



## 要旨

微生物を用いた環境保全を目的として、以下の2つのテーマについて検討した。

### 1. ヒ素汚染防除

バングラデッシュの4カ所の汚染土壤中より微生物を分離し、その生菌数を計測した結果、いずれの試料も生菌数は約  $10^6$  cells/g wet soil であった。その中で、コロニーの色や表面状態が明らかに異なる11菌株について、ヒ素耐性及び除去能を検討した。その結果、ヒ素濃度が0.1ppmの培地中で11株中3株の培養上清中のヒ素濃度に減少が見られた。その他、集積培養により50ppmの高ヒ素濃度でも増殖する6菌株を分離し、ヒ素耐性及びヒ素除去能などについて検討した。その結果、ヒ素濃度が1ppmの培地中でどの菌株も良好に増殖したが、ヒ素除去能を示さなかったものもあった。これらことから、試料土壤中に高濃度のヒ素に対する耐性を有する菌株は比較的多く存在すると考えられた。

### 2. 澱粉粕の有効利用

食品産業廃棄物である澱粉粕を炭素源として、本研究室保存株での有用な酵素の生産の検討を行った。*Aureobasidium* 属菌では、グルコーストランスフェラーゼ活性と $\beta$ -フラクトフラノシダーゼ活性、セルラーゼ活性が高く、機能性食品として注目されている各種オリゴ糖の生成に有用な酵素の生産が、澱粉粕を用いてもできることが分かった。

### 1. ヒ素汚染防除

#### 1.1 緒言

ヒ素汚染はヒトの健康に深刻な影響を与える。特にバングラデッシュやインドなどの国々では、地下水のヒ素汚染が重大な問題となっている。そこで本研究では、汚染土壤中に生息する微生物の形態的特徴、ヒ素耐性及びヒ素除去能などについて検討し、ヒ素汚染防除に有効な微生物の探索を行った。

#### 1.2 実験

##### 1.2.1 土壤中の生菌数の測定と菌株の分離

バングラデッシュのシャムタ (Samta) 村の4つのポイント (Rezaul (地名), Main road (主要道路), OBS (観測井戸), North rice field (北部水田)) でサンプリングした土を、滅菌水によく懸濁した後、普通寒天平板培地にて、30°Cで2日間培養しコロニー数を計測した。また、コロニーの形態の異なる菌株 No. 1~11 をスラント培地に分離した。

次に、亜ヒ酸ナトリウム(以下ヒ素と略す)0.1ppmを含むM9培地(炭素源としてグルコース、窒素源として塩化ナトリウムなどの栄養素を含む)に単離した11菌株をそれぞれ接種し、30℃、120strokes/minで3日間振とう培養した。その後、濁度を紫外分光光度計(Shimadzu. UV-210A)にて600nmで測定し菌株の増殖度を求めた。増殖度が比較的良好であった菌株(No. 2, 3, 6, 8, 9~11)の培養液を遠心分離(10,000rpm,15min)した後、培養液上清中のヒ素濃度を原子吸光分析(Simadzu. AA-6200)によって測定した。増殖度とヒ素濃度の変化が良好だった菌株No. 8, 10, 11を次の実験に用いた。

### 1.2.2 ヒ素濃度の経時変化

菌株No. 8, 10, 11をM9培地(ヒ素濃度1ppm)3mlに接種し、30℃、120strokes/minで振とう培養し、4日間までの培養液の濁度と培養液上清中のヒ素濃度を測定した。

### 1.2.3 集積培養による菌株の分離

Rezaul, Main road, OBS, North rice fieldの土それぞれ1.0g-wetをM9培地50mlに入れ、0.1ppm, 0.5ppm, 1.0ppm, 5.0ppm, 50ppmの順に各濃度2回ずつ、それぞれ30℃、120strokes/minで2日間振とう培養した。各濃度の2回目の培養液を普通寒天平板培地(ヒ素濃度0.1ppm)上で、30℃で2日間培養した。これらの操作により菌株No. 12~17を分離した。分離した6菌株をM9培地(ヒ素濃度1ppm)3mlに接種し、30℃、120strokes/minで3日間振とう培養し、培養液の濁度と培養液上清中のヒ素濃度を測定した。

## 1.3 結果と考察

ヒ素汚染土壤中より微生物を分離し、その生菌数を計測した結果を表1に示す。その結果、いずれの試料も生菌数は約

$10^6$  cells/g wet soilであった。その中で、コロニーの色や表面状態が明らかに異なる11菌株を分離した。

分離した菌株について、ヒ素耐性能及び除去能を検討するため、ヒ素濃度0.1ppmの培地で3日間振とう培養した。その後、増殖度が比較的良好であった菌株(No. 2, 3, 6, 8, 9~11)について、培養液上清中のヒ素濃度を測定した。表2に示すように、11株中3株(No. 8, 10, 11)について培養液上清中のヒ素濃度に減少が見られた。特に、No. 11株においては、ヒ素濃度が最も減少した。

