

藻類培養液中のグリコール酸の定量

岩手大学工学部 学生員 ○小松 佳幸 広野 吉幸

正員 相沢 治郎 海田 輝之 大村 達夫 大沼 正郎

1. はじめに 近年、湖沼水の富栄養化が重大かつ深刻な問題になってきている。その結果、藻類による有機性代謝生産物が富栄養化された水域に放出され、富栄養化の現象を一層複雑なものにしている可能性がある。そこで、藻類には種々のものがあるが、ここでは緑藻類である *chlorella pyrenoidosa* を用いて、バッチ実験によって主要な代謝生産物であるグリコール酸の定量化を行なったのでその結果を発表する。

2. 実験方法 実験はバッチで行なわれ、同様の実験が繰り返

えされた。まず、200 ml 三角フラスコに液体培地(表-1)を 100 ml 入れ、国立公害研究所より入手した *chlorella pyrenoidosa* を無菌的に培養し、その培養液を 5 ml (1 ml 中には 10^6 オーダーの *chlorella pyrenoidosa* を含む) 接種した。このような三角フラスコが 8 本用意された。これらは、無菌的に恒温恒湿槽中で 25℃、4000 ルクス、12 時間明暗培養された。これらの三角フラスコは、最大で 2 週間恒温恒湿槽中におかれ、適当な日数間隔でフラスコが取りはずされ

Ca (NO ₃) ₂ 4H ₂ O	15 mg
KNO ₃	10 mg
C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P 5H ₂ O	5 mg
Vitamine B ₁	1 µg
Vitamine B ₁₂	0.01 µg
Biotin	0.01 µg
Tris aminometane	50 mg
PIV metals	0.3 ml
tap water	99.7 ml
	pH 7.5

表-1 C 培地の組成

フラスコ内の pH、クロロフィル a, b, c、クロレラ数、グリコール酸及び重クロム酸 COD がそれぞれ測定された。

クロレラの個数は、Thoma の血球計算板を用い 600 倍の倍率で検鏡し計数された。又、クロロフィル a, b, c は色素をアセトンで抽出し抽出液の吸光度を分光光度計で測定して、それぞれを求める数式に代入して求める。

グリコール酸の濃度は、培養液から G-S 25 のフィルターを用いてクロレラを除去したサンプルで測定された。しかし、液体培地がすでに多量の塩類を含んでいる為、最初にイオン交換樹脂を用いて脱塩したのちにエステル化し、ガスクロマトグラフで測定する必要があった。イオン交換樹脂としては、陽イオンに対してアンバーライト IR 120 B、陰イオンに対してはアンバーライト IRA 68 が用いられた。また、脱塩の通水速度は $3 \sim 4 \text{ m}^3/\text{h}/\text{m}^2$ の範囲にセットされた。エステル化の方法については、脱塩された 20 ml のサンプルをロータリーエバポレーターを用いて 45℃ で減圧乾固したものにアタール 2 ml、濃硫酸 0.2 ml、無水硫酸ナトリウム 2 g を加え、冷却管を付して 30 分間穏やかに沸騰させてエステル化する。冷却後、5 ml のヘキサンを用いて冷却管を洗い水 5 ml を加える。よく混合して生成したエステルをヘキサン 5 ml で抽出し、ヘキサン層をコマゴメピペットを用いて 20 ml 容メスフラスコに移す。更に 3 回ヘキサン 5 ml で抽出しヘキサンで全量を 20 ml とする。そして、微量に混在する水と硫酸を除去する為に少量の無水炭酸ナトリウムを加え、ろ過した

後、その 10 µl をガスクロマトグラフ法によって分析する。ガスクロマトグラフの測定については、昇温スピード 10 °C/min で行ない 172℃ 前後でグリコール酸のピークが得られた。(図-1)

3. 実験結果及び考察 図 2 ~ 図 5 は、それぞれ培養日数に対する培養中のクロレラ数、クロロフィル a, b, c、グリコール酸及び COD のそれぞれの変化を示している。

図 2 より、クロレラ数の変化から見ると、RUN 1 においては、

6 日、RUN 2 においては、2 日の誘導期が観測され、その後、クロレラ数の急激な増加となった。しかし、RUN 1 では 6 日間という比較的に長い誘導期となったので実験期間中には定常期が現れなかったが、RUN 2 では、10

