

ビリルビンオキシダーゼによるアゾ染料の脱色

片山 倫子, 佐藤 裕子, 田口 香織, 前川原貴子

(東京家政大学家政学部)

原稿受付平成 15 年 2 月 6 日; 原稿受理平成 15 年 5 月 8 日

Decolorization of Azo Dyes by Bilirubin Oxidase

Michiko KATAYAMA, Yuuko SATOH, Kaori TAGUCHI and Takako MAEKAWARA

Faculty of Home Economics, Tokyo Kasei University, Itabashi-ku, Tokyo 173-8602

In order to examine the decolorization of dyeing effluent by an enzyme, aqueous solutions of eight commercial azo dyes (C. I. Direct Green 59, C. I. Direct Blue 15, C. I. Reactive Black 5, C. I. Direct Blue 6, C. I. Direct Black 51, C. I. Direct Red 2, C. I. Direct Violet 48, and C. I. Direct Black 22) were treated with bilirubin oxidase (BO). Efficient decolorization of the former six dyes was confirmed by measuring the visible and UV absorption spectra of the dye solution in the presence of the enzyme, but that of the latter two dyes, C. I. Direct Black 22 and C. I. Direct Violet 48 was not efficient. Also HPLC was introduced to measure decolorization of dyes. The chromatograms showed that the decomposition of the eight dyes started immediately after the addition of the enzyme. The decolorization ratios calculated from the peak areas in the chromatograms were *ca.* 100% for first the six dyes and 90% for that last two dyes.

(Received February 6, 2003; Accepted in revised form May 8, 2003)

Keywords: enzyme 酵素, bilirubin oxidase ビリルビンオキシダーゼ, decolorization 脱色, azo dye アゾ染料, absorption spectrum 吸収スペクトル, photo diode array analysis フォトダイアレイ分析.

1. 緒 言

著者らは衣料用洗剤に配合されている蛍光増白剤の環境中における生分解性の検討^{1)~3)}や、微生物利用による衣料用染料の染色廃水処理等を目的とした研究を継続してきた経緯の中で、銅フタロシアニン染料を効率よく分解するミロテシウムベルカリア KW-1 株を単離し、この菌株による種々の染料に対する分解能を確認してきた⁴⁾。この結果をもとに著者らは、ミロテシウムベルカリア由来のビリルビンオキシダーゼ (BO と略す) による各種化学構造の染料に対する脱色能を検討したところ銅フタロシアニン染料をはじめとして、アントラキノン系染料⁵⁾、アゾ染料等に対して BO 単独で強い脱色能を有することを突き止めた。

酵素単独による染料の脱色の研究としてはラッカーゼによる Silva and Covaco-Paulo の報告⁶⁾や、石原らの報告⁷⁾がある。石原らはアントラキノン系 26 種、アゾ系 179 種、フタロシアニン系 8 種を含んだ計 316 種について実験を行い、目視判定によりこのうちの

178 種に脱色効果を確認したとの報告をしている。ちなみにアゾ系については 179 種の中で 89 種が脱色されたと報告されているが、詳細な脱色率のデータやラッカーゼによる染料の脱色機構等に関する情報等は明らかにされていない。そこで、本報では BO によるアゾ染料の脱色、および HPLC による分解性能の検討について報告する。

2. 実 験

(1) 試 薬

1) 染 料

8 種のアゾ染料 C. I. Direct Red 2 (D. R. 2 と略す。極大吸収波長 498 nm), C. I. Direct Blue 6 (D. B. 6 と略す。極大吸収波長 584 nm), C. I. Direct Blue 15 (D. B. 15 と略す。極大吸収波長 600 nm), C. I. Reactive Black 5 (R. BK. 5 と略す。極大吸収波長 595 nm), C. I. Direct Green 59 (D. G. 59 と略す。極大吸収波長 590 nm), C. I. Direct Black 51 (D. BK. 51 と略す。極

