gを接種し、30°Cで1時間培養した。その後、一定量の培養液を採取して吸光度を測定し、吸光度減少分に相当するSBBを新たに添加して初期の吸光度に戻し、さらに1時間培養するという操作を繰り返した。なお、この操作を繰り返して12時間培養すると菌体量は0.13gになった。よって、NaN₃添加系では、菌体の増殖を阻害するNaN₃（0.017%）を添加したSBB含有LN-HC培地にカワラタケ前培養菌体0.13gを接種して、NaN₃無添加系と同様の操作を行った。

2.4 酸化系酵素活性の測定

所定時間ごとに培養液を採取してホモジナイズした後、各種基質溶液を添加して酸化系酵素の活性を測定した²⁶⁾。

ラッカーゼ活性は、1 mM 2,6-dimethoxyphenolを含有する50mM マロン酸緩衝液（pH4.5）にホモジナイズした培養液を加え、37°Cでインキュベートした後、470 nmにおける吸光度増加から算出した。マンガンペルオキシダーゼ（MnP）活性は、1 mM 2,6-dimethoxyphenol および0.1mM 硫酸マンガンを含む50mM マロン酸緩衝液（pH4.5）に培養液と0.1mM 過酸化水素を加え、37°Cでインキュベートした後、470nmにおける吸光度増加を測定し、ラッカーゼによる吸光度上昇を差し引いて算出した。リグニンペルオキシダーゼ（LiP）活性は、10mM ベラトリルアルコールを含む20mM コハク酸緩衝液（pH3.0）に培養液および0.1mM 過酸化水素を加え、37°Cでインキュベートした後、310nmにおける吸光度増加から算出した。

この際、1分間に吸光度を0.1増加させる酵素量を1 unitとし、酵素活性は培養液1 mlに対する unit (unit・ml⁻¹) で表示した。

2.5 ラッカーゼおよび MnP の部分精製

PMY 培地で前培養したカワラタケを、グルコース $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、ペプトン $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $1.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 、塩酸チアミン $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ $16 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ から成る培地 (pH5.0) に接種し、 28°C 、150rpm で 8 日間振盪培養した後、遠心分離 ($10,000 \text{ rpm}$) によって菌体と培養濾液に分画した。培養濾液を 90% 飽和硫酸アンモニウムで塩析し、沈殿部を 50mM トリス・塩酸緩衝液 (pH7.0) に溶解した後、同一緩衝液で透析し、限外濾過 (分子量 $10,000$ カット) により約 100 倍に濃縮した。次いで、セファクリル S-200 を用いるゲル濾過を行い、ラッカーゼ活性を示す画分 (分子量 $63,000$) を回収して、部分精製ラッカーゼを得た。

MnP については、PMY 培地で前培養したカワラタケを 2.5mM ベラトリルアルコール、 $200 \mu\text{M}$ MnSO_4 、0.05% Tween 80 を含有する LN-HC 培地²⁷⁾ で 3 日間振盪培養 (30°C 、200rpm) し、前報^{27,28)} に従って部分精製した。

2.6 部分精製ラッカーゼおよび MnP によるアントラキノン系染料の脱色

2,6-dimethoxyphenol を基質として 100unit に相当するラッカーゼおよび MnP を用いて SBB の処理を行った。ラッカーゼ 100unit を含む 50mM マロン酸緩衝液 (pH4.5) 100ml に SBB を 7.5mg 加え、 37°C 、130rpm でラッカーゼ処理を 200 分間行った。また、MnP 100unit、 MnSO_4 $50 \mu\text{M}$ 、過酸化水素供給のためのグルコースおよびグルコースオキシダーゼをそれぞれ 25mM および 2 unit 含む 50mM マロン酸緩衝液 (pH4.5) 100ml に SBB を 7.5mg 加え、ラッカーゼ処理に準じて MnP 処理を行った。

なお、2.2 に示す SBB 以外のアントラキノン系染料 3 種についてもラッカーゼおよび MnP 処理を行い、それぞれの染料の極大吸収波長における吸光度の減少から脱色率を算出した。

