

II - 605

木材腐朽菌を用いたフミン酸除去に関する基礎的研究

国立鹿児島高専 正 山内正仁 西留 清
アジア工科大学院 正 海田 輝之
宮崎大学 正 増田 純雄

1. はじめに

自然環境中や人間活動によって排出された有機物は、生物学的に分解され、フミン酸を生成する。フミン酸は特に泥炭地着色水やパルプ廃液等の主成分である。これらの成分は、微生物群の代謝活動によって生じる代謝産物であって、最も簡単な炭化水素であるメタンの水素3個が塩素、臭素、ヨウ素等のハロゲン原子で置換され、発ガン性物質のトリハロメタン（THM）を発生させる。フミン酸の除去は、凝集沈殿法等の物理・化学的処理が主であり、生物学的処理法の検討を加えた研究は少ない。そこで、本研究では、フミン酸がパルプ廃液等に含まれる着色成分の一つであるリグニンの化学構造と同様な官能基を有することから木材腐朽菌の持つ分解能を用いてトリハロメタンの前駆物質であるフミン酸の除去に関する検討を行なった。

2. 実験材料と方法

a) エノキタケの培養

本研究では、白色腐朽菌の中で入手し易いエノキタケを用いた。菌株の培養は、まず表-1に示した基本培地でスラントを作り、その上に保存用菌株（二核菌糸）を白金耳植種し、26℃で10日間静置培養した。培養後の菌株をフミン酸の除去に関する実験に用いた。またその一部は、保存用菌株として冷蔵庫に保存した。

表-1 培地組成（1 L中）

NH ₄ NO ₃	0.048 g
L-Asparagine	0.09 g
Thiamine-HCl	1 mg
KH ₂ PO ₄	2.0 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.018 g
CaCl ₂	80 mg
C ₆ H ₁₂ O ₆	10 g

b) フミン酸標準液

本研究で用いたフミン酸標準液は、Standard Methodsや松原等の方法で試薬フミン酸に含まれる微量な不純物の除去後、1000mg/lとしたものである。

c) 実験方法

表-1に示した基礎培地と基礎培地の0.5倍、5倍、1.5倍の窒素を含む培地にフミン酸濃度が150mg/lになるように加え、それぞれバツフル付き300ml三角フラスコに50mlずつ分注して26℃110rpmで25日間振とう培養した。各時間におけるフミン酸の除去量は4000rpmで10分間遠心分離を行い、上澄液のpHを6に調整後、吸光度の減少率（波長300nm）で評価した。また、培養液中のケルダール窒素濃度、硝酸性窒素濃度をStandard Methodsにしたがって測定した。グルコース濃度の測定にはアンスロン法を用いた。上澄液回収後、沈殿物をフィルター（GF/C）を用いて真空ろ過し、110℃で2時間乾燥して得られた残留物を菌体の乾燥重量とした。

3. 実験結果と考察

3-1 エノキタケの増殖特性とフミン酸脱色

（窒素濃度が基礎培地の5倍（12mM）の場合）

図-1に菌体の乾燥重量とフミン酸の脱色率の経時変化を示す。フミン酸の脱色率は菌の増殖とともに進行し、菌の増殖速度がピークに達すると徐々に低下した。図-2にpHの経時変化を示す。菌体の対数増殖期において培養液は酸性となり、菌の増殖がピークに達するとpHは徐々に高くなった。図-3にケルダール窒素、硝酸性窒素とグルコース濃度の経時変化を示す。ケルダール窒素、グルコース濃度は、菌体の対数増殖期において急激に低下し、ケルダール窒素は培養15日目に殆ど消費された。硝酸性窒素は、培養初期から緩やかに減少した。以上の結果から、エノキタケは硝酸性