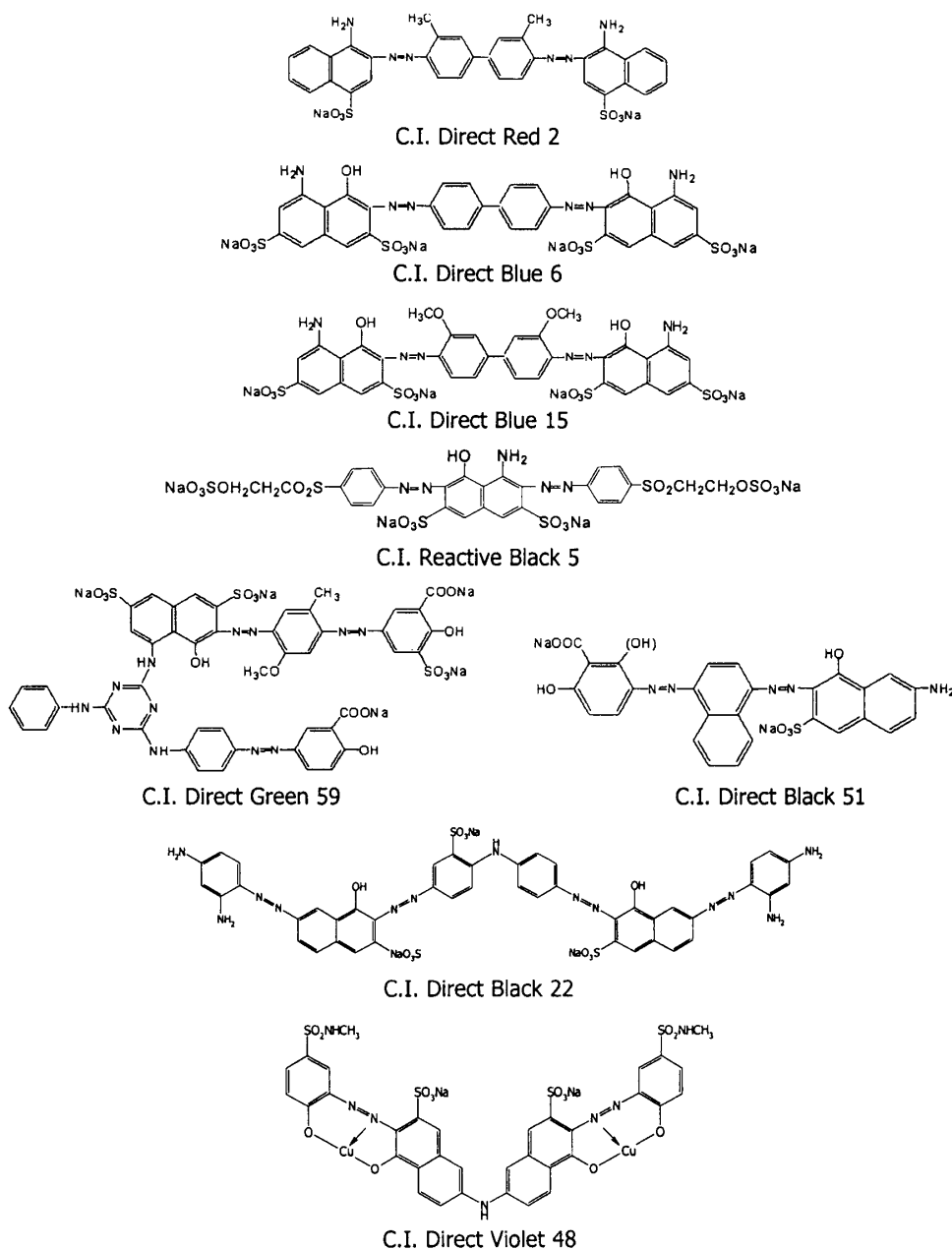


図 1. 供試染料の化学構造

大吸収波長 571 nm), C. I. Direct Black 22 (D. BK. 22 と略す. 極大吸収波長 502 nm), C. I. Direct Violet 48 (D. V. 48 と略す. 極大吸収波長 545 nm) を用いた. いずれも日本化薬 (株) 製の市販品 (純度 35~75%) をそのまま使用した. 図 1 に供試染料の化学構造を示した.

2) 酵 素

酵素としては天野製薬 (株) 製の市販品のビリルビンオキシダーゼ, BO "Amano" III (力価 2.91 units/1 mg) を用いた. 本品はミロテシウムベルカリア由来の酵素で, 至適温度は 37℃, pH は 8.40 である.

3) 試料液の調製

イオン交換水で調製した染料濃度 50 ppm の水溶液に BO を 14.55 units 添加した染料水溶液を 50 ppm 準備し, これを pH 8.40 に調整後 37℃ の恒温槽中で振とうする.