2.7 酵素処理によって得られた SBB 分解産物の HPLC 分析

2.6 に準じてラッカーゼおよび MnP を用いる SBB 処理を行い、約 90% の脱色率が得られた処理液 20ml を SEP-PAK C18 カートリッジ (Waters 製) に通過させ、SBB の分解産物および残存する SBB を吸着させた。次いで、30% メタノール溶液 30ml で分解産物を脱着させ、HPLC 分析に供した。なお、カラムには Wakosil-II 5C18AR ($\phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$) を用い、水で 10 分間溶出させた後、メタノールによるリニアグラディエントによって 40 分間をかけてメタノール比率を 60% にした。次いで、60% メタノール比率で 20 分間保持した。流速は $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ とし、検出波長は 280nm とした。

2.8 SBB および分解産物の毒性試験

2.7 に準じてラッカーゼを用いる SBB 処理を行い、約 90% の脱色率が得られた処理液 20ml ずつを 2 本の SEP-PAK C18 カートリッジに吸着させた。カートリッジには残存する SBB と SBB の分解産物が吸着されており、別途行った実験から残存 SBB は 70% 以上のメタノール溶液でのみ脱着され、SBB 分解産物は 30% メタノール溶液で完全に脱着されることが明らかとなった。よって、1 本のカートリッジについては、100% メタノール溶液を

用いて SBB 分解産物と残存 SBB を同時に脱着させ、これを 100% メタノール画分とした。また、他方のカートリッジについては、30% メタノール溶液を用いて分解産物のみを脱着させ、これを 30% メタノール画分とした。

100% および 30% メタノール画分を減圧乾固して得た 2 種の試料と SBB を秤量し、それぞれを超純水に溶解して $1,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ とした。これらをメンブランフィルター (孔径 $0.2 \mu\text{m}$) で濾過し、藻類に対する影響を評価した。

藻類増殖阻害試験には淡水産緑藻 *Selenastrum capricornutum* Printz (NIES 35) を用い、ISO の試験法²⁹⁾ に従って毒性試験を行った。試験開始時の藻類濃度を $1 \times 10^4 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、試料の最終濃度を 1.25, 2.5, 5, 10, $20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ として、 25°C の恒温器内に静置し、下部から白色蛍光灯による連続照明下で試験を行った。1 濃度につき 3 回の繰り返し実験を行い、72 時間後まで 24 時間ごとに細胞濃度を測定して増殖曲線の傾きを算出した。藻類細胞濃度は血球計測器 (セルタック MEK-4300, 日本光電) を用いて測定した。対照区に対する阻害率を算出し、得られた回帰直線から 50% 影響濃度 (ErC_{50}) を求めた。

3. 結果および考察

3.1 白色腐朽菌によるアントラキノン系染料の脱色

SBB のカワラタケ処理では、SBB を含有する培養液が濃青色から微褐色へと変化し、培養開始 3 および 12 時間後にそれぞれ約 50 および 93% の吸光度減少 (脱色率) が得られた。これに対して、*P. chrysosporium* 処理では目視による培養液の色調変化は観察されず、脱色率は全培養期間を通して約 40% にとどまった (Fig. 2)。しかしながら、両菌株の前培養菌体を SBB 含有培養液に接種すると菌体が瞬時に青く染まり、吸光度減少には SBB の菌体への吸着も関与していることが示唆された。そこで、菌体の呼吸鎖における電子伝達系および酸化還元系酵素を阻害する NaN_3 を添加した系でカワラタケによる SBB 処理を行い、吸光度の変化を NaN_3 無添加系の場合と比較した。

Fig. 2 Reduction of absorbance of SBB during treatment with white-rot fungi.

Fig. 3 Changes in absorbance of SBB during fed-batch culture with *T. versicolor* under conditions with and without addition of NaN_3 .