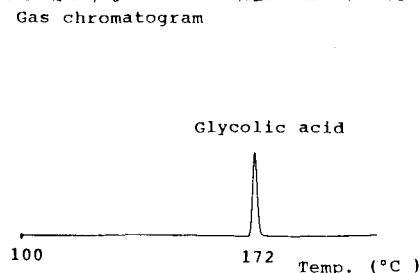


図-1 グリコール酸検出

日後にほぼ定常期に入ったと思われる。対数的に増殖していると考えられる増殖期のクロレラの平均的な比増殖速度は、RUN 1においては0.26(1/day)、RUN 2においては0.23(1/day)となった。

この図-2と図-3のクロロフィルaの対比をしてみると、非常に高い相関を示しており、当然のごとくクロロフィルaは、緑藻類であるクロレラの発量を示す良い指標となる。又、緑藻類は一般にクロロフィルaとbのみを含んでおり、その比は、2:1と言われているが本実験においては、その比はほぼ3:1となった。又、本実験においても、クロロフィルcは検出されなかった。

図-4に示されるグリコール酸の変化からは、図-2及び図-3に見られた明白な誘導期は観測されず、グリコール酸の濃度は除々に増加する傾向が見られる。又、RUN 2においては定常期以降、RUN 1においては12日目以降においてグリコール酸濃度の著しい低下が見られた。これらの現象は、誘導期及び増殖期においてもクロレラによるグリコール酸の放出が行なわれ、一方、定常期以降又はそれに近い状況においては、この実験が無菌的に行なわれている事を考慮すると、クロレラによるグリコール酸の再吸収が起っている可能性を示唆している。ただし、本実験において培養が無菌的に行なわれたかどうかの判定は、培養液の白濁及びグルコースの添加による培養液の白濁の有無によって調べられている。又、誘導期及び増殖期におけるクロレラのグリコール酸放出速度の平均値はRUN 1及びRUN 2でそれぞれ0.105(1/day)と0.145(1/day)となった。

図-5に示されるCOD_αの結果は、RUN 1においてグリコール酸濃度が最高となる12日目で、32.45(mg/l)、RUN 2では、11日目で30.22(mg/l)となった。

理論的には1(mg/l)のグリコール酸が完全に酸化されるとして約0.71(mg/l)のCOD値となるので、グリコール酸はそれらのCOD値となるので、グリコール酸はそれぞれRUN 1においては、28.4%、RUN 2においては、31.3%程度寄与していることになる。

実際、藻類による細胞外代謝生産物は、グリコール酸の他にアミノ酸、ペクチン、多糖類が報告されており、これらの物質が残り、CODとして検出されたものと思われる。

4. まとめ クロレラによるグリコール酸の放出は、誘導期及び増殖期においても行なわれる。しかし、定常期以降においてはグリコール酸の再吸収が観測され、これらの点についての現象の解明は今後の課題として残っている。

参考文献 1)大村他、藻類の混合培養系における藻類代謝生産物の評価、第13回環境問題シンポジウム、P20~25 2)水の分析、第3版 日本分析化学北海道支部、化学同人、P442

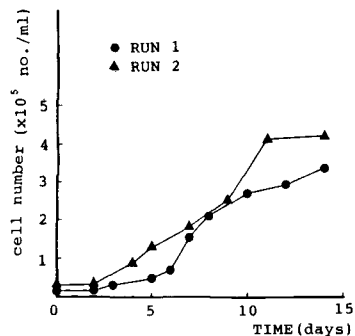


図-2 クロレラ数

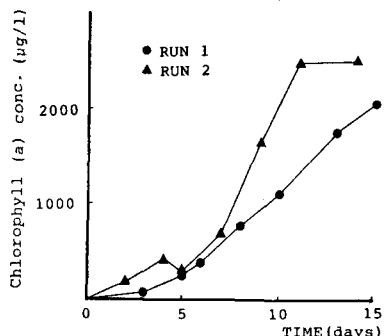


図-3 クロロフィルa

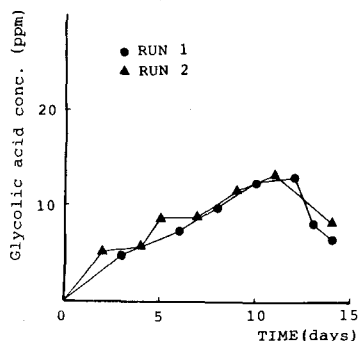


図-4 グリコール酸

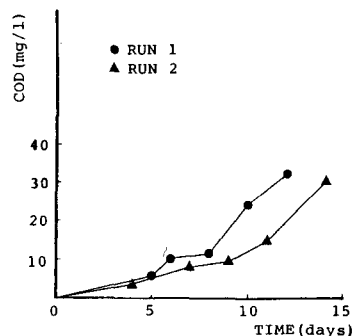


図-5 COD