BO 添加直後, および添加後の一定時間経過後に恒温槽から染料水溶液を取り出し, 限外ろ過用フィルター付きチューブに採取し, 10,000 rpm で 10 分間遠心分離後のろ液を試料液とした.

(2) 吸収スペクトルの測定

BO 添加前, BO 添加後 1 時間, 3 時間, 24 時間の

ビリルビンオキシダーゼによるアゾ染料の脱色

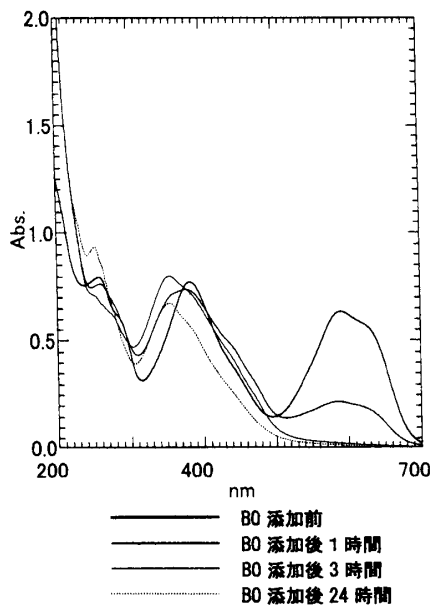


図2. BO 添加による D. G. 59 水溶液のスペクトル変化

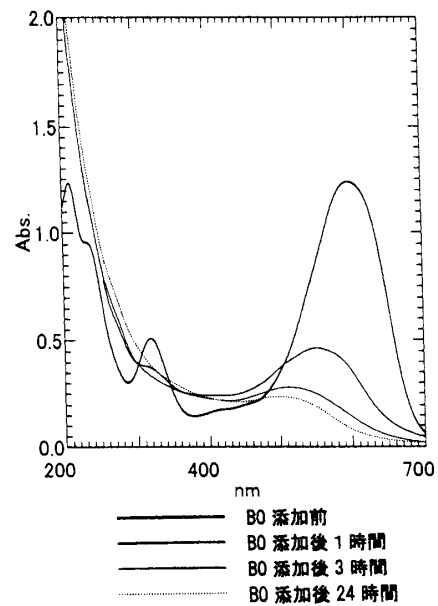


図3. BO 添加による D. B. 15 水溶液のスペクトル変化

試料液について吸収スペクトル (200~700 nm) を(株)島津製作所製自記分光光度計 UV 2200 で測定した。

BO 酵素添加後の染料の脱色率 (図 10 に示した) は、各染料の極大吸収波長における BO 添加後の試料液の吸光度を、添加前の試料液の吸光度に対する百分率 (%) で算出した。

(3) HPLC 分析

1) カラム

(株)センシュウ科学製の市販分析用カラム ODS-2202-N (6φ×200 mm) およびプレカラム ODS-2032-N (6φ×30 mm) を用いた。

2) 溶離液

関東化学(株)製の HPLC 用のアセトニトリル、メタノール、蒸留水、および試薬特級リン酸水素二アンモニウムにより、アセトニトリル：メタノール：0.05 M リン酸水素二アンモニウム水溶液を 3：1：6 に混合した液を溶離液とした。

3) 分析機器

LC ワークステーション (CLASS-VP), およびフォトダイオードアレイ紫外可視検出器 (SPD-10 A・検出波長 200~700 nm) 付きの(株)島津製作所製高速液体クロマトグラフィーを使用した。

4) 分析条件

溶離液流量 1.5 ml/min, 試料注入量 20 μl, ポンプ圧 65 kgf/cm², 温度 20℃で分析した。

3. 実験結果および考察

(1) 吸収スペクトル変化から見た BO による脱色

8 種の供試染料水溶液はいずれも BO を添加するとすぐに色の変化が生じ、D. V. 48 と D. BK. 22 をのぞいた 6 種染料では BO 添加後 1 時間での吸収スペクトルに大きな変化が生じた。

図 2 の D. G. 59 は濃い緑色から薄い黄色へと変色し、図 3 の D. B. 15 は濃い青色から薄い赤色になり、図 4 の R. BK. 5 は黒色から赤へと変色していった。図 5 の D. B. 6 は濃い青色から薄い赤色になり、図 6 の D. BK. 51 は黒色から黄色に変色し、図 7 の D. R. 2 は濃い赤色が黄色へと変色した。