NaN_3 添加系の培養では、菌体の細胞壁を物理的に破壊することなく菌体を死滅させることから、添加系におけるSBBの吸光度減少は主として菌体への吸着によって生じると考えられる。Fig. 3に示すように、培養開始1時間後に大幅な吸光度減少が認められたことから、菌体へのSBBの吸着が確認された。そこで、吸光度減少分に相当するSBBを新たに添加して初期の吸光度に戻し、さらに1時間培養するという操作を繰り返した結果、次第に吸光度の減少が少なくなり、4時間以降は吸光度の変化が認められなくなった。よって、 NaN_3 添加系では菌体への吸着が生じ、その吸着は4時間でほぼ一定に達するものと判断された。

一方、 NaN_3 無添加系においても、1時間の培養で吸光度は大きく減少したことから菌体への吸着が考えられたが、SBBを1時間毎に添加しても全培養期間を通して吸光度の減少が認められた。なお、12時間培養後の菌体量は、0.05gから0.13gに増殖していたことから、これに伴って吸着による連続的な吸光度減少を示したことが懸念された。しかしながら、 NaN_3 添加系における初期菌体接種量を0.13g(NaN_3 無添加系における12時間培養後の菌体量に相当)に設定したことから、菌体への吸着程度が両者の系で大きく異なるとは考え難く、 NaN_3 無添加系では菌体への吸着はあるものの、構造変化を伴う脱色

が生じているものと判断された。

*P. chrysosporium*を用いて同様の実験を行ったが、 NaN_3 添加系および無添加系ともに3時間以降には吸光度の減少が認められなかったことから、本菌株処理では主として菌体へのSBBの吸着が起こっているものと判断された。

3.2 アントラキノン系染料の脱色に関する酵素

リグニンは白色腐朽菌によって酸化的に分解され、その分解にはラッカーゼ、MnPおよびLiPなどの酵素が関与するとされている^{23,30-34}。そこで、SBBの脱色に関する酵素系を解明する目的で、カワラタケおよび*P. chrysosporium*でSBBを処理した際に産生される酵素の活性を測定した。

SBBの脱色能に優れていたカワラタケの場合、全培養期間を通してLiPの産生は認められなかった。一方、ラッカーゼ活性は培養3時間後から検出され、12時間後まで直線的に増加し、その後減少した。MnP活性は6時間後から検出され、ラッカーゼ活性が減少する12時間以降に増加を示した(Fig. 4)。なお、SBBの菌体への吸着

Fig. 4 Relationship between enzyme activity and absorbance of SBB during treatment with *T. versicolor*.

Fig. 5 Decolorization of SBB by treatment with laccase and MnP.

Table 2 Decolorization of anthraquinone dyes by treatment with laccase and MnP for 200min

Dye	Wavelength (nm)	Decolorization (%)	
		Laccase	MnP
Kayanol Milling Violet FBW	591	92	0
Kayanol Milling Blue 2RW	620	80	0
Mitui Milling Sky Blue FSE	634	96	85
Mitui Nylon Fast Sky Blue B (SBB)	592	87	89

が主として生じていると判断された *P. chrysosporium* については、これらの酵素の産生は認められなかった。*P. chrysosporium* は、一般に窒素源を制限した培養条件下において LiP および MnP を産生するとされているが、本研究においては培養期間が12時間と短かったため酵素の産生には至らなかったものと考えられる。