3菌株(No. 8, 10, 11)について、ヒ素濃度1ppmの培地で振とう培養し、4日間までの培養液の濁度と培養液上清中のヒ素濃度を測定した。その結果を図1に示す。3株中No. 8株が増殖度もヒ素除去量も最も高かった。No. 11株は、0.1ppmのヒ素濃度の

表1 各土壤中の生菌数

採取地点	ヒ素濃度 (ppm)	生菌数 (cells/g wet soil)	分離菌株 No.
Rezaul deep	0.05	$1.2 \times 10^6$	1~5
OBS	0.1	$1.0 \times 10^6$	6~8
Main road	0.3	$8.3 \times 10^5$	9, 10
North rice field	0.06	$4.5 \times 10^5$	11

表2 分離菌株No.8,10,11の増殖度と培養液上清中のヒ素濃度

菌株	増殖度 (A600nm)		ヒ素濃度 (ppm)
	As (-)	As (+)	
No. 8	0.904	0.451	0.098
No. 10	1.487	0.431	0.098
No. 11	0.816	0.7	0.078
Control			0.107

時には最も良好な結果を示したが、1ppm 中では菌の増殖がほとんど見られず、ヒ素除去量も少なかった。

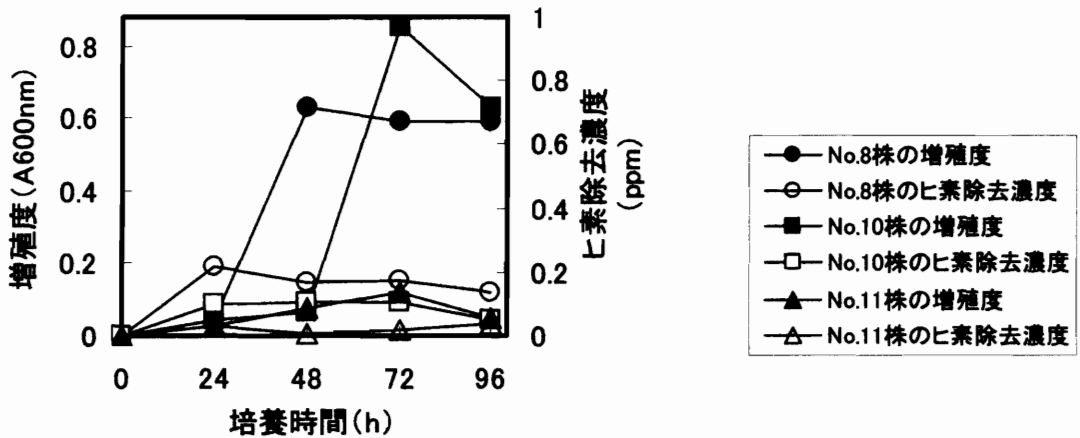


図1 分離菌株No.8,10,11の増殖とヒ素除去の経時変化

ヒ素濃度を最大 50ppmmで上げた集積培養により6菌株 (No. 12~17) を分離した。6菌株について、ヒ素濃度 1ppmの培地で3日間振とう培養を行い、培養液の濁度と培養液上清中のヒ素濃度を測定した。その結果を図2に示す。どの菌株も良好に増殖したが、No. 12株が最もヒ素を除去した。これらことから、試料土壌中に高濃度のヒ素に対する耐性を有する菌株は比較的多く存在すると考えられた。

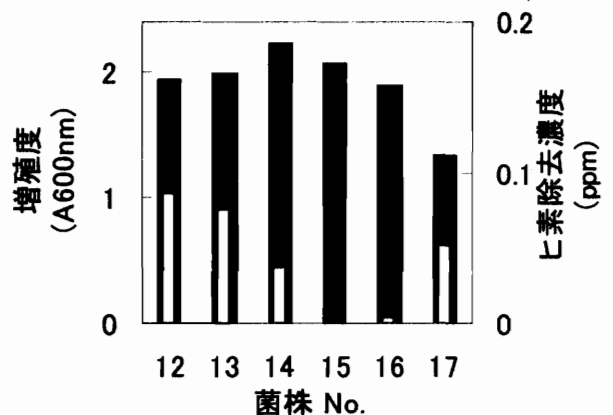


図2 分離菌株No.12~17の増殖とヒ素除去

■ 増殖度 □ ヒ素除去濃度

## 2. 澱粉粕の有効利用

### 2.1 緒言

環境保全の面から、食品産業から排出される廃棄物の新たな有効利用法及び有用物質への変換法の開発が急務となっている。そこで本研究では、食品産業廃棄物である澱粉粕を用いて、微生物による有用酵素の生産を行った。