図 8 の D. V. 48 は、BO を添加するとすぐに極大吸収波長が短波長側にシフトし、紫外部の吸収が増大する傾向はあるが、前述の 6 種染料に見られたような明確な色相変化は見られず、極大吸収波長における吸光度は減少していった。

図 9 の D. BK. 22 の場合には BO を添加するとすぐに紫外部吸収が増大し可視部吸収が減少した。時間が経過するに連れて徐々に黒色が薄くなっていくが、色相の変化は見られなかった。

これらのスペクトル変化をもとに供試染料 8 種に対する BO 添加による脱色現象を各染料の極大吸収波長における吸光度変化から調べたところ、図 10 の結果を得た。これらの脱色後の試料液は、長期間放置した後も添加前の色に復色することはなかった。

これらの 8 種の中で R. BK. 5 に対する BO 添加によ

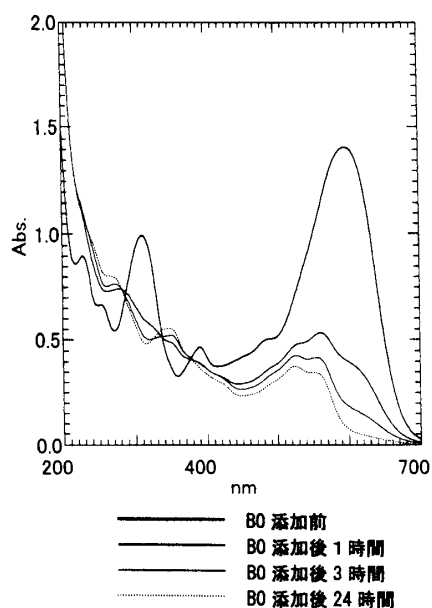


図4. BO 添加による R. BK. 5 水溶液のスペクトル変化

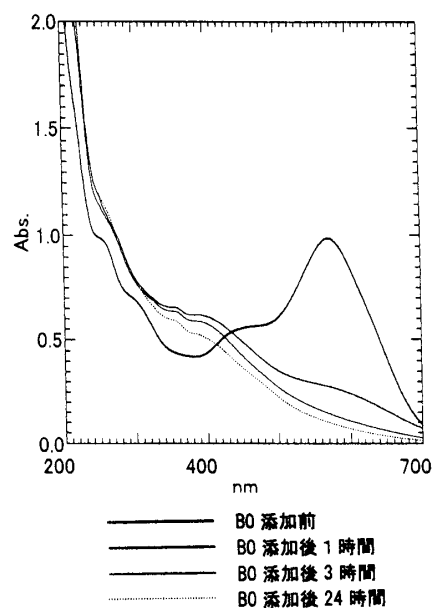


図6. BO 添加による D. BK. 51 水溶液のスペクトル変化

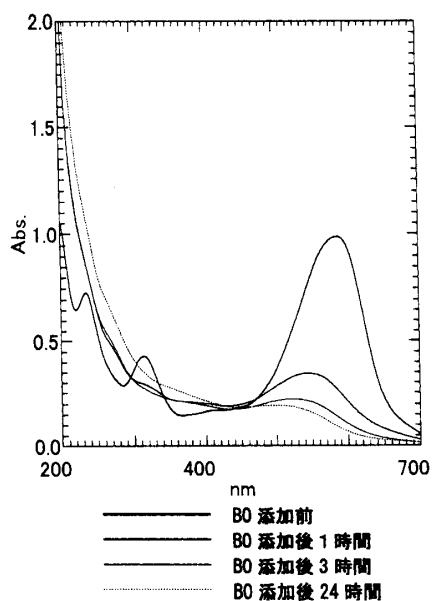


図5. BO 添加による D. B. 6 水溶液のスペクトル変化

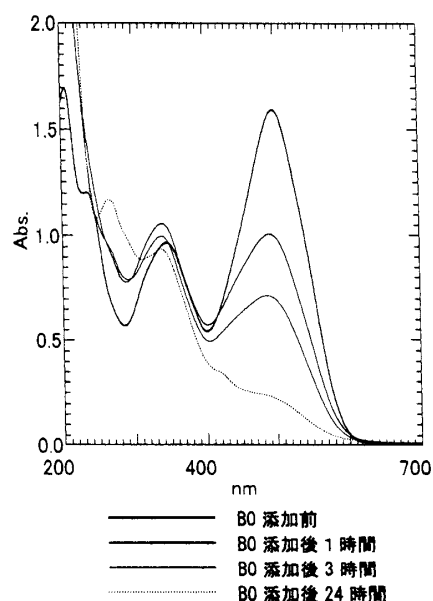


図7. BO 添加による D. R. 2 水溶液のスペクトル変化

る脱色率 93%の数値は, Silva and Covaco-Paulo のラッカーゼ添加による脱色率が 30%との報告⁶⁾と比較すると著しく高い脱色率であることがわかる。