以上のように、SBB の脱色にはラッカーゼおよび MnP が関与している可能性が示唆されたことから、部分精製したラッカーゼおよび MnP を用いて SBB の処理を行い、両酵素によって SBB が脱色されるのかを検討した。その結果、各酵素を用いた処理 (200分) によって約90%の脱色率が得られ (Fig. 5 および Table 2)、ラッカーゼおよび MnP が SBB の脱色に関与することが確認された。一方、SBB 以外のアントラキノン系染料3種をこれらの酵素で処理すると、ラッカーゼ処理では供試した全ての染料で80%以上の脱色が認められた。これに対して、MnP 処理では2種の染料が脱色されなかったことから (Table 2)、アントラキノン系染料の脱色にはラッカーゼがより重要な役割を果たしていると判断された。なお、*P. chrysosporium* によるアゾ系染料の脱色には、LiP および MnP といったペルオキシダーゼ系の酵素が関与するとされているが¹⁸⁻²⁰⁾、ラッカーゼが関与するという報告例はない。上述のように、アントラキノン系染料の脱色にはラッカーゼが関与していたが、ラッカーゼ処理はペルオキシダーゼ処理の場合のように過酸化水素を添加する必要がないという利点がある。さらに、MnP 処理においては、MnP 触媒サイクルで Mn(II) から生成してくる Mn(III) が基質を酸化するため^{35,36)}、酵素反応時に MnSO_4 の添加を必要とするが、ラッカーゼ処理では MnSO_4 添加の必要もない。これらのことから、染料の脱色に供するにはラッカーゼの方がペルオキシダーゼ系酵素よりも実用的な酵素と判断され、本研究において4種類のアントラキノン系染料がラッカーゼ処理で脱色されることを確認した。今後、種々のアントラキノン系染料の脱色にラッカーゼ処理を適用しうる可能性が期待される。

3.3 酵素処理によって得られた SBB 分解産物の HPLC 分析

P. chrysosporium によるアゾ系染料の脱色には LiP および MnP が関与し、その脱色機構は酵素によって異なることが指摘されている¹⁸⁾。そこで、ラッカーゼおよび MnP で SBB を処理し、それぞれ約90%の脱色が認められた処理液を HPLC 分析に供して分解産物の比較を行った。Fig. 6 に示すように、両酵素の処理液は比較的に類似したクロマトグラムを与え、多種の分解産物に由来すると考えられるピーク群が保持時間60分付近に観察さ

Fig. 6 HPLC analyses of SBB treated with and without enzyme.

れた。なお、カワラタケ (生菌) による1,4-dihydroxyanthraquinone の分解過程ではフタル酸および安息香酸の生成が報告²¹⁾されているが、本研究に供した SBB は、Fig. 1 に示すようにアントラキノン骨格にアミノ基、臭素基および *N*-フェニルアミノ基を有している。このことから、SBB においては酵素による酸化的な分解反応が複数の位置で起こり、多種の分解産物を与えたものと考えられる。

3.4 SBB および分解産物の藻類増殖阻害

S. capricornutum を用いた藻類増殖阻害試験では SBB の毒性が顕著に認められ、 ErC_{50} は $2.4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と算出された (Fig. 7)。一方、ラッカーゼ処理を行った試料については藻類増殖に対する阻害がほとんど認められず、分解産物のみを含む30%メタノール画分は対照区と同様の増殖を示し、有意な阻害は認められなかった。また、分解産物と残存 SBB とを含む100%メタノール画分は、 $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 以下では有意な阻害が認められず、高濃度 ($20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) で20%程度の阻害が認められた。100%メタノール画分が高濃度で阻害を示した理由は、ラッカーゼ

Fig. 7 Inhibitory effect of SBB and its degradation products on the growth of *S. capricornutum*.

処理液中に残存するSBBによるものと推察される。以上の結果は、SBBをラッカーゼ処理しても藻類に対して毒性を及ぼす分解産物は生成しないことを示しており、ラッカーゼ処理によるSBBの脱色を実用化する上での重要な知見となった。

4. ま と め

既知の代表的な白色腐朽菌（カワラタケおよび *P. chrysosporium*）を用いて4種類のアントラキノン系染料の脱色について検討した。

供試した2菌株の内、カワラタケを用いた処理ではSBBの高度な脱色が観察され、12時間の培養で592nm（SBBの極大吸収波長）における吸光度が約93%減少した。しかしながら、菌体への吸着による吸光度の減少も認められたため、SBBを1時間おきに添加する流加培養を行い、吸光度減少に菌体への吸着がどの程度関与しているのかを検討した。その結果、菌体への吸着はほぼ3～4時間の処理で飽和に達し、これ以降の処理においてはSBBの吸光度減少、すなわち脱色が起きていることが確認され、このことはHPLC分析の結果からも支持された。一方、*P. chrysosporium*を用いた場合には、菌体への吸着による吸光度減少が培養3時間までに見られたものの、これ以降は吸光度の変化がなく、主として吸着のみが生じていると判断された。