### 2.2 実験

#### 2.2.1 *Aureobasidium* sp. ATCC20524 の生産する酵素の調製

本菌を、澱粉粕 (5.0%w/v) を炭素源とする液体培地に接種し、120strokes/min、30℃で振とう培養した。培養液をろ過することにより得られた菌体を凍結乾燥して乾燥菌体を得た。乾燥菌体をキタラーゼ処理し粗酵素溶液を得た。

#### 2.2.2 *Aspeligillus japonicus* MU-4 株の生産する酵素の調製

本菌を、澱粉粕 (5.0%w/v) を炭素源とする液体培地に接種し、90strokes/min、30℃で振とう培養した。培養液をろ過することにより得られた菌体を界面活性剤処理及び超音波処理して粗酵素溶液を得た。

### 2.2.3 各酵素の活性測定法

各酵素に適当な基質（マルトースなど）を用いて酵素反応を行った。その後、各生成物をグルコースオキシダーゼ法などの比色法で定量した。グルコシルトランスフェラーゼ活性と $\beta$ -グルコシダーゼ活性、 $\beta$ -フラクトフラノシダーゼ活性は1分間に $1\ \mu\text{mol}$ のグルコースを遊離する力価、 $\beta$ -キシロシダーゼは1分間に $1\ \mu\text{mol}$ の

-ニトロフェノールを遊離させる力価、セルラーゼ活性とキシラナーゼ活性は生成した還元糖をグルコースに換算して、1分間に $1\ \mu\text{mol}$ のグルコースを生成する力価を1単位(U)とした。

### 2.3 結果と考察

澱粉粕5.0%で *Aureobasidium* sp. ATCC20524 と *Aspeligillus japonicus* MU-4 株を培養したときの各酵素の生産量を検討した。各酵素の培地100mlあたりの酵素活性を測定した結果を表3、4に示す。*Aureobasidium* 属菌では、グルコーストランスフェラーゼ活性と $\beta$ -フラクトフラノシダーゼ活性、セルラーゼ活性が高かった。*A. japonicus* も同様であったが、*Aureobasidium* 属菌よりほどの活性も低かった。グルコーストランスフェラーゼはマル

表3 澱粉粕を用いた *Aureobasidium* 属菌による各酵素生産

酵素活性	培養 2 日間	培養 4 日間
グルコーストランスフェラーゼ活性	$1.90 \times 10^2 \text{U}$	$1.32 \times 10^2 \text{U}$
$\beta$ -フラクトフラノシダーゼ活性	$2.81 \times 10^2 \text{U}$	$1.87 \times 10^2 \text{U}$
セルラーゼ活性	$1.09 \times 10^2 \text{U}$	$1.35 \times 10^2 \text{U}$
$\beta$ -グルコシダーゼ活性	$5.90 \times 10^1 \text{U}$	$4.45 \times 10^1 \text{U}$
キシラナーゼ活性	2.39U	$4.20 \times 10^{-1} \text{U}$
キシロシダーゼ活性	1.22U	1.98U

表4 澱粉粕を用いた *A. japonicus* による各酵素生産

酵素活性	培養 2 日間	培養 4 日間
グルコーストランスフェラーゼ活性	$3.73 \times 10^1 \text{U}$	$5.70 \times 10^1 \text{U}$
$\beta$ -フラクトフラノシダーゼ活性	$1.26 \times 10^1 \text{U}$	$1.83 \times 10^1 \text{U}$
セルラーゼ活性	$2.73 \times 10^1 \text{U}$	$1.35 \times 10^1 \text{U}$
$\beta$ -グルコシダーゼ活性	$1.52 \times 10^{-2} \text{U}$	$4.20 \times 10^{-2} \text{U}$
キシラナーゼ活性	1.72U	$1.48 \times 10^1 \text{U}$
キシロシダーゼ活性	$6.15 \times 10^{-2} \text{U}$	$2.52 \times 10^{-1} \text{U}$

トースからイソマルトオリゴ糖を、 $\beta$ -フラクトフラノシダーゼはショ糖からフラクトオリゴ糖を生成させる酵素であり、それぞれのオリゴ糖とも優れた甘味特性・保湿性、澱粉質食品の老化防止効果などに加えて抗う触性、ピフィズ因子特性などが持つ機能性食品として注目されている。このことから、澱粉粕のような食品産業廃棄物を利用して有用な酵素の生産ができることが分かった。

### 3. 今後の展望

来年度は、培養液上澄や菌体に含まれるヒ素の形態分析を行う。更にヒ素除去能の優れた菌株の分離を試みるとともに、微生物の生産する凝集性多糖によるヒ素除去についても検討する。また、澱粉粕を利用した有用物質の微生物生産とともに、他の食品産業廃棄物の有効利用についても検討する。