(2) HPLC 分析から見た BO による脱色

BO の脱色能を極大吸収波長における吸光度変化から算出する 3.-(1)の方法は, BO に因って生成した染料の分解物が可視部に吸収を有する場合にはその吸収の影響が出る。これらの分解物の影響を排除するためには BO 添加後の試料液中に共存する物質を分離する

必要がある。そこで 3.-(1)で吸収スペクトル分析を終えた試料液について ODS カラムによる HPLC 分析を試みた。

その結果 3.-(1)では BO 添加後 3 時間の脱色率が 55%であった D. R. 2, および脱色率が 20%であった D. BK. 22 についても各染料由来のピークを分離することが出来た。図 11 は BO 添加前, 添加後 3 時間, 添加後 24 時間の D. R. 2 試料液を検出波長 238 nm, および 498 nm で分析した HPLC で, 図 12 は D. BK.

ビリルビンオキシダーゼによるアゾ染料の脱色

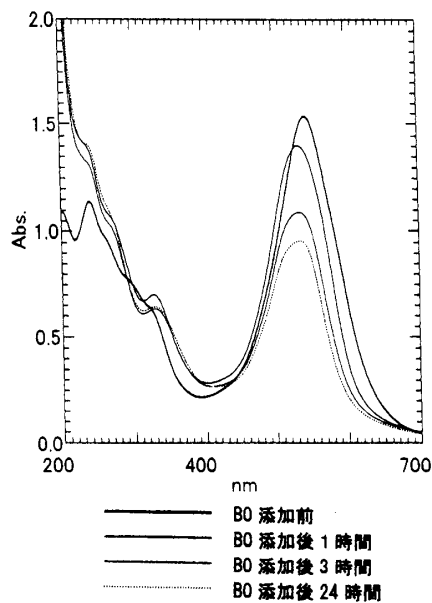


図 8. BO 添加による D. V. 48 水溶液のスペクトル変化

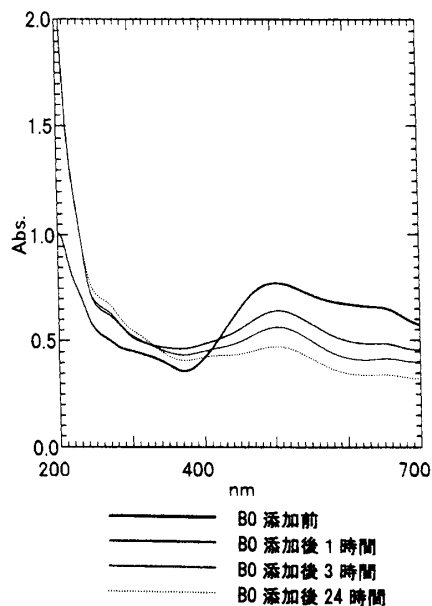


図 9. BO 添加による D. BK. 22 水溶液のスペクトル変化

22 試料液を検出波長 285 nm, および 502 nm で分析した HPLC である。いずれの染料も分解前の各染料由来のピークを A ピークとして示したが BO 添加によって消失していく様子が確認できた。つまり, D. BK. 22 は, BO 酵素によって黒色を示す共役系は切れないが, BO 添加前とは HPLC に対する親和力の異なる物質に変化したために, A ピークが完全に無くなった可能性が予想される結果となった。この点についてはさらに検討することが必要である。8 種の染料すべ