脱色能に優れているカワラタケを用いてSBBを処理し、脱色時に産生される酸化系酵素の活性を測定した。その結果、LiP活性は検出されなかったものの、ラッカーゼおよびMnPの産生が認められ、SBBの脱色にはラッカーゼあるいはMnPの関与が示唆された。そこで、カワラタケ由来の部分精製ラッカーゼおよびMnPを調製してSBBをはじめとするアントラキノン系染料4種を処理したところ、ラッカーゼ処理ではいずれの染料でも高度な脱色が観察された。しかしながら、MnPは2種の染料を脱色できなかったことから、アントラキノン系染料の脱色にはラッカーゼがより重要な役割を果たしているものと判断された。なお、SBBは藻類の増殖に対して低濃度で阻害を示したが、ラッカーゼ処理によって得られたSBB分解産物は阻害を示さなかった。以上のことから、ラッカーゼ処理によって二次的な毒性の発現を伴う

ことなくSBBを効率的に脱色しうることが明らかとなった。

謝 辞

アントラキノン系染料を恵与いただいた東レ株式会社に謝意を表します。

（原稿受付 1998年8月27日）

（原稿受理 1999年1月8日）

参 考 文 献

- 1) 東国茂 (1997) 染料含有排水の水環境への影響, 水環境学会誌, **20**, 210-214.
- 2) 寺島泰, 尾崎博明 (1992) アゾ系染料の微生物による分解, *BIO INDUSTRY*, **9**, 239-246.
- 3) 海賀信好 (1997) 染料含有排水における脱色技術の動向, 水環境学会誌, **20**, 218-223.
- 4) Horitsu, H., Takada, M., Idaka, E., Tomoyeda, M. and Ogawa, T. (1997) Degradation of *p*-aminobenzene by *Bacillus subtilis*, *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **4**, 217-224.
- 5) Roxon, J. J., Ryan, A. J. and Wright, S. E. (1996) Reduction of tartrazine by a *Proteus* species isolated from rats, *Food Cosmet. Toxicol.*, **4**, 419-426.
- 6) Scheline, R. R. and Longberg, B. (1965) The absorption, metabolism, and excretion of the sulphonated azo dye, acid yellow, by rats, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **23**, 1-14.
- 7) Scheline, R. R., Nygaard, R. T. and Longberg, B. (1970) Enzymatic reduction of the azo dye, acid yellow, by extracts of *Streptococcus faecalis* isolated from rat intestine, *Food Cosmet. Toxicol.*, **8**, 55-58.
- 8) Brown, J. P. (1981) Reduction of polymeric azo and nitro dyes by intestinal bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 1283-1286.
- 9) Rafii, F., Franklin, W. and Cerniglia, C. E. (1990) Azo-reductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2146-2151.
- 10) Kim, S. J., Ishikawa, K., Hirai, M. and Shoda, M. (1995) Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes, *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 601-607.
- 11) Bumpus, J. A., Tien, M., Wright, D. and Aust, S. D. (1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus, *Science*, **228**, 1434-1436.
- 12) Yadav, J. S. and Reddy, C. A. (1993) Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 756-762.
- 13) Joshi, D. K. and Gold, M. H. (1993) Degradation of 2,4,5-trichlorophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1779-1785.
- 14) Lee, S.-H., Kondo, R., Sakai, K., Nishida, T. and Takahara, Y. (1993) Treatment of kraft pulp bleaching effluents by lignin-degrading fungi, *Mokuzai Gakkaishi*, **39**, 470-478.
- 15) Deguchi, T., Kakezawa, M. and Nishida, T. (1997) Nylon biodegradation by lignin-degrading fungi, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 329-331.
- 16) Deguchi, T., Kitaoka, Y., Kakezawa, M. and Nishida, T. (1998) Purification and characterization of a nylon-degrading enzyme, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 1366-1371.
- 17) Iiyoshi, Y., Tsutsumi, Y. and Nishida, T. (1998) Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase, *J. Wood. Sci.*, **44**, 222-229.
- 18) Pasti-Grigsby, M. B., Paszczynski, A., Goszczynski, S., Crawford, D. L. and Crawford, R. L. (1992) Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Stre-*

- ptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3605-3613.
- 19) Ollikka, P., Alhoniemi, K., Leppänen, V.-M., Glumoff, T., Rajola, T. and Suominen, I. (1993) Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 4010-4016.
 - 20) Chivukula, M., Spadaro, J. T. and Renganathan, V. (1995) Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides, *Biochemistry*, **34**, 7765-7772.
 - 21) Itoh, K., Kitade, Y. and Yatome, C. (1998) Oxidation biodegradation of an anthraquinone dye, pigment violet 12, by *Coriolus versicolor*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **60**, 786-790.
 - 22) 鄭明淑, 徐開欽, 稻森悠平, 細見正明, 須藤隆一 (1996) Microtox 試験による埋立地浸出水の処理性能とその水圏生態系への影響評価, *水環境学会誌*, **19**, 922-929.
 - 23) 鄭明淑, 徐開欽, 稻森悠平, 須藤隆一 (1995) 水圏生態系における生産者としての藻類の増殖に及ぼす埋立地浸出水の影響, *日本水処理生物学会誌*, **31**, 99-104.
 - 24) Unger, L. A., Petropoulou, C. and Parker, R. (1994) Landfill leachate toxicity before and after treatment by PO*WW*ER™, *Proc. Superfund 14*, 1993 Vol 2, 840-844.
 - 25) Wong, M. H. (1989) Toxicity test of landfill leachate using *Sarotherodon mossambicus* (freshwater fish), *Ecotoxicol. Environ. Safety*, **17**, 149-156.
 - 26) Katagiri, N., Tsutsumi, Y. and Nishida, T. (1995) Correlation of brightening with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation during biobleaching of kraft pulp by white rot fungi in the solid-state fermentation system, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 617-622.
 - 27) Katagiri, N., Tsutsumi, Y. and Nishida, T. (1997) Biobleaching of softwood kraft pulp by white-rot fungi and its related enzymes, *Mokuzai Gakkaishi*, **43**, 678-685.
 - 28) Ehara, K., Tsutsumi, Y. and Nishida, T. (1997) Biobleaching of softwood and hardwood kraft pulp with manganese peroxidase, *Mokuzai Gakkaishi*, **43**, 861-868.
 - 29) International Organisation for Standardization (1987) Water quality-Algal growth inhibition test, ISO/DIS 8692.
 - 30) Dodson, P. J., Evans, C. S., Harvey, P. J. and Palmer, J. M. (1987) Production and properties of an extracellular peroxidase from *Coriolus versicolor* which catalyzes cleavage in a lignin model compound, *FEMS Microbiol. Lett.*, **42**, 17-22.
 - 31) Gold, M. H., Kuwahara, M., Chiu, A. A. and Glenn, J. K. (1984) Purification and characterization of extracellular H₂O₂-requiring diaryl propane oxygenase from the white rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **234**, 353-362.
 - 32) Johansson, T. and Nyman, P. O. (1987) A manganese (II)-dependent extracellular peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*, *Acta Chem. Scand. Ser. B*, **41**, 762-765.
 - 33) Reinhammar, B. (1984) Laccase, in "Copper Proteins and Copper Enzymes, vol. 3" (Ed. R. Lontic), pp.1-35, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
 - 34) Tien, M., Kirk, T. K. (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burd, *Science*, **221**, 661-663.
 - 35) Glenn, J. K., Akileswaran, L. and Gold, M. H. (1986) Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **251**, 688-696.
 - 36) Wariishi, H., Akileswaran, L. and Gold, M. H. (1988) Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle, *Biochemistry*, **27**, 5365-5370.