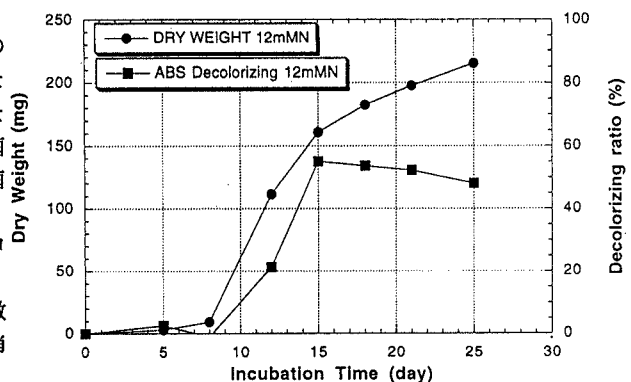


図-1 菌体乾燥重量とフミン酸脱色率の経時変化

窒素よりもケルダール窒素を優先的に摂取し、フミン酸を脱色すると考えられる。また、フミン酸脱色に伴い、pHを低下させる代謝産物が生成されることが推察される。

3-2 エノキタケのフミン酸吸着

菌体によるフミン酸の脱色は、菌体への吸着と分解とに大別される。そこで、フミン酸の菌体への吸着量を測定するために基礎培地で12日間振とう培養（26℃ 110rpm）した菌体を遠心分離により集菌後、蒸留水で洗浄し、吸引濾過器で菌体を脱水した。脱水した菌体はグルコースを除いた基礎培地へ加え超音波破砕器で1分間分散した。分散後フミン酸を添加し、フミン酸の吸着実験を行った。その結果、単位菌体量あたり 2.1×10^{-8} (abs/mg dry weight) の吸着量が得られた。これに従い、図-1の脱色率を吸着率と分解率に分類すると図-4(c)のようになる。菌体への吸着量は、菌体量の増加につれて大きくなり、分解率は培養15日目の約30%をピークに徐々に減少した。また、窒素濃度の低い培地（1, 2, 2.4mM）ではフミン酸の分解率はマイナスに転じている。このことは、菌体が超音波破砕器により破砕され、菌体の表面積が大きくなり、真の吸着量が過大評価されたか、菌体がフミン酸と同等の色成分を生成したと考えられる。また、このことから、培養液のC/N比がフミン酸の脱色に大きく関係することも推察できる。

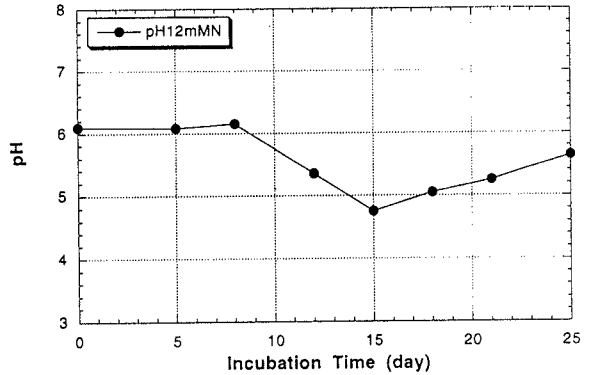


図-2 pHの経時変化

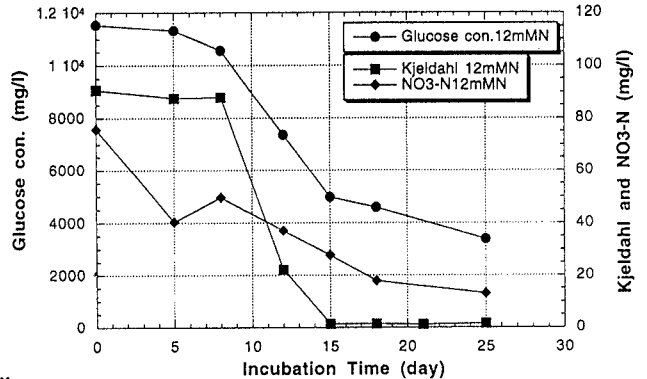
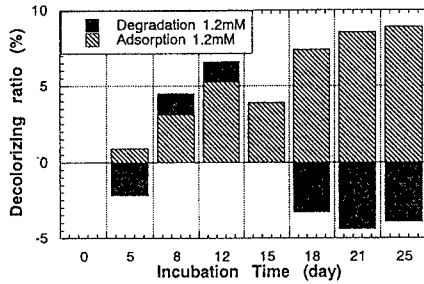
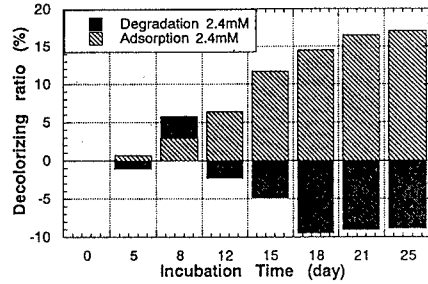


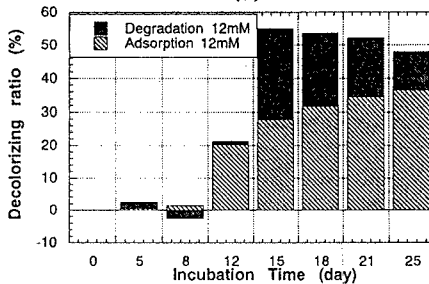
図-3 ケルダール、硝酸性窒素濃度とグルコース濃度の経時変化



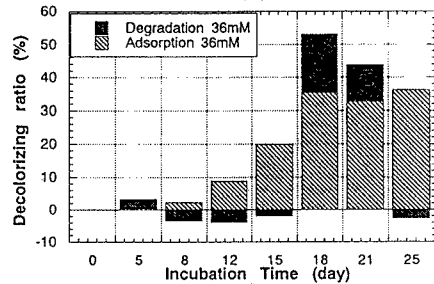
(a)



(b)



(c)



(d)

図-4 吸着率と分解率の経時変化

4. おわりに

木材腐朽菌を用いたフミン酸除去に関する実験から、白色腐朽菌の一種であるエノキタケがリグニン同様、色度成分を脱色することが分かった。今後は、リグニン分解法としての生化学的によく利用されているカワラタケ、*P. chrysosporium*等を用いて同様な実験を継続したい。