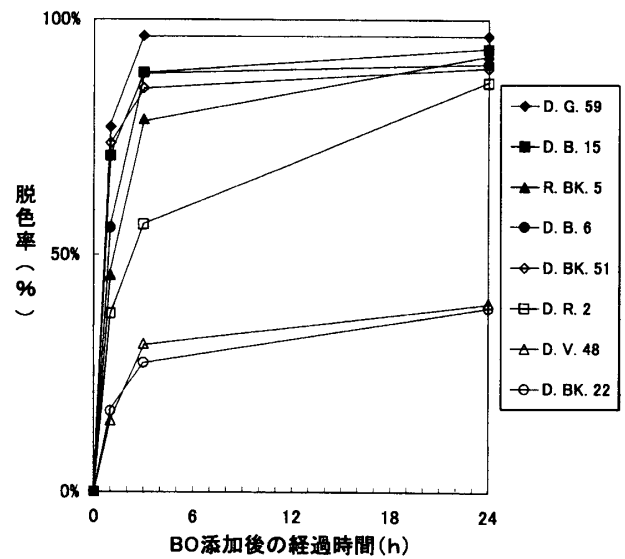


図 10. 供試染料水溶液に対する BO 添加後の脱色率変化

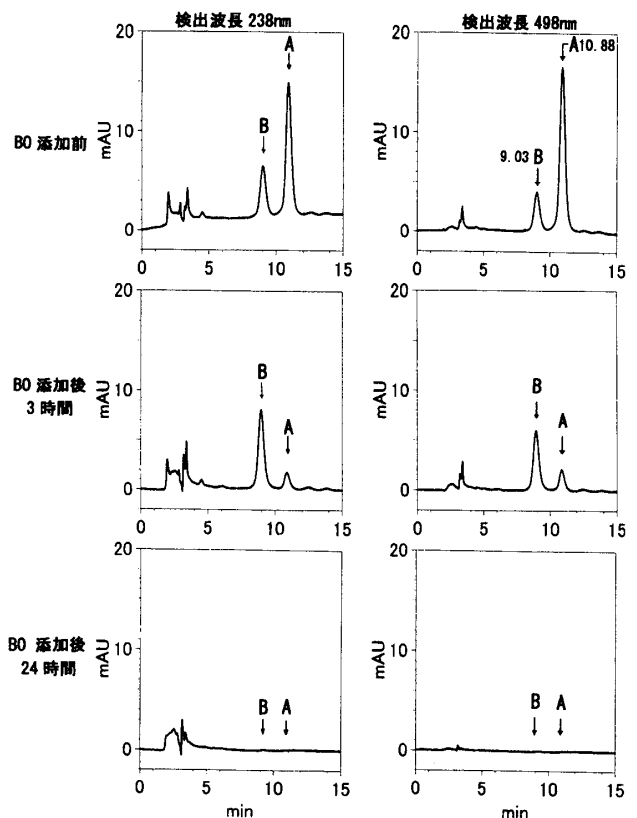


図 11. BO 添加による D. R. 2 水溶液の HPLC 変化

てについて HPLC 分析を行い, 各々の極大吸収波長 (2.-(1)-1) に記載) を検出波長として検出したところ, 表 1 に示した保持時間に各々の A ピークが出現した。各染料水溶液 (50 ppm) の BO 添加前の A ピーク面積および BO 添加後 24 時間の A ピーク面積および分

解率を表1に示した。吸収スペクトルから算出した脱色率が低かったD. V. 48とR. BK. 5の分解率についても各々100%, 92%と高い値であった。

先に著者らはBOがアントラキノン系染料に対して優れた脱色能を有することを報告⁵⁾しているが、本研究により、BOはアゾ染料に対しても優れた分解能を

有することがわかった。

現段階においては種々の染料に対するBO添加による脱色現象を確認している段階であるが、HPLCの分離技術を使って、BOによる染料の分解機構を明らかにしていきたいと考えている。

4. 要 約

8種アゾ染料(C. I. Direct Green 59, C. I. Direct Blue 15, C. I. Reactive Black 5, C. I. Direct Blue 6, C. I. Direct Black 51, C. I. Direct Red 2, C. I. Direct Violet 48, C. I. Direct Black 22)を用い、ミロテシウムベルカリア由来のビリルビンオキシダーゼ(BOと略す)による脱色性能を検討した。

それぞれの染料水溶液にBOを添加し一定時間恒温で振とう後に試料液を抜き取り、BOを除去したる液の吸収スペクトルを測定すると同時にHPLC分析を行う方法によりBOの分解効果を検討した。

供試染料はいずれもBO添加後に著しい変化が生じ濃色から薄い色の液へと変化したものや、まったく色相の異なる液に変わったものがあった。

供試染料水溶液の極大吸収波長における吸光度変化から算出したBO添加後24時間の脱色率はC. I. Direct Black 22とC. I. Direct Violet 48については約40%と低い数値であったが、他の6種染料はいずれも90~98%の高い脱色率を示した。

一方、供試染料水溶液のHPLC分析データによると、8種染料はいずれもBO添加後急速に減少していくことがわかった。吸光度変化から算出した脱色率が低かった2種の染料についても、BO添加後24時間

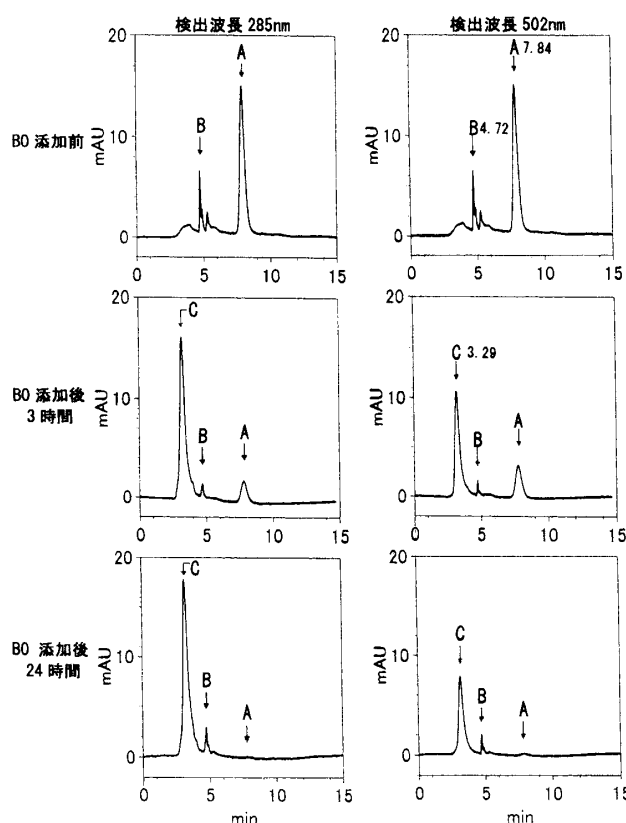


図12. BO添加によるD. BK. 22水溶液のHPLC変化

表1. ピーク面積から算出したBO添加による染料の分解率

染料名	Aピークの 保持時間 (min)	BO添加前の Aピーク面積	BO添加後24時間の Aピーク面積	(分解率%)*
D. G. 59	5.59	733,794	39	(100)
D. B. 15	2.46	1,336,554	—	(100)
R. BK. 5	2.39	561,816	43,263	(92)
D. B. 6	2.55	606,654	11,839	(98)
D. BK. 51	5.09	587,453	844	(100)
D. R. 2	10.88	1,009,747	742	(100)
D. V. 48	2.63	1,123,483	—	(100)
D. BK. 22	7.84	268,930	337	(100)

$$* \text{分解率} (\%) = \frac{(\text{BO添加前のAピーク面積}) - (\text{BO添加後24時間のAピーク面積})}{(\text{BO添加前のAピーク面積})} \times 100.$$

ビリルビンオキシダーゼによるアゾ染料の脱色

で染料由来の A ピーク面積が 90%以上減少したことが明らかになった。

引用文献

- 1) 片山倫子：環流土壌による洗剤用蛍光増白剤の生分解，*農化*，**58**，449-455 (1984)
- 2) 片山倫子：洗剤用蛍光増白剤の露光液及び土壌環流液の高速液体クロマトグラフィーによる分析，*農化*，**58**，457-462 (1984)
- 3) 片山倫子，八木澤晶子，宮崎伊津子：HPLC による蛍光増白剤の光分解過程の分析，*家政誌*，**46**，465-468 (1995)
- 4) 片山倫子，飯本時子，今村和枝，岩崎日和，別府輝彦：銅フタロシアニン染料の生分解，*家政誌*，**48**，407-413 (1997)
- 5) 片山倫子，佐藤裕子，田口香織，田代昌子，前川原貴子：アントラキノン系染料のビリルビンオキシダーゼによる脱色，*家政誌*，**54**，485-490 (2003)
- 6) Silva, L. M., and Cavaco-Paulo, A.: Enzymatic Decolorization of Textile Dyeing Effluents, *Textile Res. J.*, **70**, 409-414 (2000)
- 7) 石原彰浩，前嶋義夫，植田浩安，大石光一：ラッカーゼによる染料の脱色，静岡県浜松工業技術センター報告書，**7**，21-26 (1997)